

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie



Disertační práce

APLIKACE SEPARAČNÍCH METOD PRO STANOVENÍ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

(Soubor publikovaných prací doplněných komentářem)

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

Konzultant: doc. PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Hradec Králové, 2023

RNDr. Aneta Bílková

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

.....
RNDr. Aneta Bílková

Poděkování

Veliké poděkování patří mé školitelce doc. PharmDr. Haně Sklenářové, Ph.D. a to za odborné vedení, cenné rady a její připomínky. Hance především děkuji za její velkou podporu, trpělivost a pomoc po celou dobu mého doktorského studia, bez které by tato práce nemohla vzniknout. Velký dík patří také mému konzultantovi doc. PharmDr. Petrovi Chocholoušovi, Ph.D. za jeho cenné rady, přátelský přístup a pomoc při experimentální práci a tvorbě publikačních výstupů. S tím souvisí velké poděkování také spoluautorům předložených publikací za skvělou spolupráci při výzkumu.

Dále bych chtěla poděkovat současným, bývalým kolegům i celé Katedře analytické chemie, především Mgr. Marcele Hollé, Mgr. Anežce Adamcové a Kristýně Baďurové za přátelské pracovní prostředí a pomoc a rady při každodenní experimentální práci. Mimořádné poděkování patří prof. Františkovi Švecovi za jeho cenné rady, jeho osobní názory a připomínky při korekturách publikací, které mi pomohly nejen v osobním ale i profesním růstu.

V neposlední řadě náleží obrovské poděkování mé rodině za jejich celoživotní podporu a starostlivost, bez kterých by nebylo možné mé studium zrealizovat.

Velice děkuji za finanční a materiální podporu projektům: STARSS a EFSA-CDN (CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000465, CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000841) spolufinancovaném ERDF, Technologické agentuře ČR (TJ01000151, TJ02000196, TH 02030223), Ministerstvu Zemědělství ČR (QJ1510354, RO 1521) a projektu SVV 260548 a 260 662.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: RNDr. Aneta Bílková

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

Konzultant: doc. PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Název disertační práce: Aplikace separačních metod pro stanovení biologicky aktivních látek

V předložené disertační práci je prezentován komentovaný soubor tří odborných publikací, zaměřujících se na aplikaci separačních metod pro stanovení biologicky aktivních fenolických látek v ovoci, reziduí pesticidů v ovoci s ohledem na využití moderních skladovacích technologií, a aplikačního výsledku – užitého vzoru založeného opět na sledování obsahu fenolických látek při různých podmínkách sušení ovocného materiálu.

V teoretické části jsou z analytického hlediska charakterizovány cílové analyty, jejich fyzikálně – chemické vlastnosti, stabilita, antioxidační aktivita. Dále jsou v ní popsány metody přípravy vzorků pro stanovení biologicky aktivních fenolických látek, vybraných extrakčních postupů a přehled metod používaných pro stanovení popsanych látek v rostlinném materiálu.

Hlavní část disertační práce se zabývá vývojem, optimalizací a validací rychlé analytické metody pro chromatografickou analýzu fenolických látek v rostlinném materiálu, konkrétně v jablkách. V této části je popsána optimalizace finální metody, samotný vývoj chromatografické metody a její aplikace na vybrané vzorky, kde došlo k ověření vyvinuté metody. Další rozsáhlou částí je výzkum vlivu využití skladovacích technologií (modified atmosphere packing – MAP, chlazený sklad, skladování v podmínkách s nízkou hladinou kyslíku – ULO), posklizňových ošetření (aplikace ozonu, účinné látky 1-methylcyklopropenu) a stanovení obsahu sledovaných analytů v průběhu skladování plodů jabloní. Následující část této disertační práce navazuje na testování vlivu podmínek dlouhodobého skladování na degradaci reziduí účinných látek pesticidů v třešních.

V závěru disertační práce je uveden přehled publikací v recenzovaných časopisech bez IF se zaměřením na problematiku ovocnářství, certifikované metodiky a prezentace výsledků experimentální práce na národních a mezinárodních konferencích.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: RNDr. Aneta Bílková

Supervisor: assoc. prof. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Consultant: assoc. prof. PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Title: Application of separation methods for determination of biologically active substances

The submitted dissertation thesis presents an annotated set of three publications, focusing on the application of separation methods for the determination of biologically active phenolic substances, pesticide residues in fruits, with regard to the use of modern storage technologies, and the application result - a utility model based again on monitoring the phenolic substances content with respect to different conditions of plant material drying.

In the theoretical part, the target analytes are characterized from an analytical point of view, with respect to their physico-chemical properties, stability, antioxidant activity. It also describes sample preparation methods for the determination of biologically active phenolic substances, selected extraction procedures and an overview of the methods used for the determination of the described substances in plant material.

The main part of the dissertation deals with the development, optimization and validation of a rapid analytical method for the chromatographic analysis of phenolic substances in plant material, specifically in apples. This part describes the optimization of the final method, the development of the chromatographic method itself and its application to selected samples where the developed method was verified. Another extensive part is the study of the influence of application of different storage technologies (modified atmosphere packing - MAP, refrigerated storage, storage in conditions with a low oxygen level - ULO), post-harvest treatments (application of ozone, the active substance 1-methylcyclopropene) and determination of the content of monitored analytes during the storage of apple fruits. The next part of this dissertation follows on the application of long-term storage conditions and its effect on the degradation of residues of active pesticide substances in cherries.

At the end of the dissertation thesis, there is an overview of publications in reviewed journals without IF focusing on the fruit growing, certified methodologies and presentations of the results of experimental work at national and international conferences.

OBSAH

1	Úvod	13
2	Cíl práce.....	15
3	Teoretická část	16
3.1	Fenolické látky	16
3.1.1	Struktura a výskyt	17
3.1.2	Stabilita	19
3.1.3	Antioxidační aktivita fenolických látek	21
3.1.4	Metody identifikace a stanovení fenolických látek	23
3.2	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	24
3.3	Rešerše metod pro stanovení vybraných fenolických látek.....	25
3.4	Metody přípravy vzorku pro stanovení fenolických látek.....	32
3.5	Přístupy pro chromatografickou analýzu fenolických látek	35
3.6	Vývoj HPLC metody pro separaci fenolických látek v ovoci	37
3.7	Trendy v analýze fenolických látek.....	39
3.8	Skladovací technologie a jejich využití	42
3.8.1	Speciální obaly s modifikovanou atmosférou pro vybrané druhy ovoce	42
3.8.2	Skladování s využitím účinné látky 1-methylcyklopropan.....	44
3.8.3	Skladování v podmínkách atmosféry s nízkou hladinou kyslíku.....	44
3.8.4	Skladování s využitím ozonu	45
3.9	Vzorkování	46
3.9.1	Odběr vzorků pro studium fenolických látek v čerstvých plodech	47
3.9.2	Odběr vzorků pro výzkum obsahu fenolických látek v průběhu skladování.....	47
3.9.3	Odběr vzorků pro studium degradace reziduí v plodech třešní	48
3.10	Pesticidy a jejich využití v ovocnářství.....	49
4	Komentář k přiloženým publikacím	52
4.1	Determination of major phenolic compounds in apples: Part I—Optimization of high-performance liquid chromatography separation with diode array detection (Příloha 1)	52
4.2	Content of major phenolic compounds in apples: Benefits of ultra-low oxygen conditions in long-term storage (Příloha 2)	57
4.3	Užitný vzor „Sušený jablečný produkt“– aplikovaný výsledek projektu TJ01000151 s názvem „Monitoring prospěšných látek v ovoci a jejich zpracovatelských produktech s ohledem na lidské zdraví a výživu dětí“ (Příloha 3)	65

4.4	Effect of storage conditions on content of pesticide residues in sweet cherries (Příloha 4)	69
5	Citovaná literatura	75
6	Seznam publikovaných prací v komentovaném souhrnu	82
7	Seznam dalších publikací	83
8	Prezentace výsledků.....	86
9	Účast na projektech a stážích	89

SEZNAM ZKRATEK

AAPM	Metoda pro určení antioxidační aktivity s použitím aminoantipyrinu <i>(Aminoantipyrin method)</i>
ABTS	Metoda pro určení antioxidační aktivity s použitím 2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát <i>(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)</i>
ACN	Acetonitril <i>(acetonitril)</i>
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku <i>(Atmospheric-pressure chemical ionization)</i>
BSTFA/pyridin	Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid/pyridin <i>(Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide/pyridine)</i>
CA	Coularray detekce <i>(CoulArray detection)</i>
CAD	Detektor nabitého aerosolu <i>(Charged Aerosol Detector)</i>
CZE	Kapilární zónová elektroforéza <i>(Capillary zone electrophoresis)</i>
CUPRAC	Metoda redukce měďnatých iontů <i>(Cupric Reducing Antioxidant Capacity)</i>
DAD	Detektor diodového pole <i>(Diode array detektor)</i>
DNA	Deoxyribonukleová kyselina <i>(Deoxyribonucleic acid)</i>
DPPH	1,1- difenyl-2-pikrylhydrazyl <i>(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical)</i>
ECD	Detektor elektronového záchytu <i>(Electron capture detector)</i>
ESI	Ionizace elektrosprejem <i>(Electrospray ionization)</i>
FID	Plamenově-ionizační detektor

	<i>(Flame ionization detector)</i>
GC	Plynová chromatografie <i>(Gas chromatography)</i>
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí <i>(Gas chromatography–mass spectrometry)</i>
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie <i>(High-performance liquid chromatography)</i>
HPLC - DAD	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí diodového pole <i>(High-performance liquid chromatography with diode array detector)</i>
HPLC/UHPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie/ (ultra)vysokoúčinná kapalinová chromatografie <i>(liquid chromatography/ultra high-performance liquid chromatography)</i>
HTLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie při zvýšené teplotě <i>(High-temperature liquid chromatography)</i>
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí <i>(Liquid chromatography-mass spectrometry)</i>
LLE	Extrakce z kapaliny do kapaliny <i>(Liquid–liquid extraction)</i>
MAP	Balení s modifikovanou atmosférou <i>(Modified atmosphere packing)</i>
MLR	Maximální limity reziduí <i>(Maximum Residue Levels)</i>
MEPS	Mikroextrakce pomocí plněného sorbentu <i>(Microextraction by Packed Sorbent)</i>
MF	Mobilní fáze <i>(Mobile phase)</i>
MS	Hmotnostní spektrometrie <i>(Mass spectrometry)</i>
NaOH	Hydroxid sodný <i>(Sodium hydroxide)</i>
OL	Ochranná lhůta

	<i>(Protected period)</i>
PC	Papírová chromatografie <i>(Paper chromatography)</i>
PCA	Analýza hlavních komponent <i>(Principal Component Analysis)</i>
RP	Reverzní fáze <i>(Reversed-phase)</i>
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi <i>(Reversed-phase high-performance liquid chromatography)</i>
SF	Stacionární fáze <i>(Stationary phase)</i>
SFE	Extrakce na tuhou fázi <i>(Solid phase extraction)</i>
SPME	Mikroextrakce na tuhou fázi <i>(Solid-phase microextraction)</i>
TAA	Celková antioxidační aktivita <i>(Total antioxidant activity)</i>
TEAC	Spektrofotometrická metoda pro stanovení celkové antioxidační aktivity <i>(Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay)</i>
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě <i>(Thin Layer Chromatography)</i>
UHPLC	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie <i>(Ultra high-performance liquid chromatography)</i>
ULO	Podmínky s nízkou hladinou kyslíku <i>(Ultra low oxygen)</i>
UV/VISdetektor	Spektrofotometrický detektor měřící v ultrafialové a viditelné oblasti <i>(UV/VIS detector)</i>

1 Úvod

Separace bioaktivních fenolických látek v rostlinách, ovoci a zelenině je studována již dlouhou dobu. Fenolické látky jako potenciální antioxidanty jsou v dnešní době spojovány se snížením dopadu civilizačních chorob na člověka. Jejich konzumace se proto doporučuje jako prevence nežádoucích zdravotních problémů. Dále je stále častěji diskutováno i využití rostlinného materiálu jako potenciálního zdroje pro přípravu různých doplňků stravy, jelikož prodej těchto doplňků zaznamenává rychlý nárůst, zejména těch, které jsou založeny na rostlinných extraktech, protože jsou považovány za bezpečnější a zdravější než syntetické. Složení a obsah bioaktivních látek v rostlinách se může lišit v závislosti na klimatu, teplotě, ročním období, vlastnostech půdy a dalších faktorech. Rozpor mezi množstvím použitého extraktu a obsahem účinných látek v jedné dávce může mít podstatný vliv na dávkování a může vést k předávkování konzumenta nebo naopak k neúčinnosti přípravku [1]. Bylo prokázáno, že celková antioxidační aktivita zmrazených extraktů čerstvého materiálu se snižuje, zatímco v lyofilizovaných vzorcích nebyly prokazatelné rozdíly ve srovnání s čerstvým extraktem [2].

Rostlinné extrakty mohou být charakterizovány jako koncentrované zdroje živin. Vzhledem k jejich heterogennímu složení a s ohledem na hodnocení rizik jsou ale povolení v některých případech omezena na použití extraktu v doplňcích stravy jen pro určité skupiny populace [3]. Tyto extrakty by mohly být použity jako nové složky potravin, doplňků stravy a nutraceutika, která doplňují každodenní stravu a přispívají k udržení přiměřeného zdravotního stavu.

Stanovení biologicky aktivních látek zahrnuje řadu odlišných aspektů a analytické hodnocení zpracování bude záviset na vzorku, analytu a povaze řešené problematiky. Vzhledem k rozmanitosti analytů a typů vzorků neexistuje žádná univerzální strategie pro identifikaci, kvantifikaci a výběr vhodné analytické metody. Pro analýzu je běžně využívána vysokoúčinná kapalinová chromatografie, v některých případech plynová chromatografie. Detekce je běžně spektrofotometrická využívající hodnocení celého UV spektra pro zvýšení selektivity nebo univerzální detektory. Také spojení separace s hmotnostní spektrometrií, elektrochemickou detekcí (ECD – plynová chromatografie) nebo detekcí pomocí nabitého aerosolu (CAD) je pro tyto účely vyhovující. Pro citlivé stanovení látek obsahujících fluorofory, jako jsou kyselina gallová a epikatechin, může být využito fluorescenční detekce. Pro potvrzení identity, zvýšení selektivity stanovení fenolických látek zejména ve formě glykosidů, kterých se v rostlinném

materiálu může vyskytovat velké množství typů, se využívá spojení chromatografie s hmotnostní detekcí (MS). Pro další identifikaci látek se využívá MS/MS fragmentace, zejména když nejsou k dispozici příslušné standardy těchto látek [4]. Na druhou stranu, MS identifikace a zejména kvantifikace látek ve složitém rostlinném extraktu je často spojena s matricovými efekty. Využití spektrofotometrických detekčních technik pro rychlé vyhodnocení fenolického profilu rostlinných extraktů je v laboratořích zcela běžné. Nicméně separační techniky ve spojení se spektrofotometrií nebo elektrochemií jako typy detekce mohou mít i svá úskalí a omezení, např. kvůli složitosti matrice vzorku/rostlinného extraktu.

2 Cíl práce

Cílem teoretické části práce bylo v několika tematických blocích shrnout obecné informace o struktuře a výskytu fenolických látek, jejich fyzikálně chemických vlastnostech, antioxidační aktivitě, ale také poskytnout základní přehled analytických metod identifikace a stanovení fenolických látek. V další části byla popsána rešerše používaných metod pro stanovení bioaktivních látek v různých druzích ovoce společně s chromatografickými podmínkami. Jedna z kapitol je také věnována metodám přípravy vzorku pro stanovení fenolických látek a vývoji analytické metody. V neposlední řadě se teoretická část věnuje skladování, a to konkrétně moderním typům skladovacích technologií a jejich využití v praxi.

Cílem první experimentální práce bylo vyvinout a validovat rychlou metodu kapalinové chromatografie ve spojení se spektrofotometrickým detektorem pro stanovení obsahových bioaktivních látek v jablkách. Cílem této práce bylo rozlišení odrůd a novošlechtění na základě proměřených profilů fenolických látek. Výsledky této práce – optimalizovaná analytická metoda – byla využita pro další výzkum a tím bylo testování vlivu moderního dlouhodobého skladování na obsah vybraných fenolických látek v jablcích, což bylo cílem druhé experimentální práce. Byly provedeny skladovací pokusy a testovány vzorky odebrané v různých časových intervalech, kde byl sledován obsah fenolických látek v těchto vzorcích s ohledem na přirozenou degradaci obsahových látek.

Zjistit efekt podmínek dlouhodobého skladování na rychlost degradace reziduí pesticidů u třešní bylo cílem následující experimentální práce. V této práci byly sledovány vybrané účinné látky přípravků na ochranu rostlin a jejich degradace spojená s využitím různých skladovacích podmínek s ohledem na aktivitu pesticidů a tím pádem udržení kvality ovoce po delší dobu.

Nedílnou součástí komentované části práce jsou komplexní informace k aplikačnímu výsledku řešeného projektu TAČR-Zéta – užitnému vzoru „Sušená jablka“, jehož cílem bylo vyvinout inovativní technologický postup výroby se zachováním zdraví prospěšných látek ve finálním produktu.

3 Teoretická část

3.1 Fenolické látky

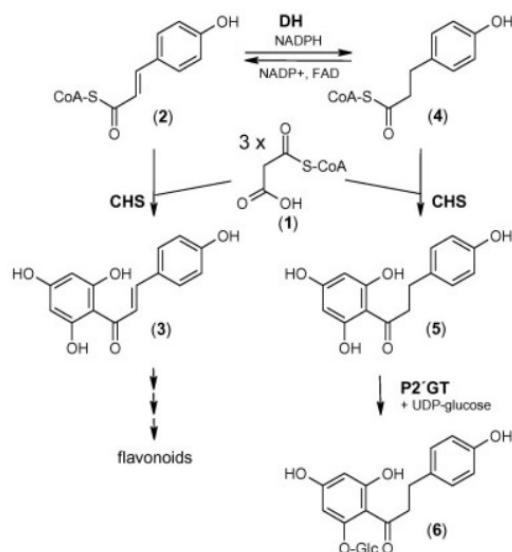
Fenolické látky jsou skupinou velice různorodých látek, tzv. sekundárních metabolitů, které jsou komponentou mnoha rostlin a různých druhů zeleniny a ovoce. Jejich zvýšenou produkci je možné pozorovat díky různým vlivům vnějšího prostředí a při působení stresových faktorů. Vytváří se v rostlinách při stresu nebo fungují i jako obranný mechanismus. Dnes je již známo mnoho konkrétních účinků těchto fenolických látek, kterých existuje až 8000 a dělí se do několika skupin, z nichž nejrozsáhlejší je skupina flavonoidů. Ta se dále dělí do dvou tříd: anthoxantiny a anthokyany. Anthoxantiny se rozdělují na několik podtříd: flavonoly, flavony, isoflavony, flavanony a flavan-3-oly. Mezi další látky patřící do fenolických látek jsou fenolové kyseliny (deriváty kyseliny benzoové a hydroxyskořicové), stilbeny (resveratrol) a lignany. Všechny tyto skupiny se liší strukturou a přítomností či postrádáním OH skupin ve struktuře daných látek na různých pozicích.

Obsah fenolických látek v zelenině se pohybuje okolo 3 g/kg. Denní dávka pro dospělého člověka by měla být zhruba 1 g/den. Denní příjem je vypočítán pro danou stravu obsahující běžné ovoce, zeleninu a nápoje. Fenolové kyseliny tvoří asi jednu třetinu celkového příjmu a flavonoidy tvoří zbývající dvě třetiny. Nejhojnějšími flavonoidy ve stravě jsou flavanoly (katechiny, proanthokyanidiny), antokyany. Hlavními zdroji fenolů ve stravě jsou ovoce a nápoje (ovocné šťávy, víno, čaj, káva, čokoláda a pivo) a v menší míře zelenina, luštěniny a obiloviny [5]. Vyskytují se v potravinách většinou jako glykosidy, zatímco flavonoly (patřící mezi flavonoidy) obvykle jako aglykony. Hlavní třídy flavonoidů jsou flavonoly, flavony, flavanoly (dihydroflavonoly), katechiny, anthokyany, a chalkony [6]. Zdrojem flavanolů je kromě ovoce (jablka, hroznové víno a bobule) a zeleniny, také čaj a červené víno. Jak uvádí literatura, bohatým zdrojem flavanolů jsou banány, jablka, borůvky, broskve a hrušky. Antokyany jsou pigmenty odpovědné za barvy rostlin, květin a ovoce. Nejčastěji vyskytující se antokyany v ovoci jsou kyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin a peonidin. Jejich výskyt je znám u ovoce, jako jsou brusinky, černý rybíz, červené hrozny, maliny, jahody, borůvky a ostružiny. Mezi chalkony, které se vyskytují ve významném množství v rajčatech, hruškách a jahodách patří floridzin, arbutin, floretin a chalkonaringenin [7]. Sušená jablečná dřeň představuje perspektivní zdroj fenolických složek, zejména kyseliny chlorogenové, floridzinových a kvercetinových glykosidů, které lze využít jako přírodní antioxidanty [8].

3.1.1 Struktura a výskyt

Fenolické látky jsou dle chemické struktury rozděleny na jednoduché fenoly, fenolové kyseliny, kumariny, flavonoidy, stilbeny, lignany, ligniny, taniny a mnohé další. Jednotlivé fenolické látky se mohou spojovat navzájem, nebo mohou být navázány se sacharidy, organickými kyselinami, aminy a lipidy. Fenolické látky obsahují ve své struktuře minimálně jedno aromatické jádro, které má dvě a více hydroxylových skupin [9]. Nejčastěji, hlavně v přírodě, se vyskytují ve formě spojené s cukry, které jsou charakteristické pro každý aglykon. Nejčastěji dochází ke spojení s galaktózou, glukózou, xylózou, méně pak s rhamnózou a arabinózou [10]. Díky cukerné složce se tyto látky lépe rozpouštějí ve vodě a jsou označovány jako glykosidy. Podle počtu monosacharidů, které jsou v řetězci navázány na aglykon, rozlišujeme monoglykosidy, diglykosidy, triglykosidy... Aglykony mohou být nejrůznější látky. Musí však obsahovat skupinu schopnou glykosidové vazby. Tuto podmínku splňují alkoholy, fenoly, thioalkoholy, aminy a podobné látky. Podle struktury aglykonu dělíme glykosidy do několika skupin: fenolové glykosidy, kumariny a jejich deriváty, flavonoidové glykosidy, antokyanidinové glykosidy, antrachinonové glykosidy, kardioaktivní glykosidy, saponiny, kyanogenní glykosidy, glukosinoláty (thioglykosidy) a glykosidy s iridoidovým aglykonem.

Fenolické glykosidy obsahují sacharid navázaný na fenolickou skupinu. Některé aglykony jsou odvozeny od kyseliny šikimové, jiné od kyseliny octové. Mnohé fenolické látky jsou v rostlině přítomny v glykosidické formě, která se odštěpuje a vznikne aktivní sloučenina. Příkladem je například floridzin (aktivní sloučenina floretinu), který se vyskytuje v některých druzích čeledi vřesovcovitých (*Ericaceae*) a také v kůře kořenů stromů čeledi růžovitých (*Rosaceae*), jako jsou jabloně, hrušně či třešně. Biosyntéza floridzinu je znázorněna na Obrázku 1.



Obrázek 1 Biosyntéza flolidzinu

Flavonoidy jsou deriváty fenypropanu. Podle toho, kde je fenylová skupina na propanu navázána, rozlišujeme flavan, isoflavan a neoflavan. Nejčastěji se vyskytují deriváty flavanu, isoflavany jsou méně časté, neoflavany jsou celkem vzácné. Mezi nejvýznamnější flavonoidy patří rutin, hesperidin a kvercetinové glykosidy, jako je kvercetin, hyperosid nebo kvercitrin. Mezi další flavanony patří naringenin a eriodyktiol. Kvercetin a jeho rhamnosový glykosid kvercitrin se nacházejí v medvědice lékařské (*Arctostaphylos uva-ursi*) nebo v některých druzích dubu (*Quercus tinctoria*) a v plodech jabloní. Flavonony nepatří zrovna mezi majoritní složky rostlin. Nevyskytují se čteně v zelenině, na rozdíl od předchozích flavonoidů. Jsou přítomny hlavně v citrusových plodech a bývají nositeli hořké chuti například v grepu.

