

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2016

Alena Šteblová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Analýza biologicky aktivních látek obsažených v jeřabinách

Alena Šteblová

Bakalářská práce

2016

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Alena Štreblová**
Osobní číslo: **C13159**
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**
Název tématu: **Analýza biologicky aktivních látek obsažených v jeřabinách**
Zadávající katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na využití moderních analytických technik v analýze biologicky aktivních látek obsažených v černých a červených jeřabinách. Zaměřte se na úpravu vzorku před analýzou pomocí různých typů extrakcí. Dále se věnujte využití separačních technik v kapalně fázi pro analýzu jednotlivých extraktů.
2. Diskutujte využití různých typů extrakčních metod, rozpouštědel a aditiv pro zajištění maximálního výtěžku extrakce. U analýzy získaných extraktů se zaměřte na porovnání různých separačních systémů a technik v kapalně fázi.
3. Výsledky prezentované v literatuře porovnejte a kriticky zhodnoťte.
4. Sepište závěrečnou zprávu.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Všechna dostupná chemická literatura.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce:

26. února 2016

Termín odevzdání bakalářské práce:

3. července 2016



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2016

Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 30. 6. 2016

Alena Štreblová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za ochotu, trpělivost a poskytnutí cenných rad, které určitě využiji při dalším studiu. Dále bych chtěla poděkovat rodině, kamarádům a svému příteli Matějovi Černovickému za podporu během mého studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se věnuje analýze biologicky aktivních látek obsažených v jeřabinách. V úvodu je uveden popis, zpracování, využití a chemické složení jeřabin. Dále je uveden stručný popis používaných separačních metod. Druhá polovina práce je věnována analýze látek obsažených v jeřabinách se zaměřením na extrakci, kapalinovou chromatografii a kapilární elektroforézu.

KLÍČOVÁ SLOVA

jeřabina červená, jeřabina černá, extrakce, kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza

TITLE

Analysis of biologically active compounds contained in rowanberry.

ANNOTATION

The aim of this bachelor thesis is the analysis of biologically active compounds contained in rowanberry. The description, processing, utilization and chemical composition of rowanberries is devoted in introduction. Subsequently, theory of separation methods is mentioned. The second part of thesis deal with analysis of compounds contained in rowanberries with a focus on extraction, liquid chromatography and capillary electrophoresis.

KEYWORDS

rowan, black chokeberry, extraction, liquid chromatography, capillary electrophoresis

OBSAH

1	Úvod.....	12
2	Teoretická část	13
2.1	Jeřabina červená	13
2.1.1	Popis.....	13
2.1.2	Úprava a využití.....	13
2.2	Jeřabina černá.....	14
2.2.1	Popis.....	14
2.2.2	Úprava a využití.....	15
2.3	Chemické složení jeřabin	15
2.3.1	Sacharidy a pektiny.....	16
2.3.2	Organické kyseliny	16
2.3.2.1	Karboxylové kyseliny.....	16
2.3.2.2	Hydroxykyseliny	17
2.3.3	Flavonoidy	17
2.3.3.1	Katechiny.....	18
2.3.3.2	Anthokyany	18
2.3.4	Karotenoidy	18
2.3.5	Silice a třísloviny	19
2.3.6	Vitamíny	19
2.4	Extrakce.....	20
2.4.1	Extrakce z pevné fáze do kapaliny	21
2.4.2	Extrakce z kapaliny do kapaliny.....	21
2.5	Chromatografie	22
2.5.1	Plynová chromatografie.....	23
2.5.2	Kapalinová chromatografie.....	24
2.6	Kapilární elektroforéza.....	25

2.7	Analýza biologicky aktivních látek v jeřabinách	26
2.7.1	Extrakce látek obsažených v jeřabinách	26
2.7.2	Separace a stanovení látek obsažených v jeřabinách.....	32
3	Závěr	37
4	Použitá literatura	38

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 – Jeřabina červená	13
Obrázek 2 – Jeřabina černá	14
Obrázek 3 – Struktura flavanu	17
Obrázek 4 – Struktura flavyliového kationtu (anthokyanidiny)	18
Obrázek 5 – Soxhletův extraktor	21
Obrázek 6 – Schéma plynového chromatografu	23
Obrázek 7 – Schéma kapalinového chromatografu	25
Obrázek 8 – Přístroj pro kapilární elektroforézu	26
Obrázek 9 – Vliv každé úrovně faktoru na obsah fenolů a anthokyanů v černé jeřabině	29
Obrázek 10 – Účinnost extrakce na obsah anthokyanů za použití vody	31
Obrázek 11 – Účinnost extrakce na obsah anthokyanů za použití ethanolu a vody	31
Obrázek 12 – Účinnost extrakce na obsah anthokyanů za použití ethanolu, vody a HCl	32
Obrázek 13 – HPLC chromatogram fenolických sloučenin černé jeřabiny:	33
Obrázek 14 – Struktura glykosidů kvercetinů	34
Obrázek 15 – HPLC chromatogram anthokyanů černé jeřabiny:	35
Obrázek 16 – Struktura anthokyanů	35
Tabulka 1 – Srovnání výtěžků při extrakci PLE a Soxhletově extrakci	28

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

FMN	flavinmononukleotid
FAD	flavinadenindinukleotid
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
GC	plynová chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
GSC	chromatografie plyn-kapalina
GLC	chromatografie plyn-tuhá fáze
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné záření
BHT	2,6-di-tert-butyl-4-methylfenol
BHA	2,3-tert-butyl-4-hydroxyanisol
PLE	tlaková kapalinová extrakce
UHPLC	ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
RP – HPLC	chromatografie v systémech s obrácenými fázemi (reversed-phase)
DAD	diodový maticový detektor
CE	kapilární elektroforéza
CZE	zónová kapilární elektroforéza
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie

1 ÚVOD

Ve světě se vyskytuje několik desítek druhů jeřabin, ale v této práci je věnována pozornost jeřabině červené, pravým názvem jeřáb ptačí a jeřabině černé neboli arónii. Obě jeřabiny patří do čeledi růžovitých a jsou to rostliny s velkou léčivou silou. Arónii nalezneme nejčastěji jako keř pěstovaný na zahradách, kdežto jeřabina červená se vyskytuje téměř po celé České republice volně v přírodě a jako potravina byla objevena zcela náhodou počátkem 19. století. Obě se hojně využívají hlavně v potravinářství, ale i v léčitelství mají své místo nejen pro své protizánětlivé a antioxidační účinky.

Červená i černá jeřabina obsahují velké množství biologicky aktivních látek. Složení látek v obou jeřabinách je velmi obdobné. Obsahují sacharidy, silice, třísloviny, organické kyseliny, vitamíny, flavonoidy, anthokyany a mnohé další. Černá jeřabina je pro svůj vysoký obsah vitamínů nazývána vitamínovou bombou a je výborným antioxidantem. Flavonoidní látky, vyskytující se v obou jeřabinách, jsou rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů a jedná se o žlutá barviva, mezi která patří i anthokyany. Anthokyany jsou polyfenolické látky a jsou také nejrozsáhlejší skupinou rostlinných barviv. Svou strukturu a zbarvení mění podle pH prostředí. Tato práce se věnuje hlavně analýze flavonoidů.

K analýze biologicky aktivních látek se využívají separační metody. Tato práce je zaměřena na úpravu vzorku před analýzou pomocí extrakce za použití různých rozpouštědel pro získání maximálního výtěžku. Dále jsou zde popsány separační techniky v kapalně fázi jako kapalinová chromatografie a kapilární elektroforéza a stanovení látek v jeřabinách.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Jeřabina červená

2.1.1 Popis

Jeřabina červená neboli jeřáb ptačí, latinsky *Sorbus aucuparia L.*, patří do čeledi růžovitých, latinsky *Rosaceae*. Řadí se mezi stromy nebo keře, jejichž větve jsou v mládí plstnaté a později olysalé, červenohnědé barvy. Může být vysoký 5 až 15 metrů. Typickým znakem je hladká, šedá, téměř lesklá kůra. Jeřabiny mají čtyř až devítijařmé lichožpeřené listy, které mají podlouhle kopinaté, pilovité lístky. Květenství je latnatě chocholičnaté, složené z drobných kvítků bílé barvy, které můžeme vidět od května do června. Květy výrazně voní. Plodem jeřabin jsou oranžové až červené, malé, kulaté malvice (obrázek 1). Plody jeřabin se využívají v lékařství^{1,2}.



Obrázek 1 – Jeřabina červená³

Dříve byla jeřabina posvátným stromem, staří Germáni ji zasvětili bohu hromu Thorovi, který vládl počasí, rostlinám a plodnosti⁴.

Jeřáb ptačí roste ve světlých listnatých a smíšených lesích, na okrajích křovin a pasek od nížin až po horské oblasti. Vyskytuje se téměř v celé Evropě, dále Asii a ve Skandinávii. Často je vysazován jako okrasná dřevina do alejí, parků nebo podél silnic^{4,5}.

2.1.2 Úprava a využití

Nejvíce využívanou částí jeřabin jsou plody, ale používají se i květy, listy nebo semena. Květy jeřabin se sbírají většinou v květnu při plném rozkvetu a používají se k celkové koupeli u dětí trpících mírnou formou atopického ekzému².

Plody se sbírají plně vyztřálé, červené a nepoškozéné v srpnu a v září za suchého počasí. Jeřabiny by se neměly konzumovat čerstvé, protože obsahují kyselinu parasorbovou, a při požití většího množství způsobují podráždění žaludku a střev. Kyselina parasorbová se sušením nebo povařením štěpí na kyselinu sorbovou, která není pro naše tělo toxická. Malvice se nejprve suší ve stínu a poté teprve na slunci. Vůní jemně připomínají jablka a jejich chuť je nakyslá, hořká a trpká^{1,5}.

Sušené jeřabiny se využívají jako složka čajů nebo macerátu (zdroj vitamínů), diuretikum, prostředek pro regulaci střevní činnosti – průjem a zácpa. Dále se využívají plody jako účinné antirevmatikum, podporují proces trávení ve střevech, protože ovlivňují vylučování žluče do střev. Má protizánětlivé účinky, tudíž se uplatňuje při zánětech horních cest dýchacích a dokáže rozrušovat a vyplavovat drobné kamínky a močový písek v ledvinách. Kromě lékařství se využívá i v potravinářství v různých podobách – likér, šťáva, sirupy, marmelády a kompoty^{2,5}.

2.2 Jeřabina černá

2.2.1 Popis

Černá jeřabina neboli temnoplodec černý, latinsky *Aronia melanocarpa*, patří také do čeledi růžovitých. Zařazuje se mezi keře vysoké kolem dvou metrů. Listy, stejně jako u jeřabiny ptačí, jsou lichozpeřené, čtyř až devítijařmé. Velmi se podobají listům višně. Oproti višni má však arónie listy lesklejší. Květenství je latnatě chocholičnaté a skládá se z malých, bílých nebo narůžovělých květů, které můžeme vidět začátkem léta. Arónie se oproti jeřabině červené, jak už je patrné z názvu, liší barvou plodu, která je černá. Plody jsou větší malvice velikosti kolem 15 mm rostoucí v hroznech (obrázek 2). Plody černé jeřabiny se využívají v lékařství⁶.



Obrázek 2 – Jeřabina černá⁷

Jeřabina černá se v přírodě vyskytuje ojediněle, spíše se pěstuje a šlechtí. V dnešní době ji známe v mnoha kultivarech jako keř, ale i strom⁶.

2.2.2 Úprava a využití

Nejvíce využívanou částí arónie jsou plody, které se sbírají koncem léta a na podzim, ale využívají se i listy. Listy se sbírají od druhé poloviny dubna do konce první poloviny května a připravují se krátkým povařením. Přidávají se do čajů jako podpora cévního systému a mohou se kombinovat s dalšími bylinkami. Dále snižují krevní tlak, mají protizánětlivé a žlučopudné účinky, můžou se využívat i v revmatologii, jelikož podporují vylučování nežádoucích solí z organismu⁶.

Lze využít účinné látky plodů i listů dohromady např. pro doléčení žloutenky, mononukleózy a podobných onemocnění zatěžující játra, protože ochraňují jaterní parenchym⁶.

