



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

OBSAH PHLORIDZINU VE VYBRANÝCH ODRŮDÁCH JABLEK

PHLORIDZIN CONTENT IN SELECTED APPLE VARIETIES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Jana Křehlíková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1952/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Jana Křehlíková**
Studijní program: Chemie přírodních látek
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Obsah phloridzinu ve vybraných odrůdách jablek

Zadání diplomové práce:

- Zpracujte literární rešerši zabývající se problematikou autenticity potravinářských výrobků a využití specifických markerů pro ověření autenticity potravin.
- Vypracujte metodu pro stanovení phloridzinu v jablkách a v potravinách obsahujících jablka pomocí HPLC.
- Zjistěte obsah phloridzinu v různých odrůdách jablek.
- Ověřte možnost využití phloridzinu jako markeru pro prokázání přítomnosti jablečné složky v potravinách.

Termín odevzdání diplomové práce: 29.4.2024:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Jana Křehlíková
studentka

doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

Abstrakt

V této práci byl zkoumán obsah phloridzinu v jablcích a v potravinách obsahujících jablka. Pro analýzu phloridzinu byla použita technika HPLC. Cílem výzkumu bylo zhodnotit potenciál phloridzinu jako markeru pro potvrzení přítomnosti jablek v potravinách a řešit problémy pravosti potravin. Metodika zahrnovala optimalizaci metody pro přípravu vzorků s ohledem na výběr rozpouštědla a vliv kyslíku na stabilitu phloridzinu. Analýza odhalila významný rozdíl v obsahu phloridzinu mezi odrůdami jablek (Golden Delicious, Red Delicious, Granny Smith, Gala, Champion a Jonagold), v průměru byl obsah phloridzinu $17 \pm 10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Dále bylo analyzováno 16 ovocných produktů na obsah phloridzinu a 5 potravin bez deklarace přítomnosti jablečné složky. Phloridzin se ukázal jako účinný marker při zjišťování nedeklarované přítomnosti jablek v džemech, náplních a v ovocných pyré, což zvýrazňuje jeho potenciál pro ověření pravosti potravin s obsahem jablek. Ovocné nápoje a džusy však vykazovaly neprůkazné výsledky, což naznačuje potřebu vývoje metod přípravy vzorků a jejich analýzy.

Abstract

Phloridzin, a phenolic compound found in *Malus* genus, was targeted in this study for detection in apples and apple-based foods via HPLC. The research aimed to assess phloridzin's potential as a marker for confirming apple presence in food, addressing food authenticity concerns. The methodology encompassed method optimization for sample preparation, considering solvent selection and oxygen impact on stability. Analysis revealed significant phloridzin distribution among apple varieties (Golden Delicious, Red Delicious, Granny Smith, Gala, Champion, Jonagold), averaging $17 \pm 10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Further, 15 fruit products were surveyed for phloridzin content, with 5 non-apple-labelled foods also analysed. Phloridzin proved effective in detecting undeclared apple presence in jams, fillings, and fruit purees, highlighting potential for authenticity verification. However, fruit drinks and juices exhibited inconclusive results, suggesting a need for improved sample preparation and analysis methods.

Klíčová slova:

Phloridzin, HPLC, jablka, autenticita, marker

Key words:

Phloridzin, HPLC, apples, authenticity, marker

KŘEHLÍKOVÁ, Jana. *Obsah phloridzinu ve vybraných odrůdách jablek* [online]. Brno, 2024 [cit. 2024-04-17]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/155015>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Pavel Diviš.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

Poděkování

Děkuji vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Pavlu Divišovi Ph.D. za odborné vedení, konzultace a trpělivost.

OBSAH

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | ÚVOD | 5 |
| 2 | TEORETICKÁ ČÁST | 6 |
| 2.1 | Falšování a autenticita potravin | 6 |
| 2.1.1 | Legislativní požadavky na výrobky obsahující ovoce | 6 |
| 2.1.2 | Autenticita potravin obsahující jablko | 7 |
| 2.2 | Metody pro ověření autenticity produktu | 7 |
| 2.2.1 | A.I.J.N Code of Practice | 8 |
| 2.2.2 | Využití markerů pro ověření autenticity | 8 |
| 2.3 | Analytické techniky pro detekci phloridzinu | 10 |
| 2.3.1 | Stanovení a separace fenolických sloučenin | 10 |
| 2.3.2 | HPLC | 11 |
| 2.3.2.1 | Příprava vzorku | 13 |
| 2.4 | Alergie na jablka | 13 |
| 2.5 | Látky obsažené v jablcích | 14 |
| 2.5.1 | Fenolické látky | 15 |
| 2.5.1.1 | Osud fenolických látek v organismu | 17 |
| 2.5.1.2 | Účinek fenolických látek na lidské zdraví | 17 |
| 2.5.1.3 | Stabilita fenolických látek během skladování a zpracování jablek | 18 |
| 2.5.2 | Charakteristika phloridzinu | 19 |
| 2.5.2.1 | Biosyntéza phloridzinu v jablcích | 20 |
| 3 | PRAKTICKÁ ČÁST | 22 |
| 3.1 | Chemikálie | 22 |
| 3.2 | Přístroje, zařízení a pomůcky | 22 |
| 3.3 | Použitý materiál | 23 |
| 3.4 | Statistické zpracování dat | 23 |
| 3.5 | Vypracování metody pro stanovení phloridzinu | 24 |
| 3.5.1 | Testování extrakčních technik | 24 |
| 3.5.2 | Ověření efektu oxidace phloridzinu | 24 |
| 3.5.3 | Parametry pro HPLC–MS | 25 |
| 3.6 | Příprava kalibračních roztoků | 25 |
| 3.7 | Příprava reálných vzorků | 26 |
| 3.7.1 | Příprava vzorků jablek | 26 |
| 3.7.2 | Příprava vzorků potravin | 26 |

| | |
|--|----|
| 3.8 Stanovení vody titračně podle Karl–Fishera | 27 |
| 3.9 Stanovení sušiny sušením..... | 27 |
| 4 VÝSLEDKY A DISKUZE | 28 |
| 4.1 Stanovení sušiny podle Karl–Fishera..... | 28 |
| 4.2 Stanovení sušiny metodou sušení..... | 29 |
| 4.3 Vyhodnocení extrakčních metod..... | 30 |
| 4.4 Efekt oxidace phloridzinu..... | 31 |
| 4.5 Optimalizace podmínek pro analýzu | 32 |
| 4.6 Kalibrace HPLC-MS | 34 |
| 4.7 Obsah phloridzinu v různých odrůdách jablek..... | 35 |
| 4.8 Obsah phloridzinu v potravinách..... | 40 |
| 5 ZÁVĚR | 49 |
| 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ | 51 |
| 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ..... | 56 |
| 8 PŘÍLOHY | 57 |

1 ÚVOD

Jablka jsou jedním z nejčastěji konzumovaných plodů na světě. V roce 2011 podle statistik Organizace pro výživu a zemědělství byla světová produkce jablek přibližně 75 milionů tun. V České republice jsou jablka jedním z nejkonzumovanějších druhů ovoce, což potvrzuje i fakt, že z celkové roční spotřeby 87 kg ovoce na jednoho obyvatele představují jablka asi 25 kg, což je současně jedna z nejvyšších spotřeb na světě [1].

Z hlediska nutriční hodnoty, přestože obsahují především vodu, obsah prospěšných biologicky aktivních látek není zanedbatelný. Významnou skupinou jsou fenolické sloučeniny. Jsou významné nejen z nutričního hlediska, ale ovlivňují i hořkost a aroma potravin. Tyto látky vykazují významnou antioxidační aktivitu. Antioxidační aktivita má příznivé biologické účinky na zdraví člověka. Nejvýznamnějším zástupcem zmiňovaných sloučenin v jablkách je phloridzin. Z důvodu jeho vysokého zastoupení, lze tuto látku považovat za marker jablka. Je možné tedy předpokládat, že se phloridzin vyskytuje ve vyšších koncentracích ve všech potravinách obsahujících jablko.

Phloridzin se tedy začal využívat pro hodnocení autenticity potravin. Jablko totiž může sloužit jako náhražka za dražší druh ovoce, což poškozuje spotřebitele. Přidáváním jablek do potravin, které by jablka obsahovat neměla, může být spotřebitel vystaven i zdravotnímu riziku z důvodu rostoucího trendu výskytu alergií na jablko. Z toho důvodu se tato diplomová práce zabývá vypracováním metody pro stanovení phloridzinu pomocí HPLC a ověřením možnosti využití phloridzinu jako markeru pro prokázání přítomnosti jablečné složky v potravinách.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Falšování a autenticita potravin

Ověřování pravosti potravin je činnost, která v posledním desetiletí nabývá na významu. Falšování potravin a nápojů se stává stále větším problémem, který může potenciálně ohrozit zdraví spotřebitelů a integritu odvětví [2]. Odhaduje se, že falšování a padělání v potravinářském průmyslu stojí ročně 10 až 15 miliard USD [3].

Konkrétní způsoby falšování potravin jsou:

- *Záměna potravin za jinou levnější:* např. vydávání levnější odrůdy za dražší
- *Nastavování potravin levnější složkou:* příkladem může být náhrada dražších druhů ovoce levnějším (jablečné pyré namísto jahod, jablečná šťáva namísto dražších šťáv atd.), přídavky vody, cukru, kyselin a barviv do ovocných šťáv, nektarů, nápojů atp.
- *Přítomnost nedeklarovaných složek:* např. nedeklarované použití jiných druhů masa v masných výrobcích (koňského).
- *Nastavení nebo falšování potravin ke zlepšení jejich vlastností:* např. nedeklarované nebo nepovolené přibarvování (barvení výrobků z červeného ovoce).
- *Nedodržení deklarovaného technologického postupu:* např. vydávání rekonstituované šťávy z koncentráту za šťávu čerstvě lisovanou.
- *Uvádění vyššího než skutečného obsahu složky:* uvádění vyššího podílu ovoce, zeleniny, masa atp.
- *Nesprávné uvádění geografického původu nebo způsobu produkce:* např. označování obvyklé produkce na bio (organic).
- *Zneužití známe značky:* jde především o falešný prodej výrobku pod dražší obchodní značkou.
- *Uvádění nesprávného obsahu látek deklarovaných na obalu:* příkladem je uvedení vitamínů, chemických prvků, aminokyselin, cukrů atp.

2.1.1 Legislativní požadavky na výrobky obsahující ovoce

Vyhláška č. 248/2018 Sb. o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí Ministerstva zemědělství ČR upravuje kvalitu ovocných šťáv, nektarů a nápojů. V přílohách a v technických normách této vyhlášky jsou uvedeny fyzikální, chemické a senzorické požadavky na jakost ovocných a zeleninových šťáv, nektarů a nápojů [4].

Jako nektar mohou být označeny ovocné nápoje, které obsahují min. 25–50 % šťávy, dřeně nebo jejich směsi, v závislosti na druhu ovoce [1]:

1. ovoce s kyselou šťávou nevhodnou k přímé spotřebě (např. černý, červený a bílý rybíz, citrony a limety – min. 25 %, švestky jeřabiny – min. 30 %, maliny, meruňky, borůvky – min. obsah šťávy 40) [5];
2. ovoce s nízkým obsahem kyselin nebo vysokým podílem dřeně či aromatických látek, se šťávou nevhodnou k přímé spotřebě (min. obsah šťávy 25 % – např. banány, papája, mango, liči, granátová jablka) [1];

3. ovoce nebo zelenina se šťávou vhodnou k přímé spotřebě (min. obsah šťávy 50 % – jablka, hrušky, broskve, citrusové plody s výjimkou citronů a limet, ananas) [1].

Vyhláška č. 397/2021 Sb. upravuje kvalitu výrobků z ovoce, která stanovuje požadavky pro čerstvé ovoce a čerstvou zeleninu, zpracované ovoce a zeleninu atd. a výroky z nich [6]. Definiuje také řadu ovocných výrobků (džemy, marmelády, povidla apod.) a stanovuje vybrané požadavky na ně (např. minimální obsah přírodních sladidel v g/100 g vyjádřený jako refraktometrická sušina, kyselost jako kyselina citronová v %, minimální hmotnostní podíl ovoce g/kg) [6].

Pokud se zaměříme na legislativu z pohledu Evropské unie, základním pilířem potravinového práva je nařízení (ES) č. 178/2002, které stanovuje obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví postupy týkající se bezpečnosti potravin [7]. Dále také zřizuje evropský informační systém včasného varování pro potraviny a krmiva (RASFF). Ochrana zájmu spotřebitele je zakotvena v článku 8, jehož cílem je zabránit [7]:

- a) podvodným nebo klamavým praktikám
- b) falšování potravin
- c) jakýmkoliv jiným praktikám, které mohou spotřebitele uvést v omyl

Za zmínku stojí také nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1169/2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům z pohledu prevence falšování potravin. V tomto nařízení právě článek 7 pojednává o uvádění nezavádějících informací [8].

2.1.2 Autenticita potravin obsahující jablko

Nejčastěji jsou hlášené případy falšování ovocných šťáv především přidáváním kukuřičného sirupu s vysokým obsahem fruktózy nebo mícháním s jinými ovocnými šťávami [2]. Samotná jablka se hojně používají jako náhražka jiné ovocné složky v potravinách např. v džemech, ovocných šťávách, povidlech atp. Celkově výrobky z ovoce jsou častým předmětem falšování [5]. Nejvíce jsou vzhledem k objemům produkce falšovány ovocné šťávy [3]. Příkladem falšování přímo jablečného výrobku je známý případ z 80. let 20. století, kdy na výrobu „jablečné šťávy“ byla použita pouze směs cukerného sirupu, kyseliny jablečné, barviva a jablečného aromatu [1]. V současné době se neobjevují až tak extrémní případy falšování, ale je čím dál více nových a rafinovanějších způsobů.

2.2 Metody pro ověření autenticity produktu

Za zakladatele analytických postupů detekce falšování potravin je pokládán německý chemik Friedrich Accum, který od roku 1793 působil v Británii [1]. V roce 1820 vydal *Accum Treatise on Adulteration of Food* (Pojednání o falšování potravin), ve kterém odsuzoval používání chemických přísad do potravin [9].

Postupy a metody pro detekci falšování ovocích šťáv a výrobku můžeme rozdělit podle principů na [2]:

- Chemické a fyzikální markery autenticity (chromatografické, biologické a spektroskopické metody)
- Izotopové metody (SNIF–NMR a IRMS)
- Fingerprinting, profilování, metabolomika
- DNA analýza (identifikace druhu a odrůdy)

Nejběžnější postup identifikace falšování u ovocných šťáv, nektarů a nápojů vychází z analýzy vybraných kritérií chemických markerů, jejichž hodnoty se porovnávají s existujícími databázemi [5]. V Evropě se nejčastěji používá A.I.J.N Code of Practice Evropské asociace ovocných šťáv. Autentický produkt musí vyhovovat ve všech nebo většině sledovaných parametrů s ohledem na sezónní a regionální rozdíly [3]. Dalším postupem může být podezření na určitý způsob falšování (přídavek cukru, jiného druhu ovoce) a volba postupů a metod, které tuto hypotézu potvrdí nebo vyvrátí [3].

2.2.1 A.I.J.N Code of Practice

Udává požadavky na kvalitu, chemické a fyzikální složení vybraných ovocných a zeleninových šťáv. Evropská asociace ovocných šťáv reprezentuje zájmy zpracovatelů ovocných šťáv v zemích EU již více než 40 let [3]. Kodex nazvaný A.I.J.N Code of Practice zahrnuje 20 referenčních směrnic pro jednotlivé druhy ovoce a zeleniny [3].

Každá směrnice obsahuje tzv. absolutní požadavky na kvalitu, označované “A“ parametry, které musí splnit každý výrobek. Patří sem minimální požadavky na hustotu, refrakci, hygienické a bezpečnostní limity (obsah alkoholu, těžkých kovů, hydroxymethylfurfuralu, patulinu apod.) [3]. Parametry “B“ jsou doporučená kritéria pro hodnocení kvality a autenticity výrobků vyjádřená buď formou koncentračních rozsahů, nebo minimální, popř. maximální akceptovatelnou hodnotou spolu s doplňujícími informacemi např. případné možné odchylky [3].

2.2.2 Využití markerů pro ověření autenticity

Pro stanovení markerů autenticity se používají především klasické fyzikálně-chemické postupy (titrace, gravimetrie, spektroskopie), chromatografické a elektroforetické metody (HPLC, superkritická fluidní chromatografie, kapilární elektroforéza, plynová chromatografie), NIR spektrometrie, kryoskopie a enzymové metody [3].

Nejvýznamnějšími markery, kterými lze odhalit pravost ovocných šťáv a výrobků z ovoce jsou: refraktometrická sušina, hustota, kyseliny (jablečná, citronová), cukry, formolové číslo, popel, fosfor, draslík, hořčík, sodík, vápník, prolin, sacharóza (cukr), poměr glukóza/fruktóza (cukr), profil oligosacharidů (cukr), syntetická barviva, konzervační látky a kyselina fumarová (syntetická kyselina jablečná) [3].

Existují markery, které jsou charakteristické pouze pro daný druh (druhy) ovoce: sorbitol (např. jablka, hrušky, meruňky), kyselina isocitronová (např. jahody, pomeranče, meruňky), phloridzin (jablka), kyselina vinná (vinné hrozny), karotenoidy (např. pomeranče, meruňky), naringin (gřep), hesperidin (pomeranč, mandarinka), eriocitrin (citron), kyselina šikimová (např. mango), atd. [1]. Právě fenolické sloučeniny jako je phloridzin, jsou považovány za účinné chemotaxonomické markery a vhodný nástroj pro hodnocení pravosti potravin např. ovocných šťáv, džemů atd. [10].

Čížková uvádí, že u některých markerů se ukázalo, že jsou teoreticky ovlivnitelné recepturou, použitými surovinami či technologií výroby [5]. Obsah kyselin může být ovlivněn přidáním kyseliny citronové, která byla součástí receptury. Obsah kyselin je také ovlivněn stupněm zralosti ovoce. Také draselné kationty mohou být vneseny do finálního výrobku chloridem draselným či použitými konzervanty (sorban draselný) [3]. Je tedy nutné vždy důkladně zohlednit vše, co může ovlivnit chemické složení výrobku a zejména sledovaných parametrů.

Tabulka 1: Přehled základních markerů pro rychlý screening ovocné šťávy [3]

| Marker | Změna markeru | Pravděpodobný způsob falšování |
|------------------------------|--|--|
| Refraktometrická sušina | Zvýšení nebo snížení | Přislazení nebo ředění |
| Sacharóza, glukóza, fruktóza | Zvýšení nebo snížení nebo změna poměrů | Přislazení, jiný druh ovoce nebo ředění |
| Draslík | Snížení | Snížení ovocného podílu |
| Hořčík, vápník | Zvýšení | Pulp wash, kvalita vody, technologie |
| Formolové číslo | Snížení | Snížení ovocného podílu |
| Kyselina citronová | Zvýšení | Zamaskování naředění a přislazení |
| Kyselina jablečná | Snížení | Snížení ovocného podílu, jiný druh ovoce |

Pro odhad podílu jablečné šťávy je možné použít rovnici (1) [3]:

$$\text{Podíl jablečné šťávy [\%]} = \text{draslík} \times 33,3/1175 + \text{fosfáty} \times 33,3/200 + \text{popel} \times 33,3/2,5 \quad (1)$$

Tabulka 2: Přehled ovocných šťáv používaných k falšování šťáv z jiného druhu ovoce a možnosti průkazu [3]

| Původní šťáva | Přidávaná šťáva | Použitý marker | Použitá metoda k detekci zvoleného markeru |
|------------------------------------|----------------------------|-----------------------|---|
| Většina ovocných šťáv | Hrušková šťáva | Arbutin | HPLC/UV fenoly, protonová NMR |
| Většina ovocných šťáv | Jablečná šťáva | Phloridzin | HPLC/UV fenoly, protonová NMR |
| Citrusové šťávy, šťávy z bobulovin | Šťáva z granátového jablka | Sorbitol | Enzymový test, HPLC/UV |
| Citronová šťáva | Limetková šťáva | 7-methoxy-kumarin | HPLC/UV nebo MS |
| Citrusová šťáva | Citronová šťáva | Eriocitrin | HPLC/UV flavonoidy |
| Citrusová šťáva | Grapefruitová šťáva | Naringin | HPLC/UV flavonoidy |
| Maracuja | Pomerančová šťáva | Hesperidin | HPLC/UV flavonoidy |
| Ostatní šťávy | Hroznová šťáva | Kyselina vinná | HPLC/UV |

2.3 Analytické techniky pro detekci phloridzinu

2.3.1 Stanovení a separace fenolických sloučenin

Existují různé validované analytické metody pro extrakci a analýzu fenolických látek z jablek a jejich částí viz tabulka 3. [11]. Mezi běžné techniky používané pro stanovení fenolických látek patří kapalinová chromatografie (LC) spojená s hmotnostní spektrometrií (MS), ionizace elektrosprejem (ESI), LC/MS/MS, vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), nukleární magnetická rezonance (NMR), hmotnostní spektrometrie (MS), LC–UV a plynová chromatografie (GS/MS) [11]. Shalika a Shashi uvádí, že i chromatografické techniky, jako sefadexová chromatografie (Sephadex LH 20), vysokorychlostní protiproudá chromatografie (HSCCC) a chromatografie za využití superkritického oxidu uhličitého, je možné pro separaci fenolických látek použít [11]. Uvádí se, že pro separaci a purifikaci phloretinu z kůry jabloní lze použít preparativní vysokorychlostní protiproudá chromatografie [11]. Na separaci a identifikaci glykosidů quercetinu a phloretinu z jablečných slupek bylo také dosaženo pomocí systému HPLC/NMR/MS a fenolické látky lze analyzovat jejich derivatizací methylestery s využitím technik GC a GC/MS [11].

Dříve se také pro kvalifikaci celkového obsahu polyfenolů používala spektrofotometrická metoda např. Folin-Ciocalteuův test. Tento test však má určité omezení v podobě interference proteinů. Stanovení fenolických látek pomocí HPLC je ve srovnání s UV/VIS spektrofotometrem přesnější. Je to nejspolehlivější, nejrychlejší, nejpřesnější, nejcitlivější a nejužitečnější technika pro separaci a identifikaci fenolických látek [11].

2.3.2 HPLC

K analýze rostlinných vzorků s orientací na fenolické látky se nejčastěji využívá kapalinová chromatografie s použitím kolon naplněných reverzní stacionární fází [12]. Jedná se o jednoduchou, rychlou a reprodukovatelnou metodu [11]. Používané kolony jsou dlouhé 150–250 mm s vnitřním průměrem 2,1; 3,1 a 4,6 mm. Stacionární fázi tvoří nejčastěji částice silikagelu s navázanými uhlovodíkovými řetězci (C8, C18) [12]. Mobilní fáze je většinou tvořena směsí dvou kapalin. Jedna z kapalin je mírně kyselý vodný roztok (obsahující kyselinu octovou, mravenčí nebo trifluoroctovou) [12]. Slabě kyselé prostředí způsobí snížení ionizace analytů, a tím umožní zvýšit retenci polyfenolů v koloně, jelikož jsou slabě kyselé [12]. A druhá je organické rozpouštědlo, jako je acetonitril nebo methanol. Marchev a spol. uvádí, že nejvyšší výtěžnosti (90 % za použití extrakce na pevné fázi) dosáhli, při použití methanolu [13]. Naopak Kindt a spol. zmiňují, že methanol sice umožňuje nejrychlejší separaci fenolických látek, ale není možné dosáhnout dobrého rozlišení. Naopak acetonitril poskytl nejlepší rozlišení, ale doba separace je delší [14]. Kindt a spol. také zmiňují, že acetonitril nebyl schopný oddělit (+)-katechin a kyselinu chlorogenovou [14]. Ve většině případů se volí gradientová eluce [12].

