Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Antioxidační vlastnosti jablek ošetřených osmo-dehydratací s přídavkem skořicového aldehydu

Bc. Barbora Kuchlerová

Diplomová práce

2021

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Bc. Barbora Kuchlerová**
Osobní číslo:	**C19485**
Studijní program:	**N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce:	**Antioxidační vlastnosti jablek ošetřených osmo-dehydratací s přídavkem skořicového aldehydu**
Zadávající katedra:	**Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na analýzu antioxidačních látek a jejich význam v potravinářství. Pro tento účel prověřte možnosti využití moderních extrakčních postupů před analýzou sledovaných sloučenin metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Popište základní metody pro analýzu antioxidačních vlastností potravin. Definujte proces osmo-dehydratace, jeho princip a benefity pro potraviny různého druhu.

2. V experimentální části nalezněte vhodné podmínky pro realizaci osmo-dehydratace jablek. Pro realizaci osmo-dehydratace využijte cukerné roztoky s přídavkem skořicového aldehydu. U takto zpracovaných vzorků jablek následně určete vybrané antioxidační ukazatele a stanovte obsah signifikantních složek. Proveďte optimalizaci podmínek pro izolaci a následnou HPLC analýzu vybraných látek ze vzorků jablek ošetřených dehydratačním roztokem.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Martin Adam, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Michaela Frühbauerová**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2021

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne ……...

Bc. Barbora Kuchlerová

PODĚKOVÁNÍ:

Děkuji svému vedoucímu diplomové práce, doc. Ing. Martinu Adamovi, Ph.D., za cenné rady, trpělivost, čas a konzultace při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat doc. Ing. Liboru Červenkovi, Ph.D. a Ing. Michaele Frühbauerové za jejich čas, vstřícnost a pomoc při vypracování experimentu. Poděkování patří i mé rodině a přátelům, kteří mě podporovali v průběhu celého studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá změnou antioxidačních vlastností jablek po procesu osmo-dehydratace s přídavkem skořicového aldehydu. Teoretická část se věnuje popisu antioxidantů a jejich vlivu na lidské zdraví. Dále se zabývá možnostmi, jak stanovit jejich antioxidační kapacitu. V další části jsou popsány extrakční metody a následná analýza kapalinovou chromatografií. V poslední části je popsán proces osmo-dehydratace a jeho využití v potravinářství. V experimentální části byly analyzovány vzorky jablek, které byly vystaveny procesu osmo-dehydratace s přídavkem různého množství skořicového aldehydu. Následně bylo provedeno stanovení antioxidační kapacity metodou využívající DPPH radikál a obsahu celkových fenolických látek. Poté byly vzorky analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

KLÍČOVÁ SLOVA

Jablka, skořicový aldehyd, antioxidační vlastnosti, extrakce, kapalinová chromatografie, osmo-dehydratace

TITLE

Antioxidant properties of apples treated by osmo-dehydration with the addition of cinnamaldehyde

ANNOTATION

This thesis deals with the change of antioxidant properties of apples after osmo-dehydration process with the addition of cinnamaldehyde. The theoretical part is devoted to the description of antioxidants and their influence on human health. It also deals with the possibilities of determining their antioxidant capacity. In the next part, extraction methods and subsequent analysis by liquid chromatography are described. In the last part, the osmo-dehydration process and its application in the food industry are described. In the experimental part, samples of apples subjected to the osmo-dehydration process with the additions of different amounts of cinnamaldehyde were analysed. Subsequently, the antioxidant capacity was determined by the method using DPPH radical and the content of total phenolic compounds. The samples were analysed by high performance liquid chromatography.

KEYWORDS

Apples, cinnamaldehyde, antioxidant properties, extraction, liquid chromatography, osmo-dehydration

OBSAH

ÚVOD 14

1 TEORETICKÁ ČÁST 15

1.1 VOLNÉ RADIKÁLY 15
1.1.1 Reaktivní formy kyslíku 15
1.1.1.1 Superoxid 16
1.1.1.2 Hydroxylový radikál 16
1.1.1.3 Peroxid vodíku 16
1.1.2 Reaktivní formy dusíku 17
1.1.2.1 Oxid dusnatý 17
1.1.2.2 Peroxynitrit 18
1.2 ANTIOXIDANTY 18
1.2.1 Přírodní antioxidanty 19
1.2.1.1 Superoxiddismutáza 19
1.2.1.2 Kataláza 19
1.2.1.3 Glutathionperoxidáza 19
1.2.1.4 Vitamín A 20
1.2.1.5 Vitamín C 21
1.2.1.6 Vitamín E 22
1.2.1.8 Polyfenoly 27
1.2.2 Syntetické antioxidanty 31
1.2.3 Stopové prvky s antioxidačními účinky 32
1.2.3.1 Zinek 32
1.2.3.2 Selen 33
1.2.3.3 Měď 34
1.2.3.4 Mangan 34
1.3 ANALÝZA ANTIOXIDANTŮ V POTRAVINÁCH 35
1.3.1 Stanovení antioxidační kapacity 35
1.3.1.1 Metoda ORAC 36
1.3.1.2 Metoda TRAP 36
1.3.1.3 Metoda využívající DPPH radikál 36
1.3.1.4 Metoda FRAP 37
1.3.1.5 Metoda využívající ABTS (Metoda TEAC) 38
1.3.1.6 Metoda CUPRAC 38
1.3.1.7 Stanovení obsahu celkových polyfenolů 39
1.3.2 Identifikace antioxidačních látek 39
1.3.2.1 Izolace antioxidačních látek 39
1.3.2.2 Analýza antioxidačních látek 44
1.3.2.3 Stanovení fenolických látek pomocí HPLC 46
1.4 VYUŽITÍ PROCESU OSMO-DEHYDRATACE V POTRAVINÁŘSTVÍ 51
1.4.1 Princip procesu osmo-dehydratace 51
1.4.2 Faktory ovlivňující proces osmo-dehydratace 52

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 55

2.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY 55
2.2 CHEMIKÁLIE 56
2.3 PŘÍPRAVA CUKERNÝCH ROZTOKŮ 56
2.4 ANALYZOVANÝ VZOREK 57
2.4.1 Charakteristika vzorku 57
2.4.2 Příprava vzorků před procesem osmo-dehydratace 58
2.4.3 Zpracování vzorků po procesu osmo-dehydratace 58
2.5 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY METODOU VYUŽÍVAJÍCÍ DPPH 58
2.5.1 Postup pro stanovení antioxidační kapacity u vzorků 59
2.5.2 Příprava kalibračních roztoků 59
2.6 STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU FENOLICKÝCH LÁTEK 59
2.6.1 Postup pro stanovení celkového obsahu fenolických látek u vzorků 59

2.6.2 Příprava kalibračních roztoků 60
2.7 MĚŘENÍ BAREVNOSTI 60
2.8 ANALÝZA KAPALINOVOU CHROMATOGRAFIÍ 60
2.8.1 Kalibrační řada, mez detekce a mez stanovitelnosti 61
2.8.2 Příprava vzorků 61
3 VÝSLEDKY A DISKUSE 62
3.1 VÝBĚR EXTRAKČNÍHO ČINIDLA 62
3.2 ANTIOXIDAČNÍ VLASTNOSTI STROUHANÉHO JABLKA A PLÁTKŮ JABLEK 64
3.3 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY METODOU VYUŽÍVAJÍCÍ DPPH 65
3.4 STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU FENOLICKÝCH LÁTEK 68
3.5 ANALÝZA KAPALINOVOU CHROMATOGRAFIÍ 71
3.6 MĚŘENÍ BAREVNOSTI 74
4 ZÁVĚR 76
POUŽITÁ LITERATURA 78
PŘÍLOHY 86

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Reaktivní formy kyslíku 16
Tabulka 2: Reaktivní formy dusíku 17
Tabulka 3: Obsah vitamínu C ve vybraných potravinách 22
Tabulka 4: Obsah vitamínu E ve vybraných potravinách 23
Tabulka 5: Chemické struktury derivátů kyseliny hydroxyskořicové 28
Tabulka 6: Chemické struktury derivátů kyseliny hydroxybenzoové 29
Tabulka 7: Podtřídy flavonoidů, jejich obecná struktura a zdroje potravin 30
Tabulka 8: Množství volné kyseliny chlorogenové (µg/g sušiny) ve slupce a dužině jablek během zrání, sklizně a skladování 50
Tabulka 9: Množství vázané kyseliny protokatechové (µg/g sušiny) ve slupce a dužině jablek během zrání, sklizně a skladování 50
Tabulka 10: Použité laboratorní přístroje a pomůcky 55
Tabulka 11: Použité chemikálie 56
Tabulka 12: Výživové hodnoty syrového jablka (ve 100 g) 57
Tabulka 13: Stupnice udávající stupeň neshody dvou barev 74

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Reakce vzniku oxidu dusnatého z L-argininu 18
Obrázek 2: Chemický vzorec a) retinolu b) retinalu c) kyseliny retinové 21
Obrázek 3: Chemický vzorec kyseliny L-askorbové 22
Obrázek 4: Chemický vzorec α-tokoferolu 23
Obrázek 5: Chemický vzorec β-karotenu 25
Obrázek 6: Chemický vzorec lykopenu 26
Obrázek 7: Chemický vzorec luteinu 27
Obrázek 8: Chemický vzorec zeaxantinu 27
Obrázek 9: Obecná struktura flavonoidů 29
Obrázek 10: Struktura radikálu DPPH a jeho redukce antioxidantem (AH) na DPPH-H 37
Obrázek 11: Fázový diagram CO_2 41
Obrázek 12: Schéma zařízení pro extrakci nadkritickou tekutinou 42
Obrázek 13: Schématické znázornění kavitace při ultrazvukové extrakci 43
Obrázek 14: Blokové schéma HPLC 45
Obrázek 15: Celkový obsah fenolů a flavonoidů ve slupce a dužině v jablku Limoncella 48

Obrázek 16: Hlavní fenolické sloučenina po analýze jablka Limoncella pomocí RP-HPLC ..48
Obrázek 17: Transport látek z potravinové matrice během procesu osmo-dehydratace 52
Obrázek 18: Vzorek jablka Jonagold.....57
Obrázek 19: DPPH metoda pro výběr extrakčního činidla (*n* = 3).....62
Obrázek 20: TPC metoda pro výběr extrakčního činidla (*n* = 3).....63
Obrázek 21: DPPH metoda pro upřesnění výběru extrakčního činidla (*n* = 3).....63
Obrázek 22: TPC metoda pro upřesnění výběru extrakčního činidla (*n* = 3).....64
Obrázek 23: DPPH metoda pro plátky jablek a strouhané jablko (*n* = 3) 65
Obrázek 24: TPC metoda pro plátky jablek a strouhané jablko (*n* = 3) 65
Obrázek 25: Optimalizace metody pro stanovení antioxidační kapacity 65
Obrázek 26: Kalibrační řada Troloxu pro stanovení antioxidační kapacity metodou DPPH...66
Obrázek 27: Výsledný efekt vlivu přidaného CA na skutečné koncentraci CA u roztoků po osmo-dehydrataci při DPPH metodě (*n* = 3) 67
Obrázek 28: Výsledný efekt vlivu přidaného CA na skutečné koncentraci CA u extraktů z jablek po osmo-dehydrataci při DPPH metodě (*n* = 3).....67
Obrázek 29: Optimalizace metody pro stanovení celkového obsahu fenolických látek 68
Obrázek 30: Kalibrační řada kyseliny gallové pro stanovení celkového obsahu fenolických látek.....69
Obrázek 31: Výsledný efekt vlivu přidaného CA na skutečné koncentraci CA u extraktů z jablek po osmo-dehydrataci při TPC metodě (*n* = 3).....70
Obrázek 32: Výsledný efekt vlivu přidaného CA na skutečné koncentraci CA u roztoků po osmo-dehydrataci při TPC metodě (*n* = 3) 70
Obrázek 33: Kalibrační řada skořicového aldehydu pro HPCL (CA = skořicový aldehyd) 71
Obrázek 34: Kalibrační řada kyseliny skořicové pro HPLC (KS = kyselina skořicová) 72
Obrázek 35: Výsledný efekt vlivu přidaného CA na skutečné koncentraci CA a KS u roztoků po osmo-dehydrataci při HPLC analýze (*n* = 3) 73
Obrázek 36: Výsledný efekt vlivu přidaného CA na skutečné koncentraci CA a KS u extraktů z jablek po osmo-dehydrataci při HPLC analýze (*n* = 3) 73
Obrázek 37: Zobrazení barevného prostoru $L^*a^*b^*$ 75

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I: Antioxidační kapacita roztoků a extraktů z jablek.....86
Příloha II: Výsledný efekt času osmo-dehydratace na obsah CA v roztocích a extraktech jablek po osmo-dehydrataci pro DPPH metodu a TPC metodu 89
Příloha III: Celkový obsah fenolických látek v roztocích a extraktech z jablek 91
Příloha IV: Množství skořicového aldehydu (CA) a kyseliny skořicové (KS) v roztocích a extraktech z jablek pro HPLC analýzu 95
Příloha V: Výsledný efekt času osmo-dehydratace na obsahu CA v roztocích a extraktech z jablek pro HPLC analýzu.....99
Příloha VI: Barvy roztoků a jablek po osmo-dehydrataci 101

SEZNAM ZKRATEK

°Bx	Stupně Brix (Degrees Brix)
a_w	Aktivita vody (Water activity)
AAPH	2,2´-azobis(2-amidinopropan) dihydrochlorid
ABAP	2,2-azobis-(2-amidinopropan) hydrochlorid
ABTS	2,2´-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
ASE	Zrychlená extrakce rozpouštědlem (Accelerated solvent extraction)
BHA	Butylhydroxyanisol (Butylated hydroxyanisole)
BHT	Butylhydroxytoluen (Butylated hydroxytoluene)
CAT	Kataláza (Catalase)
CE	Kapilární elektroforéza (Capillary electrophoresis)
CUPRAC	Stanovení antioxidační kapacity na základě redukce měďnatých iontů (Cupric ion reducing antioxidant capacity)
DAD	Detektor s diodovým polem (Diode array detector)
DDD	Doporučená denní dávka
DNA	Kyselina deoxyribonukleová (Deoxyribonucleic acid)
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DPPH-H	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazin
ECD	Elektrochemický detektor (Electrochemical detector)
EPR	Elektronová paramagnetická rezonance
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and drug administration)
FLD	Fluorescenční detektor (Fluorescence detector)
FRAP	Stanovení antioxidační aktivity na základě redukce železitých iontů (Ferric reducing antioxidant power)
GC	Plynová chromatografie (Gas chromatography)
GPx	Glutationperoxidáza
HAT	Přenos atomu vodíku (Hydrogen atom transfer)
HDL	Lipoprotein o vysoké hustotě (High density lipoprotein)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography)
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International agency for research on cancer)

LDL	Lipoprotein o nízké hustotě (Low-density lipoprotein)
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass spectrometry)
Nc	Neocuproin
NOS	Nitroxidsyntáza
ORAC	Schopnost antioxidantů eliminovat volné radikály kyslíku (Oxygen radical absorbance capacity)
PDA	Detektor diodového pole (Photodiode Array Detector)
PHWE	Extrakce vodou v podkritickém stavu (Pressurized hot water extraction)
PLE	Extrakce kapalinou za zvýšeného tlaku (Pressurized liquid extraction)
PSE	Extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku (Pressurized solvent extraction)
RE	Retinolový ekvivalent (Retinol equivalents)
RNS	Reaktivní formy dusíku (Reactive nitrogen species)
ROS	Reaktivní formy kyslíku (Reactive oxygen species)
RP-HPLC	HPLC v systému s obrácenými fázemi (Reversed-phase HPLC)
SF	Nadkritická tekutina (Supercritical fluid)
SFE	Extrakce nadkritickou tekutinou (Supercritical fluid extraction)
SET	Přenos jednoho elektronu (Single electron transfer)
SOD	Superoxidismutáza
TEAC	Vyjádření antioxidační kapacity jako ekvivalenty látky Trolox (Trolox equivalent antioxidant capacity)
TPC	Stanovení celkového obsahu fenolických látek (Total phenolic contents)
TPTZ	2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazin
TRAP	Celkový antioxidační parametr záchytu radikálů (Total radical-trapping antioxidant potential)
TROLOX	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
UV	Ultrafialové (Ultraviolet)

ÚVOD

V lidském organismu se neustále produkují volné radikály, které v malém množství představují signální molekuly a v imunitním systému napomáhají k eliminaci různých kmenů bakterií. Při nadměrné produkci volných radikálů však dochází k poškození biologicky významných sloučenin (DNA, bílkoviny a lipidy), které vede až ke vzniku mnoha chronických zdravotních problémů, jako jsou Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, kardiovaskulární a zánětlivá onemocnění, cukrovka a rakovina.

Jednou z možností, jak snížit škodlivé účinky volných radikálů na lidský organismus, jsou antioxidanty. Lidské tělo je schopné se samo bránit proti působení volných radikálů, a to především enzymy s antioxidačními účinky. I přesto je však velmi důležité přijímat antioxidanty ze stravy.

Antioxidanty jsou látky, které hrají důležitou roli jak v potravinách, tak i v lidském těle, které chrání před vznikem volných radikálů nebo je převádějí do méně reaktivních nebo nereaktivních forem. Antioxidanty se staly nepostradatelnou skupinou potravinářských přídatných látek díky svým vlastnostem, kterými prodlužují trvanlivost potravin bez jakéhokoliv nepříznivého vlivu na jejich senzorické a nutriční vlastnosti. Mezi potraviny bohaté na antioxidanty patří ovoce a zelenina.

Mezi ovoce, které obsahuje přirozené antioxidační látky s vysokým účinkem, patří jednoznačně jablka. Jejich vysoká obliba u lidí je způsobená nejen pro jejich organoleptické vlastnosti, ale především z důvodu jejich složení. Jablka a jejich produkty obsahují významné množství fenolických látek, které hrají důležitou roli při udržování lidského zdraví, protože mají preventivní účinek proti různým typům onemocnění. Skořice, jejíž základní složkou je skořicový aldehyd, neodmyslitelně patří právě k jablkům. Kombinace těchto dvou surovin dodává pokrmům vynikající a velmi žádanou chuť i vůni.

Cílem této diplomové práce je stanovit antioxidační kapacity jablek metodou využívající DPPH radikál, stanovit celkový obsah fenolických látek a následně zjistit vliv procesu osmo-dehydratace v cukerných roztocích s přídavkem skořicového aldehydu na antioxidační vlastnosti jablek. Tato stanovení jsou dále doplněna o analýzu kapalinovou chromatografií, u které je sledováno množství aldehydu jak v jablkách, tak i v cukerných roztocích.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Volné radikály

Volný radikál je atom nebo skupina atomů, které obsahují ve svém atomovém obalu jeden nebo více nepárových elektronů a jsou schopné alespoň krátkodobé samostatné existence. Přítomnost nepárového elektronu má za následek nestabilitu a vysokou reaktivitu většiny radikálů [1]. Volný radikál vzniká odevzdáním nebo přijetím elektronu z jiných molekul. Aby volný radikál dosáhl rovnovážného stavu, snaží se získat jiný elektron do páru reakcí s neradikální molekulou, ze které se následně stane radikál, který může dále přeměňovat jiné sloučeniny na volné radikály. Dochází tedy k tzv. řetězové reakci, při které vznikají další nové volné radikály. Řetězová reakce je ukončena, když volný radikál reaguje s jiným volným radikálem, se kterým vytvoří elektronový pár [2].

Příčiny vzniku volných radikálů lze rozdělit na exogenní a endogenní. Mezi exogenní příčiny patří např. cigaretový kouř, znečištěné ovzduší a vody, alkohol, UV záření, těžké kovy, strava a léky. Endogenní příčiny vznikají při metabolismu, kde k tvorbě volných radikálů dochází v buňce důsledkem enzymatických i neenzymatických reakcí [2].

1.1.1 Reaktivní formy kyslíku

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou modifikované molekuly a sloučeniny kyslíku, které vznikají jako vedlejší produkty v aerobních organismech a při oxidačním stresu. Volné radikály kyslíku jsou vysoce reaktivní a vedou k poruše životně důležitých membránových dějů a následně až k zániku buňky. Jejich přítomností dochází k poškození nukleových kyselin, proteinů a lipidů [3]. V posledních letech však bylo zjištěno, že ROS nepůsobí v organismu pouze patologicky, ale hrají důležitou roli jako intracelulární signální molekuly k regulaci biologických a fyziologických procesů [4].

V tabulce 1 jsou uvedeny reaktivní formy kyslíku. Mezi nejdůležitější reaktivní formy kyslíku, které obsahují nepárový elektron patří superoxid (O_2^-) a hydroxylový radikál ($OH\bullet$). Jako reaktivní formy kyslíku se považují i látky, které nejsou volnými radikály, jako jsou např. peroxid vodíku (H_2O_2), singletový kyslík ($^1O_2$), ozon (O_3) a kyselina chlorná ($HClO$) [5].

Tabulka 1: Reaktivní formy kyslíku [6]

Reaktivní formy kyslíku			
Volné radikály		**Látky neradikálové povahy**	
Superoxid	$\bullet O_2^-$	Peroxid vodíku	H_2O_2
Hydroxylový radikál	HO•	Singletový kyslík	$^1O_2$
Peroxyl	ROO•	Kyselina chlorná	HClO
Hydroperoxyl	$\bullet HO_2$	Ozon	O_3

1.1.1.1 Superoxid

Superoxid vzniká částečnou redukcí kyslíku, což znamená, že přijme pouze jeden elektron. Vzniká jako první kyslíkový radikál v těle a je iniciátorem řetězové reakce volných radikálů. Superoxid je mírně reaktivní, neprochází přes biologické membrány a funguje jako oxidační i redukční činidlo [7]. Samovolně nebo za katalýzy enzymem superoxiddismutázou (SOD) dismutuje na peroxid vodíku a kyslík. Superoxid představuje největší nebezpečí tím, že z něj mohou vznikat mnohem škodlivější reaktivní formy kyslíku, jako je hydroxylový radikál nebo peroxynitrit [8].

1.1.1.2 Hydroxylový radikál

Jedná se o nejreaktivnější formu kyslíku, která je produkována tříelektronovou redukcí molekulárního kyslíku. Při jednoelektronové redukci kyslíku vzniká superoxid, který při reakci s peroxidem vodíku působí jako donor elektronů a vzniká hydroxylový radikál (Haber–Weissova reakce). Tato reakce se považuje za pomalou a nevzniká při ní dostatečné množství hydroxylového radikálu. Naopak pomocí Fentonovy reakce, kdy se za přítomnosti přechodných kovů (Fe^{2+}, Cu^+) peroxid vodíku redukuje, vzniká dostatečné množství hydroxylového radikálu. Hydroxylový radikál reaguje většinou se všemi molekulami v živých buňkách (lipidy, aminokyseliny, nukleotidy a sacharidy). Má velmi krátkou životnost, proto poškozuje biomolekuly v blízkém okolí jeho vzniku [9].

1.1.1.3 Peroxid vodíku

Peroxid vodíku je nestabilní a silné oxidační činidlo. Sám o sobě je relativně nereaktivní, ale jeho reaktivita se zvýší při reakci s redukovanými přechodnými kovy, jako jsou železo a měď (Fentonova reakce). V těle se tvoří dismutací superoxidu. Peroxid vodíku volně prochází přes

buněčné membrány a jeho vyšší koncentrace může narušovat buněčný metabolismus. Jeho poločas života je poměrně dlouhý a poškozuje tedy i molekuly, které jsou vzdálené. V organismu se peroxid vodíku zneškodňuje enzymy glutathionpeoxidázou, peroxiredoxiny a katalázou [9].

1.1.2 Reaktivní formy dusíku

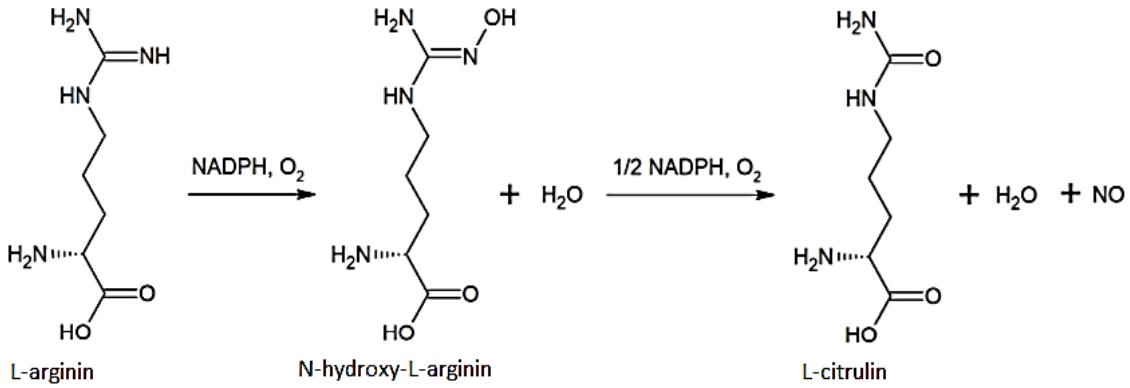
V lidském organismu se dále vyskytují radikály, jejichž volný elektron patří atomu dusíku. Tyto látky souhrnně označujeme jako reaktivní formy dusíku (RNS). Jako volné radikály patří do této skupiny oxid dusnatý a oxid dusičitý. Mezi látky neradikálové povahy patří peroxynitrit, kyselina dusitá a oxid dusný. V tabulce 2 je uveden přehled reaktivních forem dusíku [6].

Tabulka 2: Reaktivní formy dusíku [6]

Reaktivní formy dusíku			
Volné radikály		**Látky neradikálové povahy**	
Oxid dusnatý	$NO•$	Peroxynitrit	$ONOO^-$
Oxid dusičitý	$NO_2•$	Kyselina dusitá	HNO_2
		Oxid dusný	N_2O

1.1.2.1 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý je bezbarvý plyn a nestabilní volný radikál s poločasem rozpadu několik sekund. Dokáže volně difundovat přes biologické membrány, čímž ovlivňuje buňky ve svém okolí. Vzniká v buňkách při přeměně z aminokyseliny L-argininu na L-citrulin (Obr. 1). Reakce je katalyzovaná enzymem nitroxidsyntázou (NOS). Prvním krokem této reakce je hydroxylace jednoho z guanidinových dusíku L-argininu za vzniku N-hydroxy-L-argininu. V druhé fázi reakce probíhá tříelektronová oxidace meziproduktu, při které se uvolňuje oxid dusnatý a L-citrulin. NOS se vyskytuje v buňkách ve třech isoformách označovaných jako neuronální, indukovatelná a endotelová [10].



Obrázek 1: Reakce vzniku oxidu dusnatého z L-argininu [10]

1.1.2.2 Peroxynitrit

Peroxinitrit je silné oxidační a nitrační činidlo, které díky svým vlastnostem poškozuje řadu biomolekul (bílkoviny, DNA a lipidy). Při reakci s lipidy dochází k peroxidaci lipidů, kdy dochází k poškození vyšších mastných kyselin za vzniku volného radikálu. Peroxynitrit vzniká při reakci superoxidu s oxidem dusnatým [2].

1.2 Antioxidanty

Jak už bylo popsáno v předešlé kapitole, v lidském těle vznikají působením různých endogenních a exogenních vlivů volné radikály, které výrazně ovlivňují DNA, buněčnou membránu lipidů i bílkovin a přispívají tak k řadě nežádoucích změn v organismu. Vysoká koncentrace volných radikálů v lidském těle má za následek oxidační stres, který může způsobit řadu chronických onemocnění. Jednou z možností, jak organismus chránit před vlivem volných radikálů, je působení antioxidantů [11].

Antioxidanty lze definovat jako molekuly, které jsou dostatečně stabilní na to, aby darovaly svůj elektron volným radikálům a tím je neutralizovaly. Antioxidanty tedy v lidském těle vychytávají volné radikály a přeměňují je na nereaktivní formy, čímž zpomalují nebo zabraňují dalšímu poškození buněk a zastavují tak řetězovou reakci vzniku dalších volných radikálů. Pro lidské tělo je tedy velmi důležité udržovat rovnováhu mezi volnými radikály a antioxidanty. Mají také velký význam v potravinářském průmyslu, protože zvyšují stabilitu potravin [12].

Antioxidanty jsou různorodá skupina látek, a proto se můžou dělit do několika skupin. Nejčastěji lze antioxidanty rozdělit na přírodní a syntetické. Přírodní antioxidanty se dále rozdělují na neenzymatické a enzymatické, které se ještě dělí na primární a sekundární antioxidanty [13].

1.2.1 Přírodní antioxidanty

Za přírodní antioxidanty se považují látky, které je organismus člověka schopen vytvářet sám nebo je přijímá v potravě. Do skupiny přírodních antioxidantů, které si tělo vytvoří samo, jsou řazeny následující enzymatické antioxidanty: superoxiddismutáza, kataláza a glutathionperoxidáza [14].

Další skupina látek, které patří do přírodních antioxidantů, jsou látky, které si tělo nedokáže samo vytvořit a je nutné je přijímat z potravin bohatých na antioxidanty. Tyto látky se nachází v přírodních zdrojích, jako jsou ovoce, zelenina, maso, různé koření a byliny. Mohou být přijímány i jako součást doplňků stravy. Do této skupiny patří vitamín A, vitamín C, vitamín E, karotenoidy, polyfenoly a fenolické sloučeniny [15].

1.2.1.1 Superoxiddismutáza

Superoxiddismutáza (SOD) je přirozeně se vyskytující enzym, který neutralizuje superoxidový radikál a přeměňuje ho na méně toxický peroxid vodíku a kyslík. Superoxiddismutáza je přítomná téměř ve všech aerobních organismech. Tento enzym se dělí do tří skupin, které se liší kofaktorem, kterým je vždy atom kovu (Cu/Zn, Fe a Mn). Mn-SOD je přítomen v mitochondriích a peroxizomech, Fe-SOD se nachází především v chloroplastech, ale byl nalezen i v peroxizomech. Poslední enzym Cu/Zn-SOD byl lokalizován v cytosolu, chloroplastech a peroxizomech [12]. Enzym SOD je také důležitý pro fibroblasty, což jsou fixní buňky ve vazivové tkáni. Mezi běžné přírodní zdroje enzymu superoxiddismutázy patří např. zelí, ječmen, růžičková kapusta a brokolice [14].

1.2.1.2 Kataláza

Kataláza (CAT) je běžný enzym, který se nachází téměř ve všech živých organismech vystavených kyslíku. Působí jako katalyzátor rozkladu peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Peroxid vodíku je škodlivý vedlejší produkt mnoha běžných metabolických procesů. K tomu, aby nešlo k poškození buněk, musí být jeho přeměna na méně nebezpečné látky rychlá, a proto buňky k této přeměně využívají enzym katalázu [12]. Kataláza je tetramer čtyř polypeptidových řetězců [14].

1.2.1.3 Glutathionperoxidáza

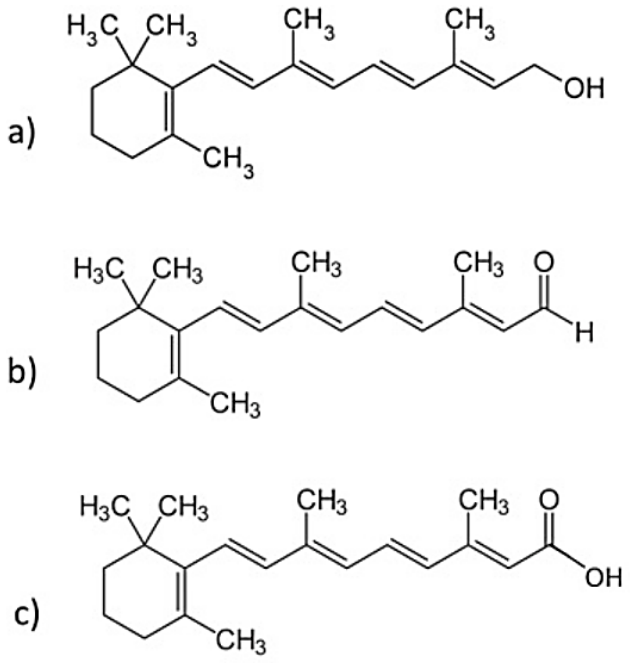
Glutathionperoxidáza (GPx) je enzym, který v organismu mění škodlivý peroxid vodíku na vodu a kyslík. GPx je také zodpovědná za ochranu buněk před hydroxylovými radikály nenasycených mastných kyselin. Při těchto reakcích dochází k oxidaci glutathionu. K tomu,

aby enzym glutathionperoxidáza zajišťoval plynulé odstranění peroxidu vodíku, je potřeba regenerovat glutathion v redukované formě. Gluthation je tedy následně regenerován enzymem glutathionreduktázou. GPx potřebuje ke své aktivaci malé množství selenu, a proto obsahuje jeden selenocysteinový zbytek v každé ze čtyř identických podjednotek [14].

1.2.1.4 Vitamín A

Vitamín A patří do skupiny vitamínů, které jsou rozpustné v tucích. Vyskytuje se ve třech oxidačních stavech: retinol (Obr. 2a), retinal (Obr. 2b) a kyselina retinová (Obr. 2c). Lidský organismus není schopný si sám syntetizovat vitamín A, a proto je nutné ho získávat z potravy především živočišného původu, jako jsou játra, mléko, vejce a ryby. Z potravin rostlinného původu se získává β-karoten, který slouží jako prekurzor vitamínu A. Retinol i karotenoidy se vstřebávají v tenkém střevě. Z 1 molekuly β-karotenu, po rozložení ve střevní sliznici, vzniknou 2 molekuly retinolu. Vitamín A je velmi důležitý pro normální funkci zraku a ke zlepšení vidění za šera. Také podporuje růst a správný vývoj sliznic i kostí. Vitamín A hraje důležitou roli v imunitním systému a ovlivňuje i reprodukční funkci [16; 17].

Doporučená denní dávka (DDD) vitamínu A je stanoven na 750 μg RE/den u mužů, 650 μg RE/den u žen a 1300 μg RE/den u kojících žen. U dětí do 3 let je DDD stanovena na 250 μg RE/den. RE je tzv. ekvivalent retinolu, přičemž 1 μg ekvivalentu retinolu odpovídá 6 μg β-karotenu. Při nedostatku vitamínu A (hypovitaminóza) se nejčastěji projevují oční nemoci hemeralopie a xeroftalmie. Při hemeralopii dochází k šerosleposti a xeroftalamie se vyznačuje vysycháním spojivky a rohovky oka. Dalším problémem může být snížení imunity a kožní projevy, které se vyznačují suchou šupinatou kůží. Nadbytek vitamínu A (hypervitaminóza) v lidském těle způsobuje akutní nebo chronické intoxikace. Tyto projevy může způsobit pouze nadbytek retinolu. Při nadměrném příjmu β-karotenu dochází pouze k oranžovo-žlutému zbarvení kůže. Akutní hypervitaminóza retinolu způsobuje bolesti hlavy, závratě, zvracení a průjem. U chronické hypervitaminóze dochází k astenii, zvracení, onemocnění jater, alopecii a ke zvýšenému riziku zlomenin. U těhotných žen může způsobit zvýšený příjem vitamínu A poškození plodu a zvyšuje se riziko vývojových vad [18].



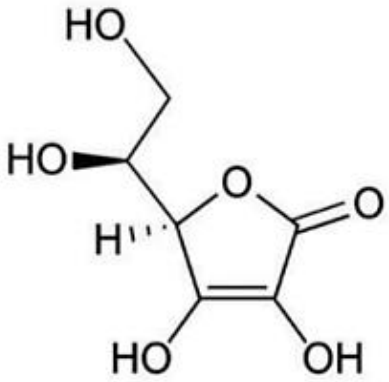
Obrázek 2: Chemický vzorec a) retinolu b) retinalu c) kyseliny retinové [19]

1.2.1.5 Vitamín C

Vitamín C, známý také jako kyselina L-askorbová (Obr. 3), je vitamín rozpustný ve vodě. Jedná se o látku, která je pro lidský organismus nezbytná a je nutné jí přijímat z potravy. V lidském těle plní mnoho funkcí. Vitamín C je velmi důležitý při syntéze bílkovin, konkrétně kolagenu. Kolagen zajišťuje pružnost pokožky a činí jí pevnou a silnou. Jedna z aminokyselin, ze kterých se kolagen tvoří – hydroxyprolin – je syntetizovaná pouze tehdy, je-li k dispozici vitamín C. Jeho antioxidační účinky jsou důležité při poškození kůže způsobené UV zářením. Jeho vlastnosti se dále využívají pro normální funkci imunitního systému, krevních cév, kostí, chrupavek, zubů a dásní. Také posiluje celkovou fyzickou kondici odstraněním toxických kovů z těla [20].

