



Pedagogická
fakulta
Faculty
of Education

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

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Pedagogická fakulta
Katedra aplikované chemie

Bakalářská práce

Porovnání metod pro stanovení obsahu anthokyanů v plodech bezu černého

Vypracovala: Lenka Kratochvílová

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

České Budějovice 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci na téma porovnání metod pro stanovení obsahu anthokyanů v plodech bezu černého 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 jejích 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:.....

Lenka Kratochvílová

Abstrakt

Obsah anthokyanů byl zjišťován v plodech bezu černého (*Sambucus nigra L.*) třemi metodami: metodou uvedenou v Českém lékopisu 2017 a dodatku 2019, pH diferenciální metodou, kterou uvádí ve své diplomové práci uvádí Bc. Kateřina Javorská a metodou kalibrační, kterou uvádí ve své diplomové práci Bc. Markéta Matějková. V bakalářské práci jsou shrnuty výsledky jednotlivých metod a jejich porovnání.

Z výsledků je zřejmé, že nejvhodnější metoda pro zjišťování obsahu anthokyanů v plodech bezu černého je metoda lékopisná, ze které byl zjištěn nejvyšší a zároveň s literaturou se nejvíce shodující obsah anthokyanů. U metody lékopisné se obsah anthokyanů přepočítával na majoritní kyanidin-3-glukosid.

Klíčová slova: anthokyany; bez černý (*Sambucus nigra L.*); kyanidin-3-glukosid

Abstract

The content of anthocyanins in elderberry (*Sambucus nigra L.*) was determined by three methods: the method described in the Czech Pharmacopoeia 2017 and its Appendix 2019, the pH differential method, which was used in the bachelor thesis of Bc. Kateina Javorská and the calibration method, which was used in the bachelor thesis of Bc. Markéta Matějková. The results of these methods and their comparison are summarized in this thesis.

According to the results, the most suitable method to determine the content of anthocyanins in elderberry is the pharmacopoeia method. This method showed the highest anthocyanin content, which at the same time corresponded the most with the literature. In the pharmacopoeia method, the anthocyanins content was recalculated to the majority of cyanidine-3-glucoside.

Keywords: anthocyanins; elderberry (*Sambucus nigra L.*); cyanidine-3-glucoside

Poděkování

Děkuji paní doc. Ing. Evě Dadákové, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady, a trpělivost. Velmi si vážím času, který poskytla při vypracování této bakalářské práce.

Také děkuji paní Ing. Tamaře Pelikánové za pomoc v laboratoři při zpracování materiálu a analýze vzorků.

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Cíle práce	9
3. Literární rešerše	10
3.1 Rostlinné polyfenoly	10
3.1.1 Flavonoidy	10
3.2 Anthokyaniny	12
3.2.1 Chemická podstata	12
3.2.2 Struktura.....	12
3.2.3 Výskyt.....	13
3.2.4 Vlastnosti	14
3.3 Biologické účinky polyfenolů	14
3.4 Biologické účinky anthokyaninů.....	16
3.4.1 Využití v potravinářství a farmaceutické využití.....	17
3.5 Drobné ovoce vynikající obsahem anthokyaninů.....	17
3.5.1 <i>Sambucus nigra L.</i> – bez černý	17
3.5.1.1 Obsahové látky	20
3.5.1.2 Potravinářské a farmaceutické využití.....	20
3.6 Stanovení anthokyaninů	21
3.6.1 Spektrofotometrie – analytické techniky pro kvalitativní a kvantitativní analýzu přírodních látek.....	21
3.6.2 HPLC	23
3.7 Charakteristika metod vhodných pro analýzu anthokyaninů	25
3.7.1 Lékopisná metoda	25
3.7.2 pH diferenciální metoda.....	25
3.7.3 Stanovené podle kalibrační závislosti	26
4. Praktická část	27

4.1	Přístroje a pomůcky	27
4.2	Použité chemikálie	27
4.3	Použitý materiál.....	27
4.4	Postupy pro stanovení obsahu anthokyanů v biologickém materiálu	28
4.4.1	Postup podle principu v českém lékopisu 2017	28
4.4.2	Postup podle pH diferenciální metody.....	29
4.4.3	Postup podle kalibrační závislosti.....	31
5.	Výsledky a diskuze	34
5.1	Obsah anthokyanů v plodech bezu černého	34
5.1.1	Obsah anthokyanů podle českého lékopisu 2017.....	34
5.1.2	Obsah anthokyanů podle pH diferenciální metody	36
5.1.3	Obsah anthokyanů podle kalibrační závislosti.....	39
6.	Závěr	42
7.	Seznam literatury	43
8.	Seznam obrázků.....	47
9.	Seznam tabulek.....	47

Seznam použitých zkratk

HPLC – Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)

pH – Záporný dekadický logaritmus číselné hodnoty koncentrace vodíkových iontů v roztoku (power of hydrogen)

UV – Ultrafialové spektrum (Ultraviolet)

SD – Směrodatná odchylka (Standard deviation)

1. Úvod

Ve své bakalářské práci se zabývám stanovením obsahu anthokyanů v plodech bezu černého. Plody bezu černého se nazývají bezinky a jsou velmi bohaté na obsah anthokyanů. Anthokyany mají pozitivní účinky na zdraví. V Čechách se bez černý vyskytuje nejčastěji volně rostoucí na vlhkých a stinných místech. V kuchyni se využívají jak květy bezu, tak i bezinky. Z bezinek se vyrábí šťávy, marmelády, čaje a další. Své uplatnění mají také jako potravinářská barviva.

Bakalářskou práci jsem rozdělila na dvě části. První část tvoří literární rešerše, ve které rozebírám polyfenolické látky, anthokyany, charakteristiku bezu černého. Popisuji způsoby měření obsahu anthokyanů spektrofotometricky a chromatograficky. Dále uvádím principy jednotlivých metod. Ve druhé praktické části porovnávám výsledky zjištěné z jednotlivých metod, které jsem použila pro určení obsahu anthokyanů. Přepočít jsem prováděla u lékopisné metody a pH diferenciální metody na kyanidin-3-glukosid. U metody, která je založena na kalibrační závislosti, jsem přepočít prováděla na méně dominantní kyanin hydrochlorid.

2. Cíle práce

Cílem této bakalářské práce bylo otestovat vhodnost několika metod pro stanovení obsahu anthokyanů v plodech bezu černého a následně jednotlivé metody porovnat a vybrat nejvhodnější metodu. Pro stanovení obsahu anthokyanů byl vždy k měření použit spektrofotometr a obsah vyjádřen v gramech na 1 kilogram bezinek.

3. Literární rešerše

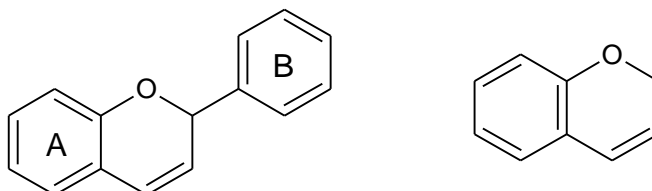
3.1 Rostlinné polyfenoly

Pro rostlinné polyfenoly je charakteristické, že obsahují více než jednu fenolovou skupinu. Nejvýznamnější polyfenoly jsou flavonoidy. Jde o nejvíce zastoupené antioxidanty v potravě (Watson a kol., 2014).

3.1.1 Flavonoidy

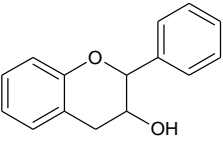
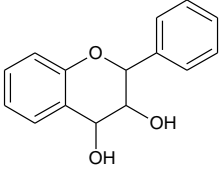
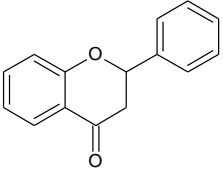
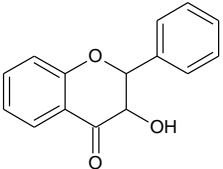
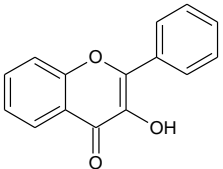
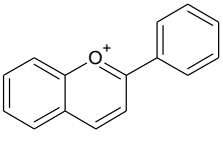
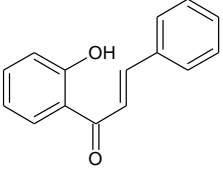
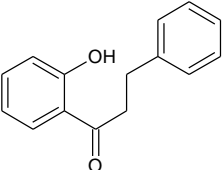
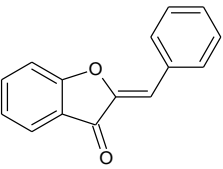
Nejvýznamnější a nejobsáhlejší skupinu polyfenolů tvoří flavonoidy. Flavonoidy obsahují ve své molekule dva benzenové kruhy (na obrázku znázorněny jako kruhy A a B), které jsou spojeny tří-uhlíkatým řetězcem. Kruh A se společně s tří-uhlíkatým řetězcem se nazývá jako 2H-chromen. Kompletní struktura tvořící flavonoidy se nazývá flavan. Struktury jsou znázorněny na následujícím obrázku 1 (Velíšek a Hajšlová, 2009).

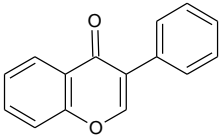
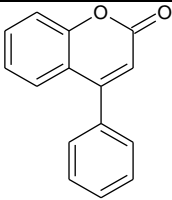
Obrázek 1: Znázornění flavanu a 2H-chromenu (Velíšek a Hajšlová, 2009)



Toto je pouze základní struktura flavonoidů. V přírodě jsou substituovány hydroxy nebo methoxy skupinami. Objevují se jako monomery, ale také jako polymery. Množství všech flavonoidních látek se odhaduje přes 5000 a stále se v rostlinách objevují nové. Podle stupně oxidace, substituce a spojení kruhů se flavonoidy dělí na základní struktury (tabulka 1) (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Tabulka 1: Základní struktury flavonoidů (Velíšek a Hajšlová, 2009)

Základní struktury flavonoidů	Vzorec
Katechiny	
Leukoanthokyanidiny	
Flavanony	
Flavanonoly	
Flavonoly	
Anthokyanidiny	
Chalkony	
Dihydrochalkony	
Aurony	

Isoflavonoidy	
Neoflavonoidy	

Základní struktury jsou také odlišné stupněm oxidace a uhlíkatým řetězcem spojujícím benzenové kruhy. Chalkony, dihydrochalkony a aurony mají benzenové kruhy spojeny řetězcem, který tvoří 3 uhlíky. Isoflavonoidy a neoflavonoidy jsou spojeny pyranovým kruhem v poloze C-3 nebo C-4 (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Některé flavonoidy jsou významnými přírodními barvivy nebo dochucovadly. Jejich chuť je trpká a hořká. Anthokyany se dříve dělily na dvě skupiny podle barvy: na červené až modré a žluté. Dnes už se toto dělení nepoužívá. Katechiny a leukoanthokyanidiny tvoří hnědé pigmenty, které vznikají při enzymovém hnědnutí (Velíšek a Hajšlová, 2009).

