SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ

XLIV. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin

26.-28. 5. 2014

Skalský Dvůr

Karel Cejpek, Jindřich Špicner
editoři

Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT v Praze
Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i.

Praha 2014

Publikace neprošla jazykovou ani odbornou úpravou.
Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

© Karel Cejpek, Jindřich Špicner, 2014

ISBN 978-80-86909-09-7 (Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i.)
ISBN 978-80-7080-903-7 (Vysoká škola chemicko-technologická v Praze)
ISSN 1802-1433 (Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i.)

Obsah

R – referáty
P – postery

	Str.	
R1	**6**	**Vavreinová S.:** Uplatnění zemědělského a potravinářského výzkumu v zajištění kvalitních potravin
R2	**7**	**Zachariášová M., Hajšlová J., Schulzová V., Kaštánek P.:** Bioprospekce – účinný nástroj pro objevování nových potravinových zdrojů
R3	**8**	**Pavela R.:** Rostlinné extrakty v ochraně rostlin, aneb účinné přípravky pro ekologické zemědělství (potraviny bez reziduí pesticidů)
R4	**9**	**Rada V., Musilová Š., Killer J., Bunešová V., Kmeť. V.:** Testování potravin s obsahem probiotik a prebiotik
R5	**10**	**Cuhra P., Rosmus J.:** Aktuální stav metod pro stanovení čistých svalových bílkovin a obsahu masa v potravinách
R6	**11**	**Cejpek K.:** Změny funkčních vlastností bílkovin v důsledku Maillardovy reakce
R7	**12**	**Pivoňka J.:** Význam regionálního výzkumu pro udržení a zlepšování kvality potravin
R8	**13**	**Válková V.:** Potraviny na pranýři a výsledky sociologického výzkumu „Potraviny a český spotřebitel“
R9	**14**	**Macháčková M.:** Informační zdroje mezinárodní sítě databází složení potravin EuroFIR
R10	**18**	**Sluková M.:** Projekt "Nové postupy pro využití zemědělských surovin a produkci hlavních druhů potravin zvyšující jejich kvalitu, bezpečnost, konkurenceschopnost a výživový benefit spotřebiteli" (NAZV, QI111B053)
R11	**19**	**Hrušková M., Švec I., Heroudková K.:** Senzorický a nutriční profil těstovin na bázi kompozitní mouky pšenice/ječmen/konopí
R12	**23**	**Švec I., Hrušková M., Babiaková B.:** Reologické charakteristiky kompozitní směsi pšenice/ječmen/chia
R13	**27**	**Marková L., Basil E., Ljubijankic A., Kukurová K., Adamechová Z., Mikušová L., Murkovic M., Zielinski H., Ciesarová Z.:** Vývoj nového zdraví prospěšného cereálního produktu s použitím fermentované pohankové mouky
R14	**31**	**Smrčková P., Šárka E., Pour Vl., Chena D.:** Sledování obsahu pomalu stravitelného škrobu v laboratorně připravených extrudovaných výrobcích
R15	**32**	**Koplík R., Revenco D., Pudil F.:** Minerální látky v pšeničném zrnu a variabilita jejich obsahu
R16	**34**	**Džuman Z., Zachariášová A., Slavíková P., Jírů M., Vepříková Z., Zachariášová M., Hajšlová J.:** Pesticidy, mykotoxiny a pyrrolizidinové alkaloidy v doplňcích stravy z českého trhu
R17	**38**	**Vepříková Z., Kováčová J., Džuman Z., Zachariášová M., Hajšlová J.:** Výskyt reziduí pesticidů a mykotoxinů v produktech ekologického zemědělství
R18	**43**	**Lanková D., Odlerová S., Socas-Rodríguez B., Pulkrabová J., Hajšlová J.:** Výskyt estrogenních látek v mléce a mléčných výrobcích z obchodní sítě České republiky
R19	**48**	**Schulzová V., Hrbek V., Novotná H., Škopíková M., Hajšlová J.:** Využití metabolomiky pro hodnocení kvality sóji
R20	**53**	**Dostálová J., Málková H., Ondřejková Z., Kortánková V.:** Využití naklíčených luštěnin při přípravé pokrmů
R21	**57**	**Landfeld A., Novotná P., Strohalm J., Rysová J., Houška M.:** Mez toku a senzorické hodnocení sójových jogurtů připravených z klíčené sóji
R22	**58**	**Fleglová I.:** Analýza tuku ještě nikdy nebyla tak automatická a efektivní
R23	**59**	**Korbářová A., Šíma J.:** Snímání "neviditelného" obrazu - infračervené kamery a jejich využití v praxi
R24	**60**	**Jírů M., Zachariášová M., Džuman Y., Hajšlová J.:** Charakteristika komerčně dostupných potravinových doplňků a kosmetických přípravků na bázi kolagenu a keratinu
R25	**64**	**Hrbek V., Václavík L., Čajka T., Elich O., Hajšlová J.:** Nová strategie hodnocení kvality a autenticity potravin živočišného původu

R26	**70**	**Škorpilová T., Šimoniová A., Pipek P.:** Rozlišení chlazeného a zmraženého/rozmraženého masa pomocí enzymových metod
R27	**74**	**Prchalová J., Rajchl A.:** Hodnocení kvality stolních hořčic na českém trhu
R28	**78**	**Hůrková K., Rubert J., Hajšlová J.:** Autentikace rakytníkového oleje
R29	**82**	**Hradecký J., Humlová E., Pulkrabová J. a Hajšlová J.:** Autentifikace bylin a koření pomocí HS-SPME GC (HR) TOF MS
R30	**86**	**Kružík V., Grégrová A., Rajchl A., Čížková H.:** Profil těkavých látek jako nástroj hodnocení kvality a autenticity medu
R31	**90**	**Neradová E., Rajchl A., Kvasnička F., Čížková H.:** Možnosti odhalení přibarvování výrobků z červeného ovoce
R32	**95**	**Duchová I., Nová J., Čížková H.:** Nejběžnější vady vůně citrusových nealkoholických nápojů a možnosti jejich detekce
R33	**99**	**Mikyška A., Matoulková D., Slabý M., Hartman I.:** Nové nápoje ze sladovaných obilovin fermentované netradičními kulturami
R34	**100**	**Stupák M., Kocourek V., Hajšlová J.:** Nové postupy v kontrole kvality a bezpečnosti lihovin
R35	**104**	**Novotná H., Škopíková M., Schulzová V., Hajšlová J.:** Mák jako zdroj alkaloidů?
R36	**105**	**Bolechová M. , Kosubová P. , Čáslavský J.:** Stanovení alkaloidů v krmivech metodou UPLC-MS/MS
R37	**106**	**Krtková V., Schulzová V., Hajšlová J.:** Toxické sekundární metabolity brambor – faktory ovlivňující jejich hladiny
P1	**110**	**Džuman Z. Slavíková P., Jírů M., Vepříková Z., Zachariášová M., Hajšlová J.:** Aplikace hmotnostní spektrometrie v otevřeném prostoru pro hodnocení rezistence cereálií vůči napadení mikromycetami r. *Fusarium*
P2	**114**	**Capouchová I., Papoušková L., Škeříková A., Konvalina P., Janovská D., Václavíková M., Prokinová E.:** Využití reologického systému Mixolab při detekci změn pekařské kvality ozimé pšenice s různou intenzitou kontaminace *Fusarium* spp.
P3	**115**	**Sluková M., Honců I., Příhoda J., Smrž F., Horáčková Š., Krejčířová L.:** Nové a netradiční využití ječmene v potravinářství
P4	**118**	**Hartman I., Benešová K., Sachambula L., Psota V.:** Změny obsahu vitaminu E při sladování bezpluchého ječmene
P5	**122**	**Hudcová T., Jelínek L. , Karabín M. , Krofta K. , Dostálek P.:** Pivo se zvýšeným obsahem xanthohumolu
P6	**125**	**Kružík V., Průšová P., Hermannová K., Seidl J., Jirešová J., Hofmann J., Čížková H.:** Využití impedanční spektroskopie pro hodnocení autenticity pomerančových šťáv
P7	**130**	**Prchalová J., Kovařík F., Neradová E., Rajchl A.:** Stanovení fenolových látek metodou DART-MS-TOF
P8	**134**	**Hauser J., Pudil F.:** Změny hydrazinových derivátů v ucháči Neuwirthovu
P9	**140**	**Ilko V., Revenco D.:** Stanovení sirných látek v ethanolových extraktech česneků metodou GC/MS
P10	**144**	**Duchová I., Neradová E., Kružík V., Haubeltová A., Čížková H.:** Roční sledování kvality strouhaného křenu na českém trhu
P11	**149**	**Slavíková P., Džuman Z., Zachariášová M., Hajšlová J.:** Ochratoxin A v kávě
P12	**154**	**Kružík V., Hofmanová A., Prchalová J., Rajchl A., Čížková H.:** Možnosti využití techniky DART-TOF/MS pro rychlé posouzení autenticity čokolád
P13	**158**	**Grégrová A., Kružík V., Vrácovská E., Rajchl A., Čížková H.:** Faktory ovlivňující krystalizaci medu
P14	**163**	**Hauser J., Pudil F.:** Charakteristika původu medu pomoci pylové analýzy
P15	**167**	**Schulzová V., Novotná H., Bhave A., Krmela A., Hajšlová J.:** Využití techniky metabolomického profilování pro posouzení kvality šípků
P16	**171**	**Krmela A., Novotná H., Hrbek V., Schulzová V., Hajšlová J.:** Galaktolipidy v plodech růže šípkové a výrobcích z nich

P17	**174**	**Fenclová M., Jírů M., Zachariášová M., Hajšlová J.:** Antioxidační aktivita potravních doplňků na bázi mikrořas
P18	**179**	**Bolechová M., Kosubová P., Nehybová Z., Mrkvicová M.:** Analýza vitaminu D v krmivech metodou UPLC-MS/MS
P19	**180**	**Fišnar J., Réblová Z.:** Účinnost antioxidantů při ochraně tokoferolů během smažení potravin na pánvi
P20	**184**	**Šimková Š., Pohořelá B., Roubíčková I., Pánek J.:** Oxidační a polymerační produkty v tepelně namáhaných olejích a tucích
P21	**188**	**Mekhanoshina L., Réblová Z.:** Kvalita vybraných smažených potravin na českém trhu
P22	**192**	**Sabolová M., Sus J., Roubíčková I., Papírníková J., Doležal M., Šimková Š., Pánek J.:** Mastné kyseliny v semenech slivoní (*Prunus domestica* L.)
P23	**197**	**Rybinskaya A., Tesařová M., Filip V., Šmidrkal J., Ilko V., Doležal M.:** Stanovení esterů 3-MCPD a glycidolu při transesterifikaci tuků
P24	**201**	**Winterová R., Novotná P., Landfeld A.:** Obsah α-galaktosidů v klíčených luštěninách
P25	**205**	**Strohalm J., Novotná P., Landfeld A., Kýhos K., Kýhosová H., Houška M., Ondřejková Z ., Kortánková V., Dostálová J.:** Přehled výrobků z klíčených luštěnin připravených pro aplikaci v praxi
P26	**209**	**Al-Balaa D., Kružík V., Rajchl A., Čížková H.:** DART mass spectrometry for rapid screening and quantitative determination of cholesterol in egg pasta
P27	**214**	**Slováková M., Stupák M., Zuzánková J., Hajšlová J., Pulkrabová J.:** Hodnocení expozice člověka polycyklickým aromatickým uhlovodíkům
P28	**215**	**Semanová J., Skláršová B., Suranová M., Šimko P.:** Nový zjednodušený postup izolácie benzo[*A*]pyrénu z údených mäsových výrobkov
P29	**219**	**Šimoniová A., Škorpilová T., Adamcová M., Pipek P.:** Prodloužení údržnosti tepelně neopracovaných masných výrobků pomocí vysokého tlaku
P30	**223**	**Bušová M., Brázdová M., Opatřilová R., Osička R., Špičák V., Kodýtek J.:** Vliv klimatických změn na změny zdravotního stavu ryb
P31	**228**	**Kleckerová A., Vičarová P., Dočekalová H., Pelcová P.:** Těžké kovy v sladkovodních rybách z lokalit okresu Žďár nad Sázavou
P32	**232**	**Vytejčková S., Hradecký J., Hajšlová J., Poustka J.:** Hodnocení kvality masa pomocí profilů těkavých látek
P33	**236**	**Vápenka L., Vavrouš A., Votavová L., Dobiáš J.:** Kontaminanty v obalových materiálech na bázi papíru
P34	**240**	**Saláková, A., Kameník, J., Pavlík, Z.:** Hodnocení kvality německých masných výrobků v porovnání s českými
P35	**244**	**Máriássyová M., Káčerík S., Káčerík P.:** Aplikačné formy stabilizovaných polyfenolov hrozna
P36	**248**	**Erban V., Eichlerová E., Valenta T., Gabrovská D.:** Homofermentativní a heterofermentativní bakterie mléčného kvašení v pekařských kvasech vyrobených na bázi ječmene

R 1

UPLATNĚNÍ ZEMĚDĚLSKÉHO A POTRAVINÁŘSKÉHO VÝZKUMU V ZAJIŠTĚNÍ KVALITNÍCH POTRAVIN

Vavreinová S.
Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i.

Kvalita potravin je v dnešní době široce diskutovaným tématem. Výzkumná sféra by měla být schopná erudovaně se do této diskuse zapojit. Proto je kvalita potravin jednou z priorit národních i mezinárodních výzkumných programů, či náplní činnosti výzkumných organizací podporovaných institucionálním financováním. V poslední době tak můžeme hovořit zejména o programech MZe VAK a KUS a připravovaný program ZEMĚ . Dále NPV II MŠMT, program ALFA Technologické agentury ČR a 7.RP- Zemědělství, potraviny a biotechnologie. O kvalitu potravin se zajímají také programy MV a MPO.

Termín kvalita potravin je multikriteriální parametr, který pokrývá hygienické, nutriční, technologické, senzorické a informační aspekty. Jak může výzkum přispět k zajištění kvalitních potravin ?

Kvalita hygienická je ukazatel, který rozhoduje o použitelnosti anebo nepoužitelnosti potraviny: potravina , resp. surovina je buď zdravotně nezávadná (bezpečná) anebo není zdravotně nezávadná. Standardem jsou mezní hodnoty chemických, fyzikálních a mikrobiálních rizik, publikované v příslušných vyhláškách. Výzkum se věnuje vývoji a optimalizaci metod stanovení kvality.

Jakost nutriční je ukazatel, který udává, jak potravina odpovídá nutričním požadavkům. Kritériem jsou výživová doporučení na různých úrovních od výživových trendů, výživových doporučených dávek (VDD nebo RDA), z nich odvozených doporučených dávek potravin anebo konečně výživové pyramidy. Zemědělský výzkum se věnuje optimalizaci zemědělských technologií vedoucích k produkci suroviny se specifikovanou nutriční hodnotou. Potravinářský výzkum se věnuje vývoji potravin na bázi těchto surovin a potravin ze stávajících surovin s optimalizovanou nutriční hodnotou, včetně funkčních potravin.

Jakost technologická, která se týká především potravinářských surovin je velmi důležitý ukazatel pro výrobce, protože může do značné míry ovlivnit zpracovatelské náklady, tedy nabídkovou cenu. Má dva aspekty, a to obsah účinné látky a zpracovatelnost. Výzkum se věnuje rozvoji zemědělských technologií pro produkci suroviny vysoké technologické kvality.

Zemědělský a potravinářský výzkum také nesmí zanedbávat senzorickou jakost, která je jedním ze základních kritérií pro volbu spotřebitele. Pro toho je důležitá i užitná hodnota potravin. Vyžaduje, aby byly ve spotřebě co nejpohodlnější. Žádá, aby se rychle a spolehlivě připravily ke konzumu, aby byly přiměřeně trvanlivé. Zde je na místě výzkum zejména v oblasti balení a skladování.

R 2

BIOPROSPEKCE – ÚČINNÝ NÁSTROJ PRO OBJEVOVÁNÍ NOVÝCH POTRAVINOVÝCH ZDROJŮ

Zachariášová M., Hajšlová J., Schulzová V., Kaštánek P.
Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha

Bioprospekce, neboli vyšetřování (nových) potravních surovin z hlediska jejich potenciálu být zdrojem pozitivně působících biologicky aktivních látek, je moderní vědní disciplínou rozvíjející se v několika posledních letech v kontextu s udržitelností životního prostředí i ekonomickou politikou ČR a Evropy. Cílem bioprospekce je nalézt takové zdroje potravinářských surovin, jejichž produkce je ekonomicky málo nákladná a nenáročná na kvalitní zemědělskou půdu sloužící primárně pro produkci běžných zemědělsko-potravinářských komodit. Vhodnými surovinami pro bioprospekci jsou tedy hlavně rychle rostoucí dřeviny a vysokoenergetické rostliny (např. topol, topinambur hlíznatý, světlice barvířská, ozdobnice čínská, planá růže, černý bez, rakytník aj.), u kterých byly identifikovány využitelné biologické účinky (např. antibakteriální, antimykotické, antiparazitické, profylaktické, či antioxidační). Další surovinou jevící extrémní potenciál z hlediska prokázaných pozitivních biologických aktivit, ale i konkrétního spektra pozitivně působících látek, je biomasa mikrořas, jejichž nenáročná kultivace na nevyužitých vodních plochách zapadá do zmíněného schématu trvalé udržitelnosti. Některé druhy řas, např. *Chlorella sp., Spirulina sp., Ulkenia sp., Haematococcus sp.*, jsou dnes již využívány jako zdroje pro produkci nutraceutik, především z důvodu zvýšeného obsahu polynenasycených mastných kyselin a antioxidantů. Nicméně, výsledky dosavadního výzkumu realizovaného na VŠCHT Praha indikují, že možnosti využití mikrořas mohou být mnohem širší; ve veřejných i institucionálních sbírkách mikroorganismů existují desítky doposud neprozkoumaných kmenů s předpokladem vysokého potenciálu potravinářsky významných látek (antioxidačně působící polysacharidy, karotenoidy, xantofyly, deriváty vyšších polynenasycených mastných kyselin, fosfono-karboxylových kyselin, eikosanoidů, aj.), či enzymových aparátů.

Obecné schéma úspěšné bioprospekce začíná účinnou extrakcí širokého spektra potenciálně zajímavých látek z vyšetřovaných matric. Aby bylo dosaženo co nejširšího pokrytí sloučenin lišících se ve své chemické struktuře, a tím i v extraktabilitě, byl pro tyto účely bioprospekce vyvinut třístupňový extrakční proces zahrnující extrakci vodou (pokrývající extrakci látek s vysokou polaritou), vodným metanolem (zajišťující extrakci fosfolipidů a středně polárních látek, např. xantofylů), a nepolárním rozpouštědlem na bázi hexanu (zajišťujícím extrakci nejméně polárních lipidů, terpenů a karotenoidů). Nepostradatelnou součástí bioprospekce je pak vyšetřování biologických aktivit. K dispozici jsou série testů založených na schopnosti extraktů zhášet volné radikály, prekurzory oxidativních reakcí, ale i inhibovat specifické enzymové reakce (glukosidáz, protéz, acetylcholin esterázy, aj.). Obrovskou vypovídací hodnotu mají i biologické testy prováděné přímo na buněčných liniích. Dalším krokem v rámci procesu bioprospekce je pak necílový screening extrakčních frakcí vykazujících některý z typů biologické aktivity, který je realizován pomocí pokročilých technik vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie. Součástí je i následná identifikace konkrétní látky za tuto aktivitu zodpovědné. Bioprospekce následovaná biorafinací, tj. průmyslově aplikovatelnou izolací konkrétní zájmové látky či skupiny látek, tvoří nový směr aplikovatelného výzkumu efektivně využitelný pro produkci nutričně obohacených (funkčních) potravin a nutraceutik s přidanou výživovou hodnotou.

R 3

ROSTLINNÉ EXTRAKTY V OCHRANĚ ROSTLIN, ANEB ÚČINNÉ PŘÍPRAVKY PRO EKOLOGICKÉ ZEMĚDĚLSTVÍ (POTRAVINY BEZ REZIDUÍ PESTICIDŮ)

Pavela R.
Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha 6

Rostliny si v průběhu evoluce vytvořily několik velmi účinných obranných strategií vůči chorobám a škůdcům. Jednou z nich je syntéza biologicky aktivních látek obranného charakteru. Tyto látky – sekundární metabolity- vykazují biocidní či inhibiční aktivitu proti různým patogenům a škůdcům. My tyto látky používáme v lékařství, kosmetice i v potravinářství jako látky brzdící výskyt především patogenních organismů. Kromě toho jsou využívány po staletí jako účinné látky tzv. botanických pesticidů. V příspěvku bude prezentována historie a současnost používání botanických pesticidů, jako environmentálně a zdravotně bezpečné alternativy ochrany rostlin a zemědělských produktů. Výzkum a vývoj botanických pesticidů je v současnosti dynamicky rozvíjející se vědní odvětví, jehož výsledky dávají vzniknout novým přípravkům využitelných v mnoha oborech lidské činnosti. Některé výsledky výzkumu získaných v rámci řešení projektu TAČR (projekt č. TA01020163) budou v příspěvku prezentovány.

R 4

TESTOVÁNI POTRAVIN S OBSAHEM PROBIOTIK A PREBIOTIK

Rada V. (1), Musilová Š. (1), Killer J. (1,2), Bunešová V. (1), Kmeť. V. (3)
(1) Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze;
(2) Ústav živočišné fyziologie a genetiky AVČR, Praha; (3) Ústav živočišnej fyziológie, Košice

Byly testovány bifidobakterie v mléčných kysaných výrobcích a lyofilizovaných práškách, přičemž byl stanovován celkový počet živých buněk v průběhu expirační doby. Testování probíhalo podle IDF Standardu 220 (ISO/DIS 29981). Výrobky vesměs splňovaly normu, nebo množství deklarované na obalu. Kromě počtu živých buněk bylo také provedena izolace čistých kultur kultur mikroorganismů a jejich identifikaci pomocí fenotypových a genotypových testů až na úroveň druhu, poddruhu a případně i kmene pomocí fingerprintových metod. Dále byly testovány také počty probiotických kmenů laktobacilů v mléčných kysaných výrobcích, které obsahují Lactobacillus acidophilus, L.rhamnosus a L. casei. Zejména posledně jmenovaný druh je hojně používán pro svoje imunostimulační vlastnosti. Počty L. casei ve výrobcích na českém trhu zpravidla splňují minimální hranici 1 milion živých buněk (6 log CFU) v 1 g výrobků, i když absolutní počty mezi jednotlivými produkty se liší. Byly také testovány metody pro selektivní stanovení ostatních probiotických mikroorganismů jako jsou kvasinky (Saccharomyces cerevisce a Saccharomyces boulardii), enterokoky, Escherichia coli (v ČR jsou známy preparáty Mutaflor a Coliinfant) a další mikroorganismy.

R 5

AKTUÁLNÍ STAV METOD PRO STANOVENÍ ČISTÝCH SVALOVÝCH BÍLKOVIN A OBSAHU MASA V POTRAVINÁCH

Cuhra P. (1), Rosmus J. (2)

(1) Státní zemědělská a potravinářská inspekce, Praha,
(2) Státní veterinární ústav, Praha

Problematika stanovení obsahu masa a čistých svalových bílkovin (ČSB) je v posledních letech předmětem širokých diskusí mezi výrobci masných výrobků, dozorovými orgány a laboratořemi. Uvedená problematika zahrnuje širokou škálu výrobků – od guláše v konzervě, přes špekáčky nebo šunku až po uzenou plec, zmrazené rybí filety nebo obalované rybí prsty. Jak obsah masa tak i ČSB vychází z definic uvedených v legislativě, avšak na jejich vlastní stanovení existují různé názory a laboratoře používají různé alternativy metod stanovení. Zejména odlišení „čistých (svalových)“ bílkovin od ostatních dusíkatých látek v případě stanovení ČSB pomocí srážení taninem je v současné době předmětem kritiky ze strany některých výrobců. Z tohoto důvodu připravila Státní zemědělská a potravinářská inspekce ve spolupráci se Státní veterinární správou a laboratořemi Státních veterinárních ústavů mezilaboratorní experiment, který by měl vést k vytvoření jednotné referenční metody pro stanovení tohoto ukazatele.

R 6

ZMĚNY FUNKČNÍCH VLASTNOSTÍ BÍLKOVIN V DŮSLEDKU MAILLARDOVY REAKCE

Cejpek K..
Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha

Cílené modifikace struktury nativních bílkovin vycházejí z výživových, hygienicko-toxikologických a technologických požadavků. Jedná se zejména o zlepšení fyzikálně-chemických vlastností bílkovin (schopnosti tvořit gely, emulze a pěny, rozpustnosti, schopnosti vázat vodu aj.), ale také výživové hodnoty výrobků (inaktivací antinutričních faktorů, zlepšením využitelnosti esenciálních aminokyselin aj.) a jejich organoleptických vlastností (textury a chuti). Chemické nebo enzymové modifikace umožňují také využití netradičních surovin pro potravinářské účely (např. bílkovin kvasinek).

Vlastnosti bílkovin se ovšem během zpracování potravin mění také zcela spontánně, a to často pouhou aplikací vyšších teplot bez přídavku dalších chemických činidel. Struktura bílkovin se zde mění jak reakcemi per se (reakcemi dehydroproteinu, deaminací, desulfurací) a oxidací, tak po reakci s přítomnými sacharidy a jejich degradačními produkty (tzv. Maillardova reakce nebo glykace), případně s fenolovými látkami (reakce neenzymového hnědnutí). Na glykaci aj. modifikace bílkovin je obvykle nahlíženo kriticky, neboť může vést ke snížení výživové jakosti potravin a vzniku potenciálně škodlivých aminokyselinových derivátů. O vlivu posttranslačních změn v důsledku Maillardovy reakce na technologickou funkčnost potravinářských bílkovin, tj. jejich zejména želatinizační, pěnotvorné a emulgační vlastnosti, je známo dosud málo. Využití tohoto potenciálu navíc naráží na absenci vhodných technicky proveditelných, optimalizovaných a reprodukovatelných metod přípravy konjugátů. Příspěvek představuje aktuální informaci o pokrocích v této oblasti modifikace bílkovin, glykace a Maillardovy reakce.

R 7

VÝZNAM REGIONÁLNÍHO VÝZKUMU PRO UDRŽENÍ A ZLEPŠOVÁNÍ KVALITY POTRAVIN

Pivoňka J.
Ústav konzervace potravin, VŠCHT Praha

Kvalita potravin je pojem často skloňovaný laickou veřejností, stejně tak i v odborných kruzích. Se samotným sdělením, že potraviny nabízené spotřebitelům mají být kvalitní, se nepochybně ztotožní každý, kdo na toto téma vyjadřuje názor. Avšak stejně jako je tomu v řadě jiných případů i v této oblasti dochází ke sporům až v okamžiku, kdy začne být obsah pojmu naplňován konkrétními detaily. V širším slova smyslu zahrnuje definice kvalitní potraviny řadu aspektů, mezi které patří například bezpečnost potravin ve všech souvislostech jejich uvádění do oběhu, výživová hodnota, senzorické vlastnosti, původ, obsahy klíčových složek a řada dalších. Vědecká práce sehrává v této oblasti nezastupitelnou roli. Výzkumníci vytváří na jedné straně prostor pro definování samotných kvalitativních znaků a na straně druhé pro jejich následnou kontrolu. Nedílnou součástí výzkumných prací je i podíl na zlepšování a inovování potravin a způsobu jejich výroby a uvádění do oběhu. V neposlední řadě patří mezi úlohy výzkumníků i zpracování podkladů pro hodnocení a následnou analýzu rizik včetně jejich komunikace. Řada z těchto úloh je plněna na úrovni mezinárodních projektů, které však přirozeně nemohou postihnout všechna regionální specifika a obvykle jsou zpracovávány v odborné rovině, která je zejména pro menší organizace obtížně uchopitelná. Právě v této oblasti sehrává významnou roli výzkumná práce prováděná na regionální úrovni a v těsné spolupráci s uživateli výsledků výzkumu.

R 8

POTRAVINY NA PRANÝŘI A VÝSLEDKY SOCIOLOGICKÉHO VÝZKUMU „POTRAVINY A ČESKÝ SPOTŘEBITEL“

Válková V.
Státní zemědělská a potravinářská inspekce, Brno

Potraviny na pranýři se staly jedním z nejdůležitějších komunikačních nástrojů Státní zemědělské a potravinářské inspekce (SZPI) se spotřebiteli. SZPI pomocí webu, mobilní aplikace a facebookového profilu přináší spotřebitelům informace o svojí činnosti - o nevyhovujících šaržích potravin zjištěných úřední kontrolou, výsledcích tematicky zaměřených kontrol a zajímavosti ze světa potravin. Potraviny na pranýři umožňují i zpětnou vazbu, spotřebitelé mohou zasílat své dotazy a podněty ke kontrole.

Sociologický výzkum v říjnu 2013 ukázal, že mezi nejméně informované spotřebitele patří zejména spotřebitelé ve věku 18-25 let. Pro oslovení této skupiny spotřebitelů je využíván od února 2014 znovuobnovený facebookový profil Potraviny na pranýři. Zde jsou pro tuto věkovou skupinu zajímavou formou prezentovány důležité informace z webu Potraviny na pranýři, přinášeny populárně-naučné informace o potravinách a zejména pak jsou zde aktivně spotřebitelé zapojeni do diskuze o kvalitě potravin.

Při sociologickém výzkumu bylo osloveno 1022 respondentů ve věku 18 -79 let z celé České republiky. Výzkum, jehož cílovou skupinou byli spotřebitelé, byl zaměřen zejména na nákupní chování a zacházení s potravinami, srozumitelnost a obsah informací na obalech potravin, vnímání bezpečnosti, kvality a falšování potravin, informovanost a (sebe)ochranu spotřebitelů a znalost institucí a organizací pro ochranu spotřebitele.

R 9

INFORMAČNÍ ZDROJE MEZINÁRODNÍ SÍTĚ DATABÁZÍ SLOŽENÍ POTRAVIN EUROFIR

Macháčková, M.
Zemědělské poradensko-vzdělávací centrum a Knihovna Antonína Švehly, Ústav zemědělské ekonomiky a informací, Mánesova 1453/75, 120 56 Praha 2

EuroFIR AISBL (European Food Ĭnformation Resource – www.eurofir.eu) je mezinárodní nezisková organizace, která sdružuje 28 center pro národní databáze složení potravin z Evropy, USA, Austrálie a Kanady a další subjekty, které využívají data o složení potravin. Členská základna zahrnuje univerzity, výzkumné ústavy, instituce státní správy, potravinářské podniky, výrobce SW, nutriční specialisty a jednotlivce.

Projekt EuroFIR vznikl v r. 2005 v návaznosti na předchozí evropské projekty, které se týkaly databází složení potravin v rámci programů COST a EPIC. V počátečním období byl zcela (2005-2010) a poté částečně (2011-2013) financován z prostředků 6. a 7. Rámcového programu EU.

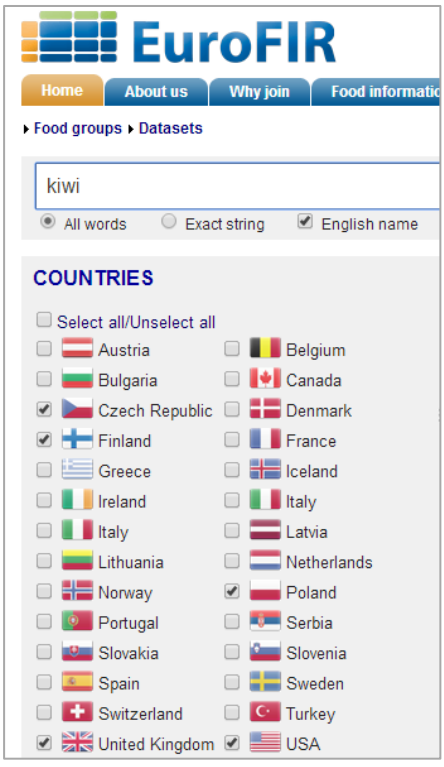
Hlavním cílem EuroFIR[(1)] je mezinárodní spolupráce a kooperace při harmonizaci metodiky [(2)] pro zpracování a zajištění kvality dat o složení potravin a vybudování jednotné platformy pro výměnu a transfer dat mezi různými aplikacemi a uživateli [(3)]. EuroFIR působí jako expertní a vzdělávací centrum pro oblast databází složení potravin.

Podpora EuroFIR měla a má zásadní význam při iniciaci a v dalších fázích rozvoje projektu Databáze složení potravin České republiky (www.nutridatabaze.cz). Na základě pověření Ministerstva zemědělství databázi spravuje a aktualizuje Ústav zemědělské ekonomiky a informací. Účast na mezinárodních vzdělávacích kurzech, přístup k dokumentaci EuroFIR a komunikace s odborníky umožnila vybudovat národní databázi plně kompatibilní se systémy EuroFIR z hlediska struktury a dokumentace dat.

Tento příspěvek má za cíl představit čtyři hlavní informační systémy EuroFIR.

EuroFIR FoodEXplorer – vlajková loď EuroFIR

FoodEXplorer je jednotné vyhledávací rozhraní pro simultánní vyhledávání dat o složení potravin v 28 národních databází složení potravin z Evropy, USA, Austrálie a Kanady. FoodEXplorer navazuje na předchozí systém tohoto typu eSearch [(3)]. Databázový soubor zahrnuje data pro více než 60 000 potravin. Databáze zařazené ve FoodExplorer jsou dokumentovány podle harmonizované metodiky EuroFIR.



Vyhledávat lze s využitím nástrojů pro jednoduché a rozšířené vyhledávání.

V rámci jednoduchého vyhledávání lze využít název potraviny v angličtině nebo v národní jazykové mutaci. Je možné vyhledávat také podle deskriptorů tezauru LanguaL (www.langual.org), který se používá pro popis potravin.

U rozšířeného vyhledávání je možné si zvolit požadovaný nutrient (či nutrienty), určit limity pro jeho (jejich) obsah v potravinách a individuální charakteristiky hodnot podle typu zdroje nebo způsobu získání hodnot. Kombinací deskriptorů tezauru LanguaL lze lépe definovat požadované vlastnosti vyhledávaných potravin (např. podle zdroje potraviny, způsobu zpracování, ingrediencí, obalových materiálů atd.).

Data pro vyhledané potraviny lze porovnávat, ukládat do schránky a exportovat mimo systém.

K dispozici jsou dva formáty pro export dat – EXCEL a tzv. balíček pro transport dat ve formátu XML (Food Data Transport Package), který byl speciálně vyvinut EuroFIR pro transfer dat

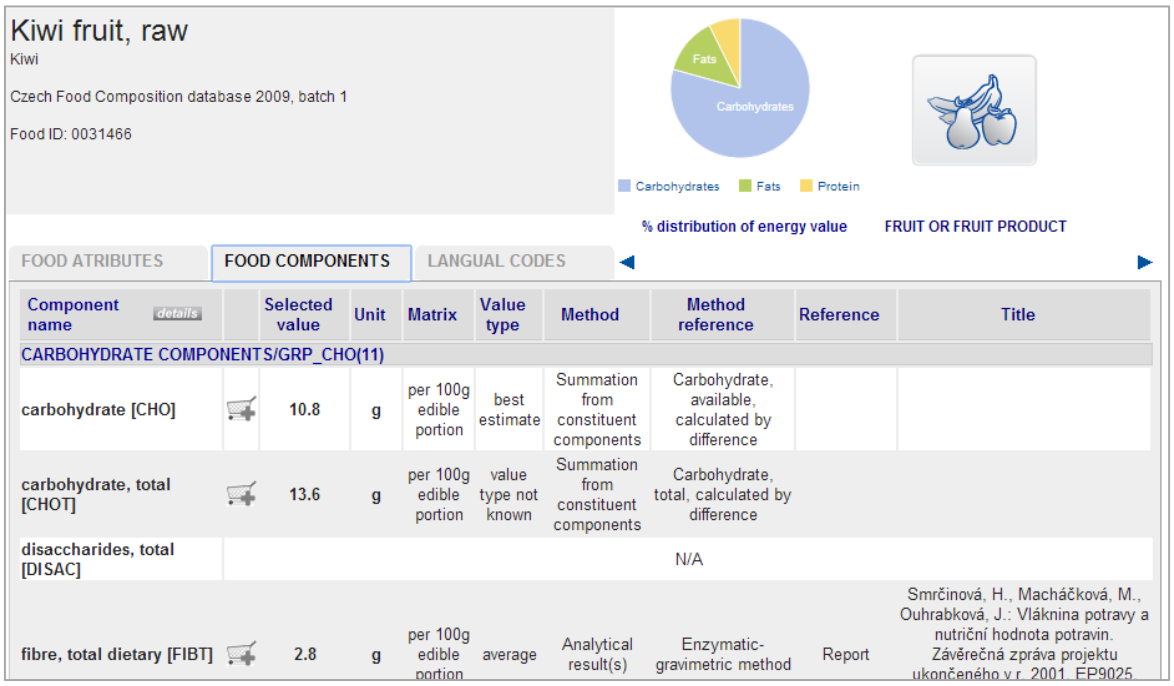
o složení potravin mezi různými aplikacemi a databázovými systémy.

Ve výstupní sestavě je uveden seznam potravin, které odpovídají zadaným parametrům. Příslušnost k jednotlivým národním databázím je označena vlaječkou.

Data pro vybrané potraviny lze porovnávat.

Component	0090339-United Kingdom Kiwi fruit Kiwi fruit	0041147-Poland Kiwi Kiwi fruit	0031466-Czech Republic Kiwi Kiwi fruit, raw	0005054-Finland Kiivi kuorittu Kiwi fruit without peel
alcohol	0 g		0 g	0 g
ash		0.7 g	0.7 g	0.7 g
biotin	0 ug			
calcium	25 mg	25 mg	32 mg	27 mg
carotenoids, total				226.8 ug
beta-carotene	40 ug	43 ug	43 ug	42.5 ug

Záznam jednotlivé potraviny poskytuje podrobné informace o způsobu získání dat vč. citace zdroje dat. Je uveden seznam deskriptorů LanguaL, které jsou přiřazeny ke zvolené potravině.



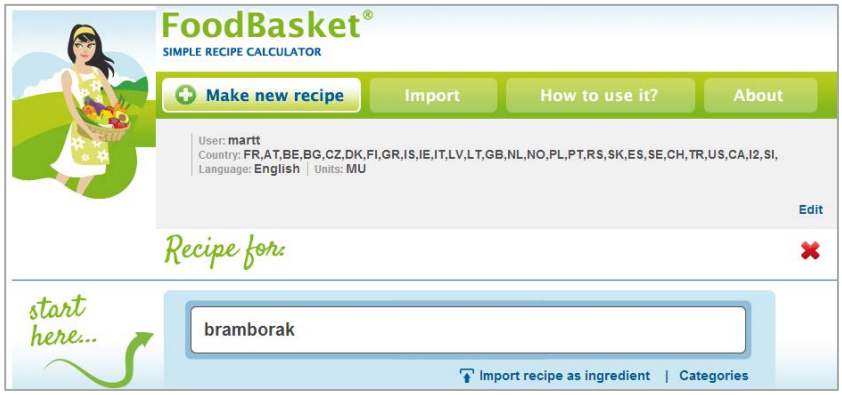
FoodEXplorer je velmi užitečný systém pro rychlé vyhledávání informací z národních databází složení potravin s využitím různých vyhledávacích nástrojů, které umožňují formulovat dotaz podle individuálních potřeb široké skupiny uživatelů (např. kompilátorů národních databází, specialistů na výživu, vědců, zástupců autorit, výrobců potravin).

EuroFIR FoodBasket – aplikace pro výpočet nutriční hodnoty potravin

Aplikace FoodBasket umožňuje výpočet nutriční hodnoty pokrmů a potravin. Aplikace je propojena se systémem FoodEXplorer. Před vlastním výpočtem si lze zvolit zdrojovou tabulku dat z jedné či více národních databází.

Výstupní sestava poskytuje výsledky vyjádřené na jednu porci, 100 g nebo na 1000 kcal.

Získaná data lze vytisknout, zaslat mailem nebo exportovat.



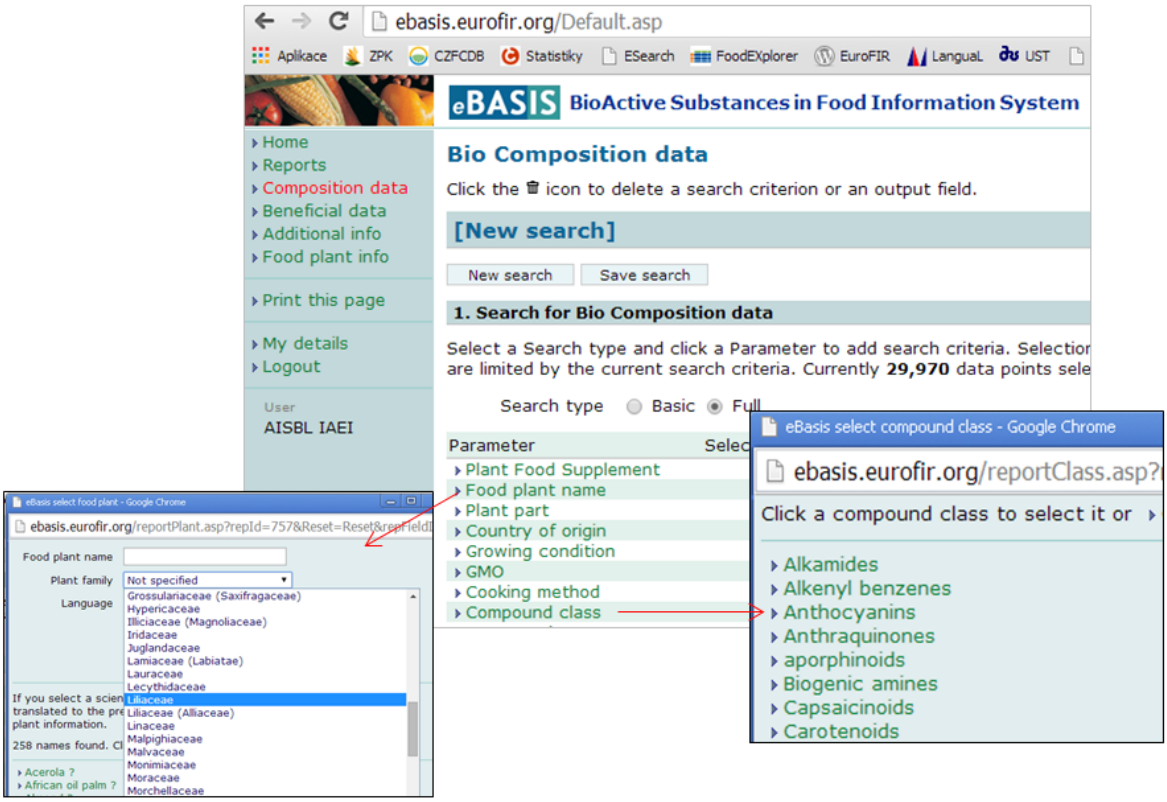
Do systému lze importovat i vlastní data pro ingredience receptur. Výpočet je realizován podle jednotné metodiky s využitím dat ze zvolených národních databází složení potravin. Aplikace zatím neumožňuje zohledňovat změny hmotnosti při zpracování potravin. Bude nutné rovněž implementovat tzv. faktory ztrát nutrientů.

EuroFIR eBASIS –databáze složení a biologických účinků látek rostlinného původu

V databáze eBASIS (Bioactive Substances in Food Information Systems) je zaměřena na sběr dat o látkách rostlinného původu, u kterých se předpokládá příznivý účinek na zdraví [(4)].

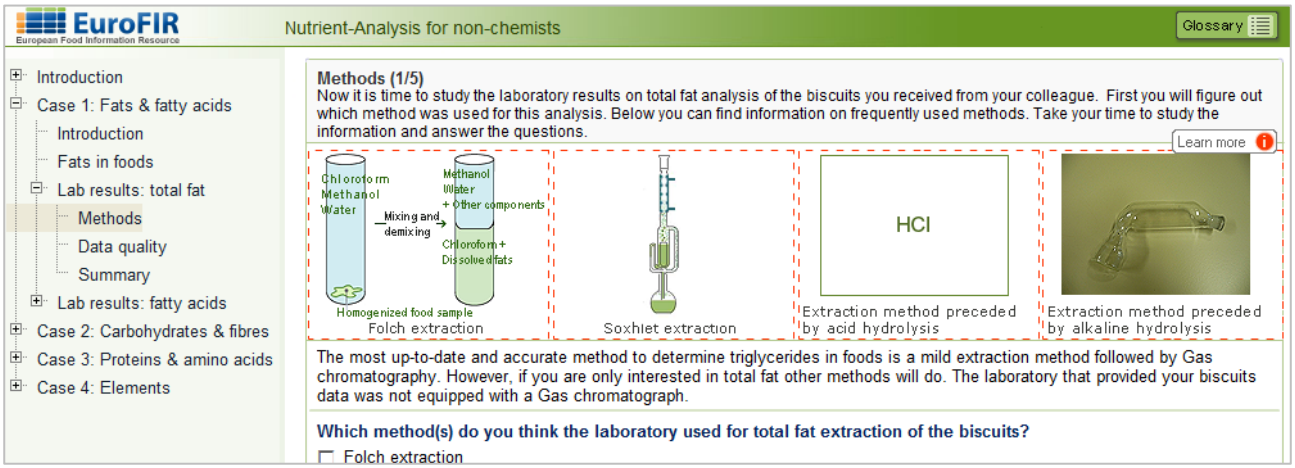
Sběr dat pro hlavní rostlinné zdroje, které se konzumují v Evropě, byl realizován výhradně z recenzovaných zdrojů.

K prohledávání jsou k dispozici čtyři moduly – data o složení, příznivé účinky na zdraví, charakteristika jednotlivých rostlinných zdrojů (vč. patnácti jazyčného slovníku názvů rostlin) a doplňkové informace. Strukturu výstupní sestavy si volí uživatel systému podle vlastních potřeb. U každého záznamu jsou k dispozici citace zdroje dat.



e-learningový kurz „Složení potravin pro nechemiky“

Kurz je koncipován jako informační a studijní materiál o databázích složení potravin. V současné době obsahuje pět modulů – tuky, bílkoviny, sacharidy a vláknina, vitaminy a minerální látky. Moduly mají jednotnou strukturu – informace o dané skupině látek (struktura, výskyt v potravinách, vlastnosti), metody pro jejich analýzu, způsob prezentace v databázích složení potravin, doplňkové informace a vysvětlivky. Kurz je ceněn jako užitečná pomůcka pro samostudium studentů a všech zájemců o problematiku databází složení potravin.



Přístup k informačním zdrojům EuroFIR

Výše popsané informační zdroje EuroFIR jsou přístupné pro členy EuroFIR po zaplacení členského příspěvku. Zdroje je možné vyzkoušet v rámci testovacího přístupu, který si lze vyžádat na sekretariátě EuroFIR: secretariat@eurofir.org

Více informací o EuroFIR je k dispozici na www.eurofir.eu

Závěr

Organizace EuroFIR je v současné době vyprofilována jako subjekt, který zajišťuje přístup k utříděným informacím o složení potravin. Technologicky zastřešuje jejich propojení s dalšími uživatelskými aplikacemi, což rozšiřuje možnosti pro vyžívání dat o složení potravin v širokém spektru oborů. EuroFIR poskytuje znalostní a expertní zázemí pro instituce, které se zabývají tvorbou a správou databází složení potravin na národní úrovni. Služby a informační zdroje jsou zaměřeny rovněž na subjekty, které tyto databázové zdroje využívají.

Poděkování

Budování Databáze složení potravin České republiky je podporováno z prostředků MZe. Některé aktivity byly podpořeny EuroFIR

Literatura

1. GIBSON-MOORE, H. EuroFIR: Where we are now? *Nutrition Bulletin.* 2013, roč. 38, 358-362.
2. BECKER, W., MOLLER, A., IRELAND, J., ROE, M., UNWIN, I. and PAKKALA, H. Proposal for structure and detail of a EuroFIR Standard on food composition data II: Technical Annex. Version 2008. Danish Food Information. 2008, ISBN 978-87-92125-10-1.
3. BELL, S., H. PAKKALA a M. FINGLAS. Towards a European food composition data interchange platform. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 2012, roč. 82, č. 3, s. 209-215.
4. KIELY, M., L. J. BLACK, J. PLUMB, P. A. KROON, P. C. HOLLMAN, J. C. LARSEN, G. J. SPEIJERS, M. KAPSOKEFALOU, D. SHEEHAN, J. GRY a P. FINGLAS. EuroFIR eBASIS: application for health claims submissions and evaluations. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2010, roč. 64, Suppl. 3, S101-S107.

.

R 10

PROJEKT "NOVÉ POSTUPY PRO VYUŽITÍ ZEMĚDĚLSKÝCH SUROVIN A PRODUKCI HLAVNÍCH DRUHŮ POTRAVIN ZVYŠUJÍCÍ JEJICH KVALITU, BEZPEČNOST, KONKURENCESCHOPNOST A VÝŽIVOVÝ BENEFIT SPOTŘEBITELI" (NAZV, QI111B053)

Sluková M.
Ústav sacharidů a cereálií, VŠCHT Praha

R 11

SENZORICKÝ A NUTRIČNÍ PROFIL TĚSTOVIN NA BÁZI KOMPOZITNÍ MOUKY PŠENICE/JEČMEN/KONOPÍ

Hrušková M., Švec I., Heroudková K.
Ústav chemie a technologie sacharidů, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha

Souhrn

Ječná mouka se liší od pšeničné, která je ve formě polohrubé těstárenské mouky nebo semoliny základní recepturní složkou těstovin, chemickým složením. Kromě vyššího obsahu vlákniny a β-glukanů je známo, že má tmavší barvu a specifickou chuť. Zlepšení nejen chuťových vlastností pšenično-ječných těstovin se očekává přídavkem konopných produktů. Při laboratorní výrobě těstovin s ječmenem byly ověřeny varianty s obsahem 30 a 50 % hladké mouky a přídavky 4 odlišných forem konopní (celozrnné a hladké). Laboratorní těstárenská linka VŠCHT Praha (lis Korngold TR-70, předsušárna Sun P+ a sušárna Sun 450/2) simuluje klasickou výrobu sušených těstovin a výrobky jsou hodnoceny v syrovém, sušeném a vařeném stavu podle interní metodiky VŠCHT. Těstoviny jednovaječné s přídavkem konopných produktů v množství 5 a 10 % byly vyrobeny standardně s teplotou lisování do 40° C. V sušeném stavu se přídavek 10 % vzorků z neloupaného semene a z hladké mouky po extrakci projevily větší deformací bez ohledu na obsah ječné složky. Vaznost a bobtnavost ječných těstovin s konopím souvisí s recepturou a hodnoty byly srovnatelné s ječným druhem. Barevný odstín a vůni ječných těstovin lze hodnotit jako spotřebitelsky přijatelné. Chuťový vjem těstovin po uvaření byl popsán jako senzoricky standardní (bez výrazné ječné nebo konopné příchuti). Nutriční profil pšenično-ječno-konopných těstovin lze popsat obsahem bílkovin, resistentního škrobu, β-glukanů a vlákniny, přičemž jejich zastoupení průkazně ovlivňuje podíl ječné mouky v receptuře.
Klíčová slova: těstoviny, ječná mouka, konopí, nutriční profil

Úvod

Sušené těstoviny jako základní potravina jsou při nízkém obsahu tuku zdrojem polysacharidů, bílkovin a vlákniny (Kruger *et al.* 1996, Pehle a Andrich 2006, Hamr 2007). Splňují požadavky zdravé výživy - mají nízký obsah sodíku, vyváženou skladbu sacharidů a nízký glykemický index. Pro inovaci sortimentu těstovin jsou přidávány netradiční suroviny s cílem zvýšení nutriční hodnoty při zachování původního spotřebitelského charakteru. Přídavky se dosahuje zvýšení obsahu zdraví prospěšných látek, např. vlákniny, β-glukanů aj. (Marconi 2001; Ugarčić-Hardi *et al.* 2007, Hrušková *et al*. 2007).

Ječmen má ve srovnání s pšenicí vyšší obsah vlákniny (cca o 40 %). β-glukany endospermu a aleuronové vrstvy ovlivňují metabolismus glukosy a lipidů. Pozitivní vliv konzumace ječmene na lidské zdraví byl dokázán při prevenci vředových žaludečních chorob a při snižování výskytu rakovinových a kardiovaskulárních onemocnění. Sacharidy ječmene tvoří převážně škrob (cca 50-68 %) se zastoupením amylosy a amylopektinu 1:3 a uvedený poměr ovlivňuje vaznost vody během vaření, tvar a celistvost těstovin. Bílkoviny se vyskytují ve srovnání s pšenicí v nižším množství, obsah kolísá od 7 do 10 %. Albuminy a globuliny jsou bohaté na lysin a threonin. Prolaminy, které se v ječmeni nazývají hordeiny, obsahují více kyseliny glutamové a prolinu (Newman a Newman 2008). Obsah lipidů v ječmeni je cca 2-4 %, což je srovnatelné s pšenicí.

Konopí seté (*Cannabis sativa*) je pěstované ve dvou subspeciích - ssp. *culta* a ssp. *indica*. Druhé jmenované je známé jako hašišné a je zakázané s ohledem na obsah THC (Perlín, 2002). Pro potravinářské užití lze použít celá semena (20-25 % bílkovin, 25-35 % tuků a 10-15 % polysacharidů), která se obvykle před použitím loupají (Best, 2009). Semeno konopí je vhodnou surovinou pro výrobu oleje s obsahem cannabidiolu (CBD), který má pozitivní účinky při pohybových obtížích. Dále obsahuje n-6 a n-3 mastné kyseliny, jejichž poměr se považuje za nutričně optimální (Ohr, 2009). Složení konopné mouky se liší podle použité suroviny (závisí na odrůdě a lokalitě pěstování), způsobu přípravy a míry odtučnění. Uvádí se obsah 30-33 % bílkovin, 7-13 % tuku a cca 40 % škrobu. Bílkoviny konopné mouky tvoří cca ze dvou třetin edestin, patřící

mezi nízkomolekulární globuliny. Konopné produkty mají i významné množství β-karotenu a vitamínů B_1 a E. Z minerálních látek je přínosem vyšší obsah železa a zinku. Konopná mouka je přirozeně bezlepková, vhodná pro nemocné celiakií.

Cílem práce bylo vyvinout a popsat nutriční profil sušených těstovin na bázi pšenice, ječmene a konopných produktů.

Materiál a metody

Těstoviny byly vyrobeny podle těstárenského pokusu VŠCHT Praha za použití lisu TR 70 (Korngold AG, Rakousko), předsušárny Sun P+ a vertikální sušárny Sun 450/2 (Mezos, ČR). Základní receptura a technologický postup popisuje Hrušková (2007). V práci byly ověřeny receptury jednovaječných těstovin s přídavky hladké ječné mouky (30 a 50 %, mlýn Křesín) a konopných produktů (K4-celozrnná mouka z loupaného semene, K5-celozrnná mouka z neloupaného semene. K6-hladká mouka z extrahovaného semene z konvenční pěstování, K7-hladká mouka z extrahovaného semene z bio produkce) v množství 5 a 10 % na polohrubou těstárenskou mouku (mlýn Delta Praha). Konopné mouky celozrnné byly připraveny na laboratorním šrotovníku KM 5001 (ČR) ze semen vypěstovaných firmou Hemp Production Chraštice. Hladká mouka K6 pochází od téže firmy (odrůda Fedora 17) a bio K7 je z Rakouska (firma Hanf Natur). Těstoviny ve tvaru kolínek byly hodnoceny při lisování, po usušení a po uvaření podle interního postupu VŠCHT Praha. Vedle senzorického hodnocení (model pro očkovitost, barvu, vůni a chuť) byly stanoveny i objektivní charakteristiky vařených těstovin (vaznost, bobtnavost). Pro popis nutričního profilu těstovin s různým recepturním složením byl stanoven obsah bílkovin dle Kjedhala (ČSN 56 0512-12), vlákniny potravy (AOAC 985.29), β-glukanů (AACC 32-23) a resistentního škrobu (AOAC 2002.02).

Výsledky a diskuse

Hodnocení senzorické jakosti v sušeném stavu

Pro výrobu těstovin s přídavkem ječné mouky a konopných komponent nepřekročila teplota během lisování doporučenou hodnotu 40 °C. Těstoviny obohacené celozrnnou moukou z konopí (K4, K5) vykazovaly vyrovnaný tvar bez zlomů. Vzorky s hladkými moukami K6 a K7 měly při přídavku 10 % větší počet zlomů (hodnocení tvaru horší o 1 až 2 body). Vyšší přidaná množství se projevují výskytem tmavších stipů, které ovlivnily vzhled a stejnoměrnost barvy sušeného výrobku bez ohledu na obsah ječné složky. Těstoviny však byly při hedonickém popisu barvy hodnoceny jako přijatelné. Vzorky s celozrnnou moukou z loupaného semene mají ve všech znacích srovnatelnou kvalitu jako standard. Fortifikací konopím je více ovlivněn tvar sušených těstovin a přídavek bio hladké mouky K7 měl v závislosti na přidaném množství spíše negativní vliv.

Hodnocení senzorické jakosti ve vařeném stavu

Při hodnocení pšenično-ječných těstovin po uvaření byla průměrná vaznost vzorku 116 resp. 125 %, což je méně než obvyklá hodnota pro pšeničné těstoviny (cca 145 %). Vzorky s celozrnnými konopnými produkty měly tento znak srovnatelný, zatímco pro těstoviny s hladkými moukami byla zjištěna vaznost vyšší (130 a 127 %). Bobtnavost těstovin s přídavkem konopných celozrnných mouk se také nelišila od nefortifikovaných s obsahem 30 % ječné složky, avšak tyto těstoviny s hladkými produkty po extrakci tuku vykazovaly hodnoty v rozmezí 1,25-1,61. V případě těstovin obsahujících 50 % ječmene byla situace opačná – celozrnné produkty bobtnavost neovlivnily, pro hladké se zjistilo zvýšení na úroveň výrobků z pšeničné mouky. Schopnost více vázat vodu souvisí s deformací těstovin po uvaření, což se varným testem potvrdilo. Nejvyšší tvarovou stabilitu si zachovaly těstoviny s přídavkem celozrnných mouk z konopí bez ohledu na přidané množství ječmene. Stejně jako v sušeném stavu byly varem více deformovány těstoviny obohacené bio hladkou moukou. Z hlediska chuti nebyl v žádném vzorku s konopím patrný nahořklý vjem typický pro ječmen v souladu s prací Sinesio *et al.* (2008). Vůně pomocí intenzitní stupnice byla v celém soboru popsaná jako typická (po konopné surovině) a plná. Barva těstovin s moukou z extrahovaných semen konopí měla výrazně tmavší odstín než vzorky bez fortifikace a odstín byl

ovlivněn přidaným množstvím. Vyšší nerovnoměrnost způsobená stipy byla patrná pro vzorky s přídavky konopné mouky z neloupaných semen.

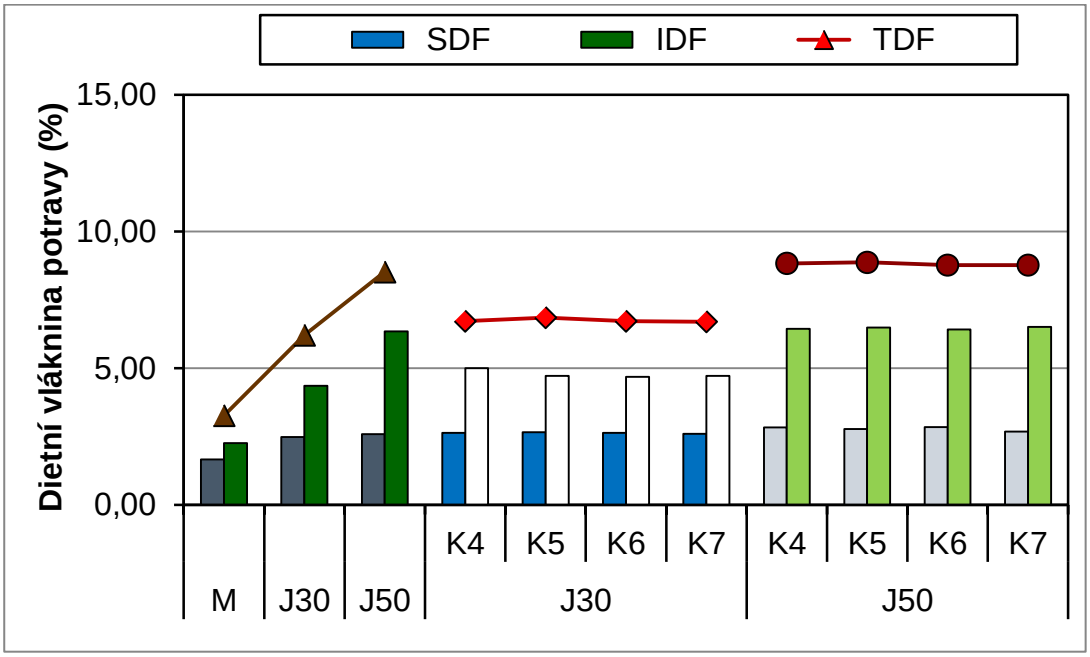
Nutriční profil konopných těstovin

Ze souboru pšenično-ječných těstovin s konopím byly pro vybrané receptury stanoveny analytické znaky - obsah bílkovin, vlákniny potravy, rezistentního (RS) škrobu a β-glukanů. Základ pro posouzení nutričního přínosu tvoří vzorek pšeničných těstovin bez fortifikace. Obsah bílkovin byl stanoven pomocí Kjeldahlovy metody a nejnižší hodnotu vykazují těstoviny pouze s přídavkem hladké ječné mouky (12,5 %). Přídavky konopných produktů bylo zjištěno zvýšení o 10-25 % v závislosti na ječné složce. Množství resistentního škrobu naopak s přídavky konopí klesá, v případě hladkých mouk téměř na polovinu. Obsah β-glukanů v těstovinách s 30 % ječmene činil 1,2 % a přídavky hladkých konopných mouk se snížil o třetinu. Téměř srovnatelné množství bylo zjištěno pro těstoviny s konopnou celozrnnou moukou z neloupaného semene (Tab. 1).

Tab. 1 Obsah resistentního škrobu a β-glukanů

vzorek	rezistentní škrob (%)	β-glukany (%)
P+30%	0,76	1,20
+10%K4	0,45	0,70
+10%K5	0,43	1,00
+10%K6	0,37	0,80
+10%K7	0,39	0,80

Obsah vlákniny potravy ve sledovaných druzích těstovin je znázorněn na Obr. 1. Těstoviny s ječmenem obsahují více všech forem vlákniny ve srovnání s pšeničnými. Vlivem fortifikace konopnými produkty došlo ke zvýšení obsahu celkové vlákniny (TDF), kterou tvoří ze 2/3 nerozpustný podíl (IDF). Rozdíly jednotlivých druhů vlákniny v těstovinách způsobené testovanými typy konopných produktů nejsou průkazné, ale obsah jednotlivých složek je dán množstvím ječné mouky v receptuře.



Obr. 1 Obsah vlákniny

V souboru sledovaných recepturních variant těstovin není zahrnuta skutečnost, že obsah všech látek s nutričním přínosem výrazně ovlivňuje původní zastoupení v ječmeni (Knuckles *et al.* 1997).

Závěr

Ve vzorcích těstovin obohacených mlýnskými výrobky z ječmene byly ve většině sledovaných znaků lépe hodnoceny druhy s přídavky celozrnných konopných mouk z loupaného semene. Přídavek 5 % mouky K4 má pozitivní vliv na tvar a celistvost ječných těstovin po uvaření. Z hladkých druhů konopné mouky se jako vhodnější jevil přídavek komerčního druhu K6. Vyšší očkovitost není v případě speciálních druhů těstovin posuzovaná negativně, ale spíše odlišuje jednotlivé recepturní varianty. V rámci zdravé výživy jsou spotřebitelé ochotní akceptovat rozdílný vzhled těstovin, pokud značí nutriční přínos výrobku, avšak za předpokladu přijatelné formy a chuťového vjemu po uvaření. Přídavky konopných produktů byl docílen určitý stupeň maskování typické ječné příchuti. Nutriční profil pšenično-ječno-konopných těstovin lze popsat obsahem bílkovin, resistentního škrobu, β-glukanů a vlákniny a jejich zastoupení průkazně ovlivňuje podíl ječné mouky v receptuře.

Literatura

Best D. (2009): Whole Seed-better than Whole Grain? *Cereal Foods World*, 54 (5): 226-228.
Hamr K. (2007): Těstoviny dnes a zítra. Ročenka pekaře a cukráře 2007: 100-108.
Hrušková M., Vítová M., Švec I. (2007): Těstoviny s přídavkem netradičních plodin. *Mlynářské noviny* XVIII (4): 7-11.
Hrušková M., Kallasová E., Sekerová H., Švec I., Leitnerová D. (2011): Spotřebitelsky atraktivní druhy těstovin. *Výživa a potraviny* 1: 2-6.
Knuckles B.E., Hudson C.A., Chiu M.M., Sayre R.N. (1997): Effect of beta-glucan barley fractions in high-fiber bread and pasta. *Cereal Foods World* 42(2): 94-99.
Kruger J.E., Matsuo R.B., Dick J.W. (1996): Pasta and noodle technology. AACC, Inc. St. Paul, USA. str. 13-59.
Marconi E., Carcea M. (2001): Pasta from non-traditional raw material. *Cereal Food World* 46: 522-530.
Newman R.K., Newman C.W. (2008): Barley for food and health: science, technology and products. John Wiley and Sons, Inc. Hoboken. New Jersey USA. str. 56-95.
Pehle T., Andrich B. (2006): Lexikon těstovin. Dobřejovice. Rebo Production. str. 19-66.
Perlín C. (2002): Konopí jako potravina. *Výživa a potraviny* 57(4): 121-122
Ohr L. M. (2009): Matters of the Heart. *Food Technology* 63 (6): 123-124.
Sinesio F., Paoletti F., D`Egidio M.G., Moneta E., Nardo N., Peparaio M., Comendador F.J. (2008): Flavor and texture as critical sensory parameters of consumer acceptance of barley pasta. *Cereal Foods World* 53(4**):** 206-213.
Ugarčić-Hardi Ž., Jukič M., Koceva-Komlenić D., Sabo M., Hardi J. (2007): Quality parameters of noodles made with various supplements. *Czech Journal of Food Science* 25(3): 151-157.

Práce byla vypracována v rámci projektu QI111B053.

R 12

REOLOGICKÉ CHARAKTERISTIKY KOMPOZITNÍ SMĚSI PŠENICE/JEČMEN/CHIA

Švec I., Hrušková M., Babiaková B.
Ústav sacharidů a cereálií, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha

Souhrn

Ve srovnání s pšeničnou obsahuje ječná mouka vyšší podíl beta-glukanů a vlákniny. Chia produkty se vyznačují vysokým obsahem tuků včetně nenasycených mastných kyselin, zastoupením lehce stravitelných bílkovin, rozpustné vlákniny a minerálních látek (vápník, železo, zinek, fosfor, hořčík). Výrobky s podílem ječné mouky mají spíše netypickou příchuť, zatímco chia semena jsou chuťově neutrální. Kompozitní mouky byly vytvořeny z premixu hladké mouky pšeničné a ječné v poměru 70:30 a dvou vzorků celozrnné chia mouky (CH1 z bílého, CH2 z hnědého semínka; 5 a 10 %). Charakteristiky pšeničné mouky, pšenično-ječného premixu a směsí s chia byly testovány na farinografu, extenzografu a amylografu a pekařským pokusem. Vaznost vody se mírně zvýšila pouze přídavkem ječné mouky, vliv obou chia mouk nebyl průkazný. Stupeň změknutí byl v případě premixu vyšší v souvislosti s „naředěním“ lepkových struktur ječnými bílkovinami, oba typy chia mouky soudržnost těsta dále oslabily. Extenzografický test naznačil změny viskoelastických vlastností pšeničného těsta – zhoršení poměru pružnosti a tažnosti ječnou a mírnou kompenzaci chia moukou s ohledem k přidanému množství. Viskozita suspenzí byla mezi testovanými vzorky nejnižší pro pšeničnou mouku, ječná mouka a přídavky chia složky hodnoty amylografického maxima zvýšily. Obrácený trend platil pro pečivo – ječná mouka velikost bulek primárně snížila, ještě nižší měrné objemy měly vzorky s chia v receptuře. Klenutost pečiva se všemi přídavky zhoršila, pouze 10 % chia v receptuře znamenalo zlepšení. Pšenično-ječné pečivo mělo vlhčí střídu a mírně cizí, ještě přijatelnou příchuť. Mezi výrobky s CH1 nebo CH2 nebyl zjištěn významný rozdíl, senzorický profil se spíše zlepšil proti pšenično-ječné receptuře pečiva.

Kličová slova: pšeničná a ječná mouka, chia, znaky těsta a pečiva

Úvod

Inovace v cereálním oboru představuje využití netradičních plodin s důrazem na nutriční hodnotu pekařských výrobků. Mlýnské produkty z ječmene a chia mohou sloužit pro fortifikaci pšeničné mouky. Obě recepturní složky jsou známé svým jedinečným chemickým složením. Přes zvýšení výživové hodnoty pečiva tyto netradiční plodiny modifikují viskoelastické chování těsta a ovlivňují výsledek pekařského pokusu. Jak reologické zkoušky, tak pekařský pokus mají za cíl optimalizovat recepturu tak, aby výsledný obohacený výrobek se svým senzorickým profilem co nejméně odlišoval od tradičního pšeničného.

Ječmen (*Hordeum vulgare* L.), patřící do čeledi *Lipnicovité*, je využívám jako hospodářské krmivo a zdroj zkvasitelných cukrů při výrobě piva a některých destilátů. Studie Newman R.K. a Newman C.W. (2008) uvádí možnost regulovat hladinu krevního cukru konzumací celozrnných ječných výrobků. Také ječná vláknina je lidskému zdraví prospěšná (obsah beta-glukanů), pomáhá redukovat hladinu cholesterolu v krvi a tak snižuje riziko srdečně-cévních onemocnění.

Chia (*Salvia hispanica* L.) představovala hlavní plodinu v časech Aztéků a Mayů, i dnes se pěstuje především v Jižní Americe. Chia semena jsou hodnotná vysokým obsahem tuků včetně nenasycených mastných kyselin, zastoupení lehce stravitelných bílkovin, rozpustné vlákniny a minerálních látek (vápník, železo, zinek, fosfor, hořčík) (Reyes-Caudillo et al. 2008, Luna Pizzaro et al. 2013). Fortifikace pšeničné mouky chia v různé formě se projevuje změnou jakostních znaků kompozitní mouky v závislosti na přidaném množství. Charakteristikami těsta s obsahem chia produktů se zabývají např. práce Ixtaina et al. 2008 nebo Iglesias-Puig a Haros (2013). Inglett et al. (2013) popisují chování směsi složené z ječné a chia mouky a uvádějí, že 10% přídavek chia nemá průkazný vliv na viskozitu ani elasticitu těsta. Přídavek chia do pšeničné mouky zeslabuje lepkovou kostru a způsobuje pokles objemu pečiva. Ortega-Ramirez et al. (2013) uvádí snížení až o 25 % proti nefortifikované receptuře při přídavku 5 a 10 % chia. Její použití v potravinářském průmyslu bylo v rámci EU povoleno v roce 2009, současný limit pro pekařské výrobky je 10%.

Cílem práce bylo zhodnotit vliv ječné a chia celozrnné mouky na reologické vlastnosti nefermentovaného těsta a výsledek pekařského pokusu. Práce porovnává dopad přídavku mouky jak z bílých, tak z hnědých chia semen.

Materiál a metody

V práci byly hodnoceny kompozitní směsi z hladké pšeničné a ječné mouky (70:30, w/w, zkratka MJ30; mlýn Delta Praha, resp. mlýn Křesín) a dvou botanických variet chia (šalvěje španělské) – bílé a hnědé (CH1, CH2) v množstvích 5 nebo 10 %. Chia celozrnné mouky byly připraveny na laboratorním šrotovníku KM 5001 ze semen pocházejících z Mexika zakoupených ve specializovaných obchodech. Technologická kvalita kompozitních vzorků je analyticky popsána Zelenyho sedimentační hodnotou a číslem poklesu. Změny vlastností moučné suspenze, resp. nefermentovaného těsta byly sledovány pomocí farinografu, extenzografu a amylografu, (metody, ISO 5530-1, ISO 5530-2 a ICC 126). Pečivo bylo připraveno a hodnoceno podle interních postupů Cereální laboratoře VŠCHT Praha.

Výsledky a diskuse

Charakteristiky kompozitních vzorků

Základní pšeničná mouka M je podle obsahu bílkovin 13,8 % a hod-noty Zelenyho testu 47 ml (kvalita bílkovin) vhodná pro fortifikaci netra-dičními plodinami. Jak uvádí **Tab. 1**, kvalita bílkovin se však z pekařského hlediska snižuje jak ječnou, tak chia moukou bez vlivu typu (22 ml pro tri-kompozit s 10 % CH1). Číslo poklesu jako míra poškození škrobu je pro M průkazně vyšší než empirické optimum 250 ± 25 s; v případě pšenično-ječné směsi došlo k mírnému snížení. Pro testované kompozitní směsi byl naopak pozorován slabý nárůst.

Tab. 1. Analytické vlastnosti kompozitní směsi

Kompozitní mouka	Číslo poklesu (s)	Zelenyho test (ml)
M	402	47
MJ30	372	30
MJ30 + CH1-5	432	25
MJ30 + CH1-10	449	22
MJ30 + CH2-5	426	26
MJ30 + CH2-10	433	24

M – pšeničná mouka, MJ30 – směs pšeničné a ječné mouky 70:30, CH1/CH2 – celozrnná mouka z bílých/hnědých chia semen

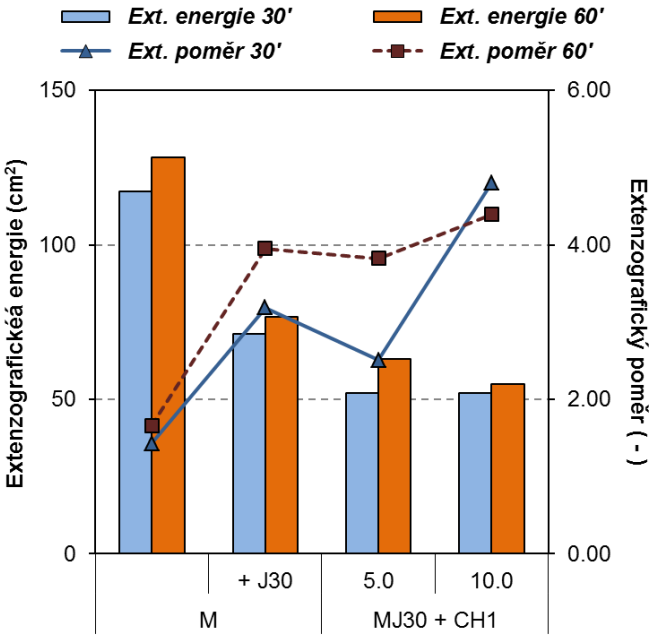
Reologické chování kompozitních vzorků

Vysoká vaznost vody (61,6 %) se podle hodnocení na farinografu významně zvýšila přídavky obou netradičních plodin (**Tab. 2**). Doba vývinu i stabilita těsta byla zkrácena přídavkem ječné mouky, částečná kompenzace nastala oběma podíly chia ve směsi. Odolnost vůči přehnětení se lineárně snižovala, stupeň změknutí tri-kompozitu s 10% CH1 byl proti stan-dardu dvojnásobný (vliv nelepkových bílkovin ječmene a chia). Směsi s CH2 se chovaly obdob-ně (data neuvedena). Ex-tenzografický test naznačil změny viskoelatických vlastností pšeničného těsta, silnější vliv byl stanoven v rámci kratší doby odležení těsta (*Obr. 1*). Ječná mouka způsobila srovnatelné zvýšení pružnosti, resp. snížení tažnosti těsta (cca o 40%),

Tab. 2. Farinografické charakteristiky kompozitního nefermentovaného těsta

Kompozitní mouka	Vaznost (%)	Doba vývinu (min)	Stabilita (min)	Stupeň změknutí (FJ)
M	61,6	6,75	8,50	55
MJ30	65,5	3,50	4,00	60
MJ30 + CH1-5	70,6	5,00	6,50	80
MJ30 + CH1-10.0	75,1	5,00	11,00	120

čímž se poměr těchto vlastností více než zdvojnásobil. Chia mouka v nižším množství pružnost těsta zeslabila, kdy extenzografický poměr byl nižší než pro MJ30. Ve vyšším zastoupení reagovala s ječnou moukou – bylo pozorováno zejména snížení tažnosti a tedy znásobení hodnoty extenzografického poměru nad hodnotu vypočtenou pro MJ30. Podle extenzografické energie je patrné snížení pekařské kvality již přídavkem ječné mouky, prohloubení negativního vlivu pokračovalo ve sho-dě s výši chia ve směsi (max. pokles na 56 % hodnoty standardu, *Obr. 1*).

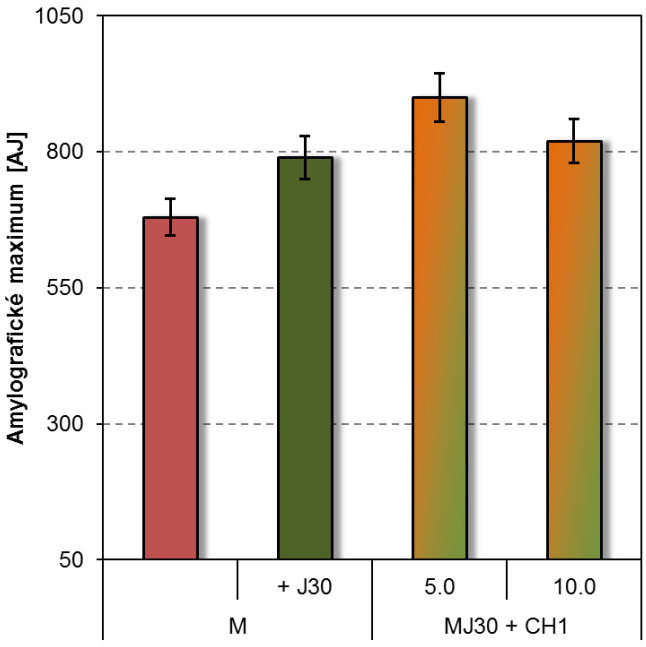


Obr. 1. Vliv ječné (J) a chia (CH) mouky na rheologické vlastnosti nefermentovaného pšeničného těsta

Viskozita suspenzí podle měření na amylografu (*Obr. 2*) byla mezi testovanými vzorky málo variabilní, ale maximum viskozity bylo nejnižší pro M. Zvýšení viskozity vlivem ječné mouky potvrzuje Hofmanová (2011), a to na dvojnásobek při 50% podílu ječné mouky ve směsi. Podobně jako číslo poklesu, hodnota 680 AJ odpovídá velmi mírnému stupni poškození škrobu; pro pekařské užití je optimum o cca 200 jednotek nižší. Z tohoto pohledu došlo vlivem fortifikace k negativní změně, ovšem mezi vzorkem MJ30 a jeho kompozity s CH1 nelze v rámci chyby měření najít průkazný rozdíl.

