

# Stanovení vybraných fenolických látek v ovocných nápojích

Bc. Lucie Masaříková

---

Diplomová práce  
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2012/2013

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Masaříková**  
Osobní číslo: **T11116**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Stanovení vybraných fenolických látek v ovocných nápojích**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Prostudujte odbornou literaturu a zjistěte biologicky aktivní fenolické sloučeniny, které se mohou vyskytovat v ovocných nápojích.
2. Popište konzervační metody používané pro zvýšení údržnosti ovocných šťáv.

### II. Praktická část

1. Provedte přípravu vzorků pro měření fenolických sloučenin v ovocných nápojích.
2. Stanovte fenolické látky v ovocných nápojích.
3. Získaná data podrobte statistické analýze a výsledky porovnejte s odbornou literaturou.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] ROP, O., HRABĚ, J. Nealkoholické a alkoholické nápoje, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín, 2009, 1. vydání, 129 stran, ISBN 978-80-7318-748-4.

[2] RASTOGI, N., K. et al. Opportunities and Challenges in High Pressure Processing of Foods, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2007, ročník 47, číslo 1, ISSN 1040-8398.

[3] ASHURST, P., R. Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices, Blackwell Publishing, Oxford UK, 2005, 2. vydání, 396 stran, ISBN 1-4051-2286-2.

[4] HUI, Y., H. et al. Handbook of Food Products Manufacturing, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2007, 1. vydání, 2237 stran, ISBN 978-0-470-04964-8.

[5] SHUI, G., LEONG, L., P. Separation and Determination of Organic Acids and Phenolic Compounds in Fruit Juices and Drinks by High-Performance Liquid Chromatography, Journal of Chromatography A, 2002, Volume 977, Issue 1, ISSN 0021-9673.

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Pavel Hanuštiak**

Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

**16. ledna 2013**

Termín odevzdání diplomové práce:

**2. května 2013**

Ve Zlíně dne 4. února 2013

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



  
doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: Masaříková Lucie

Obor: Technologie, hygiena a ekonomika  
výroby potravin

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 29. 4. 2013

*Lucie Masaříková*  
.....

<sup>11</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>12</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>31</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jim dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Cílem práce je popsat a stanovit vybrané fenolické látky, které jsou obsaženy v jablečných šťávách. Dále je popsána technologie výroby ovocných šťáv, typy konzervace šťáv a je zde uvedena i charakteristika důležité výchozí suroviny – jablek. Analýza jablečných džusů je provedena pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detektorem.

Klíčová slova: fenolické sloučeniny, antioxidanty, ovocné šťávy, vysoce účinná kapalinová chromatografie

## **ABSTRACT**

The aim of this work is a description and analysis some of the phenolic compounds in apple juices. It is also characterized apple juice production, types of preservation juices. One of the most important raw material (apples) is also described. The analysis is performed using high performance liquid chromatography with UV/VIS detector.

Keywords: phenolic compounds, antioxidants, fruit drinks, high performance liquid chromatography

## Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Pavlu Hanuštiakovi, Ph.D. za odborné vedení a konzultace při zpracování této práce, dále bych chtěla poděkovat Ing. Evě Lorencové za pomoc při praktické části. Velký dík patří i mé rodině a přátelům, kteří mi pomohli sehnat vzorky jablečných šťáv a moštů, bez nichž by tato práce nemohla být uskutečněna.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>13</b>
<b>1 VÝROBA OVOCNÝCH NÁPOJŮ</b> .....	<b>14</b>
1.1 SUROVINY .....	14
1.1.1 Jablka.....	14
1.1.2 Jablka na území ČR.....	15
1.1.3 Chemické složení jablek .....	17
1.1.4 Látky ovlivňující chuť jablek.....	17
1.2 VÝROBA ŠŤÁV .....	18
1.2.1 Skladování ovoce .....	19
1.2.2 Praní a třídění ovoce.....	19
1.2.3 Drcení ovoce .....	19
1.2.4 Lisování ovoce .....	19
1.2.5 Odkalení šťáv .....	20
1.2.6 Konzervace šťáv.....	20
<b>2 ANTIOXIDANTY</b> .....	<b>21</b>
2.1 VOLNÉ RADIKÁLY .....	21
2.2 VÝSKYT ANTIOXIDANTŮ .....	22
2.3 CELKOVÁ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA .....	22
<b>3 POLYFENOLICKÉ SLOUČENINY</b> .....	<b>23</b>
3.1 DĚLENÍ POLYFENOLŮ .....	23
3.1.1 Fenolové kyseliny .....	23
3.1.1.1 Dělení.....	24
3.1.2 Flavonoidy.....	25
3.1.3 Stilbeny .....	25
3.1.4 Lignany .....	25
3.2 CHEMICKÁ STRUKTURA POLYFENOLŮ .....	25
3.3 PŘÍJEM POLYFENOLŮ .....	26
<b>4 VYBRANÉ FENOLICKÉ SLOUČENINY</b> .....	<b>27</b>
4.1 4-AMINOBENZOOVÁ KYSELINA.....	27
4.2 3,4-DIHYDROXYBENZOOVÁ KYSELINA .....	27
4.3 4-HYDROXYBENZOOVÁ KYSELINA.....	28
4.4 VANILINOVÁ KYSELINA.....	29
4.5 KÁVOVÁ KYSELINA .....	29
4.6 VANILIN .....	30
4.7 P-KUMAROVÁ KYSELINA.....	30
4.8 FERULOVÁ KYSELINA .....	31
4.9 SINAPOVÁ KYSELINA.....	32
<b>5 PASKALIZACE</b> .....	<b>33</b>



5.1	VÝHODY KONZERVACE VYSOKÝMI TLAKY .....	33
5.2	KONZERVACE PASKALIZACÍ U OVOCNÝCH ŠŤÁV .....	33
5.3	SROVNÁNÍ KONZERVACE VYSOKÝMI TLAKY A VYSOKOU TEPLOTOU .....	34
<b>6</b>	<b>EXTRAKČNÍ METODY .....</b>	<b>35</b>
6.1	TYPY EXTRAKČNÍCH METOD .....	35
6.1.1	Extrakce fenolických sloučenin .....	36
<b>7</b>	<b>CHROMATOGRAFIE .....</b>	<b>37</b>
7.1	DĚLENÍ CHROMATOGRAFIE .....	37
7.2	KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE .....	37
7.3	VYSOCE ÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE .....	38
7.3.1	Mobilní fáze .....	39
7.3.2	Stacionární fáze .....	39
7.3.3	Vysokotlaké čerpadlo .....	40
7.3.4	Dávkovač .....	40
7.3.5	Kolona .....	40
7.3.6	Detektor .....	41
7.3.7	Vyhodnocovací zařízení .....	41
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>42</b>
<b>8</b>	<b>CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....</b>	<b>43</b>
<b>9</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>44</b>
9.1	ANALYZOVANÝ MATERIÁL .....	44
9.1.1	Popis jednotlivých vzorků .....	44
9.2	CHEMIKÁLIE .....	46
9.3	PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....	46
9.4	PŘÍPRAVA VZORKŮ .....	47
9.5	ANALÝZA HPLC .....	47
9.6	KALIBRAČNÍ KŘIVKY FENOLICKÝCH SLOUČENIN .....	47
9.6.1	Kalibrační křivka pro 4-aminobenzoovou kyselinu .....	48
9.6.2	Kalibrační křivka pro 3,4-dihydroxybenzoovou kyselinu .....	48
9.6.3	Kalibrační křivka pro 4-hydroxybenzoovou kyselinu .....	49
9.6.4	Kalibrační křivka pro vanilinovou kyselinu .....	49
9.6.5	Kalibrační křivka pro kávovou kyselinu .....	50
9.6.6	Kalibrační křivka pro vanilin .....	50
9.6.7	Kalibrační křivka pro p-kumarovou kyselinu .....	51
9.6.8	Kalibrační křivka pro ferulovou kyselinu .....	51
9.6.9	Kalibrační křivka pro sinapovou kyselinu .....	52
<b>10</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>53</b>
10.1	VÝSLEDKY .....	53
10.1.1	4-aminobenzoová kyselina .....	53
10.1.2	3,4-dihydroxybenzoová kyselina .....	53
10.1.3	4-hydroxybenzoová kyselina .....	54
10.1.4	Vanilinová kyselina .....	54
10.1.5	Kávová kyselina .....	55
10.1.6	Vanilin .....	55
10.1.7	p-kumarová kyselina .....	56

10.1.8 Sinapová kyselina.....	56
10.1.9 Celkové množství vybraných fenolických látek .....	57
10.2 DISKUZE.....	58
<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>60</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>62</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>68</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>69</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>71</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>72</b>

## ÚVOD

Pro člověka je důležitý pravidelný přísun tekutin. Lidský organismus je tvořen ze dvou třetin vodou, která je prostředím pro biochemické procesy v organismu, látkovou a energetickou výměnu, je to prostředí pro rozpouštění mnoha přijímaných látek z potravy a také je voda regulátorem teploty. Voda se z lidského těla vylučuje potem, dýcháním, močí a stolicí, a proto je tato ztráta vody doplňována tekutinami, které člověk vypije. Denní doporučená dávka příjmu tekutin je 2 až 3 litry na osobu. Džusy odvádí z těla vodu a mají vysoký obsah energie, a proto pokud džusy pijeme na zahánění žizně a jako náhradu příjmu tekutin, je doporučeno zředit džusy a ovocné šťávy s vodou v poměru 1 díl šťávy a 2 díly vody.

Ovocné šťávy jsou důležitým zdrojem látek, které potřebuje lidský organismus. Těmito látkami jsou především vitaminy, minerální látky a fenolické látky. Pitím ovocných šťáv je posilován imunitní systém a pitím 100% ovocných šťáv se snižuje riziko obezity, mozkové mrtvice, či infarktu myokardu. Výhodou ovocných šťáv oproti ovoci je, že šťávy jsou rychleji stravitelné. V posledních letech je velmi oblíbená konzumace zeleninovo-ovocných šťáv. Nejoblíbenější kombinace jsou jablko s červenou řepou, jablko s mrkví a jablko se zelím.

Při vysoké konzumaci ovocných šťáv můžeme tělu spíše uškodit než pomoci. Vysokou konzumací je myšleno více než 3 sklenice ovocných šťáv denně. Do těla se dostává vysoké množství cukrů. Při zvýšené konzumaci těchto džusů je třeba si uvědomit, že jedna sklenice jablečného džusu může obsahovat množství fruktózy odpovídající až šesti jablkům. Cukry mohou zvýšit riziko vzniku cukrovky a srdečních onemocnění a také díky vysokému množství jednoduchých cukrů je podpořen vznik rakoviny a dalších nádorových onemocnění. Dalším negativním aspektem vysoké konzumace džusů je zhoršení zubní skloviny a to především kvůli obsahu kyselin, které rozleptávají zubní sklovinu a tvrdost skloviny je tak snížena až o 80 %. U dětí je proto důležité se vyvarovat každodennímu podávání ovocných džusů. Nevýhodou vysokého příjmu jablečného, grepového a pomerančového džusu je snížení účinků některých léků při léčbě vysokého tlaku, k prevenci infarktu, či některých antibiotik.

Tato práce je zaměřena především na stanovení fenolických látek v jablečných šťávách, které jsou kombinovány i s jinými zeleninovými šťávami, nebo bylinnými extrakty. Jednotlivé šťávy vzaty k analýze jsou taky odlišné způsobem konzervace - jablečné šťávy

ošetřené teplem, nebo vysokými tlaky. V práci jsou zhodnoceny klady a zápory zmíněných dvou způsobů konzervování šťáv.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 VÝROBA OVOCNÝCH NÁPOJŮ

Vyhláškou je definován pojem ovocná šťáva jako šťáva, zkvasitelný, ale nezkvašený výrobek, který je získán z přiměřeně zralého a zdravého ovoce. Ovoce musí být čerstvé, nebo chlazené. Šťáva může být vyrobena z ovoce jednoho i více druhů a musí mít charakteristickou vůni, chuť a barvu typickou pro dané ovoce. V průběhu zpracování je možné oddělit aroma, dužninu a buňky ze šťávy a následně je to téže šťávy vrátit [1].

Ovocné šťávy je dovoleno přislažovat přírodními sladidly do povoleného množství 150 g/l šťávy. Obsah vody u těchto sladidel nesmí být vyšší než 2 %. Do ovocné šťávy se také mohou přidávat vitaminy a minerální látky [1].

Největším objemem nesycených nápojů jsou právě ovocné šťávy. Tyto šťávy jsou velmi citlivé na mikrobiální kažení a kvašení, a proto je nutné šťávy ošetřit pasterizací, výjimkou jsou šťávy z čerstvého ovoce okamžitě baleny a uchovávány při teplotě 0 – 5°C s krátkou trvanlivostí (několik dní) [2].

### 1.1 Suroviny

Pro výrobu nealkoholických nápojů jsou hlavními surovinami voda (pitná, pramenitá, přírodní minerální, kojenecká), ovoce, sladidla, kyseliny, oxid uhličitý, aromatické látky, barviva [3]. Jednou z nejdůležitějších surovin k výrobě nealkoholických nápojů je ovoce. Mezi nejvíce rozšířené ovoce na celém území České republiky jsou řazena jablka [4].

#### 1.1.1 Jablka

V současnosti jsou u nás jablka nejvíce pěstovaným ovocem. Pro výrobu šťáv jsou zpracovávána hlavně padaná a méně jakostní jablka podzimních a zimních odrůd. Jablka obsahují asi 10 % cukrů a 0,8 % kyselin. Také výlisnost jablek je vysoká – kolem 70 % [4]. Jablka (*Malus domestica*) jsou plody jabloně domácí a jsou to malvice. Jablka jsou různého vybarvení a podle normy EU jsou roztrženy na A – červené odrůdy, B – smíšené červené odrůdy, C – žíhané). U odrůd, které mají sklon ke rzivosti, jsou hodnoceny nahnědlé skvrny, síťovitá rzivost (jemně a hustě) a rozsah nesmí překročit povolené limity jednotlivých tříd [5]. Rzivost slupky může být způsobena nízkými teplotami (pod 5°C) a mrazíky, nevhodné použití pesticidů (hlavně fungicidů) a virová onemocnění. Ohroženy jsou především odrůdy jablek se žlutou slupkou (např. Golden Delicious) U silně rzivých plodů je typická zvýšená ztráta vody, dřívější vadnutí a horší skladovatelnost [6].



*Obr. 1: Jablka s/bez rzivosti [6]*

Typický tvar jablek je kulovitý. Povrch plodu je hladký, textura dužniny je jemná, šťavnatá, přiměřeně pevná, křehká, křuplavá, lámavá, není rozbředlá. Nežádoucím jevem je moučnatění jablek [7]. Jedním ze znaků přezrálости je již zmíněné moučnatění. Jablka mohou také příčně praskat, ztrácet chuť a podléhat skládkovým chorobám (např. strupovitost, kruhová hnědá hniloba) [5].

### **1.1.2 Jablka na území ČR**

Situační a výhledová zpráva z roku 2012 uvádí, že jablka jsou ovoce, které se podílí na celkové produkci ovoce z 58 %. Ze Situační a výhledové zprávy z roku 2012 také vyplývá, že sklizeň jablek (158,9 tis. t) byla v roce 2011 nejhorší od roku 1984. V ČR je v posledních letech záporná obchodní bilance konzumních jablek, jelikož produkce jablek není schopna pokrýt spotřebu. Jablka se na tržbách ovocnářských podniků podílela ze 62 % v roce 2011. Celková úroda ovoce v produkčních sadech (k 1. 9. 2012) je odhadována na 20 % nárůst oproti roku 2011, ale i tak bude produkce nižší než je průměr předcházejících pěti let. Produkce bude nižší z důvodu silných mrazů (9. 4. a 18. 5. 2012), díky kterým byly poškozeny sady na jižní Moravě a severozápadu Čech – až 100% zničení úrody nejen jablek, ale i meruněk, slivoní a jahod. V tabulce č. 1 je srovnáno celkové množství ploch osázených jabloněmi a z toho plodných jabloní v posledních dvou letech. V tabulce č. 2 je uvedeno zastoupení odrůd pěstovaných v produkčních sadech na území ČR [8].

	2011		2012	
	$\Sigma$ [ha]	plodné [ha]	$\Sigma$ [ha]	plodné [ha]
Jabloně	9 135	8 616	9 071	8 617

Tab. 1: Vývoj ploch produkčních ovocných sadů v ČR(ha) [8]

Skupina odrůd	Odrůda jabloní	ROK 2011 Celková výměra v ha	ROK 2012 Celková výměra v ha
<b>Letní odrůdy celkem</b>		<b>191,0</b>	<b>191,2</b>
Podzimní odrůdy	James Grieve a mutace	164,2	156,2
	Ostatní	162,7	163,5
<b>Podzimní odrůdy celkem</b>		<b>326,9</b>	<b>319,7</b>
Zimní odrůdy	Šampion	513,9	499,2
	Spartan, McIntosh	630,0	577,8
	Rubín, Bohemia	654,9	619,1
	Gala	285,3	334,5
	Golden Delicious a var.	1 986,8	1 955,4
	Skup. Red Delicious	143,3	135,4
	Jonagold a mutace	660,4	671,8
	Melrose	145,0	141,9
	Gloster	249,9	232,9
	Rubinola	192,1	197,4
	Topaz	242,3	249,6
	Idared	1 657,7	1 651,5
	Melodie	80,4	76,6
<b>Zimní odrůdy celkem</b>		<b>8 617,4</b>	<b>8 560,5</b>
<b>CELKEM</b>		<b>9 135,3</b>	<b>9 071,4</b>

Tab. 2: Zastoupení odrůd jabloní v produkčních sadech v ČR [8]



### 1.1.3 Chemické složení jablek

Téměř 85 % hmoty jablek je tvořeno vodou. Dále jsou v jablkách ve velkém množství zastoupeny sacharidy – může být až kolem 14 %, v menším množství je zde vláknina (2,4 %), organické kyseliny (0,8 %), bílkoviny (0,3 %) a lipidy (0,2 %).

