

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2025

TEREZA VELICKÁ

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko – technologická

Analýza přírodních antioxidantů přítomných ve švestkách

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2024/2025

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Tereza Velická**  
Osobní číslo: **C22087**  
Studijní program: **B0531A130025 Chemie**  
Téma práce: **Analýza přírodních antioxidantů přítomných ve švestkách**  
Téma práce anglicky: **Analysis of natural antioxidants present in plums**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

## Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na analýzu biologicky aktivních látek s antioxidačními účinky obsažených ve švestkách a produktech z nich připravených. Věnujte se přípravě vzorku k analýze, především různým způsobům extrakce antioxidantů z přírodní matrice. Dále se věnujte analýze přírodních antioxidantů přítomných v extraktech s využitím spektrofotometrických metod pro stanovení antioxidační kapacity a také s využitím separačních technik či jejich spojení s hmotnostní spektrometrií.
2. Na základě poznatků z literatury vyberte pro experimentální část vhodné metody pro stanovení antioxidační kapacity extraktů připravených z různě upravených švestek.
3. Výsledky experimentálně zjištěné a prezentované v literatuře porovnejte a kriticky zhodnoťte.

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí bakalářské práce: **prof. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **7. února 2025**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2025**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.**  
děkan

L.S.

**doc. Ing. Petr Česla, Ph.D. v.r.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem Analýza přírodních antioxidantů přítomných ve švestkách 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 26. 06. 2025

Tereza Velická

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat paní prof. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, ochotu a za věnovaný čas při opravách bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své sestře a přítelovi za podporu během psaní této práce.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se věnuje analytickému stanovení antioxidantů obsažených ve švestkách. Teoretická část se zabývá popisem slivoně švestky, chemického složení plodu, popisem fytochemikálií a antioxidantů. Dále je pozornost věnována metodám úpravy vzorku před analýzou a teoretickým základům spektrofotometrických a chromatografických technik, které se pro stanovení antioxidantů využívají. Experimentální část je zaměřena na stanovení antioxidační aktivity extraktů připravených z mražených švestek, povidel a sušených švestek pomocí vybraných spektrofotometrických metod.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Švestka, antioxidanty, antioxidační kapacita, extrakce, spektrofotometrie

## **TITLE**

Analysis of natural antioxidants present in plums

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis is devoted to the determination of antioxidants contained in plums. The theoretical part includes a description of *Prunus domestica*, the chemical composition of the fruit, a description of the phytochemicals and antioxidants. It also is devoted to methods of sample preparation before analysis and theoretical basis of spectrophotometric and chromatographic techniques used for the determination of antioxidants. The experimental part is devoted to the determination of the antioxidant activity of extracts prepared from frozen plums, plum jam and prunes by spectrophotometric methods.

## **KEYWORDS**

Plum, antioxidants, antioxidant capacity, extraction, spectrophotometry

# OBSAH

ÚVOD .....	13
1 Teoretická část.....	14
1.1 Švestka .....	14
1.1.1 Charakteristika .....	14
1.1.2 Složení švestek.....	15
1.2 Fytochemikálie.....	17
1.2.1 Fenolické látky.....	17
1.2.2 Těkavé látky.....	20
1.3 Antioxidanty .....	20
1.4 Úprava vzorku.....	22
1.4.1 Extrakce kapalina – kapalina .....	22
1.4.2 Extrakce na tuhé fázi .....	22
1.4.3 Soxhletova extrakce.....	23
1.4.4 Extrakce za zvýšeného tlaku.....	23
1.4.5 Extrakce nadkritickou tekutinou.....	24
1.4.6 Mikrovlnná a ultrazvuková extrakce .....	24
1.5 Spektrofotometrické metody.....	25
1.5.1 Metoda ABTS .....	26
1.5.2 Metoda DPPH.....	26
1.5.3 Metoda FRAP .....	27
1.5.4 Metoda ORAC .....	28
1.5.5 Metoda Folin–Ciocalteu pro stanovení celkového obsahu fenolických látek .....	28
1.6 Separační metody.....	29
1.6.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	29
1.6.2 Plynová chromatografie.....	30
1.7 Analýza antioxidantů obsažených ve švestkách .....	31

1.7.1 Extrakce .....	31
1.7.2 Stanovení antioxidační kapacity a fenolických látek.....	33
1.7.3 Stanovení antioxidantů pomocí separačních technik.....	34
2 Experimentální část.....	36
2.1 Použité chemikálie .....	36
2.2 Použité zařízení .....	36
2.3 Vzorky .....	37
2.4 Pracovní postupy.....	37
2.4.1 Příprava vzorků.....	37
2.4.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS .....	38
2.4.3 Stanovení celkového množství fenolických látek.....	39
3 Výsledky a diskuze .....	40
3.1 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS .....	40
3.2 Stanovení celkového množství fenolických látek.....	42
ZÁVĚR.....	44
POUŽITÁ LITERATURA .....	45
PŘÍLOHY.....	54

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Tabulka 1: Obsah živin a minerálů v čerstvých švestkách, slívách a sušených švestkách.....	16
Tabulka 2: Struktury významných fenolických kyselin .....	19
Tabulka 3: Souhrn jednotlivých provedených extrakcí .....	38
Obrázek 1: Květy švestky obecné .....	15
Obrázek 2: Chemická klasifikace fenolických látek .....	17
Obrázek 3: Struktura vybraných antokyanidinů.....	18
Obrázek 4: Klasifikace antioxidantů .....	21
Obrázek 5: Schéma Soxhletova extraktoru .....	23
Obrázek 6: Schéma Superkritické fluidní extrakce .....	24
Obrázek 7: Struktura Troloxu.....	25
Obrázek 8: Struktura ABTS .....	26
Obrázek 9: Struktura DPPH radikálu .....	26
Obrázek 10: Reakce komplexu $Fe^{3+}$ -TPTZ s antioxidantem .....	27
Obrázek 11: Struktura fluoresceinu.....	28
Obrázek 12: Reakce Folin-Ciocalteuova činidla s fenolickou látkou .....	28
Obrázek 13: Struktura kyseliny gallové .....	29
Obrázek 14: Schéma jednoduché konfigurace HPLC .....	30
Obrázek 15: Schéma GC .....	31
Obrázek 16: Vzorok pro experimentální část (na levé straně sušené švestky, uprostřed kupovaná povidla, na pravé straně domácí povidla). .....	37
Obrázek 17: Závislost úbytku absorbance v procentech na objemu extraktu .....	40
Obrázek 18: Závislost úbytku absorbance v procentech na době reakce .....	40
Obrázek 19: Antioxidační aktivita extraktů získaných ze vzorků.....	41
Obrázek 20: Celkové množství fenolických látek extraktů získaných ze vzorků.....	43

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ABTS	2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
DAD	Detektor diodového pole
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl) hydrazyl
TPTZ	2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin
FRAP	Metoda stanovení antioxidační aktivity založená na redukci železitých komplexů
GAE	Ekvivalent kyseliny gallové
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
HS	Headspace extrakce
IMS	Iontová mobilní spektrometrie
LLE	Extrakce kapalina-kapalina
MAE	Mikrovlnná extrakce
MS	Hmotnostní spektrometrie
ORAC	Metoda stanovení antioxidační kapacity založená na zhášení peroxylových radikálů
PLE	Extrakce kapalinou podporovaná tlakem
SE	Soxhletova extrakce
SFE	Extrakce nadkritickou tekutinou
SPE	Extrakce na tuhé fázi
TAA	Celková antioxidační aktivita
TEAC	Antioxidační kapacita ekvivalentní standardní látky Troloxu
TOF	Analyzátor doby letu
TPC	Celkový obsah fenolických látek

UAE Extrakce podpořená ultrazvukem

VCEAC Antioxidační kapacita ekvivalentní standardní látky vitamínu C

## ÚVOD

Antioxidanty jsou biologicky aktivní látky, které pomáhají zhaset volné radikály a chránit buňky před oxidačním stresem. Volné radikály vznikají jako přirozený vedlejší produkt metabolických procesů, ale jejich nadměrná akumulace může vést k poškození buněk a přispět k rozvoji různých chronických onemocnění. Přírodní antioxidanty obsažené v ovoci a zelenině jsou považovány za efektivní a bezpečný způsob, jak podpořit obranyschopnost organismu.

Švestky patří mezi ovoce s vysokým obsahem přírodních antioxidantů, zejména fenolických látek, flavonoidů, vitamínu C a karotenoidů. Různé odrůdy švestek se mohou lišit ve svém složení a antioxidační aktivitě, což závisí na faktorech, jako je stupeň zralosti, podmínky pěstování a způsob skladování. Chemické složení produktů připravených ze švestek, jako jsou povidla nebo sušené švestky, se vlivem tepelné úpravy liší od čerstvých švestek.

Abychom mohli analyzovat antioxidanty přítomných ve švestkách musíme nejprve provést extrakci těchto látek z pevné matrice plodu. Antioxidační kapacita vzorku se analyzuje pomocí spektrofotometrických metod, například pomocí DPPH, ABTS nebo FRAP testů. Můžeme také změřit celkové množství fenolických látek pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Pro zjištění přesného složení se využívají chromatografické metody jako například vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) nebo pro těkavější látky plynová chromatografie (GC).

# 1 Teoretická část

## 1.1 Švestka

### 1.1.1 Charakteristika

Slivoň švestka (*Prunus domestica*), známá také jako švestka domácí, je hojně pěstovaný strom z čeledi růžovitých (*Rosaceae*) a rodu slivoň (*Prunus*). Předpokládá se, že vznikla křížením slivoně myrobalán (*Prunus cerasifera*) a slivoně trnky (*Prunus spinosa*) [1,2].

Její původ je nejčastěji spojován s oblastí jižní Evropy nebo západní Asie v blízkosti Kavkazu a Kaspického moře, přičemž v Evropě je známá již déle než 2000 let [1-3].

Švestky jsou nejrozmanitější z peckovin z hlediska klasifikace. Pouze dva druhy *Prunus domestica* a *Prunus salicina* dosahují celosvětového komerčního významu a jsou rozšířeny v Asii, Evropě a Americe [4]. Dnes se slivoně pěstují v téměř všech zemích mírného klimatického pásma, avšak jejich rozšíření limituje nedostatečná zimovzdornost některých odrůd [5].

Švestka je peckovité ovoce, které se po oplodnění květu (Obrázek 1) vyvíjí ze stěny jeho semeníku. Ovoce se rozděluje na tři části: slupku (epikarp), dužinu (mezokarp) a pecku (endokarp). Slupka se skládá z vrstvy podlouhlých živých buněk (epidermis), které jsou pokryty tenkým filmem kutinu (kutikula). Kutikula chrání podkladovou tkáň a umožňuje výměnu metabolitů nebo plynů s vnějším prostředím pomocí otvorů (lenticel). Voskový povlak na kutikule vytváří světle šedé ojínění, které dodává slupce matný vzhled a zajišťuje nepropustnost pro vodu. Dužina je složena z parenchymatických buněk s aktivním protoplastem, kde probíhají všechny metabolické reakce. Protoplast je obklopen buněčnou stěnou obsahující pektiny. Střední lamely, které se nacházejí mezi sousedními buněčnými stěnami, obsahují vysoký obsah vápníku a hrají důležitou roli při udržování soudržnosti mezi buňkami, čímž zajišťují pevnou strukturu plodu. Jediné semeno je obklopeno tvrdou peckou, která se skládá z izodiametrických buněk se ztloustlými lignifikovanými buněčnými stěnami (sklerenchym). Dužina je obvykle pevně přichycena k pecce, ačkoli některé odrůdy mohou mít volnou pecku, což znamená, že dužina není s peckou spojena. Evropské švestky jsou obvykle oválné, s modře až fialově zbarvenou slupkou a mají tlustou dužinu s volnou peckou. Konzistence dužniny je charakterizována jako pevná, avšak jemná a šťavnatá [3].



*Obrázek 1: Květy švestky obecné [2]*

### **1.1.2 Složení švestek**

Chemické složení plodů slivoní se výrazně liší v závislosti na druhu, odrůdě, stupni zralosti, půdních podmínkách, výživě rostlin, klimatu, počasí a dalších faktorech. Mezi hlavní organické kyseliny obsažené ve slivoních patří kyselina jablečná a kyselina citrónová. Dále bylo nalezeno malé množství kyseliny šťavelové, jantarové, chininové a stopy methylesteru kyseliny salicylové. Co se týče cukrů, převládají glukóza a sacharóza, které jsou zastoupeny v podobném množství. Zatímco fruktóza je obsažena v menším množství. Během dozrávání plodů se množství sacharózy zvyšuje, což je charakteristické pro některé odrůdy. Složení švestky a podobných plodů je uvedeno v Tabulce 1 [3,5].

