



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

**Obsah biologicky aktivních látek v pěstovaných druzích
rodu Brusnice (Vaccinium)**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Michaela Cardová

Vedoucí práce: doc. Ing. Eva Dadáková, Ph.D.

České Budějovice 2019

Obsah biologicky aktivních látek v pěstovaných druzích rodu brusnice (*Vaccinium*)

Abstrakt

Tato bakalářská práce zahrnuje poznatky o obsahu biologických látek u nejčastějších druhů rodu brusnice (*Vaccinium*) pěstovaných na území České republiky. Aktivní látky byly analyzované v druhu brusnice brusinka *Vaccinium vitis-idaea* v odrůdách *Koralle*, *Runo bielawskie*, *Sanna*, *Sussi*, *Linnea* a *Ida*.

Polyfenoly jsou biomolekuly nacházející se v produktech rostlin a byly u nich prokázány antioxidační a protizánětlivé účinky *in vivo* i *in vitro* (Chiva-Blanch, 2017). V průběhu evoluce se u rostlin vyvinuly schopnosti ke tvorbě sekundárních fenolických metabolitů, které nijak nezasahovaly do jejich růstu a vývoje, ale byly životně důležité pro interakci s okolním prostředím, pro reprodukční strategii a ochranné mechanismy (Cheynier, 2013). Mezi polyfenoly patří například flavonoidy, např. kvercetin, a anthokyany, které jsou svým charakterem spíše ko-pigmenty.

Další analyzovanou sloučeninou je vitamín C neboli tzv. askorbová kyselina. Tato sloučenina je jednoduchým nízkomolekulárním karbohydrátem. Jeho syntéza probíhá, jak u rostlin, tak u většiny živočichů (Lykkesfeldt, 2014). Vitamín C je skvělým antioxidantem, který chrání organismus před reaktivními formami kyslíku a stimuluje imunitní systém.

Cílem tohoto výzkumu bylo zjistit množství kvercetinu, celkových anthokyanů a askorbové kyseliny v šesti vybraných odrůdách brusnice (viz výše). Samotné stanovení proběhlo pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a stanovení celkových anthokyanů bylo provedeno na spektrofotometru pro určení jejich koncentrace, vypočítané pomocí naměřené absorbance ve vzorku. Podařilo se stanovit všechny tři zmíněné skupiny látky.

Nejvyšších hodnot u celkových anthokyanů bylo analyzováno u druhu *Sussi* a to $617, \pm 8,7$ mg/kg. U druhu *Sanna* askorbová kyselina dosahovala hodnot $110, \pm 1,4$ mg/kg a byl zde také naměřen obsah kvercetinu v hodnotě 1019 ± 36 mg/kg v sušině.

Klíčová slova: polyfenoly; askorbová kyselina; *Vaccinium*; HPLC; spektrofotometrie;

Content of biologically active phenolic compounds in cultivated species of *Vaccinium* genus

Abstract

This bachelor's thesis includes a knowledge about active biologic compounds from the most common grown species of cranberry (*Vaccinium*) in the Czech Republic. Active substances have been analyzed in varieties of *Vaccinium vitis-idaea* like *Koralle*, *Runo bielawskie*, *Sanna*, *Sussi*, *Linnea* and *Ida*.

Polyphenols are biomolecules, which are founded in products of plants and there have been proved an antioxidant and anti-inflammatory effects in vivo and in vitro (Chiva-Blanch, 2017). In during of evolution, in plants evolved an ability to produce of secondary polyphenolic metabolites, which weren't intervened to their growth and development but they are very important for environment, for reproduction strategy and mechanism of protection (Cheynier, 2013). Between polyphenols belong to for examples flavonoids and anthocyanins, which are co-pigment of their property.

Next analyzed compound was vitamin C alias ascorbic acid. This substance is simple low-molecular-weight carbohydrate. Synthesis of vitamin C is localized of plants and some species of animal, (Lykkesfeldt, 2014). Ascorbic acid is a good antioxidant, which save organism before ROS (reactive oxygen form) and stimulated immune system.

The aim of this study was analyzed the content of quercetin, ascorbic acid and the content of total anthocyanin in six selected varieties of cranberry. The determination as such was performed using high performance liquid chromatography (HPLC) and determination of content of anthocyanin were analyzed by use spectrophotometer for define concentration from absorbance of valid sample. We analyzed all of three mentioned kinds of compounds.

The higher results of anthocyanin were analyzed from kind *Sussi*. Concentration was 617 ± 8.7 mg/kg. In kind of *Sanna*, the ascorbic acid amount to 110 ± 1.4 mg/kg and there were measured the content of quercetin 1019 ± 36 mg/kg in freeze-dried material.

Keywords: *polyphenols; ascorbic acid; Vaccinium; HPLC; spectrophotometry*

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2019:

Michaela Cardová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat paní doc. Ing. Evě Dadákové, Ph.D., za odborné vedení mé bakalářské práce a za cenné poradenství ohledně jejího zpracování. Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Tamaře Pelikánové za pomoc při laboratorní přípravě a následné analýze vzorků. Poděkování patří i panu Ing. Matějčíčkovi za poskytnutí šesti odrůd rodu brusnice.

Obsah

1 Úvod	9
2 Teoretická část	10
2.1 Historie Vacciniaceae; čeleď: Brusnicovité	10
2.2 Původ a rozšíření.....	11
2.2.1 Botanické zařazení brusnice.....	11
2.2.1.1 Brusinka (brusnice brusinka); <i>Vaccinium vitis-idaea</i>	11
2.2.1.2 Borůvka (brusnice borůvka); <i>Vaccinium myrtillus</i> L.	12
2.2.1.3 Vlochyně (vlochyně bahenní); <i>Vaccinium uliginosum</i> L.....	13
2.3 Biologicky aktivní látky	15
2.3.1 Vitamín C.....	15
2.3.1.1 Obecná charakteristika	15
2.3.1.2 Struktura a názvosloví.....	17
2.3.1.3 Fyziologie a výživa	18
2.3.1.4 Využití	19
2.3.2 Flavonoidy	19
2.3.2.1 Obecná charakteristika	19
2.3.2.2 Antioxidační účinky	20
2.3.2.3 Chemická struktura	20
2.3.3 Anthokyany.....	24
2.3.3.1 Obecná charakteristika	25
2.3.3.2 Účinné látky.....	26
2.3.3.3 Použití.....	26
2.4 Metody analýzy.....	27
2.4.1 HPLC (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie)	27
2.4.1.1 Princip separace	27

2.4.1.2	Stacionární fáze	29
2.4.1.3	Mobilní fáze	30
2.4.1.4	Dávkovače	30
2.4.1.5	Kolona	31
2.4.1.6	Detektor	31
2.4.2	Spektrofotometrie	32
2.4.2.1	Zdroje záření	33
2.4.2.2	Optické filtry a monochromátory	33
2.4.2.3	Kyvety	33
2.4.2.4	Detektory záření	33
2.4.2.5	Využití	34
3	Cíle práce	35
4	Praktická část	36
4.1	Materiál	36
4.2	Příprava vzorků pro samotnou analýzu	36
4.3	Použité chemikálie a přístroje	37
4.3.1	Seznam chemikálií	37
4.3.2	Seznam pomůcek a přístrojů	37
4.4.1	Stanovení obsahu Vitamínu C	38
4.4.1.1	Stanovení z čerstvého ovoce	38
4.4.2	Stanovení obsahu celkových anthokyanů	39
4.4.2.1	Stanovení v čerstvém ovoci	39
4.4.3	Stanovení obsahu celkového kvercetinu	40
4.4.3.1	Příprava vzorku z lyofilizovaného ovoce	40
4.4.3.2	Měření a výpočet	41
5	Výsledky a diskuze	43
5.1	Stanovení aglykonů flavonoidů	43

5.2 Stanovení obsahu vitamínu C (askorbové kyseliny).....	47
5.3 Stanovení obsahu anthokyanů	50
6. Závěr.....	53
7. Seznam literatury	54
8. Seznam obrázků.....	59
9. Seznam tabulek	59
10. Seznam zkratk	60

1. Úvod

Rod brusnice obsahuje poměrně velké množství zdraví podporujících látek, jako jsou například fenolická barviva, polyfenoly (kvercetin, katechiny), třísloviny nebo také vitamín C. V této bakalářské práci byly analyzovány odrůdy druhu brusnice brusinka (*Vaccinium vitis-idaea*).

Polyfenoly jsou biomolekuly nacházející se v produktech rostlin a byly u nich prokázány antioxidační a protizánětlivé účinky (Chiva-Blanch a Badimon, 2017). V rostlině tyto sloučeniny poskytují ochranu před UV záření, radiací, patogeny (Velíšek a Hajšlová, 2009). Mezi polyfenoly patří například flavonoidy a anthokyaniny, které jsou svým charakterem spíše kopigmenty. Ze zástupců flavonoidů se u brusnic nejvíce vyskytuje sloučenina zvaná kvercetin.

Anthokyaniny reprezentují bohatý zdroj biologicky aktivních látek v plodech brusnice (Benvenuti et al., 2018). Tyto sloučeniny způsobují zbarvení rostlinných částí. Dále působí i jako aktivní antioxidanty a chrání rostlinu před reaktivními produkty metabolismu.

Další analyzovanou sloučeninou je vitamín C neboli tzv. askorbová kyselina. Tato sloučenina je jednoduchý nízkomolekulární karbohydrát (Lykkesfeldt et al., 2014). Kyselinu askorbovou jsou schopny syntetizovat všechny zelené rostliny a většina živočichů (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Cílem této bakalářské práce bylo identifikovat obsah kvercetinu, celkových anthokyanů a askorbové kyseliny v šesti vybraných kulturních odrůdách rodu brusnice. Samotné stanovení obsahu sloučenin proběhlo s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a stanovení celkových anthokyanů bylo provedeno na spektrofotometru s následným určením jejich koncentrace pomocí kalibrační závislosti. Podařilo se stanovit všechny tři zmíněné skupiny látek.

2. Teoretická část

2.1 Historie - *Vacciniaceae*; čeleď: *Brusnicovité*

Bylo objeveno více než 450 druhů z rodu *Vaccinium* (*Ericaceae*), volně rostoucích v Evropě, Severní a Střední Americe, dále v Africe, Japonsku a Asii (Brown et al., 2012).

Rod brusnice (*Vaccinium*) vzhledově představují drobné keřky, jejichž charakteristickými plody jsou bobule. Bobule se liší jak velikostí, tak i barvou. Patří sem mimo jiné druhy brusinka, klikva a borůvka. Rod brusinek a rod klikvy mají zabarvení bobulí od světle červené do rudé, načež bobule borůvek mají modrofialové vzezření (Dufek a Slavík, 2013). Plodem brusnic jsou tedy bobule o různém zbarvení, ale existují i bobule nepigmentované, jako třeba u rodu brusnice borůvka, *V. myrtillus* L (Donno et al., 2013).

V současné době je trendem a cílem společnosti všeobecná podpora zdraví, a tím pádem se zkoumají chemické vlastnosti a ekonomická důležitost rodu brusnic. Jsou jim přisuzované vysoké koncentrace látek s antioxidačními vlastnostmi v podobě polyfenolů a částečně i anthokyanů, které jsou jedny z nejvýznamnějších sloučenin v plodech brusnic. Brusnice a jejich produkty jsou celosvětově oblíbené a reprezentují bohatý zdroj antioxidantů v potravě, a tedy souvisí i se zdravím populace (Donno et al., 2013).

U rodu brusnice byly zjištěny příznivé zdravotní účinky na organismus. Kromě využití tohoto rodu k pokrmu, se také široce používají k výrobě prostředků ke zlepšení nočního vidění a ke snížení vaskulární permeability nebo kapilární křehkosti. Největší vědecký zájem je o jejich antioxidační účinky úzce spjatých s obsahem anthokyanů (Donno et al., 2013).

Existuje sice mnoho studií o anthokyanech a jejich účinků na zdraví, přesto je jich vzácně o rodu brusnice samotných. Najdeme spíše studie o šťávách či výtažcích bohatých na anthokyan. Brusnice jsou v USA klasifikovány jako bylina třídy první, to znamená, že jsou považovány za kvalitní zdroj aktivních látek a nepředpokládá se u nich žádné riziko ohrožení zdraví, a tudíž je vhodná pro spotřebu (Brown et al., 2012).

Brusnice se prodávají čerstvé, zmrazené nebo jako sušina, tedy plody zbavené vody. Dále je najdeme ve formě konzerv, džemů a džusů. Obsahují poměrně velké množství látek např. fenolické sloučeniny, flavonoly (kvercetin, katechiny), třísloviny, ellagitaniny nebo také fenolové kyseliny (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Botanicky pravé brusnice jsou dužnaté plodiny s chrupavčítým endokarpem plným semen. Brusnice mohou být také definovány jako falešné bobule, které jsou tvořeny

i jinými částmi květu než je pestík, jako je třeba květní lůžko (Colak et al., 2018). Tyto rostliny mají tendenci se v podmínkách mlžných horských lesů chovat jako epifyty, což vyjadřuje biologický druh, který pro své potřeby využívá stromů a okolního prostředí jako opory pro růst, nikoli však k parazitování (Grulich a Hochmanová, 2017).

Běžně se pěstují dva druhy rodu brusnice, a to brusnice brusinka (*Vaccinium L.*) a klikva (*Oxycoccus*).

2.2 Původ a rozšíření

2.2.1 Botanické zařazení brusnice

Říše: rostliny (*Plantae*)

Podříše: cévnaté rostliny

(*Tracheobionta*)

Oddělení: krytosemenné

(*Magnoliophyta*)

Třída: vyšší dvouděložné

(*Rosopsida*)

Řád: vřesovcotvaré (*Ericales*)

Čeleď: vřesovcovité (*Ericaceae*)

Rod: Brusnice (*Vaccinium L.*)

2.2.1.1 Brusinka (brusnice brusinka); *Vaccinium vitis-idaea*

Brusnice brusinka, (*Vaccinium vitis-idaea L.*) je běžně rozšířený druh. Tento druh brusnice má obvykle bobule zbarvené do sytě červené, viz *Obrázek 1*, ale vzácně se mohou vyskytovat i bílého anebo i mírně nažloutlého vzhledu. Vzhledově rostlina představuje nízký keřík se zelenými neopadavými listy, na nichž naspod vedou hnědé žlásky. Květenství keříku brusinky jsou tři až deseti-květé hrozny, občas se vyskytne až patnácti-květé. Koruna květu bývá bílá až narůžovělá. Tato rostlina květe na počátku nebo až v průběhu léta, což představuje měsíce květen až červenec (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Rostliny s tímto rozšíření rostou převážně na severní polokouli od mírného pásu po chladnější oblasti (Grulich a Hochmanová, 2017). Brusnice brusinka roste většinou v oblastech s kyselejšími půdami světlých lesů, uprostřed vřesovišť a rašelinišť, ale lze ji najít i v písčinách či na skálách. Roste od nížin zhruba od dvou set metrů, označovaných jako planární stupně, až nad tisíc tři sta metrů nad mořem, označovaných jako subalpínské lučiny. Roste roztroušeně v hojném množství, i když v nížinách skoro vzácně (Kubát et al., 2002).

Jedlé a chuťově mírně natrpklé plody se nejčastěji konzervují jako doplněk k masu. Brusnice brusinka má také v podstatě velké uplatnění v léčitelství nebo i farmacii, kde se používají především sušené listy (Dufek a Slavík, 2003).

