

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOGNOZIE**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Antioxidační aktivita plodů různých kultivarů Sambucus nigra L.

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.

Konzultant: Ing. Aleš Matějček, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2014

Monika Nehybová

Tímto bych chtěla poděkovat paní Doc. RNDr. Jirině Spilkové, CSc. a paní RNDr. Anně Poláškové za odbornou konzultaci, ochotnou pomoc a trpělivost při vypracování této práce.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, 18.4.2014

Monika Nehybová

Obsah

1. Úvod.....	- 1 -
2. Zadání - cíl práce	- 3 -
3. TEORETICKÁ ČÁST	- 4 -
3.1. Sambucus nigra L.	- 4 -
3.1.1. Popis rostliny	- 4 -
3.1.2. Obsahové látky plodů	- 4 -
3.1.2.1. Flavonoidy	- 5 -
3.1.2.2. Antokyany	- 6 -
3.1.2.3. Hydroxyskořicové kyseliny.....	- 8 -
3.1.2.4. Vitamin C	- 8 -
3.1.2.5. Další obsahové látky.....	- 8 -
3.1.3. Využití plodů v lidové medicíně a jejich současné využití	- 9 -
3.1.4. Experimentální studie farmakologické aktivity	- 10 -
3.2. Volné radikály.....	- 11 -
3.2.1. Charakterizace	- 11 -
3.2.2. Příznivý vliv volných radikálů.....	- 11 -
3.2.3. Poškození biomolekul.....	- 11 -
3.2.4. Ochrana před volnými radikály	- 12 -
3.2.5. Měření antioxidační aktivity antokyanů	- 13 -
3.2.5.1. DPPH metoda	- 13 -
3.2.5.2. ABTS metoda	- 14 -
3.2.5.3. ORAC metoda	- 14 -
3.2.5.4. FRAP metoda	- 15 -
3.2.5.5. Metoda β -karoten/linolová kyselina.....	- 15 -
3.2.5.6. Fotochemiluminiscenční metoda.....	- 16 -
3.2.5.7. Elektrochemická metoda	- 16 -
3.2.5.8. Buněčná antioxidační aktivita	- 16 -
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 18 -
4.1. Chemikálie.....	- 18 -

4.2.	Přístroje.....	- 18 -
4.3.	Rostlinný materiál.....	- 19 -
4.4.	Stanovení antokyanů pH-diferenční metodou – AUC.....	- 19 -
4.4.1.	Příprava zásobního roztoku	- 19 -
4.4.2.	Příprava kalibračních roztoků.....	- 19 -
4.4.3.	Kalibrační graf.....	- 19 -
4.4.4.	Stanovení antokyanů.....	- 20 -
4.5.	Stanovení antioxidační aktivity	- 21 -
4.5.1.	Izolace antokyanů z plodů	- 21 -
4.5.1.1.	Materiál.....	- 21 -
4.5.1.2.	Postup extrakce plodů.....	- 21 -
4.5.1.3.	Zbytek po vysušení extraktů.....	- 22 -
4.5.2.	Příprava roztoku DPPH	- 22 -
4.5.3.	Postup stanovení	- 22 -
4.5.4.	Příprava slepého vzorku.....	- 22 -
4.5.5.	Měření absorbance	- 22 -
4.6.	Výsledky	- 24 -
4.6.1.	Stanovení antokyanů pH-diferenční metodou - AUC.....	- 24 -
4.6.1.1.	Kalibrační roztoky.....	- 24 -
4.6.1.2.	Kalibrační graf.....	- 24 -
4.6.1.3.	Stanovení antokyanů	- 25 -
4.6.2.	Stanovení antioxidační aktivity	- 31 -
4.6.2.1.	Antokyanové extrakty	- 31 -
4.6.2.2.	Zbytek po vysušení extraktů.....	- 31 -
4.6.2.3.	Antioxidační aktivita	- 32 -
	– Závislost antioxidační aktivity antokyanových extraktů z plodů na koncentraci.....	- 32 -
	– Zjištění hodnoty inhibiční koncentrace IC ₅₀	- 39 -
5.	Diskuse.....	- 53 -
6.	Závěr	- 56 -

7.	Abstrakt.....	- 57 -
8.	Abstract.....	- 58 -
9.	Použité zkratky	- 59 -
10.	Použitá literatura	- 60 -

1. Úvod

Fytoterapie je odjakživa součástí medicíny a i v dnešní době v ní má své důležité místo. Pacienti, ať už se jedná o těhotné, kojící, děti nebo seniory, často raději dávají přednost přírodním rostlinným přípravkům před přípravky syntetickými. V poslední době navíc roste zájem o tradiční a alternativní medicínu, jako je třeba tradiční čínská medicína, homeopatie, a i v rámci těchto postupů se využívají rostlinné přípravky. Části rostlin nebo jejich izolované účinné látky se v různých formách používají vnitřně nebo zevně při akutních i chronických zdravotních problémech. Druh *Sambucus nigra* L. se v evropské tradiční medicíně využíval a využívá dodnes. K používaným částem této rostliny patří hlavně květy a plody například ve formě čajů, nálevů nebo extraktů. Obsahové látky těchto částí jsou flavonoidy, hydroxyskořicové kyseliny, silice, dále v květech triterpeny a v plodech vitamin C a antokyany. (1, 2) Antokyany, flavonoidy, hydroxyskořicové kyseliny a vitamin C vykazují antioxidační účinky, a tento fakt je důvodem, proč se v poslední době studuje pozitivní vliv černého bezu na lidské zdraví.

V souvislosti s životním stylem a civilizačními onemocněními se stále více řeší problematika oxidačního stresu spojená s tvorbou volných radikálů a jejich dopadem na zdraví člověka. Volné radikály mají pro organismus jak prospěšné účinky, tak účinky škodlivé. Jakmile škodlivé účinky převažují, vznikají onemocnění a stavy, jako je například ateroskleróza, rakovina, zánět nebo stárnutí. Lidský organismus disponuje různými systémy, kterými se umí s volnými radikály vypořádat. Fungují jako takzvané antioxidanty, které působí proti oxidačním účinkům volných radikálů a samy se oxidují na stabilní nebo méně škodlivé sloučeniny. Antioxidanty mohou být i přírodního původu a jejich účinek je umožněn chemickou strukturou, většinou se jedná o (poly)fenolické látky. Tyto antioxidanty jsou také součástí lidské potravy. Můžeme je najít v ovoci, zelenině nebo víně. V současné době se intenzivně studují přírodní zdroje antokyanů jako antioxidantů. Mezi tyto zdroje patří různé plody, zejména typu bobule, listy a květy.

Jedním ze studovaných zdrojů jsou právě plody černého bezu. Jsou významným zdrojem antokyanů, které jim dávají intenzivní fialovočerné zbarvení. V dostupné literatuře můžeme najít studie zabývající se *in vitro* antioxidační aktivitou plodů nebo extraktů z plodů. Existuje mnoho metod, kterými se antioxidační aktivita měří. Jsou

založené na tvorbě volného radikálu a následně se měří, jakou měrou účinné látky tyto volné radikály inhibují. Výsledky se vyjadřují v různých jednotkách a vztahují se k různým standardům, proto není možné výsledky různých metod vzájemně porovnávat. Existují i metody, které umožňují měřit antioxidační aktivitu na izolovaných buňkách. Jedná se o buňky lidské nebo myší.

Antioxidační účinky antokyanů se prokázaly *in vitro* i na izolovaných buňkách. Ze studií je známo, že se antokyany po příjmu z potravy vstřebávají a zvyšují antioxidační kapacitu plazmy. (3) Další studie je však potřeba provést za účelem určení míry vstřebávání těchto antioxidačních látek a zjištění, jestli jsou tyto látky účinné *in vivo* u člověka, a jaká by byla optimální dávka pro terapeutické účely.

2. Zadání - cíl práce

Cílem této práce je stanovit antioxidační aktivitu extraktů z plodů různých kulturních odrůd druhu *Sambucus nigra* L. metodou využívající DPPH. Dále stanovit obsah antokyanů v extraktu a zjistit, jestli je korelace mezi obsahem antokyanů a antioxidační aktivitou.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. *Sambucus nigra* L.

3.1.1. Popis rostliny

Černý bez, *Sambucus nigra* L., patří do čeledi Sambucaceae (4), resp. Adoxaceae (5). Roste zejména na hlubokých vlhkých humózních půdách, které jsou bohaté na dusík, například podél komunikací, potoků, na rumištích, ve světlých listnatých a lužních lesích. Ve většině případů je to keř vysoký 1,5 - 5,0 metrů, málokdy se jedná o strom, kdy může dorůst až 10 metrů. (6) Mladé větve jsou holé, případně s krátkými chlupy, proto jsou barvy zelené až šedozelené. S přibývajícím věkem jsou pak barvy šedozelené až šedohnědé díky rozbrázděné borce. Listy jsou lichozpeřené s řapíkatou čepelí eliptického nebo vejčitého tvaru. Květenství vyrůstá v chocholících a květy jsou bílé až slabě nažloutlé barvy a vonné. Plodenstvím, lidově známým jako „bezinky“, jsou lesklé kulovité peckovice o průměru asi 5 - 8 mm, které mají černou až černofialovou barvu. Semena jsou žlutohnědá, vejcovitého tvaru o rozměrech 3 - 4 mm na délku a 2 mm na šířku. (6) V Evropě se pěstuje několik kultivarů bezu, nejvíce kultivar „Haschberg“, zejména pro jeho plody. (7)

3.1.2. Obsahové látky plodů

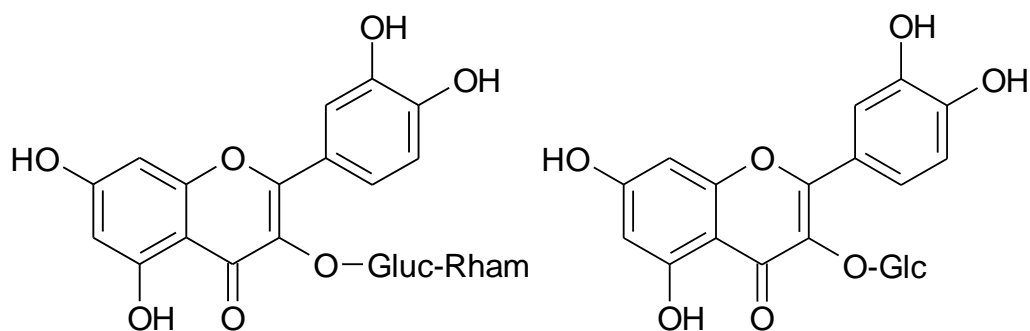
Z primárních metabolitů obsahují plody černého bezu cukry a organické kyseliny. Cukry jsou zastoupeny fruktózou, glukózou a v malém množství i sacharózou. Organické kyseliny jsou nejvíce zastoupeny kyselinou citrónovou, jablečnou a v menším množství šikimovou a fumarovou. Ze sekundárních metabolitů jsou v největším množství přítomny antokyany založené na cyanidinu. Dále jsou v plodech flavonoidy. (1, 7, 8) Z dalších polyfenolických látek nacházíme hydroxyškořicové kyseliny. (8, 9) Plody černého bezu také obsahují vitamin C. (1) Biologicky aktivní látky obsahují i semena. Můžeme v nich najít olej, ve kterém jsou zastoupené mastné kyseliny jako linolová, olejová, linolenová a myristová, dále vitamin E ve formě α a γ - tokoferolu. Z fenolických sloučenin jsou v semenech také antokyany, flavonoidy a elagová kyselina. (10) Semena navíc obsahují kyanogenní glykosidy sambunigrin, prunasin, zierin a holocalin. (1)

Mezi látky s antioxidační aktivitou patří flavonoidy, antokyany, hydroxyskořicové kyseliny a vitaminy C a E.

3.1.2.1. Flavonoidy

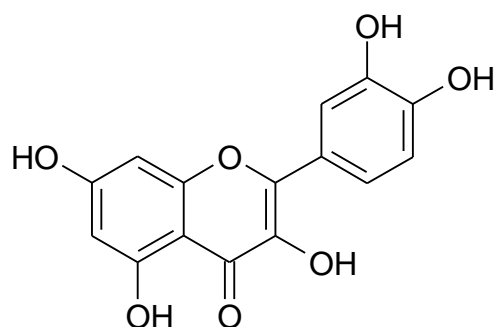
Z flavonoidů obsahují plody černého bezu rutin, isokvercetin, kvercetin, hyperosid a kempferol. (1, 7, 8) Struktury hlavních flavonoidů jsou na *Obrázku 1*. Flavonoidy jsou nejvíce rozšířenou skupinou rostlinných fenolických látek a lze je najít ve všech částech rostlin. (11) Jedná se o širokou skupinu látek, která je charakterizovaná společnou strukturou benzo- γ -pyronu. Skelet heterocyklu je stejný a jednotlivé sloučeniny se pak liší substituenty jako je hydroxyl a metoxyl. Obecně jsou všechny flavonoidy deriváty 2-fenylchromonu složeného ze tří kruhů odvozených od fenolu s označením A, B, C. Vzhledem ke struktuře pak mají tyto sloučeniny různé biologické vlastnosti. (11, 12) Hlavní zdroje těchto látek v lidské potravě jsou ovoce, zelenina, víno a čaj. Nejhojněji jsou v potravě zastoupené flavonoly, zejména tři nejběžnější kvercetin, kempferol a myricetin. (11)

Obrázek 1: Hlavní flavonoidy obsažené v plodech černého bezu



rutin (kvercetin-3-rutinosid)

isokvercetin (kvercetin-3-O-glukosid)



kvercetin

Flavonoidy v rostlinách chrání mladé listy před UV zářením, působí jako antioxidanty, enzymové inhibitory, prekurzory toxických látek nebo ochrana před patogeny. Také se podílejí například na kontrole růstu a vývoji rostlin a jejich hormonů. (11)

Flavonoidy mají důležité farmakologické vlastnosti, díky kterým by se mohly využívat v různých oblastech současné medicíny. Vykazují antioxidační, antialergický, protizánětlivý, antidiabetický, hepato- a gastroprotektivní efekt, antivirový a antineoplastický efekt. Jejich antioxidačním vlastnostem byla věnována největší pozornost. (11, 13)

Denní příjem flavonoidů v potravě se podle odhadů pohybuje od 100 do 1000 mg. Přitom se biodostupnost jednotlivých flavonoidů liší vzhledem ke zdroji v potravě a je závislá také na vstřebávání v trávicím traktu. (11)

3.1.2.2. Antokyany

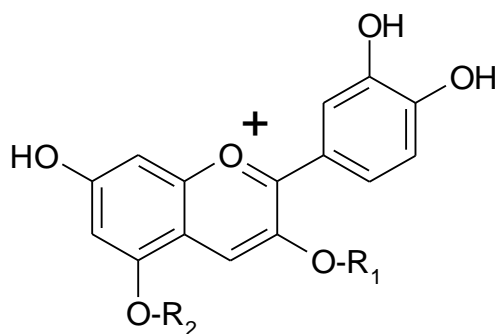
Hlavními antokyany přítomnými v plodech černého bezu jsou cyanidin 3-glukosid, cyanidin 3-sambubiosid, cyanidin 3-sambubiosid-5-glukosid a cyanidin 3,5-diglukosid. (1, 7, 8) Přehled zástupců hlavních antokyanů je na *Obrázku 2*. Dále v plodech v menším množství nacházíme cyanidin 3-rutinosid, pelargonidin 3-glukosid a pelargonidin 3-sambubiosid. (7, 8, 9, 14)

Antokyany jsou nejdůležitější ve vodě rozpustné rostlinné pigmenty. Jsou tedy zodpovědné za širokou škálu barev různých druhů ovoce, zeleniny a rostlin. Antokyany jsou zastoupeny také v rostlinné potravě, a proto se v poslední době studuje jejich vliv na lidský organizmus. (15) Izolované antokyany jsou ale velmi nestabilní. Vlivem pH,

teploty skladování, působením světla, kyslíku a rozpouštědel a přítomností enzymů a iontů kovů se rozkládají. (15, 16)

Z chemického hlediska se jedná o glykosidy polyhydroxy a polymetoxy derivátů vyskytující se jako soli 2-fenylbenzopyrylia, neboli flavyliové soli. Základem je tedy antokyanidin, ve vyšších rostlinách můžeme nejčastěji najít cyanidin, pelargonidin, peonidin, malvinidin, petunidin a delphinidin. V přírodě pak nejvíce nacházíme glykosidy cyanidinu, delphinidinu a pelargonidinu. Antokyany jsou z 80% přítomné v listech, z 69% v plodech a 50% v květech. Nejrozšířenějším antokyanem je cyanidin 3-glukosid. (17) Kromě glykosidicky vázané glukózy v antokyanech nacházíme i galaktózu, ramnózu a arabinózu. (12)

Obrázek 2: Zástupci hlavních antokyanů obsažených v plodech černého bezu



$R_1 = \text{glukóza}, R_2 = \text{OH}$	cyanidin 3-glukosid
$R_1 = \text{xylóza}, \text{glukóza}, R_2 = \text{OH}$	cyanidin 3-sambubiosid
$R_1, R_2 = \text{glukóza}$	cyanidin 3,5-diglukosid
$R_1, R_2 = \text{xylóza}, \text{glukóza}$	cyanidin 3,5-diglukosid

Antokyany určují především barvu rostlin a jejich produktů a hrají tak velkou roli jako atraktanty pro zvířata, čímž je zajištěna rostlinná reprodukce. V rostlině mohou antokyany plnit také funkci antioxidantů, antimikrobiálních látek a působit jako ochrana před patogeny. (17, 18)

