

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Analýza bioaktivních látek v cibuli

Bc. Alena Šteblová

Diplomová práce

2020

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Alena Štreblová**
Osobní číslo: **C17525**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Název tématu: **Analýza bioaktivních látek v cibuli**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

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

1. V teoretické části diplomové práce vypracujte přehled a charakteristiku bioaktivních látek, které jsou obsaženy v cibuli. Porovnejte i různé druhy cibule (klasická cibule, červená cibule, šalotka). Dále v odborné literatuře vyhledejte a popište způsob analýzy těchto látek moderními analytickými postupy.
2. Na základě rešerše navrhněte, jaké skupiny látek v cibuli budete analyzovat. K analýze využijte spektrofotometrické a chromatografické metody, jejichž podmínky optimalizujte, stejně jako způsob přípravy vzorku před vlastním stanovením. Analyzujte různé druhy cibule.
3. Získané výsledky přehledně zpracujte ve výsledkové části, řádným způsobem je okomentujte a diskutujte je s výsledky dosud publikovanými v literatuře.
4. V závěru práce zhodnotte vhodnost použití jednotlivých metod a význam stanovených látek při hodnocení kvality cibule.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Blanka Švecová, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2019**

Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 1. 7. 2020

Alena Štreblová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí této diplomové práce Ing. Blance Švecové, Ph.D. za trpělivost, ochotu, a hlavně poskytnutí cenných rad a zkušeností, které pro mě byly velmi užitečné. Dále bych chtěla poděkovat svému příteli Matějovi Černovickému, rodině a kamarádům za podporu během studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se věnuje analýze biologicky aktivních látek obsažených v různých druzích cibule. V teoretické části je popsáno chemické složení cibule a charakteristika významných bioaktivních látek v ní obsažených. Dále jsou popsány separační a spektrální metody používané ke stanovení antioxidační aktivity a jednotlivých látek obsažených v cibuli. Experimentální část je zaměřena na identifikaci těkavých látek pomocí plynové chromatografie. Dále je provedena identifikace a stanovení jednotlivých flavonoidů kapalinovou chromatografií a stanovení celkového obsahu flavonoidů a fenolických látek spektrofotometrickými metodami. Nakonec je stanovena antioxidační aktivita pomocí metod DPPH, ABTS a FRAP.

KLÍČOVÁ SLOVA

cibule, S-alk(en)ylcystein sulfoxidy, flavonoidy, anthokyaniny, kapalinová chromatografie, plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, antioxidační aktivita

TITLE

Analysis of the bioactive compounds in onion.

ANNOTATION

The aim of this thesis is the analysis of biologically active compounds contained in various kinds of onions. The chemical composition and the characteristics of important bioactive compounds contained in onion are described in the theoretical part. Separation and spectral methods used for the determination of the antioxidant activity and the individual compounds contained in the onion are briefly described, too. The experimental part is focused on the identification of volatile compounds by gas chromatography. Further, the identification and determination of flavonoids by liquid chromatography and determination of total flavonoids and phenolic compounds content using spectrophotometric methods are presented. Finally, the determination of the antioxidant activity using methods DPPH, ABTS and FRAP is performed.

KEYWORDS

onion, S-alk(en)ylcysteine sulfoxides, flavonoids, anthocyanins, liquid chromatography, gas chromatography, mass spectrometry, antioxidant activity

OBSAH

Úvod.....	12
1 Teoretická část	13
1.1 Cibule kuchyňská	13
1.1.1 Popis.....	13
1.1.2 Úprava a využití.....	13
1.2 Chemické složení cibule	15
1.2.1 Těkavé látky v cibuli.....	15
1.2.2 Fenolické látky v cibuli.....	17
1.3 Izolace bioaktivních látek	23
1.4 Chromatografické metody používané při analýze látek v cibuli.....	25
1.4.1 Kapalinová chromatografie.....	26
1.4.2 Plynová chromatografie.....	27
1.4.3 Spojení GC/MS a HPLC/MS.....	28
1.4.4 Analýza těkavých látek obsažených v cibuli	29
1.4.5 Analýza fenolických látek obsažených v cibuli.....	30
1.5 Analýza antioxidační aktivity cibule.....	31
1.5.1 Metody stanovení antioxidační aktivity.....	32
2 Experimentální část.....	34
2.1 Přístroje a zařízení.....	34
2.1.1 Plynový chromatograf.....	34
2.1.2 Kapalinový chromatograf	34
2.1.3 Spektrofotometr	34
2.1.4 Další zařízení	34
2.2 Použité chemikálie	35
2.2.1 Chemikálie.....	35
2.2.2 Standardy	36

2.3	Vzorky cibule	37
2.4	Pracovní postupy	37
2.4.1	Úprava vzorků	37
2.4.2	Podmínky analýzy těkavých látek plynovou chromatografií	37
2.4.3	Analýza vzorků kapalinovou chromatografií	38
2.4.4	Analýza vzorků spektrofotometrickými metodami	39
3	Výsledky a diskuze	43
3.1	Identifikace těkavých látek v cibuli	43
3.2	Identifikace a kvantifikace fenolických látek v cibuli	47
3.2.1	Analýza flavonoidů	47
3.2.2	Analýza anthokyanů	53
3.3	Spektrofotometrické metody	56
3.3.1	Stanovení antioxidační aktivity cibule	56
3.3.2	Stanovení celkového obsahu polyfenolických látek	63
3.3.3	Stanovení celkového obsahu flavonoidů	64
3.3.4	Stanovení celkového obsahu anthokyanů	65
	Závěr	67
	Použitá literatura	68
	Přílohy	76

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Cibule žlutá	13
Obrázek 2: Struktura S-alk(en)ylcystein sulfoxidů obsažených v cibuli.....	16
Obrázek 3: Flavan	18
Obrázek 4: Struktura glykosidů flavonolů obsažených v cibuli	19
Obrázek 5: Flavyliový kation	21
Obrázek 6: Struktura vybraných glykosidů anthokyanů obsažených v cibuli	22
Obrázek 7: Schéma techniky SPME	25
Obrázek 8: Schéma kapalinového chromatografu	26
Obrázek 9: Schéma plynového chromatografu	27
Obrázek 10: Schéma spojení GC/MS	28
Obrázek 11: Ukázkový chromatogram vzorku žluté cibule	44
Obrázek 12: Relativní zastoupení těkavých látek vzorku bílé cibule po 24 hodinách	46
Obrázek 13: Ukázkový chromatogram vzorku červené cibule extrahované v 50% MeOH.....	49
Obrázek 14: Ukázkový chromatogram vzorku červené cibule extrahované v okyseleném 80% MeOH (pH 2).....	55
Obrázek 15: Metoda DPPH – závislost absorbance roztoku na čase	57
Obrázek 16: Metoda ABTS – závislost absorbance roztoku na čase	58
Obrázek 17: Metoda FRAP – závislost absorbance roztoku na čase.....	59
Obrázek 18: Metoda DPPH – antioxidační aktivita extraktů cibule.....	59
Obrázek 19: Metoda ABTS – antioxidační aktivita extraktů cibule.....	60
Obrázek 20: Metoda FRAP – antioxidační aktivita extraktů cibule.....	61
Obrázek 21: Porovnání antioxidační aktivity extraktů cibule stanovené metodami DPPH, ABTS a FRAP	62
Obrázek 22: Celkový obsah polyfenolických látek v extraktech cibule.....	64

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Gradientová eluce při analýze flavonoidů	38
Tabulka 2: Gradientová eluce při analýze anthokyanů	39
Tabulka 3: Těkavé látky obsažené ve vzorcích cibule	43
Tabulka 4: Zastoupení těkavých látek ve vzorcích cibule	44
Tabulka 5: Gradientové eluce testované při optimalizaci separace flavonoidů.....	48
Tabulka 6: Detekční charakteristiky flavonoidů	49
Tabulka 7: Kalibrační parametry, meze detekce a stanovitelnosti standardů flavonoidů	50
Tabulka 8: Obsah jednotlivých flavonoidů v extraktech žluté cibule	50
Tabulka 9: Obsah jednotlivých flavonoidů v extraktech červené cibule.....	51
Tabulka 10: Obsah jednotlivých flavonoidů v extraktech šalotky	51
Tabulka 11: Gradientové eluce testované při optimalizaci separace anthokyanů	53
Tabulka 12: Detekční charakteristiky anthokyanů	54
Tabulka 13: Kalibrační parametry, mez detekce a stanovitelnosti kyanidin-3-glukosidu.....	55
Tabulka 14: Obsah jednotlivých anthokyanů v extraktech červené cibule a šalotky	56
Tabulka 15: Celkový obsah flavonoidů v extraktech cibule.....	65

SEZNAM ZKRATEK

AA	antioxidační aktivita
ABTS	diamonná sůl 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin -6-sulfonové kyseliny)
CAR	karboxen
CGE	ekvivalent kyanidin-3-glukosidu
CZE	zónová kapilární elektroforéza
DI-SPME	přímá mikroextrakce tuhou fází
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DVB	divinylbenzen
EI	elektronová ionizace
ESI	ionizace elektrosprejem
FRAP	metoda stanovení antioxidační aktivity založená na redukcí železitých komplexů (Ferric Reducing Antioxidant Power)
GAE	ekvivalent kyseliny galové
GC	plynová chromatografie
GC/MS	spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HPLC/MS	spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HS-SPME	headspace mikroextrakce tuhou fází
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie
QE	ekvivalent kvercetinu
PA	polyakrylát
PDMS	polydimethylsiloxan
RP-HPLC	chromatografie v systémech s obrácenými fázemi
SPME	mikroextrakce tuhou fází
TAA	celková antioxidační aktivita
TEAC	antioxidační kapacita ekvivalentu Troloxu
TPC	celkový obsah polyfenolických látek
TPTZ	2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazin

ÚVOD

Cibule kuchyňská je jedna z nejdůležitějších zemědělských plodin pěstovaných po celém světě. Existuje mnoho odrůd cibule, které se liší nejen barvou plodiny, ale i chutí. V této diplomové práci je věnována pozornost pěti druhům cibule, a to červené, žluté a bílé cibuli, šalotce a jarní cibulce. Cibule se využívá nejen v potravinářství k ochucení pokrmů v různých úpravách, ať už se jedná o čerstvou nebo sušenou cibuli, ale také v domácím léčitelství například jako domácí antibiotikum. Cibule je výborným antioxidantem, vykazuje antibakteriální a protizánětlivé účinky.

Cibule obsahuje velké množství biologicky aktivních látek. Mezi nejdůležitější patří sírné sloučeniny a flavonoidy. Sírné sloučeniny obsažené v cibuli jsou těkavé látky a jsou zastoupeny především S-alk(en)ylcystein sulfoxidy, které jsou hlavními aromatickými prekurzory. Při jejich štěpení dochází k uvolnění charakteristického zápachu a chuti cibule. Flavonoidy jsou rostlinné fenolické látky, přičemž se v cibuli vyskytují především flavonoly a anthokyany. Flavonoly dodávají určitým odrůdám cibule (např. žluté cibuli) žlutou barvu. Anthokyany jsou přírodní rostlinná barviva, která dodávají červeným odrůdám cibule (např. šalotce) červenou až fialovou barvu. Kromě těchto látek obsahuje cibule celou řadu minerálních látek a vitamínů.

K analýze biologicky aktivních látek obsažených v cibuli se využívají hlavně separační metody. Ke stanovení těkavých látek v cibuli se používá především plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Kapalinová chromatografie ve spojení se spektrofotometrickou a hmotnostní detekcí se naopak více hodí k analýze flavonolů a anthokyanů. K analýze fenolických látek lze samozřejmě využít i plynovou chromatografii, ale v tom případě je nutné látky derivatizovat. Kromě separačních metod je možné využít při analýze cibule i spektrofotometrické metody ke stanovení antioxidační aktivity, stanovení celkového obsahu polyfenolů či celkového obsahu flavonoidů a anthokyanů.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Cibule kuchyňská

1.1.1 Popis

Cibule (viz obrázek 1), latinsky *Allium cepa*, patří do čeledi liliovitých, latinsky *Liliaceae*. Řadí se mezi dvouleté až vytrvalé zeleninové plodiny. Podzemní cibule může být velká až 10 cm, má zploštělý kulovitý tvar a je složena z několika vrstev. Z podzemní cibulky vyrůstají svazčité kořeny a dlouhé, trubkovité, velmi úzké listy zelené barvy. Dále z ní vyrůstá dutá lodyha, která je ve spodní části zřetelně nafouklá a v horní části je zakončena kulovitým květenstvím bílé až světle růžové barvy. Květenství je vrcholičnaté a lze jej pozorovat převážně v červenci. Rostlina může dosahovat výšky až jednoho metru [1-3].



Obrázek 1: Cibule žlutá [4]

Cibule je jedna z nejdůležitějších a nejstarších zemědělských plodin. Je pěstována po celém světě s přibližnou produkcí 64 milionů tun, kterou překonávají už jen rajčata a melouny. První zmínky o cibuli pochází ze Střední Asie. Její pěstování a použití je známé už z období 4000 let před naším letopočtem. V historii si vojáci ve starověkém Řecku a Římu mysleli, že jim cibule dodává sílu a díky nim se dostala přes Alpy až do střední Evropy. Pro staré Egyptany představovala cibule důležitý lék. Olympijským atletům byla podávána cibule a česnek pro zlepšení sportovních výkonů a Evropané léčili pomocí cibule krevní sraženiny u koní [5-9].

1.1.2 Úprava a využití

Cibule se pěstuje na polích a zahradách ze semen nebo ze sazeček (malé cibulky). Nejlepší je slunné prostředí, díky kterému má charakteristickou jemnou a nasládlou chuť [8,10]. Ve světě se vyskytuje asi 660 odrůd cibule s různým zabarvením a chutí [3]. Podle chuti se dělí na tři skupiny, rozlišuje se ostrá, polosladká a sladká cibule. Sladkost neboli chuť cibule se určuje rovnováhou mezi úrovní štiplavosti (ostrosti) a obsahem cukru v cibuli.

Zajímavé je, že ostrá cibule může obsahovat více cukrů než sladká cibule, ale vysoká štiplavost může právě zastírat vysoký obsah cukru a nepokládá se tedy za sladkou. Polosladká cibule má srovnatelnou chuť jako ostrá, ale obsahuje méně těkavých silic. Sladká cibule se tedy vyznačuje vysokým obsahem cukru a nízkou úrovní štiplavosti [3,11,12]. Podle barvy jsou nejběžnější bílá, žlutá a červená cibule [3,5,13]. Barva plodiny souvisí s obsahem různých látek [5,14]. Sklízí se koncem července nebo na začátku srpna, když začne částečně žloutnout a zasychat nať. Před uskladněním se nechává cibule důkladně vyschnout a je možné ji skladovat až tři čtvrtě roku [10,15]. Výjimkou je zelená neboli jarní cibulka, která je vlastně nezralým druhem cibule a musí se skladovat v temnu a v chladu pouze krátkou dobu zhruba jeden týden [8].

Cibuli lze rozdělit dle užití do tří kategorií, a to na čerstvou cibuli, dehydratovanou cibuli a esenciální oleje z cibule [8,12]. Cibule je nepostradatelnou složkou jídelníčku a setkáme se s ní v každé kuchyni při přípravě nejrůznějších jídel [3,8]. Cibule zlepšuje chuť k jídlu, zvyšuje sekreci trávicích šťáv v žaludku a ve střevech, tvorbu pankreatických enzymů a žluče [1,11]. Snižuje hladinu cholesterolu a cukru v krvi, používá se při léčbě aterosklerózy a vysokého krevního tlaku [3,15,16]. Cibule je antibioticky aktivní vůči grampozitivním i gramnegativním bakteriím [1,3]. Obsahuje velké množství antioxidantů, které vykazují ochranné vlastnosti proti různým degenerativním onemocněním, jako jsou kardiovaskulární a neurologická onemocnění, rakovina a další dysfunkce založené na oxidačním stresu [7,16,17]. Dále vykazuje i protizánětlivé a antibakteriální účinky, protože obsahuje fytoncidy, což jsou látky, které ničí bakterie, plísně a jednoduché jednobuněčné organismy [1,10,11]. Nejvyšší fytoncidní aktivitu vykazují zralé cibule a vliv má i barva. Bylo prokázáno, že červená cibule má vyšší antibakteriální aktivitu než cibule bílá [11].

Šťávu z cibule lze smíchat s medem a užívat při nachlazení. Cibulovou šťávu je možné využít i na špatně se hojící a hnisavé rány. V lidovém léčitelství se používá při bodnutí hmyzem, protože zmírňuje otok a svědění, na ošetření bradavic nebo plísní na nohou či jako prevence proti vypadávání vlasů [1,3,10]. Mimo jiné má cibule afrodisiakální účinky [8]. Dále lze z čerstvé cibule připravit tinktura v lihu, která se užívá proti trichomonóze, což je onemocnění způsobené bičenkou poševní a patří mezi pohlavně přenosné infekce [1,11]. Sušená cibule se v lidovém léčitelství tolik nevyužívá, protože ztrácí svou účinnost. Výjimečně se přidává do čajových směsí [1] a téměř výhradně se používá v kuchyni jako dochucovadlo [18]. Cibuli je možné využít i při homeopatické léčbě [1].

Nevýhodou při zpracování cibule je uvolňování kyseliny propylansulfonové a silic obsahujících sloučeniny síry, které dráždí nosní sliznice a oči. Také může být mírně toxická při skladování v rozkrojeném stavu po dobu delší než 24 hodin. Cibule by se neměla používat při vředových onemocněních žaludku a dvanáctníku, akutních onemocněních žaludku a střev, jater, ledvin a močového měchýře, protože silice jsou dráždivé a mohou průběh onemocnění ztížit [1,11]. Konzumace nadměrného množství cibule na lačný žaludek může způsobit nežádoucí účinky jako plynatost, gastrointestinální symptomy (pocit pálení, průjem, nauzea atd.) a změny ve střevní mikroflóře. U některých velmi citlivých osob se mohou při užití čerstvé cibule na kůži objevit i dermatologické problémy (alergická dermatitida, puchýře a popáleniny) [3].

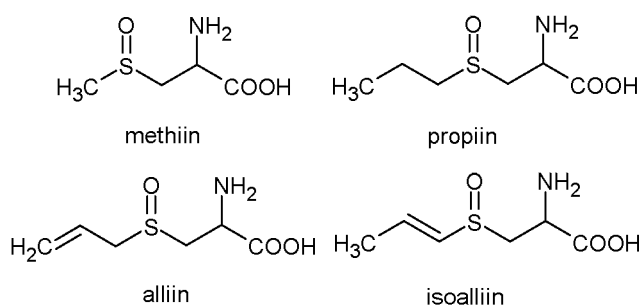
1.2 Chemické složení cibule

Složení cibule je velmi pestré. Většinu hmotnosti čerstvé cibule tvoří voda, která představuje 80 až 95 % [3,8,12]. Sušina cibule se skládá hlavně z glycidů, což jsou cukry, pektiny, vláknina a hemicelulóza. Cibule obsahuje velké množství cukrů jako např. glukózu, fruktózu, arabinózu, ribózu, sacharózu a další [1,11]. Množství cukrů závisí na odrůdě a podmínkách při pěstování [11]. Cibule obsahuje především dvě důležité skupiny látek, a to sirné sloučeniny a flavonoidy [19,20]. Mezi sirné sloučeniny patří hlavně alliin a isoalliin, které jsou prekurzory aroma [3,8]. Mezi flavonoidy nalezené v cibuli se řadí flavonoly jako kvercetin a jeho glykosidy a anthokyany, které obsahuje především červená cibule [3,8,12]. Dále cibule obsahuje i minerální látky jako je draslík, vápník, železo, mangan, zinek a kobalt či organické kyseliny (např. kyselinu citronovou) [3,11,12]. Kromě těchto látek obsahuje cibule celou řadu vitamínů, zejména vitamín C, vitamíny skupiny B (hlavně B₁ a B₂) a vitamín E [1,3,10]. V zelené nati se vyskytuje provitamin A [10,11]. Listy ani cibule neobsahují škrob, ale obsahují podobnou látku fruktan [6,11].

1.2.1 Těkavé látky v cibuli

Silice neboli etherické oleje jsou směsí těkavých látek obsažených v přírodních materiálech vyskytující se v různých částech rostlin. Silice se získávají z rostlin nejčastěji destilací s vodní párou, lisováním, extrakcí nepolárními rozpouštědly nebo méně používanou anflerází (k extrakci se používají tuky). Silice obsahují velký podíl terpenových uhlovodíků, které nemají vliv na aroma silic, ale omezují rozpustnost silic ve zředěném ethanolu a zhoršují jejich kvalitu. Odstraňují se destilací, extrakcí nebo adsorpcí na vhodný sorbent a vznikají deterpenované silice. Nositeli aroma silic jsou kyslíkaté látky jako alkoholy, aldehydy, estery a další [21].

Mezi dominantní těkavé látky v cibuli patří především sirné sloučeniny, jejichž obsah je okolo 98 % všech těkavých látek [18]. Vznikají působením enzymu allináza, který katalyzuje hydrolýzu S-alk(en)ylcystein sulfoxidů. S-alk(en)ylcystein sulfoxidy jsou hlavní aromatické prekurzory, které při štěpení enzymem uvolňují charakteristický zápach a chuť cibule [8,19,22]. Mezi nejběžnější zástupce (viz obrázek 2) se řadí S-methylcystein sulfoxid (methiin), S-propylcystein sulfoxid (propiin), S-allylcystein sulfoxid (alliin) a S-(propen-1-yl)cystein sulfoxid (isoalliin) [3,8,12]. Obsah isoalliinu je v cibuli okolo 80 % a je tedy zodpovědný za většinu chuťové chemie v cibuli [8,17].



Obrázek 2: Struktura S-alk(en)ylcystein sulfoxidů obsažených v cibuli

Enzym allináza a S-alk(en)ylcystein sulfoxidy se v neporušené tkáni cibule vyskytují v oddělených buněčných kompartmentech [8]. Allináza je glykoprotein s obsahem uhlovodíků uložený ve vakuolách [8,17,23] a S-alk(en)ylcystein sulfoxidy jsou sekundární aminokyseliny uložené v cytoplazmě [17,23]. V případě porušení tkáně cibule krájením, rozmačkáním, vařením nebo žvýkáním nastává proces hydrolýzy S-alk(en)ylcystein sulfoxidů za vzniku α -iminopropionové kyseliny a S-alk(en)ylcystein sulfenové kyseliny [8,24,25]. Obě tyto kyseliny jsou nestabilní a ihned se rozkládají. α -iminopropionová kyselina se hydrolyzuje na kyselinu pyrohroznovou a amoniak [8,19,25]. Koncentrace vzniklé kyseliny pyrohroznové se často využívá jako měřítko chuti a ostrosti cibule [3,8,12]. Slabá chuť cibule je hodnocena jako obsah cca 2 μ mol kyseliny pyrohroznové na gram cibule a silná (ostrá) chuť jako 15 až 20 μ mol kyseliny pyrohroznové na gram cibule [12]. S-alk(en)ylcystein sulfenové kyseliny se okamžitě přeskupí na tepelně nestabilní thiosulfináty, které se rozkládají za vzniku asi padesáti sloučenin obsahujících síru. Mezi tyto sloučeniny patří thiosulfonáty, mono-, di- a trisulfidy, thiofeny a specifické sirné sloučeniny např. thiopropanal sulfoxid, který je také někdy nazýván jako slzný faktor [8,24,25].

Většina sirných sloučenin se vyskytuje i v dalších druzích zeleniny stejného druhu, jako je např. česnek, a jsou zodpovědné za jejich aroma. Mezi nejvíce zastoupené látky v cibuli se řadí dipropyldisulfid, dipropyltrisulfid a propenyldisulfid. Dále se v cibuli vyskytuje

dimethylsulfid, dimethyldisulfid, dimethyltrisulfid, dipropylsulfid, dipropenylsulfid, propylensulfid, methylpropylbisulfid, methylpropyltrisulfid, 5-methyl-1,3-thiazol, 2,5-dimethylthiofen, 3,4-dimethylthiofen, 1,2,4-trithiolan, *cis*- a *trans*-methyl-1-propenylbisulfid, *cis*- a *trans*-propenylpropylbisulfid, methyl-2-propenylbisulfid a methyl-2-propenyltrisulfid [3,12,19,26]. S rostoucí teplotou (např. při sušení) se obsah látek může měnit. Například nejvíce zastoupený dipropylbisulfid z cibule téměř vymizí, ale další látky se mohou objevit jako dimethylsulfid nebo dimethyltrisulfid [18].

Dále lze v cibuli nalézt i menší množství aldehydů těkavých látek. Aldehydy v ovoci a zelenině jsou považovány za klíčové komponenty aroma [18]. Mezi aldehydy vyskytující se v cibuli patří hexanal, benzaldehyd, propanal, nonanal, nonenal, 2-methyl-2-pentenal, [E]-2-heptenal, [E]-2-oktenal, 2-methylbutanal a 3-methylbutanal [12,18,19,27]. S rostoucí teplotou při sušení se jejich obsah zvyšuje [18].

1.2.2 Fenolické látky v cibuli

Fenolické látky jsou sloučeniny nacházející se ve všech rostlinách jako jejich sekundární metabolity. Vznikají během normálního vývoje rostlin nebo také jako reakce na stresové podmínky (infekce, poranění, UV záření). V rostlinách nejsou tyto látky rovnoměrně rozmístěny. Nerozpustné fenoly se vyskytují v buněčných stěnách, zatímco rozpustné fenoly jsou umístěny ve vakuolách. Fenolické látky se dělí na fenolové kyseliny, flavonoidy, kumariny, taniny, stilbeny, ligniny a lignany. V rostlinách slouží jako antioxidanty, ochrana proti UV záření, dodávají rostlinám barvu (pigment), lákají opylovače a jiné. Jsou součástí rostlinné potravy a přispívají k jejich chuti (hořkost, trpkost), vůni či barvě. Fenolické látky jsou zdraví prospěšné látky s antioxidačními vlastnostmi a vykazují preventivní účinky proti kardiovaskulárním onemocněním, neurodegenerativním onemocněním či rakovině [28,29].

Fenolické látky lze stanovit jak spektrofotometricky, tak i pomocí separačních technik. Ke kvantifikaci různých strukturních skupin fenolických sloučenin existuje celá řada spektrofotometrických metod, mezi které patří stanovení celkového množství polyfenolických látek Folin-Ciocalteuovou či Folin-Denisovou metodou, stanovení celkového množství flavonoidů pomocí hlinité soli a dusitanu, stanovení anthokyanů pH diferenciální metodou a mnohé další [28,29].

K rozdělení a kvantifikaci fenolických látek se využívá jak kapalinová, tak i plynová chromatografie či kapilární elektroforéza (Capillary Zone Electrophoresis – CZE). Plynovou chromatografii lze využít ke stanovení fenolových kyselin a flavonoidů, ale tyto látky je třeba

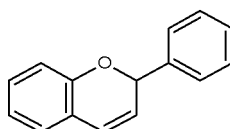
před analýzou derivatizovat např. methylací nebo přeměnou na trimethylsilyl deriváty. Na rozdíl od plynové chromatografie se kapalinová chromatografie hodí více k analýze všech fenolických látek. Obě tyto techniky se často spojují s hmotnostní spektrometrií [28-30].

Mezi nejvýznamnější skupiny fenolických látek v cibuli patří flavonoidy, anthokyany a fenolové kyseliny [7,19,31].

Stanovení celkového obsahu polyfenolických látek (Total Phenolic Content, TPC) se provádí spektrofotometricky Folin-Ciocalteuovou metodou [5]. Tato metoda je založena na redukci komplexu kyseliny fosfomolybdenanu nebo fosfowolframu fenolickými látkami v alkalickém prostředí za vzniku komplexů modrého zbarvení. Folin-Ciocalteuovo činidlo se smíchá se vzorkem v určitém poměru a nechá se vhodnou dobu reagovat v temnu. Měří se absorbance vzniklého roztoku při vlnové délce 765 nm [29,30]. Výsledky se uvádí jako ekvivalent kyseliny galové (GAE) [29,32], spíše výjimečně i jako ekvivalent rutinu [22] nebo ekvivalent kyseliny chlorogenové [33]. Celkový obsah polyfenolických látek je nejvyšší ve žluté cibuli (zhruba 750 mg/100 g), poté v červené cibuli a nejmenší v cibuli bílé (cca 390 mg/100 g) [5].

Flavonoidy

Flavonoidy jsou rostlinné fenoly, které obsahují v molekule dva benzenové kruhy spojené řetězcem tří uhlíků. Jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny 2*H*-chromenu, který je substituován fenylovou skupinou v poloze C-2 a nazývá se flavan (viz obrázek 3) [21,29,34].



