

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra analytické chemie



Hodnocení obsahu fenolických látek v ovoci

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Bc. Kristýna Bortlová

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

Dne 5. 4. 2018 v Hradci Králové

.....
podpis

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce paní Doc. PharmDr. Haně Sklenářové, Ph.D., za její vstřícný přístup, trpělivost, cenné rady a připomínky, díky kterým mohla být tato práce napsána a dokončena. Také děkuji celé katedře analytické chemie za příjemné pracovní prostředí.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Kristýna Bortlová

Školitel: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Název diplomové práce: Hodnocení obsahu fenolických látek v ovoci

Tato diplomová práce je zaměřena na analýzu vybraných fenolických látek (kyselinu gallovou, kyselinu chlorogenovou, epikatechin, rutin, kvercitrin, floridzin a floretin). Obsah těchto fenolických látek je hodnocen v deseti vybraných odrůdách jablek pomocí optimalizované HPLC metody.

V práci je zahrnut obecný popis vybraných fenolických látek. Dále práce obsahuje krátkou rešerši odborných publikací na téma obsah fenolických látek v ovoci a stručný popis HPLC metody pro stanovení fenolických látek.

HPLC analýza probíhala na předkoloně Ascentis Express C18 (5 x 4,6 mm x 5 µm), na koloně Kinetex C18 (150 x 4,6 mm x 5 µm) s povrchově porézními částicemi a pevným jádrem a na koloně Luna Omega Polar C18 (150 x 4,6 mm x 5 µm) s plně porézními částicemi. Detekce byla provedena pomocí UV detektoru při vlnových délkách 255, 280, 320 a 365 nm. Nastříkovaný objem byl 10 µl a průtoková rychlost 1 ml/min při teplotě kolonového prostoru 30 °C. Byla využita gradientová eluce mobilní fáze začínající na 95 % vodné složky okyselené na pH 2,8 kyselinou octovou a 5 % acetonitrilu, celková doba analýzy byla 18 min.

Hladiny fenolických sloučenin byly stanovovány v původním rostlinném materiálu a po 3, 5 a 7 měsících skladování v chladících skladech a za nízkého přístupu kyslíku (tzv. ULO skladování). Analyzovány byly extrakty homogenizovaných jablek v methanolu s 0,1 % kyseliny octové pro dodržení stability fenolických látek. Rozdíly mezi jednotlivými odrůdami jsou významné jak v původním rostlinném materiálu, tak v průběhu skladování. Získané koncentrace fenolických sloučenin lze použít k odlišení kvality příslušných odrůd.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradci Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Kristýna Bortlová

Supervisor: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: Evaluation of phenolic compounds content in fruits

This diploma thesis is focused on the analysis of selected phenolic compounds (gallic acid, chlorogenic acid, epicatechin, rutin, quercitrin, phloridzin and phloretin). The content of these phenolic substances was evaluated in ten selected varieties of apples using an optimized HPLC method.

A general description of phenolic substances is included in the thesis. Further, the thesis contains a short review of scientific publications devoted to the content of phenolic substances in fruits and a short description of the HPLC method for determination of phenolic substances.

HPLC analysis was performed on the guard column Ascentis Express C18 (5 x 4.6 mm x 5 μ m), and separation columns Kinetex C18 (150 x 4.6 mm x 5 μ m) with core-shell particles and Luna Omega Polar C18 column (150 x 4.6 mm x 5 μ m) with fully porous particles. Detection was performed by a UV detector at wavelengths of 255, 280, 320 and 365 nm. The injected volume was 10 μ l and a flow rate of 1 ml/min at column temperature of 30 $^{\circ}$ C was used. A gradient elution of the mobile phase was applied starting at 95 % aqueous component acidified to pH 2.8 with acetic acid and 5 % acetonitrile, total analysis time was 18 min.

The levels of phenolic compounds were determined and evaluated in the original plant material and after 3, 5 and 7 months of storage in cool and ultralow oxygen conditions (ULO storage). Extracts of homogenized apples in methanol with 0.1 % acetic acid to keep the stability of phenolic compounds were analyzed. Differences between varieties are significant both in the original plant material and during storage. The obtained concentrations of phenolic compounds can be used to distinguish the quality of the concerned varieties.

Obsah

1 Seznam použitých zkratk	1
2 Úvod	3
3 Cíl a popis zadání práce	4
4 Teoretická část	5
4.1 Fenolické látky	5
4.1.1 Fenolické látky v ovoci	6
4.1.2 Jednotlivé fenolické látky	6
4.2 Metody pro analýzu a identifikaci fenolických látek	11
4.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	11
4.2.2 Trendy v HPLC	14
4.2.3 Vývoj HPLC metody pro separaci fenolických látek	15
5 Experimentální část	21
5.1 Přístroje a zařízení	21
5.2 Chemikálie (standarty a rozpouštědla)	22
5.3 Analyzované vzorky	23
5.4 Pracovní postup	25
5.4.1 Příprava extrakčního roztoku	25
5.4.2 Příprava extrakčního roztoku s přidavky standardů.....	25
5.4.3 Příprava roztoku standardů	25
5.4.4 Příprava reálných vzorků	26
6 Výsledky a diskuze	27
6.1 Optimalizace HPLC separace	27
6.2 Stanovení obsahu fenolických látek v reálných vzorcích jablek	30
6.3 Obsah fenolických látek v čerstvých plodech	31
6.3.1 Porovnání obsahu fenolických látek v čerstvých plodech	32
6.3.2 Porovnání jednotlivých odrůd	33
6.3.3 Souhrn – obsah fenolických látek v čerstvých plodech jablek	34
6.4 Obsah fenolických látek po 3 měsících skladování	36
6.4.1 Porovnání obsahu fenolických látek po 3 měsících skladování.....	37
6.4.2 Porovnání jednotlivých odrůd po 3 měsících skladování	38

6.4.3 Souhrn - obsah fenolických látek po 3 měsících skladování	39
6.5 Obsah fenolických látek po 5 měsících skladování.....	40
6.5.1 Porovnání obsahu fenolických látek po 5 měsících skladování.....	41
6.5.2 Porovnání jednotlivých odrůd po 5 měsících skladování	41
6.5.3 Souhrn - obsah fenolických látek po 5 měsících skladování	42
6.6 Obsah fenolických látek po 7 měsících skladování.....	43
6.6.1 Porovnání obsahu fenolických látek po 7 měsících skladování.....	45
6.6.2 Porovnání jednotlivých odrůd po 7 měsících skladování	45
6.6.3 Souhrn - obsah fenolických látek po 7 měsících skladování	46
6.7 Celkový souhrn	47
6.7.1 Porovnání vybraných odrůd.....	48
6.7.2 Porovnání obsahu fenolických látek	53
7 Závěr.....	55
8 Seznam obrázků a tabulek.....	56
8.1 Obrázky	56
8.2 Tabulky.....	57
9 Literatura.....	59

1 Seznam použitých zkratek

AAPM – metoda stanovení fenolických látek s použitím aminoantipyrinu

A_s – faktor symetrie

CUPRAC – metoda stanovení fenolických látek založená na redukci měďnatých iontů

CGC – kapilární plynová chromatografie

CZE – kapilární zónová elektroforéza

DAD – detektor s diodovým polem

FCM – spektrofotometrická metoda dle Folin-Ciocalteua

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)

k – kapacitní faktor

LC – kapalinová chromatografie

LOD - limit detekce

LOQ - limit kvantifikace

MeOH – methanol

MS – hmotnostní spektrometrie

MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie

MW – molární hmotnost

PBM – spektrofotometrická metoda dle Price a Butlera

PC – papírová chromatografie

PDA – detektor s fotodiodovým polem

RP-HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi

R_s – rozlišení chromatografických píků

RSD – relativní směrodatná odchylka

TLC – tenkovrstvá chromatografie

t_r - retenční čas

UHPLC – ultravysokoučinná kapalinová chromatografie (ultra - high performance liquid chromatography)

ULO – atmosféra s nízkým obsahem kyslíku (ultralow oxygen)

2 Úvod

Fenolické sloučeniny představují velkou skupinu látek, která se vyskytuje ve velkém množství potravin (především v ovoci, zelenině, čokoládě a nápojích jako je čaj, víno, pivo apod.). Tvoří tedy součást lidské stravy a mají mnoho užitečných účinků na lidské zdraví [1].

Některé fenolické látky mají významné biologické účinky, jedná se například o antioxidační účinky, proto bývají řazeny mezi přírodní antioxidanty [2].

Fenolické látky tvoří ochranu proti bakteriím, plísním a dalším mikrobům. Konzumace potravin obsahujících fenolické látky může mít protektivní účinek před kardiovaskulárními, dýchacími a neurodegenerativními nemocemi. Doposud však nejsou plně popsány veškeré vlastnosti těchto látek [1].

Fenolické látky bývají nejčastěji stanovovány pomocí kapalinové chromatografie. V experimentální části této diplomové práce byl prostřednictvím kapalinové chromatografie hodnocen obsah vybraných fenolických látek (kyselina gallová, kyselina chlorogenová, epikatechin, kvercitrin, rutin, floretin a floridzin) v čerstvých a skladovaných plodech deseti odrůd jablek.

3 Cíl a popis zadání práce

Cílem experimentální části této diplomové práce bude analýza, stanovení a porovnání obsahu vybraných fenolických látek (kyseliny gallové, kyseliny chlorogenové, epikatechinu, rutinu, kvercitrinu, floridzinu a floretinu) v reálných vzorcích deseti vybraných odrůd jablek pomocí vhodné chromatografické metody.

Bude použita HPLC metoda vyvinutá v předchozí diplomové práci založená na využití povrchově porézního sorbentu C18, která bude porovnána se separací na plně porézním sorbentu s úpravou pro separaci polárních látek. Dále budou porovnávány obsahy daných fenolických látek, v jednotlivých odrůdách jablek při různém způsobu a době skladování.

4 Teoretická část

4.1 Fenolické látky

Fenolické látky patří mezi organické sloučeniny. Termín "fenolický" může být definován chemicky jako látka, která má jeden nebo více aromatických kruhů nesoucí jeden nebo více hydroxylových substituentů, včetně jejich funkčních derivátů (estery, methyletery, glykosidy atd.). Většina rostlinných fenolických látek má dvě nebo více hydroxylových skupin a jsou řazeny mezi bioaktivní látky. Výskyt hydroxylových skupin má vliv na polaritu látek a rozpustnost ve vodě (jednosytné a vícesytné fenoly s krátkým postranním řetězcem jsou dobře rozpustné ve vodě). V porovnání s alkoholy jsou fenoly látky stabilnější a kyselější [3, 4].

Tyto sloučeniny hrají důležitou roli v růstu a reprodukci a poskytují ochranu proti patogenům. Fenolické sloučeniny vykazují širokou škálu fyziologických vlastností, mají antialergenní, antiaterogenní, protizánětlivé, antimikrobiální, antioxidantní, antitrombotické, kardioprotektivní, antimutagenní, antikarcinogenní a vazodilatační účinky. Prospěšné účinky odvozené z fenolických sloučenin byly přičítány jejich antioxidantní aktivitě. Fenolické sloučeniny jsou molekuly biosyntetizované šikimátovou cestou, polyacetátovou (malonovou) dráhou nebo směsnou dráhou (šikimát-polyacetát). Tvoří tedy deriváty pentofosfátu, šikimátu, a fenylypropanoidních drah v rostlinách, jedná se proto o sekundární metabolity. Tyto sekundární metabolity rostlin jsou obecně zapojeny také do obrany proti ultrafialovému záření [5, 6, 7].

V přírodě se vyskytuje více než 8000 fenolických sloučenin. Fenolické sloučeniny jsou klasifikovány na základě obsahu různého počtu aromatických kruhů, s různým stupněm glykosylace, hydroxylace, methylace apod. [5, 7, 8].

Tab. 1 Dělení fenolických látek [7]

Fenolické látky						
Fenolické kyseliny	Flavonoidy			Lignany	Taniny	Stilbeny
Deriváty kyseliny skořicové a benzoové	Anthokyany	Flavonoly	Katechiny		Hydrolyzované a kondenzované	

4.1.1 Fenolické látky v ovoci

Ovoce je bohaté na fenolické sloučeniny, jejichž struktura je velmi variabilní a pohybuje se od jednoduchých fenolických molekul až po vysoce polymerizované sloučeniny (kondenzované taniny – MW > 1000) [9].

Fenolické látky tvoří nedílnou součást skupiny antioxidantů, které mají velký vliv na lidské zdraví a které člověk přijímá potravou. Fenolické látky jsou také částečně odpovědné za sensorické a nutriční vlastnosti ovoce. Interakce mezi fenolickými sloučeninami (zejména proanthokyanidiny) a glykoproteiny ve slinách přispívají k hořké a trpké chuti ovoce a ovocných šťáv [3, 6, 9].

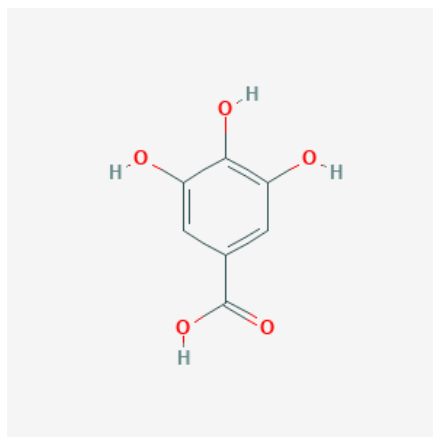
Mezi hlavní třídy fenolických sloučenin hojně se nacházejících v ovoci patří fenolické kyseliny, stilbeny, lignany, flavonoidy a taniny nebo proanthokyanidiny. Nejčastěji se ve stravě z fenolických látek vyskytují fenolové kyseliny (deriváty kyseliny benzoové a kyseliny skořicové) a flavonoidy, které představují 30 % - 60 % z celkového obsahu fenolických sloučenin v potravinách. Tyto fenolické sloučeniny mohou být spojeny s různými sacharidy, organickými kyselinami a navzájem mezi sebou. V ovoci může docházet k enzymatickému hnědnutí, jedná se o nechtěnou reakci fenolických látek katalyzovanou polyfenoloxidázou, která způsobuje tvorbu nežádoucí barvy a chuti a ztrátu živin [3, 9, 10].

4.1.2 Jednotlivé fenolické látky

Kyselina gallová

Kyselina gallová je bezbarvá nebo světle žlutá, krystalická organická kyselina patřící mezi fenolické kyseliny, také známá jako kyselina 3,4,5-trihydroxybenzoová. Kyselina gallová se nachází v řadě rostlin např. ve víně, ořechách, dubové kůře a dalších. Kyselina gallová se nachází jak volně, tak jako součást tříslovin. Obvykle se používá ve farmaceutickém průmyslu. Kyselina gallová se využívá k syntéze halucinogenního alkaloidu meskalinu, známého také jako 3,4,5-trimethoxyfenethylamin. Soli a estery kyseliny gallové jsou nazývány galáty [11, 12, 13].

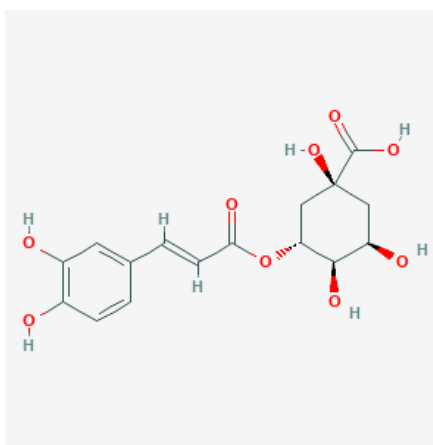
Kyselina gallová prokazuje antioxidační aktivitu tím, že odstraňuje 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl a volné radikály hydroxylů a inhibuje mikrosomální peroxidaci lipidů. Kyselina gallová se často používá jako standard pro stanovení obsahu fenolu v různých vzorcích, např. zkouškou Folin-Ciocalteu (spektrofotometrické stanovení) [13].



Obr. 1 Strukturní vzorec kyseliny gallové [11]

Kyselina chlorogenová

Chlorogenová kyselina patří mezi fenolické kyseliny, je tvořena esterifikací skořicových kyselin, jako jsou kyseliny kávová a kyselina chinová. Kyselina chlorogenová se ve velkém množství vyskytuje v kávě. Tato sloučenina, dlouho známá jako antioxidant, také zpomaluje uvolňování glukózy do krevního oběhu po jídle (zvyšuje aktivitu inzulínu). V souvislosti s její konzumací byla v posledních několika letech spojena řada zdravotních přínosů, jako je snížení relativního rizika onemocnění diabetes typu 2 a Alzheimerovy choroby [11, 14].

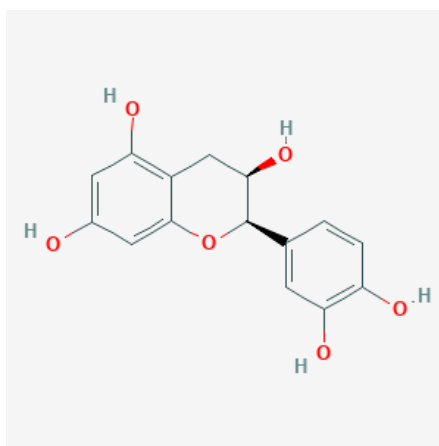


Obr. 2 Strukturní vzorec kyseliny chlorogenové [11]

Epikatechin

Epikatechin patří do skupiny flavanolů, která je součástí chemické rodiny flavonoidů. Vyskytuje se zejména u dřevinných rostlin. V rostlinném světě je k

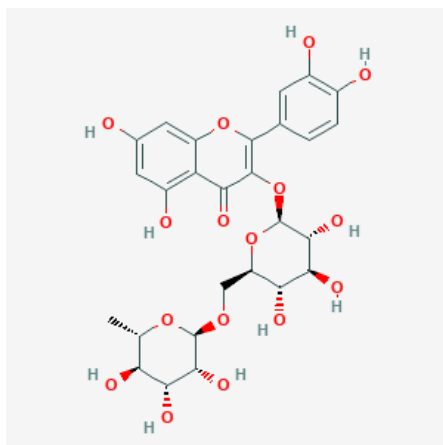
dispozici několik tisíc typů. Na uhlících 2 a 3 se nacházejí centra chiralita. Proto existují čtyři diastereoizomery. Dva z izomerů jsou v konfiguraci trans a jsou nazývány katechiny a další dva jsou v konfiguraci cis a jsou nazývány epikatechiny. Katechin je silný, ve vodě rozpustný polyfenol a antioxidant, který se snadno oxiduje. Je to tanin charakteristický pro zelené a bílé čaje, u černých čajů bývá obsah katechinů snížený procesem oxidace. Zelený čaj je vyroben z čerstvých, nefermentovaných čajových listů, oxidace katechinů je minimální, a proto jsou schopny sloužit jako antioxidanty. Vědci se domnívají, že katechin je účinný, protože snadno interaguje s bílkovinami, tím chrání buněčnou stěnu před jejím narušením bakteriemi, viry apod. [11].