Pro detekci se nejčastěji kombinuje DAD a fluorescenční (FLD) nebo MS detektory [12]. Méně častěji se využívají elektrochemické detektory [12]. DAD detektor je možné využít díky aromatickým kruhům ve struktuře těchto látek. FLD detektor lze využít u látek schopných nativní fluorescence, případně fluorescence po derivatizaci. Čím dál více se do popředí dostává hmotnostní spektrometrie, ale nevýhodou jsou vysoké náklady na přístrojové zařízení [12].

Tabulka 3: Přehled separačních podmínek [12]

| Stanovované látky | Materiál | Úprava vzorku | Typ kolony a stacionární fáze | Mobilní fáze | Detekce |
|---|---|---|---|--|-------------------|
| Kyselina gallová, kávová, syringová, chlorogenová, ferulová, skořicová, phloretin, phloridzin, katechin, kvercetin, epikatechin, prokyanidin B1 a B2, isorhamnetin, kyselina p-kumarová, kyselina hydroxybenzoová, 5-hydroxymethyl furfural | Jablečná šťáva Sušená jablka Čerstvé hrušky | Extrakce ethylacetátem | Aqua C18 (5 µm, 250 x 4,6mm) | A – CH ₃ COOH/H ₂ O B – CH ₃ COOH/H ₂ O/acetonitril | DAD MS |
| Kyselina chlorogenová, ferulová, phloretin, kyselina kumarová, kyselina kávová a skořicová, kvercetin, rutin, phloridzin | Jablka | Extrakce ethanolem v Ultrazvukové lázni | Luna C18 (5 µm, 250 x 4,6 mm) | A – CH ₃ COOH/H ₂ O B – CH ₃ COOH/H ₂ O/methanol | DAD |
| Kyselina chlorogenová, katechin epikatechin, kvercetin-3-O-ramnosid | Sušená jablka | Extrakce methanolem v ultrazvukové lázni Mikrovlnná extrakce | Zorbax Eclipse Plus C18 (5 µm, 150 x 4,6 mm) | A – HCOOH/H ₂ O B – Acetonitril | DAD |
| Kyselina chlorogenová, kávová, protokatechová, homovanilová, rutin, phloridzin | Jablka | Tlaková extrakce vroucí vodou | Ascentis Expres C18 (2,7 µm, 150 x 2,1 mm) | A – Mravenčan amonný/ H ₂ O B – methanol s HCOOH | DAD CAD ECD |

2.3.2.1 Příprava vzorku

Vzhledem k vysokému obsahu vlhkosti je vhodné jablečné tkáně před extrakcí vysušit buď lyofilizací, nebo sušením v sušárně, aby se zabránilo degradaci původních polyfenolických složek [11]. Sušení při vysokých teplotách (nad 60°C) však poškozuje většinu fenolických látek, a proto je třeba se tomu vyhnout [11]. Pro účinnou extrakci fenolických látek se využívají různá rozpouštědla. Například Rana a Bhushan pro extrakci použili aceton, methanol, ethanol a ethylacetát s různou polaritou. Příležitostně také využili k čištění techniku frakcionace rozpouštědel s použitím směsi rozpouštědel [11]. Aby se rozrušila silná vazba fenolických látek s makroživinami, jako jsou bílkoviny, doporučují metody, jako je urychlené rozpouštění (ASE – accelerated solvent extraction), ultrazvuk a mikrovlnnou extrakci [11]. Pro extrakci fenolických látek z jablečných výlisků byla účinně použita technika mikrovlnné extrakce (mikrovlnný výkon 650,4 W doba extrakce 53,7 s. koncentrace rozpouštědla 62,1 %) [11]. Pokud porovnáme extrakci kapalina-kapalina, pevná fáze a chromatografickou separaci, jako vhodnější se ukazuje extrakce pevnou fází [11]. V případě sušených jablečných výlisků se extrakce provádí při pokojově teplotě [11].

Hlavním problémem izolace a stanovení phloridzinu z přírodních zdrojů je komplexní obsah získaných extraktů. Podle Marcheua a spol. je extrakce kapalina-kapalina nevhodná metoda z důvodu malé výtěžnosti flavonoidů [13]. Aby bylo možné oddělit a identifikovat určité skupiny fenolických látek nebo jednotlivé sloučeniny z komplexních potravinových matric, je velmi často nutné izolaci řešit extrakcí na pevné fázi. Problémem této extrakce je nutnost hluboké znalosti struktury a vlastností pryskyřice a interakcí mezi adsorbentem a adsorbantem. Je potřeba také vzít v úvahu mnoho faktorů, jako přítomnost sacharidů, aminokyselin, teplotu, pH a možné vzájemné interakce fenolických látek [13].

2.4 Alergie na jablka

V současnosti existuje několik tisíc odrůd jablek [15]. Tyto odrůdy vznikly vegetativním množením jabloní (štěpování – očkování a roubování). Plody z vegetativně množných stromů jsou téměř totožné (obsahují stejné bílkoviny) a mají teoreticky stejný alergenní potenciál [15]. Asi 6,5 % Evropanů je citlivých (senzibilizovaných) na bílkoviny, které jsou v jablku [15]. U části z nich lze tuto alergii indentifikovat pouze pozitivním kožním testem nebo podle laboratorního výsledku, kdy mají zvýšený specifický “jablečný” imunoglobulin skupiny E (sIgE jablka) nebo jednotlivých bílkovin [15]. Ale pouze ti, kteří mají pozitivní alergologické vyšetření a zároveň mají reakci po konzumaci jablka, jsou skuteční potravinoví alergici.

Množství potenciálních alergenů v jablku závisí nejen na odrůdě, ale i na dalších proměnných, například na klimatických podmínkách, přítomnosti škůdců, plísní nebo parazitujících rostlin, stupni zralosti v době sklizně, způsobu skladování a na úpravě před podáním jablečného pokrmu nebo nápoje [15]. Některé jablečné alergeny ztrácí svůj potenciál při tepelném zpracování (vaření, pečení, zavařování, smažení), neboť jsou termolabilní [15]. Jablko obsahuje také odolné bílkoviny, které se nemění ani teplem ani enzymatickým štěpením – taumatin like protein, lipid transfer protein. Tyto alergeny způsobují celkové, vážné, alergické reakce [15]. Tyto vážné projevy alergie se častěji vyskytují u obyvatel na jihu Evropy. Zatímco na severu jsou lidé alergičtí na čerstvou jablečnou dužinu, lidé na jihu trpí alergií na slupku ve všech jejích podobách, ať už v syrovém nebo vařeném stavu [16].

2.5 Látky obsažené v jablcích

Jablka patří mezi nejvýznamnější ovocné zdroje polyfenolických sloučenin v západní stravě, jelikož jsou hojně konzumována a dostupná celý rok [17]. Obsahují, jako většina ovoce, především vodu. Následují sacharidy (zejména fruktóza, sacharóza a glukóza). Jablko obsahuje také mnoho bioaktivních látek např. vlákninu (především pektin a celulóza) a organické kyseliny (kyselina jablečná, v nižší koncentraci kyselina citrónová a salicylová) [18]. Přehledné složení plodu jablka je uvedeno v tabulce 4.

Tabulka 4: Látky obsažené v jablcích [5]

| Látky | Na 100 g jedlé části | Látky | Na 100 g jedlé části |
|---------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| Tuky [g] | 0,6 | Vitamin A [mg] | 6,0 |
| Bílkoviny [g] | 0,3 | Vitamin B1 [mg] | 0,04 |
| Sacharidy [g] | 11,4 | Vitamin B2 [mg] | 0,03 |
| Vláknina [g] | 2,0 | Vitamin B3 [mg] | 0,3 |
| Draslík [mg] | 122,0 | Vitamin B6 [mg] | 0,1 |
| Vápník [mg] | 7,0 | Kyselina listová [μg] | 7,5 |
| Hořčík [mg] | 6,0 | Vitamin C [mg] | 12,0 |
| Železo [mg] | 0,5 | Vitamin E [mg] | 0,5 |

Pozn. Obsah jednotlivých látek závisí na odrůdě. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty.

2.5.1 Fenolické látky

Fenolické látky jsou organické sloučeniny, které obsahují jeden nebo více aromatických kruhů nesoucí jeden nebo více hydroxylových substituentů. Jedná se také o jejich funkční deriváty (estery, methylethery, glykosidy atd.). Rostlinné fenoly (pokud nejsou zcela esterifikovány, etherifikovány nebo glykosylovány) jsou obvykle rozpustné v polárních rozpouštědlech [19]. Většina fenolických glykosidů je rozpustná ve vodě, ale odpovídající aglykony jsou obvykle rozpustné méně [19]. Až na několik výjimek rozpustnost ve vodě se zvyšuje s rostoucím počtem přítomných hydroxylových skupin [19]. Některé fenolické látky se také rozpouštějí v hydroxidu sodném a uhličitanu sodném [19]. V alkalickém prostředí se ale jejich oxidace zvyšuje, a proto by se zpracování alkalickými rozpouštědly mělo provádět buď pod N₂ atmosférou, nebo by se mělo této metodě raději vyhnout [19]. Fenolické látky s malým počtem hydroxylových skupin jsou rozpustné v etheru, chloroformu, ethylacetátu, methanolu a ethanolu [19]. K rozpouštění fenolových sloučenin se pro analytické účely používá methanol, ethanol, voda a směsi alkoholu a vody [19].

Fenolické sloučeniny jsou nutričně a organolepticky významné látky, které se nacházejí v ovoci. Ovlivňují hořkost a aroma potravin a přispívají k zakalení jablečných šťáv [10]. Rostlinné fenoly patří do skupiny sekundárních metabolitů a vykazují se významnou biologickou aktivitou [1]. Tyto fenolické látky jsou často uloženy na místech, kde zastávají signalizační i obrannou roli [1]. Zmiňované látky se obvykle hromadí v centrálních vakuolách epidermálních buněk, stejně jako v subepidermálních buňkách listů a výhonků [1]. Kromě toho některé fenolické látky jsou připojeny kovalentní vazbou na stěnu rostlinné buňky [1]. Některé studie se zmiňují o ukládání flavonoidů v jádrech buněk některých druhů stromů, kdy flavonoid–DNA komplex poskytuje vzájemnou ochranu před oxidativním poškozením [1].

Rozsáhlou skupinu fenolických látek tvoří flavonoidy, jejichž základní strukturou je flavan [20]. Flavonoidy jsou klasifikovány do několika skupin: katechiny, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavanonoly, flavony, flavonoly, anthokyanidiny a isoflavonoidy. Heterocyklický kruh C se může nacházet i v otevřené formě. Jedná se pak o chalkony a dihydrochalkony. Bylo popsáno více než 6000 těchto látek a toto číslo stále roste [21]. Množství dihydrochalkonů v rostlině se může lišit v závislosti na tkáni, odrůdě, vývojovém stádiu, době odběru a na vnějších faktorech jako je napadení patogeny [22]. V semenech jabloní se dihydrochalkonu nachází průměrně 66 %, v kůře 70–80 % a listech 80–90 % [22].

Polyfenoly přítomné v různých odrůdách jablek jsou téměř identické, ale liší se v jejich koncentraci. Mezi strukturální třídy polyfenolů přítomných v jablkách patří flavonoly (kvarcetin, kaempferol a rutin), dihydrochalkony (phloretin a phloridzin), flavan-3-oly (epikatechin a prokyanidiny) a fenolové kyseliny (kyselina kávová a kumarová) [11]. V listech jabloní se nachází fenolické sloučeniny jako 3-hydroxyphloridzin, phloridzin, kvarcetin-3-O-arabinosid a rutin. Tyto látky pocházejí z rostlinné aromatické dráhy, počínaje aminokyselinami šikimátové dráhy a konče molekulami produkovanými fenylpropanoidní a flavonoidní dráhou. Koordinovaná indukce–regulace těchto drah vede k produkci několika tisíc různých molekul. Přehled fenolických sloučenin nacházejících se v jablcích je vypsán v tabulce 5 a tabulce 6.

Z druhů rodu *Malus* bylo popsáno deset phloretinových derivátů [22]. Jsou to phloretin, phloridzin, trilobatin, 3-hydroxyphloretin, 3-hydroxyphloridzin, sieboldin, phloretin-2⁰-O-xyloglukosid, phloretin-2⁰-O-xylogalaktosid, 4-O-trans-p-kumaroyl-phloridzin a 4-O-cis-p-kumaroyl-phloridzin [22]. Poslední dva byly zjištěny pouze po ošetření inhibitorem dioxygenázy prohexydionem-Ca [22]. Kromě toho byl nalezen phloretin 2⁰,4⁰-O-giglukosid a 3-hydroxyphloretin-2⁰-O-xyloglukosid, ale pouze v extraktech jablečné šťávy [22].

Tabulka 5: Přehled fenolových kyselin v jablku [11]

| Fenolové kyseliny | | | |
|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------|
| hydroxybenzoová Kyseliny | syringová kyselina | hydroxyskořicová kyselina | káвовá kyselina |
| 4-p-kumarylchinová kyselina | 4-kafeyllchinová kyselina | ferulová kyselina | p-kumarinová kyselina |

Tabulka 6: Přehled flavonoidů v jablku [11]

| Flavonoidy | | | |
|-------------------------|---------------------------------|----------------------|------------------------------|
| Antokyaniny | Dihydrochalkony | Flavanoly | Flavonoly |
| kyanidin-3-O-arabinosid | 3-hydroxyphloretin-2-O-glukosid | katechin | quercetin-3-arabinopyranosid |
| kyanidin-3-O-galaktosid | phloridzin | epikatechin | quercetin-3-arabinofuranosid |
| kyanidin-3-O-xylosid | phloretin | prokyanidin B1 | quercetin-3-O-galaktosid |
| | phloretin-2-xyloglukosid | prokyanidin B2 | quercetin-3-O-glukosid |
| | | prokyanidin C1 | quercetin-3-O-rhamnosid |
| | | Prokyanidin-tetramer | quercetin-3-O-rutinosid |
| | | Prokyanidin-pentamer | quercetin-3-O-xylosid |
| | | | quercetin (aglykon) |

2.5.1.1 Osud fenolických látek v organismu

Hlavní místem resorpce fenolických látek je tenké střevo, kde hlavní roli hraje enzym laktáza-phloridzin-hydroláza (LPH) [23]. Tento enzym se přesněji nachází na vnější straně membrány kartáčového lemu enterocytů. Jeho působením vzniká z phloridzinu aglykon-phloretin, který se následně absorbuje stěvnou [23]. Tuto teorii potvrzuje studie, ve kterém byl myším perorálně podáván phloridzin a phloretin. Poté byl odebrán vzorek plasmy a byla provedena analýza pomocí HPLC. V plazmě myši krmených phloridzinem nebyl vlivem LPH (hydrolyzoval phloridzin ještě před absorpcí) phloridzin detekován. Naopak phloretin (v konjugované formě) se vyskytoval u myši jako krmených phloretinem i phloridzinem [24].

Masumoto a spol. zjišťoval účinek orálně podaného phloridzinu u diabetických myši [25]. Po podání bylo pozorováno snížení krevní glukózy [25]. Metodou HPLC byla také zjištěna plazmatická koncentrace phloretinu, phloridzinu a jejich metabolitů [25]. Konkrétně v plazmě byl phloridzin ve velmi nízké koncentraci a phloretin o koncentraci až 30krát vyšší [25]. Tato vysoká koncentrace nasvědčuje o přeměně phloridzinu na jeho aglykon a ten se následně absorbuje stěvnou. Phloridzin se absorbuje jen ve velmi malém množství [25].

2.5.1.2 Účinek fenolických látek na lidské zdraví

Bylo zjištěno, že konzumace jablek má pozitivní vliv na stárnutí a pokles kognitivních funkcí, regulaci hmotnosti, zdraví kostí, astma a funkce plic a zdraví trávicího traktu [11]. Většina těchto účinků je spojena s přítomností sekundárních metabolitů, jako jsou flavonoidy, isoflavonoidy, karotenoidy, fenolové kyseliny a dietní vláknina [11].

Fenolické látky se řadí mezi látky s antioxidační aktivitou. Tato aktivita je závislá na struktuře jednotlivých látek, zejména na počtu a pozici hydroxylových skupin a typu substitucí a aromatických kružích [12]. Antioxidační aktivita má příznivé biologické účinky na zdraví člověka. Rozhodující je jejich schopnost působit již v malých koncentracích na intracelulární úrovni a zpomalit nebo narušit nežádoucí oxidační reakce. Přírodní antioxidanty mají schopnost eliminovat negativní účinky způsobené volným radikálem v krvi. Inhibují oxidaci lipidů tím, že reagují s hyperoxidovým volným radikálem a vzniká tak málo reaktivní hyperoxid, čímž se přeruší řetězová radikálová reakce [20]. Antioxidanty také ovlivňují i procesy regulace krevního tlaku a hladiny glukózy v krvi [20]. Mají i protinádorové, antimikrobiální a protizánětlivé vlastnosti [20].

Rana a Bhushan uvádí, že hlavním zdrojem fenolických látek neboli antioxidantů jsou právě jablka [11]. Zmiňují také, že dřívější výzkumy ukázaly, že jablečná šťáva a její produkty fermentované ve střevech působí jako účinný antioxidant proti karcinomu tlustého střeva buněčné linie Caco-2 [11]. Uvádí se také, že inhibují proliferaci lidských buněk rakoviny jater HepG2 [11]. Výzkumy prokázaly tento účinek na extraktu z jablečných slupek o koncentraci $12,4 \pm 0,4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ [11]. Bylo také zjištěno, že antioxidační aktivita je vyšší ve slupce než v dužině jablka, což je pravděpodobně způsobeno vysokým obsahem fenolických látek ve slupce. Studie ukazují, že příjem flavonoidů snižuje riziko kardiovaskulárních onemocnění, působí protizánětlivě, redukuje hladinu triglyceridů v krvi a lipoproteinů s nízkou hustotou, snižuje také rizika karcinogeneze [11]. Kromě toho se phloridzin podílí na mnoho fyziologických procesů, jako je zesílení buněčných stěn a ochrana před oxidačním stresem [11].

Phloridzin se uplatňuje zejména při glykémii [20]. Různé studie zmiňují jeho anti-hyperglykemickou aktivitu u myší [20]. Rovněž byla provedena studie u dobrovolníků, u kterých byl sledován efekt phloridzinu na snížení krevní glykémie [20]. Po provedení orálního glukózového tolerančního testu (OGTT) se současným podáváním phloridzinu bylo zjištěno významné snížení glykémie [20]. Tyto studie poukazují na významnou schopnost phloridzinu snižovat postprandiální glukózu a zlepšit tak zdraví pacientů s diabetem [20].

2.5.1.3 Stabilita fenolických látek během skladování a zpracování jablek

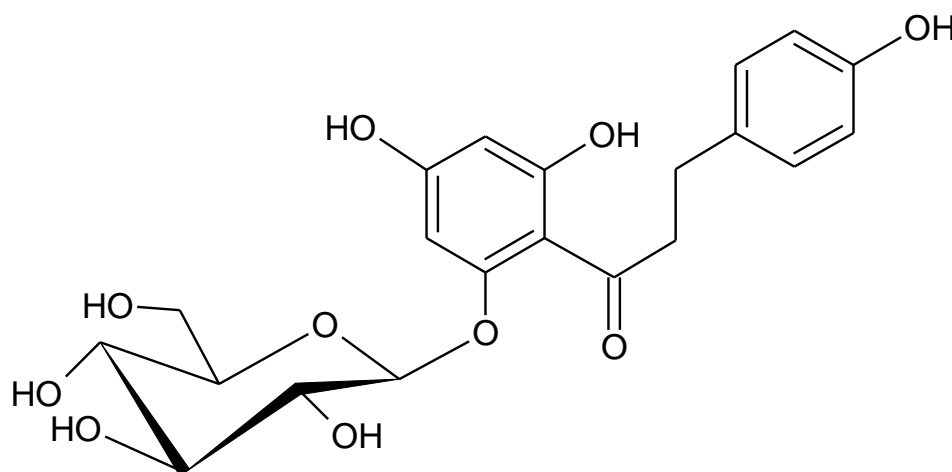
Variabilita polyfenolů je ovlivněna odrůdou, fází zrání, vegetačním obdobím, faktory prostředí, zeměpisnou oblastí, výrobními postupy a podmínkami skladování [26]. V literatuře se výsledky ohledně vlivu skladování na obsahu fenolických látek poměrně liší, a to právě z důvodu analyzování rozdílných odrůd jablek. Carbone a spol. studovali vliv genotypu, typu tkáně a skladování v chladu na bioaktivní látky různých odrůd jablek (Golden klon B, Fuji klon Kiku8 a Braeburn klon Hillwell) [26]. Autoři prokázali, že celkový obsah fenolů se po skladování v chladu (1 °C po dobu tří měsíců) dramaticky snížil v dužnině (o 50 %) a slupkách (o 20 %) jabloně Hillwell, ale ne u ostatních odrůd [26]. Phloridzin podléhá také degradaci po napadení jablka houbami. Hrubá a spol. zmiňují, že phloridzin je houbami přeměňován na phloretin, floroglucinol a kyselinu floretovou. Kyselina floretová se následně přeměňuje na kyselinu p-hydroxybenzoovou [10].

Komplexnější výsledky zjistili Begić–Akagić a spol. Tito autoři prokázali, že obsah fenolických látek v jablkách v závislosti na době skladování (60 dní při 1 °C) mírně klesá u tří běžných odrůd jablek (Topaz, Pinova a Pink Lady) a tří autochtonních odrůd jablek (Ruzmarinka, Ljepocvjetka a Paradija) z Bosny a Hercegoviny [26]. Skladováním při pokojové teplotě (20 °C po dobu dvou týdnů) se prokázalo, že obsah fenolů v jablkách odrůd Golden Delicious, Pinova, Mairac a Honey crisp se nezměnil a u odrůdy Wellant byl dokonce pozorován nárůst obsahu těchto látek [26]. U odrůdy Topazin byl naměřen výrazný pokles obsahu fenolů (o 50 %) ve srovnání s obsahem naměřeným při sklizni [26].