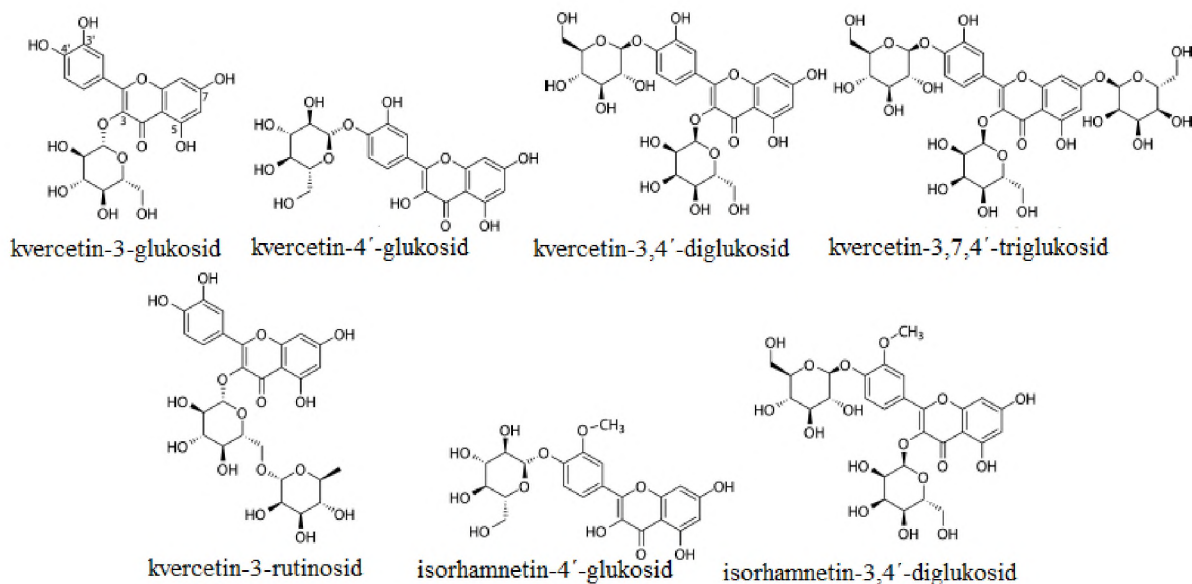
Obrázek 3: Flavan

Všechny tři kruhy mohou být substituované hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami. Jednotlivé deriváty se liší stupněm oxidace a substituce. Flavonoidy se dělí podle stupně oxidace a substituce C₃ řetězce na katechiny, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavanonoly, flavony, flavonoly, anthokyany, chalkony, dihydrochalkony a aurony [21,29,31].

Flavonoidy jsou rozsáhlou skupinou polyfenolických sloučenin s významnými biologickými účinky [5]. Mají různé funkce jako např. přírodní rostlinná barviva, chuťové látky a další [21]. Rostlinné fenoly brání rostlině proti účinkům UV záření nebo proti patogenům a parazitům [29,35]. Mimo jiné flavonoidy chrání organismus před stárnutím nebo různými

onemocněními jako je rakovina či srdeční choroby [34-36]. Vyskytují se ve všech částech rostlin, ale především v listech a ve vnějších částech rostlin (např. vnější vrstvy cibule) [37]. Jsou rozšířené jak v potravinách (ovoce, zelenina, luštěniny atd.), tak i v nápojích (káva, víno, čaj a další) a jsou tedy nedílnou součástí lidské stravy [29]. Zelenina obsahuje hlavně kvercetin a jeho glykosidy, ale v menší míře jsou přítomny i další flavonoidy jako kaempferol, luteolin a apigenin [37,38].

Cibule je jedním z hlavních zdrojů flavonoidů přijímaných ze stravy v mnoha zemích [38,39]. Pro konkrétnější představu cibule obsahuje cca 300 mg/kg kvercetinu, což je v porovnání s ostatní zeleninou a ovocem poměrně velké množství (např. brokolice obsahuje 100 mg/kg kvercetinu a jablka 50 mg/kg kvercetinu) [8,19]. V cibuli se vyskytují dvě hlavní skupiny flavonoidů, a to flavonoly a anthokyany [3,12,31]. Flavonoly jsou zodpovědné za žluté zbarvení dužiny a hnědé zbarvení slupky mnoha odrůd cibule [3,8]. Flavonoidy se v cibuli vyskytují převážně ve formě glykosidů (viz obrázek 4) [3,19]. Mezi nejznámější patří především glykosidy kvercetinu, v menší míře se pak v cibuli vyskytují i glykosidy isorhamnetinu a kaempferolu [3,19,22]. Většina glykosidů v cibuli je tvořena glukózou v pozici 4, 3 nebo 7 [3].



Obrázek 4: Struktura glykosidů flavonolů obsažených v cibuli [9]

Mezi nejběžnější flavonoly v cibuli patří kvercetin-3-rutinosid [5], kvercetin-4'-glukosid a kvercetin-3,4'-diglukosid [3,36,40]. Tyto dva glukosidy kvercetinu představují v cibuli asi 80 % obsahu všech flavonoidů [12,31,41]. Dále se v cibuli vyskytuje i samotný aglykon

kvercetin, rutin či kaempferol, isorhamnetin-4'-glukosid, isorhamnetin-3,4'-diglukosid, kvercetin-3-glukosid, kvercetin-7,4'-diglukosid, kvercetin-3,7,4'-triglukosid, [12,19,31,42].

Obsah flavonoidů se v různých druzích cibule liší a většinou klesá v pořadí červená, žlutá a bílá cibule [3,5,9], ale např. ve studii [43] byl obsah flavonoidů ve žluté cibuli větší než v červené cibuli. Červená cibule obsahuje zhruba dvojnásobek kvercetinu než cibule bílá [7,13]. Bílá cibule flavonoidy téměř neobsahuje nebo je jejich obsah velmi nízký [3,5,12]. Obsah flavonoidů ve žluté cibuli je cca 40 mg/100 g a v červené cibuli je cca 110 mg/100 g [5]. Červená cibule obsahuje velké množství polyfenolů a je doporučena ke konzumaci v čerstvém stavu (např. v salátech), protože při tepelné úpravě dochází k degradaci těchto látek. Ke ztrátě flavonoidů v cibuli během vaření dochází asi takto: 33 % při smažení, 21 % při opékání, 14 – 20 % při vaření, 14 % při napařování a 4 % při ohřívání v mikrovlnné troubě. Z tohoto vyplývá, že cibule by se měla konzumovat v čerstvém stavu nebo pouze mírně vařená, aby došlo k zachování bioaktivních látek, které jsou pro zdraví přínosné. Na rozdíl od čerstvé cibule komerčně dodávané dehydratované cibulové produkty obsahují malé množství flavonoidů [12].

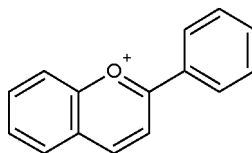
Zajímavé je, že obsah látek v cibuli se liší ve vnějších a vnitřních vrstvách cibule. Nejvyšší koncentrace flavonolů v cibuli je v suchých vnějších vrstvách, tudíž při jejím oloupaní dochází i k jejich velké ztrátě [20,44]. Množství kvercetinu v suché slupce cibule je asi 50× větší než ve vnitřních vrstvách [13]. Obsah flavonolů se tedy snižuje směrem z vnějších slupek k vnitřním a směrem z horní části do základu cibule. Důvod je ten, že se obsah flavonolů zvyšuje během stárnutí buněk cibule, které tvoří slupky cibule [9,31].

Celkový obsah flavonoidů je možné určit také spektrofotometricky při vlnové délce v rozmezí 415 nm až 430 nm jako barevnou změnu roztoku hlinité soli v přítomnosti flavonoidů. Princip této metody je založen na tvorbě stabilních komplexů chloridu hlinitého s C-3 nebo C-5 hydroxylovou skupinou flavonolů [22,45]. Výsledky se vyjadřují jako ekvivalent kvercetinu [45], rutinu [5] či katechinu [39,43].

Anthokyany

Anthokyany jsou velmi rozsáhlou skupinou přírodních rostlinných barviv modrého, červeného a fialového zbarvení, které dodávají barevnost květinám, ovoci, zelenině a dalším rostlinám [5,29,46]. Přítomnost anthokyanů v rostlinách je různá, může být od několika málo pigmentů (jahody) až po více než desítky různých pigmentů (vinná réva, borůvky) [21]. Jedná se o pigmenty rozpustné ve vodě stabilizované organickými kyselinami. Vyskytují

se v buněčných vakuolách rostlin a jsou to přirozené antioxidanty. Mají protizánětlivé a protirakovinné vlastnosti a využívají se k léčbě různých onemocnění [5]. Anthokyany jsou glykosidy různých aglykonů, které se nazývají anthokyanidiny a jsou odvozeny od flavyliového kationtu (viz obrázek 5) [46,47].

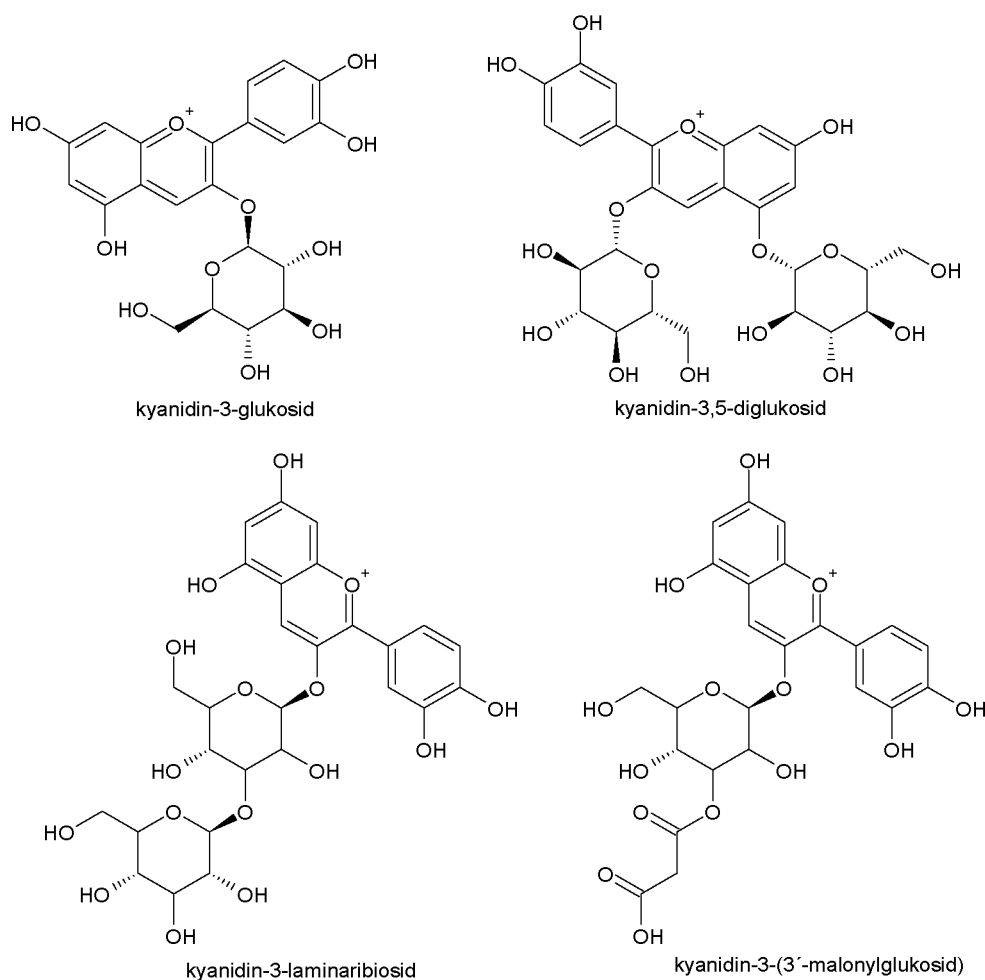


Obrázek 5: Flavyliový kation

Všechny anthokyany jsou v poloze C-4 substituovány hydroxylovou skupinou a liší se substitucí v ostatních polohách. Mezi nejvýznamnější anthokyanidiny v potravinách patří kyanidin, pelargonidin, peonidin, delphinidin, malvidin a petunidin [46,47]. Součástí struktury mohou být i sacharidy, které jsou vázány v poloze C-3. Druh cukru však nemá vliv na chemické vlastnosti konkrétního barviva [21]. Glykosidy kyanidinu, delphinidinu a pelargonidinu patří mezi nejrozšířenější v přírodě [47].

Různou barevnost cibule způsobuje primárně obsah anthokyanů ve slupkách cibulky. Anthokyany dodávají červenou až fialovou barvu červeným odrůdám cibule a vyskytují se převážně ve formě glykosidů [3,14]. Některé glykosidy jsou esterifikovány aromatickými nebo alifatickými kyselinami a jejich kombinací vzniká velká škála sloučenin. Aromatická acylace zvyšuje stabilitu anthokyanů intramolekulárním shlukováním anthokyanů s polyfenoly. Jednou z nejběžnějších forem alifatické acylace je malonylace, která je důležitá pro zvýšení rozpustnosti pigmentu ve vodě, k ochraně glykosylových skupin před enzymatickou degradací a zvýšení stability anthokyanů [14,31].

Cibule obsahuje několik druhů anthokyanů. Mezi dominantní patří kyanidin-3-glukosid [3,31,48]. Dále se v cibuli vyskytují kyanidin-3,5-diglukosid, delphinidin-3,5-diglukosid, kyanidin-3-(3''-glukosyl-6-malonylglukosid), kyanidin-3-(3''-glukosylglukosid), kyanidin-3-(6''-malonylglukosid) a kyanidin-3-laminaribiosid. Červená cibule obsahuje navíc další anthokyany jako kyanidin-3-(3'-malonylglukosid), kyanidin-3-malonyllaminaribiosid, peonidin-3-glukosid, peonidin-3,5-diglukosid, peonidin-3-malonylglukosid a kyanidin-3-dimalonyl-laminaribiosid [3,5,48]. Struktura vybraných anthokyanů je uvedena na následujícím obrázku 6.



Obrázek 6: Struktura vybraných glykosidů anthokyanů obsažených v cibuli

Obsah anthokyanů v cibuli se pohybuje v rozsahu cca 40-250 mg/kg cibule [14,44], kdy logicky je největší obsah v červené cibuli, poté ve žluté cibuli a nejmenší obsah je v bílé cibuli [5,7]. Pro představu červená cibule obsahuje zhruba 30 mg/100 g [5,19] a v bílé cibuli je obsah anthokyanů zhruba 1 – 3 mg/100 g [5,7]. Na rozdíl od flavonolů je obsah anthokyanů ve vnějších i vnitřních slupkách cibule srovnatelný [31]. Ve srovnání s ostatní zeleninou či ovocem (červené čínské zelí, ostružiny, červené hroznové víno, fialové sladké brambory a další) obsahuje cibule méně anthokyanů [5,44].

Ke stanovení celkového obsahu anthokyanů se používá pH diferenciální metoda. Tato metoda využívá výhodu strukturální přeměny anthokyanového barviva v závislosti na pH. Měří se tedy absorbance roztoku vzorku při pH 1, kdy jsou anthokyaniny ve formě barevných oxoniových solí a zároveň při pH 4,5, kdy jsou anthokyaniny přítomny v roztoku jako bezbarvé poloacetyly. Oba roztoky se proměřují při vlnových délkách 525 nm a 700 nm. Obsah anthokyanů je vyhodnocen jako rozdíl naměřených absorbancí jednotlivých roztoků vztažený

k molekulové hmotnosti a molárnímu excitačnímu koeficientu kyanidin-3-glukosidu, protože se jedná o nejběžnější anthokyan vyskytující se v přírodě [5,7,29].

Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny se dělí na dvě skupiny, a to na deriváty kyseliny benzoové (např. kyselina galová) a deriváty kyseliny skořicové (např. kyselina kumarová, kyselina ferulová a další) [29]. Mezi dominantní fenolové kyseliny červené cibule patří kyselina protokatechuová a kyselina ferulová. Kyselina *p*-hydroxybenzoová je zase dominantní v cibuli bílé. Dále se v cibuli vyskytuje např. kyselina vanilová, sinapová, anisová a některé další. Fenolové kyseliny je možné nalézt v cibuli v různých formách. Mohou být ve formě volných fenolových kyselin, esterů nebo glykosidů. Jako volné fenolové kyseliny lze nalézt v cibuli, ve velmi nízké koncentraci, kyselinu kávovou a anisovou. Kyselina *p*-kumarová a kyselina sinapová se vyskytují v cibuli převážně vázané v esterech. Celkový obsah fenolových kyselin je největší v červené cibuli (cca 6,5 mg/100 g) a nejmenší v cibuli bílé (zhruba 5,5 mg/100 g) [7].

1.3 Izolace bioaktivních látek

Izolace bioaktivních látek z rostlinného materiálu je první krok spojený s jejich analýzou a zpravidla se provádí pomocí extrakce [29,34]. Extrakce je dělicí metoda založená na přechodu složky mezi dvě navzájem nemísitelné fáze. Při extrakci se využívá různé rozpustnosti látek v různých rozpouštědlech. Výběr vhodného rozpouštědla není důležitý pouze pro extrakci, ale následně i pro chromatografickou separaci látek [49,50]. Před samotnou extrakcí je vzorek obvykle upraven mletím, drcením nebo homogenizací. Tomu může předcházet ještě sušení na vzduchu či lyofilizace [29,30,35].

K extrakci fenolických látek se nejčastěji používá extrakce rozpouštědlem zejména kvůli snadnému použití a vysoké účinnosti [29,35]. Lze využít ultrazvukovou extrakci (UAE), vysokotlakou extrakci rozpouštědlem (PFE), superkritickou fluidní extrakci (SFE) a další [29,34,35]. Kromě těchto metod lze samozřejmě k extrakci fenolických látek použít i extrakci v Soxhletově extraktoru či maceraci, ale nevýhodou jejich použití je dlouhá doba extrakce a velká spotřeba organických rozpouštědel [29,34,35].

Extrakce fenolických látek je ovlivněna chemickou povahou rostlinného materiálu a velikostí částic vzorku [28]. Výtěžek extrakce tedy závisí na typu rozpouštědla, době extrakce, množství vzorku a rozpouštědla, teplotě a na chemických a fyzikálních vlastnostech vzorku [29]. Fenolické látky mohou být extrahovány z čerstvého, zmrazeného nebo sušeného

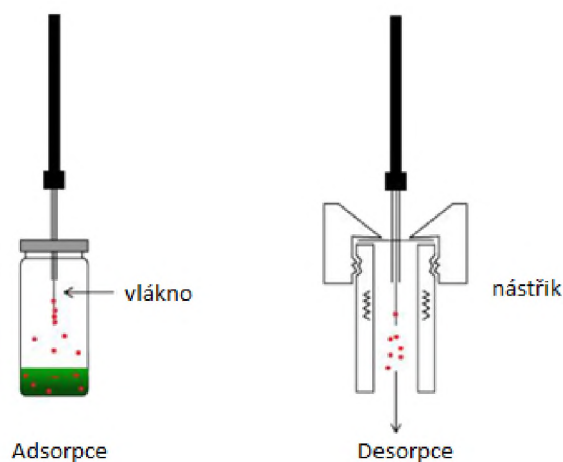
rostlinného materiálu [29]. Rozpustnost fenolických látek závisí na polaritě použitého rozpouštědla, stupni polymerace fenolických látek a dalších faktorech [28,29]. Neexistuje univerzální rozpouštědlo pro extrakci všech fenolických látek. Flavonoly a anthokyany jsou rozpustné v polárních rozpouštědlech [31,47]. Samotné aglykony jsou více rozpustné v alkoholech, ale glykosidy jsou více rozpustné ve vodě. Z tohoto důvodu jsou fenolické látky extrahovány z rostlinného materiálu v kombinaci alkoholu a vody [31]. Nejčastěji se používá methanol [28-31,34,47] nebo ethanol [28,29,31], ale využívá se i aceton [17,28,29,34], ethylacetát [28,29,35] či samotná voda [28,35]. V menší míře byl použit i propanol či dimethylformamid [28]. Rozpouštědla jsou často smíchaná v různém poměru s vodou a je možná i jejich vzájemná kombinace [28,29], např. k extrakci fenolových kyselin se využívá směs methanolu, acetonu a vody (7:7:6, v/v/v) [28]. V některých případech jsou rozpouštědla okyselená kyselinou chlorovodíkovou, která uvolňuje vázané glykosidy [28,30,39]. Optimální doba pro extrakci fenolů je do jedné hodiny, při delší době se zvyšuje riziko oxidace fenolických látek [28].

Anthokyany je potřeba extrahovat okyselenými rozpouštědly, ideálně s hodnotou pH < 2 [31]. Okyselené rozpouštědlo denaturuje buněčné membrány, současně rozpouští anthokyany a stabilizuje je [28,29]. K okyselení se používají zejména slabé kyseliny jako kyselina mravenčí [29,46,47], octová [29], fosforečná [29] a další, ale lze použít i silné kyseliny např. kyselinu chlorovodíkovou [29,44,47] či kyselinu trifluoroctovou [29], které jsou však ředěné.

K izolaci těkavých látek se využívají zejména techniky bez použití rozpouštědla jako statická nebo dynamická headspace technika, purge and trap metoda a mikroextrakce tuhou fází [51,52]. Dále je možné využít i techniky jako je sorpční extrakce na míchadle (SBSE) [52] nebo extrakce jednou kapkou (SDME). Kromě těchto metod lze použít i klasickou extrakci kapalina-kapalina, superkritickou fluidní extrakci (SFE), Soxhletovu extrakci, hydrodestilaci či ultrazvukovou extrakci [26,52,53].

K izolaci těkavých látek z cibule se nejčastěji využívá mikroextrakce tuhou fází (SPME – Solid Phase Microextraction) [26]. Tato technika byla vyvinuta Pawliszynem v roce 1990 a řadí se mezi techniky bez použití rozpouštědla, což je její velkou výhodou [54,55]. Mezi další výhody této techniky patří jednoduchost, rychlost, citlivost a nízká cena [26,53,56]. Při extrakci dochází zároveň i k zakoncentrování vzorku [26]. Důležité je optimalizovat podmínky extrakce, zejména dobu extrakce, teplotu, dobu desorpce atd. [26,52,53]. Základním principem je adsorpce složek vzorku na stacionární fázi, která

je nanesena na křemenném vlákne. Poté je vlákno vloženo do nástřikové části plynového chromatografu, kde dochází k tepelné desorpci látek (viz obrázek 7) [51,52,56].



Obrázek 7: Schéma techniky SPME [57]

Velmi tenké a křehké křemenné vlákno je potaženo tenkou polymerní vrstvou např. polydimethylsiloxanu (PDMS) [51,52,54], karboxenu (CAR) [52,54], divinylbenzenu (DVB) [52,54] nebo polyakrylátu (PA) [52,54]. Vlákno musí být správně vybrané, aby se dosáhlo vysoké selektivity a citlivosti. Každý druh vlákna lze rozeznat podle barvy jeho šroubované vrchní části. Vlákno se vkládá do kovového držáku, který vypadá jako upravená injekční stříkačka [54,55].

SPME extrakci lze použít k izolaci různých vzorků, ať už se jedná o plyn, kapalinu či tuhou látku. V zásadě je možné provést extrakci dvěma způsoby. První způsob je přímá extrakce (DI-SPME), kdy je vlákno přímo ponořeno do analytu a lze to provést pouze u plyných a kapalných vzorků [51,52]. Druhý způsob spočívá ve spojení s headspace (HS-SPME), kdy dochází k extrakci analytů v uzavřené nádobě v prostoru nad vzorkem [51,52]. Tato druhá možnost je použitelná pro vzorky všech skupenství [51].

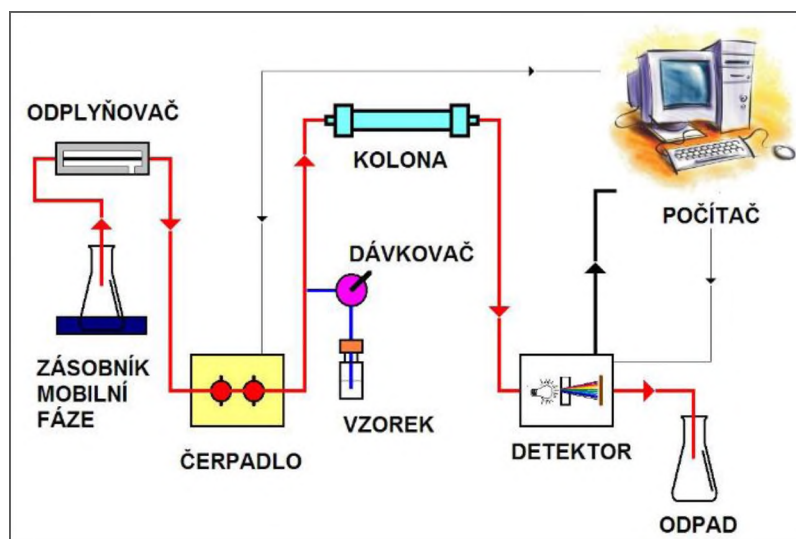
1.4 Chromatografické metody používané při analýze látek v cibuli

V cibuli je možné analyzovat různé skupiny látek např. flavonoidy, fenolové kyseliny, anthokyany nebo těkavé sírné látky (silice). K těmto analýzám se nejčastěji používají chromatografické metody. Chromatografie se řadí mezi analytické separační metody, které jsou založeny na různých fyzikálně chemických principech, při kterých dochází k ustavení rovnováhy. Dochází k dělení složek mezi dvě nemísitelné fáze – stacionární a mobilní. Stacionární fáze je umístěna v koloně a označuje se jako nepohyblivá, mobilní fáze

je pohyblivá a unáší složky vzorku kolonou. Podle skupenství mobilní fáze rozlišujeme kapalinovou a plynovou chromatografii [49,50,58].

1.4.1 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie se používá nejčastěji k dělení organických látek. Jako mobilní fáze se využívá kapalina, která rozhoduje i o separaci složek. Stacionární fáze je nejčastěji tuhá látka, případně kapalina, která je ukotvena na tuhém nosiči. Nejčastějším uspořádáním kapalinové chromatografie je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), kdy je mobilní fáze přiváděna čerpadlem za vysokého tlaku. Mobilní fáze může mít po celou dobu stejné složení (isokratická eluce) nebo se může během separace měnit (gradientová eluce) [50,58]. Schéma kapalinového chromatografu je uvedeno na obrázku 8.



Obrázek 8: Schéma kapalinového chromatografu [59]

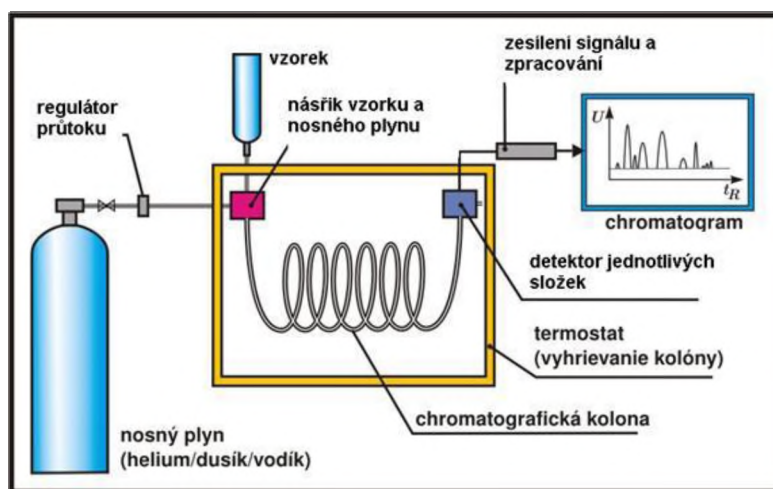
Vzorek je dávkován pomocí šesticestného ventilu s dávkovací smyčkou o různém objemu, ale dnes se mnohem častěji používají automatické dávkovače neboli autosamplery [58]. V chromatografické koloně naplněné stacionární fází dochází k vlastní separaci složek. Kolony jsou nejčastěji vyrobené z nerezové oceli, nejvíce se používají kolony o délce 50 až 150 mm, průměru 2,1 až 5 mm a naplněné sorbentem o velikosti částic 3 μm a 5 μm . Mezi nejvyužívanější stacionární fáze patří fáze s chemicky vázanými alkyly (nejčastěji oktadecyl silikagelové C18, oktyl silikagelové C8), bifenylové nebo fenylové, nitrilové, polysacharidové chirální, případně hydrofilní fáze (HILIC) a mnohé další [50,58].

Detektor zaznamenává analyty vycházející z kolony. Detektory používané v HPLC systému by měly být citlivé, univerzální, nedestruktivní a signál by neměl být závislý na složení

mobilní fáze, teplotě a průtoku. Mezi detektory používané v kapalinové chromatografii patří spektrofotometrické, fluorimetrické, elektrochemické, vodivostní a hmotnostní detektory [58].

1.4.2 Plynová chromatografie

V plynové chromatografii se jako mobilní fáze používá plyn a separované složky jsou také v plynném stavu. Pokud je vzorek kapalný, musí se zvolit taková teplota nástřiku, aby všechny složky vzorku přešly do plynného skupenství. Stacionární fáze může být tuhá látka nebo kapalina a je umístěna v náplňové nebo častěji v kapilární koloně [50,60]. Schéma plynového chromatografu je uvedeno na obrázku 9.



Obrázek 9: Schéma plynového chromatografu [61]

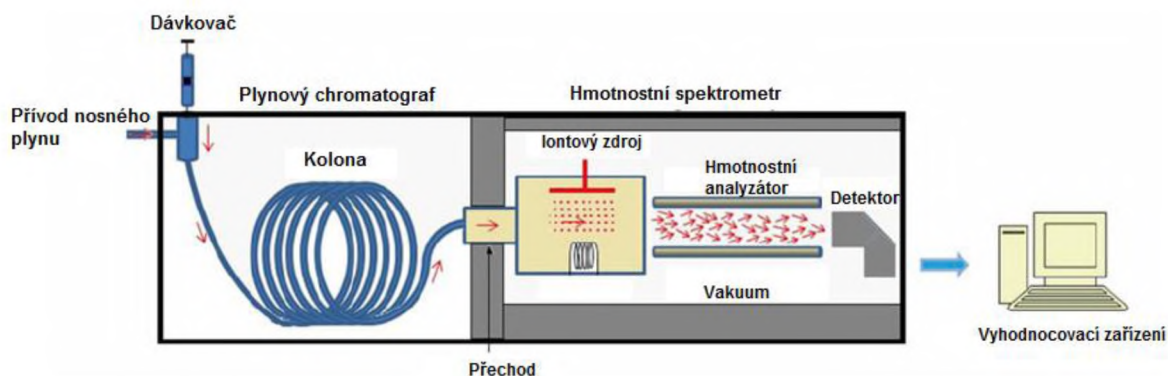
Vzorek je dávkován nejčastěji mikrostříkačkou přes septum do dávkovacího zařízení, které je vyhříváno na vhodnou teplotu. Dále je vzorek unášen proudem inertního nosného plynu do kolony. Mezi nejčastěji využívané plyny patří helium a dusík, lze využít i vodík nebo argon [50,60].