Obr. 3 Strukturální vzorec (-)-epikatechinu [11]

Rutin

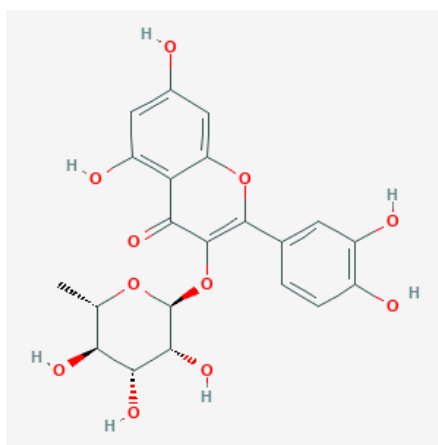
Rutin (kvercetin-3-rutinosid) je bledě žlutý prášek, je řazen mezi bioaktivní flavonoidy. Je o něm známo, že má řadu biologických aktivit. Vyskytuje se v mnoha rostlinách, včetně pohanky a tabáku, je také složkou červeného vína. Rutin má velký význam jako potenciálně užitečné terapeutické léčivo sloužící k inhibici volných radikálů. Navíc rutin zlepšuje odolnost a propustnost kapilárních cév. Použití rutinu je relativně omezené, kvůli jeho nízké rozpustnosti ve vodě (0,125 g/l) [11, 15].



Obr. 4 Strukturní vzorec rutinu [11]

Kvercitrin

Kvercitrin (kvercetin-3-rhamnosid) je žlutá, pevná látka známá jako bioflavonoidní antioxidant. Kvercitrin se nachází u řady rostlin jako je cibule, jahody, jablka, zelený čaj, červené víno, dub, třezalka atd. Používá se jako textilní barvivo a pro léčbu řady nemocí, například diabetu, šedého zákalu, pro léčbu kardiovaskulárních chorob srdce a krevních cév, schizofrenie, senné rýmy, pro prevenci rakoviny apod. Kvercitrin je O-glykosid kvercetinu, který je substituovaný alfa-L-rhamnosylovou skupinou v poloze 3 přes glykosidickou vazbu [13, 16].

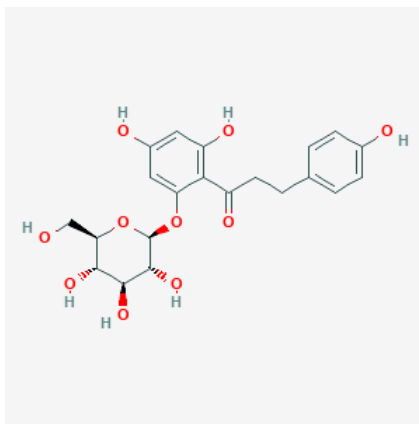


Obr. 5 Strukturní vzorec kvercitrinu [11]

Floridzin

Floridzin je glykosid floretinu (floretin 2'- β -D-glykosid), patří do podskupiny dihydrochalkonů. Je obsažen v některých rostlinách. Patří do skupiny flavonoidů.

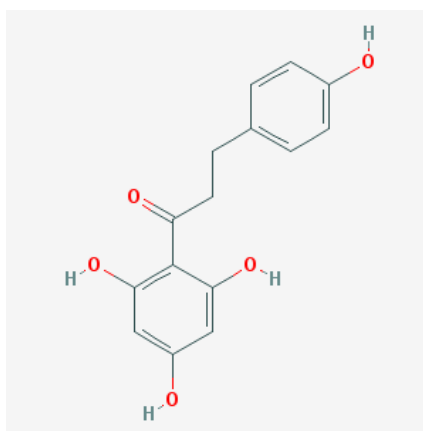
Cukernou složku zde zastupuje β -D-glukopyranosa. Je kompetitivním inhibítorem ledvinového transportu glukózy [11, 17].



Obr. 6 Strukturní vzorec floridzinu [11]

Floretin

Floretin je dihydrochalkon, typ přírodních fenolů. Jedná se o krystalickou, pevnou, bílou látku, o které se uvádí, že podporuje účinnou antioxidační aktivitu při zachytávání peroxynitritu a inhibici peroxidace lipidů. Bylo zjištěno, že floretin, který je přítomen v jablkách, hruškách a rajčatech, inhibuje růst několika typů rakovinných buněk a indukuje apoptózu buněk lidské leukemie a melanomu. Floretin je biomarker pro konzumaci jablek. Inhibuje transport glukózy (antidiabetický účinek). Také inhibuje proteinkinázu C a bylo prokázáno, že inhibuje vstup obalených virů do lidských fibroblastů [11, 13, 18].



Obr. 7 Strukturní vzorec floretinu [11]

Tab. 2 Přehled parametrů jednotlivých fenolických látek

	Sumární vzorec	MW g/mol	Log P	pKa	Zdroj
Kys. gallová	C ₇ H ₆ O ₅	170,120	0,72	3,94	[11]
Kys. chlorogenová	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,311	0,17	3,33	[14, 19]
Epikatechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,271	1,02	9,00	[18]
Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,521	0,15	6,43	[20]
Kvercitrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	466,395	1,31	6,43	[20]
Floridzin	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	472,443	0,44	7,89	[20]
Floretin	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	274,269	2,23	8,00	[19]

4.2 Metody pro analýzu a identifikaci fenolických látek

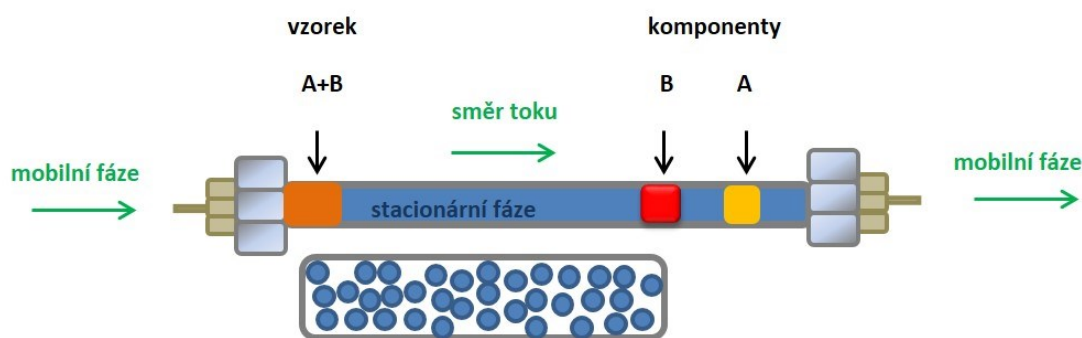
Fenolické látky vykazují redukční vlastnosti, proto jsou metody pro celkové stanovení těchto látek postaveny na oxidačně-redukčních vlastnostech. Mezi nejběžněji používané metody pro stanovení celkového obsahu fenolických látek patří metody spektrofotometrické, například stanovení podle Folin-Ciocalteua (FCM), dále metoda podle Price a Butlera (PBM), metoda s použitím aminoantipyrinu (AAPM) a metoda redukce měďnatých iontů (CUPRAC) [7].

V případě stanovení jednotlivých fenolických látek se v dnešní době nejčastěji používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) s detekcí různých typů, jako UV-VIS detekce, detekce s diodovým polem (DAD) a hmotnostní detekce (MS). Mezi starší metody se řadí papírová chromatografie (PC) a chromatografie na tenké vrstvě (TLC), které se dají využít jako orientační. V menší míře jsou pro stanovení fenolických látek využívány kapilární plynová chromatografie (CGC) a kapilární zónová elektroforéza (CZE). V posledních letech se do popředí stále více dostává hmotnostní spektrometrie (MS), která je vhodná pro identifikaci a objasnění struktury těchto látek [6, 7].

4.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie neboli HPLC (**H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography) je současnou analytickou metodou, která dominuje v separaci a stanovení fenolických látek. Jedná se o separační metodu, při které dochází ke stálému ustalování rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými fázemi (distribuce látek mezi tyto dvě různé nemísitelné fáze), mezi fází mobilní (pohyblivou) a fází stacionární

(nepohyblivou). Stacionární fázi tvoří pevná látka nebo kapalina ukotvená na pevném nosiči. Tato fáze je ve formě sorbentu lokalizovaná v chromatografické koloně. Mobilní fázi představuje u kapalinové chromatografie kapalina, která je pomocí čerpadla za vysokého tlaku přiváděna do systému a protéká sorbentem stacionární fáze. Na Obr. 8 je znázorněn průtok mobilní fáze a vzorku analytickou kolonou [21, 22, 23, 26].



Obr. 8 Postup vzorku analytickou kolonou [27]

V závislosti na polaritě rozpouštědla a stacionární fáze se u HPLC metody používají dvě varianty. U HPLC na normální fázi je použita polární stacionární fáze (kolona je naplněna malými částicemi oxidu křemičitého), mobilní fázi tvoří nepolární rozpouštědlo např. hexan. Typická kolona má vnitřní průměr 4,6 mm (může být menší) a délku 100 až 250 mm. Opakem normální fáze je HPLC metoda na reverzní fázi (RP-HPLC). V tomto případě je velikost kolony stejná, ale oxid křemičitý je modifikován tak, aby byl nepolární, nejčastěji dochází k připojení dlouhého uhlovodíkového řetězce (řetězec s 8, nebo s 18 atomy uhlíku). Mobilní fází je polární rozpouštědlo, např. směs vody a alkoholu, jako je methanol [22, 26].

K eluci látek může docházet při použití mobilní fáze o konstantním (stejném) složení, jedná se o isokratickou eluci, nebo při použití mobilní fáze se zvyšující se eluční silou, jde o gradientovou eluci. Isokratická eluce se využívá při stanovení látek, které mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti. Při gradientové eluci se většinou stanovují látky s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (např. fenolické látky) [23].

Za kolonou je umístěný detektor, který musí zaznamenat přítomnost různých složek vzorku, ale neměl by detekovat rozpouštědlo. Z tohoto důvodu neexistuje žádný univerzální detektor, který by fungoval pro všechny separace. Nejčastěji používaným detektorem je detektor spektrofotometrický. Mezi další detektory používané při HPLC

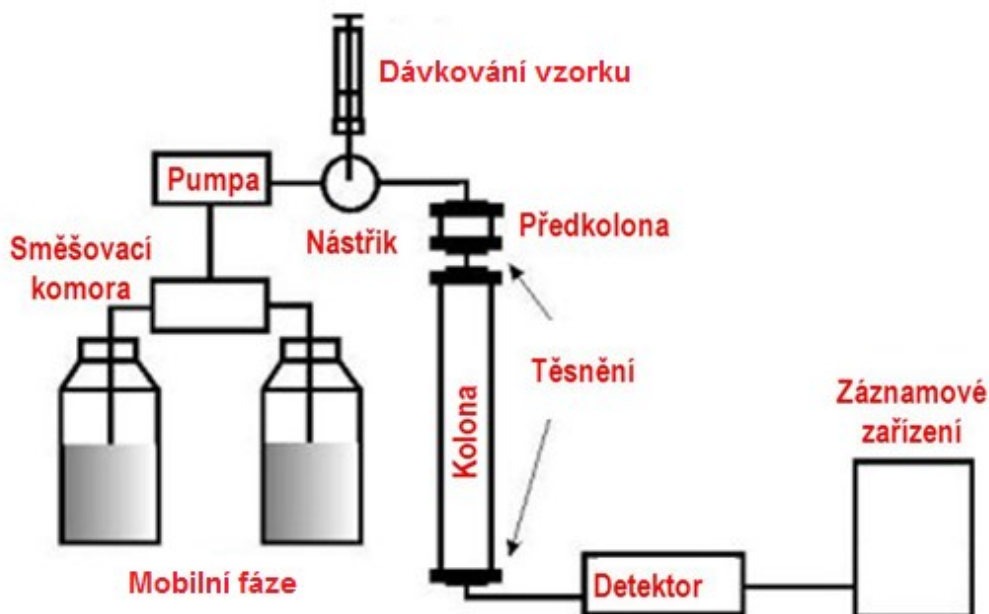
stanovení patří fluorescenční, elektrochemický, chemiluminiscenční a hmotnostní. Na Obr. 9 je znázorněno schéma HPLC systému [22, 26].

Signál získaný při průchodu detektorem je přenesen do chromatografického záznamu, chromatogramu. Na chromatogramu lze pozorovat křivky gaussovského tvaru, které jsou pojmenovány jako píky jednotlivých látek (eluční křivky) [23].

Identifikace analyzovaných látek (kvalitativní hodnocení) je prováděna pomocí retenčního času látky (t_r), ten představuje dobu od nástřiku po maximum píku. Kvantitativní hodnocení vychází z určení plochy píku. Koncentrace analyzovaných látek je stanovena pomocí porovnávání se standardními látkami. V případě kvantitativního hodnocení bývají nejčastěji využívány metody vnějšího a vnitřního standardu. Metoda vnějšího standardu (někdy označovaná též jako metoda kalibrační křivky) je založena na analýze roztoků standardů o známé, ale různé koncentraci, při které se hledá závislost mezi koncentrací a plochou píku. Pomocí lineární kalibrační funkce $X = f(c)$ (X = plocha píku), je určen obsah analyzované látky. Za optimální se považuje využití 5 - 7 standardů, jejichž měření se 2 až 3 krát opakuje. Pro kalibrační přímku je možné napsat vztah:

$$x_i = a + bc_i, \quad (1)$$

kde a je úsek na ose y , b je směrnice kalibrační přímky (vyjadřuje citlivost) a x_i je hodnota veličiny X pro koncentraci c_i . Pro analýzu složitých reálných vzorků se metoda vnějšího standardu příliš nepoužívá (nelze zanedbat vliv matrice). V tomto případě je častěji využívána metoda přidavku standardu. Tato metoda je založena na přidavku přesného a známého množství standardu stanovované látky k reálnému vzorku. Je známo několik variant (metoda jednoho nebo více přidavků standardu, metoda přidavku standardu za konstantního objemu atd.). V experimentální části této práce byla pro hodnocení výtěžnosti využita metoda přidavků vybraných standardů. Metoda vnitřního standardu je založena na přidavku vnitřního standardu o známé koncentraci a množství k roztoku standardu i k roztoku reálného vzorku o neznámé koncentraci analytu. Jedná se o chemickou látku, která je svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi podobná analyzované látce, ale ve vzorku ji neočekáváme [23, 24, 25].



Obr. 9 Schéma chromatografického systému [28]

4.2.2 Trendy v HPLC

Kapalinová chromatografie prošla během let různými úpravami, které sloužily především k získání co nejrychlejší a co nejúčinnější chromatografické separace. Mezi hlavní trendy směřující k získání takovéto separace patří:

- zmenšování částic chromatografického sorbentu, částice menší než 2 μm (UHPLC)
- úpravy stacionární fáze (povrchově porézní částice, monolitické stacionární fáze = nečásticové kolony apod.)
- zkracování délky kolony (50 – 100 mm) a zmenšování jejího vnitřního průměru (2,1 mm)
- separace probíhající za zvýšené teploty
- vyšší průtoky mobilní fáze
- užívání ultra-vysokých tlaků (100 MPa a více)
- spojování s MS, dvojdimenzionální kapalinové chromatografie (2D-LC), miniaturizované techniky (kapilární a nano-LC) apod. [23, 29].

UHPLC

Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie, jedná se o moderní druh kapalinové chromatografie, která byla vyvinuta za účelem zlepšení účinnosti

chromatografické separace. UHPLC využívá malé částice sorbentu (pod 2 μm) při ultra-vysokém tlaku (př. 100 Mpa). UHPLC systém musel podstoupit z důvodů práce za ultra-vysokých tlaků i další úpravy v instrumentaci (robustní vysokotlaké čerpadlo a dávkovací systém, přesné dávkování malých objemů, vysoká frekvence sběru dat, minimální mimokolonové objemy, vhodné stacionární fáze, rychlé dávkovací cykly atd.). V porovnání s HPLC systémem přináší UHPLC systém několik výhod. Separace analytů probíhá v kratším čase a k analýze jsou využívány menší objemy vzorků, mobilní fáze a dalších reagentů. UHPLC systém zlepšuje účinnost a citlivost separace [23, 29].

Pro účinnou separaci je důležitá kvalita a stabilita stacionárních fází, proto byl kladen důraz na jejich chemickou stabilitu (stacionární fáze užívané u UHPLC jsou stabilní v širším rozmezí pH), mechanickou stabilitu (souvislost s ultra-vysokými tlaky) a citlivost separace (užší tvary píků). Stejně jako u HPLC patří mezi běžně používané stacionární fáze modifikovaný silikagel, dále jsou používány hybridní částice. Kromě plně porézních částic jsou používány i povrchově porézní částice [23, 29].

