

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ZMĚNY ANTIOXIDANTŮ VE VYBRANÝCH DRUZÍCH OVOCE V PRŮBĚHU DLOUHODOBÉHO ZMRAŽENÍ

CHANGES OF ANTIOXIDANTS IN SELECTED FRUITS DURING LONG-TERM FREEZING

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

JITKA ŠTINDLOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0484/2009** Akademický rok: **2009/2010**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Jitka Štindlová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)
Studijní obor: Biotechnologie (2810R001)
Vedoucí práce: **doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.**
Konzultanti: Ing. Kateřina Duroňová

Název bakalářské práce:

Změny antioxidantů ve vybraných druzích ovoce v průběhu dlouhodobého zmražení

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše - přehled možností uchování a zpracování ovoce, přehled nutričně významných složek ovoce.
2. Optimalizace metod zpracování vzorků, extrakce a stanovení vybraných nízkomolekulárních antioxidantů v ovoci.
3. Analýza změn sledovaných parametrů v různých druzích ovoce v průběhu mražení celých plodů a ovocných polotovarů.
4. Vliv podmínek zpracování a doby zmražení na nutriční hodnotu ovoce.

Termín odevzdání bakalářské práce: 28.5.2010

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Jitka Štindlová
Student(ka)

doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V této bakalářské práci jsou popisovány některé nízkomolekulární antioxidanty obsažené v jahodách, malinách, borůvkách a brusinkách. Teoretická část práce popisuje také obecné vlastnosti a charakteristiku zkoumaného ovoce.

Praktická část je věnována sledování změn obsahu vybraných antioxidantů v analyzovaném ovoci. Změny daných látek byly sledovány při uchovávání ovoce ve dvou prostředích – v lednici a v mrazicím boxu. V lednici byly skladovány celé plody po dobu osmi dnů. Pokus v mrazicím boxu byl prováděn po dobu dvou měsíců a ovoce bylo skladováno ve čtyřech různých formách – jako celé plody, celé plody impregnované sacharosovým roztokem, dřeň a proslazená dřeň.

Obsah antioxidantů v ovoci byl zjišťován pomocí HPLC a spektrofotometrie. Největší celkový obsah antioxidačních látek byl zjištěn v jahodách, nejnižší naopak v malinách. V průběhu uchovávání si plody udržely část původního obsahu antioxidantů, nejvyšší obsah zůstal zachován v průběhu mražení celých plodů a impregnovaných celých plodů borůvek.

ABSTRACT

In this bachelor thesis some low molecular weight antioxidants contained in strawberries, raspberries, blueberries and cranberries are described. In the theoretical part also general characteristics of these fruits are introduced.

Experimental part was focused on analysis of the changes of selected antioxidant content in the fruits. These changes were monitored during storage in two different conditions – in refrigerator and in freezer. In refrigerator whole fruits were stored for 8 days. The experiment in the freezer was performed for 2 months and the fruits were stored in four different processed forms – as a whole fruit, whole fruit impregnated by sucrose solution, as a pulp and pulp mixed with sucrose.

Antioxidant content in fruits was analyzed by HPLC and spectrophotometry. The highest total content of antioxidants was found in strawberries, while the lowest values were found in raspberries. During storage some part of original antioxidant content stayed conserved, the highest content was preserved in blueberries processed as a whole fruits and impregnated whole fruits.

KLÍČOVÁ SLOVA

Jahody, maliny, borůvky, brusinky, antioxidanty, antioxidační aktivita, anthokyany, celkové flavonoidy, celkové polyfenoly, kyselina askorbová

KEY WORDS

Strawberries, raspberries, blueberries, cranberries, antioxidants, total antioxidant status, anthocyanins, total flavonoids, total polyphenols, ascorbic acid

ŠTINDLOVÁ, J. *Změny antioxidantů ve vybraných druzích ovoce v průběhu dlouhodobého zmražení*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 52 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat především Doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za odborné vedení, ochotu a pomoc při tvorbě bakalářské práce. Dále pak ing. Kateřině Duroňové za pomoc a cenné rady při experimentální práci a zpracování výsledků.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Volné radikály	8
2.1.1	ROS – Reactive oxygen species	8
2.1.2	RNS – Reactive nitrogen species.....	9
2.2	Antioxidanty	9
2.2.1	Flavonoidy	10
2.2.1.1	<i>Anthokyanová barviva</i>	11
2.2.2	Kyselina askorbová.....	12
2.3	Vybrané lokální druhy ovoce	12
2.3.1	Jahodník obecný	13
2.3.1.1	<i>Charakteristika rostliny</i>	13
2.3.1.2	<i>Účinné látky plodů</i>	13
2.3.2	Ostružiník maliník	13
2.3.2.1	<i>Charakteristika rostliny</i>	13
2.3.2.2	<i>Účinné látky plodů</i>	13
2.3.3	Brusnice borůvka	14
2.3.3.1	<i>Charakteristika rostliny</i>	14
2.3.3.2	<i>Účinné látky plodů</i>	14
2.3.4	Brusnice brusinka	14
2.3.4.1	<i>Charakteristika rostliny</i>	14
2.3.4.2	<i>Účinné látky plodů</i>	14
2.4	Úprava ovoce	15
3	CÍL PRÁCE	16
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	17
4.1	Použité chemikálie a přístroje	17
4.1.1	Chemikálie.....	17
4.1.2	Přístroje.....	17
4.2	Vzorky	17
4.2.1	Úprava vzorků před mražením	18
4.2.2	Úprava vzorků pro měření	18
4.2.2.1	<i>Úprava vzorků pro stanovení individuálních flavonoidů pomocí HPLC</i> .	18
4.2.2.2	<i>Úprava vzorků pro stanovení kyseliny askorbové pomocí HPLC</i>	18
4.2.2.3	<i>Úprava vzorků společná pro ostatní stanovení</i>	18
4.3	Stanovení hmotnosti suchého podílu	18
4.4	Stanovení celkové antioxidační aktivity	18
4.4.1	Princip stanovení	18
4.4.2	Postup	19
4.4.3	Vyhodnocení.....	19
4.5	Stanovení celkových polyfenolů	19
4.5.1	Princip stanovení	19
4.5.2	Postup	19
4.5.3	Vyhodnocení.....	20

4.6	Stanovení celkových flavonoidů.....	20
4.6.1	Princip stanovení	20
4.6.2	Postup	20
4.6.3	Vyhodnocení.....	20
4.7	Stanovení obsahu anthokyanů	20
4.7.1	Princip.....	20
4.7.2	Postup	20
4.7.3	Vyhodnocení.....	21
4.8	Stanovení obsahu látek pomocí HPLC	21
4.8.1	Stanovení individuálních flavonoidů.....	21
4.8.1.1	<i>Postup</i>	<i>21</i>
4.8.1.2	<i>Vyhodnocení.....</i>	<i>21</i>
4.8.2	Stanovení individuálních katechinů.....	21
4.8.2.1	<i>Postup</i>	<i>21</i>
4.8.2.2	<i>Vyhodnocení.....</i>	<i>22</i>
4.8.3	Stanovení kyseliny askorbové	22
4.8.3.1	<i>Postup</i>	<i>22</i>
4.8.3.2	<i>Vyhodnocení.....</i>	<i>22</i>
5	VÝSLEDKY A DISKUSE	23
5.1	Stanovení sušiny	23
5.2	Skladování ovoce v lednici.....	23
5.2.1	Celkové flavonoidy.....	24
5.2.2	Celkové polyfenoly.....	24
5.2.3	Obsah kyseliny askorbové	25
5.2.4	Obsah antokyanových barviv	26
5.3	Uchovávání ovoce mražením	26
5.3.1	Celková antioxidační aktivita	27
5.3.2	Celkový obsah polyfenolů	30
5.3.3	Celkový obsah flavonoidů	32
5.3.4	Obsah kyseliny askorbové	35
5.3.5	Celkový obsah anthokyanových barviv.....	38
5.3.6	Stanovení individuálních katechinů.....	40
5.3.6.1	<i>Obsah směsi katechinu a epikatechinu</i>	<i>41</i>
5.3.6.2	<i>Obsah směsi katechingallátu a epicatechingallátu</i>	<i>42</i>
5.3.7	Stanovení individuálních flavonoidů.....	42
5.3.7.1	<i>Změny obsahu rutinu a kyseliny chlorogenové v průběhu mražení.....</i>	<i>44</i>
5.3.7.2	<i>Změny obsahu morinu a myricetinu v průběhu mražení.....</i>	<i>45</i>
5.3.7.3	<i>Změny obsahu kaempferolu a kvercetinu v průběhu mražení.....</i>	<i>46</i>
5.3.7.4	<i>Změny obsahu phloridzinu v průběhu mražení.....</i>	<i>47</i>
5.3.7.5	<i>Srovnání změn obsahu individuálních flavonoidů v průběhu mražení</i>	<i>47</i>
6	ZÁVĚRY	48
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	49
8	PŘÍLOHY	51

1 ÚVOD

Kyslík je nezbytným prvkem pro existenci všech aerobních organismů. Je nesmírně důležitý pro všechny oxidační procesy v buňce. Jeho reaktivní formy – volné radikály – jsou však pro organismus toxické. Jejich přítomnost v organismu je tudíž nežádoucí, protože mohou způsobovat různá vážná onemocnění, jako je například rakovina, diabetes, kardiovaskulární choroby, neurologické poruchy a mnohé jiné. Volné radikály způsobují také stárnutí organismu.

Je proto velmi důležité se před přítomností volných radikálů v organismu chránit. Aerobní organismy jsou schopné produkovat antioxidační látky, které jsou schopné volné radikály tzv. vychytávat – na reaktivní formu kyslíku se navážou a tím zabrání jejich škodlivému účinku.

Část antioxidantů si organismus produkuje sám, je však téměř nezbytné přijímat antioxidační látky také s potravou. Nejvíce důležitých antioxidantů, jako jsou polyfenoly, flavonoidy, karotenoidy nebo vitamin C, se nachází především v ovoci a zelenině. Obsah antioxidantů v ovoci a zelenině se však mění s dobou skladování plodů. Proto je důležité je skladovat tak, aby obsah těchto látek zůstal s prodlužující se dobou skladování pokud možno co nejvyšší.

Cílem této práce je zhodnotit obsah antioxidačních látek ve čtyřech různých druzích ovoce v průběhu dvouměsíčního mražení. Pro experiment bylo vybráno ovoce, které je dobře dostupné na tuzemském trhu – jahody, maliny, brusinky a borůvky. Ovoce bylo skladováno v mrazicím boxu ve čtyřech formách úpravy. V průběhu experimentu byl sledován vliv úpravy ovoce a doby skladování na obsah antioxidačních látek.

Pro srovnání byl obsah antioxidačních látek zjišťován ve zkráceném experimentu při uchovávání těchto druhů ovoce v lednici ve formě celých plodů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Volné radikály

Volné radikály jsou molekuly, atomy nebo ionty, schopné samostatné existence, které obsahují ve své valenční sféře jeden nebo více nepárových elektronů – vysoká reaktivita vyplývá ze snahy všech molekul mít elektrony spárované [1].

Jsou to přirozené vedlejší produkty metabolismu, které, v důsledku agresivního oxidačního působení na buňky, mají za následek stárnutí a mohou způsobovat zdravotní problémy včetně srdečně-cévních chorob a některých typů rakoviny [2]. Tyto radikály působí na biologicky významné sloučeniny, především lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny, pozměňují jejich strukturu a tím modifikují i jejich funkci. Kaskáda reakcí iniciovaná radikály vede k následným změnám ve struktuře buněk, k poškození celých tkání, orgánů a důležitých funkcí v organismu [3]. V potravinách se oxidační procesy projevují žluknutím tuků, poškozováním některých biologicky aktivních látek, hnědnutím světlé dužniny plodů a jinými změnami [2].

Jde především o reaktivní kyslíkové radikály (ROS – reactive oxygen species) a dusíkové radikály (RNS – reactive nitrogen species), které jsou uvedeny v následující tabulce:

Tabulka č. 1: Reaktivní formy kyslíku a dusíku [6]

RADIKÁLY	NERADIKÁLY
superoxidový aniont (superoxid) O_2^-	peroxid vodíku H_2O_2
hydroxylový radikál OH	singletový kyslík 1O_2
hydroperoxylový radikál HO_2	kyselina chlorná HClO
peroxylové ROO, alkoxylové RO	ozon O_3
oxid dusnatý NO	
oxid dusičný N_2O_3	

2.1.1 ROS – Reactive oxygen species

ROS vznikají jako vedlejší produkt biochemických pochodů, zejména respirace. Při respiraci je produkován hlavně superoxidový radikálaniont jedoelektronovou redukcí molekuly kyslíku oxidovanými formami kofaktorů enzymů účastnících se dýchacího řetězce. Dalšími cestami pak vznikají ostatní ROS – peroxid vodíku vzniklý disproportionací superoxidového radikálaniontu může reakcí s Fe^{2+} (Fentonova reakce) nebo se semichinony (např. semichinonovou formou koenzymu Q10, tzv. „organic Fenton reaction“) poskytovat vysoce cytotoxický hydroxylový radikál, reakcí s oxidem dusnatým pak peroxynitrit apod. [4]

Postupná redukce dikyslíku vede nejprve k superoxidovému radikálu, následně k peroxidu vodíku (který není radikálem), k hydroxylovému radikálu a nakonec vzniká netoxická voda (produkt čtyřelektronové redukce dikyslíku) [1].

Superoxidový radikál není příliš reaktivní, ale je prekursorem a výchozí látkou pro tvorbu dalších redukovaných reaktivních forem kyslíku, kam především patří hydroxylový radikál. Reaktivní formy kyslíku podléhají řadě reakcí a s organickými molekulami poskytují „organické“ obdoby radikálů (peroxylový radikál, alkoxylový radikál). Navíc jsou mezi sebou vázány řadou reakcí, při kterých může vznikat opět kyslík [1].

Poškození buněčných struktur a tkání je často vyvoláno řetězovým průběhem reakcí [4].

2.1.2 RNS – Reactive nitrogen species

Reaktivní dusíkaté radikály vznikají stejně jako ROS homolytickým štěpením kovalentní dvouelektronové chemické vazby, z čehož vyplývá, že každý fragment štěpení získá jeden nepárový elektron. K této reakci je potřeba dodat velké množství energie – např. UV zářením, vysokou teplotou. Radikály mohou však také vznikat buď přidáním jednoho nepárového elektronu k neutrální molekule – redukcí, nebo také odebráním jednoho elektronu neutrální molekule – oxidací [5].

Nejvýznamnějším dusíkatým radikálem je $\text{NO}\cdot$ – oxid dusnatý. $\text{NO}\cdot$ je poměrně jednoduchá molekula, která je však za určitých okolností prudce jedovatou látkou. Je to radikál, ale při nízkých koncentracích reaguje velmi pomalu s většinou molekul, včetně kyslíku. To je způsobeno několika faktory [5]:

- Pohotově a průběžně vychytávání v erythrocytech (reaguje rychle se železem) – vzniká methemoglobin a nitrát.
- Difuze oxidu dusnatého do krve a jeho inaktivace hemoglobinem je mnohem rychlejší než jeho syntéza.
- In vivo reaguje dostatečně rychle jen s tranzitními kovy.
- V nízkých koncentracích má spíše regulační funkci

Při patologicky nejvýznamnější reakci $\text{NO}\cdot$ se superoxidem vzniká toxický peroxynitrit, který je odpovědný za nitraci a hydroxylaci tyrosinu [5].

RNS mohou však být při některých fyziologických procesech také prospěšné – účastní se např. fagocytárního zabíjení mikrobů nebo nádorových buněk nebo působí jako lokální hormony CNS [5].

2.2 Antioxidanty

Reparativní procesy v organismu nemohou samy plně eliminovat poškození biomolekul, významnou roli při ochraně před volnými radikály hraje prevence, tj. redukce příčin jejich vzniku. Jednou z možností, jak organismus chránit před vlivem exogenních i endogenních volných radikálů, je působení antioxidantů. Antioxidanty jsou molekuly, které – jsou-li přítomny v malých koncentracích ve srovnání s látkami, jež by měly chránit – mohou zabraňovat nebo omezovat oxidační destrukci těchto látek. Kromě endogenních nízkomolekulárních antioxidantů, jako je glutathion, kyselina močová, koenzym Q a další, se v poslední době do centra pozornosti řadí mnoho látek přírodního původu, které se do lidského organismu dostávají společně s potravou [3].

Z hlediska chemické podstaty jsou antioxidanty velmi různorodou skupinou, a proto se liší i chemická podstata jejich antioxidačního působení (reakcí s radikály přerušují řetězovou radikálovou reakci, váží do komplexů katalyticky působící kovy, reakcí s kyslíkem snižují jeho množství aj.) [2].

Vyčerpání antioxidantů obecně vede k poškození tkáně v důsledku procesů označovaných obecně jako tzv. oxidační stres. Míra schopnosti tkáně vzdorovat oxidačnímu stresu je určena jednak množstvím v ní přítomných antioxidantů, jednak jejich druhem. Parametr, který koreluje se schopností tkáně odolávat oxidačnímu stresu, je označován jako antioxidační kapacita. [4]

Ačkoliv je známo kolem 4 000 antioxidantů, nejznámější a nejvýznamnější jsou vitamin C, vitamin E a karotenoidy. Mezi další látky s antioxidačními vlastnostmi patří fenolové nebo polyfenolové sloučeniny, jako jsou resveratrol, katechin a kvercetin, a flavonoidy. Důležité je, že neexistuje žádný antioxidant, který by odstraňoval všechny volné radikály (např. superoxid

je odstraňován superoxidodismutázou, která je však naprosto neúčinná vůči volnému hydroxylovému radikálu). V lidském organismu jsou kyslíkové radikály neutralizovány řadou obranných mechanismů, bránících buňku před oxidativním poškozením. Tyto obranné mechanismy jsou shrnuty v tabulce 2 [6].

Tabulka č. 2: Fyziologické zhášecí systémy [6]

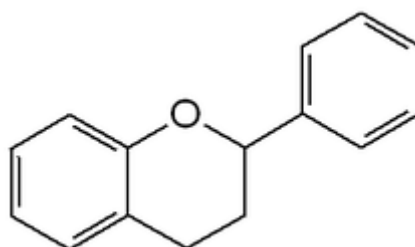
ENZYMATICKÉ	NEENZYMATICKÉ		
superoxiddismutáza	vitamin C, E, A	flavonoidy	lykopen
glutathionperoxidáza	polyfenoly	koenzym Q	transferin
kataláza	albumin	fytoestrogeny	feritin
glutathiontransferáza	selen	glutathion	ceruloplazmin
	bilirubin	kyselina lipoová	kyselina močová

Obecně je efekt antioxidace způsobován třemi mechanismy – inhibicí tvorby volných radikálů, interferencí s již vytvořenými radikály a reparací poškození způsobených oxidativními látkami. K zásadním obranným mechanismům patří především vitaminy, konkrétně alfa a gama tokoferol, betakaroten, vitamin A a vitamin C [6].

Antioxidačním vitaminům (vitaminu A, E, C a betakarotenu) a zejména suplementaci těmito vitaminy byla v posledních desetiletích minulého století připisována významná úloha v prevenci a léčbě civilizačních a nádorových chorob. Současné klinické poznatky uvedené předpoklad nepotvrzují ani nepodporují teorii, že by suplementace antioxidanty mohla být všeobecně využita v prevenci kardiovaskulárních onemocnění. Podkladem pro toto skeptické konstatování se staly rozporuplné výsledky studií provedených v posledních 15 letech, přičemž podstatnou úlohu hrál metodický přístup, který měl vztah mezi přívodem antioxidantů a zdravotním stavem u sledovaných populačních skupin ověřit [6].

2.2.1 Flavonoidy

Flavonoidy jsou velmi rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů [7]. U většiny flavonoidů je C₃ řetězec součástí heterocyklického (pyranového) kruhu. Flavonoidy jsou tedy odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny 2H-chromenu, substituovaného v poloze C-2 fenylovou skupinou, který se nazývá flavan. Flavanový skelet se skládá ze dvou benzenových kruhů a kruhu odvozeného od 2H-pyranu, který je s druhým benzenovým jádrem spojen vazbou v poloze C-2 [8]. Struktura flavanu je zobrazena na obrázku č. 1.



Obrázek č. 1: Struktura flavanu [9]

Běžně bývají všechny tři kruhy substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami a jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace [7]. Podle stupně oxidace

C₃ řetězce se rozeznávají následující základní struktury flavonoidů – katechiny (flavan-3-oly), leukoanthokyanidiny (flavan-3,4-dioly), flavanony, flavanonoly, flavony, flavonoly a anthokyanidiny [8].

Přírodní flavonoidy se nejčastěji vyskytují ve formě O-glykosidů, obsahují tedy ve své molekule necukernou součást (aglykon) a cukernou složku [7].

Flavonoly a flavony jsou nejčastější flavonoidy, se kterými se setkáváme v ovoci a zelenině [10]. Dominantní flavonoid ve výživě člověka je flavonol kvercetin, který se nachází ve vysokých koncentracích v běžně konzumovaných potravinách [7].

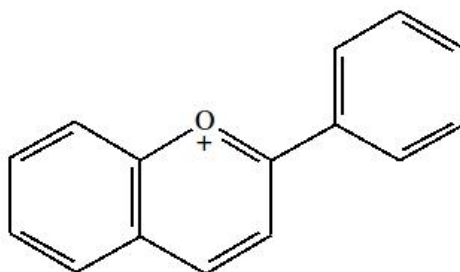
Hlavními flavanoly jsou katechiny (katechin, epikatechin, epigallokatechin) a jejich estery s kyselinou gallovou [7].

Kvantitativní stanovení jednotlivých glykosidů je obtížné [11], proto je obsah flavonoidů v potravinách obecně stanovován jako aglykony po hydrolýze potravin s cílem zcela snížit složitost analýzy. Podmínky pro hydrolýzu by však měly být optimalizovány tak, aby se aglykon zcela uvolnil, aniž by byla vyvolána jejich degradace [10].

2.2.1.1 Anthokyanová barviva

Anthokyanany, též nazývané anthokyaniny, jsou nejrozšířenější a početně velice rozsáhlou skupinou přírodních barviv. Dosud bylo v přírodních zdrojích identifikováno asi 300 různých anthokyanů. Mnoho druhů ovoce, zeleniny, květin a dalších rostlinných materiálů vděčí za svoji atraktivní oranžovou, červenou, fialovou a modrou barvu, která zvyšuje jejich spotřebitelskou oblibu, právě této skupině ve vodě rozpustných barviv [8].