Pekařský pokus s kompozitními moukami

Měrný objem i tvar pšeničného pečiva z laboratorního pokusu lze označit za standardní. Přídavkem 30 % ječné mouky došlo ke snížení měrného objemu o cca 40 %. Přídavek chia také neměl pozitivní vliv, další snížení velikosti bulky bylo v rozsahu 21-34 % (proti pšenično-ječnému pečivu) – nelze prů-kazně odlišit vzorky výrobků obsahující chia mouku z bílých nebo hnědých semen (**Tab. 3**). Tvar pečiva ze všech testovaných kompozitních směsí byl méně klenutý (v/d 0,57-0,59), pouze 10 % CH1 i CH2 tvar zlepšilo (v/d 0,63 a 0,68). Ve shodě s měrným objemem se snižovala i míra penetrace, tj. narůstala hutnost střídy. Výrobky s přídavkem chia celozrnné mouky se vyznačovaly světlej-ší barvou kůrky, střída mírně tmavla podle dávky chia. Senzorické hodnocení pšenično-ječného pečiva s chia komponentami lze považovat ve všech přípa-dech za standardní, chuťo-vě přijatelnější ve srovnání s výrobky pouze z pšenične a ječné mouky (příliš hutné s typickým přípachem a příchutí). Přídavky celozrn-ných chia mouk se proje-vily mírně horší žvýkatel-ností, ačkoli střída byla na dotek vlhčí než čistě pšeničného pečiva. Vyšší



Obr. 2. Vliv ječné (J) a chia (CH) mouky na viskozitu suspenze pšeničné mouky

přídavky chia znamenaly větší podíl dezintegrovaných slupek, které bylo možno při žvýkání sousta díky větší tvrdosti rozpoznat (lze přirovnat k máku).

Tab. 3. Charakteristiky pečiva z kompozitních mouk

Kompozitní mouka	**Měrný objem pečiva** (ml/100 g)	**Tvar pečiva v/d** (1)	**Penetrace** (mm)	**Senzorika** (body)
M	374	0.59	13.3	9
MJ30	233	0.57	4.2	15
MJ30 + CH1-5	176	0.59	5.4	10
MJ30 + CH2-5	154	0.59	4.5	13
MJ30 + CH1-10	184	0.63	6.7	12
MJ30 + CH2-10	169	0.68	4.3	18

Závěr

V pekárenském oboru patří pšeničné mouky k základním složkám a sledování jejich reologických vlastností je v současné době nedílnou součástí deklarace jakosti. V souvislosti s požadavky na "zdravější" pekařské výrobky se zvyšuje uplatnění mouky z netradičních plodin a dopady na technologické chování se sledují při navrhování nových receptur.

Pomocí základních reologických přístrojů bylo pro kompozitní směsi pšeničné a ječné mouky s chia popsáno chování při přípravě těsta a jeho deformaci. Průkazný a spíše negativní vliv změny složení byl potvrzen při zkouškách na farinografu a extenzografu. Pekařským pokusem bylo zjištěno, že i přes mírně nižší měrný objem má přídavek celozrnné mouky ze semen chia pozitivní vliv na chuťové vlastnosti pšenično-ječného pečiva.

Literatura

Reyes-Caudillo E., Tecante A., Valdivia-Lopez M.A. (2008): Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. Food Chemistry, 107: 656–663.

Hofmanová T. (2011): Charakteristiky směsí vybraných druhů tuzemských obilovin, Diplomová práce, VŠCHT Praha, 127 p.

Iglesias-Puig E., Haros M. (2013): Evaluation of performance of dough and bread incorporating chia (*Salvia hispanica* L.). Europ. Food Res. Technol., 237: 865-874.

Inglett G.E., Chen D., Xu J., Lee S. (2013): Pasting and rheological properties of chia composites containing barley flour. Internat. J. Food Sci. Technol., 48(12): 2564-2570.

Ixtaina V.Y., Nolasco S.M., Tomás M.C. (2008): Physical properties of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. Industrial Crops Products, 28: 286–293.

Luna Pizzaro P., Lopes Almeida E., Sammán N.C., Chang Y.K. (2013): Evaluation of whole chia (*Salvia hispanica* L.) flour and hydrogenated vegetable fat in pound cake. LWT - Food Sci. Technol., 54: 73-79.

Newman R.K., Newman C.W. (2008): Barley for food and health. Wiley Inc. Publication. p. 178-194. ISBN 9780470102497.

Ortega-Ramirez R., Leyva-García D. I., Sanchez-Robles R. M., Morales-Ortega A. (2013): Effect of addition of amaranthus, chia and wheat bran on bread. Sborník abstrakt (Brijs K., Gebruers K., Courtin C. M., Delcour J. A., eds.), C&E Spring Meeting: Unlocking the full potential of cereals: challenge for science based innovation, Leuven, Belgium, 29. - 31. May 2013, str. 127.

Práce byla vypracována v rámci projektu QI 111 B053.

R 13

VÝVOJ NOVÉHO ZDRAVÍ PROSPĚŠNÉHO CEREÁLNÍHO PRODUKTU S POUŽITÍM FERMENTOVANÉ POHANKOVÉ MOUKY

Marková L.[1], Basil E.[1], Ljubijankic A.[2], Kukurová K.[1], Adamechová Z.[1], Mikušová L.[3], Murkovic M.[2], Zielinski H.[4], Ciesarová Z.[1]

[1)] Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Výskumný ústav potravinársky, Bratislava, Slovenská republika
[2)] Technische Universität, Institut für Biochemie, Graz, Rakousko
[3)] STUVITAL, s.r.o., Bratislava, Slovenská republika
[4)] Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk, Olsztyn, Polsko

Abstrakt

Cílem této studie je vývoj nového druhu cereálního výrobku připraveného z nefermentované a fermentované pohankové mouky s využitím baktérií *Lactobacillus plantarum*, které zlepšují stravitelnost a organoleptické vlastnosti produktů. Pohanka je pseudocereálie (*Fagopyrum esculentum)* obsahující významné množství rutinu s antioxidačními, protizánětlivými a antikarcinogenními vlastnostmi. Zároveň byl zkoumaný aspekt zdravotní bezpečnosti z hlediska obsahu pravděpodobně karcinogenního akrylamidu, který vzniká v průběhu pečení. Výsledky ukázali, že muffiny s fermentovanou i nefermentovanou pohankovou moukou jsou pro spotřebitele přijatelné jak z hlediska zdravotního benefitu, tak i s ohledem na organoleptické vlastnosti.

Klíčová slova: pohanka, fermentace, Lactobacillus, akrylamid, cereální produkt

Úvod

Cereální výrobky patří mezi potraviny, které jsou velmi často inovovány. Vývoj nových výrobků odráží nejen požadavky spotřebitelů, ale je také snaha přispívat k řešení zdravotních problémů populace (např. výrobky se sníženým obsahem soli či energetickým obsahem, bez cholesterolu, s prodlouženou trvanlivostí atd.) [1]. V posledních letech se objevují nové potraviny s obsahem bioaktivních látek s antioxidačními vlastnostmi. V důsledku toho vzrostl zájem o pohanku (*Fagopyrum esculentum*), která obsahuje základní živiny a vlákninu v nutričně příznivém poměru. Pohanka je zdrojem řady bioaktivních látek příznivě působících na kardiovaskulární soustavu a gastrointestinální trakt [1, 2]. Je zajímavá zejména pro vysoký obsah vitamínů B1 a B2, aminokyseliny lyzin, proteinů s významným podílem esenciálních aminokyselin, flavonoidů, fytosterolů, rozpustných sacharidů a řadu dalších látek [3]. Přítomný rutin má vynikající antimutagenní, antikarcinogenní a protizanětlivé účinky, zvyšuje pružnost cevních stěn, reguluje srážlivost krve a posiluje imunitní systém organismu [1, 4].

Hlavním cílem této studie je vývoj nového zdraví prospěšného cereálního výrobku připraveného s fermentovanou a nefermentovanou pohankovou moukou s využitím baktérií *Lactobacillus plantarum*. Fermentační proces cereální matrice vede k degradaci antinutričních faktorů a zároveň zvyšuje výživovou hodnotu potraviny a dostupnost minerálů, proteinů a sacharidů pro organizmus. Mimo toho baktérie mléčného kvašení produkují mnohé aromatické látky pozitivně ovlivňující výsledné organoleptické vlastnosti produktu [5]. Výrobek je také sledován z hlediska bezpečnosti a obsahu potenciálně karcinogenního akrylamidu, který vzniká v průběhu Maillardovy reakce z aminokyseliny asparagin, a také je hodnocena jeho kvalita a akceptovatelnost pro spotřebitele [6].

Materiál a metody

Příprava fermentované pohankové mouky

Pohanková mouka byla smíchána s vodou a následně vysterilizována. Zásobní roztok *Lactobacillus plantarum* byl připraven naočkováním v MRS médiu, z něhož bylo připravováno inokulum vložením zásobní kultury do MRS média a kultivováním 24 hodin při 37 °C staticky.

Následně bylo inokulum vmícháno do sterilní suspenze mouky a kultivováno po dobu 24 hodin při 25 °C staticky.

Příprava muffinů

Muffiny byly připravovány podle upravené základní receptury pro přípravu muffinů použitím míchacího zařízení KitchenAid (KitchenAid Europa, Inc., Belgie). Pro přípravu muffinů bylo kromě fermentované či nefermentované pohankové mouky použito dalších 6 různých druhů mouk (kukuřičná, žitná, ovesná, pšeničná, pohanková a špaldová). Muffiny byly pečeny v peci Miwe Condo (Miwe Michael Wenz GmbH, Německo) při teplotě 180 °C po dobu 25 minut.

Měření barvy a analýza texturních vlastností

Barva zhomogenizovaných vzorků byla měřena kolorimetrem Color i5D, X-Rite (Grand Rapid, MI, USA) podle CIELab barevného prostoru. Zdrojem záření bylo umělé denní světlo D65/10°.

Analýza texturních vlastností muffinů byla prováděna 1,5 hodiny po upečení pomocí analyzátoru textury TA.XT *plus* (Stable Micro Systems, Velká Británie). Použita byla kulová sonda o průměru 1 palce (P/1SP) umožňující stanovení pevnosti a pružnosti muffinů.

Stanovení obsahu akrylamidu pomocí LC/ESI-MS-MS

Zhomogenizované vzorky byly extrahovány 0,1 % CH_3COOH. Jako vnitřní standard byl použit d_3-akrylamid. LC/MS-MS analýza byla prováděna pomocí HPLC systému 1200 série (Agilent Technologies, USA) spolu s Agilent 6410 Triple Quad detektorem vybaveným ESI iontovým zdrojem podle metodiky publikované v článku Bednáriková *et al.* [11].

Senzorické hodnocení

Senzorické hodnocení bylo prováděno 12 nezávislými odbornými hodnotiteli. Senzorické hodnocení bylo zaměřeno na 4 základní parametry (celkový vzhled, střídka, vůně a chuť), přičemž u vůně a chuti byli hodnoceny i doplňující deskriptory, které jsou pro muffin žádoucí, nebo vůni či chuť negativně ovlivňují.

Test spotřebitelských preferencí byl proveden v rámci veletrhu Danubius Gastro 2014 v Bratislavě, kdy byly muffiny ochutnány více jak 80 spotřebiteli. Spotřebitelé kromě hodnocení vzhledu, chuti a vůně muffinů měli také uvést, zda je tento výrobek pro ně zajímavý a zda by si jej koupili.

Statistické zhodnocení výsledků

Výsledky chemických analýz jsou uvedeny jako průměr a směrodatná odchylka z nezávislých měření. Pro statistické zhodnocení výsledků byla použita jednofaktorová analýza rozptylu ANOVA. Zhodnocení výsledků bylo prováděno na hladině významnosti 0,05.

Výsledky

Celkem bylo připraveno 6 různých druhů muffinů, jejichž společným základem bylo použití nefermentované či fermentované pohankové mouky pomocí baktérií *Lactobacillus plantarum,* přičemž se tyto muffiny lišily v použitém druhu druhé mouky, kterou byla mouka kukuřičná, žitná, ovesná, pšeničná, pohanková nebo špaldová. Vzhledem k tomu, že během fermentačního procesu cereální matrice dochází nejen k degradaci antinutričních faktorů a zvyšování výživové hodnoty potraviny, produkují také bakterie mléčného kvašení řadu látek, které mohou ovlivnit výsledné organoleptické vlastnosti produktu [5]. V prvé řadě byl tedy proveden test spotřebitelských preferencí, který měl ukázat, jak by spotřebitelé hodnotili tento výrobek a nakolik by byl pro ně atraktivní. Tento test potvrdil přijatelnost všech druhů muffinů s fermentovanou nebo nefermentovanou pohankovou moukou a i zájem spotřebitelů si takový to výrobek v obchodní síti koupit.

Současně bylo provedeno i senzorické hodnocení výrobku 12 nezávislými odbornými hodnotiteli. Úkolem hodnotitelů bylo zjistit rozdíl v jedné nebo více organoleptických vlastností

muffinů s fermentovanou nebo nefermentovanou moukou, avšak při senzorickém hodnocení odbornými hodnotiteli se neprokázali statisticky významné rozdíly v organoleptických vlastnostech (celkový vzhled, střídka, vůně nebo chuť) v důsledku fermentace laktobacily. Zároveň z výsledků vyplynulo, že hodnotitelé nejkladněji hodnotili muffin se špaldovou moukou, který získal v průměru 15 bodů z možných 20 bodů. Naopak nejméně bodů (12,5 bodů) získal muffin s žitnou moukou.

Během senzorického hodnocení byly sledovány i doplňující deskriptory vůně a chuti, přičemž hodnotitelé u všech muffinů vnímali vůni po pohance, která byla ve formě fermentované či nefermentované pohankové mouky přítomna ve všech muffinech a současně u každého muffinu zaznamenali vůni typickou pro daný muffin podle druhu použité mouky. Kromě toho byla hodnotiteli zaznamenána u muffinů se špaldovou moukou i oříšková vůně, která byla hodnotiteli přijímán velice kladně, a která byla způsobena právě přítomnou špaldovou moukou.

Chuť muffinů hodnotitelé popsali jako příjemně sladkou, typickou pro daný muffin podle druhu použité mouky a s příchutí pohanky, která byla přítomna ve všech muffinech, přičemž podle očekávání byla pohanková chuť i vůně nejvýrazněji vnímána u muffinů připravených čistě z pohankové mouky. Zároveň hodnotitelé v chuti silně vnímali vlhkost výrobku, avšak tento dojem byl hodnotiteli vnímán spíše pozitivně, a u některých muffinů dokonce vyvolával pocit větší vláčnosti. Vyšší vlhkost výrobku byla pravděpodobně dána použitím pohankové mouky, která byla před fermentováním smíchána s vodou a následně byla tato směs sterilizována, čímž došlo k vytvoření husté kaše. V této formě byla následně ať už fermentovaná či nefermentovaná pohanková mouka přidávána do muffinů. Důsledkem toho nedocházelo během pečení k tak rychlému odpařování vody z výrobku a muffiny mohli působit po upečení vlhčím a tudíž vláčnějším dojmem.

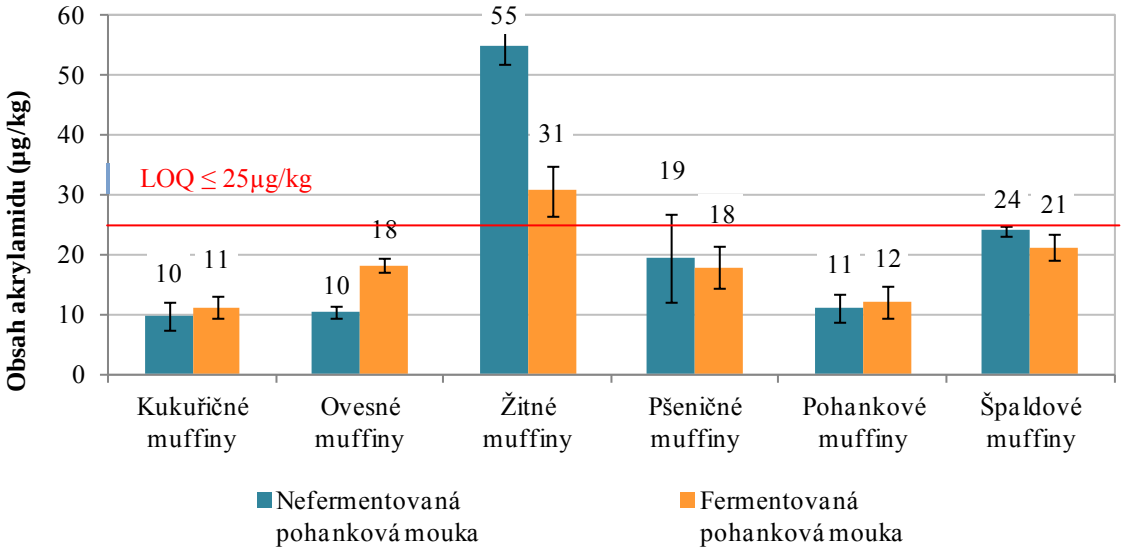
Tab. 2: Hodnoty pevnosti, pružnosti a barvy muffinů s fermentovanou a nefermentovanou pohankovou moukou

Muffin	**Pevnost (N)**		**Pružnost (%)**		**Barva – *L****	
	Neferment. pohan. mouka	Ferment. pohan. mouka	Neferment. pohan. mouka	Ferment. pohan. mouka	Neferment. pohan. mouka	Ferment. pohan. mouka
Kukuřičný	1,04 ± 0,07	1,01 ± 0,18	69,8 ± 0,4	70,3 ± 1,0	58,04 ± 0,15	57,00 ± 0,28
Ovesný	1,43 ± 0,15	1,43 ± 0,21	68,5 ± 0,5	67,6 ± 0,5	56,29 ± 0,38	56,55 ± 0,43
Žitný	1,00 ± 0,13	1,09 ± 0,08	66,6 ± 1,1	65,6 ± 0,6	56,60 ± 0,35	56,90 ± 0,65
Pšeničný	1,08 ±0,06	0,81 ± 0,12	68,7 ± 0,5	65,4 ± 0,6	56,60 ± 0,30	56,16 ± 0,55
Pohankový	2,47 ±0,20	2,01 ± 0,14	67,2 ± 0,6	67,0 ± 0,5	49,91 ± 0,33	50,41 ± 0,31
Špaldový	2,11 ± 0,20	2,54 ± 0,33	66,3 ± 0,3	66,7 ± 0,3	47,69 ± 0,43	48,38 ± 0,37

Muffiny nebyly hodnoceny pouze senzoricky, ale změny barvy a texturních vlastností byli sledovány i měřením pomocí kolorimetru Color i5D, X-Rite (Grand Rapid, MI, USA) a analyzátoru textury TA.XT *plus* (Stable Micro Systems, Velká Británie). Z texturních vlastností byla sledována pevnost a pružnost muffinů, přičemž pevnost je definována jako síla potřebná pro stlačení produktu o předem stanovenou vzdálenost a pružnost jako schopnost se po působení síly vrátit do původního stavu (čím více se blíží 100 %, tím více je výrobek pružný). Z výsledků textury (Tab. 2) vyplynulo, že použitím fermentované pohankové mouky nedochází k ovlivnění pevnosti a pružnosti muffinů v porovnání s muffiny s nefermentovanou pohankovou moukou. Stejného závěru bylo dosaženo i při porovnávání barvy muffinů připravených s fermentovanou nebo nefermentovanou pohankovou moukou, kdy v Tab. 2 jsou pro zkrácení výsledků uvedeny pro bravu hodnoty *L** z CIELab barevného prostoru.

Kromě toho byl výrobek sledován i z hlediska bezpečnosti a obsahu potenciálně karcinogenního akrylamidu, který vzniká v průběhu Maillardovy reakce z aminokyseliny asparagin [6]. Jak je vidět na Obr. 1, obsah akrylamidu v jednotlivých typech muffinů nepřekročil limit kvantifikace (LOQ ≤ 25 μg/kg). Pouze v případě muffinů s obsahem žitné mouky byl stanoven vyšší obsah akrylamidu, a to v případě nefermentované pohankové mouky 55 ± 3 μg/kg a s fermentovanou pohankovou

moukou 31 ± 4 µg/kg, což ukazuje, že použití fermentované mouky byl snížen obsah akrylamidu téměř o polovinu.



Obr. 2: Obsah akrylamidu v jednotlivých druzích muffinů s fermentovanou a nefermentovanou pohankovou moukou

Závěr

Výsledky ukazují, že muffiny s fermentovanou i nefermentovanou pohankovou moukou jsou pro spotřebitele přijatelné jak s ohledem na organoleptické vlastnosti, kdy test spotřebitelských preferencí potvrdil přijatelnost všech druhů produktů s pohankovou suspenzí a senzorické hodnocení odbornými hodnotiteli neprokázalo významné rozdíly v atributech organoleptických vlastností v důsledku fermentace laktobacily. Tyto muffiny jsou pro spotřebitele také z hlediska zdravotního benefitu, kdy prakticky neobsahují akrylamid, ale především díky obsahu pohankové mouky jsou zdrojem cenných antioxidantů. Také například muffiny se špaldovou moukou mohou být zdravější alternativou díky vyššímu podílu minerálních látek a bílkovin než u šlechtěné pšenice. Muffiny čistě z pohankové mouky nebo v kombinaci s bezlepkovou kukuřičnou moukou jsou vhodné pro lidi s celiakií.

Poděkování: Tento příspěvek byl vytvořen realizací projektu "Stratégia eliminácie akrylamidu v technologickom procese výroby potravín" (ITMS 26240220091) podporovaného ERDF. Mezinárodní spolupráci podpořila APVV v rámci projektů SK-AT-0029-12 a SK-PL-0100-12. Na práci se podílely studentky Spojené školy sv. Vincenta de Paul v Bratislavě Kamila Ciesarová, Mária Hodorovská a Daniela Sitárová v rámci středoškolské odborné činnosti.

Seznam použité literatury

[1] Kopáčová O. *Trendy ve zpracování cereálií s přihlédnutím zejména k celozrnným výrobkům*. ÚZPI, Praha 2007.
[2] Zielińska D., Szawara-Nowak D., Ornatowska A., Wiczkowski W.: J. Agric. Food Chem. *55*, 9891 (2007).
[3] Zieliński H., Michalska A., Piskuła M. K., Kozłowska H.: Mol. Nutr. Food Res. *50*, 824 (2006).
[4] Peng X., Zheng Z., Cheng K.-W., Shan F., Ren G.-X., Chen F., Wang M.: Food Chem. *106*, 475 (2008).
[5] Hammes W.P., Brandt M.J., Francis K.L., Rosenheim J., Seitter M.F.H., Vogelmann S.A.: Trends Food Sci. Technol. *16*, 4 (2005).
[6] Stadler R. H., Robert F., Riediker S., Varga N., Davidek T., Devaud S., Goldmann T., Hau J., Blank I.: J. Agric. Food Chem. *52*, 5550 (2004)

R 14

SLEDOVÁNÍ OBSAHU POMALU STRAVITELNÉHO ŠKROBU V LABORATORNĚ PŘIPRAVENÝCH EXTRUDOVANÝCH VÝROBCÍCH

Smrčková P., Šárka E., Pour Vl., Chena D.
Ústav sacharidů a cereálií, VŠCHT Praha

Pomalu stravitelný škrob je v potravinách spojován s nízkým až středním glykemickým indexem (GI). Potraviny s nízkým GI nezatěžují organismus velkými výkyvy hladiny glukosy v krvi, a proto jsou vhodné pro diabetiky a jsou součásti redukčních diet. Pro extruzi na laboratorním extrudéru KE 19 (Brabender, Německo) byly připraveny směsi jemné kukuřičné krupice s 10 až 20 % přídavkem nativního pšeničného škrobu, hrachové mouky nebo chemicky modifikovaných škrobů a standardním přídavkem vody 5, 10 a 20 % hm. Během extruze byla sledována rychlost dávkování směsi, otáčky šnekovnice, kompresní poměr, rozložení teplot podél extruzního válce, průměr trysky a tlak na výtlačné hlavě. Stanovení pomalu stravitelného škrobu bylo prováděno podle Englysta et al. (1996). Byl sledován vliv všech extruzních parametrů a chemického složení vstupní směsi na obsah SDS ve vzorcích extrudátů. Obsah pomalu stravitelného škrobu v extrudátech se pohyboval od 39,1 do 57,6%.

Práce byla zpracována v rámci řešení projektu výzkumu a vývoje MZe QJ1310219 „Pšenice se specifickým složením a vlastnostmi škrobu pro potravinářské a průmyslové účely.“

R 15

MINERÁLNÍ LÁTKY V PŠENIČNÉM ZRNU A VARIABILITA JEJICH OBSAHU

Koplík R., Revenco D., Pudil F.
Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha

Obiloviny a výrobky z obilovin podstatně přispívají k dietárnímu příjmu minerálních látek a stopových prvků. Pro konzumenta je důležitý nejen celkový obsah těchto mikronutrientů ve stravě, ale také příjem v biologicky využitelné formě. Obilné zrno a celozrnné cereální výrobky sice obsahují více minerálních látek než výrobky z bílé mouky, ale také více vlákniny a kyseliny fytové (*myo*-inositol-hexakisfosfát). Tyto složky jsou považovány za hlavní inhibitory vstřebávání minerálních látek z potravin rostlinného původu.[1] Celkové obsahy minerálních látek včetně fosforu a distribuce chemických forem fosforu v obilném zrnu závisejí na konkrétním druhu a odrůdě obiloviny a agrotechnických a půdních podmínkách pěstování a dále na lokalitě a klimatických podmínkách. Obsah esenciálních i toxických prvků v pšeničném zrnu byl v různých zemích mnohokrát zjišťován. Vztah mezi odrůdou obiloviny a schopností kumulovat určitý prvek v obilném zrnu je však stále nejasný.

Naše práce se soustředila na zmapování vlivu odrůdy pšenice na obsah minerálních látek a stopových prvků v obilném zrnu. Vzorky pocházely z šlechtitelské stanice Stupice (okres Praha – východ) a zahrnovaly ozimé i jarní pšenice těch odrůd, které jsou v současné době v zemědělské praxi využívány. Pro stanovení fosforu byly vzorky mineralizovány na mokré cestě směsí kyseliny dusičné a kyseliny sírové. Po mineralizaci byl fosfor stanoven spektrofotometrickou metodou po převedení kyseliny fosforečné na molybdenovou modř. Pro stanovení ostatních prvků byly vzorky upraveny mikrovlnným tlakovým rozkladem kyselinou dusičnou. Prvky Na, K, Mg a Ca byly stanoveny plamenovou AAS, ostatní prvky metodou ICP-MS.[2] Přehled výsledků analýzy vzorků ze sklizní 2012 a 2013 shrnuje tabulka 1.

Vliv skupiny (ozimá/jarní) a roku sklizně na obsah prvků byl statisticky vyhodnocen. Průměrný obsah hliníku, fosforu, draslíku, chromu, kobaltu, arsenu a selenu se v roce 2013 ve srovnání s rokem 2012 nezměnil. U ostatních prvků byl zjištěn statisticky významný rozdíl, nicméně stopová množství olova jsou v obou letech prakticky zanedbatelná.

Ve srovnání s rokem 2012 byly zjištěny v roce 2013 nižší průměrné obsahy hořčíku (844 *vs*. 951 μg/g), železa (33,9 *vs*. 37,2 μg/g), mědi (3,05 *vs*. 4,16 μg/g), zinku (24,4 *vs*. 30,5 μg/g) a kadmia (0,029 *vs*. 0,040 μg/g), a vyšší průměrné obsahy vápníku (378 *vs*. 336 μg/g), manganu (32,6 *vs*. 28,9 μg/g), niklu (0,18 *vs*. 0,15 μg/g) a molybdenu (0,47 *vs*. 0,18).

U všech vzorků byl v roce 2013 ve srovnání s rokem 2012 zaznamenán zřetelný pokles obsahu mědi, který byl doprovázen zvýšením obsahu molybdenu.

Analýza rozptylu ukázala, že variabilita obsahu prvku v pšeničném zrnu souvisí u hořčíku, chromu, manganu, železa a zinku převážně s rokem sklizně, kdežto u fosforu, kobaltu a arsenu převážně s příslušností do skupiny ozimých nebo jarních pšenic. Oba faktory se významně projevují ve variabilitě obsahu vápníku, mědi, molybdenu a kadmia. Naproti tomu variabilita obsahu hliníku, draslíku a selenu nesouvisí ani s jedním faktorem.

Rozdíly v obsahu prvků ve vzorcích z let 2012 a 2013 mohly být způsobeny odlišným počasím. Pro odhad toho, zda existuje mezi jednotlivými odrůdami větší nebo menší schopnost akumulovat minerální látky v pšeničném zrnu je třeba získat další data.

Tab. 1
Statistické parametry hodnot obsahu prvků ve vzorcích pšenice z let 2012 a 2013 a srovnání s publikovanými hodnotami, výsledky jsou vyjádřeny v μg/g

Prvek	Vzorky pšenice 2012 (*n*=30)			Vzorky pšenice 2013 (*n*=28)			Publikované hodnoty
	a. průměr medián	směr. odchylka	rozpětí	a. průměr medián	směr. odchylka	rozpětí	
Mg	951 939	96	711-1129	844 844	62	732-966	700-1500 (lit.[3]) 700-2800, medián 1400 (lit. [4])
Al	1,66 1,43	0,62	1,00-3,11	1,69 1,52	0,59	1,17-3,65	2-18 (lit.[3])
P	3140 3135	234	2672- 3610	3110 3145	183	2775-3394	2700-3900 (lit.[3]) 1400-6000, medián 3400 (lit. [4])
K	3684 3693	264	3148- 4270	3757 3735	312	3310-4460	3300-4800 (lit.[3]) 2600-7300, medián 3700 (lit. [4])
Ca	336 339	41	239-421	378 382	63	252-505	230-500 (lit.[3]) 180-740, medián 370 (lit. [4])
Cr	0,0036 0,0034	0,0012	0,0016- 0,0060	0,0041 0,0039	0,0012	0,0030- 0,0085	0,007-0,058 (lit.[3])
Mn	28,9 29,2	3,5	21,8-35,6	32,6 32,4	3,3	25,4-40,6	28-50 (lit.[3]) 13-67, medián 37 (lit. [4])
Fe	37,2 36,3	4,2	30,6-47,4	33,9 33,6	3,8	28,3-40,8	39-66 (lit.[3]) 17-60, medián 32 (lit. [4])
Co	0,0052 0,0051	0,0008	0,0040- 0,0070	0,0055 0,0052	0,0018	0,0033 0,0112	0,005-0,09 (lit.[3])
Ni	0,150 0,139	0,049	0,071- 0,276	0,179 0,172	0,052	0,096-0,293	0,1-0,8 (lit.[3])
Cu	4,16 4,00	0,55	3,26-5,24	3,05 2,97	0,43	2,28-4,28	3,4-6,0 (lit.[3]) 2,2-8,7, medián 4,3 (lit. [4])
Zn	30,5 29,6	3,8	24,7-37,1	24,4 23,8	3,0	20,3-31,3	22-49 (lit.[3]) 9,3-67, medián 26,5 (lit. [4])
As	0,0070 0,0069	0,0027	0,0016- 0,0170	0,0080 0,0081	0,0018	0,0045- 0,0121	<0,05-0,14 (lit.[3])
Se	0,053 0,051	0,015	0,031- 0,102	0,060 0,047	0,0030	0,034-0,156	0,003-0,025 (lit.[3]) <0,01-5,3, medián 0,16 (lit. [4])
Mo	0,181 0,182	0,032	0,120- 0,241	0,474 0,404	0,252	0,216-1,183	0,1-0,7 (lit.[3]) <0,06-1,85, medián 0,38 (lit. [4])
Cd	0,040 0,037	0,009	0,028- 0,060	0,029 0,028	0,005	0,020-0,041	0,017-0,085 (lit.[3]) <0,002-0,21, medián 0,03 (lit. [5])
Pb	0,0036 0,0036	0,0008	0,0020- 0,0060	0,0024 0,0023	0,0005	0,0016- 0,0038	0,02-0,14 (lit.[1]) <0,001-0,72, medián 0,017 (lit. [5])

Literatura

1. Mann J., Truswell S.: Essentials of Human Nutrition, 3. vydání Oxford University Press, 2009.
2. Koplík R., Borková M., Bicanová B., Polák J., Mestek O., Komínková J.: Food Chem. 99, 158-167, 2006.
3. Varo P, Nuurtamo M., Saari E., Koivistoinen P.: Acta Agric. Scand., Suppl. 22, 27-35, 1980.
4. Wolnik K. A., Fricke F. L., Capar S. G., Braude G.L., Meyer M.W., Satzger R.D., Kuennen R.W.: J. Agric. Food Chem. 31, 1244-1249, 1983.
5. Wolnik K. A., Fricke F. L., Capar S. G., Braude G.L., Meyer M.W., Satzger R.D., Bonnin E.: J. Agric. Food Chem. 31, 1240-1244, 1983.

R 16

PESTICIDY, MYKOTOXINY A PYRROLIZIDINOVÉ ALKALOIDY V DOPLŇCÍCH STRAVY Z ČESKÉHO TRHU

Džuman Z., Zachariášová A., Slavíková P., Jírů M., Vepříková Z., Zachariášová M., Hajšlová J.
Ústav chemie a analýzy potravin, Technická 3, 166 28, Praha-Dejvice

Úvod:

Doplňky stravy se v posledních letech staly významnou součástí péče o zdraví konzumenta, jejich spotřeba i šířka sortimentu má dlouhodobě rostoucí charakter. Pozitivní vliv účinných látek doplňků stravy může být negativně ovlivněn přítomností potencionálně toxických látek, jako např. sekundárních metabolitů mikroskopických plísní – mykotoxinů, ale i reziduí pesticidů či pyrrolizidinových alkaloidů, jejichž stanovení bylo předmětem této studie [1 – 3]. Pro velkou většinu z těchto kontaminujících látek pro doplňky stravy s výjimkou reziduí pesticidů v herbálních čajích dosud nebyly stanoveny legislativní limity. Vzhledem k nedostatku informací ohledně výskytu reziduí pesticidů, mykotoxinů a pyrrolizidinových alkaloidů v doplňcích stravy se o tuto problematiku značně zajímá Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority, EFSA). Tato skutečnost podnítila zájem o komplexní zhodnocení kontaminace a rizikovosti těchto preparátů. Mykotoxiny, rezidua pesticidů a další kontaminující látky jsou běžně analyzovány separátně, což je pro případné komplexní zhodnocení kontaminace vyšetřovaných vzorků nevýhodné. S rozvojem moderních analytických technik je vysoce žádoucí vyvíjet multi-detekční analytické metody umožňující simultánní stanovení širokého spektra analytů. V rámci této studie byla využita nově vyvinutá metoda pro simultánní stanovení mykotoxinů, pyrrolizidinových alkaloidů a reziduí pesticidů využívající extrakční metodu QuEChERS v širokém spektru doplňků stravy herbálního původu [4, 5].

Uvedená studie byla uskutečněna za finanční podpory projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky QI111B044.

Cíl studie:

Cílem této studie je aplikace moderní multi-detekční analytické metody pro stanovení širokého spektra kontaminantů (celkem 389 analytů) v 84 komerčně dostupných vzorcích doplňků stravy herbálního původu pro zhodnocení jejich kontaminace s využitím ultra-účinné kapalinové chromatografie s vysokorozlišovací tandemovou hmotnostně-spektrometrickou detekcí (U-HPLC-HRMS/MS).

Chemikálie, materiál, instrumentace:

- methanol, HPLC gradient, *Merck (Německo)*
- acetonitril, HPLC gradient, *Sigma Aldrich (ČR)*
- mravenčan amonný p.a., *Sigma Aldrich (ČR)*
- octan amonný p.a., *Sigma Aldrich (ČR)*
- kyselina mravenčí 99%, *Sigma Aldrich (ČR)*
- síran hořečnatý p.a., *Sigma Aldrich (ČR)*
- chlorid sodný p.a., *Penta (ČR)*
- sorbent Bondesil C-18, *Agilent (USA)*
- certifikované analytické standardy pesticidů, mykotoxinů a pyrrolizidinových alkaloidů, *Sigma Aldrich (ČR), Merck (ČR), PhytoLab (Německo), Dynex Technologies (ČR), Chromservis (ČR)*
- PTFE kyvety (15 a 50 ml), *Merci (ČR)*
- kapalinový chromatograf UltiMate® 3000 RSLC ve spojení s vysokorozlišovacím tandemovým hmotnostním spektrometrem Q-Exactive™, *Thermo Fisher Scientific (USA)*

Vzorky:

Pro analýzu mykotoxinů, pyrrolizidinových alkaloidů a reziduí pesticidů bylo zakoupeno celkem 84 vzorků herbálních doplňků stravy. Analyzované vzorky byly podle své povahy rozděleny do tří skupin, a to na (i) *herbální čaje (23 vzorků)*, (ii) *kapky a sirupy s herbálním základem (42 vzorků)* a co se týče složení velice variabilní skupinu (iii) *ostatních přípravků (19 vzorků)* zahrnující herbální tablety, kapsle, ad.

Příprava vzorku:

Vzorky byly před samotnou extrakcí zhomogenizovány. Pro izolaci cílových analytů byla využita optimalizovaná extrakční metoda založená na přístupu QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe). 1 g vzorku bylo naváženo do 50 ml kyvety, následně bylo přidáno 10 ml okyselené vody (1% kyselina mravenčí) pro důkladné smočení matrice (30 min). Poté bylo přidáno 10 ml acetonitrilu a vzorek byl extrahován po dobu 30 min. Po extrakci vzorku byly přidány 4 g $MgSO_4$ a 1 g NaCl, vzorek byl intenzivně protřepán po dobu 1 min a odstředěn (5 min, 10,000 RPM). Po centrifugaci byly odebrány 2 ml extraktu a vytřepány s 0,3 g $MgSO_4$ a 0,1 g sorbentu Bondesil-C18 po dobu 2 minut, opět následovalo odstředění (2 min, 10,000 RPM) a odebrání vzorku do vialky.

Instrumentální analýza:

Pro analýzu širokého spektra kontaminantů – mykotoxinů, pyrrolizidinových alkaloidů a pesticidů byla využita instrumentace sestávající se z ultra-účinného kapalinového chromatografu ve spojení s vysokorozlišovacím tandemovým hmotnostním spektrometrem (U-HPLC–HRMS/MS, ultra-high resolution liquid chromatography – high resolution tandem mass spectrometry). Celkem bylo analyzováno 389 analytů, z toho bylo 55 mykotoxinů, 11 pyrrolizidinových alkaloidů a 323 pesticidů. Za účelem jejich stanovení byly optimalizovány a následně využity chromatografické a hmotnostně-spektrometrické podmínky, jejich souhrn je uveden v **Tab. I** a **II**.

Tab. I: Charakteristiky ultra-účinné kapalinové chromatografie (U-HPLC)

Kolona	Accucore aQ (150 x 2.1 mm, 2.6 µm; Thermo Fisher Scientific, USA)		
Teplota kolony	25 °C		
Průtok mobilní fáze	0,4 ml/min		
Objem nástřiku	3 µl		
Mobilní fáze	ESI+	A: H_2O:MeOH (98:2); 5 mM mravenčan amonný; 0,1% kyselina mravenčí	
	ESI-	C: H_2O:MeOH (98:2); 5 mM octan amonný D: MeOH:H_2O (98:2); 5 mM octan amonný	
Délka metody	16 min		
Gradient mobilní fáze	**čas [min]**	**A/C [%]**	**B/D [%]**
	0	100	0
	4	80	20
	5,5	60	40
	10,5	0	100
	12,9	0	100
	13,0	100	0

Tab. II: Hmotnostně-spektrometrické podmínky měření (HRMS/MS)

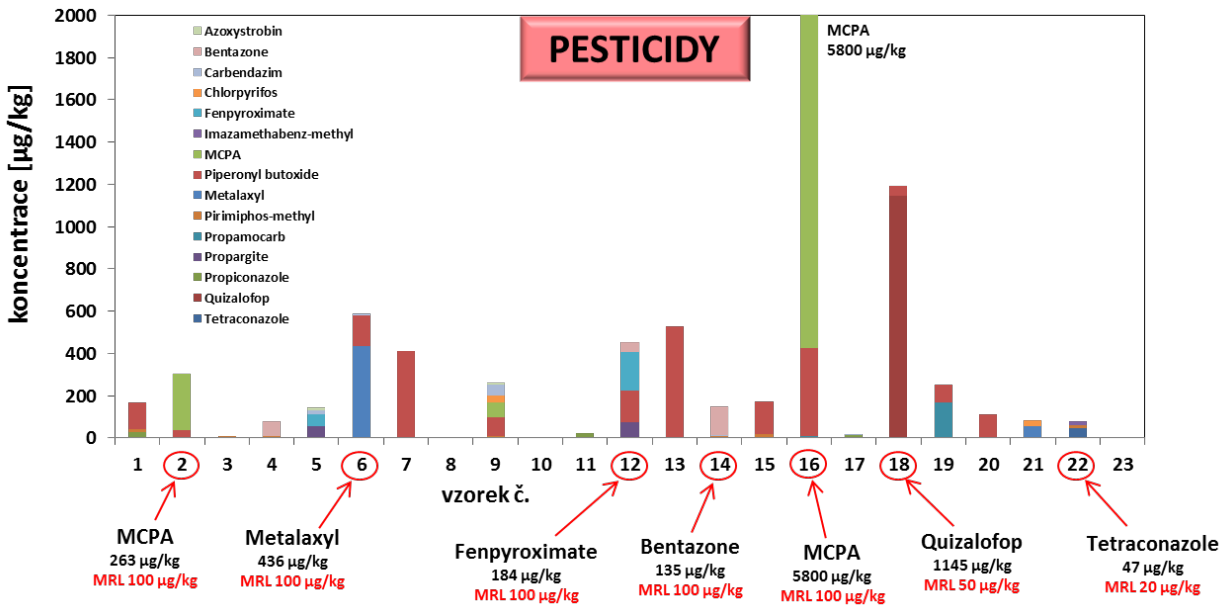
Podmínky ionizace	**Ionizace**	ESI +/-
	Nosný/pomocný plyn (N_2)	32/7 arb.j.
	Teplota kapiláry	300°C
	Vypařovací teplota	220°C
	Napětí na elektrospreji	3,3 kV
Podmínky akvizičního módu „full MS“	**Rozlišení**	70 000 FWHM
	Hmotnostní rozsah *m/z*	80-1200
Podmínky akvizičního módu „data dependent MS^{2}“	**Rozlišení**	17 500 FWHM
	Hmotnostní rozsah *m/z*	50 - *m/z* fragmentovaného analytu
	Dynamické vyloučení detekovaného analytu	10 s

Výsledky a diskuze:

Z celkového počtu 389 stanovovaných analytů jich bylo v 84 herbálních potravinových doplňcích z českého trhu detekováno 64, tedy přibližně 17%, přičemž z toho bylo detekováno 15 mykotoxinů (23%), 6 pyrrolizidinových alkaloidů (55%) a 43 pesticidů (13%). Z vyšetřovaného souboru 84 vzorků jich bylo pouze 5 prostých jakékoliv kontaminace. Detailnější výsledky kontaminace jednotlivých skupin analyzovaných vzorků jsou diskutovány níže.

1) Herbální čaje

Herbální čaje vykazovaly relativně vysokou kontaminaci ve srovnání s ostatními skupinami analyzovaných vzorků, pouze jeden vzorek byl prostý kontaminace. Celkem bylo detekováno 33 analytů, a to 11 mykotoxinů (20%), 6 pyrrolidinových alkaloidů (55%) a 16 pesticidů (5%). Mezi analyty s nejfrekventovanějším výskytem patří mykotoxiny mykofenolová kyselina a enniatiny, z pesticidů pak piperonyl butoxide. Naměřené výsledky proto byly srovnány s dostupnou legislativou a bylo zjištěno, že kontaminace rezidui pesticidů u 7 vzorků přesáhla maximální reziduální limit (MRL) pro daný pesticid, a to 1,3- až 58-krát. Tyto výsledky jsou společně s celkovou pesticidní kontaminací analyzovaných vzorků uvedeny na **Obr. 1**. Co se týče akceptovatelného denního příjmu detekovaných pesticidů (ADI), jediným výrazným nálezem je pesticid MCPA, který by po konzumaci maximálního doporučeného denního příjmu kontaminovaného čaje vyčerpal povolené ADI z 62%. Tato skutečnost je negativní především vzhledem k tomu, že je to látka karcinogenní a lze předpokládat další příjem z jiného typu potravin, protože herbální čaje tvoří zanedbatelnou část potravinového koše běžného konzumenta.



Obr. 1: Celková pesticidní kontaminace analyzovaných herbálních čajů.

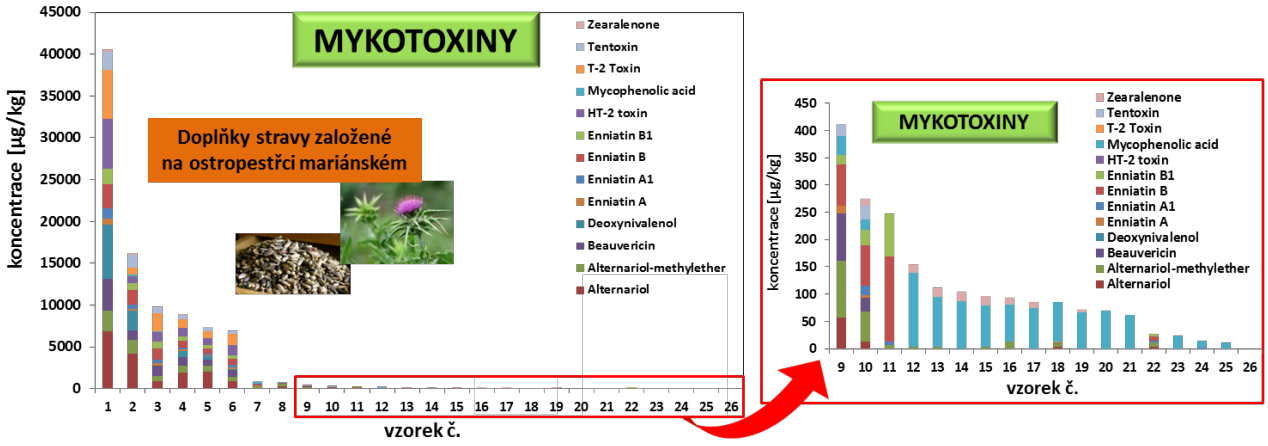
2) Herbální sirupy a kapky

Sirupy a kapky s herbálním základem patřily mezi vzorky s nejméně častým výskytem mykotoxinů, pyrrolizidinových alkaloidů a pesticidů, jejich kontaminace byla rovněž poměrně nízká. Co se týče kontaminace herbálních kapek, většina nálezů se pohybovala velmi blízko kvantifikačních limitů. Mezi analyty s nejvyšší frekvencí detekce byly mykotoxiny enniatiny a mykofenolová kyselina, pyrrilizidinové alkaloidy senecionine a seneciphylline a pesticidy bendiocarb a carbendazim, v herbálních sirupech pak ještě alternariové mykotoxiny alternariol a alternariol-methylether. Na základě výsledků kontaminace omezeného analyzovaného souboru vzorků herbálních sirupů a kapek lze konstatovat, že sirupy herbálního původu pro jejich

konzumenta nepředstavují riziko z pohledu kontaminace mykotoxiny, pyrrolizidinovými alkaloidy či rezidui pesticidů.

3) Ostatní analyzované vzorky

Mezi skupinu 19 nezařazených vzorků patřily vzorky tablet, kapslí, ad., které obsahovaly jednak např. zakoncentrované extrakty různých bylin či jejich směsí ve formě oleje či třeba pouze homogenizované části bylin obsahující potencionálně zdraví prospěšné látky. Celkově bylo ve vzorcích z této skupiny detekováno 13 mykotoxinů (22%) a 8 pesticidů (3%). Analyzované vzorky vykazovaly velmi vysokou kontaminaci především mykotoxiny, jejichž celková kontaminace je naznačena na **Obr. 2**. Zdaleka nejvyšší kontaminace byla zaznamenána u vzorků založených na ostropestřci mariánském, což je bylina obsahující antioxidační komplex silymarin a výrobky z ní jsou často používané pro podporu správné funkce či léčbu jater, což je částečně kontroverzní vzhledem k nefrotoxicitě několika detekovaných mykotoxinů. Pro žádný z detekovaných mykotoxinů dosud není stanoven legislativní limit pro výskyt v tomto typu potravinových doplňků. Co se týče tolerovatelného denního příjmu (TDI) pro mykotoxiny, v případě několika vzorků došlo k výraznému naplnění i překročení těchto limitů především pro mykotoxiny deoxynivalenol a sumu HT-2 a T-2 toxinů. Je také nutno vzít v potaz fakt, že doplňky stravy tvoří nepatrnou část dietárního příjmu kontaminantů a vysoká kontaminace doplňků stravy, které jsou konzumovány za účelem zlepšení zdravotního stavu konzumenta, je nežádoucí.



Obr. 2: Celková mykotoxinová kontaminace analyzovaných tobolek a kapslí.

Literatura:

1. Hussein S.H., Brasel J.M.: Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicol. 167 (2001): 101-134.
2. Fu P.P., Yang Y.C., Xia X.S., Chou M.W., Cui Y.Y., Lin G.: Tumorigenic components in chinese herbal medicines and dietary supplements. J. Food Drug. Anal. 10 (2002): 198-211.
3. Damalas C.A., Eleftherohorinos I.G.: Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment. Int. J. Environ. Res. Public Health 8 (2011): 1402-1419.
4. Zachariasova M., Lacina O., Malachova A., Kostelanska M., Poustka J., Godula M., Hajslova J.: Novel approaches in analysis of Fusarium mycotoxins in cereals employing ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. Anal. Chim. Acta 662 (2010): 51-61.
5. Lacina O., Zachariasova M., Urbanova J., Vaclavikova M., Cajka T., Hajslova J., Critical assessment of extraction methods for the simoultaneous determination of pesticide residues and mycotoxins in fruits, cereals, spices and oil seeds employing ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1262 (2012): 8-18.

R 17

VÝSKYT REZIDUÍ PESTICIDŮ A MYKOTOXINŮ V PRODUKTECH EKOLOGICKÉHO ZEMĚDĚLSTVÍ

Vepříková Z., Kováčová J., Džuman Z., Zachariášová Z., Hajšlová J.
Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, zdenka.veprikova@vscht.cz

ÚVOD

Během posledních let došlo k výraznému posunu nároků spotřebitelů na původ a kvalitu zemědělských produktů. Velká pozornost je věnována bioproduktům, které jsou pěstovány v souladu se zásadami ekologického zemědělství. Mezi tyto zásady patří používání hnojiv a pesticidních přípravků na přírodní bázi. S tím souvisí nižší výnosy a větší náročnost pěstování, což se následně odráží na vyšších cenách bioproduktů ve srovnání s produkty integrovaného zemědělství. V souvislosti s touto skutečností hrozí vyšší potenciální riziko falšování, které může souviset s aplikací i nepovolených přípravků. Rezidua některých pesticidů používaných v integrovaném zemědělství můžou představovat jedno z významných zdravotních rizik. Dalším významným faktorem ovlivňujícím zdravotní nezávadnost potravin je výskyt mikroskopických vláknitých hub a jejich toxických sekundárních metabolitů – mykotoxinů, jelikož potenciální výskyt těchto přírodních kontaminantů v bioproduktech je vyšší, ovšem zatím tato domněnka nebyla na základě dostupných publikací potvrzena. Vzhledem k této skutečnosti je důležité jejich výskyt monitorovat.

V rámci této práce byly zakoupeny bioprodukty převážně cereálního charakteru v maloobchodní síti českého trhu. Celkem bylo na přítomnost reziduí pesticidů a mykotoxinů vyšetřeno 38 vzorků metodou ultra-účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

STANDARDY A CHEMIKÁLIE

Standardy mykotoxinů a pesticidů byly zakoupeny u různých firem, konkrétně: Dynex s.r.o. (Buštěhrad, Česká republika), Sigma–Aldrich (Taufkirchen, Německo), GeneTiCA s.r.o. (Praha, Česká republika), Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Německo). Organická rozpouštědla použitá při přípravě vzorků a separaci (acetonitril, methanol) byly dodány firmou Sigma–Aldrich (Taufkirchen, Německo).

VZORKY

Vzorky cereálních výrobků v bio kvalitě byly zakoupeny v maloobchodní síti České republiky. Celkem se jednalo o 38 vzorků různé povahy jako piškoty, krekry, sušenky, lupínky, pečivo, káva atd. Označení vzorků a jejich charakteristika je uvedena v **Tab. I**.

PŘÍPRAVA VZORKU

Veškeré cereální vzorky byly před samotnou extrakcí pečlivě homogenizovány na laboratorním mlýnku. Před odebráním extrahovaného podílu, byl celý namletý objem důkladně promíchán. V závislosti na povaze vzorku byla zvolena navážka 1; 2,5; 5g. Jednotlivé vzorky byly naváženy do centrifugační kyvety (50 ml), následoval přídavek 10 ml roztoku 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě. Vzorek se protřepe, uzavře a nechá 30 min stát z důvodu nabobtnání matrice. Ke vzorku s vodou se poté přidalo 10 ml acetonitrilu a následoval krok extrakce na laboratorní třepačce po dobu 30 min. Do kyvety byly následně přidány sole $MgSO_4$ (4 g) a NaCl (1 g) a vzorek byl opět intenzivně třepán v ruce po dobu 3 min (díky exotermní reakci solí s vodou se vzorek samovolně zahříval). Takto připravený vzorek byl centrifugován po dobu 5 min při otáčkách 10.000 RPM. Takto připravený vzorek byl převeden do vialky a připraven k analýze. Vzorky ve vialkách byly před analýzou skladovány při -18 °C.

Tab. I Seznam analyzovaných vzorků

Číslo vzorku	Vzorek	Složení
1	Bio plátky s kukuřicí	kukuřice
2	Bio špaldové piškoty	špaldová mouka, třtinový cukr, vejce, bramborová moučka,pšeničný škrob,mléčné bílkoviny, kypřící látky: hydrogenuhličitan sodný, hydrogenuhličitan amónny, přírodní aroma
3	Špaldové bio krekry se sezamem a sójovou omáčkou	mouka pšeničná hladká, celozrnná mouka špaldová, sezamová semínka neloupaná, mouka pšeničná celozrnná, neztužený rostlinný tuk, sojová omáčka, panenský olivový olej, mořská nerafinovaná jedlá sůl, kypřící látka - vinný kámen
4	Bio kukuřičné křupky ntural	kukuřice
5	Česnekové krekry s olivovým olejem a majoránkou	celozrnná pšeničná mouka, extra panenský olivový olej, kypřící prášek, sušený česnek, majoránka, mořská sůl
6	Kukuřičné lupínky bio	kukuřičná krupice, třtinový cukr, sladový výtažek ječný, sůl s jódem
7	Sušenky kokosovo-citrónové bio	pšeničná mouka, nehydrogenovaný olej a tuk (palmový, slunečnicový), pšeničný sirup, kokos, pohanková mouka, ječná mouka, javorový sirup, kypřící látka, citronový olej, sůl
8	Sušenky kamutové bio	celozrnná kamutová mouka, nehydrogenovaný olej a tuk (palmový, slunečnicový), kamutový sirup, žitná mouka, škořice, kypřící látka, sůl (muže obsahovat stopy ořechu a sezamu)
9	Tyčinky špaldové se sezamem bio	špaldová celozrnná mouka, voda, sul, palmový tuk, droždí, třtinový cukr, kypřící látka - uhličitan sodný, sezam
10	Špaldová bio zvířátka kakaová	mouka špaldová hladká, rostlinný nestužený tuk, rýžový sirup, agávový sirup, kakao
11	Špaldové bio sušenky natural	mouka špaldová celozrnná, tuk palmový, cukr třtinnový surový, kypřící látka - vinný kámen
12	Sušenky pšeničné	pšeničná mouka, sirup z pšeničného sladu, neztužený rostlinný tuk, sójová mouka, kypřící prostředek (sodium a amonnium bikarbonát, kys. Vinná), sul, droždí
13	Špaldové bio sušenky kakao	špaldová mouka celozrnná, tuk palmový, cukr třtinový surový, kakaová prášek, kypřící látka - vinný kámen
14	Medové bio perníčky	mouka pšeničná hladká, tuk rostlinný neztužený, přírodný cukr třtinový, med, vejce, skořice, perníkové koření, kypřící látka - hydrogenuhličitan sodný
15	Sušenky špaldové zázvorové s ořechy	špaldová mouka, nehydrogenovaný olej a tuk (palmový, slunečnicový), sirup z kukuřičného sladu, ovesné vločky, vlašské ořechy, korintky, zázvor v prášku, sul, kypřící látka (jedlá soda)
16	Jukance s javorovým sirupem	celozrnná pšenice, 100% javorový sirup
17	Chipsy kukuřičné natural bio	kukuřičná mouka, rostlinný olej, mořská sul
18	Chleb mrkvový	voda, žitná chlebová mouka, pšeničná mouka, mrkev, slunečnice, lněné semínko, kornmix (pšeničný, žitný a sójový šrot, celozrnný žitný kvas, lněné semínko, pšeničné otruby, mouka, sul, koření), kvas, mořská sul, slunečnicový olej, sušené droždí
19	Rohlík cereální (3 ks)	pšeničná mouka, pšeničná celozrnná mouka, voda, slunečnicový olej, lněné semínko, sezam, pekářenský přípravek (pšeničná mouka, pšeničná sladová mouka, třtinový cukr, kyselina askorbová), sul, sušené droždí
20	Alnatura farmářské chipsy	brambory, slunečnicový olej, směs koření (mořská sul, rozmarýn, řpný cukr, bramborový škrob, cibule, jablečná vláknina, pastinák, česnek, černý pepř, chilli)
21	Crispins, bio tyčinky žitné	žitná mouka, sul
22	Crispins, bio tyčinky amarantové	kukuřičná krupice, amarantová mouka, sušená cibule, kmín, sul

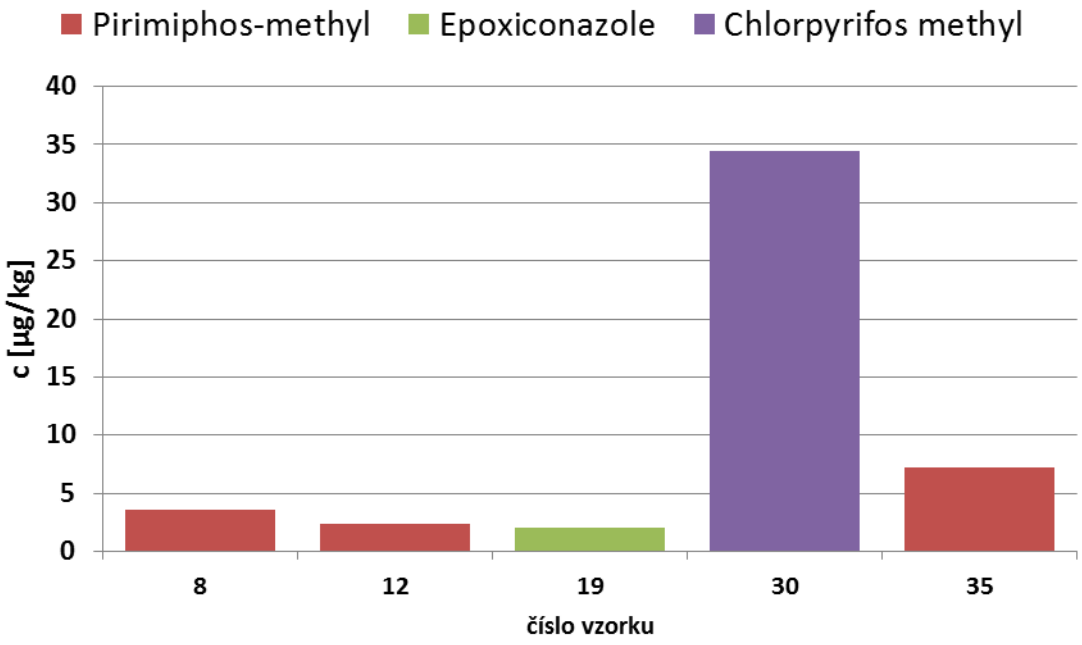
Číslo vzorku	Vzorek	Složení
23	Bio pohanková křpka	pohanka, rýže, mořská sul
24	Alnatura máslové sušenky	celoznná pšeničná mouka, máslo, třtinový cukr, strouhaný kokos, plnotučné mléko, med, sladový ječmen, kypřící prášek: uhličitan amónny, mořská sul, mletá bourbonská vanilka
25	Alnatura křpky z prosa	proso, mořská sul
26	Popcorn slaný bio	kukuřice pukancová, olej slunečnicový, sul (muze obsahovat stopy pšenice)
27	Máslové bio sušenky s ovesnými vločkami	máslo, vločky ovesné mleté, mouka celozrnná pšeničná, mouka hladká pšeničná, cukr třtinový, sušená syrovátka, vanilkové aroma, mořská neratingovaná jedlá sul, kypřící látka - vinný kámen
28	Rýžové bio piškoty	vejce, mouka rýžová, mouka kukuřičná, třtinový cukr
29	Pohankové pukance	pohanka (muze obsahovat stopy sezamu)
30	Kukuřičné křupky celozrnné	kukuřice
31	Špaldové tyčinky s mákem	špaldová mouka celozrnná, pšeničná mouka celozrnná, mak modrý, palmový tuk,droždí, sul jedlá s jódem, zlepšující přípravek (pšeničná mouka, pšeničná mouka sladová, cukr, enzymy - obsahují sóju, kyselina askorbová), kypřící látka - uhličitan sodný, regulátor kyselosti - hydroxid sodný (muže obsahovat stopy sezamu)
32	Špaldové tyčinky se sezamem	špaldová mouka celozrnná, pšeničná mouka celozrnná, sezam, rostlinný tuk, droždí, jedlá sul s jódem, zlepšující přípravek (pšeničná mouka, pšeničná mouka sladová, cukr, enzymy - obsahují sóju, kyselina askorbová), kypřící látka - uhličitan sodný, regulátor kyselosti - hydroxid sodný
33	Kukuřičné křupky natural dlouhé	kukuřice
34	Tyčinky špaldové sypané lněným semínkem	špaldová mouka celozrnná, pšeničná mouka celozrnná, lněné semínko, palmový tuk, droždí, jedlá sul s jódem, zlepšující přípravek (pšeničná mouka, pšeničná mouka sladová, cukr, enzymy - obsahují sóju, kyselina askorbová), kypřící látka - uhličitan sodný, regulátor kyselosti - hydroxid sodný
35	Špaldové suchary	špaldová mouka celozrnná, pšeničná mouka celozrnná, sušená syrovátka, palmový tuk, droždí, třtinový cukr, jedlá sul s jódem, zlepšující přípravek (pšeničná mouka, pšeničná mouka sladová, cukr, enzymy - obsahují sóju, kyselina askorbová)
36	Ječná celozrnná kolínka	ječná mouka celozrnná
37	Penne	hrubá mouka z tvrdé pšenice, voda
38	Špaldové kafe	pšenica špaldy (může obsahovat stopy sezamu)

IDENTIFIKACE A KVANTIFIKACE

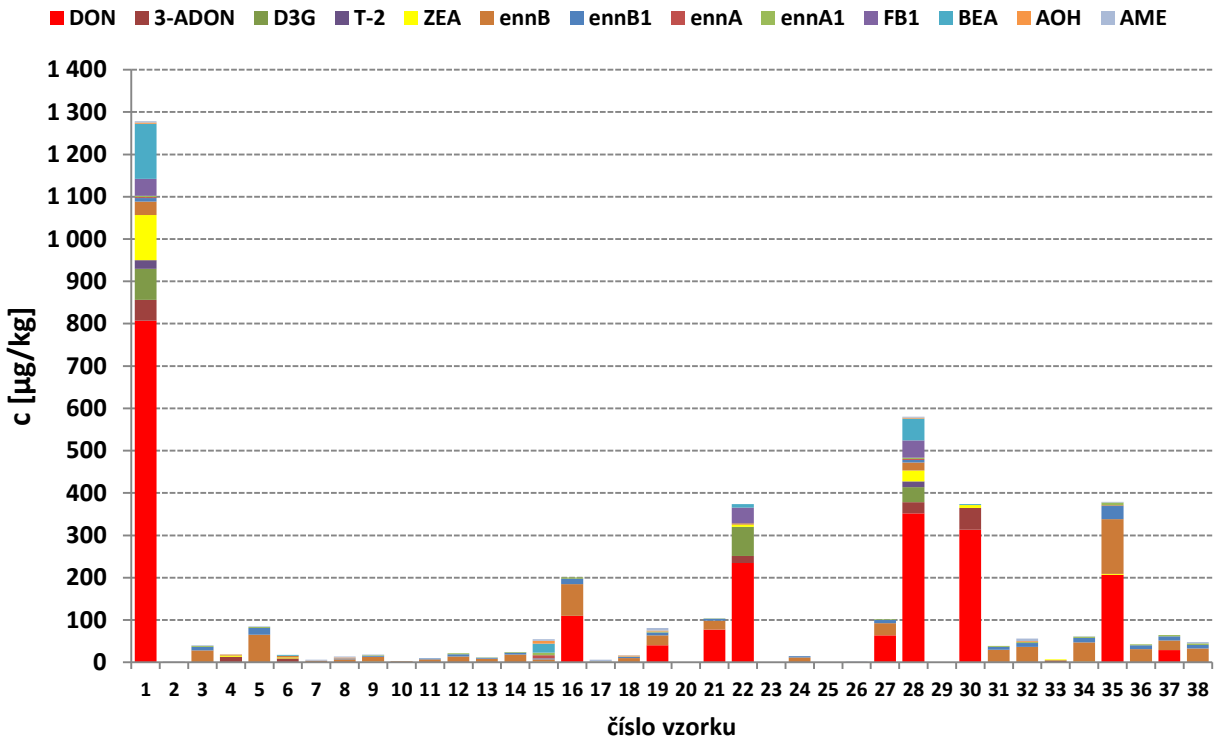
Identifikace a kvantifikace byla provedena pomocí ultra-účinné kapalinové chromatografie s využitím kapalinového chromatografu Acquity U-HPLC (Waters), k detekci mykotoxinů byl použit tandemový hmotnostní spektrometr QTRAP 5500 (Applied Biosystems) a k detekci pesticidů tandemový hmotnostní spektrometr XEVO TQ-S (Waters). Díky širokému rozmezí fyzikálně-chemických vlastností látek byly analyty rozděleny do dvou skupin (pozitivní a negativní ESI ionizace) na základě jejich optimálních parametrů pro MS/MS stanovení. Každý vzorek je tedy analyzován paralelně dvakrát, jednou v ESI+ a ESI- módu s využitím různých podmínek nastavení kapalinové chromatografie i hmotnostní detekce.[1]

VÝSLEDKY A DISKUSE

Vzorky cereálních produktů byly vyšetřeny na přítomnost 325 reziduí pesticidů a 57 mykotoxinů/ergotových (námelových) alkaloidů. Výsledné obsahy reziduí pesticidů jsou graficky uvedeny na **Obr. 1** a nálezy mykotoxinů jsou uvedeny na **Obr. 2**. Co se týká problematiky přítomnosti reziduí pesticidů, nevyhověl jeden vzorek (č. 30) s obsahem 34 µg/kg chlorpyrifos-methylu. Pro bioprodukci lze tolerovat nálezy do 10 µg/kg rezidua dle návrhu metodického pokynu pro interpretaci reziduí v biopotravinách[2]. Legislativní regulaci pro výskyt mykotoxinů v cereálních produktech nevyhověl z celkových 38 vzorků pouze jeden a to konkrétně vzorek (č. 1) kukuřičné bioplátky. Tento vzorek obsahoval vyšší koncentraci mykotoxinů deoxynivalenol (807 µg/kg) a zearalenon (107 µg/kg) než jsou povolené maximální hodnoty dle Nařízení komise (ES) č. 1126/2007 (500 µg/kg pro deoxynivalenol a 100 µg/kg pro zearalenon)[3].



Obr. 1 Rezidua pesticidů ve vzorcích cereálních produktů



Obr. 2 Obsahy mykotoxinů ve vzorcích cereálních produktů

LITERATURA

1. Lacina, O. et al.; Critical assessment of extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues and mycotoxins in fruits, cereals, spices and oil seeds employing ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1262* (2), 8–18.
2. Speiser B., Bickel R., Huber R., Urban J.; Metodika pro využívání a hodnocení analýz pesticidů v ekologickém zemědělství v České republice. FiBL Schweiz, příručka, aktualizovaná verze červen **2013**
3. NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1126/2007 ze dne 28. září 2007, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, pokud jde o fusariové toxiny v kukuřici a ve výrobcích z kukuřice. *Úřední věstník Evropské unie*, 29. 9. 2007.

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č.20/2014) a projektu QI111B154

R 18

VÝSKYT ESTROGENNÍCH LÁTEK V MLÉCE A MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH Z OBCHODNÍ SÍTĚ ČESKÉ REPUBLIKY

Lanková D.[1], Odlerová S.[1], Socas-Rodríguez B.[2], Pulkrabová J.[1], Hajšlová J.[1]

[1)] Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha

[2)] Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, Universidad de La Laguna (ULL), Tenerife, Spain

1. Úvod

Mnoho přírodních i člověkem vyrobených chemických látek, které se vyskytují v životním prostředí, vykazuje estrogenní aktivitu díky své strukturní podobnosti s hormonem estrogen. Přírodní estrogeny jsou tvořeny skupinou endogenních hormonů (syntetizovány v těle živočichů) a exogenních látek (nejsou přirozenou součástí endokrinního systému), které se podle původu dělí na fytoestrogeny (rostlinný původ), mykoestrogeny (produkty některých plísní) a xenoestrogeny (antropogenní zdroje), kam se mimo jiné řadí i látky používané v humánní medicíně jako součást perorální antikoncepce, hormonální substituční terapie a k léčbě dalších poruch endokrinního systému[i]. Řada studií prokázala výskyt těchto látek v kravském mléce[ii]. Vzhledem k tomu, že velký podíl mléka je produkován březími krávami, řada endogenních hormonů může z jejího organismu do mléka přecházeti. Přenos fytoestrogenů, jejichž nejbohatší zdrojem jsou pícniny rodu *Fabales*[iii] a mykoestrogenů (siláže napadené plísní rodu *Fusarium*)[iv] z krmiva podávaného dojnicím do mléka je také v popředí vědeckého a lékařského zájmu.

2. Cíl práce

Cílem prezentované studie bylo sledovat a zhodnotit výskyt estrogenních látek ze skupiny endogenních i legislativně regulovaných syntetických hormonů, fytoestrogenů a mykoestrogenů v mléce a mléčných výrobcích, které jsou dostupné v obchodní síti České republiky. K tomuto účelu byl v loňském (listopad) a letošním roce (duben) vyšetřen stejný soubor výrobků (celkem 53) zahrnující kravské i kozí mléko a z nich vyrobené bílé jogurty včetně produktů označených BIO (8 vzorků). Podrobný popis vzorků je shrnut v **Tabulce I**.

Tabulka I *Přehled vyšetřovaných vzorků*

Výrobek	Počet (2013)	Počet (2014)	Tuky* (%)	Sacharidy* (%)	Bílkoviny* (%)	Sušina** (%)
Kravské mléko	14	9	1,5 - 3,5	4,7 - 4,9	3,2 - 3,4	10,5 - 12,5
Kozí mléko	2	2	3,1 a 3,3	4,5 a 4,3	3,5 a 3,2	8,9 a 11,7
Jogurt (z kravského mléka)	10	10	0,1 - 10,3	2,8 - 5,1	3,4 - 5,9	11,1 - 19,7
Jogurt (z kozího mléka)	1	1	6	4,7	5,9	18,2
Jogurt (z ovčího mléka)	2	2	5,8 a 5,9	3,8 a 3,5	4,8 a 5,8	13,6 a 16,0

* hodnoty deklarované výrobcem na obalu

** sušina stanovena dle ČSN 57 0104 (pro mléko) a ČSN 57 0530 (pro jogurt)

3. Sledované analyty

V rámci realizované studie bylo sledováno celkem 22 látek estrogenního charakteru: 4 endogenní estrogeny (estriol, estron, 17α-estradiol, 17β-estradiol), 4 syntetické estrogeny (17α-ethinylestradiol, diethylstilbestrol, dienestrol, hexestrol), 5 mykoestrogenů (zearalenon, α-zearalanol, β-zearalanol, α-zearalenol, β-zearalenol) a 9 fytoestrogenů (daidzein, genistein, glycitein, biochanin A, formononetin, ekvol, kumestrol, enterolakton, enterodiol).

4. Analytická metoda

K simultánnímu stanovení cílových látek byla optimalizována a validována extrakční metoda s analytickou koncovkou ultra-účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC–MS/MS).

Pro izolaci analytů z mléka a mléčných výrobků byla zvolena metoda QuEChERS (z angl. *„Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe"*), kdy po extrakci látek acetonitrilem následuje přídavek solí NaCl a $MgSO_4$, které indukují přestup analytů do organického rozpouštědla. Vzhledem k přítomnosti lipidů v extraktu bylo nutné do metody zařadit krok přečištění. K tomuto účelu byla zvolena disperzní extrakce na tuhou fázi (d-SPE) se sorbentem C18 pro odstranění nepolárních látek.

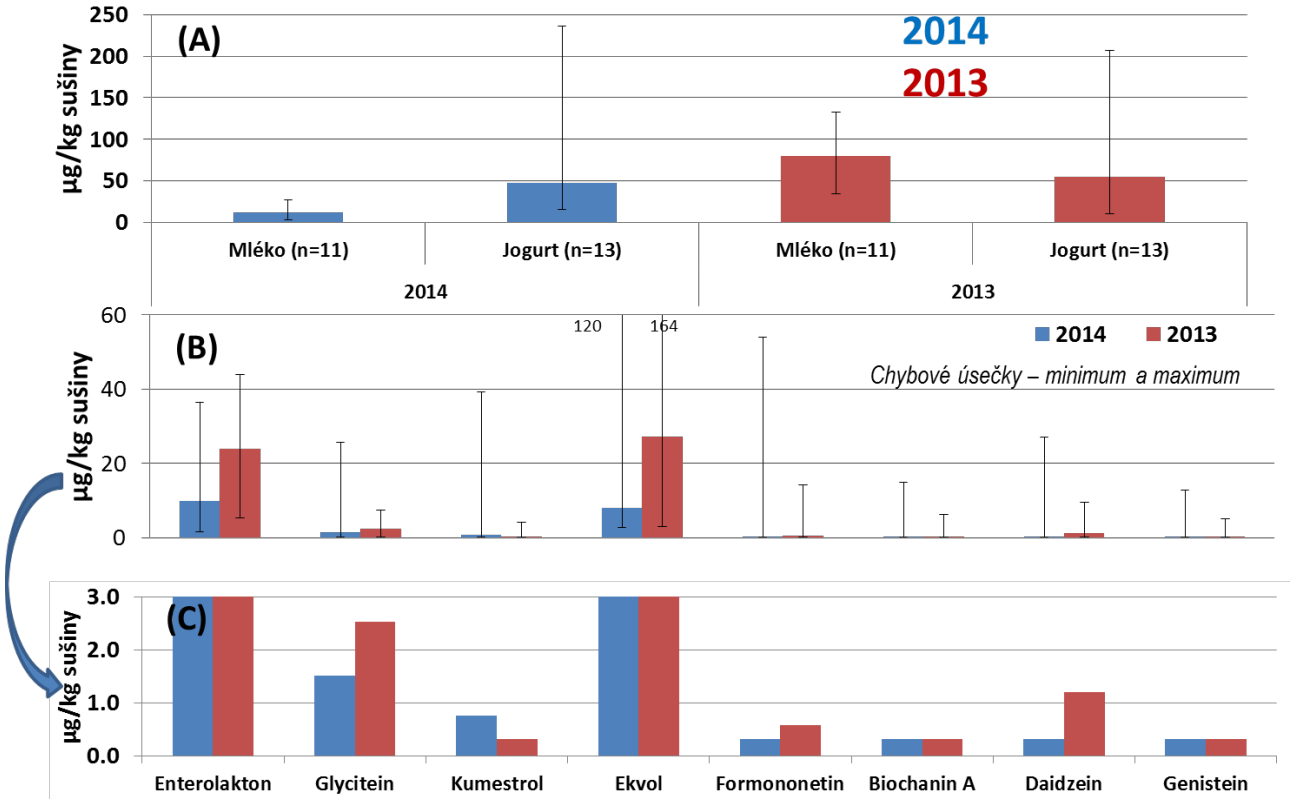
Pro identifikaci/kvantifikaci sledovaných sloučenin byla využita technika UHPLC–MS/MS: kapalinový chromatograf Waters Acquity UPLC (Waters, USA) ve spojení s hmotnostně spektrometrickým detektorem Waters XEVO TQ-S. Analyty byly separovány na koloně Acquity BEH C18 (100 mm × 2,1 mm × 1,7 μm), Waters. Pro dosažení maximální citlivosti byly získané extrakty měřeny mobilní fází (gradientová eluce) s různým složením: systém I (fytoestrogeny a mykoestrogeny): (A) voda a (B) MeOH; systém II (endogenní a syntetické estrogeny): (A) 2 mM NH_3 ve vodě a (B) MeOH:MeCN (50:50, *v/v*).

V rámci validace vyvinuté metody byla zhodnocena její výtěžnost (70–121%) a opakovatelnost (RSD, < 21%) na dvou koncentračních hladinách v 5 paralelních stanoveních. Pro validaci byly použity uměle kontaminované vzorky jogurtu a mléka, ve kterých bylo předtím vyšetřeno, zda obsahují cílové analyty. Pouze pro fytoestrogeny nebylo možné získat matrici bez jejich přirozeného obsahu. Proto musely být výsledky korigovány odečtením matričního blanku pro obě matrice. Limit kvantifikace (LOQ), 0,14–31 μg/kg sušiny, byl stanoven jako nejnižší bod kalibrační řady (matriční kalibrace – pro estrogeny a mykoestrogeny; rozpouštědlová kalibrace – pro fytoestrogeny), kdy poměr signál šum (S/N) pro kvantifikační MRM (z angl. *„multiple reaction monitoring"*) přechod byl větší než 10 a pro konfirmační větší než 3.