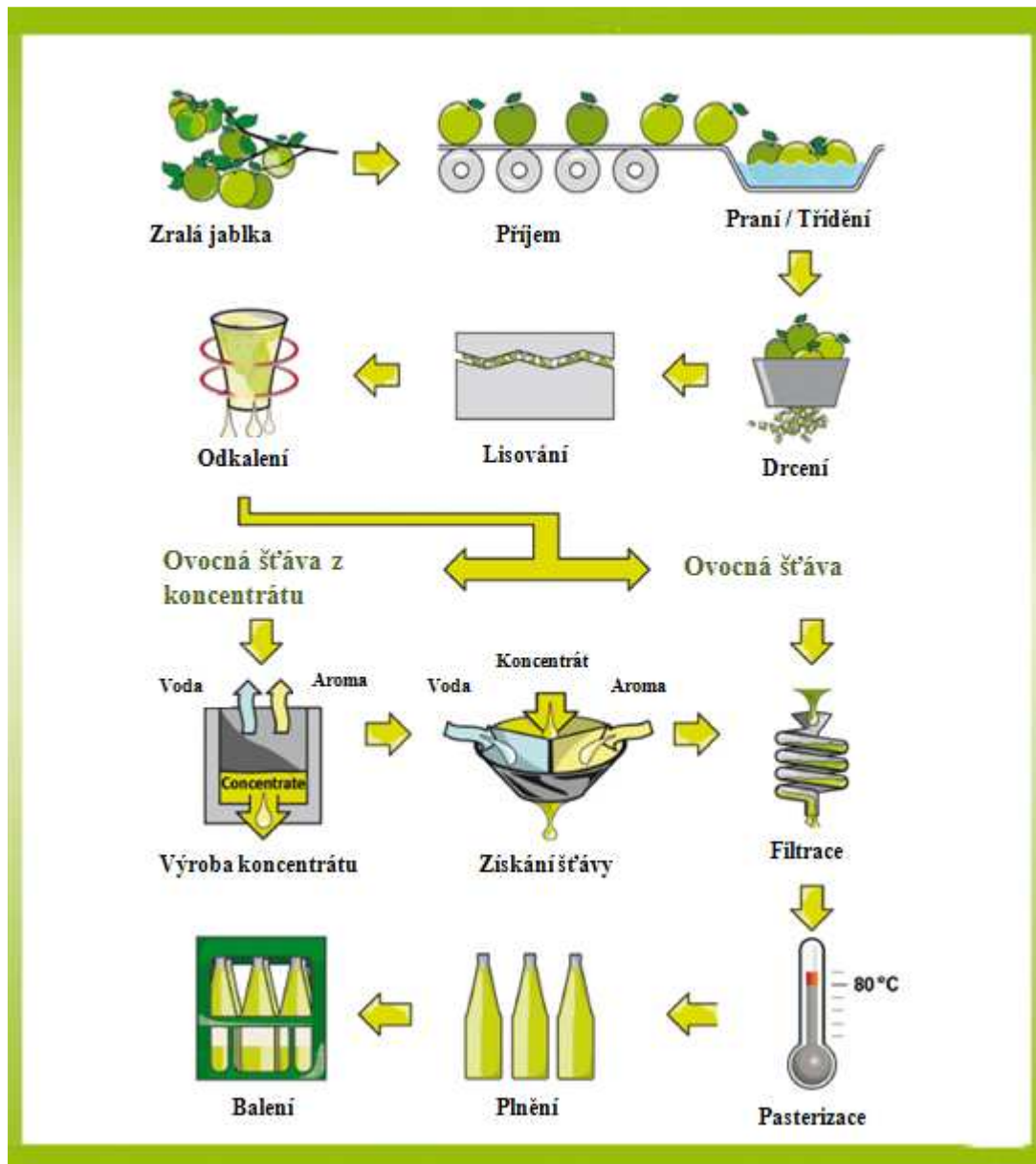
Fruktóza, glukóza a sacharóza tvoří v jablkách 75 % všech sacharidů. Z organických kyselin převládá kyselina L-jablečná. Chemické složení jablek je typické pro každý druh jablek a závisí také na environmentálních podmínkách během růstu a na způsobu skladování [9].

Jablečná vůně a aroma je typická pro danou odrůdu a dosud bylo identifikováno více než 260 pachových složek. V dužnině je přítomno malé množství těchto látek, většina se vyskytuje ve slupce. Charakteristickou složkou jablečné vůně je hexyl-2-metyléster kyseliny máselné. Jablka také obsahují velké množství fenolických látek, jako například kyselinu chinovou, kávovou, chlorogenovou [7].

### 1.1.4 Látky ovlivňující chuť jablek

Různé estery, alkoholy, aldehydy, ketony a terpenoidy vznikají v důsledku biochemických a metabolických reakcí. Tyto látky během růstu, zrání a skladování udělují charakteristické chuť a aroma pro ovoce. Většina chuťových látek v jablkách je tvořena těkavými estery. Sloučeniny jako například ethylpropionát a butylacetát jsou hlavními nositeli jablečné chuti. Hexylacetát je zodpovědný za sladce ovocné tóny, a sladký pocit je způsoben 1-butanolem.  $\beta$ -damascenon, hexylkapronát, spolu s ethylbutanoáty, propylbutanoáty a hexylbutanoáty jsou důležité pro chuť jablek. Dalšími sloučeninami ovlivňující jablečnou příchut' jsou propylacetát, butylbutyrát, t-butylpropionát, isobutyl, butylacetát, ethylbutyrát, ethyl-2-methylbutyrát a hexylbutyrát [9].

## 1.2 Výroba šťáv



Obr. 2: Výroba ovocných šťáv [10]

Pro dosažení nejlepších moštů je vhodná kombinace kyselejších a sladších odrůd jablek. Kyselejší jablka jsou původci specifického aroma moštu a kyselin a díky sladkým odrůdám jsou mošty cukernaté. Ze starých odrůd jsou vhodné následující krajové odrůdy: Jadernička moravská, Bismarkovo, Strýmka, Panenské české, Kardinál žíhaný, Car Alexandr, Grávštýnské, Croncelské, Malinové holovouské, Průsvitné letní, Landsberská reneta, Kassel-ská reneta, Parkerovo, Ušlechtilé žluté, Watervlietské mramorované, Charlamowski (Borovnicka), Wealthy. Velmi dobré mošty jsou také z novějších odrůd Melodie a Angold [11].

Šťáva z ovoce se získává především lisováním, ale může se získat i vyluhováním. Do technologického postupu se řadí následující operace: skladování ovoce, praní, třídění, drcení, úprava drtě, lisování, odkalení a konzervace šťáv [4].

### 1.2.1 Skladování ovoce

Jablka, která jsou určena pro zpracování na mošty, sirupy apod., jsou skladována krátkou dobu před samotným zpracováním [12]. Skladováním je totiž podpořen rozvoj plísní a hniloby. Také při skladování dochází k samovolnému zahřívání až k zapaření – ovoce má nepříjemnou chuť, vůni, nelze lisovat. Jablka je možné skladovat až 10 dní na betonových skládkách (se spádem asi 2 %), ze kterých jsou jablka dopravovány do sběrné jímky a následně do lisovny [4].

### 1.2.2 Praní a třídění ovoce

Praním se jablka zbaví nečistot, hlíny a mikroorganismů z povrchu. Pro praní jsou používány kartáčové, bubnové či hřeblové pračky. Na koncích praček jsou umístěny sprchy [4]. Tříděním jsou vyřazeny nevhodné plody pro zpracování (např. tvarové odlišnosti, napadené plísní či jinak narušené). Třídění je prováděno na běžících pásech, kterými je surovina unášena a zároveň otáčena, nevyhovující surovina je vyřazena a podle kvality je možno ji použít k jiným účelům (krmné, kvasné) [12].

### 1.2.3 Drcení ovoce

Drcení je zařazeno do technologického postupu z hlediska snadnějšího lisování a zvýšení výlisnosti, Pro drcení jsou používány různé typy drtičů, pro jablka jsou běžně používány pilkové nebo talířové drtiče. Vzniklá drť je dopravována pomocí čerpadel do zásobníků [4].

### 1.2.4 Lisování ovoce

Lisování jablek se provádí ihned po drcení a provádí se pomocí hydraulických nebo pneumatických lisů. Při lisování je podmínkou nechat odtéci maximální množství samotoku. Lisování je uskutečňováno přerušovaným tlakem z důvodu snadnějšího odtoku šťávy. Měrný tlak v ovocné drti by neměl přesáhnout 1,6 MPa. Dále je zakázáno lisovat rychleji, než odteče šťáva a při plnění do lisu musí být ovoce rovnoměrně vsypáno [4].

### 1.2.5 Odkalení šťáv

Šťávy, které jsou získány lisováním, jsou kalné a pro další zpracování je nutné provést odstranění kalu [4]. Tento děj je nazýván číření, které je prováděno působením čířidel. Čířidla jsou látky, kterými jsou vysráženy koloidní složky šťávy [12].

Čířidla jsou podle účinku dělena na:

- mechanická - chemicky nereagují se složkami šťávy, ale při usazování čířidla jsou strhávány i nečistoty
- chemicko-mechanická – chemicky reagují se složkami šťáv a je tvořena sraženina klesající ke dnu
- enzymatická – jsou založeny na principu působení pektolytických enzymů [4]

### 1.2.6 Konzervace šťáv

Získanou šťávu (po vylisování a odkalení) je možné ihned zpracovat, nebo zakonzervovat na polotovary pro pozdější výrobu nealkoholických nápojů. Základními polotovary jsou sukusy, matečné šťávy a ovocné koncentráty. **Sukusy** jsou šťávy konzervované chemicky nejčastěji pomocí oxidu šišičitého, nebo benzoanu sodného s kyselinou sorbovou. **Matečné šťávy** jsou šťávy konzervované oxidem uhličitým na koncentraci 1,5 %. **Ovocné koncentráty** jsou šťávy konzervované zahušťováním na 60 – 65 % refraktometrické sušiny [4].

Prodloužení údržnosti vylisovaných ovocných šťáv také možno docílit těmito zákroky: pasterací a mražením [13]. Pro konzervaci je používána i paskalizace (konzervace za použití vysokých tlaků), o které bude více napsáno v 5. kapitole.

## 2 ANTIOXIDANTY

Antioxidanty jsou definovány jako látky, které při působení v nízkých koncentracích chrání potraviny před oxidací (žluknutím tuků a oxidace vonných látek) a zpomalují oxidaci ostatních látek (tkání) [14].

Antioxidanty mohou být **přírodní** a **syntetické**.

- a) Přírodní antioxidanty jsou používány i jako aditiva do některých potravin, převážně jsou to tokoferoly. Přírodní antioxidanty jsou získávány z rostlin především jako extrakty a mohou mít i omezené použití aditivních látek z důvodu hořké chuti, nebo vůni po rostlinách, ze kterých byly získány [14].
- b) Syntetické antioxidanty jsou přidávány do potravin ve větším množství, jelikož jsou levnější než přírodní [14]. Přidávky syntetických antioxidantů mohou mít ale mnoho nežádoucích účinků, jako je riziko poškození jater a vzniku rakoviny, proto jsou lepší do potravin přidávat antioxidanty přírodního původu [15].

O látky s antioxidačními vlastnostmi je v nynější době velký zájem z důvodu léčebného využití. Důležitá vlastnost těchto látek je například zpomalení v patogenezi stárnutí, prevence kardiovaskulárních chorob, či nádorového bujení [16].

Dle struktury se dělí antioxidanty na **fenolové** (tokoferoly, galláty a další sloučeniny potravin) a **endioly** (askorbová a erythorbová kyselina, jejich soli a jiné deriváty) [14].

Látkami s antioxidační aktivitou jsou především polyfenoly, které zachytávají a likvidují volné radikály – nejvíce volné radikály kyslíku a díky těmto složkám je například dokázáno, že při umírněném konzumu vína je snižováno riziko infarktu a rakoviny [17].

### 2.1 Volné radikály

Volné radikály jsou atomy, nebo molekuly mající ve své valenční vrstvě nepárový elektron. Tyto látky jsou původci oxidačního stresu. Oxidační stres je způsoben především reaktivními formami kyslíku (superoxid  $O_2^\bullet$ , hydroxylový radikál  $HO^\bullet$ ). Toto oxidační poškození je hlavním činitelem různých onemocnění, jako je rakovina, kardiovaskulární onemocnění, nervové poruchy, Alzheimerova choroba, poškození DNA a různé plicní poruchy (astma, rakovina plic) [15]. Antioxidanty mají schopnost zabránit účinkům volných radikálů tak, že poskytují volným radikálům jeden ze svých elektronů [18, 19].

## 2.2 Výskyt antioxidantů

Antioxidanty jsou hojně zastoupeny v ovoci a zelenině, v ovocných a zeleninových šťávách. Dále jsou antioxidanty přítomny v čaji (zeleném i černém), aromatických a léčivých rostlinách, pivu, chmelu, rýži, vejcích, mas [20].

Jako antioxidanty jsou brány tyto sloučeniny: vitaminy C a E, teinové sloučeniny zeleného čaje, kyselina lipoová (jediný antioxidant rozpustný ve vodě i v tucích, proto je schopen zneškodnit volné radikály v jakémkoliv prostředí), lykopen, bilirubin, kyselina močová, albumin, koenzym Q, fosfovitin, lykopen, karotenoidy, flavonoidy [18, 19, 21]. Antioxidační vlastnosti mají také fenolické sloučeniny, které jsou obsaženy ve víně a hroznech určených pro výrobu vín [22].

## 2.3 Celková antioxidační aktivita

Celková antioxidační aktivita je celkový obsah antioxidantů u jednotlivých komodit. U různých odrůd jablek se pohybuje většinou v rozmezí 3578 – 5900  $\mu\text{mol}$ / jedno jablko. Například jablka Red Delicious mají TAC 5900  $\mu\text{mol}$ , Gala mají 3903  $\mu\text{mol}$ , Golden 3685  $\mu\text{mol}$ . V jablkách se slupkou je celková antioxidační kapacita vyšší [9].

### 3 POLYFENOLICKÉ SLOUČENINY

Polyfenoly mají příznivý vliv na zdraví člověka. Jsou antikarcinogenní, antisklerotické, mají protizánětlivé vlastnosti. Jsou to látky, které mohou být preventivní proti kardio-vaskulárním nemocem, osteoporóze a diabetes mellitus [23].

Jablka jsou bohaté na fenolické sloučeniny, což jsou sekundární rostlinné metabolity s anti-oxidativními vlastnostmi. Jednotlivé druhy jablek se liší v koncentraci fenolových sloučenin. Populární Red Delicious jablka obsahují kolem 240 mg fenolů v jednom jablku. Množství flavonolů je vyšší ve slupce jablek než v dužnině, zatímco deriváty hydroxyskořicové a chlorogenové kyseliny jsou více zastoupeny v dužnině než ve slupce. Vědci také přišli na zjištění, že jablečná slupka efektivněji inhibuje růst HepG2 lidských rakovinových buněk jater než jiné jablečné složky. Jablečné šťávy se liší v obsahu fenolických složek – čerstvé jablečné šťávy obsahují více fenolů než skladované šťávy [9].

#### 3.1 Dělení polyfenolů

Nejjednodušší dělení polyfenolů:

- a) Flavonoidy – patří zde monomerní flavanoly, proanthokyanidiny a kondenz. taniny, flavonoly, anthokyany a ostatní látky
- b) Nonflavonoidy – patří zde hydroxyskořicové kyseliny, hydroxybenzoové kyseliny, hydrolyzovatelné taniny (pocházejí z dubu), stilbeny (Resveratrol) [24]

Dále se polyfenoly dělí na 4 základní skupiny:

- 1) Fenolové kyseliny
- 2) Flavonoidy
- 3) Stilbeny
- 4) Lignany [23]

##### 3.1.1 Fenolové kyseliny

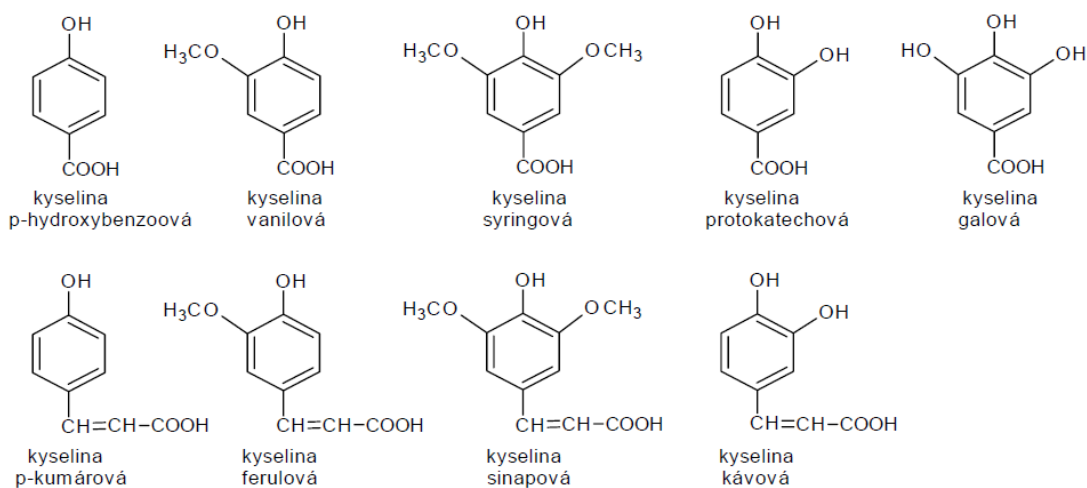
Celkový obsah fenolových látek je určován pomocí spektrofotometrie [25]. Fenolické kyseliny jsou zástupci fenolových antioxidantů běžně se vyskytujících v rostlinách. V rostlinách je jejich výskyt buď ve volné formě, nebo esterově vázané na sacharidické složky či vázané na buněčnou stěnu. Technologickým opracováním surovin (pasterace, mražení) jsou fenolické kyseliny z vazeb uvolňovány, přičemž celkový obsah fenolických

kyselin je po tepelném záhřevu téměř neměnný. Vyluhováním jsou ztráty fenolických kyselin do 2 % z celkového podílu [26].

### 3.1.1.1 Dělení

Mezi hlavní zástupce fenolových kyselin patří kyselina benzoová, kyselina skořicová a jejich deriváty [14]

- a) **deriváty kyseliny benzoové** - jsou zde řazeny kyselina p-hydroxybenzoová, kyselina vanilinová, kyselina syringová, kyselina protokatechová a kyselina gallová. Obsah těchto sloučenin je obecně v rostlinách velmi nízký, s výjimkou některých druhů lesního ovoce, ředkvičky a cibule (až několik set mg/kg čerstvé hmoty). Z důvodu výskytu v malých množstvích není těmto derivátům věnována tak velká pozornost jako derivátům kyseliny skořicové.
- b) **deriváty kyseliny skořicové** – jsou zde řazeny kyselina p-kumarová, kyselina kávová, kyselina ferulová a kyselina sinapová. Tyto deriváty jsou v *trans* konfiguraci, ale UV zářením mohou přecházet do *cis*-konfigurace. Jsou přítomny ve všech částech ovoce [26].