Anthokyanany jsou glykosidy různých aglykonů, které se nazývají anthokyanidiny. Všechny anthokyanidiny jsou odvozeny od jedné základní struktury, kterou je flavyliový (2-fenylbenzopyryliový) kation. Struktura je zobrazena na následujícím obrázku [8].



Obrázek č. 2: Flavyliový kation [8]

Uvádí se, že v přírodě existuje celkem 15 různých anthokyanidinů. Všechny jsou v poloze C-4' substituovány hydroxylovou skupinou a vzájemně se liší dalšími substitucemi. V potravinách má význam pouze 6 anthokyanidinů s hydroxyskupinou v poloze C-3. V sestupném pořadí jsou to kyanidin, pelargonidin, peonidin, delfinidin, petunidin a malvidin. Barva materiálů, které je obsahují, je do značné míry barvou těchto aglykonů [8].

Volné aglykony anthokyanidiny se vyskytují v rostlinných pletivech zřídka. Ve všech rostlinných materiálech jsou hlavními pigmenty glykosidy anthokyanidinů (anthokyanany) [8].

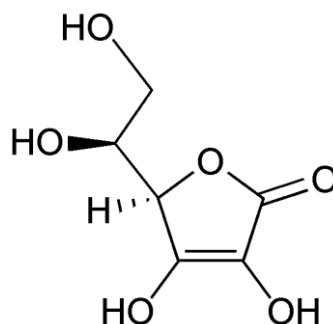
V některém ovoci či zelenině jsou přítomny anthokyanany odvozené od jediného anthokyanidinu, jindy jsou pigmenty odvozeny od několika různých anthokyanidinů, jako např. anthokyanany jahod, které jsou odvozeny od pelargonidinu a kyanidinu [8].

2.2.2 Kyselina askorbová

Kyselina askorbová – vitamin C – je esenciální, ve vodě rozpustný mikronutrient, který je při normální funkci organismu nezbytný pro řadu biochemických dějů. Lidé ztratili schopnost tento vitamin syntetizovat ve svém organismu díky mutaci v genetickém kódu L-glukonolaktonoxidasy, enzymu nezbytného pro biosyntézu tohoto vitamínu [12].

Za vitamin C je všeobecně považován reverzibilní oxidačně-redukční systém, který je charakterizován přenosem dvou elektronů a který tvoří kyselina L-askorbová (γ -lakton 2-oxo-L(-)-gulonové kyseliny), její monoanion askorbát, dále kyselina semidehydro-L-askorbová jakožto meziprodukt ve formě volného radikálu a konečně kyselina L-dehydroaskorbová (γ -lakton 2,3-dioxo-L-(+)-gulonové kyseliny). Přenos elektronů je reverzibilní, dokud není porušena kruhová struktura kyseliny dehydroaskorbové. Když dojde k jejímu hydrolytickému rozštěpení, vzniká kyselina 2,3-dioxo-L-gulonová a aktivita vitamínu C zaniká [12].

Struktura kyseliny askorbové je znázorněna na následujícím obrázku.



Obrázek č. 3: Kyselina askorbová [13]

Vitamin C se nachází téměř ve všech živých organizmech, nejvíce ho obsahuje čerstvá zelenina a ovoce, zejména citrusové plody. Snadno se ničí při skladování, při povaření a při dalších kulinářských úpravách, protože kyselina askorbová tak přechází na kyselinu dehydroaskorbovou, která poměrně snadno otevírá laktonový kruh, což má za následek ztrátu biologické aktivity. Rozklad vitamínu C urychlují i enzymy a stopy kovů z nářadí a nádobí, takže ztráty nastávají již při opracování rostlinného materiálu [12].

Kyselina askorbová je velmi citlivá na vnější prostředí. Ztráty obsahu se pohybují v mezích 20 – 80 %. Nejběžnější ztráty se dosahují skladováním, dále při ohřevu, kdy působí vzdušný kyslík. Nejstabilnější je vitamin C při zmrazování a mrazírenském skladování ovoce a zeleniny. Tato výhoda může pominout při nešetrném způsobu rozmrazování [14].

2.3 Vybrané lokální druhy ovoce

Na území České republiky jsou známy nejrůznější druhy ovoce. Lze je členit podle vzrůstu nebo plodu.

Podle vzrůstu rozlišujeme ovoce stromové, keřové a ovoce popínavých rostlin.

Podle plodů rozlišujeme jádrové, peckové, bobulovité neboli drobné a skořápkové ovoce. Jádroviny mají jádřinec s jádrem – patří k nim např. jabloně a hrušně. Peckoviny obsahují v dužnatém oplodí tvrdou pecku se semenem – patří k nim např. třešně, švestky nebo broskve. Bobule jsou plody s mnoha semeny uloženými v měkké dužnině. K bobulovinám patří

například borůvky, brusinky nebo rybíz. Skořápkové ovoce má plody ve skořápce – sem patří např. vlašské nebo lískové ořechy [15].

2.3.1 Jahodník obecný

2.3.1.1 Charakteristika rostliny

Jahodník obecný (*Fragaria vesca*) je vytrvalá bylina se šikmým a větvitým oddenkem, z něhož vyrůstají přízemní růžice trojčetných listů. Květy jsou složeny z pěti korunních plátků, bíle zbarvených, okrouhle vejčitých, 4 až 8 mm dlouhých. Plody jahodníku jsou jahody – červeně zbarvené složené plody (souplodí) s mnoha vtlačenými nažkami [16, 17].

Kromě planě rostoucích lesních jahod existuje velké množství šlechtěných velkoplodých odrůd jahod zahradních. Uvádí se, že existuje zhruba 3000 odrůd kulturního jahodníku [1].

2.3.1.2 Účinné látky plodů

Koncem zrání jahody získávají anthokyany, které jahodám dávají nejen červenou barvu, ale působí jako velmi účinné antioxidanty, které ochraňují struktury buněk v těle a brání je před poškozením kyslíkovými radikály ve všech orgánových systémech těla. Skladba fenolů v jahodách z nich činí ovoce ochraňující zdraví srdce, s protizánětlivými a antikancerogenními účinky. Katechiny v jahodách působí protizánětlivě, vážou jedovaté těžké kovy. Jahody jsou mimořádně bohaté na kyselinu listovou, vitamin C, draslík a mangan. Jsou velmi dobrým zdrojem vlákniny, riboflavinu, vitamínu B5, omega-3 mastných kyselin (z jadérek), vitamínu B6, hořčíku a mědi [1, 18].

2.3.2 Ostružiník maliník

2.3.2.1 Charakteristika rostliny

Ostružiník maliník (*Rubus idaeus*) je keř s dvouletými (zřídka víceletými) pruty, jež na zimu shazují listy. Listy jsou lichozpeřené, 3četné až 5četné. Korunní plátky květů jsou bílé a poměrně malé. Každý z početných semeníčků uprostřed květu dozrává v malou červenou (řidčeji žlutou), zevně trochu plstnatě šedě ojněnou peckovičku; dohromady skládají složený plod, jemuž říkáme malina. V době zralosti se oddělují všechny peckovičky od bílého lůžka najednou a odpadají jako dužnatý malý náprstek [16].

Maliník roste v celém mírném pásu severní polokoule. V zahradách se pěstují velkoplodé odrůdy, jichž je známo několik set [16].

2.3.2.2 Účinné látky plodů

Maliny obsahují celou škálu látek s příznivými účinky na zdraví, u kterých byly prokázány antioxidantní, antimikrobiální a antikancerogenní účinky. Maliny jsou bohatým zdrojem fytonutrientů, vitamínu C, manganu, riboflavinu, kyseliny listové, niacinu, hořčíku, draslíku, mědi a vlákniny. Vitamin A v malinách je přírodním prostředkem proti očním obtížím, protože je částí zraťového purpuru rhodopsinu. Vysoká koncentrace rutinu zpevňuje cévní stěny. Maliny jsou bohaté na vitamin C, obsahují kolem 1 % bílkovin, asi 13 % cukrů, dále vápník, hořčík, fosfor, železo, draslík a význačný podíl mědi. Maliny obsahují silné antioxidanty kvercetin a gallovou kyselinu, jež vykazují antikancerogenní účinky, působí proti onemocnění srdce a oběhového systému a projevům stárnutí. Anthokyany malin, které dávají plodům červenou barvu, vykazují nejen antioxidantní vlastnosti, ale působí i antimikrobiálně [1, 19].

2.3.3 Brusnice borůvka

2.3.3.1 Charakteristika rostliny

Brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus*) je nízký, do 50 cm vysoký keřík s listy střídavými, na zimu opadavými. Květy vyrůstají jednotlivě v úžlabí listů a jsou převislé. Plody jsou černomodré bobule – borůvky, které obsahují velké množství červené šťávy a drobná semínka. Roste hojně v řidších lesích, kde tvoří rozsáhlé porosty. Je rozšířena ve větší části Evropy [16, 17].

2.3.3.2 Účinné látky plodů

Borůvky obsahují vitaminy A a C, železo, draslík a hořčík. Jsou dobrým zdrojem vlákniny, mají nízký obsah sodíku a samozřejmě žádný cholesterol. Borůvky jako jediná „modrá“ potravina jsou bohatým zdrojem polyfenolů, tj. účinných antioxidantů, zahrnujících polyfenolové kyseliny, taniny, flavonoly a anthokyany. K hlavním anthokyanidinům přítomným v borůvkách se řadí delphinidin, cyanidin, petunidin a malvidin. Anthokyany spolu s železem a vitamínem C příznivě ovlivňují krvetvorbu [1, 20].

2.3.4 Brusnice brusinka

2.3.4.1 Charakteristika rostliny

Brusnice brusinka (*Vaccinium vitis-idaea*) je nízký polokeř, asi 10 – 20 cm vysoký. Střídavé listy na podzim neopadávají, zůstávají zelené i přes zimu. Květy skládají trochu převislé hrozny, jsou bílé až narůžovělé. Plody jsou bobule – brusinky, které jsou zprvu bílé, poté červené, lesklé, kulaté s trochu nahořklou chutí. Roste hojně v sušších lesích, hlavně borových, na kyselých půdách [16].

2.3.4.2 Účinné látky plodů

Vedle cukrů obsahují plody kyselinu citronovou a jablečnou a také kyselinu benzoovou, která je známým konzervačním prostředkem. Proto se brusinky tak snadno nekazí jako jiné plody [16].

Ochranný účinek brusinkové šťávy proti infekcím močových cest a močového měchýře byl potvrzen řadou studií a je spojován s tím, že brusinková šťáva okyseluje moč. Obsahuje antibakteriální kyselinu hippurovou a také další látky, které snižují schopnost bakterie *E. coli* (odpovědné za 80-90 % infekcí) uchytit se na stěnách močových cest. Tyto látky byly identifikovány jako protoantokyanidiny, které jsou odlišné od obdobných látek v jiných potravinách rostlinného původu, což dle odborníků vysvětluje unikátní antiadhézní aktivitu brusinek [21].

Brusinky působí také jako přírodní probiotikum, v zažívacím traktu zabíjejí bakterie vyvolávající infekce a onemocnění z potravin. Jiná studie potvrdila, že složka brusinkové šťávy zabraňuje bakterii, odpovědné za většinu žaludečních vředů, *Helicobacter pylori*, uchytit se na epiteliálních buňkách žaludeční stěny. Brusinková šťáva byla také účinná při snížení hladiny bakterie *Streptococcus mutans* ve slinách – hlavního původce zubního kazu. Obdobné účinky vykazaly jen borůvky, ale ve snížené míře [21].

2.4 Úprava ovoce

Malé plody jsou bohatým zdrojem bioaktivních látek, jako jsou flavonoidy, fenolové kyseliny a vitamin C, které vykazují potenciální pozitivní účinek na zdraví. Příjem polyfenolů je spojován se snížením rizika chronických chorob, jako jsou onemocnění srdce a rakovina, pravděpodobně kvůli jejich antioxidačním vlastnostem. Mnoho fenolických sloučenin bylo zjištěno v bobulovitých plodech a byly sledovány rozdíly v jejich profilech [22]. Vzhledem k sezónnímu charakteru tohoto ovoce je zajímavé zjistit, zda zmrazené bobule, nebo z bobulí vyrobené produkty, by rovněž mohly představovat dobrý zdroj bioaktivních sloučenin [23]. Několik studií uvádí, že zpracování může mít za následek značné ztráty fenolů rozpustných ve vodě – zejména anthokyanů. Antioxidační kapacita může být ovlivněna také zpracováním a skladováním [22].

Dobrým způsobem, jak ovoce zachovat, je použití mrazicích technologií, které kombinují nízké teploty a snížení aktivity vody. Nicméně vzhledem k velkému obsahu zmrazitelné vody vede zmrazení k výraznému poškození buněk a chemicko-fyzikálním i organoleptickým změnám, s následnou ztrátou kvality výrobku [23].

V posledních letech několik studií ukázalo, že je důležitá dehydratace ovoce před mražením, a to za účelem snížení obsahu vody a omezení poškození potravin vzniklými krystalky ledu. Osmotické ošetření před zmražením se používá k uchování některých druhů ovoce, které mohou být skladovány dlouhou dobu s dobrým zachováním struktury, barvy a chuti po rozmrazení [23].

3 CÍL PRÁCE

Cílem předložené práce bylo studium antioxidantů a jejich změn v různých druzích ovoce v průběhu zmražení.

V rámci práce byly řešeny následující dílčí cíle:

- 1) Rešerše – přehled možností uchovávání a zpracování ovoce, přehled nutričně významných složek ovoce.
- 2) Optimalizace metod zpracování vzorků, extrakce a stanovení vybraných nízkomolekulárních antioxidantů v ovoci.
- 3) Analýza změn sledovaných parametrů v různých druzích ovoce v průběhu mražení celých plodů a ovocných polotovarů.
- 4) Vliv podmínek zpracování a doby zmražení na nutriční hodnotu ovoce.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie a přístroje

4.1.1 Chemikálie

Acetonitril pro HPLC, Gradient Grade – Sigma (SRN)
Methanol pro HPLC, Gradient Grade – Sigma (SRN)
Cyanin-chlorid – Sigma-Aldrich (USA)
Folin-Ciocalteuovo činidlo – RNDr. Jan Kulich, Hradec Králové (ČR)
(-)-Katechin – Sigma-Aldrich (SRN)
Kyselina L-askorbová – Sigma-Aldrich (SRN)
Kyselina gallová – Sigma-Aldrich (SRN)
Kyselina metafosforečná – Lachema (ČR)
„Total antioxidant status kit“ – Randox Laboratories (USA)

Ostatní použité chemikálie byly vesměs čistoty p.a. a byly získány od běžných dodavatelů.

4.1.2 Přístroje

Analytické váhy (AND HR-120)
Centrifuga – U-32-R, Boeco (Německo)
Mikrocentrifuga – Mikro 200, Hettich Zentrifugen
Spektrofotometr – Helios γ , Unicam (VB)
Sestava HPLC, Ecom spol. s.r.o. (ČR)

- Termostat – LCO 102 LONG
- Pumpa, programátor gradientu - Beta 10
- Detektor – LCD 2084
- Degaser – DG 3014
- Kolona Eclipse XDB-C18, 5 μ m, 4,6 x 150 mm (Agilent Technologies – USA)
- Kolona Zorbax NH₂, 5 μ m, 4,6 x 150 mm (Agilent Technologies – USA)

Ultrazvuk – PS 02000 Ultrasonic Compact Cleaner 1,25L, PowerSonic (SR)
Vakuová odparka
Třepačka

4.2 Vzorky

V práci byly studovány jahody (dovoz Maroko), maliny (dovoz Španělsko), borůvky (dovoz Chile) a brusinky (dovoz USA). Všechno ovoce bylo ve 4 různých formách skladováno v mrazicím boxu při -18°C po dobu dvou měsíců.

Celé plody ovoce byly také krátkodobě (po dobu 8 dnů) skladovány v lednici. Při tomto skladování byla analyzována pouze část sledovaných parametrů.

Pro porovnání byla na všechny sledované parametry analyzována také komerční mražená jahodová dřeň. Použita byla „Hluboce zmražená jahodová dřeň“ od výrobce AGRIMEX Vestec a.s. Ve složení této dřene je uváděno:

- jahodový protlak min. 80 %
- cukr min. 10 %
- voda

4.2.1 Úprava vzorků před mražením

Všechny sledované druhy ovoce byly mraženy ve čtyřech různých formách – celé plody, celé impregnované plody, dřeň a dřeň s přísadkou sacharózy:

- Celé plody – před mražením byly plody sledovaného ovoce pouze omyty a poté mraženy bez jakékoliv další úpravy.
- Celé impregnované plody – po dobu 5 hodin při 30°C byly celé plody ovoce ponořeny v 50% vodném roztoku sacharózy a poté bez dalších úprav mraženy.
- Dřeň – plody ovoce byly rozmixovány a vzniklá dřeň byla zmražena.
- Dřeň s přísadkou sacharózy – plody ovoce byly rozmixovány a do dřeně bylo přidáno 10 % sacharózy. Vzniklá směs byla mražena.

4.2.2 Úprava vzorků pro měření

Před stanovováním antioxidačních látek ve zkoumaném ovoci musely být vzorky upraveny tak, aby jejich forma vyhovovala dané analýze, a aby zjišťované látky byly stabilizovány.

4.2.2.1 Úprava vzorků pro stanovení individuálních flavonoidů pomocí HPLC

Zvážené množství vzorku bylo v třecí misce rozetřeno s několika ml 1 M HCl a ponecháno 20 minut v lednici hydrolyzovat (ve tmě a chladu). Poté byla směs odstředěna a supernatant byl odlit do dělicí baňky, kde byl dvakrát vytřepáván s ethylacetátem. Organická fáze byla dána do varné baňky a ethylacetát byl odpařen pomocí vakuové odparky. Ke zbytku v baňce byl přidán 1 ml mobilní fáze. Vzniklý roztok byl nastříkovan na HPLC.

4.2.2.2 Úprava vzorků pro stanovení kyseliny askorbové pomocí HPLC

Zvážené množství vzorku bylo rozetřeno s 2% kyselinou metafosforečnou. Vzniklá směs byla odstředěna a získaný roztok byl nastříkovan na HPLC.

4.2.2.3 Úprava vzorků společná pro ostatní stanovení

Zvážené množství vzorku bylo rozetřeno s 10 ml methanolu okyseleného 0,1 obj. % HCl. Směs byla 20 minut třepána na třepačce a poté zcentrifugována. Supernatant byl přelit do odměrné baňky na 25 ml a extrakce pomocí 10 ml methanolu byla opakována ještě jednou. Po přidání druhých 10 ml do odměrné baňky byla baňka doplněna na 25 ml.

Tento roztok byl použit pro stanovení celkových polyfenolů, celkových flavonoidů, anthokyanů, celkové antioxidační aktivity a individuálních katechinů pomocí HPLC.

4.3 Stanovení hmotnosti suchého podílu

Suchý podíl byl v analyzovaném ovoci stanovován gravimetricky. Ovoce bylo zváženo a umístěno do sušárny, kde bylo sušeno při 60°C po dobu asi 4 hodin. Poté bylo znovu zváženo. Zjištěný obsah sušiny byl vztažen na gram jedlého podílu vzorku.

4.4 Stanovení celkové antioxidační aktivity

4.4.1 Princip stanovení

ABTS je inkubováno peroxidásou (metmyoglobin) a peroxidem vodíku, čímž je produkován kation ABTS⁺. Ten má poměrně stabilní modro-zelenou barvu, která je měřena při 600 nm. Antioxidanty přítomné v měřeném vzorku potlačují intenzitu barvy do té míry, která je přímo úměrná jejich celkové koncentraci.

Principem je tedy sledování míry inhibice přeměny chromogenu substrátem. Čím vyšší je absorbance dané směsi, tím více chromogenu bylo přeměněno a ve vzorku byla menší koncentrace antioxidantů.

4.4.2 Postup

Podle návodu přiloženého u kitu firmy Randox byly připraveny všechny potřebné reagentie – práškové byly pomocí pufru převedeny do tekuté formy a tekuté byly s pufrem smíchány v určeném poměru. Do zúžené kyvety byly postupně pipetovány roztoky tak, jak je uvedeno v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Množství pipetovaných roztoků

	blank	standard	vzorek
deionizovaná voda	10 µl	8 µl	8 µl
standard	-	2 µl	-
vzorek	-	-	2 µl
chromogen	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml

Po napipetování těchto roztoků byla změřena absorbance (A_1) vzniklého roztoku v kyvetě. Poté bylo přidáno 100 µl substrátu a po třech minutách byla změřena absorbance roztoku (A_2).

4.4.3 Vyhodnocení

Výsledná hodnota celkové antioxidační aktivity vzorků byla zjištěna podle vzorců uvedených u použitého kitu:

$$faktor = \frac{C_{\text{standardu}}}{(\Delta A_{\text{blank}} - \Delta A_{\text{standardu}})}$$

$$ABTS = faktor \cdot (\Delta A_{\text{blank}} - \Delta A_{\text{vzorku}})$$

ΔA bylo vypočítáno jako rozdíl absorbancí $A_2 - A_1$ daného vzorku. Výsledná koncentrace antioxidantů byla přepočítána na mmol v g suchého podílu.

4.5 Stanovení celkových polyfenolů

4.5.1 Princip stanovení

Vzorek reaguje s Folin-Ciocalteuovým činidlem za vzniku modrého zbarvení, jehož intenzita, která je přímo úměrná koncentraci polyfenolů ve vzorku, je poté zjišťována spektrofotometricky jako absorbance vzniklých roztoků při 750 nm. Jako standard byla použita kyselina gallová.

4.5.2 Postup

Do zkumavky byl napipetován 1 ml desetkrát zředěného Folin-Ciocalteuova činidla, 1 ml destilované vody a 50 µl vzorku (methanolového extraktu). Na blank bylo místo vzorku pipetováno 50 µl destilované vody. Roztok byl důkladně promíchán. Po pěti minutách byl k roztoku pipetován 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Vzniklý roztok byl opět

důkladně promíchán a ponechán 15 minut v klidu. Poté byla měřena absorbance roztoku při 750 nm proti blanku. Pro experiment v lednici byly vzorky změřeny dvakrát a pro výpočet použita průměrná hodnota, pro experiment v mrazicím boxu byl každý vzorek měřen pouze jednou.

