

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Chemické a fyzikální vlastnosti lipového sirupu  
Bc. Tereza Hloušková

Diplomová práce  
2021

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Tereza Hloušková**  
Osobní číslo: **C19478**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Téma práce: **Chemické a fyzikální vlastnosti lipového sirupu**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

### Zásady pro vypracování

1. Zpracovat teoretickou rešerši na téma vlastnosti a využití lipového květu v potravinářství a farmacii. V rámci teoretické části práce zapracujte také informace o metodách využitých při experimentální práci. Použijte dostupné databáze odborných a recenzovaných periodik (knih).
2. Proveďte sběr lipových květů z přesně definované lokace a připravte pro analýzu (sušení). Připravte lipový sirup pomocí různých postupů a zjistěte chemické a fyzikální vlastnosti výsledného produktu.
3. Výsledky vyhodnoťte pomocí adekvátních statistických metod a kriticky diskutujte s již publikovanými daty.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Michaela Frühbauerová**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2021**

Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Ing. Karel Ventura, CSc.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Chemické a fyzikální vlastnosti lipového sirupu jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 11. 6. 2021

Bc. Tereza Hloušková v. r.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu své diplomové práce doc. Ing. Liborovi Červenkovi, Ph.D. za vynaložený čas a cenné rady. Stejně tak bych chtěla poděkovat své konzultantce Ing. Michaele Frühbauerové. Velký dík patří rovněž mé rodině a přátelům, kteří mě podporovali během celého studia.

## **ANOTACE**

Tato diplomová práce se zabývá chemickými a fyzikálními vlastnostmi různě připravených lipových sirupů. V teoretické části jsou popsány biologicky aktivní složky lipového květu a jejich účinky. Dále je popsáno, v jakých formách se lipový květ využívá s ohledem na platnou legislativu. Na závěr teoretické části jsou uvedeny metody, které byly využity v části praktické. Praktická část se pak zabývá přípravou lipových sirupů a jejich výslednými vlastnostmi, které jsou následně sledovány i během skladování. Mimo jiné byla změřena i infračervená spektra lyofilizátů připravených lipových sirupů.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Lípa, lipový sirup, antioxidační aktivita

## **TITLE**

Chemical and physical properties of linden syrup

## **ANNOTATION**

This thesis examines the chemical and physical properties of linden syrup prepared by different methods. The theoretical part describes the biologically active compounds and their effects on human health. After that, various uses of linden flower as a food ingredient or medicine herb with the relation to the legislation are described. Analytical methods used in the practical part of thesis were characterized. The chemical and physical properties of linden syrup prepared by different methods as well as their changes during storage were examined. For lyophilized syrups, the infrared spectra were also collected.

## **KEYWORDS**

Linden, linden syrup, antioxidant activity

# OBSAH

<b>Seznam obrázků</b>	<b>10</b>
<b>Seznam tabulek</b>	<b>11</b>
<b>Seznam grafů</b>	<b>12</b>
<b>Seznam zkratk</b>	<b>13</b>
<b>Úvod</b>	<b>14</b>
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>15</b>
1.1 Lipový květ .....	15
1.1.1 Fenolické látky .....	15
1.1.2 Éterické oleje .....	18
1.1.3 Sliz .....	18
1.1.4 Další složky .....	18
1.2 Zdravotní účinky lipového květu .....	19
1.2.1 Účinky fenolických látek .....	19
1.2.2 Účinky éterického oleje .....	21
1.2.3 Účinky slizu .....	22
1.3 Sběr a konzervace lipového květu .....	23
1.3.1 Sušení .....	23
1.3.2 Lyofilizace .....	23
1.4 Legislativa pro použití léčivých rostlin v průmyslu .....	24
1.4.1 Využití bylin ve farmaceutickém průmyslu .....	24
1.4.2 Využití bylin v potravinářském průmyslu .....	24
1.4.3 Využití bylin v kosmetickém průmyslu .....	25
1.5 Využití lipového květu .....	26
1.5.1 Lipový čaj .....	26
1.5.2 Lipový med .....	27
1.5.3 Lipový sirup .....	28
1.5.4 Tinktury .....	29
1.5.5 Tobolky .....	29
1.5.6 Kosmetické produkty .....	29
1.6 Použité metody .....	30
1.6.1 Měření vodní aktivity .....	30
1.6.2 Měření barevnosti .....	30

1.6.3	Spektrofotometrie .....	35
1.6.4	Stanovení antioxidační aktivity .....	36
1.6.5	Stanovení celkového obsahu fenolických látek .....	37
1.6.6	Stanovení obsahu flavonoidů .....	38
1.6.7	Stanovení obsahu antokyanů .....	38
1.6.8	Infračervená spektroskopie .....	39
<b>2</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>41</b>
2.1	Přístroje .....	41
2.2	Chemikálie .....	41
2.3	Vzorky .....	43
2.3.1	Lipový květ ( <i>Tiliae flos</i> ) .....	43
2.4	Postupy analýzy vzorku lipového květu .....	45
2.4.1	Stanovení obsahu sušiny .....	45
2.4.2	Měření barevnosti .....	45
2.4.3	Stanovení obsahu slizu .....	45
2.5	Optimalizace navážky lipového květu pro přípravu sirupů .....	46
2.6	Příprava sirupů z lipového květu .....	47
2.6.1	Postup 1 .....	47
2.6.2	Postup 2 .....	47
2.6.3	Postup 3 .....	47
2.6.4	Postup 4 .....	48
2.6.5	Sledování změn během skladování a po pasterizaci .....	48
2.7	Postupy analýzy připravených lipových sirupů .....	49
2.7.1	Měření pH .....	49
2.7.2	Měření vodní aktivity .....	49
2.7.3	Měření barevnosti .....	49
2.7.4	Spektrofotometrická analýza .....	49
2.7.5	Infračervená spektroskopie .....	54
2.8	Statistické vyhodnocení .....	55
<b>3</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>56</b>
3.1	Analýza vzorku lipového květu .....	56
3.1.1	Stanovení obsahu sušiny .....	56
3.1.2	Měření barevnosti .....	56



3.1.3	Stanovení obsahu slizu .....	57
3.2	Optimalizace navážky lipového květu pro přípravu sirupů .....	59
3.3	Analýza připravených lipových sirupů .....	60
3.3.1	Měření pH .....	60
3.3.2	Měření vodní aktivity .....	61
3.3.3	Měření barevnosti .....	62
3.3.4	Spektrofotometrické analýzy .....	64
3.3.5	Infračervená spektroskopie .....	70
3.4	Analýza skladovaného a pasterizovaného lipového sirupu .....	73
3.4.1	Měření pH .....	73
3.4.2	Měření aktivity vody .....	73
3.4.3	Měření barevnosti .....	74
3.4.4	Spektrofotometrické analýzy .....	76
<b>4</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>82</b>
	<b>Použitá literatura</b> .....	<b>83</b>
	<b>Seznam příloh</b> .....	<b>91</b>

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1:</b> <i>Tiliae flos</i> .....	15
<b>Obrázek 2:</b> Obecná struktura hydroxybenzoových kyselin (A), hydroxyskořicových kyselin (B) a flavonoidů (C) .....	16
<b>Obrázek 3:</b> Schéma redukce molekulárního kyslíku na vodu .....	20
<b>Obrázek 4:</b> Geometrie měření .....	32
<b>Obrázek 5:</b> Obecné schéma spektrofotometru .....	33
<b>Obrázek 6:</b> Barevný prostor $L^*a^*b^*$ z perspektivy (A) a v průřezu (B) .....	35
<b>Obrázek 7:</b> Obecné schéma spektrofotometru .....	35
<b>Obrázek 8:</b> Schéma reakce DPPH radikálu s antioxidantem .....	37
<b>Obrázek 9:</b> Obecné schéma IČ spektrometru .....	39
<b>Obrázek 10:</b> Michelsonův interferometr .....	40
<b>Obrázek 11:</b> Zadní strana listu .....	43
<b>Obrázek 12:</b> Přední strana listu .....	43
<b>Obrázek 13:</b> Lípa velkolistá zvolená pro sběr .....	43
<b>Obrázek 14:</b> Sušení lipového květu - sušička ovoce .....	44
<b>Obrázek 15:</b> Lyofilizovaný lipový květ (A), sušený lipový květ (B) .....	56
<b>Obrázek 16:</b> Lipový sirup (ze sušeného lipového květu, Postup 1) .....	62
<b>Obrázek 17:</b> Sraženina vznikající během stanovení flavonoidů (metoda 2) .....	69
<b>Obrázek 18:</b> Infračervená spektra lipových sirupů a slepého vzorku .....	72

## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1:</b> Rozdělení základních rostlinných fenolů .....	15
<b>Tabulka 2:</b> Variabilita fenolických sloučenin v <i>Tiliae flos</i> (lípa srdčitá) .....	17
<b>Tabulka 3:</b> Zastoupení flavonoidů: lípa stříbrná a lípa velkolistá .....	18
<b>Tabulka 4:</b> Přehled ROS a RMN .....	19
<b>Tabulka 5:</b> TPC pro methanolové extrakty, nálevy a extrakty některých bylin .....	26
<b>Tabulka 6:</b> TPC pro bylinný, černý a zelený čaj .....	27
<b>Tabulka 7:</b> Zastoupení fenolických látek v lipovém medu .....	28
<b>Tabulka 8:</b> Obsah sušiny pro sušený a lyofilizovaný lipový květ .....	56
<b>Tabulka 9:</b> Měření barevnosti lipové květu v barevném prostoru $L^*a^*b^*$ a $L^*C^*h^\circ$ .....	57
<b>Tabulka 10:</b> Naměřené hodnoty pH připravených sirupů .....	60
<b>Tabulka 11:</b> Naměřené hodnoty vodní aktivity připravených sirupů.....	61
<b>Tabulka 12:</b> Měření barevnosti připravených sirupů v barevném prostoru $L^*a^*b^*$ .....	62
<b>Tabulka 13:</b> Měření barevnosti připravených sirupů v barevném prostoru $L^*C^*h^\circ$ .....	63
<b>Tabulka 14:</b> Identifikace spekter absorpčních pásů spekter lipových sirupů .....	71
<b>Tabulka 15:</b> Naměřené hodnoty pH pro čerstvý, skladovaný a pasterizovaný sirup .....	73
<b>Tabulka 16:</b> Naměřené hodnoty vodní aktivity pro čerstvý, skladovaný a pasterizovaný sirup .....	74
<b>Tabulka 17:</b> Měření barevnosti pro čerstvý, skladovaný a pasterizovaný sirup v barevném prostoru $L^*a^*b^*$ .....	74
<b>Tabulka 18:</b> Měření barevnosti pro čerstvý, skladovaný a pasterizovaný sirup v barevném prostoru $L^*C^*h^\circ$ .....	75

## SEZNAM GRAFŮ

<b>Graf 1:</b> Obsah slizu pro sušený a lyofilizovaný lipový květ .....	58
<b>Graf 2:</b> Antioxidační aktivita pro sirupy a výluhy připravené z 5 a 10 g sušeného a lipového květu stanovená metodou DPPH .....	59
<b>Graf 3:</b> Antioxidační aktivita připravených sirupů stanovená metodou DPPH .....	64
<b>Graf 4:</b> Antioxidační aktivita připravených sirupů stanovená metodou FRAP .....	65
<b>Graf 5:</b> Chelatační vlastnosti připravených sirupů .....	66
<b>Graf 6:</b> Celkový obsah fenolických látek připravených sirupů .....	67
<b>Graf 7:</b> Stanovení obsahu flavonoidů (metoda 1) u připravených sirupů .....	68
<b>Graf 8:</b> Stanovení antioxidační aktivity pro čerstvý, skladovaný a pasterizovaný sirup metodou DPPH .....	76
<b>Graf 9:</b> Stanovení antioxidační aktivity pro čerstvý, skladovaný a pasterizovaný sirup metodou FRAP .....	77
<b>Graf 10:</b> Stanovení chelatační aktivity pro čerstvý, skladovaný a pasterizovaný sirup .....	78
<b>Graf 11:</b> Stanovení celkového obsahu fenolických látek pro čerstvý, skladovaný a pasterizovaný sirup .....	79
<b>Graf 12:</b> Stanovení obsahu flavonoidů (metoda 1) pro čerstvý, skladovaný a pasterizovaný sirup .....	80

## SEZNAM ZKRATEK

CIE	Commission internationale de l'éclairage (Mezinárodní komise pro osvětlování)
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-nitrofenyl)hydrazyl
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (kyselina ethylendiamintetraoctová)
FC	Folin-Ciocalteu
Ferrozín	3-(2-Pyridyl)-5,6-difenyl-1,2,4,-triazin-p,p'-hydrát monosodné soli disulfonové kyseliny
FRAP	ferric reducing-antioxidant power (redukční síla antioxidantu)
GPS	Global Positioning System (Globální polohový systém)
IČ	infračervené
MeOH	methanol
RNS	reactive nitrogen species (reaktivní formy dusíku)
ROS	reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)
RSEX	reflection-specular excluded
RSIN	reflectance-specular included
RTRAN	regular transmission (regulární transmise)
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TPC	total phenolic content (celkový obsah fenolických látek)
TPTZ	2,4,6,-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin)
Trolox	kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboxylová
TTRAN	total transmission (totální transmise)
UV	ultraviolet (ultrafialové)
VIS	visible (viditelné)
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)

## ÚVOD

I dnes se stále mnoho lidí při své léčbě spoléhá na byliny a léčivé rostliny, mezi které patří i lípa. Lípa je listnatým stromem, který se vyskytuje v mírném podnebí na severní polokouli. K medicínám účelům se sbírají její květy včetně listenů. Ty se pak konzumují ve formě čaje nebo jako sirup, tobolky či kapky. Důvodem jsou jejich sedativní, spasmolytické a diaforetické účinky<sup>1</sup>. Navíc je lipový květ i zdrojem antioxidantů, které působí pozitivně na lidské zdraví.

Cílem této práce bylo připravit lipové sirupy podle různých postupů a následně porovnat jejich fyzikálně-chemické parametry. Mezi stanovované parametry patřilo hodnocení obsahu fenolických látek, antokyanů a některých flavonoidů. Stanovena byla také jejich antioxidační kapacita, a to pomocí metody DPPH, FRAP a porovnáním jejich chelatačních vlastností. Změřena byla rovněž jejich barva, pH a vodní aktivita. Dále byly u lyofilizátů připravených sirupů změřena infračervená spektra.

U sirupu, který obsahoval nejvyšší množství antioxidantů, byly sledovány i změny jeho parametrů v čase, tedy po skladování, ale také po pasterizaci.

Kromě toho byla provedena i analýza vzorků sušeného a lyofilizovaného lipového květu, ze kterých byly sirupy připravovány. V jejich případě byl stanoven obsah slizu, sušiny a byla porovnána také jejich barva.

---

<sup>1</sup> spasmolytický účinek = působí proti křečím, diaforetický účinek = vyvolává pocení

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Lipový květ

Lipový květ (*Tiliae flos*) je tvořen květenstvím s listeny (Obrázek 1) a vyznačuje se aromatickou vůní. Mezi biologicky aktivní složky, tedy látky zodpovědné za jeho léčivé vlastnosti, patří: fenolické látky, éterické oleje a sliz [1, 2].



Obrázek 1: *Tiliae flos* [1]

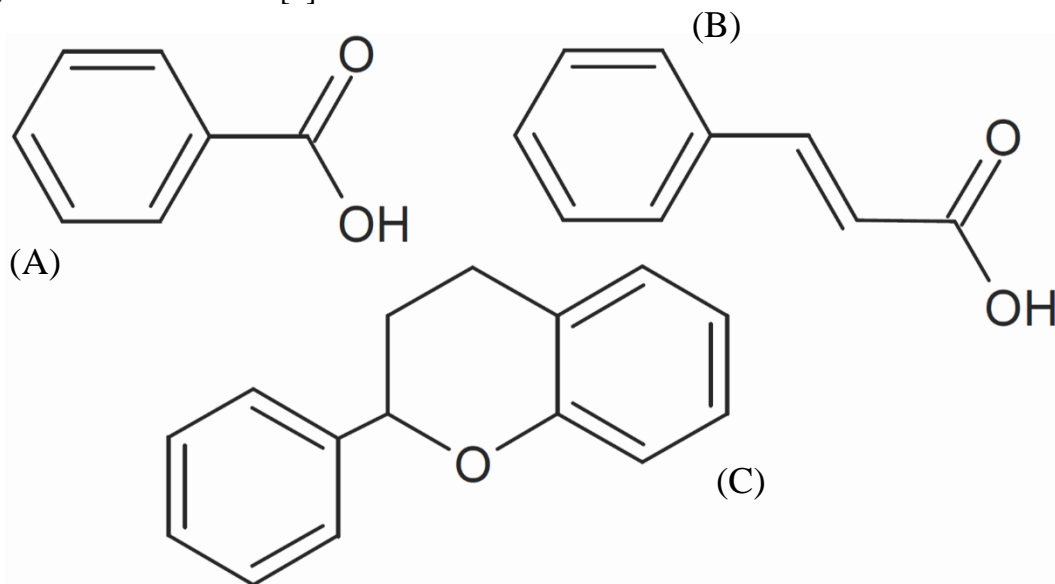
### 1.1.1 Fenolické látky

Fenoly jsou látky, které dělíme do dvou skupin, a to na flavonoidy a neflavonoidy. Mezi flavonoidy patří flavonoly, flavanoly a antokyany. Do skupiny neflavonoidních fenolů patří hydroxybenzoové a hydroxyskořicové kyseliny. Konkrétní zástupci z těchto skupin jsou uvedeny v Tabulce 1 [3].

Tabulka 1: Rozdělení základních rostlinných fenolů [3]

<i>Ne-flavonoidní fenolické látky</i>	<i>hydroxybenzoové kyseliny</i>	kyselina gallová, protokatechová, vanilová
	<i>hydroxyskořicové kyseliny</i>	kyselina kumarová, kávová, kaftarová
	<i>stilbeny</i>	trans a cis-resveratrol, astringin
<i>Flavonoidní fenolické látky</i>	<i>antokyany</i>	malvidin-3-glukosid, kyanidin-3-glukosid, peonidin-3-glukosid, delfidin-3-glukosid
	<i>flavan-3-oly</i>	katechin, epikatechin, gallokatechin
	<i>flavonoly</i>	kvercetin, myricetin, rutin, kaempferol

Co se jejich struktur týče (Obrázek 2), kyseliny hydroxybenzoové a hydroxyskořicové je mají relativně jednoduché. Jsou tvořené pouze jedním benzoovým kruhem, zatímco v případě flavonoidů je struktura komplikovanější. Jejich skelet obsahuje už větší množství aromatických jader, a navíc se dále větví [4].



**Obrázek 2:** Obecná struktura hydroxybenzoových kyselin (A), hydroxyskořicových kyselin (B) a flavonoidů (C)

Do fenolických látek, respektive polyfenolických se řadí i třísloviny. Ty jsou obecně v rostlinách hojně rozšířené. Jedná se o látky rozpustné ve vodě i alkoholu, které se dělí na hydrolyzovatelné (gallotaniny, ellagotaniny) a kondenzované (proantokyanidiny, katechinové třísloviny). Striktní zařazení do skupiny je ale v případech některých tříslovin obtížné [5].

U lipového květu se obecně vyskytují především flavonoidy, konkrétně deriváty kvercetinu (kvercitrin, isokvercetin, hyperosid), dále pak deriváty kaempferolu (astragalín, tilirosid) a katechinu. V neposlední řadě obsahuje fenolové kyseliny (chlorogenovou, kávovou, p-kumarovou) a třísloviny.

Pro jednotlivé druhy lip, respektive pro jejich lipový květ se ale zastoupení jednotlivých fenolů liší. Podle Ziaja a kol (2020)<sup>2</sup> je dokonce možné na základě analýzy fenolického profilu lipových květů zjistit, ze kterého druhu lípy pocházejí. V čem se ale pak budou odlišovat lipové květy pocházející ze stejného druhu lípy, ale jiného stromu, respektive stromu s odlišnou lokací, je celkové množství fenolických látek. To může být údajně ovlivněno genetickou

<sup>2</sup>ZIAJA, M., K. A. PAWŁOWSKA, K. JÓZEF CZYK, A. PRUŠ, J. STEFAŃSKA a S. GRANICA. UHPLC-DAD-MS/MS analysis of extracts from linden flowers (*Tiliae flos*): Differences in the chemical composition between five *Tilia* species growing in Europe. *Industrial Crops and Products* [online]. 2020, **154**. ISSN 09266690. DOI:10.1016/j.indcrop.2020.112691.



variabilitou lip anebo pak enviromentálními parametry v místě růstu, jako je teplota, vlhkost a míra oslunění [1, 6].

Výsledky analýzy, která se zabývala právě proměnlivostí obsahu fenolických látek, jsou uvedeny v Tabulce 2. Tato analýza přisoudila odlišnosti v obsahu genetické variabilitě, a to z toho důvodu, že vzorky pocházely sice z různých míst, ale s dosti podobnými enviromentálními parametry.

**Tabulka 2:** Variabilita fenolických sloučenin v *Tiliae flos* (lípa srdčitá) [1]

<i>Lípa srdčitá [mg/100 g]</i>	
chlorogenová kyselina	273–1 129
kávová kyselina	16–24
vanilová kyselina	392–1 718
p-kumarová kyselina	142–769
epikatechin	1 000–4 745
isokvercitrin	291–1 417
hyperosid	224–1 285
rutin	1 264–4 654
kvercetin	101–503
tilirosid	196–1 006
kaempferol	214–709
astragalin	270–2 295

Celkový obsah fenolických kyselin se pohyboval od 0,17 do 1,87 g/100 g. Identifikovány byly kyseliny: chlorogenová, kávová, vanilová a p-kumarová. Vanilová kyselina byla přítomna v největším množství (391,5–1 718 mg/100 g) a největší rozdíly byly v obsahu kyseliny p-kumarové (142,1–769 mg/100 g). Celkový obsah flavonoidů kolísal od 0,09 do 0,52 g/100 g. Konkrétně se vyskytoval: epikatechin, isokvercitrin, hyperosid, rutin, kvercetin, tilirosid a kaempferol. Největší podíl z nich představovaly rutin a epikatechin [1].

Zastoupení fenolických látek se liší i pro jednotlivé části lipového květu, tj. pro květ a listen. Fenoly se ale nevyskytují pouze v lipovém květu, vyskytují se i v listech. Ukázka rozdílného zastoupení flavonoidů pro jednotlivé části je vyobrazena v Tabulce 3. Právě tyto rozdíly by mohly posloužit při kontrole falšování bylinek přidavkem listů. Například v listech lípy velkolisté je hodně zastoupený kvercetin, ale u květu nikoli. Naopak květy lípy velkolisté

obsahují velké množství isokvercitrinu s rutinem a astragalin, zatímco v listech tyto flavonoidy téměř nejsou. Proto by jejich vyšší obsah mohl poukazovat na dobrou kvalitu bylin tedy na to, že v nich nejsou obsaženy listy [2].

**Tabulka 3:** Zastoupení flavonoidů: lípa stříbrná a lípa velkolistá [2]

	<i>Lípa stříbrná</i>			<i>Lípa velkolistá</i>		
	<b>Květ</b>	<b>Listen</b>	<b>Listy</b>	<b>Květ</b>	<b>Listen</b>	<b>Listy</b>
kvercetin	12,44	52,76	67,53	5,05	25,96	47,75
hyperosid					0,95	3,95
isokvercitrin + rutin	28,78	7,62	5,31	55,46	8,31	0,55
astragalin	24,84	5,12	1,78	26,47	4,2	0,81
kaempferol		13,91	16,92		10,98	29,46
kvercitrin	30,03	8,35	6	6,08	22,52	9,77
tilirosid	0,16	12,24	2,46			

výsledky jsou uvedeny v % z celkového množství flavonoidů

### 1.1.2 Éterické oleje

Éterické oleje jsou ve vodě nerozpustné látky, které se označují také pojmem silice. Jedná se o látky těkavé s výraznou vůní. Celkový obsah éterického oleje je u lipového květu proměnlivý a celkem nízký. Jeho množství se pohybuje zhruba od 0,02–0,08 %. Složení je taktéž rozmanité, a to v závislosti na životním prostředí, ale obecně zde dominují uhlovodíky. Mezi hlavní složky patří: trikosan, pentakosan, henikosan, nonanal, acetofenon, kyselina linolová a nonanová. Dále obsahuje farnesol, geraniol, eugenol a linalool, což jsou hlavní nositelé vůně [1, 7, 8, 9].

### 1.1.3 Sliz

Sliz v lipovém květu je tvořen heteropolysacharidy. Obsahuje tedy větší množství různých sacharidů, jako je arabinóza, galaktóza, rhamnóza, glukóza, manóza a xylóza. Kromě nich obsahuje ještě kyseliny, a to D-glukuronovou a D-galakturonovou. Celkový obsah slizu je údajně závislý na půdních podmínkách v místě růstu lípy, přičemž se uvádí, že může dosahovat až 10 % [1, 8, 10].

### 1.1.4 Další složky

V lipovém květu se také vyskytují aminokyseliny, a to například cystein, alanin, leucin, serin a fenyalanin. Dále obsahuje vitamíny E a C [11, 12].

## 1.2 Zdravotní účinky lipového květu

Lipový květ se užívá v různých formách, které jsou popsány v kapitole 1.5. Obecně se tato bylina využívá při nachlazení, rýmě, zánětu průdušek nebo horečkách, a to z toho důvodu, že vyvolává pocení. Kromě toho má uklidňující účinky a pomáhá i při svalových křečích. Mezi účinné složky, jak již bylo zmíněno, patří fenolické látky, éterické oleje a sliz [1, 13].

### 1.2.1 Účinky fenolických látek

Fenolickým látkám, konkrétně flavonoidům a kyselině p-kumarové je přisuzována schopnost vyvolávat pocení a působit proti křečím. Dále pak fenolické látky patří do skupiny takzvaných antioxidantů. Ty jsou pro organismus velice důležité, a to z toho důvodu, že eliminují volné radikály a reaktivní metabolity v lidském těle [14, 15, 16].

#### Volné radikály a reaktivní metabolity

Volné radikály jsou atomy, molekuly nebo jejich fragmenty, které mají jeden nebo více nepárových elektronů. Mohou být buď elektroneutralními částicemi nebo aniontového či kationtového charakteru. Volné radikály jsou často velmi reaktivní, a to díky neúplnému počtu elektronů v jejich valenční vrstvě. Ostatním látkám odebírají právě jim chybějící elektron, čímž se oxidují. Proto se také nazývají oxidanty.

Nejjednodušším radikálem je vodík, který má jeden nepárový elektron. Dále rozeznáváme radikály odvozené od kyslíku, dusíku nebo různých organických sloučenin. Z volných radikálů pak mohou vznikat i tzv. reaktivní metabolity, které nemají povahu radikálu (nemají nepárový elektron). Ty mohou být i reaktivnější než původní molekuly, ze kterých vznikly. Dohromady se pak volné radikály a reaktivní metabolity označují pojmem ROS (reactive oxygen species) nebo RNS (reactive nitrogen species) [15, 16]. Jejich přehled je uveden v Tabulce 4.

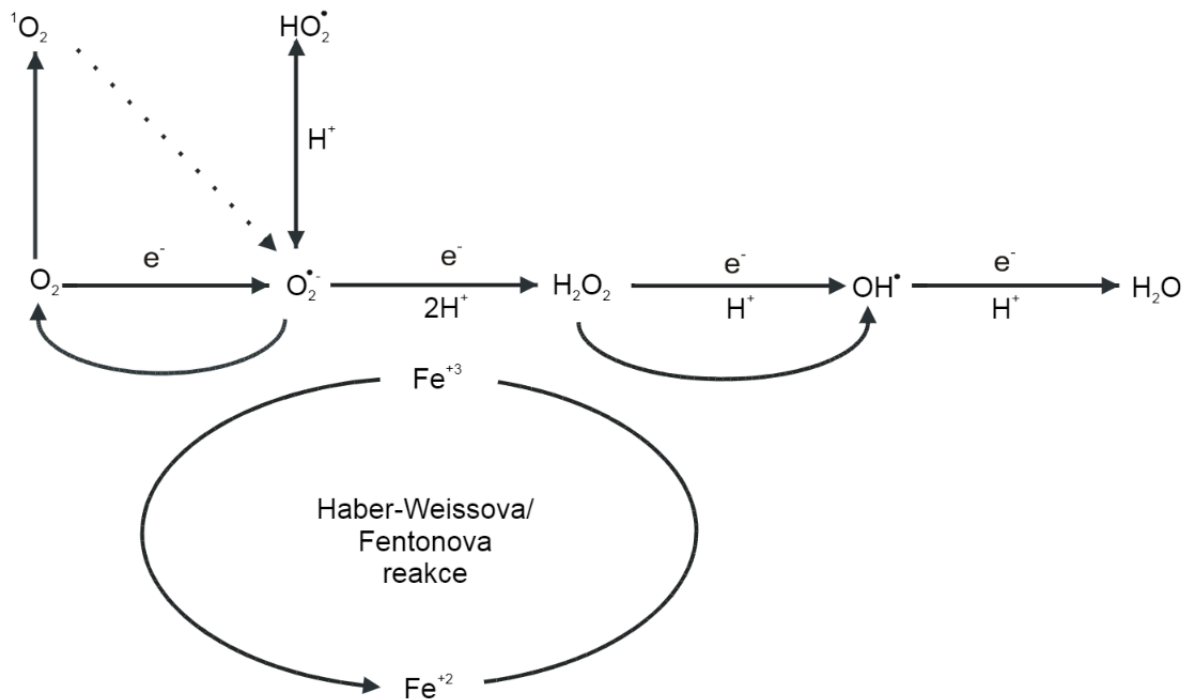
**Tabulka 4:** Přehled ROS a RMN [15]

<b>ROS</b>	<i>volné radikály</i>	superoxid $O_2^{\cdot-}$
		hydroxylový radikál $HO^{\cdot}$
		alkoxylový radikál $RO^{\cdot}$
		peroxylový radikál $ROO^{\cdot}$
<i>látky neradikálové povahy</i>	peroxid vodíku $H_2O_2$	
	kyselina chlorná $HOCl$	
	ozon $O_3$	
	singletový kyslík $^1O_2$	
<b>RNS</b>	<i>volné radikály</i>	oxid dusnatý $NO^{\cdot}$
		oxid dusičitý $NOO^{\cdot}$
		peroxynitrit $ONOO^{\cdot}$

ROS (reactive oxygen species), RNS (reactive nitrogen species)

### Endogenní zdroje ROS

Kyslík, který využívají aerobní organismy k dýchání se z velké části vylučuje z těla jako oxid uhličitý. Část vdechovaného kyslíku se ale převádí na vodu. K celkové redukci kyslíku na vodu jsou potřeba 4 elektrony, přičemž během ní vznikají všechny základní typy ROS. Přidáním jednoho elektronu k molekule kyslíku vzniká superoxid, následně peroxid vodíku, hydroxylový radikál a po přijetí čtvrtého elektronu vzniká voda (Obrázek 3) [3, 4].



**Obrázek 3:** Schéma redukce molekulárního kyslíku na vodu [3]

Během této reakce se 1–3 % kyslíku přemění na superoxid, a to například vlivem průsaku elektronů z mitochondriálního řetězce. Následně superoxid spontánně nebo působením enzymu superoxidodismutázy, přechází na peroxid vodíku. Ten může reagovat s  $Fe^{2+}$  nebo  $Cu^+$  prostřednictvím Fentonovy reakce za vzniku vysoce škodlivého hydroxylového radikálu [4, 17].