3.2 Anthokyany

3.2.1 Chemická podstata

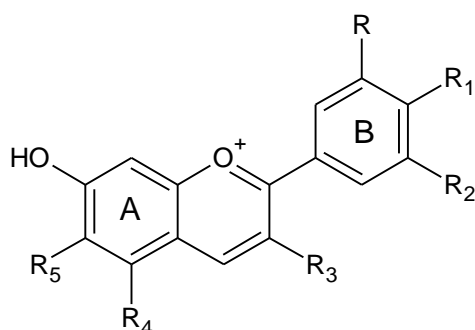
Anthokyany jsou sloučeniny, které jsou velmi dobře rozpustné v polárních rozpouštědlech. Nejčastěji jsou z rostlinných materiálů extrahovány do methanolu, který obsahuje malé množství chlorovodíkové kyseliny nebo mravenčí kyseliny. Okyselený methanol se používá z toho důvodu, že kyseliny snižují hodnotu pH roztoku a zabraňují rozkladu neacylovaného anthokyanového pigmentu. Dále se jako extrakční činidlo může používat i aceton (Kong a kol., 2003). Jedná se o pigmenty s velmi širokou barevnou škálou, a to od šarlatové přes purpurovou po modrou barvu (Glover a Martin, 2012).

3.2.2 Struktura

Anthokyany tvoří podtřídu fenolických sloučenin, které se nazývají flavonoidy. Jsou to glykosidy fenolických aglykonů anthokyanidinů a některého

sacharidu. Anthokyanidinovou strukturu tvoří dva benzenové kruhy spojené lineárním tří-uhlíkatým řetězcem. Tato struktura se taky nazývá jako $C_6 - C_3 - C_6$ systém a je znázorněna na obrázku 2. Na základní strukturu mají anthokyany navázané sacharidy substituované hydroxylovou (-OH), nebo methoxylovou (-OCH₃) skupinu. Jednotlivé anthokyany jsou rozdílné hlavně v počtu cukerných jednotek, které jsou připojené na $C_6 - C_3 - C_6$ systém (Yi a kol., 2010). V molekulách anthokyanů bylo nalezeno nejčastěji 5 sacharidů a to: D-glukosa, L-rhamnosa, D-galaktosa, D-xylosa, a L-arabinosa (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Obrázek 2: Základní struktura anthokyanů (Velíšek a Hajšlová, 2009)



3.2.3 Výskyt

V přírodě bylo identifikováno více než 400 jednotlivých druhů anthokyanů. Anthokyany se vyskytují ve víně, a to hlavně v červeném (Yi a kol., 2010). Pigmenty zabarvují ovoce a květy mnoha rostlin. Za následek mají i červené zbarvení podzimního listí. Velmi bohaté, co se obsahu anthokyanů týče, jsou borůvky, brusinky, jahody, maliny, černý rybíz, červené hrozny, ostružiny, třešně, švestky, červené zelí, červená cibule, lilek, brokolice a fialový kvěťák. Potraviny bohaté na anthokyany jsou velmi snadno rozeznatelné pouhým okem, díky své výrazně červené, nebo modré barvě (Glover a Martin, 2012). V jedlých částí rostlin jsou nejčastěji obsaženy anthokyanidiny: kyanidin, pelargonidin, peonidin, delphinin, petunidin a malvidin. Celkově nejvíce rozšířeným glykosidem anthokyanem je kyanidin-3-glukosid (Kong a kol., 2003).

3.2.4 Vlastnosti

Anthokyany vznikají metabolismem fenylpropanoidů z fenylyalaninu. Za kyselých podmínek jsou intenzivně zbarveny. Absorpčního maxima ve viditelném spektru dosahují mezi 465 až 550 nm. Absorbují i UV záření, a to v rozmezí 270–280 nm. Velmi intenzivní modré barvy vznikají ve spojení s minerálním hliníkem, který je více dostupnější v kyselých půdách, ze kterých je rostlinami přijímán. Červené zbarvení rostliny získávají na půdách neutrálních, ve kterých se namísto hliníku vyskytuje železo. Některé rostliny jsou schopny měnit své zbarvení buďto změnou pH ve vakuolách, nebo regulováním množství produkovaných anthokyanů. Například delfinin je charakteristický tmavě modrým až fialovým zbarvením, kyanidin sytě růžovým a pelargonidin červeným (Glover a Martin, 2012).

Rostliny obsahují komplexní soubor anthokyanů (Glover a Martin, 2012). Někdy také slouží jako přírodní pH indikátory (Jackman a kol., 1987). Na vlastnosti anthokyanů nemá skoro žádný vliv sacharid, který je na anthokyany navázán (Velíšek a Hajšlová, 2009).

3.3 Biologické účinky polyfenolů

Polyfenoly mají pozitivní vliv na zdraví člověka. Nacházejí se v potravě i v nápojích rostlinného původu. V potravě konkrétně v ovoci, zelenině a čokoládě. V nápojích je lze nalézt v černém a zeleném čaji, kávě a červeném víně. Bohatý na obsah polyfenolů je také extra panenský olivový olej (Watson a kol., 2014; Hoensch a Oertel, 2015).

Výzkumy se zabývaly účinky polyfenolů na zdraví člověka a dospěly k několika závěrům. Polyfenoly mají pozitivní účinky na třech úrovních, a to na úrovni primární, sekundární a terciární, kde primární úroveň působí preventivně proti nemoci nebo zhoršení zdravotního stavu jedince. Sekundární úroveň má za úkol snižovat a tlumit příznaky nemoci a snažit se o co nejrychlejší uzdravení. Terciární úroveň tlumí zdravotní poškození z uplynulé nemoci, které způsobila trvalé následky a pomáhají organismu vypořádat se z prodělané nemoci (Watson a kol., 2014).

Některé plody ovoce nebo zeleniny obsahují až 200-300 mg polyfenolů ve 100 g čerstvé hmotnosti. Šálek čaje nebo 2 dcl vína obsahuje přibližně 100 mg polyfenolů (Watson a kol., 2014).

Výzkumy na lidech, na zvířatech a výzkumy in vitro prokázaly, že potraviny obsahující polyfenoly mohou usnadnit hubnutí a zároveň zabránit nárůstu hmotnosti a redukovat obsah lipidů v krvi (Watson a kol., 2014). Mají pozitivní účinek na snížení rizika cukrovky druhého typu (Irina a Mohame, 2012), schopnost snižovat neurologické potíže (např. Alzheimerova choroba, Parkinsonova nemoc a další), kardiovaskulární choroby (Watson a kol., 2014). Bylo prokázáno, že polyfenoly díky své chemické povaze přispívají k prevenci aterosklerózy a rakoviny (Hollman a Katan, 1999). Zároveň existuje velké množství studií, které tvrdí, že polyfenoly mají pozitivní vliv také na urologické potíže a imunitu. Podporují léčbu průjmových chorob, udržují střevní mikrobiotu (Hoensch a Oertel, 2015). Polyfenoly obsažené v bobulovitém ovoci posilují imunitu a mají velký vliv proti nakažení jedince chřipkou. Vědci zjistili, že polyfenoly mají přímý vliv na virus, zabrání, zkrátí a sníží závažnost symptomů chřipky u lidí (Gramza-Michałowska a kol., 2017). Ve většině výzkumů se používaly pouze některé potraviny, nejčastěji borůvky, jahody a čokoláda (Watson a kol., 2014; Hoensch a Oertel, 2015). V následující tabulce 2 jsou zaznamenány potraviny bohaté na polyfenoly.

Tabulka 2: Obsah polyfenolů ve vybraných potravinách (Kruger a kol., 2014)

Potravina	Obsah polyfenolů [mg/100g]
Syrové borůvky	176,49
Brusinky	418,77
Kakaové boby (<i>Theobroma cacao</i>)	9481,75
Mandle	184,02
Lískové ořechy	500,66
Skořice mletá (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	8108,14
Rybíz černý	200,00

Polyfenoly obsažené v nápojích mají velmi podobné účinky jako polyfenoly obsažené v ovoci a zelenině. Například užívání zeleného čaje, který je velmi bohatý na polyfenoly, společně se zvýšením energetického výdeje, má pozitivní vliv na snahu o snížení tělesného a břišního tuku (Watson a kol., 2014). Zelené čaje obsahující polyfenoly jsou také používány jako prevence proti rakovině kůže, jater, plic, trávicího

traktu, slinivky břišní, prsu a prostaty (Irina a Mohame, 2012). Konzumace vína se naopak spojuje s nižším rizikem infarktu myokardu, nebo demenci. Konkrétně červené víno omezuje růst nádorů a je velmi přínosné pro léčbu rakoviny prsu (Kruger a kol., 2014; Kong a kol., 2003). Obsah polyfenolických sloučenin ve vybraných nápojích je uveden v následující tabulce 3.

Tabulka 3: Obsah polyfenolických sloučenin ve vybraných nápojích (Kruger a kol., 2014)

Nápoj	Obsah polyfenolů [mg/100g]
Čaj černý	3,30
Čaj zelený	12,20
Červené víno (Cabernet Sauvignon)	35,59
Červené víno (Syrah)	152,96
Růžové víno	2,20
Bílé víno (Sherry)	8,18
Pivo	2,03

Většina studií se zaměřuje na biologické účinky konkrétních potravin, nebo na polyfenoly komplexně, ale nedokážou přesně definovat jaký konkrétní polyfenol vyvolává pozitivní účinky na lidské tělo (Kruger a kol., 2014).