Na rozdíl od jeřábu ptačího se mohou plody arónie konzumovat čerstvé, protože nemají žádné nežádoucí účinky ani kontraindikace, ale jejich chuť je velmi trpká. Většinou se používají na přípravu kompotů, přírodních šťáv, sirupů, marmelád, vín a mnoha dalších, ale mohou se také používat sušené jako přísada do čajových směsí^{6,8}.

Plody se využívají k regulaci a harmonizaci štítné žlázy jak při snížené, tak i zvýšené funkci. Šťáva z plodů napomáhá ke snižování hladiny cholesterolu v krvi u lidí trpících aterosklerózou. Dále zpevňují kapiláry, ovlivňují pružnost a propustnost cév, zvyšují rychlost proudění krve, což se využívá při léčbě vysokého krevního tlaku neboli hypertenze. Uplatňují se i v kardiologii, protože s vhodnou kombinací vitamínu C a pektinů působí protiskleroticky. Používají se i jako detoxikační prostředek na podporu funkcí jater a ledvin. Delším požíváním plodů a šťáv arónie se snižuje emocionální nerovnováha a vyrovnávají procesy útlumu a vzruchu v mozku^{6,8}.

2.3 Chemické složení jeřabin

Červená a černá jeřabina mají obdobné složení. Plody jeřabiny ptačí obsahují velké množství účinných látek. Těmito látkami jsou cukry (hlavně glukóza a sorbóza), cukerné alkoholy (sorbitol), pektiny, třísloviny, silice, karotenoidy (sorbusin), hořčiny, flavonoidy (rutin a kvercetin), v malé míře i anthokyany. Dále obsahují řadu organických kyselin – sorbovou, parasorbovou, vinnou, citronovou, jablečnou a askorbovou (až 0,2%). Kyselina parasorbová se vyskytuje pouze v nezralých plodech. Květy jeřabiny ptačí obsahují téměř stejné látky jako

plody, ale sbírají se hlavně z jediného důvodu, a tím je přítomnost látek, které se podobají ženským hormonům^{2,5}.

Jeřabina černá obsahuje obrovské množství vitamínů jako vitamín P, C, PP (kyselina nikotinová), E a vitamíny skupiny B, a proto se často nazývá vitamínovou bombou. Ve větším množství obsahuje anthokyany, dále pak katechiny, karoten, flavonoidy, organické kyseliny, pektiny, třísloviny, cukry – sorbóza (až 3,5%), mikroelementy, prvky jako brom, fluor, železo, měď, větší množství jódu a další^{6,8,9}.

2.3.1 Sacharidy a pektiny

Sacharidy jsou velmi rozšířené organické sloučeniny, označují se jako polyhydroxyaldehydy (aldosy) a polyhydroxyketony (ketosy), které mají v molekule minimálně tři alifaticky vázané atomy uhlíku. Dělíme je dle počtu cukerných jednotek vázaných v molekule na monosacharidy, oligosacharidy, polysacharidy (glykany) a konjugované (složené) sacharidy. Slouží hlavně jako zdroj energie (glukóza, fruktóza), základní stavební jednotky (celulóza, chitin) a jsou zásobní funkcí pro rostliny (škrob) a živočichy (glykogen)^{10,11}. V jeřabinách se nejvíce vyskytuje glukóza patřící mezi aldosity a sorbóza, která patří mezi ketosy⁵.

Pektinové látky jsou vysokomolekulární polysacharidy, které se vyskytují v rostlinách ve formě pektocelulos a protopektinů, což jsou komplexy pektinu s celulosou nebo jinými polysacharidy. Působením zředěných kyselin vzniká pektin, což je methylovaný ester kyseliny D-galakturonové. Tyto látky se používají v potravinářském průmyslu např. k přípravě marmelád a v současnosti při léčbě cévních chorob¹¹.

2.3.2 Organické kyseliny

Mezi organické kyseliny řadíme karboxylové a hydroxykarboxylové kyseliny, oxokyseliny a aromatické kyseliny. Všechny jsou součástí rostlinných a živočišných potravin¹⁰.

2.3.2.1 Karboxylové kyseliny

Karboxylové kyseliny jsou významné složky produktů rostlinného původu, které ovlivňují průběh enzymatických a chemických reakcí, mikrobiologickou stabilitu potravin během zpracování a skladování atd. Podle počtu karboxylových skupin se dělí na monokarboxylové a polykarboxylové kyseliny¹².

Mezi monokarboxylové, nenasycené kyseliny patří kyselina sorbová, která se vyskytuje v jeřabině ptačí a vzniká zde otevřením kruhu a dehydratací kyseliny parasorbové. Používá se

jako konzervační činidlo, protože má antimikrobní účinky. Kyselina parasorbová, která se vyskytuje v nezralých jeřabinách, vykazuje karcinogenní a mutagenní účinky¹².

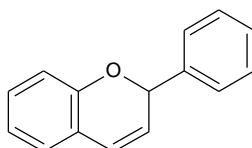
2.3.2.2 Hydroxykyseliny

Hydroxykyseliny jsou netěkavé, polární sloučeniny a některé z nich jsou nejvýznamnějšími nositeli kyselé chuti ovoce a zeleniny. V jeřabinách se vyskytuje kyselina citronová, jablečná a vinná¹².

Kyselina citronová se vyskytuje v mnoha druzích ovoce, hlavně v citronech. Získává se z citronové šťávy a je používána jako přísada do potravinářských výrobků a nealkoholických nápojů. Kyselina jablečná je ve formě L-(-)-isomeru a vzniká jako meziprodukt v citrátovém cyklu. Nalezneme ji v ovoci a zelenině a v potravinářství slouží jako potravinářské aditivum. Kyselina vinná se v přírodě vyskytuje jako L-(+)-isomer a je důležitým zástupcem aldarových kyselin¹².

2.3.3 Flavonoidy

Flavonoidní látky jsou velmi rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů, které ve své molekule obsahují dva benzenové kruhy spojené tříuhlíkatým řetězcem. Jejich struktura je odvozena od 2H-chromenu (kyslíkatá heterocyklická sloučenina), který je substituován v poloze C-2 fenylem za vzniku uspořádání C₆-C₃-C₆ flavan (obrázek 3). Jedná se o žlutá barviva, která se velmi často vyskytují v rostlinách volně nebo jako aglykony rostlinných heteroglykosidů, dále jako vonné látky^{11,12}.



Obrázek 3 – Struktura flavanu

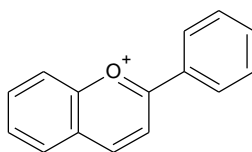
Flavonoidy dělíme na katechiny, leukoanthokyany, flavanony, flavanonoly, flavony, flavonoly, anthokyany, aurony, chalkony a dihydrochalkony. Jejich význam je odlišný, některé jsou přírodní rostlinná barviva, jiné jsou důležité svou chutí – většinou hořké a trpké látky, nebo se jedná o biologicky účinné látky. Dříve se tyto látky dělily podle barev na dvě skupiny – anthokyany (červené až modré) a anthoxanthiny (žluté). V jeřabinách se vyskytuje hlavně kvercetin a rutin. Rutin má antioxidační účinky, ovlivňuje permeabilitu a pružnost cév, a proto se používá ve farmaceutických přípravcích a potravinových doplňcích¹².

2.3.3.1 Katechiny

Katechiny jsou bezbarvé sloučeniny, které se vyskytují v rostlinách. Používají se jako barviva řady potravin, protože z nich vznikají hnědé pigmenty při reakcích enzymového hnědnutí. Nejznámějším je katechin a některé z nich vykazují vysokou aktivitu vitamínu P např. epikatechin. Řadíme je mezi kondenzované třísloviny, protože velmi snadno tvoří polymerní látky, které jsou jejich základem^{11,12}.

2.3.3.2 Anthokyaniny

Anthokyaniny neboli anthokyaniny patří do nejrozšířenější skupiny rostlinných barviv rozpustných ve vodě. Jedná se hlavně o fialová a červená zbarvení listů, květů a plodů. Svou strukturu a zbarvení mění podle pH prostředí, kdy v kyselém prostředí jsou červené, v neutrálním fialové a v zásaditém modré. Tato barviva jsou glykosidy obsahující aglykon anthokyanidiny, které jsou strukturně odvozené od flavyliového kationtu (obrázek 4). Součástí molekuly anthokyanů jsou dále i sacharidy (glukóza, galaktóza, xylóza atd.) vázány v poloze C-3^{11,12}.



Obrázek 4 – Struktura flavyliového kationtu (anthokyanidiny)

Vyskytují se v různých rostlinách čeledi révovitých, růžovitých, lilkovitých, srstkovitých, vřesovcovitých a dalších. Jsou lokalizovány v buněčných vakuolách a stabilizovány interakcemi typu ion-ion s organickými kyselinami. V arónii se vyskytují tato anthokyanová barviva: kyanidin-3-galaktosid (65-69 %), kyanidin-3-arabinosid (28-29 %), kyanidin-3-glukosid (1-2 %) a kyanidin-3-xylosid (2-4 %)¹².

2.3.4 Karotenoidy

Karotenoidy jsou žlutá, oranžová a červená barviva, která se vyskytují u rostlin, živočichů, mikroorganismů a hub. Jsou rozpustné v nepolárních rozpouštědlech. Často se označují jako retinoidy, protože některé vykazují aktivitu vitamínu A. Skládají se z isoprenoidních jednotek, takže se zařazují mezi tetraterpeny. Dělí se na karoteny (bezokysličené sloučeniny) a xanthofyly (okysličené sloučeniny – alkoholy, aldehydy, ketony, epoxidy a kyseliny). Mezi nejznámější patří karoteny, které obsahují 40 uhlíků a skládají se z osmi isoprenoidních jednotek^{11,12}.

2.3.5 Silice a třísloviny

Silice (etherické oleje) jsou obsaženy v přírodních materiálech a jedná se o složité směsi těkavých látek, které se získávají z částí rostlin – květy (jasmín), stonky a kvetoucí stonky (máta), plody nebo semena (kmín, jalovec), oplodí plodů (citrusy), listy (bobkový list), cibulí, oddenků a kořenů (hořec). Nejčastěji se získávají destilací materiálů s vodní párou a oddělením vrstvy silice z destilátu, extrakcí nepolárními rozpouštědly (benzen, petrolether), lisováním a oddělením vrstvy silice. Většina silic ještě obsahuje podíl terpenových uhlovodíků¹².

Třísloviny neboli taniny patří mezi fenolové sloučeniny, které interagují s proteiny. Vyskytují se v potravinách rostlinného původu a jsou zodpovědné za trpkou, svíravou a stahující chuť. Dělí se na hydrolyzovatelné a kondenzované třísloviny. Hydrolyzovatelné třísloviny jsou většinou estery D-glukózy a kyselina gallová, zatímco kondenzované jsou odvozeny od hydroxyskořicových kyselin. Ovlivňují chuťové vlastnosti potravin jako trpkost kávy, piva a červených vín.^{11,12}

2.3.6 Vitamíny

Vitamíny jsou nízkomolekulární organické sloučeniny, často nazývané jako exogenní esenciální biokatalyzátory. Jsou to látky nezbytné pro život, které musí být do organismu dodávány, protože si je nedokáže sám syntetizovat. Doporučená dávka vitamínů v těle pro zajištění normálních fyziologických funkcí se liší věkem, pohlavím, zdravotním stavem, životním stylem atd. Při nedostatečném množství vitamínu v těle může dojít k hypovitaminose, v horších případech dochází k avitaminose, což je úplný nedostatek vitamínu v těle. Existuje i předávkování vitamínem (nadměrné množství v těle), které se označuje jako hypervitaminosa^{10,11}.

Dělíme je na vitamíny rozpustné ve vodě (hydrofilní) a v tucích (lipofilní). Mezi vitamíny rozpustné v tucích patří A, D, E, K a mají různé funkce. Mezi vitamíny rozpustné ve vodě patří vitamíny skupiny B a vitamin C, jejich funkce je hlavně katalytická¹⁰.

