

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,  
Zemědělská fakulta

Dietární antioxidanty ve vybraných zemědělských produktech  
a jejich využití

Habilitační práce

2019

Ing. Pavel Smetana, Ph.D.

Tuto práci věnuji své rodině za trpělivost a podporu.

## Anotace

Habilitační práce obsahuje 14 tabulek, 17 obrázků, 6 grafů a 182 literárních odkazů.

Práce pojednává o vybraných zemědělských produktech (plodech hlohu peřenoklaného *Crataegus pinnatifida* Bunge a slupkách z cibule kuchyňské *Allium cepa* L.), které jsou zdrojem významných látek s antioxidační aktivitou a jejich schopnosti zhášet v orgaanizmu volné radikály. Z těchto produktů byly vyrobeny potraviny – džem z plodu hlohu a bezlepkový chléb s práškem ze slupek cibule. Ve výrobcích byly prokázány obsahy účinných látek. Jejich účinek byl následně testován na dobrovolnících. Porovnáním výsledků získaných po odběru kapilární krve bylo zjištěno, že účinné látky ovlivňují antioxidační aktivitu a množství volných radikálů. Větší účinek byl zaznamenán u bezlepkového chleba s práškem z cibulových slupek než u džemu z plodů hlohu peřenoklaného. V případě džemu k tomu došlo nejspíše díky jednorázovému podání nízkého množství antioxidačně účinných sloučenin, protože jejich obsah v surovině (plodech) odpovídal údajům z literatury.

Habilitační práce je doplněna vybranými publikacemi, na jejichž výsledcích se autor podílel.

## Obsah

1. Úvod .....	6
1.1. Zaměření habilitační práce .....	6
1.2. Antioxidanty a jejich význam pro lidský organizmus .....	6
2. Biosyntéza vybraných antioxidačních látek v rostlinách .....	8
2.1. Fenolické sloučeniny .....	8
2.2. Další vybrané účinné látky .....	9
3. Antioxidanty v lidském organizmu .....	11
3.1. Oxidační stres .....	12
3.2. Reaktivní kyslíkové a dusíkové radikály .....	12
3.3. Vliv oxidačních procesů na lidské zdraví .....	13
3.4. Antioxidační procesy .....	18
4. Hloh peřenoklaný ( <i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge) .....	20
4.1. Aktivní látky rodu <i>Crataegus</i> a jejich stabilita při skladování ...	22
4.2. Taxonomie rodu <i>Crataegus</i> podle obsahu fenolických látek ...	23
4.3. Antioxidační účinky hlohu peřenoklaného a jejich vliv na lidský organizmus .....	24
5. Cibule kuchyňská ( <i>Allium cepa</i> L.) .....	32
5.1. Aktivní látky cibule kuchyňské .....	33
5.2. Složení cibulových odpadů .....	36
5.3. Význam aktivních látek cibule kuchyňské pro lidský organizmus ....	38
5.4. Využití cibulových odpadů v potravinářské výrobě .....	40
6. Stanovení vybraných antioxidantů .....	43
6.1. Příprava džemu z plodů hlohu peřenoklaného .....	43
6.2. Příprava bezlepkových chlebů .....	44
6.3. Schéma pokusu měření <i>in vivo</i> antioxidační aktivity a volných radikálů v krvi .....	45

6.3.1. Džem z plodů hlohu peřenoklaného .....	45
6.3.2. Bezlepkový chléb obohacený práškem z cibulových slupek .....	45
6.4. Chemické analýzy .....	46
6.4.1. Stanovení pomocí HPLC-MS/MS .....	46
6.4.2. Nastavení HPLC-MS/MS .....	47
6.5. Spektrofotometrické metody – antioxidační aktivita .....	50
6.6. Stanovení <i>in vivo</i> antioxidační aktivity a obsahu volných radikálů v krvi konzumentů .....	52
6.7. Statistická analýza .....	53
7. Polyfenoly v džemu z plodů hlohu peřenoklaném .....	54
7.1. Obsah vybraných polyfenolů v džemu z plodů hlohu peřenoklaného .....	55
7.2. Využití antioxidantů hlohu v lidském organismu .....	56
8. Polyfenoly v bezlepkovém chlebu obohaceném cibulovými slupkami ...	59
8.1. Obsah flavonoidů v bezlepkovém chlebu obohaceném cibulovými slupkami .....	59
8.2. Využití antioxidantů z cibulových slupek v lidském organismu ...	60
9. Závěr .....	65
10. Literatura .....	67
11. Seznam zkratk .....	88
12. Seznam tabulek .....	90
13. Seznam obrázků .....	91
14. Seznam grafů .....	92
15. Výběr z publikovaných prací .....	93

# 1. Úvod

## 1.1. Zaměření habilitační práce

Tématem této práce jsou antioxidanty ve vybraných rostlinných surovinách a jejich význam. Toto téma bylo již zpracováno celou řadou autorů. Vzhledem k významu antioxidačních látek a mechanismu jejich působení v potravinách a následně i v lidském organismu, jsou s postupujícími schopnostmi laboratorních přístrojů detekovány stále nové sloučeniny s antioxidačními vlastnostmi nebo se schopností jejich prostřednictvím ovlivňovat jak kvalitu potravinové suroviny nebo finálního produktu, tak i stav a kondici lidského organismu.

Jedná se o tzv. zdravotně významné látky. Jejich význam může být pozitivní i negativní. Vstupují totiž do soustavy reakcí, probíhajících v surovinách, a zejména poté v lidském organismu, kde mohou v závislosti například na koncentraci, působit jak pozitivně, tak i negativně. O hranici, která mění jejich význam, se vedou často dlouhodobé diskuze a ani v současné době nelze mnohdy jednoznačně definovat jejich význam. Toto je mimo jiné i příklad kvercetinu, o jehož možném negativním působení se diskutuje, ale signifikantní závěry nejsou do této doby uzavřeny.

## 1.2. Antioxidanty a jejich význam pro lidský organizmus

Jeden z nejdůležitějších benefitů antioxidantů spočívá mimo jiné v tom, že prodlužují údržnost potravinových surovin, a tím i potravin, jakožto jejich produktů. Brání například žluknutí (oxidaci) tuků, ale i změnám dalších, oxidačním procesům snadno podléhajících složek, jako jsou například vonné látky. Dochází při nich nejen k již uvedeným změnám, ale následně mohou probíhat další chemické reakce, mající negativní vliv na sensorické, výživové, případně i toxikologické vlastnosti potravin. Látky, které působí v rámci endogenního antioxidačního systému a komplexu antioxidačně působících látek, každodenně přijímaných ve stravě, jsou nazývány dietárními antioxidanty.

Antioxidační systémy a dietární antioxidanty by měly v organismu udržovat potřebnou rovnováhu s oxidačně působícím komplexem volných radikálů a reaktivních kyslíkatých sloučenin. Vychýlení rovnováhy zpravidla způsobí oxidační stres, při kterém se destruktivní účinky oxidantů na buňky výrazně zvyšují. Tyto procesy ovlivňují veskrze negativně jejich následné využití jak v dalším řetězci zpracování, tak i využití v lidském organismu. Působí-li dlouhodobě, mohou vést až k takovým zdravotním komplikacím, jako například předčasné stárnutí nebo zvyšování rizika výskytu civilizačních chorob (např. arteriální poškození, různé formy rakoviny, diabetes a další).

## 2. Biosyntéza vybraných antioxidačních látek v rostlinách

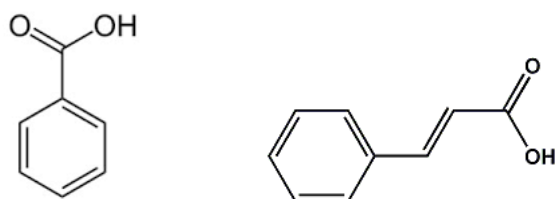
### 2.1. Fenolické sloučeniny

Fenolické sloučeniny, produkované v rostlinách, jsou velmi významnými antioxidačními látkami. Vznikají v průběhu tzv. sekundárního metabolismu, kde jsou, na rozdíl od primárního metabolismu, syntetizovány strukturně velmi rozmanité sloučeniny. Slouží například k ochraně rostlin proti škůdcům a různým predátorům, ale jejich význam je důležitý i v rámci mezidruhového boje o přežití (Tiwari a Rana, 2015). Jsou obsaženy převážně ve vyšších rostlinách, pro které slouží například jako ochrana proti UV záření, napadení různými patogeny, zachování druhu v rámci potravního řetězce (Mouradov a Spangenberg, 2014; Gould a Lister, 2006; Rozema *et al.*, 2002).

Z hlediska chemické struktury se jedná o látky obsahující aromatická jádra, na které jsou navázány různé skupiny. Struktura může být např. C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> (kyselina benzoová a její deriváty) nebo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (kyselina skořicová a její deriváty) – obrázek 1. Biosyntéza fenolických látek v rostlinách úzce souvisí s metabolismem fenylalaninu. Tento proces je stěžejní pro živočichy, kteří mají fenylalanin jako esenciální aminokyselinu a nemohou jej sami syntetizovat. Řadou reakcí v metabolickém řetězci vzniká mnoho produktů ze skupiny fenolů. Jedním z meziproductů se strukturou C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> je flavan a jeho izomer – izoflavan (obrázek 2). Na jejich struktury jsou následně vázány karboxylové, hydroxylové, methoxylové a další skupiny, jejichž počet a zastoupení má významný vliv na vlastnosti výsledné látky. Finálním procesem je v rostlinách obvykle glykosilace, kdy se na flavonoid váže glykosid, který látku stabilizuje a činí ji též lépe rozpustnou ve vodě (Velíšek a Hajšlová, 2009).

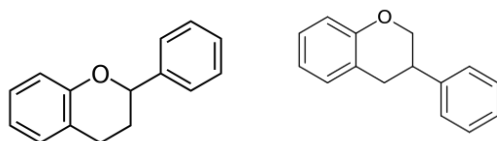


**Obr. 1** Chemické struktury kyseliny benzoové a kyseliny skořicové



Zdroj: Velíšek a Hajšlová, 2009

**Obr. 2** Struktura flavanu a izoflavanu

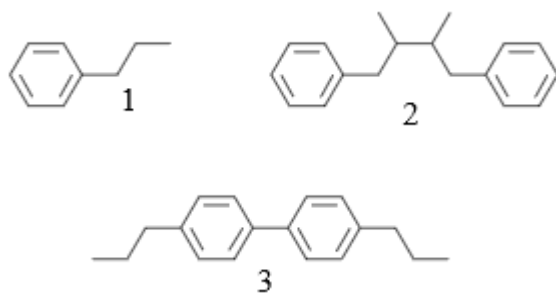


Zdroj: Velíšek a Hajšlová, 2009

## 2.2. Další vybrané účinné látky

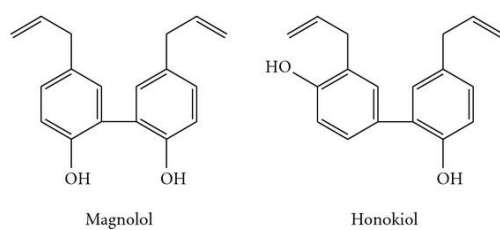
Do skupiny fenolových sloučenin (mezi tzv. fenylypropanoidy) patří lignany (Haworth, 1936). Ty jsou odvozeny od koniferylalkoholu a dalších skořicových alkoholů. Jedná se o dimery  $(C_6-C_3)_2$ , které vznikly spojením dvou fenylypropanových jednotek  $(C_6-C_3-C_3-C_6)$ . Pokud dojde ke tvorbě dimerů typu  $C_6-C_3-C_6-C_3$  (obrázek 3 a 4), jedná se o neolignany (Gottlieb, 1972). V lidském organismu se nerozkládají, pouze se štěpí vazby mezi nimi a dalšími polymery. Uplatňují se nejen jako antioxidanty, ale též jako fytoestrogeny. V rostlinách zastávají roli bariéry proti patogenům, díky jejich protivirulentním, protimikrobiálním a protiplísňovým vlastnostem. Antioxidační vlastnosti byly prokázány například u honokiolu a magnololu (Zhai *et al.*, 2003). Mezi další pozitiva patří jejich působení na onemocnění rakovinou (varlat, vaječníků, prostaty) prokázané *in vitro* studiemi ve Švédsku a na Novém Zélandě, kardiovaskulární choroby a rovněž mají vliv na snižování depresivních stavů a Parkinsonovu nemoc (Muroyama *et al.*, 2012).

**Obr. 3** Strukturální vzorec *n*-propylbenzenu (1), lignanu (2) a neolignanu (3)



Zdroj: Hazra, 2016

**Obr. 4** Strukturální vzorec magnololu a honokiolu



Zdroj: Zhai *et al.*, 2003

### 3. Antioxidanty v lidském organismu

V lidském organismu jsou antioxidanty velice důležité. Mechanismus jejich působení je velmi komplikovaný, vzhledem k tomu, že různé látky se zapojují různým způsobem.

K odbourávání oxidantů existuje v buňkách řada antioxidačních mechanismů, které mohou zabránit jejich tvorbě nebo je převést na stabilnější a méně reaktivní produkty. Dělíme je na mechanismy:

- preventivní,
- reparační,
- fyziologické obranné,
- antioxidanty.

Dochází při nich k přenosu informace z vnějšího prostředí do nitra buňky, což rezultuje v ovlivnění nejrůznějších biologických aktivit (aktivity RNA polymerázy, indukci genové exprese, buněčného růstu a neuronální transmise) a ve většině případů způsobuje buněčnou smrt (Cadenas, 1997).

Antioxidační procesy dělíme na:

- endogenní antioxidační systém,
- exogenně podané látky antioxidanty.

Endogenní antioxidační systém je tvořen enzymatickými (cytochrom c, kataláza, glutathion peroxidáza, cytosolická superoxid dismutáza a ceruloplazmin, mitochondriální superoxid dismutáza) a neenzymatickými (glutathion, sulfhydrylové skupiny, thioredoxin a další) složkami.

Mezi exogenní látky podporující antioxidační aktivitu patří stopové prvky (například selen podporující absorpci antioxidačně působícího vitamínu E, zinek stabilizující membrány buněk nebo měď, která však ve zvýšeném množství naopak oxidativní stres vyvolává), ale významnou antioxidační aktivitu má strava bohatá na ovoce a zeleninu (Masella *et al.*, 2005).

Biologické procesy jsou pak ovlivňovány antioxidačními mechanismy, které mají nepostradatelnou úlohu v signálních a regulačních mechanismech v organismu (Thannickal a Fanburg, 2000).

### 3.1. Oxidační stres

Buňky živého organismu v průběhu svého života prakticky nepřetržitě produkují volné radikály – reaktivní kyslíkové radikály označované ROS (reactive oxygen species) popřípadě reaktivní dusíkaté radikály RNS (reactive nitrogen species). Proces vzniku volných kyslíkových radikálů a jejich působení na buňky organismu se souhrnně nazývá oxidační (oxidativní) stres, v případě dusíkatých sloučenin nitrosativní stres. Je chápán jako příčina mnoha akutních a chronických onemocnění a jako děj doprovázející přirozené stárnutí organismu. Jedná se o proces nadměrné produkce reaktivních kyslíkových nebo dusíkatých částic nebo inhibici antioxidačních mechanismů buňky (Kovacic a Jacintho, 2001).

Oxidační stres byl definován jako narušení rovnováhy oxidant – antioxidant ve prospěch oxidantů, čímž může dojít k poškození buňky (Sies, 1985).

Dobrym indikátorem oxidativního stresu v organismu je měření hladiny redukovaného glutathionu (GSH) a jeho oxidované formy, disulfidu glutathionu (GSSG) v krvi (Rossi *et al.*, 2002).

### 3.2. Reaktivní kyslíkové a dusíkové radikály

Buňky živého organismu v průběhu svého života prakticky nepřetržitě produkují volné radikály. Termín ROS zahrnuje jak tzv. volné kyslíkové radikály s nepárovým elektronem ( $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{HO}_2\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$ ,  $\text{RO}_2\cdot$  a  $\text{O}_2\cdot^-$ ), tak i další reaktivní sloučeniny kyslíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{HOCl}$ ), které tento nepárový elektron nemají a vznikají přeměnou z volných radikálů. Dále vznikají i RNS, kam patří například NO nebo  $\text{ONOO}^-$ . Volné radikály, definované již v roce 1900 na základě rozkladu hexafenyletanu na dva trifenylmetylové radikály, byly dále zkoumány v průběhu celého 20. století. Mohou existovat jako molekuly, případně molekulové fragmenty, obsahující jeden nebo více nepárových elektronů v atomových či molekulových orbitalech (Halliwell a Gutteridge, 2015).

Jejich hlavními zdroji jsou dýchací řetězec v mitochondriích, biotransformační procesy na endoplazmatickém retikulu, lyzomy a peroxysomy, buňky schopné fagocytózy (zejména potom neutrofilů), Fentonova reakce přechodných kovů a některé fyzikální faktory (UV záření, X záření). Při fagocytóze

vznikají reaktivní kyslíkové radikály, zejména  $O\bullet^{2-}$ , které mají ochrannou funkci při napadení organismu bakteriemi. K exogenním faktorům, které výrazně zvyšují produkci volných radikálů, patří kouření, průmyslové znečištění životního prostředí, pesticidy, řada léčiv (zejména potom celková anestetika) či organická rozpouštědla (Buhl *et al.*, 1998, Stratil (1993).

Zvyšování koncentrace ROS způsobuje snižování buněčné aktivity v procesu přirozeného stárnutí organismu. Z volných kyslíkových radikálů jsou v organismu nejreaktivnější hydroxylový radikál ( $OH\bullet$ ) s poločasem rozpadu  $10^{-9}$  sekundy, alkoxylový radikál ( $RO\bullet$ ) s poločasem rozpadu  $10^{-6}$  sekundy, singletový kyslík s poločasem rozpadu  $10^{-5}$  sekundy, peroxylový ( $ROO\bullet$ ) radikál s poločasem rozpadu  $10^{-2}$  sekundy a superoxidový radikál ( $O\bullet^{2-}$ ) s poločasem rozpadu  $10^{-6}$  sekundy. Z řady RNS potom peroxyinitrit ( $ONOO^-$ ), mající přibližně 1000krát vyšší aktivitu než peroxid vodíku, s poločasem rozpadu 0,05-1,0 sekundy, a oxid dusnatý ( $NO\bullet$ ) s poločasem rozpadu 1-10 sekund (Aikens a Dix, 1991).

Některé látky (například NO nebo  $H_2O_2$ ) ve vysokém množství oxidují základní stavební jednotky buňky (nukleové kyseliny, bílkoviny a fosfolipidy), což vede k patologickým změnám ve fyziologii a následně k jejímu zániku (Stadtman a Levine, 2003).

### 3.3. Vliv oxidačních procesů na lidské zdraví

Volné radikály a reaktivní kyslíkaté a dusíkaté sloučeniny neradikálové povahy se do organismu dostávají z vnějšího prostředí nebo vznikají přímo v organismu během metabolických procesů jako jejich vedlejší produkty (Darley-Usmar a Halliwell, 1996).

Podle Štípka *et al.* (2000) i Racka a Holečka (1999) nejsou volné radikály a reaktivní kyslíkaté a dusíkaté sloučeniny pro organismus pouze škodlivé, ale mají svůj význam v imunitním systému

- při zneškodňování patogenů,
- zúčastňují se také biosyntézy některých fyziologicky významných sloučenin jako např. žlučových kyselin, cholesterolu a detoxikace xenobiotik a některých léčiv,
- uplatňují se při narušování membrány spermií.

V tomto ohledu se může projevit s různou intenzitou většina druhů reaktivních látek uvedených v tabulce 1.

**Tab. 1** Přehled kyslíkatých a dusíkatých volných radikálů a jejich reaktivních forem

<b>Reaktivní formy kyslíku</b>	
<b>Volné radikály</b>	<b>Látky, které nejsou volnými radikály</b>
superoxid $O_2^{\bullet-}$	peroxid vodíku $H_2O_2$
hydroxidový radikál $OH^{\bullet}$	kyselina chlorná $HClO$
peroxyl, $ROO^{\bullet}$	ozon $O_3$
hydroperoxyl $HO_2^{\bullet}$	singletový kyslík ( $^1O_2$ )
<b>Reaktivní formy dusíku</b>	
<b>Volné radikály</b>	<b>Látky, které nejsou volnými radikály</b>
oxid dusnatý, $NO^{\bullet}$	nitrosyl, $NO^+$
oxid dusičitý, $NO_2^{\bullet}$	nitroxid $NO$
	peroxynitrit, $ONOO^-$
	alkylperoxynitrit $ROONO$

Zdroj: Štípek *et al.* (2000)

Podle Rokyty a Holečka (2006) platí, že čím je organizmus starší, tím se jeho reakce a funkce zpomalují a zhoršují. Pro zpomalení stárnutí je proto především potřeba zvýšit hladinu látek zajišťujících v organizmu trvalou funkčnost jeho antioxidační ochrany pravidelným doplňováním antioxidantů (vitaminů a dalších) přijímaných z potravin, označovaných jako dietární.

Referenční hodnoty významných antioxidačně působících látek byly začleněny do norem pro doporučený příjem živin DACH (2011), které společně publikují a aktualizují vědecké společnosti pro výživu Švýcarska, Rakouska a Německa a nyní i ČR. Proto některé studie v tomto ohledu varují před používáním preparátů a doplňků stravy, obohacovaných koncentráty vitamínu E, A, selenu a  $\beta$ -karotenu zdravým lidem jako prevenci. Nezpochybňují však pozitivní účinky těchto antioxidantů v případě podvýživy a jejich nedostatečného zastoupení v konzumované stravě.

Lindahl (2014) uvádí, že z hlediska praktické výživy je proto důležitá dobrá znalost obsahu antioxidantů v jednotlivých potravinách. V případě antioxidačně působících vitaminů byla již tato problematika u nás dobře zvládnuta a obsahy jednotlivých antioxidantů v běžných potravinách byly publikovány. V tabulce 2 jsou uvedeny koncentrace antioxidačně působícího vitaminu E ve vybraných potravinách konzumovaných v České republice.

**Tab. 2** Obsah vitaminu E ve vybraných potravinách (mg.kg<sup>-1</sup>)

Řepkový olej	140,0-850,0
Slunečnicový olej	270,0-900,0
Olej z pšeničných klíčků	1650,0-3000,0
Mouka pšeničná	15,0-50,0
Rýže	0,4-4,5
Brambory	0,6-0,9
Jablka	1,8-7,4
Pomeranče	2,4-2,7
Špenát	16,0-25,0
Rajčata	3,6-4,9
Mrkev	2,5-4,5
Maso hovězí a vepřové	2,5-7,7
Játra	4,0-14,0
Vepřové sádlo	6,0-30,0
Ryby	4,0-80,0
Mléko	0,2-1,2
Sýry	3,0-3,5
Máslo	10,0-50,0
Vejce	5,0-30,0

Zdroj: Velíšek *et al.* (2002)

Z tabulky 2 vyplývá velká variabilita obsahů tohoto antioxidantu v potravinách. S tímto jevem se setkáme a musíme počítat i u jiných antioxidantů. Na kolísání hodnot působí řada faktorů již v prvovýrobě a ztráty způsobené zpracováním a skladováním po výrobě. Pro organismus je také významné, s jakou účinností je z dané potraviny určitý antioxidant využit. V tomto ohledu je zpravidla

rozhodující způsob zpracování nebo úpravy potraviny před konzumací. Rozhodujícím zdrojem antioxidantů v naší výživě je ovoce a zelenina. V tabulce 3 je uveden obsah některých významných dietárních antioxidantů, které nemají charakter vitaminů, nicméně prokazatelně příznivě ovlivňují zdravotní stav konzumentů (Lindahl, 2014).