Flavonoidy se rozdělují na dvě podtřídy: anthoxantiny a anthokyany. Bývají hlavní složkou chuti, vůně a barvy. Vyskytují se v rostlinách na rozdílných částech, záleží na podmínkách pěstování, klimatu a zralosti. Anthokyany bývají zodpovědné za barvu rostlin v tmavších odstínech (např. fialová). Anthoxantiny naopak nemají chromofor tak silný, tudíž jejich zbarvení je spíše světlé, až do žluta. Jejich barva závisí na pH. Mezi anthoxantiny se řadí: flavonoly, flavony, flavan-3-oly, flavanony a isoflavonoidy. Flavonoly mají nejrozmanitější zastoupení v rostlinách, jsou to např. kvercetin, myricetin, morin a rutin. Mají na pozici uhlíku C3 hydroxylovou skupinu. Vyskytují se hlavně v cibuli, jablku a víně. Flavony na rozdíl od flavonolů postrádají hydroxylovou skupinu. Flavanolům chybí kyslík na pozici C4. Jsou nejčastěji konjugovány s kyselinou gallovou a vznikají galláty. Anthokyany patří mezi

nejvýznamnější rostlinná barviva, bývají ve formě glykosidů, stejně jako ostatní flavonoidy. Vyskytují se v drobném ovoci – např. borůvky, třešně.

Struktura fenolických kyselin obsahuje fenolický kruh a karboxylovou skupinu. Tyto kyseliny jsou účinné proti oxidaci LDL cholesterolu v lidském organismu. Zabraňují také šíření rakovinných buněk a to tak, že vytvoří komplex s karcinogenem, a tak již nemůže vstupovat do DNA a tvořit tak mutace při transkripci. Rozdělují se na deriváty kyseliny benzoové a deriváty kyseliny hydroxyskořicové. Ty tvoří zhruba polovinu fenolických látek v rostlinách. Výskyt derivátů kyseliny hydroxyskořicové je častější než u první skupiny fenolických kyselin, a to především v obilovinách, bramborách, luštěninách, ovoci, zelenině. Konjugací s kyselinou vinnou a chinovou vzniká kyselina chlorogenová, která je jedním z hlavních fenolů v jablkách [11] a její obsah souvisí s hnědnutím dužniny jablek.

Listy a pupeny černého rybízu mohou být jako zdroj bioaktivních látek ještě zajímavější než plody. Představují potenciální surovinu pro potravinářský průmysl jako potravinářská aditiva a doplňky, které by mohly mít význam jako nutraceutika [12, 13]. Bylo prokázáno, že listy černého rybízu obsahovaly více celkového obsahu fenolů, než jaký se nachází ve zralém ovoci, a že celkový obsah fenolů koreluje s antioxidační aktivitou [13]. Listy obsahují značné množství kaempferolu, kvercetinu a fenolových kyselin [14]. V pupenech byla prokázána přítomnost vybraných fenolových kyselin, flavan-3-olů, flavonolů a anthokyanů [15]. U jablek tvoří flavan-3-oly a prokyanidiny přibližně 70 % a odrážejí hlavní třídu jablečných fenolických látek. Je známo, že flavan-3-oly a prokyanidiny jsou redukovány v procesu zrání, což je podobné jako u jiných jablečných fenolických látek [16].

3.1.2 Stabilita

Množství fenolických sloučenin a jejich stabilita závisí na mnoha faktorech, mezi které patří agrotechnické procesy, klimatické podmínky, podmínky skladování po sklizni, zpracování a metody jejich tepelné úpravy. Svou roli hraje i stupeň zralosti plodů při sklizni. Fenolické látky mohou být však nestabilní a vysoce náchylné k degradaci a/nebo reakci s některými faktory, jako je kyslík, což může mít za následek změnu struktury a snížení biologické aktivity fenolů. Stabilita fenolických látek za různých podmínek je proto jedním z nejdůležitějších aspektů, který ovlivňuje pH, teplota, světlo, kyslík, enzymy, proteiny nebo interakce s jinými složkami potravy. Stabilita fenolických látek je zásadní pro nutriční hodnotu potravin a je

přímo spojena s jejich chemickou strukturou. Fenolické látky jsou v přítomnosti kyslíku náchylné k autooxidaci a tvoří se peroxidy a hydroperoxidy. Jejich antioxidační aktivita je spojena s jejich molekulární strukturou, zejména přítomností a počtem OH skupin, konjugací dvojných vazeb. Čím více OH skupin existuje ve struktuře fenolické látky, tím větší nestabilitu vykazují.

Podle studie autorů Award a kol. [17] byla testována stabilita flavonoidů s ohledem na technologie skladování, kde byly využity chlazený sklad a skladování s nízkou hladinou kyslíku (ultra low oxygen - ULO). Mezi odrůdami jablek skladovanými v podmínkách ULO a chlazeného skladu nebyly signifikantní rozdíly v koncentracích flavonoidů a kyseliny chlorogenové. Během skladování odrůdy 'Jonagold' (3, 6 a 8 měsíců) a 'Elstar' (2, 4 a 6 měsíců) po dobu 1 a 2 týdnů skladovatelnosti byly koncentrace kyanidin-3-galaktosidu a kvercetinových glykosidů relativně konstantní, zatímco koncentrace katechinů, floridzinu a kyseliny chlorogenové vykazovaly pouze malé změny. Byl zároveň proveden i pokus vystavení jablek bílému světlu, kdy došlo ke zvýšení koncentrací kyanidinu 3-galaktosidu, ale ne žádné z jiných tříd flavonoidů. Vysvětlením může být to, že syntéza různých tříd flavonoidů může mít různé charakteristiky spektrální citlivosti. Závěrem studie bylo, že flavonoidy přítomné v jablkách jsou stabilní a pravděpodobně nepodléhají metabolické přeměně během skladování. V naší studii byla sledována dlouhodobá stabilita fenolických látek v jablkách, a to konkrétně kyseliny chlorogenové, epikatechinu, rutinu, floridzinu a kvercitrinu s ohledem na technologii skladování. Oproti literatuře zde byly patrné rozdíly v jednotlivých sledovaných látkách, ale i v rámci skladování v různých podmínkách. Rutin, kvercitrin a floridzin byly po celou dobu skladování jak v podmínkách ULO, tak v chlazeném skladu stabilní, proti tomu kyselina chlorogenová a epikatechin vykazovaly do 3 měsíců nárůst, poté hodnoty klesaly. Mohlo jít zřejmě o metabolické přeměny v plodech při ustalování skladovacích podmínek ve skladu nebo odrůdové odlišnosti.

Obecně je známo, že ošetření potravin kromě svých účinků na skladovatelnost a nutriční vlastnosti potravin může zároveň také způsobit další reakce, včetně degradace přírodních fenolických sloučenin. Jelikož rostliny obsahují velké množství strukturně odlišných antioxidačních, antikarcinogenních a antimikrobiálních fenolických sloučenin, je zajímavé vědět, zda jsou tyto sloučeniny stabilní vůči teplu a vyššímu pH. Ukázalo se, že kyselina kávová, chlorogenová a gallová nejsou stabilní ve vysokém pH. Naproti tomu (-)-katechin,

(-)-epigalokatechin, kyselina ferulová, rutin a kyselina trans-cinamová odolávaly degradaci vyvolané změnami pH [18].

3.1.3 Antioxidační aktivita fenolických látek

Studie prokazují, že fenolické látky mají antioxidační vlastnosti [19]. Mezi chemickou strukturou a antioxidační aktivitou fenolických sloučenin bylo zjištěno několik vztahů. Antioxidační potenciál fenolických látek závisí na počtu a uspořádání hydroxylových skupin [20]. Chemické metody a instrumentace používané k měření antioxidační aktivity zaznamenaly v posledních několika letech významný pokrok. Dřívější metody měří účinnost antioxidantů proti tvorbě konkrétních druhů oxidačních produktů a jsou tedy většinou založeny na měření oxidace lipidů. Doposud byly různé chemické testy spojené s vysoce citlivými a automatizovanými detekčními technikami používány k vyhodnocení antioxidační aktivity speciálními metodami, jejichž principem byla antioxidační reakce s radikálem organického kationtu (ABTS metoda), antioxidační reakce s organickým radikálem (DPPH metoda), antioxidační reakce s komplexem Fe (III) iontů (FRAP metoda). Stanovení antioxidační aktivity pomocí vybraných metod jsou obecně spojeny s jejich schopností neutralizovat určité typy radikálů.

Chemické testy měřící antioxidační aktivitu jsou dostupné, rychlé a typicky automatizované a využívají se především při screeningu a prvotním hodnocení nových antioxidačních sloučenin nebo ovocných extraktů [21]. Co se týče metody s radikálem organického kationu (ABTS metoda) založené na eliminaci radikálů, je obecně metodou spočívající v hodnocení schopnosti vzorku vychytávat volné radikály, které mohou být v reakční směsi vytvářeny nebo jsou do reakční směsi aktivně přidávány. Z chemického hlediska jde o radikály kyslíkové nebo syntetické. Metoda využívající ABTS radikál je jednou z nejpoužívanějších metod pro stanovení celkové antioxidační aktivity TAA (total antioxidant activity). Testuje schopnost vzorku či látek zhaset kation-radikál $ABTS^{\bullet+}$ (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)). Je často označována jako metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), vzhledem k tomu, že výsledná antiradikálová aktivita vzorku je srovnávána s antiradikálovou aktivitou syntetické látky Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina). Antioxidační aktivita se sleduje spektrofotometricky při vlnové délce 734 nm.

Metoda využívající pro stanovení antioxidační aktivity DPPH radikál je považována za jednu ze základních metodik pro posouzení antiradikálové aktivity čistých látek i různých směsných vzorků. Princip spočívá v reakci testované látky se stabilním radikálem 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylem (DPPH). Při reakci dochází k redukci radikálu a jeho odbarvení za vzniku DPPH-H (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazinu). Reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky při vlnové délce 515 nm. U směsných vzorků je antiradikálová aktivita někdy vyjadřována v ekvivalentech kyseliny askorbové nebo v jednotkách standardu Troloxu. Další metodou pro hodnocení antioxidačních vlastností vzorků je metoda FRAP, založena na principu chemické redukce železitého komplexu (2,4,6-tripyridyl-s-triazin + Fe (III)) na modře zbarvenou železnatou formu. Jedná se tak o kolometrickou metodu stanovení antioxidační aktivity. Zvýšení absorpance při 593 nm odpovídající množství komplexu Fe (II) je mírou antioxidační aktivity vzorku. Tato metoda analyzuje redukční aktivitu biologických materiálů (např. plasmu), antioxidantů v potravinách a vodných roztoků čistých látek [22]. Existuje však jistá korelace mezi strukturou látek a jejich antioxidační aktivitou. Se zvyšujícím se počtem hydroxylových skupin se zvyšuje antioxidační aktivita [20, 23, 24].

V naší studii jsme antioxidační aktivitu hodnotili využitím metody na základě tzv. „Trolox equivalent antioxidant capacity assay“ (TEAC) v 96-jamkových mikrotitračních destičkách. Spočívá v reakci testované látky se stabilním radikálem difenylpikrylhydrazylem – DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl). Při reakci dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Zároveň v této studii byly porovnány antioxidační charakteristiky navíc i pomocí vybrané detekční techniky ve formě kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí CoulArray (CA) a porovnání získaných výsledků s detektorem diodového pole (DAD) a detektorem nabitého aerosolu (CAD). Z dosažených výsledků studie vyplynula korelace mezi CA detekcí a TEAC stanovením. Z běžně pěstovaných odrůd dosahovaly vyšších obsahů fenolických látek odrůdy 'Rubinola' a 'Reluga', ale odrůdy vyhodnocené pomocí CA detekce patřily i v této metodě k těm s vyšším obsahem antioxidačně aktivních látek. TEAC metoda je sice běžně používaná, ale nepřináší informace o složení jablečného extraktu, zatímco CA detekce ve spojení se separací kombinuje popis jak složení, tak aktivity těchto látek. Sama o sobě je ale nedostatečně citlivá a selektivní pro rozlišení jednotlivých látek a opět je potřeba zkombinovat její výsledky s další metodou detekce, např. spektrofotometrickou.

Z praktické stránky, metoda TEAC umožňuje nejrychlejší stanovení celkového obsahu bioaktivních látek, avšak je manuálně náročná a náchylná ke vzniku náhodných chyb. V porovnání s ní je metoda CoulArray detekce časově náročnější, ale vznik náhodných chyb při automatizovaném nástřiku extraktů je minimalizovaný. Metody DAD a CAD zaujímají samostatné postavení v analýze ovoce, z důvodu identifikace konkrétních obsahových látek. Výrazným omezením použití CAD detekce je její univerzální odpověď na obsah eluovaných látek ve stejném retenčním čase. CAD detekce vyžaduje pro analýzu vzorků s komplexní maticí jako jsou právě rostlinné/ovocné vzorky používání delších gradientů, aby došlo ke kompletní separaci i minoritních složek extraktů.

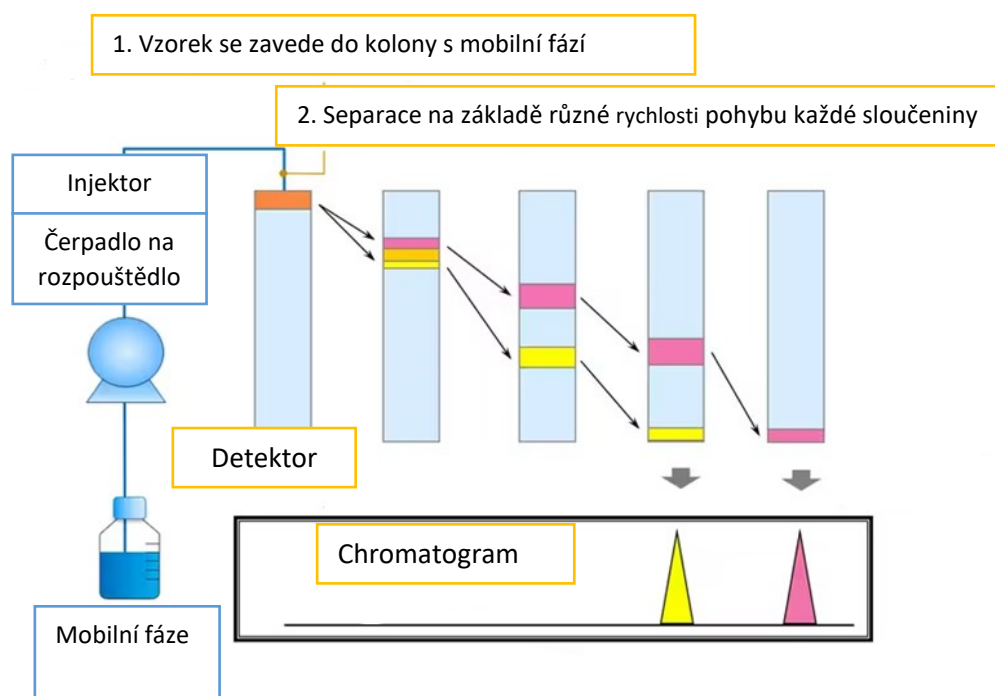
3.1.4 Metody identifikace a stanovení fenolických látek

Rostlinné extrakty obsahují různé typy bioaktivních sloučenin s různou polaritou, jejich separace stále zůstává velkou výzvou pro proces identifikace a charakterizace bioaktivních sloučenin. Fenolické látky vykazují redukční vlastnosti, proto jsou metody pro celkové stanovení těchto látek založeny na oxidačně-redukčních vlastnostech. Mezi nejběžněji používané metody pro stanovení celkového obsahu fenolických látek patří metody spektrofotometrické. Pro stanovení celkového obsahu fenolických látek je používaná metoda s využitím činidla Folin-Ciocalteua, dále metoda podle Price a Butlera (PBM), metoda s použitím aminoantipyrinu (AAPM) a metoda redukce měďnatých iontů (CUPRAC) [25].

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

3.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je důležitou analytickou metodou běžně používanou k separaci a kvantifikaci složek kapalných vzorků. Existuje několik způsobů kapalinové chromatografie v závislosti na typu použité stacionární a/nebo mobilní fáze. Metoda HPLC separuje a detekuje každou sloučeninu na základě rychlosti, kterou je eluována přes chromatografickou kolonu. Obrázek 2 ukazuje příklad HPLC separace.



Obrázek 2 Schematické znázornění příkladu chromatografické separace [26]

U metody vysokotlaké kapalinové chromatografie existují dvě fáze, jednak mobilní fáze, kapalina, která je unášena přes kolonu a vymývá cílovou sloučeninu. Stacionární fáze je část kolony, která interaguje s cílovou sloučeninou. Čím silnější je afinita (např. van der Waalsova síla) mezi analyzovanou složkou a mobilní fází, tím rychleji se složka pohybuje kolonou spolu s mobilní fází. Na druhou stranu, čím silnější je afinita ke stacionární fázi, tím pomaleji se pohybuje kolonou. Obrázek 2 ukazuje příklad, ve kterém má žlutá složka silnou afinitu k mobilní fázi a rychle se pohybuje kolonou, zatímco růžová složka má silnou afinitu ke stacionární fázi a prochází pomalu. V závislosti na složení mobilní fáze jsou obecně použitelné

dva různé režimy. Jestliže složení mobilní fáze zůstává během separačního procesu konstantní, jedná se o izokratickou eluci. Když se ale během separace mění složení mobilní fáze, je systém definován jako separace s gradientovou elucí. Použití a výběr vhodné chromatografické kolony je srdcem jakéhokoli HPLC systému. Je zodpovědná za odpovídající oddělení složek vzorku. Separační účinnost koreluje s vnitřním průměrem kolony, délkou kolony a typem a velikostí částic sorbentu. V závislosti na požadované aplikaci je v této době komerčně dostupných mnoho HPLC kolon. Různé stacionární fáze podporují různé separační mechanismy – běžné jsou materiály pro normální fázi, reverzní fázi, iontoměničovou, afinitní, chirální nebo hydrofilní interakční HPLC.

Cílem detekce je identifikovat retenční čas a množství látky, která je eluována z kolony. V současnosti je k dispozici řada detektorů v závislosti na struktuře analytu. Běžnými využívanými detekčními technikami jsou refraktometrické, UV/VIS, elektrochemické a fluorescenční detektory.

3.3 Rešerše metod pro stanovení vybraných fenolických látek

Dle prostudované odborné literatury je pro stanovení fenolických látek využíváno široké spektrum rozličných metod, lišící se zvolenými postupy úpravy vzorku, podmínkami separace a následné detekce.

V Tabulce 1 je možné srovnat podmínky jednotlivých separací uvedených v předešlých studiích, které se zabývaly separací obsahových látek v rostlinném materiálu (ovoce). Je zřejmé, že kolony s C18 sorbentem, jsou pro separaci fenolických látek velmi často využívány a délka kolony i separace pak odpovídá množství stanovovaných látek. Většinou jsou používány delší kolony, právě z důvodu velkého počtu obsahových látek. Detekce probíhala převážně pomocí spektrofotometrického detektoru při různých vlnových délkách. Jak je možné vidět v tabulce, lze tyto metody využít i u různých druhů ovoce.

Jako stacionární fáze byla ve všech studiích použita kolona se sorbentem C18. Poslední studie použila kolonu Kinetex® s povrchově porézními částicemi, která má menší délku (100 mm) a velikost částic (2,6 μm). Podle průměru kolony od 4 mm a výše a zároveň velikosti částic 5 μm lze usuzovat, že kromě poslední studie se jedná spíše o HPLC než UHPLC metody. Mobilní fáze byla ve většině případů okyselená voda kyselinou mravenčí nebo octovou o pH v rozmezí

2,8-3,1 společně s acetonitrilem, případně methanolem. Důvodem využití okyseleného pH bylo potlačení tvorby iontů při ionizaci, získání lepší symetrie píků a zvýšení účinnosti separace. Nejčastěji využívaným detektorem je DAD, a také se používá i hmotnostní spektrometr. Většina analýz trvá desítky minut v závislosti na počtu stanovovaných látek a typu detekce. V některých studiích byla pro přípravu vzorku využita ultrazvuková lázeň v procesu extrakce. Naproti tomu naše studie, ve které jsme vyvinuli metodu, trvající 17 min, s využitím kolony o délce 150 mm a optimalizované gradientové eluce jsme schopni dosáhnout účinné separace látek, které potřebujeme detekovat v analyzovaných vzorcích jablek v kratším čase.

Tabulka 1 Přehled chromatografických metod pro stanovení fenolických látek v jablkách a hruškách

Matrice	Stanovované látky	Použitá chromatografická kolona	Mobilní fáze	Detektor	Doba analýzy (min)	Použitá literatura
Jablka	kvercetin, epikatechin, prokyanidin B1, B2, C1, kys. p-kumarová, kys. transskořicová, dihydrát chloridzinu, kys. gallová, katechin, kys. chlorogenová, kys. ferulová, kys. kávová, rutin trihydrát, avikularin, kys. protokatechová, hyperosid, isokvercitrin, kvercitrin, prokyanidin A2, rejnoutrin	Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	A: H ₂ O + CH ₃ COOH (0,5%) B: CH ₃ OH gradientová eluce	DAD	160	[27]
Jablka	kys. p-hydroxybenzoová, eriodiktyol, kys. ferulová, kys. p-kumarová, kys. gallová, kvercetin, apigenin-7-glukosid, kys. chlorogenová, kys. syringová, kys. kávová, kys. rosmarinová, epikatechin, katechin, rutin, resveratrol, hesperidin, naringenin, luteolin, apigenin, akacetin	Agilent Eclipse XDB C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	A: H ₂ O + CH ₃ COOH (2%) B: CH ₃ OH gradientová eluce	DAD	50	[28]
Jablka	katechin, epikatechin, kvercetin-3-galaktosid, floridzin, prokyanidin B2, kys. chlorogenová a kys. kávová	Mightysil RP18 ODS (250 x 4,6 mm, 5 µm)	A: H ₂ O + HCOOH (2%) B: ACN + H ₂ O + HCOOH (2%) gradientová eluce	MS	50	[29]

Matrice	Stanovované látky	Použitá chromatografická kolona	Mobilní fáze	Detektor	Doba analýzy (min)	Použitá literatura
Jablka	kys. gallová, kys. protokatechová, katechin, epikatechin, floridzin, kys. p-kumarová, kys. kávová, kys. chlorogenová, rutin, prokyanidin B2, kvercetin hyperin, isokvercitrin, avikularin, kvercitrin, rejnoutrin	Nucleosil 120 C18 (250 x 4,6 mm, 3 µm)	A: H ₂ O + CH ₃ COOH (2%) B: CH ₃ OH gradientová eluce	DAD	75	[30]
Jablka	kvercetin-3-O-galaktosid, rutin, kvercitrin, floridzin, kys. chlorogenová, katechin, epikatechin, avikulin, kvercetin atd.	YMC-Pack ODS-A C18 (250 x 4,6, 5 µm)	A: HCOOH (2%) B: ACN gradientová eluce	PDA	60	[31]
Jablka	hyperosid, rutin, kvercitrin, floridzin, prokyanidin B1. B2, kys. chlorogenová, katechin, epikatechin, avikulin, isokvercitrin	YMC-Pack ODS-A C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	A: H ₂ O + CH ₃ COOH (2%) B: ACN gradientová eluce	PDA	55	[32]
Jablka	epikatechin, rutin, kys. chlorogenová, floridzin, kys. kávová, kys. ferulová, kys. p-kumarová	100-5 HD EC Nucleosil C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	A: H ₂ O + H ₃ PO ₄ B: ACN izokratická eluce, start 95:5 (v/v) A:B, konec 70:30 (v/v) A:B	UV-VIS	50	[33]
Jablka	katechin, epikatechin, prokyanidin B2, kys. kávová, kys. chlorogenová, floridzin, kvercetin, kvercitrin atd.	Xterra C18 (100 x 3,9 mm, 5 µm)	A: H ₂ O + HCOOH (2%) B: CH ₃ OH gradientová eluce	DAD	70	[34]

Matrice	Stanovované látky	Použitá chromatografická kolona	Mobilní fáze	Detektor	Doba analýzy (min)	Použitá literatura
Jablka	katechin, kyselina chlorogenová, procyanidin B2, kyselina p-kumaroylchinová, epikatechin, feruloylglukoza, p-kumaroylglukoza, hyperin, isokvercitrin, rutin, avicularin, floridzin, kvercitrin	Nova-Pac C18 (30 x 3,9 mm, 5 µm)	A: H ₂ O + CH ₃ COOH B: H ₂ O + ACN + CH ₃ COOH gradientová eluce	DAD	80	[35]
Jablka	kys. chlorogenová, kys. ferulová, kys. p-kumarová, kys. kávová, kys. skořicová, kvercetin, rutin, floridzin, floretin	Luna-C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	A: H ₂ O + CH ₃ COOH B: methanol gradientová eluce	DAD	40	[36]
Jablka	kys. gallová, katechin, kys. 4-hydroxybenzoová, kys. kávová, kys. syringová, vanilin, kys. ferulová, floroglucinol, kys. benzoová, kys. salicylová, floridzin, kvercetin, floretin, kys. skořicová	Thermo Scientific Acclaim 120, C18 (150 x 3,0 mm, 3 µm)	A: ACN B: H ₂ O + CH ₃ COOH (pH 2,6) gradientová eluce	DAD	30	[37]
Jablka, hrušky	procyanidin B1, B2, katechin, kyselina chlorogenová, kyselina kávová, epikatechin, rutin, glykosidy kvercetinu, xyloglukosid floretinu, floridzin	Nucleosil 120 C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	A: H ₂ O + 0,01 M H ₃ PO ₄ B: ACN gradientová eluce	DAD	25	[38]