DDD se pohybuje kolem 80–100 mg/den u dospělého člověka. Nedostatek vitamínu C způsobuje závažné onemocnění zvané skorbut (kurděje). Tato nemoc se projevuje oteklými a krvácejícími dásněmi i ztrátou zubů. Dalšími znaky nedostatku vitamínu jsou únava, bolesti kostí, svalová atrofie a krvácení sliznic a kloubů. K hypervitaminóze u tohoto vitamínu dochází velmi zřídka, jelikož je veškerý přebytek vyloučen močí. Vitamín C je hojně dostupný v mnoha přírodních zdrojích, včetně čerstvého ovoce a zeleniny. Nejbohatšími zdroji tohoto vitamínu jsou citrusy (limetky, pomeranče a citróny), rajčata, angrešt, brambory, papriky, kiwi, jahody,

melouny, mango, brokolice, zelí, květák a šípek. V tabulce 3 je uvedeno množství vitamínu C ve vybraných potravinách. Jelikož je vitamín C velmi citlivý na vnější prostředí, dochází k jeho ztrátám např. skladováním nebo zahříváním [20].



Obrázek 3: Chemický vzorec kyseliny L-askorbové [21]

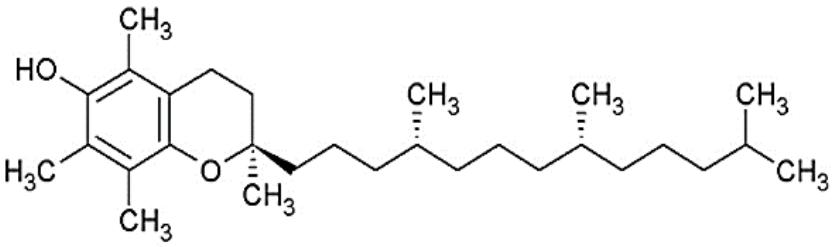
Tabulka 3: Obsah vitamínu C ve vybraných potravinách [22]

Potravina	**Obsah vitamínu C** [mg/1000 g potraviny]	**Potravina**	**Obsah vitamínu C** [mg/1000 g potraviny]
brokolice	1130	angrešt	244
květák	383	jablka	48
paprika	1615	citróny	443
rajčata	224	grapefruity	416
zelí bílé	329	pomeranče	513
kapusta hlávková	344	melouny	220
kapusta růžičková	787	maliny	225

1.2.1.6 Vitamín E

Vitamín E byl objeven v roce 1922 a slouží jako velmi důležitý antioxidant, který je rozpustný v tucích. Vitamín E je obecný název pro skupinu látek, které mají podobnou antioxidační aktivitu. Do této skupiny patří tokoferoly a tokotrienoly. Liší se od sebe počtem a polohou methylových skupin na chromanovém kruhu a postranním uhlíkovým řetězcem. Tokoferoly mají nasycený postranní řetězec obsahující tři isoprenové jednotky a tokotrienoly mají nenasycený postranní řetězec obsahující tři dvojné vazby. Vitamín E obsahuje 4 různé tokoferoly (α-, β-, γ-, a δ-) a čtyři různé tokotrienoly (α-, β-, γ-, a δ-) [23].

Nevýznamnější biologickou aktivitu vykazuje α-tokoferol (Obr. 4). Jeho funkce se nejvíce využívají při zpomalování oxidace lipidů. Autooxidační reakce lipidů probíhá radikálovým mechanismem, který se skládá ze tří fází: iniciační, propagační a terminační. α-tokoferol je schopný v propagační fázi autooxidace poskytnout atom vodíku peroxylovým radikálům nenasycených mastných kyselin za vzniku hydroperoxidů a tokoferoxylového radikálu. Vitamín E hraje také důležitou roli při prevenci chronických onemocnění, jako jsou ateroskleróza, kardiovaskulární onemocnění nebo rakovina [23].



Obrázek 4: Chemický vzorec α-tokoferolu [23]

DDD vitamínu E je 13 mg/den u mužů, 11 mg/den u žen a 5–13 mg/den u dětí (v závislosti na věku). Při nedostatku vitamínu E dochází ke špatnému vstřebávání živin, poškození metabolismu nervů a ve vážnějších případech až k neplodnosti. Toxické účinky nadměrného příjmu vitamínu E se vyskytují pouze zřídka [24]. Hlavním zdrojem vitamínu E jsou potraviny rostlinného původu. Obecně platí, že rostlinné oleje a ořechy jsou bohaté na tokoferoly, zatímco ječmen, oves a palmový olej jsou bohaté na tokotrienoly. Dalším zdrojem vitamínu je ovoce, mořské plody, sýry a vejce. Obsah vitamínu E ve vybraných potravinách je uveden v tabulce 4 [25].

Tabulka 4: Obsah vitamínu E ve vybraných potravinách [22]

Potravina	**Obsah vitamínu E** [mg/1000 g potraviny]	**Potravina**	**Obsah vitamínu E** [mg/1000 g potraviny]
makrela	16,0	hrášek	30,0
játra hovězí	10,0	mrkev	20,0
vejce	10,0	rajčata	12,2
palmový olej	100,0	kapusta růžičková	17,0
ořechy vlašské	200,0	jablka	5,9
rýže	10,2	paprika	8,0
žampiony	8,3	špenát	25,0

1.2.1.7 Karotenoidy

Z chemického hlediska patří karotenoidy do skupiny tetraterpenoidů. Jedná se o lipofilní sloučeniny, které jsou syntetizované všemi fotosyntetickými organismy (rostliny, řasy a sinice) a dále bakteriemi a houbami. Zvířata a lidé nejsou schopni si syntetizovat karotenoidy, a proto je musí přijímat v potravě [26]. Existuje více než 700 různých druhů karotenoidů a kolem 40 karotenoidů se vyskytuje v lidské stravě [27].

Typické karotenoidy obsahují 40 atomů uhlíku (C40) s osmi isoprenovými jednotkami. Jsou to lineární molekuly, jejichž řetězec obsahuje konjugované dvojné vazby, které jsou odpovědné za jejich barvu, tvar, reaktivitu a fotochemické vlastnosti. Karotenoidy lze rozdělit na acyklické a cyklické. Acyklické karotenoidy jsou ryze alifatické a cyklické karotenoidy obsahují na jednom nebo obou koncích cykly. Další rozdělení karotenoidů může být na základě chemického složení. Ty, které jsou tvořeny výhradně atomy uhlíku a vodíku, se nazývají karoteny, zatímco karotenoidy obsahující kyslík se nazývají xantofyly. Mezi karoteny patří např. α-karoteny, β-karoteny a lykopen. Mezi xantofyly patří např. lutein, zeaxanthin, violaxanthin a neoxanthin [26; 28].

Karotenoidy jsou přírodní pigmenty, které přispívají ke žlutému až červenému zabarvení mnoha organismů. V rostlinách zastávají primární a sekundární funkci. Mezi primární funkci patří ochrana před slunečními paprsky (fotooxidace) a slouží také jako prekurzory fytohormonů (kyselina abscisová a strigolaktony), které fungují jako klíčové regulátory růstu a vývoje rostliny. Jako sekundární metabolity hrají důležitou roli k přilákávání ptáků a hmyzu k opylování. V rostlinách jsou karotenoidy syntetizovány v plastidech [26].

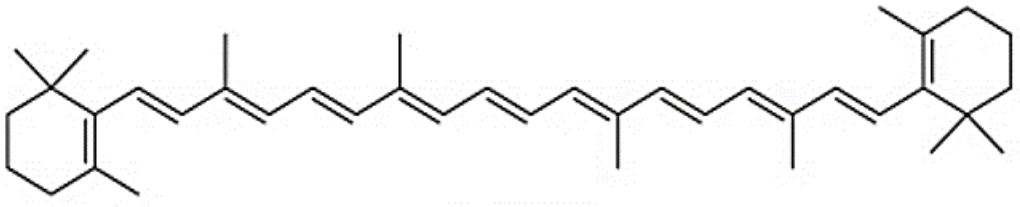
Karotenoidy zastávají mnoho funkcí i v lidském organismu. Jelikož se jedná o lipofilní sloučeniny, jsou pro jejich vstřebávání v tenkém střevě důležité žlučové kyseliny [27]. Mnoho studií dokazuje, že vyšší příjem karotenoidů ve stravě souvisí s nižším rizikem chronických onemocnění, jako jsou kardiovaskulární choroby, rakovina a onemocnění očí. Dalšími pozitivními účinky karotenoidů jsou zvýšená imunita, ochrana kůže před UV zářením a jsou využívány jako provitamíny A. V lidském organismu jsou karotenoidy součástí antioxidačního obranného systému. Fungují jako velmi účinné antioxidanty, jejichž schopnost je založena zejména na zhášení singletového kyslíku a peroxylových radikálů. Při interakci s dalšími antioxidanty (vitamín E a C) dochází ke zvýšení antioxidační aktivity a jsou účinnější než jednotlivé sloučeniny [29; 30].

Hlavním zdrojem karotenoidů je ovoce a zelenina. Za bohaté zdroje je považována nejen oranžovo-červeně zbarvená zelenina (mrkev a paprika), ale i zelená zelenina (špenát, brokolice

a hrášek). Z živočišných produktů to jsou mléčné výrobky (mléko a máslo), vaječný žloutek a mořské plody. Karotenoidy lze užívat také jako doplněk stravy. Množství a obsah karotenoidů v konkrétní potravině se mohou značně lišit. Tyto faktory závisí na stupni zralosti, odrůdě, období sklizně, výrobních postupech, manipulaci po sklizni, skladování a zpracování. Dále mohou být ovlivněny i vařením a zpracováním. Celkový příjem karotenoidů se pohybuje kolem 9,5–16 mg/den [26].

- **β-karoten**

β-karoten (Obr. 5) patří mezi nejběžnější a nejrozšířenější karotenoidy. Je důležitý nejen pro barvu, kterou potravinám dodává, ale i pro jeho pozitivní vliv na lidské zdraví. β-karoten je nejúčinnější prekurzor vitamínu A. Přirozeně se vyskytuje v podobě dvou stereoizomerů (*cis*-β-karoten a *all-trans*-β-karoten). Funguje jako silný antioxidant, který se podílí na ochraně kůže proti poškození slunečním zářením. Podílí se na snížení rizika srdečních onemocnění, zvýšení imunity a na ochraně před makulární degenerací související s věkem (závažné onemocnění zrakového orgánu). Je špatně rozpustný ve vodě a nestabilní za přítomnosti světla, tepla a kyslíku. Absorpce β-karotenu probíhá v tenkém střevě. Hlavními zdroji β-karotenu jsou mrkev, paprika, grapefruit, mango, rajčata, meruňky, špenát, hrách a brokolice [31].

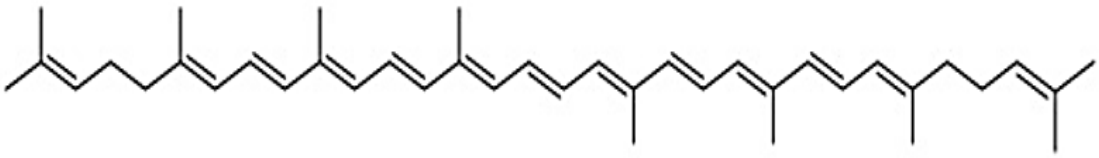


Obrázek 5: Chemický vzorec β-karotenu [27]

- **Lykopen**

Lykopen (Obr. 6) patří mezi alifatické uhlovodíkové karotenoidy, který je rozpustný v tucích. Jedná se o vysoce nenasycený uhlovodík, který obsahuje 11 konjugovaných a 2 nekonjugované dvojné vazby. U různých druhů ovoce a zeleniny je zodpovědný za červené zbarvení. Je považován za hlavní karotenoid detekovaný v lidské plazmě, který je přirozeně přítomný ve větším množství než β-karoten. Lykopen je jedním z nejúčinnějších antioxidantů mezi karotenoidy, a to díky velkému množství konjugovaných dvojných vazeb. Antioxidační aktivita lykopenu je 2× vyšší než aktivita β-karotenu a 10× vyšší než aktivita α-tokoferolu. Nejúčinnější antioxidační vlastnosti vykazuje 5-*cis*-lykopen, naopak nejslabší antioxidační vlastnosti má *all-trans*-lykopen. Lykopen zvyšuje produkci antioxidačních enzymů, jako je

superoxiddismutáza a kataláza. Většina lykopenu se v lidském těle vyskytuje v tukové tkáni, játrech a plazmě [32]. Při pravidelné konzumaci snižuje riziko rakoviny prostaty, prsu a plic. Dále snižuje riziko kardiovaskulárních a koronárních onemocnění srdce a LDL (low-density lipoprotein) cholesterolu v krvi [33]. Nejbohatším zdrojem lykopenu jsou jednoznačně rajčata. Jeho nejvyšší množství je obsaženo ve slupce rajčat. Pro lidský organismus je lépe absorbován lykopen, který se nachází v tepelně upravených rajčatech. K dalším důležitým zdrojům lykopenu patří vodní meloun, papája, guava, grapefruity a meruňky [34].



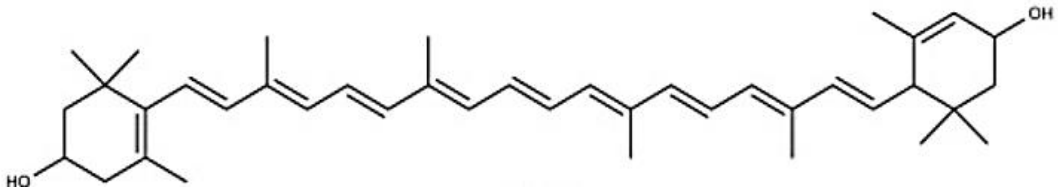
Obrázek 6: Chemický vzorec lykopenu [27]

- **Lutein a zeaxantin**

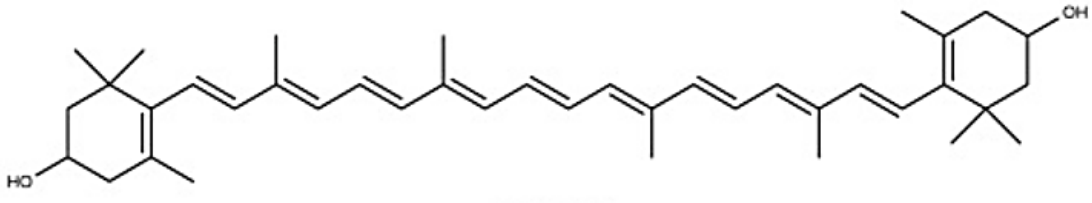
Lutein (Obr. 7) je žlutooranžové barvivo, které patří do skupiny xantofylů. V přírodě se společně vyskytuje se svým stereoizomerem zeaxantinem (Obr. 8). Jejich nejvyšší koncentrace se nachází v čočce a sítnici lidského oka. Oba karotenoidy jsou velmi důležité při snižování výskytu očních onemocnění, jako jsou věkem podmíněná makulární degenerace sítnice, katarakta (šedý zákal) a retinitis pigmentóza. Lutein i zeaxantin fungují jako antioxidanty, čímž pomáhají v pohlcování modré části viditelného spektra (při 440 nm) a chrání citlivé fotoreceptory před škodlivým UV zářením. Dále snižují riziko rakoviny a kardiovaskulárních onemocnění [35]. Lutein i zeaxantin jsou obsaženy v mateřském mléce a mají zásadní vliv na zrakový a kognitivní vývoj kojenců. V mozku kojenců tvoří až 77 % celkové koncentrace karotenoidů [36].

Díky intenzivní žluté barvě jsou široce používány jako přírodní potravinářská barviva. Používají se jako přísady do krmiv, k zesvětlení barev drůbežího peří a k zintenzivnění žluté barvy vaječného žloutku [37]. V přírodě se lutein nejhojněji vyskytuje ve žlutých okvětních lístcích měsíčku lékařského, ve kterých je chemicky vázaný na mastné kyseliny. Dalšími bohatými zdroji jsou listová zelenina (špenát a kapusta), brokolice, olivy, zelí, kukuřice, mrkev, dýně, vaječný žloutek a sýry [35]. Během tepelného zpracování potravin (blanšírování, vaření, smažení a sušení) může docházet ke snížení koncentrace luteinu v potravině [36].

DDD luteinu není stanovena, ale aby byly pozorovány pozitivní účinky luteinu, doporučuje se přibližně 6 mg/den [35].



Obrázek 7: Chemický vzorec luteinu [27]



Obrázek 8: Chemický vzorec zeaxantinu [27]

1.2.1.8 Polyfenoly

Polyfenoly jsou jednou z nejpočetnějších a nejrozšířenějších skupin sekundárních metabolitů přítomných v rostlinách. Polyfenoly mají pro rostliny fyziologický i morfologický význam. Ovlivňují jejich barvu i organoleptické vlastnosti jednotlivých rostlinných druhů. Chrání je před UV zářením, parazity, patogeny, suchem i chladem. Vznikají dvěma metabolickými dráhami: z kyseliny šikimové nebo z kyseliny octové. Polyfenoly obsahují jeden nebo více aromatických kruhů s jednou nebo více hydroxylovými skupinami. Bylo identifikováno více než 8000 fenolických sloučenin. Hlavním zdrojem polyfenolů jsou ovoce a zelenina, zejména bobuloviny. Mezi další významné zdroje patří čaj, červené víno, kakao, káva, olivový olej, sója a obilniny. Průměrná denní dávka polyfenolů u lidí se pohybuje kolem 1 g/den [38].

Polyfenoly se dělí na:

- fenolové kyseliny (kyselina gallová, kyselina salicylová, kyselina vanilová, kyselina kávová a kyselina ferulová)
- flavonoidy (flavony, flavonoly, flavanony, flavanoly, flavonony, antokyanidiny a isoflavony)
- stilbeny (resveratrol)
- lignany (secoisolariciresinol a matairesinol) [38].

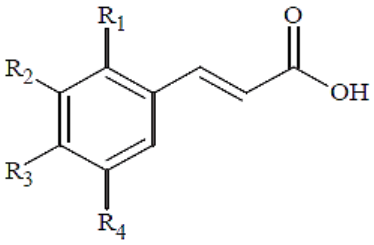
- **Fenolové kyseliny**

Fenolové kyseliny jsou aromatické sekundární rostlinné metabolity, které ve svojí molekule obsahují karboxylovou skupinu. Dělí se na dvě podskupiny: deriváty kyseliny hydroxyskořicové (Tab. 5) a deriváty kyseliny hydroxybenzoové (Tab. 6) [39]. Jejich biologická aktivita, zejména antioxidační vlastnosti, závisí na počtu hydroxylových skupin na aromatickém kruhu [40]. Hlavní metabolická dráha pro syntézu fenolových kyselin u bakterií, rostlin a hub se nazývá šikimátová dráha. Šikimátová dráha začíná kondenzací látek sacharidové povahy fosfoenolpyruvátu a erytróza-4-fosfátu, ze kterých vzniká meziprodukt šikimát. Další kondenzací s fosfoenolpyruvátem vzniká chorismát. Následně se dráha větví a vede k syntéze tří aromatických aminokyselin fenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu [41]. Fenylalanin je dále deaminován fenylalanin-amoniak lyázou na kyselinu skořicovou. Tyrosin je deaminován na kyselinu *p*-kumarovou [40].

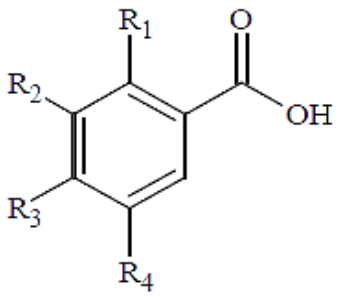
Mezi nejběžnější přirozeně se vyskytující derivát kyseliny hydroxyskořicové patří kyselina chlorogenová (ester kyseliny kávové a kyseliny chinové). Mezi další deriváty kyseliny hydroxyskořicové lze zařadit kyselinu ferulovou, kyselinu kávovou, kyselinu *p*-kumarovou a kyselinu sinapovou. Tyto kyseliny se v potravinách vyskytují převážně ve formě esterů kyseliny chinové. Mezi běžné deriváty kyseliny hydroxybenzoové patří kyselina *p*-hydroxybenzoová, kyseliny protokatechová, kyselina vanilová a kyselina gallová. Tyto kyseliny se nejčastější vyskytují vázané se sacharidy nebo organickými kyselinami [39].

Mezi hlavní zdroje potravin bohatých na fenolové kyseliny patří hroznové víno, granátové jablko, brokolice, brambory, čaj, houby, byliny a koření (rozmarýn, skořice, tymián, máta a oregano) [42].

Tabulka 5: Chemické struktury derivátů kyseliny hydroxyskořicové [40]

obecný vzorec	R_1	R_2	R_3	R_4	kyselina
	H	H	H	H	kyselina skořicová
	OH	H	H	H	kyselina *o*-kumarová
	H	H	OH	H	kyselina *p*-kumarová
	H	OH	OH	H	kyselina kávová
	H	OCH_3	OH	H	kyselina ferulová
	H	OCH_3	OH	OCH_3	kyselina sinapová

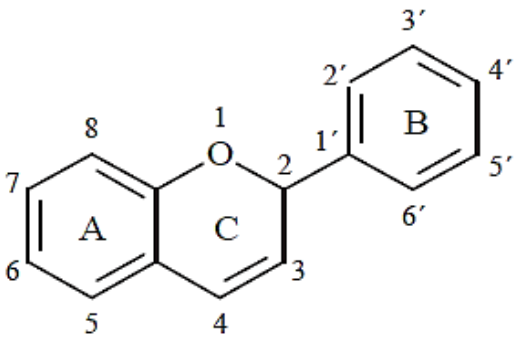
Tabulka 6: Chemické struktury derivátů kyseliny hydroxybenzoové [40]

obecný vzorec	R_1	R_2	R_3	R_4	kyselina
	H	H	H	H	kyselina benzoová
	H	H	OH	H	kyselina *p*-hydroxybenzoová
	H	H	OH	OH	kyselina protokatechová
	H	OCH_3	OH	H	kyselina vanilová
	H	OH	OH	OH	kyselina gallová
	OH	H	H	OH	kyselina gentisová
	H	OCH_3	OH	OCH_3	kyselina syringová
	OH	H	H	HSO_3	kyselina 5-sulfosalicylová

- **Flavonoidy**

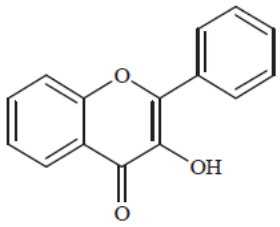
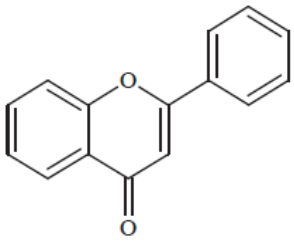
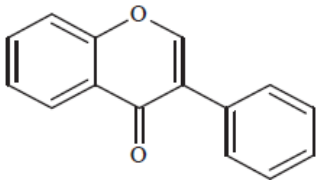
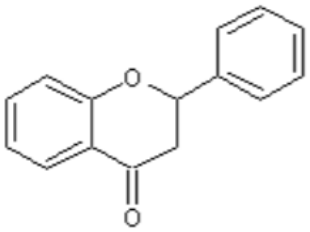
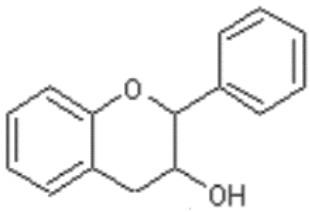
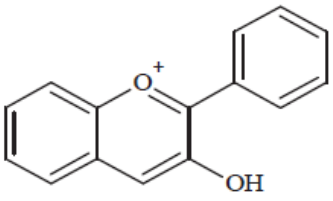
Flavonoidy jsou nízkomolekulární organické sloučeniny představující nejpočetnější skupinu fenolových sloučenin, které se vyskytují prakticky ve všech částech rostlin. Jsou spojovány se širokým spektrem účinků podporujících zdraví. Je tomu tak z důvodu jejich antioxidačních, protizánětlivých, antimutagenních a antikarcinogenních vlastností. Flavonoidy jsou barviva, která dodávají rostlinám jejich typické zabarvení i vůni [43].

Struktura flavonoidů (Obr. 9) je uspořádaná do konfigurace C_6-C_3-C_6 [44]. Skládá ze dvou benzenových kruhů (A a B), které jsou spojeny heterocyklickým kruhem obsahujícím kyslík (C). Flavonoidy lze rozdělit na základě různých počtů a poloh substituentů na kruhu C a podle spojení mezi kruhem B a C. Dělí se na: flavonoly, flavony, isoflavony, flavanony, flavonoly a antokyanidiny. V tabulce 7 jsou vypsány sloučeniny, které do těchto podtříd flavonoidů patří, a jejich výskyt v potravinách [45].



Obrázek 9: Obecná struktura flavonoidů [44]

Tabulka 7: Podtřídy flavonoidů, jejich obecná struktura a zdroje potravin [45]

Podtřída	Obecná struktura	Příklady sloučenin	Zdroje
Flavonoly		kvercetin, kemferol, myricetin	jablka, třešně, cibule, rajčata, čaj, brokolice, červené víno, olivový olej
Flavony		luteolin, chrysin, apigenin	zelenina, ovoce, obiloviny, čevrené víno
Isoflavony		genistein, daidzein, glycitein	luštěniny, sójové boby
Flavanony		naringenin, hesperidin,	citrusové plody
Flavanoly		katechin, epikatechin, galokatechin	jablka, červené hrozny, čaj
Antokyanidiny		kyanidin, pelargonidin, delfinidin, malvidin	třešně, borůvky, jahody, hroznové víno

- **Stilbeny**

Stilbeny jsou rostlinné sekundární metabolity, které jsou charakterizovány přítomností dvou fenolových kruhů s obecným vzorcem C_6-C_2-C_6. V rostlinách fungují jako fytoalexiny, jejichž funkcí je ochrana rostlin před vnějším prostředím, především proti škůdcům, patogenům a UV zářením. Mezi nejdůležitější stilbeny patří resveratrol a pterostilbem [46].

Resveratrol (3,5,4´-trihydroxy-*trans*-stilben) patří mezi účinné antioxidanty, které se podílí na prevenci před vznikem nádorových a kardiovaskulárních onemocnění [47]. Může existovat ve dvou izomerních formách, a to *cis*- a *trans*-. *Trans*-resveratrol se hojně vyskytuje v rostlinách a vykazuje daleko vyšší biologicky aktivní vlastnosti ve srovnání s *cis*-resveratrolem. Působením tepla nebo UV zářením může být izomerizovaný na *cis*-izomer. Hlavním zdrojem resveratrolu jsou slupky hroznů, dále pak borůvky, brusinky, červené víno a arašídy [46].

Ve spojitosti s resveratrolem se často mluví o tzv. „francouzském paradoxu". Tento pojem byl vytvořen v roce 1992 na základě mnoha studií, které dokazují, že Francouzi trpí menším výskytem kardiovaskulárních onemocnění, přestože konzumují stravu s vysokým obsahem nasycených tuků. Jedním z důvodů může být podle vědců francouzský způsob života a pravidelná konzumace červeného vína v mírném množství. Přesto je vysvětlení „francouzského paradoxu" stále předmětem studií [48].

- **Lignany**

Lignany patří do skupiny přirozeně se vyskytujících fenolů, které jsou široce rozšířeny v rostlinné říši. Jedná se o dimery fenylpropanoidních jednotek spojených uhlíky postranního řetězce. V rostlinách plní funkci ochranných sloučenin, které brání před působením mikroorganismů, hmyzu, hub a jiných rostlin [49]. Lignany jsou důležitou skupinou fytoestrogenů, které se v gastrointestinálním traktu přeměňují na látky s estrogenními účinky. Hrají proto důležitou roli při prevenci rakoviny prsu a prostaty, kardiovaskulárních onemocnění, menopauzálních příznaků a osteoporózy. Hlavním zdrojem lignanů jsou lněná a sezamová semínka, obilniny, luštěniny, zelenina a ovoce [50].

1.2.2 Syntetické antioxidanty

Syntetické antioxidanty se přidávají do potravin za účelem zpomalení oxidační degradace lipidů. Oxidace lipidů způsobuje nežádoucí změny v chuti, vůni, struktuře a vzhledu potraviny a může dojít i ke vzniku toxických sloučenin, které můžou představovat přímou hrozbu na lidské zdraví. Nedochází pouze ke ztrátám kvality produktu, ale také ke ztrátám výživové kvality. Žluknutím potravin totiž dochází k degradaci esenciálních mastných kyselin a vitamínů

rozpustných v tucích. Potraviny se tak stávají nepřitažlivé až nepoživatelné. Syntetické antioxidanty jsou využívány jako přídatné látky kvůli jejich vysoké stabilitě, nízké ceně a široké dostupnosti [51].

Mezi nejběžnější syntetické antioxidanty patří butylhydroxyanisol (BHA) a butylhydroxytoluen (BHT). Využívají se zejména jako antioxidanty, konzervanty a stabilizátory v potravinách, léčivech, kosmetických výrobcích a ropných produktech. BHA a BHT jsou předmětem mnoha studií pro jejich možné genotoxické a karcinogenní účinky. Podle organizace IARC (Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny) bylo ale dostatečně prokázáno, že tyto látky nepůsobí karcinogenně na člověka, ale jedná se o zvířecí karcinogen [52]. Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) považuje BHA i BHT za bezpečné, pokud celkový obsah těchto látek nepřesáhne 0,02 % obsahu tuků v potravině [53]. Mezi další syntetické antioxidanty patří *terc*-butylhydrochinon, propylgallát, oktylgallát a kyselina nordihydroguajaretová [13].

1.2.3 Stopové prvky s antioxidačními účinky

Stopové prvky jsou velmi důležité pro lidský organismus, přestože se jejich denní potřeba pohybuje v malých množstvích (řádově v μg). Stopové prvky jsou důležité pro správné fungování řady enzymů a bílkovin, které se účastní mnoha fyziologických, biochemických a metabolických procesů, a proto jsou pro organismus nepostradatelné. Důležitou roli hrají v antioxidační ochraně, a to zejména zinek, selen, měď a mangan [54].

1.2.3.1 Zinek

Zinek je esenciální stopový prvek, který je kofaktorem velkého množství enzymů. V buněčné biologii plní katalytické, strukturální a regulační funkce. Má velký význam při udržování stálé acidobazické rovnováhy krve a energetickém metabolismu, čímž ovlivňuje růst, vývoj a imunitní systém organismu. Zinek je absorbován v tenkém střevě s asi 33% účinností. Nedostatek zinku může být způsoben buď nedostatečným příjmem potravin bohatých na zinek nebo špatným vstřebáváním zinku (např. při zánětlivých onemocněních střev). To může mít za následek zpomalení růstu a vývoje, zhoršení hojení ran, akné, ekzém, nedostatečnou funkci pohlavních orgánů, ztrátu chuti k jídlu a poruchy imunity. Zvýšené riziko z nedostatku zinku se týká především kojenců a dětí, dospívajících dětí, těhotných a kojících žen a starších osob. U těhotných žen může dojít ke zpomalení vývoje plodu nebo předčasnému porodu. Existují také akutní i chronické formy toxicity zinku. Akutní příznaky se projevují nevolností, zvracením, nechutenstvím, průjmem a bolestí hlavy. Chronická toxicita zinku se značí sníženou

imunitní funkcí, snížením HDL (high-density lipoprotein) cholesterolu a špatným vstřebáváním mědi. Přirozenými zdroji zinku jsou maso, vnitřnosti, ryby, mořské plody, vejce, mléko, obilniny, luštěniny a ořechy. Zinek se daleko lépe vstřebává z potravin živočišného původu, protože rostlinné potraviny obsahují vysoké množství fytátů, které vážou zinek do nerozpustných komplexů, a tím zabraňují jeho vstřebávání [55; 56].

1.2.3.2 Selen

Selen je stopový prvek, který je nezbytný pro správný průběh životně důležitých procesů v lidském těle. Je přítomen v 25 identifikovaných selenoproteinech, z nichž řada má enzymatickou funkci. Mezi nejdůležitější enzymy patří glutathionperoxidáza, jodothyronin deiodináza a thioredoxin reduktáza, které chrání buňky před škodlivými účinky volných radikálů. Selenoenzym jodothyronin deiodináza významně vstupuje do metabolismu jódu a hormonů štítné žlázy. Selen se vyskytuje především vázaný v aminokyselinách selenocystein a selenomethionin. Dále se selen vyskytuje např. v selenoproteinu P, selenoproteinu K a selenoproteinu W [57]. Vstřebávání selenu probíhá v tenkém střevě. Absorpce selenu z jeho organických forem (selenocystein a selenomethionin) dosahuje až 95 %, zatímco z jeho anorganických forem (seleničitany a selenany) je vstřebávání méně účinné a dosahuje kolem 80 % i méně [58].

Nedostatek selenu má za následek Keshanovou chorobu, která byla pozorována v čínské provincii Keshan. Tato nemoc se projevu městnavou kardiomyopatií, která se vyznačuje zvětšeným nebo zaníceným srdečním svalem. Další nemoc z nedostatku selenu se nazývá Kashin–Beckova choroba, která byla pozorována nejen v Číně, ale také v Mongolsku a na Sibiři. Projevy této nemoci se vyznačují těžkou deformitou kloubů a končetin. Nedostatečný příjem selenu v lidském organismu může vést dále k poškození nervového systému, reprodukčních orgánů, zvýšenému riziku kardiovaskulárních onemocněních a narušení imunitních funkcí. Ve vyšších dávkách působí toxicky (příjem vyšší než 400 μg/den). Otrava selenem vede k vypadávání vlasů, ztrátě nehtů, poškození kůže, nevolnosti, únavě a poškození nervového systému a jater [59]. Přirozenými zdroji selenu pro lidský organismus jsou zejména mořské plody, ryby, maso, vejce, droždí, česnek, cibule, brokolice, ořechy, chřest a cereální výrobky. Obsah selenu v rostlinné stravě závisí hlavně na obsahu tohoto prvku v půdě, ve které byla rostlina pěstována [58]. DDD selenu je u dospělých osob 55 μg/den. Horní tolerovaný limit se udává kolem 400 μg/den [59].

1.2.3.3 Měď

Měď je esenciální stopový prvek, který je nezbytný pro mnoho fyziologických procesů. Slouží jako kofaktor několika nepostradatelných enzymů, včetně superoxiddismutázy a cytochrom c oxidázy. Je navázaná na bílkovinu ceruloplazmin, která je tvořena v játrech a hraje důležitou roli v transportu mědi a metabolismu železa. V důsledku poruchy metabolismu mědi vzniká dědičné onemocnění, které se nazývá Wilsonova choroba. Toto onemocnění vzniká mutací genu ATP7B na 13. chromozomu, který je nutný pro navázání mědi na ceruloplazmin a pro následné vyloučení mědi do žluči a poté z těla ven. Následkem poruchy vylučování mědi do žluči se měď začne hromadit v játrech a mozku. Měď je důležitá i při vstřebávání železa a jeho vazbě na hemoglobin a pro tvorbu pojivových tkání [60]. Hlavními zdroji mědi jsou obiloviny, luštěniny, maso, vnitřnosti a vejce. DDD pro dospělou osobu se pohybuje kolem 0,9–2,4 mg/den [61].