### Exogenní zdroje ROS

Mezi exogenní zdroje ROS patří tabákový kouř, toxiny z životního prostředí, těžké kovy, organické pesticidy nebo UV záření [4].

### Oxidační stres

Vzniklé ROS/RNS mohou velmi rychle reagovat s biologicky důležitými molekulami, jako jsou lipidy, proteiny nebo nukleové kyseliny, čímž je poškozují. Kromě toho je během těchto reakcí i pravděpodobný vznik dalších látek, které mohou rovněž způsobit poškození buněk nebo orgánů v lidském těle. V tu chvíli, kdy si lidský organismus nedokáže s přítomnými ROS/RNS

poradit, a tedy se jejich působení stává nekontrolovaným procesem, nazýváme tento stav tzv. oxidačním stresem. Jde tedy vlastně o nerovnováhu mezi oxidanty a antioxidanty. Poškození molekul, které je výsledkem tohoto procesu, pak může vyústit v řadu onemocnění [4, 15].

### Antioxidanty

Naštěstí existují také látky, které jsou schopny vzniklé ROS/RNS eliminovat. Jedná se o již zmíněné antioxidanty, mezi které patří rostlinné fenolické látky, jejichž zástupci byli jmenováni v rámci kapitoly 1.1.1. Dále se sem řadí enzymy, jako je superoxiddismutáza, kataláza a glutathionperoxidáza. Superoxiddismutáza slouží k urychlení přeměny superoxidu na peroxid vodíku. O jeho rozklad se pak stará kataláza nebo glutathionperoxidáza. Kromě enzymů mezi antioxidanty patří i vitamíny, jako je vitamín C nebo E. Nicméně v řadě experimentálních studií bylo prokázáno, že antioxidační aktivita mnoha rostlinných fenolických látek je vyšší než účinek antioxidačních vitamínů [15, 16, 18].

Konzumace potravin bohatých na antioxidanty, jako je ovoce a zelenina, je pro lidské tělo přínosné. Je totiž spojována s nižším výskytem rakoviny, infarktu, neurodegenerativní onemocnění a dalších chronických nemocí. Nicméně je důležité si také uvědomit, že pro zachování životních funkcí jsou i volné radikály nezbytné. Proto je nutné udržovat v těle mezi antioxidanty a volnými radikály rovnováhu [15, 19].

#### **1.2.1.1 Účinky tříslovin**

Léčivé účinky tříslovin, které rovněž lípa obsahuje, spočívají v jejich adstringentním působení. Tato schopnost je důležitá při ošetřování popálenin, omrzlin nebo zánětů v ústní dutině. Třísloviny reagují s bílkovinami na povrchu poškozené kůže či sliznice za vzniku ochranné membrány. Ta pak zastavuje drobná krvácení nebo vylučování výměšku zanícené sliznice. Zároveň se pak pod membránou může tvořit nový epitel bez rizika nové infekce. Navíc třísloviny znecitlivují nervová zakončení, čímž ulevují v daném místě od bolesti [9].

#### **1.2.2 Účinky éterického oleje**

Účinky éterických olejů jsou obecně velmi rozmanité a dělí se podle nich do několika skupin. Rozeznávají se například expektorancia, která konkrétně napomáhají odkašlávání. Dále se v některých rostlinách vyskytují éterické oleje například s diuretickými nebo dezinfekčními účinky [9].

Éterický olej obsažený v lipovém květu vykazuje účinek sedativní, diuretický a spasmolytický. Sedativní účinky jsou konkrétně připisovány látkám: benzaldehyd, benzylalkohol a

2-fenylethanol. Nicméně některé studie připisují sedativní účinky lipového květu i flavonoidům [1, 6, 14].

### **1.2.3 Účinky slizu**

Léčivý význam slizu spočívá ve zmírnění podráždění dýchacích cest, a to proto, že na jejich sliznici vytváří ochranný povlak. Zároveň podporuje vykašlávání. Je tedy užitečný jak při suchém, tak vlhkém kašli [20].

### 1.3 Sběr a konzervace lipového květu

Pro sběr rostlin je důležité zvolit vhodné načasování. To by mělo být takové, aby rostlina během sběru měla ideální fytochemický obsah. Například kořeny a oddenky se sbírají na konci vegetačního období, kůra se sbírá na jaře a květy těsně před nebo krátce po otevření. Pro lipový květ se doporučuje sběr ihned na počátku rozkvétání a jen za suchého počasí. Konkrétně se sbírají květy i s přisedlým listenem (*Tiliae flos*) z lípy obecné, velkolisté a srdčité. Z lípy stříbrné se sběr nedoporučuje kvůli jejím minimálním léčivým účinkům.

Po sběru je vhodné v co nejkratším čase zahájit konzervaci, a to z toho důvodu, že ihned po utrnutí dochází u rostliny k metabolickým změnám, což s sebou nese pokles její léčivé hodnoty. Konzervace je nutná i z hlediska možného obsahu mikroorganismů [21–26].

#### 1.3.1 Sušení

Nejběžnější metodou konzervace je sušení teplým vzduchem. To je založeno na snižování vlhkosti, a tedy i vodní aktivity<sup>3</sup>. Pro zachování léčivých látek je nutné zvolit vhodné sušicí parametry, přičemž u lipového květu se doporučují teploty do 40 °C. Pro úplné zastavení enzymatických procesů, musí být výsledný obsah vody nižší než 10 % [3, 21, 22, 24].

#### 1.3.2 Lyofilizace

Z hlediska zachování původních vlastností potraviny je lyofilizace ideální volbou. Zachován zůstává vzhled, vůně a velká část živin. Důvodem je zpracování při nízké teplotě bez přítomnosti vzduchu. Sušený materiál je umístěn do evakuované komory, kde je nejprve zmražen, a to na teplotu kolem -60 až -80 °C. Dále následuje sušicí proces, který je realizován snížením okolního tlaku a dodáním tepla. Teplo musí být dodáno v takové míře, aby voda mohla začít sublimovat skrz póry sušeného materiálu.

Lyofilizace zajišťuje téměř úplné odstranění vody a vysokou pórovitost usušeného produktu. Díky tomu pak tento produkt rychle rehydratuje a je možné jej snáz převést na prášek. Nevýhodou je dlouhá doba tohoto procesu a jeho finanční náročnost. Z tohoto důvodu nepatří mezi rutinní metody ke zpracování bylin nebo jiného rostlinného materiálu [21, 27].

---

<sup>3</sup> vodní aktivita = dosažitelná voda pro mikroorganismy (viz. kapitola 1.6.1)

## **1.4 Legislativa pro použití léčivých rostlin v průmyslu**

Byliny nebo léčivé rostliny se obecně využívají ve farmaceutickém, potravinářském či kosmetickém průmyslu. Ke každému z těchto průmyslů se vztahují jiné zákony, vyhlášky nebo nařízení.

### **1.4.1 Využití bylin ve farmaceutickém průmyslu**

Postupy a požadavky pro výrobu léčiv a léčivých přípravků jsou popsány v Českém lékopise, který připravuje Lékopisná komise Ministerstva zdravotnictví. Registrace a posuzování léčiv je pak v kompetenci Státního ústavu pro kontrolu léčiv (SÚKL). Léčivé přípravky z rostlin jsou podle zákona č. 378/2007 Sb. definovány jako přípravky obsahující jako účinné složky nejméně 1 rostlinnou látku nebo nejméně 1 rostlinný přípravek nebo nejméně 1 rostlinnou látku v kombinaci s nejméně jedním rostlinným přípravkem. Rostlinnými látkami se potom rozumějí rostliny celé, rozdrobněné nebo nařezané, části rostlin, řasy, houby, lišejníky, a to v nezpracovaném, v sušeném nebo v čerstvém stavu; za rostlinné látky se rovněž považují rostlinné sekrety, které nebyly podrobeny žádnému zpracování. Rostlinnými přípravky se rozumějí přípravky získané zpracováním rostlinné látky nebo rostlinných látek způsobem, jako je extrakce, destilace, lisování, frakcionace, přečišťování, zahušťování nebo fermentace; rostlinné přípravky zahrnují rozdrčené nebo upráškované rostlinné látky, tinktury, extrakty, silice, vylisované šťávy a zpracované sekrety [28, 29].

### **1.4.2 Využití bylin v potravinářském průmyslu**

Využití léčivých rostlin v potravinářském průmyslu se řídí zákonem č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů [30].

#### **1.4.2.1 Bylinné čaje**

Prováděcí vyhláška č. 330/1997 Sb. k zákonu o potravinách a tabákových výrobcích definuje čaj jako výrobek rostlinného původu, který slouží k přípravě nápoje určeného k přímé lidské spotřebě nebo nápoj připravený z tohoto výrobku. Vyhláška definuje bylinné čaje jako výrobky takové, které jsou z částí bylin nebo jejich směsí nebo bylin s pravým čajem (tj. čaj vyrobený z výhonků, listů, pupenů, nebo jemných částí dřevnatělých stonků čajovníku *Camellia sinensis* (Linnaeus) O. Kunze, popřípadě jejich kombinací) nebo jejich směsí s ovocem, přičemž obsah bylin musí činit minimálně 50 % hmotnosti. Do čajů je povoleno využívat květy lípy: *Tilia platyphyllos* Scopoli, *Tilia cordata* Miller, *Tillia euchlora* Koch [31].



#### **1.4.2.2 Doplnky stravy**

Zvláštní kategorii potravin, která nepodléhá tak přísným kontrolám a povolovacím procedurám jako léčiva jsou tzv. doplňky stravy. Jejich problematiku upravuje na národní úrovni vyhláška č. 58/2018 Sb. Účinky doplňku stravy deklarované výrobcem nejsou nikým ověřovány. Výrobci nesmí deklarovat vlastnosti prevence, léčby nebo vyléčení onemocnění. Většinou tak uvádějí tvrzení o léčivých vlastnostech jednotlivých složek výrobku.

Základním pravidlem pro rozlišení doplňku stravy a léčivého přípravku je odlišné označení. Na obalu doplňku stravy je uvedeno označení „doplňek stravy“. Léčivý přípravek má na obalu uvedené registrační číslo, které mu je uděleno v registračním řízení [29, 32].

#### **1.4.3 Využití bylin v kosmetickém průmyslu**

Výrobu kosmetických přípravků reguluje zákon o ochraně veřejného zdraví a nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 [33].

## 1.5 Využití lipového květu

Podle WHO se až 4 miliardy lidí spoléhá hlavně na tradiční léky jako jsou léčivé rostliny. Mezi ně patří i lípa, která má mnohonásobné využití. Jak již bylo zmíněno, připravují se z ní výrobky potravinářské, farmaceutické, ale i kosmetické [1, 34, 35, 36].

Z toho důvodu, že většina výrobků patří mezi tzv. doplňky stravy, jejichž účinky nejsou nikým ověřovány (viz. kapitola 1.4.2.2), nejsou účinky deklarované výrobcem pro jednotlivé produkty citovány. Výrobci často předkládali zdravotní účinky, které platí obecně pro lipový květ (viz. kapitola 1.2), tudíž se u jednotlivých produktů dokonce shodovaly.

### 1.5.1 Lipový čaj

Čaje jsou nejčastějším a nejjednodušším způsobem konzumace bylin, které dává přednost většina lidí. Je vědecky dokázáno, že čaj z lipových květu podporuje přirozený imunitní systém. Nicméně se nedoporučuje ho konzumovat dlouhodobě, ale pouze při potížích [25, 26, 37].

#### Fenolické látky a jejich porovnání

V lipovém čaji se objevují stejné fenolické látky jako v samotném lipovém květu, které byly uvedeny v kapitole 1.1.1, a to rutin, kvercitrin, isokvercitrin, tilirosid, astragalin, katechin, kyselina kávová, kyselina p-kumarová, chlorogenová kyselina [34, 38].

Srovnání hodnot TPC mezi lípou a dalšími bylinami, které se využívají pro přípravu čajů, poskytuje Tabulka 5. Nejvyšších hodnot dosahuje lípa, ale je patrné, že nálevy ani odvary, tedy vodné extrakty, nedosahují tak vysokých množství fenolů jako extrakty methanolové [39].

**Tabulka 5:** TPC pro methanolové extrakty, nálevy a extrakty některých bylin [39]

	TPC [mg kyseliny gallové/g]		
	MeOH extrakt	nálev	odvar
lípa	106,97 ± 1,5	32,36 ± 0,2	33,49 ± 0,5
senna	24,14 ± 1,0	17,19 ± 0,0	15,15 ± 0,2
fenykl	49,50 ± 0,0	16,13 ± 0,3	10,39 ± 0,0
anýz	32,93 ± 0,6	16,51 ± 0,0	17,41 ± 0,0
vavřík	30,90 ± 0,5	18,77 ± 0,8	26,32 ± 0,3
kopřiva	14,61 ± 0,5	16,06 ± 0,0	11,07 ± 0,2

výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (N=3)

To, že bylinné čaje nemohou v rámci obsahu fenolických látek konkurovat zelenému ani černému čaji, prezentuje Tabulka 6 [38].

**Tabulka 6:** TPC pro bylinný, černý a zelený čaj [38]

	<i>TPC [mg kyseliny gallové/šálek]</i>
máta	106 ± 0,18
heřmánek	106 ± 0,37
eukalyptus	113 ± 1,33
šalvěj	124 ± 1,57
lípa	184 ± 1,72
černý čaj	847 ± 8,89
zelený čaj	1216 ± 38,0

výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (N=3)  
šálek = 240 ml

Buřičová a kol (2018)<sup>4</sup> pak srovnávaly hodnoty antioxidačních aktivit pro ryze české léčivé rostliny, které byly vybrány na základě jejich popularity. I v tomto případě patřila lípa k rostlinám, které byly vyhodnoceny jako dobré zdroje antioxidantů. Kromě lipového květu byly naměřeny vysoké antioxidační aktivity pro rostliny z čeledi *Rosaceae* (šípek a listy malin, ostružin a jahod) a *Lamiaceae* (oregano, meduňka, tymián, hluchavka, máta). Zároveň zde byl i konstatován fakt, že byliny na rozdíl od čaje neobsahují kofein, což je v určitých situacích jejich výhodou. Nízkých antioxidačních aktivit naopak dosahovaly květy heřmánku, borůvky, jeřabiny nebo plody rakytníku. Nízké hodnoty zejména u plodů byly odůvodněny tím, že během jejich usušení došlo pravděpodobně k významnému poklesu vitamínu C, který je v jejich případě hlavní složkou s antioxidačním účinkem [40].

Nicméně hodnoty antioxidačních aktivit je nutné brát s rezervou, odlišují se totiž i pro čaje ze stejné byliny, ale od různých výrobců. To je pravděpodobně způsobeno různými výrobními postupy, dobou sklizně atd. Dále je výsledná antioxidační aktivita závislá i na způsobu přípravy čaje, to znamená na teplotě vody a době louhování [11].

#### Příprava lipového čaje

Na přípravu lipového čaje se doporučuje použít 2 lžice lipového květu na 0,5 l horké vody. Délka louhování se uvádí kolem 5–15 minut [25, 41].

### **1.5.2 Lipový med**

Lipový med je také jedním z produktů lipového květu, respektive produktem jeho nektaru. Med hraje již od pravěku důležitou roli v lidské výživě. Vyrábějí jej včely medonosné, které sbírají

<sup>4</sup> BUŘIČOVÁ, L. a Z. RÉBLOVÁ. Czech medicinal plants as possible sources of antioxidants. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. 2008, 26(2), 132-138. ISSN 12121800. DOI:10.17221/2468-CJFS.

nektar, tráví ho a skladují ve včelích plástvích, kde med dozrává. Jedná se o koncentrovaný roztok invertního cukru, který dále obsahuje: enzymy, aminokyseliny, organické kyseliny, vitamíny, minerály a fenolické látky. Zastoupení fenolických látek je uvedeno v Tabulce 7, kdy nejvyšší obsah z fenolických kyselin byl naměřen pro kyselinu gallovou a z flavonoidů byl nejvíce zastoupen naringin [36, 42, 43].

**Tabulka 7:** Zastoupení fenolických látek v lipovém medu [42]

	<i>mg/100 g</i>
protokatechová kyselina	1,55
vanilová kyselina	0,35
kumarová kyselina	0,79
gallová kyselina	11,14
kvercetin	0,10
rutin	0,48
chrysin	0,27
hesperidin	0,17
naringin	18,47

### 1.5.3 Lipový sirup

Sirup je koncentrovaným roztokem cukru ve vodě se specifickými léčivými vlastnostmi. Přípravuje se především z těch bylin, které napomáhají při léčbě kašle nebo bolesti v krku. Důvodem je to, že díky sirupové konzistenci dojde k obalení postiženého místa. Sirup se doporučuje konzumovat buď přímo po lžičkách nebo naředěný vodou [21, 44, 45].

#### Příprava sirupu

Internetové zdroje nabízejí spousty různých variant přípravy sirupů. Některé doporučují květy nejprve macerovat ve studené převařené vodě a některé naopak doporučují připravit nálev, tedy přelít květy vodou horkou. Množství použitých lipových květů k louhování se ve zdrojích různí. Po louhování, jehož délka je doporučována kolem 24 hodin, se směs scedí a výluh se nechá svařit s cukrem a šťávou z vymačkaného citrónu. Některé zdroje dokonce používají citrón již při louhování. Množství použitého cukru je většinou téměř shodné s výchozím objemem vody použité k maceraci, tzn. na 1 litr vody se používá cca 1 kg cukru [46, 47].

Některé návody spočívají i v pouhém vrstvení čerstvých květů s cukrem do sklenice [48].

### **1.5.4 Tinktura**

Tinktura je alkoholickým bylinným extraktem. Jsou v ní tedy obsaženy látky, které se nerozpouští ve vodě, což platí pro řadu účinných rostlinných látek. Výhodou tinktury je i její dlouhá trvanlivost.

#### Příprava tinktury

Příprava je založena na smíchání určitého poměru rostlina : rozpouštědlo v tmavé nádobě. Poměry jsou doporučovány 1 : 5 až 1 : 10. Jako rozpouštědlo se nejčastěji volí ethanol, glycerol či ocet. Procenta alkoholu se různí, a to podle použité části rostliny k extrakci. Pro květy je to 30–50% ethanol, ale například pro kořeny se doporučuje až 70% ethanol. Po smíchání se nechá směs 2–6 týdnů odležet. Během této doby se doporučuje směs občas promíchat a po jejím uplynutí se směs přefiltruje [21, 49].

### **1.5.5 Tobolky**

Lipový květ je stejně jako mnoho dalších léčivých rostlin nebo bylin dostupný ve formě tobolek. Tobolky se připravují především z takových bylin, které mají nepříjemnou chuť nebo by se jenom z těžší mohly konzumovat jiným způsobem. Nevýhodou tobolek je jejich horší vstřebávání v porovnání s bylinnými roztoky.

#### Příprava tobolek

Příprava tobolek je opravdu jednoduchá. Jde pouze o rozemletí byliny na jemný prášek, který se následně plní do kapslí. Kapsle je pak tvořena hydroxypropylmethylcelulózou a barvivy [21, 50].

### **1.5.6 Kosmetické produkty**

Do kosmetických produktů se využívají lipové výtažky díky svým hydratačním a uklidňujícím vlastnostem. Kromě hydratačních vlastností má lípa i příjemnou vůni, což je další z důvodů, proč je v kosmetice využívána. Konkrétně se využívá do krémů, mastí, balzámů na rty, mýdel a sprchových gelů nebo voňavek [35, 51, 52, 53].

Kromě kosmetických produktů se využívají i obyčejné obklady pro péči o pleť nebo jako utišující obklady na popáleniny či záněty [26].

## 1.6 Použité metody

### 1.6.1 Měření vodní aktivity

Aktivita vody je měřítkem mobility vody v potravinách a její využitelnosti pro mikrobiální, enzymové a chemické změny. Využívá se pro odhad chemické a mikrobiální stability potravin. Hodnoty vodní aktivity pak závisí jednak na obsahu vody, ale pak i na tom, jak je voda v potravine vázána. Voda může být vázána pevnou nebo slabou vazbou, dále se může vyskytovat jako tzv. voda volná. Právě pevně vázaná voda je nejméně dostupnou pro již jmenované změny v potravine. Pokud tedy potravina bude obsahovat především vodu vázanou, budou její hodnoty vodní aktivity nízké.

Aktivita vody  $a_w$  je definována jako poměr parciální tlaku vodní páry nad potravinou  $p_w$  k tlaku vodní páry čisté vody  $p_0$  (Rovnice 1) a nabývá hodnot od 0 do 1.

$$a_w = \frac{p_w}{p_0} \quad (1)$$

K měření vodní aktivity se využívají manometry a různé typy vlhkoměrů (kapacitní, vodivostní). Dále lze stanovit aktivitu vody na základě měření rosného bodu nebo pomocí měření sorpční izotermy [54, 55].

### 1.6.2 Měření barevnosti

Barva je důležitou vlastností potraviny. Sledováním jejích změn, lze posuzovat trvanlivost výrobku nebo hodnotit průběh výrobního procesu. Příkladem může být sledování barvy během pražení kávových zrn. V mnoha případech je charakterizace potraviny sledováním barvy mnohem efektivnější, z hlediska úspory času než hodnocení sensorické.

Věda zabývající se měřením barev se nazývá kolorimetrie. Jelikož samotnou barvu měřit nelze, využívá kolorimetrie spektrálních vlastností světla a fyziologických vlastností zraku. Výsledkem měření jsou parametry, které pak můžeme porovnávat.

#### 1.6.2.1 Barevný vjem

Barevným vjem vzniká na základě interakce světla s povrchem pozorovaného objektu. V závislosti na vlastnostech objektu se světlo pohltí nebo odrazí. Odražené světlo dopadá na sítnici oka, kde se mění na elektrické signály. Ty jsou pak přenášeny do mozku, kde jsou zpracovány na barevný obraz. Na barevném vjemu se tedy podílí světlo, objekt a pozorovatel. Změna jakéhokoli z těchto prvků vyvolá i změnu barevného vjemu. Z tohoto důvodu jsou tyto prvky standardizovány CIE (Mezinárodní komise pro osvětlování) [56, 57, 58].

## Světlo

Světlo je tvořené elektromagnetickým zářením v rozmezí vlnových délek 380–780 nm. Oblast krátkých vlnových délek zahrnuje modré světlo, mezi vlnovými délkami 520–550 nm je světlo zelené a nad 650 nm je světlo červené. CIE definuje několik standardizovaných zdrojů světla, které popisuje hlavně jejich teplota chromatičnosti. Zdroje simulující denní světlo jsou nejrozšířenější. Ty nesou označení D50 a D60 [56, 58, 59].

## Objekt

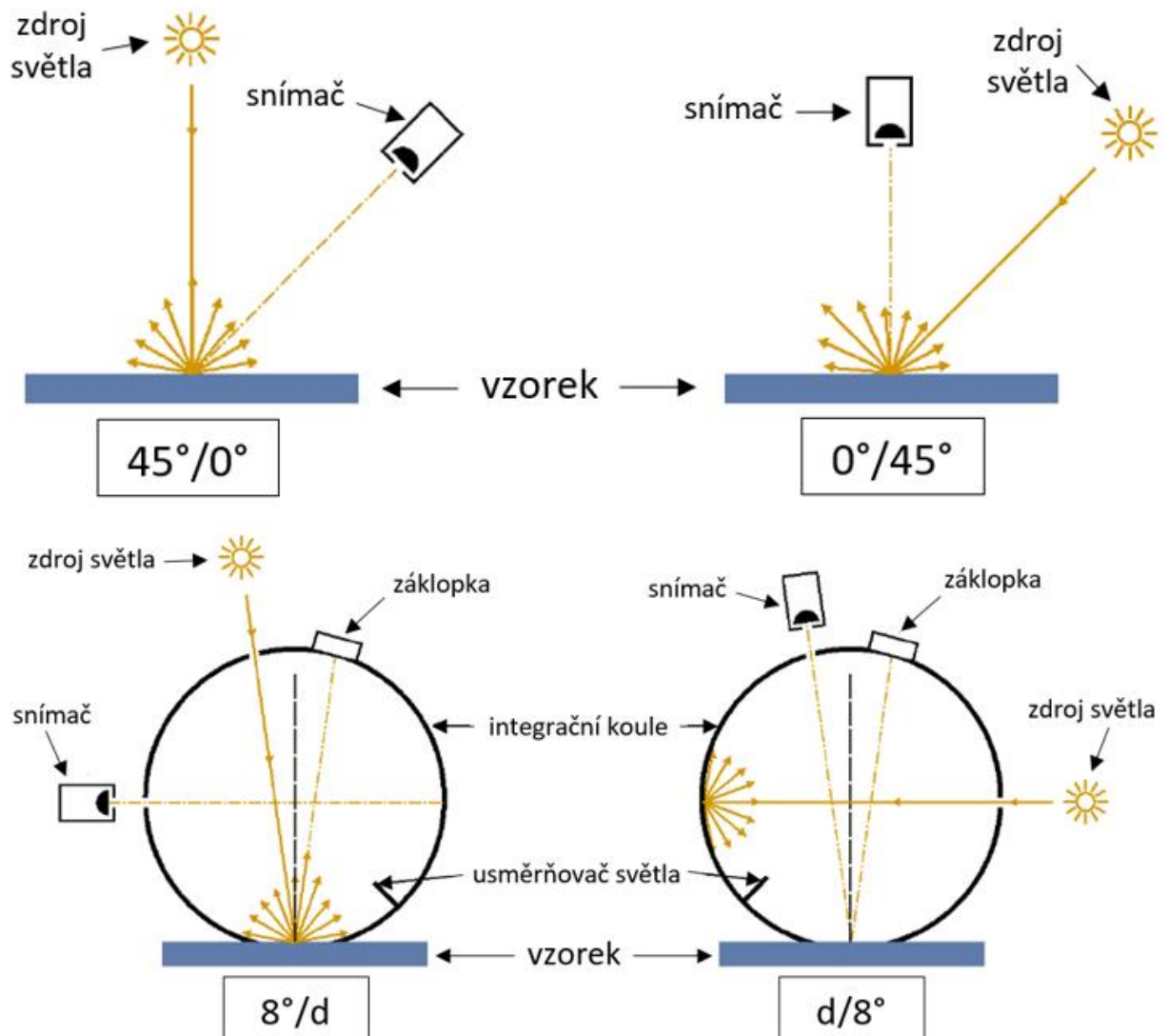
Jak již bylo zmíněno, při dopadu světla na objekt dochází k jeho pohlcení (absorpci) nebo odrazu (reflexi). Druhy odrazu rozeznáváme dva. Pokud bude pozorovaný objekt lesklého charakteru, bude docházet k takzvanému zrcadlovému odrazu. V případě spíše matného povrchu se bude jednat o odraz difúzní. Většina objektů odráží světlo zrcadlově i difúzně [56, 57].

Cílem měření je pak zjistit, na jaké vlnové délce a s jakou intenzitou daný objekt světlo odráží nebo absorbuje. Pro zajištění správného měření, musí být vhodně zvolená jeho geometrie. Geometrie udává uspořádání měřicí soustavy, tedy pod jakým úhlem dopadá světlo a pod jakým úhlem je snímáno. Geometrie se vyjadřuje pomocí dvou čísel X/Y. Číslo X vyjadřuje, pod jakým úhlem dopadá světlo a Y pod jakým úhlem se odráží. Pro měření se využívají uspořádání  $0^\circ/45^\circ$  a  $45^\circ/0^\circ$  nebo  $d/8^\circ$  a  $8^\circ/d$ , přičemž „d“ značí difúzní osvětlení (Obrázek 4) [57, 58].

Výběr geometrie, a to, zda se bude u vzorku měřit absorpce nebo reflektance, závisí na typu vzorku a samozřejmě i možnostech přístroje.

V případě měření reflektance se rozeznávají dva způsoby měření, a to RSIN (reflectance-specular included) a RSEX (reflectance-specular excluded). V módu RSIN je měřena celková reflektance zahrnující difúzní i zrcadlovou složku odrazu. V případě módu RSEX je měřena pouze difúzní složka odrazu, což se využívá při sledování barvy lesklých předmětů. V obou módech se využívá geometrie  $d/8^\circ$  [60].

V případě měření transmitance se využívají módy TTRAN (total transmission) a RTRAN (regular transmission). TTRAN měří celkovou transmitanci, která je složena z difúzní a regulární transmitance. Mód TTRAN se doporučuje například pro mírně zakalené vzorky, jako jsou třeba džusy nebo čaje. Mód RTRAN pak měří pouze regulární transmitanci a doporučuje se ho využívat na měření spíše čiré vzorky [61].



Obrázek 4: Geometrie měření [58]

### Pozorovatel

Posledním prvkem, který významně ovlivňuje měření, je pozorovatel. Definice pozorovatele byla stanovena řadou pokusů. Cílem bylo zjistit průměrnou citlivost oka na jednotlivé barevné odstíny. CIE definovala dva pozorovatele, a to 2° a 10°, přičemž stupně definují velikost zorného pole [56, 57].

### 1.6.2.2 Zařízení pro měření barevnosti

Pro měření barevnosti se využívají kolorimetry a spektrofotometry. Při měření je vycházeno z definice Lambert-Beerova zákona, který je více popsán v rámci kapitoly 1.6.3 a říká, že koncentrace látky je úměrná její absorbanci.

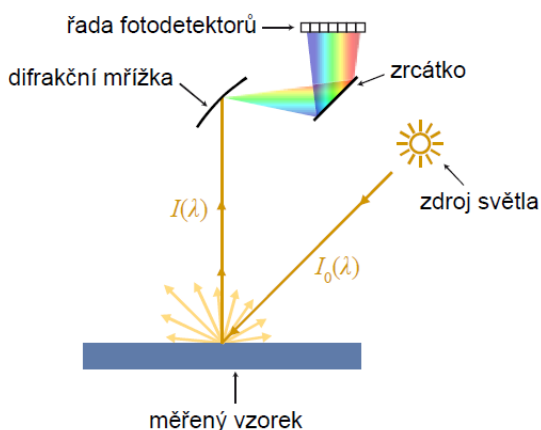


## Kolorimetr

Kolorimetr je navržen takovým způsobem, aby při měření simuloval lidské vnímání barev. Využívá k měření třech nebo čtyřech filtrů, které odpovídají základním barvám (červená, zelená, modrá). Světlo vycházející ze zdroje prochází následně právě těmito filtry, čímž dochází k izolaci určité vlnové délky. Dále světlo prochází vzorkem a následně dopadá na detektor, který měří, jak velká část záření byla absorbována. Další možností, jak měření provést, je měřit světlo odražené od vzorku, které prochází barevnými filtry až po odrazu. Výsledkem celého měření jsou pak souřadnice, popisující polohu v barevném prostoru. Kolorimetry jinak obecně využívají 2° pozorovatele. Co se týká zdroje světla, to se používá takové, aby simulovalo denní světlo [56, 62].

## Spektrofotometr

Spektrofotometry měří barvu na základě proměření celého spektra. Světlo vycházející se zdroje dopadá na vzorek, od kterého se odráží a dopadá na difrakční mřížku. Ta vyzoluje pouze jedno pásmo vlnové délky, které následně dopadá po odrazu od zrcátka na detektor. Ten pak detekuje, které vlnové délky nebyly absorbovány vzorkem (Obrázek 5). Spektrofotometry neměří barevnost jenom na základě odrazu světla od vzorku, ale i podle absorpance vzorku. Spektrofotometry využívají nejvíce geometrie typu 45°/0° nebo d/8° a 10° pozorovatele [62].



