

Mendelova univerzita v Brně

Zahradnická fakulta

Ústav posklizňové technologie zahradnických produktů



**Hodnocení změn při dozrávání a skladování ovoce s využitím
metod NIR spektroskopie**

Disertační práce

Vedoucí práce:

Dr. Ing. Anna Němcová

Vypracoval:

Ing. Petr Šnurkovič, DiS.

Lednice 2016

PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych na tomto místě poděkovat všem, kteří mi pomohli při vypracování této práce, především Dr. Ing. Anně Němcové za odborné rady, vedení a připomínky, které mi poskytla při psaní práce.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Hodnocení změn při dozrávání a skladování ovoce s využitím metod NIR spektroskopie vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Lednici dne:

.....

Podpis

OBSAH

ÚVOD.....	7
1. CÍL PRÁCE.....	8
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
2.1 Charakteristika ovoce	9
2.2 Chemické složení ovoce a zeleniny	10
2.2.1 Voda.....	10
2.2.2 Sacharidy	11
2.2.3 Lipidy.....	12
2.2.4 Organické kyseliny	12
2.2.5 Dusíkaté látky	12
2.2.6 Vitaminy a antioxidanty.....	13
2.2.7 Enzymy	14
2.2.8 Barevné látky	15
2.3 Skladování ovoce a zeleniny	16
2.4 Infračervená spektroskopie	19
2.4.1 Historie infračervené spektroskopie	20
2.4.2 Blízká infračervená spektroskopie (NIR spectroscopy).....	21
3. MATERIÁL A METODIKA	46
3.1 Materiál	46
3.1.1 Broskve	46
3.1.2 Rajčata	48
3.1.3 Jablka	49
3.2 Metodika	53
3.2.1 Spektrometrie v blízké infračervené oblasti (NIR).....	54
3.2.2 Stanovení titrovatelných kyselin.....	55
3.2.3 Stanovení kyseliny askorbové (vitaminu C) HPLC.....	55
3.2.4 Stanovení kyseliny jablečné a citronové HPLC	55
3.2.5 Stanovení celkových polyfenolů Folin - Ciocalteau.....	55
3.2.6 Stanovení rozpustné sušiny.....	56
3.2.7 Stanovení pevnosti slupky a dužniny	56
3.2.8 Stanovení barevných parametrů systémem CIELab.....	56

3.2.9	Stanovení obsahu škrobu	57
3.3	Použité statistické metody	60
4.	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	61
4.1	Broskve	62
4.1.1	Kalibrační grafy broskví	62
4.1.2	Hodnocení změn látkových složek broskví v průběhu dozrávání	70
4.1.3	Hodnocení změn látkových složek broskví v průběhu skladování.....	71
4.1.4	Hodnocení zdravotní nezávadnosti plodů broskví.....	76
4.2	Rajčata.....	79
4.2.1	Kalibrační grafy rajčat	79
4.2.2	Hodnocení změn látkových složek rajčat v průběhu dozrávání	87
4.2.3	Hodnocení změn látkových složek rajčat v průběhu skladování.....	89
4.3	Jablka.....	94
4.3.1	Kalibrační grafy jablek	94
4.3.2	Hodnocení změn látkových složek jablek v průběhu dozrávání.....	103
4.3.3	Hodnocení změn látkových složek jablek v průběhu skladování.....	105
5.	SHRNUTÍ VÝSLEDKŮ	114
6.	ZÁVĚR	119
7.	SOUHRN	122
	RESUME	123
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	124

ÚVOD

Ovoce a zelenina by měly být součástí každodenního jídelníčku, protože obsahují cenné složky, které jsou důležité pro naše zdraví. Jejich konzumace poskytuje organismu nejen vodu, ale i sacharidy jakožto důležitý zdroj energie, organické kyseliny bránící rozvoji škodlivé mikroflóry v trávicím traktu a v neposlední řadě rovněž bioaktivní látky. Mezi nejvýznamnější patří vitaminy a minerální látky, které jsou důležité pro biochemické děje v organismu a také pro udržení acidobazické rovnováhy. Nevhodným skladováním ovoce a zeleniny často dochází k rozvoji nežádoucí mikroflóry, s čímž je možné se setkat i v obchodní síti. Z tohoto důvodu je nezbytné neustále kontrolovat kvalitu těchto komodit a hledat nové možnosti prodloužení doby uchovatelnosti. Většina lidí má spojenou konzumaci ovoce a zeleniny s obsahem vitamínu C. Obsah této látky je velmi různorodý a často se výrazně liší v rámci odrůdy. Stanovení vitamínu C je poměrně složité, protože vyžaduje dokonalou homogenizaci vzorku a hlavně složité přístrojové vybavení. Časově náročné jsou i všechna další stanovení, protože je vždy nutné vzorek homogenizovat, čímž dochází k jeho destrukci. Metoda NIR spektroskopie je přesná a hlavně rychlá metoda, pomocí které lze stanovit základní složky ovoce a zeleniny do několika minut, aniž by došlo k destrukci vzorku. Nejvíce časově náročné je vytvoření kalibračních modelů, které by v ideálním případě měly obsahovat co možná nejvíce proměnných se širokým koncentračním rozpětím. Vhodnými matematickými úpravami lze vytvořit přesné kalibrační modely, které mohou být využívány pro měření neznámých vzorků. NIR spektroskopie může být využívána ve všech stupních kontroly kvality, od vstupní kontroly surovin, přes mezioperační kontrolu, tak i při kontrole hotových výrobků. Přesto klasické analytické metody nelze opomíjet, protože bez nich by nikdy NIR spektroskopie nefungovala. Disertační práce byla zaměřena na sledování změn látkových složek v průběhu zrání a skladování jablek, rajčat a broskví. Hodnoty naměřené v průběhu zrání sloužily k vytvoření kalibračních modelů, které byly následně rozšířeny i o hodnoty získané skladováním plodů, tak aby měly vytvořené kalibrace co největší koncentrační rozpětí a byly tak vhodné pro měření skladovaných plodů. V práci byly hodnoceny jak majoritní látkové složky (rozpuštěná sušina, obsah titrovatelných kyselin) tak i minoritní složky (celkové polyfenoly, kyselina askorbová, jablečná a citronová). Sledována byla i pevnost slupky a dužniny. Přesnost vytvořených kalibračních modelů byla ověřována referenčními metodami. Vytvořené kalibrace mohou sloužit pro rychlé stanovení základních parametrů, popřípadě pro dosažení větší přesnosti mohou být dále rozšiřovány.

1. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo zhodnotit možnosti využití NIR spektroskopie při hodnocení změn látkového složení ovoce a zeleniny v průběhu dozrávání a skladování. Vytvořit kalibrační modely pro rajčata, broskve a jablka, kterých bude využíváno při měření neznámých vzorků a ověřit jejich přesnost měřením neznámých kontrolních vzorků.

Základní cíle:

- Prostudovat odbornou literaturu zabývající se studiem NIR spektroskopie.
- Analyzovat vzorky chemickými metodami a pomocí NIR spektrometru.
- Vytvořit kalibrační modely a ověřit jejich přesnost.
- Sledovat vliv počtu kalibračních standardů na kvalitu kalibračního modelu.
- Sledovat změny látkového složení plodů během celého procesu dozrávání a následného skladování.
- Prokázat pracovní hypotézu, zejména korelaci minoritních látkových složek kyseliny askorbové, celkových polyfenolů, kyseliny jablečné a citronové pomocí NIR spektroskopie.
- Vyhodnotit vhodnost použití metody NIR spektroskopie k hodnocení látkových složek ovoce a zeleniny.
- Statisticky vyhodnotit výsledky.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Charakteristika ovoce

Ovoce se dělí na jádroviny, peckoviny, skořápkoviny, drobné a tropické ovoce. Jádrové ovoce se skládá ze slupky, dužniny, jádřince se semeny. Plody mají pevnou dužninu. Peckové ovoce se skládá ze slupky, dužniny a pecky. Semeno má pevnou skořáčku. Drobné ovoce má semena uložena ve šťavnaté dužnině. Semena rozdělujeme na pravá, nepravá a složená. Skořápkoviny jsou pokryty suchou, dřevnatou skořápkou, která kryje vlastní semena (GOLIÁŠ, 1996).

Plody rostlinných druhů jsou velmi různorodé, od malých suchých plodů až po velké masivní plody. Velké rozdíly jsou nejen ve velikosti a tvaru, ale také v barvě, chuti, vůni a v látkovém složení. Začátek zrání bývá spojen s barevnými změnami, zvyšuje se obsah cukru, snižuje se obsah kyselin, mění se rovněž texturní vlastnosti, dochází k syntéze těkavých aromatických látek a zvyšuje se náchylnost k poškození plodů patogeny. Tyto všechny změny naznačují, že základní genetické mechanismy, které regulují zrání ovoce, mohou být zachovány mezi plody různých druhů (GIOVANNONI, 2004).

Přes netypický průběh počasí byla celková sklizeň ovoce v ČR v roce 2014 meziročně vyšší o 4,4 % a dosáhla 325,0 tis. t. Produkce jablek, která jsou v ČR nejvýznamnějším ovocným druhem, byla v roce 2014 meziročně vyšší o 7 % a činila 208 tis. t, z toho se z produkčních sadů sklídilo 130,9 tis. t jablek (tj. meziroční nárůst o 8,5 %). Na úrodu ovoce měly také vliv především jarní mrazíky, které ve dvou vlnách poškodily hlavně peckové a jádrové ovoce. Trh s jablky v roce 2014 zcela ovlivnilo srpnové zavedení embarga na dovoz ovoce a zeleniny z EU do Ruska. Trh se dostal do složité situace a byl po velkou část sezóny pod tlakem vyšší nabídky než poptávky. Na skladě byly před sklizní ještě dosti vysoké zásoby jablek ze sklizně roku 2013 a tak exportní bariéra na ruský trh znamenala v podstatě znemožnění vývozu cca 1 mil. t jablek zejména polského původu. Reakcí byl pokles cen jablek až o třetinu a malý zájem trhu o letní jablka. Průběh zimy 2014/2015 byl mírný a celkově příznivý a na rozdíl od předchozích několika let nebylo prakticky zaznamenáno žádné významné poškození porostů jarními mrazíky. Po odkvětu stromů se výrazně ochladilo, což zpomalilo vývoj vegetace. Začátkem léta bylo několik pěstitelských lokalit zasaženo silnějším až zcela destruktivním krupobitím. Průběh léta byl extrémně suchý, prakticky bez významnějších dešťových srážek s vysokými tropickými teplotami. Vzhledem k extrémně vysokým teplotám a suchu porosty prakticky přestaly vegetovat. Lze předpokládat velmi špatné založení květních orgánů pro příští rok a dále

vzhledem k přetrvávajícímu suchému podzimu, je zde rovněž významné riziko poškození oslabených porostů zimními mrazy. V roce 2015 dosahovala celková výměra ovocných sadů v ČR dle statistického šetření ČSÚ 19402 ha, z toho je 14465 ha plodných produkčních sadů. V roce 2015 došlo k jejich velmi výrazné redukci. Po zpřísnění definice kultury „sad“ byly u řady pěstitelů skutečně zlikvidovány staré výsadby. Lze s jistotou předpokládat, že vykloučené sady již nebudou nahrazeny novými výsadbami z důvodu nedostatku finančních prostředků na investice do ovocnářství u některých podniků. Toto zredukování ploch však na druhé straně znamená jak snížení průměrného stáří produkčních sadů, tak i zvýšení celkových průměrných výnosů ovoce. Podíl přestárých sadů na celkové výměře se tak v roce 2015 snížil ze 46,1 % na 43 %. Mírně se meziročně zvýšil podíl sadů mladých a na začátku plodnosti. Za perspektivní ovocné druhy jsou považovány hrušně a švestky, u nichž se sady nové a na začátku plodnosti podílí na celkové ploše výsadeb 25 %, resp. 34 %. Naopak u jabloní do těchto dvou kategorií sadů spadá jen 13 % ploch a téměř 55 % ploch jabloňových sadů je přestárých. Výrazně na ústupu je pěstování broskví, angreštu, červeného a bílého rybízu. V roce 2014 se ceny zemědělských výrobců (CZV) ovoce v porovnání s předchozím rokem snížily. S výjimkou broskví, které zůstaly na úrovni roku 2013, byla u všech sledovaných druhů ovoce CZV nižší. Největší pokles byl zaznamenán u višňi a jablek určených ke zpracování. Ceny konzumních jablek se v I. pololetí roku 2014 pohybovaly na vyšších úrovních předchozího období, avšak vyhlášením tzv. ruského embarga jejich cena výrazně klesla. Spotřebitelské ceny ovoce mírného pásma zůstaly v roce 2014 v průměru na úrovni předchozího roku. Ze sledovaných druhů se nejvíce snížila průměrná cena broskví, nektarinek a konzumních jablek. Z jižního ovoce byla průměrná roční cena nižší pouze u pomerančů, naopak ceny citronů a kiwi výrazně vzrostly (BUCHTOVÁ, 2015).

2.2 Chemické složení ovoce a zeleniny

Ovoce a zelenina tvoří podstatnou část dobře vyvážené stravy. Denně by každý člověk měl zkonzumovat alespoň pět porcí ovoce a zeleniny v čerstvém stavu, protože v tomto stavu je zachováno největší množství biologicky aktivních látek (VAUGHAN, GEISSLER, 2009).

2.2.1 Voda

Rostlinné buňky obsahují významné množství vody. Hraje důležitou roli ve vývoji, reprodukčním cyklu a ve fyziologických procesech rostliny. To má vliv na délku doby skladování a na spotřebu rezervních látek. V rostlinných buňkách je voda k dispozici jako

vázaná voda nebo koloidní vázaná voda. Ovoce a zelenina obsahují velké množství vody v poměru k jejich hmotnosti. Zelenina obsahuje 90 až 96 % vody, zatímco ovoce 80 a 90 % (BASTIN, HENKEN, 1994).

2.2.2 Sacharidy

Sacharidy jsou hlavním zdrojem energie v jídelníčku většiny lidí a hrají důležitou úlohu v metabolismu (MANN et al., 2007). Sacharidy jsou hlavní složkou ovoce a zeleniny, tvoří více než 90 % jejich sušiny. Z energetického hlediska představují nejcennější složku potravin a významnou roli hrají také v biologických systémech. Vznikají v procesu fotosyntézy v zelených rostlinách. Mohou sloužit jako stavební prvky (celulóza), nebo jako zásobárna energie (škrob). Jsou součástí nukleových kyselin (ribóza). (DAUTHY, 1995). „Cukry“ je běžný termín popisující mono a disacharidy. Představují významnou část celkového kalorického příjmu (LAVILLE, NAZARE, 2008). Glukóza a fruktóza jsou jednoduché cukry neboli monosacharidy a lze je nalézt v ovoci, lesních plodech, zelenině a medu. Sacharóza je disacharid složený z glukózy a fruktózy. Vyrábí se z cukrové třtiny a cukrové řepy (VAUGHAN, GEISLER, 2009). Laktóza je disacharid složený z glukózy a galaktózy, tento cukr je obsažen v mléku a mléčných výrobcích. Maltóza je disacharid glukózy, která je obsažena ve sladu a sirupech na bázi škrobů.

Rafinóza a stachyóza se nacházejí v malém množství v některých luštěninách, obilninách, zelenině a medu. Škrob je hlavní zásoba energie v kořenové zelenině a obilovinách. Je složen z dlouhých řetězců glukózy a vyskytuje se v podobě granulí, jejichž velikost a tvar bývají různé. Neškrobové polysacharidy jsou hlavní složkou vlákniny. Zahrnují celulózu, hemicelulózu, inulin, pektiny a gummy. Celulóza je hlavní složkou stěny rostlinných buněk a skládá se z několika tisíc glukózových jednotek (MANN et al., 2007).

2.2.2.1 Vlákna

Vlákna je složena z polysacharidů, které nejsou tráveny v lidském žaludku a tenkém střevě. Americká dietetická asociace doporučuje, že by veřejnost měla konzumovat dostatečné množství vlákniny z různých rostlinných potravin. Doporučený denní příjem u dospělých lidí je 20 - 35 g (MARLETT et al., 2002). Toto množství může chránit proti rozvoji diabetu (BESSESEN, 2001). Vlákna snižuje hladinu cholesterolu v krvi a pomáhá normalizovat hladinu krevního cukru (DEVRIES, 2003). Epidemiologické studie ukazují ochranný účinek vlákniny proti ischemické chorobě srdeční (LUPTON, TURNER, 2003). Vlákna převážně obsahuje neškrobové polysacharidy (celulózu, hemicelulózu,

rostlinné gumy, pektiny, inulin, lignin a další rostlinné složky (vosky). Zahrnuje také jeden druh škrobu, označovaný jako rezistentní škrob (je obsažen v luštěninách, celozrnných moukách, šrotech a v některých snídaňových cereáliích). Vlákna je obsažena v ovoci (jablka, broskve, jahody, ostružiny, maliny, rybíz, pomeranče), zelenině (zelí, artyčoky, cibule, česnek, kukuřice, hrách, fazolové lusky, brokolice), luštěninách (čočka, cizrna, fazole) a v celých zrnech obilovin s otrubami (GRAY, 2003).

2.2.3 Lipidy

Ovoce a zelenina obsahují velmi malé množství tuků, méně než 0,5 %. Větší množství obsahují ořechy (55 %), meruňková jádra (40 %), semena hroznů (16 %), semena jablek (20 %) a semena rajčat (18 %).

2.2.4 Organické kyseliny

V ovoci bývá nejčastěji přítomna kyselina citronová, jablečná a vinná. O tom, která kyselina se vyskytuje v nejvyšší koncentraci, rozhoduje druh ovoce. Kyselina citronová převažuje v citrusových plodech, kyselina jablečná u jablek a kyselina vinná u hroznů révy vinné. Některé kyseliny se primárně nevyskytují v dané komoditě, ale protože mají žádoucí účinky na lidské zdraví, lze např. kvašením docílit jejich vznik. Typickým příkladem takového produktu je kvašené zelí, kdy při kvasném procesu vzniká zdraví prospěšná kyselina mléčná, která zároveň slouží jako konzervační prostředek. Organické kyseliny ovlivňují barvu potravin, protože mnohé rostlinné pigmenty jsou přirozenými pH indikátory. Nejdůležitější přínos organických kyselin je ve snižování pH, čímž zpomalují bakteriální kažení. Za anaerobních podmínek a při pH nad 4,6 mohou růst a produkovat smrtící toxiny bakterie rodu *Clostridium botulinum*. Obsah kyselin a sacharidů určuje chuť ovoce. (DAUTHY, 1995). Některé kyseliny (kyselina askorbová a fenolické kyseliny) mají vzhledem ke své antioxidační aktivitě ochrannou roli proti volným radikálům (SILVA et al., 2004).

2.2.5 Dusíkaté látky

Tyto látky se vyskytují v rostlinách jako proteiny, aminokyseliny, amidy, aminy, dusičnany atd. Zelenina obsahuje 1,0 až 5,5 %, zatímco v ovoci jsou koncentrace nižší než 1 %. Z dusíkatých látek jsou nejdůležitější bílkoviny (DAUTHY, 1995). Vyšší množství obsahuje např. pšenice 13 - 15 %, kukuřice 10 %, rýže 7,1 %, a brambory 6,7 %. Bohaté na bílkoviny jsou potraviny živočišného původu a luštěniny, které obsahují 20 - 30 %

bílkovin. Z biologického hlediska jsou rostlinné bílkoviny méně hodnotné než živočišné, protože neobsahují všechny esenciální aminokyseliny (VAUGHAN, GEISSLER, 2009).

2.2.6 Vitaminy a antioxidanty

Strava bohatá na čerstvé ovoce a zeleninu působí preventivně proti chronickým a degenerativním onemocněním (JOSHIPURA et al., 1999). Ovoce a zelenina obsahují velké množství zdraví prospěšných látek v nízkých koncentracích, které mají synergický účinek. Mezi tyto látky se řadí polyfenoly, flavonoidy, vláknina, kyselina linolenová, D - limonen, epigalokatechin, kyselina gallová, isoflavony, vitaminy A, B, C, E, vápník, selen, draslík, glutathion (KARAKAYA, KAVAS, 1999).

Vitaminy jsou esenciální organické látky, které musí být dodávány do lidského těla potravou, protože organismus si je nedovede syntetizovat na rozdíl od aminokyselin nebo mastných kyselin. Vitaminy jsou součástí enzymových systémů, které jsou důležité pro správnou funkci metabolismů proteinů, sacharidů a lipidů. Důležitou roli mají také jako zdraví prospěšné látky. Vitaminy se rozdělují na rozpustné v tucích (A, D, E a K), jejichž absorpce v organismu závisí na příjmu tuků ve stravě. Druhou skupinou jsou vitaminy rozpustné ve vodě (vitaminy skupiny B a vitamin C).

Vitamin A (Retinol)

Tento vitamin se vyskytuje v živočišných produktech (maso, mléko, vejce). Rostliny neobsahují vitamin A, ale obsahují jeho provitamin β - karoten. Ten se nachází v oranžové, žluté a listové zelenině (mrkev, dýně, brambory, špenát a kapusta). Nedostatek vitaminu A vede k šerosleposti, špatnému vývoji kostí a zubů (DAUTHY, 1995). Mezi karotenoidy s nejvyšší antioxidační aktivitou patří β - karoten, lykopen, lutein a zeaxanthin (ELLIOT, 1999).

Vitamin C (kyselina askorbová)

Vitamin C je významný antioxidant, který spolu s vitaminem E chrání buňky před působením volných radikálů. Nedostatek způsobuje křehké stěny kapilár, krvácení z dásní, uvolňování zubů a kloubní onemocnění. Vitamin C je nezbytný pro normální tvorbu kolagenu a podporuje vstřebávání železa. Snadno je ničen oxidací, zejména při vysokých teplotách, což vede k jeho ztrátám během zpracování, skladování a vaření. Výborným zdrojem vitaminu C jsou citrusové plody, rajčata, zelí a zelené papriky. Brambory, i když obsahují malé množství vitaminu C, jsou vzhledem k velké spotřebě také významným zdrojem (DAUTHY, 1995).

Fytochemikálie v ovoci a zelenině hrají významnou roli v prevenci nemocí způsobených oxidačním stresem. Oxidační stres je podmíněn přítomností škodlivých kyslíkových radikálů, které se spoluúčastní na stárnutí organismu a na mnoha závažných chorobách včetně kardiovaskulárních, šedého zákalu, rakovině, revmatismu a mnoha dalších autoimunitních onemocnění. Fytochemikálie působí jako antioxidanty, které blokují volné radikály. Epidemiologické studie opakovaně ukázaly, že existuje pozitivní závislost mezi příjmem ovoce a zeleniny a sníženým výskytem srdečních chorob, úmrtnosti, rakoviny a jiných degenerativních onemocnění, včetně stárnutí (STEINMETZ, POTTER, 1996; GARCIA-CLOSAS et al., 1999; JOSEPH et al., 1999; DILLARD, GERMAN, 2000; PRIOR, CAO, 2000; WARGOVICH, 2000). Konzumace ovoce a zeleniny zcela průkazně snižuje riziko rakoviny úst a hltanu, jícnu, plic, žaludku, tlustého střeva, slinivky, močového měchýře a karcinom prsu. (AMERICAN INSTITUTE OF CANCER RESEARCH, 1997). Polyfenoly jsou sekundární metabolity rostlin. V minulosti byly považovány za antinutriční látky, protože u některých z nich (taniny) bylo prokázáno, že mají nepříznivý účinek na lidský metabolismus. V poslední době došlo k přehodnocení směrem ke zdravotním výhodám těchto látek (BRAVO, 1998). Polyfenoly tvoří společně s kyselinou askorbovou většinu antioxidační aktivity v ovoci (WANG et al., 1996; DEIGHTON et al., 2000). Flavonoidy jsou velmi početnou skupinou sloučenin, které jsou obvykle přítomné jako glykosidy. Obiloviny, ovoce a zelenina jsou velmi významným zdrojem různých flavonoidů (MELTZER, MALTERUD, 1997; ANDLAUER, FURST, 1998). Nejvyšší antioxidační kapacitu mají hrozny a hroznové šťávy, následují grepová šťáva, rajčata, pomeranče a jablka (MACHEIX et al., 1990). Ze zeleniny to jsou kapusta, špenát, brokolice, červená řepa, paprika, cibule, kukuřice, lilek a květák (PRIOR, CAO, 2000). Vysoké množství quercetinu je obsaženo v cibuli, kapustě a rajčatech (HERTOG et al., 1992).

Dobrým doporučením pro populaci se zdá být to, že je důležité konzumovat pestrou a vyváženou stravu s vysokým obsahem vlákniny a antioxidantů, které spolehlivě zajišťují ovoce, zelenina a celozrnné obiloviny (TRIBBLE, 1999).

2.2.7 Enzymy

Enzymy jsou biologické katalyzátory, podporující většinu biochemických reakcí, které probíhají v rostlinných buňkách. V ovoci a zelenině katalyzují enzymy reakce spojené se zráním. Pokud nejsou enzymy po sklizni zničeny teplem, chemikáliemi nebo jinými prostředky, pokračují v procesu zrání. Enzymy se účastní v ovoci a zelenině obrovského

množství biochemických reakcí, proto mohou být zodpovědné za změny chuti, barvy, textury a nutričních vlastností. Tepelné procesy v průběhu zpracování ovoce a zeleniny vedou nejen ke zničení mikroorganismů, ale také způsobují deaktivaci enzymů a tím podporují stabilitu výrobků. Enzymy jsou povahy bílkovinné, proto je jejich aktivita maximální při teplotách do 50 °C. Vyšší teploty působí deaktivčně. Pro aktivitu každého enzymu je rovněž důležité optimální pH. V ovoci a zelenině hrají nejdůležitější roli třídy enzymů hydrolázy (lipáza, invertáza, amyláza, celuláza) a oxidoreduktázy (peroxidáza, kataláza, polyfenoloxidáza) (DAUTHY, 1995). Oxidoreduktázy katalyzují enzymatické hnědnutí potravin. Proces hnědnutí zahrnuje dvě reakce - hydroxylace monofenolů na difenoly (reakce je relativně pomalá a vznikají bezbarvé produkty). Druhá reakce je oxidace difenolů na chinony (reakce je rychlá a vznikají barevné produkty) (QUEIROZ et al., 2008). K omezení oxidace se používají antioxidační, chelatační a okyselující činidla (LINDLEY, 1998). Inaktivaci enzymů lze zajistit blanšírováním. Blanšírování je tepelné ošetření potravin vřoucí vodou nebo párou (ÖZEL et al., 2010). Tyto procesy jsou k zastavení enzymatického hnědnutí velmi efektivní, což ale vede ke změně některých parametrů výrobku (textury a chuti). Alternativou jsou některé metody, které mají stejný účinek, ale nevedou k zahřívání potravin (vysoký hydrostatický tlak, ultrazvuk a pulsní elektrické pole (QUEIROZ et al., 2008).

2.2.8 Barevné látky

Barviva jsou rozdělena do čtyř hlavních skupin zahrnující chlorofyly, karotenoidy, anthokyany a anthoxanthiny. Chlorofyly jsou obsaženy hlavně v chloroplastech a hrají hlavní roli při vzniku sacharidů z oxidu uhličitého a vody fotosyntézou. Chlorofyl je vysoce nestabilní a rychle mění barvu na olivově hnědou. Vzniká sloučenina feofytin. Konverze na feofytin probíhá v kyselém pH. Z tohoto důvodu ztrácí hrách, fazole, špenát a další zelenina zelenou barvu. Karotenoidy jsou žluté, oranžové, někdy žlutozelené a červené pigmenty rostlin. Často se vyskytují společně s chlorofylem v chloroplastech. Mezi karotenoidy patří oranžové karoteny, které se vyskytují v mrkvi, kukuřici, meruňkách, broskvích, citrusových plodech a dýni. Zástupcem karotenů je lykopen, který se nachází v rajčatech, melounech, meruňkách. Druhým zástupcem karotenoidů jsou xanthofyly, které jsou obsaženy v kukuřici, broskvích, paprice. Hlavní význam karotenoidů je jejich vztah k vitamínu A. Molekula β - karotenu se přemění na dvě molekuly vitamínu A. U ostatních karotenoidů, jako jsou α - karoten, γ - karoten, nebo kryptoxanthin není přeměna tak efektivní a z jedné molekuly vzniká pouze jedna molekula vitamínu A.

Karotenoidy jsou poměrně odolné vůči teplotě, změně pH a vyluhování, protože jsou rozpustné v tucích, jsou ale velmi citlivé na oxidaci (DAUTHY, 1995).

2.3 Skladování ovoce a zeleniny

U sklizeného ovoce klesá odolnost vůči mikroorganismům, to je pak více náchylné ke kontaminaci a proto se provádí opatření, aby sklizené ovoce vydrželo co nejdéle čerstvé. Mezi tato opatření patří chladírenské skladování, kterým se zamezuje růst mikroorganismů, snižuje se aktivita enzymů a zpomaluje se dýchání (THOMPSON, 1989). Ovoce určeno pro skladování musí být sklizeno předtím, než dosáhne plné zralosti a musí být zdravé. Velmi důležitá je kontrola a třídění podle jakosti. Hlavními třídícími znaky jsou velikost, hmotnost a barva. O zařazení do jednotlivých jakostních tříd rozhoduje celkový vzhled plodu. Sklizené plody musí být co nejdříve přepraveny do skladovacích prostor, protože jinak jsou v ovoci a zelenině urychlovány procesy zrání (DAUTHY, 1995). Ovoce a zelenina mají rozdílné požadavky na množství kyslíku a oxidu uhličitého v okolní atmosféře. Vzduch obsahuje 21 % kyslíku, 78 % dusíku a další plyny. Tato atmosféra i při nízkých teplotách není příznivá pro dlouhodobé skladování. Ovoce a zelenina jsou živé systémy, které v teplotě 4 °C rychle dozrávají, tím se zkracuje jejich životnost. Čím je teplota a obsah kyslíku v okolní atmosféře vyšší, tím ovoce a zelenina intenzivněji dýchají. Dýchání je proces, při kterém se spotřebovává kyslík a uvolňuje se oxid uhličitý. Snížením obsahu kyslíku v chladírenské komoře lze dosáhnout zpomalení dýchání a tím zajistit delší údržnost produktu. Příliš málo kyslíku v atmosféře může vést k produkci ethanolu (BRILEY, 2002).

Řízená atmosféra pro skladování ovoce

V posklizňovém uložení řízená atmosféra významně podporuje skladovatelnost ovoce. U jablek se jejich konzumní jakost rozšiřuje na 9 až 12 měsíců. Pro ostatní hospodářsky významné druhy (hrušky, švestky, třešně, bobulové ovoce) rovněž umožňuje dlouhodobé skladování a omezení fyziologických onemocnění. Typy plyných směsí se odvozují od vzájemného působení, sníženého obsahu kyslíku a vyšší koncentrace oxidu uhličitého v chladírenské komoře. Významné snížení kyslíku v ambientní atmosféře zpomaluje všechny znaky zrání, produkci ethylenu z plodů, fyziologická onemocnění a mikrobiální poškození plodů. Pokusy s fyziologicky aktivními plyny jako je kyslík a oxid uhličitý v atmosféře skladovaných plodů začaly ve 20. letech minulého století v East Mallingu (Anglie). Další vývoj výzkumu plyných atmosfér se opíral o poznatky účinku kyslíku. Pokud se koncentrace kyslíku v okolní atmosféře pohybovala na hranici fyziologické snesitelnosti a i

přítom se neprojeví anaerobní dýchání (1,0 – 1,2 % kyslíku), označila se termínem ULO (Ultra Low Oxygen). Pro potřeby skladovatelské praxe je uplatňována od poloviny 90. let a všechny významné podniky v ČR tuto technologii užívají alespoň v části svojí skladovatelské kapacity. V posklizňových technologiích se začíná prosazovat dynamicky řízená atmosféra (DCA – Dynamic Control Atmosphere), která přechází z výzkumného okruhu do praktického provozu velkokapacitních chladíren. Obsah kyslíku ($O_2 = 0,7\%$) v podstatě iniciuje tvorbu anaerobních sloučenin jako je ethanol, acetaldehyd a ethylacetát, ale jejich kumulace v pletivu je zpomalena postupnou adaptací pletiva na difuzi kyslíku do vnitřních částí plodu. Označení dynamicky řízená je vztaženo k pozvolnému snižování kyslíku z hodnot, které platí pro ULO (1,0 – 1,2 %) na počátku skladování a během dalších 30 – 50 dnů (tedy cca do první třetiny efektivního skladování v DCA) se koncentrace O_2 sníží k nejnižšímu limitu (0,2 %), který ještě zaručuje aerobní dýchání plodů. Na této koncentraci (v rozmezí 0,2 až 0,4 % O_2) se drží po celou dobu skladování. Parciální podíl CO_2 nehraje zásadní roli ve skladovatelnosti plodu, ale spíše je zbytkovou koncentrací (do 1 %) při jeho technologickém odstraňování z prostoru chladírenské komory (Metodické listy OPVK, 2016).

Tvorba atmosféry náhradou vzduchu za dusík

Technologická modifikace umožňuje vedle rychlého snížení obsahu kyslíku na hranici ULO (1,0 % kyslíku a do 2 % oxidu uhličitého) také snížení teploty okolní atmosféry odpařovacím teplem tekutého dusíku (LIN), i když tento chladicí výkon významně nepřispívá ke zchlazování plodiny (GOLIÁŠ, 2002).

Skladování jablek

Sklizňový termín se hodnotí podle tří parametrů (pevnost dužniny, rozpustná sušina a škrobový test), které se měří na vzorcích plodů z různých stromů. Z těchto tří parametrů lze formulovat zralostní index – Streifův index = $F/R*S$, kde F – pevnost dužniny v kg, při razidle 11 mm, R – rozpustná sušina v °Bx, S – škrobový test na stupnici 1 - 10. Jablka patří mezi klimakterické plody zvyšující intenzitu dýchání v období zrání na stromě a zrání po sklizni. Vzestup dýchání je spojený se zvýšením CO_2 , ethylenu a autokatalytickou produkcí ethylenu, která je velmi rozdílná podle odrůd. Rané odrůdy mají vysokou produkci ethylenu a zrají rychleji, naopak pozdní odrůdy mají produkci zvolněnou a zrají pomalu. Prevence nebo zastavení produkce ethylenu je strategií pro prodloužení skladovatelnosti. Budou-li skladovaná jablka vystavena extrémně nízkému obsahu kyslíku v DCA (dynamicky řízené atmosféře), tak zrání plodů bude významně omezeno ve všech

měřitelných parametrech (pevnost dužniny, barva, ztráta organických kyselin, výskyt fyziologických onemocnění jako je spála, povrchová skvrnitost a mikrobiální poškození). V těchto podmínkách mohou být plody dlouhodobě uloženy. Předností tohoto skladování je čerstvost plodů, neboť po zrušení plynné směsi a přenesení plodů do teploty, která odpovídá běžnému prodeji, se po delší dobu viditelně nemění. Plody uložené po sklizni komunikují s vnějším prostředím prostřednictvím difuzních jevů, které jsou zprostředkovány slupkou neporušeného plodu. Vnitřní atmosféra plodu je zejména u plodů jablek na rozdíl od jiných ovocných druhů jedna z největších a představuje 12 – 16 %. Posklizňové skladování je limitováno hnědnutím dužniny. Symptomy onemocnění jsou hnědé skvrny v dužnině, které přímo nezasahují jaderník (GOLIÁŠ, 2014).

Skladování broskví

Plody broskví mají v konzumní zralosti vysokou rozpustnou sušinu, poměr rozpustné sušiny k titrační kyselosti je významným faktorem pro konzumní přijatelnost. Broskve ze střední části zraje na stromě mají 11 °Bx a titrační kyselost $\leq 0,7$ %, při penetrometrické pevnosti 270 - 360 kPa, přitom akceptovatelná nejnižší hodnota je 90 až 135 kPa. Plody po sklizni musí být ihned převezeny do balíren a chladírenských komor. Vhodné je zchlazování tlakovým vzduchem nebo sprchovou vodou. Plody se ve sklizňových obalech zchlazují na 5 °C, což zlepšuje balení, které se provádí následující den. Předností řízené atmosféry je zachování pevnosti plodu a zpomalení ztráty zelené barvy ve slupce. V plynné směsi 6 % O₂ a 17 % CO₂ při 0 °C je výrazně sníženo hnědnutí dužniny. Střednědobé a pozdní odrůdy jsou náchylné k chladovému poškození.

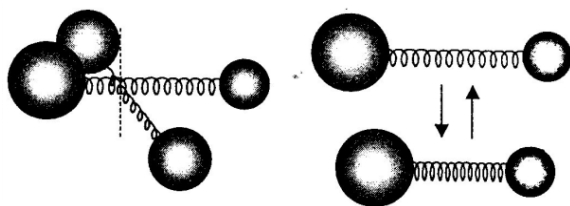
Skladování rajčat

Plody se rozdělují podle zralostních stupňů odvozených od povrchové barvy do 6 skupin (zelená, šedobílá, začínající růžová, růžová, červená, plně červená) u nichž klimakterické minimum je v začínající růžové barvě a vrchol produkce CO₂ se shoduje s červenou barvou. Skleníková rajčata se sklízí v době, kdy 10 – 30 % povrchu plodu ztratilo zelenou barvu a začínají definitivní změny růžování a vzniku červené barvy. Rajčata se předchlazují pouze na 20 °C budou-li následně dozrávat, nebo na 12 °C budou-li jen skladována. Optimální skladovací teplota je 19 - 21 °C, při 90 – 95 % relativní vlhkosti. Uložení v teplotě vyšší jak 27 °C vede ke zpomalení tvorby červené barvy, naopak při teplotě nižší jak 13 °C nejen, že se zpomaluje zrání, ale vyvolává se i chladový stres rajčat, která jsou zelená. Červená rajčata se mohou uložit do 7 °C jen na několik dnů. Za optimální řízenou atmosféru se považuje 3 % O₂ + 2 % CO₂. V těchto podmínkách dochází

ke tvorbě lykopenu, ztrátě sacharidů, organických kyselin a odbourávání chlorofylu (GOLIÁŠ, 2014).

2.4 Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie je jedna z nejstarších a dobře zavedených experimentálních technik používaných v organické a anorganické chemii (KONG, YU, 2007). Hlavním cílem IR spektroskopické analýzy je určit chemické funkční skupiny ve vzorku. Různé funkční skupiny absorbují charakteristické frekvence IR záření (HSU, 1997). Podstatou infračervené spektroskopie je interakce infračerveného záření se studovanou hmotou, kdy v případě pohlcení fotonu studovanou hmotou mluvíme o absorpční infračervené spektroskopii a v případě vyzáření fotonu o emisní infračervené spektroskopii. Infračerveným zářením rozumíme elektromagnetické záření v rozsahu vlnočtů (nejpoužívanější jednotkou v infračervené spektroskopii je vlnocet) 12500 až 20 cm^{-1} . Infračervené záření navazuje na záření viditelné na jedné straně a na záření mikrovlnné na straně druhé. Podle vžitě konvence infračervenou spektroskopii z praktických důvodů dělíme podle vlnových délek záření na dalekou (FIR z angl. far infrared), střední (MIR z angl. middle infrared) a blízkou (NIR z angl. near infrared). Pro identifikaci a určování chemické struktury má největší význam střední infračervená oblast (4000 - 200 cm^{-1}) (KANIA, 2015). Energie záření způsobuje změny rotačních a vibračních stavů molekul (obrázek 1). Rotace: molekula rotuje kolem svého těžiště. Energie rotace závisí na hmotnosti vázaných atomů a délce vazby. Vibrace: vazba mezi atomy se chová jako pružina, na které vázané atomy vibrují. Energie vibrací závisí na hmotnosti vázaných atomů a na pevnosti vazby. V infračervených spektrech sledujeme závislost transmitance nebo absorbance na vlnočtu absorbovaného záření. Spektrum je pásové. Pásky ve spektru odpovídají různým typům vibračních přechodů. Proto jsou spektra rotačně – vibrační (KLOUDA, 2003).



Obrázek 1: Rotace a vibrace dvouatomové molekuly (KLOUDA, 2003)

2.4.1 Historie infračervené spektroskopie

Za objevitele infračerveného záření je považován britský astronom Frederick William Herschel. Testoval jednotlivé barevné složky spektra, aby zjistil, která nesou největší množství tepla. Za červenou barvou objevil neviditelnou část spektra, kde teplota vzrostla nejvíce. Pojmenoval ji „infra red“ (PASQUINI, 2003). Herschel byl rovněž významný astronom, objevil planetu Uran. První infračervená spektra naměřili v roce 1881 William de Wiveleslie Abney a Edward Robert Festing pomocí fotografických desek. Správně rovněž předpokládali, že absorpce souvisí s chemickým složením zkoumaných kapalin. Nejdůležitější průkopník infračervené spektroskopie byl William W. Coblentz. V roce 1905 publikoval výsledky rozsáhlé studie sloučenin, jejichž spektra zaznamenal od 1000 do 16000 nm (DAVIES, 2015). Coblentz byl první vědec, který získal spektra čistých látek, což vedlo k identifikaci funkčních skupin organických látek. Zatímco střední infračervená spektroskopie procházela neustálými teoretickými i instrumentálními pokroky, NIR spektroskopie byla opomíjena a dlouhou dobu nemohla najít žádné další uplatnění. V osmdesátých letech minulého století došlo k rozvoji v instrumentální technice a tím i k novým možnostem využití NIR spektroskopie. Od roku 1930 do roku 1980 bylo vydáno 255 publikovaných prací zabývajících se NIR spektroskopii, zatímco v následujících deseti letech to bylo více než 1000 publikací. Průkopnická práce na analytické využití NIR spektroskopie byla vydána v roce 1938, kdy bylo popsáno stanovení vody v želatině. Významnou osobou v historii NIR spektroskopie byl Karl Norris. Hledal nové metody pro stanovení vlhkosti zemědělských produktů, nejprve extrakcí v methanolu a brzy nato extrakcí rozmletých semen v CCl_4 . První výsledky byly publikovány v roce 1965 ve speciálním čísle časopisu *Journal of Near Infrared spectroscopy*. Tento dokument představil „způsob myšlení“ tohoto průkopnického badatele, popisující model korelace spektrálních dat a koncentrace analytu. Postupem doby došlo k rychlému rozvoji této metody – modernější spektrometry, nové poznatky ve sběrech spektrálních dat a jejich zpracování a rovněž došlo k vývoji nové disciplíny chemometrie, která je nezbytná pro správné a rychlé zpracování dat. Mezi nejvýznamnější přednosti NIR spektroskopie patří rychlost, nedestruktivní charakter a téměř univerzální použití (jakákoliv molekula obsahující CH, NH, SH nebo OH skupiny), s minimálními nároky na přípravu vzorků. Jeden z nejvýznamnějších příkladů nahrazení zdlouhavých a složitých chemických metod NIR spektroskopii, je uplatnění této metody při hodnocení obsahu bílkovin. NIR spektroskopie nahrazuje metodu dle Kjeldahla, kdy je nutné nejprve

provést mineralizaci vzorku pomocí koncentrované kyseliny, vzniklý mineralizát alkalizovat, uvolněný amoniak oddestilovat vodní parou a titračně stanovit obsah dusíku. Tento složitý způsob lze nahradit NIR spektroskopií, která může přímo určit obsah proteinů např. v obilovinách během několika minut. Nicméně je důležité konstatovat, že metoda NIR spektroskopie je velmi závislá na existenci dobrých a přijatelných referenčních metod (PASQUINI, 2003).