5. Výsledky a diskuze

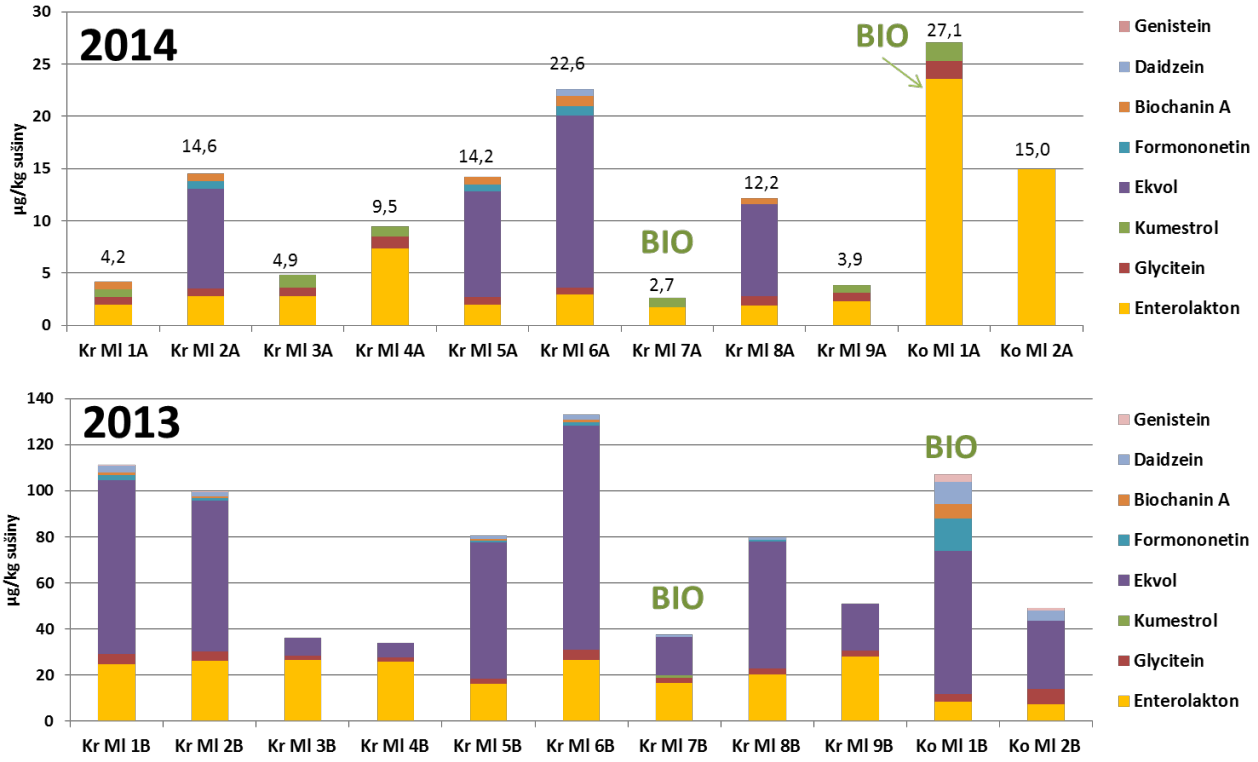
Mezi nejčastěji detekované analyty patřily fytoestrogeny: enterolakton (100%), glycitein (90%) a ekvol (75% vzorků). Ve významném množství vzorků byly přítomné i další látky z této skupiny: kumestrol, formononetin, biochanin A, daidzein a genistein (> 35% vzorků). Ve dvou vzorcích jogurtu z kravského mléka a jednom vzorku kozího mléka, které byly zakoupeny v roce 2014, byl nalezen ve stopových množstvích také estron (≈ LOQ; 0,3 μg/kg sušiny).

Ze srovnání mediánů koncentrací Σfytoestrogenů pro oba vyšetřované soubory mléka vyplývá (**Obrázek 2**), že v roce 2013 byly hladiny těchto látek v mléce vyšší (33,8–133; medián 79,8 μg/kg sušiny) než v roce 2014 (2,7–27,1; medián 12,2 μg/kg sušiny). Naopak koncentrace v jogurtech se pohybovaly ve srovnatelném rozmezí v obou obdobích (10,1–236 μg/kg sušiny). Obecně byl v nejvyšších koncentracích kvantifikován ekvol (<5,7–164; medián 27,2 μg/kg sušiny) > enterolakton (5,4–43,9; medián 24,1 μg/kg sušiny) > glycitein (<0,6–7,5; medián 2,5 μg/kg sušiny). Mediány koncentrací ostatních detekovaných fytoestrogenů se pohybovaly v rozmezí 0,32–1,2 μg/kg sušiny.

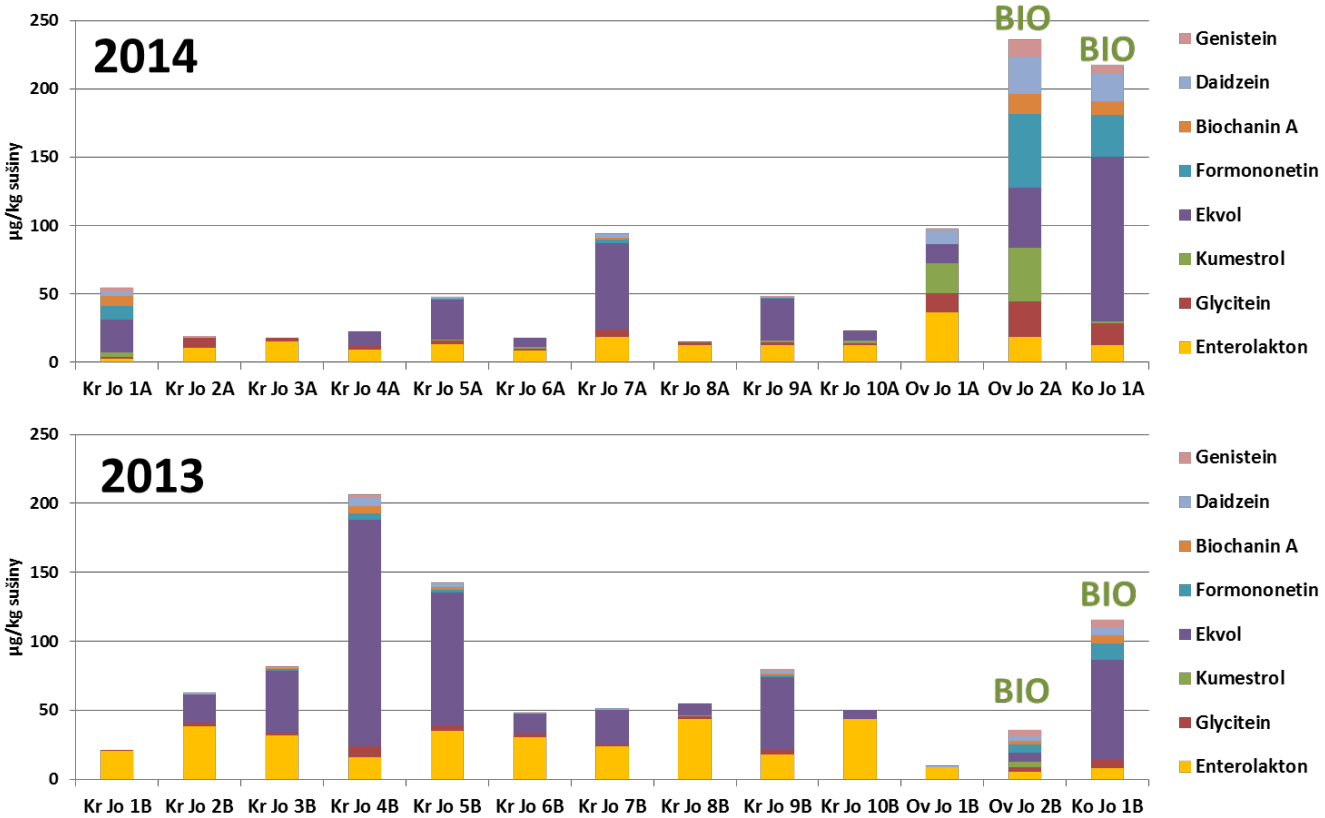


Obrázek 1 *Přehled nálezů fytoestrogenů (µg/kg sušiny) ve vyšetřovaných vzorcích z roku 2013 a 2014*
(A) Porovnání mediánů koncentrací Σfytoestrogenů v mléku a mléčných výrobcích
(B) Nálezy jednotlivých fytoestrogenů ve všech vzorcích
(C) Detailní koncentrace glyciteinu, kumestrolu, formononetinu, biochaninu A, daidzeinu a genisteinu ve všech vzorcích

Z detailního porovnání nálezů fytoestrogenů v individuálních vzorcích z roku 2013 a 2014 vyplývá, že spektrum nalezených látek ve stejných výrobcích je mezi roky velmi variabilní (**Obrázek 3**). Tento trend je patrný například pro vzorek BIO kozího mléka (Ko Ml 1A, Ko Ml 1B), kdy v roce 2013 byl majoritní ekvol (hlavní metabolit formononetinu a daidzeinu, který je produkován v bachoru a účinkem střevních bakterií), formononetin a daidzein, naopak v roce 2014 dominoval enterolakton, glycitein a kumestrol, avšak v koncentracích přibližně 5× nižších ve srovnání s předchozím rokem. Tento fakt odráží rozdílnost skladby podávaného krmiva/spásané pícniny na pastvinách v různých ročních obdobích. Významné rozdíly v hladinách a zastoupení detekovaných fytoestrogenů byly dokázány také ve vzorku kravského mléka (Kr Ml A, Kr Ml B), kdy v roce 2013 převládal ekvol, naopak v roce 2014 nebyl detekován vůbec. Obdobná variabilita (**Obrázek 4**) mezi vzorky byla dokázána i v případě jogurtů (např. Kr Jo 1A, Kr Jo 1B). Naopak stejné spektrum analytů a jejich relativní zastoupení bylo prokázáno ve vzorcích ovčího (Ov Jo 2A, Ov Jo 2B) a kozího jogurtu (Ko Jo 1A, Ko Jo 1B), jediný rozdíl byl v jejich koncentracích – v roce 2014 byly nalezené hladiny 2–4× vyšší ve srovnání s rokem 2013.



Obrázek 2 *Zastoupení detekovaných fytoestrogenů (µg/kg sušiny) v individuálních vzorcích* ***kravského*** *(zkr. Kr Ml)* ***a kozího mléka*** *(zkr. Ko Ml) v roce 2013 a 2014*



Obrázek 3 *Zastoupení detekovaných fytoestrogenů (µg/kg sušiny) v individuálních vzorcích* ***jogurtů*** *v roce 2013 a 2014; Kr/Ov/Ko Jo – zkr. jogurt z kravského/ovčího/kozího mléka*

6. Závěr

V rámci realizované studie byly nově vyvinutou a validovanou metodou vyšetřeny dva soubory vzorků kravského i kozího mléka a mléčných výrobků běžně dostupných v české obchodní síti. Ze sledovaného spektra estrogenních látek byly detekovány hlavně fytoestrogeny: enterolakton (100%), glycitein (90%) a equol (75% vzorků). Ve významném množství vzorků byly zjištěny i další látky z této skupiny: kumestrol, formononetin, biochanin A, daidzein a genistein (> 35%). Ze skupiny endogenních estrogenů byl přítomen pouze estron, a to jen v několika vzorcích ve stopových koncentracích (≈ LOQ; 0,3 µg/kg sušiny). Ostatní sledované sloučeniny ze skupiny mykoestrogenů, endogenních a syntetických estrogenů detekovány nebyly.

Z porovnání nálezů fytoestrogenů ve vyšetřovaných vzorcích mezi jednotlivými roky vyplývá, že v roce 2013 byly nálezy v mléce přibližně 4× vyšší ve srovnání s rokem 2013. Naopak v případě mléčných jogurtů byly nálezy srovnatelné. Vyšší obsah fytoestrogenů v jogurtu v porovnání s jejich obsahem v mléce může být v rozdílný v závislosti na celkovém obsahu tuku. Analyzované vzorky jogurtů měly obecně vyšší obsah tuku (0,1–10,3 %) než vzorky mléka (1,5–3,5 %), což může být důvodem vyšších nálezů těchto látek v jogurtech vzhledem k jejich lipofilnímu charakteru.

7. Poděkování

Tato studie vznikla za podpory (i) "Operačního programu Praha - Konkurenceschopnost" (CZ.2.16/3.1.00/22197) a (ii) "Národního programu udržitelnosti" (NPU I (LO) MŠMT - 34870/2013).

8. Literatura

Capriotti, A. L.; Cavaliere, Ch.; et al. Analytical strategies based on chromatography-mass spectometry for the determination of estrogen mimicking compounds in food. *J. Chromatogr. A* 2013, 1313, 62–77.

Daxanberger, A.; Ibarreta, D.; et al. Possible health impact of animal oestrogens in food. *Hum. Reprod.* 2001, 7 (3), 340–355.

Kalač, P. The effects of silage feeding on some sensory and health attributes of cow's milk: A review. *Food Chem.* 2011, 125, 307–317.

Xia, X.; Ding, L. S.; et al. Ultra-high-pressure liquid chromatogramy – tandem mass spectrometry for the analysis of six resorcylic acid lactones in bovine milk. *J. Chromatogr A* 2009, 1216 (12), 2587–2591.

R 19

VYUŽITÍ METABOLOMIKY PRO HODNOCENÍ KVALITY SÓJI

Schulzová V., Hrbek V., Novotná H., Škopíková M., Hajšlová J.
Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28

Úvod

Sója luštinatá (*Glycine max* (L.), luskovina z čeledi bobovité (*Fabaceae syn. Leguminosae*) v současné době představuje světově nejvýznamnější a nejrozšířenější luskovinu. Sójové boby patří však také mezi nejrozšířenější geneticky modifikované zemědělské plodiny. Tak zvaná geneticky modifikovaná (GM) neboli transgenní sója se podle odhadů podílí na světové produkci sóji asi 65 procenty. V EU platí povinnost označovat výrobky, k jejichž výrobě byla použita sója s větším než 0,9% podílem GM odrůdy.

Sójové boby obsahují velké množství biologicky aktivních látek. Jedná se především o fytoestrogeny - látky se slabými estrogenními účinky, které mohou ovlivňovat chování endogenních estrogenů. Z nich je podrobněji popsána skupina isoflavonů a kumestanů. Detailní pozornost je věnována fytoalexinům glyceollinům, které vznikají v rostlině při jejím napadení mikroorganismy a v přítomnosti plísní během klíčení. Také infekce různými druhy háďátek vede k biosyntéze glyceollinů. Glyceolliny vykazují mnoho pozitivních účinků na lidské zdraví. K těm řadíme především schopnost inhibice růstu rakovinových buněk, spojenou s jejich antiestrogenní aktivitou; dále také vliv na hladinu glukózy v krvi a na kontrakci cév.

Klíčová slova: sója luštinatá, metabolomika, GMO, biologicky aktivní látky, glyceolliny

Cíl práce

A. Pro autentikaci GM nebo konvenční sóji bylo testováno využití metabolomického přístupu analýzy vzorků, kdy se k hodnocení autenticity využívá charakteristického profilu („fingerprintu“) nízkomolekulárních složek dané komodity. Pro tyto účely byla použita technika vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie ve spojení s iontovým zdrojem, pracujícím za atmosférického tlaku tzv. technika přímé analýzy v reálném čase ve spojení s hmotnostním analyzátorem typu Orbitrap (DART-OrbitrapMS).

B. Pozornost byla také zaměřena na vývoj nových postupů pro využití sójových bobů, studovány byly postupy zpracování vedoucí ke zvýšení hladin biologicky aktivních látek příznivě působících na lidské zdraví. Pozornost byla věnována isoflavonům, kumestrolu a fytoalexinům glyceollinům.

A. Využití metabolomického profilování pro autenticitu geneticky modifikované sóji

Experimentální část

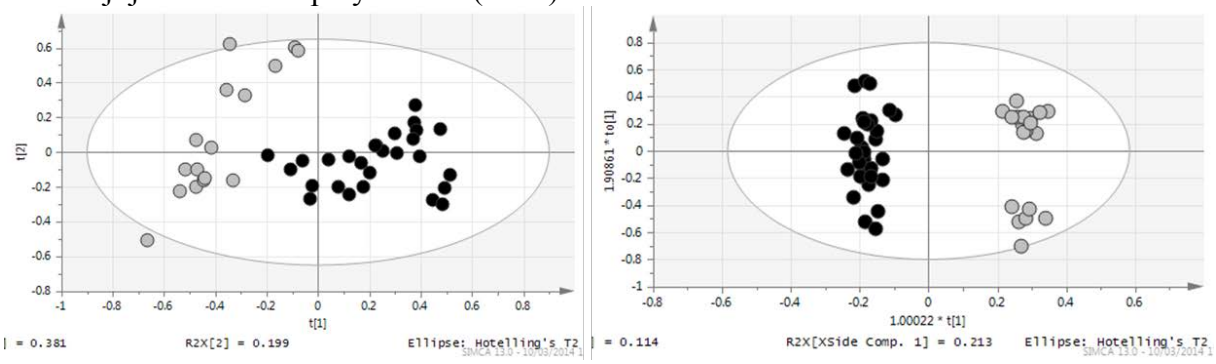
Vzorky byly zajištěny Výzkumným ústavem rostlinné výroby (VÚRV) v Praze Ruzyni. Pro tuto studii bylo použito celkem 49 vzorků sóji, z nichž bylo 30 vzorků geneticky modifikované sóji a 19 vzorků konvenční sóji. Pro analýzu byly připraveny extrakty vzorků sóji 80% methanolickým roztokem. Pro instrumentální metabolomickou analýzu byl použit iontový zdroj DART, model SVP (IonSense, USA) ve spojení s hybridním hmotnostním spektrometrem s analyzátorem typu orbitrap - Exactive (Thermo Fisher Scientific, USA) a posuvným automatickým dávkovačem (IonSense, USA). Vzorky byly vyšetřeny jak v pozitivním tak i v negativním módu ionizace. Ke zpracování naměřených dat (hmotnostní spektrum, tj. charakteristický metabolomický fingerprint) byl použit program Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, USA) a SIMCA (Umetrics, Švédsko).

Výsledky a diskuse

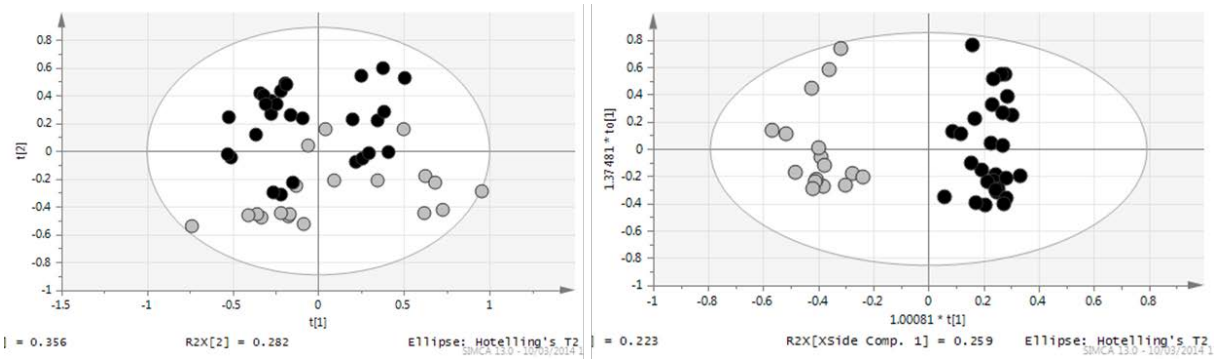
Ke zpracování a interpretaci vícerozměrných dat, získaných během metabolomických analýz, byly použity metody multivariační statistické analýzy: analýza hlavních komponent (PCA) a

ortogonální diskriminační analýza nejmenších čtverců (OPLS-DA). Výsledky těchto analýz pro jednotlivé ionizační módy jsou uvedeny na obrázcích 1 a 2. Jak je patrné z obr. 1 a 2 prvotní PCA analýza ukázala schopnost získaných dat tvořit skupiny a oddělovat je dle typu sóji (konvenční a transgenní), pomocí OPLS-DA analýzy došlo k výraznému oddělení jednotlivých typů vzorků v obou ionizačních módech.

Byly identifikovány signály (markery) s největší váhou na oddělení vzorků, které charakterizují a odlišují jednotlivé skupiny vzorků (tab. I).



Obrázek 1: Výsledky chemometrické analýzy vzorků analyzovaných DART-MS v pozitivním módu, vlevo je porovnání vzorků konvenční sóji (šedá barva) a vzorků transgenní sóji (černá barva) metodou PCA a vpravo metodou OPLS-DA.



Obrázek 2: Výsledky chemometrické analýzy vzorků analyzovaných DART-MS v negativním módu, vlevo je porovnání vzorků konvenční sóji (šedá barva) a vzorků transgenní sóji (černá barva) metodou PCA a vpravo metodou OPLS-DA.

Experimentální část

Vzorky naklíčených sójových bobů byly zajištěny Výzkumným ústavem potravinářským Praha (VÚPP), zdroj suroviny firma Kalma. Testován byl vliv délky klíčení (1-6 dnů, klíčení na táce, submerzní klíčení, jejich kombinace) a vliv inokulace plísní *Rhizopus Oligosporus.* 80% methanolické extrakty vzorků byly analyzovány technikou UHPL-OrbitrapMS (Thermo Fisher Scientific, USA), vzorky byly vyšetřeny jak v pozitivním tak i v negativním módu ionizace. Pro separaci byla použita kolona Kinetex (100 x 2,1 mm, 1,7 µm), jako mobilní fáze 1% kyselina octová ve vodě a methanol s gradientovou elucí.

Sledovány byly hladiny následujících sójových fytoestrogenů: isoflavony (volné aglykony - daidzein, genistein, glycitein, vázané glykosidy - dadzin, genistin, glycitin), kumestrol a glyceolliny.

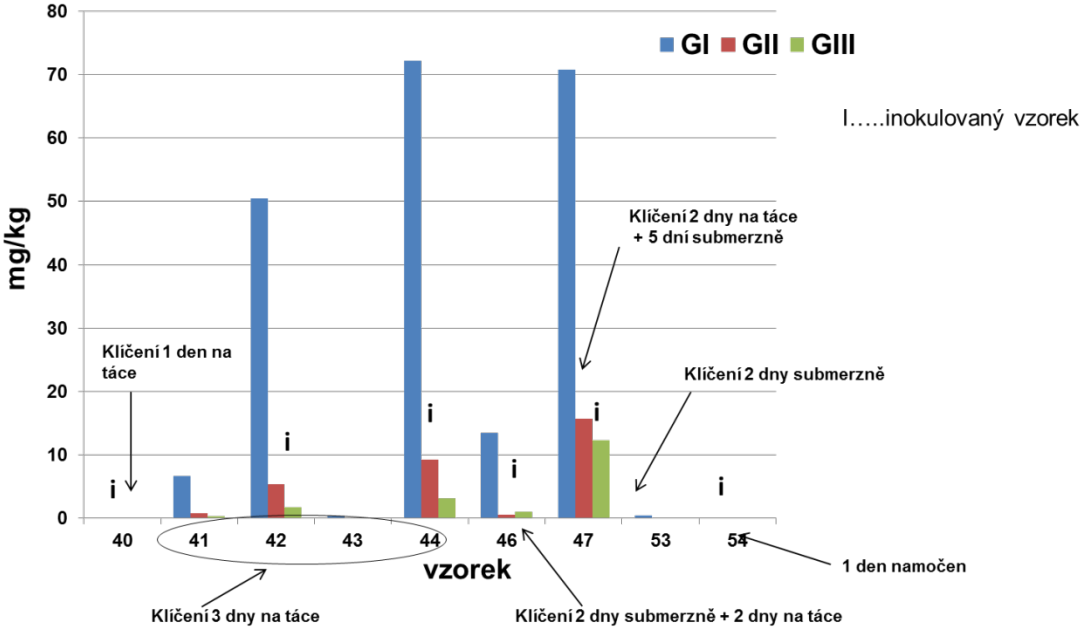
Tabulka I: Souhrn významných markerů získaných technikou DART-MS.

DART-MS nejvýznamnější markery pro odlišení vzorků - positivní ionizace					
(*m/z*) $[M+H]^+$	sumární vzorec	identifikace	(*m/z*) $[M+H]^+$	sumární vzorec	identifikace
104.0708	$C_4H_9O_2N$		195.0863	$C_7H_{14}O_6$	methylglukosid
127.0390	$C_6H_6O_3$	maltol, isomaltol, pyrogallol, hydroxyquinol	285.0760	$C_{16}H_{12}O_5$	glycitein, biochanin A, 5-O-methylgenistein
163.0600	$C_6H_{10}O_5$	1,6-anhydroglukosa			
DART-MS nejvýznamnější markery pro odlišení vzorků - negativní ionizace					
(*m/z*) $[M-H]^-$	sumární vzorec	identifikace	(*m/z*) $[M-H]^-$	sumární vzorec	identifikace
105.0184	$C_3H_6O_4$	kyselina glycerová	295.2282	$C_{18}H_{32}O_3$	kyselina vernolová
128.0345	$C_5H_7O_3N$	kyselina pyroglutamová	311.2231	$C_{18}H_{32}O_4$	
181.0710	$C_6H_{14}O_6$		313.2387	$C_{18}H_{34}O_4$	
253.0507	$C_{15}H_{10}O_4$	daidzein	327.2181	$C_{18}H_{32}O_5$	
269.0459	$C_{15}H_{10}O_5$	genistein	329.2338	$C_{18}H_{34}O_5$	
293.2126	$C_{18}H_{30}O_3$				

B. Možnosti zvýšení hladiny biologicky aktivních látek příznivě působících na lidské zdraví v sójových bobech

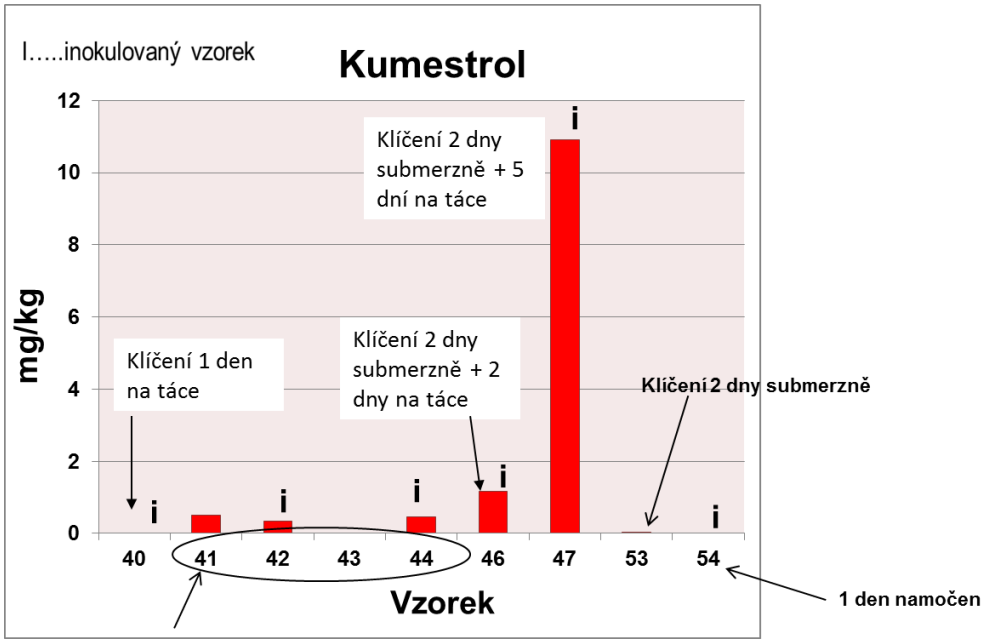
Výsledky a diskuse

Komerční standardy glyceollinů nebyly k dispozici, bylo potřeba je izolovat pomocí preparativní chromatografie (NMR čistota standardu 85 %). V naklíčených a inokulovaných vzorcích sójových bobů byly nalezeny tři izomerní formy glyceolinů – glyceollin I-III (obr. 3; GI-III). Obsah glyceollinů byl významně ovlivněn přítomností plísně a délkou klíčení, nejvíce glyceollinů (cca 100 mg/kg) bylo nalezeno v inokulovaném vzorku - klíčeném 2 dny na tácu a následně 5 dní submerzně (vzorek 47).



Obrázek 3: Vliv stresových podmínek na hladinu glyceollinů

Obsah kumestrolu v analyzovaných vzorcích závisel pouze na době klíčení, nejvyšší hladiny byly nalezeny opět ve vzorku č. 47 (obr. 4). Obsah isoflavonů nebyl klíčením ani inokulací významně ovlivněn.



Obrázek 4: Vliv stresových podmínek na obsah kumestrolu

Závěr

A. Přístup metabolomického profilování vzorků sóji ve spojení s multivariačními statistickými metodami (PCA a OPLS-DA) umožňuje rychlé a elegantní ověření autenticity geneticky modifikované (GM) a konvenční sóji.

B. Byla vyvinuta metoda pro sledování hladin glyceollinů, kumestrolu a isoflavonů v sóje a pro kvantifikaci glyceollinů byl izolován standard. Tvorba glyceollinů je významně ovlivněna délkou klíčení a případnou inokulací plísní. Prokázán byl také vliv klíčení na biosyntézu kumestrolu. Obsah isoflavonů se však během klíčení neměnil.

Poděkování

Tato studie vznikla za podpory projektů MZe NAZV QI101B267 a QI111B053 a účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20/2014)

Literatura

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1829/2003 pro geneticky modifikované potraviny a krmiva. Off. J.Eur. Union 2003; L. 268, P. 24-28.

Velíšek, J.; Hajšlová, J. Chemie potravin II., 3.rd ed.; OSSIS: Tábor, 2009.

Ng, T. B.; et al. Glyceollin, a soybean phytoalexin with medicinal properties. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011, 90 (1), 59–68.

Banks, S. W.; Dewick, P. M. Biosynthesis of glyceollins I, II and III in soybean. Phytochemistry 1983, 22 (12), 2729–2733.

Zimmermann, M. C.; et al. Glyceollin I, a Novel Antiestrogenic Phytoalexin Isolated from. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2010, 332 (4), 35–45.

Lygin, A. V.; Hill, C. B.; Zernova, O. V.; Crull, L.; et al. Response of soybean pathogens to glyceollin. Phytopathology 2010, 100 (9), 897–903.

Phipps, R. H., Park, J. R.: Envronmental benefits of genetically modified crops: global and European perspective on their ability to reduce pesticide use. J. Anim. Feed Sci. 2002, 11, 1-18.

Arun, Ö. Ö., Yilmaz, F., Muratoglu, K.: PCR detection of genetically modified maize and soy in mildly and highly processed foods. Food Control 2013, 32, 525.

Dinon, A. Z., Treml, D., Mello, C. S., Arisi, A. C. M.: Monitoring of GMO in Brazilian processed meat and soy-based products from 2007 ti 2008 J. Food Compos. Anal. 2010, 23, 226.

Hrbek V., Ovesná J., Demnerová K., Hajšlová J.: Lze využít metabolomické profilování pro autenticitu geneticky modifikované sóji?: pilotní studie. Chem. Listy, in press

R 20

VYUŽITÍ NAKLÍČENÝCH LUŠTĚNIN PŘI PŘÍPRAVĚ POKRMŮ

Dostálová J., Málková H., Ondřejková Z., Kortánková V.
Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT v Praze, Technická 5,166 28 Praha 6

Úvod

Luštěniny patří k potravinám, které se konzumují již po tisíciletí. Spotřeba luštěnin v Evropě je nižší než v ostatních částech světa, přičemž existují velké rozdíly mezi jednotlivými evropskými státy – nejvyšší spotřeba je v jižních státech Evropy. V České republice byla spotřeba v roce 2011 2,3 kg/osobu/rok a od roku 1954, kdy byla poprvé zveřejněna se stále pohybuje nepatrně nad 2 kg/osobu/rok. Nejvíce je konzumován hrách 0,9 kg/osobu/rok, čočka a fazole se konzumují po 0,6 kg/osobu/rok. Výrazně méně se konzumuje cizrna, vigna (fazole mungo) a některé další luštěniny, které lze získat ve speciálních prodejnách. Sója se u nás konzumuje především ve formě různých výrobků.

Luštěniny jsou z pohledu výživového velmi kvalitní potravina. Luštěniny jsou dobrým zdrojem bílkovin (20-25 %), arašídy až 32 % a sója až 40 %. Jejich výživová hodnota je vyšší než u obilovin, i když také patří mezi neplnohodnotné bílkoviny. Ve směsi s obilovinami se výrazně zvyšuje a může i dosáhnout kvality plnohodnotných bílkovin. Z hlediska výživového jsou proto hodnotnější pokrmy, kde jsou v receptuře kombinovány luštěniny s obilovinami např. hrách a kroupy nebo přidána luštěninová, zejména sójová mouka. Sacharidy (60 %) jsou tvořeny převážně škrobem. Sója a arašídy mají obsah sacharidů výrazně nižší a neobsahují škrob. Na rozdíl od obilovin obsahují luštěniny ve větším množství (až 10 %) nestravitelné α-galaktosidy (oligosacharidy), které způsobují flatulenci (nadýmání). Částečně lze α-galaktosidy odstranit klíčením, namáčením a tepelnými postupy. Obsah tuku je, s výjimkou sóji (20 %) a arašídů (až 58 %), nízký (1-3 %). Složení mastných kyselin je příznivé. Významný je vysoký obsah fosfolipidů (především u sóji). Pozitivní význam ve výživě mají i lipidy doprovázející rostlinné steroly. Luštěniny jsou i dobrým zdrojem vitaminů (skupiny B, sója i vitaminu E) a vlákniny. Obsah minerálních látek je vysoký, ale jsou většinou špatně využitelné v důsledku vazby na kyselinu fytovou, oxalovou (šťavelovou) a jiné látky. Pozitivem je i nízký glykemický index luštěnin, který je způsoben především přítomností vlákniny, rezistentního škrobu a zastoupením frakcí škrobu. Konzumace potravin s nízkým glykemickým indexem je doporučována z více důvodů, zejména proto, že významně prodlužují pocit sytosti po konzumaci potraviny nebo pokrmu.

Spotřebu luštěnin je žádoucí zvýšit a doporučení ke zvýšení spotřeby luštěnin je součástí výživových doporučení WHO i Výživových doporučení pro obyvatelstvo České republiky které vydala Společnost pro výživu. Hlavními důvody nízké spotřeby luštěnin jsou, pro většinu obyvatel, ne příliš lákavé senzorické vlastnosti pokrmů z luštěnin, trávicí problémy po jejich požití a časově náročná příprava pokrmů. Tyto důvody byly zjištěny i v anketě provedené v rámci diplomové práce na VŠCHT.

Trávicí potíže po požití luštěnin jsou způsobeny hlavně nestravitelnými oligosacharidy – α-galaktosidy a dále vlákninou a resistentním škrobem. Obsah nestravitelných sacharidů lze velmi účinně (na méně než 20% původní hodnoty) snížit klíčením. Při klíčení dochází ke zvýšení obsahu vitaminů (především C a B_2) a vzniku látek ochranných. Během klíčení se však velmi zvyšuje obsah mikroorganizmů – JTK v našich pokusech dosáhly hodnot až 10^9.

V literatuře je popsáno mnoho onemocnění z potravin způsobených konzumací naklíčených luštěnin.

Pro prodloužení skladovatelnosti naklíčených luštěnin existuje více metod. V naší studii jsme zvolili metodu ošetření vysokým tlakem (paskalizaci). Ošetření luštěnin vysokým tlakem po dobu 10 minut při tlaku 500 MPa provedl kolektiv VÚPP pod vedením Ing. Houšky.

Metoda ošetření vysokým tlakem má výhodu v tom, že se při ní téměř nemění senzorické vlastnosti ošetřené potraviny a u luštěnin navíc dochází k dalšímu snížení obsahu α-galaktosidů. Klíčením, působením vysokého tlaku a skladováním takto ošetřených semen došlo v našich experimentech ke

snížení jejich obsahu u hrachu na 8 %, u cizrny na 5 % a u čočky na 8 % původního obsahu galaktosidů v suchých semenech.
Pro obohacení naklíčenými luštěninami jsou vhodné následující pokrmy:

- Saláty – většina zeleninových salátů
- Polévky - zeleninové
- Přílohy – bramboráčky, různé placičky
- Hlavní pokrmy – bramborák, míchaná vejce
- Alternativy pokrmů z masa - karbanátky
- Pomazánky – slané i sladké
- Jemné pečivo – ze šlehaných hmot, perníky

Příklady obohacených zeleninových salátů s přídavkem naklíčené sóji ošetřené vysokým tlakem
Fazolovo-rajčatový salát s přídavkem naklíčené sóji

Salát s kuskusem a houbami s přídavkem naklíčené sóji

Nutriční hodnocení zeleninových salátů bez přídavku a s přídavkem naklíčené sóji

Fazolovo-rajčatový salát

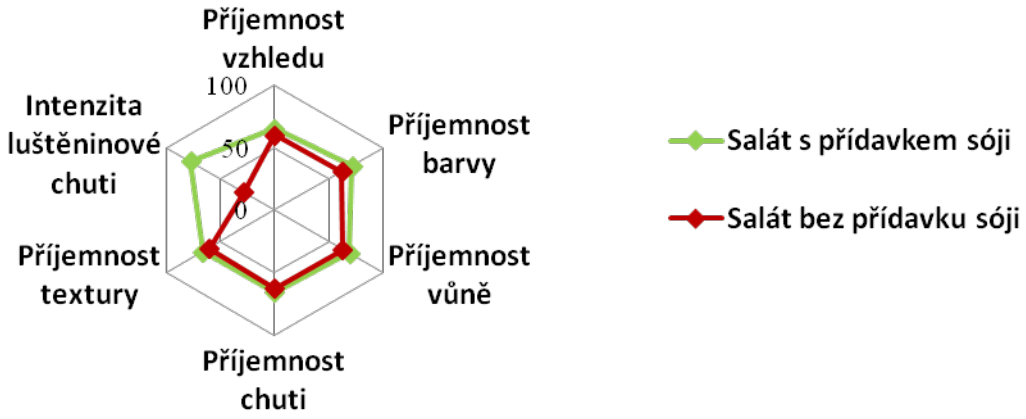
	EH	B	T	S
Bez sóji	138 kJ	1,2 g	0,6 g	5,5 g
S přídavkem sóji	238 kJ	3,8 g	2,0 g	5,9 g

Salát s kuskusem a houbami

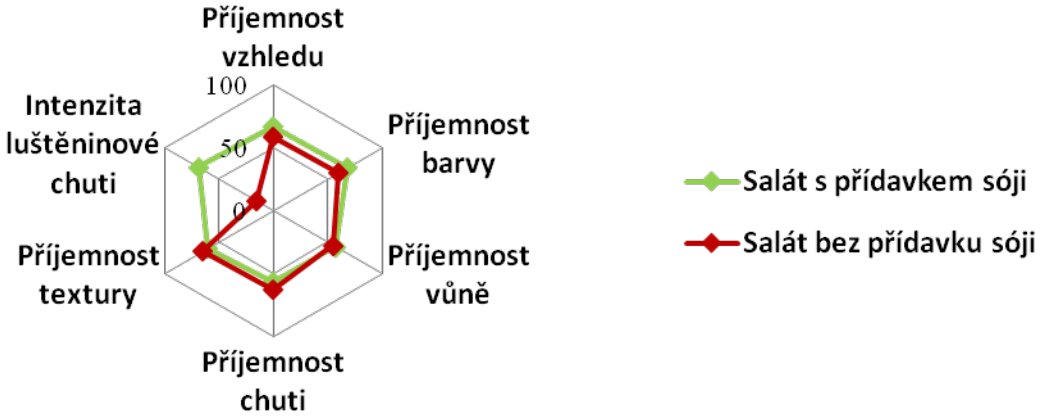
	EH	B	T	S
Bez sóji	276 kJ	2,5 g	1,1 g	11,2 g
S přídavkem sóji	320 kJ	3,9 g	1,8 g	10,8 g

Senzorického hodnocení zeleninových salátů bez přídavku a s přídavkem naklíčené sóji

Fazolovo-rajčatový salát



Salát s kuskusem a houbami



Byly prokázány statisticky významné rozdíly pouze v intenzitě luštěninové chuti

Dále jsme použili naklíčené luštěniny pro přípravu karbanátků. Na přípravu karbanátků z naklíčené cizrny byl přijat užitný vzor PUV 2013-28595 Karbanátek z naklíčené cizrny, lic. smlouva 131/2014. Pro ilustraci je uvedena část textu užitného vzoru.

Podstata technického řešení

- Uvedené nedostatky nejsou u nového výrobku, který je vyroben z naklíčených semen cizrny a má důsledkem naklíčení snížený obsah alfa-galaktosidů až na 20 %.
- Tento výrobek je vytvořen z naklíčené cizrny 50 – 80 %, loupaných slunečnicových semen 25-35 %, přibližně 20 % pak tvoří pojící vejce s moukou a zbytek doplní ochucující přídavky zeleniny a bylinek.

- Výslednou podobou výrobku je opečený karbanátek, který neobsahuje kromě vejce žádnou živočišnou bílkovinu, má přitom velmi příjemnou masitou chuť. Pachuť vznikající při klíčení, která některým konzumentům vadí, je ochucením dokonale potlačena.

Další možností využití luštěnin je použití okary, která odpadá při výrobě sójových nápojů a pro své složení je vhodná jako přídavek zejména do pokrmů pro redukční diety.
Složení okary z našich experimentů (složení okary závisí na podmínkách přípravy nápoje)

Obsah složky	**[% v sušině]**
Bílkoviny	29,1
Tuk	4,3
Sacharidy	5,0
Vláknina	57,6
Popel	4,0

Pro ilustraci možností využití okary uvádíme část textu užitného vzoru PUV 2013-28602 Pomazánka z okary, lic. smlouva 132/2014
Příklady uskutečnění technického řešení
Příklad 1
Pomazánka z okary s tuňákem a cibulí
42 g okary se smísí s 28 g sýra Gervais original, 21 g tuňáku ve vlastní šťávě, 8 g cibule, 1 g řepkového oleje, 1 g soli a ochutí se pepřem a citronovou šťávou. Všechny komponenty důkladně rozetřeme v třecí misce.
Příklad 2
Pomazánka s celerem a vejci
32 g okary se smísí s 25 gramy sýra Lučina (měkkého tvarohu), 21 g celeru, 11 g mrkve, 10 g celého vejce, 1 g řepkového oleje, 1 g soli. Všechny komponenty důkladně rozetřeme v třecí misce.
Příklad 3
Pomazánka se skořicí a ananasem
26 g okary se smísí s 25 g nízkotučného tvarohu, 25 g tučného tvarohu, 19 g na jemně nakrájeného kompotovaného ananasu, 5 g moučkového cukru. Výsledný produkt se dle chuti doplní skořicí a ananasovým aroma.
Pomazánky z okary byly senzoricky hodnoceny velice pozitivně.

Závěr.
Zvýšit spotřebu luštěnin lze přídavkem luštěnin k různým pokrmům. Tím se zmenší trávicí potíže po konzumaci luštěninových pokrmů a zároveň se pokrm obohatí důležitými živinami. Obzvláště výhodný je přídavek naklíčených luštěnin, které mají snížený obsah nadýmavých látek a obsahují více pozitivně působících živin. Pokrmy s přídavkem luštěnin lze použít i pro redukční diety. Pro redukční diety se obzvláště hodí přídavek okary - suroviny odpadající při výrobě sójových nápojů.

R 21

MEZ TOKU A SENZORICKÉ HODNOCENÍ SÓJOVÝCH JOGURTŮ PŘIPRAVENÝCH Z KLÍČENÉ SÓJI

Landfeld A., Novotná P., Strohalm J., Rysová J., Houška M.
Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i.

Cílem této práce byla aplikace klíčených sójových bobů k přípravě sójových jogurtů s podstatně sníženým obsahem alfa-galaktosidů. Toto snížení obsahu galaktosidů umožní, že tyto výrobky nejsou nadýmající. Aby bylo možno cíleně regulovat konzistenci a další senzorické parametry těchto jogurtů, bylo nutno zkoumat vliv obsahu sušiny na tyto parametry kvality, zejména mez toku, vzhled, vůně, taste, sójová pachuť, senzorická konzistence a celkový dojem. Tyto závislosti napomohly stanovit optimální obsah sušiny jogurtů z hlediska jejich senzorické přijatelnosti. Optimální hodnota sušiny je 6,5 %.

R 22

ANALÝZA TUKU JEŠTĚ NIKDY NEBYLA TAK AUTOMATICKÁ A EFEKTIVNÍ

Fleglová I.
MILCOM servis, a.s., Hostivařská 56/538, 102 00 Praha 10

FIREMNÍ PREZENTACE

Zjednodušený postup zvyšuje bezpečnost práce a snižuje náklady na provoz. Skládá se z extrakční jednotky, z jednotky pro hydrolýzu vzorku a samostatného HydroCap filtru,který je společný pro obě jednotky - Soxtec 8000 a Hydrotec 8000 . Řešení umožňuje provádět celkovou analýzu tuku jedním integrovaným procesem. Unikátní, patentovaný HydroCap filtr odstraňuje přenos vzorku , takže se snižuje riziko lidské chyby. Laboratorní náklady se tak výrazně snižují a vyšší propustnost vzorku zvyšuje efektivnost nákladů. Držák HydroCap filtrů umožňuje dokonalou sledovatelnost vzorků od procesu vážení, přes hydrolýzu a sušení, až do dokovacího systému extrakční jednotky po celý proces extrakce. Celý systém je velmi kompaktní, šetří místo, čas a peníze uživatele.

R 23

SNÍMÁNÍ "NEVIDITELNÉHO" OBRAZU - INFRAČERVENÉ KAMERY A JEJICH VYUŽITÍ V PRAXI

Korbářová A., Šíma J.
Elcom a.s.

FIREMNÍ PREZENTACE

V současné době se problematika obrazové analýzy posouvá mimo oblast viditelného spektra do pásma vlnových délek 0,9-14 μm (tj. infračervené pásmo - IČ). Nejedná se ovšem o pouhé sledování obrazu termokamerami, tak jak je v praxi známe, neboť ty jsou omezeny na dlouhovlnné záření (tzv. LWIR – 8-14 μm). V praxi se s úspěchem využívají také další části IČ spektra, část krátkovlnná (SWIR – 0,9-1,74 μm) a střední vlny (MWIR – 3,6-4,9 μm). Tato měřicí metoda, nazývaná hyperspektrální zobrazování, je s úspěchem využívána při třídění ovoce a zeleniny, odpadu, při měření vlhkosti, analýze tuků a v mnoha dalších úlohách. V našem příspěvku představíme přehled komerčně dostupných kamer, které umožňují získat obraz v IČ oblasti. Zmíníme jejich varianty, oblasti a způsob jejich použití a možnosti zpracování získaných výsledků.

R 24

CHARAKTERISTIKA KOMERČNĚ DOSTUPNÝCH POTRAVINOVÝCH DOPLŇKŮ A KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ NA BÁZI KOLAGENU A KERATINU

Jírů M.[1], Zachariášová M.[1], Džuman M.[1], Hajšlová J.[1]
1) Ústav analýzy potravin a výživy, Technická 3, 166 28, Praha-Dejvice

Úvod:

Hydrolyzovaný kolagen a keratin nacházejí široké uplatnění v kloubní výživě, ale také jako složky potravinových doplňků a kosmetických přípravků, které mají pozitivní vliv na zdraví pokožky, nehtů a vlasů. Kolagen představuje hlavní strukturální protein obratlovců, je to nejhojnější protein, který tvoří přibližně 30 % z celkového obsahu tělesných bílkovin. Vyskytuje se především ve tkáních, které mají podpůrnou funkci. Mezi nejběžnější zdroje kolagenu patří kůže, kosti, šlachy a chrupavky. V posledních letech získaly značnou pozornost také suroviny z ryb a drůbeže.[1] Keratiny jsou vláknité nerozpustné bílkoviny vyšších obratlovců. Nacházejí se v kůži, vlasech, vlně, peří, nehtech, kopytech a v rozích, kde slouží především k ochraně před vnějším prostředím. Jsou rozděleny na tvrdé a měkké podle jejich chemických a fyzikálních vlastností, a liší se zejména v obsahu cystinu. Do kategorie tvrdých keratinů patří ty, které tvoří rohovinu, nehty, vlasy, vlnu a peří (obsahují 10 až 14 % cystinu). Měkké keratiny, obsažené v kůži, obsahují cystinu velmi málo nebo žádný. Jsou ale bohaté na aminokyseliny s krátkým postranním řetězcem, zejména glycin, alanin a serin.[2][3]

Kosti, chrupavky a peří, které představují odpadní materiál vznikající v rámci živočišné produkce, obsahují obrovské množství těchto potenciálně využitelných proteinů. Přesto, že mají odpady z živočišné produkce potenciál pro další zpracování, jejich využívání je zatím jen okrajové. Tyto odpady naopak představují pro podnik spíše komodity s velmi nízkou, nulovou, někdy dokonce zápornou ekonomickou hodnotou. Efektivním zpracováním těchto surovin, jako je hydrolýza nebo biorafinace, je možné získat využitelné látky, které by mohly pomoci podnikům k vyšším ziskům, respektive ke snížení nákladů spojených s likvidací odpadů.

Prokázání účinku komerčně dostupných kolagenových/keratinových preparátů se obvykle pojí s provedenými klinickými studiemi, avšak podrobnější informace o charakteru konkrétní formy hydrolyzovaných polymerů (např. molekulová hmotnost), která má na biologickou dostupnost zásadní vliv, obvykle zcela chybí. Přesnou charakteristiku formy kolagenu/keratinu, která je v daném preparátu přítomná, žádný z výrobců na obale neuvádí. Jak bylo zjištěno na základě přímé komunikace s výrobci přípravků či dodavateli bioaktivních látek, výrobci uvádí jen kvantitu celkového kolagenu/keratinu, nikoliv jejich konkrétní formu. Avšak pro porozumění souvislostí mezi daným biologickým efektem a charakterem konkrétní formy účinné látky je třeba strukturu kolagenu a keratinu co nejvíce charakterizovat.[4][5]

Výzkum proběhl za finanční podpory projektu Centrum kompetence pro výzkum biorafinací (TE01020080) a za účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20/2014)

Cíl studie:

Cílem této studie bylo charakterizovat komerčně dostupné doplňky stravy a kosmetické výrobky na bázi hydrolyzátů kolagenu a keratinu z pohledu distribuce molekulových hmotností peptidů a proteinů. Za tímto účelem byla vyvinuta metoda využívající vylučovací kapalinové chromatografie („size exclusion“) a UV detektoru. Výsledky byly srovnány s deklarací na obalu výrobku. Informace získané z této studie budou významnou podporou běžícího projektu Centra kompetence pro výzkum biorafinací.

Chemikálie, materiál:

- dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného, *Sigma-Aldrich (ČR)*
- dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, *Sigma-Aldrich (ČR)*
- chlorid sodný p.a., *Penta (ČR)*

- sorbent Bondesil C-18, *Agilent (USA)*
- PTFE kyvety (15 ml), *Merci (ČR)*
- PTFE mikrofiltry (0,22 µm), *Ciro (USA)*
- MS® Nylon Membrane Filter (0,22 µm), *Membrane Solutions (USA)*
- analytická kolona: Yarra 3 µm SEC 2000, 300x4.6mm, *Phenomenex (USA)*
- kapalinový chromatograf HP1200 ve spojení s UV detektorem

Vzorky:

Na českém trhu bylo zakoupeno 8 vzorků doplňků stravy sloužících ke kloubní výživě, které měly deklarovány obsah hydrolyzovaného kolagenu a 6 vzorků vlasových sér s deklarovaným obsahem částečně hydrolyzovaného keratinu.

Příprava vzorků:

Vzorky potravinových doplňků byly nejprve zhomogenizovány a následně bylo 100 mg vzorku rozpuštěno v 10 ml fosfátového pufru (pH = 6,8). Aby došlo k úplnému rozpuštění všech peptidů a proteinů, byly vzorky ponechány 2 hodiny na ultrazvukové lázni. Následovalo přečištění pomocí 2 µm mikrofiltrů. Při přípravě vzorků vlasových sér musel být zahrnut krok pro odstranění nepolárních látek (olejů), které se v těchto přípravcích spolu s keratinem často vyskytují. 2 g vzorku byly vytřepány s 200 mg Bondesilu C-18 po dobu 2 minut, poté následovalo odstředění (2 min, 10,000 RPM) a opět přečištění pomocí 2 µm mikrofiltrů.

Instrumentální analýza:

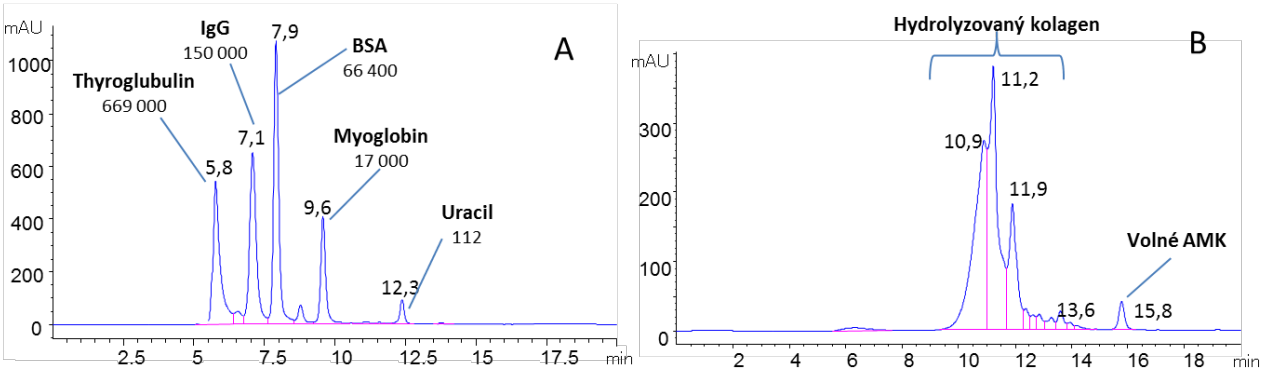
Pro separaci analytů byla využita vylučovací kapalinová chromatografie („size exclusion“) ve spojení s UV detekcí. Souhrn všech podmínek analýzy je shrnut v **Tab. I**.

Tab. I: Charakteristika chromatografických podmínek

Kolona	Yarra 3 µm SEC 2000, 300x4.6mm, Phenomenex (USA)
Teplota kolony	25 °C
Průtok mobilní fáze	0,35 ml/min
Objem nástřiku	2 µl
Mobilní fáze	50 mM fosfátový pufr, 300 mM NaCl, pH 6,8
Eluce	isokratická
Délka metody	20 min
Detekce	UV, 220 nm

Výsledky a diskuze:

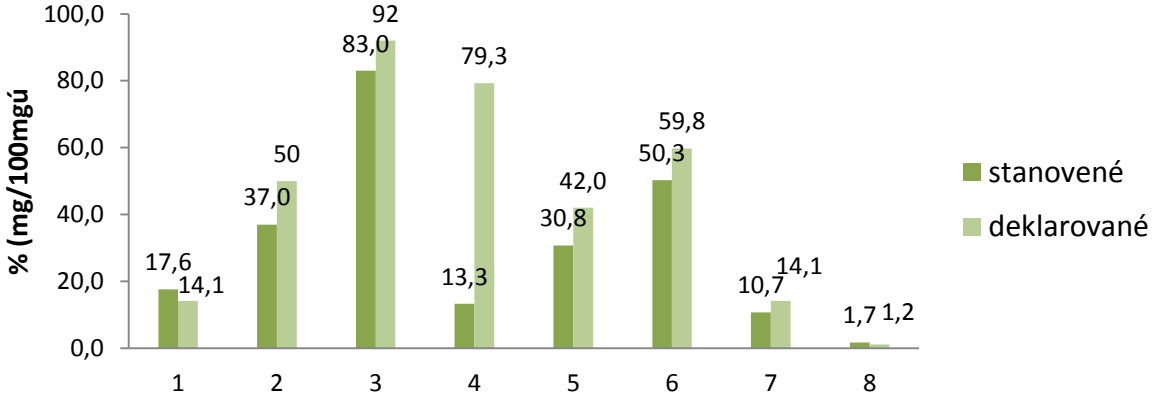
Separace proteinů a peptidů probíhala pomocí vylučovací kapalinové chromatografie, kde probíhá separace analytů podle jejich molekulové hmotnosti. Na **Obr. 1** je zobrazen chromatografický záznam standardního referenčního proteinu (BEH200 SEC Protein Standard Mix, Waters, USA), který sloužil jako standardní materiál při vývoji metody a dále chromatografický záznam vzorku hydrolyzovaného kolagenu (BioCell Collagen, USA), který má deklarovaný obsah hydrolyzovaného kolagenu 65%, a podle kterého byla provedena kvantifikace kolagenu a keratinu v analyzovaných vzorcích.



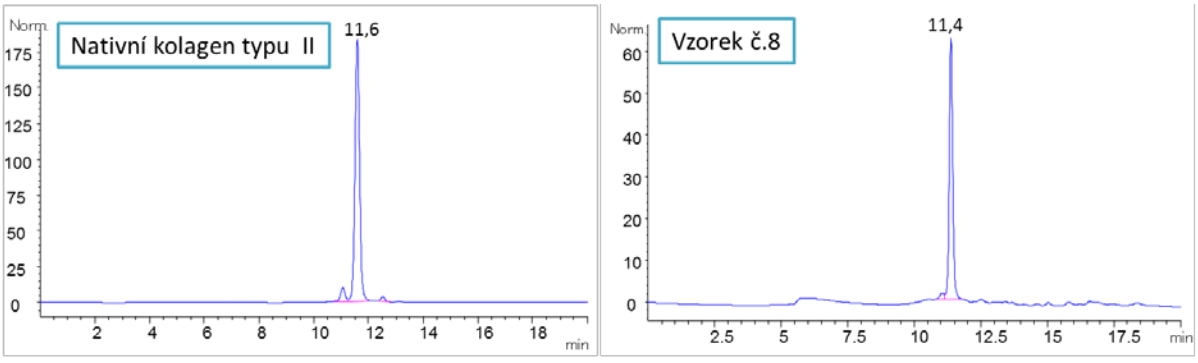
Obr. 1: Chromatografický záznam A) standardního referenčního proteinu, B) hydrolyzovaného kolagenu (BioCell Collagen)

1) Doplňky stravy na bázi kolagenu

Obsah kolagenu zjištěný experimentálně byl porovnán s informací uvedenou na obale potravinového doplňku. Deklarovaný obsah hydrolyzovaného kolagenu se významně lišil pouze u vzorku č. 4 (**Obr. 2)**. Vzorek č. 8 měl deklarovaný obsah hydrolyzovaného kolagenu, ale podle chromatografického záznamu se jednalo o kolagen nativní. Chromatografické záznamy nativního kolagenu typu II a vzorku č. 8 jsou na **Obr. 3**. Informace o tom, jestli se jedná o kolagen nativní nebo hydrolyzovaný je velice důležitá, jelikož kolagen hydrolyzovaný má lepší biologickou dostupnost než kolagen nativní.



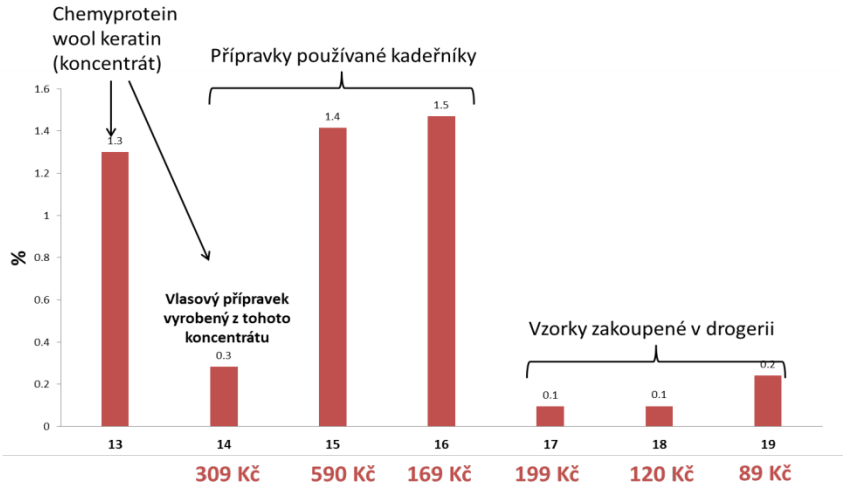
Obr. 2: Stanovený obsah hydrolyzovaného kolagenu porovnaný s informací uvedenou na obale



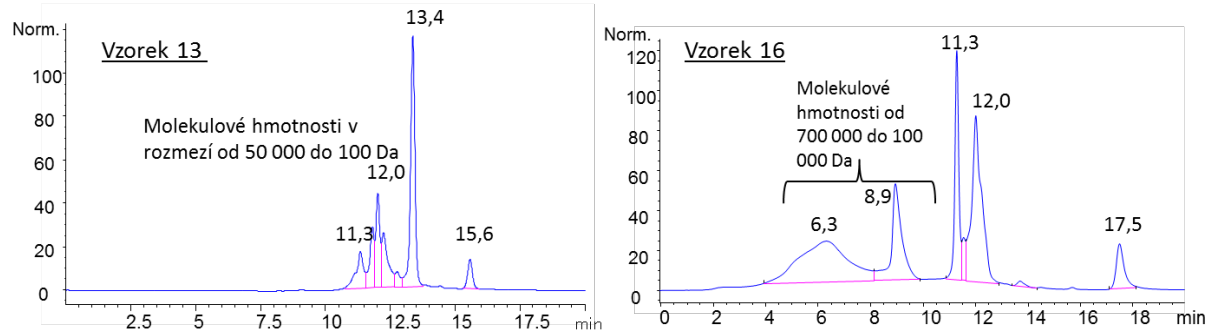
Obr. 3: Chromatografické záznamy nativního kolagenu typu II a vzorku č. 8

2) Vlasová séra na bázi keratinu

Na **Obr. 4** jsou zobrazeny výsledky analýzy vlasových sér s obsahem hydrolyzovaného vlasového keratinu. Pro srovnání byly zakoupeny profesionální produkty pro kadeřníky i výrobky, které jsou běžně dostupné v drogeriích. Z výsledků je vidět, že přípravky používané kadeřníky obsahovaly mnohem více keratinu než přípravky neprofesionální. Pro zajímavost jsou na obrázku uvedeny i ceny výrobků, kde vzorky 15 a 16, které mají téměř stejný obsah hydrolyzovaného kolagenu, se cenově poměrně výrazně liší. V tomto případě nezáleží pouze na kvantitě hydrolyzovaného keratinu, ale i na distribuci molekulových hmot. Na **Obr. 5** jsou zobrazeny chromatografické záznamy keratinového koncentrátu (vzorek 13) a vzorku 16. Vzorek 16 má vyšší obsah vysokomolekulárních látek, které hůře pronikají do vlasového vlákna.



Obr. 4: Celkový obsah hydrolyzovaného keratinu ve vzorcích vlasových sér



Obr. 5: Porovnání distribuce molekulových hmotností mezi keratinovým koncentrátem (vzorek 13) a vzorkem 16.

Literatura:

1. Lee, Ch.; et al. Biomedical applications of collagen. Int. J. Pharm. 2001, 221 (1), 1–22.
2. Joshi, S.; et al. Isolation, Identification and Characterization of a Feather Degrading Bacterium. Poult. Sci. 2007, 6 (9), 689–693.
3. Villa, A.; et al. Feather keratin hydrolysates obtained from microbial keratinases: effect on hair fiber. BMC Biotechnology 2013, 13 (15),
4. Gómez, M.; et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. Food Hydrocolloids 2011, 25 (8), 1813–1827.
5. Li, B.; et al. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry. Food Chem. 2007, 102 (4), 1135–1144.

R 25

NOVÁ STRATEGIE HODNOCENÍ KVALITY A AUTENTICITY POTRAVIN ŽIVOČIŠNÉHO PŮVODU

Hrbek V.[1], Václavík L.[1], Čajka T.[1], Elich O.[2], Hajšlová J.[1]
[1] Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav analýzy potravin a výživy, Technická 5, 166 28 Praha 6
[2]Výzkumný ústav mlékárenský, Ke Dvoru 12a, 160 00 Praha 6

Úvod

Autenticita a původ potravin jsou významnými kvalitativními parametry, na něž je v poslední době kladen velký důraz. Kontrolní orgány a spotřebitelé požadují stále více informace o potravinách, které jsou distribuovány na trh. Vedle odhalovaní falšování potravin podvodnými výrobci za účelem ekonomického zisku (např. příměsí levnější složky) je u mnoha skupin potravin nutné kontrolovat také jejich geografický nebo druhový původ, který často rozhoduje o kvalitě a/nebo ceně produktu.

Jako velmi perspektivní se v této oblasti analýzy potravin jeví aplikace metabolomického přístupu, kdy se k hodnocení autenticity a původu potravin využívá charakteristického profilu („fingerprintu“), jehož cílem je globální analýza nízkomolekulárních sloučenin (obvykle do 1500 Da).

V této studii byl využit inovativní postup s využitím iontového zdroje pro přímou analýzu v reálném čase DART (Direct Analysis in Real Time), ve spojení s vysokorozlišovacím hmotnostním spektrometrem s analyzátorem typu orbitrap, pro rychlé profilování živočišných tuků (mléko, maso, ryby) a hodnocení jejich autenticity s využitím metabolomických profilů a multivariační statistické analýzy.

Případová studie 1: detekce rostlinných olejů v mléčných výrobcích

Vzorky

Metoda je určena pro kvalitativní analýzu charakteristických rostlinných triacylglycerolů s molekulovou hmotností od 896 do 904 Da, pocházejících ze slunečnicového, řepkového a sójového oleje v mléčných výrobcích. Validační studie byla realizována s použitím vzorků měkkého sýra, ale metoda je použitelná i pro ostatní mléčné výrobky s obsahem tuku ≥ 10 %, jako jsou např. plísňové, polotvrdé a tvrdé sýry nebo máslo.

Příprava vzorku

Reprezentativní vzorek se homogenizuje s použitím laboratorního homogenizátoru. Naváží se 1,0 g homogenizovaného vzorku do 15 ml plastové kyvety a přidá se 6,0 ml toluenu. Směs se intenzivně třepe po dobu 2 min. Poté je směs odstředěna (~11000 rpm, 5 min, 20 °C) a supernatant podroben instrumentální analýze. Případné neoddělené pevné částice vzorku nebo zákal se z extraktu odstraní filtrací přes 0,45 µm PTFE mikrofiltr pomocí plastové stříkačky.

Analýza vzorku

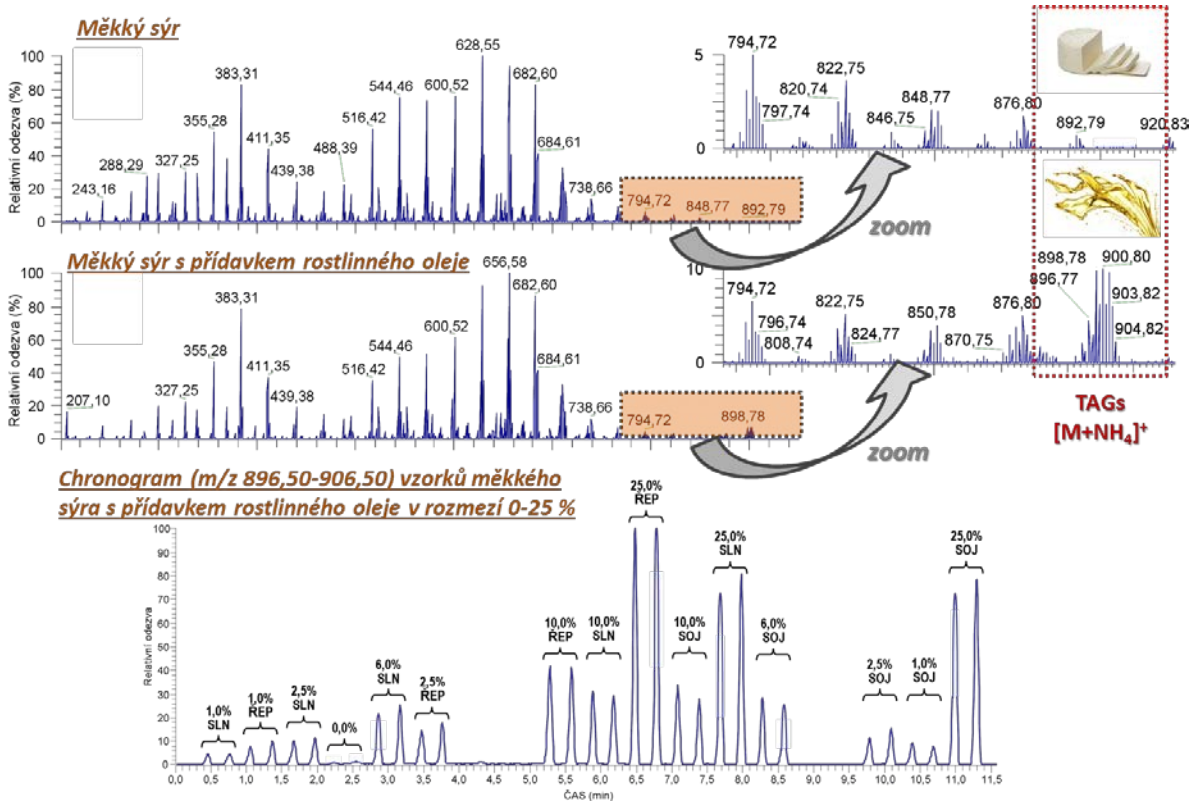
Extrakt vzorku je po nanesení na povrch vzorkovacích tyčinek (pomocí mikropipety) pomocí autosampleru automaticky přenesen do ionizačního prostoru mezi iontový zdroj DART a hmotnostní spektrometr, kde dochází k ionizaci analytů. Pro podporu efektivity ionizace triacylglycerolů je do vzdálenosti 5 cm od ionizačního prostoru umístěna 2 ml vialka s roztokem amoniaku, jehož páry indukují tvorbu intenzivních $[M+NH_4]^+$ iontů analytů. Podmínky DART ionizace a MS detekce jsou uvedeny v Tab I, ostatní parametry přístroje byly automaticky optimalizovány dle doporučení výrobce.

Tab I: Přehled nastavení parametrů DART–MS systému.

DART iontový zdroj	
Mód ionizace	positivní
Ionizační plyn	helium
Teplota ionizačního plynu	450 °C
Průtok ionizačního plynu	2,5 l/min
Napětí na jehle (needle voltage)	-5000 V
Napětí na elektrodě (electrode voltage)	+350 V
Rychlost posunu autosampleru	0,5 mm/s
Doba desorpce vzorku	12 s
Dopant	vodný roztok amoniaku (20 %, w/w)
Hmotnostní spektrometr	
Typ hmotnostního analyzátoru	iontová past / orbitální iontová past
Napětí na kapiláře (capillary voltage)	+50 V
Napětí iontové optiky (tube lens voltage)	+150 V
Sledovaný rozsah m/z	50-1000
Rychlost sběru hmotnostních spekter	2 spektra/s
Rozlišovací schopnost	50,000 fwhm

fwhm = šířka spektrálního píku v polovině jeho výšky (full width at half maximum).

Výsledky a diskuse



Obr.1: DART(+)-MS charakteristické fingerprinty měkkého sýra a měkkého sýra s přídavkem rostlinného oleje a ve spodní části obrázku je uveden chronogram znázorňující přídavek různých olejů v různém množství.

Detekce přítomnosti analytů se provádí na základě inspekce chronogramu (záznamu v čase) vytvořeného v rozmezí hodnot m/z 896 - 906. Přítomnost analytů nad mezí detekce metody se projeví jako zřetelný desorpční pík v příslušném chronogramu. Příklad chronogramu získaného analýzou vzorků měkkého sýru s přídavkem slunečnicového, řepkového a sójového oleje v rozmezí

0 až 25 hm.% (g rostlinného oleje/100 g výrobku) uvádí **Obr 1**. Identifikace a konfirmace analytů se provádí porovnáním teoretické a experimentální hodnoty m/z příslušného $[M+NH_4]^+$ iontu v hmotnostním spektru získaném zprůměrněním záznamů přes desorpční pík. Pro konfirmaci identity analytů nesmí být tento rozdíl vyšší než 5 ppm (parts per million). **Obr. 1** dále uvádí příklad DART hmotnostních spekter získaných analýzou vzorků měkkého sýra bez a s přídavkem řepkového oleje.

Případová studie 2: stanovení profilu triacylglycerolů hovězího a vepřového masa a rychlá screeningová metoda pro detekci přídavku sóji do masa a masných výrobků

Vzorky

Metoda je určena pro kvalitativní stanovení relativního zastoupení triacylglycerolů s molekulovou hmotností od 820 do 978 Da, v hexanovém extraktu masa nebo masných výrobků. Relativní zastoupení triacylglycerolů v tuku masa je vedle řady jiných faktorů ovlivněno také druhem masa. Proto data získané touto metodou mohou sloužit ke kontrole identity druhu masa na základě porovnání záznamu testovaného vzorku se záznamem získaným analýzou autentického materiálu.

Metoda je dále určena pro odhalení přídavku sóji do masa nebo masného výrobku na základě vyšetření nepolární frakce (triacylglycerolů) i polární frakce vzorku.

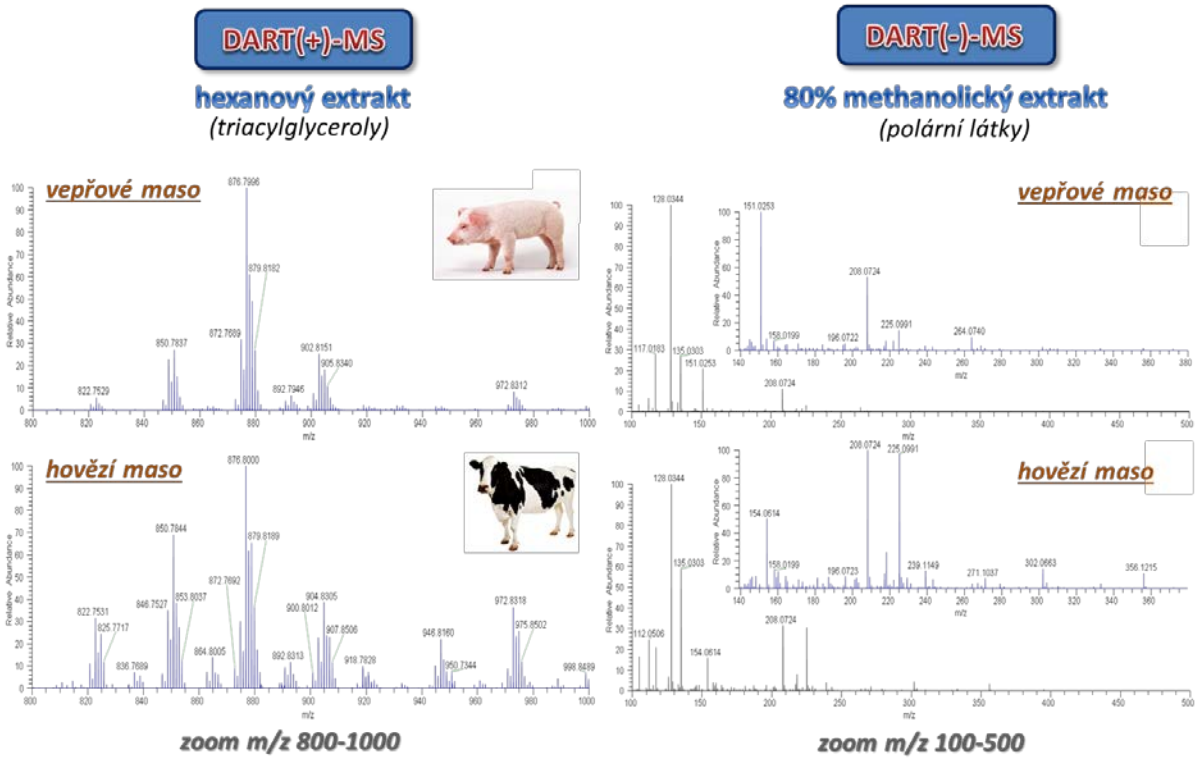
Příprava vzorku

Reprezentativní vzorek se homogenizuje s použitím laboratorního homogenizátoru. Vzorky masa byly zpracovány extrakcí hexanem (pro extrakci nepolárních látek – triacylglycerolů) a extrakcí 80% methanolickým roztokem ve vodě (pro extrakci polárních látek). K 2 g homogenizovaného vzorku bylo přidáno 6 ml příslušného rozpouštědla. Vzorek byl následně extrahován pomocí turaxu po dobu 1 min. Poté byla kyveta centrifugována po dobu 5 minut (11000 rpm, 20 °C). Pro DART–HRMS analýzu byl odebrán cca 1 ml horní vrstvy do 2 ml tmavé vialky se šroubovacím uzávěrem. Případné neoddělené pevné částice vzorku nebo zákal se z extraktu odstraní filtrací přes 0,45 μm PTFE mikrofiltr pomocí plastové stříkačky.

Analýza vzorku

Analýzy vzorků probíhala obdobně jako v případě první studie. Byly použity stejné podmínky pro analýzu nepolární frakce, jak je uvedeno v **Tab I**. Pro analýzu polárních extraktů byla zvolena teplota ionizačního plynu 350°C a extrakt byl proměřen v pozitivním i negativním módu ionizace.

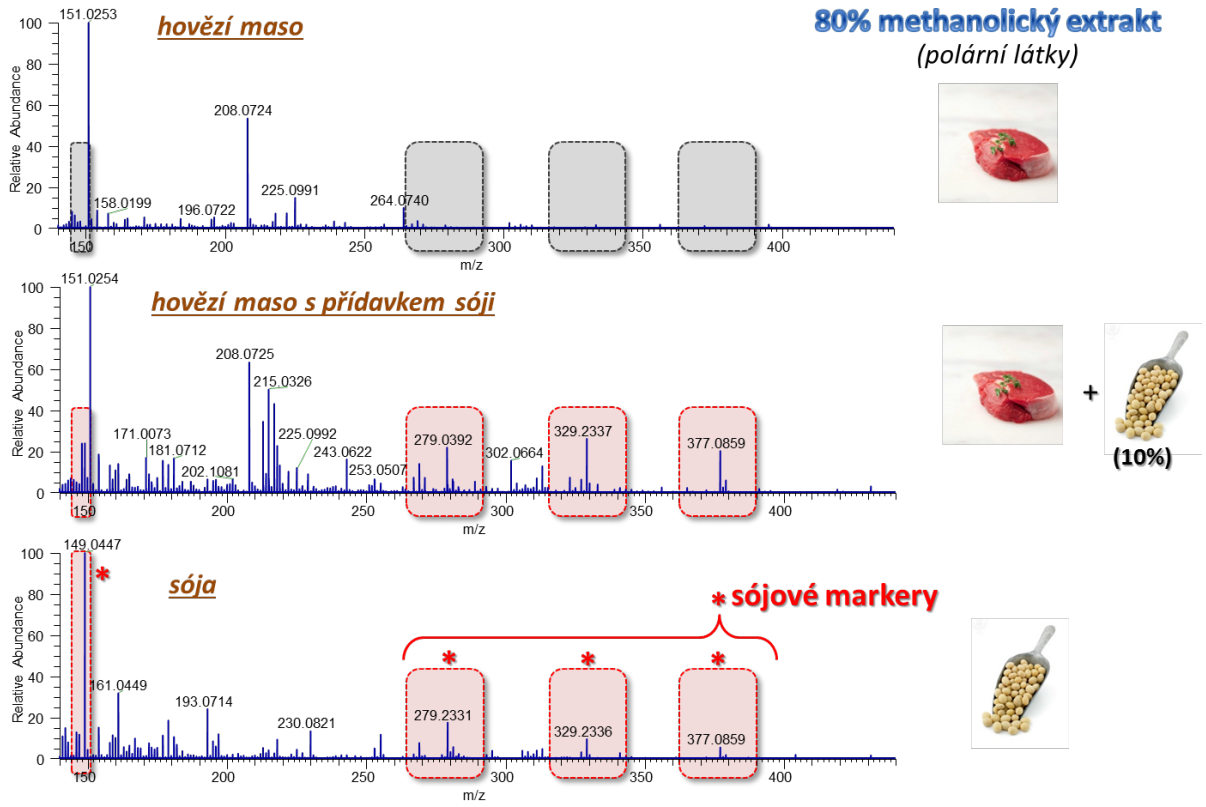
Výsledky a diskuse



Obr.2: DART(+)-MS metabolomické fingerprinty vepřového a hovězího masa – hexanové a 80%methanolické extrakty.