2.2.1.2 Borůvka (*brusnice borůvka*); *Vaccinium myrtillus L.*

U rodu brusnice borůvka bývají bobule zpravidla modře zbarvené, viz *Obrázek 2*, i když se vzácně vyskytují i bobule bělavé či červenavé barvy. Listy rostliny jsou opadavé a oproti rodu brusinka i tenké a často na povrchu ojíněné, což značí tenkou voskovou vrstvu mírně sivé barvy a naspodu nevybíhají žádné žlásky. Větve anebo letorosty jsou většinou hranatého tvaru a jasné zelené barvy. Světle zelené listy mají na okrajích zubaté zakončení a na rubu nepatrně vyniklé žilnatiny (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Květy rostou jednotlivě či ve dvou nebo čtyř-květých hroznech a jsou vždy rostoucí jednotlivě v paždí listů. Koruna květu bývá obvykle bílá, ale i s nádechem zelenavého zbarvení nebo je i narůžovělá. Doba kvetení rostliny přichází začátkem jara, a to v měsících duben až květen. Borůvka, podobně jako brusinka, roste spíše v kyselejších jehličnatých nebo méně často i v listnatých lesích, v oblastech pastvin a sutí. Hojně k nalezení je ve všech výškových stupních, zato zřídka v nížinách (Kubát et al., 2002).



Obrázek 1 Brusnice brusinka
Zdroj: www.priroda.cz



Obrázek 2 Brusnice borůvka
Zdroj: bylinkopedie.cz

Využití rodu brusnice borůvky má význam jak v přímém konzumu čerstvých či zpracovaných bobulí, tak při výrobě šťáv. Další důležitou roli má také v lékařství, kde se zužitkují například sušené plody, listy, a to třeba na čaj či různé výluhy (Dufek a Slavík, 2003).

Ovšem sběr tohoto druhu musí být koordinován, jelikož dochází k ničení porostu borůvek i jeho okolí (Grulich a Hochmanová, 2017). V České republice se hojně vyskytuje v horách a ve středních polohách. Za to v teplých oblastech se nachází velmi vzácně.

2.2.1.3 Vlochyně (vlochyň bahenní); *Vaccinium uliginosum* L.

Vlochyně bahenní je nízká keříkovitá rostlina, která se velice nápadně podobá brusnici borůvce, i barva bobulí je totožná, tedy modrofialová, viz *Obrázek 3*.

Obvykle je to vcelku vysoká rostlina, zhruba od dvaceti do osmdesáti centimetrů. Větve jsou oblé a většinou v barvě nahnědlé až červenohnědé. Listy mívají mírně sivozelené a tvarem celokrajné. Květy jsou jednotlivé anebo rostou v dvou až čtyřkvětých hroznech (Kubát et al., 2002).

Rostlina kvete při běžných podmínkách v období května až června. Rozšíření je podobné jako u předešlých druhů. V Americe se druh objevuje v oblasti Skalistých hor, zatímco v Evropě zasahuje od Alp, Karpat až po hory Balkánského poloostrova (Dufek a Slavík, 2003). Dostí hojně rostou, i když většinou roztroušeně, v pohraničních pohořích a vzácně v pahorkatinách. V teplých oblastech zcela tato volně rostoucí rostlina chybí (Kubát et al., 2002).

Plody tohoto rodu nejsou jedlé a bývají i mírně jedovaté a při větší konzumaci mohou vyvolat reakci zvracení, hlavně u citlivějších jedinců. V některých oblastech výskytu se vlochyň v minulosti používaly jako cenný zdroj halucinogenů při jakýchsi rituálních obřadech (Dufek a Slavík, 2003). U nás tento druh lze najít ojediněle v horských oblastech. V České republice tato rostlina není na seznamu ohrožených druhů, ale na Slovenském území již mezi ohrožené druhy řazena je (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Vlochyně je známá také pro to, že je jedinou živnou rostlinou housenek zákonem chráněného motýla žluťáka borůvkového (*Colias palaeno*) i ohroženého modráska stříbroskvrného (*Vacciniina optilete*), který je pojmenován po rodu brusnice (Grulich a Hochmanová, 2017).

Podoba bobulí brusnice vlochyň a brusnice borůvka je výrazná, proto lze lehce oba druhy zaměnit.

Dále bych ráda zmínila i další druh brusnice a to tzv. klikvu (*Oxycoccus*), která je vzhledově i složením velmi podobná druhu brusnice brusinka, ale pro tuto bakalářskou nebyla použita. Je důležitá jako náhrada plodů brusnice brusinky.

Mezi nejznámější pěstované druhy patří klikva bahenní (*Oxycoccus palustris pers*), klikva maloplodá, (*Oxycoccus microcarpus turcz. ex rupr.*) a klikva velkoplodá (*Oxycoccus macrocarpus (ait.) pursh*), (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Klikva bahenní (*Oxycoccus palustris pers*) je nejvíce rozšířeným druhem na Dálném východu, Japonsku a Severní Americe. V ČR hlavní oblast výskytu je např. Třeboňsko nebo Dokesko. U nás a na Slovensku tento druh představuje potenciálně ohrožený druh a je tedy chráněný dle zákona (Grulich a Hochmanová, 2017).

Klikva maloplodá (*Oxycoccus microcarpus turcz. ex rupr.*) má výskyt hlavně v Severní Americe a roste v celé oblasti Severní Evropy a Asie. V Evropě je centrum druhu hlavně ve Skandinávském poloostrově, poloostrově Kola a v evropské části Ruska a Běloruska. Velmi vzácně se objevuje na Islandu, na severu Britských ostrovů, v Alpské oblasti a Pobaltí (Grulich a Hochmanová, 2017).

V České republice se tento druh vyskytuje velmi málo, a to pouze v horských oblastech a na Slovensku pouze v šesti lokalitách. Determinace tohoto druhu je vcelku obtížná, jelikož má velmi podobný fenotyp s druhem klikva velkoplodá. Lze tedy daný druh ověřit pouze karyologicky (Grulich a Hochmanová, 2017).

Klikva velkoplodá (*Oxycoccus macrocarpus (ait.) pursh*) se vyskytuje v severovýchodní části Severní Ameriky (východní oblast Kanady a USA), ovšem velmi vzácně u Pacifického pobřeží (od území Kalifornie až po Aljašku). Na Novém Zélandu a v Evropě má význam v pěstování kulturních odrůd. Plody tohoto druhu se prodávají pod



Obrázek 3 Vlochyň bahenní
Zdroj: botany.cz

názvem brusnice, tedy jako sušené a konzervované plody pro ryze konzumní účely (Grulich a Hochmanová, 2017).

2.3 Biologicky aktivní látky

Bobule jako drobné ovoce obsahují velkou škálu sloučenin, například vitamíny a minerály. Ve výsledku to jsou látky, které pomáhají ke zdraví člověka třeba tím, že působí proti chronickým onemocněním a srdečním nedostatečnostem (Yeung et al., 2019).

2.3.1 Vitamín C

2.3.1.1 Obecná charakteristika

Pojem vitamín C se obecně používá pro soubor všech sloučenin vyjadřujících biologickou aktivitu L-askorbové kyseliny, ale také celého reversibilního redoxního systému (Velíšek a Hajšlová, 2009). Biologicky aktivní sloučenina, chemicky nazývána jako askorbová kyselina, je jedna z důležitých složek antioxidantů plodu brusnice.

Pojem antioxidant je označení látky, která je schopná svými molekulami omezit tvorbu a aktivitu kyslíkových radikálů v organismech.

Askorbová kyselina je základní biologicky aktivní forma, ale dehydroaskorbová kyselina rovněž projevuje biologickou aktivitu tím, že se dokáže v lidském těle přeměnit na formu aktivní askorbové kyseliny. Z tohoto důvodu je podstatné změřit obě dvě kyseliny (Donno et al., 2013). V lidském těle je tato sloučenina nepostradatelná pro správnou funkci pojivových tkání a kostí (Yeung et al., 2019).

Kyselinu askorbovou jsou schopny syntetizovat všechny zelené rostliny. Naopak u živočichů je tato schopnost omezena jen na některé živočichy, proto chybí například u hmyzu, bezobratlých nebo u některých druhů ptáků i savců (Velíšek a Hajšlová, 2009). Mezi živočichy, kteří akutně potřebují vitamín C pro vlastní potřebu a nejsou schopni si je syntetizovat, patří například vyšší primáti, morčata, netopýři, ryby anebo ptactvo (Lykkesfeldt et al., 2014). Člověk ve svém těle není schopen syntetizovat vitamín C z důvodu mutace genu, který byl důležitý pro kódování gulonolakto-oxidázy, a ta je prekurzorem pro vytváření struktury askorbové kyseliny (Hlúbik, 2002).

U živočichů se vitamín C podílí na tzv. hydroxylačních reakcích dějů organismu. U většiny živočichů je vitamín C přirozeným metabolitem jater a tvoří ho především při stresových situacích, jako například, potkani (Tuhársky, 2014). Rostliny si mohou

askorbovou kyselinu vyrobit, odborně řečeno syntetizovat z aktivní formy D-mannosy (GDP-D-mannosa), zatímco u savců je základem sloučenina UDP-D-glukosa.

Funkce této kyseliny se odvíjejí od jejích redoxních vlastností (Velíšek a Hajšlová, 2009). Vitamin C je vysoce efektivní antioxidant v lidském těle, který řídí snížení oxidačního stresu, jako substrát askorbátové peroxidázy. Dále je důležitý pro mnoho zásadních biochemických biosyntéz jako enzymový kofaktor, jelikož působí jako donor elektronů pro osm různých enzymů (Donno et al., 2013).

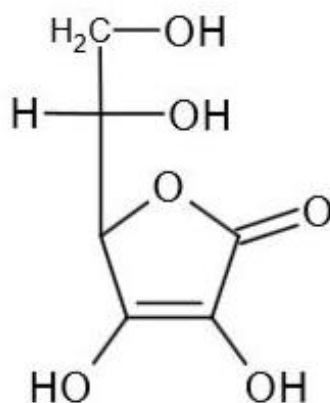
V plodech zaujímá celkový obsah askorbové kyseliny (KA) a dehydroaskorbové kyseliny (KDHA). Tyto dvě substance jsou snadno oxidovány, obzvláště pak při vystavení vysokým teplotám, některým divalentním kationtům, např. mědi a železu, nebo vystavení kyslíku, alkalickému pH, světlu nebo degradačním enzymům (Donno et al., 2013).

Askorbová kyselina je nezbytná sloučenina pro lidský organismus a její biologické funkce jsou zaměřené na antioxidantní charakter biologického systému. Kromě toho zabraňuje běžným degenerativním procesům (Smirnoff, 2000). Askorbová kyselina má dále význam jako acidulant, což vyjadřuje pomocnou okyselující látku. Vitamin C působí také jako redukční a chelatační činidlo (Velíšek a Hajšlová, 2009).

U rostlin má obrovský význam při fotosyntéze, jelikož reguluje množství aktivního kyslíku a jeho forem. Štěpením askorbové kyseliny vznikají metabolity, které obstarávají dílčí funkce, jako např. L-threonová, L-vinná, L-glycerová a další. Dále je její přítomnost podstatná u biosyntézy mukopolysacharidů, prostaglandinů, prekursoru tokoferolů a plastochinonů. Pomocí ní dochází k absorpci železa v iontové formě a jeho následnému transportu (Velíšek a Hajšlová, 2009).

2.3.1.2 Struktura a názvosloví

Askorbová kyselina je složená ze čtyř stereoisomerů, což naznačuje asymetrické vazby na uhlících C-4 a C-5. Je to sloučenina složená ze šesti uhlíků a strukturou atomu je úzce příbuzná glukóze, viz *Obrázek 4*. L-forma askorbové kyseliny (L-xylo-askorbová) vykazuje jako jediná aktivitu vitamínu C. Její isomer kyselina D-askorbová (D-xylo-askorbová) a další pár enantiomerů (L- a D-isoaskorbová) žádnou aktivitu vitamínu C nevykazují. Askorbovou kyselinu nejčastěji lze najít v roztocích s fyziologickým pH ve formě aniontu. Askorbová kyselina je ve vodě rozpustný vitamín



Obrázek 4 Kyselina L-askorbová
Zdroj: vlastní

(C), (Velíšek a Hajšlová, 2009).

S antioxidantními vlastnostmi vitamínu souvisejí také reakce s různými aktivními formami kyslíku nebo i s jeho volnými radikály. Podstatná reakce kyseliny askorbové s oxidovanou formou vitamínu E zajišťuje jistou ochranu již zmíněného vitamínu a membránových lipidů před poškozením zapříčiněným jejich oxidací. Dále má také funkci inhibitoru tvorby nitrosaminů a dokáže působit jako modulátor mutagenyze a karcinogenyze (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Tato látka působí proti bakteriálním infekcím, a pomáhá při tvorbě kolagenu ve vláknitých tkáních, jako jsou třeba vazivo, kosti, kapiláry apod. Důležitý je i z hlediska své vlastnosti jako účinného redukčního a antioxidantního činidla. Vitamín C se nedá v lidském organismu skladovat či syntetizovat, a proto je nutný jeho příjem v potravě. Další aktivity vitamínu C nejsou prozatím zcela objasněny, anebo vůbec (Velíšek a Hajšlová, 2009).

2.3.1.3 Fyziologie a výživa

Podle vědeckých studií askorbová kyselina podporuje funkčnost neuronů a posiluje synaptické transmise pro správnou vazbu mezi neurotransmitery a receptory, protože modulují jejich uvolnění a zpětné vychytávání. Důležitou roli vykonává i v souvislosti se syntézou transmitterů. Vitamín C je nezbytnou součástí pro formování pro-kolagenu, který ovlivňuje stavbu cév a jejich pružnost. Nedostatek tedy způsobuje redukci v síti cév anebo i dysfunkci (Travica et al., 2017).

Zásadní roli askorbová kyselina zastává v mozkové tkáni, kde pomáhá homeostatickým mechanismům. Ve zdravém mozku je obsah této sloučeniny v cerebrospinální tekutině (CSF) mnohem vyšší v porovnání s plazmou, kde je koncentrace v rozmezí sto padesát až čtyři sta $\mu\text{mol/L}$. CSF obsahuje jeden až dva mmol . Vitamín C v krevní plazmě s koncentrací pod jedenáct $\mu\text{mol/l}$ je považováno za vážný deficit, v rozmezí mezi jedenácti a osmadvaceti $\mu\text{mol/L}$ je označován za hraniční a snížený obsah, u hodnot osmadvacet až čtyřicet $\mu\text{mol/L}$ je adekvátní.

Optimální obsah vitamínu C v krevní plazmě je vyšší než čtyřicet $\mu\text{mol/L}$. Perorálně podaný vitamín C projde ve střevní stěně pouze v nízkém množství, tedy jeden gram této látky se do krevní plazmy dostane v koncentraci o 0,085 mmol . Intravenózním podáním se do oběhu dostane vyšší množství. Takže doporučená denní dávka je dvě stě mg, což odpovídá optimálnímu množství pro koncentraci v krvi. Vliv má i na produkci hormonů štítné žlázy, vstřebávání železa a významně se podílí na tvorbě buněk a jejich funkčnosti v imunitním systému (Kostiuk, 2012 a Travica et al., 2017).

Při vyšším příjmu askorbové kyseliny, než je střevní sliznice schopná přijmout, dochází u člověka k obranné reakci těla a vyplyne z toho onemocnění zažívání a průjmy (Tuhársky, 2014).

Jak už bylo řečeno, vitamín C se především do lidského organismu dostává s potravou. Hlavním zdrojem pro jeho získání jsou brambory (mezi dvaceti/třiceti procenty), různé druhy zeleniny (od třiceti po čtyřicet procent) a ovoce (zhruba pětatřicet procent příjmu) a mléko, které se na pokrytí potřeb organismu podílí pouze z necelých deseti procent. Deficience, jinak řečeno jako nedostatek vitamínu C nebo pouhá hypovitaminóza se může projevit řadou nemocí a nespecifických příznaků. Nejčastěji mezi ně patří mimo jiné i "jarní únava" (Kostiuk, 2012).

Nejlépe popsáním příznakem avitaminózy, což vyjadřuje akutní nedostatek, anebo úplné chybění vitamínu se projevuje chorobou, která je nazývána jako kurděje (skorbut).

Přičemž minimální denní dávka vitamínu C postačující k prevenci této nemoci je pouhých deset miligramů. Na ztrátách askorbové kyseliny se v organismu živočichů a rostlin podílí nejčastěji enzymy oxidoreduktázy (Velíšek a Hajšlová, 2009).