**Tab. 3** Zastoupení významných dietárních antioxidantů v ovoci a zelenině  
(mg.100 g<sup>-1</sup>)

<b>Potraviny</b>	<b>Kyselina askorbová</b>	<b>Rutin</b>	<b>Kvercetin</b>
Borůvky	25,20	-	12,570
Grepfruity	38,20	292,00	40,780
Hrozny čer.	6,10	-	0,480
Hrozny zel.	-	-	-
Kiwi	65,55	-	0,590
Mandarinky	28,60	56,00	20,920
Pomeranče	58,51	168,00	5,020
Ryngle	8,30	14,60	-
Brambory	10,20	-	0,308
Brambory vařené	3,50	-	0,688
Brokolice	125,20	-	-
Celer	10,10	5,87	-
Mrkev	5,80	35,47	1,958
Okurky	7,20	3,97	0,014
Papriky	158,90	25,47	1,943
Rajče	25,30	-	0,392
Špenát	52,80	178,30	69,613
Zelí bílé	28,90	15,59	1,388
Zelí červené	56,20	5,08	0,891

Zdroj: Kalač (2003)

Oxidativní stres charakterizuje oxidace polyneenasycených mastných kyselin vedoucí ke vzniku poměrně široké škály často toxických produktů, jako jsou aldehydy – malondialdehyd; 4-hydroxy-2-nonenal; dienaly; alkany; izoprostany; konjugované dieny, oxidace nukleotidů (oxidace DNA je charakterizována oxidací

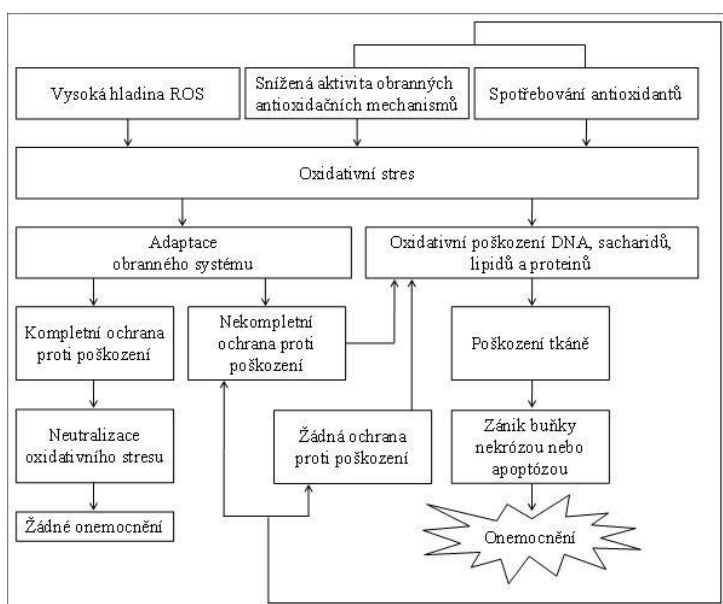


deoxyribózy, změnou struktury dusíkatých bází – zejména guaninu a rozrušením dusíkové vazby), snížení metabolické přeměny proteinů, snížení syntézy specifických enzymů a receptorů ústící v nadprodukcii příslušných genů, poškození mitochondriálních funkcí a buněčné membrány (Kastnerová, 2018) a mohou vyústit v buněčnou smrt (Kovacic *et al.*, 2005).

Oxidativní stres je v posledních letech velmi intenzívně studován v souvislosti s četnými akutními i chronickými patologickými procesy v organismu jako jsou karcinom, neurodegenerativní onemocnění, poruchy kardiovaskulárního systému, nemoci jater, ledvin, plic, kůže, *diabetes mellitus* a řada dalších chorob (Dhalla *et al.*, 2000).

Samotné reaktivní kyslíkové nebo dusíkové částice jsou velmi nestabilní. Při oxidačním stresu ovšem jejich působením vznikají ve zvýšené míře specifické sloučeniny – tzv. biomarkery oxidačního stresu. Tyto jsou obsaženy v tělních tekutinách (krevní plazmě, mozkomíšním moku, moči a kondenzátu vydechaného vzduchu) a mohou být využity k diagnostice patologických stavů souvisejících s nemocemi oxidačního stresu a jejichž mechanismus je popsán na obrázku 5. Pokud je v organismu nedostatek antioxidantů nebo jsou antioxidační mechanismy poškozeny, vzniká oxidační stres, při kterém mohou být při nedostatečné adaptaci imunitního systému poškozeny nukleové kyseliny, lipidy a proteiny a následně dojde k rozvoji onemocnění (Dalle-Donne *et al.*, 2003).

**Obr. 5** Mechanismus vzniku onemocnění souvisejícího s oxidačním stresem

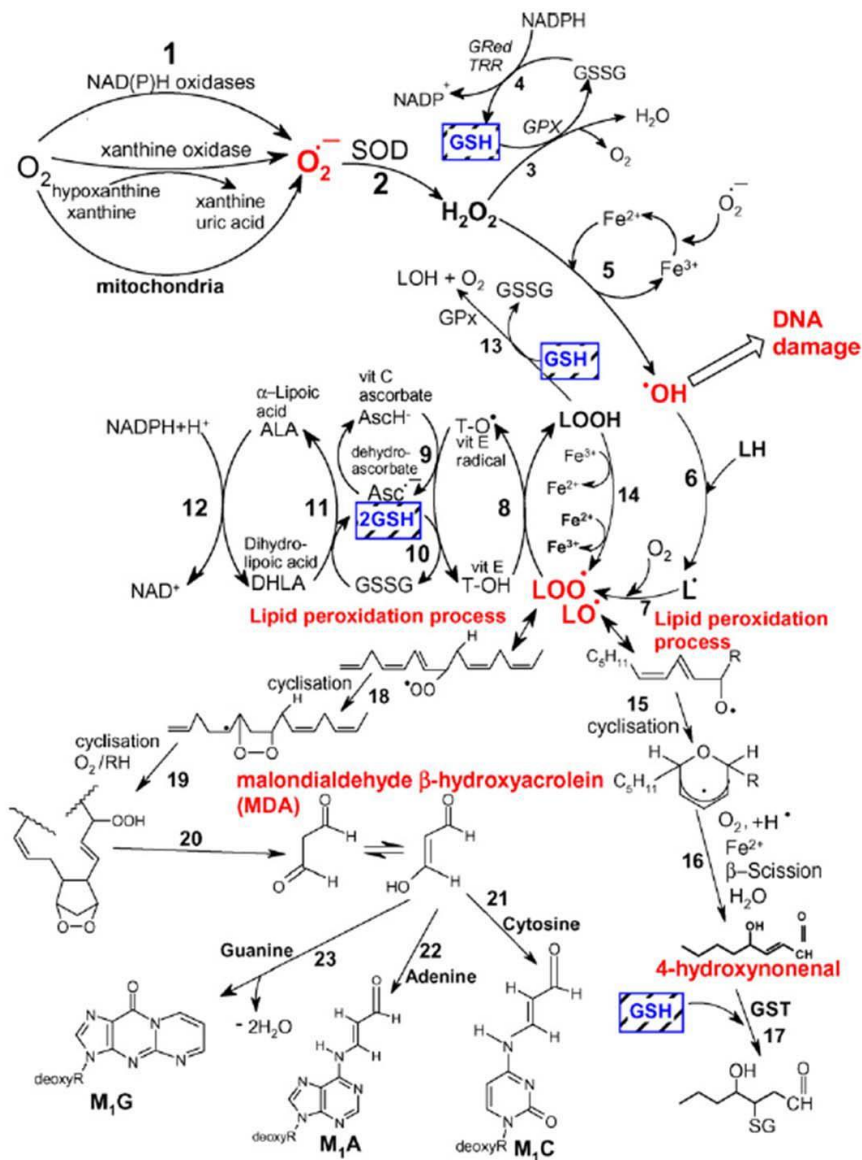


Zdroj: Dalle-Donne *et al.* (2003)

### 3.4. Antioxidační procesy

Podle Droge (2002) často dochází k nerovnováze mezi prooxidanty a antioxidanty a tento nesoulad se může v organismu projevit četnými patofyziologickými procesy. Míra poškození organismu oxidačním stresem se určuje na základě koncentrace tzv. biomarkerů, což jsou látky vznikající působením oxidantů v tělních tekutinách (kondenzátu vydechaného vzduchu, moči, krevní plazmě, mozkomíšním moku). Oxidací nenasycených mastných kyselin vznikají například prostaglandiny a celá řada dalších látek (obrázek 6).

**Obr. 6** Produkty aktivity reaktivních sloučenin kyslíku v organismu



Zdroj: Uchida (2003)

Onemocněními, která mohou být charakterizována zvýšenou hladinou 4-hydroxy2-nonenalu jako biomarkeru oxidativního poškození, jsou například Alzheimerova choroba, ateroskleróza, obstrukční plicní nemoc, nemoci kardiovaskulárního systému, Parkinsonova choroba, porucha kognitivních funkcí.

Stále roste uvědomění, že oxidativní stres hraje roli v etiopatogenezi různých klinických nemocí, jako jsou maligní onemocnění, *diabetes mellitus*, ateroskleróza, chronické záněty, ischemické příhody (Andersen, 2004; Apel a Hirt, 2004; Barja, 2004; Bergamini *et al.*, 2004; Reddy a Clark, 2004; Shah a Channon, 2004; Willner, 2004; Lachman *et al.*, 2003; Behrend *et al.*, 2003; Bohr a Dianov, 1999; Cerutti, 1994; Wei, 1992, Ames, 1983).

Antioxidanty, společně s látkami zasahujícími do škodlivých účinků cytokinů a lipidových mediátorů, mohou hrát roli v léčbě virových onemocnění (Waris a Alam, 2004; Waris *et al.*, 2003; Waris *et al.*, 2001).

#### 4. Hloh peřenoklaný (*Crataegus pinnatifida* Bunge)

Hloh (rod *Crataegus* L., čeleď *Rosaceae* L., podčeleď *Amygdaloidea*) se dělí na dva podrody – *Crataegus*, kam patří všechny euroasijské druhy a *Americanae*, zahrnující severoamerické druhy. Rod *Crataegus* L. obsahuje přibližně 280 druhů v severním mírném pásmu (mezi 30° severní šířky a 50° zeměpisné délky) především ve východní Asii, Evropě a na východě Severní Ameriky a je považován za morfologicky nejvariabilnější (Sikorowská, 2015). V tabulce 4 jsou uvedeny nejvíce komerčně využívané druhy hlohu z různých oblastí výskytu.

**Tab. 4** Hlavní komerční druhy hlohu a jejich oblasti pěstování

Vědecký název	Barva plodů	Oblast pěstování
<i>Crataegus alnica</i> Loudon	zlatá	
<i>Crataegus cuneata</i> Siebolt & Zucc.	červená	
<i>Crataegus hupehensis</i> Sargent	tmavě červená	
<i>Crataegus kansuensis</i> E. H. Wilson	oranžovo-červená	Asie
<i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge	světle červená	
<i>Crataegus scabrifolia</i> Franchet	žlutavě hnědá, zelená s červenými skvrnami	
<i>Crataegus azarolus</i> L.	žluto-červená	
<i>Crataegus laevigata</i> DC.	tmavě červená	
<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	jasně červená	Evropa
<i>Crataegus nigra</i> Waldst. & Kit.	černá	
<i>Crataegus pentagyna</i> Waldst. & Kit.	černá	
<i>Crataegus aestivalis</i> Walt.	světle až tmavě červená	
<i>Crataegus douglasii</i> Lindl.	tmavě červená	Severní
<i>Crataegus mollis</i> Scheele	červená	Amerika
<i>Crataegus opaca</i> Hook. & Arn.	žluto-tmavě červená	
<i>Crataegus phaenopyrum</i> Medik.	jasně červená	

Zdroj: Janick a Paull (2008)

Hloh peřenoklaný (*Crataegus pinnatifida* Bunge, angl. Hawthorn) byl původně pěstován v severní Číně a Japonsku, kde má více než 1700letou tradici a postupně byl rozšířen do Jižní Koreje, Evropy a Severní Ameriky. Jedná se o keř nebo menší strom, výšky maximálně 6 m, plody obsahují 3 až 5 semen, barva malviček je sytě červená, velikost 30-40 mm se št'avnatou, sladkokyselou dužninou, jejichž konzumní zralost nastává v období říjen až prosinec (Čelková, 2011) a je z hlohů nejvhodnější pro pěstování plodů (Phipps *et al.*, 2003).

V Asii je používán k přímému konzumu (syrový, zpracovaný jako džemy, želé, nealkoholické nápoje, džusy, fermentované výrobky – víno či ocet), jako lék, ale i na výzdobu. Na čínských trzích je ročně prodáno více než 50 t plodů (Phipps *et al.*, 2003).

V čínské medicíně je nazýván Shan-Zha a jako jeho účinné látky s výraznou antioxidační aktivitou byly identifikovány:

- flavonoidy,
- hyperosidy,
- isokvercitrin,
- epikatechin,
- kyselina chlorogenová,
- kvercetin,
- rutin,
- kyselina protokatechová.

Listy, květy i plody (nezávisle na stádiu zralosti) jsou využívány ke snižování krevního tlaku, hladiny cholesterolu v krvi, působí jako srdeční tonizátor, pomáhají při bolestech břicha a trávení, zastavují průjem, navozují lepší spánek a tlumí nervozitu, byly prokázány jejich pozitivní účinky při léčbě arteriosklerózy, jsou využívány při léčbě srdečních potíží a hypoxii, ale i při nedostatečné sekreci mléka, používají se k léčbě tachykardie, *anginy pectoris*, kardiomyopatie, ischemické choroby srdeční a křečových žil (Janick a Paull, 2008).

Největší sad v Evropě se nalézá v jižních Čechách v blízkosti obce Chelčice. Díky velkému obsahu účinných látek a možnému vlivu rozdílných podmínek pěstování je hloh peřenoklaný vědecky zkoumán i v dnešní době a stále jsou upřesňovány jeho účinné látky a jejich vliv na různá onemocnění.

#### 4.1. Aktivní látky rodu *Crataegus* a jejich stabilita při skladování

Janick a Paull (2008) uvádějí celou řadu aktivních a zdravotně prospěšných prvků a sloučenin, které lze nalézt v různých částech rostliny – vláknina, draslík, vápník, vitamin C,  $\beta$ -karoten, řada flavonoidů (zejména O- a C-glykosidy), vitexin (květy), vitexin-2'-O-rhamnosid (listy), kvercetin, kvercetin-3-rhamnogalaktosid, acetylvitexin, hyperosid, rutin, orientin, homoorientin, dimerní proantocyanidiny, epikatechin, triterpenové kyseliny (0,3-1,4 %), aminy, cholin, acetylcholin, purinové deriváty (adenin, guanin, kyselina močová), kyselina chlorogenová, saponiny, katechinové třísloviny, steroly, triterpeny a proanthocyanidiny. Nejvíce aminokyselin se nachází v květech, v plodech jich je nejméně. Zde jsou obsaženy flavonoidy (především hyperosid), oligomerní a polymerní procyamidiny, vitamin C a saponiny (Spilková, 1995). Z organických kyselin se jedná o kyselinu jablečnou, kyselinu citronovou a kyselinu vinnou, ze sacharidů o sacharózu, glukózu, fruktózu a sorbit.

Chang *et al.* (2006) sledovali vliv teploty na obsah čtyř hlavních fenolů – (-)-epikatechinu (EC), prokyanidinu B-2 (PC-B-2), kyseliny chlorogenové (ChA) a isokvercitrinu (IQ) v konzervovaném hlohovém nápoji skladovaném ve tmě po dobu 6 měsíců při třech různých teplotách (4 °C, 23 °C, 40 °C). Výsledky ukázaly, že sledované fenoly byly stabilní při teplotě 4 °C a poměrně nestabilní při 23 °C a 40 °C s různými stupni degradace. Při pokojové teplotě (23 °C) byly pozorovány výrazné degradace EC a PC-B-2 u ovoce i nápoje s pokesem zhruba přibližně 50 % a 30 % po 6 měsících skladování. Významnější pokles fenolických látek byl pozorován při 40 °C, zejména u EC a PC-B-2, které byly po 6měsíčním skladování téměř úplně degradovány. IQ a ChA se ukázaly být poměrně stabilní při teplotě 23 °C, ale nestabilní při 40 °C. Doporučují proto pro zachování kvality a účinnosti plodů z hlohu a jejich přípravků skladování při nízkých teplotách.

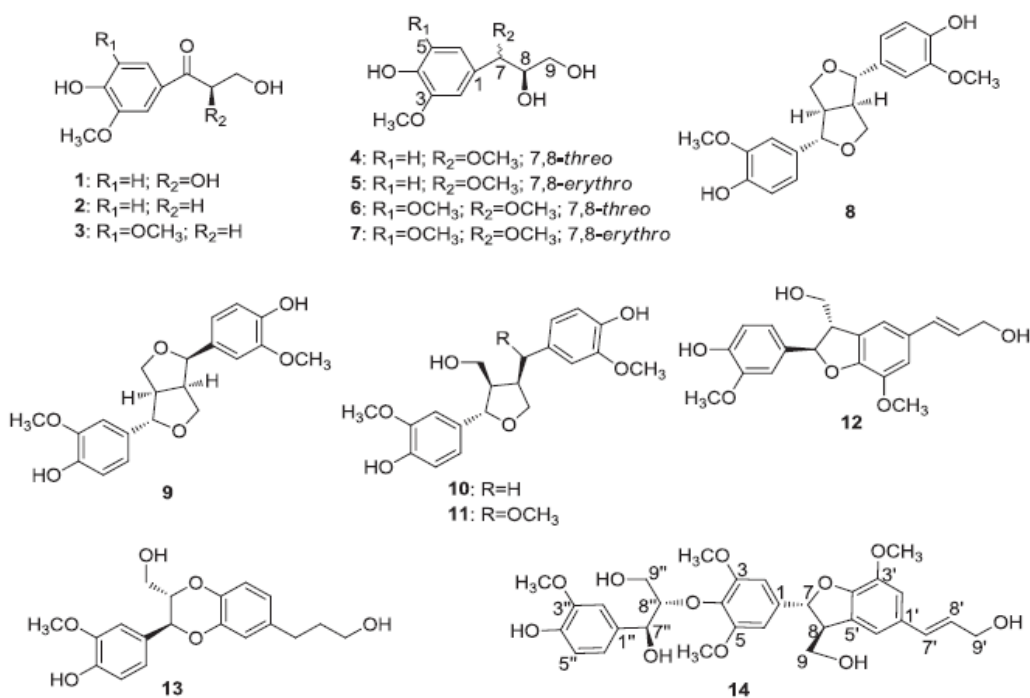
Liu *et al.* (2016) sledovali vliv předběžného mikrovlnného ošetření (dochází i ke zvýšení teploty) na obsah antokyaninu ve fermentovaném nápoji z plodů hlohu peřenoklaného a výsledky porovnávali s neošetřeným vzorkem. Předběžné ošetření pomocí teploty nebo v mikrovlnné troubě mělo významný vliv na relativní obsah anthokyaninů v nápoji, jako je kyanidin-3-galaktosid (82,9 % resp. 76,9 %) a kyanidin-3-glukosid (9,2 % a 11,5 %), ale významně neovlivňovalo hodnotu pH, celkovou rozpustnou sušinu nebo celkový obsah kyselin. Po ošetření záhřevem byl obsah anthokyaninů vyšší než po ošetření mikrovlnným zářením

(0,745 mg.100 ml<sup>-1</sup>) a po 7denním skladování byl obsah antokyaninů vyšší o 52,4 % než u kontrolního vzorku. Sytost barev výsledného produktu po 12 dnech fermentace pak u tepelně ošetřených vzorků byla vyšší o 24,5 %.

#### 4.2. Taxonomie rodu *Crataegus* podle obsahu fenolických látek

Huang *et al.* (2014) zjistili, že přítomnost kogenetických fenylypropanoidů a jejich biosyntetických vztahů může být použita k identifikaci druhů *Crataegus*. Zaměřili se na izolaci fenylypropanoidů ze semen *Crataegus pinnatifida* B. (CPB). Ve studii poprvé izolovali sloučeniny 1, 2, 6-14 (obrázek 7) a dospěli k názoru, že biosyntetický vztah sloučenin 1-14 naznačuje, že metabolity C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> by mohly přispět k podpoře taxonomie daného vzorku. Tyto fenoly pocházejí z monolignolů a jsou důležitými prekurzory různých komplexních fenylypropanoidů, jako jsou lignany, neolignany a sesquiligany. Například sesquiligany typu 4',8''-O-3,8', které obsahují neolignanovou jednotku typu 8-O-4 'a dihydrobenzofuranovou neolignanovou jednotku, jsou v přírodě distribuovány velmi specificky.

**Obr. 7** Chemické struktury fenylypropanoidů v semenech hlohu peřenoklaného (*Crataegus pinnatifida* Bunge)



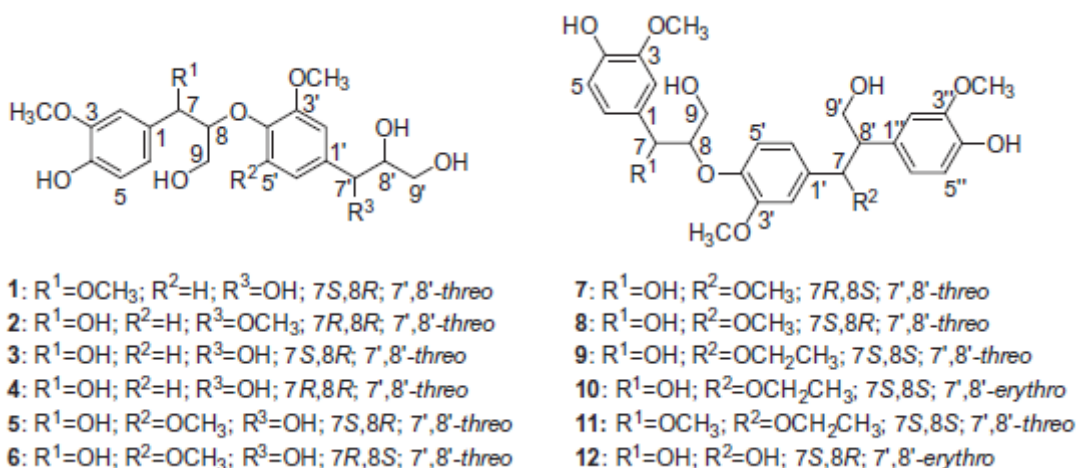
Zdroj: Huang *et al.* (2014)

Kromě již známých látek izolovali nově též fenol 7,8-erythro-7-methoxysyringylglycerol (7) a sesquilignan pinnatifidanin A I (14). Tento typ sesquilignanu byl dříve popsán pouze u několika rodů rostlin, mezi něž patří i hloh obecný, latinsky *Laevigata* (Li *et al.*, 2012; Kinghorn *et al.*, 2012). Toto zjištění naznačuje, že *Crataegus* je chemicky podobný *Laevigata*. Extrakcí fenolů z CPB se zabývali rovněž Tian *et al.* (2017).

### 4.3. Antioxidační účinky hlohu přenosklaného a jejich vliv na lidský organismus

Peng *et al.* (2016) extrahovali ze semen CPB celou řadu účinných látek, jejichž chemické struktury jsou uvedeny na obrázku 8. Kromě pěti známých sloučenin (3-6, 12) izolovali sedm nových neolignanů (1, 2, 7-11), které při sledování jejich antioxidační kapacity vykazovaly mírnou aktivitu u testu DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) a významnou aktivitu v testech ABTS (kyselina 2,2'-azino-bis(3-etylbenzothiazolin-6-sulphonová) a FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Neolignany 7-12 byly účinné při inhibici oxidu dusnatého (NO) a sloučeniny 1-4 prokazovaly silný inhibiční účinek na faktor nádorové nekrózy (TNF-alfa).

**Obr. 8** Chemické struktury neolignanů v semenech hlohu přenosklaného (*Crataegus pinnatifida* Bunge)



Zdroj: Peng *et al.* (2016)



V testu ABTS vykazovaly všechny sloučeniny (1-12) významnou antioxidační aktivitu, sloučeniny 7-12 nejsilnější. Srovnání struktur 7-12 se strukturami 1-6 prokázalo vliv benzenové skupiny v pozici C-8 na zvyšování aktivity DPPH a ABTS radikálů. Výsledky studie ukázaly, že semena *Crataegus pinnatifida* B. mohou být považována za potenciální nový zdroj antioxidantů a inhibitorů zánětu (Peng *et al.*, 2016).

Liu *et al.* (2010) se zaměřili na oxidační aktivitu prostřednictvím účinnější extrakce prokyanidinů (PC) z plodů *Crataegus pinnatifida* B., které byly optimalizovány pomocí metodiky odezvy povrchu (RSM). Výsledkem byl zisk  $93,4 \pm 0,2$  % PC, které mohly být dále využívány například jako součást přípravků snižujících množství volných radikálů v lidském organismu.

Denev *et al.* (2014) srovnávali antioxidační vlastnosti hlohu s vybranými pěti druhy ovoce: šípkem, aronií, černým rybízem, borůvkou a jeřabinou pomocí různých metod (ORAC – Oxygen Radical Absorbance Capacity, TRAP – Total Radical-trapping Antioxidant Parameter a inhibicí peroxidace lipidů) a jejich vlivem na produkci reaktivních druhů kyslíku (ROS) a rovněž jejich antimikrobiální vlastnosti proti 11 lidským patogenům. Slabou antimikrobiální aktivitu vykazovaly výtažky z hlohu a šípku. Nejúčinněji působily proti *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P a *Proteus vulgaris* G.