Mnoho studií se věnovalo plodům s vysokým obsahem antokyanů a ukázalo se, že antokyany velkou měrou přispívají k antioxidační aktivitě *in vitro* a hrají důležitou roli při oxidačním stresu spojeném s chronickými onemocněními *in vivo*. (17, 18) Proto také příjem potravy bohaté na antokyany vykazuje potenciální zdraví prospěšné účinky

při onemocnění a stavech jako je rakovina, stárnutí, neurologické poruchy, zánět, diabetes, ale i bakteriální infekce. (18) Dále antokyany vykazují v testech na zvířatech a *in vitro* příznivé účinky při kardiovaskulárních onemocněních. Pozitivní vliv polyfenolických látek na krevní lipidy a protizánětlivé vlastnosti těchto látek snižují riziko vzniku aterosklerózy. Antokyany také vykazují antitrombotické vlastnosti, dlouhodobé podávání stravy bohaté na antokyany zmírnilo poškození myokardu po ischemii a opětovné perfuzi u potkanů. (19)

3.1.2.3. Hydroxyskořicové kyseliny

V plodech černého bezu je zastoupená chlorogenová a p-kumarová kyselina. (8, 9) Jedná se o sloučeniny odvozené od katecholu, které můžeme najít v ovoci, zelenině, čaji, kávě a víně. Tyto látky vykazují protizánětlivé, antimutagenní a antikancerogenní účinky. Nejvíce je však pozornost věnovaná jejich antioxidačním vlastnostem, které byly prokázány *in vitro*. V přírodě je nejvíce zastoupená chlorogenová kyselina. (20)

3.1.2.4. Vitamin C

Ve 100 g čerstvých plodů černého bezu je asi 18 mg vitamínu C. (1) Vitamin C je ve vodě rozpustný antioxidant a má v rostlinách různé důležité funkce. Například přispívá ke správné funkci buněčného redoxního systému a zajišťuje tak průběh fotosyntézy, dále také chrání rostlinu před reaktivními formami kyslíku vznikajícími například během slunečního záření, čímž brání oxidačnímu poškození rostliny. Navíc reguluje buněčné dělení, kvetení a jako kofaktor se účastní enzymatických reakcí. (21)

Vitamin C je i důležitou součástí potravy člověka. Je nezbytný pro syntézu karnitinu a kolagenu a umožňuje vstřebání nehemového železa z rostlinné potravy. Doporučená denní dávka vitamínu C u dospělého muže je 90 mg a u ženy 75 mg. (21)

3.1.2.5. Další obsahové látky

V malém množství nacházíme v plodech černého bezu další fenolické látky a to proantokyanidiny. Chemicky jsou to oligomery nebo polymery flavan-3-olu. I tyto látky přispívají k celkové antioxidační aktivitě plodů černého bezu. (14) V testech na zvířatech a *in vitro* se prokázaly příznivé účinky proantokyanidinů na kardiovaskulární systém. Proantokyanidiny mají vasodilatační účinky díky působení na endogenní NO

syntázu. (19) Dále jsou v plodech zastoupeny vitamin B₂, ve 100 g čerstvých plodů asi 65 mg, a kyselina listová, ve 100 g čerstvých plodů asi 17 mg. (1) V literatuře jsou zmínky také o přítomnosti lektinů v plodech černého bezu. (1, 2)

3.1.3. Využití plodů v lidové medicíně a jejich současné využití

Už v roce 400 př. n. l. Hippokrates poukazoval na léčebné účinky černého bezu. Dále lékaři, jako například Galén, pokládali rostlinu za velmi dobrý prostředek k podpoře hojení. Před objevením antibiotik byly plody černého bezu hlavní přísadou přípravků k léčení bakteriálních onemocnění. V lidové medicíně se dnes plody černého bezu používají nejčastěji ve formě extraktů používaných k léčení nachlazení, chřipky a herpetických infekcí. Také jsou jako doplněk doporučovány, spolu s dalšími antioxidanty jako vitamin C a zinek, k podpoře přirozeného procesu regenerace. (22)

Tradičně se čaje, džemy, šťávy a sirupy z plodů černého bezu užívají vnitřně při virových infekcích, horečce, chřipce, infekcích respiračního traktu, gastrointestinálních onemocněních a zevně při kožních problémech. (23) V rámci lidové medicíny se plody dále využívají hlavně na přípravu šťávy, bezinkových vín nebo povidel a zavařenin. V potravinářském průmyslu se šťáva získaná z plodů používá k dobarvování potravinářských výrobků a vín. (6)

Vzhledem k obsahovým látkám, kyanogenním glykosidům, ale může požití syrových nebo nedostatečně tepelně zpracovaných plodů vést k nevolnosti a vyvolat zvracení. (1) Nežádoucí účinky mohou vyvolat i lektiny, které jsou údajně v plodech obsaženy. (2)

V současné době se využívají diaforetické, diuretické nebo laxativní účinky plodů. (1)

Extrakt z plodů je ve fytofarmacích dostupný jako barvivo i účinná látka, například v sirupech proti nachlazení. (5) Z potravních doplňků je na našem trhu například sirup Sambucus Immune® firmy Nature's way®. Sirup obsahuje standardizovaný extrakt z plodů druhu *Sambucus nigra* L., dále vitamin C, zinek a propolis. Přípravek je určen k podpoře obranyschopnosti v období chřipek a nachlazení. (24)

3.1.4. Experimentální studie farmakologické aktivity

Několik studií se věnovalo léčebným účinkům plodů černého bezu. V jedné studii autoři prokázali *in vitro* antibakteriální účinky a dále i účinky proti kvasinkám. Metanolové extrakty z plodů černého bezu, které obsahovaly antokyany, vitaminy A, C, B₆, steroly, vápník, železo a taniny, potlačovaly růst bakterií *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* a *Escherichia coli* a kvasinek druhu *Candida albicans*. Autoři také stanovili minimální inhibiční koncentrace (MIC) a neúčinnější byly extrakty v inhibici růstu *Candida albicans*, pak *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* a *Escherichia coli* a nakonec *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus*. (3) V další studii autoři také prokázali *in vitro* antibakteriální a navíc i antivirové účinky extraktu z plodů. Extrakty působily proti gram pozitivním bakteriím *Streptococcus pyogenes* a skupinám C a G, gram negativním bakteriím *Branhamella catarrhalis* a lidským virům chřipky. V buněčných kulturách extrakty bránily šíření virů chřipky kmene A a B. Extrakty z plodů černého bezu by tak mohly být jako doplňující prostředek používány při léčení bakteriálních onemocnění horních cest dýchacích nebo chřipkových onemocnění. (22) Metanolové extrakty plodů také vykazují protizánětlivé účinky. (23) Studie na potkanech, u kterých byl chemickou látkou navozen diabetes (stav hyperglykémie), prokázala příznivé účinky polyfenolických látek obsažených v extraktu z plodů druhu *Sambucus nigra* L. Přesné složení extraktu nebylo specifikováno. Po podání extraktu se zvýšila původně snížená antioxidační kapacita séra, klesla zvýšená koncentrace malondialdehydu, produktu oxidačního poškození lipidů, a zlepšil se stav osteoporózy, která se objevuje jako následek dlouhodobého působení diabetu. Tyto výsledky ukazují, že by polyfenolické látky v extraktech mohly zmírňovat pozdní komplikace diabetu u lidí. (25)

Biologické účinky plodů černého bezu vycházejí především z obsahu látek s antioxidačními účinky. Jedná se hlavně o antokyany, které po vstřebání zvyšují antioxidační kapacitu plazmy a mají další výše zmíněné účinky. (3)

Vzhledem k nedostatečným farmakologickým a klinickým údajům o léčebných účincích u člověka však není dostupné žádné léčivo s definovanou indikací. (1)

3.2. Volné radikály

3.2.1. Charakterizace

Jedná se o látky, které vznikají z normální částice tak, že uvolní nebo přijmou jeden elektron nebo vznikají homolytickým štěpením. Tím v jejich elektronovém obalu vzniká jeden nebo více nepárových elektronů. Volné radikály mohou samostatně existovat, ale jsou velmi reaktivní, protože mají tendenci doplnit elektron ke vzniku stabilní konfigurace. Podle původu mohou být exogenní (kouření, UV záření, metabolismus alkoholu, a další) nebo endogenní (reperfuze po ischemii, zánět, hyperglykémie, a další). (26)

V organismu se setkáváme s reaktivními formami různých atomů, nejčastěji kyslíku (ROS), dále dusíku (RNS). Z reaktivních forem kyslíku se nejvíce vyskytuje superoxidový radikál ($O_2^{\bullet -}$), nejreaktivnější a tedy nejvíce nebezpečný je hydroxylový radikál ($\bullet OH$). Mezi reaktivní formy dusíku patří například oxid dusnatý ($\bullet NO$) nebo peroxyinitrit ($OONO\bullet$). Tyto sloučeniny reagují mezi sebou i s dalšími látkami a vzniká tak řetězová reakce, která se zastaví vznikem stabilních radikálů nebo spojením dvou radikálů. S reaktivními formami kyslíku snadno reagují i atomy kovů, jako jsou například železo, měď, nikl nebo mangan. (26)

3.2.2. Příznivý vliv volných radikálů

Volné radikály zastupují pro organismus i důležité funkce. Například kyselina chlorná (HOCl), jako reaktivní forma kyslíku, je potřeba ke zničení mikroorganismů, které byly fagocytovány. Hydroxylový radikál ($\bullet OH$) se využívá při biosyntéze látek, jako jsou žlučové kyseliny nebo cholesterol, dále je potřeba k detoxikaci cizorodých látek, mimo jiné i léků. Štítná žláza potřebuje jód k syntéze hormonů. Jód vzniká z jodidu jeho oxidací, která je umožněna působením peroxidu vodíku (H_2O_2). Důležitý je i oxid dusnatý (NO), který má vasodilatační účinky, dále působí jako neurotransmitter a podílí se na regulaci imunitních procesů a uplatňuje se i při erekci. (26)

3.2.3. Poškození biomolekul

Reaktivní formy kyslíku způsobují poškození buněk tím, že poškozují jejich struktury, jako jsou proteiny, lipidy a DNA. Buňku nejvíce ohrožuje působení volných

radikálů na fosfolipidy v buněčné membráně, což může vést až k zániku buňky. Působení volných radikálů na DNA je spojeno s mutagenezí, karcinogenezí nebo i buněčným zánikem. Působení na proteiny vede k poškození enzymů a dalších biologicky důležitých proteinů. S tímto negativním působením je spojený vznik onemocnění, jako je například ateroskleróza, revmatoidní artritida, zánětlivé procesy, rakovina, poškození tkání po reperfuzi nebo proces stárnutí. (26, 27)

3.2.4. Ochrana před volnými radikály

Látky, které chrání organismus před působením volných radikálů, se nazývají antioxidanty. Název vyplývá ze skutečnosti, že volné radikály působí oxidačně a antioxidanty tomuto působení zabraňují. Mohou tak působit tím, že zabraňují vzniku volných radikálů, odstraňují volné radikály nebo odstraňují molekuly již poškozené volnými radikály. Mechanismem zabránění vzniku volných radikálů působí například transportní a zásobní bílkoviny pro vazbu přechodných kovů jako jsou třeba Fe^{2+} nebo Cu^+ . Dále vitaminy C a E působí mechanismem odstranění volných radikálů tak, že se samy mění na stabilnější a méně nebezpečné radikály, mají tedy redukční účinky. Mechanismem odstranění již poškozených molekul působí endonukleázy, které jsou schopné opravit poškozenou DNA. Za normálních podmínek je mezi antioxidanty a volnými radikály v organismu rovnováha. Pokud volné radikály převažují, vznikají onemocnění uvedená v předchozí kapitole. (26)

Antioxidanty, které je lidský organismus schopný produkovat nebo přijímat v potravě, jsou přirozené. Patří sem například enzymové antioxidanty jako superoxidodismutáza odstraňující superoxidový radikál, dále bílkoviny s thiolovými skupinami (-SH), jako albumin, které působí redukčně, také některé vitaminy a polyfenolické látky, v neposlední řadě i antokyany, které jsou přirozenými antioxidanty. (26) Antioxidační aktivita flavonoidů, včetně antokyanů, je umožněna jejich chemickou strukturou díky přítomnosti dvojných vazeb a hydroxylových skupin. Kruh B těchto sloučenin je snadno oxidovatelný a po reakci se otevírá. Molekuly flavonoidů tedy snadno reagují s volnými radikály za vzniku fenolických radikálů, které jsou velmi stabilní. Dále jsou jejich antioxidační účinky zprostředkovány tím, že mohou vázat ionty přechodných kovů, podílejí se na regeneraci vitamínu E a C nebo inhibují enzymy, které umožňují vznik volných radikálů. (11, 26)

3.2.5. Měření antioxidační aktivity antokyanů

Antioxidační aktivita antokyanů a na obsah antokyanů bohatých extraktů se dá stanovit několika metodami. Jednou z nejvíce používaných je metoda s využitím volného radikálu difenylpicrylhydrazylu, DPPH[•]. Dále se může zjišťovat dalšími metodami jako je ABTS, ORAC, FRAP, metoda β-karoten/linolová kyselina, chemiluminiscence, elektrochemická nebo buněčná antioxidační aktivita.

Tyto užívané metody shrnuje následující přehled.

3.2.5.1. DPPH metoda

DPPH metoda je jednou z běžně používaných metod pro měření antioxidační aktivity rostlinných extraktů. Jedná se o jednoduchý postup založený na spektrofotometrickém měření změny koncentrace DPPH[•] po reakci DPPH[•] s antioxidantem v měřeném roztoku. Reakce probíhá nejčastěji při laboratorní teplotě a bez přístupu světla. Tato metoda předpokládá, že antioxidant se chová jako donor vodíku. Po reakci s antioxidantem se změní barva radikálu DPPH[•] z fialové na žlutou, kdy vzniká DPPH-H. Míru antioxidační aktivity extraktu vyjadřuje množství nezreagovaného DPPH[•]. Pro porovnání antioxidačních aktivit různých látek se vychází z jejich hodnoty IC₅₀, koncentrace extraktu, která je potřeba k inhibici 50% na začátku reakce přítomného radikálu DPPH[•]. (28, 29, 30)

Tato metoda byla použita v mnoha studiích pouze s mírnými modifikacemi, které se týkají doby průběhu reakce, koncentrace DPPH[•], reakčního prostředí nebo pH zkoušeného roztoku. (31) Reakční doba je většinou od 1 do 60 minut, než se systém ustálí a reakce již neprobíhá. Průběh reakce také závisí na zvoleném rozpouštědle. Metanolvý roztok DPPH[•] vykazuje vyšší citlivost při měření absorbance než etanolvý. (28, 31)

Ve studiích většinou autoři volili metanolvý roztok DPPH[•]. Při vlnové délce 515, 517 nebo 520 nm měřili antioxidační aktivitu extraktů z plodů černého bezu, rybízu, borůvky, kdy reakci nechali probíhat 20 minut, aronie (černého jeřábu), kdy reakce trvala 5 případně 10 minut, maliny nebo kaliny, kdy měřili absorbanci každou minutu po dobu 60 minut. (8, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38) Naproti tomu etanolvý roztok volili při měření antioxidační aktivity extraktů z plodů moruše, kdy nechali reakci probíhat 30 minut a poté měřili absorbanci při vlnové délce 517 nm. Dále při měření

extraktů z plodů borůvky, kdy reakce probíhala 10 minut, a měřili při vlnové délce 490 nm. (30, 39)

Jako standard, ke kterému se vztahuje antioxidační aktivita měřené látky, se volí kyselina askorbová nebo butylhydroxytoluen. (32) Dále v některých studiích volili jako standard Trolox, například při měření antioxidační aktivity extraktů z plodů açaí nebo jahody. (40, 41)

Pro stanovení antioxidační aktivity extraktů z plodů borůvky autoři použili spojení DPPH metody s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií HPLC. Roztoky DPPH[•] i antokyanů vykazují silnou absorbanci při vlnových délkách 500 - 550 nm. Toto stanovení je přesnější, protože dokáže lépe zachytit malé změny absorbance těchto roztoků, než samotná DPPH metoda. Po smíchání metanolového roztoku DPPH[•] a různých koncentrací roztoku antokyanů autoři nechali směs 20 minut reagovat a poté analyzovali pomocí HPLC. Absorbanci měřili při vlnové délce 517 nm a antioxidační aktivitu stanovili na základě HPLC analýzy z rozdílu ploch pod křivkou peaků kontrolního roztoku DPPH[•] a měřeného vzorku. (35)

3.2.5.2. ABTS metoda

Tato metoda využívá volný radikál ABTS[•], jehož roztok se v přítomnosti antioxidantu odbarví. Radikál ABTS[•] vzniká reakcí vodného roztoku peroxidisíranu draselného a roztoku ABTS, ke stanovení antioxidační aktivity se pak zásobní roztok ABTS[•] naředí etanolem. Antioxidační aktivita měřených látek se vztahuje ke standardu Troloxu, proto se také tato metoda jinak nazývá TEAC. (29, 39)

Měření absorbance roztoku autoři ve studiích nejčastěji volili při vlnové délce 734 nebo 732 nm a reakční směs nechali působit nejčastěji od 4 do 10 minut, někdy až 40 minut. Tyto parametry zvolili při měření antioxidační aktivity extraktů z plodů černého bezu, moruše, maliny, černého rybízu a kaliny. (34, 37, 38, 39, 42) Při měření roztoků z plodů borůvky nebo aronie (černého jeřábu) volili vlnovou délku 750 nm. (30)

3.2.5.3. ORAC metoda

Další z metod používaných ke stanovení antioxidační aktivity rostlinných extraktů je metoda, kterou se měří schopnost antokyanů vychytávat peroxylový radikál. Reakční roztok se připravuje ze zásobního roztoku fluoresceinu ve fosfátovém pufru

přidáním extraktu nebo Troloxu. K vytvoření volného radikálu se do směsi přidává 2,2'-azobis-2-amidinopropan. Jako antioxidační standard se používá Trolox. (40)