2.3.1.4 Využití

Díky svým vlastnostem má vitamín C široké uplatnění v potravinářském průmyslu jako potravinářské aditivum při konzervaci či při kvasné technologii. Dále se využívá v technologii masa, tuků a také v cereální technologii. Jako antioxidant je askorbová kyselina použitelná ve formě rozpustné soli, tzv. askorbátu sodného (Velíšek a Hajšlová, 2009).

2.3.2 Flavonoidy

2.3.2.1 Obecná charakteristika

Flavonoidy patří do skupiny přírodních sloučenin, a ještě před nedávnem byly předmětem vědeckého a terapeutického výzkumu. Flavonoidy jsou všudypřítomné látky objeveny v různých rodech zelených rostlin, u kterých probíhá fotosyntéza (Mladěnka et al., 2010).

Jak se zdá, tak tyto látky hrají velmi důležitou roli v úspěšné léčbě infekčních onemocnění, protože podporují antibakteriální imunitu. Dále jejich dostatkem dokáže tělo předejít některým neurogenerativním onemocněním, např. Alzheimerově a Parkinsonově chorobě. Také podporují prevenci kardiovaskulárních poruch, nádorového bujení, nebo i různých metabolickým rozvratům (Havsteen, 2002).

Tento poznatek je známý už od dob antiky a jejich užívání se přeneslo až do současnosti. Novodobý zájem o vlastnosti flavonoidů má mnoho různých konvergujících vysvětlení.

Vzhledem k tomu, že flavonoidy mají charakter pigmentů, které lze nalézt hlavně u buněk zelených rostlin. Jsou také vysoce různorodé, a velmi dobře je lze separovat pomocí moderních chromatografických metod (Havsteen, 2002).

Dalším z důvodů pro vzrůstající zájem o flavonoidy je neustále se rozvíjející obor farmacie. Jelikož u flavonoidů byly objeveny velmi zajímavé biologické vlastnosti, tím pádem jsme schopni zařadit je mezi látky prospěšné pro organismus. Důvodem analyzování těchto sloučenin je rostoucí aktivita na poli biochemie, kde převládá trvalý názor na flavonoidy, jako na látky s tzv. benefítními efekty, které přispívají k

léčbě různých onemocnění. Trendem je využití přírodních produktů namísto těch uměle nasyntetizovaných. Z lékařského stanoviska je efektivní léčba pomocí flavonoidů i ve zvířecí biochemii (Havsteen, 2002).

Denní dávka skupiny látek, nazývané jako flavonoidy, představuje hodnotu od tří po sedmdesát miligramů a to v závislosti na stravovacích návycích každého jedince (Mladěnka et al., 2010).

2.3.2.2 Antioxidační účinky

Flavonoidy patří mezi skupinu látek, které mají vyšší náchylnost k oxidaci na chinony, což jsou biologicky významné sloučeniny, ze kterých může vznikat důležitý vitamín K nebo ubichinon, tedy koenzym Q10. Proces, díky němuž se může docházet ke změně v řetězci na uhlíku C1, podobně jako se to děje u anthokyanů (Havsteen, 2002).

Zásadní vlastností flavonoidů, jako antioxidačních činidel je obrana proti reaktivním formám kyslíku (ROS), které mohou způsobit oxidaci buněčných proteinů, nukleových kyselin a lipidů, což může poškozovat tkáně a následně i celý organismus, a proto je příjem flavonoidů k jejich eliminaci tak zásadní (Kumar a Pandey, 2010).

Mnoho flavonoidů prokazuje jistou antioxidační aktivitu, znamenající schopnost pracovat s volnou radikálovou kapacitou, pomocí čehož látky působí i v prevenci proti nemocím cév a srdce a před poškozováním různých tkání. Některým flavonoidům je připisována i potenciální antivirová aktivita. V rostlinném systému dokáží tyto sloučeniny pomáhat při obraně proti oxidačnímu stresu a působí i jako regulátory růstu. Flavonoidy jsou syntetizovány fenyl-propanoidovou cestou (Havsteen, 2002).

Protektivní role těchto látek v lidské stravě jsou popsány v mnoha studiích. Například vysoký obsah flavonoidů v krevní plazmě pravděpodobně snižuje úmrť, jak z příčiny koronárních srdečních onemocnění, tak i z hlediska výskytu infarktu myokardu u starších mužů. Zmenší se také riziko srdečních nemocí až o třicet osm procent u žen (Havsteen, 2002).

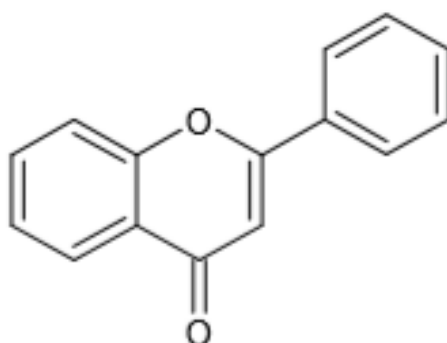
2.3.2.3 Chemická struktura

Existuje několik tisíc identifikovaných druhů flavonoidů, které jsou si strukturou velmi podobné, viz *obrázek 5*. Termín flavonoidy je kolektivní název pro rostlinné pigmenty, odvozený od chemického vzorce benzo- γ -pyrolu, který je synonymem pro chroman (Velíšek a Hajšlová, 2009).

V roce 1930 byla poprvé vyizolována neznámá substance z pomerančů. Nejdříve se myslelo, že se jedná o novou třídu vitamínů, a proto byl flavonoidům přidělen název vitamín P, ovšem později byla sloučenina pojmenována jako flavonoid (rutin) a dnes známe více než čtyři tisíce variant flavonoidů. Chemicky jsou tyto sloučeniny patnácti-uhlíkaté řetězce sestavené do dvou benzenových jader (Kumar a Pandey, 2010).

Flavonoidy jsou rozšířená skupina látek s nízkou molekulární hmotností. V rostlině tyto sloučeniny poskytují ochranu před UV záření, radiací, patogeny (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Flavonoidy se rozdělují dle umístění hydroxylových kationtů OH^+ na uhlících benzenových jader a podle stupně oxidace, viz *Obrázek 5* (Havsteen, 2002).



Obrázek 5 Obecná struktura flavonoidů,
Zdroj: vlastní

Chemická struktura flavonoidů závisí na míře hydroxylace a oxidace, tedy navázání hydroxylových skupin na uhlíkový řetězec, dalších substitucích a konjugacích či na stupni polymerace. Funkční hydroxylová skupina ve flavonoidech působí svými antioxidačními efekty pro snazší likvidaci volných radikálů nebo chelatací kovových iontů. Flavonoidy jsou lokalizované v jádře mezofylních buněk rostlin a v rámci ROS generačních center (Kumar a Pandey, 2010).

Nejvíce zdraví prospěšnými vlastnostmi flavonoidů, které jim bývají přisuzované, jsou silné antioxidační a chelatační schopnosti. Na základě jejich schopností a struktury, dokáží inhibovat LDL oxidaci a prokazují unikátní kardioprotektivní efekty. Testy na myších prokázaly snížení myokardiální postischemické destrukce tkáně, a tyto vlastnosti lze využít ve výrobě léčiv (Kumar a Pandey, 2010).

Flavonoidy se rozdělují podle struktury a umístění hydroxylových skupin na tyto druhy látek:

Flavony

U této skupiny flavonoidů nedochází k oxidaci na třetím uhlíku (3C). Vyskytují se ve formě 7- O- glykosidů (Volf a Anders, 2015). Mezi flavony patří například luteolin nebo chrysin. Tyto látky se nejvíce vyskytují v kůře ovoce, petržele, červeném vínu a v kůře rajčat (Cejpek a Velíšek, 2008). Existují i tzv. polymethoxylované flavony, ale ty lze nalézt pouze u citrusů (Volf a Anders, 2015).

Flavanoly

Tento typ sloučeniny nalezneme ve formě flavan-3-olů především v zelených listech rostliny čajovníku (*Camellia sinensis*), kde jsou flavanoly nejdominantnější skupinou polyfenolů. Nejvýznamnější zástupci této skupiny jsou katechiny a epikatechiny (Volf a Anders, 2015).

Flavonoly

Nejvýznamnějšími aktivními látkami jsou kvercetin, kemferol a myricetin. Tyto látky se od sebe liší pouze konfigurací hydroxylových skupin (Volf a Anders, 2015). Nejběžněji jsou v potravinách jako je brokolice, grep fruit, cibule, černý čaj a v neposlední řadě i v drobném ovoci (brusnice, apod). V rodech brusnice je nejvyšší obsah látek zvané myricetin (Cejpek a Velíšek, 2008).

Flavonoly se v rostlinách nacházejí především jako flavonolové, popř. kvercetinové konjugáty cukrů, tzv. glykosidy. Jejich množství se podnebně mění (Volf a Anders, 2015).

Kvercetin

Kvercetin patří mezi významné sloučeniny, které bývají obsaženy v řadě zelených rostlin. Vysoký obsah této látky mají např. cibule a česnek.

Z hlediska chemického vzorce se vyjadřuje jako 3,3',4',5,7- pentahydroxyflavonol. Patří mezi hojně se vyskytující polyfenoly obsažené v potravě. Nachází se jako sekundární rostlinný metabolit především ve formě glykosidu, což je konjugovaná molekula kvercetinu se zbytkem sacharidu (Haddad a Eid, 2017).

V této formě kvercetin tvoří běžnou složku v lidské potravě, a to nejvíce prostřednictvím zeleniny a ovoce. Naopak, doplňky stravy s kvercetinem obsahují více volné formy kvercetinu, tzv. aglykony (Andres et al., 2018).

Téma biologických efektů této látky byly popsány v řadě experimentů, jak ve studiích zvířat, tak studiích člověka. Účinky kvercetinu jsou především antioxidační, protizánětlivé, v ochraně imunitního systému, a dokonce působí i proti metabolickým rozvratům (Andres et al., 2018).

Navzdory hojnosti in vitro a in vivo, byl u kvercetinu ve výsledku zkoumán jeho antidiabetický potenciál a jeho účinnost u diabetických lidí se musí ještě nadále prozkoumávat (Haddad a Eid, 2017).

Kemferol

Nejdůležitější roli kemferol zastává v protizánětlivé imunitě. V kombinaci s kvercetinem se zvyšuje šance na obranu organismu proti vzniku rakoviny. Dokáže tedy blokovat rozpad kvercetinu a tím zvýšit jeho i svou účinnost (Devi et al., 2015).

Flavanony

Systematickým názvem jsou označovány jako dihydroflavony. Do této skupiny patří například látky jako naringenin, taxifolin a hesperidin. Nejvíce je jich v citrusových plodech (Cejpek a Velíšek, 2008). Je prokázáno, že pomerančová šťáva působí kladně na kardiovaskulární nemoci a některé druhy nádorů (Volf a Anders, 2015).

Anthokyany

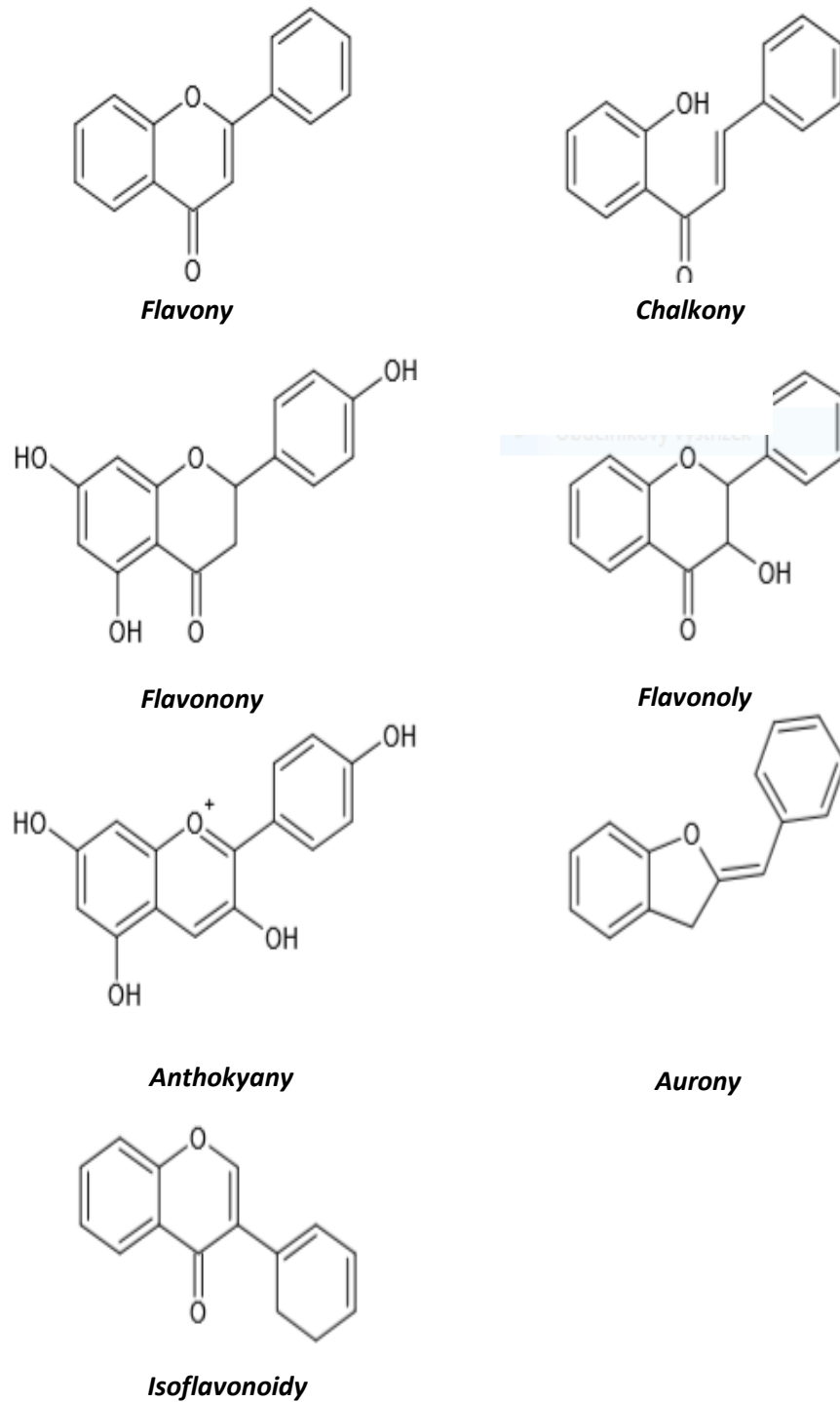
Látky, které řadíme mezi anthokyaniny, se nazývají apigenidin a yanidin. Anthokyaniny se nacházejí v barevném ovoci, jako jsou třešně, maliny, jahody a brusinky (Cejpek a Velíšek, 2008).

Isoflavonoidy

Tyto sloučeniny patří mezi nejlépe se absorbující flavonoidy, zvláště když jsou navázány na kyselinu galovou, dále s katechininy, flavanony a kvercetinem (Mojzer et al., 2016). Zahrnují sloučeniny jako je genistin, genistein a daidzein. Tyto látky v sobě obsahuje například sója (Heim et al., 2002). Působení isoflavonoidů se velmi podobá steroidnímu hormonu estradiolu a kopíruje jejich vazbu na receptory buněk a jsou schopny potlačovat růst nádorů prsou a prostaty (Volf a Anders, 2015).

Aurony

Aurony se řadí mezi malou část rostlinných flavonoidů. Bývají ve formě glykosidů a způsobují žluté zbarvení květů *Antirrhium majus* (Cejpek a Velíšek, 2008).