2.4.2 Blízká infračervená spektroskopie (NIR spektroskopie)

Blízká infračervená spektroskopie (NIRS) je rychlá a nedestruktivní metoda, která poskytuje vícesložkové analýzy prakticky jakékoliv matrice (REICH, 2005). NIR spektroskopie je typ vibrační spektroskopie, která využívá energii fotonu v energetickém rozmezí $2,65 \times 10^{-19}$ až $7,96 \times 10^{-20}$ J, což odpovídá rozsahu vlnových délek od 750 do 2500 nm. V potravinářském průmyslu patří bezpečnost a kvalita potravin mezi velmi důležité pilíře tohoto odvětví. Velmi úzce souvisí se životním stylem a zdravím obyvatel celého světa. Spotřebitelé hledají stále víc a víc informací o kvalitě potravin a očekávají, že výrobci budou produkovat potraviny vysoké kvality. Je nezbytné, aby hlavní parametry kvality potravin bylo možné rychle a spolehlivě kontrolovat. K tomuto účelu byla vyvinuta NIR spektroskopie. Rozvoj této metody byl ve 20. století velmi pozvolný (CEN, HE, 2007). V průběhu posledních 50 let se neustále klade větší důraz na kvalitu a bezpečnost potravin a potravinářských výrob. Tyto požadavky vyžadují online detekční techniky, které mají četné výhody: mohou být sestaveny přímo ve výrobě a měřit tak parametry právě vyrobených produktů, nebo polotovarů, čímž dojde okamžitě ke včasné detekci možných vad a lze tak neustále sledovat výrobní podmínky. Hlavním cílem je, aby výsledný produkt splňoval všechny parametry jakostního a zdravotně nezávadného výrobku. NIR spektroskopie je rychlá a jednoduchá technika, při které lze měřit více parametrů současně (HUANG et al., 2007). K základním chemickým parametrům patří:

a/ Vlhkost: stanovení vody bylo jednou z prvních aplikací. Využívá se intenzivní absorpce vazby O-H v molekule vody. Stanovení se provádí běžně jak u sypkých, tak u pastovitých a kapalných vzorků.

b/ Bílkoviny: stanovení obsahu bílkovin je umožňováno absorpcí vazby N-H přítomné v peptidické vazbě a dovoluje stanovení nejen celkového obsahu bílkovin, ale např. i jednotlivých aminokyselin v určitých maticích nebo jejich vlastností, jako je teplem poškozený protein, lepek nebo frakce bílkovin.

c/ Tuky, oleje: u stanovení tuků je využíváno charakteristických absorpčních pásů způsobovaných vazbou C-H přítomnou v jejich molekulách. Mimo celkového obsahu tuků je možné sledovat i jejich kvalitu (jodové číslo apod.).

d/ Polysacharidy: charakteristické skupiny a jejich vazby (C-H, O-H) umožňují stanovení vlákniny v různých modifikacích, škrobu a jednoduchých cukrů (sacharóza, glukóza, laktóza).

e/ Popel: obsah popele se metodou NIR určuje nepřímo, neboť je v řadě matric v korelaci k celkové organické hmotě (BIEN, 2006). Protože řízení výroby potravin vyžaduje neustálé monitorování procesu v reálném čase a kontrolu parametrů v kritických bodech výroby, vyvíjí se neustále nové techniky nedestruktivního hodnocení kvality (SHYAM, 2010). Jednou z nich je Hyperspektrální zobrazování (HSI), které dokáže získat prostorové i spektrální informace o sledovaném objektu. Hyperspektrální zobrazení využívá několik možností k provedení detekční činnosti (např. infračervené záření, fluorescenci), které poskytují velkou flexibilitu při hledání řešení různých problémů. Díky tomu si tato metoda vybuodovala široké uplatnění při kontrole potravin (HOUDKOVÁ, 2012). Tyto metody mají značné výhody v rychlosti a jednoduchosti oproti běžným analytickým metodám jako jsou např. HPLC a GC.

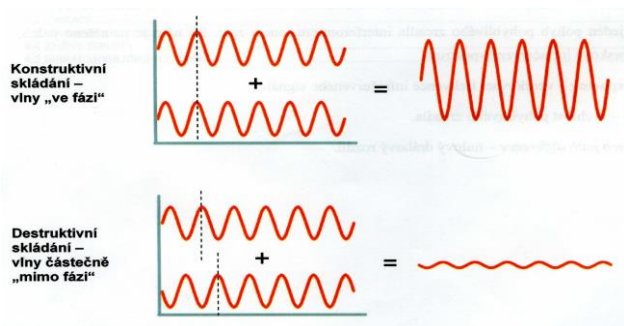
2.4.2.1 Základní principy blízké infračervené (NIR) spektroskopie

Americká společnost pro testování a materiály (ASTM) definuje NIR oblast elektromagnetického spektra v rozsahu vlnových délek od 780 do 2526 nm, která odpovídá vlnočtovému rozsahu $12820 - 3959 \text{ cm}^{-1}$ (REICH, 2005). Blízká infračervená spektroskopie zaznamenala průlom jako kontrolní metoda teprve v 90. letech minulého století v souvislosti se zavedením účinných metod matematické statistiky (chemometrie) nutných pro vyhodnocování NIR spekter a s rozvojem citlivých detektorů a sond s optickými vlákny využívaných v průmyslu ke kontrole kvality výrobních procesů tzv. procesní analytická technologie (PAT, process analytical technology) (MUSELÍK, 2012). Vývoj zaznamenala rovněž instrumentální oblast především přístroje, které jsou schopny rychle poskytnout spektra, jsou dostatečně flexibilní pro použití v různých situacích a velkou výhodou je možnost používání přenosných zařízení, která lze používat přímo na výrobních linkách a kontrolních místech výroby (BLANCO, VILLARROYA, 2002). NIR spektroskopie se uplatňuje zejména v kvantitativní analýze a při kontrole totožnosti látek. Využití pro analytické účely je mnohem méně rozšířené. Uplatnění nachází např. při studiu polymorfních forem nebo při tzv. chemickém mapování (chemical imaging) (MUSELÍK,

2012). Velký význam má zejména ve farmaceutickém průmyslu. Je vhodná pro analýzu pevných, kapalných a biotechnologických lékových forem. Je úzce spjata s vývojovými trendy ve farmacii, při výrobě a sledování procesů, nebo laboratorní kontroly kvality (ROGGO et al., 2007). Při porovnání s běžně používanými postupy nabízí NIR spektroskopie mnoho výhod: NIR spektrum může být zaznamenáno v několika málo vteřinách, charakter analýzy je nedestruktivní, nevyžaduje obvykle žádnou úpravu vzorku a v mnoha případech připouští, že vzorky mohou být po měření znovu použity. Spektra v blízké infračervené oblasti jsou tvořena násobnými přechody neboli overtony a kombinačními přechody. Většina těchto vibrací pochází z vazeb C-H, O-H, S-H a N-H. Pravděpodobnost vzniku overtonů a kombinačních přechodů je mnohem nižší, než pravděpodobnost vzniku přechodů základních, proto mají NIR spektra 10 – 1000 krát nižší intenzitu, než jaká by jim odpovídala ve střední infračervené oblasti. Nižší absorpce záření v NIR spektroskopii způsobuje, že záření proniká několik milimetrů do vzorku, což umožňuje analýzu složitých nehomogenních vzorků (obalované tablety, tobolky, práškové směsi, apod.) a navíc je možné provádět analýzy přímo bez úpravy vzorku (rozpuštění, ředění). Z naměřeného NIR spektra lze v závislosti na kalibrační metodě určit více parametrů, a to jak chemických tak fyzikálních (MUSELÍK, 2012). Analytické údaje obsažené v NIR spektrech mohou být získány pomocí různých vícerozměrných analytických technik. Těmi se buď zjišťuje nějaká vlastnost neznámých vzorků (kvantitativní analýza), nebo se zjišťují rozdíly mezi vzorky s podobnými charakteristikami (kvalitativní analýza) (BLANCO, VILLARROYA, 2002). Nevýhodou je, že metodou NIR spektroskopie nelze provádět stanovení minoritních látek (obvykle < 1 %) (MUSELÍK, 2012). Blízká infračervené spektroskopie se opírá o shromažďování velkého množství vzorků vhodných pro kalibraci a použití vhodného matematického postupu pro získání co nejpřesnějších matic (SHENK, WESTERHAUS, 1991). Chemometrie je disciplína, sloužící pro výběr optimálního experimentálního postupu a zpracování dat z chemických analýz pomocí matematických a statistických metod. Běžně používané chemometrické metody pro analýzu NIR spekter jsou regresní metody a matematické předúpravy spekter, které jsou nezbytné pro vyhodnocování spekter. Minimalizují irelevantní informace obsažené ve spektrech, tak aby bylo možné vytvořit více jednoduchých a robustních modelů. Nejčastější předúpravy jsou normalizace, derivace (první nebo druhá) a vyhlazování (ROGGO et al., 2007).

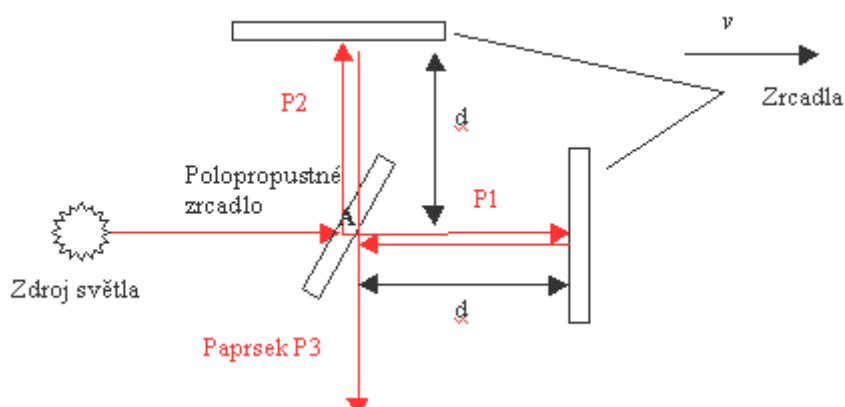
2.4.2.2 Stručný popis a funkce FT-NIR spektrometru

Úkolem infračerveného spektrometru je registrovat infračervené spektrum, tj. závislost intenzity (absorbance nebo transmittance) infračerveného záření na vlnové délce. Žádný infračervený detektor nezaznamenává vlnové délky v žádaném rozsahu a zároveň intenzity záření pro jednotlivé vlnové délky. FT-NIR spektrometr převádí vlnové délky z infračervené oblasti do oblasti audiofrekvencí (kHz), kde jsou detektory schopny zaznamenat zároveň vlnovou délku i její intenzitu. Setkání dvou vln, které se sčítají nebo odčítají v závislosti na své vlnové délce a amplitudě, se nazývá interferencí. Jsou-li dvě vlny stejné vlnové délky takzvaně „ve fázi“, což znamená, že jejich dráhový rozdíl je celočíselný násobek (1, 2, 3, 4...) jejich vlnové délky, sčítají se a výsledkem je vlna o dvojnásobné amplitudě. Dráhový rozdíl lichého násobku poloviny vlnové délky (0,5; 1,5; 2,5; 3,5) naopak vede k úplnému vyrušení těchto vln. Zařízení, na kterém lze tento efekt sledovat, je tzv. Michelsonův interferometr, zkonstruovaný v roce 1881. Michelsonův interferometr (obrázek 3) neboli modulátor rozděljuje paprsek záření na dva paprsky. Děje se tak na polopropustném zrcadle zvaném beamsplitter. Jeho úlohou je přesně polovinu záření odrazit a druhou propustit. Odražený paprsek dopadá na pevné (fixní zrcadlo) a je odražen zpět na beamsplitter. Paprsek prošlý, dopadá na pohyblivé zrcadlo, které se pohybuje směrem k beamsplittru a zpět ve směru paprsku. Pohyblivé zrcadlo je srdcem modulátoru a FT-NIR techniky vůbec. Protože se toto zrcadlo pohybuje, není paprsek odražený od tohoto zrcadla vždy ve fázi s paprskem odraženým od pevného zrcadla, a tedy se dráhový rozdíl při pohybu opakovaně mění (NICOLET, 2006). Nejkritičtější místo v konstrukci takového interferometru je optické zarovnání. Např. naklápění způsobené vibracemi vede k nestabilitě spektra (MEYER, OELICHMANN, 2006).



Obrázek 2: Znáznornění interference (NICOLET, 2006)

Funkce modulátoru: pokud by (zjednodušeně řečeno) byl zdroj infračerveného záření monochromatický, tj. produkoval by záření pouze jediné vlnové délky, tak v okamžiku, kdy by byla vzdálenost pohyblivého a pevného zrcadla od beamsplittru stejná $BP = BF$, došlo by ke konstruktivní interferenci - vlny se skládají (obrázek 2). Tato poloha je nazývána ZPD (zero path difference - nulový dráhový rozdíl). Pokud se pohyblivé zrcadlo nepatrně pohne směrem k nebo od beamsplitteru, zmenší se dráha paprsku prošlého beamsplitterem k pohyblivému zrcadlu. Posune-li se pohyblivé zrcadlo přesně o čtvrtinu vlnové délky naší vlny, je celková dráha tohoto paprsku $\frac{1}{2}$ vlnové délky ($\frac{1}{4}$ tam a $\frac{1}{4}$ zpět). To posune vlnu vůči vlně odražené od pevného zrcadla tak, že nastane destruktivní interference a vlny se zcela vyruší. Ve skutečnosti však infračervený zdroj není monochromatický, ale produkuje širší spektrum záření. Všechny vlnové délky se skládají konstruktivně v bodě ZPD bez ohledu na svou vlnovou délku. V jakékoliv jiné poloze některé vlnové délky interferují konstruktivně a jiné destruktivně. Celkový součet interferujících vln opouští beamsplitter jako jedna výstupní vlna - interferogram. Ta je po jednotlivých bodech zaznamenávána pomocí infračerveného detektoru. Všechny body digitalizovaného interferogramu jsou přepočteny na tzv. jednopaprskové spektrum (single beam) pomocí složité matematické operace, zvané Fourierova transformace. Jednopaprskové spektrum je závislost intenzity signálu na vlnočtu záření, vyjadřovaného nejčastěji v recipročných centimetrech (cm^{-1}). Tato jednotka udává počet sinusových vln záření na jednom centimetru jeho dráhy (NICOLET, 2006).



Obrázek 3: Michelsonův interferometr (ČERMÁK, 2001)

Různé FT-NIR spektrometry využívají různé interferometry (lamellar grating interferometer, Fabry - Perot interferometer). Michelsonův interferometr bývá často upřednostňován před ostatními díky své vysoké energetické propustnosti a vysoké přesnosti v měření (JAGGI, VIJ, 2006).

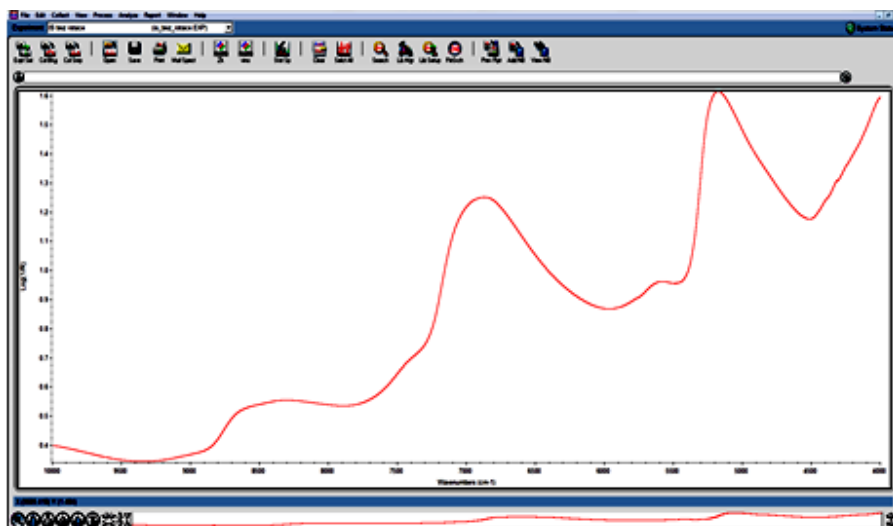
Popis přístroje Antaris II FT-NIR analyzátor



Obrázek 4: Antaris II FT-NIR analyzátor (HIRSCH, 2008)

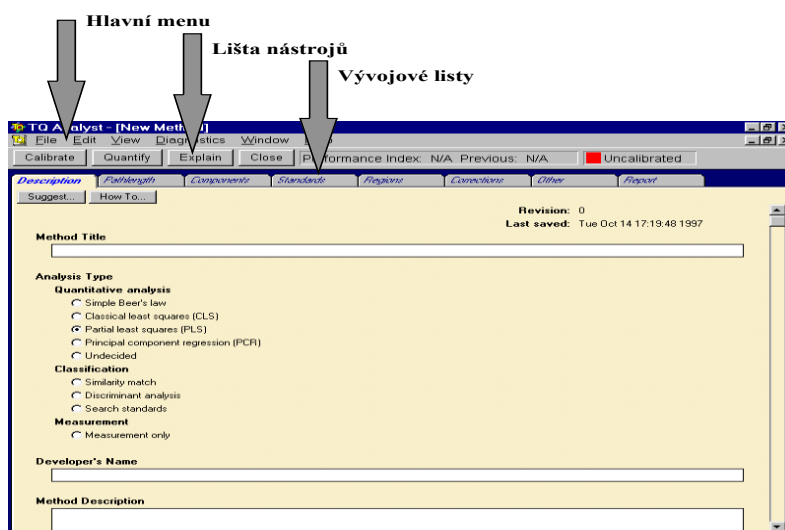
Analyzátor je určen pro použití ve výrobních linkách nebo skladech. Analyzátor Antaris II (obrázek 4) byl vyvinut s cílem splňovat specifické potřeby farmaceutického, potravinářského a chemického průmyslu. Design přístroje a jeho programy byly vyvinuty tak, aby sloužily k vyřešení problémů s kvalitou v těchto odvětvích. FT-NIR spektroskopie nabízí praktickou alternativu k časově náročným referenčním metodám (např. chromatografické metody).

Má schopnost rychle testovat materiály v průběhu jejich výroby a nahrazuje tak rutinní analýzy, které mají být prováděny v laboratoři. Umožňuje analyzovat pevné látky, kapaliny, práškové látky, pasty a tablety. Nedílnou součástí spektrometru je počítačový software Omnic, který umožňuje nastavení parametrů spektrometru, řídí vlastní měření a provádí různé následné operace se spektry.



Obrázek 5: Spektrální okno programu Omnic

Spektrální okno programu (obrázek 5) slouží k zobrazení spekter (spekter vzorků a pozadí uložených na disku, právě naměřených spekter, knihovnových spekter a jiných (NICOLET, 2011). FT-NIR spektrometr Nicolet je jednopaprskový přístroj, takže před měřením vzorků je třeba zaznamenat referenční jednopaprskové spektrum („pozadí“) pomocí příkazu „Collect Background“. Po vložení kyvety se vzorkem do držáku v kyvetovém prostoru se pak zaznamená spektrum vzorku (MATĚJKA, 2014). Pro vyhodnocování spekter slouží program TQ Analyst (obrázek 6). Důmyslný, snadno použitelný program pro vývoj kvantitativních i kvalitativních metod molekulové spektroskopie a analýzu vzorků. Použité algoritmy umožňují výpočet koncentrace komponent nebo klasifikaci neznámých látek za použití souboru kalibračních standardů. Za jeho pomoci lze také pouze měřit a zaznamenávat výšku nebo plochu zvoleného pásu (NICOLET, 2007).



Obrázek 6: Základní okno programu TQ Analyst (NICOLET, 2007)

Integrační sféra je zařízení umožňující snadné měření NIR spekter tuhých a práškových vzorků technikou difuzní reflexe. Má více než 95 % účinnost shromáždění rozptýleného záření při difuzně reflexním měření. Její vlastnosti:

- Safírové okénko s chemicky odolným těsněním
- Interní zlatý etalon pro měření pozadí
- Vlnočtový rozsah $12000 - 3800 \text{ cm}^{-1}$
- Standardní rozlišení 4 cm^{-1} nebo volitelné rozlišení 2 cm^{-1}
- Velikost vzorku až $30 \times 30 \text{ cm}$
- InGaAs detektor

Integrační sféra společně s NIR spektrometrem Antaris je podle mezinárodní klasifikace laserový produkt třídy I. Zdrojem laserového záření v přístroji je helium - neonová trubice. Malé množství laserového záření prochází společně s bílým světlem okénkem integrační sféry.

Difuzně reflexní technika měření

Tato měřicí technika FT-NIR spektroskopie je vhodná k analýze tuhých vzorků s drsným povrchem, jemných částic a prášků. Difuzní reflexe měří změny infračerveného paprsku po interakci s částicovým vzorkem.

Když je záření nasměřováno na povrch vzorku, interaguje s ním tak, že někdy se od povrchu odrazí a jindy částíčkou projde. To způsobí, že se záření při průchodu vzorkem rozptýlí. Záření se ve vzorku difuzně rozptýlí a vrací se zpět do sféry. Její vnitřní povrch je potažen matným zlatem. Záření je jím postupně směřováno na detektor.

Vhodné typy vzorků

NIR spektrometr Antaris s integrační sférou byl vyvinut pro rychlé a snadné měření vzorků ve výrobních či skladovacích prostorách farmaceutického, chemického nebo plasty zpracovávajícího průmyslu. Na integrační sféře lze měřit širokou škálu vzorků. Vzorky mohou být analyzovány umístěním jich samotných na okénko integrační sféry, nebo jejich měřením v průhledných obalech (skleněných, plastových). Pomocí integrační sféry lze měřit tyto vzorky:

- Tuhé látky s drsným nebo difuzním povrchem jako jsou potahované textilie, papír, dřevo, polymery a plastické hmoty.
- Prášky v bezbarvých skleněných ampulkách, průhledných plastových sáčcích nebo měrných kyvetách.
- Tablety s reflektujícím povrchem umístěné buď přímo na okénko sféry, nebo v některém typu držáku tablet.
- Suspenze nebo zakalené tekutiny a gely ve skleněných nebo plastových nádobkách. (NICOLET, 2011).

2.4.2.3 Typy analýz

TQ Analyst poskytuje dobré vodítko při vývoji kalibračních modelů.

◆ Kvantitativní analýzy

Všechny dostupné techniky používají pro vytvoření kalibračního modelu koncentrační informace dosažitelné v tabulce standardů a spektrální informace získané z naměřených spekter standardů. Složitost modelu je závislá na použité technice. Nejvýhodnější je volit nejjednodušší techniku, která je schopna modelovat u analyzovaných vzorků závislost absorpance na koncentraci (NICOLET, 2011). Kvantitativní měření jsou obvykle založena na korelaci mezi absorpcí světla v různých vlnových délkách v oblasti NIR a složením vzorku (XIE, 2009).

a) Simple Beers law (Použití Lambert-Beerova zákona)

Zákon Lambert - Beerův poskytuje fyzikální a matematický základ pro NIRS (PERREY, 2008). Tato technika využívá k vytvoření kalibračního modelu klasického Lambert - Beerova zákona, pro který platí, že za určitých předpokladů se absorbance u zvoleného spektrálního pásu zvyšuje přímo úměrně s koncentrací.

$$A = \varepsilon * d * c$$

A absorbance naměřená při dané vlnové délce (frekvenci)

ε absorpční koeficient (konstanta pro danou látku a frekvenci)

d optická dráha měření dané látky (např. tloušťka kvivety)

c koncentrace dané látky

Množství světla absorbovaného molekulami je přímo úměrné koncentraci látky (VILLRINGER, CHANCE, 1997). Zákon Lambert - Beerův je platný pouze za určitých podmínek: světlo (zdroj záření) procházející vzorkem musí být monochromatické, samotný vzorek musí rovnoměrně absorbovat světlo a měl by být čirý (PERREY, 2008).

Použití této metody vyžaduje měření výšky nebo plochy jediného pásu pro každou komponentu (složku směsi měřeného vzorku), přičemž každá komponenta musí mít nejméně dvě koncentrační hodnoty. Pro každou komponentu je vytvářena samostatná kalibrační závislost. Jednoduchý kalibrační model se nazývá kalibrační křivka. Rozsah kalibrace by měl určovat i rozsah stanovení, tj. koncentrace látky v neznámém vzorku by se neměla pohybovat „pod“, či „nad“ hranicemi kalibrační řady. Pokud je stanovovaná koncentrace mimo kalibrovaný rozsah, je nutno kalibrační metodu rozšířit o standard, který posune kalibrační rozmezí správným směrem. Je vhodné danou kalibrační metodu validovat pomocí validačních standardů (NICOLET, 2011).

b) Classical least squares (CLS)

Klasické metody nejmenších čtverců (CLS) s více proměnnými pro kvantitativní spektrální analýzu jsou dobře známy. CLS se využívá ke kvantifikaci plynných látek infračervenou spektroskopií a atomovou emisní spektroskopií s indukčně vázanou plazmou (HAALAND, MELGAARD, 2002). Metoda se využívá také pro odhad koncentrace látek ve farmaceutických produktech známého složení, za použití FT-NIR (LOPES et al., 2009). Algoritmus CLS je podobný algoritmu pro výpočet podle Lambert - Beerova zákona, řeší však alternativu překrývajících se pásů jednotlivých komponent. Kalibrační model může být založen na výšce nebo ploše spektrálního pásu, může však také použít soubor mnoha bodů ve spektrálním rozsahu širším, než je izolovaný pás. Metoda může používat data

s překrývajícími se pásy komponent, protože kalibrační model vyjadřuje posuzované křivky jako sumu absorbancí přispívajících z každé měřené komponenty. Matematicky je CLS simultánní aplikace Lambert - Beerovy rovnice na vybranou oblast spektra.

c) Stepwise multiple linear regression (SMLR)

Regresní metoda slouží k modelování závislosti mezi kvantitativními znaky spojitého typu (NICOLET, 2011). Nejjednodušším případem je lineární závislost jedné veličiny, tzv. závisle proměnné Y (koncentrace dusíku, ligninu, celulózy) na jiné veličině, tzv. nezávisle proměnné X (doba skladování). V takovém případě se jedná o jednoduchou lineární regresi (KOKALY, CLARK, 1999). V praxi se ale často setkáme se situací, že veličina Y může být vysvětlena lineární kombinací více proměnných (tzv. regresorů) $X_1, X_2 \dots X_k$ (kde $k \geq 2$). V takovém případě se hovoří o mnohonásobné lineární regresi (multiple linear regression). Důležitým předpokladem je zde vzájemná nezávislost vysvětlujících proměnných $X_1, X_2 \dots X_k$. Jsou-li nezávisle proměnné vzájemně silně korelovány, hovoříme o problémech spojených s multikolinearitou regresorů. Vícenásobná lineární regrese (metoda jinak známá jako metoda inverzních nejmenších čtverců nebo P - Matrix) je jednou z obvyklých statistických metod používaných v kvantitativní spektrální analýze. SMLR popisuje koncentraci látky jako funkci absorbance při více vlnových délkách (frekvencích) (NICOLET, 2011). Metoda SMLR zvolí maximální počet vlnových délek postupným procesem. To se provádí volbou vlnové délky, která nejvíce koreluje s referenční hodnotou. Po přidání vlnové délky do rovnice, dochází k vyhodnocování. Tento proces je ukončen, když přidáním vlnové délky nedojde k žádnému významnému zlepšení v modelu (GEESINK et al., 2003). SMLR je technika vhodná pro měření koncentrace několika málo složek ve vícesložkové směsi. SMLR pracuje dobře, existují-li pouze malé (nejlépe žádné) překryvy mezi pásy složek a stanovované látky absorbují lineárně s koncentrací. V blízké infračervené spektroskopii (NIR) se však často objevují široké, překrývající se pásy. SMLR lze použít pouze v případech, kdy alespoň jeden spektrální region vykazuje chování dle Lambert - Beerova zákona. SMLR při vhodném nastavení funguje dobře, i když není detailně známo složení směsi, a toto složení pak není nutné dodatečnými metodami zjišťovat. Podstatné pro metodiku jsou pouze ty složky, pro něž je vytvářen kalibrační model a vhodný výběr regionů používaných programem při výpočtu (NICOLET, 2011).

d) Partial least squares (PLS)

Metoda PLS byla vyvinuta v 70. letech Hermanem Woldem pro použití v sociálních vědách a poměrně záhy byla využita i v chemických aplikacích. Metoda PLS je jednou z nejpoužívanějších metod při vytváření kalibračních modelů. Jedním z hlavních problémů ve vícerozměrné analýze dat je výběr vhodné spektrální oblasti, protože to je podstatné pro přesnost a správnost kalibračního modelu. Je důležité vybrat oblasti, které obsahují mnoho informací, aby vznikly stabilní modely s vynikající interpretovatelností. NORGAARD et al., (2000) navrhl metodu s názvem Synergy Interval PLS (siPLS), kdy soubor dat je rozdělen do intervalů. Problémy u této metody mohou nastat i v případě standardů s odlehlými hodnotami v kalibraci (SHAO et al., 2010). Metoda PLS umožňuje komprimovat obsáhlou matici spektrálních dat. Při tomto úkonu využívá metoda PLS vícerozměrný, vzájemně ortogonální (kolmý) prostor. Ve spektrální datové matici je počet spektrálních proměnných převeden na mnohem menší počet tzv. faktorů (PLS faktory). Dojde tak k odstranění balastních spektrálních informací. Poté je provedena transformace komprimované spektrální matice na matici latentních proměnných. Stejná úprava je provedena i v matici kvantitativních dat a mezi oběma maticemi latentních proměnných je hledána regresní závislost. Na obdobném principu pracuje i další metoda multikomponentní analýzy - metoda PCR (Principal Component Regression). Tyto multikomponentní (multivariační) metody je vhodné použít v případě, kdy matrice analyzovaných vzorků není přesně definována, nebo kdy dochází k překrytí spektrální pásů. Dalšími výhodami multikomponentních metod je možnost stanovit více analytů z jednoho spektra. Jejich nevýhodou je poměrně složitý matematický aparát a rovněž potřeba značného množství standardů nutných k vytvoření spolehlivého kalibračního modelu. Při použití multikomponentních metod jsou potřebné dvě skupiny standardů: standardy kalibrační a validační. Kalibrační standardy jsou použity pro konstrukci kalibračního modelu a validační standardy pro zjištění predikčních schopností tohoto modelu. Optimální je použít alespoň třicet kalibračních standardů na každý analyt, který chceme ze spektra stanovit (precizní PLS a PCR modely pak obsahují i více než 100 standardů). Počet validačních standardů by měl tvořit pětinu, až třetinu počtu standardů kalibračních. Obsah jednotlivých stanovovaných analytů (komponent) v kalibračních a validačních standardech nesmí vykazovat závislost - nelze tedy připravovat standardy pouhým nařazením z jednoho nebo několika zásobních roztoků. Dalším důležitým požadavkem při přípravě metody je, aby všechny standardy obsahovaly všechny stanovované analyty. Vzhledem k uvedeným

podmínkám je velmi obtížné získat dostatečné množství standardů se známými hodnotami stanovovaných analytů. Proto se jako standardy používají reálné vzorky, ve kterých je nejprve zapotřebí analyzovat obsah hledaných analytů referenční metodou. Získané hodnoty se použijí jako vstupní kvantitativní data. Naměřená infračervená spektra kalibračních a validačních standardů a získané kvantitativní hodnoty se použijí pro konstrukci kalibračního modelu. Výstupem u metody PLS je lineární regrese mezi vloženými kvantitativními hodnotami a hodnotami vypočtenými kalibračním modelem. Při vhodně vypracovaném kalibračním modelu by tato regrese měla mít jednotkovou směrnici se statisticky nevýznamným absolutním členem. Parametry charakterizující kvalitu vytvořeného kalibračního modelu jsou hlavně korelační koeficient zmiňované lineární regrese, který by měl být co nejblíže hodnotě jedna a dále chyba kalibrace (Root Mean Square Error of Calibration - RMSEC), která je dána vztahem:

$$\text{RMSEC} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_{ie} - C_{ir})^2}{m_c}}$$

kde C_{ie} je vypočtená koncentrace i - tého kalibračního standardu, C_{ir} zadaná hodnota i - tého kalibračního standardu a m_c počet použitých kalibračních standardů. Vytvořený kalibrační model je použit pro výpočet obsahu analytů ve validačních standardech. Výsledky analýzy validačních standardů slouží k výpočtu chyby predikce (Root Mean Square Error of Prediction - RMSEP), což je parametr kvality predikční schopnosti vytvořeného kalibračního modelu:

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_{iev} - C_{irv})^2}{m_v}}$$

kde C_{iev} je vypočtená koncentrace i - tého validačního standardu, C_{irv} zadaná hodnota i - tého validačního standardu a m_v počet použitých validačních standardů. Algoritmus PLS zkoumá zadanou část nebo části spektra komplexně a využívá oblasti, které jsou statisticky proměnlivé jako funkce koncentrace dané komponenty. Kalibrační model je vyvinut v jednom kroku při využití spektrálních a koncentračních informací v tabulce standardů. Příkladem materiálů, které mohou být kvantifikovány pomocí PLS metody, jsou detergenty ve vodě. Pomocí tohoto algoritmu je možno kvantifikovat i „nechemické“ parametry látek, např. viskozitu, hustotu apod. (NICOLET, 2011). Dalším parametrem, který charakterizuje kvalitu kalibračního modelu je kvadratická chyba cross validace (RMSECV). Spektrum

jednoho kalibračního vzorku je odstraněno ze souboru a model PLS je postaven na zbývajících spektrech kalibračního souboru. Postup se opakuje vynecháním každého ze vzorků kalibrační řady.

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Z_i - Y_i)^2}{n}}$$

Kde n je počet vzorků, Y_i výsledek referenčního měření vzorku i a Z_i je odhadovaný výsledek pro vzorek i kalibračním modelem (CHEN et al., 2008).

e) Principal component regression (PCR)

PCR je vícerozměrná statistická metoda, která slouží k vyhodnocování NIR spekter. Zkoumá vybranou oblast, nebo oblasti měřených spekter (DEPCZYNSKI et al., 2000). Je podobná PLS, probíhá však ve dvou krocích. Nejprve jsou spektrální informace využity k výpočtu PC (principal components). Kalibrační model je vytvořen v dalším kroku jako závislost PC na koncentraci stanovovaných složek. Pro dobrou funkčnost modelu je nutno splnit tyto podmínky:

- Počet kalibračních standardů je minimálně trojnásobkem počtu stanovovaných komponent.
- Všechny standardy by měly obsahovat všechny stanovované komponenty.
- Koncentrace komponent ve standardech se musí měnit nezávisle (nevhodné je generování kalibračních standardů ředěním základního roztoku).

Techniky PLS a PCR jsou velmi podobné. Obecně se doporučuje přednostní použití algoritmu PLS (NICOLET, 2011).

◆ Kvalitativní analýzy

Kvalitativní analýzy obvykle spoléhají na použití spektrálních knihoven. Tyto knihovny jsou zpravidla sestaveny s použitím kvalitativních analytických nástrojů obsažených v softwaru, který je dodán se zařízením. Vhodné využití NIR knihoven umožňuje porovnání spektra neznámého vzorku se spektrem uloženým v knihovně, slouží rovněž k zjišťování, zda zkoumané produkty mají požadované fyzikální vlastnosti (například u obilí velikost zrna nebo jeho vlhkost). Kvalitativní vícerozměrné analytické metody jsou souhrnně známy jako „metody rozpoznávání vzorků“. Tyto metody stanovují matematická kritéria, která určují podobnost mezi dvěma vzorky. Obvykle je podobnost vyjádřena jako

koeficient korelace mezi vzorky nebo jako vzdálenost (Mahalanobisova nebo Euclideanova) měření (BLANCO, VILLAROYA, 2002).

Pro definování vhodného experimentálního postupu při klasifikaci vzorků musíme nejprve posoudit několik faktorů. Nejdůležitější je počet materiálů, které musí zvolený algoritmus rozlišit, počet standardů dostupných pro definici každého známého materiálu a kvalita spektrální informace dostupná pro neznámé vzorky a standardy.

a) Similarity Match (test podobnosti)

Similarity Match je spektrální klasifikační technika, která indikuje, jak těsně se neznámý materiál shoduje s materiálem známým. Definována je jedna třída za použití více standardů. Srovnání může být současně prováděno ve více regionech. Výsledkem je tzv. Match value (hodnota ztotožnění), která může být buď ve formátu 0 - 100, kde 100 je perfektní shoda a nebo 100 - 0, kde je perfektní shodou 0. Pro výstup lze určit limitní hodnoty a tak označovat vzorky, které jsou pod nebo nad limitní hodnotou 95 %.

b) Distance Match (test odlehlosti)

Tato klasifikační metoda stanovuje, jak přesně se zkoumaný vzorek shoduje s jednou ze dvou, či z více tříd známých materiálů. Doporučuje se použít minimálně 5 standardů pro každou třídu. Spektra standardů by měla být velmi podobná a měla by se lišit pouze v intenzitách pásů v některých kvalitativně klíčových oblastech. Příkladem použití může být kontrola obsahu aktivní substance v tabletách, které mají několik různých úrovní koncentrace (lze tedy vytvořit několik tříd spekter). Spektrum neznámého vzorku se pak porovnává s průměrným spektrem jednotlivých tříd a sleduje se, zda se neodchyluje více než jednotlivé standardy a pokud ano, tak o kolik.

c) Discriminant Analysis (rozlišovací analýza)

Tato spektrální klasifikační technika určuje třídu (nebo třídy), které jsou nejpodobnější neznámému materiálu. V kalibračním modelu je specifikováno více tříd, přičemž každá třída je popsána libovolným počtem standardů (nejméně však dvěma). Výsledkem této metody je jméno třídy (nebo tříd), které jsou nejpodobnější posuzovanému vzorku. Součástí výsledku je i tzv. Mahalanobisova vzdálenost tj. vzdálenost hodnoceného spektra od těžiště každé třídy. V případě diskriminační analýzy se jedná zejména o varování o odlehlosti neznámého spektra od nejbližší třídy.

d) Search Standards (vyhledání standardů v knihovně)

Tento algoritmus je velmi podobný technice vyhledávání v knihovnách v programu Omnic. Určuje, který ze známých materiálů je nejpodobnější neznámému vzorku.

Pro definici známých látek je použit vždy jeden standard. Nelze zde slučovat knihovny do skupin, pro vyhledávání může být v programu TQ Analyst použito několik regionů spektra. Výsledkem je název nejpodobnějšího standardu, jeho index a hodnota 0 - 100, kde 100 % je maximálně možná shoda.

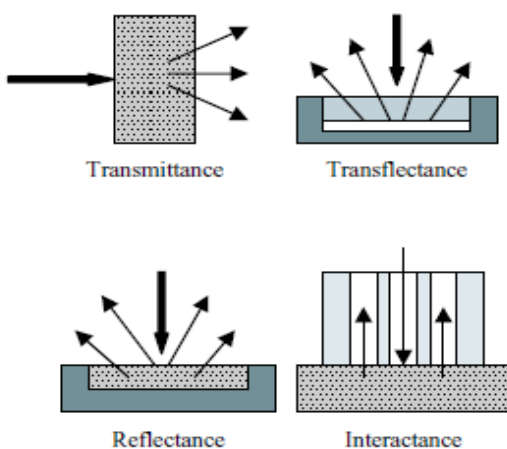
e) QC Compare search (kontrola kvality - srovnání s třídami standardů)

Klasifikační technika, která vyhledá třídu standardů nejpodobnější analyzovanému vzorku. Musí být definovány nejméně 2 třídy, každá může obsahovat několik standardů. Pro analýzu může být použito i více vybraných regionů spektra. Výsledkem je pak jedna nebo více nejpodobnějších tříd, což je vlastně procento shody v definovaném regionu s nejpodobnějším standardem ve třídě. Maximálně možná shoda je 100 %.

Tato metoda je vhodná například pro zjišťování totožnosti vzorků pomocí spekter naměřených v blízké infračervené oblasti (NIR). Jestliže je k dispozici jen jeden standard od každého materiálu, je vhodnější použít metodu Search Standards (NICOLET, 2011).

2.4.3 Využití NIR spektroskopie v potravinářství

Ovoce, zelenina a ovocné šťávy

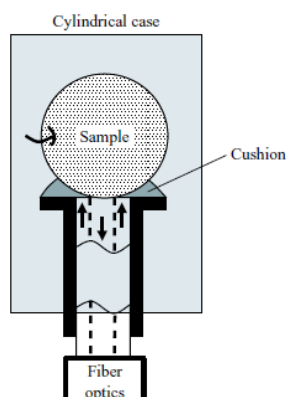


Aplikace NIR spektroskopie je dnes v oblasti kvality ovoce a zeleniny moderním trendem. V závislosti na typu vzorku a druhu chemické analýzy existují 4 způsoby měření: reflektance, transmittance, interaktance, a transflektance (obrázek 7). Ovoce a zelenina mohou mít tenkou slupku (jablka, mango, broskve), středně tlustou slupku (pomeranče, banány nebo velmi tlustou slupku (melouny).

Obrázek 7: Režimy měření NIR (OZAKI et al., 2007).

Vzorky s tenkou slupkou mohou být měřeny v režimu interaktance (obrázek 8). Záleží na tom, kde je zkoumaná chemická látka obsažena. Pokud je chemická látka obsažena těsně pod slupkou, dostačuje menší pronikavost - režim reflektance. Dalším faktorem, který ovlivňuje stanovení je struktura plodů. Jestliže je ovoce homogenní (jablka), dají se spektra snadno měřit a získá se přesná kalibrace.

Pokud plod nemá homogenní strukturu, stanovení může být komplikovanější (OZAKI et al., 2007).



Obrázek 8: Spektrální měření celých broskví (KAWANO et al., 1995).

Stanovení rozpustné sušiny je jedním z nejčastějších kvalitativních faktorů ovoce a zeleniny. Naměřené spektrum obsahuje dostatečné množství informací týkajících se absorpce cukru. Referenční měření rozpustné sušiny je rychlé a jednoduché. Hodnota se získá analýzou ovocné nebo zeleninové šťávy pomocí digitálního refraktometru. Důležité je měřit rozpustnou sušinu co nejdříve po extrakci šťávy. Odpařováním vody ze šťávy se hodnota zvyšuje. Dalším stanovením u ovoce a zeleniny bývá stanovení sušiny (Dry Matter), což zahrnuje cukry, škrob a vlákninu. Obsah se liší dle druhu, odrůdy a rovněž stáří plodů. Pro vytvoření přesného kalibračního modelu je nezbytná přítomnost reprezentativních vzorků. Přítomností velkého počtu nezralých jablek budou mít kalibrace vysoké koncentrace škrobu a nízké koncentrace cukrů, zatímco bude-li kalibrace obsahovat převážně zralá jablka, budou koncentrace škrobu nízké. Měření obsahu titračních kyselin je stejně důležité jako měření rozpustné sušiny. Toto měření metodou NIR je méně přesné přítomností funkční skupiny COOH. Kovalentní vazba mezi velkými atomy C-O má menší dipólový moment a velmi nízkou absorpci ve srovnání s vazbami mezi velkými a malými atomy jako jsou C-H nebo O-H. Dalším důvodem je nízká koncentrace kyselin obvykle menší než 2 %. V posledních deseti letech ale výzkumy ukázaly, že NIR spektroskopie může být používána jako poměrně přesná metoda k zjišťování obsahu titrovatelných kyselin. Stanovení optimálního termínu sklizně se zjišťuje měřením pevnosti dužniny. Z fyziologického hlediska bývá ztráta pevnosti plodu spojena se ztrátou pevnosti buněčné stěny, kterou tvoří látky jako pektin, celulóza a hemicelulóza. Metoda NIR spektroskopie se ukázala jako přesná metoda v postupu nedestruktivního zjišťování pevnosti dužniny.

Autoři SOHN and CHO ve své publikaci v roce 2000 vytvořili kalibrační model pro pevnost dužniny, který měl korelační koeficient roven hodnotě 0,84 a chybu kalibrace 0,84 N (OZAKI et al., 2007).

HE et al., (2005) hodnotili pomocí blízké infračervené spektroskopie základní charakteristiky plodů rajčat odrůdy Heatwave. Spektra plodů byla měřena v rozsahu vlnových délek 350 - 2500 nm. U plodů byly měřeny obsah rozpustné sušiny (SSC) a kyselost (pH). Kalibrační modely byly vytvořeny ze 100 plodů a PCR a PLS metod. Korelační koeficient pro model obsahu rozpustné sušiny byl 0,95 (PLS) a 0,92 (PCR). Chyba kalibrace byla vyšší u metody PCR 0,11 °Bx. Když byl model použit pro predikci dalších 30 vzorků, výsledky predikce byly rovněž žádoucí. Korelační koeficient byl 0,90 a směrodatná odchylka predikce (SEP) 0,19 °Bx. Korelační koeficient pro model pH byl 0,92 (PLS) a 0,90 (PCR). Chyba kalibrace byla 0,07.

MCGLONE, KAWANO, (1998) ověřovali použití NIR spektroskopie k zjišťování posklizňové zralosti a fyzikálně - chemických vlastností plodů kiwi. Plody pocházely z Nového Zélandu a Japonska. Část plodů pocházela z maloobchodní sítě a část byla získána přímo z lodi převážející čerstvé plody. Po příjezdu do laboratoře bylo ovoce ihned umístěno do chladu a skladováno v 10 °C po dobu 14 dnů. Náhodné dílčí vzorky v počtu 100 kusů ovoce byly odebrány 1., 4., 10., a 93. den. Před každým měřením byly vzorky ponechány 3 hodiny v laboratorní teplotě, aby se teplota ovoce stabilizovala. Spektra byla měřena v rozsahu vlnových délek 800 - 1100 nm. U každého plodu byl zjišťován obsah rozpustné sušiny a pevnost. Po vyhodnocení kalibrace byl zjištěn korelační koeficient pro rozpustnou sušinu 0,9 a chyba 0,39 °Bx. Tento model tedy lze používat pro měření neznámých vzorků. Model pro zjišťování pevnosti měl korelační koeficient 0,66 a není dle autorů příliš vhodný pro další měření.