Jak už bylo zmíněno výše, jeřabina černá obsahuje velké množství vitamínů jako vitamin C, P, PP (kyselina nikotinová), E a vitamíny skupiny B⁶.

Vitamin C neboli kyselina askorbová se využívá jako potravinářské aditivum a má antioxidační účinky. Nejbohatším zdrojem tohoto vitamínu je ovoce a zelenina, dále játra. Nedostatek se projevuje onemocněním kurděje (skorbut)^{10,11}.

Vitamín PP neboli kyselina nikotinová je důležitá pro vznik koenzymů NAD^+ a NADP^+ . Největším zdrojem jsou kvasnice, maso, játra a vejce. Méně ho obsahují ovoce, zelenina, mléko a luštěniny. Nedostatek má za následek onemocnění pelagra^{10,11}.

Vitamín E neboli tokoferol se vyskytuje hlavně v potravinách rostlinného původu, v menší míře i v potravinách živočišného původu. Nachází se v rostlinném oleji, v mase, vejcích, játrech a bohatým zdrojem na tento vitamín je olej z obilných klíčků. Používá se hlavně pro své antioxidační účinky. Nedostatek se může projevit špatnou funkcí pohlavních žláz, neurologickými potížemi a chudokrevností^{10,11}.

Vitamíny skupiny B (B-komplex) jsou důležité prekursorů kofaktorů enzymatických reakcí. Do této skupiny patří thiamin (B_1), riboflavin (B_2), pyridoxin (B_6), niacin, pantothenová kyselina, biotin (H), kyselina listová, kobalamin (B_{12}) a kyselina lipová^{10,11}.

Thiamin se nachází ve všech tkáních a pletivech. Zdrojem tohoto vitamínu jsou pivovarské kvasnice, obilná zrna, luštěniny, játra, ledviny a srdce. Nedostatek se projevuje jako onemocnění beri-beri^{10,11}.

Riboflavin se vyskytuje v rostlinných i živočišných organismech. Je součástí flavinových kofaktorů FMN a FAD. Jeho zdrojem je maso, vnitřnosti, mléko a zelenina. Nedostatek se projevuje zánětlivými změnami sliznic a kůže^{10,11}.

Pyridoxin se také nachází v rostlinných i živočišných organismech. Vyskytuje se v obilovinách, mase, vnitřnostech, droždí, mléce, vejcích, luštěninách, ovoci a zelenině. Nedostatek se projevuje nervovými onemocněními^{10,11}.

Kobalamin se nevyskytuje v rostlinných organismech, ale pouze v živočišných. Nepřidává se do potravin, ale je součástí farmaceutických přípravků. Zdrojem je maso, mléko, mléčné výrobky a vejce. Avitaminóza je velmi vážná a označuje se jako tzv. zhoubná anémie^{10,11}.

2.4 Extrakce

Extrakce je dělicí metoda, kdy jedna složka přechází fázovým rozhraním mezi dvěma vzájemně nemísitelnými kapalinami nebo tuhou a kapalnou fází. Při této metodě se využívá různé rozpustnosti jednotlivých složek v různých rozpouštědlech. Volba vhodného rozpouštědla závisí na znalosti interakcí molekul rozpouštědla s molekulami rozpuštěné látky. Mezi tyto interakce patří disperzní interakce, interakce dipól-dipól, indukční interakce a tvorba vodíkových můstků. Volba rozpouštědla je důležitá jak pro extrakční dělení, tak později pro výběr stacionární a mobilní fáze v rozdělovací chromatografii. Extrakci dělíme podle

skupenství fází na extrakci z pevné fáze do kapaliny, z kapaliny do kapaliny, z kapaliny na pevnou fázi a z kapaliny nebo plynu na pevnou fázi^{13,14}.

2.4.1 Extrakce z pevné fáze do kapaliny

Tato metoda se nejčastěji používá k dělení organických látek, k izolaci jedné nebo více složek z přírodního materiálu nebo z technických produktů. Ve vhodném rozpouštědle se z pevného materiálu (vzorku) rozpustí požadovaná složka. Nejčastěji se používá extraktor podle Twisselmana nebo Soxhletův extraktor (obrázek 5). Ve střední části extraktoru se nachází patrona, která se plní rozmělněným vzorkem. Pod střední částí se nachází baňka, do které se nalije vhodně zvolené rozpouštědlo a zahřívá se k jeho bodu varu. Po zahřátí začnou páry rozpouštědla stoupat postranní trubicí do zpětného chladiče, kdy páry kondenzují a kapou na vzorek v patroně a rozpouštědlo extrahuje látku ve vzorku. Když se střední část naplní kondenzátem, tak roztok přeteče přepadovou trubičkou do baňky a celý proces se opakuje. Jedná se o opakovanou neboli kontinuální extrakci pro získání většího výtěžku. Po tomto opakovaném procesu je v baňce jedna nebo více složek a rozpouštědlo, které se odstraní destilací. Poté v baňce zůstane pouze izolovaná látka^{14,15}.



Obrázek 5 – Soxhletův extraktor¹⁶

2.4.2 Extrakce z kapaliny do kapaliny

Tato metoda se nejčastěji používá k dělení anorganických látek a je založena na ustavení fázové rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými kapalinami. Těmito kapalinami jsou vzorek s analytem a rozpouštědlo, do kterého se analyt převádí. Anorganické látky jsou ve vodě disociovány ve formě iontů, které nelze extrahovat. Musí se přeměnit na neutrální komplexní sloučeniny chelátového typu, které se můžou převést do organické fáze. K extrakci z kapaliny do kapaliny se používají dělicí nálevky s krátkým stonkem a jádro kohoutu a zátku mají zhotovenou

z plastu. Jsou vhodné pro extrakci rozpouštědlem těžší než voda, pokud je lehčí než voda, používá se zabroušená zkumavka, u které se organická část odsaje pipetou. Nálevky se promíchávají převrácením a zkumavky rotací. Vytřepávání není vhodné, protože některá rozpouštědla tvoří špatně odstranitelnou emulzi. Tato metoda extrakce se může provádět jednorázově nebo mnohostupňově^{13,14,15}.

2.5 Chromatografie

Chromatografie je separační metoda používaná k dělení, stanovení a identifikaci anorganických a organických látek. Je založena na fyzikálně chemických principech, kdy při rozdělávání směsi dochází k mnohonásobnému ustavení rovnováhy mezi vzájemně nemísitelnými fázemi. Těmito fázemi jsou fáze stacionární (nepohyblivá) a mobilní (pohyblivá). Stacionární fáze může být označována jako sorbent, protože se vyskytuje v různých formách jako částice tuhé fáze nebo kapalina na vnitřní straně kapiláry^{13,15,17}.

Složky vzorku jsou separovány na základě jejich afinity ke stacionární fázi. Čím je afinita vyšší, tím je delší i retenční čas a složky se eluují později. Tímto způsobem jsou od sebe složky odděleny^{13,14}.

Chromatografické metody se dělí podle několika hledisek:

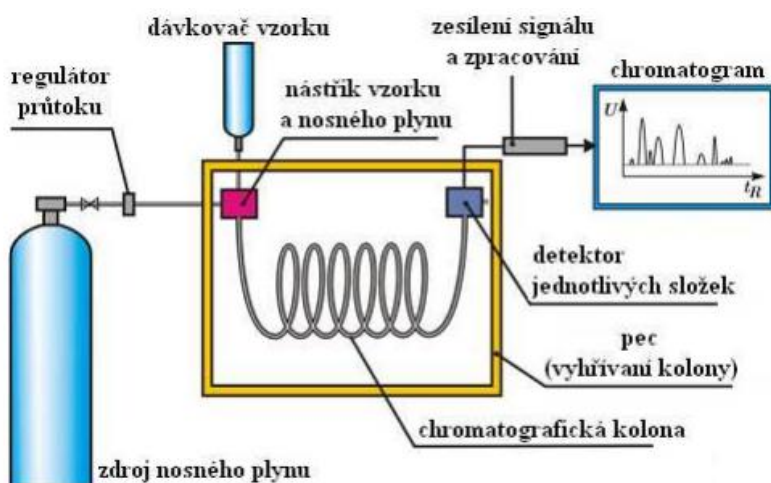
- Podle mobilní fáze:
 - plynová chromatografie (GC),
 - kapalinová chromatografie (LC).
- Podle uspořádání stacionární fáze:
 - sloupcová (kolonová) chromatografie,
 - chromatografické techniky v plošném uspořádání.
- Podle separačního principu:
 - adsorpční,
 - rozdělovací,
 - iontově výměnné,
 - gelové,
 - afinitní.

Mezi chromatografické techniky v plošném uspořádání se řadí papírová a tenkovrstvá chromatografie^{13,15}.

2.5.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je fyzikálně chemická metoda lišící se od dalších druhů chromatografie mobilní fází, kterou je plyn. Separované složky jsou také v plynném stavu. Pokud jsou vzorky kapalně, musí se zvolit teplota taková, aby dělené složky přešly do páry. Stacionární fází může být tuhá látka nebo kapalina. Podle toho rozlišujeme chromatografii na systém plyn-tuhá látka (GSC), při které se složky dělí mezi nosný plyn a tuhý sorbent, a dále na systém plyn-kapalina (GLC), při které se složky dělí mezi nosný plyn a stacionární kapalnou fází^{15,18}.

Schéma instrumentálního uspořádání je uvedeno na obrázku 6. Vzorek se vnáší do dávkovacího zařízení vyhřívaného na určitou teplotu a je unášen proudem nosného plynu kolonou. V koloně je přítomna stacionární fáze a podle vzájemných interakcí dochází k rozdělení neboli retenci složek a jejich rozdílné eluci. Složky vystupující z kolony jsou zaznamenávány detektorem, který určuje množství složek jako funkci času nebo objemu proteklého nosného plynu^{13,15}.



Obrázek 6 – Schéma plynového chromatografu¹⁹

Tlaková lahev s redukčním ventilem je zdrojem nosného plynu, který musí být inertní. Volba plynu velmi závisí na typu detektoru, dále na toxicitě a ceně. Nejčastěji používanými plyny jsou helium, dusík, vodík, argon, oxid uhličitý a další. Průtok nosného plynu je regulován ventilem, který je umístěn hned za tlakovou lahev^{13,18}.

Dávkovací zařízení slouží k nástřiku vzorku do kolony, které musí být co nejrychlejší. Kapalně vzorky se dávkuje pomocí mikrostřičky opatřené jehlou a dávkovač je vyhříván. Plyny využívají větší injekční stříkačky o objemu až několik milimetrů^{15,18}.

V termostatu je umístěn dávkovač, kolona i detektor, a zajišťuje takovou teplotu, aby byl po celou dobu vzorek v plynném stavu. Stacionární fáze se nachází v koloně, ve které dochází

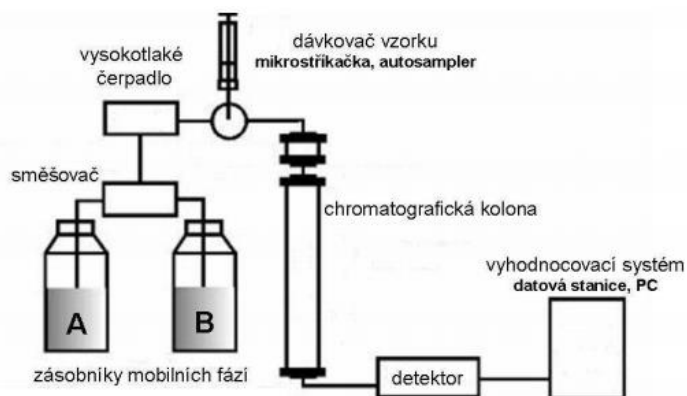
k separaci složek. Používají se 2 druhy kolon – náplňová a kapilární. Náplňové kolony jsou tvořené trubicí ze skla nebo oceli o délce 1 až 3 metry a mají vyšší kapacitu než kapilární kolony. Trubice jsou naplněné granulovaným materiálem nebo nosiči pokrytými kapalnou fází. Kapilární kolony jsou vyrobené většinou z taveného křemene, ale i z oceli nebo skla. Jejich délka je 10 až 100 metrů a jsou stočené do šroubovice. Využívají své vnitřní stěny jako nosič stacionární fáze^{13,18}.