3.4 Biologické účinky anthokyanů

Existuje několik důkazů, že konzumace anthokyanů má pozitivní vliv na zdraví člověka. Velký ohlas byl na konci 80. let minulého století. Tehdy byla definována výživová anomálie „Francouzský paradox“. Z výzkumů vyšlo, že Francouzi mají mnohem méně infarktů v porovnání s Američany i přesto, že konzumují více tuků a mají vyšší obsah cholesterolu v krvi spolu s vyšším krevním tlakem (Glover a Martin, 2012). Vysvětlováno to bylo tím, že ve Francii se mnohem více konzumuje červené víno, a konzumace červeného vína je hlavní příčinou ochrany proti kardiovaskulárním poruchám (Kruger a kol., 2014). Při konkrétním výzkumu bylo prokázáno, že při každodenním užívání anthokyanů v podobě červeného vína (Cabernet) výrazně poklesla koncentrace cukru v moči a krevním séru (Kong a kol., 2003).

Na tento popud se anthokyany začaly mnohem více zkoumat. Různé výzkumy prokázaly, že tyto látky zmírňují průběh rakoviny a zároveň slouží i jako prevence k některým druhům rakoviny. Konkrétně rakovinu tlustého střeva a žaludku (Kong a kol., 2003). Podporují úbytek tuku a redukci hmotnosti, chrání před chronickým onemocněním, jako je například kardiovaskulární onemocnění. Prodlužují tak život jedince. Pro pozitivní vliv na lidské tělo je důležité, aby anthokyany byly užívány každý den v různém ovoci nebo zelenině (Glover a Martin, 2012).

I velmi nepatrná změna ve struktuře anthokyanů (oxidace, substituce), může mít významný účinek na lidský organismus. Konkrétně na buňky cévního endotelu (Yi a kol., 2010).

3.4.1 Využití v potravinářství a farmaceutické využití

Anthokyany se v potravinářství využívají jako barviva, a to už více než 100 let. Nevýhoda využití anthokyanových barviv je, že jsou použitelné pouze v kyselém prostředí (Velíšek a Hajšlová, 2009). Z tohoto důvodů mají největší uplatnění u barvení kyselých potravin, například vín, džusů, dále v nápojích, které obsahují konzervant oxid uhličitý, v dezertech, jogurtech, mléčných výrobcích, zmrzlínách a dalších. Toto barvivo v potravinách najdeme pod kódem E163, které nemá žádné nežádoucí vedlejší účinky. V České republice je povoleno k užívání ve všech potravinách kromě dětské výživy. V USA je povoleno i v dětské potravě (<https://www.ferpotravina.cz/seznam-ecek/E163>).

Anthokyany se ve farmacii používají jako prevence proti zánětu močových cest. Podporují funkci očí a mozku. Své uplatnění mají i při léčbě křečových žil. Anthokyany dokážou absorbovat volné radikály v těle a zneškodnit je (<https://www.celostnimediceina.cz/antokyany-prirodni-lecivo-v-te-nejcistsi-podobe.htm>).

3.5 Drobné ovoce vynikající obsahem anthokyanů

3.5.1 *Sambucus nigra L.* – bez černý

Charakteristika botanického druhu

Bez černý je keř, který se vyskytuje podél zdí a plotů, ve světlých listnatých a lužních lesích, na zbořeništích, skládkách, zahradách, okolí potoků. Spíše na

stinných místech. Jeho odrůdy jsou sázeny do parků a sadů, kde se pěstují hlavně keře s nízkým vzrůstem a různým zbarvením listů. V České republice se vyskytuje téměř na celé rozloze mimo oblasti s vysokou nadmořskou výškou, přibližně od 1100 metrů nad mořem. Daří se mu hlavně na vlhkých místech s vysokým obsahem dusíku v půdě. Keř je rozšířen i po celém našem světadílu, kromě Finska, Skandinávie a částí Ruska. S tímto keřem se můžeme setkat i mimo Evropský kontinent například v Africe, na Krétě, nebo na Kypru (Slavík a kol., 1997; Kubát, 2002).

Tento listnatý keř nejčastěji dorůstá do výšky 1,5–5 metrů. Jeho koruna je bohatě větvená. Větve jsou u mladých keřů lysé, nebo mírně chlupaté. Zbarvené do zelené až šedozelené barvy s čočinkami. Starší keře jsou charakteristické šedozeleným až šedohnědým zbarvením větví se svisle popraskanou nepříjemně páchnoucí kůrou. Dřeň větví má bílé zbarvení a je poměrně široká. Bezové dřevo je velmi tvrdé a nažloutlé barvy (Slavík a kol., 1997; Kubát, 2002).

Pro keř jsou charakteristické vstřícné lichozpeřené listy nejčastěji složené z pěti podlouhlých listů, které mají na okraji pilovité zubení. Jejich délka je v rozmezí pěti až deseti centimetrů. Z vrchní strany jsou zelené, ze spodní šedavé (Grau a kol., 1996).

Během června a července kvete bílými květy v průměru 10 až 25 cm. Květy jsou uspořádány do deštníkovitého květenství nejčastěji s 5 dominantními paprsky. Květy jsou příjemně vonící (Grau a kol., 1996). Obrázek 3.

Obrázek 3: Rozkvetlý keř bezu černého (<http://www.vysnenazahrada.cz/2012/05/cerny-bez.html>)



Plody známé jako bezinky dozrávají na podzim a jsou charakteristické kulatým tvarem o velikosti 5–8 milimetrů. Jsou lesklé černé až černofialové barvy. Každý plod obsahuje 3 pecky (Grau a kol., 1996). Obrázek 4.

Obrázek 4: Plody bezu černého – bezinky (<https://vitalplus.org/cerny-bez/>)



3.5.1.1 *Obsahové látky*

V květenství

Květenství je bohaté na polyfenolické sloučeniny. Nejvíce zastoupen je rutin. Obsah rutinu v květenství bezu černého je 20 mg v 1 g květu sušeném na vzduchu. Díky tomuto obsahu je společně s pohankou považován za nejbohatší rostlinný zdroj rutinu (Vrchotová a kol., 2017).

V plodech

Bezinky obsahují cukry, organické kyseliny, anthokyany a flavonoidy. Nejvíce zastoupeny jsou anthokyany, ze kterých jsou v bezinkách nejvíce obsaženy kyanidin-3-sambubiosid a kyanidin-3-glukosid. V menší míře jsou zastoupeny také kyanidin-3,5-diglukosid a kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid. Z cukrů je to především fruktóza a glukóza. Sacharóza představuje pouze stopové množství. Dále bezinky obsahují organické kyseliny. Nejvíce zastoupena je citrónová kyselina. Ve stopovém množství se v bezinkách vyskytuje i šikimová kyselina a fumarová kyselina. Z flavonoidů byl v bezinkách nalezen kvercetin, ale především kvercetin-3-rutinosid spolu s kvercetinem-3-glukosidem (Veberic a kol., 2009).

Bezinky dále obsahují vitamíny C, B₁, B₂, B₆, 0,01% éterického oleje (<http://cms.herbalgram.org/press/files/elderberry-scr.pdf>). Dále se v nich vyskytují minerální látky jako draslík, fosfor, vápník, sodík, hořčík, mangan, železo, zinek, měď. Mají vysoký obsah bílkovin. Přibližně kolem 3 g ve 100 ml. Nejčastější aminokyseliny, které tvoří bílkoviny jsou alanin, leucin, asparagová kyselina, glutamová kyselina, společně s dalšími méně zastoupenými. Obsahují také vysoký podíl celulózových vláken (Vulic a kol., 2008).

3.5.1.2 *Potravinářské a farmaceutické využití*

Bez černý se využívá v léčitelství a farmaceutickém průmyslu. Léčivé účinky mají květy i plody. Z květů se vyrábí nápoje, nebo se pojídají jako takzvané kosmatice, což jsou smažené květy v těstíčku a podávané pocukrované. Bezinky v syrovém stavu jsou jedovaté a nejedlé. Způsobují zažívací potíže (průjem, nevolnost, zvracení, křeče v břiše) a někdy se mohou objevit i závratě. Z tohoto důvodu je nutná tepelná úprava bezinek před požitím. Bezinky zpracovávají do zavařenin, na povidla, šťávy, sirupy,

likéry a vína, nebo přímo plody osmažené na tuku se používají již od starověku (Grau a kol., 1996; Slavík a kol., 1997). Šťáva z bezinek má využití i jako přírodní barvivo (Vrchotová a kol., 2017).

Bezinky se využívají v poslední době jako lék, nebo jako doplněk stravy. Bezinky jsou charakteristické vysokým obsahem anthokyanů. Bezinky podporují imunitu, mají antibakteriální a antivirové vlastnosti. Užívání bezinek podporuje prevenci proti nemoci kardiovaskulárního systému, snižuje cholesterol a obezitu, podporují léčbu rakoviny, zánětlivá onemocnění a cukrovku. Anthokyaniny také dokážou velmi dobře vychytávat volné radikály v organismu člověka (Veberic a kol., 2009). Dále se používají k léčbě nachlazení (rýma, kašel), příznakům chřipky, k prevenci a léčbě dýchacích cest, léčbě infekce traktu, při horečkách. Léčení pomocí bezinek je populární hlavně v USA. Také se využívají pro odvodnění organismu v podobě čaje nebo džusu. Šťáva z bezinek se používá k potlačení replikace virů v lidském organismu (<http://cms.herbalgram.org/press/files/elderberry-scr.pdf>).

3.6 Stanovení anthokyanů

Anthokyaniny se stanovují pomocí dvou metod a to spektrofotometricky, nebo pomocí HPLC. Stanovení pomocí spektrofotometrie se využívá hlavně díky své jednoduchosti, nenáročnosti a rychlosti. Tato metoda ale má i nevýhody. Anthokyaniny se touto metodou stanovují jako suma příbuzných látek na základě jejich podobného chování. HPLC metoda při kvantifikaci anthokyanů dokáže kvantifikovat koncentrace jednotlivých anthokyanů, tato metoda je oproti spektrofotometrické metodě časově náročnější, finančně náročnější a práce využívá složitější metody pro kvantifikaci (Lao a Giusti, 2016).