V koloně dochází k separaci složek podle vzájemné interakce mezi složkami a stacionární fází. Náplňové kolony jsou vyrobené ze skla nebo nerezové oceli a jejich délka je kolem dvou metrů a průměr 2 až 4 mm. Častěji používané kapilární kolony jsou z taveného křemene nebo skla o délce 10 až 150 m a průměru 0,05 až 0,5 mm. Jako stacionární fáze se nejčastěji používají polysiloxanové, polyethylenglykolové nebo chemicky vázané fáze na silikagelu (Durapak nebo Ultra-bond) [50,62].

Rozdělené složky vystupují z kolony a jejich množství je zaznamenáno detektorem. Mezi nejpoužívanější detektory patří plamenově-ionizační detektor (FID) a hmotnostní spektrometr (MSD). Další použitelné detektory jsou tepelně-vodivostní detektor (TCD) a detektor elektronového záchytu (ECD) [50,62].

1.4.3 Spojení GC/MS a HPLC/MS

Spojení separačních technik s hmotnostní spektrometrií (viz obrázek 10) je velmi výhodné, protože v jedné analýze lze směs látek separovat a zároveň i identifikovat. Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická technika, která slouží k převedení molekul na ionty, jejich následnému rozlišení podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a zaznamenání relativních intenzit jednotlivých iontů. K tomuto se využívá hmotnostní spektrometr, který se skládá ze tří částí – iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru [63,64].



Obrázek 10: Schéma spojení GC/MS [63]

Iontový zdroj slouží k tzv. ionizaci neboli tvorbě iontů. Ionizační techniky se dělí podle množství vnitřní energie vzniklé po ionizaci molekuly na tvrdé a měkké techniky. U tvrdých ionizačních technik získá ionizovaná molekula nadbytek vnitřní energie, což se ve spektru projevuje vznikem tzv. fragmentových iontů. Mezi tyto techniky se řadí především elektronová ionizace (EI). Oproti tomu molekula ionizovaná měkkými ionizačními technikami získá mnohem menší množství vnitřní energie. Do této skupiny patří ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), ionizace laserem za účasti matrice (MALDI) a další. Ionizace probíhá buď za sníženého tlaku, nebo za atmosférického tlaku [63,64].

Elektronová ionizace (EI) je tedy „nejtvrdší“ a nejstarší ionizační technika, při které vznikají ionty s lichým počtem elektronů (M^+). Při zavedení vzorku dojde k uvolnění valenčního elektronu emitovaným elektronem ze žhavené katody. Díky tomu vznikne radikalkationt M^+ , který je pomocí vytěšňovací elektrody vypuzen z iontového zdroje do hmotnostního analyzátoru. Nejčastěji se využívá ve spojení s plynovou chromatografií (GC/MS). Velkou výhodou je využití rozsáhlé knihovny EI spekter [64].

Ionizace elektrosprejem (ESI) je nejčastější měkká ionizační technika používaná pro spojení s kapalinovou chromatografií (HPLC/MS). Je vhodná pro látky středně polární až iontové

a pracuje za atmosférického tlaku. Při ionizaci vznikají převážně ionty se sudým počtem elektronů. Vzorek je přiveden do iontového zdroje ve formě aerosolu kovovou kapilárou, na které je vloženo vysoké napětí (3 až 5 kV). Dále je kolem kapiláry přiváděn zmlžující plyn, díky kterému obsahují kapičky aerosolu na svém povrchu velké množství nábojů. Pomocí sušícího plynu, který je zodpovědný za odpařování rozpouštědla, dochází k tzv. Coulombické explozi (rozpad na menší kapičky a rozdělení nábojů) a jejím opakováním dojde až k uvolnění iontů, které jsou elektrodami usměrněny do hmotnostního analyzátoru [64].

Dělení iontů v hmotnostním analyzátoru podle poměru m/z probíhá na základě různých fyzikálních principů, jako je např. zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli (magnetický sektorový analyzátor), různá doba rychlosti letu iontů (analyzátor doby letu, TOF) a mnohé další. Nejčastěji se ve spojení se separačními technikami využívá kvadrupólový nebo trojitý kvadrupólový analyzátor, iontová past a analyzátor doby letu [63,64].

Iontová past se skládá z prstencové elektrody a dvou koncových elektrod (vstupní a výstupní), na které je vloženo napětí. Vstupním otvorem koncové elektrody jsou přiváděny ionty krátkým napěťovým pulzem do pasti, ve které jsou zadržovány vložení určité hodnoty napětí mezi koncové elektrody a prstencovou elektrodu. Při změně napětí dochází k jejich vypuzení podle poměru m/z výstupním otvorem koncové elektrody na detektor [64].

Kvadrupólový analyzátor je tvořen čtyřmi kovovými tyčemi o stejné délce (20 až 30 cm). Na dvě protilehlé tyče je vždy vloženo kladné stejnosměrné napětí, na zbylé dvě záporné stejnosměrné napětí a dohromady na všechny tyče je vloženo vysokofrekvenční střídavé napětí. Přiváděný ion osciluje mezi tyčemi a pro určitý poměr stejnosměrného a střídavého napětí jsou oscilace stabilní pouze pro ionty o konkrétní hmotě m/z , které se dostanou na detektor. Změnou poměru obou napětí dochází postupně k propouštění i dalších iontů o určité hmotě m/z na detektor [64].

Na detektor vstupují už rozdělené ionty, ten tak slouží k jejich detekci a určení relativních intenzit jednotlivých iontů. Veškeré analyzátoři kromě Orbitrapu a FTICR využívají detektory jako je elektronový násobič, fotonásobič nebo Faradayova klec [63,64].

1.4.4 Analýza těkavých látek obsažených v cibuli

Před samotnou analýzou těkavých látek je potřeba látky z cibule izolovat. K izolaci se nejčastěji využívá HS-SPME extrakce [12,18,26,56]. Nejprve je ale třeba cibuli oloupat

a omýt v destilované vodě. Poté je cibule nakrájena na malé kousky či rozemleta [24,26,27,56]. Nakrájenou cibuli lze ještě navíc homogenizovat [26].

Po těchto krocích je možné provést extrakci zavedením SPME vlákna přes septum do vialky. Mezi nejčastěji používané sorbenty k izolaci těkavých látek z cibule patří DVB/PDMS/CAR [26], PDMS/DVB [18] nebo PDMS [56]. Je možné použití i vlákna PA [24,26] či CAR/PDMS [26], ale s menším počtem píků a nižší odezvou. Po adsorpci je vlákno převedeno do nástříkové části plynového chromatografu, kde dojde k desorpci látek.

K identifikaci těkavých látek v cibuli se nejčastěji používá spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) [12,19,26]. Těkavé látky izolované především pomocí extrakce HS-SPME jsou běžně separovány na kapilárních polysiloxanových [26,27,56] nebo polyethylenglykolových [18,19] kolonách. Jako nosný plyn se nejčastěji využívá helium a látky jsou separovány s využitím programovatelné teploty [19,26,56]. K ionizaci látek pro GC/MS analýzu se využívá elektronová ionizace (EI) při 70 eV [18,26,27]. Ke kvalitativní analýze látek obsažených v cibuli lze využít knihovnu hmotnostních EI spekter NIST [19,26,27] nebo porovnání retenčních indexů analyzovaných látek s retenčními indexy standardních látek (*n*-alkany) [18,19,26].

1.4.5 Analýza fenolických látek obsažených v cibuli

Prvním důležitým krokem spojeným s analýzou fenolických látek je úprava vzorku cibule s následnou extrakcí. Nejprve je třeba cibuli oloupat, omýt v destilované vodě a očistit. Cibule se nakrájí podélně na čtvrtky, na malé kousky nebo se rozemele [9,22,31,39-41,65]. Takto připravený vzorek lze rovnou extrahovat nebo ho před samotnou extrakcí homogenizovat. Čerstvý vzorek cibule se homogenizuje na pastu [5] nebo lze vzorek homogenizovat roztokem [19,31,38] např. methanolu s kyselinou octovou a vodou (50:5:45, v:v:v) a po určité době se odstředí [31]. Poté následuje krok extrakce.

Vzorek cibule se nejčastěji extrahuje v ultrazvukové lázni [5,19,39], ale lze použít i extrakci rozpouštědlem za laboratorní teploty [16], extrakci na magnetickém míchadle [22,39,65] nebo maceraci [48]. Metody extrakce lze i kombinovat dohromady např. nejprve extrahovat vzorek na magnetickém míchadle a poté použít ještě extrakci ultrazvukem [22,38,39]. Látky z cibule je možné extrahovat do různých rozpouštědel, ale mezi nejpoužívanější patří ethanol [5,9,20] nebo methanol [7,39,48] ve směsi s vodou. Mimo jiné může být použit i aceton ve směsi s vodou [43]. K analýze anthokyanů je zapotřebí rozpouštědlo okyselit. Nejčastěji se používá kyselina mravenčí [13,31] nebo zředěná kyselina chlorovodíková [5,7,39]. Po samotné

extrakci se vzorek odstředí a zfiltruje. Takto je extrakt připraven k analýze fenolických látek obsažených v cibuli pomocí kapalinové chromatografie a ke stanovení antioxidační aktivity.

Ke stanovení fenolických sloučenin v cibuli se nejčastěji používá metoda HPLC, která je v dnešní době nejvíce využívanou metodou analýzy [5,40]. Separace látek se běžně uskutečňuje v systémech s obrácenými fázemi (RP) na stacionárních fázích naplněných sorbentem s chemicky vázanými alkyly (nejčastěji oktadecyl silikagelové C18) [5,17,19,38]. Jako mobilní fáze se nejvíce využívá acetonitril [7,19,42] nebo methanol [14,31,48] ve směsi s okyselenou vodou [5,19,31]. Nejčastěji se používá kyselina octová [19,20] nebo mravenčí [5,31,48], ale lze použít i kyselina fosforečná [7,14] nebo kyselina trifluoroctová [37,38,40]. Při analýze anthokyanů je optimální pH okyselené vody kolem hodnoty 2, aby nedocházelo k jejich degradaci [31]. Většinou se aplikuje gradientová eluce [5,19,31]. K detekci se využívá spektrofotometrický detektor, kdy jsou flavonoly a anthokyany detekovány v rozsahu vlnových délek 200 nm až 600 nm [31,41,48]. Dále se používá i hmotnostní spektrometr s ionizací elektrosprejem (ESI) [5,41,42]. ESI patří mezi nejvyužívanější ionizační techniky při analýze fenolických látek v cibuli [5].

1.5 Analýza antioxidační aktivity cibule

Cibule obsahuje také antioxidanty, jak již bylo uvedeno výše. Antioxidanty jsou definovány jako látky, které zpomalují nebo inhibují oxidaci oxidovatelných látek eliminací volných radikálů a snížením oxidačního stresu. Oxidační stres je zodpovědný za kardiovaskulární a nádorová onemocnění [29]. Mezi významné antioxidanty patří zejména fenolické sloučeniny (flavonoidy, fenolové kyseliny apod.), které cibule obsahuje [32]. Antioxidační aktivitu (AA) lze stanovit v jednotlivých látkách vůči volným radikálům, ale většina přírodních antioxidantů se stanovuje ve směsi. Pro stanovení antioxidační aktivity směsí se používá pojem celková antioxidační aktivita (TAA), což je parametr, který vyjadřuje schopnost biologického materiálu eliminovat volné radikály [66].

Cibule má vysokou úroveň antioxidačních vlastností, které jsou spojeny s obsahem sirných sloučenin, flavonoidů a anthokyanů [14,39,65]. Červená cibule má zpravidla největší antioxidační aktivitu, a naopak nejmenší cibule bílá [5,7,30]. I když bílá cibule téměř neobsahuje flavonoidy a má malý obsah anthokyanů, tak vykazuje měřitelnou antioxidační aktivitu, která může být způsobena obsahem jiných látek, jako je např. kyselina askorbová, fenolové kyseliny, sirné sloučeniny atd. [5].

1.5.1 Metody stanovení antioxidační aktivity

Existuje asi dvacet analytických metod k určení antioxidační aktivity, které se liší použitím činidel, složením reakční směsi a dalšími podmínkami [30]. Metody stanovení antioxidační aktivity můžeme rozdělit na metody chemické a fyzikální. Chemické metody jsou založené na reakci činidla s volnými kyslíkovými radikály za vzniku barevných produktů, kdy se měří intenzita vzniklého zbarvení spektrofotometricky. Fyzikální metody jsou založené na sledování změn fyzikálních vlastností, které doprovázejí chemické reakce nebo změny obsahů jednotlivých látek [67,68]. Chemické metody lze rozdělit na metody založené na eliminaci radikálů a na metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek [66].

Metody založené na eliminaci radikálů hodnotí schopnost vzorku vychytávat volné radikály. Radikály mohou být kyslíkové (hydroxyl, peroxy) nebo synteticky stabilní (DPPH[•], ABTS^{•+}). Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek se posuzují u antioxidantů, které se chovají jako redukční činidla. Antioxidační aktivita se tedy posuzuje na základě redukční schopnosti látky. Mezi tyto metody se řadí metoda FRAP a některé elektrochemické metody [66].

Metoda DPPH

Tato metoda je jednou ze základních metod pro posouzení antiradikálové aktivity jak čistých látek, tak i směsí ve vzorku. Je založena na reakci vzorku se stabilním radikálem DPPH[•] – difenylpikrylhydrazylem, při které dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazinu). [67] Tato reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky při 517 nm jako odbarvení původně fialového roztoku radikálu na roztok žluté barvy [19,30]. Výsledek se vyjadřuje jako ekvivalent troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) nebo jako ekvivalent kyseliny askorbové [66].

Metoda ABTS

Metoda ABTS je založena na schopnosti vzorku nebo látky zhaset radikálový kation ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-ethyl-benzothiazolin-6-sulfonát) na bezbarvou formu ABTS. Radikál ABTS^{•+} se generuje v reakční směsi oxidací ABTS peroxidisíranem draselným nebo oxidem manganičitým. Výsledná antiradikálová aktivita vzorku je porovnávána s antiradikálovou aktivitou syntetické látky trolox, a proto se tato metoda také označuje jako TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Zhasení radikálu ABTS^{•+} antioxidanty se sleduje spektrofotometricky při 734 nm [30,66,67].

Metoda FRAP

Metoda FRAP je založena na principu redoxní reakce. Antioxidanty ve vzorku redukují komplex Fe^{3+} -TPTZ (Fe^{3+} -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin)). Při reakci s antioxidantem dochází k redukci Fe^{3+} -TPTZ na Fe^{2+} -TPTZ komplex modrého zbarvení. Měří se nárůst absorbance při 593 nm odpovídající množství komplexu Fe^{2+} -TPTZ [7,30,66].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje a zařízení

2.1.1 Plynový chromatograf

K separaci těkavých látek byl použit plynový chromatograf Agilent Technologies 7890A vybavený hmotnostním spektrometrem 5977A MSD (Santa Clara, CA, USA) s elektronovou ionizací a kvadrupólovým analyzátozem. K separaci analyzovaných látek byla použita kapilární kolona Rtx®-5MS o složení 5% difenyl – 95% dimethylpolysiloxan, 30 m × 0,25 mm ID, tloušťka stacionární fáze 1 μm (Restek, Bellefonte, PA, USA).

2.1.2 Kapalinový chromatograf

Analýza fenolických látek byla provedena na kapalinovém chromatografu Agilent Technologies 1100 Series LC/MSD Trap SL (Santa Clara, CA, USA) s kvartérní pumpou, autosamplerem, termostatem kolony, spektrofotometrickým a hmotnostním detektorem. Hmotnostní detektor byl vybaven iontovou pastí a k ionizaci byl použit iontový zdroj ESI. K odplynění mobilní fáze byl použit Vacuum Degasser DG 3014 (Ecom, Praha, ČR). K separaci flavonoidů a fenolových kyselin byla použita kolona Gemini 3u C18 110A, 150 × 3 mm, tloušťka stacionární fáze 3 μm. K separaci anthokyanů byla použita kolona Luna Omega PS, C18 150 × 4,6 mm, tloušťka stacionární fáze 5 μm (obě kolony Phenomenex, Torrance, CA, USA).

2.1.3 Spektrofotometr

Ke stanovení antioxidační aktivity, stanovení celkového obsahu polyfenolických látek, celkového obsahu flavonoidů a celkového obsahu anthokyanů byl použit spektrofotometr Thermo Spectronic Helios Delta (Cambridge, UK).

2.1.4 Další zařízení

- analytické váhy KERN ABT 220-4M (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo),
- ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex TK B2 a Bandelin Sonorex RK 31 (Bandelin electronic, Berlín, Německo),
- minitřepačka IKA VORTEX 1 V1 S000 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo),
- odstředivka NF 400 (Nüve, Ankara, Turecko),
- pH metr SCHOTT CG 842 (SCHOTT GLAS, Mainz, Německo),
- membránová vývěva KnF N035 AN.18 (KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Německo),

- sada automatických pipet Sartorius Proline a Biohit Proline (Helsinky, Finsko),
- vlákno na extrakci SPME: DVB/CAR/PDMS (Supelco, Bellefonte PA, USA),
- membránové filtry MCE 0,45 μm , prům. 47 mm (Fisher Scientific, Pardubice, ČR),
- stříkačkové filtry PP 0,45 μm , prům. 25 mm (Fisher Scientific, Pardubice, ČR),
nylonové 0,45 μm , prům. 13 mm a PTFE 0,45 μm , prům. 25 mm (oba Labicom s.r.o.,
Olomouc, ČR),
- běžné laboratorní sklo.

2.2 Použité chemikálie

2.2.1 Chemikálie

- demineralizovaná voda (Univerzita Pardubice, Pardubice, ČR),
- n-hexan $\geq 98\%$ (Merck KGaA, Darmstadt, Německo),
- methanol $\geq 99,9\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo),
- acetonitril pro MS $\geq 99,9\%$ (Honeywell, Seelze, Německo),
- ethanol p.a. (Penta, Praha, ČR),
- kyselina mravenčí p.a. $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo),
- kyselina octová 99% p.a. (Penta, Praha, ČR),
- kyselina chlorovodíková 35% p.a. (Penta, Praha, ČR),
- Folin-Ciocalteuovo činidlo (Penta, Praha, ČR),
- mravenčan amonný $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo),
- octan amonný (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo),
- octan sodný $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo),
- DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo),
- ABTS tablety 10 mg (diamonná sůl 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin -6-sulfonové kyseliny)), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo),
- TPTZ $\geq 98\%$ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazin), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo),
- Trolox $> 98\%$ (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), (Fluka, Buchs, Švýcarsko),
- peroxodisíran draselný $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo),
- chlorid železitý 97% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo),
- hydroxid sodný p.a. (Penta, Praha, ČR),
- hexahydrát chloridu hlinitého 99,5% (Lach-Ner, Neratovice, ČR),
- chlorid draselný (Radelkis, Budapešť, Maďarsko),

- uhličitan sodný p.a. (Penta, Praha, ČR).

2.2.2 Standardy

Anthokyany

- delfinidin chlorid $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), kyanidin chlorid $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Buchs, Švýcarsko), kyanidin-3-galaktosid $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) kyanidin-3-glukosid $\geq 98\%$ (Phytolab, Vestenbergsgreuth, Německo), peonidin chlorid $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo).

Flavonoidy

- apigenin 97% (Alfa Aesar, Kandel, Německo), arbutin $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), baicalein $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), epikatechin $> 90\%$ (Fluka, Buchs, Švýcarsko), galangin $\geq 97\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), isorhamnetin-3-O-glukosid $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), isorhamnetin-3-O-rutinosid $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), kaempferol $\geq 96\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), kaempferol-3-glukosid $\geq 90\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), kaempferol-3-rutinosid $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), katechin 98% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), kvercetin $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), kvercetin-3-glukosid $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Buchs, Švýcarsko), kvercitrin $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), luteolin (Alfa Aesar, Kandel, Německo), rutin 95% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo).

Fenolové kyseliny

- kyselina *p*-anisoová $> 99\%$ (TCl, Tokio, Japonsko), kyselina elagová $> 96\%$ (Fluka, Buchs, Švýcarsko), kyselina ferulová 99% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), kyselina galová $> 98\%$ (Fluka, Buchs, Švýcarsko), kyselina gentisová $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), kyselina *p*-hydroxybenzoová $> 99\%$ (Fluka, Buchs, Švýcarsko), kyselina chlorogenová $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), kyselina kávová 99% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), kyselina *p*-kumarová $> 98\%$ (Fluka, Buchs, Švýcarsko), kyselina protokatechuová $> 97\%$ (Fluka, Buchs, Švýcarsko), kyselina sinapová $> 97\%$ (Fluka, Buchs, Švýcarsko), kyselina syringová $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), kyselina vanilová $> 97\%$ (Fluka, Buchs, Švýcarsko).

2.3 Vzorky cibule

Veškeré vzorky byly nakoupeny v obchodním řetězci Globus ČR, v.o.s.

- Cibule žlutá, původ Slovensko,
- Cibule červená, původ Slovensko,
- Cibule bílá, původ Itálie,
- Cibule šalotka, původ Francie,
- Jarní cibulka (zelená), původ Itálie.

2.4 Pracovní postupy

2.4.1 Úprava vzorků

Vzorky cibule byly vždy nejprve oloupany, omyty a nakrájeny na drobné kousky. Ihned po nakrájení cibule byly veškeré vzorky extrahovány. Pro analýzu plynovou chromatografií byla využita HS-SPME extrakce. Pro přípravu extraktů pro stanovení antioxidační aktivity, celkového obsahu polyfenolických látek, celkového obsahu flavonoidů, celkového obsahu anthokyanů a analýzu kapalinovou chromatografií byla použita extrakce ultrazvukem.

HS-SPME extrakce

Vialka o velikosti 20 ml byla naplněna nadrobno nakrájenou cibulí zhruba do poloviny jejího objemu a uzavřena víčkem se septem. Přes septum bylo do vialky těsně nad vzorek zavedeno šedé vlákno se směsným sorbentem DVB/CAR/PDMS a při laboratorní teplotě probíhala adsorpce těkavých látek na vlákno po dobu 15 minut. Následně bylo vlákno z vialky vytaženo a vloženo do nástřikové části plynového chromatografu, kde došlo k desorpci látek při teplotě 250 °C po dobu 2 minut.

Extrakce ultrazvukem

K 5 g vzorku cibule bylo přidáno 10 ml rozpouštědla (okyselená voda na hodnotu pH 2, 50% methanol, 80% methanol a methanol). Pro extrakci anthokyanů byla navíc všechna rozpouštědla okyselená kyselinou mravenčí na hodnotu pH 2. Následně byl vzorek cca 1 minutu vortexován a vloženo do ultrazvukové lázně, kde byl extrahován po dobu 15 minut. Poté byl získaný extrakt zfiltrován přes stříkačkový filtr nylonový, PP či PTFE podle příslušného rozpouštědla.

2.4.2 Podmínky analýzy těkavých látek plynovou chromatografií

Jako nosný plyn bylo použito helium čistoty 5.0 (Linde Gas a.s., Pardubice, ČR) s průtokem 1 ml/s. Teplota nástřiku byla 250 °C a počátek teplotního gradientu byl nastaven na 40 °C.

Následně se teplota zvyšovala rychlostí 6 °C/min na 250 °C (5 minut) a celková doba analýzy byla 40 minut. K detekci byl použit hmotnostní detektor nastavený v rozsahu m/z 35-500 s elektronovou ionizací za použití ionizační energie 70 eV. Dále byl nastaven gain faktor na hodnotu 1.0, izolační šířka m/z na 0,1 a frekvence skenování na 5,9 skenů za sekundu. Teplota iontového zdroje byla nastavena na 230 °C a teplota hmotnostního analyzátoru na 150 °C. Za těchto podmínek byly analyzovány všechny vzorky připravené pomocí extrakce HS-SPME, jak je uvedeno výše.

2.4.3 Analýza vzorků kapalinovou chromatografií

Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla složena z demineralizované vody s přidavkem kyseliny mravenčí (MF A) a acetonitrilu (MF B). Pro analýzu flavonoidů byla MF A okyselená na hodnotu pH 3 a pro analýzu anthokyanů byla okyselená na hodnotu pH 1,8. Následně byla takto připravená mobilní fáze zfiltrována přes membránový filtr MCE 0,45 µm.

Příprava standardních roztoků a kalibračních řad

Zásobní roztoky kvercetinu, isorhamnetin-3-glukosidu a kyanidin-3-glukosidu o koncentraci 1000 mg/l byly připraveny rozpuštěním příslušné navážky v methanolu (resp. v 80% methanolu okyseleného kyselinou mravenčí na hodnotu pH 2 u posledního standardu) v odměrné baňce. Z těchto zásobních roztoků byly dále připraveny sedmibodové kalibrační řady v rozsahu 0,5 – 15 mg/l.

Podmínky chromatografické analýzy

Mobilní fáze pro analýzu flavonoidů byla složena z demineralizované vody okyselené na hodnotu pH 3 kyselinou mravenčí (MF A) a acetonitrilu (MF B). Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min, objem dávkovaného vzorku byl 10 µl a kolona Gemini 3u C18 110A (150 × 3 mm, 3 µm) byla vyhřívána na teplotu 35 °C. Gradientová eluce je uvedena v následující tabulce 1.

Tabulka 1: Gradientová eluce při analýze flavonoidů

čas [min]	MF A [%]	MF B [%]
0	90	10
25	80	20
40	40	60

Flavonoidy byly detekovány spektrofotometricky při vlnové délce 254 nm a hmotnostním detektorem. Hmotnostní detektor byl nastaven na cílovou hmotu m/z 463. Jako iontový zdroj

byla použita ionizace elektrosprejem (ESI) a měření probíhalo v negativním módu. Zmlžovač byl nastaven na hodnotu 50 psi, průtok sušícího plynu na 9 ml/min, sušící teplota na 350 °C, rozsah skenovaných hmot na 100-1000 m/z , trap target na 20 000, max acu time na 50 ms, trap drive level na 100 % a stabilita sloučeniny na 100 %.

Mobilní fáze pro analýzu anthokyanů byla složena také z acetonitrilu (MF B) a z demineralizované vody okyselené kyselinou mravenčí, ale na hodnotu pH 1,8 (MF A). Průtok mobilní fáze byl 0,7 ml/min, objem dávkovaného vzorku byl 10 μ l a kolona Luna Omega PS, C18 (150 \times 4,6 mm, 5 μ m) byla vyhřívána na teplotu 40 °C. Gradient je uveden v následující tabulce 2.

Tabulka 2: Gradientová eluce při analýze anthokyanů

čas [min]	MF A [%]	MF B [%]
0	90	10
15	82	18
20	60	40
25	30	70

Anthokyanany byly detekovány spektrofotometricky při vlnové délce 520 nm a hmotnostním detektorem. Hmotnostní detektor byl nastaven na cílovou hmotu m/z 500. Jako iontový zdroj byla použita ionizace elektrosprejem (ESI) a měření probíhalo v pozitivním módu. Zmlžovač byl nastaven na hodnotu 58 psi, průtok sušícího plynu na 9 ml/min, sušící teplota na 350 °C, rozsah skenovaných hmot na 200-1000 m/z , trap target na 20 000, max acu time na 50 ms, trap drive level na 100 % a stabilita sloučeniny na 100 %.

2.4.4 Analýza vzorků spektrofotometrickými metodami

Metoda DPPH

Do 500 ml odměrné baňky bylo naváženo 12,5 mg DPPH a doplněno methanolem po rysku. Z takto připraveného roztoku radikálu byly odpipetovány 3 ml do zkumavky s víčkem. Dále bylo přidáno 200 μ l extraktu (podle potřeby různě ředěného) a směs byla promíchána. Roztok se nechal reagovat za laboratorní teploty bez přístupu světla po dobu 30 minut a poté byl změřen úbytek absorbance při vlnové délce 517 nm. Stejným způsobem byl proměřen slepý pokus i roztoky kalibrační řady standardní látky trolox. Ze zásobního roztoku troloxu v methanolu o koncentraci 10 mmol/l byla připravena kalibrační řada v rozsahu 0,01 – 0,2 mmol/l.

Pro vyhodnocení antioxidační aktivity pomocí metody DPPH je potřeba vypočítat úbytek absorbance ΔA [%] podle následujícího vztahu:

$$\Delta A [\%] = \frac{A_0 - A}{A_0} \cdot 100$$

Rovnice 1: Úbytek absorbance DPPH

- A_0 – absorbance slepého vzorku,
- A – absorbance vzorku v čase ($t = 30$ min).