Tabulka 1: Obsah živin, minerálů a kyselin v čerstvých švestkách, slívách a sušených švestkách [3,6]

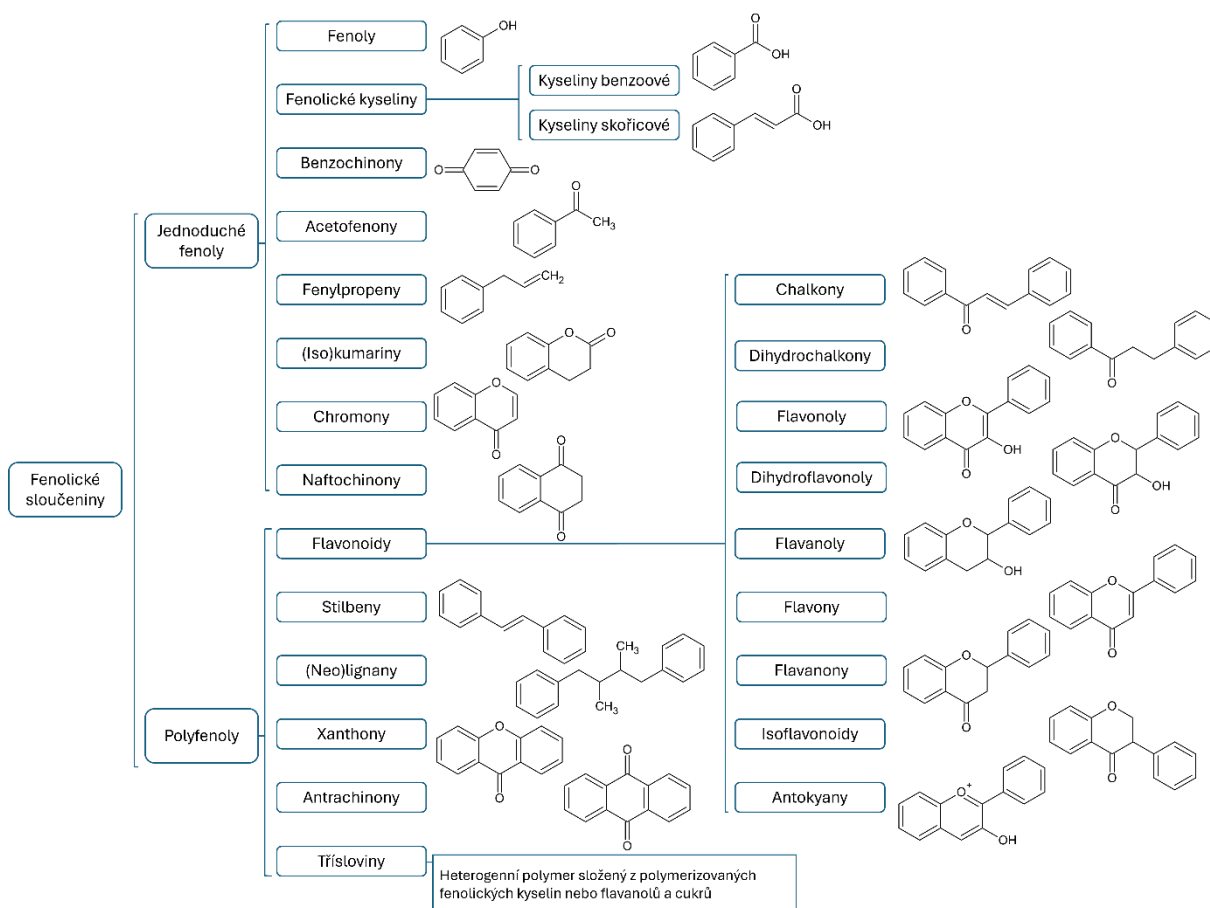
Výživové údaje	Obsah (na 100 g jedlé porce)		
	Švestka	Slíva	Sušená švestka
Vlhkost (%)	85,2	69,7	32,4
Energetická hodnota (kJ)	230	146	1000
Sacharidy (g)	11,0	8,6	55,5
Vláknina (g)	2,0	1,6	7,2
Bílkoviny (g)	0,8	0,5	2,6
Celkový tuk (g)	0,6	stopové množství	0,5
Kyselina nikotinová (mg)	0,5	0,3	2,0
Kyselina pantothenová (mg)	0,18	0,24	0,46
Riboflavin (mg)	0,10	0,03	0,16
Thiamin (mg)	0,04	0,09	0,08
Kyselina listová (μg)	2,0	3,0	4,0
Karoten (μg)	295	265	140
Vitamín B <sub>6</sub> (mg)	0,08	0,05	0,26
Vitamín C (mg)	10,0	5,0	3,0
Vitamín E (mg)	0,65	0,60	-
Sodík (mg)	-	2,0	4,0
Draslík (mg)	172	260	745
Vápník (mg)	4,0	22,0	51,0
Hořčík (mg)	7,0	10,0	45,0
Fosfor (mg)	10,0	14,0	79,0
Železo (mg)	0,1	0,4	2,5
Měď (mg)	0,04	0,07	0,43
Zinek (mg)	0,10	0,10	0,53
Kyselina jablečná (mg)	820–1990	-	-
Kyselina citrónová (mg)	23–55	-	-
Kyselina salicylová (mg)	0,14	-	-

## 1.2 Fytochemikálie

Švestky také obsahují fytochemické látky, které snižují riziko kardiovaskulárního onemocnění, rakoviny, cukrovky, osteoporózy, zrakových onemocnění, revmatoidní artritidy, Parkinsonovy choroby a Alzheimerovy choroby. V peckovinách se jedná hlavně o polyfenoly (flavonoidy, antokyany a fenolové kyseliny), karotenoidy, triterpeny a těkavé sloučeniny [4,7].

### 1.2.1 Fenolické látky

Fenolické látky jsou v rostlinách široce rozšířené a přispívají k jejich celkovému vzhledu, chuti a biologické aktivitě. Dělí se na jednoduché fenoly, které obsahují jedno fenolové jádro, a polyfenoly, které ve své struktuře obsahují dvě nebo více fenolových jader [7,8]. Na obrázku 2 je znázorněna klasifikace fenolických látek [8].



Obrázek 2: Chemická klasifikace fenolických látek [9]

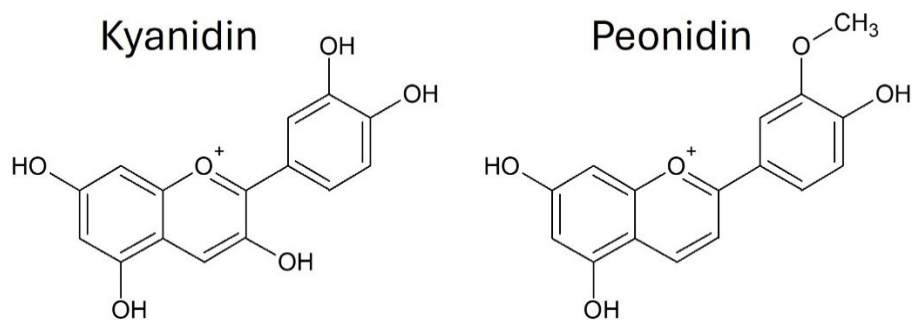
Zpracování rostlinného materiálu, obzvláště tepelné, má na tyto sloučeniny dvojitý dopad. Může vést k degradaci antokyanů a celkových fenolů, ale zároveň může celkovou antioxidační kapacitu produktu zvýšit. Tento jev lze vysvětlit Maillardovou reakcí. Jedná se

o reakci mezi cukry a aminokyselinami za zvýšené teploty. Při ní vznikají nové látky (melanoidiny) [4,7].

Peckovité ovoce obsahuje hlavně flavonoidy (nejvíce antokyany) a fenolické kyseliny. Hlavní flavonoidy ve švestkách, především kvercetin a jeho glykosidy (rutin a hyperosid), se vyskytují ve výrazně vyšší koncentraci ve slupce než v dužině [4].

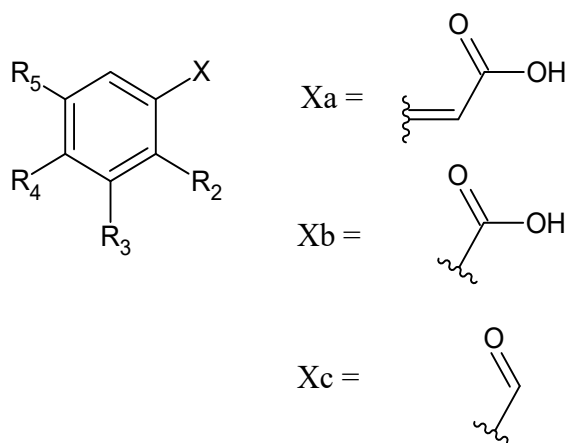
Flavonoidy se dělí na flavonoly, flavony, isoflavonoidy, flavonony, antokyany a flavanoly. Ovoce obvykle obsahuje řadu různých flavonolových glykosidů, které se hromadí ve slupce a v listech, jelikož jejich biosyntéza je stimulována světlem [4,7].

Antokyany ve švestkách jsou tvořeny především 3-glukosidy a 3-rutinosidy kyanidinu a peonidinu (Obrázek 3) [3,4]. Tyto pigmenty jsou zodpovědné za charakteristickou barvu plodů, přičemž platí, že vyšší obsah antokyanů propůjčuje švestkám intenzivnější fialovou až modročernou barvu [7,10].



Obrázek 3: Struktura vybraných antokyanidinů [9]

Fenolické kyseliny se dělí na deriváty kyseliny benzoové a skořicové (Tabulka 2). V ovoci dominují deriváty kyseliny hydroxyskořicové, mezi které patří například kyselina *p*-kumarová, kávová a ferulová. Jejich celkový obsah se v ovoci, jako jsou švestky, borůvky či jablka, pohybuje od 0,5 do 2 g na kilogram čerstvé hmotnosti [6,7].



Tabulka 2: Struktury významných fenolických kyselin [6]

Kyseliny	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	X
<b>Deriváty kyseliny skořicové</b>					
Kyselina skořicová	-H	-H	-H	-H	a
Kyselina <i>o</i> -kumarová	-OH	-H	-H	-H	a
Kyselina <i>p</i> -kumarová	-H	-H	-OH	-H	a
Kyselina <i>m</i> -kumarová	-H	-OH	-H	-H	a
Kyselina ferulová	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-H	a
Kyselina sinapová	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>	a
Kyselina kávová	-H	-OH	-OH	-H	a
<b>Deriváty kyseliny benzoové</b>					
Kyselina benzoová	-H	-H	-H	-H	b
Kyselina salicylová	-OH	-H	-H	-H	b
Kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová	-H	-H	-OH	-H	b
Kyselina vanilinová	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-H	b
Kyselina syringová	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>	b
Kyselina protocatechová	-H	-OH	-OH	-H	b
Kyselina gentisová	-OH	-H	-H	-OH	b
Kyselina gallová	-OH	-OH	-OH	-OH	b
Kyselina veratrová	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	b
<b>Aldehydy</b>					
Syringaldehyd	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>	c
Vanilin	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-H	c

Ačkoliv je ve většině druhů ovoce nejvíce zastoupená samotná kyselina chlorogenová (5-kafeoylchinová), plody švestek obsahují především její izomer, kyselinu neochlorogenovou (3-kafeoylchinová). Její obsah se ve švestkách pohybuje v rozmezí 88–771 mg/kg a spolu s kyselinou *p*-kumarovou (140–1150 mg/kg) tvoří dominantní fenolické kyseliny. Samotná kyselina chlorogenová se ve švestkách nachází v podstatně nižších koncentracích (15-142 mg/kg), podobně jako kyselina sinapová [6].

### 1.2.2 Těkavé látky

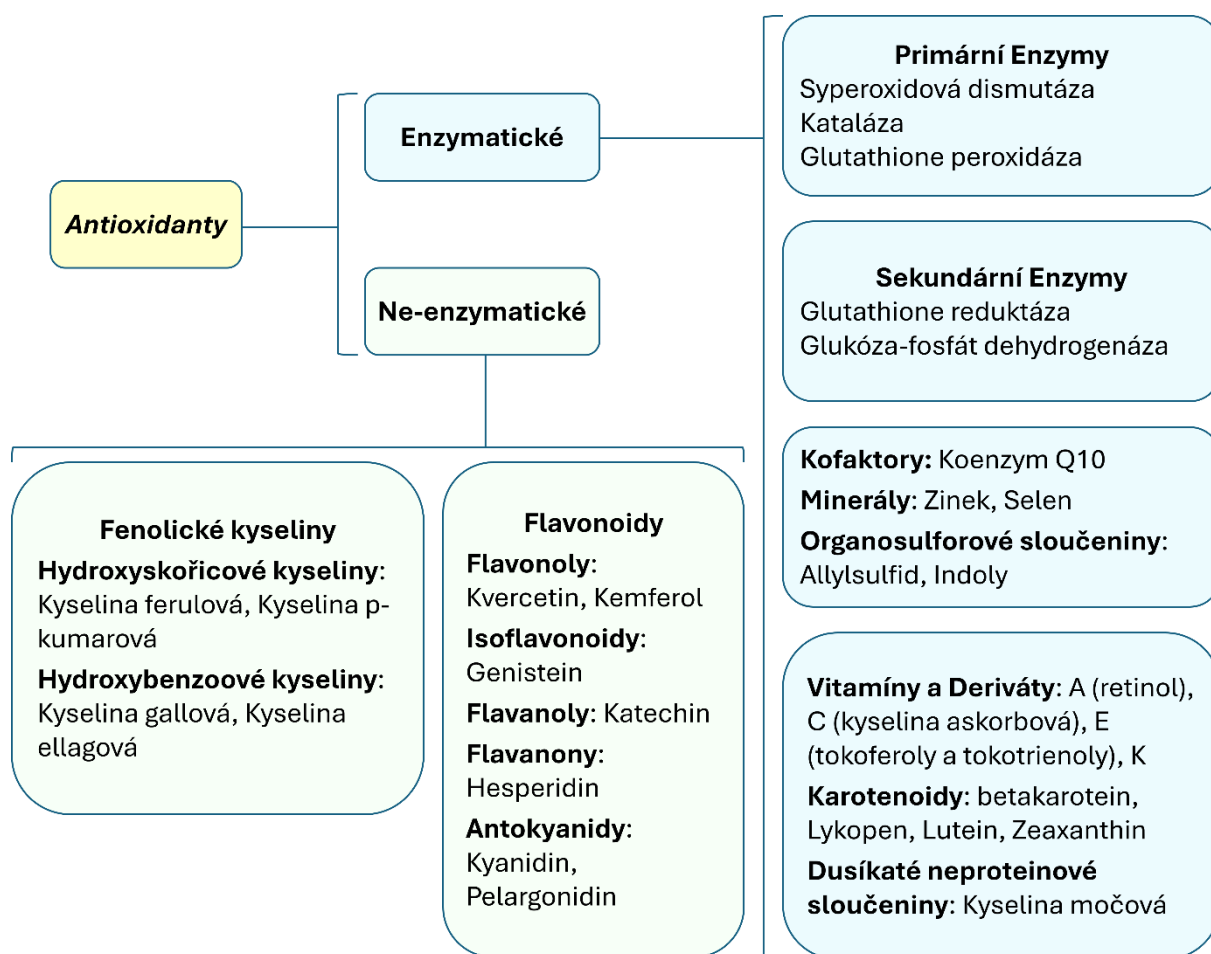
Aroma ovoce, které je tvořeno těkavými látkami, zásadně ovlivňuje zájem spotřebitelů. Těkavé látky se uvolňují v závislosti na vnitřních i vnějších faktorech, například během zrání, skladování nebo při mechanickém poškození. V procesu tvorby charakteristické chuti a vůně ovoce hraje klíčovou roli právě stupeň zralosti. Mezi nejdůležitější skupiny těkavých látek patří aldehydy, alkoholy, estery, laktony a monoterpeny [4].