Obrázek 6 Vzorke různých skupin flavonoidů
Zdroj: vlastní

2.3.3 Anthokyany

2.3.3.1 Obecná charakteristika

Název tato skupina látek získala původem z řečtiny ze slov „anthos“, znamenající květ a „cyaneos“ tedy modrý. Brusnice (*Vaccinium myrtillus L.*) obsahuje anthokyany, které se liší ve funkční skupině aglykonu a vázaného cukru, takže brusnicové extrakty představují široké spektrum anthokyanů oproti ostatním plodům a extraktům. Konkrétně rod brusnic obsahuje na patnáct různých anthokyanů, které se liší ve struktuře a funkci, což z brusnic dělá reprezentanty široké škály biologicky aktivních látek (Mueller et al., 2017).

V současné době je známo více jak sedm set strukturně odlišných derivátů anthokyanů z dvaceti sedmi aglykonů identifikovaných v přírodě, nazývaných jako anthokyanidiny. Anthokyany jsou jen zřídka přítomny ve formě aglykonů. Existují téměř výhradně v glykosylované formě. V přírodě převládá šest typů anthokyanidinů a zastupují devadesát procent všech anthokyanů, které byly prozatím objeveny. Tyto látky nejsou esenciálními živinami a nebývá s nimi spojovaná žádná porucha z nedostatku jejich příjmů (Wallace a Giusti, 2015).

Anthokyany reprezentují bohatý zdroj bioaktivních sloučenin v plodech brusnice (*Vaccinium myrtillus L.*) a udělují tak jejich plodům vlastnosti důležité pro podporu zdraví. Obsah těchto látek v produktech brusnic mohou být ovlivněny řadou parametrů, což je podstatou studia jejich složení (Benvenuti et al., 2018). Tyto látky jsou polyfenolické pigmenty patřící do skupiny flavonoidů, které zodpovídají za přítomnost mnoha barev, které se projeví dle pH prostředí od červeno-oranžové po modro-fialové v rostlinných orgánech, jako jsou plody, květy nebo listy. Polyfenoly z brusnic mají význam jako silné antioxidanty, zvláště anthokyany s potenciálem k prevenci proti oxidativnímu poškození způsobeným reaktivními formami kyslíku (ROS), (Wallace a Giusti, 2015).

Modrá barva korunních lístků květu je způsobena anthokyanem delfinidem. Ačkoli je delfinidin glykosid lehce nafialovělý, prezentuje se tu jako kopigment. Červené zbarvení je většinou projevem dalšího rostlinného barviva z řad anthokyanů tzv. kyanidin (Harborne a Williams, 2000).

Bobule rodu brusnic obsahují nejvíce z fenolových sloučenin právě anthokyany. Díky jejich vysoké polaritě jsou snadno extrahovatelné pomocí okyselených polárních rozpouštědel, například vodou, acetonem anebo ethanolem (EtOH), methanolem (MeOH)

a směsí hydrofilních rozpouštědel. Methanol bývá v laboratorní praxi nejpoužívanějším a nejeftivnějším rozpouštědlem pro extrakci anthokyanů. Obvykle se okyseluje kyselinou chlorovodíkovou nebo mravenčí pro kvalitní extrahování těchto sloučenin ve formě flavyliové soli (Renato et al., 2014).

2.3.3.2 Účinné látky

V rostlinách se nejčastěji objevují tři typy aglykonů: skupina pelargonidinů, kyaidinů/peonidinů a další skupiny anthokyanů (Fang, 2015). Stupeň absorpce anthokyanů do krevní cirkulace v lidském těle vysoce závisí na jejich struktuře. Anthokyaniny se dostávají do cirkulace hlavně jako glukuronidy (Wallace a Giusti, 2015).

Vyšší množství degradačních látek (fenolové kyseliny, fenylaldehydy, apod.) než samotných anthokyanů jsou nalézány v cirkulaci krevního oběhu i po příjmu brusinek v obou podrodech (Mueller et al., 2017). Anthokyaniny mohou být absorbovány už v žaludku, ale stejně tak v intestinu. Tyto sloučeniny se nejlépe vstřebávají ve formě kyanidin-3-glukosidu a pelargonidin-3-glukosidu (Fang, 2014).

Anthokyanidiny nejsou příliš stabilními sloučeninami, a tudíž se vyznačují menší rozpustností ve vodě oproti anthokyanům. Mezi anthokyaniny a ostatními látkami vzniká interakce typu ion- ion. Nejčastěji probíhá reakce s organickými kyselinami, jako je kyselina malonová, citronová nebo jablečná. Tyto kyseliny stabilizují strukturu anthokyanů (Velíšek a Hajšlová, 2009).

2.3.3.3 Použití

Příjmem těchto látek v potravinách na ně bohaté, se předpokládá jejich využití v celé řadě zdraví prospěšných procesů, včetně vlivu na kardiovaskulární systém, nervový systém, zlepšení zrakových vjemů. Dále je tato skupina látek známá pro své antidiabetické vlastnosti anebo pomáhá i proti obezitě a proti tvorbě zánětů (Wallace a Giusti, 2015).

Navzdory tradičnímu medicínskému využití, přímo anthokyaniny nejsou momentálně v západní medicíně hojně užívány pro terapii. Naopak ve východní Evropě a Asii se běžně podávají pro léčbu aterosklerózy a dalších cévních onemocnění. FAO/WHO společný expertní výbor určil přijatelné množství anthokyanů na dva a půl mg/ kg na den (Wallace a Giusti, 2015).

Anthokyany z výtazků plodů z rodu brusnice působí jako silné antioxidanty, a proto jsou vhodné jako hepatoprotektiva (Popović et al., 2016). Antokyany jsou považovány za významná rostlinná barviva dobře rozpustná ve vodě a alkoholu (Zanotti et al., 2015). Balené potraviny mají tyto barviva vedeny pod kódem E163 (Velíšek a Hajšlová, 2009).

2.4 Metody analýzy

2.4.1 HPLC (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie)

2.4.1.1 Princip separace

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, z anglického high-performance liquid chromatography, představuje jednu z analytických metod založených na principu separace a využívá se k analýze široké škály biologicky aktivních látek, a také pro stanovení fenolických sloučenin, viz *Obrázek 7* (Křížek a Šíma, 2015).

Tato metoda má své klady ve vysoké účinnosti separace, dobré opakovatelnosti a v robustnosti analýzy.

Zásadním momentem této metody je distribuce analytu mezi dvěma fázemi, a to mezi mobilní a stacionární fází. Doba zdržení buď v jedné, nebo druhé fázi má vždy závislost na afinitě vzorku k dané fázi, a proto je vhodná pro dělení netěkavých polárních látek. Jestliže analyt stráví delší čas ve stacionární neboli pevné fázi, nejspíš bude mít pozdější dobu eluce, což označuje vymývání.

Látky, jejichž afinita ke stacionární fázi má nulovou hodnotu, se v chromatografické koloně nezadržují a bývají eluovány v tzv. “mrtvém objemu”. Naopak u látek s vysokou afinitou k pevné fázi dochází k dlouhému zadržování v místě kolony a nemusí být z ní eluovány vůbec. Nejvýznamnějším mechanismem pro funkci separačního procesu je opakovaná absorpce analytu mezi oběma fázemi (Dohnal a Kadlečková, 2013).

Proces kapalinové chromatografie lze vyjádřit vztahem, kdy přechod analytu mezi fázemi, mobilní a stacionární, se blíží k rovnovážnému stavu. Pro tento stav je popsána distribuční konstanta vyjádřená jako K_D . V rovnici symbol $[A]_s$ označuje rovnovážnou koncentraci analyzované sloučeniny ve stacionární fázi, zatímco $[A]_m$ vyjadřuje koncentraci ve fázi mobilní.

$$K_D = \frac{[A]_s}{[A]_m}$$

Metodou HPLC jsme schopni provést veškeré možné separace a rozdělování podle různých vlastností analytů, např. dle odlišné rozpustnosti látek, různých interakcí v afinitní chromatografii nebo na základě iontové výměny (Dohnal a Kadlečková, 2013).

Kapalinovou chromatografii lze rozdělit na metodu v otevřeném systému, např. papírovou či tenkovrstvou, a na metodu v uzavřeném systému, HPLC. V porovnání s plynovou chromatografií je kapalinová forma o poznání složitější a její nevýhoda plyne z pomalejších a složitějších procesů v kondenzovaných fázích.

Dále není kapalinová chromatografie zdaleka tak účinná, a navíc je i daleko více finančně nákladnější. Naopak výhodou této metody je separace a analýza až 80 % analytů (Štulík a Juláková, 2006) i z velmi malé koncentrace (Křížek a Šíma, 2015). Důležitým pojmem je i gradientová eluce, což je pojem označující mísení rozpouštědel před samotnou separací. U nízkotlakého gradientu dochází k mísení rozpouštědel za nízkého tlaku, kdy k tomu dochází ještě před vstupem do čerpadla, a naopak u vysokotlakého gradientu tento proces probíhá až za čerpadly (Dohnal a Kadlečková, 2013).

Výsledkem chromatografické analýzy je graf, tzv. chromatogram, jehož součástí je pík, který vlastně označuje eluční křivku nebo vlnu zaznamenávající odezvu detektoru na analyt nebo na jeho složky. Dalším důležitým pojmem je retenční (eluční) čas vyjadřující dobu, kdy dochází k dosažení maximu eluční vlny složky analytu (Dohnal a Kadlečková, 2013).

Retenční čas se značí jako t_R a je měřen v minutách. Existuje i označení mrtvý eluční čas t_M , který se měří v minutách, který se zhruba rovná celkovému objemu fáze mobilní reagující v koloně. Podle výšky nebo podle plochy (šířky) píku lze stanovit obsažené látky a posléze dochází k odečtení odpovídající koncentrace z dané kalibrační křivky.

Schéma, HPLC se skládá ze čtyř částí:

- Vysokotlaké čerpadlo pro přesun mobilní fáze
- Místo dávkování vzorku
- Chromatografická kolona a termostat (separace látek)
- Zařízení pro detekci molekul analytů

2.4.1.2 Stacionární fáze

Označovaná jako tzv. pevná fáze nebo pro jednoduchost, i jako sorbent. Ve většině případů bývá tato fáze lokalizována na nějakém pevném nosiči umístěného uvnitř kolony chromatografie. Kolona obsahuje sorbent, přes který během procesu přechází mobilní fáze (Dohnal a Kadlečková, 2013, Křížek a Šíma, 2015).

Tímto pevným nosičem jsou nejčastěji křemenné kuličky o rozměrech v jednotkách mikrometrů (μm). Na povrchu těchto kuliček jsou navázané silanolové skupiny stacionární fáze. Nejběžnější sloučeninou je např. oktadecylový zbytek (C18) a část oktylového zbytku (C8). Díky modifikaci C18 a C8 na povrchu nosiče získává jeho polární složení hydrofobní vlastnosti (Dohnal a Kadlečková, 2013).

Uskupení stacionární fáze na C18 (C8) se proto nazývá jako tzv. reverzní, zatímco polární povrch nosiče bez modifikace jako “normální”. Kromě změny C18/8 existuje i modifikace s aminoskupinou využívaná pro separaci sacharidů, s fenylem pro separaci určitých aromatických látek anebo s pentafluorfenylem (PFP), (Křížek a Šíma, 2015).

Mohou se speciálně používat i stacionární nosiče s neporézním jádrem, čímž nedochází k difúzi analytu do nosiče a nerozmývá se jeho zóna.

V průběhu separace dochází k rozdělení látek v chromatografické koloně podle vlastností molekul v analytu. Dle rozdílu distribuční konstanty, lze zjistit míru zadržování analytu v koloně. Rozdíl se porovnává pomocí retenčních faktorů k (Dohnal a Kadlečková, 2013).

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Vztah, kde t_R znamená tzv. retenční čas analytu (což vyjadřuje dobu od dávkování vzorku po čas detekování maxima píku), t_M se označuje jako mrtvý čas (tj. retenční čas látky, která už nereaguje se stacionární fází), (Křížek a Šíma, 2015).

Lze vypočítat parametr pro posouzení kvality “kolony”, z jeho výškového ekvivalentu teoretického patra H : $H = L/n$, kde L představuje délku kolony. V neposlední řadě můžeme získat i parametr k posouzení tvaru píku, jenž se nazývá symetrií píku (Dohnal a Kadlečková, 2013).

2.4.1.3 Mobilní fáze

Mobilní neboli pohyblivá fáze je vždy kapalina, která je pomocí vysokého tlaku tlačena kolonou. Tlak je vytvářen vysokotlakou pumpou. Mobilní fáze je vedena přes tzv. odplyňovač směrem ze zásobníku do vysokotlakého čerpadla (Dohnal a Kadlečková, 2013).

Jednotlivé složky mobilní fáze se během procesu dostávají do směšovače, kde se mísí v určitém poměru. Z čerpadla přechází kapalina do kolony, která je obvykle vyrobena z nerez oceli anebo speciálního skla a je přímo připojena na detektor (Křížek a Šíma, 2015).

Kapalinou může být jak voda, tak například i vodný roztok soli anorganické nebo organické, nebo i některé z kyselin, pufrů, či směsi vody nebo vodného roztoku a rozpouštědel organického charakteru (Dohnal a Kadlečková, 2013).

Ve speciálních případech lze dodat do roztoku modifikátory pro separace chirální a k chromatografii micel. Mezi zásobníky mobilní fáze patří nádoby o objemu 0,1-2,5 l, u kterých najdeme rysky a uzávěr především z inertního plastu s otvory pro teflonové hadičky (Dohnal a Kadlečková, 2013).

Mobilní fáze je opatřena filtry, jimiž dochází k odstranění nečistot. Velikost pórů je od dvou až po dvacet mikrometrů. Čerpadla této fáze mohou být označena jako čerpadla UHPLC, pístová anebo stříkačková na bázi injekční stříkačky (Nollet a Toldrá, 2012).

2.4.1.4 Dávkovače

U kapalinové chromatografie se nejběžněji používají automatické dávkovače. Vzorky jsou kvantitativně převedeny do jakýchsi mikronádobek zvaných vialky, které se následně uloží do vytemperovaného prostoru. Pomocí řízeného programu se automaticky vybere požadovaná vialka a poté provede nástřik za pomoci smyčkového ventilu. Tyto vialky jsou vlastně takové vzorkovnice o objemu zhruba 1,5 ml se šroubovacím víčkem se septem uprostřed, kde dochází k propíchnutí místa jehlou a k provedení nástřiku (Nollet a Toldrá, 2012).



Obrázek 7 HPLC
Zdroj: vlastní

2.4.1.5 Kolona

HPLC kolona je vyráběná hlavně z kovu, skla, křemene anebo lze i z plastu. Uvnitř kolona obsahuje stacionární fázi. Lze kolonu specifikovat dle typu fáze, rozměru kolony, velikosti částic a také dle velikosti pórů. Důležitou součástí kolon je i termostat, který napomáhá a ovlivňuje separaci aktivních látek. Při zvýšené teplotě je možno urychlit analýzu vzorku a tím pádem dosahuje i vyšší účinnosti.

V současné době teplota uvnitř kolony je vytemperována na 0-50 °C a bývá chráněna před světlem. Díky kontrole teploty termostatem se reprodukovatelnost retenčních časů může výrazně zlepšit (Cvačka, 2010).

2.4.1.6 Detektor

Detektory jsou zařízení, které analyzují změny ve složení mobilní fáze tím, že měří její fyzikální a chemické parametry.

Další rozdělení detektorů je na nedestruktivní, kdy se nemění struktura látky a na destruktivní, kdy se analyt reverzně mění (Cvačka, 2010).

Nejběžněji užívané detektory jsou UV/VIS a fluorescenční. UV/VIS detektory jsou založené na principu spektrofotometrie, kde dochází k absorpci záření v rozmezí vlnových délek od 190 až po 800 nm. Tento princip je založen na zákoně Lambert-Beerově, který je vyjádřen vztahem mezi tloušťkou absorpční vrstvy (l), koncentrací roztoku (c) a vlastní absorpcí (A) značenou jako absorbance, kde je ϵ tzv. molární absorpční koeficient v jednotkách na l , mol anebo v centimetrech (Dohnal a Kadlečková, 2013).