1.2.3.4 Mangan

Mangan je nezbytný stopový prvek, který je zásadní pro funkci celé řady enzymů, včetně oxidoreduktáz, transferáz, hydroláz, lyáz a ligáz. Působí jako kofaktor některých metaloenzymů, jako je superoxiddismutáza. Mangan je zapojen do metabolismu aminokyselin, lipidů, bílkovin a sacharidů. V lidském těle se nejvyšší koncentrace manganu nachází v játrech, ledvinách, slinivce, kostech a části mozku (bazální ganglia a mozeček). Působí na správný růst kostí, udržuje správnou hladinu cukru v krvi, podporuje správnou činnost imunitního systému a pohlavních žláz. Vstřebávání manganu v tenkém střevě probíhá s účinností kolem 1–5 % a je ovlivňováno zejména přítomností dalších stopových prvků. Obzvlášť vysoký obsah železa ve stravě snižuje jeho resorpci a naopak, vysoké dávky manganu snižují využití železa, a tím způsobuje pokles množství hemoglobinu. Nedostatek manganu způsobuje špatný růst a vývoj kostí, abnormality skeletu, poruchy koordinace pohybů, neschopnost metabolizovat glukózu a kožní změny. Nadměrný příjem manganu z potravy nebývá obvyklý, avšak při chronickém vystavení nadměrným hladinám manganu (např. vdechování prachu s obsahem manganu v pracovním prostředí) může nastat stav zvaný manganismus. V počáteční fázi tohoto onemocnění dochází ke zhoršení motorické koordinace, ztrátě rovnováhy a nastává porucha řeči. V konečné fázi se pak příznaky podobají idiopatické Parkinsově chorobě. Mezi potraviny bohaté na mangan patří obiloviny, luštěniny, ovoce, zelenina a ořechy [62].

1.3 ANALÝZA ANTIOXIDANTŮ V POTRAVINÁCH

1.3.1 Stanovení antioxidační kapacity

Antioxidanty chrání lidský organismu před oxidačním stresem způsobeným volnými radikály a jsou důležité v prevenci tzv. civilizačních chorob (kardiovaskulární onemocnění, nádorové onemocnění, neurologické poruchy a procesy stárnutí). V potravinách prodlužují trvanlivost tím, že je chrání před nežádoucí oxidací [63]. Pro stanovení antioxidačních schopností složek potravin se objevují dva termíny: antioxidační aktivita a antioxidační kapacita. Antioxidační aktivita charakterizuje průběh a rychlost reakce mezi antioxidanty a volnými radikály, zatímco antioxidační kapacita informuje o účinnosti všech přítomných antioxidačních látek, které působí proti volným radikálům. Antioxidační aktivita závisí nejen na strukturních vlastnostech antioxidantů, ale může se lišit v závislosti na teplotě, typu potraviny, složení a struktuře potraviny [64].

Pro stanovení antioxidační kapacity se používají chemické metody s vysoce citlivými a automatizovanými detekčními systémy. Tyto metody jsou rozděleny do dvou hlavních skupin podle typu probíhající reakce:

- HAT (hydrogen atom transfer): přenos atomu vodíku
- SET (single electron transfer): přenos jednoho elektronu [64]

Metody založené na reakcích s mechanismem HAT měří schopnost antioxidantu zhášet volné radikály darováním vodíku. Reakce HAT jsou nezávislé na rozpouštědle a pH a obvykle probíhají velmi rychle (během několika sekund až minut). Přítomnost redukčních činidel, jako jsou kovové ionty, může vést k vysoké reaktivitě. Tato skupina zahrnuje následující metody: ORAC (oxygen radical absorbance capacity), TRAP (total radical-trapping antioxidant potential), LDL oxidace a chemiluminiscence [64].

Metody založené na reakcích s mechanismem SET detekují schopnost antioxidantu přenášet jeden elektron za účelem redukce jakékoliv sloučeniny, včetně kovů, karbonylových sloučenin a radikálů. Reakce jsou závislé na pH a bývají obvykle pomalé. Patří sem metody: metoda využívající DPPH radikál (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl), TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), FRAP (ferric reducing antioxidant power), metoda využívající ABTS (2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)), CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) a stanovení celkových polyfenolů metodou Folin–Ciocalteu [64].

1.3.1.1 Metoda ORAC

Při této metodě se hodnotí schopnost testované látky zpomalovat nebo zastavovat kyslíkové radikály, které jsou v testovaném vzorku záměrně generovány. Principem metody je tedy generování radikálů, které se dostávají do styku s fluorescenční molekulou, a tím dochází k jejímu poškození a ztrátě fluorescence. Právě antioxidanty se používají na ochranu fluorescenční molekuly před působením radikálů. Stupeň ochrany se měří pomocí fluorimetru. Detekce je tedy založena na sledování úbytku fluorescence v závislosti na čase. Jako generátor peroxidových radikálu se používají azosloučeniny, jako je AAPH (2,2´-azobis(2-aminopropan)dihydrochlorid), které vznikají tepelným rozkladem v přítomnosti dostatečného množství kyslíku. Jako standard se pro měření využívá látka Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), jejíž antioxidační aktivita je známá [63; 64]. Trolox je ve vodě rozpustný analog vitamínu E [65]. V začátcích metody se úbytek fluorescence pozoroval na fluoreskující bílkovině β-fykoerythrinu. Později však bylo zjištěno, že β-fykoerythrin není zcela vhodný, a to z důvodu jeho citlivosti na světlo a vazbě na polyfenolové antioxidanty, a proto byl nahrazen fluoresceinem. Tato metoda byla původně vyvinuta pro měření antioxidační aktivity hydrofilních antioxidantů, ale v průběhu času byla upravena tak, aby detekovala aktivitu i lipofilních antioxidantů [63; 64].

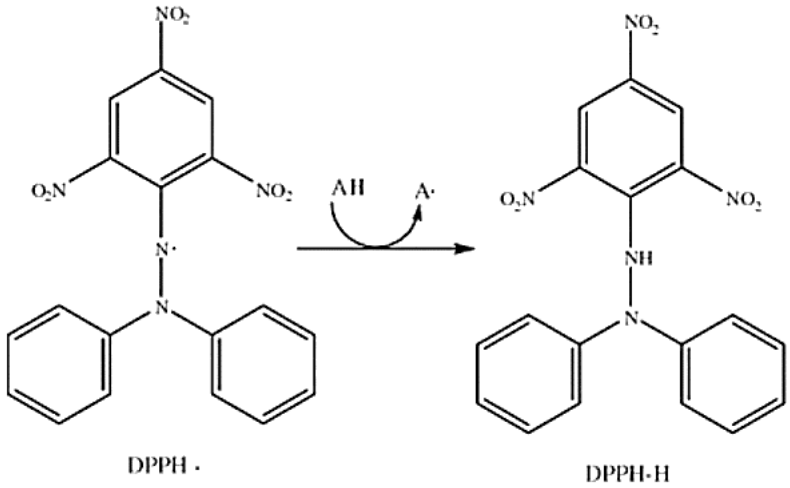
1.3.1.2 Metoda TRAP

Princip metody TRAP je podobný jako u metody ORAC. Jako generátor peroxidových radikálů se využívá AAPH nebo ABAP (2,2´-azobis(2-aminopropan)hydrochlorid), které oxidují luminol. Ten produkuje chemiluminiscenční signál, který je následně měřen luminometrem [64].

1.3.1.3 Metoda využívající DPPH radikál

Tato metoda je považována za jednu z nejstarších a nejvíce používaných metod pro stanovení antioxidační kapacity. Principem metody je reakce stabilního organického radikálu DPPH s přítomným antioxidantem v alkoholovém roztoku, při které dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazin). Reakce je doprovázená změnou barvy vzorku, kdy se tmavě fialový roztok odbarvuje do žluta. Reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky při absorpčním maximu čerstvě připraveného roztoku DPPH radikálu (517 nm). Jestliže se radikál DPPH setká a antioxidantem, radikál je zachycen a absorbance se snižuje. Antioxidační kapacita stanovovaného vzorku je tak přímo úměrná změně barevnosti. DPPH radikál je komerčně dostupný a není nutné ho před každým testem generovat [63; 64].

Přestože je stanovení antioxidační kapacity DPPH metodou jednoduché a nevyžaduje speciální úpravy vzorků, může být citlivost metody ovlivněna řadou faktorů, jako je typ a množství rozpouštědla, přítomnost a koncentrace vodíku a kovových iontů a čerstvost činidla DPPH. Silná absorpce některých pigmentů, jako jsou antokyany, při stejné vlnové délce jako DPPH (500–550 nm) vede k dalšímu omezení testu. Lze tedy využít i jiné metody, např. elektronovou paramagnetickou rezonanční (EPR) spektroskopii, metodu s amperometrickou detekcí nebo HPLC-UV (HPLC = high performance liquid chromatography) [63; 64]. Na obrázku 10 je znázorněna redukce radikálu DPPH na DPPH-H za pomoci antioxidantu.



Obrázek 10: Struktura radikálu DPPH a jeho redukce antioxidantem (AH) na DPPH-H [64]

1.3.1.4 Metoda FRAP

Metoda FRAP je založena na redukci bezbarevných železitých komplexů (Fe^{3+}-TPTZ) na intenzivně modře zbarvené železnaté komplexy (Fe^{2+}-TPTZ) (TPTZ = 2,4,6-tris(2-pyridyl-1,3,5-triazin)). Stanovení FRAP probíhá v kyselém prostředí při pH 3,6, aby se zachovala rozpustnost železa. Hodnoty FRAP se získají porovnáním změny absorbance při 593 nm ve zkušebních reakčních směsích s těmi, které obsahují ionty železa o známé koncentraci. Stanovení metodou FRAP lze provést pomocí automatizovaných, poloautomatizovaných a manuálních metod. Bývá jednoduché, rychlé, levné, činidla se snadno připravují a výsledky jsou vysoce reprodukovatelné. Pulido a kol. [66] však zjistili, že některé polyfenolické látky (kys. kávová, kys. ferulová, kvercetin a kys. třísloví) reagují pomalu a pro detekci vyžadují delší reakční dobu. Metoda FRAP nedetekuje thiolové antioxidanty, jako je glutathion. Jelikož v této metodě nedochází k žádnému přísunu volných radikálů do systému, měří se pouze redukční síla antioxidantů, a ne jejich schopnost zhášet volné radikály [64].

1.3.1.5 Metoda využívající ABTS (Metoda TEAC)

Miller a kol. [67] vyvinuli jednoduchou spektrofotometrickou metodu pro stanovení celkové antioxidační kapacity. Při této metodě se sleduje schopnost antioxidantů obsažených ve vzorku zhášet stabilní radikálový kationt ABTS ($ABTS^{\bullet+}$). V reakční směsi se $ABTS^{\bullet+}$ generují z ABTS za přítomnosti silných oxidačních činidel několika způsoby, a to chemicky pomocí oxidu manganičitého, peroxidového radikálu, AAPH nebo peroxodisíranu draselného, enzymaticky s využitím metmyoglobinu nebo křenové peroxidázy, a dokonce i elektrochemicky. Obecně lze říct, že chemická generace radikálů vyžaduje buď delší čas nebo vyšší teplotu, oproti enzymatické, která bývá rychlejší a reakční podmínky jsou mírnější. Radikálový kationt ABTS má intenzivní modrozelené zbarvení s absorpčními maximy při vlnových délkách 414 nm, 734 nm a 815 nm ve vodném prostředí a při vlnových délkách 414 nm, 730 nm a 873 nm v ethanolovém prostředí. Nejčastěji stanovení probíhá při 734 nm, protože je při této vlnové délce minimalizována interference od ostatních absorbujících složek. Antioxidační kapacita je přímo úměrná ubývající intenzitě zabarvení modrozeleného roztoku [63; 64].

Metoda ABTS je jednoduchá, rychlá a může být použita v širokém rozmezí pH pro měření celkové antioxidační kapacity čistých látek i směsí. Je vhodná pro měření hydrofilních i lipofilních antioxidantů [63; 64]. Tato metoda je označována též jako metoda TEAC a odpovídá antioxidační aktivitě vzorku, která se porovnává s antioxidační aktivitou standardní látky Trolox [68].

1.3.1.6 Metoda CUPRAC

Metoda CUPRAC je založena na podobném principu jako metoda FRAP, kdy místo redukce železa dochází k redukci mědi. Jako chromogenní oxidační činidlo se využívá komplex neokuproinu s Cu^{2+} [Cu(II)-Nc] (Nc = 2,9-dimethyl-1,10-fenantrolin). Metoda je založena na redoxní reakci [Cu(II)-Nc] s antioxidantem za vzniku žlutooranžového chelátu [Cu(I)-Nc] s maximální absorbancí při vlnové délce 450 nm. Reakce probíhá relativně rychle (cca 30 min) a použitá činidla jsou cenově dostupná a stabilní. Oproti metodě FRAP probíhá metoda při téměř neutrálním pH a je schopná stanovit antioxidační kapacitu u antioxidantů s thiolovou skupinou, jako je glutathion. Metodu CUPRAC lze uplatnit při stanovení antioxidační kapacity hydrofilních i lipofilních antioxidantů [63; 64].

1.3.1.7 Stanovení obsahu celkových polyfenolů

Metoda TPC (total phenolic content) se využívá ke stanovení obsahu celkových polyfenolů s pomocí Folin–Ciocalteuova činidla. Metoda je založena na redukci Folin–Ciocalteuova činidla, které je tvořeno směsí kyseliny fosfomolybdenové a kyseliny fosfowolframové. Činidlo se po oxidaci fenolů redukuje na produkty s modrým zbarvením. Reakce probíhá v alkalickém prostředí (nejčastěji se přidává uhličitan sodný) a vzniklé modré komplexy se stanovují spektrofotometricky s maximální absorbancí při vlnové délce 765 nm. Mezi výhody metody patří jednoduchost, přesnost, citlivost a reprodukovatelnost, nevýhodou metody je citlivost na pH (při kyselém pH probíhá reakce pomalu) a teplotu. Pro tuto metodu se využívá jako standard kyselina gallová a výsledná hodnota je přepočítávána na ekvivalentní množství této kyseliny. Původně byla metoda využívána k analýze bílkovin, až v roce 1999 Singleton a kol. [69] rozšířili tuto metodu na stanovení celkových fenolických látek ve víně a následně se stala rutinní analýzou pro antioxidační hodnocení potravin a rostlinných extraktů [63; 64].

1.3.2 Identifikace antioxidačních látek

1.3.2.1 Izolace antioxidačních látek

Než dojde k samotnému stanovení antioxidačních látek, je nejprve nutné provést izolaci antioxidantů vhodnými metodami z potravinové matrice. K získání antioxidantů se nejčastěji využívají různé extrakční metody, jako jsou např. extrakce rozpouštědlem, extrakce nadkritickou tekutinou, mikrovlnná extrakce a ultrazvuková extrakce. Účinnost extrakce antioxidačních látek z rostlinného materiálu je ovlivněna zejména podmínkami, za kterých probíhá proces extrakce tuhá látka-kapalina [70].

Extrakce je proces, při kterém dochází k separaci jedné nebo více složek ze směsi mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze (kapalina-kapalina, tuhá látka-kapalina). Složky se rozdělují mezi tyto dvě fáze na základě různé rozpustnosti ve vzorku a extrakčním rozpouštědle. Po extrakci vznikají dvě fáze: první fáze obohacená o extrahovanou látku se nazývá extrakt a druhá fáze, která je ochuzena o extrahovanou látku, se nazývá extrakční zbytek [71].

- **Extrakce tuhá látka-kapalina**

Extrakce rozpouštědlem je separační technika, při které se využívá rozpouštědlo k extrakci/separaci požadovaného analytu z tuhého vzorku. Metoda závisí na rozpustnosti analytu v rozpouštědle, do kterého se extrahuje složka, kterou chceme analyzovat. K tomu, aby extrakce byla považována za velmi účinnou separační techniku, je potřeba použít vhodné

rozpouštědlo. Výběr rozpouštědla se řídí Liebigovým pravidlem („podobné se rozpouští v podobném“). Znamená to tedy, že v nepolárních rozpouštědlech se rozpouští nepolární látky, zatímco v polárních rozpouštědlech se rozpouští látky polární. Rozpouštědla, která se běžně používají pro extrakci chemických složek jsou rozdělené podle rostoucí polarity takto: petrolether < tetrachlormethan < benzen < dichlormethan < chloroform < diethylether < < ethylacetát < *n*-butanol < aceton < ethanol < methanol < voda [72].

Voda je levné, snadno dostupné a netoxické rozpouštědlo se silnou polaritou. Používá se k extrakci fytochemikálií se silnou polaritou, jako jsou sacharidy, aminokyseliny, třísloviny a bílkoviny. Mezi další silně polární rozpouštědla, která jsou mísitelná s vodou, patří methanol, ethanol a aceton. Ethanol je jedním z nepoužívanějších hydrofilních organických rozpouštědel pro extrakci antioxidačních látek. Je levný, opakovaně použitelný a bezpečný. Methanol má podobné vlastnosti jako ethanol (má nižší teplotu varu než ethanol), ale kvůli své toxicitě není v potravinářském průmyslu upřednostňován. Aceton se využívá jako vhodné rozpouštědlo pro extrakci chemických složek rozpustných v tucích (např. lykopen v rajčatech). Pro extrakci antokyanů, které patří mezi polární látky, se používá jako extrakční rozpouštědlo okyselený methanol nebo ethanol. Kyselina v rozpouštědle porušuje buněčnou membránu a uvolňuje tak antokyany. Aby nedošlo k narušení struktury antokyanů, je důležité rozpouštědla okyselit organickými kyselinami (kyselina mravenčí nebo octová) [70; 72].

- **Extrakce v Soxhletově extraktoru**

Extrakční přístroj navrhl německý chemik Franz Ritter Von Soxhlet v roce 1879. Tato extrakce byla vyvinuta především pro extrakci lipidů. V dnešní době se však už široce využívá k extrakci významných bioaktivních sloučenin z různých přírodních zdrojů. Tato metoda se používá zejména k hodnocení účinností nových extrakčních metod [73].

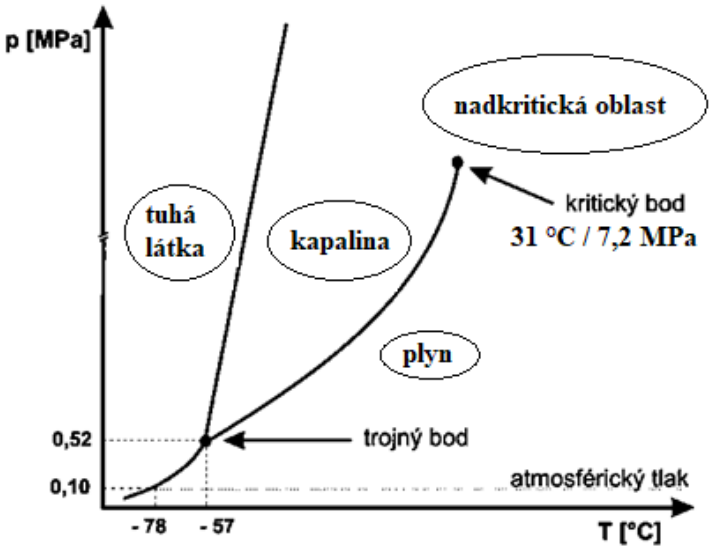
Principem extrakce v Soxhletově extraktoru je izolace jedné nebo více složek z tuhé matrice. Vzorek je umístěn do patrony z propustného materiálu, která je následně vložena do extraktoru. Varná baňka se naplní vhodným rozpouštědlem, připojí se ke spodní části extraktoru a vloží se do topného hnízda. K horní části extraktoru se připevní zpětný chladič. Varná baňka se začne zahřívat, rozpouštědlo se přivede k varu a odpařuje se. Páry rozpouštědla postupují až do chladiče, kde dochází k jejich kondenzaci. Zkondenzované rozpouštědlo kape na patronu se vzorkem, čímž dochází k extrakci složek. Extrakční prostor se naplňuje do té doby, než roztok s vyextrahovanými látkami dosáhne úrovně přepadu a vrací se zpět do varné baňky. Tento proces se opakuje, dokud není extrakce dokončena [74].

Extrakce v Soxhletově extraktoru patří mezi jednoduché metody. Výhody metody jsou následující: vzorek je opakovaně uveden do kontaktu s čerstvými částmi rozpouštědla, čímž se podporuje extrakce analytu z matrice a po extrakci není nutná filtrace. Extrakce v Soxhletově extraktoru má také značné nevýhody, mezi které patří dlouhá doba potřebná k extrakci a použití velkého množství organického rozpouštědla, jehož likvidace je nákladná [74].

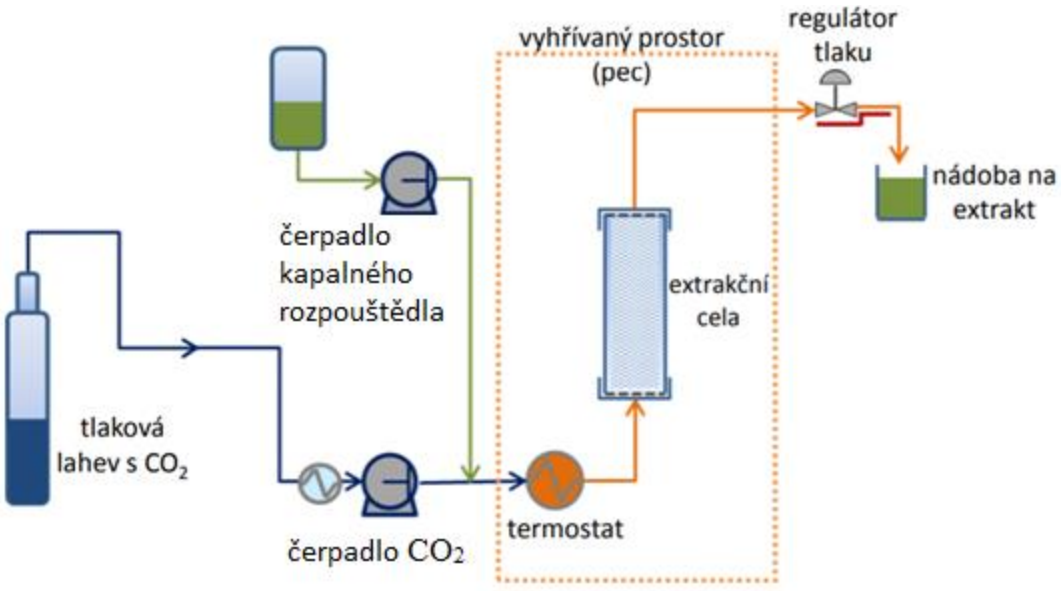
- **Extrakce nadkritickou tekutinou**

Extrakce nadkritickou tekutinou (SFE) je metoda, která využívá k extrakci analytů ze vzorku tekutinu v nadkritickém stavu. Nadkritická tekutina (SF – supercritical fluid) je definována jako látka, která je ve stavu nad svým kritickým tlakem (p_C) a kritickou teplotou (T_C). Tekutina, která se nachází v nadkritickém stavu, má některé vlastnosti jako kapaliny a některé vlastnosti se blíží plynům [72]. Hustota nadkritické tekutiny je podobná kapalinám, zatímco její nízká viskozita a vyšší difúzní koeficient jsou srovnatelné s plyny, což umožňuje vyšší účinnost extrakce [75].

Nejčastěji se jako nadkritická tekutina využívá oxid uhličitý. CO_2 má kritickou teplotu 31 °C a kritický tlak 7,2 MPa (Obr. 11). Je to nepolární látka, která se používá k extrakci lipofilních sloučenin. Jeho rozpouštěcí schopnost pro polární látky je velmi omezená, proto se ke zvýšení účinnosti extrakce polárních látek přidává malé množství organických polárních rozpouštědel (methanol, ethanol nebo aceton). Použití oxidu uhličitého má velké výhody. Je zdravotně nezávadný, nehořlavý, bez zápachu, levný a snadno odstranitelný. Produkt po extrakci má vysokou čistotu a výtěžek. Na obrázku 12 je zobrazeno schéma extrakce nadkritickým CO_2 [72].



Obrázek 11: Fázový diagram CO_2 [76]



Obrázek 12: Schéma zařízení pro extrakci nadkritickou tekutinou [77]

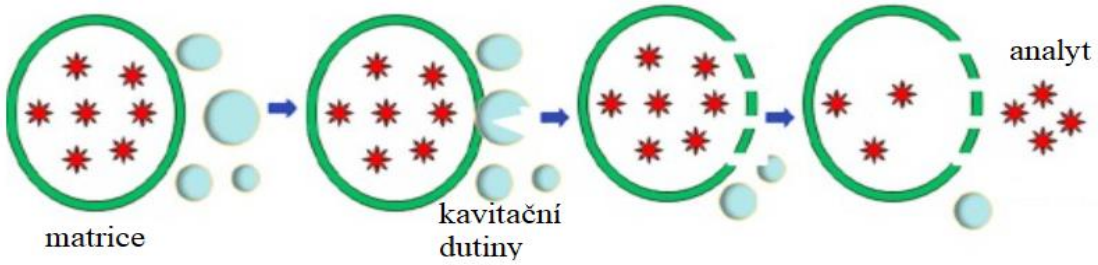
- **Mikrovlnná extrakce**

Mikrovlnná extrakce byla poprvé použita v 80. letech 20. století. Tato extrakční metoda se používá pro získání analytu z tuhého vzorku. K tomu se využívá mikrovlnná energie o frekvenci 300 MHz až 300 GHz, která odpovídá vlnovým délkám 0,1 mm až 100 cm. V chemickém odvětví se nejčastěji využívají dvě frekvence: 2,45 GHz (pro laboratorní zařízení) a 915 MHz (pro průmyslová zařízení) [78]. Při této metodě se pracuje s polárním rozpouštědlem, které je ve styku se vzorkem a je schopné absorbovat mikrovlnné záření, čímž se uvolňuje energie ve formě tepla a dochází tak ke stejnoměrnému ohřevu rozpouštědla i vzorku. Zvýšenou teplotou a vyšším tlakem uvnitř média dochází k uvolňování analytu ze zkoumaného vzorku do rozpouštědla [72]. V posledních letech se mikrovlnná extrakce stala velmi oblíbenou metodou, a to z důvodu zkrácení doby extrakce (v řádu minut), menší spotřebě rozpouštědla a zvýšení extrakčního výtěžku oproti Soxhletově extrakci. Existují dva typy metod: extrakce bez rozpouštědla (obvykle pro těkavé sloučeniny) a extrakce s rozpouštědlem (obvykle pro netěkavé sloučeniny) [79].

- **Ultrazvuková extrakce**

Ultrazvuková extrakce byla v posledních třech desetiletích hojně používaná jako účinná extrakční metoda v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Nejčastěji se využívá k uvolňování bioaktivních látek (polyfenoly, vitamíny a sacharidy) z rostlinného materiálu [80]. Principem je extrakce rozpouštědlem (nejčastěji voda nebo ethanol) za pomoci

ultrazvukového vlnění o frekvenci větší než 20 kHz. Při této metodě se využívá tzv. kavitace (Obr. 13). Kavitace je fyzikální jev, který vzniká při působení ultrazvukových vln v kapalině. Podstatou vzniku kavitace je snížení tlaku, čímž dochází ke vzniku kavitačních dutin, které se začnou plnit párou a plyny rozpuštěnými v kapalině. Kavitační dutiny jsou odnášeny proudící kapalinou do míst s vyšším tlakem, kde dochází k jejich implozi (kavitační kolaps). Kavitační kolaps způsobuje rázové vlny, které jsou spojeny s prudkým nárůstem teploty (5000 K) a tlaku (řádově stovky MPa), což má za následek rozpad buněčných stěn a vyloučení buněčného obsahu do rozpouštědla. Mezi výhody této metody patří zkrácená doba extrakce, zvýšení kvality a výtěžku extraktu, malá spotřeba rozpouštědla a šetrnost k životnímu prostředí [81; 82; 83].



Obrázek 13: Schématické znázornění kavitace při ultrazvukové extrakci [81]

- **Extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku**

Extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku (PSE), známá také jako extrakce kapalinou za zvýšeného tlaku (PLE) nebo jako zrychlená extrakce rozpouštědlem (ASE), byla poprvé popsána v roce 1995. Principem je extrakce analytu z tuhých nebo polotuhých vzorků organickým nebo vodným rozpouštědlem za zvýšené teploty a tlaku za krátký čas a s využitím malého množství rozpouštědla ve srovnání s klasickými extrakčními postupy [84]. Zvýšená teplota (50–200 °C) zvyšuje rozpustnost analytů, narušuje interakce mezi analytem a matricí a zvyšuje difúzní rychlost. Zvýšený tlak (10–15 MPa) udržuje rozpouštědlo pod bodem varu, čímž zůstává v kapalném stavu. Při zvýšeném tlaku a teplotě také dochází ke snížení viskozity a povrchového napětí rozpouštědla, které pak může snadněji pronikat do pórů tuhých vzorků a dochází tak ke snadnější extrakci analytů. K tomu také dopomáhá sušení vzorku před extrakcí (obvykle se využívá síran sodný nebo Hydromatrix). Metodu PSE lze provádět ve statickém režimu (nejčastěji), dynamickém režimu nebo v kombinaci obou těchto režimů [85]. Nejčastěji se metoda PSE využívá ke stanovení kontaminantů z enviromentálních matric [84].

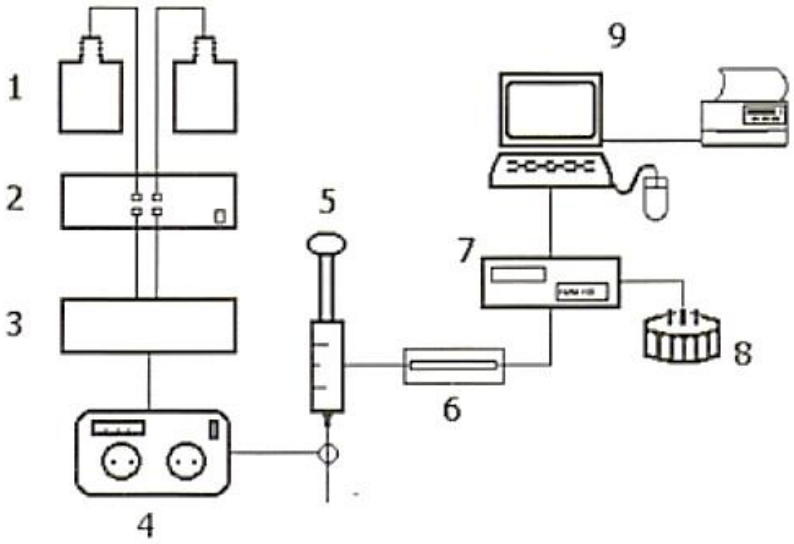
- **Extrakce podkritickou vodou**

Extrakce podkritickou vodou (PHWE) je metoda založená na využití vody jako extrakčního činidla při teplotách mezi 100 až 374 °C a tlaku, který je dostatečně vysoký, aby udržel vodu v kapalném stavu (kritický bod vody je při tlaku 22,4 MPa a teplotě 374 °C) [86]. Vlivem podkritických podmínek dochází k rozpadu intermolekulárních vodíkových vazeb vody a dochází k poklesu dielektrické konstanty vody (míra její polarity). Hodnota dielektrické konstanty vody při pokojové teplotě je 80, se zvýšením teploty na 250 °C lze hodnotu snížit na 27. Tato hodnota je podobná hodnotám některých polárnějších organických rozpouštědel, jako je ethanol a methanol, ale i rozpouštědlům nepolárním (např. *n*-hexan), a je natolik nízká na to, aby rozpustila sloučeniny se střední nebo nízkou polaritou [87]. Voda v podkritickém stavu se vyznačuje vysokou hustotou, vysokou reaktivitou a dobrou rozpustností pro řadu organických sloučenin s relativně nízkou molekulovou hmotností. Na rozdíl od běžných metod je metoda PHWE šetrná k životnímu prostředí. PHWE patří mezi účinné metody používané k izolaci antioxidačních složek z rostlinných materiálů. Mezi výhody metody patří nízké náklady na extrakční činidla, vysoká čistota extraktu a zkrácená doba extrakce. Hlavní nevýhodou této metody je vysoká cena zařízení [86].

1.3.2.2 Analýza antioxidačních látek

K analýze antioxidačních látek se nejčastěji využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GC – gas chromatography) a kapilární elektroforéza (CE – capillary electrophoresis) [88]. Tato kapitola bude zaměřena na metodu HPLC z důvodu jejího vyžití v experimentální části této diplomové práce.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je separační metoda, která je založená na rozdílné distribuci dělených látek ve směsi mezi dvě nemísitelné fáze: mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou). V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina a stacionární fází je buď tuhá látka nebo kapalina ukotvená na tuhém nosiči. Mobilní fáze protéká stacionární fází, která je umístěna v chromatografické koloně ve formě sorbentu. V HPLC metodě je mobilní fáze přiváděna do systému pomocí vysokotlakého čerpadla. K tomu, aby byly jednotlivé složky ve vzorku odděleny, je nutné, aby se lišily svými distribučními konstantami. Čím vyšší je hodnota distribuční konstanty, tím déle bude složka zadržována ve stacionární fázi. Pokud se složení mobilní fáze během separace nemění, jedná se o tzv. izokratickou eluci. Jestliže dochází ke změně složení mobilní fáze během separace, jde o tzv. gradientovou eluci [89]. Na obrázku 14 je znázorněno blokové schéma HPLC.



Obrázek 14: Blokové schéma HPLC [89]

1 – zásobníky mobilních fází, 2 – odplyňovač, 3 – směšovač, 4 – vysokotlaké čerpadlo, 5 – dávkovací zařízení, 6 – separační kolona, 7 – detektor, 8 – sběrač frakcí, 9 – počítač [89]

Zařízení pro HPLC analýzu se skládá z těchto částí:

- **Zásobník mobilní fáze:** zásobníky musí být dobře uzavřeny tak, aby z nich mohla odtékat kapalina, ale přitom neunikaly její páry do okolního prostředí.
- **Odplyňovací zařízení:** mobilní fáze musí být odplyňována proto, aby při změně tlaku na výstupu z kolony nebo i v koloně nedocházelo k uvolnění bublinek rozpuštěných plynů. K odplynění mobilní fáze se využívají dva způsoby – probublávání heliem nebo vakuový odplyňovač.
- **Vysokotlaké čerpadlo:** od čerpadla se požaduje stabilní průtok mobilní fáze, minimální tlakové pulsy, tlak mobilní fáze až do 100 MPa. Mezi používaná čerpadla patří pístová čerpadla, čerpadla injekčního typu a membránová čerpadla.
- **Dávkování vzorku:** vzorek je možné dávkovat ručně (manuální smyčkový dávkovač) nebo pomocí automatického dávkovače (autosamplery).
- **Separační kolona:** plášť kolony je většinou z nerezové oceli, která je vysoce antikorozivní. Využívají se konvenční analytické kolony o délce 30–300 mm, vnitřním průměru 2–6 mm plněné sorbentem o velikosti částic 1–10 μm.
- **Nastavení teploty:** většina separací probíhá při laboratorní teplotě, ale některé separace se zvýšením teploty mohou zlepšit.

- **Detektor:** detektory zaznamenávají rozdíl v signálu mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující analyt. Lze je rozdělit na koncentrační a hmotnostní nebo na nedestruktivní a destruktivní. Nejpoužívanějšími detektory jsou spektrofotometrický, fluorescenční (FLD), refraktometrický, amperometrický, vodivostní, detektor s diodovým polem (DAD) a hmotnostní spektrometr (MS) [89].