Matrice	Stanovované látky	Použitá chromatografická kolona	Mobilní fáze	Detektor	Doba analýzy (min)	Použitá literatura
Jablka, hrušky	arbutin, kys. gallová, 5-hydroxymethylfurfural, procyanidin B1, B2, 4-hydroxybenzoová kys. katechin, kys. chlorogenová, kys. kávová, kys. syringová, epikatechin, kys. p-kumarová, kys. ferulová, kys. sinapová, floridzin, floretin, kvercetin, kys. skořicová	Aqua C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) + předkolona C18 ODS (4 x 3,0 mm)	A: H ₂ O + CH ₃ COOH B: H ₂ O + CH ₃ COOH (0,05%) + ACN gradientová eluce	MS	60	[39]
Jablka, hrušky	kys. chlorogenová, kys. gallová, rutin, hyperozid, hirsutrin, floridzin, arbutin, kvercitrin	LiChrospher® 100 C18 (250 x 4 mm, 5 µm)	A: H ₂ O + HCOOH (1%) B: ACN gradientová eluce	DAD	25	[40]
Hrušky	kys. nechlorogenová, kys. chlorogenová, katechin, rutin, epikatechin, hyperozid, hirsutrin, kyanidín-3-O-galaktozid, peonidin-3-O-galaktozid, izorhamnetin	LiChrospher® 100 C18 (150 x 3,2 mm, 5 µm)	A: H ₂ O + HCOOH (2%) B: ACN gradientová eluce	DAD	52	[41]
Hrušky	arbutin, rutin, kys. gallová, kys. chlorogenová, kys. vanilová, kys. p-kumarová, kys. ferulová, kys. ursolová, kys. oleanolová, katechin, epikatechin	Kromasil® 100 C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	A: H ₂ O + CH ₃ COOH (0,5%) B: ACN gradientová eluce	DAD	86	[42]

Matrice	Stanovované látky	Použitá chromatografická kolona	Mobilní fáze	Detektor	Doba analýzy (min)	Použitá literatura
Hrušky	arbutin, rutin, epikatechin, katechin, kys. chlorogenová, kys. gallová, kys. vanilová, kys. p-kumarová, ky. ferulová, ky. oleanolová, kys. ursolová	Kromasil® 100 C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm)	A: H ₂ O + CH ₃ COOH (0,5%) B: HCOOH (1%) + ACN gradientová eluce	DAD	86	[43]
Hrušky	kys. chlorogenová, kys. kaftarová, kys. kávová, kys. p-kumarová, kys. ferulová, kys. kryptochlorogenová, kys. gentisová, kys. ellagová, kys. 4-hydroxybenzoová, kys. gallová, kys. homovanilová, kys. sinapová, kys. nechlorogenová, kys. protokatechová, apigenin, arbutin, epikatechin, katechin, kuromanin, kyanidin, kyanidin-3-rutinosid, fisetin, epigallokatechin, etylgallát, morin, izorhamnetin, kaempferol, piceid, myricetin, prokyanidin B1, rutin, hyperozid, hirsutrin, kvercitrin, t-resveratrol, taxifolin, tyrozol	Kinetex® 100 C18, (100 × 4,6 mm, 2,6 μm)	A: H ₂ O + HCOOH (0,1%) B: methanol gradientová eluce	DAD	35	[44]

3.4 Metody přípravy vzorku pro stanovení fenolických látek

Příprava vzorku k analýze závisí na typu vzorku (tuhý vs. kapalný vzorek) a povaze stanovovaných analytů, kdy významnou roli při volbě postupu přípravy vzorku mají fyzikálně chemické vlastnosti sloučenin, stabilita a náchylnost k degradaci. Dalšími aspekty, které ovlivňují zpracování vzorku, jsou zvolené separační, detekční podmínky, selektivita vs. výtěžnost použité metody přípravy vzorku. Cílem přípravy vzorku je zachovat v extraktu cílové analyty a odstranit složky matrice.

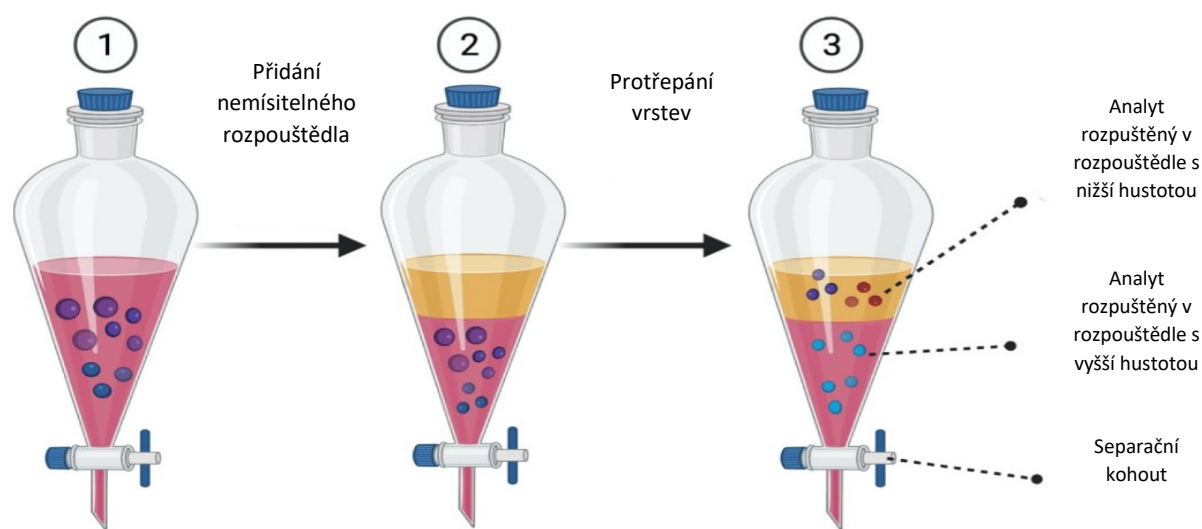
Obecně jsou fenolické sloučeniny považovány za polární až středně polární sloučeniny, které jsou náchylné k degradaci po vystavení záření, oxidaci a zvýšené teplotě. Jejich extrakce z rostlinného materiálu může být náročná kvůli polaritě matrice a přítomnosti sloučenin s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Pro extrakci fenolických sloučenin jsou používány jednak konvenční, tak šetrné nekonvenční extrakční přístupy. Mezi nejčastější konvenční postupy přípravy vzorku patří macerace a Soxhletova extrakce, které se stále běžně používají v mnoha laboratořích, i přes jejich několik nevýhod, včetně dlouhé doby extrakce, spotřeby rozpouštědla a možné degradace sledovaných analytů [45].

Extrakt z ovoce představují matrici s vysokou enzymatickou aktivitou, a proto je třeba zajistit správný postup extrakce pro co nejvyšší výtěžnost cílových analytů. Použité podmínky přípravy vzorku by proto měly být co nejšetrnější, aby se zabránilo oxidaci, tepelné degradaci a dalším chemickým a biochemickým změnám ve vzorku/extraktu. Postup přípravy vzorku bude vždy záviset na povaze cílových analytů a matrici (druh ovoce, části ovoce, způsob provedení extrakce, odpadní materiál...). V dostupné literatuře bylo například prokázáno, že při extrakci pomerančové kůry methanolem, která probíhala pod zpětným chladičem, následně s odpařením do sucha a rozpuštěním v dimethylformamidu, byl extrakt bohatý na flavony a glykosylované flavanony, zatímco extrakt připravený zásaditou hydrolýzou NaOH obsahoval převážně fenolové kyseliny a flavonoly [46].

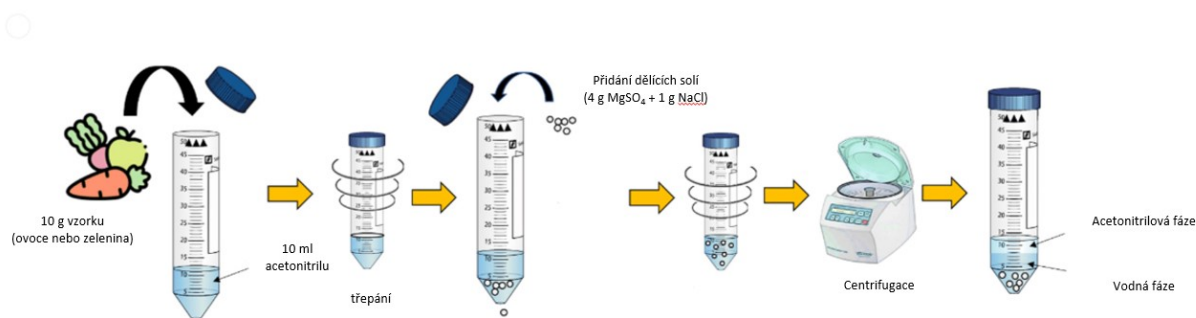
Nejjednoduššími úpravami vzorku před samotnou analýzou je zředění a filtrace. Čiré šťávy v ideálním případě vyžadují minimální přípravu vzorku kromě centrifugace a/nebo filtrace. Ve studii Pearsona [47] byla pro analýzu jablečné šťávy použita filtrace přes polytetrafluorethylenové filtry. Byly identifikovány a zároveň stanoveny fenolické sloučeniny pomocí HPLC při charakteristických vlnových délkách jako 316 nm (hydroxycinnamáty),

520 nm (antokyany), 280 nm (flavan-3 -oly) a 365 nm (flavonoly). Kolektiv Guyota [48] analyzoval jablka, která před přípravou vzorku ošetřil 3% roztokem kyseliny mravenčí, aby se zabránilo oxidaci vzorku. Vzorky dužniny pak byly zmrazeny, lyofilizovány a extrahovány hexanem, aby se odstranily lipidy, karotenoidy a chlorofyl. Cukry, organické kyseliny a fenoly s nízkou molekulovou hmotností byly poté extrahovány methanolem a polymerizované fenoly byly získány ze zbytku extrakcí vodným acetonem. Suchý methanolvý extrakt a suché acetonové extrakty byly analyzovány pomocí HPLC s reverzní fází spojenou s detektorem diodového pole po thiolýze, aby bylo možné kvantifikovat fenolické sloučeniny jako deriváty kyseliny hydroxyskořicové, flavan-3-oly, flavonoly a dihydrochalkony. Fenolické látky, které v získaných extraktech převládaly, byly identifikovány jako prokyanidiny.

Nejrozšířenějšími z extrakčních metod jsou extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) a extrakce na tuhou fázi (SPE). Schéma extrakčních procesů je znázorněno na Obrázku 3. Jedná se o rutinně nejvíce používané metody. Výhodami LLE je jednoduchost provedení a nenáročnost vybavení. Značně nevýhodnou vlastností je vysoká spotřeba vzorku i extrakčních činidel. Díky této nevýhodě jsou proto stále častěji využívány SPE metody, které snižují spotřebu činidel, umožňují větší přečištění vzorku, zakoncentrování analytu a umožňují automatizaci. Tento způsob extrakce je však finančně i časově náročnější než LLE. Příprava vzorku pomocí metody QuEChERS (příklad SPE přípravy) je zdokumentován na Obrázku 4.



Obrázek 3 Schéma procesů při LLE extrakcích [49]



Obrázek 4 Příklad procedury QuEChERS (SPE příprava vzorku) pro stanovení pesticidů [50]

Trendem při vývoji extrakčních postupů je snížení objemu analyzovaného vzorku i extrakčních činidel a zkrácení času nutného pro úpravu vzorku. Jedná se o metody založené na LLE – extrakce do jedné kapky rozpouštědla, extrakce pomocí dutého vlákna a disperzní LLE mikroextrakce [51]. Příkladem jsou také SPE metody extrakce pomocí plněných špiček pipet nebo mikroextrakce pomocí plněné stříkačky (MEPS), časově náročnější mikroextrakce na tuhou fázi (SPME) nebo sorpční extrakce pomocí míchadla.

Mikroextrakce na tuhé fázi (SPME) je technika, která se široce používá jako metoda přípravy vzorku pro plynovou chromatografii (GC). Méně se používá pro kapalinovou chromatografii (HPLC), a tedy její použití při analýze fenolických sloučenin v ovoci je z hlediska dostupné literatury méně popsáno. Dále stěžuje odběr vzorku nerovnoměrné rozložení fenolických sloučenin v částech plodů/rostlin.

Během několika posledních let byly preferovány nekonvenční přístupy umožňující aplikaci ekologicky šetrných rozpouštědel, zkrácení doby extrakce, snížení spotřeby rozpouštědla a nízkou spotřebu energie. Jedná se o extrakci s využitím ultrazvukové lázně, extrakce superkritickou tekutinou v různých modifikacích (SFE), včetně extrakce plynem expandovanou kapalinou a extrakce za zvýšeného tlaku.

Ultrazvuková extrakce je jednoduchý přístup, který se často používá pro extrakci polárních sloučenin z ovocných matric. Tento postup se vyznačuje dostatečnou extrakční účinností. Použité polární rozpouštědlo je vybráno s ohledem na rozpustnost sloučeniny, zatímco čas extrakce je potřeba optimalizovat. Mezi výhody moderních přístupů můžeme uvést

efektivnost, malé množství vzorku a rozpouštědla, zkrácení doby extrakce, jednoduchost instrumentace a jednoduché ovládání. Tyto metody přípravy vzorku jsou běžně používány při stanovení sekundárních metabolitů jako jsou flavonoidy, alkaloidy a fenolové kyseliny. Extrakčním činidlem je nadkritická tekutina. Její předností je nízká viskozita a vysoká difuzivita, což umožňuje rychlou a účinnou extrakci analytů. SFE je metoda ekologická, plně automatizovatelná a vhodná pro extrakci tepelně nestabilních sloučenin. Významně se tento typ extrakce uplatňuje při izolaci bioaktivních látek různé polariry (např. u fenolických látek) z rostlinné matrice.

Mezi další možnosti přípravy vzorku patří mikrovlnná extrakce. Principem této metody je, že vlivem mikrovlnného záření dochází ke zvýšení teploty a tlaku, teplo je absorbováno molekulami rozpouštědla na základě jejich dielektrické konstanty, a dochází k difuzi analytů z matrice do finálního extraktu. Výhodami této metody přípravy vzorku je především efektivnost, rychlost a vyšší výtěžnost. Využití této metody je hlavně v oblasti analýz těkavých a netěkavých látek. Degradace nestabilních látek při vysoké teplotě může být limitujícím faktorem pro rozhodnutí využít tuto metodu pro přípravu vzorku. Obecně lze této metody využít pro přípravu vzorku ke stanovení flavonoidů, fenolických kyselin, silic, alkaloidů, saponinů, kovů, ale i pesticidů.

3.5 Přístupy pro chromatografickou analýzu fenolických látek

Množství a rozmanitost fenolických látek a extraktů z různých druhů rostlinné matrice vyžaduje různé přístupy k jejich separaci a identifikaci. Proto tradiční spektrofotometrické metody byly v mnoha případech nahrazeny chromatografickými analýzami s detektory s vysokým rozlišením, aby poskytly profily a jednoznačnou identifikaci jednotlivých fenolických látek. Dalšími metodami, které jsou využívány k separaci fenolických sloučenin jsou kapilární zónová elektroforéza (CZE) a micelární elektrokinetická kapilární chromatografie. Většina těchto separací používá pufrů o pH 8,0 – 10,5, které jsou vhodné pro většinu fenolů, ale nejsou vhodné pro antokyany citlivé na změny pH.

Ve studii Costy a kol. [52], kde byla řešena otázka stability antokyanů, bylo potvrzeno, že jedním z hlavních faktorů, které ovlivňují stabilitu těchto pigmentů, je jejich chemická struktura, pH a teplota. Byly stanovovány antokyany kyanidin 3-glucosid, kyanidin 3-rutinosid,

delphinidin- 3-glucosid a delphinidin 3-rutinosid ve šťávě z černého rybízu metodou kapilární zónové elektroforézy. Podmínky separace byly testovány při standardním pH pro antokyany, což bylo pH 8, s tím, že byla prokázána vyšší senzitivita pro cílové analyty (cyanidin 3-glukosid, cyanidin 3-rutinosid a delphinidin 3-glukosid s použitím pH 1,5 při koncentraci 25 mg/ml, zatímco při pH 8 došlo k separaci minoritích píků, ale při vyšší koncentraci 4 mg/ml. Spektrofotometrická detekce probíhala při vlnové délce 520 nm.

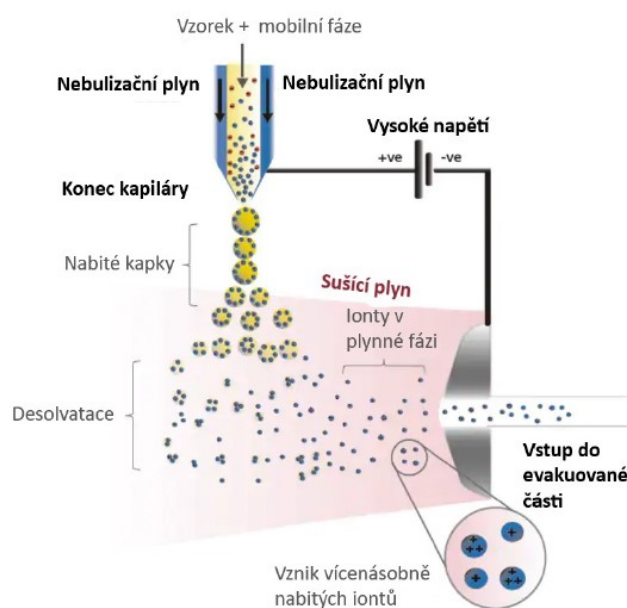
Pro fenolické látky, identifikované a stanovené plynovou chromatografií (GC) je někdy v přípravě vzorku nutný derivatizační krok. Soleas a kol. [53] použili derivatizační činidlo bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid/pyridin (BSTFA/pyridin) pro analýzu 15 biologicky aktivních látek (kyselina vanilová, kyselina gentisová, kyselina m- a p-kumarová, kyselina gallová, kyselina ferulová, kyselina kávová, cis- a trans-resveratrol, epikatechin, katechin, morin, kvercetin a cis- a trans-polydatin) ve víně pomocí GC-MS. Metoda GC-MS společně s účinnou separací 15 fenolických sloučenin by měla být vhodná pro stanovení fenolických látek v řadě druhů ovoce, problémem může být stabilita těchto látek při vyšší teplotě separace.

Využití HPLC s reverzní stacionární fází se vyhýbá nutnosti derivatizace jako tomu bylo u GC-MS/MS a je univerzální metodou pro tyto účely z hlediska úspory rozpouštědel a dalších výhod, včetně stability analyzovaných látek.

Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (LC-MS) je v současnosti stále častěji používanější analytickou metodou, jejíž aplikovatelnost je velmi široká. Výhodou spojení je možnost současně separovat a identifikovat složitější směsi látek (komplikované matrice), přičemž se využívá vysoké účinnosti separace a selektivity HPLC/UHPLC techniky a citlivosti hmotnostního spektrometru. Pro metodu LC/MS byly vyvinuty ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku (elektrosprej ESI a APCI), kdy se mobilní fáze přímo účastní ionizačního procesu. Ionizace elektrosprejem neboli ESI technika se používá především pro silně polární látky, APCI pro méně polární látky a pro nepolární látky se běžně používá fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) [54]. Hmotnostním analyzátozem bývá trojitý kvadrupól, iontová past nebo analyzátor doby letu. Důležitý je také výběr mobilní fáze, která má vliv na tvorbu iontů. Jako mobilní fáze se často používá methanol/voda, acetonitril/voda nebo kombinace obou organických rozpouštědel methanol/acetonitril/voda. Veškerá aditiva do mobilní fáze musí být těkavá a měla by se přidat v co nejnižší koncentraci, aby nedošlo

k potlačení intenzity signálu. Z kyselin se nejčastěji používají kyselina mravenčí, octová či trifluoroctová, z pufrů to jsou mravenčan amonný nebo octan amonný.

Metoda LC-MS, respektive LC-MS/MS, se využívá pro vysoce selektivní ultrastopovou kvantitativní analýzu komplexních matic, zejména v potravinářství, farmacii, toxikologii nebo ekologii. Pomocí této techniky je možné analyzovat především netěkavé polární látky s velmi složitou strukturou, např. fenolické sloučeniny, pesticidy. Princip ionizace elektrosprejem u LC-MS techniky je znázorněn na Obrázku 5.



Obrázek 5 Schematické znázornění procesu a princip ionizace elektrosprejem [55]

3.6 Vývoj HPLC metody pro separaci fenolických látek v ovoci

Současný výzkum fenolických látek v ovoci probíhá ve třech hlavních oblastech, které mají vliv na výběr přípravy vzorku a důležitost připisovanou tomuto kroku v celkové analýze. Jednou z nich je identifikace nových sloučenin, jejich rozmanitost a četnost při využití moderních citlivých analytických detekčních technik. Druhý pohled se týká pochopení úlohy fenolických látek jako sekundárních metabolitů v rostlině. Za třetí, existuje zájem o jejich antioxidační vlastnosti, jako alternativy k syntetickým antioxidantům v potravinářském průmyslu a jako složky lidské stravy. Makronutrienty, jako jsou sacharidy, bílkoviny a mastné kyseliny, jsou

pravidelně kvantifikovány, protože přímo ovlivňují kvalitu hotového produktu. Jako mikroživiny se fenolické látky při zpracování nepovažují za tak důležité (a to navzdory skutečnosti, že v mnoha případech je změna kvality potravin spojena s oxidačními reakcemi obsahových fenolických látek, např. při „hnědnutí“). Současný trend směrem ke zvýšení informovanosti spotřebitelů a poptávce po potravinách se zdravím prospěšnými látkami (takzvané „funkční potraviny“) však může vést k tomu, že kvantifikace fenolických látek bude stále důležitější.

Značnou komplikací při separaci fenolických látek jsou složité matrice ovoce, jedná se především o další obsahové látky např. polysacharidy, fytoosteroly, proteiny, vitamíny, stopové prvky a mnoho dalších látek. Také zastoupení fenolických látek je závislé na druhu ovoce a na jeho rozložení ve slupce a dužnině. V jablečné slupce je oproti dužnině poměrně vysoké množství fenolů. Z důvodu širokého spektra polarit fenolických látek je obtížné vyvinout účinnou gradientovou eluci a dosáhnout dostatečné separace všech fenolických analytů. Jelikož většina fenolických látek je aromatická a dobře rozpustná ve vodě, využívá se reverzní stacionární fáze (C18) a polární mobilní fáze [56, 57].

Další komplikací představuje strukturní podobnost fenolických látek a také jejich konjugace s různými typy cukrů. Z tohoto důvodu je nutná vysoká chromatografická selektivita a rozlišení, pro zlepšení separace se využívá úprava pH mobilní fáze a různý profil gradientu. Problém může také vzniknout při koeluci různých skupin fenolických látek.

Velmi důležitým krokem optimalizace analytické metody je nalezení vhodných podmínek pro separaci a kvantifikaci cílových analytů, v tomto případě fenolických látek. V této práci byla nejprve vyvíjena metoda pro 10 hlavních obsahových látek: kyselina gallová, chlorogenová a kávová, katechin, epikatechin, rutin, kvercitrin, kvercetin, floretin a floridzin. Při porovnání složení extraktů z jablek byl seznam sledovaných analytů zredukován na kyselinu gallovou, kyselinu chlorogenovou, epikatechin, rutin, kvercitrin, floridzin a floretin.

Převážná část experimentální práce byla zaměřena na optimalizaci podmínek analýzy, jako výběr vhodné chromatografické kolony, optimální průběh gradientové eluce, složení mobilní fáze, byly optimalizovány chromatografické parametry, jako průtok, teplota termostatu kolony a množství nastříkovaného vzorku.