3.6.1 Spektrofotometrie – analytické techniky pro kvalitativní a kvantitativní analýzu přírodních látek

Spektrometrie označuje měření, při kterém dochází k interakci mezi monochromatickým zářením a zkoumanou látkou. Pomocí měření se získává informace o identitě vzorku, nebo koncentrace analytů ve vzorku. V minulosti své uplatnění našla při objevení nových prvků. Spektrofotometrie se rozděluje na emisní, luminiscenční a absorpční. Toto dělení je odlišné výsledným měřením. Při emisních

a luminiscenčních metodách spektrofotometrie se měří elektromagnetické záření, které je vyzařováno při návratu analytu z excitovaného stavu do základního stavu. U absorpčních metod se měří elektromagnetické záření, které je pohlcováno při excitaci. Při všech měření dochází k excitaci některých částic zkoumaného vzorku (analytu), ze základního stavu do stavu excitovaného (tento stav je pro analyt méně výhodný, než stav základní). Analyt se do excitovaného stavu dostane dodáním tepelné, nebo elektrické energie, popřípadě chemickou reakcí (Skoog a kol., 2019).

Výsledkem měření je grafické vyjádření, které vyjadřuje závislost excitovaného zářivého toku na frekvenci, nebo vlnovou délku. Absorpční spektrofotometrie byla použita v této práci k měření absorbance u každé ze zkoumaných metod (Skoog a kol., 2019).

Při absorpční spektrofotometrii se měří množství absorbovaného záření analytem ze světelného zdroje. Poskytuje kvalitativní i kvantitativní informace o obsažených látkách ve vzorku (Křížek a Šíma, 2015).

Absorpční spektrofotometrie je využívána v biochemii, biologii ale i k potravinářské nebo zemědělské analýze. Při této metodě se využívá poznatků z Lambert–Beertova zákona. Analyt pohlcuje monochromatické záření pouze v určitých, pro něj charakteristických frekvencích. Při pohlcení záření analytem klesne světelný tok, který vychází ze světelného zdroje. Pokles světelného zdroje je závislý na koncentraci analytu (Skoog a kol., 2019).

Lambert-Beerův zákon

Detailně popisuje kvantitativní analýzu, při které zohledňuje koncentraci pohlcující látky a tloušťku analytu, kterým paprsek prochází. Koncentrace analytu je nepřímo úměrná k zářivému toku při konstantní tloušťce analytu. Pro obsah pohlceného záření se využívá veličina transmitance. Vyjadřuje se v procentech a značí písmenem *T*. Udává poměr mezi zářivými toky, které do analytu vstupují a zářivými toky, který z analytu vystupují. Na transmitanci navazuje další veličina, které je spojena se spektrofotometrií a tou je absorbance, která se značí *A*. Jedná se o veličinu, kterou určíme jako záporně vzatý logaritmus transmitance. Na rozdíl od transmitance je absorbance bezrozměrná veličina (Skoog a kol., 2019; Křížek a Šíma, 2015).

Měření probíhá ve speciálních nádobách, které se označují kyveta pro výrobu kyvet se používá optické a křemenné sklo, nebo plast. Z důvodu, že kyvety mohou

záření rozptýlit, nebo odrazit, používá se před vlastním stanovením analytu referenční měření. Při měření se porovnává zářivý tok, který propustí referenční kyveta se zářivým tokem, který propustí kyveta s analytem. Referenční kyveta obsahuje blank, což je označení pro slepý vzorek, který je tvořen rozpouštědlem příslušného analytu. Lambert-Beerův zákon zahrnuje do určení výsledku tloušťku absorpční vrstvy (l), koncentraci absorpční složky (c), vstupní (Φ_0) i výstupní (Φ) světelný tok a molární absorpční koeficient pro vlnové délce λ . Kompletní vzorec pro výpočet absorbance je uveden na obrázku 5 (Skoog a kol., 2019; Křížek a Šíma, 2015).

Obrázek 5: Vztah pro výpočet absorbance (Skoog a kol., 2019)

$$A = -\log \frac{\Phi}{\Phi_0} = -\log T = e_{\lambda} c l$$

3.6.2 HPLC

Chromatografie

Chromatografie je nejvýznamnější separační analytickou metodou, umožňuje dělení, identifikaci ale i stanovení jak organických, tak anorganických látek (Křížek a Šíma, 2015).

Chromatografie se dělí dle použité pohyblivé fáze na plynovou, kapalinovou, fluidní a plazmovou. Využívá dělení mezi dvěma fázemi. Fázi pohyblivou, která je také označována jako fáze mobilní. Fázi nepohyblivou označovanou jako fázi stacionární, která má velmi rozdílnou formu např. částičky tuhé fáze, kapalina umístěna na povrchu inertního nosiče, film kapaliny na vnitřní stěně kapiláry. Jakákoliv stacionární fáze se pro přehlednost označuje jako sorbent. Kolona je naplněna sorbentem a prochází přes něj určitou rychlostí mobilní fáze. Při styku stacionární fáze s mobilní fází obsahující zkoumanou látku dochází k vzájemným interakcím. Podle druhu reakce dále chromatografické metody dělíme na absorpční, rozdělovací, iontově výměnné a gelové chromatografie. Směs zkoumané látky se do chromatografické kolony zavádí nástřikem. Po nástřiku se jednotlivé složky směsi nechají unášet mobilní fází v koloně naplněné sorbetem a dochází k oddělení. Směs látek opouští kolonu přes detektor, který zaznamenává píky, které jsou oddělené. Počet píků je stejný jako počet látek, ze které je směs složena (Křížek a Šíma, 2015).

Kapalinová chromatografie

Chromatografii kapalinovou objevil na počátku 20. století ruský botanik Michail Tsvet, který rozdělil listová barviva na tenkovrstvé chromatografii (Křížek a Šíma, 2015). Vysokotlaká chromatografie se vyvinula v 70. letech postupně z chromatografie plynové (Štulík a kol., 2005).

Dělí se na uzavřený a otevřený systém. Papírová a tenkovrstvá chromatografie je označována za otevřený systém neboli nízkotlaký, a tzv. HPLC je charakterizována uzavřeným systémem neboli vysokotlakým. U obou chromatografií tvoří mobilní fázi kapalina (Křížek a Šíma, 2015).

Mobilní fáze je vedena ze zásobníku do vysokotlakého čerpadla. Vysokotlaké čerpadlo používá tlaky v rozmezí 1-60 MPa. Dále je vedena do tlumiče pulsů a následně do kolony, která je vyrobena z nerez oceli, nebo skla. Její délka je 10-100 cm a průměr 0,2-2 cm. Za kolonou je průtokový fotometrický, nebo fluorimetrický citlivý detektor, který umožňuje nepřetržité monitorování látek na výstupu z kolony. Zároveň je spojený se zapisovačem. Dnes nejčastěji jako zapisovač používáme počítač s příslušným softwarem (Křížek a Šíma, 2015).

Mobilní a stacionární fáze jako náplň využívá silikagel, alumina (krystalická forma oxidu hlinitého), nebo florisil. U většiny chromatografií se využívá nejčastěji pro mobilní fázi polární neinertní sloučeniny, což jsou: binární, nebo ternární směsi vody, methanolu, tetrahydrofuranu, dioxanu a acetonitrilu a pro stacionární fázi nepolární hydrofobizovaný silikagel. Tento systém se nazývá chromatografie na reverzní fázi (Křížek a Šíma, 2015). Vzorek se do HPLC dávkuje pomocí vstříků o velmi malých objemech v řádech mikrolitrů (Štulík a kol., 2005).

Využití HPLC

Pomocí HPLC lze analyzovat ionty, jak polární, tak i nepolární látky, látky málo těkavé, tepelně nestabilní, látky nízkomolekulární a polymerní (Štulík a kol., 2005).

3.7 Charakteristika metod vhodných pro analýzu anthokyanů

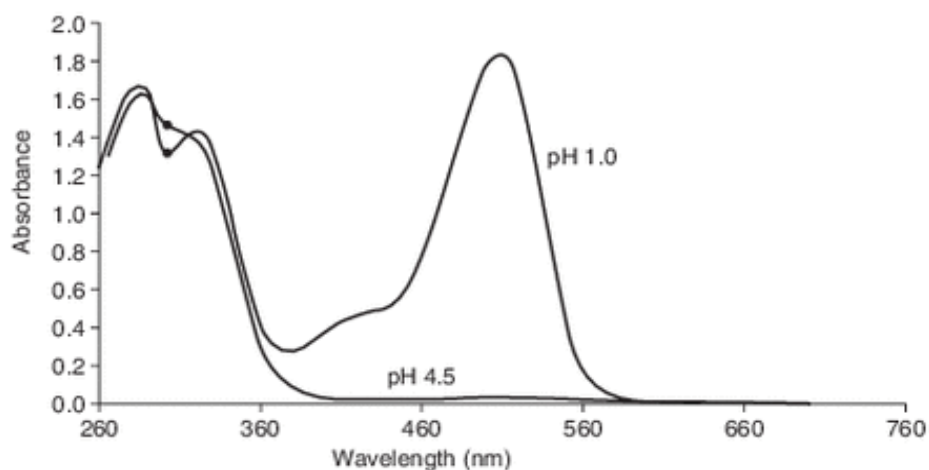
3.7.1 Lékopisná metoda

Lékopisná metoda je založena na extrakci anthokyanů, které jsou obsaženy v biologickém materiálu do extrakčního činidla (okyseleného methanolu). Po extrakci je u vzorku změřena absorbance ve spektrofotometru při vlnové délce 528nm. Následně podle návodu v doplňku k českém lékopisu z roku vypočítán obsah anthokyanů (Zdravotnictví, 2017).