#### • **Metabolismus cholesterolu**

Zhu *et al.* (2013, 2015) i Zhang *et al.* (2002) se zaměřili na ovlivnění metabolismu cholesterolu u křečka, který je podobný metabolismu lidskému a porovnávali účinky pektinu z hlohu (HP), hydrolyzátů ztuženého hlohového pektinu (HPH) a hlohového pseudo-pentasacharidu (HPPS). Uvedenými studiemi bylo zjištěno, že HPPS byl účinnější než HP a HPH při snižování přírůstku tělesné hmotnosti (o 38,2 %), hmotnosti jater (o 16,4 %) a celkového cholesterolu (TC) v plazmě a játrech (o 23,6 % a 27,3 %). Skupina s HP dosahovala vyššího objemu vylučovaného cholesterolu než skupiny s HPH a HPPS tím, že inhibovala vstřebávání cholesterolu ve stravě (21,7 % zvýšení vylučování TC a 31,1 % snížení absorpce TC). HPPS by tedy mohla být slibnou antiaterogenní dietní složkou pro vývoj funkčních potravin ke zlepšení metabolismu cholesterolu.

Rovněž Kwok *et al.* (2013) prokázali významný hypocholesterolemický účinek 80% etanolového extraktu z *Crataegus pinnatifida* B. Var. Major N.E. Br, v čínštině nazývaný Shan-Zha. Při 4týdenní léčbě došlo ke snížení celkového cholesterolu v plazmě a LDL-cholesterolu (LDL-C) u potkanů krmených hypercholesterolemickou stravou.

Lin *et al.* (2011) zkoumali vliv látek snižujících hladinu lipidů a základní mechanismy působení hlohu v organismu křečků. Zjistili, že práškové extrakty z hlohu inhibovaly aktivitu acylCoA:cholesterol acyltransferázy (ACAT) v buňkách. Tato inhibiční aktivita se zvyšovala s nárůstem obsahu triterpenových kyselin – kyseliny olejové a kyseliny ursolové v extraktech. Zvířata, kterým byl podáván extrakt z hlohu, vykazovala nižší hodnoty cholesterolu v plazmě i v játrech. Studie prokázala, že zejména uvedené kyseliny v extraktu jsou zodpovědné za účinek snížení hladiny cholesterolu.

Han *et al.* (2016) zjistili, že myši, krmené výtažky s polyfenoly (hlavní složky – kyselina chlorogenová, epikatechin, rutin a hyperosid) ze slupek plodů hlohu (HPP) vykazovaly nižší hladiny TC, triglyceridů (TG), lipoproteinů cholesterolu s velmi nízkou hustotou a lipoproteinů cholesterolu s nízkou hustotou (VLDL-C, LDL-C) a vyšší hladiny lipoproteinů cholesterolu s vysokou hustotou (HDL-C) než myši krmené dužninou (HFP).

- **Obezita a dislipidemie**

Kuo *et al.* (2009) zkoumali účinek Shan-Zha na obezitu nebo dyslipidemii u křečků a zjistili, že plazmatické hladiny TC, TG a LDL-C byly při tomto léčení sníženy, zatímco HDL-C byl zvýšený.

Guo *et al.* (2014) se zaměřili na sušený zralý plod *Crataegus pinnatifida* Bunge var. Major N.E.Br. nebo *Crataegus pinnatifida* Bunge, kde jsou hlavními hypolipidemickými složkami flavonoidy a triterpenové kyseliny. Prokázali, že vodné extrakty, podávané v dávce 3,6 g denně po dobu 3 měsíců, snížily hladinu TC, TG a LDL-C.

- **Poškození jater**

Han *et al.* (2016) zkoumali diferenciální účinky působení výtažků s polyfenoly (hlavní složky – kyselina chlorogenová, epikatechin, rutin a hyperosid) z HPP, kde jich je obsaženo větší množství a HFP na játra myši poškozená krmnou dávkou s vysokým obsahem fruktózy. Podávání HPP vykazovalo lepší výsledky než HFP na zmírnění poškození jater a apoptózu hepatocytů, zánět jater a oxidativní stres. Výsledky, společně s histopatologií jater naznačují, že plody hlohu, zejména jeho slupka, jsou vynikajícím zdrojem přírodních polyfenolických chemopreventivních látek pro léčbu poruch jater.

- **Ateroskleróza**

Dong *et al.* (2017) zkoumali, zda flavonoidy (HLF) z listů hlohu mohou potlačit rozvoj aterosklerózy a případně jakým mechanismem. Zjistili, že myši, krmené dávkou s 20 mg.kg<sup>-1</sup> HLF vykazovaly po 16 týdnech hladinu TC o 18,6 % nižší, hladina VLDL-C + LDL-C byla nižší o 23,1 %, zatímco hladiny HDL-C a TG byly podobné ve srovnání s kontrolní skupinou. Z uvedených výsledků usoudili, že flavonoidy z hlohových listů mohou zpomalit vývoj aterosklerózy u myši, což znamená potenciální použití při prevenci aterosklerózy.

Oproti tomu Zhang *et al.* (2013) studovali vliv vodného extraktu bez cukru z plodů hlohu, jehož hlavními složkami byly kyselina chlorogenová, prokyanidin B-2, (-)-epikatechin, rutin a isokvercitrin, na léčbu aterosklerózy na potkanech. Dospěli k závěrům, že tento typ extraktu významně snížil hladiny TC, TG a LDL-C, ale zvýšil hladiny HDL-C. Histopatologické vyšetření prokázalo, že též inhibuje patologické změny v artériích kryš s tímto onemocněním.

- **Neurodegenerativní nemoci (Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba)**

Chang *et al.* (2013) sledovali vliv flavonoidů (kvercetin, hyperosid a rutin), polyfenolů (kyselina chlorogenová, kyselina chinová, (+)-katechin a (-)-epikatechin), triterpenoidů (kyselina oleanolová, kyselina korosolová), organických kyselin (kyselina citronová a kyselina jablečná), sacharidů (fruktóza a glukóza) a dalších

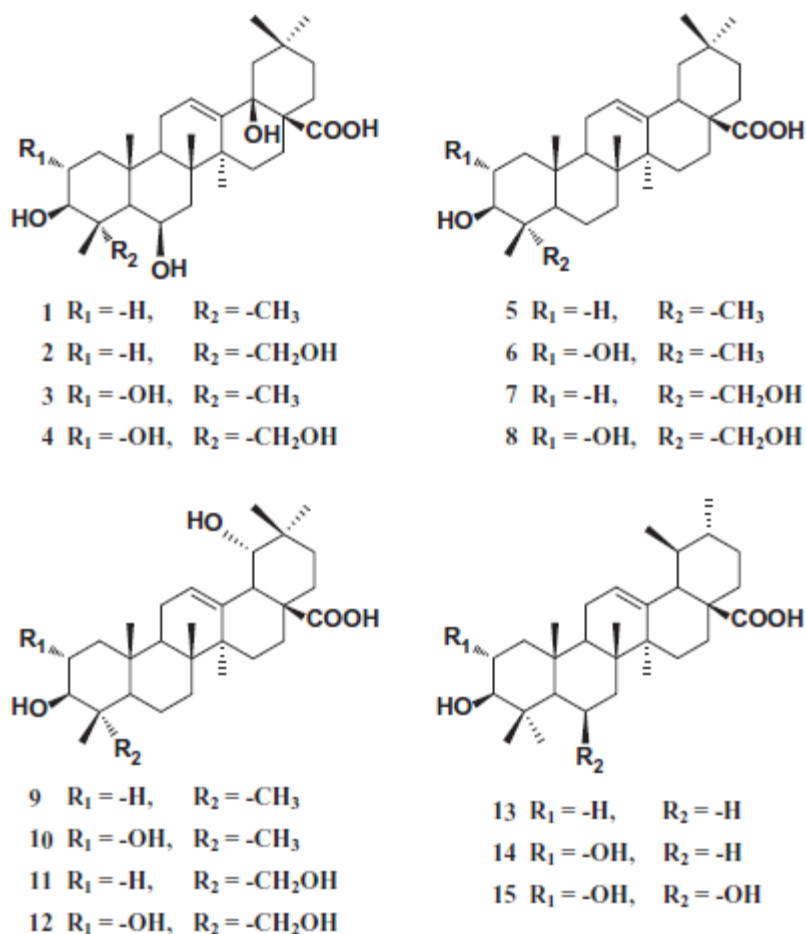
sloučenin (sorbitol, myo-inositol, crataechinony A a crataechinony B) z plodů CPB na volné radikály kyslíku ( $O\bullet^{2-}$ ), hydroxylové radikály ( $OH\bullet$ ) a peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) produkované v lidském těle. Srovnali fytochemické složení vodných, methanolových a 95% etanolových extraktů z plodu *C. pinnatifida* B. v jejich antioxidačních a neuroprotektivních účincích s tím, že metanolový extrakt obsahuje nejvyšší celkový obsah fenolů, flavonoidů a taninu, které vykazují příznivé účinky na vylučování ROS, 95% etanolový extrakt obsahuje nejvíce triterpenoidů a vykazuje příznivější antioxidační účinky než vodní extrakt. Tyto výsledky ukazují, že uvedené extrakty mohou být potenciálními zdroji přírodních antioxidantů pro využití v potravinách s potenciálem inhibovat nástup neurodegenerativních onemocnění. K obdobným závěrům dospěli i Cheng *et al.* (2013).

- **Cytotoxicita a antiproliferační účinek**

Qiao *et al.* (2015) studovali antiproliferativní a antioxidační aktivitu triterpenoidů z CPB (obrázek 9). Sloučeniny 2, 3 a 4 vykazovaly vysokou antiproliferační aktivitu. V testu absorpční kapacity peroxylových radikálů vykazovaly sloučeniny 1, 10 a 12 výraznou antioxidační aktivitu, v testu superoxidových volných radikálů ( $O\bullet^{2-}$ ) sloučeniny 1, 9 a 10 projevovaly výraznou aktivitu vychytávání volných radikálů.

Rovněž Wen *et al.* (2017, 2015) prokázali jejich významný obsah a silný antiproliferační účinek zejména proti liniím lidských rakovinných buněk HepG (2), MCF-7 a MDA-MB-231. Fragmenty obohacené triterpenoidy a jejich převládající složkou kyselinou ursolovou, prokázaly významné antiproliferační aktivity pro všechny testované rakovinné buněčné linie. Významný rozdíl zaznamenali v obsahu fenolických a antiproliferativních aktivit plodů čínské hlohy z různých odrůd se závěrem, že frakce obohacená triterpenoidy s kyselinou ursolovou měla nejúčinnější antiproliferační účinek k zastavení buněčného cyklu a apoptotické indukci a byla pravděpodobně zodpovědná za silnou protinádorovou aktivitu těchto plodů.

**Obr. 9** Chemické struktury triterpenoidů plodů hlohu peřenoklaného  
(*Crataegus pinnatifida* Bunge)



Zdroj Qiao *et al.* (2015)

- **Antiageing**

Stelmakiene *et al.* (2016) sledovali účinnost výtažků z CPB při aplikaci na kůži. Studie analyzovala extrakt z listů sušeného hlohu (*Crataegus oxyacantha* L.) s fenolickými sloučeninami – kyselinou chlorogenovou, vitexin-2'-O-ramnosidem, hyperosidem a isokvercitrinem. Extrakt vykazoval antibakteriální aktivitu proti *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* a *Escherichia coli* a antiradikální aktivitu založenou na vazebné kapacitě antioxidantních radikálů a může být použit jako aktivní složka přípravků k ošetření kůže. Prostup těchto látek přes epidermis však nebyl příliš vysoký, pohyboval se na hranici 42 %.

- **Antitrombotická aktivita**

Zhou *et al.* (2014) a Li *et al.* (2015) detekovali ve hlohu seskviterpen ( $1\alpha,4\alpha\beta,8\alpha\alpha$ )-1-isopropanol-4a-metyl-8-metylenedecahydronaftalen (1) a potvrdili antitrombotickou aktivitu nových monoterpenových glykosidů (1-4) a fenolického glykosidu (10) – identifikovaných jako pinnatifidanosid AE (1-4, 10), které doplnily již známé složky (2-9, 11-15), z nichž největší význam mají byzantonosid B (5), (3S,5R,6R,7E,9R)-3,6-epoxy-7-megastigmen-5,9-diol-9-O- $\beta$ -D-glucopyranosid (6), (6S,7Z,9R)-roseosid (7), icarisid B6 (8), linalooloxid- $\beta$ -D-glukosid (9), shanyenosid A (11), dihydrocharkon-2'- $\beta$ -D-glukopyranosid (12), eriodectyol (13), vitexin (14) a vitexin-2''-O-rhamnosyl (15) izolované z listů CPB (obrázky 10 a 11). Pomocí antitrombotických testů sloučenin 1 až 15 *in vitro* a *in vivo* zjistili, že látky 7, 13 a 15 vykazují účinnou antitrombotickou aktivitu *in vitro* i *in vivo*.

**Obr. 10** Chemické struktury terpenů v listech hlohu peřenoklaného

(*Crataegus pinnatifida* Bunge)

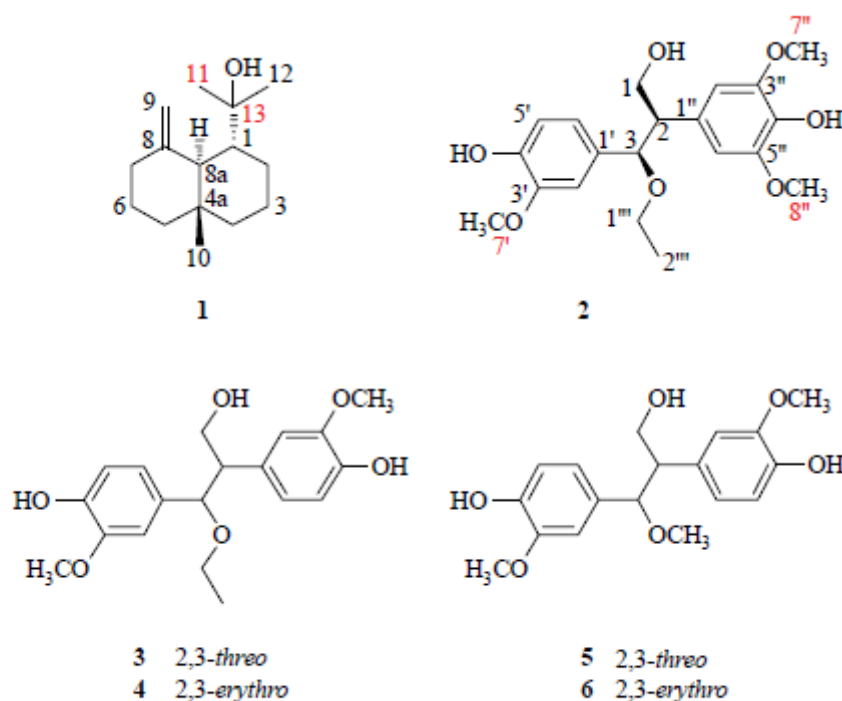
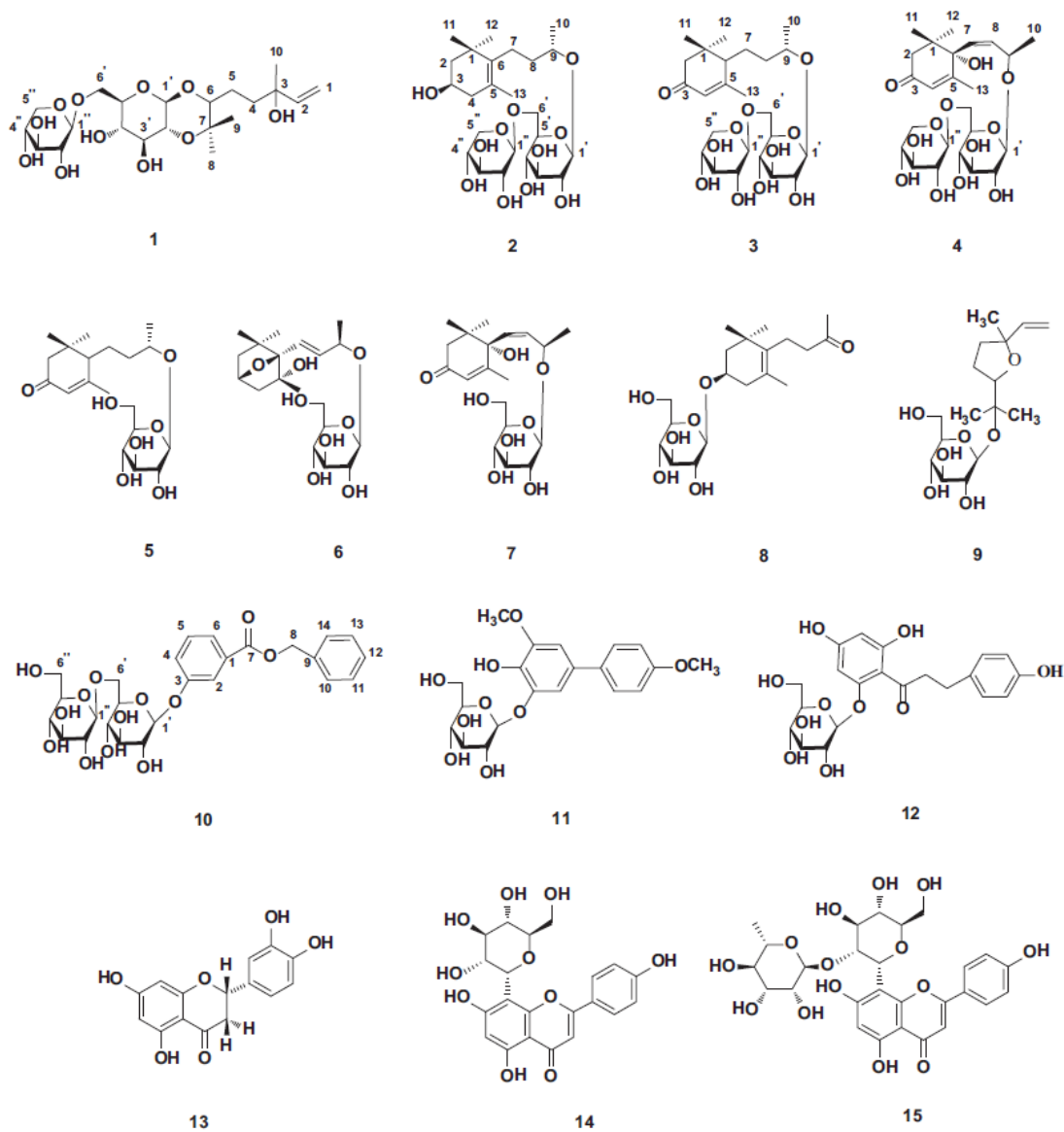


Figure 1. The structures of compounds 1–6.

Zdroj: Zhou *et al.* (2014)

**Obr. 11** Chemické struktury glykosidů v listech hlohu přeroklaného  
(*Crataegus pinnatifida* Bunge)



Zdroj: Li *et al.* (2015)

## 5. Cibule kuchyňská (*Allium cepa* L.)

Cibule kuchyňská (*Allium cepa* L.) je jeden z nejběžnějších druhů zeleniny. Je využívána k potravinářským a kulinárním účelům, ale významné jsou i její léčebné vlastnosti, které jsou známy mnoho set let.

Světová produkce cibule seté se od roku 1999 zvýšila na více než 88 500 000 tun a je tedy druhou nejdůležitější zeleninou z hlediska produkce (na prvním místě jsou rajčata). V České republice je cibule po zelí druhou nejpěstovanější zeleninou s produkcí 43 400 tun za rok 2018 (MZe, 2019).

V souvislosti s nárůstem její výroby a spotřeby je produkováno velké množství odpadu, zejména při zpracování nebo posklizňových úpravách. Tento odpad obsahuje mnoho biologicky aktivních látek s pozitivním dopadem na zdraví člověka a je vhodné jej využít v různých průmyslových odvětvích.

Cibule kuchyňská (*Allium cepa* L.) spadá botanicky do čeledi amarylkovitých (*Amaryllidaceae*), rodu česnek (*Allium*) a vyskytuje se v prakticky na všech světadílech s výjimkou Antarktidy (Griffiths *et al.*, 2002). Jedná se o dvouletou jednoděložnou rostlinu produkující v prvním roce vegetace listy a velkou cibuli. Má kulovitý až mírně zploštělý tvar. Na povrchu jsou slupky různých barev (bílé, bronzové, fialové, hnědožluté, purpurové, růžově červené, stříbrné, žluté). Její vnitřní část (dužnina) může být bílá až modro-červená. Po jarovizaci, způsobené nízkými teplotami během zimy, nastává rychlé obnovení růstu listů, dochází k vytvoření tubulárního stonku. Na jeho vrcholu se tvoří květenství (okolík), kde se nachází i několik set, většinou bílých, kvítků. Jedna rostlina je schopna vyprodukovat až 6 semen (Brewster, 2008; Griffiths *et al.*, 2002). Potravinářský význam mají zejména dvě varianty

- zelené čerstvé výhonky použitelné do různých salátů,
- zralá cibule.

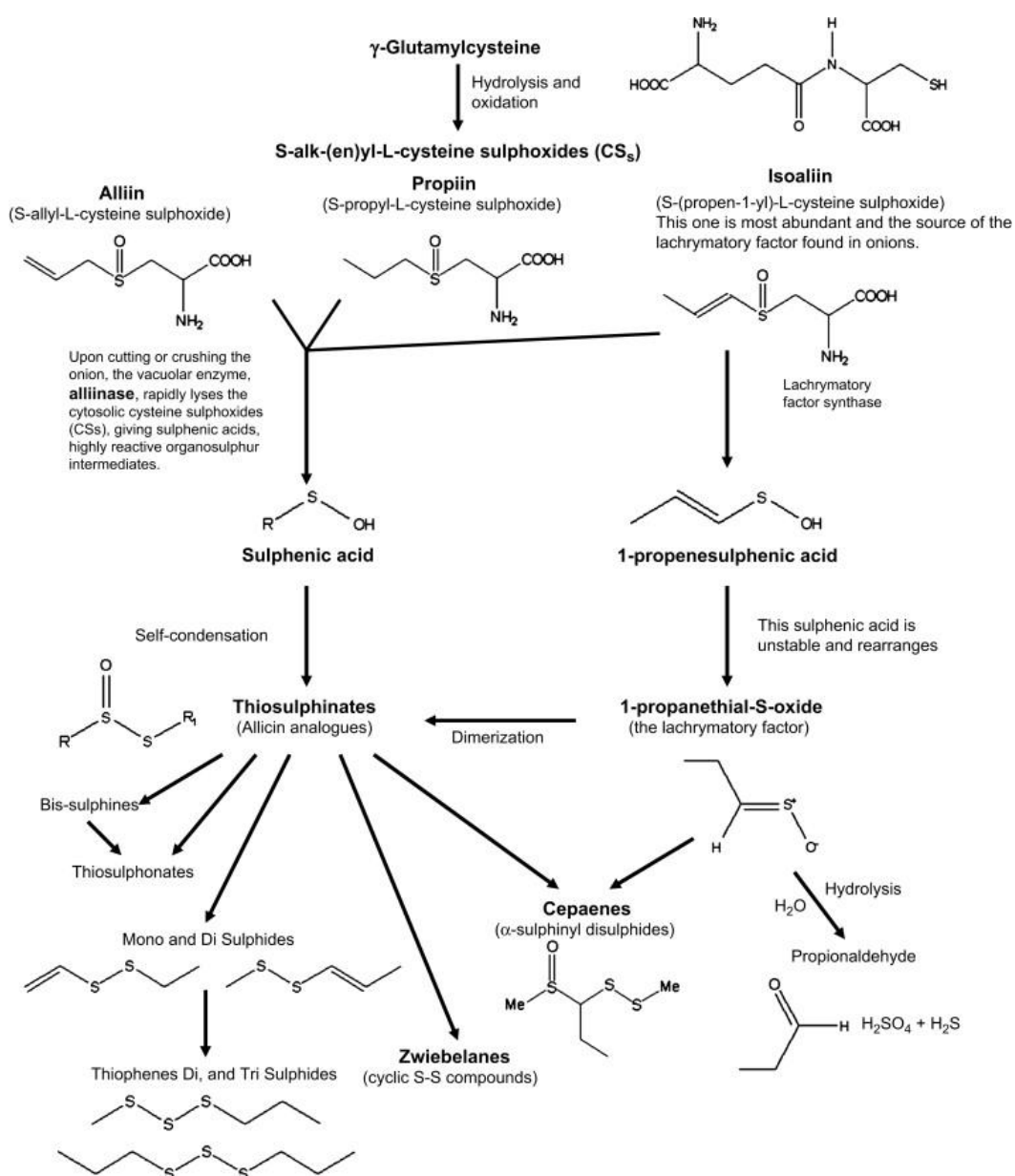
Ta se poté dá konzumovat v pokrmech neupravená i upravená (tepelně, fermentovaná) nebo je vstupní surovinou pro produkci cibulového prášku, který je využíván jako koření přípravek (Brewster, 2008).