Obr. 2 uvádí příklad DART hmotnostních spekter získaných analýzou vzorků vepřového a hovězího masa. Z porovnání záznamů jsou patrné rozdíly mezi jednotlivými druhy masa, které mohou být použity pro sledování autentičnosti. Rozdíly je možné pozorovat jak ve výskytu jednotlivých iontů, tak v jejich relativních intenzitách. Dále uvádí příklad DART hmotnostních spekter polárních látek měřených v 80% methanolickém roztoku v negativním módu ionizace analýzou vzorků vepřového a hovězího masa. Z porovnání záznamů jsou opět patrné rozdíly mezi jednotlivými druhy masa, které mohou být použity pro sledování autentičnosti. Rozdíly je možné znovu pozorovat jak ve výskytu jednotlivých iontů, tak v poměrech relativních intenzit vybraných iontů (např. *m/z* 151, 154 208, 225, 264, 271, 302 a 356).

Na **Obr. 3** je uveden příklad DART hmotnostních spekter polárních látek měřených v 80% methanolickém roztoku v negativním módu ionizace analýzou vzorků čistého hovězího masa, hovězího masa s přídavkem sóji a samotné sóji. Z porovnání záznamů jsou patrné rozdíly mezi jednotlivými vzorky, které mohou být použity pro detekci přídavku sóji do masa. Platí stejně jako v předchozím případě, že rozdíly je možné pozorovat jak ve výskytu jednotlivých iontů, tak v poměrech relativních intenzit vybraných iontů.



Obr. 3: DART(-)-MS metabolomické fingerprinty 80% methanolického extraktu hovězího masa, hovězího masa s 10% přídavkem sóji a samotné sóji.

Případová studie 3: stanovení profilu triacylglycerolů sladkovodních a mořských ryb

Vzorky

Metoda je určena pro kvalitativní stanovení relativního zastoupení triacylglycerolů s molekulovou hmotností od 791 do 993 Da, v ethylacetátovém extraktu rybí svaloviny. Relativní zastoupení triacylglycerolů v tuku ryb je vedle řady jiných faktorů ovlivněno také druhem ryby. Proto data získané touto metodou mohou sloužit ke kontrole identity rybí tkáně na základě porovnání záznamu testovaného vzorku se záznamem získaným analýzou autentického materiálu.

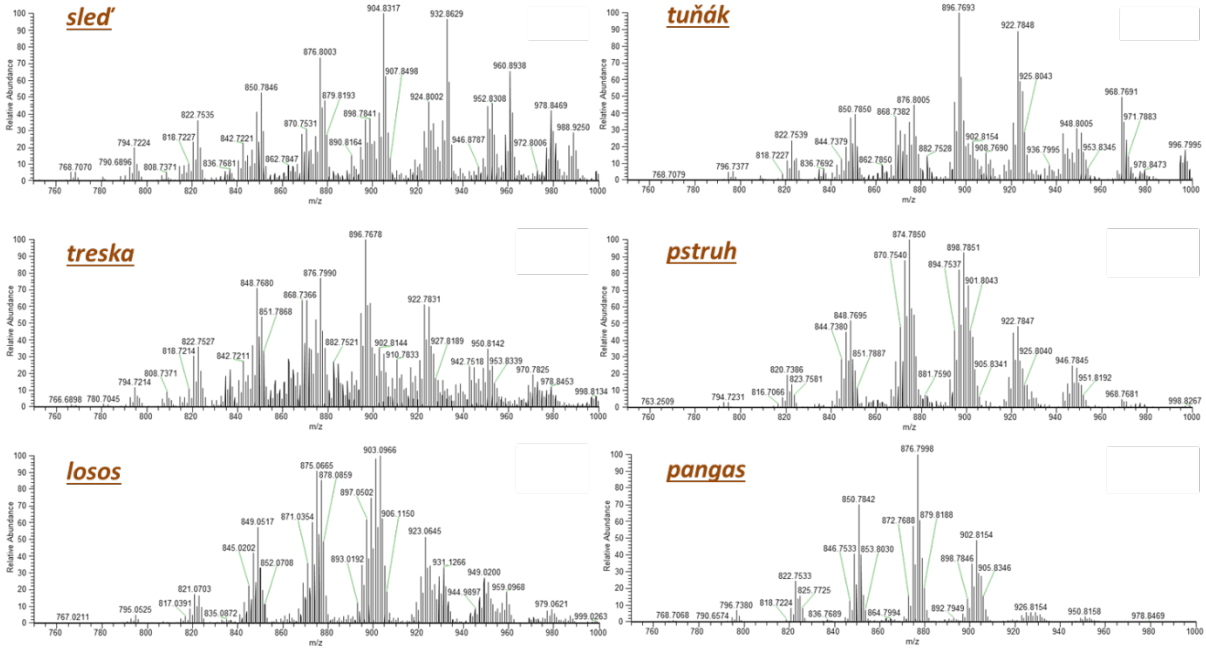
Příprava vzorku

Reprezentativní vzorek se homogenizuje s použitím laboratorního homogenizátoru. Vzorky ryb byly zpracovány extrakcí ethylacetátem. K 10 g homogenizovaného vzorku bylo přidáno 5 ml deionizované vody a 10 ml ethylacetátu. Vzorek resp. lipidy byly následně extrahovány pomocí Turraxu po dobu 1 min. Poté byla kyveta centrifugována po dobu 5 minut (11000 rpm, 20 °C). Pro DART–HRMS analýzu byl odebrán cca 1 ml horní vrstvy do 2 ml tmavé vialky se šroubovacím uzávěrem. Případné neoddělené pevné částice vzorku nebo zákal se z extraktu odstraní filtrací přes 0,45 µm PTFE mikrofiltr pomocí plastové stříkačky.

Analýza vzorku

Analýzy vzorků probíhala obdobně jako v případě první studie. Byly použity stejné podmínky pro analýzu nepolární frakce, jak je uvedeno v **Tab I**.

Výsledky a diskuse



Obr. 4: DART(+)-MS metabolomické profily triacylglycerolů různých druhů ryb.

Detekce analytů se provádí na základě inspekce chronogramu (záznamu v čase) vytvořeného v rozmezí hodnot m/z 750-1000. Identifikace a konfirmace analytů se provádí porovnáním teoretické a experimentální hodnoty m/z příslušného $[M+NH_4]^+$ iontu v hmotnostním spektru získaném zprůměrněním záznamů přes desorpční pík. Pro konfirmaci identity analytů nesmí být tento rozdíl vyšší než 5 ppm (parts per million). Obr. 4 uvádí příklad DART hmotnostních spekter získaných analýzou vzorků různých druhů mořských (sleď, tuňák, treska, losos, pangas) a sladkovodních ryb (pstruh). Z porovnání záznamů jsou patrné rozdíly mezi jednotlivými druhy ryb, které mohou být použity pro sledování autentičnosti. A opět platí, že rozdíly je možné pozorovat jak ve výskytu jednotlivých iontů, tak v poměrech relativních intenzit vybraných iontů.

Závěr

Na základě provedených experimentů a získaných výsledků byly sepsány a předány do praxe tři certifikované metodiky pro kontrolu potravin živočišného původu (mléko, maso, ryby), pro stanovení autenticity a detekci falšování potravin: 1) Metoda pro detekci rostlinných olejů v mléčných výrobcích – metoda je určena pro Státní zemědělské a potravinářské inspekce (SZPI), 2) Metoda pro stanovení profilu triacylglycerolů hovězího a vepřového masa a rychlá screeningová metoda pro detekci přídavku sóji do masa a masných výrobků – metoda je určena pro Státního veterinárního ústavu Praha (SVÚ), 3) Metoda pro stanovení profilu triacylglycerolů sladkovodních a mořských ryb – metoda je určena pro Státního veterinárního ústavu Praha (SVÚ). Metody lze genericky požít také pro analýzu dalších typů matric.

Tato studie vznikla za podpory projektů (i) MZe QI91B306 (ii) MŠMT MSM 6046137305 a (iii) účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20/2013).

.

R 26

ROZLIŠENÍ CHLAZENÉHO A ZMRAŽENÉHO/ROZMRAŽENÉHO MASA POMOCÍ ENZYMOVÝCH METOD

Škorpilová T., Šimoniová A., Pipek P.
Ústav konzervace potravin, VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6

Abstrakt

Krystalky ledu, které vznikají v průběhu zmražení masa, poškozují buněčné membrány a buněčné organely, v důsledku čehož se uvolňují mitochondriální enzymy do sarkoplasmatu. Přítomnost těchto enzymů v sarkoplasmatu masa tak může indikovat předcházející zmražení. Na základě dřívějších experimentů [Petrová et al., 2010 a Pipek et al., 2010] byly navrženy skladovací experimenty s vepřovým a kuřecím masem, kdy byly porovnány obě doposud použité metody, tj. měření aktivity citrátsyntázy a akonitázy, a byl sledován rozdíl aktivity enzymů v exsudátu mezi chladírensky a mrazírensky skladovanými vzorky. Ze získaných dat je patrné, že obě metody umožňují rozlišení čerstvého a rozmraženého masa, detekce pomocí aktivity akonitázy však poskytuje přesnější výsledky.

ÚVOD

Zmrazování je jednou z nejstarších metod úchovy potravin. Slouží k dlouhodobému uchování potravin a bývá nutným krokem při přípravě některých pokrmů [tatarský biftek, carpaccio atd.]. Zmrazením dochází ke ztrátě čerstvého vzhledu a ztrátě některých složek, jako je voda a v ní rozpuštěné vitamíny a minerální látky, jež dodávají masu chuť a aroma. Také se zkracuje doba údržnosti, jelikož dochází k poškození buněk a přítomná mikroflóra se jednodušeji dostane k živinám. Je-li tedy maso rozmražené prodáváno jako čerstvé, jde o falšování [Leygonie et al., 2012].

K detekci zmražení je možné použít řadu metod, které lze rozdělit na neenzymové a enzymové. Mezi nejběžnější neenzymové metody patří mikroskopie, kdy se sleduje poškození cytoplasmatické membrány buněk, a senzorické hodnocení, kdy panel proškolených hodnotitelů určuje na základě vzhledu, zda ke zmražení došlo [Ballin a Lametsch, 2008]. Dalšími metodami jsou např. infračervená spektroskopie, jež využívá rozdílného rozptylu světla při rozdílném obsahu vody [Damez a Clejron, 2008], a dále DNA metody, kdy se zjišťuje míra poškození DNA [Ballin a Lametsch, 2008].

Enzymové metody jsou založeny na detekci mitochondriálních enzymů, které mohou být ukazatelem zmrazení, protože se uvolňují pouze při poškození buněčné membrány [Ballin a Lametsch, 2008]. Mezi starší enzymové metody patří HADH metoda, která detekuje enzym *β*-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenázu [Fernandez et al., 1999], a API-ZYM^{TM} testovací souprava, díky níž je možné stanovit 19 enzymů; jen některé však ukazují na zmražení, protože ne všechny jsou mitochondriální [Ellerbroek et al., 1995]. Zkouší se stanovení aktivity citrátsyntázy a akonitázy.

MATERIÁL A METODY

K experimentům byly použity vzorky vepřového [*m. longissimus lumborum et thoracis*] a kuřecího masa [stehna bez kůže].

Příprava vzorků
Vepřová svalovina [*m. longissimus lumborum et thoracis]* byla rozdělena na plátky o hmotnosti přibližně 15 g a plátky byly vakuově zabaleny do PE folie. Vzorky kuřecích stehen [200 – 230 g] byly jednotlivě zabaleny do PE folie, vakuově zabaleny a umístěny do lednice [+2 °C] a mrazáku [-18 °C]. Chladírensky skladované vzorky byly sledovány po dobu 10 dní, mrazírensky skladované vzorky po dobu 45 dní. Ke sledování aktivity enzymů byl použit exsudát uvolněný ze vzorků.

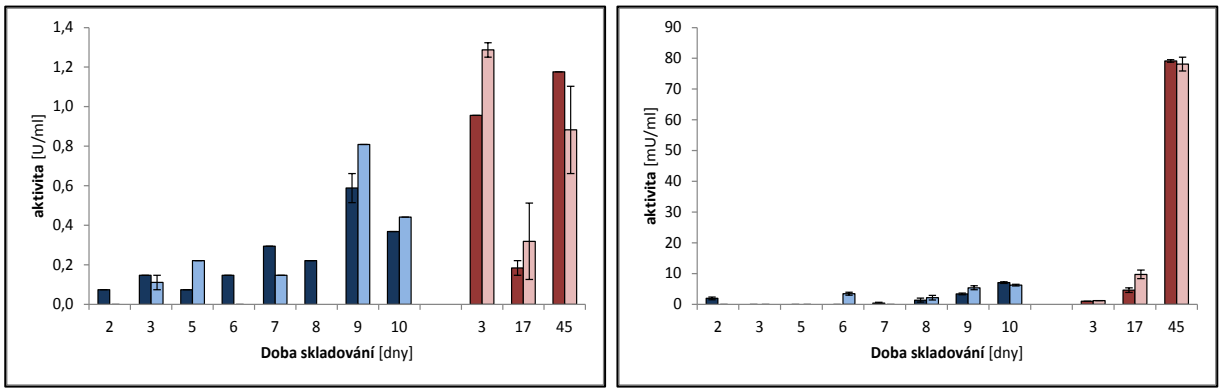
Metody
Exsudát byl zředěn v poměru 1:9 vodou, přefiltrován a použit pro stanovení aktivity obou enzymů. Aktivita citrátsyntázy a akonitázy se měřila podle postupů dodávaných ke komerčním sadám pro dané enzymy.

Citrátsyntáza se detekuje pomocí 5-thio-2-nitrobenzoové kyseliny [TNB], která vzniká reakcí DTNB s CoA-SH a její koncentrace se měří spektrofotometricky při 412 nm. Aktivita akonitázy se stanoví spektrometricky při 340 nm na základě koncentrace NADPH [OxisResearch™, 2014; SIGMA-ALDRICH®, 2014].

VÝSLEDKY A DISKUSE

Alizadeh et al. [2007] říkají, že specifické enzymy by se měly vyskytovat pouze v exsudátu z rozmraženého masa, avšak několik prací toto tvrzení nepotvrzuje [Hamm a Gottesmann, 1984; Guilaume et al., 2002; Šimoniová et al., 2013]. Proto bylo cílem této práce odlišit maso čerstvé od rozmraženého pomocí změny v hodnotě aktivity enzymů a výsledky statisticky zhodnotit.

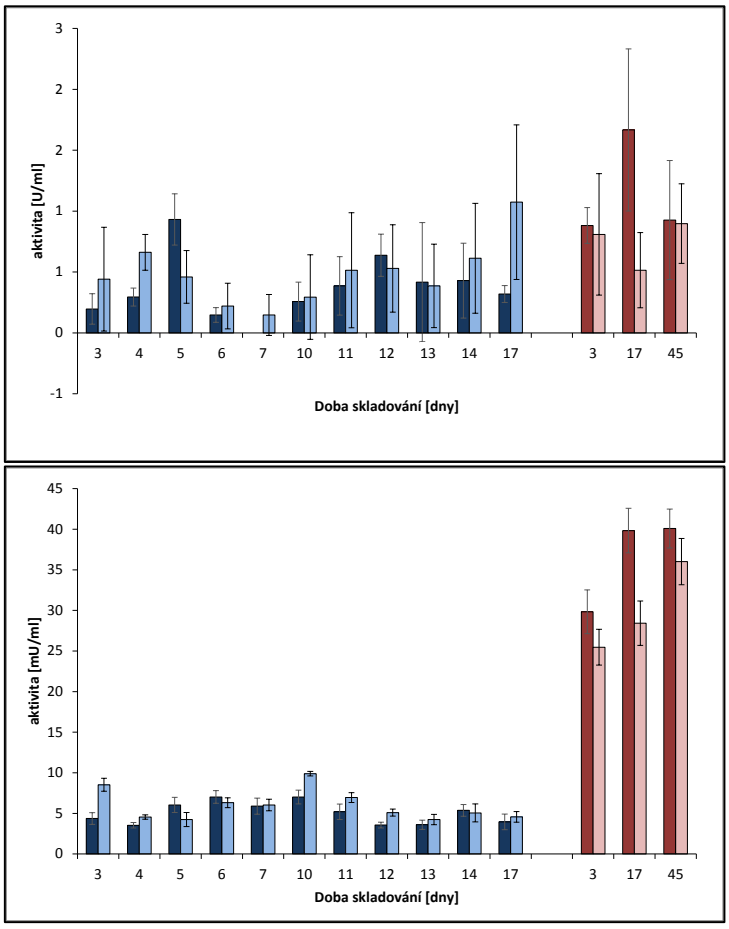
Na základě získaných dat pro kuřecí maso je patrné, že čerstvé maso je možné rozlišit od rozmraženého pomocí obou metod. Avšak při stanovení aktivity akonitázy je možné rozlišit vzorky na vyšší hladině významnosti [$\alpha = 0{,}01$], než při stanovení aktivity citrátsyntázy. Stejně tak shoda dvou na sobě nezávislých pokusů je vyšší v případě stanovení aktivity akonitázy [$r = 0{,}99$]. Výhodou akonitázové metody je i to, že v prvních dnech chladírenského skladování byla ve většině případů naměřena téměř nulová aktivita, zatímco některé hodnoty aktivity citrátsyntázy byly u chlazených vzorků vyšší než u zmražených.



Obr. 1: Závislost aktivity citrátsyntázy [vlevo] a akonitázy [vpravo] na době a způsobu skladování u kuřecího masa; modrá – chlazené, červená – rozmražené, tmavá – 1. série, světlá – 2. série

Pro vepřové maso se ještě více prohloubily rozdíly v použitelnosti obou metod. Korelace dvou na sobě nezávislých testů při stanovení aktivity citrátsyntázy byla pouze 20 %, přičemž u akonitázy se korelační koeficient pohyboval podobně jako v případě kuřecího masa, a to $r = 0{,}98$. Rozlišení chlazených vzorků vepřového masa od rozmražených v případě citrátsyntázy lze uskutečnit stejně jako v případě kuřecího na hladině významnosti $\alpha = 0{,}05$, ale chyba měření je značně vyšší. Hladina významnosti při stanovení akonitázy se zvýšila na 0,001, což znamená, že rozlišení je možné určit

s vysokou přesností. Aktivita akonitázy chlazených vzorků nebyla nulová, ale po celou dobu skladování se držela na velice nízké úrovni. Hodnoty pro aktivitu citrátsyntázy byly v případě chlazených vzorků značně rozkolísané.



Obr. 2: Závislost aktivity citrátsyntázy [nahoře] a akonitázy [dole] na době a způsobu skladování u vepřového masa; modrá – chlazené, červená – rozmražené, tmavá – 1. série, světlá – 2. série

ZÁVĚR

Ze získaných dat je patrné, že pro rozlišení chlazených a rozmražených vzorků je možné použít stanovení aktivity akonitázy. Opakovatelnost metody je vysoká a rozdíly mezi chlazenými a rozmraženými vzorky jsou významné v případě kuřecího masa a u vepřového dokonce vysoce významné [$p = 0{,}001$]. Citrátsyntáza neposkytuje jednoznačné závěry a mohla by poskytovat v některých případech falešně pozitivní nálezy.

Studie se uskutečnila za podpory Ministerstva zemědělství [NAZV] v rámci projektu QI111B053

Literatura:

- Aconitase Activity Assay Kit sufficient for 100 colorimetric tests. SIGMA ALDRICH®. http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/mak051?lang=en®ion=CZ, [accessed July 16, 2014].
- Alizadeh E., Chapleau N., de Lamballerie M., Le-Bail A. (2007): Effect of different freezing processes on the microstructure of Atlantic salmon [Salmo salar] fillets. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8, 493–499.
- BIOXYTECH® Aconitase-340 Catalog Number: 21041. OxisResearch™ Products. http://www.oxisresearch.com/product_details_new.html?ProductSelector=21041, [accessed July 16, 2014].

- Ballin N. Z., Lametsch R. (2008): Analytical methods for authentication of fresh vs. thawed meat – A review. *Meat Sci.*, 80, 151–158.
- Damez J., Clerjon S. (2008): Meat quality assessment using biophysical methods related to meat structure. *Meat Sci.*, 80, 132–149.
- Ellerbroek L. I., Lichtenberg G., Weise E. (1995): Differentiation Between Fresh and Thawed Meat by an Enzyme Profile Test. *Meat Sci.*, 40, 203–209.
- Fernandez M., Mano S., de Fernando G. D. G., Ordónez J. A., Hoz L. (1999): Use of beta-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase [HADH] activity to differentiate frozen from unfrozen fish and shellfish. *European Food Research and Technology*, 209 (3,4), 205–208.
- Guillaume D., Le Fur B., Mulak V., Becel P., Malle P. (2002): Comparison of methods of differentiating between fresh and frozen-thawed fish or fillets. *J. Sci. Food Agric.*, 82, 1341-1345.
- Hamm R., Gottesmann P. (1984): Release of mitochondrial enzymes by freezing and thawing of meat: structural and analytical aspects, *Proc. Euro. Meat Res. Work. Meeting* 3: 152-155.
- Leygonie C., Britz T. J., Hoffman L. C. (2012): Impact of freezing and thawing on the quality of meat. *Meat Sci.*, 91 (2), 93–98.
- Petrová M., Šimoniová A., Bělková B-A., Pipek P. (2010): Detekce zmrazování a rozmrazování masa pomocí citratsynthasy. Sborník příspěvků XXXVI. Semináře o jakosti potravin a potravinových surovin „Ingrovy dny“. Brno 3. 3. 2010. s. 171-175.
- Pipek P., Brychta J., Petrová M., Šimoniová A., Rohlík B-A. (2010): Jak rozlišit zmrazené/ rozmrazené maso od čerstvého. *Maso*, 4(10), 44-49.
- Šimoniová A., Rohlík B-A., Škorpilová T., Petrová M., Pipek P. (2013): Differentiation Between Fresh and Thawed Chicken Meats. *Czech J. Food Sci.* 31(2), 108-115.

R 27

HODNOCENÍ KVALITY STOLNÍCH HOŘČIC NA ČESKÉM TRHU

Prchalová J.[1], Rajchl A.[1]
[1)] Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav konzervace potravin, Technická 5, 166 28 Praha 6

Úvod

Stolní hořčicí se rozumí pochutina pikantní chuti a kašovité konzistence vyrobená z hořčičných semen. Při výrobě stolních hořčic se používají tři základní druhy hořčičných semen obsahující charakteristické glukosinoláty.[3] Semena hořčice žluté (*Sinapis alba*) obsahující glukosinolát sinalbin, který se působením enzymu myrosinázy (EC 3.2.1.147) rozkládá na 4-hydroxybenzyl isothiokyanát poskytující jemnou a nepříliš palčivou chuť. Semena hořčice černé (*Brassica nigra*) a sareptské (*Brassica juncea* L.) obsahují sinigrin, jehož štěpením vzniká těkavý allylisothiokyanát, chuť příslušných hořčic je palčivá a štiplavá.[1-3]

Ve světě existuje velké množství druhů stolních hořčic, které se mezi sebou liší chutí od jemné až po velice ostrou, ale také konzistencí, barvou a použitou technologií výroby. V České republice je nejoblíbenější stolní hořčice plnotučná, kde výchozí surovinou jsou semena hořčice žluté. Dalším oblíbeným druhem je kremžská hořčice, která se vyrábí ze směsi semen hořčice černé a žluté. Dále ve světě se vyrábí následující druhy stolních hořčic: Dijonská, Bordeaux, Meaux, Německá, Ruská a Anglická.[4-5]

Vzorky

Celkem bylo analyzováno 24 vzorků stolních hořčic (8 plnotučné, 8 kremžské, 8 dijonské) a 13 vzorků semen hořčice žluté. Analyzované vzorky byly zakoupeny v tržní síti.

Senzorická analýza stolních hořčic

Senzorické hodnocení 24 vzorků stolních hořčic probíhalo na Ústavu konzervace potravin Vysoké školy chemicko-technologické v Praze deseti proškolenými hodnotiteli. Při hédonickém hodnocení u vzorků plnotučných, kremžských a dijonských hořčic se hodnotily tyto parametry: barva, chuť a konzistence.

Byla využita deseti bodová stupnice: 0 - naprosto nevyhovující, 1 - mimořádně nevyhovující, 2 - velmi nevyhovující, 3 - dosti nevyhovující, 4 - nevyhovující, 5 - průměrný, 6 - přijatelný, 7 - dosti přijatelný, 8 - velmi přijatelný, 9 - mimořádně přijatelný, 10 - naprosto přijatelný.

Příprava vzorku

Příprava vzorků stolních hořčic a semen hořčice žluté - kvalitativní analýza

Bylo naváženo 5 g vzorků stolních hořčic a drcených semen hořčice žluté do 10 ml odměrné baňky a doplněno toulenem. Takto připravené vzorky byly použity pro kvalitativní analýzu metodou DART-MS-TOF.

Příprava vzorků semen hořčice žluté - stanovení sinalbinu - kvantitativní analýza

Semena hořčice žluté byla zahřívána v autoklávu po dobu 20 min při 121 °C kvůli inaktivaci enzymu myrosinázy. Semena hořčice byla rozdrcena na hořčičný šrot v mlýnku. Do kádinek bylo naváženo 10 g hořčičné mouky, ke kterým bylo přidáno 50 ml horkého fosfátového pufru (80 °C, 20 mM, pH = 7). Obsah v kádinkách byl zahříván a míchán 10 min ve vroucí vodní lázni. Obsah v kádinkách se po vyjmutí z vodní lázně ochladil a odstředil po dobu 10 min (2000 G, 20 °C). Do zkumavky bylo odpipetováno 5 ml supernatantu, ke kterému byla přidána směs 0,5 ml octanu olovnatého a octanu barnatého (1:1, 0,5 M pro každý). Následně byl obsah ve zkumavkách protřepán a odstředěn po dobu 10 min (6000 G, 20 °C). Po odstředění se 2 ml supernatantu 5 krát zředily a byly zfiltrovány přes PTFE mikrofiltr (0,45 μm). Takto připravené vzorky byly použity pro kvantitativní analýzu metodou DART-MS-TOF a HPLC/UV.

Cíle práce

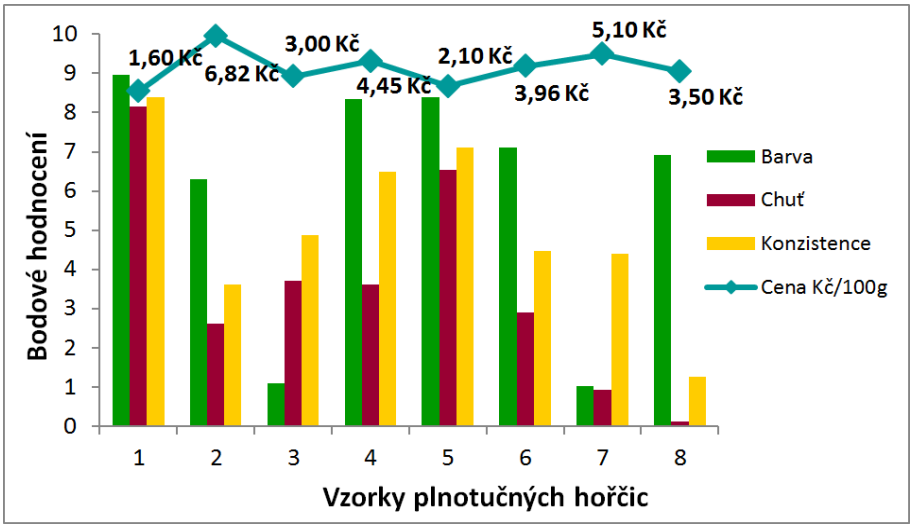
Cílem této studie bylo charakterizovat kvalitu stolních hořčic a semen hořčice žluté pomocí nové techniky DART-MS-TOF. Technika DART-MS-TOF byla použita pro rychlý screening

stolních hořčic a jejich charakterizací. Technika DART-MS-TOF byla dále použita pro kvantitativní stanovení glukosinolátu sinalbinu v semenech hořčice žluté.

Výsledky a diskuze

Senzorické hodnocení stolních hořčic

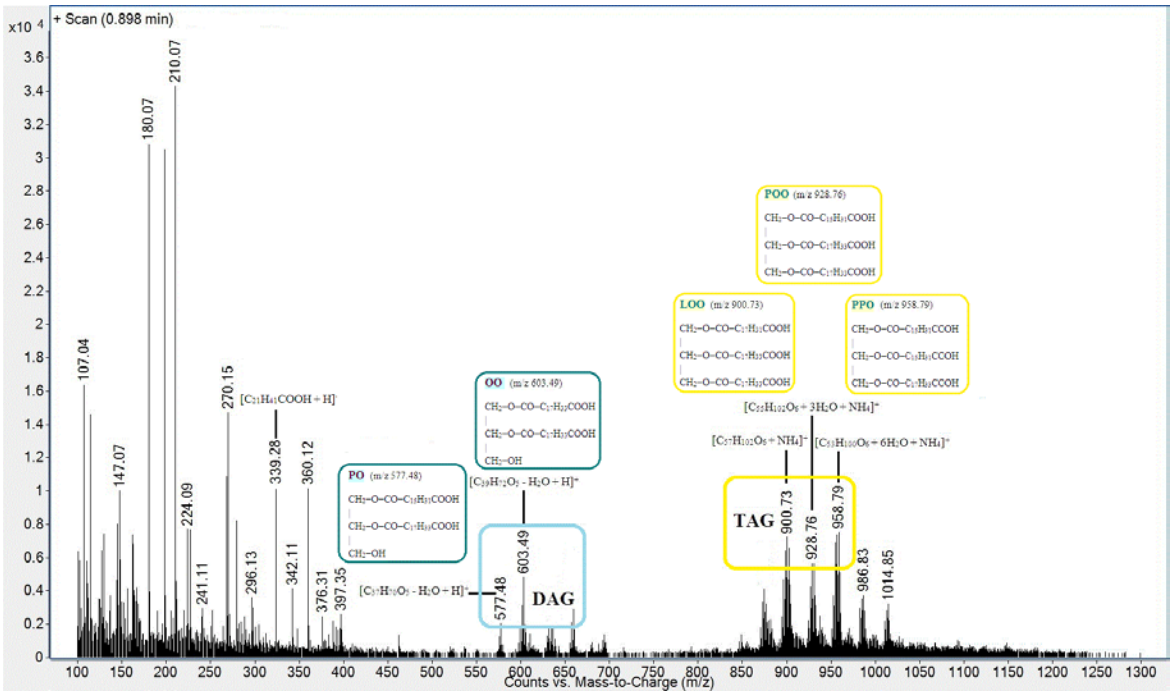
Z obrázku č. 1 je patrné, že hodnotitelé označili vzorek 1 jako nejlepší vzorek plnotučné hořčice na českém trhu, naproti tomu ohodnotili vzorek 8 jako nejhorší. Nejvíce typickou barvu plnotučné hořčice měly vzorky 1, 4 a 5. Nejméně typická barva byla shledána u vzorku plnotučné hořčice 7 a dále také u vzorku 3. Nejlépe byla hodnocena chuť u vzorku plnotučné hořčice 1 a 5. Průměrnou chuť měly vzorky 3 a 4. Nejhůře byla hodnocena chuť u vzorku 8 a dále také u vzorku 7. U vzorku 1 byla hodnocena konzistence velmi příznivě, oproti tomu byla nejhůře hodnocena u vzorku 8 (konzistence řídká, vodnatá). Ze zjištěných výsledků vyplývá, že nejvíce hodnotitelé preferovali vzorek 1, což byla paradoxně nejlevnější plnotučná hořčice.



Obr. č. 1 - Grafické znázornění senzorické analýzy plnotučné hořčice, uvedena cena na 100 g výrobku

Analýza stolních hořčic pro metodu DART-MS-TOF

Ambientní technika DART-MS-TOF byla použita pro rychlý screening analyzovaných stolních hořčic a byly optimalizovány podmínky pro jejich analýzu, jako jsou měřící mód, optimální ionizační teplota a vhodné extrakční činidlo.

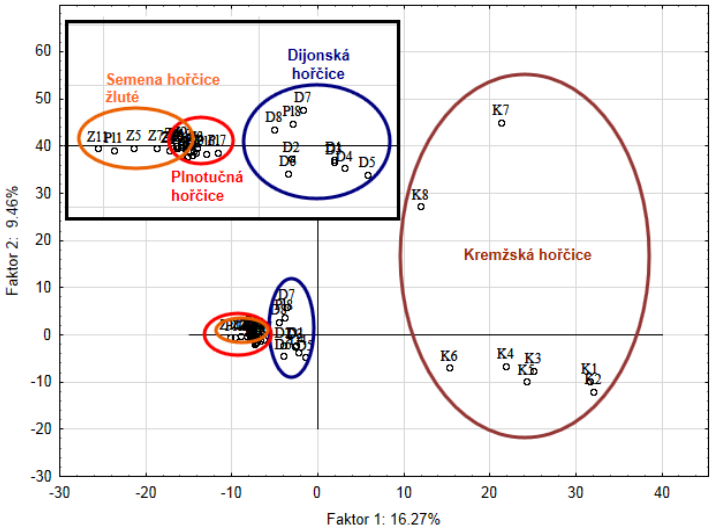


Obr. č. 2 - Positivní MS spektrum stolní hořčice, toluen, 450 °C

V MS spektru stolních hořčic byly přítomny ionty s hodnotou m/z odpovídajícím tri-/di-acylglycerolům (viz obr. č. 2). Z triacylglycerolů (TAG) byly nejvíce zasoupeny především LOO (TAG s mastnými kyselinami linolové - olejové - olejové) o m/z 900,73, POO (TAG s mastnými kyselinami palmitové - olejové - olejové) o m/z 928,76 a PPO (TAG s mastnými kyselinami palmitové - palmitové - olejové o m/z 958,79. Ve spektru byly pozorovány také ionty DAG (diacylglyceroly) a to OO (DAG s mastnými kyselinami olejové - olejové) o m/z 603,49 a PO (DAG s mastnými kyselinami palmitové - olejové) o m/z 577,48.

PCA analýza stolních hořčic pro metodu DART-MS-TOF

Hmotnostních spektra stolních hořčic a semen hořčice žluté byla statisticky zpracována analýzou hlavních komponent, kdy došlo k rozdělení jednotlivých druhů hořčic do skupin/klastrů (viz obr. č. 3).



Z obrázku č. 3 je patrné, že plnotučná, dijonská a kremžská hořčice vytvořila v PCA samostatnou skupinu. Což je v souladu s tím, že stolní hořčice plnotučné a dijonské jsou si podobné svým charakterem. Klastr semen hořčice žluté se nachází poblíž klastrů stolních hořčic plnotučné a dijonské. Od klastrů stolních hořčic plnotučné a dijonské se zcela oddělily hořčice kremžské, protože se při jejich výrobě používají zejména semena hořčice černé.

Obr. č. 3 - Analýza hlavních komponent vzorků stolních hořčic a semen hořčice žluté

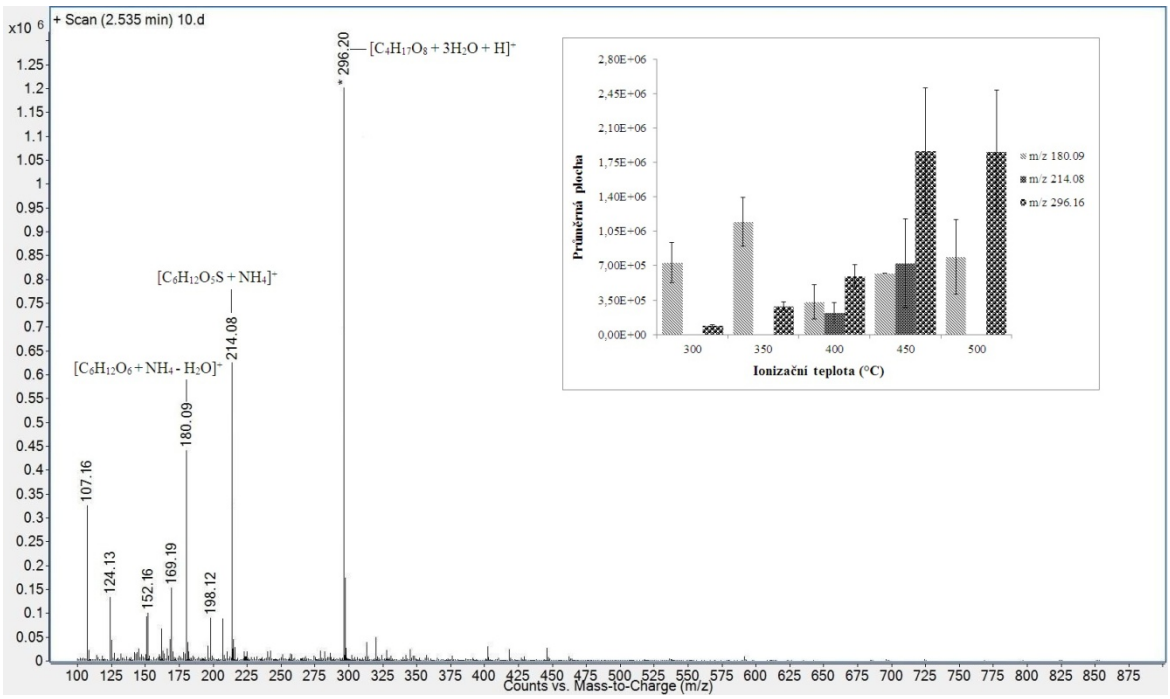
Stanovení glukosinolátu sinalbinu pro metodu DART-MS-TOF

Technika DART-MS byla použita pro kvantitativní stanovení glukosinolátů sinalbinu ve vzorcích semen hořčice žluté. Optimalizován byl měřící mód, ionizační teplota a též i metoda extrakce sinalbinu z hořčičných semen. Optimálním měřícím módem byl positivní mód, který poskytoval spektrum obsahující charakteristické ionty příslušející sinalbinu (viz obr. č. 4).

Byla sledována intenzita signálu charakteristických iontů standardu sinalbinu v rozmezí ionizačních teplot od 300 do 500 °C (viz obr. č. 4). Standard sinalbinu (viz obr. 4) poskytoval tyto charakteristické ionty s hodnotou m/z 180,09 $[C_6H_{12}O_6+NH_4-H_2O]^+$, 214,08 $[C_6H_{12}O_5S+NH_4]^+$, 296,20 $[C_4H_{17}O_8+3H_2O+H]^+$.

Pro kvantitativní stanovení sinalbinu bylo proměřeno 13 vzorků semen hořčice žluté. Obsah sinalbinu v semenech hořčice žluté byl kvantifikován metodou DART-MS-TOF a naměřené hodnoty byly porovnány metodou HPLC/UV.

Obsah sinalbinu v analyzovaných vzorcích byl přítomen v množství od 14,1 do 33,9 g/kg. Výsledky stanovení z DART-MS-TOF a HPLC/UV metod korelují (R^2 = 0,972) a odpovídají hodnotám, které jsou uváděné v literatuře.[6] Semi-kvantitativní stanovení technikou DART-MS-TOF bylo zatíženo vysokou nejistotu, kterou by bylo možno podstatně snížit s použitím izotopově značeného vnitřního standardu.



Obr. č. 4 - MS spektrum standardu sinalbinu o koncentraci 1 g/l, demineralizovaná voda, 450 °C

Závěr

Z výsledků vyplývá, že technika DART-MS-TOF je účinným nástrojem pro charakterizaci, hodnocení kvality a stanovení autenticity stolních hořčice a semen hořčice žluté. Technika DART-MS-TOF je vhodná pro semi-kvantitativní stanovení sinalbinu v semenech hořčice žluté.

Poděkování

Tento projekt byl financován z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č.20/2014): A1_FPBT_2014_006.

Seznam použité literatury

1. M. Abul-Fadl, N. El-Badry, M.S. Ammar. Nutritional and Chemical Evaluation for Two Different Varieties of Mustard Seeds. *World App. Sci. J.* **2011**, *15*, 1225.
2. D. Paunović, T.Š. Knudsen, M. Krivokapić, B. Zlatković, M. Antić. Sinalbin degradation products in mild yellow mustard paste. *Hem. Ind.* **2012**, *66*, 29.
3. S. Sindhu, T.N. Indira. A Method for preparation of mustard (*Brassica juncea*) powder with retained pungency and reduced bitterness. *Food Sci. Technol.* **2012**, *49*, 42.
4. F. Kvasnička, K. Míková. Isotachophoretic Determination of Sulphite in Mustard. *J. Food Compos. Anal.* **2002**, *15*, 585.
5. Warseck, M. Food products containing non-pungent dijon mustard flavoring and a process for making mustard paste. Patent Number: 5023105 **1991**.
6. J. Jen, T. Lin, J. Huang, W. Chung. Direct determination of sinigrin in mustard seed without desulfatation by reversed-phase ion-pair liquid chromatography. *J. Chromatogr., A* **2001**, *912*, 363.

R 28

AUTENTIKACE RAKYTNÍKOVÉHO OLEJE

Hůrková K.[1], Rubert J.[1], Hajšlová J.[1]
1) Ústav analýzy potravin a výživy, Technická 5, 160 23, Praha-Dejvice

Úvod:

V posledních letech se stále zvyšuje zájem o doplňky stravy a jiné výrobky z rakytníku řešetlákového (Hippophae rhamnoides). Tento keř se vyskytuje především ve východní Evropě a Asii a jeho žluté až oranžové plody jsou bohatým zdrojem mnohých biologicky aktivních látek, jako jsou karotenoidy, tokoferoly, vitaminy, polyfenoly, flavonoidy, terpeny, organické kyseliny a další. Podle mnohých studií rakytníkový olej pomáhá snižovat hladinu cholesterolu v krvi, vykazuje antioxidační a imunostimulační účinky a především je využíván při léčbě kožních nemocí. S ohledem na vysokou cenu a stále se zvyšující oblibu je rakytníkový olej často předmětem falšování, a to zejména přídavkem nebo úplnou náhradou slunečnicovým olejem [1, 2, 3].

Rakytníkový olej se od slunečnicového liší kromě přítomnosti výše zmíněných biologicky aktivních látek také složením mastných kyselin. V rakytníkovém oleji převládá palmitolejová kyselina (C16:1), netypická pro rostlinné oleje, které může být přítomno až 43 %, zatímco ve slunečnicovém oleji jsou majoritními mastnými kyselinami olejová (C18:1) a palmitová (C18:2), jejichž podíl může dosahovat až 40 resp. 74 % [3, 4].

Hlavním úkolem této případové studie bylo identifikovat vhodné markery, podle kterých je možné rozlišit rakytníkový olej od oleje slunečnicového a pomocí těchto markerů určit druh oleje v doplňku stravy. Polární i nepolární extrakty olejů byly porovnávány na základě jejich profilů / fingerprintů získaných technikou hmotnostní spektrometrie v otevřeném prostoru s iontovým zdrojem DART (Direct Analysis in Real Time) v kombinaci s vysokorozlišovacím hmotnostním detektorem. Pro stanovení karotenů v olejích byla využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s UV detektorem (HPLC–UV) [5].

Chemikálie:

- methanol, HPLC gradient, *Sigma-Aldrich (USA)*
- acetonitril, HPLC gradient, *Sigma-Aldrich (USA)*
- aceton, HPLC gradient, *Sigma-Aldrich (USA)*
- toluen, HPLC gradient, *Sigma-Aldrich (USA)*
- ethanol, HPLC gradient, *Sigma-Aldrich (USA)*
- mravenčan amonný, p.a., *Sigma-Aldrich (USA)*
- kyselina mravenčí, p.a., *Sigma-Aldrich (USA)*

Vzorky:

V této případové studii byl analyzován referenční rakytníkový olej, referenční slunečnicový olej a vzorek jednoho doplňku stravy ve formě oranžových tobolek, který byl podezřelý svou nízkou cenou.

Příprava vzorku:

I. Metabolomické profilování

a) Polární extrakt: 0,5 mL oleje bylo odebráno do 15 mL PTFE centrifugační kyvety a třepáno s 1,5 mL extrakční směsi methanol:voda (20:80, *v/v*) po dobu 1 minuty. Následně byla směs odstředěna při 10 000 rpm po dobu 5 minut. Odstředěný extrakt byl analyzován pomocí přímé analýzy v reálném čase ve spojení s vysokorozlišovací tandemovou hmotnostní spektrometrií (DART-HRMS/MS).

b) Nepolární extrakt: 200 µL oleje bylo odebráno do 15 mL PTFE centrifugační kyvety a třepáno s 10 mL toluenu po dobu 1 minuty. Následně byl takto připravený extrakt analyzován pomocí DART-HRMS/MS.

II. Analýza karotenů

100 mg oleje bylo extrahováno 5 mL směsi aceton:ethanol (40:60, *v/v*) a třepáno po dobu 1 minuty. Dále byla směs odstředěna při 10 000 rpm po dobu 5 min a přefiltrována. Následně byl takto připravený extrakt analyzován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s UV detektorem.

Metody:

I. Metabolomické profilování

K metabolickému profilování olejů byla využita metoda přímé analýzy v reálném čase ve spojení s vysokorozlišovací tandemovou hmotnostní spektrometrií s detektorem typu kvadrupól-analyzátor doby letu. Podmínky měření jsou uvedeny v **Tabulce I**.

Tab. I. Podmínky DART-HRMS/MS

extrakt	**polární**	**nepolární**
Ionizační mód	pozitivní	
hmotnostní rozsah m/z	50 - 1000	
ionizační plyn	helium	
doba desorpce	10 s	
teplota desorpce	250°C	400°C
dopant	NH_3	

II. Analýza karotenů

Pro analýzu karotenů byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detektorem. Podmínky měření jsou uvedeny v **Tabulce II**.

Tab. II. Charakteristiky HPLC-UV

kolona	Poroshell 120, 100 mm x 2,1 mm, 2,7 µm (Agilent Technologies)
teplota kolony	40°C
průtok	0,5 ml/min
objem nástřiku	2 µl
mobilní fáze	A: voda B: acetonitril

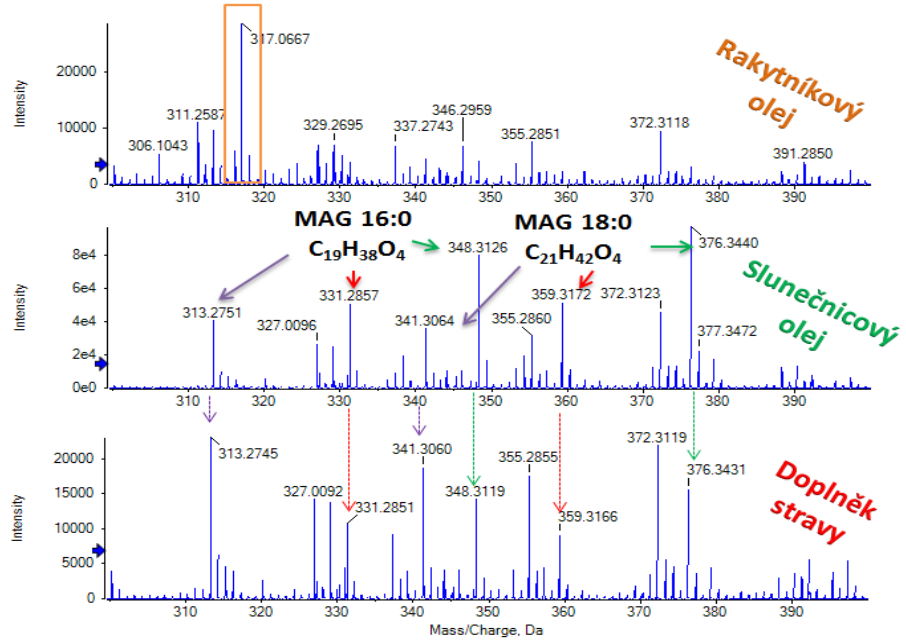
Výsledky a diskuze:

I. Metabolomické profilování

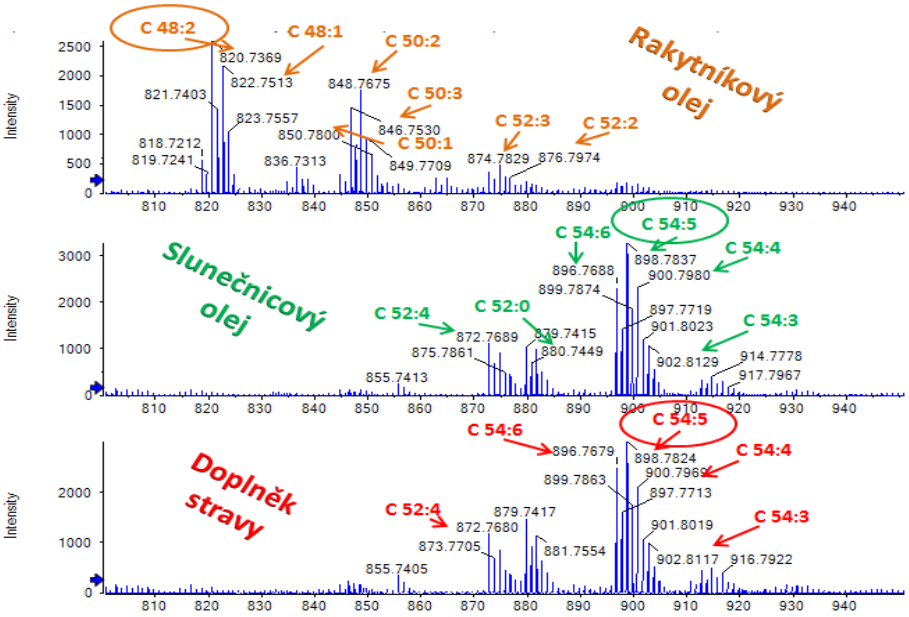
a) Při analýze polárního extraktu byl ve spektru rakytníkového oleje nejintenzivnější iont s m/z 317,0667 (na **Obr. 1** vyznačen oranžovým obdélníkem) identifikován jako isorhamnetin, charakteristický flavonoid rakytníku. Tato látka nebyla přítomna ani ve slunečnicovém oleji, ani v doplňku stravy, jak je patrné z **Obrázku 1.** Profil polárního extraktu doplňku stravy se shodoval s profilem slunečnicového oleje, kde nejintenzivnější ionty patřily monoacylglycerolu palmitové a stearové kyseliny a jejich aduktům.

Analýza nepolárního extraktu umožnila porovnání profilů triacylglycerolů (TAG) jednotlivých olejů a doplňku stravy. Z **Obrázku 2** vyplývá, že rakytníkový olej obsahoval TAG s mastnými kyselinami s kratšími řetězci, než slunečnicový olej. Nejintenzivnější iont ve spektru rakytníkového

oleje odpovídal TAG s navázanou jednou molekulou palmitové a dvěma molekulami palmitolejové kyseliny, což odpovídá údajům z literatury označujícím palmitolejovou kyselinu za majoritní mastnou kyselinu přítomnou v rakytníkovém oleji [3, 4]. Na druhou stranu ve slunečnicovém oleji byl nejintenzivnější iont identifikován jako TAG s jednou molekulou olejové a dvěma molekulami linolové kyseliny. Spektrum doplňku stravy se shodovalo se spektrem slunečnicového oleje a to nejen v nejintenzivnějším iontu, ale v celém profilu TAG, nejintenzivnější ionty TAG přítomné v rakytníkovém oleji se v doplňku stravy nenacházely vůbec. Z těchto výsledků můžeme usuzovat, že olej přítomný v doplňku stravy nebyl rakytníkový, ale slunečnicový.



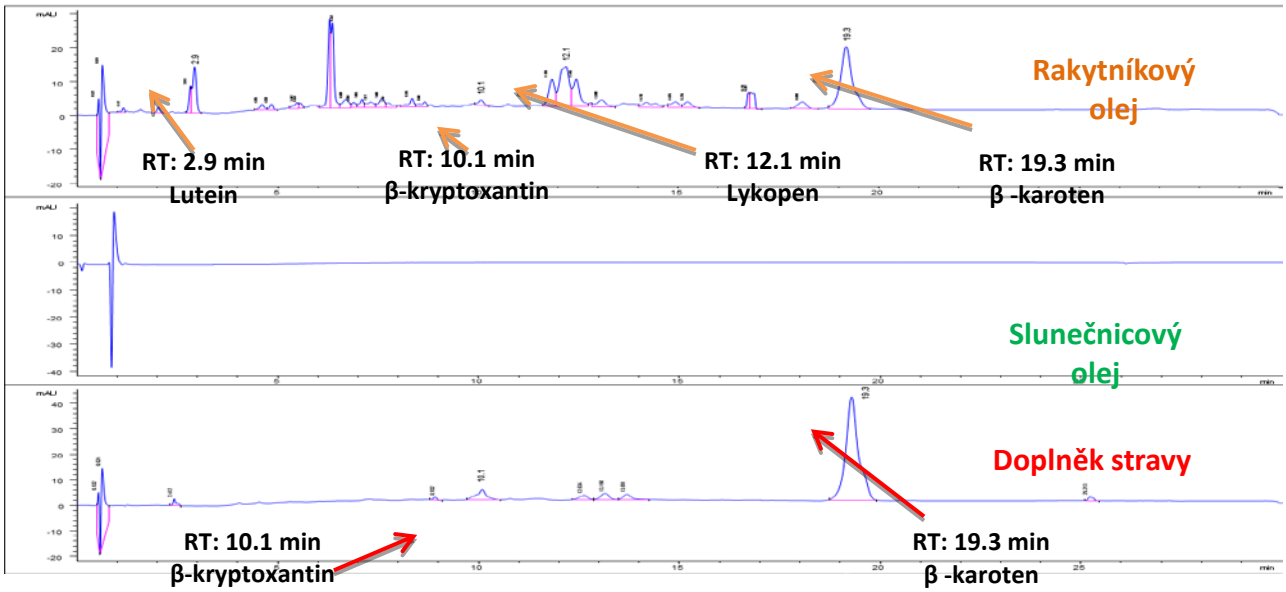
Obrázek 1: Hmotnostní spektrum polárního extraktu rakytníkového oleje, slunečnicového oleje a doplňku stravy, přiblížená oblast m/z 300-400, C x:y (x = počet uhlíků mastných kyselin navázaných v TAG, y = počet dvojných vazeb v mastných kyselinách)



Obrázek 2: Hmotnostní spektrum nepolárního extraktu rakytníkového oleje, slunečnicového oleje a doplňku stravy, přiblížená oblast m/z 800-950, C x:y (x = počet uhlíků mastných kyselin navázaných v TAG, y = počet dvojných vazeb v mastných kyselinách)

II. Analýza karotenů

Dále byla provedena analýza karotenů, pro určení původu oranžové barvy doplňku stravy a pro porovnání profilu karotenů přítomných v rakytníkovém oleji a v doplňku stravy. Zatímco v rakytníkovém oleji bylo detekováno široké spektrum karotenů, z nichž byl identifikován např. lutein, β-kryptoxantin, lykopen nebo β-karoten, v doplňku stravy se nacházel především β-karoten. Ve slunečnicovém oleji nebyly detekovány žádné karoteny.



Obrázek 3: Chromatografické záznamy analýzy karotenů rakytníkového oleje, slunečnicového oleje a doplňku stravy

Závěr:

Na základě porovnání profilu polárních a nepolárních látek rakytníkového a slunečnicového oleje s olejem z doplňku stravy bylo zjištěno, že olej v doplňku stravy, deklarovaný jako 100% rakytníkový je ve skutečnosti olej slunečnicový a že tudíž došlo k falšování. Díky analýze karotenů bylo možné určit, že oranžová barva doplňku je způsobena směsí přírodních barviv s převažujícím zastoupením β-karotenu.

Literatura:

1) Bal, L.M., et al., Sea buckthorn berries: A potential source of valuable nutrients for nutraceuticals and cosmoceuticals. *Food Research International*, 2011. **44**(7): p. 1718-1727.
2) Suryakumar, G. and A. Gupta, Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 2011. **138**(2): p. 268-78.
3) Ranjith, A., et al., Fatty acids, tocols, and carotenoids in pulp oil of three sea buckthorn species (Hippophae rhamnoides, H. salicifolia, and H. tibetana) grown in the Indian Himalayas. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **2006**. 83(4): p. 359-364.
4) Dulf, F.V., Fatty acids in berry lipids of six sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L., subspecies carpatica) cultivars grown in Romania. *Chemistry Central Journal*, 2012. **6**(1): p. 106.
5) Václavík, L.; Čajka, T.; Hrbek, V.; Hajšlová, J. Ambient mass spectrometry employing direct analysis in real time (DART) ion source for olive oil quality and authenticity assessment. *Analytica Chimica Acta* **2009**, *645*, 56–63.

R 29

AUTENTIFIKACE BYLIN A KOŘENÍ POMOCÍ HS-SPME GC (HR) TOF MS

Hradecký J., Humlová E., Pulkrabová J. a Hajšlová J.
Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha, e-mail: jaromir.hradecky@vscht.cz

Úvod a cíle studie

Byliny a koření jakožto hojně využívané komodity v potravinářství se mohou stát terčem falšování a to hned několika způsoby. Časté je mylné označení biologického druhu, nebo náhrada za jinou surovinu, čímž nedochází jen k šizení zákazníka, jelikož biologicky účinné látky nemusí být v náhražce zastoupeny ve stejném množství jako v deklarované surovině, ale dokonce i k případnému ohrožení zdraví v případě alergie na náhražkovou složku. Dalším případem je potom nesprávně uvedená informace o geografickém původu surovin, při kterém dochází k náhradě části nebo celého obsahu dražší suroviny levnější surovinou jiného geografického původu.

Pro testování autenticity bylin a koření se s výhodou dá použít metabolomického přístupu, při kterém namísto analýzy cílené na jeden nebo jen malou skupinu indikátorů kvality suroviny je důraz kladen na analýzu širokého spektra malých molekul (potenciálních markerů). Relativní zastoupení vybraných markerů může poskytnout informaci o biologickém a geografickém původu, případně o dalších kvalitativních znacích suroviny, za předpokladu dostupnosti dobře charakterizovaných vzorků, jako základu pro příslušnou databázi.

Cílem studie bylo ověřit možnost využití mikroextrakce na tuhou fázi ve spojení s plynovou chromatografií a hmotnostně spektrometrickou detekcí s analyzátorem doby letu a následného statistického zpracování pro autentifikaci heřmánku.

Vzorky

V rámci prezentované studie byl analyzován soubor 40 vzorků heřmánku lékařského (*Matricaria recutita*) zakoupeného ve formě sušeného a mletého květu a také ve formě sáčků pro přípravu čaje. Vzorky celých květů byly analyzovány, tak jak byly zakoupeny a také po homogenizaci. Vedle vzorků heřmánku lékařského byly analyzovány také dva vzorky heřmánku římského (*Anthemis nobilis*).

Popis experimentu

Profil těkavých látek byl získán pomocí mikroextrakce na tuhou fázi (SPME) a plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickým detektorem (GC-MS) vybaveným **A**) vysokorozlišovacím analyzátorem doby letu (HRTOF) nebo **B**) vysokorychlostním TOF.

Příprava vzorku

200 mg vzorku bylo naváženo do 10 ml vialky pro HS analýzy a těkavé látky byly po inkubaci při 50 °C (10 min) extrahovány na SPME vlákno s fází DVB/CX/PDMS po dobu 5 minut. Desorpce sloučenin probíhala po dobu 1 minuty při 270 °C.

Systém A: HS-SPME-GC/HR-TOFMS

- Autosampler umožnující mikroextrakci tuhou fází Combi Pal (CTC Analytical, USA)
- Plynový chromatograf Agilent 7890A (Agilent Technologies, USA) vybavený křemennou kapilární kolonou pro plynovou chromatografii HP-Innowax: 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent Technologies, USA)
- Hmotnostně spektrometrický detektor s vysokorozlišovacím analyzátorem doby letu HR-TOF HT (Leco Coporation, USA)

Parametry plynové chromatografie

Teplotní program:	40 °C (1 min), 8 °C/min do 270 °C
Nosný plyn:	He (1 mL/min)

Parametry hmotnostní spektrometrie

Ionizace:	EI (-70eV)
Mód analyzátoru:	High Resolution (25000 FWHM)
Hmotnostní rozsah:	28-500 m/z
Doba analýzy:	28,5 min
Akviziční rychlost:	4 spektra/s
Extrakční energie:	2 kHz
Teplota iontového zdroje	250 °C

Systém B: HS-SPME- GCxGC/TOFMS

- Autosampler umožnující mikroextrakci tuhou fází Combi Pal (CTC Analytical, USA)
- Plynový chromatograf Agilent 7890A (Agilent Technologies, USA) vybavený křemennými kapilárními kolonami:
- 1D: HP-5MS: 15 m x 0,25 mm x 0,25 μm (Agilent Technologies, USA)
- 2D: BPX50: 1.75 m x 0.1 mm x 0.1 μm (SGE, Australia)
- Hmotnostně spektrometrický detektor s rychlým sběrem dat a s analyzátorem doby letu TOF Pegasus 4D (Leco Coporation, USA).

Parametry plynové chromatografie

Teplotní program 1D pece:	40 °C (1 min), 15 °C/min do 320 °C
Nosný plyn:	He (1 mL/min)
Modulační perioda:	3 s
Teplotní program 2D pece:	50 °C (1 min), 15 °C/min do 320 °C

Parametry hmotnostní spektrometrie

Ionizace:	EI (-70V)
Mód analyzátoru:	Unit resolution
Hmotnostní rozsah:	28-500 m/z
Doba analýzy:	15 min
Akviziční rychlost:	100 spekter/s
Teplota iontového zdroje:	250 °C

Zpracování dat

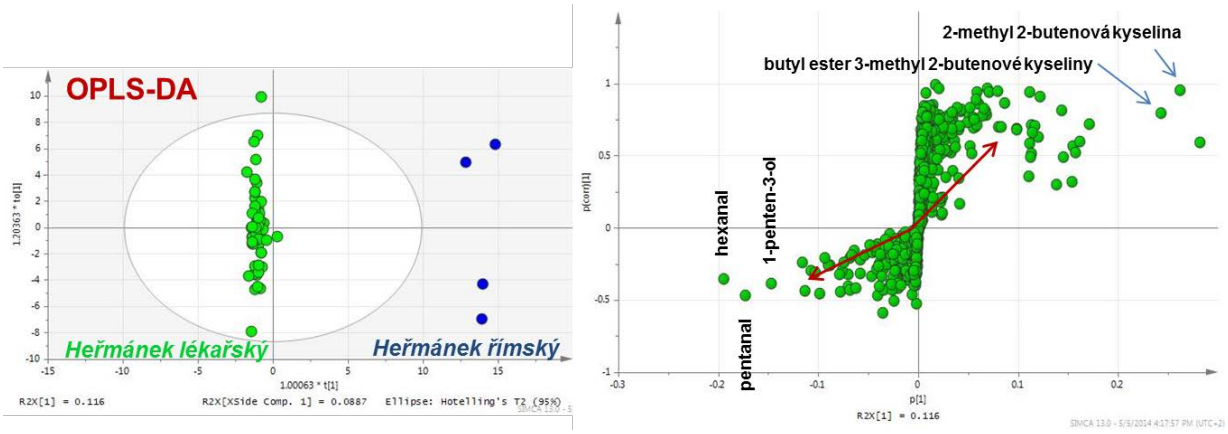
Plochy sloučenin, jejichž poměr signálu k šumu byl větší než 100, byly ze všech vzorků seřazeny podle retenčního času a normalizovány v MS Excel. Následně byla tato matice zpracována pomocí software SIMCA (Ulmetrics), kde se využily zejména PCA (Principal Component Analysis) a OPLS-DA (Orthogonal Partial Least-Squares Discriminant Analysis) modely.

Výsledky a diskuse

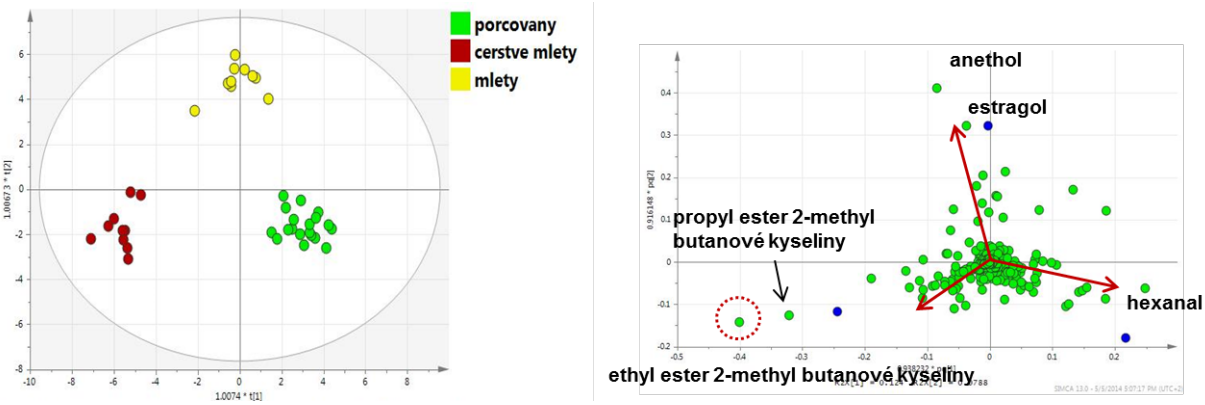
Zpracováním naměřených dat bylo zjištěno, že lze bezpečně oddělit vzorky heřmánku římského od heřmánku lékařského. Toto rozdělení bylo patrné již v PCA modelu, avšak pro lepší vizualizaci vlivu relativního zastoupení jednotlivých těkavých látek - markerů, byl vytvořen OPLS-DA model, respektive k němu příslušný tzv. S-plot (**obr. 1**). Největší vliv na oddělení vzorků heřmánku římského od vzorků heřmánku lékařského měly sloučeniny typické pro prvně jmenovaný rostlinný druh (2-methyl 2-butenová kyselina a butyl ester 3-methyl 2-butenové kyseliny).

Po vyloučení vzorků heřmánku římského z dat pro statistické zpracování byla pozorována separace do skupin podle toho, zda se jednalo o heřmánek porcovaný do nálevových sáčků, průmyslově mletý nebo mletý čerstvě před analýzou. Skupina vzorků reprezentovaných celými květy zasahovala do všech kvadrantů grafu, což bylo způsobeno zřejmě špatnou opakovatelností

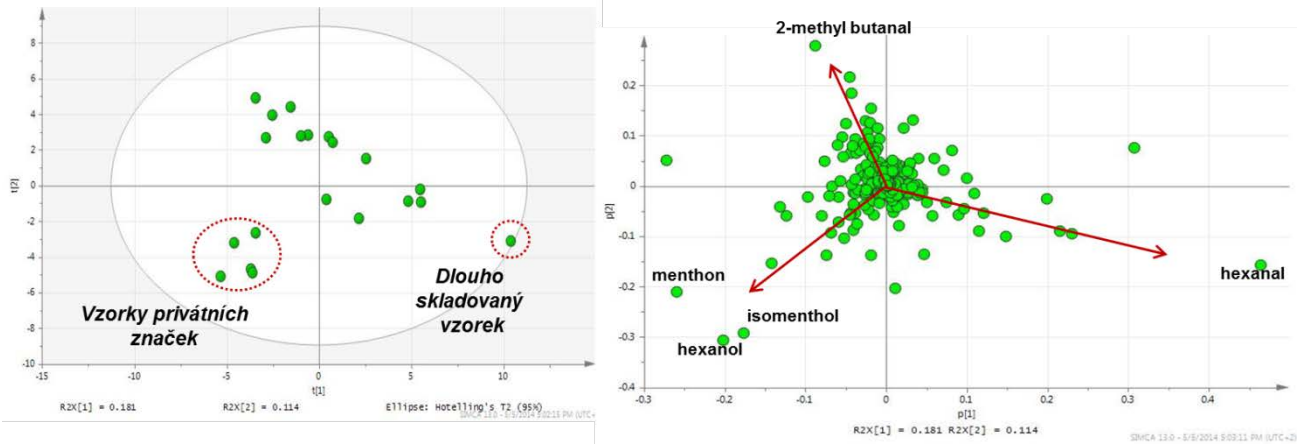
vzorkování. Podle hmotnosti květů v jednotlivých vzorcích bylo totiž pro navážku 200 mg (s přihlédnutím k nutnému prostoru pro SPME vlákno) do vialky umístěno pouze 5 až 12 sušených květů. Vzorky připravené v laboratoři homogenizací celých květů se statistickým zpracováním oddělily od vzorků porcovaných heřmánkových čajů (jak mletých tak i celých květů v nálevových sáčcích) což ukazuje **obr. 2**. Nejvýznamnějším markerem nedávné homogenizace květů heřmánku byl ethyl ester 2 – methyl butanové kyseliny. Jeho relativní zastoupení v průběhu skladování klesalo a po 30 dnech od homogenizace byla zhruba na úrovni zjištěné ve vzorku celých květů.



Obr. 1: rozdělení heřmánku lékařského a římského prostřednictvím modelu OPLS-DA a graf (S plot) znázorňující vliv jednotlivých sloučenin na toto rozdělení



Obr. 2: rozdělení heřmánku lékařského podle způsobu mletí pomocí modelu OPLS-DA a graf znázorňující význam jednotlivých sloučenin



Obr.3: rozdělení vzorků heřmánku lékařského pomocí PCA a graf sloučenin zodpovědných za toto rozdělení

Ve skupině heřmánkových čajů porcovaných do nálevových sáčků byla prostřednictvím PCA pozorována separace vzorků tzv. privátních značek velkých obchodních řetězců (**obr. 3**). Toto shlukování bylo způsobeno relativním zastoupením menthonu, isomentohu a hexanolu. Současně se ze skupiny vydělil i vzorek dlouho skladovaného heřmánku – markerem této separace byl hexanal, jehož zvýšená přítomnost může být způsobena oxidací přítomných lipidů.

Markery zodpovědné za shlukování byly identifikovány jednak na základě podobnosti změřeného spektra se spektry uloženými v knihovně NIST 2.0 a jednak na základě měření přesné hmoty, při kterém byla pro konfirmaci využita vedle samotné přesnosti hmoty informace o isotopickém vzoru molekulového iontu.

Prezentovaná vědecká práce byla realizována s podporou “Operational Program Prague – Competitiveness“ (CZ.2.16/3.1.00/22197) a “National Program of Sustainability“ (NPU I (LO) MSMT - 34870/2013)

R 30

PROFIL TĚKAVÝCH LÁTEK JAKO NÁSTROJ HODNOCENÍ KVALITY A AUTENTICITY MEDU

Kružík V.[1], Grégrová A.[1], Rajchl A.[1], Čížková H.[1]
1) Ústav konzervace potravin, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika

ÚVOD

Podle záznamů SZPI je med čtvrtou nejčastěji falšovanou potravinou v ČR a nejběžnější klamání spotřebitele v tomto případě spočívá v nepovoleném přídavku sladidel a ve vysokém obsahu 5-hydroxymethylfurfuralu (5-HMF). Komplexní kontrola medu představuje zhodnocení širokého spektra kvalitativních znaků (obsah a složení cukrů, obsah vody a 5-HMF, dále elektrická vodivost, aktivita přítomných enzymů či stanovení izotopových poměrů uhlíku), což je časově i finančně náročné.

Cílem studie bylo potvrzení předpokladu, že naředění, nadměrný záhřev nebo přídavek nepovolených složek se projeví na smyslových vlastnostech, respektive na profilu a obsahu těkavých látek (stanoveného metodou SPME-GC/MS). Byl proměřen soubor vzorků zahrnující jak vzorky medů zakoupené v české tržní síti, tak získané přímo od českých včelařů. Výsledky byly statisticky zpracovány a u podezřelých vzorků byly následně stanoveny vybrané kvalitativní parametry, tj. obsah 5-HMF, aktivita diastasy, obsah ethanolu a triacetinu.

MATERIÁL A METODY

V rámci této studie bylo celkem proměřeno 76 medů. Soubor vzorků obsahoval komerční medy (63 vzorků) neznámé kvality různého původu (původ z ČR: 17 medů; původ z EU a mimo EU: 46 medů). Dalších 13 vzorků bylo získáno přímo od českých včelařů. Botanický původ vzorků medů byl následující: smíšené medy (19 vzorků), květové medy (42 vzorků) a medovicové medy (15 vzorků).

Pro stanovení profilu těkavých látek byla využita metoda SPME-GC/MS. Extrakce těkavých sloučenin byla provedena pomocí vlákna typu DVB/CAR/PDMS. Příprava vzorku spočívala v navážení 1 g medu do 10ml vialky a přidání 1 ml roztoku NaCl (200g NaCl/100ml destilované vody).

Všechny vzorky byly senzoricky ohodnoceny (10 hodnotitelů) podle metodiky Piana *et at.* 2004. Hodnotitelé posuzovali intenzitu medového aroma a vůni po přídavku syntetického medového aroma. Vybrané kvalitativní parametry medů byly stanoveny pomocí níže uvedených metod: stanovení 5-HMF (HPLC/UV); diastasy (Phadebas Honey Diastase Test); obsahu ethanolu a triacetinu (SPME-GC/FID).

Profily těkavých látek vzorků medů byly zpracovány vícerozměrnými statistickými metodami. Konkrétně byla využita lineární diskriminační analýza (LDA) a faktorová analýza (FA).

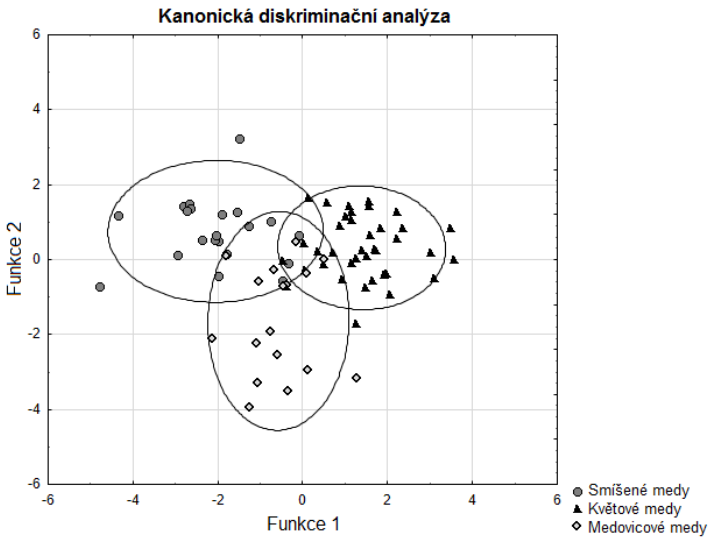
VÝSLEDKY A DISKUSE

Ve vzorcích medů bylo identifikováno více než 30 dominantních sloučenin. Zastoupení jednotlivých těkavých látek bylo velmi variabilní. V autentických vzorcích se vyskytovaly ve vysokém množství následující sloučeniny (Tab. I): benzaldehyd; 2-fenylethanol; (5E)-3, 7-dimethylocta-1, 5, 7-trien-3-ol a 2-fenylacetaldehyd. Jednotlivé vzorky medů se hlavně lišily v obsahu 2-furaldehydu; 1, 4-dimethyl-pyrazolu; benzaldehydu a 2-fenylacetaldehydu.

Tab. I Variabilita vybraných těkavých látek autentických medů (obsah vyjádřen jako procentuální zastoupení (%) z celkové plochy těkavých látek).

Sloučenina	Min (%)	Max (%)	Medián
Furan-2-karbaldehyd	0,5	5,1	0,8
Benzaldehyd	6,1	32,3	9,1
2-fenylacetaldehyd	0,7	40,3	3,0
Linalool oxid	0,8	10,6	2,2
p-cymenen(1-isopropenyl-4-methylbenzen)	0,6	8,0	1,8
Hotrienol ((5E)-3, 7-dimethylocta-1, 5, 7-trien-3-ol)	2,6	18,9	4,1
2-fenylethanol	1,6	24,8	5,2
Methyl-fenylacetát	0,2	3,3	0,7

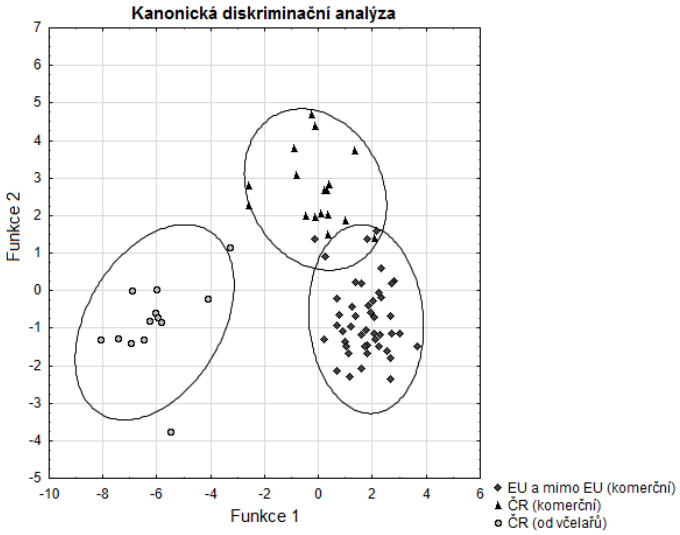
Vzorky medů se značně lišily v závislosti na jejich druhu a geografickém původu. Lineární diskriminační analýza (LDA) byla použita pro ověření možnosti klasifikovat vzorky medů na základě profilu těkavých látek. Nejprve byla vícerozměrná statistická metoda LDA použita pro zhodnocení diskriminace vzorků do 3 základních tříd podle druhu, tj. na květové, medovicové a smíšené medy. Na Obr. 1 je znázorněna projekce všech vzorků ve dvourozměrném prostoru, který je vytvořen pomocí prvních dvou diskriminačních funkcí. Na tomto diagramu lze vidět tři skupiny vzorků, z nichž každá odpovídá danému druhu medu. Pro výběr nejvýznamnějších proměnných tohoto diskriminačního modelu byla zvolena kroková metoda. Na základě Wilksova kritéria a hodnoty testačního kritéria F bylo nalezeno 8 sloučenin, které nejvíce přispívají k diskriminaci vzorků. Příspěvek jednotlivých znaků k diskriminaci je následující: p-cymenen < 3- methylbutanal < D-limonen < α-terpineol < fenylethylalkohol < dekanal < acetylfuran < borneol. Borneol je charakteristický svým dřevitým aroma (konkrétně borovice) a v literatuře (Soria *et al.* 2009) byl identifikován jako sloučenina s vysokou diskriminační silou pro medovicové medy. Naopak acetylfuran je těkavá látka s vysokou negativní korelací pro medovicové medy, a proto slouží ke klasifikaci květových medů (Soria *et al.* 2009). Dekanal je typický pro květové medy (Odeh *et al.* 2013) a také významně přispívá k jejich diskriminaci.