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Lze rozdělit UV/VIS na detektory s fixní vlnovou délkou nejčastěji stanovení v 253,7 nanometrů, na detektory s měnitelnou vlnovou délkou, detektory s programovanou vlnovou délkou s rozmezím právě mezi sto devadesát a sedm set nanometrů. V poslední řadě existují i tzv. detektory diodového pole (PDA, DAD), (Dohnal a Kadlečková, 2013).

U fluorescenčních HPLC detektorů dochází k měření emisního sekundárního záření, kdy je látka zasažena pomocí primárního excitačního elektromagnetického záření a po jeho absorpci vydává emisní záření. Silnou detekční techniku zahrnuje hmotnostní spektrometrie a coulometrická elektrodová array detekce (Dohnal a Kadlečková, 2013).

2.4.2 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie představuje optickou analytickou metodu založenou na absorbanci světla. Metoda je založená na vzájemné reakci elektromagnetického záření a zkoumaným analytem, kdy částice obsažené ve vzorku absorbují dané záření. Během absorpce fotonu částicemi dochází ke změně energie molekul a dojde k excitaci. Část záření, která nebyla absorbována, roztokem projde a tato část je pak následně detekována přístrojem, tedy spektrofotometrem (Dohnal a Kadlečková, 2013).

Z chemicko-fyzikální stránky je intenzita prošlého záření závislá na koncentraci částic v analytu. Platí zde, stejně jako u kapalinové chromatografie, Lambert-Beerův zákon. Analyt je umístěn do tzv. kyvet, skrz které prochází záření (Rosina, 2013).

Dále je nutné znát i vztah mezi intenzitou prošlého záření (I_0), která je vždy podstatně menší než intenzita dopadajícího záření na látku (I). Podílem obou intenzit záření lze vypočítat tzv. transmitanci (T), která zaznamenává hodnotu tohoto zeslabení.

$$T = I/I_0$$

U spektrofotometrie je pro získávání záření použita vlastnost monochromatického svazku a to rozkladem na hranolového nebo mřížkového monochromátoru, na rozdíl od fotometrie, kde se světlo získává pomocí barevných filtrů (Křížek a Šíma, 2015). Výsledkem spektrofotometrického měření je tzv. absorpční spektrum, díky němuž zjišťujeme absorpční maximum zkoumané látky.

V grafické podobě se jedná o závislost absorbance na vlnové délce. V UV/VIS spektrofotometrii a fotometrii se využívá světla v UV oblasti zhruba v rozmezí vlnové

délky od 190 nm do 390 nm, ve VIS v rozmezí od 390 nm do 790 nm a v infračervené oblasti o vlnových délkách od 770 nm po 1 mm (Rosina, 2013).

2.4.2.1 Zdroje záření

Zdroje světla musí vysílat v různých intervalech vlnových délek určitý svazek záření o dané intenzitě. Pro analýzu v UV oblasti jsou nejvhodnější zdroje vodíkové anebo deuteriové výbojky. Pro rozmezí viditelného světla mají využití žárovky s wolframovou spirálou, které jsou plněné nějaký ze vzácných plynů, jako je například Ar a Kr (Rosina, 2013).

2.4.2.2 Optické filtry a monochromátory

S monochromátory souvisí i čočky a zrcadla, které jsou v přístroji nastavené tak, aby dokázali usměrnit paprsek. Nejčastěji se pro zachytávání polychromatického záření používají skleněné barevné filtry, díky nimž se získává spektrum o šíři třicet až osmdesát nm, což je součástí pouze nejjednodušších přístrojů. V moderních spektrofotometrech jsou už monochromátory k získání monochromatického záření. U dražších přístrojů se dává přednost mřížkovým monochromátorům s odraznou mřížkou, kde je možné dospět ke spektrální šíři o 0,5 až 5 nm (Křížek a Šíma, 2015).

2.4.2.3 Kyvety

Kyvety jsou malé nádobky, viz *obrázek 8*, ve kterých dochází k měření absorpce v roztoku. V UV oblasti se používají křemenné kyvety a ve VIS skleněné nebo i kyvety z plastu. Nejběžněji se jako rozpouštědlo používá voda, u které nedochází k absorpci záření a označuje se jako tzv. blank, tedy slepý vzorek, díky němuž se kalibruje přístroj (Křížek a Šíma, 2015).

2.4.2.4 Detektory záření

Pro detekci procházejícího záření se používají fotoelektrické detektory. U těch jednodušších přístrojů je to především selenový hradlový fotočlánek, zatímco u těch dražších a citlivějších jsou to fotonky nebo častěji fotonásobiče. V přístroji vzniká fotoelektrický proud po dopadu záření na detektor a lze změřit digitálním mikroampérmetrem (Rosina, 2013).

Měří se absorbance nebo transmitance (Křížek a Šíma, 2015). V současné době se také používají tzv. CCD kamery nebo fotodiody. Po detekci se výsledek stanovování převede do software pro další analýzu dat (Rosina, 2013).

2.4.2.5 Využití

Využívá se jak pro stanovení látek, které jsou schopny absorbovat záření, tak i pro identifikaci látek bez této schopnosti. Tyto sloučeniny lze převést na látky absorbující záření reakcí s jinou složkou, například při stanovení iontů kovů, které vytváří s ostatními ligandy komplexy s barevnou změnou. Spektrofotometrie je určena k analýze látek v malých koncentracích (Křížek a Šíma, 2015).

V lékařství má tato metoda využití ke stanovení mozkomíšního moku pro určení diagnózy náhlých cévních mozkových příhod a pro podezření pro místní krvácení. Určuje se stáří krvácení a jeho rozsah. Stanovuje se ve viditelném spektru, a dle toho dokážeme určit vznik oxyhemoglobinu, methemoglobinu a bilirubinu (Křížek a Šíma, 2015).

Spektrofotometrie je jedna z metod, kde nedochází k destrukci analyzované látky a proto je výhodnou analytickou metodou pro experimentální biochemii, kde se stanovuje DNA nebo RNA a různé proteiny (Rosina, 2013).



Obrázek 8 Dávkováče (Vialky)
Zdroj: vlastní

3 Cíle práce

- Vypracování podrobné literární rešerše o biologicky aktivních fenolických látkách obsažených plodech v pěstovaných odrůdách ovoce z rodu brusnice (*Vaccinium*), jejich účincích na zdraví člověka a zobrazení metod jejich stanovení.
- Seznámení s analytickou metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie a s její pomocí analyzovat vybrané biologicky aktivní látky.
- Zpracování vzorků plodů pěstovaných kulturních ČR odrůd rodu brusnice. Stěžejní je stanovení obsahu vybraných aktivní sloučenin a zpracování dat.

4. Praktická část

V této bakalářské práci byly ke zpracování vzorků a analýze dat použity dvě metody, a to HPLC a spektrofotometrie.

4.1 Materiál

Pro stanovení biologicky aktivních sloučenin (fenolické látky, vitamín C) bylo zpracováno šest odrůd z rodu brusnice (*Vaccinium*) pěstovaných v České republice. Všech šest odrůd je druhu brusnice brusinka (*Vaccinium vitis-idaea*). Viz tabulka 1.

Tabulka 1: Analyzované odrůdy rodu Brusnice

Označení vzorku	Odrůda
BR-1	Ida
BR-2	Korál
BR-3	Linnea
BR-4	Runo bielawske
BR-5	Sanna
BR-6	Sussi

Zdroj: vlastní

Čerstvé plody brusnic byly poskytnuty panem Ing. Alešem Matějčíčkem z Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského v Holovousích v srpnu 2018. Před samotnou analýzou byly vzorky připraveny v budově katedry aplikované chemie zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, a to pro praktickou část této bakalářské práce. Příprava vzorků započala zamražením za teploty $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následnému lyofilizování, tedy metodou sušení mrazem, kdy plody byly zbaveny přebytku vody, aby byla poskytnuta kvalitnější analýza. Následným procesem bylo skladování brusnic. Některé látky byly stanoveny přímo v čerstvých plodech.

4.2 Příprava vzorků pro samotnou analýzu

Pro analýzu obsahu biologicky aktivních látek v plodech brusnice (*Vaccinium*) bylo nutné rozmrazení bobulí a následně se provedla tzv. lyofilizace, desikace neboli sušení mrazem vlhkých anebo vodnatých materiálů. Provádí se pro zachování aktivních látek

v potravinách v původním stavu, jako jsou například vitamíny. Je to proces odpařování vody ze zmraženého vzorku pod vakuem. Při procesu nedochází ovšem k žádnému zahřívání, což znamená, že nedochází k přímé přeměně vody z kapalného skupenství do plynného, jelikož ta přeměna bývá důvodem k destrukci aktivních sloučenin.

Výsledný materiál se nazývá tzv. lyofilizátem. U některých metod se pracuje pouze se zmraženým ovocem, kdy se odváží na analytických vahách zhruba dva a půl gramu plodů a následně se pomocí třecí misky a tloučku brusnice rozemelou a vytvoří se roztok, jenž se analyzuje na přístrojích.

4.3 Použité chemikálie a přístroje

4.3.1 Seznam chemikálií

kyselina šťavelová a EDTA (chelatační činidlo)

6 M kyselina chlorovodíková (HCl), 5 % methanol (Lachema, Brno)

Destilovaná voda – demineralizace (Premier, USA)

L-Askorbová kyselina (Merck, Německo)

5% kyselina mravenčí (Lachema, Brno)

4.3.2 Seznam pomůcek a přístrojů

sada laboratorního skla (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)

třecí miska a tlouček

automatické pipety (objem 20—200 µl a 100-1000 µl Transferpette

(Treff AG, Švýcarsko)

analytické váhy AB 204 (Mettler Toledo, Švýcarsko)

váhy Kern (Německo)

centrifuga/odstředivka (Eppendorf)

lyofilizátor (Alpha 1-4, Christ, Německo)

termostavovaná vodní lázeň (EL – 20 R; Kavalier, ČR)

filtrační zařízení (Sigma- Aldrich)

speciální filtry ze skleněných vláken (Z7) (GF/C Whatman, VB)

Vialky

SPE extrakce – kolonky značené jako RP-18 (Merck, Německo)

kapalinový chromatograf (HPLC) Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC

Systém (Agilent Technologies, USA)

HPLC kolona Zorbax SB-C18 (4,6 x 50 mm, zrnitost 1,8 μm)

(Agilent Technologies, USA)

Spektrofotometr (WPA Biochrom, ČR)

Kombinovaná lednička a chladnička (Bosh Cooler, Německo)

4.4 Metodika stanovení biologicky aktivních látek

4.4.1 Stanovení obsahu Vitamínu C

Ke stanovení obsahu vitamínu C bylo zapotřebí izolovat L-askorbovou kyselinu a jí chemicky příbuzné látky, jako např. L- dehydroaskorbová kyselina. Při procesu extrakce vzorku sloučeniny došlo k využití extrakčního činidla pro chromatografické stanovení. U sloučeniny jako je L-askorbová kyselina, může docházet při zpracovávání materiálu k její rychlé oxidaci a následně i jejím hmotným ztrátám.

Lze tomuto procesu zabránit použitím roztoku obsahující šťavelovou kyselinu a chelatační činidlo (0,02 mol/l šťavelové kyseliny a 0,5 mmol/l EDTA), které mohou působit jako extrakční činidla. Tento postup má východisko z publikované práce A. Begum and S. Harikrishna (2010) a podmínky pro vykonávání chromatografické separace byly stanoveny na pracovišti katedry aplikované chemie.

4.4.1.1 Stanovení z čerstvého ovoce

Ze vzorku víceméně homogenního vzorku (tedy jednotlivé odrůdy) se na vahách navážilo $\pm 2,5$ g a po přidání 25 ml extrakčního činidla se vzorek minimálně pět až deset minut homogenizoval. Zhomogenizovaná směs se převedla do odstředovací kyvety a nechala se 10 minut odstředovat v centrifuze při 3500 otáčkách.

Při odstředění docházelo k oddělení supernatantu, který se odebral do 50 ml odměrné baňky. Zbytek vzorku v kyvetě se dále resuspendoval s 25 ml čerstvého extrakčního činidla a opět došlo ke vložení do centrifugy a dalšímu odstředění za stejných podmínek.

Druhý supernatant se oddělil do stejné 50 ml odměrné baňky, kde se supernatanty spojily. Roztok se doplnil po rysku a důkladně se promíchal. Před samotným měřením docházelo ještě k filtrování vzorku přes speciální filtry ze skleněných vláken (Z7). Správně přefiltrované vzorky ve vialkách o 1 ml se okamžitě měřily na kapalinové chromatografii (HPLC).

Chromatografická separace materiálu byla provedena na přístroji UHPLC Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC Systém na koloně Zorbax SB-C (4,6 x 150 mm, zrnitost 5 μ m).

V tomto případě byl použit roztok 0,02 M kyseliny šťavelové jako mobilní fáze. Nastříklo se pět μ l vzorku, přičemž teplota při procesu analýzy se pohybovala okolo pětadvaceti stupňů celsia a absorbance vzorku se odečítala při vlnové délce 254 nm. Za takto stanovených podmínek eluovaly všechny formy tohoto vitamínu jako jeden pík. Kvantifikace byla provedena za užití standardu kyseliny L-askorbové v rozpětí pět až sto mg/ kg čerstvého vzorku.

4.4.2 Stanovení obsahu celkových anthokyanů

Postup ke stanovení anthokyanů vychází především z metodiky publikované v diplomové práci od Matějkové z roku 2011 (DP VUT v Brně). Zbarvení rodu brusnice je spojeno s polyfenolickými barvivy anthokyany, kde nejvýznamnějším barvivem je např. kyanin. V procesu stanovení daného barviva docházelo k jejich extrakci do extrakčního činidla, což představovalo okyselený methanol pomocí 0,1 % HCl. Hotový vzorek se přefiltroval a z něho bylo možné naměřit jeho absorbanci při 528 nm.

4.4.2.1 Stanovení v čerstvém ovoci

Podobně jako u stanovení obsahu vitamínu C se nejdříve navázilo zhruba dva a půl gramu průměrného homogenního vzorku, který dále procházelo fází homogenizace po dobu pěti minut s dvaceti ml extrakčního činidla (methanol + 0,1 % HCl). Dále se směs převedla do odstředivací kyvety a nechala se v centrifuze při 3500 otáčkách po deset minut odstředit.

Po odstředění se provedlo oddělení supernatantu a převedení do 50 ml odměrné baňky, přičemž se zbytek, který zůstal v kyvetě, resuspendoval s 20 ml čerstvého extrakčního činidla a opětovně se nechal odstředit za stejných laboratorních podmínek.

Po druhém odstředění se supernatanty spojily v 50 ml odměrné baňce, roztok se doplnil po rysku a důkladně se promíchal. Před samotným měřením absorbance muselo

dojít k odstranění nečistot roztoku pomocí filtrace. Vzorek se opět filtroval za využití filtrů ze skleněných vláken (Z7). Přefiltrované vzorky se co nejdříve musely změřit na fotometru při vlnové délce 528 nm proti slepému vzorku, tzv. blanku, což představuje čisté extrakční činidlo.

Za stejných podmínek lze také změřit standardy kyanin-chloridu pro účely sestavování kalibrační řady v rozmezí 0,5-1000 mg/kg čerstvé hmoty. Obsah celkových anthokyanů byl vyjádřen v mg/kg ovoce.

4.4.3 Stanovení obsahu celkového kvercetinu

Běžně se vyskytující látkou v rostlinných materiálech, tedy v ovoci a zelenině je dominantní flavonoidní aglykon kvercetin. V rostlinách se nejčastěji vyskytuje ve formě glykosidů, kdy je molekula kvercetinu navázaná na některý ze sacharidů. K rozštěpení glykosidické vazby je zapotřebí podmínek metody kyselé hydrolýzy, což je rozhodující pro stanovení obsahu celkového kvercetinu. Tento postup stanovení je založen na publikované práci Dadákové et al. (2001). Je tedy přizpůsoben pro provedení analytickou koncovku HPLC.