4.2.3 Vývoj HPLC metody pro separaci fenolických látek

Fenolické látky jsou aromatické, sekundární, rostlinné metabolity. Snaha o vývoj a optimalizaci analytických metod stanovujících fenolické látky vyplývá z jejich pestrých vlastností (antioxidační, organoleptické, vliv na kvalitu potravin atd.). Jak už bylo několikrát řečeno, pro analýzu fenolických látek bývá nejčastěji použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi. Přehled chromatografických metod pro stanovení fenolických látek je uveden v Tabulce 3.

Pro stanovení fenolických látek jsou nejběžněji používané kolony o délce 10 – 30 cm (delší kolony vykazují lepší separaci velkého počtu látek) se stacionární fází C18, jejichž vnitřní průměr se pohybuje v rozmezí od 2,1 do 5 mm (nejčastěji 4,6 mm). Při analýzách, kde dochází ke spojení moderní kapalinové chromatografie (UHPLC) s hmotnostní spektrometrií (MS) jsou použity kolony s vnitřním průměrem 2,1 mm až 1,1 mm. Současné použití hmotnostní spektrometrie umožnilo potvrdit identitu různých analytů, což představuje také možný způsob necílené analýzy. Velikost částic stacionární fáze pro HPLC analýzy je ve většině případů 3 - 5 μm [21, 30, 31].

Lineární gradientové eluční systémy jsou častěji používané než systémy isokratické. Mobilní fázi tvoří vodná složka (často označována jako složka A) a složka organická (B). Běžně se k vodné fázi přidává kyselina, důvodem je snížení pH pro

zvýšení retence slabě kyselých látek. Nejčastěji se volí jako kyselá přísada kyselina octová, použít se však mohou i kyselina sírová, chloristá, fosforečná, trifluoroctová, chlorovodíková a mravenčí. Organickou fází představují převážně methanol a acetonitril, avšak využívány bývají i propanol, butanol, tetrahydrofuran a ethylacetát. Pořadí eluce látek je od nejvíce polárních k látkám nepolárním [21, 30, 31].

Čas separace látek se velmi liší, od 30 do 150 min. Některé metody byly vyvinuty tak, aby byly schopné analyzovat větší polyfenoly (flavonoidy) stejně jako fenolové kyseliny, čímž došlo k prodloužení doby analýzy. Průtoková rychlost se pohybuje od 0,15 do 1,8 ml/min, nejběžnější je průtok 1 ml/min. Dávkovaný objem se pohybuje okolo 10 až 20 μ l, zde záleží na velikosti kolony a na očekávaném obsahu fenolických látek. Teplota kolony bývá v rozmezí od 20 do 45 °C [21, 30, 31].

Detekční techniku pro HPLC analýzu tvoří převážně UV-Vis detektor s fotodiódovým polem (PDA), jedná se o běžnou metodu, která sleduje vlnové délky od 190 až 380 nm. Fenolové kyseliny odvozené od kyseliny benzoové mají λ_{\max} v rozmezí 200 až 290 nm. Výběr vhodné vlnové délky pro každou sloučeninu umožňuje získat vysokou specifičnost také pomocí detektoru DAD. Protože je mnoho absorpčních spekter velmi podobných, jsou pro identifikaci jednotlivých látek porovnávány retenční časy a UV-Vis spektra standardů. Vyvinuté separační metody se ověřují pomocí validačních parametrů, např. linearitu, opakovatelnosti, limitů detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) [21, 30, 31].

Získané výsledky ukazují, že metody založené na HPLC analýze jsou přesné, citlivé a schopné dostatečně separovat analyzované sloučeniny. HPLC-DAD technika se prokázala jako vhodná metoda pro kvalitativní i kvantitativní analýzu fenolických látek [32].

Samotná HPLC metoda nemusí vždy vést k dokonalému oddělení některých derivátů, proto bývají ve stále větší míře používány sofistikovanější přístroje, jako je UHPLC, což také umožňuje zkrátit dobu analýzy a spojení s MS/MS detekcí [32].

Tab. 3 Přehled podmínek separace fenolických látek v předešlých studiích

Typ vzorku	Stanovované látky	Kolona (stacionární fáze)	Mobilní fáze	Detektor	Doba analýzy (min)	Zdroj
Jablečná a hrušková šťáva	kys. abscisová, apigenin, arbutin, kys. kávová, kys. chlorogenová, katechin, p-kumarová kys., epikatechin, kys. ferulová, kys. 4-hydroxybenzoová, isorhamnetin-3-O-glukosid, isokvercetin, narigenin, floridzin, kvercetin, resveratrol, rutin, isorhamnetin-3-O-rutinosid	ODS-3 C18 (250 x 4,6 mm x 5 µm)	H ₂ O + HCOOH, ACN + H ₂ O + HCOOH	HPLC-PDA	95	[33]
Jablečné a hroznové šťávy	florizin a sorbitol	Zorbax 300SB-C18 (250 x 4,6 mm x 5 µm) a Aminex HPX-87C (300 x 7,8 mm)	H ₂ O + CH ₃ COOH, ACN + H ₂ O + CH ₃ COOH (1,5%) a voda (sorbitol)	HPLC-PDA a refraktometrický	35	[34]
Jablka	kvercetin, epikatechin, prokyanidin B1, B2, C1, kys. p-kumarová, kys. trans-skořicová, dihydrát chloridzinu, kys. gallová, katechin, kys. chlorogenová, kys. ferulová, kys. kávová, rutin trihydrát, avikularin, kys. protokatechová, hyperosid, isokvercitrin, kvercitrin, prokyanidin A2, rejnoutrin, dihydrochlorid	Luna C18 (250 x 4,6 mm, x 5 µm)	H ₂ O + CH ₃ COOH (0,5 %), CH ₃ OH	HPLC-DAD	160	[35]
Jablečný džus	kys. chlorogenová, kys. kávová, kys. skořicová, kys. p-kumarová, kys. protokatechová, epikatechin, prokyanidin B2, kvercetin, kvercetin-3-d-galaktosid, kvercetin 3-β-glukosid, floridzin	ZORBAX XDB-C18 (4,6 x 150 mm)	H ₂ O + CH ₃ COOH (2 %), ACN	HPLC-DAD	60	[36]

Typ vzorku	Stanovované látky	Kolona (stacionární fáze)	Mobilní fáze	Detektor	Doba analýzy (min)	Zdroj
Jablka	kys. p-hydroxybenzoová, eriodiktyol, kys. ferulová, kys. p-kumarová, kys. gallová, kvercetin, apigenin-7-glukosid, kys. chlorogenová, kys. syringová, kys. kávová, kys. rosmarinová, epikatechin, katechin, rutin, resveratrol, hesperidin, naringenin, luteolin, apigenin, akacetin	Agilent Eclipse XDB C18 (250 x 4,6 mm x 5 µm)	H ₂ O + CH ₃ COOH (2 %), CH ₃ OH	HPLC-DAD	50	[37]
Jablka	katechin, epikatechin, kvercetin-3-galaktosid, floridzin, prokyanidin B2, kys. chlorogenová a kyselina kávová	Mightysil RP-18 ODS (250 x 4,6 mm x 5 µm)	H ₂ O + HCOOH, ACN + H ₂ O + HCOOH (2 %)	LC-MS	50	[38]
Jablka	kys. gallová, kys. protokatechová, katechin, epikatechin, floridzin, kys. p-kumarová, kys. kávová, kys. chlorogenová, rutin, prokyanidin B2, kvercetin hyperin, isokvercitrin, avikularin, kvercitrin, rejnoutrin	Nucleosil 120 C18 (250 x 4,6 mm)	H ₂ O + CH ₃ COOH (2 %), CH ₃ OH	HPLC-DAD	75	[39]
Jablka	kvercetin-3-O-galaktosid, rutin, kvercitrin, floridzin, kys. chlorogenová, katechin, epikatechin, avikulin, kvercetin atd.	YMC-Pack ODS-A C18 (250 x 4,6 x 5 µm)	HCOOH (2 %), ACN	HPLC-PDA	60	[40]
Jablečný list	kys. p-hydroxybenzoová, kys. chlorogenová, isokvercitrin, hyperosid, kvercitrin	Thermo Scientific Aquasil C18 (250 x 4,6 mm x 5 µm)	ACN, 1mM H ₃ PO ₄	HPLC-PDA	75	[41]
Jablka	hyperosid, rutin, kvercitrin, floridzin, prokyanidin B1 a B2, kys. chlorogenová, katechin, epikatechin, avikulin, isokvercitrin	YMC-Pack ODS-A C18 (250 x 4,6 mm x 5 µm)	H ₂ O + CH ₃ COOH (2 %), ACN	HPLC-PDA	55	[42]

Typ vzorku	Stanovované látky	Kolona (stacionární fáze)	Mobilní fáze	Detektor	Doba analýzy (min)	Zdroj
Jablka	epikatechin, rutin, kys. chlorogenová, floridzin, kys. kávová, kys. ferulová, kys. p-kumarová	100-5 HD EC Nucleosil C18 (250 x 4,5 mm)	H ₂ O + H ₃ PO ₄ , ACN	HPLC–UV-Vis	50	[43]
Jablka	katechin, epikatechin, prokyanidin B2, kys. kávová, kys. chlorogenová, floridzin, kvercetin, kvercetrin atd.	Xterra C18 (100 x 3,9 mm x 3,5 μm)	H ₂ O + HCOOH (2%), CH ₃ OH	HPLC–DAD	70	[44]
Jablečný džus a mošt	katechin, epikatechin, kys. protokatechová, kys. chlorogenová, kys. skořicová, kys. p-kumarová, kys. gallová, kys. kávová, kys. ferulová, rutin a floridzin	Waters xTerra MS C18 (250 mm x 4,6 mm, x 5 μm)	H ₂ O + CH ₃ COOH (2 %), ACN + H ₂ O + CH ₃ COOH (0,5 %)	HPLC–UV-Vis	65	[45]
Jablka	kys. gallová, gentisová, kávová, p-kumarová a protokatechová	NovoPack C18 (150 x 3,9 mm)	CH ₃ OH : H ₂ O : CH ₃ COOH (34 : 65 : 1)	HPLC-DAD	30	[46]

V Tabulce 3 jsou uvedeny základní podmínky separací fenolických látek z předchozích studií. Podobně jako v naší studii, byl obsah fenolických látek stanovován v jablkách, dále pak hruškách, vínu apod. Mezi nejběžněji stanovované fenolické látky patří kyselina gallová, kávová, chlorogenová, p-kumarová, ferulová, epikatechin, floridzin, katechin, kvercetin, kvercitrin, prokyanidiny, rutin a další.

Při porovnání těchto podmínek je zjevné, že jsou k separaci fenolických látek nejčastěji používány kolony s reverzní fází C18. Délka kolony se pohybuje okolo 25 cm, důvodem je vyšší počet stanovovaných látek. Mobilní fázi tvoří nejčastěji vodná složka s přidavkem kyseliny mravenčí či octové a složka organická, kterou zde představuje acetonitril nebo methanol. Doba analýzy se výrazně liší, pohybuje se v rozmezí 30 – 160 min, velký podíl má na tom množství stanovovaných látek a průtok mobilní fáze. Detekce fenolických látek byla provedena v mnoha případech pomocí DAD nebo PDA detektoru při různých vlnových délkách (ty se odvíjí od analyzovaných látek).

Kromě různých druhů ovoce, jsou fenolické látky stanovovány také například v zelenině, pivu, čaji, oleji a dalších přírodních zdrojích antioxidantů.

5 Experimentální část

5.1 Přístroje a zařízení

Pro stanovení obsahu vybraných fenolických látek byla v předchozí diplomové práci vyvinutá vhodná chromatografická metoda. V průběhu optimalizace v ní byly testovány různé typy stacionárních fází a rozdílné gradienty mobilní fáze. K testování sloužilo několik vybraných standardů, jejichž počet se postupně redukoval. K optimalizaci metody byly použity i reálné, homogenizované vzorky jablek, které obsahovaly části jablečné slupky i dužiny. Pro získání kompletní separace vybraných látek byl zvolen sorbent typu C18 s povrchově porézními částicemi a pevným jádrem. Z důvodu měření velkého počtu vzorků byly vybrány částice o velikosti 5 μm . Byl proveden test vhodnosti chromatografického systému [47].

Optimalizovaná metoda byla využita v rámci této diplomové práce pro měření obsahu fenolických látek u reálných vzorků jablek deseti vybraných odrůd. Jablka byla skladována dvěma různými způsoby, při nízkých teplotách a v atmosféře s nízkým obsahem kyslíku neboli ULO skladování.

Analýza reálných vzorků jablek probíhala v první řadě na koloně Kinetex C18, jedná se o kolonu s povrchově porézními částicemi, během měření vzorků jablek byla testována i kolona Luna Omega Polar C18, kolona s plně porézními částicemi upravenými pro separaci polárních látek. Separace na obou kolonách byla poté porovnána. Pro hodnocení obsahu fenolických látek byla, pro vyšší opakovatelnost plochy píků, zvolena kolona s povrchově porézními částicemi.

Extrakce fenolických látek probíhala v ultrazvukové lázni. Samotná analýza látek byla prováděna pomocí chromatografického systému Shimadzu LC-10, jednotlivé parametry jsou dále uvedeny v Tabulce 4.

Tab. 4 Chromatografický systém

Chromatografický systém	Shimadzu LC-10
Čerpadlo	LC-10AD VP
Autosampler	SIL-HT A
Dávkovaný objem	10 μ l
Termostat kolony	CTO-10A VP
Předkolona	Ascentis Express C18 (5 x 4,6 mm x 5 μ m)
Kolona	Kinetex C18 (150 x 4,6 mm x 5 μ m) Luna Omega Polar C18 (150 x 4,6 mm x 5 μ m)
Mobilní fáze	Acetonitril a ultračistá voda (pH bylo upraveno kyselinou octovou na 2,8)
Gradientový režim	Gradientová eluce – mobilní fázi tvoří složka A (acetonitril) a složka B (voda upravena na pH 2,8 kys. octovou). Na začátku 95 % složky B a 5 % složky A, poté pozvolné snižování množství složky B do 2,5 min na 85 % a následně do 12. min na 50 % + 3 min ekvilibrace.
Průtok	1 ml/min
Teplota	30 °C
Detektor	DAD detektor SPD-M10A VP
Detekce	255, 280, 320, 365 nm
Vyhodnocení	Chromatografický software LC solution

Dále byly pro přípravu vzorků použity analytické váhy, mikropipety s nastavitelným objemem, laboratorní centrifuga a stříkačkové filtry PTFE 0,45 μ m.

5.2 Chemikálie (standardy a rozpouštědla)

Mobilní fáze:

Acetonitril (HPLC, Gradient Grade, $\geq 99,9\%$), Sigma-Aldrich – Praha, ČR

Kyselina octová (bezvodá), Sigma-Aldrich – Praha, ČR

Ultračistá voda

Extrakční roztok:

Methanol - MeOH (HPLC, Gradient Grade, $\geq 99,9\%$), Sigma-Aldrich – Praha, ČR

Kyselina octová (bezvodá), Sigma-Aldrich – Praha, ČR

Standardy:

Epikatechin $> 90\%$, BioChemika – Praha, ČR

Floretin $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich – Praha, ČR

Floridzin dihydrát $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich – Praha, ČR

Kvercitrin hydrát $> 78\%$, Sigma-Aldrich – Praha, ČR

Kyselina gallová 99% , Sigma-Aldrich – Praha, ČR

Kyselina chlorogenová $\geq 95\%$, Sigma-Aldrich – Praha, ČR

Rutin hydrát 95% , Sigma-Aldrich – Praha, ČR

5.3 Analyzované vzorky

Obsah jednotlivých fenolických látek byl testován u deseti vybraných odrůd jablek, které dodal Výzkumný a Šlechtitelský Ústav Ovocnářský Holovousy s.r.o. Hladiny fenolických látek byly testovány v původním rostlinném materiálu a dále po 3, 5 a 7 měsících skladování při různých podmínkách (v chladu a za nízkého přístupu kyslíku – ULO skladování).

Tab. 5 Testované odrůdy jablek

Odrůda	Popis
Angold	Zrání - druhá polovina září nebo začátkem října Skladování – sklep (od listopadu do března), v chladírně (do června i déle) Plody - velké (190 - 260 g) Dužnina - krémová, chruplavá a velmi šťavnatá Chuť - harmonická, navinule sladká až sladká
Fragrance	Zrání - ve stejnou dobu jako odrůda Golden Delicious Skladování – v chladu až do jarních měsíců Plody - střední až nadprůměrné velikosti Dužnina - krémová, jemná, pevná, středně šťavnatá, příjemně aromatická Chuť – sladká, výborná
Gala	Zrání - sklizňová zralost koncem září nebo začátkem října Plody - souměrné, kuželovité až soudkovité, slupka slabě mastná, hladká nebo slabě síťovitě rvivá, základní barva zpočátku nažloutlá, později sytě žlutá, krycí barva je žilhaná, jasně červená Dužnina – žlutavá, pevná, chruplavá a přiměřeně šťavnatá Chuť - sladší, mírně aromatická, velmi dobrá
Golden Delicious	Zrání - v teplých oblastech koncem září, střední polohy až v druhé polovině října Skladování - vydrží do března až dubna Plody - středně velké (od 115 do 195 g) Dužnina - žlutavá, pevná, velmi jemná, šťavnatá Chuť - navinule sladká, příjemně aromatická, při dobrém vyzrání plodů výborná
Lady Sylvia	Zrání - sklizeň na konci září Skladování - do března, v chladírně déle Plody - střední až velké (140 – 175 g), vejčité až kuželovité, základní barva zelenavě žlutá, krycí barva červená (až 90 % povrchu) Dužnina - krémová, jemná, velice pevná a šťavnatá Chuť - navinule sladká, příjemně aromatická, výborná
Meteor	Zrání - přelom září a říjen Plody - velké (200 - 250 g), atraktivní s vysokým obsahem cukru a kyselin Dužnina - krémově žlutá, jemná, středně pevná, chruplavá a šťavnatá Chuť - navinule sladká, výborná
Nikoleta	Zrání - sklizeň v druhé polovině září Skladování - do února, v chladírně vydrží do května Plody - velké (240 g), kuželovitý tvar, základní barva žlutá, krycí barva jasně červená na 70 % povrchu s rozmytým žilháním Dužnina - žlutá, jemná, středně pevná a šťavnatá Chuť - spíše sladká, příjemně aromatická, velmi dobrá
Opál	Zrání - sklízí se v září, dozrává v listopadu (zimní odrůda) Skladování - do dubna Plody - kulovitý až podlouhlý, střední, slupka hladká, žlutozelené zbarvení je překryté červenou barvou s žilháním Dužnina - nažloutlá Chuť - sladce navinulá až sladká, velmi dobrá
Rubín	Zrání - koncem října, sklízí se v září Plody – kulaté, relativně velké, s červeným žilháním na žlutém základě Dužnina – aromatická, šťavnatá
Rucla	Zrání - 1 týden před odrůdou Golden Delicious Skladování – chladírna (do května) Plody - středně velké, zelenavě žluté, s purpurovou až hnědo purpurovou krycí barvou Dužnina - krémová, jemná, chruplavá, dostatečně pevná a šťavnatá Chuť - harmonická, navinule sladká, příjemně aromatická, výborná

5.4 Pracovní postup

5.4.1 Příprava extrakčního roztoku

Extrakce vzorků, připravených homogenizací jablečné dužiny včetně slupky tyčovým mixérem, probíhala v 0,1% roztoku kyseliny octové v MeOH. Roztok byl připraven smísením daného množství kyseliny octové (bezvodé) s určitým množstvím MeOH. Například na přípravu 0,1% roztoku bylo potřeba 1,01 ml kyseliny octové doplněný do objemu 1 l MeOH.