Během zpracování jablek, dochází také k výrazným ztrátám fenolických látek [26]. Při procesu čiření jablečných šťáv se odstraňují zejména (–)-epikatechin a prokyanidiny [26]. Naopak v zakalených šťávách se tmavé produkty oxidace ze šťávy neodstraňují. Po zpracování se jablečná šťáva obvykle skladuje. Skladování jablečné šťávy při pokojové teplotě (25 °C) po dobu devíti měsíců vedlo k 60% ztrátě kvercetinu a celkové ztrátě prokyanidinů, a to navzdory skutečnosti, že polyfenoly jsou v ovocných šťávách stabilnější než vitamin C [26].

2.5.2 Charakteristika phloridzinu

Phloridzin je flavonoid, který byl poprvé izolován De Koninckem z kůry jabloní v roce 1835 [22]. Phloridzin patří do chemické třídy fenyylpropanoidů, dihydrochalkonů, na které je v poloze 2' navázána β -D-glukopyranosa (Obrázek 1) [22]. Dihydrochalkony jsou charakterizovány přítomností dvou benzoových jader, které jsou spojeny tříuhlíkatým řetězcem. Na rozdíl od chalkonů, se zde vyskytuje redukováná dvojná vazba. Aglykon phloridzinu se nazývá phloretin. Phloridzin je přítomen u všech druhů *Malus*, ale u *Malus trilobita* je zcela nahrazen trilobatinem, zatímco druhy ze skupiny Sieboldiana (např. *Malus sieboldii*) obsahují kromě phloridzinu také sieboldin [22]. Trilobatin a sieboldin nebyly nalezeny společně u stejných druhů [22]. Distribuce phloridzinu v jablkách silně závisí na odrůdě jablek [10]. Velké rozdíly jsou také v různých tkáních jablek – slupka, dužina a jádřinec. Nejvyšší koncentrace byly nalezeny v semínkách jablek [10]. Značnou dobu přetrvával předpoklad, že se phloridzin vyskytuje pouze v jablcích. Následný výzkum však ukázal, že phloridzin byl nalezen i v některých dalších rostlinách (jahody, brusinky, oregano a růže šípková) [10]. Obsah phloridzinu v jiných druzích technologicky významného ovoce není však v tak vysokých koncentracích jako v jablkách.



Obrázek 1: Struktura phloridzinu

Existuje omezený počet studií, které porovnávají ekologicky a konvenčně pěstovaná jablka [27, 28, 29]. Nedávná studie s jablky Golden Delicious pěstovanými ekologicky a konvenčním způsobem zjistila relativně podobný celkový obsah polyfenolů [30]. Valavanidis a spol. uvádějí, že nezjistili žádné rozdíly mezi ekologicky a konvenčně pěstovanými jablky, pokud jde o koncentrace phloridzinu [31]. Jablka obou typů postupů zemědělské produkce pečlivě vybírali tak, aby odpovídaly oblasti, regionu (sousední farmy) a dnu nákupu, který byl do týdne od sklizně [31]. Hecke a spol. naopak zmiňují, že obsah fenolů je u ekologicky pěstovaných odrůd mnohem vyšší, než u odrůd pěstovaných komerčně [30]. V článku není ale zmíněno, zda stanovovali i obsah samotného phloridzinu. Jak je zmíněno výše, obsah phloridzinu v různých odrůdách je odlišný a Hecke a spol. neanalyzoval stejnou odrůdu jablek, která by byla pěstovaná jak komerčně, tak i ekologicky. Jejich závěry tedy neprokazují, že pokud je jablko pěstováno ekologicky, má vyšší obsah fenolických látek konkrétně phloridzinu.

Domnělá úloha phloridzinu a jeho vedlejších produktů pro jabloně je sporná. Hunter a Lorry zmiňují, že se o nich uvažuje jako o konečných produktech metabolismu, represorech auxinů, kofaktorech zakořenění, antibakteriálních, fungicidních a anti-herbivorních látkách [33]. Gosh a spol. také zmiňují předpoklad, že se phloridzin podílí na odolnosti jablek vůči patogenům [22]. Podíl phloridzinu a jeho derivátů na odolnosti jablek vůči různým patogenům je však sporný, protože jeho obsah ne vždy koreluje se stupněm odolnosti různým odrůd jabloní [22]. Bylo prokázáno in vitro, že aglykon phloretin inhibuje růst *Venturia inaequalis* (strupovitost jablek) [22]. Zjistili se také silné fungicidní účinky phloridzinu a phloretinu na růst mycelia *Phytophthora cactorum* (korunová hniloba jabloní) [22]. Akumulace phloridzinu byla zjištěna v kůře jabloní infikovaných *P. cactorum* nebo v listech infikovaných *V. inaequalis* [22].

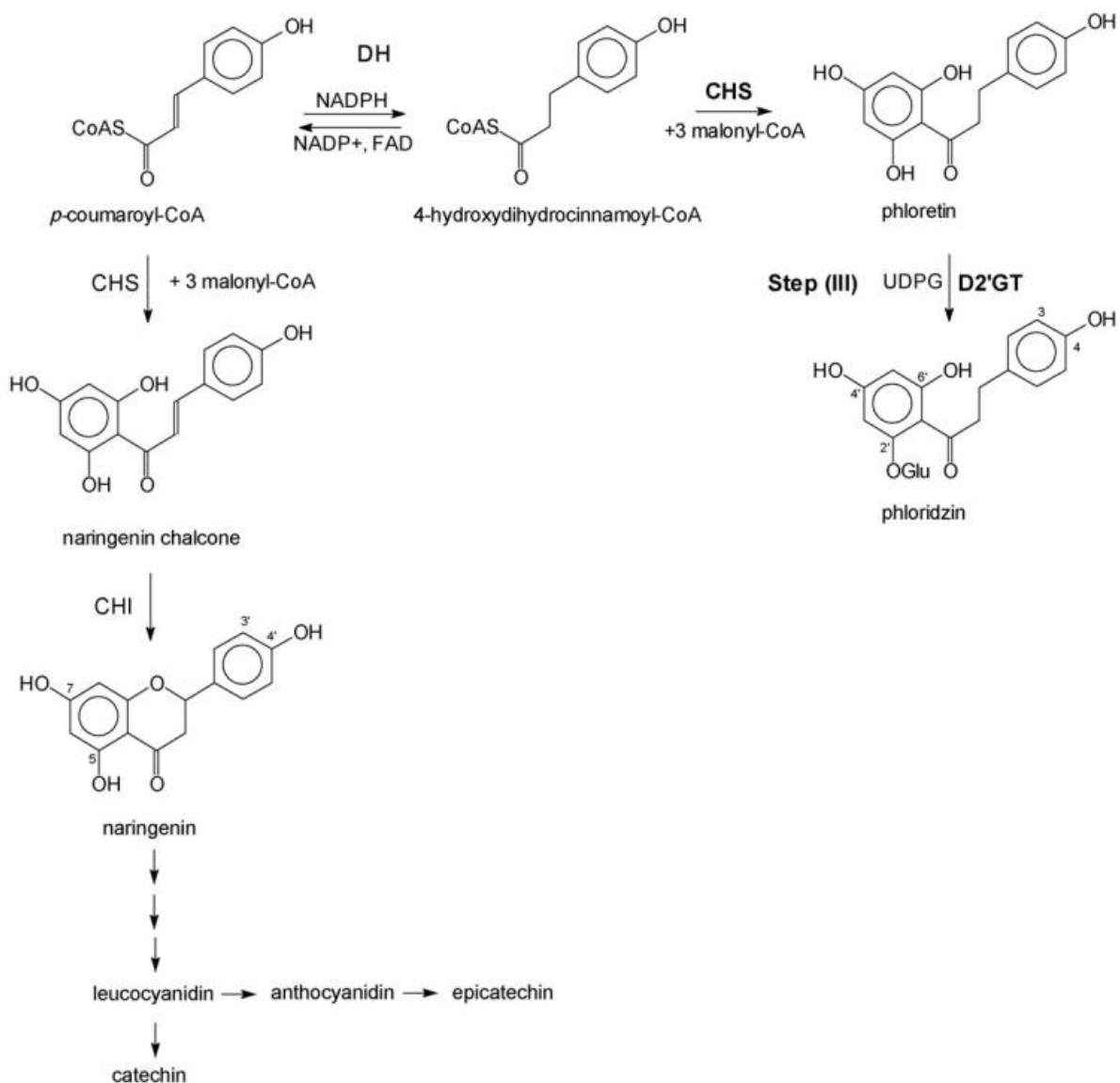
Gosh a spol. taktéž zmiňují antimikrobiální účinek phloretinu a 4-O-*cis-p*-kumaroyl-phloridzinu proti bakterii *Erwinia amylovora*. [22]. Muthuswamy a Rupasinghe prokázali, že phloridzin vykazuje antimikrobiální účinky proti patogenním bakteriím [22]. Naproti tomu Hunter, Noveroske a spol. a Raa nezjistili žádnou korelaci mezi obsahem phloridzinu a rezistencí vůči strupovitosti jabloní. Podle Picinelli a spol. je pro odolnost proti strupovitosti rozhodující poměr phloridzinu a flavanolu, což do jisté míry potvrdily i výsledky Mikulic–Petkovšek a spol [22]. U náchylných odrůd jabloní byl zjištěn vyšší poměr phloridzin/flavanol. Na rozdíl od Huntera, Noveroske a spol. i Raa označili oxidační produkty phloridzinu jako antimykotické [22]. Bylo také prokázáno, že phloridzin a phloretin inhibují klíčení spor posklizňové hniloby plodů jabloní *Phlyctaena vagabunda* při koinkubaci s polyfenoloxidázou [22].

2.5.2.1 Biosyntéza phloridzinu v jablech

Biosyntéza phloridzinu byla zkoumána teprve nedávno pomocí rekombinantních enzymů a extraktů rostlinných proteinů a zahrnovala NADPH–dependentní dehydrogenázu, chalkon-syntázu a UDP-glukoza:phloretin-2'-O-glykosyltransferázu [22]. Zatímco biosyntéza chalkonů a flavonoidů je na enzymové a genové úrovni dobře známa, biosyntéza phloridzinu byla objasněna a popsána až mezi roky 2008–2010 Goschem a spol. [22, 34].

Melonyl-CoA je syntetizován z acetyl-CoA, zatímco *p*-kumaroyl-CoA vzniká z fenylalaninu, který je produkován šikimátovou cestou [22]. Fenylalanin-amoniak-lyáza katalyzuje tvorbu cinnamátu (kyselina skořicová) z fenylalaninu a označuje bod rozvětvení mezi primárním metabolismem a polyfenolyckými sloučeninami souvisejícími se cinnamátem [22]. Cinnamát je dále hydroxylován enzymem cinnamát-4-hydroxyláza a aktivován ligázou hydroxycinnamát:CoA, čímž vzniká *p*-kumaroyl-CoA (4-hydroxycinnamoyl-CoA) [22]. Jeho kondenzací s třemi molekulami maloyl-CoA vniká naringeninový chalkon [22]. Tato reakce je katalyzována enzymem chalkon-syntáza (CHS) [22].

Zatímco *p*-kumaroyl-CoA je prekurzorem chalkonu naringeninů a dalších flavonoidů, *p*-dihydrokumaroyl-CoA je nutný pro biosyntézu dihydrochalkonů jako je phloretin [22]. *P*-dihydrokumaroyl-CoA kondenzuje se třemi molekulami malonyl-CoA a vzniká právě phloretin [22]. Posledním krokem reakce je glykosylace phloretinu za účasti phloretin-2'-O-glykosyltransferázy (P2'GT) a produktem je phloridzin [22]. Vysoká podobnost *p*-kumaroyl-CoA a *p*-dihydrokumaroyl-CoA vedla k předpokladu, že chalkon-syntáza může využívat oba substráty se třemi molekulami malonyl-CoA za vzniku naringeninového chalkonu, resp. phloretinu [22]. Nebyla zjištěna žádná substrátová preference – alespoň u různých rekombinantních chalkonsyntáz z jabloně, což naznačuje, že tvorbu dihydrochalkonů katalyzuje běžná chalkonsyntáza, a nikoli specializovaný enzym s odlišnou substrátovou specifitou [22].



Obrázek 2: Syntéza phloridzinu v jablku [22]

3 PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Chemikálie

- standard phloridzinu (phloridzin dihydrate, 99 %) od firmy Sigma–Aldrich (Praha, Česká republika)
- methanol (v LC kvalitě, 99,8 %) od firmy LiChrosolv® (Darmstadt, Německo)
- methanol (v LC–MS kvalitě, $\geq 99,9$ %) od firmy Fisher Scientific (USA)
- acetonitril (v LC–MS kvalitě, $\geq 99,9$ %) od firmy Fisher Scientific (USA)
- kyselina mravenčí (99–100 %) od firmy VWR International (USA)
- ultračistá voda (VWR International, USA)
- hydranal Titrant 5 (Honeywell)
- hydranal Water Standard (Honeywell)
- hydranal – Solvent (Honeywell)

3.2 Přístroje, zařízení a pomůcky

- analytické váhy
- ultrazvuk
- kapalinový chromatograf (Agilent 1260 Infinity, Agilent Technologies)
 - čerpadlo – 1260 Infinity Quaternary Pump
 - autosampler – 1260 Infinity Autosampler
 - kolona HPLC (Kinetex® 2.6 μm F5 100 Å, LC Column 150 x 4.6 mm)
 - kolona HPLC (Kinetex® 5 μm EVO C18 100 Å, LC Column 250 x 4.6 mm)
 - termostat kolony – 1290 Infinity Thermostat
 - detektor – 1260 Infinity Diode Array Detector
 - MS detektor – Agilent InfinityLab LC/MS iQ
 - analyzátor: Single quadrupole
 - ionizace: ESI
- Karl–Fisher titrátor 701 KF Terino s 703 Ti Stand (Methrohm)
- běžné laboratorní sklo
- injekční stříkačky (BD Discardit)
- stříkačkové filtry CHS s velikostí pórů 0,45 μm Nylon (Chromservis)
- skleněné vialky a víčka (Agilent Technologies, 2 ml)
- plastové struhadlo
- elektrický mixér Sencor
- keramický nůž

3.3 Použitý materiál

- Vzorčky jablek:
 - jablko odrůda Golden Delicious (země původu Česká republika)
 - jablko odrůda Gala (země původu Česká republika)
 - jablko odrůdy Red Delicious (země původu Česká republika)
 - jablko odrůdy Granny Smith (země původu Itálie)
 - jablko odrůdy Jonagold (země původu Česká republika)
 - jablko odrůdy Champion (země původu Polsko)

Vzorčky ovocných nápojů:

- Albert Čerstvá šťáva jablko (100 % jablek)
- Nature's promise kids kids 100% mošt, jablko
- Albert 100% ovocná šťáva jablko a meruňka (69,2 % jablečná šťáva, 21,2 % meruňkové pyré, 9,6 % jablečná dřevina)
- Relax Ovocný nápoj pomeranč (pomerančová šťáva z koncentrátu 30 %)
- Relax Ovocný nápoj jablko, aronie, višň, lesní jahoda (jablečná šťáva z koncentrátu 25 %, šťáva z aronie z konc. 3,5 %, višňová šťáva z konc. 1 %, šťáva z lesních jahod z konc. 0,5 %)
- Relax Ovocný nápoj jablko (jablečná šťáva z koncentrátu 30 %, Relax)
- RIO Stévie jablko, jablečný nápoj (jablečná šťáva z koncentrátu 40 %, jablečné pyré 4 %)
- Pfanner B, C, E ovocný nápoj s chutí lesních plodů (podíl ovocné složky nejméně 30 %, jablko, hroznové víno, aronie, černý rybíz, bezinka, jahoda, malina, borůvka, ostružina)
- Pevné vzorky potravin:
 - Hamé Meruňka a jablko, ovocná směs (25 % jablek, 15 % meruňky, Hamé)
 - Nature's Promise Bio Meruňkový výběrový džem (55 % meruňky)
 - Hamé Extra džem ostružinový (50 % ostružiny)
 - Hamé Povidlová náplň se skořicí s vůní rumu (170 g švestek na 100 g výrobku)
 - HELLO Ovocná přesnídávka s jablek (85 % hm jablečná dřevina)
 - HELLO Ovocná přesnídávka s meruňkami (63 % hm jablečná dřevina, 22 % hm meruňková dřevina)
 - HELLO Ovocná přesnídávka s jahodami (65 % hm. jablečná dřevina, 20 % hm. jahodová dřevina)
 - HiPP BIO Meruňky (46 % meruňky, příkrm)
 - domácí jablečná přesnídávka s přísadkou malin

3.4 Statistické zpracování dat

Všechny naměřené hodnoty byly zpracovány pomocí programu MS Excel, kde byly používány funkce PRŮMĚR a SMODCH.VÝBĚR.S. Výsledky vzorků po analýze HPLC byly statisticky vyhodnocovány pomocí programu MS Excel jednofázovým ANOVA s Tukey HSD testem.

3.5 Vypracování metody pro stanovení phloridzinu

3.5.1 Testování extrakčních technik

Pro stanovení nejvhodnější metody extrakce byly vybrány 4 vzorky:

- standard phloridzinu (dihydrát)
- jablko, odrůda Golden Delicious
- vzorek Albert Čerstvá šťáva jablko
- vzorek domácí jablečné přesnídávky s přídavkem malin

Po prostudování literatury byl jako rozpouštědlo nejprve zvolen ethylacetát [12, 35]. Na analytických vahách bylo odváženo 0,250 g standardu phloridzinu s přesností na čtyři desetinná místa. Vzorek byl kvantitativně převeden do odměrné baňky (o objemu 25 ml) a doplněn ethylacetátem po rysku. Pro účinnější rozpuštění byla baňka vložena na 1 min do ultrazvukové lázně. Takto připravený roztok byla následně naředěn do vialky – 100 μ l roztoku vzorku a 900 μ l ethylacetátu. Vzorek byl poté změřen přístrojem HPLC–MS. Ethylacetátem byl také 1:1 ředěn vzorek Albert Čerstvá šťáva jablko. Tento vzorek se však nepodrobil HPLC–MS analýze z důvodu použití nevhodného rozpouštědla.

Druhé použité rozpouštědlo pro stanovení způsobu extrakce byl methanol [10, 12, 31, 36]. Extrakční metoda za použití methanolu probíhala u standardu totožně jako u předchozího rozpouštědla. Methanol byl použit i u vzorku domácí jablečné přesnídávky, kde bylo do kádinky na analytických vahách naváženo 2,5 g přesnídávky a přidáno 25 ml methanolu. Jablko odrůdy Golden Delicious bylo omyto vodou, nakrájeno a byl odstraněn jádřinec. Jablko (i se slupkou) bylo nastrouháno do petriho misky. Do kádinky byly odváženy přibližně 2 g nastrouhaného jablka a přidáno 10 ml methanolu.

Veškeré vzorky kromě standardu byly umístěny na vícemístnou magnetickou míchačku a v závislosti na čase byly vzorky míchány za laboratorní teploty. Po uplynutí určitého času byly vzorky převedeny do injekčních stříkaček se stříkačkovým filtrem a přes filtr dále převedeny do vialek. Vzorky byly poté měřeny přístrojem HPLC–MS. Vzorek džusu byl také analyzován bez použití výše zmíněných rozpouštědel. Vzorek džusu byl přefiltrován přes stříkačku s filtrem. Přefiltrovaný vzorek byl následně ředěn 1:1 s destilovanou vodou tak, že do vialky bylo napipetováno 500 μ l přefiltrovaného vzorku a 500 μ l destilované vody.

3.5.2 Ověření efektu oxidace phloridzinu

Jablka odrůdy Golden Delicious, Gala a Champion byla vložena do dusíkového vaku, kde byla rozpůlena pomocí keramického nože a byly odstraněny jádřince. Půlka jablka byla následně zpracovávána bez přítomnosti kyslíku v dusíkovém vaku a druhá půlka při standardních laboratorních podmínkách za přítomnosti O₂. Každá půlka jablka byla nastrouhána a odvážena do třech kádinek (tabulka 7). Postup extrakce byl totožný jako ten z předchozí kapitoly za použití methanolu jako rozpouštědla s jediným rozdílem, že v dusíkovém vaku byly vzorky odvažovány za použití předvážek s přesností na dvě desetinná místa. Veškeré vzorky byly následně přefiltrovány do vialek a byla provedena HPLC–MS analýza.

Tabulka 7: Navážky vzorků extrahovaných za přítomnosti kyslíku a v dusíkové atmosféře

| Golden delicious [g] | | Gala [g] | | Champion [g] | |
|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| N ₂ atm. | O ₂ atm. | N ₂ atm. | O ₂ atm. | N ₂ atm. | O ₂ atm. |
| 2,74 | 2,3531 | 2,58 | 2,3570 | 2,58 | 3,0054 |
| 2,20 | 2,0543 | 2,47 | 3,1869 | 2,35 | 2,8323 |
| 2,31 | 2,1006 | 2,29 | 2,9052 | 3,32 | 2,8679 |

Pozn. N₂ atm. je označení pro přípravu vzorku v dusíkové atmosféře (váženo na předvážkách). O₂ atm. je označení pro standardní laboratorní podmínky, působení kyslíku na vzorek (váženo na analytických vahách).

3.5.3 Parametry pro HPLC–MS

Jednotlivé parametry analýzy byly testovány na vzorcích:

- standard phloridzinu (dihydrát)
- jablko, odrůda Golden Delicious
- vzorek Albert Čerstvá šťáva jablko
- vzorek domácí jablečné přesnídávky s přídavkem malin

Byly testovány různé stacionární a mobilní fáze:

1. kolona Kinetex® 2.6 μm F5 100 Å, LC Column 150 x 4.6 mm. Mobilní fáze obsahovala 0,1% kyseliny octovou, vodu (rozpuštědlo A) a acetonitril (rozpuštědlo B). Eluční gradient: 0 min: 90 % A, 3 min: 90 % A, lineární klesání do 25 min: 70 % A, Lineární pokles do 30 min: 60 % A, 30,01 min: 60 % A.
2. kolona Kinetex® 5 μm EVO C18 100 Å, LC Column 250 x 4.6 mm. Mobilní fáze obsahovala 0,1% kyseliny mravenčí, vodu (rozpuštědlo A) a acetonitril (rozpuštědlo B). Eluční gradient: 0 min: 90 % A, 3 min: 90 % A, lineární klesání do 25 min: 50 % A, lineární růst do 30 min: 90 % A, 30,01 min: 90 % A.

3.6 Příprava kalibračních roztoků

Jako standardní vzorek byl použit phloridzin (dihydrát) od značky Sigma Aldrich (≥ 99 %). Nejprve bylo na analytické váze naváženo 0,0250 g standardního vzorku phloridzinu. Toto množství bylo následně kvantitativně převedeno do odměrné baňky (25 ml) a doplněno methanolem po značku, aby vznikl zásobní roztok. Tento zásobní roztok o koncentraci 1000 mg·l⁻¹ byl rozředěn na koncentraci 100 mg·l⁻¹; 10 mg·l⁻¹; 1,0 mg·l⁻¹ a 0,1 mg·l⁻¹. Tyto čtyři roztoky byly následně převedeny do vialek, uzavřeny víčkem a změřeny přístrojem HPLC–MS. Po analýze prvních vzorků, byl zjištěn koncentrační rozsah a byly připraveny nové kalibrační roztoky o koncentraci: 10 mg·l⁻¹; 5,0 mg·l⁻¹; 1,0 mg·l⁻¹ a 0,1 mg·l⁻¹.