Obr. 3: Chemická struktura fenolických kyselin [26]

Mezi nejčastěji nacházející se fenolové kyseliny v rostlinách patří například kyselina kávová, ferulová, gallová. Tyto kyseliny jsou v rostlinách obsaženy ve formě esterů, ve kterých se váží karboxylem na hydroxylové skupiny organických kyselin, či sacharidů. Kyselina ferulová se vyskytuje nejčastěji jako součást vlákniny (kyselina ferulová je esterovou vazbou navázána na hemicelulose). Výskyt kyseliny gallové je také ve formě esterů. Nej-



rozšířenější fenolovou kyselinou v lidské potravě je kyselina chlorogenová (5-kofeylchinová kyselina). Ve vysokém množství je obsažena v kávě (50-150 mg/šálek), tudíž konzumenti kávy přijímají více fenolových kyselin než flavonoidů. Kyselinu chlorogenovou nalezneme i v bramborách a v různých druzích ovoce a zeleniny [27]. V nezralých jablkách je obsah kyseliny chlorogenové až 7 – 8 % (v sušině), ale během zrání je hodnota nižší – pokles až na 1/3 [12].

### 3.1.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou fenolické látky, které jsou řazeny mezi bezdusíkatá barviva. Jsou to žlutá ve vodě rozpustná barviva. Jejich typickou vlastností je, že působí jako stabilizátory kyseliny L-askorbové. Tento děj je uskutečňován hlavně v přítomnosti těžkých kovů, které jsou za běžných podmínek původci urychlení destrukce kyseliny askorbové. Flavonoidy jsou totiž silná komplexotvorná činidla vázající na sebe těžké kovy, a tudíž je inhibován katalytický účinek těžkých kovů [5].

### 3.1.3 Stilbeny

Stilbeny jsou řazeny mezi fytoalexiny, tj. nízkomolekulární látky, které mají antimikrobiální vlastnosti a vznikají na základě vzájemného působení mezi rostlinnou a mikroorganismem. Stilbeny se vyznačují i svými pozitivními zdravotními účinky [28].

### 3.1.4 Lignany

Lignany jsou látky, které vznikají z meziproductů metabolické dráhy, to jest z alkoholů, které pochází z kyseliny skořicové nebo p-kumarové. Biologická funkce lignanů nebyla dosud objasněna, ale existují důkazy o přítomnosti lignanů v obranném systému rostlin [28]. V dnešní době je výzkum soustředěn na vývoj nových farmakologických preparátů a další modifikace lignanů při léčbě rakoviny. Mezi nejvýznamnější lignany patří enterodiol a enterolakton [29].

## 3.2 Chemická struktura polyfenolů

Polyfenoly jsou běžné antioxidanty přítomny ve velkém počtu potravin a nápojů rostlinného původu. Všechny polyfenoly jsou charakterizovány přítomností jedné, nebo více fenolových skupin v jejich struktuře. Polyfenoly jsou velmi rozmanitou skupinou různorodých struktur, přičemž je známo více než 500 různých molekul v potravinách. Tato rozmanitost je zohledňována při biologických a specifických vlastnostech těchto sloučenin. Díky speci-

fické chemické struktury mají polyfenoly pozitivní vliv na zdraví. Rozmanitost polyfenolů také ztěžuje odhad celkového obsahu polyfenolů v potravinách (důležitý ukazatel pro potraviny a výživové hledisko potravinářského průmyslu) [30].

Fenoly jsou cyklické sloučeniny s benzenovým jádrem, na kterém je navázána jedna, nebo více hydroxylových skupin. I když jsou ve struktuře alkoholické skupiny, fenolické látky nevykazují vlastnosti alkoholu. Fenoly jsou tvořeny dvěma odlišnými skupinami - flavonoidy a nonflavonoidy [31]. Polyfenolické látky obsahují ve své molekule dvě a více hydroxylových skupin navázaných na benzenovém jádře [32].

### 3.3 Příjem polyfenolů

Dle srovnání dietetiků je denní příjem polyfenolů v různých zemích odlišný (viz tabulka). Pro ukázkou ve Finsku je příjem polyfenolů 6 mg/den, ve Francii 25 mg/den a v Japonsku 64 mg/den [33].

Denní příjem polyfenolů je odhadován na 1 gram, což je vyšší příjem než příjem antioxidantních vitaminů (např. tokoferoly, karoteny, kyselina askorbová). Celkový příjem polyfenolů je tvořen ze dvou třetin flavonoidy, z jedné třetiny fenolovými kyselinami a minoritním podílem ostatních polyfenolů (stilbeny a lignany) [27].

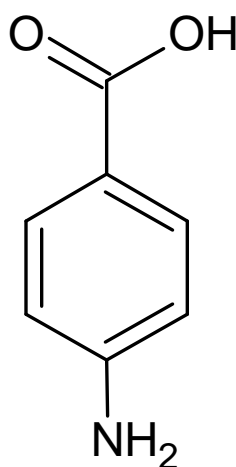
V testech byla prokázána vyšší antioxidační aktivita polyfenolů než vitaminů a endogenních antioxidantů (např. kyselina močová). Hlavní zdroje polyfenolů jsou nápoje (víno, ovocné džusy, káva), ovoce a čokoláda. Vysoký je i obsah polyfenolů v pivě (asi 350mg.l<sup>-1</sup>), ale část tohoto množství je spotřebováno na Maillardovy produkty [27].

## 4 VYBRANÉ FENOLICKÉ SLOUČENINY

V této kapitole budou popsány vybrané fenolické látky s biologickou aktivitou, které jsou cílem stanovení v praktické části této práce.

### 4.1 4-aminobenzoová kyselina

Tato kyselina bývá nalezena pod názvy p-aminobenzoová kyselina a PABA. Je součástí molekuly kyseliny listové. Dříve byla tato sloučenina označována jako vitamin B<sub>X</sub>. Vyskytuje se v obilovinách, vejcích, mléce a mase. V průmyslovém odvětví je tato kyselina výchozím materiálem pro výrobu cílových esterů a solí kyseliny listové, azobarviv a jiných organických sloučenin. Používá se jako látka, která blokuje UV záření v kosmetických opalovacích přípravcích. Dále je používána v medicíně k přípravě lokálních anestetik a mastí. Je používána k léčbě kožních onemocnění, neplodnosti u žen, anémie, zácpy, bolestí hlavy, vypadávání vlasů, omlazení pleti a jako ochrana před spálením se na slunci. Amino-benzoová kyselina je také důležitá pro přípravu dalších farmaceutických výrobků, barviv, příchutí a konzervačních látek [34, 35].

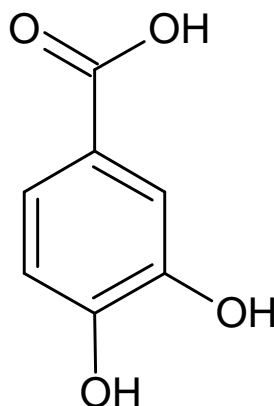


Obr. 4: Struktura 4-aminobenzoové kyseliny

### 4.2 3,4-dihydroxybenzoová kyselina

Tuto kyselinu můžeme najít pod názvem protokatechová kyselina. Je produktem oxidace adrenalinu a vyskytuje se v rostlinných produktech a pryskyřicích. Tato kyselina má antioxi-dační vlastnosti. V potravinách je hojně zastoupena v cibuli, houbách, révě vinné, jabl-kách. 3,4-dihydroxybenzoová kyselina má antibakteriální účinky, například inhibuje růst

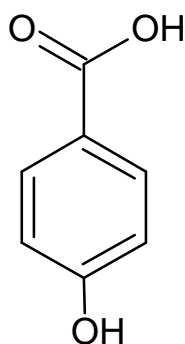
*Esherichia coli* a další tepelně odolné bakterie, které se mohou nacházet v jablečných šťávách [36].



Obr. 5: Struktura 3,4-dihydroxybenzoové kyseliny

### 4.3 4-hydroxybenzoová kyselina

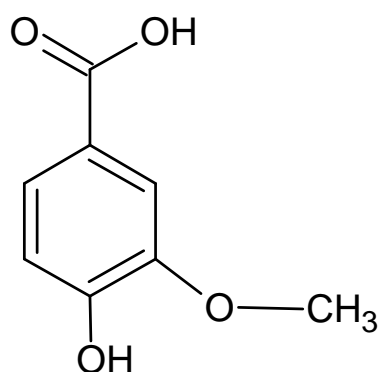
4-hydroxybenzoová kyselina je derivátem benzoové kyseliny a je to bílý krystalický prášek rozpustný v polárních rozpouštědlech. Přirozeně se vyskytuje například ve víně, kokosech, cibuli a jablkách. V dnešní době jsou zvláště používány estery 4-hydroxybenzoové kyseliny, známé pod názvem parabeny. Parabeny jsou využívány jako konzervační látky v kosmetickém průmyslu, farmaceutickém průmyslu, do potravin a nápojů. Hlavním důvodem použití těchto látek jsou jejich antimikrobiální vlastnosti [37].



Obr. 6: Struktura 4-hydroxybenzoové kyseliny

#### 4.4 Vanilinová kyselina

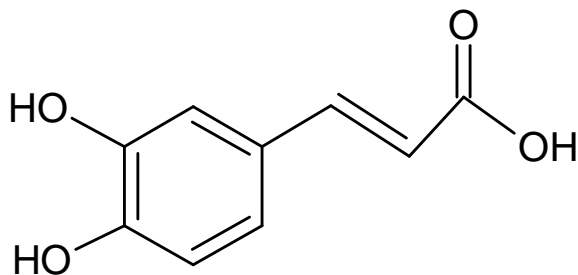
Vanilinová kyselina je derivátem kyseliny benzoové. Tato kyselina je oxidační forma vanillin, která vzniká při výrobě vanilinu z kyseliny ferulové. Je obsažena v rostlinách a nejvyšší množství je v kořenech tradiční čínské rostliny *Angelica sinensis*. V potravinářství je používána k ochucování pokrmů. Podle jednotlivých studií bylo zjištěno, že vanilinová kyselina se podílí na obranyschopnosti imunitního systému a protizánětlivých reakcích [38].



Obr. 7: Struktura vanilinové kyseliny

#### 4.5 Kávová kyselina

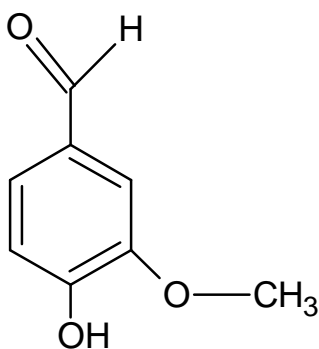
Kávová kyselina je látka vyskytující se v mnoha rostlinách a dalších jídlech. Je zastoupena hlavně v kávě, ale je hojně přítomna i v jablkách, artyčoku, hruškách a révě vinné. Kyselina kávová je nejběžnější fenolickou kyselinou v jablkách. Tato kyselina je pro člověka látka s mnoha příznivými účinky, například je to antioxidant, příznivě podporuje imunitní systém. Díky laboratorním testům bylo zjištěno, že kávová kyselina je schopna snížit růst nádorových buněk a virů. U zvířat bylo prokázáno, že má mírně povzbuzující účinky a snižuje únavu, u lidí zatím tato skutečnost nebyla zcela potvrzena. Kávová kyselina je používána jako látka přidávající se do potravinových doplňků pro zvýšení sportovního výkonu, k redukci tělesné hmotnosti, pro léčbu rakoviny, viru HIV a herpes [39].



Obr. 8: Struktura kávové kyseliny

## 4.6 Vanilin

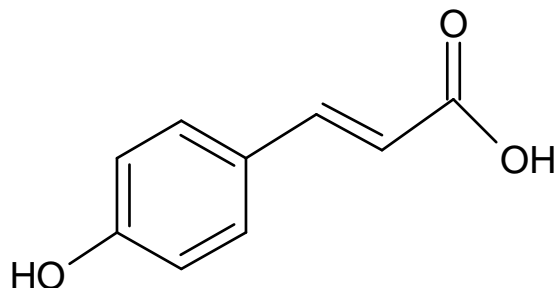
Tato chemická sloučenina byla objevena roku 1874. Vanilin je využíván v potravinářském průmyslu k ochucování sladkých jídel a nápojů. Díky typickému aroma je vanilin přidáván do parfémů, mýdel a jiných kosmetických výrobků. Vanilin je získáván z vanilkových lusků a je přírodní látkou vyznačující se antimikrobiálními vlastnostmi. Tento fakt byl potvrzen například v jablečných šťávách zaočkovaných bakterií *Listeria innocua* [40, 41].



Obr. 9: Struktura vanilinu

## 4.7 p-kumarová kyselina

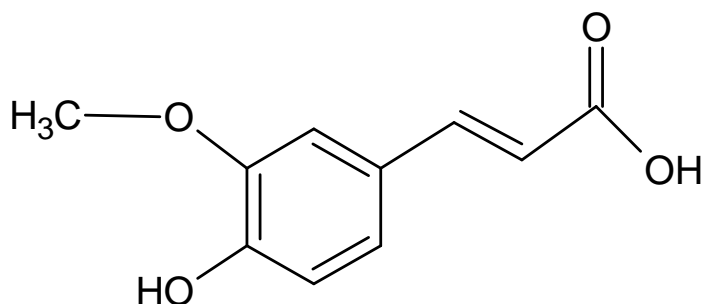
Kyselina p-kumarová je hojně se vyskytující fenolickou kyselinou v jablkách. Ve velké míře se v jablkách nacházejí především estery této kyseliny. Tuto kyselinu je možné nalézt především v ovoci a výrobcích z ovoce [42]. Tato kyselina inhibuje růst patogenních bakterií, jelikož má antimikrobiální vlastnosti [43].



Obr. 10: Struktura p-kumarové kyseliny

#### 4.8 Ferulová kyselina

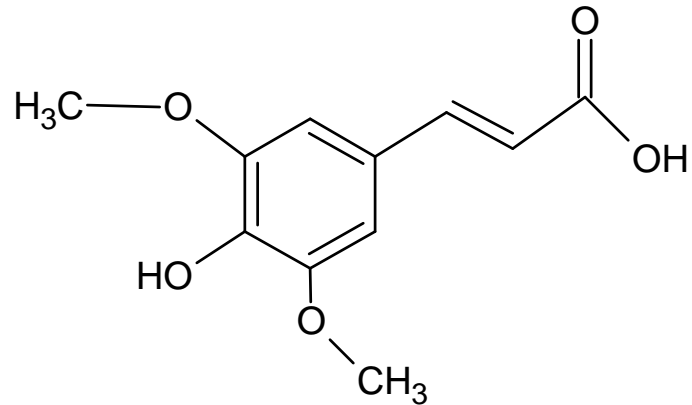
Kyselina ferulová je nejhojněji se vyskytující derivát hydroxyskořicové kyseliny v rostlinných materiálech, hlavně v cereáliích, ananasu, řepných řízkách a mrkvi. Tato kyselina má antioxidační účinky a ve stěnách rostlinných buněk slouží k větší tuhosti. Další vlastností této kyseliny je inaktivace rostlinných virů a toxicita této kyseliny je účinná proti napadením hmyzem. Ferulovou kyselinu získanou z vedlejších zemědělských produktů je možné použít jako prekurzor pro výrobu přírodního vanilinu (sníží se tak výrobní náklady). Kyselina ferulová představuje asi 0,14 % (w / w, v sušině) v zrnech ječmene, 0,66 % pšeničných otrubách, 0,8 % v řepných řízcích, 0,9 % v endospermu rýže a 3,1 % v kukuřičných otrubách [44].



Obr. 11: Struktura ferulové kyseliny

## 4.9 Sinapová kyselina

Kyselina sinapová je látkou s antioxidačními a bioaktivními vlastnostmi. Tato kyselina je derivátem kyselina hydroxyskořicové ve formě nažloutlého prášku. Je přítomna v révě vinné, octu a také v jablkách [45].



Obr. 12: Struktura sinapové kyseliny



## 5 PASKALIZACE

Paskalizace je konzervace vysokými tlaky, můžeme ji nalézt pod zkratkou HPP = High Pressure Processing. Při paskalizaci jsou běžně používány tlaky v rozmezí 300 – 700 MPa po dobu působení 30 sekund až několik minut, aby byly zničeny patogenní bakterie, jako jsou *Listeria sp.*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli* a *Vibrio*, stejně ostatní vegetační formy bakterií, kvasinek a plísní. Bakteriální spory jsou schopny přežít i tlaky 1000 MPa [46].

Dle výživových doporučení je vhodné konzumovat až 600 g ovoce a zeleniny na osobu a den. Nejlépe je přijímat ovoce a zeleninu v čerstvém stavu. Příjem ovoce a zeleniny je možné nahradit pitím ovocných/zeleninových šťáv a pro dosažení čerstvosti vyráběny šťávy ošetřené paskalizací, pomocí které je zachována většina nutričních faktorů [47].

### 5.1 Výhody konzervace vysokými tlaky

Mezi hlavní výhody této konzervace patří:

1. Umožnění zpracování potravin při pokojové teplotě nebo i nižší teplotě
2. Umožnění okamžité prostupnosti tlaku ve všech směrech a v celém objemu potraviny
3. Inaktivace mikroorganismů, bez použití vysoké teploty a chemických konzervačních činidel, což vede ke zlepšení celkové kvality výrobku
4. Může být použita k vytvoření složky s novými funkčními vlastnostmi [48]

Konzervace vysokými tlaky je využívána v potravinářství zejména proto, že potraviny nejsou vystaveny vysokým teplotám, a proto se zachovávají sensorické a nutriční vlastnosti typické pro výchozí suroviny. Pomocí tlaku je stabilizována tvorba bílkovinných gelů a také se využívá k úpravám konzistence u zpracování masa a ryb [49].

### 5.2 Konzervace paskalizací u ovocných šťáv

Konzervace vysokými tlaky je také často využívána u ovocných šťáv z důvodu ošetření nižšími teplotami a hlavně zachování všech aromatických látek typických pro dané ovoce. Nevýhodou této konzervace jsou především vysoké pořizovací náklady na vysokotlaké zařízení [2].