1.3.2.3 Stanovení fenolických látek pomocí HPLC

Fenolické sloučeniny se běžně vyskytují v rostlinách a plodech. Jejich příznivý vliv na lidský organismus zvýšil zájem o analýzu potravin, které mohou být potencionálními zdroji těchto látek (ovoce a zelenina) [90]. Za významný zdroj fenolických látek se považují jablka, která jsou jedním z nejvíce konzumovaných druhů ovoce po celém světě. Díky své dobré dostupnosti patří mezi důležité zdroje fenolických sloučenin. Příjem jablek je spojován se sníženým rizikem kardiovaskulárních onemocnění, některých druhů rakoviny (zejména rakovina plic) a cukrovky. Také ovlivňuje tělesnou hmotnost a snižuje hladinu cholesterolu. Tyto prospěšné účinky na lidské zdraví souvisí právě s přítomností fenolických sloučenin. Polyfenoly přítomné v různých odrůdách jablek jsou téměř totožné, avšak jejich koncentrace se značně liší a je závislá na kultivaru, stupni zralosti, prostředí, sklizni a skladování [91]. Podle studií Boyera a Liua [92] bylo zjištěno, že jablka mají druhou nejvyšší hladinu antioxidantů (po brusinkách) mezi běžně konzumovaným ovocem (následovalo červené hroznové víno, jahody, broskve a citróny) [93]. V jablkách jsou obsaženy i další důležité složky, včetně polysacharidů, triterpenoidů, fytosterolů, bílkovin, vitamínů (A, C a E), β-karotenu a stopových prvků (např. železo, hořčík, vápník, zinek, mangan, síra, měď a draslík). Nejvyšší obsah fenolů je obsažen v jablečné slupce [94].

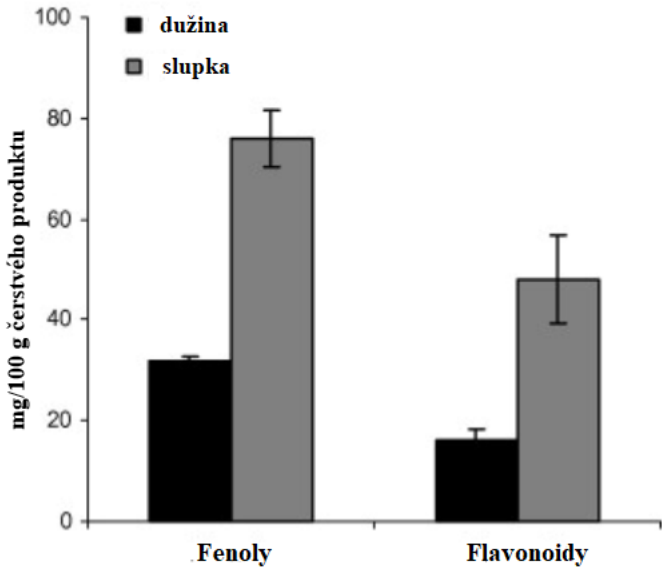
Ke kvantitativní analýze fenolických sloučenin existuje několik analytických metod, jako jsou UV spektrometrie, GC, CE a micelární elektrokinetická chromatografie. Mají však určitá omezení, a proto se k analýze těchto látek nejčastěji používá HPLC. Pro úspěšnou analýzu je nutný výběr selektivní a citlivé detekční techniky, proto se ke stanovení využívá HPLC spojená s různými detektory, jako jsou UV detektor, DAD, MS a tandemová MS (MS/MS) [95]. Pro stanovení látek obsahující fluorofory (např. kyselina gallová a epikatechin) může být zvolena FLD detekce. K separaci fenolických látek se nejvíce využívá RP-HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi). Tato metoda se vyznačuje tím, že stacionární fáze je méně polární než fáze mobilní. Stacionární fázi tvoří částice silikagelu s navázanými uhlovodíkovými řetězci (C8 nebo C18) a mobilní fáze je tvořena většinou směsí dvou kapalin – vodná fáze (často s přídavkem kyseliny octové, mravenčí nebo

trifluoroctové) a organické rozpouštědlo (methanol, acetonitril, *iso*-propanol, *iso*-butanol, tetrahydrofuran, ethylacetát a další) [90]. Mobilní fáze je mírně okyselená z důvodu vyšší retence slabě kyselých látek nebo naopak obsahuje příměsi slabých zásad pro vyšší retenci slabě zásaditých látek. Nejčastěji se používá lineární gradientová eluce. Při RP-HPLC za obvyklých podmínek jsou jako první eluovány polární látky, tedy diglykosidy předchází monoglykosidy a monoglykosidy předchází aglykony. Pro stejně substituované sloučeniny klesá intenzita afinity k mobilní fázi takto: flavanony > flavanoly > flavony. Pro chromatografické chování antokyanů na koloně s reverzní fází patří mezi klíčové faktory především charakter substituce B-kruhu flavanového skeletu, počet, poloha a druh sacharidických substituentů [96].

Lu a Foo [97] studovali polyfenoly, které extrahovaly z jablek v roce 1997. Jejich výsledky ukázaly, že mezi hlavní fenolické složky patří katechiny, kyselina kávová, kyselina chlorogenová, hyperosid, phloridzin, kvercetin-3-arabinosid, epikatechin, 3-hydroxyphloridzin, kvercetin-3-xylóza, isokvercitrin a kvercetin-3-rhamnóza.

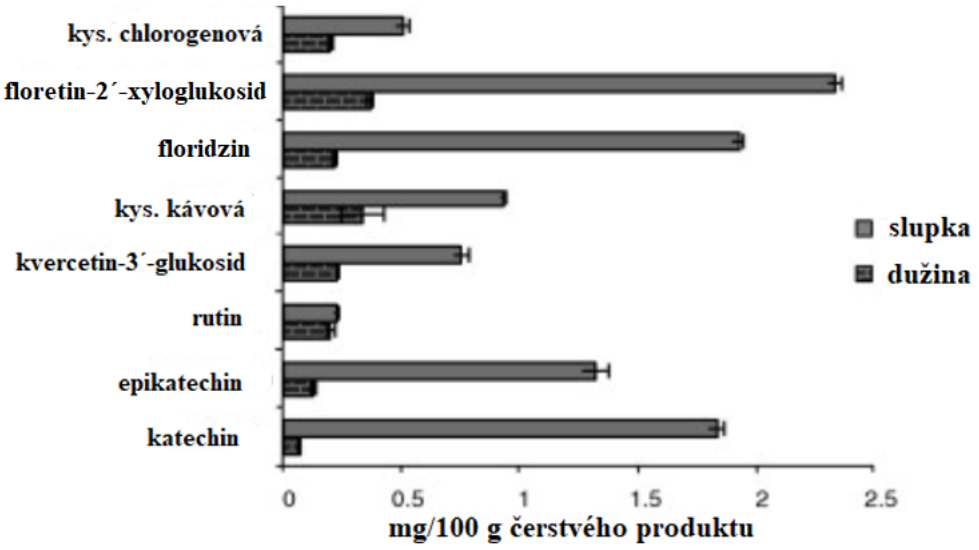
Alonso a kol. [98] provedli další analýzu extrahovaných polyfenolů z jablek v roce 2004. Za pomoci HPLC-DAD-MS detekovali až 30 druhů polyfenolů v jablku [94].

D´Abrosca a kol. [99] provedli analýzu obsahu fenolů a flavonoidů v jablku Limoncella. Tato odrůda jablek je pěstována v jižní a střední Itálii a je přizpůsobená místnímu podnebí. Plody jsou středně velké a mají zelenožlutou slupku s citrónovou chutí. Dužina je bílá, šťavnatá, aromatická a lehce kyselá. Skladovatelnost této odrůdy je možná až do konce jara. Jablka byla před analýzou oloupána, slupka i dužina byla rozdělena na tři stejné podíly, zmražena v kapalném dusíku a lyofilizována. Získaný materiál byl extrahován pomocí Soxhletova zařízení po dobu 4 hodin s methanolem. Po odstranění rozpouštědla byly získány surové extrakty, které pak byly analyzovány pomocí HPLC s UV detekcí. Stanovení celkového obsahu fenolů v extraktech slupky i dužiny bylo provedeno metodou TPC a byl vyjádřen jako miligramy ekvivalentů kyselina gallové ve 100 g čerstvého produktu. Stanovení celkového obsahu flavonoidů bylo získáno pomocí kolometrického testu a výsledky byly vyjádřeny jako miligramy ekvivalentů kvercetinu ve 100 g čerstvého produktu. Celkový obsah fenolů a flavonoidů ve slupce a dužině v jablku Limoncella je uveden na obrázku 15 [99].



Obrázek 15: Celkový obsah fenolů a flavonoidů ve slupce a dužině v jablku Limoncella [99]

Pro zjištění obsahu fenolických sloučenin bylo 100 µg extraktu rozpuštěno v 1 ml methanolu a analyzováno pomocí RP-HPLC s UV-VIS detekcí. Na obrázku 16 jsou uvedeny hlavní fenolické složky extraktů. Analýza ukázala, že jablka Limoncella obsahují vysoké množství flavonoidů (floridzin a floretin-2´-xyloglukosid). Slupka jablka byla bohatá na katechin a epikatechin [99].



Obrázek 16: Hlavní fenolické sloučenina po analýze jablka Limoncella pomocí RP-HPLC [99]

Vondráková a kol. [93] provedli studii na kvantifikaci fenolových kyselin u tří různobarevných odrůd jablek (žlutá odrůda Sirius, červená odrůda Bonita a pruhovaná odrůda Karneval). Všechny vzorky jablek byly získány z experimentálního sadu ze stanice šlechtění jabloně na rezistenci k chorobám ve Střížovicích. Jablka byla odebrána během jejich fáze vývoje a zrání v červnu, červenci, srpnu a září, v době sklizně v říjnu a po 2 a 5 měsících (tj. v prosinci a březnu) skladování v chladu (při 1–2 °C). Ihned po odběru vzorků byly ponořeny do kapalného dusíku a až do extrakce skladovány při teplotě –80 °C. Detekce a kvantifikace fenolových kyselin byla prováděna systémem HPLC-MS [93].

Studie dokazuje, že se obsah fenolových kyselin výrazně mění během zrání, sklizně a skladování vzorků jablek. Všechny tři kultivary jablek měly kvalitativně podobná spektra fenolových kyselin (kyselina chlorogenová, protokatechová, vanilová, gallová, kávová, *p*-kumarová, ferulová, *p*-hydroxybenzoová, gentisová a syringová). Hlavní volnou fenolovou kyselinou ve slupce i dužině vzorků jablek byla jednoznačně kyselina chlorogenová (téměř veškerý celkový obsah volných kyselin), následovala (v mnohem nižších koncentracích) kyselina protokatechová, vanilová, gallová, ferulová, *p*-kumarová a kávová. Toto zjištění je v souladu s výsledky mnoha studií, které dokazují, že volná kyselina chlorogenová je hlavní fenolovou sloučeninou v jablkách. Všechny tři studované odrůdy obsahovaly větší množství fenolových kyselin vázaných na glykosid než ve formě volných kyselin. Hlavní vázanou kyselinou ve všech odrůdách byla kyselina protokatechová (cca 80 % celkového obsahu vázaných fenolových kyselin). Dále bylo zjištěno, že nejvyšší obsah volné kyseliny chlorogenové ve slupce i dužině vzorků byl na začátku růstu jablečných plodů (v červnu), během zrání (červenec, srpen a září) výrazně poklesl. V říjnu, v době sklizně, bylo její množství u odrůdy Bonita velmi nízké, zatímco ve slupce odrůdy Karneval mírně vzrostlo. U ostatních volných fenolových kyselin bylo jejich množství nejvyšší také na začátku růstu plodů a během zrání ovoce se výrazně snížilo. Během skladování (od října do března) bylo množství volných fenolových kyselin poměrně nízké. Jediný významný nárůst byl pozorován u kyseliny chlorogenové v dužině odrůdy Sirius a mírný nárůst ve slupce i dužině odrůdy Karneval. U všech tří odrůd došlo během skladování ke značnému navýšení množství vázané formy kyseliny protokatechové ve slupce. V tabulce 8 je uvedeno množství volné kyseliny chlorogenové, které bylo detekované ve slupce a dužině u studovaných odrůd jablek během zrání, sklizně a skladování, v tabulce 9 je pak uvedeno množství vázané kyseliny protokatechové [93].

Tabulka 8: Množství volné kyseliny chlorogenové (µg/g sušiny) ve slupce a dužině jablek během zrání, sklizně a skladování [93]

Měsíc	odrůda Bonita		odrůda Karneval		odrůda Sirius	
	slupka	dužina	slupka	dužina	slupka	dužina
červen	1019,20	1295,60	1594,40	1614	1242,80	1292,10
červenec	256,28	44,54	231,40	328,60	492,10	573,40
srpen	44,58	52,27	100,48	97,84	106,24	112,29
září	2,82	39,02	168,20	75,45	166,89	287,99
říjen	10,75	48,97	494,80	142,70	64,78	245,42
prosinec	18,34	91,81	278,65	329,21	66,60	524,10
březen	47,15	145,50	358,63	252,80	112,58	476,20

Tabulka 9: Množství vázané kyseliny protokatechové (µg/g sušiny) ve slupce a dužině jablek během zrání, sklizně a skladování [93]

Měsíc	odrůda Bonita		odrůda Karneval		odrůda Sirius	
	slupka	dužina	slupka	dužina	slupka	dužina
červen	484,45	535,82	357,98	209,70	351,44	433,59
červenec	29,21	2,94	17,41	6,45	41,03	23,50
srpen	78,52	58,86	22,98	13,81	28,32	18,30
září	167,75	7,08	72,56	4,53	222,40	20,09
říjen	657,10	24,24	355,43	12,59	589,27	63,34
prosinec	941,80	51,80	1099,10	28,43	520,30	74,62
březen	996,80	40,05	1179,86	18,26	504,13	81,75

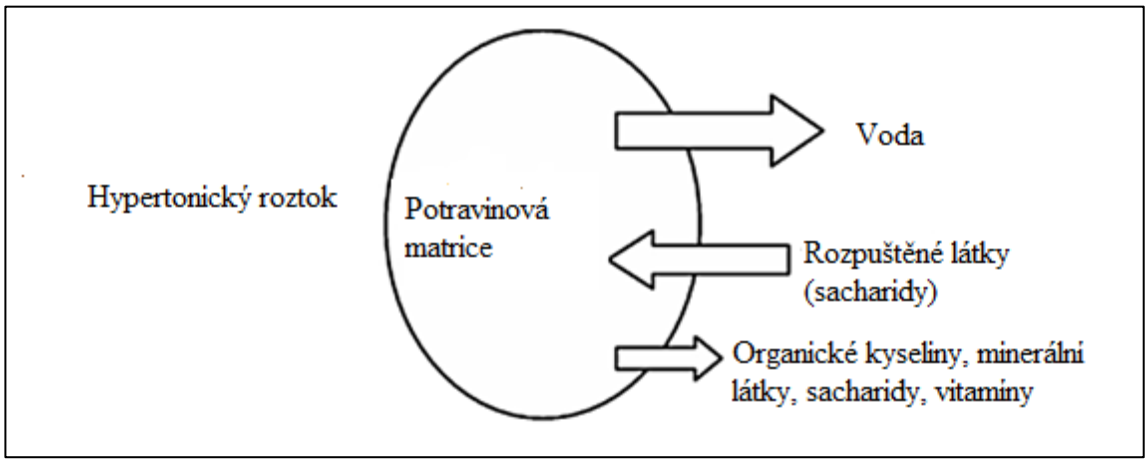
1.4 Využití procesu osmo-dehydratace v potravinářství

Konzervace potravin je metoda, která se využívá k prodloužení trvanlivosti potravin a zachování jejich zdravotní nezávadnosti. Jedná se o proces ošetření potravin, jehož cílem je zastavit nebo výrazně zpomalit znehodnocování (ztráta kvality, poživatelnosti nebo nutričních hodnot) způsobené mikroorganismy. Konzervace se používá k prevenci proti růstu bakterií, plísní a jiných mikroorganismů a také zpomaluje oxidaci tuků, která způsobuje žluknutí. Zahrnuje také procesy, které zabraňují změně zabarvení, které může nastat během přípravy jídla, jako je např. enzymatické hnědnutí jablek po jejich nakrájení. K nejstarším technikám konzervace potravin patří dehydratace (sušení) a přídavek soli nebo cukru [100]. Sušení potravin je důležitou a široce používanou metodou zpracování potravin. Jedná se o jednoduchý, avšak energeticky velmi náročný proces, při kterém dochází k odstraňování přebytečné vody (vlhkosti) z tuhého materiálu až do určité úrovně, při které je minimalizováno mikrobiální znehodnocení. Sušením následně vznikají dehydratované produkty, které mohou být skladovány a konzervovány po dlouhou dobu bez znehodnocení. Většina dehydratovaných produktů je během jejich používání obvykle rehydratována [101]. Znamená to tedy, že když jsou sušené potraviny připravené k použití, znovu se ponoří do kapalného média a téměř obnoví svůj původní stav bez podstatné ztráty chuti, barvy a aroma [102; 103]. Druhou možností může být sušení potravin, při kterém dochází k úplnému odstranění vlhkosti. Potraviny tak nemají vůbec žádnou vlhkost a rehydratace je u nich nemožná [103].

1.4.1 Princip procesu osmo-dehydratace

Osmotická dehydratace, nebo také osmo-dehydratace, se využívá jako proces předúpravy, po kterém obvykle následují další metody sušení, jako je sušení na vzduchu, vakuové sušení nebo lyofilizace [104]. Jedná se o proces částečné dehydratace potravin, při kterém je potravinová matrice ponořena do hypertonického roztoku. K osmotické dehydrataci dochází z důvodu vyšší koncentrace rozpuštěných látek přítomných v osmotickém roztoku (osmotické činidlo) než v potravinové matrici. Voda je odstraněna z matrice průchodem do hypertonického roztoku apoplastickým transportem (mezibuněčnými prostory), symplastickým transportem (z buňky do buňky prostřednictvím plazmodesmat) a transmembránovým transportem (výměna látek mezi vnitřním prostředím buňky a vnějším prostředím přes cytoplazmatickou membránu). Z důvodu polopropustné buněčné stěny dochází nejen ke ztrátě vody z matrice do okolního roztoku, ale i k vpravení rozpuštěných látek přítomných v osmotickém roztoku do matrice. Společně s vodou dochází také k úniku dalších složek (organické kyseliny, minerální látky,

sacharidy a vitamíny) obsažených v potravinové matrici do osmotického roztoku. Proces končí, až když je dosažen stav osmotické rovnováhy, tj. když je rozdíl mezi osmotickými tlaky téměř nulový. Po osmotické dehydrataci lze získat potravinu se střední vlhkostí (a_w = 0,70–0,85) (a_w = aktivita vody) [105]. Nejčastěji používanými osmotickými činidly jsou glukóza, sacharóza, fruktóza, glycerol, sorbitol, kukuřičný sirup a chlorid sodný [104]. Na obrázku 17 je znázorněn přenos látek z potravinové matrice do roztoku během procesu osmo-dehydratace.



Obrázek 17: Transport látek z potravinové matrice během procesu osmo-dehydratace [106]

1.4.2 Faktory ovlivňující proces osmo-dehydratace

Rychlost transportu látek během osmo-dehydratace závisí na mnoha faktorech, jako jsou odrůda a zralost potravinové matrice, předúprava matrice, teplota a koncentrace osmotického činidla, rozměry matrice, rychlost míchání, doba ponoření do roztoku, poměr potraviny k osmotickému roztoku a fyzikálně-chemické vlastnosti matrice [104; 105].

- **Potravinová matrice**

Rychlost transportu látek, během osmotické dehydratace ovoce a zeleniny, je ovlivňována chemickým složením (odrůda a stupeň zralosti) potravinářské matrice. Mavroudis a kol. [107] porovnávali ztrátu vody a zvýšení rozpuštěných látek během osmotické dehydratace [50 °Bx sacharózy (°Bx = stupně Brix) při 5–40 °C] ve třech odrůdách jablek (Kim, Jonagold a Mutsu). Autoři zjistili, že odrůdy Kim a Jonagold měly vyšší ztráty vody (0,20–0,45 g vody/g produktu) v poměru k absorpci rozpuštěných látek (0,10–0,12 g rozpuštěné látky/g produktu). U odrůdy Mutsu byla ztráta vody nižší, ale došlo k vyšší absorpci rozpuštěných látek [105].

Rychlost procesu může být také ovlivněná slupkou, pórovitostí, velikostí a tvarem matrice. Aby byla zajištěna lepší propustnost slupky pro zlepšení transportu látek, většinou je slupka oloupána nebo ořezána z potravinové matrice. U některých potravin však může dojít k poškození textury vlivem loupání nebo řezání. Z tohoto důvodu se slupky potravinové matrice pouze upravují tak, aby se zvýšila jejich propustnost. Alfaro a kol. [108] studovali propustnost slupky Brusnice (borůvky) úzkolisté (*Vaccinium angustifolium* Ait.) ponořením do kapalného dusíku (–196 °C, 10 sekund). Zjistili, že během osmo-dehydratace (60 °Bx sacharózy při 40 °C, 8 hodin) ztratilo ovoce ošetřené touto metodou o 20 % více vody a získalo o 23 % více rozpuštěných látek ve srovnání se stejným produktem bez předchozí úpravy [105].

- **Výběr osmotického činidla**

Proces osmotické dehydratace je ovlivněn zejména fyzikálně-chemickými vlastnostmi (aktivita vody), rozpustností a molekulovou hmotností osmotického činidla. Čím větší je rozdíl v aktivitě vody mezi osmotickým činidlem a potravinářskou matricí, tím větší je hnací síla pro transport látek. Osmotické látky s nižší molekulovou hmotností snadněji pronikají do buněk matrice v porovnání s osmotickou látkou, která má vyšší molekulovou hmotnost. Správný výběr osmotického činidla je velmi důležitý, protože ovlivňuje fyzikální a senzorické vlastnosti konečného produktu. Dalším důležitým kritériem je kompatibilita rozpuštěné látky s potravinovou matricí. Obecně platí, že NaCl se používá na zeleninu, červené maso, ryby, krevety atd. Naopak roztoky monosacharidů a disacharidů se používají na ovoce [104; 105].

- **Koncentrace osmotického roztoku**

Koncentrace osmotického roztoku hraje důležitou roli v rychlosti transportu látek. Jestliže je v roztoku vyšší koncentrace rozpuštěné látky, dochází k větším ztrátám vody a vyšší absorpci rozpuštěných látek. Tento proces lze sledovat zejména u roztoků NaCl a sacharózy. V případě, že je v osmotickém roztoku více než jedna složka, je rychlost transportu látek ovlivněna především koncentrací složky s nejnižší molekulovou hmotností [105].

- **Teplota osmotického roztoku**

Teplota osmotického roztoku je nejdůležitějším faktorem, který ovlivňuje přenos látek. Vyšší teplota přispívá k větším ztrátám vody, zatímco absorpce rozpuštěných látek je ovlivněna méně. S vyšší teplotou se také zvyšuje rozpustnost látek obsažených v roztoku a dochází ke změnám viskozity osmotického roztoku. Lazarides [109] studoval vliv teploty na jablka. Zjistil, že při teplotách 30 °C a 50 °C docházelo k vyšším příjmům cukerných složek (až o 55 %) než u osmo-dehydratace, která probíhala při pokojové teplotě. Dále bylo zjištěno, že během

osmo-dehydratace, která probíhala při teplotě vyšší než 50 °C, byly pozorovány nepříznivé změny u vzorku borůvek. Teplota by při procesu osmo-dehydratace neměla překročit 60 °C, protože může dojít k poškození rostlinné tkáně nebo ke ztrátám některých sloučenin, jako jsou karotenoidy [104; 105].

- **Poměr osmotického roztoku k potravinové matrici**

Poměr objemu osmotického roztoku k hmotnosti potravinové matrice má zásadní význam při ovlivnění rychlosti transportu látek. Voda, která je během procesu uvolňována z matrice, snižuje koncentraci osmotického roztoku. K tomu dopomáhá i ztráta rozpuštěných látek z roztoku. Při práci s roztokem NaCl se doporučuje poměr potravinové matrice k osmotickému roztoku alespoň 1:15. U roztoku sacharózy se doporučuje poměr 1:2 nebo 1:3 [104; 105].

- **Míchání osmotického roztoku**

Během procesu osmotické dehydratace dochází ke zředění osmotického roztoku v blízkosti potravinové matrice z důvodu uvolňování vody ze vzorku. Jestliže se během procesu využije míchání roztoku, zlepší se homogenita roztoku při kontaktu mezi vzorkem a roztokem. Obecně platí, že pro roztoky s rozpuštěnými látkami s nízkou molekulovou hmotností, jako je NaCl, se používá rychlost míchání 120–190 otáček/min. Podobná rychlost míchání se používá i pro 30 až 50 °Bx roztoky sacharózy. Jestliže je osmotické činidlo viskóznější (roztok sacharózy, sorbitolu nebo glycerolu s koncentracemi vyššími než 60 °Bx), požadovaná rychlost míchání se pohybuje od 1000 do 1800 otáček/min [105].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje a pomůcky

V tabulce 10 je uveden přehled laboratorních přístrojů a pomůcek, které byly použity v experimentální části.

Tabulka 10: Použité laboratorní přístroje a pomůcky

Přístroje a pomůcky	Výrobce
Laboratorní váhy KERN 440-35N	KERN & Sohn GmbH, Balingen, Německo
Analytické váhy KERN ABJ-NM/ABS-N	KERN & Sohn GmbH, Balingen, Německo
UV/Vis Spektrofotometr Helios δ	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vodní lázeň Memmert	Memmert, Schwabach, Německo
Kapalinový chromatograf Nexera X2	Shimadzu, Kyoto, Japonsko
Ultrazvuková lázeň Sonorex	Bandelin, Berlín, Německo
Lyofilizátor L4-110	Gregor Instruments s.r.o., Říčany, ČR
Sušárna laboratorní Apex AX 60	Carbolite, Derbyshire, UK
Centrifuga NF 400 (r = 90 mm)	Nüve, Ankara, Turecko
Mixér NutriBullet	Delimano, Lublaň, Slovinsko
Spektrofotometr UltraScan VIS	HunterLab, Virginie, USA
Automatické pipety	Biohit, Helsinky, Finsko
Laboratorní nádobí	Fisher Scientific, Pardubice, ČR

2.2 Chemikálie

V tabulce 11 je uveden přehled všech chemikálií, které byly použity v experimentální části.

Tabulka 11: Použité chemikálie

Chemikálie	Výrobce
DPPH radikál	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Folin–Ciocalteuovo činidlo	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Kyselina gallová	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Kyselina skořicová ≥99%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Trolox 97%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Methanol ≥99,9%	Honeywell, Morristown, Německo
Ethanol 96%	Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR
Acetonitril ≥99,9%	Honeywell, Morristown, Německo
Uhličitan sodný	J.T.Baker, Deventer, Nizozemsko
trans-Cinnamaldehyd 99%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Destilovaná voda	Univerzita Pardubice, ČR
Redestilovaná voda	Univerzita Pardubice, ČR
Kyselina mravenčí 98%	Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR

2.3 Příprava cukerných roztoků

Na analytických vahách bylo naváženo 0,01 g, 0,05 g, 0,1 g, 0,5 g a 1,0 g cinnamaldehydu do kádinek a rozpuštěno v 10 ml ethanolu. Poté bylo do 5 skleněných lahví o objemu 1 litr naváženo 500 g cukru, kvantitativně převedeny roztoky cinnamaldehydu o různé koncentraci a doplněno pitnou vodou do celkové hmotnosti 1000 g. Následně byly připraveny také 2 kontrolní roztoky. První kontrolní roztok obsahoval 500 g cukru, 10 ml ethanolu a byl doplněn pitnou vodou do 1000 g. Druhý kontrolní roztok byla pouze pitná voda s 10 ml ethanolu, celková hmotnost roztoku byla 1000 g. Takto připravené a promíchané roztoky byly dány do vodní lázně o teplotě 75 °C. Po úplném rozpuštění cukru byly roztoky vyndány z lázně a ponechány 40 min chladnout, než byly dále použity. Bylo zjištěno, že 1 ml roztoku, který obsahoval cukr, odpovídala hmotnost 1,2278 g (ρ = 1,2278 g/ml). Z tohoto výsledku byl

vypočten objem vody pro cukerný roztok o hmotnosti 1000 g. Tímto výpočtem bylo stanoveno, že 1 kg cukerného roztoku odpovídalo 814,5 ml. 1 kg kontrolního roztoku, který obsahoval pouze pitnou vodu, odpovídalo 997 ml vody.

2.4 Analyzovaný vzorek

2.4.1 Charakteristika vzorku

K analýze byla použita odrůda jablek Jonagold (Obr. 18), která byla zakoupena v obchodním řetězci Albert. Jablka byla vypěstována v České republice. Odrůda Jonagold je velice populární a rozšířená odrůda jabloně, která vznikla křížením odrůd Golden Delicious a Jonathan v USA. Jedná se o zimní odrůdu jablek, která se sklízí v říjnu, dozrává během ledna a její skladování je možné do jara. Plody jsou středně velké až velké, kuželovitého tvaru, červené se žlutým zbarvením. Slupka je hladká a lesklá. Dužina je křehká, křupavá, nažloutlá, aromatická a velmi šťavnatá. V tabulce 12 jsou uvedeny výživové hodnoty syrového jablka (ve 100 g) [110].

Obrázek 18: Vzorek jablka Jonagold

Tabulka 12: Výživové hodnoty syrového jablka (ve 100 g) [111]

Energetická hodnota	52 kcal (218 kJ)
Bílkoviny	0,37 g
Sacharidy	13 g
Z toho cukry	11 g
Tuky	0,4 g
Vláknina	3 g

2.4.2 Příprava vzorků před procesem osmo-dehydratace

Před procesem osmo-dehydratace byla jablka oloupána, rozpůlena a z obou polovin byl vyjmut jádřinec. První polovina jablka byla nastrouhaná na hrubším struhadle, z druhé poloviny byla odkrojena 3 kolečka pro následné měření barevnosti. Do kádinky o objemu 250 ml bylo naváženo cca 35 g nastrouhaného jablka a přidána 3 kolečka jablka (cca 15 g, průměr 2 cm). K 50 g jablek bylo následně přidáno 150 g roztoku. Takto připravené kádinky byly zakryty alobalem a vloženy do vodní lázně o teplotě 50 °C. Pro každý cukerný roztok o různé koncentraci skořicového aldehydu a 2 kontrolní roztoky byly takto připraveny 3 kádinky (celkem tedy 21 kádinek/vzorků). První kádinka se vzorkem byla z vodní lázně vytažena vždy po 1 hodině, druhá kádinka po 2 hodinách a třetí kádinka po 3 hodinách. Cca 30 ml cukerného roztoku o různé koncentraci skořicového aldehydu i kontrolních roztoků před procesem osmo-dehydratace bylo přelito do plastových zkumavek, zamraženo a použito k další analýze.

2.4.3 Zpracování vzorků po procesu osmo-dehydratace

Z kádinek vytažených z vodní lázně byla vyndána kolečka jablek, ta byla osušena filtračním papírem a ihned u nich byla změřena barevnost. Následně bylo z cukerného roztoku vyndáno strouhané jablko, které bylo také osušeno filtračním papírem a vloženo do sušárny při teplotě 50 °C. Vzorky nastrouhaného jablka byly po 24 hodinách vyndány ze sušárny, vloženy do plastových zkumavek a dány do mrazničky. Po získání všech vzorků bylo zmražené strouhané jablko převedeno na Petriho misku a lyofilizováno po dobu 26 hodin při –110 °C. Po lyofilizaci byly vzorky vloženy do mixéru, rozemlety na prášek a použity k extrakci. K extrakci bylo naváženo cca 0,3 g práškového vzorku jablka s přesností 0,001 g do plastové zkumavky a přidány 3 ml 50% acetonitrilu. Zkumavky byly uzavřeny a vloženy na 25 minut do ultrazvukové lázně. Po extrakci byly zkumavky vyndány a 10 minut odstřeďovány při 4000 ot/min. Následně byla kapalná fáze odebrána a ponechána v mrazničce do dalších analýz. Cca 30 ml cukerného roztoku o různé koncentraci skořicového aldehydu i kontrolních vzorků po procesu osmo-dehydratace bylo přelito do plastových zkumavek, zamraženo a použito k další analýze.

2.5 Stanovení antioxidační kapacity metodou využívající DPPH

Antioxidační kapacita byla stanovena touto metodou pro cukerné roztoky před osmo-dehydratací, cukerné roztoky po osmo-dehydrataci i pro extrakty z jablek po osmo-dehydrataci.

2.5.1 Postup pro stanovení antioxidační kapacity u vzorků

Do skleněných zkumavek s víčkem bylo pomocí dávkovače převedeno 5 ml methanolického roztoku DPPH radikálu (methanolický roztok o koncentraci 0,025 mg/ml) a poté přidáno 300 µl vzorku. Zkumavky byly uzavřeny, promíchány a ponechány 80 minut v temnu při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byl změřen úbytek absorbance (míra odbarvení roztoku) při vlnové délce 517 nm. U každého stanovení byl proveden slepý pokus, který místo vzorku obsahoval extrakční činidlo (50% acetonitril). Stanovený úbytek absorbance se vyjadřuje v procentech inhibice DPPH radikálu (Rovnice 1). Pomocí kalibrační řady Troloxu byla vyjádřena antioxidační kapacita vzorků a výsledky byly vyjádřeny jako µg Troloxu v ml vzorku. Následně byly výsledky pro roztoky převedeny na mikrogramy v 1 kg roztoku a extrakty jablek na mikrogramy v 1 g sušeného jablka.

$$I\ (\%) = \frac{A_{\mathrm{sp}} - A_{\mathrm{vz}}}{A_{\mathrm{sp}}} \cdot 100 \qquad (1)$$

A_{sp}……absorbance slepého pokusu

A_{vz}……absorbance vzorku (resp. kalibračního roztoku)

I (%)….inhibice

2.5.2 Příprava kalibračních roztoků

Kalibrační řada byla připravena ze zásobního roztoku Troloxu o koncentraci 1 g/l. Zásobní roztok byl připraven navážením 0,0250 g Troloxu do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplněn methanolem po rysku. Kalibrační roztoky byly připraveny v rozmezí koncentrací 5–105 µg/ml. Stanovení antioxidační kapacity kalibračních roztoků bylo provedeno stejně jako u vzorků.

2.6 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Celkový obsah fenolických látek byl stanoven pro cukerné roztoky před osmo-dehydratací, cukerné roztoky po osmo-dehydrataci i pro extrakty z jablek po osmo-dehydrataci.

2.6.1 Postup pro stanovení celkového obsahu fenolických látek u vzorků

Do skleněných zkumavek s víčkem byl pipetován 1 ml vzorku. Poté byl do zkumavky dávkovačem přidán 1 ml ethanolu, 5 ml pitné vody a nakonec 0,5 ml činidla dle Folin–Ciocalteua. Zkumavky byly uzavřeny, promíchány a ponechány v temnu. Po 5 minutách byl do zkumavek přidán 1 ml 5% roztoku uhličitanu sodného. Zkumavky byly opět promíchány a ponechány v temnu po dobu 80 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byla

změřena absorbance při vlnové délce 765 nm. U každého stanovení byl proveden slepý pokus, který místo vzorku obsahoval extrakční činidlo. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent kyseliny gallové. Pomocí kalibrační řady kyseliny gallové byl vypočten celkový obsah fenolických látek ve vzorcích a výsledky byly vyjádřeny jako µg kyseliny gallové v ml vzorku. Následně byly výsledky pro roztoky převedeny na mikrogramy v 1 kg roztoku a extrakty jablek na mikrogramy v 1 g sušeného jablka.

2.6.2 Příprava kalibračních roztoků

Kalibrační řada byla připravena ze zásobního roztoku kyseliny gallové o koncentraci 1 g/l. Zásobní roztok byl připraven navážením 0,0250 g kyseliny gallové do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplněn methanolem po rysku. Kalibrační roztoky byly připraveny v rozmezí koncentrací 10–150 µg/ml. Stanovení celkového obsahu fenolických látek kalibračních roztoků bylo provedeno stejně jako u vzorků.

2.7 Měření barevnosti

K měření barevnosti u plátků jablek byl použit přístroj spektrofotometr UltraScan VIS s integrační koulí v geometrii d/8°, světelným zdrojem D65 a rozsahem 400–700 nm. Vzorky byly měřeny v režimu, který měří celkový odraz, včetně přímého odrazu a rozptýleného odrazu. Standardizace přístroje proběhla na bílou kachli.