MOGHIMI et al., (2010) se rovněž zabývali hodnocením kvality plodů kiwi. Celkem bylo vybráno 100 plodů odrůdy Hayward. 70 plodů bylo použito k vytvoření kalibračních modelů a 30 plodů k následnému ověření vytvořené kalibrace. Všechny vzorky pocházely ze stejného místa. Byly sklizeny ručně během jednoho dne a uloženy do teploty 20 °C a relativní vlhkosti 60 %. Plody byly nejprve proměřeny pomocí NIR spektrometru a poté byly u každého plodu změřeny pH a rozpustná sušina. Z naměřených i vypočítaných hodnot vznikly pomocí programu TQ Analyst kalibrační modely. U rozpustné sušiny byl korelační koeficient roven hodnotě 0,93 a chyba predikce byla 0,259 °Bx. U pH byl korelační koeficient roven hodnotě 0,943 a chyba predikce byla 0,076.

PISSARD et al., (2013) analyzovali obsah kyseliny askorbové, cukrů a polyfenolů NIR spektroskopii a referenčními metodami u plodů jablek. Obsah kyseliny askorbové byl zjišťován u 1474 plodů, obsah polyfenolů u 2646 plodů a obsah cukrů u 1875 plodů. Analýzou velkého počtu plodů byl získán potřebný koncentrační rozsah nutný pro vytvoření kalibrací NIR spektroskopii. Kyselina askorbová (0,27 - 75 mg.100g⁻¹), polyfenoly (276 - 7600 μg.g⁻¹) a cukry (7,2 - 20,9 °Bx). Ve všech třech případech byly získány kalibrační modely s hodnotami korelačních koeficientů v rozmezí 0,8 - 0,94 a dle autorů lze tedy tyto modely využívat při měření neznámých vzorků.

SÁNCHEZ et al., (2013) popsali použití aplikace NIR spektroskopie pro nedestruktivní měření kvalitativních parametrů pomerančů v průběhu zrání a sklizně. Pro pokus bylo vybráno 8 stromů se 4 různými zavlažovacími systémy, celkem tedy 32 stromů. Pomeranče byly sklizeny ve třech různých termínech 9. března (48 pomerančů), 16. března (48 pomerančů), a 22. března (95 pomerančů). Sklizené pomeranče byly uloženy do chladírny při 5 °C a 90 % relativní vlhkosti až do následujícího dne, kdy byly provedeny laboratorní analýzy. Před každým měřením byly plody vytemperovány na pokojovou teplotu a analyzovány při 20 °C. Plody byly nejprve proměřeny pomocí NIR spektrometru, následně byly pomocí spektrofotometru změřeny barevné parametry (L, a, b), vymačkala se šťáva a referenčními metodami byly stanoveny titrovatelné kyseliny a rozpustná sušina. Ze získaných výsledků byly vytvořeny kalibrační modely. Korelační koeficient dosahoval nejvyšších hodnot (0,80) u parametru celková rozpustná sušina, kde byla chyba metody rovna hodnotě 0,58 °Bx.

CAYUELA, WEILAND, (2010) se rovněž zabývali hodnocením pomerančů a vytvářením kalibračních modelů metodou NIR spektroskopie. 4 odrůdy byly postupně sklizeny od ledna do dubna, aby se zajistila co největší variabilita plodů. Celkem bylo vytvořeno 6 kalibračních modelů: pevnost dužniny, pH, rozpustná sušina, index zralosti, obsah titrovatelných kyselin a hmotnost plodů. Grafy rozpustné sušiny a hmotnosti plodů měly nejvyšší hodnoty korelačního koeficientu.

CAMPS, CHRISTEN, (2009) analyzovali tři odrůdy meruněk: Bergarouge, Harostar a Kioto. Plody pocházely z výzkumné stanice ve Švýcarsku. Ovoce bylo sklizené a analyzováno ve stejný den. Celkem bylo analyzováno 264 plodů. Plody byly nejprve měřeny pomocí NIR spektrometru v režimu reflektance na protilehlých stranách v rozsahu vlnových délek 650 – 1200 nm. U plodů byla dále stanovena pevnost (měřeno penetrometrem na protilehlých stranách), titrační kyseliny alkalimetry a obsah

rozpuštěné sušiny refraktometrem. Z hodnot vypočítaných a naměřených byly vytvořeny kalibrační modely. Hodnoty korelačního koeficientu se u všech tří parametrů pohybovaly kolem 0,90. Z výsledků vyšel nejlépe model pro měření rozpuštěné sušiny, který měl chybu kalibrace 0,6 °Bx.

GIOVANELLI et al., (2014) sledovali změny v kvalitě jablek odrůdy Golden Delicious v průběhu skladování v kontrolované atmosféře (1 % O₂ a 2,5 – 3 % CO₂). Podle vytvořených kalibračních modelů z téže odrůdy, hodnotili rozpuštěnou sušinu, pevnost, antioxidační kapacitu a obsah celkových fenolických látek. U všech parametrů bylo dosaženo hodnot korelačního koeficientu kolem 0,90. U rozpuštěné sušiny bylo pro kalibraci použito 254 plodů a chyba stanovení byla 0,4 °Bx. Kalibrační modely pro hodnocení antioxidační kapacity a fenolických látek obsahovala 46 vzorků a chyba stanovení byla 0,05 TE mmol.kg⁻¹ (antioxidační kapacita) a 41 mg.kg⁻¹ (fenolické látky). Kalibrační model pevnosti dužniny plodů byl sestaven ze 143 plodů s chybou 0,5 N.mm⁻¹.

SÁNCHEZ et al., (2013) hodnotili schopnost blízké infračervené spektroskopie třídít zelený chřest podle způsobu pěstování (ekologické vs. konvenční) v závislosti na podmínkách skladování a době sklizně. Pro tento účel bylo vybráno 300 zelených chřestů. Vzorky byly odebírány po 7, 14, 21, 28 dnech a byly uloženy do chladírenské komory (2 °C a 95 % relativní vlhkost). Pomocí spektrometru byla změřena jejich spektra a k vyhodnocení byla použita diskriminační analýza, která správně oddělila 91 % vzorků.

PARPINELLO et al., (2013) zkombinovali NIR spektroskopii, instrumentální analýzu a senzorickou analýzu při hodnocení bobulí hroznů révy vinné. V průběhu roku 2011 proběhla sklizeň. Po převozu do laboratoře byla část vzorků analyzována okamžitě, část až po dvoudenním skladování při teplotě 4 °C. Pro kalibraci obsahu cukrů bylo použito 682 bobulí. Kalibrační model měl hodnotou korelačního koeficientu 0,9 a chybu 0,94 °Bx. 400 bobulí bylo použito pro senzorickou analýzu. Spotřebitelé (12 žen a 8 mužů) hodnotili sladkost bobulí 4 bodovou stupnicí. 43 mužů a 57 žen hodnotili celkový dojem 9 - ti bodovou stupnicí. Bylo zjištěno, že PLS modely jsou velmi užitečné pro predikci chuti a celkové přijatelnosti senzorických vlastností.

IGNAT et al., (2012) zkoumali obsah kyseliny askorbové v paprice. K pokusu byly vybrány papriky pěstované ve skleníku v Izraeli. „Ever Green“ (zelená odrůda), „No 117“ (žlutá odrůda) a „Celica“ (modrá odrůda). Papriky byly odebírány v průběhu vegetačního období od 34. dne až do úplného zrání (88. den) v průměru po 7 dnech. Celkem bylo

odebráno 180 plodů každé odrůdy. Plody byly zchlazeny a před měřením spekter byly uloženy v klimatizované laboratoři (23 °C). Obsah kyseliny askorbové byl stanoven titračně (odměrný roztok 2,6 dichlorfenolindofenol). Nejvyšší obsah byl zaznamenán mezi 67 – 70 dnem (110 mg.100g⁻¹). Hodnoty korelačního koeficientu se u kalibračních modelů pohybovaly kolem hodnoty 0,8 a nejvyšší chyba kalibrace byla u odrůdy Celica 14,2 mg.100g⁻¹.

FRANCOIS et al., (2008) vypracovali studii na téma: Předvídání sensorických vlastností čekanky pomocí fyzikálně - chemických měření a blízké infračervené spektroskopie. Čekanky byly uchovávány ve tmě při teplotě 4 °C. Hodinu před vlastním hodnocením byla provedena aklimatizace. Listy byly nejprve proměřeny pomocí NIR spektrometru, poté následovalo sensorické hodnocení pomocí 10 vyškolených specialistů, kteří hodnotili sladkost, křupavost a hořkost 10 - ti bodovou stupnicí. Fyzikální metodou byla hodnocena křupavost a HPLC metodou byly analyzovány hořké látky a obsah cukrů. Tato studie ukázala, že hlavní smyslové vlastnosti čekanky vysoce korelují s koncentrací cukrů a hořkých sloučenin. Sensorickým hodnocením bylo zjištěno, že koncentrace cukrů jednak pozitivně ovlivňuje sladkou chuť a zároveň inhibuje hořkost čekanky. Kalibrační model sladké chuti vytvořený z hodnot sensorické analýzy a z hodnot vypočítaných NIR spektroskopii měl hodnotu korelačního koeficientu 0,95, což naznačuje možné využívání této techniky při sensorickém hodnocení čekanky.

STEUER et al., (2001) analyzovali citrusové oleje metodou NIR spektroskopie. U olejů byly stanoveny těkavé látky metodou GC (Limonene, Myrcene, α -Pinene, β -Pinene, Sabinene, γ -Terpinene, Terpinolene) a titračně byl stanoven obsah aldehydů. Diskriminační analýza ukázala velkou podobnost mezi pomerančovým, grepovým a olejem z hořkých pomerančů. Tuto trojici sluků oddělila od ostatních olejů. Vytvořené kalibrační modely měly vysoké hodnoty korelačních koeficientů (0,90) a nízké chyby kalibrace.

LIU et al., (2008) použili NIR spektroskopii k rozlišení Ryzlinku, pocházejícího z různých oblastí. Celkem bylo použito 50 vzorků, které pocházely z Německa, Austrálie, Nového Zélandu a Francie. Spektra vín byla proměřena pomocí NIR spektrometru a k vyhodnocení byly použity Principal component analysis (PCA) a Stepwise linear discriminant analysis (SLDA). Metoda PCA nedokázala vzorky oddělit a došlo tak k překrytí vzorků z Nového Zélandu a Evropy a rovněž Nového Zélandu a Austrálie. Metoda SLDA správně oddělila 95 % vín z Austrálie a Evropy a 86 % vín pocházejících z Austrálie a Nového Zélandu.

GARDE-CERDÁN et al., (2010) studovali schopnost NIR spektroskopie stanovovat těkavé sloučeniny v červených vínech. Pro tuto studii bylo analyzováno 510 vzorků červených vín, která zrála v různých dubových sudech různou dobu. Červená vína jsou klasifikována dle procesu stárnutí do tří různých kategorií: „Crianza“ vína (červené víno zraje nejméně 6 měsíců v dubových sudech, „Reserva“ (červené víno s dobou zrání alespoň 12 měsíců v sudech), „Gran reserva“ (červená vína zrající po dobu nejméně 18 měsíců v dubových sudech). U vín byla nejprve změřena jejich spektra a následovala analýza těkavých složek (Furfural, 5-Methylfurfural, Guaiacol, Eugenol, cis-Oak lactone, trans-Oak lactone, 4-Ethylphenol, 4-Ethylguaiacol) metodou kapalinové chromatografie. Z naměřených a vypočítaných hodnot byly metodou PLS vytvořeny kalibrační modely o korelačním koeficientu $r > 0,86$.

WU et al., (2012) popsali použití blízké infračervené spektroskopie pro rychlé stanovení antioxidační aktivity extraktu z listů bambusu. Listy se nechaly usušit na slunci, vzniklý prášek byl podroben extrakci deionizovanou vodou a zahuštěn vakuovou odparkou. Takto připravený vzorek byl proměřen NIR spektrometrem a byla u něj stanovena antioxidační kapacita metodami FRAP, DPPH a ABTS. Ze získaných hodnot byly vytvořeny kalibrační modely s korelačními koeficienty 0,863; 0,910 a 0,966.

BERTONE et al., (2012) určovali optimální termín sklizně u jablek pomocí NIR spektroskopie. 600 plodů bylo sklizeno v období od srpna do října. Ihned po sklizni byly plody proměřeny na NIR spektrometru. Referenčními metodami byly analyzovány pevnost dužniny plodů, obsah škrobu Lugolovým roztokem a rozpustná sušina. Z naměřených a vypočítaných hodnot byly sestaveny kalibrační a cross validační modely, které hodnotí přesnost metody. Hlavní hodnotící metodou pro určení optimálního sklizňového termínu jablek je zjišťování množství škrobu Lugolovým roztokem. Stupnice má hodnoty 1 - 10, kdy při úplné zralosti je škrob odbourán. Vytvořená kalibrace metodou NIR spektroskopie měla chybu 1,7.

LOUW, THERON, (2010) vytvořili kalibrační modely pro stanovení titrovatelných kyselin, pevnost dužniny, hmotnost plodů a poměr cukrů a kyselin metodou NIR spektroskopie. Analýzy byly provedeny na 3 odrůdách slivoní (Pioneer, Laetitia and Angeleno). Vzorky byly odebírány po dobu 7 týdnů. Ihned po sklizni byla změřena spektra jednotlivých plodů. Kalibrace byla vytvořena z 3360 plodů (1200 Pioneer, 1120 Laetitia a 1040 Angeleno). Výsledky ukazují, že NIR spektroskopií lze vytvořit relativně přesné

modely predikce pro vnitřní kvalitní vlastnosti švestek, protože chyby vytvořených metod (RMSEP) vykazovaly nízké hodnoty.

DI EGIDIO et al., (2009) hodnotili trvanlivost řezaného ananasu NIR spektroskopií. Nařezané části (250 g) byly baleny do PVC fólií a uskladněny ve třech různých teplotách (4, 8 a 16 °C). Vzorky z prvních dvou teplot byly analyzovány v 10 - ti denních intervalech a vzorky z 16 °C byly analyzovány každý 6. den. Při každém odběru se vždy hodnotil obsah titrovatelných kyselin, obsah rozpustných látek, pH a byl proveden i mikrobiologický rozbor (počet mezofilních aerobních bakterií, celkový počet bakterií, kvasinky a plísňe). Obsah kyselin a rozpustné sušiny se v průběhu skladování příliš neměnil, celkový počet mikroorganismů se zvýšil. Hlavní změny vyskytující se ve spektrech během skladování jsou spojeny se ztrátou vody a se změnou složení výrobku, což do jisté míry souvisí s rozvojem mikroflóry.

INÁCIO et al., (2013) stanovovali celkový obsah anthokyaninů v plodech palmy *Euterpe oleracea* a *Euterpe edulis*. Celkem bylo analyzováno 139 plodů, u kterých byla nejprve změřena jejich spektra a následovala analýza celkového obsahu anthokyaninů metodou AOAC. Celkové množství bylo vyjádřeno jako cyanidin-3-glucosid. Vytvořený kalibrační model měl hodnotu korelačního koeficientu 0,97 a chyba predikce byla 4,8 g.kg⁻¹. QUILITZSCH et al., (2005) zjišťovali obsah α -karotenu, β -karotenu, a sušiny v kořenech mrkve s využitím metody NIR spektroskopie. K pokusu bylo použito 260 vzorků mrkve třinácti odrůd. Mrkve byly po změření spekter analyzovány metodou HPLC (stanovení karotenoidů) a gravimetricky (obsah sušiny). Kalibrační model obsahu α -karotenu měl korelační koeficient 0,92 a chyba cross validace byla 1,29 mg.kg⁻¹. Kalibrační model obsahu β -karotenu měl korelační koeficient 0,88 a chyba cross validace byla 2,34 mg.kg⁻¹. Kalibrační model sušiny měl korelační koeficient 0,96 a chybu cross validace 0,53 %. Falšování ovocných šťáv a koncentrátů je přetrvávajícím problémem. Metody falšování zahrnují přidávání vody, pulp wash (méně kvalitní koncentrát z druhého lisování), přidávání levnější šťávy, barviv a další přísady, které napodobují profily neředitých šťáv. Vzhledem k rozmanitosti falšovacích technik, je nezbytné analyzovat více komponentů. Každá ovocná šťáva má různý profil z hlediska obsahu kyselin (jablčná, citronová, titrovatelné kyseliny), proto i zjišťování obsahu těchto kyselin patří mezi metody pro zjišťování pravosti šťáv (SAAVEDRA et al., 2000). Všeobecně závazné předpisy a limity ukazatelů kvality ovocných šťáv vydává pro Evropu organizace AIJN (Association of the Industries of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Economic

Community). Tyto předpisy vycházejí z modelů multikomponentní analýzy promítnuté do referenčních hodnot RSK (Richtwerte und Schwankungsbreiten bestimmter Kennzahlen) v Německu a do francouzských norem asociace AFNOR (Association Francaise de Normalisation). Kontrola kvality ovocných šťáv spadá pod kontrolní evropský systém EQCS (European Quality Control System). (HAMMOND, 1996). V oblasti falšování ovocných šťáv se rovněž uplatňuje metoda NIR spektroskopie. Je důležité mít rozsáhlou databázi prokazatelně nefalšovaných šťáv, s jejichž spektry je potom neznámý vzorek porovnáván (SUN, 2008). LEÓN et al., (2005) použili diskriminační analýzu k detekci přídavných látek u jablečných šťáv. Ke vzorkům byly přidávány různé koncentrace cukrů (10, 20, 30, 40 %). TWOMEY et al., (2006) zkoumali pomocí diskriminační analýzy autenticitu pomerančových šťáv z Brazílie a Izraele. Vzorky byly falšovány vodou, cukrem, pulp wash, grapefruitovou šťávou. Diskriminační analýza se použila k rozlišení vzorků pomerančového džusu a džusu pančovaného. Z výsledků vyplývá, že diskriminační analýza dokáže zjistit falšování šťávy s 90 % přesností. VARDIN et al., (2008) provedli pomocí NIR spektroskopie detekci přídavku hroznového moštu z koncentráту do šťávy z granátového jablka z koncentráту. Přístroj oddělil přidaný mošt v množství 2 – 14 %. SAONA, ALLENDORF, (2011) ověřovali přesnost NIRspektroskopie při stanovení cukrů v jablečných a pomerančových šťávách. Kalibrační modely byly vytvořeny z čistých látek (glukóza, fruktóza a sacharóza). Koncentrace jednotlivých cukrů (0, 2, 4 a 8 g. 100 ml⁻¹) měla odpovídat obsahu cukrů ve skutečných šťávách. Zakoupené vzorky šťáv byly analyzovány dvěma metodami (HPAE chromatografie s pulzním amperometrickým detektorem PAD a metodou enzymatických testovacích souprav). Výsledky získané z kalibračních modelů NIR spektroskopie byly následně porovnávány s výsledky referenčních metod. Výsledky ukázaly, že metoda NIR spektroskopie může být používána ke kontrole kvality nápojů. ŠNURKOVIČ, (2013) zkoumal pravost 100 % ovocných šťáv zakoupených v maloobchodní síti dle parametrů AIJN. V této práci bylo zkoumáno 10 parametrů - obsah kyseliny citronové, jablečné, askorbové, refraktometrická sušina, formolové číslo, obsah ethanolu, kyseliny mléčné, obsah těkavých kyselin, hustota, obsah titrovatelných kyselin. Ze 45 vzorků 10 šťáv porušilo minimálně 1 ukazatel. Nejčastěji to byly formolové číslo, rozpustná sušina, kyseliny citronová a jablečná. Dále byla u šťáv zkoumána možnost detekce přídavných látek pomocí NIR spektroskopie. Ke šťávě byly přidávány různé koncentrace vody, cukerného roztoku a jiné ovocné šťávy. Diskriminační analýza spolehlivě oddělila původní ovocnou šťávu od falšované i při velmi nízkých

koncentracích (1 %). Tato metoda rovněž oddělila pomerančovou šťávu přímo lisovanou a pomerančovou šťávu vyrobenou z koncentrátu.

COLLELL et al., (2011) popisují schopnost NIR spektroskopie stanovit vlhkost, aktivitu vody a obsah soli v šunce. K pokusu byly použity 2 sady vzorků s použitím různých solících směsí a s různou dobou a teplotou zrání šunky. U odebíraných vzorků byla vždy nejprve měřena spektra a pak byl vzorek podroben chemické analýze. První sada vzorků sloužila k vytvoření kalibračních modelů a druhá sada k jejich ověření. Výsledky ukazují, že NIR spektroskopie může být zahrnuta do kontrolního systému hodnocení jakosti šunky.

ZHANG et al., (2014) popisují využití NIR spektroskopie při falšování mléka. K pokusu bylo použito nefalšované mléko, dále vodné roztoky, které obsahovaly dextrin, nebo škrob a obsah bílkovin byl zajištěn přidavkem melaminu, močoviny, nebo dusičnanu amonného, tak aby výsledný obsah bílkovin nebyl nižší než 3 %. K pokusu byly připraveny ještě vzorky, které vznikly smícháním nefalšovaného mléka a připravených vodných roztoků (koncentrace 5, 10 a 15 %). Vyhodnocení bylo provedeno pomocí diskriminační analýzy, která spolehlivě oddělila nefalšované mléko a od falšovaného, pokud koncentrace byla vyšší nebo rovna 5 %.

KIM et al., (2007) hodnotili obsah bílkovin, tuků, cukrů, vlhkost a celkovou energii v hotových jídlech zakoupených v maloobchodní síti. Vzorky (153) byly rozděleny do tří skupin: jídla na bázi sacharidů (obiloviny) se zeleninou a masem, rostlinné bílkoviny (luštěniny) se zeleninou a masem a živočišné bílkoviny (maso, ryby) se zeleninou. U jídel byla nejprve změřena spektra a následovaly analytické rozbory hlavních komponent. Ze získaných výsledků byly vytvořeny kalibrační modely s hodnotou korelačního koeficientu 0,95 – 1,00. Dle vytvořených modelů lze hotová jídla hodnotit bez dlouhých analytických rozborů.

CHEN et al., (2011) použili NIR spektroskopii k rozlišení pravého a falšovaného medu. K pokusu bylo celkem použito 70 vzorků medu získaných přímo od včelařů a 74 vzorků medu bylo falšováno HFCS (High fructose corn syrup). Vzorky obsahovaly různé množství kukuřičného sirupu s vysokým množstvím fruktózy (7 – 59 %). 96 vzorků bylo použito pro kalibraci a 48 pro validaci. Bylo zjištěno, že mezní hodnota pro detekci falšování je 7 %. Metoda správně určila 97,9 % falšovaných a 95,8 % nefalšovaných medů.

3. MATERIÁL A METODIKA

V práci byly hodnoceny změny v průběhu zrání jablek (odrůda Rubinola), broskví (odrůda Redhaven) a rajčat (odrůda Dagmar) vypěstovaných na pozemcích Zahradnické fakulty v Lednici. Z každého ovocného a zeleninového druhu byla zvolena jedna odrůda, jejíž plody byly analyzovány po celou dobu zrání z důvodů širokého koncentračního rozpětí látkových složek. Získané hodnoty sloužily k vytvoření kalibračních modelů NIR spektroskopie. Vytvořené modely byly následně rozšířeny o analytické hodnoty získané analýzou skladovaných plodů. Ke skladování byly vybrány broskve (odrůdy Redhaven a Fairhaven), rajčata (odrůda Dagmar) a jablka (odrůdy Rubinola, Idared a Desert). Takto vytvořené kalibrace byly použity při hodnocení skladovaných plodů. Odrůdy Redhaven, Fairhaven, Dagmar, Parto, Rubinola a Topaz byly použity k ověření přesnosti vytvořených kalibračních modelů.

3.1 Materiál

3.1.1 Broskve

REDHAVEN



Obrázek 9: Plody odrůdy Redhaven

Obrázek 10: Broskvoň Redhaven

Je křížencem odrůd „Halehaven“ x „Kalhaven“ rozmnožovaných od r. 1940 v USA (Michigan). Je nejrozšířenější světovou odrůdou, pěstovanou dnes na všech kontinentech. Plod je středně velký, průměrné výšky 58 mm, hmotnost jednoho plodu dosahuje průměrně

180 g. Tvar má kulovitý až oválný, lehce zploštělý. Plody jsou značně vyrovnané. Obě roviny plodu jsou souměrné. Břišní šev je málo zřetelný, mělký, úzký, končí v čnělečné části rýhou, v níž je černá tečka na malém svalu. Stopková jamka je širší, mělká. Slupka je středně tlustá, jemně plstnatá, loupateľná. Základní barvu má žlutou. Více než polovina plodu je překryta tmavě karmínovou červení, často až fialovým nádechem. Dužina je jemně zrnitá, pevná. Barvu má kolem pecky načervenalou. Chuť má dobrou, výraznou, aromatickou. Od pecky je dobře odlučiteľná pouze v plné zralosti (KUTINA, 1991).

FAIRHAVEN



Obrázek 11: Plody odrůdy Fairhaven

Obrázek 12: Broskvoň Fairhaven

Odrůda pochází z USA, u nás povolena k množení v roce 1970. Stromy rostou středně bujně až bujně. Koruny jsou vzpřímené, později rozkladité. Pro pěstování se hodí nejlépe zákrsek s dutou (kotlovitou) korunou. Vyžaduje redukci násady jak řezem, tak i probírkou



plodů. Vůči houbovým chorobám je poměrně odolná. Plodnost je vysoká, nastupuje již třetím rokem po výsadbě. Plod je oválný, nesouměrný, středně velký. Slupka je středně tlustá, žluté barvy.

Obrázek 13: Broskvoň Fairhaven

Dužina je jemná, žlutá, dobře oddělitelná od pecky. Plody jsou vhodné pro přímý konzum i konzervářské účely (RICHTER, 2002).

3.1.2 Rajčata

DAGMAR



Obrázek 14: Plody odrůdy Dagmar



Obrázek 15: Rostlina s plody

Raný až poloraný hybrid vhodný pro rychlení, vhodný ale i pro polní pěstování. Výborná odolnost proti praskání. Vyžadují teplou a chráněnou lokalitu.

PARTO



Obrázek 16: Plody odrůdy Parto



Obrázek 17: Rostlina s plody

Poloraný hybrid s dlouhodobě skladovatelnými plody. Rostliny středního vzrůstu poskytují velikostí i tvarem atraktivní, vyrovnané, nepraskající plody. Hybrid vhodný do nevytápěných rychlíren i na pole (OHANKA, 2007).

3.1.3 Jablka

RUBINOLA



Obrázek 18: Plody odrůdy Rubinola

Odrůda byla vyšlechtěna na Ústavu experimentální botaniky ve Střížovicích jako kříženec odrůd Prima x Rubín. Sklízí se koncem září až počátkem října. Plody nepropadávají a je třeba je sklízet jakmile se vybarví. Konzumně dozrává v listopadu a vydrží do března až dubna. Má silnou intenzitu růstu, později střední. Stromy vytvářejí velké, vzpřímené, široce kulovité koruny. Plodí převážně na dlouhém plodném dřevě. Po silném řezu a na silných podnožích hůře obrůstají plodonosným obrostem. Je cizosprašná. Kvete poloraně



a je dobrým opylovačem. Plody jsou střední až velké, zploštěle kulovité až kulovité, mírně žebernaté. Stopka je tenká a dlouhá. Slupka slabě masná, středně silná, žlutá až žluto-oranžová. Krycí zbarvení je zářivě červené, pokrývající $\frac{3}{4}$ povrchu plodu.

Obrázek 19: Jabloň Rubinola

Kolem stopečné jamky se často vyskytuje rzivost. Dužnina je krémová, středně pevná, rozplývavá, středně šťavnatá, navinule sladká, příjemně aromatická, velmi dobrá. Do plodnosti nastupuje středně brzo, plodí dobře a pravidelně. Vzhledem k bujnějšímu růstu se

doporučuje pěstovat formou štíhlého vřetene a volně rostoucího zákrsku na slabých podnožích. Má sklon k vyholování a proto je třeba v mládí omezovat zpětný zimní řez. Rubinola je rezistentní ke strupovitosti a velmi odolná k padlí (NEČAS a kol., 2004).

TOPAZ



Obrázek 20: Plody odrůdy Topaz

Odrůda byla vyšlechtěna na Ústavu experimentální botaniky ve Střížovicích jako kříženec odrůd Rubín a Vanda. Plody jsou střední až většinou větší velikosti (148 – 223 gramů). Jejich tvar je pravidelný, kulovitě kuželovitý až ploše kulovitý, v kališní části někdy žebnatý. Slupka středně tlustá, hladká a lesklá. Dužnina je žlutá, navinule sladká, jemné konzistence, středně šťavnatá a aromatická (RICHTER, 2002). Stromy rostou středně silně,



Obrázek 21: Jablň Topaz

později slaběji, vytvářejí vysoce kulovité pravidelné koruny. Kvetou středně pozdě a jsou dobrými opylovači. Jsou rezistentní ke strupovitosti, padlím trpí jen málo. Někdy se projevuje sklon k hořké skvrnitosti plodů.

Velmi brzy vstupují do plodnosti, plodí velmi hojně a dost pravidelně. Stromy se snadno tvarují, spolehlivě plodí na všech podnožových typech. Vyžadují často probírku plodů (VACHŮN, 1980). Plodnost je brzká, vysoká a pravidelná. Sklizňová zralost nastává začátkem října, plody konzumně dozrávají v prosinci. Vchladírně je lze udržet do dubna. Plody jsou vhodné k přímému konzumu, konzervaci, sušení a průmyslovému zpracování. (KUTINA, 1991).

IDARED



Obrázek 22: Jabloň Idared



Obrázek 23: Plody odrůdy Idared

Odrůda byla vyšlechtěna v USA křížením Wagenerovo a Jonathan. Plod je středně velký, ploše kulovitý. Slupka je lesklá, pevná a velmi tuhá. Základní barva je zelenožlutá, krycí barva jasně červená. Stopka je tuhá a pružná. Dužnina je jen málo nažloutlá, jemná, velmi šťavnatá a křehká. Chuť je navinule sladká, málo aromatická. (DVOŘÁK, 1987)



Obrázek 24: Jabloň Idared

Stromy v prvních letech rostou silně, po vstupu do plné plodnosti jejich růst slábne. Vytváří kulovité až zpolštělé kulovité koruny střední velikosti, dost husté. Větve dobře obrůstají plodonosným obrostem. Stromy kvetou raně a jsou dobrými opylovači.

Silně trpí padlím a často strupovitostí. Plodnost je raná, vysoká a pravidelná. Odrůda je vhodná pro všechny pěstitelské tvary. (NEČAS a kol., 2004). Zimní, dobře skladovatelná odrůda jabloně. Sklizeň je v polovině října, konzumně dozrává v prosinci, dá se skladovat do dubna i déle. Velmi rozšířená odrůda s plody vhodnými pro přímý konzum i konzervářské zpracování (RICHTER, 2004).

DESERT



Obrázek 25: Plody odrůdy Desert

Odrůda je vyšlechtěna ŠS Těchobuzice, vznikla křížením odrůd Golden Delicious a Coxova reneta. Registrována je od r. 1993. Plody jsou středně velké až větší, mají pravidelný kulovitý tvar. Slupka je zlatožlutá, krytá jasně červeným žiháním a výraznějším líčkem. Nápadné jsou světlejší lenticely a někdy rzivé mramorování typu Coxovy renety. Dužnina je žlutá, má křehkou konzistenci a výbornou příjemně aromatickou navinule sladkou chuť. Růst je střední až silnější, vytváří široce pyramidální koruny.



Velmi dobře obrůstá středně dlouhým plodonosným obrostem. Kvete středně raně. Plodnost je raná, velmi dobrá a pravidelná. Sklízí se kolem poloviny září, podle polohy stanoviště. Lépe je však sklízet dříve než později, aby nedocházelo k propadu nejvyvinutějších plodů.

Obrázek 26: Jabloň Desert

Konzumně dozrává brzy po sklizni, vydrží podle uložení do prosince, v chladárně do ledna. Odrůda je značně odolná k padlí i ke strupovitosti. Je vhodná k pěstování ve všech tvarech a podnožích. Pro intenzivní pěstování však lépe vyhovují slabě až středně rostoucí podnože. Dobře se daří především ve středních, ale i vyšších polohách. Výbornou kvalitou dužniny připomíná Coxovu renetu, kterou v pěstování může nahradit. Sklizeň i další manipulace je třeba provádět šetrně, aby nedocházelo k otlakům (ANONYM, 2015).

3.2 Metodika

Jablka

Plody odrůdy Rubinola byly odebrány ze stromů v období 16. srpna až 16. listopadu v roce 2011 v celkovém počtu 138 plodů. Spektrální rozdíly mezi plody jsou zobrazeny na obrázku 27. Celkem bylo provedeno 12 odběrů v týdenních intervalech. Vždy bylo sklizeno 10 - 12 plodů. Plody byly ponechány 2 hodiny v laboratorních podmínkách a teprve potom byl každý plod jednotlivě z 3 stran 50 scany proměřen NIR spektrometrem Antaris II. K vytvoření kalibračních modelů bylo vždy použito průměrné spektrum. Spektrum každého plodu bylo uloženo a byly k němu přiřazeny výsledky získané analytickými rozbory. U každého plodu byl hodnocen obsah titrovatelných kyselin, rozpustné sušiny, polyfenolických látek, kyseliny jablečné, kyseliny citronové, kyseliny askorbové, pevnost slupky a dužniny. Z hodnot naměřených (vložených) a vypočítaných (NIR) byly v programu TQ Analyst vytvořeny kalibrační modely, pomocí kterých byly hodnoceny skladované plody. Vzorky byly analyzovány v laboratoři Ústavu posklizňové technologie zahradnických produktů Zahradnické fakulty v Lednici. Po skončení analýz byly vytvořeny kalibrační modely, obsahující 138 kalibračních standardů. V dalším roce byla pomocí plodů odrůdy Rubinola, ale i dalších odrůd (Desert a Idared) ověřována přesnost kalibračních modelů. Nevyhovujícím parametrem byl obsah kyseliny jablečné a titrovatelných kyselin, kterých v tomto roce bylo v plodech obsaženo více než v roce minulém. Na základě tohoto zjištění byly stávající kalibrace kyselin rozšířeny o další hodnoty obsahu kyselin. Kalibrační modely titrovatelných kyselin a kyseliny jablečné proto obsahují 250 kalibračních standardů. V roce 2013 bylo skladováno 25 plodů odrůdy Idared, 25 plodů odrůdy Desert a 25 plodů odrůdy Rubinola v chladárně při teplotě 4 °C v normální atmosféře. Plody byly skladovány 90 dnů a každých 10 dnů byla měřena jejich spektra stejným způsobem (NIR spektroskopie) a za stejných podmínek (teplota) jako tomu bylo v průběhu zrání plodů.

Na konci skladování bylo 25 plodů odrůdy Idared a 25 plodů odrůdy Desert analyzováno stejnými metodami, pomocí kterých byly kalibrace vytvořeny. Hodnocen byl obsah titrovatelných kyselin, rozpustné sušiny, polyfenolických látek, kyseliny jablečné, citronové, askorbové, pevnost slupky a dužniny. Získanými hodnotami byly rozšířeny stávající kalibrační modely. Spektra skladovaných plodů byla vyhodnocena podle kalibrací rozšířených o skladované plody. Skladované plody odrůdy Rubinola nebyly analyzovány z důvodu jejich převahy v kalibračním modelu.

3.2.1 Spektrometrie v blízké infračervené oblasti (NIR)

NIR spektra byla měřena po odrazu záření vzorkem. Principem je difúzní reflexe, kdy se dopadající záření odráží od povrchu vzorku. Jednotka $\log(1/R)$ vyjadřuje závislost difúzní reflexe na vlnové délce. K měření byl používán přístroj Antaris II od firmy Nicolet. Spektrometr Antaris II je FT-NIR analyzátor používaný v různých oblastech průmyslu včetně potravinářského. NIR spektra byla měřena v prostředí softwaru Omnic. Tento program umožňuje nejen nastavení vhodných parametrů spektrometru a řízení vlastního měření, ale jeho použitím lze naměřená spektra i vhodně upravit a podrobně analyzovat. Kalibrace byly vytvořeny pomocí programu TQ Analyst, což je program pro vývoj kvantitativních i kvalitativních metod molekulové spektroskopie. Použité algoritmy umožňují výpočet koncentrace komponent nebo klasifikaci neznámých látek za použití souboru kalibračních standardů. Pro vývoj kalibračních modelů byla použita metoda PLS. Tato metoda umožňuje komprimovat obsáhlou matici spektrálních dat, kdy je počet spektrálních proměnných převeden na mnohem menší počet tzv. faktorů (PLS faktory). Parametry charakterizující kvalitu vytvořených kalibračních modelů byly korelační koeficient (r), chyba kalibrace (RMSEC), chyba cross validace (RMSECV) a chyba predikce (RMSEP).

Měření bylo provedeno za těchto podmínek:

Počet scanů :	50
Rozlišení :	16 cm^{-1}
Vlnočtový rozsah:	$4000 - 10\,000 \text{ cm}^{-1}$
Detektor:	InGaAs
Beamsplitter:	CaF_2

3.2.2 Stanovení titrovatelných kyselin

Vzorky byly homogenizovány pomocí mixéru a v navážce (5 g) byly stanoveny titrovatelné kyseliny alkalimetry - titrací odměrným roztokem $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ NaOH do pH 8,1 na přístroji inoLab pH 7310. Obsah kyselin byl vždy přepočten na kyselinu, která se vyskytovala v nejvyšší koncentraci a vyjádřen v % titrovatelných kyselin. Kalibračními roztoky byla zjištěna odchylka přístroje $\pm 0,02$.

3.2.3 Stanovení kyseliny askorbové (vitaminu C) HPLC

Vzorek (10 g) byl homogenizován ve třecí misce s kyselinou šťavelovou (10 ml). Následovala filtrace přes papírový filtr a poté filtrace přes nylonový filtr (\emptyset pórů 22 μm) do hnědé vialky. Takto připravený vzorek byl dávkován do chromatografické kolony. Podmínky stanovení: Chromatografická stanice Clarity, kolona: Prevail 5 μm Organic Acid 110A HPLC Column 250 x 4.6 mm, průtok mobilní fáze 25 mM KH_2PO_4 1 ml.min^{-1} , vlnová délka 210 nm, teplota 30 °C. Obsah kyseliny askorbové byl přepočten na čerstvou hmotu rostlinného materiálu a vyjádřen jako mg kyseliny na 1 kg plodů.

3.2.4 Stanovení kyseliny jablečné a citronové HPLC

Každý plod byl pomocí mixéru homogenizován a získaná šťáva byla filtrována přes papírový filtr, naředěna vodou a poté filtrována přes nylonový filtr (\emptyset pórů 22 μm) do hnědé vialky. Takto připravený vzorek byl dávkován do chromatografické kolony. Podmínky stanovení: Chromatografická stanice Clarity, kolona: Prevail 5 μm Organic Acid 110A HPLC Column 250 x 4.6 mm, průtok mobilní fáze 25 mM KH_2PO_4 1 ml.min^{-1} , vlnová délka 210 nm, teplota 30 °C. Obsah kyseliny jablečné a citronové byl přepočten na čerstvou hmotu rostlinného materiálu a vyjádřen jako mg kyseliny na 1 kg plodů. Kalibračními roztoky byla zjištěna chyba měření $\pm 8,2 \text{ mg.kg}^{-1}$.

3.2.5 Stanovení celkových polyfenolů Folin - Ciocalteu

Metoda je založena na spektrofotometrickém měření barevných produktů reakce hydroxylových skupin fenolických sloučenin s činidlem Folin – Ciocalteu.

Každý plod byl pomocí mixéru homogenizován a získaná šťáva (0,5 ml) byla po odstředění pipetována do 50 ml odměrné baňky, následně bylo přidáno 20 ml destilované vody, 1 ml Folin – Ciocalteuova činidla a vše bylo promícháno. Po třech minutách bylo přidáno 5 ml 20% roztoku Na_2CO_3 , odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou po značku a promíchána. Po třiceti minutách byla měřena absorbance pomocí

spektrofotometru Helios Beta v 10 milimetrové kyvetě při vlnové délce 700 nm proti slepému vzorku. Stanovený obsah celkových polyfenolů byl následně přepočten na čerstvou hmotu rostlinného materiálu a vyjádřen jako mg kyseliny gallové na 1 kg plodů. Dle testů přesnosti pomocí certifikovaných referenčních materiálů byly u přístroje zjištěny rozdíly v absorbanci $\pm 0,034$.

3.2.6 Stanovení rozpustné sušiny

Rozpustná sušina byla měřena ve šťávě získané homogenizací vzorku pomocí Abbeho refraktometru. Mezi 2 hranoly byla nejprve nanесena vrstvička destilované vody a po vynulování přístroje byl nanесen vzorek a pomocí stupnice byly odečteny °Bx rozpustné sušiny. Dle kalibračního protokolu přístroj měří s chybou $\pm 0,2$ °Bx.

3.2.7 Stanovení pevnosti slupky a dužniny

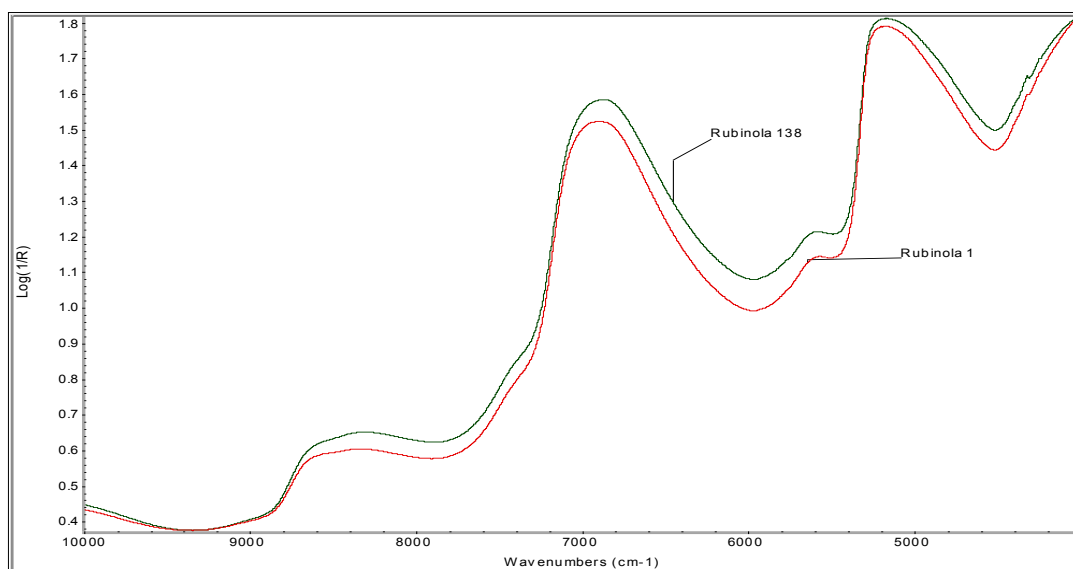
Pevnost slupky a dužniny intaktního plodu byla měřena na penetrometru TEXAN 2000 s grafickým záznamem tlakového napětí. Plod byl zatěžován razidlem o průměru 5 mm při rychlosti zatěžování $8 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$. Byla vykreslena deformační křivka s dvěma zvraty. První zvrát představuje tlakové napětí slupky v okamžiku, kdy se její celistvost porušila, druhý zvrát představuje tlakové napětí dužniny. Plocha pod deformační křivkou vyjadřuje tuhost. Měření bylo prováděno na dvou protilehlých místech u každého plodu. Výsledky jsou uvedeny v MPa.

3.2.8 Stanovení barevných parametrů systémem CIELab

Barevné parametry byly měřeny pomocí přístroje Lovibond RT850i. Každý plod jednotlivě byl proměřen ze tří stran. Na jedno měření byly zvoleny 2 scany (záblesky). Měření proběhlo v režimu reflektance (světlo se odráží od povrchu plodů). Nejdříve byla provedena kalibrace přístroje pomocí černého a bílého válce. Po kalibraci následovalo měření vzorků. Prvním měřením byl vytvořen standard, se kterým software porovnává každý změřený vzorek. Jako standard sloužil vždy první plod. Každý plod byl vždy přiložen k průzoru, tak aby byl otvor dokonale zakrytý a došlo tak ke změření barevnosti plodu. Po skončení měření se zobrazila tabulka s hodnotami L^* , a^* , b^* . Měřenými veličinami jsou jas a souřadnice barevnosti a^* a b^* . Jas (Lightness, L^*), se pohybuje v rozsahu 0 až 100, 0 vyjadřuje černou barvu a 100 barvu bílou. Hodnota a^* popisuje barvu ve směru do červena ($+a^*$) a ve směru do zelena ($-a^*$). Hodnota b^* popisuje barvu ve směru do žluta ($+b^*$) a směr do modra ($-b^*$).