## 5.1. Aktivní látky cibule kuchyňské

Cibule má specifickou chuť a aroma. Je to dáno zejména přítomností látek, které jsou při krájení, drcení či kousání rozkládány enzymem alliinázou na celou řadu sírných látek – obrázek 12 (Suleria *et al.*, 2015; Corzo-Martínez *et al.*, 2007; Lanzotti 2006; Griffiths *et al.*, 2002).

**Obr. 12** Struktury sírných sloučenin vznikajících při zpracování cibule kuchyňské



Zdroj: Corzo-Martínez *et al.*, 2007

Největší podíl v čerstvé cibuli má voda (zhruba 89 %) a dále je zde zhruba 9 % sacharidů (Keugsen, 2002). Ty jsou podle Shiomi *et al.* (2005) zastoupeny převážně nestrukturními sacharidy – glukózou, fruktózou, sacharózou a sérií fruktooligosacharidů (FOS) polymerovaných až na 12 jednotek. Z celkového objemu sušiny tvoří tyto sacharidy 65-80 %. V cibuli se dále nachází zhruba 1,7 % vlákniny (Akash *et al.*, 2014), pouze 1,1 % bílkovin (Akash *et al.*, 2014) a 0,1 % tuku (USDA Nutrient Database, 2017), neobsahuje žádný škrob (Ernst a Bufler, 1994). Cibule kuchyňská je také významným zdrojem mikronutrientů – polyfenolů a organických sloučenin síry (tabulka 5).

**Tab. 5** Obsah živin, vitaminů a minerálních látek v cibuli kuchyňské

(*Allium cepa* L.)

Látka	Množství na 100 g	Látka	Množství na 100 g
Voda	89,11 g	Draslík	146,00 mg
Sacharidy	9,34 g	Fosfor	29,00 mg
Vláknina	1,70 g	Vápník	23,00 mg
Bílkoviny	1,10 g	Sodík	4,00 mg
Tuky	0,10 g	Železo	0,21 mg
Vitamin C	7,400 mg	Zinek	0,17 mg
Vitamin B <sub>6</sub>	0,120 mg	Hořčík	0,13 mg
Niacin (vitamin B <sub>3</sub> )	0,116 mg	Vitamin E	0,02 mg
Thiamin (vitamin B <sub>1</sub> )	0,046 mg	Kyselina listová	19,0 μg
Riboflavin (vitamin B <sub>2</sub> )	0,027 mg	Vitamin K	0,4 μg

Zdroj: USDA Nutrient Database (2017)

Flavonoidy jsou v cibuli kuchyňské zastoupeny dvěma hlavními skupinami:

- flavonoly, které způsobují žluté až hnědé zbarvení žlutých odrůd,
- anthokyany, které dávají některým odrůdám modrou, fialovou až červenou barvu (Downes *et al.*, 2009).

Cibule je velmi důležitý zdroj flavonolů v lidské stravě (Sellappan a Akoh, 2002) jedním z nejbohatších zdrojů kvercetinů (Hertog *et al.*, 1992).

Kvercetin a jeho glukosidy – kvercetin-4'-glukosid a kvercetin-3,4'-diglukosid (obrázek 13), které mohou tvořit až 88 % z celkového obsahu kvercetinů

(Rodríguez Galdón *et al.*, 2008), jsou dominantní flavonoly (Roldán-Marín *et al.*, 2009) a tvoří téměř 80 % všech flavonoidů přítomných v cibuli (Bonaccorsi *et al.*, 2008).

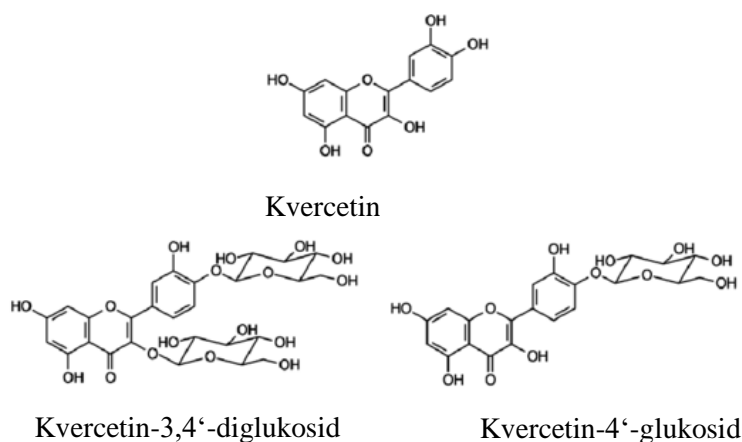
Na obsah glykosidů kvercetinů má podstatný vliv odrůda. V bílých odrůdách byla zjištěna koncentrace glukosidů okolo 7 mg.kg<sup>-1</sup> v sušině, v červených a žlutých odrůdách bylo stanoveno 600-700 mg.kg<sup>-1</sup> glykosidů v sušině (Bonaccorsi *et al.*, 2008).

Kromě celkového kvercetinů se v cibuli vyskytuje například i flavonol (kaempferol) a fenolické látky ze skupiny hydroxybenzoových (gallová a protokatechová) a hydroxyskořicových (ferulová) kyselin. Jejich obsah vzhledem ke kvercetinů je však velmi malý (Prakash *et al.*, 2007).

Mezi dalšími minoritními flavonoidy zastoupenými v cibuli jsou isorhamnetin, isorhamnetin 4'-O-glukosid a rutin (Park a Lee, 1996).

Ly *et al.* (2005) stanovili ve slupkách také méně časté flavonoidy – dimery a trimery kvercetinů s vysokou antioxidační aktivitu.

### Obr. 13 Struktura kvercetinů a jeho glukosidů



Zdroj: Beesk *et al.* (2010)

Červené odrůdy cibule jsou bohaté na anthokyaniny, druhou nejvýznamnější skupinu flavonoidů. Nejvíce jich můžeme nalézt v barevných odrůdách. Jsou to obvykle deriváty kyanidinu. Detekovány byly i minoritní množství peonidinu a dalších anthokyanidinů (Slimestad *et al.*, 2007).

Fossen a Andersen (2003) uvádějí, že v červených odrůdách jsou čtyři hlavní anthokyaniny:

- 3-(3'-glukosyl-6'-malonylglukosid) kyanidin,

- 3-(6-malonylglukosid) kyanidin,
- 3-(3'-glukosylglukosid),
- 3-glukosid kyanidin.

Celkový obsah anthokyanů se liší v závislosti na odrůdě.

Zhang *et al.* (2016) zjistili, že obsah anthokyanidů v odrůdách cibule je následující:

- bílé odrůdy – 0,75 mg anthokyanů na 100 g čerstvé hmotnosti,
- žluté odrůdy – 9,64 mg.100 g<sup>-1</sup>,
- červené odrůdy – 29,99 mg.100 g<sup>-1</sup>.

Cibule je rovněž bohatým zdrojem celkového obsahu polyfenolů (Lachman *et al.*, 2003).

Lee *et al.* (2015) uvádějí, že cibule s vyšším obsahem anthokyanů a kvercetinu mají vyšší antioxidační aktivitu, která s obsahem flavonoidů významně pozitivně koreluje – korelační koeficient pro metodu FRAP až 0,90 (Sharma *et al.*, 2014). Principem je schopnost antioxidantu redukovat trojmocné železo na dvojmocné, tvořící barevný komplex s tripyridyltriazinem, což vyvolá změnu absorbance při 593 nm (Benzie a Strain, 1996).

## 5.2. Složení cibulových odpadů

Odpad ze zpracování cibule se skládá z vnějších šťavnatých vrstev, vrchních a spodních částí cibule, suchých slupek, kořenů a nestandardních cibulí (malé, deformované). Vzhledem k charakteristickému pachu a kvůli rychlému rozvoji fytopatogenů není vhodným krmivem pro zvířata a nehodí se ani ke kompostování (Benítez *et al.*, 2011; Jang *et al.*, 2013). Je však bohatým zdrojem mnoha biologicky aktivních látek: sirných aromatických derivátů cysteinu, vlákniny a flavonoidů (Schieber a Stintzing., 2001), FOS (Jaime *et al.*, 2001), což jsou látky s pozitivním vlivem na lidské zdraví (Kosseva a Webb, 2013). Největší částí odpadu jsou však cibulové slupky, které obsahují zhruba 90 % sušiny (Vojvodić *et al.*, 2016), zatímco v čerstvé cibuli jich je pouze 5-12 % (Keugsen, 2002).

Sušinu slupek (obrázek 14) tvoří z valné části strukturní sacharidy, respektive vláknina – 65-75 % hmotnosti (Benítez *et al.*, 2011; Jaime *et al.*, 2002).

Celková vláknina se dělí podle rozpustnosti ve vodě na dvě skupiny:

- rozpustná vláknina (např. pektiny),
- nerozpustná vláknina (např. celulóza a lignin (Mudgil a Barak, 2013).

Poměr mezi rozpustnou a nerozpustnou vlákninou leží v rozmezí 1:8 až 1:14 a závisí na odrůdě (Benítez *et al.*, 2011).

**Obr. 14** Odpad z cibule kuchyňské – slupky



Zdroj: Bedrníček, 2018

Nejbohatším zdrojem flavonolů ( $2,5-6,5 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) jsou cibulové slupky (Slimestad *et al.*, 2007), z nichž je nejdominantnější celkový kvercetin. Ve slupkách se nalézá převážně ve formě aglykonu, což je dáno přítomností glukosidáz, nalézajících se z valné části na přechodu mezi suchými vrstvami (slupkami) a vrstvami s vysokým obsahem vody, kterou je pro činnost těchto enzymů důležitá (Wiczowski *et al.*, 2008; Takahama a Hirota, 2000).

Koncentrace volného a vázaného kvercetinu klesá od vnějších vrstev směrem dovnitř a jeho nejnižší koncentraci lze nalézt v jádře cibule (Albishi *et al.*, 2013). Různí autoři uvádějí hodnoty koncentrace celkového kvercetinu v sušině od  $3,386 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  (Grzelak *et al.*, 2009) do  $8,3 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  (Nuutila *et al.* (2003).

Ve slupkách červené cibule se nalézá též velké množství anthokyanů, více než v celé cibuli – až  $0,219 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  sušiny (Donner *et al.*, 1997).

V cibulových slupkách se vůbec nevyskytují FOS a jsou zde pouze stopová množství organických sloučenin síry (Benítez *et al.*, 2011).

### 5.3. Význam aktivních látek cibule kuchyňské pro lidský organizmus

V cibulovém odpadu (s výjimkou slupek) se nalézá velké množství biologicky aktivních látek. Nejdůležitější a nejvíce zastoupené jsou FOS, flavonoidy a organické sloučeniny síry. Díky svým funkčním vlastnostem mají blahodárný vliv na lidské zdraví. Byl prokázán pozitivní vliv na kardiovaskulární choroby, rakovinu, astma, *diabetes melitus*, neurodegenerativní poruchy, osteoporózu a některé další (Bisen a Emerald, 2016; Galeone *et al.*, 2006). Dosud však nebylo prokázáno, zda tyto látky mají stejné účinky jako komplex všech látek, které se v cibuli nacházejí. Některé studie uvádějí, že pozitivní působení ovoce a zeleniny na kardiovaskulární systém a antikarcinogenní vlastnosti závisí na synergických vztazích jednotlivých složek (Liu, 2003).

- **Flavonoidy**

Zde jde především o kvercetin a jeho deriváty, tedy látky, mající výrazný ochranný vliv proti alergiím, artritidě, astmatu, *diabetes melitus*, dně, neurodegenerativním poruchám, osteoporóze a rakovině (Ren *et al.*, 2017).

Extrakty z vnějších slupek cibule mají schopnost zhášet volné radikály *in vitro*. Funkčnost *in vivo* těchto částí cibule jsou však stále poměrně nejasné (Fiedor a Burda, 2014; Singh *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2007). K posunu v této oblasti je nejdůležitější prokázat *in vivo* absorpci této látky v zažívacím traktu a popřípadě specifikovat i její formu (Griffiths *et al.*, 2002).

Současné výsledky výzkumů poukazují na lepší biodostupnost kvercetinu a jeho glukosidů z přírodních zdrojů (například smažená cibule, kapsle s extrakty cibulových slupek, müsli tyčinky obohacené extrakty cibulových slupek) v porovnání s kapslemi dihydrátu kvercetinu, používanému v komerčně dostupných potravinových doplňcích (Burak *et al.*, 2017; Egert *et al.*, 2012; Hollman *et al.*, 1995).

Jan *et al.* (2010) ve své práci uvádějí, že současné poznatky o působení kvercetinu naznačují jeho působení jakožto antioxidantu pro zlepšení přežívání normálních buněk a rovněž jako prooxidačního činidla indukujícího apoptózu rakovinných buněk, případně, podle Kim *et al.* (2014), účinně zabraňujícího inhibici mezibuněčné komunikace vyvolané peroxidem vodíku, což je proces silně spjatý s počátkem karcinogeneze či chránícího kardiovaskulární systém (Brüll *et al.*, 2015).

Některé práce však označují kvercetin jako toxický až karcinogen v *in vivo* a *in vitro* experimentech na myších a bakteriálních kulturách (Dunnick a Hailey, 1992; Pamukcu *et al.*, 1980; Bjeldanes a Chang, 1977).

Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) vydala roku 1999 zprávu o karcinogenitě kvercetinu. Jejím výstupem je: „neklasifikovatelný, pokud jde o karcinogenitu pro člověka“ (skupina 3) s tím, že neexistují žádná data, která by nasvědčovala o jeho karcinogenních účincích pro člověka (IARC, 1999). To potvrzují i další autoři (Harwood *et al.*, 2007; Okamoto, 2005), kteří tvrdí, že bezpečnost kvercetinu je prokázána a pro člověka nepředstavuje při běžných dávkách žádné nepříznivé účinky.

- **Vláknina a FOS**

Cibulové slupky jsou též bohaté na vlákninu tvořící 65-75 % hmotnosti (Benítez *et al.*, 2011; Jaime *et al.*, 2002). V krvi myší, které byly krmeny potravou s vysokým obsahem tuku a cholesterolu, bylo, po přidavku cibulové vlákniny z cibulových odpadů, prokázáno signifikantní snížení celkových sérových lipidů a zvýšení HDL-C (Benítez *et al.*, 2012). Momentálně však není v literatuře mnoho zmínek o *in vivo* experimentech, zabývajících se účinky cibulové vlákniny z odpadních produktů.

Po vstupu do zažívacího traktu putují FOS do tlustého střeva, kde jsou fermentovány na kyselinu mléčnou a mastné kyseliny s krátkým řetězcem (octová, propionová, máselná). Jsou schopny stimulovat růst bifidobakterií a současně inhibovat růst některých jiných bakterií, například *Clostridium perfringens* (Bornet *et al.*, 2002).

Byl též prokázán pozitivní vliv FOS na vstřebávání minerálů (zinku a vápníku), metabolismus lipidů (snižuje sérové lipidy, cholesterol a riziko vzniku diabetes a obezity) a snížení rizika vzniku rakoviny (Sabater-Molina *et al.*, 2009).

- **Organosírné sloučeniny**

Organosírné sloučeniny cibule vykazují silné antikarcinogenní účinky. Je to dáno nejspíše tím, že tyto látky jsou aktivátory detoxikačních enzymů, které mohou rakovinotvorné látky odstranit z organismu (Suleria *et al.*, 2015).

Mají též pozitivní vliv na kardiovaskulární systém. Zabraňují srážení krevních destiček a zabraňují tak vzniku tromboembolické nemoci (Osmont *et al.*, 2003).

#### **5.4. Využití cibulových odpadů v potravinářské výrobě**

Odpady, vznikající při zpracování potravin rostlinného původu, jsou zajímavým zdrojem surovin, poskytujících biologicky a technologicky významné sekundární metabolity (Schieber *et al.*, 2001).

Podle Jang *et al.* (2013) je pro získávání kvercetinu z rostlinných zdrojů nejdůležitější extrakce, která rozhoduje o efektivitě celého procesu. K dispozici existuje celá řada postupů pro tuto extrakci lišících se pouze svou efektivitou. Důležitý je typ použitého extrakčního činidla a zvolený postup. Lze použít vodu, metanol, etanol, subkritickou vodu, ultrazvuk a biomagnetickou extrakci (Nile *et al.*, 2017; Choi *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2014; González-Sáiz *et al.*, 2008).

Vzhledem ke vztahu k životnímu prostředí je nejjednodušší použít vodu. Ta je však za běžných podmínek pro extrakci kvercetinu příliš polární, a proto se používají vysoké teploty (100-374 °C) a tlaky, kdy voda přechází do tzv. subkritického stavu, což jí dává specifické extrakční vlastnosti (Turner *et al.*, 2006).

Způsob, jak využít cibulové odřezky nebo nevhodné cibule (deformované, malé) je vyrobit z nich vlákninové koncentráty. Cibule jsou rozmixovány, je z nich vylisována šťáva a pevná složka, zbylá po vylisování, je tepelně upravena, aby se zabránilo mikrobiálnímu znehodnocení. Na závěr jsou etanolem extrahovány rozpustné látky. Získá se vlákninový koncentrát v podobě bílého prášku. Ten lze použít například k obohacování potravin vlákninou za účelem zvyšování jejího příjmu (Benítez *et al.*, 2017).



Z nestandardních cibulí je možno vyrábět cibulový ocet (Horiuchi *et al.*, 1999) s vysokým obsahem organických kyselin (aminokyselin a karboxylových kyselin) a nízkou koncentrací sodíku (významná v prevenci proti hypertenzi). Je nutno vyřešit mírně nižší obsah cukrů v cibuli a přítomnost antimikrobiálně působících sírných sloučenin, aby bylo možno iniciovat a správně vést kvasný proces. Ocet lze rovněž obohatit cibulovými slupkami v množství 0,5 % hmotnosti pro zvýšení obsahu celkového kvercetinu (Cheun *et al.*, 2005).

Přítomnost thiosulfinátů a flavonoidů v cibulových slupkách jim, kromě jejich antioxidačních vlastností, dává i vlastnosti antimikrobiální. Proti extraktům z jedlých částí cibule vykazují extrakty z cibulových slupek mnohem větší antimikrobiální schopnosti a velmi silně inhibují růst bakterií *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, ale nejsou příliš účinné proti *Staphylococcus aureus*. Lze je použít jako antimikrobiální činidlo v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu (Kim *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011; Santas *et al.*, 2010; Škerget *et al.*, 2009).

Přídavek dvou procent etanolového extraktu z cibulových slupek na kořeněná kuřecí prsa dokázal během skladování výrazně redukovat celkový počet mikroorganismů a rovněž zpomalit pokles pH během skladování. Měl však negativní vliv na senzorycké vlastnosti (Alahakoon *et al.*, 2013).

Opačné výsledky přinesl pokus Tanga a Cronina (2007). Ti přidávali do krůtího masa cibulovou šťávu, což podle panelu hodnotitelů, mělo pozitivní dopad na výsledné senzorycké vlastnosti.

Shim *et al.* (2012) použili extrakty ze slupek do mletého vepřového masa. V průběhu 16denního skladování zjistili, že ve vakuově baleném syrovém mase došlo proti kontrole ke zvýšení hodnoty pH (nejspíš potlačením růstu bakterií mléčného kvašení) a ke snížení hodnoty peroxidového čísla a TBARS (thiobarbituric acid reactive substances), což nasvědčuje zpomalení oxidace lipidů. Přídavek 1,6 % až 3 % cibulového prášku před tepelnou úpravou kuřecího masa snížil (po jeho skladování po dobu 6 dnů ve vakuu) 6-36násobně hodnoty TBARS. Totéž potvrdil i Karastogiannidou (1999).

Gawlik-Dziki *et al.* (2013) zkoumali pšeničný chléb, ve kterém nahradili pšeničnou mouku 1-5 % jemně namletých cibulových slupek. Obohacený chléb vykazoval oproti kontrolnímu vzorku vyšší antioxidační aktivitu. Rovněž senzorycké vlastnosti byly, až do přídavku 3 %, hodnoceny jako uspokojivé. Fenolické látky

mohou díky svým vzájemným interakcím snižovat stravitelnost proteinů. Nelze však podle nich vyloučit využití cibulových slupek jako potravinářského aditiva, ochraňujícího zažívací trakt před rakovinou.

V současné době není v literatuře mnoho informací o vlivu přídavku cibule nebo jejích slupek na sensorické vlastnosti. Zmínění autoři, kteří prováděli pokusy s masem a chleby, dospěli k závěrům, že extrakty z cibule a slupek z cibule jsou vhodnou náhradou za syntetické antioxidanty.

## 6. Stanovení vybraných antioxidantů

### 6.1. Příprava džemu z plodů hlohu peřenoklaného

Džem byl vyroben z plodů hlohu peřenoklaného *Crataegus pinnatifida* B., (Ing. Karel Tůma, Chelčice, Jihočeský kraj, ČR) v roce 2016. Výroba (tabulka 6) probíhala za vakua na zařízení BM50T (FRIGOJOLINOX, Campobaso, Itálie) z důvodu nižší degradace účinných látek teplem (Chang *et al.*, 2006). Hotový produkt byl po plnění do skleněných obalů, předehřátých na 70 °C, ihned uzavřen víčkem Twist-Off a zchlazen při teplotě 20 °C v sušárně UF55m TWINDISPLAY (MEMMERT, Büchenbach, Německo). Hotové vzorky byly skladovány při pokojové teplotě 23 °C ve tmě po dobu 14 dnů. Poté byly použity na analýzu antioxidační aktivity, LC/MS analýzu a cross-over studii.

**Tab. 6** Výrobní postup džemu z hlohu peřenoklaného – suroviny a technologické parametry

Suroviny	Množství (%)
Hloh peřenoklaný – vypeckované plody	22,10
Pitná voda	33,10
Cukr řepný bílý	44,20
Citronová šťáva	0,60

Technologické parametry	
Cukernatost finální	60 °Brix
Pasterační teplota	65 °C
Prodleva pasterační teploty	7,5 min.
Teplota džemu při plnění	min. 60 °C
Teplota džemu po zchlazení	20 °C
Teplota skladování	23 °C

## 6.2. Příprava bezlepkových chlebů

Jako zdroj antioxidantů byly zvoleny cibulové slupky (*Allium cepa* L., odrůda Lisa, VITAL Czech, s.r.o., ČR), které jsou rovněž velmi obtížně využitelným odpadem při zpracování. Po přetřídění a vyčištění byly propláchnuty pitnou vodou, sušeny při 40 °C do konstantní hmotnosti a namlety na kulovém mlýnu Retsch MM 400 (Retsch, Německo) na částice menší než 0,25 mm.

Kontrolní vzorek bezlepkového chleba (BCH) a vzorek bezlepkového chleba s práškem z cibulových slupek (BCHS) byly vyrobeny podle receptur (tabulka 7) v domácí pekárně Duplica Vital Plus (ETA, Hlinsko, ČR). Výrobní postup spočíval v míchání a kynutí těsta a následném pečení při teplotě 180 °C po dobu 60 minut. Upečené chleby byly vyjmuty z forem a ponechány k vychladnutí při pokojové teplotě (23 °C) po dobu 24 hodin. Vzorky pro chemické analýzy byly odkrojeny, lyofilizovány a skladovány při 4 °C. Čerstvé vzorky po vychladnutí byly použity pro cross-over studii. V rámci chemických analýz byly provedeny testy na antioxidační aktivitu (metody DPPH, FRAP), obsah celkových polyfenolů a stanovení jednotlivých flavonoidů pomocí HPLC-MS/MS.

**Tab. 7** Receptury chlebů pro analýzy vlivu přídavku prášku z cibulových slupek do těsta (kontrolní a testovaný vzorek)

Surovina	Množství (%) v BCH	Množství (%) v BHS
Pohanková mouka	24,70	23,47
Kukuřičná mouka	17,60	16,72
Rýžová mouky	14,10	13,39
Lněná mouka	12,00	11,40
Cibulové slupky	0,00	3,42
Pitná voda	29,20	29,20
Olej rostlinný	1,40	1,40
Kvasnice	1,00	1,00

### **6.3. Schéma pokusu měření *in vivo* antioxidační aktivity a volných radikálů v krvi**

#### **6.3.1. Džem z plodů hlohu peřenoklaného**

Cílem experimentu bylo zjistit, zda může konzumace džemu z hlohu peřenoklaného (DHP), vyrobeného vakuovou pasterací, zvýšit *in vivo* antioxidační aktivitu a snížit obsah volných radikálů v krvi. Pokus byl proveden za účasti 18 dobrovolníků (7 mužů, 11 žen), studentů Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (věk  $23 \pm 2$  roky a váha  $60,5 \pm 5,27$  kg). Všichni byli seznámeni s průběhem pokusu a byl od nich získán podepsaný informovaný souhlas s jejich účastí a s průběhem pokusu. Před vlastním odběrem kapilární krve dobrovolníci nekonzumovali potraviny, bohaté na antioxidanty (zejména ovoce, zelenina, čaj, džusy apod.) po dobu 24 hodin.