2.8 Analýza kapalinovou chromatografií

K separaci vzorků byl použit kapalinový chromatograf Nexera X2 s PDA detekcí. Soustava se dále skládala z odplyňovače mobilní fáze, vysokotlaké pumpy, autosampleru a termostatu kolony. Jako mobilní fáze A byla použita redestilovaná voda s přídavkem kyseliny mravenčí (pH = 3,2), jako mobilní fáze B byl použit 100% methanol. Nástřik vzorku činil 10 µl a průtok byl nastaven na 0,5 ml/min. Separace probíhala na koloně C18 (10 cm × 2,1 mm, 3 µm). Byla použita gradientová eluce s následujícím průběhem gradientu: 0–2 minuty 5% methanol, 2–10 minut lineární změna na 60% methanol a 10–20 minut nárůst na 90% methanol. Poté bylo složení mobilní fáze vráceno na počáteční složení a ponecháno 10 min.

Po analýze cukerného roztoku s přídavkem aldehydu (0,1%) bylo zjištěno, že část tohoto aldehydu byla zoxidována na kyselinu skořicovou, proto byl k další analýze použit i standard této látky. Signál kyseliny skořicové byl detekován při 275 nm a retenčním čase 9,86 min a signál skořicového aldehydu byl detekován při 290 nm a retenčním čase 9,38 min. Teplota separace byla 40 °C.

2.8.1 Kalibrační řada, mez detekce a mez stanovitelnosti

Kalibrační řada pro skořicový aldehyd byla připravena ze zásobního roztoku o koncentraci 1 g/l. Zásobní roztok byl připraven navážením 0,025 g skořicového aldehydu do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplněn methanolem po rysku. Kalibrační roztoky byly připraveny v rozmezí koncentrací 0,125–250 µg/ml. Kalibrační řada pro kyselinu skořicovou byla připravena ze zásobního roztoku 1 g/l. Zásobní roztok byl připraven navážením 0,025 g kyseliny skořicové do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplněn methanolem po rysku. Kalibrační roztoky byly připraveny v rozmezí koncentrací 0,030–55 µg/ml. Pro obě látky byla vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti. Meze detekce a stanovitelnosti byly počítány na základě trojnásobku, resp. desetinásobku hodnoty šumu. Jako šum byla brána hodnota směrodatné odchylky úseku kalibrační závislosti pro danou sloučeninu. Mez detekce pro skořicový aldehyd činila 0,00826 µg/ml a mez stanovitelnosti činila 0,03779 µg/ml. Mez detekce pro kyselinu skořicovou činila 0,00088 µg/ml a mez stanovitelnosti činila 0,00433 µg/ml.

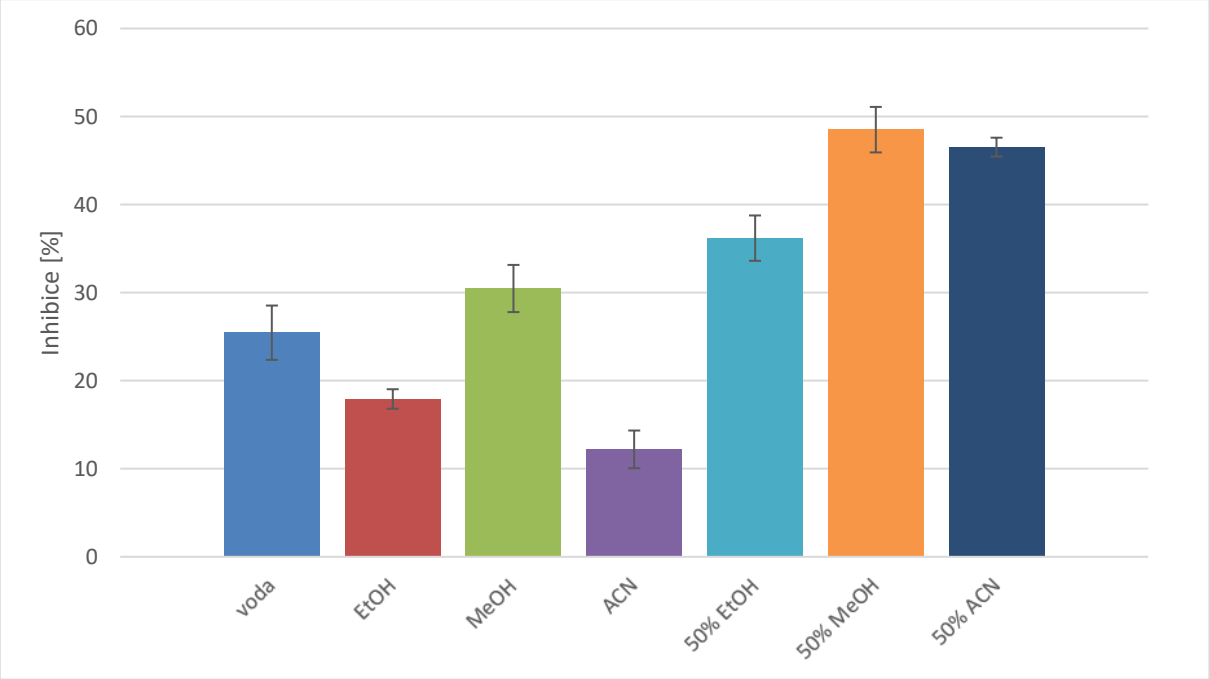
2.8.2 Příprava vzorků

Cukerné roztoky před i po osmo-dehydrataci bylo nutné 5× naředit počátečním složením mobilní fáze. Kontrolní roztoky a extrakty z jablek nebylo potřeba ředit.

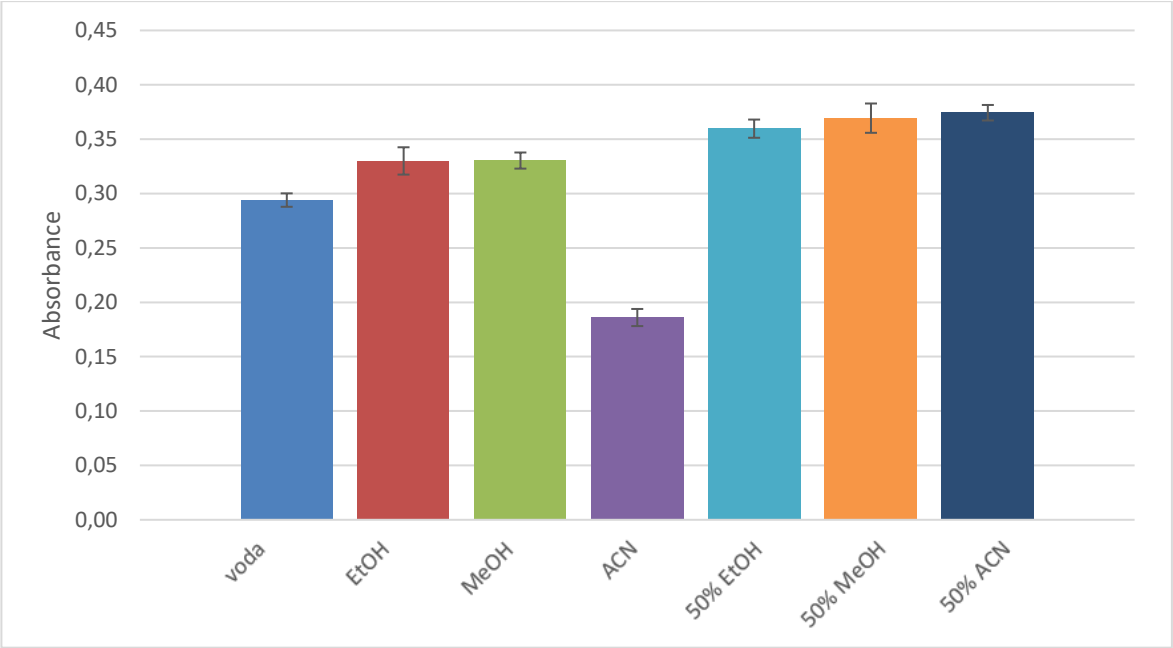
3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Výběr extrakčního činidla

Pro výběr extrakčního činidla k analýze byla vybrána tato rozpouštědla: voda, ethanol, methanol, acetonitril, 50% ethanol, 50% methanol a 50% acetonitril. Jablko bylo oloupáno a nastrouháno. Byl navážen 1 g jablka do kádinky a přidáno 20 ml rozpouštědla. Vzorek se extrahoval v ultrazvukové lázni po dobu 25 minut. Po extrakci byl vzorek zfiltrován a byla změřena antioxidační kapacita (postup podle kapitoly 2.5.1) a obsah celkových fenolických látek (postup podle kapitoly 2.6.1). Obě analýzy byly provedeny pro každé rozpouštědlo třikrát (n = 3). Z výsledků, které jsou zobrazeny na obrázku 19 a 20, bylo vybráno jako nejvhodnější extrakční činidlo methanol a acetonitril, které vykazovaly nejvyšší hodnoty pro antioxidační vlastnosti.

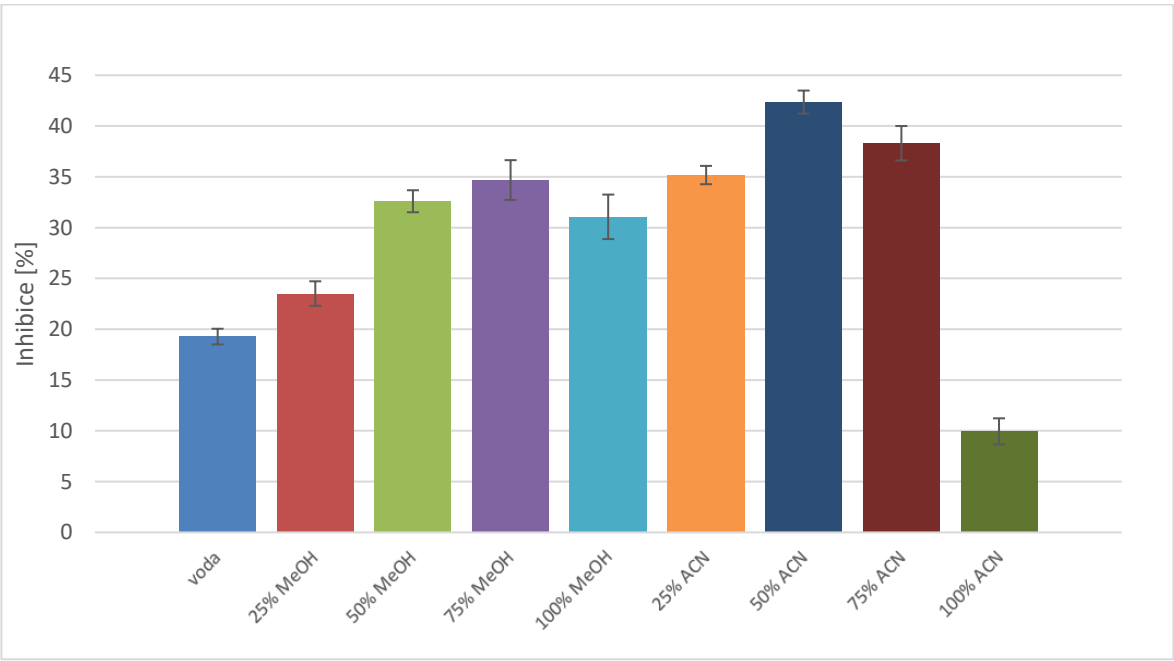


Obrázek 19: DPPH metoda pro výběr extrakčního činidla (n = 3)

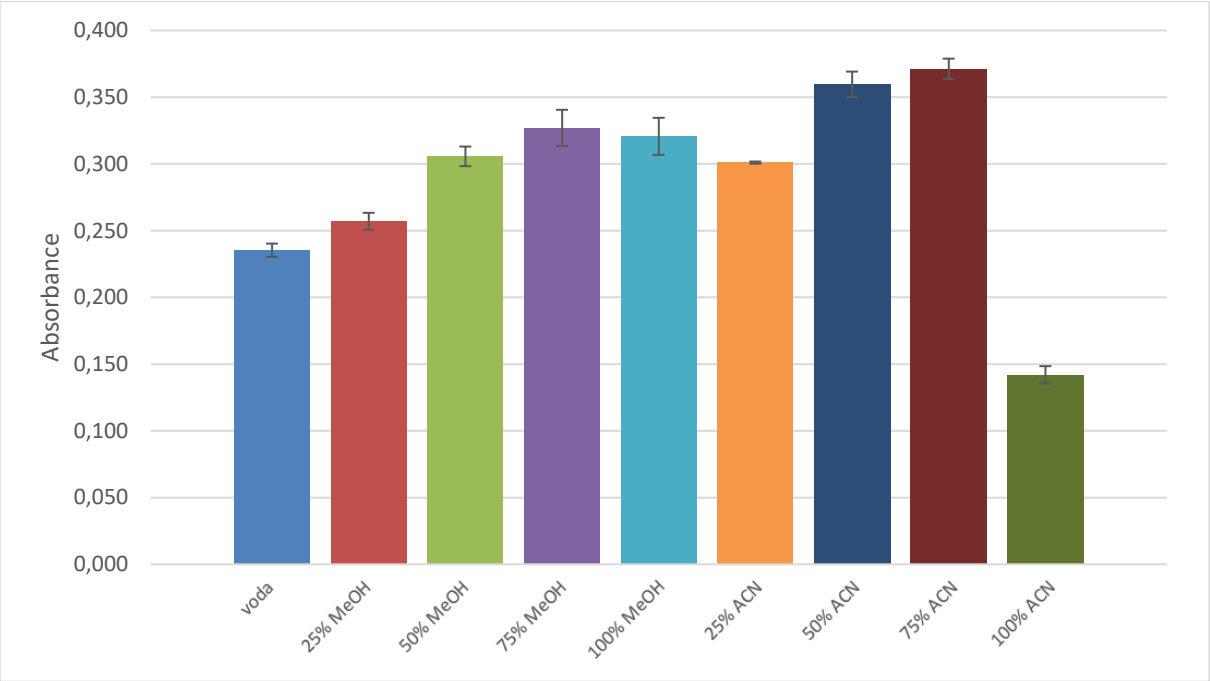


Obrázek 20: TPC metoda pro výběr extrakčního činidla (n = 3)

Následně bylo potřeba upřesnit koncentrace methanolu nebo acetonitrilu, které bude vhodné použít k dalším analýzám jako extrakční činidlo. K další analýze byly proto vybrána tato rozpouštědla: voda, 25% methanol, 50% methanol, 75% methanol, 100% methanol, 25% acetonitril, 50% acetonitril, 75% acetonitril a 100% acetonitril. Obě analýzy byly provedeny stejně jako u výběru extrakčního činidla a byly provedeny pro každé rozpouštědlo třikrát (n = 3). Z výsledků, které jsou zobrazeny na obrázku 21 a 22, byl vybrán jako nejvhodnější extrakční činidlo 50% acetonitril.



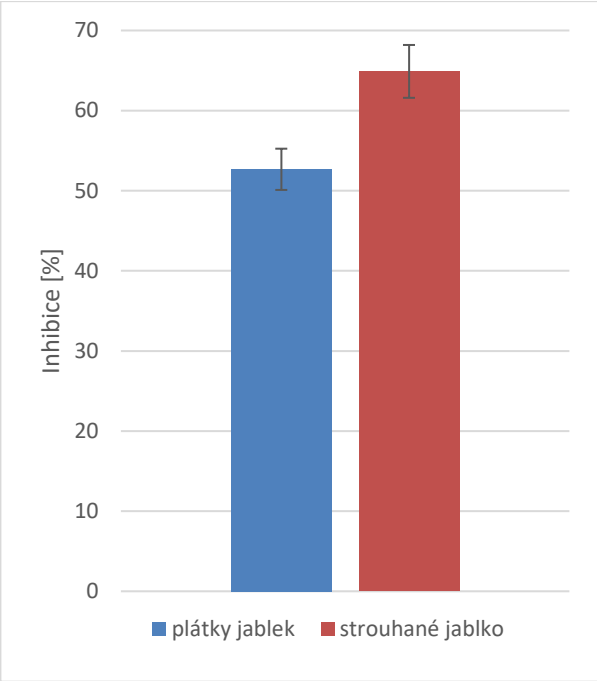
Obrázek 21: DPPH metoda pro upřesnění výběru extrakčního činidla (n = 3)



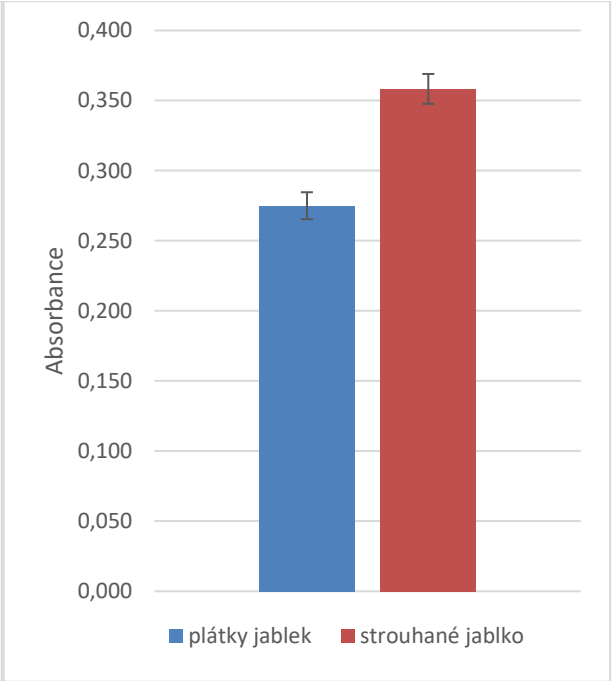
Obrázek 22: TPC metoda pro upřesnění výběru extrakčního činidla (n = 3)

3.2 Antioxidační vlastnosti strouhaného jablka a plátků jablek

Pro porovnání antioxidačních vlastností mezi strouhaným jablkem a plátky jablek byla použita DPPH metoda a TPC metoda. K analýze bylo jablko oloupáno a rozpůleno. Z obou částí byl vyjmut jádřinec, jedna půlka jablka byla nastrouhána a z druhé půlky byla odkrojena kolečka. Na analytických vahách byl navážen 1 g jablka do kádinky a bylo přidáno 20 ml extrakčního činidla (50% acetonitril). Vzorek byl extrahován v ultrazvukové lázni po dobu 25 minut. Po extrakci byl vzorek zfiltrován a z extraktu byla změřena antioxidační kapacita (postup podle kapitoly 2.5.1) a obsah celkových fenolických látek (postup podle kapitoly 2.6.1). Obě analýzy byly provedeny pro každý extrakt třikrát (n = 3). Z obrázku 23 a 24 lze pozorovat, že větší antioxidační vlastnosti u obou metod vykazuje strouhané jablko, které z tohoto důvodu bylo použito k dalším analýzám.



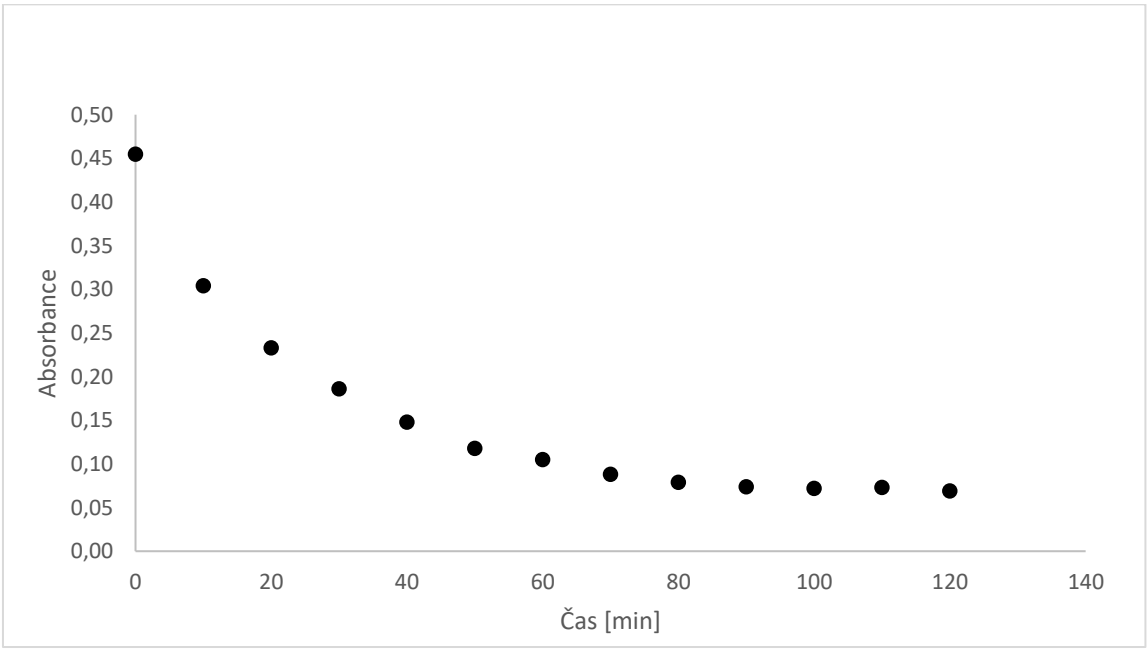
Obrázek 23: DPPH metoda pro plátky jablek a strouhané jablko (n = 3)



Obrázek 24: TPC metoda pro plátky jablek a strouhané jablko (n = 3)

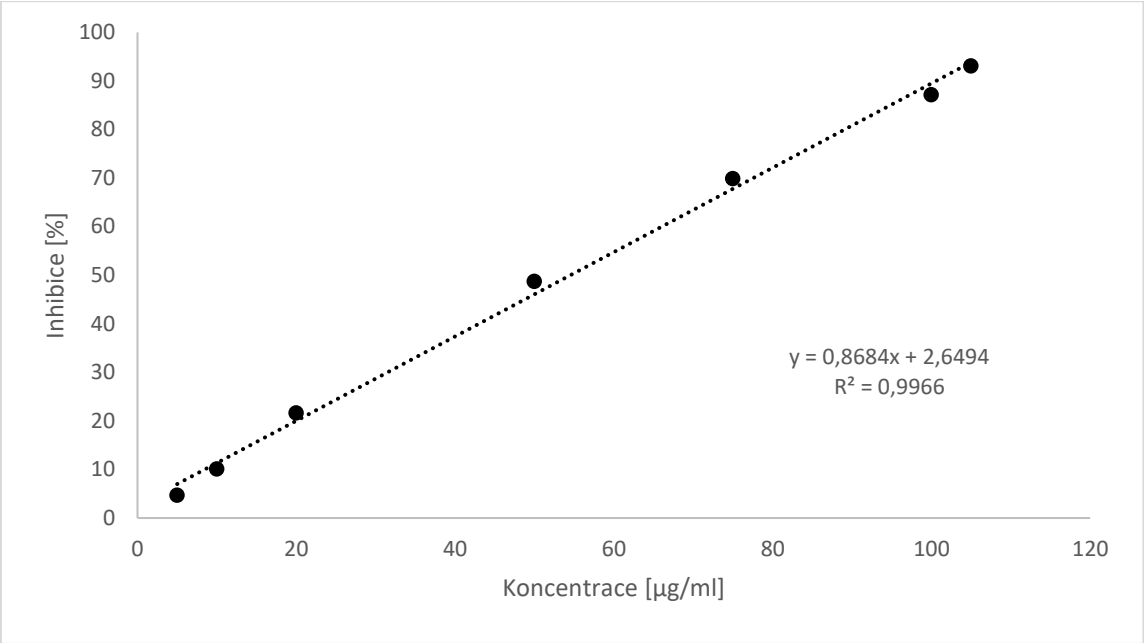
3.3 Stanovení antioxidační kapacity metodou využívající DPPH

Jako první byla provedena optimalizace času reakce. K proměření byl použit cukerný roztok po osmo-dehydrataci (1 hodina) s nejvyšší koncentrací skořicového aldehydu (0,1%). Na základě této optimalizace bylo zjištěno, že vzorek nemusí být ředěn a jako optimální doba k měření vzorků bylo stanoveno 80 minut (Obr. 25).



Obrázek 25: Optimalizace metody pro stanovení antioxidační kapacity

Naměřené hodnoty absorbance pro jednotlivé vzorky byly převedeny na procento inhibice. Následně pomocí kalibrační řady Troloxu (Obr. 26) byla vyjádřena antioxidační kapacita vzorků a výsledky byly vyjádřeny jako µg Troloxu v ml vzorku. Pro roztoky před i po procesu osmo-dehydratace pak tyto hodnoty byly převedeny na miligramy Troloxu v 1 kg roztoku, extrakty z jablek byly převedeny na miligramy Troloxu v 1 g sušeného jablka (Příloha I).

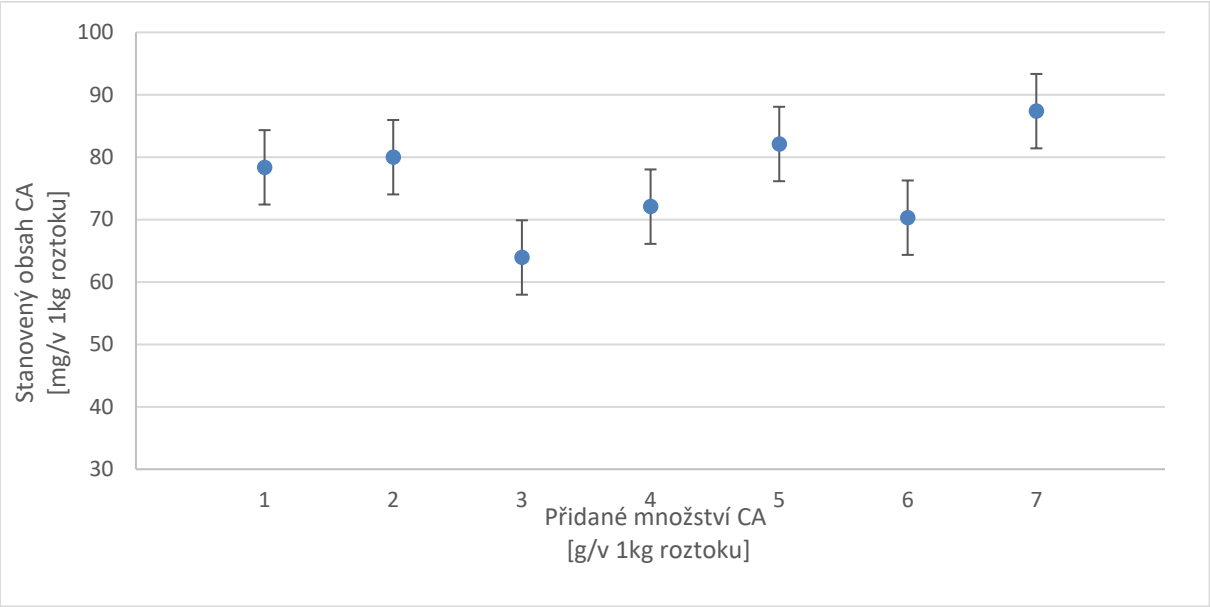


Obrázek 26: Kalibrační řada Troloxu pro stanovení antioxidační kapacity metodou DPPH

Z výsledků pro roztoky před osmo-dehydratací bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací skořicového aldehydu v roztoku dochází ke zvýšení antioxidační kapacity roztoků (Příloha I – Tabulka I/1). Dále z těchto výsledků bylo zjištěno, že antioxidační kapacita roztoků před osmo-dehydratací s přídavkem aldehydu je velmi nízká (cukerný roztok s nejnižším přídavkem skořicového aldehydu měl nižší antioxidační kapacitu než cukerný roztok bez aldehydu). Z toho vyplývá, že antioxidační vlastnosti skořicového aldehydu nejsou příliš vysoké.

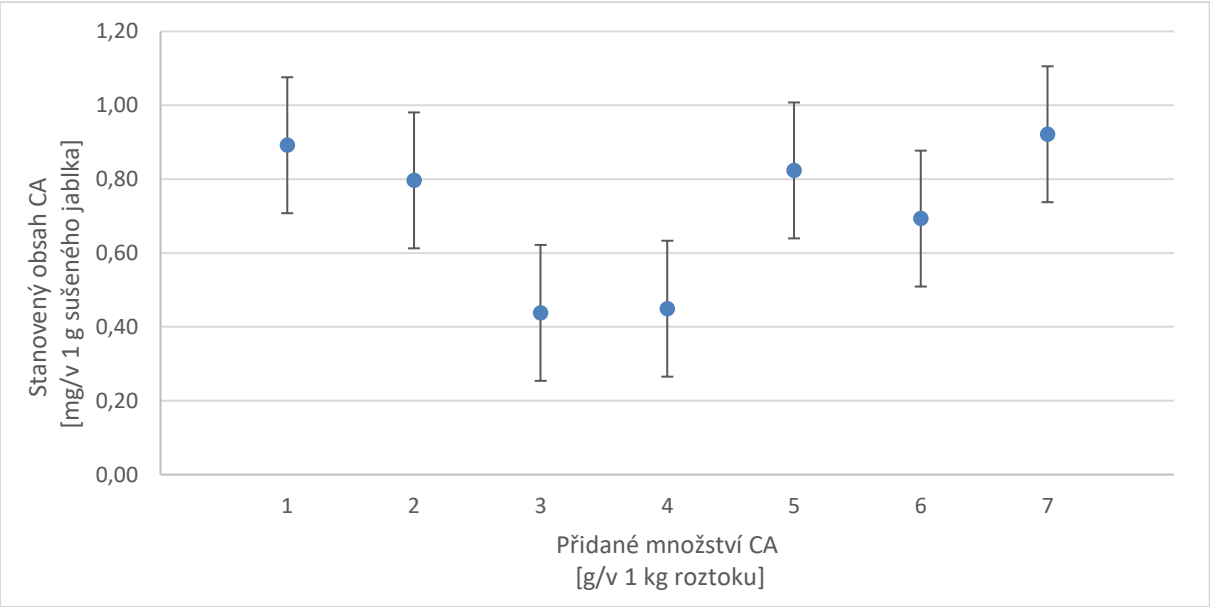
Z výsledků analýzy rozptylu vyplývá, že čas s hodnotami antioxidační kapacity u roztoků po osmo-dehydrataci i u extraktů z jablek po osmo-dehydrataci nesouvisí ($p > 0,05$) (Příloha II). Lze tedy říct, že nezáleží na tom, jestli je jablko (resp. roztoky) vystaveno procesu osmo-dehydratace 1 hodinu, 2 hodiny nebo 3 hodiny. Co však tvrdit nelze je to, jestli by jablko po procesu osmo-dehydratace (resp. roztoky) vykazovalo podobné hodnoty antioxidační kapacity, jestliže by osmo-dehydratace probíhala např. pouze 15 minut nebo naopak 8 hodin. K tomuto zjištění by bylo potřeba další analýzy. Za zmínku dále stojí zjištění, že cukerné roztoky po osmo-dehydrataci s nízkým přídavkem skořicového aldehydu mají nižší antioxidační kapacitu než kontrolní roztok, který obsahoval pouze vodu a ethanol. Antioxidační kapacita se zvýšila až u cukerných roztoků,

které obsahovaly přídavek 0,05% a 0,1% skořicový aldehyd (Obr. 27). To samé platí i pro antioxidační kapacitu u extraktů z jablek po osmo-dehydrataci (p = 0,007) (Obr. 28).



Obrázek 27: Výsledný efekt vlivu přidaného CA na skutečné koncentraci CA u roztoků po osmo-dehydrataci při DPPH metodě (n = 3)

Poznámka k obrázku 27: Na ose x je znázorněno množství přidaného CA:
1 – 1 g CA; 2 – 0,5 g CA; 3 – 0,1 g CA; 4 – 0,05 g CA; 5 – 0,01g CA; 6 – kontrolní roztok (cukr + voda + EtOH); 7 – kontrolní roztok (voda + EtOH). Vertikální úsečky znázorňují 95% konfidenční interval.

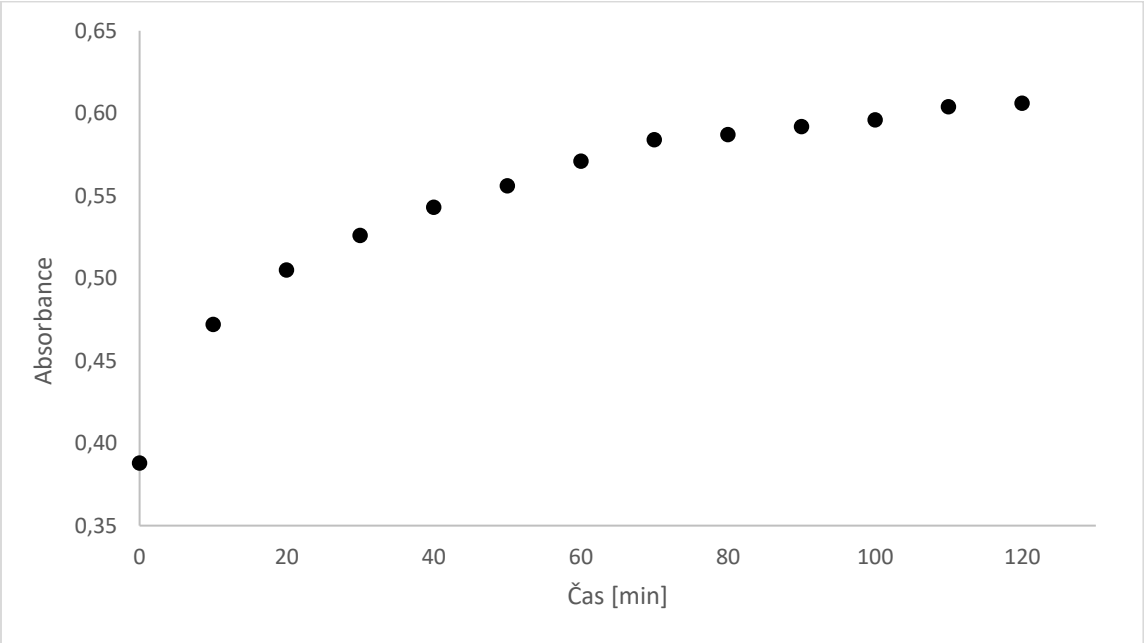


Obrázek 28: Výsledný efekt vlivu přidaného CA na skutečné koncentraci CA u extraktů z jablek po osmo-dehydrataci při DPPH metodě (n = 3)

Poznámka k obrázku 28: Na ose x je znázorněno množství přidaného CA:
1 – 1 g CA; 2 – 0,5 g CA; 3 – 0,1 g CA; 4 – 0,05 g CA; 5 – 0,01g CA; 6 – kontrolní roztok (cukr + voda + EtOH); 7 – kontrolní roztok (voda + EtOH). Vertikální úsečky znázorňují 95% konfidenční interval.