3.7.2 pH diferenciální metoda

Princip této metody je založen na vlastnostech anthokyanů, které mění svou barvu podle hodnoty pH. Společně se změnou zbarvení se mění i absorbance pigmentů při vlnové délce 520 nm a 700 nm, při které je absorbance světelného záření anthokyanů největší. Závislost absorbance na vlnové délce při daném pH je znázorněna na obrázku 6. U vlnové délky 700 nm je důležité, aby ve extraktu nebyl žádný zákal. Měření by poté bylo nepřesné (Lee a kol., 2005).

Obrázek 6: Příklad závislosti absorbance k vlnové délce při pH 1 a pH 4,5 pro anthokyany (Becková, 2012)



U této metody se anthokyany extrahují do destilované vody. Tato metoda je vhodná pro stanovení ovocných šťáv a nápojů, nikoliv celých plodů (Lee a kol., 2005).

3.7.3 Stanovené podle kalibrační závislosti

Kalibrační metoda je založena na extrakci anthokyanidů do okyseleného methanolu. Jako standart u této metody se používá kyanin hydrochlorid. Připravený vzorek je proměřen na spektrofotometru. Pro výpočet obsahu kyanin hydrochloridu ve vzorku se používá rovnice kalibrační křivky kyanin hydrochloridu. Tato křivka je sestrojena z koncentrací od 1 až 20 μg v 1 ml (Matějková, 2011).

4. Praktická část

4.1 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy AB 204 (Mettler Toledo, Švýcarsko)

Automatické pipety, objem 20-200 μ l a 100-1000 μ l Transferpette (Treff AG, Švýcarsko)

Filtry ze skleněných vláken GF/C (Whatman, Velká Británie)

Homogenizátor (Moulinex, Francie)

Kombinovaná lednička s chladničkou (Bosch Cooler, Německo)

Magnetické míchadlo (Heidolph, Německo)

Odstředivka Sigma 2-5 (Sigma Laborzentrifugen, Německo)

pH – metr Inolab-1, s elektrodou SenTix 61 (WTW, Německo)

Sada laboratorního skla (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)

Skleněné filtrační zařízení (Sigma Aldrich)

Spektrofotometr Biochrom WPA Lightwave II UV/Visible (WPA Biochrom, UK)

Třepačka LT2, Kavalier Sázava, ČR

Tyčový mixér (Bosch, Německo)

4.2 Použité chemikálie

Destilovaná voda (ZF JČU, ČR), připravovaná na zařízení firmy Premier (USA)

Chlorid draselný (p.a Lachema, ČR)

Kyselina chlorovodíková (35%, Lachema, ČR)

Methanol (p.a. LiChrosolv Reag. Ph. EUR, Merck)

Trihydrát octanu sodného (p.a. Lachema, ČR)

4.3 Použitý materiál

Pro praktickou část byl biologický materiál (označení pro plody bezu černého) nasbírána na volně rostoucích keřích bezu černého v lokalitě Lhenicko (49.0365689 N, 14.1072628 E) na podzim roku 2018 v množství 1000 g. Následně byly z materiálu odděleny čisté bobule, které byly použity pro experimentální práci. Následně byly plody bezu černého zmrazeny a uchovávány ve zmrzlém stavu při -16° do stanovení.

4.4 Postupy pro stanovení obsahu anthokyanů v biologickém materiálu

Ve všech zvolených postupech byl stanovovaný obsah anthokyanů neboli polyfenolických barviv v plodech bezu černého, založen na extrakci anthokyanů do extrakčního činidla. Extrakční činidla tvořily dvě chemicky odlišné kapaliny, a to destilovaná voda, nebo okyselený methanol. Vyextrahovaný obsah anthokyanů byl následně měřen pomocí spektrofotometru.

4.4.1 Postup podle principu v českém lékopisu 2017

Stanovení obsahu anthokyanů bylo prováděno podle postupu uvedeném v Českém lékopisu 2017 a dodatku z roku 2019 podle kapitoly *Myrtilli fructus recens* (Zdravotnictví, 2017). Stanovení se provádělo na pěti navážkách vzorku. Postup byl oproti literárnímu mírně obměněn.

Příprava vzorku k měření

Reprezentativní vzorek byl připraven ze zmrzlého biologického materiálu. Bylo naváženo asi 50 g bezinek, které se následně zhomogenizovaly. Ze zhomogenizovaného materiálu se odvážilo asi 5 g. Toto množství se smíchalo s 95 ml okyseleného methanolu v plastové kyvetě, která se dala na 30 minut do třepačky. Po uplynutí doby se vzorek zfiltraval do 100 ml odměrné baňky. Filtr se promyl okyseleným methanolem. Filtrát se naředil okyseleným materiálem na objem 100ml. Následně byl vzorek promíchán a 50x zředěn okyseleným methanolem do 50 ml odměrné baňky. (1 ml vzorku se smíchalo s 49 ml okyseleného methanolu).

Měření absorbance

Vzorek byl proměřen pomocí spektrofotometru při vlnové délce 528 nm, kde byla měřena absorbance vzorku. Jako blank se zde použil okyselený methanol. Následně připravený vzorek byl změřen 3krát. Z naměřených hodnot byl vypočten obsah anthokyanů v g/100 g. Výsledky této metody jsou zaznamenány v tabulce 5.

Vzorec pro výpočet obsahu anthokyanů

$$x = \frac{A * 5000}{718 * m} * z$$

x...obsah anthokyanů [g/100 g]

A...absorbance při 528 nm

718...specifická absorbance pro kyanidin-3-O-glukosid-chlorid při 528nm

m...hmotnost naváženého vzorku [g]

z...ředění vzorku

4.4.2 Postup podle pH diferenciální metody

Stanovení obsahu anthokyanů bylo prováděno podle diplomové práce obhájené na Vysokém učení technickém v Brně v roce 2014 (Javorská, 2014). Stanovení se provádělo na pěti navážkách vzorku.

Příprava KCl pufru: 0,025 mol/l roztok chloridu draselného o pH 1

Na analytických váhách bylo naváženo 1,864 g KCl a navážka kvantitativně převedena do kádinky, ve které byla rozpuštěna v destilované vodě o objemu 980 ml. Následně probíhala úprava hodnoty pH pomocí elektrody. Daného pH bylo dosaženo přidáním koncentrované HCl. Poté byl pufr převeden do 1000 ml odměrné baňky. Hodnota pH výsledného pufru byla 1,00.

Příprava acetátového pufru: 0,4 mol/l roztoku octanu sodného o pH 4,5

Na analytických vahách bylo naváženo 54,432 g trihydrátu octanu sodného. Navážka poté kvantitativně převedena do kádinky, ve které byla rozpuštěna v 960 ml destilované vody. Hodnota pH byla upravena pomocí koncentrované HCl přidáním přibližně 40 ml na výslednou hodnotu 4,47. Poté byl roztok převeden do odměrné baňky o objemu 1000 ml.

Příprava vzorku k měření

Na analytických vahách bylo naváženo přibližně 2,5–5 g zmražených plodů bezinek. K navážce přidáno 20 ml destilované vody. Směs byla zhomogenizovaná tyčovým mixérem. Poté mixér i použité nádobí bylo omyto destilovanou vodou pro minimalizování ztrát. Obsah kádinky byl převeden do 50 ml odměrné baňky, baňka po rysku doplněna destilovanou vodou a dána do lednice na 1 hodinu. Po uplynutí doby byl vzorek převeden do odstředivací kyvety o objemu 50 ml a odstředěn 10 minut při

3500 otáčkách za minutu. Poté byl vzorek zfiltrován za sníženého tlaku přes filtr ze skleněných vláken filtrát o objemu přibližně 10 ml. Dále bylo pipetováno 0,5 ml filtrátu automatickou pipetou do 6 zkumavek. Do třech z nich bylo napipetováno 2,5 ml pufru o pH hodnotě 1. Do dalších třech byl napipetován stejný objem pufru o hodnotě pH 4,5.

Měření absorbance

Vzorek byl proměřen pomocí spektrofotometru při vlnových délkách 700 nm a 510 nm, kde byla měřena absorbance vzorku. Jako blank byla použita destilovaná voda. Připravené vzorky byly měřeny každou vlnovou délkou jednou. Z naměřených hodnot byl vypočten obsah anthokyanů v mg/100 g. Výsledky této metody jsou zaznamenány v tabulce 7.

Vzorec pro výpočet obsahu anthokyanů

$$c = \frac{c_{MP} * V * 0,1}{m}$$

c...obsah anthokyanů [mg/100 g]

V... objem ve kterém se vzorek extrahoval [ml]

m...hmotnost navážky [g]

c_{MP} ...koncentrace monomerního pigmentu [mg/l]

Vzorec pro výpočet koncentrace monomerního pigmentu

$$c_{MP} = \frac{A * MW * DF * 1000}{\epsilon * l} * Z$$

c_{MP} ...koncentrace monomerního pigmentu [mg/l]

MW...molekulová hmotnost pro kyanidin-3-glukosid = 449,2 g/mol

DF...faktor ředění

ϵ ...molární absorpční koeficient pro kyanidin-3-glukosid = 26900 l/cm²*mol

l...délka optické dráhy

A...absorbance [cm]

Vzorec pro výpočet absorbance

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH 1} - (A_{510} - A_{700})_{pH 4,5}$$

4.4.3 Postup podle kalibrační závislosti

Postup práce odpovídal diplomové práci obhájené na Vysokém učení technickém v Brně v roce 2011 (Matějková, 2011). Měření se provádělo na čtyřech navážkách vzorku.

Příprava vzorku k měření

Na analytických váhách bylo naváženo asi 50 g biologického materiálu. Navážka byla následně rozmrazena v mikrovlnné troubě a tyčovým mixérem homogenizována. Z homogenizovaného materiálu bylo odváženo 2,5 g do plastové kyvety. Dále bylo do kyvety přidáno asi 40 ml okyseleného methanolu. Následovala extrakce po dobu 30 minut za tmy v třepačce. Poté byl vzorek odstředěn v centrifuze po dobu 10 minut při otáčkách 3500 za minutu. Dále byl odstředěný supernatant převeden do 50 ml odměrné baňky a byl doplněn na daný objem okyseleným methanolem. Poté zfiltrován za sníženého tlaku přes filtr ze skleněných vláken. Filtrát byl naředěn 10x do 50 ml odměrné baňky (5 ml filtrátu smícháno s 45 ml okyseleného methanolu). Ředění proběhlo z důvodu vysoké absorpce původního vzorku.