Průběh pokusu byl rozložen do 3 dnů, každý den byly zpracovány údaje od 6 osob. Dobrovolníci se dostavili k odběru krve na lačno (12 hodin před odběrem nesměli nic jíst) vždy ve stanoveném čase. Bezprostředně po prvním odběru jim byl podán testovaný vzorek:

- 80 g DHP,
- 106 g bílého pečiva (rohlík tukový) jako nosič vzorku,
- 200 ml pitné vody na zapití.

Odběr kapilární krve (50  $\mu$ l pro stanovení FORD – Free Oxygen Radical Defense – antioxidační aktivita krve) a 20  $\mu$ l pro FORT (Free Oxygen Radical Test – množství volných radikálů v krvi) probíhal z posledních článků prstů na ruce. Na základě studií (Ottaviani *et al.*, 2012; Serra *et al.*, 2010; Richelle *et al.*, 1999), kde bylo zjištěno, že nejvyšší koncentrace flavan-3-olů v krvi bývá dosahována v čase +60 až +120 minut po konzumaci vzorku, byl stanoven čas +90 minut od zkonsumování vzorku. Poté byla každému dobrovolníkovi odebrána krev ve stejném objemu a byly opět provedeny výše uvedené analýzy.

#### **6.3.2. Bezlepkový chléb obohacený práškem z cibulových slupek**

Cílem tohoto pokusu bylo ověřit, zda, a případně jak, ovlivňuje konzumace bezlepkového chleba, obohaceného surovinou s antioxidační aktivitou (prášek

z cibulových slupek) *in vivo*, antioxidační aktivitu a obsah volných radikálů v krvi konzumentů. Experiment byl nastaven jako randomizovaný cross-over s jednodenní wash-out periodou (tabulka 8) s účastí 14 dobrovolníků, studentů a zaměstnanců Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (průměrný věk  $26 \pm 5$  let a váha  $61.5 \pm 9.27$  kg), kteří podepsali informovaný souhlas s jeho průběhem a byli rozděleni do 2 skupin – A a B. Všichni byli upozorněni, aby 24 hodin před zahájením experimentu a v celém jeho průběhu nekonzumovali potraviny bohaté na antioxidanty (např. ovoce, zeleninu, čaj, džusy a podobně).

Odběry (50  $\mu$ l pro stanovení FORD a 20  $\mu$ l pro FORT) proběhly vždy ráno po 12hodinovém lačnění. Hmotnost vzorků, které následně konzumovali, byla stanovena na 200 g kontrolního respektive obohaceného chleba + 200 ml pitné vody na zapití (Bojňanská *et al.*, 2009). Po 90 minutách od zkonsumování jim byla opět odebrána krev (Kashino *et al.*, 2015).

**Tab. 8** Schéma cross-over studie s jednodenní wash-out periodou pro stanovení antioxidační aktivity a obsahu volných radikálů v krvi – bezlepkový chléb s přidavkem prášku z cibulových slupek

Skupina A			Skupina B		
Den 1	Den 2	Den 3	Den 1	Den 2	Den 3
Kontrolní vzorek	---	Vzorek s cibulovými slupkami	Vzorek s cibulovými slupkami	---	Kontrolní vzorek

## 6.4. Chemické analýzy

### 6.4.1. Stanovení pomocí HPLC-MS/MS

- **Extrakce vzorků džemu z hlohu peřenoklaného**

Bylo odebráno 5 g vzorku a smícháno v hmoždíři s malým množstvím metanolu po dobu 1 až 2 minut. Směs byla následně převedena do 50ml odměrné baňky a doplněna po rysku metanolem. Po 15minutové extrakci v ultrazvukové lázni

byl alikvotní podíl převeden do centrifugační zkumavky a odstředěn (3 000 min<sup>-1</sup> po dobu 5 minut). Vzorky byly skladovány při -20 °C (Wicklund *et al.*, 2005).

- **Extrakce vzorků bezlepkových chlebů**

Ze vzorku lyofilizovaného chleba, extrahovaného v 5 ml metanolu, byl odvážen 1 g do centrifugační zkumavky a 15 minut extrahován v ultrazvukové lázni. Následovalo odstředění při 3 000 min<sup>-1</sup> po dobu 15 min.

#### 6.4.2. Nastavení HPLC-MS/MS

Vzhledem k rozdílnosti stanovovaných látek byly pro jejich stanovení v džemu a bezlepkových chlebech použity dva různé separační gradienty a následným kvalitativním vyhodnocením pomocí hmotnostního spektrometru.

- **Nastavení pro DHP**

Polyfenolické látky v DHP byly stanoveny na systému HPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) a hmotnostním spektrometru (MS) Agilent 6420 QqQ (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornie, USA) – tabulky 9 a 10.

**Tab. 9** MS/MS hodnoty použité při kvantifikaci látek v džemu z hlohu peřenoklaného

Látka	Parametr*			
	Kvantifikační přechod	Fragmentor (V)	Kolizní energie (eV)	Polarita
Chlorogenová kys.	353 → 191	110	15	negativní
(-)-epikatechin	289 → 245	150	10	negativní
Procyanidin B2	577 → 289	140	12	negativní
Hyperosid	463 → 301	170	25	negativní
Isokvercitrin	463 → 301	160	15	negativní

\* konkrétní hodnoty přechodů, fragmentoru a kolizní energie byly optimalizovány pro získání co nejvyšší odezvy.

**Tab. 10** Parametry HPLC a MS systému pro analýzu polyfenolů v džemu z hlohu peřenoklaného

<b>Nastavení HPLC</b>			
Analytická kolona	Phenomenex Kinetex (C18; 2,6 $\mu\text{m}$ ; 150 x 2,1 mm) s předkolonou Security Guard ULTRA (Phenomenex)		
Teplota kolony	35 °C		
Objem nástřiku	5 $\mu\text{l}$		
Mobilní fáze	A = 5% acetonitril + 0,5% kyselina mravenčí B = 100% acetonitril		
Doba analýzy	30 minut		
Průtok mobilní fáze	0,2 ml.min <sup>-1</sup>		
Gradient	Čas (min)	% A	% B
	0	95	5
	25	83	17
	30	95	5
	10 min ekvibrace kolony		
<b>Nastavení MS</b>			
Iontový zdroj	Elektrosprej (ESI negative)		
Napětí kapiláry	-4000 V		
Sušící plyn	Dusík		
Průtok sušícího plynu	10 l.min <sup>-1</sup>		
Teplota sušícího plynu	300 °C		
Tlak nebulizéru	35 psi		
Delta EMV	200		
Dwell time	500 pro všechny látky		
	Akcelerační napětí kolizní cely 7 V pro všechny látky		

Pro kvantifikaci vybraných látek byla sestrojena 6 bodová kalibrační křivka v rozsahu od 0,1 do 20  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ .

- **Nastavení pro bezlepkové chleby**

Polyfenolické látky v bezlepkových chlebech byly stanoveny na systému HPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts,



USA) a hmotnostním spektrometru (MS) Agilent 6420 QqQ (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornie, USA). Parametry jednotlivých stanovení jsou uvedeny v tabulkách 11 a 12.

**Tab. 11** Parametry HPLC a MS systému pro analýzu polyfenolů v bezpečkových chlebech

<b>Nastavení HPLC</b>			
Analytická kolona	Phenomenex Kinetex (C18; 2,6 $\mu$ m; 150 x 2,1 mm) s předkolonou Security Guard ULTRA (Phenomenex)		
Teplota kolony	35 °C		
Objem nástřiku	5 $\mu$ l		
Mobilní fáze	A = 5% acetonitril + 0,5% kyselina mravenčí B = 100% acetonitril		
Doba analýzy	20 minut		
Průtok mobilní fáze	0,2 ml.min <sup>-1</sup>		
Gradient	Čas (min)	% A	% B
	0	85	15
	20	30	70
	25	85	15
	10 min ekvilibrace kolony		
<b>Nastavení MS</b>			
Iontový zdroj	Elektrosprej (ESI negative)		
Napětí kapiláry	-4000 V		
Sušící plyn	Dusík		
Průtok sušícího plynu	11 l.min <sup>-1</sup>		
Teplota sušícího plynu	300 °C		
Tlak nebulizéru	35 psi		
Delta EMV	200		
Dwell time	200 pro všechny látky		
	Akcelerační napětí kolizní cely 7 V pro všechny látky		

**Tab. 12** MS/MS hodnoty použité při kvantifikaci látek v bezpečkových chlebech

Látka	Parametr*			
	Kvantifikační přechod	Fragmentor (V)	Kolizní energie (eV)	Polarita
Kvercetin-3,4'-diglukosid	625 → 463	100	10	negativní
Rutin	609 → 300	200	30	negativní
Kvercetin-4-monoglukosid	463 → 301	100	10	negativní
Kvercetin	301 → 151	130	20	negativní

\* konkrétní hodnoty přechodů, fragmentoru, a kolizní energie byly optimalizovány pro získání co nejvyšší odezvy.

Pro kvantifikaci vybraných látek byla sestrojena 6 bodová kalibrační křivka v rozsahu od 0,1 do 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

## 6.5. Spektrofotometrické metody – antioxidační aktivita

### • Extrakce

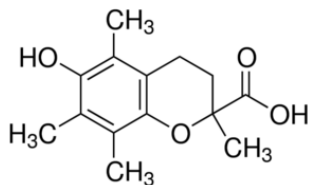
Nejprve bylo 0,2 g lyofilizovaného namletého vzorku bezpečkového chleba smíšeno s 9,8 ml směsi metanolu a vody (poměr 90:10 obj.) a následně extrahováno v laboratorní třepačce po dobu 10 minut. Následovalo odstředění při 7000  $\text{min}^{-1}$  a době 15 minut. Stanovení antioxidační aktivity metodami DPPH a FRAP proběhlo neprodleně po centrifugaci.

### • DPPH

Antioxidační aktivita metodou DPPH byla provedena podle Brand-Williams *et al.* (1995) s malými úpravami. Do 4 ml metanolového roztoku DPPH (27,5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) bylo přidáno 0,1 ml extraktu. Směs vzorku a DPPH byla skladována při pokojové teplotě (23 °C) bez přístupu světla po dobu 2 hodin. Poté byla měřena absorbance při 515 nm proti blanku (metanol). Výsledky jsou vyjádřeny jako Trolox

ekvivalenty ( $\text{TE.g}^{-1}$ ). Trolox je obchodní název ve vodě rozpustného analogu vitamínu E –  $\alpha$ -tokoferolu (obrázek 15).

**Obr. 15** Trolox – 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina



Zdroj: Velíšek a Hajšlová, 2009

- **FRAP**

Mírně upravená metoda dle Dudonné *et al.* (2009) byla použita na měření antioxidační aktivity metodou FRAP. K 4 ml roztoku FRAP, připraveného ze směsi 100 ml 300 mM acetátového pufru (pH 3,6) s 10 ml 10 mM TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazin) rozpuštěného v 40 mM kyselině chlorovodíkové a 10 ml 10 mM chloridu železitého, bylo přidáno 0,1 ml extraktu vzorku a směs byla inkubována 30 minut při 37 °C. Poté byla měřena absorbance při 593 nm. Jako blank sloužil acetátový pufr. Výsledky jsou vyjádřeny jako  $\text{TE.g}^{-1}$ .

- **Celkové polyfenoly**

Metoda stanovení celkových polyfenolů byla provedena dle Lachmana *et al.* (1998). Nejprve bylo 5 g lyofilizovaného mletého vzorku extrahováno ve 100 ml 80% etanolu po dobu 120 minut pod zpětným chladičem. Alikvótní podíl extraktu (1 ml) byl filtrován a převeden do 50ml odměrné baňky, do které bylo, spolu s 10 ml deionizované vody, přidáno 2,5 ml Folin-Ciocalteuova činidla a 7,5 ml 20% uhličitanu sodného. Po promíchání a doplnění po rysku deionizovanou vodou byla směs ponechána 120 minut při pokojové teplotě (23 °C) reagovat. Poté byla změřena absorbance při 765 nm. Výsledky jsou uvedeny jako ekvivalenty kyseliny galové ( $\text{GAE.g}^{-1}$ ).

## 6.6. Stanovení *in vivo* antioxidační aktivity a obsahu volných radikálů v krvi konzumentů

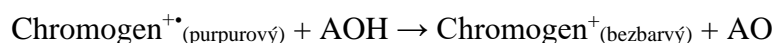
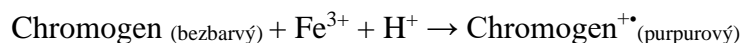
Dobrovolníkům byla odebrána kapilární krev (50  $\mu$ l pro FORD a 20  $\mu$ l pro FORT analýzu) z posledního článku prstu a bylo provedeno *in vivo* měření pomocí přístroje Callegari CR3000 (Callegari SpA, Catellani Group, Parma, Itálie). Kapilární krev byla po odběru smíšena s originálními roztoky, centrifugována a spektrofotometricky měřena.

### • Metoda FORD

Rychlá, jednoduchá a neselektivní metoda pro měření volných radikálů v krvi, která byla použita v několika studiích (např. Lorgis *et al.*, 2010). Antioxidanty přijaté z potravy neutralizují volné radikály produkované během fyziologických procesů nebo získané z exogenních zdrojů (Harasym a Oledzki, 2014).

Využívá stabilní zbarvený radikál, jehož absorbance při 505 nm je v přítomnosti kyselého pufru (pH = 5,2) a vhodného oxidantu ( $\text{FeCl}_3$ ) chromogen (který obsahuje 4-amino-N,N-diethylanilin sulfát) nepřímo úměrná koncentraci antioxidantů v krvi, neboť vytváří stabilní a barevný kation-radikál. Antioxidant (AOH/AO) ve vzorku (krvi) redukuje kationtový radikál chromogenu, čímž ho odbarvuje, což je přímo úměrné koncentraci antioxidantu. Výsledky testu jsou vyjádřeny jako mmol  $\text{TE}\cdot\text{l}^{-1}$  krve.

Reakce probíhá dle následujících rovnic:

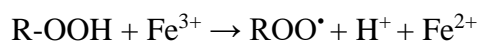
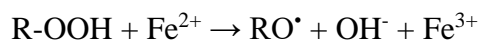


### • Metoda FORT

Jedná se o kolorimetrický test založený na schopnosti přechodných kovů (například železa) katalyzovat za přítomnosti hydroperoxidů (ROOH) vytváření volných radikálů, které jsou poté zhaseny pomocí amino-derivátu  $\text{CrNH}_2$ . Amin reaguje s volnými radikály, které produkují barevný a poměrně dlouho stabilní

kation-radikál, detekovatelný při 505 nm. Intenzita zbarvení přímo úměrně koreluje s množstvím radikálů v krvi. Výsledky jsou vyjádřeny jako mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eq. .l<sup>-1</sup> krve.

Reakce probíhá podle rovnic:



## 6.7. Statistická analýza

Všechny hodnoty jsou prezentovány jako průměr ± směrodatná odchylka. Počet opakování je uveden vždy pod grafem nebo tabulkou.

Studentův-t test pro závislé vzorky byl použit pro vyhodnocení výsledků získaných při měření antioxidační aktivity krve a volných radikálů v krvi dobrovolníků po konzumaci hlohového džemu.

Studentův t-test pro nezávislé vzorky byl použit při posuzování výsledků získaných z analýz DPPH, FRAP a HPLC-MS/MS.

Jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA) s Tukeyovým HSD-testem pro opakovaná měření byla použita na porovnání rozdílů získaných z měření antioxidační aktivity krve a volných radikálů v krvi dobrovolníků po konzumaci bezlepkových chlebů.

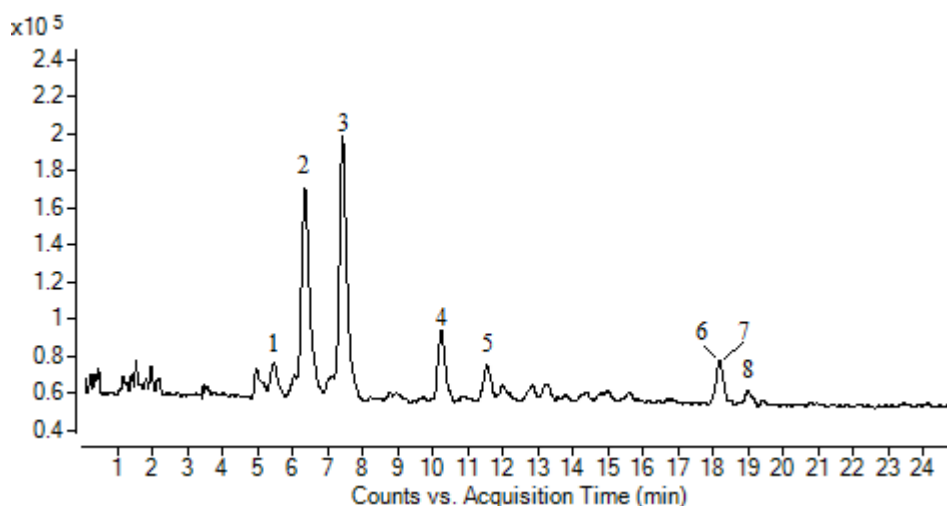
## 7. Polyfenoly v džemu z plodů hlohu peřenoklaného

Sledované látky se nacházejí v různých částech rostliny (Janick a Paull, 2008). V plodech, ze kterých byly vyrobeny vzorky džemu, se nachází zejména proanthokyanidy, (-)-epikatechin a chlorogenová kyselina (Spilková, 1995). Kromě těchto látek byl zjišťován obsah hyperosidu a isokvercitrinu (obrázek 16). Stanovované látky jsou popsány v tabulce 13.

**Tab. 13** Retenční časy a hmotnostní spektra látek vybraných látek v džemu z hlohu peřenoklaného

Pík č.	Látka	Retenční čas (min)	ESI negativ [M-H] <sup>-</sup> (m/z)	
			Molekulární iont	Fragmentové ionty (MS <sup>2</sup> )
1	Chlorogenová kyselina	5,54	353	191, 179, 173, 135
2	Prokyanidin B2	6,49	577	559, 451, 425, 407, 289, 245, 125
3	(-)-epikatechin	7,5	289	271, 245, 205, 137, 109
4	Prokyanidin trimer	10,31	865	739, 713, 577, 451, 287
5	Prokyanidin tetramer	11,62	1153	577
6	Prokyanidin dimer	18,24	577	451, 425, 407, 289, 245, 125
7	Hyperosid	18,24	463	301
8	Isokvercitrin	19,1	463	301

**Obr. 16** Reprezentativní chromatogram (full scan) extraktu hlohového džemu



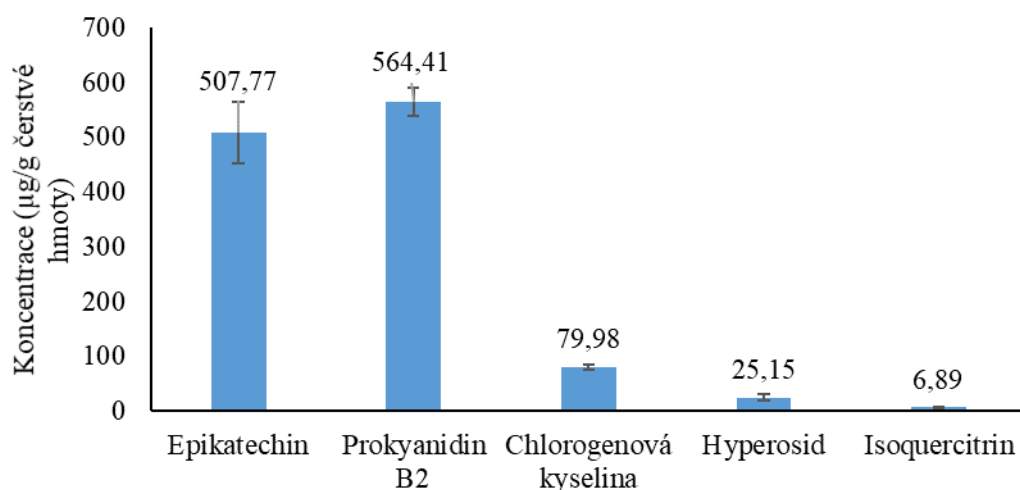
### 7.1. Obsah vybraných polyfenolů v džemu z plodů hlohu peřenoklaného

V DHP, jehož základní surovina byla pěstována v České republice, byly sledovány obsahy prokyanidinu B2, (-)-epikatechinu, chlorogenové kyseliny, hyperosidu a isokvercitrinu. Jedná se o látky, které mají významný pozitivní vliv na různá onemocnění a zdravotní stav konzumentů – hladinu cholesterolu a poškození jater (Han *et al.*, 2016), aterosklerózu (Zhang *et al.*, 2013), neurodegenerativní onemocnění (Chang *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2013).

Jak vyplývá z grafu 1, největší množství bylo zjištěno u prokyanidinu B2 ( $564,41 \pm 25,68 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  čerstvé hmoty). (-)-epikatechin, jako druhá nejvíce zastoupení látka, byl obsažen v množství  $507,77 \pm 55,85 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  čerstvé hmoty. Naměřené podíly zbývajících tří látek byly v absolutní hodnotě významně nižší (chlorogenová kyselina  $79,98 \pm 5,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  čerstvé hmoty, hyperosid  $25,15 \pm 5,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  čerstvé hmoty a isokvercitrin  $6,89 \pm 1,37 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  čerstvé hmoty).

V tomto případě se jedná o zpracovanou surovinu, která byla vystavena tepelné zátěži, což podle Chang *et al.* (2006) vede k degradaci účinných látek. Rovněž došlo k jejímu naředění, neboť ve 100 g DHP je pouze 22,10 g vypeckovaných plodů. Na tuto skutečnost může mít také vliv celá řada faktorů, zejména jiné prostředí pěstování (např. klimatické a půdní podmínky) a odrůda.

**Graf 1** Obsah vybraných flavonoidů v džemu z hlohu peřenoklaného



- sloupčky grafu představují průměr ± směrodatnou odchylku ( $n = 3$ ).

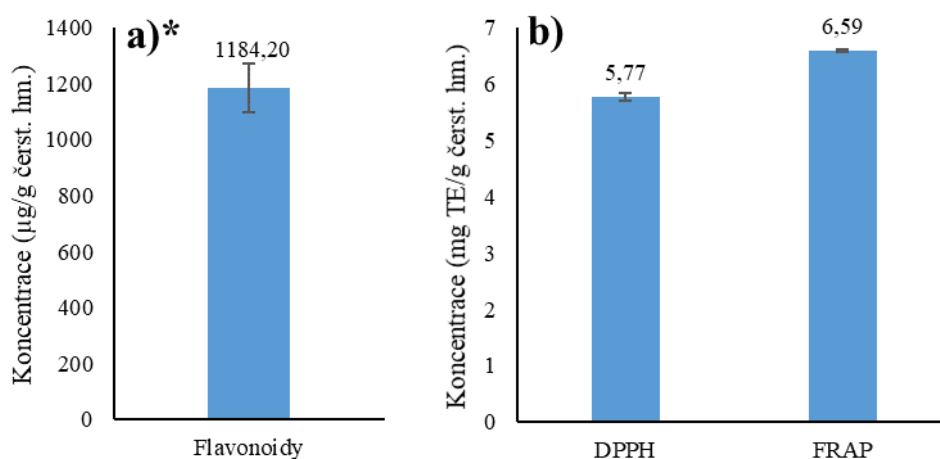
## 7.2. Využití antioxidantů hlohu v lidském organismu

Vybrané účinné látky hlohu peřenoklaného s antioxidační aktivitou (prokyanidin B2, (-)-epikatechin, chlorogenová kyselina, hyperosid a isokvercitrin), obsažené v DHP, byly podány dobrovolníkům za účelem sledování jejich schopnosti ovlivňovat antioxidační aktivitu krve.

Průměrná suma celkového obsahu flavonoidů v DHP (graf 2) dosahovala hodnoty  $1184,2 \pm 85,4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (tedy  $118,42 \pm 8,54 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), což se liší zhruba 4násobně v porovnání s výsledky, které publikovali Chang *et al.* (2006), Cheng *et al.* (2013) a Wen *et al.* (2015). I zde je však nutno vzít v úvahu množství plodů ve 100 g hotového džemu (pouze 22,10 %). Přepočteme-li získané výsledky tak, aby byly porovnatelné s výsledky výše uvedených studií, které hodnotili celkový obsah flavonoidů v plodech, získáme hodnotu  $535,85 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ . Tato hodnota je relevantní uvedeným studiím.