První diskriminační funkce rozděluje především třídu smíšených a květových medů. Druhá diskriminační funkce rozlišuje mezi skupinou medovicových medů a ostatními vzorky. Správně je klasifikováno celkově 89 % vzorků; konkrétně v jednotlivých skupinách: květové medy 97 %, smíšené medy 86 %, medovicové medy 76 %. Uvedená statistická metoda představuje silný nástroj pro vysvětlení rozdílů mezi vzorky medů.

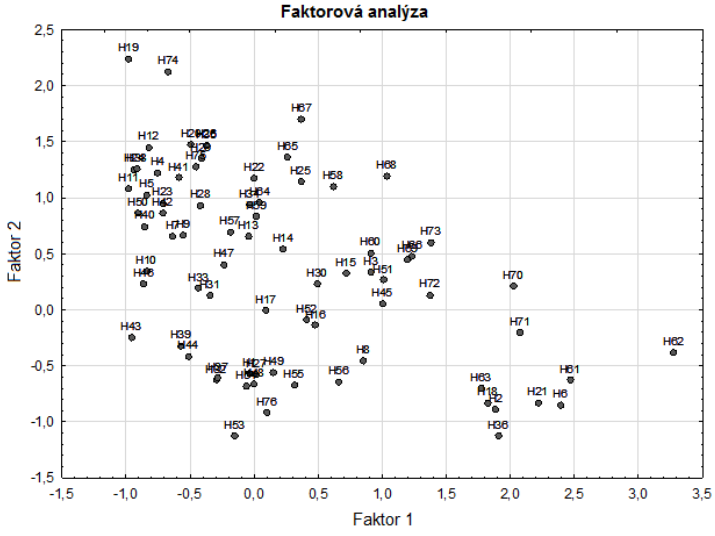
Obr. 1. Klasifikace medů podle druhu na základě 8 těkavých sloučenin znázorněná pomocí metody LDA.

LDA byla také použita pro klasifikaci medů podle geografického původu. Vzorky byly zařazeny do třech tříd, tj. komerční medy z ČR, komerční medy z EU a mimo EU a medy z ČR přímo od včelařů. Diskriminace medů podle geografických tříd je uvedena na Obr 2. Tento diagram vyjadřuje klasifikaci vzorků v prostoru první a druhé diskriminační funkce. Na Obr. 2 je možné vidět tři zřetelně oddělené skupiny objektů. Pomocí LDA byly nalezeny těkavé sloučeniny, které nejvíce uvedenou diskriminaci umožňují. Jedná se především o látky: 2-fenylacetonitril < ethylbenzoát < p-cymen-3-ol < lilac-aldehyd D < 3- methyl-butannitril < dimethyl-disulfid < p-cymen < 3-methyl pentanová kyselina. Jako sloučenina s největší diskriminační silou byla určena 3-methyl pentanová kyselina. Tato látka je typická svým ovocným aroma a ve skupině medů z ČR (od včelařů) se vyskytovala ve 3-krát vyšším množství než v ostatních třídách vzorků. Ve studii (Koskoniene *et al.* 2010) byla 3-methyl pentanová kyselina označena za významnou sloučeninu květových medů.



Obr. 2. Klasifikace medů podle geografického původu na základě 8 vybraných těkavých sloučenin znázorněná pomocí metody LDA.

Profily těkavých látek všech vzorků byly zpracovány pomocí faktorové analýzy (FA). První faktor popisuje 68,2 % proměnlivosti (rozptylu) naměřených dat a druhý faktor 12,1 %, první dva faktory tedy popisují 80,3 % proměnlivosti. Faktorová skóre jednotlivých objektů v rozptylovém diagramu po rotaci Varimax jsou uvedeny na Obr. 3.



Obr. 3 Variabilita medů zhodnocená pomocí faktorové analýzy s rotací Varimax. Rozptylový diagram faktorového skóre pro 1 a 2 faktor (H – honey). Vzorky medů byly specifikovány celkem 48 těkavými sloučeninami.

Výše znázorněný diagram (Obr. 3) ukazuje polohu objektů (H – honey) v prostoru faktorů. Kromě mírně odlehlých objektů H61, H6, H21, H36, H63, H18, H2, H18, H70 a H71, jsou ostatní objekty umístěny v jediném shluku. Za vysloveně odlehlé body lze považovat objekty označené H62, H19 a H74. Med H62 vyjádřený především hodnotou prvního faktoru je odlehlý vzhledem k vysokému obsahu ethyl-fenylacetátu (6-krát vyšší než průměrná hodnota) a isoborneolu (5-krát vyšší než průměrná hodnota). Medy H61 a H6 jsou charakteristické také obsahem výše uvedených látek, jejich obsah je vzhledem k průměrným hodnotám 3-krát vyšší. Naopak velmi odlehlé vzorky H19 a H74 jsou specifikovány nejvíce hodnotou druhého faktoru. Med H19 se od ostatních vzorků liší obsahem2-fenylacetonitrilu. Tento vzorek obsahuje 7-krát více 2-fenylacetonitrilu než ostatní vzorky. Podobný trend vykazuje i vzorek H74. Obsah 2-fenylacetonitrilu je v tomto medu přibližně 5-krát vyšší než je průměrná hodnota. Hodnoty standardních kvalitativních charakteristik pro vybrané podezřelé vzorky medů jsou v Tab. II.

Tab. II Standardní kvalitativní charakteristiky vybraných podezřelých vzorků medů

Označení vzorku	Důvody pro podezření z falšování	Země původu	5-HMF [mg·kg^{-1}]	Aktivita diastasy [DN]	Ethanol [mg·kg^{-1}]	Triacetin [mg·kg^{-1}]
Med H21	senzorické hodnocení; statistické zpracování	ČR	19,7	10,1	5,3	< LOQ
Med H27	vysoký obsah 5-HMF; senzorické hodnocení	EU a mimo EU	404,1	< 0.9	193,3	ND
Med H31	vysoký obsah 5-HMF; přítomnost triacetinu	EU a mimo EU	247,1	1,7	25,4	1,2
Med H36	senzorické hodnocení; statistické zpracování	EU a mimo EU	50,3	1,7	12,5	ND
Med H39	vysoký obsah 5-HMF; senzorické hodnocení	EU a mimo EU	52,3	10,5	4,5	ND
Med H62	zvýšený obsah ethanolu; statistické zpracování	ČR	5,1	15,6	1364,7	1,2

DN – diastase number; LOQ – limit of quantification; ND – not detected

ZÁVĚR

Pomocí měření profilu těkavých látek byly identifikovány medy podezřelé z falšování. Ukázalo se, že uvedená metoda je vhodným nástrojem pro hodnocení kvality medu. Tato skutečnost byla potvrzena stanovením základních kvalitativních charakteristik medu (obsah 5-HMF, aktivita diastasy, přítomnost nosiče aromat). Profil těkavých látek byl také využit pro rozlišení medů podle botanického či geografického původu. Odhalit přídavek syntetického medového aroma však bylo možné pouze v extrémních koncentracích.

PODĚKOVÁNÍ

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20/2014): A1_FPBT_2014_006.

POUŽITÁ LITERATURA

Soria, A. C. – Sanz, J. –Martínez-Castro, I.: SPME followed by GC–MS: a powerful technique for qualitative analysis of honey volatiles. European Food Research and Technology, *228*, 2009, pp. 579–590.

Odeh, I. – Abu-Lafi, S – Al-Najjar, I.: Determination of potential volatiles markers from citrus, eucalyptus, cotton and wildflower Palestinian honeys using SPME followed by GCMS analysis. International Food Research Journal, *20*, 2013, pp. 1243–1247.

Kaškonienė, V. – Venskutonis, P. R.: Floral Markers in Honey of Various Botanical and Geographic Origins: A Review. Comprehensive Review in Food Science and Food Safety, *9*, 2010, pp. 620–634.

Bogdanov, S. – Martin, P. – Lüllmann, C.: Harmonised methods of the European honey commission. Apidologie, *28*, 1997, pp. 1–59.

Alissandrakis, E. – Tarantilis, P. A. – Harizanis, P. C. – Polissiou, M.: Aroma investigation of unifloral Greek citrus honey using solid-phase microextraction coupled to gas chromatographic-mass spectrometric analysis. Food Chemistry, *100*, 2007, pp. 396–404.

Panseri, S. – Manzo, A. – Chiesa, L. M. – Giorgi, A.: Melissopalynological and Volatile Compounds Analysis of Buckwheat Honey from Different Geographical Origins and Their Role in Botanical Determination. Journal of Chemistry, *2013*, 2013, pp. 1–11.

R 31

MOŽNOSTI ODHALENÍ PŘIBARVOVÁNÍ VÝROBKŮ Z ČERVENÉHO OVOCE

Neradová E.[1], Rajchl A.[1], Kvasnička F.[1], Čížková H.[1]
[1)] Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav konzervace potravin, Technická 5, 16628 Praha 6

Úvod

Problematika falšování a autenticity potravin je stále aktuální. Mezi běžně falšované potraviny patří i výrobky z červeného ovoce jako jsou například ovocné nápoje, sirupy nebo džemy. U těchto výrobků dochází ke snížení ovocného podílu, nahrazení dražšího ovoce levnějším a přibarvení různými extrakty z ovoce nebo zeleniny. Přibarvováním lze zamaskovat nižší podíl barevného ovoce nebo použitím méně kvalitní suroviny. Mezi ovocné/zeleninové druhy využívané k přibarvování patří aronie, černý bez, červená řepa, černá mrkev, granátové jablko a hroznové víno. Intenzitu a odstín červené barvy v ovoci a zelenině udávají především specifické anthokyany, betalainy a karotenoidy, které jsou pro daný druh charakteristické. Anthokyany se řadí mezi heteroglykosidy a skládají se z necukerné složky (nejčastěji delphinidin, kyanidin, malvidin, pelargonidin, peonidin a petunidin) a cukerné složky (nejčastěji glukosa, galaktosa, rhamnosa, xylosa a arabinosa). Faktory ovlivňující jejich tvorbu, jsou: rostlinné druhy a odrůdy, sluneční záření, teplota a doba posklizňového dozrávání. Velký vliv má také technologie výroby a skladování. Záhřevem dochází ke krátkodobému vzestupu barevné intenzity při zachování barevného tónu, ale i k uvolnění barviva a postupnému poklesu. Prostředí pH má významný vliv, při pH < 5 dochází k vzestupu barevné intenzity, přičemž je barevný tón nezměněn, při pH > 5 je barva fialová až modrá. Přítomnost cizorodých látek jako například kovů, peroxidu vodíku či kyslíku způsobuje oxidaci anthokyanových barviv na nebarevné či hnědě zbarvené sloučeniny. Anthokyany jsou citlivé na přítomnost viditelného, ultrafialového i ionizujícího záření.[1] Cílem práce bylo ověření možnosti využití metody HPLC-DAD pro odhalení přibarvování výrobků přírodními barvivy (šťávami, extrakty, koncentráty).

Vzorky

Analýzy byly provedeny na vzorcích ovoce jako zástupců, kteří jsou často falšovány: jahod, malin, třešní a borůvek. Dále také na vzorcích ovoce a zeleniny jako zástupců, kteří se používají k přibarvování: aronie, granátové jablko, černá mrkev, černý bez a červená řepa. Byly také analyzovány vzorky jahodových pomazánek a dětské výživy z obchodní sítě s následujícím přídavkem jiných ovocných/zeleninových druhů: Vzorek 1 – jahody 100 %, koncentrát hroznové šťávy, šťáva z červeného ovoce. Vzorek 2 - jahody 45 %, mrkvový koncentrát, koncentrát z černého rybízu. Vzorek 3 – jahody 50 %, rostlinný koncentrát šťávy z aronie. Vzorek 4 – jahody 70 %, koncentrát citronové a aroniové šťávy. Vzorek 5 – jablečná dřeň 76 %, jahodová dřeň 24 %, barvící rostlinné extrakty, koncentrát z karotky a granátového jablka. Vzorek 6 – jablka 75 %, černý rybíz 13 %, maliny 7 %, bezinky 5 %, koncentrát z černé mrkve. Analyzované vzorky byly převážně zakoupeny v obchodní síti, ale například vzorky aronií a černého bezu byly sbírány na území České Republiky.

Příprava vzorku

V první části experimentu byly připraveny roztoky standardů (kyanidin-3-glukosid, peonidin-3-glukosid, pelargonidin-3-glukosid, malvidin chlorid, delphinidin chlorid, kyanidin-3,5-diglukosid) v methanolu o koncentraci 10, 1 a 0,1 mg/l. V následující části experimentu byly testovány tři druhy přípravy vzorků (voda, kyselina a SPE) jednotlivých ovocných a zeleninových druhů.

Voda: Přibližně 4 g vzorku byly extrahovány s 20 ml destilované vody a vloženy do ultrazvukové lázně, aby došlo k vyluhování anthokyanových barviv. Po 30 minutách byl vzorek odstředěn a vzniklý extrakt byl přečištěn přes 0,45 µm nylonový mikrofiltr. Takto připravené vzorky byly použity pro kvalitativní analýzu metodou HPLC-DAD.

Kyselina: Přibližně 4 g vzorku byly extrahovány s 20 ml vodného roztoku kyseliny mravenčí (1:9) a vloženy do ultrazvukové lázně, aby došlo k vyluhování anthokyanových barviv. Po 30 minutách

byl vzorek odstředěn a vzniklý extrakt byl přečištěn přes 0,45 μm nylonový mikrofiltr. Takto připravené vzorky byly použity pro kvalitativní analýzu metodou HPLC-DAD.
SPE: Přibližně 4 g vzorku byly extrahovány s 20 ml vodného roztoku kyseliny mravenčí (1:9) a vloženy do ultrazvukové lázně, aby došlo k vyluhování anthokyanových barviv. Po 30 minutách byl vzorek odstředěn. Extrakt byl přečištěn pomocí SPE (0,1 - 1 ml) a vymyt pomocí 5 ml metanolu. Přečištěný extrakt byl odpařen na vakuové odparce a rozpuštěn v 1 ml v 0,01% HCl. Takto připravené vzorky byly použity pro kvalitativní analýzu metodou HPLC-DAD.

Podmínky analýzy

Stanovení anthokyanů pomocí HPLC-DAD podle IFU no. 71: Průtok 1ml/min, kolona 5 μm Purospher STAR RP-18e, 4 x 250 mm, detekce UV/VIS při 525 nm, mobilní fáze A – voda:kyselina mravenčí (9:1 v/v), B – voda:kyselina mravenčí:acetonitril (4:1:5 v/v/v)
Tab. 1 Popis gradientové eluce

Čas (min)	Procentuální podíl mobilní fáze A	Procentuální podíl mobilní fáze B
0	88	12
1	88	12
26	70	30
35	0	100
41	88	12
50	88	12

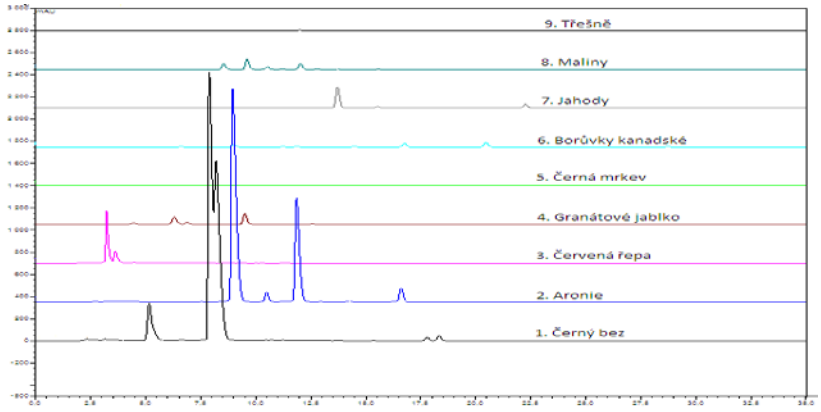
Výsledky a diskuze

Pro odhalení přibarvování byla využita technika fingerprintů anthokyanů pomocí HPLC-DAD. Hlavním úkolem bylo navržení a optimalizace postupu izolace barevné složky a způsobu interpretace výsledků. Současně byla ověřena pracovní charakteristika celého postupu (mez detekce, mez stanovitelnosti, opakovatelnost a linearita). Vzhledem k nízké stabilitě pelargonidin-3-glukosidu, malvidin chloridu, delphinidin chloridu a kyanidin-3,5-diglukosidu jsou pracovní charakteristiky uvedeny pouze pro stabilní standardy anthokyanů a to: kyanidin-3-glukosidu a peonidin-3-glukosidu viz Tab. 2. Identifikace jednotlivých anthokyanů byla provedena porovnáním charakteristického retenčního času, UV/VIS spektra a literatury.

Tab. 2 Pracovní charakteristiky vybraných standardů anthokyanů

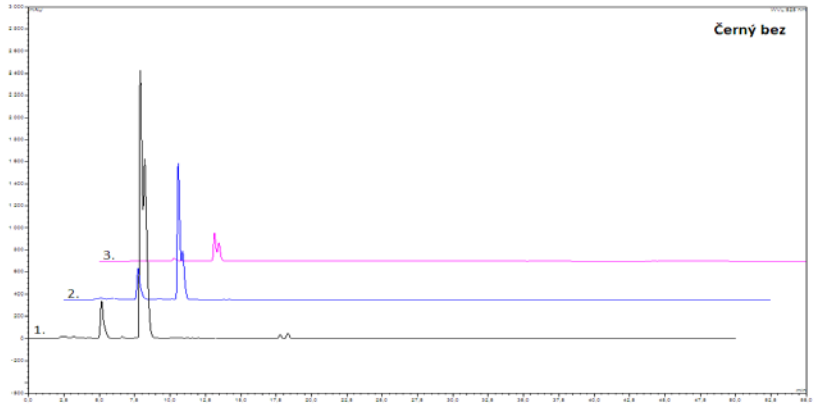
Anthokyan	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)	Výtěžnost (%)	RSD (%)
kyanidin-3-glukosid	0,32	1,07	96,6	4,84
peonidin-3-glukosid	0,33	1,09	92,9	4,70

Na následujícím chromatogramu Obr. 1 jsou uvedeny profily anthokyanů jednotlivých druhů ovoce (od spodu: 1. černý bez, 2. aronie, 3. červená řepa, 4. granátové jablko, 5. černá mrkev, 6. kanadské borůvky, 7. jahody, 8. maliny a 9. třešně). Je zde srovnání plodu černého bezu a aronií, které obsahují několikanásobnou koncentraci anthokyanů než v jiných běžně používaných ovocných druzích. Majoritní anthokyany v plodech černého bezu jsou pouze tři a to 1. kyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid (RT 5,2), 2. kyanidin-3-sambubiosid (RT 7,9) a kyanidin-3-glukosid (RT 8,7).[2] Majoritní anthokyany v plodech aronií jsou pouze čtyři, a to 1. kyanidin-3-galaktosid (RT 7,5), 2. kyanidin-3-glukosid (RT 8,7), 3. kyanidin-3-xylosid (RT 10), 4. kyanidin-3-arabinosid (14,2).[3] Profil kanadských borůvek je chudší co do počtu píku, ale i koncentrace, důvodem je přítomnost anthokyanových barviv pouze ve slupce.

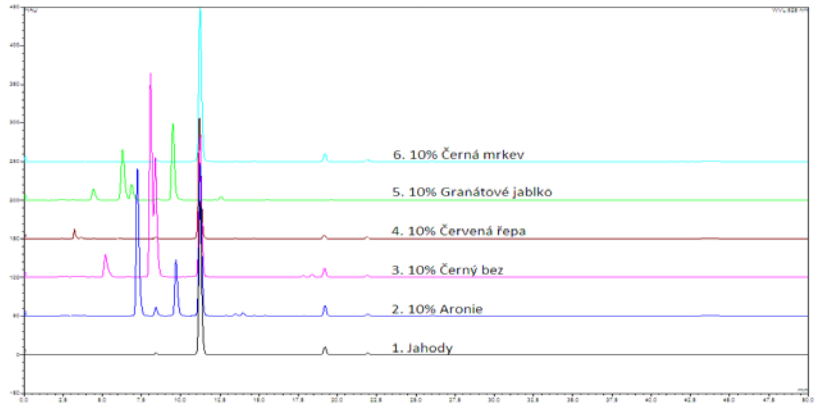


Obr. 1 Profil anthokyanů jednotlivých druhů ovoce

Na chromatogramu (Obr. 2) jsou tři různé přípravy vzorku černého bezu 1. kyselina, 2. voda, 3. SPE. Z chromatogramu je patrné, že extrakce kyselinou je nejúčinnější. Při extrakci ve vodě došlo k částečné degradaci anthokyanových barviv. Problémem při přečištění pomocí SPE kolonek je v důsledku velkého obsahu anthokyanů nedostatečné vymytí vzorku. Stejný vliv byl zjištěn i u ostatních vzorků ovoce a zeleniny.



Obr. 2 Různé způsoby extrakce vzorku černého bezu (kyselina, voda, SPE)



Obr. 3 Porovnání vzorku jahod a vzorku s 10% přídavkem jiného druhu ovoce

Na obrázku 3 jsou uvedeny vzorky jahod (1.) a vzorky s 10% přídavkem jiného druhu ovoce. Vzorek 2. s 10% přídavkem aronie, 3. s 10% přídavkem černého bezu, 4. s 10% přídavkem červené řepy, 5. s 10% přídavkem granátového jablka, 6. s 10% přídavkem černé mrkve. Majoritním anthokyanem je u jahod pelargonidin-3-glukosid (RT 11,2), dále je přítomen kyanidin-3-glukosid (RT 8,7), pelargonidin-3-rutinosid (RT 19,1) a pelargonidin-3-arabinosid (RT 21,9).[4] Je patrné, že lze podle profilu anthokyanů odhalit 10% přídavek černého bezu, aronie, ale i granátového jablka. V případě červené řepy se profil shlukuje pouze na počátku analýzy, a proto by bylo vhodné pro její detekci použít jinou metodiku. Koncentrace anthokyanů v černé mrkvi je velmi nízká, proto by bylo vhodné použít jinou extrakci vzorku, popř. i jinou metodiku.

Tab. 4 Průměrné procentuální zastoupení jahod podle literaturu, naměřených vzorků jahod, 10% přídavek aronie, černého bezu a červené řepy

Anthokyan	Literatura průměrné procentuální zastoupení jahod	Průměrné procentuální zastoupení změřených jahod (n=10)	Rozsah hodnot z literatury a měření	Procentuální zastoupení 10% aronie	Procentuální zastoupení 10% černý bez	Procentuální zastoupení 10% červená řepa	Procentuální zastoupení 10% granátové jablko	Procentuální zastoupení 10% černá mrkev
Cy-3-glc	3,5	0,9	0,4-4	2,2	26,0	1,1	5,5	0,8
Pg-3-glc	90,7	93,0	90-95	39,9	28,6	89,7	80,9	92,9
Pg-3-rut	3,5	4,9	3-5,4	nd	1,9	2,9	5,1	4,9
Pg-3-ara	4,2	1,2	0,7-4,7	2,8	nd	1,3	1,2	1,1
Celkem (%)	101,9 ± 5	100	100±5	44,9	56,5	95,0	92,7	99,7

Naměřené hodnoty průměrného procentuálního zastoupení pro jahody odpovídají literatuře. Procentuální zastoupení pelargonidin-3-glukosidu, který je majoritním anthokyanem jahod, se při přídavku jiného ovocného/zeleninového druhu sníží. U 10% přídavku černého bezu se sníží až na necelých 29 %. Přídavek 10 % aronie způsobí snížení na necelých 40 %. Pelargonidin-3-rutinosid je při přídavku 10% aronie pod mezí detekce. Naopak pelargonidin-3-arabinosid je pod mezí detekce u 10% přídavku černého bezu.

Tab. 5 Průměrné procentuální zastoupení vzorků jahodových pomazánek a dětské výživy

Anthokyan	Vzorek 1 Jahodová pomazánka (100 %)	Vzorek 2 Jahodová pomazánka (45 %)	Vzorek 3 Jahodová pomazánka (50 %)	Vzorek 4 Jahodový džem (70 %)	Vzorek 5 Dětská výživa (24 %)	Vzorek 6 Ovocná směs (0 %)
Cy-3-glc	7,4	2,8	nd	nd	3,5	3,1
Pg-3-glc	72,5	63,6	100	100	48,7	nd
Pg-3-rut	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Pg-3-ara	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Celkem (%)	79,9	66,4	100	100	52,2	3,1
Další přítomné anthokyany	cy-3-sam	dp-3-glc	-	-	cy-3,5-diglc, cy-3,5-diglc	cy-3-sam, dp-3-glc, dp-3-rut, peo-3-glc
Identifikovaný ovocný druh	-	černý rybíz	-	-	granátové jablko	černý bez, černý rybíz, hroznové víno

Z tabulky 5 vyplývá, že vzorky jahodových pomazánek (100 %, 45 %, 50 %), jahodového džemu (70 %), dětské výživy (24 %) obsahovaly majoritní anthokyan jahod pelargonidin-3-glukosid, dále také vzorky 1, 2 a 5 obsahovaly kyanidin-3-glukosid. Zatímco ve vzorku ovocné směsi (6) byl detekován pouze kyanidin-3-glukosid, typický pro jahody. Zároveň obsahoval charakteristické anthokyany, které jsou typické pro černý bez, černý rybíz a hroznové víno.[5] Ve vzorku jahodové pomazánky (1) byla zjištěna přítomnost anthokyanu kyanidin-sambubiosidu typického pro černý bez. Jelikož byla koncentrace u tohoto vzorku velmi nízká, nelze s jistotou potvrdit daný ovocný druh. U vzorku jahodové pomazánky (2) byla potvrzena přítomnost černého rybízu.

Závěr

Výsledky ukazují, že stanovení profilu anthokyanů pomocí HPLC-DAD lze využít jako jeden z markerů pro odhalení nesprávně značených nebo falšovaných výrobků na českém trhu. Metodu by bylo třeba ověřit na větším množství vzorků s nízkým obsahem ovocné složky. Dále pro porovnání a případně odhalení přídavku syntetických barviv využít metodu TLC.

Poděkování

Tento projekt byl financován z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20/2014): A1_FPBT_2014_006.

Seznam použité literatury

1. Velíšek, J., Hajšlová, J. *Chemie potravin II.*. 3.rd ed. Tábor: OSSIS, 2009. 644 p. ISBN 978-80-86659-17-6.
2. Lee, J., Finn, Ch. E. Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars. *J. Sci. Food Agric.*, 2007, 87, 2665–2675. ISSN 1097-0010.
3. Šnebergrová, J.; et al. Variability of Characteristic Components of Aronia. *Czech J. Food Sci.* 2014, *32* (1), 25–30. ISSN 1805-9317.
4. Fiorini, M. Preparative high-performance liquid chromatography for the purification of natural anthocyanins. *J. Chromatogr., A* 1995, *692*, 213-2. ISSN 0021-9673.
5. Bordonaba, J. G.; et al. A new acetonitrile-free mobile phase for HPLC-DAD determination of individual anthocyanins in blackcurrant and strawberry fruits: A comparison and validation study. *Food Chemistry* 2011, *129*, 1265–1273. ISSN 0308-8146.

R 32

NEJBĚŽNĚJŠÍ VADY VŮNĚ CITRUSOVÝCH NEALKOHOLICKÝCH NÁPOJŮ A MOŽNOSTI JEJICH DETEKCE

Duchová I., Nová J., Čížková H.
Ústav konzervace potravin, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6

ÚVOD

Spotřeba nealkoholických nápojů v ČR dosáhla maxima v roce 2008, kdy bylo spotřebováno 297 litrů na osobu. Od té doby spotřeba mírně klesá, ale stále s 278 litry na osobu (rok 2012) se jedná o velké množství vypitých PET lahví, TetraPack krabic či ve skle balených nápojů. Není divu, že při takto velké spotřebě, se stále častěji objevují stížnosti spotřebitelů na nevyhovující senzorické vlastnosti zakoupeného výrobku. Mezi nejčastější senzorické defekty nealkoholických nápojů patří nevyhovující vzhled (např. zákal, sediment, plovoucí částečky) či netypická vůně a chuť.

Většina látek, které negativně ovlivňují vůni nealkoholických nápojů, ovlivňuje také jejich chuť, subjektivně většinou nelze oddělit pachový a chuťový vjem (flavor). V případě pachové vady nealkoholického nápoje je často problematické identifikovat konkrétní látku odpovědnou za nežádoucí vůni, a tím i zjistit původ vzniklého defektu. Vedle senzorického hodnocení je rychlou metodou pro detekci těkavých látek SPME analýza spojená s GC-MS. V praxi může nastat situace, že senzorickým hodnocením se prokáže nestandardní vůně daného výrobku, ale pomocí instrumentální analýzy se nepodaří zjistit konkrétní látka či látky zodpovědné za danou vadu. Důvodem je, že práh vnímání konkrétní látky je nižší než mez detekce použité analytické metody.

Cílem práce bylo zhodnotit nejběžnější vady vůně nealkoholických nápojů z pohledu spotřebitele a z pohledu analytické metody. Na základě literárních údajů a vlastních zkušeností bylo vybráno 9 látek (viz Tab. 1), které byly identifikovány jako častá příčina senzorického defektu nápoje. Cílem bylo stanovit prahové koncentrace vnímání daných látek spotřebiteli, vliv těchto látek na celkovou vůni nápoje s citronovou příchutí a následně ověřit, zda jsou zjištěné prahové koncentrace detekovatelné SPME-GC-MS analýzou.

METODY

Senzorická analýza

Výcvik hodnotitelů pomocí pořadové a párové zkoušky: vodné roztoky chemických látek.
Stanovení prahové koncentrace v citronové limonádě: trojúhelníková zkouška, hodnocení rozdílu od standardu. Koncentrace látek jsou uvedeny v tabulce (Tab. 2).

SPME/GC/MS analýza pro stanovení profilu těkavých látek

Instrument: plynový chromatograf (7890A Agilent Technologies) s hmotnostním detektorem (5975C Agilent Technologies).
Izolační podmínky: DVB/Carboxen™/PDMS StableFlex™ vlákno 50/30 µm, temperování vzorku 1 minutu při teplotě 40 °C, extrakce 10 minut při teplotě 40 °C, desorpce 4 minuty při teplotě 240 °C.
Chromatografické podmínky: kolona HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane (Agilent), 30 m x 250 µm x 0,25 µm; mobilní fáze: helium, konstantní průtok 1,4 $ml.min^{-1}$.

Tab. 1: Charakteristika vybraných látek, potenciálních zdrojů vad vůně citronové limonády

Látka	Příčina/původ	Charakteristika vůně	Prahová koncentrace ve vodě	Rozpustnost ve vodě	Bod varu (°C)
D-limonen	Složka citrusového aroma*	Sladký, citrusový	200 µg/l	33,9 mg/l	176 – 177
α-terpineol	Složka citrusového aroma*	Zatuchlý, plesnivý, terpenický, dřevitý, květinový	330 – 350 µg/l	710 mg/l	217 – 218
p-cymen	Složka citrusového aroma*	Zatuchlý, terpenický, dřevité tóny, jako rozpouštědlo	0,1 mg/l	23,4 mg/l	176 – 178
γ-terpinen	Složka citrusového aroma*	Terpenický, citrusový	1,5 µg/l	8,68 mg/l	182
Hexanal	V nízkých koncentracích přirozená složka, produkt oxidace lipofilních složek	Po čerstvě posekané trávě	30 µg/l	4,8 g/l	130 – 131
1,3-pentadien	Produkt degradace sorbanu draselného plísní	Zápach po petroleji	100 µg/l	690 mg/l	42
Guajakol	Metabolit bakterií (*Alicyclobacillus* sp.)	Zápach po uzených rybách a sýru, medicinální	3 – 21 µg/l	17 g/l	205
2,4,6-trichloroanisol	Metabolit plísní	Zemitý, zatuchlý, plesnivý	0,03 ng/l	10 mg/l	132
Acetaldehyd	Migrace z PET	Štiplavý, ovocný a zatuchlý zápach	10 – 20 µg/l	>500 g/l	21

* ve vyšších koncentracích zdrojem smyslového defektu

VÝSLEDKY A DISKUSE

K určení prahové koncentrace sledovaných látek v limonádě byla použita trojúhelníková zkouška a zkouška hodnocení rozdílu od standardu. Pomocí trojúhelníkové zkoušky byly hodnotiteli zkoumány rozdíly mezi dvěma vzorky a to mezi vzorkem samotné limonády a limonády, které obsahovala námi přidané chemické látky. Výsledky jsou uvedeny v tabulce (Tab. 2). Na základě těchto výsledků byly u některých látek upraveny koncentrace použité pro zkoušku hodnocení rozdílu od standardu.

Zkouška hodnocení rozdílu od standardu byla využita pro potvrzení prahové koncentrace chemických látek v limonádě. Úkolem hodnotitelů bylo určit, který z předložených vzorků je

totožný se standardem (samotné limonády) a který je odlišný od standardu. U této zkoušky byla vypočítána hodnota χ^2, která byla následně porovnána s tabelovanými kritickými hodnotami rozdělení χ^2 (viz Tab. 2). Pokud byla vypočtená hodnota větší než hodnota tabelovaná ($\chi^2 = 3,84$), dá se říci, že mezi vzorky byl průkazný rozdíl. Rozdíl mezi vzorky byl po porovnání hodnot u acetaldehydu, hexanalu a 2,4,6-trichloroanisolu. Senzorická analýza nebyla úspěšná u všech sledovaných chemických látek. Hodnotitelům dělaly potíže hlavně 1,3-pentadien, D-limonen a γ-terpinen.

Tab. 2: Podklady k určení prahové koncentrace sledovaných látek v limonádě – vyhodnocení trojúhelníkové zkoušky a zkoušky hodnocení rozdílu od standardu

Látka	Trojúhelníková zkouška			Zkouška hodnocení rozdílu od standardu		
	Koncentrace (µg/l)	Správně z celkového počtu	Min. správně K_{95} (95 %)	Koncentrace (µg/l)	Správně z celkového počtu	Vypočtené hodnoty χ^2 *
Acetaldehyd	5000	12 / 20	11	200	10 / 13	5,6
Hexanal	200	14 / 20	11	150	12 / 13	10,4
D-limonen	5000	6 / 20	11	2000	6 / 13	0,7
1,3-pentadien	1000	7 / 20	11	1000	5 / 13	0,2
Guajakol	1000	8 / 20	11	220	7 / 13	0,6
α-terpineol	5000	13 / 20	11	3500	7 / 13	0,2
p-cymen	10000	12 / 26	14	10000	9 / 13	1,4
γ-terpinen	15	12 / 26	14	15	4 / 13	0,2
2,4,6-TCA	3	11 / 26	14	3	12 / 13	6,5

* Kritické hodnoty rozdělení zkoušky hodnocení rozdílu od standardu $\chi^2 = 3,84$

Pro SPME-GC-MS analýzu byly použity prahové koncentrace látek zjištěné pomocí senzorické analýzy. Chemické látky přidané do limonády byly pomocí analytické metody dobře detekovány. U látek, které se přirozeně vyskytovaly v limonádě a byly současně záměrně přidány, například D-limonen, α-terpineol, p-cymen, γ-terpinen, byly zřetelné odpovídající nárůsty ploch píků.

Plynová chromatografie se v tomto případě ukázala jako účinnější metoda než senzorická analýza. SPME-GC-MS analýzu byly detekovány i prahové koncentrace uváděné v literatuře, které senzorická analýza nebyla schopná odhalit. Tabulka 3 shrnuje zjištěné meze detekce pro vybrané chemické látky.

Na základě naměřených výsledků bylo možno rozdělit sledované látky do dvou skupin. U acetaldehydu, p-cymenu, γ-terpinenu a 2,4,6-trichloroanisolu byla mez detekce analytické metody a práh vnímání jejich vůně v limonádě srovnatelné. U ostatních látek (hexanal, D-limonen, 1,3-pentadien, guajakol, α-terpineol) byla zjištěná mez detekce plynovou chromatografií nižší než postřehnutelnost lidskými smysly.

Tab. 3: Zjištěné meze detekce pro vybrané chemické látky

Látka	SPME/GC/MS ve vodě (µg/l)	SPME/GC/MS v limonádě (µg/l)	Senzorická analýza v limonádě (µg/l)
Acetaldehyd	200	200	200
Hexanal	20	75	150
D-limonen	200	200	>5000
1,3-pentadien	100	250	>1000
Guajakol	2000	2200	>1000
α-terpineol	35	1700	5000
p-cymen	5	10	>10
γ-terpinen	15	15	>15
2,4,6-trichloroanisol	3	3	3

ZÁVĚR

Nevýhodou senzorické analýzy jako nástroje identifikace příčiny defektu je to, že je ke spolehlivému hodnocení zapotřebí poměrně velké množství zaškolených a na konkrétní látku citlivých hodnotitelů. Výhodou je jednoduchost, rychlost a po vycvičení hodnotitelů i levnost metody.

Metoda SPME/GC/MS jednoznačně identifikovala a kvantifikovala všechny testované chemické látky v daných koncentracích. Pokud se u některé látky vyskytl problém s detekcí, byl použit u metody tzv. výběr iontů, pomocí něhož byla látka následně dohledána. Nevýhodou u této metody je nutnost instrumentálního vybavení, relativně velká nejistota měření (RSD 20 %) a neznámá citlivost na další těkavé látky, které se mohou vyznačovat velmi nízkým prahem vnímání.

Pro odhalení přípachů v nápojích se jeví jako výhodné kombinace výše uvedených metod. Pro rychlé odhalení defektu použití senzorické analýzy a pro následnou identifikaci a kvantifikaci látky zodpovědné za defekt využití SPME-GC-MS.

PODĚKOVÁNÍ

Projekt byl financován z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č.20/2014): A1_FPBT_2014_006.

POUŽITÁ LITERATURA

- ANDREAS, P. *Taste and Odor in Drinking Water: Sources and Mitigation Strategies.* Zurich, 2008. Dissertation submitted. SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH.
- NOVÁ, J. *Defekty nealkoholických nápojů.* Diplomová práce, VŠCHT v Praze, 2014.
- Rogers, H. R. *Factors causing off-taste in waters, and methods and practices for the removal of off taste and its causes.* Final Report to the Department of the Environment, Transport and the Regions. Report No: DETR/DWI 5008/1. November 2001.
- The Good Scents Company Information System. Web site. http://www.thegoodscentscompany.com (accessed March 18, 2014).
- POKORNÝ, J., VALENTOVÁ, H., PUDIL, F. *Senzorická analýza potravin – laboratorní cvičení.* VŠCHT Praha, 1999. ISBN: 80-7080-278-2.

R 33

NOVÉ NÁPOJE ZE SLADOVANÝCH OBILOVIN FERMENTOVANÉ NETRADIČNÍMI KULTURAMI

Mikyška A., Matoulková D., Slabý M., Hartman I.
Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s.

Využití netradičních sladovaných obilovin a použití nepivovarských kultur produkčních mikroorganizmů pro fermentaci skýtá nové možnosti výroby piv a pivu podobných nápojů se zajímavými senzorickými vlastnostmi a potenciálním zdravotním benefitem. V pilotním pivovaru byly připraveny pokusné várky ze 100 % sladované pšenice Citrus, ovsa a směsi pohankového sladu s ječným sladem v poměru 1:1. Sladiny byly fermentovány kmeny RIBM 2-107 a RIBM 2-108 (Lactobacillus casei subsp. paracasei) a kmeny RIBM 163, RIBM 164 (Saccharomyces cerevisiae) v různých variantách. Nápoje byly připraveny v hořké a nehořké variantě. Prokvašení nápojů bylo výrazně nižší nežli u piv, u pokusů s pšeničným sladem přibližně 50%, u ovesného sladu 45% a směsi sladů z pohanky a ječmene přibližně 32%. Spektrum senzoricky aktivních látek ve fermentovaném nápoji záviselo větší měrou na sladu (obilovině) a v menší míře na použitém kmenu mikroorganismu. Nápoje měly oproti pivu kyselejší charakter. Senzorická obliba byla obecně nejlepší u piv/nápojů z pšenice Citrus, nejlepší skóre bylo u fermentace směsnou kulturou RIBM 2-107+ RIBM 163 ve variantě nehořčeno, kladně akceptovatelné byly i chmelené varianty. Perspektivní chuťové vlastnosti měl nechmelený nápoj z ovesného sladu fermentovaný směsnou kulturou kmenů Lactobacillus casei subsp. paracasei. Z variant pohankových byla nejlepší nehořčená varianta fermentovaná kmenem RIBM 164. Z pohledu hořčení (chmelení) byly preferovány nechmelené nápoje.

R 34

NOVÉ POSTUPY V KONTROLE KVALITY A BEZPEČNOSTI LIHOVIN

Stupák M.[1], Kocourek V.[1], Hajšlová J.[1]
1) Ústav analýzy potravin a výživy, Technická 5, 160 23, Praha-Dejvice

Úvod

Falšování lihovin je v posledních letech velmi rozšířený problém a kromě finančních (daňových) ztrát pro státní pokladnu, šizení spotřebitelů i poctivých výrobců, mohou tyto nekalé praktiky vést k závažným trvalým následkům na zdraví a dokonce smrti. Je velice důležité sledovat v lihovinách především obsah etanolu, metanolu, alkoholů přiboudliny a dalších těkavých látek a také detekovat denaturační činidla.[1,2] Pro stanovení etanolu se nejčastěji využívá pyknometrické stanovení. Ačkoli je tato metoda používána po dlouhá léta a její podstata je poměrně jednoduchá, pyknometrické stanovení je časově dost náročné a pracné a vyžaduje zkušeného pracovníka.[3]
Cílem studie byl vývoj rychlých, jednoduchých a cenově dostupných analytických postupů pro hodnocení kvality lihovin s využitím plynové chromatografie (GC, gaschromatography) ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS, massspectrometry). První část studie byla zaměřena na vývoj, optimalizaci a validaci analytické metody pro stanovení koncentrace etanolu v různých typech lihovin s rozdílným obsahem etanolu a těkavých látek s využitím metody isotopového zřeďování deuterovaného standardu etanolu. V druhé části byly lihoviny vyšetřeny na obsah těkavých látek (vyšší alkoholy, metanol, ethylacetát atd.) a denaturačních činidel (isopropanol a terc-butanol).

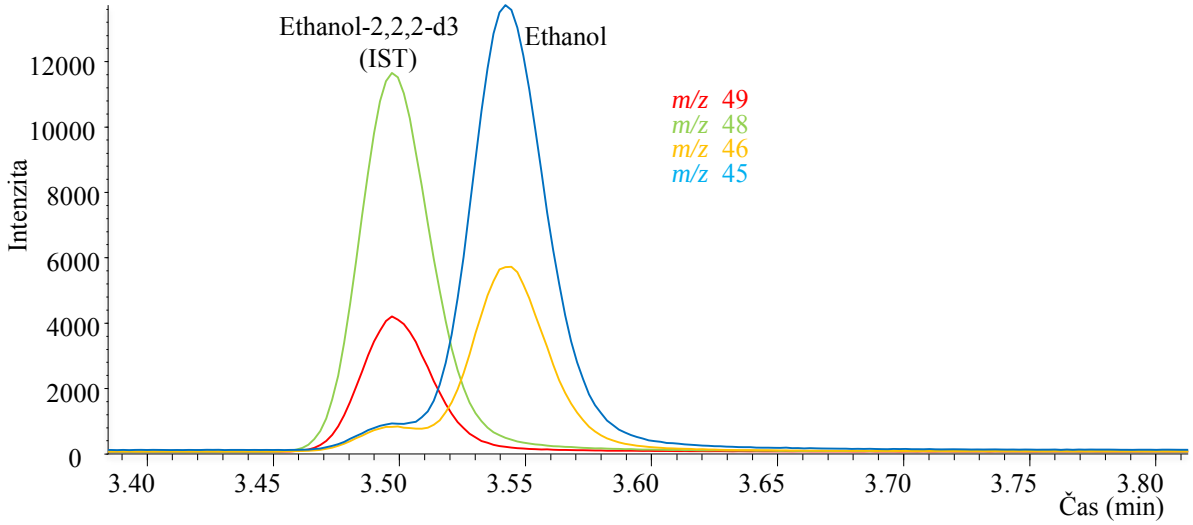
Metoda analýzy etanolu v alkoholických nápojích

Vnitřní standard (IST, z angl. i*nternal standard*) etanol-2,2,2-$d_3$byl připraven navážením do 10 ml odměrné baňky, do které byla navážena deionizovaná voda doplněna do objemu 10 ml. Dále byl připraven zásobní roztok navážením standardu etanolu do 10 ml odměrné baňky a doplněn deionizovanou vodou, která byla zvážena. Kalibrační roztoky byly připraveny navážením daných objemů (100, 125, 150, 175, 200, 225 a 250 µl) výše zmíněného standardu etanolu, 100 µl IST a roztok byl doplněn deionizovanou vodou. Vzorky pro analýzu etanolu v lihovinách byly nejprve vytemperovány na laboratorní teplotu a poté bylo 50 µl daného vzorku naváženo do 10 ml odměrné baňky. Ke vzorku bylo naváženo 100 µl IST a byla přidána a zvážena deionizovaná voda na výsledný objem 10 ml. Takto připravené vzorky byly analyzovány.
Při přípravě vzorku a kalibračních roztoků byla korigována objemová kontrakce, která nastává při smísení etanolu a vody. Experimenty probíhaly za běžné laboratorní teploty (22±1°C) a nebylo nutno přesně temperovat vzorky, standardy atd.
Pro chromatografickou separaci byl použit plynový chromatograf Agilent 6890N s kapilární kolonou HP-Innowax (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) ve spojení s hmotnostním spektrometrem Agilent 5975 MSD. Podmínky GC–MS jsou uvedeny v **tabulce I**.

Tabulka I: Podmínky GC–MS pro stanovení etanolu

Nosný plyn	Helium, konstantní průtok nosného plynu 1 ml/min
Objem nástřiku	0,5 µl
Nástřik	Split (1:150)
Teplota nástřiku	200°C
Teplotní program pece	40°C (4,5 min), post run 180°C (2 min)
Teplota transferline	200°C
Teplota zdroje	230°C
Teplota kvadrupólu	150°C
Akviziční mód	Monitoring vybraných iontů (SIM)
Monitorované m/z	46,45,49,48

Na **obr.1** je uveden chromatografický záznam separace nativního etanolu a vnitřního standardu ve vzorku whisky. Byly vybrány kvantifikační hodnoty m/z 46 pro nativní etanol a m/z 49 pro vnitřní standard.



Obrázek 1: separace nativního etanolu a vnitřního standardu ve vzorku whisky (40,18 % *v/v* etanolu).

Validace byla provedena na pěti různých typech lihovin s různými obsahy etanolu a dalších těkavých látek (acetaldehyd, metanol, vyšší alkoholy, atd.). Jako zástupce lihovin s vysokým obsahem těkavých látek byla vybrána hrušková pálenka a grappa, se středním obsahem těkavých látek rum a whisky a s minimálním obsahem těkavých látek vodka. Analýza každého vzorku byla provedena v šesti opakování.
Výsledné koncentrace etanolu v hmotnostním zlomku byly přepočteny pomocí lihometrických tabulek na procentuální obsah ethanolu (*v/v*). Koncentrace etanolu (%, *v/v*) v testovaných vzorcích jsou uvedeny společně s opakovatelností vyjádřenou jako relativní směrodatná odchylka (RSD, %) v **tabII**. Pro ověření metody byl úspěšně analyzován testovací materiál whisky (FAPAS®).

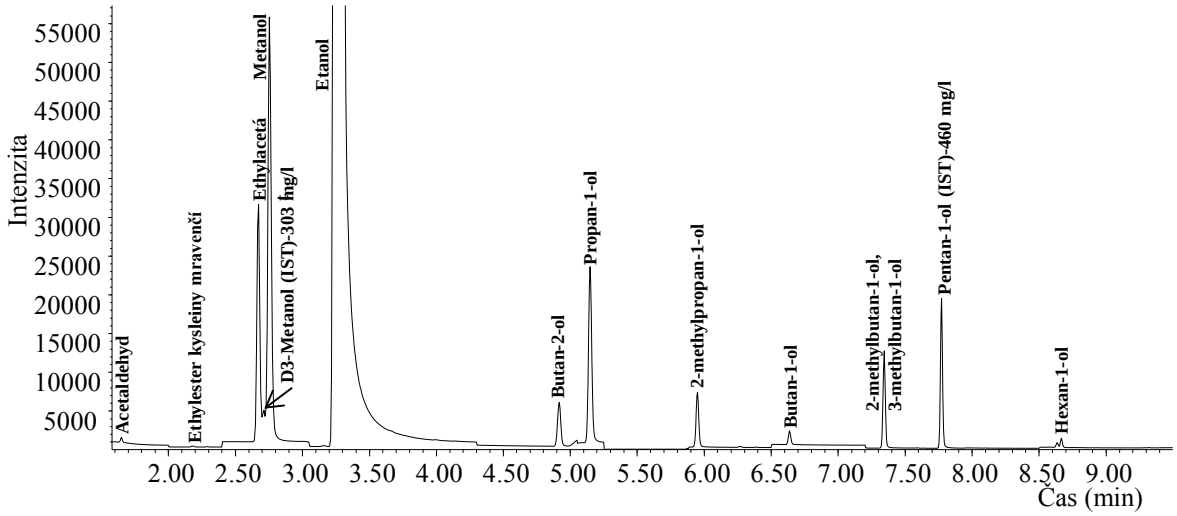
Tabulka II: výsledné koncentrace etanolu v analyzovaných vzorcích a opakovatelnost metody

Vzorek	Koncentrace ethanolu (%, *v/v*)	RSD (%)
Hrušková pálenka	44,47	0,54
Grappa	40,09	0,67
Rum	37,74	0,19
Whisky	40,18	0,26
Vodka	44,91	0,51

Hodnocení obsahu vyšších alkoholů a těkavých látek

Cílem tohoto experimentu bylo porovnat obsahy etanolu získané pomocí nově vyvinuté metody GC-MS a pyknometrie. Při pyknometrickém stanovení se spolu s etanolem destilují také další těkavé látky, které jsou přítomny v lihovinách. Především se jedná o metanol, acetaldehyd, ethylester kyseliny mravenčí, ethylacetát a o vyšší alkoholy (alkoholy přiboudliny, mezi které patří butan-2-ol, propan-1-ol, 2-methylpropan-1-ol, butan-1-ol, 2-methylbutan-1-ol, 3-methylbutan-1-ol a hexan-1-ol). Tento fakt může způsobit mírné nadhodnocení výsledné koncentrace etanolu při pyknometrickém měření druhů lihovin s vysokým obsahem těchto látek.
Ve vzorcích použitých v předchozím experimentu byly sledovány výše uvedené těkavé látky běžně sledované v lihovinách. Pro tento účel byla navržena a validována metoda GC–MS, která využívá isotopově značený metanol a pentan-1-ol jako IST a tato metoda byla rozšířená o dvě běžně se používající denaturační činidla (isopropanol a terc-butanol)

Do 10 ml odměrné baňky bylo přidáno 100 µl D_3-metanol a 100 µl pentan-1-olu a poté byla baňka doplněna daným vzorkem a vzorek byl analyzován. Podmínky GC-MS jsou uvedeny v **tabulce III.** Byla použita stejná instrumentace GC–MS a kapilární kolona jako při stanovení etanolu. Na **obr. 2** je znázorněn příklad chromatografického záznamu z analýzy hruškové pálenky, která obsahovala nejvyšší koncentrace těkavých látek.



Obrázek 2: chromatografický záznam těkavých látek v hruškové pálence.

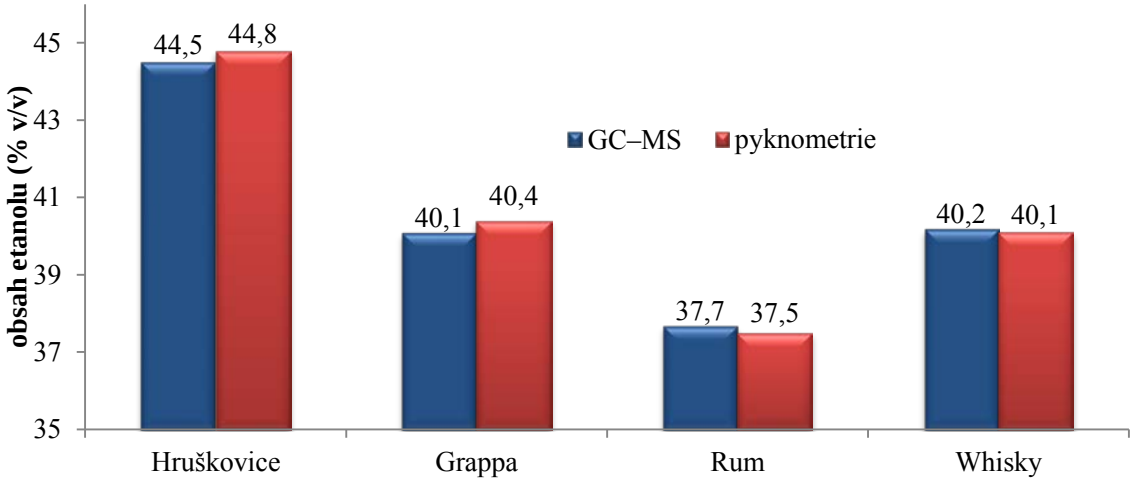
Tabulka III: Podmínky GC–MS pro stanovení těkavých látek

Nosný plyn	Helium, konstantní průtok nosného plynu 1 ml/min
Objem nástřiku	0,5 µl
Nástřik	Split (1:150)
Teplota nástřiku	200°C
Teplotní program pece	40°C (4 min), 20°C/min do 150°C, post run 180°C (5 min)
Teplota transferline	200°C
Teplota zdroje	230°C
Teplota kvadrupólu	150°C
Akviziční mód	Monitoring vybraných iontů (SIM)
Monitorované m/z	29,43,44,31,45,43,32,33,35,59,61,103,45,45,55,56

Naměřené koncentrace metanolu, acetaldehydu, ethylesteru kyseliny mravenčí, ethylacetátu a vyšších alkoholů (suma butan-2-ol, propan-1-ol, 2-methylpropan-1-ol, butan-1-ol, 2-methylbutan-1-ol, 3-methylbutan-1-ol a hexan-1-ol) jsou uvedeny v **tab. 2**. Nejvyšší koncentraci těkavých látek obsahovala podle očekávání hrušková pálenka a grappa, dále whisky a rum.Ve vodce byly všechny stanovované analyty pod limitem kvantifikace (LOQ, *limit of quantification*).
Na **obr. 3** je uvedeno porovnání koncentrací etanolu získaných metodou GC-MS a pyknometrií. Z obrázku je patrné, že při vysokých hladinách těkavých látek (hrušková pálenka, grappa) skutečně dochází k mírnému nadhodnocení koncentrací etanolu.

Tabulka 1: koncentrace alkoholů přiboudliny v analyzovaných vzorcích

Vzorek	**Koncentrace sumy těkavých látek (mg/l a.a.)**
Hrušková pálenka	16354
Grappa	14089
Whisky	2396
Rum	602
Vodka	<LOQ



Obrázek 3: porovnání obsahů etanolu (%, *v/v*) ve vzorcích získaných GC–MS a pyknometrií.

Závěr

Obě nově vyvinuté a optimalizované metody byly použity pro analýzu komerčně dodaných lihovin především během „metanolové aféry“ pro potřebu tzv. rodného listu. Analyzováno bylo 220 tůzných druhů lihovin a ani u jednoho vzorku nebyl překročen maximální povolený limit pro metanol a další těkavé látky udávané legislativou.

Literatura

[1] González-Rodríguez, J.; et al. Determination of ethanol in beverages by flow injection, pervaporation and density measurements. *Talanta* **2003**, *59* (4), 691–696.

[2] Wang, M.; et al. Simultaneous quantification of methanol and ethanol in alcoholic beverage using a rapid gas chromatographic method coupling with dual internal standards. *Food chemistry* **2004**, *86* (4), 609–615.

[3] Bereton, P.; Hasnip, S. Analytical methods for the determination of spirit drinks. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2003**, *22* (1), 19–25.

R 35

MÁK JAKO ZDROJ ALKALOIDŮ?

Novotná H., Škopíková M., Schulzová V., Hajšlová J.
Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha

Pěstování máku setého (*Papaver Somniferum* L.) má v Českých zemích více než tisíciletou tradici. Česká republika je také nejvýznamnějším producentem této komodity, a to s produkcí řádově desítek tun ročně. Maková semena se používají v pekařských výrobcích, jako náplně do koláčů a různých dezertů a také se z nich lisují jedlé makové oleje. Potraviny obsahující mák jsou oblíbené především ve státech střední Evropy.

Co se týče morfinových alkaloidů, ty maková semena sice neobsahují, ale mohou být jimi kontaminována z jiných částí makové rostliny, například při napadení makovic hmyzem nebo během sklizně a výrobního zpracování. Z toho důvodu maková semena vyvolávají řadu otázek, týkajících se bezpečnosti. Konzumace máku kontaminovaného opiovými alkaloidy může vést k nepříznivým zdravotním k účinkům, a také k měřitelným hladinám morfinu v moči a krvi, přetrvávajícím po dobu několika dní.

Správně sklizený a kvalitně vyčištěný mák z odrůd vypěstovaných v ČR nemůže být zdrojem kontaminace morfinovými alkaloidy v rozsahu, který by mohl mít nežádoucí farmakologický účinek na lidský organismus a vytvářel zdravotní rizika pro normálního konzumenta potravinářských výrobků obsahujících tuto olejninu. Významným zdrojem alkaloidů však může být semeno technického (nepotravinářského) máku, primárně neurčeného pro kulinární účely, vzniklého jako odpad z výrob farmaceutického průmyslu, pro který jsou specializované technické odrůdy máku setého legálně pěstovány s cílem izolovat z makové slámy (makoviny) morfinové alkaloidy pro výrobu léčiv. Povrch makových semen technických odrůd je kontaminován zpravidla řádově vyšším obsahem morfinu a jeho derivátů, než je tomu u registrovaných potravinářských odrůd pěstovaných v ČR. Přimíchávání těchto nepotravinářských máků může tedy znamenat kromě snížené senzorické jakosti i zvýšené riziko kontaminace alkaloidy. Z tohoto důvodu je potřeba mít k dispozici rychlé a spolehlivé analytické metody pro kontrolu hladin opiových alkaloidů.

R 36

STANOVENÍ ALKALOIDŮ V KRMIVECH METODOU UPLC-MS/MS

Bolechová M. (1, 2), Kosubová P. (1), Čáslavský J. (2)
(1) Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno,
(2) Ústav Chemie a technologie ochrany životního prostředí, Fakulta chemická, VUT v Brně

Alkaloidy jsou produkovány celou řadou rostlin, hub, bakterií a živočichů. Tyto sekundární metabolity nejsou nezbytné pro přežití zmíněných organismů, ale zejména pro jejich ochranu. Na základě typických strukturních charakteristik se alkaloidy dělí do několika početných skupin. Například pyrrolizidinové alkaloidy (PA) obsahují více než 350 chemických heterocyklických individuí, a ergotové alkaloidy (EA) obsahují více než 70 sloučenin. První skupina alkaloidů je produkována rostlinami, zatímco druhá skupina parazitujícími houbami. Obě skupiny jmenovaných alkaloidů tedy mohou být přítomny v materiálu určeném ke zkrmování, nebo k výrobě potravin. Tyto alkaloidy představují vážné riziko pro zdraví lidí a zvířat, a proto je nezbytné jejich výskyt sledovat.

Tato studie představuje rychlou, jednoduchou a citlivou metodu umožňující identifikaci a kvantifikaci PA a EA v krmivech a v surovinách pro jejich výrobu. Vybrané PA (monokrotalin, senkirkin, senecionin, seneciphyllin a retrorsin) spolu s vybranými EA (ergokrystin, ergokryptin, ergosin, ergokornin a jejich odpovídající izomery) jsou analyzovány pomocí ultra-účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UPLC-MS/MS). Příprava vzorků pro tuto analýzu je založena na modifikované QuEChERS metodě. Přesnost, správnost, specificita, limit detekce a limit kvantifikace byly ověřeny během validace.

Metoda byla použita pro analýzu vzorků krmiv a surovin pro jejich výrobu pocházejících z české zemědělské produkce. Na základě množství jednotlivých skupin alkaloidů byly pícniny a další objemná krmiva vyhodnocena jako možné zdroje kontaminace PA, zatímco obiloviny byly především zdrojem EA kontaminace.

R 37

TOXICKÉ SEKUNDÁRNÍ METABOLITY BRAMBOR – FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ JEJICH HLADINY

Krtková V., Schulzová V., Hajšlová J.
Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6

Klíčová slova: kalysteginy, glykoalkaloidy, brambory, U-HPLC-MS/MS

Úvod

Hlízy brambor obsahují řadu biologicky aktivních látek s pozitivními i negativními (toxické sekundární metabolity) účinky. Mezi toxické sekundární metabolity řadíme glykoalkaloidy (GA) a nortropanové alkaloidy kalysteginy (CAL), které rostlina produkuje jako obranu před působením vnějších vlivů. Vznik těchto látek v hlízách brambor může být ovlivněn mnoha faktory (stres rostliny během pěstování, mechanické poranění při sklizni či špatné podmínky při skladování). Hladiny GA a CAL v hlízách brambor mohou být dále ovlivněny odrůdou, způsobem pěstování, lokalitou pěstování, klimatickými podmínkami a případným ošetřením hlíz brambor proti škůdcům.

Cíl práce

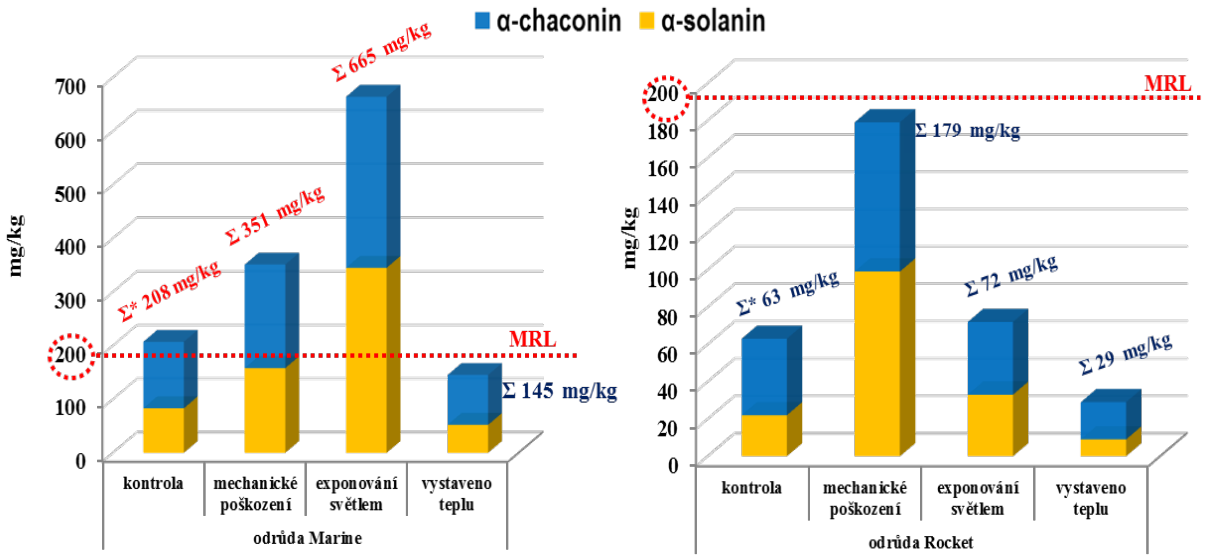
Cílem dlouhodobé realizované studie (r. 2008 – 2012) bylo srovnání obsahu významných a zdraví prospěšných látek stejně jako sloučenin představující hygienicko – toxikologické riziko v hlízách brambor. Hladiny těchto látek byly sledovány u dvou českých odrůd brambor: velmi rané odrůdy Finka a rané odrůdy Katka. Brambory byly pěstovány ve dvou lokalitách (Praha Uhříněves a Leškovice). Dále byla realizována krátkodobá studie, kdy byly sledovány změny hladin GA (α-chaconin a α-solanin) a CAL (A3, B2 a B4) v 21 švédských odrůdách brambor z ekologického a konvenčního zemědělství. Hlízy byly podrobeny (i) mechanickému posklizňovému poranění, (ii) exponovány světlu a (iii) skladovány při zvýšené teplotě.

Analytická metoda

K 5 g homogenizovaných hlíz brambor bylo přidáno 80 ml extrakčního činidla (50% metanol) a 30 min intenzivně třepáno. Směs byla poté přefiltrována a vzniklý extrakt byl extrakčním činidlem doplněn na výsledný objem 100 ml. Ke stanovení glykoalkaloidů a kalysteginů byla využita optimalizovaná a validovaná metoda ultra-účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (U-HPLC - MS/MS). Pro separaci byla využita analytická kolona Atlantis® HILIC Silica (100 x 3 mm; 3 μm) a jako mobilní fáze směs acetonitrilu a 20 mM octanu amonného, gradientová eluce.

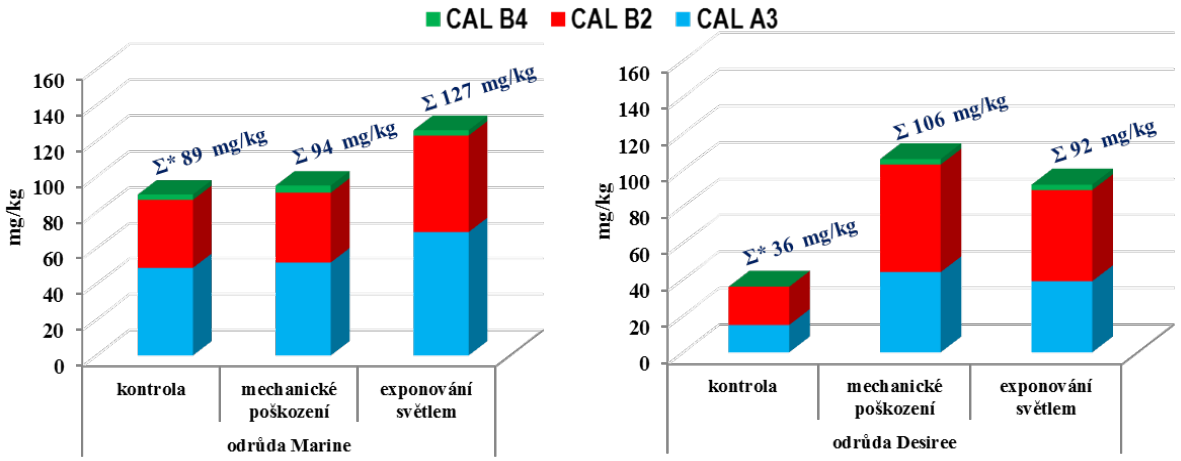
Výsledky a diskuze

Studie I: Obsah GA (Σ α-solanin a α-chaconinu) a CAL (Σ A3, B2 a B4) byl sledován u 21 švédských odrůd brambor, kdy byly hlízy brambor jednotlivých odrůd exponovány světlu, teplu a mechanicky poškozeny. Pro každou odrůdu byl testován i kontrolní vzorek (bez poškození). Zvýšený obsah GA byl zaznamenán u hlíz brambor, které byly mechanicky poraněny či exponovány světlu. Na **Obrázku 1** je ukázána změna obsahu GA v závislosti na poškození hlíz, vybrány dva příklady. U odrůdy Marine obsah GA překročil hygienický limit 200 mg/kg č.h. již v kontrolním vzorku. V druhém případě u odrůdy Rocket byl obsah GA jak u kontroly, tak u hlíz po poškození či exponování světlu a teplu pod daným hygienickým limitem. Změny hladin CAL v závislosti na mechanickém poškození a exponování světlu jsou pro vybrané odrůdy brambor ukázány na **Obrázku 2**. Významné změny v obsahu CAL byly zaznamenány pouze u kalysteginu B4, nicméně mechanické poranění či expozice světlu neměly na celkový obsah CAL významný vliv.



Σ α-solaninu a α-chaconinu v analyzovaném vzorku*

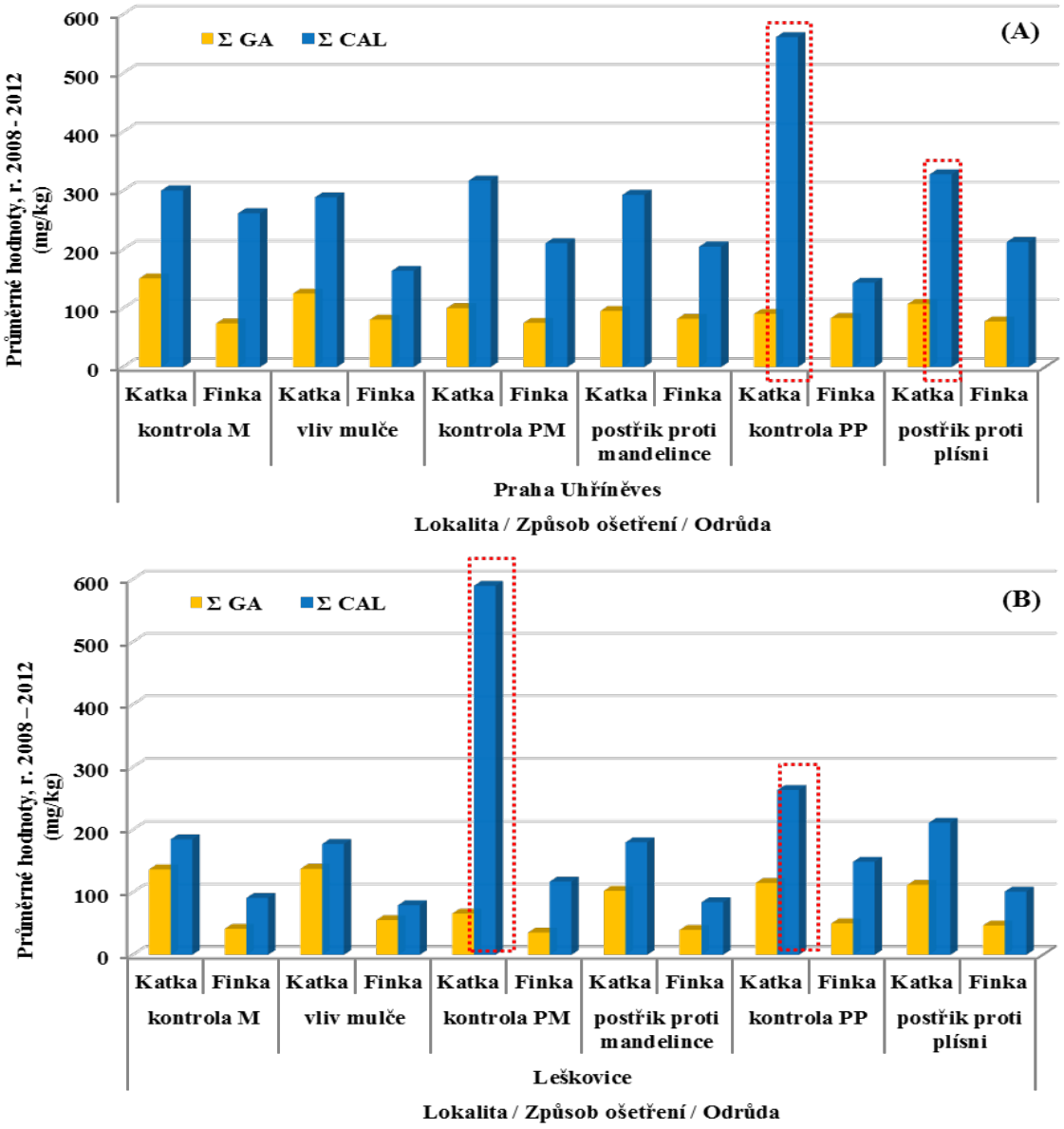
Obrázek 1: Obsah GA v odrůdách švédských brambor v závislosti na různém způsobu poškození hlíz.



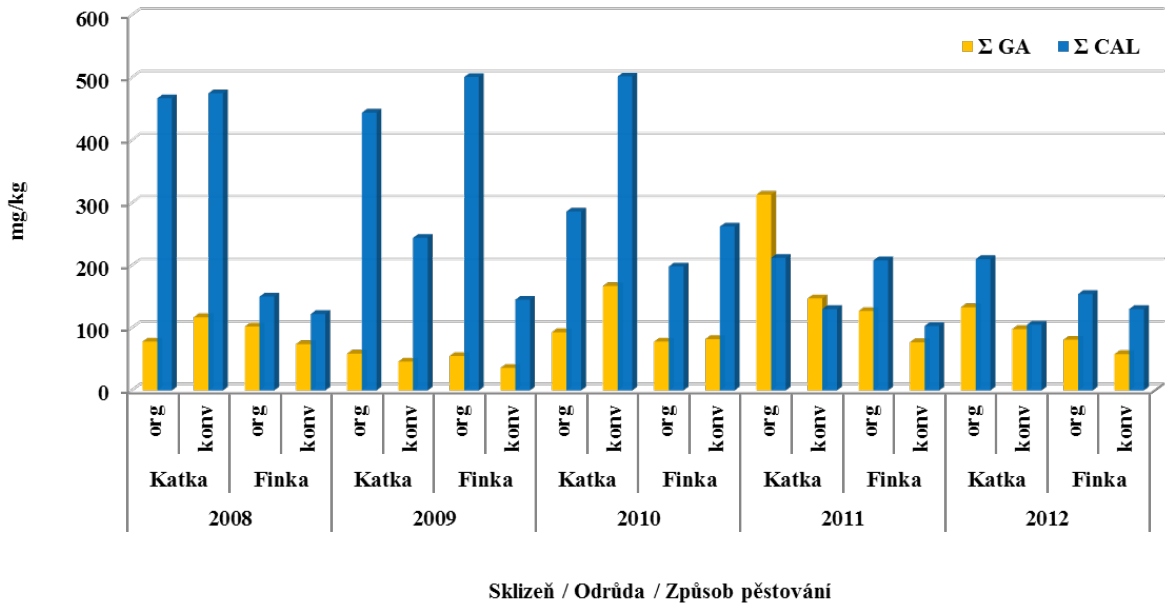
Σ CAL A_3, B_2 a B_4 v analyzovaném vzorku*

Obrázek 2: Obsah CAL v odrůdách švédských brambor v závislosti na různém způsobu poškození hlíz.

Studie II: Hladiny GA a CAL byly sledovány v závislosti na způsobu ošetření hlíz brambor. Byly testovány dvě české odrůdy (Katka a Finka) ze dvou lokalit (Leškovice a Praha Uhříněves). Vyšší hladiny těchto látek byly zaznamenány u odrůdy Katka z obou lokalit. U odrůdy Katka z lokality Praha Uhříněves byly vyšší hladiny CAL zaznamenány u hlíz brambor po aplikaci postřiku proti plísni bramborové a v kontrole k tomuto experimentu. U odrůdy Katka z lokality Leškovice byly nejvyšší hladiny CAL v hlízách brambor sloužící jako kontrola k aplikaci postřiku proti mandelince a plísni bramborové. Obecně se dá konstatovat, že vyšší hladiny CAL byly nalezeny v kontrolních hlízách brambor. Získané průměrné hodnoty GA a CAL (r. 2008 – 2012) jsou shrnuty na **Obrázku 3**. Při porovnání hladin GA a CAL v závislosti na způsobu pěstování brambor nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly (t-test, $\alpha = 0{,}05$) mezi organickým a konvenčním způsobem pěstování (**Obrázek 4**).



Obrázek 3: Porovnání průměrných hladin GA a CAL ve dvou odrůdách brambor v závislosti na způsobu ošetření (A: lokalita Praha Uhříněves, B: lokalita Leškovice).



O**brázek 4:** Porovnání hladin GA a CAL v závislosti na způsobu pěstování hlíz brambor.

Závěr

Studie I: Mechanické poškození hlíz vedlo k významnému nárůstu hladin GA o 50 až 320 %. Po exponování hlíz světlem vzrostly hladiny GA až o 480 %. Skladování hlíz brambor za zvýšené teploty vedlo ke snížení hladin GA u většiny odrůd. U třech odrůd bez poškození (kontrola) byl překročen hygienický limit 200 mg/kg č.h. Hladiny CAL u hlíz po mechanickém poškození vzrostly o 104 až 294 %. Exponování hlíz světlu vedlo k nárůstu hladin CAL o 117 až 146 %. Získané výsledky byly publikovány v květnu 2013 v Journal of Agricultural and Food Chemistry.

Studie II: Za celou dobu sledování (r. 2008 – 2012) obsahu GA byl hygienický limit 200 mg/kg č.h. překročen pouze ve 4 případech, vždy se jednalo o odrůdu Katka. Významný vliv na hladiny toxických sekundárních metabolitů má odrůda, lokalita pěstování a projevují se také klimatické podmínky (variabilita mezi jednotlivými roky, teplota, srážky, UV záření,…). Způsob pěstování hraje při ovlivňování hladin GA a CAL méně důležitou roli.

Poděkování

Tato studie vznikla za podpory projektů (i) NAZV QH82149, (ii) MŠMT MSM 6046137305 a (iii) účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20/2014)

Literatura

1. Petersson E. V., Arif U., Schulzova V., Krtkova V., Hajslova J., Meijer J., Andersson H. CH., Jonsson L., Sitbon F.: Glycoalkaloid and calystegine levels in table potato cultivars subjected to wounding, light, and heat treatments, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2013**, 61, 5893-5902.
2. Friedman M. J.: Potato glycoalkaloids and metabolites: Role in the plant and in the diet, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 8655-8681.
3. Andersson C.: Calystegine alkaloids in Solanaceaous food plants, *TemaNord*, **2002**, 513, 1-54.