Měření absorbance

Vzorek byl proměřen pomocí spektrofotometru při vlnové délce 528 nm, kde byla měřena absorbance vzorku. Jako blank se zde použil okyselený methanol. Následně připravený vzorek byl změřen třikrát. Z naměřených hodnot byl vypočten obsah anthokyanů v g/100 g.

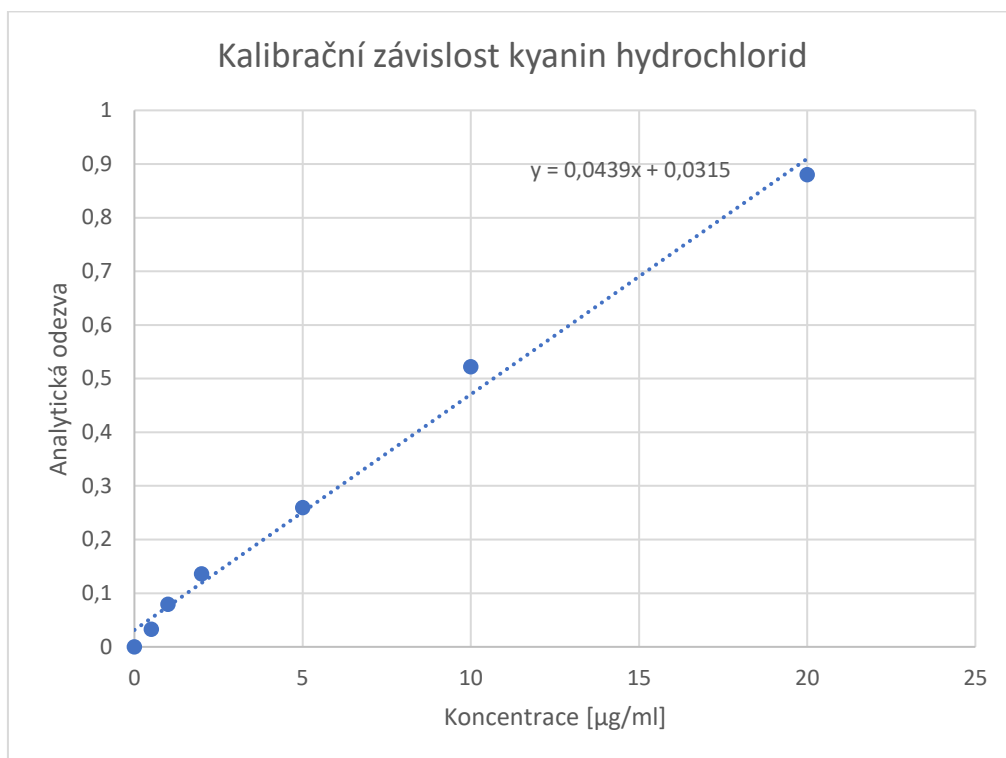
Postup pro výpočet obsahu anthokyanů

Výpočet byl proveden pomocí kalibrační křivky. Kvantifikace byla provedena podle kalibrační závislosti se standardem kyanin hydrochlorid. Kalibrační řada pro kyanin hydrochlorid s pracovním rozsahem 0,5–20 ug/ml je zapsána v tabulce 4, kde x je koncentrace kyanin hydrochlorid [$\mu\text{g/ml}$], y je analytická odezva. Po určení obsahu látky byl proveden ještě přepočet na zředění, ve kterém se vzorek zředil 10x. Výsledky této metody jsou zaznamenány v tabulce 9.

Tabulka 4: Kalibrační řada pro kyanin hydrochlorid

x	y
0	0
0,5	0,033
1	0,079
2	0,136
5	0,260
10	0,522
20	0,880

Obrázek 7: Kalibrační křivka pro kyanin hydrochlorid s rovnicí regrese



5. Výsledky a diskuze

V bakalářské práci byly srovnány tři metody, které sloužily ke zjištění obsahu anthokyanů v plodech bezu černého. Metody se ve svém principu odlišovaly. U dvou metod byl obsah anthokyanů přepočítáván na majoritní anthokyan kyanidin-3-glukosid. U poslední metody byl obsah anthokyanů přepočítáván na kyanin hydrochlorid.

5.1 Obsah anthokyanů v plodech bezu černého

5.1.1 Obsah anthokyanů podle českého lékopisu 2017

Vzhledem k tomu že přesný postup, který je uveden v lékopisu se mi nepodařil zrealizovat musela jsem si postup upravit a vzorek jsem připravovala s následujícím rozdíly. Lékopisná metoda uvádí odebrat 5 gramů vzorku, ale spektrofotometr nedokázal změřit absorbanci. Z tohoto důvodu bylo odebíráno 2,5 g materiálu. Před filtrací byl vzorek odstředěn po dobu 10 minut na centrifuze, aby bylo možné zrealizovat filtraci.

U lékopisné metody bylo zabráněno ztrátám na navážce při homogenizaci tím, že materiál byl nejprve zhomogenizován a až poté byl odvážen vzorek se kterým se dále pracovalo. Homogenizovala jsem padesáti gramovou navážkou, ze které bylo následně odebráno 2,5 g pro jednotlivé měření. Pracovala jsem s polovičními objemy a hmotnostmi oproti lékopisu, toto množství mi pro zkoumání stačilo. Průměrná koncentrace obsahu anthokyanů je 7,948 g/kg a směrodatná odchylka 0,25.

U vyhodnocování této metody jsem vyloučila hrubou chybu, která vznikla u navážky o hmotnosti 2,71 g. U této hmotnosti byly naměřeny relativně vysoké absorbance oproti ostatním navážkám. K chybě mohlo dojít při odebírání vzorku. Bobule bezu černého byly velmi rozmanité od nedozrálých plodů až k plodům přezrálým. Chyba také mohla vzniknout na základě lidského faktoru při přípravě vzorku, práci s nepřesnými objemy, nebo při vyhodnocování chybou přístroje. Po vyloučení hrubé chyby byly naměřeny a následně dopočítány koncentrace, které jsou velmi blízko ke koncentracím obsahu anthokyanů v plodech bezu černého, které uvádí literární zdroje. Vzhledem k naměřenému obsahu anthokyanů a relativně nízké směrodatné odchylky považuji tuto metodu za naprosto vhodnou pro určování obsahu

anthokyanů v plodech bezu černého. Vhodnost metody potvrzuje i relativní směrodatná odchylka, která se pohybuje kolem 3 %.

Tabulka 5: Obsah anthokyanů podle českého lékopisu 2017

Hmotnost navážky [g]	Absorbance [-]	Obsah anthokyanů [g/kg]	Aritmetický průměr±SD
2,59	0,298	8,012	7,948±0,25
	0,299	8,039	
	0,300	8,066	
2,92	0,324	7,783	
	0,326	7,775	
	0,329	7,846	
2,58	0,283	7,639	
	0,285	7,693	
	0,287	7,747	
2,75	0,329	8,331	
	0,326	8,255	
	0,326	8,255	
2,71	0,450	11,563	
	0,409	10,510	
	0,408	10,484	

Obsah anthokyanů v bezu černém stanovovala podle postupu uvedeném v Českém lékopisu i Eva Lehárová ve dvě diplomové práci. Stanovení prováděla u deseti odrůd. V práci zjistila, že obsah anthokyanů se v jednotlivých odrůdách velmi liší, a to až na dvojnásobek. Nejnižší obsah naměřila u odrůdy Allesö a nejvyšší u odrůdy Samyl (Leharová, 2014).

Ferreira a kol. uskutečnili v letech 2012-2014 tříletý výzkum, při kterém porovnávali mimo jiné také obsah kyanidin-3–glukosidu v bezinkách pěstovaných na polích v Portugalsku. Každý rok byly keře pěstovány na stejném místě a ve stejných podmínkách. Obsah anthokyanů porovnávali u třech odrůd. Kvantifikaci prováděli pomocí HPLC (Ferreira a kol., 2020). Výsledky zobrazené v tabulce 6 jsou relativně podobné výsledkům zjištěným pomocí lékopisné metody.

Tabulka 6: Výsledky tříletého výzkumu v Portugalsku obsah anthokyanů (Ferreira a kol., 2020)

	1. rok [g/kg] ± SD	2. rok [g/kg] ± SD	3. rok [g/kg] ± SD
1. odrůda (Sabugueiro)	5,10±0,55	8,20±1,30	7,44±1,54
2. odrůda (Sabugueira)	6,21±0,82	8,35±1,91	7,22±1,47
3. odrůda (Bastardeira)	7,01±0,56	9,53±1,87	8,82±1,53

Při porovnání výsledků je zřejmé, že velmi záleží na počasí, které je daný rok. Jednotlivé roky se obsahem anthokyanů v plodech velmi liší.

Obsahem anthokyanů v plodech bezu černého se zabývali i vědci z Dánska v 90. letech 20. století. Obsah anthokyanů měřili ve zhomogenizovaných plodech bezu černého u třinácti odrůd. Anthokyany identifikovali pomocí HPLC. Naměřili obsah kyanidin-3–glukosidu v rozmezí od 3,61–12,66 g/kg. I přes velmi rozdílné obsahy u jednotlivých odrůd je průměrný obsah kyanidin-3–glukosidu 7,21 g/kg (Kaack a Austed, 1998). Tento naměřený obsah se také shoduje s naměřenými hodnotami lékopisnou metodou.

V diplomové práci obhájené na Univerzitě Karlově v Praze se K. Dostálová zabírala stanovením anthokyanů pomocí HPLC v kanadských borůvkách. Obsah stanovovala v několika odrůdách a zjistila, že průměrná koncentrace kyanid-3–glukosidu je 1,52 mg ve 100 gramech syrových borůvek, což dokazuje že kanadské borůvky jsou na anthokyany chudší oproti bezinkám (Dostálová, 2016).