**Graf 2** Obsah flavonoidů (a), antioxidační aktivita (b) džemu z hlohu peřenoklaného

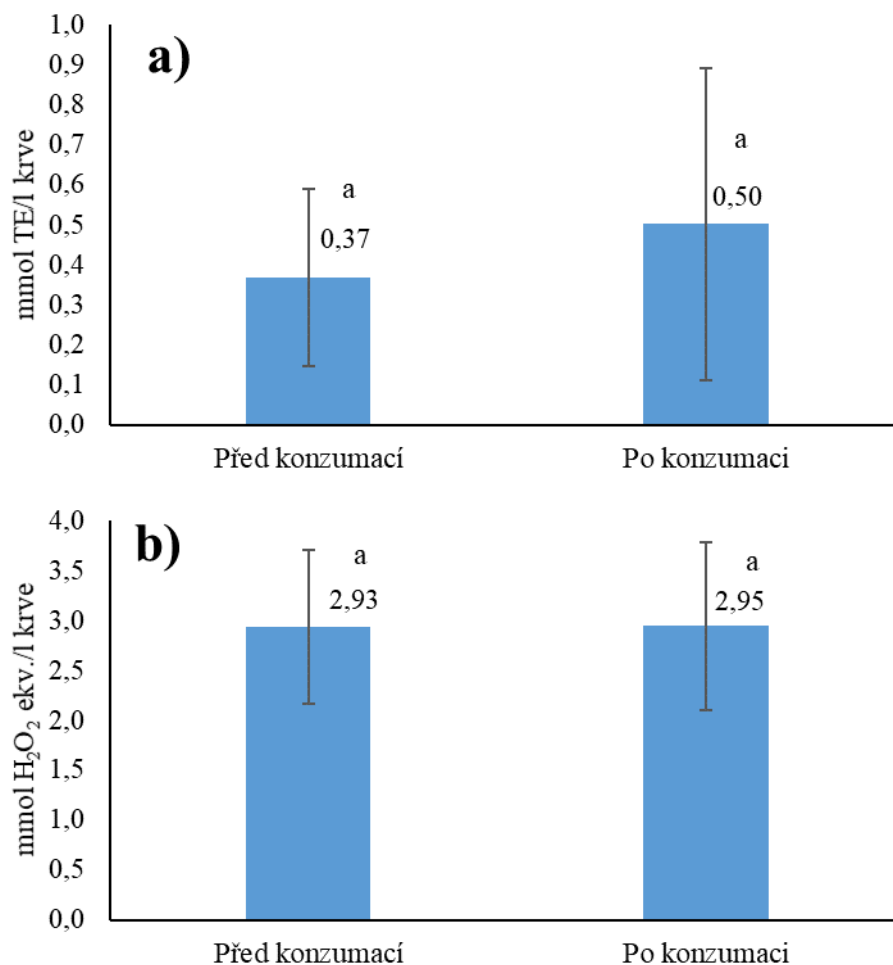


- \* suma chlorogenové kyseliny, (-)-epikatechinu, procyanidinu B2, hyperosidu a isokvercitrinu;
- sloupečky grafu představují průměr ± směrodatnou odchylku ( $n = 3$  pro flavonoidy, DPPH a FRAP).

V naší studii byl 18 dobrovolníkům podán džem z plodů hlohu peřenoklaného s bílým pečivem jako nosičem. V 80 g DHP bylo obsaženo 94,74 mg polyfenolických antioxidantů (graf 2) tvořených převážně flavan-3-oly a proanthokyanidiny ((-)-epikatechin a prokyanidin B2). Je však nutné podotknout, že suma všech stanovovaných látek není celková, protože některé látky (uvedené v tabulce 13) nebylo možné kvantifikovat kvůli komerční nedostupnosti standardů.

Rovněž bylo zjištěno zvýšení průměrné antioxidační kapacity krve z 0,37 mmol TE.l<sup>-1</sup> na 0,50 mmol TE.l<sup>-1</sup> po 90 minutách od podání vzorku (graf 3), nicméně toto zvýšení není statisticky významné ( $p > 0,05$ ). Hodnota volných radikálů však zůstala téměř totožná (2,93 resp. 2,95 mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ekv.l<sup>-1</sup>). Z literatury a zjištěných výsledků se lze domnívat, že uvedené množství džemu (80 g) bylo příliš nízké a tyto látky by bylo nutno podávat v uvedeném množství dlouhodobě. Schopnost sledovaných látek v DHP pozitivně ovlivňovat antioxidační aktivitu krve a zdravotní stav prokázali ve svých studiích Wen *et al.* (2017, 2015), Zhang *et al.* (2016), Steilmakene *et al.* (2016), Zhou *et al.* (2014) a Zhang *et al.* (2013).

**Graf 3** *In vivo* antioxidační aktivita (a) a *in vivo* koncentrace volných radikálů (b) v krvi konzumentů před a po (+90 min) konzumaci džemu z hlohu peřenoklaného



<sup>a</sup> hodnoty se stejným indexem se od sebe statisticky výrazně neliší ( $p > 0,05$ );  
- sloupčky grafu představují průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku ( $n = 18$ ).

Vzhledem k tomu, že se jednalo o jednorázové podání, je zde prostor pro další dlouhodobější experiment, kde bude účinná látka například podávána opakovaně po delší časový úsek.

## 8. Polyfenoly v bezlepkovém chlebu obohaceném cibulovými slupkami

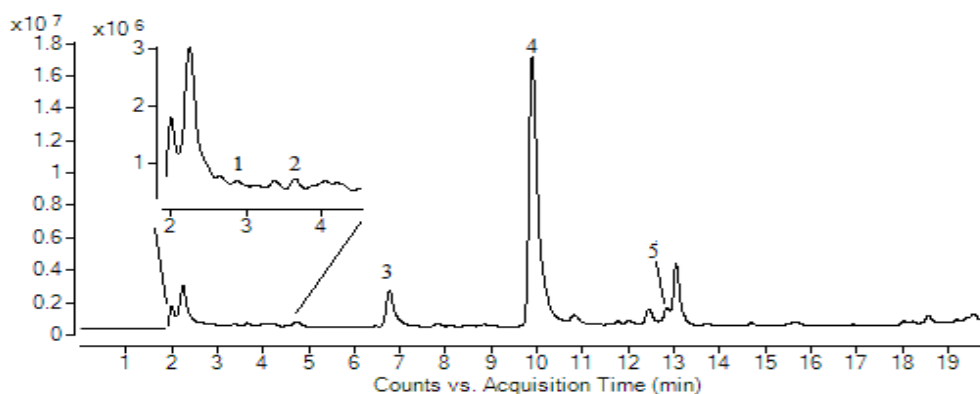
### 8.1. Obsah flavonoidů v bezlepkovém chlebu obohaceném cibulovými slupkami

Na obrázku 17 je zobrazen full scan bezlepkového chleba s práškem z cibulových slupek. Stanovované látky jsou popsány v tabulce 14.

**Tab. 14** Retenční časy a hmotnostní spektra látek vybraných látek v bezlepkovém chlebu obohaceném cibulovými slupkami

Pík č.	Látka	Retenční čas (min)	ESI negativ [M-H] <sup>-</sup> (m/z)	
			Molekulární iont	Fragmentové ionty (MS <sup>2</sup> )
1	Kvercetin-3,4'-diglukosid	2,88	625	301, 151
2	Rutin	3,65	609	463, 301, 300, 151
3	Kvercetin-4-monoglukosid	6,83	463	301
4	Kvercetin	9,95	301	273, 179, 151, 121
5	Glukosid dimeru kvercetinu	12,87	763	299

**Obr. 17** Reprezentativní chromatogram (full scan) vzorku chleba obohaceného cibulovými slupkami

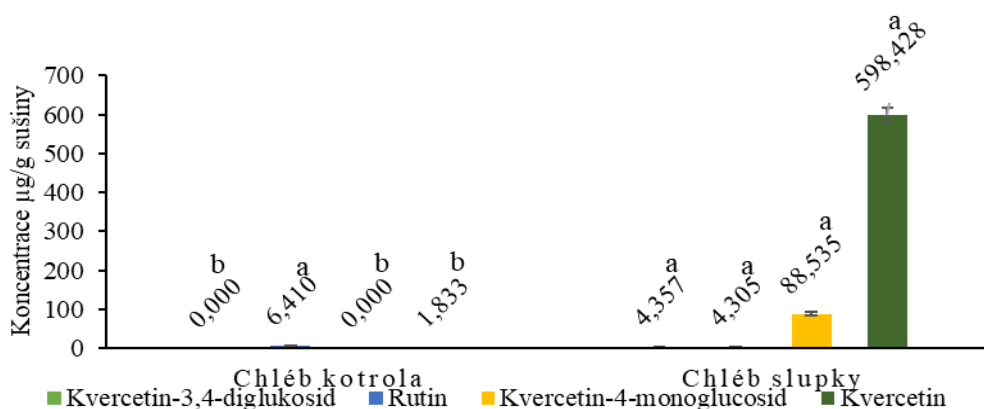


V BCH a BCHS byly stanovovány obsahy složek 1-4 (kvercetin-3,4'-diglukosidu, rutinu, kvercetin-4'-monoglukosidu a kvercetinu). Jak je patrné z grafu 4, přídavek prášku z cibulových slupek výrazně zvýšil obsah kvercetin-3,4'-diglukosidu, kvercetin-4'-monoglukosidu a kvercetinu, zatímco obsah rutinu se snížil. Snížení rutinu je nejspíše dáno tím, že jeho jedinou složkou byla pohanková mouka, jejíž obsah byl v BCHS snížen (z 24,70 na 23,47 %).

Nízký obsah kvercetin-3,4'-diglukosidu v BCHS je v souladu s literaturou, neboť kvercetin je v cibulovém slupce zastoupen zejména jako aglykon vzhledem k přítomnosti glukosidáz, katalyzujících štěpení glukózového zbytku (Takahama a Hirota, 2000). Největší obsah byl pozorován v případě kvercetinu, jehož koncentrace v pečeném chlebu byla  $598,43 \pm 17,75 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  v sušině, což bylo mnohem více, než uvádí Gawlik-Dziki *et al.* (2013).

Složka 5 (glukosid dimeru kvercetinu) byla nekvantifikovatelná, neboť podle dostupných zdrojů není dosud popsán mechanismus jeho vstřebávání v organismu přesto, že je biodostupný (Borges *et al.*, 2018).

**Graf 4** Obsah flavonoidů v kontrolním vzorku bezpečného chleba a vzorku bezpečného chleba s práškem z cibulových slupek



<sup>a,b</sup> hodnoty s různým indexem u stejné látky se od sebe statisticky výrazně liší ( $p < 0,05$ );

- sloupečky grafu představují průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku ( $n = 4$ ).

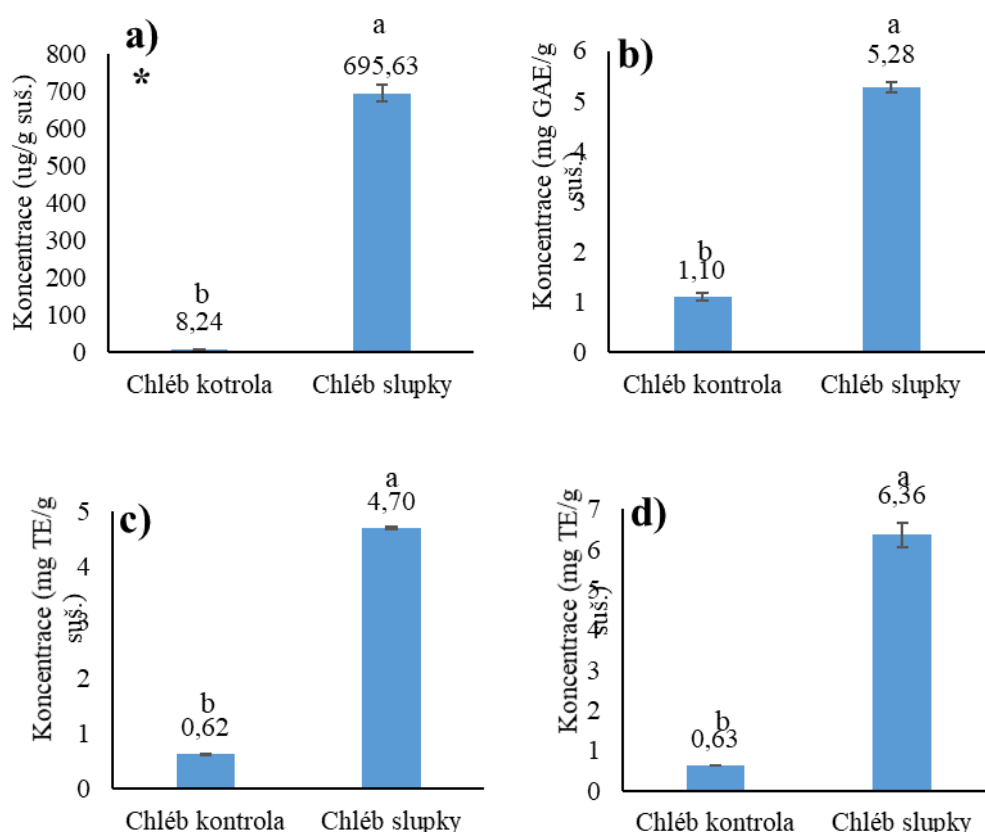
## 8.2. Využití antioxidantů z cibulových slupek v lidském organismu

Největší podíl flavonolů (90 %) v cibuli představuje kvercetin. Z grafu 5a je zřejmé, že v BCHS je jejich obsah výrazně vyšší než v BCH

( $695,63 \pm 22,55 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  sušiny proti  $8,24 \pm 1,00 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  sušiny) právě díky přidavku prášku z cibulových slupek, v nichž se ve velké míře nalézají.

Celkový obsah polyfenolů (graf 5b) v BCHS činil  $5,28 \pm 0,11 \text{ mg GAE}\cdot\text{g}^{-1}$  v sušině, zatímco v BCH to bylo pouze  $1,10 \pm 0,11 \text{ mg GAE}\cdot\text{g}^{-1}$  v sušině.

**Graf 5** Koncentrace flavonolů (a), celkových polyfenolů (b) a antioxidační aktivita metodami DPPH (c) a FRAP (d) v kontrolním vzorku bezlepkového chleba a vzorku bezlepkového chleba s práškem z cibulových slupek



\* suma kvercetinu-3,4'-diglukosidu, kvercetinu-4-monoglukosidu, rutinu a kvercetinu;

<sup>a,b</sup> hodnoty s různým indexem u stejné látky se od sebe statisticky výrazně liší ( $p < 0,05$ );

- sloupečky grafu představují průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku ( $n = 4$  pro flavonoly,  $n = 3$  pro antioxidační aktivitu DPPH a FRAP a  $n = 2$  pro celkové polyfenoly).

Stejný trend (graf 5c, d) jako v celkovém obsahu flavonolu je pozorován v případě antioxidační aktivity (DPPH a FRAP). Přídavek prášku z cibulových slupek statisticky významně zvýšil ( $p < 0,05$ ) antioxidační aktivitu BCHS ve srovnání s BCH. Lze se domnívat, že kvercetin má po degradaci jeho derivátů

(dimery, trimery, kondenzační produkty s protokatechuovou kyselinou a glykosidy) vyšší antioxidační aktivitu, než když je vázán.

V experimentu, jehož výsledky jsou zobrazeny v grafu 6, byl zkoumán vliv konzumace běžné dávky chleba obohaceného práškem z cibulových slupek na antioxidační aktivitu krve a koncentraci volných radikálů. Existují zprávy, že potravinová matrice (v tomto případě chléb) ovlivňuje biodostupnost kvercetin, například kvercetin z cibulových slupek je více biodostupný než čistá látka (Burak *et al.*, 2017), a to díky jeho poměrně lipofilnímu charakteru a tudíž nízké rozpustnosti v zažívacím traktu (Wiczowski *et al.*, 2008).

Bedrníček *et al.* (2019) uvádějí, že porce kontrolního vzorku bezpečného chleba (BCH) o hmotnosti 200 g obsahovala 0,84 mg flavonolů (sumu kvercetinu-3,4'-diglukosidu, rutinu, kvercetinu-4-monoglukosidu a rutinu), což po přepočtu na ekvivalenty kvercetin dává hodnotu 0,51 mg v původní hmotě. Stejně množství vzorku BCHS obsahovalo 68,02 mg flavonolů, které byly převážně zastoupeny aglykonem kvercetin, jak je uvedeno v kapitole 8.1. Tento údaj odpovídá 65 mg ekvivalentu kvercetin v 200 g čerstvé chlebové hmotě. Podle Harwooda *et al.* (2007) je tato dávka dostatečná, protože kvercetin může být použit v doplňcích stravy či funkčních potravinách v dávce od 0,008-0,5 % či 10-125 mg na jednu porci.

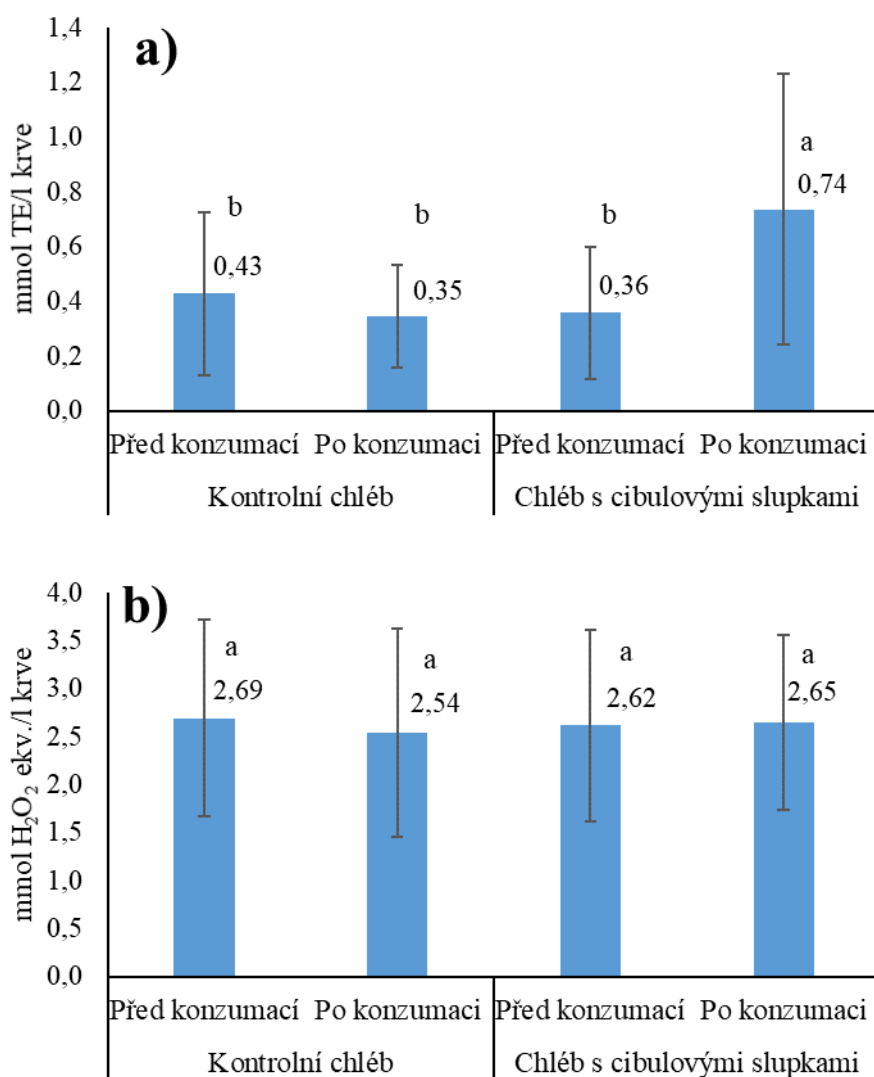
Jak můžeme zjistit z grafu 6a, BCH neovlivnil antioxidační aktivitu (hodnoty FORD) krve dobrovolníků, nicméně po konzumaci BCHS antioxidační aktivita subjektů významně vzrostla ( $p < 0,05$ ) na dvojnásobek v porovnání s hodnotami před konzumací. Z grafu 6 je rovněž zřejmá vysoká inter-individuální variabilita dat (směrodatná odchylka). Almeida *et al.* (2018) ve své review uvádí, že v mnoha studiích, zaměřených na biodostupnost kvercetin, byla tato skutečnost pozorována. Může být zapříčiněna mnoha faktory zahrnujícími genetický polymorfismus, dietární adaptaci, složení střevní mikroflóry, užívání léků a dalšími jako je aktuální zdravotní stav a index tělesné hmotnosti.

Výsledky, uvedené v grafu 6, jsou v porovnání s ostatními autory rozdílné (Egert *et al.*, 2008; Shanely *et al.*, 2010). Ti nezaznamenali žádné rozdíly v hodnotách antioxidační aktivity krve po podání kvercetin. Podávali však čistou látku ve formě kapslí, zatímco podstata uvedeného experimentu spočívala v podávání látky v přirozené formě na nosiči, který je běžnou součástí stravy (chléb). Rozdíl

byl rovněž v měření antioxidační aktivity, neboť uvedení autoři použili metody ORAC respektive FRAP. Je proto obtížné metody porovnávat.

Též je třeba zmínit, že obecně metody měření antioxidační aktivity (včetně FORD) mají nízkou specifitu (Lotio a Frei, 2006). Každá z nich může produkovat jiné výsledky. Bohužel autoři, kteří byli zaměřeni ve svých studiích na biodostupnost kvercetinu z cibulových slupek, neměřili antioxidační aktivitu, ale koncentraci látky v krvi (Wiczowski *et al.*, 2008, Burak *et al.*, 2017 a Kashino *et al.*, 2015).

**Graf 6** *In vivo* antioxidační aktivita (a) a *in vivo* koncentrace volných radikálů (b) v krvi konzumentů před a po (+90 min) konzumaci kontrolního vzorku bezpečového chleba a vzorku bezpečového chleba s práškem z cibulových slupek



<sup>a,b</sup> hodnoty s různým indexem se od sebe statisticky výrazně liší ( $p < 0,05$ );

- sloupečky grafu představují průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku ( $n = 14$ ).

FORT je rychlá, jednoduchá a neselektivní metoda pro měření volných radikálů v krvi, která byla použita v několika studiích (např. Lorgis *et al.*, 2010). Antioxidanty přijaté z potravy neutralizují volné radikály produkované během fyziologických procesů nebo získané z exogenních zdrojů (Harasym a Oledzki, 2014). Po 90 minutách od konzumace BCH nebo BCHS (graf 6b), nebyly pozorovány žádné statisticky významné změny ( $p > 0,05$ ) v hodnotách FORT (koncentraci volných radikálů v krvi), i přesto, že se zvýšily hodnoty antioxidační aktivity (FORD) po konzumaci chleba s cibulovými slupkami. Tento jev může být částečně vysvětlen nedostatečnou dávkou kvercetinu nebo krátkou dobou experimentu.



## 9. Závěr

Dietární antioxidanty jsou důležitou složkou potravin. Je proto nutné konzumovat potraviny obsahující tyto látky a napomáhající tak preventivnímu působení zejména proti celé řadě civilizačních chorob.

Bylo prokázáno, že džem z hlohu peřenoklaného (*Crataegus pinnatifida* Bunge), vypěstovaného v České republice, obsahoval totožné aktivní látky jako hlohy pěstované v Číně, kde jsou využívány v tradiční čínské medicíně. Jejich obsah byl nižší, na což mohou mít vliv klimatické a půdní podmínky.

Zvýšení antioxidační aktivity v krvi po konzumaci džemu z plodů hlohu peřenoklaného nebylo prokazatelné, nicméně nedošlo k průkaznému snížení počtu volných radikálů, které by s tímto mělo souviset. Příčinou může být nízké množství v jednorázově podaném vzorku. Rovněž se na tomto výsledku mohl podílet nízký obsah účinných látek v džemu, neboť ten obsahoval pouze 22,10 g plodů hlohu peřenoklaného ve 100 g vzorku. Takto nízký podíl základní složky je způsoben technologickými vlastnostmi plodů, které, i ve stupni plné zralosti, obsahují velké množství pektinů. Při jejich zpracování je nutno přidávat pitnou vodu. Tím pádem dochází k snižování množství ovocného podílu v hotovém výrobku.

Využití slupek z cibule kuchyňské (*Allium cepa* L.) je důležité z několika důvodů:

- jedná se o odpad z potravinářské výroby,
- lze jej obtížně likvidovat, protože se obtížně kompostuje,
- obsahuje celou řadu zdravotně prospěšných látek.

Přídavek prášku z cibulových slupek do bezlepkového chleba se projevil výrazným nárůstem antioxidační aktivity vzorku. Z výsledků hmotnostní spektrometrie vyplynulo, že účinné látky zůstaly zachovány i po tepelném opracování (pečení) a byly schopny ovlivňovat antioxidační aktivitu *in vivo*.