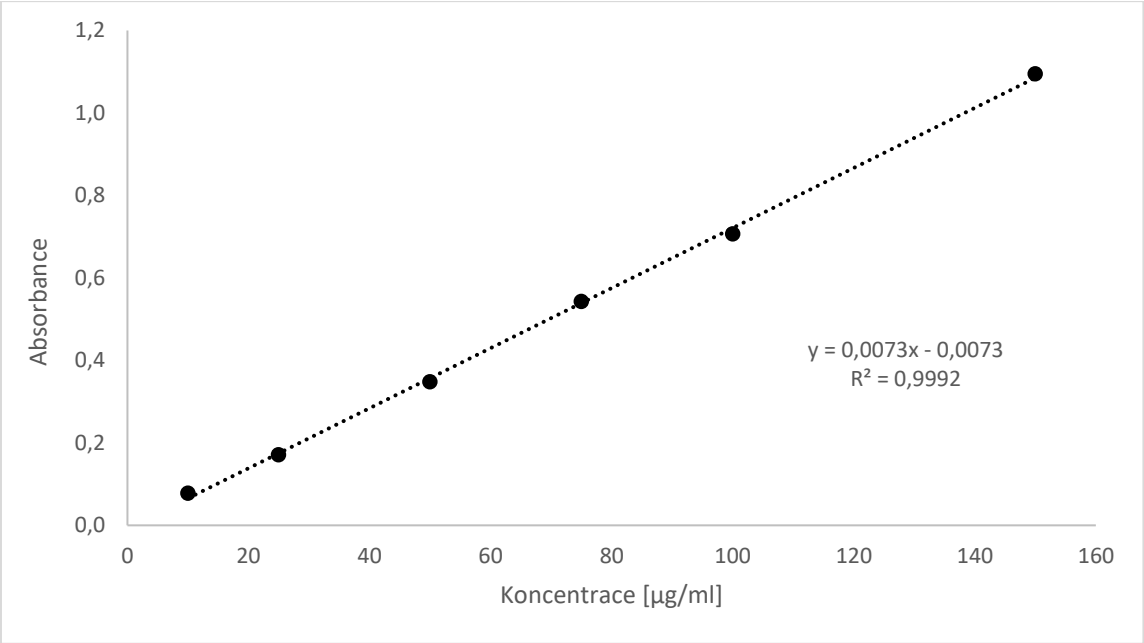
3.4 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Jako první byla provedena optimalizace času reakce. K proměření byl použit cukerný roztok po osmo-dehydrataci (1 hodina) s nejvyšší koncentrací skořicového aldehydu (0,1%). Na základě této optimalizace bylo zjištěno, že vzorek nemusí být ředěn a jako optimální doba k měření vzorků bylo stanoveno 80 minut (Obr. 29).



Obrázek 29: Optimalizace metody pro stanovení celkového obsahu fenolických látek

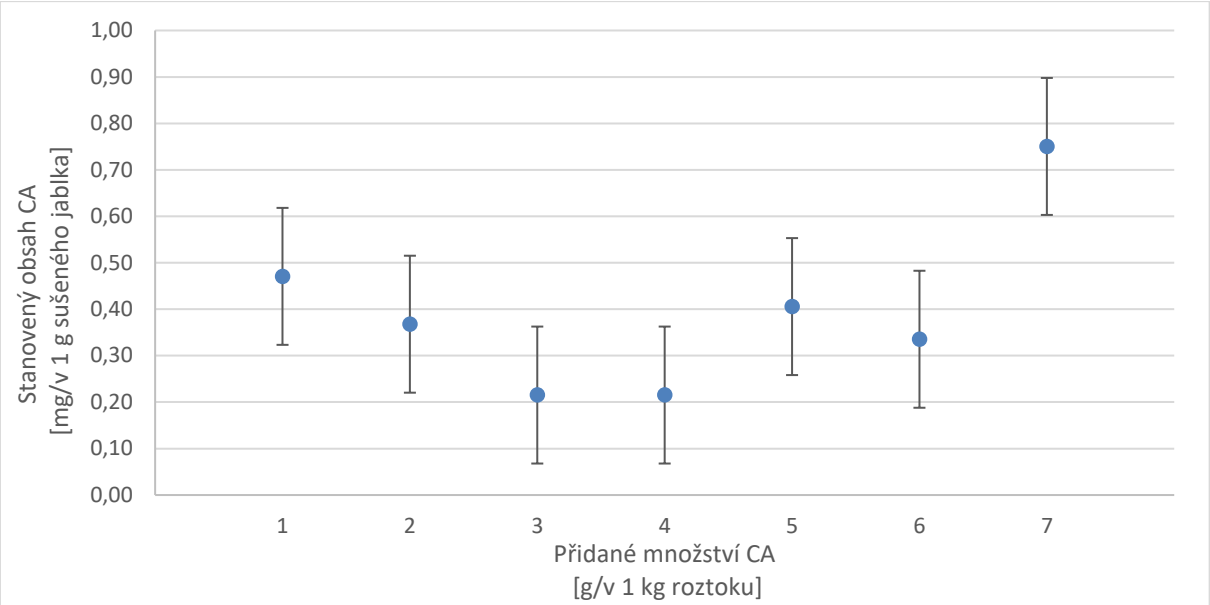
Pomocí kalibrační řady kyseliny gallové (Obr. 30) byl vypočten celkový obsah fenolických látek ve vzorků a výsledky byly vyjádřeny jako µg kyseliny gallové v ml vzorku. Pro roztoky před i po procesu osmo-dehydratace pak tyto hodnoty byly převedeny na miligramy kyseliny gallové v 1 kg roztoku, extrakty z jablek byly převedeny na miligramy kyseliny gallové v 1 g sušeného jablka (Příloha III).



Obrázek 30: Kalibrační řada kyseliny gallové pro stanovení celkového obsahu fenolických látek

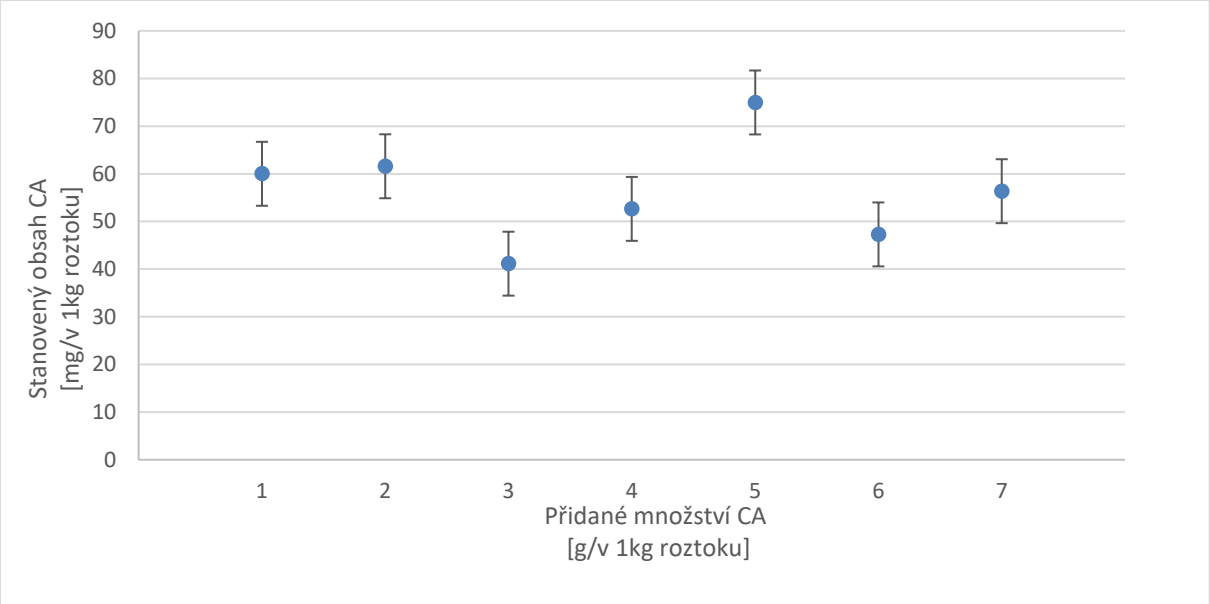
Z výsledků pro roztoky před osmo-dehydratací bylo zjištěno, že se zvyšující se koncentrací skořicového aldehydu v roztoku dochází ke zvýšení celkového obsahu fenolických látek (Příloha III – Tabulka III/1). Dále z těchto výsledků bylo zjištěno, že celkový obsah fenolických látek v roztocích před osmo-dehydratací s přídavkem aldehydu je velmi nízký. Z toho vyplývá, že vliv skořicového aldehydu na celkový obsah fenolických látek není příliš vysoký.

Z výsledků analýzy rozptylu vyplývá, že čas s celkovým obsahem fenolických látek u roztoků po osmo-dehydrataci i u extraktů z jablek po osmo-dehydrataci nesouvisí ($p > 0,05$) (Příloha II). To znamená, že pro TPC metodu je to s časem stejné jako u DPPH metody (kapitola 3.3). Za zmínku dále stojí zjištění, že jablka, která byla naložena do kontrolního roztoku, který obsahoval pouze vodu a ethanol, vykazovala výrazně vyšší celkový obsah fenolických látek, než jablka naložena v ostatních roztocích (Obr. 31) ($p = 0,002$). Celkový obsah fenolických látek u roztoků po osmo-dehydrataci se zvýšil až u cukerných roztoků, které obsahovaly přídavek 0,05% a 0,1% skořicový aldehyd (Obr. 32).



Obrázek 31: Výsledný efekt vlivu přidaného CA na skutečné koncentraci CA u extraktů z jablek po osmo-dehydrataci při TPC metodě (n = 3)

Poznámka k obrázku 31: Na ose x je znázorněno množství přidaného CA:
1 – 1 g CA; 2 – 0,5 g CA; 3 – 0,1 g CA; 4 – 0,05 g CA; 5 – 0,01g CA; 6 – kontrolní roztok (cukr + voda + EtOH); 7 – kontrolní roztok (voda + EtOH). Vertikální úsečky znázorňují 95% konfidenční interval.



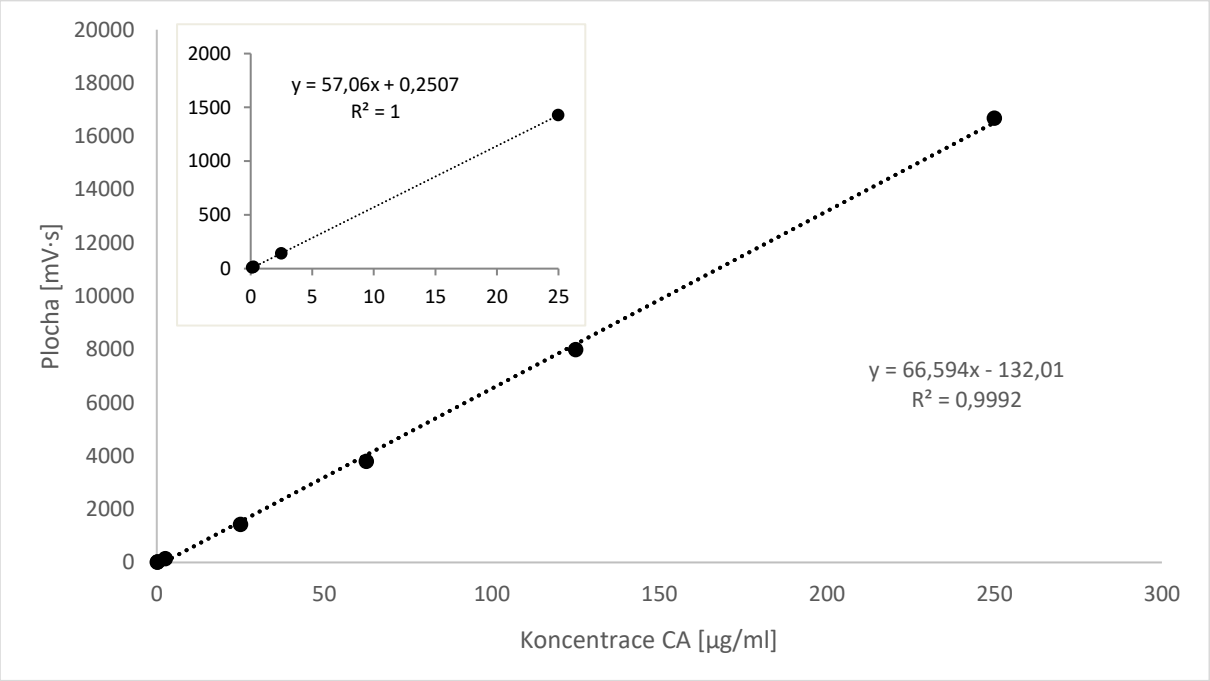
Obrázek 32: Výsledný efekt vlivu přidaného CA na skutečné koncentraci CA u roztoků po osmo-dehydrataci při TPC metodě (n = 3)

Poznámka k obrázku 32: Na ose x je znázorněno množství přidaného CA:
1 – 1 g CA; 2 – 0,5 g CA; 3 – 0,1 g CA; 4 – 0,05 g CA; 5 – 0,01g CA; 6 – kontrolní roztok (cukr + voda + EtOH); 7 – kontrolní roztok (voda + EtOH). Vertikální úsečky znázorňují 95% konfidenční interval.

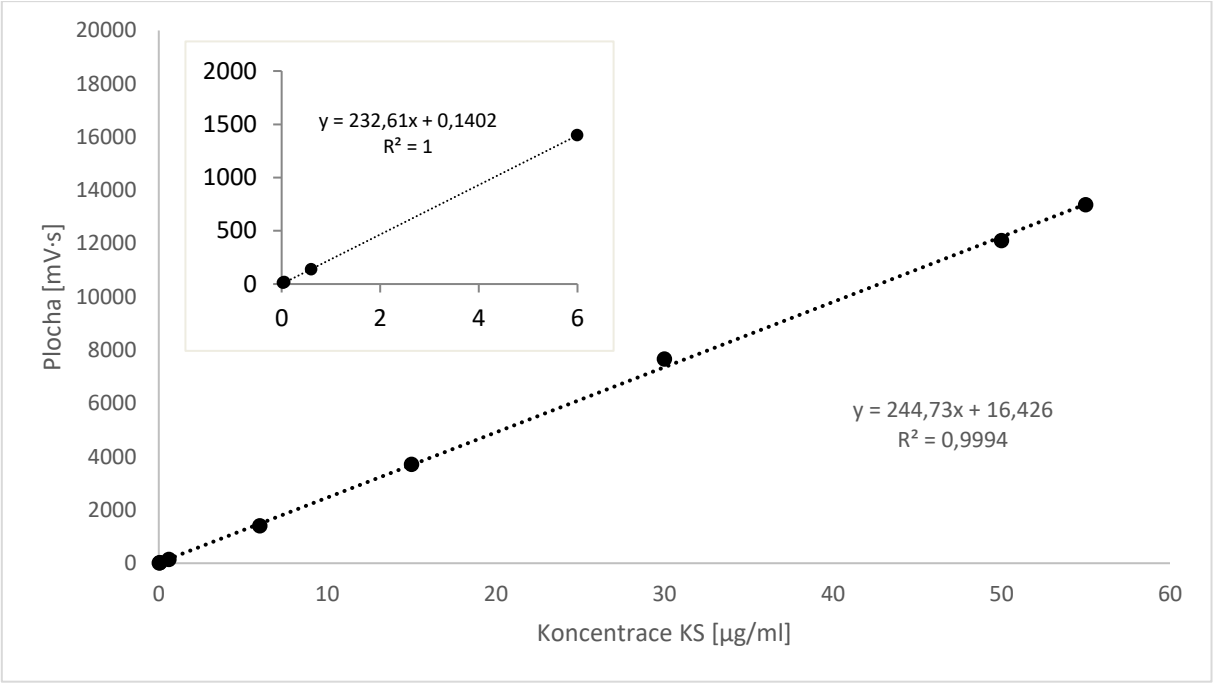
Je však potřeba doplnit, že výsledky pro celkový obsah fenolických látek i antioxidační kapacitu nijak nesouvisí s obsahem skořicového aldehydu a kyseliny skořicové. Jelikož jablka obsahují významné množství antioxidantů (převážně fenolických látek), lze předpokládat, že došlo k uvolnění těchto látek z jablek do roztoku.

3.5 Analýza kapalinovou chromatografií

Pomocí kapalinové chromatografie byly analyzovány roztoky před osmo-dehydratací, roztoky po osmo-dehydrataci a extrakty z jablek po osmo-dehydrataci. Ze získaných chromatogramů pak byly odečteny plochy píků, jak pro skořicový aldehyd, tak i pro kyselinu skořicovou. Pomocí kalibračních řad pro obě látky (Obr. 33 a 34) byla vypočtena koncentrace aldehydu a kyseliny ve vzorku a následně vyjádřena jako µg v ml vzorku. Tyto hodnoty byly dále převedeny na miligramy v 1 kg roztoku a pro extrakty z jablek na miligramy v 1 g jablka (Příloha IV).

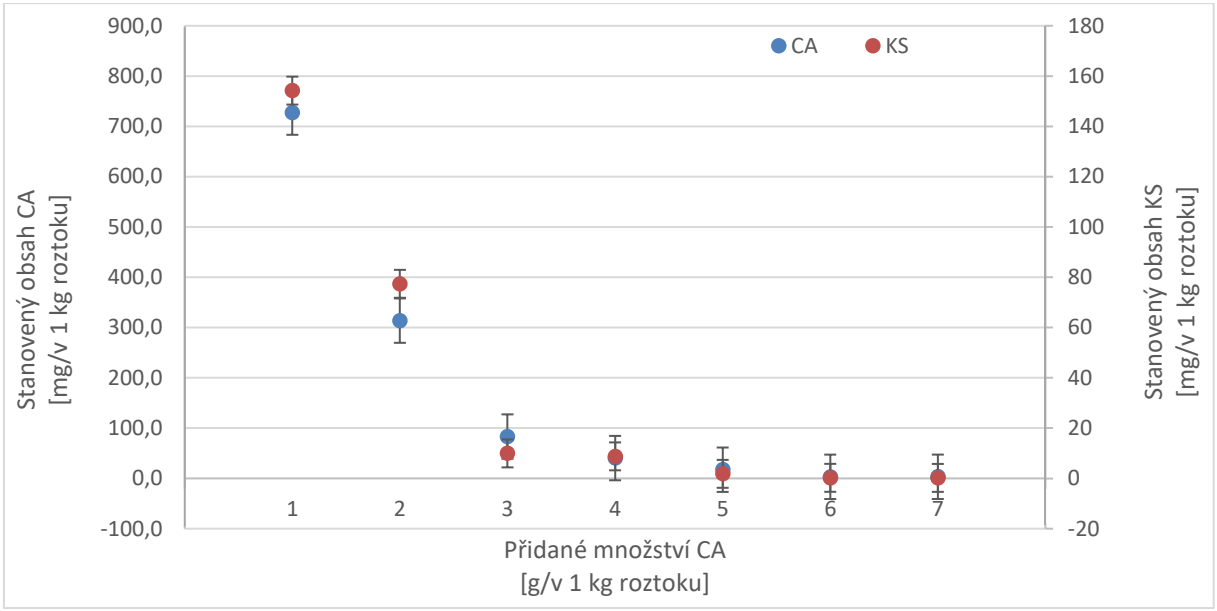


Obrázek 33: Kalibrační řada skořicového aldehydu pro HPCL (CA = skořicový aldehyd)



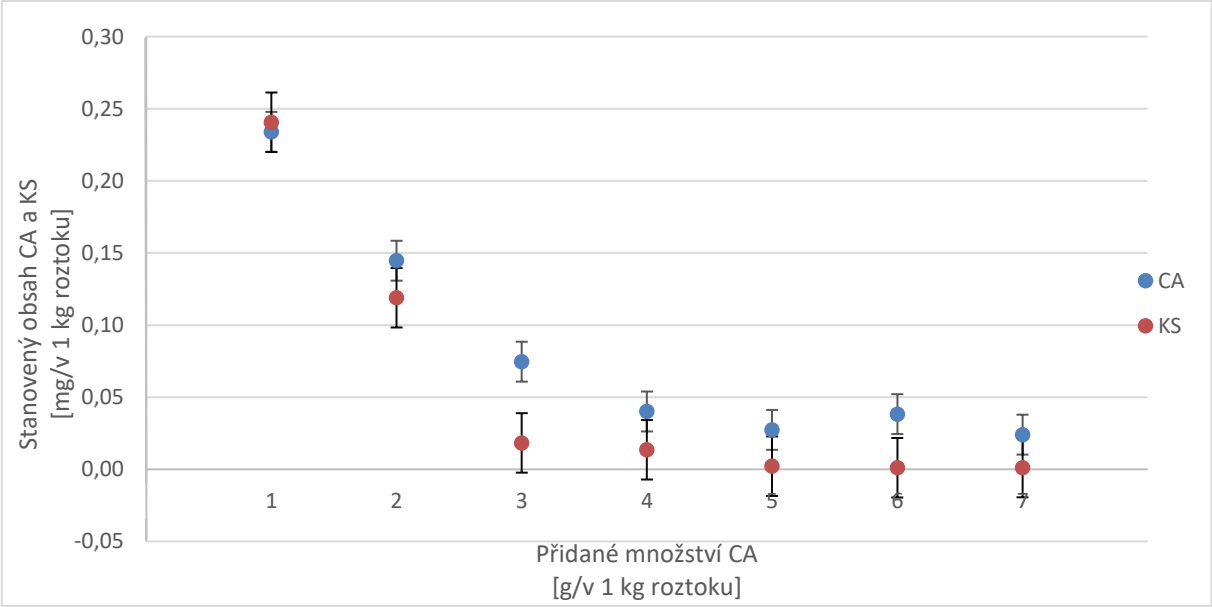
Obrázek 34: Kalibrační řada kyseliny skořicové pro HPLC (KS = kyselina skořicová)

Z výsledků analýzy rozptylu vyplývá, že čas s obsahem skořicového aldehydu a kyseliny skořicové u roztoků po osmo-dehydrataci i u extraktů z jablek po osmo-dehydrataci nesouvisí ($p > 0,05$) (Příloha V). U cukerných roztoků byl potvrzen efekt přídavku skořicového aldehydu v různých koncentracích ($p < 0,001$). Z obrázku 35 lze pozorovat, že přídavek skořicového aldehydu se v roztocích projevil až při koncentraci 0,05 %. U roztoků, které obsahovaly 0–0,005 % přídavku skořicového aldehydu byl jeho stanovený obsah stejný jako obsah stanovený v kontrolních roztocích. V roztocích byl také potvrzen významný obsah kyseliny skořicové, ale pouze ve vzorcích s přídavkem 0,05 % a 0,1 % skořicového aldehydu. U jablek po osmo-dehydrataci byl efekt koncentrace přidaného skořicového aldehydu také potvrzen ($p < 0,001$). Z obrázku 36 lze pozorovat, že k výraznému nárůstu koncentrace skořicového aldehydu došlo až u jablek, která byla naložena v roztocích o koncentraci vyšší než 0,01 %. Lze tedy říct, že jakmile se projevil přídavek skořicového aldehydu u roztoků, tak se také projevil u extraktů z jablek. U jablek po osmo-dehydrataci byl také potvrzen efekt pro vývoj kyseliny skořicové ($p < 0,001$). Ve srovnání s kontrolními roztoky došlo k výraznému nárustu kyseliny skořicové až u jablek, která byla naložena v roztocích s přídavkem 0,05 % a 0,1 % skořicového aldehydu. Tento nárůst mohl být způsoben oxidací skořicového aldehydu na kyselinu skořicovou.



Obrázek 35: Výsledný efekt vlivu přidaného CA na skutečné koncentraci CA a KS u roztoků po osmo-dehydrataci při HPLC analýze (n = 3)

Poznámka k obrázku 35: Na ose x je znázorněno množství přidaného CA:
1 – 1 g CA; 2 – 0,5 g CA; 3 – 0,1 g CA; 4 – 0,05 g CA; 5 – 0,01g CA; 6 – kontrolní roztok (cukr + voda + EtOH); 7 – kontrolní roztok (voda + EtOH). Vertikální úsečky znázorňují 95% konfidenční interval.



Obrázek 36: Výsledný efekt vlivu přidaného CA na skutečné koncentraci CA a KS u extraktů z jablek po osmo-dehydrataci při HPLC analýze (n = 3)

Poznámka k obrázku 36: Na ose x je znázorněno množství přidaného CA:
1 – 1 g CA; 2 – 0,5 g CA; 3 – 0,1 g CA; 4 – 0,05 g CA; 5 – 0,01g CA; 6 – kontrolní roztok (cukr + voda + EtOH); 7 – kontrolní roztok (voda + EtOH). Vertikální úsečky znázorňují 95% konfidenční interval.

3.6 Měření barevnosti

Objektivní nebo subjektivní vyhodnocení barevnosti objektu závisí na zdroji světla, zkoumaném objektu a lidském oku, které vnímané informace dále předává mozku. K objektivnímu popisu barev se využívá kolorimetrie. Mezinárodní komise pro osvětlení (CIE) definovala barevný prostor CIE $L^*a^*b^*$, který vyjadřuje barvu jako tři číselné hodnoty. Parametr L^* definuje měrnou světlost, která určuje, jestli se jedná o barvu tmavou (hodnota 0) nebo světlou (hodnota 100), parametr a^* definuje přechod od zelené k červené barvě (zelená v záporném směru a červená v kladném směru) a parametr b^* definuje přechod od modré ke žluté barvě (modrá v záporném směru a žlutá v kladném směru). K porovnání dvou barev se využívá barvová odchylka ΔE, která lze vypočítat podle rovnice 2:

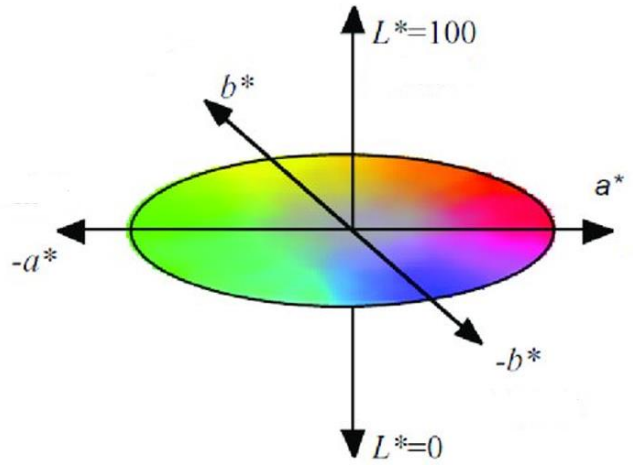
$$\Delta E_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (2)$$

Podle hodnoty, která vyjde z rovnice 2 lze podle tabulky 13 posoudit stupeň neshody dvou barev.

Tabulka 13: Stupnice udávající stupeň neshody dvou barev [112]

ΔE	**Rozdíl**	ΔE	**Rozdíl**
0,0–0,2	nepostřehnutelný		
0,2–0,5	velmi slabý	0,2–1,0	postřehnutelný
0,5–1,5	slabý	1,0–2,0	rozeznatelný
1,5–3,0	jasně postřehnutelný	2,0–4,0	ještě nerušící
3,0–6,0	střední	4,0–8,0	mírně rušící
6,0–12,0	výrazný		
12,0–16,0	velmi výrazný		
Větší než 16,0	rušící		

Ze souřadnic a^* a b^* je možné vypočítat další parametry barev, a to chromu (C^*) a odstín (h^*). Chroma vyjadřuje pestrost barvy a zvětšuje se se vzdáleností od osy L^*, odstín h^* je určený úhlem. Obrázek 37 znázorňuje barevný prostor $L^*a^*b^*$ [113].



Obrázek 37: Zobrazení barevného prostoru $L^*a^*b^*$ [113]

Z výsledků pro měření barevnosti lze říct, že jablka (resp. roztoky) po osmo-dehydrataci, která byla vyndána z cukerných roztoků s přídavkem jakékoliv koncentrace skořicového aldehydu, byla světlejší než jablka, která byla pouze v kontrolních roztocích bez přídavku aldehydu. Tento fakt potvrzují i obrázky, které jsou v příloze VI. K hodnocení rozdílu barev byl použit i výpočet pro barvovou odchylku (Rovnice 2). Byly porovnány mezi sebou výsledky pro jablka, která byla v cukerném roztoku s přídavkem 0,1% skořicového aldehydu po dobu 3 hodin (hodnoty uvedeny v příloze VI – obrázek VI/1) a výsledky pro jablka, která byla v kontrolním roztoku voda a ethanol po dobu 3 hodin (hodnoty uvedeny v příloze VI – obrázek VI/7) (Rovnice 3):

$$\Delta E_{a,b} = \sqrt{(74{,}63 - 70{,}15)^2 + (4{,}69 - 6{,}25)^2 + (37{,}16 - 44{,}34)^2} = 8{,}60 \qquad (3)$$

Podle tabulky 13 je rozdíl mezi oběma barvami výrazný. Z těchto výsledků lze tedy říct, že přídavek skořicového aldehydu má vliv na změnu barvy u jablek a zabraňuje jejich rychlému hnědnutí.

4 ZÁVĚR

Úkolem této diplomové práce bylo stanovení antioxidační kapacity metodou využívající DPPH radikál a obsahu celkových fenolických látek s Folin–Ciocalteuovým činidlem u jablka. Jako extrakční činidlo byl použit 50% acetonitril a extrakce probíhala v ultrazvukové lázní. Měření pak probíhalo spektrofotometricky. Z této analýzy bylo zjištěno, že větší antioxidační vlastnosti vykazuje strouhané jablko.

Dalším úkolem bylo stanovit, jaký vliv má na tyto antioxidační vlastnosti proces osmo-dehydratace, ke kterému byly využity cukerné roztoky s přídavkem různého množství skořicového aldehydu. Z roztoků před osmo-dehydratací bylo zjištěno, že samotný skořicový aldehyd nevykazuje vysoké antioxidační vlastnosti. Osmo-dehydratace jablek probíhala 1 hodinu, 2 hodiny a 3 hodiny. U antioxidační kapacity i celkového obsahu fenolických látek nebyl prokázán významný vliv času. Lze tedy předpokládat, že vliv osmo-dehydratace na jablka více než 3 hodiny by další zlepšení nepřinesl. Co by však stálo za ověření je vliv osmo-dehydratace na jablka kratší než 1 hodinu. Dále bylo zjištěno, že vyšší antioxidační kapacitu i celkový obsah fenolických látek vykazovaly až cukerné roztoky s přídavkem 0,05 % a 0,1 % skořicového aldehydu a jablka po osmo-dehydrataci, která byla naložena v roztocích s přídavkem 0,05 % a 0,1 % skořicového aldehydu. Vysoké hodnoty vykazoval i kontrolní roztok a jablka v něm, který obsahoval pouze vodu. Tyto výsledky však nijak nesouvisí s obsahem skořicového aldehydu.

V další části této práce byla provedena analýza kapalinovou chromatografií všech roztoků před i po procesu osmo-dehydratace a extraktů z jablek po procesu osmo-dehydratace, kde bylo sledováno množství skořicového aldehydu, které se dostalo do jablek z roztoků a jeho množství, které zůstalo v roztocích. Bylo však zjištěno, že část skořicového aldehydu se oxiduje na kyselinu skořicovou, a proto bylo sledováno i množství této látky. Z analýz bylo zjištěno, že vliv času na množství skořicového aldehydu v roztocích a jablkách nebyl prokázán. Přídavek skořicového aldehydu se projevil až v roztoku s přídavkem 0,05 % skořicového aldehydu. Roztoky s přídavkem 0,001 % a 0,005 % skořicového aldehydu obsahovaly stejné množství jako kontrolní roztoky bez aldehydu. V roztocích s přídavkem 0,05 % a 0,1 % skořicového aldehydu i extraktech z jablek byl potvrzen významný obsah kyseliny skořicové. Vyšší množství skořicového aldehydu pak vykazovala jablka, která byla v roztocích o koncentraci vyšší než 0,01 %.

V diplomové práci byl dále zkoumán vliv cukerných roztoků s přídavkem skořicového aldehydu na senzorické vlastnosti jablek. Chuťově byla jablka po procesu osmo-dehydratace velmi dobrá. Jablka, která byla v roztocích se skořicovým aldehydem byla výrazně světlejší než jablka, která byla pouze v kontrolních roztocích. To samé bylo pozorováno i u roztoků.

POUŽITÁ LITERATURA

[1] PHANIENDRA, Alugoju, Dinesh Babu JESTADI a Latha PERIYASAMY. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2015, **30**(1), 11–26. DOI:10.1007/s12291-014-0446-0.

[2] SANTO, Arben, Hong ZHU a Y. Robert LI. Free Radicals: From Health to Disease. *Reactive Oxygen Species*, 2016, **2**(4), 245–263. DOI:10.20455/ros.2016.847.

[3] ZHANG, Jixiang, Xiaoli WANG, Vikash VIKASH, Qing YE, Dandan WU, Yulan LIU a Weiguo DONG. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, **2016**, 4350965. DOI:10.1155/2016/4350965.

[4] SCHIEBER, Michael a Navdeep S. CHANDEL. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology*, 2014, **24**(10), 453–462. DOI:10.1016/j.cub.2014.03.034.

[5] WANG, Ling, Zheng KUANG, Duo ZHANG, Yifan GAO, Mingzhen YING a Tengjiao WANG. Reactive oxygen species in immune cells: A new antitumor target. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, **133,** 110978. DOI:10.1016/j.biopha.2020.110978.

[6] DEL RÍO, Luis A. ROS and RNS in plant physiology: an overview. *Journal of Experimental Botany*, 2015, **66**(10), 2827–2837. DOI:10.1093/jxb/erv099.

[7] YAN, Fanyong, Yueyan ZANG, Jingru SUN, Zhonghui SUN a Hao ZHANG. Sensing mechanism of reactive oxygen species optical detection. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2020, **131,** 116009. DOI:10.1016/j.trac.2020.116009.

[8] AFONSO, Valéry, Romuald CHAMPY, Dragoslav MITROVIC, Pascal COLLIN a Abderrahim LOMRI. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, 2007, **74**(4), 324–329. DOI:10.1016/j.jbspin.2007.02.002.

[9] HRYCAY, Eugene G. a Stelvio M. BANDIERA. Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. *Advances in Pharmacology*, 2015, **74**, 35–84. DOI:10.1016/bs.apha.2015.03.003.

[10] BRUCKDORFER, Richard. The basics about nitric oxide. *Molecular Aspects of Medicine*, 2005, **26**(1–2), 3–31. DOI:10.1016/j.mam.2004.09.002.

[11] LI, Sen, Guowei CHEN, Chao ZHANG, Man WU, Shuyan WU a Qing LIU. Research progress of natural antioxidants in foods for the treatment of diseases. *Food Science and Human Wellness*, 2014, **3**(3–4), 110–116. DOI:10.1016/j.fshw.2014.11.002.

[12] LOBO, V, A PATIL, A PHATAK a N CHANDRA. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 2010, **4**(8), 118–126. DOI:10.4103/0973-7847.70902.

[13] CAROCHO, Márcio a Isabel C.F.R. FERREIRA. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, **51**, 15–25. DOI:10.1016/j.fct.2012.09.021.

[14] ATTA, Emad M, Nawal H. MOHAMED a Ahmed A. M. ABDELGAWAD. ANTIOXIDANTS: AN OVERVIEW ON THE NATURAL AND SYNTHETIC TYPES. *European Chemical Bulletin*, 2017, **6**(8), 365–375. DOI:10.17628/ecb.2017.6.365-375.

[15] YADAV, Anuj, Rewa KUMARI, Ashwani YADAV, J.P. MISHRA, Seweta SRIVATVA a Shashi PRABHA. Antioxidants and its functions in human body - A Review. *Research in Environment and Life Sciences*, 2016, **9**(11), 1328–1331.

[16] ZHOU, H.B., X.Y. HUANG, Z. BI, Y.H. HU, F.Q. WANG, X.X. WANG, Y.Z. WANG a Z.Q. LU. Vitamin A with L-ascorbic acid sodium salt improves the growth performance, immune function and antioxidant capacity of weaned pigs. *Animal*, 2021, **15**(2), 100133. DOI:10.1016/j.animal.2020.100133.

[17] SHOJADOOST, Bahram, Alexander YITBAREK, Mohammadali ALIZADEH, Raveendra KULKARNI, Jake ASTILL, Nitish BOODHOO a Shayan SHARIF. Centennial Review: Effects of vitamins A, D, E and C on the chicken immune systém. *Poultry Science*, 2021, **100**(4), 100930. DOI:10.1016/j.psj.2020.12.027.

[18] VIDAILHET, Michel, Daniel RIEU, Francois FEILLET et al. Vitamin A in pediatrics: An update from the Nutrition Committee of the French Society of Pediatrics. *Archives de Pédiatrie*, 2017, **24**(3), 288–297. DOI:10.1016/j.arcped.2016.11.021.

[19] TOZER, Sarah, Cian O'MAHONY, Jen HANNAH, John O'BRIEN, Seamus KELLY, Kirstin KOSEMUND-MEYNEN a Camilla ALEXANDER-WHITE. Aggregate exposure modelling of vitamin A from cosmetic products, diet and food supplements. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, **131,** 110549. DOI:10.1016/j.fct.2019.05.057.