Ve studii zabývající se antioxidační aktivitou extraktů z plodů açaí měřili autoři fluorescenci při excitační vlnové délce 485 nm a emisní vlnové délce 535 nm každou minutu, dokud reakce nepřestala probíhat. Za stejných podmínek měřili antioxidační aktivitu extraktů z plodů třešňí a malin. (40, 43, 44) Fluorescenci extraktů z plodů černého rybízu měřili při vlnových délkách 485 nm a 520 nm každé 2 minuty po dobu 4 hodin. Při stejných vlnových délkách měřili fluorescenci extraktů z plodů angreštu, moruše nebo kaliny. (34, 38, 45, 46)

3.2.5.4. FRAP metoda

Principem této metody je schopnost antioxidačních látek redukovat železité Fe^{3+} ionty na ionty železnaté Fe^{2+} doprovázená změnou barvy reakčního roztoku ze žluté na modrou, kdy se tvoří komplex Fe^{2+} a 2,4,6-tripyridyl-s-triazinu (TPTZ). Změna barvy roztoku je zaznamenána spektrofotometricky. (29)

Při využití této metody ve studiích připravovali reakční roztok z octanového pufru, roztoku TPTZ v kyselině chlorovodíkové a roztoku $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. K této směsi poté přidali rostlinný extrakt. Absorbanci nejčastěji měřili při vlnové délce 593 nm. Tento postup zvolili při měření extraktů z plodů černého bezu, kaliny, jahody, borůvky a ostružiny. Absorbanci 595 nm volili v jedné studii při měření extraktů z plodů aronie (černého jeřábu) a borůvky. Reakční roztok nechali většinou reagovat od 4 minut až do 30 minut. Jako standard volili Trolox nebo FeSO_4 , někde vztahovali antioxidační aktivitu k oběma sloučeninám. (30, 33, 38, 41, 47, 48)

3.2.5.5. Metoda β -karoten/linolová kyselina

Další z metod využívajících spektrofotometrické měření je založená na schopnosti antioxidačních látek extraktu snižovat oxidační ztráty β -karotenu v systému β -karoten/linolová kyselina. Ve studiích využívajících tuto metodu připravovali měřený roztok z β -karotenu rozpuštěného v chloroformu, linolové kyseliny a Tweenu 40 nebo 20. Po odpaření chloroformu směs smíchali s destilovanou vodou a přidali k rostlinnému extraktu. Absorbanci měřili při vlnové délce 470 nm ihned po přípravě

roztoku. Pak měřili v 15 minutových intervalech, dokud se β -karoten neodbarvil. (32, 49)

Při měření antioxidační aktivity touto metodou u extraktů z plodů černého bezu jako kontrolní roztok zvolili stejné složení jako u měřeného roztoku, jen místo extraktu přidali metanol, slepý roztok pak připravili ještě bez přidání β -karotenu. Při měření antioxidační aktivity plodů goji nechali reakční roztok reagovat 50 minut a poté měřili absorbanci. Kontrolní roztok měl stejné složení jako měřený, jen obsahoval butylhydroxytoluen místo účinných látek z plodů. (32, 42, 49)

3.2.5.6. Fotochemiluminiscenční metoda

Principem této metody je tvorba volných radikálů fotochemickou reakcí a zároveň jejich detekce pomocí chemiluminiscence. Pro detekci volných kyslíkových radikálů se využívá chemiluminiscenční detekční činidlo luminol. Tuto metodu lze použít pro měření antioxidační aktivity v hydrofilním nebo lipofilním prostředí. (50)

Metodu využili autoři při měření antioxidační aktivity suchých extraktů plodů černého bezu. Standardem pro měření byl Trolox. (51)

3.2.5.7. Elektrochemická metoda

Velké množství antioxidantů díky svým redukčním schopnostem vykazuje v roztoku přirozenou elektroaktivitu, proto lze k měření jejich antioxidační aktivity využít elektrochemickou metodu. Používá se voltametrie, která využívá snadné oxidovatelnosti antioxidantů, kdy se na elektrody přivádí napětí a dochází tak k oxidaci těchto látek. Oxidace při nižším napětí a vyšší oxidační peaky na voltamogramu znamenají větší antioxidační aktivitu. (52)

Touto metodou autoři měřili antioxidační aktivitu šťávy z plodů černého rybízu a jahody. (52) Dále ji autoři použili při měření extraktů z plodů vinné révy a maliny. Jako standard zvolili kyselinu askorbovou. (53)

3.2.5.8. Buněčná antioxidační aktivita

Metoda využívá lidské a myší buňky (lidské epiteliální buňky kolorektálního adenokarcinomu, hepatocelulárního karcinomu, cévního endotelu a myší buňky

hladkého cévního svalu) k prokázání buněčné antioxidační aktivity extraktů na antokyany a flavonoidy bohatých plodů. (34, 54)

Tuto metodu autoři zvolili pro měření extraktů z plodů borůvek. Pro tvorbu volných kyslíkových radikálů použili sloučeninu 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihydrochlorid. Dochází k oxidaci a tvorbě fluorescentní sloučeniny 2',7'-dichlorofluorescein. Následně změřili stoupající fluorescenci. Po inkubaci buněk s extrakty se tento proces inhibuje, projevuje se buněčná antioxidační aktivita účinných látek v extraktech. (54) Metodu použili i při měření buněčné antioxidační aktivity extraktů z plodů černého rybízu. (34)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Chemikálie

Standard Kuromanin chlorid (cyanidin 3-glukosid), Sigma-Aldrich, Německo

Chlorid draselný p.a., Penta, Chrudim, Česká republika

Kyselina chlorovodíková p.a., Penta, Chrudim, Česká republika

Octan sodný p.a., Penta, Chrudim, Česká republika

Etanol p.a., Penta, Chrudim, Česká republika

Metanol, Penta, Chrudim, Česká republika

Kyselina citronová p.a., Penta, Chrudim, Česká republika

DPPH – 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl, Sigma, St. Louis, USA

Kyselina fosforečná p.a., Penta, Chrudim, Česká republika

Voda s přídavkem kyseliny fosforečné 0,5 ml ve 100,0 ml vody

4.2. Přístroje

Spektrofotometr UV/VIS, HALO DB-20S se softwarem UV Detective Plus,
DYNAMICA GmbH, Rakousko

pH-metr Multi 340i, WTW, Weihelm, Německo

Automatické pipety 5ml, 1000 µl, Biohit, Finsko

Analytické váhy, Kern, Německo

Dvoupaprskový spektrofotometr UV 1601, Shimatzu, Japonsko

Ultrazvuková lázeň, Bandelin Sonorex, Německo

Sušárna, Binder, Německo

4.3. Rostlinný materiál

Plody druhu *Sambucus nigra* L. kulturních odrůd Samdal, Mammut, Sambo, Sambu, Sampo, Bohatka, Haschberg, Weihenstephan, Allesö a Samyl pochází z Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy s.r.o. Sušené plody Fructus sambuci se zakoupily v prodejně léčivých rostlin Pharmacentrum s.r.o. Hradec Králové.

4.4. Stanovení antokyanů pH-diferenční metodou – AUC

4.4.1. Příprava zásobního roztoku

Zásobní roztok standardu cyanidin 3-glukosidu (C3G): 200 µg/ml, pH 2,93

5,00 mg standardu se rozpustilo v 25 ml 50% etanolu denaturovaného 1% metanolem a okyseleného kyselinou citronovou (koncentrace v zásobním roztoku 0,01M).

4.4.2. Příprava kalibračních roztoků

Zásobní roztok se smíchal s pufrů o přibližném pH 1,4 a 5,5. Vznikla řada kalibračních roztoků pro barevnou formu antokyanu C a leukoformu L o koncentracích 2 až 15 µl/ml. U vzniklých roztoků se změřilo přesné pH. Výsledky uvádí *Tabulka 1*.

4.4.3. Kalibrační graf

Z hodnot měření absorbance kalibračních roztoků cyanidin 3-glukosidu při vlnových délkách 350 – 600 nm proti slepému vzorku (pufru) bez obsahu antokyanů se vygeneroval graf závislosti absorbance na vlnové délce. Automatickým programem byla vyhodnocena diferenční křivka, jako rozdíl absorbancí barevné a bezbarvé formy kalibračních roztoků. Pro hodnocení výsledků se vychází z plochy pod diferenční křivkou (AUC). Z hodnot ploch pod křivkou při různých koncentracích kalibračních roztoků se sestrojila kalibrační křivka. Výsledky uvádí *Tabulka 2*. a *Graf 1*.

4.4.4. Stanovení antokyanů

Extrakty z plodů jednotlivých kultivarů se doplnily pufrům o pH 1,39 a 4,50 do objemu 10 ml a získaly se roztoky C = barevné a L = bezbarvé formy obsahující 5 až 50 μ l extraktu v 1 ml. Změřilo se přesné pH. Výsledky uvádí *Tabulka 3*.

Absorbance vzorků se změřila při vlnových délkách 350 - 600 nm. Automatickým programem byla opět vyhodnocena diferenční křivka jako rozdíl absorbancí barevné a bezbarvé formy měřených vzorků. Hodnoty uvádí *Tabulka 4*. Příklad záznamu z měření vzorků znázorňuje *Graf 2*, kde červená křivka je barevná forma měřeného vzorku, modrá je bezbarvá a černá křivka je diferenční.

Graf 4 znázorňuje závislost absorbance na vlnové délce u měřeného vzorku Fructus sambuci, jehož extrakt byl získán ze sušených plodů. Ostatní vzorky se získaly ze zmrazených plodů. Pro porovnání je uveden *Graf 3*. *Obrázek 3* ukazuje barevné rozdíly měřených vzorků.

Všechna měření byla provedena dvakrát.

4.5. Stanovení antioxidační aktivity

4.5.1. Izolace antokyanů z plodů

4.5.1.1. Materiál

Sorbent MTO-SEPABEADS SP825L, Supelco Analytical, USA

Příprava separační kolony:

15 ml sorbentu se v kádince smísilo s metanolem a nechalo 15 min stát, poté se metanol opatrně slil a k sorbentu se přidala voda a nechalo se opět 15 min stát. Chromatografická kolona se naplnila vodou do výše asi 2 cm a pomalu se nalévala suspenze sorbentu ve vodě. Kolona se promyla 100 ml vody.

4.5.1.2. Postup extrakce plodů

10,0 g zmrazených plodů se rozmělnilo se 100 ml vody s přídavkem 0,5 % kyseliny fosforečné a extrahovalo při teplotě 50 °C na ultrazvukové lázni 60 min. Extrakt se zfiltraval a ještě teplý byl sorbován na chromatografickém sloupci na připravený sorbent. Po ukončení sorpce extraktu byla kolona promývána 40 ml vodou a následně eluována vodným etanolem 95 %.

Získaný etanolový eluát byl odpařen za sníženého tlaku na hustý tmavě fialový roztok. Tímto postupem se získaly extrakty z plodů všech kultivarů. Výsledky uvádí *Tabulka 6*.

U získaného eluátu se stanovil zbytek po vysušení. Obsah antokyanových barviv se stanovil spektrofotometricky, složení se analyzovalo metodou HPLC.

4.5.1.3. Zbytek po vysušení extraktů

Stanovení bylo provedeno postupem dle ČL 2009:

2,0 ml extraktu byly převedeny do misky s plochým dnem a extrakt se odpařil na vodní lázni do sucha. Zbytek se sušil 3 hodiny v sušárně při 105 °C. Po vychladnutí v exsikátoru se zvažil. Výsledek se vyjádřil v mg/ml. Hodnoty zbytku po vysušení extraktů jsou uvedeny v *Tabulce 7*.

4.5.2. Příprava roztoku DPPH

0,05 g DPPH se rozpustilo v metanolu a pro usnadnění rozpouštění se na 30 minut vložilo do ultrazvukové lázně. Po ochlazení se objem doplnil metanolem v odměrné baňce 5,0 ml po značku. Vzniklý roztok se poté uložil do chladu bez přístupu světla, aby se zamezilo rozkladným procesům.

4.5.3. Postup stanovení

100 µl každého extraktu z plodů se zředilo 1 ml metanolu (koncentrace 91 µl/ml). Pro měření se odebral objem 10 µl až 500 µl do odměrné baňky. Ke směsi se přidalo 200 µl roztoku DPPH a doplnilo se metanolem do objemu 5,0 ml (výsledná koncentrace od 0,182 do 9,1 µl/ml). Tato směs se nechala po důkladném promíchání 30 minut reagovat při laboratorní teplotě bez přístupu světla. Poté se změřila absorbance.

4.5.4. Příprava slepého vzorku

200 µl roztoku DPPH se smíchalo s metanolem do celkového objemu 5,0 ml v odměrné baňce. Směs se po promíchání nechala reagovat 30 minut bez přístupu světla s ostatními vzorky. Poté se změřila absorbance.

4.5.5. Měření absorbance

Po 30 minutách se u vzorků i slepého vzorku změřila absorbance při vlnové délce 517 nm proti metanolu. Získané hodnoty se použily k výpočtu procenta inhibice volného radikálu DPPH[•]. Pro výpočet se použil následující vzorec:

$$\% = (1 - A_{VZ}/A_{SL}) \cdot 100$$

kde A_{VZ} je absorbance měřeného vzorku

A_{SL} je absorbance slepého vzorku

Z procenta inhibice volného radikálu DPPH[•] při různých koncentracích měřených vzorků se sestrojil graf, ze kterého se získala hodnota inhibiční koncentrace IC_{50} pro porovnání antioxidačních aktivit jednotlivých vzorků.

Každé měření se provedlo třikrát.

Výsledky uvádí *Tabulky 8 - 31* a *Grafy 8 – 19*

4.6. Výsledky

4.6.1. Stanovení antokyanů pH-diferenční metodou - AUC

4.6.1.1. Kalibrační roztoky

Tabulka 1. Kalibrační roztoky cyanidin 3-glukosidu

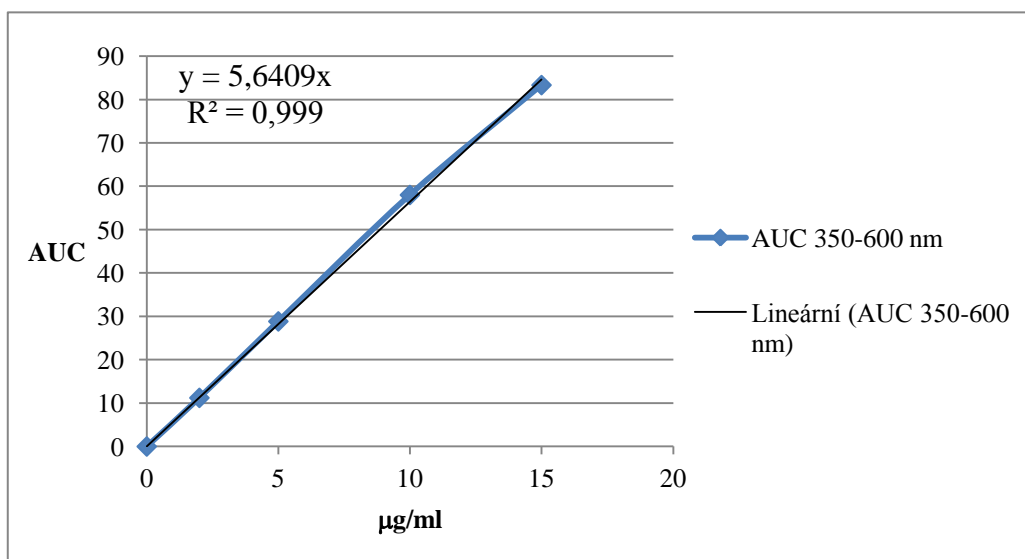
<i>c</i> [μl/ml]	vzorek	řada C: v pufru pH 1,4			řada L: v pufru pH 5,5		
		V C3G [μl]	V C [μl]	skutečné pH	V C3G [μl]	V L [μl]	skutečné pH
2	C3G 2	100	9900	1,40	100	9900	5,37
5	C3G 5	125	4875	1,37	125	4875	5,33
10	C3G 10	250	4750	1,39	250	4750	5,30
15	C3G 15	375	4625	1,40	375	4625	5,27

4.6.1.2. Kalibrační graf

Tabulka 2. Závislost plochy pod křivkou (AUC) na koncentraci kalibračního roztoku

<i>c</i> [μg/ml]	AUC 350 - 600 nm
0	0
2	11,22
5	28,85
10	58,01
15	83,34

Graf 1. Kalibrační graf



4.6.1.3. Stanovení antokyanů

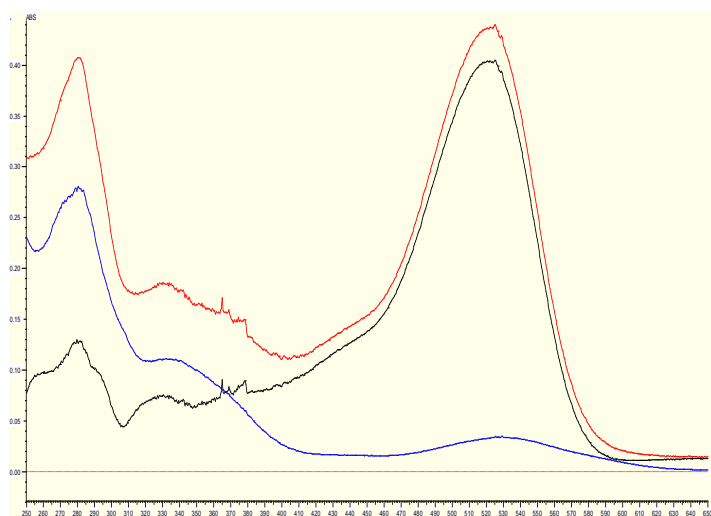
Tabulka 3. Koncentrace a pH měřených roztoků (*c* - koncentrace roztoku, **C1**, **C2** - barevná forma roztoku, **L1**, **L2** - bezbarvá)