Metoda ABTS

Roztok radikálu ABTS^{•+} byl připraven rozpuštěním tablety ABTS (10 mg) v 5 ml destilované vody. Dále bylo přidáno 100 μ l peroxodisíranu draselného o koncentraci 0,064 mol/l a vzniklý roztok se nechal cca 16 hodin reagovat za laboratorní teploty bez přístupu světla do tmavě zeleného zbarvení. Po reakci bylo odebráno 2,5 ml tohoto roztoku do 100 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku. Z takto připraveného roztoku radikálu ABTS^{•+} byly odpipetovány 3 ml do zkumavky s víčkem, přidalo se 200 μ l extraktu (podle potřeby různě ředěného) a směs byla promíchána. Roztok se dále nechal reagovat po dobu 40 minut bez přístupu světla za laboratorní teploty. Úbytek absorbance byl změřen při vlnové délce 734 nm. Stejným způsobem byl proměřen slepý pokus a roztoky kalibrační řady troloxu, která byla použita ve stejném rozsahu jako u metody DPPH.

Úbytek absorbance ΔA [%] pro vyhodnocení antioxidační aktivity metodou ABTS se počítá stejně jako u metody DPPH (viz rovnice 1). Změna je pouze v čase reakce ($t = 40$ min) u absorbance vzorku A .

Metoda FRAP

Reakční směs na metodu FRAP byla složena z vodného roztoku FeCl₃ o koncentraci 20 mmol/l, roztoku TPTZ o koncentraci 10 mmol/l, rozpuštěného v kyselině chlorovodíkové o koncentraci 40 mmol/l, a octanového pufru o koncentraci 0,3 mol/l. Roztoky byly smíchány v poměru 1:1:10. Z tohoto reakčního roztoku byly odpipetovány 3 ml do zkumavky s víčkem, dále bylo přidáno 200 μ l extraktu (podle potřeby různě ředěného) a směs byla promíchána. Roztok se nechal reagovat za laboratorní teploty bez přístupu světla po dobu 30 minut a poté byla změřena absorbance při vlnové 593 nm. Slepý pokus a kalibrační řada troloxu byly proměřeny za stejných podmínek.

Pro vyhodnocení antioxidační aktivity metodou FRAP je třeba vypočítat nárůst absorbance ΔA podle následujícího vztahu:

$$\Delta A = A - A_0$$

Rovnice 2: Nárůst absorbance FRAP

- A_0 – absorbance slepého vzorku,
- A – absorbance vzorku v čase ($t = 30$ min).

Stanovení celkového obsahu polyfenolických látek (TPC)

Do zkumavky s víčkem byl předložen 1 ml extraktu, 1 ml 95% ethanolu, 5 ml destilované vody a 0,5 ml Folin-Ciocalteuova činidla (1 M roztok). Po 5 minutách stání byl přidán 1 ml 5% roztoku uhličitanu sodného a směs byla protřepána. Následně se směs nechala po dobu 30 minut reagovat při laboratorní teplotě. Poté byla změřena absorbance roztoku při vlnové délce 765 nm. Za stejných podmínek byl proměřen i slepý vzorek a kalibrační řada kyseliny galové v rozsahu 5 – 150 $\mu\text{g/ml}$. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent kyseliny galové (GAE).

Stanovení celkového obsahu flavonoidů

Ke stanovení celkového obsahu flavonoidů byl nejprve připraven zásobní roztok 2% chloridu hlinitého v ethanolu. Do zkumavky s víčkem byl odpipetován 1 ml extraktu (podle potřeby různě ředěného) a 1 ml roztoku AlCl_3 . Směs byla promíchána a nechala se reagovat po dobu 30 minut za laboratorní teploty. Poté byla změřena absorbance roztoku při vlnové délce 420 nm. Stejným způsobem byl proměřen slepý pokus a kalibrační řada standardu kvercetinu, na který byly vztaženy výsledky. Kalibrační řada kvercetinu byla připravena v rozsahu 0,5 – 50 $\mu\text{g/ml}$.

Stanovení celkového obsahu anthokyanů

Ke stanovení celkového obsahu anthokyanů pH diferenciální metodou byly nejprve připraveny roztoky chloridu draselného a octanu sodného, oba o koncentraci 0,2 mol/l. Dále bylo pH roztoku chloridu draselného upraveno kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 1 (pufr pH 1) a pH roztoku octanu sodného na hodnotu 4,5 (pufr pH 4,5). Do 5 ml odměrné baňky byl pipetován 1 ml extraktu, který byl doplněn pufrům o pH 1. Do druhé 5 ml odměrné baňky byl také přidán 1 ml extraktu, ale byl doplněn pufrům o pH 4,5. Baňky byly promíchány a oba roztoky ihned změřeny spektrofotometricky při vlnových délkách 525 nm a 700 nm. Obsah anthokyanů je vyhodnocen jako rozdíl naměřených absorbancí jednotlivých roztoků a vztažen

k molekulové hmotnosti a molárnímu excitačnímu koeficientu kyanidin-3-glukosidu dle následujícího vztahu:

$$m_{ANT} [mg/l] = \frac{[(A_{525} - A_{700})_{pH_1} - (A_{525} - A_{700})_{pH_{4,5}}] \cdot M \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l} \cdot D_F$$

Rovnice 3: Výpočet obsahu anthokyanů pH diferenciální metodou

- A – absorbance vzorku při dané vlnové délce a pH,
- M – molární hmotnost kyanidin-3-glukosidu – 449,2 g/mol,
- D_F – zředovací faktor,
- ε – molární absorpční koeficient – 26 900 dm³·cm⁻¹·mol⁻¹,
- l – délka kyvety – 1 cm.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

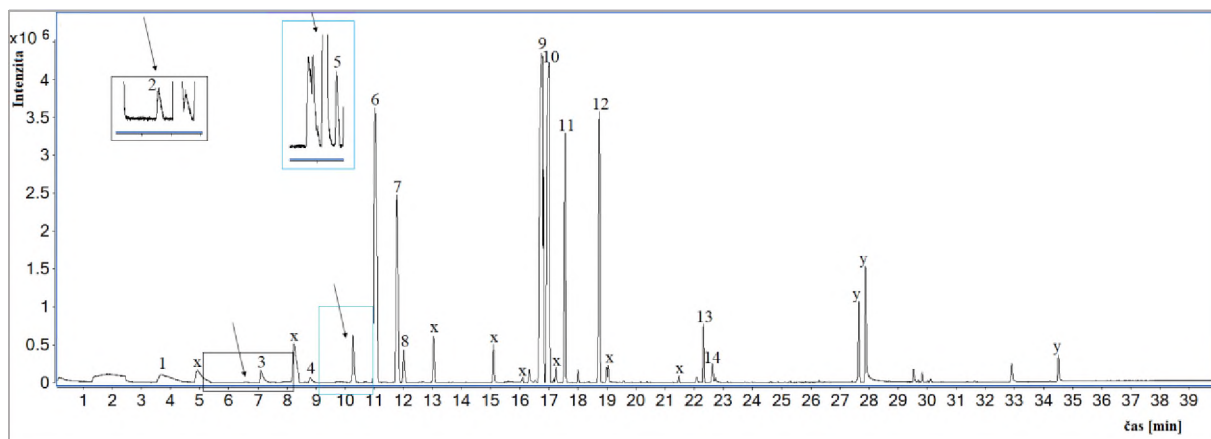
3.1 Identifikace těkavých látek v cibuli

K analýze těkavých látek obsažených v cibuli byly nejprve zvoleny podmínky chromatografické separace podle diplomové práce M. Machové [69], které byly dále upraveny dle potřeby. Výsledné podmínky jsou uvedeny v kapitole 2.4.2 a byly použity k analýze všech pěti druhů cibulí upravených podle postupu popsaného v kapitole 2.4.1. Látky v cibuli byly identifikovány na základě hmotnostních EI spekter pomocí knihovny NIST. Tento software umí vyhodnotit nalezené struktury procentuálně jako míru pravděpodobnosti toho, že se jedná o určitou látku. Identifikace látek ve vzorku byla považována za platnou, pokud byla hodnota pravděpodobnosti vyšší než 65 %. V následující tabulce 3 jsou uvedeny všechny těkavé látky nalezené ve vzorcích cibule, jejich retenční časy a sumární vzorce.

Tabulka 3: Těkavé látky obsažené ve vzorcích cibule

Číslo	Retenční čas [min]	Látka	Sumární vzorec	Druh cibule
1	3,7	propanthiol	C_3H_8S	všechny druhy
2	6,5	dimethyldisulfid	$C_2H_6S_2$	žlutá, jarní
3	7,1	thiopropenal sulfoxid	C_3H_6OS	všechny druhy
4	8,8	2-methyl-2-pental	$C_6H_{10}O$	všechny druhy
5	10,7	allyl n-propylsulfid	$C_6H_{12}S$	žlutá, červená, bílá, jarní
6	11	3,4-dimethylthiofen	C_6H_8S	všechny druhy
7	11,8	methylpropylsulfid	$C_4H_{10}S_2$	všechny druhy
8	12	methylpropenylsulfid	$C_4H_8S_2$	všechny druhy
9	16,7	dipropylsulfid	$C_6H_{14}S_2$	všechny druhy
10	17	propenylpropylsulfid	$C_6H_{12}S_2$	všechny druhy
11	17,5	2-merkapt-3,4-dimethyl-2,3-dihydrothiofen	$C_6H_{10}S_2$	všechny druhy
12	18,7	2-merkapt-3,4-dimethyl-2,3-dihydrothiofen	$C_6H_{10}S_2$	všechny druhy
13	22,3	dipropyltrisulfid	$C_6H_{14}S_3$	všechny druhy
14	22,6	3,5-diethyl-1,2,4-trithiolan	$C_6H_{12}S_3$	všechny druhy
15	22,7	di-2-propenyltrisulfid	$C_6H_{10}S_3$	červená, bílá, šalotka

Na následujícím obrázku 11 je znázorněn ukázkový chromatogram analýzy vzorku žluté cibule.



Obrázek 11: Ukázkový chromatogram vzorku žluté cibule

(1) propanthiol, (2) dimethyldisulfid, (3) thiopropanal sulfoxid, (4) 2-methyl-2-pentenal, (5) allyl n-propylsulfid, (6) 3,4-dimethylthiofen, (7) methylpropylsulfid, (8) methylpropenyldisulfid, (9) dipropylsulfid, (10) propenylpropylsulfid, (11) 2-merkpto-3,4-dimethyl-2,3-dihydrothiofen, (12) 2-merkpto-3,4-dimethyl-2,3-dihydrothiofen, (13) dipropyltrisulfid, (14) 3,5-diethyl-1,2,4-trithiolan, (x) siloxany (z kolony), (y) fthaláty (z prostředí)

Podmínky analýzy: kolona Rtx®-5MS o složení 5% difenyl – 95% dimethylpolysiloxan, (30 m × 0,25 mm ID, 1 μm), nosný plyn helium, průtok 1 ml/s, teplota nástřiku 250 °C, teplotní program počátek 40 °C, následně 6 °C/min na 250 °C (5 minut), MS detekce EI 70 eV.

Všech patnáct látek bylo zpravidla identifikováno ve všech cibulích s výjimkou dimethyldisulfidu, který obsahovala pouze žlutá cibule a jarní cibulka, ale tyto dvě cibule zase neobsahovaly di-2-propenyltrisulfid na rozdíl od ostatních druhů. Látku allyl n-propylsulfid neobsahovala šalotka. Cílem práce nebylo látky kvantifikovat, ale pouze identifikovat. Pro představu relativního zastoupení identifikovaných látek v cibulích bylo množství jednotlivých látek vztaženo ke vzorku žluté cibule, její obsah byl považován za 100 % a množství těkavých látek u ostatních vzorků bylo vyjádřeno v relativních procentech. Látka di-2-propenyltrisulfid byla vztažena ke vzorku červené cibule, protože ve žluté cibuli nebyla detekována. V následující tabulce 4 je uvedeno zastoupení látek v jednotlivých cibulích.

Tabulka 4: Zastoupení těkavých látek ve vzorcích cibule

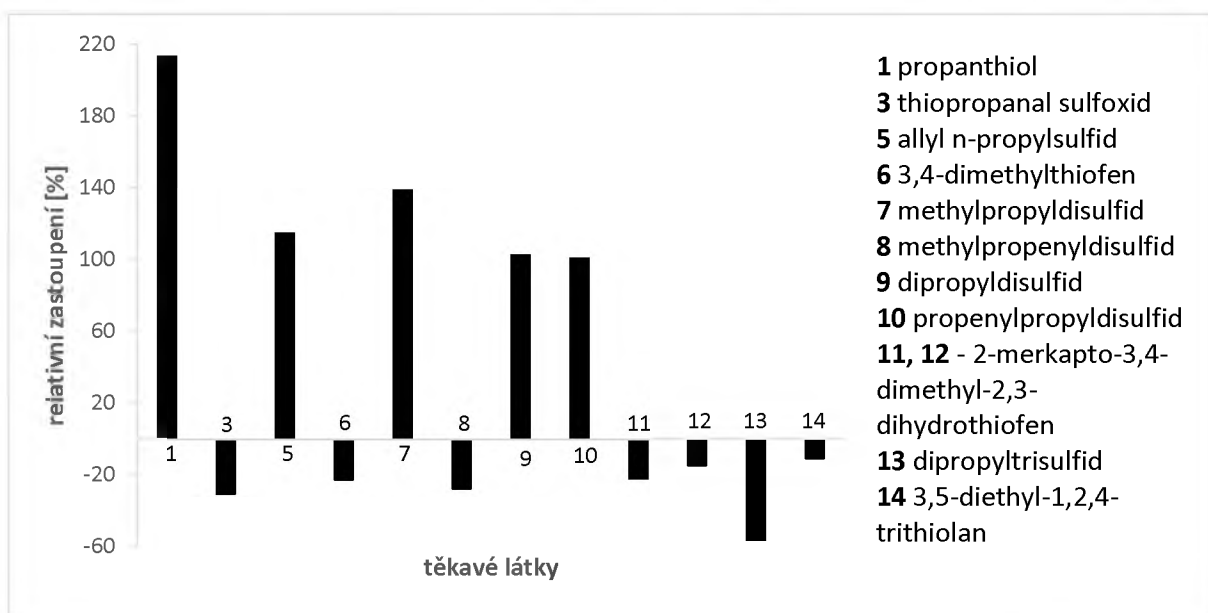
Číslo	Látka	červená	bílá	jarní	šalotka
		relativní zastoupení [%]			
1	propanthiol	80,3	153,7	443,3	98,4
2	dimethyldisulfid	neobsahuje	neobsahuje	1690,3	neobsahuje
3	thiopropanal sulfoxid	232,9	133,2	24,8	324,1
4	2-methyl-2-pentenal	104,2	46,2	25,0	295,9
5	allyl n-propylsulfid	70,3	102,8	116,7	neobsahuje
6	3,4-dimethylthiofen	74,8	89,3	37,1	91,1

Číslo	Látka	červená	bílá	jarní	šalotka
		relativní zastoupení [%]			
7	methypropyldisulfid	37,4	42,9	137,3	41,0
8	methylpropenyldisulfid	34,8	37,7	203,4	75,4
9	dipropyldisulfid	96,9	96,8	101,8	79,8
10	propenylpropyldisulfid	97,7	97,1	99,7	91,3
11	2-merkpto-3,4-dimethyl-2,3-dihydrothiofen	91,9	104,9	46,5	110,4
12	2-merkpto-3,4-dimethyl-2,3-dihydrothiofen	91,5	100,8	39,0	103,4
13	dipropyltrisulfid	51,6	144,5	228,2	19,0
14	3,5-diethyl-1,2,4-trithiolan	63,4	134,2	86,5	33,1
15	di-2-propenyltrisulfid	100,0	174,5	neobsahuje	81,0

Látky propanthiol, dimethyldisulfid, allyl n-propylsulfid, methypropyldisulfid, methylpropenyldisulfid, dipropyldisulfid a dipropyltrisulfid byly nejvíce zastoupeny ve vzorku jarní cibulky. Největší rozdíl v zastoupení těchto látek u jarní cibulky v porovnání se žlutou cibulí byl u látky propanthiol ($4,5\times$ více) a u látky dimethyldisulfid ($17\times$ více), která byla přítomna pouze ve vzorku žluté cibule a jarní cibulky. Thiopropanal sulfoxid (slzný faktor) byl nejvíce zastoupený ve vzorku šalotky, čemuž odpovídalo i subjektivní hodnocení, protože při zpracování všech vzorků byla nejhorší štiplavost v očích a v nose právě u vzorku šalotky. Látky 2-methyl-2-pentenal a 2-merkpto-3,4-dimethyl-2,3-dihydrothiofen byly nejvíce zastoupeny ve vzorku šalotky. Látky 3,4-dimethylthiofen a propenylpropyldisulfid byly nejvíce zastoupeny ve žluté cibuli, ale v porovnání s ostatními druhy cibulí to nebyl výrazný rozdíl, kromě zastoupení 3,4-dimethylthiofenu u jarní cibulky. Látky 3,5-diethyl-1,2,4-trithiolan a di-2-propenyltrisulfid byly nejvíce zastoupeny v bílé cibuli.

Pro zajímavost byla analyzována i zelená nať jarní cibulky a porovnána s bílou cibulkou. Samotná cibulka (bílá část) je již výše popsána a obsahovala čtrnáct látek. V zelené nati, která se také konzumuje, bylo identifikováno třináct látek. U zelené natě jarní cibulky nebyla na rozdíl od samotné cibulky identifikována látka 2-methyl-2-pentenal. Celkové zastoupení jednotlivých látek bylo vyšší u samotné cibulky než u zelené natě. Pouze u látek propanthiolu a allyl n-propylsulfidu bylo zastoupení vyšší u zelené natě téměř o 50 %. Podobné zastoupení v obou částech jarní cibulky bylo u látek methypropyldisulfidu, propenylpropyldisulfidu a dipropyldisulfidu (94 – 99,7 %). Obsah thiopropanal sulfoxidu byl u obou částí také podobný, ale u zelené natě byl o něco málo nižší (83,6 %). Zastoupení šesti látek (např. 3,4-dimethylthiofen) u zelené natě se pohybovalo v rozmezí 46,1 – 70,6 %. Nejméně zastoupenou látkou u zelené natě byl dimethyldisulfid (13,1 %).

S dobou od rozkrojení cibule se může profil těkavých látek a jejich zastoupení v cibuli měnit, a proto byl proveden pokus, kdy byl vzorek bílé cibule analyzován za stejných podmínek, ale 24 hodin po jeho rozkrojení (viz obrázek 12), kdy byl vzorek uchován za laboratorní teploty, za přístupu vzduchu i světla.



Obrázek 12: Relativní zastoupení těkavých látek vzorku bílé cibule po 24 hodinách

Ve vzorku bílé cibule analyzované ihned po rozkrojení bylo identifikováno čtrnáct látek a ve vzorku analyzovaném po 24 hodinách třináct látek. Po 24 hodinách nebyly ve vzorku detekovány látky dimethyldisulfid (číslo 2), 2-methyl-2-pentenal (číslo 4) a di-2-propenyltrisulfid (číslo 15), které se původně, kromě dimethyldisulfidu, ve vzorku vyskytovaly. Navíc byla ve vzorku identifikována nová látka, 2-undekanon, jejíž retenční čas byl 21,08 minut. Obsah většiny látek se během 24 hodin snížil (o 43,6 – 89,0 %). Na druhou stranu se nejvíce zvýšilo zastoupení propanthiolu (213,5 %). Obsah se téměř nezměnil u látek propenylpropyldisulfidu, dipropyldisulfidu a allyl n-propylsulfidu (100,7 – 114,9 %). Látka 3,5-diethyl-1,2,4-trithiolan byla ze všech látek nejméně zastoupena (11 %).

Látky identifikované v cibuli v této diplomové práci se shodují s publikovanou literaturou. V cibuli se vyskytují dvě skupiny těkavých látek, a to aldehydy a sírné sloučeniny. V této práci byly nalezeny především sírné těkavé látky a pouze jeden aldehyd (2-methyl-2-pentenal). Ve většině studií bylo identifikováno více aldehydů [18,19,27], ale ve studii [56] byl nalezen pouze 2-methyl-2-pentenal stejně jako v této diplomové práci. Veškeré identifikované sírné sloučeniny v této práci byly shodně nalezeny ve studiích [18,19,56]. Látka di-2-propenyltrisulfid byla identifikována v této diplomové práci a pouze ve studii

našich kolegů z Univerzity Pardubice [26]. Látka 3,5-diethyl-1,2,4-trithiolan také nebyla jedna z nejčastěji identifikovaných, ale ve studiích [26,27] byla uvedena. Při analýze vzorku bílé cibule po 24 hodinách od rozkrojení byl nalezen 2-undekanon, který nebyl identifikován v žádné studii, ale pouze v diplomové práci M. Machové [69].

3.2 Identifikace a kvantifikace fenolických látek v cibuli

3.2.1 Analýza flavonoidů

Optimalizace podmínek HPLC/MS

Optimalizace chromatografických podmínek pro analýzu flavonoidů byla provedena na extraktu žluté cibule. K analýze flavonoidů bylo třeba optimalizovat složení mobilní fáze, gradientovou eluci, vlnovou délku u spektrofotometrické detekce a parametry hmotnostní detekce. Průtok mobilní fáze, objem nástřiku a teplota kolony se během optimalizace neměnily. Optimalizované podmínky metody jsou uvedeny v kapitole 2.4.3 a byly použity pro analýzu všech vzorků cibule.

Pro separaci flavonoidů bylo vyzkoušeno několik různých složení mobilní fáze. Jako organická složka mobilní fáze byl vždy použit acetonitril (MF B), který byl vybrán na základě studií [7,9,19]. Vodnou složkou mobilní fáze byl 5mM octan amonný, 5mM mravenčan amonný, okyselená voda a oba 5mM pufrů okyselené kyselinou mravenčí na hodnotu pH 3. Ze všech vyzkoušených mobilních fází byla jako nejvhodnější vybrána okyselená voda, protože při jejím použití docházelo k lepší ionizaci látek, z čehož vyplývá, že odezvy v signálu na hmotnostním detektoru byly vyšší. U spektrofotometrické detekce nedocházelo ke změnám při použití jednotlivých typů mobilní fáze.

Při optimalizaci metody bylo testováno několik elučních gradientů (viz tabulka 5), aby bylo dosaženo co nejlepší separace flavonoidů. Jako nejvhodnější byl určen gradient 6. Celková doba analýzy byla 40 minut a za těchto podmínek byly rozděleny veškeré flavonoidy obsažené v extraktu cibule. Analýzu by bylo možné ještě zkrátit, ale v případě výskytu fenolových kyselin v ostatních vzorcích cibule by mohlo dojít ke koeluci jednotlivých píků (např. kyseliny ferulové a sinapové).

Tabulka 5: Gradientové eluce testované při optimalizaci separace flavonoidů

Gradient 1	čas [min]	0	40	
	MF B [%]	5	70	
Gradient 2	čas [min]	0	20	
	MF B [%]	15	70	
Gradient 3	čas [min]	0	10	20
	MF B [%]	15	35	60
Gradient 4	čas [min]	0	10	15
	MF B [%]	10	30	50
Gradient 5	čas [min]	0	10	20
	MF B [%]	10	20	30
Gradient 6	čas [min]	0	25	40
	MF B [%]	10	20	60

K detekci flavonoidů obsažených v cibuli pomocí spektrofotometrické detekce bylo vyzkoušeno několik vlnových délek, a to 350 nm, 325 nm, 280 nm, 265 nm a 254 nm. Při použití vlnové délky 350 nm a 254 nm bylo možné v chromatogramu vidět nejvíce píků. Jako nejvhodnější vlnová délka byla vybrána 254 nm, protože v porovnání s vlnovou délkou 350 nm byly vyšší odezvy o 22 až 42 %. Navíc při vlnové délce 254 nm kromě flavonoidů absorbují i fenolové kyseliny, které by se mohly vyskytovat v ostatních vzorcích cibule.

Dále byl k detekci flavonoidů použit i hmotnostní detektor. Extrakt žluté cibule byl analyzován při negativním i pozitivním módu ionizace. Vhodnějším módem pro detekci flavonoidů se ukázal negativní mód, jelikož došlo ke snížení šumu, nulová linie byla pravidelnější a spektrum bylo celkově čistší, protože neobsahovalo další píky navíc. Dle doporučení výrobce byly nastaveny parametry MS detektoru podle průtoku mobilní fáze. Cílová hmota m/z byla nastavena na hodnotu 463, protože cibule nejčastěji obsahuje glykosidy kvercetinu.

Identifikace a kvantifikace flavonoidů v cibuli

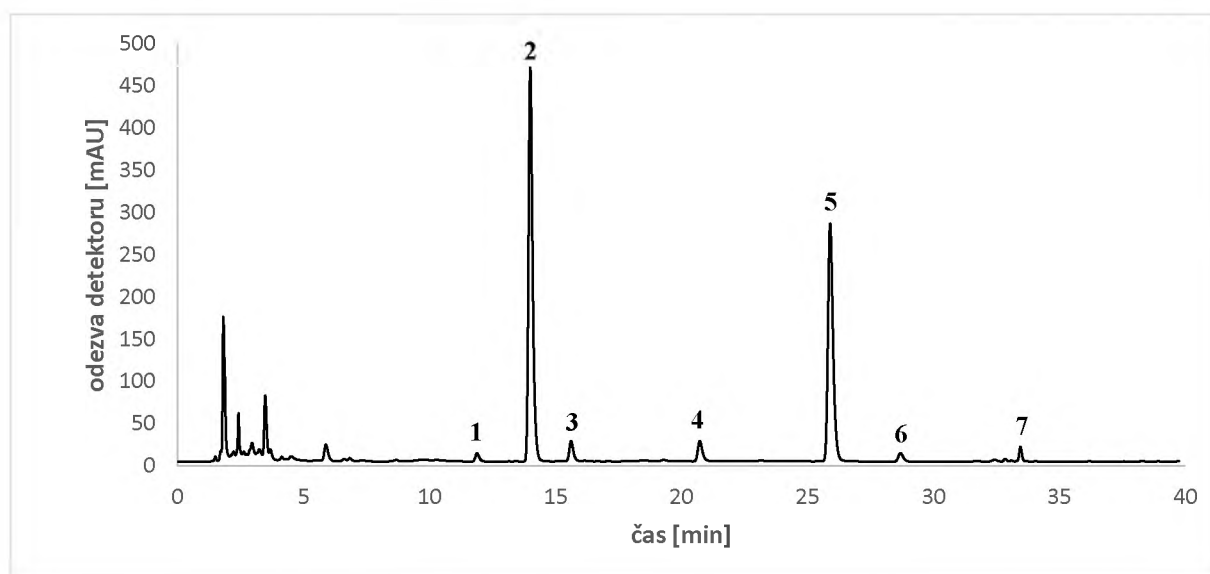
Po optimalizaci podmínek metody bylo potřeba jednotlivé látky ve vzorcích cibule identifikovat a kvantifikovat. Identifikace flavonoidů byla založena na porovnání UV/VIS a hmotnostních spekter s dostupnými standardy, dále byly látky identifikovány podle zjištěných molekulových hmotností a výsledky porovnány s literaturou [9,31,41]. Ve zkušebním extraktu červené cibule v 50% methanolu se podařilo identifikovat sedm

flavonoidů a v následující tabulce 6 jsou uvedeny jejich názvy, retenční časy, molekulové hmotnosti a molekulární ionty $[M-H]^-$. Žádná z testovaných fenolových kyselin nebyla v extraktu nalezena.

Tabulka 6: Detekční charakteristiky flavonoidů

Pík	Látka	Retenční čas [min]	Molekulová hmotnost [g/mol]	$[M-H]^-$
1	kvercetin-7,4'-diglukosid	11,89	626,52	625
2	kvercetin-3,4'-diglukosid	14,00	626,52	625
3	isorhamnetin-3,4'-diglukosid	15,62	640,54	639
4	kvercetin-3-glukosid	20,73	464,38	463
5	kvercetin-4'-glukosid	25,91	464,38	463
6	isorhamnetin-4'-glukosid	28,70	478,40	477
7	kvercetin	33,46	302,24	301

V příloze je uveden chromatogram (TIC) a extrahované chromatogramy molekulových iontů jednotlivých flavonoidů. Dále jsou v příloze uvedena i jejich hmotnostní spektra (viz příloha I – III). Na následujícím obrázku 13 je uveden ukázkový chromatogram extraktu červené cibule.



Obrázek 13: Ukázkový chromatogram vzorku červené cibule extrahované v 50% MeOH

(1) kvercetin-7,4'-diglukosid, (2) kvercetin-3,4'-diglukosid, (3) isorhamnetin-3,4'-diglukosid, (4) kvercetin-3-glukosid, (5) kvercetin-4'-glukosid, (6) isorhamnetin-4'-glukosid, (7) kvercetin

Podmínky analýzy: kolona Gemini 3u C18 110A (150 × 3 mm, 3 μm), MF A okyselená voda pH 3, MF B acetonitril, nástřik 10 μl, teplota kolony 35 °C, průtok mobilní fáze 0,5 ml/min, gradient 0 min 10 % MF B, 25 min 20 % MF B a 40 min 60 % MF B, UV/VIS detekce 254 nm.

Flavonoidy byly kvantifikovány na dostupné standardy kvercetinu a isorhamnetin-3-glukosidu při použití spektrofotometrické detekce. Kvantitativní vyhodnocení flavonoidů

v cibuli bylo provedeno metodou kalibrační křivky. Kalibrační rozsah byl zvolen dle zkušebního extraktu červené cibule a každý kalibrační roztok byl proměřen třikrát. Grafy kalibračních závislostí jsou uvedeny v příloze IV a V. U těchto dvou standardů byla vypočtena mez detekce (LOD – Limit of Detection) a mez stanovitelnosti (LOQ – Limit of Quantification). Mez detekce se určuje jako trojnásobek šumu základní linie a mez stanovitelnosti jako desetinásobek šumu základní linie. Obě hodnoty lze vypočítat z kalibrační závislosti výšky píků na koncentraci standardu. Hodnota šumu byla odečtena z třikrát proměřené čisté mobilní fáze. Parametry kalibračních závislostí standardů jsou zobrazeny v následující tabulce 7.