## 1.3 Antioxidanty

Při metabolismu v lidském těle vznikají volné radikály, které hrají důležitou roli v různých fyziologických procesech. Rovnováhu mezi tvorbou a odstraňováním volných radikálů v organismu pomáhá udržovat antioxidační systém. Tuto rovnováhu však mohou narušit faktory, jako je kouření, konzumace alkoholu, vystavení radiaci či toxinům.

Pokud se radikály tvoří ve velkém množství nebo nejsou rychle odbourávány, mohou být škodlivé tak, že narušují buněčné membrány, poškozují DNA a přispívají k rozvoji degenerativních a chronických onemocnění.

Antioxidanty, které jsou přirozeně přítomné v potravě, pomáhají neutralizovat volné radikály a chránit buňky před oxidačním stresem, čímž podporují obranyschopnost organismu [11,12]. Antioxidanty působí různými mechanismy, například vážou ionty kovů, vychytávají reaktivní formy kyslíku, přeměňují hydroperoxydy na neradikálové látky, absorbují UV záření nebo deaktivují singletový kyslík [13,14]. Podle jejich mechanismu účinku je lze rozdělit na primární a sekundární. Další klasifikace antioxidantů je uvedena na obrázku 4 [13,14].



Obrázek 4: Klasifikace antioxidantů [13,14]

Ovoce a zelenina, které jsou bohaté na antokyany (např. jahody, maliny), mají nejvyšší antioxidační aktivitu [2,15]. Nižší aktivitu mají druhy s vysokým obsahem flavanonů (např. pomeranč, grapefruit) a flavanolů (cibule, špenát), zatímco nejnižší aktivitu vykazují ty, v nichž převažují hydroxyskořicové kyseliny (např. jablko, hruška) [2,15].

## 1.4 Úprava vzorku

Před finálním stanovením je klíčovým krokem příprava vzorku, jejímž úkolem je separovat požadované látky od ostatních složek matrice a připravit je tak pro vlastní analýzu. Volba vhodné extrakční metody přitom závisí na povaze dané matrice [8].

Extrakce z pevné fáze do kapaliny nebo extrakce kapalina – kapalina jsou levné a snadno proveditelné extrakční techniky, avšak jejich nevýhodou je časová náročnost a velká spotřeba rozpouštědel. Existují však techniky, které jsou méně náročné na čas a mají menší spotřebu rozpouštědel, mezi které patří extrakce podpořená ultrazvukem (UAE), mikrovlnná extrakce (MAE), extrakce za zvýšeného tlaku (PLE), či extrakce nadkritickou kapalinou (SFE) [9].

### 1.4.1 Extrakce kapalina – kapalina

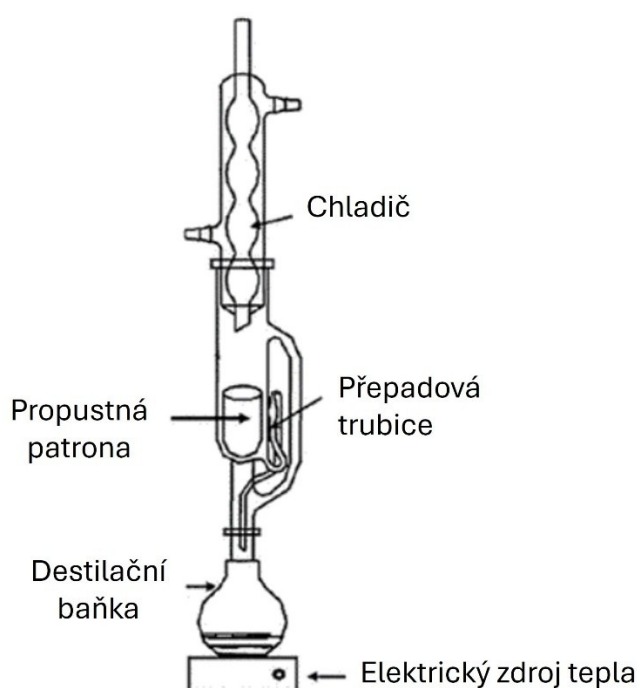
Extrakce kapalina-kapalina (LLE) je separační metoda založená na rozdělení analytu mezi dvě vzájemně nemísitelné kapalně fáze (obvykle vodný vzorek a organické rozpouštědlo). Mezi hlavní nevýhody LLE patří vysoká spotřeba rozpouštědel, riziko tvorby emulzí a často nedostatečné zakoncentrování analytu. Tato omezení lze překonat miniaturizací systému, například pomocí techniky in-vial LLE. Při tomto přístupu probíhá extrakce přímo v chromatografické lahvičce, což minimalizuje ztráty vzorku při manipulaci a zároveň umožňuje snadnou automatizaci celého analytického postupu [16].

### 1.4.2 Extrakce na tuhé fázi

Extrakce na tuhé fázi (SPE) je jednou z nejrozšířenějších technik přípravy vzorků, která slouží k izolaci a zakoncentrování analytů z kapalných matric. Princip metody spočívá v zachycení cílových sloučenin na pevném sorbentu, z něhož jsou následně selektivně uvolněny malým objemem rozpouštědla. Díky obrovskému výběru komerčně dostupných sorbentů je technika SPE mimořádně všestranná a umožňuje efektivní zpracování analytů s velmi rozdílnou polaritou a chemickou strukturou [17].

### 1.4.3 Soxhletova extrakce

Soxhletova extrakce (SE) je standardní technikou extrakce tuhá látka-kapalina, která má zásadní význam pro získání analytických vzorků z objemných matric. Při SE je tuhý vzorek v extrakční patroně opakovaně promýván kondenzujícím rozpouštědlem, které se cyklicky odpařuje z baňky a po naplnění extraktoru se přepadovou trubicí vrací zpět (Obrázek 5). Výhodou této metody je efektivní přenos hmoty díky kontaktu s čistým rozpouštědlem a absence nutnosti filtrace. Mezi nevýhody se naopak řadí dlouhá doba trvání, vysoká spotřeba rozpouštědla a riziko rozkladu tepelně nestabilních látek, které se shromažďují v horké destilační baňce [18,19].



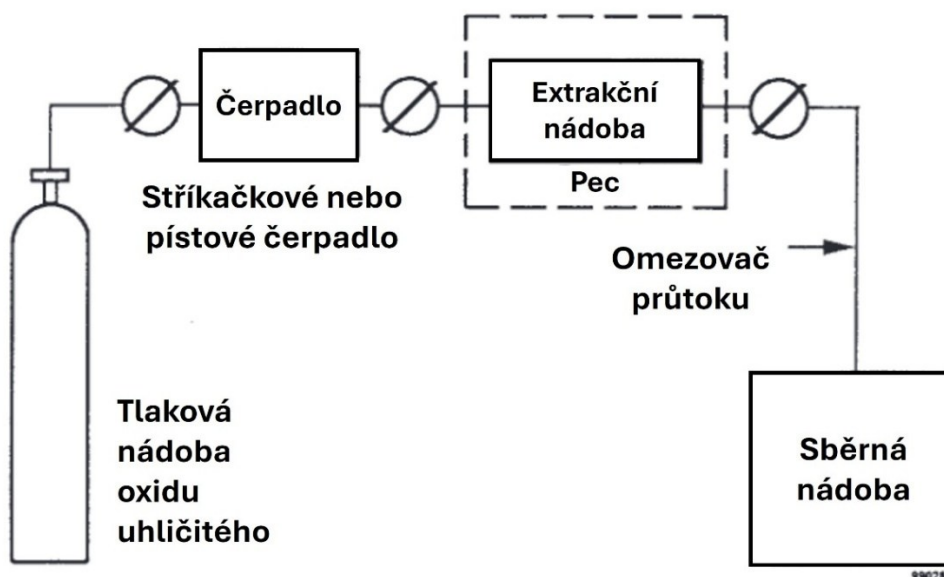
Obrázek 5: Schéma Soxhletova extraktoru [18]

### 1.4.4 Extrakce za zvýšeného tlaku

Při extrakci za zvýšeného tlaku se používá vzorek, který je obvykle rozptýlený v sušicím nebo inertním sorbentu. Tento vzorek je extrahován zvoleným rozpouštědlem při teplotách nad jeho atmosférickým bodem varu. Rozpouštědlo musí být během extrakce udržováno v kapalném stavu, proto se používají poměrně vysoké tlaky (cca 5 až 15 MPa). Tato metoda je relativně jednoduchá, rychlá a účinná. Její hlavní využití je v oblasti environmentální analýzy a při charakterizaci potravinářských vzorků [20,21].

### 1.4.5 Extrakce nadkritickou tekutinou

Při extrakci nadkritickou tekutinou (Obrázek 6) se využívá rozpouštědlo, které je převedeno do nadkritického stavu. V tomto stavu má rozpouštědlo vlastnosti mezi plynem a kapalinou, což umožňuje efektivní extrakci látek z různých matric. Viskozita a difuzní schopnosti rozpouštědla jsou podobné plynům, a proto může pronikat do pórů pevných látek mnohem snadněji než kapaliny. Na druhé straně je hustota rozpouštědla blízká kapalinám, což pozitivně ovlivňuje rozpustnost látek v daném rozpouštědle. Nejčastěji se jako nadkritická kapalina využívá oxid uhličitý, protože nadkritického stavu dosahuje při relativně nízkém tlaku a teplotě. Je netoxický, nehořlavý, nekorozivní, chemicky velmi inertní a cenově dostupný [21,22].



Obrázek 6: Schéma extrakce nadkritickou tekutinou [22]

### 1.4.6 Mikrovlnná a ultrazvuková extrakce

Účinnost extrakčního procesu lze zvýšit využitím externích zdrojů energie, kterými mohou být mikrovlny či ultrazvuk.

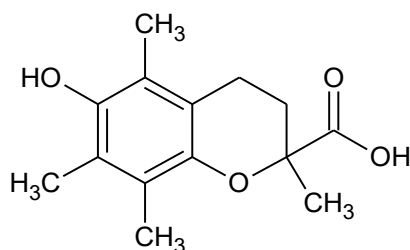
Princip mikrovlnami asistované extrakce spočívá v selektivním ohřevu polárních molekul (dipolárních materiálů) obsažených ve vzorku či v rozpouštědle. Tyto molekuly absorbují mikrovlnnou energii, což vede k rychlému efektivnímu ohřevu a následnému uvolnění analytů z matrice. Účinnost metody je však závislá na dielektrických vlastnostech systému. Pro nepolární rozpouštědla a suché vzorky je méně efektivní, pokud se nepřidá mikrovlnný absorbent. Hlavní výhodou MAE je její široká použitelnost pro rychlou extrakci analytů [23].

U extrakce podpořené u ultrazvukem dochází k aplikaci zvukových vln o frekvenci nad 20 kHz, které procházejí hmotou nebo kapalinou, vytvářejí podtlak a bubliny. Když bublina již nemůže účinně absorbovat energii z ultrazvuku, kolabuje. Celý tento proces se nazývá kavitace a vytváří mikroprostředí s vysokými teplotami a vysokými tlaky, které urychlují izolaci analytů z matric vzorků. Nejčastěji se UAE provádí v ultrazvukových lázních, sonoreaktorech či za pomoci ultrazvukové sondy [23].

## 1.5 Spektrofotometrické metody

K hodnocení, analýze a porovnávání účinnosti přírodních antioxidantů obsažených v potravinách se používá několik metod. Tyto metody se dělí podle reakčního mechanismu na dvě skupiny: přenos atomu vodíku (HAT) a přenos jednoho elektronu (SET). Metody založené na HAT měří schopnost antioxidantů darovat vodík pro zhášení volných radikálů (např. ORAC) a metody založené na SET měří schopnost antioxidantů přenášet elektron pro redukci sloučenin (např. ABTS, DPPH, FRAP a Folin-Ciocalteu metoda) [7,24].

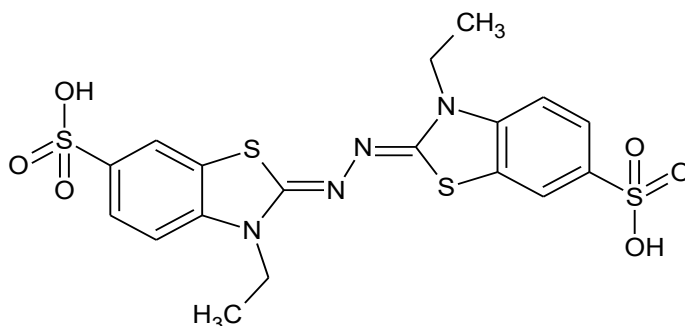
Pro srovnání antioxidačních vlastností studovaných vzorků se používá standard Trolox (Obrázek 7), což je ve vodě rozpustný syntetický analog vitamínu E [2]. Výsledky se poté uvádí jako ekvivalentní množství standardu Trolox (TEAC).



Obrázek 7: Struktura Troloxu

### 1.5.1 Metoda ABTS

U jedné ze spektrofotometrických metod se pro stanovení celkové antioxidační kapacity (TAC) používá sloučenina ABTS (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát), obrázek 8).