Cílem výběru vhodné stacionární fáze a chromatografické kolony pro naše účely byla separační účinnost pro zájmové analyty, tvar píku a odezva detektoru. Co se týče běžných kolon C 18 s povrchově porézními částicemi, které jsou využívány běžně pro tyto aplikace, byla odezva detektoru vyšší, pro vybrané látky byla zřetelná dobrá symetrie píků, docházelo však ke koeluci kyseliny chlorogenové a katechinu, ostatní látky byly dobře separovány. Oproti monolitickým kolonám, které umožňují vyšší průtok, který sice vedl k urychlení analýzy, došlo ke koeluci katechinu, kyseliny chlorogenové a kyseliny kávové. Zároveň došlo ke snížení odezvy detektoru, tvary píků nebyly symetrické ani dostatečně štíhlé a měly tendenci chvostovat. Při použití core – shell kolony s amidovou reverzní fází nedošlo k separaci kyseliny gallové z mrtvého objemu kolony, nicméně došlo k nejlepší separaci ostatních testovaných fenolických látek. Byly také vybrány a optimalizovány 4 vlnové délky pro detekci zájmových fenolických látek v reálných vzorcích jablek. Na základě proměření absorpčních maxim byly pro jednotlivé fenolické látky vybrány finální vlnové délky pro jejich detekci ve vzorcích (255, 280, 320 a 365 nm).

3.7 Trendy v analýze fenolických látek

Současný vývoj metod založených na principu kapalinové chromatografie spočívá ve zrychlení separací se zachováním nebo zlepšením jejich selektivity a účinnosti. V problematice zrychlení separace dominuje UHPLC (ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie), využívající zkrácení kolon a zúžení jejich vnitřního průměru, snížení velikosti/průměru částic chromatografického sorbentu pod 2 μm , což ale s sebou přináší zvýšení zpětného tlaku v systému na hodnotu 100 MPa, a s tím spojené instrumentální limitace. Tento směr výzkumu a vývoje se dokázal prosadit až po zavedení přístroje UHPLC typu. Na druhou stranu je nevýhodou vyšší pořizovací cena přístroje a užší výběr mechanicky stabilních stacionárních fází.

Další možností, jak ovlivnit parametry separace, je zvýšení teploty separace, použití monolitických či povrchově porézních SF, zvýšení průtoku MF, využití miniaturizace LC uspořádání, případně použití superkritické fluidní chromatografie. Tyto trendy jsou v současné době považovány za směry rychlé chromatografie, jinými slovy „Fast LC“ [58].

Novými trendy v oblasti kapalinové chromatografie, které ale nemají vliv na urychlení analýzy a využití je především v oblasti separace velmi komplexních směsí, které dosahují velmi vysokých separačních účinností, jsou dvoudimenzionální kapalinová chromatografie (2D-LC) a miniaturizované techniky (kapilární a nano-LC).

Využití ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC)

Principem této metody je využití částic stacionární fáze menších než 2 μm pro zvýšení účinnosti separace. Systémy UHPLC pracují za ultra-vysokých tlaků obvykle okolo 100 MPa, oproti standardním HPLC technikám, které pracují při tlacích 30-40 MPa. Jedním z klíčových aspektů pro realizaci rychlé a účinné separace pomocí UHPLC je kvalita a stabilita stacionární fáze. Důraz při vývoji stacionárních fází byl kladen na vysokou chemickou stabilitu, vysokou mechanickou stabilitu a zavedení modifikací pro získání odlišné selektivity. V této době jsou dostupné stacionární fáze pro UHPLC s velikostí částic od 1,5 – 2 μm . Základem stacionární fáze je nejčastěji silikagel (modifikovaný) nebo hybridní materiál. Kromě kolon s celkově porézními částicemi menšími než 2 μm lze používat také povrchově porézní částice. Ve studii Kirklanda [59] bylo zjištěno, že ve srovnání s podobnými kolonami plněnými plně porézními sorbenty a kolon s povrchově porézními částicemi byla prokázána vyšší separační účinnost povrchově porézních sorbentů pro separaci makromolekul s vyšší molekulovou hmotností.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie při zvýšené teplotě (HTLC)

Teplota je klíčovou proměnnou kapalinové chromatografie, která ovlivňuje rychlost eluce analytů a viskozitu mobilní fáze. Tento trend v kapalinové chromatografii je nedávnou novinkou, jelikož byl brán větší zřetel na úpravu mobilní fáze pro zvýšení selektivity separace. Této techniky bylo využíváno až po vývoji stabilnějších stacionárních fází, které jsou odolnější k vyšším teplotám v termostatovaném kolonovém prostoru. Výhodou této metody je využití mobilních fází s nižší eluční silou, tzn. čistých vodných fází oproti využití organických rozpouštědel. Tím je možné při vyšších teplotách provádět separace s čistě vodnou mobilní fází (čistá voda o teplotě mezi 100-250 $^{\circ}\text{C}$), což přináší mnoho výhod ve srovnání s použitím mobilních fází na bázi organiky. Výhodou této metody je především cena analýzy, nulová toxicita z hlediska vyprodukovaného odpadu, ekologie a v neposlední řadě i zdraví analytika.

Proto tento směr chromatografie patří mezi tzv. „green chromatography“, nebo-li mezi trendy zelené chromatografie [58].

Zájem o zelenou analytickou chemii roste. Principy zelené chemie můžou být aplikovány v jednotlivých krocích analytického procesu. Ať už v počátku v přípravě vzorku k analýze až po finální stanovení studovaných látek.

Ve studii Baranowske [60] jsou popsány aplikace této techniky pro stanovení kardiovaskulárních léčiv a jejich metabolitů. Zde byla tato techniky využita jako prostředek ke snížení zpětného tlaku, zkrácení doby separace a zvýšení účinnosti separace. HTLC je výkonný nástroj pro změnu chromatografické selektivity, zvýšení rychlosti analýzy (separace v řádu několika málo minut) a zvýšení maximální kapacity pro analýzu komplexních vzorků.

Monolitické kolony

Ačkoli vývoj monolitických kolon započal již před 20 lety, tyto fáze nebyly široce používány pro stanovení fenolických látek. Monolitické kolony nabízejí výhodu mnohem nižšího průtokového odporu díky vyšší poréznosti. V některých ohledech lze proto monolitické kolony považovat za alternativní přístup k UHPLC. Nicméně, stejně jako v případě UHPLC, jsou monolitické kolony nejčastěji používány pro účely získání rychlejších separací ve srovnání s konvenční HPLC [61]. To je možné díky vysoké porositě monolitických kolon, která umožňuje použití vysokých průtoků až 10 ml/min. Nevýhodami monolitických kolon je výběr materiálu stacionárních fází. Komerčně dostupné monolitické stacionární fáze jsou většinou vyrobeny ze silikagelu (modifikovaného), který ale značně omezuje jejich chemickou stabilitu, termální stabilitu a z toho plynoucí oblast aplikací. Výsledky našeho výzkumu, popsaného v publikaci Sklenářové a kol. [62], byly založeny na testování částicové kolony, „core-shell“ a monolitické kolony pro optimalizaci podmínek stanovení fenolických sloučenin v jablkách. Výsledkem studie bylo výrazné zkrácení doby analýzy z 12 na 5 min při průtoku MF 4 ml/min a na 6 min, při průtoku 2 ml/min doprovázené ale větší spotřebou mobilní fáze, která se u separace pomocí monolitických kolon oproti core-shell kolonám zvýšila z 12 ml na 20 ml.

Superkritická fluidní chromatografie

Tato technika kolonové chromatografie využívá mobilní fázi v nadkritickém stavu. Umožňuje rychlejší separaci v porovnání s HPLC díky nižší viskozitě mobilní fáze a vyšším difúzním koeficientům v nadkritické fázi, která je o 1–2 řády vyšší než v kapalinách. Zvýšení účinnosti separace je způsobeno rychlejším ustálením rovnováhy mezi stacionární a mobilní fází. Další výhodou je možnost zvýšení citlivosti pomocí použití GC detektorů (FID, ECD) v porovnání s UV/VIS detekcí. Využití této metody je především ve farmaceutickém průmyslu. Tím, že jsou dosahovány kratší doby analýzy ve srovnání s HPLC je tato technika ideální pro stanovení malých molekul v léčivech a pro účinné chirální separace, kdy je k separaci enantiomerů využito dalších fyzikálních rozdílů. Často je pak dosaženo stejné nebo lepší separace enantiomerů za kratší čas a s nižší spotřebou organických rozpouštědel.

3.8 Skladovací technologie a jejich využití

Péče o sklizenou produkci má trvale vzestupnou úroveň v souladu s potřebami společenské poptávky. Skladování ovoce se opírá o přesné řízení teploty, optimální vzdušnou vlhkost a složení okolní atmosféry. Řízená atmosféra neboli ULO, uplatňovaná při chladírenském skladování již od počátku komerčního skladování, která byla původně zamýšlena jen na jádrové ovoce, zejména odrůdy jablek a hrušek, se nyní zavádí i pro méně tradiční komodity jako jsou třešně, švestky, broskve. Využití dalších moderních typů skladování s ohledem na prodloužení trvanlivosti ovoce a zároveň dostupnosti ovoce po celý rok je v této době aktuální téma. Proto bylo úkolem porovnat tyto technologie napříč odrůdami jabloní s tím, že výsledkem našeho výzkumu byla selekce odrůd se zachovaným vysokým obsahem zdraví prospěšných látek pro dlouhodobé skladování.

Důležitou otázkou je také bezpečnost potravin a vliv aplikace přípravků na ochranu rostlin (POR) na finální obsahy reziduí pesticidů. V tomto případě byl naším záměrem experiment, kde jsme využili technologie skladování pro zjištění degradace vybraných účinných látek POR v peckovinách, konkrétně třešních, meruňkách a slivoních.

3.8.1 Speciální obaly s modifikovanou atmosférou pro vybrané druhy ovoce

Využití skladování ovoce ve speciálních obalech selektivně propustných pro plyny v modifikované atmosféře (Modified atmosphere packaging – MAP) má velký potenciál při

prodlužování životnosti plodů po sklizni. Vlastnosti obalu zpomalují proces zrání a stárnutí skladovaného ovoce a udržují jeho pevnost. Také redukuje úbytek hmotnosti a zároveň si skladované plody zachovávají svoji chuť, nutriční hodnotu a čerstvý vzhled i po dlouhodobém skladování. Na Obrázku 6 je ukázka skladovaných plodů třešní v obalech s modifikovanou atmosférou. U jablek, stejně jako u jiných druhů ovoce, je variabilita fenolického profilu ovlivněna kultivarem, fází zrání, vegetačním obdobím, faktory prostředí, geografickou oblastí, zpracováním a podmínkami skladování [63-65]. Některé fenolické sloučeniny jako kyselina chlorogenová, p-kumaroylchinová, kvercetin, epikatechin a floridzin jsou stabilní a díky nim se ani antioxidační aktivita během skladování ovoce výrazně nemění [66].



Obrázek 6 Ukázka skladování plodů třešní v MAP obalech pro třešně s modifikovanou atmosférou

3.8.2 Skladování s využitím účinné látky 1-methylcyklopropen

Posklizňové ošetření tímto přípravkem je založeno na jednorázové aplikaci účinné látky 1-methylcyklopropenu (1-MCP), který účinně inhibuje ethylen, čímž je zabráněno rychlému dozrávání plodů. Přípravek na bázi 1-MCP je aplikován rozptýlením pomocí difuzéru v plynotěsně uzavřených prostorách ULO boxu. Slupka jabloní ošetřená 1-MCP se podle naší studie vyznačovala vyšším obsahem fenolových kyselin a flavonolů než neošetřené ovoce, zejména po 20 týdnech skladování v kombinaci s podmínkami ULO. Účinek 1-MCP na antioxidační aktivitu ve slupce ovoce byl mírný, avšak může nastat situace, že jablka neošetřená 1-MCP mohou mít nižší antioxidační aktivitu, zvláště když jsou přepravována za normálních podmínek skladování v chladu [67]. Koncentrace 1-MCP, které byly využity pro náš výzkum pro degradaci reziduí pesticidů v peckovinách byly následovné: třešně: 0,00158 g/m³; meruňky 0,06, g/m³ a švestky 0,037 g/m³. Tento typ posklizňového ošetření neměl tak efektivní vliv na degradaci vybraných účinných látek (acetamiprid, fludioxonil) oproti ozonu nebo skladování v modifikované atmosféře (MAP), a tím bylo zajištěno působení aktivních látek v ovoci po delší dobu [68] při dodržení doporučeného aplikačního plánu testovaných postřiků a zároveň nepřekročení maximálních povolených limitů.

3.8.3 Skladování v podmínkách atmosféry s nízkou hladinou kyslíku

Skladování s využitím technologie a podmínek s nízkou hladinou kyslíku, ultra-low oxygen (ULO), přináší výrazné prodloužení uchovatelnosti ovoce. Podmínky této technologie skladování jsou obvykle 2 % O₂ a 1 % CO₂, teplota 1,2 – 1,6 °C a relativní vlhkost vzduchu 99 %. Uchování plodů v podmínkách ULO maximalizuje jejich skladovatelnost bez velké ztráty na kvalitě ovoce. Podmínkou je rychlý transport ovoce do ULO boxů, uzavření boxů a vytvoření ULO atmosféry s optimálním poměrem teploty a koncentrací O₂ a CO₂. V optimálních podmínkách ULO atmosféry je dlouhodobě omezen proces dýchání, čímž jsou minimalizovány i ztráty na hmotnosti plodů. Řízená atmosféra snižuje ztráty chlorofylu, karotenoidů, antokyanů a fenolických sloučenin.

Tento typ technologie skladování udržuje potřebnou kvalitu ovoce a poskytuje spotřebitelům čerstvé plody se zachováním zdravích prospěšných látek [69]. Hlavními znaky ovlivňujícími chuťovou kvalitu skladovaného ovoce jsou pevnost dužniny, změna poměru cukru a kyselin (sladkost) a přeměna zelené barvy (žloutnutí) [70]. Využití tohoto typu skladování vede u jablek k výraznému prodloužení skladovatelnosti a umožnění dodávek kvalitního ovoce na

trh během celého roku, a tak ovlivňuje ekonomiku pěstování jablek. Odrůdy jabloní vhodné pro tento typ skladování jsou 'Golden Delicious', 'Idared', 'Jonagold' a jeho mutace, 'Gala', 'Angold' a 'Topaz'. Což potvrzuje i náš výzkum vlivu skladování na uchování zdraví prospěných látek, konkrétně fenolických látek, kde u odrůd 'Golden Delicious', 'Angold' a 'Gala' byly po 7 měsících skladování v ULO podmínkách zachovány tyto látky v poměrně vysokých koncentracích. Ukázka ULO skladovacích boxů je na Obrázku 7. Skladování hrušek v řízené atmosféře prodlužuje významně jejich skladovatelnost při zachování kvality a omezení ztrát [71] za předpokladu sklizně zdravých plodů v optimální zralosti [72, 73]. Pro skladování hrušek v řízené atmosféře je doporučován poměr plynů O_2 (2–2,5 %) : CO_2 (0,8–1 %).



Obrázek 7 Ukázka výzkumných ULO boxů pro skladování ovoce

3.8.4 Skladování s využitím ozonu

Použití ozonu při skladování ovoce vede ke snížení aktivity povrchové mikroflóry na sklizených a skladovaných plodech. To následně vede k prodloužení uchovatelnosti a k zachování jejich organoleptických vlastností. Koncentrace ozonu použitelná pro peckoviny je nastavena na 0,4 ppm u meruněk a slivoní, a 0,2 ppm u třešní po dobu 8 hodin. Po uplynutí této doby je ozonizovaná atmosféra vyvětrána, následně je skladovací kontejner opět uzavřen a skladování dále pokračuje v běžné atmosféře. Dostupná literatura uvádí, že rezidua pesticidů zůstávají nezměněná nebo se velmi pomalu rozkládají během skladování ovoce v chlazeném skladu s využitím ozonu. Hlavním a důležitým faktorem je zde teplota skladování a struktura pesticidu, protože obsah sloučenin s nízkou stabilitou a vysokou těkavostí je ovlivněn

teplotou. V jedné ze studií byl sledován poločas rozpadu reziduí u jablek a citronů a tento poločas byl u skladovaných plodin při nízké teplotě průměrně desetkrát vyšší než u čerstvých plodin skladovaných při laboratorní teplotě [74, 75]. Skladovací teplota je kritickým faktorem ovlivňujícím stabilitu reziduí pesticidů. Degradace pesticidů je mimo jiné dána klimatickými podmínkami prostředí. Mezi další důležité faktory patří podmínky skladování a vlhkost prostředí. Degradace reziduí též závisí na povaze a chemické struktuře použitých pesticidů.

3.9 Vzorkování

Správně provedený odběr vzorku je základní podmínkou pro úspěšné provedení všech zkoušek, počínaje přípravou vzorku k analýze, provedení chemické analýzy a získání spolehlivých výsledků měření. Oproti tomu nesprávně provedený odběr může mít za následek zkreslení či úplné znehodnocení výsledků analýzy. Je nutné mít také na paměti výběr vhodného obalu pro odběr a uchování vzorku. Otázkou výběru materiálu pro transport a uchování do doby přípravy vzorku, jeho velikost, popř. dále pro skladování, je nutné zvážit individuálně podle povahy a typu odebíraného vzorku [76].

Při odběru vzorků rostlinného materiálu je potřeba dbát určitých pravidel. Je třeba zajistit, aby byl vzorek dostatečně reprezentativní, důležitá je velikost vzorku, počet jednotlivých dílčích vzorků. Při odběru vzorků ovoce se odebírá z různých částí ovocného stromu, konkrétně z osvětlených, neosvětlených míst koruny a probíhá i odběr z částí u kmene stromu. Vzorky nesmí být poškozeny, s výskytem hniloby nebo jinak degradovány. Aby byl vzorek reprezentativní, odebírá se daný počet jednotlivých plodů, v případě jablek bylo odebíráno na vzorek cca 1 kg (10–15 plodů) dle velikosti.

Nejen vzorkování, ale také klimatické podmínky v dané sezóně ovlivňují obsah bioaktivních látek v ovoci, proto je žádoucí pro výzkum a získání dostatečného množství dat k vyhodnocení výsledků provádět studie po delší dobu, resp. výsledky z jednotlivých let porovnat. Mezi hlavní vlivy, které ovlivňují kvalitu odebíraného vzorku jsou především počet slunečných dní, teplota, množství srážek, vlhkost a samozřejmě má vliv sezona, která souvisí již s nasadou květů na začátku vegetačního období.

V případě odběru vzorků pro stanovení pesticidů je pravidlem, že vzorky nesmí být z nějakého důvodu znehodnoceny ať už hnilobným procesem, nebo poškozeny (popadané plody). Je

nezbytné, aby vzorky bezprostředně po odběru byly až do doby analýzy uchovány v chladničce nebo v mrazáku, aby nedocházelo k degradaci reziduí pesticidů, a tak k ovlivnění výsledků [77].

3.9.1 Odběr vzorků pro studium fenolických látek v čerstvých plodech

Vzorek pro chemickou analýzu fenolických látek byl v našem případě složen z 10–15 jablek a byl odebrán z osvětlených a neosvětlených míst koruny a u kmene stromu 5 označených stromů v optimální sklizňové zralosti 10 kultivarů jabloní vypěstovaných v experimentální výsadbě VÝZKUMNÉHO A ŠLECHTITELSKÉHO ÚSTAVU OVOCNÁŘSKÉHO HOLOVOUSY s.r.o. Rané odrůdy jako 'Rubín' a UEB 32 642 byly odebrány koncem září. Středně rané odrůdy, zároveň komerční odrůdy jako 'Gala', 'Golden Delicious' a 'Angold' byly sklizeny v období mezi koncem září a začátkem října. Pozdnější odrůdy 'Rucla' a 'Meteor' začátkem října. Testované odrůdy jako 'Rucla', 'Meteor', 'Fragrance', běžně prodávané 'Lady Silvia' a 'Angold' jsou odrůdy vyšlechtěné přímo ve VÝZKUMNÉM A ŠLECHTITELSKÉM ÚSTAVU OVOCNÁŘSKÉM V HOLOVOUSÍCH s.r.o.

3.9.2 Odběr vzorků pro výzkum obsahu fenolických látek v průběhu skladování

Zároveň při odběru vzorků pro analýzu obsahových látek v čerstvých plodech byl proveden test skladovacích podmínek, který zahrnoval rozdělení vzorků jablek (10–15 ks) pro různé skladovací technologie. Jednotlivé vzorky byly uloženy do chladicího boxu, ze kterého byly v průběhu 3, 5 a 7 měsíců vyskladňovány a analyzovány. Zároveň byl tento pokus proveden i u skladování v podmínkách ULO ve stejných časových intervalech. Jablka byla skladována v 15 kg boxech v následujících podmínkách chlazeného skladu (1,2–1,6 °C, vlhkost 87–91 %) a ULO (< 2 % O₂ + < 1 % CO₂ v dusíku, 1,5–2,0 °C, vlhkost 99 %). Po třech, pěti a sedmi měsících byly odebrány vzorky pouze z plodů, které nevykazovaly žádné známky poškození, a poté byly homogenizovány a byla provedena chemická analýza cílových analytů. Vzhledem ke skutečnosti, že se jednalo o rostlinný materiál vykazovaly některé plody odrůd 'Rucla', 'Golden Delicious' a 'Fragrance' známky hniloby, některé plody 'Gala', 'Lady Silvia' a UEB 32 642 vykazovaly při skladování po dobu pěti měsíců v chlazeném skladu vysokou ztrátou vody. U odrůdy 'Nicoleta' byly po pěti měsících v obou typech skladování nalezeny plody s vysokým výskytem hniloby a tato odrůda proto nebyla dále analyzována.

3.9.3 Odběr vzorků pro studium degradace reziduí v plodech třešní

Při testování obsahu reziduí pesticidů byly sklizeny plody třešně odrůdy 'Tamara' v pokusné výsadbě ve VÝZKUMNÉM A ŠLECHTITELSKÉM ÚSTAVU OVOCNÁŘSKÉM V HOLOVOUSÍCH. Po ní pokusy a aplikace přípravků na ochranu rostlin se sledovanými účinnými látkami byly prováděny v sadu na 5-letých stromech pěstovaných ve tvaru 4,5 × 1,5 m ve stylu vysokého větene. U každé varianty skladovacího pokusu byly plody třešní sesbírány do 15 kg boxů z 15–18 stromů pro zachování homogenity a reprezentativnosti jednotlivých vzorků. Vzorky plodů, které byly určeny pro analýzu reziduí pesticidů v čerstvých plodech, byly vypeckovány a uchovány v mrazáku při teplotě -20 °C do doby analýzy. V případě skladovacích pokusů byly sesbírané plody rozděleny do čtyř částí. První část vzorků byla umístěna do plastových boxů v MAP sáčcích, druhá část byla před skladováním ošetřena účinnou látkou 1-MCP a třetí část byla ošetřena ozonem. Ukázka rozdělení skladovacího pokusu s ozonem je vidět z Obrázku 8. Veškeré ovoce zahrnuté v těchto třech ošetřeních bylo skladováno při teplotě 1,2–1,6 °C. Čtvrtá část vzorku byla uložena v ULO boxech v atmosféře obsahující 2 % O₂ a 1 % CO₂ při teplotě 1,5–2 °C a vlhkosti 99 %. Pátou variantou byly plody, které byly kontrolní neošetřenu variantou, a byly skladovány v plastových boxech umístěných v ULO boxu. Skladovací pokusy byly nastaveny tak, že plody byly vyjmuty po době skladování 14 a 28 dnů a následně byla provedena chemická analýza na rezidua pesticidů. Běžná doba skladování odrůdy 'Tamara' je uváděna v chlazeném skladu 14 dní. Při použití skladování v MCP obalech se běžná doba skladování prodlužuje až na 30 dnů nebo i více v závislosti na odrůdě třešní.



Obrázek 8 Ukázka vzorků třešní rozdělených na skladovací pokus s ozonem

Posklizňové ošetření účinnou látkou 1-MCP zahrnovalo jednorázovou aplikaci, která účinně inhibovala produkci ethylenu, a tak zabránila dozrávání plodů. Přípravek obsahující 1,58 mg/m³ byl první den po skladování aplikován pomocí difuzéru v plynotěsně uzavřeném prostoru ULO boxu. Doba expozice byla 24 hodin, po které byla atmosféra odvětrána. Poté byl skladovací kontejner znovu utěsněn a skladování pokračovalo v normální atmosféře po dobu 14 a 28 dní.

V případě použití posklizňového ošetření ozonem se jednalo o jednorázovou aplikaci koncentrace ozonu 0,2 ppm po dobu 8 hodin. Poté byla atmosféra také vyvětrána, skladovací kontejner byl znovu uzavřen a skladování pokračovalo v normální atmosféře. Skladovací sáčky s modifikovanou atmosférou (MAP) speciálně určené pro třešně je způsob balení, při kterém je atmosférický vzduch v sáčku nahrazen modifikovanou atmosférou, obvykle oxidem uhličitým. Tento obal zpomaluje proces dozrávání a dýchání klimakterických plodů a snižuje ztrátu hmotnosti. Takto skladované třešně si přirozeně zachovávají chuť, nutriční hodnoty a svěží vzhled i po dlouhodobém skladování.