Tabulka 7: Kalibrační parametry, meze detekce a stanovitelnosti standardů flavonoidů

Látka	Rozsah kalibrace [mg/l]	Rovnice regrese	R ²	LOD [μg/l]	LOQ [μg/l]
kvercetin	1,0 – 15,0	$y = 77,00x - 10,05$	0,9991	32,07	106,88
isorhamnetin-3-glukosid	1,0 – 15,0	$y = 57,88x + 7,80$	0,9972	27,70	92,33

K extrakci všech analyzovaných cibulí byla použita okyselená voda na hodnotu pH 2, 50% methanol a čistý methanol. Každý vzorek byl extrahován třikrát do příslušného rozpouštědla a každý extrakt byl poté třikrát proměřen. V případě potřeby byly extrakty před analýzou zředěny. Flavonoidy se podařilo stanovit ve třech z pěti vzorků cibulí. V šalotce, ve žluté a v červené cibuli bylo identifikováno všech sedm flavonoidů. Obsah jednotlivých flavonoidů v těchto třech cibulích je uveden v jednotkách μg/g čerstvé cibule v následujících tabulkách 8 – 10. V bílé cibuli a v jarní cibulce se nepovedlo flavonoidy detekovat vůbec, protože je jejich obsah buď velmi nízký, nebo flavonoidy vůbec neobsahují. Ve studii [3] byl uveden obsah dvou nejvíce zastoupených flavonoidů kvercetin-3,4'-diglukosidu a kvercetin-4'-glukosidu v bílé cibuli pod 1 mg/100 g.

Tabulka 8: Obsah jednotlivých flavonoidů v extraktech žluté cibule

Žlutá cibule		c [μg/g]		
Pík	Látka	okyselená voda	50% MeOH	MeOH
1	kvercetin-7,4'-diglukosid	< LOQ	< LOQ	2,42 ± 0,31
2	kvercetin-3,4'-diglukosid	61,53 ± 0,69	84,63 ± 0,28	122,02 ± 9,45
3	isorhamnetin-3,4'-diglukosid	5,88 ± 0,06	7,31 ± 0,35	10,99 ± 0,34
4	kvercetin-3-glukosid	< LOQ	< LOQ	< LOQ
5	kvercetin-4'-glukosid	27,02 ± 1,24	48,06 ± 0,16	108,01 ± 12,36
6	isorhamnetin-4'-glukosid	6,59 ± 0,05	9,69 ± 0,20	20,08 ± 1,86
7	kvercetin	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Σ flavonoidů		101,02 ± 2,04	149,69 ± 0,99	263,52 ± 24,32

Ze žluté cibule se nejvíce flavonoidů extrahovalo do methanolu ($263,52 \pm 24,32 \mu\text{g/g}$). Nejvyšší obsah byl stanoven u dvou flavonoidů, a to u kvercetin-3,4'-diglukosidu ($122,02 \pm 9,45 \mu\text{g/g}$) a u kvercetin-4'-glukosidu ($108,01 \pm 12,36 \mu\text{g/g}$). Kvercetin-7,4'-diglukosid se podařilo stanovit pouze v methanolicém extraktu ($2,42 \pm 0,31 \mu\text{g/g}$). Téměř o polovinu nižší množství flavonoidů bylo nalezeno ve vzorku extrahovaném do 50% methanolu a nejnižší obsah byl zjištěn u vodného extraktu ($101,02 \pm 2,04 \mu\text{g/g}$). Kvercetin-3-glukosid a kvercetin byly ve všech extraktech pod mezí stanovitelnosti.

Tabulka 9: Obsah jednotlivých flavonoidů v extraktech červené cibule

Červená cibule		c [$\mu\text{g/g}$]		
Pík	Látka	okyselená voda	50% MeOH	MeOH
1	kvercetin-7,4'-diglukosid	$2,47 \pm 0,15$	$3,12 \pm 0,07$	$3,33 \pm 0,19$
2	kvercetin-3,4'-diglukosid	$98,56 \pm 2,13$	$133,50 \pm 3,79$	$141,00 \pm 6,43$
3	isorhamnetin-3,4'-diglukosid	$8,30 \pm 0,53$	$9,71 \pm 0,40$	$10,28 \pm 0,32$
4	kvercetin-3-glukosid	$5,57 \pm 0,49$	$8,15 \pm 0,25$	$10,39 \pm 0,46$
5	kvercetin-4'-glukosid	$58,26 \pm 4,17$	$101,29 \pm 3,99$	$141,27 \pm 10,96$
6	isorhamnetin-4'-glukosid	$3,89 \pm 0,14$	$5,25 \pm 0,43$	$7,03 \pm 0,85$
7	kvercetin	< LOQ	$3,65 \pm 0,20$	$4,03 \pm 0,05$
Σ flavonoidů		$177,05 \pm 7,61$	$264,67 \pm 9,13$	$317,33 \pm 19,26$

Obsah flavonoidů v červené cibuli byl v porovnání se žlutou cibulí vyšší. Nejvyšší obsah flavonoidů byl stanoven u methanolicého extraktu a nejnižší obsah byl ve vodném extraktu, což je stejné jako u vzorku žluté cibule. Nejvyšší obsah byl také nalezen u kvercetin-4'-glukosidu ($141,27 \pm 10,96 \mu\text{g/g}$) a u kvercetin-3,4'-diglukosidu ($141,00 \pm 6,43 \mu\text{g/g}$). Na rozdíl od žluté cibule byl pod mezí stanovitelnosti pouze kvercetin ve vodném extraktu.

Tabulka 10: Obsah jednotlivých flavonoidů v extraktech šalotky

Šalotka		c [$\mu\text{g/g}$]		
Pík	Látka	okyselená voda	50% MeOH	MeOH
1	kvercetin-7,4'-diglukosid	$2,80 \pm 0,32$	$2,84 \pm 0,60$	$3,22 \pm 0,07$
2	kvercetin-3,4'-diglukosid	$96,45 \pm 9,91$	$103,78 \pm 6,08$	$110,66 \pm 2,87$
3	isorhamnetin-3,4'-diglukosid	$3,20 \pm 0,62$	$3,39 \pm 0,73$	$4,41 \pm 0,22$
4	kvercetin-3-glukosid	$4,14 \pm 0,50$	$3,95 \pm 0,42$	$5,75 \pm 0,77$
5	kvercetin-4'-glukosid	$67,79 \pm 9,58$	$89,76 \pm 1,72$	$126,01 \pm 10,39$
6	isorhamnetin-4'-glukosid	$8,24 \pm 1,62$	$6,74 \pm 0,97$	$14,22 \pm 1,14$
7	kvercetin	< LOQ	< LOQ	$2,41 \pm 0,02$
Σ flavonoidů		$182,62 \pm 22,55$	$210,46 \pm 10,52$	$266,66 \pm 15,48$

Obsah flavonoidů v extraktech šalotky byl v porovnání se žlutou cibulí vyšší. Ve vodném extraktu šalotky bylo v součtu všech flavonoidů obsaženo vyšší množství flavonoidů

($182,62 \pm 22,55 \mu\text{g/g}$) než ve vodném extraktu červené cibule ($177,05 \pm 7,61$), přičemž je to způsobeno hlavně obsahem kvercetin-4'-glukosidu. V methanolických extraktech šalotky byl obsah flavonoidů v porovnání s červenou cibulí nižší. Stejně jako u předchozích dvou vzorků byl obsah flavonoidů u šalotky extrahované do methanolu nejvyšší a nejnižší ve vodném extraktu. Nejvyšší množství flavonoidů bylo opět stanoveno u kvercetin-4'-glukosidu ($126,01 \pm 10,39 \mu\text{g/g}$) a u kvercetin-3,4'-diglukosidu ($110,66 \pm 2,87 \mu\text{g/g}$). Kvercetin se podařilo stanovit pouze u methanolického extraktu ($2,41 \pm 0,02 \mu\text{g/g}$), protože v ostatních extraktech byl pod mezí stanovitelnosti.

Ve žluté, červené cibuli a šalotce byl nejvyšší obsah dvou glukosidů kvercetinu (kvercetin-3,4'-diglukosidu a kvercetin-4'-glukosidu). Tyto dva glukosidy kvercetinu představovaly ve žluté cibuli 87 % všech flavonoidů, v červené cibuli a šalotce 89 % všech flavonoidů. Ve studii [3] je uvedeno, že tyto dva glukosidy kvercetinu v cibuli tvoří asi 90 %, což se shoduje i s touto diplomovou prací. Ve většině studií identifikovali stejné látky jako v této práci, ale ještě se jim podařilo identifikovat kvercetin-3,7,4'-triglukosid [9,31,41]. Ve studii [42] autoři identifikovali navíc samotný rutin, isorhamnetin a luteolin, ale jejich obsah byl velmi nízký (0,8 – 1,3 $\mu\text{g/g}$).

V porovnání s literaturou byly výsledky získané v této diplomové práci obdobné. Ve studii [31] byl stanoven u různých druhů cibule extrahovaných do 50% methanolu nejvyšší obsah kvercetin-3,4'-diglukosidu (43 – 147 $\mu\text{g/g}$) a kvercetin-4'-glukosidu (37 – 127 $\mu\text{g/g}$), což se shoduje s výsledky této diplomové práce. Nejnižší množství flavonoidů bylo ve studii stanoveno pro bílou cibuli, což je jediný rozdíl v porovnání s touto diplomovou prací, protože u bílé cibule se flavonoidy nepodařilo stanovit. Důvodem může být geografický původ vzorků. Ve studii [9] byl obsah jednotlivých flavonoidů ve vzorcích cibule o něco nižší. Celkový obsah flavonoidů se pohyboval v rozmezí 52 – 137 $\mu\text{g/g}$ v extraktech 80% ethanolu a v diplomové práci byl obsah 263 – 317 $\mu\text{g/g}$ v extraktech čistého methanolu. Poněkud vyšší výsledky byly uvedeny ve studii [41], ve které se autoři věnovali stanovení flavonoidů v italské červené cibuli. Cibule byla extrahována do methanolu a obsah kvercetin-3,4'-diglukosidu byl zhruba 260 mg/kg a kvercetin-4'-glukosidu zhruba 220 mg/kg. Obsahu flavonoidů v šalotce se věnovali ve studii [42], kde byl uveden celkový obsah flavonoidů o něco nižší než v této diplomové práci (200 $\mu\text{g/g}$).

3.2.2 Analýza anthokyanů

Optimalizace podmínek HPLC/MS

Optimalizace chromatografických podmínek pro analýzu anthokyanů obsažených v cibuli byla provedena na extraktu červené cibule. K analýze anthokyanů bylo třeba optimalizovat složení a průtok mobilní fáze, gradientovou eluci a parametry hmotnostní detekce. Objem nástřiku a teplota kolony se během optimalizace neměnily. K detekci anthokyanů byla použita i spektrofotometrická detekce s vlnovou délkou 520 nm. Optimalizované podmínky metody jsou uvedeny v kapitole 2.4.3 a byly použity pro analýzu šalotky, červené a žluté cibule. Vzorky bílé cibule a jarní cibulky analyzovány nebyly, protože jejich obsah anthokyanů je velmi nízký nebo je vůbec neobsahují, jak už vyplývá z jejich zbarvení.

Jak je uvedeno v literatuře, mobilní fázi je potřeba k analýze anthokyanů okyselit. V kyselém prostředí dochází k denaturaci buněčné membrány, současně se anthokyaniny rozpouští a jsou stabilizovány. Demineralizovaná voda byla okyselená kyselinou mravenčí a byly vyzkoušeny tři různé hodnoty pH, a to 2,5; 2 a 1,8. Nejvhodnější bylo okyselení vody na hodnotu pH 1,8, protože čím bylo prostředí kyselejší, tím byla separace lepší. V porovnání s analýzou za použití okyselené vody na hodnotu pH 2,5 byly píky vyšší a štíhlejší.

Dále bylo při optimalizaci testováno několik elučních gradientů (viz tabulka 11). Cílem bylo dosažení co nejlepší separace a k tomu byl využit gradient 5. Za těchto podmínek byly rozděleny všechny anthokyaniny a celková doba analýzy byla 25 minut.

Tabulka 11: Gradientové eluce testované při optimalizaci separace anthokyanů

Gradient 1	čas [min]	0	20	30	35
	MF B [%]	15	15	70	80
Gradient 2	čas [min]	0	20	30	
	MF B [%]	10	30	60	
Gradient 3	čas [min]	0	15	20	40
	MF B [%]	10	20	60	70
Gradient 4	čas [min]	0	15	25	30
	MF B [%]	12	18	50	70
Gradient 5	čas [min]	0	15	20	25
	MF B [%]	10	18	40	70

Kromě výběru vhodné mobilní fáze byl při optimalizaci podmínek testován i průtok mobilní fáze. U nastaveného gradientu byl vyzkoušen průtok 1 ml/min a nižší. Použití nižšího průtoku je lepší a šetrnější pro hmotnostní detektor. Jako nejvhodnější průtok byl vybrán 0,7 ml/min, protože separace byla stále uspokojivá.

K detekci anthokyanů byl použit také hmotnostní detektor. Extrakt červené cibule byl analyzován při negativním i pozitivním módu ionizace. Při detekci anthokyanů, na rozdíl od flavonoidů, byl vhodnější pozitivní mód ionizace, protože při negativním módu nedocházelo k ionizaci anthokyanů. Dle doporučení výrobce byly nastaveny parametry MS detektoru podle průtoku mobilní fáze a cílová hmota m/z byla nastavena na hodnotu 500, protože cibule obsahuje především glykosidy kyanidinu, které mají molekulovou hmotnost kolem 500 g/mol (např. kyanidin-3-glukosid 484,83 g/mol).

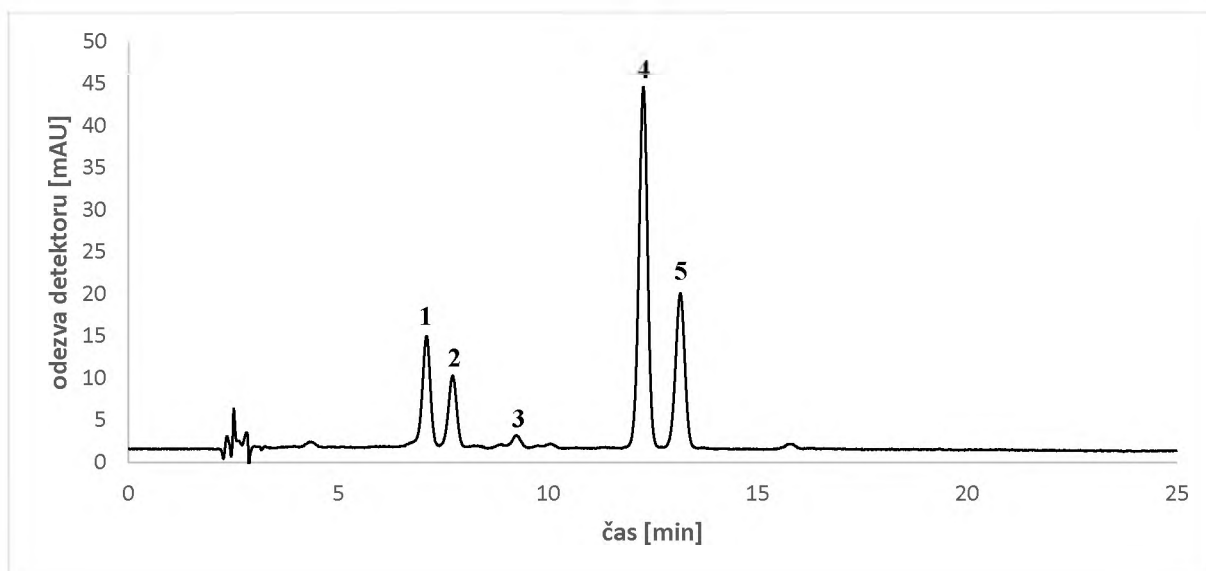
Identifikace a kvantifikace anthokyanů v cibuli

Stejně jako u flavonoidů bylo potřeba po optimalizaci metody jednotlivé látky ve vzorcích cibule identifikovat a kvantifikovat. Identifikace byla provedena stejným způsobem jako u předešlé metody, tzn. porovnání UV/VIS a hmotnostních spekter s dostupnými standardy, dále byly látky identifikovány podle zjištěných molekulových hmotností a porovnány s literaturou [5,31,44]. Ve zkušebním extraktu červené cibule v okyseleném 80% methanolu se podařilo identifikovat pět anthokyanů a v následující tabulce 12 jsou uvedeny jejich názvy, retenční časy, molekulové hmotnosti a molekulární ionty $[M+H]^+$.

Tabulka 12: Detekční charakteristiky anthokyanů

Pík	Látka	Retenční čas [min]	Molekulová hmotnost [g/mol]	$[M+H]^+$
1	kyanidin-3-glukosid	7,11	449,38	449
2	kyanidin-3,5-diglukosid	7,73	611,52	611
3	delfinidin-3,5-diglukosid	9,25	627,53	627
4	kyanidin-3-(6''-malonylglukosid)	12,28	535,43	535
5	kyanidin-3-(6''-malonyl-3''-glukosylglukosid)	13,16	697,57	697

V příloze je uveden chromatogram (TIC) a extrahované chromatogramy molekulových iontů jednotlivých anthokyanů obsažených v cibuli. Dále jsou v příloze uvedena i jejich hmotnostní spektra (viz příloha VI – VIII). Na následujícím obrázku 14 je uveden ukázkový chromatogram extraktu červené cibule.



Obrázek 14: Ukázkový chromatogram vzorku červené cibule extrahované v okyseleném 80% MeOH (pH 2) (1) kyanidin-3-glukosid, (2) kyanidin-3,5-diglukosid, (3) delphinidin-3,5-diglukosid, (4) kyanidin-3-(6''-malonylglukosid), (5) kyanidin-3-(6''-malonyl-3''-glukosylglukosid)

Podmínky analýzy: kolona Luna Omega PS, C18 (150 × 4,6 mm, 5 μm), MF A okyselená voda pH 1,8, MF B acetonitril, nástřik 10 μl, teplota kolony 40 °C, průtok mobilní fáze 0,7 ml/min, gradient 0 min 10 % MF B, 15 min 18 % MF B, 20 min 40 % MF B a 25 min 0 % MF B, UV/VIS detekce 520 nm.

Stejným způsobem jako u flavonoidů bylo kvantitativní vyhodnocení anthokyanů provedeno metodou kalibrační křivky a obsah anthokyanů byl vztažen ke standardu kyanidin-3-glukosidu [31]. Kalibrační rozsah byl zvolen dle zkušebního extraktu červené cibule a každý kalibrační roztok byl proměřen třikrát. Graf kalibrační závislosti je uveden v příloze IX. Také byla vypočtena mez detekce a stanovitelnosti. Parametry kalibračních závislostí standardu jsou uvedeny v následující tabulce 13.

Tabulka 13: Kalibrační parametry, mez detekce a stanovitelnosti kyanidin-3-glukosidu

Látka	Rozsah kalibrace [mg/l]	Rovnice regrese	R ²	LOD [μg/l]	LOQ [μg/l]
kyanidin-3-glukosid	0,5 – 15,0	$y = 41,22x + 18,04$	0,9922	122,4	408,1

K extrakci analyzovaných druhů cibulí byla použita okyselená voda a okyselený 80% methanol, obojí na hodnotu pH 2. 80 % methanol byl vybrán na základě literatury, protože v něm jsou anthokyaniny dobře rozpustné. Každý vzorek byl extrahován třikrát do příslušného rozpouštědla a každý extrakt byl poté třikrát proměřen.

Anthokyaniny se podařilo stanovit ve vzorku červené cibule a šalotky. Ve žluté cibuli se anthokyaniny nepovedlo vůbec detekovat, protože je jejich obsah buď velmi nízký, nebo anthokyaniny vůbec neobsahují. Obsah jednotlivých anthokyanů v červené cibuli a šalotce je uveden v jednotkách μg/g čerstvé cibule v následující tabulce 14.

Tabulka 14: Obsah jednotlivých anthokyanů v extraktech červené cibule a šalotky

Píky	Látka	Červená cibule		Šalotka	
		okyselená voda	okyselený 80% MeOH	okyselená voda	okyselený 80% MeOH
		c [µg/g]			
1	kyanidin-3-glukosid	2,43 ± 0,05	4,78 ± 0,04	< LOQ	< LOQ
2	kyanidin-3,5-diglukosid	1,34 ± 0,05	2,63 ± 0,16	< LOQ	< LOQ
3	delfinidin-3,5-diglukosid	< LOQ	< LOQ	< LOD	< LOD
4	kyanidin-3-(6''-malonylglukosid)	7,97 ± 0,06	15,52 ± 0,67	1,19 ± 0,10	1,93 ± 0,14
5	kyanidin-3-(6''-malonyl-3''-glukosylglukosid)	3,59 ± 0,03	6,74 ± 0,22	< LOQ	0,45 ± 0,04

Obsah anthokyanů v červené cibuli byl v porovnání se šalotkou několikrát vyšší. Podstatně větší obsah anthokyanů byl stanoven v extraktech 80% methanolu. Dominantním anthokyanem v obou vzorcích byl kyanidin-3-(6''-malonylglukosid). Delfinidin-3,5-diglukosid byl v extraktech červené cibule pod mezí stanovitelnosti a v extraktech šalotky nebyl detekován vůbec. Pod mezí stanovitelnosti byly v obou extraktech šalotky i kyanidin-3-glukosid a kyanidin-3,5-diglukosid. U vzorku šalotky byl kyanidin-3-(6''-malonyl-3''-glukosylglukosid) stanoven pouze v methanolickém extraktu ($0,45 \pm 0,04$ µg/g).

V literatuře [5,31,44] byly identifikovány stejné anthokyany jako v této diplomové práci, ale i některé navíc, jako např. delfinidin-3-glukosid nebo samotný kyanidin. Obsah anthokyanů stanovený v této práci byl v porovnání s literaturou velmi podobný. Ve studii [31] autoři stanovili kyanidin-3-(6''-malonyl-3''-glukosylglukosid) jako dominantní anthokyan u červených cibulí v rozmezí cca 3 – 16 µg/g, což je v souladu s touto diplomovou prací. Podobný obsah (15 µg/g) kyanidin-3-(6''-malonyl-3''-glukosylglukosidu) byl stanoven i v další studii [44], ale zde nebyl určen jako dominantní anthokyan.

3.3 Spektrofotometrické metody

3.3.1 Stanovení antioxidační aktivity cibule

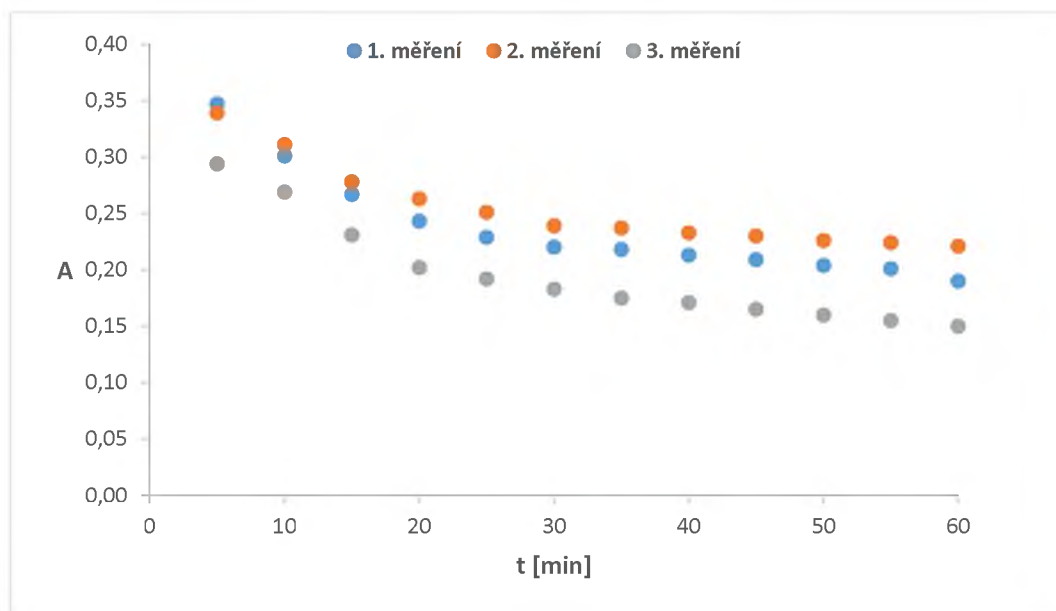
Antioxidační aktivita cibule byla stanovena spektrofotometrickými metodami DPPH, ABTS a FRAP. Vzorky všech pěti druhů cibulí byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 2.4.1. K extrakci byla vždy použita tři rozpouštědla, a to okyselená voda na hodnotu pH 2, 50% methanol a methanol, a směs byla 15 minut ultrazvukována. Veškeré extrakty pro toto stanovení byly pro všechny tři metody připraveny stejně (vzorek 5 g cibule v 10 ml rozpouštědla), protože cílem práce bylo porovnání antioxidační aktivity cibule naměřené jednotlivými metodami. Aby bylo možné tyto tři metody srovnat, výsledky byly přepočteny

na ekvivalentní množství standardu troloxu (TEAC) a vyjádřeny v jednotkách mmol/l. Každý extrakt byl proměřen pětkrát.

Před samotným stanovením bylo potřeba určit vhodné množství extraktu přidávaného k reakční směsi a dále také vhodnou reakční dobu. Toto bylo provedeno na extraktu žluté cibule v 50% methanolu.

Optimalizace metody DPPH

V rámci optimalizace byla testována vhodná doba reakce a dva různé objemy extraktu. Ke 3 ml reakční směsi radikálu DPPH[•] bylo přidáno 100 a 200 μ l extraktu. Při použití množství 100 μ l extraktu docházelo k malým odchylkám absorbance v čase a křivka závislosti absorbance na čase nebyla zřetelná. Při použití množství 200 μ l extraktu už docházelo k větším odchylkám absorbance v čase a toto množství bylo vybráno jako vhodné k měření. Reakce byla sledována každých 5 minut po dobu 1 hodiny. Z naměřených hodnot byl sestaven graf závislosti absorbance roztoku na čase (viz obrázek 15), ze kterého je patrné, že optimální doba reakce byla 30 minut. Po 30 minutách sice stále docházelo ke snižování absorbance, ale pokles byl již minimální a doba 30 minut byla dostatečná. Množství 200 μ l extraktu a reakční doba 30 minut byly dále použity při měření všech extraktů cibule a kalibrační řady, kdy místo extraktu byl použit standard trolox.

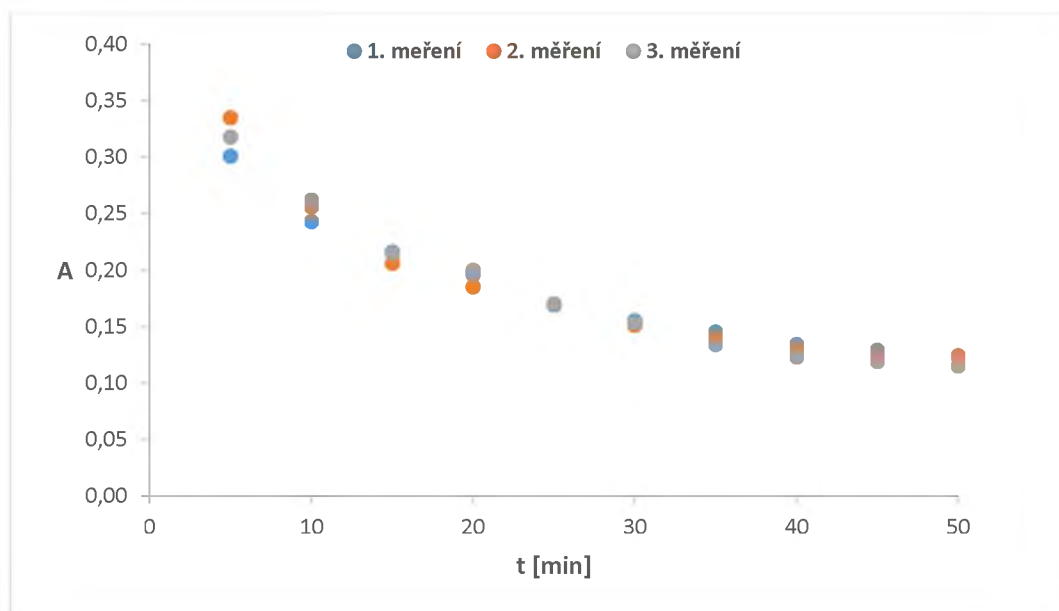


Obrázek 15: Metoda DPPH – závislost absorbance roztoku na čase

Optimalizace metody ABTS

Metoda ABTS byla optimalizována z časového hlediska. Ke 3 ml reakční směsi radikálového kationtu ABTS^{•+} bylo přidáno 200 μ l extraktu a byla sledována vhodná reakční doba

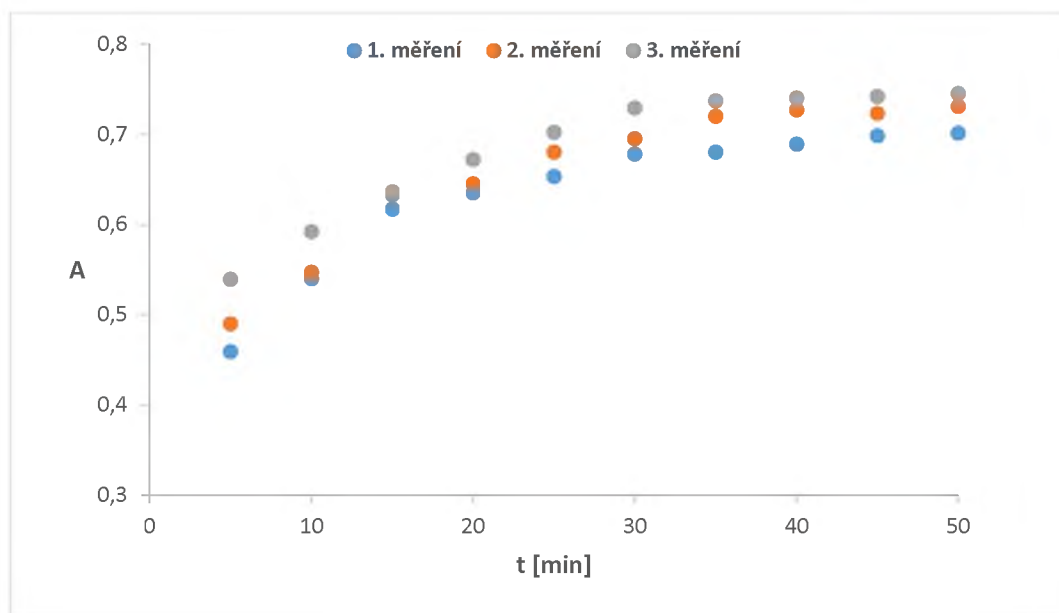
v intervalu každých 5 minut až po dobu 50 minut. Z grafu závislosti absorbance roztoku na čase (viz obrázek 16) je patrné, že optimální doba reakce byla 40 minut, protože pokles absorbance byl poté mírný a mezi 30. a 40. minutou byly hodnoty absorbance podobné. Pro měření všech extraktů cibule a kalibrační řady touto metodou bylo tedy použito množství 200 μl extraktu a reakční doba 40 minut.