Výrazný nárůst antioxidační aktivity byl zaznamenán v krvi dobrovolníků po zkonsumování obohaceného vzorku bezlepkového chleba práškem z cibulových slupek. V porovnání s výsledky, získanými po konzumaci džemu z hlohu peřenoklaného, se jedná o více než dvojnásobné zvýšení torloxekvivalentu. Tento progres je dán vyšší koncentrací účinných látek v cibulových slupkách.

To, že po konzumaci bezlepkového chleba s práškem z cibulových slupek došlo k vyššímu nárůstu antioxidační aktivity, než u džemu z plodů hlohu peřenoklaného může být dáno tím, že účinná látka, obsažená v cibulových slupkách (kvercetin), má větší antioxidační kapacitu *in vitro*, než účinné látky hlohu peřenoklaného a je schopen aktivněji vstupovat do reakcí zchášejších volné radikály (Rice-Evans *et al.*, 1996). Tím se vysvětluje fakt, že i přes vyšší celkové množství účinných látek v porci džemu z plodů hlohu peřenoklaného než ve vzorku bezlepkového chleba obohaceného práškem z cibulových slupek byla naměřena vyšší antioxidační aktivita v krvi po konzumaci vzorku s obsahem kvercetinu.

Získané poznatky lze využít i pro jiné druhy potravin, například masné a mléčné výrobky, které jsou rovněž významnou součástí jídelníčku značného procenta populace a mohou tak pozitivně ovlivnit jejich zdravotní stav.

## 10. Literatura

1. Aikens, J.; Dix, T. A. (1991). Perohydroxyl radical (HOO\*) initiated lipid-peroxidation – the role of fatty-acid hydroperoxides. *J Biol Chem*, 266: 150-156.
2. Akash, M. S. H.; Rehman, K.; Chen, S. (2014). Spice plant *Allium cepa*: Dietary supplement for treatment of type 2 *diabetes mellitus*. *Nutrition*, 30(10): 1128-1137.
3. Alahakoon, A. U.; Bae, Y. S.; Kim, H. J.; Jung, S.; Jayasena, D. D.; Yong, H. I.; Kim, S. H.; Jo, C. (2013). The effect of citrus and onion peel extracts, calcium lactate, and phosvitin on microbial quality of seasoned chicken breast meat. *CNU Journal of Agricultural Science*, 40(2): 131-137.
4. Albishi, T.; John, J. A.; Al-Khalifa, A. S.; Shahidi, F. (2013). Antioxidative phenolic constituents of skins of onion varieties and their activities. *Journal of Functional Foods*, 5(3): 1191-1203.
5. Almeida, A. F.; Borge, G. I. A.; Piskula, M.; Tudose, A.; Tudoreanu, L.; Valentová, K.; Williamson G.; Santos C. N. (2018). Bioavailability of quercetin in humans with a focus on interindividual variation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(3), 714-731.
6. Ames, B. N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, 221(4617) :1256-1264.
7. Andersen, J. K. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature Medicine*, 10: 18-25.
8. Apel, K.; Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55: 373-399.
9. Barja, G. (2004). Free radicals and aging. *Trends Neurosci*, 27: 595-600.

10. Bedrníček, J.; Jirotková, D.; Kadlec, J.; Laknerová, I.; Vrchotová, N.; Tříška, J.; Samková, E.; Smetana, P. (2019). Functional gluten free bread enriched with onion industrial wastes: a novel product with increased health benefits. *Czech Journal of Food Sciences*, 37: 268-275.
11. Beesk, N.; Perner, H.; Schwarz, D.; George, E.; Kroh, L. W.; Rohn, S. (2010). Distribution of quercetin-3, 4'-O-diglucoside, quercetin-4'-O-monoglucoside and quercetin in different parts of the onion bulb (*Allium cepa* L.) influenced by genotype. *Food Chemistry*, 122(3): 566-571.
12. Benítez, V.; Mollá, R.; Martín-Cabrejas, M. A.; Aguilera, Y.; Esteban, R. M. (2017). Physicochemical properties and in vitro antidiabetic potential of fibre concentrates from onion by-products. *Journal of Functional Foods*, 36: 34-42.
13. Benítez, V.; Mollá, R.; Martín-Cabrejas, M. A.; Aguilera, Y.; López-Andréu, F. J.; Esteban, R. M. (2012). Onion (*Allium cepa* L.) by-products as source of dietary fiber: physicochemical properties and effect on serum lipid levels in high-fat fed rats. *European Food Research and Technology*, 234(4): 617-625.
14. Benítez, V.; Mollá, R.; Martín-Cabrejas, M. A.; Aguilera, Y.; López-Andréu, F. J.; Cools, K.; Terry, L. A.; Esteban, R. M. (2011). Characterization of industrial onion wastes (*Allium cepa* L.): dietary fibre and bioactive compounds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66(1): 48-57.
15. Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1): 70-76.
16. Behrend, L.; Henderson, G.; Zwacka, R. M. (2003). Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans*, 31: 1441-1444.
17. Bergamini, C. M.; Gambetti, S.; Dondi, A.; Cervellatti, C. (2004). Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr Pharm Des.*, 10: 1611-1626.
18. Bisen Prakash, S.; Emerald, M. (2016). Nutritional and Therapeutic Potential of Garlic and Onion (*Allium sp.*). *Current Nutrition and Food Science*, 12(3): 190-199.

19. Bjeldanes, L. F.; Chang, G. W. (1977). Mutagenic activity of quercetin and related compounds. *Science*, 197(4303): 577-578.
20. Bohr, V. A.; Dianov, G. L. (1999). Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. *Biochemie*, 81: 155-160.
21. Bojňanská, T.; Frančáková, H.; Chlebo, P.; Vollmannová, A. (2009). Rutin content in buckwheat enriched bread and influence of its consumption on plasma total antioxidant status. *Czech Journal of Food Sciences*, 27(1), 236-240.
22. Bonaccorsi, P.; Caristi, C.; Gargiulli, C.; Leuzzi, U. (2008). Flavonol glucosides in *Allium* species: A comparative study by means of HPLC-DAD-ESI-MS-MS. *Food Chemistry*, 107(4): 1668-1673.
23. Borges, G.; Ottaviani, J. I.; van der Hooft J. J. J.; Schroeter, H.; Crozier, A. (2018). Absorption, metabolism, distribution and excretion of (-)-epicatechin: A review of recent findings. *Mol. Aspects Med.*, 61: 18-30. Doi: 10.1016/j.mam.2017.11.002.
24. Bornet, F. R.; Brouns, F.; Tashiro, Y.; Duvillier, V. (2002). Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. *Digestive and Liver Disease*, 30(34): 111-120.
25. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28, 25-30.
26. Brewster, J. L. (2008). *Onions and other vegetable alliums*, 2nd ed.; CAB International, 432 s. ISBN 978-1-84593-399-9.
27. Brüll, V.; Burak, C.; Stoffel-Wagner, B.; Wolfram, S. (2015). Effects of a quercetin-rich onion skin extract on 24 h ambulatory blood pressure and endothelial function in overweight-to-obese patients with (pre-)hypertension: a randomised double-blinded placebo-controlled cross-over trial. *British Journal of Nutrition*, 114(8): 1263-1277.

28. Buhl, R.; Jaffe, H. A.; Holroyd, K. J.; Wells, F. B.; Mastrangeli, A.; Saltini, C.; Cantin, A. M.; Cadenas, E.; Sies, H. (1998). The lag phase. *Free Radic Res*, 28(6): 601-609.
29. Burak, C.; Brüll, V.; Langguth, P.; Zimmermann, B. F.; Stoffel-Wagner, B.; Sausen, U.; Stehle, P.; Wolfram, S.; Egert, S. (2017). Higher plasma quercetin levels following oral administration of an onion skin extract compared with pure quercetin dihydrate in humans. *European Journal of Nutrition*, 56(1): 343-353.
30. Cadenas, E. (1997). Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*, 6(4): 391-397.
31. Cerutti, P. A. (1994). Oxy-radicals and cancer. *Lancet*, 344(8926): 862-863.
32. Corzo-Martínez, M.; Corzo, N.; Villamiel, M. (2007). Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology*, 18(12): 609-625.
33. Čelková, L. (2011). Hloh peřenoklaný – *Crataegus pinnatifida*. [cit. 2019-07-30]. Dostupné z: <http://prirodnizahrada.webnode.cz/news/hloh-perenoklany-crataegus-pinnatifida>.
34. DACH – *Referenční hodnoty pro příjem živin* (2011), Praha: Výživaservis s.r.o., 192 s.
35. Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Giustarrini, D.; Milzani, A.; Colombo R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta*, 329(1-2): 23-38.
36. Darley-Usmar, V.; Halliwell, B. (1996). Blood radicals. Reactive nitrogen species. *Pharm. Res.* 13(2): 649-662.
37. Denev, P.; Kratchanova, M.; Ciz, M.; Lojek, A.; Vasicek, O.; Nedelcheva, P.; Blazheva, D.; Toshkova, R.; Gardeva, E.; Yossifova, L. (2014). Biological activities of selected polyphenol-rich fruits related to immunity and gastrointestinal health. *Food Chemistry*, 157: 37-44.

38. Dhalla, N. S.; Temsah, R. M.; Netticadan, T. (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens*, 18(6): 655-673.
39. Dong, P.; Pan, L.; Zhang, X.; Zhang, W.; Wang, X.; Jiang, M.; Chen, Y.; Duan, Y.; Wu, H.; Xu, Y. (2017). Hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge) leave flavonoids attenuate atherosclerosis development in apoE knock-out mice. *Journal Of Ethnopharmacology*, 198: 79-88.
40. Donner, H.; Gao, L.; Mazza, G. (1997). Separation and characterization of simple and malonylated anthocyanins in red onions, *Allium cepa* L. *Food Research International*, 30(8): 637-643.
41. Downes, K.; Chope, G. A.; Terry, L. A. (2009). Effect of curing at different temperatures on biochemical composition of onion (*Allium cepa* L.) skin from three freshly cured and cold stored UK-grown onion cultivars. *Postharvest Biology and Technology*, 54(2): 80-86.
42. Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82(1): 47-95.
43. Dudonné, S.; Vitrac, X.; Coutière, P.; Woillez, M.; Mérillon, J.-M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1768-1774.
44. Dunnick, J. K.; Hailey, J. R. (1992). Toxicity and carcinogenicity studies of quercetin, a natural component of foods. *Fundamental and Applied Toxicology*, 19(3): 423-431.
45. Egert, S.; Wolfram, S.; Schulze, B.; Langguth, P.; Hubbermann, E. M.; Schwarz, K.; Adolphi, B.; Bosy-Westphal, A.; Rimbach, G.; Müller, M. J. (2012). Enriched cereal bars are more effective in increasing plasma quercetin compared with quercetin from powder-filled hard capsules. *British Journal of Nutrition*, 107(4): 539-546.

46. Egert, S.; Wolfram, S.; Bosy-Westphal, A.; Boesch-Saadatmandi, C.; Wagner, A. E.; Frank, J.; Rimbach, G.; Mueller, M. J. (2008). Daily quercetin supplementation dose dependently increases plasma quercetin concentrations in healthy humans. *The Journal of Nutrition*, 138(9), 1615-1621.
47. Ernst, M.; Bufler, G. (1994). Stems of *Allium cepa* L. contain starch. *New Phytologist*, 128(3): 403-406.
48. Fiedor, J.; Burda, K. (2014). Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, 6(2): 466-488.
49. Fossen, T.; Andersen, Ø. M. (2003). Anthocyanins from red onion, *Allium cepa*, with novel aglycone. *Phytochemistry*, 62(8): 1217-1220.
50. Galeone, C.; Pelucchi, C.; Levi, F.; Negri, E.; Franceschi, S.; Talamini, R.; Giacosa, A.; La Vecchia, C. (2006). Onion and garlic use and human cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84(5): 1027-1032.
51. Gawlik-Dziki, U.; Świeca, M.; Dziki, D.; Baraniak, B.; Tomilo, J.; Czyz, J. (2013). Quality and antioxidant properties of breads enriched with dry onion (*Allium cepa* L.) skin. *Food Chemistry*, 138(2): 1621-1628.
52. González-Sáiz, J. M.; Esteban-Díez, I.; Rodríguez-Tecedor, S.; Pizarro, C. (2008). Valorization of onion waste and by products: MCRALS applied to reveal the compositional profiles of alcoholic fermentations of onion juice monitored by nearinfrared spectroscopy. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(4): 776-787.
53. Gottlieb, O., R. (1972). Chemosystematics of the *Lauraceae*. *Phytochemistry*, 11(5): 1537-1570.
54. Gould, K. S.; Lister, C. (2006). Flavonoid Function in Plants. In: *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*; Andersen, Ø.M., Markham, K. R. Eds. Boca Raton: Taylor & Francis; pp 397-441.
55. Griffiths, G.; Trueman, L.; Crowther, T.; Thomas, B.; Smith, B. (2002). Onions a global benefit to health. *Phytotherapy Research*, 16(7): 603-615.



56. Grzelak, K.; Milala, J.; Król, B.; Adamicki, F.; Badelek, E. (2009). Content of quercetin glycosides and fructooligosaccharides in onion stored in a cold room. *European Food Research and Technology*, 228(6): 1001-1007.
57. Guo, M.; Liu, Y.; Gao, Z. Y.; Shi, D. Z. (2014). Chinese Herbal Medicine on Dyslipidemia: Progress and Perspective. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Article Number: 163036. DOI: 10.1155/2014/163036.
58. Han, X.; Li, W.; Huang, D.; Yang, X. (2016). Polyphenols from hawthorn peels and fleshs differently mitigate dyslipidemia, inflammation and oxidative stress in association with modulation of liver injury in high fructose diet-fed mice. *Chem Biol Interact*, 257: 132-140.
59. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed., Oxford University Press, ISBN 9780198717478.
60. Harasym, J.; Oledzki, R. (2014). Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma. *Nutrition*, 30(5), 511-517.
61. Harwood, M.; Danielewska-Nikiel, B.; Borzelleca, J. F.; Flamm, G. W.; Williams, G. M.; Lines, T. C. (2007). A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food and Chemical Toxicology*, 45(11): 2179-2205.
62. Haworth, R. D. (1936). Natural resins. *Annual Reports on the Progress of Chemistry*, 33: 266-279.
63. Hazra, S. (2016). An overview of lignans with special reference to podophyllotoxin, a cytotoxic lignan. *Chemical Biology Letters*, 3: 1-8.
64. Hertog, M. G. L.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B. (1992). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(12): 2379-2383.
65. Hollman, P. C.; De Vries, J. H.; Van Leeuwen, S. D.; Mengelers, M. J.; Katan, M. B. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in

- healthy ileostomy volunteers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62(6): 1276-1282.
66. Horiuchi, J. I.; Kanno, T.; Kobayashi, M. (1999). New vinegar production from onions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(1): 107-109.
  67. Huang, X. X.; Liu, S.; Lou, L. L.; Liu, Q. B.; Zhou, C. C.; Li, L. Z.; Peng, Y., Song, S. J. (2014). Phenylpropanoids from *Crataegus pinnatifida* and their chemotaxonomic importance. *Biochemical Systematics and Ecology*, 54: 208-212.
  68. Chang, C. L.; Chen, H. S.; Shen, Y. C.; Lai, G. H.; Lin, P. K.; Wang, C. M. (2013). Phytochemical composition, antioxidant activity and neuroprotective effect of *Crataegus pinnatifida* fruit. *South African Journal of Botany*, 88: 432-437.
  69. Chang, Q.; Zuo, Z.; Chow, M. S. S.; Ho, W. K. K. (2006). Effect of storage temperature on phenolics stability in hawthorn (*Crataegus pinnatifida* var. Major) fruits and a hawthorn drink. *Food Chemistry*, 98(3): 426-430.
  70. Cheng, N.; Wang, Y.; Gao, H.; Yuan, J.; Feng, F.; Cao, W.; Zheng, J. (2013). Protective effect of extract of *Crataegus pinnatifida* pollen on DNA damage response to oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*, 59: 709-714.
  71. Cheun, K. S.; Kang, S. G.; Kang S. K.; Jung, S. T.; Park, Y. K. (2005). Changes of the Flavonoids in Onion Vinegar Fermented with Onion Juice and Ethanol. *Korean Journal of Food Preservation*, 12(6): 650-655.
  72. Choi, I. S.; Cho, E. J.; Moon, J. H.; Bae, H. J. (2015). Onion skin waste as a valorization resource for the by-products quercetin and biosugar. *Food Chemistry*, 188: 537-542.
  73. International Agency For Research On Cancer – IARC (1999). Quercetin: Summary Evaluation, 73: 497.
  74. Jaime, L.; Martínez, F.; Martín-Cabrejas, M. A.; Mollá, E.; López-Andréu, F. J.; Waldron, K. W.; Esteban, R. M. (2001). Study of total fructan and

- fructooligosaccharide content in different onion tissues. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(2): 177-182.
75. Jaime, L.; Mollá, E.; Fernández, A.; Martín-Cabrejas, M. A.; López-Andréu, F. J.; Esteban, R. M. (2002). Structural carbohydrate differences and potential source of dietary fiber of onion (*Allium cepa* L.) tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1): 122-128.
  76. Jan, A. T.; Kamli, M. R.; Murtaza, I.; Singh, J. B.; Ali, A.; Haq, Q. M. R. (2010). Dietary flavonoid quercetin and associated health benefits – an overview. *Food Reviews International*, 26(3): 302-317.
  77. Jang, M.; Asnin, L.; Nile, S. H.; Keum, Y. S.; Kim, H. Y.; Park, S. W. (2013). Ultrasound assisted extraction of quercetin from onion solid wastes. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(2): 246-252.
  78. Janick, J.; Paull., R. E. (2008). The encyclopedia of fruit & nuts. Wallingford: CABI. ISBN 978-0-85119-638-7.
  79. Kalač, P. (2003). *Funkční potraviny – kroky ke zdraví*. České Budějovice: Dona, 136 s.
  80. Karastogiannidou, C. (1999). Effects of Onion Quercetin on Oxidative Stability of Cook Chill Chicken in Vacuum Sealed Containers. *Journal of Food Science*, 64(6): 978-981.
  81. Kashino, Y.; Murota, K.; Matsuda, N.; Tomotake, M.; Hamano, T.; Mukai, R.; Terao, J. (2015). Effect of processed onions on the plasma concentration of quercetin in rats and humans. *Journal of Food Science*, 80(11), 2597-2602.
  82. Kastnerová, M. (2018). The role of oxidative stress in the etiopathogenesis of civilization diseases. In *Dietary Antioxidants in Practise*, 1st ed., Smetana, P. Ed., ZF JU, PF JU, FROV: České Budějovice, p 200. ISBN 978-80-7394-708-8.

83. Keugsen (2002). Health and Allium. In *Allium Crop Science: Recent Advances*. Rabinowitch, H. D.; Curah, L. Eds., CAB International, 528. ISBN 978-0851995106.
84. Kim, W. J.; Lee, K. A.; Kim, K. T.; Chung, M. S.; Cho, S. W.; Paik, H. D. (2011). Antimicrobial effects of onion (*Allium cepa* L.) peel extracts produced via subcritical water extraction against *Bacillus cereus* strains as compared with ethanolic and hot water extraction. *Food Science and Biotechnology*, 20(4): 1101-1106.
85. Kim, Y. J.; Seo, S. G.; Choi, K.; Kim, J. E.; Kang, H.; Chung, M. Y.; Lee, K. W.; Lee, H. J. (2014). Recovery Effect of Onion Peel Extract against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Induced Inhibition of Gap Junctional Intercellular Communication is Mediated through Quercetin. *Journal of Food Science*, 79(5): 1011-1017.
86. Kinghorn, A. D.; Ren, Y.; Li, J.; Sung, C. K. (2012). Cancer chemopreventive activity of higher plants. In *Plant Bioactives and Drug Discovery: Principles, Practice, and Perspectives*; Cechinel-Filho, V. Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, 586. ISBN 78-0-470-58226-8.
87. Kosseva, M. R.; Webb, C. (2013). *Food Industry Wastes: Assessment and Recuperation of Commodities*, 1st ed., Elsevier Inc., 338 s. ISBN 978-0123919212.
88. Kovacic, P.; Pozos, R. S.; Somanathan, R. (2005). Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: Focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. *Curr Med Chem*, 12: 2601-2623.
89. Kovacic, P.; Jacintho, J. D. (2001). Mechanisms of carcinogenesis: Focus on oxidative stress and electron transfer. *Curr Med Chem*, 8(7): 773-796.
90. Kuo, D. H.; Yeh, C. H.; Shieh, P. C.; Cheng, K. C.; Chen, F. A.; Cheng, J. T. (2009). Effect of Shan-Zha, a Chinese herbal product, on obesity and dyslipidemia in hamsters receiving high-fat diet. *Journal of Ethnopharmacology*. 124(3): 544-550.

91. Kwok, C. Y.; Li, C.; Cheng, H. L.; Ng, Y. F.; Chan, T. Y.; Kwan, Y. W.; Leung, G. P. H.; Lee, S. M. Y.; Mok, D. K. W.; Yu, P. H. F. (2013). Cholesterol lowering and vascular protective effects of ethanolic extract of dried fruit of *Crataegus pinnatifida*, hawthorn (Shan-Zha), in diet-induced hypercholesterolaemic rat model. *Journal of Functional Foods*, 5(3): 1326-1335.
92. Lachman, J.; Hosnedl, V.; Pivec, V. (1998). Polyphenols in cereals and their positive and negative role in human and animal nutrition. *Proceedings of Conference Cereals for Human Health and Preventive Nutrition*, 118-125.
93. Lachman, J.; Proněk, D.; Hejtmánková, A.; Dudjak, J.; Pivec, V.; Faitová, K. (2003). Total polyphenol and main flavonoid antioxidants in different onion (*Allium cepa* L.) varieties. *Scientia Horticulturae*, 30(4): 142-147.
94. Lanzotti, V. (2006). The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography A*, 1112(1): 3-22.
95. Lee, E. J.; Patil, B. S.; Yoo, K. S. (2015). Antioxidants of 15 onions with white, yellow, and red colors and their relationship with pungency, anthocyanin, and quercetin. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1): 108-114.
96. Lee, K. A.; Kim, K. T.; Kim, H. J.; Chung, M. S.; Chang, P. S.; Park, H.; Pai, H. D. (2014). Antioxidant activities of onion (*Allium cepa* L.) peel extracts produced by ethanol, hot water, and subcritical water extraction. *Food Science and Biotechnology*, 23(2): 615-621.
97. Lee, K. A.; Kim, K. T.; Nah, S. Y.; Chung, M. S.; Cho, S.; Paik, H. D. (2011). Antimicrobial and antioxidative effects of onion peel extracted by the subcritical water. *Food Science and Biotechnology*, 20(2): 543-548.
98. Li, J.; Deng, Y.; Yuan, C.; Pan, L.; Chai, H.; Keller, W. J.; Kinghorn, A.D. (2012). Antioxidant and quinone reductase-inducing constituents of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) fruits. *J. Agric. Food Chem*, 60(46): 11551-11559.

99. Li, L. Z.; Gao, P. Y.; Song, S. J.; Yuan, Y. Q.; Liu, C. T.; Huang, X. X.; Liu, Q. B. (2015). Monoterpenes and flavones from the leaves of *Crataegus pinnatifida* with anticoagulant activities. *Journal of Functional Foods*, 12: 237-245.
100. Lin, Y. G., Vermeer, M. A.; Trautwein, E. A. (2011). Triterpenic Acids Present in Hawthorn Lower Plasma Cholesterol by Inhibiting Intestinal ACAT Activity in Hamsters. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1:801272. DOI: 10.1093/ecam/nep007.
101. Lindahl, P. (2014). *Antioxidanty podporují vznik rakoviny, ukázala studie*. from : <http://www.novinky.cz/veda-skoly/326339> [cit-2019-07-30].
102. Liu, R. H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3): 517-520.
103. Liu, S.; Chang, X.; Liu, X.; Shen, Z. (2016). Effects of pretreatments on anthocyanin composition, phenolics contents and antioxidant capacities during fermentation of hawthorn (*Crataegus pinnatifida*) drink. *Food Chemistry*, 212: 87-95.
104. Liu, T.; Cao, Y.; Zhao, M. (2010). Extraction optimization, purification and antioxidant activity of procyanidins from hawthorn (*C. pinnatifida* Bge. var. Major) fruits. *Food Chemistry*, 119(4): 1656-1662.
105. Lorgis, L.; Zeller, M.; Dentan, G.; Sicard, P.; Buffet, P.; L'Huillier, I.; Beer, J. C.; Cottin, Y.; Rochette, L.; Vargely, C. (2010). The free oxygen radicals test (FORT) to assess circulating oxidative stress in patients with acute myocardial infraction. *Atherosclerosis*, 213(2), 616-621.
106. Lotio, B. S.; Frei, B. (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radical Biology and Medicine*, 41(12), 1727-1746.