### 5.3 Srovnání konzervace vysokými tlaky a vysokou teplotou

Pokud je srovnáno ošetření potravin tepelným záhřevem a vysokými tlaky, je lepší použití vysokých tlaků. Po vysokotlakém ošetření je v ovocných šťávách zachováno téměř stejné množství fenolových sloučenin, barviv, kyseliny askorbové a antioxidační aktivity. Po vysokotlakém ošetření jsou zachovány stejné sensorické vlastnosti použitých surovin. Při skladování ovocných šťáv bylo zjištěno, že po ošetření paskalizací jsou zachovány nutriční i sensorické vlastnosti [50]. Po ošetření potravin vysokými teplotami je možný vznik varné příchuti, sensoricky pozměněných vlastností typických pro výchozí suroviny. Také může být nastat úbytek vitaminů a jiných hodnotných látek a změna barvy [11].

Z ekonomického pohledu jsou u konzervace paskalizací vyšší pořizovací náklady na zařízení než při tepelném ošetření. Při používání vysokotlakých zařízení jsou náklady na energii nižší, jelikož není vyžadováno tolik tepelného záření, jako je tomu u vysokoteplotních zařízení. Další úspora nákladů je u sanitace, která nemusí být prováděna, jelikož ošetření paskalizací se provádí ve spotřebitelských obalech [51].

## 6 EXTRAKČNÍ METODY

**Extrakce** je po chemické stránce synonymum ke slovu vyluhování. Extrakcí jsou oddělovány látky o větší rozpustnosti, které jsou ve zvoleném rozpouštědle, od látky méně rozpustné a následným převedením látky do roztoku. Látku je možné získat ze směsi po extrakci například po odpaření rozpouštědla. Extrakce je používána k oddělení žadoucích složek ze směsi [52].

**Extraktem** je nazýván výluh rozpustných složek z přirozených surovin ve vodě, nebo v jiném rozpouštědle (např. etanol). Extrakt je složen z látek přímo rozpustných i enzymově hydrolyzovaných [52].

Ve všech extrakčních metodách je přenos analytů do extrakční fáze (plyn, kapalina, nebo pevná látka) závislý na chemických vlastnostech analytů. Hlavní parametry, které musí být zváženy, jsou těkavost, rozpustnost (hydrofobnost), molekulová hmotnost, disociační konstanta (pKa) a polarita. Analyt je distribuován mezi dvěma nemístitelnými fázemi a distribuce může být popsána z hlediska rovnováhy mezi těmito fázemi. Proto pomocí distribučního Nernstova zákona může být distribuce definována jako

$$K_D = \frac{[X]_A}{[X]_B},$$

kde:  $K_D$  je rozdělovací koeficient

$[X]_{A, B}$  jsou koncentrace v jednotlivých fázích (např. ve vodě, v organickém rozpouštědle) při konstantní teplotě [53]

### 6.1 Typy extrakčních metod

Nejrozšířenější extrakční metodou je extrakce kapalinou (liquid-liquid extrakce = LLE), jejíž výhodou je nízká cena, ale nevýhodou je časová náročnost. Pro analýzu kapalných vzorků je také využívána extrakce tuhou fází (solid-phase extraction = SPE). Moderními extrakčními metodami jsou nadkritická fluidní extrakce (supercritical fluid extraction = SFE), tlaková extrakce rozpouštědlem (pressurized liquid extraction = PLE), extrakce mikrovlnným zářením (microwave-assisted extraction = MAE) a extrakce podpořena ultrazvukem (ultrasound-assisted extraction = UAE). U těchto moderních technik je podstatně sníženo použití rozpouštědel a extrakce není tak časově náročná [54].

### 6.1.1 Extrakce fenolických sloučenin

Kapalinová extrakce (liquid-liquid extraction = LLE). Jedná se o extrakci z vodných roztoků ovocných vzorků pomocí vodného rozpouštědla, aby byly vyluhovány fenolické sloučeniny. Rozpouštědlem může být ethanol, aceton, metanol, nebo jejich vhodné roztoky s vodou. Tato extrakce je prováděna při pokojové teplotě. Po extrakci jsou vytvořeny dvě zřetelně oddělené vrstvy [54].

## 7 CHROMATOGRRAFIE

Chromatografie je separační metoda. Principem této metody je oddělení (separace) složek, které jsou obsaženy ve zkoumaném vzorku. Vzorek je nanášen mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze – stacionární fáze (nepohyblivá) a mobilní fáze (pohyblivá). Vzorek je umístěn na začátek stacionární fáze a pohybem mobilní fáze přes stacionární je vzorek unášen. Složky vzorku mohou být zachyceny ve stacionární fázi, tudíž se při pohybu zdržují. Složky, které jsou poutány na stacionární fázi silněji, jsou zadržovány více. Takto dochází k separaci jednotlivých složek [55].

### 7.1 Dělení chromatografie

Jednotlivé druhy chromatografie jsou děleny dle několika kritérií:

Rozdělení chromatografie dle separačního principu:

- adsorpční
- rozdělovací
- měničová
- založena na síťovém efektu (gelová filtrace)

Rozdělení chromatografie dle skupenství mobilní fáze:

- plynová
- kapalinová

Rozdělení chromatografie dle typu a uspořádání stacionární fáze:

- papírová
- sloupcová [52]

### 7.2 Kapalinová chromatografie

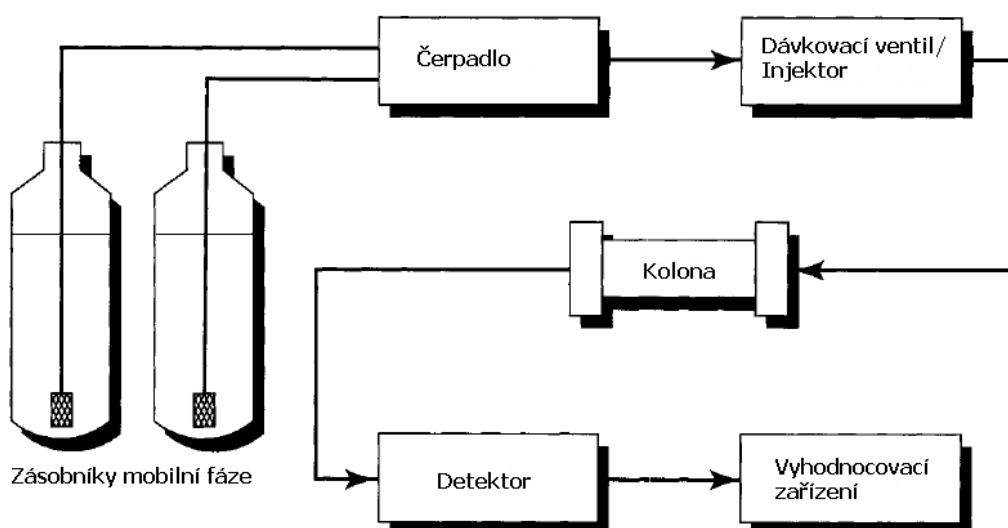
V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Jako stacionární fáze je film příslušné látky, který je zakotven na povrchu nosiče, nebo může být stacionární fází i pevný adsorbent. Kapalinová chromatografie je prováděna na přístroji - kapalinovém chromatografu, který je složen ze zásobníků s mobilní fází, vysokotlaké pumpy, dávkovače (injektor), kolony a detektoru [56].

Mezi kapalinovou chromatografií je řazena metoda HPLC, jejíž zkratka má dva významy. Prvním významem je high performance liquid chromatography, což znamená vysokouúčinná kapalinová chromatografie. Druhým překladem zkratky HPLC je high pressure liquid chromatography, což je překládáno jako vysokotlaká kapalinová chromatografie [56].

### 7.3 Vysoce účinná kapalinová chromatografie

Metoda HPLC nabízí kombinaci rychlosti, reprodukovatelnosti a citlivosti. Doba, po kterou HPLC stanovení probíhá, je většinou mezi 10 až 30 minutami. Existují ale i delší časové stanovení – hodina až 2 hodiny [57].

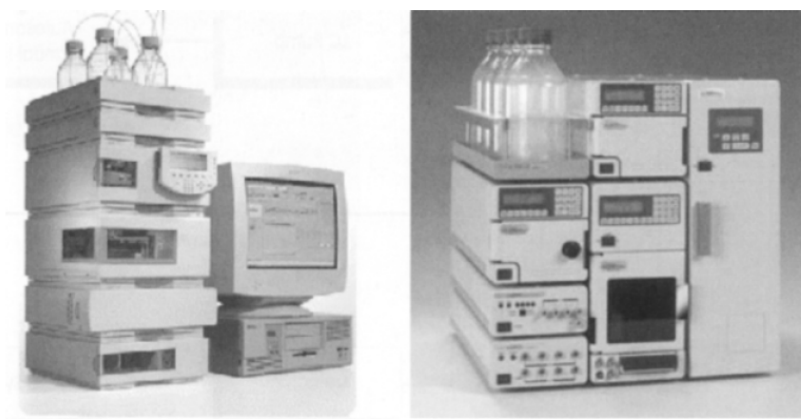
Vysokotlaká kapalinová chromatografie je nejvíce používaná analytická metoda. Typický HPLC systém je složen z několika modulů: čerpadlo, vstřikovač (injektor), kolona, detektor a zařízení vyhodnocující data (obr.13).



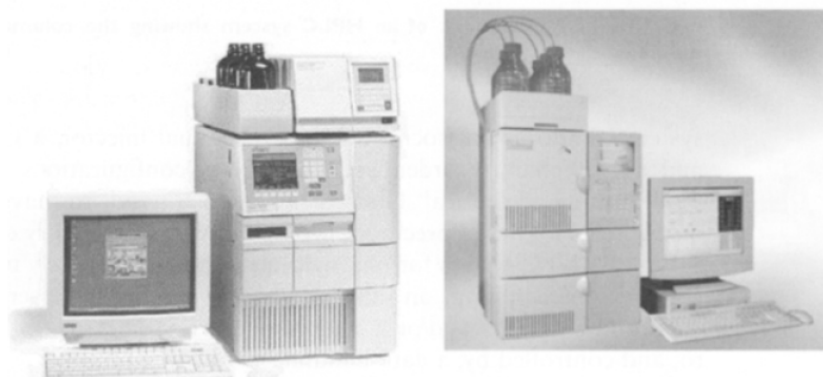
Obr. 13: Schéma HPLC systému [58]

HPLC přístroje jsou klasifikovány jako modulární a integrované systémy. V modulárním systému jsou jednotlivé moduly postaveny na sebe a vzájemně spojeny, aby fungovaly jako celek. V integrovaném systému jsou moduly postaveny v jednom pouzdře a často sdílejí i společnou řídicí desku. Tyto vestavěné moduly nemohou fungovat mimo systém, rozpouštědla a elektrické dráty jsou také uvnitř systému, což svědčí a „čistším“ vzhledu. Modulární systémy jsou většinou více provozuschopné, protože interní komponenty jsou snadno přístupné a případné poruchy jednotlivých modulů mohou být snáze vyměněny. Na druhou

stranu mohou mít integrované systémy lepší vlastnosti – například autosampler určený pro vstříkávání vzorků přímo u začátku pumpování, který přináší lepší a přesnější výsledky v retenčních časech. V praxi tyto dva typy nejsou významné, jelikož dobře navržené modulové systémy často vypadají a fungují jako dobře začleněné systémy [58].



Obr. 14: Modulární systémy [58]



Obr. 15: Integrované systémy [58]

### 7.3.1 Mobilní fáze

Mobilní fáze je kapalina, kterou většinou bývá metanol. Další sloučeninou v mobilní fázi může být acetonitril v kombinaci s vodou. Mobilní fáze plynule prochází kolonou [59].

### 7.3.2 Stacionární fáze

Stacionární fáze v kapalinové chromatografii je tvořena zrnitými materiály, kterými mohou být:

- silikagel

- oxid hlinitý
- aktivní uhlí
- celulóza
- uhličitan vápenatý [60]

Stacionární fáze je umístěna v chromatografické koloně. Přes stacionární fázi je unášen vzorek s mobilní fází [60].

### 7.3.3 Vysokotlaké čerpadlo

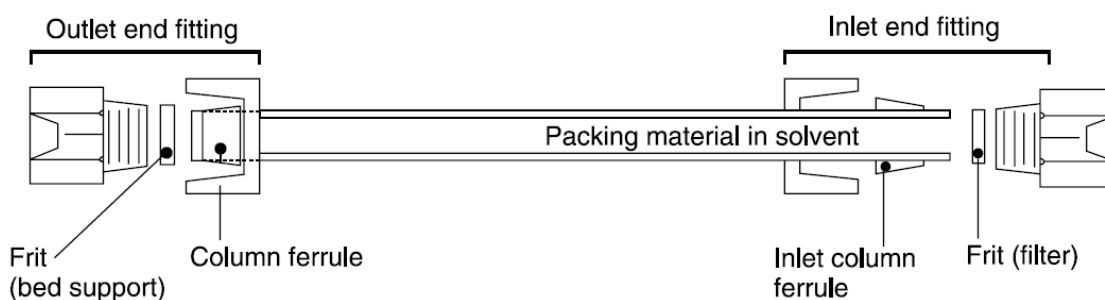
Je zařazeno z důvodu konstantního průtoku mobilní fáze. Pomocí čerpadla je mobilní fáze nasávána do systému a čerpadlo je uzpůsobeno pro práci při vysokých tlacích (až 10 MPa) [57].

### 7.3.4 Dávkovač

Vzorek, který je rozpuštěn v rozpouštědle, je pomocí dávkovače (injektoru) vpíchnut do proudu rozpouštědla (mobilní fáze), které prochází kolonou s pevnou dělicí fází [57].

### 7.3.5 Kolona

Kolona je nejvýznamnější částí HPLC systému. Kolony jsou trubky se stěnami z nerezové oceli o délce 5 – 25 cm a vnitřním průměru 3- 5 mm. Průtok těchto kolon je 1-2 ml/min. Na obou koncích kolony jsou vysokotlaké sloupce. V koloně je umístěna stacionární fáze [57].



Obr. 16: Kolona HPLC [57]



### 7.3.6 Detektor

Hlavní úlohou detektoru je automaticky a kontinuálně změřit některou z fyzikálních vlastností eluátu. V HPLC systému je používáno několik typů detektorů dle měřené veličiny:

Měřená veličina	Název detektoru
absorpce záření	spektrofotometrický UV-VIS
fluorescence	fluorimetrický (fluorescenční)
index lomu	refraktometrický
elektrická vodivost	vodivostní
elektrolytický proud	polarografický
permitivita	kapacitní (permitivitní)
elektrodotový potenciál	potenciometrický
ionizační proud	transportní s plamenoionizační detekcí
sorpční teplo (teplota)	mikroadsorpční
radioaktivita	radiometrický

Tab. 3: Detektory dle měřené veličiny [61]

UV detektory jsou méně účinnější než fluorescenční, tudíž před analýzou musí být provedena extrakce, protože by mohlo dojít k chromatografickému rušení působením jiných složek ve vzorku [62].

### 7.3.7 Vyhodnocovací zařízení

Toto zařízení je spojeno s detektorem. Vyhodnocovacím zařízením je nejčastěji počítač s příslušným softwarovým programem pro HPLC [62].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 8 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce v teoretické části bylo popsat výrobu ovocných nápojů a konzervaci těchto nápojů se zaměřením se na konzervaci vysokými tlaky. Dalším cílem bylo popsat fenolické látky a jejich antioxidační vlastnosti, uvést extrakční metody využívající se při stanovení fenolických látek a popsat vysoce účinnou kapalinovou chromatografii.

Cílem diplomové práce v praktické části bylo stanovit pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie množství vybraných fenolických látek v jablečných nápojích od různých výrobců a konzervovány odlišnými metodami.