Obrázek 16: Metoda ABTS – závislost absorbance roztoku na čase

Optimalizace metody FRAP

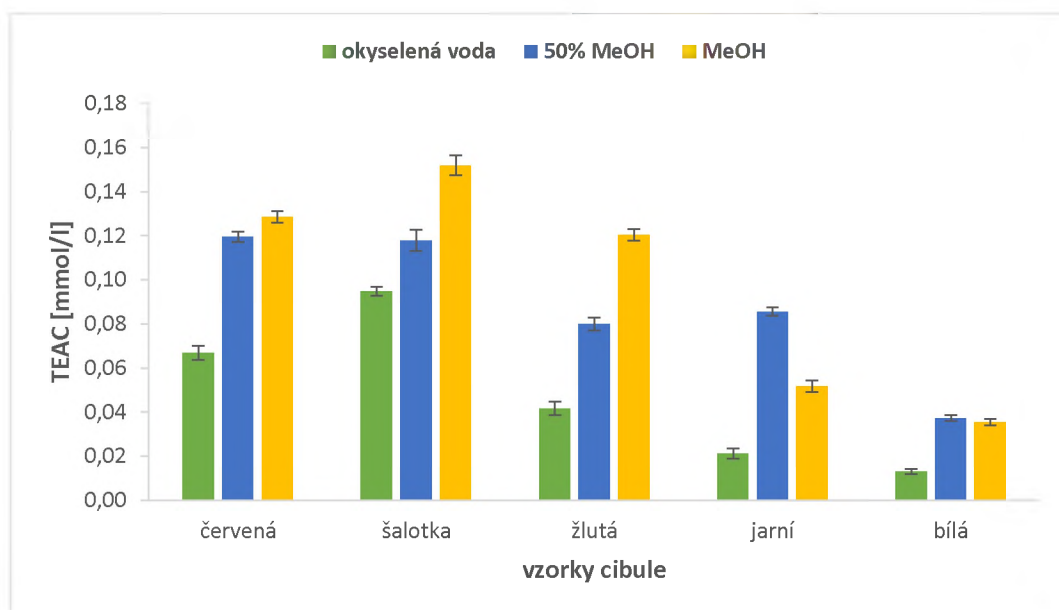
Stejně jako u optimalizace metod DPPH a ABTS bylo ke 3 ml reakční směsi Fe^{3+} -TPTZ přidáno 200 μl extraktu. Reakční doba byla sledována každých 5 minut po dobu 50 minut. Z grafu závislosti absorbance roztoku na čase (viz obrázek 17) je patrné, že optimální doba reakce byla 30 minut. Po 30 minutách již téměř nedocházelo k nárůstu hodnot absorbance. Optimalizované množství 200 μl a reakční doba 30 minut byly dále použity při měření všech extraktů cibule a kalibrační řady troloxu.



Obrázek 17: Metoda FRAP – závislost absorbance roztoku na čase

Výsledky metody DPPH

Stanovení antioxidační aktivity extraktů cibule metodou DPPH bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 2.4.4. Naměřené hodnoty byly přepočítány na úbytek absorbance dle rovnice 1 a následně přepočteny na ekvivalentní množství troloxu (TEAC) z rovnice regrese kalibrační křivky (viz příloha X). Výsledné hodnoty a směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce v příloze XI. Na následujícím obrázku 18 je uvedeno porovnání hodnot antioxidační aktivity jednotlivých extraktů cibule v různých rozpouštědlech. Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatné odchylky z pěti měření.

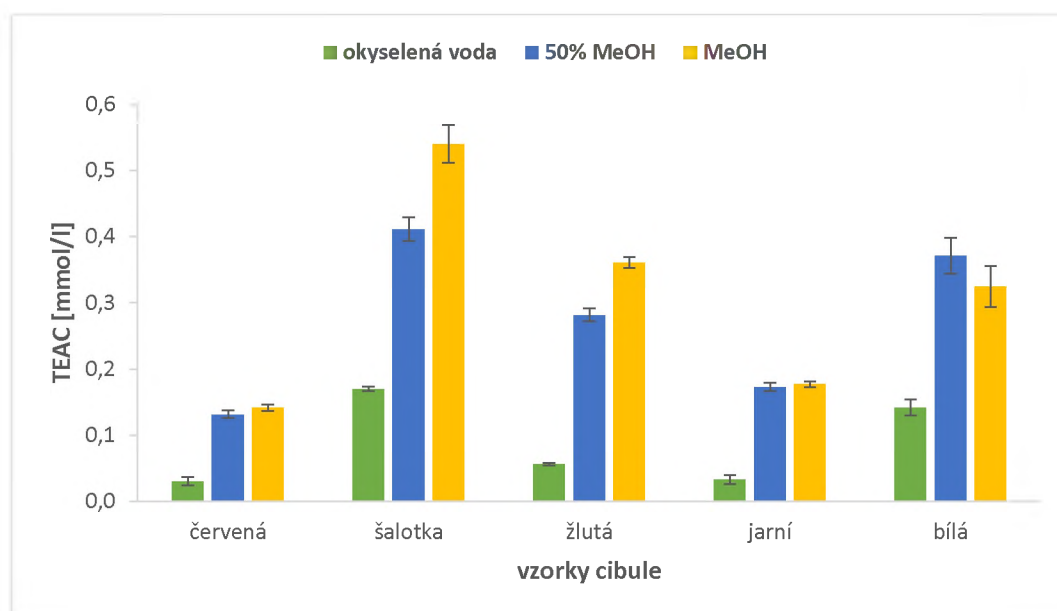


Obrázek 18: Metoda DPPH – antioxidační aktivita extraktů cibule

Z obrázku je patrné, že nejnižší hodnoty antioxidační aktivity stanovené metodou DPPH měly vzorky cibule extrahované do okyselené vody. Methanolové extrakty vykazovaly v porovnání s okyselenou vodou zhruba dvojnásobné hodnoty antioxidační aktivity. Antioxidační aktivita se u vzorků cibule liší v závislosti na barvě cibule, se kterou úzce souvisí obsah fenolických látek. Nejvyšší hodnota antioxidační aktivity byla naměřena u methanolického extraktu šalotky ($0,1519 \pm 0,0045$ mmol/l), zatímco nejmenší hodnota byla naměřena u vodného extraktu bílé cibule ($0,0131 \pm 0,0011$ mmol/l). Nízká hodnota antioxidační aktivity u jarní cibulky a bílé cibule naznačuje nižší obsah antioxidantů v porovnání se šalotkou nebo červenou cibulí.

Výsledky metody ABTS

Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS bylo provedeno u všech extraktů cibule podle postupu uvedeného v kapitole 2.4.4. Získané hodnoty byly vyhodnoceny stejným způsobem jako u metody DPPH a vztaženy na ekvivalentní množství troloxu. Příslušná kalibrační závislost troloxu je uvedena v příloze XII. Výsledné hodnoty a směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce v příloze XIII. Porovnání hodnot antioxidační aktivity jednotlivých extraktů cibule je uvedeno na obrázku 19. Chybové úsečky v grafu opět znázorňují směrodatné odchylky z pěti měření.



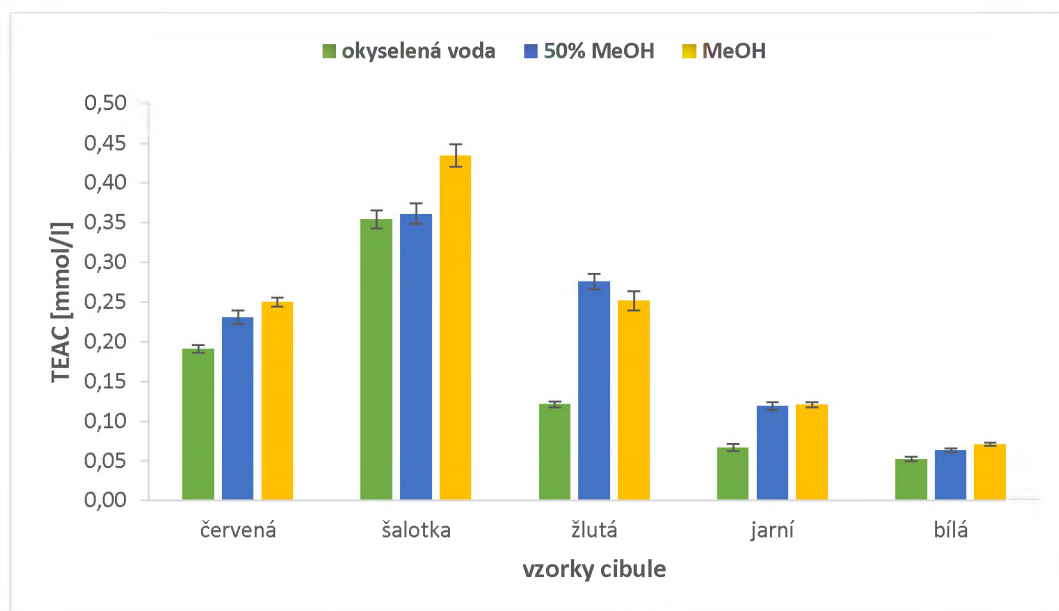
Obrázek 19: Metoda ABTS – antioxidační aktivita extraktů cibule

Nejnižší antioxidační aktivita byla obdobně jako u metody DPPH naměřena u všech vzorků cibule extrahovaných do okyselené vody. Vzorky extrahované v čistém a v 50% methanolu poskytovaly mnohem větší hodnoty v porovnání s extrakty v okyselené vodě. Nejvyšší

antioxidační aktivita byla naměřena stejně jako u metody DPPH v methanolickém extraktu šalotky ($0,5398 \pm 0,0285$ mmol/l). Nejnižší hodnotu antioxidační aktivity vykazoval vzorek červené cibule extrahované v okyselené vodě ($0,0303 \pm 0,0064$ mmol/l), což je naopak s výsledky naměřenými pomocí metody DPPH.

Výsledky metody FRAP

Stanovení antioxidační aktivity všech vzorků cibule metodou FRAP bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 2.4.4. Naměřené hodnoty absorbance byly přepočítány podle rovnice 2 a vztaženy na ekvivalentní množství troloxu. Kalibrační závislost troloxu je uvedena v příloze XIV a výsledné hodnoty se směrodatnými odchylkami jsou uvedeny v příloze XV. Na následujícím obrázku 20 je uvedeno porovnání hodnot antioxidační aktivity jednotlivých extraktů cibule v různých rozpouštědlech.

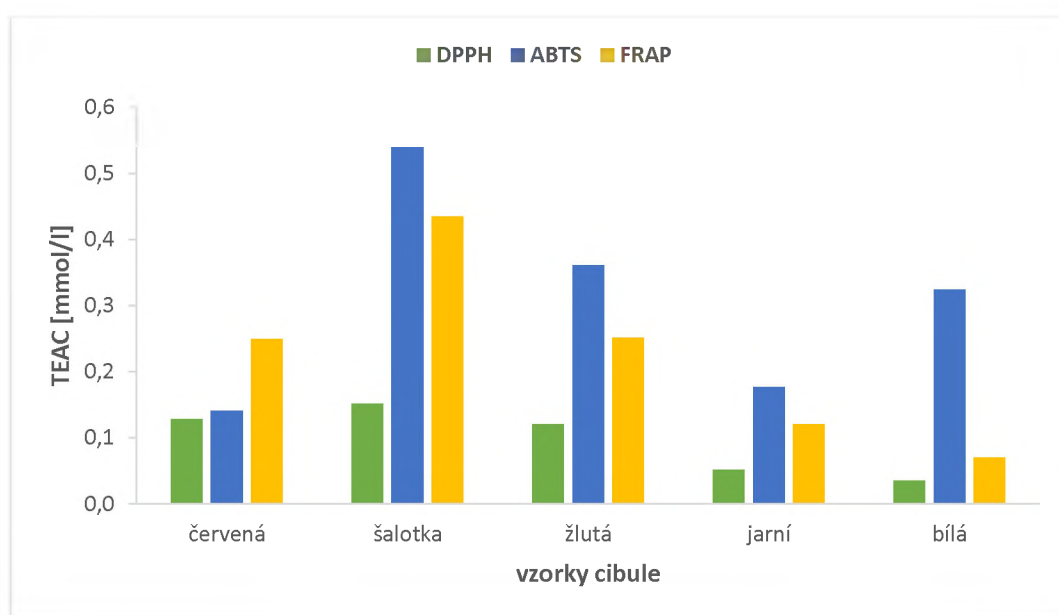


Obrázek 20: Metoda FRAP – antioxidační aktivita extraktů cibule

Opět jako u metody DPPH a ABTS byla nejnižší antioxidační aktivita u vodných extraktů, ale např. u extraktu šalotky už nebyl tak patrný rozdíl jako u předešlých dvou metod. Vzorky extrahované v čistém a v 50% methanolu poskytovaly obdobné hodnoty antioxidační aktivity kromě vzorku šalotky, která měla celkově nejvyšší antioxidační aktivitu v extraktu methanolu ($0,4346 \pm 0,0143$ mmol/l). Nejnižší hodnoty byly stejně jako u metody DPPH naměřeny u všech extraktů bílé cibule, kdy nejnižší hodnota byla stanovena ve vodném extraktu ($0,0523 \pm 0,0029$ mmol/l). Jak už bylo řečeno, nízká antioxidační aktivita souvisí s nízkým obsahem látek s antioxidačním účinkem.

Porovnání metod pro stanovení antioxidační aktivity

K porovnání výsledků všech tří metod použitých ke stanovení antioxidační aktivity (viz obrázek 21) byly vybrány methanolické extrakty, protože téměř u všech byla naměřena nejvyšší antioxidační aktivita. Z obrázku je patrné, že antioxidační aktivita extraktů cibule naměřená metodou DPPH klesala postupně v řadě šalotka, červená cibule, žlutá cibule, jarní cibulka a bílá cibule. U metody FRAP došlo pouze k prohození pořadí u červené a žluté cibule, kdy žlutá cibule měla nepatrně vyšší hodnotu antioxidační aktivity než cibule červená. U metody ABTS klesala antioxidační aktivita vzorků cibule postupně v řadě šalotka, žlutá cibule, bílá cibule, jarní cibulka a červená cibule.



Obrázek 21: Porovnání antioxidační aktivity extraktů cibule stanovené metodami DPPH, ABTS a FRAP

Nejvyšší antioxidační aktivita byla naměřena metodou ABTS, a to v rozsahu 0,1412 – 0,5398 mmol/l. Výjimkou byl pouze vzorek červené cibule, kde byla největší antioxidační aktivita zaznamenána metodou FRAP. Naproti tomu nejnižší hodnoty antioxidační aktivity poskytla metoda DPPH v rozsahu 0,0355 – 0,1519 mmol/l. Hodnoty antioxidační aktivity naměřené metodou FRAP byly v porovnání s metodou DPPH značně vyšší a pohybovaly se v rozmezí 0,0706 – 0,4346 mmol/l.

Rozdílné výsledky antioxidační aktivity získané jednotlivými metodami mohou být způsobené jak odlišnými principy těchto metod, tak různými reakčními mechanismy daných činidel s antioxidanty obsaženými ve vzorku. Radikálový kation $ABTS^{•+}$ reaguje s veškerými látkami, které vykazují antioxidační aktivitu, tudíž by metoda ABTS měla poskytovat nejvyšší výsledky a měla by být nejpřesnější. Rozdíl je ale u reakce radikálu $DPPH^{•}$, který

se všemi antioxidanty reagovat nemusí (např. některé skupiny flavonoidů), popřípadě je reakce velmi pomalá. Z tohoto důvodu jsou výsledky získané pomocí metody DPPH ve srovnání s metodou ABTS nižší. Metoda FRAP je založena na redukci komplexu Fe^{3+} -TPTZ a její princip je tedy odlišný od metod DPPH a ABTS. Při této metodě je zjištěna spíše celková redukční schopnost látek, která nemusí zcela souviset s antioxidační aktivitou naměřenou metodami ABTS a DPPH. Antioxidační aktivita získaná metodou FRAP je tedy interpretována jako redukční schopnost antioxidantů.

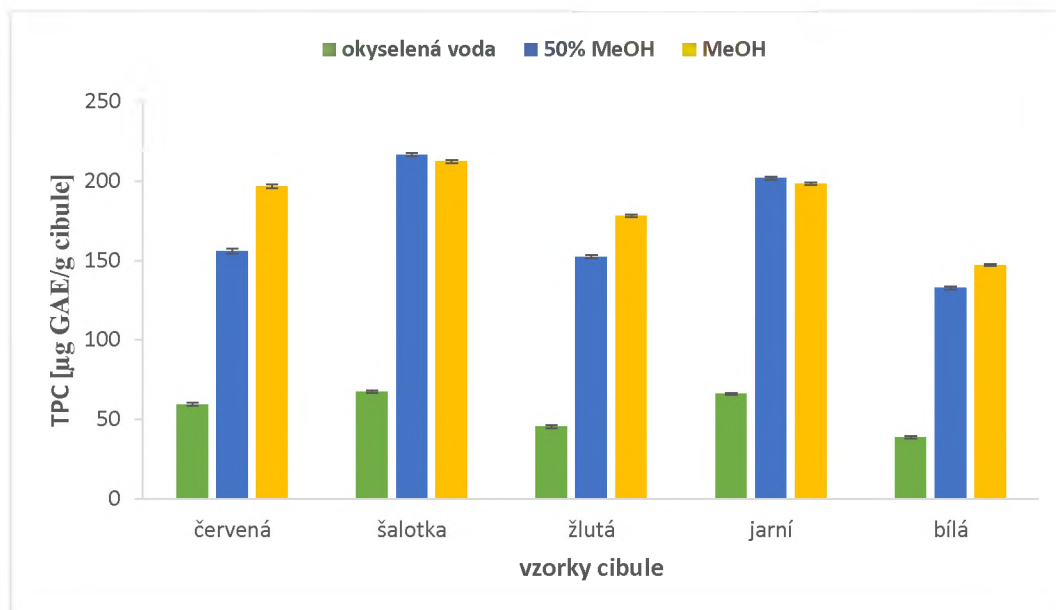
Co se týká porovnání výsledků získaných v této diplomové práci s publikovanou literaturou, je možné shrnout, že antioxidační aktivita cibulí v této práci je zpravidla značně nižší, než uvádí rozličné studie [5,7,14,43,65]. Podle literatury antioxidační aktivita cibule souvisí s barvou odrůdy, což je úzce spojeno s obsahem fenolických látek. Dále ale může být antioxidační aktivita cibule ovlivněna i počasím při jejím pěstování. Hodnoty antioxidační aktivity mohou být vyšší, když je při pěstování cibule horko a sucho, kdežto nižší hodnoty mohou být způsobeny nízkou teplotou a vydatnými srážkami. Závisí i na geografických podmínkách. Nejčastěji je antioxidační aktivita v publikované literatuře stanovována u vzorků červené, žluté a bílé cibule. U šalotky a jarní cibulky už tolik ne. Nejvyšší antioxidační aktivita byla stanovena u šalotky či červené cibule a nejnižší u cibule bílé. V této diplomové práci bylo dosaženo stejného trendu poklesu antioxidační aktivity u jednotlivých extraktů cibule kromě stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS u bílé cibule.

Ve studiích [5,7,65] byla antioxidační aktivita stanovena stejnými metodami jako v této diplomové práci. Nejvyšší výsledky antioxidační aktivity u vzorků cibule byly získány metodou ABTS, poté metodou FRAP a nejnižší výsledky byly naměřeny metodou DPPH, což je v souladu s touto prací.

3.3.2 Stanovení celkového obsahu polyfenolických látek

Stanovení celkového obsahu polyfenolických látek (TPC) u všech vzorků cibule bylo provedeno Folin-Ciocalteuovou metodou podle postupu uvedeného v kapitole 2.4.4. Vzorky cibulí byly zpracovány podle postupu uvedeného v kapitole 2.4.1 a k extrakci byla použita okyselená voda na hodnotu pH 2, 50% methanol a methanol. Všechny extrakty byly proměřeny pětkrát a výsledky byly přepočítány na ekvivalent kyseliny galové (GAE) z rovnice regrese kalibrační křivky (viz příloha XVI) a vyjádřeny v jednotkách μg GAE/g cibule (viz příloha XVII). Na následujícím obrázku 22 jsou získané výsledky celkového

obsahu polyfenolických látek v jednotlivých druzích cibule. Chybové úsečky v grafu znázorňují směrodatné odchylky z pěti měření.



Obrázek 22: Celkový obsah polyfenolických látek v extraktech cibule

Z grafu je patrné, že nejnižší hodnoty polyfenolických látek byly získány extrakcí cibule do okyselené vody 38,62 – 67,30 µg GAE/g. Výsledky vzorků cibule extrahovaných do 50% methanolu se pohybovaly v rozsahu 132,70 – 216,62 µg GAE/g a v čistém methanolu v rozmezí 147,13 – 212,28 µg GAE/g. Hodnoty získané u methanolicých extraktů byly mezi sebou téměř srovnatelné.

Výsledky diplomové práce byly v porovnání s literaturou nižší [5,14,43,65]. Ve studii [14] byl obsah polyfenolických látek v cibulové šťávě asi 3,5× nižší než v této práci. Vyšší hodnoty byly uvedeny i ve studii [43], ale pouze u jednoho druhu žluté cibule – *Vidalia* byl stanoven podobný obsah polyfenolických látek jako v této práci (168 ± 12 µg GAE/g). V uvedených studiích byl nejvyšší obsah polyfenolických látek u šalotky nebo červené cibule, naopak nejnižší obsah byl uveden u cibule bílé, což se shoduje s touto diplomovou prací. Při porovnání s literaturou je ale třeba brát v úvahu to, že vzorky cibulí ve studiích jsou z jiných oblastí než ty, co byly analyzovány v této diplomové práci. Jak už bylo řečeno u antioxidační aktivity, obsah polyfenolických látek se může měnit v závislosti na podmínkách při pěstování.

3.3.3 Stanovení celkového obsahu flavonoidů

Ke stanovení celkového obsahu flavonoidů cibule byl použit postup uvedený v kapitole 2.4.4. Vzorky všech pěti druhů cibulí byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 2.4.1

a stejně jako u předchozích stanovení byla k extrakci použita okyselená voda na hodnotu pH 2, 50% methanol a methanol. Všechny extrakty byly proměřeny pětkrát a hodnoty byly přepočítány jako ekvivalent kvercetinu (QE) z rovnice regrese kalibrační křivky (viz příloha XVIII). V následující tabulce 15 je zobrazeno porovnání výsledků v jednotlivých odrůdách cibule.

Tabulka 15: Celkový obsah flavonoidů v extraktech cibule

Flavonoidy [$\mu\text{g QE/g}$ cibule]			
Druh cibule	okyselená voda	50% MeOH	MeOH
šalotka	$78,03 \pm 0,94$	$111,22 \pm 0,95$	$123,17 \pm 0,59$
žlutá	$29,72 \pm 0,44$	$71,65 \pm 0,74$	$105,54 \pm 0,78$
červená	$23,07 \pm 0,44$	$40,76 \pm 0,60$	$56,93 \pm 1,15$
jarní	--	$1,61 \pm 0,08$	$2,38 \pm 0,1$
bílá	--	--	--

Celkový obsah flavonoidů se podařilo stanovit ve všech extraktech šalotky, červené cibule a žluté cibule. Vodný extrakt jarní cibulky a všechny extrakty bílé cibule neposkytovaly měřitelnou absorbanci. Obdobně jako u stanovení antioxidační aktivity a celkového obsahu polyfenolických látek platilo, že nejnižší obsah flavonoidů byl ve vodných extraktech a nejvyšší obsah byl v methanolicých extraktech. Největší množství flavonoidů obsahovala šalotka extrahovaná v methanolu ($123,17 \pm 0,59 \mu\text{g QE/g}$), což koreluje i s obsahem polyfenolických látek a s antioxidační aktivitou. Nejmenší množství bylo naměřeno u jarní cibulky ($1,61 \pm 0,08 \mu\text{g QE/g}$). Obsah flavonoidů ve vzorcích postupně klesal v pořadí šalotka, žlutá cibule, červená cibule a jarní cibulka.

Celkový obsah flavonoidů ve studiích [5,7] byl v porovnání s diplomovou prací o něco vyšší, avšak látky byly vztaženy na standardy rutinu či katechinu, což nelze s výsledky diplomové práce úplně srovnávat. Ve studii [39] byl stanoven podobný obsah flavonoidů u různých druhů cibule (v rozmezí $80 - 180 \mu\text{g/g}$) jako v této diplomové práci, ale opět byly výsledky vztaženy na standard katechinu.

3.3.4 Stanovení celkového obsahu anthokyanů

Stanovení celkového obsahu anthokyanů bylo provedeno pH diferenciální metodou podle postupu uvedeného v kapitole 2.4.4. Vzorky šalotky, červené a žluté cibule byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 2.4.1. Vzorky bílé cibule a jarní cibulky analyzovány nebyly, protože anthokyanů buď neobsahují, nebo je jejich obsah velmi nízký, jak je patrné už z jejich zbarvení. K extrakci byla použita dvě rozpouštědla okyselená kyselinou mravenčí

na hodnotu pH 2, a to voda a 80% methanol, který byl vybrán na základě literatury, protože v něm jsou anthokyaniny dobře rozpustné. Všechny extrakty byly proměřeny pětkrát a obsah anthokyaninů byl vztažen na standard kyanidin-3-glukosid (CGE) dle rovnice 3 a vyjádřen v jednotkách $\mu\text{g CGE/g}$ cibule.

Před vlastním stanovením bylo testováno množství pufru přidávaného k 1 ml extraktu. 1 ml extraktu v odměrné baňce byl vždy doplněn puftrem o příslušném pH (pH 1 nebo pH 4,5) po rysku, a to na objem 5 ml, 10 ml a 25 ml. Nejvyšší absorpenci při spektrofotometrickém měření poskytoval 1 ml extraktu doplněný puftrem na 5 ml objemu. Tento objem byl tedy použit při stanovení extraktů.

Vzorky extrahované v okyselené vodě obsahovaly menší množství anthokyaninů než vzorky extrahované v okyseleném 80% methanolu. Nejvyšší obsah byl stanoven v methanolickeém extraktu červené cibule ($13,81 \pm 1,44 \mu\text{g/g}$). Vodný extrakt červené cibule obsahoval zhruba o polovinu menší množství anthokyaninů ($7,20 \pm 0,30 \mu\text{g/g}$). Extrakty šalotky v porovnání s červenou cibulí obsahovaly mnohem méně anthokyaninů ($1,52 \pm 0,32 \mu\text{g/g}$ vodný extrakt a $2,61 \pm 0,73 \mu\text{g/g}$ methanolickeý extrakt). Tento rozdíl je patrný již ze zbarvení obou vzorků. Šalotka je narůžovělá až fialová, kdežto červená cibule má barvu purpurově červenou. V extraktech žluté cibule nebyla měřitelná absorpance, tudíž se anthokyaniny nepodařilo stanovit.