107. Ly, T. N.; Hazama, C.; Shimoyamada, M.; Ando, H.; Kato, K.; Yamauchi, R. (2005). Antioxidative compounds from the outer scales of onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21): 8183-8189.
108. Masella, R.; Di Benedetto, R.; Vari, R. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*, 16(10): 577-586.
109. Mouradov, A.; Spangenberg, G. (2014). Flavonoids: a metabolic network mediating plants adaptation to their real estate. *Frontiers in plant science*, 5: 1-16.
110. Mudgil, D.; Barak, S. (2013). Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61: 1-6.
111. Muroyama, A.; Fujita, A.; Lv, C.; Kobayashi, S.; Fukuyama, Y.; Mitsumoto, Y. (2012). Magnolol Protects against MPTP/MPP+-Induced Toxicity via Inhibition of Oxidative Stress in In Vivo and In Vitro Models of Parkinson's Disease. *Parkinson's disease*. 985157. DOI: 10.1155/2012/985157.
112. Nile, S. H.; Nile, A. S.; Keum, Y. S.; Sharma, K. (2017). Utilization of quercetin and quercetin glycosides from onion (*Allium cepa* L.) solid waste as an antioxidant, urease and xanthine oxidase inhibitors. *Food Chemistry*, 235: 119-126.
113. Nuutila, A. N.; Puupponen-Pimiä, R.; Aarni, M.; & Oksman-Caldentey, K. M. (2003). Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 81(4): 485-493.
114. Okamoto, T. (2005). Safety of quercetin for clinical application. *International Journal of Molecular Medicine*, 16(2): 275-278.
115. Osmont K. S.; Arnt C. R.; Goldman, I. L. (2003). Temporal aspects of onion-induced antiplatelet activity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 58(1): 27-40.

116. Ottaviani, J. I.; Momma, T. Y.; Kuhnle, G. K.; Keen, C. L.; Schroeter, H. (2012). Structurally related (-)-epicatechin metabolites in humans: assessment using de novo chemically synthesized authentic standards. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(8): 1403-1412. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.12.010.
117. Pamukcu, A. M.; Yalciner, S.; Hatcher, J. F.; Bryan, G. T. (1980). Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Cancer Research*, 40(10): 3468-3472.
118. Park, J.; Kim, J.; Kim, M. K. (2007). Onion flesh and onion peel enhance antioxidant status in aged rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 53(1): 21-29.
119. Park, Y. K. F.; Lee, C. Y. (1996). Identification of isorhamnetin 4'-glucoside in onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1): 34-36.
120. Peng, Y.; Lou, L. L.; Liu, S. F.; Zhou, L.; Huang, X. X.; Song, S. J. (2016). Antioxidant and anti-inflammatory neolignans from the seeds of hawthorn. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26(22): 5501-5506.
121. Phipps, J.; O'Kennon, B.; Lance, R. (2003). *Hawthorns and medlars*. Portland: Timber Press. 180. ISBN 978-0881925913.
122. Prakash, D.; Singh, B. N.; Upadhyay, G. (2007). Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*). *Food Chemistry*, 102(4): 1389-1393.
123. Qiao, A.; Wang, Y.; Xiang, L.; Zhang, Z. X.; He, X. J. (2015). Novel triterpenoids isolated from hawthorn berries functioned as antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of Functional Foods*, 13: 308-313.
124. Racek, J.; Holeček, V. (1999). Enzymy a volné radikály. *Chemické listy* 93(12): 774-780.
125. Reddy, M. B.; Clark, L. (2004). Iron, oxidative stress, and disease risk. *Nutr Rev*, 62: 120-14.



126. Ren, F.; Reilly, K.; Kerry, J. P.; Gaffney, M.; Hossain, M.; Rai, D. K. (2017). Higher Antioxidant Activity, Total Flavonols, and Specific Quercetin Glucosides in Two Different Onion (*Allium cepa* L.) Varieties Grown under Organic Production: Results from a 6-Year Field Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(25): 5122-5132.
127. Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7): 933-956.
128. Richelle, M.; Tavazzi, I.; Enslin, M.; Offord, E. A. (1999). Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate. *European Journal of Clinical Nutrition*, 53(1): 22-26.
129. Rodríguez Galdón, B.; Rodríguez Rodríguez, E. M.; Díaz Romero, C. (2008). Flavonoids in onion cultivars (*Allium cepa* L.). *Journal of Food Science*, 73(8): 599-605.
130. Rokyta, R.; Holeček, V. (2006). Volné radikály a nemoci, které nelze ovlivnit antioxidanty. *Vesmír*, (10): 617-619.
131. Roldán-Marín, E.; Sánchez-Moreno, C.; Lloría, R.; De Ancos, B.; Cano, M. P. (2009). Onion high-pressure processing: Flavonol content and antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 42(4): 835-841.
132. Rossi, R.; Milzani, A.; Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Lusini, L., Colombo, R., Di Simplicio, P. (2002). Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact? *Clin Chem*, 48(5): 742-753.
133. Rozema, J.; Björn, L. O.; Bornman, J. F.; Gaberščik, A.; Häder, D. P.; Trošt, T.; Germ, M.; Klisch, M.; Gröniger, A.; Sinha, R. P.; Lebert, M.; He, Y. Y.; Buffoni-Hall, R.; de Bakker, N. V. J.; van de Staaij, J.; Meijkamp, B. B. (2002). The Role of UV-B Radiation in Aquatic and Terrestrial Ecosystems – an Experimental and Functional Analysis of the Evolution of UV-Absorbing Components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 66(1): 2-12.

134. Sabater-Molina, M.; Larqué, E.; Torrella, F.; Zamora, S. (2009). Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 65(3): 315-328.
135. Santas, J.; Almajano, M. P.; Carbó, R. (2010). Antimicrobial and antioxidant activity of crude onion (*Allium cepa*, L.) extracts. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(2): 403-409.
136. Sellappan, S.; Akoh, C. C. (2002). Flavonoids and antioxidant capacity of Georgia-grown Vidalia onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(19): 5338-5342.
137. Serra, A.; Macià, A.; Romero, M. P.; Valls, J.; Bladé, C.; Arola, L.; Motilva, M. J. (2010). Bioavailability of procyanidin dimers and trimers and matrix food effects in in vitro and in vivo models. *The British Journal of Nutrition*, 103(7): 944-952. Doi: 10.1017/S0007114509992741.
138. Shah, A. M.; Channon, K. M. (2004). Free radicals and redox signalling in cardiovascular disease. *Heart*, 90(5): 486-487.
139. Shanely, R. A.; Knab, A. M.; Nieman, D. C.; Jin, F.; McAnulty, S. R.; Landram, M. J. (2010). Quercetin supplementation does not alter antioxidant status in humans. *Free Radical Research*, 44(2), 224-231.
140. Sharma, K.; Assefa, A. D.; Kim, S.; Ko, E. Y.; Lee, E. T.; Park, S. W. (2014). Evaluation of total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of 18 Korean onion cultivars: a comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(8): 1521-1529.
141. Shim, S. Y.; Choi, Y. S.; Kim, H. Y.; Kim, H. W.; Hwang, K. E.; Song, D. H.; Lee, M. A.; Lee, J. W.; Kim, C. J. (2012). Antioxidative properties of onion peel extracts against lipid oxidation in raw ground pork. *Food Science and Biotechnology*, 21(2): 565-572.
142. Shiomi, N.; Benkeblia, N.; Onodera, S. (2005). The metabolism of the fructooligosaccharides in onion bulbs: a comprehensive review. *Journal of Applied Glycoscience*, 52(2): 121-127.

143. Schieber, A.; Stintzing, F. C.; Carle, R. (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12(11): 401-413.
144. Sies, H. (1985). Introductory Remarks. In: *Oxidative Stress*, Sies, H., Ed., Academic Press: London, p 507. ISBN 9781483289113.
145. Sikorowská, M. (2015). *Pomologické hodnocení vybraných méně pěstovaných jádřovin*. Brno: MENDELU, diplomová práce.
146. Singh, B. N.; Singh, B. R.; Singh, R. L.; Prakash, D.; Singh, D. P.; Sarma, B. K. Upadhyay G.; Singh, H. B. (2009). Polyphenolics from various extracts/fractions of red onion (*Allium cepa*) peel with potent antioxidant and antimutagenic activities. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6): 1161-1167.
147. Slimestad, R.; Fossen, T.; Vagen, I. M. (2007). Onions: a source of unique dietary flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(25): 10067-10080.
148. Spilková, J. (1995). Botanická charakteristika a obsahové látky hlohu. In: *Naše léčivé rostliny*. Obzor: Bratislava, s. 15-18. ISSN 0323-2646.
149. Stadtman, E. R.; Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25(3-4): 207-218.
150. Stelmakiene, A.; Ramanauskiene, K.; Petrikaite, V.; Jakstas, V.; Briedis, V. (2016). Application of dry hawthorn (*Crataegus oxyacantha* L.) extract in natural topical formulations. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 73(4): 955-965.
151. Stratil, P. (1993). *ABC zdravé výživy I*. P. Stratil: Brno, 1. vyd., 344 s. ISBN 80-900029-8-6.
152. Suleria, H. A. R.; Butt, M. S.; Anjum, F. M.; Saeed, F.; Khalid, N. (2015). Onion: nature protection against physiological threats. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(1): 50-66.

153. Škerget, M.; Majhenič, L.; Bezjak, M.; Knez, Ž. (2009). Antioxidant, radical scavenging and antimicrobial activities of red onion (*Allium cepa* L.) skin and edible part extracts. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 23(4): 435-444.
154. Štípek, S. *et al.* (2000). *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. 1. vyd., Praha: Grada. 314 s. ISBN 80-7169-704-4.
155. Takahama, U.; Hirota, S. (2000). Deglucosidation of quercetin glucosides to the aglycone and formation of antifungal agents by peroxidase-dependent oxidation of quercetin on browning of onion scales. *Plant and Cell Physiology*, 41(9): 1021-1029.
156. Tang, X.; Cronin, D. A. (2007). The effects of brined onion extracts on lipid oxidation and sensory quality in refrigerated cooked turkey breast rolls during storage. *Food Chemistry*, 100(2): 712-718.
157. Thannickal, V. J.; Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279(6): 1005-1028.
158. Tian, Y.; Liimatainen, J.; Alanne, A. L.; Lindstedt, A.; Liu, P.; Sinkkonen, J.; Kallio, H.; Yang, B. (2017). Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants. *Food Chemistry*, 220: 266-281.
159. Tiwari, R.; Rana, C. S. (2015). Plant Secondary Metabolites: A Review. *International Journal of Engineering research and General Science*, 3: 661-670.
160. Turner, C.; Turner, P.; Jacobson, G.; Almgren, K.; Waldebäck, M.; Sjöberg, P.; Nordberg Karlsson, E.; Markides, K. E. (2006). Subcritical water extraction and  $\beta$ -glucosidase-catalyzed hydrolysis of quercetin glycosides in onion waste. *Green Chemistry*, 8(11): 949-959.
161. Uchida, K. (2003). 4-hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res*, 42(4): 318-343.

162. USDA Nutrient Database (2017) Raw Onion Dostupné na WWW: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/>, [cit. 2019-07-30].
163. Velíšek, J.; Hajšlová, J. (2009). *Chemie potravin I. a II.*, 3. vyd., OSSIS: Tábor, s 1246. ISBN 978-80-86659-16-9.
164. Velíšek, J. (2002). *Chemie potravin I-III*. 1. vyd., OSSIS: Tábor, s 1038. ISBN 80-86659-03-8.
165. Vojvodić, A.; Komes, D.; Vovk, I.; Belščak-Cvitanović, A.; Bušić, A. (2016). Compositional evaluation of selected agro-industrial wastes as valuable sources for the recovery of complex carbohydrates. *Food Research International*. 89(1): 565-573.
166. Waris, G.; Alam, K. (2004). Immunogenicity of superoxide radical modified-DNA: studies on induced antibodies and SLE anti-DNA autoantibodies. *Life Sci*, 75(22): 2633-2642.
167. Waris, G.; Huh, K. W.; Siddiqui, A. (2001). Mitochondrially associated hepatitis B virus X protein constitutively activates transcription factors STAT-3 and NF-kappa B via oxidative stress. *Mol Cell Biol.*, 21(22): 7721-7730.
168. Waris, G.; Livolsi, A.; Imbert, V.; Peyron, J. F.; Siddiqui, A. (2003). Hepatitis C virus NS5A and subgenomic replicon activate NF-kappaB via tyrosine phosphorylation of kappaBalpha and its degradation by calpain protease. *J Biol Chem*, 278(52): 40778-40787.
169. Wei, H. (1992). Activation of oncogenes and/or inactivation of anti-oncogenes by reactive oxygen species. *Med Hypotheses*, 39(3): 267-267.
170. Wen, L.; Guo, R.; You, L.; Abbasi, A. M.; Li, T.; Fu, X.; Liu, R. H. (2017). Major triterpenoids in Chinese hawthorn "*Crataegus pinnatifida*" and their effects on cell proliferation and apoptosis induction in MDA-MB-231 cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 100: 149-160.

171. Wen, L.; Guo, X. B.; Liu, R. H.; You, L. J.; Abbasi, A. M.; Fu, X. (2015). Phenolic contents and cellular antioxidant activity of Chinese hawthorn "*Crataegus pinnatifida*". *Food Chemistry*, 186: 54-62.
172. Wiczkowski, W.; Romaszko, J.; Bucinski, A.; Szawara-Nowak, D.; Honke, J.; Zielinski, H.; Piskula, M. K. (2008). Quercetin from shallots (*Allium cepa* L. var. *aggregatum*) is more bioavailable than its glucosides. *The Journal of Nutrition*, 138(5): 885-888.
173. Wicklund, T.; Rosenfeld, H. J.; Martinsen, B. K.; Sundfjør, M. W.; Lea, P.; Bruun, T.; Blomhoff, R.; Haffner, K. (2005). Antioxidant capacity and colour of strawberry jam as influenced by cultivar and storage conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 38(4), 387-391.
174. Willner, C. (2004). An overview of the pathophysiology of neurodegenerative disorders. *Altern Ther Health Med*, 10(4): 26-34.
175. Zemědělství 2018. Ministerstvo zemědělství ČR: Praha, 2019, s 161. ISBN 978-80-7437-512-8.
176. Zhai, H.; Nakade, K.; Mitsumoto, Y.; Fukuyama, Y. (2003). Honokiol and magnolol induce  $Ca^{2+}$  mobilization in rat cortical neurons and human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *European Journal of Pharmacology*, 474(2-3): 199-204. DOI: 10.1016/S0014-2999(03)02075-2.
177. Zhang, J.; Liang, R.; Wang, L.; Yan, R.; Hou, R.; Gao, S.; Yang, B. (2013). Effects of an aqueous extract of *Crataegus pinnatifida* Bge. var. Major NEBr. fruit on experimental atherosclerosis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 148(2), 563-569.
178. Zhang, S. L.; Deng, P.; Xu, Y. C.; Lü, S. W.; Wang, J. J. (2016). Quantification and analysis of anthocyanin and flavonoids compositions, and antioxidant activities in onions with three different colors. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(9): 2175-2181.
179. Zhang, Z. S.; Ho, W. K. K.; Huang, Y.; Chen, Z. Y. (2002). Hypocholesterolemic activity of hawthorn fruit is mediated by regulation of

cholesterol-7 alpha-hydroxylase and acyl CoA: cholesterol acyltransferase. *Food Research International*, 35(9): 885-891.

180. Zhou, C. C.; Huang, X. X.; Gao, P. Y.; Li, F. F.; Li, D. M.; Li, L. Z.; Song, S. J. (2014). Two new compounds from *Crataegus pinnatifida* and their antithrombotic activities. *Journal of Asian Natural Products Research*, 16(2): 169-174.
181. Zhu, R.; Li, T.; Dong, Y.; Liu, Y.; Li, S.; Chen, G.; Zhao, Z.; Jia, Y. (2013). Pectin pentasaccharide from hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge var. Major) ameliorates disorders of cholesterol metabolism in high-fat diet fed mice. *Food Research International*, 54(1): 262-268.
182. Zhu, R. G.; Sun, Y. D.; Li, T. P.; Chen, G.; Peng, X.; Duan, W. B.; Zheng, Z. Z.; Shi, S. L.; Xu, J. G.; Liu, Y. H. (2015). Comparative effects of hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge) pectin and pectin hydrolyzates on the cholesterol homeostasis of hamsters fed high-cholesterol diets. *Chemico-Biological Interactions*, 238: 42-47.

## 11. Seznam zkratek

ABTS	kyselina 2,2'-azino-bis(3-etylbenzothiazolin-6-sulphonová)
ACAT	acylCoA:cholesterol acyltransferáza
ANOVA	jednofaktorová analýza rozptylu
B.	Bunge
BCH	kontrolní vzorek bezlepkového chleba
BCHS	vzorek bezlepkového chleba obohacený práškem z cibulových slupek
CPB	<i>Crataegus pinnatifida</i> B.
DHP	džem z hlohu peřenoklaného
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EC	(-)-epikatechin
FORD	antioxidační aktivita krve
FORT	množství volných radikálů v krvi
FOS	fruktooligosacharidy
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GAE.g <sup>-1</sup>	ekvivalent kyseliny galové
GSH	hladina redukovaného glutathionu
GSSG	disulfid glutathionu
HDL-C	lipoproteiny cholesterolu s vysokou hustotou
HFP	dužninou plodů hlohu
HLF	flavonoidy z listů hlohu
HP	pektin z hlohu
HPH	hydrolyzáty ztuženého hlohového pektinu
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie



HPLC-MS/MS	vysokotlaká kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
HPP	slupky plodů hlohu
HPPS	hlohový pseudo-pentasacharid ChA kyselina chlorogenové
IARC	mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
IQ	isokvercitrin
LDL-C	lipoproteiny cholesterolu s nízkou hustotou
MS	hmotnostní spektrometrie
ORAC	oxygen radical absorbance capacity
PC	prokyanidiny
PC-B-2	prokyanidinu B-2
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
RNS	reaktivní dusíkaté radikály
RSM	metodiky odezvy povrchu
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances
TC	celkový cholesterol
TE.g <sup>-1</sup>	Trolox ekvivalent
TG	triglyceridy
TNF-alfa	faktor nádorové nekrózy
TRAP	total radical-trapping antioxidant parameter
VLDL-C	lipoproteiny cholesterolu s velmi nízkou hustotou

## 12. Seznam tabulek

Tab. 1 Přehled kyslíkatých a dusíkatých volných radikálů a jejich reaktivních forem

Tab. 2 Obsah vitamínu E ve vybraných potravinách (mg.kg-1)

Tab. 3 Zastoupení významných dietárních antioxidantů v ovoci a zelenině

Tab. 4 Hlavní komerční druhy hlohu a jejich oblasti pěstování

Tab. 5 Obsah živin, vitaminů a minerálních látek v cibuli kuchyňské (*Allium cepa* L.)

Tab. 6 Výrobní postup džemu z hlohu peřenoklaného – suroviny a technologické parametry

Tab. 7 Receptury chlebů pro analýzy vlivu přídatku prášku z cibulových slupek do těsta (kontrolní a testovaný vzorek)

Tab. 8 Schéma cross-over studie s jednodenní wash-out periodou pro stanovení antioxidační aktivity a obsahu volných radikálů v krvi – bezpečkový chléb s přídatkem prášku z cibulových slupek

Tab. 10 Parametry HPLC a MS systému pro analýzu polyfenolů v džemu z hlohu peřenoklaného

Tab. 11 Parametry HPLC a MS systému pro analýzu polyfenolů v bezpečkových chlebech

Tab. 12 MS/MS hodnoty použité při kvantifikaci látek v bezpečkových chlebech

Tab. 13 Retenční časy a hmotnostní spektra látek vybraných látek v džemu z hlohu peřenoklaného

Tab. 14 Retenční časy a hmotnostní spektra látek vybraných látek v bezpečkovém chlebu obohaceném cibulovými slupkami

### 13. Seznam obrázků

- Obr. 1 Chemické struktury kyseliny benzoové a kyseliny skořicové
- Obr. 2 Struktura flavanu a izoflavanu
- Obr. 3 Strukturální vzorec n-propylbenzenu (1), lignanu (2) a neolignanů (3)
- Obr. 4 Strukturální vzorec magnololu a honokiolu
- Obr. 5 Mechanismus vzniku onemocnění souvisejícího s oxidačním stresem
- Obr. 6 Produkty aktivity reaktivních sloučenin kyslíku v organismu
- Obr. 7 Chemické struktury fenyylpropanoidů v semenech hlohu peřenoklaného (*Crataegus pinnatifida* Bunge)
- Obr. 8 Chemické struktury neolignanů v semenech hlohu peřenoklaného (*Crataegus pinnatifida* Bunge)
- Obr. 9 Chemické struktury triterpenoidů plodů hlohu peřenoklaného (*Crataegus pinnatifida* Bunge)
- Obr. 10 Chemické struktury terpenů v listech hlohu peřenoklaného (*Crataegus pinnatifida* Bunge)
- Obr. 11 Chemické struktury glykosidů v listech hlohu peřenoklaného (*Crataegus pinnatifida* Bunge)
- Obr. 12 Struktury sirných sloučenin vznikajících při zpracování cibule kuchyňské
- Obr. 13 Struktura kvercetinu a jeho glukosidů
- Obr. 14 Odpad z cibule kuchyňské – slupky
- Obr. 15 Trolox – 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
- Obr. 16 Reprezentativní chromatogram (full scan) extraktu hlohového džemu
- Obr. 17 Reprezentativní chromatogram (full scan) vzorku chleba obohaceného o cibulové slupky

## 14. Seznam grafů

Graf 1 Obsah vybraných flavonoidů v džemu z hlohu peřenoklaného

Graf 2 Obsah flavonoidů (a), antioxidační aktivita (b) džemu z hlohu peřenoklaného

Graf 3 *In vivo* antioxidační aktivita (a) a *in vivo* koncentrace volných radikálů (b) v krvi konzumentů před a po (+90 min) konzumaci džemu z hlohu peřenoklaného

Graf 4 Obsah flavonoidů v kontrolním vzorku bezlepkového chleba a vzorku s práškem z cibulových slupek

Graf 5 Koncentrace flavonolů (a), celkových polyfenolů (b) a antioxidační aktivita metodami DPPH (c) a FRAP (d) v kontrolním vzorku bezlepkového chleba a vzorku bezlepkového chleba s práškem z cibulových slupek

Graf 6 *In vivo* antioxidační aktivita (a) a *in vivo* koncentrace volných radikálů (b) v krvi konzumentů před a po (+90 min) konzumaci kontrolního vzorku bezlepkového chleba a vzorku bezlepkového chleba s práškem z cibulových slupek

## 15. Výběr z publikovaných prací

1. Bedrníček, J.; Jirotková, D.; Kadlec, J.; Laknerová, I.; Vrchotová, N.; Tříška, J.; Samková, E.; Smetana, P. (2019). Functional gluten free bread enriched with onion industrial wastes: a novel product with increased health benefits. *Czech Journal of Food Sciences*, 37(4): 268-275. DOI: 10.1007/s10499-019-00369-3.
2. Linhartová, Z.; Lunda, R.; Dvořák, P.; Bárta, J.; Bártová, V.; Kadlec, J.; Samková, E.; Bedrníček, J.; Pešek, M.; Laknerová, I.; Možina, S. S.; Smetana, P.; Mráz, J. (2019). Influence of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis*) in olens to extend the shelf life of vacuum-packed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets stored under refrigerated conditions. *Aquaculture International*, 27: 833-847. DOI: 10.1007/s10499-019-00369-3.
3. Sak, B.; Vecková, T.; Brdíčková, K.; Smetana, P.; Hlásková, L.; Kicia M.; Holubová, N.; McEvoy, J.; Kváč, M. (2019). Experimental Encephalitozoon cuniculi Infection Acquired from Fermented Meat Products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 16(6): 394-398. DOI: 10.1089/fpd.2018.2569
4. Samková, E.; Hasoňová, L.; Kadlec, J.; Smetana, P.; Kala, R. (2019). Young consumer preferences of basic food products depending on age and gender. *Journal of Central European Agriculture*, 20(2): 741-747. DOI: /10.5513/JCEA01/20.2.2162.
5. Kolář, L.; Maršálek, M.; Frelich, J.; Kužel, S.; Smetana, P.; Zedníková, J.; Švecová, M. (2009). Changes in methane release from organic matter passing through the digestive tract of horses. *Czech J. Anim. Sci.*, 54(3): 112-120.
6. Smetana, P.; Pešta, A. (2014). *Ovocná pomazánky, marmeláda nebo džem. Úřed průmyslového vlastnictví*, Praha: Osvědčení o zápisu užitého vzoru č. 26543.
7. Licenční smlouva ze dne 30. 11. 2017 k užívání užitého vzoru č. 26543.