## 9 MATERIÁL A METODIKA

### 9.1 Analyzovaný materiál

Pro praktickou analýzu bylo použito 15 vzorků jablečných šťáv, z tohoto množství byly:

- 3 různé pasterizované šťávy z obchodní sítě
- 5 šťáv od společnosti UGO
- 5 šťáv Bio kvality z moštárny Hostětín
- 2 šťávy od společnosti Beskyd Fryčovice



Obr. 17: Analyzované vzorky

#### 9.1.1 Popis jednotlivých vzorků

- 1) **RELAX JABLEČNÁ ŠTÁVA** – 100% jablečná šťáva vyrobená z jablečného koncentrátu bez přidaného cukru, obsahuje přirozeně se vyskytující cukry, podíl ovocné šťávy 100 %, bez konzervantů, umělých aromat a barviv, pasterizovaná, objem 1 l
- 2) **HELLO 100% ČERSTVĚ LISOVANÁ JABLEČNÁ ŠTÁVA** – 100% jablečná šťáva, podíl ovocné složky 100 %, bez chemické konzervace, pasterována, výrobce Linea Nivnice, objem 1 l
- 3) **VIKO 100% JABLEČNÁ ŠTÁVA** – jablečná šťáva z koncentrátu, podíl ovocné složky 100%, bez chemické konzervace, nepřislazená, pasterizována, výrobce ZEMCHEBA s.r.o., objem 750 ml
- 4) **UGOVA ČERSTVÁ ŠTÁVA JABLKO** – 100% jablečná šťáva ošetřena vysokým tlakem, nepasterováno, výrobce Kofola a.s., objem 200 ml

- 5) **UGOVA ČERSTVÁ ŠŤÁVA JABLKO A ŘEPA** – 100% ovocno-zeleninová šťáva z jablka (50 %) a červené řepy (50 %) ošetřena vysokým tlakem, nepasterováno, výrobce Kofola a.s., objem 200 ml
- 6) **UGOVA ČERSTVÁ ŠŤÁVA JABLKO A CELER** - 100% ovocno-zeleninová šťáva z jablka (50 %) a celeru (50 %) ošetřena vysokým tlakem, nepasterováno, výrobce Kofola a.s., objem 200 ml
- 7) **UGOVA ČERSTVÁ ŠŤÁVA JABLKO A MRKEV** - 100% ovocno-zeleninová šťáva z jablka (50 %) a mrkve (50 %) ošetřena vysokým tlakem, nepasterováno, výrobce Kofola a.s., objem 200 ml
- 8) **UGOVA ČERSTVÁ ŠŤÁVA JABLKO A ZELÍ** - 100% ovocno-zeleninová šťáva z jablka (70 %) a červeného zelí (30 %) ošetřena vysokým tlakem, nepasterováno, výrobce Kofola a.s., objem 200 ml
- 9) **HOSTĚTÍNSKÝ MOŠT JABLKO A MÁTA** – ovocný osvěžující nápoj vyrobený z jablečné šťávy (50 %) a vodního výtažku z máty peprné (50 %), bez chemické konzervace, pasterovaný, výrobce Moštárna Hostětín, objem 750 ml
- 10) **HOSTĚTÍNSKÝ MOŠT JABLKO A RAKYTNÍK** - ovocný osvěžující nápoj vyrobený z jablečné šťávy (94 %) a rakytníkové šťávy (6 %), bez chemické konzervace, pasterovaný, výrobce Moštárna Hostětín, objem 750 ml
- 11) **HOSTĚTÍNSKÝ MOŠT JABLKO A ČERVENÁ ŘEPA** – ovocná a zeleninová šťáva vyrobená z jablečné šťávy (80 %) a šťávy z červené řepy (20 %), nefiltrovaná, neředěná, nepřislazená, bez chemické konzervace, pasterována, výrobce Moštárna Hostětín, objem 750 ml
- 12) **HOSTĚTÍNSKÝ MOŠT JABLKO A ZÁZVOR** - ovocný osvěžující nápoj vyrobený z jablečné šťávy (85 %) a vodního výtažku ze zázvoru (15 %), bez chemické konzervace, pasterovaný, výrobce Moštárna Hostětín, objem 750 ml
- 13) **HOSTĚTÍNSKÝ MOŠT ZELENÁ ENERGIE** – ovocný energetický nápoj vyrobený z jablečné šťávy (50 %), vodního výtažku ze zeleného čaje (25 %) a vodního výtažku z maté green (25 %), obsahuje přírodní kofein, nevhodný pro kojící matky a děti, pasterovaný, výrobce Moštárna Hostětín, objem 750 ml
- 14) **REFIT BROKOLICE A JABLKO** – jablečná šťáva s brokolicí vyrobená z jablečné šťávy (50 %), brokolicové šťávy (30 %), pomerančového koncentrátu (18 %) a limetkové šťávy (2 %), zpracována vysokým tlakem za studena, výrobce Beskyd Fryčovice, a.s., objem 330 ml

- 15) **REFIT ZELÍ A JABLKO** – jablečno-zelná šťáva, vyrobená z jablečné šťávy (64 %), zelné šťávy (32 %) a citronové šťávy (4 %) zpracována vysokým tlakem za studena, výrobce Beskyd Fryčovice, a.s., objem 330 ml

## 9.2 Chemikálie

Pro přípravu vzorků byl použit:

- Metanol  $\geq 99,9\%$ , Sigma Aldrich Co, Germany
- Kyselina trihydrogen fosforečná  $\geq 85\%$ , Sigma Aldrich Co, Germany
- Dusík plyný 5.0 (čistota 99,999%)
- Standardy fenolických sloučenin:
  - 4-aminobenzoová kyselina - Sigma Aldrich Co, Germany
  - 3,4-dihydroxybenzoová kyselina - Sigma Aldrich Co, Germany
  - 4-hydroxybenzoová kyselina - Sigma Aldrich Co, Germany
  - vanilinová kyselina - Sigma Aldrich Co, Germany
  - káвовá kyselina - Sigma Aldrich Co, Germany
  - vanilin - Sigma Aldrich Co, Germany
  - p-kumarová kyselina - Sigma Aldrich Co, Germany
  - ferulová kyselina - Sigma Aldrich Co, Germany
  - sinapová kyselina - Sigma Aldrich Co, Germany

## 9.3 Přístroje a pomůcky

- Mikropipeta 100 – 1000  $\mu\text{l}$ , TRANSFERPETTE<sup>®</sup> S
- Mikrozkuřavky (eppendorfy) 1,5 ml, plastové
- Stříkačkové filtry LUT Syringe Filtres Nylon, 13 mm, 0,22  $\mu\text{m}$
- Vortex BIOSAN, BioVortex V1
- Ultrazvuk KRAINTEK 2, Galic Design
- Kapalinový chromatogram Shimadzu LC-20AD
  - UV/VIS detektor SPD-20A, Shimadzu
  - Autosampler SIL – 20ACHT, Shimadzu (Duisburg, Německo)
  - maximální tlak 35 MPa
- Vyhodnocovací software LC solution, Shimadzu

## 9.4 Příprava vzorků

Před laboratorní úpravou byly vzorky Hello, Viko a Relax zakoupeny v obchodním řetězci Albert. Vzorky Refit byly koupeny v hypermarketu Globus v Olomouci, kam jsou vzorky dodávány z Beskydu Fryčovice. Šťávy Ugo byly přivezeny z Prahy, kde jsou běžně k dostání v několika prodejnách. Mošty z Hostětína byly zakoupeny přímo v moštárně Hostětín. Všechny vzorky byly 3 až 5 dní skladovány při chladírenských teplotách a následně byly podrobeny laboratorní úpravě.

Každý vzorek byl upraven ředěním 100% metanolem v poměru 1:1. Do eppendorfky bylo napipetováno 500  $\mu$ l vzorku a 500  $\mu$ l rozpouštědla (metanolu). Takto naředěné vzorky byly ponechány 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po tomto čase byly vzorky zfiltrovány pomocí stříkačkového filtru 0,22  $\mu$ m. Připravené vzorky byly vloženy do HPLC přístroje a proběhla analýza fenolických látek.

## 9.5 Analýza HPLC

Pro tuto analýzu byly připraveny dvě mobilní fáze:

- mobilní fáze A: 745 ml vody, 245 ml 100% metanolu a 10 ml 85%  $H_3PO_4$
- mobilní fáze B: 100% metanol

Obě tyto fáze byly přefiltrovány a ponechány 10 minut na probublání dusíkem a poté byly vloženy na 15 minut do ultrazvuku při 20°C. Tento zákrok odplynil obě fáze a takto byly připraveny pro laboratorní analýzu.

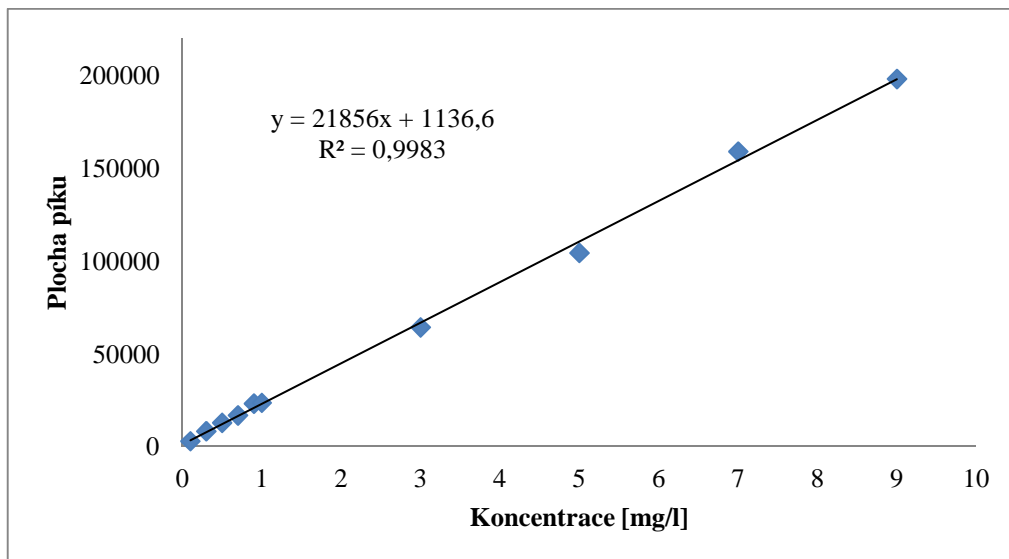
Analýza vzorků byla provedena při 254 nm i 313 nm (pro ferulovou, p-kumarovou a sinapovou kyselinu). Byla použita kolona Supelcosil<sup>TM</sup> LC-18 od výrobce Sigma-Aldrich, (Belefore, USA) o rozměrech 25 cm x 4,6 mm x 5 $\mu$ l a předkolona SecurityGuard<sup>TM</sup> cartridge AJ0-4286 od firmy Phenomenex. Eluce byla provedena při 25 °C, objem nástřiku vzorku byl 10  $\mu$ l a průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml.min<sup>-1</sup>. Při analýze byla využita izokratická eluce, tudíž nebyl žádný gradient a byla zařazena jen fáze promývání metanolem po dobu 4 minut. Doba analýzy pro jeden vzorek trvala 40 minut.

## 9.6 Kalibrační křivky fenolických sloučenin

Kalibrační křivky byly sestaveny na základě přípravy jednotlivých fenolických sloučenin. Každá sloučenina byla připravena na roztoky o koncentracích 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0 a 9,0 mg.l<sup>-1</sup>. Tyto roztoky byly změřeny na HPLC přístroji a na základě ploch

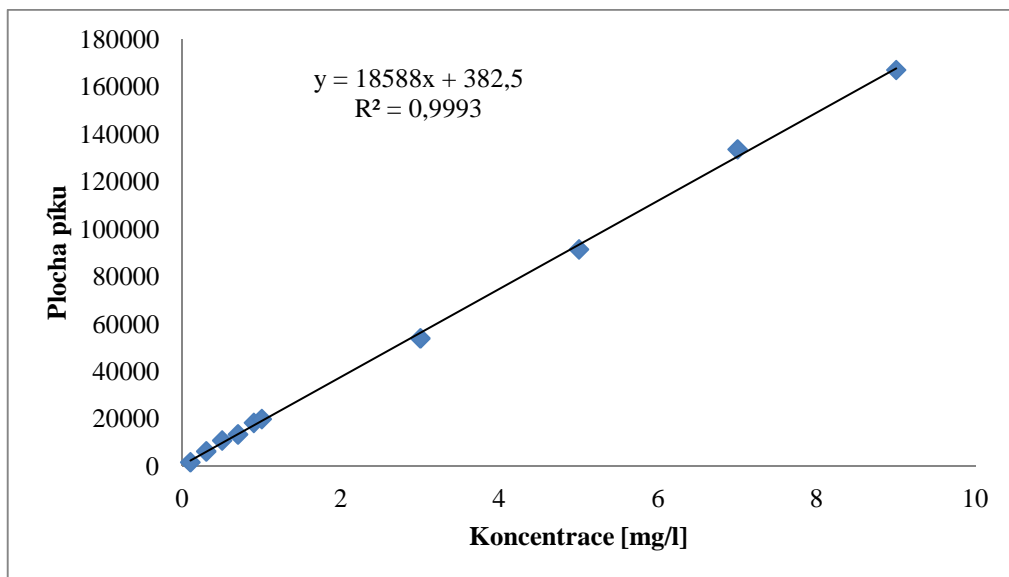
píků a koncentrace roztoků byly sestrojeny kalibrační křivky, ve kterých byla zaznačena i rovnice přímky s hodnotou spolehlivosti. Tabulka výchozích ploch píků pro sestrojení grafů je vložena v příloze PI.

### 9.6.1 Kalibrační křivka pro 4-aminobenzoovou kyselinu



Obr. 18: Kalibrační křivka pro 4-aminobenzoovou kyselinu

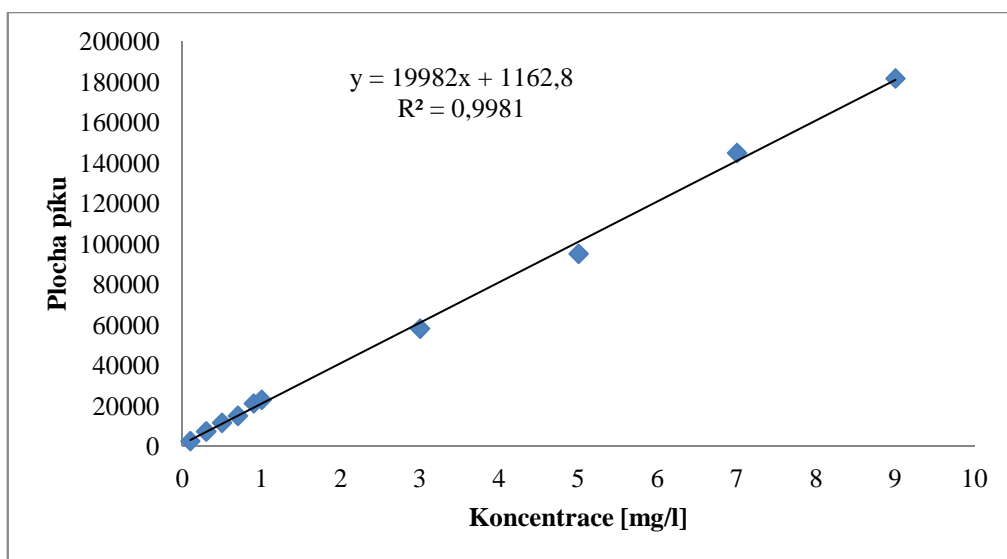
### 9.6.2 Kalibrační křivka pro 3,4-dihydroxybenzoovou kyselinu



Obr. 19: Kalibrační křivka pro 3,4-dihydroxybenzoovou kyselinu

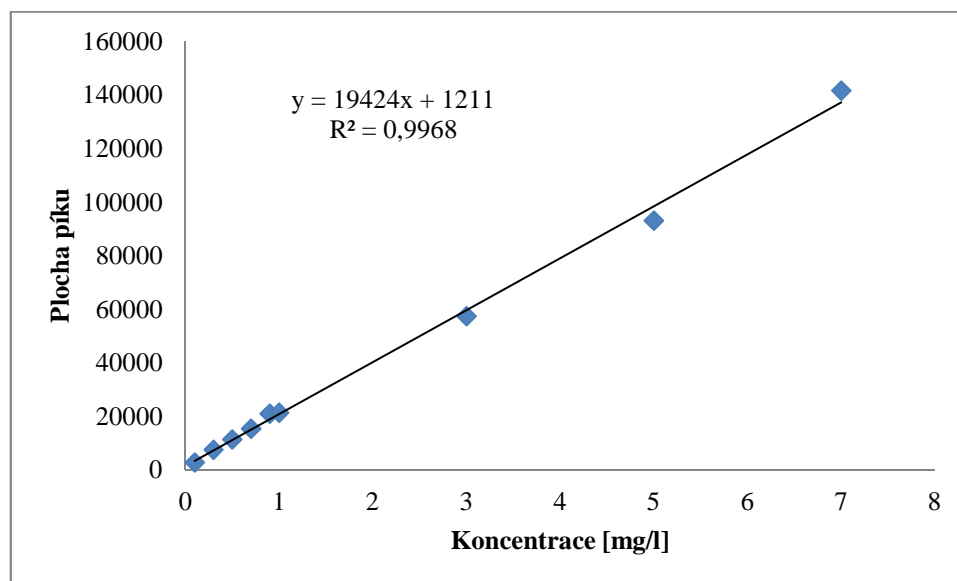


### 9.6.3 Kalibrační křivka pro 4-hydroxybenzoovou kyselinu



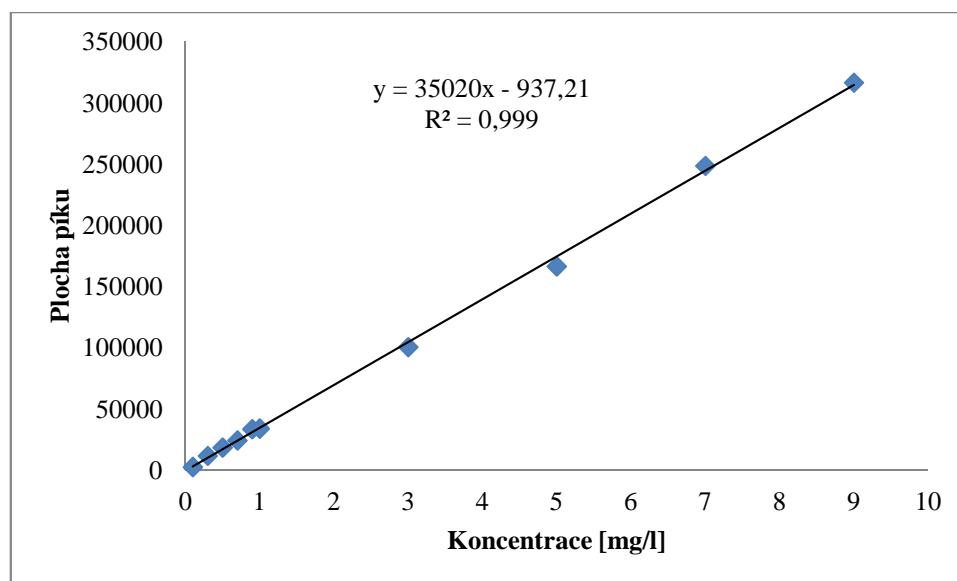
Obr. 20: Kalibrační křivka pro 4-hydroxybenzoovou kyselinu

### 9.6.4 Kalibrační křivka pro vanilinovou kyselinu



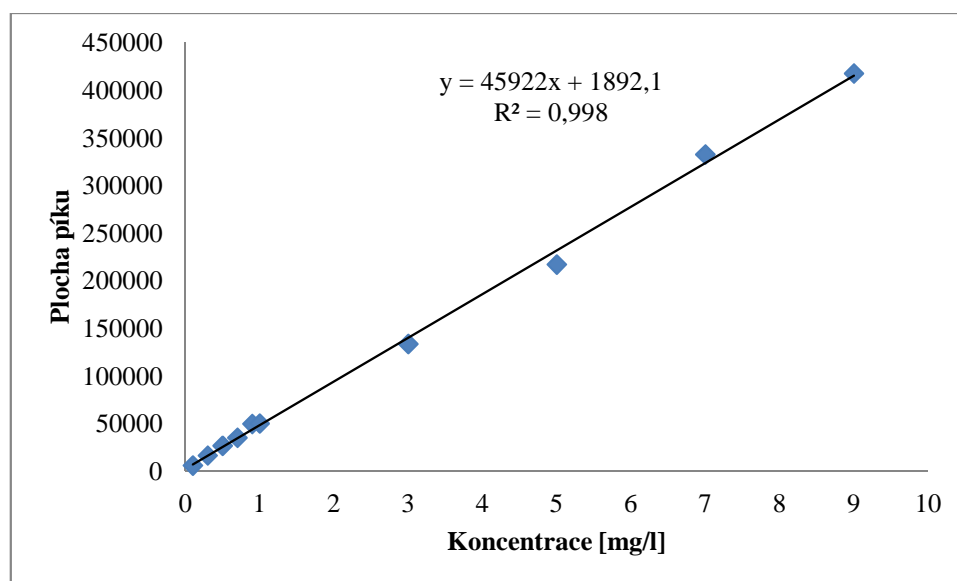
Obr. 21: Kalibrační křivka pro vanilinovou kyselinu