4.5.3 Vyhodnocení

Pro výpočet obsahu polyfenolů byla použita rovnice získaná z kalibrační křivky kyseliny gallové sestrojené v rozmezí koncentrací 0,1-0,5 mg/ml:

$$A = 1,2892 \cdot c.$$

Celkový obsah polyfenolů byl přepočítán na mg v g suchého podílu.

4.6 Stanovení celkových flavonoidů

4.6.1 Princip stanovení

Přítomnost flavonoidů v reakční směsi vyvolá změnu zbarvení. Intenzita tohoto zbarvení, která je přímo úměrná koncentraci flavonoidů ve vzorku, je měřena spektrofotometricky při 510 nm. Jako standard byl použit katechin.

4.6.2 Postup

Do zkumavky bylo napipetováno 0,5 ml vzorku (methanolového extraktu), 1,5 ml destilované vody, 0,2 ml dusitanu sodného a roztok byl důkladně promíchán. Po pěti minutách bylo přidáno 0,2 ml chloridu hlinitého a roztok byl opět promíchán. Po dalších pěti minutách bylo k roztoku přidáno 1,5 ml hydroxidu sodného a 1 ml vody a roztok byl promíchán. Po patnácti minutách byla měřena absorbance roztoku při 510 nm proti blanku (fyziologickému roztoku). Pro experiment v lednici byly vzorky změřeny dvakrát a pro výpočet použita průměrná hodnota, pro experiment v mrazicím boxu byl každý vzorek měřen pouze jednou.

4.6.3 Vyhodnocení

Pro výpočet obsahu flavonoidů ve vzorku byla použita rovnice získaná z kalibrační křivky katechinu sestrojené v rozmezí koncentrací 0,05-0,3 mg/ml:

$$A = 3,3482 \cdot c.$$

Celkový obsah flavonoidů byl vyjádřen v mg na g suchého podílu.

4.7 Stanovení obsahu anthokyanů

4.7.1 Princip

Intenzita zbarvení methanolového extraktu je přímo úměrná koncentraci anthokyanů ve vzorku. Jako standard byl použit cyanin-chlorid.

4.7.2 Postup

Byla měřena absorbance získaného methanolového extraktu vzorku proti blanku (okyselenému methanolu) při 528 nm. Pro experiment v lednici byly vzorky změřeny dvakrát a pro výpočet použita průměrná hodnota, pro experiment v mrazicím boxu byl každý vzorek měřen pouze jednou.

4.7.3 Vyhodnocení

Pro výpočet obsahu anthokyanů ve vzorku byla použita rovnice kalibrační křivky cyanin-chloridu sestavené v rozmezí koncentrací 1-20 µg/ml:

$$A = 60,3368 \cdot c.$$

Celkový obsah anthokyanů byl vyjádřen v mg na g suchého podílu.

4.8 Stanovení obsahu látek pomocí HPLC

HPLC (High performance liquid chromatography) neboli vysoce účinná kapalinová chromatografie je založená na afinitě jednotlivých složek vzorku ke stacionární fázi.

Analyzovaný vzorek je nastříkovan na začátek kolony a unášen mobilní fází. Jednotlivé složky se v koloně zachycují a poté ji postupně opouští – podle toho, jak silně jsou stacionární fází zadržovány. Následně se dostávají do detektoru, který vyhodnotí intenzitu signálu dané látky.

Kvalitativní charakteristikou látky je její retenční čas, kvantitu určuje plocha píku.

4.8.1 Stanovení individuálních flavonoidů

4.8.1.1 Postup

Jako mobilní fáze byl použit roztok methanolu, acetonitrilu a okyselené vody v poměru 20 : 30 : 50. Okyselená voda byla připravena z destilované vody a kyseliny orthofosforečné v poměru 99 : 1. Eluce byla izokratická, kolona byla v termostatu zahřívána na 30°C a průtok byl nastaven na 0,75 ml za minutu. Byla použita kolona Eclipse XDB-C18. Na začátek kolony byl nastříkovan vzorek a detekce látek probíhala v detektoru při 370 nm.

4.8.1.2 Vyhodnocení

Ze získaných chromatogramů byly zjištěny plochy píků a porovnány s plochami standardů. Z kalibračních křivek byl poté vypočítán obsah daných látek. Celkový obsah jednotlivých flavonoidů ve vzorku byl přepočítáván na mg v kg suchého podílu.

Kalibrační křivky pro stanovení individuálních flavonoidů byly naměřeny v paralelní diplomové práci [24]:

- Rutin:	$A = 19,91 \cdot c$
- Kyselina chlorogenová:	$A = 17,44 \cdot c$
- Phloridzin:	$A = 1,176 \cdot c$
- Myricetin:	$A = 371,3 \cdot c$
- Morin:	$A = 129,8 \cdot c$
- Kvercetin:	$A = 329,9 \cdot c$
- Kaempferol:	$A = 310,6 \cdot c$

4.8.2 Stanovení individuálních katechinů

4.8.2.1 Postup

Jako mobilní fáze byl použit roztok methanolu a vody v poměru 45 : 55. Eluce byla izokratická, kolona byla v termostatu zahřívána na 30°C a průtok byl nastaven na 0,75 ml za minutu. Byla použita kolona Eclipse XDB-C18. Na začátek kolony byl nastříkovan vzorek a detekce látek probíhala v detektoru při 280 nm.

4.8.2.2 *Vyhodnocení*

Ze získaných chromatogramů byly zjištěny plochy píků a porovnány s plochami standardů. Z kalibračních křivek byl poté vypočítán obsah daných látek. Celkový obsah směsi katechinů a směsi gallátů ve vzorku byl přepočítáván na mg v kg suchého podílu.

Kalibrační křivky pro stanovení individuálních katechinů byly naměřeny v paralelní diplomové práci [24]:

- Směs katechinu a epikatechinu: $A = 46,355 \cdot c$.
- Směs katechin-gallátu a epikatechin-gallátu: $A = 135 \cdot c$.

4.8.3 Stanovení kyseliny askorbové

4.8.3.1 *Postup*

Jako mobilní fáze byl použit roztok 0,05 M octanu sodného a acetonitrilu v poměru 95 : 5. Eluce byla izokratická, kolona byla v termostatu zahřívána na 30°C a průtok byl nastaven na 0,6 ml za minutu. Byla použita kolona Zorbax NH₂. Na začátek kolony byl nastříkovan vzorek a detekce látek probíhala v detektoru při 254 nm.

4.8.3.2 *Vyhodnocení*

Z chromatogramů byly zjištěny plochy píků a porovnány s naměřenou kalibrační křivkou standardu – kyseliny askorbové sestrojené v rozmezí koncentrací 10-100 µg/ml. Z kalibrační křivky byl poté vypočítán její obsah ve vzorku. Celkový obsah kyseliny askorbové byl přepočítáván na mg v g suchého podílu.

Kalibrační křivka: $A = 328,96 \cdot c$.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Stanovení sušiny

Výsledky stanovení sušiny v průběhu experimentu v lednici i v mrazicím boxu jsou shrnuty do následující tabulky – uváděna je hmotnost v gramech sušiny na gram jedlého podílu ovoce.

Tabulka č. 4: Obsah sušiny ve vzorcích v průběhu skladování

Ovoce	Forma skladování	Čerstvé plody	Lednice		Mrazicí box	
		Odběr 1	Odběr 2	Odběr 3	Odběr 2	Odběr 3
Jahody	Celé plody	0,1031	0,0884	0,0801	0,0730	0,0778
	Celé impregnované plody				0,1043	0,1072
	Dřeň				0,0547	0,0687
	Proslazená dřeň				0,1622	0,1671
Maliny	Celé plody	0,1281	0,1363	0,1361	0,1236	0,1070
	Celé impregnované plody				0,1835	0,1941
	Dřeň				0,1275	0,1124
	Proslazená dřeň				0,1957	0,1947
Borůvky	Celé plody	0,1659	0,1685	0,1717	0,1229	0,1656
	Celé impregnované plody				0,1482	0,1480
	Dřeň				0,1606	0,1550
	Proslazená dřeň				0,2483	0,2408
Brusinky	Celé plody	0,1115	0,1050	0,1155	0,1262	0,1043
	Celé impregnované plody				0,1049	0,1269
	Dřeň				0,1145	0,1143
	Proslazená dřeň				0,1962	0,1933
Jahody komerčně mražené					0,1779	

V průběhu celého skladování se obsah sušiny ve vzorcích příliš nemění. V průběhu skladování v lednici obsah mírně stoupá u malin, což bylo potvrzeno i pozorováním – plody značně sesychaly. U skladování vzorků v mrazicím boxu lze srovnat obsah sušiny v celých neupravovaných a celých impregnovaných plodech a také v proslazené a neproslazené dřeni. U vzorků, při jejichž přípravě byla přidána sacharosa, je obsah sušiny evidentně vyšší. Tato skutečnost značně ovlivňuje navážku a tudíž i koncentrace jednotlivých látek v těchto vzorcích.

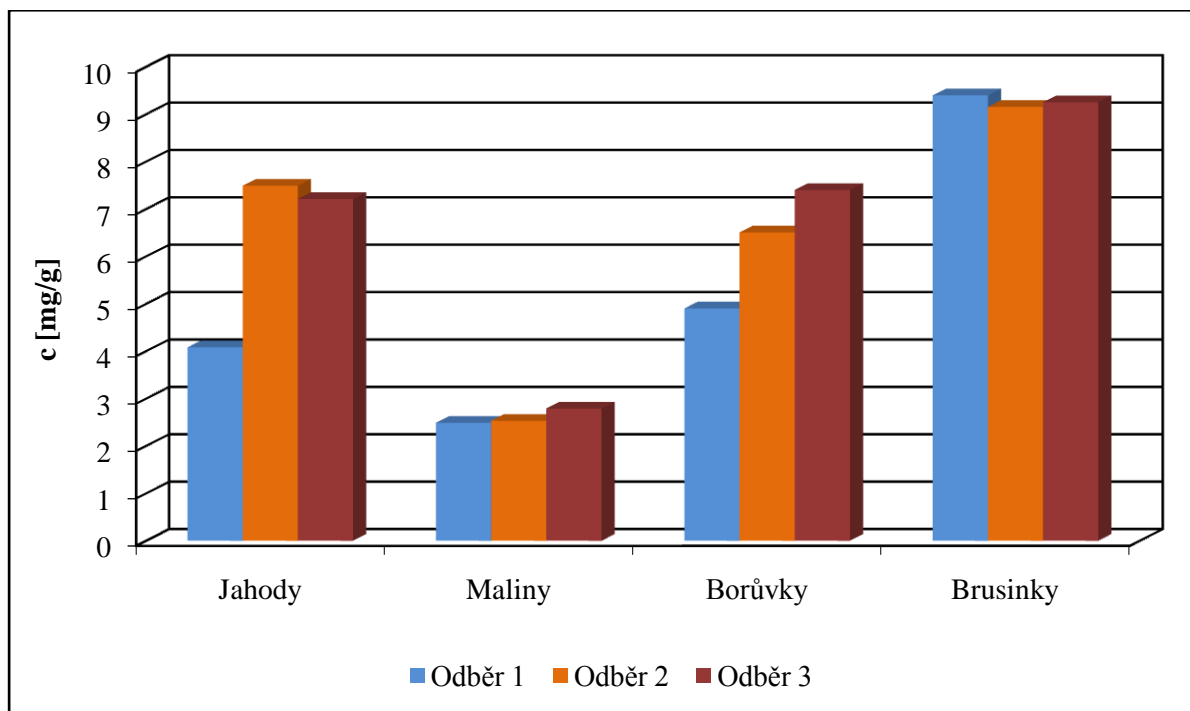
5.2 Skladování ovoce v lednici

Počáteční hodnoty sledovaných parametrů byly u všech druhů ovoce proměřeny ihned po zakoupení. Poté byly celé plody uloženy do ledničky a skladovány při teplotě 8°C. Všechny parametry byly znovu stanovovány po čtyřech a po osmi dnech. Při tomto skladování byly zjišťovány změny celkových flavonoidů, celkových polyfenolů, anthokyanů a kyseliny askorbové.

5.2.1 Celkové flavonoidy

Celkový obsah flavonoidů byl zjišťován podle postupu uvedeného v kapitole 3.5.2. Zjištěné výsledky jsou shrnuty v následujícím grafu. Každá hodnota byla měřena dvakrát, v grafu jsou uvedeny průměrné hodnoty ze dvou měření.

Graf č. 1: Celkový obsah flavonoidů u ovoce skladovaného v lednici



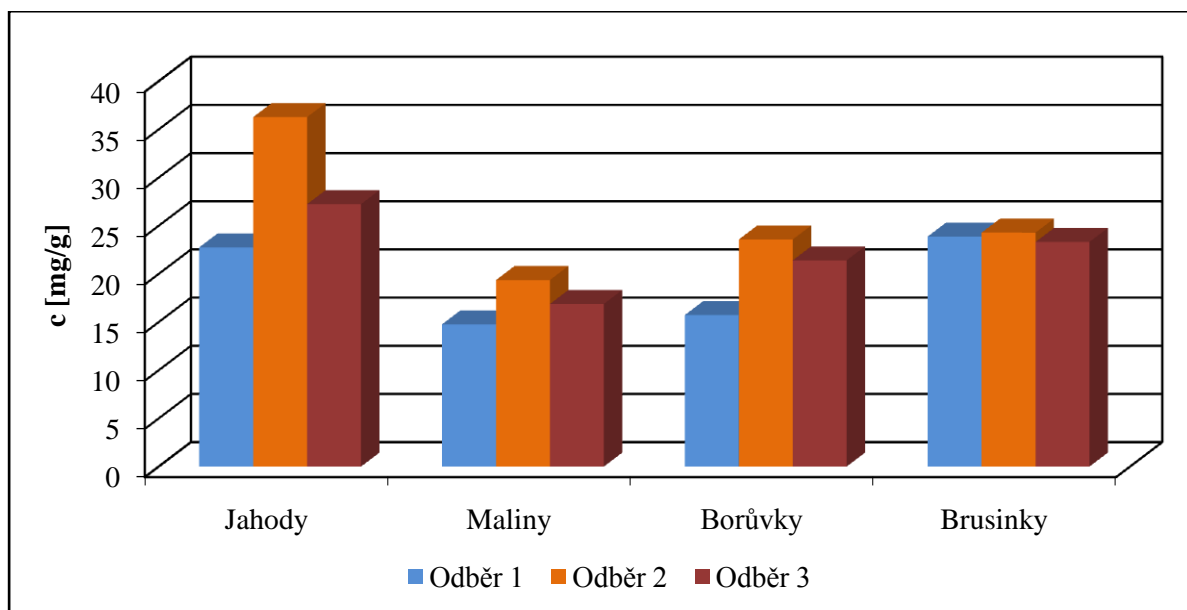
Z grafu je patrné, že celkový obsah flavonoidů se v průběhu skladování v lednici u jahod zvýšil, poté však mírně klesl – tato odchylka však mohla být pravděpodobně způsobena chybou měření. Borůvky vykazují téměř lineární vzestup obsahu flavonoidů. Nejvyšší a poměrně konstantní obsah těchto látek je v brusinkách a nejnižší, ale také téměř konstantní koncentraci flavonoidů obsahují maliny.

Rozdíly v průběhu skladování prakticky odpovídají rozdílům na začátku měření. Ke zvýšení obsahu u borůvek a jahod mohlo dojít reakcí plodu na změnu teploty, ale také tím, že při zakoupení nemusely být plody úplně zralé a dozrály až po několika dnech v lednici. Dalším možným důvodem narůstání obsahu flavonoidů může být individualita každého jednotlivého plodu – v žádných dvou plodech není obsah naprosto stejný, tudíž mohlo dojít k tomu, že pro analýzu byly vybrány plody, které se lišily už původním obsahem.

5.2.2 Celkové polyfenoly

Celkový obsah polyfenolů ve vzorcích byl stanovován podle postupu uvedeného v kapitole 3.4.2. Naměřené hodnoty jsou shrnuty do grafu č. 2.

Graf č. 2: Celkový obsah polyfenolů zjištěný u ovoce skladovaného v lednici

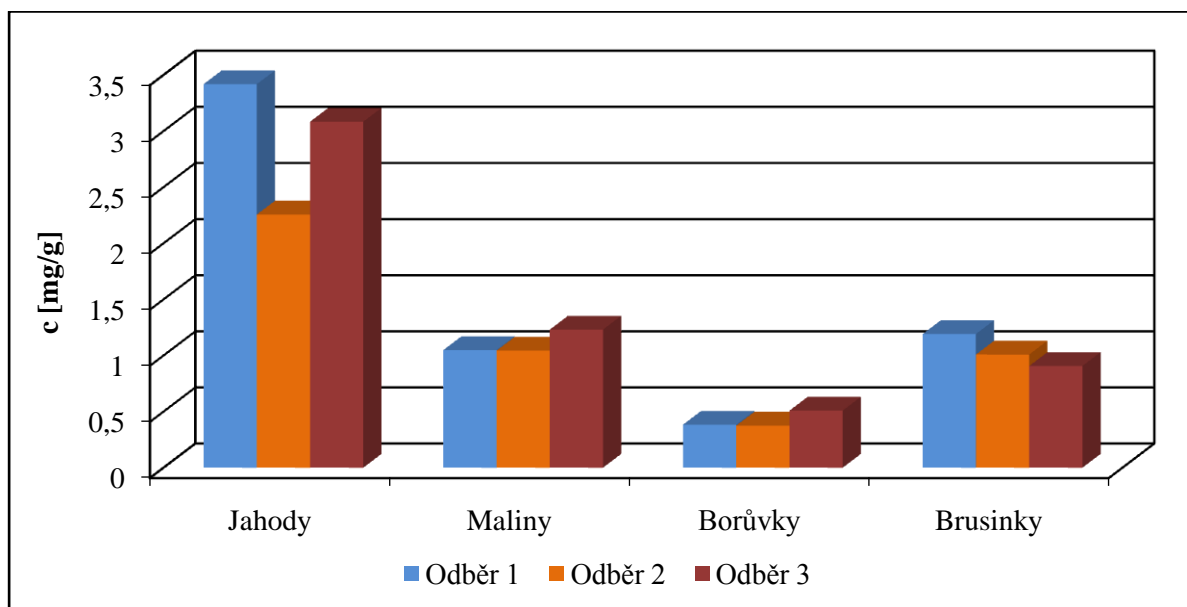


Obsah polyfenolů se v průběhu skladování téměř nemění v brusinkách. Jahody ze začátku vykazují značný nárůst, poté obsah opět klesá. To bylo pravděpodobně způsobeno odlišnostmi jednotlivých plodů nebo dozráním plodů až v průběhu uskladnění. V malinách byl obsah polyfenolů ze všech analyzovaných druhů ovoce nejnižší, přičemž se obsah v průběhu skladování měnil jen nepatrně. V borůvkách se nejdříve obsah polyfenolů mírně zvýšil a poté se držel téměř na stejné hodnotě.

5.2.3 Obsah kyseliny askorbové

Obsah kyseliny askorbové byl u všech vzorků stanovován podle postupu, který je uveden v kapitole 3.7.4. Získané výsledky jsou shrnuty do následujícího grafu.

Graf č. 3: Celkový obsah kyseliny askorbové a jeho změny v průběhu skladování v lednici

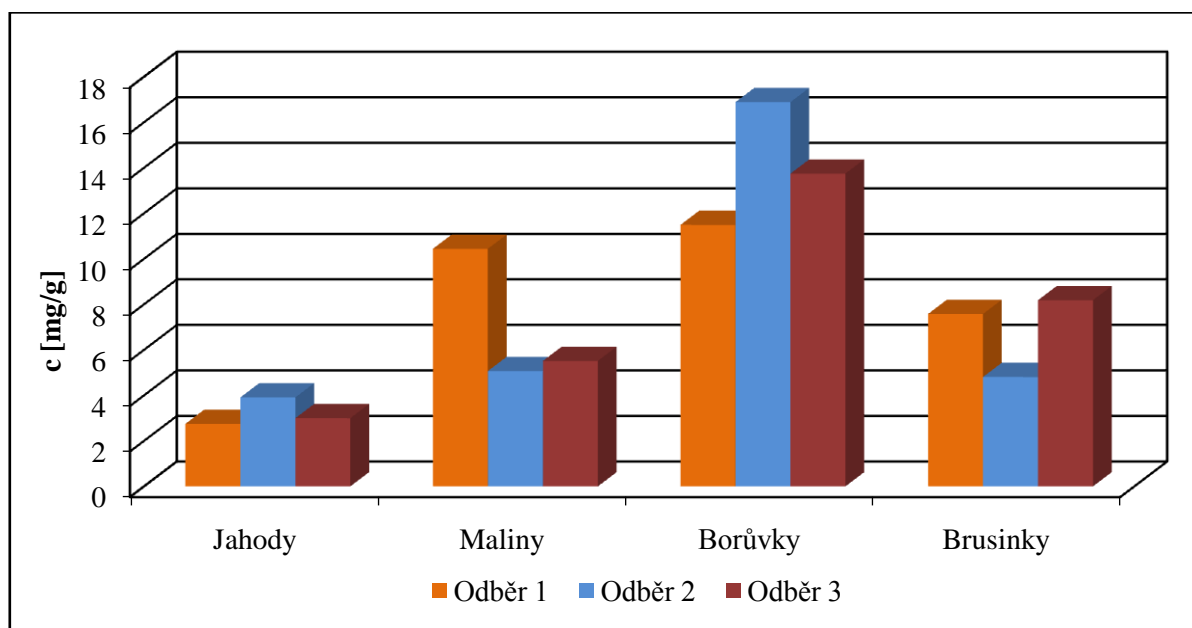


Z výše uvedeného grafu lze říci, že nejvyšší obsah kyseliny askorbové je v jahodách, zato nejméně této látky mají borůvky. Kromě mírného poklesu u jahod při druhém odběru lze říci, že obsah vitamínu C ve sledovaných druzích ovoce příliš nekolísá a drží se téměř na původních hodnotách.

5.2.4 Obsah antokyanových barviv

Obsah barviv byl ve vzorcích stanovován spektrofotometricky podle postupu uvedeného v kapitole 3.6.2. Celkový obsah, vyjádřený v mg barviv na g suchého podílu a jejich změnu v čase shrnuje následující graf.