3.2.9 Stanovení obsahu škrobu

Během zrání se škrob přeměňuje v rozpustné cukry. Odbourávání škrobu se zjišťuje tím, že se jablko příčně rozříznuté ve výšce jádřince namočí řeznou plochou do Lugolova roztoku (roztok jodu a jodidu draselného). Škrob se barví tmavě modře. Intenzita tmavomodré barvy se postupně snižuje vlivem přeměny škrobu v cukr. Odbourávání škrobu začíná v centrální části plodu a postupuje směrem ke slupce. (ANONYM, 2015).

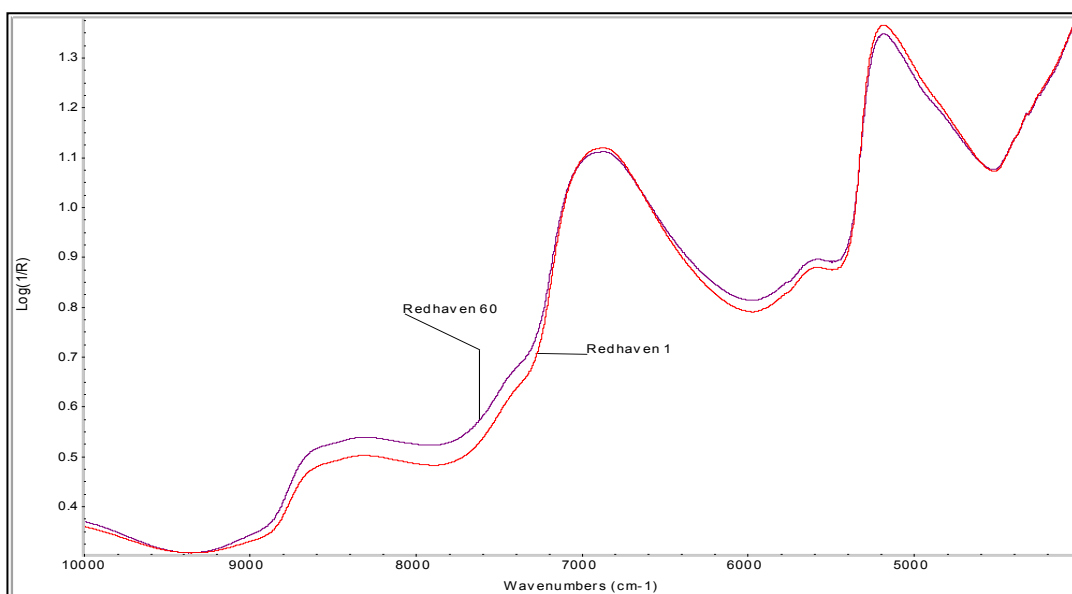


Obrázek 27: Spektrální rozdíly mezi plodem (1) sklizeným 16. srpna a plodem (138) sklizeným 16. listopadu

Broskve

Plody odrůdy Redhaven byly odebírány ze stromů v období 20. července až 10. srpna v celkovém počtu 60 plodů každý čtvrtý den. Spektrální rozdíly mezi plody jsou zobrazeny na obrázku 28. Celkem bylo provedeno 6 odběrů. Vždy bylo sklizeno 10 plodů, které byly jednotlivě analyzovány. Každý plod byl nejprve z 3 stran 50 scany proměřen NIR spektrometrem Antaris II. K vytvoření kalibračních modelů bylo vždy použito průměrné spektrum. Spektrum každého plodu bylo uloženo a byly k němu přiřazeny výsledky, získané analytickými rozbory. U každého plodu byl hodnocen obsah titrovatelných kyselin, rozpustné sušiny, polyfenolických látek, kyseliny jablečné, kyseliny citronové, kyseliny askorbové a měřena byla rovněž pevnost slupky. Z hodnot naměřených (vložených) a vypočítaných (NIR) byly v programu TQ Analyst vytvořeny kalibrační modely, pomocí kterých byly hodnoceny skladované plody.

Vzorky byly analyzovány v laboratoři Ústavu posklizňové technologie zahradnických produktů Zahradnické fakulty v Lednici. Analýzy byly provedeny stejnými postupy jako v případě jablek. Plody byly odebírány a analyzovány v roce 2012. V dalším roce bylo skladováno 35 plodů odrůdy Redhaven a 35 plodů odrůdy Fairhaven v chladárně při teplotě 4 °C v normální atmosféře. 10 plodů každé odrůdy bylo po 14 dnech skladování analyzováno stejnými metodami, pomocí kterých byly kalibrace vytvořeny. Hodnocen byl obsah titrovatelných kyselin, rozpustné sušiny, polyfenolických látek, kyseliny jablečné, kyseliny citronové, kyseliny askorbové a pevnost slupky. Získanými hodnotami byly rozšířeny stávající kalibrace. Zbývajících 25 plodů obou odrůd bylo skladováno 24 dnů a každé 4 dny byla měřena jejich spektra stejnou metodou (NIR) a ve stejných teplotních podmínkách, ve kterých bylo prováděno měření spekter plodů zrajících. Kalibračními modely byly následně vyhodnoceny změny látkových složek v průběhu skladování. V dalším roce byla pomocí 5 plodů obou odrůd ověřována přesnost vytvořeného kalibračního modelu. Plody byly odebrány z pozemku jednorázově ve stádiu sklizňové zralosti.

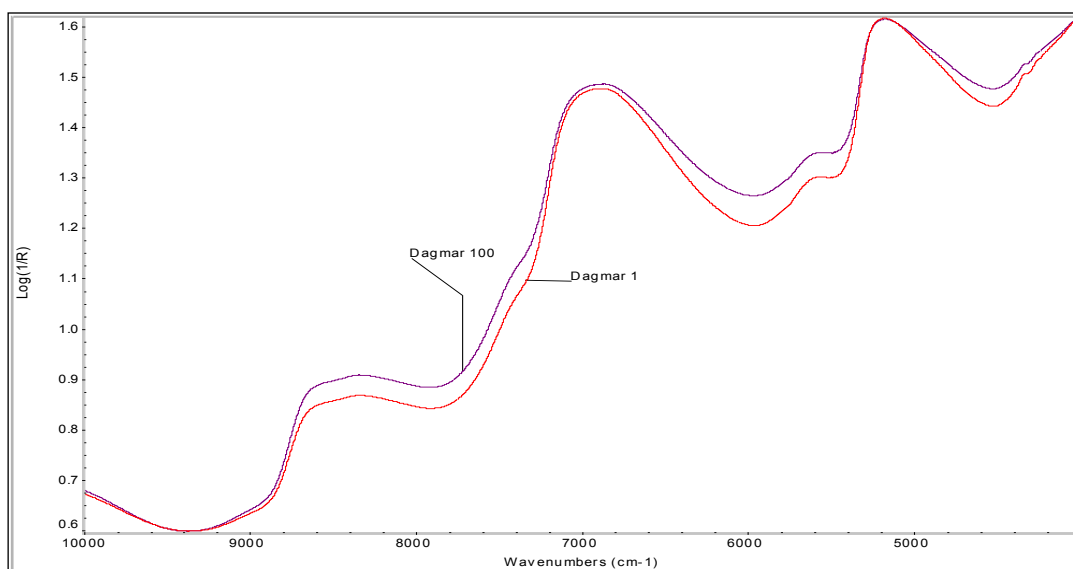


Obrázek 28: Spektrální rozdíly mezi plodem (1) sklizeným 20. července a plodem (60) sklizeným 10. srpna

Rajčata

Plody byly odebírány v týdenních intervalech z 6 rostlin v období 11. července až 15. září v celkovém počtu 100 plodů. Spektrální rozdíly mezi plody jsou zobrazeny na obrázku 29. Celkem bylo provedeno 10 odběrů. Každý plod jednotlivě byl nejprve z 3 stran 50 scany proměřen NIR spektrometrem Antaris II. K vytvoření kalibračního modelu bylo vždy

použito průměrné spektrum. Spektrum každého plodu bylo uloženo a byly k němu přiřazeny výsledky, získané analytickými rozbory. U každého plodu byl hodnocen obsah titrovatelných kyselin, rozpustné sušiny, polyfenolických látek, kyseliny jablečné, kyseliny citronové, kyseliny askorbové a měřena byla i pevnost slupky. Z hodnot naměřených (vložených) a vypočítaných (NIR) byly v programu TQ Analyst vytvořeny kalibrační modely, pomocí kterých byly hodnoceny skladované plody. Vzorky byly analyzovány v laboratoři Ústavu posklizňové technologie zahradnických produktů Zahradnické fakulty v Lednici. Analýzy byly provedeny stejnými postupy jako v případě jablek a broskví. Plody byly odebírány a analyzovány v roce 2011. V roce 2012 bylo skladováno 45 plodů odrůdy Dagmar. Plody byly skladovány v chladárně při teplotě 4 °C v normální atmosféře. Po 20 dnech skladování bylo 20 plodů analyzováno stejnými metodami, pomocí kterých byly kalibrace vytvořeny. Hodnocen byl obsah titrovatelných kyselin, rozpustné sušiny, polyfenolických látek, kyseliny jablečné, kyseliny citronové, kyseliny askorbové a pevnost slupky. Získanými hodnotami byly rozšířeny stávající kalibrace. Zbývajících 25 plodů bylo skladováno 32 dnů a každé 4 dny byla měřena jejich spektra stejným způsobem a za stejných podmínek jako tomu bylo v průběhu zrání plodů. Kalibračními modely byly následně vyhodnoceny změny látkových složek v průběhu skladování. V dalším roce byla pomocí 5 plodů odrůdy Dagmar a Parto ověřena přesnost kalibračních modelů. Plody byly odebrány z pozemku jednorázově ve stádiu sklizňové zralosti.



Obrázek 29: Spektrální rozdíly mezi plodem (1) sklizeným 11. července a plodem (100) sklizeným 15. září.

3.3 Použité statistické metody

Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu STATISTICA 12. Pomocí statistických operací byly zjištěny průměry a směrodatné odchylky ze třech paralelních stanovení. Na potvrzení homogenity rozptylů byl použit Cochran, Hartley, Bartlett test. Na potvrzení průkazného rozdílu mezi hodnotami byla zvolena metoda jednofaktorové analýzy s následným využitím Tukeyova HSD testu na hladině významnosti $p = 0,05$. Jednotlivé statistické analýzy jsou umístěny v Přílohách práce.

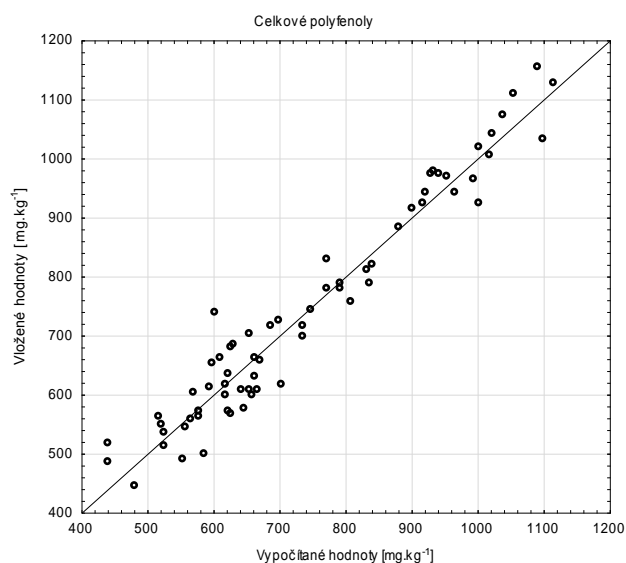
4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Pomocí programu TQ Analyst byly vytvořeny kalibrační modely metody NIR spektroskopie, kterými byly hodnoceny skladované plody. Kalibrace byly vytvořeny z hodnot získaných v průběhu zrání a skladování plodů. Vždy se jedná o závislost mezi hodnotami vloženými (naměřenými analytickými metodami) a vypočítanými (NIR hodnoty). Takto vytvořenými modely byly hodnoceny skladované plody. Kalibrační modely byly hodnoceny podle více hledisek. V první řadě se hodnotil průběh funkce PRESS. Její optimální průběh by měl mít prudký pokles, další průběh klesání je již pozvolný. Diagnostika modelu PRESS (Predicted Residual Error Sum of Squares) zobrazuje hodnotu chyby stanovení při zvyšujícím se počtu faktorů použitých k výpočtu (v ideálním případě je grafem diagnostiky PRESS křivka prudce klesající do minimální hodnoty chyby). Kvalitní robustní chemometrický kalibrační model v infračervené spektroskopii využívá k výpočtu malý počet faktorů a vykazuje malý rozdíl mezi chybou kalibrační (RMSEC) a chybou cross validace (RMSECV). Dalším parametrem, který charakterizuje kvalitu kalibračního modelu je chyba predikce (RMSEP). Programem zvolený počet kalibračních standardů je převeden na standardy validační, což znamená, že tento počet standardů je z kalibrace vyloučen a model je posuzuje jako neznámé vzorky. Pokud je model dostatečně robustní, tak by se kalibrační model neměl zásadně změnit. Nejdůležitějším parametrem pro posouzení kalibračního modelu je kvadratická chyba cross validace (RMSECV). Při vyhodnocování výsledků tento parametr zastupuje směrodatnou odchylku. Aby mohly být kalibrace používány pro měření dalších vzorků, bylo nutné ověřit přesnost kalibrací. Na ověření bylo použito vždy 5 plodů 2 odrůd. Plody byly změřeny stejným způsobem (stejně teplotní podmínky a stejný počet scanů) jako plody určené ke kalibraci. Po změření plodů bylo provedeno vyhodnocení pomocí uložených kalibračních modelů a následovaly analýzy stejnými metodami a postupy jako v případě vzorků pro kalibraci. Z těchto měření byly získány údaje o přesnosti vytvořených kalibrací.

4.1 Broskve

4.1.1 Kalibrační grafy broskví

Kalibrace je složena ze 70 plodů odrůdy Redhaven a 10 plodů odrůdy Fairhaven. Ze všech sledovaných plodin bylo na kalibraci použito nejméně plodů, proto tyto modely vykazují menší přesnost, než kalibrační modely rajčat a jablek. Při ověření přesnosti kalibrací byly použity odrůdy Redhaven (1 - 5) a Fairhaven (6 - 10) viz tabulka 1.



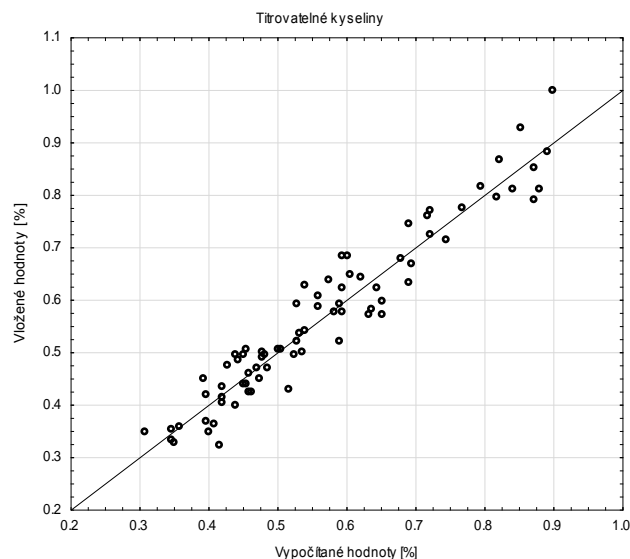
Vytvořený kalibrační model má rozsah 450 – 1150 mg.kg⁻¹. Korelační koeficient je roven hodnotě 0,98. Chyba kalibrace celkových polyfenolů je 55 mg.kg⁻¹, chyba cross validace 100 mg.kg⁻¹ a chyba predikce 110 mg.kg⁻¹. Spektrum bylo derivováno (1. derivace), čímž došlo ke zvýraznění pásů.

Obrázek 30: Kalibrační graf celkových polyfenolů

Tabulka 1: Ověření přesnosti kalibrace celkových polyfenolů

Číslo Vzorku	Polyfenoly [mg.kg ⁻¹]	Polyfenoly NIR [mg.kg ⁻¹]	Rozdíl mezi metodami
1	1129 ±30	850	279
2	321 ±14	560	239
3	488 ±28	680	192
4	885 ±32	785	100
5	728 ±20	529	199
6	492 ±15	600	108
7	679 ±11	498	181
8	607 ±32	800	193
9	1044 ±21	840	204
10	744 ±19	540	204

V případě stanovení celkových polyfenolů byla chyba predikce vyšší než chyba cross validace. Kalibrační model není dostatečně robustní, což dokazují velké rozdíly mezi metodou NIR a referenční metodou (tabulka 1). Hlavní příčinou je nedostatečný počet i nízká koncentrace kalibračních standardů.



Vytvořený kalibrační model s rozsahem 0,33 – 1,0 % obsahu titrovatelných kyselin má chybu kalibrace 0,045 %, chybu cross validace 0,08 % a chybu predikce 0,06 %. Spektrum bylo derivováno (1. derivace), čímž došlo ke zvýraznění pásů. Korelační koeficient je roven hodnotě 0,96.

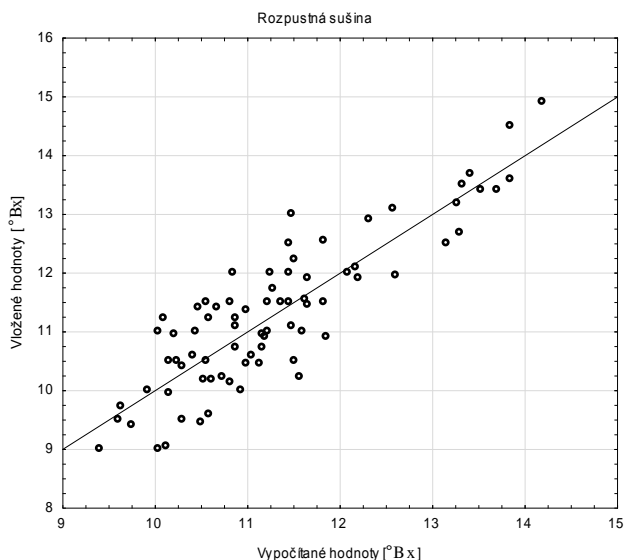
Obrázek 31: Kalibrační graf titrovatelných kyselin

Tabulka 2: Ověření přesnosti kalibrace titrovatelných kyselin

Číslo vzorku	Obsah kyselin [%]	Obsah kyselin NIR [%]	Rozdíl mezi metodami
1	0,35 ±0,026	0,40	0,05
2	0,47 ±0,019	0,49	0,02
3	0,58±0,020	0,61	0,03
4	0,60±0,052	0,62	0,02
5	0,68±0,030	0,66	0,02
6	0,36±0,018	0,44	0,08
7	0,41±0,014	0,47	0,06
8	0,52±0,016	0,60	0,08
9	0,69±0,025	0,61	0,08
10	0,63±0,019	0,53	0,10

I přes nízký počet kalibračních standardů patří tento model k těm přesnějším, což je dáno i tím, že se kyseliny vyskytují ve vyšších koncentracích a nepatří k minoritním složkám.

Model spolehlivě funguje u odrůdy Redhaven (tabulka 2), v případě měření jiných odrůd je třeba počítat s chybou cross validace.



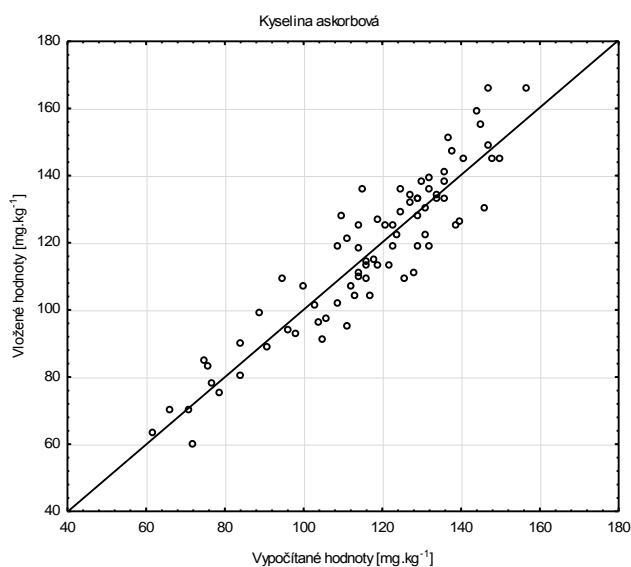
Vytvořený kalibrační model s rozsahem 9 - 15 °Bx obsahu rozpustné sušiny má chybu kalibrace 0,62 °Bx, chybu cross validace 0,75 °Bx a chybu predikce 0,61 °Bx. Data byla analyzována v původní formě naměřených spekter. Korelační koeficient vytvořeného modelu má hodnotu 0,87.

Obrázek 32: Kalibrační graf rozpustné sušiny

Tabulka 3: Ověření přesnosti kalibrace rozpustné sušiny

Číslo vzorku	Rozpustná sušina [°Bx]	Rozpustná sušina NIR [°Bx]	Rozdíl mezi metodami
1	9,4 ±0,05	9,6	0,2
2	11,4 ±0,02	11,2	0,2
3	9,0±0,02	9,5	0,5
4	12,0±0,10	12,5	0,5
5	11,0±0,04	10,5	0,5
6	12,1±0,16	12,0	0,1
7	11,5±0,06	12,3	0,8
8	9,5±0,12	10,2	0,7
9	11,8±0,05	11,2	0,6
10	13,0±0,15	12,3	0,7

Rozpustná sušina patří mezi majoritní složky, její hodnoty se ze všech sledovaných analytů vyskytují v nejvyšších koncentracích. Vytvořený model lze používat i při měření dalších odrůd, je třeba ale počítat s chybou cross validace (tabulka 3).



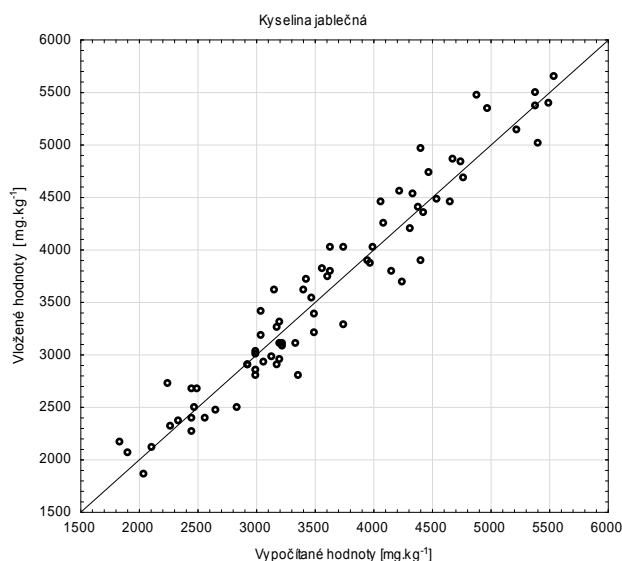
Vytvořený kalibrační model s rozsahem 60 - 170 mg.kg⁻¹ obsahu kyseliny askorbové má chybu kalibrace 9 mg.kg⁻¹, chybu cross validace 15,4 mg.kg⁻¹ a chybu predikce 12,3 mg.kg⁻¹. Spektrum bylo derivováno (1. derivace). Korelační koeficient je roven hodnotě 0,93.

Obrázek 33: Kalibrační graf kyseliny askorbové

Tabulka 4: Ověření přesnosti kalibrace kyseliny askorbové

Číslo vzorku	Kyselina askorbová [mg.kg ⁻¹]	Kyselina askorbová NIR [mg.kg ⁻¹]	Rozdíl mezi metodami
1	132 ±5,0	137	5
2	136 ±6,0	131	5
3	145±8,0	132	13
4	136±5,0	128	8
5	151±10,0	139	12
6	122±11,0	134	12
7	122±5,0	142	20
8	110±9,0	92	18
9	91±11,0	109	18
10	155±6,0	140	15

I přes nízký počet kalibračních standardů a fakt, že se kyselina askorbová vyskytovala v nejnižších koncentracích ze všech sledovaných analytů, lze metodou NIR spektroskopie vytvořit poměrně přesný kalibrační model, který lze využívat při měření neznámých vzorků různých odrůd (tabulka 4). Pro lepší přesnost je nutné, doplnit kalibraci o další odrůdy.



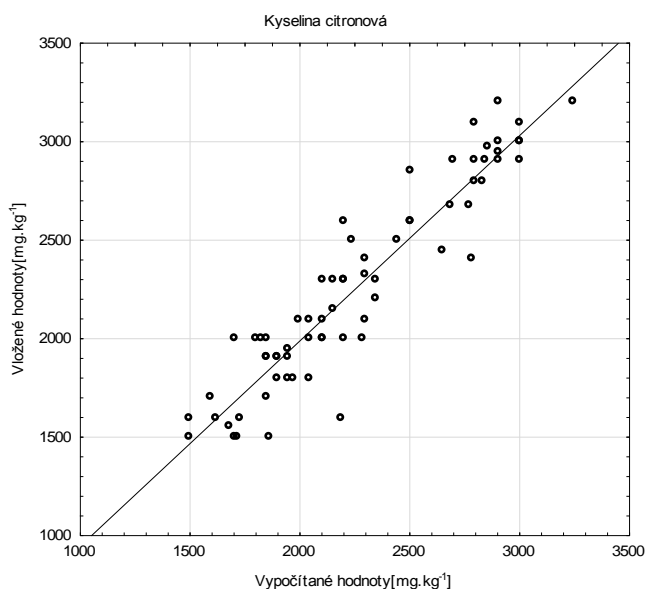
Vytvořený kalibrační model s rozsahem 1 840 – 5500 mg.kg⁻¹ obsahu kyseliny jablečné, má chybu kalibrace 250 mg.kg⁻¹, chybu cross validace 600 mg.kg⁻¹ a chybu predikce 541 mg.kg⁻¹. Data byla analyzována v původní formě naměřených spekter. Korelační koeficient je roven hodnotě 0,97.

Obrázek 34: Kalibrační graf kyseliny jablečné

Tabulka 5: Ověření přesnosti kalibrace kyseliny jablečné

Číslo vzorku	Kyselina jablečná [mg.kg ⁻¹]	Kyselina jablečná NIR [mg.kg ⁻¹]	Rozdíl mezi metodami
1	2900 ±50	2820	80
2	2900 ±98	3050	150
3	3300±102	3210	90
4	3000±46	3240	240
5	4350±74	4580	230
6	2900±80	3200	300
7	3700±25	4300	600
8	2400±15	2000	400
9	3700±65	4200	500
10	2900±60	3500	600

Kyselina jablečná se v plodech použitých pro kalibraci vyskytovala v koncentraci 0,18 - 0,55 % (obrázek 34). V případě odrůdy Redhaven, která v kalibraci převažuje, lze tento analyt stanovit do výše chyby kalibrace (tabulka 5). V případě dalších odrůd je potřeba počítat s chybou cross validace. Pro lepší přesnost je třeba kalibraci rozšířit dalšími odrůdami.



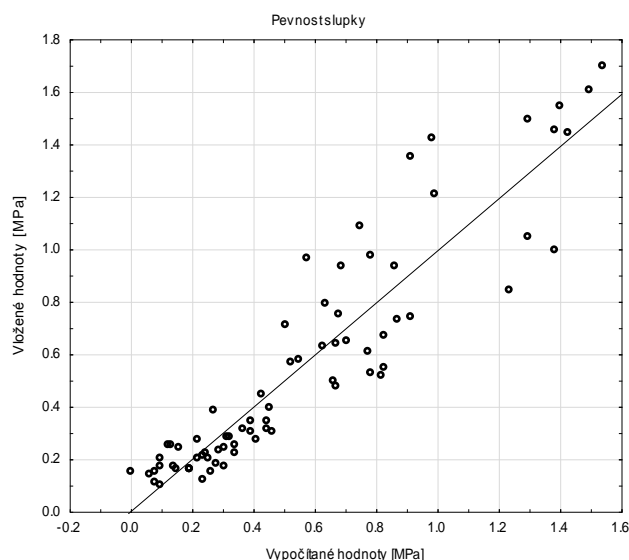
Vytvořený kalibrační model s rozsahem 1500 – 3300 mg.kg⁻¹ obsahu kyseliny citronové má chybu kalibrace 417 mg.kg⁻¹, chybu cross validace 690 mg.kg⁻¹ a chybu predikce 653 mg.kg⁻¹. Data byla analyzována v původní formě naměřených spekter. Korelační koeficient je roven hodnotě 0,98.

Obrázek 35: Kalibrační graf kyseliny citronové

Tabulka 6: Ověření přesnosti kalibrace kyseliny citronové

Číslo vzorku	Kyselina citronová [mg.kg ⁻¹]	Kyselina citronová NIR [mg.kg ⁻¹]	Rozdíl mezi metodami
1	2800 ±42	2500	300
2	3400 ±76	3100	300
3	1950±39	1690	260
4	2400±49	2800	400
5	1730±72	1680	50
6	2500±36	3200	700
7	2720±85	2210	510
8	1790±10	2400	610
9	2500±20	2200	300
10	3100±15	2450	650

Kyselina citronová se v plodech použitých pro kalibraci vyskytovala v koncentraci 0,15 - 0,3 % (obrázek 35). V případě odrůdy Redhaven byly zjištěné rozdíly do výše chyby kalibrace (tabulka 6). Při měření jiných odrůd bude potřeba počítat s chybou cross validace.



Vytvořený kalibrační model s rozsahem 0,11 – 1,65 MPa pevnosti slupky má chybu kalibrace 0,16 MPa, chybu cross validace 0,22 MPa a chybu predikce 0,33 MPa. Spektrum bylo derivováno (1. derivace), čímž došlo ke zvýraznění pásů. Korelační koeficient je roven hodnotě 0,92.

Obrázek 36: Kalibrační graf pevnosti slupky

Tabulka 7: Ověření přesnosti kalibrace pevnosti slupky








Číslo vzorku	Pevnost slupky [MPa]	Pevnost slupky NIR [MPa]	Rozdíl mezi metodami
1	0,17 ± 0,021	0,31	0,14
2	0,55 ± 0,016	0,78	0,23
3	0,29 ± 0,011	0,54	0,25
4	0,89 ± 0,022	0,61	0,28
5	0,17 ± 0,010	0,41	0,24
6	1,21 ± 0,020	0,83	0,38
7	0,84 ± 0,020	1,35	0,51
8	0,99 ± 0,013	1,53	0,54
9	0,89 ± 0,011	0,53	0,36
10	0,71 ± 0,020	0,40	0,31

V případě stanovení pevnosti slupky byla chyba predikce vyšší než chyba cross validace a tedy kalibrační model není dostatečně robustní. Hlavní příčinou je nedostatečný počet kalibračních standardů. Jak lze vidět v tabulce 7, u obou odrůd jsou rozdíly mezi metodami vyšší, než chyba cross validace modelu.

K vytvoření kalibračních modelů bylo použito nejméně kalibračních vzorků (80 plodů), což se výrazně odrazilo i v kvalitě vytvořených modelů.

I přes nízký počet kalibračních standardů, lze některé modely přímo použít k hodnocení neznámých vzorků zejména odrůdy Redhaven, která se v této oblasti pěstuje nejvíce. V případě celkových polyfenolů a pevnosti slupky byla chyba predikce vyšší než chyba cross validace, byly také zjištěny větší difference mezi metodou NIR a referenční metodou a proto modely nelze s dostatečnou přesností používat při hodnocení neznámých vzorků. U většiny modelů se při ověření přesnosti ukázalo, že rozdíly mezi metodou NIR a referenční metodou nepřesahují v případě odrůdy Redhaven chybu kalibrace daného modelu. Jinak tomu bylo v případě odrůdy Fairhaven, které bylo v kalibraci pouze 10 plodů. Při měření odrůd s výjimkou Redhaven je ve většině případů třeba počítat s chybou cross validace daného modelu. Pro větší přesnost je tedy nezbytné rozšíření kalibrace o další odrůdy.

Tabulka 8: Souhrnná tabulka kalibračních standardů

Parametr	n	ignoro- vané	min. konc.	max. konc.	počet faktorů	Derivace	PRES S	RMS EC	RMSE CV	R
Kyselina askorbová [mg.kg ⁻¹]	80	3	60	170	5	První derivace		9	15,4	0,93
Celkové polyfenoly [mg.kg ⁻¹]	80	4	450	1150	9	První derivace		55	100	0,98
Titrovatelné kyseliny [%]	80	3	0,33	1,0	9	První derivace		0,045	0,080	0,96
Rozpustná sušina [°Bx]	80	2	9,0	15,0	7	Spektrum		0,62	0,75	0,87
Kyselina jablečná [mg.kg ⁻¹]	80	4	1 840	5 500	9	Spektrum		250	600	0,97
Pevnost slupky [MPa]	80	3	0,11	1,65	4	První derivace		0,16	0,22	0,92
Kyselina citronová [mg.kg ⁻¹]	80	3	1500	3300	10	Spektrum		417	690	0,98

V tabulce 8 jsou detailní charakteristiky kalibračního modelu vytvořeného pomocí odrůd Redhaven a Fairhaven.

n.....počet vzorků (standardů) v kalibraci

ignorované.....počet standardů vyloučených z kalibrace

počet faktorů.....počet PLS faktorů, na které byly přeměněny spektrální proměnné

RMSEC.....chyba kalibrace vytvořeného modelu

RMSECV.....chyba cross validace vytvořeného modelu

R.....korelační koeficient modelu

4.1.2 Hodnocení změn látkových složek v průběhu dozrávání broskví odrůdy Redhaven

Celkem bylo analyzováno 60 plodů v průběhu zrání plodů. Plody byly odebírány ze stromů v období 20. července až 10. srpna. Hlavním kritériem pro sběr plodů byla pevnost slupky. Při první sklizni byly posbírány tvrdé, nezralé plody, u kterých byla změřena pevnost slupky. Nejvyšší naměřená hodnota byla 1,7 MPa. Ze všech deseti plodů pak vyšla průměrná hodnota 1,40 MPa. Celkem bylo provedeno 6 odběrů. Průměrné hodnoty v tabulce jsou vždy z 10 různých plodů.

Tabulka 9: Změny látkového složení broskví v průběhu zrání

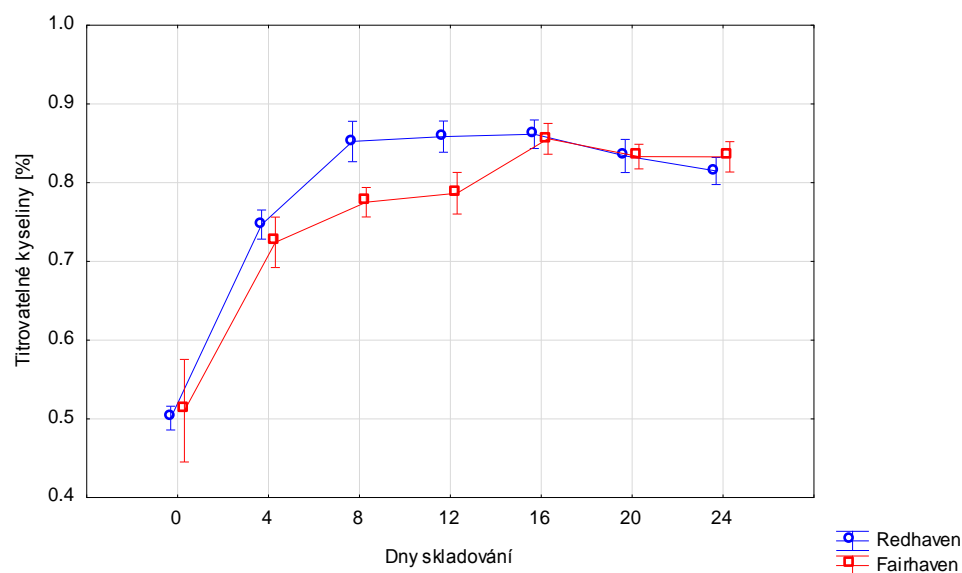
Sklizeň	Polyfenoly [mg.kg ⁻¹]	Kyselina askorbová [mg.kg ⁻¹]	Rozpustná sušina [°Bx]	Kyselina citronová [g.kg ⁻¹]	Kyselina jablečná [g.kg ⁻¹]	Titrovatelné kyseliny [%]	Pevnost slupky [MPa]
1.	607±24	135±6,5	9,9±0,23	2,96±0,05	5,1±0,2	0,70±0,056	1,40±0,10
2.	652±34	133±9,8	10,4±0,22	2,71±0,05	5,0±0,3	0,64±0,037	0,91±0,11
3.	819±75	128±3,9	10,9±0,33	2,21±0,03	3,5±0,1	0,54±0,022	0,56±0,05
4.	933±59	127±8,5	11,0±0,16	2,04±0,04	3,0±0,2	0,51±0,020	0,36±0,08
5.	964±67	111±4,4	11,5±0,27	1,91±0,06	2,9±0,2	0,50±0,029	0,23±0,09
6.	546±45	108±3,2	12,0±0,16	1,68±0,05	2,4±0,4	0,40±0,015	0,18±0,08

Dle tabulky 9 byl obsah polyfenolů u tvrdých, nezralých broskví přes 600 mg.kg⁻¹. Postupným zráním se jejich obsah zvyšoval až k hodnotě téměř 1000 mg.kg⁻¹. V tomto termínu (5. sklizeň) bylo u poloviny plodů naměřeno více jak 1000 mg.kg⁻¹. Přezrálé broskve (6. sklizeň) měly podobný obsah, jako plody nezralé. U těchto plodů došlo téměř k polovičnímu úbytku celkových polyfenolů oproti plodům sklizených v předchozím termínu. Nejvíce titrovatelných kyselin bylo zjištěno u nezralých plodů, postupným zráním se jejich obsah snižoval. Přezrálé broskve obsahovaly 0,40 % kyselin. Obsah kyseliny jablečné a citronové v průběhu zrání klesal. Převažující kyselinou byla po celou dobu dozrávání kyselina jablečná. Největší pokles nastal u třetí sklizně, kdy se obsah kyseliny jablečné snížil o 1,5 g.kg⁻¹ oproti sklizni předchozí a obsah kyseliny citronové o 0,5 g.kg⁻¹. Obsah rozpustné sušiny se po celou dobu zrání broskví zvyšoval. Přezrálé broskve obsahovaly více rozpustných látek než plody nezralé. Nejvyšší koncentrace kyseliny askorbové byla zjištěna u nezralých plodů. V průběhu dozrávání se její obsah postupně

snižoval. Největší pokles v obsahu nastal u předposlední sklizně, tedy u zralých až přezrálých plodů. I tak obsah kyseliny askorbové neklesl pod 100 mg.kg^{-1} .

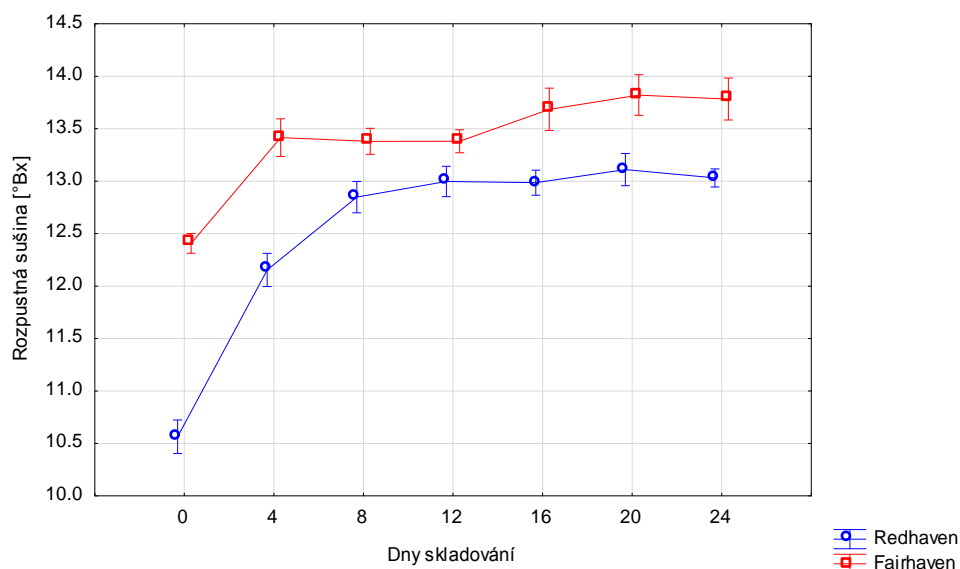
4.1.3 Hodnocení změn látkových složek broskví v průběhu skladování u odrůd Redhaven a Fairhaven

V roce 2013 bylo skladováno 25 plodů odrůdy Redhaven a 25 plodů odrůdy Fairhaven v chladárně při teplotě $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ v normální atmosféře. Plody byly skladovány 24 dnů a každé 4 dny byla měřena jejich spektra stejným způsobem a za stejných podmínek jako tomu bylo v průběhu zrání plodů. Vytvořenými kalibračními modely metodou NIR spektroskopie byl hodnocen obsah titrovatelných kyselin, rozpustné sušiny, kyseliny jablečné, kyseliny citronové a kyseliny askorbové. Pevnost slupky a celkový obsah polyfenolů nebyly vyhodnoceny z důvodu nepřesného kalibračního modelu.



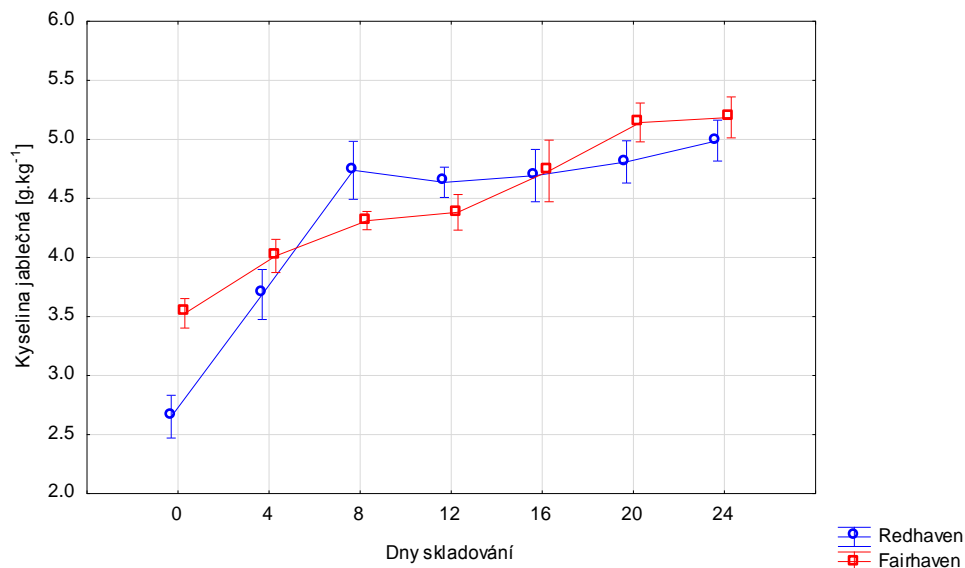
Obrázek 37: Změny v obsahu titrovatelných kyselin u odrůd Redhaven a Fairhaven v průběhu skladování.

Plody odrůdy Redhaven i Fairhaven obsahovaly na počátku skladování 0,5 % kyselin (obrázek 37). V průběhu skladování se jejich obsah u obou odrůd zvyšoval téměř identicky. Po 24 dnech skladování byl obsah kyselin u obou odrůd téměř shodný (Fairhaven - 0,83 %, Redhaven - 0,81 %). Statisticky významné rozdíly byly u obou odrůd zejména mezi 0. dnem a ostatními dny skladování (tabulky 31 a 36 Přílohy).



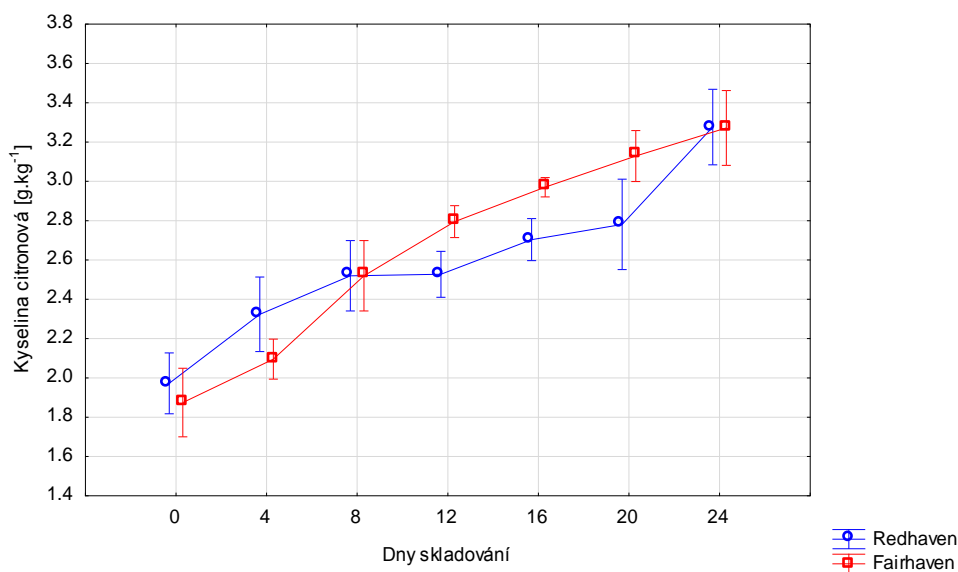
Obrázek 38: Změny v obsahu rozpustné sušiny u odrůd Redhaven a Fairhaven v průběhu skladování.