3.7 Příprava reálných vzorků

3.7.1 Příprava vzorků jablek

Jablka byla omyta vodou, nakrájena na menší části a byly odstraněny jádřince. Vzorky byly rozmělněny (struhadlem nebo mixérem). Rozmělněné vzorky jablek byly naváženy do kádinek s přesností na dvě desetinná místa (navážky tabulka 8). Do kádinek bylo přidáno 10 ml methanolu z odměrného válce. Veškeré kádinky byly zadělány parafilmem. Extrakce probíhala přibližně 30 min na magnetických míchačkách. Vyextrahované vzorky byly přefiltrovány přes stříkačku s filtrem do vialek. Celá tato příprava již probíhala bez přítomnosti kyslíku v dusíkovém vaku.

Tabulka 8: Navážky jednotlivých vzorků jablek extrahovaných v dusíkové atmosféře

| Golden Delicious [g] | Gala [g] | Red Delicious [g] | Granny Smith [g] | Jonagold [g] | Champion [g] |
|-------------------------|-------------|----------------------|---------------------|-----------------|-----------------|
| 2,74 | 2,58 | 2,33 | 1,93 | 2,16 | 2,58 |
| 2,20 | 2,47 | 2,62 | 1,82 | 1,95 | 2,35 |
| 2,31 | 2,29 | 2,62 | 2,35 | 2,63 | 3,32 |

3.7.2 Příprava vzorků potravin

V rámci stanovení obsahu phloridzinu byly analyzovány vzorky potravin deklarující obsah jablek a potraviny, které by jablko podle deklarace neměly obsahovat. Méně tekuté vzorky jako jsou marmelády, povidla i přesnídávky byly odváženy do kádinek s přesností na 4 desetinná místa viz tabulka 9 a bylo přidáno 10 ml methanolu. Do kádinek bylo následně přidáno míchadlo a kádinky byly zadělány parafilmem. Vzorek byl míchán na míchače 30 min. Po uplynutí času byly vzorky přefiltrovány pomocí stříkačky s filtrem do vialky a byly analyzovány pomocí HPLC–MS. Veškeré tekuté vzorky, jako ovocné nápoje, džusy a mošty, byly ředěny destilovanou vodou v poměru viz tabulka 10.

Tabulka 9: Navážky jednotlivých vzorků potravin

| Vzorek | Navážka [g] |
|--|-------------|
| Meruňka a jablko, ovocná směs | 3,0384 |
| Meruňkový výběrový džem Bio | 3,0547 |
| Extra džem oSTRUŽINOVÝ | 3,0598 |
| Ovocná přesnídávka s jablky | 2,8148 |
| Ovocný příkrm BIO meruňky | 2,9703 |
| Ovocná přesnídávka s meruňkami | 2,9284 |
| Ovocná přesnídávka s jahodami | 3,0630 |
| Povidlová náplň se skořicí s vůní rumu | 2,9064 |

Tabulka 10: Ředění vzorků ovocných nápojů

| Vzorek | Ředění |
|--|--------|
| Čerstvá šťáva jablko | 1:1 |
| 100% ovocná šťáva jablko a meruňka | 1:1 |
| 100 % jablečný mošt | 1:5 |
| Stévie jablko, jablečný nápoj | 1:1 |
| Ovocný nápoj jablko | 1:1 |
| Ovocný nápoj jablko, arónie, višně, lesní jahoda | 1:1 |
| Ovocný nápoj B+C+E s chutí lesních plodů | 1:1 |
| Ovocný nápoj pomeranč | 1:1 |

3.8 Stanovení vody titračně podle Karl–Fishera

Při každé analýze vzorku jablka byl stanoven i obsah vody. Příprava probíhala tak, že přibližně 2 g nastrouhaného vzorku byly přidány do kádinky a zváženy s přesností na čtyři desetinná místa (m_v). Váhy byly vytárovány a bylo přidáno 10 ml methanolu a roztok byl opět zvážen (m_{MeOH}). Do kádinky bylo přidáno míchadlo a vzorek byl extrahován 30 min na magnetické míchačce. Slepý vzorek obsahoval pouze methanol. Všechny kádinky byly zadělány parafilmem, aby nedošlo k vytékání methanolu.

Následně z každé kádinky bylo odebráno asi 5 ml vzorku injekční stříkačkou s filtrem a vzorek byl přefiltrován do vysušených označených vialek. Do titrační cely Karl–Fisherova titrátoru bylo přidáno titrační činidlo hydranal a míchadlo. Přístroj byl zkalibrován. Do injekční stříkačky s jehlou bylo nabráno asi 80 μ l vzorku, případné vzduchové bubliny byly vytlačeny. Naplněná injekční stříkačka byla zvážena na analytické váze, váha byla vytárována a vzorek byl nadávkován do titrační cely. Stříkačka byla poté zvážena a rozdíl hmotností byl zapsán do přístroje. Po spuštění přístroje začala titrace vzorku. Po ukončení titrace byl obsah vody odečten z displeje. Takto bylo postupováno u všech vzorků. Každý vzorek byl titrován minimálně dvakrát, aby se získaly relevantní data.

3.9 Stanovení sušiny sušením

Sušina byla stanovena u všech odrůd jablek, které byly analyzovány pomocí HPLC–MS. Čistá jablka byla rozpůlena a následně byl odkrojen tenký plátek. Hliníkové misky s odkrytými víčky byly vysušeny při 110 °C v sušárně a po vychladnutí v exsikátoru byly i s víčky zváženy (m_m). Rychle byly do nich naváženy cca 3 g jablka (pro každou odrůdu zvlášť) s přesností na čtyři desetinná místa (m_v). Misky byly vloženy do sušárny vyhřáté na 110 °C a sušily se 2,5 hodiny. Potom se misky uzavřely víčky a po patnáctiminutovém chladnutí v exsikátoru byly zváženy. Pak byly misky se vzorky vloženy opět do sušárny na 30 minut a po vychladnutí byly opět zváženy (m_{m+ss}). Tento postup se opakoval, dokud rozdíl mezi posledními dvěma váženými byl menší než 2 mg.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Stanovení sušiny podle Karl–Fishera

Z naměřených hodnot titrace podle Karl–Fishera byly v programu MS Excel dopočítány hodnoty obsahu vody ve vzorku (w_{H_2O}) dle vztahu (2). Z obsahu vody byla následně určena sušina ($m_{sušina}$). Výsledky všech vzorků z Karl–Fisherovy titrace jsou uvedeny v tabulce 11 a tabulce 12. Obsah vody ve vzorcích se pohyboval mezi 62,78 až 67,79 %. Masoudi a spol. uvádí hodnoty obsahu vody v různých odrůdách jablek kolem 83,77 % [37]. Tato hodnota neodpovídá hodnotám naměřeným metodou podle Karl Fishera. Z toho důvodu, bylo potřeba použít jinou metodu stanovení obsahu vody v jablku. U jablek Gala byla také provedeno opakované měření s tím rozdílem, že u opakování nebyl vzorek strouhán, ale kovovou lžičkou byla dužina seškrabována přímo do kádinky. Předpoklad byl, že tímto způsobem přípravy, nedojde ke ztrátám vody, jelikož během strouhání na prkénku docházelo k odtékání jablečné šťávy z prkénka. Tento předpoklad se nepotvrdil, jelikož naměřené hodnoty z opakování byly dokonce o přibližně 5 % nižší.

$$w_{H_2O} = \frac{(w_{H_2O_{ex}} - w_{H_2O_{MeOH}}) \cdot m_{MeOH}}{m_v} \quad (2)$$

Tabulka 11: Navážka vzorků jablek na stanovení obsahu vody podle Karl Fishera

| Odrůda | Navážka vzorku [g] | Navážka methanolu [g] |
|------------------|--------------------|-----------------------|
| Golden Delicious | 2,0620 | 6,9615 |
| Gala | 2,2448 | 7,8134 |
| Gala opakování | 2,4014 | 7,5955 |
| Red Delicious | 2,6468 | 7,7874 |

Tabulka 12: Naměřené a dopočítané hodnoty

| Vzorek | W_{MeOH} [%] | $w_{průměrH_2O_{ex}}$ [%] | w_{H_2O} [%] | $m_{sušina}$ [g] |
|------------------|-----------------|---------------------------|----------------|------------------|
| Golden Delicious | 1,89 | $20,49 \pm 0,01$ | 62,78 | 0,7675 |
| Gala | $1,20 \pm 0,02$ | $20,70 \pm 0,30$ | 67,79 | 0,7229 |
| Gala opakování | | $21,10 \pm 0,60$ | 62,81 | 0,8930 |
| Red Delicious | | $22,64 \pm 0,08$ | 63,10 | 0,9768 |

4.2 Stanovení sušiny metodou sušení

Přestože jablka obsahují vyšší množství monosacharidů, dosáhlo se u vzorků Golden Delicious, Jonagold a Champoin konstantního úbytku hmotnosti již po druhém vážení sušiny. U zbylých vzorků bylo potřeba jablka sušit o 30 minut déle. Z navážek vysušených vzorků byly pomocí programu MS Excel dopočítány hodnoty obsahu vody dle vztahu (3). Výsledky všech vzorků jsou uvedeny v tabulce 13. Obsah vody ve vzorcích se pohyboval mezi 83,46 % a 86,99 %. Tyto naměřené hodnoty jsou mírně vyšší, než uvádí Masoudi a spol. Konkrétně pro odrůdu Golden Delicious uvádí průměrný obsah vody 83,78 %, což je o 3,21 % méně než hodnota naměřená v této diplomové práci [37]. Masoudi a spol. měřili obsah vody u odrůd Golden Delicious, Red Delicious a Granny Smith [37].

Mezi průměrnými obsahy vody stanovenými Masoudim a spol. a hodnotami v této diplomové práci je statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$). Obsah vody v jablcích je závislý na stupni zralosti, zemi původu atp., proto tyto diference se dají přisoudit právě rozdílům mezi jednotlivými jablky. Tyto odchylky by se také daly přisoudit způsobem sušení. Masoudi a spol. sušili jablka pouze při 77 °C [37]. Vyšší použitá teplota (110 °C) mohla výsledky také ovlivnit. Po porovnání naměřených výsledků s metodou podle Karl Fishera, je metoda sušení přesnější, proto se pro další účely pracovalo s těmito hodnotami.

$$w_{H_2O} = 100 - \left(\frac{m_{s+m} - m_m}{m_v} \cdot 100 \right) \quad (3)$$

Tabulka 13: Navážky a dopočítané hodnoty pro sušinu a obsah vody

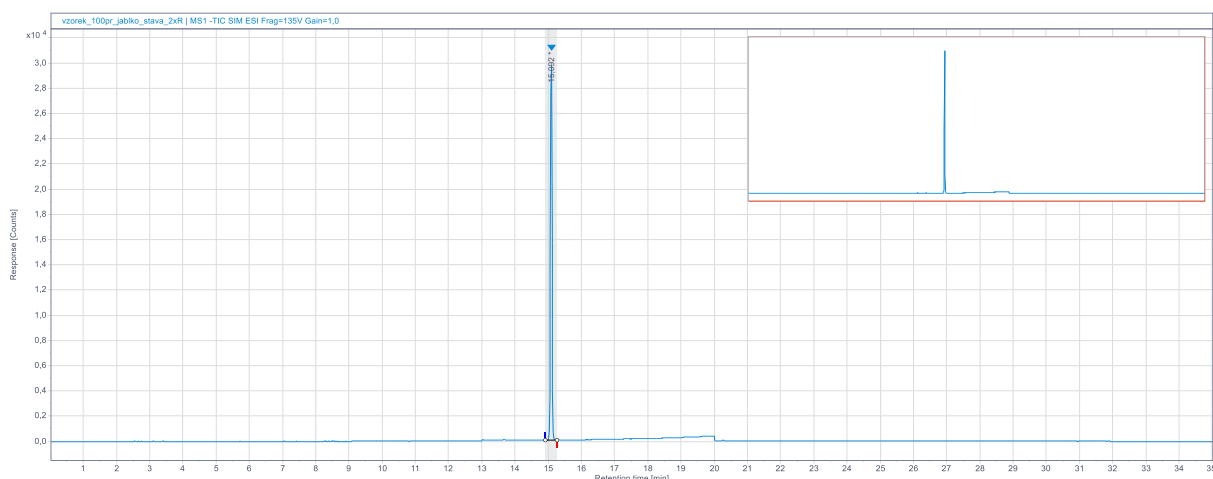
| Odrůda | Hliníková miska [g] | Navážka vzorku [g] | Miska se sušinou [g] | Sušina [g] | Obsah vody [%] |
|------------------|---------------------|--------------------|----------------------|------------|----------------|
| Golden Delicious | 23,9255 | 2,9945 | 24,3152 | 0,3897 | 86,99 |
| Gala | 24,4883 | 2,6738 | 24,8863 | 0,3980 | 85,11 |
| Red Delicious | 23,3241 | 2,7321 | 23,6962 | 0,3721 | 86,38 |
| Granny Smith | 23,4806 | 2,8252 | 23,8951 | 0,4145 | 85,33 |
| Jonagold | 24,4090 | 2,7589 | 24,8203 | 0,4113 | 85,09 |
| Champion | 23,5123 | 2,1616 | 23,8699 | 0,1654 | 83,46 |

4.3 Vyhodnocení extrakčních metod

Jako první bylo zvoleno rozpouštědlo ethylacetát. Standard phloridzinu se v ethylacetátu účinně rozpustil. Při extrakci jiných vzorků např. domácí jablečné přesnídávky, se roztok rozdělil na dvě fáze. Cílem bylo získat homogenní roztok, proto místo ethylacetátu jako rozpouštědla byl zvolen methanol. Toto druhé zvolené rozpouštědlo bylo vhodnější pro použití, jelikož se netvořily dvě fáze a vzorek se efektivněji rozpouštěl. Toto rozpouštědlo preferují ve většině člancích, kde tedy většinou využívají směs methanol:voda (např. 80:20 nebo 90:10) [10, 31, 36]. Vzorky marmelád a přesnídávek se v methanolu efektivně rozpouštěly. Vzorek povidlové náplně bylo zapotřebí před přidáním na magnetickou míchačku pečlivě v methanolu rozmíchat pomocí skleněné tyčinky. Methanol byl jako rozpouštědlo použit u všech pevných vzorků.

Tekuté vzorky byly ředěny destilovanou vodou. Vzorek Čerstvé šťávy jablko byl ředěn 2x. Z důvodu vyšších naměřených hodnot (viz obrázek 3), byl následně již vzorek 100% moštu ředěn 5x. Takto naředěný vzorek vykazoval dostatečně silnou odezvu na detektoru. Pro ovocné nápoje, které obsahovaly průměrně 30% šťávu z koncentráту, bylo zapotřebí naopak menší ředění a to 1:1. Vzhledem k nízkým naměřeným koncentracím phloridzinu je i možnost provést nástřík přefiltrovaného vzorku bez předchozího ředění. Toto doporučují i Suárez a spol., kteří vzorky 100% jablečných džusů pouze filtrovali a následně bez ředění vzorek převedli do vialek [38]. Vzhled k velmi nízkým koncentracím phloridzinu naměřených v ovocných nápojích v rámci této diplomové práce (viz tabulka 23), je potřeba upravit metodu přípravy vzorků a jejich analýzu. Vhodně by bylo vzorek např. zakoncentrovat, použít sorbent nebo extrakční rozpouštědlo např. methanol.

Jablka byla rozmělnována pomocí plastového struhadla, jelikož rozmixovaný vzorek mixérem nebyl dostatečně homogenní. Byla také pozorována rychlejší oxidace/hnědnutí rozmixovaného jablka, a to i v dusíkové atmosféře. Proto bylo na zpracování jablek využito nejen plastové struhadlo, ale i keramický nůž, čím se míra hnědnutí snížila.



Obrázek 3: Záznam signálu pro phloridzin na MS detektoru – vzorek Čerstvé šťávy jablko, ředění 1:1

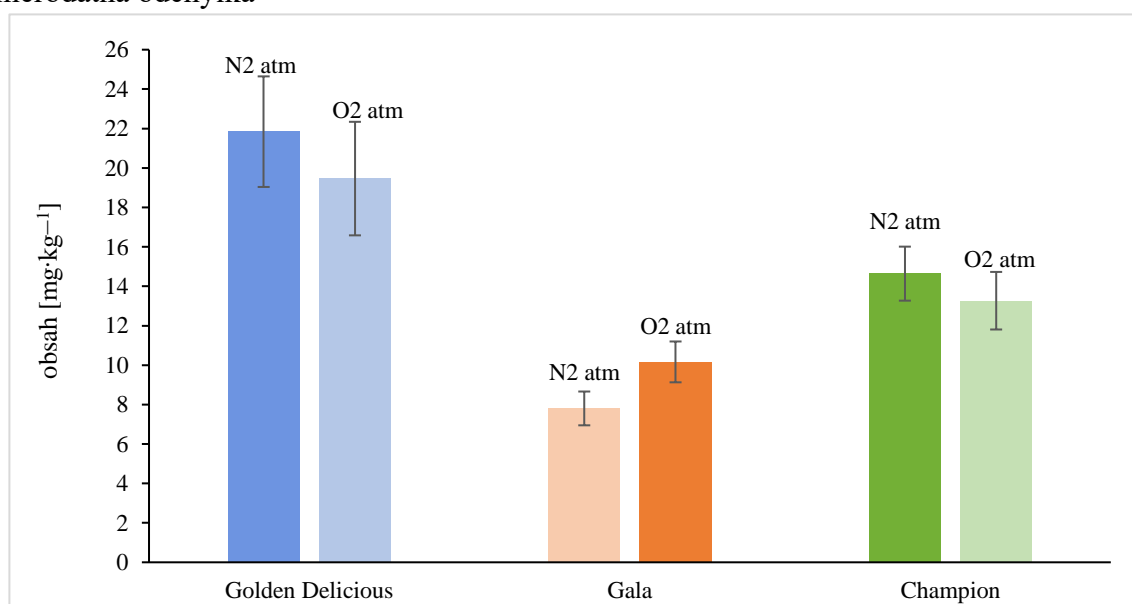
4.4 Efekt oxidace phloridzinu

Pro hodnocení vlivu atmosféry byla použita jablka odrůdy Golden Delicious, Gala a Champion. Cílem bylo určit, zda a jaký vliv má přítomnost kyslíku během extrakce na míru degradace phloridzinu. Jak lze vidět v tabulce 14 a na obrázku 4, u odrůd Golden Delicious a Champion byla koncentrace phloridzinu vlivem kyslíku v průměru o 10,84 % nižší. Naopak u jablek Gala byla koncentrace phloridzinu vyšší a to o 2,56 mg·kg⁻¹ (v čerstvém stavu). Tyto vyšší hodnoty se dají vysvětlit tím, že vzorek byl připraven v co nejkratším časovém intervalu od rozkrojení jablka, nedošlo tedy k takové míře degradace. Celkově tedy v průměru byl obsah phloridzinu za použití dusíkové atmosféry o 3,15 % vyšší než za přítomnosti kyslíku, statisticky ale se nejedná o významný rozdíl ($p > 0,05$). Statisticky nevýznamný vliv kyslíku na míru degradace phloridzinu zmiňuje také Hrubá a spol. [10]. I přes tyto závěry byl dusíkový vak použit při přípravě všech ostatních vzorků jablek.

Tabulka 14: Výsledné obsahy phloridzinu v různých odrůdách jablek a v různé atmosféře.

| Odrůda | Atmosféra | Obsah phloridzinu [mg·kg ⁻¹] | Obsah phloridzinu v sušině [mg·kg ⁻¹] |
|------------------|--------------------|--|---|
| Golden Delicious | N ₂ atm | 22 ± 3 | 170 ± 22 |
| | O ₂ atm | 19 ± 3 | 150 ± 22 |
| Gala | N ₂ atm | 7,8 ± 0,9 | 52 ± 8 |
| | O ₂ atm | 10 ± 1 | 68 ± 7 |
| Champion | N ₂ atm | 15 ± 1 | 88 ± 8 |
| | O ₂ atm | 13 ± 1 | 80 ± 9 |

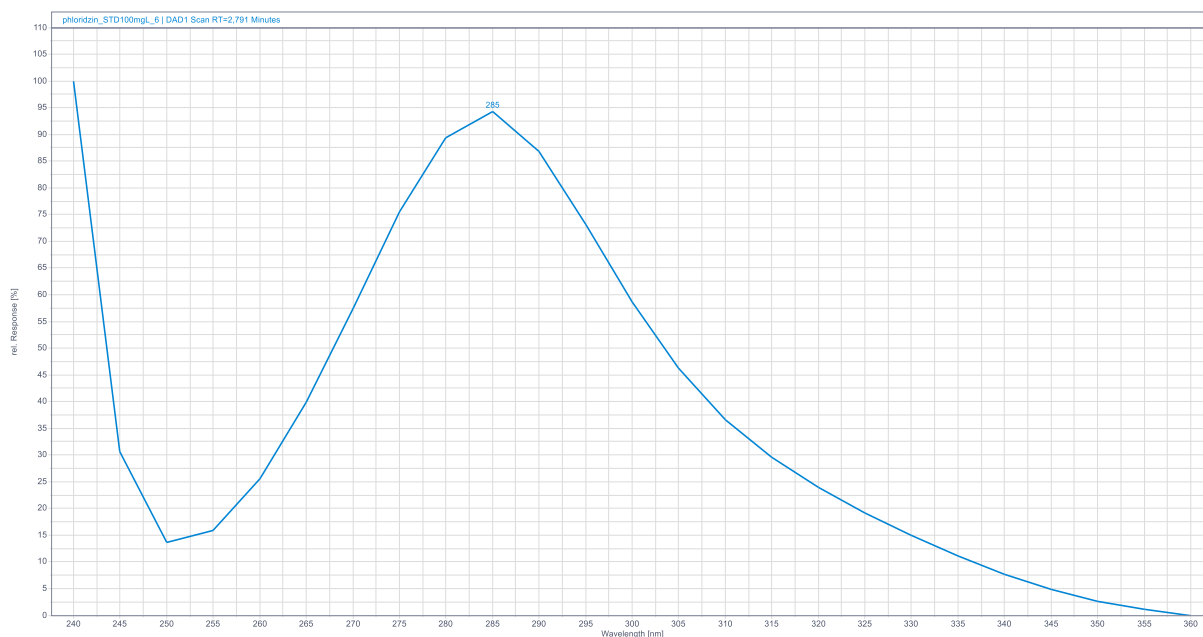
Pozn. pro tabulku 14 a obrázek 4: N₂ atm. je označení pro přípravu vzorku v dusíkové atmosféře (váženo na předvážkách). O₂ atm. je označení pro standardní laboratorní podmínky, působení kyslíku na vzorek (váženo na analytických vahách). Každá hodnota je vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka



Obrázek 4: Graf zobrazující rozdíly v obsahu phloridzinu při rozdílné volbě atmosféry

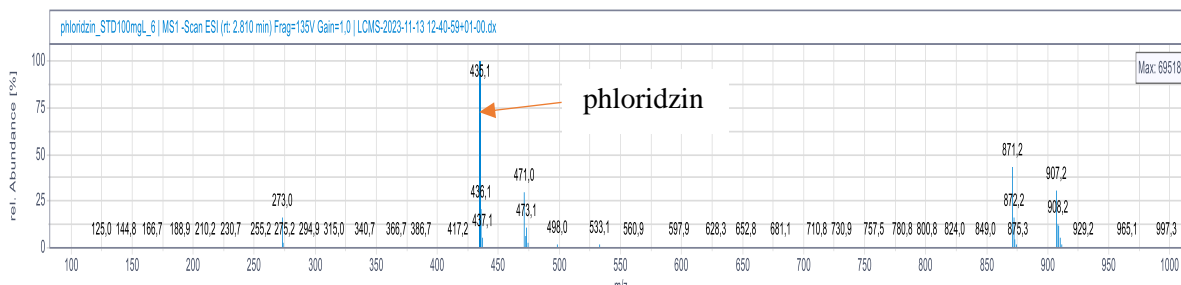
4.5 Optimalizace podmínek pro analýzu

Při analýze standardu phloridzinu za použití kolony Kinetex® 2.6 μm F5 100 Å, LC Column 150 x 4.6 mm a mobilní fáze se skládající se z 0,1% kyseliny octové, vody (rozpuštědlo A) a acetonitrilu (rozpuštědlo B) byl retenční čas byl pouhých 2,5 min. Absorpční maximum naměřené DAD detektorem bylo 285 nm (obrázek 5). Literatura uvádí nejvhodnější měření phloridzinu při 280 nm [10, 20].