**Obrázek 5:** Obecné schéma spektrofotometru [58]

### **1.6.2.3 Barevné prostory**

Pro vyjádření naměřených barev se pak využívají různé barevné prostory.

### **1.6.2.4 Barevný prostor $L^*a^*b^*$**

Barevný prostor  $L^*a^*b^*$  (Obrázek 6, A) je definován třemi souřadnicemi, přičemž každá ze souřadnic vyjadřuje jeden barevný parametr. Parametr  $L^*$  vyjadřuje, zda se jedná o barvu světlou nebo tmavou, vyjadřuje tedy její jas (lightness). Na ose  $a^*$  se nachází barvy od zelené po červenou a na ose  $b^*$  od žluté po modrou [57, 58].

### Určení barevné difference mezi vzorky

Pro porovnání naměřených hodnot v systému  $L^*a^*b^*$  se využívá výpočtu tzv. barvové odchylky  $\Delta E^*$ . Jde v podstatě o srovnání barev na základě jejich vzájemné vzdálenosti v barevném prostoru. Výpočet  $\Delta E^*$  se provádí podle následující Rovnice 2.

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (2)$$

$\Delta E^*$  ...barvová odchylka,  $\Delta L^*$  ...rozdíl mezi parametry ( $L^*_{vzorek} - L^*_{standard}$ ),  $\Delta a^*$  ...rozdíl mezi parametry ( $a^*_{vzorek} - a^*_{standard}$ ),  $\Delta b^*$  ...rozdíl mezi parametry ( $b^*_{vzorek} - b^*_{standard}$ )

O výsledných hodnotách  $\Delta E^*$  pak můžeme říci, že pokud dosahují hodnot 5 a vyšší, lze rozdíl v barvě u měřených vzorků postřehnout již pouhým okem. Pokud je hodnota naopak nižší než 1, rozdíl v barvě není pouhým okem viditelný [63].

### **1.6.2.5 Barevný prostor $L^*C^*h^\circ$**

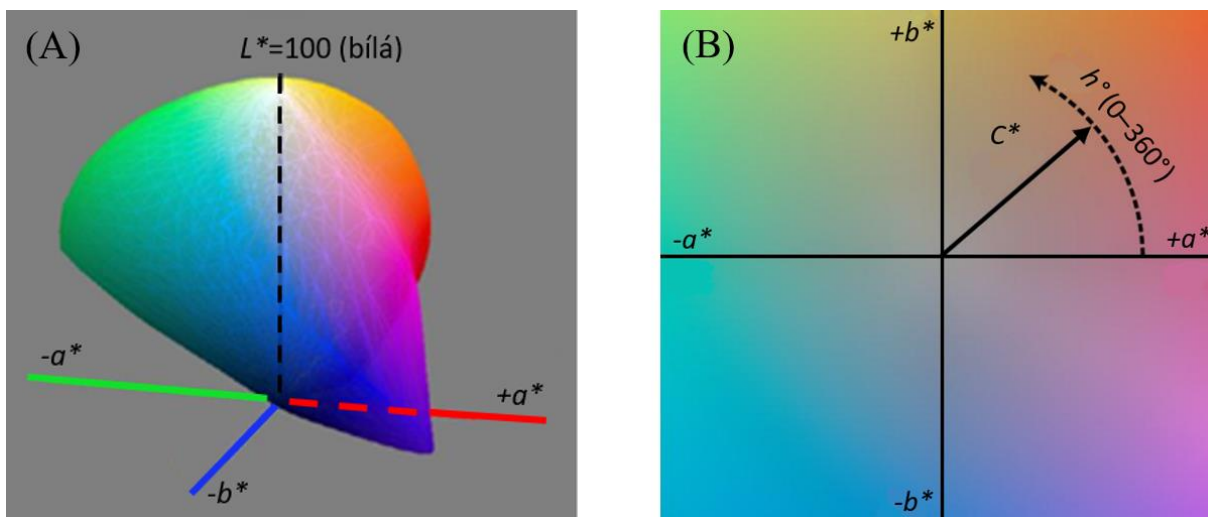
Dalším barevným prostorem je prostor  $L^*C^*h^\circ$ . Parametr  $L^*$  je opět vyjádřením jasu sledované barvy. Další souřadnice  $C^*$  a  $h^\circ$  jsou odvozeny z výše zmíněných souřadnic  $a^*$  a  $b^*$ . Parametr  $C^*$  vyjadřuje, jak je barva sytá (chroma) a zvětšuje se s rostoucí vzdáleností od osy  $L^*$ . Parametr  $h^\circ$  znázorňuje odstín sledované barvy (hue) a je určen úhlem mezi kladnou poloosou  $a^*$  a barevným vektorem (Obrázek 6, B). Nabývá tedy hodnot 0–360°, kdy hodnota 0° náleží červené barvě, 90° žluté barvě, 180° zelené barvě a 270° barvě modré [56, 57, 58, 64].

### Určení barevné difference mezi vzorky

Pro porovnání naměřených hodnot v systému  $L^*C^*h^\circ$  se využívá výpočtu tzv. stínové odchylky  $\Delta H^*$ , která se vypočte podle následující Rovnice 3. Výhodou je oproti hodnotě  $h^\circ$  to, že není ve stupních [56, 65].

$$\Delta H^* = \sqrt{(\Delta E^*)^2 - (\Delta L^*)^2 - (\Delta C^*)^2} \quad (3)$$

$\Delta H^*$  ...stínová odchylka,  $\Delta E^*$  ...barvová odchylka,  $\Delta L^*$  ...rozdíl mezi parametry ( $L^*_{vzorek} - L^*_{standard}$ ),  $\Delta C^*$  ...rozdíl mezi parametry ( $C^*_{vzorek} - C^*_{standard}$ )



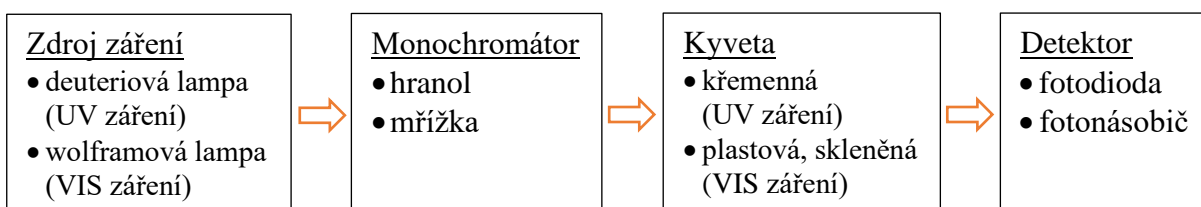
Obrázek 6: Barevný prostor  $L^*a^*b^*$  z perspektivy (A) a v průřezu (B) [58]

### 1.6.3 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je instrumentální technika, která se využívá ke kvantitativní a kvalitativní analýze. Podstatou metody je měření absorpce monochromatického záření při jeho průchodu vzorkem. Pro analýzu se využívá záření z ultrafialové (UV, 200–380 nm), viditelné (VIS, 380–780 nm) a blízké infračervené oblasti [3, 66].

#### 1.6.3.1 Instrumentace a měření

K měření se využívají takzvané spektrofotometry. Ty se skládají ze zdroje záření, monochromátoru, absorbujícího prostředí (kyveta se vzorkem) a detektoru (Obrázek 7).



Obrázek 7: Obecné schéma spektrofotometru [3, 66]

Spektrofotometry se rozdělují na jednopaprskové a dvoupaprskové. V případě jednopaprskových je nutné nejprve proměřit referenční vzorek (rozpuštědlo bez vzorku) a poté vzorek. U dvoupaprskových je záření rozděleno na dva paralelní paprsky a je tedy možné měřit oba vzorky zároveň. Měření referenčního vzorku se provádí z důvodu možné absorpce rozpouštědla.

Při průchodu monochromatického záření vzorkem se část absorbuje a část jím prochází. Původní monochromatické záření dopadající na vzorek má intenzitu  $I_0$  a prošlá část záření je rovna intenzitě  $I$ . Poměr těchto intenzit je roven transmitanci  $T$  podle Rovnice 4.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (4)$$

Absorbance  $A$  se následně získá přepočtem podle Rovnice 5.

$$A = \log \frac{1}{T} \quad (5)$$

Lambert-Beerův zákon pak popisuje vztah mezi absorbancí a koncentrací. Říká, že absorbance je přímo úměrná délce absorpčního prostředí a koncentraci měřeného vzorku podle Rovnice 6.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (6)$$

$\varepsilon$ ...molární absorpční koeficient [ $dm^3 \cdot cm^{-1} \cdot mol^{-1}$ ],  $l$ ...délka absorpčního prostředí [ $cm$ ],  
 $c$ ...koncentrace [ $mol \cdot dm^{-3}$ ]

Měření absorbance lze tedy využít ke stanovení kvantity látek. Stanovení kvality, tedy identifikace látek, je pak založené na proměření celého absorpčního spektra zkoumané látky. Výsledné spektrum se následně porovnává se spektry naměřenými pro další látky, přičemž shoda nemusí vždy znamenat, že se jedná o látku totožnou. Spektra se totiž mohou shodovat i u rozdílných analytů a je tedy vhodné si výsledek ověřit i jinou analytickou technikou [3, 66, 67].

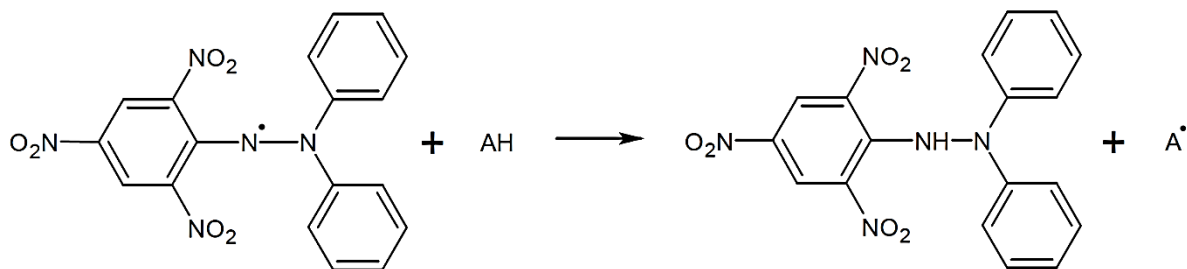
#### 1.6.4 Stanovení antioxidační aktivity

Ke stanovení antioxidační aktivity se využívá celá řada testů. Jejich četnost vyplývá ze skutečnosti, že antioxidanty mohou působit různými mechanismy. K vyhodnocení jejich antioxidačního působení je tedy zapotřebí provést více testů založených rovněž na různých mechanismech. Jedná se o testy hodnotící schopnost antioxidantu eliminovat radikály nebo testy posuzující jeho redoxní vlastnosti. V těchto případech je mechanismem reakce přenos elektronu nebo atomu vodíku z antioxidantu na volný radikál. Reakce je spojena například se změnou nebo vznikem zbarvení, což je pak možné registrovat pomocí spektrofotometru.

Jiné testy využívají ke stanovení antioxidační aktivity i chelatačních vlastností antioxidantů. V tomto případě dochází k vytvoření komplexu mezi antioxidantem a kovem. Tím brání antioxidant kovu, účastnit se Fentonovy reakce (viz. kapitola 1.2.1), během níž vznikají škodlivé radikály a jinými slovy tedy vykazuje antioxidační aktivitu [18, 68].

#### 1.6.4.1 Metoda DPPH

Metoda využívá DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-nitrofenyl)hydrazyl) radikál, jehož alkoholický roztok je fialově zbarvený a absorbuje přibližně při 520 nm. Smícháním tohoto roztoku s látkou, která může darovat atom vodíku nebo elektron, bude docházet k redukci tohoto roztoku (Obrázek 8). To je spojeno se změnou jeho barvy z fialové na žlutou, a tedy i se změnou původní maximální absorbance. Výsledky mohou být vyjádřeny jako ekvivalenty DPPH na gram analyzovaného materiálu nebo se využívá kyseliny askorbové či Troloxu.



Obrázek 8: Schéma reakce DPPH radikálu s antioxidantem [69]

Metoda je rychlá, jednoduchá, levná a hodí se pro zkoumání antioxidačních aktivit široké skupiny látek [69].

#### 1.6.4.2 Metoda FRAP

Principem FRAP metody je redukce komplexu  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ ( $\text{Fe}^{3+}$ -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin) antioxidanty, což se projeví nárůstem absorbance při 593 nm. Nárůst absorbance odpovídá redukcí vytvořenému množství  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ a je tedy vyjádřením schopnosti antioxidantů redukovat železité ionty [18].

#### 1.6.4.3 Stanovení chelatačních vlastností

Stanovení je založené na vytvoření komplexu mezi antioxidantem a kovem. Nejvíce se k provedení této metody využívají síran železnatý nebo ferrozín. V případě síranu železnatého se pak sleduje úbytek absorbance při 485 nm a v případě ferrozínu při 562 nm. Výsledky je v tomto případě možné vyjádřit jako ekvivalenty EDTA nebo v procentech inhibice [68, 70].

#### 1.6.5 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Stanovení celkového obsahu fenolů (TPC) využívá Folin-Ciocalteu (FC) činidla a je založené právě na jeho redukcí fenolickými sloučeninami v alkalickém prostředí. FC činidlo se skládá z komplexů fosfomolybdenové a fosfowolframové kyseliny. Místem redukce je molybdenové centrum, kdy iont molybdenový ( $\text{Mo}^{6+}$ ) je redukován na molybdeničný ( $\text{Mo}^{5+}$ ) přijetím elektronu od fenolického antioxidantu. Redukce se projeví vznikem modře zbarveného

chromoforu s maximální absorbancí při 765 nm. Jako referenční standard se většinou využívá kyselina gallová a výsledky jsou pak vyjadřovány jako ekvivalenty této kyseliny. Dále je možné k tomuto účelu využít kyseliny kávové nebo katechinu.

Stanovení má řadu předností, mezi které patří jednoduchost, reprodukovatelnost a robustnost. Mezi stinné stránky tohoto stanovení patří možnost jeho narušení jinými redukujícími látkami, jako jsou například redukující cukry nebo některé aminokyseliny [68].

### **1.6.6 Stanovení obsahu flavonoidů**

Ke stanovení flavonoidů se široce využívají spektrofotometrické testy, založené na tvorbě komplexu hliníku.

#### **1.6.6.1 Stanovení obsahu flavonoidů (metoda 1)**

Jedna z možností, jak stanovení provést, je použít 2–10%  $\text{AlCl}_3$ . Ten, pokud je přidán do okyseleného vzorku, vytvoří s některými flavonoidy žluté komplexy, které je pak možné registrovat spektrofotometricky, a to proměřením absorpance při 404–430 nm. K vyjádření výsledků se v tomto případě využívá například kvercetin, rutin nebo katechin. Tato metoda selektivní pro flavonoly a flavony (luteolin), proto ji nelze označit za metodu, která by stanovovala celkové množství flavonoidů ve vzorku [71].

#### **1.6.6.2 Stanovení obsahu flavonoidů (metoda 2)**

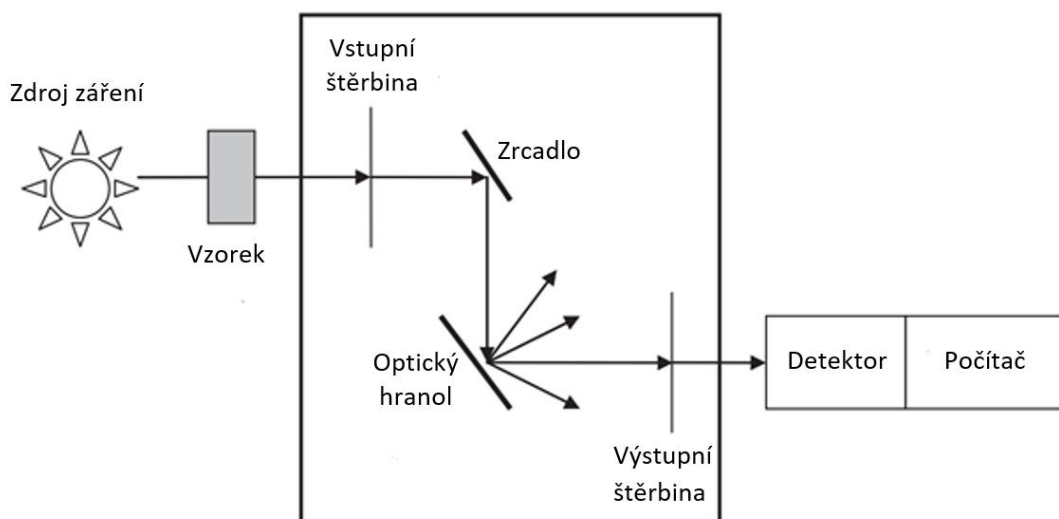
Další z možností, jak stanovit flavonoidy, je využít nitrace  $\text{NaNO}_2$  na aromatický kruh, který flavonoidy obsahují. Pokud je po nitraci přidán 2%  $\text{AlCl}_3$  dochází ke vzniku žlutého komplexu, který se po zalkalizování změní na zbarvení červené. Intenzita červeného zbarvení je pak měřena při 510 nm. V případě této metody se doporučuje výsledky vyjadřovat jako ekvivalenty katechinu. Metoda je specifická pro rutin, luteolin, katechiny a fenolové kyseliny [71].

### **1.6.7 Stanovení obsahu antokyanů**

Spektrofotometrické stanovení antokyanů využívá jejich přirozeného zbarvení a faktu, že toto zbarvení může se změnou pH i zanikat. Vzorek je tedy v tomto případě umístěn do dvou roztoků o různém pH. Konkrétně se využívají pufrů o pH 1,0 a 4,5. U každého z roztoků je pak měřena absorpance při vlnové délce, odpovídající maximální absorbanci nejvíce zastoupeného antokyanu. Jedním z nejvíce zastoupených antokyanů v přírodě je kyanidin-3-glukosid, jehož maximální absorpance je při 520 nm [72].

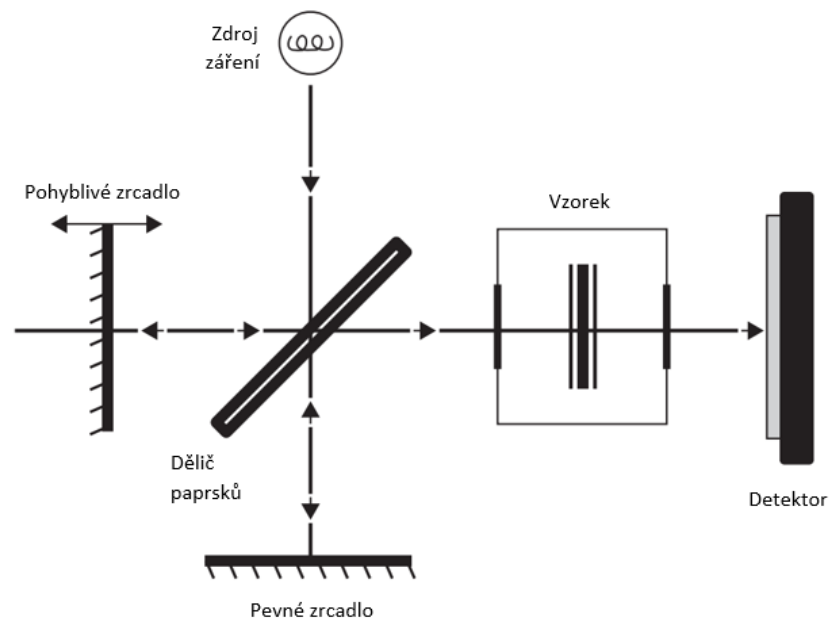
### 1.6.8 Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie je technika založená na měření rotačně-vibračních přechodů molekul měřeného vzorku během působení infračerveného (IČ) záření. Molekuly získávají k těmto přechodům energii právě z působícího IČ záření, což se projeví ve spektru, které je výsledkem měření, jako absorpční pás. Poloha vzniklého pásu ve spektru pak odpovídá frekvenci vibrace určité části molekuly. Díky tomu je možné detekovat určité funkční skupiny, jako je třeba C-H, O-H, N-H, C=O a další. Infračervené záření se obvykle dělí do tří oblastí, a to na blízkou ( $13\,333\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ ), střední ( $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ ) a vzdálenou ( $400\text{--}10\text{ cm}^{-1}$ ). Právě ve střední oblasti absorbuje mnoho funkční skupin, a proto je tato oblast využívání k měření nejčastěji. Měření se pak provádí buď v transmisním, nebo reflexním režimu, kdy je sledováno buď záření po průchodu vzorkem, nebo záření odražené. Obecné schéma IČ spektrometru je znázorněno na dalším Obrázku 9 [73].



**Obrázek 9:** Obecné schéma IČ spektrometru [73]

Mimo jiné se využívají i IČ spektrometry s tzv. Fourierovou transformací. Ty obsahují Michelsonův interferometr (Obrázek 10), což je zařízení, které umožňuje generování interferogramů. Získané interferogramy se pak převádí pomocí Fourierovy transformace na IČ spektrum. Předností tohoto měření je to, že místo měření při jedné vlnové délce, je možné zaznamenat celé spektrum současně [74].



**Obrázek 10:** Michelsonův interferometr [74]



## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Přístroje

Analytické váhy KERN ABT 220-4 M	(Kern & Sohn, Balingen, Německo)
Centrifuga Sorvall ST4 Plus - MD	(Thermo Fisher Scientific, Německo)
Lyofilizátor L4-110	(Gregor Instruments s.r.o., ČR)
Nicolet iS50 FT-IR	(Nicolet CZ, Praha, ČR)
pH-metr SCHOTT	(SCHOTT AG, Mainz, Německo)
Přístroj Aqualab TDL pro měření vodní aktivity	(Decagon Devices, USA)
Spektrofotometr UltraScan VIS	(HunterLab, USA)
Spektrofotometr UV-VIS Shimadzu UV-2600	(Shimadzu, Japonsko)
Sterilizátor HS 62 A	(Chirana, Brno, ČR)
Sušička Gallet DES 120	(Gallet, Praha, ČR)
+ kuchyňský cedník a běžné laboratorní vybavení	

### 2.2 Chemikálie

Destilovaná voda	(Univerzita Pardubice, ČR)
Diethylether 99%	(Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR)
DPPH radikál	(Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
Dusitan sodný	(Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR)
Ethanol 96%	(Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR)
FC činidlo	(Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
Ferrozín	(Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
Hexahydrát chloridu železitého	(PENTA, s.r.o., Praha, ČR)
Hydroxid sodný	(PENTA, s.r.o., Praha, ČR)
Chlorid draselný	(PENTA, s.r.o., Praha, ČR)
Chlorid hlinitý	(TCI, Tokyo, Japonsko)
Kvercetin hydrát $\geq 95\%$	(Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)

Kyselina gallová	(Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
Kyselina chlorovodíková 35%	(Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR)
Kyselina octová 99%	(Lach-ner, s.r.o., Neratovice, ČR)
Methanol $\geq$ 99,9%	(Honeywell, Morristown, USA)
Octan sodný	(Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
Tetrahydrát chloridu železnatého	(PENTA, s.r.o., Praha, ČR)
TPTZ	(Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
Trolox	(Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
Uhličitan sodný	(J. T. Baker, Deventer, Holandsko)

Všechny chemické látky byly minimálně p.a. čistoty.

## 2.3 Vzorky

### 2.3.1 Lipový květ (*Tiliae flos*)

K analýze byly využity lipové květy včetně listenů, pocházející z lípy velkolisté (Obrázek 11, 12, 13) rostoucí v podkrkonoší (Jilemnice, GPS souřadnice: 50°36'27.995"N, 15°30'13.942"E). Roční úhrn srážek se na tomto místě pohybuje kolem 720–860 mm. Průměrná roční teplota vzduchu je pak v rozmezí 5–8 °C. V zimních měsících se pohybuje v záporných hodnotách kolem -2,3°C. V letních je to kolem 12–14 °C. Sběr lipových květů byl proveden v počínající fázi rozkvétání, dne 30. 6. 2020, za slunečného počasí [75].



Obrázek 13: Lípa velkolistá zvolená pro sběr



Obrázek 12: Přední strana listu



Obrázek 11: Zadní strana listu

### 2.3.1.1 Zpracování vzorku lipového květu

Po sběru byl vzorek rozdělen na dva podíly. Jeden z podílů byl usušen pomocí sušičky Gallet DES 120 (35 °C, 14 h) (Obrázek 14) a v rámci dalších kapitol je tedy označován jako sušený lipový květ. Po usušení byl ještě lehce rozsekán nožem a umístěn do sklenic, které byly skladovány v tmavém prostředí až do dalšího zpracování.



**Obrázek 14:** Sušení lipového květu - sušička ovoce

Druhý podíl vzorku byl zamražen a následně lyofilizován (-110 °C, 26 h). V rámci dalších kapitol je tedy označován jako lyofilizovaný lipový květ. Po lyofilizaci byl ještě lehce rozsekán nožem a umístěn do igelitové tašky, která byla skladována při -20 °C až do dalšího zpracování.

## 2.4 Postupy analýzy vzorku lipového květu

Jednotlivé analýzy byly provedeny pro sušený a lyofilizovaný lipový květ. Výjimkou je pouze stanovení obsahu sušiny, které bylo provedeno jen v případě květu sušeného. Vzhledem k tomu, že lyofilizace je jednou z metod používaných pro stanovení obsahu sušiny, byly lyofilizované lipové květy považovány za prosté vlhkosti.

### 2.4.1 Stanovení obsahu sušiny

Obsah sušiny byl stanoven na základě rozdílu hmotnosti vzorku před a po vysušení do konstantní hmotnosti. Ke stanovení bylo naváženo kolem 1 g lipového květu do váženky. Ta byla následně se vzorkem umístěna do sušárny (Sterilizátor HS 62 A) vyhřáté na 105 °C a vzorek byl sušen do konstantní hmotnosti. Stanovení bylo provedeno ve čtyřech opakování (N=4).

### 2.4.2 Měření barevnosti

Měření barevnosti lipového květu bylo provedeno pomocí spektrofotometru UltraScan VIS (geometrie d/8°, zdroj světla D65, 400–700 nm) v režimu měření barvy odrazem pouze v difúzní části odraženého světla (RSEX), a to celkem ve čtyřech opakování (N=4). Vzorek byl měřen v křemenné kyvetě. Měřeny byly parametry  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $h^\circ$ , ze kterých byly následně vypočteny parametry  $\Delta E$  (Rovnice 2) a  $\Delta H$  (Rovnice 3). V obou výpočtech byl jako standard použit lyofilizovaný lipový květ.

### 2.4.3 Stanovení obsahu slizu

Postup stanovení obsahu slizu v lipovém květu byl proveden podle Kosakowska a kol (2015)<sup>5</sup> s mírnou modifikací. Ke stanovení byl navážen 1 g lipového květu a k němu bylo přidáno 20 ml destilované vody. Takto připravená směs byla po dobu 60 minut promíchávána. Následně byla směs odstředěna (10000 rpm, 15 minut) a pro další zpracování bylo odebráno 10 ml čirého extraktu. K odebraným 10 ml bylo přidáno 40 ml směsi ethanolu a 2M kyseliny octové v poměru 99 : 1. Takto připravený roztok byl ponechán 6 hodin v tmavém prostředí. Poté byla směs přefiltrována přes předem zvážený filtrační papír pomocí Büchnerovy nálevky. Po přefiltrování byla sraženina na filtru ještě promyta ethanolem a diethyletherem. Filtrační papír se sraženinou byl pak umístěn na Petriho misku a sušen při laboratorní teplotě. Po jeho vyschnutí byl filtrační papír opět zvážen. Výsledky byly pak vypočteny v mg slizu na g sušiny lipové květu. Analýza byla provedena ve třech opakování (N=3).

---

<sup>5</sup> KOSAKOWSKA a kol. Intraspecific variability in the content of phenolic compounds, essential oil and mucilage of small-leaved lime (*Tilia cordata* Mill.) from Poland. *Industrial Crops and Products* [online]. 2015, **78**, 58-65. ISSN 09266690. DOI:10.1016/j.indcrop.2015.10.002.

## 2.5 Optimalizace navážky lipového květu pro přípravu sirupů

V rámci této optimalizace byl vybrán jeden z možných způsobů přípravy sirupu z lipového květu. Jedná se o postup, který je v další kapitole 2.6 označován jako Postup 1. Nejprve byly připraveny nálevy z navážek 5, 10 a 20 g sušeného lipového květu, zalitím 250 ml destilované vody zahřáté na 90 °C. Po 24 hodinách louhování ve tmě, bylo provedeno přecedění přes kuchyňský cedník. U získaných výluhů byl změřen jejich objem. Podle získaného objemu bylo dopočítáno množství cukru, které bylo následně přidáváno do výluhu během jeho zahřívání. Množství cukru bylo dopočítáno podle poměru 250 ml výluhu : 200 g cukru. Tzn. bylo-li po přecedění získáno například 175 ml výluhu, bylo k němu během následného zahřívání přidáno 140 g cukru. Po rozpuštění veškerého cukru během zahřívání výluhu byl výsledný sirup ještě 5 minut mírně vařen.

Kromě sirupů byly paralelně připraveny výluhy z lipového květu. Jejich příprava byla totožná s přípravou sirupů pouze s tím rozdílem, že objem, který v případě sirupů představoval cukr, byl nahrazen destilovanou vodou. Tzn. byl-li například objem sirupu, připraveného z nálevu obsahujícího 10 g sušeného lipového květu, 235 ml a objem lipového výluhu, připraveného rovněž z 10 g sušeného lipového květu, byl 175 ml, bylo k lipovému výluhu přidáno 60 ml destilované vody na výsledný objem 235 ml. Takto naředěné lipové výluhy byly ještě 5 minut mírně vařeny.

Společně s výluhy a sirupy byl ještě připraven slepý roztok, a to smícháním destilované vody s cukrem v poměru 250 ml vody : 200 g cukru, s následným povařením po dobu 5 minut.

V rámci optimalizace byly tedy připraveny sirupy z navážek 5, 10 a 20 g a výluhy rovněž z navážek 5, 10 a 20 g sušeného lipového květu a slepý roztok. U připravených sirupů a výluhů byla změřena antioxidační aktivita metodou DPPH, jejíž provedení je popsáno v kapitole 2.7.4.1.

## **2.6 Příprava sirupů z lipového květu**

Pro přípravu sirupů byly vybrány následující čtyři postupy, které jsou označeny jako Postup 1–4. Kromě lipového květu byl k přípravě sirupů využíván bílý krupicový cukr od firmy Tereos TTD, a.s. z Dobrovic. Před přípravou sirupů byla provedena optimalizace navážky lipového květu, která je popsána v rámci předchozí kapitoly 2.5.

Kromě přípravy sirupů podle Postupů 1–4, byly připraveny i sirupy, kde byl sledován vliv pasterizace a skladování. Jejich příprava je popsána v kapitole 2.6.5.