Na konci kolony se nachází detektor, který reaguje na přítomnost látek v nosném plynu. Vysílá signály, které jsou zaznamenávány v závislosti na čase. Detektor musí být citlivý, selektivní a musí rychle reagovat na změnu složení. Nejčastěji používanými detektory jsou tepelně-vodivostní a plamenový ionizační detektor^{13,18}.

2.5.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie se od plynové chromatografie liší mobilní fází, kterou je kapalina. Dále o separaci složek nerozhoduje pouze stacionární fáze, ale i mobilní fáze. Dochází k rozdělení vzorku mezi mobilní a stacionární fázi. Využívá se k dělení organických méně těkavých kapalin i tuhých látek, které se rozpouštějí ve vodě, zředěných minerálních kyselinách a v organických rozpouštědlech. Kapalinovou chromatografii můžeme dělit na chromatografii v otevřeném systému (klasická kapalinová chromatografie) nebo v uzavřeném systému (vysokoúčinná kapalinová chromatografie, HPLC)^{13,15}.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC (obrázek 7) se od klasické kapalinové chromatografie liší vyšší účinností. Kolona je naplněna sorbentem s malými částicemi (3 – 5 μm), které kladou protékající kapalině odpor. Průtok mobilní fáze kolonou zajišťuje vysokotlaké čerpadlo. Čerpadla musí být zhotovena z odolného materiálu (např. nerezová ocel), aby mobilní fáze nebyla znečištěna nebo nedocházelo ke korozi částí čerpadla. Lze je rozdělit na pulsní a bezpulsní. Mezi pulsní čerpadla patří pístová nebo membránová a množství dodané mobilní fáze záleží na výšce zdvihu pístu nebo membrány. Jejich výhodou je v nepřetržitém dodávání eluátu, ale nevýhodou je pulsující tok, který lze omezit použitím zařízení, které se nazývá tlumič pulsů. Bezpulsní čerpadla se používají méně, protože mají omezenou kapacitu. Jsou konstruovány jako lineární dávkovače nebo pneumatické zesilovače^{13,18}.



Obrázek 7 – Schéma kapalinového chromatografu²⁰

Před čerpadlem se vyskytuje směšovací zařízení, které umožňuje během procesu měnit složení mobilní fáze¹⁸. Dávkování vzorku se provádí bez zastavení toku mobilní fáze pomocí šesticestného dávkovacího ventilu se smyčkou o různém objemu. Dále je možné využít automatického dávkování tzv. autosampleru^{13,18}.

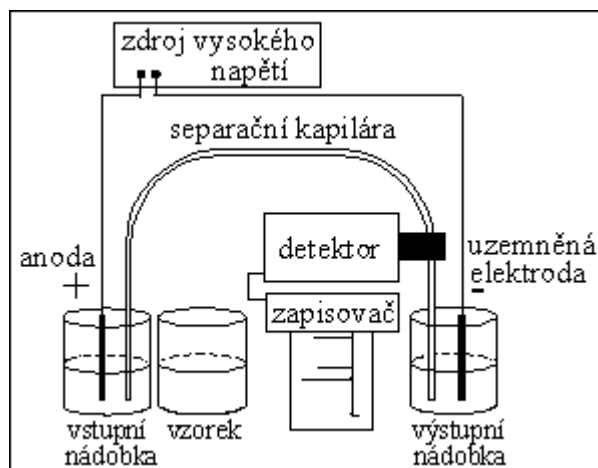
Nejdůležitější částí kapalinového chromatografu je kolona, na které dochází k samotné separaci. Využívají se náplňové kolony různé délky, průměru a velikosti částic. V případě analytické chromatografie se délka pohybuje do 250 mm a průměr do 4.6 mm. Kolony jsou naplněné sorbentem o velikosti částic nejčastěji 3 – 5 μm . V současné době jsou kolony dodávány několika výrobci, protože v běžně zařízené laboratoři není možné vyrobit kvalitní kolonu, která by poskytovala opakovatelné analýzy^{15,18}.

Po průchodu kolonou látka prochází detektorem. Detektor by měl být málo citlivý na změnu složení mobilní fáze a velmi citlivý na analyzované složky. Mezi nejčastěji používané patří spektrofotometrické, fluorimetrické a elektrochemické detektory^{13,18}.

2.6 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza patří mezi kapilární elektromigrační separační metody založené na pohybu iontů v elektrickém poli. Tato metoda využívá elektroforetické migrace iontů a elektroosmotického toku kapaliny kapilárou. Separace látek se provádí v kapiláře z taveného křemene, která je na vnějším povrchu pokryta vrstvou polyimidu. Ten snižuje křehkost a kapilára se dá ohýbat, aniž by se zlomila. Přístroj pro kapilární elektroforézu (obrázek 8) se skládá ze vstupní a výstupní nádoby a kapiláry, všechny tyto části se naplní základním elektrolytem. V nádobách jsou platinové elektrody a mezi ně je vloženo napětí asi 10 – 30 kV po krátkou dobu, aby se stabilizoval elektroosmotický tok. Do kapiláry se vzorek dávkuje tak, že se vymění vstupní nádoba za nádobu se vzorkem a na elektrody se opět připojí napětí na

velmi krátkou dobu, aby došlo vlivem elektroosmotického tlaku k nasátí malého množství vzorku do kapiláry. K separaci látek dochází vlivem odlišné rychlosti migrace složek vzorku, kdy dochází ke vzniku zón jednotlivých složek – kladně nabitě, neutrální a záporně nabitě. Kapilára prochází přes detektor, kam se zóny dostanou v různých migračních časech. Nejčastěji se používá spektrofotometrický detektor, který pracuje v UV/VIS oblasti a měří absorbanci roztoku uvnitř kapiláry o dané vlnové délce. Na záznamu, který se označuje jako elektroferogram, se objeví jako pík^{13,22}.



Obrázek 8 – Přístroj pro kapilární elektroforézu²¹

2.7 Analýza biologicky aktivních látek v jeřabinách

Jeřabiny jsou velice bohatým zdrojem polyfenolů, mezi které se řadí flavonoidy, flavan-3-oly, prokyanidiny a fenolové kyseliny²⁴. Dále představují jednu z nejbohatších rostlin na obsah anthokyanů²⁵. Vyznačují se protizánětlivými²⁶ a hlavně antioxidačními účinky²⁷. Příznivě ovlivňují kardiovaskulární systém, používají se k prevenci vážných onemocnění jako rakovina a cukrovka^{24,27}. Nejčastěji se využívají plody jeřabin, ale pro jejich nežádoucí trpkou chuť se nekonzumují čerstvé. Zpracovávají se lisováním na výrobu ovocných vín a šťáv, suší se a vyrábí se z nich marmelády a zavařeniny. Kromě plodů se využívají i listy a bohužel se vyhazují výlisky obohacené o hodnotné látky, které se získávají většinou při lisování plodů. Všechny tyto látky se získávají a zpracovávají pomocí výše popsaných metod jako extrakce, chromatografie a další²³.

2.7.1 Extrakce látek obsažených v jeřabinách

Extrakce je jeden z prvních a velmi důležitých kroků v izolaci a čištění biologicky aktivních látek z rostlinných materiálů. Používají se různé druhy extrakce, které můžeme rozdělit na tradiční a moderní metody extrakce. Mezi tradiční metody řadíme extrakce z kapaliny do

kapaliny, z pevné fáze do kapaliny s použitím Soxhletova extraktoru, macerace a mnohé další²⁴. Mezi moderní metody se řadí ultrazvuková extrakce (UAE), mikrovlnná extrakce (MAE), nadkritická fluidní extrakce (SFE), subkritická extrakce vodou (SWE) a další²⁸. Každá z těchto technik má své výhody a nevýhody, ale hlavním cílem je dosažení úplné extrakce, tedy dosažení největšího možného výtěžku. Účinnost může být ovlivněna druhem a koncentrací rozpouštědla, poměrem rozpouštědla k vzorku, časem, teplotou a pH²⁴.

Jeřabiny se dají extrahovat různými rozpouštědly, záleží na tom, jaké látky se z nich extrahují. Jak už bylo zmíněno výše, jeřabiny obsahují velké množství flavonoidů. Flavonoidy jsou vysoce biologicky aktivní sloučeniny, které se nejčastěji extrahují methanolem^{29,30}, ethanolem³¹, acetonem²⁹, vodou nebo směsí těchto rozpouštědel²⁸. Extrakce rozpouštědlem je nejčastější metodou používanou k extrakci flavonoidů²⁹. Extrakci lze provést z plodů, výlisků i listů jeřabin.

Methanol byl použit jako extrakční činidlo u zmrzlých malvic, které byly nejprve rozetřeny v třecí misce na jemnou pastu chlazenou kapalným dusíkem^{32,37}. Extrakce byla provedena v chlazené ultrazvukové lázni s přidavkem 3% kyseliny mravenčí a 1% 2,6-di-tert-butyl-4-methylfenolu (BHT). BHT se k methanolu přidává proto, aby během extrakce nedocházelo k oxidaci³⁷. Obdobná extrakce se využívá i pro sušené vzorky, ke kterým se přidal 62,5% methanol obsahující malé množství 2,3-tert-butyl-4-hydroxyanisolu (BHA) a nechal se extrahovat pomocí ultrazvuku³². Směs methanolu s vodou s přidavkem kyseliny chlorovodíkové byla využita pro extrakci fenolických látek z plodů jeřabin^{33,34,38}. Přídavek kyseliny urychluje extrakci. Dále je možné přidat 0,04% kyselinu askorbovou k zabránění oxidace³⁴. Takto připravené extrakty se dále centrifugují a filtrují za sníženého tlaku^{37,38}. Methanol může být nahrazen při extrakci plodů směsí ethanolu s vodou (70:30 v/v)³¹ nebo acetonu s vodou^{35,36}. Lze užít různé metody extrakce např. extrakce za použití ethanolu může probíhat pod refluxem nebo v Soxhletově extraktoru. Tyto metody se liší extrakčním časem, kdy zahřívání pod refluxem je téměř o polovinu kratší³¹.

Výlisky jeřabin, které obsahují velké množství polyfenolů, se mohou extrahovat vychlazenou směsí acetonu s vodou (60:40 v/v)³⁹, methanolem okyseleným 0,1% kyselinou chlorovodíkovou⁴⁰ nebo kyselinou mravenčí⁴¹ v ultrazvukové lázni. Extrakt je poté zfiltrován, centrifugován a připraven k analýze^{39,41}.