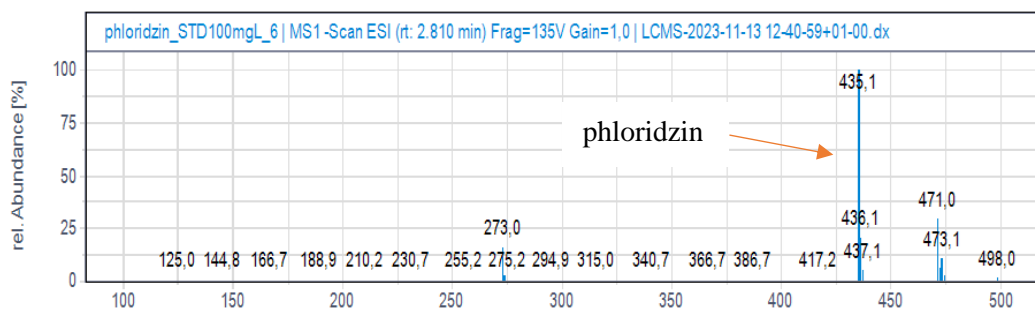


Obrázek 5: Chromatogram standardu phloridzinu měřeném na DAD detektoru

Na hmotnostním spektru byl nejvyšší pík s poměrem m/z 435,1 (viz obrázek 6 a obrázek 7). Tato hodnota se shoduje s literaturou, kde např. Meng a spol. naměřili hodnotu m/z 435,1279 [39]. Hodnoty v publikacích jsou uvedeny s přesností na čtyři desetinná místa, jelikož využívali vysoce rozlišovací techniky. Při použití gradientu pro kolonu Kinetex® 2.6 μm F5, byl retenční čas 15 min, z čehož vyplývá, že se phloridzin bude eluovat při složení mobilní fáze odpovídající poměru A: 79 a B: 21.



Obrázek 6: Hmotnostní spektrum standardu phloridzinu



Obrázek 7: Hmotnostní spektrum standardu phloridzinu s přiblížením na phloridzin

Následně byla testována kolona Kinetex® 5 µm EVO C18 100 Å, LC Column 250 x 4.6 mm, která byla poté využita při analýze všech vzorků. Pro tuto kolonu byla zvolena mobilní fáze o složení: 0,1% kyselina mravenčí, voda (Rozpouštědlo A) a acetonitril (rozpouštědlo B) a gradient viz tabulka 16. Retenční čas se zkrátil na přibližně 13,4 min. Při těchto parametrech analýzy bylo testováno, jakou nejnižší koncentraci standardu phloridzinu dokáže MS detektor detekovat. Vzorek standardu o koncentraci 0,1 mg·l⁻¹ byl zředěn nejprve na 10 µg·l⁻¹ a následně na 1 µg·l⁻¹. Z výsledků analýzy HPLC-MS vyplynulo, že i takto nízké koncentrace jsou na MS detektoru zachyceny s dostatečnou vysokou intenzitou. LOQ je rovno 0,20 µg·l⁻¹ a LOD je 0,06 µg·l⁻¹. Tyto hodnoty naznačují vysokou citlivost metody.

Na základě výsledků testování byly nastaveny nejideálnější parametry analýzy. Tato metoda byla použita u všech analyzovaných vzorcích metodou HPLC–MS.

Tabulka 15: Parametry nastavení HPLC–MS pro stanovení phloridzinu

| Název a typ přístroje | HPLC Agilent 1260 Infinity |
|-----------------------|---|
| složení MF | 0,1% kyselina mravenčí |
| | acetonitril |
| objem nástřiku | 5 µl |
| průtok MF | 1 ml/min |
| teplota kolony | 35 °C |
| doba analýzy | 30 min |
| kolona | Kinetex® 5 µm EVO C18 100 Å, LC Column 250 x 4.6 mm |
| detektor | DAD – 280 nm |
| | MS – m/z 435,1 |
| ionizace | ESI |
| typ skenu | SIM |
| napětí fragmentoru | 135 V |
| polarita | negativní |

Tabulka 16: Zvolený gradient mobilní fáze

| t [min] | Mobilní fáze | |
|---------|----------------|-----------------|
| | 0,1% HCOOH [%] | Acetonitril [%] |
| 0,00 | 90 | 10 |
| 3,00 | 90 | 10 |
| 25,00 | 50 | 50 |
| 30,00 | 90 | 10 |
| 30,01 | 90 | 10 |

4.6 Kalibrace HPLC-MS

Během optimalizace metody přípravy vzorků a analýzy HPLC–MS, byla sestavena kalibrační řada z koncentračními rozsahy: $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$; $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$; $1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Následně z výsledné rovnice (4) byl vypočten průměrný obsah phloridzinu ve vzorku jablka odrůdy Golden Delicious a to $5,2953 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (za y dosazovaná hodnota plochy píku). Takto byl stanoven koncentrační rozsah v jablku, koncentrace se pohybovaly spíše ve spodní oblasti kalibrační řady. Byla tedy sestavena nová kalibrační řada o koncentracích: $10 \text{ mg}\cdot\text{mol}^{-1}$; $1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $5,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Výslednou kalibrační řadu lze vidět na obrázku 8. Pro výpočet obsahu phloridzinu ve všech vzorcích byla využita výsledná rovnice (5), za y byla dotazovaná hodnota výšky píku.

$$y = -188,2230x^2 + 42823,2280x + 4631,4692 \quad (4)$$

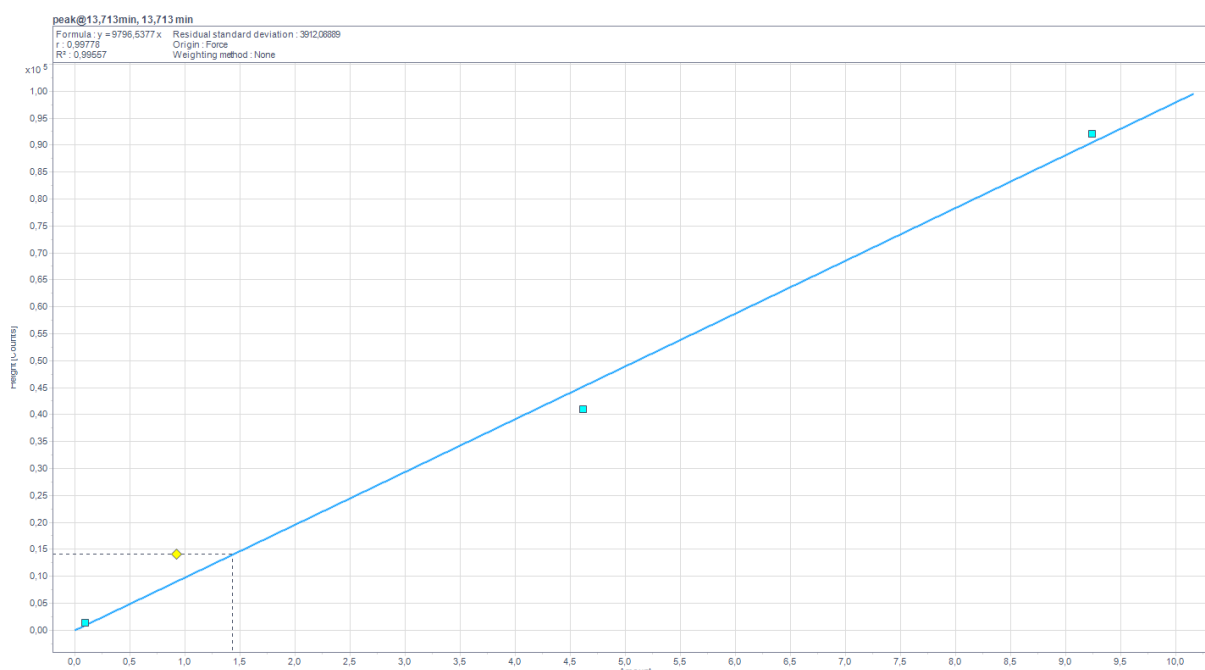
$$y = 9796,5377x \quad (5)$$

Jelikož jako standard byl využit phloridzin dihydrát s molární hmotností $M_{rD} = 472,44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, která je vyšší než molární hmotnost molekuly phloridzinu $M_r = 436,413 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, bylo zapotřebí hodnoty koncentrací kalibrační řady přepočítat. Pomocí rovnice (6) a přímé úměry byly dopočítány reálné koncentrace, které byly zapsány do programu Data analysis, čímž byla upravena kalibrační řada. Výsledné koncentrace kalibrační řady lze vidět viz tabulka 17.

$$m = \frac{m_d}{M_{rD}} \cdot M_r \quad (6)$$

Tabulka 17: Přepočet koncentrací kalibrační řady pro phloridzin

| Číslo řady | Koncentrace phloridzinu (dihydrát) [mg·kg ⁻¹] | Koncentrace phloridzinu [mg·kg ⁻¹] |
|------------|--|---|
| 1 | 0,10 | 0,09 |
| 2 | 1,00 | 0,93 |
| 3 | 5,00 | 4,64 |
| 4 | 10,00 | 9,27 |



Obrázek 8: Kalibrační řada pro phloridzin

4.7 Obsah phloridzinu v různých odrůdách jablek

Analyzováno bylo 6 nejčastěji se vyskytujících odrůd jablek na českém trhu. Záměrem bylo také vybrat jablka, která budou pocházet z jednoho regionu. Nakonec byly testovány čtyři odrůdy se zemí původu Česká republika. Vzorek jablka odrůdy Champion pocházel z Polska a vzorek odrůdy Granny Smith z Itálie. Z toho důvodu mohou být výsledky mírně zkresleny, jelikož profil polyfenolů závisí nejen na odrůdě, ale i na typu půdy, intenzitě slunečního záření a hnojení dusíkem [31].

Výsledky v tabulce 18 a tabulce 20, a obrázku 9 potvrzují, že mezi jednotlivými odrůdami je statisticky významný rozdíl v obsahu phloridzinu ($p < 0,01$), tento předpoklad zmiňuje např. Valavanidis a spol. [31]. Naproti tomu Hrubá a spol. neprokázali žádný rozdíl mezi testovanými odrůdami jablek z hlediska obsahu phloridzinu [10]. Významné rozdíly v koncentraci phloridzinu nebyly zaznamenány mezi odrůdami Gala a Granny Smith, dále také mezi Champion a Jonagold ($p > 0,05$). Nejvyšší koncentrace phloridzinu se nacházela v jablku odrůdy Red Delicious, konkrétně $37 \pm 5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($270 \pm 38 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ v přepočtu na sušinu). Tato hodnota je o 182 % vyšší než průměrné koncentrace u zbylých odrůd. Naopak nejnižší množství phloridzinu bylo naměřeno u odrůdy Granny Smith a to $7 \pm 1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($48 \pm 6 \text{ mg/kg}$ v přepočtu na sušinu), což je o 61 % méně než průměrný obsah phloridzinu ostatních odrůd jablek.

Jednotlivé výsledky se nedají exaktně porovnat s hodnotami uvedenými v literatuře, jelikož ty vykazovaly velké rozdíly, které pravděpodobně odrážely různé metody extrakce, různé odrůdy jablek, pěstitelské oblasti, typ půdy a intenzitu slunečního záření [10, 29, 40, 41]. Valavanidis a spol. si na analýzu zvolili odrůdy, které byly analyzovány i v této diplomové práci (Red Delicious, Golden Delicious, Champion, Jonagold a Gala) [31]. Valavandis a spol. naměřili nejvyšší obsah phloridzinu u odrůd Red Delicious ($84 \pm 13 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a Golden Delicious ($45 \pm \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) [31]. V této diplomové práci byly taktéž naměřeny nejvyšší koncentrace u odrůd Red Delicious ($37 \pm 5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a Golden Delicious ($22 \pm 3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Naopak nejnižší koncentrace phloridzinu Valavanidis a spol. stanovili u odrůdy Jonagold ($8 \pm \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) [31]. Veškeré koncentrace, které Valavandis a spol. naměřili (viz tabulka 19), jsou vyšší, než byly naměřeny v rámci této diplomové práce.

Tyto vyšší koncentrace mohou být způsobeny metodou přípravy, kdy byly na analýzu použita celá jablka tedy i s jadřinci, která byla dusíkem zmrazena a následně rozemleta na prášek. Extrakci následně prováděli pomocí 90% methanolu v dusíkové atmosféře [31]. Jak lze vidět právě v tabulce 19, rozdíly mezi jednotlivými částmi jablka jsou patrné a výsledné koncentrace tak mohou být způsobem přípravy vzorku ovlivněny.

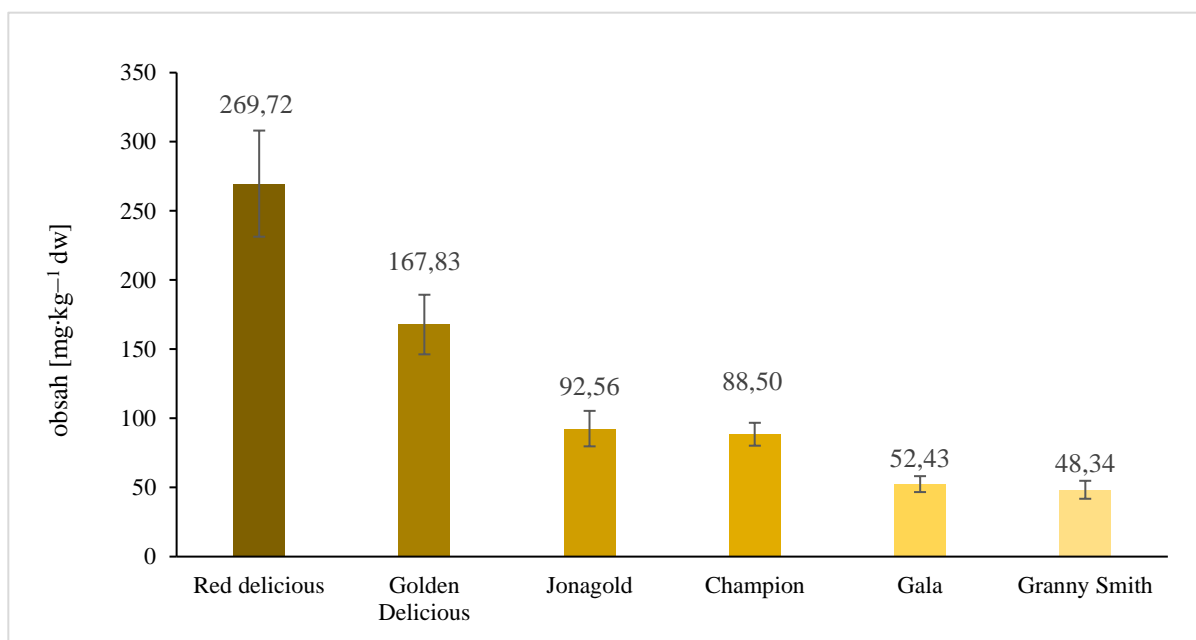
Tabulka 18: Obsah phloridzinu v různých odrůdách jablek analyzovaných v této diplomové práci

| Odrůda | Obsah phloridzinu [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$] | Obsah phloridzinu v sušině [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$] |
|------------------|--|---|
| Red Delicious | 37 ± 5 | 270 ± 38 |
| Golden Delicious | 22 ± 3 | 170 ± 22 |
| Champion | 15 ± 1 | 88 ± 8 |
| Jonagold | 14 ± 2 | 92 ± 13 |
| Gala | $7,8 \pm 0,9$ | 52 ± 8 |
| Granny Smith | 7 ± 1 | 48 ± 6 |

Každá hodnota je vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka

Tabulka 19: Obsah phloridzinu ve vybraných odrůdách jablek uváděný v literatuře [10, 31]

| | Granny Smith (mg·kg⁻¹) | Golden Delicious (mg·kg⁻¹) | Champion (mg·kg⁻¹) | Royal Gala (mg·kg⁻¹) | Jonagold (mg·kg⁻¹) | Red Delicious (mg·kg⁻¹) |
|-------------|--|--|--|--|--|---|
| Slupka | 10,0 ± 0,4 | 34,3 ± 21,3 | 18,8 ± 8,4 | 23 ± 6 | 21 ± 5 | 142 ± 23 |
| Dužina | 2,0 ± 0,8 | 3,4 ± 2,0 | 6,9 ± 1,8 | – | – | – |
| Jádro | 16,8 ± 11,8 | 18,9 ± 6,6 | 66,7 ± 22,9 | – | – | – |
| Semínka | 2307 ± 337 | 2566 ± 1529 | 1734 ± 173 | – | – | – |
| Celé jablka | 16 ± 5 | 45 ± 8 | – | 12 ± 3 | 8 ± 2 | 84 ± 13 |



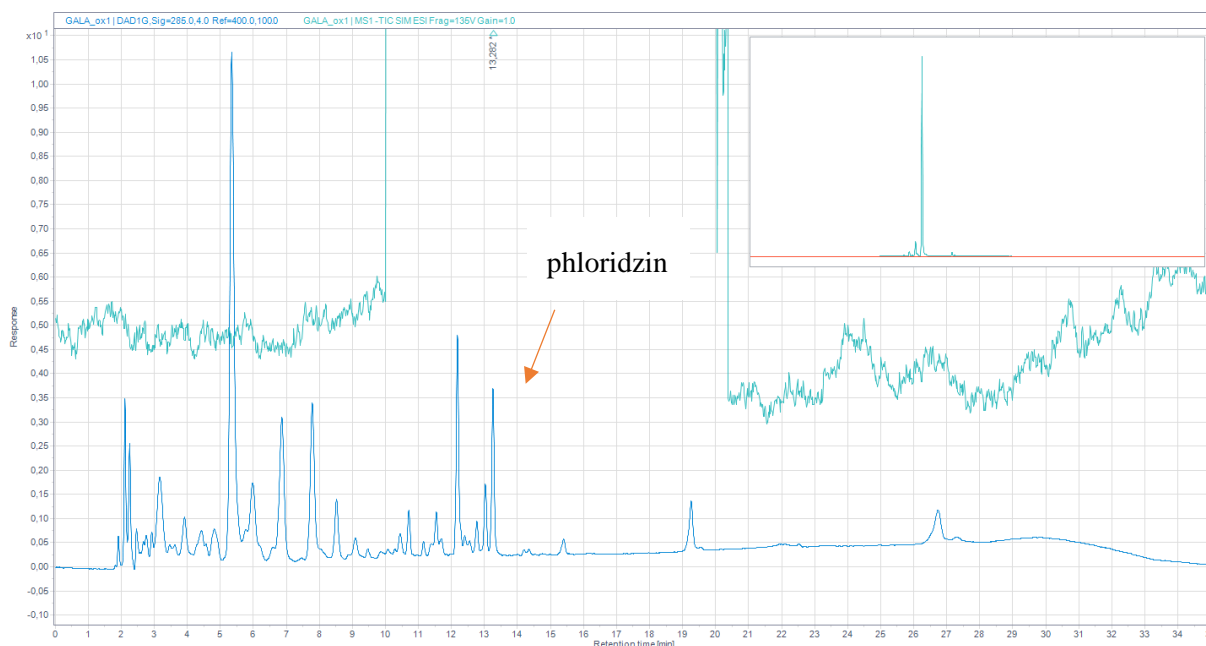
Obrázek 9: Obsah phloridzinu v různých odrůdách jablek

Pozn. Každá hodnota vyjadřuje průměr ± směrodatná odchylka

Tabulka 20: Výsledky jednofázového ANOVA s Tukey HSD testem –**($p < 0,01$), *($p < 0,05$), ns (not significant – nevýznamné)

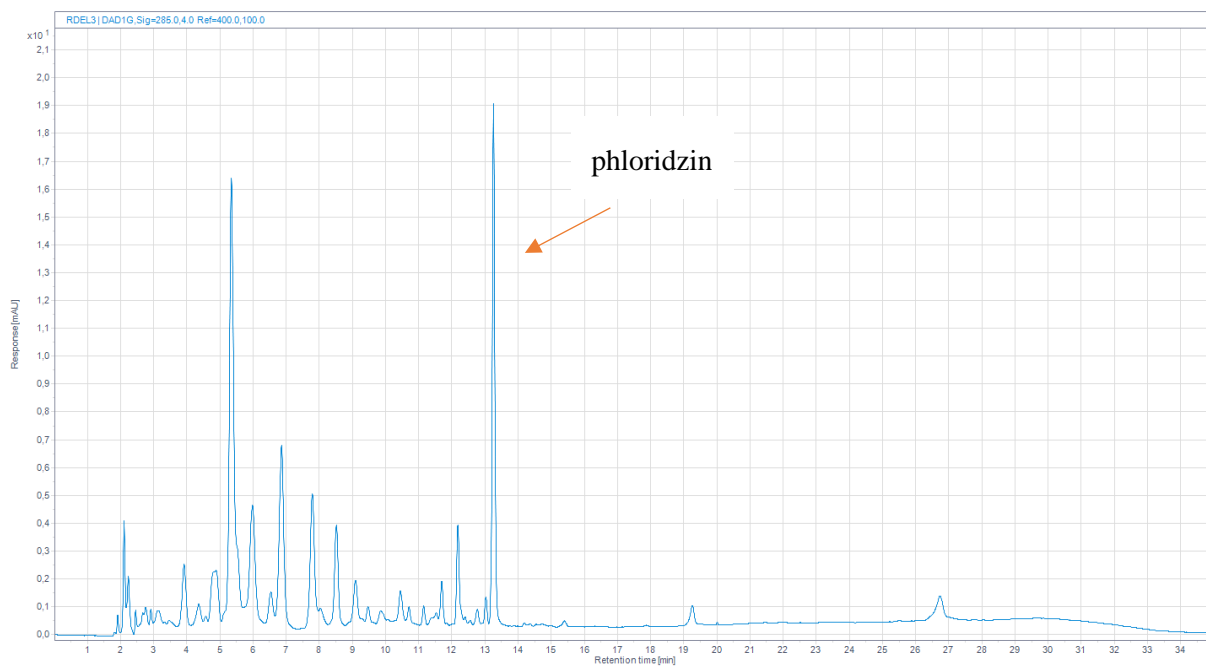
| | Golden Delicious | Gala | Red Delicious | Granny Smith | Jonagold | Champion |
|------------------|------------------|------|---------------|--------------|----------|----------|
| Golden Delicious | | ** | * | ** | * | * |
| Gala | ** | | ** | ns | ** | ** |
| Red Delicious | * | ** | | ** | ** | ** |
| Granny Smith | ** | ns | ** | | ** | ** |
| Jonagold | * | ** | ** | ** | | ns |
| Champion | * | ** | ** | ** | ns | |

Na obrázku 10 a především na obrázku 11 lze pozorovat pík charakteristický pro phloridzin zaznamenaný na DAD detektoru (měřeno při 280 nm). Odezva je pro vzorky jablek dostatečně silná, dokonce u odrůdy Red Delicious je pík pro phloridzin nejvyšší ze zaznamenaných píků. Odezva na MS detektoru (obrázek 10 a obrázek 12) je mnohonásobně vyšší než na DAD detektoru (měřeno při m/z 435,1). Pík je ostřejší a bez větších překryvů, proto je pro vyhodnocení obsahu vhodnější využít data právě z MS detektoru.