Kultivar	<i>c</i> [$\mu\text{l/ml}$]	pH			
		C1	C2	L1	L2
Sampo	10	1,43	1,40	4,58	4,59
Mammut		1,45	1,41	4,58	4,58
Sambo		1,39	1,34	4,55	4,59
Fructus sambuci	50	1,45	1,37	4,59	4,59
Sambu	10	1,31	1,31	4,57	4,58
Haschberg		1,40	1,35	4,58	4,61
Allesö		1,40	1,37	4,56	4,58
Weihenstephan		1,40	1,36	4,58	4,59
Bohatka		1,42	1,34	4,55	4,56
Samyl		1,41	1,39	4,57	4,59
Samdal 2	50	1,42	1,38	4,56	4,57
Samdal 1	5	1,40	1,35	4,53	4,53

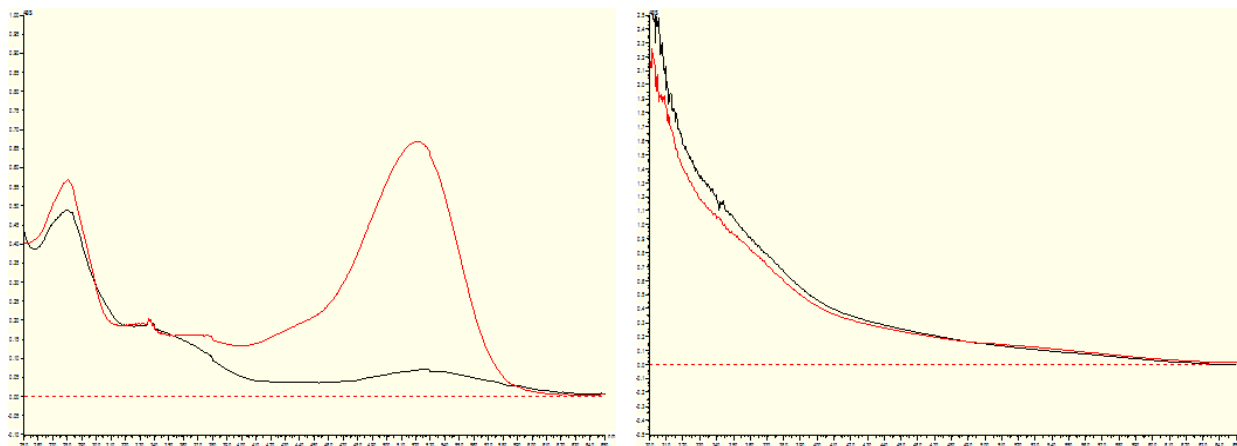
Tabulka 4. Stanovení antokyanů – naměřené hodnoty (C - barevná forma roztoku, ΔAUC 350-600 nm - rozdíl ploch pod křivkou bezbarvé a barevné formy roztoku, tedy plocha pod diferenční křivkou)

Vzorek	Kultivar	Peak C [nm]	Absorbance C	Peak diferenční křivka [nm]	Absorbance při λ_{max} - diferenční křivka	ΔAUC 350-600 nm
W1	Weihenstephan	520,50	0,619	520,50	0,563	50,65
W2		525,00	0,584	520,00	0,526	46,87
\bar{x}		522,75	0,602	520,25	0,545	48,76
M1	Mammut	525,50	0,222	525,00	0,203	17,72
M2		525,50	0,235	525,50	0,217	19,58
\bar{x}		525,50	0,229	525,25	0,210	18,65
samyl1	Samyl	523,00	0,741	518,50	0,679	63,35
samyl2		520,00	0,708	520,00	0,648	60,74
\bar{x}		521,50	0,725	519,25	0,664	62,05
sampo1	Sampo	525,50	0,465	520,50	0,423	38,16
sampo2		525,50	0,474	522,00	0,436	39,77
\bar{x}		525,50	0,470	521,25	0,430	38,97
sambu1	Sambu	525,00	0,439	525,00	0,405	42,04
sambu2		525,00	0,431	522,00	0,401	37,94
\bar{x}		525,00	0,435	523,50	0,403	39,99
sambo1	Sambo	525,00	0,441	520,00	0,402	37,90
sambo2		525,50	0,428	522,00	0,392	36,15
\bar{x}		525,25	0,435	521,00	0,397	37,03
S2	Samdal 2	521,50	0,875	521,50	0,792	72,89
S2-2		522,00	0,865	520,00	0,795	74,59
\bar{x}		521,75	0,870	520,75	0,794	73,74
S1	Samdal 1	520,50	0,921	520,00	0,817	75,24
S1-2		519,00	0,976	519,00	0,870	80,20
\bar{x}		519,75	0,949	519,50	0,844	77,72
H1	Haschberg	523,00	0,592	520,50	0,539	50,34
H2		521,00	0,627	521,00	0,572	53,66
\bar{x}		522,00	0,610	520,75	0,556	52,00
B1	Bohatka	525,50	0,333	525,00	0,304	27,58
B2		525,50	0,388	522,00	0,346	31,10
\bar{x}		525,50	0,361	523,50	0,325	29,34
A1	Allesö	525,50	0,367	525,50	0,331	29,63
A2		525,50	0,351	525,50	0,315	28,16
\bar{x}		525,50	0,359	525,50	0,323	28,90

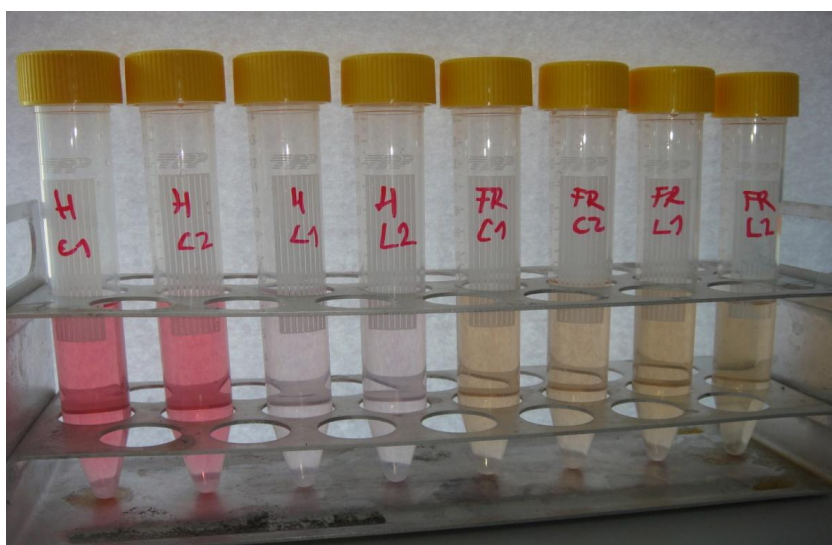
Graf 2. Závislost absorbance na vlnové délce, kultivar Sambu



Graf 3 a 4. Závislost absorbance na vlnové délce, kultivar Haschberg a Fr. Sambuci



Obrázek 3. Měřené roztoky barevná a bezbarvá forma, kultivar Haschberg a Fr.Sambuci



Tabulka 5. Koncentrace antokyanů v měřeném roztoku, v extraktech a přepočteno na obsah ve zbytku po vysušení a ve 100 g vysušených plodů vyjádřeno jako cyanidin 3-glukosid (koncentrace a obsah antokyanů: v měřeném roztoku – c_1 , v extraktech - c_2 , ve zbytku po vysušení extraktů - c_3 , C3G – cyanidin 3-glukosid)

Kultivar	c_1 [$\mu\text{g/ml}$]	c_2 [mg/ml]	c_3 [mg/g]	C3G/100g plodů [mg]
Samdal 1	13,78	2,76	351,59	7630
Samyl	11,00	1,10	511,63	4203
Haschberg	9,22	0,92	428,84	3063
Weihenstephan	8,65	0,87	384,44	2725
Sambu	7,09	0,71	345,85	2329
Sampo	6,91	0,69	345,50	2032
Sambo	6,56	0,66	328,00	1841
Bohatka	5,20	0,52	231,11	1716
Allesö	5,12	0,51	243,81	1555
Mammut	3,31	0,33	733,33	1136
Samdal 2	13,07	0,26	371,43	720

Pro výpočet c_1 se vychází z rovnice lineární regrese kalibrační křivky z Grafu 1.

$$y = 5,6409x$$

Pro stanovení koncentrace antokyanů v měřeném roztoku o absorbanci v rozmezí 0,3 - 0,9 a pro kyvetu 1 cm se tedy použil vzorec:

$$c_1 \text{ (ekv C3G) } \mu\text{g/ml} = \Delta\text{AUC}_{350-600}/5,6409$$

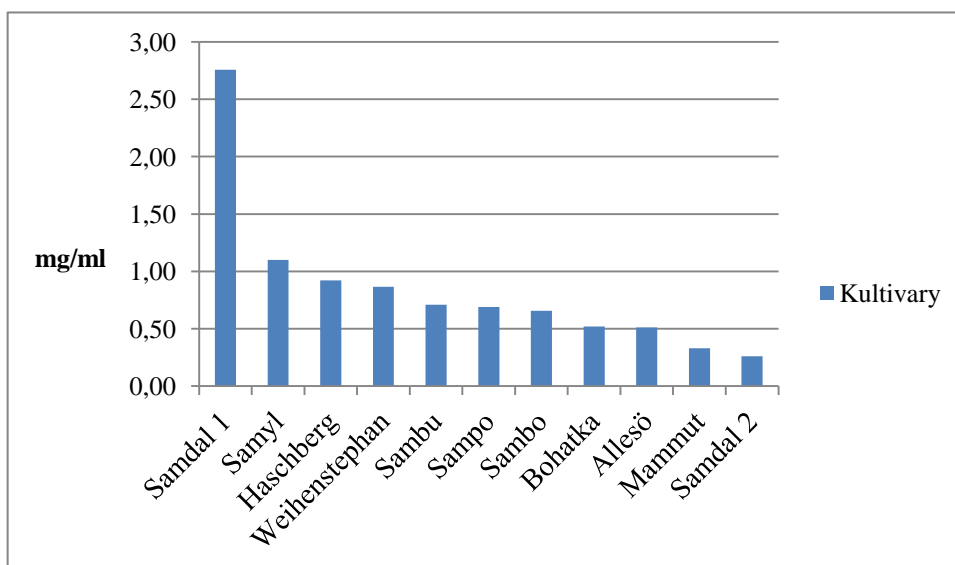
Pro výpočet c_2 se vycházelo z koncentrace antokyanů v měřeném roztoku a obsahu extraktu v měřeném roztoku. Použil se tedy vzorec:

$$c_2 \text{ (ekv C3G) } \text{mg/ml} = c_1 \text{ (ekv C3G)}/c_{\text{extrakt}}$$

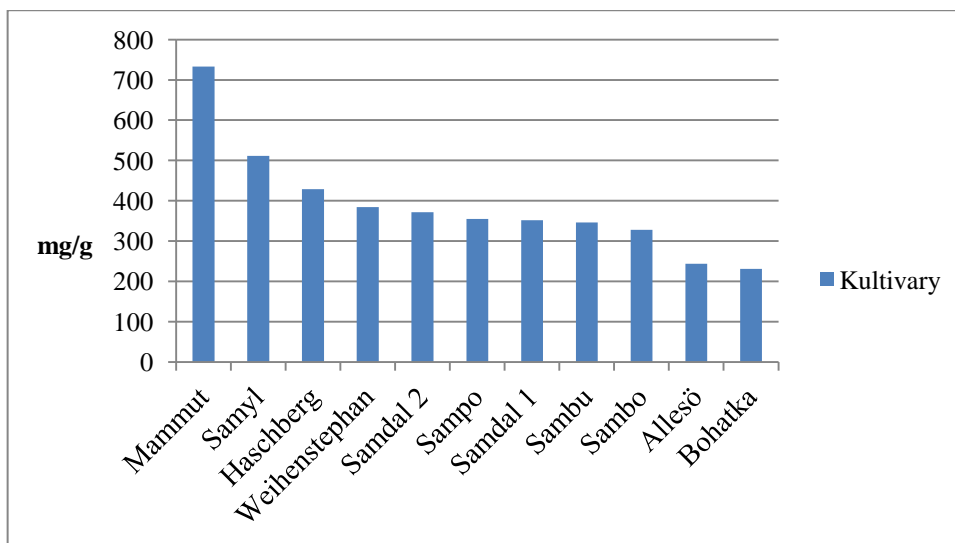
Pro výpočet c_3 se vycházelo z koncentrace antokyanů v extraktech a ze zbytku po vysušení extraktů z Tabulky 7. Použil se tedy vzorec:

$$c_3 \text{ (ekv C3G) } \text{mg/g} = (c_2 \text{ (ekv C3G)}/\text{Zbytek po vysušení}) \cdot 1000$$

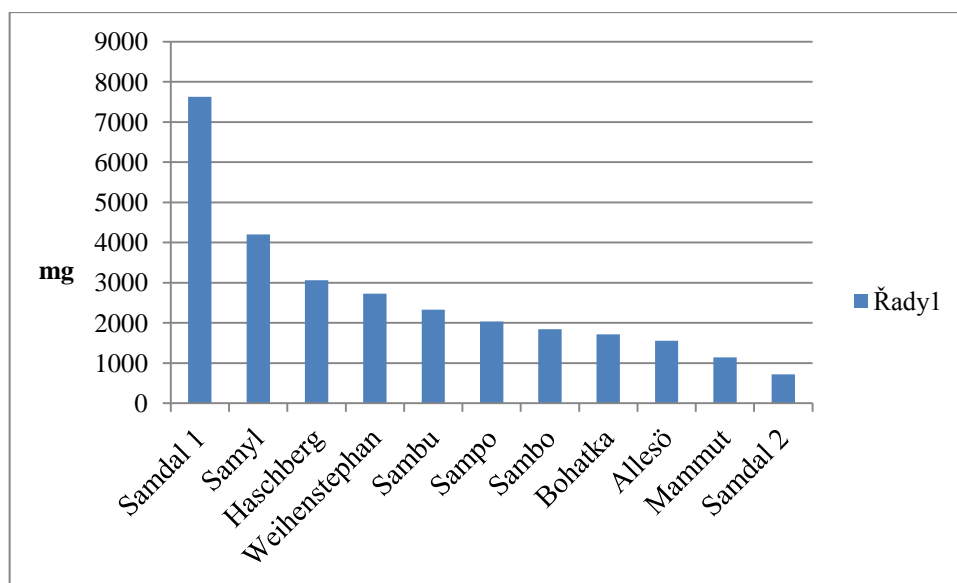
Graf 5. Koncentrace antokyanů v extraktech, počítáno jako cyanidin 3-glukosid



Graf 6. Koncentrace antokyanů v extraktech, počítáno jako cyanidin 3-glukosid, přepočteno na zbytek po vysušení



Graf 7. Obsah antokyanů, počítáno jako cyanidin 3-glukosid, přepočteno na 100 g vysušených plodů



4.6.2. Stanovení antioxidační aktivity

4.6.2.1. Antokyanové extrakty

Tabulka 6. Extrakce antokyanových barviv z plodů černého bezu.

Kultivar	Sušina [%]	Navážka plodů [g]	Objem extraktu [ml]
Samdal	17,9	10,0921	50,0
Mammut	17,3	10,0689	60,0
Sambo	14,2	10,0966	40,0
Sambu	15,2	10,0286	50,0
Sampo	16,6	10,2207	50,0
Allesö	16,1	10,1789	50,0
Samyl	15,5	10,1277	60,0
Bohatka	18,1	10,0468	60,0
Haschberg	17,9	10,0668	60,0
Weihenstephan	19,0	10,0792	60,0

4.6.2.2. Zbytek po vysušení extraktů

Tabulka 7. Hodnoty zbytku po vysušení extraktů.