5.4.2 Příprava extrakčního roztoku s přidavky standardů

Jedná se o extrakční rozpouštědlo, které bylo připraveno podle předchozího návodu (viz. 5.4.1) a při přípravě do něj bylo přidáno určité množství vybraných standardů. Například na 200 ml extrakčního roztoku s přidavky standardů je třeba 2 ml zásobního roztoku každého vybraného standardu.

Roztok s přidavky standardů byl připraven pro hodnocení výtěžnosti. Byly vybrány 3 standardní látky – kyselina chlorogenová, rutin a floretin, u kterých bylo hodnocení provedeno. Výsledná koncentrace těchto látek v roztoku s přidavkem činila 20 µg/ml kyseliny chlorogenové, 5 µg/ml rutinu a 5 µg/ml floretinu.

5.4.3 Příprava roztoku standardů

V první řadě byla odvážena potřebná množství standardů. Takto navážené standardy byly následně jednotlivě rozpuštěny v 1 ml extrakčního roztoku. Poté bylo odpipetováno 10 µl z každého standardu a doplněno extrakčním roztokem MeOH na 1 ml.

Takto byl získán směsný roztok standardů, který byl proměřen vždy před sérií vzorků a na jejím konci znovu, aby bylo možné co nejpřesnější porovnání ploch píků jednotlivých standardů v sérii vzorků měřených většinou ve dvou dnech (běžná délka měření celé série vzorků včetně hodnocení výtěžnosti byla 30 – 50 hodin).

Tab. 6 Koncentrace použitých standardů ve směsném roztoku

Standard	Koncentrace (µg/ml)
Kyselina gallová	5
Kyselina chlorogenová	20
Epikatechin	10
Kvercitrin	5
Rutin	5
Floridzin	5
Floretin	5

Koncentrace vybraných fenolických látek byly zvoleny z hlediska obsahu jednotlivých látek v analyzovaném materiálu. V největším množství se v jablkách vyskytují kyselina chlorogenová a epikatechin.

5.4.4 Příprava reálných vzorků

Jablka bylo nejprve nutné homogenizovat (vznikla tak směs dužiny a slupky). Na analytických váhách bylo odváženo potřebné množství vzorku (3 g), poté bylo ke vzorku v 50 ml centrifugační zkumavce přidáno 15 ml extrakčního roztoku (pro hodnocení výtěžnosti bylo přidáno 15 ml extrakčního roztoku s přísádky standardů). Dále byl vzorek ponořen do ultrazvukové lázně na 10 min, následovala centrifugace při 6000 otáčkách za min (rpm) po dobu 10 min a nakonec filtrace vzorků do vialek pomocí stříkačkových filtrů PTFE 0,45 µm.

Vzorky jablek dodal Výzkumný a Šlechtitelský Ústav Ovocnářský Holovousy s.r.o. již homogenizované a zamražené.

Takto připravené vzorky, roztoky a standardy byly pro udržení jejich stability průběžně uchovávány v lednici při teplotě 4 °C, pro měření v rámci několika dnů, případně byly vzorky zamraženy.

6 Výsledky a diskuze

6.1 Optimalizace HPLC separace

Pro hodnocení obsahu fenolických látek v ovoci byla vyvinuta optimální separační metoda. Stanovení vybraných fenolických látek bylo realizováno pomocí HPLC systému. Podle předchozích prací a zkušeností bylo vybráno několik standardních fenolických látek: kyselina gallová, chlorogenová a kávová, katechin, epikatechin, rutin, kvercitrin, kvercetin, floretin a floridzin, postupně byly zredukovány na kyselinu gallovou, kyselinu chlorogenovou, epikatechin, rutin, kvercitrin, floridzin a floretin. Při optimalizaci metody byly testovány rozdílné gradienty mobilní fáze a odlišné stacionární fáze. Nakonec byl zvolen gradient, u kterého docházelo k postupnému snižování množství vodné složky z 95 % na 85 % do 2,5 minuty a poté na 50 % do 12. minuty. Nejvhodnějšího rozlišení vybraných látek bylo dosaženo na koloně Kinetex C18 o délce 15 cm, s průměrem 4,6 mm a s velikostí částic 5 μm . Nejideálnější mobilní fází byla vyhodnocena kombinace acetonitrilu a vody, jejíž pH bylo upraveno pomocí kyseliny octové na pH 2,8. Analýza látek probíhala při teplotě 30 °C s průtokovou rychlostí 1 ml/min. Pro detekci látek byly zvoleny vlnové délky 255, 280, 320 a 365 nm [47].

V průběhu měření reálných vzorků jablek byla kromě kolony Kinetex C18 použita i kolona Luna Omega Polar C18, u níž byl proveden test vhodnosti chromatografického systému. Test vhodnosti zahrnuje hodnocení opakovatelnosti retenčního času t_r a plochy pod píkem A, faktoru symetrie chromatografických píků A_s , rozlišení chromatografických píků R_s a separační kapacity. Hodnocení opakovatelnosti bylo provedeno pro směs standardů popsanou v kapitole 5.4.3. Bylo provedeno několik po sobě jdoucích nástřiků na kolonu a následně byla určena relativní směrodatná odchylka hodnot plochy píku a retenčního času ze 6 nástřiků, tyto hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 7. Výsledná hodnota by neměla překročit limit 1 % [48].

V tomto případě byly hodnoty RSD u kyseliny gallové a floridzinu vyšší, což se nezměnilo ani při opakování tohoto testu.

Tab. 7 Hodnocení opakovatelnosti plochy píků a retenčních časů

	Koncentrace μg/ml	Plocha píků (průměr)	RSD (%)	Retenční čas t_r min (průměr)	RSD (%)
Kys. gallová	5	124847	4,32	4,59	0,21
Kys. chlorogenová	20	167355	0,57	6,42	0,08
Epikatechin	10	55499	0,83	7,23	0,10
Rutin	5	59981	0,74	8,05	0,09
Kvercitrin	5	84260	0,87	9,25	0,10
Floridzin	5	64750	1,13	9,75	0,07
Floretin	5	125031	0,29	12,85	0,07

Faktor symetrie byl hodnocen ze 3 nástřiků. Výsledné hodnoty by se měly pohybovat v rozmezí od 0,8 – 1,5. Rozlišení se stejně jako faktor symetrie hodnotí ze 3 nástřiků, jeho hodnoty by měly nabývat vyšších hodnot než 1,5 [48].

V Tabulce 8 jsou uvedeny získané hodnoty faktoru symetrie, rozlišení a separační kapacity.

Tab. 8 Parametry testu vhodnosti chromatografického systému

	Faktor symetrie A_s	Rozlišení R_s	Separační kapacita
Kys. gallová	0,91	4,69	30
Kys. chlorogenová	1,31	11,78	53
Epikatechin	1,24	6,95	54
Rutin	1,24	6,37	56
Kvercitrin	1,22	2,02	53
Floridzin	1,23	3,36	50
Floretin	1,18	24,87	46

Reálné vzorky jablek byly měřeny na obou kolonách, ale konečné porovnávání a hodnocení výsledných hodnot koncentrací bylo prováděno z měření na koloně Kinetex C18, protože u testu vhodnosti pro kolonu Luna Omega Polar C18 byl překročen limit pro opakovatelnost plochy píků.

Dalším hodnoceným validačním parametrem, který se váže na extrakci fenolických látek z reálných vzorků, byla výtěžnost. Pro hodnocení výtěžnosti byl připraven extrakční roztok s přídávky standardů. V Tabulce 9 jsou uvedeny průměrné hodnoty výtěžnosti pro jednotlivé stanovované látky. Byly pozorovány rozdíly mezi jednotlivými odrůdami, které byly pravděpodobně způsobené odlišnostmi matrice vzorků. Výtěžnost se pohybovala v rozmezí 83,67 – 107,54 % a byla opakovaně hodnocena pro každé měření vzorků. Byly vybrány 3 standardní látky – kyselina chlorogenová, rutin a floretin, u kterých bylo hodnocení provedeno.

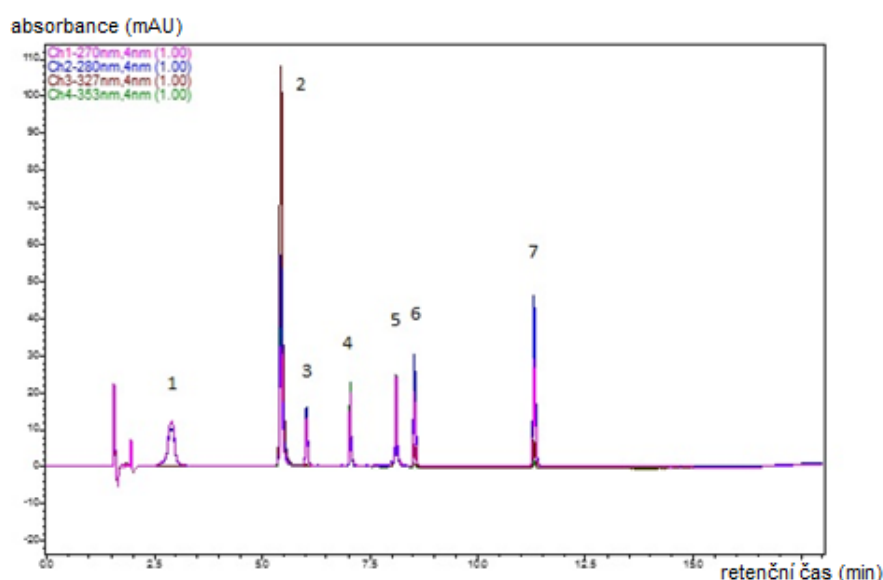
Tab. 9 Průměrná výtěžnost fenolických látek

Fenolická látka	Výtěžnost (%)
Kyselina gallová	105,26
Kyselina chlorogenová	101,12
Epikatechin	95,56
Rutin	97,30
Kvercitrin	83,67
Floridzin	107,54
Floretin	105,94

6.2 Stanovení obsahu fenolických látek v reálných vzorcích jablek

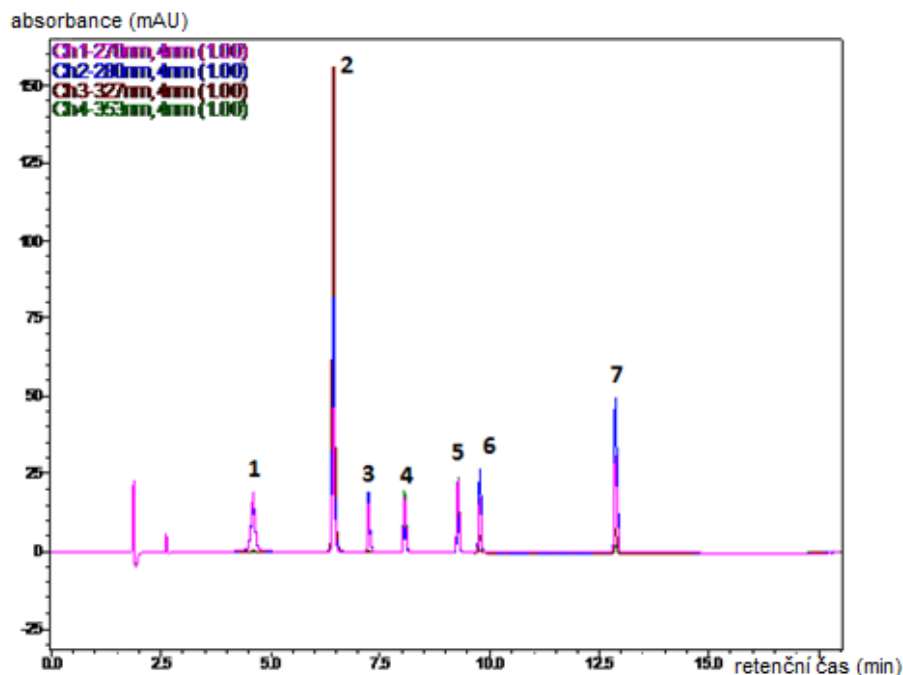
Tato práce je zaměřena především na hodnocení obsahu fenolických látek ve vybraných odrůdách ovoce, zejména jablek, orientačně byly fenolické látky stanoveny i ve vzorku třešni (u dvou odrůd – Rum a Švestičková). Množství fenolických látek v jablkách se odvíjí od odrůdy jablka, skladování plodů a jejich zpracování. Jak již bylo řečeno, byly sledovány hladiny fenolických látek v původním rostlinném materiálu a dále po třech, pěti a sedmi měsících skladování. Jablka byla skladována dvěma způsoby, v chladném prostředí a za nízkého přístupu kyslíku (ULO podmínky). Byly pozorovány rozdíly v hladinách fenolických sloučenin, jak mezi jednotlivými kultivary, tak v době a způsobu skladování.

Separace fenolických látek probíhala na koloně s povrchově porézním sorbentem Kinetex C18 a v průběhu měření skladovaných vzorků byla testována i kolona s plně porézními částicemi s úpravou pro separaci polárních látek Luna Omega Polar C18. Na začátku každého měření (poté i na jejím konci) byl proveden opakovaný nástřik směsi standardů, který nadále sloužil k identifikaci a porovnávání obsahu jednotlivých fenolických látek u různých odrůd jablek. Na Obr. 10 a 11 je znázorněna separace jednotlivých standardních látek.



Obr. 10 Chromatogram separace směsi standardních fenolických látek na koloně Kinetex C18 (150 x 4,6 mm x 5 μm), průtoková rychlost 1 ml/min

Pořadí píků: 1 - kyselina gallová, 2 – kyselina chlorogenová, 3 – epikatechin, 4 – rutin, 5 – kvercitrin, 6 - floridzin, 7 – floretin



Obr. 11 Chromatogram separace směsi standardních fenolických látek na koloně Luna Omega Polar C18 (150 x 4,6 mm x 5 μm), průtoková rychlost 1 ml/min

Pořadí píků: 1 - kyselina gallová, 2 – kyselina chlorogenová, 3 – epikatechin, 4 – rutin, 5 – kvercitrin, 6 - floridzin, 7 – floretin

Pořadí píků na obou kolonách je shodné. Liší se retenční časy látek a mírně i tvar píků. Separací na koloně Luna Omega Polar C18 byly získány symetričtější a štíhlejší píky s mírně posunutými retenčními časy oproti retenčním časům píků vznikajících separací na koloně Kinetex C18 (rozdíl mezi povrchově a plně porézními částicemi). Navázaná fáze C18 způsobuje hydrofobní interakce, polární modifikace povrchu poskytuje vyšší selektivitu a retenci zejména pro polární látky (zpoždění eluce prvního píku kyseliny gallové a jeho vyšší symetrie).

6.3 Obsah fenolických látek v čerstvých plodech

Vzorky čerstvých jablek byly měřeny na koloně Kinetex C18. Identifikace látek byla provedena pomocí porovnávání retenčních časů a UV spekter daných látek. Obsah byl stanoven podle plochy píků při porovnání se standardy.

Tab. 10 Koncentrace jednotlivých fenolických látek u různých odrůd jablek

Kolona Kinetex C18	Obsah fenolických látek (µg/ml)						
Odrůda	Kys. gallová	Kys. chlorogenová	Epikatechin	Rutin	Kvercitrin	Floridzin	Floretin
Opál	0,00	0,92	1,04	0,35	2,26	0,37	0,00
Opál - dolní	0,00	0,99	1,30	0,59	1,49	0,35	0,00
Opál - horní	0,00	1,62	2,82	0,60	2,23	1,07	0,00
Gala	0,00	10,49	1,35	0,15	1,26	0,62	0,00
Nikoleta	0,00	3,66	3,34	0,40	2,97	1,86	0,01
Angold	0,00	19,92	1,14	0,38	1,21	2,72	0,00
Rucla	0,00	2,97	4,26	0,49	1,23	0,94	0,00
Lady Sylvia	0,00	6,60	0,70	0,12	1,58	0,49	0,00
Meteor	0,00	2,28	1,06	0,31	1,27	1,06	0,00
Rubín	0,00	0,79	0,30	0,13	0,43	0,13	0,00
Golden	0,00	3,13	0,57	0,09	1,21	0,65	0,00
Fragrance	0,00	0,27	0,15	0,29	4,80	0,45	0,00

6.3.1 Porovnání obsahu fenolických látek v čerstvých plodech

Kys. gallová – nevyskytuje se u žádné z vybraných odrůd jablek.