Graf č. 4: Změny obsahu anthokyanových barviv ve vzorcích



Obsah anthokyanových barviv odpovídá zbarvení analyzovaného ovoce. Nejméně anthokyanů obsahují jahody a v průběhu skladování se obsah příliš nemění. V malinách se obsah v průběhu skladování poměrně značně snižuje (o cca 55%). Tato změna mohla být způsobena pravděpodobně ztrátou vody skladovaných plodů, což poté ovlivňuje přepočítání obsahu látek na suchý podíl. Brusinky nevykazují příliš velké změny, rozdíly v obsahu v průběhu skladování mohou být způsobeny reakcí plodů, spíše však různým obsahem látek v každém jednotlivém plodu. Obsah anthokyanových barviv je nejvyšší v borůvkách. V průběhu skladování došlo navíc k rapidnímu nárůstu obsahu. To bylo pravděpodobně způsobeno dozráváním plodů až v průběhu skladování, případně lepším uvolněním barviv z vázaných forem u zralejších nebo déle uchovávaných plodů.

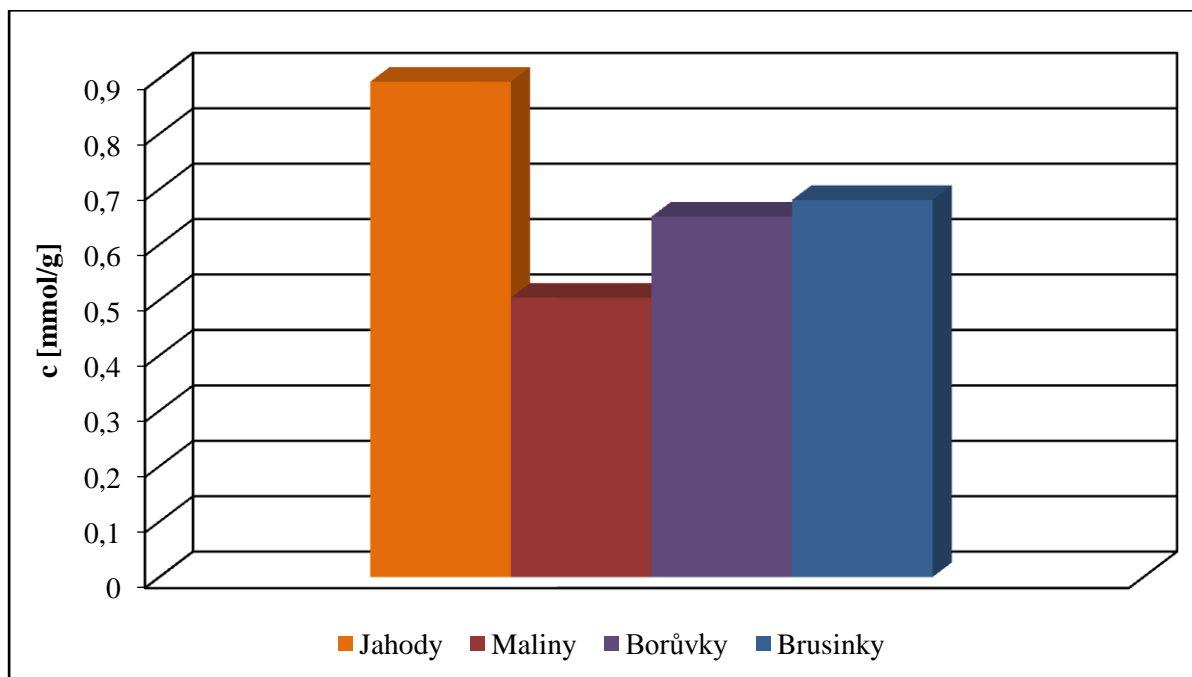
5.3 Uchovávání ovoce mražením

Počáteční hodnoty jednotlivých parametrů zjištěné pro analýzu změn ovoce probíhající během skladování v lednici byly použity i pro analýzu plodů uchovávaných v mrazicím boxu. Proto jsou všechny výchozí hodnoty pro celé plody, celé impregnované plody, dřeň i proslazenou dřeň identické. Obsah všech analyzovaných látek byl stanovován po 28 a 56 dnech, pouze obsah kyseliny askorbové byl stanovován po 28 a 63 dnech.

5.3.1 Celková antioxidační aktivita

Celková antioxidační aktivita zmraženého ovoce i ovocných polotovarů byla stanovována podle postupu v uvedeného v kapitole 3.3.2 pomocí TAS kitu od firmy Randox. Následující grafy vystihují změny koncentrací celkových antioxidantů ve všech sledovaných druzích ovoce v průběhu dvouměsíčního mražení.

Graf č. 5: Celková antioxidační aktivita čerstvého ovoce



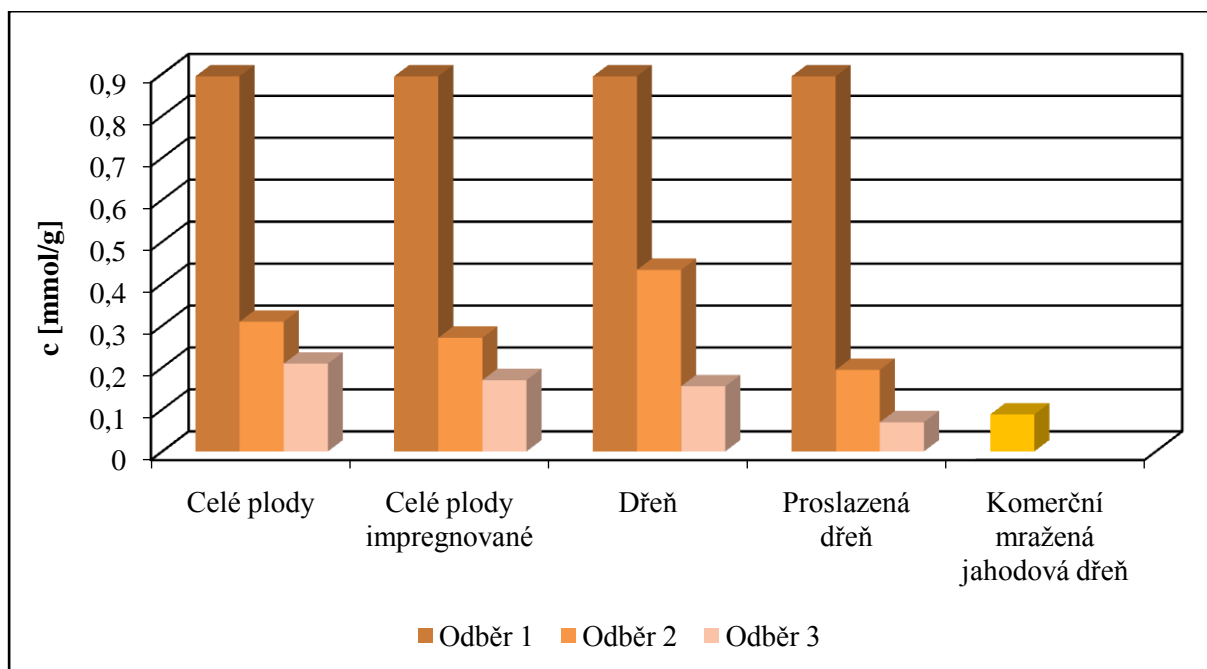
Graf č. 5 shrnuje celkovou antioxidační aktivitu u čerstvého ovoce před mražením. Je z něj dobře vidět, že při porovnání koncentrací antioxidantů ve sledovaných druzích ovoce bylo zjištěno, že nejvyšší celkovou antioxidační aktivitu vykazují jahody, nejnižší naopak maliny. Borůvky a brusinky mají hodnotu TAS srovnatelnou. Částečně tento výsledek koresponduje s obsahem kyseliny askorbové, která je jedním z hlavních faktorů antioxidačního komplexu přispívajících k hodnotě TAS v jednotlivých plodech.

Následující grafy č. 6-9 porovnávají vliv zpracování ovoce na hodnotu TAS.

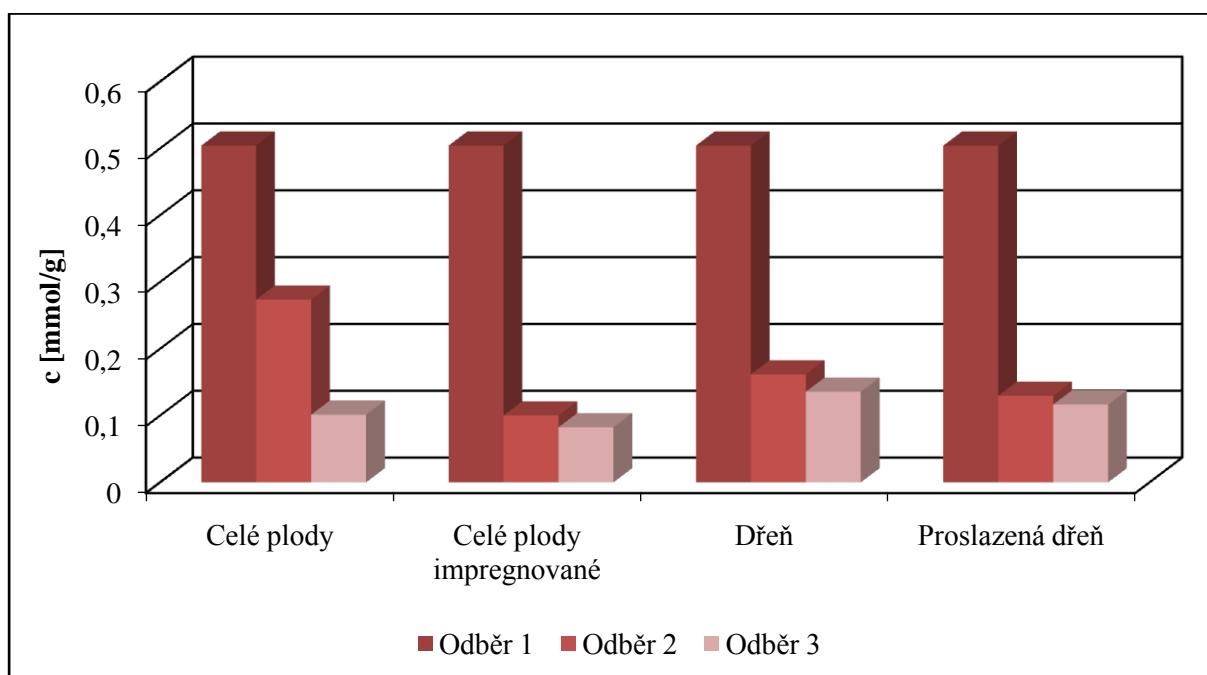
Hodnota celkové antioxidační aktivity v jahodách se v průběhu dlouhodobého mražení značně snižovala. Po dvou měsících je TAS v proslazené dřeni srovnatelný s hodnotou TAS v komerčně mražené jahodové dřeni. Oproti antioxidační aktivitě zjištěné v čerstvém ovoci je však hodnota TAS v jakýchkoliv mražených polotovarech značně nižší.

Antioxidační aktivita v impregnovaných celých plodech mohla být značně snížena samotnou impregnací, kdy díky osmotickému tlaku v povrchových buňkách plodů mohlo dojít k jejich lyzi a tím uvolnění látek do roztoku. U proslazené dřene je větší pokles (oproti dřeni bez sacharosy) pravděpodobně způsoben přítomností sacharosy, která ovlivňuje navážku a tím pádem i koncentraci aktivních látek ve vzorku.

Graf č. 6: Celková antioxidační aktivita jahod v průběhu mražení

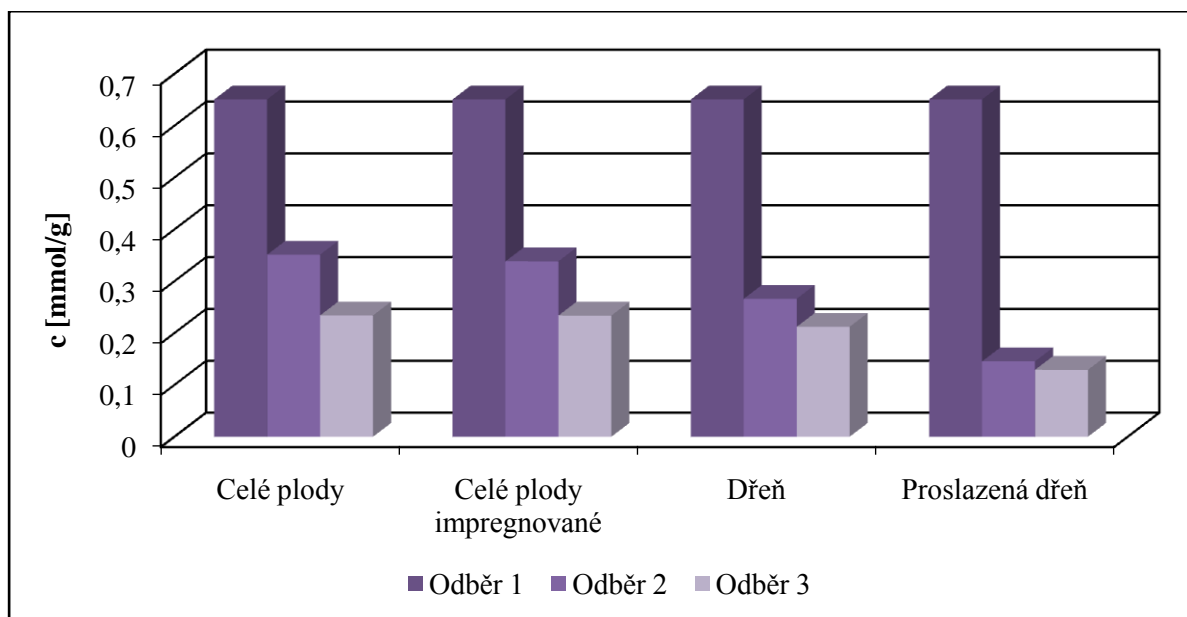


Graf č. 7: Celková antioxidační aktivita malin v průběhu mražení



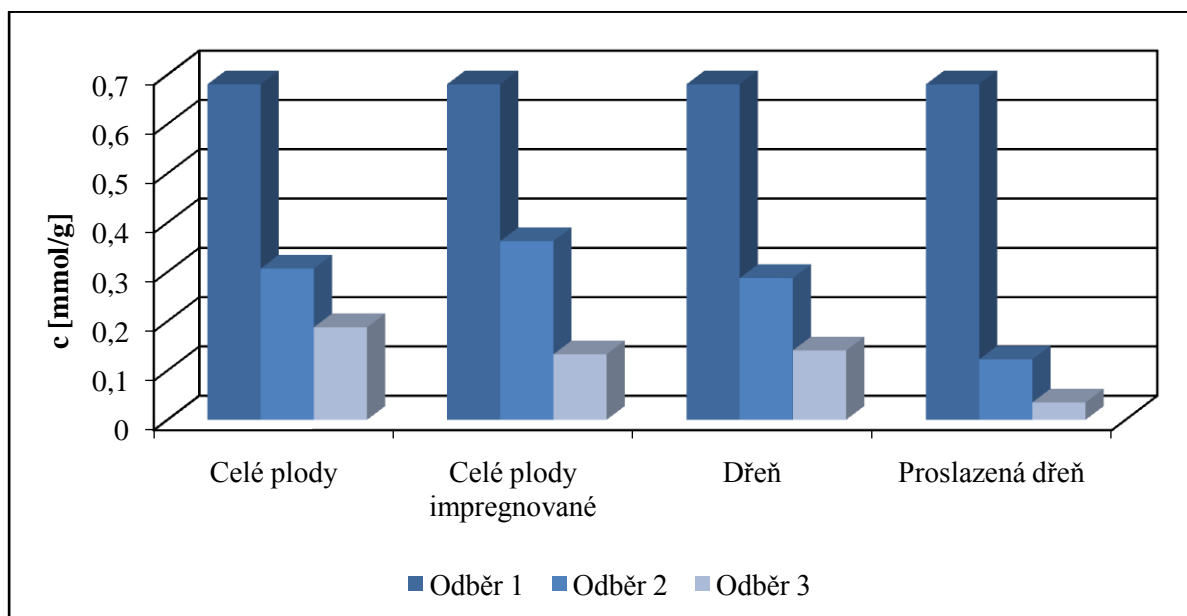
Pokles obsahu celkových antioxidantů u malin není tak velký, jako u jahod. To může být však také proto, že i čerstvé plody malin mají mnohem méně antioxidačních látek než plody jahod. Celkově lze také říct, že obsah se poměrně hodně snižuje. Značné snižování impregnovaných plodů a proslazené dřeň může být, stejně jako u jahod, způsobené osmotickým tlakem a přítomností sacharosy.

Graf č. 8: Celková antioxidační aktivita borůvek v průběhu mražení



U borůvek byl zaznamenán celkově nejmenší pokles obsahu antioxidantů. Rozdíl mezi celými plody a impregnovanými plody téměř nebyl zaznamenán, což bylo pravděpodobně způsobeno relativně pevnou slupkou borůvek, na kterou neměl osmotický tlak příliš velký vliv. Nejmenší obsah byl zjištěn u proslazené dřeň, což bylo pravděpodobně způsobeno přítomností sacharosy – stejně jako u jahod a malin.

Graf č. 9: Celková antioxidační aktivita brusinek v průběhu mražení



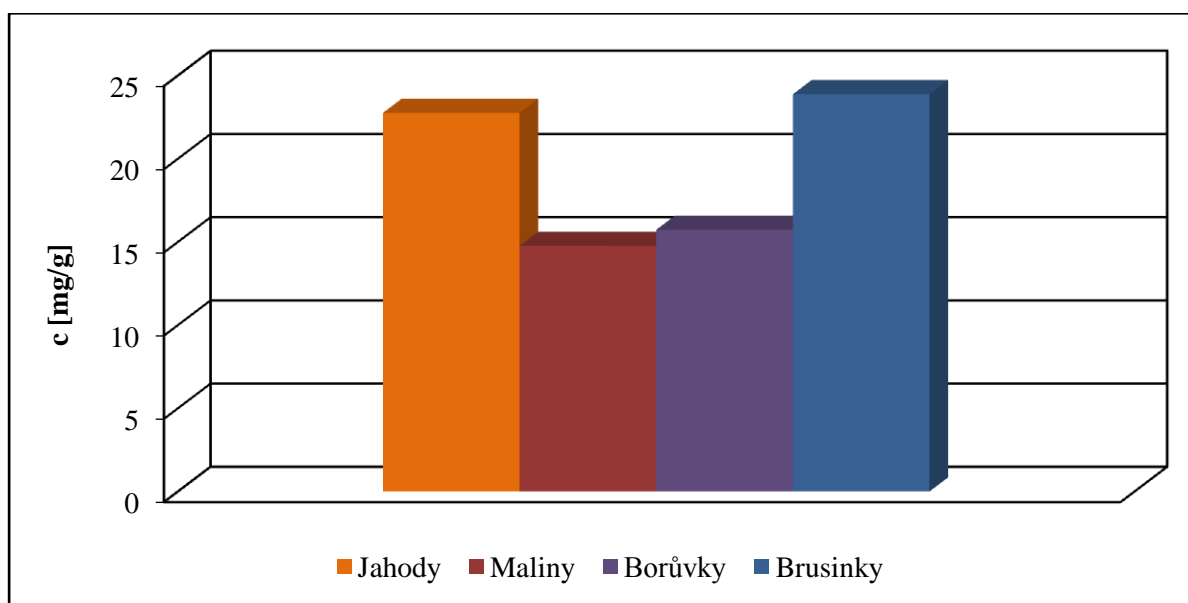
Z výše uvedeného grafu je patrné, že obsah antioxidantů u brusinek se, stejně jako u ostatního ovoce, s dobou skladování poměrně značně snižuje. Po prvním měsíci lze pozorovat vliv impregnace – obsah antioxidantů je mírně větší. Po druhém měsíci byl ale

obsah v impregnovaných plodech menší než v plodech neupravovaných. Nejnižší obsah má opět proslazená dřev díky vlivu přítomné sacharosu.

5.3.2 Celkový obsah polyfenolů

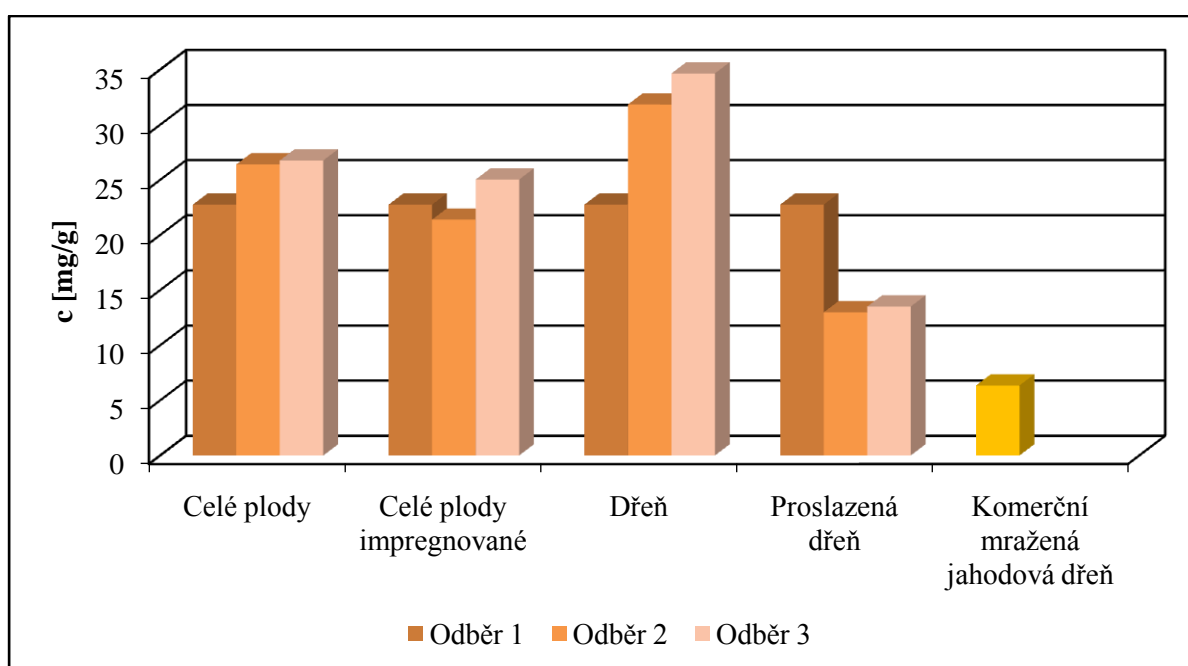
Celkový obsah polyfenolů v čerstvých analyzovaných plodech a změny tohoto obsahu v průběhu mražení jsou shrnuty v následujících grafech.