### **2.6.1 Postup 1**

Navážením 10 g lipového květu a jeho smícháním s 250 ml destilované vody zahřáté na 90 °C, byl připraven nálev. Takto připravený nálev byl ponechán 24 hodin v tmavém prostředí a poté byl přeceděn pomocí sítky. U získaného výluhu byl následně změřen objem. Podle výsledného objemu bylo dopočítáno množství potřebného cukru pro přípravu sirupu, a to podle poměru 250 ml výluhu : 200 g cukru. Výsledné množství cukru bylo přidáváno do výluhu během jeho zahřívání. Po úplném rozpuštění cukru byl výsledný sirup ještě 5 minut mírně vařen.

Podle Postupu 1 byly připraveny 3 sirupy ze sušeného lipového květu a 3 sirupy z lyofilizovaného lipového květu.

### **2.6.2 Postup 2**

Navážením 10 g lipového květu a jeho smícháním s 250 ml destilované vody o laboratorní teplotě, byl připraven macerát. Ten byl pak ponechán 24 hodin v tmavém prostředí a poté byl přeceděn pomocí sítky. U získaného výluhu byl následně změřen objem. Podle výsledného objemu bylo dopočítáno množství potřebného cukru pro přípravu sirupu, a to podle poměru 250 ml výluhu : 200 g cukru. Výsledné množství cukru bylo přidáváno do výluhu během jeho zahřívání. Po úplném rozpuštění cukru byl výsledný sirup ještě 5 minut mírně vařen.

Podle Postupu 2 byly připraveny 3 sirupy ze sušeného lipového květu a 3 sirupy z lyofilizovaného lipového květu.

### **2.6.3 Postup 3**

V rámci Postupu 3 byl nejprve připraven cukerný roztok. Do 250 ml destilované vody bylo během zahřívání přidáno 200 g krupicového cukru. Po úplném rozpuštění cukru, byl roztok odstaven z vařiče a byla měřena jeho teplota. Při hodnotě 90 °C bylo přidáno 10 g lipového květu. Takto připravený roztok byl ponechán 24 hodin v tmavém prostředí. Po uplynutí této doby, byl roztok přeceděn pomocí sítky. Získaný lipový sirup byl poté ještě 5 minut mírně vařen.

Podle Postupu 3 byly připraveny 3 sirupy ze sušeného lipového květu a 3 sirupy z lyofilizovaného lipového květu.

#### **2.6.4 Postup 4**

V rámci Postupu 4 byl nejprve připraven cukerný roztok. Do 250 ml destilované vody bylo během zahřívání přidáno 200 g krupicového cukru. Po úplném rozpuštění cukru, byl roztok odstaven z vařiče. Po jeho vychladnutí na laboratorní teplotu do něj bylo přidáno 10 g lipového květu. Takto připravený roztok byl ponechán 24 hodin v tmavém prostředí. Po uplynutí této doby, byl roztok přeceděn pomocí sítka. Získaný lipový sirup byl poté ještě 5 minut mírně vařen.

Podle Postupu 4 byly připraveny 3 sirupy ze sušeného lipového květu a 3 sirupy z lyofilizovaného lipového květu.

#### **2.6.5 Sledování změn během skladování a po pasterizaci**

Na základě výsledků kapitoly 3.3, byl vybrán postup, jehož výsledkem byl sirup s nejvyšší antioxidační aktivitou a nejvyšším obsahem biologicky aktivních látek naměřených pomocí spektrofotometrických metod. Podle něj byly připraveny sirupy další, u kterých byly sledovány změny jejich vlastností po skladování a pasterizaci.

Konkrétně bylo připraveno celkem 6 sirupů ze sušeného a 6 sirupů z lyofilizovaného lipového květu dle vybraného postupu. Ty byly ještě horké přelity do tmavých vymytých sklenic o objemu 100 ml až po jejich okraj a zavíčkovány.

3 sklenice se sirupem ze sušeného lipového květu a 3 sklenice z lyofilizovaného lipového květu byly následně umístěny do termostatu nastaveného na 5 °C, po dobu 14 dní a v rámci dalšího popisu jsou označovány jako sirupy skladované.

Zbylé 3 sklenice se sirupem ze sušeného lipového květu a 3 sklenice se sirupem z lyofilizovaného lipového květu byly vloženy do vodní lázně vyhřáté na 75 °C, po dobu 25 minut a v rámci další části jsou označovány jako pasterizované lipové sirupy. Po vyjmutí z vodní lázně byly po zchladnutí umístěny rovněž do termostatu nastaveného na 5 °C, po dobu 14 dní.



## **2.7 Postupy analýzy připravených lipových sirupů**

U připravených sirupů (dle Postupů 1–4) bylo změřeno pH a vodní aktivita. Dále byla sledována jejich barva a antioxidační schopnosti. Nakonec u jejich lyofilizátů bylo změřeno i infračervené spektrum.

Všechna uvedená měření a analýzy, s výjimkou měření infračervených spekter, byla dále provedena i pro sirupy, které byly vystaveny skladování a pasterizaci.

### **2.7.1 Měření pH**

pH připravených sirupů bylo změřeno pomocí skleněné elektrody. Elektroda byla před samotným měřením kalibrována na pufrů o hodnotách pH 4,0 a 7,0.

### **2.7.2 Měření vodní aktivity**

Vodní aktivita připravených sirupů byla změřena pomocí přístroje Aqualab TDL při 25 °C. Plastové misky se vzorky byly vždy před měřením umístěny do termostatu vytemperovaného na 25 °C.

### **2.7.3 Měření barevnosti**

Před měřením byly sirupy odstředěny pomocí centrifugy Sorvall ST4 Plus – MD (2000 rpm, 10 minut). Barevnost byla následně měřena pomocí spektrofotometru UltraScan VIS (geometrie d/8°, zdroj světla D65, 400–700 nm) v režimu celkové transmitance (TTRAN). Vzorek byl měřen ve skleněné kyvetě s optickou dráhou 10 mm (objem 20 ml). Měřeny byly parametry  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $h^\circ$ , ze kterých byly následně vypočteny parametry  $\Delta E$  (Rovnice 2) a  $\Delta H$  (Rovnice 3). Podrobnosti k těmto výpočtům jsou pak uvedeny v kapitole 3 (Výsledky a diskuze).

### **2.7.4 Spektrofotometrická analýza**

V případě optimalizace navážky lipového květu pro přípravu sirupů (kapitola 2.5) bylo provedeno pouze hodnocení antioxidační aktivity metodou DPPH. Měření bylo provedeno pro každý sirup a výluh ve dvou opakování (N=2).

V případě sirupů připravených dle Postupů 1–4 (kapitola 2.6) byly zvoleny k jejich analýze následující spektrofotometrické metody. Antioxidační aktivita byla stanovena pomocí metody DPPH, FRAP a porovnáním chelatačních vlastností jednotlivých vzorků. Dále byla provedena analýza celkového obsahu fenolických látek, antokyanů a některých flavonoidů. Měření bylo provedeno pro každý sirup jednou, přičemž podle každého z Postupů (1–4) bylo připraveno dohromady 6 sirupů, a to 3 ze sušeného lipového květu a 3 z lyofilizovaného lipového květu.

U skladovaných a pasterizovaných sirupů (kapitola 2.6.5) byla pak stanovena antioxidační aktivita metodou DPPH, FRAP a porovnáním chelatačních vlastností jednotlivých vzorků. Dále byl změřen celkový obsah fenolických látek a některých flavonoidů.

K samotnému měření byl používán Spektrofotometr UV-VIS Shimadzu UV-2600. Vzorky byly umístěny během měření ve skleněných kyvetách, kromě stanovení chelatační aktivity, kde byly využity plastové mikrokyvety.

#### **2.7.4.1 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH**

Postup k tomuto stanovení byl převzat z diplomové práce Kudrnáčové Marie (2018)<sup>6</sup>. Optimalizace reakčního času této metody je uvedena v Příloze 1.

Před měřením byl nejprve připraven methanolický roztok DPPH radikálu, a to navážením 12,5 mg činidla do 500ml odměrné baňky.

Pro samotné stanovení pak bylo vždy pipetováno 5 ml roztoku radikálu DPPH a 500  $\mu$ l naředěného vzorku (sirupu) do zkumavky s víčkem. Takto připravená reakční směs byla ponechána 20 minut v temnu při laboratorní teplotě. Po uplynutí reakční doby byla změřena absorbance při 517 nm. Stejným způsobem byly připraveny i slepé pokusy, které obsahovaly místo vzorku destilovanou vodu.

Dále byla připravena kalibrační řada ze zásobního roztoku Troloxu. Zásobní roztok byl připraven navážením 0,0251 g Troloxu do 25ml odměrné baňky a doplněním methanolem po rysku. Ze zásobního roztoku byla připravena kalibrační řada v rozmezí 12,55–100,4  $\mu$ g Troloxu na ml. Kalibrační řada byla pak proměřena stejným způsobem jako vzorky.

Naměřené hodnoty byly následně přepočítány na procento inhibice podle následující Rovnice 7.

$$\text{Inhibice [\%]} = \frac{A_{sl} - A_{vz}}{A_{sl}} \cdot 100 \quad (7)$$

$A_{sl}$ ...absorbance slepého pokusu,  $A_{vz}$ ...absorbance vzorku

Antioxidační aktivita vzorků byla pak vyjádřena ve formě ekvivalentů Troloxu, a to vypočtením z rovnice regrese kalibrační řady závislosti inhibice na koncentraci Troloxu (Příloha 2).

---

<sup>6</sup> KUDRNÁČOVÁ, M. *Vliv přídavku pokrutin z bobulí révy vinné na antioxidační vlastnosti taveného sýra* [online]. Pardubice, 2018. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická.

#### 2.7.4.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP

Postup byl převzat ze článku Vábková a kol (2012)<sup>7</sup> s mírnou úpravou. Optimalizace reakčního času této metody je uvedena v Příloze 3.

Před měřením byla nejprve připravena reakční směs, která obsahovala FeCl<sub>3</sub> o koncentraci 20 mM, dále 10mM roztok TPTZ ve 40mM HCl a 0,3M octanový pufr o pH 3,6. Uvedené látky byly smíchány v poměru 1 : 1 : 10.

Ke stanovení pak byly pipetovány 3 ml výše uvedené reakční směsi do zkumavky s víčkem a k ní bylo přidáno 300 µl naředěného vzorku. Zkumavky byly dále ponechány 50 minut v temnu při laboratorní teplotě. Po uplynutí reakční doby byla proměřena absorbance při 593 nm. Slepé pokusy byly připravovány smícháním 3 ml reakční směsi s 300 µl destilované vody.

Dále byla připravena kalibrační řada ze zásobního roztoku Troloxu. Zásobní roztok byl připraven navážením 0,0598 g Troloxu do 100ml odměrné baňky a doplněním methanolem po rysku. Ze zásobního roztoku pak byla připravena kalibrační řada v rozmezí 5,98–119,60 µg Troloxu na ml. Kalibrační řada byla následně proměřena stejným způsobem jako vzorky.

Antioxidační aktivita vzorků byla vyjádřena ve formě ekvivalentů Troloxu, a to vypočtením z rovnice regrese kalibrační řady závislosti absorbance kalibračních roztoků na koncentraci Troloxu (Příloha 4).

#### 2.7.4.3 Stanovení chelatační aktivity

Postup byl převzat ze článku Wang a kol (2009)<sup>8</sup> s mírnou úpravou. Reakční čas metody zůstal zachován podle předloženého zdroje.

Ke stanovení byl pipetován 1 ml neředěného vzorku, ke kterému bylo přidáno 50 µl 2 mM FeCl<sub>2</sub> a 200 µl 5mM ferrozinu. Vzniklá směs byla umístěna na 10 minut do tmavého prostředí a následně byla proměřena absorbance při 562 nm. V případě slepého pokusu byl vzorek nahrazen destilovanou vodou, jinak u něj bylo postupováno stejně.

Chelatační aktivity vzorků byla následně vyjádřena v procentech inhibice. K jejímu výpočtu byla využita již uvedená Rovnice 7.

---

<sup>7</sup> VÁBKOVÁ, J. a J. NEUGEBAUEROVÁ. Determination of total phenolic content, total flavonoid content and FRAP in culinary herbs in relation to harvest time. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* [online]. 2012, **60**(1), 167-172. ISSN 12118516. DOI:10.11118/actaun201260010167.

<sup>8</sup> WANG, T., R. JÓNSDÓTTIR a G. ÓLAFSDÓTTIR. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry* [online]. 2009, **116**(1), 240-248. ISSN 03088146. DOI:10.1016/j.foodchem.2009.02.041.

#### 2.7.4.4 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Postup k tomuto stanovení byl převzat z diplomové práce Kudrnáčové Marie (2018)<sup>9</sup> s mírnou úpravou. Optimalizace reakčního času této metody je uvedena v Příloze 5.

Ke stanovení bylo pipetováno 6 ml destilované vody, 1 ml naředěného vzorku a 0,5 ml FC činidla do zkumavky s víčkem. Takto připravená reakční směs byla ponechána 5 minut v klidu. Následně byl přidán 1 ml 5% roztoku Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a takto vzniklá reakční směs byla umístěna na 90 minut do temna, při laboratorní teplotě. Po uplynuté době byla změřena absorbance při 765 nm. Stejným způsobem byly připraveny i slepé pokusy, které obsahovaly místo vzorku destilovanou vodu.

Dále byla připravena kalibrační řada v rozmezí 10–100 mg/l ze zásobního roztoku kyseliny gallové. Kalibrační řada byla pak proměřena stejným způsobem jako vzorky.

Celkový obsah fenolických látek byl následně vypočten pomocí rovnice regrese sestavené kalibrační řady s kyselinou gallovou (Příloha 6).

#### 2.7.4.5 Stanovení obsahu flavonoidů (metoda 1)

Postup k tomuto stanovení byl převzat ze článku Peřkal a kol (2014)<sup>10</sup>. Optimalizace reakčního času této metody je uvedena v Příloze 7.

Ke stanovení byly pipetovány 2 ml naředěného vzorku do zkumavky s víčkem. Následně byl přidán 1 ml 2% AlCl<sub>3</sub>, 1 ml destilované vody, 1 ml 1M HCl a 1 ml 1M CH<sub>3</sub>COONa. Vzniklá reakční směs byla umístěna do temna při laboratorní teplotě na 30 minut. Poté byla změřena absorbance při 425 nm. V případě slepého pokusu byl 2% AlCl<sub>3</sub> nahrazen destilovanou vodou, jinak bylo postupováno stejným způsobem.

Kalibrační řada byla připravena ze zásobního roztoku kvercetinu, který byl připraven navážením 0,05 g kvercetinu do 100ml odměrné baňky a doplněním methanolem po rysku. Z takto připraveného zásobního roztoku byla dále připravena kalibrační řada v rozmezí 5–80 mg/l. Kalibrační řada byla následně proměřena stejným způsobem jako vzorky samotné.

Obsah flavonoidů byl následně vypočten pomocí rovnice regrese sestavené kalibrační řady s kvercetinem (Příloha 8).

---

<sup>9</sup> KUDRNÁČOVÁ, M. *Vliv přídavku pokrutin z bobulí révy vinné na antioxidační vlastnosti taveného sýra* [online]. Pardubice, 2018. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická.

<sup>10</sup> PEŘKAL, A. a K. PYRZYŃSKA. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods*. 2014, 7(9), 1776-1782. ISSN 1936-9751. DOI:10.1007/s12161-014-9814-x.

#### 2.7.4.6 Stanovení obsahu flavonoidů (metoda 2)

Postup k tomuto stanovení byl převzat ze článku Pękal a kol (2014)<sup>11</sup>.

Ke stanovení byl pipetován 1 ml vzorku a 0,6 ml 5% NaNO<sub>2</sub> do zkumavky s víčkem. Zkumavka byla následně ponechána 5 minut v klidu a poté byl do ní přidán 1 ml 2% AlCl<sub>3</sub>. Po 6 minutách byl přidán 1 ml 1M NaOH. Vzniklá směs byla umístěna dále na 10 minut do tmavého prostředí a po uplynutí 10 minut byla změřena absorbance při 510 nm. V případě slepého pokusu byl 2% AlCl<sub>3</sub> nahrazen destilovanou vodou, jinak bylo postupováno stejným způsobem.

Kalibrační řada byla připravena ze zásobního roztoku katechinu, který byl připraven navážením 0,05 g katechinu do 100ml odměrné baňky a doplněním methanolem po rysku. Z takto připraveného zásobního roztoku byla dále připravena kalibrační řada v rozmezí 0,5–50 mg/l. Kalibrační řada byla následně proměřena stejným způsobem jako vzorky samotné.

Obsah flavonoidů byl následně vypočten pomocí rovnice regrese sestavené kalibrační řady s katechinem (Příloha 9).

#### 2.7.4.7 Stanovení obsahu antokyanů

Postup ke stanovení antokyanů byl převzat ze článku Barnes a kol (2005)<sup>12</sup>.

Ke stanovení byl pipetován 1 ml vzorku do zkumavky se 4 ml roztoku KCl o pH = 1, který byl připraven navážením 0,9 g KCl do 480 ml destilované vody, s následnou úpravou pH pomocí 5M HCl na pH = 1 a doplněním po rysku na výsledný objem 500 ml. Kromě toho byl tentýž vzorek v množství 1 ml pipetován do zkumavky se 4 ml roztoku CH<sub>3</sub>COONa o pH = 4,5, který byl připraven navážením 27,2 g CH<sub>3</sub>COONa do 480 ml, s následnou úpravou pH pomocí 5M HCl na pH = 4,5 a doplněním po rysku na výsledný objem 500 ml. Zkumavky byly následně umístěny do temna na 20 minut a poté byly změřeny jejich absorbance při 510 a při 700 nm.

Výsledná absorbance jednotlivých vzorků byla vypočtena podle následující Rovnice 8.

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH_1} - (A_{510} - A_{700})_{pH_{4,5}} \quad (8)$$

Takto vypočtená absorbance  $A$  byla dosazena do následující Rovnice 9, pro výpočet koncentrace antokyanů. Koncentrace antokyanů je v tomto případě vyjádřena jako ekvivalent kyanidin-3-glukosidu.

---

<sup>11</sup> PEKAL, A. a K. PYRZYNSKA. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods*. 2014, 7(9), 1776-1782. ISSN 1936-9751. DOI:10.1007/s12161-014-9814-x.

<sup>12</sup> LEE, J., R. W. DURST a R. E. WROLSTAD. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 2005, 88(5), 1269-1278. ISSN 1060-3271. DOI:10.1093/jaoac/88.5.1269.

$$c = \frac{A \cdot M \cdot f \cdot 10^3}{\varepsilon \cdot l} \quad (9)$$

$c$ ...koncentrace kyanidin-3-glukosidu [ $mg \cdot l^{-1}$ ],  $A$ ...absorbance,  $M$ ...molekulová hmotnost kyanidin-3-glukosidu ( $449,2 g \cdot mol^{-1}$ ),  $f$ ...použité ředění,  $\varepsilon$ ...molární absorpční koeficient [ $dm^3 \cdot cm^{-1} \cdot mol^{-1}$ ],  $l$ ...délka absorpčního prostředí [ $cm$ ]

### 2.7.5 Infračervená spektroskopie

Sirupy připravené dle Postupu 1–4 byly nejprve lyofilizovány ( $-110 \text{ }^\circ\text{C}$ , 26 h) a u jejich lyofilizátů bylo změřeno infračervené spektrum. Kromě toho bylo pro porovnání naměřeno i spektrum pro slepý vzorek, který byl připraven rozpuštěním 200 g cukru v 250 ml destilované vody. Takto vzniklý roztok byl ještě 5 minut mírně vařen, aby byly zachovány stejné podmínky jako při přípravě sirupů a následně byla provedena jeho lyofilizace.

Samotné měření infračervených spekter probíhalo na přístroji Nicolet iS50 FT-IR, za následujících podmínek:

- Metoda iS50 ATR Lab.
- Oblast snímání spektra:  $400\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$
- Počet skenů: 64

K měření byl použit ATR modul. Na něj byly, po rozmělnění kopistí, postupně vkládány vzorky a proměřeny proti vzduchu.

## 2.8 Statistické vyhodnocení

K vyhodnocení výsledků analýz lipového květu (kapitola 3.1) bylo použito párové porovnání mezi výsledky pomocí Duncanova testu.

K vyhodnocení výsledků optimalizace navážky lipového květu pro přípravu sirupů (kapitola 3.2) byla využita analýza rozptylu s interakcemi. Interakce byly hledány mezi naměřenými hodnotami antioxidační aktivity pro výluhy a sirupy, připravené z různě velkých navážek lipového květu. Párové porovnání mezi výsledky pak bylo provedeno pomocí Duncanova testu.

K vyhodnocení výsledků analýz lipových sirupů (kapitola 3.3) byla využita dvoufaktorová analýza rozptylu s interakcemi. Byl testován vliv postupů k přípravě lipového sirupu a použitého typu lipového květu (sušený vs. lyofilizovaný). Párové porovnání mezi výsledky bylo provedeno pomocí Duncanova testu.

K vyhodnocení výsledků analýz skladovaného a pasterizovaného sirupu (kapitola 3.4) byla využita dvoufaktorová analýza rozptylu s interakcemi. Byl testován vliv skladování a pasterizace. Kromě toho byl sledován i vliv použitého typu lipového květu (sušený vs. lyofilizovaný). Párové porovnání mezi výsledky bylo provedeno pomocí Duncanova testu.

Všechny výpočty byly provedeny s hladinou významnosti  $p = 0,05$ , pomocí Statistica CZ, ver.12 (StatSoft CR, s.r.o., Česká republika). Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr se standardní odchylkou.

### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

#### 3.1 Analýza vzorku lipového květu

Jednotlivé analýzy byly provedeny podle postupů, které jsou popsány v rámci kapitoly 2.4.

##### 3.1.1 Stanovení obsahu sušiny

Obsah sušiny byl stanoven pro sušený lipový květ na 93 %. V případě lyofilizovaného lipového květu byla sušina 100%. Výsledky stanovení obsahu sušiny jsou uvedeny v Tabulce 8.

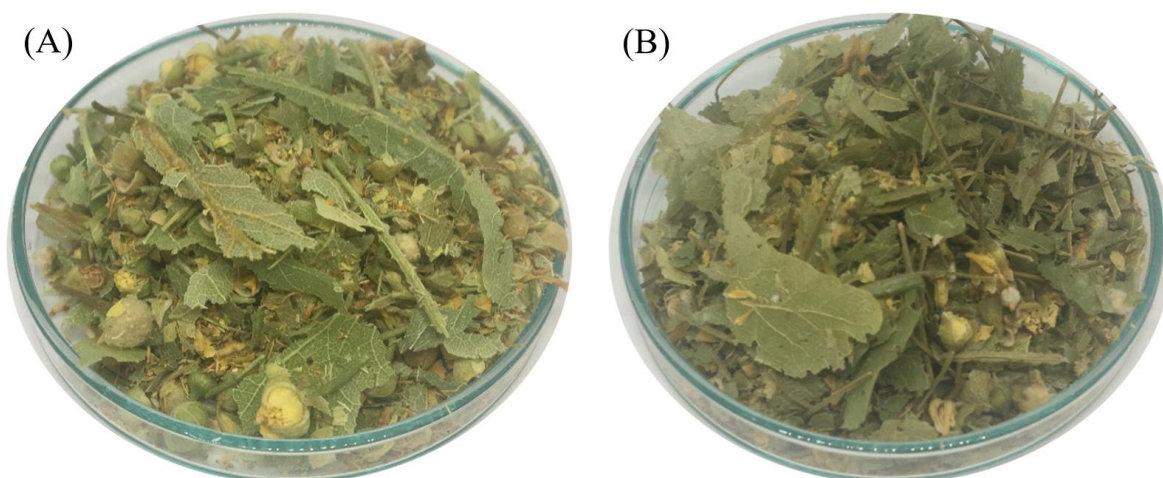
**Tabulka 8:** Obsah sušiny pro sušený a lyofilizovaný lipový květ

	<i>lipový květ</i>	
	<i>sušený</i>	<i>lyofilizovaný</i>
obsah sušiny [%]	93,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	100 ± 0 <sup>b</sup>

aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (N=4),  
různá písmena označují statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ )

##### 3.1.2 Měření barevnosti

Pro oba typy lipového květu byla změřena jejich barva v odraženém světle, a to v rámci barevných prostorů  $L^*a^*b^*$  a  $L^*C^*h^\circ$ . Hodnoty pro oba barevné prostory jsou shrnuty v Tabulce 9. Naměřené hodnoty pro sušený a lyofilizovaný lipový květ byly pak porovnány mezi sebou. Statisticky významně se od sebe odlišovaly hodnoty parametru  $L^*$  a  $b^*$ , přičemž parametr  $L^*$  popisuje jas a parametr  $b^*$  popisuje v tomto případě odstín žluté. Z výsledků tedy vyplývá, že lyofilizovaný lipový květ je světlejší a zároveň žlutější než sušený lipový květ. Parametr  $\Delta E^*$  byl vypočítán podle Rovnice 2 a nabývá hodnoty  $7,8 \pm 2$ , což vyjadřuje, že barevný rozdíl mezi vzorky by měl být patrný již pouhým okem. Tento fakt prezentuje Obrázek 15, na kterém je vidět, že vzorky se od sebe skutečně barevně odlišují.



**Obrázek 15:** Lyofilizovaný lipový květ (A), sušený lipový květ (B)



**Tabulka 9:** Měření barevnosti lipové květu v barevném prostoru  $L^*a^*b^*$  a  $L^*C^*h^\circ$ 

<i>lipový květ</i>	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E^*$	$C^*$	$h^\circ$	$\Delta H^*$
sušený	49 ± 2 <sup>a</sup>	1 ± 2 <sup>a</sup>	24 ± 2 <sup>a</sup>	7,8 ± 2	24 ± 1 <sup>a</sup>	93 ± 4 <sup>a</sup>	1,7 ± 2
lyofilizovaný	53 ± 1 <sup>b</sup>	0,6 ± 0,8 <sup>a</sup>	30 ± 1 <sup>b</sup>		30 ± 1 <sup>b</sup>	89 ± 2 <sup>a</sup>	

aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (N=4),  
různá písmena označují statisticky významný rozdíl v rámci sloupce ( $p < 0,05$ )

Selvi (2020)<sup>13</sup>, který zkoumal změnu barvy listů lípy velkolisté během sušení pomocí infračerveného záření, zjistil, že během sušení došlo ke zvýšení hodnot  $L^*$  a  $b^*$  v porovnání s hodnotami čerstvých listů. Zesvětlení během sušení bylo přisuzováno degradaci chlorofylu.

Di Cesare a kol (2003)<sup>14</sup>, porovnávali barvu čerstvé, sušené a lyofilizované bazalky. V případě obou metod byl registrován pokles sytosti barvy ( $C^*$ ), ale v případě lyofilizované bazalky byl pokles nižší. I v našem případě dosahuje lyofilizovaná lípa vyšších hodnot parametru  $C^*$  než sušená. Podle Veskutonis (1997)<sup>15</sup> je lyofilizace metodou, která je schopna zachovat původní vzhled čerstvé byliny.

### 3.1.3 Stanovení obsahu slizu

Výsledky stanovení obsahu slizu v mg/g sušiny lipového květu prezentuje Graf 1. Z Grafu 1 je viditelné, že nepatrně vyšší obsah slizu vykazovaly vzorky sušeného lipové květu. Z výsledků analýzy rozptylu však vyplývá, že obsah slizu s typem vzorku nijak nesouvisí ( $p > 0,05$ ) a rozdíl mezi hodnotami není statisticky významný. Obsah slizu se pohyboval od 4,7 do 6,3 mg/g sušiny.

Kosakowska a kol (2015)<sup>16</sup>, kteří se zabývali stanovením obsahu slizu pro sušený lipový květ z lípy srdčité, provedly analýzu květů pocházejících z několika různě umístěných stromů a došly k závěru, že obsah slizu je dosti variabilní. V jejich případě se pohyboval od 6 do 30 mg/g sušiny, což jsou výsledky o něco málo vyšší než v rámci této práce.

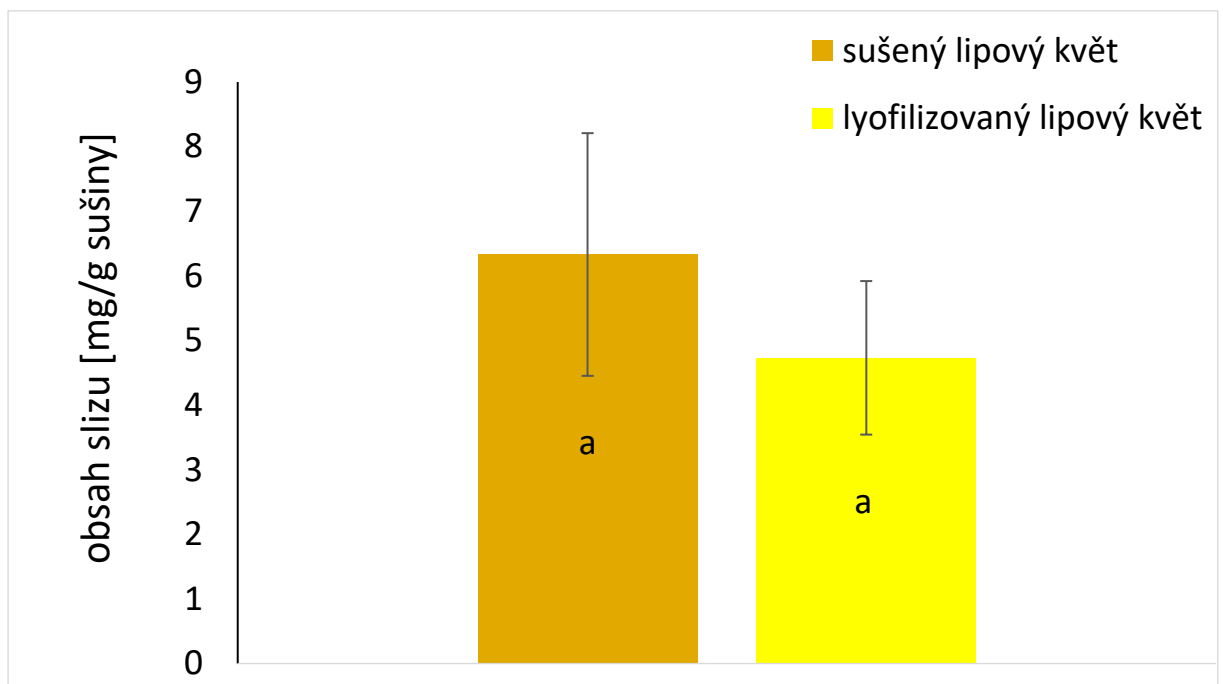
<sup>13</sup> SELVI, K. Ç. Investigating the influence of infrared drying method on linden (*Tilia platyphyllos Scop.*) leaves: Kinetics, color, projected area, modeling, total phenolic, and flavonoid content. *Plants* [online]. 2020, **9**(7). ISSN 2223-7747. DOI:10.3390/plants9070916.

<sup>14</sup> DI CESARE, L. F., E. FORNI, D. VISCARDI a R. C. NANI. Changes in the chemical composition of basil caused by different drying procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2003, **51**(12), 3575-3581. ISSN 0021-8561. DOI:10.1021/jf021080o.

<sup>15</sup> VENSKUTONIS, P. R. Effect of drying on the volatile constituents of thyme (*Thymus vulgaris L.*) and sage (*Salvia officinalis L.*). *Food Chemistry* [online]. 1997, **59**(2), 219-227. ISSN 03088146. DIO:10.1016/S0308-8146(96)00242-7.