Kys. chlorogenová – vyskytuje se ve všech odrůdách, pouze u odrůdy Fragrance je její obsah velmi nízký. U dalších odrůd je její obsah značně odlišný, nejvyšší hodnoty byly nalezeny u odrůd Gala (více než 50 µg/g), Angold (cca 100 µg/g), Lady Sylvia (méně než 50 µg/g) a Golden (méně než 50 µg/g).

Epikatechin – nevyskytuje se u odrůdy Fragrance, velmi nízký obsah se vyskytoval u odrůd Lady Sylvia, Rubín a Golden, vyšší obsah byl nalezen u odrůdy Opál (horní koruna, méně než 25 µg/g), Nikoleta (méně než 25 µg/g) a Rucla (cca 25 µg/g).

Rutin – nenachází se u odrůdy Gala a Golden, velmi malé množství se nachází u odrůd, Lady Sylvia a Rubín, vyšší obsah se nevyskytuje u žádné z odrůd, v největším množství se vyskytuje u Opálu (okolo 3 µg/g).

Kvercitrin – vyskytuje se u všech odrůd, ve velmi malém množství se nachází u Meteoru, vyšší obsah u odrůd Opál, Nikoleta (pod 15 µg/g) a Fragrance (méně než 25 µg/g).

Floridzin – vyskytuje se u všech odrůd, vyšší obsah byl nalezen u Angoldu a Nikolety (méně než 15 µg/g).

Floretin – nebyl nalezen u žádné z odrůd. Tato látka by se neměla vyskytovat v čerstvém materiálu, protože vzniká při rozkladu floridzinu při nešetrném skladování.

6.3.2 Porovnání jednotlivých odrůd

Opál (celá koruna) - Obsahuje kys. chlorogenovou, epikatechin, rutin, kvercitrin, floridzin a další neidentifikované látky (pravděpodobně glykosidy fenolických látek). Nejvyšší obsah vykazuje kvercitrin.

Opál - (dolní část koruny) – Opál dolní část koruny obsahuje nižší množství fenolických látek než horní část koruny, poměrné zastoupení jednotlivých látek je však stejné. Nejvyšší obsah opět vykazuje kvercitrin.

Opál - (horní část koruny) – Opál horní část koruny obsahuje vyšší množství fenolických látek, způsobený lepším přístupem slunečního světla, vyšší zralostí, zastoupení látek je stejné, nejvyšší obsah vykazuje kvercitrin.

Gala - Obsahuje kys. chlorogenovou, epikatechin, kvercitrin, floridzin a látky, které nebyly identifikovány a pravděpodobně patří mezi glykosidy fenolických látek. Ve značně vysokém obsahu se vykytuje kys. chlorogenová. Vyšší obsah dále vykazují i epikatechin a kvercitrin.

Nikoleta – Obsahuje kys. chlorogenovou, epikatechin, rutin, kvercitrin, floridzin. Nejvyšší obsah vykazuje kys. chlorogenová, epikatechin a kvercitrin.

Angold - Obsahuje kys. chlorogenovou, epikatechin, rutin, kvercitrin a floridzin. Nejvyšší obsah vykazuje kys. chlorogenová (ze všech analyzovaných odrůd). Floridzin je zde také obsažen v největším množství v porovnání s ostatními odrůdami.

Rucla - Obsahuje kys. chlorogenovou, epikatechin, rutin, kvercitrin, floridzin. Nejvyšší obsah vykazuje epikatechin (ze všech analyzovaných odrůd).

Lady Sylvia - Obsahuje kys. chlorogenovou, epikatechin, rutin, kvercitrin, floridzin. Nejvyšší obsah vykazuje kys. chlorogenová a kvercitrin.

Meteor - Obsahuje kys. chlorogenovou, epikatechin, rutin, kvercitrin, floridzin. Nejvyšší obsah vykazuje kys. chlorogenová.

Rubín - Obsahuje kys. chlorogenovou, epikatechin, kvercitrin a floridzin. Ze všech odrůd obsahuje nejmenší množství fenolických látek.

Golden - Obsahuje kys. chlorogenovou, epikatechin, kvercitrin, floridzin. Nejvyšší obsah vykazuje kys. chlorogenová.

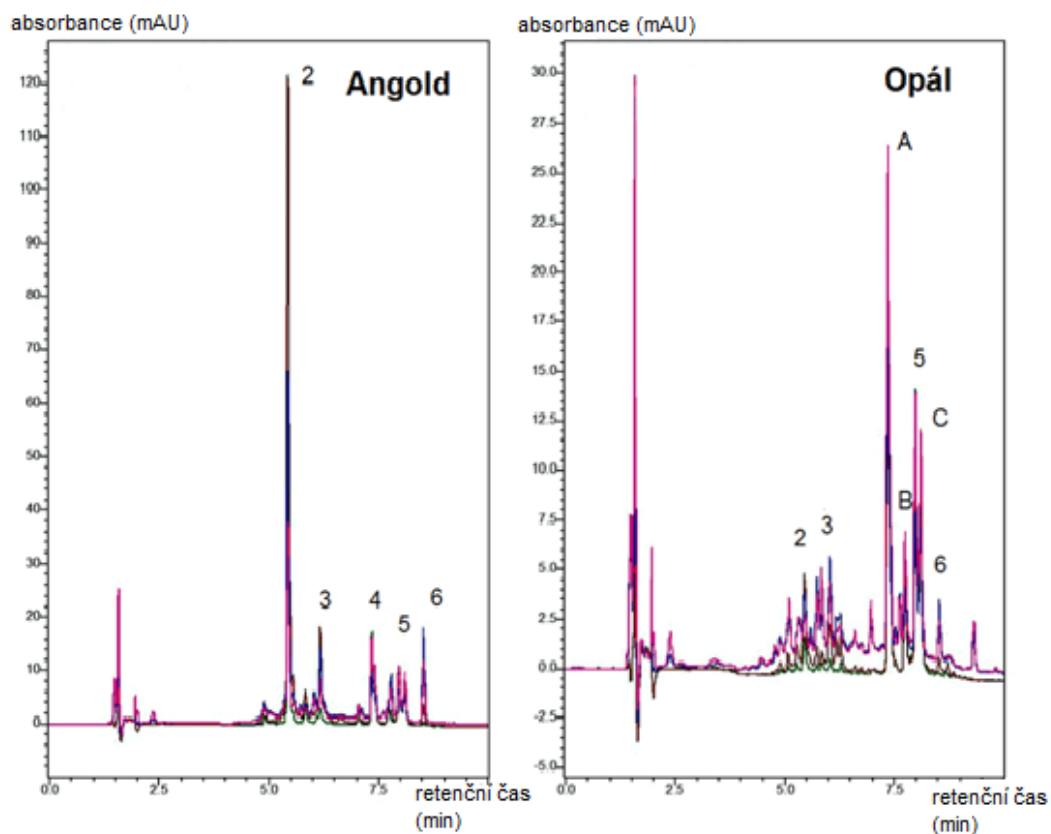
Fragrance - Obsahuje rutin, kvercitrin, floridzin. Nejvyšší obsah vykazuje kvercitrin.

6.3.3 Souhrn – obsah fenolických látek v čerstvých plodech jablek

U většiny odrůd se z fenolických látek v největším množství vyskytovala kys. chlorogenová, dále pak kvercitrin a epikatechin. Ostatní fenolické látky se vyskytovaly v menším množství, nebo převažovaly pouze u některé z odrůd.

Fenolické látky se v největším množství vyskytovaly u odrůd Nikoleta, Opál (horní i dolní část koruny) a Angold, který má výrazně odlišný profil fenolických látek s převažujícím obsahem kyseliny chlorogenové.

Na Obr. 12 jsou uvedeny chromatogramy separace fenolických látek reálných vzorků jablek. Při porovnání chromatogramů je zřejmé, že obsah fenolických látek je u jednotlivých odrůd značně odlišný. U odrůdy Angold výrazně převažuje kyselina chlorogenová. Ostatní fenolické látky jsou v přibližně stejném zastoupení. U odrůdy Opál jsou na chromatogramu kromě standardních látek zřetelné další látky, které nebyly identifikovány (pravděpodobně glykosidy fenolických látek). Z námi vybraných fenolických látek je v největším množství u této odrůdy zastoupený kvercitrin.



Obr. 12 Chromatogram separace fenolických látek na koloně Kinetex C18 (150 x 4,6 mm x 5 μ m) u odrůd jablek Angold a Opál

Pořadí píků: 2 – kys. chlorogenová, 3 – epikatechin, 4 – rutin, 5 – kvercitrin, 6 - floridzin, A, B a C – neidentifikované glykosidy

6.4 Obsah fenolických látek po 3 měsících skladování

Tab. 11 Koncentrace jednotlivých fenolických látek u různých odrůd jablek měřených po 3 měsících skladování v chladu

Kolona Kinetex C18	Obsah fenolických látek (µg/ml)						
Odrůda	Kys. gallová	Kys. chlorogenová	Epikatechin	Rutin	Kvercitrin	Floridzin	Floretin
Opál	0,00	0,27	1,19	0,20	0,81	0,79	0,01
Gala	0,00	4,77	1,57	0,48	1,39	0,47	0,01
Nikoleta	0,00	2,37	3,10	0,22	1,14	2,74	0,01
Angold	0,00	44,28	3,96	1,65	1,30	1,27	0,01
Rucla	0,00	1,83	4,06	0,00	0,73	1,06	0,01
Lady Sylvia	0,00	14,19	3,81	0,18	1,36	0,97	0,00
Meteor	0,00	16,39	22,89	1,16	9,83	6,65	0,01
Rubín	0,00	4,75	4,32	0,18	1,14	0,76	0,01
Golden	0,00	18,10	6,94	0,35	2,27	2,26	0,00
Fragrance	0,00	0,09	2,15	0,53	10,49	2,78	0,01

Tab. 12 Koncentrace jednotlivých fenolických látek u různých odrůd jablek měřených po 3 měsících skladování ULO

Kolona Kinetex C18	Obsah fenolických látek (µg/ml)						
Odrůda	Kys. gallová	Kys. chlorogenová	Epikatechin	Rutin	Kvercitrin	Floridzin	Floretin
Opál	0,00	0,21	2,43	0,08	1,31	1,29	0,00
Gala	0,00	5,42	1,83	0,24	1,23	0,62	0,00
Nikoleta	0,00	5,05	5,14	1,60	0,00	3,59	0,00
Angold	0,00	47,85	3,95	2,63	1,73	1,49	0,14
Rucla	0,00	1,97	3,89	0,00	0,94	1,13	0,02
Lady Sylvia	0,00	30,14	9,05	0,12	3,15	1,55	0,00
Meteor	0,00	12,60	13,25	2,05	7,23	3,66	0,00
Rubín	0,00	1,35	1,81	0,15	0,49	0,36	0,01
Golden	0,00	13,21	5,13	0,22	1,81	2,09	0,01
Fragrance	0,00	1,86	6,41	20,22	1,92	0,02	0,00

6.4.1 Porovnání obsahu fenolických látek po 3 měsících skladování

Kys. gallová – nebyly zaznamenány žádné změny, i nadále se nevyskytovala u žádné z odrůd.

Kys. chlorogenová – došlo k poklesu hodnot u odrůd Opál, Gala a Rucla u obou způsobů skladování (nízká teplota a nízký přístup kyslíku). Naproti tomu u odrůd Angold, Lady Sylvia, Meteor, Rubín a Golden došlo k vzrůstu hodnot u obou způsobů skladování. Nárůst obsahu dané fenolické látky přitom může být způsoben jejím uvolněním z glykosidické formy. U odrůd Nikoleta a Fragrance došlo k poklesu hodnot při skladování v chladném prostředí a naopak ke vzrůstu hodnot při skladování za nízkého přístupu kyslíku. Obsah kys. chlorogenové byl velice odlišný. Ve velkém množství se nacházela u odrůdy Angold (více než 200 µg/g). Ve vyšším množství se vyskytovala i u odrůd Lady Sylvia, Meteor a Golden.

Epikatechin – zde byl zaznamenán nárůst hodnot u všech odrůd u obou typů skladování, pouze při skladování v chladném prostředí se hodnoty u odrůd Nikoleta a Rucla nijak výrazně nezměnily. Nejvyšší nárůst byl zaznamenán u odrůdy Meteor (ULO sklad více než 50 µg/g, skladování v chladu více než 100 µg/g), dále pak u odrůd Lady Sylvia (ULO sklad pod 50 µg/g), Golden a Fragrance (ULO sklad nad 25 µg/g). Výraznější vzrůst hodnot byl pozorován u skladování za nízkého přístupu kyslíku.

Rutin – u jednotlivých odrůd se vyskytuje ve velmi malém množství, po tříměsíčním skladování nebyl detekován u odrůdy Rucla. Nejvyšší obsah rutinu se nachází u odrůd Angold a Meteor (především skladování ULO, cca 10 µg/g). U jednotlivých způsobů skladování nebyly pozorovány významné rozdíly. Velmi vysoké hodnoty byly nalezeny u odrůdy Fragrance, ale tam zřejmě došlo k chybě měření. Výsledky mohou být způsobené dobou měření, vzorek této odrůdy byl měřen vždy poslední (byl delší dobu v autosampleru, který byl chlazen pouze provizorně), a proto u něj mohlo docházet k pomalému rozkladu látek (uvolnění z glykosidické formy).

Kvercitrin – významný nárůst byl zaznamenán u Meteoru u obou typů skladování (přibližně 40 µg/g), u Lady Sylvia při ULO skladování a u Fragrance při skladování v chladu. U ostatních odrůd došlo pouze k mírnému nárůstu nebo poklesu.

Floridzin – výraznější nárůst hodnot byl detekován u odrůdy Meteor a to především skladování v chladném prostředí (okolo 30 µg/g) a odrůdy Golden (více než 10 µg/g). U ostatních odrůd se nevyskytovaly žádné větší rozdíly, docházelo buď k mírnému poklesu, nebo nárůstu.

Floretin – nenacházel se u žádné z odrůd.

6.4.2 Porovnání jednotlivých odrůd po 3 měsících skladování

Opál – Hodnoty obsahu fenolických látek se po tříměsíčním skladování výrazně nelišily. Při skladování v chladném prostředí docházelo častěji k mírnému snížení hodnot. K nejvyššímu poklesu došlo u kvercitrinu. Při skladování za sníženého přístupu kyslíku docházelo také častěji k mírnému snižování obsahu. Vyšší koncentrace byly nalezeny pouze u epikatechinu.

Gala – Obsah fenolických látek se po tříměsíčním skladování výrazně lišil pouze u kys. chlorogenové, kde došlo k výraznému snížení koncentrace. Pro ostatní fenolické látky byl zaznamenán mírný nárůst hodnot u obou typů skladování.

Nikoleta – U této odrůdy byl zaznamenán rozdíl v hodnotách mezi jednotlivými způsoby skladování. Při skladování v chladném prostředí docházelo ke snižování hodnot, naproti tomu při skladování za nízkého přístupu kyslíku docházelo více k nárůstu koncentrací fenolických látek, způsobené jejich postupným uvolněním z glykosidických forem a dalšími metabolickými procesy.

Angold – Velmi výrazný nárůst množství kys. chlorogenové i oproti ostatním odrůdám. Ke zvýšení množství docházelo i u ostatních fenolických látek s výjimkou floridzinu, kde docházelo k poklesu u obou způsobů skladování. Nebyly zaznamenány nějaké výrazné rozdíly mezi způsoby skladování.

Rucla – Po tříměsíčním skladování již nebyl detekován rutin u obou typů skladování. U ostatních fenolických látek došlo častěji k mírnému poklesu koncentrací, pouze u floridzinu byl zaznamenán mírný nárůst.

Lady Sylvia – K významnému zvýšení hodnot došlo u kys. chlorogenové a epikatechinu při skladování v chladném prostředí. Ke zvýšení obsahu došlo i u dalších fenolických látek.

Meteor – U této odrůdy byl zaregistrován největší nárůst obsahu fenolických látek a to kys. chlorogenové, epikatechinu, kvercitrinu a floridzinu u obou způsobů skladování. Koncentrace rutinu byly zvýšeny pouze mírně.

Rubín – Byl zaregistrován vzestup obsahu všech fenolických látek. Největší zvýšení bylo pozorováno u kys. chlorogenové a epikatechinu. Hodnoty při skladování ULO byly o něco nižší ve srovnání se skladováním v chladu.

Golden – Došlo ke zvýšení koncentrací u všech fenolických látek. Největší vzrůst byl zaznamenán u kys. chlorogenové a epikatechinu. Skladování při nízkých teplotách bylo

méně šetrné, došlo k vyšším nárůstům obsahu jednotlivých fenolických látek (vyšší rozklad glykosidických forem).

Fragrance – Hodnoty obsahu fenolických látek se lišily u různých typů skladování. Při skladování za nízkého přístupu kyslíku došlo k výraznému zvýšení obsahu epikatechinu a rutinu, ke snížení došlo u kvercitrinu a floridzinu. Naproti tomu při skladování za chladných podmínek došlo k výraznému zvýšení koncentrace kvercitrinu, obsah kys. chlorogenové a epikatechinu byl zvýšený pouze mírně.

6.4.3 Souhrn - obsah fenolických látek po 3 měsících skladování

Tři měsíce skladování měly vliv na hodnocené fenolické látky, jejich obsah se v mnoha případech zvýšil. Nárůst obsahu fenolických látek je způsobný metabolickými procesy látek v plodech jablek. Velké množství fenolických látek se v přírodě (rostlinném materiálu) vyskytuje v glykosidické formě, která se po sběru rozkládá a poté se uvolňuje sama aktivní látka, zejména u odrůd, kde byly ve fenolickém profilu čerstvých plodů nalezeny neidentifikované látky.