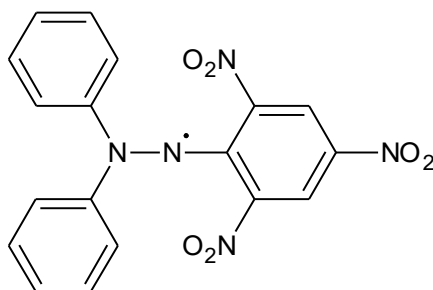


Obrázek 8: Struktura ABTS

Před samotným stanovením je nutné převést ABTS na stabilní radikál, který má modrozelenou barvu. Pro tvorbu ABTS radikálu se využívá peroxodisíran či jiné oxidační činidlo. Při reakci s antioxidantem dochází ke zhášení radikálu a měří se úbytek barvy původního radikálu zpravidla při 734 nm. Pro měření lze využít i vlnové délky v rozsahu 414-417 nm, avšak tyto nižší vlnové délky nejsou využívány tak často z důvodu možných interferencí [7,24,25]. Výsledky této metody se vztahují na standard Trolox a vyjadřují se jako TEAC.

### 1.5.2 Metoda DPPH

U této spektrofotometrické metody se využívá stabilní organický radikál DPPH (1,1-difenylnitroxyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl, obrázek 9), jehož modrofialový roztok se v přítomnosti antioxidantů odbarvuje [7,24].



Obrázek 9: Struktura DPPH radikálu

Tyto modrofialové roztoky silně absorbují světlo při vlnové délce 515 až 528 nm a po zhášení radikálů antioxidačními sloučeninami dochází k odbarvení roztoku, čímž se absorbance sníží.

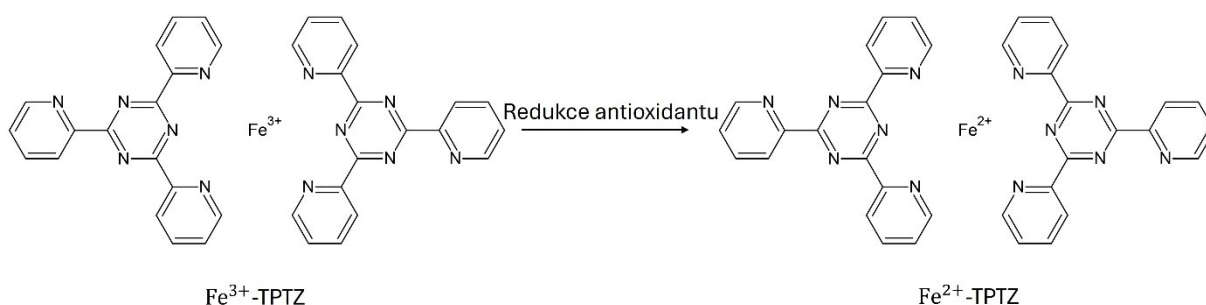
Neutralizace DPPH radikálu probíhá rychle podle SET mechanismu (přenosem elektronů), ale aktivitu vykazují i antioxidační sloučeniny, které působí převážně prostřednictvím HAT (přenosem vodíkového atomu) [7,24]. Výsledky se zpravidla uvádějí jako procento inhibice DPPH, které se vypočítá podle rovnice [24]:

$$\% \text{ DPPH inhibice} = \frac{(\text{Abs}_{\text{Blanku}} - \text{Abs}_{\text{Vzorku}})}{\text{Abs}_{\text{Blanku}}} \cdot 100$$

Dále se procento inhibice přepočítává na ekvivalent standardu Trolox odpovídající 1 g nebo 100 g vzorku [7].

### 1.5.3 Metoda FRAP

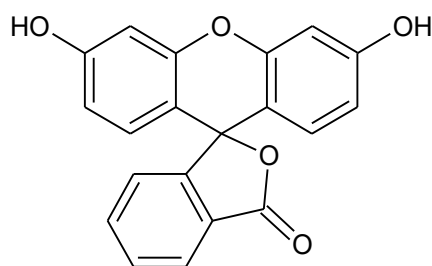
Tato metoda se výhradně využívá u sloučenin aktivních v rámci SET mechanismu. Tento test sleduje schopnost látek redukovat komplex železité soli s TPTZ (2,4,6-tri(2-piridyl)-1,3,5-triazin) na železnatý komplex v kyselém prostředí (pH 3,6), což se projeví tvorbou intenzivního modrého produktu absorbujícího světlo při vlnové délce 593 nm (Obrázek 10). Nárůst absorbance se monitoruje proti slepému vzorku činidla FRAP po uplynutí stanovené doby [7,24].



Obrázek 10: Reakce komplexu  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ s antioxidantem [24]

### 1.5.4 Metoda ORAC

Metoda ORAC využívá HAT mechanismu a pro generování radikálů využívá azosloučeniny. Při mírném zahřátí se rozpadá azosloučenina AAPH (2,2'-azobis-2-amidinopropan hydrochlorid) a dochází k uvolnění dusíku a dvou radikálů s uhlíkovým centrem. Tyto radikály se v kyslíkovém prostředí rychle přemění na peroxylové radikály, které napadají vhodné fluorescenční činidlo, například fluorescein, jehož struktura je uvedena na obrázku 11 [7,24].

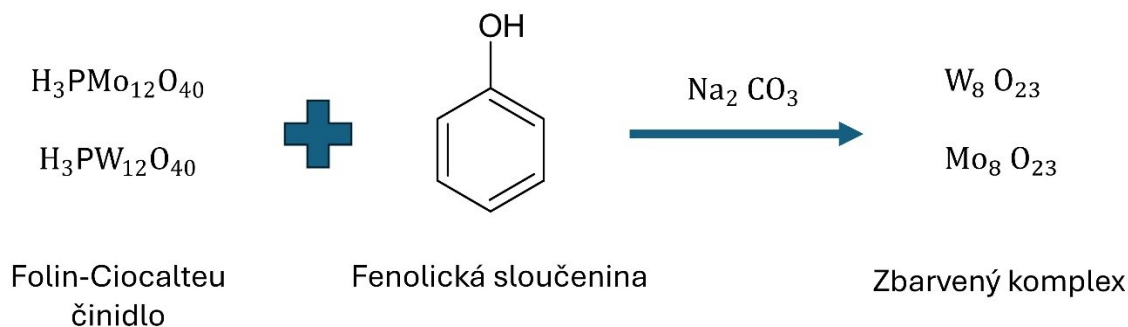


Obrázek 11: Struktura fluoresceinu

Antioxidanty chrání molekulu fluoresceinu před radikály, a tudíž za jejich přítomnosti dochází ke zpomalení poklesu fluorescence, který je monitorován. U této metody můžeme detekovat jak hydrofilní, tak lipofilní antioxidanty. Výsledky se opět uvádějí jako antioxidační kapacita ekvivalentní standardu Trolox [7,24].

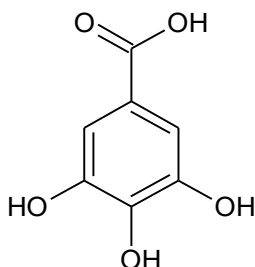
### 1.5.5 Metoda Folin–Ciocalteu pro stanovení celkového obsahu fenolických látek

Antioxidační aktivita úzce souvisí s obsahem fenolických látek, proto se často pro porovnání stanovuje i jejich celkový obsah. Pro stanovení celkového obsahu fenolických látek se zpravidla využívá spektrofotometrická metoda dle Folin–Ciocalteu. Tato metoda je založena na reakci fenolických látek s Folin–Ciocalteuovým činidlem (komplex fosfomolybdenanu a fosfowolframanu) za vzniku modře zbarveného komplexu (Obrázek 12).



Obrázek 12: Reakce Folin-Ciocalteuova činidla s fenolickou látkou [24]

Reakce fenolických látek s činidlem probíhá v zásaditém prostředí a intenzita vznikajícího modrého zbarvení je monitorována spektrofotometricky při 760 nm. Celkový obsah fenolických látek je vyjádřen jako ekvivalent kyseliny gallové (Obrázek 13), která se používá jako standardní látka [7, 24, 26].



Obrázek 13: Struktura kyseliny gallové

Kromě Folin-Ciocalteuova činidla je možné využít i Folin–Denisovo činidlo, ale toto činidlo je oproti Folin–Ciocalteuovu činidlu méně citlivé [7].

## 1.6 Separáční metody

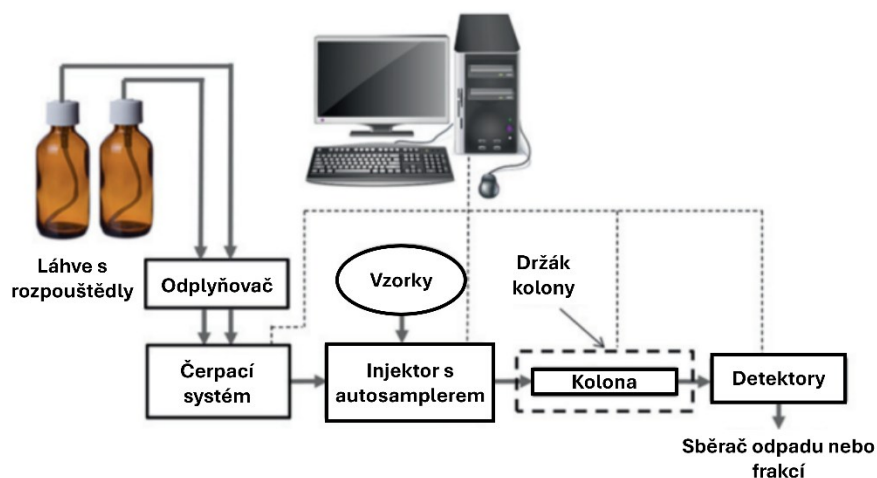
Kl ovou skupinu separačních metod představuje chromatografie, jejíž princip je založen na distribuci analytů mezi stacionární a mobilní fází [27,28]. Tyto techniky umořňují nejen identifikaci, ale i kvantifikaci jednotlivých látek. Volba konkr tn  chromatografick  metody závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech analyzovaných látek. Kapalinov  chromatografie (LC) je primárně určena pro analýzu netěkov ch a termicky labilních sloučenin. Naopak plynov  chromatografie (GC) vyžaduje, aby analyty byly dostatečně těkov  a termostabilní. Látky, které tuto podmínku nesplňují, musí být před analýzou převedeny na těkov  deriváty (tzv. derivatizace) [9].

### 1.6.1 Vysokoučinná kapalinov  chromatografie

Vysokoučinná kapalinov  chromatografie (HPLC) je separační metoda, kde se využívá pevn  stacionární fáze a kapaln  mobilní fáze. HPLC je vhodn  pro analýzu širokého spektra látek, jak polárních, tak nepolárních a v některých případech i iontových. Pro analýzu složitějších vzorků, které obsahují velké množství látek, je nutn  optimalizace separačních podmínek. Vhodnou volbou stacionární a mobilní fáze můžeme ovlivňovat eluční pořad  jednotlivých sledovaných látek ve směsi. Pro separaci látek se využívá několik separačních systémů, z nichž nejběžnější je systém s obrácenými fázemi, kde se pro separaci využívá polární mobilní fáze (směs vody a organického rozpouřtědla, nejčastěji methanolu nebo acetonitrilu) a nepolární stacionární fáze (nejčastěji chemicky v zan  oktadecyl silikagelov  fáze). Pokud

bude mobilní fáze nepolární a stacionární fáze polární jedná se o systémy s normálními fázemi [27-29].

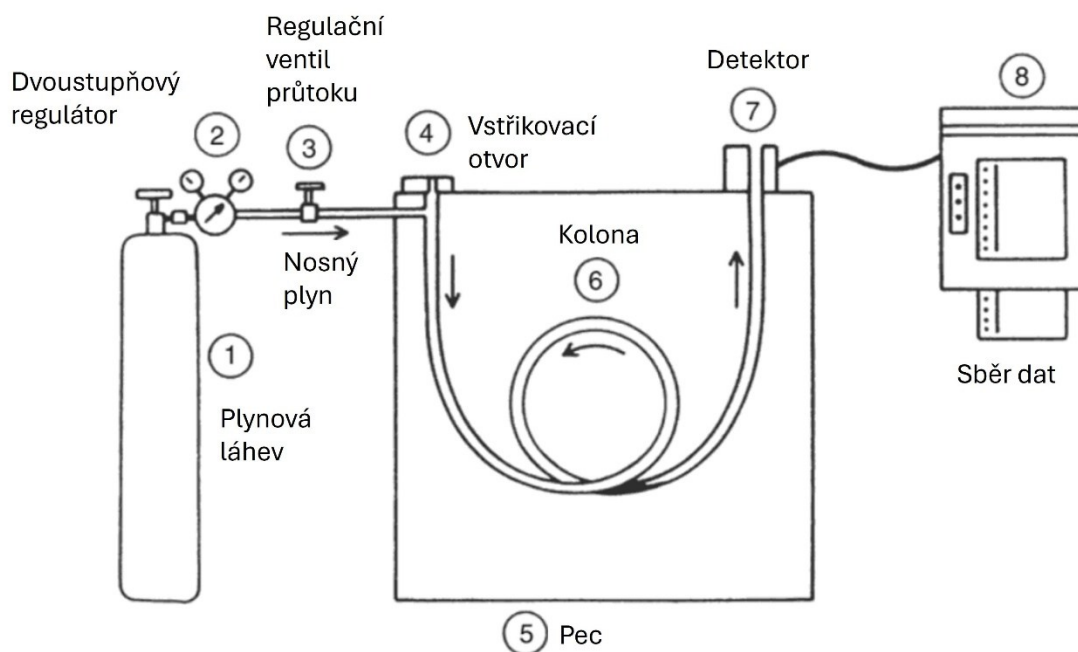
Na obrázku 14 je uvedeno schematické zobrazení instrumentálního uspořádání běžného chromatografu, který se skládá ze zásobníků mobilní fáze, vysokotlakého čerpadla pro čerpání mobilní fáze, dávkovacího zařízení pro zavedení vzorku do mobilní fáze, chromatografické kolony a detektoru [28,29]. Nejběžnějším detektorem je spektrofotometrický detektor, který monitoruje absorpenci separovaných látek v UV a viditelné oblasti spektra. Dále je možné využívat hmotnostní spektrometr nebo fluorescenční detektor [28].