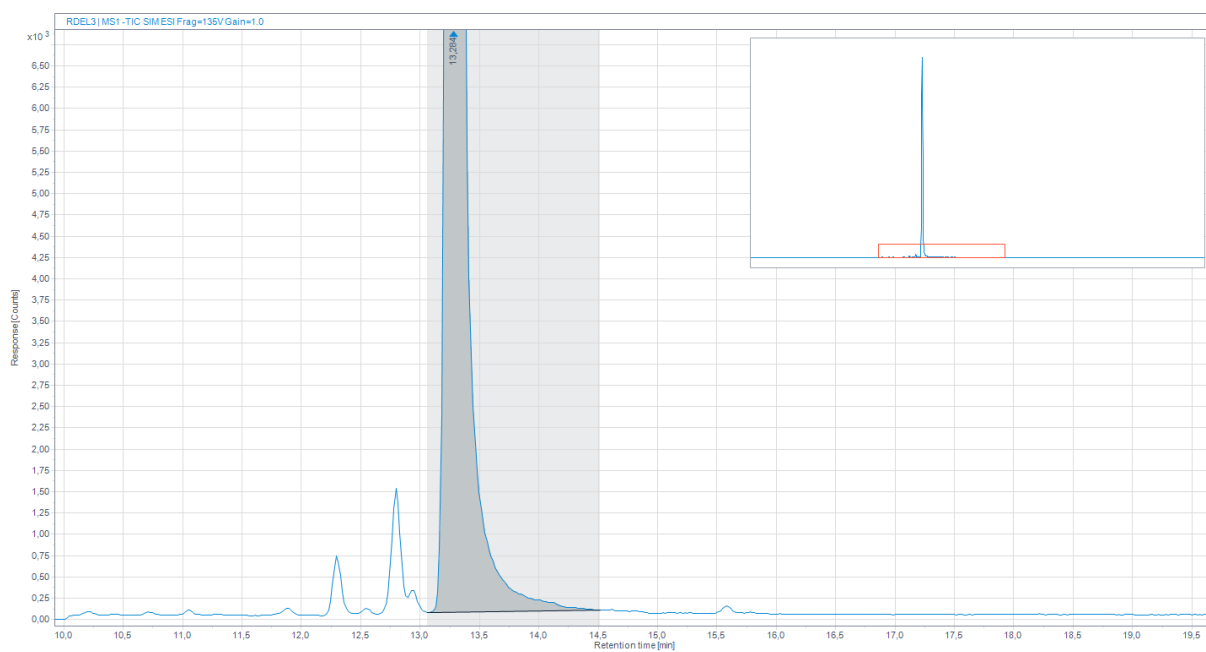


Obrázek 10: Záznam na DAD a MS detektoru – vzorek jableka odrůdy Gala zpraveném za přítomnosti O_2 (přiblížení na záznam DAD)

Pozn. zelená křivka zaznamenává výstup z MS detektoru, modrá z DAD



Obrázek 11: Záznam na DAD – vzorek jablka odrůdy Red Delicious



Obrázek 12: Záznam phloridzinu na MS detektoru – vzorek jablka odrůdy Red Delicious

4.8 Obsah phloridzinu v potravinách

Pro určení toho, zda je phloridzin vhodný jako marker jablečné složky, bylo vybráno osm pevných vzorků potravin a osm vzorků ovocných nápojů. Veškeré tyto vzorky byly podrobeny HPLC-MS analýze. Výsledné koncentrace phloridzinu v jednotlivých vzorcích lze vidět v tabulce 21a tabulce 23. Na obrázku 13 a obrázku 14 lze pozorovat trend, kde u potravin s nižším obsahem jablek byla naměřena nižší koncentrace phloridzinu. Již z těchto obrázků, lze určit, že množství phloridzinu je přímo úměrné obsahu jablek v potravine. Pro potvrzení tohoto předpokladu byla vypočítána průměrná koncentrace phloridzinu v jablečích testovaných výše viz tabulka 18 ($16,99 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a přímou úměrou byl dopočítán odhadovaný procentuální obsah jablek v potravinách. Odhadované množství jablek korelovalo s deklarovaným obsahem na etiketě viz tabulka 21. Mezi deklarovanými procentuálními obsahy a odhadnutými nebyl žádný statistický rozdíl ($p > 0,1$). Použití phloridzinu jako markeru pravosti pevných ovocných produktů je tedy slibné.

Hrubá a spol. zjistili, že stanovený obsah phloridzinu na úrovni $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (tj. přítomnost přibližně 30 g jablek na kg výrobku) dokazuje přídavek jablek do ovocných výrobků [10]. Toto tvrzení bylo tedy v této diplomové práci následně ověřeno na vybraných výrobcích z českého trhu viz tabulka 21. V potravinách, které na svých etiketách nedeklarovaly přítomnost jablek, se koncentrace phloridzinu pohybovala mezi $0,0669 - 0,1671 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, což je méně než výše zmiňovaný $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, a tedy byla dodržena deklarace na etiketách. Tento závěr odpovídá i odhadovanému množství jablek, který se u těchto potravin pohyboval pod 1 %. Hrubá a spol. pro výpočet odhadu obsahu jablek vycházeli z obsahu phloridzinu ve vzorcích jablečného pyré, konkrétně z rozmezí od 28,7 do $32,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ [10]. V této diplomové práci se při výpočtu odhadu vycházelo z průměrných koncentrací v analyzovaných jablečích, tedy z hodnoty ($16,99 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Pokud se bude vycházet z průměrné koncentrace phloridzinu v jablečích, obsah na úrovni $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ by odpovídal přibližně 59 g jablek na 1 kg výrobku.

Největší odchylka od deklarovaného množství na etiketě byla nalezena u ovocné přesnídávky s jahodami, kde na etiketě byl deklarováno 65 % jablek. Naměřené koncentrace phloridzinu, ale naznačují obsah jablek až 80,23 %. Obsah phloridzinu byl tedy o $2,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ vyšší, což by odpovídalo možnému přídavku 152,4 g jablek na 1 kg výrobku. Odchylka byla také u ovocné směsi Meruňka a jablko, kde byla vyšší koncentrace phloridzinu o $1,48 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, což by odpovídalo možnému přídavku 87 g jablek na 1 kg. Výsledky mohly být ovlivněny tím, že potraviny byly vyrobeny ze dvou druhů ovoce. Hrubá a spol. uvádí, že v jahodách byla naměřena koncentrace phloridzinu $0,38 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (přepočteno na sušinu) [10]. Jelikož se ale jedná o hodnotu menší než $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, nedá se říci, že by výsledná koncentrace phloridzinu v potravine byla ovlivněná přídavkem jahod. Pokud se zaměříme na meruňky, v rámci této diplomové práce byl analyzován džem obsahující pouze meruňky (55 %) bez přídavku jablek. U tohoto vzorku byla naměřena koncentrace phloridzinu nižší než $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, a to přesně $0,07 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Opět se nedá předpokládat, že by přídavek meruňek značně ovlivnil koncentraci phloridzinu v potravine.

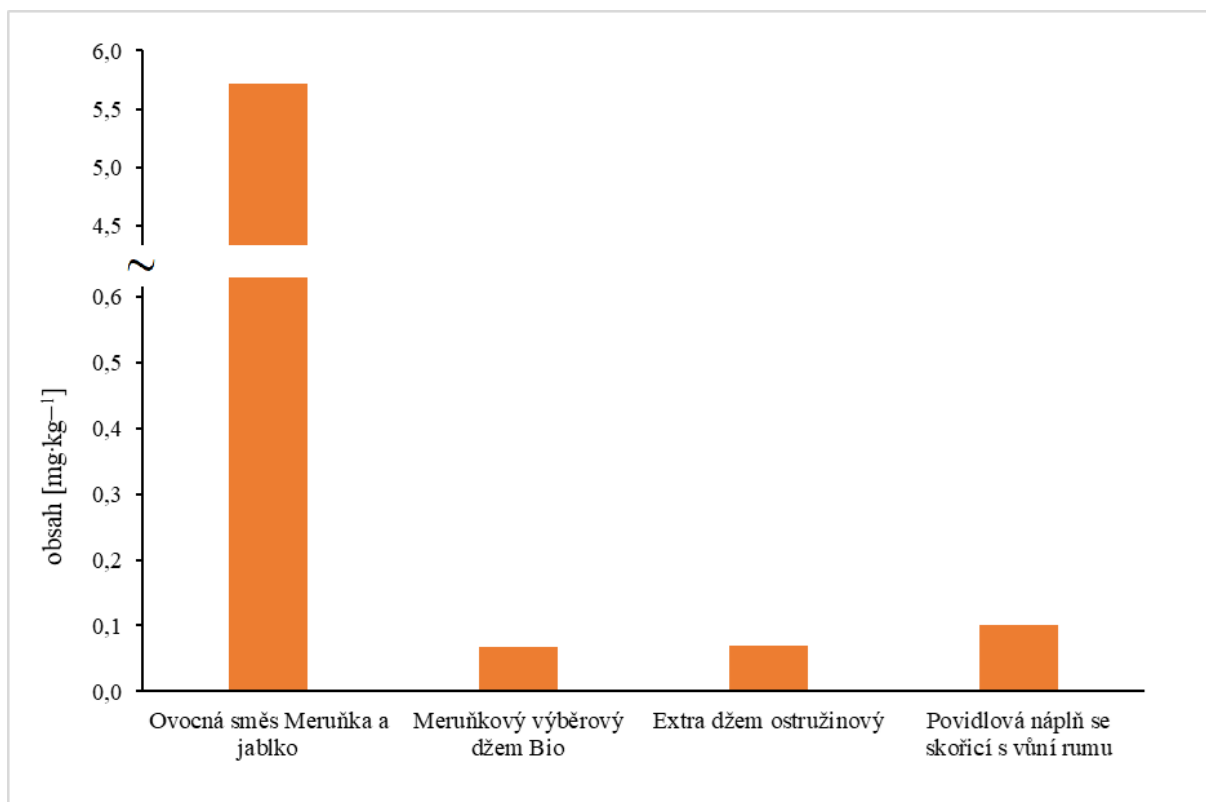
Tabulka 21: Obsah phloridzinu v pevných vzorcích potravin analyzovaných v této diplomové práci s procentuálním odhadem obsahu jablek

| Vzorek | Obsah phloridzinu [mg·kg ⁻¹] | Odhadovaný obsah jablek [%] |
|---|---|--------------------------------|
| Ovocná směs meruňka a jablko (25 % jablek) | 5,72 | 33,69 |
| Meruňkový výběrový džem Bio (55 % meruněk) | 0,07 | 0,39 |
| Extra džem ostružinový (50 % ostružin) | 0,07 | 0,41 |
| Povidlová náplň se skořicí s vůní rumu (170 g švestek na 100 g výrobku) | 0,10 | 0,59 |
| Ovocná přesnídávka s jablky (85 % hm. jablek) | 15,14 | 89,14 |
| Ovocná přesnídávka s meruňkami (63 % hm. jablek) | 10,29 | 60,59 |
| Ovocná přesnídávka s jahodami (65 % hm. jablek) | 13,63 | 80,23 |
| Ovocný příkrm BIO meruňky (46 % meruněk) | 0,17 | 0,98 |

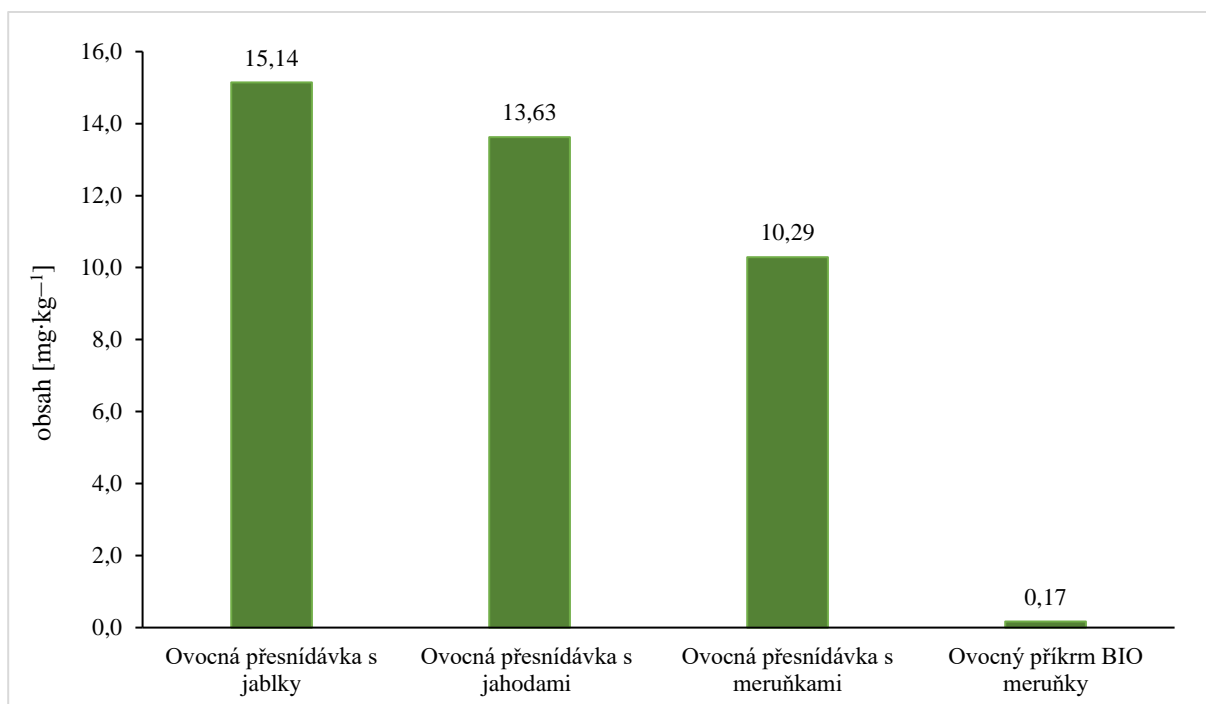
Tabulka 22: Obsah phloridzinu ve vybraných výrobcích na českém trhu (deklarovaný obsah v jablkách je uveden v závorkách) [10]

| Vzorek | Phloridzin [mg·kg ⁻¹] | Odhadovaný obsah jablek [%] |
|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| Švestková povidla s jablky | 19,7 ± 0.5 | 60,6–68,6 |
| Švestková povidla | 4,8 ± 0.2 | 14,8–16,7 |
| Jablečná náplň na pečení (90 %) | 6,1 ± 0.1 | 18,8–21,3 |
| Meruňková náplň na pečení (70 %) | 1,5 ± 0.1 | 4,6–5,2 |
| Jahodová náplň na pečení (70 %) | 1,8 ± 0.2 | 5,5–6,3 |
| Jablečná dětská výživa | 25,0 ± 0.2 | 76,9–87,1 |
| Jablečné purée (95 %) | 31,4 ± 0.2 | 96,6–109,4 |
| Jablečno–jahodový džem (35 %) | 15,6 ± 0.4 | 48–54,4 |
| Jablečno–rybízovo–jahodový džem | 10,8 ± 0.5 | 33,2–37,6 |
| Jablečno–meruňkový džem (35 %) | 12,6 ± 0.1 | 38,8–43,9 |
| Borůvkový džem | 5,7 ± 0.1 | 17,5–19,9 |

Pozn. vypočteno s intervalem spolehlivosti 32,5–28,7 mg·kg⁻¹ phloridzinu (úroveň spolehlivosti: 0,95) pro čisté jablečné pyré; každou hodnotu je vyjádřena jako průměr ± SD; není statistický rozdíl mezi vzorky označenými stejným písmenem (P > 0,01)

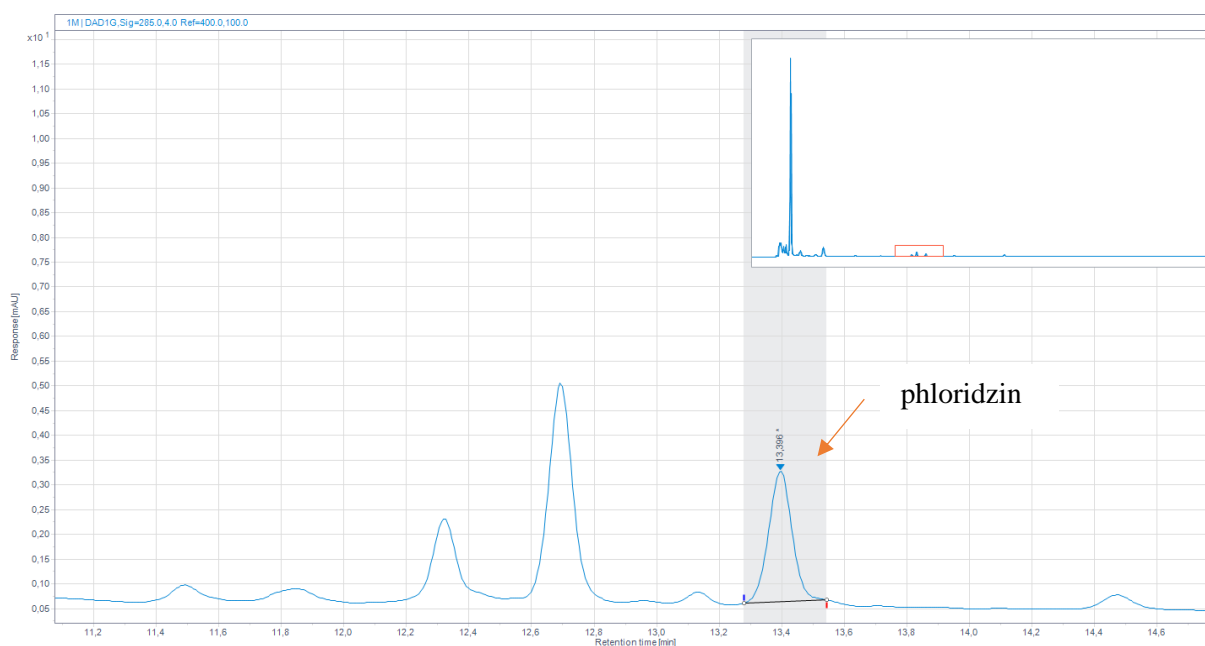


Obrázek 13: Obsah phloridzinu v pevných vzorcích typu džem, povidla atp. analyzovaných v této diplomové práci

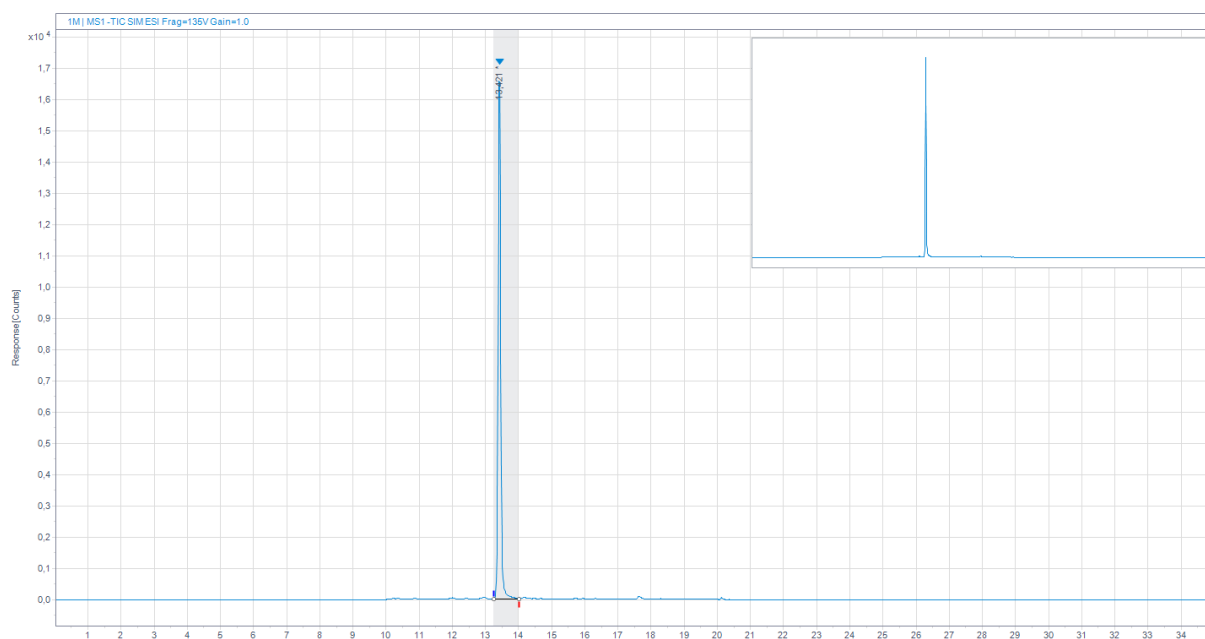


Obrázek 14: Obsah phloridzinu ve vybraných ovocných přesnídávkách a příkrmech analyzovaných v této diplomové práci

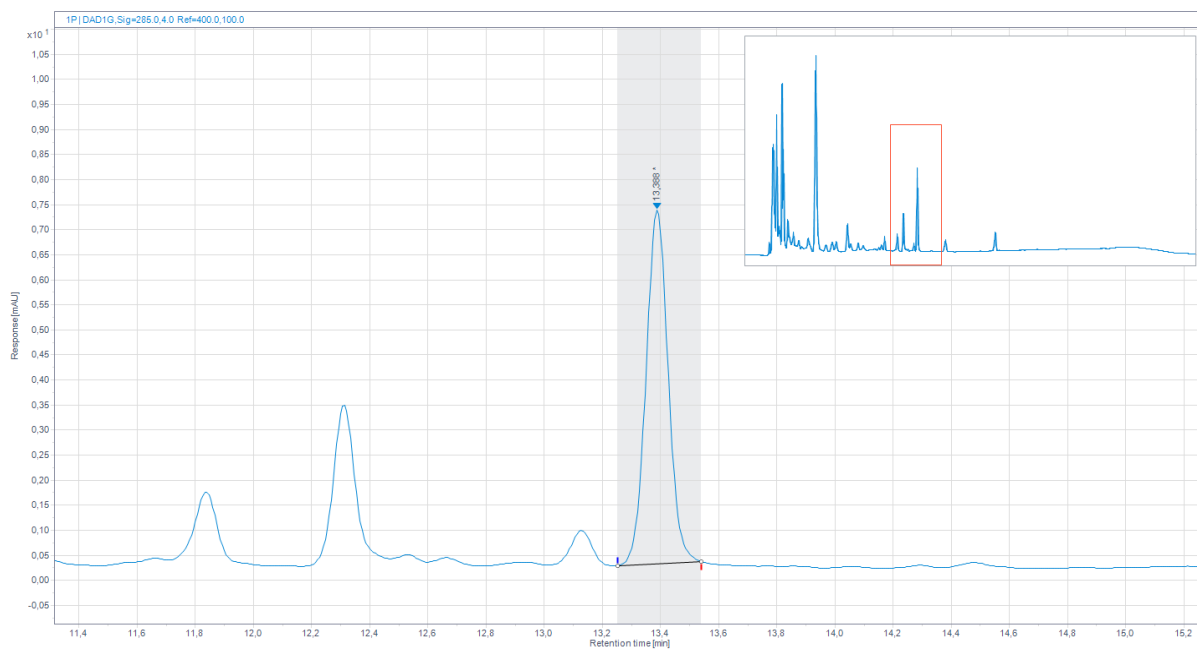
Obrázek 15 a obrázek 16 zobrazuje chromatogram pro ovocnou směs Meruňka a jablko. Pokud tento záznam porovnáme s obrázkem 17 (záznam vzorku přesnídávky s jablky), můžeme vidět, že i na DAD odpovídá intenzita signálu množství jablek deklarovaných na etiketě. Zkrátka, čím více jablek v potravine, tím intenzivnější odezva na DAD detektoru. Na obou obrázcích lze vidět, že i použitím DAD detektoru, je možné zjistit, kolik jablek obsahuje potravina. Problém nastává při nižších koncentracích kde, již píky nejsou tolik ostré, rozšiřují se a splývají s jinými. Tento problém právě řeší citlivější MS detektor. Obrázek 16 a obrázek 18 zobrazuje záznam na MS detektoru, těchto dvou potravin. Z obrázku je patrné, že při zadání hodnoty m/z pro phloridzin, dostaneme jeden vysoký ostrý pík, díky čemuž se dosáhneme vyšší přesnosti a spolehlivosti.