Největší nárůst zaznamenaly odrůdy Meteor, Angold, Lady Sylvia a Golden. U ostatních odrůd docházelo k menšímu nárůstu množství fenolických látek, někdy i k poklesu množství. Pokles fenolických látek byl pozorován především u odrůdy Rucla.

Nárůst koncentrací byl zaznamenán u kys. chlorogenové, epikatechinu, kvercitrinu a floridzinu. Rutin vykazoval jak pokles, tak nárůst, ale ve všech odrůdách se vyskytuje ve velmi malém množství, proto na něj nebyl kladen zvláštní důraz.

Skladování v chladném prostředí se projevilo uvolněním většího množství kvercitrinu, rutinu a floridzinu způsobeným pravděpodobně enzymatickou činností. Při ULO skladování docházelo k většímu nárůstu kys. chlorogenové a epikatechinu. Skladování za nízkého přístupu kyslíku se jevílo jako více šetrné při uchování obsahu fenolických látek oproti skladování v chladu.

6.5 Obsah fenolických látek po 5 měsících skladování

Tab. 13 Koncentrace jednotlivých fenolických látek u různých odrůd jablek měřených po 5 měsících skladování v chladu

Kolona Kinetex C18	Obsah fenolických látek (μg/ml)						
Odrůda	Kys. gallová	Kys. chlorogenová	Epikatechin	Rutin	Kvercitrin	Floridzin	Floretin
Opál	0,00	0,51	3,76	0,24	2,55	1,31	0,01
Gala	0,00	5,70	1,53	0,35	1,31	0,77	0,03
Angold	0,00	46,98	1,97	2,60	3,19	1,97	0,00
Rucla	0,00	1,11	5,83	0,06	0,75	0,62	0,00
Lady Sylvia	0,00	13,65	2,71	0,06	2,62	1,13	0,01
Meteor	0,00	9,00	8,43	1,12	8,51	6,16	0,01
Rubín	0,00	2,79	2,37	0,45	2,15	0,77	0,01
Golden	0,00	6,00	1,57	0,21	1,47	1,19	0,00
Fragrance	0,00	0,38	1,70	0,89	11,40	2,69	0,02

Tab. 14 Koncentrace jednotlivých fenolických látek u různých odrůd jablek měřených po 5 měsících skladování ULO

Kolona Kinetex C18	Obsah fenolických látek (μg/ml)						
Odrůda	Kys. gallová	Kys. chlorogenová	Epikatechin	Rutin	Kvercitrin	Floridzin	Floretin
Opál	0,00	1,08	9,88	0,03	2,80	3,22	0,02
Gala	0,00	9,24	1,71	1,22	2,80	0,96	0,00
Angold	0,00	52,81	1,39	3,00	2,41	2,57	0,00
Rucla	0,00	1,82	11,49	0,00	0,81	1,55	0,00
Lady Sylvia	0,00	11,20	3,05	0,06	3,19	1,15	0,00
Meteor	0,00	7,11	4,34	2,04	5,71	2,76	0,01
Rubín	0,00	4,21	3,70	0,32	2,04	1,26	0,00
Golden	0,00	8,97	1,66	0,21	1,66	2,09	0,02
Fragrance	0,00	2,10	6,32	0,01	7,29	1,95	0,01

6.5.1 Porovnání obsahu fenolických látek po 5 měsících skladování

Kys. gallová – opět nebyly zaznamenány žádné změny, i nadále se nevyskytovala u žádné z odrůd.

Kys. chlorogenová – po pěti měsících skladování došlo jak k poklesu, tak i nárůstu obsahu kys. chlorogenové ve vzorcích jablek. K mírnému zvýšení došlo u odrůd Angold, Rubín a Fragrance u obou způsobů skladování. U odrůd Opál a Gala došlo k nárůstu obsahu kys. chlorogenové vůči hodnotám naměřeným po třech měsících skladování, avšak tyto hodnoty byly nižší, než hodnoty obsahu kys. chlorogenové u čerstvého ovoce. K poklesu obsahu oproti hodnotám naměřeným po tříměsíčním skladování došlo u odrůd Lady Sylvia, Meteor a Golden, avšak tento obsah byl vyšší, než obsah naměřený u čerstvého ovoce.

Epikatechin - po pětíměsíčním skladování jablek byl zaznamenán převážně pokles obsahu epikatechinu. Ke zvýšení obsahu došlo pouze u odrůdy Opál (a to v obou případech skladování), Rucla u obou typů skladování (více než 50 $\mu\text{g/g}$ ULO sklad) a Rubín (cca 13 $\mu\text{g/g}$).

Rutin – jeho už tak nízké hodnoty se u většiny odrůd ještě snížily, a proto nebyl téměř detekován. Nejvyšší obsah byl nalezen u Angoldu (do 15 $\mu\text{g/g}$).

Kvercitrin – u této glykosidické formy fenolické látky kvercetin byl zaznamenán častěji nárůst než pokles naměřených hodnot obsahu (enzymatická aktivita). Obsah kvercitrinu vzrostl u odrůdy Opál, Angold, Rubín a Fragrance (pod 60 $\mu\text{g/g}$) u obou způsobů skladování. K poklesu množství fenolické látky došlo u odrůdy Meteor, ale i přes to byl obsah kvercitrinu u této odrůdy poměrně vysoký (okolo 35 $\mu\text{g/g}$).

Floridzin – zde byl zaznamenán převážně nárůst obsahu fenolické látky (především při ULO skladování – vyšší enzymatická aktivita), avšak jejich zvýšení bylo jen velmi mírné. Nejvyšší hodnoty obsahu měla odrůda Meteor u obou způsobů skladování (skladování při nízké teplotě- cca 30 $\mu\text{g/g}$), u této odrůdy však došlo k mírným poklesům oproti měření po tříměsíčním skladování. Dále pak Rucla (okolo 13 $\mu\text{g/g}$) při skladování v chladných podmínkách, Opál a Angold (okolo 13 $\mu\text{g/g}$) při ULO skladování.

Floretin – nenacházel se u žádné z odrůd.

6.5.2 Porovnání jednotlivých odrůd po 5 měsících skladování

Opál – Obsah fenolických látek se po pětíměsíčním skladování navyšoval (metabolické procesy). Vyšší nárůst obsahu byl nalezen u epikatechinu při ULO skladování.

Gala – Obsah fenolických látek se po pětíměsíčním skladování výrazně nelišil, pouze u kys. chlorogenové došlo k výraznějšímu opětovnému zvýšení koncentrace (především při ULO skladování). Ostatní fenolické látky zaznamenávaly mírný nárůst nebo pokles obsahu u obou typů skladování.

Nikoleta – Tato odrůda již nebyla měřena, byla vyřazena ze skladování kvůli plesnivění.

Angold – Došlo k dalšímu mírnému navýšení hodnot obsahu všech fenolických látek, kromě epikatechinu, u kterého došlo naopak k poklesu obsahu. Nebyly zaznamenány výrazné rozdíly mezi způsoby skladování.

Rucla – U této odrůdy byly zaznamenány výraznější rozdíly pouze u epikatechinu, kde došlo k výraznému nárůstu obsahu při skladování za nízkého přístupu kyslíku (cca 55 µg/g).

Lady Sylvia – U této odrůdy došlo k poklesu koncentrací většiny fenolických látek u obou způsobů skladování. Výrazný pokles byl u kyseliny chlorogenové a epikatechinu při ULO skladování.

Meteor – U této odrůdy byl nalezen pokles koncentrací u všech fenolických látek. K největšímu poklesu došlo u kys. chlorogenové a epikatechinu u obou typů skladování.

Rubín – Byl zaregistrován mírný nárůst obsahu u většiny fenolických látek. Snížení množství bylo nalezeno pouze u kyseliny chlorogenové a epikatechinu při skladování za nízkých teplot.

Golden – Došlo ke snížení koncentrací u všech fenolických látek. Největší pokles byl zaznamenán u kys. chlorogenové a epikatechinu u obou typů skladování.

Fragrance – Zde nebylo jednoznačné, zda po pětíměsíčním skladování došlo ke zvýšení či snížení obsahu fenolických látek. Část fenolických látek zaznamenala vzestup, jiné pokles.

6.5.3 Souhrn - obsah fenolických látek po 5 měsících skladování

Souhrnné výsledky jsou hodnoceny z měření prováděných na koloně Kinetex C18. Po pěti měsících docházelo jak k poklesu, tak nárůstu obsahu fenolických látek. Největší pokles byl zaznamenán u epikatechinu, naopak k častějším nárůstům došlo u kvercitrinu a floridzinu.

Pokles fenolických látek se nejvíce projevil u odrůd Meteor a Golden. Naproti tomu vzrůst stále zaznamenávaly odrůdy Opál, Angold a Rubín (stále probíhající metabolické procesy).

6.6 Obsah fenolických látek po 7 měsících skladování

Tab. 15 Koncentrace jednotlivých fenolických látek u různých odrůd jablek měřených po 7 měsících skladování v chladu

Kolona Kinetex C18	Obsah fenolických látek (µg/ml)						
Odrůda	Kys. gallová	Kys. chlorogenová	Epikatechin	Rutin	Kvercitrin	Floridzin	Floretin
Opál	0,00	2,90	6,00	0,16	2,90	4,16	0,00
Gala	0,00	12,83	3,62	0,39	1,71	1,61	0,00
Angold	0,00	34,52	1,35	2,80	1,25	1,43	0,00
Rucla	0,00	1,67	3,96	0,21	0,75	1,00	0,00
Lady Sylvia	0,00	13,42	2,37	0,24	1,85	1,22	0,00
Meteor	0,00	4,84	7,52	1,61	5,82	3,20	0,00
Rubín	0,00	1,16	1,17	0,36	1,05	0,43	0,00
Golden	0,00	6,44	1,99	0,19	1,17	1,36	0,00
Fragrance	0,00	0,70	0,67	1,60	14,52	1,90	0,02

Tab. 16 Koncentrace jednotlivých fenolických látek u různých odrůd jablek měřených po 7 měsících skladování ULO

Kolona Kinetex C18	Obsah fenolických látek (µg/ml)						
Odrůda	Kys. gallová	Kys. chlorogenová	Epikatechin	Rutin	Kvercitrin	Floridzin	Floretin
Opál	0,00	1,40	4,34	0,11	1,65	2,35	0,00
Gala	0,00	14,28	3,56	1,64	2,00	1,43	0,00
Angold	0,00	42,33	2,19	1,53	1,57	1,77	0,00
Rucla	0,00	0,99	4,68	0,13	0,73	1,29	0,00
Lady Sylvia	0,00	11,51	1,83	0,15	1,81	1,60	0,00
Meteor	0,00	4,58	4,69	0,90	2,89	2,09	0,00
Rubín	0,00	2,73	2,10	0,32	1,44	0,89	0,00
Golden	0,00	9,89	3,27	0,21	1,99	2,07	0,00
Fragrance	0,00	0,28	1,15	0,67	11,11	2,99	0,01

Tab. 17 Koncentrace jednotlivých fenolických látek u různých odrůd jablek měřených po 7 měsících skladování v chladu

Kolona Luna Omega Polar C18	Obsah fenolických látek (µg/ml)						
Odrůda	Kys. gallová	Kys. chlorogenová	Epikatechin	Rutin	Kvercitrin	Floridzin	Floretin
Opál	0,00	3,21	3,69	0,16	2,51	3,24	0,00
Gala	0,00	14,85	2,71	0,70	1,39	1,41	0,00
Angold	0,00	39,51	0,77	2,68	1,10	1,29	0,00
Rucla	0,00	2,09	2,41	0,08	0,58	0,82	0,00
Lady Sylvia	0,00	15,72	1,36	0,18	1,52	1,04	0,00
Meteor	0,00	4,94	2,96	1,63	4,14	1,75	0,02
Rubín	0,00	1,39	0,35	0,35	0,70	0,18	0,00
Golden	0,00	6,61	0,79	0,08	0,96	0,78	0,00
Fragrance	0,00	0,45	0,35	2,13	12,32	1,00	0,03

Tab. 18 Koncentrace jednotlivých fenolických látek u různých odrůd jablek měřených po 7 měsících skladování ULO

Kolona Luna Omega Polar C18	Obsah fenolických látek (µg/ml)						
Odrůda	Kys. gallová	Kys. chlorogenová	Epikatechin	Rutin	Kvercitrin	Floridzin	Floretin
Opál	0,00	1,77	2,30	0,13	1,39	1,94	0,00
Gala	0,00	16,53	2,41	1,48	1,64	1,39	0,00
Angold	0,00	48,09	1,02	1,35	1,14	1,58	0,00
Rucla	0,00	1,44	2,47	0,10	0,47	1,03	0,00
Lady Sylvia	0,00	13,11	1,01	0,19	1,56	1,31	0,00
Meteor	0,00	4,38	2,41	1,15	1,97	1,22	0,02
Rubín	0,00	2,91	0,74	0,39	1,02	0,38	0,00
Golden	0,00	10,12	1,14	0,15	1,69	1,17	0,00
Fragrance	0,00	0,32	0,26	0,81	9,06	1,72	0,00

6.6.1 Porovnání obsahu fenolických látek po 7 měsících skladování

Kys. gallová – nenacházela se u žádné z odrůd.

Kys. chlorogenová – po sedmi měsících skladování došlo k výraznému zvýšení koncentrací u odrůd Opál, Gala (nejvýraznější nárůst – cca 65 µg/g), Rubín a Golden u obou způsobů skladování. U ostatních odrůd došlo spíše ke snížení koncentrace kys. chlorogenové.

Epikatechin – ve většině případů došlo k poklesu obsahu této fenolické látky. Ke zvýšení obsahu došlo u odrůdy Opál a Rubín při skladování za nízkých teplot, Gala (méně než 20 µg/g) a Golden u obou způsobů skladování a k mírnému zvýšení obsahu došlo u odrůdy Angold (při skladování ULO).

Rutin – ve všech odrůdách se vyskytuje ve velmi malém množství. Některé odrůdy zaznamenaly velmi mírný vzrůst koncentrací, jiné pokles. V nejvyšším obsahu se vyskytuje u odrůdy Angold (okolo 13 µg/g) a Meteor (cca 10 µg/g).

Kvercitrin – u této fenolické látky byl po sedmiměsíčním skladování zaznamenán převážně pokles obsahu. K výrazným poklesům hodnot obsahu došlo u odrůdy Meteor. Pouze u odrůdy Fragrance stoupaly hodnoty obsahu velmi výrazně (okolo 60 µg/g), zřejmě zde došlo k chybě v analýze vzorku, vzhledem k časově náročnému měření a provizornímu chlazení autosampleru.

Floridzin – byl zaznamenán převážně pokles množství této fenolické látky. K nárůstu obsahu došlo u odrůd Gala a Fragrance, avšak jejich zvýšení bylo jen velmi mírné.

Floretin – tato fenolická látka nebyla detekována u žádné z odrůd.

6.6.2 Porovnání jednotlivých odrůd po 7 měsících skladování

Opál – Obsahy fenolických látek se po sedmiměsíčním skladování navyšovaly u vzorků jablek skladovaných v chladném prostředí. U vzorků jablek skladovaných ULO, byl zaznamenán častěji pokles obsahu fenolických látek.

Gala – U obou způsobů skladování byl zaznamenán nárůst koncentrací fenolických látek. K největšímu vzrůstu došlo u kys. chlorogenové.

Angold – Došlo ke snížení obsahu většiny fenolických látek. Nebyly zaznamenány výrazné rozdíly mezi způsoby skladování.

Rucla – Zde také došlo převážně k poklesu koncentrací všech fenolických látek. Mírný nárůst byl zaznamenán pouze u kys. chlorogenové a epikatechinu při skladování v chladu.

Lady Sylvia – U této odrůdy nedošlo k výrazné změně v množství fenolických látek. Pouze u kvercitrinu byl zaznamenán pokles množství této fenolické látky u obou způsobů skladování.

Meteor – Po sedmi měsících skladování došlo k dalšímu výraznějšímu poklesu množství fenolických látek. Pouze u epikatechinu se nevyskytovaly výraznější změny. Obdobně tomu bylo u obou způsobů skladování.

Rubín – Došlo k poklesu koncentrací všech fenolických látek u obou způsobů skladování.

Golden – U této odrůdy nedošlo k výraznějším změnám. Pouze u kys. chlorogenové a epikatechinu došlo k nárůstu hodnot obsahu, především při ULO skladování.

Fragrance – pokles obsahu zaznamenaly kys. chlorogenová a epikatechin u obou typů skladování. Výrazný nárůst obsahu byl detekován u kvercitrinu.

Některé výsledné hodnoty koncentrací a obsahu se odchyľují od ostatních výsledků, důvodem byla pravděpodobně dlouhá doba měření (cca 30 - 50 hodin), vzorků bylo velké množství, a proto mohlo docházet k pomalému rozkladu látek u později měřených extraktů daných odrůd.

6.6.3 Souhrn - obsah fenolických látek po 7 měsících skladování

Po sedmi měsících skladování dochází většinou k poklesu koncentrací fenolických látek nebo se jejich obsah nemění, jen v některých případech dochází stále k nárůstu (odrůdy Opál a Gala). Největší pokles množství fenolických látek byl zaznamenán u odrůdy Meteor.

Obsahy fenolických látek u vzorků jablek skladovaných v chladném prostředí jsou ve většině případů vyšší oproti hodnotám získaným z měření jablek skladovaných za nízkého přístupu kyslíku. Skladování v chladném prostředí je pro uchování obsahu fenolických látek méně účinné a metabolické procesy zde probíhají ve větší míře. Proto se ULO skladování jeví jako výhodnější a šetrnější pro uchování hladin a stability fenolických látek.