Obrázek 14: Schéma jednoduché konfigurace HPLC [29]

## 1.6.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) se sestává z plynné mobilní fáze a z pevné nebo kapalné stacionární fáze. Používá se pro separaci tepelně stabilních těkavých látek nebo látek plynných. Plynový chromatograf (Obrázek 15) se skládá z nosného plynu, dávkovacího zařízení, chromatografické kolony a detektoru. Těkavé látky se pak oddělují na základě několika vlastností, včetně bodu varu, velikosti molekul a polaritě [27,28]. V GC je nejběžnějším detektorem plamenový ionizační detektor (FID), který generuje signál po spálení organických látek ve vodíkovém plameni. Jako detektor lze také použít hmotnostní spektrometr [7].



Obrázek 15: Schéma GC [30]

## 1.7 Analýza antioxidantů obsažených ve švestkách

### 1.7.1 Extrakce

Pro extrakci látek s antioxidačními vlastnostmi z přírodní matrice se většinou používají různá organická rozpouštědla. Výběr rozpouštědel závisí na polaritě sledovaných antioxidantů, například hexan [31,32] s acetonem se používá pro extrakci antioxidantů rozpustných v tucích (karotenoidy) a ethanol [33] či methanol [32-37] a jejich směsi s vodou se využívají pro antioxidanty rozpustné ve vodě (fenolické kyseliny, flavanoidy a antokyany) [12,38]. Při extrakci dáváme přednost směsi ethanol-voda před čistým ethanolem, protože voda zlepšuje schopnost extrahovat polární fenolické látky. Zároveň přítomnost ethanolu umožňuje lepší pronikání extrakční směsi do hydrofobních struktur matrice a napomáhá odstranění nežádoucích proteinů jejich vysrážením [39,40].

Účinnost extrakce fenolických látek z přírodních matric je silně ovlivněna teplotou a pH extrakční směsi. Zvýšení teploty obecně vede k vyššímu výtěžku, a to díky zlepšení rozpustnosti, zrychlení difuze a narušení buněčných struktur, což usnadňuje uvolnění analytů [9]. Je však nutné postupovat opatrně, neboť při teplotách nad 50 °C již může docházet k tepelné degradaci extrahovaných látek [39]. Vedle teploty hraje klíčovou roli také pH extrakční směsi. Okyselení, využívané zejména pro extrakci fenolických kyselin a antokyanů, významně zvyšuje extrakční účinnost a stabilitu těchto sloučenin [7].

Při výrobě marmelád dochází nejvíce k degradaci antokyanů. Například ve studii Kim a kol. [41] byla při výrobě marmelád pozorována degradace antokyanů obsažených v třešních až o 90 % a u švestek až o 40 %. Kromě teploty stability antokyanů ovlivňuje pH a koncentrace cukru, což jsou právě klíčové parametry při výrobě marmelád. Pomocí spektrofotometrických metod bylo dále zjištěno, že u třešní zůstalo zachováno 73 % celkových fenolických látek a 65 % antioxidační kapacity. U švestek byly výsledky mírně odlišné, zachovalo se 65 % celkových fenolických látek a 66 % antioxidační kapacity [41].

Při analýze antioxidantů přítomných ve švestkách je nutné švestky nejprve zbavit nečistot opláchnutím ve vodě. Poté pomocí mixéru při maximálních otáčkách nože po dobu několika vteřin se vzorek rozemele a vzniklá homogenní směs se extrahuje pomocí vodného roztoku methanolu [33,35,36] nebo ethanolu [33,42]. Doba extrakce bývá většinou 1-2 hodiny [35,43] a bývá provedena za pomoci třepání s rozpouštědlem [33-35] nebo za podpory ultrazvuku [44,45]. Po skončení extrakce se pevný podíl oddělí filtrací a vzniklý supernatant bývá rovněž odstředěn [33-35,44,45]. Pro zamezení degradace přítomných látek může být extrakce provedena i pod ochrannou atmosférou dusíku [44,45]. Vzorky by měly být uloženy při teplotě 4 °C po dobu maximálně 1 až 3 dnů [34], aby nedošlo k jejich znehodnocení [33,34]. Pro přípravu stabilních a suchých vzorků se kromě zpracování čerstvého ovoce často využívá lyofilizace [44,45]. Jedná se o metodu, která je považována za velmi šetrnou k obsahu bioaktivních látek. Na rozdíl od klasického sušení, které využívá teplo, lyofilizace odstraňuje vodu při nízkých teplotách. Tím se minimalizuje riziko tepelné degradace cenných látek, jako jsou antioxidanty, a pomáhá tak zachovat původní chemické složení vzorku pro další analýzu [7,46]. Lyofilizované švestky se před extrakcí pouze rozdrtí na jemný prášek a extrahují stejným způsobem jako čerstvé a sušené plody [44,45].

Sušení švestek se zpravidla provádí při teplotě 85 až 90 °C po dobu 18 hodin [47,48]. Tato tepelná úprava s sebou však nese komplexní chemické změny. Na jedné straně dochází ke ztrátám či přeměnám přirozeně se vyskytujících látek, jako jsou kyselina askorbová, kyselina chlorogenová a neochlorogenová, flavonoly a antokyaniny. Na druhé straně může vlivem Maillardovy reakce dojít k tvorbě nových sloučenin s antioxidačními vlastnostmi, takže výsledná antioxidační kapacita se může až zdvojnásobit [48]. Ze sušených švestek jsou antioxidanty extrahovány stejným způsobem jako z čerstvých švestek [49].

Pro extrakci z povidel se používají stejná rozpouštědla jako pro čerstvé švestky. Samotný proces extrakce je prováděn buď pomocí ultrazvuku [37,50], nebo mechanickým třepáním

[51]. Po ukončení extrakce jsou vzorky zchlazeny na laboratorní teplotu a následně zfiltrovány.

### **1.7.2 Stanovení antioxidační kapacity a fenolických látek**

Pro stanovení antioxidační kapacity švestek a produktů z nich připravených se používají spektrofotometrické metody ABTS [42,45], DPPH [33,42,43], ORAC [43] či FRAP [35,42,52,53]. Ve většině případů se antioxidační aktivita vyjadřuje jako ekvivalentní množství standardu Troloxu na jeden gram vzorku [32,36,52] nebo méně často jako ekvivalentní množství vitamínu C (VCEAC) [42,45]. U metody FRAP se v některých případech vyjadřuje antioxidační aktivita jako ekvivalent  $\text{FeSO}_4$  [32,35,52,53]. Pro stanovení celkového obsahu fenolických látek (TPC) švestek se zpravidla používá metoda s Folin-Ciocalteuovým činidlem [35,37,43,52], kde jako standardní látka slouží kyselina gallová a výsledky se vyjadřují jako její ekvivalentní množství (GAE) na 1 g vzorku [32,37,43,52].

Jednotlivé studie potvrzují, že švestky jsou významným zdrojem antioxidantů. Ve srovnání s běžně konzumovaným ovocem, jako jsou například jablka, vykazují švestky vyšší antioxidační kapacitu [42,45,53]. Obsah bioaktivních látek se však výrazně liší v závislosti na kultivaru, stupni zralosti a způsobu zpracování. Analýza divoce rostoucích tureckých kultivarů švestek [52] ukázala, že kultivar 'Blackthorn' dosáhl nejvyšších hodnot TPC a antioxidační aktivity u metody FRAP, zatímco u metody DPPH byl nejúčinnější kultivar 'Karaca'. U evropských genotypů švestek byla navíc odhalena pozitivní korelace mezi intenzitou zbarvení slupky a obsahem fenolických látek, což naznačuje, že tmavší plody jsou na tyto látky bohatší [35].

Zpracování a skladování mají na obsah fenolických látek a antioxidační aktivitu zásadní vliv. Bylo prokázáno [33], že sušené švestky jsou koncentrovanějším zdrojem fenolických látek než švestky čerstvé, a to díky jejich nízkému obsahu vody a vzniku produktů neenzymatických reakcí. Podobně se lišil obsah fenolických látek i u povidel [37], kdy nejvyšší hodnoty byly naměřeny u domácích povidel, následovaly povidla z ekologického zemědělství a nejnižší hodnoty byly naměřeny u komerčně dostupných produktů. Zajímavý vliv na obsah fenolických látek mělo také skladování při nízkých teplotách [43], které u podzimních kultivarů vedlo ke zvýšení TPC, zatímco u letních kultivarů došlo k jeho poklesu. Zvýšení TPC bylo pravděpodobně způsobeno stimulací jejich biosyntézy chladovým stresem.

Napříč analyzovanými studii [33,35,43,45] byla opakovaně potvrzena přímá souvislost mezi celkovým obsahem fenolických látek a výslednou antioxidační aktivitou, což podtrhuje klíčovou roli těchto sloučenin v antioxidačním potenciálu švestek.

### **1.7.3 Stanovení antioxidantů pomocí separačních technik**

K analýze fenolických látek ve švestkách se využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systémech s obrácenými fázemi a se spektrofotometrickým detektorem (s diodovým polem – DAD) [36,44,54]. Jako stacionární fáze se ve většině případů využívá oktadecyl silikagel [36,44,54] a jako mobilní fáze se používá směs vody a organického rozpouštědla, nejčastěji acetonitrilu [44,54] nebo methanolu [36]. Pro zlepšení separace se vodná složka či obě složky mobilní fáze okyselují pomocí kyseliny mravenčí [36,54] nebo octové [43]. K úpravě pH lze také využít různých pufrů [43]. Zatímco pro většinu fenolických látek je dostatečný přídavek kyseliny v nízké koncentraci (např. 0,1 %) [54], analýza antokyanů vyžaduje specifický přístup a z důvodu stabilizace jejich struktury se vyžaduje silně kyselé prostředí, a tudíž se kyselina přidává v jednotkách až desítkách procent [36]. Protože se jedná o komplexní směsi látek, využívá se zpravidla gradientová eluce.

Výhodou detektoru s diodovým polem je, že umožňuje záznam celého UV-VIS spektra v každém bodě chromatogramu. Díky tomu je možné z celkových dat extrahovat chromatogramy při specifických vlnových délkách, které odpovídají absorpčním maximům jednotlivých skupin látek. Pro kvantifikaci se tak volí například vlnové délky 280–320 nm pro hydroxyskořicové kyseliny, 340–370 nm pro flavonoly a 510–520 nm pro antokyaniny [36,44]. Jako převládající fenolická kyselina bývá v testovaných švestkách identifikována neochlorogenová kyselina [2,36,44,54], mezi hlavní flavonoidy patří kvercetin-3-glukosid a kvercetin-3-rutinosid. Antokyaniny se vyskytují zpravidla pouze u červených a přežralých kultivarů, přičemž se jedná především o kyanidin-3-glukosid a kyanidin-3-rutinosid [2,36].

Pro analýzu těkavých látek se využívá plynová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem [55,56,58,59]. K izolaci a zakoncentrování analytů z matrice se zpravidla využívá metoda mikroextrakce na pevné fázi (SPME) [55,56], neboť se jedná o rychlou techniku bez použití rozpouštědel. Účinnost extrakce je dále navýšena přidáním nasyceného roztoku NaCl [55,56], který na principu tzv. "vysolovacího efektu" snižuje rozpustnost těkavých látek ve vodném prostředí a podporuje jejich přechod do plynné fáze, kde jsou zachyceny na SPME vlákne [57]. Ve studiích [55,56] bylo pro tento účel zvoleno vlákno s kombinovanou vrstvou divinylbenzen/karboxen/polydimethylsiloxan. Pomocí plynové

chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem s analyzátozem doby letu (GC-TOF-MS) [55] bylo identifikováno 737 těkavých látek, přičemž největší podíl tvořily estery a alkoholy. Spojení GC/MS s kvadrupólovým analyzátozem bylo využito pro analýzu tří odrůd švestek [56], kde bylo identifikováno celkem 938 těkavých látek, přičemž nejvíce dominovali terpenoidy a estery [56]. Další moderní přístup představuje plynová chromatografie ve spojení s iontovou mobilitní spektrometrií (GC-IMS). Princip metody spočívá v tom, že IMS ionizuje složky a následně je odděluje na základě jejich mobility v unášeném plynu pod vlivem elektrického pole [58]. Pomocí GC-IMS byl monitorován vliv čtyř různých metod zahušťování povidel na obsah těkavých látek [59]. Výsledky ukázaly, že netepelné metody (především vakuové vymrazování) výrazně překonaly tepelné metody v zachování živin a původního chuťového profilu. Bylo identifikováno 42 těkavých látek obsažených v povidlech pomocí headspace extrakce bez SPME zakoncentrování.

## **2 Experimentální část**

### **2.1 Použité chemikálie**

- ABTS diamonná sůl (Sigma Aldrich, USA)
- 2M Folin-Ciocalteuovo činidlo (Sigma Aldrich, USA)
- Methanol (Sigma Aldrich, USA)
- Kyselina mravenčí (Sigma Aldrich, USA)
- Uhličitan sodný (Lach-Ner, Neratovice)
- Peroxodisíran draselný (Laborchemie Apoldo, Německo)
- Deionizovaná voda (Merck, Německo)
- Destilovaná voda

### **2.2 Použité zařízení**

- UV/VIS spektrofotometr Shimadzu UV-2450 (Kyoto, Japonsko)
- Automatické pipety (Biohit, Finsko)
- Ultrazvuková lázeň (Kraintek, Česká republika)
- Termostatová sušící vana Digital Dry Bath (Miulab, Čína)
- Analytické váhy (Sartorius, Ústí nad Labem)
- Homogenizátor ULTRA TURRAX T 18 (IKA, Německo)
- Třepačka (Heidolph, Německo)

## 2.3 Vzorky

Pro stanovení antioxidační aktivity a celkového množství fenolických látek byly připraveny extrakty z mražených švestek, domácích a kupovaných povidel a kupovaných sušených švestek (Obrázek 16).



Obrázek 16: Vzorky pro experimentální část (na levé straně sušené švestky, uprostřed kupovaná povidla, na pravé straně domácí povidla).

## 2.4 Pracovní postupy

### 2.4.1 Příprava vzorků

Mražené a sušené švestky byly zváženy na analytických vahách a k naváženému množství bylo přidáno 40 ml extrakčního roztoku. Pro extrakci byly testovány dva extrakční roztoky, a to 70% nebo 80% (v/v) methanol (MeOH) ve směsi s vodou. Voda byla okyselená kyselinou mravenčí (1 %, v/v). Extrakce byla provedena pomocí homogenizátoru, kdy nejprve byl vzorek rozmixován při vysokých otáčkách a poté byl míchán následných 10 minut při menších otáčkách. Po extrakci byl supernatant odfiltrován a vzorek byl připraven na měření.