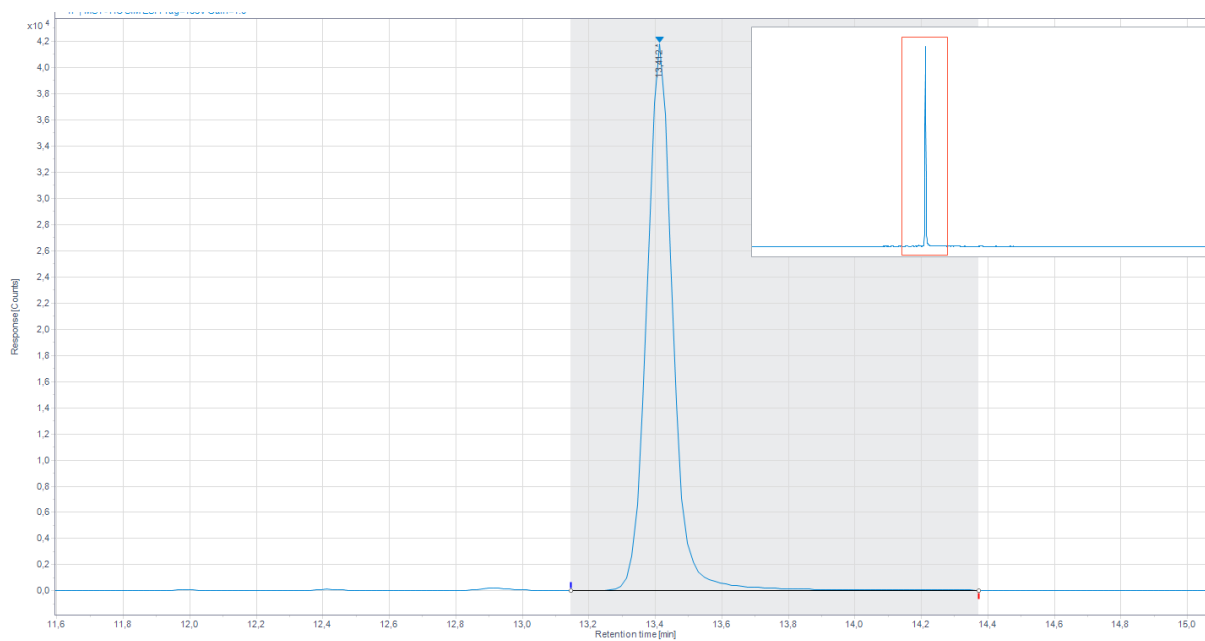
Obrázek 15: Záznam na DAD detektoru - vzorek Ovocná směs meruňka a jablko (jablko 25 %)



Obrázek 16: Záznam na MS detektoru – vzorek Ovocná směs meruňka a jablko



Obrázek 17: Záznam na DAD detektoru - vzorek ovocné přesnídávky s jablky



Obrázek 18: Záznam na MS detektoru – vzorek ovocné přesnídávky s jablky

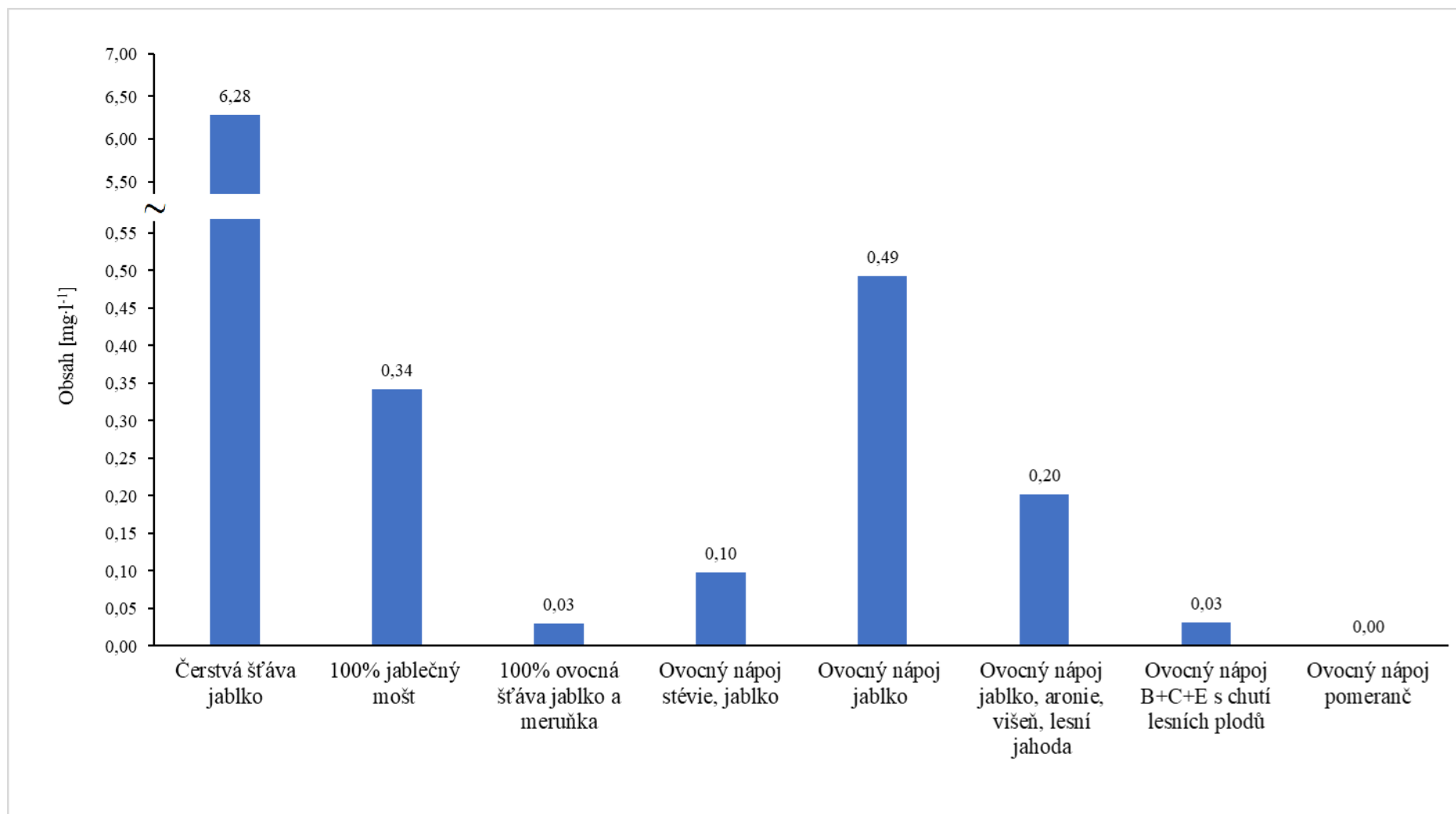
V ovocných nápojích byly naměřeny velmi nízké hodnoty phloridzinu srovnatelné s pevnými vzorky potravin, které neobsahují žádné jablko viz výše. Tyto nízké koncentrace jsou u části vzorku způsobené nízkým obsahem jablečné složky a také absencí dužiny. Bylo by tedy vhodné upravit metodu přípravy vzorků, s použitím metody zakoncentrování. Obsah phloridzinu také nekoreloval s deklarovaným obsahem jablečné složky viz tabulka 23. Obrázek 19 zobrazuje graf, kde jsou vzorky seřazeny sestupně dle deklarovaného obsahu jablečné složky. Jak se lze vidět v tomto případě není obsah phloridzinu úměrný obsahu jablečné složky. Toto porovnání není zcela relevantní z toho důvodu, že některé ovocné nápoje obsahovaly šťávu z koncentráту, některé čistou šťávu a vzorek 100% ovocné šťávy jablko a meruňka obsahoval i pyré.

Koncentrace phloridzinu uvedená v tabulce 23 neodpovídá publikovaným údajům v literatuře, kde se obsah phloridzinu pohyboval v rozmezí 2,3 – 38,0 mg·l⁻¹ [10, 42, 43, 44, 45]. V těchto publikacích byly analyzovány džusy vyrobené pouze z jablek, bez přísad jiného ovoce a bez velkých úprav. V této diplomové práci byly testovány dva vzorky 100 % jablečné šťávy. Zaprvé vzorek 100 % jablečného moštu, kde byla naměřena koncentrace phloridzinu pouhých 0,3422 mg·l⁻¹. Zadruhé vzorek Čerstvé šťávy jablko (100% za studena lisovaná), kde byla naměřena nejvyšší koncentrace phloridzinu 6,2817 mg·l⁻¹. Tato hodnota se nejvíce přibližuje intervalu, který je zmíněn výše. Je pravděpodobné, že se vzorek Čerstvé šťávy jablko složením nejvíce přibližuje vzorkům, testovaným ve zmiňovaných publikacích. Obsahuje 100 % nečiřené, nefiltrované, zakalené jablečné šťávy. Většina zbylých testovaných vzorků ovocných nápojů byla čirá šťáva, která se vyznačuje nízkým obsahem fenolů v důsledku procesu čiření. Tento proces vede k i dramatickým změnám v profilu fenolických sloučenin [10, 45]. Suárez a spol. došli k závěru, že stabilizace jablečných šťáv membránovými technologiemi výrazně ovlivňuje hlavní fenolický profil zejména phloridzin, (-)-epikatechin, *p*-kumarový derivát a prokyanidin B1 [38].

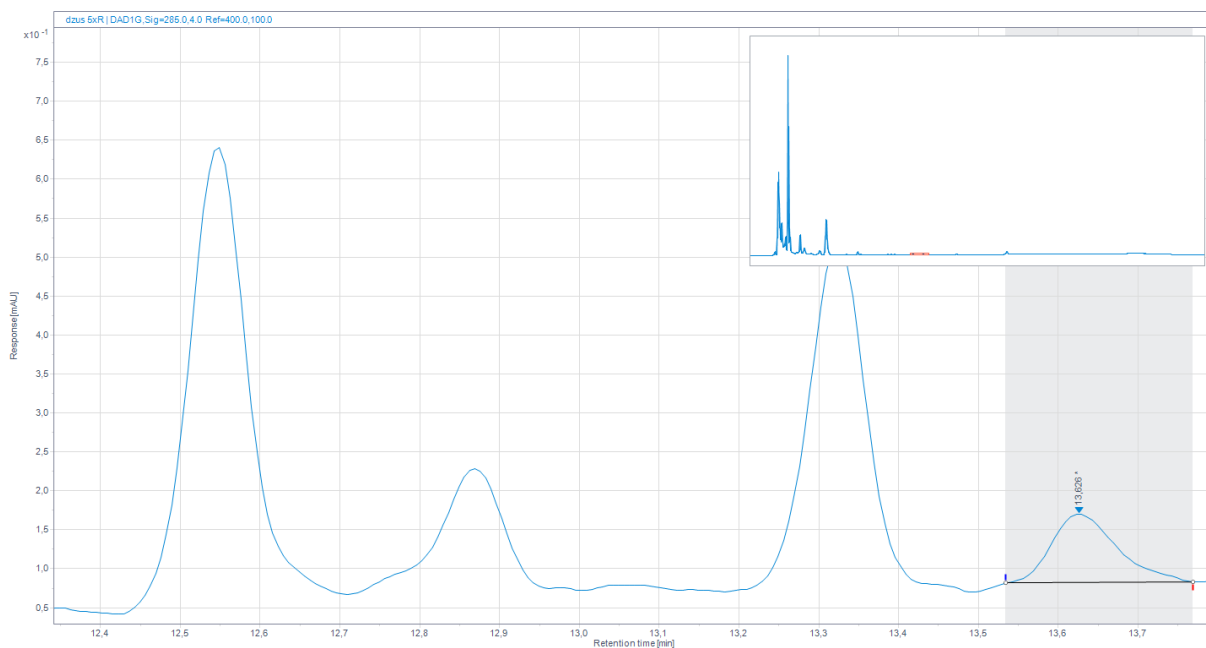
Z výsledků tedy vyplývá, že v komerčních ovocných nápojích, které nejsou vyrobené ze 100% nečiřené jablečné šťávy nelze s přesností určit, kolik jablek bylo do produktu přidáno a zda to odpovídá deklaraci. U některých produktů s vyšším obsahem jablek, byly naměřeny nižší koncentrace phloridzinu než u produktů, které deklarovaly nižší obsah jablečné složky. Jelikož nejvíce jsou vzhledem k objemům produkce falšovány právě ovocné šťávy je možné, že testované vzorky nesplňovaly deklarovaný obsah jablečné složky [5]. Testován byl i vzorek ovocného nápoje Pomeranč, který podle deklarace neobsahuje žádnou jablečnou složku. V tomto případě nebyl ve vzorku phloridzin detekován. Z toho se dá usoudit, že se nedá určit, kolik bylo jablek do produktu přidáno. Pokud ale nebyl v nápoji phloridzin detekován, neobsahuje jablečnou složku. Problémem u nápojů však může být otázka, jaká koncentrace již může být považována za přísadu jablek. LOD bylo stanoveno na 0,06 µg·l⁻¹, je tedy pravděpodobné, že zachytí i phloridzin pocházející např. z jahodové složky v nápoji, jelikož i jahody phloridzin v nízkých koncentracích obsahují [10].

Tabulka 23: Obsah phloridzinu v ovocných nápojích analyzovaných v této diplomové práci

| Vzorek | Obsah phloridzinu [mg·l ⁻¹] |
|--|--|
| Čerstvá šťáva jablko (100% za studena lisované jablečná šťáva) | 6,28 |
| 100% ovocná šťáva jablko a meruňka (69,2 % jablečná šťáva, 9,6 % jablečná dřevina) | 0,03 |
| 100 % jablečný mošt | 0,34 |
| Ovocný nápoj pomeranč | n.d. |
| Ovocný nápoj jablko, arónie, višně, lesní jahoda (25 % jablečné šťávy z koncentrátu) | 0,20 |
| Ovocný nápoj jablko (30 % jablečné šťávy z koncentrátu) | 0,49 |
| Ovocný nápoj B+C+E s chutí lesních plodů (podíl ovocné složky nejméně 30 %) | 0,03 |
| Ovocný nápoj stévie, jablko (nejméně 40% jablko) | 0,10 |

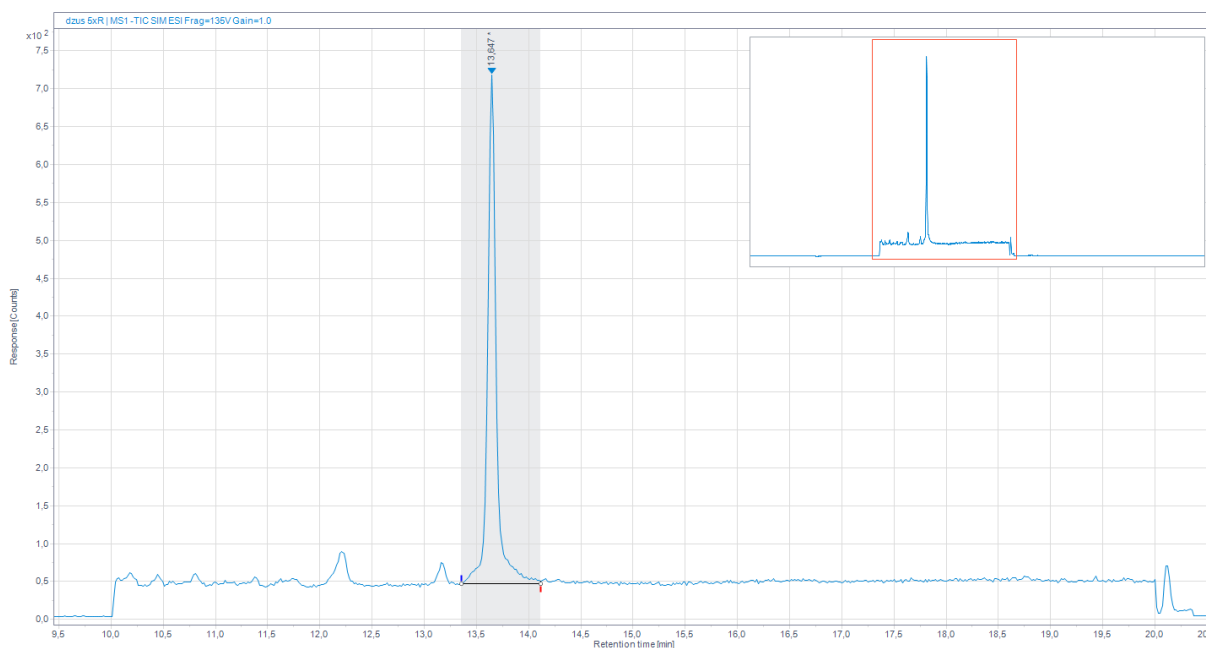


Obrázek 19: obsah phloridzinu v ovocných nápojích analyzovaných v této diplomové práci



Obrázek 20: Záznam na DAD detektoru – vzorek 100% moštu 5x ředěný

Obrázek 20 a obrázek 21 zobrazuje záznamy z analýzy vzorku 100% moštu. Jelikož byl vzorek 5x ředěn signál je na DAD detektoru velmi slabý. Na MS detektoru je signál silnější, ale v porovnání s přesnídávkami, nebo samotnými jablky, je intenzita píku nízká.



Obrázek 21: Záznam na MS detektoru – vzorek 100% moštu, 5x ředěný

5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat metodu pro stanovení phloridzinu a ověřit, zda je phloridzin jako marker vhodný pro prokázání přítomnosti jablečné složky v potravinách. Nejdříve bylo vybráno vhodné rozpouštědlo pro extrakci pevných vzorků. Po sérii testování byl zvolen $\geq 99,8\%$ methanol. Následně se volila atmosféra, při které se bude vzorek extrahovat. Pro otestování byla zvolena odrůda Golden Delicious. Vzorek extrahovaný v dusíkové atmosféře průměrně obsahoval $22 \pm 3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ phloridzinu ($170 \pm 22 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ v přepočtu na sušinu). U vzorku zpracovávaného za přístupu kyslíku byla naměřena nižší koncentrace phloridzinu $19 \pm 3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($150 \pm 22 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ v přepočtu na sušinu). Rozdíl mezi těmito vzorky byl přibližně $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Na základě těchto výsledků, bylo rozhodnuto, že veškeré ostatní vzorky jablek budou připravovány v dusíkovém vaku. Za přístupu kyslíku byly následně extrahovány i vzorky odrůdy Gala a Champion, aby se potvrdil nebo vyvrátil předchozí závěr. Po získání dat bylo zjištěno, že mezi koncentracemi phloridzinu ve vzorcích připravených v dusíkovém vaku a těmi zpracovaných za přístupu kyslíku není žádný statistický rozdíl ($p > 0,05$).

Pro stanovení množství phloridzinu byla použita metoda HPLC s DAD a MS detektorem. Po vyhodnocení prvních dat, se nakonec zvolila mobilní fáze složená z 0,1% kyseliny mravenčí, vody (rozpouštědlo A) a acetonitrilu (rozpouštědlo B). Pro vyhodnocení koncentrací se čerpalo z dat z MS detektoru. Obsah phloridzinu byl měřen u šesti odrůd jablek, kdy byl mezi odrůdami potvrzen statistický významný rozdíl ($p < 0,01$) v obsahu phloridzinu. Tyto rozdíly je důležité brát v potaz, jelikož mohou ovlivnit množství phloridzinu v potravinách vyrobených z jablek. Výsledky analýzy bylo také potřeba přepočítat na obsah v sušině. Z tohoto důvodu byl v jednotlivých vzorcích jablek stanoven obsah vody titrací dle Karl-Fishera. Výsledné hodnoty nekorespondovaly s literaturou, jelikož byly příliš nízké. Z toho důvodu se sušina stanovila metodou sušení.

Pro ověření phloridzinu jako markeru jablek bylo vybráno 16 vzorků potravin, které obsah jablek deklarují na etiketě a také potraviny, které obsah jablek nedeklarují. U vzorků džemů i přesnídávek byl pozorován trend, kde se úměrně se snižujícím se obsahem jablek, snižoval obsah phloridzinu. Z průměrného obsahu phloridzinu v testovaných odrůdách jablek ($16,99 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) byl odhadnut procentuální obsah jablečné složky v potravině. Tyto hodnoty byly porovnány s obsahy deklarovanými na etiketě. Mezi těmito hodnotami nebyl žádný statistický rozdíl ($p > 0,05$), tudíž se díky této metodě dá odhadnout, zda do potraviny bylo přidáno větší množství jablečné složky, než je deklarováno.