### 9.6.5 Kalibrační křivka pro kávovou kyselinu



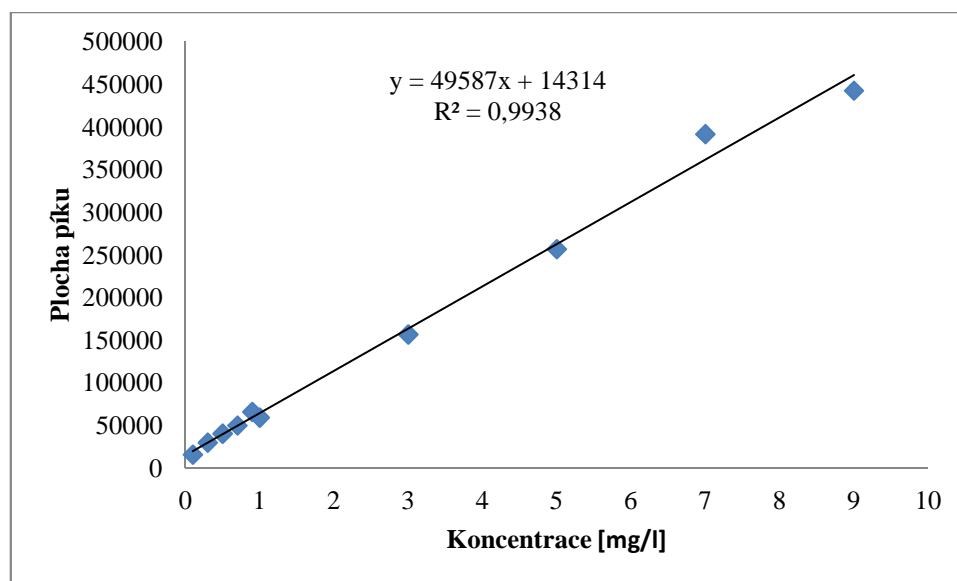
Obr. 22: Kalibrační křivka pro kávovou kyselinu

### 9.6.6 Kalibrační křivka pro vanilin



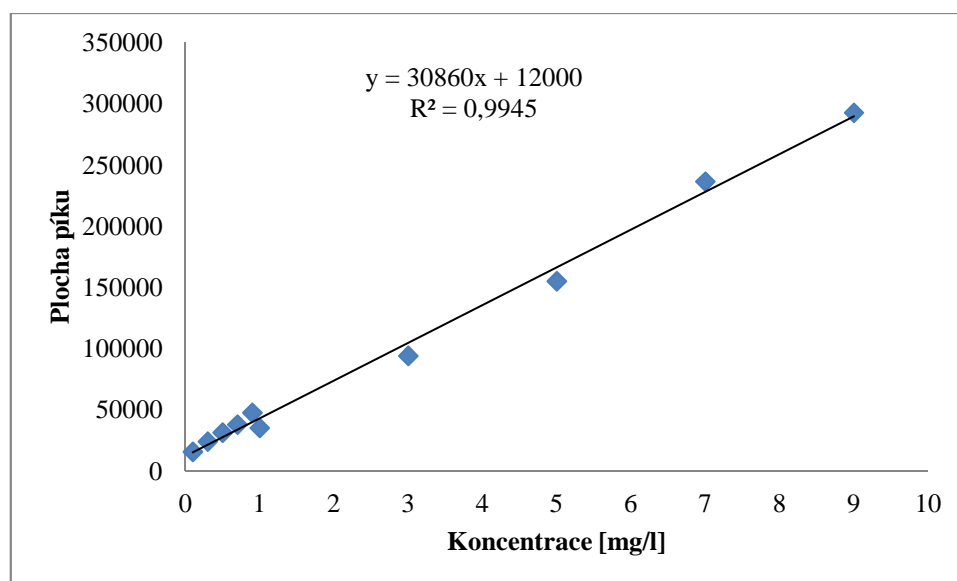
Obr. 23: Kalibrační křivka pro vanilin

### 9.6.7 Kalibrační křivka pro p-kumarovou kyselinu



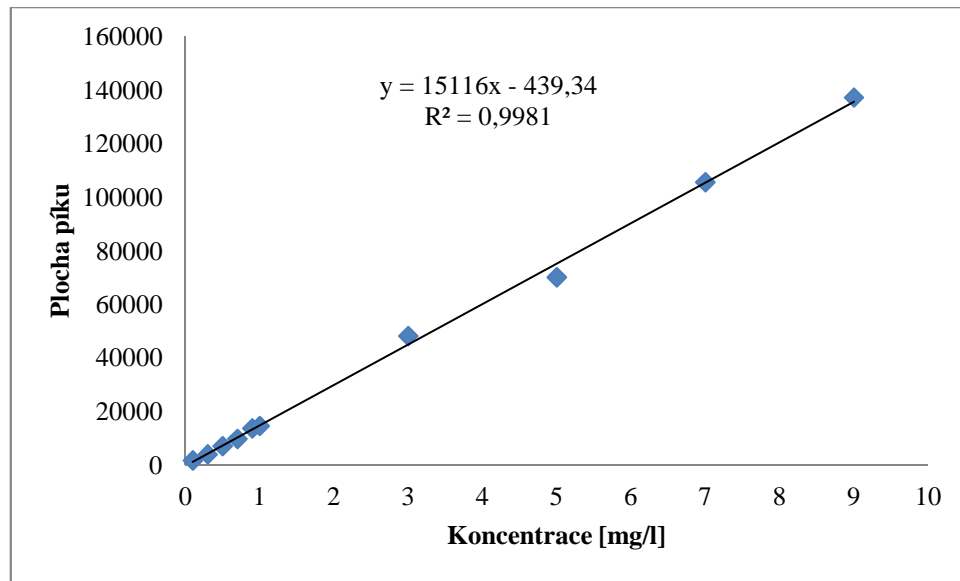
Obr. 24: Kalibrační křivka pro p-kumarovou kyselinu

### 9.6.8 Kalibrační křivka pro ferulovou kyselinu



Obr. 25: Kalibrační křivka pro ferulovou kyselinu

### 9.6.9 Kalibrační křivka pro sinapovou kyselinu



Obr. 26: Kalibrační křivka pro sinapovou kyselinu

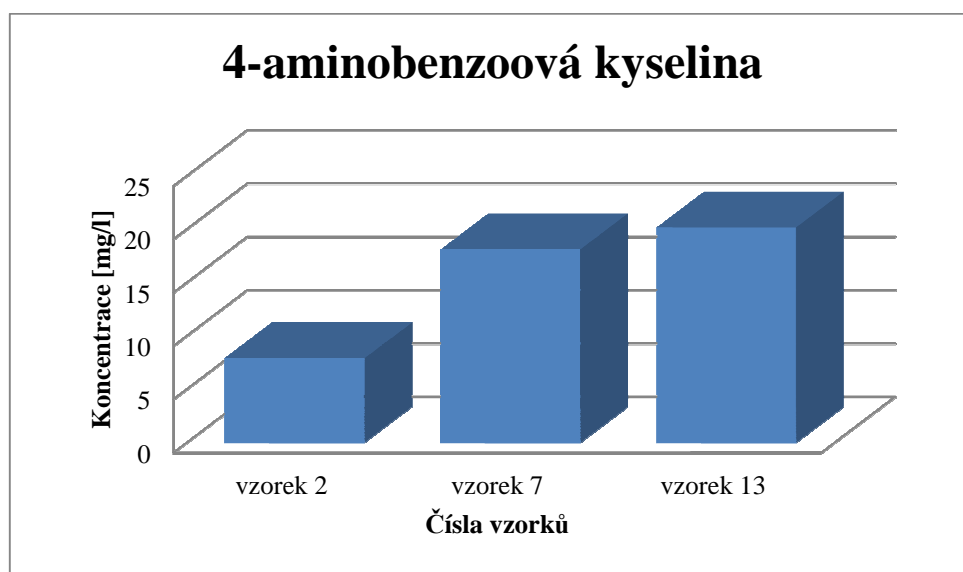
## 10 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 10.1 Výsledky

Z každého vzorku se prováděly tři měření na HPLC. Byly získány tři hodnoty velikostí píků pro dané fenolické látky. Velikosti jednotlivých píků byly dosazeny do rovnic kalibračních křivek pro určité fenolické látky. Z těchto výpočtů byly získány tři hodnoty koncentrací pro každou fenolickou látku. Z těchto tří hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Tabulka získaných hodnot je součástí přílohy PII.

#### 10.1.1 4-aminobenzoová kyselina

Z přiloženého grafu je viditelné, že 4-aminobenzoová kyselina je obsažena pouze ve vzorcích 2, 7 a 13. Nejvyšší množství  $20,156 \text{ mg.l}^{-1} \pm 0,18$  obsahuje vzorek 13 (Hostětínský mošt jablko, zelený čaj a maté green).



Obr. 27: Koncentrace 4-aminobenzoové kyseliny ve vzorcích

#### 10.1.2 3,4-dihydroxybenzoová kyselina

Kyselina 3,4-dihydroxybenzoová byla přítomna téměř ve všech analyzovaných vzorcích kromě vzorků 3, 4, 7 a 15. Nejvyšší hodnotu  $163,696 \text{ mg.l}^{-1} \pm 5,17$  měl vzorek 8 (Ugova čerstvá šťáva jablko a zelí).



Obr. 28: Koncentrace 3,4-dihydroxybenzoové kyseliny ve vzorcích

#### 10.1.3 4-hydroxybenzoová kyselina

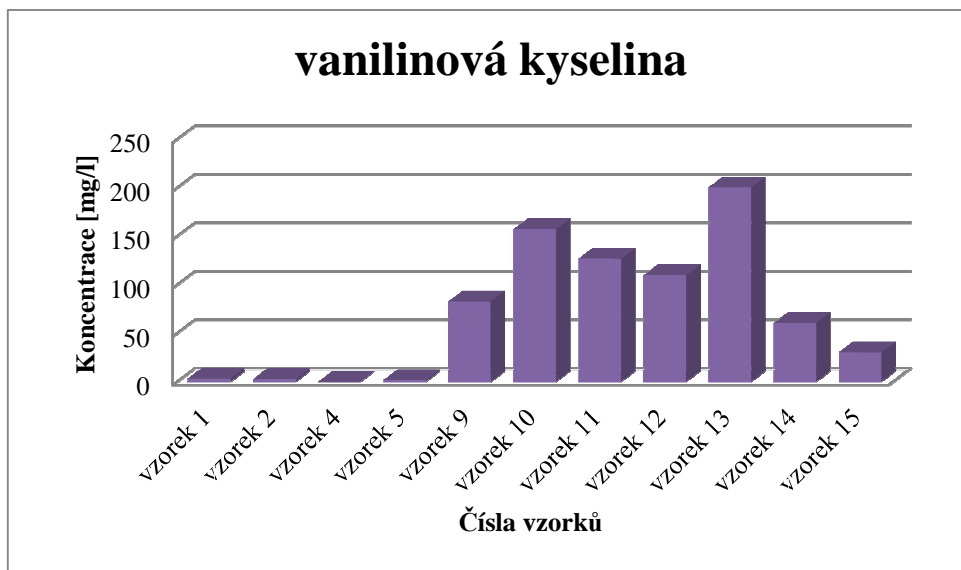
Kyselina 4-hydroxybenzoová byla obsažena ve dvanácti vzorcích. Mezi dva vzorky s nejvyššími koncentracemi je řazen nápoj Viko 100% jablečná šťáva ( $39,676 \text{ mg.l}^{-1} \pm 0,26$ ) a Ugova čerstvá šťáva jablko ( $37,781 \text{ mg.l}^{-1} \pm 0,05$ ).



Obr. 29: Koncentrace 4-hydroxybenzoové kyseliny ve vzorcích

#### 10.1.4 Vanilinová kyselina

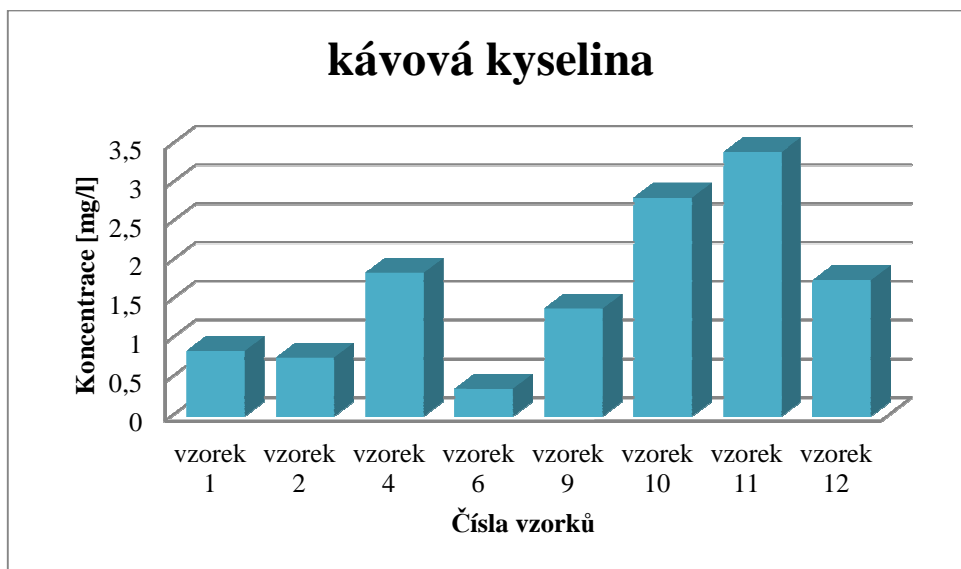
Vanilinová kyselina byla přítomna v jedenácti vzorcích. Nejvyšší koncentraci této kyseliny ( $200,425 \text{ mg.l}^{-1} \pm 0,69$ ) měl vzorek 13 (Hostětínský mošt jablko, zelený čaj a maté green).



Obr. 30: Koncentrace vanilinové kyseliny ve vzorcích

### 10.1.5 Káвовá kyselina

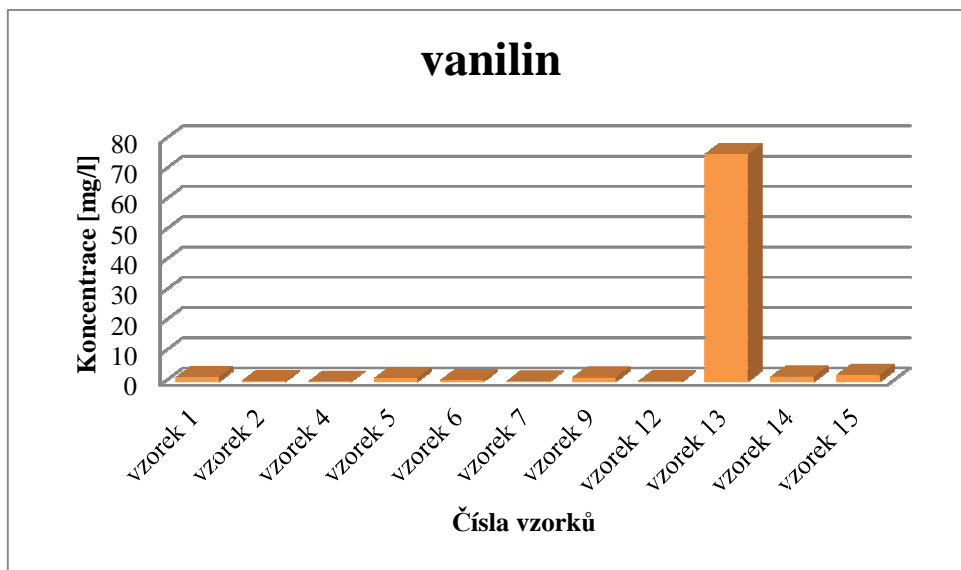
Káвовá kyselina se nacházela v osmi vzorcích a nejvyšší hodnoty měly vzorky z Hostětína. Vzorek Hostětínský mošt jablko a červená řepa obsahoval  $3,404 \text{ mg.l}^{-1} \pm 0,13$ , vzorek Hostětínský mošt jablko a rakytník obsahoval  $2,820 \text{ mg.l}^{-1} \pm 0,03$ .



Obr. 31: Koncentrace káвовé kyseliny ve vzorcích

### 10.1.6 Vanilin

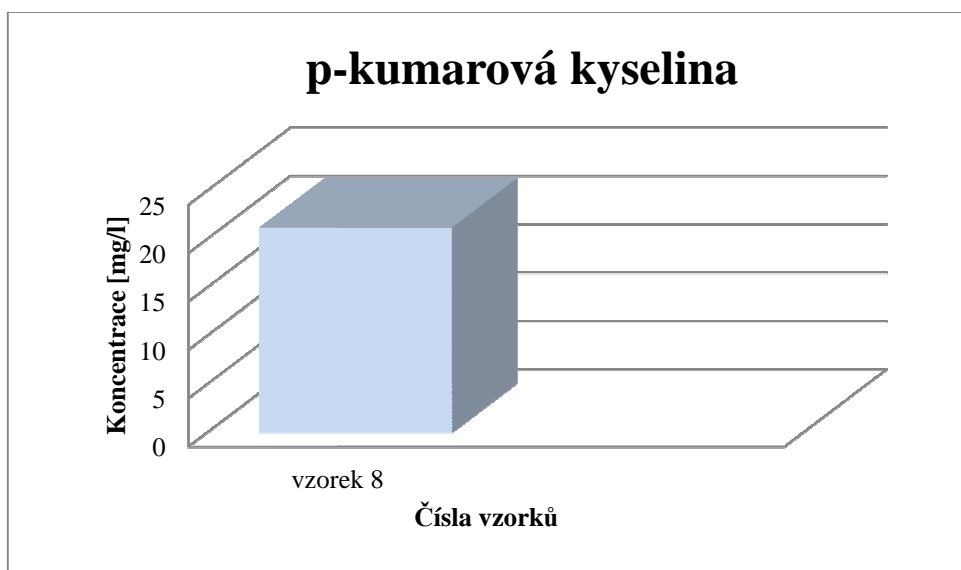
Fenolická látka vanilin byla obsažena v jedenácti vzorcích. Absolutně nejvyšší hodnotu převyšující hodnoty vanilinu ve zbylých vzorcích měl vzorek 13 (Hostětínský mošt jablko, zelený čaj a maté green) –  $75,243 \text{ mg.l}^{-1} \pm 0,44$ .