<sup>16</sup> KOSAKOWSKA a kol. Intraspecific variability in the content of phenolic compounds, essential oil and mucilage of small-leaved lime (*Tilia cordata Mill.*) from Poland. *Industrial Crops and Products* [online]. 2015, **78**, 58-65. ISSN 09266690. DOI:10.1016/j.indcrop.2015.10.002.

**Graf 1:** Obsah slizu pro sušený a lyofilizovaný lipový květ

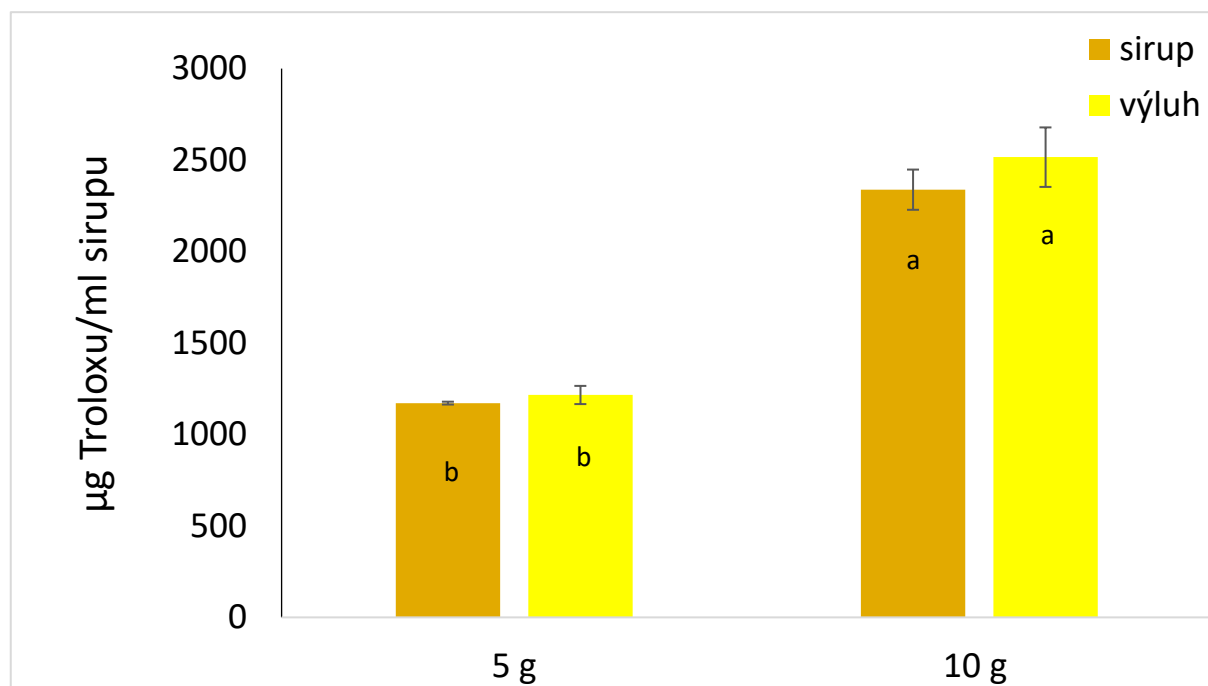


aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (N=3),  
různá písmena označují statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ )

### 3.2 Optimalizace navážky lipového květu pro přípravu sirupů

Optimalizace byla provedena podle uvedeného postupu v kapitole 2.5 s následnou analýzou podle kapitoly 2.7.4.1. Její výsledky jsou prezentovány v následujícím Grafu 2.

**Graf 2:** Antioxidační aktivita pro sirupy a výluhy připravené z 5 a 10 g sušeného a lipového květu stanovená metodou DPPH



aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (N=2),  
různá písmena označují statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ )

Z Grafu 2 je patrné, že sirup i výluh připravovaný z 10 g lipového květu dosahuje vyšších hodnot antioxidační aktivity, než sirup a výluh připravovaný z 5 g lipového květu. Tento fakt byl potvrzen i využitím analýzy rozptylu, kde byl prokázán mezi hodnotami statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ). Mezi naměřenými hodnotami antioxidační aktivity pro sirupy a výluhy připravovaných ze stejných navážek lipového květu, se objevují pouze nepatrné rozdíly, které nejsou statisticky významné. Díky tomu je možné konstatovat, že cukr nijak nepřispívá ke zvýšení antioxidační kapacity (stanovené metodou DPPH) výsledných sirupů.

V rámci této optimalizace byl připraven i sirup a nálev z 20 g lipového květu. Ten byl ale z důvodu nízkého objemového výtěžku vyřazen ještě před měřením. Získaný objem výluhu byl v porovnání s výluhem získaným z 5 g lipového květu zhruba o polovinu nižší.

Z hlediska objemové výtěžnosti a antioxidační aktivity výsledného sirupu dosahovala nejlepších výsledků navážka 10 g lipového květu. Ta byla pak využívána pro přípravu všech dalších sirupů v rámci této práce.

### 3.3 Analýza připravených lipových sirupů

Sirupy byly připraveny dle postupů uvedených v kapitolách 2.6.1–2.6.4 a následně analyzovány metodami uvedenými v rámci kapitoly 2.7.

#### 3.3.1 Měření pH

Naměřené hodnoty pH (Tabulka 10) pro jednotlivé lipové sirupy se pohybovaly v rozmezí 5,16–5,61. Analýza rozptylu prokázala, že hodnoty výsledného pH jsou ovlivněny způsobem přípravy sirupu ( $p < 0,001$ ). Statisticky významně nejnižší pH bylo naměřeno u sirupů připravených dle Postupu 2 ( $p < 0,05$ ). Dále byl zjištěn statisticky významný rozdíl u naměřených hodnot pH mezi sirupy připravovanými ze sušeného a lyofilizovaného lipového květu ( $p < 0,001$ ). Při porovnání hodnot pH v rámci jednoho postupu přípravy lipového sirupu, dosahují vždy sirupy ze sušeného lipového květu vyšších hodnot než sirupy z lyofilizovaného lipového květu. Kromě sirupů byla změřena hodnota pH i pro slepý vzorek, který představovala destilovaná voda s cukrem. Jeho pH se pohybovalo kolem hodnoty 7. Lze tedy říci, že u jednotlivých sirupů došlo vlivem lipového květu ke snížení hodnoty pH.

**Tabulka 10:** Naměřené hodnoty pH připravených sirupů

	<i>lipový květ</i>	
	<i>sušený</i>	<i>lyofilizovaný</i>
<b>Postup 1</b>	<sup>B</sup> 5,61 ± 0,03 <sup>a</sup>	<sup>A</sup> 5,27 ± 0,05 <sup>a</sup>
<b>Postup 2</b>	<sup>B</sup> 5,36 ± 0,06 <sup>c</sup>	<sup>A</sup> 5,16 ± 0,02 <sup>b</sup>
<b>Postup 3</b>	<sup>B</sup> 5,48 ± 0,02 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 5,2 ± 0,1 <sup>b</sup>
<b>Postup 4</b>	<sup>B</sup> 5,53 ± 0,06 <sup>ba</sup>	<sup>A</sup> 5,28 ± 0,07 <sup>a</sup>

aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (N=3),  
různá malá písmena v horním indexu označují statisticky významný rozdíl v rámci sloupce,  
různá velká písmena označují statisticky rozdílné hodnoty v řádku ( $p < 0,05$ )

Co se týká komerčně prodávaných ovocných sirupů, jejich pH se pohybuje kolem hodnoty 2,3. Ty obsahují kromě přirozeně se vyskytujících kyselin i kyseliny přidané. Výrobci používají především kyselinu citrónovou. Ta plní ve výrobku jak funkci antioxidantu, tak funkci konzervační [76]. Konzervační účinek je zajištěn snížením pH u daného sirupu, přičemž pH nižší než 4,5 zajišťuje ochranu před většinou bakterií, respektive inhibuje jejich množení. Kromě toho, čím větší bude rozdíl pH výrobku oproti optimální hodnotě pH daného mikroorganismu, tím hůř bude mikroorganismus snášet vyšší teploty. To má svůj význam například při následné pasterizaci [77]. Z tohoto hlediska by bylo vhodné zvážit přidání citrónové šťávy během přípravy sirupu, jak tomu doporučují internetové zdroje (viz. kapitola

1.5.3), jejíž hodnota pH je kolem 2,2 [78]. Přidání citrónové šťávy by zvýšilo ochranu sirupu před mikroorganismy, a kromě toho by mohlo dojít i ke zvýšení antioxidační aktivity výsledného sirupu, protože jak je známo, citrusové ovoce je důležitým zdrojem antioxidantů [79].

### 3.3.2 Měření vodní aktivity

Naměřené hodnoty vodní aktivity připravených sirupů (Tabulka 11) se pohybovaly v rozmezí 0,946–0,966. Analýza rozptylu prokázala ovlivnění vodní aktivity způsobem přípravy sirupu ( $p < 0,01$ ) a rovněž ovlivnění typem lipového květu, ze kterého byl sirup připraven ( $p < 0,05$ ). Nejnižších hodnot vodní aktivity dosahovaly sirupy připravené dle Postupu 1. V rámci srovnání naměřených hodnot pro sirupy z lyofilizovaného a sušeného lipového květu, dosahují nižších hodnot sirupy z květu lyofilizovaného. Vzhledem k tomu, že sirupy byly připravovány takovým způsobem, že do každého z nich byl přidán stejný podíl cukru, je možné, že by nižší hodnoty vodní aktivity mohly souviset s vyšším množstvím dalších rozpuštěných složek nebo s nižším obsahem sušiny v případě sušeného lipového květu.

Obecně lze říci, že potravina je chráněna před bakteriemi způsobující kažení, pokud je její hodnota vodní aktivity 0,9–0,91. Kvasinky a plísňe jsou odolnější a snesou i nižší hodnoty. Pro kvasinky je to 0,87–0,94 a pro plísňe 0,7–0,8 [80]. Lze tedy říci, že v případě připravených sirupů není ochrana před mikroorganismy dostatečná a je tedy na místě zvážit již jmenované přidání citrónové šťávy. Kombinace kyselého pH a nižší vodní aktivity by mělo ochranu před mikroorganismy podpořit.

**Tabulka 11:** Naměřené hodnoty vodní aktivity připravených sirupů

	<i>lipový květ</i>	
	<i>sušený</i>	<i>lyofilizovaný</i>
<b><i>Postup 1</i></b>	<sup>A</sup> 0,946 ± 0,002 <sup>c</sup>	<sup>A</sup> 0,950 ± 0,002 <sup>b</sup>
<b><i>Postup 2</i></b>	<sup>A</sup> 0,959 ± 0,003 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 0,959 ± 0,005 <sup>a</sup>
<b><i>Postup 3</i></b>	<sup>A</sup> 0,966 ± 0,009 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 0,952 ± 0,002 <sup>b</sup>
<b><i>Postup 4</i></b>	<sup>A</sup> 0,963 ± 0,005 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 0,953 ± 0,006 <sup>b</sup>

aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (N=3),  
různá malá písmena v horním indexu označují statisticky významný rozdíl v rámci sloupce,  
různá velká písmena označují statisticky rozdílné hodnoty v řádku ( $p < 0,05$ )

### 3.3.3 Měření barevnosti

Pro ukázkou zabarvení sirupu je uveden Obrázek 16. Jedná se o sirup připravený podle Postupu 1 ze sušeného lipového květu.

#### 3.3.3.1 Barevný prostor $L^*a^*b^*$

Naměřené hodnoty pro parametry  $L^*a^*b^*$  prezentuje Tabulka 12. V případě všech zmíněných parametrů bylo s využitím analýzy rozptylu prokázáno ovlivnění barvy sirupů typem použitého lipového květu ( $p < 0,01$ ). Ovlivnění barvy sirupů způsobem jejich přípravy bylo zjištěno v případě parametru  $L^*$  ( $p < 0,001$ ) a  $b^*$  ( $p < 0,001$ ), v případě parametru  $a^*$  prokázáno nebylo. Nejvíce se od ostatních sirupů odlišuje sirup připravený z lyofilizovaného květu pomocí Postupu 2.



**Obrázek 16:** Lipový sirup (ze sušeného lipového květu, Postup 1)

Barvová odchylka  $\Delta E^*$  byla vypočítána pro sirupy připravené podle stejného postupu, ale s využitím jinak zpracovaného lipového květu (Rovnice 2). Za standard byl v rámci výpočtu považován vždy sirup z květu lyofilizovaného. Podle výsledných hodnot lze říci, že nejvíce se mezi sebou lišily sirupy připravené dle Postupu 2 a 1. Mezi sirupy připravenými podle Postupů 3 a 4 jsou rozdíly menší.

**Tabulka 12:** Měření barevnosti připravených sirupů v barevném prostoru  $L^*a^*b^*$

	<i>lipový květ</i>	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E^*$
<b>Postup 1</b>	<i>sušený</i>	$93,4 \pm 0,5^b$	$-2,18 \pm 0,08^{bc}$	$24,9 \pm 0,8^b$	$6,2 \pm 1^c$
	<i>lyofilizovaný</i>	$93,7 \pm 0,1^{ab}$	$-2,16 \pm 0,06^{bc}$	$18,8 \pm 0,3^{de}$	
<b>Postup 2</b>	<i>sušený</i>	$93,5 \pm 0,2^{ab}$	$-1,84 \pm 0,03^c$	$21,8 \pm 0,4^c$	$8,6 \pm 3^a$
	<i>lyofilizovaný</i>	$89 \pm 1^c$	$-2,6 \pm 0,5^a$	$40 \pm 3^a$	
<b>Postup 3</b>	<i>sušený</i>	$94,4 \pm 0,1^{ab}$	$-2,6 \pm 0,3^a$	$20 \pm 1^{ce}$	$3,0 \pm 2^{bc}$
	<i>lyofilizovaný</i>	$94,8 \pm 0,7^a$	$-2,34 \pm 0,04^{ab}$	$17,2 \pm 0,6^d$	
<b>Postup 4</b>	<i>sušený</i>	$94,09 \pm 0,08^{ab}$	$-2,1 \pm 0,08^{bc}$	$19,8 \pm 0,6^{ce}$	$2,2 \pm 1^b$
	<i>lyofilizovaný</i>	$94 \pm 0,6^{ab}$	$-2,7 \pm 0,1^a$	$20 \pm 2^{ce}$	

aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (N=3),  
různá písmena označují statisticky významný rozdíl v rámci sloupce ( $p < 0,05$ )

### 3.3.3.2 Barevný prostor $L^*C^*h^\circ$

Naměřené hodnoty pro parametry  $L^*C^*h^\circ$  prezentuje Tabulka 13. Analýza rozptylu prokázala, že všechny uvedené parametry jsou ovlivněné jak postupem přípravy sirupu ( $p < 0,001$ ), tak použitým typem lipového květu ( $p < 0,01$ ). Stínová odchylka  $\Delta H^*$  byla vypočítána pro sirupy připravené podle stejného postupu, ale s využitím jinak zpracovaného lipového květu (Rovnice 3). Za standard byl v rámci výpočtu dosazen vždy sirup z květu lyofilizovaného. I v tomto barevném prostoru se projevuje statisticky významná odlišnost sirupu připraveného podle Postupu 2 z lyofilizovaného lipového květu.

**Tabulka 13:** Měření barevnosti připravených sirupů v barevném prostoru  $L^*C^*h^\circ$

	<i>lipový květ</i>	$L^*$	$C^*$	$h^\circ$	$\Delta H^*$
<b>Postup 1</b>	<i>sušený</i>	93,4 ± 0,5 <sup>b</sup>	25,0 ± 0,8 <sup>b</sup>	95,0 ± 0,3 <sup>c</sup>	0,64 ± 0,1 <sup>ab</sup>
	<i>lyofilizovaný</i>	93,7 ± 0,1 <sup>ab</sup>	18,9 ± 0,3 <sup>de</sup>	96,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	
<b>Postup 2</b>	<i>sušený</i>	93,5 ± 0,2 <sup>ab</sup>	21,9 ± 0,4 <sup>c</sup>	94,8 ± 0,1 <sup>c</sup>	0,79 ± 0,2 <sup>a</sup>
	<i>lyofilizovaný</i>	89 ± 1 <sup>c</sup>	40 ± 3 <sup>a</sup>	94 ± 1 <sup>d</sup>	
<b>Postup 3</b>	<i>sušený</i>	94,4 ± 0,1 <sup>ab</sup>	20,2 ± 1,1 <sup>ce</sup>	97,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,1 <sup>c</sup>
	<i>lyofilizovaný</i>	94,8 ± 0,7 <sup>a</sup>	17,3 ± 0,6 <sup>d</sup>	97,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	
<b>Postup 4</b>	<i>sušený</i>	94,09 ± 0,08 <sup>ab</sup>	19,9 ± 0,6 <sup>ce</sup>	96,08 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,47 ± 0,1 <sup>bc</sup>
	<i>lyofilizovaný</i>	94 ± 0,6 <sup>ab</sup>	21 ± 2 <sup>ce</sup>	97,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	

aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (N=3),

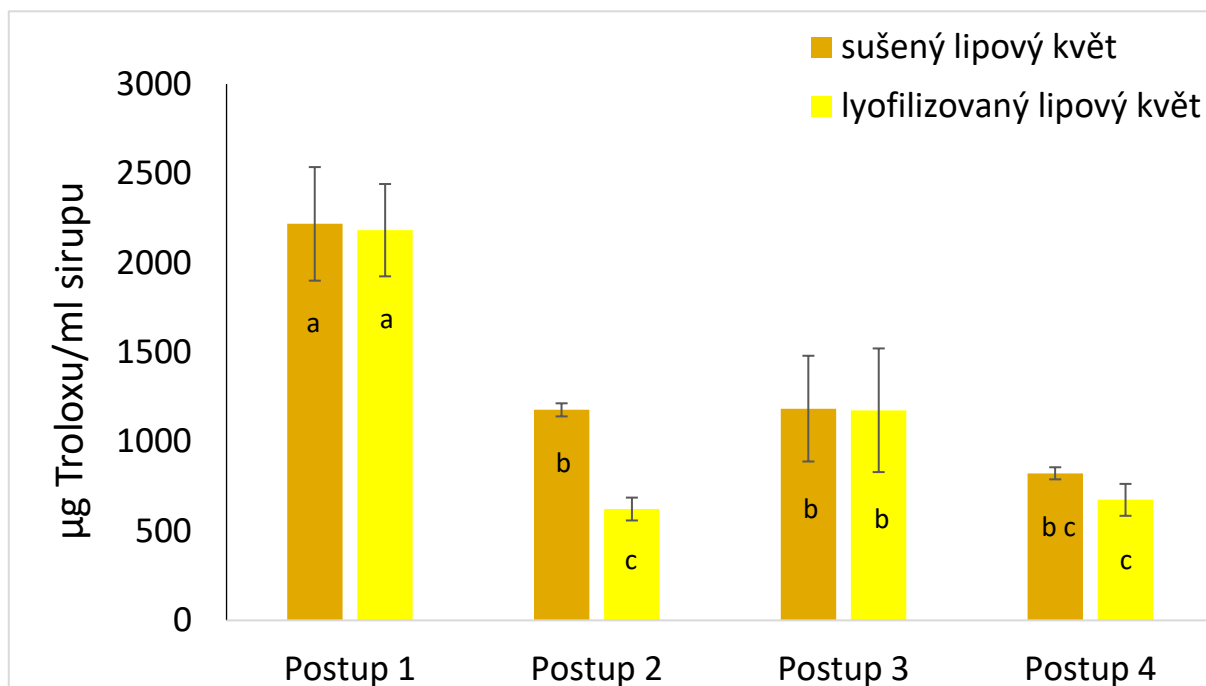
různá písmena označují statisticky významný rozdíl v rámci sloupce ( $p < 0,05$ )

### 3.3.4 Spektrofotometrické analýzy

#### 3.3.4.1 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Výsledky stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH jsou vyjádřeny v  $\mu\text{g}$  Troloxu/ml sirupu a prezentuje je Graf 3.

**Graf 3:** Antioxidační aktivita připravených sirupů stanovená metodou DPPH



aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (N=3),  
různá písmena označují statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ )

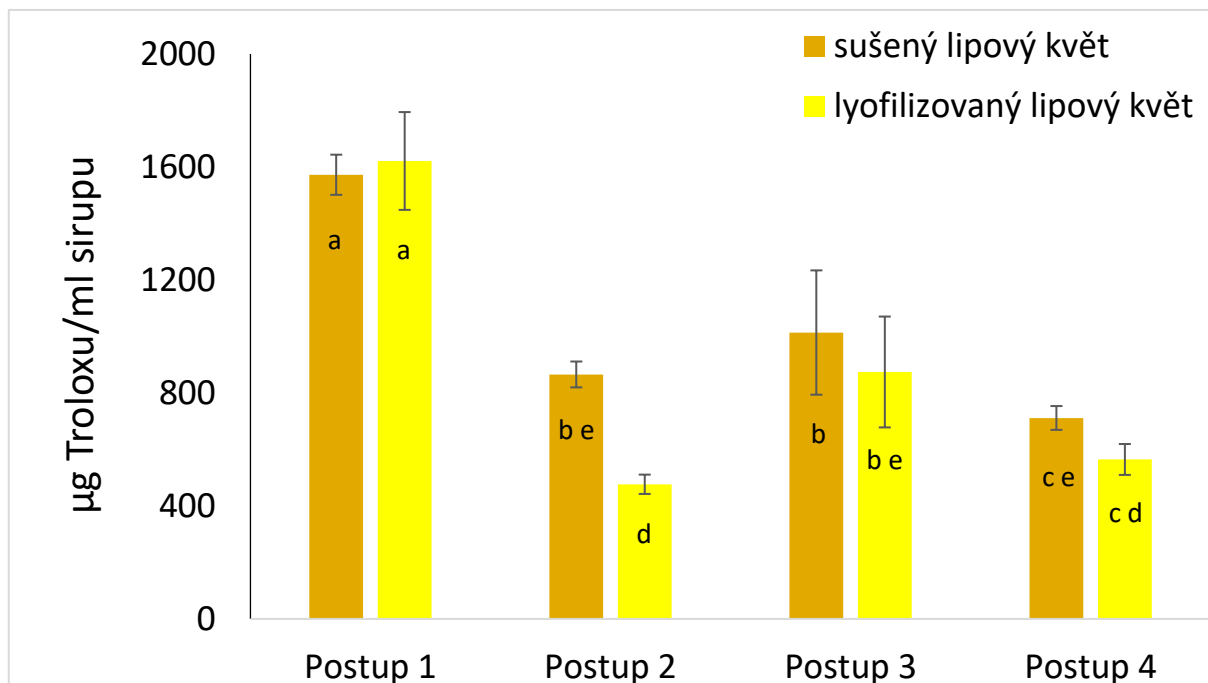
Z Grafu 3 je patrné, že nejvyšších hodnot dosahoval sirup připravený dle Postupu 1 a ze zbylých tří příprav se jeví, jako nejlepší Postup 3. Analýza rozptylu prokázala, že způsob přípravy jednotlivých sirupů má skutečně vliv na výsledné hodnoty antioxidačních aktivit ( $p < 0,001$ ). Dále potvrdila, že příprava sirupu dle Postupu 1 je z hlediska zachování antioxidantů neúčinnější ( $p < 0,05$ ). Výsledky zbylých Postupů 2–4 se pak od sebe statisticky příliš nelišily. U srovnání výsledků pro sirupy ze sušeného a lyofilizovaného lipové květu nebyl shledán statisticky významný rozdíl. Nicméně v případě Postupu 2 je evidentní, že sirup z lyofilizovaného květu dosahoval statisticky významně nižší hodnoty.



### 3.3.4.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP

Výsledky stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP jsou vyjádřeny v  $\mu\text{g}$  Troloxu/ml sirupu a prezentuje je Graf 4.

Graf 4: Antioxidační aktivita připravených sirupů stanovená metodou FRAP



aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (N=3),  
různá písmena označují statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ )

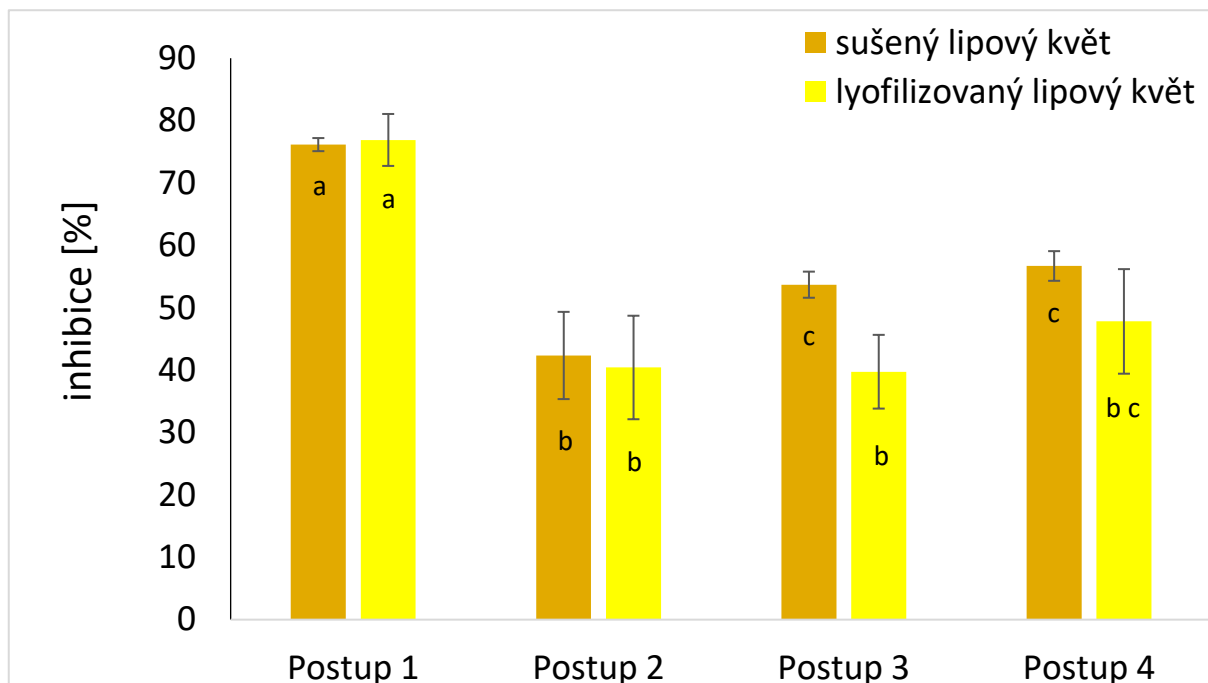
Z Grafu 4 je viditelné, že nejvyšších hodnot dosahovaly sirupy připravené dle Postupu 1. Sirupy vyhotovené dle zbylých Postupů 2–4 jsou si svými výsledky blízké, ale je též vidět, že sirup připravený podle Postupu 3 zbylé sirupy mírně převyšuje. V tomto případě analýza rozptylu opět potvrdila ovlivnění výsledných hodnot antioxidačních aktivit způsobem přípravy sirupů ( $p < 0,001$ ). Kromě toho byl prokázán statisticky významný rozdíl i v porovnání sirupů připravených z jinak zpracovaného lipového květu ( $p < 0,01$ ), přičemž vyšší antioxidační aktivity dosahovaly obecně sirupy ze sušeného lipového květu.

V případě porovnání výsledků tohoto stanovení s výsledky stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH (kapitola 3.3.4.1), je viditelné, že výsledky v případě metody FRAP dosahují nižších hodnot. Nicméně je ale viditelný mezi výsledky stejný trend.

### 3.3.4.3 Stanovení chelatační aktivity

Porovnání chelatační aktivity mezi jednotlivými vzorky je vyjádřeno v procentech inhibice a je vyobrazeno v následujícím Grafu 5.

**Graf 5:** Chelatační vlastnosti připravených sirupů



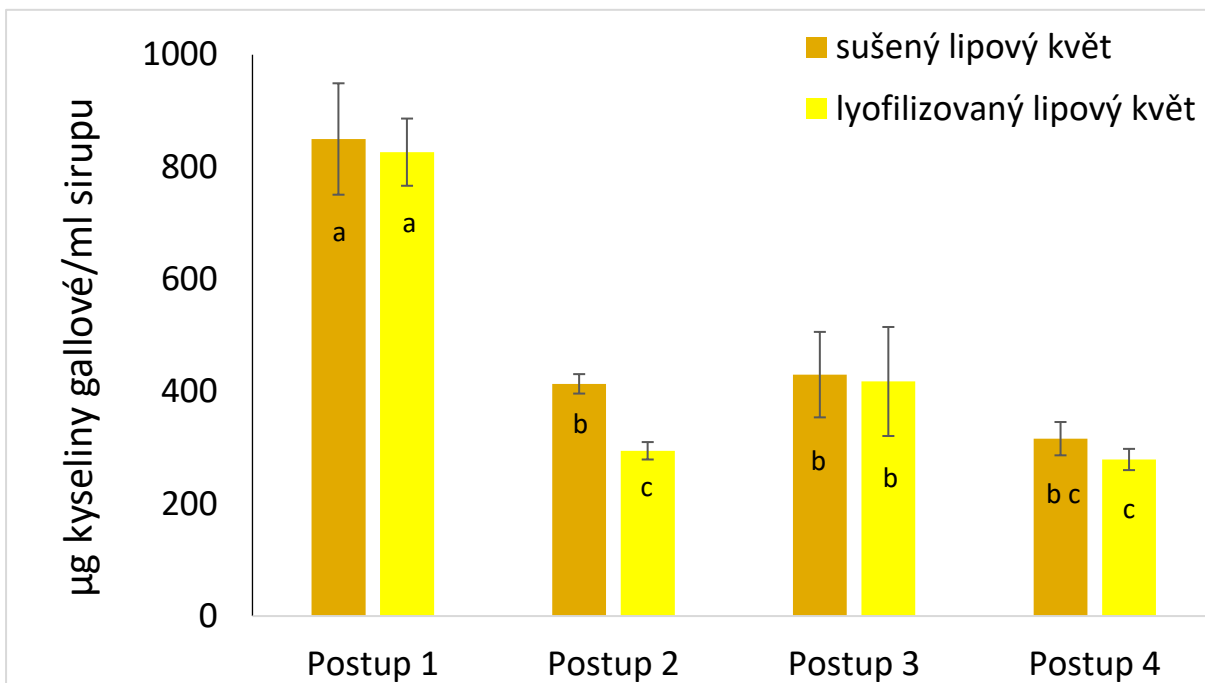
aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (N=3),  
různá písmena označují statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ )

Na Grafu 5 je viditelné, že nejvyšších hodnot dosahují sirupy připravené dle Postupu 1. Významný statistický rozdíl byl v jejich případě potvrzen i pomocí analýzy rozptylu a zároveň bylo potvrzeno, že na výsledné chelatační vlastnosti sirupů má vliv i jejich způsob přípravy ( $p < 0,001$ ). Rovněž byl registrován statisticky významný rozdíl mezi sirupy připravenými z jinak zpracovaného lipového květu ( $p < 0,05$ ), kdy obecně vyšších výsledků dosahovaly sirupy připravené ze sušeného lipového květu.

### 3.3.4.4 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Výsledky stanovení celkové obsahu fenolických látek jsou vyjádřeny v  $\mu\text{g}$  kyseliny gallové/ml sirupu a jsou uvedeny v Grafu 6.