Jak lze vidět na obrázku 38 plody odrůdy Fairhaven obsahovaly na počátku skladování 12,4 °Bx rozpustné sušiny. Nejvyšší nárůst byl zaznamenán po 4 dnech uskladnění a v dalších dnech se obsah nepatrně zvyšoval. Po 24 dnech skladování byl obsah rozpustné sušiny 13,8 °Bx. Plody odrůdy Redhaven obsahovaly při uskladnění 10,6 °Bx rozpustné sušiny. Po 8 dnech skladování se obsah zvýšil o 2,2 °Bx. Po 24 dnech skladování byl obsah rozpustné sušiny 13 °Bx. Statisticky významné rozdíly byly u obou odrůd zejména mezi 0. dnem a ostatními dny skladování (tabulky 32 a 37 Přílohy).



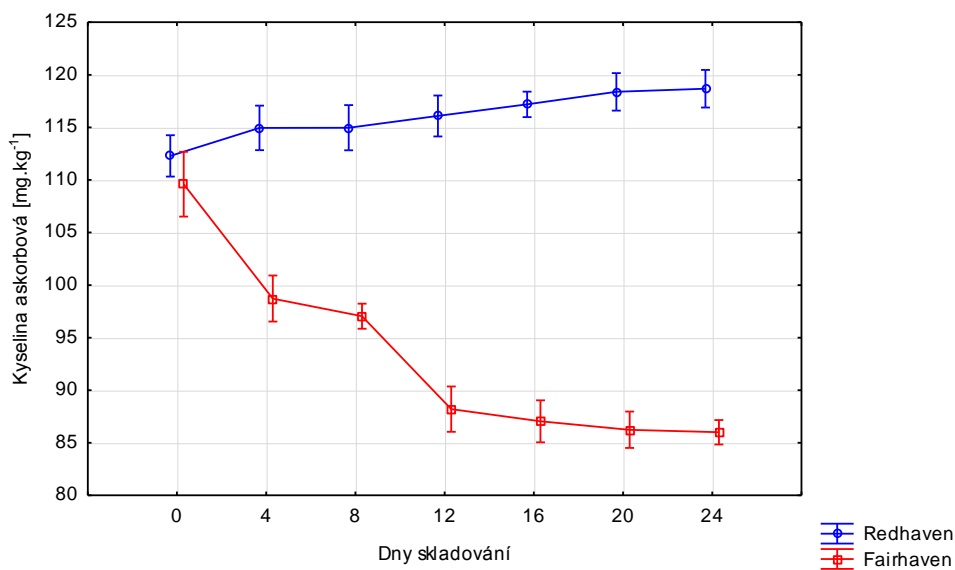
Obrázek 39: Změny v obsahu kyseliny jablečné u odrůd Redhaven a Fairhaven v průběhu skladování.

Dle obrázku 39 byl u odrůdy Fairhaven obsah kyseliny jablečné na počátku skladování $3,5 \text{ g.kg}^{-1}$, v průběhu skladování se tento obsah postupně zvyšoval až na hodnotu $5,2 \text{ g.kg}^{-1}$. Odrůda Redhaven měla na počátku skladování nižší obsah kyseliny jablečné ($2,7 \text{ g.kg}^{-1}$), nejvyšší nárůst nastal během prvních 8 dnů skladování ($4,7 \text{ g.kg}^{-1}$) v dalších dnech se obsah nepatrně zvyšoval až na hodnotu 5 g.kg^{-1} . U odrůdy Fairhaven nebyly statisticky významné rozdíly mezi 4. a 8., 8. a 12., 20. a 24. dnem skladování (tabulka 30 Přílohy). U odrůdy Redhaven nebyly statisticky významné rozdíly mezi 8. až 24. dnem skladování (tabulka 35 Přílohy).



Obrázek 40: Změny v obsahu kyseliny citronové u odrůd Redhaven a Fairhaven v průběhu skladování.

Obsah kyseliny citronové se na počátku skladování u obou odrůd pohyboval kolem 2 g.kg^{-1} (obrázek 40). V průběhu skladování se obsah kyseliny citronové postupně zvyšoval u obou odrůd téměř identicky. Po 24 dnech skladování měly obě odrůdy stejný obsah kyseliny citronové ($3,3 \text{ g.kg}^{-1}$). U odrůdy Fairhaven nebyly statisticky významné rozdíly mezi 0. a 4., 8. a 12., 12. a 16., 16. a 20., 20. a 24. dnem skladování (tabulka 33 Přílohy). U odrůdy Redhaven nebyly statisticky významné rozdíly mezi 4. až 20. dnem skladování (tabulka 38 Přílohy).



Obrázek 41: Změny v obsahu kyseliny askorbové u odrůd Redhaven a Fairhaven v průběhu skladování.

Na obrázku 41 je patrné, že na počátku skladování byl obsah kyseliny askorbové u plodů odrůdy Fairhaven 110 mg.kg⁻¹. V první polovině skladování se obsah kyseliny askorbové výrazně snižoval, ve druhé polovině skladování se její obsah téměř neměnil. Na konci skladování obsahovaly plody 86 mg.kg⁻¹ kyseliny askorbové. Plody odrůdy Redhaven měly na počátku skladování podobný obsah kyseliny askorbové, jako plody odrůdy Fairhaven (113 mg.kg⁻¹), během skladování se její obsah mírně zvyšoval až na hodnotu téměř 120 mg.kg⁻¹. U odrůdy Fairhaven byly statisticky významné rozdíly zejména mezi 0. dnem a ostatními dny skladování (tabulka 34 Přílohy). U odrůdy Redhaven byly statisticky významné rozdíly mezi 0. dnem a 20. a 24. dnem skladování (tabulka 39 Přílohy).

DI VAIO et al., (2008) zkoumali obsah rozpustné sušiny a celkový obsah kyselin u 7 odrůd broskví se žlutou dužninou, 5 odrůd nektarinek se žlutou dužninou a 1 odrůdy s bílou dužninou. Obsah rozpustné sušiny se pohyboval v rozmezí 8,6 - 12,6 °Bx, obsah titrovatelných kyselin 0,41 - 0,65 %. Hodnoty rozpustné sušiny se shodují spíše s odrůdou Redhaven. U odrůdy Redhaven i Fairhaven se obsah kyselin v průběhu skladování pohyboval v hodnotách 0,5 – 0,8 %.

CARBONARO et al., (2002) zkoumali obsah kyseliny citronové a askorbové v broskvích pěstovaných ekologickým a konvenčním způsobem. Kyselina askorbová i citronová byly stanoveny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie po extrakci pomocí 5% kyseliny m-fosforečné. Obsah kyseliny askorbové se pohyboval kolem 50 mg.kg⁻¹.

Vyšší hodnota byla naměřena u broskví pěstovaných ekologickým způsobem. Obsah kyseliny citronové byl rovněž zjištěn vyšší u broskví z ekologického pěstování. Broskve v průměru obsahovaly $3,5 \text{ g.kg}^{-1}$ kyseliny citronové. Takové množství kyseliny citronové obsahovaly plody odrůd Redhaven a Fairhaven na konci skladování (po 24 dnech). Broskve pěstované konvenčním způsobem obsahovaly $2,8 \text{ g.kg}^{-1}$ kyseliny citronové. Tato hodnota odpovídá obsahu kyseliny citronové na počátku zrání odrůdy Redhaven.

FAURIEL et al., (2007) stanovovali rozpustnou sušinu u plodů broskví. Celkem bylo k analýze odebráno 30 plodů z 6 různých stromů. Hodnoty rozpustné sušiny se pohybovaly v rozmezí $8,6 - 8,9 \text{ }^\circ\text{Bx}$. Hodnoty rozpustné sušiny odpovídají spíše méně zralým plodům, protože jak odrůda Redhaven, tak i odrůda Fairhaven měly na počátku skladování obsah rozpustné sušiny nad $10 \text{ }^\circ\text{Bx}$.

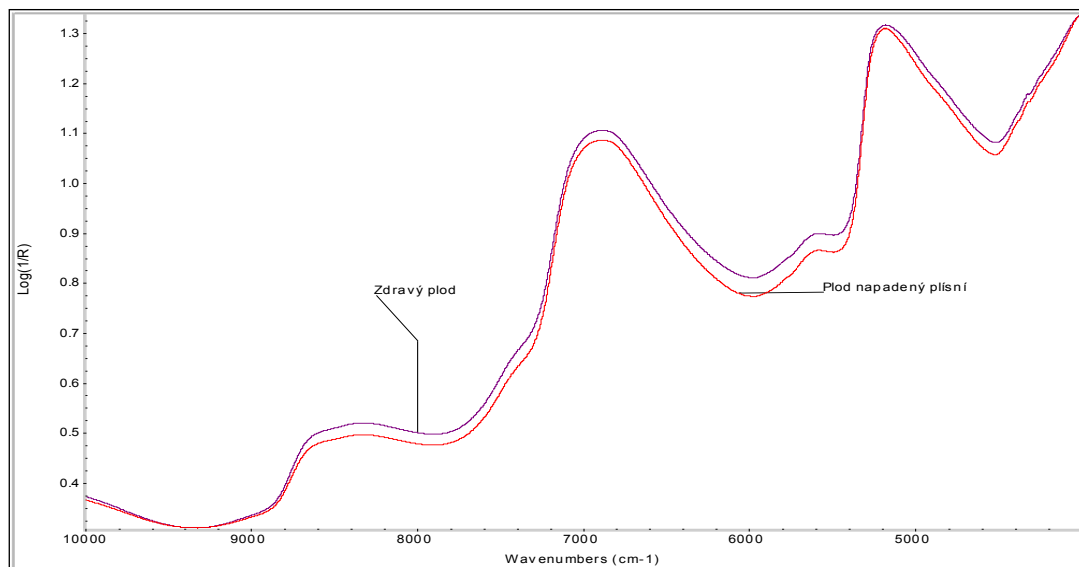
ZIOSI et al., (2008) provedli v letech 2003 - 2005 na zemědělské univerzitě v Bologni pokus se dvěma nektarinkami (Stark Red Gold a Laura) a broskví odrůdy Fayette. Plody byly sklizeny 7. července, 1. a 27. srpna, ihned byla změřena a uložena jejich spektra a rovněž byl stanoven obsah rozpustné sušiny. Analýzy obsahu titrovatelných kyselin byly provedeny po sklizni, dále pak po 12, 36 a 60 hodinách. Nejnižší hodnoty rozpustné sušiny měla odrůda Laura ($10 \text{ }^\circ\text{Bx}$), u zbylých 2 odrůd byly hodnoty kolem $13 \text{ }^\circ\text{Bx}$. Stejně hodnoty rozpustné sušiny byly zjištěny také u odrůd Redhaven a Fairhaven v průběhu skladování. Nejvyšší hodnoty titračních kyselin (jako kyselina jablečná) byly naměřeny ihned po sklizni ($0,7 - 1,1 \%$). V průběhu skladování došlo ke snížení obsahu kyselin v průměru o $0,25 \%$. U odrůd Redhaven a Fairhaven se obsah titrovatelných kyselin pohyboval v rozmezí $0,5 - 0,8 \%$ a převažující kyselinou byla rovněž kyselina jablečná.

4.1.4 Využití NIR spektroskopie při hodnocení zdravotní nezávadnosti plodů broskví.

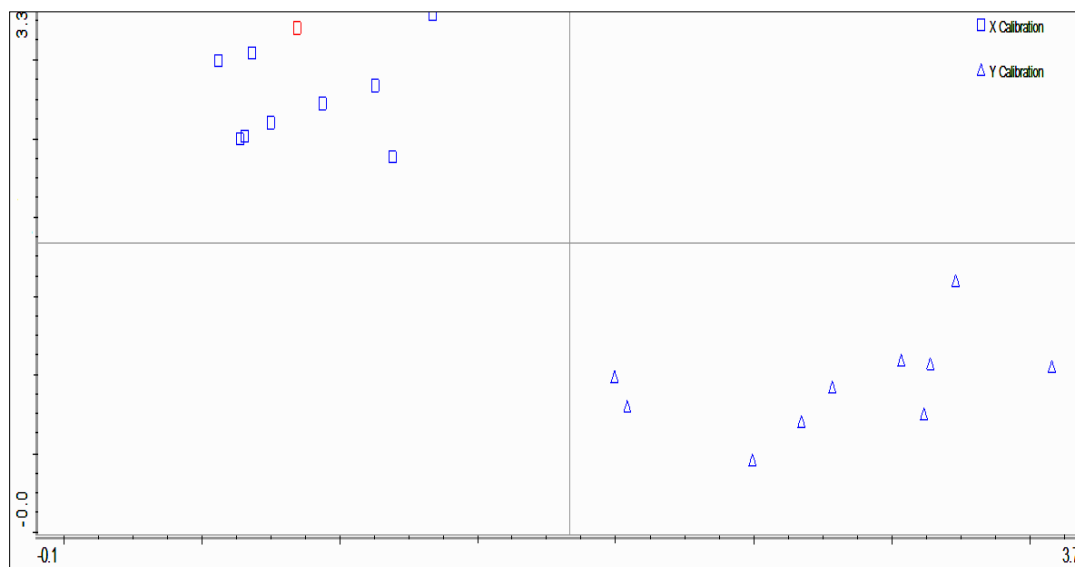
Předmětem pokusu bylo zjistit, zda lze metodou NIR spektroskopie spolehlivě oddělit napadené plody od plodů zdravých. K měření bylo použito 10 plodů napadených plísní a 10 zdravých plodů (obrázek 42). U obou skupin plodů byla změřena jejich spektra metodou NIR spektroskopie (spektra napadených plodů byla měřena ze zdravé strany) a pomocí diskriminační analýzy bylo zjišťováno, zda budou plody od sebe odděleny.



Obrázek 42: Napadené a zdravé plody



Obrázek 43: Spektrální rozdíly mezi zdravým a napadeným plodem



Obrázek 44: Diskriminační analýza mezi plody zdravými a napadenými

Diskriminační analýza oddělila plody zdravé od plodů napadených plísní. Dle obrázku 44 je patrné, že rozdíl mezi clusterami je velmi zřetelný, což dokazuje i přítomnost diskriminačního kříže a nedochází tedy k prolínání jednotlivých spekter.

RŮŽIČKOVÁ et al., (2010) hodnotili napadení gleosporiovou hnilobou u odrůd jablek Idared a Golden Delicious pomocí NIR spektroskopie. 40 plodů obou odrůd bylo rozděleno na 2 skupiny po 20 plodech. První skupina byla ponechána v původním stavu, druhá skupina byla infikována myceliem houby *Gleosporium album*. Sledování rozvoje gloeosporia probíhalo po dobu sedmi týdnů a to v cca týdenních intervalech, přičemž první měření se provedlo asi pět dní po aplikaci mycelia. K rozlišení plodů byla použita diskriminační analýza. Rozdíl mezi clusterami zdravých a infikovaných plodů byl zřetelný již na počátku sledování a tento trend byl zachován po celou dobu pokusu.

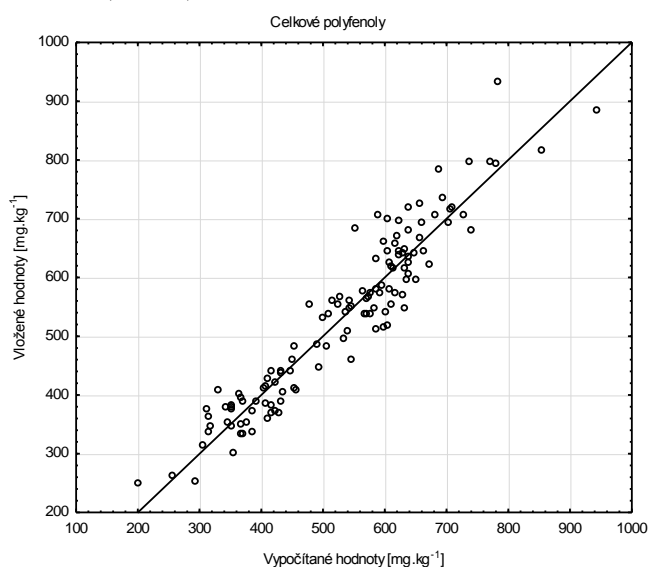
NICOLAI et al., (2006) vytvořili A hyperspectral NIR imaging systém pro předpověď pihovitosti u jablek. Ovoce bylo sklizeno v experimentální stanici FTC z Rillaar (Belgie) ze stromů, na jejichž plodech se v minulých letech objevovaly pihy již před sklizní. Sklizené ovoce bylo bez viditelných příznaků. Diskriminační PLS kalibrační model byl vytvořen ze zcela zdravých plodů a plodů náchylných k pihovitosti. Kalibrační model byl úspěšně ověřen na neznámých plodech. Systém byl schopen identifikovat pihovitost neviditelnou pouhým okem.

TIWARI et al., (2013) vytvořili kalibrační modely pro identifikaci nezralých rajčat. K pokusu bylo odebráno 350 zelených plodů dvou odrůd 901 a Bobcat. Plody se nechaly dozrávat a byly rozříděny do 6 znalostních tříd (1 - zcela zelené, 6 - zcela červené). Pro kalibraci byly vytvořeny 3 třídy (nezralé, středně zralé a zcela zralé). Spektra plodů byla měřena NIR spektrometrem a pomocí diskriminační analýzy byly vytvořeny modely sloužící k rozlišení jednotlivých stádií zralosti plodů. Model byl schopen identifikovat 71 % nezralých zelených rajčat různých odrůd.

4.2 Rajčata

4.2.1 Kalibrační grafy rajčat

Kalibrace je složena ze 120 plodů odrůdy Dagmar. Kalibrace byly vytvořeny z hodnot získaných v průběhu zrání a skladování plodů. Vždy se jedná o závislost mezi hodnotami vypočítanými (NIR hodnoty) a vloženými. Takto vytvořenými modely byly hodnoceny skladované plody. Při ověření přesnosti kalibrace byly použity odrůdy Dagmar (1 - 5) a Parto (6 - 10) viz tabulka 10.



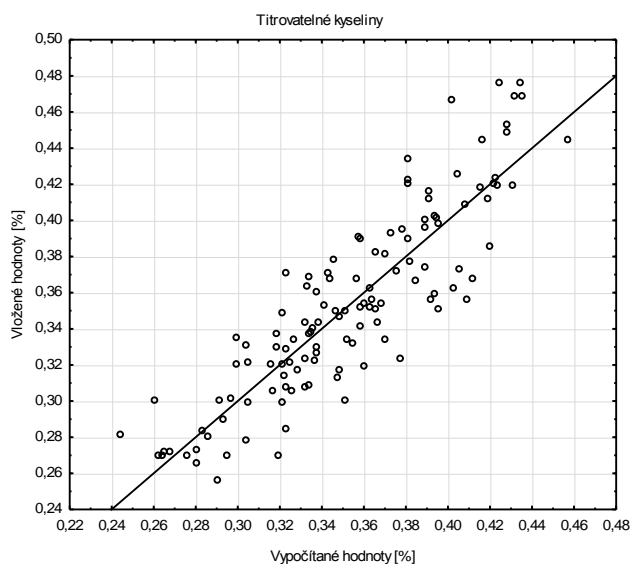
Vytvořený kalibrační model s rozsahem 250 – 944 mg.kg⁻¹ má chybu kalibrace rovnou hodnotě 50 mg.kg⁻¹, chybu cross validace 90 mg.kg⁻¹ a chybu predikce 79 mg.kg⁻¹. Korelační koeficient je roven hodnotě 0,95.

Obrázek 45: Kalibrační graf celkových polyfenolů

Tabulka 10: Ověření přesnosti kalibrace celkových polyfenolů

Číslo vzorku	Polyfenoly [mg.kg ⁻¹]	Polyfenoly NIR [mg.kg ⁻¹]	Rozdíl mezi metodami
1	268 ±10	313	45
2	263 ±16	320	57
3	484±17	404	33
4	717±12	670	47
5	658±8	612	46
6	548±18	632	84
7	725±14	640	85
8	336±11	436	100
9	681±10	770	89
10	658±17	568	90

Vytvořený kalibrační model celkových polyfenolů je robustnější, než v případě broskví. Dle tabulky 10 byla pouze u jednoho vzorku odrůdy Parto překročena chyba cross validace. Model lze tedy využívat i při měření dalších odrůd. Zvýšením počtu kalibračních standardů oproti broskvím se chyba kalibrace ani cross validace příliš nezměnila a lze tedy konstatovat, že vysoká chyba je zapříčiněna nízkou koncentrací tohoto analytu.



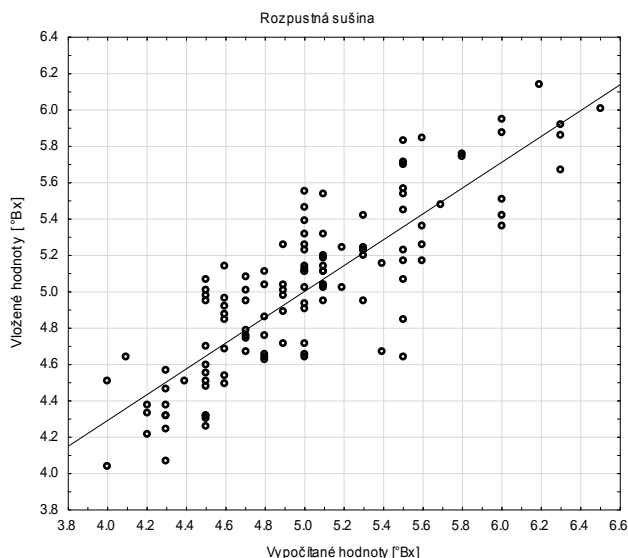
Vytvořený kalibrační model s rozsahem 0,25 – 0,48 % obsahu titrovatelných kyselin má chybu kalibrace 0,025 %, chybu cross validace 0,043 % a chybu predikce 0,043 %. Data byla analyzována v původní formě naměřených spekter. Korelační koeficient je roven hodnotě 0,88.

Obrázek 46: Kalibrační graf titrovatelných kyselin

Tabulka 11: Ověření přesnosti kalibrace kyselin

Číslo vzorku	Obsah kyselin [%]	Obsah kyselin NIR [%]	Rozdíl mezi metodami
1	0,32 ± 0,016	0,35	0,03
2	0,41 ± 0,020	0,39	0,02
3	0,33 ± 0,020	0,34	0,01
4	0,30 ± 0,032	0,32	0,02
5	0,31 ± 0,010	0,32	0,01
6	0,28 ± 0,019	0,25	0,03
7	0,38 ± 0,025	0,43	0,05
8	0,29 ± 0,010	0,33	0,04
9	0,39 ± 0,020	0,44	0,05
10	0,42 ± 0,019	0,40	0,02

Oproti kalibračnímu modelu titrovatelných kyselin u broskví je zde chyba kalibrace i cross validace téměř o polovinu nižší (obrázek 46) a model má tedy větší přesnost a lze jej využívat při měření kyselin u různých odrůd rajčat (tabulka 11).



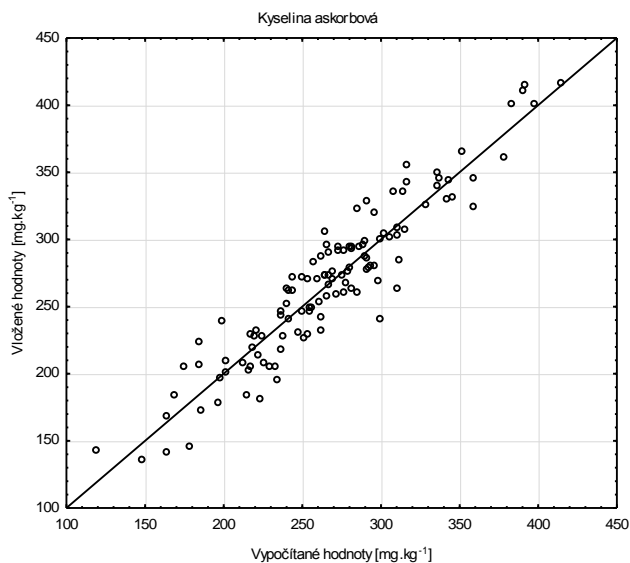
Vytvořený kalibrační model s rozsahem 4,0 – 6,1 °Bx obsahu rozpustné sušiny má chybu kalibrace 0,29 °Bx, chybu cross validace 0,45 °Bx a chybu predikce 0,55 °Bx. Spektrum bylo derivováno (1. derivace). Korelační koeficient vytvořeného modelu má hodnotu 0,84.

Obrázek 47: Kalibrační graf rozpustné sušiny

Tabulka 12: Ověření přesnosti kalibrace rozpustné sušiny

Číslo vzorku	Rozpustná sušina [°Bx]	Rozpustná sušina NIR [°Bx]	Rozdíl mezi metodami
1	4,2 ± 0,08	4,4	0,2
2	4,2 ± 0,06	4,6	0,4
3	5,4 ± 0,04	5,1	0,3
4	4,5 ± 0,10	4,9	0,4
5	5,1 ± 0,04	5,4	0,3
6	4,7 ± 0,09	5,2	0,5
7	5,4 ± 0,06	4,7	0,7
8	4,2 ± 0,02	5,0	0,8
9	6,3 ± 0,04	5,5	0,8
10	4,6 ± 0,07	5,1	0,5

Model má vyšší chybu predikce z důvodu velkého počtu vzorků podobné koncentrace (obrázek 47). Při ověřování přesnosti modelu (tabulka 12) nebyla u odrůdy Dagmar vyšší odchylka než 0,4 °Bx a u další odrůdy 0,8 °Bx. Přidáváním dalších vzorků do kalibrace se koncentrační rozpětí příliš nezmění a naopak se zvýší počet vzorků v kalibraci s hodnotami 4,8 - 5,5 °Bx.



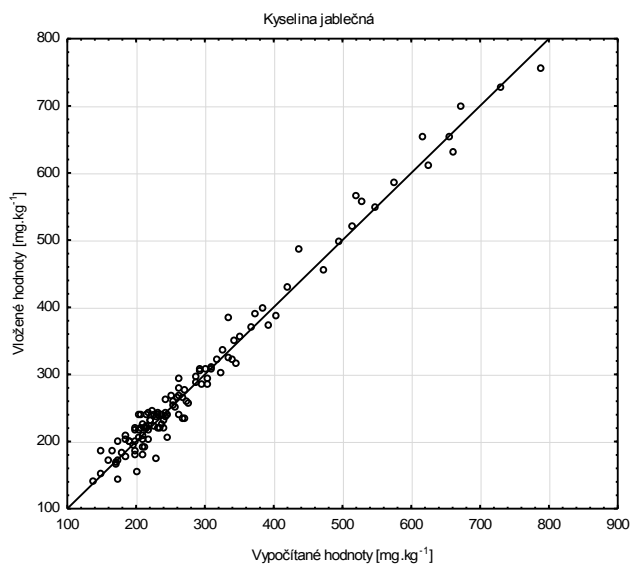
Vytvořený kalibrační model s rozsahem 140 - 415 mg.kg⁻¹ obsahu kyseliny askorbové má chybu kalibrace 25 mg.kg⁻¹, chybu cross validace 46 mg.kg⁻¹ a chybu predikce 44 mg.kg⁻¹. Data byla analyzována v původní formě naměřených spekter Korelační koeficient je roven hodnotě 0,94.

Obrázek 48: Kalibrační graf kyseliny askorbové

Tabulka 13: Ověření přesnosti kalibrace kyseliny askorbové

Číslo vzorku	Kyselina askorbová [mg.kg ⁻¹]	Kyselina askorbová NIR [mg.kg ⁻¹]	Rozdíl mezi metodami
1	225 ±7,0	250	25
2	230 ±4,0	257	27
3	273±9,0	293	20
4	277±5,0	300	23
5	283±3,0	268	15
6	306±12	257	49
7	239±9,0	189	50
8	276±6,0	296	20
9	365±4,0	316	49
10	342±6,0	300	42

Stejně jako u broskví i u rajčat bylo zjištěno, že model kyseliny askorbové funguje. Jak lze vidět v tabulce 13 v případě odrůdy Dagmar se rozdíl mezi metodou NIR a HPLC pohyboval do výše chyby kalibrace, u jiných odrůd bude třeba počítat s chybou kolem 50 mg.kg⁻¹.



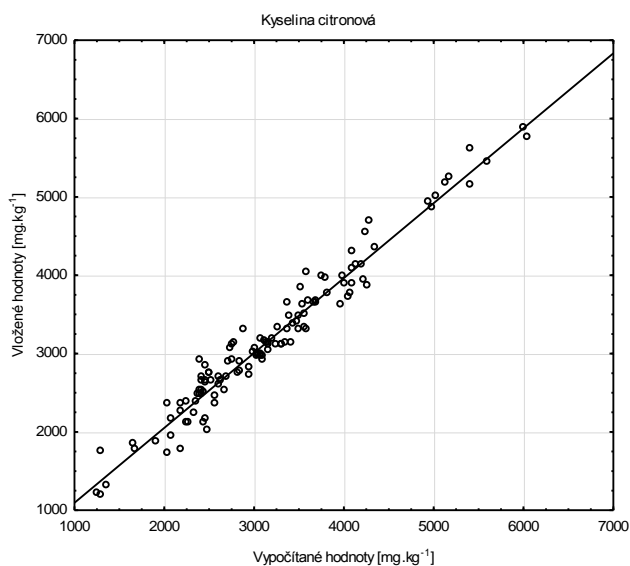
Vytvořený kalibrační model s rozsahem 140 – 760 mg.kg⁻¹ obsahu kyseliny jablečné má chybu kalibrace 19 mg.kg⁻¹, chybu cross validace 90 mg.kg⁻¹ a chybu predikce 120 mg.kg⁻¹. Spektrum bylo derivováno (1. derivace). Korelační koeficient je roven hodnotě 0,99.

Obrázek 49: Kalibrační graf kyseliny jablečné

Tabulka 14: Ověření přesnosti kalibrace kyseliny jablečné

Číslo vzorku	Kyselina jablečná [mg.kg ⁻¹]	Kyselina jablečná NIR [mg.kg ⁻¹]	Rozdíl mezi metodami
1	230 ±5,0	280	50
2	390 ±10	320	70
3	350±8,0	280	70
4	258±6,0	338	80
5	260±4,0	250	10
6	485±8,0	308	177
7	629±5,0	396	233
8	520±11	350	170
9	698±5,0	427	271
10	440±8,0	350	90

Kalibrační model kyseliny jablečné je ze všech sledovaných parametrů nejméně přesný, což je dáno tím, že se tato látka vyskytovala v kalibraci ve velmi nízkých koncentracích (obrázek 49). Nejvíce kalibračních standardů leželo v rozmezí 200 - 400 mg.kg⁻¹, proto pokud měl vzorek vyšší obsah, kalibrační model ho zařadil do nižších koncentrací a vznikly tak velké rozdíly mezi metodami NIR a HPLC. Model lze použít jen pro odrůdu Dagmar.



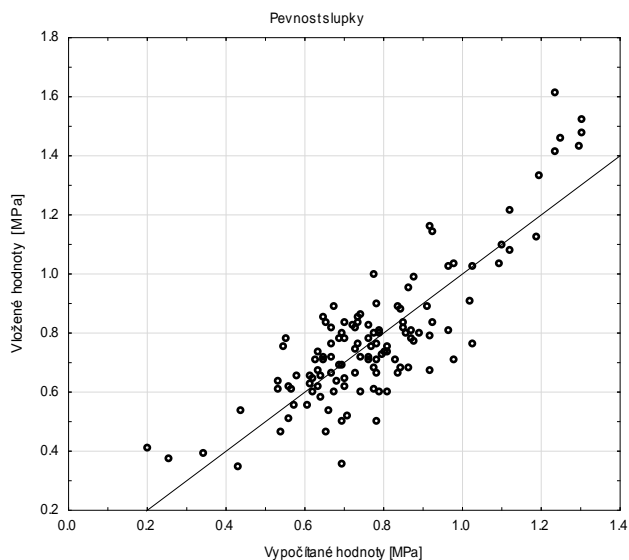
Vytvořený kalibrační model s rozsahem 1200 – 5900 mg.kg⁻¹ obsahu kyseliny citronové má chybu kalibrace 301 mg.kg⁻¹, chybu cross validace 790 mg.kg⁻¹ a chybu predikce 550 mg.kg⁻¹. Spektrum bylo derivováno (1. derivace). Korelační koeficient je roven hodnotě 0,98.

Obrázek 50: Kalibrační graf kyseliny citronové

Tabulka 15: Ověření přesnosti kalibrace kyseliny citronové

Číslo vzorku	Kyselina citronová [mg.kg ⁻¹]	Kyselina citronová NIR [mg.kg ⁻¹]	Rozdíl mezi metodami
1	2445 ±42	2706	261
2	2575 ±56	2391	184
3	3040±29	2920	120
4	5000±40	4700	300
5	3173±51	3133	40
6	2445±36	2993	548
7	5300±45	4500	800
8	2383±11	2988	605
9	5500±10	5100	400
10	1680±9,0	2460	780

Kalibrační model kyseliny citronové u rajčat se příliš neliší od kalibračního modelu broskví. Vyšší počet kalibračních standardů nesnížil chybu cross validace vzniklého modelu. Při měření odrůd, které nejsou v kalibraci, je třeba počítat s chybou cross validace modelu (tabulka 15). I v tomto případě se kyselina citronová vyskytovala v menší koncentraci než 1 % (obrázek 50).



Vytvořený kalibrační model s rozsahem 0,38 – 1,60 MPa pevnosti slupky má chybu kalibrace 0,13 MPa, chybu cross validace 0,18 MPa a chybu predikce 0,13 MPa. Data byla analyzována v původní formě naměřených spekter. Korelační koeficient je roven hodnotě 0,84.








Obrázek 51: Kalibrační graf pevnosti slupky

Tabulka 16: Ověření přesnosti kalibrace pevnosti slupky

Číslo vzorku	Pevnost slupky [MPa]	Pevnost slupky NIR [MPa]	Rozdíl mezi metodami
1	0,57 ± 0,022	0,52	0,05
2	0,76 ± 0,031	0,80	0,04
3	0,64 ± 0,010	0,71	0,12
4	0,39 ± 0,023	0,35	0,04
5	1,07 ± 0,023	1,03	0,04
6	1,03 ± 0,009	0,84	0,19
7	1,20 ± 0,014	1,03	0,17
8	0,70 ± 0,014	0,68	0,02
9	0,79 ± 0,015	0,98	0,19
10	0,59 ± 0,021	0,62	0,03

Zvýšením počtu kalibračních standardů oproti broskvím, kde nebyl kalibrační model dostatečně robustní, se tady ukázalo, že model může být dostatečně přesný i při měření jiných odrůd, než které jsou obsaženy v kalibraci. U odrůdy Dagmar byl maximální rozdíl 0,12 MPa a u odrůdy Parto 0,19 MPa (tabulka 16).

Tabulka 17: Souhrnná tabulka kalibračních standardů

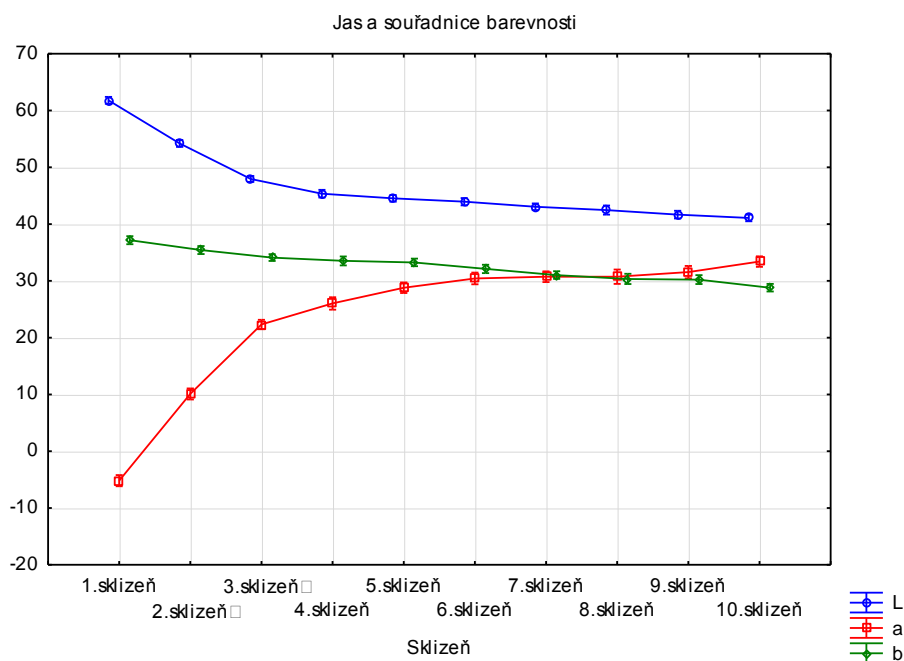
Parametr	n	ignoro- vané	min. konc.	max. konc.	počet faktorů	Derivace	PRES S	RMS EC	RMSE CV	R
Kyselina askorbová [mg.kg ⁻¹]	120	2	140	415	10	Spektrum		25	46	0,94
Celkové polyfenoly [mg.kg ⁻¹]	120	4	250	944	6	První derivace		50	90	0,95
Titrovatelné kyseliny [%]	120	5	0,25	0,48	7	Spektrum		0,025	0,043	0,88
Rozpustná sušina [°Bx]	120	6	4,0	6,1	4	První derivace		0,29	0,45	0,84
Kyselina jablečná [mg.kg ⁻¹]	120	9	140	760	9	První derivace		19	90	0,99
Pevnost slupky [MPa]	120	4	0,38	1,6	10	Spektrum		0,13	0,18	0,84
Kyselina citronová [mg.kg ⁻¹]	120	4	1200	5900	6	První derivace		301	790	0,98

V tabulce 17 jsou detailní charakteristiky kalibračního modelu vytvořeného pomocí odrůdy Dagmar.

V případě kalibračních modelů rajčat se ukázalo, že zvýšení počtu kalibračních standardů nemusí vést ke snížení chyby a ke zvýšení přesnosti vytvořeného modelu, což se ukázalo v případě kyseliny citronové a jablečné. Zejména kyselina jablečná se u rajčat vyskytuje v nízkých koncentracích a nelze ji metodou NIR spektroskopie přesně stanovit. Naopak ke zvýšení přesnosti modelu došlo v případě celkových polyfenolů a pevnosti slupky, kdy dalším rozšířením vytvořených kalibrací, bude model ještě více přesný. V případě titrovatelných kyselin a rozpustné sušiny, které se vyskytují v nejvyšších koncentracích lze, modely využívat i k měření různých odrůd, i tady se ale musí počítat s určitou chybou modelu. I když se kyselina askorbová vyskytovala v podobných koncentracích jako kyselina jablečná, vytvořený model je přesnější a lze ho použít i pro měření různých odrůd.

4.2.2 Hodnocení změn látkových složek v průběhu dozrávání rajčat odrůdy Dagmar

Celkem bylo analyzováno 100 plodů v průběhu zrání rajčat. Plody byly odebírány v období 11. července až 15. září. Hlavním kritériem pro sběr plodů byly barevné parametry L^* , a^* , b^* a pevnost slupky. Při první sklizni byly otrhány zelené, nezralé plody, u kterých byla změřena pevnost slupky a barevné parametry. Nejvyšší naměřená hodnota byla 1,6 MPa. Ze všech deseti plodů pak vyšla průměrná hodnota 1,39 MPa. Nejnižší hodnota u parametru a^* (zelená - červená) byla -7,35. Při dalších odběrech se parametr a^* postupně zvyšoval, přes barvu růžovou až po úplně červené plody. Celkem bylo provedeno 10 odběrů. Průměrné hodnoty (tabulka 18) jsou vždy z 10 různých plodů.



Obrázek 52: Vývoj barevných změn v průběhu dozrávání plodů rajčat

Změna barvy byla jedním ze dvou kritérií správné sklizně plodů. Sklizeň začala, jakmile se na rostlině objevily první velké zelené plody a pokračovala v pravidelných týdenních intervalech do poloviny září, kdy už rostliny pomalu usychaly a plody tedy nemohly dál dozrávat. Parametr a^* se postupem času zvyšoval, tedy plody přecházely z barvy zelené na barvu červenou. Parametr b^* popisující změnu barvy z modré (-) do žluté (+) zůstal po celou dobu v kladných hodnotách a nijak zásadně se neměnil. Parametr L^* (jas) pohybující se v hodnotách 0 až 100 popisuje přechod z černé barvy (0) na bílou barvu (100) se rovněž po celou dobu zrání pohyboval ve vyšších kladných hodnotách, postupným tmavnutím plodů se snižoval (obrázek 52).

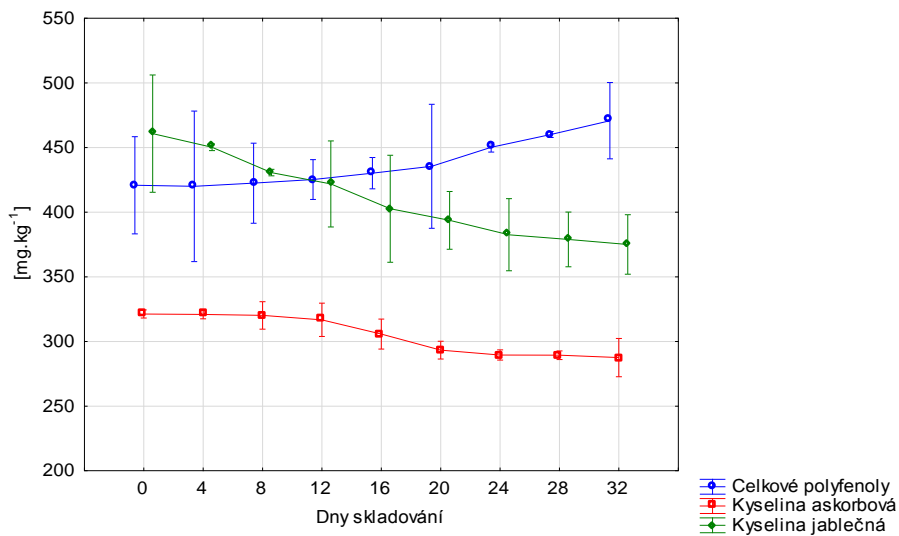
Tabulka 18: Změny látkového složení rajčat v průběhu zrání

Sklizeň	Polyfenoly [mg.kg ⁻¹]	Kyselina askorbová [mg.kg ⁻¹]	Rozpustná sušina [°Bx]	Kyselina citronová [g.kg ⁻¹]	Kyselina jablečná [mg.kg ⁻¹]	Titrovatelné kyseliny [%]	Pevnost slupky [MPa]
1.	310±20	160±21	4,3±0,07	4,9±0,12	650±40	0,44±0,008	1,39±0,04
2.	426±15	205±10	4,3±0,07	3,9±0,12	342±28	0,33±0,006	1,01±0,07
3.	605±11	257±15	4,4±0,05	3,5±0,25	311±22	0,30±0,007	0,86±0,03
4.	621±20	280±10	4,5±0,07	3,4±0,15	267±11	0,30±0,004	0,82±0,02
5.	628±15	289±11	4,7±0,07	3,3±0,11	234±13	0,29±0,009	0,76±0,03
6.	636±10	267±12	4,9±0,07	3,1±0,15	222±10	0,30±0,010	0,75±0,03
7.	630±15	272±12	5,2±0,06	3,0±0,12	210±15	0,29±0,013	0,70±0,02
8.	629±20	273±11	5,5±0,10	2,8±0,07	209±11	0,28±0,012	0,66±0,02
9.	700±16	375±15	5,7±0,07	2,8±0,01	210±13	0,28±0,012	0,53±0,02
10.	795±35	390±28	6,0±0,11	2,6±0,05	205±10	0,26±0,010	0,50±0,01

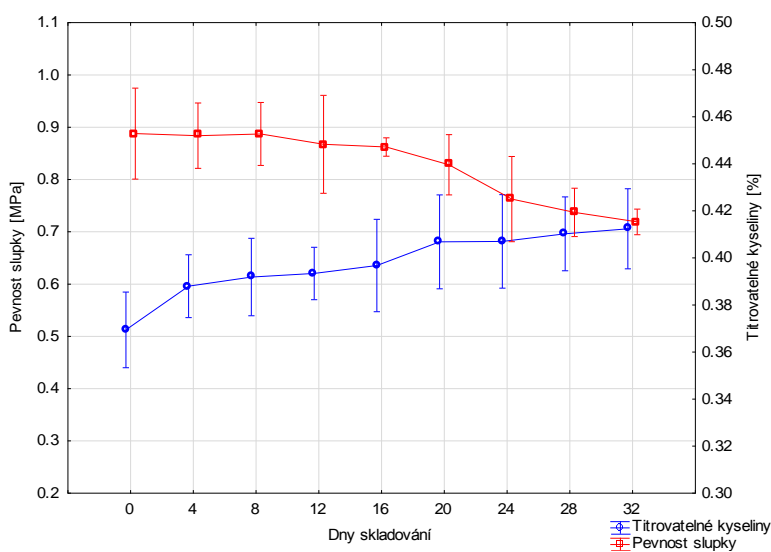
Jak lze vidět v tabulce 18, tak v průběhu zrání se obsah polyfenolů postupně zvyšoval. Nejnižší koncentrace byly naměřeny u nezralých, zelených plodů, nejvyšší koncentrace měly zralé plody. U dvou plodů při poslední sklizni byly naměřeny hodnoty kolem 900 mg.kg⁻¹, u zbylých 8 plodů odpovídaly hodnoty průměru. Stejný trend byl zaznamenán v případě kyseliny askorbové. Poměrně vysoký obsah kyseliny askorbové byl zjištěn u zelených, nezralých rajčat (160 mg.kg⁻¹). Už při druhé sklizni se u narůžovělých plodů obsah kyseliny askorbové zvýšil téměř o 50 mg kg⁻¹. Největší nárůst (o 100 mg kg⁻¹) nastal na přelomu srpna a září. Plody sklizené v září (9 a 10. sklizeň) obsahovaly téměř 400 mg.kg⁻¹ kyseliny askorbové. Obsah titrovatelných kyselin, ale i obsah kyseliny jablečné a citronové se v průběhu dozrávání snižoval. Nejvyšší obsah kyselin měly nezralé plody. Nejvíce zastoupenou kyselinou v plodech rajčat byla kyselina citronová, jejíž obsah byl 10x vyšší, než obsah kyseliny jablečné. Postupným zráním se zvýšil obsah rozpustné sušiny o necelé 2 °Bx. Pevnost slupky klesla na 1/3 původní hodnoty.