Obr. 32: Koncentrace vanilinu ve vzorcích

### 10.1.7 p-kumarová kyselina

Kyselina p-kumarová byla přítomna pouze v jednom vzorku – Ugova čerstvá šťáva jablko a zelí. Koncentrace této kyseliny měla hodnotu  $21,197 \text{ mg.l}^{-1} \pm 1,36$ .

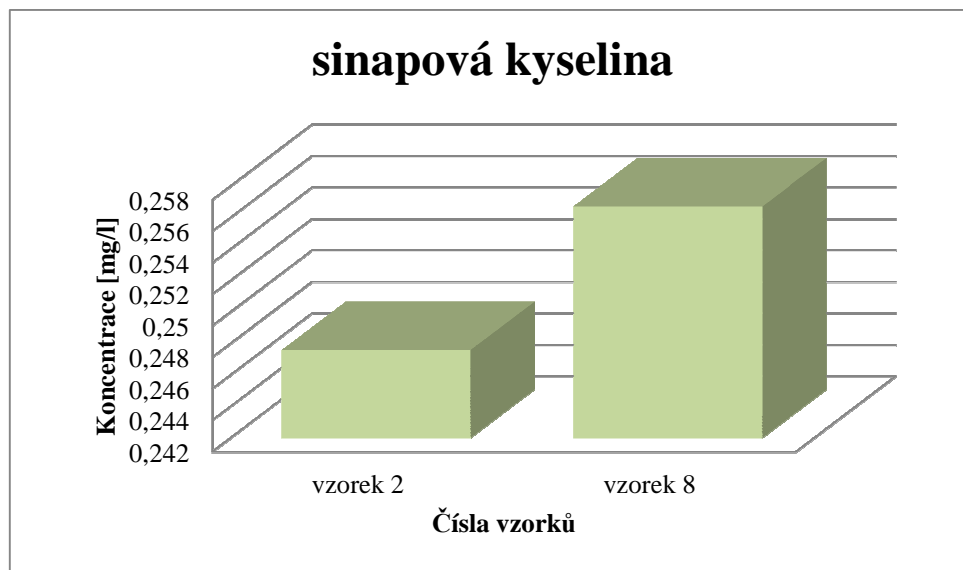


Obr. 33: Koncentrace p-kumarové kyseliny ve vzorcích

### 10.1.8 Sinapová kyselina

Sinapová kyselina se nacházela ve dvou vzorcích. Ve vzorku 8 (Ugova čerstvá šťáva jablko a zelí) byla zjištěna koncentrace  $0,257 \text{ mg.l}^{-1} \pm 0,02$  a ve vzorku 2 (Hello 100% čerstvě lisovaná šťáva) byla hodnota koncentrace  $0,248 \text{ mg.l}^{-1} \pm 0,04$ .

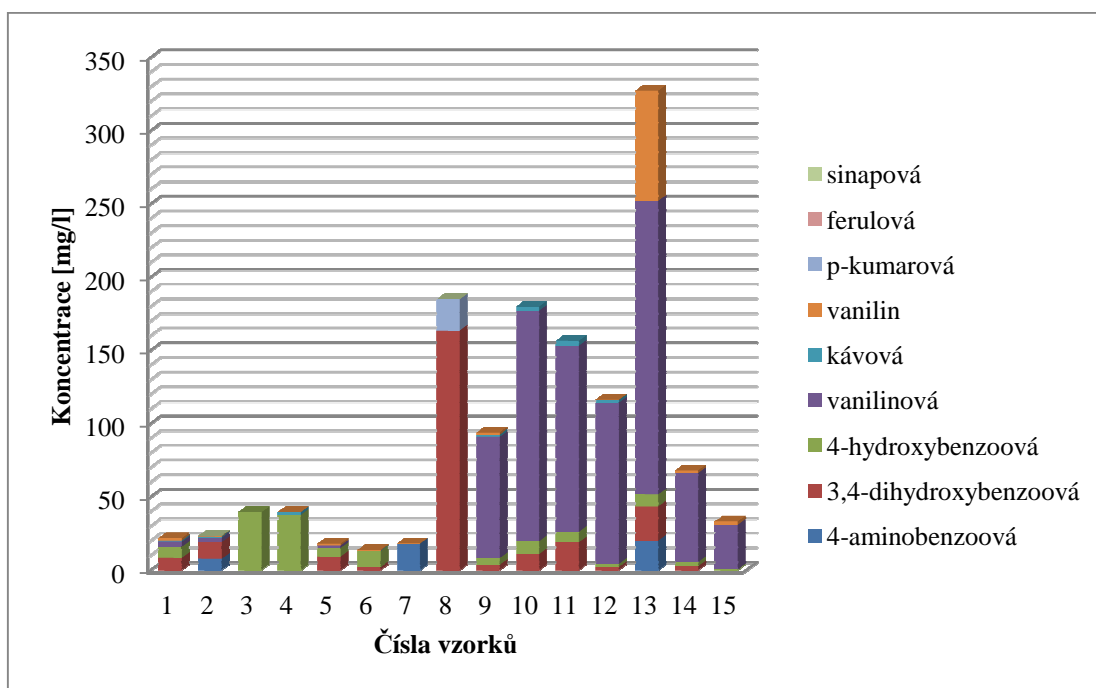




Obr. 34: Koncentrace sinapové kyseliny ve vzorcích

### 10.1.9 Celkové množství vybraných fenolických látek

Ze všech analyzovaných jablečných šťáv měl nejvyšší koncentraci vybraných látek vzorek 13 (Hostětínský mošt jablko, zelený čaj a maté green). Z grafu je také viditelné, že jedny z nejvyšších hodnot fenolických látek měly všechny mošty z Hostětína. K těmto hodnotám je ještě přiřazen i vzorek Ugo čerstvá šťáva jablko a zelí. Ostatní vzorky obsahovaly daleko nižší hodnoty koncentrací fenolických sloučenin.



Obr. 35: Celkové množství vybraných fenolických sloučenin ve vzorcích

## 10.2 Diskuze

Ve vzorcích jablečných šťáv bylo stanovováno devět vybraných fenolických látek (4-aminobenzoová kyselina, 3,4-dihydroxybenzoová kyselina, 4-hydroxybenzoová kyselina, vanilinová kyselina, kávová kyselina, vanilin, ferulová kyselina, p-kumarová kyselina a sinapová kyselina). Po analýze všech vzorků bylo zjištěno, že z předpokládaných devíti látek bylo ve vzorcích přítomno pouze osm fenolických látek. Ze sledovaných fenolických látek nebyla ani v jednom vzorku přítomna kyselina ferulová, která je hojně zastoupena v rostlinných materiálech a je známá svou antioxidační aktivitou a ochranou rostlin před napadením různými škůdci. Ferulová kyselina bývá obsažena i v jablkách, ale její množství je závislé na odrůdě jablek a způsobu pěstování, a tudíž nemusela být obsažena v analyzovaných vzorcích.

Analyzované vzorky byly rozděleny do čtyř kategorií:

Do první kategorie patřily jablečné šťávy, které jsou běžné dostupné v obchodních sítích a všechny vzorky byly ošetřeny pasterací. Tyto vzorky měly malé množství fenolických látek, dokonce vzorek od společnosti Viko obsahoval pouze jednu sledovanou fenolickou látku (4-hydroxybenzoovou kyselinu o koncentraci  $39,676 \pm 0,26 \text{ mg.l}^{-1}$ ).

Druhá kategorie jablečných šťáv byla od společnosti UGO. Tyto šťávy byly ošetřeny paskalizací (vysokými tlaky). Podle prostudovaných zdrojů je paskalizace typická tím, že je zachováno větší množství nutričních látek než při pasteraci. Paskalizaci jsou přičítány pozitivní účinky i z hlediska toho, že jsou zničeny pouze škodlivé látky. Při stanovení fenolických látek nebyla toto tvrzení dokázáno, jelikož tři z pěti vzorků byly s nižšími hodnotami látek než šťávy pasterované (z první kategorie). Jeden vzorek byl s nepatrně vyšší hodnotou fenolických látek jako vzorek ošetřený pasterací. A pouze jeden vzorek s příchutí jablko a červené zelí měl vysokou hodnotu fenolických látek. Tento vzorek byl ze všech vzorků na druhém místě s celkovým obsahem fenolických sloučenin. Je patrné, že vysoké množství fenolických látek u tohoto vzorku je ovlivněno i podílem šťávy z červeného zelí.

Třetí kategorie byla tvořena Hostětínskými mošty, které jsou vyráběny v bio kvalitě. Všechny mošty z této kategorie měly převyšující množství fenolických sloučenin (kromě vzorku 8, který byl v množství fenolických látek srovnatelný). Celkově byly mošty z Hostětína nejlépe vyhodnocenou skupinou. V nejvyšším množství a ve všech vzorcích se

nacházela kyselina vanilinová, hodnoty se pohybovaly v koncentracích od  $82,797 \pm 0,73$  do  $200,425 \pm 0,69$   $\text{mg.l}^{-1}$ . Také ve všech vzorcích byla přítomna kyselina 3,4-dihydroxybenzoová (v koncentracích od  $2,153 \pm 0,01$  do  $23,432 \pm 0,44$   $\text{mg.l}^{-1}$ ) a 4-hydroxybenzoová (v koncentracích od  $2,262 \pm 0,00$  do  $8,156 \pm 0,41$   $\text{mg.l}^{-1}$ ).

Do čtvrté kategorie jsou zařazeny zeleninovo-ovocné šťávy REFIT od společnosti Beskyd Fryčovice, a. s., které jsou ošetřeny vysokými tlaky stejně jako vzorky z druhé kategorie. Hodnoty koncentrací přítomných vybraných fenolických látek jsou vyšší než vzorky pasteurované (z první kategorie). Po srovnání vzorků ošetřených vysokými tlaky od společnosti UGO a Beskyd Fryčovice zjistíme, že šťávy REFIT mají vyšší hodnoty (kromě jedné – vzorek UGO jablko a červené zelí má vyšší hodnoty než oba vzorky REFIT). V obou vzorcích REFIT byly přítomny kyselina vanilinová (v koncentracích  $30,389 \pm 0,50$  a  $60,791 \pm 4,65$   $\text{mg.l}^{-1}$ ), vanilin (v koncentracích  $1,761 \pm 0,21$  a  $2,350 \pm 0,04$   $\text{mg.l}^{-1}$ ) a kyselina 4-hydroxybenzoová (v koncentracích  $0,631 \pm 0,03$  a  $2,649 \pm 0,04$   $\text{mg.l}^{-1}$ ). Z dalších přítomných látek se zde vyskytovala pouze kyselina 3,4-dihydroxybenzoová ( $2,855 \pm 0,18$   $\text{mg.l}^{-1}$ ), která se nacházela ve vzorku 14 (jablko a brokolice), z toho lze usoudit, že právě kyselina 3,4-dihydroxybenzoová může pocházet právě ze šťávy z brokolice.

Z obrázku číslo 35 je viditelné, že stanovované fenolické látky byly přítomny ve vyšších koncentracích ve šťávách a mošttech, do kterých byla přidána jiná zeleninová, či ovocná složka. Zřetelně nejvyšších koncentrací nabývala kyselina vanilinová. U kyseliny p-kumarové je viditelné, že byla přítomna jen v jednom vzorku, který byl tvořen z 50 % jablečnou šťávou a z 50 % šťávou z červeného zelí. Je proto zřejmé, že kyselina p-kumarová pochází právě z červeného zelí.

Plnohodnotné srovnání výsledků analyzovaných fenolických sloučenin s dostupnými literárním zdroji není možné, jelikož předmětem velkého množství výzkumů je stanovení jiných fenolických látek (zejména kyseliny gallová, kyselina chlorogenová, katechiny) a v největším množství je stanovováno celkové množství fenolických látek v jablkách specifických druhů a šťáv či džusů z nich vyrobených.

## ZÁVĚR

Po prostudování literatury byla popsána výroba ovocných šťáv, bylo zhodnoceno ošetření šťáv teplotou a vysokými tlaky a také byly popsány fenolické látky, které byly stanovovány. Dále byla popsána extrakční metoda a vysoce účinná kapalinová chromatografie.

Pro vlastní analýzu se nejdříve zajistily standardy analyzovaných látek a samotné vzorky jablečných šťáv a moštů. Ze standardů se změřily plochy píků a následně vytvořily kalibrační křivky, ze kterých byly vyhodnoceny rovnice přímků. Do rovnic byly dosazeny plochy píků z analyzovaných vzorků a výsledky byly zpracovány do grafů a tabulky.

Pro tuto práci byly vybrány jablečné šťávy a mošty, jelikož konzumaci jablek jsou přičítány pozitivní zdravotní účinky, jako je snížení rizika rakoviny plic, astma, kardiovaskulárních nemocí a mozkové mrtvice. Tyto zdravotní účinky jsou přičítány vysokému obsahu fytochemikálií (hlavně flavonoidů) v jablkách. Jablka obsahují kolem 0,5 - 2 g polyfenolů na kg jablek v čerstvém stavu, ale tato hodnota je ale jen orientační, jelikož je závislá na klimatických podmínkách pro pěstování jablek a na jednotlivých jablečných odrůdách.

Je také obecně známo, že nízká koncentrace fenolických látek chrání jablka před oxidačním poškozením, například při výrobě šťáv. Vysoká koncentrace fenolických látek a jejich oxidační produkty mohou způsobit zabarvení ovocných produktů a zákal jablečných šťáv jako výsledek reakce taninů s proteiny, karbohydráty nebo minerály. Vyšší koncentrace fenolických látek byly v Hostětínských moštech a také v těchto moštech byl viditelný značný zákal.

Během analýzy pomocí vysoko účinné kapalinové chromatografie bylo zjištěno, že se ve vzorcích nacházely všechny vybrané fenolické látky, kromě ferulové kyseliny. Ferulová kyselina je totiž přítomna především v obilovinách. A také bylo zjištěno, že jablečné šťávy a mošty s přísadky bylinných extraktů nebo zeleninových šťáv obsahovaly větší množství fenolických látek, než 100% jablečné šťávy. Vysokých hodnot fenolických sloučenin dosahovala šťáva UGO jablko a červené zelí a je zřejmé, že tyto hodnoty byly vyšší v důsledku obsahu šťávy z červeného zelí.

Největší koncentraci fenolických sloučenin měl vzorek Hostětínský mošt jablko, zelený čaj a green maté. Tento vzorek je z moštárny Hostětín, která své mošty vyrábí v bio kvalitě. Šťávy, které byly ošetřeny paskalizací, měly nižší hodnoty fenolických sloučenin, než

mošty ošetřené teplem. Z práce tudíž vyplývá, že mošty jsou daleko lepším zdrojem analyzovaných fenolických látek než šťávy, ať již pasterované, či ošetřené vysokými tlaky.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] ANONYM: *Vyhláška 335/1997 Sb., kterou se provádí § 18 písm. a), d), h), i), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro nealkoholické nápoje a koncentráty k přípravě nealkoholických nápojů, ovocná vína, ostatní vína a medovinu, pivo, konzumní líh, lihoviny a ostatní alkoholické nápoje, kvasný ocet a droždí*, Vydává Ministerstvo zemědělství České republiky
- [2] ASHURST, Philip, R.: *Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices*, Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2005, 2. vydání, 374 stran, ISBN 1-4051-2286-2
- [3] ROP, Otakar a Pavel VALÁŠEK. *Výroba nápojů a pochutin: doplňkové texty k základnímu kurzu*, Univerzita Tomáše Bati, Zlín, 2007, CD-ROM, ISBN 978-80-7318-588-6
- [4] ROP, O., HRABĚ, J.: *Nealkoholické a alkoholické nápoje*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín, 2009, 1. vydání, 129 stran, ISBN 978-80-7318-748-4
- [5] ROP, Otakar, Pavel VALÁŠEK a Ignác HOZA. *Teoretické principy konzervace potravin I*. Univerzita Tomáše Bati, Zlín, 2005, 1. vydání, 130 stran, ISBN 80-7318-339-0
- [6] Interaktivní databáze chorob a škůdců ovocných plodin: Fyziologická rzivost jablek [online] cit [2013-02-20]. Dostupný z WWW: <[http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/551/ustav\\_551/aplikace/soubory/rzivost\\_jablek.pdf](http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/551/ustav_551/aplikace/soubory/rzivost_jablek.pdf)>
- [7] KOPEC, Karel, BALÍK, Josef: *Kvalitologie zahradnických produktů – Nauka o hodnocení a řízení jakosti produktů a produkčních procesů*, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno 2008, 1. vydání, 171 stran, ISBN 978-80-7375-198-2
- [8] BUCHTOVÁ, Irena: *Situační a výhledová zpráva: Ovoce*, Mze ČR, Říjen 2012, Ministerstvo zemědělství České republiky, Praha
- [9] HUI, Y., H.: *Handbook of Food Products Manufacturing*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2007, 1. vydání, 2237 stran, ISBN 978-0-470-04964-8
- [10] Fruit juice production [online] cit [2013-04-17]. Dostupný z WWW: <<http://www.aijn.org/pages/main/fruit-juice-production.html>>