Pro srovnání výtěžků při extrakci výlisků (tabulka 1) lze použít dvě metody – tlakovou kapalinovou extrakci (PLE) a extrakci v Soxhletově extraktoru (obrázek 10). Tlaková

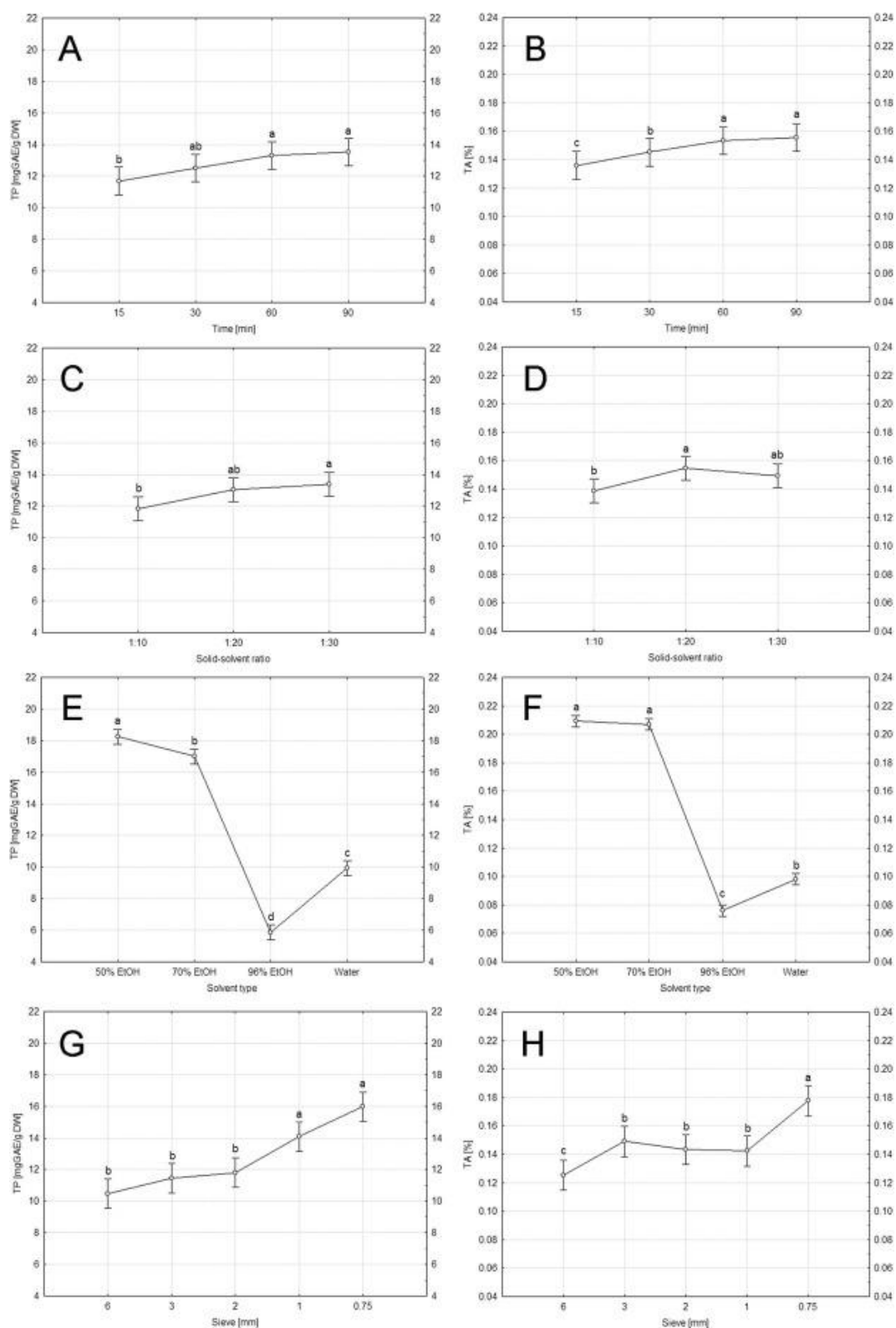
kapalinová extrakce se provádí postupně při tlaku 10,3 MPa za použití čistých rozpouštědel různé polaritě – hexan, methanol, voda. Dále jsou použity i směsi rozpouštědel – methanol s vodou a aceton s vodou. Pomocí hexanu se odstraní lipofilní látky, které nejsou potřeba při další analýze. Největšího výtěžku, asi 45%, je dosaženo za použití čistého methanolu a jeho směsi s vodou. Čistá voda je nejméně účinná, získá se asi 20% látek. Při extrakci v Soxhletově extraktoru se využívají jiná rozpouštědla – hexan, aceton a ethanol. Ethanol je nejvíce účinný a použití acetonu s vodou je asi 3 krát účinnější při metodě PLE než samotný aceton při extrakci v Soxhletově extraktoru²³.

Tabulka 1 – Srovnání výtěžků při extrakci PLE a Soxhletově extrakci²³

Soxhlet	Výtěžek (g/100 g)	PLE	Výtěžek (g/100 g)
Hexan	5,30 ± 1,23	Hexan 40 °C	4,26 ± 1,13
Aceton	8,35 ± 2,73	Methanol 40 °C	34,11 ± 1,25
Ethanol	25,92 ± 1,12	Methanol 130 °C	48,13 ± 0,81
		Voda 40 °C	21,38 ± 1,12
		Voda 130 °C	17,67 ± 1,31
		Aceton/voda 130 °C	28,29 ± 1,99
		Methanol/voda 130 °C	45,55 ± 2,21

Listy jeřabin jsou mírně kyselé a sladké, dokonce se mladé lístky využívají v Severní Koreji jako salát. Lyofilizované listy se extrahují ve vodném roztoku methanolu. Dále je extrakt zfiltrován za sníženého tlaku, odstředěn a takto připraven k analýze⁴².

Jak už bylo zmíněno výše, je velmi důležité volit vhodné podmínky extrakce pro získání maximálního výtěžku, což dokazuje i následující studie. Při extrakci polyfenolů z černé jeřabiny pomocí macerace byl studován efekt čtyř faktorů na účinnost extrakce. Mezi tyto faktory patřil čas, poměr pevné látky a rozpouštědla, druh rozpouštědla a velikost částic. Čas extrakce byl studován za použití 50% ethanolu, poměru pevné látky a rozpouštědla 1:20 a velikosti částic 2 mm. Vzorky byly odebrány v časech 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 2 h, 2,5 h, 5 h, 10 h a 18 h. Doba extrakce delší než 90 minut neměla vliv na množství fenolických látek, proto při dalším studování faktorů byla extrakce sledována při 15, 30, 60 a 90 minutách. Pro zjištění vhodnosti rozpouštědla byla použita destilovaná voda, 50%, 70% a 90% směs ethanolu a vody. Byly zkoumány tři úrovně poměru pevné látky a rozpouštědla (1:10, 1:20 a 1:30) a pět úrovní tříd částic ke zjištění optimální velikosti částic (6, 3, 2, 1 a 0,75 mm). Výsledky pokusu můžete vidět níže na obrázku 9²⁴.



Obrázek 9 – Vliv každé úrovně faktoru na obsah fenolů a anthokyanů v černé jeřabině²⁴

Vliv doby extrakce na obsah fenolů je vidět na obrázku 9-A a na obsah anthokyanů na obrázku 9-B. Účinnost extrakce se zlepšila s prodloužením trvání extrakce, kdy maximálního výtěžku obou látek se dosáhlo za 90 minut, ale mezi 60 a 90 minutami nebyly pozorovány žádné velké

rozdíly. Lze pozorovat dva stupně extrakce, kdy na počátku procesu došlo ke zvýšení koncentrace polyfenolů, které bylo následované pomalou extrakcí (po 60 minutách) charakterizovanou nízkým zvýšením koncentrace polyfenolů s průběhem extrakce²⁴.

Na obrázku 9-C a 9-D je vyhodnocen účinek objemu rozpouštědla na výtěžek extrakce fenolů a anthokyanů. Výtěžek fenolů (obrázek 9-C) se postupně zvyšoval z poměru 1:10 pevné látky a rozpouštědla a nejvyšší hodnoty dosáhl při poměru 1:30. Rozdíl byl zaznamenán u výtěžku anthokyanů (obrázek 9-D), kde byl získán největší výtěžek při poměru 1:20 a poté následovalo malé snížení²⁴.

Vliv rozpouštědla na účinnost extrakce je vidět na obrázku 9-E a 9-F. Největšího výtěžku u fenolů i anthokyanů bylo dosaženo za použití 50% ethanolu. Následně výtěžnost se zvyšující se koncentrací rozpouštědla klesala, kdy nejmenšího výtěžku bylo dosaženo za použití 96% ethanolu a vody²⁴.

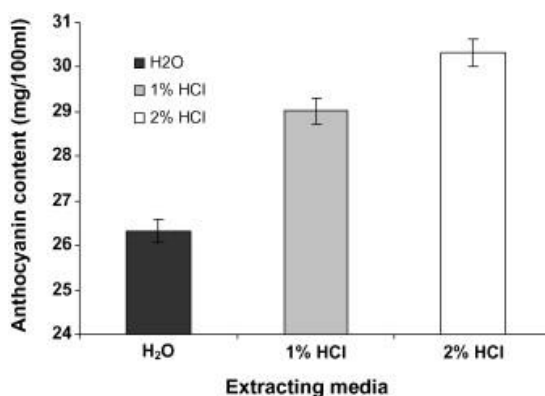
Na obrázku 9-G a 9-H je zaznamenán vliv velikosti částic na výtěžek polyfenolů. U fenolů bylo dosaženo největšího výtěžku za použití velikosti částic 0,75 a 1 mm, než za užití větších velikostí částic jako 2, 3 a 6 mm. U anthokyanů byl výsledek velmi podobný, kdy nejmenší výtěžek byl získán za použití velikosti částic 6 mm a největší při 0,75 mm²⁴.

Z této studie plyne, že faktory jako rozpouštědlo, poměr pevné látky a rozpouštědla a velikost částic patří mezi významné, zatímco čas není tak podstatným faktorem ovlivňující celkový obsah fenolů a anthokyanů. Optimální podmínky pro získání vysokých výtěžků polyfenolů činí 50% ethanol, poměr pevné látky a rozpouštědla 1:20 a velikost částic 0,75 mm²⁴.

Jeřabiny dále obsahují velké množství anthokyanů. Anthokyaniny patří mezi nejběžnější pigmenty v přírodě, které mohou být extrahovány okyselenými rozpouštědly jako je aceton s vodou⁴³, ethanol s vodou^{45,46}, methanol s vodou^{23,39,43,45,48} a voda^{45,46}. Kromě těchto běžných rozpouštědel lze použít i dichlormethan s ethanol²⁵. K rozpouštědlům se tedy přidává kyselina chlorovodíková^{23,43,46} nebo mravenčí^{39,44,48}. Anthokyaniny jsou více stabilní v kyselém prostředí při nízkých hodnotách pH než v alkalických roztocích při vyšším pH⁴⁷. V kyselém prostředí se lépe uvolňují, a navíc je zabráněno degradaci neacylovaných anthokyanových barviv^{28,44}.

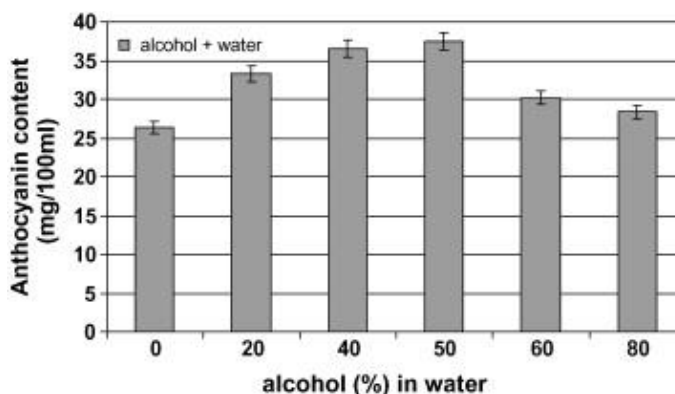
Velmi důležitý je výběr rozpouštědla při extrakci přírodních pigmentů, kdy médium by mělo extrahovat maximum pigmentu s minimálním množstvím dalších látek a se změnou cílového produktu⁴⁶. Methanol patří mezi nejběžnější a nejúčinnější rozpouštědla při extrakci

anthokyanů. Obsah anthokyanů za použití okyseleného methanolu je v průměru o 59% vyšší než za použití vodného roztoku acetonu⁴³. I když je methanol velmi efektivní, jeho nevýhodou je toxicita, tudíž je nevhodný při extrakci potravin. Aceton také není preferován, protože vyžaduje odstranění chloroformu, při kterém hrozí nebezpečí výbuchu a je škodlivý pro zdraví. Mezi přijatelná rozpouštědla při extrakci potravin je možné zařadit vodu a ethanol. Na obrázku 10 je vidět účinnost extrakce za použití čisté a okyselené vody, kdy okyselená voda je mnohem účinnější, protože kyselina stabilizuje pigmenty a snižuje pH. Obsah anthokyanů roste se zvýšením koncentrace kyseliny chlorovodíkové ve vodě, ale při extrakci potravin se doporučuje nižší koncentrace (1%)⁴⁶.