5.1.2 Obsah anthokyanů podle pH diferenciální metody

U pH diferenciální metody došlo při realizaci k několika problémům, které způsobily chyby při určování celkové koncentrace. Biologický materiál nebylo možné dokonale homogenizovat i přes to, že jsem pracovala s větším množstvím, než uváděl zdroj. Docházelo ke ztrátám biologického materiálu. Z homogenizátoru nebylo možné vzorek převést kvantitativně, ani převést do odměrné baňky o objemu 25 ml. Musela být použita baňka o objemu 50 ml. Další ztráty vznikly při velmi častém přelévání vzorku a nekvantitativním převáděním do jednotlivých odměrných nádob. Chyby a ztráty materiálu jsme se u jednotlivých měření snažila minimalizovat. Průměrná

koncentrace anthokyanů v plodech bezu černého je 4,589 g/kg a směrodatná odchylka 0,30.

Tabulka 7: Obsah anthokyanů podle pH diferenciální metody

Hmotnost navážky [g]	Absorbance [-]	Obsah anthokyanů [g/kg]	Aritmetický průměr±SD
5,08	2,073	1,678	4,589±0,30
	2,095	1,696	
	2,061	1,668	
2,59	1,442	4,497	
	1,489	4,644	
	1,425	4,444	
2,59	1,317	4,101	
	1,376	4,285	
	1,371	4,269	
2,61	1,638	5,011	
	1,619	4,953	
	1,637	5,008	
2,60	1,449	4,478	
	1,524	4,709	
	1,508	4,660	

U tohoto měření jsem vyloučila navážku o hmotnosti 5,08g, a to z toho důvodu, že tato první navážka byla filtrována přes papírový filtr a na výsledcích se ukázalo, že tento filtr silně zachytává anthokyan. V porovnání s ostatními navážkami, kde byl použit filtr ze skleněných vláken je obsah anthokyanů podstatně nižší.

Pro určování obsahu anthokyanů v plodech bezu černého považuji pH diferenciální metodu za naprosto nevhodnou, a to z několika důvodů. U této metody se používalo rozpouštědlo voda. Ve vodě se anthokyanu neuvolní ze slupky bobulí, ve které jich je nejvíce. Zároveň se anthokyanu v neutrálním prostředí rychle rozkládají a u této metody, byly bezinky ve vodě minimálně 60 minut při kterých mělo docházet k extrakci ve vodě. S jiným rozpouštědlem pH diferenciální metoda není možná, protože nelze upravit pH rozpouštědla (např. u methanolu nebo okyseleného

methanolu). Z těchto důvodů je metoda nevhodná i pro další plody obsahující anthokyany jako je angrešt, hroznové víno, třešně, černý rybíz, borůvky a další.

Bc. Eliška Becková (Becková, 2012) se ve své diplomové práci zabývala také pH diferenciální metodou a zjišťovala obsah anthokyanů ve šťávě, kterou vymačkala z různých odrůd bezu černého a vinné révy. Obsah přepočítávala na mg anthokyanů obsažených v 1 litru šťávy. Zjistila, že v jednotlivých odrůdách se obsah anthokyanů velmi liší.

Tuto metodu použila ve své diplomové práci i Bc. Kateřina Javorská (Javorská, 2014), která zkoumala obsah anthokyanů v různých odrůdách angreštu. Plody rozdělila na několik úrovní podle zbarvení. Obsahy anthokyanů jsou u jednotlivých odrůd velmi rozdílné. Nejnižší obsah naměřila u odrůdy Krasnoslawjankij: 0,67 mg/100 g naopak nejvíce u odrůdy Karmen V: 22,81 mg/100 g.

Američtí vědci zkoumali obsah anthokyanů ve dvou odrůdách bezu černého (*Sambucus nigra L.*), který pěstovali v USA. Tento výzkum probíhal v průběhu dvou let, konkrétně v letech 2004 a 2005. Tabulka 8 obsahuje výsledky, s obsahy anthokyanů, které byly v této studii získány pomocí HPLC a pH diferenciální metody. V Tabulce 8 je uveden obsah nejvíce zastoupeného anthokyanu kyanidin-3-glukosidu (Lee a Finn, 2007).

Tabulka 8: Porovnání obsahů anthokyanů pomocí metody pH diferenciální a HPLC (Lee, Finn, 2007)

		2004 [g/kg]	2005 [g/kg]
Odrůda	HPLC	2,53±0,04	4,81±0,24
Korsør	pH diferenciální	1,76±0,04	3,43±0,11
Odrůda	HPLC	2,04±0,17	3,09±0,183
Haschberg	pH diferenciální	1,70±0,12	2,68±0,16

Autoři tohoto výzkumu bohužel neuvádí, z jakého důvodu jsou výsledky naměřeny pomocí HPLC 2,0-2,3x vyšší, než obsahy naměřeny pomocí pH diferenciální metody (Lee a Finn, 2007).

Obsahy naměřené v mé práci jsou podobné hlavně s obsahy, které vědci naměřili v roce 2005.

5.1.3 Obsah anthokyanů podle kalibrační závislosti

Měření vzorku probíhalo velmi podobně jako u lékopisné metody. Vzorky byly vyhodnocovány podle kalibrační závislosti, která byla měřena pomocí standardu kyanin hydrochloridu. Z té jsem následně vypočítala rovnici regrese a obsah anthokyanů. Průměrná koncentrace anthokyanů je 5,317g/kg a směrodatná odchylka 0,47.

Menší obsah anthokyanů v bezinkách u této metody vyšel pravděpodobně z důvodu, že se anthokyaniny přepočítávaly na jiný anthokyan než u lékopisné metody, a to na kyanin hydrochlorid. A z tohoto důvodu ani tato metoda není příliš vhodná. Kyanin hydrochlorid nemá v bezinkách dominantní zastoupení.

Tabulka 9: Obsah anthokyanů podle kalibrační závislosti

Hmotnost navážky [g]	Absorbance [-]	Obsah anthokyanů [g/kg]	Aritmetický průměr±SD
2,52	1,432	6,330	5,317±0,47
	1,350	5,959	
	1,347	5,956	
2,46	1,133	5,099	
	1,131	5,091	
	1,133	5,099	
2,59	1,171	5,011	
	1,170	5,007	
	1,173	5,020	
2,6	1,190	5,075	
	1,187	5,062	
	1,197	5,106	

V porovnání s bezinkami, které testovala v diplomové práci Bc. Lenka Laxová (Laxová, 2017) stejnou metodou, jsem v průměru naměřila téměř jednu tolik anthokyanů ve 1 kg bezinek. Laxová naměřila v plodech bezu černého 2,790 g/kg anthokyanů.

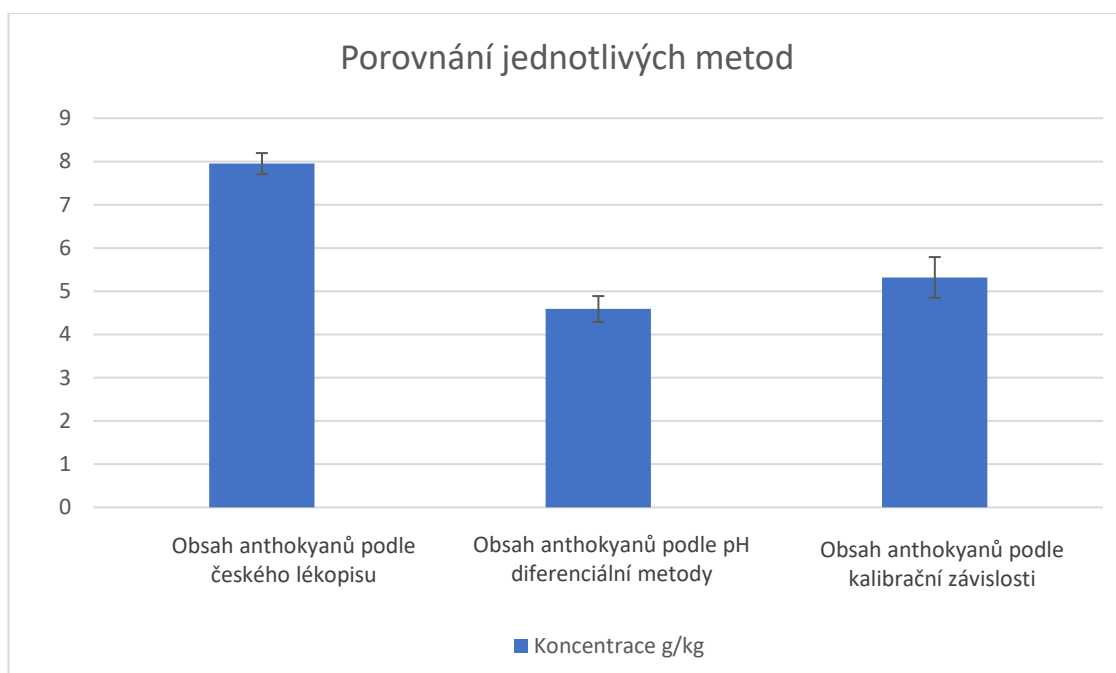
V porovnání s ovocem, které testovala Bc. Markéta Matějková (Matějková, 2011) došlo ke zjištění, že v borůvkách je přibližně 3x více anthokyanů než v bezinách, přibližně stejný obsah jako v bezinkách se vyskytuje v černém rybízu. Mnohem méně těchto látek se potom vyskytuje v malinách, jahodách a červeném rybízu, kde obsah

anthokyanů je v rozmezí od 0,85 g/kg do 1,47 g/kg, kde Matějková přepočítávala obsah anthokyanů na kg sušiny.

Tabulka 10: Porovnání jednotlivých metod pro stanovení obsahu anthokyanů v g/kg

	Obsah anthokyanů podle českého lékopisu 2017	Obsah anthokyanů podle pH diferenciální metody	obsah anthokyanů podle kalibrační závislosti
Aritmetický průměr ± SD	7,948±0,25	4,589±0,30	5,317±0,47

Obrázek 8: Souhrnné porovnání naměřených obsahů



Stanovení anthokyanů pomocí metody HPLC nebylo v bakalářské práci realizováno z důvodu vysoké instrumentální náročnosti a absenci analytického

standardu. Tuto metodu jsem chtěla realizovat podle práce obhájené roku 2016 na Univerzitě Karlově v Praze (Dostálová, 2016).

6. Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo porovnat různé metody pro stanovení obsahu anthokyanů v plodech bezu černého. Zvolila jsem si tři metody, které jsem následně porovnávala a zjišťovala jejich výhody a nevýhody.

V literární rešerši jsem se zabývala teorií, kde jsou popsány látky vyskytující se v plodech bezu černého. Jedná se o polyfenolické látky a anthokyany. Dále jsem se zabývala charakteristickými vlastnostmi bezu černého jako botanického druhu. Krátce jsem se věnovala jednotlivým metodám z pohledu teorie. V teoretické části se zabývám také optickou metodou spektrofotometrií, tu jsem využívala u všech představených metod a chromatografií, která se také často používá ke stanovení anthokyanů. V praktické části se věnuji zpracování výsledků a diskuzí k danému tématu.

Biologický materiál, který jsem použila, byl nasbírán z volně rostoucích keřů z lokality Lhenicko. Stanovení obsahu anthokyanů probíhalo na zemědělské fakultě pod katedrou aplikované chemie.

Obsah anthokyanů stanovených jednotlivými metodami se výrazně lišil. Největší obsah byl zaznamenán u lékopisné metody, a to v průměru 7,498 g anthokyanů ve 1 kg bezinek. Ve srovnání s literaturou dosahuje tento údaj největší shody. Podobné výsledky dosahují i výzkumy, které pro kvantifikaci používají HPLC. Metoda pH diferenciální se pro stanovování obsahu anthokyanů v bezinkách ukázala jako naprosto nevhodná, uplatnění této metody bych našla při stanovování obsahu anthokyanů ve šťávách, nikoli celých plodech. Metoda, kterou uvádí ve své práci Bc. Markéta Matějková, nemůžu srovnávat s předešlými, protože přepočítání u kalibrační závislosti se provádí na kyanin hydrochlorid, který není v bezinkách dominantní.

7. Seznam literatury

Becková, E., (2012). *Sledování obsahu anthokyanových barviv ve vybraných odrůdách bezu černého a vinných hroznů*. [Diplomová práce]. Brno, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií, 86 s.

Dostálová, K., 2016. *Vývoj a validace HPLC metody pro stanovení anthokyanů v kanadských borůvkách*. [Diplomová práce]. Hradec Králové, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie, 88s.

Ferreira, S. S., Silva, P., Silva, A. M., Nunes, F. M. (2020). Effect of harvesting year and elderberry cultivar on the chemical composition and potential bioactivity: A three-year study. *Food Chemistry*, 302, 125366.

Glover, B. J., Martin, C. (2012). Anthocyanins. *Current Biology*, 22(5), R147–R150.

Gramza-Michałowska, A., Sidor, A., Kulczyński, B. (2017). Berries as a potential anti-influenza factor – A review. *Journal of Functional Foods*, 37, 116–137.

Grau, J., Jung, R., Münker, B., (1996). *Bobulovitě, užitkové a léčivé rostliny*. 1. vydání. Praha: Knižní klub. 32-33 s. ISBN 80-7176-369-1

Hoensch, H. P., Oertel, R. (2015). The value of flavonoids for the human nutrition: Short review and perspectives. *Clinical Nutrition Experimental*, 3, 8–14.

Hollman, P. C. H., Katan, M. B. (1999). Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*, 37(9–10), 937–942.

Irina, I., Mohame, G. (2012). Biological Activities and Effects of Food Processing on Flavonoids as Phenolic Antioxidants. In M. Petre (Ed.), *Advances in Applied Biotechnology*. InTech.

Jackman, R. L., Yada, R. Y., Tung, M. A., Speers, R. A. (1987). Anthocyanins as food colorants. *Journal of Food Biochemistry*, 11(3), 201–247.

Javorská, K., (2014). *Stanovení vybraných chemických parametrů plodů moderních odrůd angreštů*. [Diplomová práce]. Brno, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií, 111 s.

Kaack, K., Austed, T. (1998). Interaction of vitamin C and flavonoids in elderberry (*Sambucus nigra* L.) during juice processing. *Plant Foods for Human Nutrition*, 52(3), 187–198.

Kong, J.-M., Chia, L.-S., Goh, N.-K., Chia, T.-F., & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5), 923–933.

Kong, J.-M., Chia, L.-S., Goh, N.-K., Chia, T.-F., Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5), 923–933.

Kruger, M. J., Davies, N., Myburgh, K. H., Lecour, S. (2014). Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. *Food Research International*, 59, 41–52.

Křížek, M., Šíma, J., (2015), *Analytická chemie*. 1. vydání. České Budějovice, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, s. 178-191. ISBN 978-80-7394-486-5

Kubát, K., (2002), *Klíč ke květeně České republiky*. 1. vydání. Praha, Academia, s. 927.

Lao, F., Giusti, M. M. (2016). Quantification of Purple Corn (*Zea mays* L.) Anthocyanins Using Spectrophotometric and HPLC Approaches: Method Comparison and Correlation. *Food Analytical Methods*, 9(5), 1367–1380.

Laxová, L., (2017). *Biologicky aktivní fenolické látky v drobném ovoci*. [Diplomová práce]. České Budějovice, Jihočeská univerzita, Fakulta pedagogická, Katedra aplikované chemie, 57 s.

Lee, J., Durst, R., Wrolstad, R. (2005). *AOAC 2005.02: Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines- pH Differential Method* (s. 37–39).

Lee, J., Finn, C. E. (2007). Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(14), 2665–2675.

Lehárová, E., 2014. *Anthokyany v plodech vybraných kultivarů Sambucus niagra L.I.* [Diplomová práce]. Hradec Králové, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakognosie, 32-36s.

Matějková, M., 2011: *Sledování změn vybraných druhů lokálního ovoce v průběhu mražení.* [Diplomová práce]. Brno, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií, 102s.

Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R., (2019). *Analytická chemie.* 1. vydání. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, s. 601-604. ISBN 978-80-7592-043-0

Slavík, B., Chrtek, J., Tomšovic, P., (1997). *Květena České republiky 5.* 1. vydání. Praha, Academia. S. 503-508. ISBN 80-200-0590-0

Štulík, K., a kol., (2005). *Analytické separační metody.* 1. vydání. Praha, Karolinum, s. 94-171. ISBN 80-246-0852-9

Veberic, R., Jakopic, J., Stampar, F., Schmitzer, V. (2009). European elderberry (*Sambucus nigra L.*) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chemistry*, 114(2), 511–515.

Velíšek, J., Hajšlová, J., (2009). *Chemie potravin II.* 3. vydání. Tábor, OSSIS, s. 601-604. ISBN 978-80-86659-16-9

Vrchotová, N., Dadáková, E., Matějčíček, A., Tříška, J., & Kaplan, J. (2017). Effect of variety on content of bioactive phenolic compounds in common elder (*Sambucus nigra L.*). *Natural Product Research*, 31(6), 700–703.

Vulic, J., Vracar, L., Sumic, Z. (2008). Chemical characteristics of cultivated elderberry fruit. *Acta Periodica Technologica*, 39, 85–90.

Watson, R.R., Preedy, V.R., Zibadi, S., (2014). *Polyphenols in human health and disease.* 1. vydání. Boston, Academic Press, s. 9-15. ISBN 0123984564

Yi, L., Chen, C., Jin, X., Mi, M., Yu, B., Chang, H., Ling, W., Zhang, T. (2010). Structural requirements of anthocyanins in relation to inhibition of endothelial injury induced by oxidized low-density lipoprotein and correlation with radical scavenging activity. *FEBS Letters*, 584(3), 583–590.

ZDRAVOTNICTVÍ ČR MINISTERSTVO, (2017). *Český lékopis 2017*. 1. vydání. Praha, Grada, s. 4904. ISBN 859-404-924-045-6

Použité internetové zdroje dostupné online

<https://www.celostnimedicina.cz/antokyany-prirodni-lecivo-v-te-nejcistsi-podobe.htm> [cit. 21.3.2020]

<http://cms.herbalgram.org/press/files/elderberry-scr.pdf> [cit. 13.3.2020]

<https://www.ferpotravina.cz/seznam-ecek/E163> [cit. 2020-03-05]

<https://vitalplus.org/cerny-bez/> [cit. 25.3.2020]

<http://www.vysnenazahrada.cz/2012/05/cerny-bez.html>) [cit. 25.3.2020]

8. Seznam obrázků

Obrázek 1: Znázornění flavanu a 2H-chromenu	10
Obrázek 2: Základní struktura anthokyanů	13
Obrázek 3: Rozkvetlý keř bezu černého	19
Obrázek 4: Plody bezu černého – bezinky	19
Obrázek 5: Vztah pro výpočet absorbance.....	23
Obrázek 6: Příklad závislosti absorbance k vlnové délce při pH 1 a pH 4,5 pro anthokyany	25
Obrázek 7: Kalibrační křivka pro kyanin hydrochlorid s rovnicí regrese.....	33
Obrázek 8: Souhrnné porovnání naměřených obsahů.....	40

9. Seznam tabulek

Tabulka 1: Základní struktury flavonoidů.....	11
Tabulka 2: Obsah polyfenolů ve vybraných potravinách	15
Tabulka 3: Obsah polyfenolických sloučenin ve vybraných nápojích.....	16
Tabulka 4: Kalibrační řada pro kyanin hydrochlorid.....	32
Tabulka 5: Obsah anthokyanů podle českého lékopisu 2017	35
Tabulka 6: Výsledky tříletého výzkumu v Portugalsku obsah anthokyanů.....	36
Tabulka 7: Obsah anthokyanů podle pH diferenciální metody.....	37
Tabulka 8: Porovnání obsahů anthokyanů pomocí metody pH diferenciální a HPLC	38
Tabulka 9: Obsah anthokyanů podle kalibrační závislosti.....	39
Tabulka 10: Porovnání jednotlivých metod pro stanovení obsahu anthokyanů v g/kg	40