Vyšší výsledky v porovnání s touto diplomovou prací byly uvedeny ve studii [5]. Celkový obsah anthokyaninů autoři stanovili nejen u červené cibule (cca $300 \mu\text{g/g}$), ale i u cibule žluté, a dokonce u cibule bílé (cca $8 \mu\text{g/g}$). Cibule analyzované v této studii jsou z oblasti Číny, což může být jeden z důvodů vyššího obsahu anthokyaninů než ve vzorcích analyzovaných v této práci. Vyšší obsah anthokyaninů byl také uveden ve studii [7]. S výsledky diplomové práce koresponduje studie [70], v které uvádí obsah anthokyaninů v červené cibuli zhruba $7 \mu\text{g/g}$. Pro zajímavost v suchých obalových listech cibule stanovili vyšší obsah cca $100 \mu\text{g/g}$.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byla analýza bioaktivních látek obsažených v různých druzích cibule za využití chromatografických a spektrofotometrických technik. Mezi nejvýznamnější bioaktivní látky v cibuli patří zejména sírné sloučeniny a fenolické látky.

První část diplomové práce byla zaměřena na analýzu těkavých látek pomocí plynové chromatografie. Mezi dominantní těkavé látky v cibuli patří především sírné sloučeniny, které jsou zodpovědné za charakteristický zápach a chuť cibule. Ve vzorcích cibule bylo nalezeno čtrnáct sírných látek a jeden aldehyd. Mezi nejběžnější sírné sloučeniny obsažené v cibuli patřily disulfidy, trisulfidy a thiofeny. Nejzajímavější látkou byl thiopropanal sulfoxid (tzv. slzný faktor), který byl nejvíce zastoupen ve vzorku šalotky.

Další část této práce byla věnována identifikaci a kvantifikaci fenolických látek kapalinovou chromatografií. Byly analyzovány dvě skupiny fenolických látek, a to flavonoidy a anthokyany. V cibulích bylo identifikováno celkem sedm flavonoidů. Jednalo se o dva glykosidy isorhamnetinu a aglykon kvercetin s jeho čtyřmi glykosidy. Dominantními flavonoidy byly kvercetin-3,4'-diglukosid a kvercetin-4'-glukosid, které tvořily zhruba 90 % obsahu všech flavonoidů v cibuli. Nejvyšší obsah flavonoidů byl stanoven u červené cibule, poté u šalotky, a nakonec u žluté cibule. V bílé cibuli a jarní cibulce se flavonoidy nepodařilo stanovit. Anthokyany byly analyzovány v šalotce, červené a žluté cibuli. Celkově se podařilo identifikovat pět anthokyanů, z toho byly čtyři glykosidy kyanidinu a jeden glykosid delfinidinu. V červené cibuli i šalotce byl dominantním anthokyanem kyanidin-3-(6''-malonylglukosid). Nejvyšší obsah byl stanoven u vzorku červené cibule a poté u šalotky. Žlutá cibule anthokyany neobsahovala.

Poslední částí této diplomové práce bylo stanovení antioxidační aktivity, stanovení celkového obsahu polyfenolických látek, flavonoidů a anthokyanů spektrofotometrickými metodami. Nejvyšší antioxidační aktivitu stanovenou metodami DPPH, ABTS a FRAP vykazovala šalotka. Antioxidační aktivita cibule je způsobena obsahem sírných sloučenin, flavonoidů a anthokyanů. Nejvyšší množství polyfenolických látek bylo stanoveno u šalotky a nejnižší obsah byl určen u bílé cibule. Celkový obsah flavonoidů byl nejvyšší také u šalotky a nejnižší u jarní cibulky. Červená cibule obsahovala nejvyšší množství anthokyanů, po ní následovala šalotka a žlutá cibule anthokyany neobsahovala.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] JANČA, Jiří, ZENTRICH, Josef A. *Herbář léčivých rostlin 1. díl*. Praha: Eminent, 1994, 288 s. ISBN: 80-85876-02-7.
- [2] ŠTĚPÁNKOVÁ, Jitka, CHRTEK, Jindřich, KAPLAN, Zdeněk. *Květena České republiky 8*. Praha: Academia, 2010, 712 s. ISBN: 978-80-200-1824-3.
- [3] SULERIA, HA., BUTT, MS., ANJUM, FM., SAEED, F., KHALID, N. Onion: nature protection against physiological threats. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **2015**, 55 (1), 50-66. ISSN: 1549-7852.
- [4] *ZeSemen.cz* [online]. © 2010-2020 [cit. 16. 10. 2018].
Dostupné z: <https://www.zesemen.cz/cibule/800-cibule-jarni-kuchynska-vsetana-semena-cibule-200-ks.html>.
- [5] ZHANG, Shi-lin, DENG, Peng, XU, Yu-chao, LÜ, Shan-wu, WANG, Jian-jun. Quantification and analysis of anthocyanin and flavonoids compositions, and antioxidant activities in onions with three different colors. *Journal of Integrative Agriculture*. **2016**, 15 (9), 2175-2181. ISSN: 2095-3119.
- [6] MICHALEC, Zdeněk. *Člověk a rostliny*. Praha: ROH, 1997, 272 s. ISBN: 24-110-77.
- [7] GORINSTEIN, Shela, LEONTOWICZ, Hanna, LEONTOWICZ, Maria, NAMIESNIK, Jacek, NAJMAN, Kasia, DRZEWIECKI, Jerzy, CVIKROVÁ, Milena, MARTINCOVÁ, Olga, KATRICH, Elena, TRAKHTENBERG, Simon. Comparison of the Main Bioactive Compounds and Antioxidant Activities in Garlic and White and Red Onions after Treatment Protocols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**, 56 (12), 4418-4426. ISSN: 0021-8561.
- [8] GRIFFITHS, G., TRUEMAN, L., CROWTHER, T., THOMAS, B., SMITH, B. Onions – a global benefit to health. *Phytotherapy Research*. **2002**, 16 (7), 603-615. ISSN: 1099-1573.
- [9] LEE, Seung Uh, Jong Ha, CHOI, Suk Hyun, LEE, Jin Shik, OHNISI-KAMEYAMA, Mayumi, KOZUKUE, Nobuyuki, LEVIN, Carol E., FRIEDMAN, Mendel. Flavonoid Content in Fresh, Home-Processed, and Light-Exposed Onions and in Dehydrated Commercial Onion Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**, 56 (18), 8541-8548. ISSN: 0021-8561.

- [10] DOLEJŠÍ, Antonín. *Zelenina na zahrádce*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1987, 216 s. ISBN: 07-019-87.
- [11] ŠAPIRO, D. K. a kolektiv. *Ovoce a zelenina ve výživě člověka*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1988, 232 s. ISBN: 5-7860-0431-7.
- [12] BAHRAM-PARVAR, Maryam, LIM, Loong-Tak. Fresh-Cut Onion: A Review on Processing, Health Benefits, and Shelf-Life. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **2018**, 17 (2), 290-308. ISSN: 1541-4337.
- [13] KWAK, Jung-Ho, SEO, Jeong Min, KIM, Na-Hyung, ARASU, Mariadhas Valan, KIM, Sunggil, YOON, Moo Kyoung, KIM, Sun-Ju. Variation of quercetin glycoside derivatives in three onion (*Allium cepa* L.) varieties. *Saudi Journal of Biological Sciences*. **2016**, 24 (6), 1387-1391. ISSN: 1319-562X.
- [14] LEE, Eun Jin, PATIL, Bhimanagouda S., YOO, Kil Sun. Antioxidants of 15 onions with white, yellow, and red colors and their relationship with pungency, anthocyanin, and quercetin. *LWT - Food Science and Technology*. **2015**, 63 (1), 108-114. ISSN: 1096-1127.
- [15] NORMANOVÁ, Jill. *Česnek a cibule*. Praha: Slovart, 2004, 40 s. ISBN: 80-7209-532-3.
- [16] PRAKASH, Dhan, SINGH, Brahma N., UPADHYAY, Garima. Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*). *Food Chemistry*. **2007**, 102 (4), 1389-1393. ISSN: 1873-7072.
- [17] LANZOTTI, Virginia. The analysis of onion and Garlic. *Journal of Chromatography A*. **2006**, 1112 (1-2), 3-22. ISSN: 1873-3778.
- [18] SO MANG, Choi, DONG-JIN, Lee, JONG-YEA, Kim, SEUNG-TAIK, Lim. Volatile composition and sensory characteristics of onion powders prepared by convective drying. *Food Chemistry*. **2017**, 231, 386-392. ISSN: 1873-7072.
- [19] LIGUORI, Loredana, CALIFANO, Rosa, ALBANESE, Donatella, RAIMO, Francesco, CRESCITELLI, Alessio, MATTEO, Di Marisa. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Five White Onion (*Allium cepa* L.) Landraces. *Journal of Food Quality*. **2017**, 2017, 1-9. ISSN: 1745-4557.

- [20] MORGEN, Lars M, OLSSON, Marie E, GERTSSON, Ulla E. Effects of cultivar, lifting time and nitrogen fertiliser level on quercetin content in onion (*Allium cepa* L.) at lifting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2007**, 87 (3), 470-476. ISSN: 1097-0010.
- [21] VELÍŠEK, Jan, HAJŠLOVÁ, Jana. *Chemie potravin II*. Tábor: OSSIS, 2009, 644 s. ISBN: 978-80-86659-16-9.
- [22] SANTAS, Jonathan, ALMAJANO, María Pilar, CARBÓ, Rosa. Antimicrobial and antioxidant activity of crude onion (*Allium cepa*, L.) extracts. *International Journal of Food Science and Technology*. **2010**, 45 (2), 403-409. ISSN: 1365-2621.
- [23] LANCASTER, J. E., COLLIN, H. A. Presence of alliinase in isolated vacuoles and of alkyl cysteine sulphoxides in the cytoplasm of bulbs of onion (*Allium cepa*). *Plant Science Letters*. **1981**, 22 (2), 169-176. ISSN: 1873-2259.
- [24] MONDY, N., DUPLAT, D., CHRISTIDES, J.P., ARNAULT, I., AUGER, J. Aroma analysis of fresh and preserved onions and leek by dual solid-phase microextraction–liquid extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2002**, 963 (1-2), 89-93. ISSN: 1873-3778.
- [25] COLINA-COCA, Clara, GONZÁLEZ-PEÑA, Diana, VEGA, Estela, ANCOS, de Begoña, SÁNCHEZ-MORENO, Concepción. Novel approach for the determination of volatile compounds in processed onion by headspace gas chromatography–mass spectrometry (HS GC–MS). *Talanta*. **2013**, 103, 137-144. ISSN: 0039-9140.
- [26] KREMR, D., BAJEROVÁ, P, BAJER, T, EISNER, A, ADAM, M, VENTURA, K. Using headspace solid-phase microextraction for comparison of volatile sulphur compounds of fresh plants belonging to families Alliaceae and Brassicaceae. *Journal of Food Science and Technology*. **2015**, 52 (9), 5727-5735. ISSN: 0975-8402.
- [27] TOCMO, Restituto, LIN, Yi, HUANG, Dejian. Effect of Processing Conditions on the Organosulfides of Shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum Group). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2014**, 62 (23), 5296-5304. ISSN: 0021-8561.

- [28] NACZK, Marian, SHAHIDI, Fereidoon. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*. **2004**, 1054 (1-2), 95-111. ISSN: 1873-3778.
- [29] DAI, Jin, MUMPER, Russell J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*. **2010**, 15 (10), 7313-7352. ISSN: 1420-3049.
- [30] STRATIL, Pavel, KLEJDUS, Bořivoj, KUBÁŇ, Vlastimil. Determination of Total Content of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Vegetables – Evaluation of Spectrophotometric Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, 54 (3), 607-616. ISSN: 0021-8561.
- [31] PÉREZ-GREGORIO, Rosa María, GARCÍA-FALCÓN, Mercedes Sonia, SIMAL-GÁNDARA, Jesús, RODRIGUES, Ana Sofia, ALMEIDA, Domingos P.F. Identification and quantification of flavonoids in traditional cultivars of red and white onions at harvest. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2010**, 23 (6), 592-598. ISSN: 0889-1575.
- [32] LEELARUNGRAYUB, Nuttakaan, RATTANAPANONE, Viboon, CHANARAT, Nantaya, GEBICKI, Janusz M. Quantitative evaluation of the antioxidant properties of garlic and shallot preparations. *Nutrition*. **2006**, 22 (3), 266-274. ISSN: 1475-2891.
- [33] ROLDÁN-MARÍN, Eduvigis, SÁNCHEZ-MORENO, Concepción, LLORÍA, Rosana, ANCOS, de Begoña, CANO, M. Pilar. Onion high-pressure processing: Flavonol content and antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*. **2009**, 42 (4), 835-841. ISSN: 1096-1127.
- [34] BIESAGA, Magdalena. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A*. **2011**, 1218 (18), 2505–2512. ISSN: 1873-3778.
- [35] ROUTRAY, Winny, ORSAT, Valérie. Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. *Food and Bioprocess Technology*. **2012**, 5 (2), 409-424. ISSN: 1935-5130.
- [36] MUROTA, Kaeko, TERAOKA, Junji. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **2003**, 417 (1), 12-17. ISSN: 1096-0384.

- [37] NUUTILA, A.M., KAMMIOVIRTA, K., OKSMAN-CALDENTEY, K.-M. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chemistry*. **2002**, 76 (4), 519-525. ISSN: 1873-7072.
- [38] NUUTILA, Anna Maria, PUUPPONEN-PIMIÄ, Riitta, AARNI, Marjukka, OKSMAN-CALDENTEY, Kirsi-Marja. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chemistry*. **2003**, 81 (4), 485-493. ISSN: 1873-7072.
- [39] SOTO, V.C., GONZÁLEZ, R.E., SANCE, M.M., GALMARINI, C.R. Organosulfur and phenolic content of garlic (*Allium sativum* L.) and onion (*Allium cepa* L.) and its relationship with antioxidant activity. *Acta Horticulturae*. **2016**, (1143), 277-290. ISSN: 2406-6168.
- [40] LOMBARD, Kevin A., GEOFFRIAU, Emmanuel, PEFFLEY, Ellen. Flavonoid Quantification in Onion by Spectrophotometric and High Performance Liquid Chromatography Analysis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. **2002**, 37 (4), 682-685. ISSN: 0003-1062.
- [41] BONACCORSI, Paola, CARISTI, Corrado, GARGIULLI, Claudia, LEUZZI, Ugo. Flavonol Glucoside Profile of Southern Italian Red Onion (*Allium cepa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53 (7), 2733-2740. ISSN: 0021-8561.
- [42] MORENO-ROJAS, José Manuel, MORENO-ORTEGA, Alicia, ORDÓÑEZ, José Luis, MORENO-ROJAS, Rafael, PÉREZ-APARICIO, Jesús, PEREIRA-CARO, Gema. Development and validation of UHPLC-HRMS methodology for the determination of flavonoids, amino acids and organosulfur compounds in black onion, a novel derived product from fresh shallot onions (*Allium cepa* var. *aggregatum*). *LWT - Food Science and Technology*. **2018**, 97, 376-383. ISSN: 1096-1127.
- [43] YANG, Jun, MEYERS, Katherine J., HEIDE, van der Jan, LIU, Rui Hai. Varietal Differences in Phenolic Content and Antioxidant and Antiproliferative Activities of Onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**, 52 (22), 6787-6793. ISSN: 0021-8561.

- [44] GENNARO, Laura, LEONARDI, Cherubino, ESPOSITO, Fabrizio, SALUCCI, Monica, MAIANI, Giuseppe, QUAGLIA, Giovanni, FOGLIANO Vincenzo. Flavonoid and Carbohydrate Contents in Tropea Red Onions: Effects of Homelike Peeling and Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**, 50 (7), 1904-1910. ISSN: 0021-8561.
- [45] CHANG, Chia-Chi, YANG, Ming-Hua, WEN Hwei-Mei, CHERN, Jiing-Chuan. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. **2002**, 10 (3), 178-182. ISSN: 1021-9498.
- [46] ZHENG, Jie, LI, Hui, DING, ChenXu, SUO, YouRui, WANG, LiangSheng, WANG, HongLun. Anthocyanins composition and antioxidant activity of two major wild *Nitraria tangutorun* Bobr. variations from Qinghai-Tibet Plateau. *Food Research International*. **2011**, 44 (7), 2041-2046. ISSN: 0963-9969.
- [47] KONG, 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.
- [48] FOSSEN, Torgils, SLIMESTAD, Rune, ANDERSEN, Øyvind M. Anthocyanins with 4'-glucosidation from red onion, *Allium cepa*. *Phytochemistry*. **2003**, 64 (8), 1367-1374. ISSN: 0031-9422.
- [49] CHURÁČEK, J. a kolektiv. *Analytická separace látek*. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1990, 384 s. ISBN: 80-03-00569-8.
- [50] HOLZBEHCER, Z., CHURÁČEK, J. *Analytická chemie*. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1987, 664 s. ISBN: 04-612-87.
- [51] ZHANG, Zhouyao. YANG, Min J., PAWLISZYN, Janusz. Solid-Phase Microextraction. *Analytical Chemistry*. **1994**, 66 (17), 844A-853A. ISSN: 1520-6882.
- [52] ŠTĚRBA, K., DOSTÁLEK, P., KARABÍN, M. Modern Trends in Sample Preparation for Determination of Alcohols, Esters and Acids in Beer. *Chemické listy*. **2011**, 105 (8), 603-610. ISSN: 1213-7103.

- [53] FANG, Zhu, JIANQIAO, Xu, YUANYUAN, Ke, SIMING, Huang, FENG, Zeng, TIANGANG, Luan, GANGFENG, Ouyang. Applications of in vivo and in vitro solid-phase microextraction techniques in plant analysis: A review. *Analytica Chimica Acta*. **2013**, 794, 1-14. ISSN: 1873-4324.
- [54] GRAFIT, Arnon, MULLER, Dan, KIMCHI, Sarit, AVISSAR, Yaniv Y. Development of a Solid-phase microextraction (SPME) Fiber protector and its application in flammable liquid residues analysis. *Forensic Science International*. **2018**, 292, 138-147. ISSN: 0379-0738.
- [55] PAWLISZYN, Janusz. *Applications of Solid Phase Microextraction*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1999, 656 s. ISBN: 0-85404-525-2.
- [56] JÄRVENPÄÄ, Eila P., ZHANG, Zhouyao, HUOPALAHTI Rainer, KING, Jerry W. Determination of fresh onion (*Allium cepa* L.) volatiles by solid phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *Z Lebensm Unters Forsch A*. **1998**, 207, 39-43. ISSN: 0044-3026.
- [57] Sample Preparation: Headspace SPME. *Team:Valecia UPV – 2014.igem.org* [online]. Valencia_UPV, [cit. 10. 1. 2020]. Dostupné z: http://2014.igem.org/Team:Valencia_UPV/Project/modules/methodology/sample_preparation.
- [58] NOVÁKOVÁ, Lucie, DOUŠA, Michal. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha: Europrint, 2013, 300 s. ISBN: 978-80-260-4243-3.
- [59] CVAČKA, Josef. Úvod do vysokoúčinné kapalinové chromatografie [přednáška]. Praha: Katedra analytické chemie PřF UK, 5. 10. 2015. In: *docplayer.cz* [online]. [cit. 21. 11. 2018]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/12812453-Uvod-do-vysokoucinne-kapalinove-chromatografie.html>.
- [60] ČESLA, Petr. *Separáční analytické metody: 3 – Planární techniky, úvod do GC* [přednáška]. Pardubice: Univerzita Pardubice, fakulta chemicko-technologická, 16. 3. 2018.
- [61] ELIÁŠ, Jaromír. Plynově – chromatografická separace dusíkatých látek [prezentace]. Praha: Ústav plynárenství, koksochemie a ochrany ovzduší, VŠCHT, 15. 5. 2007. In: *SlidePlayer.cz* [online]. [cit. 28. 2. 2020]. Dostupné z: <https://slideplayer.cz/slide/3648503/>.

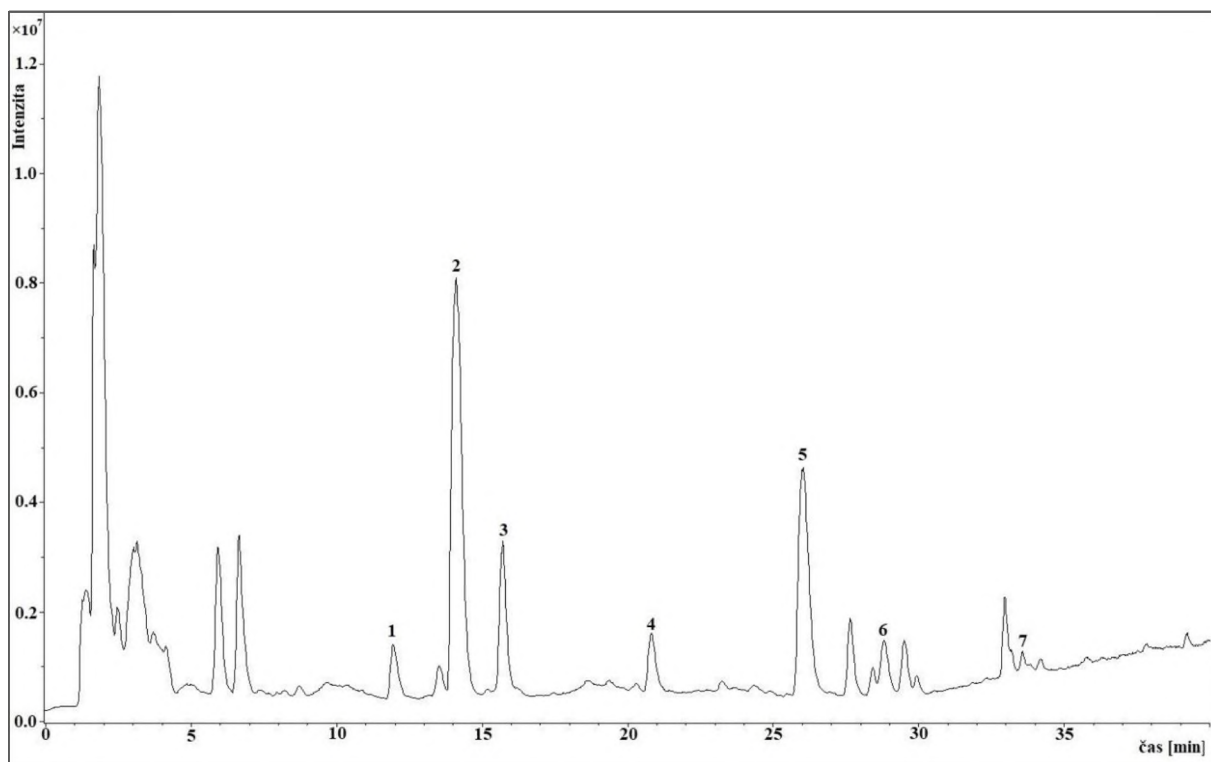
- [62] ČESLA, Petr. *Separační analytické metody: 4 – Kolony, detekce v GC* [přednáška]. Pardubice: Univerzita Pardubice, fakulta chemicko-technologická, 23. 3. 2018.
- [63] EMWAS, Abdul-Hamid M., AL-TALLA, Zeyad A., YANG, Yang, KHARBATIA, Najeh M. Gas Chromatography–Mass Spectrometry of Biofluids and Extracts. *Methods in Molecular Biology*. **2015**, 1277, 91-112. ISSN: 1940-6029.
- [64] HOLČAPEK, Michal. Hmotnostní spektrometrie [přednáška]. Pardubice, fakulta chemicko-technologická, 18. 3. 2019. In: *Michal Holčapek Mass Spectrometry Group at University of Pardubice* [online]. [cit. 28. 2. 2020]. Dostupné z: http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek/Mol_spek_prednaska6_MS.pdf.
- [65] LU, Xiaonan, WANG, Jun, AL-QADIRI, Hamzah M., ROSS, Carolyn F., POWERS, Joseph R., TANG, Juming, RASCO, Barbara A. Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy. *Food Chemistry*. **2011**, 129 (2), 637-644. ISSN: 1873-7072.
- [66] PAULOVÁ, Hana, BOCHOŘÁKOVÁ, Hana, TÁBORSKÁ, Eva. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*. *Chemické Listy*. **2004**, 98 (4), 174-179. ISSN: 1213-7103.
- [67] KARABÍN, Marcel, DOSTÁLEK, Pavel, HOFTA, Pavel. Přehled metod pro stanovení antioxidační aktivity v pivovarství. *Chemické Listy*. **2006**, 100 (3), 184-189. ISSN: 1213-7103.
- [68] FIDLER, Martin, KOLÁŘOVÁ, Lenka. Analýza antioxidantů v chmelu a pivu. *Chemické Listy*. **2009**, 103 (3), 232-235. ISSN: 1213-7103.
- [69] MACHOVÁ, Martina. *Těkavé látky uvolňované z cibule*. Pardubice, 2018. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická.
- [70] TASAHL, Albishia, JENNY, A. Johna, ABDULRAHMAN, S. Al-Khalifab, FERREIDON, Shahidi. Antioxidative phenolic constituents of skins of onion varieties and their activities. *Journal of Functional Foods*. **2013**, 5 (3), 1191-1203. ISSN: 1756-4646.

PŘÍLOHY

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I: TIC chromatogram vzorku červené cibule extrahované v 50% MeOH	77
Příloha II: Extrahované chromatogramy molekulových iontů flavonoidů	77
Příloha III: Hmotnostní spektra flavonoidů	78
Příloha IV: Kalibrační závislost kvercetinu (HPLC stanovení flavonoidů)	78
Příloha V: Kalibrační závislost isorhamnetin-3-glukosidu (HPLC stanovení flavonoidů)	79
Příloha VI: TIC chromatogram vzorku červené cibule extrahované v okyseleném 80% MeOH pH 2.....	79
Příloha VII: Extrahované chromatogramy molekulových iontů anthokyanů	80
Příloha VIII: Hmotnostní spektra anthokyanů	80
Příloha IX: Kalibrační závislost kyanidin-3-glukosidu (HPLC stanovení anthokyanů)	81
Příloha X: Metoda DPPH – závislost úbytku absorbance na koncentraci troloxu	81
Příloha XI: Antioxidační aktivita všech vzorků cibule naměřená metodou DPPH	81
Příloha XII: Metoda ABTS – závislost úbytku absorbance na koncentraci troloxu.....	82
Příloha XIII: Antioxidační aktivita všech vzorků cibule naměřená metodou ABTS	82
Příloha XIV: Metoda FRAP – závislost absorbance na koncentraci troloxu	82
Příloha XV: Antioxidační aktivita všech vzorků cibule naměřená metodou FRAP.....	83
Příloha XVI: Kalibrační závislost kyseliny galové (stanovení celkového obsahu polyfenolických látek, TPC).....	83
Příloha XVII: Celkový obsah fenolických látek ve všech vzorcích cibule	83
Příloha XVIII: Kalibrační závislost kvercetinu (stanovení obsahu flavonoidů).....	84

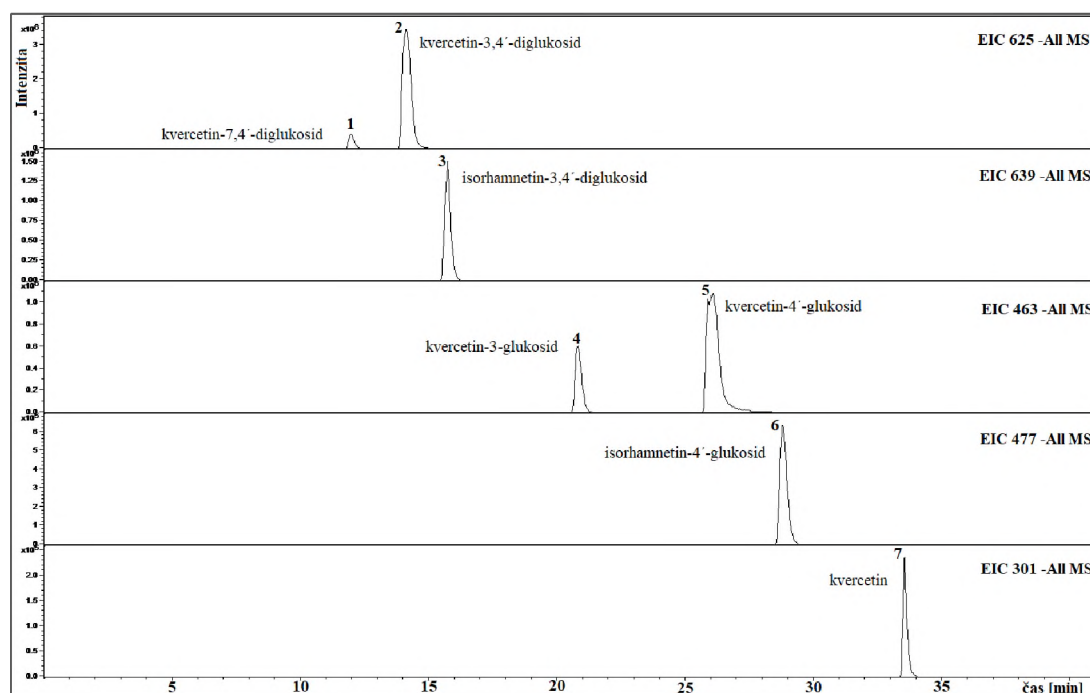
Příloha I: TIC chromatogram vzorku červené cibule extrahované v 50% MeOH



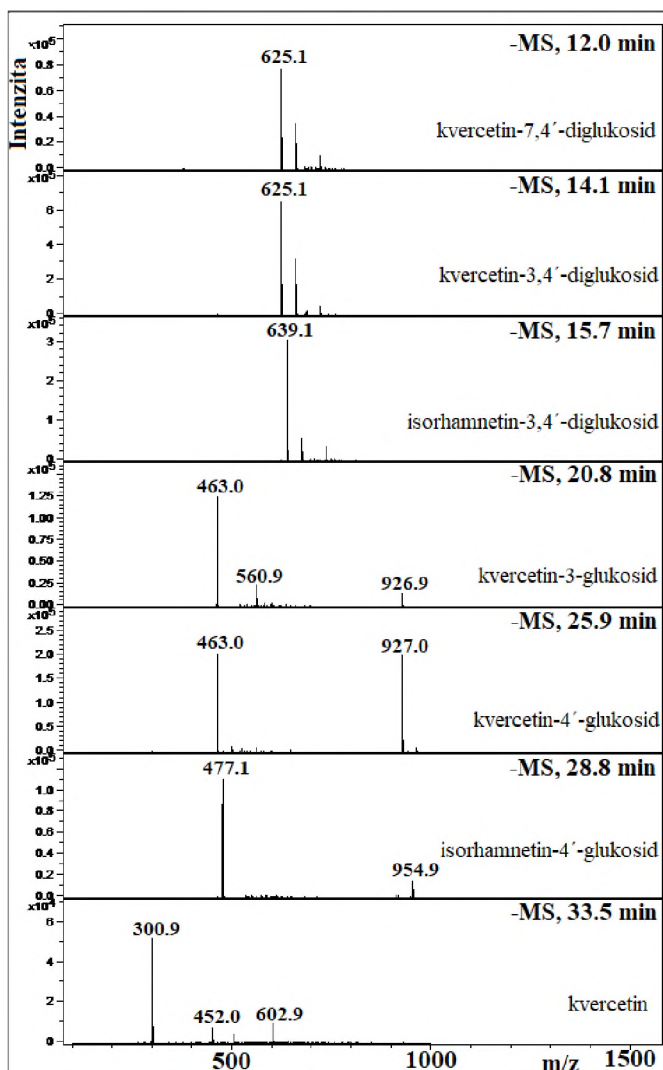
(1) kvercetin-7,4'-diglukosid, (2) kvercetin-3,4'-diglukosid, (3) isorhamnetin-3,4'-diglukosid, (4) kvercetin-3-glukosid, (5) kvercetin-4'-glukosid, (6) isorhamnetin-4'-glukosid, (7) kvercetin

Podmínky analýzy: kolona Gemini 3u C18 110A (150 × 3 mm, 3 μm), MF A okyselená voda pH 2, MF B acetonitril, nástřik 10 μl, teplota kolony 35 °C, průtok mobilní fáze 0,5 ml/min, gradient 0 min 10 % MF B, 25 min 20 % MF B a 40 min 60 % MF B, UV/VIS detekce 254 nm.