Kultivar	Zbytek po vysušení [mg/ml]
Samdal 1	7,85
Weihenstephan	2,25
Bohatka	2,25
Haschberg	2,15
Samyl	2,15
Allesö	2,10
Sambu	2,05
Sampo	2,00
Sambo	2,00
Samdal 2	0,70
Mammut	0,45

4.6.2.3. Antioxidační aktivita

Vysvětlivky: AA – antioxidační aktivita

A – absorbance

A_{SL} – absorbance slepého vzorku

% - procento inhibice volného radikálu

– Závislost antioxidační aktivity antokyanových extraktů z plodů na koncentraci

Tabulka 8. AA extraktu z plodů černého bezu, kultivar Samdal, vzorek 1

V [μl]	c [μl/ml]	A _{SL} = 0,771	
		A	%
5	0,091	0,615	20,23
10	0,182	0,513	33,46
15	0,273	0,487	36,84
20	0,364	0,435	43,58
25	0,455	0,423	45,14
30	0,546	0,405	47,47
40	0,728	0,247	67,96
50	0,910	0,203	73,67
60	1,092	0,193	74,97
70	1,274	0,131	83,01
80	1,456	0,097	87,42
90	1,638	0,006	99,22
100	1,820	0,003	99,61
IC ₅₀ [μl]		30,320	

Tabulka 9. AA extraktu z plodů černého bezu, kultivar Samdal, vzorek 2

V [μl]	c [μl/ml]	A _{SL} = 0,581	
		A	%
100	1,820	0,487	16,18
150	2,730	0,448	22,89
200	3,640	0,392	32,53
300	5,460	0,334	42,51
350	6,370	0,337	42,00
400	7,280	0,278	52,15
450	8,190	0,255	56,11
500	9,100	0,227	60,93
550	10,010	0,192	66,95
600	10,920	0,157	72,98
650	11,830	0,160	72,46
700	12,740	0,110	81,07
900	16,380	0,018	96,90
940	17,108	0,014	97,59
IC ₅₀ [μl]		401,360	

Tabulka 10. AA extraktu z plodů černého bezu, kultivar Samyl

V [μl]	c [μl/ml]	A _{SL} = 0,466	
		A	%
10	0,182	0,454	2,58
30	0,546	0,363	22,10
50	0,910	0,306	34,33
100	1,820	0,185	60,30
150	2,730	0,160	65,67
170	3,094	0,084	81,97
190	3,458	0,013	97,21
IC ₅₀ [μl]		95,600	

Tabulka 11. AA extraktu z plodů černého bezu, kultivar Bohatka

V [μl]	c [μl/ml]	A _{SL} = 0,667	
		A	%
110	2,002	0,478	28,34
130	2,366	0,384	42,43
150	2,730	0,356	46,63
170	3,094	0,331	50,37
190	3,458	0,281	57,87
210	3,822	0,265	60,27
230	4,186	0,248	62,82
250	4,550	0,231	65,37
270	4,914	0,218	67,32
290	5,278	0,201	69,87
310	5,642	0,132	80,21
330	6,006	0,055	91,75
350	6,370	0,023	96,55
IC ₅₀ [μl]		175,490	

Tabulka 12. AA extraktu z plodů černého bezu, kultivar Weihestephan

V [μl]	c [μl/ml]	A _{SL} = 0,667	
		A	%
10	0,182	0,639	4,20
30	0,546	0,492	26,24
50	0,910	0,466	30,13
70	1,274	0,367	44,98
110	2,002	0,289	56,67
130	2,366	0,257	61,47
150	2,730	0,243	63,57
170	3,094	0,219	67,17
190	3,458	0,152	77,21
210	3,822	0,079	88,16
230	4,186	0,041	93,85
250	4,550	0,015	97,75
270	4,914	0,009	98,65
IC ₅₀ [μl]		107,600	

Tabulka 13. AA extraktu z plodů černého bezu, kultivar Allesö

V [μl]	c [μl/m]	A _{SL} = 0,620	
		A	%
25	0,455	0,527	15,00
100	1,820	0,403	35,00
150	2,730	0,269	56,61
160	2,912	0,227	63,39
180	3,276	0,206	66,77
200	3,640	0,171	72,42
220	4,004	0,161	74,03
240	4,368	0,148	76,13
260	4,732	0,098	84,19
280	5,096	0,089	85,65
310	5,642	0,076	87,74
320	5,824	0,065	89,52
330	6,006	0,031	95,00
340	6,188	0,008	98,71
350	6,370	0,006	99,03
IC ₅₀ [μl]		134,530	

Tabulka 14. AA extraktu z plodů černého bezu, kultivar Haschberg

V [μl]	c [μl/ml]	A _{SL} = 0,620	
		A	%
20	0,364	0,435	29,84
30	0,546	0,359	42,10
50	0,910	0,309	50,16
60	1,092	0,252	59,35
70	1,274	0,221	64,35
90	1,638	0,156	74,84
100	1,820	0,147	76,29
150	2,730	0,103	83,39
160	2,912	0,075	87,90
170	3,094	0,050	91,94
180	3,276	0,016	97,42
190	3,458	0,014	97,74
IC ₅₀ [μl]		45,306	

Tabulka 15. AA extraktu z plodů černého bezu, kultivar Sambu

V [μl]	c [μl/ml]	A _{SL} = 0,620	
		A	%
25	0,455	0,420	32,26
50	0,910	0,378	39,03
100	1,820	0,302	51,29
150	2,730	0,219	64,68
200	3,640	0,135	78,23
250	4,550	0,078	87,42
300	5,460	0,061	90,16
350	6,370	0,043	93,06
450	8,190	0,004	99,35
IC ₅₀ [μl]		84,430	

Tabulka 16. AA extraktu z plodů černého bezu, Fructus sambuci

V [μl]	c [μl/ml]	A _{SL} = 0,581	
		A	%
10	0,182	0,573	1,38
30	0,546	0,530	8,78
50	0,910	0,524	9,81
100	1,820	0,467	19,62
150	2,730	0,403	30,64
200	3,640	0,287	50,60
270	4,914	0,195	66,44
350	6,370	0,176	69,71
370	6,734	0,096	83,48
390	7,098	0,080	86,23
430	7,826	0,023	96,04
470	8,554	0,006	98,97
490	8,918	0,005	99,14
IC ₅₀ [μl]		228,990	

Tabulka 17. AA extraktu z plodů černého bezu, kultivar Sambo

V [μl]	c [μl/ml]	A _{SL} = 0,581	
		A	%
60	1,092	0,478	17,73
80	1,456	0,442	23,92
100	1,820	0,409	29,60
150	2,730	0,269	53,70
200	3,640	0,227	60,93
270	4,914	0,175	69,88
290	5,278	0,151	74,01
310	5,642	0,116	80,03
350	6,370	0,060	89,67
390	7,098	0,040	93,12
410	7,462	0,020	96,56
480	8,736	0,002	99,66
IC ₅₀ [μl]		180,120	

Tabulka 18. AA extraktu z plodů černého bezu, kultivar Mammot

V [μl]	c [μl/ml]	A _{SL} = 0,581	
		A	%
50	0,910	0,498	14,29
100	1,820	0,453	22,03
150	2,730	0,375	35,46
200	3,640	0,335	42,34
250	4,550	0,307	47,16
300	5,460	0,295	49,23
350	6,370	0,211	63,68
400	7,280	0,194	66,61
500	9,100	0,187	67,81
530	9,646	0,129	77,80
550	10,010	0,120	79,35
600	10,920	0,108	81,41
650	11,830	0,073	87,44
750	13,650	0,064	88,98
770	14,014	0,018	96,90
790	14,378	0,003	99,48
IC ₅₀ [μl]		303,150	

Tabulka 19. AA extraktu z plodů černého bezu, kultivar Sampo

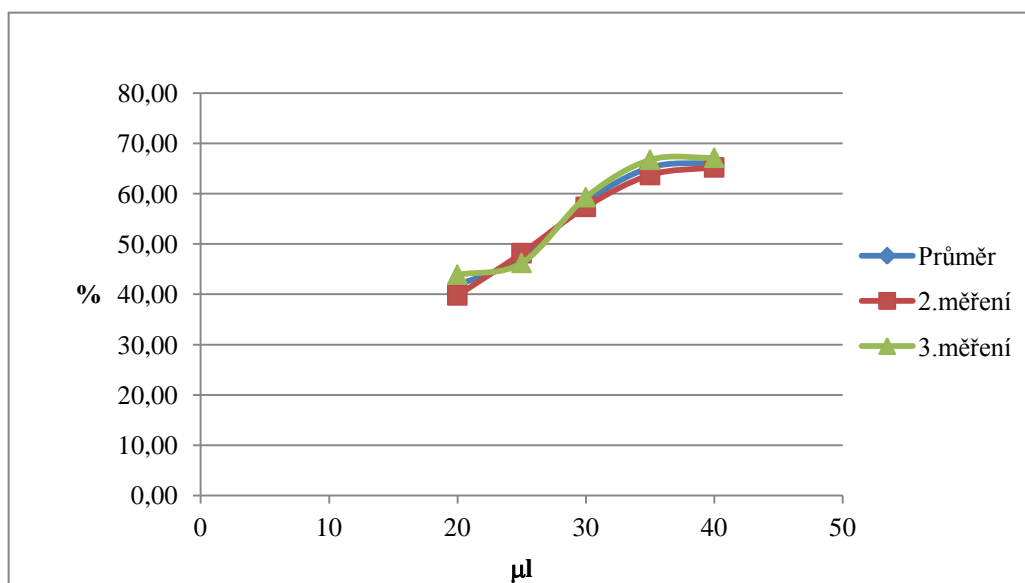
V [μl]	c [μl/ml]	A _{SL} = 0,466	
		A	%
10	0,182	0,451	3,22
30	0,546	0,412	11,59
50	0,910	0,333	28,54
70	1,274	0,304	34,76
100	1,820	0,294	36,91
120	2,184	0,257	44,85
140	2,548	0,199	57,30
160	2,912	0,180	61,37
180	3,276	0,129	72,32
230	4,186	0,089	80,90
250	4,550	0,016	96,57
IC₅₀ [μl]		127,280	

– Zjištění hodnoty inhibiční koncentrace IC₅₀

Tabulka 20. AA extraktu z plodů černého bezu, kultivar Samdal, vzorek 1

V [μl]	c [μl/ml]	A _{SL} = 0,727				\bar{x}	Směrodatná odchylka (±)
		1		2			
		A	%	A	%		
20	0,364	0,438	39,75	0,408	43,88	41,82	2,07
25	0,455	0,377	48,14	0,391	46,22	47,18	0,96
30	0,546	0,310	57,36	0,296	59,28	58,32	0,96
35	0,637	0,264	63,69	0,242	66,71	65,20	1,51
40	0,728	0,253	65,20	0,239	67,13	66,16	0,97
IC ₅₀ [μl]		26,370		25,040		25,705	0,67

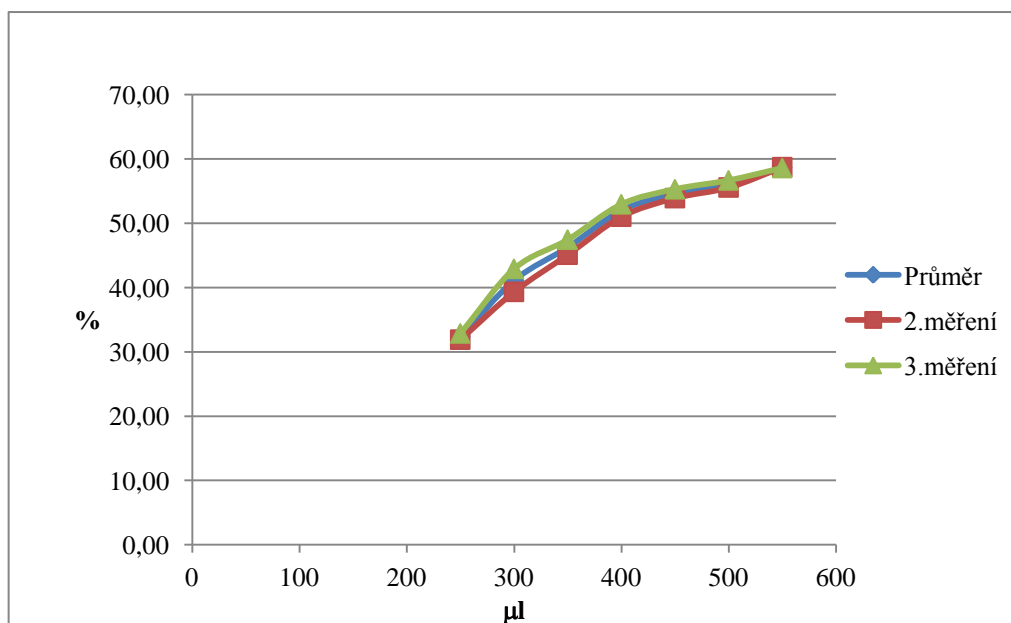
Graf 8. Závislost procenta inhibice volného radikálu na objemu extraktu z plodů, kultivar Samdal, vzorek 1



Tabulka 21. AA extraktu z plodů černého bezu, kultivar Samdal, vzorek 2

V [μ l]	c [μ l/ml]	$A_{SL} = 0,727$				\bar{x}	Směrodatná odchylka (\pm)
		1		2			
		A	%	A	%		
250	4,55	0,495	31,91	0,488	32,87	32,39	0,48
300	5,46	0,441	39,34	0,415	42,92	41,13	1,79
350	6,37	0,399	45,12	0,382	47,46	46,29	1,17
400	7,28	0,356	51,03	0,342	52,96	51,99	0,96
450	8,19	0,335	53,92	0,325	55,30	54,61	0,69
500	9,1	0,323	55,57	0,315	56,67	56,12	0,55
550	10,01	0,3	58,73	0,301	58,60	58,67	0,06
IC_{50} [μ l]		423,380		405,600		414,490	8,89

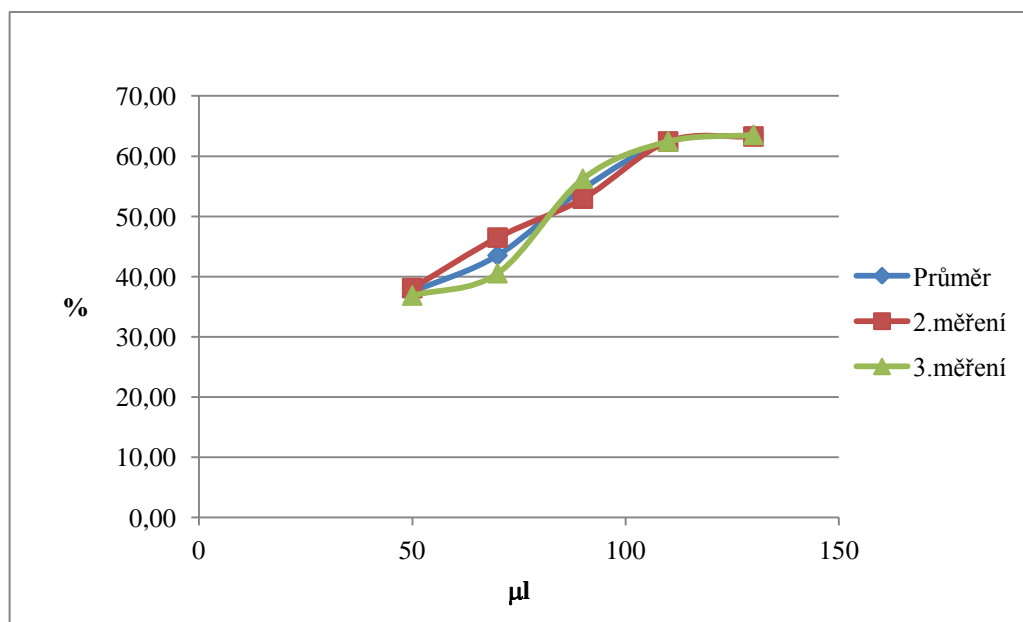
Graf 9. Závislost procenta inhibice volného radikálu na objemu extraktu z plodů, kultivar Samdal, vzorek 2



Tabulka 22. AA extraktu z plodů černého bezu, kultivar Samyl

V [μ l]	c [μ l/ml]	$A_{SL} = 0,727$				\bar{x}	Směrodatná odchylka (\pm)
		1		2			
		A	%	A	%		
50	0,910	0,45	38,10	0,459	36,86	37,48	0,62
70	1,274	0,389	46,49	0,432	40,58	43,54	2,96
90	1,638	0,342	52,96	0,318	56,26	54,61	1,65
110	2,002	0,273	62,45	0,273	62,45	62,45	0,00
130	2,366	0,267	63,27	0,265	63,55	63,41	0,14
IC ₅₀ [μ l]		81,990		84,850		83,420	1,43

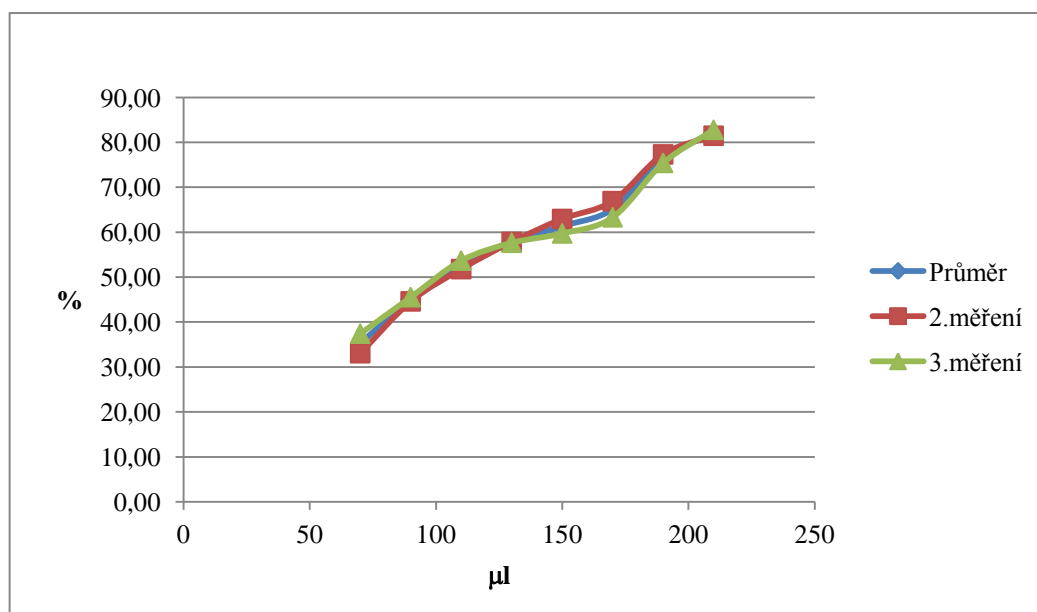
Graf 10. Závislost procenta inhibice volného radikálu na objemu extraktu z plodů, kultivar Samyl



Tabulka 23. AA extraktu z plodů černého bezu, kultivar Bohatka

V [μ l]	c [μ l/ml]	$A_{SL} = 0,529$				\bar{x}	Směrodatná odchylka (\pm)
		1		2			
		A	%	A	%		
70	1,274	0,354	33,08	0,331	37,43	35,26	2,18
90	1,638	0,293	44,61	0,288	45,56	45,09	0,47
110	2,002	0,255	51,80	0,245	53,69	52,74	0,94
130	2,366	0,223	57,84	0,224	57,66	57,75	0,09
150	2,730	0,196	62,95	0,213	59,74	61,34	1,61
170	3,094	0,175	66,92	0,194	63,33	65,12	1,80
190	3,458	0,120	77,32	0,130	75,43	76,37	0,94
210	3,822	0,098	81,47	0,091	82,80	82,14	0,67
IC_{50} [μ l]		111,130		108,104		109,617	1,51