Graf č. 10: Obsah polyfenolů v čerstvém ovoci

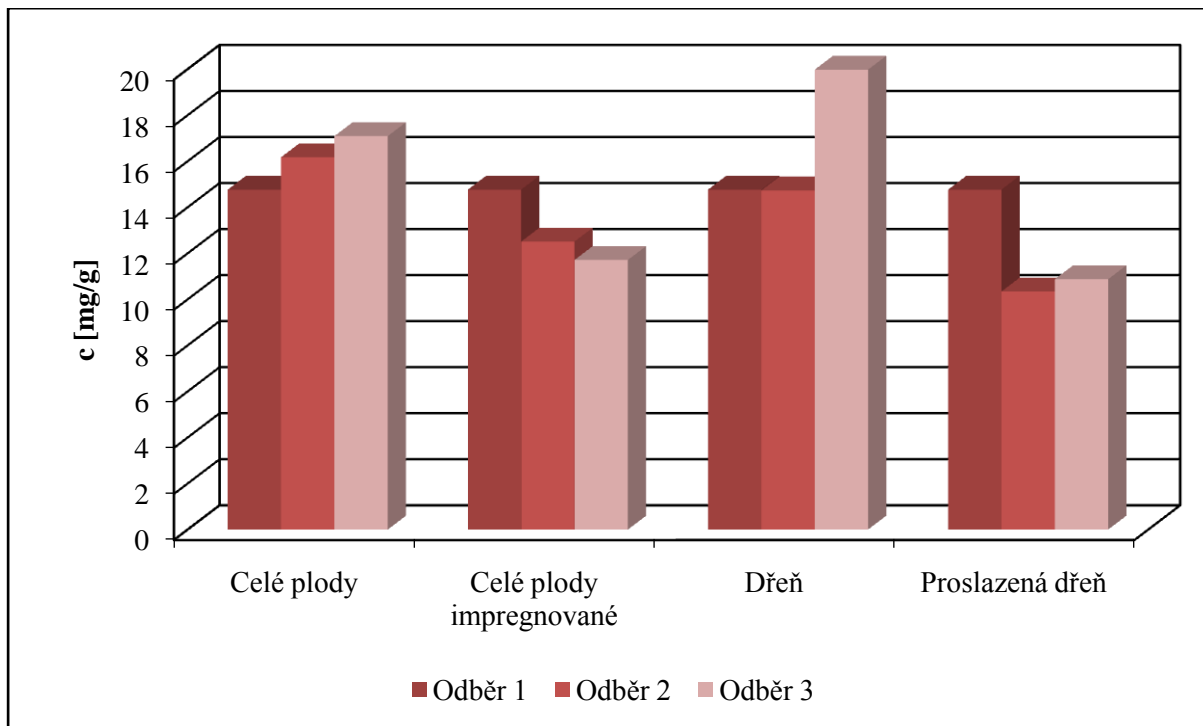


V grafu č. 10 je zobrazen celkový obsah polyfenolických látek v čerstvém ovoci. U jahod a brusinek byl naměřen téměř stejný, a to poměrně vysoký obsah těchto látek, naopak nízký obsah, ale opět vzájemně srovnatelný, byl naměřen u malin a borůvek.

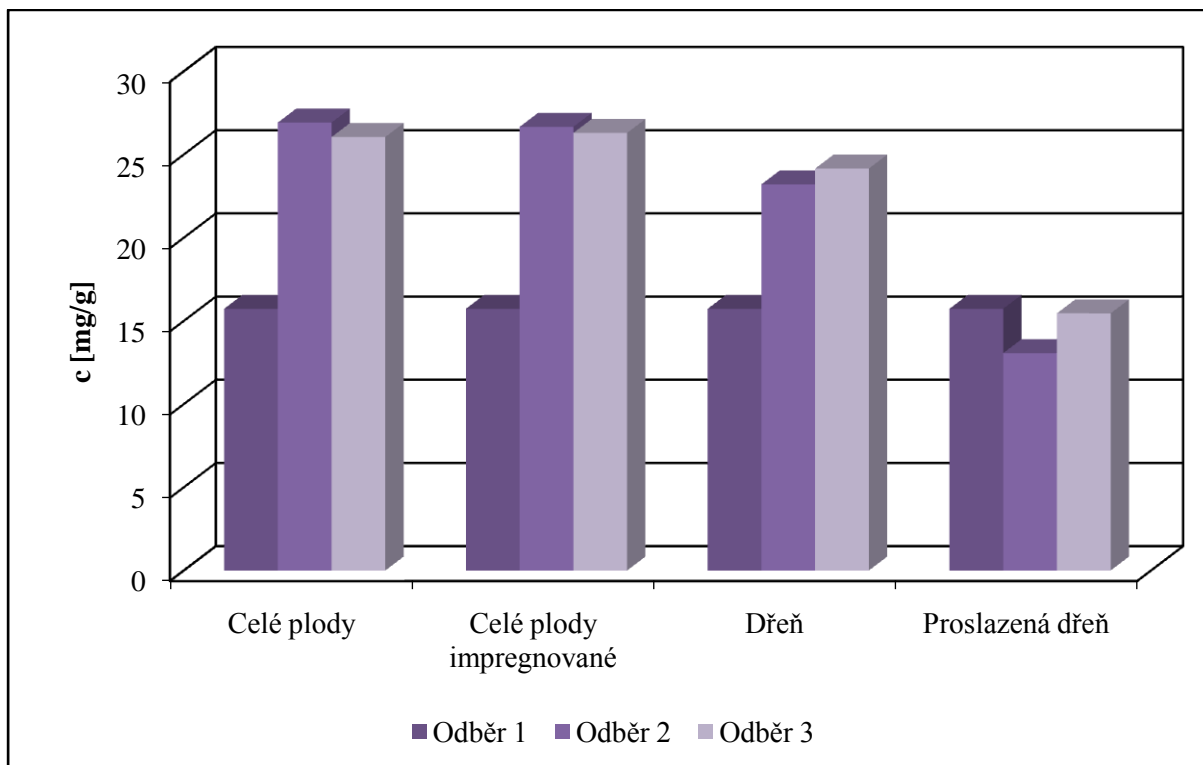
Graf č. 11: Obsah polyfenolů v průběhu mražení – jahody



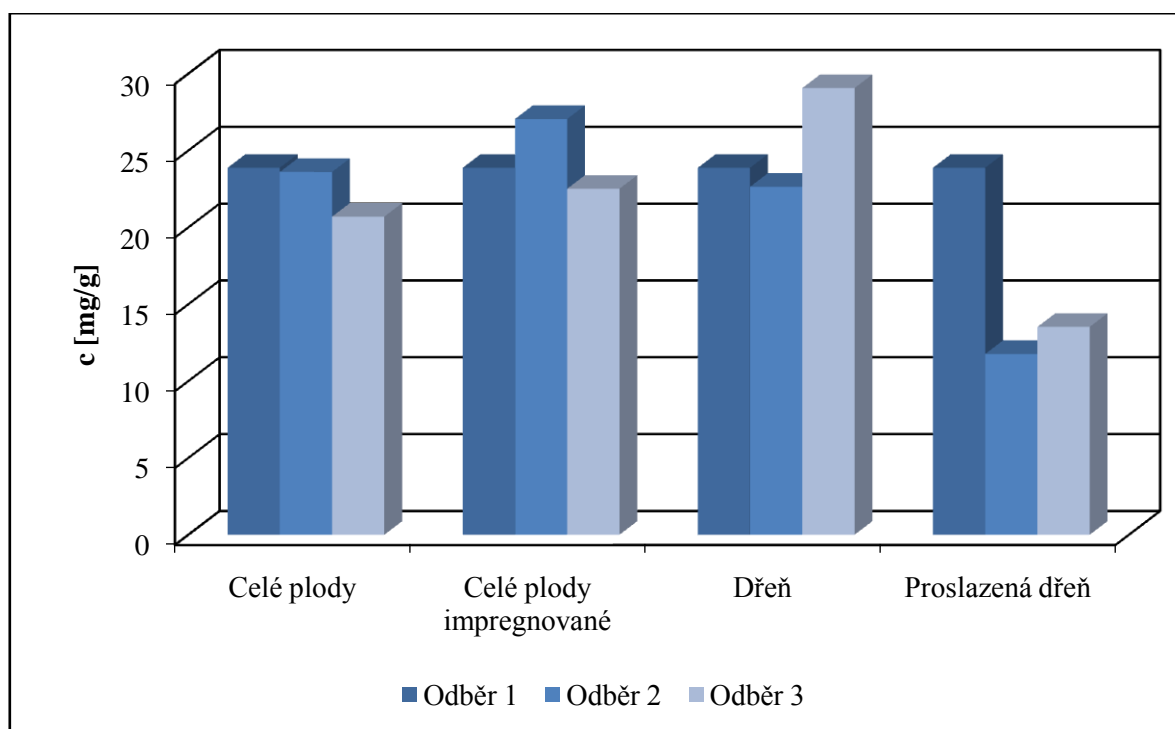
Graf č. 12: Obsah polyfenolů v průběhu mražení – maliny



Graf č. 13: Obsah polyfenolů v průběhu mražení – borůvky



Graf č. 14: Obsah polyfenolů v průběhu mražení – brusinky



Z předchozích grafů je patrné porovnání obsahu polyfenolů v jednotlivých druzích ovoce i zpracování. U všech druhů ovoce byl největší pokles obsahu zaznamenán u proslazených dření. To bylo způsobené vlivem sacharosy na hmotnost a koncentraci vzorku.

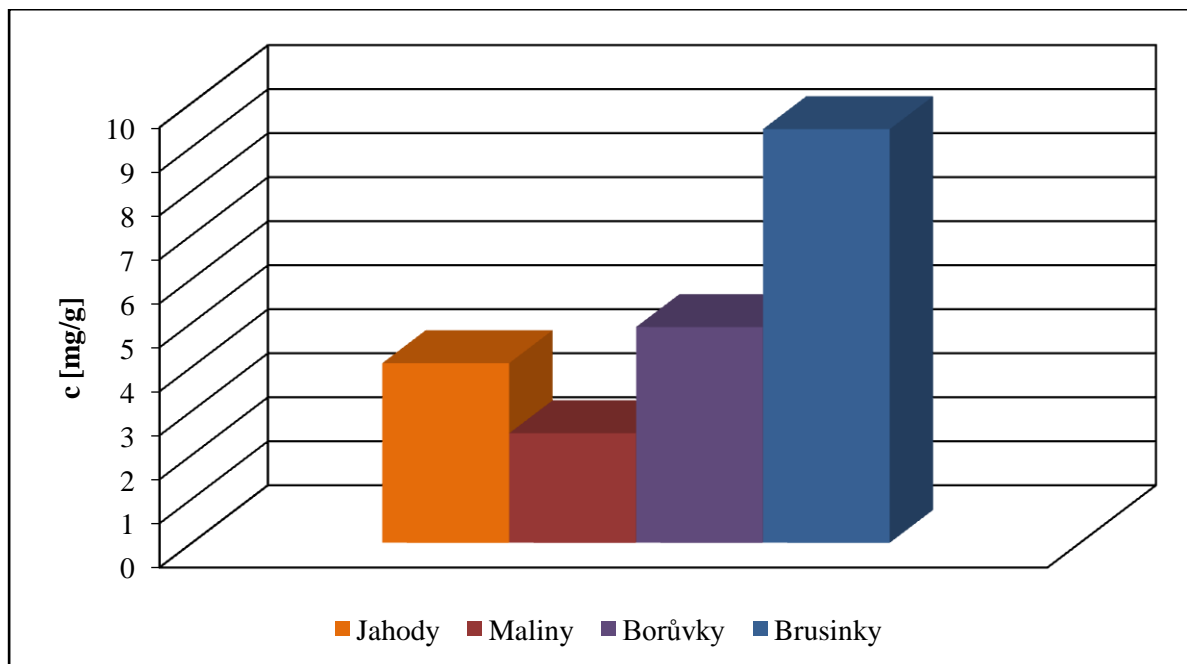
U malin a brusinek byly u ostatních typů zpracování zaznamenány jen mírné výkyvy oproti hodnotě zjištěné u čerstvého ovoce. Větší rozdíly byly zaznamenány u jahod a borůvek, kde byl patrný značný nárůst. Tento nárůst byl největší u dření z jahod a borůvek, což bylo pravděpodobně uvolněním pigmentů z vázaných forem ve tkáních. Tím pádem byl detekován větší obsah polyfenolů ve vzorcích dření než u celých plodů, ať již neopracovaných, nebo impregnovaných.

Celkově byl nejvyšší obsah polyfenolů zaznamenán u jahod. U komerčně mražené jahodové dřeni byl obsah polyfenolů velmi nízký i v porovnání s připravenou jahodovou dřeni po dvou měsících mražení.

5.3.3 Celkový obsah flavonoidů

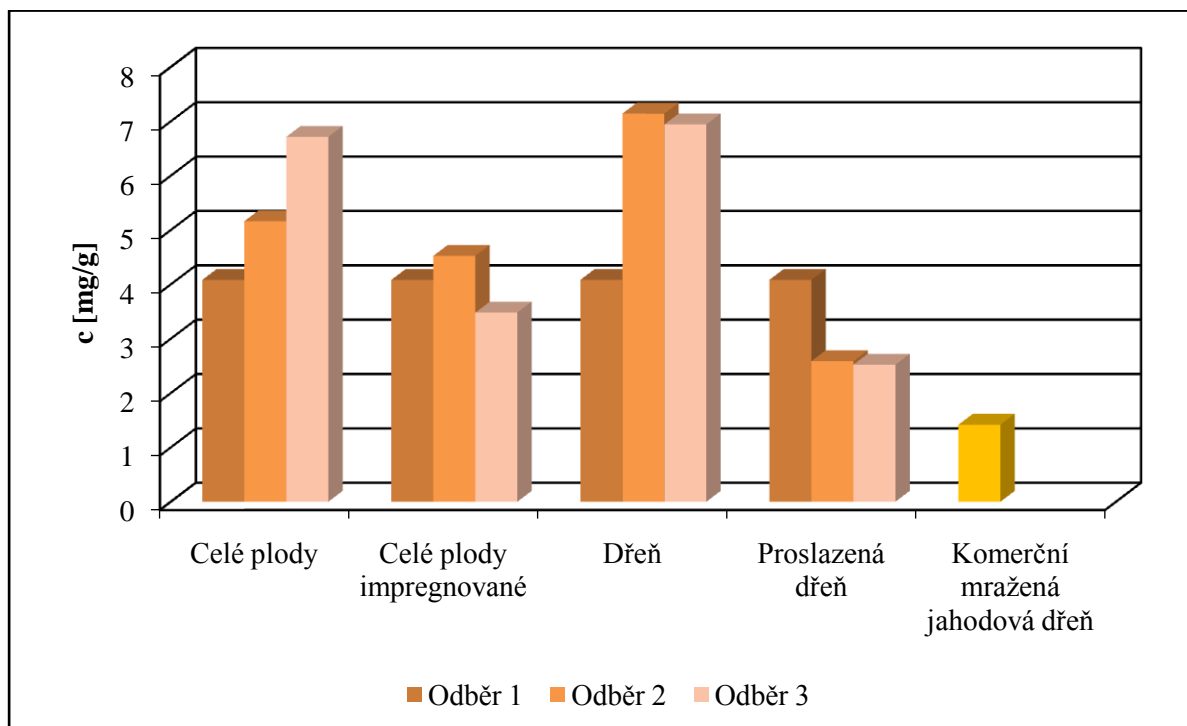
Změny obsahu flavonoidů v průběhu skladování vzorků v mrazicím boxu po dobu dvou měsíců shrnují následující grafy.

Graf č. 15: Obsah flavonoidů v čerstvém ovoci

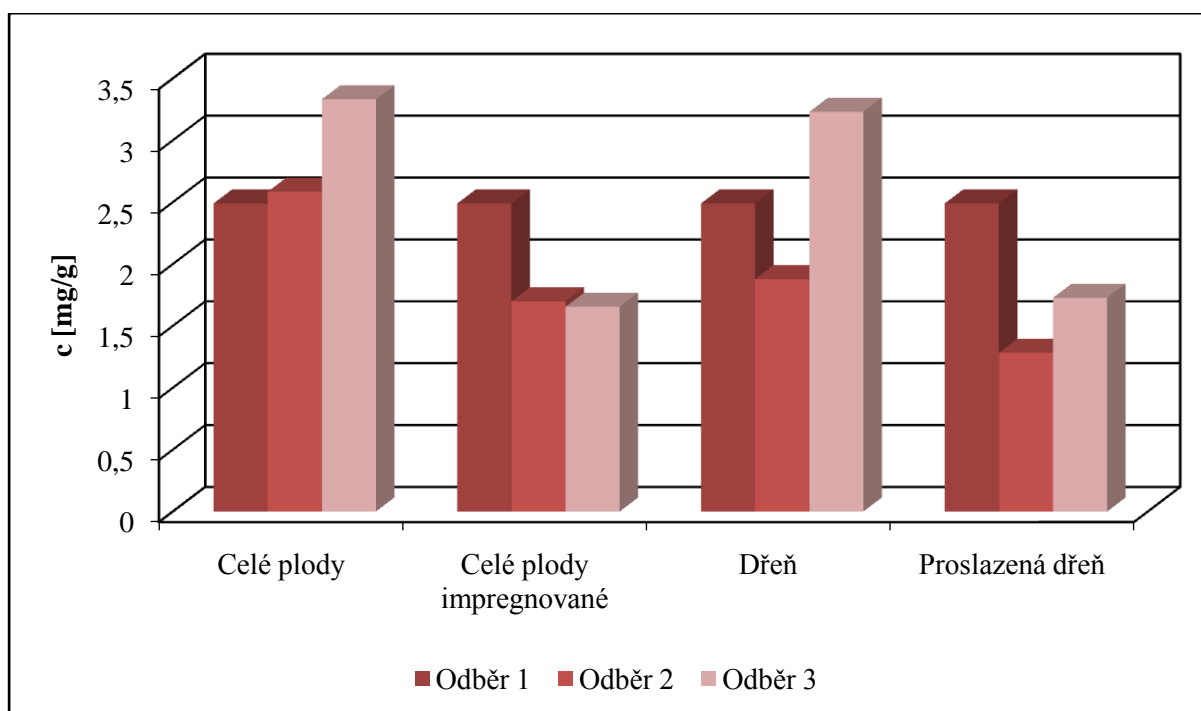


Z grafu je dobře vidět rozdíl mezi obsahem flavonoidů v čerstvých plodech zkoumaného ovoce. Bрусinky mají těchto látek nejvíce, zatímco maliny jich obsahují velmi málo. Přibližně stejný obsah byl zjištěn u jahod a borůvek.

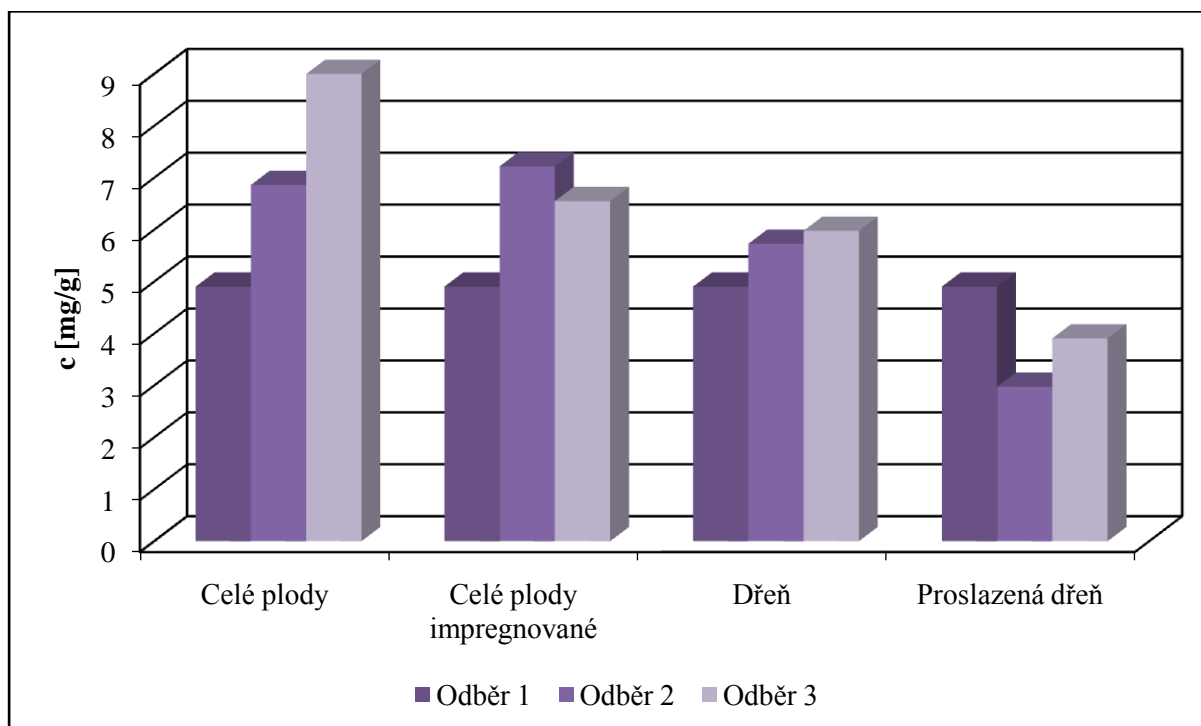
Graf č. 16: Obsah flavonoidů v průběhu mražení – jahody



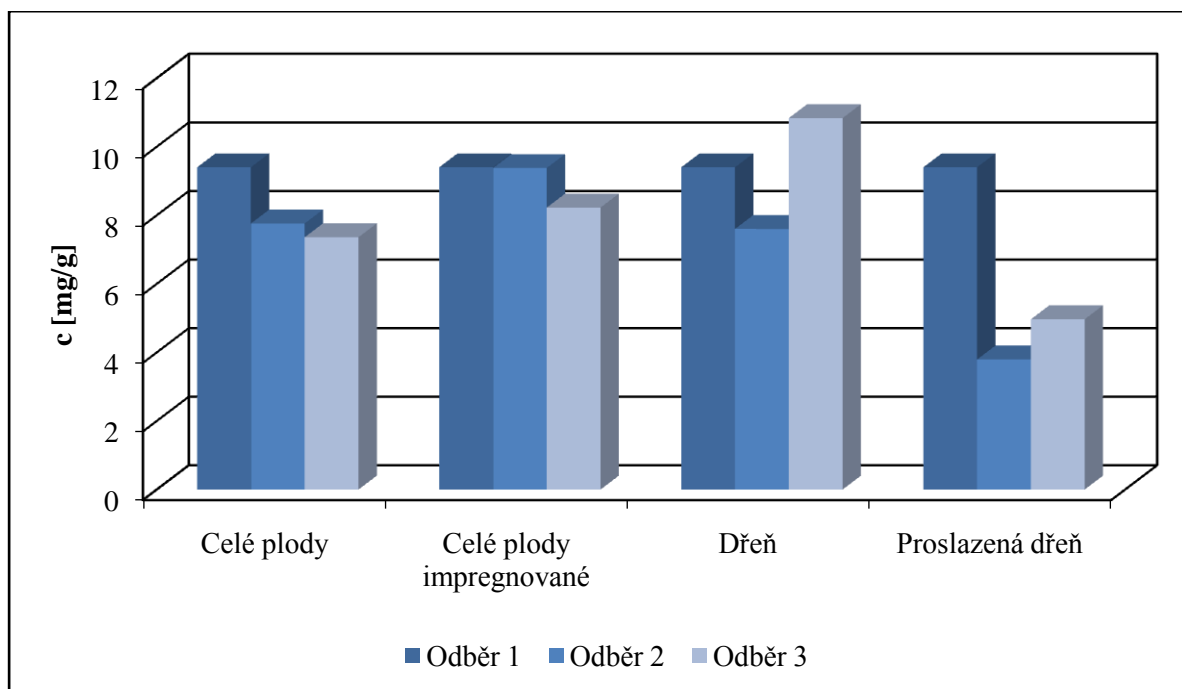
Graf č. 17: Obsah flavonoidů v průběhu mražení – maliny



Graf č. 18: Obsah flavonoidů v průběhu mražení – borůvky



Graf č. 19: Obsah flavonoidů v průběhu mražení – brusinky



Profil změn obsahu flavonoidů je v podstatě téměř stejný jako změny obsahu polyfenolů. Největší poklesy byly také zaznamenány u proslazené dřeně v důsledku přítomnosti sacharosy. U neproslazované dřeně byl – stejně jako u obsahu polyfenolů – zaznamenán nárůst.