Extrakce antioxidantů z povidel byla provedena pomocí stejných extrakčních směsí, pouze s tím rozdílem, že byla míchána na třepačce nebo byla extrakce podpořena ultrazvukem. Doba extrakce byla u obou testovaných postupů stejná, a to 15 minut. Po extrakci byl opět pevný podíl odfiltrován a extrakt byl připraven k analýze.

U všech vzorků byl zjištěn obsah vlhkosti, který byl využit pro zjištění obsahu sušiny v navážkách jednotlivých vzorků a pro porovnání výsledků.

Souhrn všech připravených extraktů je uveden v tabulce 3.

Tabulka 3: Souhrn jednotlivých provedených extrakcí.

Číslo Vzorku	Vzorek	Navážka [g]	Navážka sušiny [g]	Extrakční činidlo	Způsob a doba extrakce
1	Mražené švestky	5,61	1,09	70% MeOH + HCOOH	10 minut v homogenizátoru
2	Mražené švestky	5,57	1,08	80% MeOH + HCOOH	10 minut v homogenizátoru
3	Domácí povidla	2,04	1,06	70% MeOH + HCOOH	15 minut v ultrazvukové lázni
4	Domácí povidla	2,19	1,14	80% MeOH + HCOOH	15 minut v ultrazvukové lázni
5	Kupované povidla	2,19	1,60	70% MeOH + HCOOH	15 minut v ultrazvukové lázni
6	Kupované povidla	2,14	1,56	80% MeOH + HCOOH	15 minut v ultrazvukové lázni
7	Domácí povidla	2,33	1,21	70% MeOH + HCOOH	15 minut na třepačce
8	Domácí povidla	2,40	1,25	80% MeOH + HCOOH	15 minut na třepačce
9	Kupované povidla	2,25	1,64	70% MeOH + HCOOH	15 minut na třepačce
10	Kupované povidla	1,95	1,42	80% MeOH + HCOOH	15 minut na třepačce
11	Sušené švestky	5,61	4,21	70% MeOH + HCOOH	10 minut v homogenizátoru
12	Sušené švestky	5,82	4,37	80% MeOH + HCOOH	10 minut v homogenizátoru

#### 2.4.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Radikál ABTS byl připraven rozpuštěním 10 mg ABTS diazoniové soli v 5 ml deionizované vody (3,6 mmol/l) a po rozpuštění bylo přidáno 100  $\mu$ l roztoku  $K_2S_2O_8$  (0,064 mol/l) a roztok se nechal přes noc inkubovat v chladu. Výsledný modrozelený roztok byl poté zředěn, aby

výsledná absorbance se pohybovala v rozmezí hodnot absorbance 0,8-0,9. Z pracovního roztoku ABTS byly odpipetovány 3 ml do ampulky a přidáno 100 µl extraktu vzorku nebo 70% methanolu v případě slepého vzorku. Směs byla promíchána a nechána 60 minut ve tmě. Po uplynutí této doby byla změřena absorbance směsi při vlnové délce 734 nm. Každý vzorek byl změřen čtyřikrát. Na základě níže uvedeného vztahu byl vypočítán úbytek absorbance v procentech, kde  $A_{\text{vzorku}}$  je absorbance vzorku a  $A_{\text{blank}}$  je absorbance slepého vzorku.

$$\text{úbytek A (\%)} = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{vzorku}}}{A_{\text{blank}}} \cdot 100$$

Pomocí kalibrační křivky byl úbytek absorbance přepočítán na ekvivalentní množství standardu Troloxu. Kalibrační řada byla získána z diplomové práce Denisy Vrané [60].

### **2.4.3 Stanovení celkového množství fenolických látek**

Pracovní roztok byl připraven naředěním 2M Folin-Ciocalteuového činidla deionizovanou vodou v poměru 1:20 (v/v). Ke 2 ml zředěného Folin-Ciocalteuového činidla bylo přidáno 100 µl vzorku či 70% methanolu (slepý vzorek) a po 5 minutách byl do reakční směsi přidán 1 ml 7,5 % roztoku  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Směs byla nechána dalších 30 minut v klidu ve tmě. Po uplynutí doby byla změřena absorbance při vlnové délce 750 nm. Každý vzorek byl změřen čtyřikrát. Nárůst absorbance byl korigován pomocí slepého roztoku dle níže uvedené rovnice a pomocí standardu kyseliny gallové byl přepočítán na GAE.

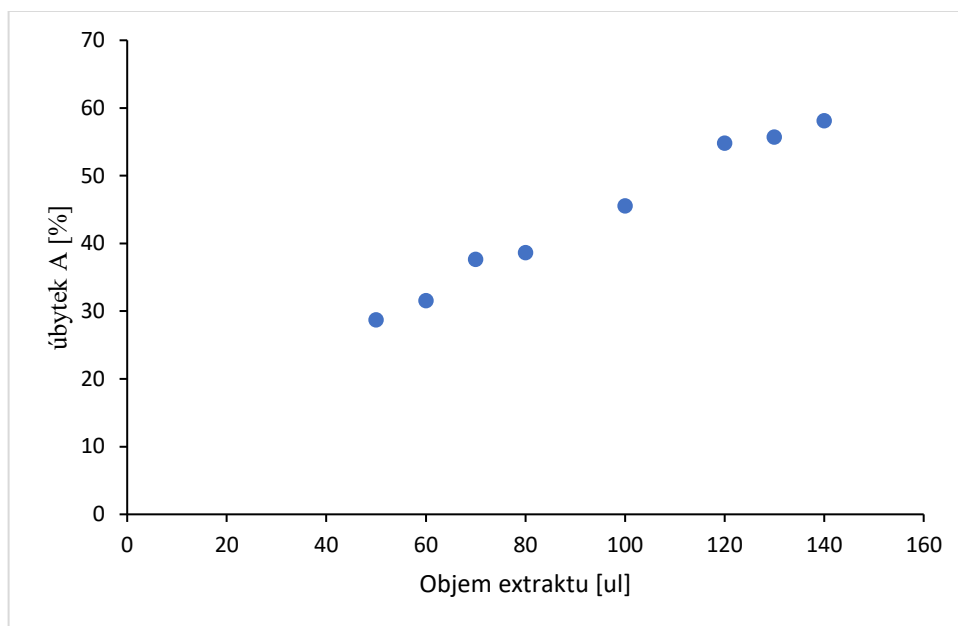
$$\Delta A = A_{\text{vzorku}} - A_{\text{blank}}$$

Kalibrační křivka pro přepočet na kyselinu gallovou byla opět získána z předchozí diplomové práce [60].

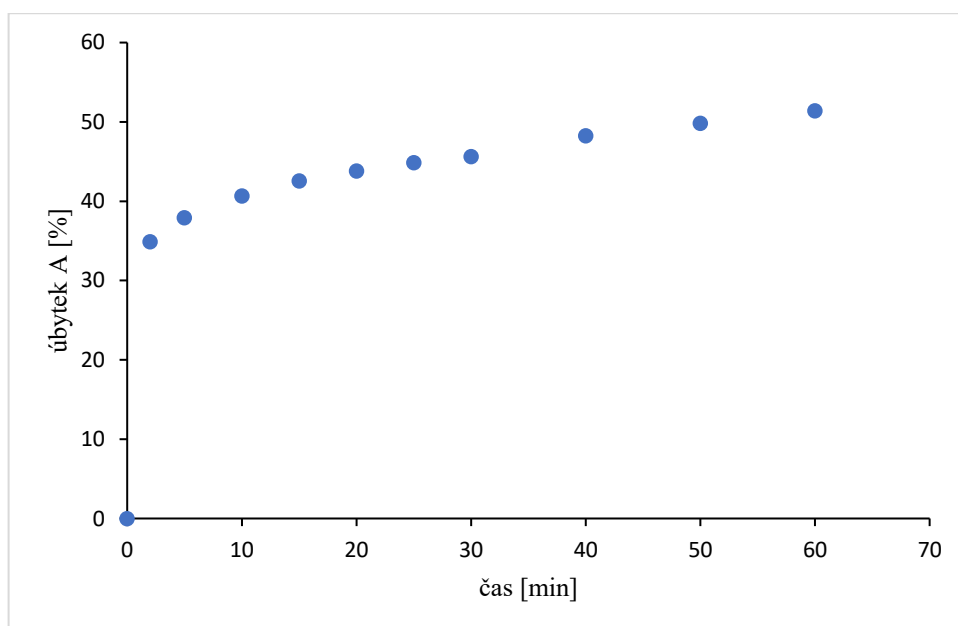
### 3 Výsledky a diskuze

#### 3.1 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Nejdříve byl optimalizován objem vzorku a doba reakce vzorku s ABTS roztokem pro měření antioxidační aktivity. Ze závislosti úbytku absorbance v procentech na objemu extraktu (Obrázek 17) byl zvolen objem 100  $\mu\text{l}$  a ze závislosti úbytku absorbance v procentech na dobu reakce (Obrázek 18) byl zvolen čas 60 minut.



Obrázek 17: Závislost úbytku absorbance v procentech na objemu extraktu



Obrázek 18: Závislost úbytku absorbance v procentech na době reakce

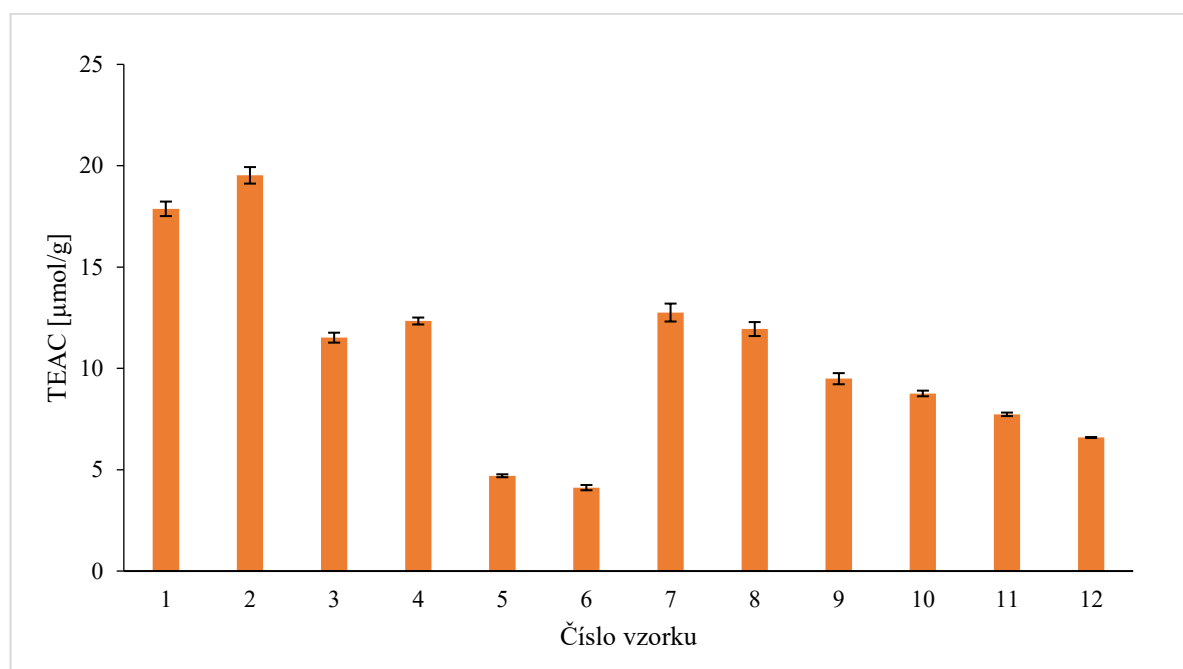
Poté byly proměřeny extrakty připravené z mražených švestek, povidel a sušených švestek dle postupu uvedeného v experimentální části (kapitola 2.4.2). Z rovnice regrese kalibrační křivky závislosti úbytku absorbance na množství Troloxu v dávkovaném objemu [60] byly přepočítány hodnoty úbytku absorbance extraktů na ekvivalentní množství Troloxu.

Ke každému ekvivalentnímu množství byla vypočítána hodnota TEAC ( $\mu\text{mol}$  Troloxu na 1 g vzorku) podle vztahu:

$$\text{TEAC } (\mu\text{mol/g}) = \frac{\text{ekvivalentní množství } (\mu\text{mol Troloxu})}{m \text{ (g)}} \cdot f_R$$

kde  $m$  je navážka vzorku a  $f_R$  je faktor zahrnující dávkované množství extraktu vzorku a ředění.

Z průměrných hodnot TEAC získaných proměřením jednotlivých extraktů byl sestrojen sloupcový graf (Obrázek 19). Přesné hodnoty TEAC jsou uvedeny v příloze v tabulce P1.



Obrázek 19: Antioxidační aktivita jednotlivých extraktů

1 - čerstvé švestky, 70% MeOH, 2 - čerstvé švestky, 80% MeOH, 3 - domácí povidla ultrazvukem, 70% MeOH, 4 - domácí povidla ultrazvukem, 80% MeOH, 5 - kupované povidla ultrazvukem, 70% MeOH, 6 - kupované povidla ultrazvukem, 80% MeOH, 7 - domácí povidla třepáním, 70% MeOH, 8 - domácí povidla třepáním, 80% MeOH, 9 - kupované povidla třepáním, 70% MeOH, 10 - kupované povidla třepáním, 80% MeOH, 11 - sušené švestky, 70% MeOH, 12 - sušené švestky, 80% MeOH.