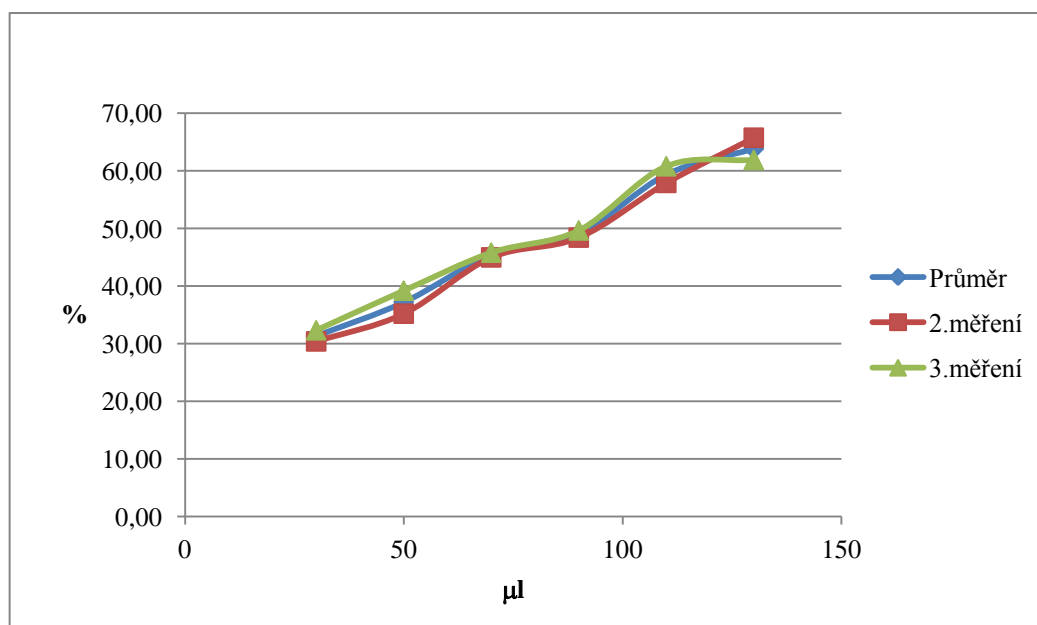
Graf 11. Závislost procenta inhibice volného radikálu na objemu extraktu z plodů, kultivar Bohatka



Tabulka 24. AA extraktu z plodů černého bezu, kultivar Weihenstephan

V [μl]	c [$\mu\text{l}/\text{ml}$]	$A_{SL} = 0,727$				\bar{x}	Směrodatná odchylka (\pm)
		1		2			
		A	%	A	%		
30	0,546	0,506	30,40	0,492	32,32	31,36	0,96
50	0,910	0,471	35,21	0,442	39,20	37,21	2,00
70	1,274	0,400	44,98	0,394	45,80	45,39	0,41
90	1,638	0,375	48,42	0,366	49,66	49,04	0,62
110	2,002	0,306	57,91	0,285	60,80	59,35	1,45
130	2,366	0,249	65,75	0,277	61,90	63,82	1,92
IC_{50} [μl]		88,142		85,560		86,851	1,29

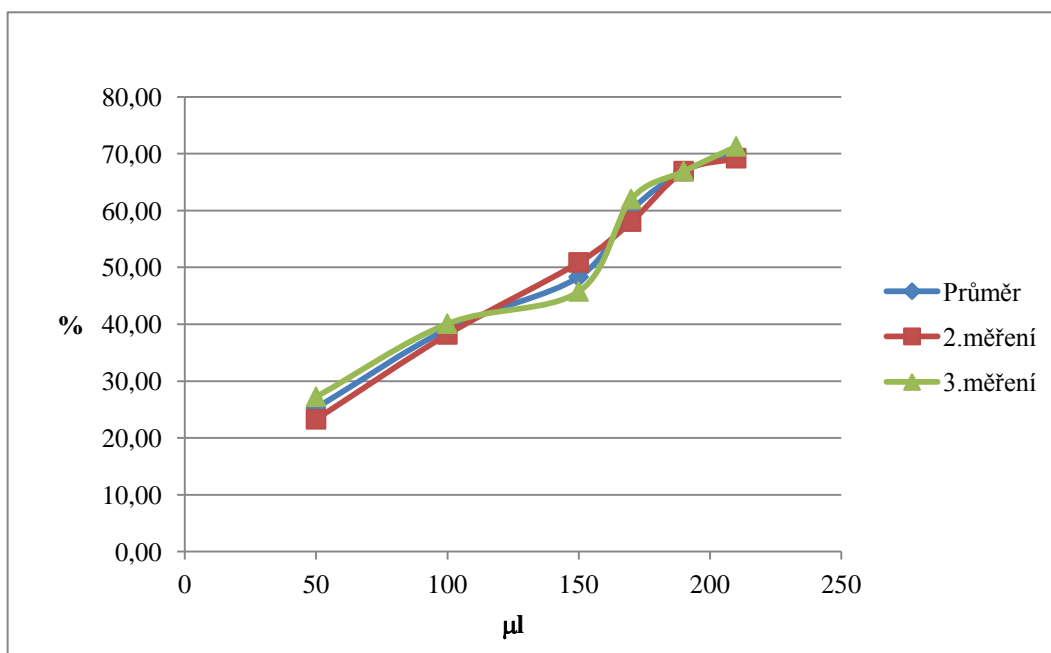
Graf 12. Závislost procenta inhibice volného radikálu na objemu extraktu z plodů, kultivar Weihenstephan



Tabulka 25. AA extraktu z plodů černého bezu, kultivar Allesö

V [μl]	c [μl/ml]	A _{SL} = 0,529				\bar{X}	Směrodatná odchylka (±)
		1		2			
		A	%	A	%		
50	0,910	0,406	23,25	0,385	27,22	25,24	1,98
100	1,820	0,327	38,19	0,317	40,08	39,13	0,95
150	2,730	0,260	50,85	0,287	45,75	48,30	2,55
170	3,094	0,222	58,03	0,201	62,00	60,02	1,99
190	3,458	0,175	66,92	0,175	66,92	66,92	0,00
210	3,822	0,163	69,19	0,152	71,27	70,23	1,04
IC ₅₀ [μl]		141,370		137,130		139,250	2,12

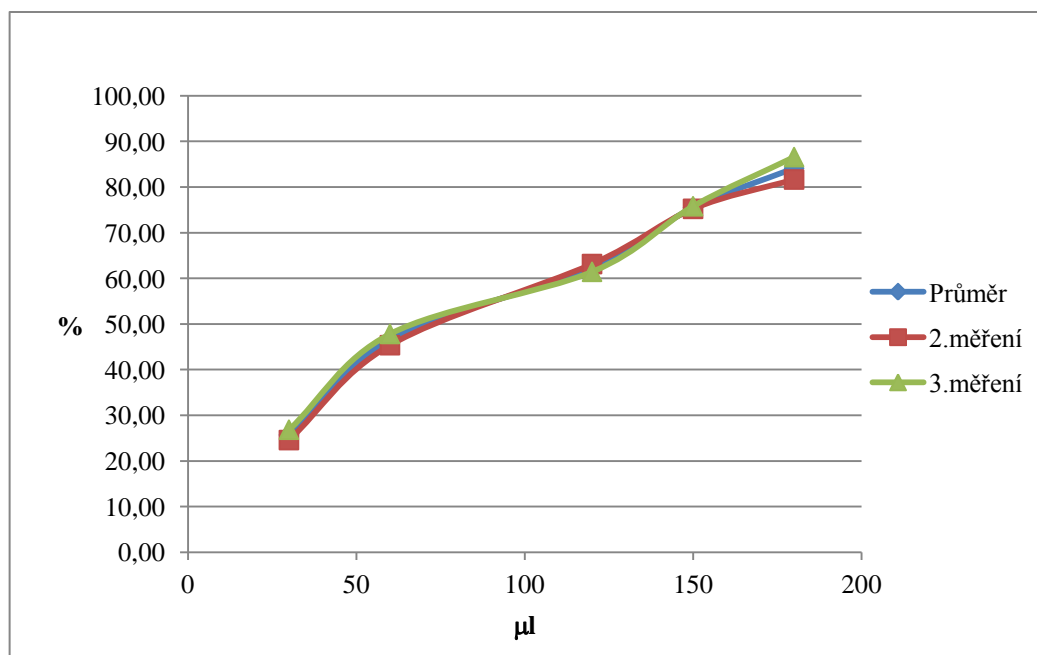
Graf 13. Závislost procenta inhibice volného radikálu na objemu extraktu z plodů, kultivar Allesö



Tabulka 26. AA extraktu z plodů černého bezu, kultivar Haschberg

V [μ l]	c [μ l/ml]	A _{SL} = 0,529				\bar{x}	Směrodatná odchylka (\pm)
		1		2			
		A	%	A	%		
30	0,546	0,399	24,57	0,387	26,84	25,71	1,14
60	1,092	0,289	45,37	0,276	47,83	46,60	1,23
120	2,184	0,195	63,14	0,204	61,44	62,29	0,85
150	2,730	0,131	75,24	0,128	75,80	75,52	0,28
180	3,276	0,097	81,66	0,071	86,58	84,12	2,46
IC ₅₀ [μ l]		86,290		81,970		84,130	2,16

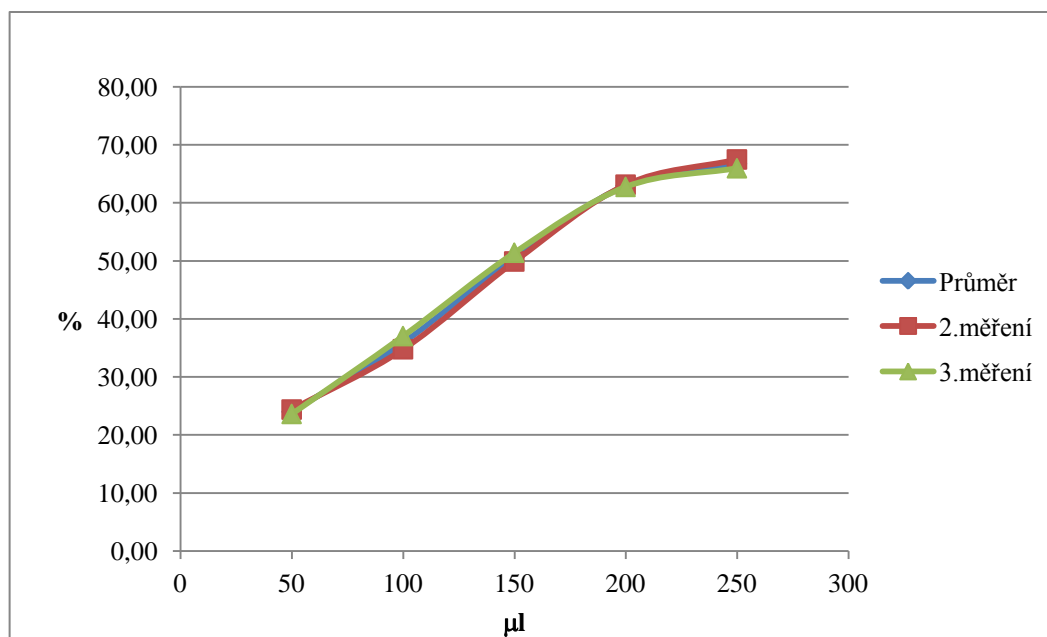
Graf 14. Závislost procenta inhibice volného radikálu na objemu extraktu z plodů, kultivar Haschberg



Tabulka 27. AA extraktu z plodů černého bezu, kultivar Sambu

V [μ l]	c [μ l/ml]	$A_{SL} = 0,529$				\bar{x}	Směrodatná odchylka (\pm)
		1		2			
		A	%	A	%		
50	0,910	0,400	24,39	0,404	23,63	24,01	0,38
100	1,820	0,345	34,78	0,333	37,05	35,92	1,14
150	2,730	0,265	49,91	0,257	51,42	50,66	0,75
200	3,640	0,195	63,14	0,197	62,76	62,95	0,19
250	4,550	0,172	67,49	0,180	65,97	66,73	0,76
IC_{50} [μ l]		159,000		158,300		158,650	0,35

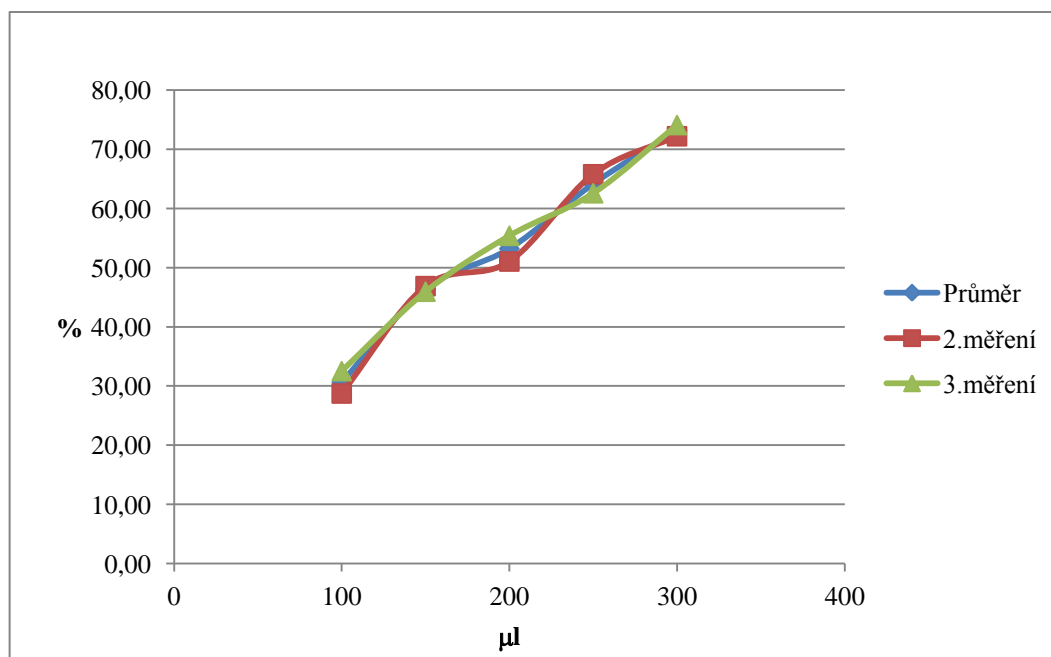
Graf 15. Závislost procenta inhibice volného radikálu na objemu extraktu z plodů, kultivar Sambu



Tabulka 28. AA extraktu z plodů černého bezu, Fructus sambuci

V [μ l]	c [μ l/ml]	$A_{SL} = 0,529$				\bar{X}	Směrodatná odchylka (\pm)
		1		2			
		A	%	A	%		
100	1,820	0,377	28,73	0,357	32,51	30,62	1,89
150	2,730	0,281	46,88	0,286	45,94	46,41	0,47
200	3,640	0,259	51,04	0,236	55,39	53,21	2,17
250	4,550	0,181	65,78	0,198	62,57	64,18	1,60
300	5,460	0,147	72,21	0,137	74,10	73,16	0,94
IC_{50} [μ l]		186,180		179,470		182,825	3,36

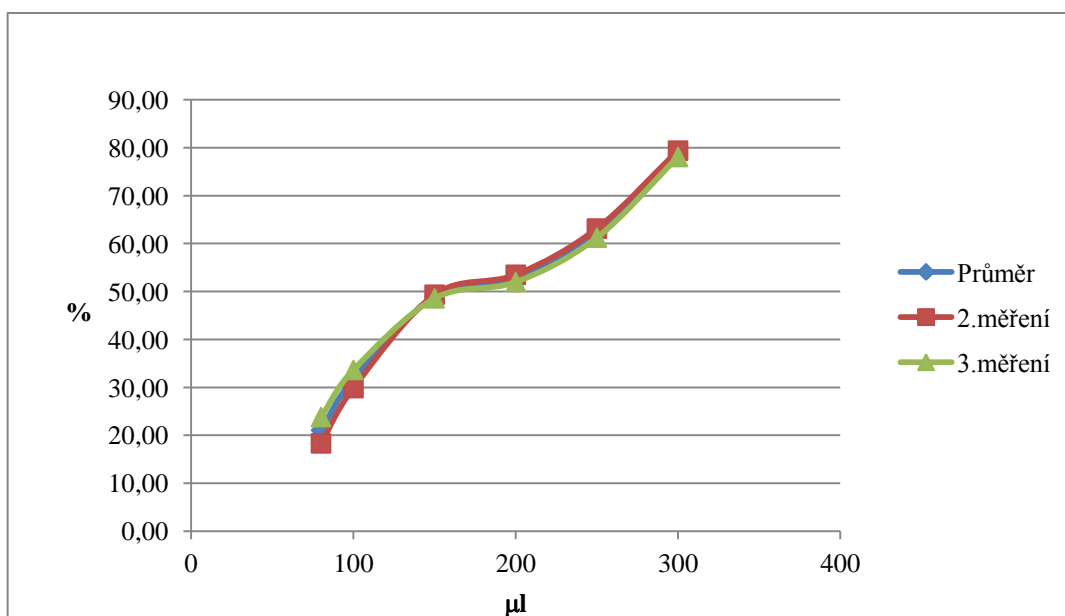
Graf 16. Závislost procenta inhibice volného radikálu na objemu extraktu z plodů, Fructus sambuci



Tabulka 29. AA extraktu z plodů černého bezu, kultivar Sambo

V [μ l]	c [μ l/ml]	$A_{SL} = 0,529$				\bar{X}	Směrodatná odchylka (\pm)
		1		2			
		A	%	A	%		
80	1,456	0,432	18,34	0,403	23,82	21,08	2,74
100	1,820	0,371	29,87	0,351	33,65	31,76	1,89
150	2,730	0,268	49,34	0,272	48,58	48,96	0,38
200	3,640	0,246	53,50	0,254	51,98	52,74	0,76
250	4,550	0,195	63,14	0,205	61,25	62,19	0,94
300	5,460	0,109	79,40	0,116	78,07	78,73	0,66
IC_{50} [μ l]		184,270		181,970		183,120	1,15