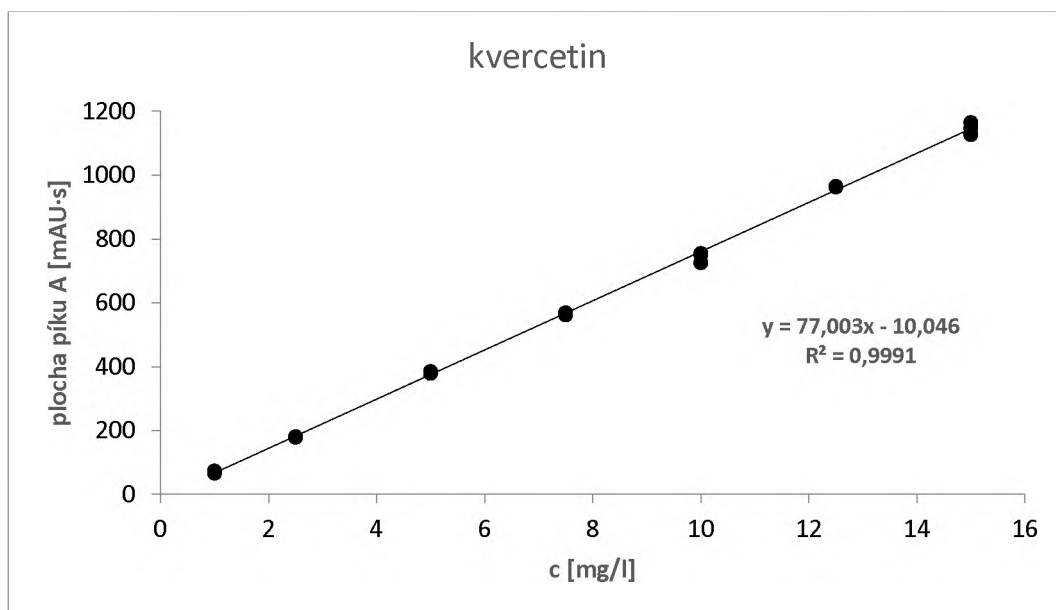
Příloha II: Extrahované chromatogramy molekulových iontů flavonoidů



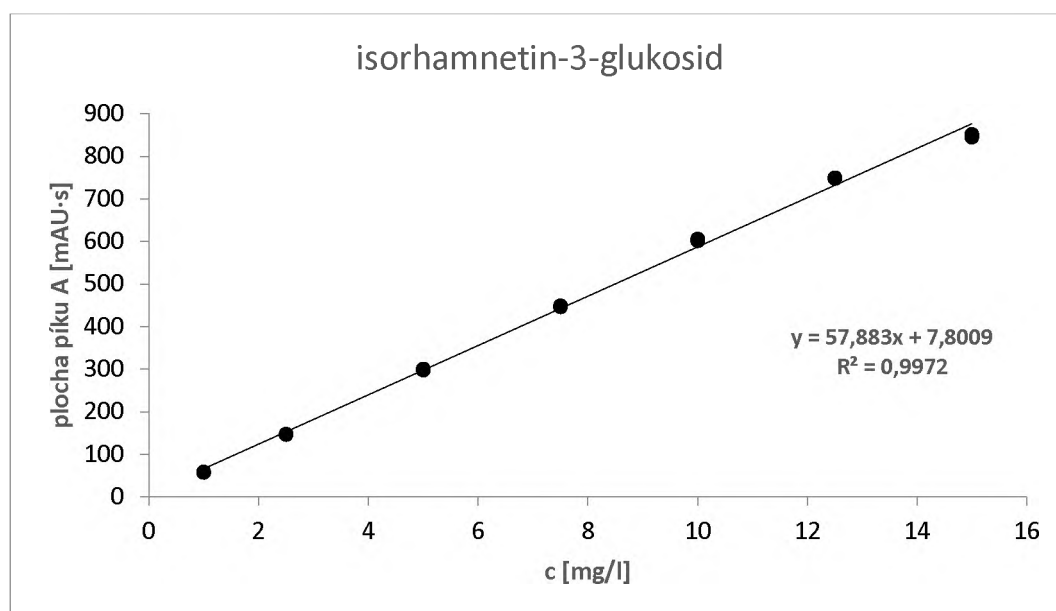
Příloha III: Hmotnostní spektra flavonoidů



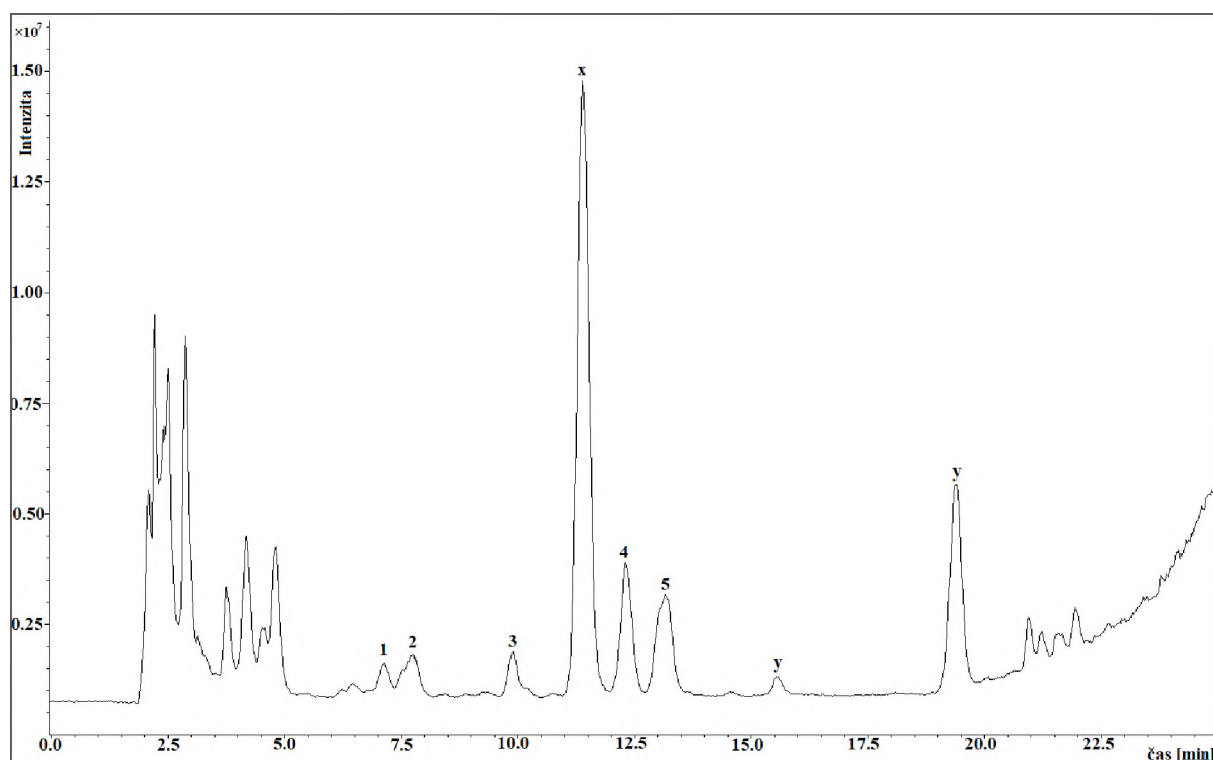
Příloha IV: Kalibrační závislost kvercetinu (HPLC stanovení flavonoidů)



Příloha V: Kalibrační závislost isorhamnetin-3-glukosidu (HPLC stanovení flavonoidů)



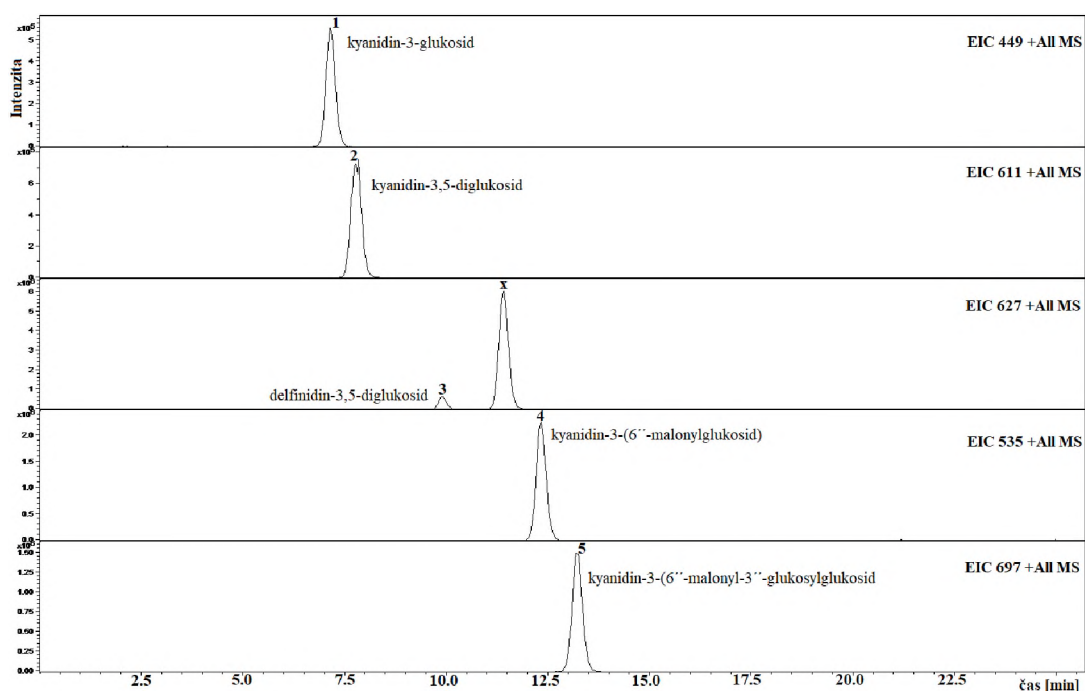
Příloha VI: TIC chromatogram vzorku červené cibule extrahované v okyseleném 80% MeOH pH 2



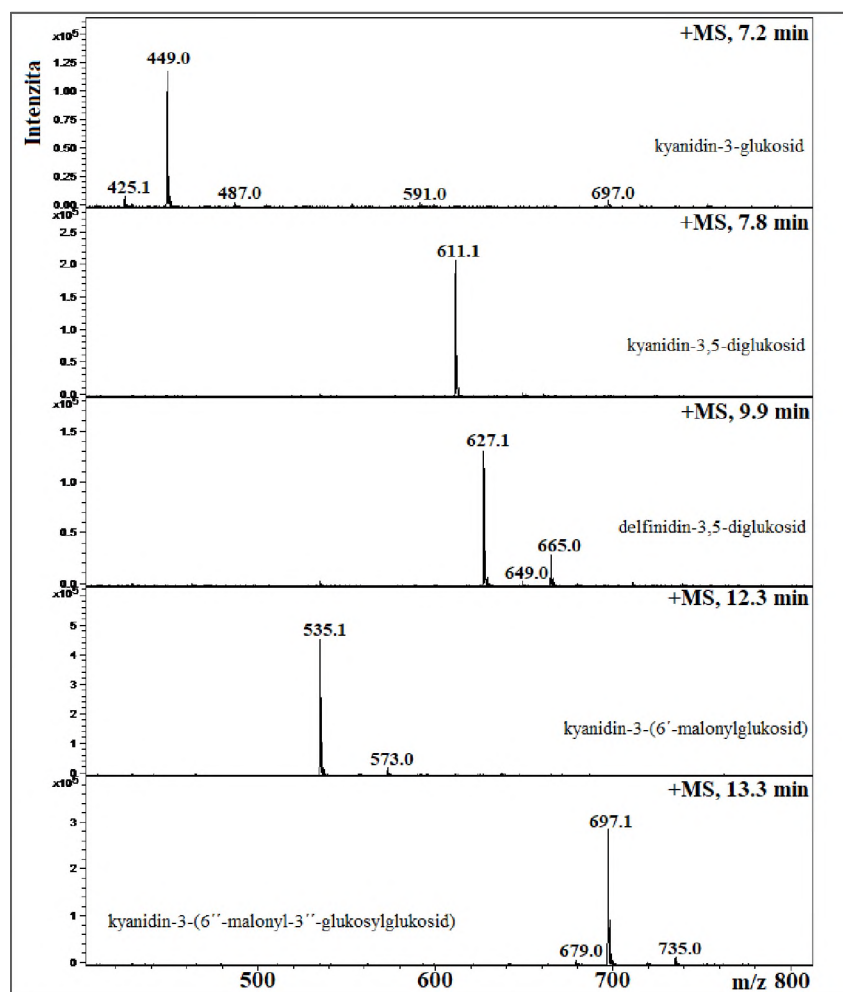
(1) kyanidin-3-glukosid, (2) kyanidin-3,5-diglukosid, (3) delphinidin-3,5-diglukosid, (4) kyanidin-3-(6''-malonylglukosid), (5) kyanidin-3-(6''-malonyl-3''-glukosylglukosid), (x) kvercetin diglukosid, (y) kvercetin momoglukosid

Podmínky analýzy: kolona Luna Omega PS, C18 (150 × 4,6 mm, 5 μm), MF A okyselená voda pH 1,8, MF B acetonitril, nástřik 10 μl, teplota kolony 40 °C, průtok mobilní fáze 0,7 ml/min, gradient 0 min 10 % MF B, 15 min 18 % MF B, 20 min 40 % MF B a 25 min 0 % MF B, UV/VIS detekce 520 nm.

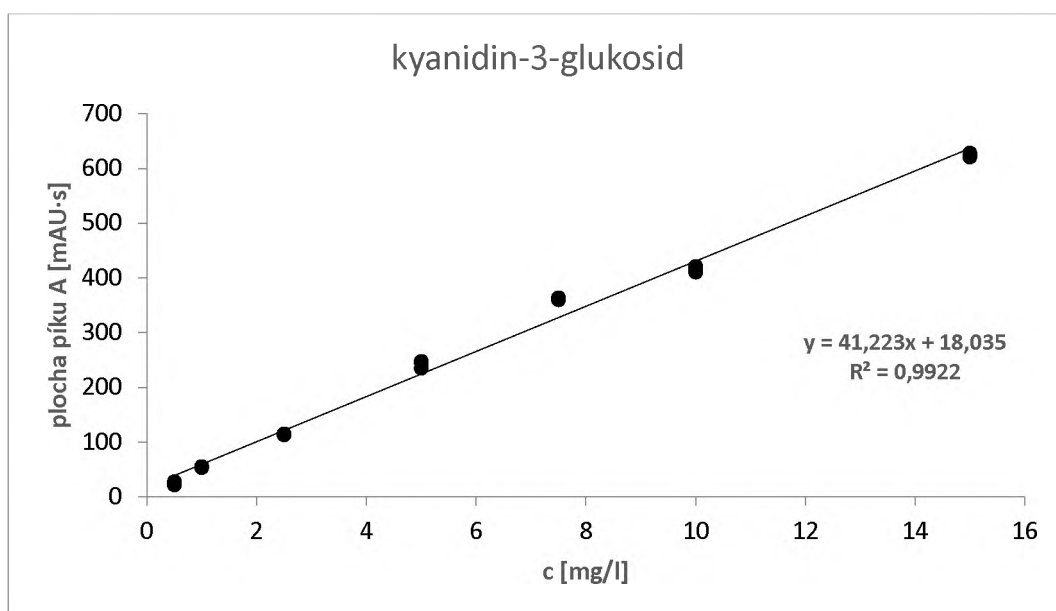
Příloha VII: Extrahované chromatogramy molekulových iontů anthokyanů



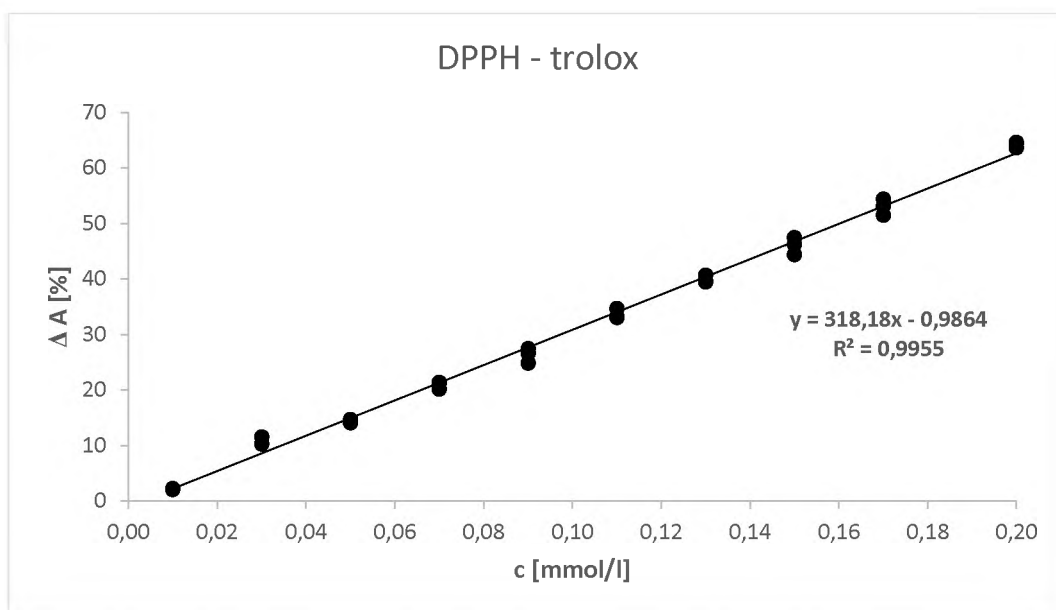
Příloha VIII: Hmotnostní spektra anthokyanů



Příloha IX: Kalibrační závislost kyanidin-3-glukosidu (HPLC stanovení anthokyanů)



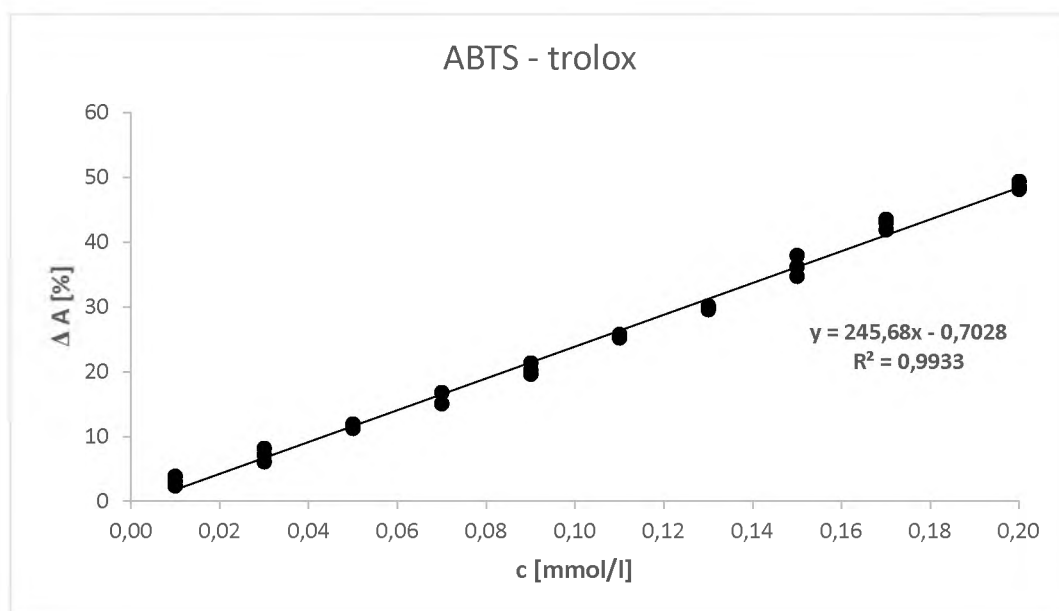
Příloha X: Metoda DPPH – závislost úbytku absorbance na koncentraci troloxu



Příloha XI: Antioxidační aktivita všech vzorků cibule naměřená metodou DPPH

DPPH	[TEAC mmol/l]		
	okyselená voda	50% MeOH	MeOH
šalotka	0,0948 ± 0,0021	0,1179 ± 0,0049	0,1519 ± 0,0045
červená	0,0669 ± 0,0032	0,1195 ± 0,0024	0,1284 ± 0,0026
žlutá	0,0416 ± 0,0029	0,0799 ± 0,0030	0,1204 ± 0,0026
jarní	0,0212 ± 0,0024	0,0856 ± 0,0019	0,0517 ± 0,0027
bílá	0,0131 ± 0,0011	0,0373 ± 0,0014	0,0355 ± 0,0014

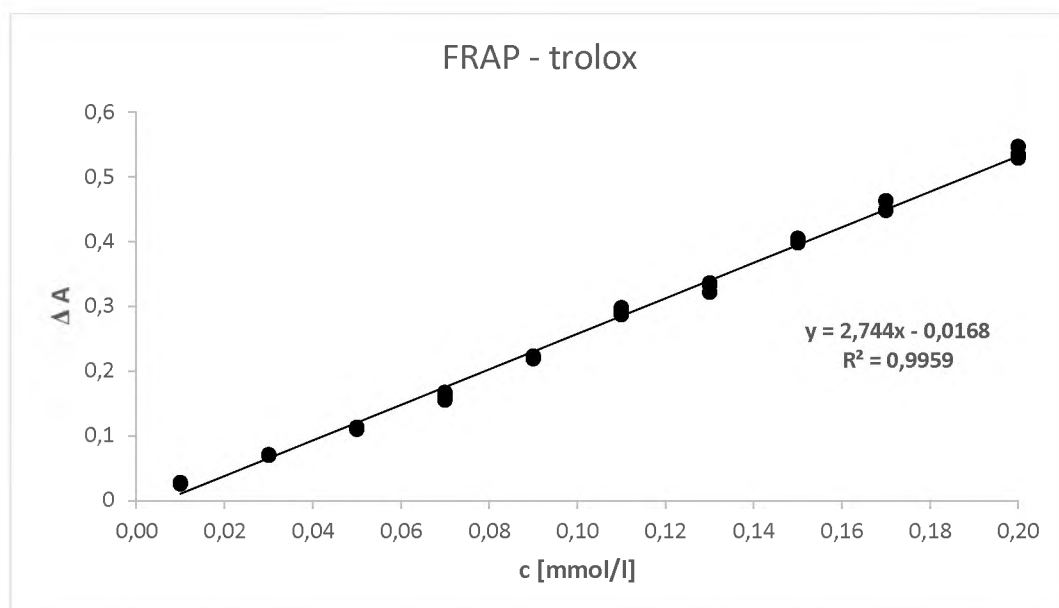
Příloha XII: Metoda ABTS – závislost úbytku absorbance na koncentraci troloxu



Příloha XIII: Antioxidační aktivita všech vzorků cibule naměřená metodou ABTS

ABTS	[TEAC mmol/l]		
	okyselená voda	50% MeOH	MeOH
šalotka	0,1695 ± 0,0033	0,4112 ± 0,0179	0,5398 ± 0,0285
červená	0,0303 ± 0,0064	0,1311 ± 0,0057	0,1412 ± 0,0046
žlutá	0,0558 ± 0,0022	0,2814 ± 0,0096	0,3609 ± 0,0082
jarní	0,0325 ± 0,0068	0,1724 ± 0,0065	0,1769 ± 0,0044
bílá	0,1416 ± 0,0121	0,3711 ± 0,0271	0,3244 ± 0,0313

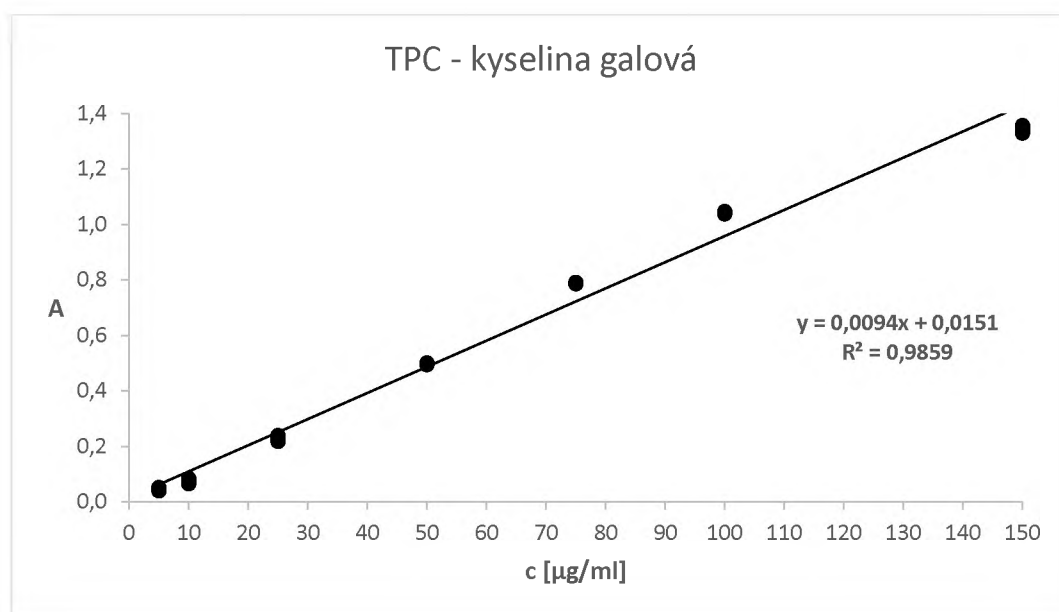
Příloha XIV: Metoda FRAP – závislost absorbance na koncentraci troloxu



Příloha XV: Antioxidační aktivita všech vzorků cibule naměřená metodou FRAP

FRAP	[TEAC mmol/l]		
	okyselená voda	50% MeOH	MeOH
šalotka	0,3542 ± 0,0113	0,3611 ± 0,0129	0,4346 ± 0,0143
červená	0,1909 ± 0,0051	0,2307 ± 0,0084	0,2498 ± 0,0060
žlutá	0,1211 ± 0,0037	0,2755 ± 0,0095	0,2514 ± 0,0124
jarní	0,0668 ± 0,0044	0,1190 ± 0,0049	0,1206 ± 0,0032
bílá	0,0523 ± 0,0029	0,0632 ± 0,0024	0,0706 ± 0,0020

Příloha XVI: Kalibrační závislost kyseliny galové (stanovení celkového obsahu polyfenolických látek, TPC)



Příloha XVII: Celkový obsah fenolických látek ve všech vzorcích cibule

Druh cibule	TPC [$\mu\text{g GAE/g}$ cibule]		
	okyselená voda	50% MeOH	MeOH
šalotka	67,30 ± 0,65	216,62 ± 1,02	212,28 ± 0,98
jarní	65,81 ± 0,72	201,81 ± 1,06	198,25 ± 0,90
červená	59,47 ± 1,13	155,81 ± 1,51	196,53 ± 1,24
žlutá	45,38 ± 1,00	152,23 ± 0,96	178,06 ± 0,95
bílá	38,62 ± 0,91	132,70 ± 1,06	147,13 ± 0,68

Příloha XVIII: Kalibrační závislost kvercetinu (stanovení obsahu flavonoidů)