[20] DEVAKI, Sudha J. a Reshma Lali RAVEENDRAN. Vitamin C: Sources, Functions, Sensing and Analysis. V knize: HAMZA, Amal H., ed. *Vitamin C*. InTech, 2017. ISBN 978-953-51-3421-3. DOI:10.5772/intechopen.70162.

[21] PEHLIVAN, Fadime Eryılmaz. Vitamin C: An Antioxidant Agent. V knize: HAMZA, Amal H., ed. *Vitamin C*. InTech, 2017. ISBN 978-953-51-3421-3. DOI:10.5772/intechopen.69660.

[22] HLÚBIK, Pavol a Libuše OPLTOVÁ. *Vitaminy*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0373-4.

[23] BELLÉS, Marc, María DEL MAR CAMPO, Pedro RONCALÉS a José Antonio BELTRÁN. Supranutritional doses of vitamin E to improve lamb meat quality. *Meat Science*, 2019, **149**, 14–23. DOI:10.1016/j.meatsci.2018.11.002.

[24] GALLI, Francesco, Angelo AZZI, Marc BIRRINGER et al. Vitamin E: Emerging aspects and new directions. *Free Radical Biology and Medicine*, 2017, **102**, 16–36. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.017.

[25] MIYAZAWA, Taiki, Gregor C. BURDEOS, Mayuko ITAYA, Kiyotaka NAKAGAWA a Teruo MIYAZAWA. Vitamin E: Regulatory Redox Interactions. *IUBMB Life*, 2019, **71**(4), 430–441. DOI:10.1002/iub.2008.

[26] RODRIGUEZ-CONCEPCION, Manuel, Javier AVALOS, M. Luisa BONET et al. A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Progress in Lipid Research*, 2018, **70**, 62–93. DOI:10.1016/j.plipres.2018.04.004.

[27] RIBEIRO, Daniela, Marisa FREITAS, Artur M.S. SILVA, Félix CARVALHO a Eduarda FERNANDES. Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, **120**, 681–699. DOI:10.1016/j.fct.2018.07.060.

[28] MAOKA, Takashi. Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*, 2020, **74**, 1–16. DOI:10.1007/s11418-019-01364-x.

[29] EGGERSDORFER, Manfred a Adrian WYSS. Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2018, **652**, 18–26. DOI:10.1016/j.abb.2018.06.001.

[30] STAHL, Wilhelm a Helmut SIES. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 2003, **24**(6), 345–351. DOI:10.1016/S0098-2997(03)00030-X.

[31] GUL, Khalid, Afshan TAK, A. K. SINGH, Preeti SINGH, Basharat YOUSUF a Ali Abas WANI. Chemistry, encapsulation, and health benefits of β-carotene - A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2015, **1**(1), 1018696. DOI:10.1080/23311932.2015.1018696.

[32] ONO, Misaki, Mikako TAKESHIMA a Shuji NAKANO. Mechanism of the Anticancer Effect of Lycopene (Tetraterpenoids). Mechanism of the Anticancer Effect of Phytochemicals. *The Enzymes*, 2015, **37**, 139–166. DOI:10.1016/bs.enz.2015.06.002.

[33] POOJARY, Mahesha M. a Paolo PASSAMONTI. Extraction of lycopene from tomato processing waste: Kinetics and modelling. *Food Chemistry*, 2015, **173**, 943–950. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.10.127.

[34] MOZOS, Ioana, Dana STOIAN, Alexandru CARABA, Clemens MALAINER, Jarosław O. HORBAńCZUK a Atanas G. ATANASOV. Lycopene and Vascular Health. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, **9,** 521. DOI:10.3389/fphar.2018.00521.

[35] NWACHUKWU, Ifeanyi D., Chibuike C. UDENIGWE a Rotimi E. ALUKO. Lutein and zeaxanthin: Production technology, bioavailability, mechanisms of action, visual function, and health claim status. *Trends in Food Science & Technology*, 2016, **49**, 74–84. DOI:10.1016/j.tifs.2015.12.005.

[36] OCHOA BECERRA, Mario, Luis MOJICA CONTRERAS, Ming HSIEH LO, Juan MATEOS DÍAZ a Gustavo CASTILLO HERRERA. Lutein as a functional food ingredient: Stability and bioavailability. *Journal of Functional Foods*, 2020, **66,** 103771. DOI:10.1016/j.jff.2019.103771.

[37] LIN, Jian-Hao, Duu-Jong LEE a Jo-Shu CHANG. Lutein production from biomass: Marigold flowers versus microalgae. *Bioresource Technology*, 2015, **184**, 421–428. DOI:10.1016/j.biortech.2014.09.099.

[38] TRESSERRA-RIMBAU, Anna, Rosa M. LAMUELA-RAVENTOS a Juan J. MORENO. Polyphenols, food and pharma. Current knowledge and directions for future research. *Biochemical Pharmacology*, 2018, **156**, 186–195. DOI:10.1016/j.bcp.2018.07.050.

[39] KUMAR, Naresh a Nidhi GOEL. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, 2019, **24,** e00370. DOI:10.1016/j.btre.2019.e00370.

[40] HELENO, Sandrina A., Anabela MARTINS, Maria João R.P. QUEIROZ a Isabel C.F.R. FERREIRA. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: a review. *Food Chemistry*, 2015, **173**, 501–513. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.10.057.

[41] LEE, Jin-Ho a Volker F. WENDISCH. Biotechnological production of aromatic compounds of the extended shikimate pathway from renewable biomass. *Journal of Biotechnology*, 2017, **257**, 211–221. DOI:10.1016/j.jbiotec.2016.11.016.

[42] SEVGI, Kemal, Bektas TEPE a Cengiz SARIKURKCU. Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 2015, **77**, 12–21. DOI:10.1016/j.fct.2014.12.006.

[43] PANCHE, Archana., Arvind D. DIWAN a Sadanandvalli R. CHANDRA. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 2016, **5,** e47. DOI:10.1017/jns.2016.41.

[44] WANG, Tian-yang, Qing LI a Kai-shun BI. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, **13**(1), 12–23. DOI:10.1016/j.ajps.2017.08.004.

[45] MALEKI, Soheila J., Jesus F. CRESPO a Beatriz CABANILLAS. Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 2019, **299,** 125124. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.125124.

[46] KISELEV, Konstantin V., Valeria P. GRIGORCHUK, Zlata V. OGNEVA, Andrey R. SUPRUN a Alexandra S. DUBROVINA. Stilbene biosynthesis in the needles of spruce Picea jezoensis. *Phytochemistry*, 2016, **131**, 57–67. DOI:10.1016/j.phytochem.2016.08.011.

[47] CARTER, Lindsay G, John A D'ORAZIO a Kevin J PEARSON. Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. *Endocrine-Related Cancer*, 2014, **21**(3), 209–225. DOI:10.1530/ERC-13-0171.

[48] CATALGOL, Betul, Saime BATIREL, Yavuz TAGA a Nesrin Kartal OZER. Resveratrol: French Paradox Revisited. *Frontiers in Pharmacology*, 2012, **3,** 141. DOI:10.3389/fphar.2012.00141.

[49] ZÁLEŠÁK, František, David Jean-Yves Denis BON a Jiří POSPÍŠIL. Lignans and Neolignans: Plant secondary metabolites as a reservoir of biologically active substances. *Pharmacological Research*, 2019, **146,** 104284. DOI:10.1016/j.phrs.2019.104284.

[50] KIYAMA, Ryoiti. Biological effects induced by estrogenic activity of lignans. *Trends in Food Science & Technology*, 2016, **54**, 186–196. DOI:10.1016/j.tifs.2016.06.007.

[51] EMBUSCADO, Milda E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. *Journal of Functional Foods*, 2015, **18**, 811–819. DOI:10.1016/j.jff.2015.03.005.

[52] WILLIAMS, Gary M., Michael J. IATROPOULOS a John WHYSNER. Safety Assessment of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene as Antioxidant Food Additives. *Food and Chemical Toxicology*, 1999, **37**(9–10), 1027–1038. DOI:10.1016/S0278-6915(99)00085-X.

[53] WANG, Wei a Kurunthachalam KANNAN. Quantitative identification of and exposure to synthetic phenolic antioxidants, including butylated hydroxytoluene, in urine. *Environment International*, 2019, **128**, 24–29. DOI:10.1016/j.envint.2019.04.028.

[54] YATOO, Mohd Iqbal, Archana SAXENA, Padinjare Melepad DEEPA, Biju Peer HABEAB, Sarita DEVI, Ranbir Singh JATAV a Umesh DIMRI. Role of trace elements in animals: a review. *Veterinary World*, 2013, **6**(12), 963–967. DOI:10.14202/vetworld.2013.963-967.

[55] KING, Janet C, Kenneth H BROWN, Rosalind S GIBSON, Nancy F KREBS, Nicola M LOWE, Jonathan H SIEKMANN a Daniel J RAITEN. Biomarkers of Nutrition for Development (BOND)—Zinc Review. *The Journal of Nutrition*, 2016, **146**(4), 858–885. DOI:10.3945/jn.115.220079.

[56] ROOHANI, Nazanin, Richard HURRELL, Roya KELISHADI a Rainer SCHULIN. Zinc and its importance for human health: An integrative review. *Journal of Research in Medical Sciences*, 2013, **182**, 144–157.

[57] KIELISZEK, Marek a Stanisław BłAżEJAK. Selenium: Significance, and outlook for supplementation. *Nutrition*, 2013, **29**(5), 713–718. DOI:10.1016/j.nut.2012.11.012.

[58] PIECZYńSKA, Joanna a Halina GRAJETA. The role of selenium in human conception and pregnancy. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2015, **29**, 31–38. DOI:10.1016/j.jtemb.2014.07.003.

[59] SANTHOSH KUMAR, B. a K.I. PRIYADARSINI. Selenium nutrition: How important is it?. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 2014, **4**(2), 333–341. DOI:10.1016/j.bionut.2014.01.006.

[60] HUSTER, Dominik. Wilson disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2010, **24**(5), 531–539. DOI:10.1016/j.bpg.2010.07.014.

[61] BOST, Muriel, Sabine HOUDART, Marion OBERLI, Esther KALONJI, Jean-François HUNEAU a Irène MARGARITIS. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2016, **35**, 107–115. DOI:10.1016/j.jtemb.2016.02.006.

[62] TUSCHL, Karin, Philippa B. MILLS a Peter T. CLAYTON. Manganese and the Brain. I*nternational Review of Neurobiology*, 2013, **110**, 277–312. DOI:10.1016/B978-0-12-410502-7.00013-2.

[63] SHAHIDI, Fereidoon a Ying ZHONG. Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 2015, **18**, 757–781. DOI:10.1016/j.jff.2015.01.047.

[64] GÜLçIN, İlhami. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 2012, **86**(3), 345–391. DOI:10.1007/s00204-011-0774-2.

[65] GÜLçIN, İlhami. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, 2020, **94**(3), 651–715. DOI:10.1007/s00204-020-02689-3.

[66] PULIDO, R., M. HERNÁNDEZ-GARCÍA a F. SAURA-CALIXTO. Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2003, **57**, 1275–1282. DOI:10.1038/sj.ejcn.1601685.

[67] MILLER, Nicholas J., Catherine RICE-EVANS, Michael J. DAVIES, Vimala GOPINATHAN a Anthony MILNER. A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clinical Science*, 1993, **84**(4), 407–412. DOI:10.1042/cs0840407.

[68] ALFA, Hajara H. a Randolph R. J. ARROO. Over 3 decades of research on dietary flavonoid antioxidants and cancer prevention: What have we achieved?. *Phytochemistry Reviews*, 2019, **18**(4), 989–1004. DOI:10.1007/s11101-019-09632-0.

[69] SINGLETON, Vernon L., Rudolf ORTHOFER a Rosa M. LAMUELA-RAVENTÓS. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Oxidants and Antioxidants Part A. *Methods in Enzymology*, 1999, **299**, 152–178. DOI:10.1016/S0076-6879(99)99017-1.

[70] OROIAN, Mircea a Isabel ESCRICHE. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 2015, **74**, 10–36. DOI:10.1016/j.foodres.2015.04.018.

[71] HANSEN, Frederik A. a Stig PEDERSEN-BJERGAARD. Emerging Extraction Strategies in Analytical Chemistry. *Analytical Chemistry*, 2019, **92**(1), 2–15. ISSN 0003-2700. DOI:10.1021/acs.analchem.9b04677.

[72] FENG, Weisheng, Meng LI, Zhiyou HAO a Jingke ZHANG. Analytical Methods of Isolation and Identification. RAO, Venketeshwer, Dennis MANS a Leticia RAO, ed. *Phytochemicals in Human Health*. IntechOpen, 2020. ISBN 978-1-78985-587-6. DOI:10.5772/intechopen.88122.

[73] AZMIR, Jannatul, Islam S.M. ZAIDUL, Mohd M. RAHMAN et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food* Engineering, 2013, **117**(4), 426–436. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014.

[74] LUQUE DE CASTRO, Mária D. a Feliciano PRIEGO-CAPOTE. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 2010, **1217**(16), 2383–2389. DOI:10.1016/j.chroma.2009.11.027.

[75] ABHARI, Khadijeh a Amin MOUSAVI KHANEGHAH. Alternative extraction techniques to obtain, isolate and purify proteins and bioactive from aquaculture and by-products. *Aquaculture and By-Products: Challenges and Opportunities in the Use of Alternative Protein Sources and Bioactive Compounds*, 2020, **92**, 35–52. DOI:10.1016/bs.afnr.2019.12.004.

[76] Superkritická tekutina. *Ústav chemických procesů AV ČR, v. v. i.* Dostupné z: http://intranet.icpf.cas.cz/cs/superkriticka-tekutina

[77] Poustka, Jan. *Extrakce vzorku kapalinou: Izolační a separační metody*, VŠChT Praha, 2018. Dostupné z: https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20PIGA%20Cz-11%20Extrakce%20vzorku%20kapalinou%20(LLE_LSE_PLE_MASE_SFE)_VH2018.pdf

[78] VINATORU, Mircea, Timothy J. MASON a Ioan CALINESCU. Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2017, **97**, 159–178. DOI:10.1016/j.trac.2017.09.002.

[79] ZHANG, Qing-Wen, Li-Gen LIN a Wen-Cai YE. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*, 2018, **13**, 20. DOI:10.1186/s13020-018-0177-x.

[80] ESCLAPEZ, M. D., J. V. GARCÍA-PÉREZ, A. MULET a J. A. CÁRCEL. Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. *Food Engineering Reviews*, 2011, **3**, 108–120. DOI:10.1007/s12393-011-9036-6.

[81] WEN, Chaoting, Jixian ZHANG, Haihui ZHANG, Courage Sedem DZAH, Manyakara ZANDILE, Yuqing DUAN, Haile MA a Xiaoping LUO. Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2018, **48**, 538–549. DOI:10.1016/j.ultsonch.2018.07.018.

[82] PICÓ, Yolanda. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2013, **43**, 84–99. DOI:10.1016/j.trac.2012.12.005.

[83] CHEMAT, Farid, ZILL-E-HUMA a Muhammed Kamran KHAN. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2011, **18**(4), 813–835. DOI:10.1016/j.ultsonch.2010.11.023.

[84] RICHTER, Bruce E. Extraction of hydrocarbon contamination from soils using accelerated solvent extraction. *Journal of Chromatography A*, 2000, **874**(2), 217–224. DOI:10.1016/S0021-9673(00)00073-X.

[85] VAZQUEZ-ROIG, Pablo a Yolanda PICÓ. Pressurized liquid extraction of organic contaminants in environmental and food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2015, **71**, 55–64. DOI:10.1016/j.trac.2015.04.014.

[86] YU, Xue-mei, Ping ZHU, Qiu-ping ZHONG, Meng-ying LI a Han-ruo MA. Subcritical water extraction of antioxidant phenolic compounds from XiLan olive fruit dreg. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, **52**(8), 5012–5020. DOI:10.1007/s13197-014-1551-z.

[87] PLAZA, Merichel, Miryam AMIGO-BENAVENT, María D. DEL CASTILLO, Elena IBÁñEZ a Miguel HERRERO. Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. *Food Research International*, 2010, **43**(10), 2341–2348. DOI.:10.1016/j.foodres.2010.07.036.

[88] XIU-QIN, Li, Ji CHAO, Sun YAN-YAN, Yang MIN-LI a Chu XIAO-GANG. Analysis of synthetic antioxidants and preservatives in edible vegetable oil by HPLC/TOF-MS. *Food Chemistry*, 2009, **113**(2), 692–700. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.07.072.

[89] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.

[90] HOLLÁ, Marcela. *Metodika pro kvalitativní hodnocení ovoce a zpracovatelských produktů z hlediska obsahu látek prospěšných pro zdraví člověka*. Hradec Králové: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2019. ISBN 978-80-906644-4-9.

[91] RAUDONE, Lina, Raimondas RAUDONIS, Mindaugas LIAUDANSKAS, Valdimaras JANULIS a Pranas VISKELIS. Phenolic antioxidant profiles in the whole fruit, flesh and peel of apple cultivars grown in Lithuania. *Scientia Horticulturae*, 2017, **216**, 186–192. DOI:10.1016/j.scienta.2017.01.005.

[92] BOYER, Jeanelle a Rui Hai LIU. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal* [online]. 2004, **3**, 5. DOI:10.1186/1475-2891-3-5.

[93] VONDRÁKOVÁ, Zuzana, Jiří MALBECK, Alena TRÁVNÍČKOVÁ, Radek ČERNÝ a Milena CVIKROVÁ. Phenolic acids in selected scab-resistant and mildew-tolerant apple cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2020, **42**, 43. DOI:10.1007/s11738-020-3031-6.

[94] BAI, Lu, Sen GUO, Qingchao LIU et al. Characterization of nine polyphenols in fruits of Malus pumila Mill by high-performance liquid chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2016, **24**(2), 293–298. DOI:10.1016/j.jfda.2015.10.002.

[95] ALARCÓN FLORES, María Isabel, Roberto ROMERO-GONZÁLEZ, Antonia GARRIDO FRENICH a José Luis MARTÍNEZ VIDAL. Analysis of phenolic compounds in olive oil by solid-phase extraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 2012, **134**(4), 2465–2472. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.04.058.

[96] DVOŘÁKOVÁ, Markéta, Pavel DOSTÁLEK a Petr HULÍN. Analytical Methods for Determination of Polyphenols in Sweet Wort, Wort and Beer. *Kvasný Průmysl*, 2006, **52**(4), 111–114. DOI:10.18832/kp2006010.

[97] LU, Yinrong a L.Yeap FOO. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. *Food Chemistry*, 1997, **59**(2), 187–194. DOI:10.1016/S0308-8146(96)00287-7.

[98] ALONSO-SALCES, Rosa M., Karine NDJOKO, Emerson F. QUEIROZ, Jean R. IOSET, Kurt HOSTETTMANN, Luis A. BERRUETA, Blanca GALLO a Francisca VICENTE. On-line characterisation of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A*, 2004, **1046**(1–2), 89–100. DOI:10.1016/j.chroma.2004.06.077.

[99] D´ABROSCA, Brigida, Severina PACIFICO, Giuseppe CEFARELLI, Claudio MASTELLONE a Antonio FIORENTINO. 'Limoncella' apple, an Italian apple cultivar: Phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 2007, **104**(4), 1333–1337. DOI:10.1016/j.foodchem.2007.01.073.

[100] YADAV, Ashok Kumar a Satya Vir SINGH. Osmotic dehydration of fruits and vegetables: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 2014, **51**(9), 1654–1673. DOI:10.1007/s13197-012-0659-2.

[101] KROKIDA, Magdalini K. a Dimitrios MARINOS-KOURIS. Rehydration kinetics of dehydrated products. *Journal of Food Engineering*, 2003, **57**(1), 1–7. DOI:10.1016/S0260-8774(02)00214-5.

[102] MITRA, Jayeeta, S. L. SHRIVASTAVA a P. S. RAO. Onion dehydration: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 2012, **49**(3), 267–277. DOI:10.1007/s13197-011-0369-1.

[103] BELESSIOTIS, V. a E. DELYANNIS. Solar drying. *Solar Energy*, 2011, **85**(8), 1665–1691. DOI:10.1016/j.solener.2009.10.001.

[104] AHMED, Ishfaq, Ihsan Mabood QAZI a Suraiya JAMAL. Developments in osmotic dehydration technique for the preservation of fruits and vegetables. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2016, **34**, 29–43. DOI:10.1016/j.ifset.2016.01.003.

[105] GONZÁLEZ-PÉREZ, Julio E., Nelly RAMÍREZ-CORONA a Aurelio LÓPEZ-MALO. Mass Transfer During Osmotic Dehydration of Fruits and Vegetables: Process Factors and Non-Thermal Methods. *Food Engineering Reviews*, 2021, **13**(2), 344–374. DOI:10.1007/s12393-020-09276-3.

[106] RAMYA, V. a N. K. JAIN. A Review on Osmotic Dehydration of Fruits and Vegetables: An Integrated Approach. *Journal of Food Process Engineering*, 2017, **40**(3), e12440. DOI:10.1111/jfpe.12440.

[107] MAVROUDIS, Nikolaos E, Petr DEJMEK a Ingegerd SJÖHOLM. Osmotic-treatment-induced cell death and osmotic processing kinetics of apples with characterised raw material properties. *Journal of Food Engineering*, 2004, **63**(1), 47–56. DOI:10.1016/S0260-8774(03)00281-4.

[108] ALFARO, Luis, Sirirak SIRAMARD, Alexander CHOULJENKO a Subramaniam SATHIVEL. Effects of liquid nitrogen pretreatment on the osmotic dehydration and quality of cryogenically frozen blueberries (Vaccinium angustifolium Ait.). *Food Bioscience*, 2018, **22**, 165–169. DOI:10.1016/j.fbio.2018.02.006.

[109] LAZARIDES, H. N. *Osmotic pre-concentration: Developments and prospects: Minimal processing of foods and process optimization: An interface*, London, UK, 1994.

[110] *Zahradnictví Flos: Jabloň zimní 'Jonagold'*, Praha. Dostupné z: https://www.zahradnictvi-flos.cz/malus-domestica-jonagold-jablon-zimni-jonagold.html.

[111] *Kalorické tabulky*. Dostupné z: https://www.kaloricketabulky.cz/potraviny/jablko.

[112] ZMEŠKAL, Oldřich, Michal ČEPPAN a Petr DZIK. *Barevné prostory a správa barev*. Brno, 2002. Dostupné z: https://docplayer.cz/16462229-Barevne-prostory-a-sprava-barev.html.

[113] PANÁK, Ondrej. *Měření barevnosti*. Univerzita Pardubice. Dostupné z: https://www.upce.cz/sites/default/binary_www_old/fcht/kpf/studenti-kpf/merenibarevnosti.pdf.

PŘÍLOHY

Příloha I: Antioxidační kapacita roztoků a extraktů z jablek

Tabulka I/1: Antioxidační kapacita roztoků před osmo-dehydratací (*n* = 3)

roztok	inhibice [%]	koncentrace [µg/ml]	v 1 kg roztoku [mg]
0,1% CA	12,29	11,10	9,036
0,05% CA	11,65	10,36	8,435
0,01% CA	9,38	7,75	6,307
0,005% CA	7,89	6,03	4,908
0,001% CA	6,67	4,63	3,772
voda + EtOH	0,71	-	-
cukr + EtOH	7,38	5,45	4,437

Tabulka I/2: Antioxidační kapacita roztoků po osmo-dehydrataci po 1 hodině (*n* = 3)

roztok	inhibice [%]	koncentrace [µg/ml]	v 1 kg roztoku [mg]
0,1% CA	84,74	94,53	76,951
0,05% CA	88,25	98,57	80,238
0,01% CA	68,34	75,65	61,576
0,005% CA	73,37	81,44	66,291
0,001% CA	90,42	101,07	82,274
voda + EtOH	79,47	88,46	88,194
cukr + EtOH	71,20	78,93	64,252

Tabulka I/3: Antioxidační kapacita roztoků po osmo-dehydrataci po 2 hodinách (*n* = 3)

roztok	inhibice [%]	koncentrace [µg/ml]	v 1 kg roztoku [mg]
0,1% CA	89,55	100,07	81,455
0,05% CA	89,32	99,81	81,244
0,01% CA	70,91	78,60	63,981
0,005% CA	76,08	84,55	68,827
0,001% CA	89,54	100,06	81,451
voda + EtOH	70,84	78,52	78,287
cukr + EtOH	80,70	89,88	73,161

Tabulka I/4: Antioxidační kapacita roztoků po osmo-dehydrataci po 3 hodinách (*n* = 3)

roztok	inhibice [%]	koncentrace [µg/ml]	v 1 kg roztoku [mg]
0,1% CA	84,50	94,25	76,720
0,05% CA	86,40	96,44	78,505
0,01% CA	73,31	81,37	66,236
0,005% CA	89,18	99,64	81,108
0,001% CA	90,79	101,50	82,619
voda + EtOH	85,96	95,94	95,649
cukr + EtOH	81,07	90,31	73,512

Tabulka I/5: Antioxidační vlastnosti extraktů z jablek po osmo-dehydrataci po 1 hodině (*n* = 3)

roztok	inhibice [%]	koncentrace [µg/ml]	v 1 g jablka [mg]
0,1% CA	85,06	94,90	0,949
0,05% CA	74,72	82,99	0,830
0,01% CA	49,94	54,46	0,545
0,005% CA	38,99	41,84	0,418
0,001% CA	63,75	70,36	0,704
voda + EtOH	90,77	101,48	1,015
cukr + EtOH	84,50	94,26	0,943

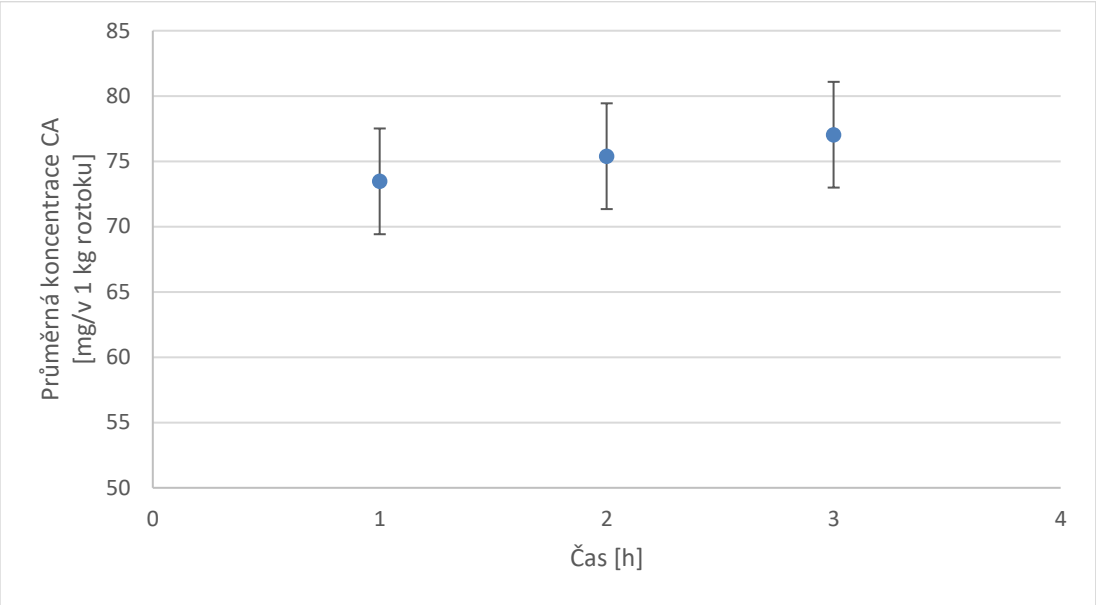
Tabulka I/6: Antioxidační vlastnosti extraktů z jablek po osmo-dehydrataci po 2 hodinách (*n* = 3)

roztok	inhibice [%]	koncentrace [µg/ml]	v 1 g jablka [mg]
0,1% CA	89,56	100,08	1,001
0,05% CA	63,01	69,51	0,695
0,01% CA	32,37	34,23	0,342
0,005% CA	45,49	49,33	0,493
0,001% CA	66,31	73,31	0,733
voda + EtOH	65,79	72,71	0,727
cukr + EtOH	55,54	60,91	0,609

Tabulka I/7: Antioxidační vlastnosti extraktů z jablek po osmo-dehydrataci po 3 hodinách (*n* = 3)

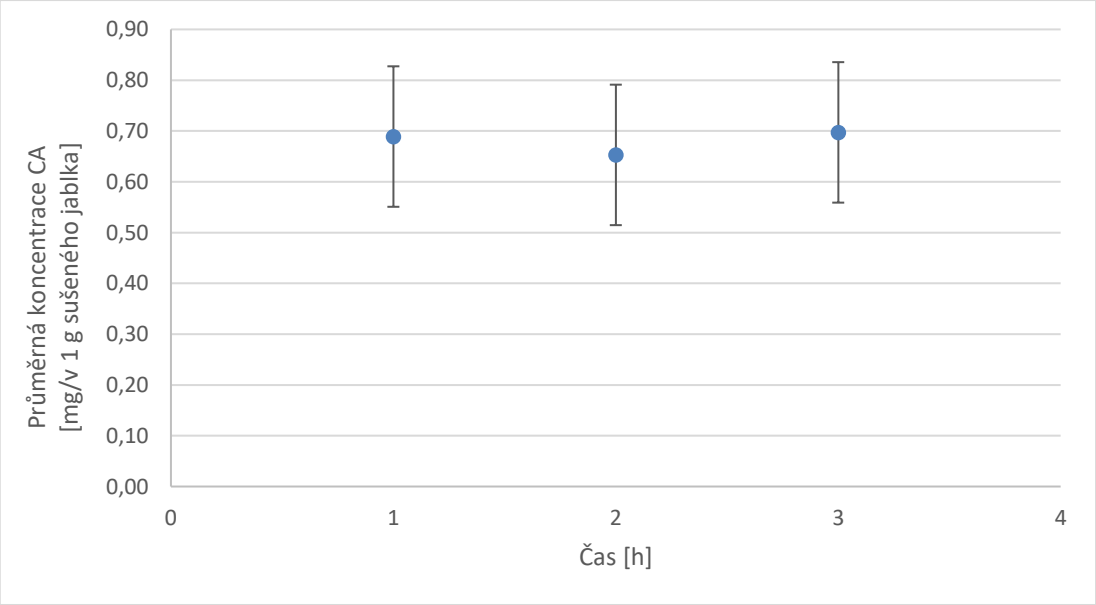
roztok	inhibice [%]	koncentrace [µg/ml]	v 1 g jablka [mg]
0,1% CA	65,66	72,55	0,726
0,05% CA	77,74	86,47	0,865
0,01% CA	39,69	42,66	0,427
0,005% CA	40,48	43,56	0,436
0,001% CA	92,44	103,39	1,034
voda + EtOH	91,46	102,27	1,023
cukr + EtOH	48,48	52,78	0,528

Příloha II: Výsledný efekt času osmo-dehydratace na obsah CA v roztocích a extraktech jablek po osmo-dehydrataci pro DPPH metodu a TPC metodu



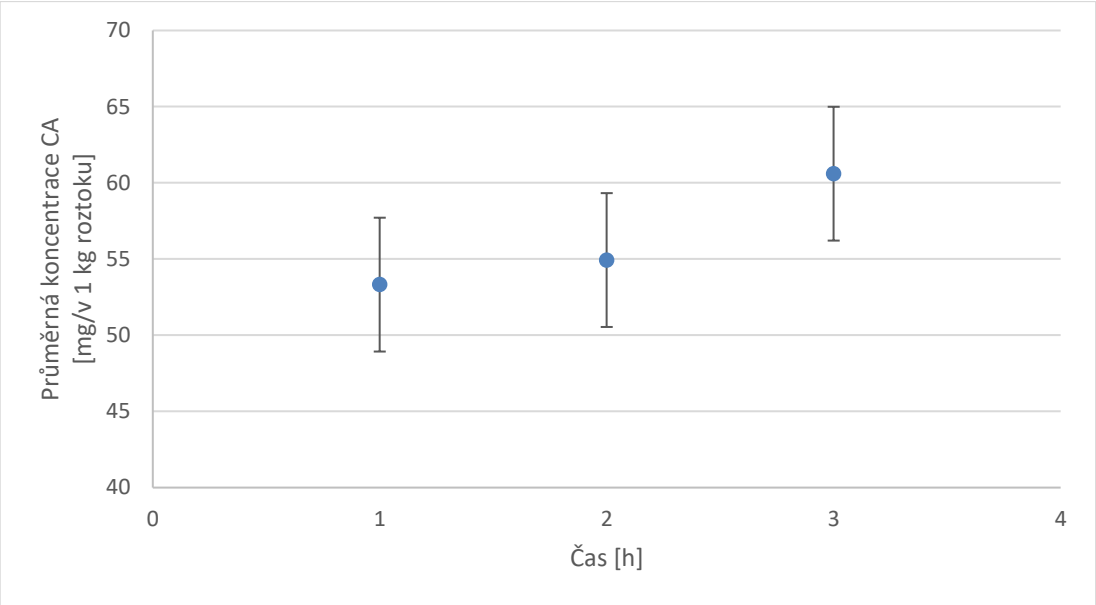
Obrázek II/1: Výsledný efekt času osmo-dehydratace na obsah CA v roztocích po osmo-dehydrataci pro DPPH metodu (n = 3)

Poznámka: Vertikální úsečky znázorňují 95% konfidenční interval



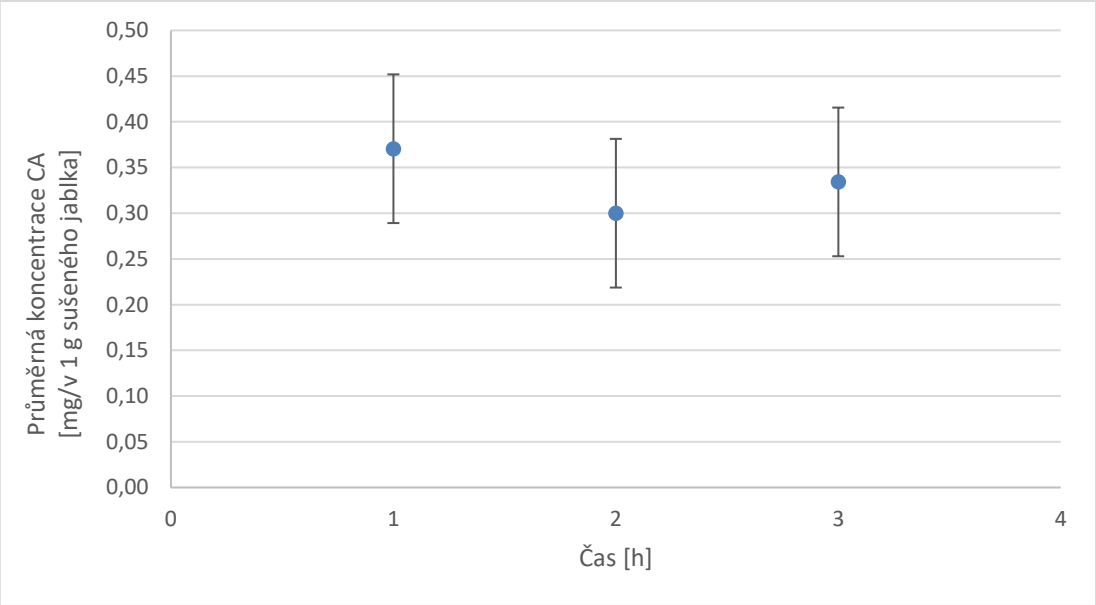
Obrázek II/2: Výsledný efekt času osmo-dehydratace na obsah CA v extraktech z jablek po osmo dehydrataci pro DPPH metodu (n = 3)

Poznámka: Vertikální úsečky znázorňují 95% konfidenční interval



Obrázek II/3: Výsledný efekt času osmo-dehydratace na obsahu CA v roztocích po osmo-dehydrataci pro TPC metodu (n = 3)