4.2.3 Hodnocení změn látkových složek v průběhu skladování rajčat odrůdy Dagmar

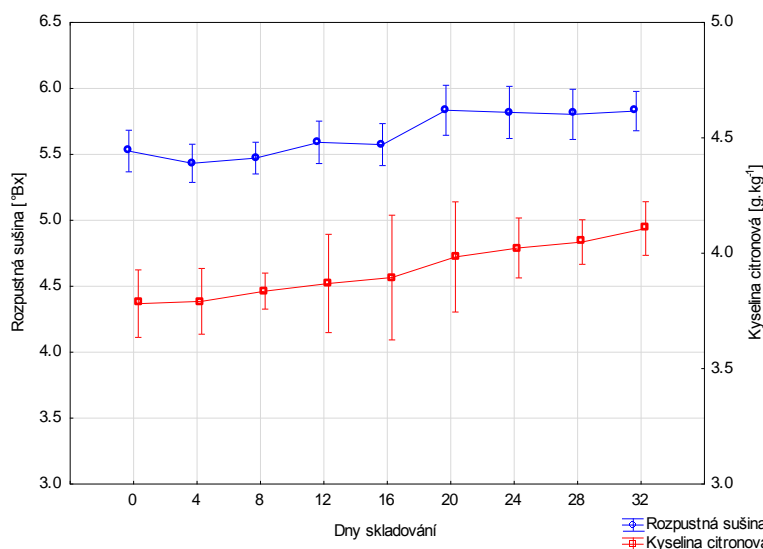
V roce 2012 bylo skladováno 25 plodů odrůdy Dagmar v chladárně při teplotě 4 °C v normální atmosféře po dobu 32 dnů a každé 4 dny byla měřena jejich spektra stejným způsobem a za stejných podmínek jako tomu bylo v průběhu zrání plodů. Vytvořenými kalibračními modely metodou NIR spektroskopie byl hodnocen obsah titrovatelných kyselin, rozpustné sušiny, polyfenolických látek, kyseliny jablečné, kyseliny citronové, kyseliny askorbové a pevnost slupky v průběhu skladování.



Obrázek 53: Změny v obsahu kyseliny askorbové, jablečné a celkových polyfenolů v průběhu skladování.



Obrázek 54: Změny v obsahu titrovatelných kyselin a změny v pevnosti slupky.



Obrázek 55: Změny v obsahu kyseliny citronové a rozpustné sušiny v průběhu skladování.

V průběhu skladování nedošlo k výrazným změnám v látkovém složení rajčat. Na počátku skladování obsahovaly plody 321 mg.kg⁻¹ kyseliny askorbové. Po celou dobu skladování se její obsah jen velmi nepatrně snižoval (obrázek 53). Po 32 dnech skladování plody obsahovaly 288 mg.kg⁻¹ kyseliny askorbové. V průběhu skladování plodů byl zaznamenán také pokles v obsahu kyseliny jablečné. Plody na počátku skladování obsahovaly 461 mg.kg⁻¹ kyseliny jablečné, po 32 dnech skladování její obsah klesl na hodnotu 375 mg.kg⁻¹ (obrázek 53). V průběhu skladování se snižovala i pevnost slupky. Plody ihned po sklizni měly pevnost téměř 0,9 MPa (obrázek 54), po měsíci skladování se pevnost snížila na hodnotu 0,72 MPa. V průběhu skladování se mírně zvyšoval obsah titrovatelných kyselin. Plody na počátku skladování obsahovaly 0,37 % kyselin, na konci skladování byl obsah 0,41 % (obrázek 54). Kyselina citronová se vyskytovala v plodech rajčat v desetinásobném množství oproti kyselině jablečné. Obsah kyseliny citronové se postupně zvyšoval z hodnoty 3,8 g.kg⁻¹ na počátku skladování, až na hodnotu 4,1 g.kg⁻¹ (obrázek 55), která byla naměřena po 32 dnech skladování. V průběhu skladování rajčat se také zvyšoval obsah celkových polyfenolů. Plody na počátku skladování obsahovaly 420 mg.kg⁻¹, na konci skladování byl obsah roven hodnotě 470 mg.kg⁻¹ (obrázek 53). Nepatrný nárůst byl zaznamenán i v obsahu rozpustné sušiny přibližně o 0,3 °Bx na hodnotu 5,8 °Bx (obrázek 55). V průběhu skladování nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v obsahu celkových polyfenolů a kyseliny citronové (tabulky 27 a 29 Přílohy). U titrovatelných kyselin byl statisticky významný rozdíl zjištěn mezi 0. dnem skladování a 28. a 32. dnem (tabulka 24 Přílohy).

U kyseliny askorbové nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v průběhu skladování mezi dny 0 až 16 stejně jako od 20. dne do konce skladování (tabulka 26 Přílohy). U kyseliny jablečné byly statisticky významné rozdíly mezi prvními 8 a posledními 8 dny skladování (tabulka 23 Přílohy).

FLORES et al., (2009) zkoumali možnost předpovědět vnitřní parametry kvality plodů rajčat (rozpustnou sušinu a titrovatelné kyseliny) metodou NIR spektroskopie. Ke kalibraci bylo použito 180 plodů. Vytvořený kalibrační model pro měření rozpustné sušiny měl korelační koeficient 0,79, chybu kalibrace 0,59 °Bx a chybu cross validace 0,68 °Bx. Kalibrační model pro měření titrovatelných kyselin měl korelační koeficient 0,56, chybu kalibrace 0,07 % a chybu cross validace 0,08 %. Vytvořený kalibrační model rozpustné sušiny pomocí odrůdy Dagmar měl korelační koeficient 0,84, ale chyby kalibrace a cross validace byly pouze 0,29 °Bx a 0,45 °Bx. Vytvořený kalibrační model titrovatelných kyselin pomocí odrůdy Dagmar měl korelační koeficient 0,88 a chyby kalibrace a cross validace byly pouze 0,025 % a 0,043 %.

SIRISOMBOON et al., (2012) rovněž vytvářeli kalibrační model rozpustné sušiny. Ke kalibraci bylo použito 68 plodů. Hodnoty rozpustné sušiny se pohybovaly v rozmezí 4,10 - 5,60 °Bx. Vytvořený kalibrační model pro měření rozpustné sušiny měl korelační koeficient 0,77 a chybu kalibrace 0,25 °Bx. Kalibrační graf vytvořený odrůdou Dagmar měl rozsah 4,0 - 6,1 °Bx.

TOOR, SAVAGE, (2006) provedli studii, jejímž cílem bylo sledovat změny v obsahu lykopenu, polyfenolů, antioxidantů a kyseliny askorbové u rajčat (odrůda Tradiro), sklizené ze skleníku v Canterbury na Novém Zélandu. Sklizené plody byly skladovány při 7, 15 a 25 ° C, po dobu 10 dnů. Fenolické látky a obsah kyseliny askorbové v plodech rajčat vykazovaly mírný nárůst v průběhu skladování, bez ohledu na teplotu. Rovněž u odrůdy Dagmar byl zjištěn v průběhu skladování mírný nárůst obsahu polyfenolů, obsah kyseliny askorbové se v průběhu 10 dnů výrazně neměnil.

OMS – OLIU et al., (2011) sledovali změny základních látkových složek rajčat v průběhu dozrávání a skladování. Plody byly sklizeny v různých růstových fázích a zralosti (malé zelené, velké zelené, světle oranžové, oranžové, růžové a červené). Ke skladování byly sklizeny zralé červené plody, které byly uloženy při teplotě 18 °C po dobu 0, 1, 4, 7 a 10 dnů. V průběhu skladování obsah kyseliny citronové dosáhl hodnoty 4,5 g.kg⁻¹.

U odrůdy Dagmar se obsah kyseliny citronové po celou dobu skladování zvyšoval až na hodnotu 4,1 g.kg⁻¹. Obsah kyseliny jablečné klesal až do konce skladování na výslednou

hodnotu 300 mg.kg^{-1} . U odrůdy Dagmar se obsah kyseliny jablečné po celou dobu skladování snižoval. Na konci skladování byly naměřeny hodnoty kolem 370 mg.kg^{-1} . V průběhu zrání se obsah kyseliny askorbové téměř zdvojnásobil, v průběhu skladování se její obsah snižoval. Stejný průběh byl zaznamenán i u odrůdy Dagmar.

CLÉMENT et al., (2008) se zaměřili na vytvoření kalibračních modelů rozpustné sušiny, titrovatelných kyselin a pevnosti plodů rajčat. Ke kalibraci bylo použito 96 plodů v různých stupních zralosti, které byly získány z obchodní sítě, ze skleníku a přímo od pěstitelů. Plody byly nejprve změřeny pomocí NIR spektrometru a ihned potom u nich byly provedeny analýzy, jejichž výsledky sloužily jako kalibrační data. Rozpustná sušina u zkoumaných plodů byla v rozmezí $3,50 - 5,60 \text{ }^\circ\text{Bx}$ a chyba cross validace byla $0,308 \text{ }^\circ\text{Bx}$. Obsah titrovatelných kyselin byl v rozmezí $0,24 - 0,66 \%$. Vytvořený kalibrační model měl chybu cross validace $0,070 \%$. U odrůdy Dagmar byla rozpustná sušina v rozmezí $4,0 - 6,1 \text{ }^\circ\text{Bx}$ a titrovatelné kyseliny $0,25 - 0,48 \%$.

VERMEIR et al., (2009) se své práci vytvářeli kalibrační modely pro zjišťování obsahu kyseliny citronové a jablečné v plodech rajčat. K pokusu bylo v roce 2006 zvoleno 6 odrůd (vždy 10 plodů), které byly vybrány na základě rozdílné chuti, která je dána především rozdílným obsahem cukrů a kyselin. Ke kalibraci bylo použito 40 plodů a k ověření přesnosti kalibračních modelů 20 plodů. Dle autorů nebyl kalibrační model kyseliny jablečné přesný z důvodu nízkých koncentrací této látky v plodech. Obsah kyseliny citronové byl v rozmezí $2870 - 5420 \text{ mg.kg}^{-1}$. Vytvořený kalibrační model kyseliny citronové měl korelační koeficient $0,96$, chybu kalibrace 350 mg.kg^{-1} a chybu cross validace 410 mg.kg^{-1} . Vytvořený kalibrační model kyseliny citronové odrůdou Dagmar měl rozsah $1200 - 5900 \text{ mg.kg}^{-1}$, korelační koeficient $0,98$, chybu kalibrace 301 mg.kg^{-1} a chybu cross validace 790 mg.kg^{-1} .

WILKERSON et al., (2013) se zabývali hodnocením titrovatelných kyselin, rozpustné sušiny a kyseliny citronové u rajčatové šťávy. Ze sklizených plodů (5 odrůd) byl okamžitě připraven 100% rajčatový džus, který byl nejprve proměřen na NIR spektrometru a ihned potom u něj byly stanoveny základní analytické parametry, ze kterých byly vytvořeny kalibrační modely. Hodnoty rozpustné sušiny se pohybovaly v rozmezí $4,2 - 6,7 \text{ }^\circ\text{Bx}$. Vytvořený kalibrační model měl korelační koeficient $0,96$ a chybu cross validace $0,2 \text{ }^\circ\text{Bx}$. Hodnoty titrovatelných kyselin byly v rozmezí $0,15 - 0,35 \%$. Vytvořený kalibrační model měl korelační koeficient $0,92$ a chybu cross validace $0,014 \%$. Obsah kyseliny citronové

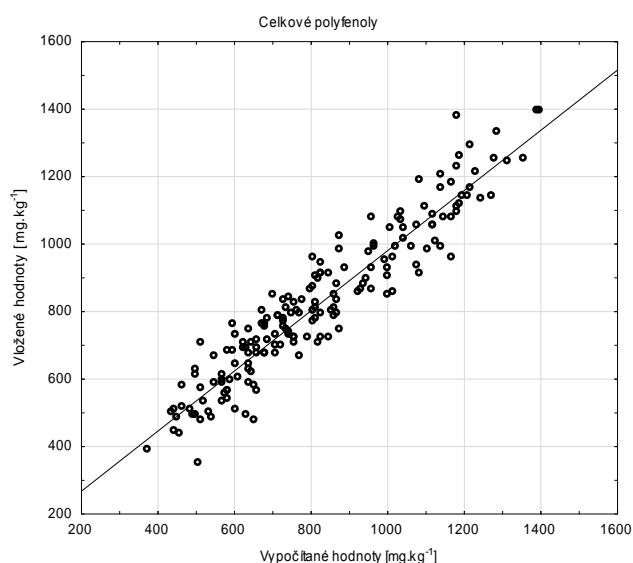
byl v rozmezí 1290 - 3860 mg.kg⁻¹. Vytvořený kalibrační model měl korelační koeficient 0,88.

CHEN, (2008) sledoval změny obsahu titrovatelných kyselin a rozpustné sušiny v průběhu zrání rajčat. 60 plodů bylo použito k vytvoření kalibračních modelů a 24 plodů sloužilo k ověření přesnosti. Rozpustná sušina se pohybovala v rozmezí 4,10 - 5,30 °Bx. Vytvořený kalibrační model měl korelační koeficient roven hodnotě 0,84, chybu kalibrace 0,12 °Bx a chybu cross validace 0,17 °Bx. V průběhu zrání (17 monitorovaných dnů) se obsah rozpustné sušiny postupně zvyšoval, nejvyšších hodnot bylo dosaženo po 8 dnech, v dalších dnech docházelo k pozvolnému poklesu. Obsah titrovatelných kyselin byl v rozmezí 0,32 - 0,59 %. Vytvořený kalibrační model měl korelační koeficient roven hodnotě 0,80, chybu kalibrace 0,025 % a chybu cross validace 0,031 %. V průběhu zrání se obsah titrovatelných kyselin neustále snižoval a to z 0,5 % až na hodnotu 0,35 %. U odrůdy Dagmar se v průběhu zrání obsah kyselin snižoval z 0,44 na 0,26 %.

4.3 Jablka

4.3.1 Kalibrační grafy jablek

Kalibrace je složena ze 138 plodů odrůdy Rubinola analyzovaných v průběhu zrání, 25 plodů odrůdy Desert a 25 plodů odrůdy Idared analyzovaných po 3 měsících skladování. Kalibrační modely kyseliny jablečné a titrovatelných kyselin obsahují 250 standardů. Takto vytvořenými kalibracemi byly hodnoceny skladované plody. Při ověření přesnosti kalibrace byly použity odrůdy Rubinola (1 - 5) a Topaz (6 - 10) viz tabulka 19.



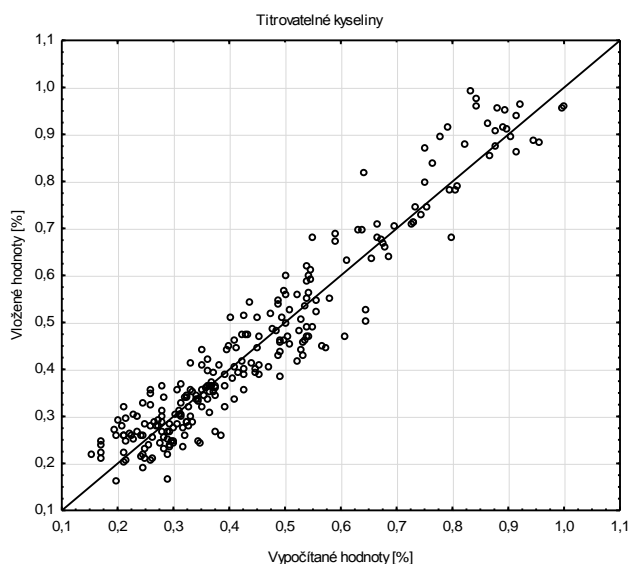
Vytvořený kalibrační model s rozsahem 350 – 1400 mg.kg⁻¹ obsahu celkových polyfenolů má chybu kalibrace 90 mg.kg⁻¹, chybu cross validace 110 mg.kg⁻¹ a chybu predikce 105 mg.kg⁻¹. Korelační koeficient je roven hodnotě 0,94. Data byla analyzována v původní formě naměřených spekter.

Obrázek 56: Kalibrační graf celkových polyfenolů

Tabulka 19: Ověření přesnosti kalibrace celkových polyfenolů

Číslo vzorku	Polyfenoly [mg.kg ⁻¹]	Polyfenoly NIR [mg.kg ⁻¹]	Rozdíl mezi metodami
1	502 ±20	600	98
2	729 ±11	630	99
3	822±5,0	935	113
4	820±12	710	90
5	938±6,0	894	44
6	829±10	928	99
7	1248±16	1072	170
8	860±10	764	96
9	719±25	620	99
10	820±7,0	730	90

Stejně jako v případě rajčat a broskví, tak i u jablek byla chyba cross validace celkových polyfenolů kolem 100 mg.kg^{-1} , i když je v kalibraci obsaženo 188 vzorků (obrázek 56). Velikost této chyby se odrazila i při ověřování přesnosti modelu (tabulka 19). Rozšíření kalibrace zcela jistě může vést ke zlepšení přesnosti, ale díky nízké koncentraci tohoto analytu ve vzorku, se chyba cross validace příliš nesníží.



Vytvořený kalibrační model s rozsahem 0,15 – 0,99 % obsahu titrovatelných kyselin má chybu kalibrace 0,037 %, chybu cross validace 0,06 % a chybu predikce 0,06%.

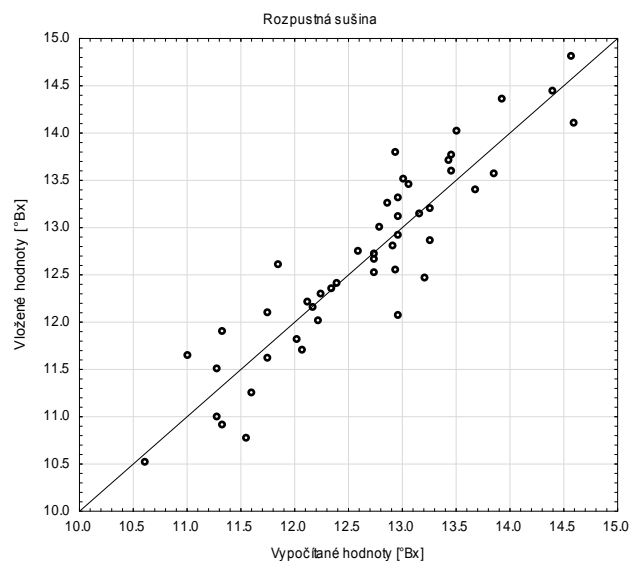
Data byla analyzována v původní formě naměřených spekter. Korelační koeficient je roven hodnotě 0,96.

Obrázek 57: Kalibrační graf titrovatelných kyselin

Tabulka 20: Ověření přesnosti kalibrace titrovatelných kyselin

Číslo vzorku	Obsah kyselin [%]	Obsah kyselin NIR [%]	Rozdíl mezi metodami
1	0,33 ±0,022	0,39	0,06
2	0,45 ±0,014	0,44	0,01
3	0,33±0,015	0,36	0,03
4	0,41±0,012	0,36	0,05
5	0,33±0,030	0,31	0,02
6	0,52±0,080	0,55	0,03
7	0,46±0,024	0,50	0,04
8	0,33±0,026	0,31	0,02
9	0,74±0,050	0,70	0,04
10	0,32±0,019	0,30	0,02

Dle tabulky 20 lze tento kalibrační model používat při hodnocení obsahu kyselin u jablek různých odrůd. Díky velkému počtu standardů, má model široké koncentrační rozpětí.



Vytvořený kalibrační model s rozsahem 10,5 – 14,6 °Bx obsahu rozpustné sušiny má chybu kalibrace 0,39 °Bx, chybu cross validace 0,50 °Bx a chybu predikce 0,50 °Bx.

Data byla analyzována v původní formě naměřených spekter. Při stanovování rozpustné sušiny se u více plodů vyskytovaly podobné hodnoty.

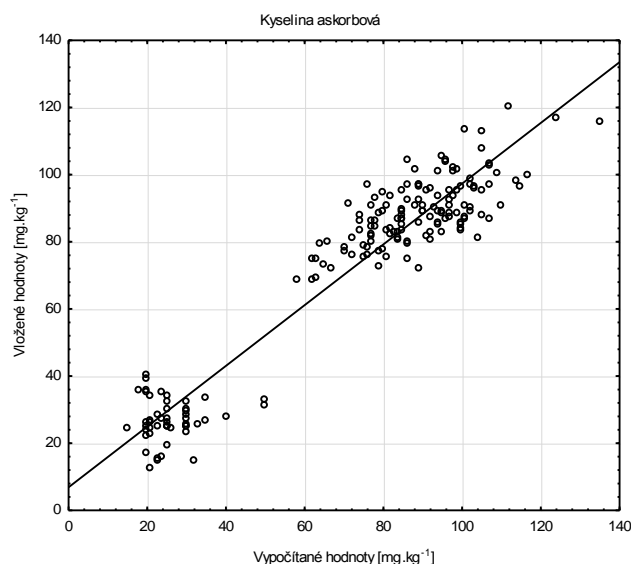
Obrázek 58: Kalibrační graf rozpustné sušiny

Pomocí funkce merge like standard byly kalibrační standardy převedeny na menší počet kompozitních standardů a výsledkem je zjednodušený kalibrační model s hodnotou korelačního koeficientu 0,92.

Tabulka 21: Ověření přesnosti kalibrace rozpustné sušiny

Číslo vzorku	Rozpustná sušina [°Bx]	Rozpustná sušina NIR [°Bx]	Rozdíl mezi metodami
1	12,7 ± 0,10	12,9	0,2
2	13,0 ± 0,08	11,4	0,2
3	12,5 ± 0,01	13,0	0,5
4	11,9 ± 0,12	11,6	0,3
5	11,8 ± 0,14	12,1	0,3
6	14,4 ± 0,11	14,1	0,3
7	12,7 ± 0,06	12,3	0,4
8	12,5 ± 0,16	12,1	0,4
9	12,2 ± 0,05	12,3	0,1
10	12,9 ± 0,08	12,4	0,5

Při srovnávání přesnosti metod u rozpustné sušiny (tabulka 21), bylo zjištěno, že vytvořený kalibrační model je velmi přesný, protože hodnoty naměřené metodou NIR a pomocí refraktometru se téměř nelišily. Pouze u dvou vzorků byl rozdíl mezi metodami roven chybě cross validace.



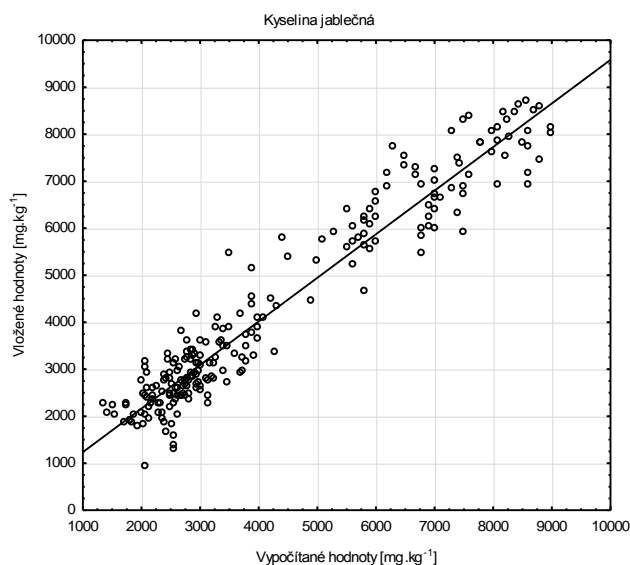
Vytvořený kalibrační model s rozsahem 12 - 120 mg.kg⁻¹ obsahu kyseliny askorbové má chybu kalibrace 9 mg.kg⁻¹, chybu cross validace a predikce 12 mg.kg⁻¹. Data byla analyzována v původní formě naměřených spekter. Korelační koeficient je roven hodnotě 0,95.

Obrázek 59: Kalibrační graf kyseliny askorbové

Tabulka 22: Ověření přesnosti kalibrace kyseliny askorbové

Číslo vzorku	Kyselina askorbová [mg.kg ⁻¹]	Kyselina askorbová NIR [mg.kg ⁻¹]	Rozdíl mezi metodami
1	124 ±2,0	113	11
2	78 ±3,0	74	4
3	65±6,0	73	12
4	86±5,0	91	5
5	110±9,0	103	7
6	88±5,0	110	12
7	94±3,0	82	12
8	86±7,0	95	9
9	96±4,0	101	5
10	100±6,0	88	12

Jablka mívají nízký obsah kyseliny askorbové. Vytvořený kalibrační model (obrázek 59) obsahuje poměrně široké koncentrační rozpětí této látky, proto u kontrolních vzorků byly rozdíly minimální (tabulka 22) a kalibrační model lze používat při měření různých plodů.



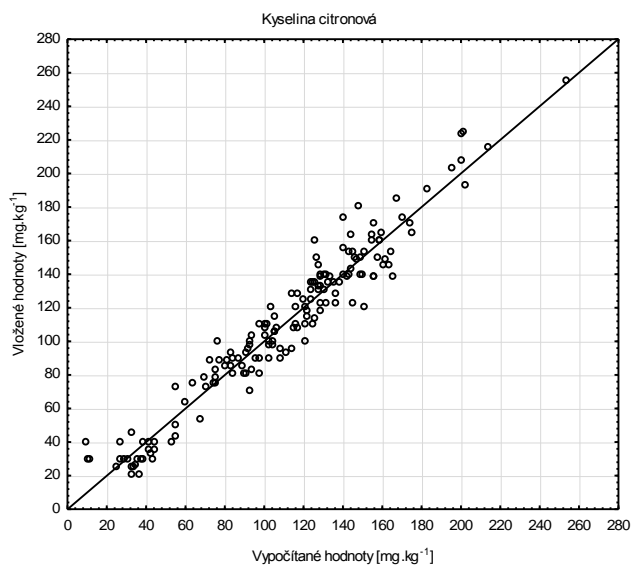
Vytvořený kalibrační model s rozsahem 1000 – 8900 mg.kg⁻¹ obsahu kyseliny jablečné má chybu kalibrace 588 mg.kg⁻¹, chybu cross validace 870 mg.kg⁻¹ a chybu predikce 800 mg.kg⁻¹. Data byla analyzována v původní formě naměřených spekter. Korelační koeficient je roven hodnotě 0,96.

Obrázek 60: Kalibrační graf kyseliny jablečné

Tabulka 23: Ověření přesnosti kalibrace kyseliny jablečné

Číslo vzorku	Kyselina jablečná [mg.kg ⁻¹]	Kyselina jablečná NIR [mg.kg ⁻¹]	Rozdíl mezi metodami
1	6200 ±50	6600	400
2	5700±48	6400	700
3	6700±10	7100	400
4	2600±75	2050	550
5	4050±47	3500	550
6	4800±20	4500	300
7	3600±30	4200	600
8	3600±26	3100	500
9	4000±15	3500	500
10	3800±26	3000	800

Kalibrační model kyseliny jablečné obsahuje 250 kalibračních standardů různých odrůd a tím má také velmi široké koncentrační rozpětí (obrázek 60). U všech 10 kontrolních vzorků byl mezi metodou NIR a HPLC průměrný rozdíl 500 mg.kg⁻¹ (tabulka 23).



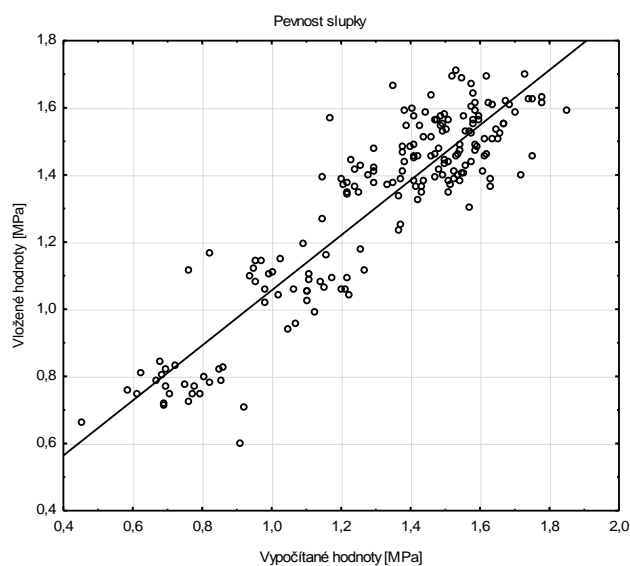
Vytvořený kalibrační model s rozsahem 20 – 254 mg.kg⁻¹ obsahu kyseliny citronové má chybu kalibrace 12 mg.kg⁻¹, chybu cross validace 31 mg.kg⁻¹ a chybu predikce 41 mg.kg⁻¹. Spektrum bylo derivováno (1. derivace), čímž došlo ke zvýraznění pásů. Korelační koeficient je roven hodnotě 0,97.

Obrázek 61: Kalibrační graf kyseliny citronové

Tabulka 24: Ověření přesnosti kalibrace kyseliny citronové

Číslo vzorku	Kyselina citronová [mg.kg ⁻¹]	Kyselina citronová NIR [mg.kg ⁻¹]	Rozdíl mezi metodami
1	100 ±4,0	123	23
2	103±2,0	124	21
3	60±6,0	90	30
4	60±1,0	87	27
5	150±3,7	84	66
6	88±3,0	119	31
7	68±1,0	95	27
8	93±3,0	141	48
9	50±4,0	95	45
10	88±1,5	130	42

Kyselina citronová se vyskytovala převážně v koncentracích 80 - 160 mg.kg⁻¹ (obrázek 61). Chyba predikce je vyšší než chyba cross validace, proto model není dostatečně robustní. Po převedení kalibračních standardů na validační měl model korelační koeficient roven hodnotě 0,0048. I přes velký počet vzorků v kalibraci nelze tento model používat pro stanovení kyseliny citronové.



Vytvořený kalibrační model s rozsahem 0,6 – 1,70 MPa pevnosti slupky má chybu kalibrace 0,13 MPa, chybu cross validace a predikce 0,14 MPa.

Data byla analyzována v původní formě naměřených spekter.

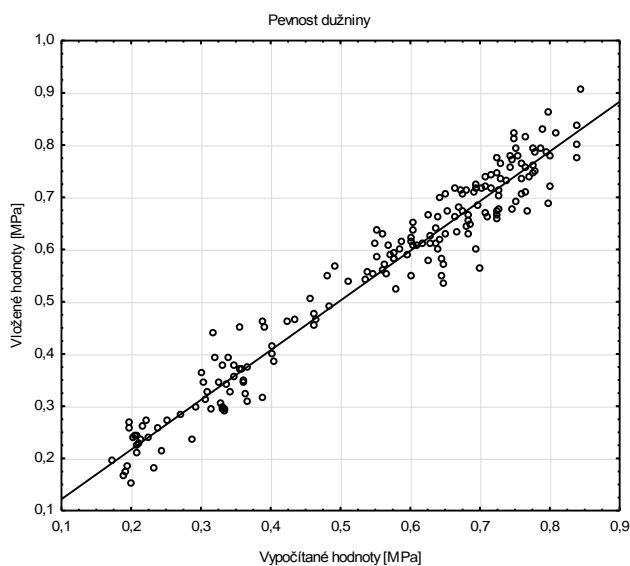
Korelační koeficient je roven hodnotě 0,90.

Obrázek 62: Kalibrační graf pevnosti slupky u plodů jablek.

Tabulka 25: Ověření přesnosti kalibrace pevnosti slupky

Číslo vzorku	Pevnost slupky [MPa]	Pevnost slupky NIR [MPa]	Rozdíl mezi metodami
1	1,52 ±0,05	1,67	0,15
2	1,50 ±0,03	1,52	0,02
3	0,99±0,01	1,09	0,10
4	1,07±0,02	0,94	0,13
5	1,07±0,04	1,03	0,04
6	1,18±0,008	1,30	0,12
7	0,80±0,06	0,90	0,10
8	0,98±0,02	1,16	0,18
9	1,32±0,01	1,40	0,08
10	1,72±0,02	1,40	0,32

Stejně jako v případě rajčat je vytvořený kalibrační model pevnosti slupky přesný (obrázek 62) a lze jej používat při měření různých odrůd. Jen u velmi tvrdého plodu (1,72 MPa) byl při ověřování přesnosti kalibračního modelu zjištěn větší rozdíl, protože naměřená hodnota již byla mimo kalibraci (tabulka 25).



Vytvořený kalibrační model s rozsahem 0,15 – 0,90 MPa pevnosti dužniny má chybu kalibrace 0,04 MPa, chybu cross validace 0,07 MPa a chybu predikce 0,06 MPa. Spektrum bylo derivováno (1. derivace). Korelační koeficient je roven hodnotě 0,98.









Obrázek 63 Kalibrační graf pevnosti dužniny u plodů jablek.

Tabulka 26: Ověření přesnosti kalibrace pevnosti dužniny

Číslo vzorku	Pevnost dužniny [MPa]	Pevnost dužniny NIR [MPa]	Rozdíl mezi metodami
1	0,77±0,03	0,73	0,04
2	0,73 ±0,04	0,79	0,06
3	0,69±0,01	0,76	0,07
4	0,73±0,03	0,60	0,13
5	0,53±0,02	0,54	0,01
6	0,50±0,02	0,50	0,00
7	0,36±0,02	0,32	0,04
8	0,46±0,01	0,48	0,02
9	0,43±0,03	0,41	0,02
10	0,52±0,05	0,48	0,04

Pevnost dužniny je rovněž parametrem, který lze velmi přesně měřit metodou NIR spektroskopie. Rozdíly mezi penetrometrickým měřením a metodou NIR byly minimální (tabulka 26) a tento model lze využívat při měření různých odrůd jablek.

Tabulka 27: Souhrnná tabulka kalibračních standardů

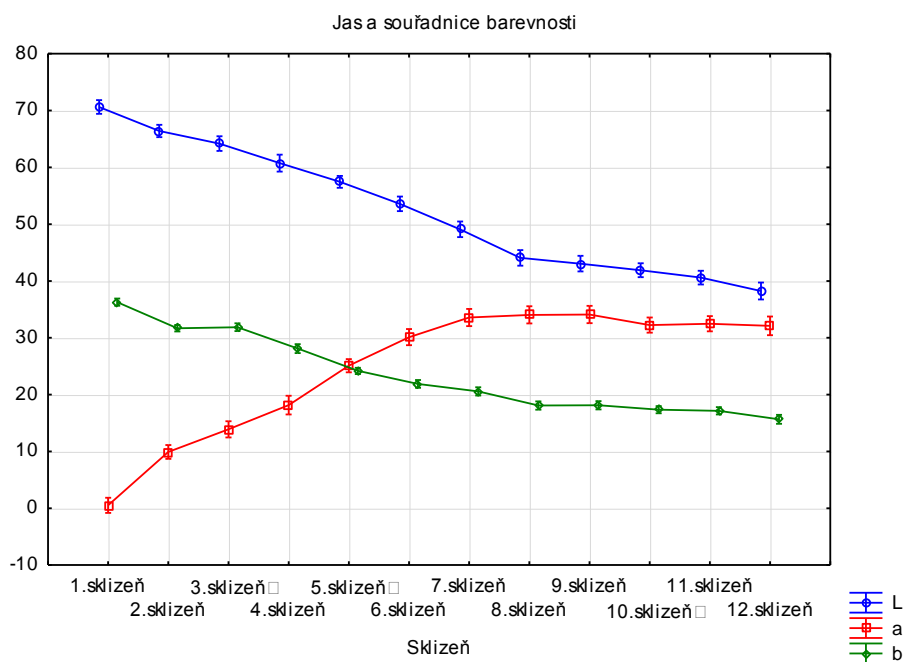
Parametr	n	ignoro- vané	min. konc.	max. konc.	počet faktorů	Derivace	PRES S	RMS EC	RMSE CV	R
Kyselina askorbová [mg.kg ⁻¹]	188	3	12	120	13	Spektrum		9,0	12	0,95
Celkové polyfenoly [mg.kg ⁻¹]	188	4	350	1400	16	Spektrum		90	110	0,94
Titrovatelné kyseliny [%]	250	11	0,15	0,99	16	Spektrum		0,037	0,060	0,96
Rozpustná sušina [°Bx]	188	0	10,5	14,6	7	Spektrum		0,39	0,50	0,92
Kyselina jablečná [mg.kg ⁻¹]	250	10	1000	8900	13	Spektrum		588	870	0,96
Pevnost slupky [MPa]	188	2	0,6	1,7	9	Spektrum		0,13	0,14	0,90
Pevnost dužniny [MPa]	188	2	0,15	0,90	8	První derivace		0,04	0,07	0,98
Kyselina citronová [mg.kg ⁻¹]	188	5	20	254	10	První derivace		12	31	0,97

V tabulce 27 jsou detailní charakteristiky kalibračního modelu vytvořeného pomocí odrůd Rubinola, Idared a Desert.

Vytvořené kalibrační modely obsahovaly ze všech tří sledovaných komodit nejvíce kalibračních standardů i přesto kalibrační model kyseliny citronové nelze pro měření využít, protože není dostatečně robustní. Nejpravděpodobnější příčinou jsou velmi nízké koncentrace kyseliny citronové v plodech jablek. Vyšší počet kalibračních standardů nesnížil chybu cross validace modelu celkových polyfenolů, která je podobná jako v případě rajčat a broskví. Polyfenoly rovněž patří mezi minoritní látky a při použití tohoto modelu je třeba počítat s danou chybou. I když se kyselina askorbová vyskytovala v nižších koncentracích než kyselina citronová, vytvořený model je robustní a lze jej při měření neznámých plodů využívat. Ověření přesnosti kalibračních modelů ukázalo, že také modely titrovatelných kyselin, rozpustné sušiny, pevnosti slupky a dužniny lze využívat při měření neznámých vzorků.

4.3.2 Hodnocení změn látkových složek v průběhu dozrávání jablek odrůdy Rubinola

Plody byly odebírány v období 16. srpna až 16. listopadu v roce 2011 v týdenních intervalech. Hlavním kritériem termínu sklizně byl obsah škrobu, který byl zjišťován Lugolovým roztokem. Nezralé plody po namočení do Lugolova roztoku po celé řezné ploše zmodraly. Dalšími odběry se intenzita modré barvy snižovala, protože docházelo k odbourávání škrobu. U posledních dvou sklizní nedošlo ke změně barvy na řezné ploše a škrob byl tedy odbourán. Při sklizni byly hodnoceny také pevnost slupky, pevnost dužniny a barevné parametry L^* , a^* , b^* .



Obrázek 64: Vývoj barevných změn v průběhu dozrávání plodů jablek

Změna barvy byla jedním z kritérií správného odběru plodů. Sklizeň začala nezralými plody. Plody odrůdy Rubinola měly na počátku sklizně červeno - zelenou barvu. V průběhu zrání se plocha červené barvy postupně zvyšovala. Parametr a^* se tedy postupem času zvyšoval. Parametr b^* popisující změnu barvy z modré (-) do žluté (+) postupně klesal. Parametr L^* (jas) pohybující se v hodnotách 0 až 100 popisuje přechod z černé barvy (0) na bílou barvu (100) se po celou dobu zrání pohyboval ve vyšších kladných hodnotách, postupným tmavnutím plodů se snižoval (obrázek 64).

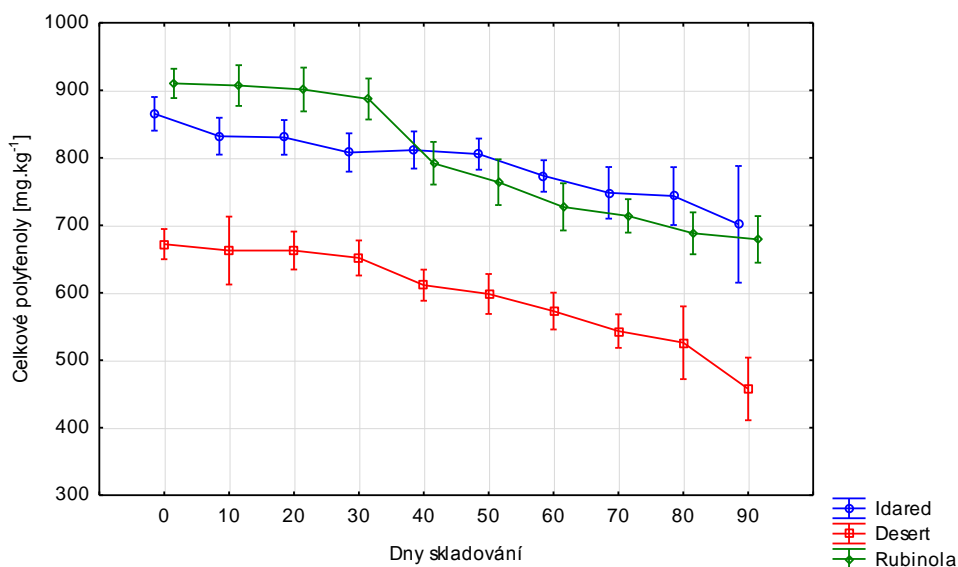
Tabulka 28: Změny látkového složení jablek v průběhu zrání

Sklizeň	Polyfenoly [mg.kg ⁻¹]	Kyselina askorbová [mg.kg ⁻¹]	Rozpustná sušina [°Bx]	Kyselina citronová [mg.kg ⁻¹]	Kyselina jablečná [g.kg ⁻¹]	Titrovatelné kyseliny [%]	Pevnost slupky [MPa]
1.	1207±33	77±4,4	11,8±0,32	160±7,7	3,1±0,05	0,49±0,016	1,62±0,03
2.	1204±31	78±1,3	12,1±0,21	150±12	3,0±0,25	0,45±0,015	1,58±0,03
3.	1171±39	80±4,5	12,2±0,24	138±1,5	2,8±0,15	0,45±0,015	1,55±0,03
4.	1053±23	80±4,5	12,4±0,15	136±6,2	2,8±0,09	0,43±0,022	1,49±0,03
5.	943±41	83±1,1	12,5±0,19	134±3,4	2,7±0,08	0,38±0,013	1,43±0,05
6.	914±34	85±3,2	12,7±0,16	133±3,4	2,7±0,06	0,40±0,016	1,36±0,02
7.	828±44	87±2,7	12,7±0,18	135±6,2	2,5±0,08	0,36±0,013	1,30±0,03
8.	724±27	95±2,1	13,0±0,11	125±5,1	2,3±0,18	0,30±0,011	1,23±0,01
9.	688±20	97±1,6	13,0±0,11	120±9,5	2,1±0,15	0,30±0,011	1,17±0,02
10.	677±42	98±7,1	13,3±0,10	120±9,5	1,9±0,06	0,27±0,011	1,10±0,04
11.	659±13	100±4,4	13,5±0,18	117±5,6	1,8±0,05	0,27±0,008	1,06±0,02
12.	657±15	101±1,5	13,7±0,20	118±8,5	1,7±0,04	0,26±0,018	1,04±0,02

Jak lze vidět v tabulce 28, v průběhu zrání plodů (16.8 – 16.11) odrůdy Rubinola se obsah celkových polyfenolů postupně snižoval. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u nezralých plodů v průběhu měsíce srpna. Za 3 měsíce se obsah polyfenolů snížil téměř na polovinu původního obsahu. Obsah kyseliny askorbové se oproti polyfenolům mírně zvyšoval. Nejvyšší obsah měly plody v posledních dvou sklizňových termínech. V tomto období byla naměřena u jednoho plodu hodnota 123 mg.kg⁻¹. Obsah titrovatelných kyselin se také v průběhu zrání plodů postupně snižoval, stejně jako obsah kyseliny jablečné, která je převažující kyselinou. Obsah titrovatelných kyselin se snížil o polovinu. Ve velmi nízkých koncentracích se oproti kyselině jablečné vyskytovala kyselina citronová. Nejvyšší hodnota byla naměřena při první sklizni 210 mg.kg⁻¹, průměrná hodnota z 10 plodů pak byla 160 mg.kg⁻¹. Při posledních sklizňových termínech byly u některých plodů naměřeny koncentrace pod 100 mg.kg⁻¹. V průběhu zrání plodů došlo k poklesu pevnosti slupky i dužniny. Nejtvrdší jablko mělo pevnost slupky 1,78 MPa a pevnost dužniny 0,85 MPa. U plodů sklizených 16. srpna byla průměrná pevnost dužniny 0,77 MPa, u plodů sklizených 16. listopadu jenom 0,36 MPa. Tyto plody měly tedy dužninu o polovinu měkčí než na začátku sklizně. Obsah rozpustné sušiny se zvýšil o 2 °Bx.