Z obrázku 19 je patrné, že nejvyšší antioxidační aktivitu vykazují mražené švestky (vzorky 1 a 2), protože neprošly tepelnou úpravou. Díky tomu nedošlo k degradaci fenolických látek, především antokyanů, jako u ostatních vzorků. Vyšší účinnosti extrakce bylo dosaženo pomocí 80% methanolu (2). Sušené švestky (11 a 12) vykazují nižší antioxidační aktivitu než

většina ostatních vzorků švestek a povidel. Vůbec nejnižší hodnoty ze všech analyzovaných extraktů však byly naměřeny u kupovaných povidel (5 a 6) připravených pomocí ultrazvukové lázně. Zajímavé je, že extrakty připravené z povidel v ultrazvukové lázni (3, 4, 5 a 6) vykazovaly nižší antioxidační aktivitu ve srovnání se vzorky připravenými na třepačce (7, 8, 9 a 10). Pravděpodobně má ultrazvuk negativní dopad na antioxidanty přítomné v analyzovaných vzorcích. Mezi vzorky extrahovanými 70% a 80% methanolem nebyl pozorován velký rozdíl antioxidační aktivity. U vzorků mražených švestek a domácích povidel, které byly připraveny v ultrazvukové lázni, byla zjištěna vyšší antioxidační aktivita při použití 80% methanolu. Naopak u všech ostatních vzorků byla vyšší aktivita naměřena po extrakci 70% methanolem. Z chybových úseček je patrné, že nedocházelo k velkým odchylkám při měření.

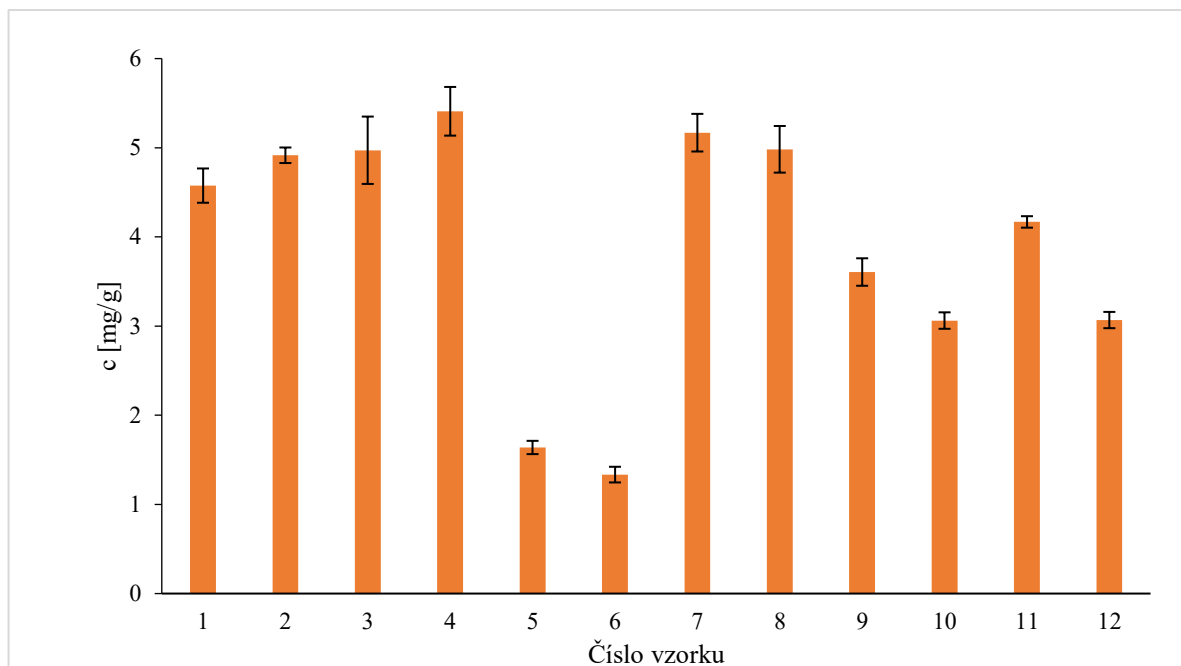
### 3.2 Stanovení celkového množství fenolických látek

Stejně jako u stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS byl zvolen dávkovaný objem vzorku 100  $\mu$ l a celková doba reakce u této metody byla 35 minut. Připravené extrakty byly proměřeny optimalizovanou metodou dle postupu uvedeného v experimentální části (kapitola 2.4.3) a pomocí výsledné rovnice regrese z kalibrační křivky závislosti nárůstu absorbance na množství kyseliny gallové v dávkovaném objemu [60] byly přepočítány hodnoty absorbance u všech extraktů na ekvivalentní množství kyseliny gallové a s využitím níže uvedeného vztahu bylo zjištěno celkové množství fenolických látek jako mg kyseliny gallové na 1 gram vzorku.

$$c \text{ (mg/g)} = \frac{\text{ekvivalentní množství (mg kyseliny gallové)}}{m \text{ (g)}} \cdot f_R$$

kde  $m$  je navážka vzorku a  $f_R$  je faktor zahrnující dávkované množství extraktu vzorku a ředění.

Ze získaných průměrných hodnot celkového množství fenolických látek u každého extraktu byl vytvořen sloupcový graf (Obrázek 20). Přesné hodnoty TEAC jsou uvedeny v příloze v tabulce P2.



Obrázek 20: Celkové množství fenolických látek u jednotlivých extraktů  
 1 - čerstvé švestky, 70% MeOH, 2 - čerstvé švestky, 80% MeOH, 3 - domácí povidla ultrazvukem, 70% MeOH, 4 - domácí povidla ultrazvukem, 80% MeOH, 5 - kupované povidla ultrazvukem, 70% MeOH, 6 - kupované povidla ultrazvukem, 80% MeOH, 7 - domácí povidla třepáním, 70% MeOH, 8 - domácí povidla třepáním, 80% MeOH, 9 - kupované povidla třepáním, 70% MeOH, 10 - kupované povidla třepáním, 80% MeOH, 11 - sušené švestky, 70% MeOH, 12 - sušené švestky, 80% MeOH.

Z obrázku 20 je patrné, že nejvyšší množství fenolických látek vykazují vzorky mražených švestek (1 a 2) a domácích povidel (3, 4, 7 a 8). Podobně jako ve studii [37] bylo i zde zjištěno vyšší množství fenolických látek v domácích povidel než u kupovaných povidel. Ve studii [33] bylo zjištěno vyšší množství fenolických látek v methanolovém extraktu připraveném ze sušených švestek, než bylo naměřeno v rámci této práce (11 a 12). U extraktů kupovaných povidel připravených pomocí ultrazvukové lázně (5 a 6) je opět nejnížší množství fenolických látek a koreluje to s metodou ABTS, kde byla u stejných extraktů zjištěna nejnížší antioxidační aktivita. Stejně jako u metody ABTS, zde nebyl prokázán velký rozdíl mezi extrakty připravenými pomocí 80% a 70% methanolu. Oproti metodě ABTS zde byla pozorována větší chyba v měření.

## ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se věnuje analýze přírodních antioxidantů přítomných ve švestkách.

Teoretická část se zaměřuje na charakteristiku a složení švestek, včetně popisu fytochemikálií a antioxidantů v nich obsažených. Dále se věnuje metodám extrakce využívaných pro úpravu vzorků a analytickým metodám, které se pro analýzu antioxidantů obsažených ve švestkách používají. Nejprve jsou diskutovány teoretické základy a výsledky publikovaných prací u spektrofotometrických metod (ABTS, DPPH, FRAP, ORAC a metoda s Folin-Ciocalteuovým činidlem) a poté u separačních metod, a to jak výsledky analýz získaných vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, tak plynovou chromatografií.

V experimentální části byla stanovena antioxidační aktivita extraktů připravených z mražených švestek, domácích a kupovaných povidel a sušených švestek pomocí metody ABTS a dále byl u stejných extraktů stanoven celkový obsah fenolických látek pomocí metody dle Folin-Ciocalteua. Vzorky byly extrahovány pomocí 70% a 80% vodného roztoku methanolu okyseleného kyselinou mravenčí, přičemž k extrakci bylo využito třepání na třepáče nebo ultrazvukové lázně. Celkem bylo připraveno a vzájemně porovnáno 12 extraktů.

Bylo zjištěno, že nejvyšší antioxidační aktivitu vykazují mražené švestky připravené pomocí 80% methanolu a nejvyšší obsah celkových fenolických látek byl naměřen u mražených švestek a domácích povidel. U extraktů z povidel připravených pomocí ultrazvuku byly naměřeny nízké hodnoty antioxidační aktivity a obsahu fenolických látek.

## POUŽITÁ LITERATURA

1. BARSTOW, M.; HARVEY-BROWN, Y. *Prunus domestica*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2017: e.T50135950A50135957. 2017 [cit. 2024-11-03]. Dostupné z: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T50135950A50135957.en>
2. LIM, T.K. *Prunus Domestica*. Online. In: *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants*. Dordrecht: Springer, 2012, 462–475 [cit. 2025-03-20]. Dostupné z: [https://doi.org/10.1007/978-94-007-4053-2\\_53](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4053-2_53)
3. HANSMANN, C F; COMBRINK, J C. Plums and related fruits. In: CABALLERO, Benjamin (ed.). *The Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2nd ed. vol. 7. Oxford: Academic Press, 2003, 4606–4610. ISBN 978-0-12-227055-0. [cit. 2025-03-20].
4. LUNA-VÁZQUEZ, Francisco J.; IBARRA-ALVARADO, César; ROJAS-MOLINA, Alejandra; ROJAS-MOLINA, Juana I.; BAH, Moustapha. *Prunus*. In: YAHIA, Elhadi M (ed.). *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2nd Edition*. Online. 2nd ed. Hoboken: Wiley, 2017, 1215–1226 [cit. 2025-03-20]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9781119158042.ch63>.
5. ŠAPIRO, D. K. *Ovoce a zelenina ve výživě člověka*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1988. ISBN 5-7860-0431-7 [cit. 2025-03-20].
6. VELIOGLU, Y. Sedat. Food Acids: Organic Acids, Volatile Organic Acids, and Phenolic Acids. In: YILDIZ, Fatih (ed.). *Advances in food biochemistry*. Boca Raton: CRC Press, 2010, 313-335. ISBN 978-0-8493-7499-9 [cit. 2025-03-20].
7. BUNZEL, Mirko; SHENDEL, Rachel R. Determination of (Total) Phenolics and Antioxidant Capacity in Food and Ingredients. In: NIELSEN, S. Suzanne (ed.). *Food Analysis*. Online. 5th ed. Cham: Springer, 2018. 455–468 [cit. 2025-03-20]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5>
8. DINELLI, Giovanni; MAROTTI, Ilaria; BOSI, Sara; DI GIOIA, Diana; BIAVATI, Bruno et al. Physiologically Bioactive Compounds of Functional Foods, Herbs, and Dietary Supplements. In: YILDIZ, Fatih (ed.). *Advances in*

- food biochemistry*. Boca Raton: CRC Press, 2010, s. 240-279. ISBN 978-0-8493-7499-9.
9. LOZANO-SÁNCHEZ, Jesús; BORRÁS-LINARES, Isabel; SASS-KISS, Agnes a SEGURA-CARRETERO, Antonio. Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). Online. In: SUN, Da-Wen (ed.). *Modern Techniques for Food Authentication*. 2nd Ed. Elsevier, 2018, 459–525 [cit. 2025-03-20]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814264-6.00013-X>
  10. INFANTE, Rodrigo; MARTÍNEZ-GÓMEZ, Pedro a PREDIERI, Stefano. Breeding for Fruit Quality in Prunus. Online. In: JENKS, Matthew A. a BEBELI, Penelope J. (ed.). *Breeding for Fruit Quality*. Hoboken: Wiley, 2011, 201–229 [cit. 2025-03-20]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9780470959350.ch9>
  11. JORDÁN, Václav a HEMZALOVÁ, Marie. *Antioxidanty: závažné zbraně*. Brno: Jota, 2001. ISBN 80-7217-156-9. [cit. 2024-11-08].
  12. XU, Dong-Ping; LI, Ya; MENG, Xiao; ZHOU, Tong; ZHOU, Yue; ZHENG, Jie; ZHANG, Jiao-Jiao; LI, Hua-Bin. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, 18(1) [cit. 2024-11-01]. <https://doi.org/10.3390/ijms18010096>
  13. MUNTEANU, Irina Georgiana; APETREI, Constantin. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(7) [cit. 2024-12-07]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
  14. CAROCHO, Márcio a FERREIRA, Isabel C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Online. *Food and Chemical Toxicology*. 2013, 51, 15-25 [cit. 2025-06-18]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
  15. PROTEGGENTE, Anna R.; PANNALA, Ananth Sekher; PAGANGA, George; VAN BUREN, Leo; WAGNER, Eveline et al. The Antioxidant Activity of

- Regularly Consumed Fruit and Vegetables Reflects their Phenolic and Vitamin C Composition. Online. *Free Radical Research*. 2009, 36(2), 217-233 [cit. 2025-06-18]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10715760290006484>
16. CANTWELL, Frederick F. a LOSIER, Manon. Chapter 11 Liquid—liquid extraction. Online. *Comprehensive Analytical Chemistry*. 2002, 37, 297-340 [cit. 2025-06-18]. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0166-526X\(02\)80048-4](https://doi.org/10.1016/S0166-526X(02)80048-4)
17. NCUBE, Somandla; MADIKIZELA, Lawrence Mzukisi; NINDI, Mathew Muzi a CHIMUKA, Luke. Chapter Three - Solid phase extraction technique as a general field of application of molecularly imprinted polymer materials. Online. *Comprehensive Analytical Chemistry*. 2019, 86, 41-76 [cit. 2025-06-18]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2019.05.001>
18. LÓPEZ-BASCÓN, M.A. a LUQUE DE CASTRO, M.D. Soxhlet Extraction. Online. In: POOLE, Colin F. (ed.). *Liquid-Phase Extraction*. Amsterdam: Elsevier, 2020, 327-354 [cit. 2025-04-14]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00011-6>
19. DEAN, John R. *Extraction Techniques in Analytical Sciences*. Online. Hoboken: Wiley, 2010 [cit. 2025-06-18]. Dostupné z: <https://www.google.com/books?hl=cs&lr=&id=hR-mihMxxCoC&oi=fnd&pg=PR7&dq=Extraction+Techniques+in+Analytical+Sciences,+John+R.+Dean,+Soxhlet+6.2&ots=4tCM-zlVrb&sig=8s2cN36FGTid6LFQnjMTEZitQP4>
20. ALVAREZ RIVERA, Gerardo; BUENO, Monica; BALLESTEROS-VIVAS, Diego; MENDIOLA, Jose A. a IBANEZ, Elena. Chapter 13 - Pressurized Liquid Extraction. Online. *Liquid-Phase Extraction*. 2020, 375-398 [cit. 2025-06-18]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00013-X>
21. SÁNCHEZ-CAMARGO, Andrea del Pilár; IBÁÑEZ, Elena; CIFUENTES, Alejandro a HERRERO, Miguel. Chapter Two - Bioactives Obtained From Plants, Seaweeds, Microalgae and Food By-Products Using Pressurized Liquid Extraction and Supercritical Fluid Extraction. Online. *Comprehensive Analytical Chemistry*. 2017, 76, 27-51 [cit. 2025-06-18]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2017.01.001>