4.4.3.1 Příprava vzorku z lyofilizovaného ovoce

Jako u předchozích metod se nejdříve navážilo zhruba 0,25 g lyofilizovaného materiálu a převedlo se to do 100 ml varné baňky. Dále se postupně přidávaly další látky 80 mg kyseliny askorbové, 12,5 ml methanolu, 7,5 ml vody a 5 ml 6 M HCl.

Vše se odměřovalo pomocí odměrného válce. Následně se směs pomalu zahřívala pod zpětným chladičem po dobu 2 hodin ve vodní lázni při teplotě 90 °C. Po uplynutí tohoto času se po ochlazení vzorku jeho obsah zneutralizoval pomocí 2 g NaHCO₃ a kvantitativně se převedl do odstředovací kyvety a vložil se do centrifugy pro odstředění materiálu po dobu 15 minut při 3500 otáčkách.

Po odstředování vzorku se musela baňka vypláchnout 7,5 ml methanolu a poté i destilovanou vodou, aby nedošlo ke ztrátám vzorku. Odstředění se ještě 2x zopakovalo, přičemž podruhé už bez vypláchnutí methanolem. Díky tomu se spojené supernatanty zředily v 500 ml kádince pomocí vody na 200 ml. Díky pH-metru se hodnota nastavila na pH 3.

Po nastavení pH se roztok musel zfiltrvat na vakuové filtrační aparatuře přes speciální filtr ze skleněných vláken a následně i k promytí zbytků uvíznutých na filtru se

použilo pět mililitrů methanolu. Získaný filtrát se kvantitativně převedl do 500 ml odměrné baňky a ta se doplnil po rysku.

Pro SPE se použily kolonky značené jako RP-18 pro zakoncentrování kvercetinu a případného odstranění polárních látek. Kolonky se připravily promytím deseti ml methanolu a deseti ml vody. Použil se správně naředěný vzorek, aby mohlo dojít k izolování námi sledovaných sloučenin pomocí této metody (SPE).

Následně bývá použit pro ředění roztoku předem připravený pěti procentní roztok methanolu s pH hodnotou tři a půl. Posledním krokem po aplikaci vzorku do kolonky bylo jejich sušení po dvacet minut procházejícím vzduchem. Ty látky, které se zachytily v kolonce, se díky 1,4 ml methanolu vymyly a získali jsme vzorek, ke kterému se poté ještě přidal 200 μg kyseliny α -naftyloctové v roztoku methanolu, což se potom využilo jako vnitřní standard.



Obrázek 9 Filtrační zařízení

Zdroj: vlastní

4.4.3.2 Měření a výpočet

Analýza připravených vzorků se uskutečnil metodou HPLC. Pro separaci chromatografií se použil přístroj Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC System a kolona Zorbax SB-C18 (4,6 x 50 mm, zrnitost 1,8 μm).

Pro stanovení obsahu celkové kvercetinu se jako mobilní fáze v praxi použil roztok A: 5% acetonitril, 0,1% mravenčí kyselina ve vodě a B: 0,1 % kyselina mravenčí přímo v acetonitrilu. Znázornění tzv. gradientové eluce (schéma, viz *Tabulka 2*):

Tabulka 2 Schéma měření

čas (min)	% B
0	20
1	25
5	30
7	50
9	20
15	20

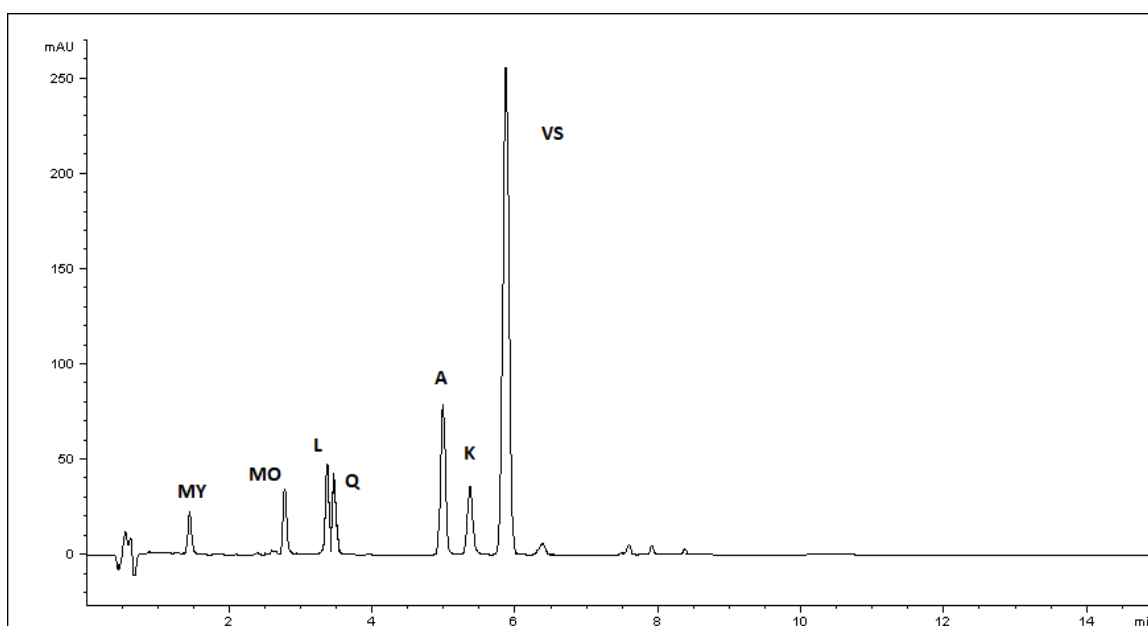
Zdroj: vlastní

Do přístroje se nastříkovalo pět mikrolitrů vzorku a analýza proběhla za teploty pětadvacet stupňů celsia. Absorbance vzorku byla odečítána při vlnové délce 270 nm. Kombinací poměru ploch píku vzorku a vnitřního standardu jsme dostali tzv. analytickou odezvu metody. Kvantifikace analytu byla provedena s pomocí kvercetinového standardu v pracovním rozmezí pět až sto mg/kg na čerstvý materiál.

5. Výsledky a diskuze

Pro analýzu vzorků byla použita metoda kapalinové chromatografie HPLC a spektrofotometrie. Byly naměřeny hodnoty askorbové kyseliny, aglykonů flavonoidů (kvercetin) a celkových anthokyanů ve vzorcích. Výsledky z těchto měření byly zaznamenány a pomocí programu MS Office Excel byly provedeny výpočty a jejich grafické znázornění. Bylo provedeno dvojí měření a zprůměrování výsledných hodnot, z čehož se posléze vypočetla směrodatná odchylka (viz tabulky). Z plochy píku a vnitřního standardu se vypočetla odezva. Dále byla přepočtena sušina na čerstvý materiál. K výpočtům byly použity kalibrační křivky dle obsahu jednotlivých analyzovaných látek. Vše bylo přepočteno na mg/kg.

5.1 Stanovení aglykonů flavonoidů



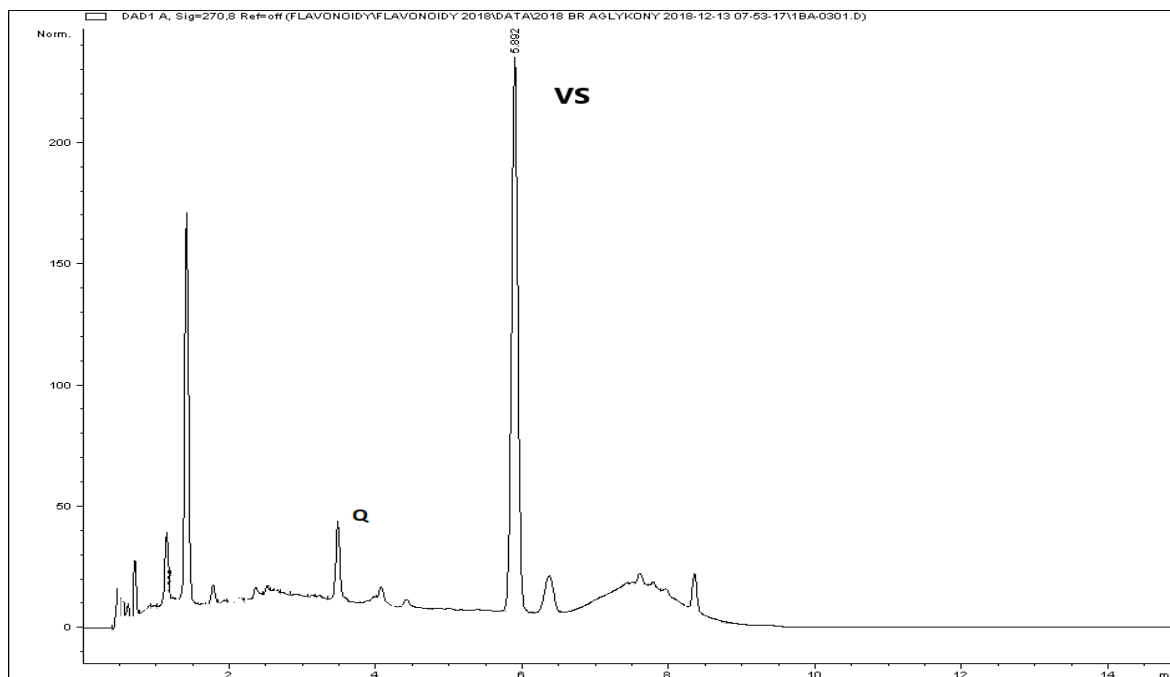
Obrázek 10 Záznam aglykonů flavonoidů; Zdroj: vlastní

Měření flavonoidních aglykonů probíhalo podle chromatografických standardů:

Schéma aglykonů dle píků:

- | | |
|-------------------|--------------------------|
| a) MY – Myricetin | e) A – Apigenin |
| b) MO – Morin | f) K – Kempferol |
| c) L – Luteolin | g) VS – Vnitřní Standard |
| d) Q – Kvercetin | |

Po zpracování dat v analytické metodě kapalinové chromatografie vznikl tzv. chromatografický profil, kde se prokázaly hodnoty kvercetinu, viz *Obrázek 11*. Významná je plocha píku kvercetinu (Q), která byla analyzována na čase 3,48 minut.



Obrázek 11 Stanovení obsahu celkového kvercetinu; Zdroj: vlastní

Z hodnot sušiny jsem tedy mohla přepočítat obsah kvercetinu na hodnotu čerstvého materiálu. Vše vyjádřeno v jednotkách mg/kg.

V této analýze byly zjištěny různé hodnoty obsahu kvercetinu v plodech pěstovaných odrůd brusnice. V sušině byly naměřeny nejnižší hodnoty obsahu tohoto typu flavonoidu, u druhu zvaného Runo bielawske (BR-4) o koncentraci 251 ± 30 mg/kg a druhu Sussi (BR-6) o obsahu $273 \pm 4,3$ mg/kg. V přepočtu na čerstvý materiál u vzorku odrůdy Runo bielawske jednalo o průměrnou hodnotu $59,1 \pm 7,04$ mg/kg a u Sussi to bylo $61,0 \pm 1$ mg/kg.

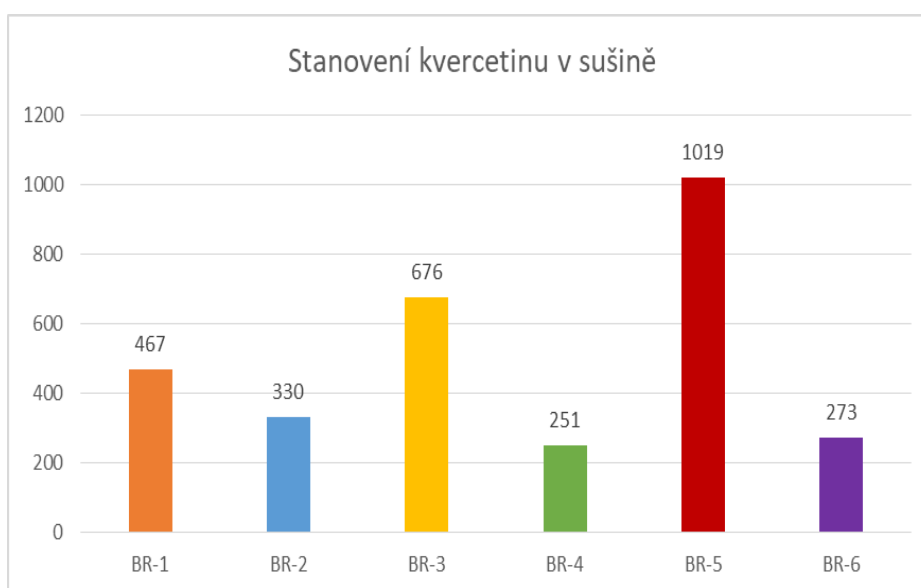
Středních hodnot dosáhly druhy Ida (BR-1), Korál (BR-2) a Linnea (BR-3) u obsahu v sušině, a jedná se o hodnoty $467 \pm 4,0$ mg/kg, 330 ± 12 mg/kg a $676 \pm 6,5$ mg/kg. V čerstvém ovoci jsem výpočtem stanovila hodnoty jako $70,5 \pm 0,6$ mg/kg, $55,2 \pm 1,9$ mg/kg a $141 \pm 1,4$ mg/kg.

Nejbohatším druhem na flavonoidní aglykony se ukázal v plodech druhu Sanny (BR 5), kde byl naměřen obsah kvercetinu v sušině o hodnotě 1019 ± 36 mg/kg a v čerstvém materiálu je to $242 \pm 8,6$ mg/kg. Veškeré naměřené koncentrace kvercetinu i se směrodatnou odchylkou v sušině lze najít v *Tabulka 3*, i s grafickým znázorněním rozdílů obsahů, viz *Obrázek 12*.

Tabulka 3 Stanovení kvercetinu (sušina)

Označení	Koncentrace u sušiny (mg/kg)	Průměr	Směrodatná odchylka
Br-1	463	467	4,0
	471		
Br-2	319	330	12
	342		
Br-3	669	676	6,5
	682		
Br-4	221	251	30
	281		
Br-5	982	1019	36
	1055		
Br-6	268	273	4,3
	277		

Zdroj: vlastní



Obrázek 12 Graf kvercetinu v sušině
Zdroj: vlastní

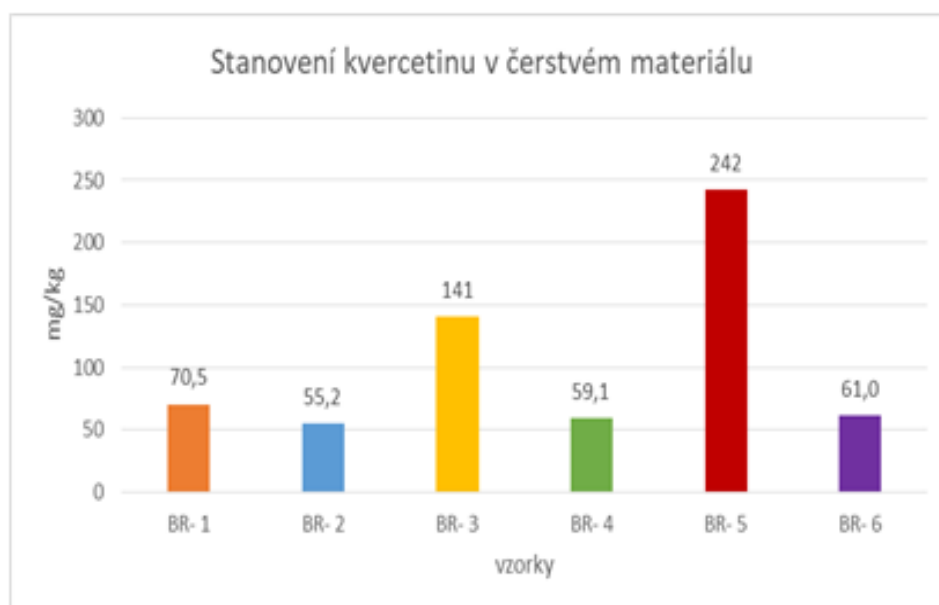
Z grafu je jasně znázorněna převaha v obsahu kvercetinu ve vzorku BR-5, tedy druhu Sanna, nad ostatními druhy rodu brusnice.