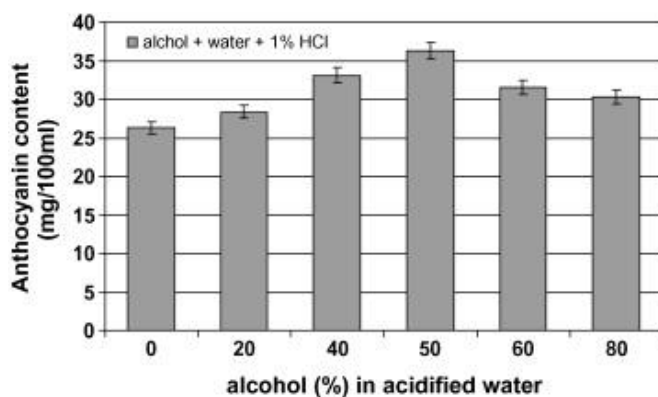
Obrázek 10 – Účinnost extrakce na obsah anthokyanů za použití vody⁴⁶

Na obrázku 11 lze sledovat vliv různě koncentrovaného ethanolu s vodou na obsah anthokyanů. 100% ethanol není preferován jako dobré rozpouštědlo, protože pro extrakci anthokyanů je zapotřebí malé množství vody. Obsah anthokyanů se zvyšuje s rostoucí koncentrací ethanolu, kdy největšího výtěžku je dosaženo při použití 50% ethanolu s vodou. Dále se se zvyšující koncentrací ethanolu výtěžek zmenšuje⁴⁶.



Obrázek 11 – Účinnost extrakce na obsah anthokyanů za použití ethanolu a vody⁴⁶

Při použití ethanolu s okyselenou vodou (obrázek 12) lze pozorovat menší změnu. Zpočátku se zvyšováním koncentrace ethanolu je výtěžek anthokyanů oproti předchozímu případu o něco menší. Největšího výtěžku je opět dosaženo za použití 50% ethanolu a dále se výtěžek zmenšuje s rostoucí koncentrací pomaleji, než tomu bylo pouze u ethanolu s neokyselenou vodou⁴⁶.



Obrázek 12 – Účinnost extrakce na obsah anthokyanů za použití ethanolu, vody a HCl⁴⁶

Jeřabiny obsahují kromě flavonoidů a anthokyanů i kyselinu askorbovou, sacharidy a organické kyseliny. Redukovaná kyselina askorbová se z jeřabin získává extrakcí vodou^{38,60} nebo kyselinou metafosforečnou s kyselinou octovou⁵⁹. Výlisky se také extrahují vodou pro získání organických kyselin⁴¹, ale i sacharidů^{23,41}. K extraktu se navíc přidává uhličitan vápenatý, suspenze se zahřívá k bodu varu, následně je ochlazená, zfiltrována a připravena k analýze⁴¹.

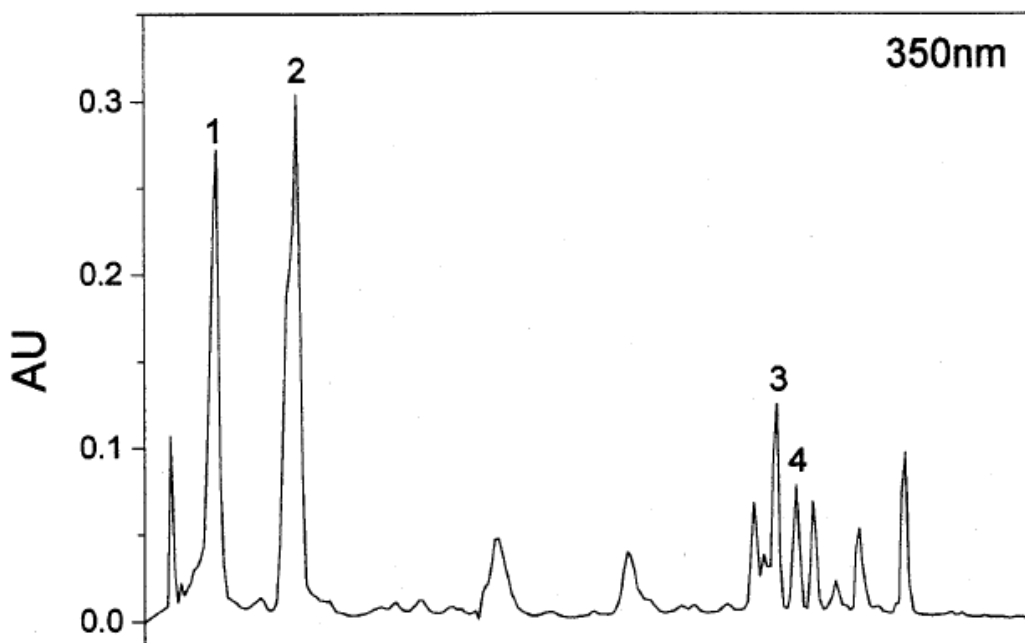
2.7.2 Separace a stanovení látek obsažených v jeřabinách

Kapalinová chromatografie patří mezi nejběžnější metody používané k identifikaci, charakterizaci a stanovení fenolických látek⁴⁹. Můžeme se setkat s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) nebo s ultra – vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (UHPLC). UHPLC je modernější metoda, která je oproti HPLC rychlejší, účinnější a spotřeba rozpouštědel je menší. HPLC se využívá jak pro kvantitativní, tak i pro kvalitativní analýzu od roku 1970⁵⁰. Využívá se k separaci přírodních látek v rostlinných materiálech ve spojení se spektrofotometrickou detekcí nebo hmotnostní spektrometrií (MS)⁵¹. Vhodný výběr kolony je jeden z důležitých faktorů při identifikaci fenolických látek²⁸. Kapalinová chromatografie flavonoidů je obvykle prováděna v systémech s obrácenými fázemi (RP) na oktadecyl nebo oktyl silikagelových kolonách při pokojové teplotě, ale občas je doporučeno i při vyšší teplotě do 40 °C kvůli snížení doby analýzy⁵².

Fenolické sloučeniny v jeřabinách jsou nejčastěji analyzovány pomocí metody HPLC s využitím hmotnostního spektrometru s ionizací elektrosprejem (ESI). Jejich přítomnost se zjišťuje porovnáním retenčních časů a jejich spekter se standardními vzorky^{37,41}. Koncentrace

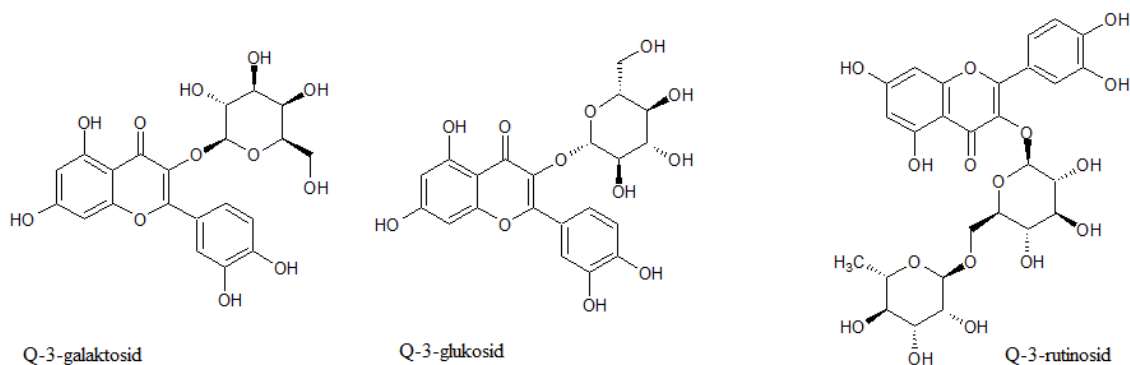
těchto látek je určována z ploch píků vzorku a odpovídajících standardů^{37,41} nebo vypočítána pomocí kalibrační křivky²⁴. Mezi nejpoužívanější mobilní fáze patří acetonitril^{24,37,40,41,53}, methanol^{42,54,58} a jejich vodné roztoky²⁸, ale lze využívat i ethanol⁵⁵, tetrahydrofuran⁵⁶ a 2-propanol⁵⁷. Další složkou mobilní fáze je kyselina mravenčí^{37,41,42}, která může být nahrazena kyselinou octovou⁴⁰ nebo kyselinou fosforečnou^{24,58}. Černá i červená jeřabina obsahuje velké množství flavonoidů³⁷.

V obou jeřabinách se vyskytuje kvercetin^{24,37,40,41,42,58}, myricetin³⁷, kaempferol^{37,42,58} a pouze v černé jeřabině isorhamnetin^{37,42}. Černá jeřabina obsahuje velké množství glykosidů kvercetinu (Q). Mezi dominantně zastoupené glykosidy patří Q-3-galaktosid^{24,37,40,41}, Q-3-glukosid^{24,37,40,41,42} a Q-3-rutinosid^{24,37,40,41,42} (obrázek 13, 14). Dále v menší míře obsahuje i Q-3-robinobiosid^{37,41}, Q-3-vicianosid^{37,41,42}, Q-3-glukuronid³⁷, Q-3-xylosid³⁷ a Q-3-arabinopyranosid³⁷. Červená jeřabina také obsahuje glykosidy kvercetinu, ale v menším množství než černá jeřabina. Oproti černé jeřabině, ale obsahuje větší množství dvou glykosidů – kvercetin dihexosid 1 a 2³⁷.



Obrázek 13 – HPLC chromatogram fenolických sloučenin černé jeřabiny:

(1) kyselina kávová, (2) kyselina kávová, (3) Q-3-galaktosid, (4) Q-3-glukosid³⁵

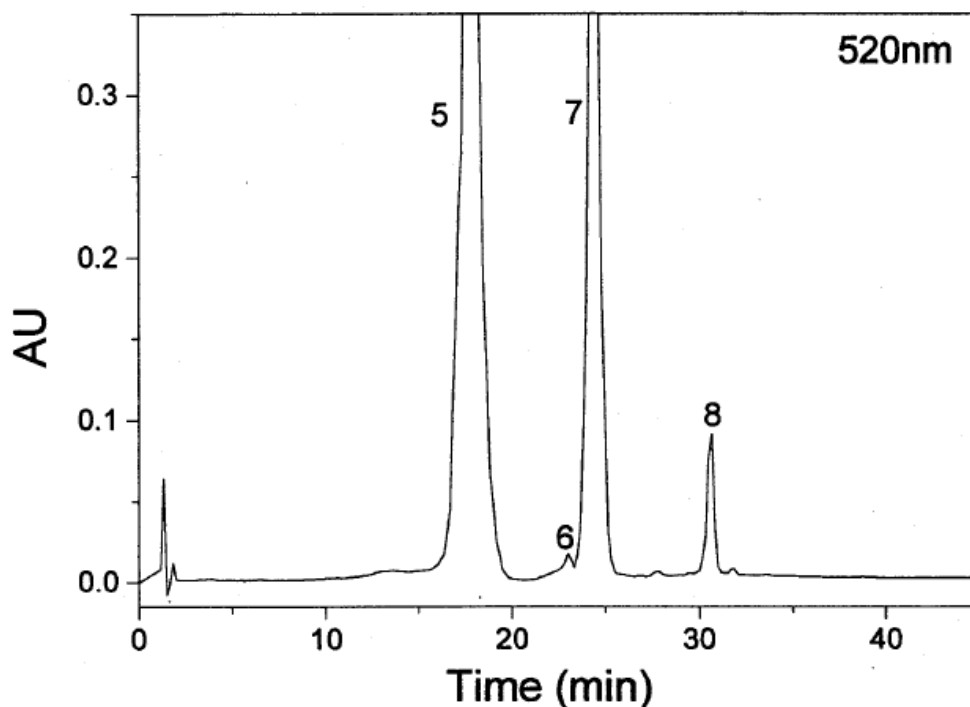


Obrázek 14 – Struktura glykosidů kvercetinu

Obsah myricetinu (M) je v obou jeřabinách oproti kvercetinu velmi malý, a navíc obsahují pouze dva glykosidy M-3-galaktosid a M-3-glukosid. Podobné je to i s obsahem glykosidů kaempferolu (K) v obou jeřabinách, kdy červená jeřabina obsahuje K-3-glukosid, K-3-rutinosid, K-3-soforosid, K-3-(6-acetyl)galaktosid a černá jeřabina pouze jeden glykosid K-3-galaktosid. Glykosidy isorhamnetinu Iso-3-galaktosid a Iso-3-glukosid obsahuje pouze černá jeřabina taktéž v malém množství³⁷.