**Graf 6:** Celkový obsah fenolických látek připravených sirupů



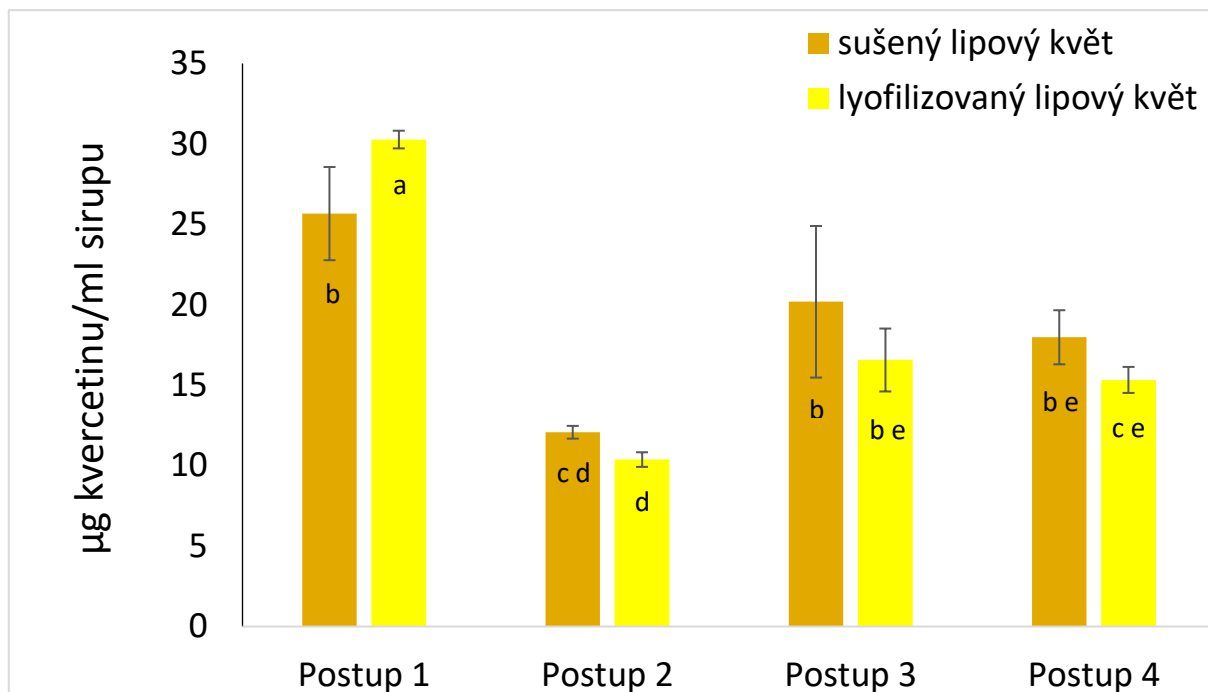
aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (N=3),  
různá písmena označují statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ )

Graf 6 ukazuje, že nejvyšší obsah fenolických látek byl naměřen pro sirupy připravené dle Postupu 1. Naopak nejnižší hodnoty byly naměřeny pro sirupy z lyofilizovaného lipového květu připravených dle Postupu 2 a 4, přičemž podobný trend mezi výsledky byl znatelný již u stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH. Analýza rozptylu prokázala ovlivnění obsahu fenolických látek způsobem přípravy sirupů ( $p < 0,001$ ). Ovlivnění výsledných hodnot metodou zpracování lipového květu naopak prokázáno nebylo.

### 3.3.4.5 Stanovení obsahu flavonoidů (metoda 1)

Výsledky stanovení obsahu flavonoidů dle metody 1 jsou vyjádřeny v  $\mu\text{g}$  kvercetinu/ml sirupu a jsou uvedeny v Grafu 7.

**Graf 7:** Stanovení obsahu flavonoidů (metoda 1) u připravených sirupů



aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (N=3),  
různá písmena označují statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ )

V případě tohoto stanovení, které nese označení Stanovení obsahu flavonoidů (metoda 1), není měřen celkový obsah flavonoidů. Stanovení je selektivní pro flavonoly a flavony, jak je zmiňováno v kapitole 1.6.6.1. Na Grafu 7 je viditelné, že nejvyšší hodnoty byly naměřeny pro sirupy připravené dle Postupu 1. S využitím analýzy rozptylu bylo opět prokázáno ovlivnění výsledných hodnot způsobem přípravy sirupů ( $p < 0,001$ ). Dále byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi sirupy připravenými ze sušeného a lyofilizovaného lipového květu dle Postupu 1. Paradoxně nebyl potvrzen vliv různě zpracovaného lipového květu na obsah flavonoidů.

### 3.3.4.6 Stanovení obsahu flavonoidů (metoda 2)

V případě stanovení obsahu flavonoidů dle metody 2 docházelo u všech vzorků během reakce ke vzniku sraženiny. Tato sraženina (Obrázek 17) se tvořila i po přefiltrování jednotlivých vzorků a narušovala následné spektrofotometrické měření. Pravděpodobně mohlo docházet k nitraci přítomných sacharidů.

Abbès a kol (2013)<sup>17</sup> analyzovali datlový sirup. Jejich postup byl více méně totožný, ale lišil se v koncentraci použitého AlCl<sub>3</sub>, který nebyl 2%, ale 10%.

Blasa a kol (2006)<sup>18</sup> se zmiňují o možném vlivu redukujících cukrů na výsledný produkt této reakce. Sacharóza, která byla využívána k přípravě sirupů, sice nepatří mezi redukující cukry, ale je možné, že během jejího záhřevu mohlo dojít ke vzniku invertního cukru.



**Obrázek 17:** Sraženina vznikající během stanovení flavonoidů (metoda 2)

### 3.3.4.7 Stanovení obsahu antokyanů

U žádného z připravených sirupů nebyly zjištěny žádné antokyaniny, přestože Vidovic a kol (2015)<sup>19</sup> prokázaly přítomnost antokyanů, konkrétně kyanidinu a delfinidinu, v listech lípy velkolisté. Je možné, že antokyaniny byly ze sirupů odstraněny během jejich povaření, z důvodu jejich citlivosti k vyšším teplotám [81]. Například Brownmiller a kol (2008)<sup>20</sup> naměřily pokles monomerních antokyanů, při pasterizaci borůvkového džusu při 90 °C, asi o 10 %. Údajně antokyanům nesvědčí ani příliš sladké prostředí [82].

### 3.3.4.8 Srovnání výsledků v rámci spektrofotometrické analýzy

Nejlepších výsledků dosahoval napříč všemi stanoveními lipový sirup připravený dle Postupu 1. Při srovnání výsledků zbylých příprav (Postup 2–4) se u většiny stanovení jevila jako nejlepší příprava dle Postupu 3. V obou případech byly sirupy připraveny zalitím lipových

<sup>17</sup> ABBÈS, F., W. KCHAOU, Ch. BLECKER, M. ONGENA, G. LOGNAY, H. ATTIA a S. BESBES. Effect of processing conditions on phenolic compounds and antioxidant properties of date syrup. *Industrial Crops and Products* [online]. 2013, **44**, 634-642. ISSN 09266690. DOI:10.1016/j.indcrop.2012.09.008.

<sup>18</sup> BLASA, M., M. CANDIRACCI, A. ACCORSI, M. P. PIACENTINI, M. C. ALBERTINI a E. PIATTI. Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chemistry* [online]. 2006, **97**(2), 217-222. ISSN 03088146. DOI:10.1016/j.foodchem.2005.03.039.

<sup>19</sup> VIDOVIC, M., F. MORINA, S. M. KOMIĆ a S. VELJOVIC-JOVANOVIC. An improved HPLC-DAD method for simultaneously measuring phenolics in the leaves of *Tilia platyphyllos* and *Ailanthus altissima*. *Botanica SERBICA* [online]. 2015, **39**(2), 177-186. ISSN 1821-2158.

<sup>20</sup> BROWNMILLER, C., L. R. HOWARD a R. L. PRIOR. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. *Journal of Food Science* [online]. 2008, **73**(5), H72-H79. ISSN 00221147. DOI:10.1111/j.1750-3841.2008.00761.x.

květů horkým roztokem, přičemž louhování probíhalo v uzavřeném prostoru (skříňka), kde se teplota pohybovala 26–23 °C (Příloha 10). Výsledky tedy naznačují, že extrakce fenolických látek je v tomto případě podpořena vyšší teplotou použitého extrakčního činidla. Obecně extrakce fenolických sloučenin z rostlinných materiálů je ovlivněna řadou faktorů, jako je například velikost částic extrahovaného vzorku, polarita extrakčního činidla, čas extrakce a přítomnost interferujících látek [83]. Zároveň jsou fenolické látky strukturálně velmi rozmanité, a tedy je obtížné vyvinout extrakční metodu, která by byla vhodná pro všechny rostlinné fenoly [64]. Řada autorů, která se zabývala metodami extrakce rostlinných fenolů, se shoduje s výsledky této práce, a tedy že při vyšších teplotách extrakčního činidla je zajištěna vyšší výtěžnost fenolických látek (Bucić-Kojić a kol (2009)<sup>21</sup>, Aqilah Abd Rahim a kol (2020)<sup>22</sup>).

Co se týká srovnání výsledků sirupů připravovaných z různě zpracovaného lipového květu, nebyly mezi výsledky v rámci většiny metod pozorovány statisticky významné rozdíly. V těch případech, kde byl statisticky významný rozdíl stanoven, dosahovaly vyšších výsledků sirupy ze sušeného lipového květu.

### 3.3.5 Infračervená spektroskopie

Infračervená spektra změřená pro lyofilizáty připravených sirupů (dle Postupu 1–4) jsou na Obrázku 18. Mimo ně bylo změřeno i spektrum pro slepý vzorek, který se od lipových sirupů liší absencí extraktu lipového květu.

Při pohledu na Obrázek 18 je ale viditelné, že tento rozdíl se ve spektru nijak neprojevil. Slepý vzorek vykazuje pouze nižší hodnoty absorbance a absenci píku při vlnočtu 1644 cm<sup>-1</sup>, který náleží deformační vibraci O-H skupiny. Spektrum tedy obsahuje, kromě již zmíněného pásu (1644 cm<sup>-1</sup>), ještě vibrační pás O-H skupiny při 3294 cm<sup>-1</sup>, kdy oba tyto pásy náleží vodě. Důvodem výskytu vody v lyofilizátech je pravděpodobně to, že při lyofilizaci cukerný roztoků vzniká tzv. amorfní cukr, který vodu obsahuje [84]. Bylo dokonce prokázáno, že některé polyfenolické látky, které lipový květ obsahuje, zvyšují stabilitu amorfního cukru [85].

Další pásy ve spektru v rozmezí vlnočtu 1000–1500 cm<sup>-1</sup> náleží valenční vibraci C-O a deformační vibraci O-H, jejichž podrobnější popis je k dispozici v Tabulce 14. V oblasti

---

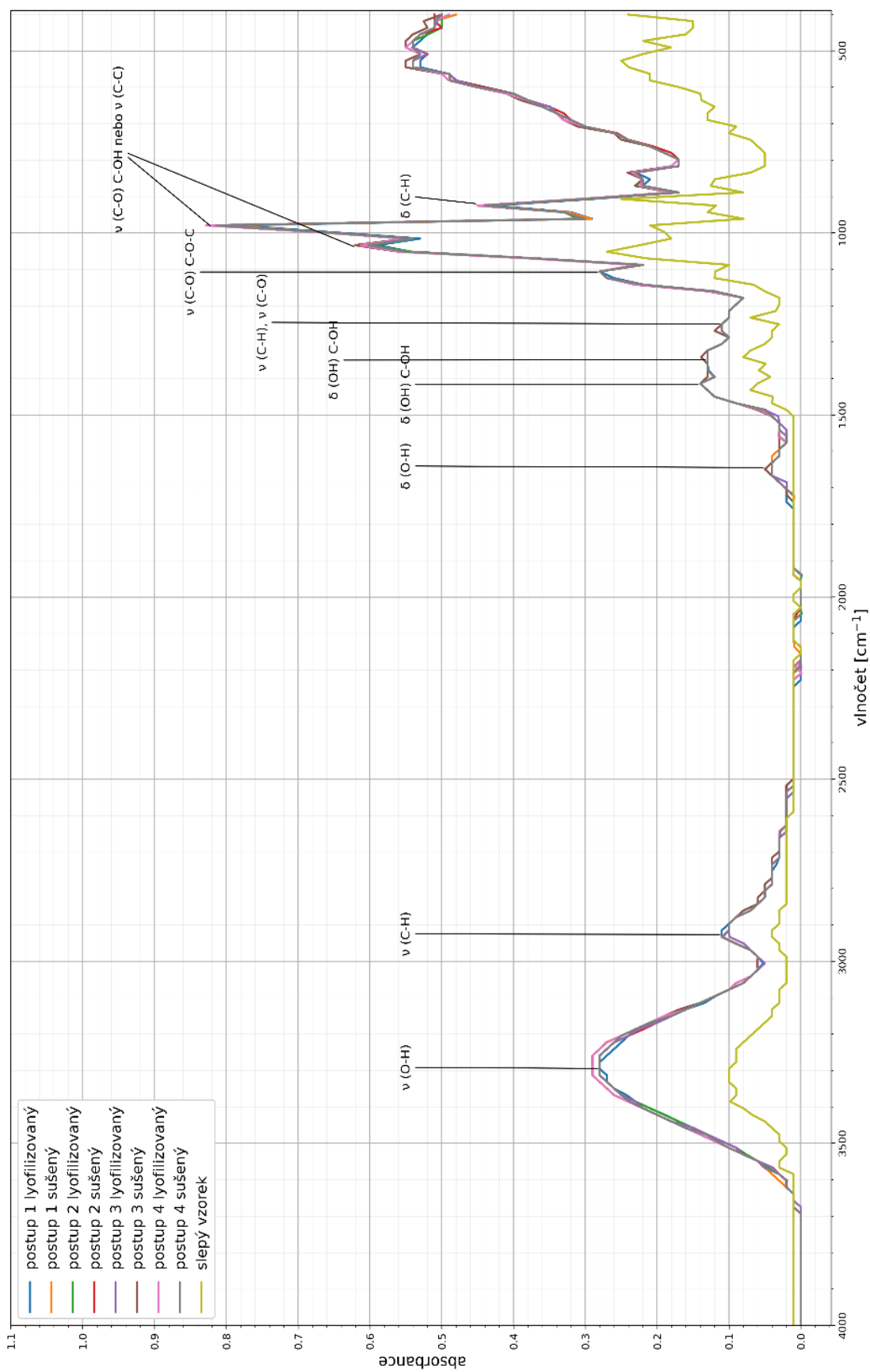
<sup>21</sup> BUCIĆ-KOJIĆ, A., M. PLANINIĆ, S. TOMAS, L. JAKOBEK a M. ŠERUGA. Influence of solvent and temperature on extraction of phenolic compounds from grape seed, antioxidant activity and color of extract [online]. 2009, **44**(12), 2394-2401. ISSN 09505423. DOI:10.1111/j.1365-2621.2008.01876.x.

<sup>22</sup> AQILAH ABD RAHIM, S., N. MOHD AMER a K. FARIHAN KASIM. Kinetic extraction of antioxidant and total phenolic content of *Clinachantus nutans*. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering [online]. 2020, **864**. ISSN 1757-899X. DOI:10.1088/1757-899X/864/1/012125.

vlnočtu  $920\text{ cm}^{-1}$  se pak nachází pás, představující deformační vibraci C-H skupiny. Tyto zmíněné pásy pak patří pravděpodobně molekule sacharózy.

**Tabulka 14:** Identifikace spekter absorpčních pásů spekter lipových sirupů

Vlnočť [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Typ vibrace	Složka
3294	$\nu$ (O-H)	voda
2926	$\nu$ (C-H)	sacharóza
1644	$\delta$ (O-H)	voda
1415	$\delta$ (OH) C-OH	sacharóza
1348	$\delta$ (OH) C-OH	sacharóza
1250	$\nu$ (C-H), $\nu$ (C-O)	sacharóza
1107	$\nu$ (C-O) C-O-C	sacharóza
1039	$\nu$ (C-O) C-OH nebo $\nu$ (C-C)	sacharóza
984	$\nu$ (C-O) C-OH nebo $\nu$ (C-C)	sacharóza
920	$\delta$ (C-H)	sacharóza



**Obrázek 18:** Infračervená spektra lípových sirupů a slepého vzorku



### 3.4 Analýza skladovaného a pasterizovaného lipového sirupu

Sirupy byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 2.6.5, a to na základě výsledků uvedených v rámci kapitoly 3.3.4.8. Jednotlivé analýzy byly pak provedeny podle kapitoly 2.7, s výjimkou stanovení obsahu flavonoidů (metoda 2) a obsahu antokyanů, které byly vynechány. Naměřené hodnoty pro skladovaný a pasterizovaný sirup jsou srovnávány s hodnotami zjištěnými pro čerstvý sirup, který byl připraven stejným postupem (tj. dle Postupu 1).

#### 3.4.1 Měření pH

Naměřené hodnoty pH jsou vyobrazeny v rámci Tabulky 15. Analýza rozptylu v tomto případě neprokázala, že by u připravených sirupů během jejich skladování nebo pasterizace, docházelo ke změnám hodnoty pH. Opět byl potvrzen statisticky významný rozdíl mezi hodnotou pH sirupů připravených z jinak zpracovaného lipového květu, jako tomu bylo v kapitole 3.3.1.

**Tabulka 15:** Naměřené hodnoty pH pro čerstvý, skladovaný a pasterizovaný sirup

	<i>lipový květ</i>	
	<i>sušený</i>	<i>lyofilizovaný</i>
čerstvý	<sup>A</sup> 5,61 ± 0,03 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 5,27 ± 0,05 <sup>a</sup>
skladovaný	<sup>A</sup> 5,49 ± 0,06 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 5,25 ± 0,06 <sup>a</sup>
pasterizovaný	<sup>A</sup> 5,54 ± 0,03 <sup>ab</sup>	<sup>B</sup> 5,27 ± 0,06 <sup>a</sup>

aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (N=3),  
různá malá písmena v horním indexu označují statisticky významný rozdíl v rámci sloupce,  
různá velká písmena označují statisticky rozdílné hodnoty v řádku (p < 0,05)

V rámci kapitoly 3.3.1 bylo již zmíněno, že pH připravených sirupů není z hlediska ochrany před mikroorganismy zcela optimální. Mikrobiologická analýza nebyla v rámci této práce provedena, ale sirupy po skladování nevykazovaly žádné známky kažení.

#### 3.4.2 Měření aktivity vody

V případě naměřených hodnot vodní aktivity (Tabulka 16) byl opět zjištěn statisticky významný rozdíl mezi sirupy z lyofilizovaného a sušeného lipového květu, jako tomu bylo u kapitoly 3.3.2. Čerstvý sirup dosahuje nižších hodnot než sirup skladovaný a pasterizovaný. Mezi hodnotami pro skladovaný a pasterizovaný sirup nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl. Z výsledků tedy vyplývá, že během skladování došlo ke zvýšení vodní aktivity připravených sirupů.

I když v rámci této práce byl zjištěn významný nárůst vodní aktivity během skladování, v práci Naknean a kol (2013)<sup>23</sup> se hodnoty vodní aktivity při skladování palmového sirupu nezměnily. Zároveň změny, ke kterým došlo v rámci této práce jsou velmi nízké, a mohou být způsobeny rozdílnou ztrátou vlhkosti během přípravy sirupů.

**Tabulka 16:** Naměřené hodnoty vodní aktivity pro čerstvý, skladovaný a pasterizovaný sirup

	<i>lipový květ</i>	
	<i>sušený</i>	<i>lyofilizovaný</i>
čerstvý	<sup>A</sup> 0,946 ± 0,002 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 0,950 ± 0,002 <sup>a</sup>
skladovaný	<sup>A</sup> 0,958 ± 0,001 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 0,953 ± 0,001 <sup>ab</sup>
pasterizovaný	<sup>A</sup> 0,962 ± 0,003 <sup>b</sup>	<sup>B</sup> 0,954 ± 0,002 <sup>b</sup>

aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (N=3),  
různá malá písmena v horním indexu označují statisticky významný rozdíl v rámci sloupce,  
různá velká písmena označují statisticky rozdílné hodnoty v řádku (p < 0,05)

### 3.4.3 Měření barevnosti

#### 3.4.3.1 Barevný prostor $L^*a^*b^*$

Naměřené hodnoty pro barevný prostor  $L^*a^*b^*$  obsahuje Tabulka 17.

**Tabulka 17:** Měření barevnosti pro čerstvý, skladovaný a pasterizovaný sirup v barevném prostoru  $L^*a^*b^*$

	<i>lipový květ</i>	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E^*$
<i>čerstvý</i>	<i>sušený</i>	93,4 ± 0,5 <sup>b</sup>	-2,18 ± 0,08 <sup>ab</sup>	24,9 ± 0,8 <sup>a</sup>	standard
	<i>lyofilizovaný</i>	93,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	-2,16 ± 0,06 <sup>ab</sup>	18,8 ± 0,3 <sup>b</sup>	standard
<i>skladovaný</i>	<i>sušený</i>	93,9 ± 0,1 <sup>b</sup>	-2,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	24,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,92 ± 0,8 <sup>a</sup>
	<i>lyofilizovaný</i>	94,9 ± 0,7 <sup>a</sup>	-2,0 ± 0,1 <sup>bc</sup>	18,0 ± 1,0 <sup>b</sup>	1,37 ± 0,9 <sup>a</sup>
<i>pasterizovaný</i>	<i>sušený</i>	93,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	-2,0 ± 0,1 <sup>bc</sup>	24,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,67 ± 0,4 <sup>a</sup>
	<i>lyofilizovaný</i>	95,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	-1,9 ± 0,2 <sup>c</sup>	18,7 ± 0,9 <sup>b</sup>	1,37 ± 0,2 <sup>a</sup>

aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (N=3),  
různá písmena označují statisticky významný rozdíl v rámci sloupce (p < 0,05)

V případě parametru  $L^*$  bylo prokázáno, že vlivem skladování došlo u připravených sirupů k jejich zesvětlení, tedy k statisticky významnému zvýšení hodnoty parametru  $L^*$  (p < 0,01). Nicméně se jedná pouze o rozdíly v desetínách, tudíž nejsou příliš veliké. U parametru  $a^*$  byl rovněž zjištěn statisticky významný rozdíl u naměřených hodnot mezi sirupy pasterizovanými

<sup>23</sup> NAKNEAN, P., M. MEENUNE a G. ROUDAUT. Changes in properties of palm sugar syrup produced by an open pan and a vacuum evaporator during storage. *International Food Research Journal* [online]. 2013, **20**(5), 2323-2334. ISSN 19854668.

a čerstvými. Změna tohoto parametru je tedy přisuzována pasterizaci, nikoli skladování, protože u skladovaných sirupů ke statisticky významné změně nedošlo. U parametru  $b^*$  nebyly pozorovány žádné změny. Ovlivnění barevných parametru vlivem použitého typu lipového květu pak bylo zjištěno v případě parametru  $L^*$  a  $b^*$  ( $p < 0,001$ ). Konkrétně sirupy lyofilizované byly vyhodnoceny jako světlejší a žlutější. Hodnoty  $\Delta E^*$  pak byly vypočteny podle Rovnice 2, kdy hodnoty pro čerstvý vzorek byly použity jako standard. Z výsledků je viditelné, že barevné odchylky nejsou příliš velké.

### 3.4.3.2 Barevný prostor $L^*C^*h^\circ$

Naměřené hodnoty pro barevný prostor  $L^*C^*h^\circ$  obsahuje Tabulka 18.

**Tabulka 18:** Měření barevnosti pro čerstvý, skladovaný a pasterizovaný sirup v barevném prostoru  $L^*C^*h^\circ$

	<i>lipový květ</i>	$L^*$	$C^*$	$h^\circ$	$\Delta H^*$
<b>čerstvý</b>	<i>sušený</i>	$93,4 \pm 0,5^b$	$25,0 \pm 0,8^a$	$95,0 \pm 0,3^{cd}$	standard
	<i>lyofilizovaný</i>	$93,7 \pm 0,1^b$	$18,9 \pm 0,3^b$	$96,6 \pm 0,1^a$	standard
<b>skladovaný</b>	<i>sušený</i>	$93,9 \pm 0,1^b$	$24,3 \pm 0,3^a$	$95,3 \pm 0,3^c$	$0,12 \pm 0,07^a$
	<i>lyofilizovaný</i>	$94,9 \pm 0,7^a$	$18 \pm 1,0^b$	$96,3 \pm 0,5^{ab}$	$0,16 \pm 0,1^a$
<b>pasterizovaný</b>	<i>sušený</i>	$93,3 \pm 0,2^b$	$25,0 \pm 0,3^a$	$94,6 \pm 0,3^d$	$0,19 \pm 0,08^a$
	<i>lyofilizovaný</i>	$95,0 \pm 0,3^a$	$18,8 \pm 0,9^b$	$95,9 \pm 0,3^b$	$0,23 \pm 0,1^a$

aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka (N=3),

různá písmena označují statisticky významný rozdíl v rámci sloupce ( $p < 0,05$ )

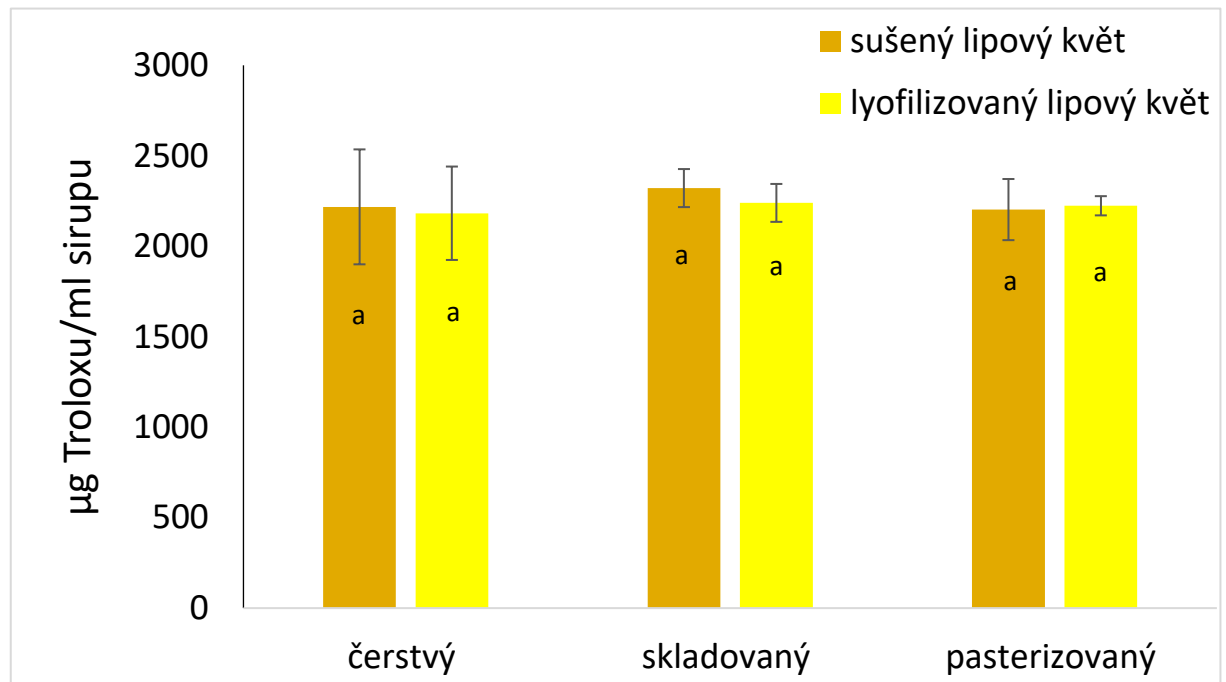
U parametru  $C^*$ , který popisuje odstín, nebylo zjištěno jeho ovlivnění pasterizací nebo skladováním. Statisticky významně vyšší hodnoty tohoto parametru byly zjištěny u sirupů ze sušeného lipového květu ( $p < 0,001$ ). U parametru  $h^\circ$  pak bylo zjištěno jeho ovlivnění pasterizací sirupu ( $p < 0,05$ ), přičemž konkrétně došlo k jeho snížení. Parametr  $\Delta H^*$  byl pak vypočten podle Rovnice 3, kdy hodnoty pro čerstvý vzorek byly určeny jako standard. Z výsledků je viditelné, že stínové odchylky  $\Delta H^*$  nejsou příliš velké.

### 3.4.4 Spektrofotometrické analýzy

#### 3.4.4.1 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

V případě stanovení antioxidační aktivity s využitím radikálu DPPH, jehož výsledky prezentuje Graf 8, nebylo prokázáno, že by docházelo u sirupů vlivem pasterizace nebo skladování ke změnám jejich antioxidační aktivity. Rozdílné hodnoty antioxidační aktivity nebyly stanoveny ani v rámci sirupů připravených z jinak zpracovaného lipového květu.

**Graf 8:** Stanovení antioxidační aktivity pro čerstvý, skladovaný a pasterizovaný sirup metodou DPPH

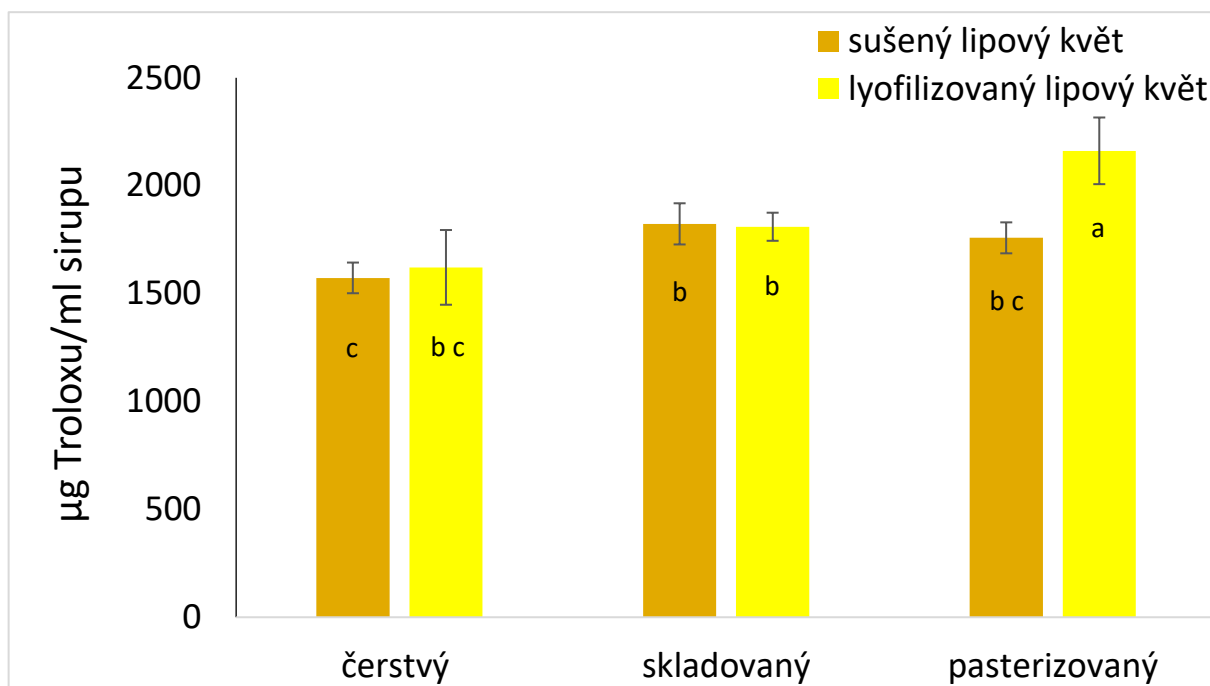


aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (N=3),  
různá písmena označují statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ )

### 3.4.4.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP

Výsledky stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP jsou vyobrazeny v Grafu 9. Bylo prokázáno, že výsledné hodnoty jsou ovlivněny skladováním i pasterizací sirupů, protože v jejich případě byly naměřeny hodnoty vyšší než u sirupů čerstvých. Na Grafu 9 je ale viditelné, že výsledky si jsou blízké a statisticky významně se odlišuje pouze pasterizovaný sirup z lyofilizovaného lipového květu.