22. LOPEZ-AVILA, Viorica. Sample Preparation for Environmental Analysis. Online. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2010, 29(3), 195-230 [cit. 2025-04-14]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10408349891199392>
23. VERNES, Léa; VIAN, Maryline a CHEMAT, Farid. Chapter 12 - Ultrasound and Microwave as Green Tools for Solid-Liquid Extraction. Online. *Liquid-Phase Extraction*. 2020, 355-374 [cit. 2025-06-18]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00012-8>
24. RODRÍGUEZ-ROQUE, María Janeth; SOLIVA-FORTUNY, Robert a MARTÍN-BELLOSO, Olga. Methods for Determining the Antioxidant Capacity of Food Constituents. Online. In: YAHIA, Elhadi M (ed.). *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health*. 2nd Ed. Hoboken: Wiley, 2017, 803-816 [cit. 2025-04-14]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9781119158042.ch36>
25. CANO, A.; MAESTRE, A. B.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; ARNAO, M. B. ABTS/TAC Methodology: Main Milestones and Recent Applications. *Processes*. 2023, 11(1) [cit. 2024-11-22]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pr11010185>
26. IRMAK, S. a ERBATUR, O. Additives for environmentally compatible active food packaging. Online. In: CHIELLINI, Emo (ed.). *Environmentally Compatible Food Packaging*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2008, 263-293 [cit. 2025-04-08]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1533/9781845694784.2.263>
27. OPEKAR, František. *Základní analytická chemie: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. Praha: Karolinum, 2002 [cit. 2025-04-28].
28. ISMAIL, Baraem P. Basic Principles of Chromatography. In: NIELSEN, S. Suzanne (ed.). *Food Analysis*. Online. 5th ed. Cham: Springer, 2018. 455–468 [cit. 2024-11-05]. Dostupné z [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_12)
29. MOLDOVEANU, Serban a DAVID, Victor. Overview of HPLC instrumentation and its use. Online. In: *Essentials in Modern HPLC Separations*. 2nd Ed. Amsterdam: Elsevier, 2022, 21-61 [cit. 2025-04-14]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91177-1.00015-6>

30. MCNAIR, Harold M.; MILLER, James M. a SNOW, Nicholas H. Introduction. Online. In: *Basic Gas Chromatography*. 3rd Ed. Hoboken: Wiley, 2019, 1-14 [cit. 2025-04-14]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9781119450795.ch1>
31. STRATI, Irimi F. a OREOPOULOU, Vassiliki. Effect of extraction parameters on the carotenoid recovery from tomato waste. Online. 2011, 46(1), 23-29 [cit. 2025-06-18]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02496.x>
32. THAIPONG, Kriengsak; BOONPRAKOB, Unaroj; CROSBY, Kevin; CISNEROS-ZEVALLOS, Luis a HAWKINGS BYRNE, David. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Online. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006, 19(6-7), 669-675 [cit. 2025-06-18]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
33. NAJAFABAD, Amin Morabbi a JAMEI, Rashid. Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of methanolic and ethanolic extracts of plum (*Prunus domestica* L.) in both fresh and dried samples. Online. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 2014, 4(5), 343-353 [cit. 2025-04-08]. Dostupné z: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4224712/>
34. ZLOCH, Zdeněk; Čelakovský, J; Aujezdská, A. Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu. 2004 [cit. 2025-04-12]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/268049143 Stanoveni\\_obsahu\\_polyfenolu\\_a\\_celkove\\_antioxidacni\\_kapacity\\_v\\_potravinach\\_rostlinneho\\_puvodu](https://www.researchgate.net/publication/268049143 Stanoveni_obsahu_polyfenolu_a_celkove_antioxidacni_kapacity_v_potravinach_rostlinneho_puvodu)
35. VASANTHA RUPASINGHE, H.P.; JAYASANKAR, S. a LAY, W. Variation in total phenolics and antioxidant capacity among European plum genotypes. Online. *Scientia Horticulturae*. 2006, 108(3), 243-246 [cit. 2025-04-12]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.020>
36. TOMÁS-BARBERÁN, Francisco A.; GIL, María I.; CREMIN, Paedar; WATERHOUSE, Andrew L.; HESS-PIERCE, Betty et al. HPLC–DAD–ESIMS Analysis of Phenolic Compounds in Nectarines, Peaches, and Plums. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, 49(10), 4748-4760 [cit. 2025-04-12]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf0104681>

37. SINKA, László Tamás a KOVÁCS-PAULUSZ, Nikolett. Spectrophotometric analysis of plum jams. Online. 2021 [cit. 2025-06-18]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/361503171\\_Spectrophotometric\\_analysis\\_of\\_plum\\_jams](https://www.researchgate.net/publication/361503171_Spectrophotometric_analysis_of_plum_jams)
38. WIJNGAARD, Hilde H.; TRIFUNOVIC, Olivera; BONGERS, Peter. Novel extraction techniques for phytochemicals. *Handbook of Plant Food Phytochemicals: Sources, Stability and Extraction*. 2013, 412-433 [cit. 2024-12-06]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9781118464717.ch18>
39. CONDE, E.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H. a PARAJÓ, J. C. Extraction of Natural Antioxidants from Plant Foods. Online. In: RIZVI, Syed S. H. (ed.). *Separation, Extraction and Concentration Processes in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2010, 506-537 [cit. 2025-03-21]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1533/9780857090751.2.506>
40. ZUORRO, Antonio; IANNONE, Annalaura a LAVECCHIA, Roberto. Water–Organic Solvent Extraction of Phenolic Antioxidants from Brewers’ Spent Grain. Online. *Processes*. 2019, 7(3) [cit. 2025-06-18]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pr7030126>
41. KIM, D.-O. a PADILLA-ZAKOUR, O.I. Jam Processing Effect on Phenolics and Antioxidant Capacity in Anthocyanin-rich Fruits: Cherry, Plum, and Raspberry. Online. *Journal of Food Science*. 2006, 69(9), S395-S400 [cit. 2025-03-22]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09956.x>
42. HAMEED, Ahsan; LIU, Ziyao; WU, Hanjing; ZHONG, Biming; CIBOROWSKI, Michal et al. A Comparative and Comprehensive Characterization of Polyphenols of Selected Fruits from the Rosaceae Family. Online. *Metabolites*. 2022, 12(3) [cit. 2025-06-21]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/metabo12030271>
43. MICHALACHE ARION, Cristina; TABART, Jessica; KEVERS, Claire; NICULAUA, Marius; FILIMON, Răzvan et al. Antioxidant potential of different plum cultivars during storage. Online. *Food Chemistry*. 2014, 146, 485-491 [cit. 2025-04-12]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.072>

44. KIM, Dae-Ok; CHUN, Ock Kyoung; KIM, Young Jun; MOON, Hae-Yeon a LEE, Chang Y. Quantification of Polyphenolics and Their Antioxidant Capacity in Fresh Plums. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, 51(22), 6509-6515 [cit. 2025-04-12]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf0343074>
45. KIM, Dae-OK; JEONG, Seung weon; LEE, Y. Chang; KIM. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*. 2003, 81(3), 321-326 [cit. 2024-11-07]. Dostupné z [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00423-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00423-5)
46. DAL-BÓ, Vanessa a FREIRE, José Teixeira. Effects of lyophilization on colorimetric indices, phenolics content, and antioxidant activity of avocado (*Persea americana*) pulp. Online. *Food Control*. 2022, 132 [cit. 2025-06-18]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108526>
47. ŽILIC, Slađana a GÖKMEN, Vural. Online. In: *Acrylamide in Food*. 2016, 197-213 [cit. 2025-04-12]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802832-2.00010-3>
48. PIGA, Antonio; DEL CARO, Alessandra a CORDA, Giampaola. From Plums to Prunes: Influence of Drying Parameters on Polyphenols and Antioxidant Activity. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, 51(12), 3675-3681 [cit. 2025-04-12]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf021207+>
49. OUCHEMOUKH, Salim; HACHOUD, Said; BOUDRAHAM, Hamou; MOKRANI, Abderrahmane a LOUAILECHE, Hayette. Antioxidant activities of some dried fruits consumed in Algeria. Online. *LWT - Food Science and Technology*. 2012, 49(2), 329-332 [cit. 2025-06-06]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.022>
50. MORELLI, Lucíula Lemos Lima a PRADO, Marcelo Alexandre. Extraction optimization for antioxidant phenolic compounds in red grape jam using ultrasound with a response surface methodology. Online. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2012, 19(6), 144-1149 [cit. 2025-05-05]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.03.009>

51. RABABAH, Taha M.; AL-MAHASNEH, Majdi A.; KILANI, Isra; YANG, Wade; ALHAMAD, Mohammad N. et al. Effect of jam processing and storage on total phenolics, antioxidant activity, and anthocyanins of different fruits. Online. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2011, 91(6), 1096-1102 [cit. 2025-06-18]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jsfa.4289>
52. OZZENGIN, Berat; ZANNOU, Oscar a KOCA, Ilkay. Quality attributes and antioxidant activity of three wild plums from *Prunus spinosa* and *Prunus domestica* species. Online. *Measurement: Food*. 2023, 10 [cit. 2025-06-18]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.meafao.2023.100079>
53. MAQBOOL, Mehdi; ZAHID, Noosheen; SHAD, Syed Zulfiqar Ali a HAMID, Abdul. Ethno-Horticultural and Physico-Chemical Characterization of Indigenous Fruit Species for Nutritional and Socio-Economic Uplift of Local Communities from District Poonch, Azad Jammu and Kashmir. Online. *Journal of Horticultural Science and Technology*. 2021, 4(3), 81-88 [cit. 2025-06-21]. Dostupné z: <https://doi.org/10.46653/jhst2143081>
54. JAISWAL, Rakesh; KARAKOSE, Hande; RUHMANN, Susanne; NEUMULLER, Michael; TREUTTER, Dieter et al. Identification of Phenolic Compounds in Plum Fruits (*Prunus salicina* L. and *Prunus domestica* L.) by High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry and Characterization of Varieties by Quantitative Phenolic Fingerprints. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013, 61(49), 12020–12031 [cit. 2025-04-08]. <https://doi.org/10.1021/jf402288j>
55. ZIXI, Lin; BINBIN, Li; MAOWEN, Liao; JIA, Liu; YAN, Zhou et al. The Physicochemical Attributes, Volatile Compounds, and Antioxidant Activities of Five Plum Cultivars in Sichuan. Online. *Foods*. 2023, 12(20) [cit. 2025-04-12]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods12203801>
56. ZHANG, Qin; ZHU, Shouliang; LIN, Xin; PENG, Junsen; LUO, Dengcan et al. Analysis of Volatile Compounds in Different Varieties of Plum Fruits Based on Headspace Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry Technique. Online. *Horticulturae*. 2023, 9(10) [cit. 2025-06-18]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/horticulturae9101069>

57. ŽNIDERŠIČ, Luka; MLAKAR, Anita a PROSEN, Helena. Development of a SPME-GC-MS/MS method for the determination of some contaminants from food contact material in beverages. Online. *Food and Chemical Toxicology*. 2019, 134 [cit. 2025-06-18]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110829>
58. PARASTAR, Hadi a WELLER, Philipp. Towards greener volatilomics: Is GC-IMS the new Swiss army knife of gas phase analysis? Online. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2024, 170 [cit. 2025-06-21]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117438>
59. YANG, Rui; ZHAO, Langhan; WANG, Wei; DU, Qingping; LI, Wei et al. Quality Assessment of Prune Jam with Different Concentration Methods Based on Physicochemical Properties, GC-IMS, and Intelligent Sensory Analysis. Online. *Foods*. 2025, 14(12) [cit. 2025-06-21]. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods14122084>
60. VRANÁ, Bc. Denisa. Optimalizace HPLC/MS/MS metody pro analýzu fenolických látek obsažených v amarantovém zrně. Pardubice, 2020. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.

## PŘÍLOHY

**Tabulka P1** – Průměrné hodnoty TEAC fenolických látek v extraktech

Číslo vzorku	TEAC [ $\mu\text{mol/g}$ ]
1	$17,9 \pm 0,36$
2	$19,5 \pm 0,41$
3	$11,5 \pm 0,25$
4	$12,3 \pm 0,17$
5	$4,70 \pm 0,07$
6	$4,1 \pm 0,13$
7	$12,8 \pm 0,44$
8	$11,9 \pm 0,35$
9	$9,5 \pm 0,27$
10	$8,8 \pm 0,14$
11	$7,73 \pm 0,09$
12	$6,59 \pm 0,03$

**Tabulka P2** – Průměrné hodnoty celkového množství fenolických látek v extraktech

Číslo vzorku	c [ $\text{mg/g}$ ]
1	$4,6 \pm 0,19$
2	$4,92 \pm 0,09$
3	$5,0 \pm 0,38$
4	$5,4 \pm 0,27$
5	$1,64 \pm 0,08$
6	$1,33 \pm 0,09$
7	$5,17 \pm 0,21$
8	$4,98 \pm 0,26$
9	$3,61 \pm 0,15$
10	$3,06 \pm 0,09$
11	$4,17 \pm 0,06$
12	$3,07 \pm 0,09$