P 1

APLIKACE HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE V OTEVŘENÉM PROSTORU PRO HODNOCENÍ REZISTENCE CEREÁLIÍ VŮČI NAPADENÍ MIKROMYCETAMI R. *FUSARIUM*

Džuman Z. Slavíková P., Jírů M., Vepříková Z., Zachariášová M., Hajšlová J.
Ústav chemie a analýzy potravin, Technická 3, 166 28, Praha-Dejvice

Úvod:

Mezi významné negativní vlivy v produkci obilovin patří působení mikromycet rodu *Fusarium*. Onemocnění způsobené těmito mikromycetami jsou obecně nazývány fusariózy [1]. Nejrozšířenějšími druhy fusarií způsobujících fusariózy jsou *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* a *F. poae* [2]. Výskyt fusarií a následná produkce jejich toxických sekundárních metabolitů – mykotoxinů – je ovlivněna celou řadou faktorů, mezi něž patří především a teplotní podmínky během růstu a typ předplodiny [3]. Rozvoj infekce lze do jisté míry ovlivnit výběrem vhodné odrůdy pěstované obiloviny a předplodiny, aplikací pesticidních přípravků a skladovacími podmínkami [2, 4]. Metabolomické profilování je novým přístupem, který lze využít pro posouzení míry napadení mikromycetami. Principem této techniky je cílová či necílová analýza nízkomolekulárních látek vzorku (metabolomu). Pokud při měření nedochází k identifikaci těchto látek, jde o metabolomický fingerprinting. Pro analýzu metabolomického profilu či fingerprintu se často využívá kombinací chromatografických a hmotnostně-spektrometrických technik [5 – 7]. V této studii bylo využito přístupu metabolomického fingerprintingu pro studování širokého souboru vzorků přirozeně kontaminované pšenice. Pro tento experiment byla využita technika přímé analýzy v reálném čase (direct analysis in real time, DART) s hmotnostně-spektrometrickou detekcí s vysokorozlišovacím analyzátorem typu orbitální iontová past (orbitrap). Značnou předností této techniky je velmi nízký čas analýzy umožňující rychlé zjištění výsledků. Naměřená data byla zpracována statistickou analýzou hlavních komponent (principal component analysis, PCA), která slouží k redukci původního množství dat za účelem zjištění jejich struktury s cílem zachování co největšího množství informací a následně lineární diskriminační analýzou (linear discriminant analysis, LDA), která slouží k vytvoření požadovaných modelů pro klasifikaci analyzovaných vzorků.

Uvedená studie byla uskutečněna za finanční podpory projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky QI111B044.

Cíl studie:

Cílem této studie je aplikace metabolomického fingerprintingu na soubor vzorků pšenice s využitím techniky hmotnostní spektrometrie (MS) v otevřeném prostoru s přímou analýzou v reálném čase za účelem vytvoření statistických modelů (SIMCA) pro klasifikaci vyšetřovaných vzorků dle i) detekce pathogenu *F. graminearum*, ii) detekce mykotoxinu deoxynivalenolu (DON) a iii) poškození zrn pšenice.

Vzorky:

Pro přímou analýzu DART–MS byl využit široký soubor 60 vzorků přirozeně kontaminované pšenice pocházející z mnoha lokalit v rámci celé České Republiky. Před provedením vlastního měření byly vzorky analyzovány na míru kontaminace mykotoxinem deoxynivalenolem, dále pak míru poškození zrn pšenice a výskyt mikromycet r. *Fusarium*.

Chemikálie, materiál:

- methanol, HPLC gradient, *Merck (Německo)*
- technické plyny: dusík 5.0, dusík 4.0, *Linde Technoplyn (ČR)*
- PTFE kyvety (50 ml), *Merci (ČR)*
- PTFE mikrofiltry (0,22 μm), *Ciro (USA)*
- kovová mřížka DART s 96 jamkami, *IonSense (USA)*

- instrumentace sestávající se z iontového zdroje DART a vysokorozlišovacího hmotnostního spektrometru ExactiveTM, *IonSense (USA)* a *Thermo Fisher Scientific (USA)*

Příprava vzorku a instrumentální analýza:

Homogenizované vzorky byly zpracovány s využitím optimalizované extrakce směsí methanolu s vodou (1:1, v/v) po dobu 30 minut. Vzorky byly poté odstředěny (5 min, 10,000 RPM), supernatant (1 ml) odebrán a přefiltrován s využitím PTFE mikrofiltru (0,22 μm). Následovalo odebrání do vialky, takto byl vzorek připraven pro instrumentální analýzu.

Po extrakci vzorku byly 3 μl každého vzorku naneseny na kovovou mřížku, na kterou je možné nanést až 96 vzorků v rámci jednoho měření. Po zaschnutí vzorku byla mřížka vsunuta mezi iontový zdroj a vysokorozlišovací hmotnostní spektrometr Exactive^{TM} a vzorky změřeny za předem optimalizovaných podmínek shrnutých v **Tab. I**.

Tab. I: Podmínky měření DART–MS

Ionizace	DART
Ionizační mód	pozitivní
Hmotnostní rozsah *m/z*	50 – 4000
Rozlišení	50,000 FWHM
Teplota desorpce	300°C
Desorpce vzorku	7 s

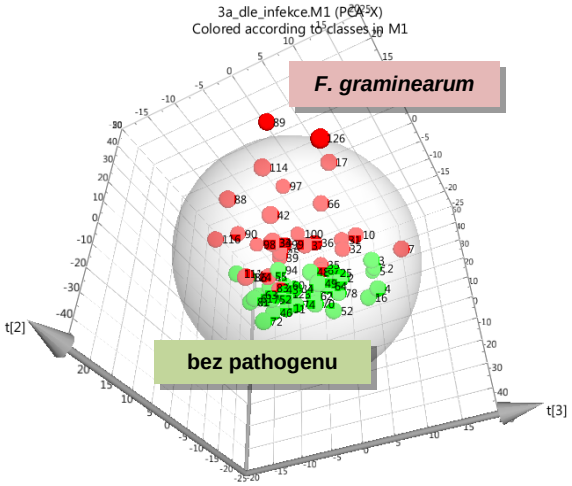
Statistická analýza:

Prvním krokem zpracování dat je výběr intenzivních odezev z hmotnostních spekter analyzovaných vzorků pro všechny analyzované vzorky, tzv. markerů. Následuje zpracování primárních dat pro všechny vzorky spočívající v normalizaci obsáhlého souboru dat a dále metodami pokročilé statistické analýzy s využitím programu SIMCA (*Unimetrics, USA*). První metodou použitou pro zpracování dat byla analýza hlavních komponent (PCA) která slouží k redukci původního souboru dat za současného zachování co největšího množství původní informace. Redukovaná data jsou poté zpracována lineární diskriminační analýzou (LDA) za účelem vytvoření modelů, které jsou později validovány a na základě kterých by bylo možné klasifikovat analyzované vzorky dle detekce pathogenu *F. graminearum*, kontaminace deoxynivalenolem či míry poškození zrn pšenice.

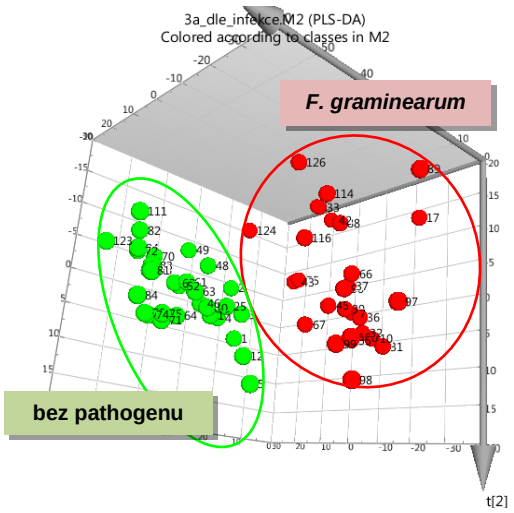
Výsledky a diskuze:

1. Klasifikace vzorků dle detekce pathogenu F. graminearum

Jak je patrné z **Obr. 1**, jehož osy tvoří tzv. hlavní komponenty (PC) nesoucí informace o míře rozdílu mezi zamýšlenými skupinami, vzorky vykazují částečný rozdíl mezi těmi, u kterých byly detekovány mikromycety *F. graminearum* a vzorky prostými kontaminace mikromycetami. Po zpracování redukovaných dat LDA (**Obr. 2**) a následnou validací vytvořeného modelu bylo zjištěno, že je možné klasifikovat neznámé vzorky pšenice s pravděpodobností přesahující 92%.



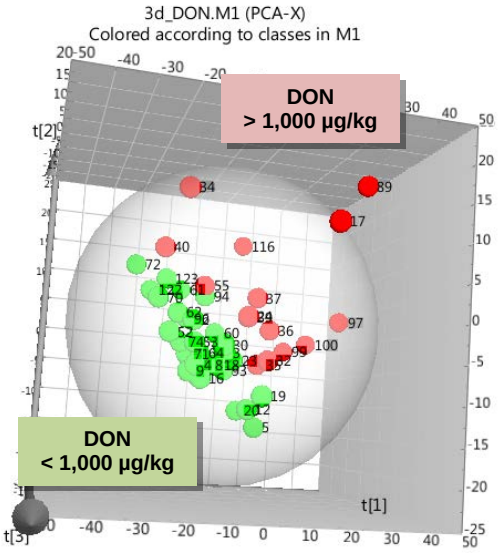
Obr. 1: Grafický výstup PCA analýzy



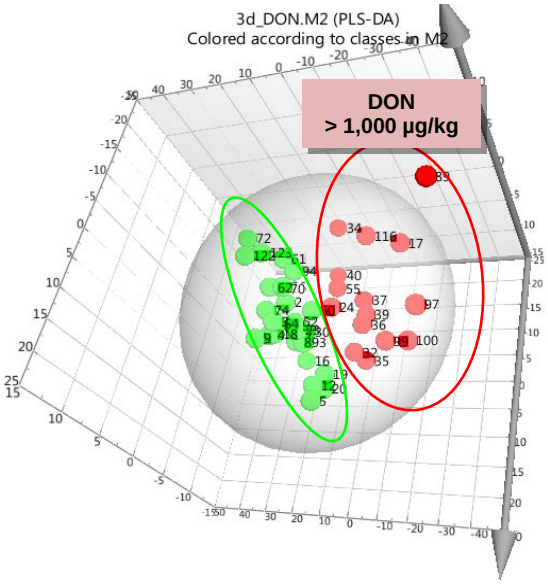
Obr. 2: Grafický výstup LDA analýzy

2. *Klasifikace vzorků dle detekce deoxynivalenolu*

Po stanovení deoxynivalenolu v analyzovaných vzorcích byly vytvořeny skupiny vzorků (i) nižší a (i) přesahující koncentraci 1000 µg/kg. Jak je patrné z grafického výstupu PCA analýzy (**Obr. 3**) naznačující možné rozdělení vzorků dle kritéria míry kontaminace deoxynivalenolem i následné LDA analýzy (**Obr. 4**), v tomto případě je možné bezpečně rozlišit vzorky pšenice s vysokou kontaminací od méně kontaminovaných. Předpoklad byl potvrzen po validaci vytvořeného modelu s pravděpodobností správné klasifikace vzorků 100%.



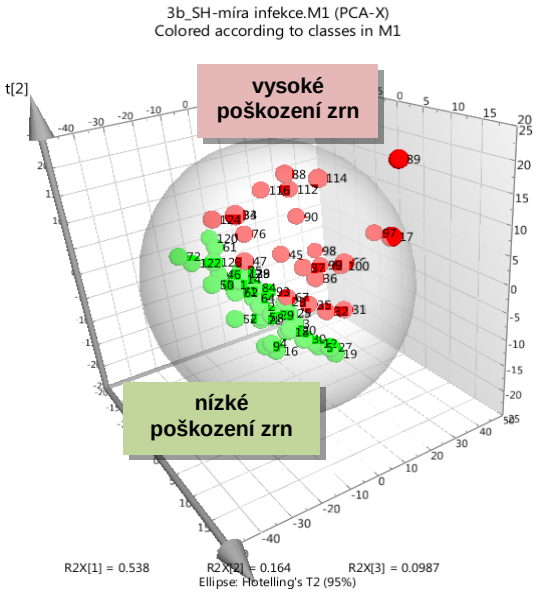
Obr. 3: Grafický výstup PCA analýzy



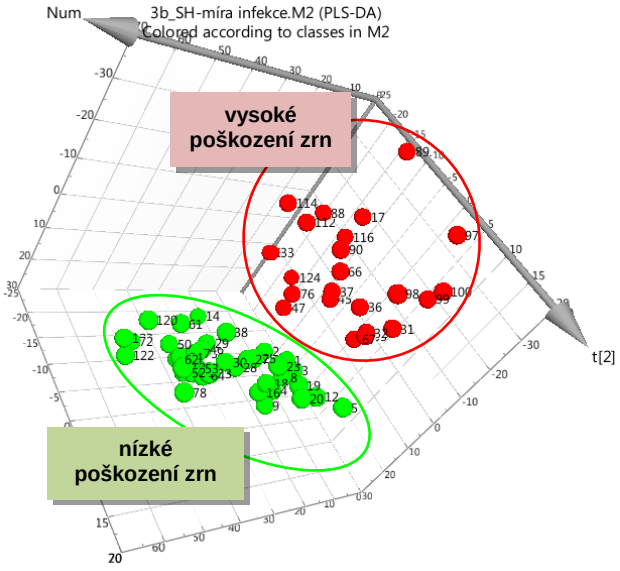
Obr. 4: Grafický výstup LDA analýzy

3. *Klasifikace vzorků dle poškození zrn pšenice*

Po rozdělení větší části vyšetřovaných vzorků na skupiny zahrnující vzorky s vysokým poškozením zrn a na vzorky bez poškození a zpracování těchto dat PCA (**Obr. 5**) bylo zjištěno, že s využitím techniky DART–MS dle tohoto kritéria je zřejmě možné rozlišit případné neznámé vzorky pšenice. Po zpracování dat LDA, jehož grafický výstup je uveden na Obr. 6 a validaci vytvořeného modelu bylo zjištěno, že je možné klasifikovat vzorky dle poškození zrn s pravděpodobností přesahující 90%.



Obr. 5: Grafický výstup PCA analýzy



Obr. 6: Grafický výstup LDA analýzy

Literatura:

1. Siuda R., Grabowski A., Lenc L., Ralcewicz, Spichaj-Fabisiak E. (2012): *Influence of the degree of fusariosis on technological traits of wheat grain*. Int. J. Food Sc. Tech. 45: 2596-2604
2. Müllenborn C., Steiner U., Ludwig M., Oerke E.C. (2008): *Effect of fungicides on the complex of Fusarium species and saprophytic fungi colonizing wheat kernels*. Eur. J. Plant Path. 120: 157-166
3. Champeil A., Doré T., Foubert J.F. (2004): *Fusarium head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by Fusarium in wheat grains*, Plant Sci., 166: 1389-1415
4. Hussein H.S., Brasel J.M. (2001): *Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals*. Toxicology 167: 101-134
5. Hamzehzarghani H., Kushalappa A.C., Dion Y., Rioux S., Comeau A., Yaylayan V., Marshall W.D., Mather D.E. (2005): *Metabolic profiling and factor analysis to discriminate quantitative resistance in wheat cultivars against fusarium head blight*. Physiol. Mol. Pl. Path. 66: 119-133
6. Hajslova J., Cajka T., Vaclavik L. (2011): *Challenging applications offered by direct analysis in real time (DART) in food-quality and safety analysis*. Trends Anal. Chem. 30: 204-218
7. Mercier P., Lewis M.J., Chang D., Baker D., Wishart D.S. (2011): *Towards automatic metabolomic profiling of high-resolution one-dimensional proton NMR spectra*. J. Biomol. NMR 49: 307-323

P 2

VYUŽITÍ REOLOGICKÉHO SYSTÉMU MIXOLAB PŘI DETEKCI ZMĚN PEKAŘSKÉ KVALITY OZIMÉ PŠENICE S RŮZNOU INTENZITOU KONTAMINACE *FUSARIUM* SPP.

Capouchová I. (1), Papoušková L. (2), Škeříková A. (1), Konvalina P. (3), Janovská D. (2), Václavíková M. (4), Prokinová E. (1)

Česká zemědělská univerzita v Praze; (2) Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.; (3) Zemědělská fakulta JU v Českých Budějovicích; (4) Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha

Reologický systém Mixolab (Chopin) je špičkové laboratorní zařízení, schopné kompletně chatakterizovat vlastnosti mouky. Cílem naší práce bylo zhodnotit reologické vlastnosti souboru vzorků pšeničných mouk s pekařskou jakostí ovlivněnou v důsledku různé intenzity kontaminace Fusarium spp., indikované různou koncentrací deoxynivalenolu a zjistit korelace mezi charakteristikami Mixolabu a dalšími jakostními parametry zrna pšenice a pšeničných mouk (charakteristiky farinografu, obsah N-látek a mokrého lepku, Zeleny test, číslo poklesu, měrný objem pečiva). Mixolab velmi citlivě detekoval vzorky s různou úrovní kontaminace Fusarium spp.; při zvyšující se intenzitě kontaminace Fusarium spp. docházelo ke zhoršování hodnot reologických charakteristik. Charakteristiky obou částí křivky mixolabu (protein a škrob) vykázaly těsné korelace s hodnotami farinografu (r = 0,64* - 0,89**) i dalšími jakostními parametry zrna pšenice a pšeničných mouk, zejména se Zelenyho testem (0,80** - 0,91**), číslem poklesu (0,56* - 0,83**) a měrným objemem pečiva (0,62 - 0,79**). Těsné korelace byly rovněž zaznamenány mezi obsahem deoxynivalenolu a charakteristikami křivky mixolabu.

P 3

NOVÉ A NETRADIČNÍ VYUŽITÍ JEČMENE V POTRAVINÁŘSTVÍ

Sluková M.[1], Honců I.[1], Příhoda J.[1], Smrž F.[2], Horáčková Š.[3], Krejčířová L.[1]
[1)] Ústav sacharidů a cereálií, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
[2)] Zeelandia spol. s r.o., Malšice 267, 391 75 Malšice
[3)] Ústav mléka, tuků a kosmetiky, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6

Ječmen je v současnosti čtvrtou nejpěstovanější plodinou na světě. Na území, kde se dnes rozkládá Česká republika, se podle údajů z archeologických nalezišť ječmen pěstuje údajně už 5000 let. Před několika staletími byl ječmen na našem území hlavní semílanou surovinou dále používanou zejména pro pekařské účely, i když pečivo nemělo charakter klenutého bochníku. Z ječmene se v minulosti připravovala ječná mouka, z mouky lívance, palačinky a vdolky, dále chléb ze směsi ječmene, žita nebo i pšenice a také různé kaše. Později ječmen vytěsnila pšenice. Ječmen zůstal jen ve výživě chudších vrstev a byl využíván převážně v období krize. Pražený ječmen se používal a stále používá jako náhražka kávy nebo barvivo.

V dnešní době je v ČR potravinářský ječmen využíván hlavně jako surovina na výrobu sladu a piva, v malém množství se zpracovává na kroupy různých velikostí (kroupy, krupky, lámanka) a vločky. Novinkou je přídavek ječné mouky do receptury sušenek nebo oplatek. Ječná mouka je také součástí instantních směsí na přípravu ječných lívanců, palačinek a kaší (*ready to eat*). Ječmen a jeho produkty mohou být tepelně nebo enzymově upraveny a přidávány do řady vícezrnných nebo speciálních chlebů, běžného a jemného pečiva nebo do snídaňových směsí (tzv. *breakfast cereals*).

V porovnání s pšeničným pečivem nebyly a nejsou ječné výrobky tak atraktivní a senzoricky přijatelné. Avšak ječmeni a jeho mlýnským produktům je potřeba věnovat pozornost zejména z výživového a zdravotního hlediska. Ječmen je významným zdrojem vlákniny potravy (až 16 %), konkrétně ve vodě rozpustných beta-glukanů (obsah až 5 %) se smíšenými vazbami beta-(1,3)(1,4), které vykazují řadu pozitivních zdravotních efektů. Konzumace potravin obsahující ječmen působí příznivě v prevenci závažných civilizačních onemocnění (diabetes mellitus 2. typu, srdečně-cévní onemocnění) a při řadě zdravotních obtíží (trávicí potíže, nadváha, obezita, zácpa). Pozitivní vliv ječné vlákniny a ječných beta-glukanů na lidské zdraví potvrdila řada klinických studií. Na základě ověřených výsledků těchto studií byla pro vlákninu a beta-glukany ječného zrna schválena 3 zdravotní tvrzení a podmínky pro používání těchto zdravotních tvrzení při označování potravin (nařízení EU č. 432/2012). V dnešní hektické, uspěchané době plné stresů a napětí je konzumace výrobků s ječnou složkou velmi žádoucí pro udržení zdraví a pohody.

Cílem práce bylo vyvinout a zhodnotit (analyticky i senzoricky) cereální výrobky s přídavkem ječmene. Dále byly prakticky ověřeny možnosti úpravy ječmene (celé nebo obroušené zrno, mouka, vybrané mlýnské frakce, tepelná úprava ječných surovin nebo meziproduktů apod.) pro výrobu nových potravin s ječmenem.

V rámci aktivity České technologické platformy pro potraviny Potravinářské komory ČR, výzkumných ústavů, vysokých škol a průmyslových partnerů „Renesance ječmene“ se ječmen opět dostal do popředí zájmu pekárenské výroby. Z ječné mouky, kvasu a krup (ječné zápary) byl vyroben pšenično-ječný chléb *Mr. Barley*, který se se svými nutričními vlastnostmi řadí mezi vícezrnné chleby s významným obsahem vlákniny (11,0 %) a beta-glukanů (2,8 %). Pravidelná konzumace 3 plátků tohoto vícezrnného chleba (100 g chleba) naplní doporučenou denní dávku beta-glukanů pro prevenci výše uvedených zdravotních potíží. Dalšími experimentálně připravenými pekařskými výrobky s ječnými složkami byly bagety (obsah vlákniny 5,9 %), muffiny (obsah vlákniny 3,5 %, senzoricky nejlépe hodnocené pekařské výrobky), vdolky (obsah vlákniny 4,0 %), linecké sušenky (obsah vlákniny 1,2 %), sladké koláče a rohlíky a další. Ječmen byl použit také jako surovina na výrobu extrudovaných výrobků („plátkové chleby“, obsah vlákniny 17,3 %) a různě tvarovaných cereálních *snack* výrobků (obsah vlákniny kolem 9 %). V gastronomii byly některé ječné produkty použity jako zahušťovadla (zejména tepelně zpracované ječné mouky) nebo jako zavářky do polévek (kroupy a krupky) apod.

Nové netradiční aplikace obrouseného ječného zrna v mlékárenské malovýrobě spočívaly v přídavku různě ochucených ječných perel, perliček a krup do jogurtů, do čerstvých sýrů a tavených sýrů (obilno-mléčné produkty). V rámci experimentu byly senzoricky hodnoceny sladké a slané ječné perly, perly se skořicí, s rozinkami, s ořechy a medem a s borůvkovým a jahodovým gelem. Ječné perly a kroupy obohacují jogurty o rozpustnou (bobtnající) vlákninu, což je z výživového hlediska velice prospěšné. Navíc mají perly a kroupy vliv na příjemnou, specifickou chuť a konzistenci mléčného výrobku. Drobnější ječné perličky (slané, sladké a s různými druhy koření a bylinek) byly také použity jako surovina při výrobě tavených sýrů. Ječné perličky dodávaly tavenému sýru neobvyklou, avšak příjemnou chuť. Přidané perličky byly příjemné na skus, byly viditelné ve struktuře sýra a zároveň byl tavený sýr snadno roztíratelný. V případě přípravy čerstvých sýrů byly použity jemné nebo hrubé ječné perličky v chuťových variacích: slané, sladké, s paprikou a s provensálským kořením.

Dalším inovativním využitím ječmene v potravinářství bylo biotechnologické (fermentační) zpracování ječných surovin za účasti potravinářsky významných mikroorganismů. Pomocí biotechnologických procesů je možné upravit mlýnské obilné produkty a vytvořit tak zcela nové produkty s řadou přidaných funkcí (Lappi *et al.*, 2010; Katina *et al.,* 2007; Katina *et al.,* 2006; Marklinder *et al.,* 1996 a další). V cereální technologii jsou fermentační technologie zpracování obilovin (zejména žita a pšenice) na kvasy tradiční záležitostí jak v ČR, tak i v zahraničí. Žitný kvas se připravuje smícháním žitné mouky a vody, a ponecháním při pokojové teplotě dojde díky kvasinkám a bakteriím přirozeně přítomných v mouce ke spontánní fermentaci. Po určité době se vyzrálý kvas dávkuje do chlebového těsta. Při fermentaci dochází k tvorbě oxidu uhličitého a dalších organických sloučenin (aldehydy, alkoholy, organické kyseliny). Tyto sloučeniny mají vliv na bohatou chuť a vůni chleba a také na jeho delší trvanlivost. Jak již bylo uvedeno, příprava a využití žitných kvasů (v zahraničí i pšeničných) nejsou žádnou novinkou. V případě využití ječmene na přípravu kvasů se však jedná o netradiční a novou technologickou úpravu. Novinkou je tedy nejen využití ječné mouky, krup nebo otrub (odpad mlýnské výroby), ale také aplikace některých mikroorganismů, které nejsou obvykle využívány v cereální technologii. Jedná se zejména o bakterie propionového kvašení, což jsou bakterie používané v mlékárenské výrobě při výrobě sýra ementálského typu způsobující charakteristická „oka“ ve struktuře sýra. Smícháním hladké nebo celozrnné ječné mouky nebo jemně mletých ječných otrub s vodou a vybranými kvasinkami a bakteriemi mléčného a propionové kvašení byly připraveny ječné kvasy (tekuté, pastovité i práškové kvasy). Během fermentačního procesu vznikly v ječných kvasech organické kyseliny s krátkým řetězcem (zejména kyselina mléčná, octová, propionová nebo fenyloctová) a cyklické dipeptidy působící jako antimikrobiální (konzervační) látky (látky inhibující růst nežádoucích mikroorganismů v potravině) a po přídavku takto připravených kvasů do receptury chleba prodlužily jeho trvanlivost až na 12 dnů (Sluková *et al.*, 2012).

Během biotechnologické úpravy ječné mouky a ječných otrub došlo ke zvýšení obsahu beta-glukanů (až na 7 % v sušině) a celkové vlákniny potravy, také k navýšení obsahu celkových bílkovin a ke změně v podílu bílkovinných frakcí ve prospěch rozpustných bílkovin (albuminů a globulinů) ve srovnání s původními ječnými surovinami. Všechny sledované fermentované ječné produkty vykazovaly výborné sorpční vlastnosti (vysoké hodnoty retenčních kapacit v roztocích různých chemikálií, předpokládá se proto vysoká vaznost vodných roztoků a tvorba stabilních koloidních roztoků nebo gelů). Při zpracování těsta zajistily fermentované ječné produkty rovnoměrnou distribuci vody a její pevné navázání ve struktuře těsta a tím snížily lepivost těsta.

Další pracovní aktivitou bylo sledování vlivu procesů zpracování (pražení a extruze) na složení ječné suroviny (mouky, šroty a otruby). U analyzovaných surovin byly sledovány změny v obsahu beta-glukanů a vlákniny potravy během uvedených tepelných procesů. Během pražení ječných otrub a celého ječného zrna ve fluidním loži došlo jen k nepatrnému navýšení obsahu beta-glukanů a rozpustné vlákniny. Naopak obsah nerozpustné a celkové vlákniny se během pražení významně zvýšil. U pražené ječné mouky souvisel rozsah navýšení obsahu vlákniny s původem frakce (z jaké části ječného zrna frakce pocházela) a s velikostí (granulací) moučné frakce. Při dvojnásobném pražení docházelo k poklesu obsahu beta-glukanů i složek vlákniny. Výsledky změn v obsahu

vlákniny a beta-glukanů jsou v souladu s údaji uvedenými v literatuře (Gajula *et al.*, 2008; Vasanthan *et al.*, 2002 a další). Během tepelných a termomechanických procesů dochází ke změně v obsahu, složení a fyzikálních vlastností vlákniny potravy a ke změně jednotlivých složek vlákniny. Dochází k uvolnění a degradaci některých vázaných složek, což může vést ke snížení obsahu vlákniny (modifikace struktury molekuly, oddělení bočných řetězců od hlavního řetězce apod.). Naopak u rozpustné vlákniny může docházet k procesu transglykosidace a vytvoření komplexních struktur (rezistentní škrob, enzymově rezistentní beta-glukany apod.), což může vést k navýšení obsahu daných složek vlákniny (Duodu, 2014; Průckler *et al.*, 2014, Zhang *et al.*, 2011; Gajula *et al.*, 2008). Díky Maillardovým reakcím může docházet k navýšení obsahu složek odolných vůči trávení v lidském střevě. Nerozpustná složka vlákniny může být naopak během tepelného působení degradována na složky o nižší molekulové hmotnosti a tyto složky mohou být již tráveny pomocí enzymů v organismu, a nemusí být detekovány jako vláknina.

Ječmen jako tradiční obilovina českého zemědělství si zaslouží větší pozornost. Je potřeba využít jedinečného složení a vlastností ječného zrna pro různé zpracovatelské využití v potravinářství. Z tohoto důvodu je nutné stále hledat a nalézat nové postupy zpracování a využití ječmene a rozšířit tak produkci potravin s vyšší kvalitou a vyšší výživovou hodnotou a zejména přijatelnou senzorickou kvalitou. Větší rozsah využití ječmene mohou nabízet nové, šlechtěné odrůdy bezpluchého (nahého) ječmene, u kterého odpadá problém s odstraňováním pluch, což vede k výraznému snížení výrobních nákladů.

Uvedená problematika využití ječmene byla a je řešena v rámci projektu NAZV, QI111B053: „Nové postupy pro využití zemědělských surovin a produkci hlavních druhů potravin zvyšující jejich kvalitu, bezpečnost, konkurenceschopnost a výživový benefit spotřebiteli“.

Seznam použité literatury:

Duodu K.G.: Cereal Foods World, 59, 64 (2014).

Gajula H. *et al.:* Journal of Food Science, 73, 173 (2008).

Katina K. *et al.:* Food Microbiology*, 24*, 175 (2007).

Katina K. *et al.*: LWT-Food Science and Technology, *39*, 479 (2006).

Lappi J.S.E. *et al.*: Journal of Cereal Science, *51*, 152 (2010).

Marklinder I. *et al.*: Food Quality Preferences, *7*, 285 (1996).

Nařízení komise (EU) č. 432/2012 ze dne 16. května 2012, kterým se zřizuje seznam schválených zdravotních tvrzení při označování potravin jiných než tvrzení o snížení rizika onemocnění a o vývoji a zdraví dětí (v konsolidovaném znění platném od 14.12.2012).

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1924/2006 ze dne 20. prosince 2006 o výživových a zdravotních tvrzeních při označování potravin.

Průckler M. *et al.*: LWT-Food Science and Technology, *56*, 211 (2014).

Publikace České technologické platformy pro potraviny, 2012, RENESANCE JEČMENE. ISBN 978-80-905096-0-3. Vydavatel Potravinářská komora České republiky.
(*www.ctpp.cz/cze/file/8cb9aa76c8dcda84b5d5c2afdbe017dd.html*)

Sluková M. *et al.*: Pekař cukrář *10*, 44 (2012).

Zhang D. *et al.*: Advanced Materials Research, 183 (2011).

P 4

ZMĚNY OBSAHU VITAMINU E PŘI SLADOVÁNÍ BEZPLUCHÉHO JEČMENE

Hartman, I., Benešová, K., Sachambula, L., Psota, V:
Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Sladařský ústav Brno, Mostecká7, 614 00 Brno

Úvod

Ječmen, jako tradiční surovina pro výrobu sladu, piva a krmiv pro hospodářská zvířata, je také plodinou s mimořádným významem pro výživu lidí. Díky vysokému obsahu vlákniny byl ječmen zahrnut americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA-Food and Drug Administration) do kvalifikovaného zdravotního tvrzení, týkajícího se prevence kardiovaskulárních chorob (Newman a Newman, 2008).

Obilka ječmene obsahuje vitamin E, komplex vitaminů skupiny B a také řadu látek s antioxidačními vlastnostmi (fenoly).

Enzym superoxiddismutáza (SOD, EC 1.15.1.1.) je řazen do skupiny oxidoreduktas. V zrnu ječmene, je lokalizován především v embryu a v menší míře je součástí i aleuronové vrstvy. Aktivita SOD v zrnu ječmene se mění v závislosti na odrůdě a lokalitě pěstování. SOD hraje důležitou roli nejenom v zrnu ječmene, ale také ve sladu, kde zabraňuje žluknutí během skladování (Bamforth, 1983, Havlová 1999).

Slady a sladové mouky jsou považovány za zdravotně významné potravinové doplňky. Bezpluché odrůdy ječmene jsou pro tyto účely vhodnější, protože jejich zrno lze zužitkovat bez větších technologických úprav prakticky celé (Bhatty 1996). Navíc konzumace celých obilek je významná i tím, že se zužitkuje podstatně vyšší podíl cenných látek, které jsou obsaženy hlavně v povrchových vrstvách obilky.

Materiál a metody

Pro sladování byl použit ječmen bezpluchý (Hordeum vulgare L., subsp. distichon, var. nudum). Bylo provedeno sladování dvou odrůd bezpluchého ječmene (AF Lucius, AF Cesar) pro porovnání rozdílů obsahu zdravotně prospěšných látek.

Byly sladovány vzorky ječmene o hmotnosti 500 g v laboratorní mikrosladovně ve třech opakováních.

Sladování bylo prováděno v laboratorní sladovně firmy KVM. Laboratorní sladovna sestává ze dvou samostatných skříní. Jedna skříň slouží k máčení zrna, včetně vzdušných přestávek, druhá skříň umožňuje klíčení zrna a hvozdění zeleného sladu. Sladovna je řízena vlastním programem s vizualizací. Její kapacita je 16 kg zrna, které může být sladováno v nerezových nádobách v rozsahu 0,25 kg až 8 kg suchého vzorku. Vzorky jsou ve sladovně vždy jedenkrát denně ručně obraceny a promíchány.

Technologie sladování

Délka máčení: 1. den 4 hodiny, 2. den 6 hodin. Třetí den byl obsah vody (stupeň domočení) ve vymáčeném ječmeni upraven na 45 %.

Teplota vody při máčení a teplota ječmene při vzdušných přestávkách a klíčení byla 14 °C. Hvozdění probíhalo na jednolískovém, elektricky vyhřívaném hvozdě 1 x 22 hodin, při teplotě předsoušení 55 °C po dobu 12 hodin a při dotahovací teplotě 80 °C po dobu 4 hodin.

Délka sladování:

4D – máčení a klíčení celkem 4 dny,
5D – máčení a klíčení celkem 5 dnů,
6D – máčení a klíčení celkem 6 dnů,
7D – máčení a klíčení celkem 7 dnů.

Stanovení aktivity vitamínu E bylo provedeno pomocí vysokoúčiné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s fluorescenční detekcí (Benešová et al 2012). Stanovení aktivity enzymu superoxiddismutázy bylo provedeno pomocí soupravy Ransod. (Belcrediová et al 2007). Stanovení obsahu beta-glukanů ve sladu bylo provedeno metodou FIA (EBC 3.10.2).

Výsledky a diskuse

Kvalitativní ukazatele zrna ječmene, které bylo použito pro sladování, jsou uvedeny v tabulce 1. K nejdůležitějším vlastnostem zrna při sladování patří jeho klíčivost, která u obou testovaných odrůd vyhovovala požadavkům na sladovnický ječmen. Z hlediska obsahu dusíkatých látek byl jejich obsah výrazně vyšší u odrůdy AF Cesar.

Tabulka 1: Kvalitativní ukazatele zrna ječmene

Parametr	**Jednotka**	**Ječmen bezpluchý**	**Ječmen bezpluchý**
Odrůda	-	AF Lucius	AF Cesar
Hmotnost tisíce zrn	g	37,5	38,2
Energie klíčení 4 ml / 72h	%	94,0	95,5
Rychlost klíčení	%	90,6	72,7
Energie klíčení 8 ml / 72h	%	98,0	96,3
Klíčivost (H_2O_2)	%	96,5	97,0
Obsah vody	%	15,6	13,2
Obsah dusíkatých látek	%	11,7	16,1
Porostlost (Falling number)	s	335	552

Hodnoty průměrného obsahu tokoferolů, vitaminu E ($mg.kg^{-1}$) ve sladu při různé délce sladování jsou uvedeny v tabulce 2. Ze zjištěných výsledků vyplývá, že u odrůdy AF Cesar byl obsah většiny sledovaných látek (s výjimkou obsahu beta-trienolu a luteinu) vyšší než u odrůdy AF Lucius.

Tabulka 2: Průměrný obsah tokoferolů a vitaminu E při různé délce sladování

Varianta	**delta-T3**	**gama-T3**	**beta-T3**	**alfa-T3**	**delta-T**	**gama -T**	**beta-T**	**alfa-T**	**vit. E**
Jednotka	$mg.kg^{-1}$	$mg.kg^{-1}$	$mg.kg^{-1}$	$mg.kg^{-1}$	$mg.kg^{-1}$	$mg.kg^{-1}$	$mg.kg^{-1}$	$mg.kg^{-1}$	$mg.kg^{-1}$
AF LUCIUS - 4D	0,65	6,28	3,09	16,74	0,27	2,34	0,57	7,88	13,59
AF LUCIUS - 5D	0,66	6,80	3,29	15,97	0,27	2,69	1,56	7,71	13,64
AF LUCIUS - 6D	0,63	6,60	3,24	14,15	0,26	2,52	0,66	7,21	12,21
AF LUCIUS - 7D	0,66	7,73	3,66	20,37	0,27	3,16	0,84	11,43	18,46
Průměr AF LUCIUS	**0,65**	**6,85**	**3,32**	**16,81**	**0,27**	**2,68**	**0,91**	**8,56**	**14,47**
s_x	**0,07**	**0,79**	**0,36**	**3,26**	**0,03**	**0,38**	**0,74**	**2,05**	**2,95**
AF CESAR - 3D	0,77	7,20	2,43	15,59	0,44	3,57	1,06	10,17	15,83
AF CESAR - 5D	0,77	7,50	2,73	13,20	0,45	3,88	0,96	8,22	13,17
AF CESAR - 6D	0,61	7,01	3,05	16,64	0,42	3,64	1,04	10,41	16,41
AF CESAR - 7D	0,87	7,98	3,25	21,27	0,52	4,96	1,37	14,90	22,58
Průměr AF CESAR	**0,76**	**7,42**	**2,86**	**16,67**	**0,46**	**4,01**	**1,11**	**10,92**	**17,00**
s_x	**0,13**	**0,70**	**0,34**	**3,95**	**0,06**	**0,67**	**0,23**	**3,08**	**4,38**

Delší čas sladování se pozitivně projevil na zvýšení obsahu sledovaných látek, i když v některých případech docházelo ke kolísání hodnot v průběhu sladování.

Březinová-Belcredi (2009) uvádí u souboru 20 sladovaných odrůd a linií ječmene jarního aktivitu vitaminu E v rozsahu 11,98 až 20,83 $mg.kg^{-1}$, u alfa-T 4,83 až 8,75 $mg.kg^{-1}$, u delta-T 0,23

až 0,67 mg.kg^{-1}, u alfa-T3 20,66 až 38,28 mg.kg^{-1} a u delta-T3 0,11 až 0,74 mg.kg^{-1}. Námi zjištěné hodnoty se pohybují v uvedených rozmezích s výjimkou izomeru alfa-T, kde byly námi naměřené hodnoty vyšší a u alfa-T3 nižší.

Tabulka 3: Průměrný obsah luteinu, beta-karotenu, SOD a beta-glukanů ve sladu

Varianta	**Lutein**	**Beta-karoten**	**SOD**	**Beta-glukany**
Jednotka	mg.kg^{-1}	mg.kg^{-1}	U.g^{-1}	%
AF LUCIUS - 4D	2,29	0,35	105,0	2,57
AF LUCIUS - 5D	2,83	0,44	139,7	1,99
AF LUCIUS - 6D	3,21	0,52	120,7	1,39
AF LUCIUS - 7D	3,40	0,50	130,3	0,91
Průměr AF LUCIUS	**2,93**	**0,45**	**123,9**	**1,71**
s_x	**0,65**	**0,09**	**14,24**	**0,63**
AF CESAR - 3D	2,19	0,46	91,7	2,96
AF CESAR - 5D	2,41	0,52	91,7	2,65
AF CESAR - 6D	2,17	0,44	86,0	2,28
AF CESAR - 7D	2,55	0,54	145,7	1,78
Průměr AF CESAR	**2,33**	**0,49**	**103,7**	**2,42**
s_x	**0,22**	**0,05**	**28,11**	**0,46**

Hodnoty průměrného obsahu luteinu, β-karotenu, aktivity SOD a beta-glukanů ve sladu při různé délce sladování jsou uvedeny v tabulce 3. Aktivita enzymu SOD byla délkou sladování ovlivněna pozitivně. Obsah β-glukanů ve sladu s délkou sladování klesal. Vyšší aktivitu enzymu SOD měla odrůda AF Lucius. U odrůdy AF Cesar byl patrný pomalejší nárůst aktivity enzymu ve čtvrtém až šestém dní sladování. Hodnoty aktivity SOD jsou srovnatelné s výsledky, které uvádí Belcrediová et al (2006).

Závěr

Z provedených experimentů a jejich zhodnocení vyplývá, že při porovnání rozdílů obsahu zdravotně prospěšných látek při sladování dvou odrůd bezpluchého ječmene, bylo zjištěno, že u odrůdy AF Cesar byl obsah většiny sledovaných látek (s výjimkou obsahu β-trienolu a luteinu) vyšší než u odrůdy AF Lucius. Delší čas sladování se pozitivně projevil na zvýšení obsahu těchto látek. Aktivita enzymu SOD byla délkou sladování ovlivněna pozitivně. Vyšší aktivitu enzymu SOD měla odrůda AF Lucius.

Použitá literatura

Bamforth C. W. (1983): Superoxid dismutase in Barley. J. Inst. Brew., 89: 420-423.

Benešová K., Pluháčková H., Běláková S., Vaculová K., Mikulíková R., Ehrenberegerová J., Březinová-Belcredi N. (2012): Využití moderní separační techniky UPLC ke stanovení vitaminu E v zrnu ječmene. Chem. Listy, 106: 672-676.

Belcrediová, N., Ehrenbergerová, J., Havlová, P. (2006): Enzyme superoxide dismutase in grain of barley and malt. Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis, 54 (2): 7-13.

Belcrediová, N., Ehrenbergerová, J., Prýma, J., Havlová, P. (2007): Stanovení aktivity enzymu superoxidismutasy pomocí soupravy Ransod v rostlinném materiálu. Chem. Listy, 101: 504-508.

Bhatty, R.S. (1996): Production of Food Malt from Hull-less Barley, Cereal Chem., 73: 75-80.

Březinová-Belcredi, N. (2009): Variabilita vybraných antioxidantů v zrnu ječmene jarního. Disertační práce. MZLU v Brně, 117 s.

Havlová P. (1999): Hydrolytické a oxidoredukční enzymy ječného sladu. ÚZPI, Praha, 43 s.

Newman, C.W., Newman, R.K. (2008) Barley for Food and Health: Science, Technology, and Products. 1st edition, USA: Wiley-Interscience, 245 p. ISBN 978-0-470-10249-7.

Poděkování

Výsledky byly získány při řešení projektu NAZV QI111B053 - Nové postupy pro využití zemědělských surovin a produkci hlavních druhů potravin zvyšující jejich kvalitu, bezpečnost, konkurenceschopnost a výživový benefit spotřebitelů.

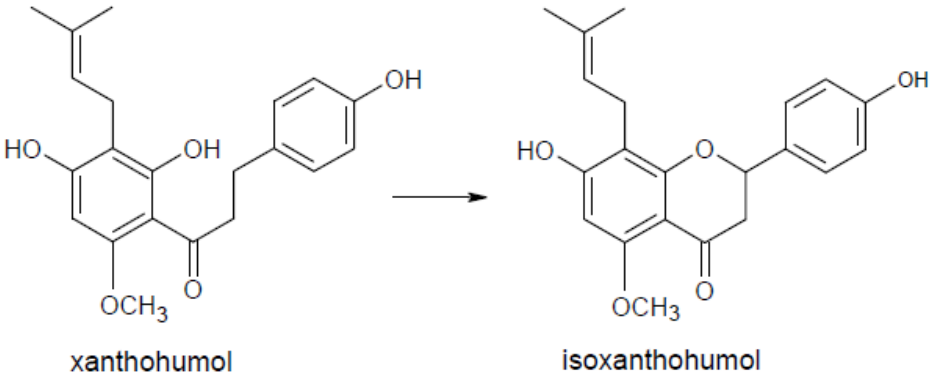
P 5

PIVO SE ZVÝŠENÝM OBSAHEM XANTHOHUMOLU

Hudcová T.[1], Jelínek L. [1], Karabín M. [1], Krofta K. [2], Dostálek P. [1]
[1)] Ústav biotechnologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
[2)] Chmelařský institut s.r.o, Žatec

1. ÚVOD

Chmelové hlávky obsahují kromě pivovarsky cenných složek rovněž řadu dalších sekundárních metabolitů, z nichž se dostávají do popředí zájmu vědecké veřejnosti zejména prenylflavonoidy, a to především v souvislosti se svými prokázanými biologickými účinky [1].
Prenylflavonoidy se řadí do skupiny polyfenolů, nicméně díky své prenylované skupině mají oproti ostatním polyfenolům více nepolární charakter, a hromadí se společně s hořkými kyselinami v lupulinových žlázkách chmele [1]. Xanthohumol je majoritní prenylovaný chalkon chmelových hlávek (0,25-1,1 %hm. v sušině) s prokazatelně pozitivními účinky na lidské zdraví, které zahrnují antioxidační, antiinfekční a antikarcinogenní vlastnosti. Xanthohumol významně brání v rozvoji nádoru v jeho počátečním i pokročilém stádiu, přičemž působí především na buňky lidského karcinomu prsu, vaječníku či tlustého střeva [1].
Hlavní zdroj xanthohumolu ve výživě je pivo, nicméně v průběhu procesu výroby piva dochází k významným ztrátám této látky. Důvodem je zejména jeho špatná rozpustnost ve vodě (1,1 mg/l při 8 °C) a chemická nestabilita. Prostřednictvím isomerace, při které dochází k cyklizaci přes hydroxylovou skupinu, je xanthohumol, za podmínek vysokých teplot zejména v průběhu chmelovaru, přeměňován až z 95 % na isoxanthohumol. Míra isomerační reakce se zvyšuje se vzrůstající teplotou a hodnotou pH. K poklesu obsahu xanthohumolu dochází rovněž během kvašení. Důvodem je zejména sorpce na povrch kvasničných buněk a kalových částic, které jsou následně odstraněny při filtraci. Isoxanthohumol má menší schopnost adsorbovat se na kvasinky, a to především z důvodu rozdílné struktury a rozpustnosti oproti xanthohumolu. Také využití sorpčních stabilizačních prostředků jako je polyvinylpolypyrrolidon má za následek zásadní snížení obsahu xanthohumolu a příbuzných látek. Všechny tyto aspekty vedou k tomu, že využití chmelových prenylflavonidů v pivovarském průmyslu je velice nízké.
Díky pozitivním účinkům prenylflavonoidů na lidské zdraví a vzhledem k velmi nízké koncentraci prenylflavonoidů v běžně komerčně dostupných pivech (pod 0,1 mg/l), byla v uplynulých deseti letech pozornost soustředěna na vývoj nových postupů, jak koncentraci xanthohumolu a ostatních chmelových prenylflavonoidů v pivu navýšit [2-3]. Jednou z možností, jak zajistit zvýšený obsah xanthohumolu v pivu, je výběr vhodné suroviny. Za tímto účelem byly v posledních letech vyšlechtěny některé nové odrůdy chmele (např. odrůda Vital), které se vyznačují výrazně vyšším obsahem těchto látek (vysoký obsah zejména desmethylxanthohumolu a xanthohumolu). Výslednou koncentraci v konečném pivu, ovšem ovlivňuje nejenom použitá odrůda chmele, ale i druh sladu. Byl prokázán zvýšený obsah xanthohumolu v závislosti na dávce praženého sladu. Zodpovědné jsou za to tzv. Maillardovy produkty (především melanoidiny a reduktony) vznikající za podmínek vysoké teploty během dotahování sladu. Dokáží na sebe navázat během chmelovaru xanthohumol, a chránit ho tak před isomerací na isoxanthohumol. Další z možností, jak obohatit pivo o xanthohumol, je vyrobit extrakt bohatý na xanthohumol, a ten pak do piva přidávat [4].
Naším cílem bylo vypracování postupu pro přípravu extraktu s vysokým podílem xanthohumolu (vyšším než 20 %hm.) a následné navržení postupu, jak tento extrakt co nejefektivněji dávkovat do piva, s cílem dosažení co možná nejvyšší koncentrace xanthohumolu v konečném produktu.



Obr. 1: Isomerace xanthohumolu na isoxanthohumol

2. VÝSLEDKY

2.1. Příprava chmelových extraktů s vysokým obsahem Xanthohumolu

Jako výchozí materiál byl vzhledem k výhodným vlastnostem (vysoký obsah prenylflavonoidů, nízký obsah hořkých látek) použit zbytek chmelového materiálu odrůdy Vital po extrakci superkritickým oxidem uhličitým. Postup zahrnoval extrakci chmelového materiálu ethanolovým roztokem, vytřepání nepolárních látek do hexanu, sorpci xanthohumolu na PVPP, následnou desorpci pomocí 70% roztoku acetonu a lyofilizaci výsledného produktu. Výsledný produkt byl žlutý prášek s obsahem xanthohumolu téměř 30 %hm. Tento postup je ovšem vhodný spíše jako laboratorní příprava.
Pro průmyslové využití se dá využít spíše dvojitá extrakce oxidem uhličitým. Metoda zahrnovala superkritickou extrakci superkritickým oxidem uhličitým chmelového materiálu odrůdy Vital (290 bar a 50 °C) a následnou reextrakci zbytku opět oxidem uhličitým, nicméně za podmínek velice vysokých teplot a tlaku (600-1000 bar a 60-90 °C). Výsledný extrakt měl obsah xanthohumolu vyšší než 20 %hm.

2.2. Vliv některých technologických parametrů na obsah xanthohumolu v pivech

Byly provedeny pokusné várky s přídavkem extraktu s vysokým obsahem xanthohumolu. Bylo zjištěno, že během chmelovaru trvajícího 90 minut poklesne koncentrace xanthohumolu na 30 % původní hodnoty. Při teplotě 80 °C poklesne jeho koncentrace za 90 minut pouze na 75 % původního množství. Zároveň bylo zjištěno, že při teplotách nižších než 60 °C nedochází k významnému poklesu obsahu xanthohumolu.

2.3. Provozní zkoušky zaměřené na finální úpravy technologie výroby piv se zvýšeným obsahem xanthohumoluv pivovaru

Extrakt s vysokým obsahem xanthohumolu byl použit na výrobu piv se zvýšeným obsahem xanthohumolu. Tento extrakt byl smíchán s mikronizovanou celulózou, která sloužila jako pevný inertní nosič pro zvýšení aktivního povrchu. Tento preparát obsahoval 0,8-2 %hm. xanthohumolu a byl přidáván do piva ve studené fázi výroby.
Během várky A byl preparát xanthohumolu (72 g, 2,01 %hm. xanthohumolu) smíchán s mladinou. Výsledné koncentrace xanthohumolu v mladém pivu a v pivu jsou znázorněné v Tab.I.
Nejlepších výsledků (3,74 mg/l) bylo dosaženo várkou B, kdy byl preparát xanthohumolu (72 g, 2,01 %hm. xanthohumolu) vložen do silonové punčochy a se závažím pověšen do kvasící mladiny

po celou dobu hlavního kvašení. Výhodou prodyšné textilie bylo zabránění sorpci xanthohumolu na kvasinky. Žádné anomálie nebyly v průběhu kvašení pozorovány [5].

Tab. I: Obsahy xanthohumolu a isoxanthohumolu v pokusných pivech

Várka	Prenylflavonoid	Mladé pivo (mg/l)	Pivo (mg/l)
A	Xanthohumol	1,17	1,28
	Isoxanthohumol	3,27	2,93
B	Xanthohumol	1,33	1,43
	Isoxanthohumol	3,84	3,74

3. ZÁVĚR

Naše práce spočívala v nalezení vhodných podmínek pro dosažení zvýšené koncentrace xanthohumolu v pivu. Byl navržen postup obohacení piva preparátem s vysokým obsahem xanthohumolu za použití mikronizované celulózy jako pevného inertního nosiče, přičemž takto lze vyrobit pivo, které může obsahovat až 4 mg/l xanthohumolu, což je koncentrace několikanásobně převyšující hodnoty v běžně dostupných pivech.

4. LITERATURA

1. Karabín M., Hudcová T., Jelínek L., Dostálek P.: Význam chmelových prenylflavonoidů pro lidské zdraví, Chemické listy 106, 2012, 1095-1103.
2. Jelínek L., Karabín M., Kinčl T., Hudcová T., Kotlíková B., Dostálek P.: Xanthohumol: Možnosti isolace a obohacování piva, Chemické listy 107, 2013, 209-213.
3. Karabín M., Jelínek L., Kinčl T., Hudcová T., Kotlíková B., Dostálek P.: New approach to the production of xanthohumol-enriched beers, Journal of the Institute of Brewing 119, 2013, 98-102.
4. Wunderlich S., Zürcher A., Back W.: Enrichment of xanthohumol in the brewing precess. Molecular Nutrition and Food Research 49, 2005, 874-881.
5. Krofta K. Preparát pro přípravu piv se zvýšeným obsahem xanthohumolu. Česká republika. Užitný vzor CZ 26 661 U1. 24.03.2014.

Tato práce vznikla s podporou projektu MZe ČR (QI111B053). Autoři také děkují za spolupráci pivovaru Kácov.

P 6

VYUŽITÍ IMPEDANČNÍ SPEKTROSKOPIE PRO HODNOCENÍ AUTENTICITY POMERANČOVÝCH ŠŤÁV

Kružík V.[1], Průšová P.[1], Hermannová K.[1], Seidl J.[2], Jirešová J.[2], Hofmann J.[2], Čížková H.[1]
2) Ústav konzervace potravin, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika
3) Ústav fyziky a měřicí techniky, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika

ÚVOD

Na českém trhu je možné se setkat s velkým množstvím druhů pomerančových šťáv rozdílné kvality a ceny. Vzhledem k vysokému objemu produkce jsou tyto výrobky poměrně často falšovány především snížením obsahu ovocného podílu a následným maskováním naředění vodou přídavkem kyselin a cukrů. Kvantifikace ovocného podílu je standardně založena na stanovení souboru markerů, které jsou definovány kodexem Evropské asociace producentů šťáv a nektarů (AIJN *Code of Practice*). Mezi sledované kvalitativní parametry patří refraktometrická sušina, obsah volných aminokyselin, obsah vybraných minerálních látek, zastoupení sacharidů a organických kyselin apod. Avšak analýzy výše zmíněných parametrů jsou pracné a zdlouhavé. Cílem této studie bylo zhodnocení obsahu ovocného podílu 100% pomerančových šťáv pomocí nedestruktivní a relativně rychlé metody impedanční spektroskopie. Tato metoda má velký potenciál v analýze potravin a detekci falšování.

MATERIÁL A METODY

V rámci měření bylo celkem analyzováno 14 vzorků pomerančových šťáv. Konkrétně se jednalo o 6 vzorků komerčně dostupných 100% pomerančových šťáv z koncentrátu a 8 vzorků laboratorně připravených modelových pomerančových šťáv navrhnutých metodou Design of Experiment (DOE).

Pro stanovení impedančního spektra byl využit impedanční analyzátor *Agilent 4294A Precision Impedance Analyzer*, který umožňuje měřit v rozsahu frekvencí 40 Hz – 1 MHz. Tento analyzátor byl spojen s celou s planárními elektrodami.

U všech analyzovaných vzorků byly proměřeny následující základní parametry: titrační kyselost a formolové číslo bylo stanoveno titrační metodou; obsah fosforu byl určen spektrofotometricky; obsah popela byl stanoven gravimetricky; refraktometrická sušina byla analyzována pomocí digitálního refraktometru.

Výsledky impedance a základních parametrů pro modelové i reálné vzorky byly zpracovány vícerozměrnými statistickými metodami.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Studie byla započata optimalizací podmínek měření na impedančním analyzátoru. Byl ověřován vliv míchání, teploty a množství dávkovaného vzorku. Bylo zjištěno, že míchání pomocí skleněného míchadla negativně ovlivňuje stabilitu impedance, proto vzorek při měření míchán nebyl. Stanovení impedance musí však proběhnout do 10 minut po umístění do cely, jinak naopak dochází ke změnám hodnot impedance vlivem sedimentace vzorku. Významný vliv měla také teplota měření. Změna teploty o ± 5 °C vyvolá změnu impedance o 10 %, proto bylo nutné udržovat při měření konstantní teplotu 25 °C. Opakovatelnost měření byla 1,5 % pro dávkovaný objem vzorku 80 ml. Jako významná (a sledovaná) část impedančního spektra byla určena lineární oblast v rozsahu frekvencí 100 000 – 650 000 Hz.

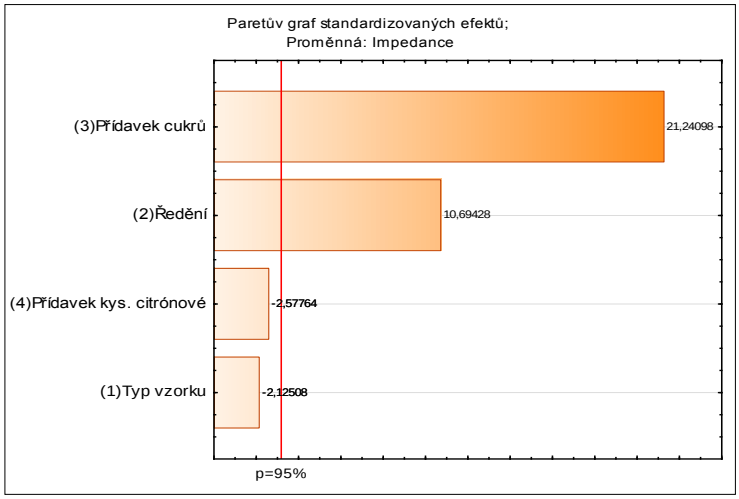
Impedanční spektrum je ovlivňováno složením vzorku. V případně pomerančových šťáv se jedná o samotný typ vzorku (přímá šťáva, šťáva z koncentrátu), složení (především mineralizace) vody použité k ředění, obsah cukrů a kyselin. Modelové vzorky byly připraveny na základě návrhu metody DOE, pro kterou byly zvoleny 4 faktory: typ vzorku (- 100% pomerančová šťáva z ČR; + 100% pomerančová šťáva z Rakouska), ředění (- žádné; + přídavek 10 % pitné vody), přídavek

cukrů (- žádný; + 4g/100 ml vzorku – směs glukosy, fruktosy a sacharosy v poměru 1:1:1,1). Složení modelových vzorků (M1-M8) je uvedeno v následující tabulce (Tab. I).

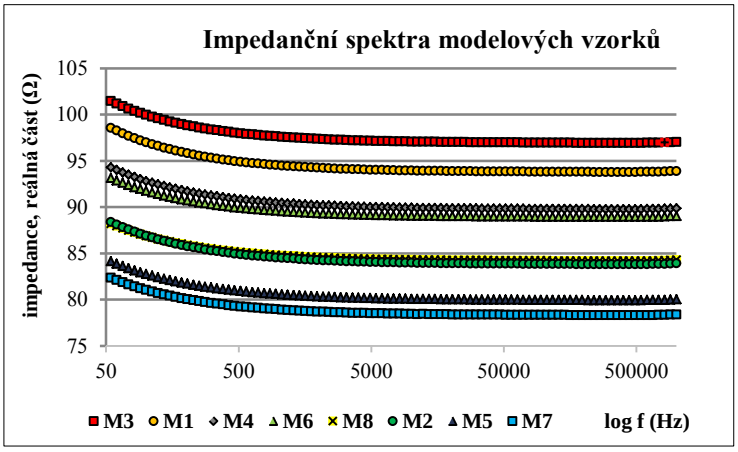
Tab. I Složení modelových vzorků (M1-M8) pomerančových šťáv (DOE).

	Typ vzorku	Ředění	Přídavek cukrů	Přídavek kyseliny citrónové
M 1	+	+	+	+
M 2	+	+	-	-
M 3	-	+	+	-
M 4	+	-	+	-
M 5	-	-	-	-
M 6	-	-	+	+
M 7	+	-	-	+
M 8	-	+	-	+

Vliv jednotlivých faktorů na hodnotu impedance je vyjádřen pomocí Paretova grafu (Obr. 1). Z tohoto diagramu je zřejmé, že největší vliv na výslednou hodnotu impedance má obsah cukrů a ředění vzorku. Naopak statisticky nevýznamný vliv vykazuje přídavek kyseliny citrónové a použitý typ vzorku. Tato skutečnost je velmi pozitivní vzhledem k odhalování falšovaných výrobků. Impedanční spektra jednotlivých modelových vzorků jsou znázorněna na Obr. 2. Mezi modelovými vzorky lze pozorovat významné rozdíly, které korelují s obsahem ovocného podílu.



Obr. 1 Vliv jednotlivých faktorů na hodnotu impedance vyjádřený pomocí Paretova grafu.



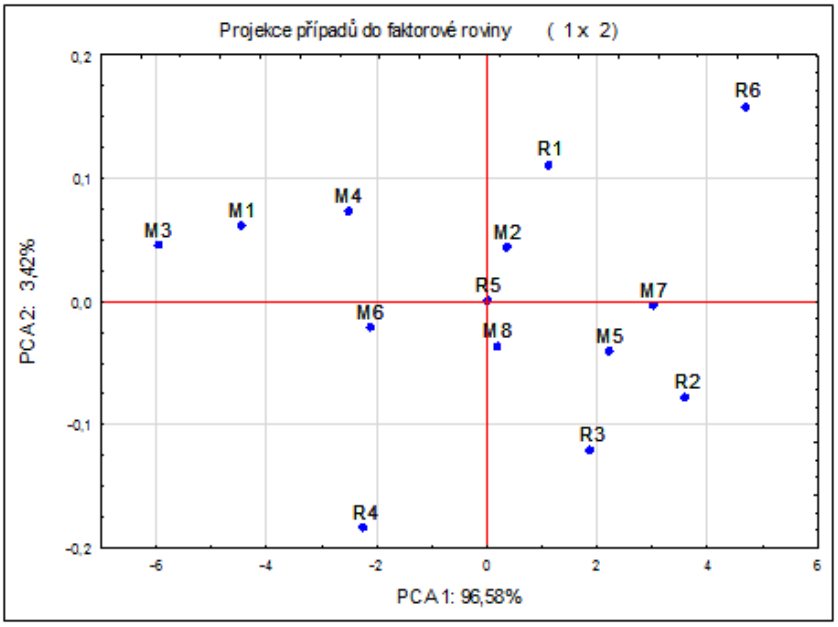
Obr. 2 Impedanční spektra modelových vzorků pomerančových šťáv (M1-M8).

V rámci této studie byla také proměřena série reálných vzorků 100% pomerančových šťáv z koncentrátu. Pro posouzení jejich autenticity sloužily hodnoty základních parametrů. Zjištěné hodnoty byly porovnány s definovanými limity z AIJN *Code of Practice*. Všechny analyzované vzorky splňovaly požadované parametry, takže se s velkou pravděpodobností jednalo o 100% šťávy. Výsledky pro reálné vzorky jsou uvedeny v Tab. II.

Tab. II Hodnoty základních parametrů pro reálné vzorky (R1-R6).

Reálné vzorky	Refraktometrická sušina (°Brix)	Titrační kyselost (g/l)	Formolové číslo (ml 0,1 M NaOH/100ml)	Fosfor (mg/l)	Popel (g/l)
R1-R6	11,3-11,9 (AIJN min. 11,2)	6,0-7,1 (AIJN 5,8-15,4)	18-23 (AIJN 15-26)	118-280 (AIJN 115-210)	3,7-4,5 (AIJN 2,8-5,0)

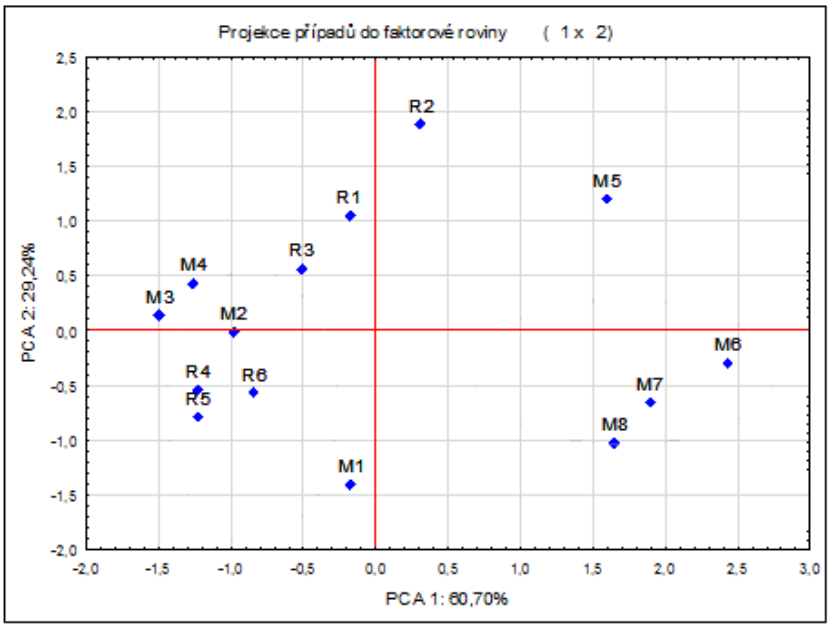
Analýza hlavních komponent (PCA) byla použita pro vyhodnocení impedance všech reálných a modelových vzorků. Byly vybrány hodnoty pro významné frekvence z lineární oblasti impedanční křivky (Hz: 105361; 129279; 215598; 395554; 441175; 664210), které sloužily jako znaky pro vzorky při analýze PCA. Na Obr. 3 je znázorněn graf komponentního skóre pro 1 a 2 hlavní komponentu. První komponenta vyjadřuje 96 % proměnlivosti (rozptylu) původních dat a druhá hlavní komponenta 3 %. Průměrné vzorky nabývají hodnot první hlavní komponenty v rozmezí od - 4 do + 4. Za odlehlé objekty lze považovat vzorky M3, M1 a R6. Objekt R6 je typický nejnižší hodnotou impedance mezi reálnými vzorky. Naopak vzorky M3 a M1 jsou charakteristické nejvyššími hodnotami impedance v souboru modelových vzorků.



Obr. 3 Graf komponentního skóre pro 1 a 2 hlavní komponentu; celkem 14 vzorků; znaky: 6 hodnot impedance v rozsahu frekvence 100 000-650 000 Hz (R-reálné vzorky, M-modelové vzorky).

Statistická metoda PCA byla také využita pro vyhodnocení základních parametrů pomerančových šťáv všech modelových a reálných vzorků (Obr. 4). Na tomto diagramu komponentního skóre celkově popisuje první a druhá hlavní komponenta 90 % proměnlivosti dat. Vzorky s vyšším obsahem markerů typických pro ovocný podíl mají kladné hodnoty druhé hlavní komponenty. V této oblasti je autentický vzorek M5. Objekty R4, R5 a R6 jsou specifické nižšími hodnotami formolového čísla a obsahu fosforu. Z tohoto důvodu se nacházejí v oblasti záporných

hodnot druhé hlavní komponenty, kde vytvářejí shluk. Není však možné přesně oddělit falšované a autentické vzorky.



Obr. 4 Graf komponentního skóre pro 1 a 2 hlavní komponentu; celkem 14 vzorků; znaky: refraktometrická sušina, formolové číslo, titrační kyselost, obsah fosforu a popela (R-reálné vzorky, M-modelové vzorky).

ZÁVĚR

Metoda impedanční spektroskopie je vhodná pro rychlý screening vzorků pomerančových šťáv. Analýza 10 vzorků trvá přibližně 60 minut. Naopak stanovení základních parametrů je značně časově náročné (na analýzu 10 vzorků je nutné 24 hodin). Na základě DOE bylo zjištěno, že nejvíce impedanční spektrum pomerančových šťáv ovlivňuje naředění a/nebo přídavek cukrů. Podmínky měření je vždy nutné standardizovat kvůli opakovatelnosti analýz.

Impedanční spektroskopie prokázala potenciál stát se vhodnou a rychlou metodou k detekci falšování pomerančových šťáv. Z naměřených výsledků však nebylo možno navrhnout vhodný statistický model, na jehož základě by šlo snadno rozhodnout, zda byl vzorek falšovaný či autentický. Na výslednou hodnotu impedance má vliv velký počet faktorů. Pro zvýšení možností interpretace impedančních spekter bude nutné rozšířit soubor modelových a reálných vzorků. Předmětem budoucí práce bude sestavení regresního modelu pro závislost mezi obsahem ovocného podílu a hodnotou impedance.

PODĚKOVÁNÍ

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20/2014): A1_FPBT_2014_006.

POUŽITÁ LITERATURA

Das S., Sivaramakrishna M., Biswas K., Goswami B.: Performance study of a ´constant phase angle based´ impedance sensor to detect milk adulteration. *Sensors and Actuators A*, 167, pp 273 – 278, **2011**.

Harker F.R., Maindonald J.H.: Ripening of Nectarine Fruit. Changes in the Cell Wall, Vacuole, and Membranes Detected Using Electrical Impedance Measurements. *Plant Physiol.*, 106, pp 165 - 171, **1994**.

Bauchot A.D., Harker F.R., Arnold W.M.: The use of electrical impedance spectroscopy to assess the physiological condition of kiwifruit. *Postharvest Biology and Technology*, 18, pp 9 – 18, **2000**.

Masot R., Fuentes A., Barat J.M.: Design of a low-cost non-destructive system for punctual measurements of salt levels in food products using impedance spectroscopy. *Sensors and Actuators A: Physical*, 158, pp 217 – 233, **2010**.

Association of the Industry of Juice and Nectars from Fruits of the EEC (AIJN): Code of Practice for Evaluation of Fruit and Vegetable Juice. A.I.J.N. Brussels, **1999**.

Chevalier D., Ossart F., Ghommids G.: Development of a non-destructive salt and moisture measurement method in salmon (Salmo salar) fillets using impedance technology. *Food Control*, *17*, pp 342–347, **2006**.
Damez J., Clerjon S., Abouelkaram S., Lepetit J.: Electrical impedance probing of the muscle food anisotropy for meat ageing control. *Food control*, *19* (10), 931–939, **2008**.

P 7

STANOVENÍ FENOLOVÝCH LÁTEK METODOU DART-MS-TOF

Prchalová J., Kovařík F., Neradová E., Rajchl A.
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav konzervace potravin, Technická 5, 166 28 Praha 6

Úvod

Fenolové látky tvoří velmi početnou a různorodou skupinu rostlinných sekundárních metabolitů. U těchto látek jsou často diskutovány jejich positivní účinky na lidské zdraví, jejich příznivý vliv spočívá především v antioxidačních vlastnostech, které chrání lidský organismus před chronickými chorobami, např. před kardiovaskulárním onemocněním, Alzheimerovou chorobou aj.[1] Celkový příjem fenolových látek potravou je tvořen ze dvou třetin flavonoidy a z jedné třetiny fenolovými kyselinami.[2]

Fenolové látky jsou charakteristické markery pro ovoce, zeleninu, obilí, ale také pro luštěniny. Vybrané fenolové látky jsou specifickými markery identifikujícími přítomnost jablek v potravinách a používají se pro sledování nedeklarovaného přídavku jablečné suroviny v ovocných výrobcích.[3] Mezi nejčastěji se vyskytující fenolové sloučeniny patří: kyselina ferulová, kyselina galová, kyselina chlorogenová, kyselina kávová, floridzin, katechin, kvercetin a rutin aj.[4]

Obsah a zastoupení jednotlivých fenolových látek v jablkách se velmi liší v závislosti na odrůdě, způsobu pěstování apod. [5]

Vzorky

Analyzovány byly jablečné odrůdy Gala, Golden Delicious, Jonagold, které byly zakoupeny v obchodní síti. Všechny vzorky byly vypěstovány v České republice.

Příprava vzorku

Příprava standardů pro metodu DART-MS-TOF

Byly připraveny zásobní roztoky standardů (kyseliny ferulové, kyseliny galové, kyseliny chlorogenové, kyseliny kávové, floridzinu, katechinu, kvercetinu a rutinu) v demineralizované vodě o koncentraci 1 g/l. Ze zásobních roztoků byla následně připravena kalibrační řada o koncentraci 0,01; 0,02; 0,1 a 1 g/l.

Příprava vzorků jablečných odrůd pro metodu DART-MS-TOF

Ke kvalitativní analýze byly připraveny vzorky jablečných odrůd (Gala, Golden Delicious, Jonagold). Bylo naváženo 15 g jablečné odrůdy, která byla homogenizována s 30 ml 80% (v/v) roztoku etanol/voda pomocí ultra-torraxu. Vzorky byly následně ponechány 1 hod v ultrazvukové lázni. Extrakty byly zfiltrovány přes filtrační papír a následně přes PTFE mikrofiltr (0,45 μm). Takto připravené vzorky byly použity pro kvalitativní analýzu metodou DART-MS-TOF (přímá analýza v reálném čase s hmotnostní spektrometrií a vysokorozlišovacím průletovým analyzátorem).

Cíle práce

Cílem práce bylo vyvinout metodiku stanovení vybraných fenolových látek technikou DART-MS-TOF. V experimentální části bylo nejprve nutné optimalizovat podmínky stanovení standardů fenolových látek.

Dalším cílem této práce bylo prokázat využitelnost techniky DART-MS-TOF pro rychlou screeningovou analýzu jablečných odrůd.

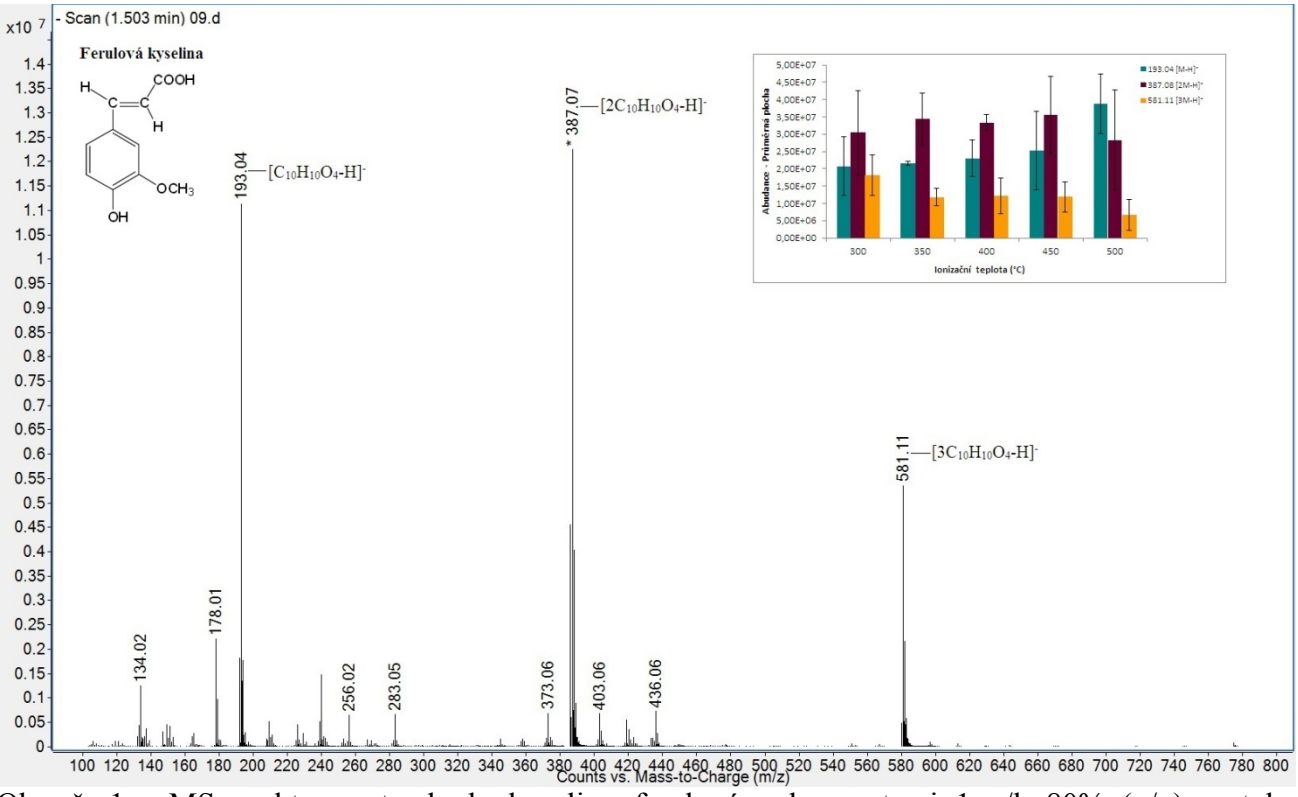
Výsledky a diskuze

Analýza fenolových látek byla provedena pomocí metody DART-MS-TOF. Standardy fenolových látek (kyselina ferulová, kyselina galová, kyselina chlorogenová, kyselina kávová, floridzin, katechin, kvercetin a rutin) byly měřeny v negativním módu, který poskytoval spektrum obsahující charakteristické ionty příslušejících fenolových látek. U těchto měřených fenolových látek byla sledována intenzita signálů iontů v rozmezí ionizačních teplot od 300 do 500 °C,

s krokem 50 °C (viz obr. č. 1). Charakteristické ionty/fragmenty pro měřené fenolové látky jsou uvedeny v Tab. č. 1.