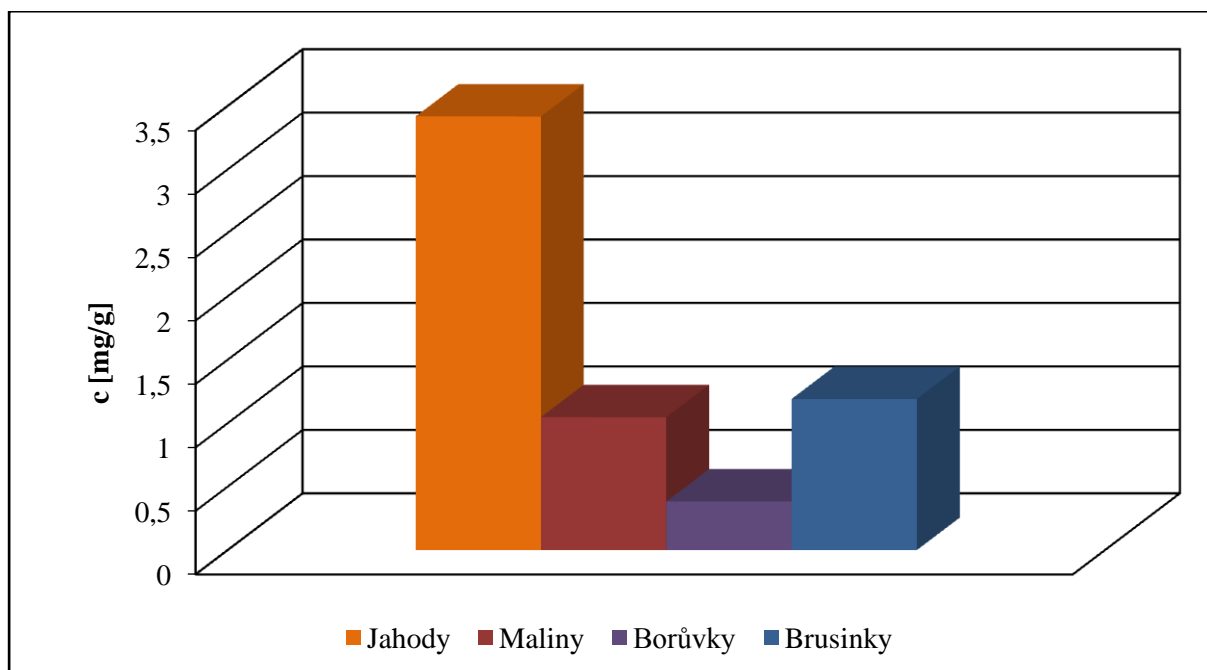
U impregnovaných plodů malin a jahod pravděpodobně došlo k popraskání povrchových buněk v důsledku změn osmotického tlaku, proto je obsah flavonoidů poměrně nízký. Protože borůvky a brusinky mají na svém povrchu pevnou slupku, sacharosový roztok neměl na tyto plody tak negativní vliv, proto není tak velký rozdíl mezi obsahem flavonoidů v neopracovaných a v impregnovaných plodech.

V komerčně mražené jahodové dřeni byl zjištěn velmi nízký obsah flavonoidů, a to i ve srovnání s připravenou proslazenou jahodovou dřeni po dvou měsících mražení.

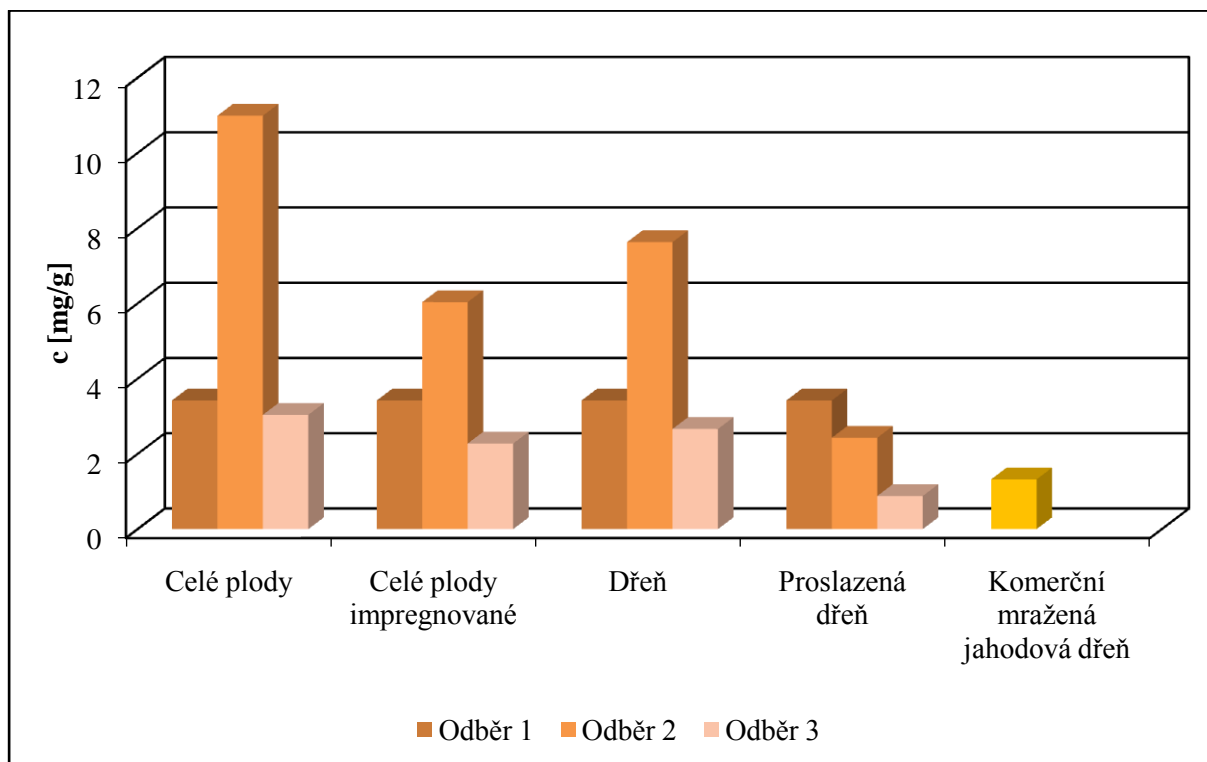
5.3.4 Obsah kyseliny askorbové

Celkový obsah kyseliny askorbové v ovoci a ovocných polotovarech byl zjišťován po měsíci a poté po devíti týdnech od začátku mražení. Získané výsledky jsou zobrazeny v následujících grafech.

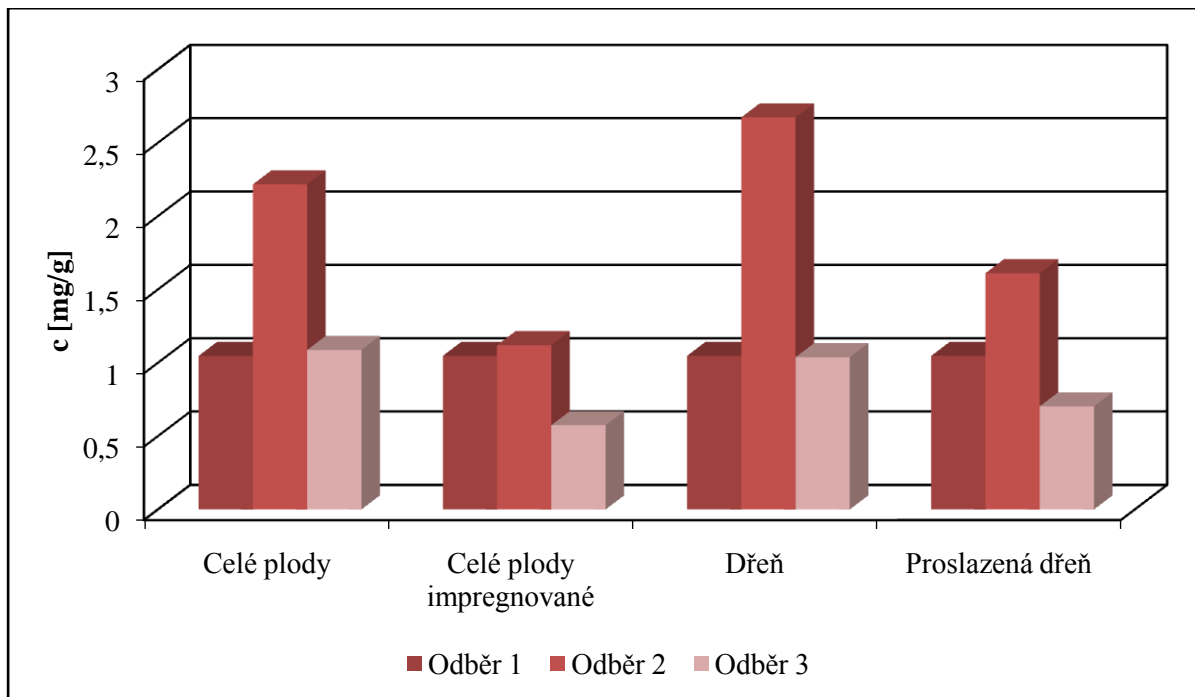
Graf č. 20: Obsah kyseliny askorbové v čerstvém ovoci



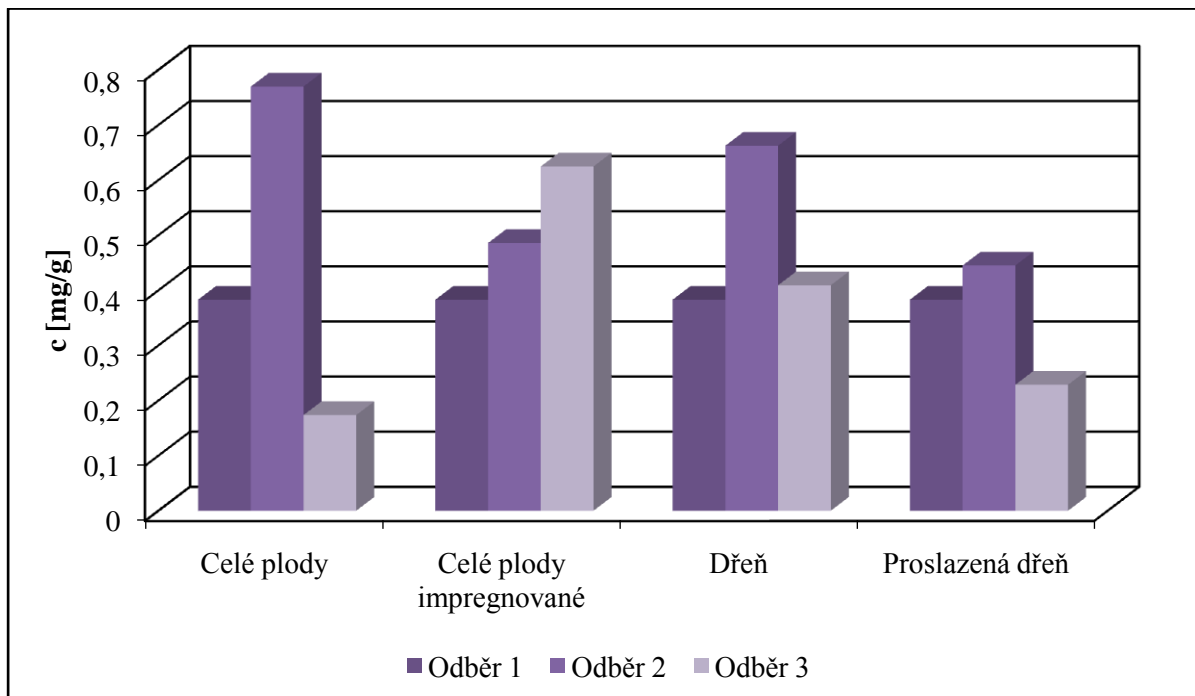
Graf č. 21: Obsah kyseliny askorbové v průběhu mražení – jahody



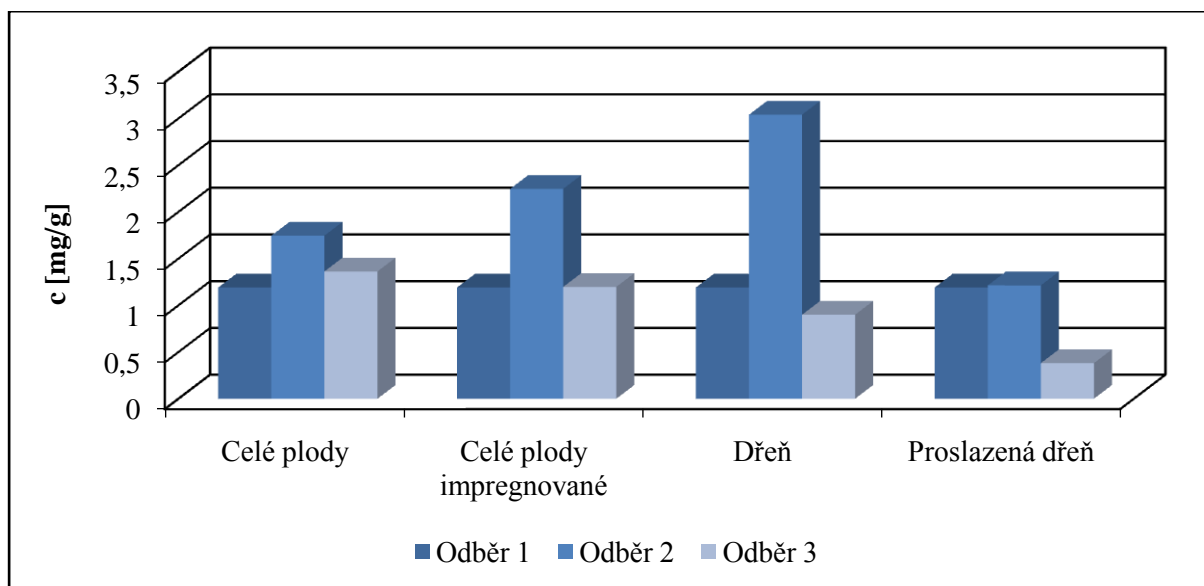
Graf č. 22: Obsah kyseliny askorbové v průběhu mražení – maliny



Graf č. 23: Obsah kyseliny askorbové v průběhu mražení – borůvky



Graf č. 24: Obsah kyseliny askorbové v průběhu mražení – brusinky



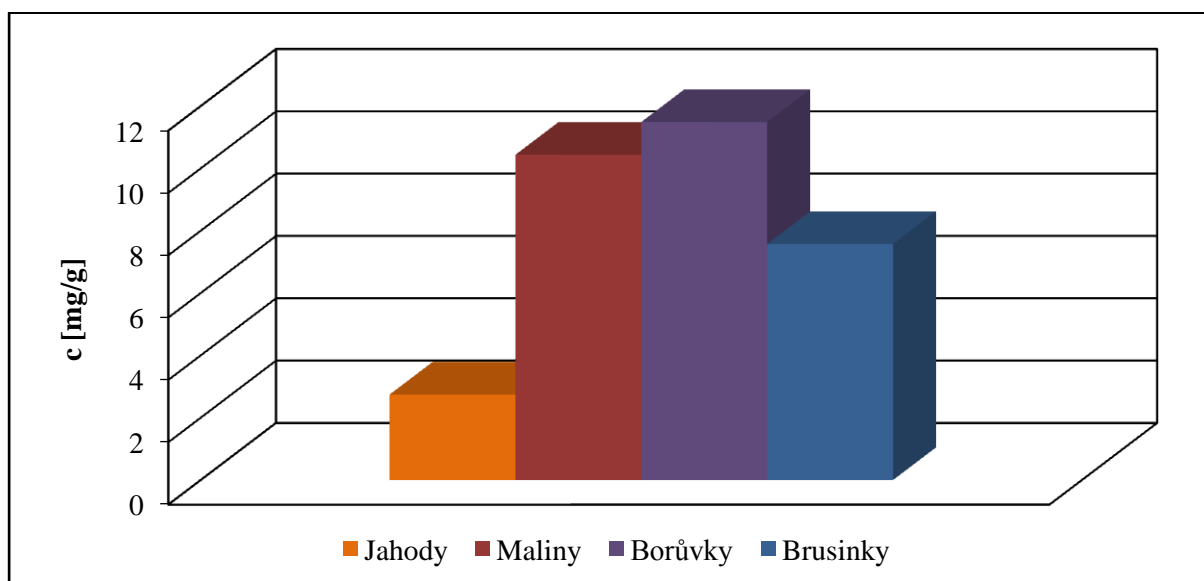
Z grafů je dobře patrné, že největší obsah vitamínu C lze najít v jahodách, nejnižší naopak v borůvkách. Obsah kyseliny askorbové v komerční jahodové dřeni je relativně srovnatelný s obsahem v proslazené dřeni po dvou měsících mražení.

Nejvíce z obsahu vitamínu C se zachovalo i po dvou měsících v jahodách, konkrétně v celých nepracovaných plodech, u kterých byl také pozorován největší nárůst po měsíci skladování. Obecně lze říci, že u všech druhů ovoce došlo po prvním měsíci skladování k nárůstu, avšak po dalších pěti týdnech se obsah askorbátu značně snížil.

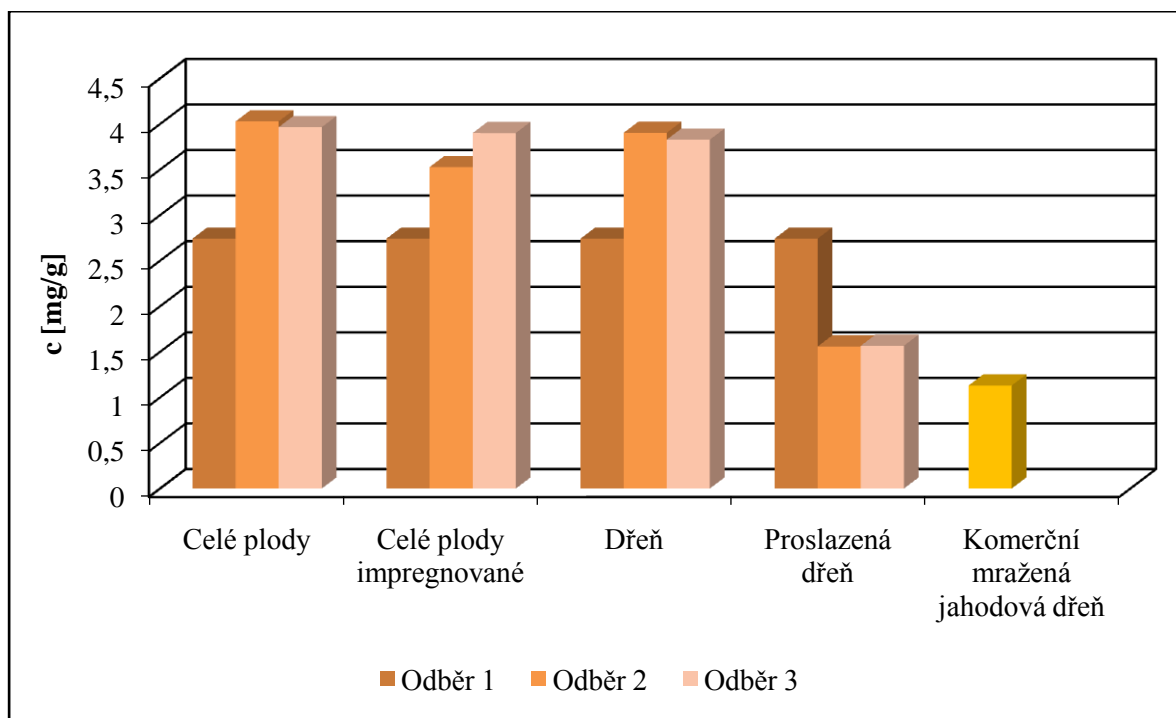
5.3.5 Celkový obsah anthokyanových barviv

Celkový obsah anthokyanů v analyzovaných vzorcích v průběhu dvouměsíčního mražení byl zjišťován podle postupu uvedeného v kapitole 3.6.2 a získané výsledky shrnují následující grafy č. 25-29.