3.10 Pesticidy a jejich využití v ovocnářství

Pesticidy jsou přípravky určené převážně k tlumení chorob rostlin a hubení plevelů a živočišných škůdců pěstovaných plodin. Nejčastěji jsou pesticidy užívány v zemědělství. Pesticidních přípravků s obsahem účinných látek je na českém trhu k dispozici poměrně široké spektrum a rozdělují se podle druhu hubení určitého organismu (fungicidy, herbicidy, insekticidy...), způsobu aplikace (postřiky, zálivka...), podle původu, způsobu působení a chemické povahy. Tyto přípravky jsou pro použití v ČR vždy definovány pro konkrétní plodinu včetně způsobu použití, indikace a dávkování. Nicméně v oblasti ovocnářství se neustále portfolio přípravků na ochranu rostlin snižuje a je poměrně omezené.

Výskyt zbytkových množství (reziduí) pesticidů může vykazovat toxické účinky nejen proti škodlivým činitelům, ale může mít negativní dopad i na necílové organismy. Pesticidy jsou tedy potenciálně toxické pro člověka, zvířata a životní prostředí. Je samozřejmostí, že při aplikaci pesticidů dochází ke vstupu cizorodých látek do životního prostředí, ale je v zájmu nejen v ovocnářství tyto vstupy minimalizovat.

Rizika pesticidů pro zdraví člověka můžeme posuzovat ze dvou pohledů. Zaprvé se jedná o hodnocení jejich akutní toxicity a zadruhé jejich reziduální (chronické) toxicity. Rizika akutní toxicity pesticidů se týkají převážně osob, kteří provádějí jejich aplikaci nebo s pesticidy přímo pracují. Rizika reziduální toxicity pesticidů se týkají konzumentů potravin.

Pesticidy a jejich rezidua patří do širokého spektra látek, které mohou kontaminovat potraviny. Rezidua pesticidů jsou zbytky účinných látek přípravků aplikovaných proti škodlivým činitelům. Tyto látky mohou být v některých případech přítomny v rostlině po aplikaci přípravků až do sklizně. Z toxikologického hlediska vzbuzuje obavy skutečnost, že v potravinách, včetně ovoce, se můžeme setkat s výskytem reziduí několika různých účinných látek pocházejících z aplikovaných přípravků, přičemž každá z nich je pod hladinou povoleného limitu. Výskyt reziduí může být i výsledkem kontaminace životního prostředí dnes již nepoužívanými a zakázanými pesticidy. V takových případech nelze vyloučit aditivní toxické, případně i synergické působení obsahových účinných látek.

Pro zajištění zdravotní nezávadnosti zemědělských produktů jsou v EU pro každý přípravek (účinnou látku přípravku) a komoditu stanoveny zákonné limity reziduí pesticidů, tzv. maximální limity reziduí (MLR) v potravinách a krmivech nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 396/2005. MLR je nejvyšší přípustné, toxikologicky přijatelné množství pesticidů v potravinách a potravinových surovinách, které se vyjadřuje v jednotkách mg/kg definovaného produktu. MLR respektuje použití pesticidních přípravků v souladu se správnou zemědělskou praxí, při ochraně rostlin během vegetace a skladování. Předpokládá se, že při dodržování správné zemědělské praxe, zejména doporučených dávek a koncentrací přípravků a ochranné lhůty před sklizní stanovené pro přípravek a komoditu, by výskyt reziduí v produktu měl během této doby poklesnout na přijatelnou úroveň, tedy pod hodnotu maximálního limitu reziduí (MLR).

Legislativní rámec týkající se reziduí pesticidů je založen na dodržování aplikačních dávek a koncentrací přípravků povolených pro danou komoditu, dodržování stanovených ochranných lhůt a na hodnocení výskytu reziduí pesticidů v rostlině nebo sklízeném produktu v době sklizně nebo v době konzumace finální potraviny. Ochranná lhůta (OL) představuje čas od poslední aplikace pesticidního přípravku po dobu sklizně, která je vždy uváděna pro přípravek a konkrétní plodinu.

V produkci ovoce jsou ve stále širší míře uplatňovány nové moderní způsoby vedoucí k prodloužení skladování a posklizňové úpravy ovoce. Trend prodloužení skladovatelnosti plodů se prakticky týká všech druhů ovoce, hlavně jádrového ovoce a peckového (vyšší realizační cena, dostupnost na trhu i mimo jeho hlavní sezónu). V případě posklizňové ochrany a prodloužení skladování a snížení výskytu skládkových chorob se jedná např. o využití ošetření systémem blokace účinku etylenu látkou 1-MCP (1-metylcyklopropen), skladování v kontrolované atmosféře ULO, využití ošetření v ozónové atmosféře, využití skladování ve speciálních pro plyny selektivně propustných obalech s modifikovanou atmosférou (MAP = Modified Atmosphere Packaging), třídění ve vodě dosycené ozónem aj.

Podle dříve publikovaných studií jsou rezidua pesticidů v potravinách ovlivněna skladováním, manipulací a zpracováním, ke kterým dochází mezi sklizní čerstvého ovoce a jejich spotřebou. Chování reziduí během skladování a zpracování lze racionalizovat z hlediska fyzikálně-chemických vlastností pesticidů a povahy zpracování či uchování. Například posklizňová úprava ozonem měla vliv na degradaci vybraných pesticidů [57, 78-80]. Nejdůležitějším faktorem byla teplota skladování, která ovlivňuje kinetiku chemických reakcí. Průměrný poločas rozkladu pesticidů v jablkách a citronech byl desetkrát delší při skladování při nízké teplotě ve srovnání s pokojovou teplotou, jak je publikováno v dostupné literatuře [35, 74, 75, 81, 82].

4 Komentář k přiloženým publikacím

4.1 Determination of major phenolic compounds in apples: Part I— Optimization of high-performance liquid chromatography separation with diode array detection (Příloha 1)

Cílem a tématem první experimentální práce, zároveň i začátek mého výzkumu, bylo vyvinout a validovat krátkou časově nenáročnou separační metodu, a to s ohledem na dobu analýzy, spotřebu mobilní fáze a dostatečně účinnou separaci fenolických látek ve velkém počtu analyzovaných vzorků odrůd jablek.

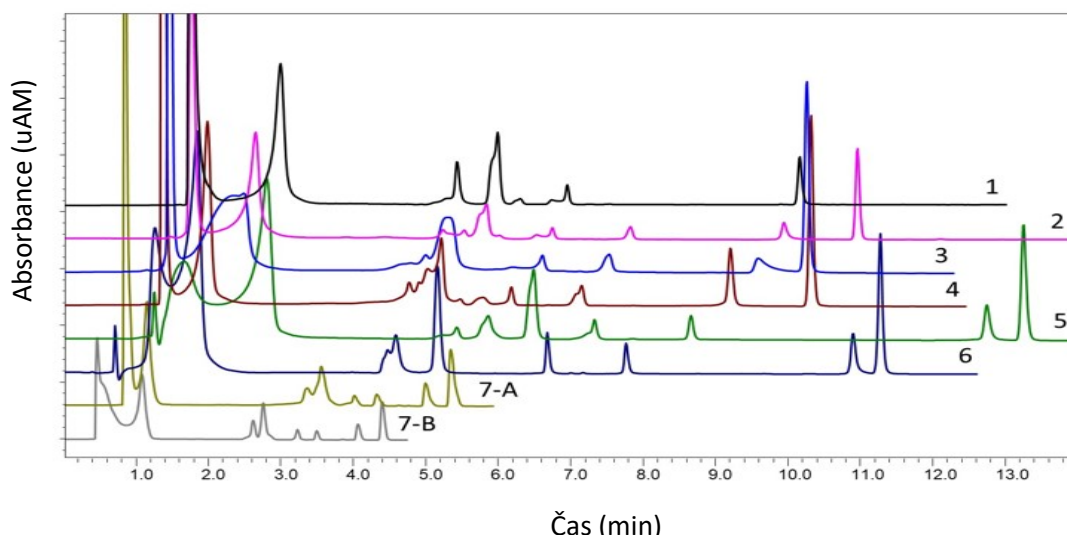
Tento experiment byl především zaměřen na optimalizaci separačních podmínek sedmi hlavních fenolických sloučenin (kyselina gallová, kyselina chlorogenová, epikatechin, kvercitrin, rutin, floridzin a floretin) přítomných v plodech jabloní.

Na začátku práce byla provedena podrobná rešerše s tematikou separace fenolických látek v ovoci. Z dostupné literatury bylo zjištěno, že stacionární fáze použité pro tyto účely jsou převážně C18 a je zde vidět trend v použití kratších kolon s menšími průměry a menšími částicemi sorbentu. Doba analýzy odpovídala počtu separovaných analytů a délce kolony a pohybovala se od 20 až do 85 minut. Výběr našich testovaných fenolických sloučenin v jablečných extraktech byl proveden na základě již publikované práce, ve které byl popsán význam a stanovení hlavních fenolických sloučenin v jablečných extraktech s ohledem na vybrané technologie skladování [83]. Na tuto studii navazovala druhá část experimentu, která byla zaměřena na zhodnocení vlivu dlouhodobého skladování na obsah vybraných fenolických látek [84].

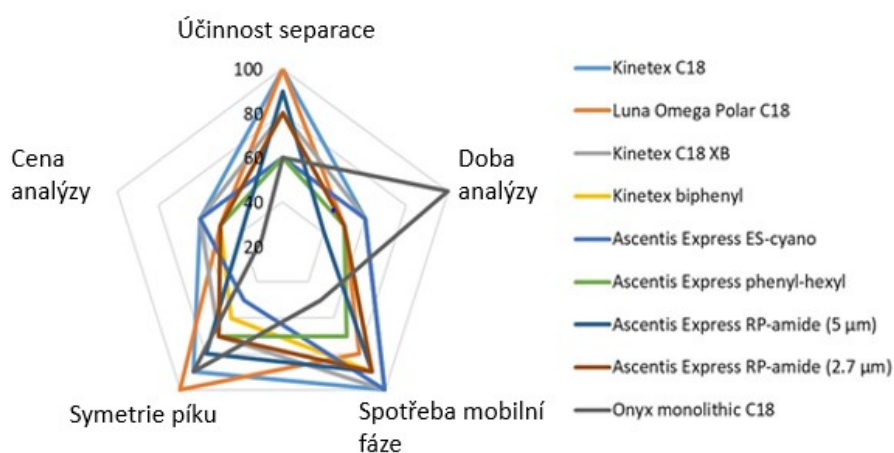
Hlavní optimalizační kroky, které byly zásadní pro vývoj rutinní metody, zahrnovaly porovnání účinnosti chromatografických kolon při separaci fenolických látek. Během optimalizace byly studovány a optimalizovány i další parametry včetně průtoku, objemu nástřiku, teploty kolony a nastavení detekce. Objem nástřiku vzorku 10 μ l se osvědčil jako optimální z důvodu zajištění dostatečné citlivosti i pro analyty přítomné na nižších koncentračních hladinách. Dále byl testován profil gradientové eluce pro separaci analytů, které jsou eluovány blízko mrtvého objemu systému a pH vodné složky mobilní fáze s vlivem na retenci analytů. Jako optimální se

jevil poměr 95 % vodné složky v mobilní fázi na začátku gradientu. Toto procento (na rozdíl od čistě vodné mobilní fáze) také umožnilo prodloužit životnost kolony, což je důležitá vlastnost v případě dlouhých sérií vzorků.

V rámci porovnání kolon byly testovány tyto stacionární fáze – C18, bifenyl, fenylhexyl, RP-amid a ES-kyano kolony. Do této studie byly také zahrnuty monolitické C 18, kolony s povrchově porézními částicemi a kolony s modifikací pro separaci polárních látek. Koeluze kyseliny chlorogenové a katechinu, stejně jako problematické rozlišení kyseliny gallové a píku mrtvého objemu systému, byly pozorovány u kolon se sorbenty C18, bifenylové, fenylhexylové, RP-amidové a ES-kyano kolony. Nejlepší separace všech analytů kromě výše zmíněné koeluze bylo dosaženo s RP-amidovými kolonami. Překryvné chromatogramy směsných standardů u jednotlivých testovaných kolon jsou znázorněny na Obrázku 9. Porovnání parametrů analýzy je znázorněno na Obrázku 10.

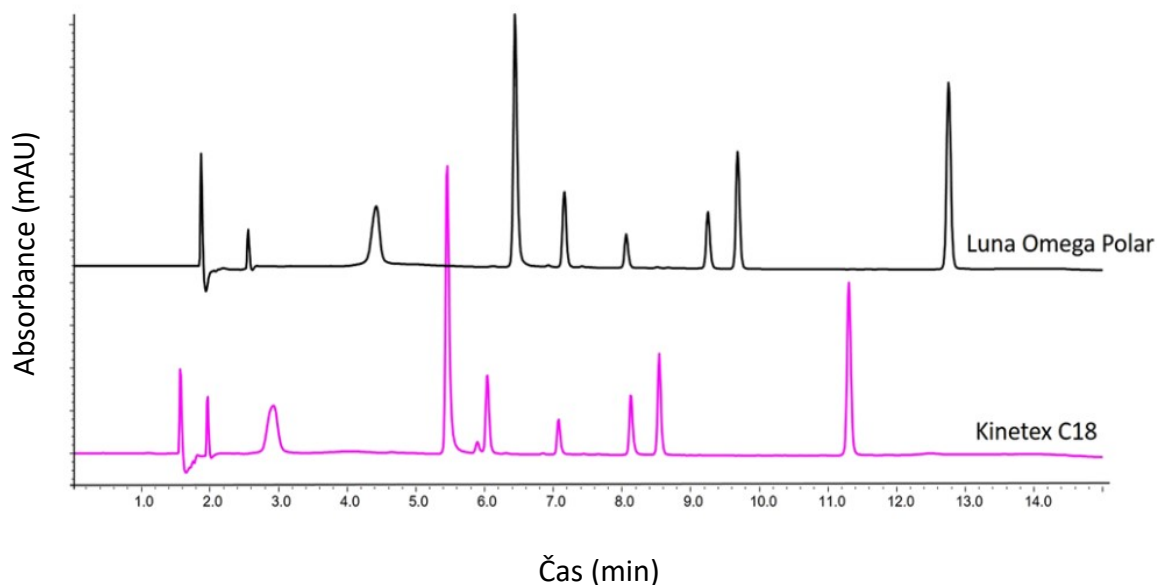


Obrázek 9 Separace směsi standardů s využitím jednotlivých testovaných kolon, podmínky: průtok 1 ml/min, objem nástřiku 10 μ l, teplota 30 $^{\circ}$ C, detekce při 280 nm: (1) XB-C18 (150 x 4,6 mm, 5 μ m); (2) bifenyl (150 x 4,6 mm, 5 μ m); (3) ES-kyano (100 x 4,6 mm, 5 μ m); (4) fenyl-hexyl (100 x 4,6 mm, 5 μ m); (5) RP-amid (100 x 4,6 mm, 5 μ m); (6) RP-amid (100 x 3,0 mm, 2,7 μ m); a monolitické kolony (100 x 4,6 mm): (7-A) průtok 2 ml/min; (7-B) průtok 4 ml/min



Obrázek 10 Porovnání účinnosti separace, doby analýzy, spotřeby mobilní fáze, symetrie píku a nákladů na analýzu

Kolona s povrchově porézními částicemi Luna Omega C18 Polar modifikovaná pro separaci polárních látek byla zvolena jako optimální, stejně tak jako gradientový profil, začínající na 95 % vodné složky mobilní fáze. Při těchto podmínkách se mírně prodloužila doba analýzy, ale došlo k lepší symetrii píků a rozlišení stanovovaných analytů, mírně se snížila opakovatelnost plochy píku. Porovnání separace je znázorněno na Obrázku 11. Separace pomocí kolon naplněných povrchově porézními částicemi vykazovaly mírně snížené rozlišení analytů, ale stále dostatečné pro účely stanovení fenolických látek. Ostatní validační parametry (výtěžnost, linearita, test vhodnosti systému, opakovatelnost) byly srovnatelné pro kolonu Kinetex C18 i pro kolonu Luna Omega C18 Polar. Porovnání řady kolon naplněných různými stacionárními fázemi potvrdilo, že sorbenty C18 byly nejúčinnější pro separaci všech testovaných fenolických látek.



Obrázek 11 Separace roztoku směšného standardu pomocí kolony Luna Omega Polar s povrchově porézními částicemi a core-shell Kinetex C18 (obě $150 \times 4,6$ mm, $5 \mu\text{m}$). Podmínky: mobilní fáze A: voda (pH 2,8 upravené kyselinou octovou), B: acetonitril; průtok 1 ml/min, objem nástřiku 10 μl , teplota 30 °C, detekce při 280 nm; pořadí eluce: kyselina gallová, kyselina chlorogenová, epikatechin, rutin, kvercitrin, floridzin a floretin

Vyvinutá HPLC metoda se může jevit jako podobná dřívějším publikacím s ohledem na využití sorbentů C18 a gradientů mobilní fáze složené z acetonitrilu a vodné složky okyselené kyselinou octovou, nicméně doba analýzy byla v porovnání s ostatními pracemi kratší a to konkrétně 18 min včetně ekvilibrace. Doba analýzy, uvedená v ostatních publikacích, byla za podobných podmínek separace v rozmezí 25–80 min a to s ohledem na počet stanovovaných látek. Náš přístup byl však založen na optimalizaci gradientových profilů s ohledem na počet a typ nejvíce zastoupených fenolických látek v daném materiálu. Doba analýzy by teoreticky mohla být ještě zkrácena díky použití kolon naplněných moderními stacionárními fázemi (sub-2 mikrometrových a povrchově porézními částicemi), ale pravděpodobně na úkor kratší životnosti kolon při analýze velkých sérií vzorků.

Metoda byla vyvinuta pro účely stanovení obsahu fenolických látek v jablečných extraktech, ale lze ji zároveň použít i pro separaci fenolických sloučenin v ovoci s podobným složením. Aplikace a využití vyvinuté metody bylo uplatněné pro stanovení obsahu fenolických sloučenin

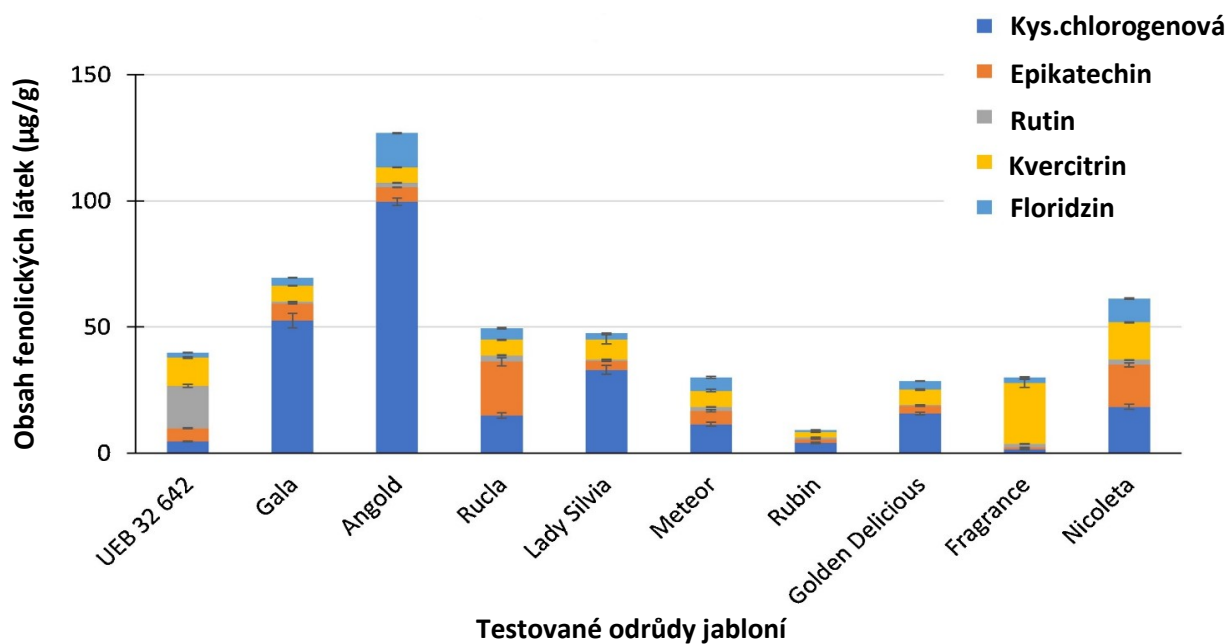
pro rozlišení 16 stávajících odrůd a 11 novošlechtění jabloní. Naše metoda byla využita i pro další výzkum a tím bylo hodnocení vlivu moderního dlouhodobého skladování na obsah vybraných fenolických látek. Získané výsledky studie sloužily jako podklad pro certifikovanou metodiku [85].

4.2 Content of major phenolic compounds in apples: Benefits of ultra-low oxygen conditions in long-term storage (Příloha 2)

Touto prací bylo plynule navázáno na výsledky prvního experimentu, kde byla validovaná analytická metoda využita pro studium vlivu dlouhodobého skladování, a to konkrétně podmínek skladování s ultra-nízkou hladinou kyslíku (ULO) na plody jabloní s ohledem na zachování obsahu vybraných fenolických sloučenin. Vzhledem ke skutečnosti, že při využití tohoto typu skladování byl zachován obsah bioaktivních látek v plodech jabloní, našim cílem bylo zjistit, jaké výhody mají ULO podmínky oproti chlazenému skladu na obsah fenolických látek během skladování u komerčních odrůd. Skladování ovoce v chlazeném skladě lze ovlivnit jednak nastavením nízké teploty, ale také upravenou atmosférou, kdy lze oddálit fyziologickou zralost ovoce a výrazně zpomalit látkové přeměny v plodech.

V rámci experimentu bylo testováno celkem 10 odrůd jabloní – ‘Angold’, ‘Gala’, ‘Nicoleta’, ‘Rucla’, ‘Lady Silvia’, ‘UEB 32 642’, ‘Meteor’, ‘Fragrance’, ‘Golden Delicious’ a ‘Rubín’. Obsah fenolických látek – kyseliny gallové, kyseliny chlorogenové, epikatechinu, kvercitrinu, rutinu, floridzinu a floretinu – byl opět nejdříve stanoven bezprostředně po sklizni a následovalo monitorování změn jejich obsahu po třech, pěti a sedmi měsících skladování v chlazeném skladu a za podmínek ULO. Pro monitorování obsahu fenolických látek v plodech byla použita validovaná LC metoda s detektorem využívajícím diodové pole pro rychlou separaci a stanovení vybraných fenolických látek. Podmínky metody byly nastaveny na základě zoptimalizovaných podmínek dle předešlé publikace, ve které byl popsán vývoj rutinní rychlé separační metody [5]. Byly testovány a proměřeny vybrané odrůdy jabloní a provedena statistická analýza pomocí t-testu s více hypotézami s p-hodnotou upravenou metodou Holm-Bonferroni.

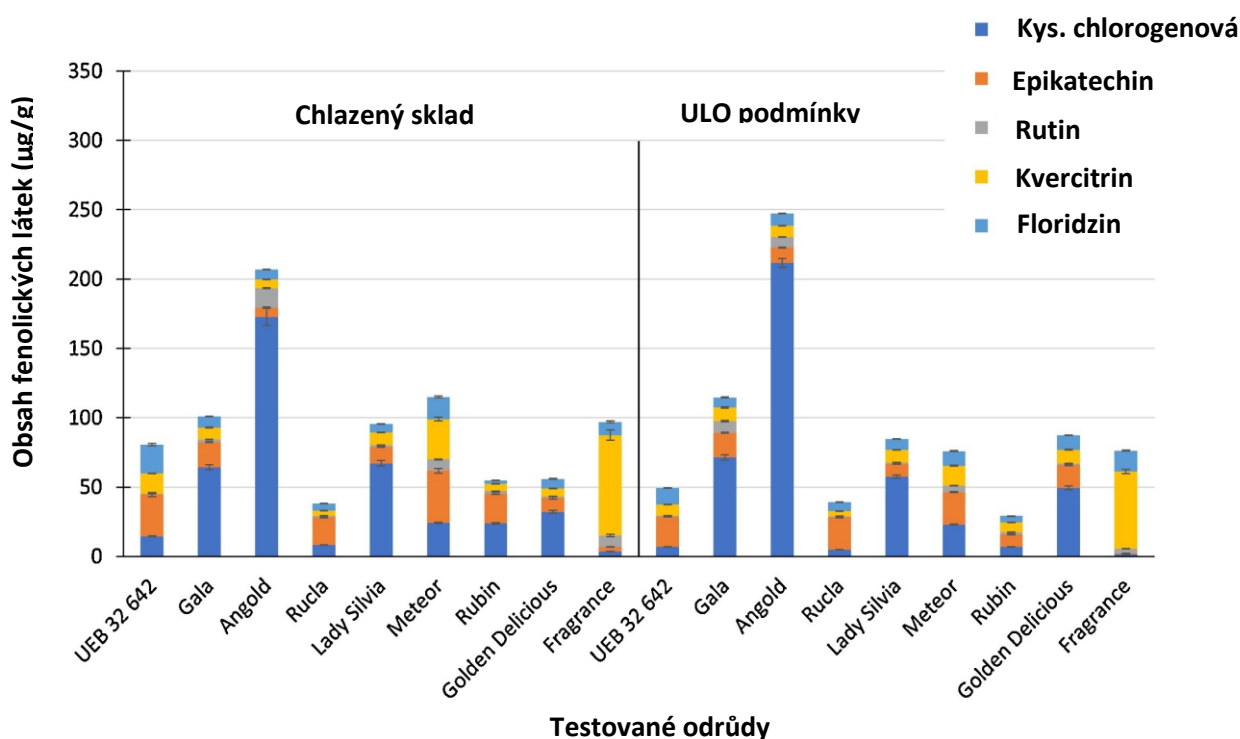
Na základě získaných výsledků stanovení obsahu fenolických látek u čerstvých plodů byly testované odrůdy rozděleny do skupin dle obsahu majoritních fenolických sloučenin, jako jsou kyselina chlorogenová, kvercitrin a epikatechin. Ve skupině odrůd s celkovým obsahem těchto látek > 100 µg/g byla na začátku studie pouze odrůda ‘Angold’, ve skupině s obsahem 50–100 µg/g ‘Gala’ a ‘Nicoleta’ a ve skupině s obsahem < 50 µg/g odrůdy ‘Rucla’, ‘Lady Silvia’, ‘UEB 32 642’, ‘Meteor’, ‘Rubín’, ‘Golden Delicious’ a ‘Fragrance’. Na Obrázku 12 je graf obsahu hlavních fenolických látek v jablkách bezprostředně po jejich sklizni.