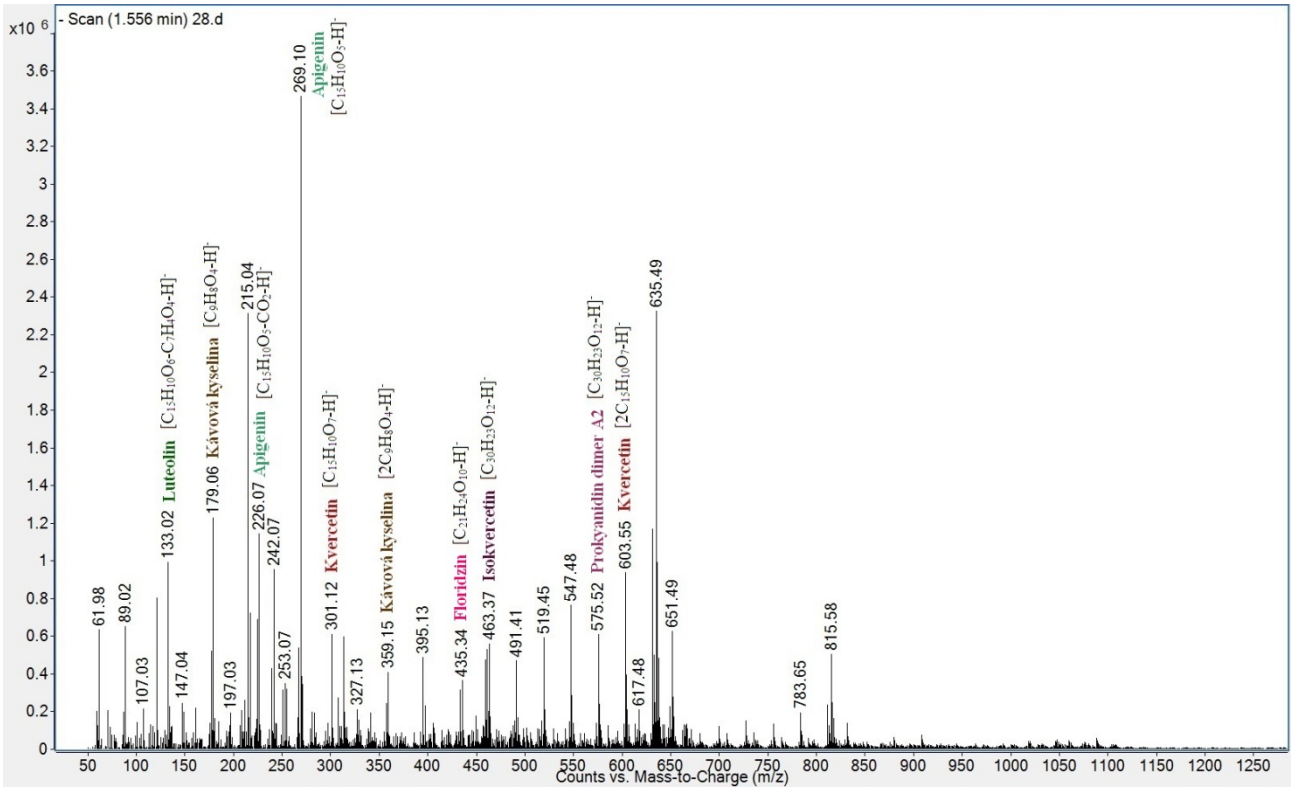
Tab. č. 1: Ionty fenolových látek zjištěných metodou DART-MS-TOF

Název standardu	Vzorec	M [g/mol]	Nalezené ionty v MS
Ferulová kyselina	$C_{10}H_{10}O_4$	194,0579	193,04 $[M-H]^-$
			387,08 $[2M-H]^-$
			581,11 $[3M-H]^-$
Floridzin	$C_{21}H_{24}O_{10}$	436,1396	273,05 $[M-H-162]^-$
			435,10 $[M-H]^-$
Galová kyselina	$C_7H_6O_5$	170,1195	125,10 $[M-H-CO_2]^-$
			169,02 $[M-H]^-$
			339,03 $[2M-H]^-$
Chlorogenová kyselina	$C_{16}H_{18}O_9$	354,0951	179,06 [caffeic acid-H]$^-$
			191,04 [quninic acid-H]$^-$
			353,08 $[M-H]^-$
Katechin	$C_{15}H_{14}O_6$	290,0790	289,07 $[M-H]^-$
			579,11 $[2M-H]^-$
Kávová kyselina	$C_9H_8O_4$	180,0423	135,03 $[M-H-CO_2]^-$
			179,03 $[M-H]^-$
			359,06 $[2M-H]^-$
Kvercetin	$C_{15}H_{10}O_7$	302,0427	300,02 $[M-H]^{-\bullet}$
			301,02 $[M-H]^-$
			603,03 $[2M-H]^-$
Rutin	$C_{27}H_{30}O_{16}$	620,1663	301,02 [M-H-(Rha+Glu)]$^-$

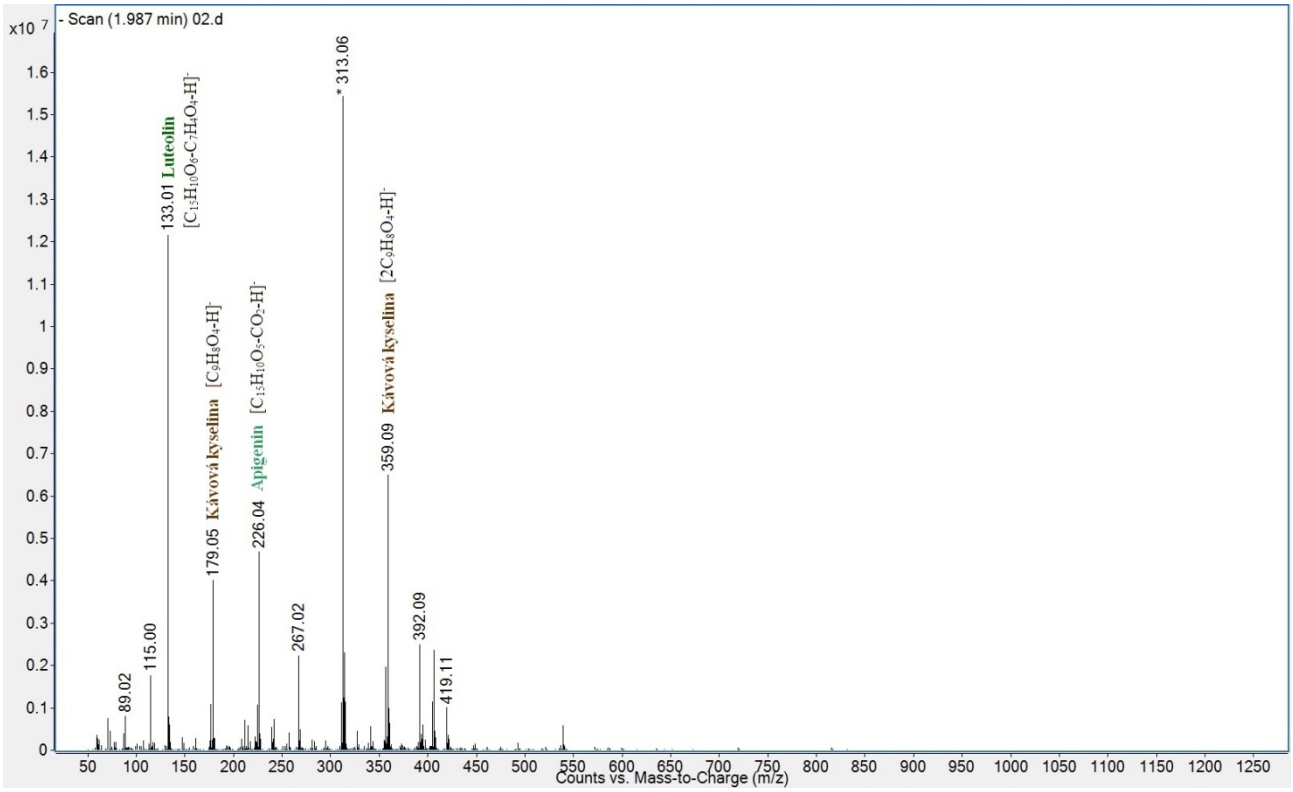


Obr. č. 1 - MS spektrum standardu kyseliny ferulové o koncentraci 1 g/l, 80% (v/v) roztok etanol/voda, 400 °C

Na obrázku č. 2 je uvedena ukázka hmotnostního spektra vzorku slupky odrůdy jablka Gala. V hmotnostním spektru byly pozorovány ionty fenolových látek s hodnotou m/z odpovídající kyselině kávové (m/z 179,06), kvercetinu (m/z 301,12), floridzinu (m/z 435,35) a prokyanidinu dimeru A2 (m/z 575,52). Dalšími ionty přítomné v hmotnostním spektru jsou luteolin (m/z 133,02) a apigenin (m/z 226,07), které patří do skupiny flavonů.



Obr. č. 2 - Fingerprint MS spektra slupky jablka Gala, 80% (v/v) roztok etanol/voda, 400 °C



Obr. č. 3 - Fingerprint MS spektra dužniny jablka Gala, 80% (v/v) roztok etanol/voda, 400 °C

V MS spektru slupky a dužniny jablečných odrůd byly pozorovány ionty odpovídajícím fenolovým a flavonovým látkám. Analýzou dužnin odrůd Gala, Golden Delicious a Jonagold byla zjištěna přítomnost luteolinu, apigeninu a kyseliny kávové. Ve spektrech dužniny Gala, Golden Delicious a Jonagold (viz obr. č. 3) byly pozorovány tyto dominantní ionty s hodnotami m/z 133,02 luteolin, m/z 226,07 apigenin a m/z 179,06 kávová kyselina (i její dimer m/z 359,10). V MS spektrech slupky odrůdy Gala byly navíc identifikovány další ionty, odpovídající kvercetinu, floridzinu a prokyanidinu dimeru A2. MS spektra slupek jablečných odrůd (viz obr. č. 2) poskytla významně bohatší spektra oproti dužninám (viz obr. č. 3), ale s výrazně nižší intenzitou signálů iontů příslušných fenolových látek.

Ze získaných MS spekter je patrné, že metoda DART-MS-TOF je potenciálně vhodná pro rozpoznávání a charakterizaci jednotlivých jablečných odrůd.

Závěr

Z experimentální části vyplynulo, že pro nalezení typických iontů fenolových látek jsou optimální tyto podmínky: negativní měřící mód, ionizační teplota 400 °C a 80% (v/v) roztok etanolu/vody jako extrakční činidlo.

Výsledky ukazují, že technika DART-MS-TOF je vhodná pro semi-kvalitativní stanovení fenolových látek a pro rychlou screeningovou analýzu těchto látek. Technikou DART-MS-TOF lze získat fingerprinty vybraných jablečných odrůd, které jsou charakteristické pro každou jablečnou odrůdu.

Do budoucna by bylo možné využít metodu DART-MS-TOF za účelem průkazu falšování jednodruhových výrobků, například šťáv a pyré, u kterých je deklarováno použití jedné jablečné odrůdy.

Poděkování

Tento projekt byl financován z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20/2014): A2_FPBT_2014_066, A1_FPBT_2014_006.

Seznam použité literatury

1. Hyson, D. A. A comprehensive review of apples and apple components and their relationship to human health. *Advances in Nutrition* **2011**, *2* (5), 408-420.
2. Sies, H. Polyphenols and health: Update and perspectives. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2010**, *501*, 2-5.
3. Fűgel, R., Carle, R., Schieber, A. Quality and authenticity control of fruit purées, fruit preparations and jams - a review. *Trends in Food Science & Technology* **2005**, *16*, 433-441.
4. Kerwin, J. L. Negative Ion Electrospray Mass Spectrometry of Polyphenols, Catecholamines and their Oxidation Products. *Journal of Mass Spectrometry* **1996**, *31*, 1429-1439.
5. Treutter, D. Managing phenol contents in crop plants by phytochemical farming and breeding-visions and constraints. *International Journal of Molecular Sciences* **2010**, *11*(3), 807-857.

P 8

ZMĚNY HYDRAZINOVÝCH DERIVÁTŮ V UCHÁČI NEUWIRTHOVU

Hauser J., Pudil F.
Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha, Technická, 166 28 Praha 6

Úvod

Houbaření patří v některých zemích k oblíbeným koníčkům. Mezi nejvášnivější houbaře na světě patří Češi. Dále je houbaření a také pěstování hub rozšířeno také v zemích Evropy ležících severovýchodně od České republiky např.: Slovensko, Polsko, Rusko. Ve zbytku Evropy není tato záliba tak rozšířená, kromě některých oblastí Skandinávie. Mimo Evropu je pěstování a sběr hub ještě hodně rozšířen v jihovýchodní Asii. Známým rizikem tohoto koníčka je možnost otravy jedovatými houbami. Výskyt otrav způsobených houbami na celém světě značně kolísá v závislosti na místní tradici, životním stylu, výživových faktorech, klimatu a výskytu hub v lesích. Pouze výjimečně jsou toxické houby použity za účelem sebevražd nebo vražd, ale některé houby jsou pro svoje halucinogenní účinky častěji využívány drogově závislými lidmi. [1, 2]

Jednou z méně běžných skupin toxických hub jsou ucháči (*Gyromitra*). Pozornost se jim věnuje zejména v severní Evropě (ve Skandinávii). V těchto zemích se častěji vyskytují i smrtelné otravy po konzumaci ucháčů. Nejčastěji jsou otravy ucháčem obecným (*Gyromitra esculenta*), který je zaměňován za jedlý ucháč obrovský (*Gyromitra gigas*) nebo zaměněn dokonce i s jedlými smrži (*Morchella*) viz Obr. 1. Přestože ucháč obecný (*Gyromitra esculenta*) je v současnosti považován za jedovatou houbu, tak existují konzumenti, kteří tuto houbu konzumují bez zdravotních následků. [2, 3]

plodnice Ucháče obecného (*Gyromitra esculenta*) | plodnice Smrže obecného (*Morchella esculenta*) | plodnice Ucháče Neuwirthova (*Gyromitra Neuwirthii*) | plodnice Ucháče Obrovského (*Gyromitra Gigas*)

Obr. 1: Plodnice Ucháčů a Smrže na přirozeném stanovišti. [2, 3] převzato a upraveno

Houby rodu ucháči (*Gyromitra*) patří do kmene *Ascomycota*, který je v Čechách hojně zastoupen. Tento rod obsahuje asi 18 druhů, z nich nejznámější jsou ucháč obecný (*Gyromitra esculenta*) a ucháč obrovský (*Gyromitra gigas*). [4, 5] Roste v celé severní, střední a východní Evropě. K identifikování jednotlivých druhů je často mykology používán tvar askospor. [2, 6]

Ucháč obecný se v minulém století hojně vyskytoval v tržní síti, ale díky svojí toxicitě byl stažen z trhu. Některé druhy rodu Gyromitra jsou vysoce jedovaté, za syrová tyto houby způsobily vážné otravy a dokonce i úmrtí u lidí. [4, 5, 7]

Tyto otravy jsou však méně časté v západní Evropě než ve východní nebo severní Evropě, kde je tento druh více konzumován. [5, 7, 8]

Ucháč Neuwirthův (*Gyromitra Neuwirthii*) viz. Obr. 1 byl poprvé u nás objeven prof. Františkem Neuwirthem, který tento druh nalezl v roce 1919 u Jindřichova Hradce. Znovu byl objeven a identifikován až v roce 2005 pracovníky české mykologické společnosti a je uložen v mykologickém herbáři Národního muzea pod evidenčním číslem PRM 902 256. Klobouk je 2 - 3

cm široký, kulovitě zaoblený, nepravidelně laločnatý a povrch klobouku je černě kaštanový, na spodu čistě bílý. Třeň je z klobouku málo vyniklá, 4 – 8 mm široká a bílá. [2, 9, 10, 11, 12]

Otravu ucháče způsobují především hydrazinové deriváty a to: **gyromitrin** (acetaldehyd-N-methyl-N-formylhydrazon), který činí asi 88 % z celkového počtu toxinů a osm dalších vyšších homologů gyromitrinu, u kterých je skupina ethyl- nahrazena vyšší alkylovou skupinou (dohromady asi 12 %). Tyto látky v houbách jsou volné nebo vázané na buněčný materiál, především na glykosidech. [4, 12, 13, 14, 15]

V dnešní době je gyromitrin známou a hlavní toxickou sloučeninou v ucháči, která se v žaludku přeměňuje na vysoce toxický methylhydrazin (MMH), který je považován za agens způsobující akutní toxicitu v ucháči. [16]

Metabolická změna gyromitrinu se obvykle dělí do dvou odlišných fází:

- Žaludeční fáze, která nastává během pomalé hydrolýzy N-methyl-N-formylhydrazinu (MFH) na monomethylhydrazin (MMH)
- Jaterní fáze, ve které se MMH (a možná MFH) oxiduje na toxické a pravděpodobně i karcinogenní deriváty. [8] viz schéma 1

Gyromitrin je hlavně považován za neurotoxickou sloučeninu, která může také vyvolat mírné poškození jater a hemolýzu. [1] Dále gyromitrin a MMH jsou i mutagenní a teratogenní. [3]

Studie potvrdily, že MMH, MFH, gyromitrin a také i syrový ucháč obecný jsou karcinogenní u experimentálních zvířat. Dokonce i malé množství může mít karcinogenní účinek. V roce 1983 došla Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) k názoru, že u ucháče obecného nebylo pozorováno to, že způsobuje rakovinu u lidí ale je zde karcinogenní riziko pro osoby, které tento druh hub konzumují. Doté doby než budou provedeny experimentální studie, kde se zjistí vztah mezi orální expozici ucháčem a výskytem rakoviny u lidí, jsou hydrazinové deriváty z ucháče obecného považovány za rizikové sloučeniny, které způsobují rakovinu u konzumentů. [5, 6]

Citlivost na otravu ucháčem je dána individuálně. Tato citlivost je vysvětlena genetickou různorodostí metabolismu gyromitrinu u lidí. [6]

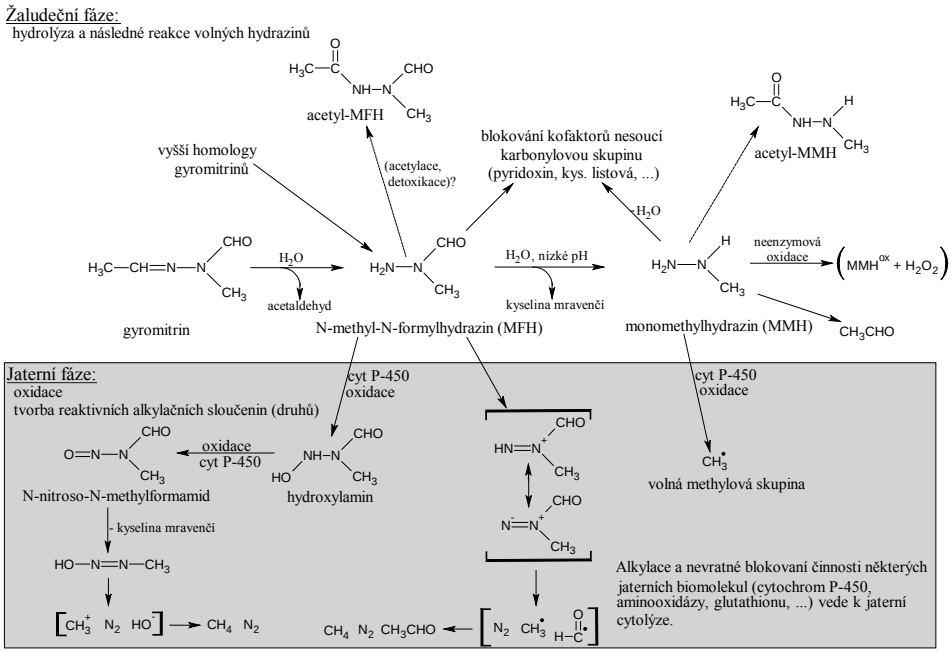


Schéma 1: Metabolismus gyromitrinu. [3, 6, 8] převzato a upraveno

Gyromitrin je poměrně nestabilní sloučenina a je snadno oxidovatelná kyslíkem při vystavení okolnímu vzduchu i při pokojové teplotě za vzniku karcinogenního methylhydrazinu (MMH) viz schéma 1. [3]

Diskuze ohledně toxicity některých ucháčů vede k zamyšlení, jestli během kulinářských úprav nedochází k detoxikaci gyromitrinu a jeho homologů. [1, 3]

Materiál a metody

K analýzám byl použit lyofilizovaný vzorek Ucháče Neuwirthův (*Gyromitra Neuwirthii*) z roku 2008, který byl nalezen v Brdech (Brdských lesích).

Těkavé látky ze vzorku byly izolovány pomoci metody SPME. Bylo použito vlákno 65 μm carbowax®/divinylbenzen. Sorpce probíhala podle typu analýzy různě dlouho a při různých teplotách.

Analýza proběhla na přístroji GC/MS s autoinjektorem a byla použita elektronová ionizace (EI). Analýza probíhala na kapilární koloně SAC™-5 (30 m x 250 μm x 0,25 μm). Nosným plynem bylo helium a průtok plynu činil 1 ml/min. Vzorek byl nastřikován v splitless režimu a teplota injektoru byla 230 °C. Dále byla u kolony naprogramována teplota (50 °C), izotermicky po dobu 3 min, 5 °C/min do 230 °C a teplota 230 °C byla udržována po dobu 30 min. Teplota na rozhraní mezi kolonou a detektorem byla 230 °C. Na MS bylo nastaveno plné skenování EI hmotnostního spektra rozsahu 27 – 350 m/z s rychlostí 2,27 scan/s, která byla zaznamenána při 70 eV.

Lyofilizovaný materiál byl vložen do vialek a uzavřen septem a poté byl sorbován pomoci SPME při konstantní teplotě. Jednotlivé vialky s ucháčem byly zahřívány pomocí termostatu na různé teploty (50 °C, 90 °C, 130 °C a 180 °C). Vodná hydrolýza se provedla tak, že k ucháči se přidalo takové množství vody, aby to odpovídalo desetině hmotnosti vzorku a při 90 °C se vialka 1 hodinu zahřívala. Poté bylo vlákno vloženo do vialky a při laboratorní teplotě (22 °C) se nechalo 1 hodinu sorbovat. Sorbované těkavé látky z ucháče byly analyzovány pomoci GC/MS. Obdobně se provedla také kyselá hydrolýza s 5 % kyselinou chlorovodíkovou.

K identifikaci těkavých látek byly použity knihovny hmotnostních spekter NIST MS Search 2.0.

Výsledky a diskuse

Tepelně degradovaný lyofilizovaný Ucháč Neuwirthův se sorboval pomoci SPME na carbowax®/divinylbenzen. Byly zvoleny teploty 50 °C, 90 °C, 130 °C a 180 °C. Získané chromatogramy jsou vidět na Obr. 2. Tepelnou degradaci ucháče lze rozdělit do dvou fází:

- první fáze (do 100 °C) bez dramatických změn hydrazinových derivátů, pomalu se objevují heterocyklické sloučeniny.
- druhá fáze (nad 100 °C) výrazný úbytek vyšších homologů gyromitrinu, velké množství degradačních produktů zejména ze sacharidů.

Při průběhu hydrolýzy vařením (viz Obr. 3) se úplně nezbavíme volných ani vázaných hydrazinových derivátů. Na jednu stranu během hydrolýzy dochází k významnému poklesu hydrazinových derivátů, ale na druhou stranu zde dochází k přeměně těchto hydrazinových derivátů na methylhydrazin.

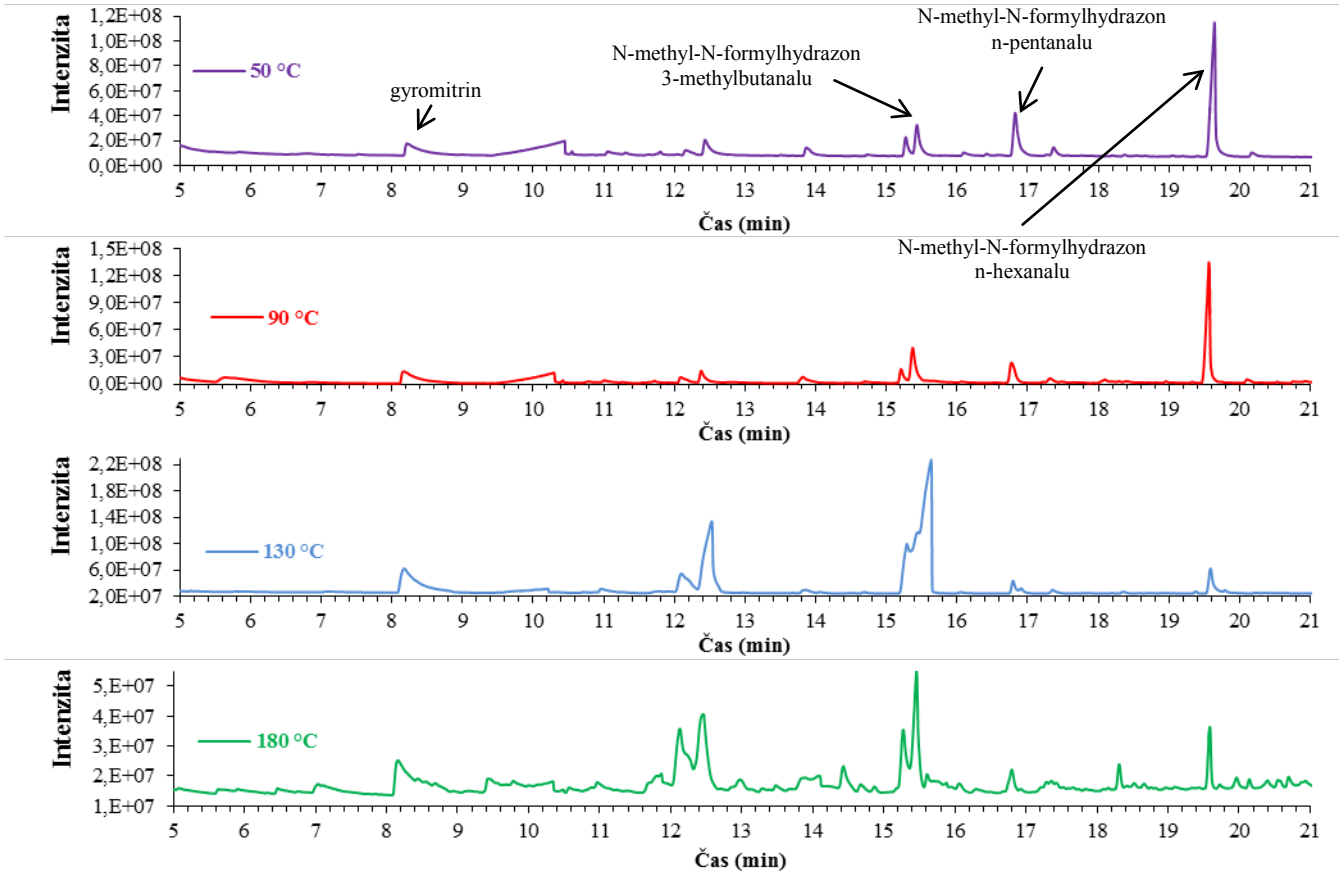
Přestože SPME technika není plně vhodná pro kvantitativní analýzy, je zřejmé že ukazuje významné změny ve složení těkavých látek reakčních směsí.

Při hydrolýze dochází k rychlejšímu úbytku vyšších homologů gyromitrinu a vázaný gyromitrin se uvolňuje. Dále při vaření těchto hub se musíme také vyvarovat unikajících par, protože obsahují velice těkavý methylhydrazin, který vznikl při hydrolýze. Dále může zůstávat ve vodě, proto se nedoporučuje použití této vody (vývaru) na přípravu omáček, polévek atd..

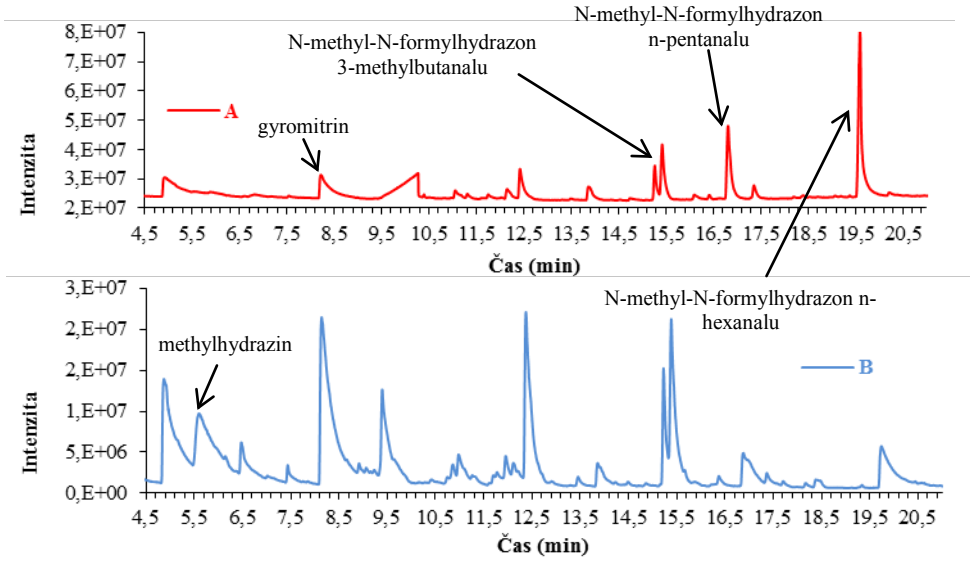
Během hydrolýzy došlo u lyofilizovaného ucháče k uvolnění složek přirozeného houbového aroma např.: 1-okten-3-ol, 3-oktanon.

U kyselé hydrolýzy (viz Obr. 4), dochází k úplné degradaci sledovaných hydrazinových derivátů. Objevila se zde skupina furanových derivátů, které pravděpodobně pochází z degradace polysacharidů, popřípadě dalších produktů z ligninu. Mezi těkavými látkami nebyl detektován ani methylhydrazin, který pravděpodobně vytěkal nebo zůstal v roztoku jako protonizovaný derivát.

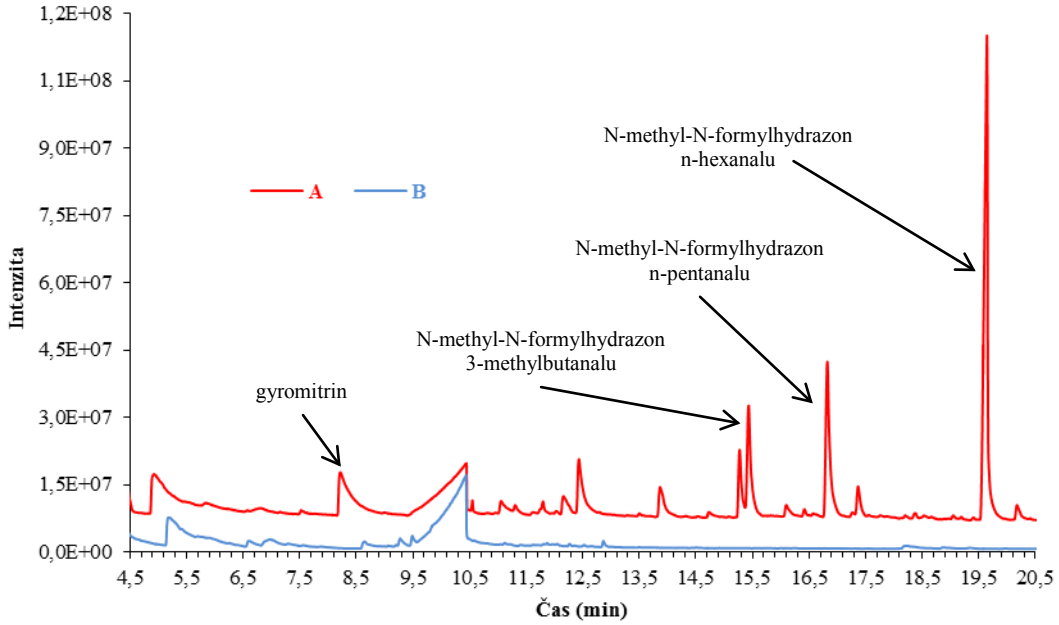
Lze tedy konstatovat, že kdyby se tyto houby konzervovaly (nakládaly) v kyselém nálevu (kyseliny octové) mohly by být zdraví neškodné.



Obr. 2: GC-MS SPME analýza těkavých látek lyofilizovaného ucháče zahřívaného při teplotách 50 °C, 90 °C, 130 °C a 180 °C



Obr. 3: GC-MS SPME analýza těkavých látek lyofilizovaného ucháče (chromatogram A) a ucháče podroben hydrolýze (chromatogram B)



Obr. 4: GC-MS SPME analýza těkavých látek lyofilizovaného ucháče (chromatogram A) a ucháče, který byl podroben kyselé hydrolýze (chromatogram B)

Závěr

Gyromitrin a jeho vyšší homology ukázaly relativně vysokou stabilitu v suchém stavu při nižších teplotách. Ale při vyšších teplotách zejména v přítomnosti vlhkosti dochází k rychlému rozkladu. Při hydrolýze se uvolňuje methylhydrazin do par, které jsou pro konzumenta toxické, anebo zůstává ve vodě, a proto se nedoporučuje použití této vody (vývaru) na přípravu omáček, polévek atd. Vhodnou kulinářskou úpravou by byla konzervace těchto hub pomoci kyseliny octové, ale nebylo by vhodné využít tohoto láku z konzervovaných hub pro potravinářské účely. Přestože u kyselé hydrolýzy dochází k rychlému rozkladu hydrazinových derivátu nemůžeme tyto ucháče nebo podobné houby, které obsahují hydrazinové deriváty, doporučit ke konzumaci.

Seznam literatury:

1. Karlson-Stiber, Ch.; Persson, H. Cytotoxic fungi—an overview. *Toxicon* **2003**, *42*, 339–349.
2. Mikšík, M. *Poznáváme jarní houby*, 1st ed.; Nakladatelství Grada Publishing, a.s.: Praha 7, **2013**.
3. Hauser, J. Změny hydrazinových derivátů v Ucháči Neuwirthovu. Diplomová práce, VŠCHT Praha, **2013**.
4. Pudil F., Šrůta P., Uvíra R., Maryška M.,Vymětalová V., Janda V. Volatile Organic Compounds in Neuwirth's False Morel Mushroom (Gyromitra Neuwirthii), poster P-22, In proceeding of: 6th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, Research Institute for Medical Plants, **2005**, Siofók.
5. Patocka, J.; Pita, R.; Kuca, K. Gyromitrin. Mushroom toxin of Gyromitra spp.. *Mil. Med. Sci. Lett.* **2012**, *81* (2), 61–67.
6. TemaNord *Hydrazones in the False Morel*; The Nordic Council of Ministers: Copenhagen, **1995**.
7. Coulet, M.; Guillot, J. Poisoning by Gyromitra: a possible mechanism. *Med. Hypotheses* **1982**, *8* (4), 325–334.
8. Michelot, D.; Toth, B. Poisoning by Gyromitra esczdenta-a Review. *J. Appl. Toxicol.* **1991**, *11* (4), 235–243.
9. Velenovský, J. *České Houby*, 1st ed.; Edv. Leschingra: Praha, **1920**.
10. Pudil F., Šrůta P., Uvíra R., Maryška M., Janda V. Deriváty hydrazinu v ucháči Neuwirthovu (Gyromitra Neuwirthii), přednáška, Sborník souhrnů ChemZi 1 (1), 109 (2005), 57.Zjazd chemických společnosti, **2005**, Vysoké Tatry.
11. Pudil F., Šrůta P., Uvíra R., Maryška M., Vymětalová V., Janda V. Analýza těkavých látek ucháče (Gyromitra Neuwirthii), str. 69-75, Sborník příspěvků, XXXVI. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, **2005**, Skalský Dvůr.
12. Pudil F., Šrůta P., Uvíra R., Vymětalová V., Maryška M. Obrazová dokumentace ucháče Neuwirthova (Gyromitra Neuwitrhii), poster, Digitální zobrazování v biologii a medicíně, **2005**, České Budějovice.
13. Arshadi, M.; Nilsson, C.; Magnusson, B. Gas chromatography–mass spectrometry determination of the pentafluorobenzoyl derivative of methylhydrazine in false morel (Gyromitra esculenta) as a monitor for the content of the toxin gyromitrin. *J. Chromatogr., A* **2006**, *1125* (4), 229–233.

14. Toth, B.; Taylor, J.; Gannett, P. Tumor induction with hexanal methylformylhydrazone of Gyromitra esculenta. *Mycopathologia* **1991**, *115* (2), 65–11.
15. Biegański, T.; Braun, R.; Kusche, J. N-methyl-N-formylhydrazine: a toxic and mutagenic inhibitor of the intestinal diamine oxidase. *Agents Actions* **1984**, *14* (3-4), 351–355.
16. Ascherová, A. Toxické látky vyšších hub. Bakalářská práce, VUT v Brně, **2009**.

P 9

STANOVENÍ SIRNÝCH LÁTEK V ETHANOLOVÝCH EXTRAKTECH ČESNEKŮ METODOU GC/MS

Ilko V., Revenco D.
Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha

Souhrn

Česnek je považován za jednu z nejstarších kulturních rostlin. Rod *Allium* zahrnuje asi 700 různých botanických druhů. Česnek má prokazatelné antibakteriální antivirové, antifungální, antiagregační, antioxidační, antihyperlipidické, antihypertenzní a antitumorózní účinky. Proto se v dnešní době česnek využívá ve formě česnekových prášků, česnekové silice, olejového macerátu, nebo česnekového extraktu jako doplněk stravy. Chemické složení je v rostlinách rodu *Allium* velmi rozmanité. Při zpracování česneku dochází k široké škále chemických změn, přičemž vznikají různé typy senzoricky aktivních látek, které mají také fyziologické účinky.

V této práci byla vyvinuta rychlá a robustní metoda na stanovení dialk(en)ylsulfidů a dial(en)yloligosulfidů v ethanolových česnekových extraktech. Na kvantifikaci byla použita metoda vnitřního standardu. Vzorky byly analyzovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.

Úvod

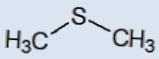
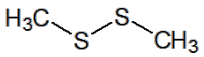
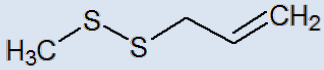
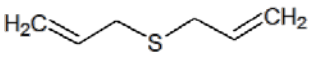
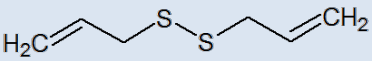
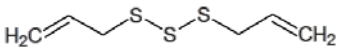
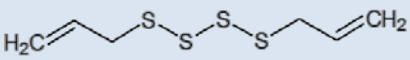
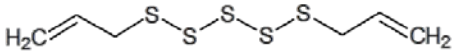
Česnek kuchyňský (*Allium sativum*) využívali již Babylóňané před více než 5000 lety, což potvrzuje zápis psaný klínovým písmem. Při stavbě Cheopsovy pyramidy dělníci odmítali pracovat, protože jim byl odepřen přísun česneku. To bylo zaznamenáno kolem roku 450 př.n.l. řeckým historikem Herodotem. Česnek byl využíván při uštknutí hadem, při kožních vyrážkách, při menstruačních potížích, proti kašli, při odpuzování hmyzu, proti hlístům, proti bolesti zubů, na rány, nebo jako deuretikum, a taky ve veterinárním lékařství. Proto se v současnosti hledají účinné netoxické přírodní preparáty proti různým nemocem. Česnek má prokazatelné antibakterialní antivirové, antifungální, antiagregační, antioxidační, antihyperlipidické, antihypertenzní a antitumorózní účinky. Za tyto účinky může rozmanitost chemických sloučenin, které se nacházejí v česneku, nebo vznikají při porušení obalových vrstev. Při tom jsou sledovány různé neobvyklé oxido-redukční reakce, přesmyky, pericyklické reakce, interakce a přeskupení funkčních skupin. Tyto vzniklé látky jsou často velmi reaktivní a nestabilní.

Experimentální část

V této práci bylo analyzováno 11 vzorků česnekových ethanolových extraktů. Do odměrné baňky (10 ml) byl přidán vnitřní standard (1-butanol) a následně byla odměrná baňka doplněna vzorkem po rysku. Následně byl vzorek přefiltrován do vialky. Analýzy byly prováděny na přístroji Agilent 6890N (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) s kvadrupólovým hmotnostním detektorem Agilent 5973(Network Mass Selective Detector) vybavený kapilární kolonou HP-Innowax (Agilent Technologies, USA) o rozměrech 30 m x 250 µm s tloušťkou filmu 0,25 µm. Nástřik byl 1µl vzorku v režimu pulsed splitless a hmotnostní detektor byl v módu SCAN. Nástřikový prostor byl vyhřát na teplotu 220 °C. Počáteční teplota analýzy byla 40 °C a průtok nosního plynu byl 1ml/min. Počáteční teplota byla držena 3 minuty, následně teplota stoupala gradientem 5 °C/min do teploty 140 °C, potom 8 °C/min do 240 °C a tato teplota byla držena 10 minut.

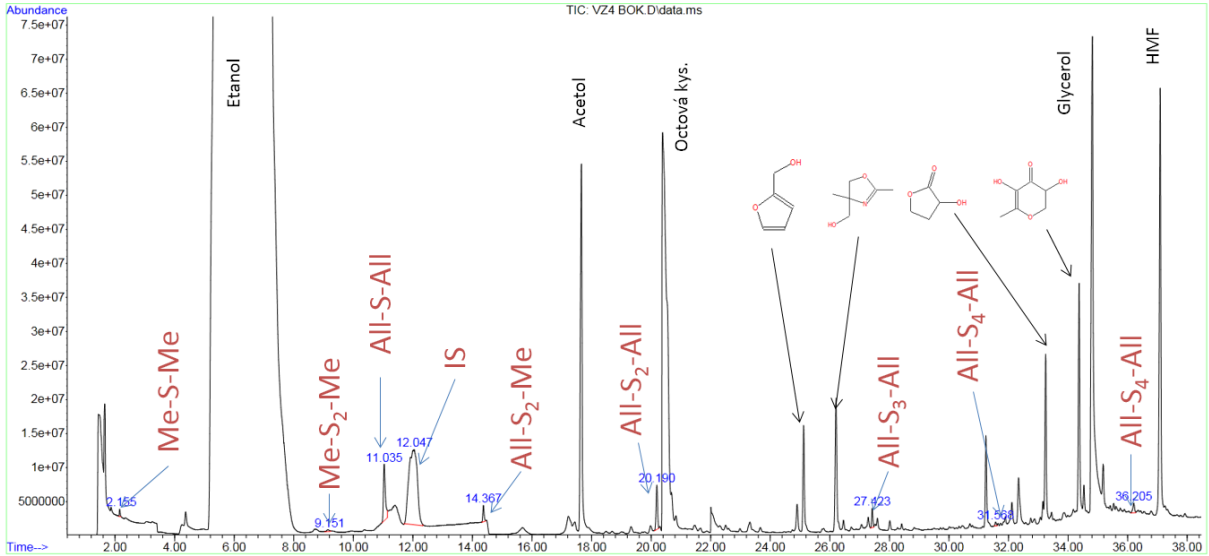
Pomocí knihovny spekter NIST byly zjištěny analyty, které se kvantifikovaly pomocí 1-butanolu, jakožto vnitřního standardu. Sledované analyty dialk(en)ylsulfidy a dial(en)yloligosulfidy jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka č 1: Sledované analyty v česnekových ethanolových extraktech

Název	Zkratka	Vzorec
dimethylsulfid	Me-S-Me	
dimethyldisulfid	Me-S_2-Me	
allylmethyldisulfid	All-S_2-Me	
diallylsulfid	All-S-All	
diallyldisulfid	All-S_2-All	
diallyltrisulfid	All-S_3-All	
diallyltetrasulfid	All-S_4-All	
diallylpentasulfid	**All-S_5-All**	

Výsledky a diskuze

Na obrázku č. 1 je vidět chromatogram analyzovaného vzorku, z něhož je patrné, že česnekové tinktury jsou velice komplexní matrice, které obsahují velké množství různých chemických látek. Největší obsah z matrice tvoří ethanol. Dalšími významnými složkami, které nebyly kvantifikovány, jsou acetol, kyselina octová, glycerol a hydroxymethylfurfural.



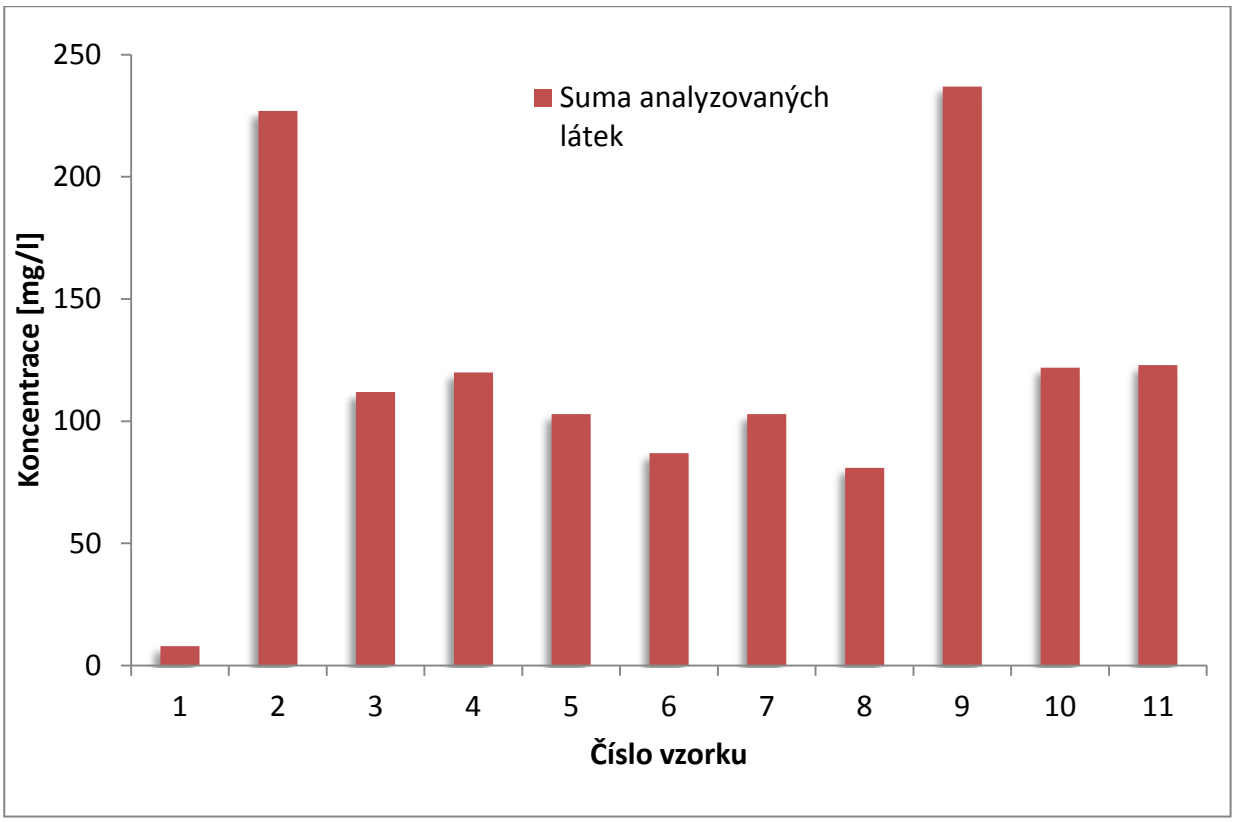
Obrázek č. 1: ukázka chromatogramu analyzovaného vzorku číslo 4.

Poprvé přítomnost diallydisulfidu a diallyltrisulfidu v česnekovém aroma popsal Semmler 1892. V tabulce č. 2 lze vidět výsledky obsahu dialk(en)ylsulfidy a dial(en)yloligosulfidy ve všech jedenácti vzorcích. Z výsledků vyplývá, že nejvíce zastoupený je allylmethyldisulfid, kterého následuje diallyldisulfid. Nejméně byl zastoupen dimethylsulfitd, který byl přítomen jen v jednom vzorku.

Tabulka č 2: Zastoupení jednotlivých dialk(en)ylsulfidů a dial(en)yloligosulfidů v jednotlivých vzorcích

Vzorek	Me-S-Me [mg/l]	Me-S_2-Me [mg/l]	All-S_2-Me [mg/l]	All-S-All [mg/l]	All-S_2-All [mg/l]	All-S_3-All [mg/l]	All-S_4-All [mg/l]	All-S_5-All [mg/l]
1	n.d.	n.d.	1,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1	n.d	n.d
2	n.d.	n.d.	144,9 ± 7,4	7,7 ± 0,2	34,0 ± 0,2	12,9 ± 0,1	18,2 ± 0,1	9,2 ± 0,2
3	n.d.	2,5 ± 0,2	64,3 ± 1,2	9,3 ± 0,4	23,5 ± 0,5	8,4 ± 0,1	3,6 ± 0,1	n.d
4	n.d.	2,7 ± 0,1	66,8 ± 0,3	11,1 ± 0,4	24,4 ± 0,6	9,0 ± 0,2	3,7 ± 0,2	2,1 ± 0,2
5	n.d.	1,6 ± 0,1	59,6 ± 2,6	7,1 ± 0,4	21,3 ± 0,1	7,2 ± 0,1	4,8 ± 0,3	1,6 ± 0,1
6	n.d.	1,3 ± 0,1	43,9 ± 0,3	4,7 ± 0,1	23,0 ± 0,2	7,7 ± 0,1	4,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1
7	n.d.	2,7 ± 0,2	49,5 ± 0,7	8,3 ± 0,1	24,9 ± 1,5	9,0 ± 0,3	5,2 ± 0,1	3,8 ± 0,2
8	n.d.	1,1 ± 0,1	32,9 ± 0,2	6,0 ± 0,1	21,1 ± 2,0	7,4 ± 0,4	6,9 ± 0,2	5,8 ± 0,1
9	n.d.	1,0 ± 0,1	157,0 ± 13	9,0 ± 0,3	36,9 ± 0,9	10,1 ± 0,2	15,4 ± 0,1	7,8 ± 0,2
10	2,2 ± 0,1	1,4 ± 0,2	57,6 ± 0,5	7,7 ± 0,1	26,9 ± 2,6	8,3 ± 0,6	12,4 ± 0,2	6,3 ± 0,1
11	n.d.	n.d.	91,4 ± 1,4	5,7 ± 0,4	17,0 ± 0,5	2,7 ± 0,3	6,2 ± 0,1	n.d

Na obrázku č. 2 je vidět celkový obsah dialk(en)ylsulfidů a dial(en)yloligosulfidů, z něhož vyplývá, že největší obsah byl ve vzorku č. 2 a 9. Nejnižší obsah byl ve vzorku č. 2, který byl jako jediný od zahraničního výrobce. Literatura uvádí, že v AGE („Aged Garlic Exrtract“ = extrakt vzniklý dlouhodobým skladováním česneku v ethanolu) byly nalezeny velmi různé obsahy. Například v roce 2004 1110,0-1227,6 mg/l oproti roku 2002, kdy byl obsah celkových oligosulfidů 252,4 mg/l. V některých vzorcích se nevyskytovaly vůbec. I to dokazuje složitost analyzované matrice.



Obrázek č. 2: Suma dialk(en)ylsulfidů a dial(en)yloligosulfidů v jednotlivých vzorcích

Závěr

Vyvinutá metoda na stanovení sirných látek v česnekových tinkturách je rychlá a robustní. Příprava vzorků je jednoduchá: filtrace přes membránový filtr, následné zředění a přidaní vnitřního standardu. Pomocí této metody byly analyzovány komerčně dostupné česnekové extrakty v ethanolu, přičemž bylo zjištěno, že nejvíce dialk(en)ylsulfidů a dial(en)yloligosulfidů bylo ve vzorcích č. 2 a 9. Ve vzorku č. 1 byl obsah sirných sloučenin nejmenší ze všech analyzovaných vzorků, pravděpodobně kvůli použití nekvalitních surovin nebo technologické chybě při výrobě.

Literatura

Ichikawa, M., et al. *Change in organosulfur compounds in garlic cloves during storage.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54, 4849-4854

Kubec, R., et al. *Gas chromatographic determination of S-alk(en)ylcysteine sulfoxides*, Journal of chromatography A, 1999, 862, 85-94

Velíšek J., Vos R., Schouten A. 1993. *HPLC Determination of Allin and its Transformation Products in Garlic and Garlic-containing Phytomedical Preparation*, Potravinářské vědy 11(6):445-453

P 10

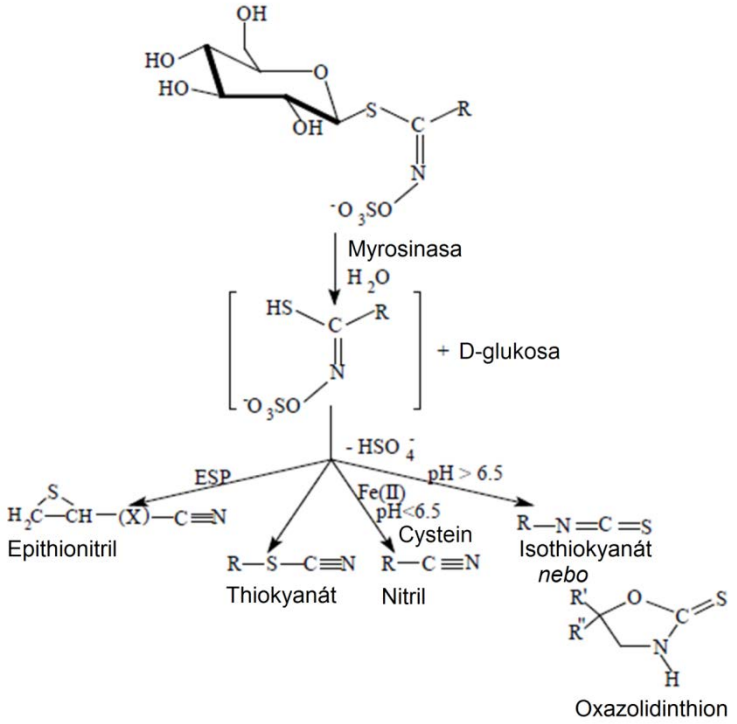
ROČNÍ SLEDOVÁNÍ KVALITY STROUHANÉHO KŘENU NA ČESKÉM TRHU

Duchová I., Neradová E., Kružík V., Haubeltová A., Čížková H.,
Ústav konzervace potravin, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6

ÚVOD

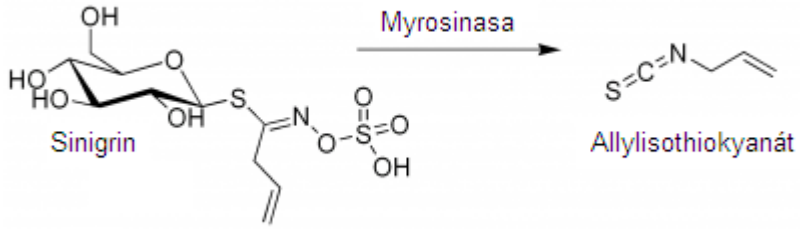
Křen obsahuje řadu biologicky aktivních látek, které mají pozitivní vliv na lidské zdraví, významná je jeho antioxidační, antimutagenní, antibakteriální a antifungální aktivita. Křen lze v obchodních řetězcích koupit v mnoha různých podobách – čerstvý křen, předpřipravený strouhaný křen, křen s dalšími přísadami, např. jablečný křen, křenová pasta, pomazánkový krém s křenovou příchutí aj.

Typické štiplavé aroma a pálivá chuť křenu selského (*Armoracia rusticana*, čeleď *Brassicaceae*) vzniká až během mechanického porušení pletiva. Strouháním či krájením se uvolňuje enzym myrosinasa (EC 3.2.1.147), který hydrolyzuje přítomné glukosinoláty za vzniku glukosy a dalších látek (Obr. 1).



Obr. 4: Hydrolýza glukosinolátů křenu za různých podmínek (Daniela, 2006)

Z celkové sumy glukosinolátů tvoří přibližně 80 % sinigrin, ze kterého působením myrosinasy vzniká allylisothiokyanát (AITK), látka odpovědná za charakteristické senzorické vlastnosti křenu (Obr. 2).



Obr. 5: Hydrolýza sinigrinu na allylisothiokyanát

Jelikož se jedná o přírodní produkt, lze u kořene křenu očekávat velkou variabilitu v obsahu a zastoupení biologicky aktivních složek, v důsledku rozdílných klimatických podmínek, typu půdy, dostupnosti živin a době produkce. Variabilita ve vstupní surovině pak má za následek výkyvy v kvalitě strouhaného křenu jako finálního výrobku uváděného na trh.

Pro přímé stanovení obsahu glukosinolátů a isothiokyanátů se uplatňuje nejčastěji kapalinová a plynová chromatografie, tyto metody vyžadují speciální přístroje, které nejsou běžné v provozních laboratořích výrobních podniků. Dále lze obsah glukosinolátů stanovit nepřímo po enzymatickém štěpení na základě uvolněné glukosy spektrofotometricky či titrací uvolněných kyselin.

Cílem práce bylo zhodnotit kvalitu strouhaného křenu na českém trhu. Během ročního sledování bylo analyzováno přes 100 vzorků s minimální trvanlivostí 6 měsíců od data výroby. Vzorky byly analyzovány 3 až 10 dnů od výroby. Jako jakostní ukazatele kvality byly vybrány senzorické vlastnosti, obsah AITK a ostatních isothiokyanátů (ITK), a obsahy přídatných látek (SO_2 a oleje). Přídatné látky jako oxid siřičitý a řepkový olej se používají pro zlepšení a uchování senzorických vlastností výrobku. Oxid siřičitý konzervuje a zabraňuje hnědnutí nastrouhaného křenu, olej zlepšuje vzhled výrobku.

Naší snahou bylo také navrhnout rychlou a jednoduchou metodu pro stanovení kvality vstupní suroviny již při příjmu suroviny do výrobního závodu.

METODY

Stanovení AITK a ostatních isothiokyanátů pomocí SPME/GC/MS

Instrument: plynový chromatograf (7890A Agilent Technologies) s hmotnostním detektorem (5975C Agilent Technologies).

Izolační podmínky: DVB/Carboxen™/PDMS StableFlex™ vlákno 50/30 μm, temperování vzorku 1 minutu při teplotě 40 °C, extrakce 10 minut při teplotě 40 °C, desorpce 4 minuty při teplotě 280 °C.

Chromatografické podmínky: kolona HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane (Agilent), 30 m x 250 μm x 0,25 μm; mobilní fáze: helium, konstantní průtok 1,4 $ml.min^{-1}$.

Obsah AITK a ostatních ITK byl stanoven pomocí kalibrační křivky.

Stanovení oxidu siřičitého

Oxid siřičitý se z okyseleného vzorku uvolní destilací a oxiduje se peroxidem vodíku. Vzniklá kyselina sírová se ztitruje hydroxidem.

Stanovení celkového tuku

Extrakcí petroletherem v Soxhletově extraktoru (Soxtec™ 2043, Foss).

Program: 20 min louhování – 35 min promývání – 10 min regenerace rozpouštědla, vše při 90 °C.

Senzorická analýza

Test intenzity štiplavosti – hodnocení pomocí tříbodové stupnice.

VÝSLEDKY A DISKUSE

U všech vzorků strouhaného křenu byla provedena senzorická analýza, při které se hodnotila intenzita štiplavosti. Vzorky byly hodnoceny tříbodovou stupnicí: (1) mdlý, nevýrazný; (2) poctivý, typický; (3) příliš štiplavý/pálivý. 23 % vzorků bylo hodnoceno jako mdlé, nevýrazné, 45 % vzorků odpovídalo představě hodnotitelů o typickém, poctivém křenu a 32 % vzorků bylo hodnoceno jako příliš štiplavých.

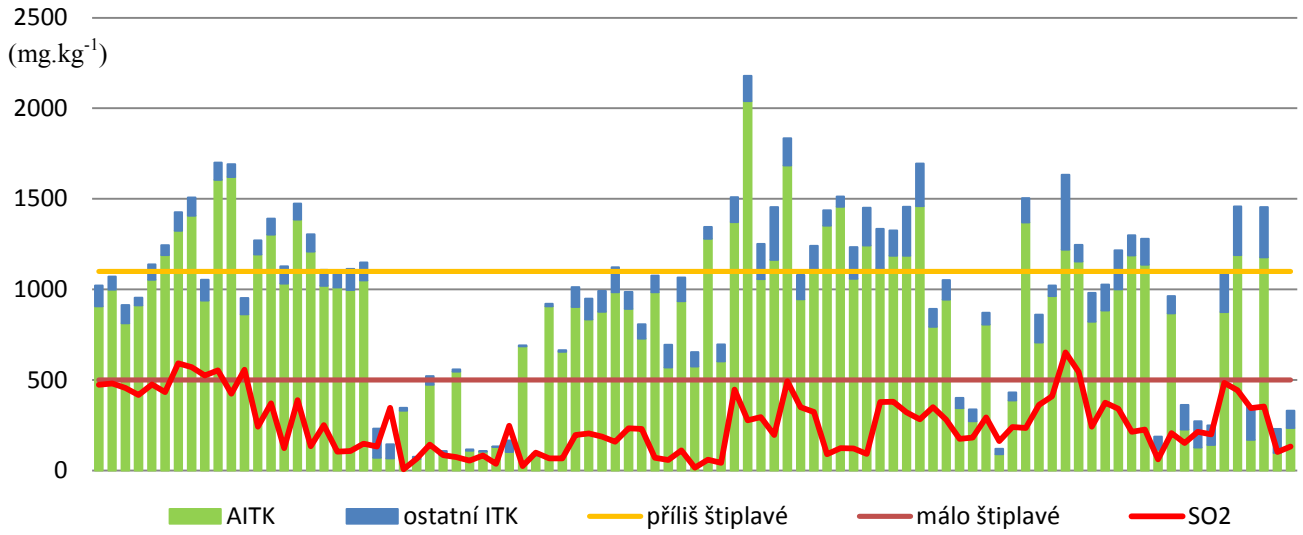
Pomocí SPME/GC/MS analýzy bylo v křenu identifikováno 9 ITK: allylisothiokyanát, butyl isothiokyanát, isobutyl isothiokyanát, 3-butenyl isothiokyanát, cyklompentyl isothiokyanát, n-pentyl isothiokyanát, benzyl isothiokyanát, β-penetyl isothiokyanát a 1-isothiokyanato-3-metylbuten.

Z porovnání výsledků senzorického hodnocení a stanovení obsahu AITK bylo možné stanovit hranici minimálně 500 mg AITK na kg křenu pro hodnocení vzorku jako typický, odpovídající představě o kvalitním křenu. Obsah AITK u vzorků hodnocených jako příliš štiplavé byl nad 1100 $mg.kg^{-1}$.

Průměrné naměřené hodnoty jakostních ukazatelů kvality a rozmezí naměřených hodnot (min–max) uvádí tabulka (Tab. 1), výsledky jednotlivých vzorků jsou na obrázku (Obr. 3). Námi zjištěné obsahy AITK jsou srovnatelné s výsledky Kasson a kol. (2008), který zkoumal obsah AITK u polského (1000–1400 $mg.kg^{-1}$) a maďarského křenu (700–750 $mg.kg^{-1}$).

Tab. 4: Naměřené hodnoty obsahu AITK, ostatních ITK, oxidu siřičitého a přidaného tuku

	AITK	ostatní ITK	SO_2	tuk
	$mg.kg^{-1}$	$mg.kg^{-1}$	$mg.kg^{-1}$	%
Průměr	845	110	253	1,9
SD	446	70	160	1,4
MIN	64	3	6	0,1
MAX	2039	413	651	5,9



Obr. 6: Výsledky jednotlivých vzorků strouhaného křenu

TESTOVANÉ RYCHLÉ METODY STANOVENÍ OBSAHU GLUKOSINOLÁTŮ

Na základě uvolněné glukosy dle Smith (1987)

Glukosinoláty jsou hydrolyzovány pomocí endogenní myrosinasy, čímž dojde k uvolnění glukosy, která je následně stanovena pomocí kolorimetrické metody. Pro stanovení přirozeně přítomné glukosy ve vzorku (tj. blank vzorku) je myrosinasa deaktivována okyseleným 40% metanolem. Glukosa je stanovena pomocí kolorimetrické metody s testovacími proužky (Glucose MQuant 10-500mg/l, Merck Millipore).

Obsahy glukosy ve vzorku a příslušném blanku byly velmi podobné (viz Tab. 2). Tento vysoký obsah volné glukosy brání přesnější kvantifikaci glukosy vzniklé z glukosinolátů. Nárůst glukosy po hydrolýze byl velmi malý a přesnost stupnice neumožňovala takový přírůstek podstatně rozeznat.

$$Glukosinoláty\ \left(\frac{mg}{kg}\right) = glukosa\left(\frac{mg}{l}\right) * \frac{M(sinigrin)}{M(glukosa)} * faktor\ \text{ředění} * celkový\ objem\ (l) * \frac{1000}{navážka\ (g)}$$

Tab. 5: Stanovení obsahu glukosinolátů dle Smith (1987)

Vzorek	Glukosa - uvolněná ($mg.l^{-1}$)*	Glukosa - blank ($mg.l^{-1}$)*	Δ Glukosa ($mg.l^{-1}$)	Glukosinoláty ($mg.kg^{-1}$)**
mdlý, nepálí	20-25	15-20	5	1670
typický, pálivý	25	15-20	7,5	2500

* odečteno z barevné stupnice Glucose MQuant

** vyjádřeno jako obsah sinigrinu ($mg.kg^{-1}$), pro výpočet použity průměrné hodnoty

Titračně dle Croft (1979)

Stanovení je založené na reakci extraktu křenu s inaktivovanou myrosinasou s enzymově aktivním extraktem ze semen hořčice bílé, čímž dojde k uvolněním kyselin, které jsou následně titrovány hydroxidem sodným na pH 6.

Strouhané křeny a křeny v celku jsou podle obsahu AITK špatně porovnatelné. Okamžitě po nastrouhání probíhají ve vzorcích křenů rozkladné enzymové reakce, které významně ovlivňují výsledky stanovení.

ZÁVĚR

Z porovnání získaných hodnot AITK a senzorického hodnocení lze konstatovat, že výrobky s obsahem AITK pod 500 $mg.kg^{-1}$ jsou hodnoceny jako mdlé, nevýrazné a neodpovídají představě o kvalitním strouhaném křenu. Na druhé straně, vzorky s obsahem AITK nad 1100 $mg.kg^{-1}$ byly hodnoceny jako příliš štiplavé. Z naměřených výsledků je zřejmé, že kvalita strouhaného křenu na trhu není stabilní. Navrhované rychlé metody pro stanovení kvality vstupní suroviny potřebují další ověření a optimalizaci z důvodu nestabilního poměru mezi volnou a vázanou formou glukosy, matričního efektu. Vedle koncentrace cílového analytu výsledek významně ovlivňuje i aktivita endogenního enzymu myrosinasy.

PODĚKOVÁNÍ

Projekt byl financován z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20/2014): A1_FPBT_2014_006.

POUŽITÁ LITERATURA

- Bladh K.W. a kol., 2013: *Evaluation of glucosinolates in nordic horseradish (Armoracia rusticana)*. Botanica Lithuanica, 19(1), str. 45-56.
- Croft A.G., 1979: *The determination of total glucosinolates in rapeseed meal by titration of enzyme-liberated acid and the identification of individual glucosinolates*. J.Sci. Food Agric., 30, str. 417-423.
- Daniela M. a kol., 2006: Myrosinase aktivity in *Aromatica rusticana*. USAMV-CN, str. 88-93.
- Davídek J. a kol., 1981: Laboratorní příručka analýzy potravin. Praha, str. 476-477.

- Kasson R. a kol., 2008: *Effect of long term storage on some nutritive components and isothiocyanates content in roots of two horseradish types*. Vegetable crops research bullerin, 69, str. 155-164.
- Smith C.A. a Dacombe C., 1987: *Rapid method for determining total glucosinolates in rapeseed by measurement of enzymatically released glucose*. J. Sci. Food Agric., 38, str. 141-150.

P 11

OCHRATOXIN A V KÁVĚ

Slavíková P.[1], Džuman Z.[1], Zachariášová M.[1], Hajšlová J.[1]
[1] Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 - Dejvice

ÚVOD:

Jedním z nejznámějších a nejrozšířenějších nápojů světa je káva, která zaujímá na světovém trhu 2. místo jako nejprodávanější artikl hned po ropě. Největšími producenty jsou Brazílie, Vietnam a následně Kolumbie s Indonésií. 2. místo také tato pochutina obsadila ve spotřebním žebříčku nealkoholických nápojů hned po vodě. Globálně je spotřebováno více jak 400 mld. šálků ročně a toto číslo stále roste.[1] V roce 2011 byla spotřeba této komodity dle Mezinárodní kávové organizace (ICO) v České republice 3,26, Švédsku 7,14 a Dánsku 8,21 kg/osobu/rok.[2] Kromě celé řady pozitivních účinků na lidský organismus jako třeba prokázané antioxidační a proti-rakovinné účinky může káva představovat i riziko v důsledku častého nedodržování podmínek správné hospodářské praxe (skladování atd.), tím pádem možného napadení mikromycetami a následné produkce toxických sekundárních metabolitů – mykotoxinů.

Jedním z těchto toxinů je i ochratoxin A (14-(S)-ochratoxin A; OTA), nejvýznamnější zástupce skupiny ochratoxinů. Hlavními producenty OTA jsou *Aspergillus ochraceus* a *Penicillium verrucosum*.[3] OTA je často se vyskytujícím ´přírodním´ kontaminantem obilovin, ovoce, kávy a potažmo komodit jako pečivo a víno. Významná část příjmu OTA v lidské výživě pochází především z obilovin, ale částečně také právě z kávy.[4] Maximální hladiny OTA jsou v EU regulovány nařízením Komise č. 1881/2006, kde je stanoveno 5 µg/kg pro praženou kávu a 10 µg/kg pro kávu instantní. Je prokázáno, že OTA vykazuje renální toxicitu a genotoxicitu, proto je Mezinárodní organizací pro výzkum rakoviny (IARC) zařazen do skupiny 2B, tj. potencionální lidský karcinogen.[5] Z těchto důvodů stanovil Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) pro OTA tolerovatelný týdenní příjem (TWI) 120 ng/kg tělesné hmotnosti.

Uvedená studie byla realizována v rámci specifického vysokoškolského výzkumu za finanční podpory projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky MŠMT č. 21/2012.

CÍL STUDIE:

Cílem této studie je v prvé řadě zhodnocení úrovně kontaminace souboru komerčně dostupných vzorků pražených a instantních káv z obchodních sítí České Republiky, Švédska a Dánska OTA, dále posouzení kontaminace kávy ve vztahu k výrobní technologii a ilustrace procesu tepelné degradace OTA s identifikací reakčních produktů, k čemuž bylo využito imunoafinitního přečištění (Ochraprep®) pro izolaci OTA, ultra-účinného kapalinového chromatografu ACQUITY UPLC® System ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem QTRAP® 5500 (UPLC-MS/MS) pro vlastní stanovení analytu a ultra-účinného kapalinového chromatografu U-HPLC ACCELA™ ve spojení s hmotnostním spektrometrem Exactive™ s vysokorozlišovacím analyzátorem Orbitrap™ k identifikaci reakčních produktů tepelné degradace.

CHEMIKÁLIE, SPOTŘEBNÍ MATERIÁL, INSTRUMENTACE:

- běžné laboratorní sklo a vybavení, *Simax, Labicom, Merci (ČR)*
- mikrofiltry 0,2 µm, *Alltech (USA)*
- plastové centrifugační zkumavky 2 ml (pro použití s mikrofiltry), *Alltech (USA)*
- deionizovaná voda (Milli-Q , *Millipore Corp., USA*)
- metanol, HPLC gradient, *Merck (Německo)*
- acetonitril, HPLC gradient, *Sigma Aldrich (ČR)*
- hydrogenuhličitan sodný, *Lach-Ner (ČR)*
- mravenčan amonný p.a., *Sigma Aldrich (ČR)*
- kyselina mravenčí 99%, *Sigma Aldrich (ČR)*
- kyselina octová 99,99%, *Sigma Aldrich (ČR)*

- fosfátový pufr (PBS) v tabletách, *Sigma-Aldrich (ČR)*
- analytický standard ochratoxinu A (99,5%), *Biopure (Rakousko)*
- certifikovaný referenční materiál OTA v mleté pražené kávě ERM® BD475 (6.0 ± 0.6) µg kg^{-1}, *European Reference Materials (Belgie)*
- IAC imunoafinitní kolonky OCHRAPREP®, *R-Biopharm (Německo)*
- ultra-účinný kapalinový chromatograf ACQUITY UPLC™ System, *Waters Corp. (USA)* ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem QTRAP® 5500, *AB Sciex (USA)*
- ultra-účinný kapalinový chromatograf U-HPLC ACCELA™ ve spojení s hmotnostním spektrometrem Exactive™ s vysokorozlišovacím analyzátorem Orbitrap™, *Thermo Fisher Scientific (USA)*

VZORKY:

Za účelem prošetření výskytu OTA v kávě bylo zakoupeno na konci roku 2011 a v průběhu roku 2012 107 vzorků, z toho 87 mletých pražených káv českého (57 vz.), švédského (16 vz.) a dánského původu (14 vz.) a 20 instantních káv pouze z českého trhu.

ÚPRAVA VZORKŮ:

Ze zhomogenizovaných vzorků bylo do erlenmayerovy baňky odváženo 5 g vzorku a zalito 100 ml 1% roztoku hydrogenuhličitanu sodného ve vodě. Následovalo 60-ti minutové třepání při 210 otáčkách za minutu na horizontální třepačce, 10-ti minutové odstředění extraktu při 10 000 otáčkách za minutu a odběr alikvótního podílu 20 ml supernatantu (odpovídá 1 g matrice). Ten byl následně zředěn 20-ti ml pufru PBS a nanesen na kondicionovanou imunoafinitní kolonku OCHRAPREP® (průtok 2 ml/min.). Poté bylo nutné kolonku promýt dalšími 20-ti ml PBS (průtok 5 ml/min.) a na závěr přes ni propustit několik ml vzduchu. OTA navázaný v kolonce byl eluován 3 ml směsi metanol:kyselina octová (98:2, v/v) a 1,5 ml deionizované vody. Získaný eluát byl odpařen do sucha, odparek rozpuštěn v 1 ml směsi metanol:voda (1:1, v/v), přečištěn pomocí mikrofiltru (0,2 µm) a analyzován s využitím LC-MS.

INSTRUMENTÁLNÍ ANALÝZA:

Ke zhodnocení úrovně kontaminace kávy ochratoxinem A byla aplikována cílová analýza OTA s využitím ultra-účinného kapalinového chromatografu ACQUITY UPLC® ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem QTRAP® 5500. Souhrn chromatografických a hmotnostně-spektrometrických podmínek je uveden v **tabulkách I. a II**.

Tab. I: Podmínky kapalinové chromatografie pro OTA (U-HPLC-[ESI+]-MS/MS)

KOLONA	HSS T3 UPLC® (100x2.1 mm; 1,8 µm)			
TEPLOTA KOLONY	40 °C			
OBJEM NÁSTŘIKU	5 µl			
DÉLKA METODY	12 min.			
SLOŽENÍ MOBILNÍ FÁZE	A: 5mM mravenčan amonný, B: MeOH			
GRADIENT MOBILNÍ FÁZE	**čas [min]**	**A [%]**	**B [%]**	**průtok [ml/min.]**
	0	90	10	0,35
	1	50	50	0,35
	8	0	100	0,7
	10	0	100	0,7
	10,01	90	10	0,35
	12	90	10	0,35

Tab. II: Hmotnostně-spektrometrické podmínky měření (QTRAP® 5500, tandemová MS-kvadrupól/iontová past)

DETEKČNÍ MÓD	MRM
MRM DETEKCE	60 sec
IONIZACE	ESI+
NAPĚTÍ NA ELEKTROSPREJI	+ 4500 V
TEPLOTA ZDROJE	600 °C
ŘÍDÍCÍ A VYHODNOCOVACÍ SOFTWARE	ANALYST® Software 1.1

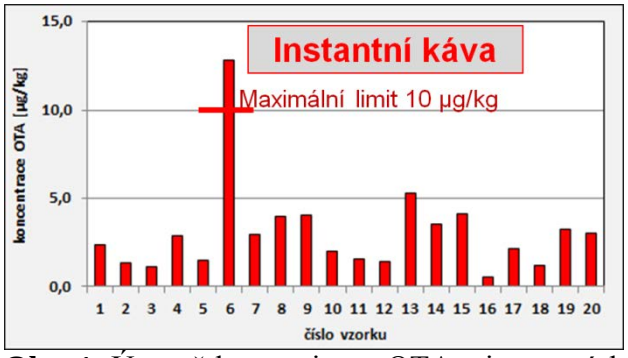
VÝSLEDKY A DISKUZE:

1. Zhodnocení úrovně kontaminace OTA souboru 107 vzorků pražených a instantních káv a následné posouzení kontaminace kávy ve vztahu k výrobní technologii

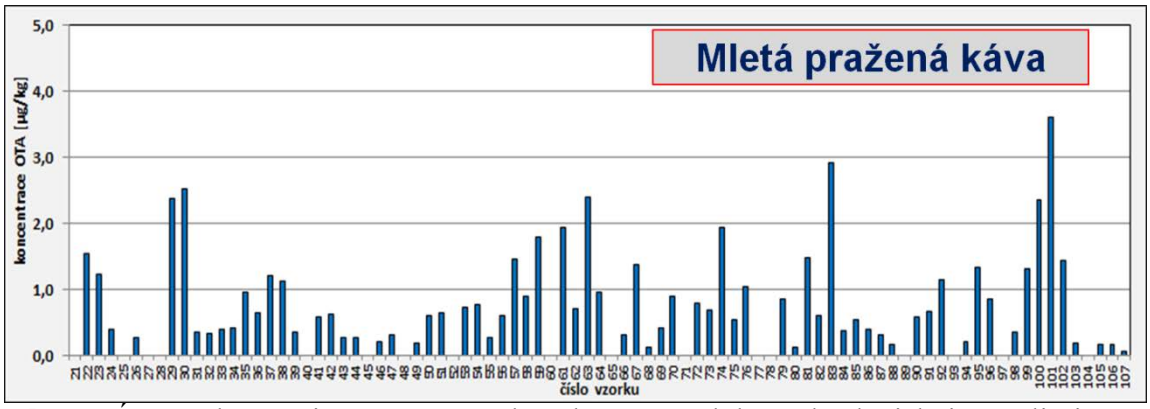
Z celkového počtu 87 vzorků mletých pražených káv byl ochratoxin A detekován v 70 vzorcích, tzn. v 80 %, a to s koncentracemi v rozsahu od 0,1 do 3,6 µg/kg. Průměrná koncentrace v rámci pozitivních vzorků byla relativně nízká, a to 0,87 ± 0,01 µg/kg.

U vzorků instantních káv byla přítomnost OTA potvrzena ve všech 20 vzorcích, tedy ve 100 %. Koncentrace se pohybovaly v rozmezí od 0,6 do 12,8 µg/kg a průměrná koncentrace byla 3,06 ± 0,08 µg/kg. Vztáhneme-li veškeré výsledky (viz **obr. 1** a **obr. 2**) k legislativním limitům 5 µg/kg pro praženou kávu a 10 µg/kg pro kávu instantní (nařízení Komise č. 1881/2006), dojdeme k závěru, že pouze jeden vzorek instantní kávy tuto hladinu překročil, a to o 2,8 µg/kg.

Kromě zhodnocení míry kontaminace OTA v jednotlivých vzorcích káv celého souboru byl také posuzován rozdíl koncentračních hladin mezi skupinami pražená versus instantní káva. Výchozím předpokladem bylo, že instantní káva by měla vykazovat vyšší nálezy OTA v závislosti na výrobní technologii, při které je původní kávová matrice cca. 3x koncentrovanější. Z výsledků vyplývá, že byl tento předpoklad potvrzen.