**Graf 9:** Stanovení antioxidační aktivity pro čerstvý, skladovaný a pasterizovaný sirup metodou FRAP

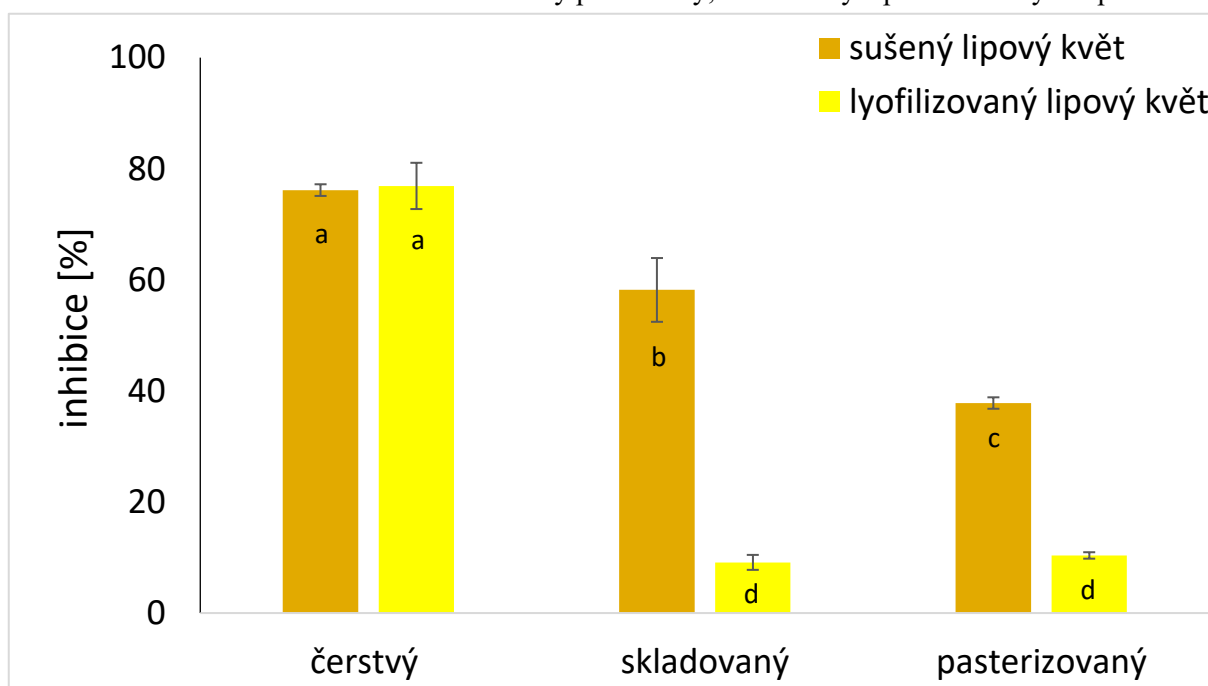


aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (N=3),  
různá písmena označují statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ )

### 3.4.4.3 Stanovení chelatační aktivity

V případě porovnání výsledků chelatační aktivity čerstvého, skladovaného a pasterizovaného lipového sirupu (Graf 10) bylo analýzou rozptylu zjištěno, že na chelatační aktivitu má vliv, jak skladování, tak pasterizace sirupů. Nejvyšších hodnot tedy dosahovaly čerstvé sirupy a u zbylých sirupů byl zaznamenán pokles. Zajímavé pak je, že došlo k razantnímu poklesu chelatační aktivity v případě pasterizovaného i skladovaného sirupu z lyofilizovaného lipového květu, a to až o 88 %. Mladěnka a kol (2016)<sup>24</sup> se zmiňují o závislosti ferrozinu na pH, přičemž bylo sledováno snížení chelatační aktivity v kyselém pH (4,5). Vzhledem k tomu, že analyzované sirupy v rámci této práce se liší v pH pouze v rámci desetiny, není pravděpodobné, že by byl pokles chelatační aktivity v rámci sirupů s lyofilizovaným lipovým květem způsoben rozdílnými hodnotami pH. Je tedy možné, že v případě lyofilizovaných sirupů došlo během skladování k významnému poklesu látek s chelatační aktivitou.

**Graf 10:** Stanovení chelatační aktivity pro čerstvý, skladovaný a pasterizovaný sirup



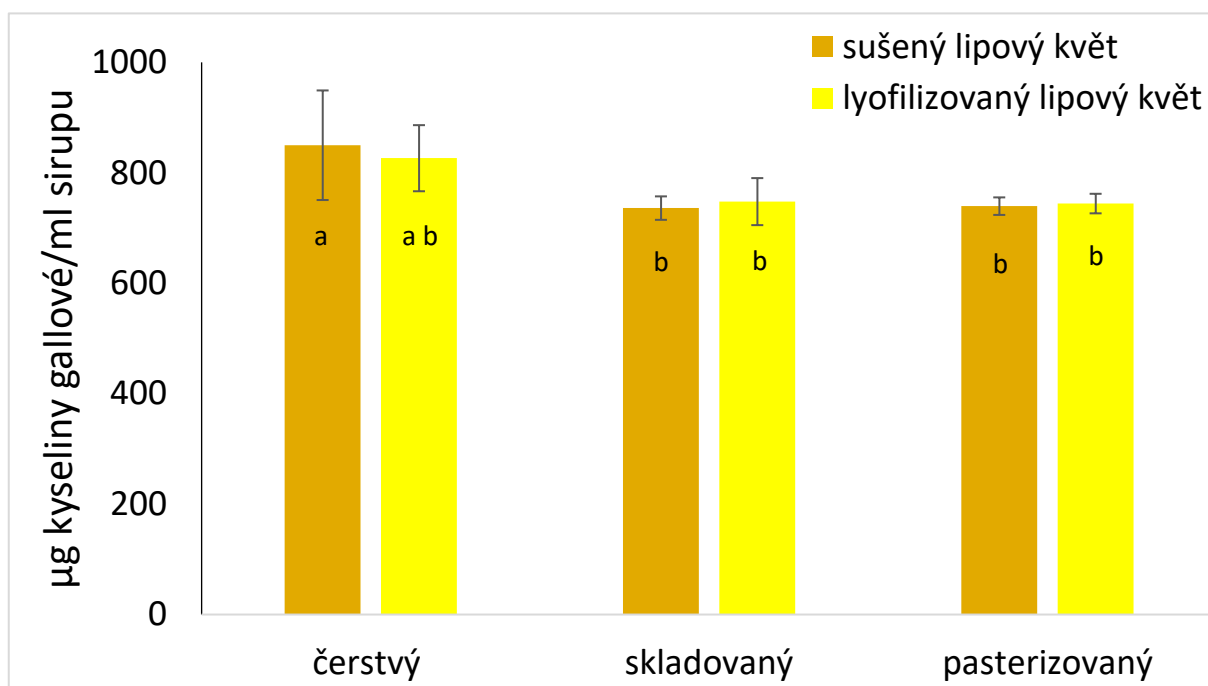
aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (N=3),  
různá písmena označují statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ )

<sup>24</sup> MLADĚNKA, P., M. ŘÍHA, J. MARTIN, B. GOROVÁ, A. MATĚJČEK a J. SPILKOVÁ. Fruit extracts of 10 varieties of elderberry (*Sambucus nigra* L.) interact differently with iron and copper. *Phytochemistry Letters* [online]. 2016, **18**, 232-238. ISSN 18743900. DOI:10.1016/j.phytol.2016.10.025.

#### 3.4.4.4 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Výsledky stanovení celkového obsahu fenolických látek prezentuje Graf 11. Na Grafu 11 je viditelné, že v případě skladovaného a pasterizovaného sirupu došlo k mírnému poklesu fenolických látek. Sirupy, které byly vystaveny pasterizaci dosahují ale stejných výsledků, jako sirupy skladované. Díky tomu je možné říci, že pasterizace nezpůsobila snížení celkového obsahu fenolických látek a snížení je způsobeno pouze skladováním. Analýza rozptylu pak potvrdila, že skladování skutečně ovlivňuje celkový obsah fenolických látek a způsobuje jeho snížení ( $p < 0,05$ ).

**Graf 11:** Stanovení celkového obsahu fenolických látek pro čerstvý, skladovaný a pasterizovaný sirup

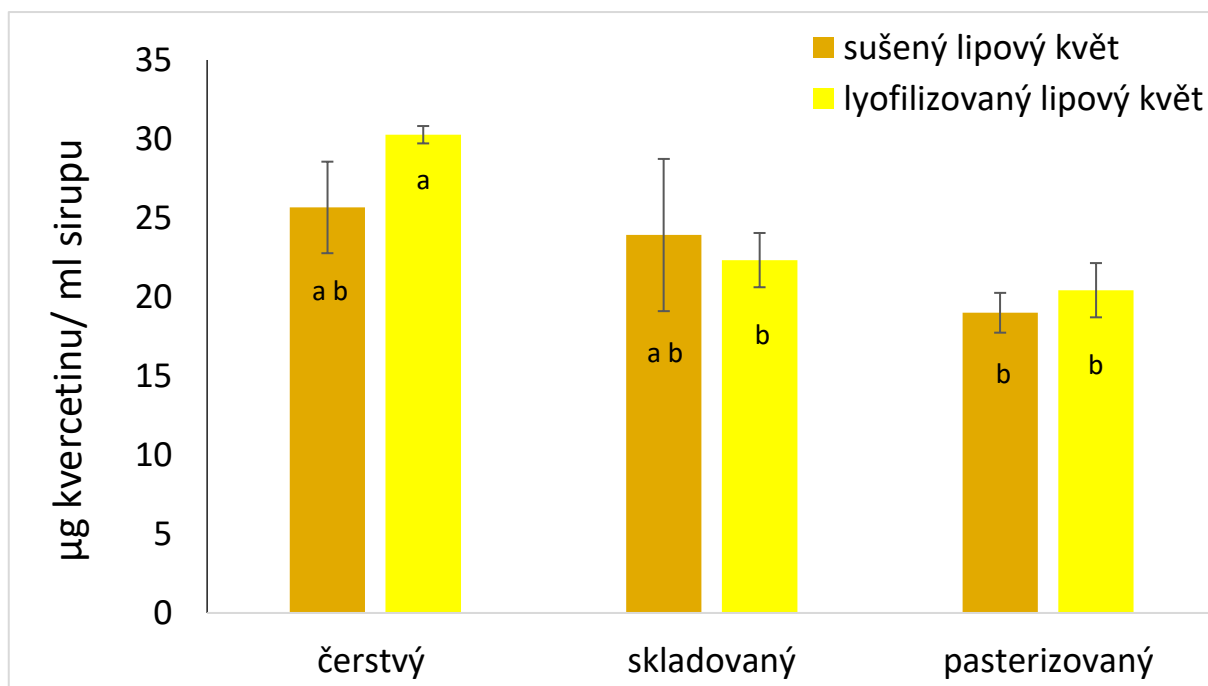


aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (N=3),  
různá písmena označují statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ )

### 3.4.4.5 Stanovení obsahu flavonoidů 1

Stanovení obsahu flavonoidů 1 (Graf 12) prokázalo ovlivnění obsahu flavonoidů vlivem pasterizace ( $p < 0,05$ ). V případě skladovaných sirupů je z grafu také viditelný pokles, nicméně nebyl shledán statisticky významným.

**Graf 12:** Stanovení obsahu flavonoidů (metoda 1) pro čerstvý, skladovaný a pasterizovaný sirup



aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (N=3),  
různá písmena označují statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ )

### 3.4.4.6 Srovnání výsledků v rámci spektrofotometrické analýzy

Vliv pasterizace a skladování se projevil v rámci některých metod. U stanovení antioxidační aktivity metodu FRAP bylo pozorováno zvýšení antioxidační aktivity u skladovaného i pasterizovaného sirupu. Ke kolísání antioxidační aktivity došlo i v případě skladování slupek z plodů baobabů, kterým se zabývali Tembo a kol (2017)<sup>25</sup>. To bylo přisuzováno polymerizačním reakcím během skladování za vzniku látek s větší reakční plochou, což se pak při stavení antioxidační aktivity projeví právě jejím zvýšením. Toto platí například pro epikatechin a prokyanidiny B<sub>2</sub>.

Dále bylo zjištěno, že během skladování dochází k poklesu celkového obsahu fenolických látek a chelatační aktivity. V případě pasterizace byl sledován pokles obsahu některých flavonoidů a dramatický pokles naměřených hodnot v rámci chelatační aktivity. Pokles antioxidantů během

<sup>25</sup> TEMBO, D. T., M. J. HOLMES a L. J. MARSHALL. Effect of thermal treatment and storage on bioactive compounds, organic acids and antioxidant activity of baobab fruit (*Adansonia digitata*) pulp from Malawi. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2017, **58**, 40-51. ISSN 08891575. DOI:10.1016/j.jfca.2017.01.002.



skladování byl zjištěn i jinými autory. Například Szymanowska a kol (2017)<sup>26</sup>, kteří se zabývali změnami obsahu antioxidantů jahodových džusů během skladování, prokázaly u všech svých vzorků výrazný pokles. Igual a kol (2011)<sup>27</sup> sledovali vliv pasterizace a skladování na obsah flavonoidů u grepové šťávy. Pasterizaci prováděli ve vodní lázni při 95 °C, po dobu 11 sekund (+ 80 sekund ohřátí). Během pasterizace byl zjištěn významný pokles v obsahu flavonoidů. Dále byl zjištěn výrazný pokles i v rámci skladování, a to především během prvních 12 dní.

---

<sup>26</sup> SZYMANOWSKA, U., B. BARANIAK a U. GAWLIK-DZIKI. Changes in the level and antioxidant activity of polyphenols during storage of enzymatically treated raspberry juices and syrups. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* [online]. 2017, **16**(3), 269-282. ISSN 1898-9594. DOI:10.17306/J.AFS.2017.0491.

<sup>27</sup> IGUAL, M., E. GARCÍA-MARTÍNEZ, M. M. CAMACHO a N. MARTÍNEZ-NAVARRETE. *Changes in flavonoid content of grapefruit juice caused by thermal treatment and storage* [online]. 2011, **12**(2), 153-162. ISSN 14668564. DOI:10.1016/j.ifset.2010.12.010.

## 4 ZÁVĚR

Úkolem této diplomové práce bylo připravit lipové sirupy podle různých postupů a následně porovnat jejich fyzikální a chemické vlastnosti.

Nejprve byl proveden sběr lipového květu, který byl rozdělen na dva podíly. Jeden podíl byl usušen při 35 °C a druhý podíl byl lyofilizován. U obou typů různě zpracovaného lipového květu byl stanoven obsah slizu a byla změřena barva, která byla následně porovnána. V případě lyofilizovaného lipového květu bylo zjištěno, že má světlejší a žlutější barvu. Obsah slizu byl pak u obou typů lipového květu shodný, pohyboval se od 4,7 do 6,3 mg/g sušiny.

Poté byly jak ze sušeného, tak lyofilizovaného lipového květu připraveny sirupy, a to podle celkem čtyřech různých postupů. U připravených sirupů bylo změřeno jejich pH a vodní aktivita. Dále byla změřena jejich barva, antioxidační aktivita, celkový obsah fenolických látek, některých flavonoidů a antokyanů. Všechny naměřené hodnoty byly mezi sebou následně porovnány. Nejvyšších, a tedy nejlepších výsledků, dosahoval v rámci obsahu antioxidantů lipový sirup připravený dle Postupu 1. V tomto případě se projevilo podpoření účinnosti extrakce fenolických látek z lipového květu vyšší teplotou extrakčního činidla. Při srovnání sirupů ze sušeného a lyofilizovaného lipového květu, dosahovaly o něco lepších výsledků sirupy z květu sušeného.

U sirupu připraveného podle Postupu 1 byly následně sledovány změny jeho vlastností během skladování a po pasterizaci. V tomto případě bylo zjištěno, že na obsah celkových fenolických látek a chelatační aktivitu má vliv doba skladování sirupů. Během skladování, které trvalo 14 dní u nich došlo ke statisticky významnému poklesu. U pasterizace pak bylo prokázáno rovněž ovlivnění chelatační aktivity a dále obsahu některých flavonoidů, kde došlo rovněž ke snížení měřených hodnot.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] KOSAKOWSKA, O., K. BĄCZEK, J. PRZYBYŁ, M. EJDYS, P. KUŹMA, M. OBIEDZIŃSKI a Z. WĘGLARZ. Intraspecific variability in the content of phenolic compounds, essential oil and mucilage of small-leaved lime (*Tilia cordata* Mill.) from Poland. *Industrial Crops and Products* [online]. 2015, **78**, 58-65. ISSN 09266690. DOI:10.1016/j.indcrop.2015.10.002.
- [2] TOKER, G., M. ASLAN, E. YEŞILADA, M. MEMİŞOĞLU a S. ITO. Comparative evaluation of the flavonoid content in officinal *Tiliae flos* and Turkish lime species for quality assessment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2001, **26**(1), 111-121. ISSN 07317085. DOI:10.1016/S0731-7085(01)00351-X.
- [3] HLOUŠKOVÁ, T. *Vliv sušení na antioxidační vlastnosti slupek z bobulí révy vinné*. Pardubice, 2019. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice.
- [4] YOUNG, D., R. TSAO a Y. MINE. Nutraceuticals and antioxidant function. *Functional foods, nutraceuticals, and degenerative disease prevention* [online]. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2011, s. 75-82. ISBN 9780470960844. DOI:10.1002/9780470960844.ch4.
- [5] SPILKOVÁ, J. Trísloviny. SPILKOVÁ, Jiřina. *Farmakognozie* [online]. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2016, s. 177-178. ISBN 978-80-246-3264-3.
- [6] ZIAJA, M., K. PAWŁOWSKA, K. JÓZEFczyk, A. PRUŚ, J. STEFAŃSKA a S. GRANICA. UHPLC-DAD-MS/MS analysis of extracts from linden flowers (*Tiliae flos*): Differences in the chemical composition between five *Tilia* species growing in Europe. *Industrial Crops and Products* [online]. 2020, **154**. ISSN 09266690. DOI:10.1016/j.indcrop.2020.112691.
- [7] KOWALSKI, R., T. BAJ, K. KALWA, G. KOWALSKA a M. SUJKA. Essential oil composition of *Tilia cordata* flowers. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* [online]. 2017, **20**(4), 1137-1142. ISSN 0972-060X. DOI:10.1080/0972060X.2017.1359681.
- [8] SPILKOVÁ, J. Glykosidy. *Farmakognozie* [online]. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2016, s. 110-111. ISBN 978-80-246-3264-3.
- [9] JIRÁSEK, V. a F. STARÝ. Produkty sekundárního metabolismu rostlin. *Atlas léčivých rostlin* [online]. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986, 28-32, 42.
- [10] YAKOVLEV, A. Polysaccharides of the inflorescences of *Tilia cordata*. *Chemistry of Natural Compounds* [online]. 1985, **21**(1), 114-115. ISSN 0009-3130. DOI:10.1007/BF00574267.

- [11] ZIENIEWSKA, I., A. ZALEWSKA, M. ŻENDZIAN-PIOTROWSKA, J. ŁADNY a M. MACIEJCZYK. Antioxidant and antiglycation properties of seventeen fruit teas obtained from one manufacturer. *Applied Sciences* [online]. 2020, **10**(15). ISSN 2076-3417. DOI:10.3390/app10155195.
- [12] MIHALAKIS, M. *Physiological and nutritional implications of herbal tea use*. Kalifornie, 1988. California State University, Northridge.
- [13] Lipový květ a lahodný sirup. *Zahrada a příroda* [online]. Dostupné z: <https://www.zahradaapriroda.cz/lipovy-kvet-a-lahodny-sirup/>.
- [14] Lípa. JAHODÁŘ, L. *Léčivé rostliny v současné medicíně: (co Mattioli ještě nevěděl)* [online]. Praha: Havlíček Brain Team, 2010, s. 89. ISBN 978-80-87109-22-9.
- [15] ĎURAČKOVÁ, Z. Oxidants, antioxidants and oxidative stress. GVOZDJÁKOVÁ, Anna, ed., A. GVOZDJÁKOVÁ. *Mitochondrial medicine: Mitochondrial metabolism, diseases, diagnosis and therapy* [online]. London: Springer, 2008, s. 20-38. ISBN 9781402067143. DOI:10.1007/978-1-4020-6714-3\_2.
- [16] RACEK, J. a V. HOLEČEK. Enzymy a volné radikály. *Chemické listy* [online]. 1999, **93**(12), 774-780.
- [17] PLÁTENÍK, J. Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2009, **11**(1), 30.
- [18] PAULOVÁ, H., H. BOCHOŘÁKOVÁ a E. TÁBORSKÁ. *Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro* [online]. 2004. ISSN 1213-7103.
- [19] HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants: Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* [online]. 2006, **141**(2), 312-322. ISSN 0032-0889. DOI:10.1104/pp.106.077073.
- [20] Jaké bylinky pomáhají lépe odkašlávat. *Celostnímedicina.cz* [online]. Dostupné z: <https://www.celostnímedicina.cz/jake-bylinky-pomahaji-lepe-odkaslavat.htm>.
- [21] Herbal drugs: their collection, preservation, and preparation; evaluation, quality control, and standardization of herbal drugs. ALAMGIR, A. *Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts: Volume 1* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017, 457-459, 464, 467, 478. Progress in Drug Research. ISBN 978-3-319-63861-4.
- [22] KORBELÁŘ, J., Z. ENDRIS a J. KREJČA. *Naše rostliny v lékařství*. 3., rozš. a přeprac. vyd. Praha: Avicenum, 1970, s. 226.
- [23] VOLKOVÁ, G. *Biologicky aktivní látky v bylinách pro kulinární využití*. Zlín, 2013. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.

- [24] MUJUMDAR, A., W. JIN a M. ZHANG, ed., W. SHI. Recent developments in high-quality drying of herbs and spices. HOSSAIN, M., N. BRUNTON a D. RAI. *Herbs, spices and medicinal plants: Processing, health benefits and safety* [online]. John Wiley & Sons, 2020, s. 45-46. ISBN 9781119036685.
- [25] STAŇKOVÁ-KRÖHNOVÁ, M. Lípa obecná. *Bylinky pro děti a maminky: praktické použití léčivých rostlin pro rodiny s dětmi od jara do zimy* [online]. Praha: Grada Publishing, 2009, s. 64-67. ISBN 978-80-247-2312-9.
- [26] Portréty léčivých rostlin. BÜHRING, U. *Léčivé rostliny: obsahové látky, zpracování, základní recepty* [online]. Praha: Knižní klub, 2010, s. 242-243. ISBN 978-80-242-2474-9.
- [27] KROKIDA, M., P. MICHAELIDIS, ed. Drying and dehydration processes in food preservation and processing. BHATTACHARYA, S. *Conventional and advanced food processing technologies* [online]. John Wiley & Sons, 2014, s. 7-9. ISBN 9781118406281.
- [28] Zákon č. 378/2007 Sb. *Zákony pro lidi* [online]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2007-378/zneni-20071231#p115-1>.
- [29] Rozlišení doplňků stravy od léčivých přípravků. *SÚKL* [online]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/leciva/rozliseni-doplunku-stravy-od-lecivych-pripravku>.
- [30] Zákon č. 110/1997 Sb. *Zákony pro lidi* [online]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-110>.
- [31] Vyhláška č. 330/1997 Sb. *Zákony pro lidi* [online]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-330>.
- [32] Vyhláška č. 58/2018 Sb. *Zákony pro lidi* [online]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-58>.
- [33] Zakázané rostliny či jiné látky. *SÚKL* [online]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/leciva/zakazane-rostliny-ci-jine-latky>.
- [34] PAVLOVIĆ, T., I. DIMKIĆ, S. ANDRIĆ, D. MILOJKOVIĆ-OPSENICA, S. STANKOVIĆ, P. JANAČKOVIĆ, M. GAVRILOVIĆ a P. RISTIVOJEVIĆ. Linden tea from Serbia – an insight into the phenolic profile, radical scavenging and antimicrobial activities. *Industrial Crops and Products* [online]. 2020, **154**. ISSN 09266690. DOI:10.1016/j.indcrop.2020.112639.
- [35] KARIOTI, A., L. CHIARABINI, A. ALACHKAR, M. FAWAZ CHEHNA, F. VINCIERI a A. BILIA. HPLC–DAD and HPLC–ESI-MS analyses of *Tiliae flos* and its preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2014, **100**, 205-214. ISSN 07317085. DOI:10.1016/j.jpba.2014.08.010.

- [36] NAEF, R., A. JAQUIER, A. VELLUZ a B. BACHOFEN. From the linden flower to linden honey - volatile constituents of linden nectar, the extract of bee-stomach and ripe honey. *Chemistry & Biodiversity* [online]. 2004, **1**(12), 1870. ISSN 1612-1872. DOI:10.1002/cbdv.200490143.
- [37] CITTAN, Mustafa, Esra ALTUNTAŞ a Ali ÇELİK. Evaluation of antioxidant capacities and phenolic profiles in *Tilia cordata* fruit extracts: A comparative study to determine the efficiency of traditional hot water infusion method. *Industrial Crops and Products* [online]. 2018, **122**, 553-558. ISSN 09266690. DOI:10.1016/j.indcrop.2018.06.044.
- [38] ATOUI, A., A. MANSOUR, G. BOSKOU a P. KEFALAS. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry* [online]. 2005, **89**(1), 27-36. ISSN 0308-8146. DOI:10.1016/j.foodchem.2004.01.075.
- [39] ALBAYRAK, S., A. AKSOY, O. SAGDIC a S. ALBAYRAK. Antioxidant and antimicrobial activities of different extracts of some medicinal herbs consumed as tea and spices in Turkey. *Journal of Food Biochemistry* [online]. 2011, **36**(5), 547-554. ISSN 1745-4514. DOI:10.1111/j.1745-4514.2011.00568.x.
- [40] BUŘIČOVÁ, L. a Z. RÉBLOVÁ. Czech medicinal plants as possible sources of antioxidants. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. 2008, **26**(2), 132-138. ISSN 12121800. DOI:10.17221/2468-CJFS.
- [41] Lipový květ je jednička v přírodní léčbě. *Vitalia* [online]. Dostupné také z: <https://www.vitalia.cz/clanky/lipovy-kvet-je-jednicka-v-prirodni-lecbe/>.
- [42] ČETKOVIĆ, G., J. ČANADANOVIĆ-BRUNET, J. VULIĆ, S. DJILAS a V. TUMBAS ŠAPONJAC. Antioxidant and sensorial properties of linden honey with dried apricots. *Chemistry & Biodiversity* [online]. 2014, **11**(11), 1861. ISSN 16121872. DOI:10.1002/cbdv.201400028.
- [43] BIESAGA, M. a K. PYRZYŃSKA. Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods. *Food Chemistry* [online]. 2013, **136**(1), 46-54. ISSN 03088146. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.07.095.
- [44] Lipový sirup. *VitalCountry* [online]. Dostupné z: <https://www.vitalcountry.cz/lipovy-sirup-500ml/>.
- [45] Sirup z lipového květu. *Eshop Bylinkářství* [online]. Dostupné z: <http://www.bylinky21.eu/obchod/bylinne-sirupy/sirup-z-lipoveho-kvetu>.
- [46] Sirup z lipového květu. *Bylinky pro všechny* [online]. Dostupné z: <https://www.bylinkyprovsechny.cz/zpracovani/receptury/1128-sirup-z-lipoveho-kvetu-lipy-recept-postup-navod-priprava-vyroba-suroviny>.
- [47] Lipový sirup. *Čarovná lékárna kolem nás* [online]. Dostupné z: <https://mudr-alena-hamplova.cz/lipovy-sirup/>.

- [48] Návod na výrobu domácích léčivých sirupů.... *Prima receptář* [online]. Dostupné z: <https://prima-receptar.cz/navod-na-vyrodu-domacich-lecivych-sirupu/>.
- [49] Domáci zelená lékárna. BÜHRING, U. *Léčivé rostliny: obsahové látky, zpracování, základní recepty* [online]. Praha: Knižní klub, 2010, s. 19-21. ISBN 978-80-242-2474-9.
- [50] Bylinné kapsle. *Herbal Store* [online]. Dostupné z: [https://www.herbal-store.cz/kategorie\\_k172/bylinne-kapsle\\_k159/#](https://www.herbal-store.cz/kategorie_k172/bylinne-kapsle_k159/#).
- [51] Dámská toaletní voda LÍPA. *Manufaktura* [online]. Dostupné z: <https://manufaktura.cz/produkt/462022/damska-toaletni-voda-lipa/>.
- [52] Přírodní balzám na rty. *Soaphoria* [online]. Dostupné z: <https://www.soaphoria.cz/p/265/lipa-5g-prirodni-balzam-na-rty>.
- [53] MANUFAKTURA | KOLEKCE LÍPA. *Dazzlicious* [online]. Dostupné z: <https://www.dazzlicious.cz/2018/09/manufaktura-kolekce-lipa.html>.
- [54] VOTAVOVÁ, L. a M. VOLDŘICH. Aktivita vody. *Procesy a zařízení v potravinářství a biotechnologiích*. Ostrava: Key Publishing, 2013, s. 73-75. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-163-4.
- [55] MATHLOUTHI, M. Water content, water activity, water structure and the stability of foodstuffs. *Food Control* [online]. 2001, **12**(7), 409-417. ISSN 09567135. DOI:10.1016/S0956-7135(01)00032-9.
- [56] BOTEK, M. *Měření barevných souřadnic materiálu v průmyslové výrobě*. Zlín, 2014. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [57] MACDOUGALL, D. Colour measurement of foods by colour reflectance. JOSHI, P. a C. BRIMELOW. *Colour in Food - Improving Quality* [online]. Woodhead Publishing, 2002, s. 80-97. ISBN 978-1-85-573667-2.
- [58] PANÁK, O. *Věda pro papírové artefakty: Měření barevnosti*. Univerzita Pardubice, 2015. ISBN 8073959178.
- [59] SCHANDA, J., ed. CIE Colorimetry. SCHANDA, J. *Colorimetry: understanding the CIE system* [online]. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007, s. 26. ISBN 978-0-470-04904-4.
- [60] Reflectance Measurements: Specular Included versus Specular Excluded. *HunterLab* [online]. Dostupné také z: <https://support.hunterlab.com/hc/en-us/articles/203993775-Reflectance-Measurements-Specular-Included-versus-Specular-Excluded-an04-01r2>.
- [61] RTRAN Versus TTRAN. *HunterLab* [online]. Dostupné také z: <https://support.hunterlab.com/hc/en-us/articles/203992215-RTRAN-Versus-TTRAN-an01-06r2>.