Obrázek 12 Obsah hlavních fenolických látek v jablkách bezprostředně po jejich sklizni

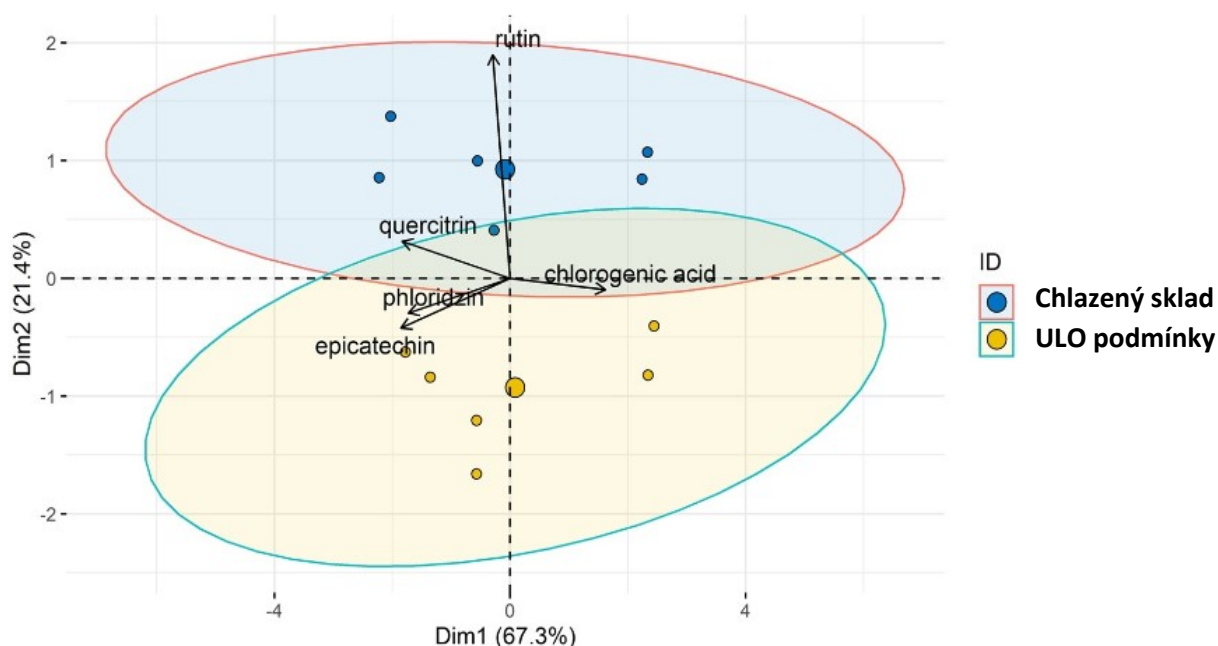
Tři měsíce skladování plodů ovlivnily obsah fenolických látek, a to bez ohledu na podmínky skladování. Zejména metabolické procesy způsobily zvýšení koncentrace některých aglykonů v důsledku jejich uvolňování z glykosidů. Tím se změnila i pozice jednotlivých odrůd ve skupinách. Významné zvýšení obsahu kyseliny chlorogenové nastalo u odrůdy 'Lady Silvia' skladované v podmínkách ULO. Pak společně s odrůdami 'Angold', 'Meteor' a 'Golden Delicious' byl celkový obsah fenolických látek > 100 µg/g. Také u odrůdy 'Nikoleta' došlo k přesunu díky nárůstu obsahu rutinu, kyseliny chlorogenové a epikatechinu. V této skupině byla zároveň i odrůda 'Fragrance'. U odrůd 'Gala' a 'Rucla' byl obsah fenolických látek < 50 µg/g. Výsledky monitoringu fenolických látek z hlediska skladování (chlazený sklad, technologie ULO) byly zároveň statisticky zpracovány. Statisticky významné rozdíly při porovnání typů skladování byly shledány u odrůdy 'Lady Silvia' pro obsah kyseliny chlorogenové, epikatechinu, kvercitrinu a floridzinu. U 'Meteoru' byly zjištěny statisticky významné rozdíly v obsahu epikatechinu, rutinu a floridzinu, také odrůda 'Rubín' vykazovala rozdíly v obsahu kyseliny chlorogenové, epikatechinu, kvercitrinu a floridzinu. U odrůdy 'Fragrance' byl znatelný 7násobný nárůst celkového obsahu v porovnání s čerstvými plody. Nejvýznamnější změna byla pozorována v obsahu epikatechinu představující 10 až 42násobné zvýšení pro skladování v chlazeném skladu. Statisticky zpracované výsledky po pěti měsících nevykazovaly signifikantní rozdíly mezi těmito dvěma typy skladování. Při analýze vzorků

plodů po sedmi měsících skladování u všech kultivarů neodhalily výsledky významný rozdíl mezi testovanými odrůdami s ohledem na typ skladování. Nicméně u odrůd 'Gala', 'Angold' a 'Rubín', které jsou doporučeny pro dlouhodobému skladování, byl znatelný statistický rozdíl mezi koncentrací jednotlivých fenolických látek, a to konkrétně u obsahu rutinu a kvercitrinu. Obrázek 13 znázorňuje obsah hlavních fenolických látek v jablkách po 7 měsících skladování v podmínkách chlazeného skladu a ULO podmínek. PCA graf a obsah fenolických látek pro odrůdy jabloní po 7 měsících skladování v chlazeném skladu a podmínkách ULO je znázorněn v Obrázku 14.



Obrázek 13 Obsah hlavních fenolických látek v jablkách po 7 měsících skladování v podmínkách chlazeného skladu a ULO podmínkách ($n = 4$)

V dostupných zdrojích a literatuře autoři nepozorovali téměř žádný vliv způsobu skladování ve vybraných podmínkách na obsah fenolických látek. Zároveň nebyl potvrzen vliv krátkodobého skladování v řízené atmosféře [5]. Autoři Awad a kol. [17] našli pouze nevýznamnou výhodu ULO podmínek pro vybrané fenolické látky. V naší experimentální práci byl proti předešlým publikacím pozorován rozdíl mezi podmínkami skladování v řízené atmosféře nebo chlazeném skladu pouze pro odrůdy určené pro dlouhodobé skladování.



Obrázek 14 PCA graf pro odrůdy jabloní 'Gala', 'Angold' a 'Rubín' po 7 měsících skladování v chlazeném skladu a ULO podmínkách

Osud fenolických sloučenin u vybraných kultivarů se lišil s ohledem na řízenou atmosféru a dobu skladování. Z dosažených výsledků je zřejmé, že ULO podmínky jsou ve srovnání s podmínkami chlazeného skladu šetrnější k našim sledovaným látkám, ale rozdíl nebyl tak významný. Naše zjištění potvrdilo, že vliv hladiny kyslíku při dlouhodobém skladování je významný při různé délce skladování a zároveň i pro různé odrůdy. Výsledky prokázaly výhody podmínek skladování ULO pro kultivary určené k delšímu skladování. Většina kultivarů vhodných pro krátkodobé skladování v chlazených nebo ULO podmínkách nevykazovala žádný statistický rozdíl v obsahu fenolických látek.

V rámci výsledků experimentální práce byly hodnoceny vybrané genotypy jabloní z hlediska obsahu fenolických látek a jeho zachování po určitou dobu skladování. Ze získaných výsledků bylo vidět, že k poklesům koncentrací fenolických látek začalo docházet ve většině případů po pěti měsících skladování, ať už při skladování v nízké hladině kyslíku (ULO) nebo při skladování za nízké teploty. Při skladování v chlazeném skladu o teplotě 1–2 °C byl pokles obsahu fenolických látek výraznější (po výraznějším nárůstu koncentrací fenolických látek na začátku skladování způsobeným uvolňováním z glykosidických forem a enzymatickou aktivitou, docházelo k výraznějším poklesům obsahu fenolických látek). Zjistili jsme, že na podmínky skladování byly nejvíce citlivé kyselina chlorogenová a epikatechin, u těchto látek docházelo k nejvýraznějším změnám koncentrací vlivem doby a způsobu skladování. Fenolické látky

kvercitrin a rutin vykazovaly vyšší stabilitu. Závěrem celé studie byl výběr odrůd, které nejlépe zachovaly obsah těchto vybraných látek a tím i vysokou hladinu antioxidantů i po delší době skladování, čímž byly zvýhodněny odrůdy 'Angold', 'Gala', 'Lady Silvia' a 'Meteor'. V Tabulce 2 jsou zdokumentovány obsahy fenolických látek u odrůdy 'Angold' u čerstvých plodů a plodů skladovaných s ohledem na dobu a podmínky skladování. Tabulka 3 znázorňuje obsahy fenolických látek, podmínky skladování a dobu skladování u odrůdy 'Golden Delicious'.

Tabulka 2 Obsahy vybraných fenolických sloučenin v $\mu\text{g/g} \pm \text{SD}$ s ohledem na počet měsíců skladování u odrůdy 'Angold' u plodů skladovaných v podmínkách chlazeného skladu a ULO

Počet měsíců skladování	Kys. chlorogenová		Epikatechin		Rutin		Kvercitrin		Floridzin		Suma	
	sklad	ULO	sklad	ULO	sklad	ULO	sklad	ULO	sklad	ULO	sklad	ULO
0 (po sklizni)	99,6 ± 3,0		5,7 ± 0,2		1,9 ± 0,1		6,1 ± 0,2		13,6 ± 0,4		126,9 ± 8,9	
3	221,4 ± 6,6	239,3 ± 19,5	19,8 ± 0,9	19,8 ± 1,9	8,3 ± 0,5	13,2 ± 2,0	6,5 ± 0,7	8,7 ± 1,0	6,4 ± 0,2	7,5 ± 1,1	262,4 ± 18,4	288,5 ± 33,2
5	234,9 ± 3,1	264,1 ± 4,2	9,9 ± 0,4	7,0 ± 0,4	13,0 ± 0,4	15,0 ± 1,3	16,0 ± 0,3	12,1 ± 0,6	9,9 ± 0,2	12,9 ± 0,6	283,7 ± 11,3	311,1 ± 27,9
7	172,6 ± 12,1	211,7 ± 6,4	6,8 ± 0,8	11,0 ± 0,7	14,0 ± 0,4	7,7 ± 0,2	6,3 ± 0,4	7,9 ± 0,3	7,2 ± 0,3	8,9 ± 0,4	206,9 ± 18,6	247,2 ± 14,8

Tabulka 3 Obsahy vybraných fenolických sloučenin v $\mu\text{g/g} \pm \text{SD}$ s ohledem na počet měsíců skladování u odrůdy 'Golden Delicious' u plodů skladovaných v podmínkách chlazeného skladu a ULO

Počet měsíců skladování	Kys. chlorogenová		Epikatechin		Rutin		Kvercitrin		Floridzin		Suma	
	sklad	ULO	sklad	ULO	sklad	ULO	sklad	ULO	sklad	ULO	sklad	ULO
0 (po sklizni)	15,7 ± 1,1		2,9 ± 0,3		0,5 ± 0,1		6,1 ± 0,5		3,3 ± 0,2		28,5 ± 3,7	
3	90,5 ± 5,4	66,1 ± 1,5	34,7 ± 2,1	25,7 ± 0,5	1,8 ± 0,1	1,1 ± 0,1	11,4 ± 0,5	9,1 ± 0,3	11,3 ± 0,7	10,5 ± 0,4	149,7 ± 8,9	112,5 ± 11,2
5	30,0 ± 0,9	44,9 ± 2,7	7,9 ± 0,3	8,3 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,1	7,4 ± 1,1	8,3 ± 0,6	6,0 ± 0,3	10,5 ± 0,4	52,4 ± 3,7	73,1 ± 5,1
7	32,2 ± 1,9	49,5 ± 2,5	10,0 ± 1,6	16,4 ± 0,8	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,0	5,9 ± 0,2	10,0 ± 0,5	6,8 ± 0,7	10,4 ± 0,5	55,9 ± 8,3	87,4 ± 4,4

Tyto poznatky sloužily jako podklad pro další certifikovanou metodiku založenou na kvalitativním hodnocení ovoce a zpracovatelských produktů z hlediska obsahu látek prospěšných pro zdraví člověka [4]. V rámci metodiky byly porovnány různé metody detekce, antioxidační aktivita a obsah vybraných fenolických látek v plodech jabloní. Získané výsledky dokumentují, že vysoký obsah fenolických látek a zároveň vysokou hladinu zdraví prospěšných látek s antioxidačními účinky vykazovaly odrůdy 'Angold', 'Artiga', 'Lady Silvia', 'Rubinola', 'Topaz' a 'Jarka', z novošlechtění pak 'HL 1651', 'HL 2010' a 'HL 207'.

4.3 Užitný vzor „Sušený jablečný produkt“– aplikovaný výsledek projektu TJ01000151 s názvem „Monitoring prospěšných látek v ovoci a jejich zpracovatelských produktech s ohledem na lidské zdraví a výživu dětí“ (Příloha 3)

Předmětem a cílem širšího výzkumu, ze kterého vychází uvedený užitný vzor, je detekce obsahových látek v plodech a zpracovatelských produktech jabloní, třešní a meruněk, optimalizace metody stanovení těchto látek pro rutinní analýzu a pro praktické použití. V neposlední řadě i selekce vybraných odrůd ovoce s vysokým obsahem zdraví prospěšných látek pro potřeby zpracování a výrobu různých produktů zpracování pro praktické využití.

Hlavními řešiteli projektu byla Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, dalším řešitelem projektu byl VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o. Aplikačním garantem byla firma Severofrukt a.s. Terezín, na vzniku aplikovaného výsledku užitný vzor se podílela firma Frutigo s.r.o. Chrast.

Užitný vzor se týkal inovativního řešení technologické výroby zpracovatelského produktu testovaných odrůd jablek s vysokým antioxidačním potenciálem. Hlavní podstatou technického řešení byla optimalizace doby a teploty sušení výchozího produktu pro výrobu zpracovatelského produktu se zachováním vysokého obsahu látek s antioxidační aktivitou, se zaměřením na fenolické látky.

Ovoce sušené při vysokých teplotách může být tvrdé a mít nepřírozenou hnědou barvu, při vyšších teplotách navíc dochází k nežádoucím ztrátám obsahu fenolických látek, resp. jejich rozkladu. Z hlediska zachování významných obsahových látek ve zpracovatelských produktech je žádoucí, aby sušení probíhalo při nižších teplotách a co nejkratší dobu. Čím je zahřátí ovocné hmoty šetrnější, a tím více jsou omezeny chemické změny. Proto se doporučuje, aby v moderních sušárnách teploty (na vlhkém ovoci) nepřesahovaly 57 až 82 °C. Nevýhodou jablečných produktů, které jsou připraveny běžnými způsoby sušení, je nízký obsah významných fenolických látek.

Stávající technologický postup zpracování plodů jabloní k výrobě sušených produktů využíval 4pásovou sušárnu s postupným ohříváním sušícího vzduchu s předsušárnou, ve které se teplota sušení pohybovala od 60 do 120 °C. Na začátku sušení byla nastavena nejvyšší teplota (120 °C), zde dochází k odpaření povrchové vody, poté se teplota snižovala na teplotu

80 °C a v poslední fázi sušení byla snížena na 60 °C. Při takto nastavených teplotách trvá proces sušení cca 4 hodiny, v závislosti na obsahu vody ve výchozí surovině (jablkách). Náš inovativní přístup v zachování vysokého obsahu fenolických látek ve zpracovatelských produktech spočíval v použití nižší teploty sušení a zároveň mírně prodloužené době sušení, a to konkrétně tak, že se již na začátku sušení snížila teplota na 62 až 65 °C a teploty dosušení produktu byly udrženy v rozmezí 45 až 50 °C.

Při optimalizaci podmínek vývoje užitého vzoru "Sušený jablečný produkt" docházelo při původní teplotě sušení 80 °C ke ztrátě a snížení koncentrace fenolických látek. Co se týče sušení při nižší teplotě 62 až 65 °C, docházelo k udržení vyššího obsahu fenolických látek, tedy nedochází ke ztrátám způsobených vysokou teplotou. Nicméně se doba sušení prodloužila ze 4 na 6 hod. V rámci našeho výrobního procesu a dostupných studií bylo potvrzeno, že díky nižší teplotě sušení se fenolické látky uvolňují šetrně z glykosidických struktur (dochází k odštěpení cukerné složky), a tím je v sušených produktech z jablek více volných forem fenolických látek s antioxidační aktivitou.

Sušený jablečný produkt z vybraných odrůd jabloní a novošlechtění, které byly vybrány jako nejvhodnější pro zpracování a dlouhodobé skladování, připravený prostřednictvím inovativního postupu proti dosavadnímu stavu deklaroval vysoký obsah antioxidačních látek ve zpracovatelském produktu a jeho zachování i během procesu výroby – zpracování a sušení. U první testované odrůdy byl u čerstvých plodů obsah hlavní fenolické sloučeniny – kyseliny chlorogenové 49,65 µg/g čerstvého ovoce, ve zpracovatelském produktu byl 2krát vyšší, konkrétně 101,86 µg/g. U druhé testované odrůdy s vyšším obsahem glykosidů byl obsah kyseliny chlorogenové v čerstvých plodech 1,31 µg/g, u křížal 131,74 µg/g.

Při původní teplotě sušení 80 °C docházelo ke ztrátě a snížení koncentrace fenolických látek, jak je patrné z dosažených výsledků zdokumentovaných v Tabulce 4. V provozu je tento model využitelný, dojde k úpravě teploty sušení na pásové sušičce a délce doby, kterou musí plody být v sušičce uloženy. Zvýší se tak přidaná hodnota jablečného produktu s tím, že nedojde ke ztrátám obsahu antioxidačních látek. Hladiny sledovaných fenolických látek byly stanoveny metodou kapalinové chromatografie s UV detekcí.

Rozdíly v obsahu fenolických látek byly významné a pro udržení obsahu fenolických látek je doporučena nižší teplota sušení i za cenu prodloužení sušícího procesu. Hlavní obsahová látka

(kyselina chlorogenová) pak zůstává zachována i v sušených jablcích a jako látka s poměrně vysokou antioxidační aktivitou je pak zodpovědná za zdraví prospěšné vlastnosti ovoce sušeného šetrným postupem.

Tabulka 4 Koncentrace fenolických látek v čerstvých plodech jablek a ve zpracovatelských produktech v závislosti na teplotě sušení u jedné testované odrůdy

Odrůda	Fenolická látka	Čerstvá hmota ($\mu\text{g/g}$)	Křížaly 62-65 °C ($\mu\text{g/g}$)	Křížaly 77-80 °C ($\mu\text{g/g}$)
Odrůda 1	kyselina chlorogenová	49,65	101,86	44,61
	epikatechin	23,64	7,24	4,49
	rutin	1,24	1,01	0,56

Co se týče průmyslové využitelnosti v praxi, „Sušený jablečný produkt“ z vybraných odrůd jabloní a novošlechtění, které byly vybrány jako 7 nejvhodnějších pro zpracování a dlouhodobé skladování na základě našeho předchozího výzkumu [84], můžeme říci, že nejvhodnější jsou odrůdy 'Angold', 'Lady Silvia', 'Rubinola', 'Topaz' a novošlechtění 'HL 1651', 'HL 2010' a 'HL 207'. Nové technické řešení zpracování produktů zvyšuje svojí podstatou kvalitu sušeného produktu vyrobeného z těchto odrůd, díky kterému budou zachovány zdraví prospěšné látky ve výrobku, který je možnou náhradou konzumace potravinových doplňků jako zdroje těchto látek.



Obrázek 15 Fotodokumentace výrobku „Hološovská sušená jablka“

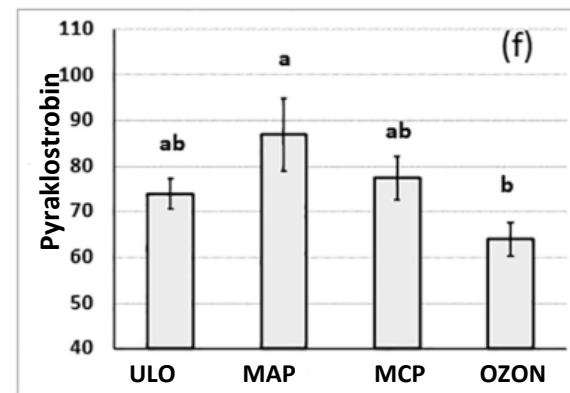
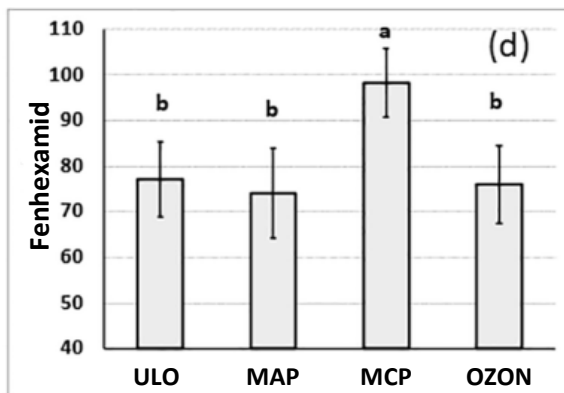
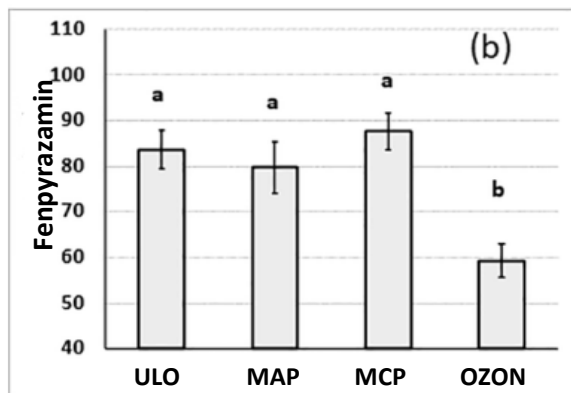
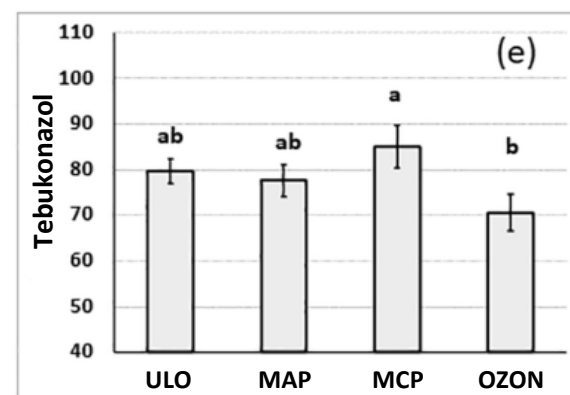
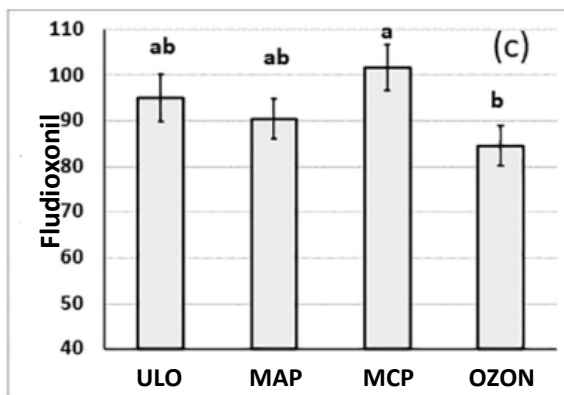
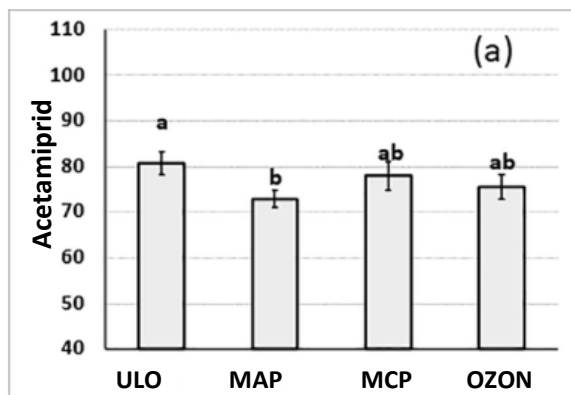
4.4 Effect of storage conditions on content of pesticide residues in sweet cherries (Příloha 4)

V této práci byla studována dynamika rozpadu účinných látek pesticidů běžně aplikovaných v rámci integrované ochrany ovoce. Pro náš výzkum jsme se zaměřili na peckoviny, a to konkrétně na plody třešní, kde byla tato degradace sledována v čerstvých plodech, ale i při využití vybraných technologií dlouhodobého skladování – skladování v ULO podmínkách (atmosféra s nízkou hladinou kyslíku), obalech s modifikovanou atmosférou a s využitím posklizňové aplikace 1-methylcyklopropenu a ozonu. Předpokládali jsme, že typ pesticidu a podmínky skladování ovoce mohou mít zásadní vliv na obsah reziduí pesticidů. Proto byly sledovány hladiny reziduí po aplikaci kombinací účinných látek včetně acetamipridu, boscalidu, cyprodinilu, fenhexamidu, fenpyrazaminu, fludioxonilu, fluopyramu, pyraclostrobinu, pirimikarbu, tebukonazolu, thiaclopridu a trifloxystrobinu. Aplikace pesticidů na peckoviny byla provedena s ohledem na doporučení výrobce a dané ochranné lhůty pro vybrané přípravky.