Poznámka: Vertikální úsečky znázorňují 95% konfidenční interval



Obrázek II/4: Výsledný efekt času osmo-dehydratace na obsah CA v extraktech z jablek po osmo-dehydrataci pro TPC metodu (n = 3)

Poznámka: Vertikální úsečky znázorňují 95% konfidenční interval

Příloha III: Celkový obsah fenolických látek v roztocích a extraktech z jablek

Tabulka III/1: Celkový obsah fenolických látek v roztocích před osmo-dehydratací (n = 3)

roztok	absorbance	koncentrace [µg/ml]	v 1 kg roztoku [mg]
0,1% CA	0,049	7,71	6,282
0,05% CA	0,042	6,75	5,501
0,01% CA	0,025	4,42	3,604
0,005% CA	0,021	3,88	3,158
0,001% CA	0,020	3,67	2,990
voda + EtOH	0,007	1,89	1,885
cukr + EtOH	0,016	3,19	2,600

Tabula III/2: Celkový obsah fenolických látek v roztocích po osmo-dehydrataci po 1 hodině (n = 3)

roztok	absorbance	koncentrace [µg/ml]	v 1 kg roztoku [mg]
0,1% CA	0,545	75,66	61,623
0,05% CA	0,542	75,25	61,288
0,01% CA	0,335	46,89	38,192
0,005% CA	0,405	56,48	46,003
0,001% CA	0,613	84,97	69,210
voda + EtOH	0,400	55,73	55,559
cukr + EtOH	0,364	50,79	41,372

Tabulka III/3: Celkový obsah fenolických látek v roztocích po osmo-dehydrataci po 2 hodinách (*n* = 3)

roztok	absorbance	koncentrace [µg/ml]	v 1 kg roztoku [mg]
0,1% CA	0,526	73,05	59,503
0,05% CA	0,575	79,77	64,970
0,01% CA	0,368	51,34	41,818
0,005% CA	0,405	56,41	45,947
0,001% CA	0,647	89,63	73,004
voda + EtOH	0,360	50,32	50,164
cukr + EtOH	0,433	60,32	49,127

Tabulka III/4: Celkový obsah fenolických látek v roztocích po osmo-dehydrataci po 3 hodinách (*n* = 3)

roztok	absorbance	koncentrace [µg/ml]	v 1 kg roztoku [mg]
0,1% CA	0,521	72,30	58,889
0,05% CA	0,517	71,82	58,499
0,01% CA	0,382	53,33	43,436
0,005% CA	0,584	81,00	65,975
0,001% CA	0,734	101,55	82,711
voda + EtOH	0,457	63,53	63,344
cukr + EtOH	0,453	63,05	51,358

Tabulka III/5: Celkový obsah fenolických látek v extraktech z jablek po osmo-dehydrataci po 1 hodině (n = 3)

roztok	absorbance	koncentrace [µg/ml]	v 1 g jablka [mg]
0,1% CA	0,416	57,99	0,580
0,05% CA	0,328	45,93	0,459
0,01% CA	0,186	26,41	0,264
0,005% CA	0,133	19,22	0,192
0,001% CA	0,254	35,73	0,357
voda + EtOH	0,729	100,79	1,008
cukr + EtOH	0,363	50,73	0,507

Tabulka III/6: Celkový obsah fenolických látek v extraktech z jablek po osmo-dehydrataci po 2 hodinách (n = 3)

roztok	absorbance	koncentrace [µg/ml]	v 1 g jablka [mg]
0,1% CA	0,315	44,08	0,441
0,05% CA	0,184	26,21	0,262
0,01% CA	0,115	16,75	0,168
0,005% CA	0,191	27,16	0,272
0,001% CA	0,254	35,79	0,358
voda + EtOH	0,326	45,66	0,457
cukr + EtOH	0,181	25,79	0,258

Tabulka III/7: Celkový obsah fenolických látek v extraktech z jablek po osmo-dehydrataci po 3 hodinách (n = 3)

roztok	absorbance	koncentrace [µg/ml]	v 1 g jablka [g]
0,1% CA	0,279	39,15	0,392
0,05% CA	0,272	38,19	0,382
0,01% CA	0,149	21,41	0,214
0,005% CA	0,126	18,19	0,182
0,001% CA	0,359	50,18	0,502
voda + EtOH	0,567	78,67	0,787
cukr + EtOH	0,169	24,08	0,241

Příloha IV: Množství skořicového aldehydu (CA) a kyseliny skořicové (KS) v roztocích a extraktech z jablek pro HPLC analýzu

Tabulka IV/1: Množství CA a KS v cukerném roztoku s obsahem 0,1 % skořicového aldehydu [mg/1 kg roztoku] (n = 3)

	před osmo-dehydratací	**po 1 hodině**	**po 2 hodinách**	**po 3 hodinách**
CA	922,6	651,4	826,0	704,8
KS	217,4	141,3	163,9	157,4
Celkem	1140,0	792,7	989,9	862,2

Tabulka IV/2: Množství CA a KS v extraktu z jablek po osmo-dehdrataci v roztoku s obsahem 0,1 % skořicového aldehydu [mg/1 g jablka] (n = 3)

	po 1 hodině	**po 2 hodinách**	**po 3 hodinách**
CA	0,241	0,221	0,240
KS	0,205	0,236	0,281
Celkem	0,446	0,457	0,521

Tabulka IV/3: Množství CA a KS v cukerném roztoku s obsahem 0,05 % skořicového aldehydu [mg/1 kg roztoku] (n = 3)

	před osmo-dehydratací	**po 1 hodině**	**po 2 hodinách**	**po 3 hodinách**
CA	396,3	326,5	301,3	313,5
KS	97,9	78,7	76,4	77,1
Celkem	494,2	405,2	377,7	390,6

Tabulka IV/4: Množství CA a KS v extraktu z jablek po osmo-dehydrataci v roztoku s obsahem 0,05 % skořicového aldehydu [mg/1 g jablka] (n = 3)

	po 1 hodině	**po 2 hodinách**	**po 3 hodinách**
CA	0,141	0,166	0,127
KS	0,117	0,136	0,104
Celkem	0,258	0,302	0,231

Tabulka IV/5: Množství CA a KS v cukerném roztoku s obsahem 0,01 % skořicového aldehydu [mg/1 kg roztoku] (n = 3)

	před osmo-dehydratací	po 1 hodině	po 2 hodinách	po 3 hodinách
CA	108,2	83,8	79,1	86,9
KS	12,2	9,2	10,0	10,6
Celkem	120,4	93,0	89,1	97,5

Tabulka IV/6: Množství CA a KS v extraktu z jablek po osmo-dehydrataci v roztoku s obsahem 0,01 % skořicového aldehydu [mg/1 g jablka] (n = 3)

	po 1 hodině	po 2 hodinách	po 3 hodinách
CA	0,074	0,085	0,065
KS	0,018	0,021	0,015
Celkem	0,092	0,106	0,080

Tabulka IV/7: Množství CA a KS v cukerném roztoku s obsahem 0,005 % skořicového aldehydu [mg/1 kg roztoku] (n = 3)

	před osmo-dehydratací	po 1 hodině	po 2 hodinách	po 3 hodinách
CA	52,2	38,6	40,2	42,5
KS	11,3	7,8	8,5	9,9
Celkem	63,5	46,4	48,7	52,4

Tabulka IV/8: Množství CA a KS v extraktu z jablek po osmo-dehydrataci v roztoku s obsahem 0,005 % skořicového aldehydu [mg/1 g jablka] (n = 3)

	po 1 hodině	po 2 hodinách	po 3 hodinách
CA	0,045	0,036	0,040
KS	0,016	0,011	0,014
Celkem	0,061	0,047	0,054

Tabulka IV/9: Množství CA a KS v cukerném roztoku s obsahem 0,001 % skořicového aldehydu [mg/1 kg roztoku] (n = 3)

	před osmo-dehydratací	po 1 hodině	po 2 hodinách	po 3 hodinách
CA	22,8	16,5	17,7	17,7
KS	1,4	0,8	3,3	1,4
Celkem	24,2	17,3	21,0	19,1

Tabulka IV/10: Množství CA a KS v extraktu z jablek po osmo-dehydrataci v roztoku s obsahem 0,001 % skořicového aldehydu [mg/1 g jablka] (n = 3)

	po 1 hodině	po 2 hodinách	po 3 hodinách
CA	0,027	0,025	0,030
KS	0,003	0,001	0,003
Celkem	0,030	0,026	0,033

Tabulka IV/11: Množství CA a KS v kontrolním roztoku (cukr + voda + EtOH) bez skořicového aldehydu [mg/1 kg roztoku] (n = 3)

	před osmo-dehydratací	po 1 hodině	po 2 hodinách	po 3 hodinách
CA	-	2,717	3,271	3,545
KS	-	0,078	0,284	0,346
Celkem	-	2,795	3,555	3,891

Tabulka IV/12: Množství CA a KS v extraktu z jablek po osmo-dehydrataci v kontrolním roztoku (cukr + voda + EtOH) [mg/1 g jablka] (n = 3)

	po 1 hodině	po 2 hodinách	po 3 hodinách
CA	0,028	0,037	0,049
KS	0,002	0,00035	0,00085
Celkem	0,030	0,03735	0,04985

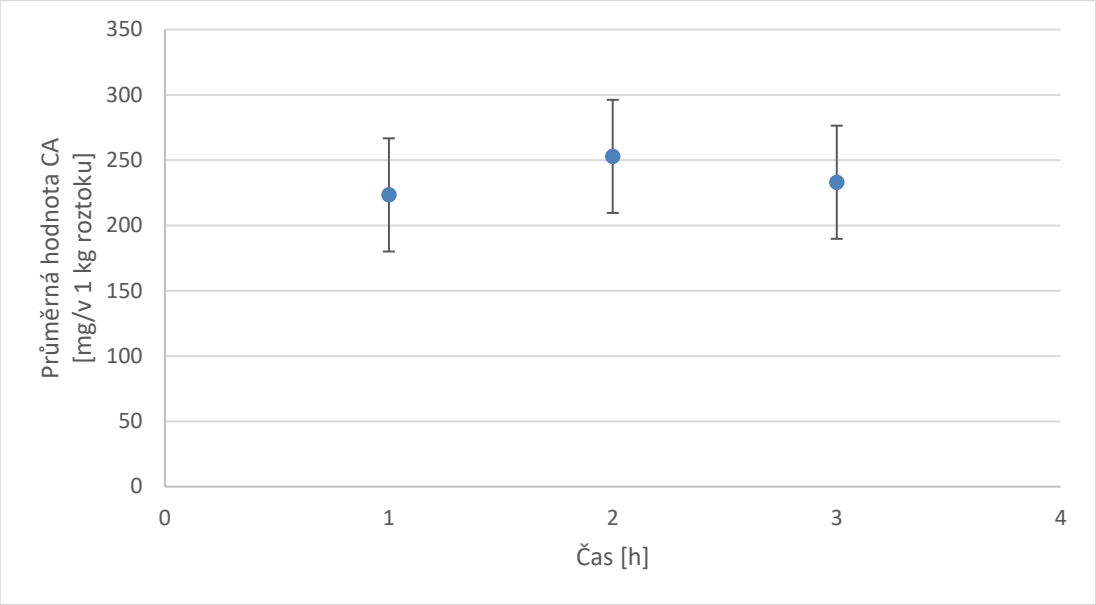
Tabulka IV/13: Množství CA a KS v kontrolním roztoku (voda + EtOH) bez skořicového aldehydu [mg/1 kg roztoku] (n = 3)

	před osmo-dehydratací	**po 1 hodině**	**po 2 hodinách**	**po 3 hodinách**
CA	-	3,865	2,704	3,095
KS	-	0,204	0,407	0,024
Celkem	-	4,069	3,111	3,119

Tabulka IV/14: Množství CA a KS v extraktu z jablek po osmo-dehydrataci v kontrolním roztoku (voda + EtOH) [mg/1 g jablka] (n = 3)

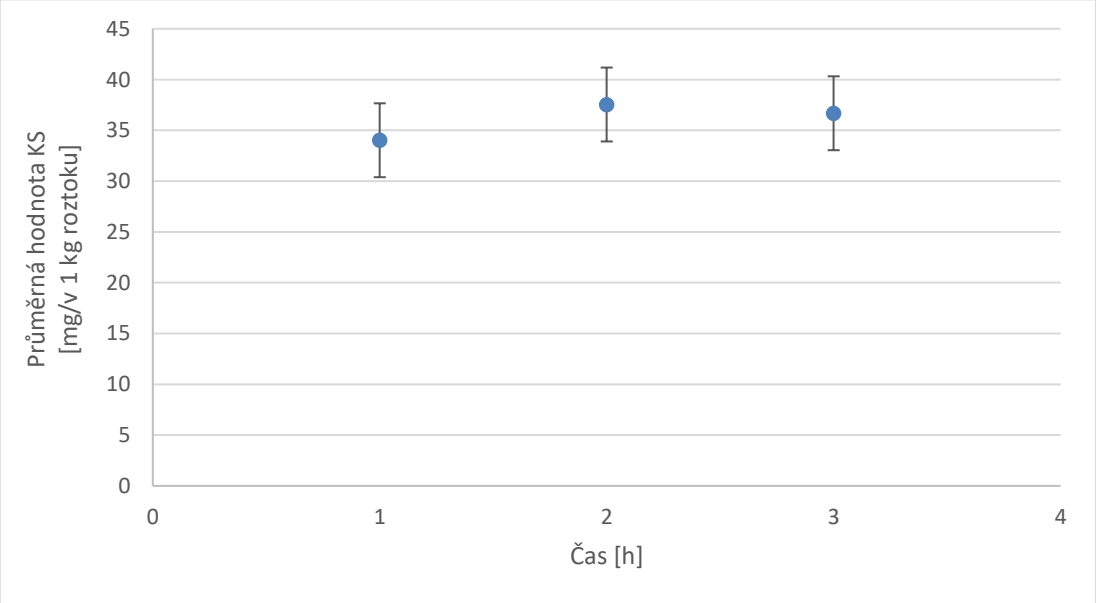
	po 1 hodině	**po 2 hodinách**	**po 3 hodinách**
CA	0,025	0,023	0,024
KS	0,003	0,002	0,00021
Celkem	0,028	0,025	0,02421

Příloha V: Výsledný efekt času osmo-dehydratace na obsahu CA v roztocích a extraktech z jablek pro HPLC analýzu



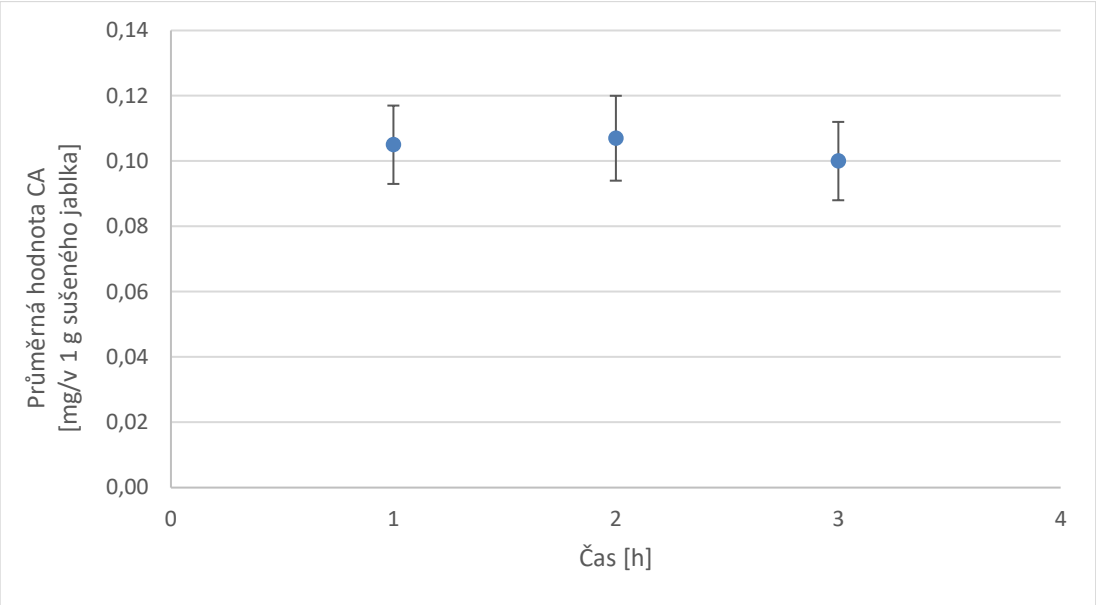
Obrázek V/1: Výsledný efekt času osmo-dehydratace na obsahu CA v roztocích po osmo-dehydrataci pro HPLC analýzu (n = 3)

Poznámka: Vertikální úsečky znázorňují 95% konfidenční interval



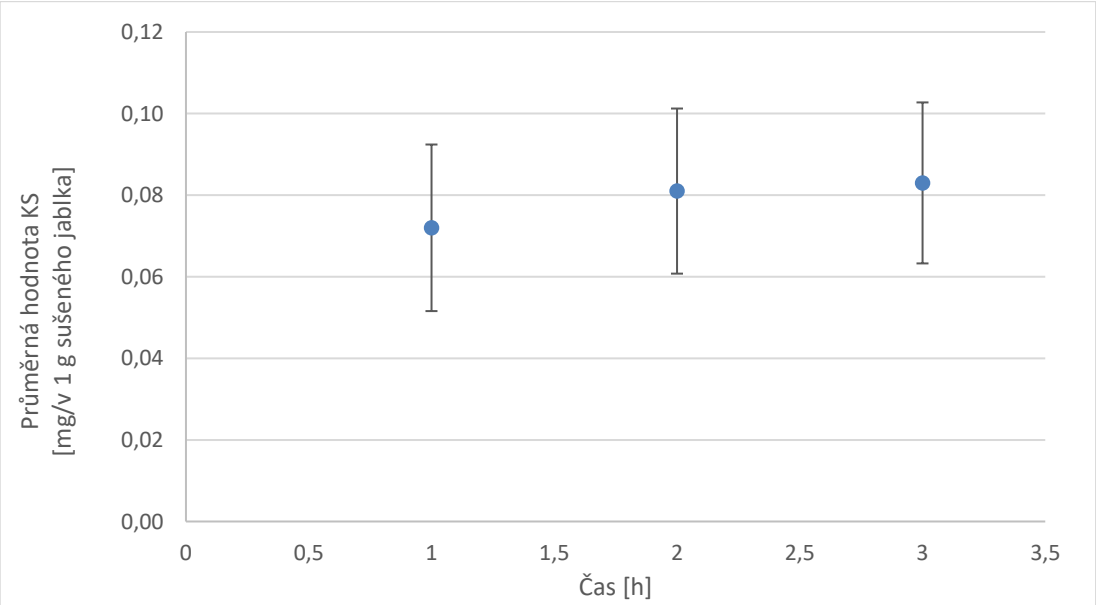
Obrázek V/2: Výsledný efekt času osmo-dehydratace na obsahu KS v roztocích po osmo-dehydrataci pro HPLC analýzu (n = 3)

Poznámka: Vertikální úsečky znázorňují 95% konfidenční interval



Obrázek V/3: Výsledný efekt času osmo-dehydratace na obsah CA v extraktech z jablek po osmo-dehydrataci pro HPLC analýzu (n = 3)

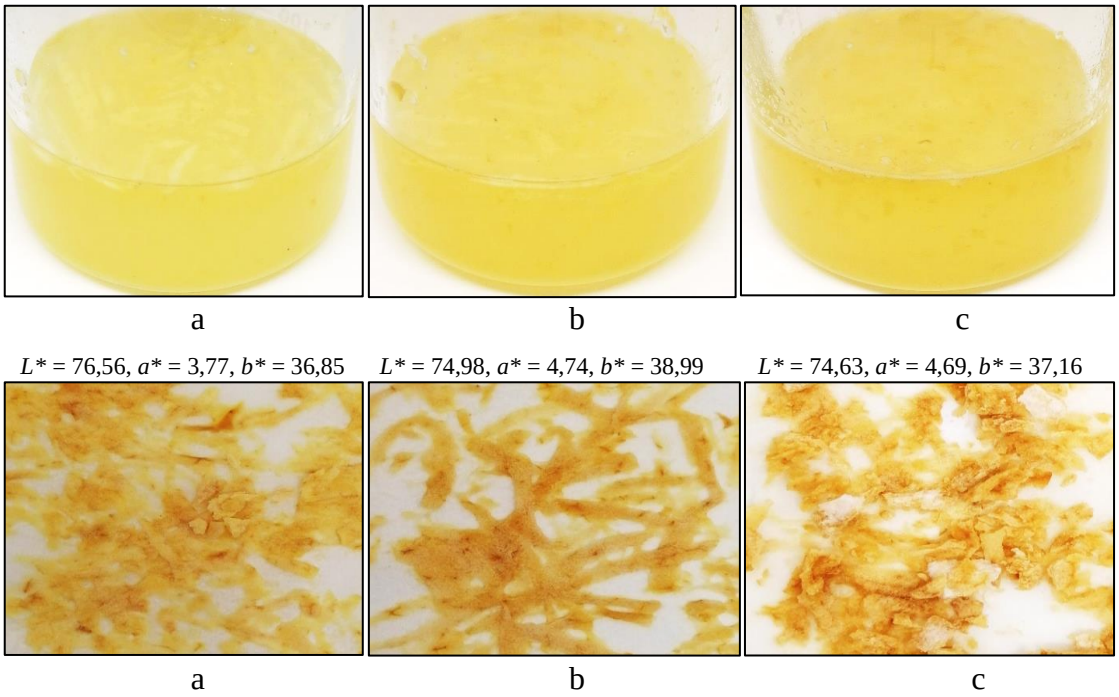
Poznámka: Vertikální úsečky znázorňují 95% konfidenční interval



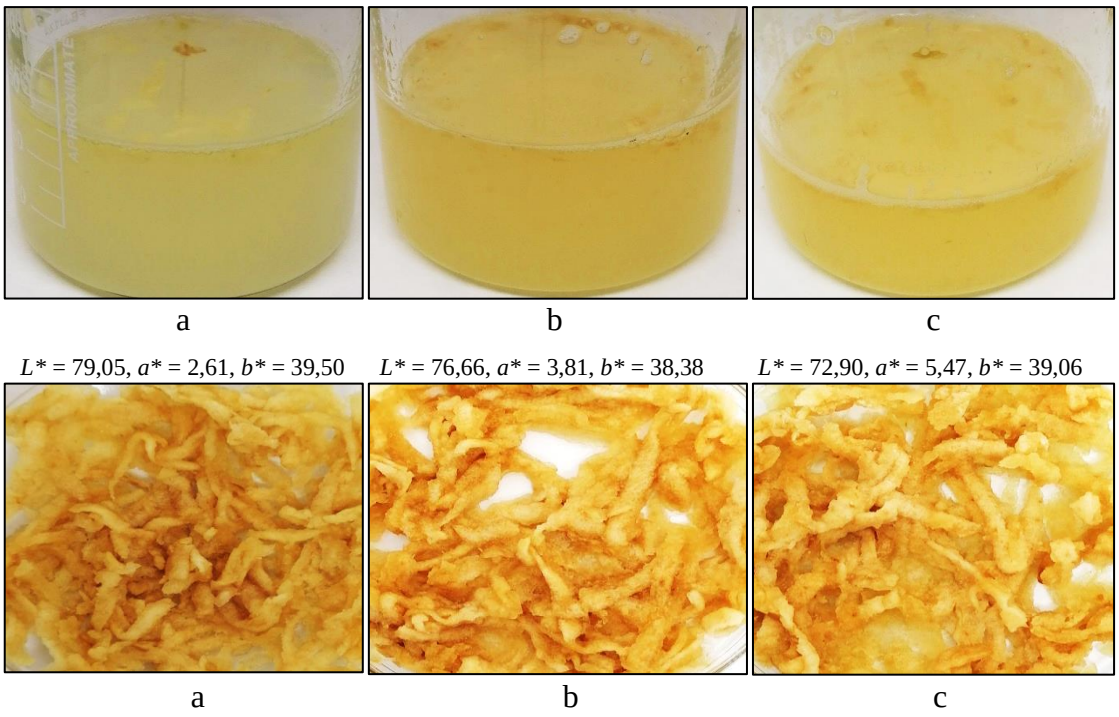
Obrázek V/4: Výsledný efekt času osmo-dehydratace na obsah KS v extraktech z jablek po osmo-dehydrataci pro HPLC analýzu (n = 3)

Poznámka: Vertikální úsečky znázorňují 95% konfidenční interval

Příloha VI: Barvy roztoků a jablek po osmo-dehydrataci

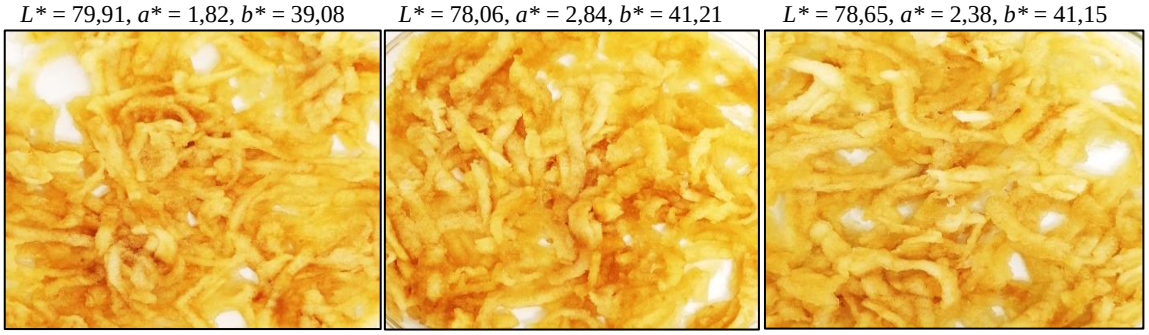


Obrázek VI/1: Barva cukerného roztoku (nahoře) a jablek po osmo-dehydrataci (dole) s přídavkem 0,1 % skořicového aldehydu a) po 1 hodině, b) po 2 hodinách a c) po 3 hodinách



Obrázek VI/2: Barva cukerného roztoku (nahoře) a jablek po osmo-dehydrataci (dole) s přídavkem 0,05 % skořicového aldehydu a) po 1 hodině, b) po 2 hodinách a c) po 3 hodinách

a b c

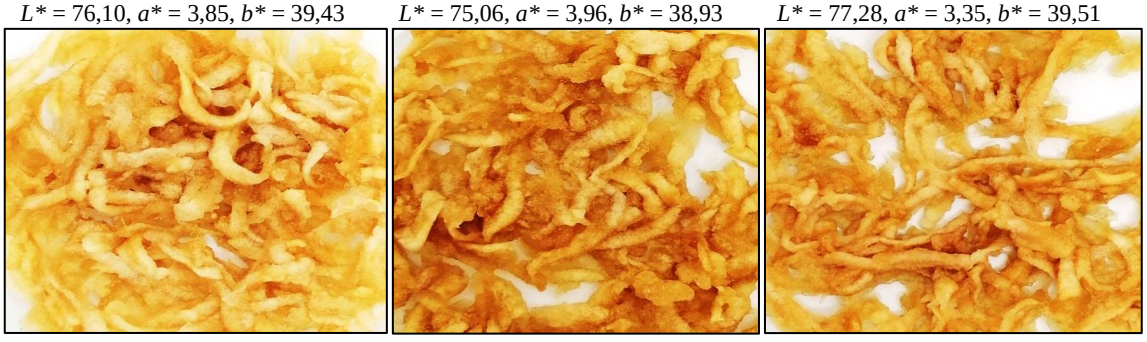


*L** = 79,91, *a** = 1,82, *b** = 39,08 *L** = 78,06, *a** = 2,84, *b** = 41,21 *L** = 78,65, *a** = 2,38, *b** = 41,15

a b c

Obrázek VI/3: Barva cukerného roztoku a jablek po osmo-dehydrataci s přídavkem 0,01 % skořicového aldehydu a) po 1 hodině, b) po 2 hodinách a c) po 3 hodinách

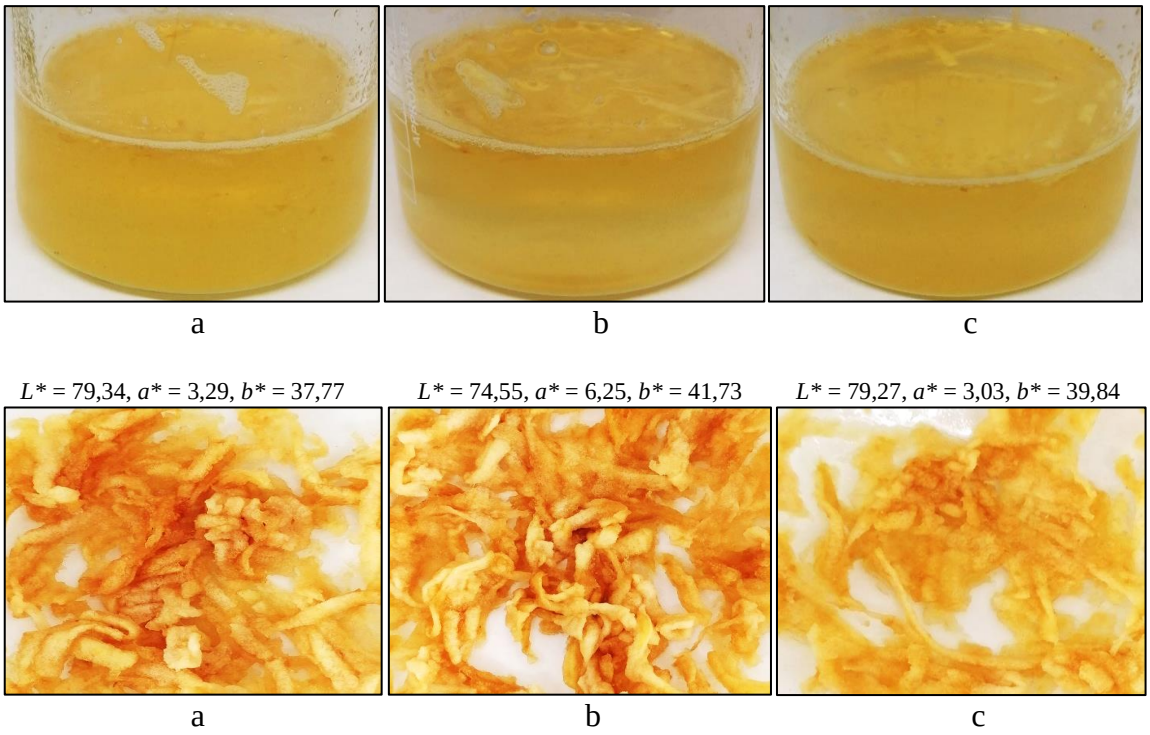
a b c



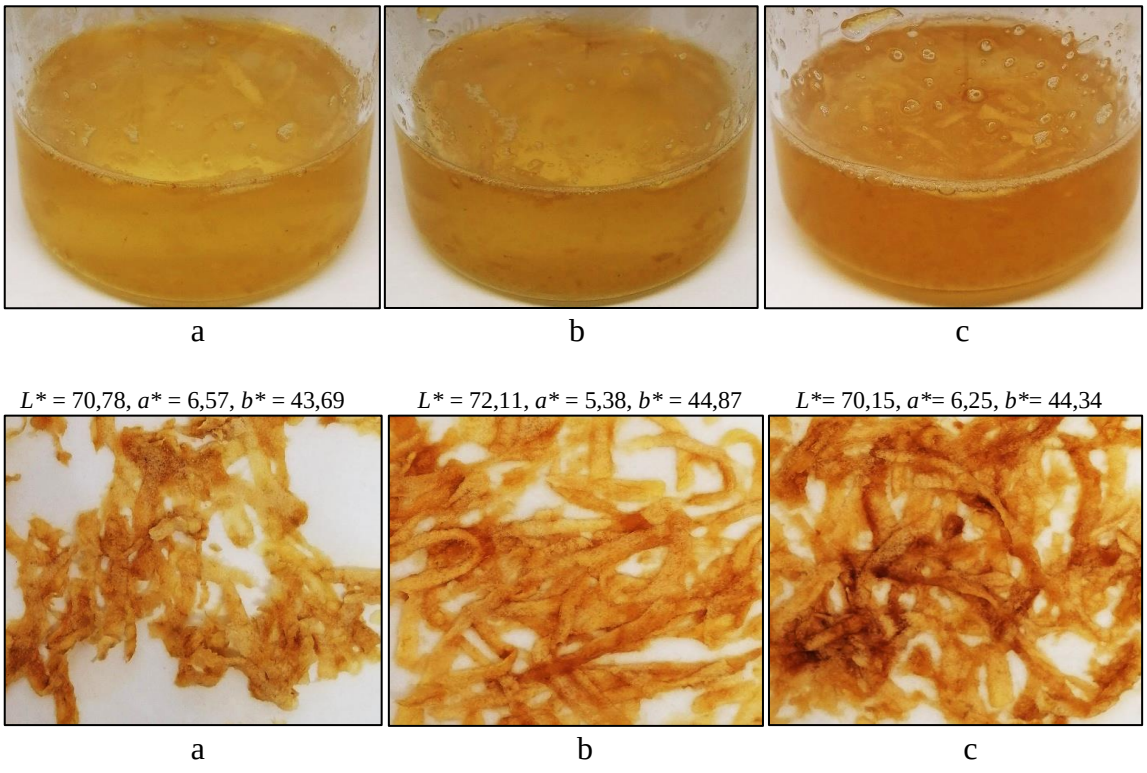
*L** = 76,10, *a** = 3,85, *b** = 39,43 *L** = 75,06, *a** = 3,96, *b** = 38,93 *L** = 77,28, *a** = 3,35, *b** = 39,51

a b c

Obrázek VI/4: Barva cukerného roztoku a jablek po osmo-dehydrataci s přídavkem 0,005 % skořicového aldehydu a) po 1 hodině, b) po 2 hodinách a c) po 3 hodinách



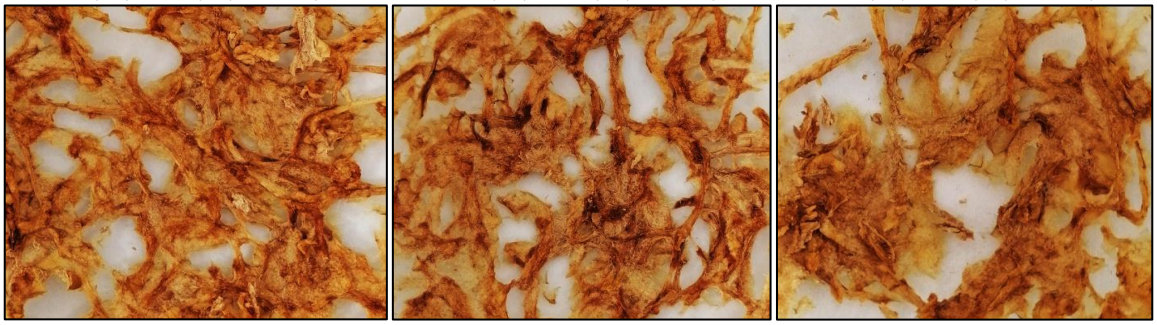
Obrázek VI/5: Barva cukerného roztoku a jablek po osmo-dehydrataci s přídavkem 0,001 % skořicového aldehydu a) po 1 hodině, b) po 2 hodinách a c) po 3 hodinách



Obrázek VI/6: Barva kontrolního roztoku a jablek po osmo-dehydrataci bez skořicového aldehydu (cukr + voda + EtOH) a) po 1 hodině, b) po 2 hodinách a c) po 3 hodinách

a b c

*L** = 67,54, *a** = 6,89, *b** = 38,94 *L** = 66,32, *a** = 7,65, *b** = 41,79 *L** = 67,76, *a** = 6,75, *b** = 39,35



a b c

Obrázek VI/7: Barva kontrolního roztoku a jablek po osmo-dehydrataci bez skořicového aldehydu (voda + EtOH) a) po 1 hodině, b) po 2 hodinách a c) po 3 hodinách