- [62] Spectrophotometer vs. Colorimeter: What's the Difference?. *HunterLab* [online]. Dostupné také z: <https://blog.hunterlab.com/blog/color-and-appearance-theory/spectrophotometer-vs-colorimeter-whats-the-difference/>.
- [63] MOKRZYCKI, W. a M. TATOL. Color difference Delta E - A survey. *Machine Graphics and Vision* [online]. 2011, **20**(4), 383-411.
- [64] BUCIĆ-KOJIĆ, A., M. PLANINIĆ, S. TOMAS, L. JAKOBEK a M. ŠERUGA. Influence of solvent and temperature on extraction of phenolic compounds from grape seed, antioxidant activity and colour of extract. *International Journal of Food Science and Technology* [online]. 2009, **44**(12), 2394-2401. ISSN 09505423. DOI:10.1111/j.1365-2621.2008.01876.x.
- [65] OLEARI, C. *Standard colorimetry: definitions, algorithms and software* [online]. Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd, 2016, s. 266. Society of Dyers and Colourists series. ISBN 9781118894446.
- [66] UV Spectrophotometry. HONORÉ HANSEN, S., S. PEDERSEN-BJERGAARD a K. RASMUSSEN. *Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis* [online]. John Wiley & Sons, 2012, s. 89-98. ISBN 978-1-119-95433-0.
- [67] HARRISON, R. Ultraviolet-Visible (UV-Vis) Spectroscopy. *Organic spectroscopic analysis* [online]. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2004, s. 7-9. ISBN 978-0-85404-476-4.
- [68] ZHONG, Y. a F. SHAHIDI. Methods for the assessment of antioxidant activity in foods. FERREIDON, S. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation: Total phenolic content* [online]. Waltham, MA, USA: Elsevier, 2015, s. 290-305. Woodhead Publishing in food science, technology, and nutrition, no. 276. ISBN 9781782420897. DOI:10.1016/B978-1-78242-089-7.00012-9.
- [69] KEDARE, S. a R. SINGH. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2011, **48**(4), 412-422. ISSN 0022-1155. DOI:10.1007/s13197-011-0251-1
- [70] WANG, T., R. JÓNSDÓTTIR a G. ÓLAFSDÓTTIR. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry* [online]. 2009, **116**(1), 240-248. ISSN 03088146. DOI:10.1016/j.foodchem.2009.02.041.
- [71] PEKAL, A. a K. PYRZYNSKA. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods*. 2014, **7**(9), 1776-1782. ISSN 1936-9751. DOI:10.1007/s12161-014-9814-x.
- [72] LEE, J., R. DURST a R. WROLSTAD. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative Study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 2005, **88**(5), 1269-1278. ISSN 1060-3271. DOI:10.1093/jaoac/88.5.1269.



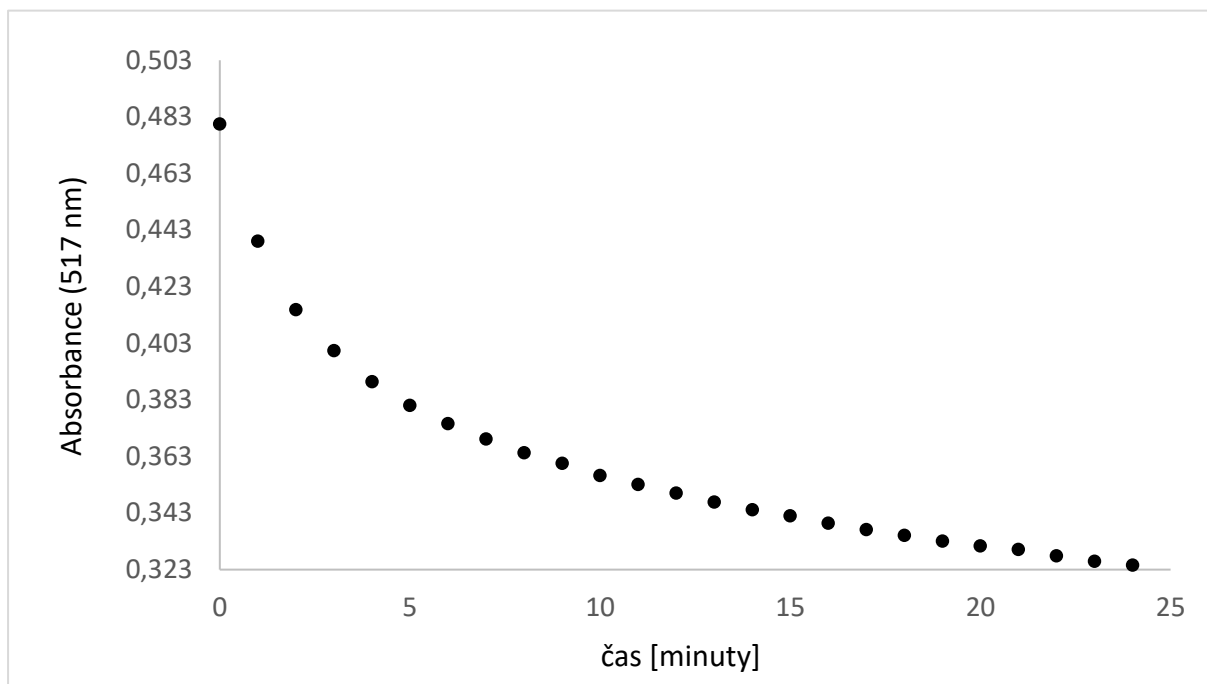
- [73] LIN, M., B. RASCO, A. CAVINATO a M. AL-HOLY. Infrared (IR) Spectroscopy—Near-Infrared Spectroscopy and Mid-Infrared Spectroscopy. *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control* [online]. Elsevier, 2009, s. 119-143. ISBN 9780123741363. DOI:10.1016/B978-0-12-374136-3.00006-7.
- [74] SUBRAMANIAN, A. a L. RODRIGUEZ-SAONA. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control*. Elsevier, 2009, s. 145-178. ISBN 9780123741363. DOI:10.1016/B978-0-12-374136-3.00007-9.
- [75] Strategický plán města Jilemnice. *Jilemnice* [online]. Dostupné z: <http://mestojilemnice.cz/>.
- [76] ČERVINKOVÁ, V. *Kvalitativní parametry vybraných sirupů v maloobchodní síti*. Brno, 2017. Bakalářská práce. Mendelova univerzita v Brně.
- [77] pH. *Bezpečnost potravin* [online]. Dostupné také z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76782.aspx>.
- [78] Kyselost - pH potravin. KADLEC, P. *Přehled tradičních potravinářských výrobních technologií potravin* [online]. Ostrava: Key Publishing, 2012, s. 40. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-145-0.
- [79] GHASEMI, K., Y. GHASEMI a M. EBRAHIMZADEH. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 22(3):277-81 [online]. 2009, **22**(3), 277-281.
- [80] Aktivita vody. *Bezpečnost potravin* [online]. Dostupné také z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76457.aspx>.
- [81] LALEH, G., H. FRYDOONFAR, R. HEIDARY, R. JAMEEI a S. ZARE. The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four berberis species. *Pakistan Journal of Nutrition* [online]. 2006, **5**(1), 90-92. ISSN 16805194. DOI:10.3923/pjn.2006.90.92.
- [82] ŽOLDOŠOVÁ, K. ACTA FACULTATIS PAEDAGOGICAE UNIVERSITATIS TYRNAVIENSIS. *Antioxidační vplyv rastlinných pigmentov v ľudskom organizme*. 2003, 31-35 s.
- [83] NACZK, M. a F. SHAHIDI. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, **1054**(1-2), 95-111. ISSN 00219673. DOI:10.1016/j.chroma.2004.08.059.
- [84] MOZNINE, R., G. SMITH, E. POLYGALOV, P. SUHERMAN a J. BROADHEAD. Dielectric properties of residual water in amorphous lyophilized mixtures of sugar and drug. *Journal of Physics D: Applied Physics* [online]. 2003, **36**(4), 330-335. ISSN 0022-3727. DOI:10.1088/0022-3727/36/4/302.

[85] VOELKER, A., C. FELTEN, L. TAYLOR a L. MAUER. Effects of polyphenols on crystallization of amorphous sucrose lyophiles. *Food Chemistry* [online]. 2021, **338**. ISSN 03088146. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.128061.

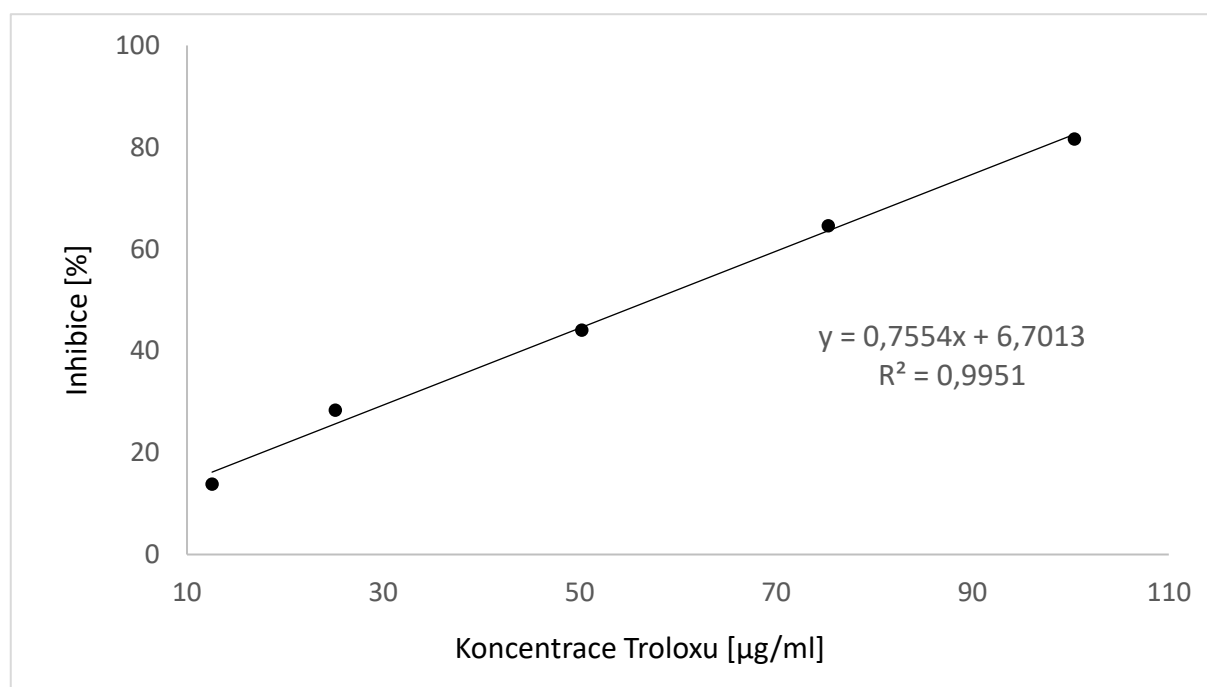
## SEZNAM PŘÍLOH

<b>Příloha 1:</b> Optimalizace metody pro stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH .....	92
<b>Příloha 2:</b> Kalibrační křivka Troloxu pro stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH ...	92
<b>Příloha 3:</b> Optimalizace metody pro stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP .....	93
<b>Příloha 4:</b> Kalibrační křivka Troloxu pro stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP ...	93
<b>Příloha 5:</b> Optimalizace metody pro stanovení celkového obsahu fenolických látek .....	94
<b>Příloha 6:</b> Kalibrační křivka kyseliny gallové pro stanovení celkového obsahu fenolických látek .....	94
<b>Příloha 7:</b> Optimalizace metody pro stanovení obsahu flavonoidů (metoda 1) .....	95
<b>Příloha 8:</b> Kalibrační křivka kvercetinu pro stanovení obsahu flavonoidů (metoda 1) .....	95
<b>Příloha 9:</b> Kalibrační křivka katechinu pro stanovení obsahu flavonoidů (metoda 2) .....	96
<b>Příloha 10:</b> Průběh teploty během louhování .....	96

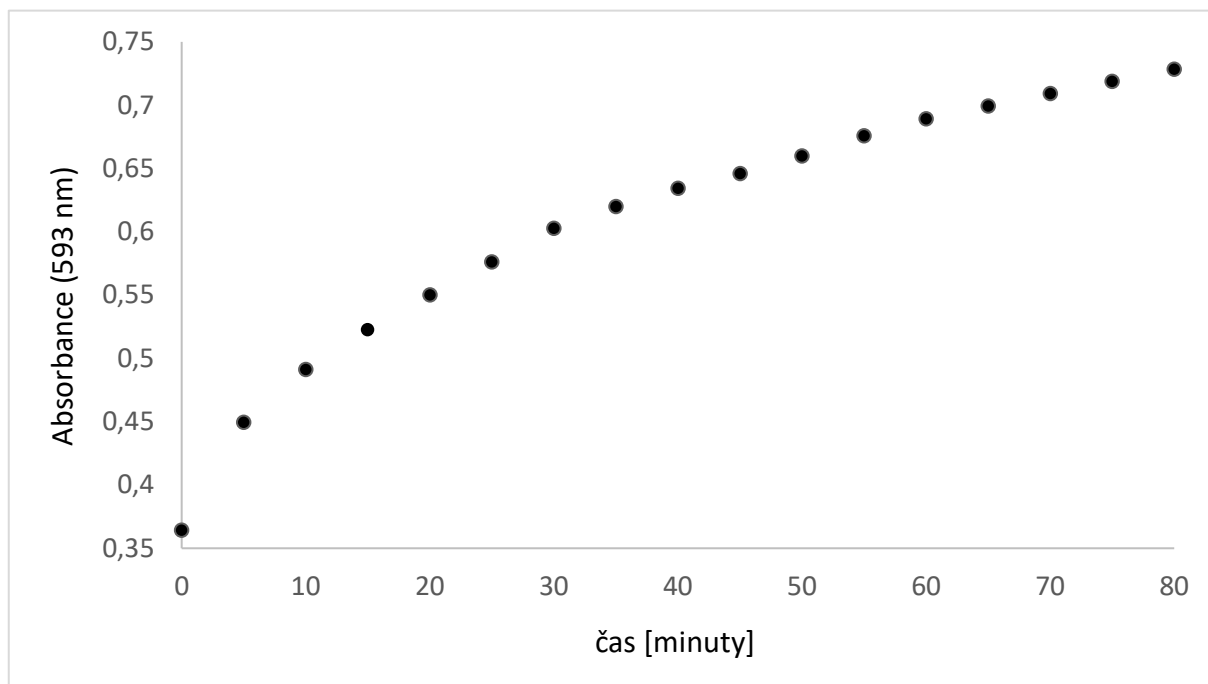
**Příloha 1:** Optimalizace metody pro stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH



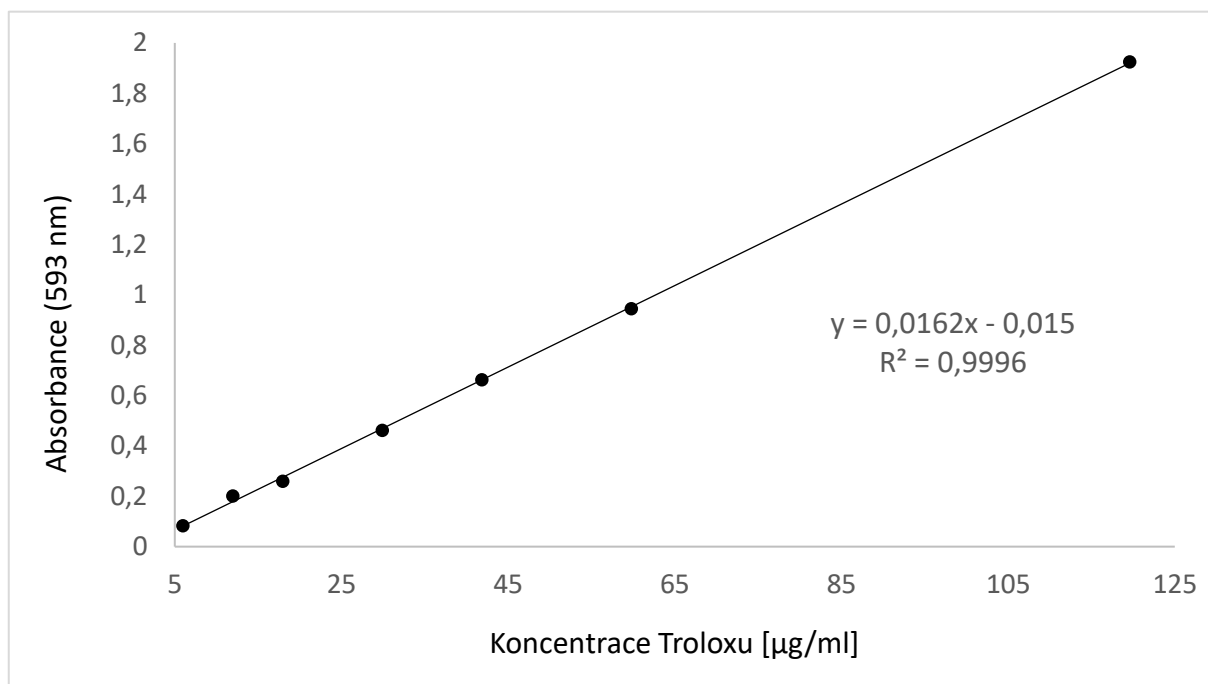
**Příloha 2:** Kalibrační křivka Troloxu pro stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH



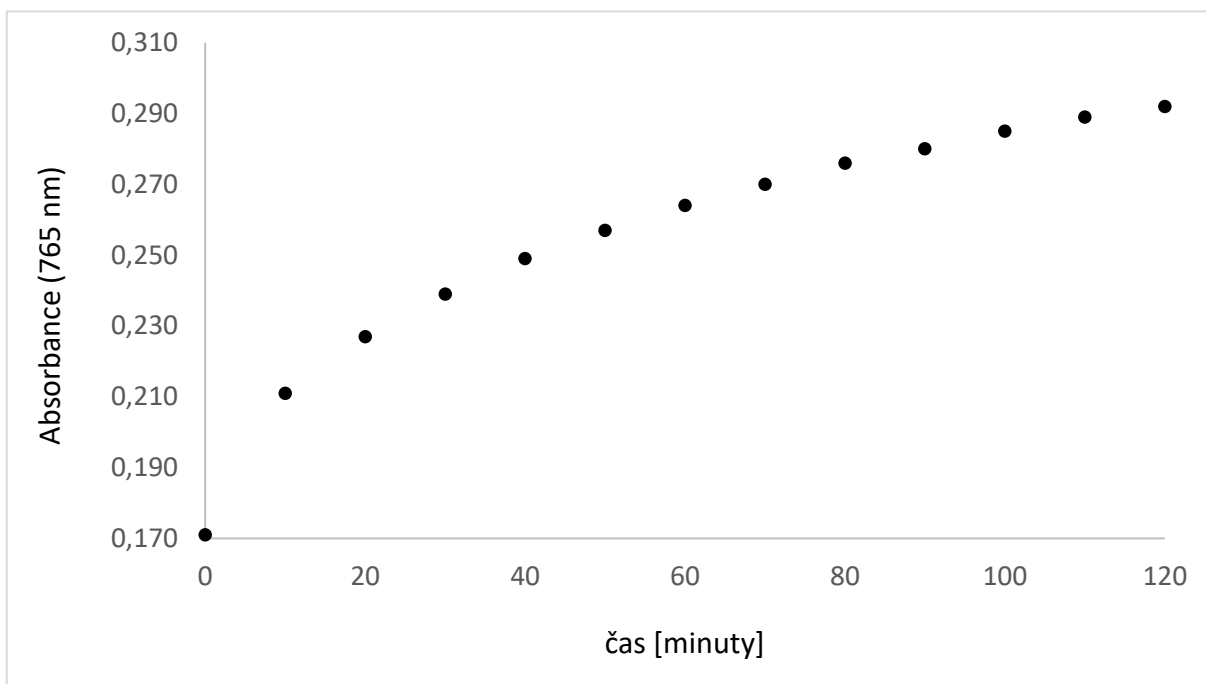
### Příloha 3: Optimalizace metody pro stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP



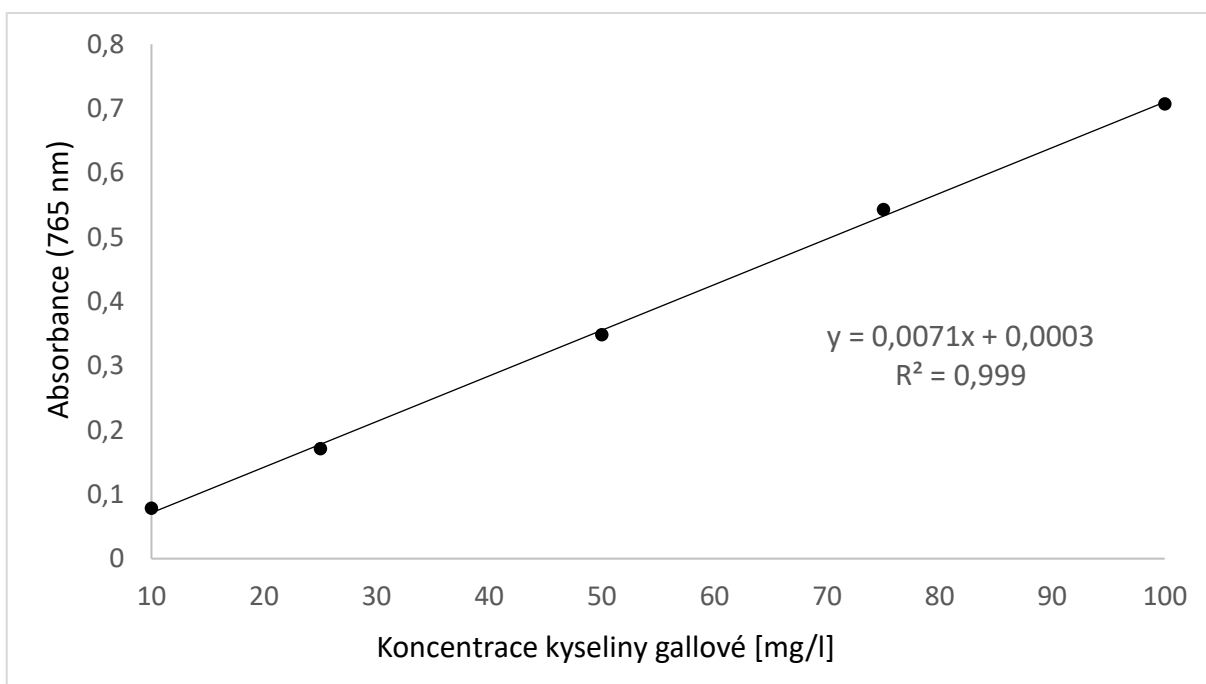
### Příloha 4: Kalibrační křivka Troloxu pro stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP



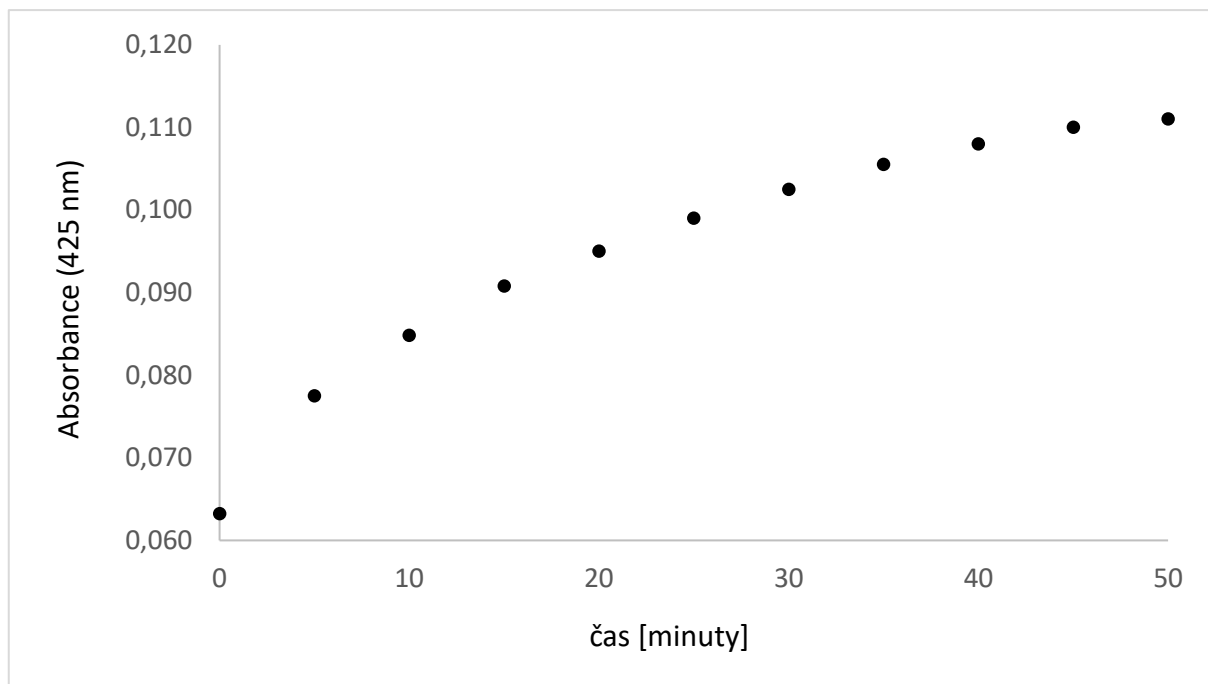
**Příloha 5:** Optimalizace metody pro stanovení celkového obsahu fenolických látek



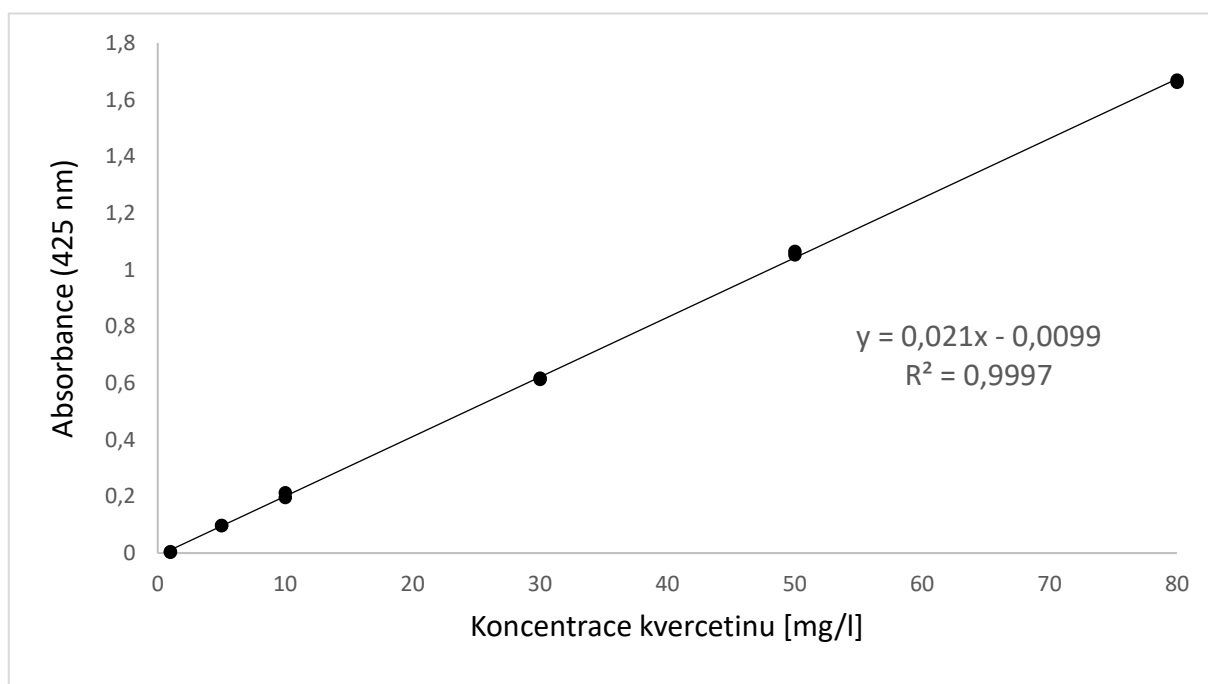
**Příloha 6:** Kalibrační křivka kyseliny gallové pro stanovení celkového obsahu fenolických látek



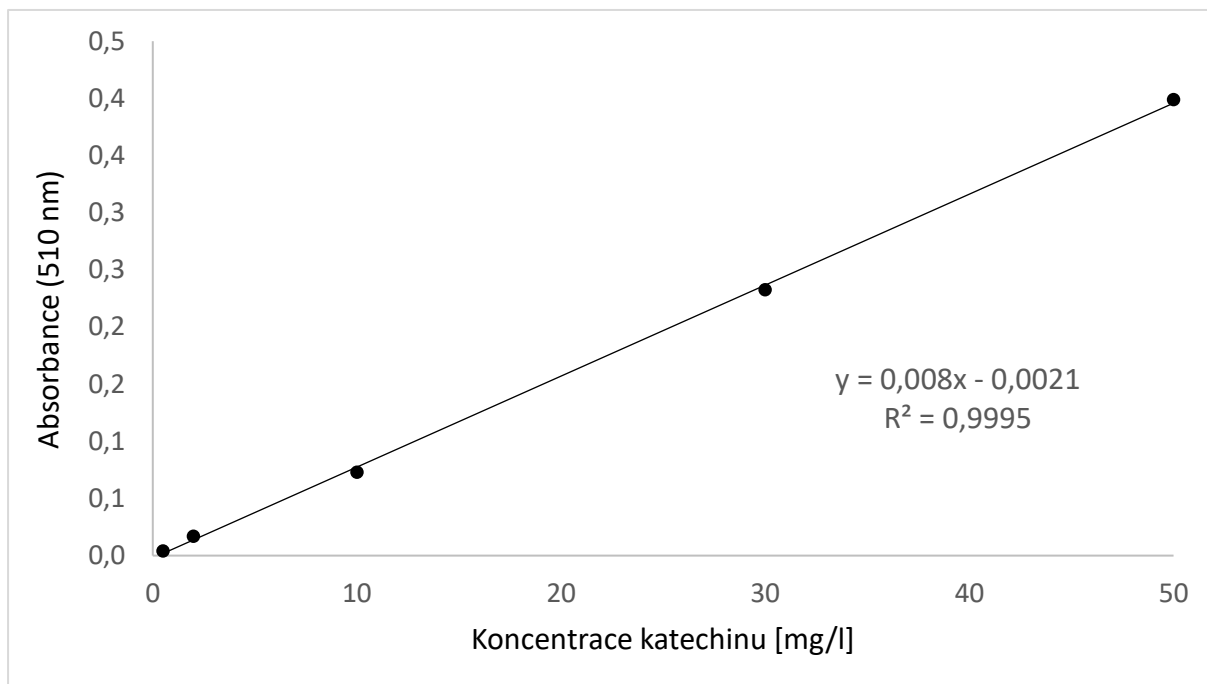
**Příloha 7:** Optimalizace metody pro stanovení obsahu flavonoidů (metoda 1)



**Příloha 8:** Kalibrační křivka kvercetinu pro stanovení obsahu flavonoidů (metoda 1)



**Příloha 9:** Kalibrační křivka katechinu pro stanovení obsahu flavonoidů (metoda 2)



**Příloha 10:** Průběh teploty během louhování