Jak bylo zjištěno v rámci důkladné rešerše, dosud nebyla publikována žádná komplexní studie s ohledem na degradaci pesticidů a způsoby skladování peckovin. Ve sklizeném ovoci nebylo v této práci u žádné účinné látky nalezeno překročení MRL (což je limit, který nesmí být při doporučené aplikaci pesticidů překročen). Dále byl monitorován pokles hladin pesticidů ovlivněný různými podmínkami skladování a porovnány podmínky skladování s ohledem na rozklad a/nebo zachování obsahu u všech testovaných účinných látek. Navíc byly během skladování pozorovány změny v kvalitě plodů třešní napadených chorobami a škůdci a hodnoceno procento poškozených plodů.

Získané výsledky potvrdily, že během skladování plodů v chlazeném skladu dochází k postupné degradaci. Vliv typu skladování znázorněný na Obrázku 16 se měnil v závislosti na klimatických podmínkách daného roku (studie probíhala v letech 2018 a 2019). Vzorky byly měřeny ve čtyřech replikátech a získané průměrné hodnoty byly uvedeny s 20% nejistotou, s ohledem na velmi nízký obsah pesticidů. Pokud jde o hodnocení obsahu účinných látek, byl v roce 2018 pozorován statisticky významný rozdíl v obsahu reziduí acetamipridu mezi režimy skladování MAP a ULO. První z nich vedl k nižšímu obsahu reziduí, jak ukazuje Obrázek 16a. Z dostupné literatury je známo, že účinná látka acetamiprid degraduje rychleji v MPA než v ULO podmínkách [86], což bylo potvrzeno. Dále byl sledován statisticky významný rozdíl

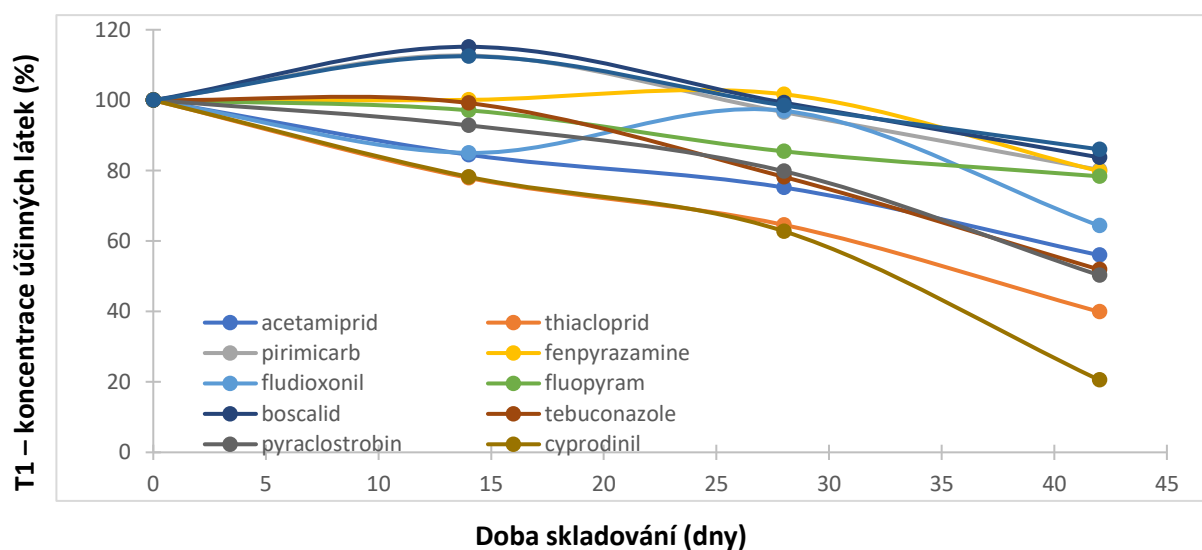
u fenpyrazaminu s nejnižším obsahem reziduí po posklizňovém ošetření ozonem ve srovnání s ostatními variantami skladování – Obrázek 16b. Statisticky významný rozdíl byl zaznamenán u fludioxonilu po použití MCP a ozonu. Nižší hladiny reziduí byly zjištěny při skladování s ozonem, dokumentováno na Obrázku 16c. Obsah reziduí fenhexamidu byl po ošetření MCP nejnižší ve srovnání s ULO, MAP a ozonem (Obrázek 16d). Došlo také ke snížení hladiny tebukonazolu po skladování s ozonem v porovnání s aplikací MCP (Obrázek 16e). Nižší rezidua pyraclostrobinu byla pozorována při posklizňovém ošetření ozonem ve srovnání se skladováním v obalech MAP (Obrázek 16f).



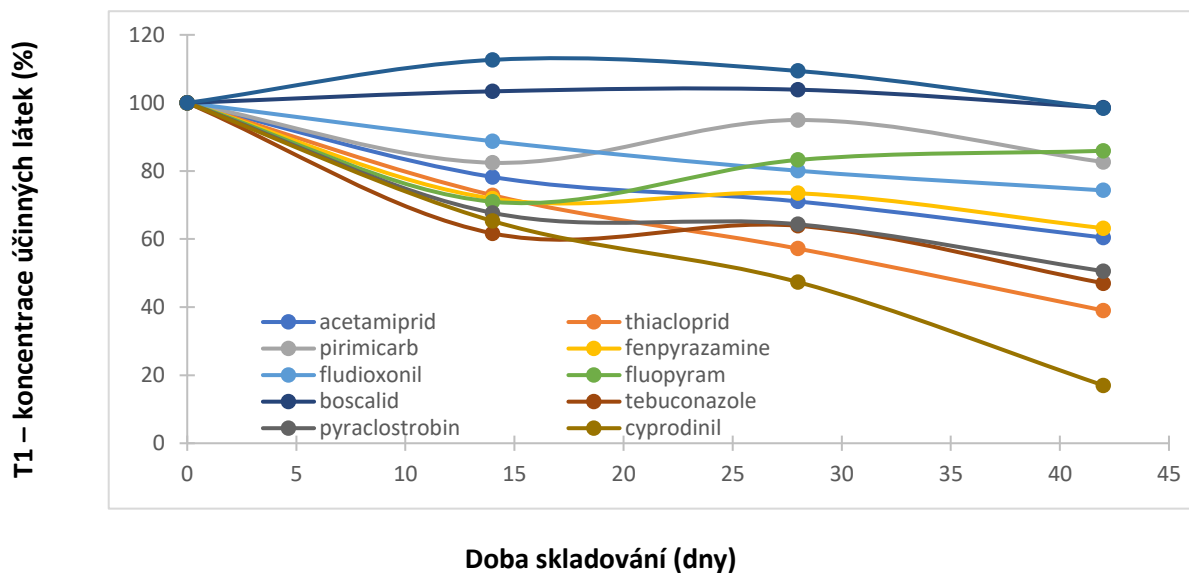
Obrázek 16 Relativizovaný obsah účinných látek (a) acetamidiprid, (b) fenpyrazamin, (c) fludioxonil, (d) fenhexamid, (e) tebukonazol a (f) pyraklostrobinu 28. den po sklizni pro vybrané režimy skladování a kombinované varianty postřiku (2018).

Klesající trend byl zřetelně vidět u účinných látek při posklizňovém ošetření ozonem a při skladování v obalech MAP. Posklizňová úprava ozonem před uskladněním navíc vede ke snížení povrchové mikroflóry na sklizených a následně skladovaných plodech, a také ke snížení hladiny ethylenu. Toto ošetření samo o sobě pak umožňuje prodloužení trvanlivosti a zachování organoleptických vlastností plodin [75, 87].

V rámci experimentální práce byla studována i reakční kinetika rozkladu pesticidů. Zatímco tato kinetika byla zjevně ovlivněna vnějšími podmínkami včetně teploty, vlhkosti, kyslíku/ozónu a MCP, zůstává otázka, zda samotné ovoce (druh ovoce) také ovlivňuje rychlost rozkladu. Třešně ve skladovacích podmínkách včetně MCP a ozonu byly analyzovány z hlediska obsahu reziduí pesticidů po 14, 28 a 42 dnech skladování. Rychlost degradace za použití MCP a podmínek skladování ozonu pro sprejovou variantu T1 je ukázána jako příklad na Obrázcích 17 a 18.



Obrázek 17 Degradace pesticidů po 42 dnech skladování při použití MCP pro variantu T1 (2018).



Obrázek 18 Degradace pesticidů po 42 dnech skladování při použití ozonu pro variantu T1 (2018).

Bylo zjištěno, že trendy v degradaci reziduí jsou velmi podobné bez ohledu na technologie skladování. Ve variantě T1 se např. účinná látka fenpyrazamin při použití MCP rozložila za 28 dní na 80 % původního obsahu. Podobně probíhala degradace pesticidů ozonem, která snížila obsah reziduí na 85 % ve stejném časovém období. Aplikace MCP způsobila pouze mírný pokles jejich hladiny, přičemž v ozonu nebyl pozorován téměř žádný rozklad. Ozon měl ale výraznější vliv na degradaci fludioxonilu ve srovnání s MCP (60 %), kde byla degradace pomalejší (85 %). Průběh rozkladu fludioxonilu ve sprejové variantě T4 byl při použití ozonu odlišný a po dobu skladování kolísal kolem 80 % původní koncentrace, přičemž po aplikaci MCP nebyla sledována prakticky žádná degradace. Stejné trendy byly pozorovány u boscalidu a trifloxystrobinu.

Přestože byl po použití ozonu a posklizňové úpravy MCP charakteristický mírný pokles koncentrace pesticidů, stále pod MLR, bylo zachováno dostatečné množství účinné látky a plody třešní byly během skladování chráněny proti skládkovým chorobám. Porovnání technologií skladování nám umožnilo potvrdit pozitivní účinek aplikace pesticidů bez ohledu na to, která varianta postřiku byla použita, a všechny varianty kromě kontroly se ukázaly jako účinné proti škodlivým organismům a skládkovým chorobám. Úbytek hmotnosti plodů v důsledku skládkové hniloby byl u variant ošetřených pesticidními přípravky zanedbatelný a i po 28 dnech skladování a představoval méně než 2 %. Naproti tomu u neošetřené varianty bylo degradováno značné procento plodů, a to v průměru kolem 20 %.

Degradace pesticidů byla ovlivněna především klimatickými podmínkami prostředí a po sklizni a při skladování také dalšími faktory, mezi které patřily podmínky skladování a vlhkost prostředí. Záleželo také na povaze a chemické struktuře samotného pesticidu. Bylo zjištěno, že testované skladovací technologie ovlivnily degradaci reziduí účinných látek acetamipridu, fludioxonilu, fenhexamidu, tebukonazolu a pyraklostrobinu (statisticky významné výsledky – $p < 0,05$). Pozitivním aspektem našeho výzkumu je příznivé zjištění, že všechny testované vzorky obsahovaly rezidua pesticidů hluboko pod MLR, při zachování jejich pozitivního efektu pro udržení kvality ovoce

Domníváme se, že kromě účinných látek a podmínek skladování, jako je MCP a ozón, může rozklad účinných látek ovlivnit i samotný druh ovoce nebo alespoň chemie jeho povrchu. Potvrzení této myšlenky by ale vyžadovalo rozsáhlejší studii provedenou s širší paletou druhů ovoce. Proto bylo testování následně rozšířeno i na další druhy ovoce, přičemž největší efekt na snížení obsahu reziduí v plodech slivoní měly skladovací obaly MAP společně s využitím ozonu a skladováním v podmínkách ULO. Vyšší vliv byl vyhodnocen také při použití obalů MAP u meruněk, kde tento způsob skladování způsoboval rychlejší degradaci reziduí než při skladování plodů v ULO podmínkách [88].

5 Citovaná literatura

- [1] J. Fibigr, D. Satinsky, P. Solich, Current trends in the analysis and quality control of food supplements based on plant extracts, *Anal Chim Acta* 1036 (2018) 1-15.
- [2] J. Tabart, C. Kevers, A. Sipel, J. Pincemail, J.O. Defraigne, J. Dommès, Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage, *Food Chemistry* 105(3) (2007) 1268-1275.
- [3] R. Lopez-Rodriguez, L. Dominguez, V. Fernandez-Ruiz, M. Camara, Extracts Rich in Nutrients as Novel Food Ingredients to Be Used in Food Supplements: A Proposal Classification, *Nutrients* 14(15) (2022) 3194.
- [4] M. Hollá, e. al., Metodika pro kvalitativní hodnocení ovoce a zpracovatelských produktů z hlediska obsahu látek prospěšných pro zdraví člověka, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové 2019, 60 s.
- [5] M. Leja, A. Mareczek, J. Ben, Antioxidant properties of two apple cultivars during long-term storage, *Food Chemistry* 80(3) (2003) 303-307.
- [6] M.C. Dias, D.C.G.A. Pinto, A.M.S. Silva, Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity, *Molecules* 26(17) (2021) 5377.
- [7] A.N. Panche, A.D. Diwan, S.R. Chandra, Flavonoids: an overview, *J Nutr Sci* 5 (2016) e47.
- [8] H.P.V. Rupasinghe, C. Kean, Polyphenol concentrations in apple processing by-products determined using electrospray ionization mass spectrometry, *Can J Plant Sci* 88(4) (2008) 759-762.
- [9] C.W.I. Haminiuk, G.M. Maciel, M.S.V. Plata-Oviedo, R.M. Peralta, Phenolic compounds in fruits - an overview, *International Journal of Food Science and Technology* 47(10) (2012) 2023-2044.
- [10] C.E. Lister, J.E. Lancaster, K.H. Sutton, J.R.L. Walker, Aglycone and glycoside specificity of apple skin flavonoid glycosyltransferase, *J Sci Food Agr* 75(3) (1997) 378-382.
- [11] K. Amaki, E. Saito, K. Taniguchi, K. Joshita, M. Murata, Role of Chlorogenic Acid Quinone and Interaction of Chlorogenic Acid Quinone and Catechins in the Enzymatic Browning of Apple, *Biosci Biotech Bioch* 75(5) (2011) 829-832.
- [12] J. Tabart, C. Kevers, J. Pincemail, J.O. Defraigne, J. Dommès, Antioxidant capacity of black currant varies with organ, season, and cultivar, *J Agr Food Chem* 54(17) (2006) 6271-6276.
- [13] J. Tabart, T. Franck, C. Kevers, J. Pincemail, D. Serteyn, J.O. Defraigne, J. Dornmes, Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Ribes nigrum* extracts, *Food Chemistry* 131(4) (2012) 1116-1122.
- [14] M. Vagiri, A. Ekholm, S.C. Andersson, E. Johansson, K. Rumpunen, An Optimized Method for Analysis of Phenolic Compounds in Buds, Leaves, and Fruits of Black Currant (*Ribes nigrum* L.), *J Agr Food Chem* 60(42) (2012) 10501-10510.

- [15] J. Tabart, C. Kevers, D. Evers, J. Dommes, Ascorbic Acid, Phenolic Acid, Flavonoid, and Carotenoid Profiles of Selected Extracts from *Ribes nigrum*, *J Agr Food Chem* 59(9) (2011) 4763-4770.
- [16] T. Shoji, M. Obara, T. Takahashi, S. Masumoto, H. Hirota, T. Miura, The Differences in the Flavan-3-ol and Procyanidin Contents of the Japanese 'Fuji' and 'Orin' Apples Using a Rapid Quantitative High-Performance Liquid Chromatography Method: Estimation of the Japanese Intake of Flavan-3-ols and Procyanidins from Apple as Case Study, *Foods* 10(2) (2021) 274.
- [17] M.A. Awad, A. de Jager, Flavonoid and chlorogenic acid concentrations in skin of 'Jonagold' and 'Elstar' apples during and after regular and ultra low oxygen storage, *Postharvest Biol Tec* 20(1) (2000) 15-24.
- [18] M. Friedman, H.S. Jurgens, Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds, *J Agr Food Chem* 48(6) (2000) 2101-2110.
- [19] S.M. Sang, K. Lapsley, W.S. Jeong, P.A. Lachance, C.T. Ho, R.T. Rosen, Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (*Prunus amygdalus batsch*), *J Agr Food Chem* 50(8) (2002) 2459-2463.
- [20] G.H. Cao, E. Sofic, R.L. Prior, Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships, *Free Radical Bio Med* 22(5) (1997) 749-760.
- [21] I.G. Munteanu, C. Apetrei, Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review, *Int J Mol Sci* 22(7) (2021) 3380.
- [22] P. Baronová, Analytické metody stanovení antioxidační/antiradikálové aktivity, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie Hradec Králové, Hradec Králové, 2009, 65 s.
- [23] D. Villano, M.S. Fernandez-Pachon, A.M. Troncoso, M.C. Garcia-Parrilla, Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro, *Anal Chim Acta* 538(1-2) (2005) 391-398.
- [24] Z.Y. Chen, P.T. Chan, K.Y. Ho, K.P. Fung, J. Wang, Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups, *Chem Phys Lipids* 79(2) (1996) 157-163.
- [25] K. Bortlová, Hodnocení obsahu fenolických látek v ovoci, Farmaceutická fakulta, Katedra analytické chemie, Univerzita Karlova, Hradec Králové, 2018, 62 s.
- [26] S.E. Science, SHIMADZU Excellence in Science, 2023. www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html (Accessed 31-08-2023).
- [27] J. Kschonsek, T. Wolfram, A. Stockl, V. Bohm, Polyphenolic Compounds Analysis of Old and New Apple Cultivars and Contribution of Polyphenolic Profile to the In Vitro Antioxidant Capacity, *Antioxidants-Basel* 7(1) (2018) 20.
- [28] F. Yildirim, e. al., The Relationship Between Growth Vigour of Rootstock and Phenolic Contents in Apple (*Malus × domestica*), *Erwerbs-Obstbau* 58 (2016) 25-29.

- [29] H. Sato, S. Otagaki, P. Saelai, S. Kondo, K. Shiratake, S. Matsumoto, Varietal differences in phenolic compounds metabolism of type 2 red-fleshed apples, *Scientia Horticulturae* 219 (2017) 1-9.
- [30] B. Suarez, A.L. Alvarez, Y.D. Garcia, G. del Barrio, A.P. Lobo, F. Parra, Phenolic profiles, antioxidant activity and in vitro antiviral properties of apple pomace, *Food Chemistry* 120(1) (2010) 339-342.
- [31] L. Raudone, R. Raudonis, M. Liaudanskas, J. Viskelis, A. Pukalskas, V. Janulis, Phenolic Profiles and Contribution of Individual Compounds to Antioxidant Activity of Apple Powders, *J Food Sci* 81(5) (2016) C1055-C1061.
- [32] M. Liaudanskas, P. Viskelis, D. Kviklys, R. Raudonis, V. Janulis, A Comparative Study of Phenolic Content in Apple Fruits, *Int J Food Prop* 18(5) (2015) 945-953.
- [33] J. Leyva-Corral, A. Quintero-Ramos, A. Camacho-Davila, J.D. Zazueta-Morales, E. Aguilar-Palazuelos, M.G. Ruiz-Gutierrez, C.O. Melendez-Pizarro, T.D. Ruiz-Anchondo, Polyphenolic compound stability and antioxidant capacity of apple pomace in an extruded cereal, *Lwt-Food Sci Technol* 65 (2016) 228-236.
- [34] V. Chandrasekar, et al., Optimizing microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from red delicious and jonatán apple pomace, *Journal of Food Process Engineering* 38 (2015) 571-582.
- [35] A.G. Perez, C. Sanz, J.J. Rios, R. Olias, J.M. Olias, Effects of ozone treatment on postharvest strawberry quality, *J Agr Food Chem* 47(4) (1999) 1652-1656.
- [36] L. Bai, S. Guo, Q.C. Liu, X.Q. Cui, X.X. Zhang, L. Zhang, X.W. Yang, M.W. Hou, C.T. Ho, N.S. Bai, Characterization of nine polyphenols in fruits of *Malus pumila* Mill by high-performance liquid chromatography, *J Food Drug Anal* 24(2) (2016) 293-298.
- [37] C. Jinshui, Qun, X., Lina, L., Rohrer, J., Determination of Phenolic Compounds in Apple Orchard Soil. Thermo Scientific Webpage, application Note 1077., 1-5.
- [38] A. Escarpa, M.C. Gonzalez, Fast separation of (poly)phenolic compounds from apples and pears by high-performance liquid chromatography with diode-array detection, *Journal of Chromatography A* 830(2) (1999) 301-309.
- [39] A. Schieber, P. Keller, R. Carle, Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 910(2) (2001) 265-273.
- [40] J. Zivkovic, K. Savikin, G. Zdunic, B. Dojcinovic, N. Menkovic, Phenolic and mineral profile of Balkan indigenous apple and pear cultivars, *J Serb Chem Soc* 81(6) (2016) 607-621.
- [41] M. Brahem, C.M.G.C. Renard, S. Eder, M. Loonis, R. Ouni, M. Mars, C. Le Bourvellec, Characterization and quantification of fruit phenolic compounds of European and Tunisian pear cultivars, *Food Res Int* 95 (2017) 125-133.