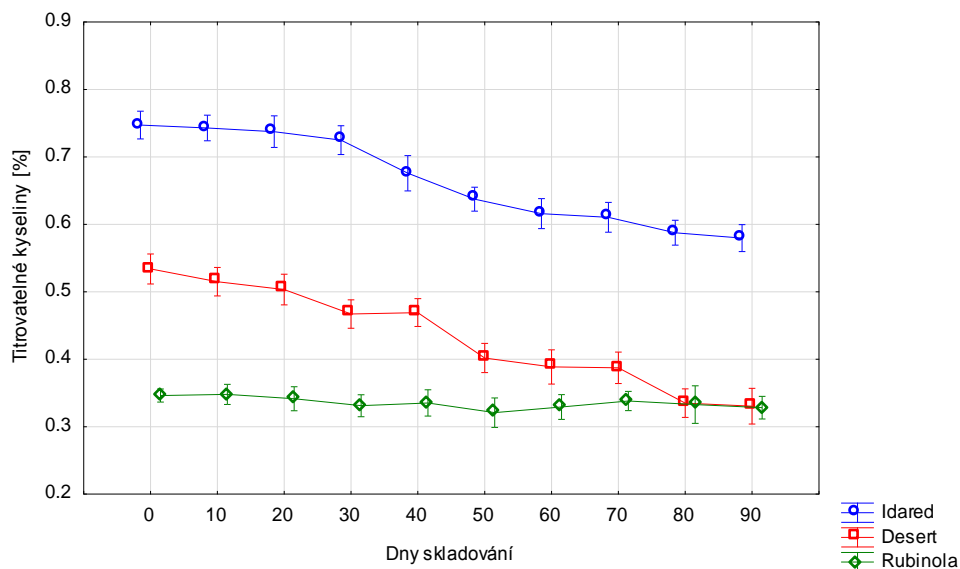
4.3.3 Hodnocení změn látkových složek jablek v průběhu skladování u odrůd Idared, Desert a Rubinola

V roce 2013 bylo skladováno 25 plodů odrůdy Idared, 25 plodů odrůdy Desert a 25 plodů odrůdy Rubinola v chladárně při teplotě 4 °C v normální atmosféře. Plody byly skladovány 90 dnů a každých 10 dnů byla měřena jejich spektra stejným způsobem (NIR spektroskopie) a za stejných podmínek (teplota) jako tomu bylo v průběhu zrání plodů. Vytvořenými kalibračními modely byl následně hodnocen obsah titrovatelných kyselin, rozpustné sušiny, polyfenolických látek, kyseliny jablečné, askorbové, pevnost slupky a dužniny. Kyselina citronová nebyla vyhodnocena z důvodu nepřesného kalibračního modelu.



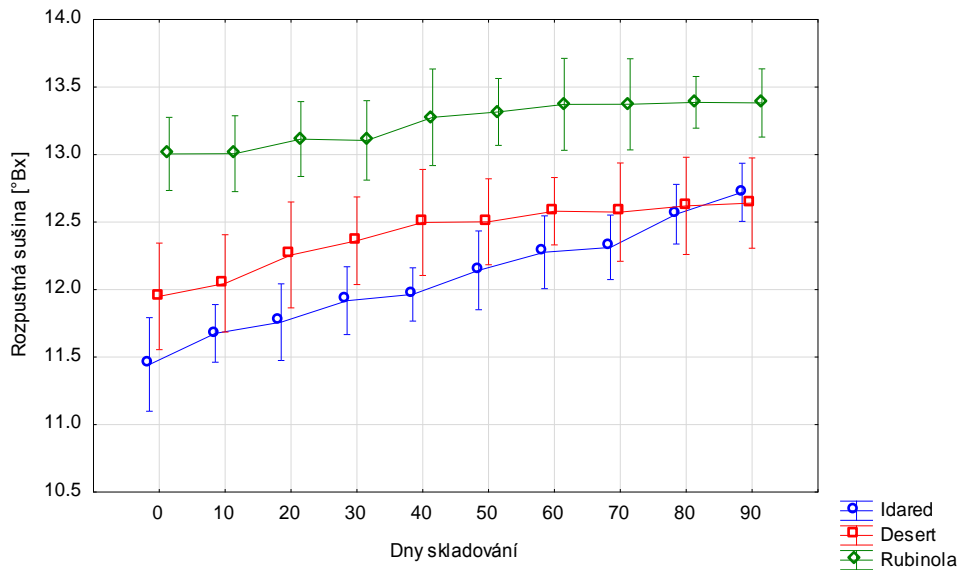
Obrázek 65: Změny v celkovém obsahu polyfenolických látek u odrůd Rubinola, Idared a Desert v průběhu skladování.

U všech tří odrůd bylo nejvyšší množství polyfenolů naměřeno ihned po sklizni (obrázek 65). U odrůdy Rubinola a Idared byl obsah podobný (kolem 900 mg.kg⁻¹). V průběhu skladování byly hodnoty i průběh změn obsahu polyfenolů velmi podobné. Po 90 dnech skladování byl obsah polyfenolů u obou odrůd téměř shodný (700 mg.kg⁻¹). Odrůda Desert měla na počátku nižší obsah polyfenolů (670 mg.kg⁻¹), po 90 dnech skladování se tento obsah snížil až na hodnotu 450 mg.kg⁻¹. U odrůdy Rubinola jsou statisticky významné rozdíly v obsahu polyfenolů mezi prvními 30 dny a posledními 30 dny skladování (tabulka 60 Přílohy). U odrůdy Desert je to mezi dny 0 až 60 a 80 až 90 (tabulka 53 Přílohy) a u odrůdy Idared jsou statisticky významné rozdíly mezi dny 0 až 50 a 60 až 90 (tabulka 46 Přílohy).



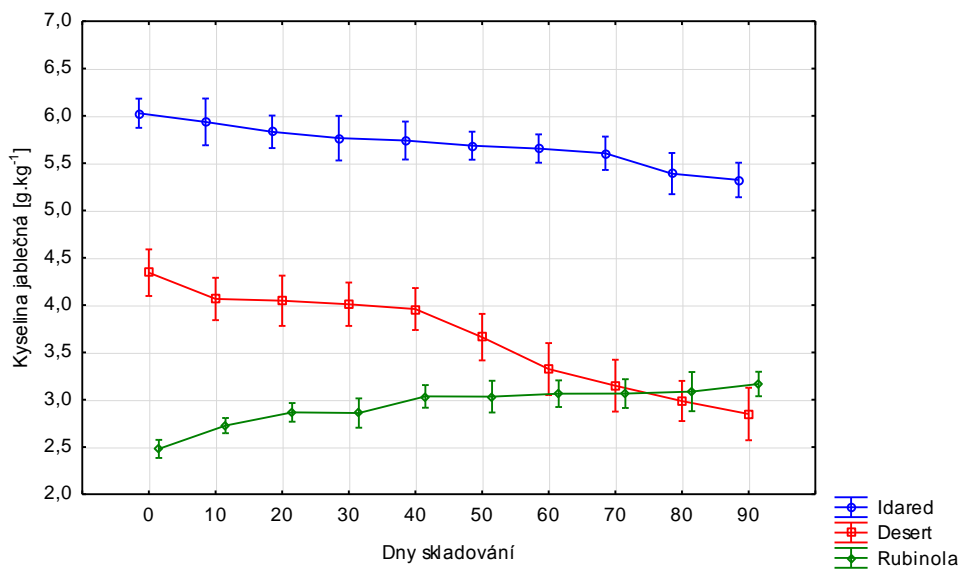
Obrázek 66: Změny v celkovém obsahu titrovatelných kyselin u odrůd Rubinola, Idared a Desert v průběhu skladování.

V průběhu skladování se obsah kyselin u odrůd Idared a Desert postupně snižoval (obrázek 66). Nejvyšší obsah kyselin měla po celou dobu skladování odrůda Idared, kdy plody na počátku skladování obsahovaly 0,75 % kyselin. Na konci skladování byl obsah kyselin 0,59 %. Plody odrůdy Desert obsahovaly na počátku skladování 0,53 % kyselin, po 90 dnech skladování se jejich obsah snížil na hodnotu shodnou s odrůdou Rubinola (0,33 %), která měla dvojnásobně nižší obsah kyselin oproti odrůdě Idared. Statisticky významné rozdíly v obsahu kyselin u odrůdy Idared jsou mezi dny 0 až 30 a 60 až 90 (tabulka 41 Přílohy). U odrůdy Desert je to mezi dny 0 až 20, 50 až 70 a 80 až 90 (tabulka 48 Přílohy). U odrůdy Rubinola nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v obsahu kyselin v průběhu skladování (tabulka 55 Přílohy).



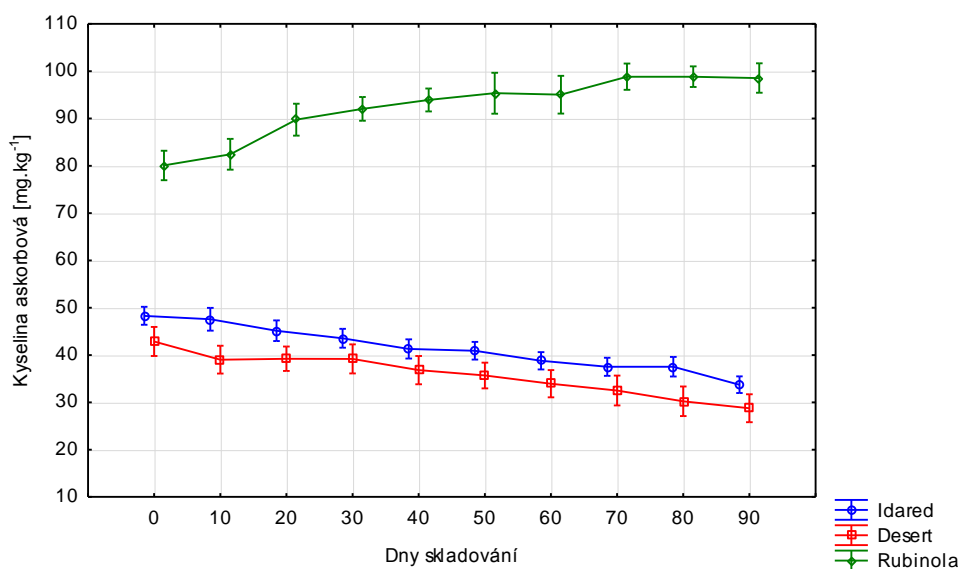
Obrázek 67: Změny v celkovém obsahu rozpustné sušiny u odrůd Rubinola, Idared a Desert v průběhu skladování.

Rozpustná sušina se u všech tří odrůd v průběhu skladování postupně zvyšovala (obrázek 67). Nejvyšší hodnoty měly plody odrůdy Rubinola, u kterých bylo ihned po sklizni naměřeno 13 °Bx. Dalším skladováním se tento obsah příliš nezvyšoval. Nejnižší hodnoty rozpustné sušiny měly na počátku skladování plody odrůdy Idared (11,4 °Bx). Po 90 dnech skladování se obsah zvýšil na hodnotu 12,7 °Bx. Statisticky významné rozdíly v obsahu rozpustné sušiny jsou pouze u odrůdy Idared mezi dny 0 až 40 a 60 až 90 (tabulka 42 Přílohy).



Obrázek 68: Změny v celkovém obsahu kyseliny jablečné u odrůd Rubinola, Idared a Desert v průběhu skladování.

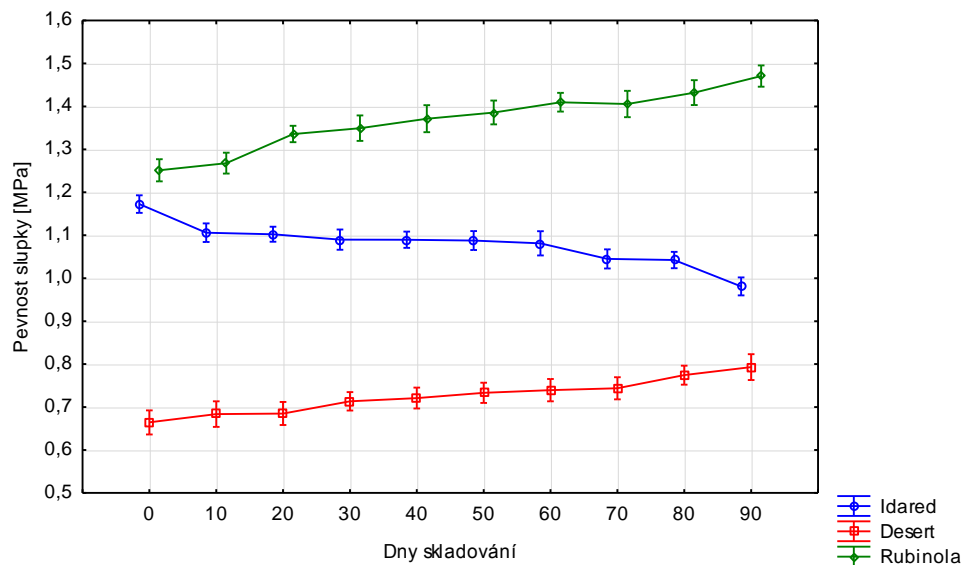
Nejvyšší obsah kyseliny jablečné měly plody odrůdy Idared. Ihned po sklizni bylo naměřeno 6 g.kg^{-1} (obrázek 68). V průběhu skladování se obsah postupně snižoval až na hodnotu $5,4 \text{ g.kg}^{-1}$. U odrůdy Desert se obsah kyseliny jablečné v prvních 40 dnech skladování nijak zásadně neměnil, větší pokles nastal až v druhé polovině skladování, kdy se obsah kyseliny jablečné snížil na necelé 3 g.kg^{-1} . U odrůdy Rubinola se obsah kyseliny jablečné v první polovině skladování mírně zvyšoval (z $2,5$ na 3 g.kg^{-1}) od 40. dne se pak obsah kyseliny téměř neměnil. U odrůdy Rubinola byly statisticky významné rozdíly v obsahu kyseliny jablečné mezi prvními 10 dny a ostatními dny skladování (tabulka 54 Přílohy). U odrůdy Desert byly statisticky významné rozdíly mezi dny 0 až 40 a 60 až 90 (tabulka 47 Přílohy). U odrůdy Idared to bylo mezi 0. dnem skladování a posledními 20 dny skladování (tabulka 40 Přílohy).



Obrázek 69: Změny v celkovém obsahu kyseliny askorbové u odrůd Rubinola, Idared a Desert v průběhu skladování.

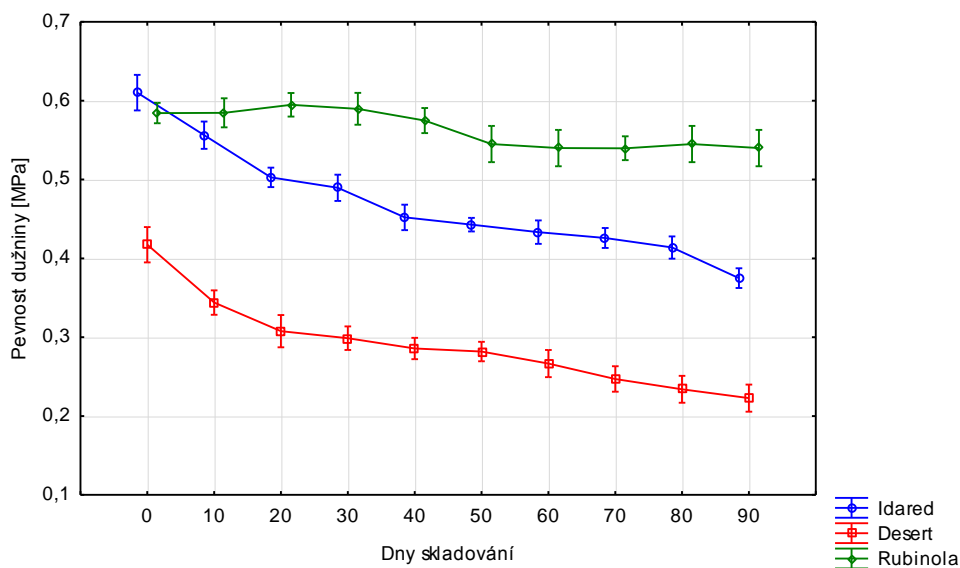
Odrůdy Idared a Desert měly na počátku skladování přibližně stejný obsah kyseliny askorbové (45 mg.kg^{-1}). V jeho průběhu se její obsah u obou odrůd snižoval téměř identicky, až na výslednou hodnotu kolem 30 mg.kg^{-1} (obrázek 69). Naproti tomu plody odrůdy Rubinola obsahovaly na počátku skladování 80 mg.kg^{-1} kyseliny askorbové. Toto množství se v průběhu skladování dále zvyšovalo až na hodnotu 100 mg.kg^{-1} . U odrůdy Idared jsou statisticky významné rozdíly v obsahu kyseliny askorbové mezi prvními 20 dny a posledními 30 dny skladování (tabulka 43 Přílohy). U odrůdy Desert jsou statisticky významné rozdíly v obsahu kyseliny askorbové mezi dny 0 až 40 a 60 až 90 (tabulka 50

Přílohy). U odrůdy Rubinola jsou statisticky významné rozdíly mezi prvními 10 dny a ostatními dny skladování (tabulka 57 Přílohy).



Obrázek 70: Změny v pevnosti slupky u odrůd Rubinola, Idared a Desert v průběhu skladování.

Plody odrůdy Idared a Rubinola měly na počátku skladování podobné hodnoty pevnosti slupky (1,2 MPa). U odrůdy Rubinola se pevnost slupky v průběhu skladování zvyšovala a po 90 dnech dosáhla hodnot téměř 1,5 MPa (obrázek 70). Pevnost slupky se u plodů odrůdy Idared snižovala k hodnotě 1,0 MPa. Nejméně pevnou slupku měla odrůda Desert, kdy na počátku skladování byla pevnost slupky jen 0,68 MPa, na konci skladování byla pevnost 0,8 MPa. U odrůdy Rubinola jsou statisticky významné rozdíly v pevnosti slupky plodů mezi prvními 10 dny a ostatními dny skladování (tabulka 58 Přílohy). U odrůdy Desert jsou statisticky významné rozdíly mezi dny 0 až 30 a 60 až 90 (tabulka 51 Přílohy). U odrůdy Idared jsou statisticky významné rozdíly mezi 0. dnem skladování a dny 10 až 60, dále pak mezi 90. dnem a ostatními dny skladování (tabulka 44 Přílohy).



Obrázek 71: Změny v pevnosti dužniny u odrůd Rubinola, Idared a Desert v průběhu skladování.

Pevnost dužniny se u všech tří odrůd v průběhu skladování postupně snižovala (obrázek 71). Nejnižší hodnoty, stejně jako v případě pevnosti slupky byly naměřeny u odrůdy Desert, kdy se pevnost snížila z hodnoty 0,42 MPa na 0,22 MPa. U plodů odrůdy Rubinola se v průběhu 90 dnů skladování pevnost dužniny téměř nezměnila. Plody ihned po uskladnění měly pevnost dužniny 0,58 MPa, na konci skladování to bylo 0,55 MPa. Plody odrůdy Idared měly na počátku skladování stejné hodnoty jako plody odrůdy Rubinola, po 90 dnech skladování byla dužnina plodů mnohem měkčí, než plody odrůdy Rubinola. Pevnost dužniny u plodů Idared byla na konci skladování 0,38 MPa. U odrůdy Idared jsou statisticky významné rozdíly v pevnosti dužniny plodů mezi 0. dnem a ostatními dny skladování, stejně tak i mezi 10. dnem a ostatními dny skladování a mezi 90. dnem a ostatními dny skladování (tabulka 45 Přílohy). U odrůdy Desert jsou statisticky významné rozdíly mezi 0. dnem a ostatními dny skladování (tabulka 52 Přílohy). U odrůdy Rubinola jsou statisticky významné rozdíly mezi dny 0 až 40 a 50 až 90 (tabulka 59 Přílohy).

VENTURA et al., (1998) ve své práci sledovali obsah rozpustné sušiny ve vzorcích jablek po 5 - ti měsíčním skladování. Jablka (Golden Delicious a Jonagold) v celkovém počtu 340 plodů byla sklizena v září a říjnu a uložena na 5 měsíců do teploty 2 °C. Finální analýzy byly provedeny v dubnu. Jablka byla nejprve proměřena pomocí NIR spektrometru, následovala analýza rozpustné sušiny refraktometricky. Z výsledků byl vytvořen kalibrační model s hodnotou korelačního koeficientu 0,56, chybou kalibrace 1,01 °Bx a chybu

predikce 1,14 °Bx. Vytvořený kalibrační model odrůdou Rubinola měl korelační koeficient 0,92, chybu kalibrace 0,39 °Bx a chybu predikce 0,50 °Bx.

PISSARD et al., (2013) analyzovali obsah kyseliny askorbové, rozpustné sušiny a polyfenolů v plodech 37 odrůd jablek. Obsah kyseliny askorbové byl zjišťován u 1474 vzorků jablek, obsah polyfenolů u 2646 plodů a obsah cukrů u 1875 plodů. Pro vytvoření kalibračního modelu kyseliny askorbové bylo použito 800 plodů, celkových polyfenolů 2000 plodů a rozpustné sušiny 1000 plodů. Kyselina askorbová se vyskytovala v analyzovaných plodech v rozmezí 2,7 - 750 mg.kg⁻¹, polyfenoly 276 - 7600 mg.kg⁻¹ a rozpustná sušina 7,2 - 20,9 °Bx. Vytvořený kalibrační model kyseliny askorbové měl chybu kalibrace 34 mg.kg⁻¹ a chybu cross validace 48,9 mg.kg⁻¹. Kalibrační model celkových polyfenolů měl chybu kalibrace 138 mg.kg⁻¹ a chybu cross validace 140 mg.kg⁻¹. Vytvořený kalibrační model rozpustné sušiny měl chybu kalibrace 0,45 °Bx a chybu cross validace 0,37 °Bx. I přes nižší počet kalibračních standardů, měly vytvořené kalibrace v této práci nižší chyby kalibrace a v případě kyseliny askorbové a celkových polyfenolů i nižší chyby cross validace.

LIU, YING, (2005) studovali možnosti rychlého měření rozpustné sušiny a titrovatelných kyselin u plodů jablek metodou NIR spektroskopie. Byly zvoleny 3 rozsahy vlnových délek 812 – 2357 nm, 1100 – 2357 nm a 812 – 1100 nm. Jako nejoptimálnější vlnový rozsah pro měření se jevil 812 – 2357 nm. K pokusu bylo použito celkem 333 plodů jablek odrůdy Fuji. 235 plodů bylo použito ke kalibraci a 98 plodů k validaci modelu. Vytvořený kalibrační model pro rozpustnou sušinu měl korelační koeficient 0,97, chybu kalibrace 0,48 °Bx a chybu cross validace 0,54 °Bx. Vytvořený kalibrační model pro titrovatelné kyseliny měl korelační koeficient 0,73, chybu kalibrace 0,0041 % a chybu cross validace 0,0045 %. Kalibrační model rozpustné sušiny z odrůd Rubinola, Idared a Desert měl korelační koeficient 0,92, chybu kalibrace 0,39 °Bx a chybu cross validace 0,50 °Bx. Kalibrační model titrovatelných kyselin měl korelační koeficient 0,96, chybu kalibrace 0,037 % a chybu cross validace 0,06 %.

BOBELYN et al., (2010) analyzovali přibližně 6000 jablek různých odrůd: Golden Delicious (Belgie, Jižní Afrika, Itálie a Francie), Royal Gala (Chile, Argentina, Nový Zéland, Francie a Belgie), Jonagold (Belgie), Braeburn (Jižní Afrika, Chile, Francie a Nový Zéland), Pink Lady (Chile, Argentina, Francie, Jižní Afrika a Nový Zéland), a Fuji (Čína, Francie). Jablka byla po zakoupení v supermarketech ihned umístěna do chladírenského skladu (1 °C). Z každé odrůdy a místa původu bylo k pokusu odebráno 200

plodů. Polovina plodů byla analyzována den po zakoupení, druhá polovina byla skladována 1 týden při teplotě 18 °C. U všech plodů byla nejprve změřena spektra metodou NIR spektroskopie a chemickými metodami byly zkoumány pevnost a rozpustná sušina. Ze získaných hodnot byly vytvořeny kalibrační modely pro každou odrůdu zvlášť. Nejlepší kalibrační model rozpustné sušiny měla odrůda Golden Delicious s korelačním koeficientem 0,88 a s chybou cross validace 0,60 °Bx. Nejlepší kalibrační model pevnosti dužniny měly odrůdy Royal Gala and Braeburn s korelačním koeficientem 0,68. U odrůd Rubinola, Idared a Desert byl vytvořen kalibrační model pevnosti dužniny s koeficientem 0,98.

VRHOVSEK et al., (2004) ve své studii analyzovali celkem 8 odrůd jablek (Braeburn, Fuji, Golden Delicious, Granny Smith, Morgenduft, Renetta, Royal Gala, a Red Delicious) na obsah kyseliny askorbové a celkových polyfenolů. Celkem bylo odebráno 41 plodů mezi srpnem a listopadem. Obsah kyseliny askorbové byl v rozmezí 4 - 81 mg.kg⁻¹. Nejnižší hodnotu měla odrůda Royal Gala a nejvyšší odrůda Braeburn. Tato odrůda měla srovnatelný obsah s odrůdou Rubinola, která měla v prvních fázích zrání rovněž obsah kyseliny askorbové kolem 80 mg.kg⁻¹. Obsah celkových polyfenolů byl v rozmezí 662 - 2190 mg.kg⁻¹. Nejnižší hodnotu měla odrůda Fuji a nejvyšší Renetta. Všechny odrůdy sledované v této studii s výjimkou odrůdy Renetta mají srovnatelný obsah celkových polyfenolů s odrůdami Rubinola, Desert a Idared.

MCGLONE et al., (2002) ve své práci vytvářeli kalibrační modely rozpustné sušiny, titrovatelných kyselin a pevnosti dužniny u plodu odrůdy Royal Gala. Jablka pocházela z 8 sadů ve 2 pěstitelských oblastech. Analyzovány byly ihned po sklizni a po 6 týdenním skladování. Vytvořený kalibrační model pro rozpustnou sušinu měl chybu cross validace 0,70 °Bx. Vytvořený kalibrační model pro pevnost dužniny měl chybu cross validace 0,07 MPa. Vytvořený kalibrační model pro titrovatelné kyseliny měl chybu cross validace 0,40 %. Dle autorů jsou tyto kalibrace nepřesné pro určování těchto parametrů u neznámých vzorků, protože je třeba kalibraci rozšířit o další odrůdy a ročníky.

PEIRS et al., (2000) hodnotili ve své práci metodou NIR spektroskopie vnitřní kvalitu a optimální termín sklizně jablek. Kalibrační modely obsahovaly data z osmi kultivarů, která byla získána ze třech různých sadů v období 2 let. Základními kritérii byly obsah rozpustné sušiny, titrovatelných kyselin a pevnost dužniny. Bylo vytvořeno několik kalibračních modelů pro rozpustnou sušinu, z nichž nejlepší měl korelační koeficient roven hodnotě 0,92 a chybu kalibrace 0,49 °Bx. Kalibrační model titrovatelných kyselin měl

hodnotu korelačního koeficientu 0,88. Kalibrační modely pro pevnost měli hodnoty korelačních koeficientů v rozmezí 0,80 až 0,84 a chyby kalibrace 0,08 až 0,1 MPa.

PEIRS et al., (2003) zkoumali vliv teploty na infračervené spektrum. Čtyřicet jablek odrůdy Jonagold bylo kondicionováno při teplotě 0 °C po dobu 2 dnů. Měření spekter bylo prováděno na čtyřech místech plodu. Plody byly kondicionovány přes noc při teplotě 2 °C a spektra byla měřena stejným způsobem. Tento postup se opakoval postupným zvyšováním teploty vždy o 2 °C až do konečné teploty 26 °C. Dle výsledků má teplota vzorku nelineární vliv na blízké infračervené spektrum.

ALAMAR et al., (2007) zkoušeli převod NIR kalibračních modelů rozpustné sušiny jablek z jednoho spektrometru na druhý. Kalibrační model byl vyvinut na spektrometru s Fourierovou transformací a následně byl úspěšně přenesen na spektrometr s diodovým polem. Kalibrace byla provedena se souborem, který obsahoval 477 jablek odrůdy Jonagored. Standardní chyba predikce byla 0,85 °Bx.

5. SHRNU TÍ VÝSLEDKŮ

Disertační práce se zabývala hodnocením změn látkového složení ovoce a zeleniny v průběhu zrání a skladování s využitím metod NIR spektroskopie. K pokusu byla vybrána jablka, broskve a rajčata. V první fázi bylo nutné vytvořit kalibrační modely, pomocí nichž bylo následně možné hodnotit skladované plody. K tomuto účelu byly použity dozrávající plody. Plody byly odebírány po celou dobu jejich zrání, aby vytvořené kalibrační modely měly co nejširší koncentrační rozpětí. Kalibrace byly rozšířeny také o hodnoty získané analýzou skladovaných plodů. Vliv na kvalitu kalibračního modelu má rovněž i počet kalibračních standardů, proto byla sledována robustnost modelu v závislosti na počtu kalibračních standardů. Sledovanými parametry byly u všech komodit obsah celkových polyfenolů, obsah titrovatelných kyselin, rozpustné sušiny, kyseliny jablečné, askorbové, citronové, pevnost slupky a u jablek i pevnost dužniny.

Kalibrační modely obsahu celkových polyfenolů měly u všech tří komodit podobné koncentrační rozpětí (300 – 1000 mg.kg⁻¹) u jablek do výše 1400 mg.kg⁻¹. U broskví (80 plodů) byla zjištěna vyšší chyba predikce, než chyba cross validace. Při ověřování přesnosti modelu byly zjištěny velké difference mezi hodnotami metody NIR a spektrofotometrickým stanovením, proto tento model nelze použít při hodnocení neznámých vzorků. U rajčat (120 plodů) a jablek (188 plodů) byla chyba predikce nižší než chyba cross validace, ale přesto byla u všech tří plodin chyba cross validace velmi podobná (kolem 100 mg.kg⁻¹). Počet kalibračních standardů tedy nijak zásadně tuto chybu neovlivnil a při ověřování přesnosti modelu se rozdíl mezi metodou NIR a spektrofotometrickou metodou pohyboval do velikosti této hodnoty. U odrůdy Redhaven se obsah polyfenolů v průběhu dozrání postupně zvyšoval až na hodnotu 964 mg.kg⁻¹, přezrálé plody obsahovaly podobné množství jako plody nezralé (kolem 600 mg.kg⁻¹). Obsah celkových polyfenolů u skladovaných plodů nebyl vyhodnocen z důvodu nepřesného kalibračního modelu. U rajčat došlo v průběhu dozrání k postupnému nárůstu polyfenolů z 310 na 795 mg.kg⁻¹. U skladovaných plodů došlo v průběhu 32 dnů k navýšení o 50 mg.kg⁻¹ na výslednou hodnotu 470 mg.kg⁻¹. U jablek se při dozrání obsah polyfenolů postupně snižoval. Nejvyšší hodnoty (1200 mg.kg⁻¹) byly naměřeny u prvních dvou sklizňových termínů. Po 3 měsících zrání se obsah celkových polyfenolů snížil téměř o polovinu (657 mg.kg⁻¹). U skladovaných plodů všech tří odrůd došlo během 90 dnů k poklesu obsahu polyfenolů o 200 mg.kg⁻¹.

Kalibrační modely obsahu titrovatelných kyselin jsou dostatečně robustní, protože ani u jedné komodity nebyla chyba predikce vyšší než chyba cross validace a lze je tedy používat při měření neznámých vzorků. Se zvyšujícím se počtem kalibračních standardů se snižovaly rozdíly mezi metodou NIR a titračním stanovením. Nejširší koncentrační rozpětí měl kalibrační graf u jablek (0,15 - 0,99 %), protože kalibrace byla složena z 250 plodů různých odrůd. V průběhu zrání odrůdy broskví Redhaven se obsah titrovatelných kyselin postupně snižoval až na hodnotu 0,40 %. Během skladování byl průběh změn obsahu kyselin u obou odrůd totožný. Ihned po sklizni byl obsah kyselin jak u odrůdy Redhaven, tak i u odrůdy Fairhaven podobný (0,50 %), po 24 dnech skladování se tento obsah u obou odrůd zvýšil na hodnotu kolem 0,80 %. U rajčat stejně jako u zrajících broskví se obsah kyselin rovněž snižoval. Nezralé, zelené plody obsahovaly kolem 0,44 %, u zralých plodů byl obsah 0,26 %. V průběhu skladování se obsah kyselin nepatrně zvýšil na hodnotu 0,41 %. U jablek klesl obsah kyselin během zrání na poloviční obsah (0,26 %). V průběhu skladování došlo k výraznějšímu poklesu obsahu kyselin u odrůd Desert a Idared přibližně o 0,2 %. U odrůdy Rubinola se obsah kyselin výrazně neměnil a celou dobu skladování (90 dnů) se pohyboval kolem hodnoty 0,35 %.

Rozpustná sušina se vyskytovala v nejvyšších koncentracích ze všech sledovaných analytů. Počet kalibračních standardů ovlivnil přesnost kalibračních modelů. U jablek, kterých bylo v kalibraci nejvíce, lze tento analyt stanovovat u různých odrůd s maximální chybou 0,5 °Bx. U broskví a rajčat, jejichž kalibrace obsahovaly méně plodů než jablka, je nutné počítat s chybou do 1 °Bx. V průběhu dozrávání plodů broskví se obsah rozpustné sušiny postupně zvyšoval. Nezralé, tvrdé plody měly obsah kolem 10 °Bx, u zralých plodů byl zjištěn obsah 12 °Bx. Během skladování se obsah rozpustné sušiny u obou odrůd zvyšoval. Nejvyšší nárůst nastal 4. den po uskladnění, kdy se u odrůdy Redhaven zvýšil obsah z 10,5 % na 12,2 °Bx a u odrůdy Fairhaven z 12,4 na 13,4 °Bx. V dalších dnech se obsah rozpustné sušiny zvyšoval jen nepatrně. V průběhu zrání rajčat se obsah rozpustné sušiny postupně zvyšoval. Nezralá, zelená rajčata měla 4,3 °Bx, u zralých plodů bylo naměřeno 6 °Bx. Během skladování se obsah rozpustné sušiny zvýšil jen nepatrně. Na počátku uskladnění byl obsah 5,5 °Bx, po 32 dnech skladování se obsah zvýšil na 5,8 °Bx. Postupné zvyšování rozpustné sušiny v průběhu dozrávání nastalo i u jablek. Nezralé plody měly obsah 11,8 °Bx, plody sklizené po 3 měsících měly obsah 13,7 °Bx. Rozpustná sušina se u všech tří odrůd v průběhu skladování postupně zvyšovala. Nejvyšší hodnoty vykazovala odrůda Rubinola, u které ihned po sklizni bylo naměřeno 13 °Bx, dalším

skladováním se tento obsah příliš nezvyšoval. Nejvyšší nárůst byl zaznamenán u odrůdy Idared, kdy se obsah po 90 dnech skladování zvýšil z 11,5 na 12,7 °Bx.

I přesto, že se kyselina askorbová vyskytovala v nízkých koncentracích, vzniklé kalibrační modely lze považovat za poměrně přesné. U všech tří komodit byla chyba predikce nižší než chyba cross validace a modely jsou tak dostatečně robustní. Kalibrační model spolehlivě funguje u odrůd, které v kalibraci převažují. Kontrolním měřením bylo zjištěno, že rozdíly mezi metodou NIR a HPLC byly do výše chyby cross validace. U jiných odrůd byly rozdíly vyšší. Je tedy potřeba kalibraci doplnit dalšími odrůdami. V případě jablek, která obsahují v kalibraci vyšší počet standardů a odrůd, nebyla chyba cross validace překročena ani u odrůdy, která se v kalibraci vůbec nevyskytuje. Obsah kyseliny askorbové se v průběhu zrání plodů odrůdy Redhaven snižoval. Nejvyšší hodnoty měly nezralé plody (135 mg.kg⁻¹), u zralých plodů byl obsah 108 mg.kg⁻¹. V průběhu skladování se obsah kyseliny askorbové u obou odrůd měnil rozdílně. Na začátku uskladnění byly hodnoty u obou odrůd velmi podobné (kolem 110 mg.kg⁻¹). U odrůdy Fairhaven bylo naměřeno po 24 dnech skladování pouze 86 mg.kg⁻¹. U odrůdy Redhaven došlo naopak ke zvýšení obsahu na necelých 120 mg.kg⁻¹. V průběhu zrání rajčat se obsah kyseliny askorbové zvýšil více jak dvojnásobně. Zralé plody obsahovaly 390 mg.kg⁻¹ kyseliny askorbové. V dalším roce se u téže odrůdy v průběhu skladování obsah kyseliny askorbové postupně snižoval z 320 na 290 mg.kg⁻¹. U jablek se obsah kyseliny askorbové v průběhu zrání postupně zvyšoval. Plody na počátku skladování obsahovaly kolem 80 mg.kg⁻¹, plody analyzované po třech měsících obsahovaly 100 mg.kg⁻¹. Odrůdy Idared a Desert měly přibližně stejný obsah kyseliny askorbové na počátku skladování (kolem 45 mg.kg⁻¹). V jeho průběhu se její obsah u obou odrůd snižoval téměř indenticky na výslednou hodnotu kolem 30 mg.kg⁻¹. Naproti tomu u odrůdy Rubinola byl zjištěn daleko vyšší obsah kyseliny askorbové (80 mg.kg⁻¹), který se v průběhu skladování dále zvyšoval až na hodnotu 100 mg.kg⁻¹.

Kalibrační graf kyseliny jablečné byl nejméně přesný u rajčat z důvodu nízké koncentrace tohoto analytu v plodech a velmi podobné koncentraci u velké části plodů. Lze měřit hlavně plody odrůdy, z nichž je kalibrace složena. U těchto plodů jsou odchylky do výše chyby cross validace. Pro měření dalších odrůd je nutné, rozšířit počet kalibračních standardů dalšími odrůdami. Podobně je tomu i v případě broskví, kdy je model více robustní, ale pro přesnější měření dalších odrůd kromě odrůdy Redhaven, je potřeba kalibraci doplnit o další odrůdy.

U jablek lze považovat model kyseliny jablečné za nejpřesnější, protože obsahuje 250 standardů různých odrůd a chyba cross validace nebyla překročena ani u odrůd, které se v kalibraci nevyskytují. V průběhu zrání se obsah kyseliny jablečné u plodů odrůdy Redhaven postupně snižoval. Po celou dobu byla kyselina jablečná převažující kyselinou. Nezralé, zelené plody obsahovaly $5,1 \text{ g.kg}^{-1}$, plody zralé jen $2,4 \text{ g.kg}^{-1}$. V průběhu skladování se obsah kyseliny jablečné u odrůdy Redhaven zvýšil z $2,7 \text{ g.kg}^{-1}$ až na hodnotu 5 g.kg^{-1} , u odrůdy Fairhaven byl nárůst z $3,5 \text{ g.kg}^{-1}$ na $5,2 \text{ g.kg}^{-1}$. U plodů rajčat se obsah kyseliny jablečné v průběhu zrání snížil trojnásobně. Nezralé plody obsahovaly 650 mg.kg^{-1} , zralé plody obsahovaly pouze kolem 200 mg.kg^{-1} . Stejný trend byl zaznamenán i u skladovaných plodů, kdy na počátku skladování plody obsahovaly 460 mg.kg^{-1} , po 32 dnech se obsah snížil na 375 mg.kg^{-1} . U jablek se stejně jako u broskví a rajčat obsah kyseliny jablečné během zrání snižoval z $3,1 \text{ g.kg}^{-1}$ na $1,7 \text{ g.kg}^{-1}$. Nejvyšší obsah kyseliny jablečné měla odrůda Idared. Ihned po sklizni bylo naměřeno 6 g.kg^{-1} a v průběhu skladování se obsah postupně snížil na $5,4 \text{ g.kg}^{-1}$. U odrůdy Desert se obsah snížil ze $4,4 \text{ g.kg}^{-1}$ na $2,9 \text{ g.kg}^{-1}$. U odrůdy Rubinola se obsah kyseliny jablečné v první polovině skladování mírně zvyšoval, od 40. dne se pak obsah kyseliny téměř neměnil. Po 90 dnech skladování obsahovaly plody $3,3 \text{ g.kg}^{-1}$ kyseliny jablečné.

Kalibrační modely kyseliny citronové patří k méně přesným, protože mají vysokou chybu cross validace. Zvyšování počtu kalibračních standardů nemělo vliv na přesnost modelu. U broskví a rajčat lze model použít pro odrůdu, která v kalibraci převažuje, je ovšem nutné počítat s chybou kalibrace. V případě dalších odrůd se musí počítat s chybou cross validace. Nejméně přesný je model u jablek, protože kyselina citronová se vyskytovala ve velmi nízkých koncentracích. Kalibrační model není dostatečně robustní, což dokazují velké rozdíly mezi metodou NIR a referenční metodou. V průběhu zrání odrůdy Redhaven klesl obsah kyseliny citronové přibližně o poloviční množství na výslednou hodnotu $1,68 \text{ g.kg}^{-1}$. Během skladování se obsah kyseliny citronové zvyšoval u odrůdy Redhaven i Fairhaven téměř identicky z hodnoty 2 g.kg^{-1} na $3,3 \text{ g.kg}^{-1}$. U rajčat se v průběhu zrání obsah kyseliny citronové postupně snižoval. Nezralé plody obsahovaly $4,9 \text{ g.kg}^{-1}$, u zralých plodů byl naměřen obsah $2,6 \text{ g.kg}^{-1}$. V průběhu skladování se obsah kyseliny citronové postupně zvyšoval až na hodnotu $4,1 \text{ g.kg}^{-1}$. U jablek se při zrání obsah kyseliny citronové postupně snižoval až na 118 mg.kg^{-1} . U skladovaných plodů nebyl obsah kyseliny citronové vyhodocen z důvodu nepřesného kalibračního modelu.

Kalibrační model pevnosti slupky u broskví je nejméně přesný z důvodu nízkého počtu kalibračních standardů. Kalibrační model není dostatečně robustní, což dokazují velké rozdíly mezi metodou NIR a referenční metodou a je nutné jej rozšířit o další standardy. V případě rajčat a jablek byl model přesnější a výrazné odchylky nebyly ani u plodů, které v kalibraci obsaženy nejsou. Tvrdé, nezralé plody broskví měly pevnost slupky 1,40 MPa, zráním se pevnost snižovala až na hodnotu 0,18 MPa. U skladovaných plodů nebyla pevnost slupky hodocena z důvodu nepřesného kalibračního modelu. U rajčat se také pevnost slupky snižovala. Nezralé, zelené plody měly pevnost 1,39 MPa, plody zralé jen 0,50 MPa. K poklesu pevnosti došlo i během skladování. Uskladněné plody měly pevnost 0,9 MPa, po 32 dnech skladování se pevnost snížila o 0,2 MPa. Nezralá jablka měla pevnost slupky 1,62 MPa, po 3 měsících se pevnost snížila na hodnotu 1,04 MPa. U odrůd Rubinola a Desert se pevnost slupky v průběhu skladování postupně zvyšovala. Plody odrůdy Rubinola měly na počátku uskladnění pevnost 1,25 MPa, po 90 dnech skladování to bylo 1,45 MPa. Plody odrůdy Desert měly na počátku skladování pevnost 0,68 MPa, na konci to bylo 0,8 MPa. U odrůdy Idared byl zaznamenán trend opačný. Uskladněné plody měly pevnost 1,2 MPa, po 90 dnech skladování se pevnost snížila na hodnotu 1,0 MPa.