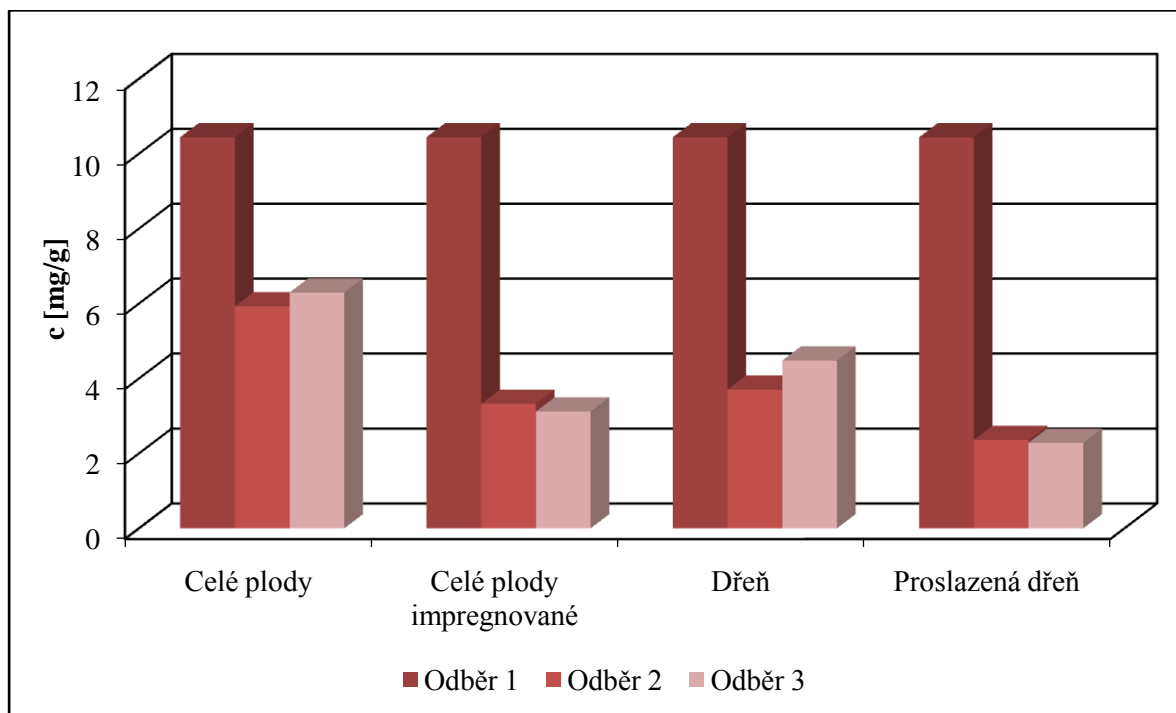
Graf č. 25: Obsah anthokyanových barviv v čerstvém ovoci



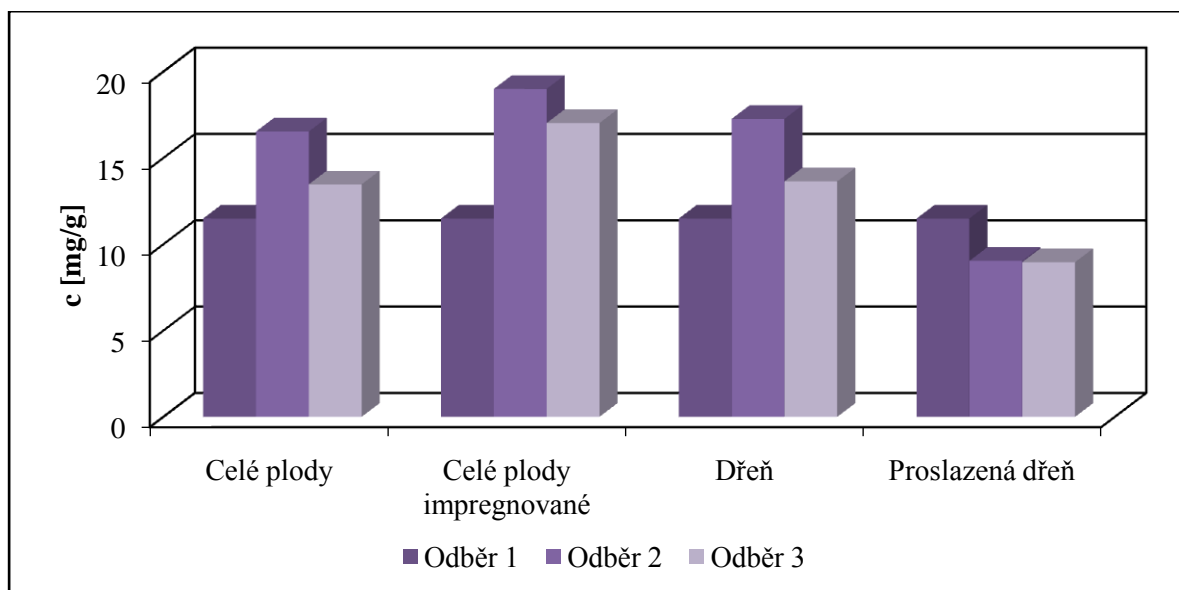
Graf č. 26: Obsah anthokyanových barviv v průběhu mražení – jahody



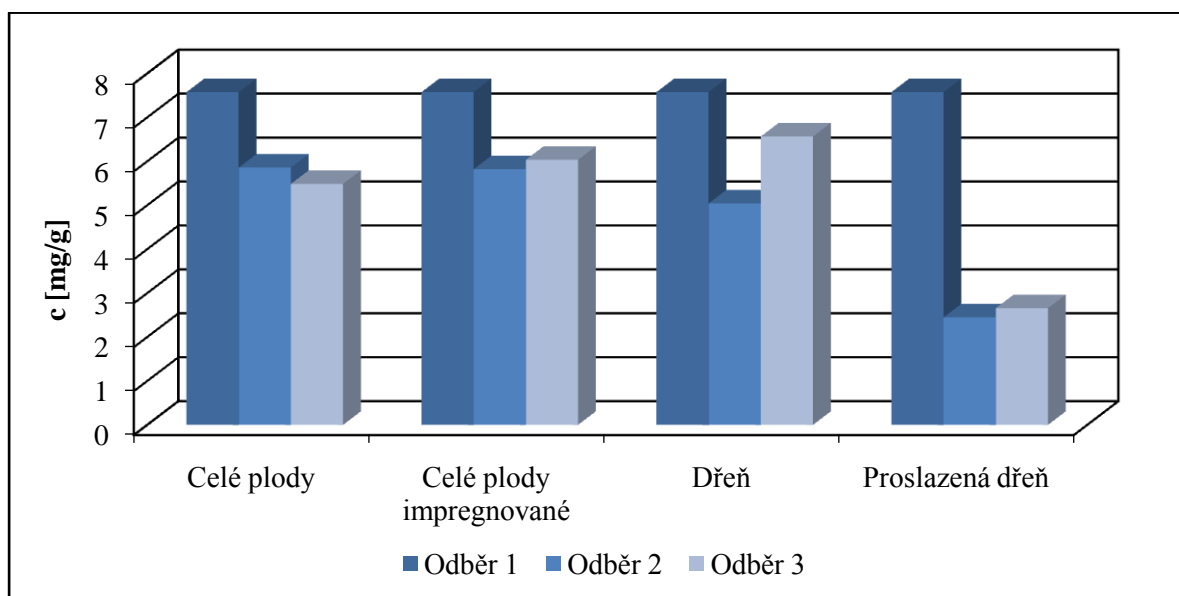
Graf č. 27: Obsah anthokyanových barviv v průběhu mražení – maliny



Graf č. 28: Obsah anthokyanových barviv v průběhu mražení – borůvky



Graf č. 29: Obsah anthokyanových barviv v průběhu mražení – brusinky



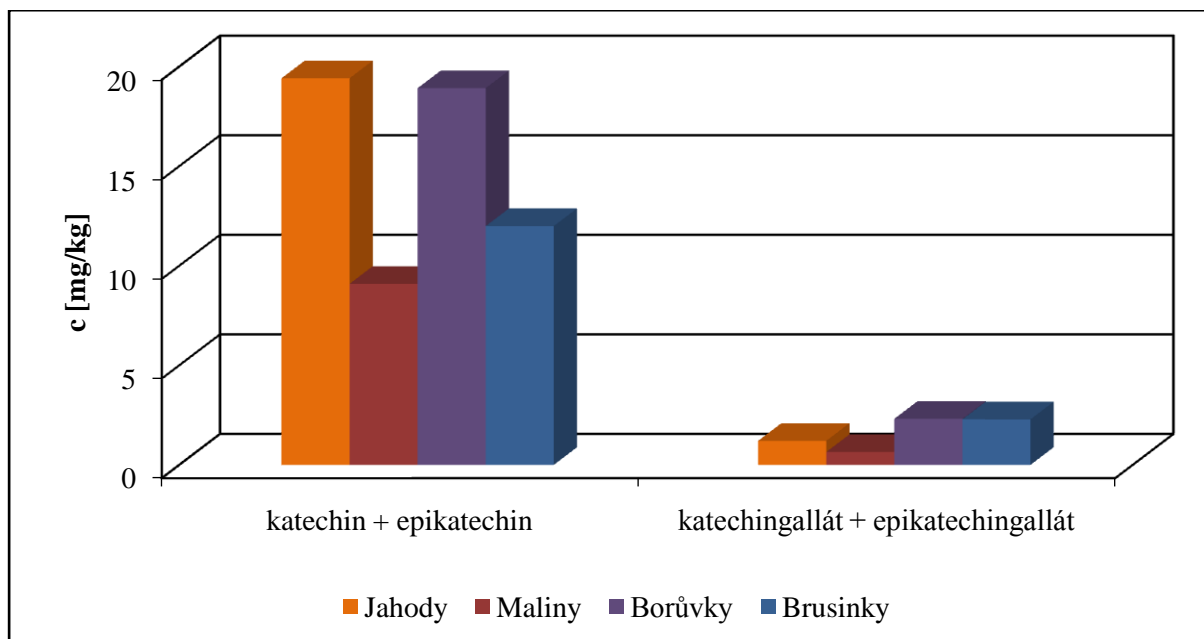
Nejvyšší obsah anthokyanových barviv byl zjištěn v borůvkách, přičemž se od sebe jednotlivé způsoby zpracování příliš neliší – až na proslazenou dřeň, u které je třeba vzít opět v úvahu vliv přítomnosti sacharosy.

Obsah anthokyanů mírně klesal v brusinkách a malinách a to méně v celých plodech než ve dřeni. U jahod naopak došlo k navýšení obsahu u celých plodů neopracovaných, impregnovaných i u dřene přibližně stejně, pouze u proslazené dřene došlo k poměrně výraznějšímu poklesu.

5.3.6 Stanovení individuálních katechinů

Individuální katechiny byly stanovovány metodou HPLC podle postupu uvedeného v kapitole 3.7.3 a zjištěné výsledky jsou shrnuty do tabulek a grafu. V tabulkách jsou naměřené hodnoty uváděny v mg látky na kg suchého podílu.

Graf č. 30: Srovnání obsahu směsi katechinu a epikatechinu a směsi katechingallátu a epikatechingallátu v čtvrtém ovoci



5.3.6.1 Obsah směsi katechinu a epikatechinu

Tabulka č. 5: Obsah směsi katechinu a epikatechinu ve vzorcích v průběhu skladování

		Látka	katechin + epikatechin [mg/kg]		
			Odběr	1	2
Jahody	Celé plody		19,41	18,28	16,16
	Celé impregnované plody		19,41	23,51	11,62
	Dřeň		19,41	28,67	11,94
	Proslazená dřeň		19,41	16,17	5,35
	Komerčně mražené		3,99	–	–
Maliny	Celé plody		9,09	23,65	8,04
	Celé impregnované plody		9,09	15,83	4,31
	Dřeň		9,09	16,27	6,54
	Proslazená dřeň		9,09	10,13	2,08
Borůvky	Celé plody		18,92	74,24	13,81
	Celé impregnované plody		18,92	57,49	19,29
	Dřeň		18,92	44,73	17,11
	Proslazená dřeň		18,92	32,75	7,34
Brusinky	Celé plody		11,99	36,49	12,22
	Celé impregnované plody		11,99	34,64	11,78
	Dřeň		11,99	28,71	13,17
	Proslazená dřeň		11,99	17,69	6,19

U každého sledovaného vzorku byl po prvním měsíci skladování zaznamenán poměrně značný nárůst obsahu směsi katechinu a epikatechinu. U jahod byl však největší nárůst pozorován u dřeň, avšak u malin, borůvek a brusinek došlo k největšímu nárůstu v celých neopracovaných plodech. Po druhém měsíci skladování se obsah sledované směsi opět snížil a to u všech druhů ovoce.

Obsah katechinů ve vzorku komerční dřeň byl srovnatelný s obsahem v proslazené dřeni po dvou měsících skladování.

5.3.6.2 Obsah směsi katechingallátu a epikatechingallátu

Tabulka č. 6: Obsah směsi katechingallátu a epikatechingallátu v průběhu skladování

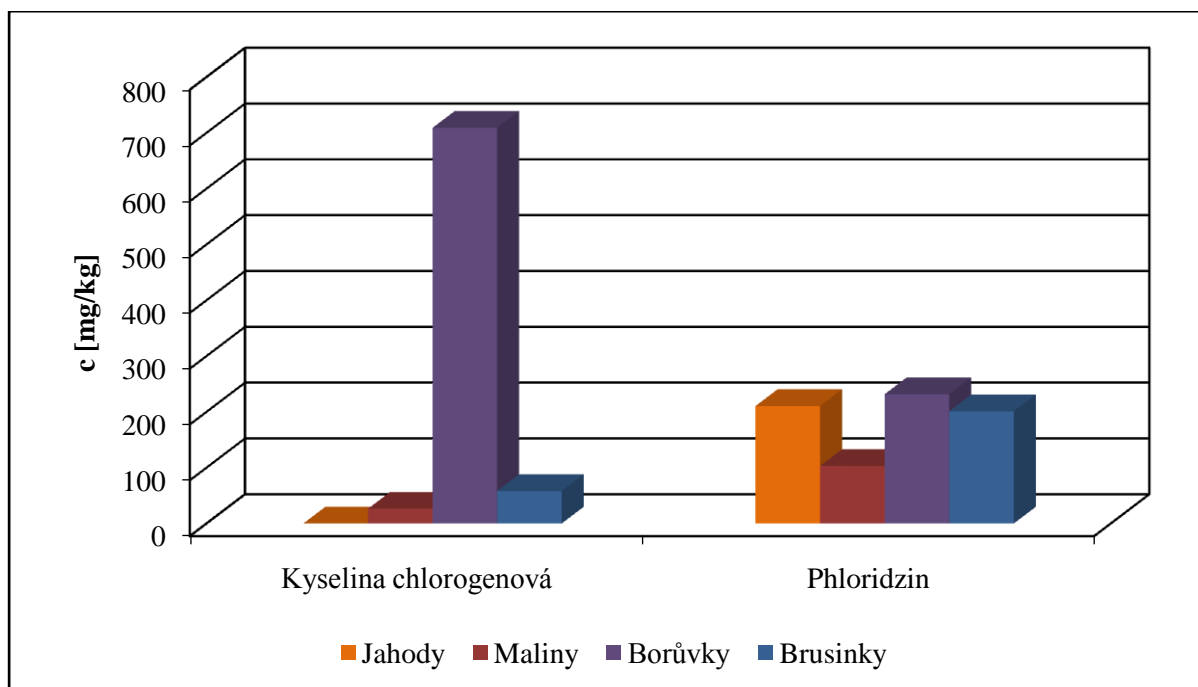
	Látka	katechingallát + epikatechingallát [mg/kg]		
	Odběr	1	2	3
Jahody	Celé plody	1,20	1,43	1,30
	Celé impregnované plody	1,20	0,74	1,96
	Dřeň	1,20	1,36	0,65
	Proslazená dřeň	1,20	0,65	0,31
	Komerčně mražené	0,17		
Maliny	Celé plody	0,64	0,91	0,35
	Celé impregnované plody	0,64	0,67	0,14
	Dřeň	0,64	1,02	0,34
	Proslazená dřeň	0,64	0,55	0,40
Borůvky	Celé plody	2,31	2,37	3,71
	Celé impregnované plody	2,31	2,73	0,85
	Dřeň	2,31	4,30	1,17
	Proslazená dřeň	2,31	0,82	1,65
Brusinky	Celé plody	2,28	2,09	0,85
	Celé impregnované plody	2,28	2,65	0,93
	Dřeň	2,28	1,83	1,05
	Proslazená dřeň	2,28	1,22	0,50

Obsah směsi katechingallátu a epikatechin gallátu je ve všech druzích ovoce značně nižší než obsah katechinu a epikatechinu. Vzhledem ke změnám v průběhu skladování lze říci, že, kromě celých plodů borůvek a impregnovaných jahod, dochází po dvou měsících k mírnému poklesu těchto látek ve sledovaném ovoci. Po prvním měsíci však obsah v některých vzorcích narůstal, lze tudíž usoudit, že koncentrace v ovoci bude kolísat.

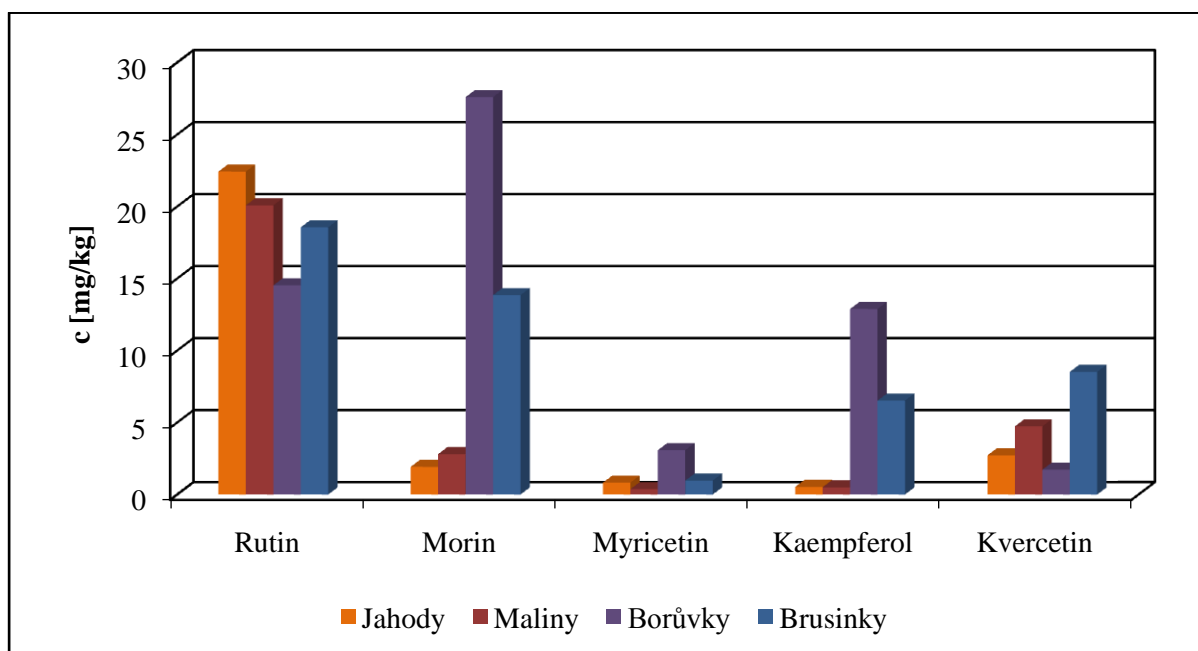
5.3.7 Stanovení individuálních flavonoidů

Změny obsahu individuálních flavonoidů v průběhu skladování byly zjišťovány podle postupu uvedeného v kapitole 3.7.2. Výsledky pro jednotlivé látky jsou shrnuty do následujících tabulek (* – látka nebyla ve vzorku detekována). Zjištěné hodnoty jsou v tabulkách uváděny v mg látky na kg suchého podílu.

Graf č. 31: Porovnání obsahu phloridzinu a kyseliny chlorogenové v čerstvém ovoci



Graf č. 32: Porovnání obsahu ostatních flavonoidů v čerstvém ovoci



Z uvedených grafů jsou patrné rozdíly v obsahu jednotlivých flavonoidů u čerstvých plodů analyzovaného ovoce. V porovnání s ostatními druhy byl (kromě rutinu a kvercetin) naměřen u všech látek nejvyšší obsah v borůvkách. Zvláště patrné je to pak u obsahu kyseliny chlorogenové. Ostatní hodnoty značně kolísají – v závislosti na ovoci a zjišťované látce.

5.3.7.1 Změny obsahu rutinu a kyseliny chlorogenové v průběhu mražení

Tabulka č. 7: Obsah rutinu a kyseliny chlorogenové v průběhu mražení

	Látka	Rutin [mg/kg]			Kyselina chlorogenová [mg/kg]		
		1	2	3	1	2	3
Jahody	Celé plody	22,43	830,24	508,11	43,92	5404,20	8581,54
	Celé impregnované plody	22,43	236,93	478,04	43,92	1374,96	6653,22
	Dřeň	22,43	760,65	392,45	43,92	4748,60	2764,73
	Proslazená dřeň	22,43	190,51	139,15	43,92	941,28	921,23
	Komerčně mražené	160,04			825,85		
Maliny	Celé plody	20,08	119,22	109,78	26,39	364,23	510,88
	Celé impregnované plody	20,08	59,80	28,25	26,39	157,38	166,95
	Dřeň	20,08	171,69	139,95	26,39	574,67	506,45
	Proslazená dřeň	20,08	82,17	56,37	26,39	244,39	283,13
Borůvky	Celé plody	14,52	4707,92	1048,27	709,01	19821,24	3275,62
	Celé impregnované plody	14,52	1233,76	585,66	709,01	4398,66	4733,82
	Dřeň	14,52	1049,80	405,48	709,01	3430,74	5874,45
	Proslazená dřeň	14,52	619,62	304,81	709,01	2441,35	3032,56
Brusinky	Celé plody	18,56	1057,03	950,32	58,19	10113,71	5451,98
	Celé impregnované plody	18,56	1905,10	651,63	58,19	14149,20	5102,16
	Dřeň	18,56	1807,88	927,26	58,19	10607,34	7564,34
	Proslazená dřeň	18,56	744,97	527,64	58,19	4485,04	3647,49

Z tabulky je vidět, že u čerstvého ovoce je obsah rutinu téměř zanedbatelný, ale po zpracování a zmražení se obsah této látky ve vzorcích značně zvyšoval. To mohlo být způsobeno reakcí plodů na snížení teploty, případně uvolněním analyzovaných látek z vázaných forem ve tkáních. Po dvou měsících už obsah rutinu opět klesal. Největší nárůst byl po prvním měsíci zaznamenán v celých neopracovaných plodech borůvek.