- [42] T. WANG, Xia LI, Bin ZHOU, Jie ZENG a Wenyuan GAO, Anti-diabetic activity in type 2 diabetic mice and α -glucosidase inhibitory, antioxidant and anti-inflammatory potential of chemically profiled pear peel and pulp extracts (*Pyrus* spp.). , *Journal of Functional Foods* 13 (2015) 276-288.
- [43] X. Li, T. Wang, B. Zhou, W. Gao, J. Cao, L. Huang, Chemical composition and antioxidant and anti-inflammatory potential of peels and flesh from 10 different pear varieties (*Pyrus* spp.), *Food Chem* 152 (2014) 531-8.
- [44] M. Raja, J. Hernandez-Revelles, S. Hernandez-Cassou, J. Saurina, Determination of polyphenols in the pear pulp matrix by solvent extraction and liquid chromatography with UV-Vis detection, *Anal Methods-Uk* 6(24) (2014) 9769-9776.
- [45] Q.W. Zhang, L.G. Lin, W.C. Ye, Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review, *Chin Med-Uk* 13 (2018).
- [46] A. Bocco, M.E. Cuvelier, H. Richard, C. Berset, Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts, *J Agr Food Chem* 46(6) (1998) 2123-2129.
- [47] D.A. Pearson, C.H. Tan, J.B. German, P.A. Davis, M.E. Gershwin, Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation, *Life Sci* 64(21) (1999) 1913-1920.
- [48] S. Guyot, N. Marnet, D. Laraba, P. Sanoner, J.F. Drilleau, Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a French cider apple variety (*Malus domestica* var. Kermerrien), *J Agr Food Chem* 46(5) (1998) 1698-1705.
- [49] S. Wahab, K. Muzammil, N. Nasir, M.S. Khan, M.F. Ahmad, M. Khalid, W. Ahmad, A. Dawria, L.K.V. Reddy, A.M. Busayli, Advancement and New Trends in Analysis of Pesticide Residues in Food: A Comprehensive Review, *Plants* 11(9) (2022) 1106.
- [50] N. Casado, S. Morante-Zarcelero, I. Sierra, Application of the QuEChERS Strategy as a Useful Sample Preparation Tool for the Multiresidue Determination of Pyrrolizidine Alkaloids in Food and Feed Samples: A Critical Overview, *Applied Sciences* 12(9) (2022) 4325.
- [51] S. Kořková, Hodnocení vybraných obsahových látek v ovoci metodou HPLC-DAD-CAD, Farmaceutická fakulta, Katedra analytické chemie, Univerzita Karlova, Hradec Králové, 2019, 73 s.
- [52] C.T. da Costa, B.C. Nelson, S.A. Margolis, D. Horton, Separation of blackcurrant anthocyanins by capillary zone electrophoresis, *Journal of Chromatography A* 799(1-2) (1998) 321-327.
- [53] G.J. Soleas, E.P. Diamandis, A. Karumanchiri, D.M. Goldberg, A multiresidue derivatization gas chromatographic assay for fifteen phenolic constituents with mass selective detection, *Analytical Chemistry* 69(21) (1997) 4405-4409.
- [54] D. Vraná, Optimalizace HPLC/MS/MS metody pro analýzu fenolických látek obsažených v amarantovém zrnu, Univerzita Pardubice, Pardubice, 2020, 91 s.

- [55] S.E. Science, SHIMADZU Excellence Science, 2023. https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basics_of_lcms/interfaces_for_lcms.html (Accessed 31-06-2023).
- [56] S. Granica, K. Krupa, A. Klebowska, A.K. Kiss, Development and validation of HPLC-DAD-CAD-MS(3) method for qualitative and quantitative standardization of polyphenols in *Agrimoniae eupatoriae herba* (Ph. Eur), *J Pharm Biomed Anal* 86 (2013) 112-22.
- [57] L.P. Souza, L.R.D. Faroni, F.F. Heleno, F.G. Pinto, M. Queiroz, L.H.F. Prates, Ozone treatment for pesticide removal from carrots: Optimization by response surface methodology, *Food Chem* 243 (2018) 435-441.
- [58] L. Nováková, M. Douša, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.*, Praha, 2013.
- [59] J.J. Kirkland, F.A. Truszkowski, C.H. Dilks, G.S. Engel, Superficially porous silica microspheres for fast high-performance liquid chromatography of macromolecules, *Journal of Chromatography A* 890(1) (2000) 3-13.
- [60] I. Baranowska, S. Magiera, J. Baranowski, Clinical applications of fast liquid chromatography: A review on the analysis of cardiovascular drugs and their metabolites, *J Chromatogr B* 927 (2013) 54-79.
- [61] K.M. Kalili, A. de Villiers, Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds, *J Sep Sci* 34(8) (2011) 854-876.
- [62] H. Sklenarova, A. Bilkova, M. Pechova, P. Chocholous, Determination of major phenolic compounds in apples: Part I-Optimization of high-performance liquid chromatography separation with diode array detection, *J Sep Sci* 41(15) (2018) 3042-3050.
- [63] T.K. McGhie, M. Hunt, L.E. Barnett, Cultivar and growing region determine the antioxidant polyphenolic concentration and composition of apples grown in New Zealand, *J Agr Food Chem* 53(8) (2005) 3065-3070.
- [64] R. Tsao, R. Yang, S. Xie, E. Sockovie, S. Khanizadeh, Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple?, *J Agr Food Chem* 53(12) (2005) 4989-4995.
- [65] D.-C. A., The profile of polyphenols and antioxidant properties of selected apple cultivars grown in Poland, *J Fruit Ornament Plant Res.* (18) (2010) 39-50.
- [66] P. Putnik, D.B. Kovacevic, K. Herceg, I. Pavkov, Z. Zoric, B. Levaj, Effects of modified atmosphere, anti-browning treatments and ultrasound on the polyphenolic stability, antioxidant capacity and microbial growth in fresh-cut apples, *Journal of Food Process Engineering* 40(5) (2017) e12539.
- [67] T. Krupa, E. Zaras-Januszkiewicz, A. Kistechok, Influence of 1-Methylcyclopropene on the Antioxidants of 'Red Cap' Apples during Transportation and Shelf Life, *Agronomy-Basel* 11(2) (2021) 341.

- [68] A. Bilkova, P. Knapova, P. Suran, J. Kwiecien, F. Svec, H. Sklenarova, Effect of storage conditions on content of pesticide residues in sweet cherries, *Food Chem X* 13 (2022) 100185.
- [69] J. Streif, Ripening Management and Postharvest Fruit Quality, *Iii International Conference Postharvest Unlimited 2008* 858 (2010) 121-129.
- [70] J. Skrzynski, P. Konopacki, Quality of apples after storage - a review of methods, *Proceedings of the International Conference on Quality in Chains, Vols 1 and 2* (604) (2003) 565-570.
- [71] J.H. Bower, W.V. Blasi, E.J. Mitcham, Effect of ethylene in the storage environment on quality of 'Bartlett pears', *Postharvest Biol Tec* 28(3) (2003) 371-379.
- [72] S.S. Ma, P.M. Chen, Storage disorder and ripening behavior of 'Doyenne du Comice' pears in relation to storage conditions, *Postharvest Biol Tec* 28(2) (2003) 281-294.
- [73] S.S. Ma, P.M. Chen, E.A. Mielke, Storage life and ripening behavior of 'Cascade' pears as influenced by harvest maturity and storage temperature, *J Amer Pomolog Soc* 54(3) (2000) 138-147.
- [74] J. Ticha, J. Hajslova, M. Jech, J. Honzicek, O. Lacina, J. Kohoutkova, V. Kocourek, M. Lansky, J. Kloutvorova, V. Falta, Changes of pesticide residues in apples during cold storage, *Food Control* 19(3) (2008) 247-256.
- [75] M. Alothman, B. Kaur, A. Fazilah, R. Bhat, A.A. Karim, Ozone-induced changes of antioxidant capacity of fresh-cut tropical fruits, *Innov Food Sci Emerg* 11(4) (2010) 666-671.
- [76] Š.J.G.K. Horálek V., Čurdová E., Helán V. a kol., *Vzorkování I. Obecné zásady*, Český Těšín, 2010.
- [77] P.Š. Koplík R., Šrámek I., Šviráková E, *Vzorkování III Potraviny, zemědělství, předměty běžného užívání*, Český Těšín 2016.
- [78] P.T. Holland, D. Hamilton, B. Ohlin, M.W. Skidmore, *Iupac Reports on Pesticides .31. Effects of Storage and Processing on Pesticide-Residues in Plant-Products*, *Pure Appl Chem* 66(2) (1994) 335-356.
- [79] J. Song, L.H. Fan, C.F. Forney, M.A. Jordan, P.D. Hildebrand, W. Kalt, D.A.J. Ryan, Effect of ozone treatment and controlled atmosphere storage on quality and phytochemicals in Highbush blueberries, *Acta Horti* (600) (2003) 417-423.
- [80] Y.S. Velioglu, S. Fikirdesici-Ergen, P. Aksu, A. Altindag, Effects of Ozone Treatment on the Degradation and Toxicity of Several Pesticides in Different Groups, *J Agr Sci-Tarim Bili* 24(2) (2018) 245-255.
- [81] P.E. Athanasopoulos, C. Pappas, Effects of fruit acidity and storage conditions on the rate of degradation of azinphos methyl on apples and lemons, *Food Chemistry* 69(1) (2000) 69-72.
- [82] A. Akyildiz, E. Agcam, S. Gurkan, B. Cetinkaya, E. Karaca, H. Benli, Effects of Rinsing on Residue Level of Chlorpyrifos Ethyl, Acetamiprid and Penconazole in Grapes, *J Agr Sci-Tarim Bili* 20(2) (2014) 112-119.

- [83] A. Bílková, H. Sklenářová, R. Vávra, Význam a monitoring vybraných fenolických sloučenin v plodech jablek s ohledem na různé podmínky skladování, Vědecké práce ovocnářské 25 (2017) 15-22.
- [84] A. Bilkova, K. Bad'urova, P. Svobodova, R. Vavra, P. Jakubec, P. Chocholous, F. Svec, H. Sklenarova, Content of major phenolic compounds in apples: Benefits of ultra-low oxygen conditions in long-term storage, Journal of Food Composition and Analysis 92 (2020) 103587.
- [85] A. Bílková, e. al., Metodika stanovení hlavních fenolických sloučenin v genotypch jablek s ohledem na různé podmínky skladování, Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.,2018, 44 s.
- [86] A. Bílková, V. Nekvindová, P. Suran, L. Zelený, Z. Nývltová, J. Kwiecien, Monitoring dynamiky degradace reziduí pesticidů v třešncích s ohledem na dlouhodobé skladování, Zahradnictví (1) (2018) 64-68.
- [87] S.K. Amit, M.M. Uddin, R. Rahman, S.M.R. Islam, M.S. Khan, A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing, Agriculture & Food Security 6(1) (2017) 51.
- [88] A. Bílková, P. Suran, M. Skalský, Metodika minimalizace obsahu reziduí pesticidů u peckovin s využitím ochrany rostlin a dlouhodobého skladování, VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.2020, 64 s.

6 Seznam publikovaných prací v komentovaném souhrnu

1. Sklenářová H., Bílková A., Pechová M., Chocholouš P. **Determination Of Major Phenolic Compounds In Apples: Part I-Optimization Of High-Performance Liquid Chromatography Separation With Diode Array Detection.** Journal of Separation Science, 2018, Vol. 41, S. 3042-3050. ISSN 1615-9306. (IF: 2018 – 2,516 - Q2, JSS (2018) – Q2 (IF), Q3 (AIS))

Podíl autorky = 50 %: výběr a selekce testovaných odrůd a novošlechtění, experimentální práce (vývoj HPLC metod, metodika skladovacích pokusů), vyhodnocení výsledků a jejich zpracování.

2. Bílková A., Baďurová K., Svobodová P., Vávra R., Jakubec P., Chocholouš P., Švec F., Sklenářová H. **Content of major phenolic compounds in apples: Benefits of ultra-low oxygen conditions in long-term storage.** Journal of Food Composition and Analysis, 2020, vol. 92. ISSN 0889-1575 (IF: 2020 - 4,556 – Q1, JFCA (2020) – Q1/Q1 (IF), Q1/Q1 (AIS))

Podíl autorky = 70 %: výběr a selekce testovaných odrůd a novošlechtění, rešerše literatury, metodický postup skladovacích pokusů, vyhodnocení výsledků a jejich zpracování, příprava rukopisu.

3. **Užitný vzor „ Sušený jablečný produkt“ 33 395, 2019**

Podíl autorky = 50 %: selekce odrůd pro zpracování, konkrétně pro sušení. Chemické analýzy významných obsahových fenolických látek v testovaných odrůdách, zpracování výsledků, příprava užitného vzoru.

4. Bílková A., Knapová P., Suran P., Kwiecien J., Švec F., Sklenářová H. **Effect of storage conditions on content of pesticide residues in sweet cherries.** Food Chemistry - X, 2022, ISSN 2590157(IF: 2022 – 6,443 – Q1, Food Chemistry X (2022) - Q1 (IF), Q1 (AIS))

Podíl autorky = 70 %: rešerše literatury, experimentální práce (odběry vzorků, metodika skladovacích postupů), shrnutí dosažených výsledků, shromáždění a zpracování dat, příprava publikace.

7 Seznam dalších publikací

1. Bílková A.; Sklenářová H.; Vávra R., **Význam a monitoring vybraných fenolických sloučenin v plodech jabloní s ohledem na různé podmínky skladování.** Vědecké práce ovocnářské, 2017, 25:15-22.
2. Vávra R., Jonáš M., Nekvindová V., Ždárská I., Bílková A., Blažková J., Skřivanová A., Šubrtová M. **Charakteristika plodů perspektivních hybridů třešní.** Vědecké práce ovocnářské, 2017, 25:111-116.
3. Vávra R., Jonáš M., Bílková A., Nekvindová V., Ždárská I., Skřivanová A., Suran P., Litschmann T. **Využití zakrývacích systémů proti dešti v ochraně proti mrazovému poškození třešní v době kvetení.** Vědecké práce ovocnářské, 2017, 25: 63-67.
4. Vávra R., Jonáš M., Nekvindová V., Ždárská I., Bílková A., Šubrtová M., Blažková J. **Odolnost genotypů třešní k praskání plodů.** Vědecké práce ovocnářské, 2017, 25:45-50.
5. Bílková A., Hortová B., Nekvindová V., Suran P., Zelený L, Nývltová Z., Kwiecien J. **Monitoring dynamiky degradace reziduí pesticidů v třešních s ohledem na dlouhodobé skladování,** Zahradnictví, 2018, 1: 64-68.
6. Bílková A., Vávra R., Hollá M., Sklenářová H., Chocholouš P., Dvořáková R., Horna A., Eichlerová E. **Metodika stanovení hlavních fenolických sloučenin v genotypech jabloní s ohledem na různé podmínky skladování.** Certifikovaná metodika. VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o., 2019, ISBN 978-80-87030-68-4.
7. Vávra R., Suran P., Jonáš M., Ždárská I., Skřivanová A., Bílková A., Nekvindová V., Danková V., Jaklová P., Skalský M., Ouředníčková J., Mészáros M. **Pěstování třešní v zakrytých výsadbách.** Certifikovaná metodika. VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY, 2018, ISBN 978-80-87030-66-0.
8. Vávra R., Suran P., Bílková A., Horna A., Dvořáková R., Eichlerová E. **Hodnocení celkových elektroaktivních antioxidačních látek ve třešních.** Zahradnictví. 2018, 17(12): 20–22. ISSN 1213-7596.
9. Bílková A., Knapová P., Suran P., Ždárská I., Zelený L. **Moderní typy dlouhodobého skladování: Efekt na celkovou antioxidační aktivitu u plodů slivoní,** Zahradnictví, 2019, 3: 20-22.

10. Bílková A., Hortová B., Nekvindová V., Suran P., Zelený L. **Moderní trendy dlouhodobého skladování třešní a jejich vliv na degradaci reziduí pesticidů.** Vědecké práce ovocnářské. 2019:7-16.
11. Bílková A., Hortová B., Nekvindová V., Suran P., Zelený L., Nývltová Z., Portychová L., Kwiecien J. **Rezidua pesticidů a jejich vliv na celkovou antioxidační aktivitu plodů meruněk,** Zahradnictví. 2019, 5:38-41.
12. Vávra R., Falta V., Kadlecová V., Bílková A., Žďárská I. **Degradace pesticidů ve výsadbách třešní s nadkrytím proti dešti.** Zahradnictví. 2019, 18(2):21–23. ISSN 1213-7596.
13. Bílková A., Hortová B., Nekvindová V., Suran P., Zelený L., Nývltová Z., Kwiecien J. **Monitoring dynamiky degradace reziduí pesticidů v třešních s ohledem na dlouhodobé skladování.** Zahradnictví, 2019, 1:64-68. ISSN 1213-7596.
14. Hollá M., Sklenářová H., Chocholouš P., Adamcová A., Košková S., Šmídová B., Bílková A., Nekvindová V., Suran P. **Metodika pro kvalitativní hodnocení ovoce a zpracovatelských produktů z hlediska obsahu látek prospěšných pro zdraví člověka.** Certifikovaná metodika. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2019, ISBN 978-80-906644-4-9.
15. Bílková A. **Monitoring degradace reziduí pesticidů v peckovinách.** Zahradnictví, 2020, 19:30-32. ISSN 1213-7596.
16. Bílková A. **Elektrochemické metody pro stanovení celkové antioxidační aktivity jabloní a křížal.** Zahradnictví, 2020, 8:40-42. ISSN 1213-7596.
17. Bílková A., Knapová P., Suran P., Skalský M. **Metodika minimalizace obsahu reziduí pesticidů u peckovin s využitím ochrany rostlin a dlouhodobého skladování.** Certifikovaná metodika. VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o., 2020, ISBN 978-80-87030-79-0.
18. Jaklová P., Kracíková M., Lišková P., Varga V., Bílková A., Suran P., Nývltová Z., Kwiecien J., Portychová L., **Metodika technologie ochrany jahodníku z hlediska rezistence Botrytis cinerea k fungicidům a minimalizace reziduí v plodech.** Certifikovaná metodika. VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o., 2021, ISBN 978-80-87030-82-0.
19. Adamcová A., Šatínský D., Zatrochová S., Hollá M., Šírová K., Šilhavá K., Bílková A., Knapová P. **Metodika pro identifikaci a detekci bioaktivních látek v rostlinných**

- částech ovocných stromů a odpadní biomase.** Certifikovaná metodika. UNIVERZITA KARLOVA, FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ, 2021. ISBN 978-80-906644-7-0.
20. Hollá M., Bílková A., Jakubec P., Košková S., Vlčková Kočová H., Šatínská D., Švec F., Sklenářová H. **Benefits and Pitfalls of HPLC Coupled to Diode-Array, Charged Aerosol, and Coulometric Detections:** Effect of Detection on Screening of Bioactive Compounds in Apples. *Molecules* [online]. 2021, 26(11) [cit. 2022-06-03]. ISSN 1420-3049.
21. Bílková A., Knapová P., Skalský M., Kwiecien J., Svárovská M. **Metodika detekce fosfonátů v rostlinných částech jaderovin s ohledem na jejich chování.** Certifikovaná metodika. VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o., 2022, ISBN 978-80-87030-86-8.
22. Bílková A., Knapová P., Jiroušová D. **Antioxidační charakteristiky třešní z různých regionů v České republice.** *Vědecké práce ovocnářské.* 2022,2:43-50. 2695-1347.
23. Bílková A., Knapová P. **Polyfenoly a antioxidační aktivita meruněk s ohledem na skladování.** *Vědecké práce ovocnářské.* 2022. 1:29-37. 2695-1347.
24. Bílková A., Knapová P., Jiroušová D., Mészáros M., Sedlák J. **Polyfenoly v odrůdách jablek z pěstitelských regionů České republiky a Polska.** 2023. *Vědecké práce ovocnářské,* 2023. 1-44-51. 2695-1347.

8 Prezentace výsledků

1. “Vitamíny a Antioxidanty“, Hotel VZ Bedřichov, Špindlerův Mlýn, 2016

Ústní prezentace: Přírodní antioxidanty; výzkum antioxidantů v ovoci (Bílková A.)

2. 16th International Nutrition & Diagnostics Conference, hotel DUO, Praha, 2016

Posterové sdělení: Application of HPLC and sequential injection chemiluminescence methods for testing anti-oxidation activity as complementary techniques for the assay of phenolic compounds in apple cultivars (Bílková A., Vávra R., Hana Sklenářová, Martina Pechová, Petr Chocholouš)

3. 20th International Conference on Flow Injection Analysis and Related Techniques, Palma de Mallorca, Spain, 2016

Posterové sdělení: Chemiluminescence method for testing anti-oxidation activity by the sequential injection technique as a complementary method for the assay of phenolic compounds in apples (H. Sklenářová, K. Kunovská, M. Pechová, A. Bílková, P. Chocholouš, M. Polášek)

4. 23rd International Symposium on Separation Sciences – Vídeň, Rakousko, 2017

Publikace v časopise konference Chrom Food Forum: Compounds in Fruits: Objectives and Importance of Monitoring with respect to Storage Conditions (Aneta Bílková, Hana Sklenářová, Frantisek Švec)

Posterové sdělení: Optimization of HPLC determination of phenolic compounds in apple extracts (Aneta Bílková, Kristýna Bortlová, Hana Sklenářová, Radek Vávra)

Posterové sdělení: Content of phenolic substances assayed by hplc-dad in apples kept under different storage conditions (Aneta Bílková, Kristýna Bortlová, Hana Sklenářová, Radek Vávra)

5. Ingrovy dny 2018, XLIV. Konference o jakosti potravin a potravinových surovin - Brno, Mendelova univerzita

Posterové sdělení: Porovnanie fenolického profilu vybraných jablčných odrôd (Marcela Hollá, Aneta Bílková, Hana Sklenářová)

6. VITATOX 2018 - Dvůr Králové nad Labem

Ústní sdělení: Význam a monitoring vybraných fenolických sloučenin v plodech jabloní s ohledem na různé podmínky skladování (Bílková A.)

7. 18th International Nutrition & Diagnostics Conference INDC, Praha, 2018

Posterové sdělení: Comparing antioxidant content in apple cultivars via hplc-ecd method (Marcela Hollá, Aneta Bílková, Hana Sklenářová, Blanka Švecová, Dalibor Šatínský)

Ústní sdělení: Phenolic compounds in apples under longer storage in different conditions (Bílková A.)

8. Ingrový dny 2019, XLV. konferenci o jakosti potravin a potravinových surovin, Brno, Mendelova univerzita

Posterové sdělení: Monitoring vybraných fenolických sloučenin v plodech jabloní s ohledem na různé podmínky skladování (Aneta Bílková, Marcela Hollá, Hana Sklenářová)

9. VITATOX 2019 - Dvůr Králové nad Labem

Ústní sdělení: Antioxidanty v plodech jabloní s ohledem na dlouhodobé skladování (Bílková A.)

10. XV. EUCARPIA Fruit Breeding and Genetics Symposium – 2019, Praha

Posterové sdělení: Pesticide residues and their influence on the total antioxidant activity of apricot fruits (Bílková A., Hortová B., Nývltová Z., Hollá M. Sklenářová H.)

11. Workshop 2019 – VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.

Ústní sdělení: Project „Phosphonates in fruits (Bílková A.)

12. Seminář pěstitelů ovoce – 2019, Holovousy

Ústní sdělení: Degradace reziduí pesticidů u peckovin a vliv posklizňového ošetření na celkovou antioxidační aktivitu plodů (Bílková A.)

13. VITATOX 2020 - Dvůr Králové nad Labem

Ústní sdělení: Monitoring antioxidační aktivity drobného ovoce (Bílková A.)

14. 14th European Pesticide Residue Workshop, Pesticides in food and drink – 2022, Bologna Itálie

Posterové sdělení: Effect of long-term storage on pesticide residues in sweet cherries (Bílková
A.)

9 Účast na projektech a stážích

1. 2023- 2025 MZe – NAZV QK23020046

Inovativní postupy managementu jabloňových sadů pro zvýšení konkurenceschopnosti tuzemské produkce (student - člen řešitelského týmu)

2. 2021- 2025 MZe – NAZV QK21010200

Šlechtění ovocných druhů na odolnost k abiotickým vlivům v kombinaci s vysokým obsahem antioxidantních látek v plodech (student – člen řešitelského týmu)

3. 2020-2022 TAČR ZETA 4 - TJ04000245

Studium chování fosfonátů s cílem snížení ztrát v rostlinných produktech (student – hlavní koordinátor projektu)

4. 2019-2021 TAČR ZETA 2 - TJ02000196

Výzkum využití odpadů z ovocných stromů jako zdroje cenných bioaktivních látek (student – koordinátor projektu za VŠÚO Holovousy a člen řešitelského týmu hlavního řešitele Faf UK, Hradec Králové)

5. 2019-2021 TAČR ZETA 2 - TJ02000098

Monitoring citlivosti populací Botrytis cinerea k fungicidům ve vztahu k inovaci integrované ochrany jahodníku, obsahu reziduí a skladování (student – další řešitel)

6. 2019-2023 NAZV QK1910296

Efektivita nových postupů regulace škodlivých činitelů v ovocnářství (student - člen řešitelského týmu)

7. 2017 - 2020 TAČR TH 02030223

Inovace integrované ochrany peckovin ve vztahu ke způsobu skladování a obsahu reziduí pesticidů (student – hlavní koordinátor projektu)

8. 2017 - 2019 TAČR TJ01000151

Monitoring prospěšných látek v ovoci a jejich zpracovatelských produktech s ohledem na lidské zdraví a výživu dětí (student - koordinátor projektu za VŠÚO Holovousy a hlavní koordinátor prací hlavního řešitele Faf UK, Hradec Králové)

9. 2014 - 2018 MZe – NAZV QJ1510354

Tvorba a selekce odrůd jabloní s vysokým obsahem zdraví prospěšných látek a prodlouženou skladovatelností plodů (student – člen řešitelského týmu)

10. 2015 - 2017 EUREKA CZ (LF)

Introdukce nových odrůd třešní s vysokou kvalitou plodů na evropský trh (student – člen řešitelského týmu)

11. Odborná stáž RADANAL s.r.o., duben-květen 2015, Analytická laboratoř