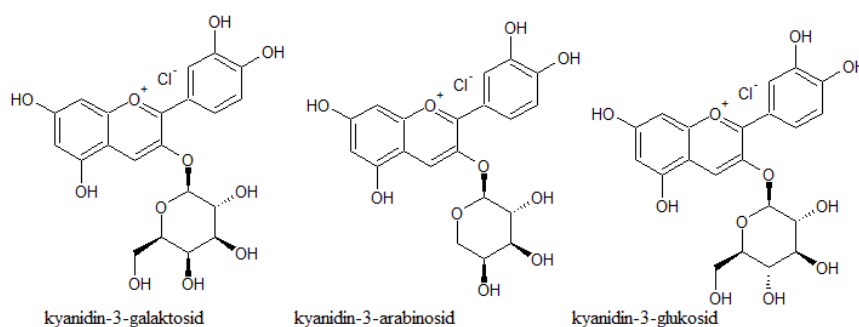
Anthokyaniny tvoří v jeřabinách druhou největší skupinu fenolických látek, které se také nejčastěji analyzují pomocí techniky HPLC²⁵. Při této metodě se velmi často využívá hmotnostní spektrometr^{25,36,41} nebo DAD detektor^{24,40,48}. Jejich přítomnost ve vzorku se také identifikuje pomocí retenčních časů a jejich porovnáním se standardními vzorky^{40,41}. Koncentrace je určena výpočtem z kalibračních křivek²⁴. Jako mobilní fáze se používá acetonitril^{24,35,36,40,41} a methanol^{25,48}. Při analýze anthokyanů se k mobilní fázi přidávají více koncentrované kyseliny kvůli snížení pH roztoku, čímž se zvýší stabilita anthokyanů⁵¹. Nejčastěji se používá 5% nebo 10% kyselina mravenčí^{24,25,35,41,48}. Dále lze použít i kyselinu octovou⁴⁰.

Jeřabiny obsahují velké množství anthokyanů a jsou hlavně směsí čtyř glykosidů²⁵. Mezi nejvíce zastoupené patří kyanidin-3-galaktosid a kyanidin-3-arabinosid, v menším množství se v jeřabinách vyskytuje kyanidin-3-glukosid a kyanidin-3-xylosid^{24,25,35,36,40,41,48} (obrázek 15, 16).



Obrázek 15 – HPLC chromatogram anthokyanů černé jeřabiny:

(5) kyanidin-3-galaktosid, (6) kyanidin-3-glukosid, (7) kyanidin-3-arabinosid, (8) kyanidin-3-xylosid³⁵



Obrázek 16 – Struktura anthokyanů

Kromě hojně zastoupených flavonoidů a anthokyanů obsahují jeřabiny i kyselinu askorbovou, tokoferoly, organické kyseliny a sacharidy. Kyselina askorbová je analyzována pomocí techniky HPLC s využitím DAD detektoru^{38,60}. Mobilní fáze je složena z methanolu^{48,60} nebo oktylaminu salicylátu³⁸. Obsah askorbové kyseliny se určuje porovnáním jejich píků s retenčním časem a UV spektrem standardu. Jeřabiny obsahují velké množství kyseliny askorbové a jsou dobrým přírodním zdrojem antioxidantů³⁸. Kromě metody HPLC lze kyselinu askorbovou analyzovat i pomocí jodometrické titrace⁶¹.

Metoda HPLC se používá i k separaci tokoferolů v jeřabinách, ale místo silikagelové kolony se využívá kolona RP-C30 a fluorescenční detektor. Mobilní fáze se skládá z acetonitrilu,

methanolu a dichlormethanu. Identifikace tokoferolů se provádí porovnáním retenčních časů se standardy. V jeřabině se vyskytuje α -tokoferol, β -tokoferol, γ -tokoferol a δ -tokoferol²³.

Výskyt organických kyselin v jeřabinách lze také analyzovat pomocí techniky HPLC za použití dihydrogenfosforečnanu draselného jako mobilní fáze. V jeřabinách se nejvíce vyskytuje kyselina galakturonová, dále kyselina jablečná a kyselina citronová. Obsah kyselin ve výliscích je mnohem menší než v dužině⁴¹.

Sacharidy se separují také pomocí metody HPLC s využitím kalciové kolony a vody jako mobilní fáze. Ke kvantifikaci se používají standardy sacharidů jako glukóza, fruktóza, sacharóza a sorbitol. Výlisky se vyznačují nízkým obsahem cukerných složek na rozdíl od dužiny. Jeřabiny nejvíce obsahují sorbitol, dále fruktózu, glukózu a sacharózu⁴¹.

Kapilární elektroforéza (CE) je další důležitou separační technikou, která se využívá k analýze fenolických sloučenin⁶². CE separuje sloučeniny založené na rozdílech v jejich elektroforetické mobilitě⁵¹. Jedná se tedy o alternativní metodu nahrazující techniku HPLC. Oproti HPLC má řadu výhod jako nízkou spotřebu vzorku, vysokou účinnost, vysoké rozlišení, kratší čas analýzy, nižší cenu a použití malého nebo žádného množství organického rozpouštědla⁶². Existují různé režimy CE, mezi které patří zónová kapilární elektroforéza (CZE) a micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)⁵². Metoda CZE je nejběžněji používanou k separaci anthokyanů a migrace konkrétních sloučenin závisí na poměru náboje k velikosti. Celkový čas migrace kladně nabitých menších molekul je delší než u molekul s nižším nábojem nebo s větší velikostí⁵¹. Důležitou součástí CE je kapilára, která je nejčastěji vyrobena z taveného oxidu křemičitého^{49,51,62,63}. Kapiláru je nutné před analýzou stabilizovat roztokem hydroxidu sodného a vodou a po každé analýze ji tímto roztokem regenerovat⁶³. Detektor, přes který prochází kapilára, je nejčastěji spektrofotometrický detektor^{49,51,52,62,63} nebo se používá i MS⁵². Elektrolytem v CE je nejčastěji borátový pufr (tetraboritan sodný) obsahující methanol^{49,51,52,62} nebo fosfátový pufr⁵².

3 ZÁVĚR

Tato práce se věnuje analýze biologicky aktivních látek v jeřabinách. Mezi tyto látky patří hlavně flavonoidy, které se vyskytují v obou jeřabinách. Před samotnou analýzou je nutné látky ze vzorku izolovat pomocí extrakce. Nejdůležitější je dosažení maximálního výtěžku a zvolení vhodných podmínek jako druh a koncentrace rozpouštědla, čas, teplota, pH, poměr rozpouštědla ke vzorku a velikost částic. Optimální podmínky pro získání vysokých výtěžků polyfenolů jsou za použití 50% ethanolu, poměru pevné látky a rozpouštědla 1:20 a velikosti částic 0,75 mm. Při extrakci fenolických látek v jeřabinách se nejčastěji používá vodná směs methanolu, ethanolu nebo acetonu s přidavkem kyseliny mravenčí nebo kyseliny chlorovodíkové. Při extrakci anthokyanů se používají okyselená rozpouštědla jako je aceton, ethanol a methanol ve směsi s vodou. Používají se více koncentrované kyseliny, protože jsou anthokyany v kyselém prostředí stabilnější a lépe se uvolňují. Při extrakci ostatních látek jako jsou organické kyseliny, sacharidy nebo kyselina askorbová se používá voda.

Flavonoidy se stanovují separačními technikami v kapalně fázi, mezi které patří kapalinová chromatografie (HPLC) a kapilární elektroforéza (CE). Flavonoidy v jeřabinách se nejčastěji analyzují pomocí metody HPLC s hmotnostním spektrometrem a ionizací elektrosprejem. Pro separaci se volí systémy s obrácenými fázemi. Mobilní fáze je nejčastěji složena z acetonitrilu nebo methanolu ve spojení s kyselinou mravenčí. U analýzy anthokyanů se používá více koncentrovaná kyselina mravenčí nebo silnější kyselina octová. Další důležitou metodou ke stanovení je i metoda CE, která se nejvíce využívá k analýze fenolických sloučenin. CE separuje sloučeniny založené na rozdílech v jejich elektroforetické mobilitě a je nejčastěji spojena se spektrofotometrickým detektorem. Kapilára je zhotovena z taveného křemene a jako elektrolyt se používá borátový pufr s přidavkem methanolu nebo fosfátový pufr.

Červená i černá jeřabina obsahuje velké množství flavonoidů. V obou jeřabinách lze nalézt kvercetin, myricetin, kaempferol a jejich glykosidy. Mezi nejvíce zastoupené patří Q-3-galaktosid, Q-3-glukosid a Q-3-rutinosid. V arónii se navíc vyskytuje i v menší míře isorhamnetin. Obě jeřabiny obsahují i velké množství anthokyanů a jsou hlavně směsí čtyř glykosidů. Mezi nejvíce zastoupené patří kyanidin-3-galaktosid a kyanidin-3-arabinosid, v menší míře kyanidin-3-glukosid a kyanidin-3-xylosid. Dále lze nalézt v černé jeřabině velké množství kyseliny askorbové a tokoferoly. V obou jeřabinách se vyskytují i organické kyseliny jako jablečná, citronová a galakturonová, dále sacharidy jako glukóza, fruktóza, sacharóza a sorbitol.

4 POUŽITÁ LITERATURA

1. KORBELÁŘ, Jaroslav, ENDRIS, Zdeněk. *Naše rostliny v lékařství*. Praha: Avicenum, 1981, 504 s. ISBN: 08-092-81.
2. JANČA, Jiří, ZENTRICH, Josef A. *Herbář léčivých rostlin 2. díl*. Praha: Eminent, 1995, 288 s. ISBN: 80-85876-04-3.
3. Dostupné z: <http://www.garten.cz/a/cz/6954-sorbus-aucuparia-edulis-jerab-ptaci/> - staženo 11. 4. 2016.
4. HOFMANN, Helga. *Stromy a keře*. Praha: Svojtka & Co., s.r.o., 2015, 256 s. ISBN: 978-80-256-1584-3.
5. LÁNSKÁ, Dagmar. *Jedlé rostliny z přírody*. Praha: Aventinum s.r.o., 2006, 223 s. ISBN: 80-86858-13-8.
6. JANČA, Jiří, ZENTRICH, Josef A. *Herbář léčivých rostlin 1. díl*. Praha: Eminent, 1994, 288 s. ISBN: 80-85876-02-7.
7. Dostupné z: http://www.ibot.cas.cz/botanika/casopis_BOTANIKA_Zajimavosti-ze-sveta-rostlin.html - staženo 14. 4. 2016.
8. ŠAPIRO, D. K. a kolektiv. *Ovoce a zelenina ve výživě člověka*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1988, 232 s. ISBN: 5-7860-0431-7.
9. JAHODÁŘ, Luděk. *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Praha: Karolinum, 2009, 264 s.
10. VELÍŠEK, Jan, HAJŠLOVÁ, Jana. *Chemie potravin I*. Tábor: OSSIS, 2009, 602 s. ISBN: 978-80-86659-12-2.
11. ŠÍCHO, Vladislav, VODRÁŽKA, Zdeněk, KRÁLOVÁ, Blanka. *Potravinářská biochemie*. Praha: SNTL, 1981, 360 s. ISBN: 04-815-81.
12. VELÍŠEK, Jan, HAJŠLOVÁ, Jana. *Chemie potravin II*. Tábor: OSSIS, 2009, 644 s. ISBN: 978-80-86659-16-9.
13. KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN: 80-863-69-07-2
14. CHURÁČEK, Jaroslav a kolektiv. *Analytická separace látek*. Praha: SNTL, 1990, 384 s. ISBN: 80-03-00569-8.