- [11] CHROUST, Petr, ŠKARKOVÁ, Pavla, LOKOČ, Radim: Zpracování a uchování ovoce [online] cit [2013-02-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.ovocne-stezky.cz/4web/soubory/moznosti-zpracovani-ovoce.pdf>>
- [22] HRABĚ, Jan, Ignác HOZA a Otakar ROP. *Technologie výroby potravin rostlinného původu: bakalářský stupeň*. 1. vydání, Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005, 178 stran, ISBN 8073183722
- [33] CHROUST, Petr, LOKOČ, Radim: Konzervace vylisovaných ovocných šťáv, [online] cit [2013-02-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.ovocne-stezky.cz/?page=navody-a-doporuceni&group=mostovani&text=navody-konzervace-ovocnych-stav>>
- [44] VELÍŠEK, Jan, HAJŠLOVÁ, Jana: *Chemie potravin*, OSSIS, Tábor, 2009, 3. vydání, ISBN 978-80-86659-17-6
- [55] YADAV, Sangilimuthu, Alagar et al.: *Active Mechanism Against Free Radical using Tragia involucrata L. Leaves and Root Extract by In vitro Antioxidant Models*, Journal of Pharmacy Research, 2012, Volume 5, Issue 8, ISSN 0974-6943
- [66] KOLEČKÁŘ, Vít et al: *Proanthocyanidiny a jejich antioxidační aktivita*, Chemické listy, 2012, ročník 106, číslo 2, ISSN 1213-7103
- [77] FADER, Werner: *Vinná réva v zahradce*, Vydavatel'stvo Příroda, s.r.o., Bratislava, 2002, 1. vydání, 95stran, ISBN 80-07-00937-X
- [88] PLÁTENÍK, Jan: *Volné radikály, antioxidanty a stárnutí*, Interní medicína pro praxi, 2009, ročník 11, číslo 1, ISSN 1212-7299
- [99] BROWN, Ellen: *Supercharge Your Immune System*, Fair Winds Press, USA, 2008, 1. vydání, 211 stran, ISBN 978-1-59233-328-8
- [20] FIDLER Martin, KOLÁŘOVÁ, Lenka: *Analýza antioxidantů v chmelu a pivu*, Chemické listy, 2009, ročník 103, číslo 3, ISSN 1213-7103
- [21] PENG, F. ET AL: *Low antioxidant status of serum uric acid, bilirubin and albumin in patients with neuromyelitis optica*, European Journal of Neurology, 2012, Volume 19, Issue 2, ISSN: 1468-1331
- [22] SUN, Baoshan et al: *Fractionation of Red Wine Polyphenols by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography*, Journal of Chromatography A, 2006, Volume 1128, Issue 1-2, ISSN 0021-9673

- [23] DISERTAČNÍ PRÁCE: MANDELOVÁ, Lucie: *Antimutagenní aktivita obsahových látek v zelenině a v ovoci*, Brno 2006, Masarykova univerzita, Lékařská fakulta
- [24] PAVLOUŠEK, Pavel: *Výroba vína u malovinařů*, Grada Publishing, Praha, 2010, 2. vydání, 120 stran, ISBN 978-80-247-3487-3
- [25] CHENG-HONG, Yang et al: *Antioxidant Activity of Various Parts of Cinnamomum cassia Extracted with Different Extraction Methods*, *Molecules*, 2012, Volume 17, Issue 6, ISSN 1420-3049
- [26] TIMORACKÁ, Mária: *Polyfenolické látky*, *Biológia, ekológia, chémia - časopis pre školy*, 2010, ročník 14, číslo 1, ISSN: 1338-1024
- [27] SLANINA, Jiří, TÁBORSKÁ, Eva: *Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka*, *Chemické listy*, 2004, ročník 98, číslo 5, ISSN 1213-7103
- [28] PAVLOUŠEK, Pavel: *Pěstování révy vinné - Moderní vinohradnictví*, Grada Publishing, 2011, 1.vydání, 336 stran, ISBN 978-80-247-3314-2
- [29] HARMATHA, Juraj: *Strukturní bohatství a biologický význam lignanů a jim příbuzných rostlinných fenyylpropanoidů*, *Chemické listy*, 2005, ročník 99, číslo 9, ISSN 1213-7103
- [30] PÉREZ-JIMÉNEZ, J. et al: *Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer Database*, *European Journal of Clinical Nutrition*, 2010, Volume 64, Issue 3, p. 112-120, ISSN 0954-3007
- [31] JACKSON, S., Ronald: *Wine science*, Academia Press, San Diego, 2002, 2. vydání, ISBN 0-12-379062-X
- [32] DISERTAČNÍ PRÁCE: ZENDULKA, Ondřej: *Polyfenoly ve výživě jako možná prevence nádorových onemocnění*, Brno 2008, Masarykova univerzita v Brně, Lékařská fakulta, Ústav preventivního lékařství
- [33] KRAUS, Vilém et al: *Nová encyklopedie českého a moravského vína: 1. díl*, Praga Mystica, Praha 1, 2005, 1. vydání, 306 stran, ISBN 80-86767-00-0
- [34] p-aminobenzoic acid [online] cit [2013-04-03]. Dostupný z WWW: <<http://chemicalland21.com/specialtychem/finechem/p-AMINO BENZOIC%20ACID.htm>>
- [35] Para-aminobenzoic acid (PABA) [online] cit [2013-04-03]. Dostupný z WWW: <<http://www.webmd.com>>



- [36] CHAO, Che-Yi, YIN, Mei-Chin: *Antibacterial effects of roselle calyx extracts and protocatechuic acid in ground beef and apple juice*, Foodborne Pathogens and Disease, 2009, Volume 6, Issue 2, ISSN 1535-3141
- [37] ROSSI, De, Antonella, DESIDERIO, Claudia: *Fast Capillary Electrochromatographic Analysis of Parabens and 4-hydroxybenzoic acid in Drugs and Cosmetics*, Electrophoresis, 2002, Volume 23, Issue 19, ISSN 1522-2683
- [38] KIM, Su-Jin et al.: *The Beneficial Effect of Vanillic Acid on Ulcerative Colitis*, Molecules, 2010, Volume 15, Issue 10, ISSN 1420-3049
- [39] Caffeic acid [online] cit [2013-04-05] Dostupný z WWW: <<http://www.webmd.com/vitamins-supplements/ingredientmono-1266-CAFFEIC%20ACID.aspx?activeIngredientId=1266&activeIngredientName=CAFFEIC%20ACID>>
- [40] The European Food Information Council [online] cit [2013-04-07] Dostupný z WWW: <<http://www.eufic.org/article/cs/artid/ochuceny-potravinny-etiketu>>
- [41] CORTE, Federico et al.: *Survival of Listeria innocua in Apple Juice as Affected by Vanillin or Potassium Sorbate*, Journal of Food Safety, 2004, Volume 24, Issue 1, ISSN 1745-4565
- [42] MARKOWSKI, Jarosław et al.: *Phenolics in Apples and Processed Apple Products*, Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 2007, Volume 57, Issue 4, ISSN 1230-0322
- [43] LOU, Zaixiang et al.: *P-Coumaric Acid Kills Bacteria Through Dual Damage Mechanisms*, Food Control, 2012, Volume 25, Issue 2, ISSN 0956-7135
- [44] MATHEW, Sindhu, ABRAHAM, Emilia, T.: *Ferulic Acid: An Antioxidant Found Naturally in Plant Cell Walls and Feruloyl Esterases Involved in its Release and Their Applications*, Critical Reviews in Biotechnology, 2004, Volume 24, Issue 2-3, ISSN 0738-8551
- [45] KHATTAB, Rabie et al.: *Determination of Sinapic Acid Derivatives in Canola Extracts Using High-Performance Liquid Chromatography*, Journal of the American Oil Chemists' Society, 2010, Volume 87, Issue 2, ISSN 0003-021x
- [46] BULL, Michelle, K. et al: *The Effect of High Pressure Processing on the Microbial, Physical and Chemical Properties of Valencia and Navel Orange Juice*, In-

- novative Food Science and Emerging Technologies, 2004, Volume 8, Issue 5, ISSN 1466-8564
- [47] HOUSKA, M. et al: *Food safety issues of high pressure processed fruit/vegetable juices*, **High Pressure Research**, 2007, Volume 27 Issue 1, p157-162, ISSN 0895-7959
- [48] RASTOGI, N., K. ET AL: *Opportunities and Challenges in High Pressure Processing of Foods*, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2007, Volume 47, Issue 1, ISSN 1040-8398
- [49] Principy konzervace potravin, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze [online] cit [2013-02-26]. Dostupný z WWW: <[http://www.vscht.cz/ktk/www\\_324/studium/KP/konzervace.swf](http://www.vscht.cz/ktk/www_324/studium/KP/konzervace.swf)>
- [50] CHAUHAN, Om, Prakash et al.: *Studies on Retention of Antioxidant Activity, Phenolics and Flavonoids in High Pressure Processed Black Grape Juice and Their Modelling*, *International Journal of Food Science & Technology*, 2011, Volume 46, Issue 12, ISSN 1365-2621
- [51] Ošetření potravin vysokým tlakem, Beskyd Fryčovice, a. s. [online] cit [2013-03-18]. Dostupný z WWW: <<http://www.beskyd.cz/data2/scan0007.jpg>>
- [52] ANONYM: *Ottova všeobecná encyklopedie ve dvou svazcích A – L*, Ottovo nakladatelství, s. r. o, Praha, 2003, 1. vydání, 735 stran, ISBN 80-7181-938
- [53] ÖTLEŞ, Semih: *Handbook of Food Analysis Instruments*, CRC Press, New York, 2009, 1. vydání, 525 stran, ISBN 978-1-4200-4566-6
- [54] GARCIA-SALAS, Patricia et al: *Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples*, *Molecules*, 2010, Volume 15, Issue 12, ISSN 1420-3049
- [55] KLOUDA, Pavel: *Moderní analytické metody*, Nakladatelství Pavel Klouda, Ostava, 2003, 2. vydání, 132 stran, ISBN 80-86369-07-2
- [56] Chromatografie: Oddělení lékařské chemie a biochemie, 3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze [online] cit [2012-11-24]. Dostupný z WWW: <[http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy\\_B/chromatografie.doc](http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc)>
- [57] McMASTER, Marvin: *HPLC - A Practical User's Guide*, John Wiley & Sons, New Jersey, 2007, 1. vydání, 238 stran, ISBN 978-0-471-75401-5

- [58] SATINDER, Ahuja, DONG, Michael, W: *Handbook of Pharmacautical Analysis by HPLC*, Elsevier Inc, San Diego, 2005, 1. vydání, 658 stran, ISBN 0-12-088547-6
- [59] LEE, Philip, W.: *Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals*, John Wiley & Sons, West Sussex, 2003, 1. vydání, 1350 stran, ISBN: 978-0-470-41090-5
- [60] FIŠERA, Miroslav: *Přednášky z předmětu Analýza a hodnocení potravin*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2011
- [61] DOLEŽALOVÁ, Věra a kol.: *Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii*, Nakladatelství Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, Brno, 1995, 4. vydání, 286 stran, ISBN 80-7013-198-5
- [62] REEVE, Roger, N: *Introduction to Environmental Analysis*, John Wiley & Sons, University of Sunderland, United Kingdom, 2002, 1. vydání, 301 stran, ISBN 0-471-47294-9

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

g/l	Jednotka koncentrace
°C	Stupeň Celsia - jednotka teploty
EU	Evropská unie
ČR	Česká republika
např.	Například
$\Sigma$	Suma
ha	Hektar – jednotka výměry
MPa	Jednotka tlaku
$\mu\text{mol}$	Jednotka látkového množství
mg	Jednotka váhy
w/w	Weight/weight – vyjádření koncentrace
sp.	Species
pKa	Disociační konstanta
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie
UV/VIS	Ultrafialová a viditelná oblast
l	Jednotka objemu
ml	Jednotka objemu
$\mu\text{l}$	Jednotka objemu
$\mu\text{m}$	Jednotka délky
nm	Jednotka délky
mg/l	Jednotka koncentrace

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<i>Obr. 1: Jablka s/bez rzivosti [6].....</i>	15
<i>Obr. 2: Výroba ovocných šťáv [10] .....</i>	18
<i>Obr. 3: Chemická struktura fenolických kyselin [26] .....</i>	24
<i>Obr. 4: Struktura 4-aminobenzoové kyseliny .....</i>	27
<i>Obr. 5: Struktura 3,4-dihydroxybenzoové kyseliny .....</i>	28
<i>Obr. 6: Struktura 4-hydroxybenzoové kyseliny.....</i>	28
<i>Obr. 7: Struktura vanilinové kyseliny .....</i>	29
<i>Obr. 8: Struktura kávové kyseliny.....</i>	30
<i>Obr. 9: Struktura vanilinu .....</i>	30
<i>Obr. 10: Struktura p-kumarové kyseliny.....</i>	31
<i>Obr. 11: Struktura ferulové kyseliny.....</i>	31
<i>Obr. 12: Struktura sinapové kyseliny .....</i>	32
<i>Obr. 13: Schéma HPLC systému [58].....</i>	38
<i>Obr. 14: Modulární systémy [58] .....</i>	39
<i>Obr. 15: Integrované systémy [58] .....</i>	39
<i>Obr. 16: Kolona HPLC [57] .....</i>	40
<i>Obr. 17: Analyzované vzorky.....</i>	44
<i>Obr. 18: Kalibrační křivka pro 4-aminobenzoovou kyselinu .....</i>	48
<i>Obr. 19: Kalibrační křivka pro 3,4-dihydroxybenzoovou kyselinu .....</i>	48
<i>Obr. 20: Kalibrační křivka pro 4-hydroxybenzoovou kyselinu .....</i>	49
<i>Obr. 21: Kalibrační křivka pro vanilinovou kyselinu .....</i>	49
<i>Obr. 22: Kalibrační křivka pro kávovou kyselinu .....</i>	50
<i>Obr. 23: Kalibrační křivka pro vanilin.....</i>	50
<i>Obr. 24: Kalibrační křivka pro p-kumarovou kyselinu .....</i>	51
<i>Obr. 25: Kalibrační křivka pro ferulovou kyselinu .....</i>	51
<i>Obr. 26: Kalibrační křivka pro sinapovou kyselinu .....</i>	52
<i>Obr. 27: Koncentrace 4-aminobenzoové kyseliny ve vzorcích .....</i>	53
<i>Obr. 28: Koncentrace 3,4-dihydroxybenzoové kyseliny ve vzorcích .....</i>	54
<i>Obr. 29: Koncentrace 4-hydroxybenzoové kyseliny ve vzorcích .....</i>	54
<i>Obr. 30: Koncentrace vanilinové kyseliny ve vzorcích.....</i>	55
<i>Obr. 31: Koncentrace kávové kyseliny ve vzorcích .....</i>	55
<i>Obr. 32: Koncentrace vanilinu ve vzorcích .....</i>	56

---

<i>Obr. 33: Koncentrace p-kumarové kyseliny ve vzorcích .....</i>	<i>56</i>
<i>Obr. 34: Koncentrace sinapové kyseliny ve vzorcích .....</i>	<i>57</i>
<i>Obr. 35: Celkové množství vybraných fenolických sloučenin ve vzorcích .....</i>	<i>57</i>

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1: Vývoj ploch produkčních ovocných sadů v ČR(ha) [8] .....</i>	16
<i>Tab. 2: Zastoupení odrůd jabloní v produkčních sadech v ČR [8].....</i>	16
<i>Tab. 3: Detektory dle měřené veličiny [61] .....</i>	41
<i>Tab. 4: Výchozí data pro kalibrační křivky .....</i>	73
<i>Tab. 5: Koncentrace fenolických látek .....</i>	74

## **SEZNAM PŘÍLOH**

I: VÝCHOZÍ DATA PRO KALIBRAČNÍ KŘIVKY

II: KONCENTRACE FENOLICKÝCH LÁTEK



## PŘÍLOHA PI: VÝCHOZÍ DATA PRO KALIBRAČNÍ KŘIVKY

	Plochy píků								
Koncentrace [mg.l <sup>-1</sup> ]	4-aminobenzoová kyselina	3,4-dihydroxybenzoová kyselina	4-hydroxybenzoová kyselina	Vanilínová kyselina	Kávoá kyselina	Vanilin	p-kumarová kyselina	Ferulová kyselina	Sinapová kyselina
0,1	2796	1478	2606	2603	2238	5585	15615	15525	1622
0,3	8172	6119	7433	7374	11382	16091	29581	23920	3894
0,5	12729	10683	11648	11216	18153	26397	40111	31182	6977
0,7	16747	13244	15103	15229	23950	34756	49752	37755	9691
0,9	23074	18149	21241	20847	33155	49318	65739	47461	13612
1	23512	19726	23018	21215	33648	49710	59073	34996	14528
3	64171	53746	58194	57250	100261	133235	156581	93929	48123
5	104276	91312	95182	92970	166193	216806	256530	154901	70055
7	158909	133529	144940	141531	248364	332345	391403	236371	105589
9	198026	167001	181760	417524	316347	417524	442388	292602	137205

*Tab. 4: Výchozí data pro kalibrační křivky*

## PŘÍLOHA P II: KONCENTRACE FENOLICKÝCH LÁTEK

Fenolické látky [mg.l <sup>-1</sup> ]	Číslo vzorků							
	1	2	3	4	5	6	7	
4-aminobenzoová kyselina		7,921 ±0,66					18,098 ±0,52	
3,4-dihydroxybenzoová kyselina	8,529± 0,39	11,432 ±0,26			9,395 ±1,31	1,997 ±0,37		
4-hydroxybenzoová kyselina	7,455 ±0,15		39,676 ±0,26	37,781 ±0,05	5,833 ±0,09	10,855 ±0,38		
Vanilinová kyselina	3,537 ±0,10	2,841 ±0,04		0,016 ±0,01	1,700± 0,11			
Káвовá kyselina	0,845 ±0,03	0,760 ±0,07		1,852 ±0,14		0,359 ±0,01		
Vanilin	1,531 ±0,18	0,345 ±0,06		0,109 ±0,03	1,255 ±0,16	0,600 ±0,01	0,170 ±0,07	
p-kumarová kyselina								
Ferulová kyselina								
Sinapová kyselina		0,248 ±0,04						
Fenolické látky [mg.l <sup>-1</sup> ]	8	9	10	11	12	13	14	15
4-aminobenzoová kyselina						20,156 ±0,18		
3,4-dihydroxybenzoová kyselina	163,69 7±5,17	3,645 ±0,12	10,997 ±0,15	19,079 ±0,16	2,153 ±0,01	23,432 ±0,44	2,855 ±0,18	
4-hydroxybenzoová kyselina		4,720 ±0,20	8,809 ±0,06	7,194 ±0,08	2,262 ±0,00	8,156 ±0,41	2,649 ±0,04	0,631 ±0,03
Vanilinová kyselina		82,797 ±0,73	157,32 0±0,95	127,02 6±0,43	110,06 3±1,78	200,42 5±0,69	60,791 ±4,65	30,389 ±0,50
Káвовá kyselina		1,391 ±0,05	2,820 ±0,03	3,404 ±0,13	1,757 ±0,14			
Vanilin		1,440 ±0,01			0,271 ±0,08	75,243 ±0,44	1,761 ±0,21	2,350 ±0,04
p-kumarová kyselina	21,197 ±1,36							
Ferulová kyselina								
Sinapová kyselina	0,257 ±0,02							

*Tab. 5: Koncentrace fenolických látek*

**Žlutá políčka** ukazují, že ve vzorku nebyla látka nalezena.