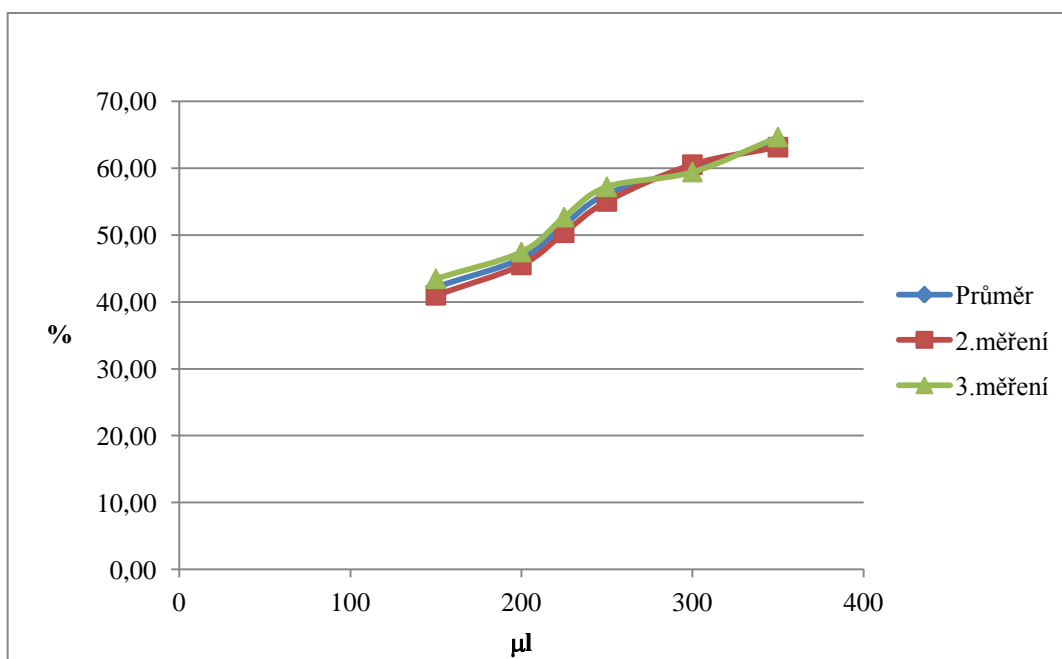
Graf 17. Závislost procenta inhibice volného radikálu na objemu extraktu z plodů, kultivar Sambo



Tabulka 30. AA extraktu z plodů černého bezu, kultivar Mammut

V [μ l]	c [μ l/ml]	$A_{SL} = 0,727$				\bar{X}	Směrodatná odchylka (\pm)
		1		2			
		A	%	A	%		
150	2,730	0,429	40,99	0,411	43,47	42,23	1,24
200	3,640	0,396	45,53	0,382	47,46	46,49	0,96
225	4,095	0,361	50,34	0,344	52,68	51,51	1,17
250	4,550	0,327	55,02	0,311	57,22	56,12	1,10
300	5,460	0,287	60,52	0,295	59,42	59,97	0,55
350	6,370	0,268	63,14	0,257	64,65	63,89	0,75
IC_{50} [μ l]		223,850		207,340		215,595	8,25

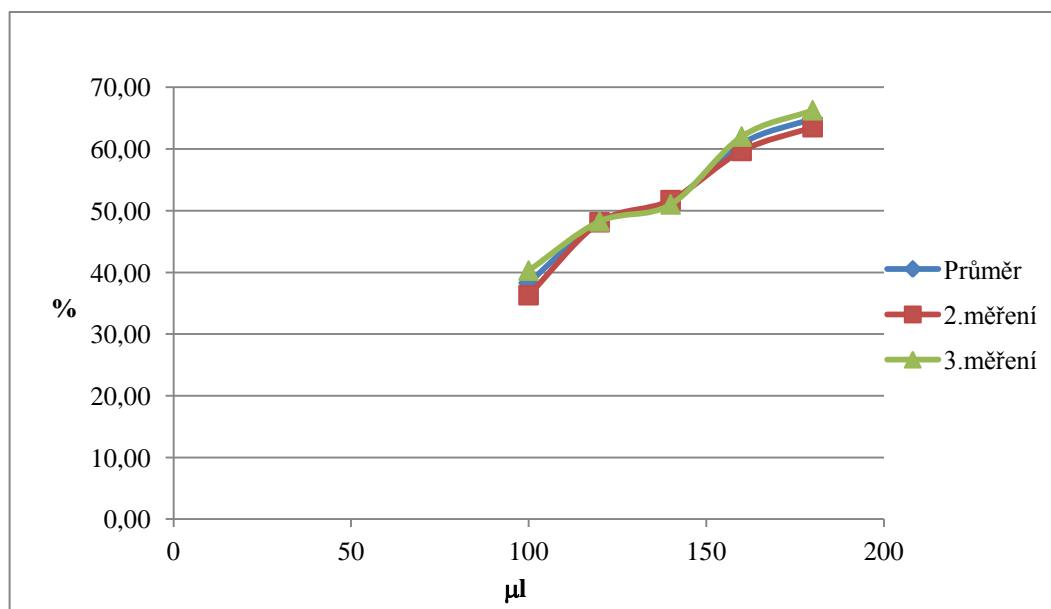
Graf 18. Závislost procenta inhibice volného radikálu na objemu extraktu z plodů, kultivar Mammut



Tabulka 31. AA extraktu z plodů černého bezu, kultivar Sampo

V [μ l]	c [μ l/ml]	$A_{SL} = 0,727$				\bar{X}	Směrodatná odchylka (\pm)
		1		2			
		A	%	A	%		
100	1,820	0,463	36,31	0,434	40,30	38,31	1,99
120	2,184	0,377	48,14	0,376	48,28	48,21	0,07
140	2,548	0,351	51,72	0,356	51,03	51,38	0,34
160	2,912	0,293	59,70	0,276	62,04	60,87	1,17
180	3,276	0,265	63,55	0,245	66,30	64,92	1,38
IC_{50} [μ l]		134,300		129,100		131,700	2,60

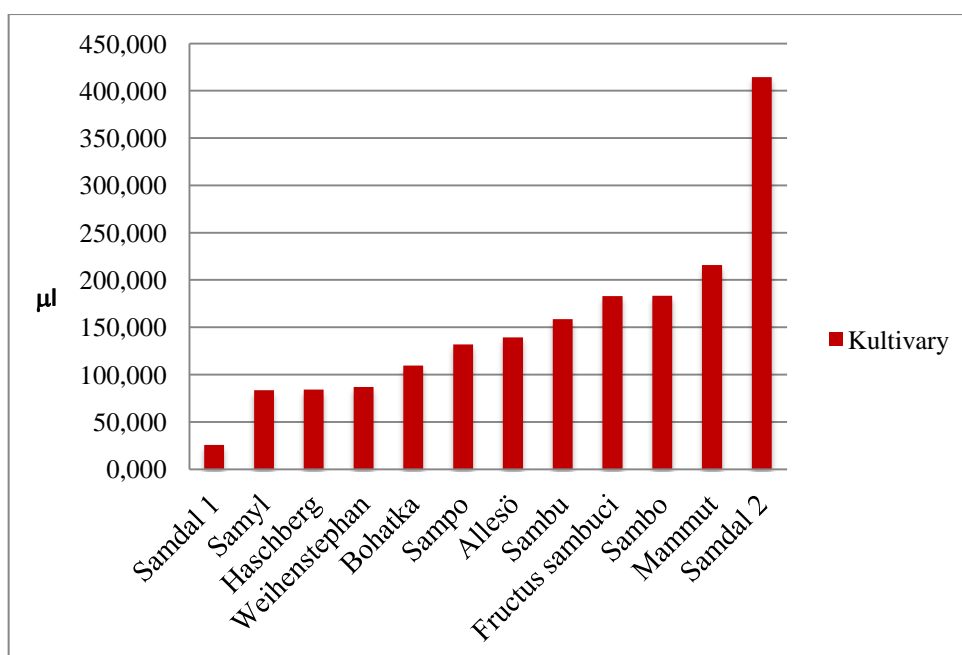
Graf 19. Závislost procenta inhibice volného radikálu na objemu extraktu z plodů, kultivar Sampo



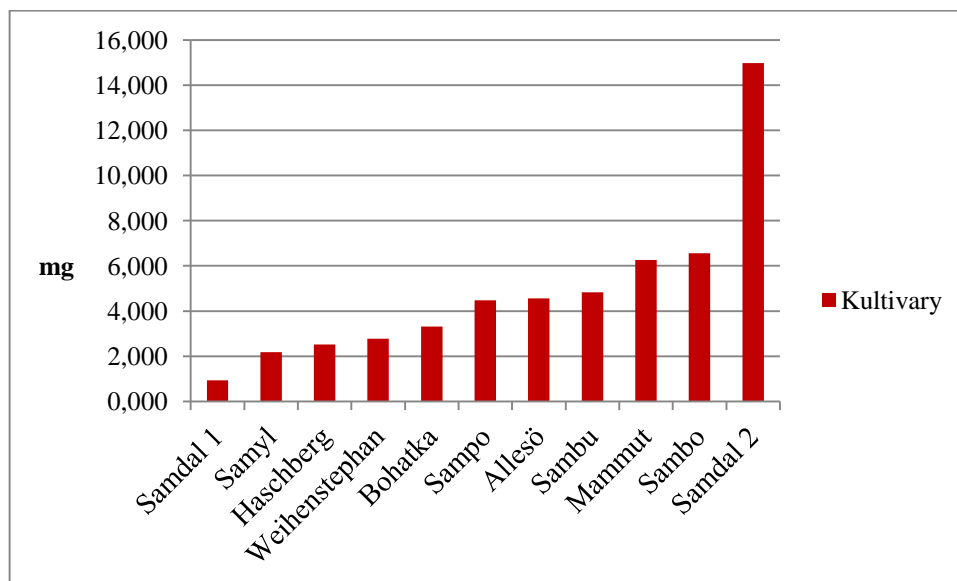
Tabulka 32. Antioxidační aktivita plodů jednotlivých odrůd (naměřené hodnoty byly přepočteny na množství suchého extraktu a tomu odpovídající množství cyanidin 3-glukosidu (C3G) obsaženého v extraktech, respektive v plodech)

Kultivar	IC ₅₀ [μl]	IC ₅₀ [mg]	IC ₅₀ C3G [mg]
Samdal 1	25,705	0,928	0,071
Samyl	83,420	2,183	0,092
Haschberg	84,130	2,526	0,078
Weihenstephan	86,851	2,772	0,075
Bohatka	109,617	3,321	0,057
Sampo	131,700	4,470	0,091
Allesö	139,250	4,565	0,071
Sambu	158,650	4,836	0,112
Mammut	215,595	6,259	0,071
Sambo	183,120	6,565	0,120
Samdal 2	414,490	14,971	0,108

Graf 20. Porovnání hodnot IC₅₀ odrůd, údaje z Tabulek 8 - 31.



Graf 21. Množství suchého extraktu, které působí 50% inhibici radikálu DPPH• (IC₅₀ mg)



5. Diskuse

V této práci jsem stanovovala antioxidační aktivitu extraktů z plodů různých kulturních odrůd černého bezu. Nejprve se z plodů získaly extrakty. Extrakce antokyanových barviv z plodů byla založena na extrakci zmrazeného materiálu okyselenou vodou. Přítomnost kyseliny je důležitá, protože zaručuje převedení kationtů antokyanových barviv na soli použité kyseliny během extrakce a rafinace extraktu a má vliv na výtěžek a kvalitu konečného produktu. Teplota extrakce byla zvolena 50°C. Extrakt, ještě teplý, se nechal sorbovat na sloupci polymerního neionogenního polystyren-divinylbenzenového sorbentu. Po sorpci antokyanů následovalo promytí sorbentu demineralizovanou vodou, čímž se odstranil zbytek balastních a nenasorbovaných látek a volné kyseliny fosforečné z extrakčního činidla. Nasorbované látky se desorbovaly etanolem 95%. Alkoholový extrakt se nakonec odpařil za sníženého tlaku na koncentraci sušiny v rozmezí 14,2 - 19%. Hodnoty uvádí *Tabulka 6*.

Vzhledem k tomu, že jsou antokyanany polární, dají se k jejich extrakci z plodů využít metanol, etanol, aceton nebo voda. Jako nejvhodnější extrakční činidlo k extrakci antokyanů z plodů černého bezu se vzhledem k potravinářskému a farmaceutickému použití volí voda a k okyselení kyselina citrónová. (55) Jinou možností je například metanol okyselený kyselinou mravenčí nebo směs metanolu a vody okyselená kyselinou octovou. (9, 14)

Poté se stanovil obsah antokyanů v extraktech spektrofotometricky modifikovanou pH-diferenční metodou. Obsah se pohyboval v rozmezí 0,33 - 2,76 mg cyanidin 3-glukosidu (standardu) v 1 ml extraktu. Obsah cyanidin 3-glukosidu byl v extraktu z plodů vzorku Samdal 2 nízký (0,26 mg/ml), protože se extrakt získal ze zbytků po extrakci vzorku Samdal 1. Hodnoty jsou uvedeny v *Tabulce 5* a zpracovány v *Grafu 5*. Jako standard se zvolil cyanidin 3-glukosid, protože patří mezi hlavní antokyanany obsažené v plodech černého bezu. (1, 7, 8) U extraktu Fructus sambuci, který se získal ze sušených plodů, nebylo možné stanovit obsah antokyanů, protože se sušením mění povaha těchto látek. Jak ukazuje *Obrázek 3*, je patrný rozdíl v barvě měřených roztoků. Literatura uvádí, že celkový obsah fenolických látek lineárně koreluje s červenou barvou, zatímco negativně koreluje se žlutou barvou a číroostí šťávy z plodů černého bezu i černého rybízu. Dále se uvádí, že stabilita barvy antokyanů je mimo jiné ovlivněna i teplotou. (56) Během procesů, které probíhají při vysokých

teplotách tak u antokyanů dochází k přeměně na žluté nebo hnědé pigmenty. (12) Výsledky, které jsem získala při stanovení obsahu antokyanů v extraktech z plodů, lze tedy odůvodnit tím, že se antokyaniny v plodech *Fructus sambuci* při sušení rozložily. Ale přesto byla u tohoto extraktu naměřena antioxidační aktivita, na které se mohou podílet další obsažené látky i degradační produkty antokyanů.

V dostupné literatuře se uvádí vyšší obsah antokyanů ve šťávě z plodů černého bezu planého, než jsem zjistila v této práci u extraktů, se kterými jsem pracovala. Šťáva se získala odstředěním plodů a supernatant se po přefiltrování použil k analýze. Obsah antokyanů založených na cyanidinu stanovený HPLC byl 7440,85 $\mu\text{g/ml}$ a antokyaniny tak tvořily 92,3% obsahových látek v této šťávě. (57) pH-diferenční metodu stanovení antokyanů také zvolili autoři v práci, ve které se věnovali kultivarů druhu *Sambucus canadensis* a kultivarům Korsör a Haschberg druhu *Sambucus nigra*. Na rozdíl od této práce autoři zvolili pro měření vlnové délky 520-700 nm. Obsah antokyanů v plodech v mg cyanidin 3-glukosidu (standard) na 100 g plodů byl stanoven ve dvou sezónách, v roce 2004 a 2005. U odrůdy Haschberg byl obsah 170, respektive 268 mg cyanidin 3-glukosidu/100 g plodů. (9) Zatímco já jsem u odrůdy Haschberg zjistila obsah 3100 mg cyanidin 3-glukosidu/100 g sušených plodů.

Také byl stanoven obsah antokyanů v extraktech přepočtený na zbytek po vysušení. Výsledky uvádí *Tabulka 5* a *Graf 6*. Během stanovení bylo u extraktů z plodů vzorků Mammut a Samdal 2 pozorováno, že vypadal pevný nerozpustný podíl a výsledky měření jsou tedy zkreslené.

Antokyaniny patří mezi látky s antioxidační aktivitou, proto se hodnotila antioxidační aktivita extraktů z plodů černého bezu bohatých na obsah těchto látek. Jejich množství v analyzovaných plodech bylo v rozmezí 720 – 7700 mg cyanidin 3-glukosidu/100 g suchých plodů. Stanovení antioxidační aktivity bylo provedeno metodou stanovení s DPPH[•]. Výsledky se vyjádřily jako IC₅₀ mg suchého extraktu. Hodnoty se pohybovaly v rozmezí 0,928 – 6,565 mg v závislosti na kultivaru. IC₅₀ vzorku Samdal 2 bylo velmi vysoké (14,971 mg) vzhledem k nízkému obsahu antokyanů v extraktu. Získaná data jsou uvedena v *Tabulce 34* a zpracována v *Grafu 20*. Maximální antioxidační aktivita byla u plodů kultivaru Samdal. U dalších kultivarů se antioxidační aktivita lišila, podle výsledků byla dvakrát až šestkrát nižší než u odrůdy Samdal. Podle výsledků nekorelovala u všech kultivarů antioxidační aktivita s obsahem

cyanidin 3-glukosidu v extraktech. Korelovala u kultivarů Samdal, Samyl, Haschberg a Weihenstephan.