15. HOLZBECHER, Závaš, CHURÁČEK, Jaroslav a kolektiv. *Analytická chemie*. Praha: SNTL/Alfa, 1987, 664 s. ISBN: 04-612-87.
16. Dostupné z: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/2264> - staženo 19. 4. 2016
17. STARÝ, Jiří, KYRŠ, Miroslav, MARHOL, Milan a kolektiv. *Separační metody v radiochemii*. Praha: Československá akademie věd, 1975, 400 s. ISBN: 509-21-857.
18. Kolektiv autorů. *Instrumentální analýza*. Praha: SNTL/Alfa, 1986, 296 s. ISBN: 04-601-88.
19. Dostupné z: http://www.hgf.vsb.cz/export/sites/hgf2/instituty-a-pracoviste/cs/546/studijni-materialy/Navody_k_praktiku.pdf
20. Dostupné z: http://is.muni.cz/el/1431/podzim2013/C8102/um/HPLC_spec_metody.pdf
21. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/cze.html> - staženo 14. 6. 2016
22. ŠTULÍK, Karel a kolektiv. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004, 264 s. ISBN: 80-246-0852-9.
23. GRUNOVAITĚ, Lina, PUKALSKIENĖ, Milda, PUKALSKAS, Audrius, VENSKUTONIS, Petras Rimantas. Fractionation of black chokeberry pomace into functional ingredients using high pressure extraction methods and evaluation of their antioxidant capacity and chemical composition. *Journal of Functional Foods*. **2016**, 24, 85-96. ISSN: 1756-4646.
24. ČUJIĆ, Nada, ŠAVIKIN, Katarina, JANKOVIĆ, Teodora, PLJEVLJAKUŠIĆ, Dejan, ZDUNIĆ, Gordana, IBRIĆ, Svetlana. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chemistry*. **2016**, 194, 135-142. ISSN: 0308-8146.
25. BRÄUNLICH, Marie, SLIMESTAD, Rune, WANGENSTEEN, Helle, BREDE, Cato, MALTERUD, Karl E., BARSETT, Hilde. Extracts, anthocyanins and procyanidins from *Aronia melanocarpa* as radical scavengers and enzyme inhibitors. *Nutrients*. **2013**, 5, 663-678. ISSN: 2072-6643.
26. JOSEPH, Shama V., EDIRISINGHE, Indika, BURTON-FREEMAN, Britt M. Berries: Anti-inflammatory Effects in Humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2014**, 62 (18), 3886–3903. ISSN: 0021-8561.

27. SAINOVA, I., PAVLOVA, V., ALEXIEVA, B., VAVREK, I., NIKOLOVA, E., VALCHEVA-KUZMANOVA, S., MARKOVA, T., KRACHANOVA, M., DENEV, P. Chemoprotective, antioxidant and immunomodulatory in vitro effects of Aronia melanocarpa total extract on laboratory-cultivated normal and malignant cells. *Journal of BioScience and Biotechnology*. **2012**, 35-43. ISSN: 1314-6246.
28. KHODDAMI, Ali, WILKES, Meredith A., ROBERTS, Thomas H. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*. **2013**, 18 (2), 2328-2375. ISSN: 1420-3049.
29. ROUTRAY, Winny, ORSAT, Valérie. Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. *Food and Bioprocess Technology*. **2012**, 5 (2), 409-424. ISSN: 1935-5130.
30. OSASENAGA MACDONALD, Ighodaro, OLUDARE SHEDRACH, Agunbiade, OLABIYI, Akintobi. Phytotoxic and Anti-microbial activities of Flavonoids in Ocimum gratissimum. *Life Science Journal*. **2010**, 7 (3), 45-48. ISSN: 1097-8135.
31. ZHU, Hongbin, WANG, Yuzhi, LIU, Yuxuan, XIA, Yalin, TANG, Tian. Analysis of Flavonoids in Portulaca oleracea L. by UV–Vis Spectrophotometry with Comparative Study on Different Extraction Technologies. *Food Analytical Methods*. **2010**, 3 (2), 90-97. ISSN: 1936-9751.
32. MATTILA, Pirjo, ASTOLA, Jouni, KUMPULAINEN, Jorma. Determination of Flavonoids in Plant Material by HPLC with Diode-Array and Electro-Array Detections. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2000**, 48 (12), 5834-5841. ISSN: 0021-8561.
33. BIESAGA, Magdalena. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A*. **2011**, 1218 (18), 2505–2512. ISSN: 0021-9673.
34. HAGHI, Ghasem, HATAMI, Alireza. Simultaneous Quantification of Flavonoids and Phenolic Acids in Plant Materials by a Newly Developed Isocratic High-Performance Liquid Chromatography Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, 58 (20), 10812–10816. ISSN: 0021-8561.
35. ZHENG, Wei, WANG, Y. SHIOW. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Phenolics in Blueberries, Cranberries, Chokeberries, and Lingonberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51 (2), 502-509. ISSN: 0021-8561.

36. SUEIRO, L., YOUSEF, G. G., SEIGLER, D., MEJIA, E. G., GRACE, M. H., LILA, M. A. Chemopreventive Potential of Flavonoid Extracts from Plantation-Bred and Wild *Aronia melanocarpa* (Black Chokeberry) Fruits. *Journal of Food Science*. **2006**, 71 (8), C480-C488. ISSN: 1750-3841.
37. MIKULIC-PETKOVSEK, Maja, SLATNAR, Ana, STAMPAR, Franci, VEBERIC, Robert. HPLC–MSⁿ identification and quantification of flavonol glycosides in 28 wild and cultivated berry species. *Food Chemistry*. **2012**, 135 (4), 2138-2146. ISSN: 0308-8146.
38. BENVENUTI, S., PELLATI, F., MELEGARI, M., BERTELLI, D. Polyphenols, Anthocyanins, Ascorbic Acid, and Radical Scavenging Activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. *Journal of Food Science*. **2004**, 69 (3), 164-169. ISSN: 1750-3841.
39. MAYER-MIEBACH, Esther, ADAMIUK, Marta, BEHSNILIAN, Diana. Stability of Chokeberry Bioactive Polyphenols during Juice Processing and Stabilization of a Polyphenol-Rich Material from the By-Product. *Agriculture*. **2012**, 2 (3), 244-258. ISSN: 2077-0472.
40. OSZMIAŃSKI, Jan, WOJDYLO, Aneta. *Aronia melanocarpa* phenolics and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*. **2005**, 221 (6), 809-813. ISSN: 1438-2377.
41. SÓJKA, Michał, KOŁODZIEJCZYK, Krzysztof, MILALA, Joanna. Polyphenolic and basic chemical composition of black chokeberry industrial by-products. *Industrial Crops and Products*. **2013**, 51, 77-86. ISSN: 0926-6690.
42. LEE, Ji Eun, KIM, Gon-Sup, PARK, Semin, KIM, Yun-Hi, KIM, Man-Bae, LEE, Won Sup, JEONG, Sung Woo, LEE, Soo Jung, JIN, Jong Sung, SHIN, Sung Chul. Determination of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenol components using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Overall contribution to antioxidant activity. *Food Chemistry*. **2014**, 146, 1-5. ISSN: 0308-8146.
43. AWIKA, Joseph M., ROONEY, Lloyd W., WANISKA, Ralph D. Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chemistry*. **2005**, 90 (1-2), 293-301. ISSN: 0308-8146.

44. KONGA, Jin-Ming, CHIA, Lian-Sai, GOH, Ngoh-Khang, CHIA, Tet-Fatt, BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. **2003**, 64 (5), 923-933. ISSN: 0031-9422.
45. AMR, Ayed, AL-TAMIMI, E. Stability of the crude extracts of *Ranunculus asiaticus* anthocyanins and their use as food colourants. *Journal of Food Science and Technology*. **2007**, 42 (8), 985-991. ISSN: 0022-1155.
46. PANTIL, Ganapathi, MADHUSUDHAN, M.C., BABU, B. Ravindra, RAGHAVARAO, K.S.M.S. Extraction, dealcoholization and concentration of anthocyanin from red radish. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. **2009**, 48 (1), 364-369. ISSN: 0255-2701.
47. REIN, Maarit. *Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins*. Helsinki: University of Helsinki **2005**, 87 s. ISBN: 952-10-2292-2.
48. ESPÍN, Juan Carlos, SOLER-RIVAS, Cristina, WICHERS, Harry J., GARCÍA-VIGUERA, Cristina. Anthocyanin-Based Natural Colorants: A New Source of Antiradical Activity for Foodstuff. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2000**, 48 (5), 1588-1592. ISSN: 0021-8561.
49. NAVARRO, Meritxell, NÚÑEZ, Oscar, SAURINA, Javier, HERNÁNDEZ-CASSOU, Santiago, PUIGNOU, Lluís. Characterization of Fruit Products by Capillary Zone Electrophoresis and Liquid Chromatography Using the Compositional Profiles of Polyphenols: Application to Authentication of Natural Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2014**, 62 (5), 1038-1046. ISSN: 0021-8561.
50. MOTILVA, Maria-José, SERRA, Aida, MACIÀ, Alba. Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. *Journal of Chromatography A*. **2013**, 1292, 66-82. ISSN: 0021-9673.
51. WELCH, Cara R., WU, Qingli, SIMON, James E. Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization. *Current Analytical Chemistry*. **2008**, 4 (2), 75-101. ISSN: 1573-4110.
52. RIJKE, de Eva, OUT, Pieter, NIESEN, Wilfried M.A., ARIESE, Freek, GOOIJER, Cees, BRINKMAN, Udo A.Th. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*. **2006**, 1112 (1-2), 31-63. ISSN: 0021-9673.

53. QIN, C., LI, Y., NIU, W., DING, Y., ZHANG, R., SHANG, X. Analysis and Characterisation of Anthocyanins in Mulberry Fruit. *Czech Journal of Food Sciences*. **2010**, 28 (2), 117-126. ISSN: 1805-9317.
54. ZARENA, A.S., UDAYA SANKAR, K. Phenolic acids, flavonoid profile and antioxidant activity in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) pericarp. *Journal of Food Biochemistry*. **2012**, 36 (5), 627-633. ISSN: 1745-4514.
55. REICHEL, K.V., PETER, R., PAETZ, S., ROLOFF, M., LEY, J.P., KRAMMER, G.E., ENGEL, K.H. Characterization of Flavor Modulating Effects in Complex Mixtures via High Temperature Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, 58 (1), 458-464. ISSN: 0021-8561.
56. COOPER, K.A., CAMPOS-GIMENEZ, E., JIMENEZ-ALVAREZ, D., NAGY, K., DONOVAN, J.L., WILLIAMSON, G. Rapid Reversed Phase Ultra-Performance Liquid Chromatography Analysis of the Major Cocoa Polyphenols and Inter-relationships of Their Concentrations in Chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2007**, 55 (8), 2841-2847. ISSN: 0021-8561.
57. TAKENAKA, Y., MORIMOTO, N., HAMADA, N., TANAHASHI, T. Phenolic compounds from the cultured mycobionts of *Graphis proserpens*. *Phytochemistry*. **2011**, 72 (11-12), 1431-1435. ISSN: 0031-9422.
58. JAKOBEK, Lidija, ŠEGURA, Marijan, NOVAK, Ivana, MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ, Martina. Flavonols, Phenolic Acids and Antioxidant Activity of Some Red Fruits. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau: Zeitschrift für Lebensmittelkunde und Lebensmittelrecht*. **2007**, 103 (8), 1-10. ISSN: 0012-0413.
59. HERNÁNDEZ, Y., LOBO, Gloria M., GONZÁLEZ, M. Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. *Food Chemistry*. **2006**, 96 (4), 654-664. ISSN: 0308-8146.
60. SCARTEZZINI, P., ANTOGNONI, F., RAGGI, M. A., POLI, F., SABBIONI, C. Vitamin C content and antioxidant activity of the fruit and of the Ayurvedic preparation of *Embllica officinalis* Gaertn. *Journal of Ethnopharmacology*. **2006**, 104 (1-2), 113-118. ISSN: 0378-8741.
61. BALLENTINE, Robert. Determination of Ascorbic Acid in Citrus Fruit Juices. *Analytical Chemistry*. **1941**, 13 (2), 89. ISSN: 0003-2700.

62. EHALA, Sille, VAHER, Merike, KALJURAND, Mihkel. Characterization of Phenolic Profiles of Northern European Berries by Capillary Electrophoresis and Determination of their Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53 (16), 6484-6490. ISSN: 0021-8561.
63. GORBATSOVA, Jelena, LOUGAS, Tiina, VOKK, Raivo, KALJURAND, Mihkel. Comparison of the contents of various antioxidants of sea buckthorn berries using CE. *Electrophoresis*. **2007**, 28 (22), 4136-4142. ISSN: 0173-0835.