V *Tabulka 4* je znázorněna koncentrace kvercetinu v čerstvém materiálu. Další součástí analýzy je vytvoření sloupcového grafu pro lepší orientaci ve výsledcích. Graf, viz *Obrázek 13*, znázorňuje rozdíly v obsahu kvercetinu u jednotlivých vybraných druhů brusnic.

Tabulka 4 Kvercetin v čerstvém ovoci

Označení	Koncentrace u čerstvého materiálu (mg/kg)	Průměr	Směrodatná odchylka
Br-1	69,9	70,5	0,6
	71,1		
Br-2	53,3	55,2	1,9
	57,1		
Br-3	140	141	1,4
	143		
Br-4	52,1	59,1	7,0
	66,2		
Br-5	234	242	8,6
	251		
Br-6	60,0	61,0	1,0
	61,9		

Zdroj: vlastní



Obrázek 13 Graf kvercetinu v čerstvém ovoci

Zdroj: vlastní

Obsah kvercetinu u černého bezu v práci Carusa et al.(2015) v této studii dosahuje nejvyšších hodnot u prvního druhu 14,8 mg/kg, což je mnoho násobně menší než nejnižší hodnota u rodu brusnic, kde byla koncentrace kvercetinu analyzována v rozmezí od $55,2 \pm 1,9$ mg/kg po $242 \pm 8,6$ mg/kg.

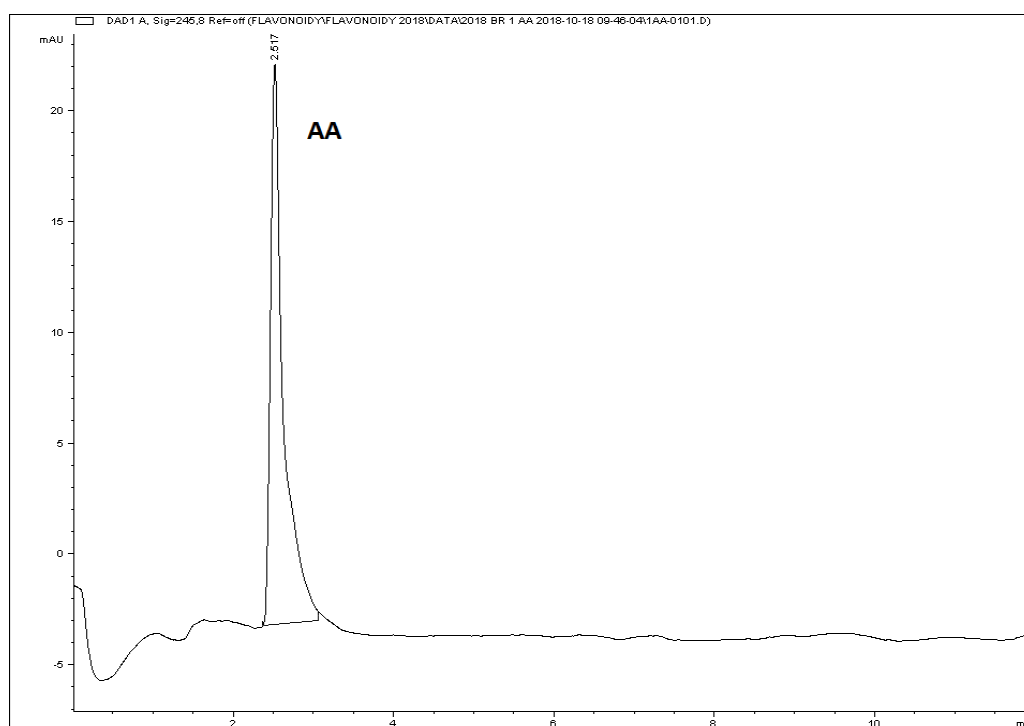
U studie Brasanac-Vukanovic et al. (2018) je hlavním tématem chemické složení u rostlin rodu brusnice, které byly vypěstovány v Černé Hoře. Nejvýznamnější pro mou práci jsou hodnoty obsahu kvercetinu v čerstvých plodech brusnice.

Hladina tohoto flavonoidu byla detekována při vlnové délce 325 nm a koncentrace určena jako 0,36 mg/ml, což znamená zhruba 360 mg/kg, což je o trochu vyšší koncentrace kvercetinu než v mé bakalářské práci.

V publikaci autora Milivojevic et al. (2012) se jedná o porovnání profilů biologicky aktivních látek, především u flavonoidů, konkrétně kvercetinu, ve druzích rodu brusnice. V druhu *Vaccinium myrtillus*, kde byl analyzován nejvyšší obsah kvercetinu a následně vyjádřen jako $7,10 \pm 0,4$ mg/kg. U rodu *V. corymbosum* byla zjištěna koncentrace kvercetinu jako $9,11 \pm 0,6$ mg/kg.

5.3 Stanovení obsahu vitamínu C (askorbové kyseliny)

Stanovování askorbové kyseliny probíhalo pomocí analytické metody formou HPLC. Po vytvoření chromatografického profilu byl určen retenční čas vitamínu C jako 2,52.



Obrázek 14 Chromatografický profil askorbové kyseliny (AA); Zdroj: vlastní

Pro analýzu askorbové kyseliny, značené jako AA (z angl. Ascorbic Acid), bylo nutné provést dvojité měření od jednoho vzorku. Z těchto hodnot se vypočítala průměrná koncentrace ve vzorcích jednoho druhu. Koncentrace askorbové kyseliny se jeví jako rozdílná napříč druhy tohoto rodu.

Nejnižší průměrné hodnoty byly zjištěny u druhu s názvem Sussi (BR-6), kdy nejnižší hodnota měření představovala $47,9 \pm 5,3$ mg/kg a druhu Ida (BR-1) o průměrné koncentraci $63,0 \pm 8,0$ mg/kg.

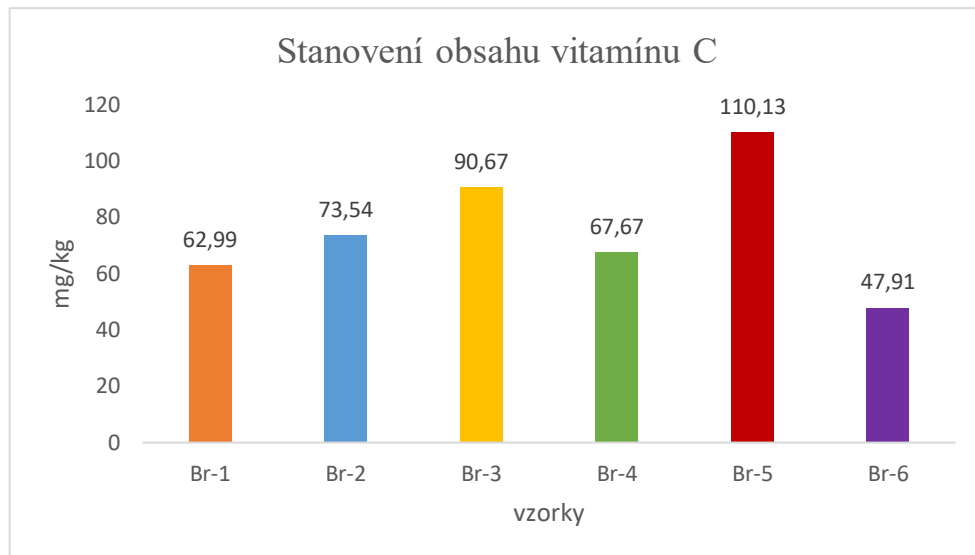
Středních hodnot v obsahu vitamínu C se projevily odrůdy Korál (BR-2) a Runo bielawske (BR-3) a to s hodnotami $73,5 \pm 1,2$ mg/kg a $67,6 \pm 1,7$ mg/kg.

Naopak s největší hojností vitamínu C byl analyzován druh Sanna (Br- 5) o průměrné analyzované hodnotě $110 \pm 1,4$ mg/kg, který jako jediný z měřených druhů přesáhl hranici 100 mg/kg. Druhým nejvýraznějším obsahem disponuje druh Linnea (BR- 3) o celkovém obsahu $90,7 \pm 3,3$ mg/kg. Všechna data o koncentraci v rodech brusnice se nalézají, viz *Tabulka 5* a v grafu viz *obrázek 15*.

Tabulka 4 Stanovení obsahu vitamínu C

Vzorky	Průměrná koncentrace (mg/kg)	Směrodatná odchylka
Br -1	63,0	7,8
Br -2	73,5	1,2
Br -3	90,7	3,3
Br -4	67,6	1,7
Br -5	110	1,4
Br -6	47,9	5,3

Zdroj: vlastní



Obrázek 15 Graf stanovení vitamínu C; Zdroj: vlastní

Ve studii od Celik et al.(2018) se porovnávají biologicky aktivní látky mezi druhy brusnice brusinka a brusnice borůvka (*V. myrtillus*) volně rostoucích v severovýchodním Turecku. Jedním z analyzovaných sloučenin je právě vitamín C. Extrakty se dostávají přímo z čerstvých plodů. Plody obsahovaly minimálně tři mg askorbové kyseliny a tři mg kvercetinů ve sto gramech extraktu.

Ovšem brusnice borůvka obsahovala vyšší množství (zhruba 39,10 mg/kg) vitamínu C než brusnice brusinka, která měla koncentraci této látky v rozmezí mezi čtyři až osm mg/100 g čerstvého ovoce.

V porovnání s analýzou Ochian et al. (2009), kde došli ke zjištění, že koncentrace vitamínu C v brusinkách je 7 mg/kg a v borůvkách 34 mg/kg.

Analýza plodů od Milivojevic et al. (2012) zaznamenává porovnání profilů biologicky aktivních látek, jako je vitamín C v druzích rodu brusnice. V druhu *Vaccinium myrtillus*, kde byla analyzována nejvyšší hodnota koncentrace askorbové kyseliny jako $25,8 \pm 1,9$ g/ kg. U rodu *V. corymbosum* byla zjištěna koncentrace vitamínu C jako $9,69 \pm 0,1$ mg/100g.

V porovnání s mou analýzou jsou to nízké hodnoty. Výsledné hladiny vitamínu C jsou srovnatelné s mou analýzou.

5.3 Stanovení obsahu anthokyanů

Analyzování obsahu anthokyanů bylo provedeno na spektrofotometru, kdy jsem pomocí měření absorpance vzorku snadno dopočetla koncentrace anthokyanů ve vzorku. Obsah celkových anthokyanů byl vyjádřen pomocí standardu kyanin chloridu, viz *Tabulka 6*.

Měření probíhalo při vlnové délce 528 nm. Stanovovala jsem celkový obsah anthokyanů, kdy nejnižší obsah ve vzorku představoval druh Runo bielawske (BR-4) o naměřené absorpanci 0,70 a spočítané koncentraci anthokyanů o 306 ± 19 mg/kg, který se taktéž projevil nízkým obsahem flavonoidů a vitamínu C ve vzorku.

Tabulka 5 Stanovení obsahu celkových anthokyanů

Označení	Průměrná absorpance (3 měření)	Průměrná koncentrace anthokyanů (mg/kg)	Směrodatná odchylka
Br-1	1,09	466	26
Br-2	0,95	410	2,9
Br-3	1,27	546	53
Br-4	0,70	306	19
Br-5	1,19	489	13
Br-6	1,50	617	8,7

Zdroj: vlastní

Dalším druhem s nízkými výsledky je druh brusnic, a to konkrétně druh Korál (BR- 2) s absorpancí 0,95 a obsahu určované látky s hodnotou $410 \pm 2,9$ mg/kg, který má střední hodnoty obsahu flavonoidů i vitamínu C.

Nejvyšších hodnot dosáhla analýza vzorku BR-6 u druhu Sussi a vzorku BR-3 druhu Linea. U brusnic s názvem Linea byla naměřena absorpance o 1,27 a koncentrace o 546 ± 53 mg/kg a u rodu Sussi o absorpanci 1,50 a odvozené koncentraci $617, \pm 8,7$ mg/kg.

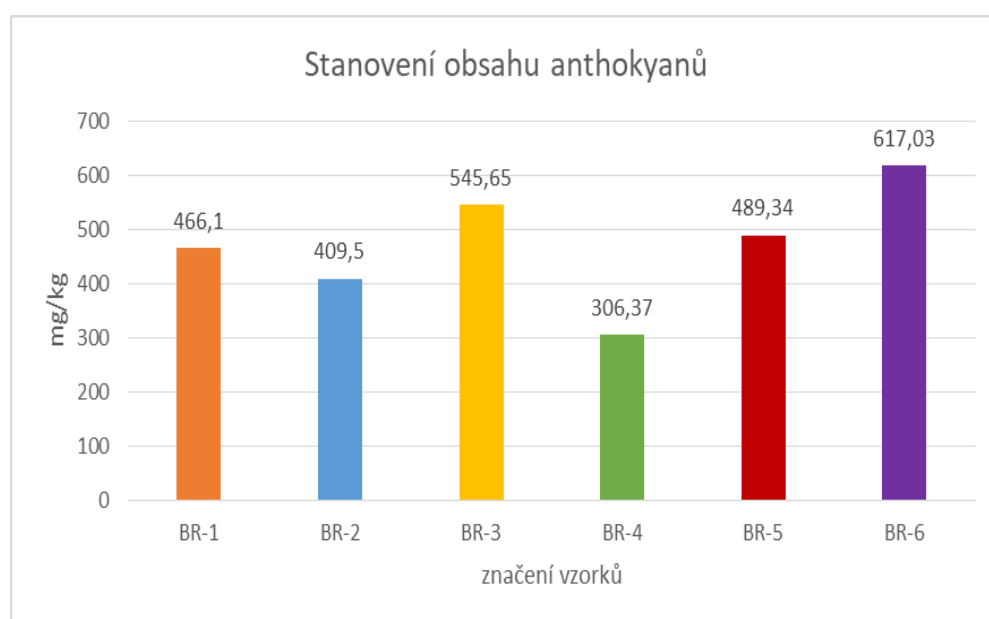
Zjistili jsme, že nejbohatším zdrojem ze zkoumaných odrůd rodu brusnice je odrůda Sussi.

Na tomto grafu, viz *Obrázek 16*, je patrné, že zkoumané rody brusnice vykazují vysoké hodnoty anthokyaninů a to v rozmezí koncentrace od 306 mg/kg po 617 mg/kg.

Studie od Colak et al. (2018) se zabývá analýzou různých forem sloučenin anthokyanů, a to hlavně u druhu brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus L*) a porovnává je s dalšími drobnými plody, jako jsou divoce rostoucí rody brusnice, ale i s plody ostružiny, maliny a bílými jahodami.

Plody pocházely z území Finska, které patří do přirozené flóry této země. Bobule byly sebrány v létě roku 2007 ze šesti různých lokalit. Vzorčky byly zamraženy až na - 25°C předtím, než se před analýzou provedla lyofilizace.

Ve Finsku divoce roste pět druhů rodu *Vaccinium*, a to *V. oxycoccus*, *V. microcarpum*, *V. vitis-idaea*, *V. uliginosum* a *V. myrtillus*.



Obrázek 16 Graf stanovení celkových anthokyanů, zdroj: vlastní

Nejvyšší hodnoty celkového obsahu anthokyanů dosáhl druh bobulí s modrofialovou pigmentací bobulí, a to hodnotou $868 \pm 4,5$ mg/kg, což označuje vysoký obsah anthokyanů.