Obsah rutinu v komerční jahodové dřeni se pohyboval přibližně na úrovni obsahu v jahodové proslazené dřeni po dvou měsících mražení.

U proslazené dřene lze opět pozorovat nejnižší hodnoty u všech druhů ovoce vlivem přítomnosti sacharosy.

Obsah kyseliny chlorogenové byl na počátku experimentu velmi nízký, ale po měsíci mražení byl u všech sledovaných vzorků zaznamenán nárůst – nejvíce u celých neopracovaných plodů borůvek. U těch se však po dvou měsících obsah kyseliny chlorogenové opět značně snížil. Ostatní vzorky nevykazovaly velké rozdíly při porovnání obsahu po jednom a dvou měsících mražení – projevuje se pouze mírné kolísání.

Obsah kyseliny chlorogenové v komerční jahodové dřeni je přibližně srovnatelný s obsahem ve dřeni po dvou měsících mražení.

Podobné výkyvy obsahu po 1 a 2 měsících uchovávání, jako u kyseliny chlorogenové, byly pozorovány rovněž u rutinu, jehož obsah v analyzovaných plodech je většinou alespoň řádově srovnatelný s obsahem kyseliny chlorogenové.

5.3.7.2 Změny obsahu morinu a myricetinu v průběhu mražení

Tabulka č. 9: Obsah morinu a myricetinu v průběhu mražení

	Látka	Morin [mg/kg]			Myricetin [mg/kg]		
	Odběr	1	2	3	1	2	3
Jahody	Celé plody	1,92	5,35	14,17	0,82	6,37	5,82
	Celé impregnované plody	1,92	1,81	6,90	0,82	3,05	2,35
	Dřeň	1,92	19,77	7,72	0,82	7,55	1,85
	Proslazená dřeň	1,92	3,38	2,46	0,82	1,58	1,09
	Komerčně mražené	3,02			1,03		
Maliny	Celé plody	2,81	3,53	4,88	0,37	*	*
	Celé impregnované plody	2,81	1,24	2,29	0,37	0,35	*
	Dřeň	2,81	3,24	5,59	0,37	*	*
	Proslazená dřeň	2,81	2,22	2,09	0,37	0,41	0,32
Borůvky	Celé plody	27,60	76,65	41,73	3,08	*	*
	Celé impregnované plody	27,60	34,08	63,30	3,08	*	*
	Dřeň	27,60	27,72	17,56	3,08	*	3,90
	Proslazená dřeň	27,60	21,20	5,79	3,08	*	5,22
Brusinky	Celé plody	13,84	129,58	223,03	0,97	*	*
	Celé impregnované plody	13,84	126,33	205,18	0,97	*	*
	Dřeň	13,84	111,25	127,85	0,97	*	*
	Proslazená dřeň	13,84	58,83	34,27	0,97	*	*

Z tabulky je patrné, že u všech vzorků z brusinek lze pozorovat nárůst obsahu morinu v průběhu mražení. Nárůst lze také pozorovat u celých plodů borůvek a u jahodové dřeně. U ostatních vzorků dochází ke kolísání obsahu kolem původní hodnoty zjištěné u čerstvého ovoce.

Komerční jahodová dřeň má obsah vyšší než čerstvé ovoce a je opět přibližně srovnatelný s obsahem morinu ve dva měsíce zmražené proslazené dřeni.

Změny obsahu myricetinu v jednotlivých vzorcích se poměrně značně liší podle druhu ovoce. U jahod dochází po prvním měsíci ke značnému nárůstu u všech vzorků, ale po druhém měsíci se obsah myricetinu opět snižuje. U celých neopracovaných plodů zůstává obsah i po dvou měsících značně vysoký. Komerční dřeň svým obsahem přibližně odpovídá proslazené jahodové dřeni.

U malin dochází k postupné degradaci této látky – po prvním měsíci byl myricetin zaznamenán pouze u impregnovaných plodů a proslazené dřeně, po dvou měsících pak už jen u proslazené dřeně.

Po prvním měsíci skladování nelze u borůvek myricetin detekovat vůbec, avšak po dvou měsících kolísá obsah této látky ve dřeni a proslazené dřeni tak, že byl zjištěn vyšší obsah než u čerstvého ovoce.

V brusinkách dochází zpracováním a zmražením k úplné degradaci myricetinu. Po jednom ani po dvou měsících skladování nebyl žádný obsah této látky v brusinkách detekován.

5.3.7.3 Změny obsahu kaempferolu a kvercetinů v průběhu mražení

Tabulka č. 10: Obsah kaempferolu a kvercetinů v průběhu mražení

	Látka	Kvercetin [mg/kg]			Kaempferol [mg/kg]		
	Odběr	1	2	3	1	2	3
Jahody	Celé plody	2,72	*	1,52	0,53	*	*
	Celé impregnované plody	2,72	*	0,77	0,53	*	*
	Dřeň	2,72	*	1,62	0,53	*	*
	Proslazená dřeň	2,72	*	1,38	0,53	*	*
	Komerčně mražené	*			*		
Maliny	Celé plody	4,73	*	*	0,50	*	*
	Celé impregnované plody	4,73	*	*	0,50	*	*
	Dřeň	4,73	0,37	0,23	0,50	*	*
	Proslazená dřeň	4,73	0,30	*	0,50	*	*
Borůvky	Celé plody	1,72	3,06	3,14	12,88	*	*
	Celé impregnované plody	1,72	3,88	6,92	12,88	*	*
	Dřeň	1,72	3,35	*	12,88	*	*
	Proslazená dřeň	1,72	4,25	*	12,88	*	1,12
Brusinky	Celé plody	8,52	4,21	5,54	6,52	*	*
	Celé impregnované plody	8,52	3,43	6,96	6,52	*	*
	Dřeň	8,52	2,52	1,19	6,52	*	*
	Proslazená dřeň	8,52	1,33	0,10	6,52	*	0,48

Obsah kaempferolu byl detekován pouze u čerstvého ovoce. Zmražením ovoce dochází k degradaci kaempferolu, a proto po měsíci skladování klesla koncentrace této látky u všech vzorků pod mez detekce. Po dvou měsících bylo nepatrné množství zaznamenáno u proslazené dřeně borůvek a brusinek.

Nárůst obsahu kvercetinů byl zaznamenán pouze u borůvek, u všech ostatních druhů ovoce se koncentrace kvercetinů ve vzorcích snižovala. U jahod klesla tato koncentrace po měsíci skladování pod mez detekce, avšak po dvou měsících se opět obsah kvercetinů zvýšil. Tato kolísavá tendence je patrná i u malin a brusinek.

U komerčně mražené jahodové dřeně nebyl obsah kvercetinů ani kaempferolu zaznamenán.

5.3.7.4 Změny obsahu phloridzinu v průběhu mražení

Tabulka č. 11: Obsah phloridzinu v průběhu mražení

	Látka	Phloridzin [mg/kg]		
	Odběr	1	2	3
Jahody	Celé plody	210,46	2674,47	3438,80
	Celé impregnované plody	210,46	1246,75	1718,20
	Dřeň	210,46	3008,15	693,61
	Proslazená dřeň	210,46	824,74	579,23
	Komerčně mražené	713,62		
Maliny	Celé plody	103,10	293,10	908,93
	Celé impregnované plody	103,10	138,69	471,65
	Dřeň	103,10	908,28	692,58
	Proslazená dřeň	103,10	588,88	550,26
Borůvky	Celé plody	231,65	*	2162,97
	Celé impregnované plody	231,65	1806,95	2821,27
	Dřeň	231,65	2055,71	962,28
	Proslazená dřeň	231,65	1365,09	1165,55
Brusinky	Celé plody	201,05	4729,33	2326,85
	Celé impregnované plody	201,05	6158,49	19319,75
	Dřeň	201,05	4932,20	13392,52
	Proslazená dřeň	201,05	2549,50	5220,52

Obsah phloridzinu se s dobou skladování značně zvyšuje. U čerstvého ovoce je obsah této látky téměř zanedbatelný, avšak v průběhu skladování dochází ke stabilnímu nárůstu. Nejvíce je tento nárůst patrný u jahod a malin u celých neopracovaných plodů a u brusinek a borůvek u impregnovaných plodů.

5.3.7.5 Srovnání změn obsahu individuálních flavonoidů v průběhu mražení

Z výše uvedených tabulek a grafů vyplývá, že všechny analyzované druhy ovoce obsahují značné množství phloridzinu a kyseliny chlorogenové, avšak po delší době skladování téměř nelze zaznamenat obsah kaempferolu, kvercetinů a myricetinu.

V porovnání s hodnotami získanými při stanovení celkových flavonoidů je zřejmé, že se rozdílné kolísání hodnot těchto jednotlivých látek navzájem téměř vyrovná. V závislosti na druhu ovoce i formě skladování však můžeme pozorovat velkou převahu nárůstu kyseliny chlorogenové a phloridzinu nad úbytkem dalších látek (např. u celých plodů borůvek), jinde je však více patrný úbytek kaempferolu, kvercetinů a myricetinu (např. u celých impregnovaných plodů malin). Zdá se, že majoritní flavonoidy s vyšším obsahem vykazují nárůst a poté pokles hodnot, zatímco minoritní látky ubývají v průběhu uchovávání rychleji. Některé z těchto jevů mohou souviset i s citlivostí použitých metod stanovení.

6 ZÁVĚRY

V předložené práci byly zjišťovány změny obsahu nízkomolekulárních antioxidantů ve čtyřech různých druzích ovoce sezónně dostupných v ČR – v jahodách, malinách, borůvkách a brusinkách. Vzhledem k sezónnosti tohoto ovoce bylo pro analýzu použito dovážené ovoce ze zahraničí. Všechny plody byly před mražením upraveny do čtyř různých forem a v mrazicím boxu byly skladovány jako neupravené plody, celé impregnované plody, dřev a proslazená dřev.

Ve zkráceném experimentu v lednici byly analyzovány pouze některé vybrané parametry.

Hlavní závěry práce:

- Profil změn polyfenolů přibližně odpovídal změnám v obsahu flavonoidů, a to jak při skladování v lednici, tak i v mrazicím boxu, z čehož je zřejmé, že flavonoidy v tomto ovoci tvoří významnou a zřejmě i největší poměrnou část polyfenolů.
- Při skladování v lednici se obsah sledovaných parametrů téměř neměnil, pouze u jahod došlo u flavonoidů i u polyfenolů k relativně značnému nárůstu po prvních čtyřech dnech skladování.
- Nejvyšší obsah celkových antioxidantů byl zjištěn v plodech jahod, V jahodách byl zjištěn také nejvyšší obsah vitamínu C, který se však do konce skladování značně snížil.
- Po dvou měsících skladování bylo nejvíce antioxidantů zachováno v celých impregnovaných a neupravovaných plodech borůvek.
- U komerční mražené jahodové dřev lze říci, že obsah většiny látek v této dřev přibližně odpovídá obsahu látek v připravené jahodové proslazené dřev po dvou měsících mražení.
- Z naměřených výsledků nelze jednoznačně doporučit obecný postup skladování ovoce nejvhodnější z pohledu zachování antioxidantních látek – je třeba optimalizovat postup zpracování s ohledem na druh ovoce i sledovanou látku.

Z uvedených výsledků měření lze usoudit, že žádný z analyzovaných druhů ovoce si nezachovává původní obsah antioxidantů po zpracování a dlouhodobějším mražení. Důvodem může být mimo jiné i vliv podmínek transportu a uchování plodů v období od sběru k dodávce do maloobchodní sítě (šlo vesměs o dovozové ovoce). Je rovněž třeba ověřit a případně optimalizovat používané analytické metody. Avšak i přes značný úbytek v průběhu skladování jsou tyto plody zejména v čerstvém stavu významným zdrojem důležitých antioxidantních látek, které jsou pro lidský organismus velmi prospěšné.

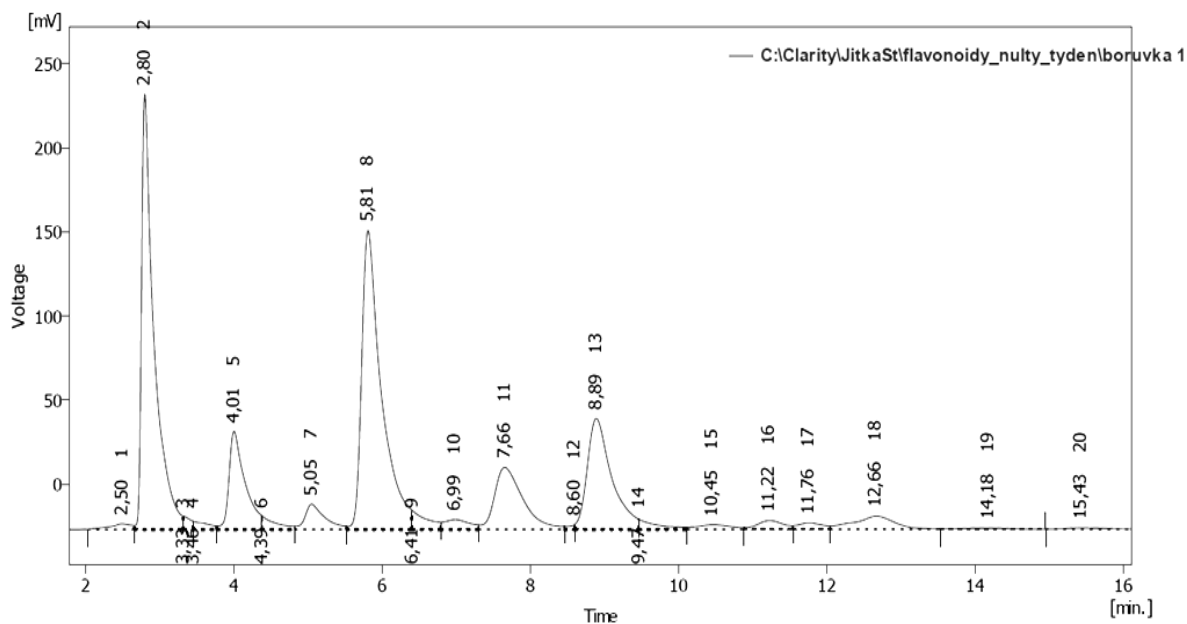
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd Edition, 936 stran. Oxford University Press, 1999.
- [2] Agronavigátor: A-Z slovník pro spotřebitele [online]. 2002 [cit. 2010-05-09]. Antioxidanty. Dostupné z WWW: <<http://agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=76468>>.
- [3] PAULOVÁ, Hana; BOCHOŘÁKOVÁ, Hana; TÁBORSKÁ, Eva. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy* [online]. 2004, 98, [cit. 2010-05-09]. Dostupný z WWW: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf>.
- [4] HRBÁČ, Jan. Aplikace elektrochemických metod pro stanovení fyziologicky zajímavých látek [online]. Olomouc, 2007. 114 s. Habilitační práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Dostupné z WWW: <http://www.upol.cz/fileadmin/user_upload/PrF-dokumenty/Vedecka_rada/Habilitace_a_profesury/ukon_hab_prof/Hrbac_Jan/Hrbac_habilitacni_prace_cast1.pdf>.
- [5] DOSTÁLOVÁ, Květoslava. Univerzita Palackého v Olomouci [online]. [cit. 2010-05-09]. Reaktivní volné radikály, kalciový signál a kalciová hypotéza. Dostupné z WWW: <http://video.upol.cz/dpx_enterprise_media_user/dpx/slidedmedia/49/04_02.pdf>.
- [6] HLÚBIK, Pavol; STRÍTECKÁ, Hana; FAJFROVÁ, Jana. Antioxidanty v klinické praxi. *Praktické lékařství* [online]. 2006, 6, [cit. 2010-05-09]. Dostupný z WWW: <<http://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2006/06/02.pdf>>.
- [7] Agronavigátor: A-Z slovník pro spotřebitele [online]. 2002 [cit. 2010-05-07]. Flavonoidy. Dostupné z WWW: <<http://agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92217>>.
- [8] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. 2. upravené. Tábor: OSSIS, 2002. 368 s. ISBN 80-86659-02-X.
- [9] Lotito S. B., Frei B.: Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence or epiphenomenon?, *Free Radical Biology & Medicine*, 41, 1727-1746, (2006).
- [10] HOFFMANN-RIBANI, Rosemary; HUBER, Lísia S.; RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2009, 22, s. 263-268.
- [11] HERTOĞ, M.G.L, HOLLMAN, P.C.H., VENEMA, D.P. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1992, 40, s. 1591-1598.
- [12] *Zdravcentra.sk: Primárna starostlivosť* [online]. 2009 [cit. 2010-05-09]. Vitamin C. ISSN 1336-4154. Dostupné z WWW: <https://www.zdravcentra.sk/cps/rde/xchg/zcsk/xsl/3141_23657.html>.

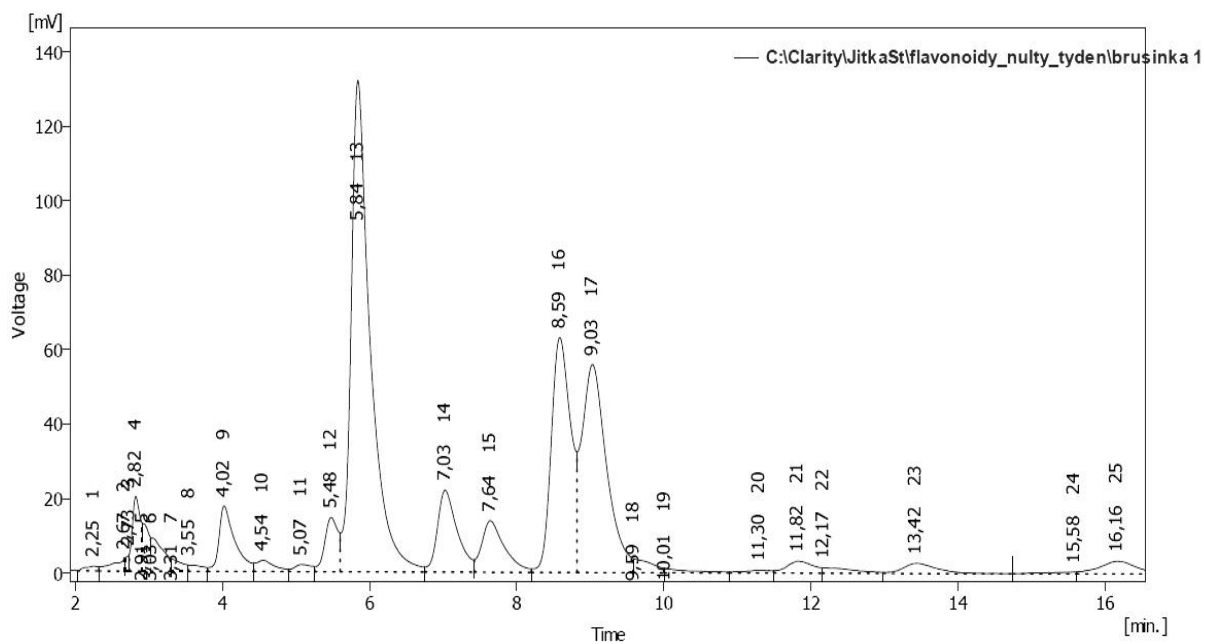
- [13] Štípek S. a kolektiv: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2000, 320 s. ISBN 80-7169-704-4
- [14] Agronavigátor: A-Z slovník pro spotřebitele [online]. 2002 [cit. 2010-05-07]. Vitamin C. Dostupné z WWW: < <http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92149>>.
- [15] HENSEL, Wolfgang, et al. *Praktická zahrada: Dobré rady zahrádkářům*. 1. vydání. Praha: JAN VAŠUT s.r.o., 2007. 600 s.
- [16] PILÁT, Albert. *Kapesní atlas rostlin*. 7. vydání. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1976. 256 s.
- [17] RANDUŠKA, Dušan; ŠOMŠÁK, Ladislav; HÁBEROVÁ, Izabela. *Barevný atlas rostlin*. 3. vydání. Bratislava: Obzor, 1986. 640 s.
- [18] Agronavigátor: A-Z slovník pro spotřebitele [online]. 2002 [cit. 2010-04-12]. Jahody. Dostupné z WWW: < <http://agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92181>>.
- [19] Agronavigátor: A-Z slovník pro spotřebitele [online]. 2002 [cit. 2010-04-12]. Maliny. Dostupné z WWW: < <http://agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92186>>.
- [20] Agronavigátor: A-Z slovník pro spotřebitele [online]. 2002 [cit. 2010-04-12]. Borůvky. Dostupné z WWW: < <http://agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92166>>.
- [21] Agronavigátor: A-Z slovník pro spotřebitele [online]. 2002 [cit. 2010-04-12]. Brusinky. Dostupné z WWW: < <http://agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92167>>.
- [22] ŠAVIKIN, Katarina, et al. Phenolic Content and Radical Scavenging Capacity of Berries and Related Jams from Certificated Area in Serbia. *Plant Food for Human Nutrition*. 2009, 64, s. 212-217.
- [23] BLANDA, Giampaolo, et al. Osmotic dehydrofreezing of strawberries: Polyphenolic content, volatile profile and consumer acceptance. *LWT - Food Science and Technology*. 2009, 42, s. 30-36.
- [24] FERDOVÁ, J. *Změny aktivit enzymů v ovoci v průběhu dlouhodobého uchovávání*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 142 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

8 PŘÍLOHY

Příloha 1: Ukázka chromatogramu pro stanovení obsahu individuálních flavonoidů u borůvek



Příloha 2: Ukázka chromatogramu pro stanovení obsahu individuálních flavonoidů u brusinek



Příloha 3: Ukázka chromatogramu pro stanovení kyseliny askorbové u jahod