Měření bylo prováděno na obou kolonách se stejnými extrakty, které byly rozděleny vždy do dvou vialek pro měření na první i druhé koloně. Při porovnání hodnot koncentrací mezi oběma kolonami je možné pozorovat rozdíl některých hodnot koncentrací získaných při měření na koloně Luna Omega Polar C18 oproti hodnotám získaným při měření na koloně Kinetex C18. Tyto hodnoty koncentrací se však neliší výrazně.

6.7 Celkový souhrn

Obsah fenolických látek v jablkách se odvíjí od odrůdy jablka a jeho způsobu skladování a zpracování. Rozdíly v obsahu fenolických látek byly nalezeny jak při porovnání jednotlivých odrůd, tak při porovnání doby a způsobu skladování u stejné odrůdy. Podle koncentrace daných fenolických látek u příslušných odrůd, můžeme tyto odrůdy jablek rozdělit podle jejich kvality a obsahu antioxidantů.

K poklesům koncentrací fenolických látek začalo docházet ve většině případů po pěti měsících skladování, ať už při skladování ULO nebo při skladování za nízké teploty. Při skladování v chladném prostředí byl pokles obsahu fenolických látek výraznější (po výraznějším nárůstu koncentrací fenolických látek způsobeným uvolňováním z glykosidických forem a enzymatickou aktivitou, docházelo k výraznějším poklesům obsahu fenolických látek).

Na podmínky skladování byly nejvíce citlivé kyselina chlorogenová a epikatechin, u těchto látek docházelo k nejvýraznějším nárůstům a poklesům koncentrací vlivem doby a způsobu skladování. Fenolické látky kvercitrin a rutin vykazovaly vyšší stabilitu.

Odrůdy, u kterých se vyskytoval poměrně vysoký obsah fenolických látek a které nejlépe zachovaly jejich obsah a tím i vysokou hladinu antioxidantů i po delší době skladování, byly odrůdy Angold, Gala, Lady Sylvia a Meteor (avšak u této odrůdy je s narůstající dobou skladování nejvíce patrné kolísání koncentrací fenolických látek). Naproti tomu u odrůd Fragrance, Rubín a Rucla jsou měřené fenolické látky zastoupeny v menším množství, proto je můžeme označit jako méně kvalitní z hlediska obsahu antioxidantů.

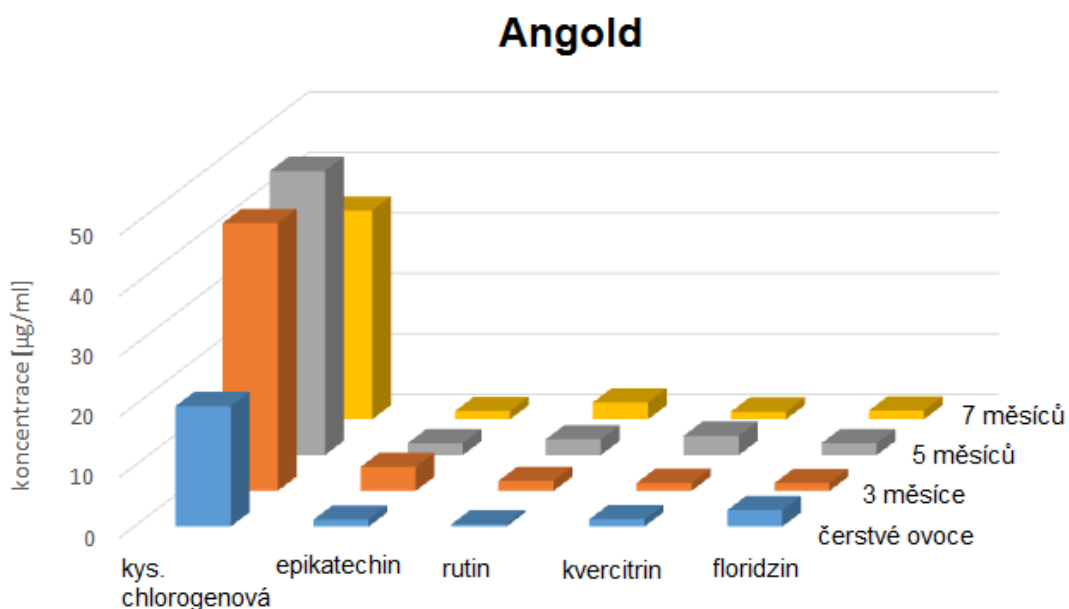
6.7.1 Porovnání vybraných odrůd

Pro porovnání stability fenolických látek v průběhu obou typů skladování byly vybrány odrůdy Angold a Meteor.

Angold

Tab. 19 Koncentrace jednotlivých fenolických látek měřených na kolonách Kinetex C18 – skladování při nízké teplotě

Angold							
	Chlazený sklad						
Koncentrace μg/ml	Kys. gallová	Kys. chlorogenová	Epikatechin	Rutin	Kvercitrin	Floridzin	Floretin
Čerstvé ovoce	0,00	19,92	1,14	0,38	1,21	2,72	0,00
3 měsíce skladování	0,00	44,28	3,96	1,65	1,30	1,27	0,01
5 měsíců skladování	0,00	46,98	1,97	2,60	3,19	1,97	0,00
7 měsíců skladování	0,00	34,52	1,35	2,80	1,25	1,43	0,00



Obr. 13 Stabilita fenolických látek u odrůdy Angold skladované při nízké teplotě

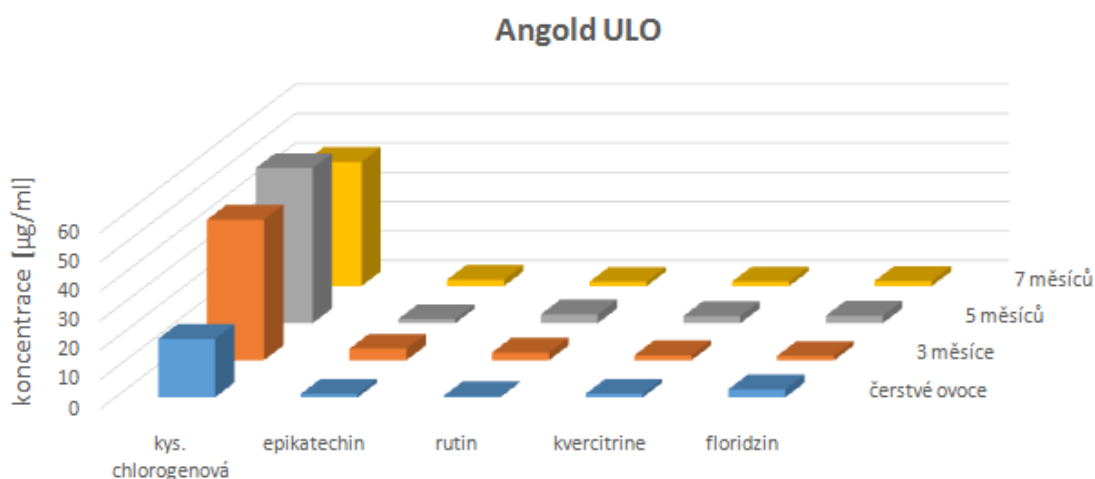
U odrůdy Angold docházelo k největšímu vzestupu koncentrací po třech a pěti měsících skladování. Po sedmi měsících skladování v chladících skladech došlo ke snížení koncentrací fenolických látek. Tato odrůda je poměrně bohatá na obsah fenolických látek. Ve velmi vysokých koncentracích je zde obsažena kyselina chlorogenová, která má zde nejvyšší hodnoty ze všech zkoumaných odrůd jablek (až nad 200 µg/g). Ve vyšším množství v porovnání s ostatními odrůdami je zde obsažen i rutin.

Při porovnání hodnot koncentrací naměřených na obou kolonách, je možné vidět mírné odchylky u kyseliny chlorogenové po třech měsících skladování a epikatechinu po třech a pěti měsících skladování.

Na Obr. 13 je dobře zachycena převaha kyseliny chlorogenové nad ostatními látkami. Ostatní fenolické látky jsou obsaženy v menším množství v porovnání s kys. chlorogenovou a jejich množství jen mírně narůstá nebo klesá.

Tab. 20 Koncentrace jednotlivých fenolických látek měřených na kolonách Kinetex C18 - skladování ULO

Angold - ULO							
	ULO skladování						
Koncentrace µg/ml	Kys. gallová	Kys. chlorogenová	Epikatechin	Rutin	Kvercitrin	Floridzin	Floretin
Čerstvé ovoce	0,00	19,92	1,14	0,38	1,21	2,72	0,00
3 měsíce skladování	0,00	47,85	3,95	2,63	1,73	1,49	0,14
5 měsíců skladování	0,00	52,81	1,39	3,00	2,41	2,57	0,00
7 měsíců skladování	0,00	42,33	2,19	1,53	1,57	1,77	0,00



Obr. 14 Stabilita fenolických látek u odrůdy Angold - skladování ULO

Skladování za nízkého přístupu kyslíku vedlo k udržení vyšších koncentrací fenolických látek u odrůdy Angold. Zvýšení oproti hodnotám získaným při měření jablek skladovaných v chladu ale nebylo vysoké. Ke zvýšení obsahu fenolických látek došlo především po třech a pěti měsících skladování a po sedmi měsících skladování začalo docházet k poklesu těchto látek.

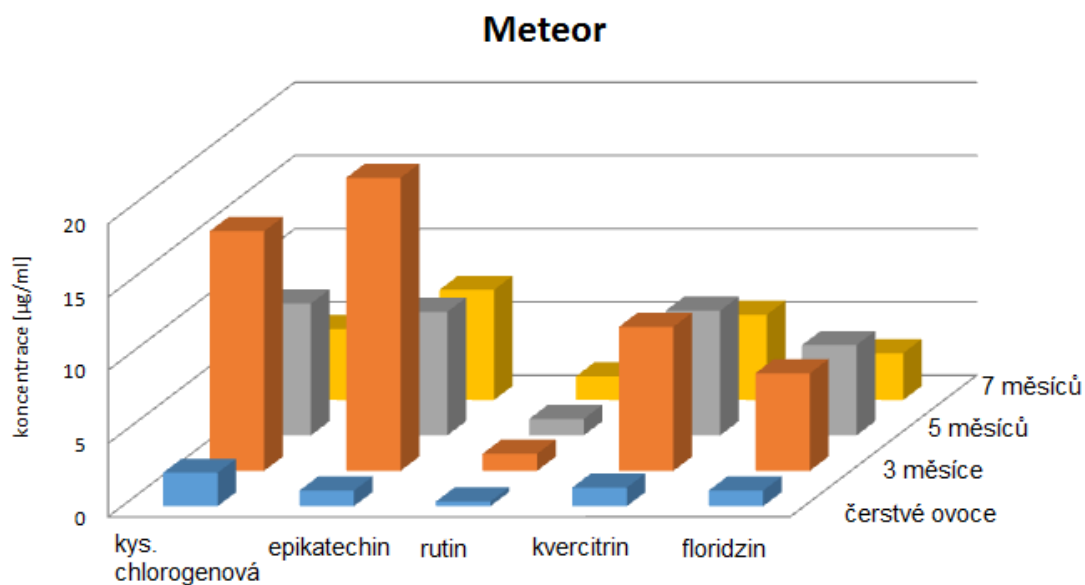
Obr. 14 – stabilita fenolických látek odrůdy Angold skladované v ULO podmínkách se podobá Obr. 13 (stabilitě fenolických látek získané měřením vzorků odrůdy Angold skladovaných v chladících skladech). Ale je patrný rychlejší pokles hladiny kyseliny chlorogenové po sedmi měsících při skladování v chlazeném skladu v porovnání s ULO podmínkami.

Meteor

Tab. 21 Koncentrace jednotlivých fenolických látek měřených na kolonách Kinetex C18

– skladování při nízké teplotě

Meteor							
	Chlazený sklad						
Koncentrace µg/ml	Kys. gallová	Kys. chlorogenová	Epikatechin	Rutin	Kvercitrin	Floridzin	Floretin
Čerstvé ovoce	0,00	2,28	1,06	0,31	1,27	1,06	0,00
3 měsíce skladování	0,00	16,39	22,89	1,16	9,83	6,65	0,01
5 měsíců skladování	0,00	9,00	8,43	1,12	8,51	6,16	0,01
7 měsíců skladování	0,00	4,84	7,52	1,61	5,82	3,20	0,00



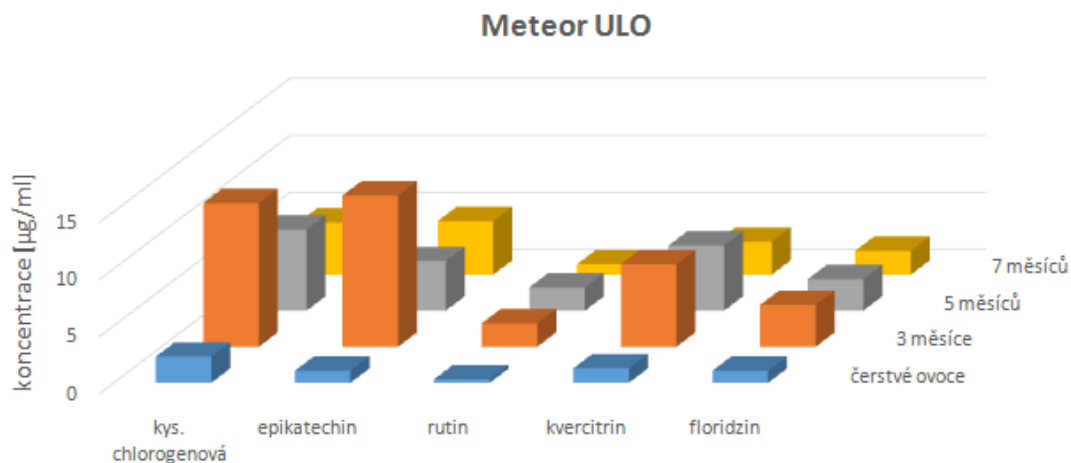
Obr. 15 Stabilita fenolických látek u odrůdy Meteor skladované při nízké teplotě

Odrůda Meteor obsahuje velké množství fenolických látek. K nejvyšším nárůstům koncentrací fenolických látek dochází po třech měsících skladování, poté jejich obsah mírně klesá. Nejvyšších koncentrací dosahuje epikatechin (více než 100 µg/g) a kyselina chlorogenová (okolo 80 µg/g). Ve srovnání s jinými odrůdami

obsahuje i vysoké množství kvercitrinu, floridzinu a rutinu. Na Obr. 15 je znázorněn nárůst i pokles jednotlivých fenolických látek.

Tab. 22 Koncentrace jednotlivých fenolických látek měřených na kolonách Kinetex C18 – skladování ULO

Meteor - ULO							
	ULO skladování						
Koncentrace µg/ml	Kys. gallová	Kys. chlorogenová	Epikatechin	Rutin	Kvercitrin	Floridzin	Floretin
Čerstvé ovoce	0,00	2,28	1,06	0,31	1,27	1,06	0,00
3 měsíce skladování	0,00	12,6	13,25	2,05	7,23	3,66	0,00
5 měsíců skladování	0,00	7,11	4,34	2,04	5,71	2,76	0,01
7 měsíců skladování	0,00	4,58	4,69	0,90	2,89	2,09	0,00



Obr. 16 Stabilita fenolických látek u odrůdy Meteor - skladování ULO

Při skladování za nízkého přístupu kyslíku (ULO skladování) nedocházelo k tak vysokým nárůstům a poklesům fenolických látek, jako tomu bylo při skladování v chladu (lepší pro udržení obsahu fenolických látek). I zde dosahovaly fenolické látky nejvyšších hodnot koncentrací po tříměsíčním skladování, poté docházelo k jejich úbytku. Opět lze na Obr. 16 dobře vidět nárůst a pokles jednotlivých fenolických látek.

6.7.2 Porovnání obsahu fenolických látek

Pro porovnání obsahu fenolických látek byla vybrána kyselina chlorogenová, která vykazovala vysoký obsah u všech sledovaných odrůd.