Ostatně plody s narůžovělou barvou ve finské studii měly průměrnou hodnotu $206 \pm 6,8$ mg/kg, v porovnání s celkovým obsahem anthokyanů v plodech analyzovaného rodu brusnice brusinky, které mají rozmezí koncentrace 306 až 617 mg/kg, byly finské plody shledány jako chudší na celkové anthokyaniny než námi analyzované.

Vědecká práce Carusa et al. (2015) je založena na analýze anthokyanů v plodech rodu Bez černý (*Sambucus nigra*) a Ostružiníku (*Rubus*). V porovnání s plody rodu brusnice se hodnoty anthokyanů jeví jako srovnatelné. Přičemž u brusnic se hladina hodnot pohybuje v rozmezí od 306 po 617 mg/kg, u druhů bezu je nejvyšší koncentrací

339 mg/kg a u plodů ostružin dosahují hodnoty pouze do koncentrace 152 mg/kg.

V práci Ancilloti et al. (2015) byly zpracované data analyzovaných polyfenolů a celkových anthokyanů v druzích *Vaccinium myrtillus* a tzv. falešných brusnicích (*V. uliginosum*, podrod *gaultherioides* Bigelow). Tento rod brusnic rostl dříve v Italských horách, konkrétně v Toskánsku. Bylo zjištěno, že pravé brusnice obsahují desetkrát větší koncentraci kvercetinu než nepravé. Obsah anthokyanů u *V. myrtillus* dosahoval hodnoty koncentrace 230 mg/kg, přičemž u *V. uliginosum* dvojnásobný množství a tedy 471 mg/kg.

6. Závěr

Principem této bakalářské práce bylo vypracování rešerše z odborné literatury a co nejvíce přiblížit tematiku biologicky aktivních látek obsažených v rodu brusnice (*Vaccinium*). Mezi tyto aktivní sloučeniny patří například vitamín C, flavonoidy (kvercetin) a barviva anthokyany.

Zpracováno a analyzováno bylo vcelku šest různých odrůd z druhu brusnice brusinka, které byly dodány z Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského v Holovousích v srpnu roku 2018, a to panem Ing. Alešem Matějčkem.

Samotná analýza proběhla metodou kapalinové chromatografie HPLC, kde se detekovaly hladiny obsahu vitamínu C a kvercetinu, zatímco anthokyany se měřily pomocí spektrofotometru a jejich koncentrace se určila díky naměřené absorbanci.

Ze získaných dat tohoto výzkumu bylo zjištěno, že v plodech brusnice analyzovaných odrůd *Koralle*, *Runo bielawskie*, *Sanna*, *Sussi*, *Linnea* and *Ida*, jsou nejvíce zastoupeny biologicky aktivní látky v podobě flavonoidů, s hlavní sloučeninou zvanou kvercetin, a pigmentů anthokyanů. Nejvyšší celkový obsah kvercetinu byl analyzován v čerstvém materiálu odrůdy *Sanna* a to s koncentrací $242 \pm 8,6$ mg/kg. Maximální obsah anthokyanů byl zjištěn u odrůdy *Sussi* jako $617 \pm 8,7$ mg/kg.

Vitamín C neboli askorbová kyselina byla detekována u odrůdy *Sanna* s nejvyšší naměřenou koncentrací o hodnotě $110 \pm 1,4$ mg/kg. Takže můžeme pokládat brusnice za plody bohaté na tuto látku.

Tato bakalářská práce se snaží poukázat na látky tělu prospěšných a na významnost rodu brusnice, které je obsahují.

7. Seznam literatury

1. Begum, A. a Harikrishna, S., 2010. Phytoremediation Study of Aquatic Macrophytes Collected from Five Lakes Of Bangalore, India. 311-316.
2. Ancillotti, C., Lorenzo, C., Daniele, P., et al., 2016. Polyphenolic profiles and antioxidant and antiradical activity of italian berries from *Vaccinium myrtillus* L. and *vaccinium uliginosum* L. Subsp. *Gaultherioides* (bigelow) s.b. Young. *Food Chemistry*. Florencie, Itálie: *University of Florence*, 204, 176-184.
3. Andres, S., Pevny, S., Ziegenhagen, R., Bakhiya, et al., 2018. Safety aspects of the use of quercetin as a dietary supplement. Berlín: *Department of Food Safety*, 62(1).
4. Benvenuti, S., Brighenti, V. A Pellati, F., 2018. High-performance liquid chromatography for the analytical characterization of anthocyanins in *Vaccinium myrtillus* L. (bilberry) fruit and food products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 410(15).
5. Brasanac-Vukanovic, S., Mutic, J., Stankovic, D., et al., 2018. Wild bilberry (*Vaccinium myrtillus* L., ericaceae) from Montenegro as a source of antioxidants for use in the production of nutraceuticals. *Molecules*. Serbia: *University of Montenegro*, 23(8).
6. Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., Bren, U., 2016. Polyphenols: extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules*. Slovenia: *University of Maribor*, 21(7).
7. Brown, P., Turi, Ch., Shipley P. A Murch, S., 2012. Comparisons of large (*Vaccinium macrocarpon* ait.) and small (*Vaccinium oxycoccos* L., *Vaccinium vitis-idaea* L.) cranberry in British Columbia by phytochemical determination, antioxidant potential, and metabolomic profiling with chemometric analysis. *Planta Medica*. New York, 78(06), 630-640.
8. Bruneton, J., 1999. Pharmacognosy, phytochemistry medical plants. Paris cedex 08: *Lavoisier publishing*; 309-351.
9. Caruso, M. C., Galgano, F., Pecora, M., Tolve, R., Verrastro, M. A Favati, F., 2015. Improvement of analytical methods for the determination of polyphenolic bioactive compounds in berry fruits. *Journal of Chemistry*. Turecko, 2015, 1-6.
10. Castleman, M., 2004. Velká kniha léčivých rostlin: klasický průvodce nejlepšími přírodními léčivy představující ty nejlepší - časem i vědou prověřené - léčivé rostliny.

- Velká kniha léčivých rostlin: klasický průvodce nejlepšími přírodními léčivy představující ty nejlepší - časem i vědou prověřené - léčivé rostliny. Praha: *Columbus*, s. 115-118. ISBN 80-7249-177-6
11. Cejpek, K. a Velíšek, J., 2008. Biosynthesis of food components. Tábor: Osis, s. 397-410. ISBN 978-80-86659-12-1
 12. Celik, F., Celik, G., Gundogdu, M. a Bozhuyuk, M., 2018. Physicochemical and bioactive characteristics of wild grown bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Genotypes from northeastern Turkey. *Academic pres*. Turecko: Yuzuncu Yil University, 46(1), 128-133.
 13. Colak, N., Primetta, A. K. a Riihinen, K. R., 2018. Phenolic compounds and antioxidant capacity in different-colored and non-pigmented berries of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). *Food Bioscience*. 20, 12.
 14. Cvačka, J., 2010. Instrumentace pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii: vysokoúčinná kapalinová chromatografie [online]. Praha, 2010, 19 [cit. 2019-03-12].
 15. Dadáková, E., Procházková, E., Křížek, M., 2001.: Application of micellar electrokinetic capillary chromatography for quantitative analysis of quercetin in plant materials *Electrophoresis*. 22(8). 1573-8.
 16. Devi, K. P., Malar, D. S., Nabavi, S. F., Sureda, A., Xiao, J., Nabavi, S. M. a Daglia, M., 2015. Kaempferol and inflammation: from chemistry to medicine. *Pharmacological Research*. 99, 1-10.
 17. Dohnal, V. a Kadlečková, I., 2013. Analýza látek pomocí HPLC [online]. Ústí nad Labem: UJEP, 2013, 5-7.
 18. Donno*, D., Cavanna M. a Beccaro, G. L., 2013. Currants and strawberries as bioactive compound sources: determination of antioxidant profiles with hplc-dad/ms. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. (86), 1-10.
 19. Dufek, J. a Slavík, B., 2002. Květena lesů, luk a strání. Květena České Republiky. Praha: *Academia*.
 20. Fang, J., 2014. Bioavailability of Anthocyanins.
 21. Fang, J., 2015. Classification of fruits based on anthocyanin types and relevance to their health effects. *Nutrition*. 31(11-12), 1301-1306.
 22. Grulich, V. a Dvorská-Hochmanová, P., 2017. Botany: Ericaceae. [online]. 2013 [cit. 2018-11-05].

23. Haddad, P., Eid, H., 2017. The antidiabetic potential of quercetin: underlying mechanisms. *Current medicinal chemistry: Natural health products and metabolic diseases laboratory*. Canada: *Department of Pharmacology*, 24(4), 355-364.
24. Harborne, J. B., Williams, Ch., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Pergamon: Phytochemistry*. The University of Reading, UK, (55), 481-504.
25. Havsteen, Bent H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics: department of biochemistry*. University of Kiel: *Elsevier*, (96), 67-202.
26. Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. University of New Hampshire: department of animal and nutritional sciences, 13, 572-584.
27. Hejny, S. a Slavík B., 2003. Květena České republiky. 2., nezm. vyd. Praha: *Academia*. ISBN 80-200-1089-0.
28. Hlúbik, P., 2002. Vitamin C: esenciální mikronutrient. Hradec Králové: *Vojenská Lékařská Akademie JEP. Interní medicína pro praxi*.
29. Cheynier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., Martens, V., 2013. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*. 72, 1-20.
30. Chiva-Blanch, G., Badimon, L., 2017. Effects of polyphenol intake on metabolic syndrome: Current evidences from human trials. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017, 1-18.
31. Chu, W. - K., Cheung, S., Lau, R., Benzie, I., A Wachtel-Galor, S., 2011. Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects. *NCBI. Taylor & Francis Group*, press, (2nd edition), 464.
32. Jahodář, L., 2011. Farmakobotanika: semenné rostliny. Vyd. 3., upr. a dopl. *Praha: Karolinum*, s. 68-69. ISBN 978-80-246-2015-2.
33. Kostiuk, P., 2012. Vysokodávkovaný vitamín C: Zapomenutý poklad ve farmakoterapii. *Zdravotnické noviny*. Praha: Edukofarm, 46-47.
34. Křížek, M. a Šíma J., 2015. Analytická chemie. České budějovice: Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, zemědělská fakulta. ISBN 978-80-7394-486-5.
35. Kubát, K., Hrouda, L., Zázvorka, J., a Spol., 2002. Klíč ke květeně České republiky. Praha: *Academia*, s. 927. ISBN 80-200-0836-5.

36. Kumar, S., Pandey, A. K., 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*. University of Allahabad, 2013, 16.
37. Lykkesfeldt, J., Michels, A. J., Frei, B., 2014. Vitamin C. *Advances in Nutrition*. USA: Oregon State University, 5(1), 16-18.
38. Matějková, M., 2011. Sledování změn vybraných druhů lokálního ovoce v průběhu zmrazení. *VUT, Brno*.
39. Milivijevic, J., Maksimovic, V., Maksimovic, J. D. A Radivojevic, D., 2012. A comparison of major taste- and health-related compounds of vaccinium berries. *Tubitak*. Serbia: *University of Belgrade*, 36, 738-745.
40. Mladěnka, P., Zatloukalová, L., Filipický, T., Hrdina, R., 2010. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biol. Med.*, 2010; 49, 963-975.
41. Mueller, D., Jung, K., Winter, M., Rogoll, D., Melcher, R., Richling, E., 2017. Human intervention study to investigate the intestinal accessibility and bioavailability of anthocyanins from bilberries. *Food chemistry*. 231, 275-286.
42. Nollet, Leo M. L., Toldrá Fidel, 2012. Handbook of analysis of active compound in functional food. *US: CRC Press, Taylor a Francis Group*.
43. Popović, D., Dukić, D., Vukica Katić, et al., 2016. Antioxidant and proapoptotic effects of anthocyanins from bilberry extract in rats exposed to hepatotoxic effects of carbon tetrachloride. *Life Science*. 168.
44. Prencipe, F. P., Brunni, R., Guerrini, A., Rossi, D., 2014. Metabolite profiling of polyphenols in Vaccinium berries and determination of their chemopreventive properties. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (89), 257-267.
45. Rosina, J., 2013. Biofyzika: pro zdravotnické a biomedicínské obory. Praha: *Grada*. ISBN 978-80-247-4237-3.
46. Schönfelder, I. a Schönfelder P., 2010. Léčivé rostliny – Ottův průvodce přírodou. Praha: *Ottovo nakladatelství*, s. 437-439. ISBN 978-80-7360-588-9.
47. Smirnoff, N., 2005. Antioxidants and reactive oxygen species in plants
48. Štulík, K. a Juláková E., 2006. *Vysokoúčinné analytické separace biologicky aktivních látek*. Praha, 11-30. [cit. 2019-03-11].
49. Travica, N., Ried, K., Sali, A., Scholey, A., Hudson, I., Pipingas, A., 2017. Vitamin C status and cognitive function: a systematic review. *Nutrients*. Melbourne, Australia: *Swinburne University of Technology*, 9(9).
50. Tuhársky, P., 2014. Vitamin C: megaskorbická léčba. Slovensko: *Perfekt*, 288 s.

51. Velíšek, J. a Hajšlová J., 2009. Chemie potravin 1.a 2. rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: *Osis*, s. 429-444.1 vyd. ISBN 978-80-86659-15-2. 2 vyd. ISBN 978-80-86659-16-9.
52. Volf, K. a Anders, F., 2015. Flavonoidy a jejich biologické působení. Praha, 292.
53. Wallace, T. a Giusti, M., 2015. Anthocyanins. *Advances in Nutrition*. 6(5), 620-622.
54. Yeung, A. W. K., Tzvetkov N. T., Zengin, G., et al., 2019. The berries on the top. *Journal of Berry Research*. Univ Hong Kong, 9(1), 125-139.
55. Zanotti, I., Dall'asta, M., Mena, P., Mele, L., Bruni, R., Ray, S., Del Rio, D, 2015. Atheroprotective effects of (poly)phenols: a focus on cell cholesterol metabolism. In: *Food and Function*. 6, s. 13 – 31

8. Seznam obrázků

Obrázek 1 brusnice borůvka	12
Obrázek 2 brusnice brusinka	12
Obrázek 3 vlochyně bahenní	14
Obrázek 4 Kyselina L-askorbová Zdroj: vlastní.....	17
Obrázek 5 Obecná struktura flavonoidů; Zdroj: vlastní.....	21
Obrázek 6 Vzorce různých skupin flavonoidů; Zdroj: vlastní	24
Obrázek 7 HPLC; Zdroj: vlastní.....	31
Obrázek 8 Dávkovače (Vialky); Zdroj: vlastní	34
Obrázek 9 Filtrační zařízení; Zdroj: vlastní	41
Obrázek 10 Záznam aglykonů flavonoidů; Zdroj: vlastní	43
Obrázek 11 Stanovení obsahu celkového kvercetinu; Zdroj: vlastní.....	44
Obrázek 12 Graf kvercetinu v sušině; Zdroj: vlastní	45
Obrázek 13 Graf kvercetinu v čerstvém ovoci; Zdroj: vlastní	46
Obrázek 14 Chromatografický profil askorbové kyseliny (AA); Zdroj: vlastní	47
Obrázek 15 Graf stanovení vitamínu C; Zdroj: vlastní.....	49
Obrázek 16 Graf stanovení celkových anthokyanů, Zdroj: vlastní	51

9. Seznam tabulek

Tabulka 1: Analyzované odrůdy rodu Brusnice	36
Tabulka 2 Schéma měření	42
Tabulka 3 Stanovení kvercetinu (sušina)	45
Tabulka 4 Stanovení obsahu vitamínu C.....	48
Tabulka 5 Stanovení obsahu celkových anthokyanů	50

10. Seznam zkratk

CSF – Cerebralspinal Fluid (mozkomíšní mok)

FAO – Organizace OSN pro výživu a zemědělství

HPLC – Vysokoučinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)

ROS – reaktivní kyslíkaté formy

SPE – extrakce na pevné fázi (solid phase extraction)

UV – oblast ultrafialového spektra

VIS – oblast viditelného spektra

WHO – světová zdravotnická organizace