U dvou vzorků se odhadovaný obsah jablek neshodoval s deklarací. U přesnídávky s jahodami bylo na etiketě deklarováno 65 % jablek. Naměřené koncentrace phloridzinu, ale naznačují obsah jablek až 80,23 %. Obsah phloridzinu byl tedy o $2,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ vyšší (tj. o 152,4 g jablek na 1 kg výrobku). Odchylna byla také u ovocné směsi meruňka a jablko, kde byla vyšší koncentrace phloridzinu o $1,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (tj. 87 g jablek na 1 kg). Vzhledem k nízkým koncentracím phloridzinu v jahodách $0,38 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (přepočteno na sušinu) [10] a meruňkách $0,07 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (naměřeno v této diplomové práci v meruňkovém džemu obsahujícím 55 % meruněk), nelze předpokládat, že by přídavek meruněk nebo jahod značně ovlivnil koncentraci phloridzinu v potravině. Bylo tedy potvrzeno, že obsah phloridzinu na úrovni přibližně $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (tj. přítomnost přibližně 59 g jablek na 1 kg výrobku) může naznačovat přídavek jablek do ovocných výrobků. Tento předpoklad se potvrdil pouze u pevných vzorků džemů, náplní, přesnídávek a příkrmů. U ovocných nápojů se tento předpoklad nepotvrdil.

Posledními analyzovanými vzorky byly ovocné nápoje a džusy. U těchto vzorků byly naměřeny velmi nízké koncentrace phloridzinu pod $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Obsah phloridzinu nekoreloval s deklarovaným množstvím jablek. Jediný vzorek, který vykazoval vyšší hodnoty byl vzorek čerstvé šťávy jablko, zde byla koncentrace phloridzinu rovna $6,2819 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Tyto vyšší hodnoty koncentrace phloridzinu mohou být způsobeny tím, že šťáva byla za studena lisovaná a nebyla jinak technologicky upravovaná (čiření, filtrace...) Ostatní vzorky byly příliš technologicky upravované a ředěné. Byl analyzován i vzorek, který podle deklarace nemá obsahovat jablko, a to ovocný nápoj Pomeranč. Zde nebylo detekováno žádné množství phloridzinu. Závěrem se tedy dá říci, že využití phloridzinu jako markeru ovocné složky se zdá slibné u pevných vzorků potravin, kde lze i díky množství phloridzinu odhadnout množství přidané jablečné složky. U vzorků ovocných nápojů je potřeba vyvinout přesnější metodu úpravy vzorku, aby výsledky byly přesnější a odezva na detektoru silnější. Zatím lze říci, že pokud nápoj jablko neobsahuje, nemělo by být naměřeno prakticky žádné množství phloridzinu, pokud tedy není potravina vyrobena z jiného ovoce obsahujících phloridzin např. jahody.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] DUROŇOVÁ, Kateřina. Vliv skladovacích podmínek na metabolický profil jablek. Brno, 2012. Disertační práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [2] TWOHIG, Marian; GLEDHILL, Antonietta a BURGESS, Jennifer. *The Determination of Fruit Juice Authenticity Using High Resolution Chromatography, UV, Time-of-Flight MS, and Multivariate Analysis*. Online. In: WATERS CORPORATION. Waters. 2011. Dostupné z: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiR8sfqyauEAXWag_0HHV-JDdIQFnoECBAQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.waters.com%2Fwaters%2Flibrary.htm%3Fcid%3D511436%26lid%3D134648162&usg=AOvVaw2hF8p514m7QoPPrMP9AAqo&opi=89978449. [cit. 2024-02-14].
- [3] Kearney AT and Grocery Manufacturers Association. Consumer Product Fraud: Deterrence and Detection, (2010).
- [4] Vyhláška č. 248/2018 Sb., o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí. In: In: *Zákony pro lidi.cz* [online]. © AION CS 2010–2024 [cit. 11. 2. 2024]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-248?citace=1&text=Vyhl%C3%A1%C5%A1ka%20%C4%8D.%20157%2F2003%20Sb>
- [5] ČÍŽKOVÁ, Helena. *Falšování potravin*. Praha: Verlag Dashöfer, [2019]. ISBN 978-80-87963-88-3.
- [6] Vyhláška č. 379/2021 Sb., o požadavcích na konzervované ovoce a konzervovanou zeleninu, skořápkové plody, houby, brambory a výrobky z nich a banány. In: *Zákony pro lidi.cz* [online]. © AION CS 2010–2024 [cit. 11. 2. 2024]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2021-379/zneni-20220101#f7308389>
- [7] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002 ze dne 28. ledna 2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví postupy týkající se bezpečnosti potravin. In: *Zákony pro lidi.cz* [online]. © AION CS 2010–2024 [cit. 11. 2. 2024]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/pravoEU/dokument?celex=32002R0178&date=20220701>
- [8] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1169/2011 ze dne 25. října 2011, o poskytování informací o potravinách spotřebitelům... In: *Zákony pro lidi.cz* [online]. © AION CS 2010–2024 [cit. 11. 2. 2024]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/pravoEU/dokument?celex=32011R1169&date=20180101>
- [9] R.J. Cole B.Sc. F.R.I.C. A.M.I.Chem.E. (1951) Friedrich Accum (1769–1838). A biographical study, *Annals of Science*, 7:2, 128–143, DOI: 10.1080/00033795100202291
- [10] HRUBÁ, Magdaléna; BAXANT, Josef; ČÍŽKOVÁ, Helena; SMUTNÁ, Veronika; KOVAŘÍK, František et al. Phloridzin as a marker for evaluation of fruit products authenticity. In: *Czech Journal of Food Sciences*. 2021, s. 49–57. ISSN 12121800. Dostupné z: <https://doi.org/10.17221/239/2020-CJFS>.
- [11] RANA, Shalika a BHUSHAN, Shashi. Apple phenolics as nutraceuticals: assessment, analysis and application. In: *Journal of Food Science and Technology*. 2016, s.

1727–1738. ISSN 0022–1155. Dostupné z:
<https://doi.org/10.1007/s13197-015-2093-8>.

- [12] HOLLÁ, Marcela. Metodika pro kvalitativní hodnocení ovoce a zpracovatelských produktů z hlediska obsahu látek prospěšných pro zdraví člověka. Hradec Králové, 2019. Certifikovaná metodika. Univerzita Karlova, farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- [13] MARCHEV, A.; IVANOV, I.; VRANCHEVA, R. a PAVLOV, A. Solid phase extraction and HPLC determination of phloridzin in natural products. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 2013, roč. 2, č. 19, s. 201–203.
- [14] KINDT, M.; ORSINI, M. C. a COSTANTINI, B. Improved High–Performance Liquid Chromatography–Diode Array Detection Method for the Determination of Phenolic Compounds in Leaves and Peels From Different Apple Varieties. Online. *Journal of Chromatographic Science*. 2007, roč. 45, č. 8, s. 507–514. ISSN 0021–9665. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/chromsci/45.8.507>. [cit. 2024–02–03].
- [15] SOLÁŘOVÁ, Veronika. Alergie na jablka. Online. In: BĚLOHLÁVKOVÁ, Simona; FUCHS, Martin a SOLAŘ, František. ALERGIENAPOTRAVINY.CZ ©. Alergie na potraviny. Dostupné z: <https://alergienapotraviny.cz/clanky/alergie-na-jablka/>. [cit. 2024–03–20].
- [16] ZDECHOVSKÝ, Tomáš. Alergie na jablka: Otázka k písemnému zodpovězení E–004847–16. Online. In: Evropský parlament. Dostupné z: https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/E-8-2016-004847_CS.html. [cit. 2024–03–20].
- [17] KSCHONSEK, Josephine; WOLFRAM, Theresa; STÖCKL, Annette a BÖHM, Volker. Polyphenolic Compounds Analysis of Old and New Apple Cultivars and Contribution of Polyphenolic Profile to the In Vitro Antioxidant Capacity. Online. *Antioxidants*. 2018, roč. 7, č. 1. ISSN 2076–3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox7010020>. [cit. 2024–02–04].
- [18] Národní zdravotnický informační portál [online]. Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR a Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2023 [cit. 04.09.2023]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz>. ISSN 2695–0340.
- [19] LATTANZIO, Vincenzo; LATTANZIO, V. M. T. a CARDINALI, Angela. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: *Phytochemistry: Advances in Research*. Kerala: Research Signpost, 2006, s. 23–67. ISBN 81–308–0034–9.
- [20] ADAMCOVÁ, Anežka; ŠATÍNSKÝ, Dalibor; ZATROCHOVÁ, Slavomíra; HOLLÁ, Marcela; ŠÍROVÁ, Karolína et al. Metodika pro identifikaci a detekci bioaktivních látek v rostlinných částech ovocných stromů a odpadní biomase. PDF, Certifikovaná metodika. Hradec Králové: Univerzita Karlova, farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2021. ISBN 978–80–906644–7–0.
- [21] FALCONE FERREYRA, María L.; RIUS, Sebastián P. a CASATI, Paula. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. In: *Frontiers in Plant Science*. 2012, s. 1727–1738. ISSN 1664–462X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222>.

- [22] GOSCH, Christian, Heidi HALBWIRTH a Karl STICH. Phloridzin: Biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. *Phytochemistry* [online]. 2010, 71(8–9), 838–843 [cit. 2023–09–14]. ISSN 00319422. Dostupné z: doi:10.1016/j.phytochem.2010.03.003
- [23] SLANINA, Jiří a Eva TÁBORSKÁ. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2004, roč. 98, č. 5, s. 239–245. ISSN 0009–2770.
- [24] CRESPIY, Vanessa; APRIKIAN, Olivier; MORAND, Christine; BESSON, Catherine; MANACH, Claudine et al. Bioavailability of Phloretin and Phloridzin in Rats. Online. *The Journal of Nutrition*. 2001, roč. 131, č. 12, s. 3227–3230. ISSN 00223166. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jn/131.12.3227>. [cit. 2024–02–14].
- [25] MASUMOTO, Saeko; AKIMOTO, Yukari; OIKE, Hideaki a KOBORI, Masuko. Dietary Phloridzin Reduces Blood Glucose Levels and Reverses Sglt1 Expression in the Small Intestine in Streptozotocin–Induced Diabetic Mice. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, roč. 57, č. 11, s. 4651–4656. ISSN 0021–8561. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf9008197>. [cit. 2024–02–14].
- [26] FRANCCINI, Alessandra a SEBASTIANI, Luca. Phenolic Compounds in Apple (*Malus x domestica* Borkh.): Compounds Characterization and Stability during Postharvest and after Processing. Online. *Antioxidants*. 2013, roč. 2, č. 3, s. 181–193. ISSN 2076–3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox2030181>. [cit. 2024–01–27].
- [27] CARBONARO, Marina; MATTERA, Maria; NICOLI, Stefano; BERGAMO, Paolo a CAPPELLONI, Marsilio. Modulation of Antioxidant Compounds in Organic vs Conventional Fruit (Peach, *Prunus persica* L., and Pear, *Pyrus communis* L.). Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, roč. 50, č. 19, s. 5458–5462. ISSN 0021–8561. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf0202584>. [cit. 2024–04–05].
- [28] CHINNICI, Fabio; BENDINI, Alessandra; GAIANI, Anna; RIPONI, Claudio a CAPPELLONI, Marsilio. Radical Scavenging Activities of Peels and Pulp from cv. Golden Delicious Apples as Related to Their Phenolic Composition. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, roč. 52, č. 15, s. 4684–4689. ISSN 0021–8561. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf049770a>. [cit. 2024–04–05].
- [29] VEBERIC, Robert; TROBEC, Mateja; HERBINGER, Karin; HOFER, Melanie; GRILL, Dieter et al. Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production. Online. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2005, roč. 85, č. 10, s. 1687–1694. ISSN 0022–5142. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2113>. [cit. 2024–04–05].
- [30] BRIVIBA, Karlis; STRACKE, Berenike A.; RÜFER, Corinna E.; WATZL, Bernhard; WEIBEL, Franco P. et al. Effect of Consumption of Organically and Conventionally Produced Apples on Antioxidant Activity and DNA Damage in Humans. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, roč. 55, č. 19, s. 7716–7721. ISSN 0021–8561. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf0710534>. [cit. 2024–04–05].
- [31] VALAVANIDIS, Athanasios; VLACHOGIANNI, Thomie; PSOMAS, Antonios; ZOVOILI, Alexandra a SIATIS, Vasilios. Polyphenolic profile and antioxidant activity of five apple cultivars grown under organic and conventional agricultural practices.

- Online. 2009, roč. 44, č. 6, s. 1167–1175. ISSN 0950–5423. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.01937.x>. [cit. 2024–04–03].
- [32] HECKE, K; HERBINGER, K; VEBERÍČ, R; TROBEC, M; TOPLAK, H et al. Sugar-, acid- and phenol contents in apple cultivars from organic and integrated fruit cultivation. Online. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2006, roč. 60, č. 9, s. 1136–1140. ISSN 0954–3007. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602430>. [cit. 2024–01–28].
- [33] HUNTER, Mark a Larry HULL. Variation in concentrations of phloridzin and phloretin in apple foliage. *Phytochemistry*. 1993, 34(5), 1251–1254. ISSN 0031–9422.
- [34] GOSCH, Christian, Heidi HALBWIRTH, Jasmin KUHN, Silvija MIOSIC a Karl STICH. Biosynthesis of phloridzin in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Plant Science* [online]. 2009, 176(2), 223–231 [cit. 2023–09–16]. ISSN 01689452. Dostupné z: [doi:10.1016/j.plantsci.2008.10.011](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.10.011)
- [35] ADAMCOVÁ, Anežka; HORNA, Aleš a ŠATÍNSKÝ, Dalibor. Determination of Phloridzin and Other Phenolic Compounds in Apple Tree Leaves, Bark, and Buds Using Liquid Chromatography with Multilayered Column Technology and Evaluation of the Total Antioxidant Activity. Online. *Pharmaceuticals*. 2022, roč. 15, č. 2. ISSN 1424-8247. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ph15020244>. [cit. 2024-04-15].
- [36] VEBERIC, Robert; TROBEC, Mateja; HERBINGER, Karin; HOFER, Melanie; GRILL, Dieter et al. Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production. Online. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2005, roč. 85, č. 10, s. 1687-1694. ISSN 0022-5142. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2113>. [cit. 2024-04-15].
- [37] MASOUDI, Hassan; TABATABAEEFAR, A. a BORGHAEE, Ali Mohammed. Determination of storage effect on mechanical properties of apples using the uniaxial compression test. Online. *Canadian Biosystems Engineering*. 2007, č. 49, s. 3.29–3.33. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/242418120_Determination_of_storage_effect_on_mechanical_properties_of_apples_using_the_uniaxial_compression_test#fullTextFileContent. [cit. 2024–03–23].
- [38] SUÁREZ, Belén; PICINELLI, Anna; MORENO, Javier a MANGAS, Juan. Changes in Phenolic Composition of Apple Juices by HPLC with Direct Injection. *J Sci Food Agric*. 1998, č. 78, s. 461-465.
- [39] MENG, Ying; DING, Lin; WANG, Yuan; NIE, Qi-ting; XING, Yang-yang et al. Phytochemical identification of *Lithocarpus polystachyus* extracts by ultra-high-performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight–MS and their protein tyrosine phosphatase 1B and α -glucosidase activities. Online. *Biomedical Chromatography*. 2020, roč. 34, č. 1. ISSN 0269–3879. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bmc.4705>. [cit. 2024–03–31].
- [40] AGUAYO, Encarna; REQUEJO–JACKMAN, Cecilia; STANLEY, Roger a WOOLF, Allan. Effects of calcium ascorbate treatments and storage atmosphere on antioxidant activity and quality of fresh-cut apple slices. Online. *Postharvest Biology and Technology*. 2010, roč. 57, č. 1, s. 52–60. ISSN 09255214. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.03.001>. [cit. 2024–04–05].

- [41] VRHOVSEK, Urska; RIGO, Adelio; TONON, Diego a MATTIVI, Fulvio. Quantitation of Polyphenols in Different Apple Varieties. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, roč. 52, č. 21, s. 6532–6538. ISSN 0021–8561. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf049317z>. [cit. 2024–04–05].
- [42] KERMASHA, S.; GOETGHEBEUR, M.; DUMONT, J. a COUTURE, R. Analyses of phenolic and furfural compounds in concentrated and non-concentrated apple juices. Online. *Food Research International*. 1995, roč. 28, č. 3, s. 245-252. ISSN 09639969. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(94\)00046-B](https://doi.org/10.1016/0963-9969(94)00046-B). [cit. 2024-04-14].
- [43] KAHLE, Kathrin; KRAUS, Michael a RICHLING, Elke. Polyphenol profiles of apple juices. Online. 2005, roč. 49, č. 8, s. 797-806. ISSN 1613-4125. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500064>. [cit. 2024-04-14].
- [44] SCHIEBER, Andreas; KELLER, Petra a CARLE, Reinhold. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. Online. *Journal of Chromatography A*. 2001, roč. 910, č. 2, s. 265-273. ISSN 00219673. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01217-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01217-6). [cit. 2024-04-14].
- [45] MARKOWSKI, J.; BARON, A.; MIESZCZAKOWSKA, M. a PŁOCHARSKI, W. Chemical composition of French and Polish cloudy apple juices. Online. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 2015, roč. 84, č. 6, s. 68-74. ISSN 1462-0316. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/14620316.2009.11512598>. [cit. 2024-04-14].

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

| | |
|----------------------|--|
| CAD | detektro nabitého aerosolu |
| DAD | detektor diodového pole |
| DH | dehydrogenáza |
| DCH2'GT | dihydrochalkon 2'-O-glukosynttransferáza |
| ECD | detektor elektronového záchytu |
| ESI | elektrosprej |
| EU | Evropská unie |
| CH ₃ COOH | kyselina octová |
| CHI | chalkonisomeráza |
| CHS | chalkosyntáza |
| HCOOH | kyselina mravenčí |
| H ₂ O | voda |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| HPLC-MS | vysokoúčinná kapalinová chromatografie za použití hmotnostního spektrometru jako detektoru |
| HPLC-UV | vysokoúčinná kapalinová chromatografie za použití spektroskopie v ultrafialovém spektru |
| IRMS | izotopová hmotnostní spektrometrie |
| M _r | molární hmotnost |
| MS | hmotnostní spektrometr |
| n.d. | nedetekováno |
| LOD | limit detekce |
| LOQ | limit stanovitelnosti |
| LPH | laktáza-phloridzin-hydroláza |
| SNIF-NMR | nukleární magnetická rezonanční spektrometrie s frakcionací přírodních izotopů specifických pro danou lokalitu |
| USD | americký dolar |

8 PŘÍLOHY

Příloha 1: Vzorky použité k analýze potravin



HELLO Ovocná přesnídávka s jablky



HELLO Ovocná přesnídávka s meruňkami



HELLO Ovocná přesnídávka s jahodami



HiPP BIO meruňky - příkrm



Hamé Meruňka a jablko, ovocná směs



Hamé Povidlová náplň se skořicí a vůní rumu



Nature's Promise Bio Meruňkový výběrový džem



Hamé Extra džem ostružinový



Relax Ovocný nápoj jablko, aronie, višně, jahoda



Relax Ovocný nápoj pomeranč



Relax Ovocný nápoj jablko



Albert 100% ovocná šťáva jablko a meruňka



Pfanner B + C + E ovocný nápoj s chutí lesních plodů



Nature's Promise kids 100% Mošt, jablko

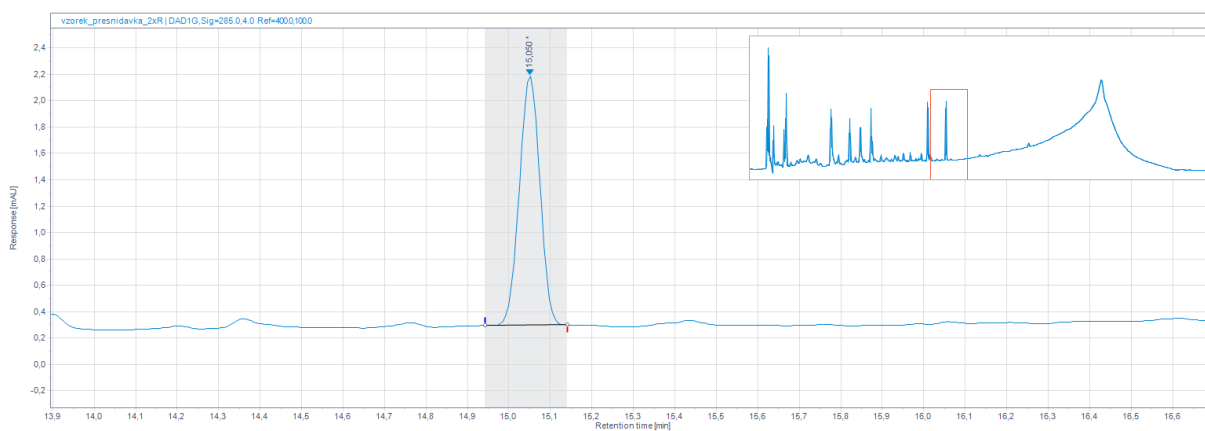


Rio Stévie jablko, jableční nápoj

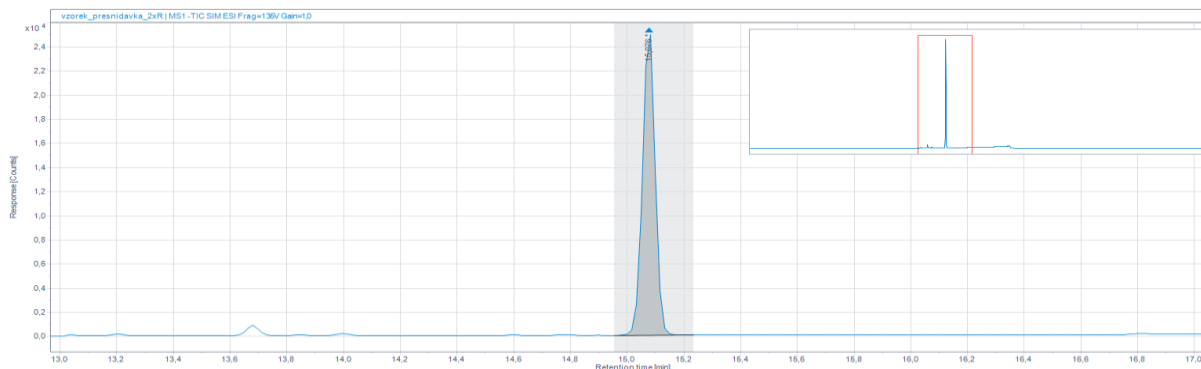


Albert Čerstvá šťáva jablko

Příloha 2: Záznam domácí přesnídávky



Obrázek 22: Chromatogram domáci přesnídávky, měřeno na DAD detektoru



Obrázek 23: Záznam phloridzinu na MS detektoru – vzorek domáci přesnídávky