Kalibrační model pevnosti dužniny u jablek je dostatečně robustní a lze jej využít i při měření jiných odrůd, než jsou obsaženy v kalibraci. V průběhu zrání se pevnost dužniny, stejně jako pevnost slupky postupně snižovala. U plodů sklizených 16. srpna byla pevnost dužniny 0,77 MPa, u plodů sklizených 16. listopadu jenom 0,36 MPa. V průběhu skladování došlo u všech tří odrůd k poklesu pevnosti dužniny. Odrůda Desert měla stejně jako v případě slupky nejnižší hodnoty pevnosti dužniny. Z počáteční hodnoty 0,42 MPa byla po 90 dnech skladování hodnota 0,22 MPa. Odrůdy Idared a Rubinola měly na počátku skladování pevnost dužniny 0,6 MPa, na konci skladování měly plody odrůdy Rubinola pevnost dužniny 0,55 MPa a plody odrůdy Idared 0,38 MPa.

6. ZÁVĚR

Cílem práce bylo zhodnotit možnosti využití NIR spektroskopie při hodnocení změn látkového složení ovoce a zeleniny v průběhu dozrávání a skladování. K pokusu byla vybrána jablka (odráda Rubinola), rajčata (odráda Dagmar) a broskve (odráda Redhaven), u kterých byly hodnoceny změny v látkovém složení v průběhu dozrávání. Sledovanými parametry byl u všech komodit obsah celkových polyfenolů, obsah titrovatelných kyselin, rozpustné sušiny, kyseliny jablečné, askorbové, citronové, pevnost slupky a u jablek i pevnost dužniny. Plody byly odebírány po celou dobu dozrávání a analyzovány v laboratoři. Pomocí získaných údajů byly vytvořeny kalibrační modely metodou NIR spektroskopie, kterými byly hodnoceny změny látkového složení u skladovaných plodů. Ke skladování byly použity broskve (odrády Redhaven a Fairhaven), rajčata (odráda Dagmar) a jablka (odrády Rubinola, Idared a Desert).

Vytvořené kalibrační modely celkových polyfenolů rajčat a jablek lze používat pro hodnocení neznámých plodů, přičemž se musí počítat s chybou cross validace modelu. U broskví model nelze použít, protože v kalibraci bylo obsaženo pouze 80 plodů a při ověření přesnosti byly zjištěny větší diference mezi metodou NIR a referenční spektrofotometrickou metodou. Obsah celkových polyfenolů tedy nebyl u skladovaných plodů v textu práce hodnocen.

Kalibrační modely titrovatelných kyselin i rozpustné sušiny lze u všech tří komodit používat pro hodnocení plodů. I přesto, že se kyselina askorbová vyskytovala v nízkých koncentracích ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) lze vytvořené modely spolehlivě používat pro hodnocení plodů všech tří komodit bez ohledu na počet kalibračních standardů.

Kalibrační model kyseliny jablečné byl nejméně přesný u rajčat, z důvodu nízkých koncentrací této látky v kalibraci. Model lze využít jen pro měření plodů odrůdy Dagmar, z níž je kalibrace vytvořena. U broskví a jablek lze kyselinu jablečnou stanovit u plodů různých odrůd do výše chyby cross validace modelu.

U broskví a rajčat lze kalibrační model kyseliny citronové používat u plodů různých odrůd, je ale nezbytné počítat s chybou cross validace modelu. U jablek se kyselina citronová vyskytovala v nízkých koncentracích, proto ani vysoký počet kalibračních standardů nezajistil robustnost modelu, který nelze používat pro hodnocení plodů. Kyselina citronová tedy u skladovaných plodů nebyla v textu práce hodnocena.

Kalibrační model pevnosti slupky u broskví nebyl díky nízkému počtu kalibračních standardů dostatečně robustní, a proto ho nelze používat pro hodnocení plodů.

U skladovaných plodů tedy tento parametr nebyl v textu práce hodnocen. Zvýšením počtu kalibračních standardů v případě rajčat a jablek bylo dosaženo vyšší přesnosti modelu a lze jej využívat pro měření různých odrůd do výše chyby cross validace modelu. Stejně tak lze použít i model pro pevnost dužniny u jablek.

Metoda NIR spektroskopie je rychlá, nedestruktivní metoda, která je přímo závislá na vytvoření přesné kalibrace s dostatečným koncentračním rozpětím. Její přesnost úzce souvisí s počtem a koncentrací kalibračních standardů, neméně důležitá je i přesnost referenčních metod, které jsou při kalibraci používány. Každý kalibrační model je charakterizován korelačním koeficientem, chybou kalibrace, chybou cross validace a chybou predikce. V ideálním případě by se hodnota korelace měla blížit 1 a chyby by měly být co nejnižší. Při každém měření neznámých vzorků je třeba s těmito chybami počítat. Dle výsledků této práce lze metodou NIR spektroskopie poměrně přesně, rychle a nedestruktivně stanovit u různých plodů titrovatelné kyseliny, rozpustnou sušinu, kyselinu askorbovou a pevnost dužniny. Zvyšující se počet kalibračních standardů může daný model více zpřesnit, důležitou roli ale hraje koncentrace daného analytu. Metodou NIR spektroskopie se obtížněji stanovují složky, které se vyskytují v nízkých koncentracích ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), oproti látkám, které se vyskytují v % koncentracích. Výjimkou byla kyselina askorbová, protože počet kalibračních standardů ani její koncentrace v plodech nijak zásadně přesnost modelu neovlivnily a u všech tří plodin lze tento model používat pro měření různých odrůd. Z důvodu nízkého počtu kalibračních standardů nebylo možné vytvořit přesný kalibrační model pro hodnocení celkových polyfenolů a pevnosti slupky u broskví. Vyšší počet kalibračních standardů v případě rajčat a jablek oba modely zpřesnil a lze je tak využívat pro hodnocení plodů různých odrůd. Z důvodu nízké koncentrace kyseliny citronové v jablkách nebylo možné vytvořit kalibrační model pro její hodnocení, i přesto že bylo v kalibraci 188 standardů tří různých odrůd.

Lze tedy konstatovat, že NIR spektroskopie je metoda, kterou lze přesně stanovovat některé základní složky ovoce a zeleniny během několika minut bez nutné destrukce vzorku. To všechno ovšem za předpokladu, že jsou k dispozici přesné kalibrační modely pro hodnocení příslušných analytů. Tato velmi pracná, avšak nezbytná součást metody vyžaduje spoustu času, velké množství vzorků a zkušené pracovníky, kteří budou za pomoci referenčních metod přiřazovat k naměřeným spektrům co možná nejvíce přesné výsledky. Dalším nezbytným předpokladem je dokonalé ovládnutí programu TQ Analyst, pomocí kterého jsou kalibrace vytvářeny a kde se dají různými příkazy dané kalibrace víc

zpřesňovat. V neposlední řadě se musí vytvořené kalibrace validovat, tedy ověřovat jejich přesnost. V případě ovoce a zeleniny se vlivem klimatických podmínek každoročně mírně mění koncentrace jednotlivých látkových složek a proto je nezbytné tyto kalibrace rozšiřovat o další plody více odrůd a tím je zpřesňovat. I tak, pokud se některý analyt vyskytuje ve velmi nízké koncentraci, nelze jej spolehlivě metodou NIR spektroskopie stanovit. Neopomenutelné využití má NIR spektroskopie také jako kvalitativní metoda, neboť diskriminační analýzou lze spolehlivě oddělit zdravé plody od plodů, u kterých není zatím jejich poškození viditelné a tato technika může být využívána i při kontrolách falšování potravin.

7. SOUHRN

Disertační práce byla zaměřena na možnosti využití NIR spektroskopie při hodnocení látkového složení ovoce a zeleniny. V literární části jsou charakterizovány jednotlivé základní složky ovoce a zeleniny, metody skladování jablek, broskví a rajčat. Detailně je popsána historie infračervené spektroskopie, současnost, principy a typy analýz NIR spektroskopie. Jsou zde také popisovány možnosti využití NIR spektroskopie v potravinářském průmyslu se zaměřením na hodnocení kvality ovoce a zeleniny.

V experimentální části jsou hodnoceny změny látkového složení ovoce a zeleniny v průběhu dozrávání. K pokusu byla vybrána jablka (odrůda Rubinola), rajčata (odrůda Dagmar) a broskve (odrůda Redhaven), u kterých byly hodnoceny změny v obsahu celkových polyfenolů, obsahu titrovatelných kyselin, rozpustné sušiny, kyseliny jablečné, askorbové, citronové, pevnosti slupky a u jablek i pevnosti dužniny. Ze získaných hodnot byly vytvořeny metodou NIR spektroskopie kalibrační modely, pomocí kterých byly hodnoceny změny látkových složek u skladovaných plodů. Dle výsledků lze poměrně rychle a přesně stanovovat u různých odrůd jablek, broskví a rajčat rozpustnou sušinu, titrovatelné kyseliny, kyselinu askorbovou a pevnost dužniny u jablek. V případě přesnosti modelů celkových polyfenolů a pevnosti slupky hraje významnou roli počet kalibračních standardů, u kyseliny jablečné a citronové přesnost modelu úzce souvisí s koncentrací dané látky v plodech.

RESUME

The dissertation thesis is focused on investigation of possibilities of usage NIR spectroscopy for nutritional composition of fruit and vegetables evaluation. The basic nutritional components of fruit and vegetables, methods of apples, peaches and tomatoes storage are characterized in the literary section. The history of infrared spectroscopy, present, principles and types of NIR spectroscopy analyses are described in detail. The possibilities of usage of NIR spectroscopy in food industry aimed on fruit and vegetables quality evaluation are also described in the literary section.

Changes of fruit and vegetables nutritional composition during ripening are evaluated in the experimental part. Evaluated fruit and vegetables were apples (variety Rubinola), tomatoes (variety Dagmar) and peaches (variety Redhaven). Changes in the total polyphenols content, titratable acids, soluble dry matter, malic acid, ascorbic acid, citric acid, peel firmness and apple flesh firmness were evaluated. Calibration models were prepared from the gained data using the NIR spectroscopy method. The changes of stored fruits nutritional composition were evaluated using the created calibration models. Soluble dry matter, titratable acids, ascorbic acid and flesh firmness of different apple, peach and tomato varieties can be determined fast and exactly according to the data. The accuracy of models for total polyphenols and peel firmness is significantly influenced by the number of calibration standards. The accuracy of models for malic and citric acids is influenced by the concentration of these components in fruits.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ALAMAR C. M., BOBELYN E., LAMMERTYN J., NICOLAI M. B., MOLTÓ E. Calibration transfer between NIR diode array and FT-NIR spectrophotometers for measuring the soluble solids contents of apple. 2007, 45, 38-45.
2. AMERICAN INSTITUTE OF CANCER RESEARCH. Food Nutrition, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. 1997, Washington, DC.
3. ANDLAUER W., FURST P. Antioxidative power of phytochemicals with special reference to cereals. *Cereal Foods*. 1998, 43, 356-360.
4. ANONYM: Odrůdy ovoce, popisy jabloně. [online]. 2015, [cit. 2015-06-09]. <http://www.sempra.cz/odrudy/ovoce/popisy/jablone.ht>
5. ANONYM: Sklizeň jablek. [online]. 2015, [cit. 2015-04-09]. <http://www.sadarstvi.cz/sklizen-jablek/>.
6. BASTIN S., HENKEN K. Water content of fruits and vegetables. 1994.
7. BERTONE E., VENTURELLO A., LEARDI R., GEOBALDO F. Prediction of the optimum harvest time of 'Scarlet' apples using DR - UV-Vis and NIR spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology*. 2012, 69, 15-23.
8. BESSESEN D. H. The role of carbohydrates in insulin resistance. *J Nutr*. 2001, 131, 10, 2782-2786.
9. BIEN R. NIR spektroskopie v systému hodnocení jakosti potravin a krmiv. NIR instrumentace Perten Instruments. 2006.
10. BLANCO M., VILLARROYA I. NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. *Trends in analytical chemistry*. 2002, 21,4.
11. BOBELYN E., SERBAN S. A., NICU M., LAMMERTYN J., NICOLAI, M. B., SAEYS W. Postharvest quality of apple predicted by NIR-spectroscopy: Study of the effect of biological variability on spectra and model performance. *Posth Biology and Technology*. 2010, 55, 133-143.
12. BRAVO I. Polyphenols: chemistry, dietary source, metabolism, and nutritional significance. *Nutritional Review*. 1998, 56, 317-333.
13. BRILEY C. G., Fellow E. P. Controlled atmosphere storage of fruits and vegetables. *Ashrae Journal*. 2002, 72.
14. BUCHTOVÁ I. Situační a výhledová zpráva ovoce. Odbor rostlinných komodit MZe Praha. 2015, 84.

15. CAMPS C., CHRISTEN D. Non-destructive assessment of apricot fruit quality by portable visible-near infrared spectroscopy. *Food Science and Technology*. 2009, 42, 6, 1125-1131.
16. CARBONARO M., MATTERA M., NICOLI S., BERGAMO P., CAPPELLONI M. Modulation of Antioxidant Compounds in Organic vs Conventional Fruit (Peach, *Prunus persica* L., and Pear, *Pyrus communis* L.) *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 5458-5462.
17. CAYUELA J. A., WEILAND, C. Intact orange quality prediction with two portable NIR spectrometers. *Postharvest Biology and Technology*. 2010, 58, 2, 113-120.
18. CEN H., HE Y. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends in Food Science & Technology*. 2007, 18, 72-83.
19. CLÉMENT A., DORAIS M., VERNON M. Nondestructive Measurement of Fresh Tomato Lycopene Content and Other Physicochemical Characteristics Using Visible-NIR Spectroscopy. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 2008, 56, 9813-9818.
20. COLLELL C., GOU P., ARNAU J., COMAPOSADA J. Non-destructive estimation of moisture, water activity and NaCl at ham surface during resting and drying using NIR spectroscopy. *Food Chemistry*. 2011, 129, 601-607.
21. ČERMÁK P. Konec éteru - Michelsonův-Morleyův pokus. *Fyzika pro nefyziky I - Svět kolem nás. Ústav teoretické fyziky MFF UK*. 2001.
22. DAUTHY E. M. Fruit and vegetable processing. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome. 1995, 382.
23. DAVIES C. M. A. An introduction to near infrared (NIR) spectroscopy. *A Journal of Near Infrared Spectroscopy*. [ONLINE]. 2015, [CIT. 2015-08-19].
24. DEIGHTON N., BRENNAN R., FINN C., DAVIES H. V. Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000, 80, 107-1313.
25. DEPCZYNSKI U., FROST J. V, MOLT K. Genetic algorithms applied to the selection of factors in principal component regression. *Analytica Chimica Acta*. 2000, 420, 217-227.
26. DEVRIES J. W. On defining dietary fibre. *Proc Nutr Soc*. 2003, 62, 1, 37- 43.
27. DI EGIDIO V., SINELLI N., LIMBO S., TORRI L., FRANZETTI L., CASIRAGHI E. Evaluation of shelf-life of fresh-cut pineapple using FT-NIR and FT-IR spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology*. 2009, 54, 2, 87- 92.

28. DILLARD C. J., GERMAN J. B. Phytochemicals : nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000, 80, 1744-1756.
29. DI VAIO C., GRAZIANI G., MARRA L., CASCONI A., RITIENI A. Antioxidant capacities, carotenoids and polyphenols evaluation of fresh and refrigerated peach and nectarine cultivars from Italy. *European Food Research and Technology*. 2008, 227, 4, 1225-1231.
30. DVOŘÁK, A. Pěstování jabloní. 2. Přepřacované a doplněné vydání. SZN Praha 1987.
31. ELLIOT J.G. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Technology*. 1999, 53, 46-48.
32. FAURIEL J., BELLON S., PLENET D., AMIOT J. M. On-farm influence of production patterns on total polyphenol content in peach. *3rd QLIF Congress, Hohenheim, Germany*. 2007.
33. FLORES K., SÁNCHEZ T. M., PÉREZ-MARÍN D., GUERRERO E.J., GARRIDO-VARO A. Feasibility in NIRS instruments for predicting internal quality in intact tomato. *Journal of Food Engineering*. 2009, 91, 311–318.
34. FRANCOIS M. I., WINS H., BUYSSENS S., GODTS C., VAN PEE E., NICOLAI, B., DE PROFT M. Predicting sensory attributes of different chicory hybrids using physico-chemical measurements and visible/near infrared spectroscopy. 2008, 49, 3, 366-373.
35. GARCIA-CLOSAS R., GONZALEZ C.A., AGUDO A., RIBOLI E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes and Control*. 1999, 10, 71-75.
36. GARDE-CERDÁN T., LORENZO C., ALONSO L. G., SALINAS M. R. Employment of near infrared spectroscopy to determine oak volatile compounds and ethylphenols in aged red wines. *Food Chemistry*. 2010, 119, 2, 823-828.
37. GEESINK H. G., SCHREUTELKAMP H. F., FRANKHUIZEN R., VEDDER W. H., FABER M. N., KRANEN W. R., GERRITZEN A. M. Prediction of pork quality attributes from near infrared reflectance spectra. *Meat Science*. 2003, 65, 661-668.
38. GIOVANELLI G., SINELLI N., BEGHI R., GUIDETTI R., CASIRAGHI E. NIR spectroscopy for the optimization of postharvest apple management. *Postharvest Biology and Technology*. 2014, 87, 13-20.
39. GIOVANNONI J.J. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell*. 2004, 16, 170–180.
40. GOLIÁŠ J. Skladování peckového ovoce pomocí upravené plynné směsi. *Zemědělec*. 2002, sv. 10, č. 40, s. 11.

41. GOLIÁŠ J. Skladování a zpracování ovoce a zeleniny. Mendelova univerzita v Brně. 2014.
42. GOLIÁŠ J. Skladování a zpracování I. Základy chladiřenství. Mendelova univerzita v Brně. 1996.
43. GRAY, J. Carbohydrates: Nutritional and health aspect. 2003.
44. HAALAND M. D., MELGAARD K. D. New augmented classical least squares methods for improved quantitative spectral analyses. *Vibrational spectroscopy*. 2002, 29, 171-175.
45. HAMMOND, D. A. Authenticity of fruit juices, jams and preserves. In: ASHURST, P. R., DENNIS, M. J. Food Authentication. London; Weinheim; New York; Tokyo; Melbourne; Madras: Blackie Academic & Professional, 1996, 15-60.
46. HE Y., ZHANG Y., PEREIRA G. A., GÓMEZ H. A., WANG J. Nondestructive Determination of Tomato Fruit Quality Characteristics Using Vis/NIR Spectroscopy Technique. *International Journal of Information Technology*. 2005, 11, 97-108.
47. HERTOOG M. G. L., HOLLMAN, P. C. H., KATAN, M. B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 1992, 40, 2379-2383.
48. HIRSCH J. Raw Materials Qualification Within a Workflow: FT-NIR Analysis Using the Antaris II Analyzer. Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA.
49. HOUDKOVÁ M. Využití hyperspektrálního zobrazení při kontrole bezpečnosti potravin. *Food Science and Nutrition*. 2012, 52, 11, 1039-1058.
50. HSU S. Infrared spectroscopy. *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*. 1997.
51. HUANG H., YU H., XU H., YING Y. Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. *Journal of Food Engineering*. 2007, 87, 303-313.
52. CHEN L., XUE X., YE Z., ZHOU J., CHEN F., ZHAO J. Determination of Chinese honey adulterated with high fructose corn syrup by near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*. 2011, 128, 1110-1114.
53. CHEN Q., ZHAO J., LIU M., CAI J., LIU J. Determination of total polyphenols content in green tea using FT-NIR spectroscopy and different PLS algorithms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008, 46, 568-573.
54. IGNAT T., SCHMILOVITCH Z., FEFOLDI J., STEINER B., ALKALAI-TUVIA S. Non-destructive measurement of ascorbic acid content in bell peppers by VIS-NIR and SWIR spectrometry. 2012, 74, 91-99.

55. INÁCIO M. R., DE LIMA K. M., LOPES V.G., PESSOA J. D. , DE ALMEIDA TEIXEIRA G. H. Total anthocyanin content determination in intact açai (Euterpe oleracea Mart.) and palmitero-juçara (Euterpe edulis Mart.) fruit using near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate calibration. *Food Chemistry*. 2013, 136, 3-4.
56. JAGGI N., VIJ R. D. Fourier transform infrared spectroscopy. *Handbook of Applied Solid State Spectroscopy*. 2006, 411-450.
57. JOSEPH J. A., SHUKIT-HALE B., DENISOVA N. A. Reversal of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioural deficits with blue berry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *Journal of Neuroscience*. 1999, 19, 8114-8812.
58. JOSHIPURA K., ASCHERIO A., MANSON A.E, STAMPFER M.J., RIMM E.B., SPEIZER F.E., HENNEKENS C.H., SPIEGELEMAN D., WILLETT W.C. Fruit and vegetable intake in relation to risk of ischaemic stroke. *Journal of the American Medical Association*. 1999, 282, 1233 – 1239.
59. KANIA P. Infračervená spektrometrie. Návod y do cvičení z analytické chemie I. VŠCHT Praha. [online]. 2015, [cit. 2015-02-12].
60. KARAKAYA S., KAVAS, A. Antimutagenic activities of some foods. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 1999, 79, 237-242.
61. KAWANO S., HIDEYUKI A., IWAMOTO M. Development of a calibration equation with temperature compensation for determining the Bx value in intact peaches. *J Near infrared spectrosc*. 1995, 3, 211.
62. KIM Y., SINGH M., KAYS E. S. Near-infrared spectroscopic analysis of macronutrients and energy in homogenized meals. *Food Chemistry*. 2007, 105, 1248-1255.
63. KLOUDA P. Moderní analytické metody. 2003.
64. KOKALY F. R., CLARK N. R. Spectroscopic Determination of Leaf Biochemistry Using Band-Depth Analysis of Absorption Features and Stepwise Multiple Linear Regression. *Remote sens. Environ*. 1999, 67, 267-287.
65. KONG J., YU S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2007, 39(8): 549–559.
66. KUTINA J. Pomologický atlas 1. Zemědělské nakladatelství BRÁZDA, 1991.
67. KUTINA J. Pomologický atlas 2. Zemědělské nakladatelství BRÁZDA, 1991.
68. LAVILLE M., NAZARE A.J. Diabetes, insulin resistance and sugars. *Obesity Reviews* 10. 2008, 24-33.
69. LEÓN, L., KELLY, J. D., DOWNEY, G. Detection of Apple Juice Adulteration Using Near-Infrared Transflectance Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*. 2005, 59,

593–599.

70. LINDLEY, M. G. The impact of food processing on antioxidants in vegetable oils, fruits and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*. 1998, 9(8-9), 336-340.
71. LIU L., COZZOLINO D., CYNKAR U. W., DAMBERGS G. R., JANIK L., O'NEILL K. B., COLBY B. C., GISHEN M. Preliminary study on the application of visible – near infrared spectroscopy and chemometrics to classify Riesling wines from different countries. *Food Chemistry*. 2008, 106, 2, 781-786.
72. LIU Y., YING Y. Use of FT-NIR spectrometry in non-invasive measurements of internal quality of 'Fuji' apples. *Postharvest Biology and Technology*. 2005, 37, 65–71.
73. LOPES B. M., WOLFF C. J., BIOUCAS-DIAS M. J., FIGUEIREDO A. T. M. Determination of the composition of counterfeit HeptodinTM tablets by near infrared chemical imaging and classical least squares estimation. *Analytica Chimica Acta*. 2009, 641, 46-51.
74. LOUW D. E., THERON I. K. Robust prediction models for quality parameters in Japanese plums (*Prunus salicina* L.) using NIR spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology*. 2010, 58, 3, 176-184.
75. LUPTON J. R., TURNER N. D. Dietary fiber and coronary disease: does the evidence support an association? *Curr Atheroscler Rep*. 2003, 5, 6, 500-505.
76. MACHEIX J. J., FLEURIET A., BILLOT J. Fruit Phenolics. CRC Press Inc. 1990.
77. MANN J., CUMMINGS H. J., ENGLYST N.H., KEY T., LIU S., RICCARDI G., SUMMERBELL C., UAUY R., VAN DAM MR., VENN B., VORSTER H.H., WISEMAN M. FAO/WHO Scientific Update on carbohydrates in human nutrition: conclusions. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2007, 61, 132-137.
78. MARLETT J., A., MCBURNEY M. I., SLAVIN J. L., AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION. Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. *J Am Diet Assoc*. 2002, 102, 7, 993-1000.
79. MATĚJKA P., Spektrometrie v blízké infračervené oblasti. Návod y do cvičení z analytické chemie II. VŠCHT Praha. [online]. 2014, [cit. 2014-03-12].
80. MCGLONE A. V., JORDAN B. R., MARTINSEN J. P. Vis/NIR estimation at harvest of pre- and post-storage quality indices for 'Royal Gala' apple. *Postharvest Biology and Technology*. 2002, 25, 135–144.
81. MCGLONE A. V., KAWANO S. Firmness, dry matter and soluble solids assessment of postharvest kiwifruit by NIR spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology*. 1998. 13, 131-141.

82. MELTZER H. M., MALTERUD K. E. Can dietary flavonoids influence the development of coronary heart disease? *Scandinavian Journal of Nutrition*. 1997, 41, 50-57.
83. MEYER T., OELICHMANN J., KELLERHALS H. Resolution and suppression of mechanical noise in FT-NIR spectroscopy. *Trends in Analytical Chemistry*. 2006, 25, 1, 19-23.
84. MOGHIMI A., AGHKHANI H. M., SAZGARNIA A., SARMA M. Vis/NIR spectroscopy and chemometrics for the prediction of soluble solids content and acidity (pH) of kiwifruit. *Biosystems engineering*. 2010, 106, 295-302.
85. MUSELÍK J. Aplikace blízké infračervené spektroskopie ve farmaceutické analýze. *Chem. Listy*. 2012, 106, 10 - 15.
86. NEČAS T., KRŠKA B., ONDRÁŠEK I. Multimediální učební skriptum ovocnictví. Lednice. 2004.
87. NICOLAI M. B., LÖTZE E., PEIRS A., SCHEERLINCK N., THERON I. K. Non-destructive measurement of bitter pit in apple fruit using NIR hyperspectral imaging. *Postharvest Biology and Technology*. 2006, 40, 1-6.
88. NICOLET CZ. Jak funguje FTIR spektrometr a jak ho nastavit. 2006. Praha.
89. NICOLET CZ. Spektroskopický software TQ Analyst stručný návod. 2007. Praha.
90. NICOLET CZ. Spektroskopický software TQ Analyst stručný návod. 2011. Praha.
91. NORGAARD L., SAUDLAND A., WAGNER J., NIELSEN P. J. Interval Partial Least-Squares Regression (iPLS): A Comparative Chemometric Study with an Example from Near-Infrared Spectroscopy. *Applied Spectroscopy Journal*. 2000, 54, 413-419.
92. OHANKA R. Rajče tyčkové. Soukromá česká společnost SEMO a.s 2007. Online [2015-06-20]. WWW.semo.cz/homegardencz/.
93. OMS-OLIU G., HERTOGE M. T. A. L. M., VAN DE POEL B., AMPOFO-ASIAMA J., GEERAERD H. A., NICOLAI M. B. Metabolic characterization of tomato fruit during preharvest development, ripening, and postharvest shelf-life. *Postharvest Biology and Technology*. 2011, 62, 7-16.
94. OZAKI Y., MCCLURE F. W., CHRISTY A. A. Near-infrared spectroscopy in food science and technology. 2007.
95. ÖZEL A., COLAK, A., ARSLAN, O., YILDIRIM, M. Purification and characterisation of a polyphenol oxidase from *Boletus erythropus* and investigation of its catalytic efficiency in selected organic solvents. *Food Chemistry*. 2010, 119(3), 1044-1049.

96. PARPINELLO P. G., NUNZIATINI G., ROMBOLA D. A., GOTTARDI F., VERSARI A. Relationship between sensory and NIR spectroscopy in consumer preference of table grape (cv Italia). *Postharvest Biology and Technology*. 2013, 83, 47-53.
97. PASQUINI C. Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications. *J. Braz. Chem. Soc.* 2003, 14, 2, 198-219.
98. PEIRS A., LAMMERTYN J., OOMS K., NICOLAI M. B. Prediction of the optimal picking date of different apple cultivars by means of VIS:NIR-spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology*. 2000, 21 189–199.
99. PEIRS A., SCHEERLINCK N., NICOLAI M. B. Temperature compensation for near infrared reflectance measurement of apple fruit soluble solids contents. *Postharvest Biology and Technology*. 2003, 30, 233 – 248.
100. PERREY S. Non-invasive NIR spectroscopy of human brain function during exercise. *Methods*. 2008, 45, 289-299.
101. PISSARD A., FERNANDEZ PIERNA J. A., BAETEN V., SINNAEVE G., LOGNAY G., MOUTEAU A., DUPONT P., RONDIA A., LATEURA M. Non-destructive measurement of vitamin C, total polyphenol and sugar content in apples using near-infrared spectroscopy. *J Sci Food Agric*. 2013, 93(2), 238-44.
102. PRIOR R. L., CAO G. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: diet and health implications. *Horticulture Science*, 2000, 35, 588-592.
103. QUEIROZ C., LOPES, M. L. M., FIALHO, E., VALENTE-MESQUITA, V. L. Polyphenol oxidase: Characteristics and mechanisms of browning control. *Food Reviews International*. 2008, 24(4), 361-375.
104. QUILITZSCH R., BARANSKA M., SCHULZ H., HOBERG E. Fast determination of carrot quality by spectroscopy methods in the UV-VIS, NIR and IR range. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 2005, 79, 163-167.
105. REICH G. Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005, 57, 1109–1143.
106. RICHTER M. Velký atlas odrůd ovoce a révy. 1. vyd. Lanškroun: TG Tisk. 2002, 158 s.
107. RICHTER M. Malý obrazový atlas odrůd ovoce 4 jabloně. 1. vyd. Lanškroun: TG Tisk. 2004, 130 s.
108. ROGGO Y., CHALUS P., MAURER L., LEMA-MARTINEZ C., EDMOND A., JENT N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.

2007, 44, 683-700.

109. RŮŽIČKOVÁ J., MLČEK J., ROP O., NĚMCOVÁ A., ŠUSTOVÁ K., LUŽOVÁ T. Využití blízké infračervené spektroskopie (NIR) v zahradnictví - detekce *Gloeosporium album*. *Zahradnictví*. 2010, 9, 7, 14-16.
110. SAAVEDRA L., GARCÍA A., BARBAS C. Development and validation of a capillary electrophoresis method for direct measurement of isocitric, citric, tartaric and malic acids as adulteration markers in orange juice. *Journal of Chromatography*. 2000, 881, 395 – 401.
111. SÁNCHEZ T. M., DE LA HABA J. M., SERRANO I., PÉREZ-MARÍN D. Application of NIRS for Nondestructive Measurement of Quality Parameters in Intact Oranges During On-Tree Ripening and at Harvest. *Food Analytical Methods*. 2013, 6, 3, 826-837.
112. SÁNCHEZ T. M., GARRIDO-VARO A., GUERRERO E J., PÉREZ-MARÍN D. NIRS technology for fast authentication of green asparagus grown under organic and conventional production systems. *Postharvest Biology and Technology*. 2013, 85, 116-123.
113. SAONA, R. E. L, ALLENDORF, M. E. Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food. *Food Science and Technology*. 2011, 2, 467-483.
114. SHAO X., BIAN X., CAI W. An improved boosting partial least squares method for near-infrared spectroscopic quantitative analysis. *Analytica Chimica Acta*. 2010, 666, 32-37.
115. SHENK J. S., WESTERHAUS M. O. Population Definition, Sample Selection, and Calibration Procedures for Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Crop Sciences*. 1991, 31, 469 – 474.
116. SHYAM N. Nondestructive evaluation of food quality - Theory and Practice. 2010.
117. SILVA M. B., ANDRADE B. P., VALENTÃO P., FERRERES F., SEABRA M.R., FERREIRA A.M. “Quince (*Cydonia oblonga* Miller) Fruit (Pulp, Peel, and Seed) and Jam: Antioxidant Activity,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, Vol. 52, No. 15, 4705-4712.
118. SIRISOMBOON P., TANAKA M., KOJIMA T., WILLIAMS P. Nondestructive estimation of maturity and textural properties on tomato ‘Momotaro’ by near infrared spectroscopy. *Journal of Food Engineering*. 2012, 218-226.
119. STEINMETZ K. A., POTTER J.D. Vegetable, fruit and cancer epidemiology. *Cancer Causes and Control*. 1996, 2, 325-351.

120. STEUER B., SCHULZH., LÄGER E. Classification and analysis of citrus oils by NIR spectroscopy. *Food Chemistry*. 2001, 72, 1, 113-117.
121. SUN, D. Modern Techniques for good Authentication. 2008.
122. ŠNURKOVIČ P. Quality assessment of fruit juices by NIR spectroscopy. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 2013, 61, 3, 803-812.
123. THOMPSON, D. P. Fungitoxic activity of essential oil components on food storage fungi. *Mycologia*. 1989, 81 (1) 151-153.
124. TIWARI G., SLAUGHTER C. D., CANTWELL M. Nondestructive maturity determination in green tomatoes using a handheld visible and near infrared instrument. *Postharvest Biology and Technology*. 2013, 86, 221–229.
125. TOOR K. R., SAVAGE P. G. Changes in major antioxidant components of tomatoes during post-harvest storage. *Food Chemistry*. 2006, 99, 724-727.
126. TRIBBLE D. L. Antioxidant consumption and risk of coronary heart diseases. Emphasis on vitamin C, vitamin E and β carotene. *Circulation*. 1999, 99, 591-595.
127. TWOMEY M., DOWNEY G., McNULTY B. P. The potential of NIR spectroscopy for the detection of the adulteration of orange juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006, 67, 77-84.
128. VACHŮN Z. Ovocnictví: Pěstitelská pomologie - peckoviny, drobné ovoce: Návody do cvičení. Praha. 1980.
129. VARDIN H., TAY A., OZEN B., MAUER L. Authentication of pomegranate juice concentrate using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Food Chemistry*. 2008, 108, 742-748.
130. VAUGHAN G. J., GEISLER A. C. The new Oxford book of food plants. Oxford university New York 2009.
131. VENTURA M., DE JAGER A., DE PUTTER H., ROELOFS M. M. P. F. Non-destructive determination of soluble solids in apple fruit by near infrared spectroscopy (NIRS). *Postharvest Biology and Technology*. 1998, 14, 21–27.
132. VERMEIR S., BEULLENS K., MÉSZÁROS P., POLSHIN E., BANICOLAI M. B., LAMMERTYN J. Sequential injection ATR-FTIR spectroscopy for taste analysis in tomato. *Sensors and Actuators*. 2009, 137, 715-721.
133. VILLRINGER A., CHANCE B. Non-invasive optical spectroscopy and imaging of human brain function. *Trends Neurosci*. 1997, 20, 435-442.

134. VRHOVSEK U., RIGO A., TONON D., MATTIVI F. Quantitation of Polyphenols in Different Apple Varieties. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 6532-6538.
135. WANG H., CAO G. H., PRIOR R. L. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural Food Chemistry.* 1996, 44, 701-705.
136. WARGOVICH M. J. Anticancer properties of fruits and vegetables. *Horticulture Science.* 2000, 35, 573-575.
137. WILKERSON D. E., ANTHON E. G., BARRETT M. D., SAYAJON G. FE. G., SANTOS M. A., RODRIGUEZ-SAONA E. L. Rapid Assessment of Quality Parameters in Processing Tomatoes Using Hand-Held and Benchtop Infrared Spectrometers and Multivariate Analysis. *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61, 2088–2095.
138. WU D., CHEN J., LU B., XIONG L., HE Y., ZHANG Y. Application of near infrared spectroscopy for the rapid determination of antioxidant activity of bamboo leaf extract. *Food Chemistry.* 2012, 135, 4, 2147-2156.
139. XIE L., YE X., LIU D., YING Y. Quantification of glucose, fructose and sucrose in bayberry juice by NIR and PLS. *Food Chemistry.* 2009, 114, 1135-1140.
140. ZHANG G. L., ZHANG X., NI J. L., XUE B. Z., GU X., HUANG X. S. Rapid identification of adulterated cow milk by non-linear pattern recognition methods based on near infrared spectroscopy. *Food Chemistry.* 2014, 145, 342-348.
141. ZIOSI V., NOFERINI M., FIORI G., TADIELLO A., TRAINOTTI L., CASADORO G., COSTA G. A new index based on vis spectroscopy to characterize the progression of ripening in peach fruit. *Postharvest Biology and Technology.* 2008, 49, 319–329.
142. Metodické listy OPVK. Moderní metody skladování ovoce. Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy.
http://www.vsuo.cz/common/cms_files_pr/files_to_download/A12_Moderni_metody_skladovani_ovoce.pdf [cit. 2016 – 03 – 20].

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1: Rotace a vibrace dvouatomové molekuly
- Obrázek 2: Znárodnění interference
- Obrázek 3: Michelsonův interferometr
- Obrázek 4: Antaris II FT-NIR analyzátor
- Obrázek 5: Spektrální okno programu OMNIC
- Obrázek 6: Základní okno programu TQ Analyst
- Obrázek 7: Režimy měření NIR
- Obrázek 8: Spektrální měření celých broskví
- Obrázek 9: Plody odrůdy Redhaven
- Obrázek 10: Broskvoň Redhaven
- Obrázek 11: Plody odrůdy Fairhaven
- Obrázek 12: Broskvoň Fairhaven
- Obrázek 13: Broskvoň Fairhaven
- Obrázek 14: Plody odrůdy Dagmar
- Obrázek 15: Rostlina s plody
- Obrázek 16: Plody odrůdy Parto
- Obrázek 17: Rostlina s plody
- Obrázek 18: Plody odrůdy Rubinola
- Obrázek 19: Jabloň Rubinola
- Obrázek 20: Plody odrůdy Topaz
- Obrázek 21: Jabloň Topaz
- Obrázek 22: Jabloň Idared
- Obrázek 23: Plody odrůdy Idared
- Obrázek 24: Jabloň Idared
- Obrázek 25: Plody odrůdy Desert
- Obrázek 26: Jabloň Desert.
- Obrázek 27: Spektrální rozdíly mezi plodem (1) sklizeným 16. srpna a plodem (138) sklizeným 16. listopadu.
- Obrázek 28: Spektrální rozdíly mezi plodem (1) sklizeným 20. července a plodem (60) sklizeným 10. srpna.

Obrázek 29: Spektrální rozdíly mezi plodem (1) sklizeným 11. července a plodem (100) sklizeným 15. září.

Obrázek 30: Kalibrační graf celkových polyfenolů

Obrázek 31: Kalibrační graf titrovatelných kyselin

Obrázek 32: Kalibrační graf rozpustné sušiny

Obrázek 33: Kalibrační graf kyseliny askorbové

Obrázek 34: Kalibrační graf kyseliny jablečné

Obrázek 35: Kalibrační graf kyseliny citronové

Obrázek 36: Kalibrační graf pevnost slupky

Obrázek 37: Změny v obsahu titrovatelných kyselin u odrůd Redhaven a Fairhaven v průběhu skladování.

Obrázek 38: Změny v obsahu rozpustné sušiny u odrůd Redhaven a Fairhaven v průběhu skladování.

Obrázek 39: Změny v obsahu kyseliny jablečné u odrůd Redhaven a Fairhaven v průběhu skladování.

Obrázek 40: Změny v obsahu kyseliny citronové u odrůd Redhaven a Fairhaven v průběhu skladování.

Obrázek 41: Změny v obsahu kyseliny askorbové u odrůd Redhaven a Fairhaven v průběhu skladování.

Obrázek 42: Napadené a zdravé plody

Obrázek 43: Spektrální rozdíly mezi zdravým a napadeným plodem

Obrázek 44: Diskriminační analýza mezi plody zdravými a napadenými

Obrázek 45: Kalibrační graf celkových polyfenolů

Obrázek 46: Kalibrační graf titrovatelných kyselin

Obrázek 47: Kalibrační graf rozpustné sušiny

Obrázek 48: Kalibrační graf kyseliny askorbové

Obrázek 49: Kalibrační graf kyseliny jablečné

Obrázek 50: Kalibrační graf kyseliny citronové

Obrázek 51: Kalibrační graf pevnost slupky

Obrázek 52: Vývoj barevných změn v průběhu dozrání plodů rajčat

Obrázek 53: Změny v obsahu kyseliny askorbové, jablečné a celkových polyfenolů v průběhu skladování.

Obrázek 54: Změny v obsahu titrovatelných kyselin a změny v pevnosti slupky.

Obrázek 55: Změny v obsahu kyseliny citronové a rozpustné sušiny v průběhu skladování.

Obrázek 56: Kalibrační graf celkových polyfenolů

Obrázek 57: Kalibrační graf titrovatelných kyselin

Obrázek 58: Kalibrační graf rozpustné sušiny

Obrázek 59: Kalibrační graf kyseliny askorbové

Obrázek 60: Kalibrační graf kyseliny jablečné

Obrázek 61: Kalibrační graf kyseliny citronové

Obrázek 62: Kalibrační graf pevnosti slupky u plodů jablek.

Obrázek 63 Kalibrační graf pevnosti dužniny u plodů jablek.

Obrázek 64: Vývoj barevných změn v průběhu dozrávání plodů jablek

Obrázek 65: Změny v celkovém obsahu polyfenolických látek u odrůd Rubinola, Idared a Desert v průběhu skladování.

Obrázek 66: Změny v celkovém obsahu titrovatelných kyselin u odrůd Rubinola, Idared a Desert v průběhu skladování.

Obrázek 67: Změny v celkovém obsahu rozpustné sušiny u odrůd Rubinola, Idared a Desert v průběhu skladování.

Obrázek 68: Změny v celkovém obsahu kyseliny jablečné u odrůd Rubinola, Idared a Desert v průběhu skladování.

Obrázek 69: Změny v celkovém obsahu kyseliny askorbové u odrůd Rubinola, Idared a Desert v průběhu skladování.

Obrázek 70: Změny v pevnosti slupky u odrůd Rubinola, Idared a Desert v průběhu skladování.

Obrázek 71: Změny v pevnosti dužniny u odrůd Rubinola, Idared a Desert v průběhu skladování.

SEZNAM TABULEK

- Tabulka 1: Ověření přesnosti kalibrace celkových polyfenolů
- Tabulka 2: Ověření přesnosti kalibrace titrovatelných kyselin
- Tabulka 3: Ověření přesnosti kalibrace rozpustné sušiny
- Tabulka 4: Ověření přesnosti kalibrace kyseliny askorbové
- Tabulka 5: Ověření přesnosti kalibrace kyseliny jablečné
- Tabulka 6: Ověření přesnosti kalibrace kyseliny citronové
- Tabulka 7: Ověření přesnosti kalibrace pevnost slupky
- Tabulka 8: Souhrnná tabulka kalibračních standardů
- Tabulka 9: Změny látkového složení broskví v průběhu zrání
- Tabulka 10: Ověření přesnosti kalibrace celkových polyfenolů
- Tabulka 11: Ověření přesnosti kalibrace kyselin
- Tabulka 12: Ověření přesnosti kalibrace rozpustné sušiny
- Tabulka 13: Ověření přesnosti kalibrace kyseliny askorbové
- Tabulka 14: Ověření přesnosti kalibrace kyseliny jablečné
- Tabulka 15: Ověření přesnosti kalibrace kyseliny citronové
- Tabulka 16: Ověření přesnosti kalibrace pevnosti slupky
- Tabulka 17: Souhrnná tabulka kalibračních standardů
- Tabulka 18: Změny látkového složení rajčat v průběhu zrání
- Tabulka 19: Ověření přesnosti kalibrace celkových polyfenolů
- Tabulka 20: Ověření přesnosti kalibrace titrovatelných kyselin
- Tabulka 21: Ověření přesnosti kalibrace rozpustné sušiny
- Tabulka 22: Ověření přesnosti kalibrace kyseliny askorbové
- Tabulka 23: Ověření přesnosti kalibrace kyseliny jablečné
- Tabulka 24: Ověření přesnosti kalibrace kyseliny citronové
- Tabulka 25: Ověření přesnosti kalibrace pevnosti slupky
- Tabulka 26: Ověření přesnosti kalibrace pevnosti dužniny
- Tabulka 27: Souhrnná tabulka kalibračních standardů
- Tabulka 28: Změny látkového složení jablek v průběhu zrání