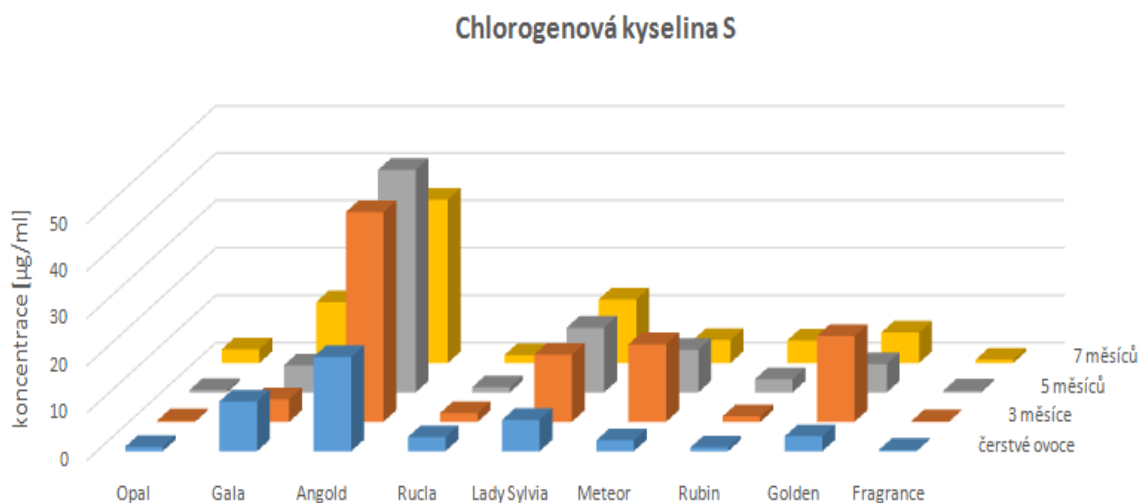
Kyselina chlorogenová

Tab. 23 Koncentrace kyseliny chlorogenové měřených na kolonách Kinetex C18 u jednotlivých odrůd skladovaných při rozdílných podmínkách

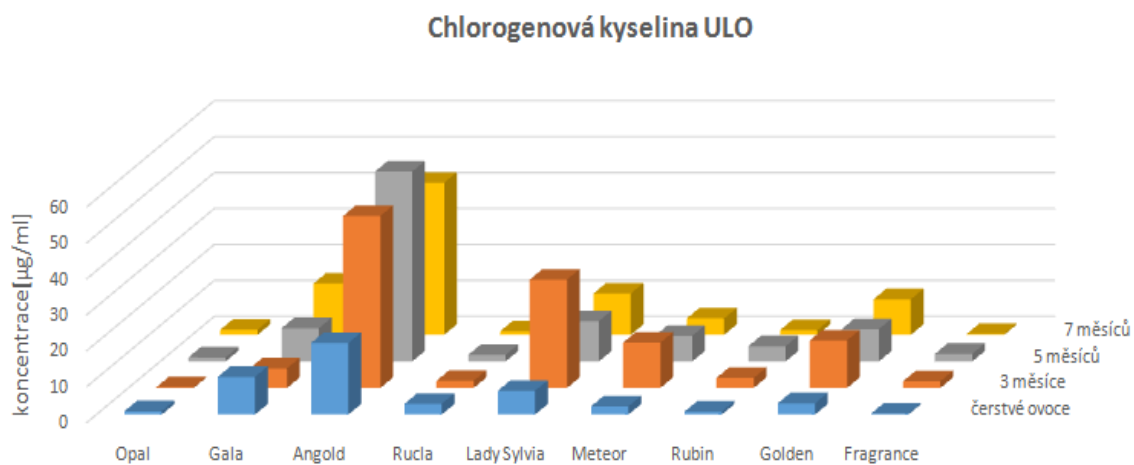
Kyselina chlorogenová	Skladování v chladu (měs.)				Skladování ULO (měs.)			
	0	3	5	7	0	3	5	7
Koncentrace $\mu\text{g/ml}$								
Opál	0,92	0,27	0,51	2,90	0,92	0,21	1,08	1,40
Gala	10,49	4,77	5,70	12,83	10,49	5,42	9,24	14,28
Angold	19,92	44,28	46,98	34,52	19,92	47,85	52,81	42,33
Rucla	2,97	1,83	1,11	1,67	2,97	1,97	1,82	0,99
Lady Sylvia	6,60	14,19	13,65	13,42	6,60	30,14	11,20	11,51
Meteor	2,28	16,36	9,00	4,84	2,28	12,60	7,11	4,58
Rubín	0,79	1,16	2,79	4,75	0,79	2,77	4,21	1,35
Golden	3,13	18,10	6,00	6,44	3,13	13,21	8,97	9,89
Fragrance	0,27	0,09	0,38	0,70	0,27	1,86	2,10	0,28

V Tabulce 23 jsou uvedeny koncentrace kyseliny chlorogenové získané z měření na koloně Kinetex C18 všech testovaných odrůd jablek u obou způsobů skladování. Už na první pohled z ní vyplývá, že tato fenolická látka se v jablkách nachází v poměrně značném množství, nejvyšší obsah kyseliny chlorogenové se nacházel u odrůdy Angold. Vyšší množství kyseliny chlorogenové se dále vyskytovalo u odrůd Gala, Lady Sylvia a Golden. Při porovnání koncentrací získaných různým způsobem skladování, nebyly zaznamenány výraznější odchylky, proto nelze jednoznačně říct, který způsob skladování je výhodnější pro udržení obsahu této fenolické látky.

Na Obr. 17 a 18 lze snáze porovnat koncentrace kyseliny chlorogenové u jednotlivých odrůd při různě dlouhém skladování. U většiny odrůd docházelo k největším nárůstům koncentrací kyseliny chlorogenové po třech měsících skladování, poté její obsah u některých odrůd stále stoupal, u dalších začal postupně klesat, avšak její obsah ani po sedmi měsících skladování neklesl pod úroveň, které dosahoval u čerstvého ovoce, výjimku tvoří odrůda Rucla.



Obr. 17 Koncentrace kyseliny chlorogenové v různých odrůdách jablek skladovaných při nízké teplotě



Obr. 18 Koncentrace kyseliny chlorogenové v různých odrůdách jablek při ULO skladování

7 Závěr

Pomocí HPLC metody byly stanovovány a hodnoceny hladiny zvolených fenolických látek v homogenizovaných extraktech deseti vybraných odrůd jablek. Hladiny fenolických látek byly stanoveny v čerstvém rostlinném materiálu a po 3, 5 a 7 měsících skladování v chladném prostředí a za ultra-nízkého přístupu kyslíku. HPLC metoda je vhodnou metodou pro stanovení těchto látek.

Vzorky byly měřeny na koloně Kinetex C18 (kolona s povrchově porézními částicemi) a na koloně Luna Omega Polar C18 (kolona s plně porézními částicemi). Pro lepší opakovatelnost plochy píku se pro samotné hodnocení využívaly výsledky získané měřeními na koloně Kinetex C18.

Z výsledků měření vyplývá, že obsah fenolických látek v jablkách závisí na jejich odrůdě, skladování a zpracování. Rozdíly mezi odrůdami byly významné jak v původním, čerstvém rostlinném materiálu, tak s odstupem času skladování. Koncentrační úrovně příslušných fenolických sloučenin lze použít k rozlišení kvality jednotlivých odrůd. Vyšší množství fenolických látek obsahovaly odrůdy Angold, Meteor a Lady Sylvia. Na podmínky skladování byly, co se týče fenolických látek, nejvíce citlivé kyselina chlorogenová a epikatechin. Naproti tomu kvercitrin a rutin vykazovali vyšší stabilitu. Skladování za ultra-nízkého přístupu kyslíku se jeví jako účinnější pro udržení stability fenolických látek.

8 Seznam obrázků a tabulek

8.1 Obrázky

Obr. 1	Strukturní vzorec kyseliny gallové [11]	7
Obr. 2	Strukturní vzorec kyseliny chlorogenové [11]	7
Obr. 3	Strukturní vzorec (-)-epikatechinu [11]	8
Obr. 4	Strukturní vzorec rutinu [11]	9
Obr. 5	Strukturní vzorec kvercitrinu [11]	9
Obr. 6	Strukturní vzorec floridzinu [11]	10
Obr. 7	Strukturní vzorec floretinu [11]	10
Obr. 8	Postup vzorku analytickou kolonou [27]	12
Obr. 9	Schéma chromatografického systému [28]	14
Obr. 10	Chromatogram separace směsi standardních fenolických látek na koloně Kinetex C18 (150 x 4,6 mm x 5 µm), průtoková rychlost 1 ml/min	30
Obr. 11	Chromatogram separace směsi standardních fenolických látek na koloně Luna Omega Polar C18 (150 x 4,6 mm x 5 µm), průtoková rychlost 1 ml/min	31
Obr. 12	Chromatogram separace fenolických látek na koloně Kinetex C18 (150 x 4,6 mm x 5 µm) u odrůd jablek Angold a Opál	35
Obr. 13	Stabilita fenolických látek u odrůdy Angold skladované při nízké teplotě	48
Obr. 14	Stabilita fenolických látek u odrůdy Angold - skladování ULO	50
Obr. 15	Stabilita fenolických látek u odrůdy Meteor skladované při nízké teplotě	51
Obr. 16	Stabilita fenolických látek u odrůdy Meteor - skladování ULO	52
Obr. 17	Koncentrace kyseliny chlorogenové v různých odrůdách jablek skladovaných při nízké teplotě	54
Obr. 18	Koncentrace kyseliny chlorogenové v různých odrůdách jablek při ULO skladování	54

8.2 Tabulky

Tab. 1 Dělení fenolických látek	5
Tab. 2 Přehled parametrů jednotlivých fenolických látek	11
Tab. 3 Přehled podmínek separace fenolických látek v předešlých studiích.....	17
Tab. 4 Chromatografický systém.....	22
Tab. 5 Testované odrůdy jablek.....	24
Tab. 6 Koncentrace použitých standardů ve směsném roztoku.....	26
Tab. 7 Hodnocení opakovatelnosti plochy píků a retenčních časů.....	28
Tab. 8 Parametry testu vhodnosti chromatografického systému	28
Tab.9 Průměrná výtěžnost fenolických látek.....	29
Tab.10 Koncentrace jednotlivých fenolických látek u různých odrůd jablek	32
Tab. 11 Koncentrace jednotlivých fenolických látek u různých odrůd jablek měřených po 3 měsících skladování v chladu	36
Tab. 12 Koncentrace jednotlivých fenolických látek u různých odrůd jablek měřených po 3 měsících skladování ULO.....	36
Tab. 13 Koncentrace jednotlivých fenolických látek u různých odrůd jablek měřených po 5 měsících skladování v chladu	40
Tab. 14 Koncentrace jednotlivých fenolických látek u různých odrůd jablek měřených po 5 měsících skladování ULO.....	40
Tab. 15 Koncentrace jednotlivých fenolických látek u různých odrůd jablek měřených po 7 měsících skladování v chladu	43
Tab. 16 Koncentrace jednotlivých fenolických látek u různých odrůd jablek měřených po 7 měsících skladování ULO.....	43
Tab. 17 Koncentrace jednotlivých fenolických látek u různých odrůd jablek měřených po 7 měsících skladování v chladu	44
Tab. 18 Koncentrace jednotlivých fenolických látek u různých odrůd jablek měřených po 7 měsících skladování ULO.....	44
Tab. 19 Koncentrace jednotlivých fenolických látek měřených na kolonách Kinetex C18	48
Tab. 20 Koncentrace jednotlivých fenolických látek měřených na kolonách Kinetex C18 - skladování ULO.....	49
Tab. 21 Koncentrace jednotlivých fenolických látek měřených na kolonách Kinetex C18 – skladování při nízké teplotě	51

Tab. 22 Koncentrace jednotlivých fenolických látek měřených na kolonách Kinetex C18 – skladování ULO	52
Tab. 23 Koncentrace kyseliny chlorogenové měřených na kolonách Kinetex C18 u jednotlivých odrůd skladovaných při rozdílných podmínkách.....	53

9 Literatura

1. KUCHYŇKOVÁ, Š., *Změny obsahových látek v brukvovité zelenině při různé kulinární úpravě*. Diplomová práce. Brno: Masarykova univerzita, 2007.
2. VELÍŠEK, J., *Chemie potravin 2*. Tábor: OSSIS, 1999, ISBN: 80-902391-4-5.
3. HO, CHI-TANG et al., *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I ACS Symposium Series*; American Chemical Society: Washington, DC, 1992.
4. KREJČÍKOVÁ, A., *Zajímavé reakce fenolických látek*. FPE ZČU, Plzeň.
5. BALASUNDRAM N. et al., *Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses*. Food Chemistry 99. 2006, 191–203.
6. MARCANÍKOVÁ, K., BEŇOVÁ, B., *Využití coulometrického detektoru pro analýzu fenolických látek*. Chemické listy. 2010, 104, 27-30.
7. KANIOVÁ, L., *Analýza šťáv vybraných odrůd černého rybízu*. Brno, 2015. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
8. VELÍŠEK, J., CEJPEK, K., *Biosynthesis of Food Components*. Ossis, Tábor 2008.
9. *Chemopreventive Properties of Fruit Phenolic Compounds and Their Possible Mode of Actions* [online]. December 2014, 229 [cit. 2018-01-17]. DOI: 10.1016/B978-0-444-63281-400008-2. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/287232949_Chemopreventive_Properties_of_Fruit_Phenolic_Compounds_and_Their_Possible_Mode_of_Actions
10. FIEDOROVÁ, I., *Fenolické látkové složky v potravinách*. Lednice, 2008. Bakalářská práce. Mendelova zemědělská lesnická univerzita v Brně, Zahradnická fakulta v Lednici. Vedoucí práce Ing. Josef Balík, Ph.D.
11. *PubChem, Open Chemistry database* [online]. [cit. 2018-01-18]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallic_acid#section=Top
12. YILMAZA, Ü. T. et al., *Determination of Gallic Acid by Differential Pulse Polarography: Application to Fruit Juices*. Journal of Analytical Chemistry. 2013, 68(12), 1064-1069.
13. *Chemical Book* [online]. [cit. 2018-01-18]. Dostupné z: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB0158671.htm

14. FARAH, A. et al., *Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans*. Journal of Nutrition. 2008, **138**(12), 2309-2315.
15. PEDRIALI, C. A. et al., *The synthesis of a water-soluble derivative of rutin as an antiradical agent*. Quimica Nova. 2008, **31**(8), 2147-2151.
16. WebMD [online]. [cit. 22. 01. 2018]. Dostupné z: <https://www.webmd.com/vitamins-supplements/ingredientmono-294-%20QUERCETIN.aspx?activeIngredientId=294&activeIngredientName=QUERCETIN>
17. GOSCH, Ch., HALBWIRTH, H., STICH, K., *Phloridzin: Biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants*. Phytochemistry 71, 2010, 838-843.
18. FooDB [online]. [cit. 22. 01. 2018]. <http://foodb.ca/compounds/FDB015553>
19. SIVARAMAN, D. et al., *Isolation, characterization and insilico pharmacological screening of medicinally important bio-active phytoconstituents from the leaves of ipomoea aquatica forsk.* Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2014, **6**(2), 262-267.
20. Alberta Food Composition Database [online]. [cit. 01. 02. 2018]. <http://afcdb.ca>
21. DVOŘÁKOVÁ, M. et al., *Analytické metody stanovení polyfenolů ve sladínách, mladínách a pivech*. Kvasný průmysl. 2006, **52**(4), 111-114.
22. High Performance liquid chromatography – HPLC [online]. [cit. 22. 01. 2018]. <https://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>
23. NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
24. NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
25. ECKSCHLAGER, K., KODEJŠ, Z., HORSÁK, I., *Vyhodnocování analytických výsledků a metod*. Praha: SNTL-nakladatelství technické literatury, 1980.
26. HPLC. Chemistry LibreText [online]. [cit. 22. 01. 2018]. https://chem.libretexts.org/Core/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Chromatography/High_performance_liquid_chromatography
27. HPLC. SlidePlayer [online]. [cit. 01. 02. 2018]. <http://slideplayer.cz/slide/3160943/>
28. HPLC. ScienceZoom [online]. [cit. 01. 02. 2018]. <http://www.sciencezoom.cz/cs/>

29. UHPLC. CHROMSERVIS [online]. [cit. 01. 02. 2018].
<https://www.chromservis.eu/i/uhplc?lang=CZ>
30. RICCIUTELLI, M. et al., *Olive oil polyphenols: A quantitative method by high-performance liquid-chromatography-diode-array detection for their determination and the assessment of the related health claim*. Journal of Chromatography A. 2017, **1481**, 53-63.
31. ROBBINS, REBECCA J., *Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003, **51**(10), 2866–2887.
32. LORENZO, Chiara Die et al., *Phenolic profile and antioxidant activity of different raisin (*Vitis vinifera* L.) samples*. BIO Web of Conferences. 2016, **7**.
33. WILLEMS, Jamie L. a Nicholas H. LOW., *Structural identification of compounds for use in the detection of juice-to-juice debasing between apple and pear juices*. Food Chemistry. 2018, **241**, 346-352.
34. SPINELLI, F. R. et al., *Detection of addition of apple juice in purple grape juice*. Food Control. 2016, **69**, 1-4.
35. KSCHONSEK, J. et al., *Polyphenolic Compounds Analysis of Old and New Apple Cultivars and Contribution of Polyphenolic Profile to the In Vitro Antioxidant Capacity*. Antioxidants. 2018, **7**(1), 14.
36. RAMOS-AGUILAR, A. L. et al., *Physicochemical properties of apple juice during sequential steps of the industrial processing and functional properties of pectin fractions from the generated pomace*. Food Science and Technology. 2017, **86**, 465-472.
37. YILDIRIM, F. et al., *The Relationship Between Growth Vigour of Rootstock and Phenolic Contents in Apple (*Malus × domestica*)*. Erwerbs-Obstbau. 2016, **58**, 25-29.
38. SATO, H. et al., *Varietal differences in phenolic compounds metabolism of type 2 red-fleshed apples*. Scientia Horticulturae. 2017, **219**, 1-9.
39. SUÁREZ, B., *Phenolic profiles, antioxidant activity and in vitro antiviral properties of apple pomace*. Food Chemistry. 2010, **120**, 339–342.
40. RAUDONE, L. et al., *Phenolic Profiles and Contribution of Individual Compounds to Antioxidant Activity of Apple Powders*. Journal of Food Science. 2016, **81**(5), 1055-1061.

41. SOWA, A. et al., *Analysis of Polyphenolic Compounds in Extracts from Leaves of Some Malus domestica Cultivars: Antiradical and Antimicrobial Analysis of These Extracts*. BioMed Research International. 2016, **2016**, 12.
42. LIAUDANSKAS, M. et al., *A Comparative Study of Phenolic Content in Apple Fruits*. International Journal of Food Properties. 2015, **18**, 945–953.
43. LEYVA-CORRAL, J. et al., *Polyphenolic compound stability and antioxidant capacity of apple pomace in an extruded cereal*. LWT - Food Science and Technology. 2016, **65**, 228-236.
44. CHANDRASEKAR, V. et al., *Optimizing microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from red delicious and jonatán apple pomace*. Journal of Food Process Engineering. 2015, **38**, 571–582.
45. YE, M., *Evolution of polyphenols and organic acids during the fermentation of apple cider*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2014, **94**(14), 2951–2957.
46. JAGTAP, UMESH B. a VISHWAS A. BAPAT. *Phenolic composition and antioxidant capacity of wine prepared from custard apple (Annona squamola L.) fruits*. Journal of Food Processing and Preservation. 2015, **39**, 175–182.
47. PECHOVÁ, M. *Stanovení vybraných fenolických látek v ovoci*. Hradec Králové, 2017. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.
48. *Český lékopis 2017*. Praha: Grada Publishing, 2017. ISBN 859-404-924-045-6.