K podobným závěrům došli i jiní autoři. Při stanovení antioxidační aktivity alkoholových extraktů z plodů, květů a listů černého bezu metodou stanovení s DPPH[•] bylo zjištěno, že přímá korelace mezi obsahem flavonoidů (rutin, isokvercetin, astragalin, cyanidin 3-sambubiosid, cyanidin 3-glukosid) v rostlinných extraktech a jejich antioxidační aktivitou není. (32) Dále se prokázala lineární korelace antioxidační aktivity, měřené FRAP metodou, u extraktů z plodů borůvek s celkovým obsahem fenolických látek. Méně pak antioxidační aktivita korelovala s obsahem antokyanů. (48) Jiní autoři, kteří měřili antioxidační aktivitu metodou ORAC u plodů včetně černého bezu, uvádějí, že antioxidační aktivita lineárně korelovala s celkovým obsahem fenolických látek. Ale jednotlivé látky mohou různou měrou přispívat k celkové antioxidační aktivitě, s tím, že antokyany korelovaly s antioxidační aktivitou nejvíce. (14) Autoři ve studii uvádějí, že ze 14 antokyanů zahrnujících i aglykony vykazoval nejsilnější antioxidační aktivitu, měřenou ORAC metodou, cyanidin 3-glukosid. (58) Zastoupení jednotlivých látek ve směsi tak může ovlivňovat antioxidační aktivitu extraktu. Plody černého bezu obsahují zejména antokyany cyanidin 3-glukosid, cyanidin 3-sambubiosid, cyanidin 3-sambubiosid-5-glukosid a cyanidin 3,5-diglukosid. (1, 7, 8). Zastoupení jednotlivých látek v kultivarech nebylo z dostupných zdrojů zjištěno. Vzhledem k tomu, že se antioxidační aktivita hodnotila u sumárního extraktu získaného separací, mohou mít na zjištěné rozdíly v hodnotách antioxidační aktivity vliv další látky jako například flavonoidy, proantokyanidiny, hydroxyskořicové kyseliny a kyselina askorbová, které mohou přispívat k celkové antioxidační aktivitě. Například u plodů černého rybízu se antokyany podílí na antioxidační aktivitě ze 73% a vitamin C z 18% na rozdíl od plodů borůvky, kde antokyany přispívají 84% a flavonoly 14%. (59)

V této práci jsem prokázala antioxidační účinky na antokyany bohatých extraktů z plodů černého bezu. Také se prokázalo, že se na celkové antioxidační aktivitě mohou podílet další fenolické látky i látky nefenolické povahy. Pěstované kulturní odrůdy černého bezu představují zajímavý zdroj biologicky aktivních látek. Nejvýznamnější se ukazují antokyany z plodů kultivaru Samdal. Extrakty získané separací aktivních látek mají antioxidační aktivitu, která se pohybuje v rozmezí IC₅₀ 0,928 – 14,971 mg suchého extraktu, respektive 0,071 – 0,120 mg odpovídajících množství cyanidin 3-glukosidu.

6. Závěr

Plody černého bezu *Sambucus nigra* L. jsou významné obsahem antokyanů. Z plodů 10 kulturních odrůd černého bezu se získaly sumární antokyanové extrakty. Také se získal extrakt z drogy *Sambuci fructus*. Extrakce plodů se provedla okyselenou vodou a separace se provedla na sloupci polymerního neionogenního polystyren-divinylbenzenového sorbentu.

Obsah antokyanů v extraktech se stanovil spektrofotometricky modifikovanou pH-diferenční metodou. Jako standard se využil cyanidin 3-glukosid. Antioxidační aktivita se hodnotila *in vitro* metodou stanovení s DPPH[•].

Obsah antokyanů v extraktech se pohyboval v rozmezí 0,33 – 2,76 mg cyanidin 3-glukosidu na 1 ml extraktu. Nejvyšší množství antokyanů (počítáno jako cyanidin 3-glukosid) bylo v extraktech z plodů kultivarů Samdal (2,76 mg/ml).

Antioxidační aktivitu vykazovaly extrakty z plodů všech kultivarů. Antioxidační aktivita se vyjádřila jako IC₅₀ mg suchého extraktu. Hodnoty se pohybovaly v rozmezí 0,928 – 6,565 mg. Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazovaly plody kultivarů Samdal. Ostatní vykazovaly aktivitu dvakrát až šestkrát nižší. Nejnižší byla zjištěna u kultivarů Mammut a Sambo (IC₅₀ = 6,259 mg, resp. 6,565 mg). Antioxidační aktivita korelovala s obsahem antokyanů (cyanidin 3-glukosidu) u kultivarů Samdal, Samyl, Haschberg a Weihenstephan. Lze tedy říct, že se na celkové antioxidační aktivitě podílejí i jiné fenolické látky.

Plody pěstovaných kulturních odrůd černého bezu mohou být využity jako zdroj přírodních antioxidantů.

7. Abstrakt

Plody černého bezu *Sambucus nigra* L. se jako droga *Sambuci fructus* používají v terapii jako diaforetikum, diuretikum a laxativum. Vyšlechtěné kulturní odrůdy černého bezu se zkoumají pro využití v potravinářství i ve farmacii. Plody obsahují především antokyany a flavonoidy, které jsou známé svojí antioxidační aktivitou.

Cílem této práce je stanovit antioxidační aktivitu plodů druhu *Sambucus nigra* L., kultivarů Samdal, Mammut, Sambo, Sambu, Sampo, Bohatka, Haschberg, Weihenstephan, Allesö a Samyl a drogy *Sambuci fructus*. Z plodů se získal antokyanový extrakt postupem založeným na extrakci zmrazeného materiálu okyselenou vodou za tepla a separací na sloupci polymerního neionogenního polystyren-divinylbenzenového sorbentu.

Obsah antokyanových barviv v extraktech se stanovil spektrofotometricky modifikovanou pH-diferenční metodou. Absorbance se měřila v rozmezí 350 - 600 nm. Obsah antokyanů se vyjádřil jako mg cyanidin 3-glukosidu v 1 ml extraktu. Pohyboval se v rozmezí 0,33 – 2,76 mg cyanidin 3-glukosidu/ml extraktu. Nejvyšší obsah měl extrakt z plodů kultivaru Samdal a nejnižší kultivaru Mammut.

Poté se u suchých alkoholových extraktů stanovovala antioxidační aktivita *in vitro* metodou stanovení s DPPH[•]. Antioxidační aktivita extraktů se vyjádřila jako IC₅₀ mg suchého extraktu. Aktivitu vykazovaly extrakty z plodů všech kultivarů a hodnoty IC₅₀ se v závislosti na odrůdě pohybovaly v rozmezí 0,928 – 6,565 mg. Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval extrakt z plodů kultivaru Samdal a nejnižší, až šestkrát nižší, z kultivarů Mammut a Sambo. Aktivita byla v pořadí: Samdal > Samyl > Haschberg > Weihenstephan > Bohatka > Sampo > Allesö > Sambu > Mammut > Sambo.

Antioxidační aktivita korelovala s obsahem cyanidin 3-glukosidu v extraktech z plodů kultivarů Samdal, Samyl, Haschberg a Weihenstephan.

Plody pěstovaných kulturních odrůd černého bezu jsou významným zdrojem antokyanů a díky jejich antioxidační aktivitě mohou být využity jako zdroj přírodních antioxidantů.

8. Abstract

The fruit of the European elder, *Sambucus nigra* L., is used in therapy as a drug *Sambuci fructus* for its diaphoretic, diuretic and laxative effects. Cultivars of European elder are being studied for the use in the food industry and pharmacy. The fruit contains especially large amount of anthocyanins and flavonoids that are known for their antioxidant activity.

The aim of this work is to measure the antioxidant activity of the drug *Sambuci fructus* and of the fruit of the European elder cultivars Samdal, Mammüt, Sambo, Sambu, Sampo, Bohatka, Haschberg, Weihestephan, Allesö, and Samyl. An extract containing anthocyanins was obtained from fruit by a process based on extraction of frozen material with acidified water at high temperature, followed by separation with polymer non-ionogenic polystyrene-divinylbenzene sorbent.

The content of anthocyanins in the extracts was determined spectrophotometrically using a modified pH-differential method. The absorbance was measured along the range of 350 – 600 nm. The content of the anthocyanins was quantified in units of mg of cyanidin 3-glucoside in 1 ml of extract. The content ranged from 0.33 – 2.76 mg cyanidin 3-glucoside/ml of extract. The highest content was in the extract from the fruit of the cultivar Samdal and the lowest was of the cultivar Mammüt.

Then the antioxidant activity of dry alcoholic extracts was determined *in vitro* using the DPPH[•] free radical method. Antioxidant activity of extracts was quantified in units of IC₅₀ mg of dry extract. The extracts from the fruit of all the cultivars possessed the antioxidant activity ranging from 0.928 – 6.565 mg depending on the cultivar. The extract from the fruit of the cultivar Samdal showed the highest antioxidant activity, while the antioxidant activity of extracts of the cultivars Mammüt and Sambo were up to six times lower. The antioxidant activity was Samdal > Samyl > Haschberg > Weihestephan > Bohatka > Sampo > Allesö > Sambu > Mammüt > Sambo.

Antioxidant activity correlated with the content of cyanidin 3-glucoside in extracts from the fruit of the cultivars Samdal, Samyl, Haschberg, and Weihestephan.

The fruit of industry grown cultivars of the European elder is a considerable source of anthocyanins and thanks to their antioxidant activity it can be used as a source of natural antioxidants.

9. Použité zkratky

NO – nitrogen oxide, oxid dusnatý

ABTS - 2,2-azino-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonová kyselina)

ORAC – oxygen radical absorbance activity, aktivita vylučování kyslíkových radikálů

FRAP – ferric reducing antioxidant power, schopnost antioxidantu redukovat železitě ionty

IC₅₀ – inhibition concentration 50%, 50% inhibiční koncentrace

HPLC - high-performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

TEAC – Trolox equivalent antioxidant capacity, antioxidační aktivita ekvivalentní k Troloxu

10. Použitá literatura

1. Wichtl M. Teedrogen und Phytopharmaka: Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage. 5. vyd. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2009; 601-602s.
2. Heinrich M., Barnes J, Gibbons S., Williamson E. M. Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy. 2nd ed. London: Churchill Livingstone, Elsevier 2012; 235s.
3. Mohammadsadeghi S. et al. The antimicrobial activity of elderberry (*Sambucus nigra* L.) extract against gram positive bacteria, gram negative bacteria and yeast. Res. J. Appl. Sci. 2013; 8(4), 240-243.
4. Jahodář L. Farmakobotanika: Semenné rostliny. 1. vyd. Praha: Karolinum 2006; 22s.
5. <http://www.itis.gov>. Integrated Taxonomic Information System: on-line database (online). 2013. (10.12.2013)
6. Slavík B. Květena České republiky 5. Praha: Academia 2000; 504-506s.
7. Veberic R., Jakopic J., Stampar F., Schmitzer V. European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. Food Chem. 2009; 114(2), 511-515.
8. Anton A. M. et al. Preliminary studies on the chemical characterization and antioxidant capacity of polyphenols from *Sambucus* sp. Dig. J. Nanomater. Bios. 2013; 8(3), 973-980.
9. Lee J., Finn Ch. E. Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars. J. Sci. Food Agr. 2007; 87, 2665-2675.
10. Fazio A. et al. Comparative analyses of seeds of wild fruits of *Rubus* and *Sambucus* species from Southern Italy: Fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts. Food Chem. 2012; 140(4), 817-824.
11. Yao L.H. et al. Flavonoids in food and their health benefits. Plant Food Hum. Nutr. 2004; 59, 113-122.
12. Clifford M. N. Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. J. Sci. Food Agr. 2000; 80(7), 1063-1072.
13. Aherne S. A., O'brien N. M. Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. Nutrition. 2002; 18(1), 75-81.

14. Wu X. et al. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and their antioxidant capacity. *J. Agr. Food Chem.* 2004; 52(26), 7846-7856.
15. Fernandes I. et al. Antioxidant and antiproliferative properties of methylated metabolites of anthocyanins. *Food Chem.* 2013; 141, 2923-2933.
16. Castañeda-Ovando A. et al. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem.* 2009; 113(4), 859-871.
17. Kong J.-M. et al. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry.* 2003; 64, 923-933.
18. Li H. et al. Highly pigmented vegetables: Anthocyanin compositions and their role in antioxidant activities. *Food Res. Int.* 2012; 46(1), 250-259.
19. De Pascual-Theresa S., Moreno D. A., García-Viguera C. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence. *Int. J. Mol. Sci.* 2010; 11, 1679-1703.
20. Scobie H. A. Dietary hydroxycinnamic acids: Phase I and phase II metabolism (online). 2000; 1-106s.
<https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/14199/1/MQ54178.pdf>
(02.12.2013)
21. Gallie D. R. L-Ascorbic Acid: A multifunctional molecule supporting plant growth and development. *Scientifica.* 2012; 2013, 1-24.
22. Krawitz Ch. et al. Inhibitory activity of a standardized elderberry liquid extract against clinically-relevant human respiratory bacterial pathogens and influenza A and B viruses. *BMC Complement. Altern. Med.* 2011; 11(16), 1-6.
23. Vogl S. et al. Ethnopharmacological in vitro studies on Austria's folk medicine - An unexplored lore in vitro anti-inflammatory activities of 71 Austrian traditional herbaldrugs. *J. Ethnopharmacol.* 2013; 149, 750-771.
24. <http://www.naturesway.com/Products/Winter-Season/6974-Sambucus-Immune-Syrup.aspx>. Nature's Way (online). 2008. (07.11.2013)
25. Badescu L. et al. Mechanism by Sambucus nigra extract improves bone mineral density in experimental diabetes. *Evid-Based Compl. Alt.* 2012; 2012, 1-6.
26. Racek J. Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění. 1. vyd. Praha: Galén 2003; 9-13, 16-21, 34-35, 64-65s.
27. Barros L. et al. Chemical, biochemical and electrochemical assays to evaluate phytochemicals and antioxidant activity of wild plants. *Food Chem.* 2011; 127, 1600-1608.
28. Dawidowicz A. L., Wianowska D., Olszowy M. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH: Problems in estimation of antioxidant activity. *Food Chem.* 2012; 131, 1037-1043.

29. Carochó M., Ferreira I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* 2013; 51, 15-25.
30. Hwang S. J. et al. Radical-scavenging-linked antioxidant activities of extracts from black chokeberry and blueberry cultivated in Korea. *Food Chem.* 2014; 146, 71-77.
31. Sharma O.P., Bhat T.K. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.* 2009; 113, 1202-1205.
32. Dawidowicz A. L., Wianowska D., Baraniak B. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). *Food Sci. Technol.* 2006; 39, 308-315.
33. Ozgen M. et al. Total phenolic, anthocyanin contents and antioxidant capacity of selected elderberry (*Sambucus canadensis* L.) accessions. *Pharmacogn. Mag.* 2010; 6(23), 198-203.
34. Tabart J. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Ribes nigrum* extracts. *Food Chem.* 2012; 131, 1116-1122.
35. Sun L.-Q. et al. Antioxidant anthocyanins screening through spectrum–effect relationships and DPPH-HPLC-DAD analysis on nine cultivars of introduced rabbiteye blueberry in China. *Food Chem.* 2012; 132, 759-765.
36. Jakobek L. et al. Phenolic acids, flavonols, anthocyanins and antiradical activity of “Nero”, “Viking”, “Galicianka” and wild chokeberries. *Sci. Hortic-Amsterdam.* 2012; 147, 56-63.
37. Im S.-E. et al. Anthocyanins in the ripe fruits of *Rubus coreanus* Miquel and their protective effect on neuronal PC-12 cells. *Food Chem.* 2013; 139, 604-610.
38. Kraujalyte V. et al. Antioxidant properties and polyphenolic compositions of fruits from different European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) genotypes. *Food Chem.* 2013; 141, 3695-3702.
39. Liang L. et al. In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Res. Int.* 2012; 46, 76-82.
40. Hogan S. et al. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. *Food Chem.* 2010; 118, 208-214.
41. Fernandes V. C. et al. Strawberries from integrated pest management and organic farming: Phenolic composition and antioxidant properties. *Food Chem.* 2012; 134, 1926-1931.
42. Duymuş H. G., Göger F., Hüsnü Can Başer K. In vitro antioxidant properties and anthocyanin compositions of elderberry extracts. *Food Chem.* 2014; 155, 112-119.

43. Ballistreri G. et al. Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Italy. *Food Chem.* 2013; 140, 630-638.
44. Zhang L. et al. Inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition. *Food Chem.* 2010; 119, 592-599.
45. Chiang Ch.-J., Kadouh H., Zhou K. Phenolic compounds and antioxidant properties of gooseberry as affected by in vitro digestion. *Food Sci. Technol.* 2013; 51, 417-422.
46. Yu Y. et al. Effect of ultra-high pressure homogenisation processing on phenolic compounds, antioxidant capacity and anti-glucosidase of mulberry juice. *Food Chem.* 2014; 153, 114-120.
47. Cerezo A. B. et al. Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in Camarosa strawberry. *Food Chem.* 2010; 123, 574-582.
48. Koca I., Karadeniz B. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. *Sci. Hortic-Amsterdam.* 2009; 121, 447-450.
49. He N. et al. Characterisation of antioxidant and antiproliferative acidic polysaccharides from Chinese wolfberry fruits. *Food Chem.* 2012; 133, 978-989.
50. Balogh E., Hegedűs A., Stefanovits-Bányai É. Application of and correlation among antioxidant and antiradical assays for characterizing antioxidant capacity of berries. *Sci. Hortic-Amsterdam.* 2010; 125, 332-336.
51. Bratu M. M. et al. Determination of Antioxidant Activity and Toxicity of *Sambucus nigra* Fruit Extract Using Alternative Methods. *Food Technol. Biotech.* 2012; 50(2), 177-182.
52. Bordonaba J. G., Terry L. A. Electrochemical behaviour of polyphenol rich fruit juices using disposable screen-printed carbon electrodes: Towards a rapid sensor for antioxidant capacity and individual antioxidants. *Talanta.* 2012; 90, 38-45.
53. Aguirre M. J. et al. Electrochemical behaviour and antioxidant capacity of anthocyanins from Chilean red wine, grape and raspberry. *Food Chem.* 2010; 121, 44-48.
54. Bornsek S. M. et al. Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intracellular antioxidants in mammalian cells. *Food Chem.* 2012; 134, 1878–1884.
55. Denev P. et al. Solid-phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. *Food Chem.* 2010; 123, 1055-1061.

56. Casati C. B. et al. Relationships between colour parameters, phenolic content and sensory changes of processed blueberry, elderberry and blackcurrant commercial juices. *Int. J. Food Sci. Tech.* 2012; 47, 1728-1736.
57. Slantar A. et al. The Effect of Bioactive Compounds on In Vitro and In Vivo Antioxidant Activity of Different Berry Juices. *PLoS ONE.* 2012; 7(10). DOI: 10.1371/journal.pone.0047880
58. Wang H., Cao G., Prior L. R. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 1997; 45(2), 304-309.
59. Borges G. et al. Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants, and cranberries. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58(7), 3901-3909.