Obr. 1: Úroveň kontaminace OTA v instantních kávách s legislativním limitem 10 µg/kg



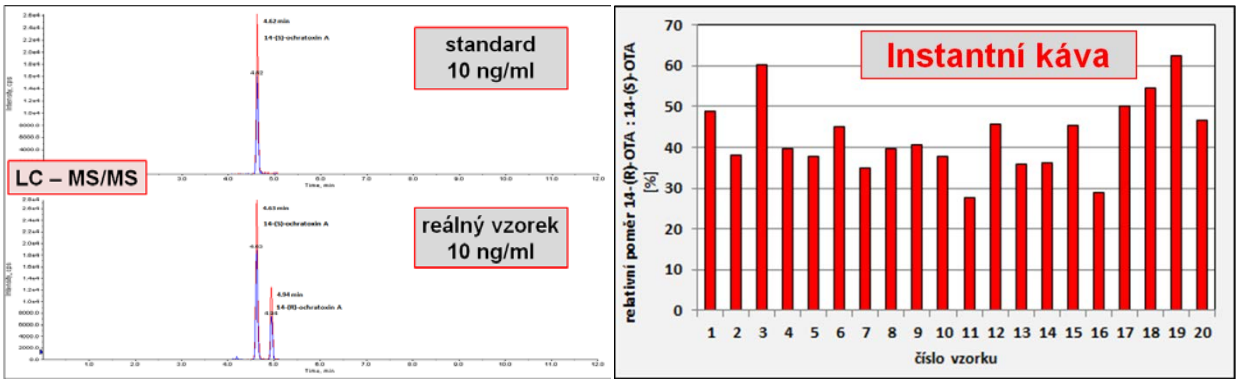
Obr. 2: Úroveň kontaminace OTA v mletých pražených kávách s legislativním limitem 5 µg/kg

2. Ilustrace procesu tepelné degradace OTA s identifikací reakčních produktů

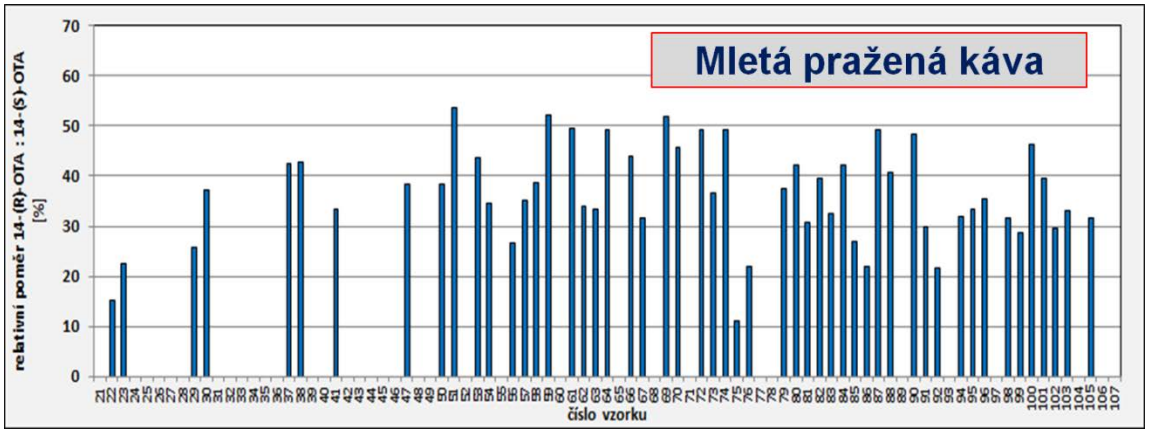
V rámci provedených analýz s využitím tandemové hmotnostní spektrometrie byl detekován neznámý degradační produkt OTA. V chromatografickém záznamu řady vzorků byly přítomny odezvy se stejným poměrem intenzit kvantifikačního a konfirmačního iontu (**viz obr. 3**). Vzhledem k principu této techniky, dodatečné analýzy s využitím vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie a na základě dostupné literatury byla potvrzena přítomnost degradačního produktu 14-(R)-OTA vznikajícího z OTA v důsledku vysokých pražících teplot, za kterých tato sloučenina izomeruje. Tento produkt je podle dostupných literárních informací 10x méně toxický než výchozí sloučenina.[6]

Po tomto zjištění byla na 14-(R)-OTA zpětně zaměřena pozornost v rámci celého souboru vyšetřovaných vzorků a proměřeno její relativní zastoupení pomocí porovnání ploch píků obou isomerů z důvodu neexistujícího komerčního standardu (**viz obr. 4 a obr. 5**).

V 60 % vzorků pražených káv (52 z 87 vz.) byl kromě S-isomeru identifikován také isomer R s průměrným relativním zastoupením 36 % vůči S formě OTA. U instantních káv byla stejně jako v případě S-isomeru zaznamenána 100% incidence R-isomeru a to s relativním zastoupením R formy k S formě 43 %.



Obr. 3: Chromatografický záznam přítomnosti degradačního produktu (vlevo)
Obr. 4: Relativní zastoupení degradačního produktu 14-(R)-OTA v instantních kávách (vpravo)



Obr. 5: Relativní zastoupení degradačního produktu 14-(R)-OTA v mletých pražených kávách

LITERATURA:

1. Mussatto, S. I.; Machado, E. M. S.; Martins, S.; Teixeira, J. A. Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food Bioprocess Technol* **2011**, 4, 661–672
2. Country datasheets, **2011**. International Coffee Organization. http://www.ico.org/profiles_e.asp?section=Statistics (accessed July 14, 18)
3. Creppy E.E.: Update of survey, regulation and toxic effect of mycotoxins in Europe, *Toxicol. Lett.***2002,** 127, 19-28

4. Coronel M.B., Marin S., Cano G., Ramos A.J., Sanchis V.: Ochratoxin A in Spanish retail ground roasted coffee: Occurrence and assessment of the exposure in Catalonia, *Food Control* **2011,** 22, 414-419
5. Agents classified by the IARC Monographs, volumes 1 - 109, **2014**. International Agency for Research on Cancer. http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php (accessed July 14, 18)
6. Cramer, B.; Königs, M.; Humpf, H. Identification and in Vitro Cytotoxicity of Ochratoxin A Degradation Products Formed during Coffee Roasting. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 5673–5681

P 12

MOŽNOSTI VYUŽITÍ TECHNIKY DART-TOF/MS PRO RYCHLÉ POSOUZENÍ AUTENTICITY ČOKOLÁD

Kružík V., Hofmanová A., Prchalová J., Rajchl A., Čížková H.
Ústav konzervace potravin, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika

ÚVOD

Čokoláda je celosvětově velmi oblíbenou potravinou. Hlavními surovinami pro její výrobu jsou kakaová hmota a kakaové máslo. Vzhledem k vysoké ceně těchto složek může být čokoláda falšována buď náhradou kakaového másla levnějšími rostlinnými tuky, nebo snížením celkové tukuprosté kakaové sušiny. Cílem této práce bylo využití techniky DART-TOF/MS ke zhodnocení kvality a autenticity vzorků čokolád zakoupených v české tržní síti. Mezi hlavní výhody této techniky patří možnost proměření většího množství vzorků v relativně krátkém čase a jejich jednoduchá příprava. Výsledky stanovené pomocí metody analýzy v reálném čase byly následně korelovány s hodnotami získanými prostřednictvím klasických laboratorních metod.

Požadavky na kvalitu čokolády jsou v národní legislativě stanoveny Vyhláškou 76/2003 Sb. Jedním z nejdůležitějších parametrů, který je definovaný pro všechny druhy čokolád (kromě bílé čokolády) je obsah tukuprosté kakaové sušiny (TKS). V hořké čokoládě musí být obsah TKS minimálně 14 % a v mléčné čokoládě minimálně 2,5 %. TKS se stanovuje na základě obsahu kofeinu a theobrominu. V čokoládě a čokoládových výrobcích se výše uvedené sloučeniny vyskytují v poměru 1:10 (kofein:theobromin).

Kakaové máslo je nejdůležitější složkou čokolády z pohledu texturních vlastností. Je to dáno jeho specifickým bodem tání (cca 35 °C), který umožňuje snadné rozpouštění čokolády v ústech. Kakaové máslo obsahuje převážně následující triacylglyceroly (TAG): 1,3-dipalmitoyl-2-oleoylglycerol (POP), 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoylglycerol (POS) a 1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol (SOS). Tyto látky se využívají jako markery čistoty kakaového másla.

MATERIÁL A METODY

V rámci této studie bylo celkem analyzováno 14 vzorků různých čokolád. Konkrétně se jednalo o 7 vzorků komerčně dostupných mléčných čokolád (MC01-MC07) a 7 vzorků hořkých čokolád (HC01-HC07).

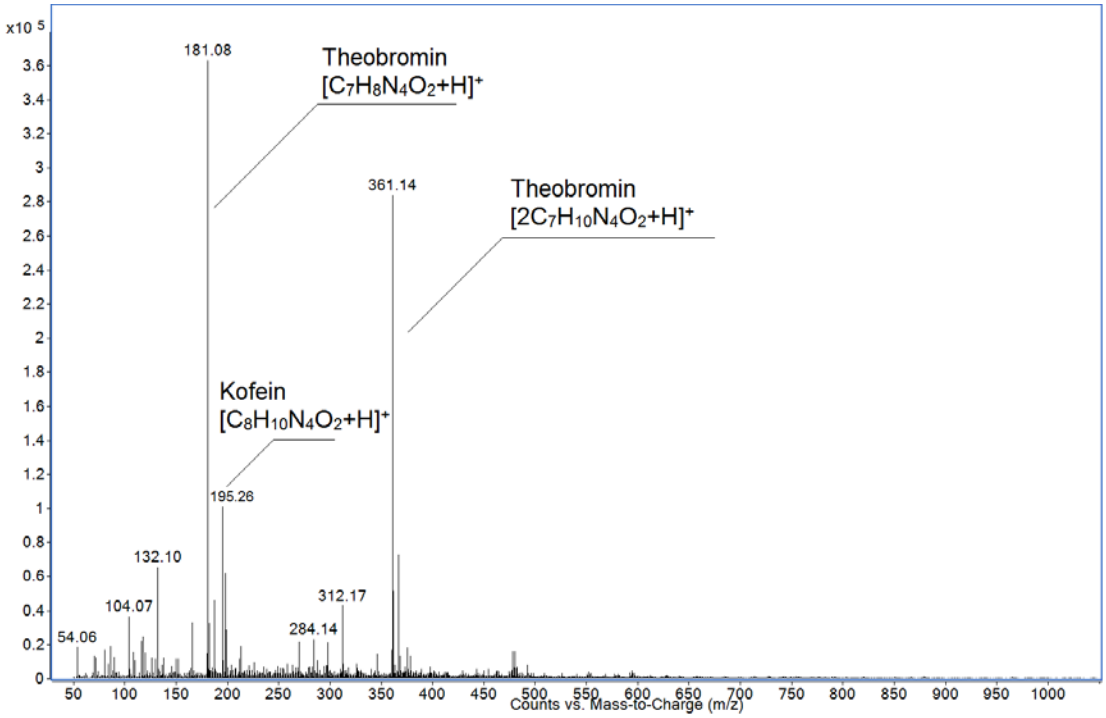
Pro zhodnocení kvality čokolády byla použita technika DART-TOF/MS. Vedle této instrumentace byly pro stanovení základních parametrů čokolád použity následující metody: HPLC/UV pro stanovení obsahu kofeinu a theobrominu; GC/FID pro analýzu profilu triacylglycerolů.

Pro zpracování výsledků získaných pomocí techniky DART-TOF/MS byly použity vícerozměrné statistické metody.

VÝSLEDKY A DISKUSE

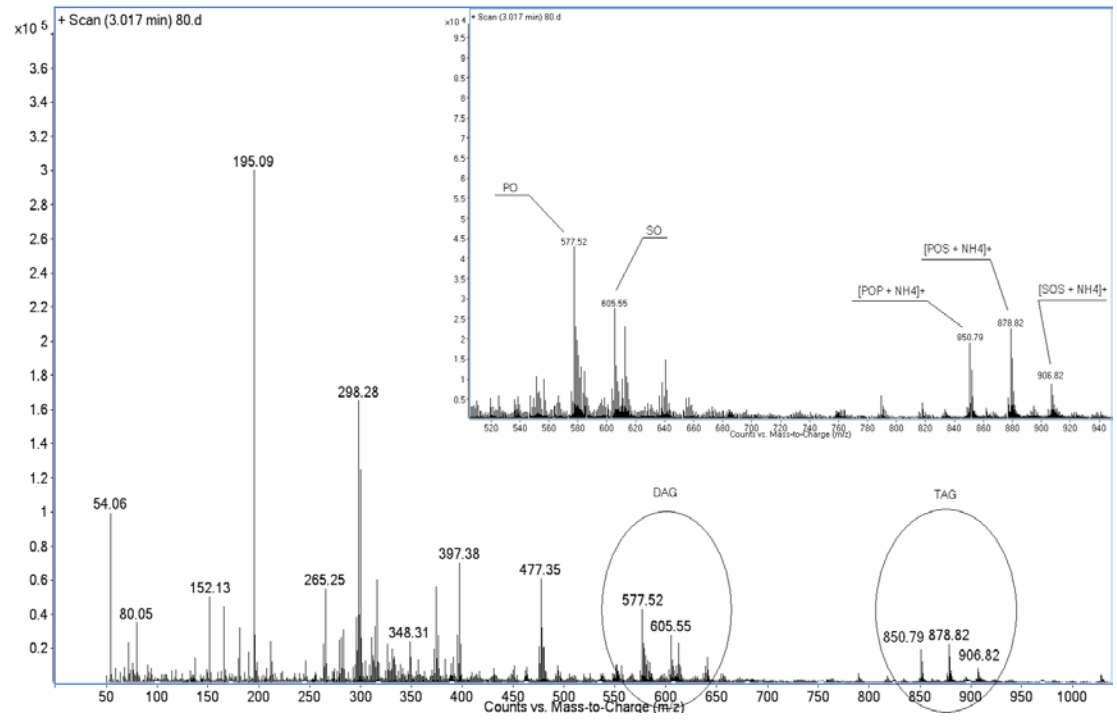
Studie byla započata optimalizací podmínek měření vzorků čokolády pomocí DART-TOF/MS. Optimalizace byla především zaměřena na výběr vhodného rozpouštědla, volbu ionizační teploty a měřicího módu. Pro stanovení kofeinu a theobrominu byla jako rozpouštědlo použita voda, teplota zdroje byla nastavena na 350 °C a měřicí mód zvolen pozitivní. Kvantifikace výše uvedených sloučenin byla provedena pomocí přídavku izotopově značeného vnitřního standardu theobrominu (theobromin-(*dimethyl-*d_6)). Pro analýzu TAG byl zvolen jako vhodné rozpouštědlo toluen, teplota zdroje byla opět 350 °C a měřicí mód pozitivní.

Vlastní optimalizace metody byla provedena na vzorku 70% hořké čokolády (Obr. 1). Na tomto hmotnostním spektru jsou označeny charakteristické ionty pro kofein a theobromin. Na spektrech v pozitivním módu byly pozorovány ionty $[M+H]^+$, $[M+NH^4]^+$ a $[2M+H]^+$. Konkrétně se jedná o hmoty m/z: 181,1 $[C_7H_8N_4O_2+H]^+$; 195,3 $[C_8H_{10}N_4O_2+H]^+$; 198,1 $[C_7H_8N_4O_2+NH_4]^+$; 212,1 $[C_8H_{10}N_4O_2+NH_4]^+$; 361,1 $[2C_7H_8N_4O_2+H]^+$ a 389,2 $[2C_8H_{10}N_4O_2+H]^+$.



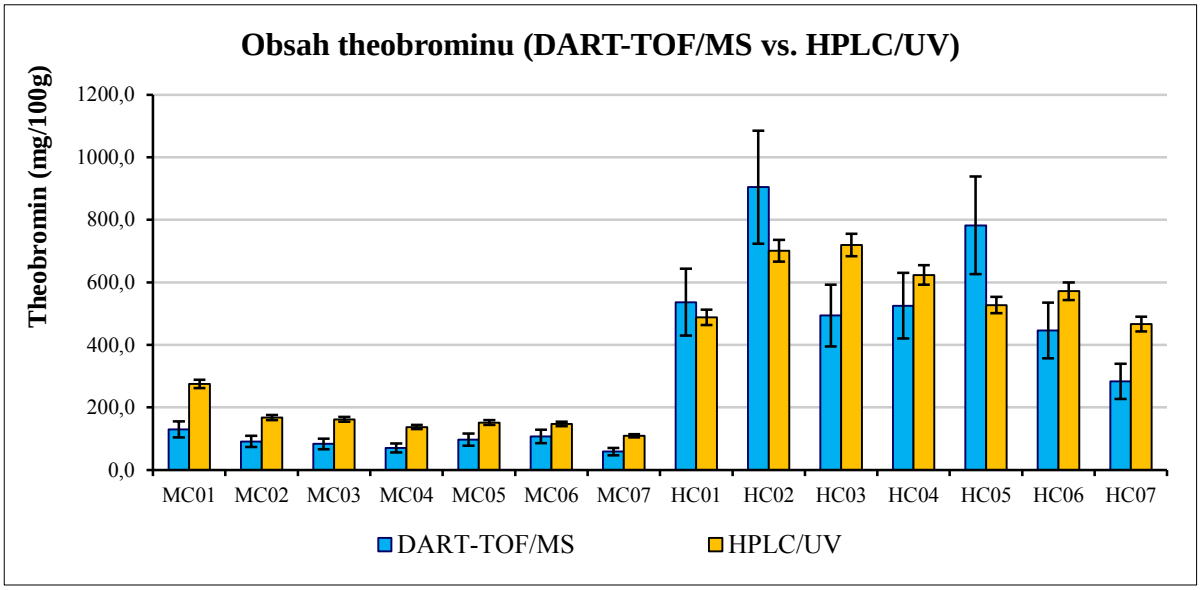
Obr. 1 Hmotnostní spektrum 70% hořké čokolády. Podmínky měření: 5 g/50 ml, rozpouštědlo voda, teplota zdroje 350 °C, pozitivní mód.

Na níže uvedeném hmotnostním spektru mléčné čokolády (Obr. 2) jsou označeny charakteristické ionty DAG a TAG. Nejvýznamnější jsou hmoty m/z odpovídající TAG: 850,8 $[POP+NH_4]^+$; 878,8 $[POS+NH_4]^+$; 906,8 $[SOS+NH_4]^+$.

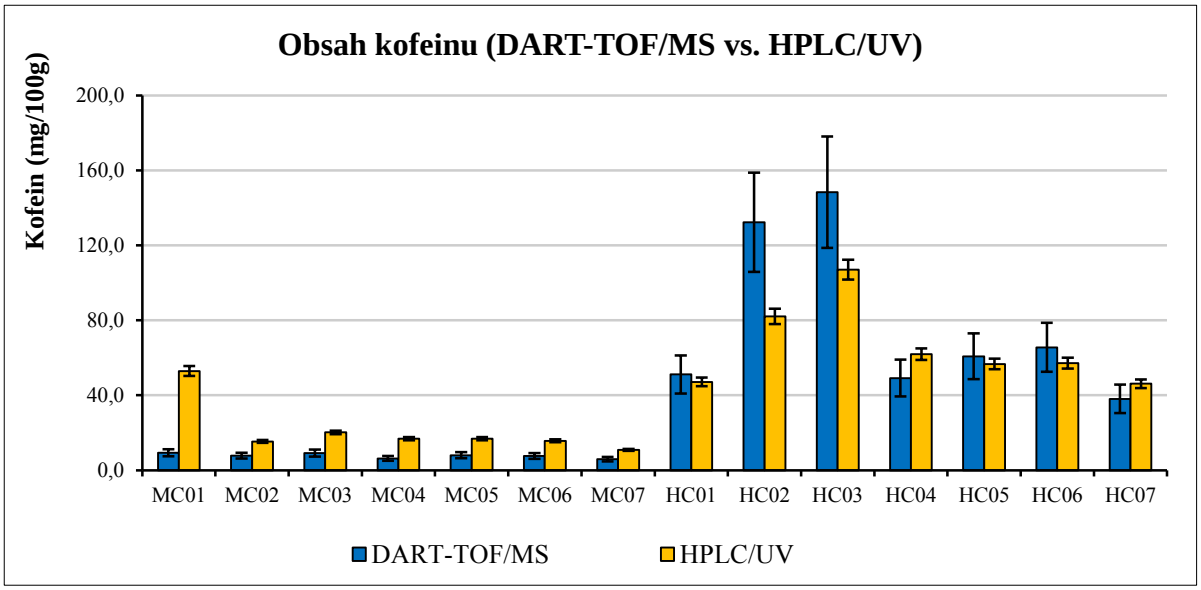


Obr. 2 Hmotnostní spektrum mléčné čokolády. Podmínky měření: 5 g/50 ml, rozpouštědlo toluen, teplota zdroje 350 °C, pozitivní mód.

Stanovené obsahy kofeinu a theobrominu v mléčných a hořkých čokoládách jsou uvedeny na Obr. 3 a 4. Pro porovnání jsou znázorněny také hodnoty získané standardní metodou HPLC/UV.



Obr. 3 Obsah theobrominu stanovený ve vzorcích mléčných a hořkých čokolád. Porovnání výsledků získaných metodou DART-TOF/MS a HPLC/UV.

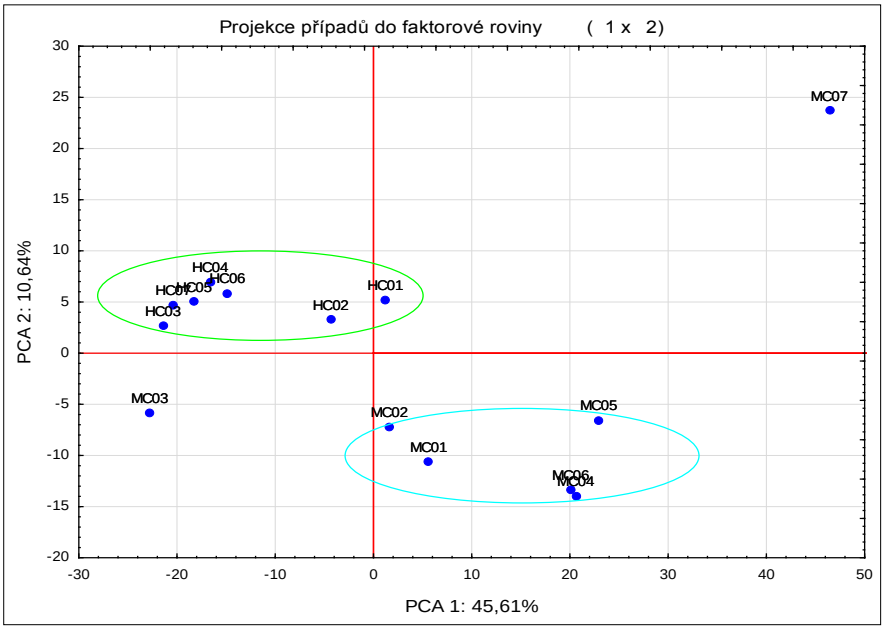


Obr. 4 Obsah kofeinu stanovený ve vzorcích mléčných a hořkých čokolád. Porovnání výsledků získaných metodou DART-TOF/MS a HPLC/UV.

Z výše uvedených grafů je zřejmé, že obsahy kofeinu a theobrominu získané oběma metodami spolu poměrně dobře korelují (pro kofein R^2 = 0,85; pro theobromin R^2 = 0,80). S ohledem na evidentní vliv matrice a nízkou opakovatelnost měření (25 %, vyjádřeno jako RSD) se metoda DART-TOF/MS jeví vhodná jen pro předběžný nebo rychlý screening vzorků.

Pro celkové zhodnocení hmotnostních spekter byla použita vícerozměrná statistická metoda PCA (tj. analýza hlavních komponent). Graf komponentního skóre pro první dvě hlavní komponenty je uveden na Obr. 5. První hlavní komponenta vyjadřuje 45,6 % proměnlivosti (rozptylu) původních dat a druhá hlavní komponenta 10,6 %. Na uvedeném diagramu lze vidět dvě jasně oddělené skupiny prezentující mléčné a hořké čokolády. Velmi odlehlé jsou vzorky MC03 a

MC07. Mléčná čokoláda MC07 obsahovala nejnižší obsah kofeinu a theobrominu a dále měla nejnižší obsah celkové mléčné sušiny. Vzorek MC03 byl charakteristický nejvyšším obsahem mléčného tuku tj. 6 g/100g výrobku.



Obr. 5 Diagram komponentního skóre pro 1 a 2 hlavní komponentu. Celkem vyjádřeno pro 14 vzorků; jako znaky použito 977 hodnot abundancí v rozsahu 100 – 900 m/z. Podmínky měření: 5g/50 ml, rozpouštědlo toluen, teplota zdroje 350 °C, pozitivní mód.

ZÁVĚR

Pomocí DART-TOF/MS byly zhodnoceny sloučeniny důležité pro autenticitu čokolád. Mezi hlavní výhody této metody patří možnost proměření většího množství vzorků v relativně krátkém čase (analýza 10 vzorků, včetně 5 opakování, trvá cca 60 minut) a jejich jednoduchá příprava. Získaná data byla statisticky zpracována. Byla provedena analýza hlavních komponent na základě fingerprintů hmotnostních spekter při které došlo k rozdělení mléčných a hořkých čokolád a k identifikaci odlehlých netypických vzorků. Pro vyslovení přesnějších závěrů by bylo přínosné proměřit větší soubor čokolád o známém složení.

PODĚKOVÁNÍ

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20/2014): A1_FPBT_2014_006.

POUŽITÁ LITERATURA

Ulberth, F.; Buchgraber, M. Analytical platforms to assess the authenticity of cocoa butter. *European Journal of Lipid Science and Technology* ***2003, 105: 32–42.***

Ramli, N.; Yatim, A. M.; Said, M.; Hok, H. Ch. HPLC Determination of methylxanthines and polyphenols levels in cocoa and chocolate products. *Malaysian Journal of Analytical Sciences* ***2001, 7 (2): 377–386.***

Lipp, M.; Anklam, E.; et al. Review of cocoa butter and alternative fats for use in chocolate - Part A. Compositional data. *Food chemistry* ***1998, 62: 73–97.***

Cajka, T.; Vaclavik, L.; Riddelova, K.; Hajslova, J. GC–TOF-MS and DART–TOF-MS: Challenges in the Analysis of Soft Drinks. *LC-GC Europe* ***2008, 250–256***.

Vyhláška **č. 76/2003** Sb., ČR, kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony.

Shukla, V. K. Cocoa butter, cocoa butter equivalents and cocoa butter substitutes. *Handbook of Functional Lipids*; Taylor & Francis Group, **2006**, **12**: ***279–307***.

P 13

FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ KRYSTALIZACI MEDU

Grégrová A.[1], Kružík V.[1], Vrácovská E.[1], Rajchl A.[1], Čížková H.[1]
Ústav konzervace potravin, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6

ÚVOD

Med je komplexní přírodní produkt vytvářený včelami z květového nektaru nebo medovice. Složení a vlastnosti medu jsou závislé jak na klimatických podmínkách, tak na jeho botanickém a geografickém původu. V České republice je med definován vyhláškou č. 76/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony. Dle smyslových požadavků na med ve výše zmíněné vyhlášce by měl být med květový i medovicový mírně až silně viskózní, tekutý, částečně až plně krystalický.

Od prvního kontaktu včely s nektarem nebo medovicí dochází k přeměně a reakci složek budoucího medu. Tyto procesy probíhají nepřetržitě i po uložení medu do pláství a pokračují také ve spotřebitelském obalu, do kterého je následně med stočen. Jedním z těchto projevů je zjevná změna skupenství medu, krystalizace. Krystalizace bývá obvykle spotřebitelem hodnocena negativně, tekutý a průhledný med je mylně považován za více kvalitní. Opak je však pravdou, krystalizace je přirozenou vlastností medu a v některých aspektech, jak bude vysvětleno dále, je indikátorem čerstvosti a přirozeného složení medu.

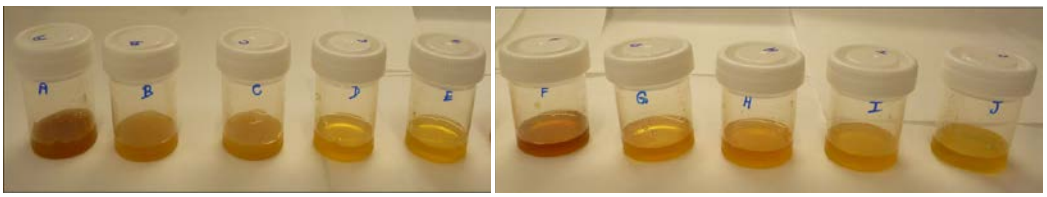
Doba, za kterou dojde k úplné krystalizaci, je mezi jednotlivými druhy medů značně variabilní a těžko předvídatelná; pohybuje se v rozsahu týdnů až let od vytočení medu. Krystalizace a velikost vytvořených krystalů závisí na mnoha faktorech, jako je např. poměr fruktosy a glukosy, vlhkost, aktivita vody, obsah dextrinů, stáří či tepelná historie medu. Obecně rychleji krystalizují medy květové díky většímu obsahu glukosy a četným pylovým zrnům a naopak pomaleji probíhá krystalizace u medů medovicových, které obsahují více fruktosy. Většina druhů medů by měla zhruba do jednoho roku zkrystalizovat. Pokud se tak nestane, byl pravděpodobně narušen proces zrání medu nebo byly do medu přidány látky zabraňující krystalizaci. Zrání medu může být narušeno vystavením medu vysokým teplotám nebo jeho filtrací, která je prováděna kvůli odstranění pylových zrn, což jsou, kromě jiného, možná krystalizační centra. Obecně platí, že čím je vyšší obsah glukosy a čím je nižší obsah vody, tím rychleji nastává krystalizace. Krystalizace medu nastává rychleji, pokud je obsah glukosy větší než 280-300 g/kg medu, poměr obsahu glukosy a vody 2,1 a vyšší a poměr obsahu fruktosy a glukosy menší než 1,14.

Během krystalizace mohou krystalická i kapalná fáze po určitou dobu koexistovat. Avšak ve zbývající kapalné fázi je aktivita vody (a_w) vyšší než před počátkem krystalizace, což je způsobeno poklesem koncentrace roztoku díky odvodu vody z pevné fáze v důsledku tvorby krystalů. Aktivita vody v medu se pohybuje okolo 0,6, což je max. hodnota zabraňující růstu téměř všech mikroorganismů, tato hodnota odpovídá přibližně 200 g vody/kg medu. V případě a_w se nad 0,6 zvyšuje riziko nežádoucí fermentace působením osmofilních kvasinek, při které je z glukosy a fruktosy produkován oxid uhličitý a ethanol, jenž může být v přítomnosti kyslíku přeměněn na kyselinu octovou.

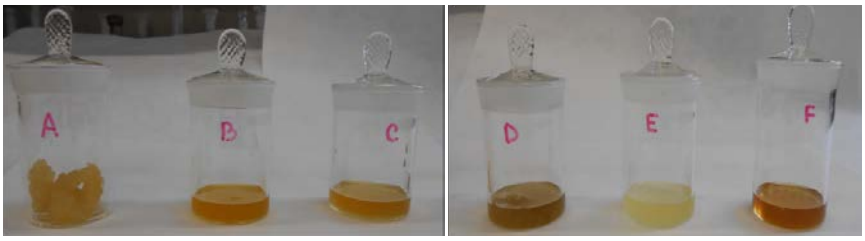
Cílem této studie bylo zhodnocení faktorů ovlivňujících krystalizaci medu.

MATERIÁL A METODY

Byly provedeny dvě separátní studie, v rámci nichž bylo analyzováno celkem 16 vzorků medů (medy květové a smíšené; směs medů ze zemí ES a ze zemí mimo ES i medy české). Přičemž v rámci studie 1 byl analyzován soubor 10 modelových vzorků medů v různém stupni krystalizace a se známou tepelnou historií (Obr. 1) a v rámci studie 2 byl analyzován soubor 6 vzorků medů zakoupených v české tržní síti různého původu a s neznámou tepelnou historií (Obr. 2).



Obr. 1 Analyzované vzorky – studie 1



Obr. 2 Analyzované vzorky – studie 2

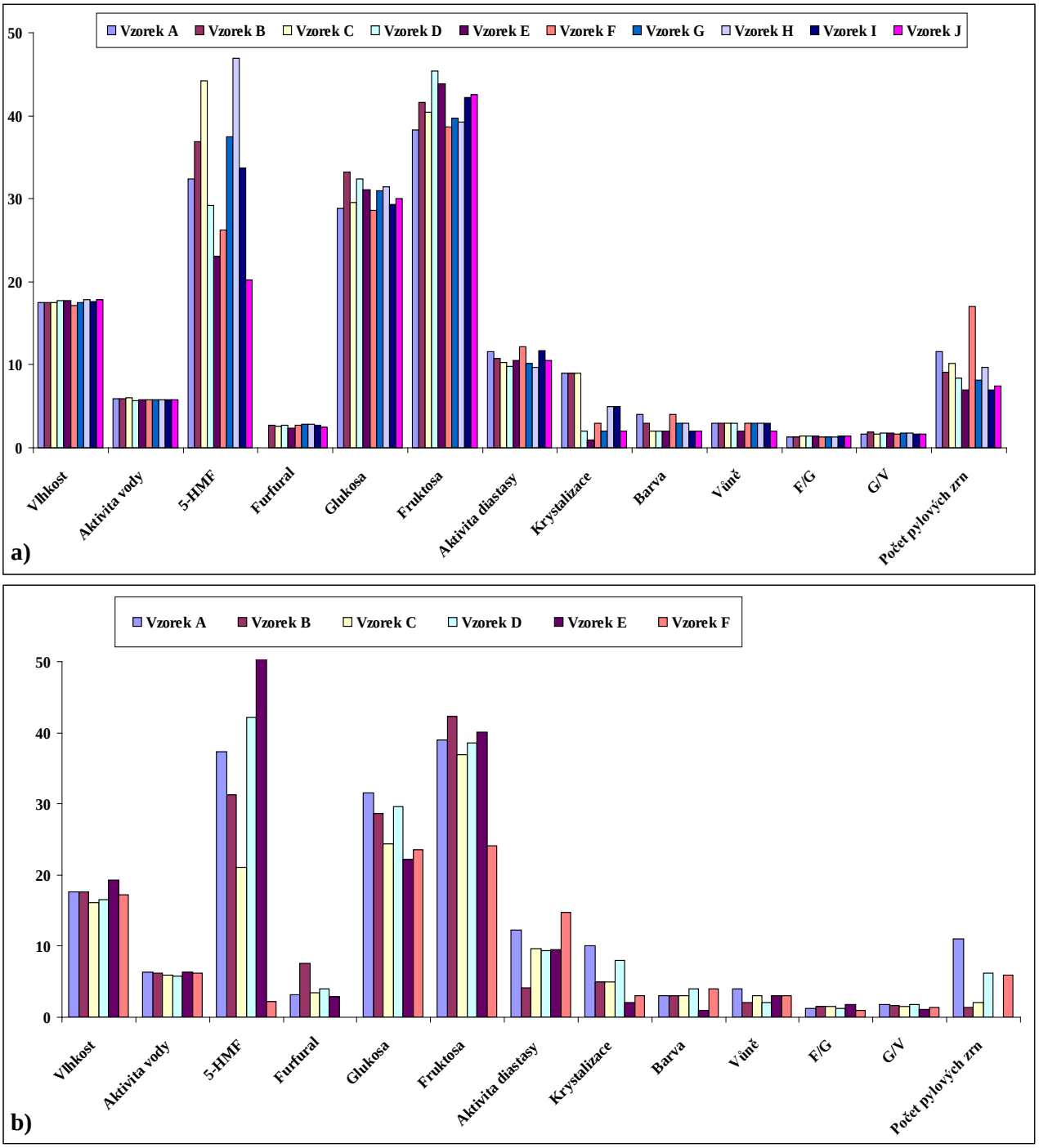
Byly stanoveny následující fyzikálně-chemické, kvalitativní parametry: vlhkost byla proměřena automatickým digitálním refraktometrem RFM 340; aktivita vody byla analyzována pomocí Aqua Lab; obsah 5-hydroxymethylfurfuralu (5-HMF) byl určen spektrofotometricky (metoda dle Whitea); obsah cukrů (glukosa, fruktosa) a furfuralu byl stanoven pomocí HPLC/RI, respektive HPLC/UV; aktivita diastasy (DN) byla analyzována s využitím Phadebas tablet. Jednotlivé parametry byly až na aktivitu vody (Chirife *et al.* 2006) stanoveny dle harmonizovaných metod pro analýzu medu (IHC 2009).

Senzorické hodnocení bylo provedeno 10 panelisty z Ústavu konzervace potravin (VŠCHT Praha). Pro hodnocení krystalizace byla využita deseti bodová stupnice (1 = tekutý až 10 = zcela krystalický). Barva a vůně byly hodnoceny stupnicí od 1 = velmi světlý nebo minimální vůně až 5 = velmi tmavý nebo velmi silná vůně (Piana *et al.* 2004).

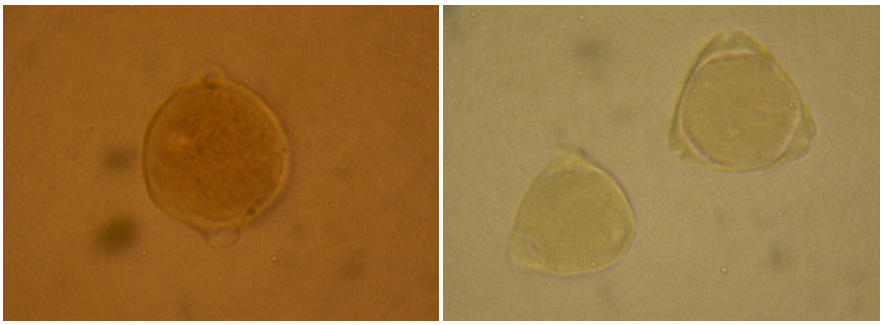
Kvantitativní pylová analýza byla provedena mikroskopicky a vyjádřena jako počet pylových zrn v 1 g medu (Přidal 2003): 10 g medu bylo zředěno a rozpuštěno v destilované vodě, roztok byl v kyvetě odstředěn při 3 000 otáčkách/min celkem 3krát po 5 min, následně byl sediment přefiltrován na mikrobiologickém filtru, ponechán zaschnout a prosvětlen cedrovým olejem; pylová zrna byla počítána v 60 zorných polí (zvětšení 1 000×).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Byl proměřen soubor vzorků medů v různém stupni krystalizace (míra krystalizace byla stanovena senzoricky) a s odlišnou tepelnou historií (studie 1; Graf 1 a)) a také soubor vzorků různého původu a s neznámou tepelnou historií (studie 2; Graf 1 b)), u nichž byly stanoveny a posouzeny následující kvalitativní parametry: obsah 5-HMF, furfuralu, glukosy a fruktosy; aktivita diastasy, aktivita vody, vlhkost, a zhodnocen výskyt a četnost krystalizačních center (počet pylových zrn; Obr. 3). Barva a vůně vzorků byly také posouzeny senzoricky. Obsah vlhkosti, aktivita vody, aktivita diastasy a poměry fruktosa/glukosa (F/G) a glukosa/voda (G/V) byly v případě vzorků se známou tepelnou historií velmi vyrovnané. V případě nesourodého souboru vzorků z tržní sítě byly již rozdíly v hodnotách více patrné. Vlivy jednotlivých parametrů na stupeň krystalizace byly následně statisticky vyhodnoceny. Pro vyhodnocení vztahů mezi jednotlivými parametry a vlastnostmi vzorků medů byla použita korelační matice (Tab. 1 a 2). Statistickým vyhodnocením míry krystalizace a analýzy kvalitativních parametrů bylo zjištěno, že v případě vzorků se známou tepelnou historií (studie 1) byla prokázána korelace mezi krystalizací s aktivitou vody a koncentrací 5-HMF. Pokud se jednalo o soubor nesourodých vzorků s neznámou tepelnou historií (studie 2), byla v souladu s odbornými literárními zdroji zjištěna korelace mezi krystalizací s glukosou, poměrem glukosa/voda a počtem pylových zrn (krystalizačních center).



Graf 1 Porovnání naměřených dat: a) studie 1; b) studie 2 (vlhkost: g/100 g; aktivita vody: a_w*10; 5-HMF: mg/kg; glukosa, fruktosa: g/100 g; furfural: mg/kg; aktivita diastasy: DN; krystalizace: stupnice 1 = tekutý až 10 = zcela krystalický; barva: stupnice 1 = velmi světlý až 5 = velmi tmavý; vůně: stupnice 1 = minimální až 5 = velmi silná; počet pylových zrn: v 1 g medu*10^{-3})



Obr. 3 Ukázky nalezených pylových zrn (mikroskopie)

Tab. 1 Korelační matice – studie 1

	Vlhkost	a_w	5-HMF	Furfural	Glukosa	Fruktosa	Aktivita diastasy	Krystal.	Barva	Vůně	F/G	G/V	Počet pyl. zrn
Vlhkost	**1,00**												
a_w	-0,28	**1,00**											
5-HMF	0,01	**0,59**	**1,00**										
Furfural	0,06	-0,19	0,15	**1,00**									
Glukosa	0,37	-0,05	0,19	0,41	**1,00**								
Fruktosa	**0,55**	-0,38	-0,45	0,34	0,51	**1,00**							
Aktivita diastasy	**-0,66**	-0,01	-0,36	-0,39	**-0,68**	-0,40	**1,00**						
Krystal.	-0,24	**0,88**	**0,59**	-0,41	-0,08	-0,46	0,19	**1,00**					
Barva	**-0,67**	0,10	0,11	-0,47	-0,29	**-0,80**	0,52	0,30	**1,00**				
Vůně	-0,44	0,36	**0,69**	-0,02	0,00	-0,45	0,11	0,52	0,45	**1,00**			
F/G	0,24	-0,36	**-0,65**	-0,03	-0,41	**0,57**	0,24	-0,39	**-0,57**	-0,48	**1,00**		
G/V	0,14	0,03	0,21	0,43	**0,97**	0,40	**-0,56**	-0,02	-0,15	0,12	-0,50	**1,00**	
Počet pyl. zrn	**-0,80**	0,17	0,02	-0,18	-0,46	**-0,64**	**0,56**	0,21	**0,77**	0,41	-0,24	-0,30	**1,00**

Pozn.: kritická mez pro korelační koeficient r v případě 10 vzorků (na hladině pravděpodobnosti α = 90%) = **0,549**.

Tab. 2 Korelační matice – studie 2

	Vlhkost	a_w	5-HMF	Furfural	Glukosa	Fruktosa	Aktivita diastasy	Krystal.	Barva	Vůně	F/G	G/V	Počet pyl. zrn
Vlhkost	**1,00**												
a_w	**0,79**	**1,00**											
5-HMF	**0,76**	0,33	**1,00**										
Furfural	0,03	-0,16	0,19	**1,00**									
Glukosa	-0,28	-0,15	-0,17	0,48	**1,00**								
Fruktosa	0,26	0,00	0,61	**0,83**	0,42	**1,00**							
Aktivita diastasy	-0,11	0,19	-0,29	**-0,96**	-0,22	**-0,79**	**1,00**						
Krystal.	-0,41	-0,21	-0,18	0,24	**0,93**	0,33	0,02	**1,00**					
Barva	**-0,81**	-0,60	**-0,85**	-0,14	0,43	-0,49	0,26	0,42	**1,00**				
Vůně	0,19	0,64	0,01	-0,53	0,00	-0,20	0,65	0,22	-0,24	**1,00**			
F/G	0,52	0,16	**0,81**	0,42	-0,36	0,69	-0,58	-0,38	**-0,87**	-0,15	**1,00**		
G/V	-0,59	-0,42	-0,38	0,40	**0,94**	0,28	-0,16	**0,93**	0,63	-0,09	-0,47	**1,00**	
Počet pyl. zrn	-0,30	0,06	-0,38	-0,33	0,67	-0,25	0,57	**0,79**	0,54	0,52	**-0,75**	0,66	**1,00**

Pozn.: kritická mez pro korelační koeficient r v případě 6 vzorků (na hladině pravděpodobnosti α = 90%) = **0,729**.

ZÁVĚR

Z naměřených výsledků nelze vzhledem ke komplexnosti jevu krystalizace medu jednoznačně definovat hlavní faktory, které ji ovlivňují. Je známo, že krystalizace medu může být upravena teplotními podmínkami. Z dalších faktorů nejčastěji uvedených v odborné literatuře (poměr fruktosy a glukosy, poměr glukosy a vody a intenzivní záhřev) byl statisticky prokázán vztah mezi krystalizací s glukosou a poměrem glukosa/voda. Korelace byla dále zjištěna mezi krystalizací a aktivitou vody, koncentrací 5-HMF a počtem pylových zrn. Předpokládány byly též korelace mezi aktivitou diastasy, zastoupením fruktosy a krystalizací. Tyto korelace však nebyly potvrzeny pravděpodobně z důvodu menšího souboru vzorků a také vzájemného působení několika faktorů proti sobě, jako je např. poměr cukrů versus záhřev zpomalující krystalizaci.

PODĚKOVÁNÍ

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20/2014): A1_FPBT_2014_006.

POUŽITÁ LITERATURA

Bogdanov S.: Harmonised methods of the European Honey Commission, Internaitonal Honey Comission (IHC), (2009): 1-63.

Bogdanov S., Gallmann P.: Authenticity of Honey and Other Bee Products State Of The Art, ALP Science, (2008) 520: 1-12.

Dobre I. et al.: Rheological behavior of different honey types from Romania, Food Research International (2012) 49: 126-132.

El-Bialee N. M., Sorour M. A.: Effect of adulteration on honey properties, International Journal of Applied Science and Technology, (2011) 1: 122-133.

Chirife J. et al.: The correlation between water activity and % moisture in honey: Fundamental aspects and application to Argentine honeys, Journal of Food Engineering, (2006) 72: 287-292.
Piana M. L. et al.: Sensory analysis applied to honey: state of the art. Apidologie, (2004) 35: 26-27.
Přidal A.: Včelí produkty – cvičení. Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2003, 61. ISBN 80-7157-711-1.
Tosi E. A. et al..: Effect of honey high-temperature short time heating on parameters related to quality, crystallisation phenomena and fungal inhibition, Lebensmittel, Wissenschaft und Technologie, (2004) 37: 669-678.
Tosi E. et al.: Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content, Food Chemistry, (2002) 77: 71-74.
Vyhláška č. 76/2003 Sb., ČR, kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony.

P 14

CHARAKTERISTIKA PŮVODU MEDU POMOCI PYLOVÉ ANALÝZY

Hauser J., Pudil F.
Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha, Technická, 166 28 Praha 6

Úvod

Med se falšoval už od nepaměti (od přidávání cukru, sirupů až po špatné označování) hlavně proto, že se jedná o drahou a specifickou sezónní komoditu. Cílem falšování je ošidit spotřebitelé nebo stát (na cle) anebo získat ekonomický prospěch a výhodu oproti konkurenci. Jedna z klasických metod, kterou lze prokázat falšování (autenticitu) medu je pylová analýza. Touhle metodou lze určit botanický nebo geografický původ.

Med je hustá, sladká a lepkavá kapalina, produkována včelami (*Apis mellifera L.*) a jinými druhy společenského hmyzu. Vzniká zahušťováním sladkých šťáv sbíraných z rostlin. [1, 2]

Chemické složení medu je specifické a závisí nejvíc na směsi květů, které včely opylují, a dále se liší i podle lokality, období/sezony i jednotlivých včelstev. Med je směsí cukrů, vody, a dalších složek (např. pylová zrna, bílkoviny, kyseliny, aminokyseliny, barviva, aromatické látky, acetylcholin, adrenalin, peroxid vodíku) viz Tabulka I.. [1, 2 3]

Tabulka I.: Chemické složení medu. [1] převzato a upraveno

SLOŽKA	KVĚTOVÝ	MEDOVICOVÝ	jednotka
JEDNODUCHÉ CUKRY			
Fruktóza	38,2	31,8	%
Glukóza	31,3	26,1	%
SLOŽITÉ CUKRY			
Sacharóza	0,7	0,5	%
Ostatní	9,5	22,1	%
MINERÁLNÍ LÁTKY			
Draslík	205	1676	mg/kg
Sodík	18	76	mg/kg
Vápník	49	51	mg/kg
Hořčík	19	35	mg/kg
Železo	2,4	9,4	mg/kg
Mangan	0,3	4,1	mg/kg
Křemík	9	14	mg/kg
Zinek	1,2	2,5	mg/kg
VITAMÍNY			
B_1, B_2, B_3, B_5, B_6, C - vše v malém množství			
OSTATNÍ			
Voda	18		%
Antioxidanty	2		mmol/kg
Tuky	0,015		%
pH	3,4	6,1	
Další	enzymy, pryskyřice, silice	melecitosa, AK	

Medy se rozdělují na:

a) *květový* - z nektaru (sladká tekutina vylučovaná nektáriemi); viz. Obr. 1
b) *medovicový* (lesní) - medovice je sladká tekutina, která je vylučovaná stejnokřídlým hmyzem; viz. Obr. 2
   - tmavá barva lesního medu je způsobena prachem, který se na medovici nachytá

c) *smíšený* - kombinace předchozích dvou [1, 2]

d)

Obr. 1: Včela při sběru květového medu. [1]

Obr. 2: Včela při sběru medovicového medu. [1]

Český med, který produkují domácí včelaři, patří k nejkvalitnějším výrobkům, a proto byla zavedena regionální značka „*Český med*“. [2] Podléhá nezávazné svazové normě (ČSV 1/1999) [4], která je přísnější než evropská směrnice Rady (2001/110/ES z 20. 12. 2001) [5] tak i české vyhlášky MZe (Vyhl. č.76/2003 Sb.) [6].

Pyl je soubor samčích pohlavních buněk semenných rostlin. Jedna samčí buňka kvetoucích rostlin se nazývá **pylové zrno**. Barva pylu bývá velmi často žlutá nebo nažloutlá. Vědní disciplína zabývající se pylem je **palynologie**. [7, 8]

Pylová zrna jsou různě velká, od 5 μm (pomněnky) po 250 μm (tykve). Mívají nejčastěji kolovité nebo elipsovité tvary, u vodních rostlin jsou nitkovité. Povrch pylového zrna je pro jednotlivé druhy rostlin charakteristický svou drsností, což je přizpůsobeno jejich způsobu přenosu.

Pro palynologii je povrch, tvar a velikost zrna důležitým rozeznávacím znakem při určování rostlin podle pylových zrn. [7, 8]

Materiál a metody

Podle normy ČSN 57 0190 Metody zkoušení včelího medu [9] bylo zatím analyzováno 40 vzorků pylu z různých druhů rostlin a 5 medů.

Vzorky pylu byli odebráni z předem botanicky určených květů. Pyl z prašníku se přenesl kličkou do kapky vody na podložní sklíčko a rozetřel se v ní. Sklíčko se zalilo rozehřátou glycerinovou želatinou a překrylo se krycím sklíčkem. Želatina se nechala zatuhnout a přebytečná se odstranila. Obvod se zafixoval lakem.

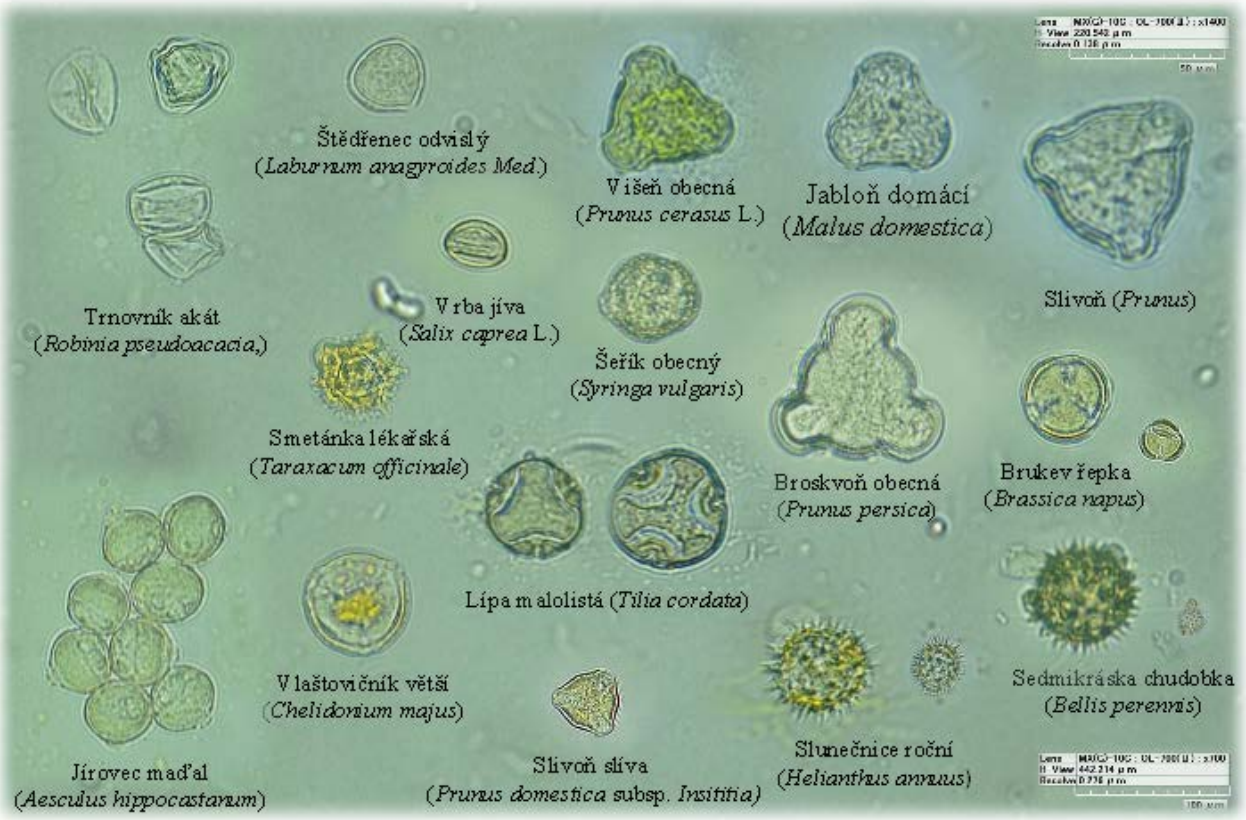
Vzorek medu se naředil vodou a nechal se rozpustit ve vodní lázni. Po rozpuštění se vzorek odstředil na centrifuze. Vzniklý sediment se přenesl do kapky vody na podložním skle a dále se postupovalo stejně jako při tvorbě preparátu pylu.

Mikroskopování preparátu pylů a medů se provádělo pomocí digitálního mikroskopu Hirox KH 7700 (http://www.hirox-usa.com/index.html) pří zvětšení (x700, x1400 a x2100).

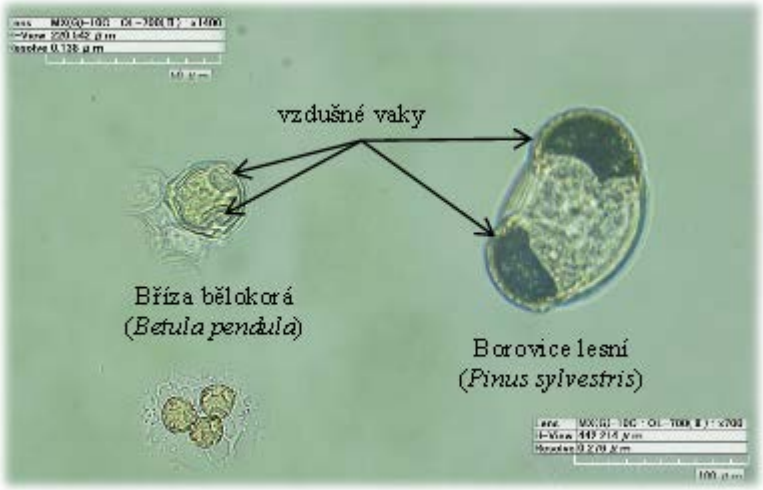
Výsledky a diskuse

Mikroskopovaná pylová zrna jednotlivých květin a medu jsou znázorněná na obrázcích.

U hmyzosprašných rostlin (opylení hlavně hmyzem) je povrch pylového zrna zvrásněný, drsný a obsahuje „ostny“, viz obrázky pylů. U větrosprašných (větrosnubných) rostlin (opylení pomocí větru), bývá povrch hladký a nelepkavý a mnohdy jsou tato pylová zrna opatřena přídavnými vzdušnými vaky pro snazší přenos vzduchem. U mnoha krytosemenných rostlin dochází k opylení pomocí vody.

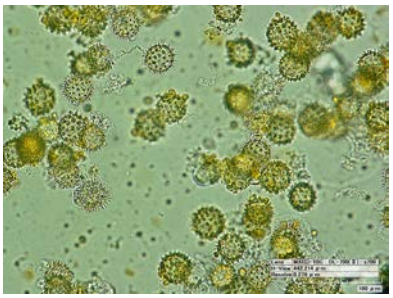


Obr. 3: Vybraná pylová zrna hmyzosprašných rostlin (u řepky, sedmikrásky a slunečnice jsou ukázané i pyly v menším měřítku).

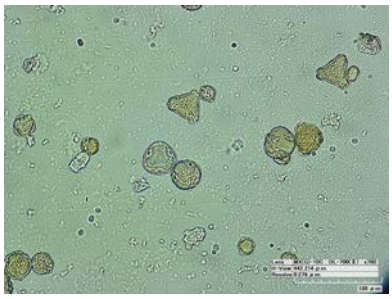


Obr. 4: Vybraná pylová zrna větrosprašných rostlin (u břízy jsou ukázané i pyly v menším měřítku).

Obr. 5: Mikroskopický preparát medu od včelaře.



Obr. 8: Mikroskopický preparát **květného medu.**



Obr. 7: Mikroskopický preparát **lipového medu.**

Obr. 6: Mikroskopický preparát **lesního medu.**

Závěr

Metoda je jednoduchá, ale klade velké nároky na znalosti a zkušenosti analytika (v souvislosti s interpretací výsledků).

Lesní medy (medovicový) neobsahují pyl z jehličnanů. Ojedinělé může obsahovat pylová zrna květin z luk, která jsou poblíž lesa, a prachové částice.

Obrazová databáze pylových zrn je vytvářena v rámci pedagogického projektu VŠCHT v r. 2014 a bude se dále doplňovat o rostliny, které teprve začínají kvést. Databáze bude využívána v pedagogice i v expertizních analýzách např. forenzních.

Seznam literatury

1. http://www.beedol.cz. (accessed June 25, 2014).
2. http://www.vcelar.info/?page_id=259. (accessed June 25, 2014).
3. http://www.vcelky.cz/med.htm#slozeni. (accessed June 25, 2014).
4. Mercuri, A. M.; Porrini, C. Melissopalynological analysis applied to air pollution studies in urban areas of Modena and Reggio Emilia (Italy). *Aerobiologia* **1991**, *7* (1), 38–48.
5. Bryant, Vaughn M., Jr. "Pollen Contents of Honey". *CAP Newsletter* **2001**, *24* (1), 10–24.
6. Norma jakostní č. ČSV 1/1999. *Svazová norma ČESKÝ MED*. Praha: Český svaz včelařů, 1999. 3 p. (http://www.vcelarstvi.cz/files/pdf/smernicemed.pdf)
7. Směrnice Rady 2001/110/ES o medu. *Rada Evropské Unie*, 20. 12. 2001. (http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32001L0110&from=CS)
8. Vyhláška č. 76/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony. *Ministerstvo Zemědělství*. (http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_vyhlaska-2003-76-potraviny.html)
9. ČSN 57 0190. *Metody zkoušení včelího medu*. Praha: Český normalizační institut, 1973. 28 p.

P 15

VYUŽITÍ TECHNIKY METABOLOMICKÉHO PROFILOVÁNÍ PRO POSOUZENÍ KVALITY ŠÍPKŮ

Schulzová V., Novotná H., Bhave A., Krmela A., Hajšlová J.
Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6

Úvod

Plody růže šípkové (*Rosa Canina*, čeleď *Rosaceae*) jsou tradičně využívány k přípravě čajů, nálevů a marmelád a jsou bohatým zdrojem nutričně významných látek. Kromě vysokých hladin vitaminu C obsahují šípky významné hladiny dalších antioxidantů, jako jsou karotenoidy (β-karoten a lykopen), polyfenolické látky, tokoferoly (α a γ tokoferol), flavonoidy (katechin, kvercetin, eriodyctiol, taxifolin a jejich příslušné glykosidy), triterpenové kyseliny (betulinová, oleanolová a ursolová kyseliny), galaktolipidy a mnoho dalších látek. Šípky jsou vzhledem k vysokému obsahu biologicky aktivních látek využívány jako doplňky stravy a funkční potraviny. Doplňky stravy obsahující šípkový prášek podle klinických studií vykazují protizánětlivý účinek, mírní projevy osteoartrózy, a to tak že snižují bolest kloubů a zvyšují jejich pohyblivost a jsou významnými antioxidanty.

Ke studiu biologicky aktivních látek šípků a sledování změn jejich složení je možno využít tzv. metabolomického přístupu, kdy se k hodnocení kvality využívá charakteristického profilu („fingerprintu“) nízkomolekulárních složek dané komodity. Pro metabolomické profilování / fingerprinting plodů růže šípkové byla využita hmotnostní spektrometrie v otevřeném prostoru s unikátním iontovým zdrojem pro přímou analýzu v reálném čase ve spojení s vysokorozlišovacím průletovým hmotnostním spektrometrem (DART-HRMS, Direct Analysis in Real Time - High Resolution Mass Spectrometry) umožňující extrémně rychlou analýzu ionizovatelných látek. Tato technika umožnuje komplexní posouzení kvality šípků a produktů z nich vyrobených a také identifikaci mnoha látek vyskytujících se v šípcích (produkty primárního i sekundárního metabolismu). Metoda je vhodná také k posouzení vlivu podmínek skladování a zpracování doplňků stravy na obsah vybraných biologicky aktivních látek a umožňuje charakterizaci analyzovaných materiálů (fingerprinty/profily) a následné vytvoření databází metabolomických profilů.

Klíčová slova: šípek, metabolomické profilování, DART-MS, biologicky aktivní látky

Cíl práce

Využití hmotnostní spektrometrie v otevřeném prostoru s unikátním iontovým zdrojem pro přímou analýzu s vysokorozlišovacím průletovým hmotnostním spektrometrem (DART-TOFMS) ke studiu biologicky aktivních látek šípků a sledování změn v jejich složení. Monitorovány byly biologicky aktivní látky ve vzorcích celých šípků, analyzovány byly také vzorky bez semínek – dužnina a semínka šípků. Metoda byla využita ke studiu stability biologicky aktivních látek v průběhu skladování

Experimentální část

Vzorky šípků byly extrahovány: (i) směsí methanol voda pro extrakci polárních látek, (ii) ethylcetátem pro izolaci flavonoidů a (iii) hexanem pro extrakci nepolárních látek.

Pro instrumentální metabolomickou analýzu byl použit DART-TOFMS systém sestávající z iontového zdroje DART (IonSense, Saugus, MA, USA) ve spojení s vysokorozlišovacím (rozlišovací schopnost 6000 FWHM) hmotnostním spektrometrem AccuTOF typu Time-of-Flight (JEOL, SAS, Croissy sur Seine, France) a automatickým dávkovačem HTCPAL (AutoDART-96 Leap Technologies, Carrboro, NC, USA). Helium o teplotě 250 °C a průtoku 3,5 l/min bylo použito jako ionizační plyn.

Všechny tři typy extraktů byly měřeny jak v pozitivním tak i negativním módu ionizace, biologicky aktivní látky byly identifikovány v (+) a (–) DART-MS spektrech

Ke zpracování naměřených dat (hmotnostní spektrum, tj. charakteristický metabolomický fingerprint) byl použit program Mass Center software verze 1.3 (2006) (JEOL, Tokyo, Japan).

Výsledky a diskuse

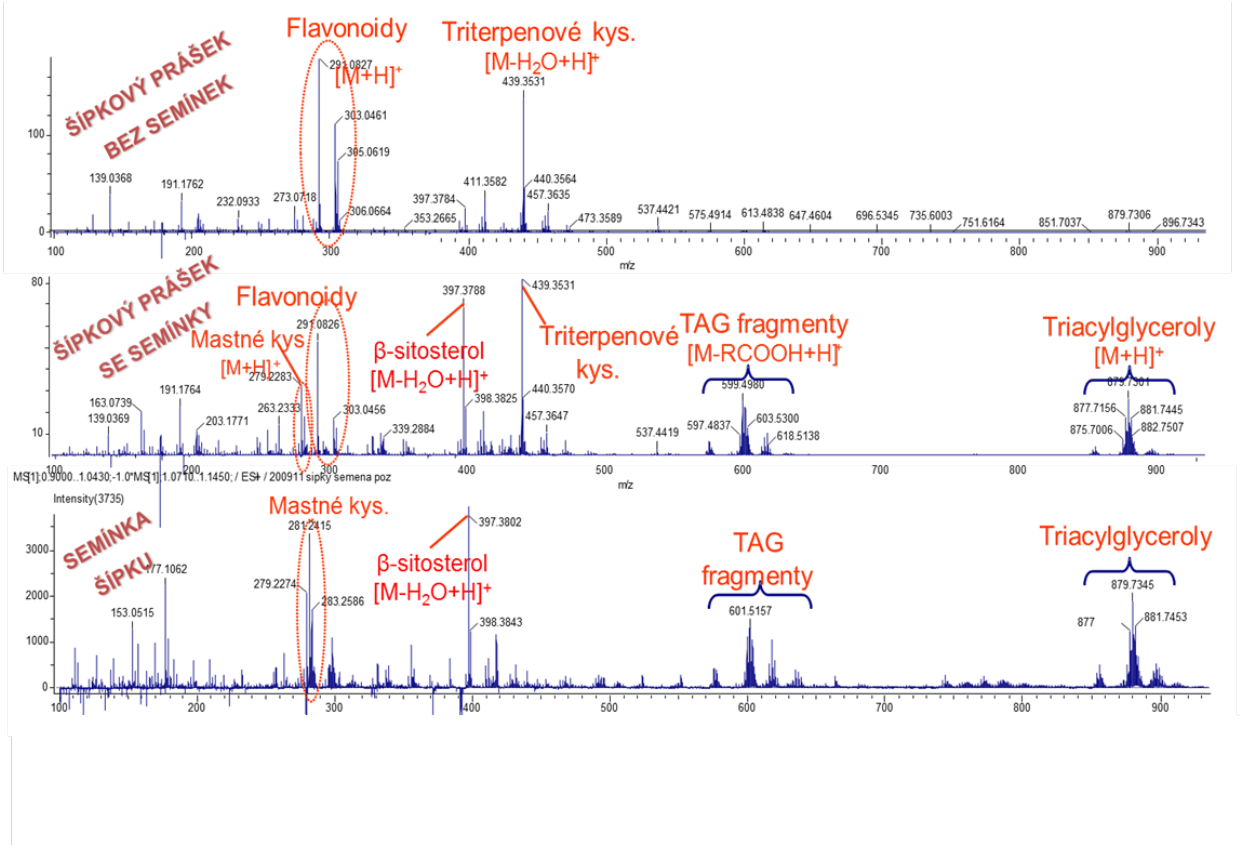
DART(+)TOFMS spektra ethylacetátových extraktů jsou uvedena na Obrázku 1 a DART(+)TOFMS spektra hexanových extraktů na Obrázku 2. Porovnávány jsou extrakty šípkového prášku se semínky a bez semínek, na Obr. 1 je uveden pro porovnání také metabolomický profil semínek šípků.

V ethylacetátových extraktech byly identifikovány především flavonoidy (katechin/epikatechin, kvercetin a taxifolin) a nepolární látky (Obr. 1). Triacylglyceroly (TAGs) (m/z 850 - 920), jejich fragmenty (m/z 570 - 640) a mastné kyseliny (především α-linolenová kyseliny) jsou dominantní ve vzorcích zrníček a šípkového prášku se zrníčky, v dužnině je jejich obsah minimální. Významný ion β-sitosterolu byl také identifikován ve vzorcích obsahujících semínka. Ve spektrech vzorků obsahujících dužninu byl pozorován výrazný iont trietrpenových kyselin a flavonoidů.

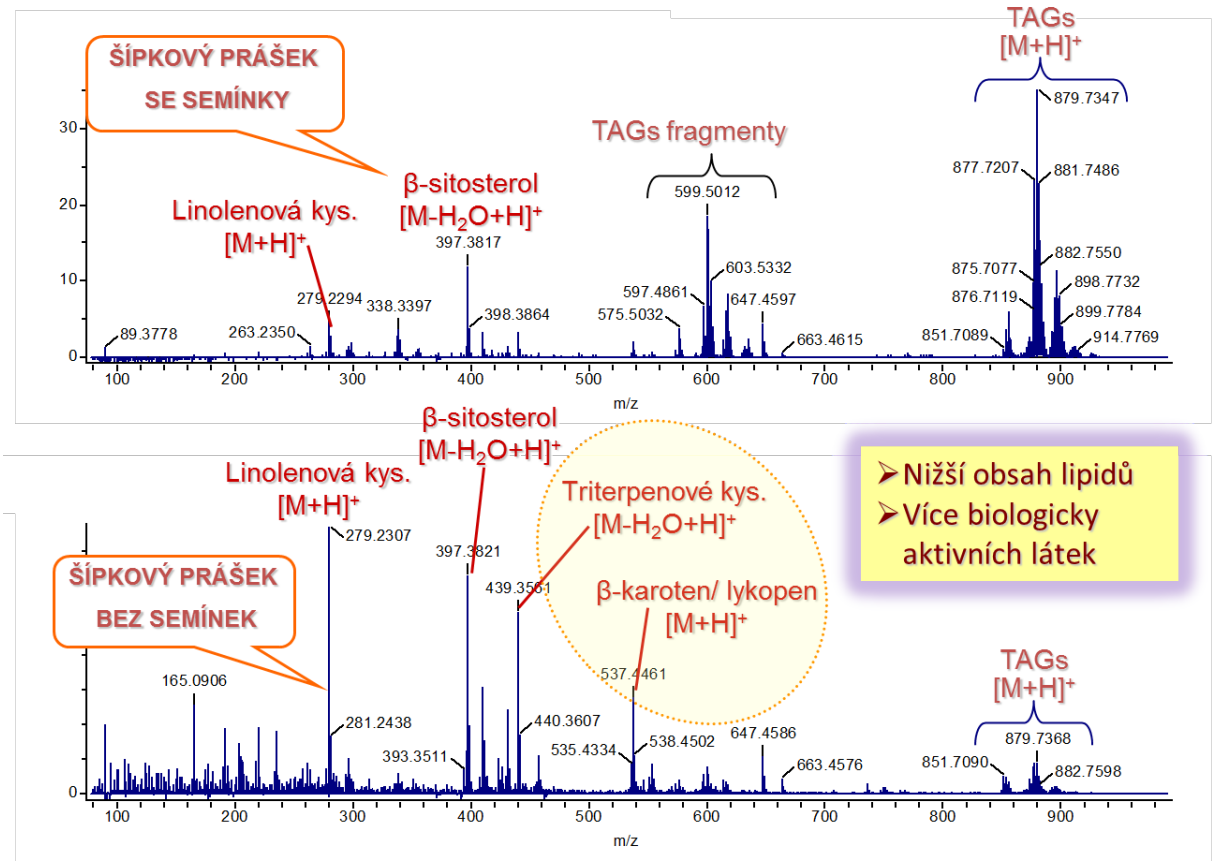
V hexanových extraktech (Obr. 2) byly ve všech vzorcích identifikovány následující nepolární látky: α-linolenová kyselina a β-sitosterol; iont β-karotenu / lykopenu byl významný pouze ve vzorcích bez semínek, stejně jako triterpenové kyseliny.

V extraktech směsí methanol voda byly identifikovány převážně organické kyseliny (jablečná kyselina a citronová kyseliny), a vitamin C (askorbová a dehydroaskorbová kyselina).

Biologicky aktivní látky identifikované jak v pozitivním, tak i negativním módu ionizace jsou shrnuty v Tabulce I.



Obrázek 1: Necílová analýza: DART(+)TOFMS spektra ethylacetátových extraktů



Obrázek 2: Necílová analýza: DART(+)TOFMS spektra hexanových extraktů

Tabulka I: Cílová analýza: identifikované biologicky aktivní látky (pozitivní i negativní mód ionizace)

Sloučenina	Vzorec	(+) ionizace	m/z	(-) ionizace	m/z
Jablečná kys.	$C_4H_6O_5$	-	-	$[M-H]^-$	133,0137
Dehydroaskorbová kys.	$C_6H_6O_6$	-	-	$[M-H]^-$	173,0086
Askorbová kys.	$C_6H_8O_6$	-	-	$[M-H]^-$	175,0243
Citronová kys.	$C_6H_8O_7$	-	-	$[M-H]^-$	191,0192
Linolenová kys.	$C_{18}H_{30}O_2$	$[M+H]^+$	279,2324	$[M-H]^-$	277,2168
Katechin/Epikatechin	$C_{15}H_{14}O_6$	$[M+H]^+$	291,0869	$[M-H]^-$	289,0712
Kvercetin	$C_{15}H_{10}O_7$	$[M+H]^+$	303,0505	$[M-H]^-$	301,0348
Taxifolin	$C_{15}H_{12}O_7$	$[M+H]^+$	305,0661	$[M-H]^-$	303,0505
β-sitosterol	$C_{29}H_{50}O$	$[M+H-H_2O]^+$	397,3834	-	-
Triterpenové kys.	$C_{30}H_{48}O_3$	$[M+H-H_2O]^+$	439,3576	$[M-H]^-$	455,3525
β-karoten/Lykopen	$C_{40}H_{56}$	$[M+H]^+$	537,4460	-	-

Závěr

Technika DART-TOFMS umožňuje komplexní posouzení kvality šípků a produktů z nich vyrobených

Biologicky aktivní látky jsou soustředěny především ve slupkách, triacylglyceroly v semínkách. Hlavní rozdíly mezi testovanými vzorky byly v obsahu triacylglycerolů a mastných kyselin. Vzorky obsahující semínka měly výrazně vyšší obsah triacylglycerolů v porovnání se vzorky obsahujícími pouze dužninu šípků. Ionty β-karotenu/lykopenu a triterpenové kyseliny byly ve větší intenzitě identifikovány ve vzorcích neobsahujících semínka, to ale může být způsobeno matričními efekty a potlačením ionizace minoritních látek ve vzorcích s vysokým obsahem TAGs.

Metoda je vhodná pro posouzení vlivu podmínek skladování a zpracování doplňků stravy na hladiny biologicky aktivních látek; byl zaznamenán významný pokles kyseliny askorbové, karotenoidů, flavonoidů, tokoferolů i triterpenových kyselin po 6 měsících skladování v závislosti na teplotě a vlhkosti

Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie umožňuje identifikaci nutričně významných látek šípků

Poděkování

Tato studie vznikla za podpory projektu MŠMT COST LD14092 a účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT č. 20/2014

Literatura

Cajka T., Riddellova K., Tomaniova M., Hajslova J.: Ambient mass spectrometry employing a DART ion source for metabolomic fingerprinting/profiling: a powerful tool for beer origin recognition. Metabolomics 7, 500–508 (2011).

Ghazghazi H., Miguel M. G., Hasnaoui B., Sebei H., Ksontini M., Figueiredo A. C., Pedro L. G., Barroso J. G.: Phenols, essential oils and carotenoids of Rosa canina from Tunisia and their antioxidant activities African Journal of Biotechnology Vol. 9(18), 2709-2716 (2010).

Hajslova J., Cajka T., Vaclavik L.: Challenging applications offered by direct analysis in real time (DART) in food-quality and safety analysis. Trend Anal. Chem. 30, 204–218 (2011).

Hvattum E.: Determination of phenolic compounds in rose hip (Rosa canina) using liquid chromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry and diode-array detection Rapid Communications in Mass Spectrometry 16(7), 655–662 (2002).

Novotná H., Kmiecik O., Galazka M., Krtková V., Hurajová A., Schulzová V., Rembialkowska E., Hajšlová J: Metabolomic fingerprinting employing DART-TOFMS for authentication of tomatoes and peppers from organic and conventional farming, Food Additives and contaminants A, 29(9), 1335-1346 (2012).

Vaclavik L., Cajka T., Hrbek V., Hajslova J.: Ambient mass spectrometry employing direct analysis in real time (DART) ion source for olive oil quality and authenticity assessment. Anal. Chim. Acta 645, 56–63 (2009).

Wenzig E.M., Widowitz U., Kunert O., Chrubasik S., Bucar F., Knauder E., Bauer R.: Phytochemical composition and in vitro pharmacological activity of two rose hip (Rosa canina L.) preparations Phytomedicine 15, 826–835 (2008).

P 16

GALAKTOLIPIDY V PLODECH RŮŽE ŠÍPKOVÉ A VÝROBCÍCH Z NICH

Krmela A., Novotná H., Hrbek V., Schulzová V., Hajšlová J.
Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28, Praha 6

Úvod:

Galaktolipidy jsou skupinou biologicky aktivních látek, široce zastoupenou v rostlinné říši. Jejich molekula se skládá z dvou nenasycených mastných kyselin s průměrnou délkou 16 až 20 uhlíků vázaných na první a druhý uhlík jedné molekuly glycerolu. V třetí pozici glycerolu je pak vázán monosacharid, v případě galaktolipidů galaktosa. Dle počtu vázaných jednotek galaktosy můžeme galaktolipidy dále dělit na monogalaktosyldiacylglyceroly (MGDG) a digalaktosyldiacylglyceroly (DGDG).

Obě skupiny galaktolipidů se hojně vyskytují v buněčných stěnách rostlin, konkrétně ve stěnách thylakoidů. MGDG a DGDG mohou společně tvořit až 80% celkového obsahu membránových lipidů zelených částí rostlin. Mezi známé zdroje galaktolipidů patří například luštěniny (fazole, hrášek), listová zelenina (kapusta, špenát), stonková zelenina (chřest, brokolice) a plodová zelenina (sladká paprika, dýně).

Jedním z nejbohatších zdrojů je však růže šípková (*Rosa canina*), která je již dlouho známá pro své příznivé biologické účinky. Některé studie naznačují, že šípky a výrobky z nich mohou tišit bolest u pacientů trpících zánětlivými onemocněními jako je osteoartritida. Je prokázáno, že několik galaktolipidů má *in vitro* a/nebo *in vivo* protinádorové a protizánětlivé účinky. Nedávno bylo zjištěno, že právě galaktolipid 1,2-di-α-linolenoyl-3-O-β-D-galactopyranosyl-sn-glycerol (DLGG) může být účinnou látkou zodpovědnou za protizánětlivé účinky šípkové růže (*Rosa canina*).

Za účelem sledování výskytu galaktolipidů byla vyvinuta metoda ultra účinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (UPLC-MS). Metoda byla aplikována pro monitoring výskytu galaktolipidů v komerčních vzorcích výrobků z šípků.

Klíčová slova: galaktolipidy, UPLC-MS, růže šípková

Chemikálie:

- methanol, HPLC gradient, *Merck (Německo)*
- mravenčan amonný, p.a., *Sigma-Aldrich (USA)*
- dichlormethan, extrakce, *Merck (Německo)*
- technické plyny: dusík 5.0, dusík 4.0, *Linde Technoplyn (ČR)*

Vzorky:

Pro vývoj a optimalizaci vhodného extrakčního postupu byl použit komerční vzorek potravního doplňku vyrobený z plodů šípkové růže (*Rosa canina*) dodaný firmou Axellus AS.

Příprava vzorku:

Pro analýzu obsahu galaktolipidů ve vzorku potravního doplňku byl navážen obsah jedné tobolky (přibližně 0,75 g). K navážce bylo přidáno 5 ml dichlormethanu, následovalo intenzivní protřepání a 30 minut sonikace. Směs byla uchována v lednici po dobu 20 hodin. Po zchlazení byla směs odstředěna (5000 rpm, 3 min), přefiltrována přes 0,45 μm mikrofilm a převedena do vialky pro UPLC-MS analýzu.

Identifikace a kvantifikace:

K analýze galaktolipidů byla využita metoda ultraúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (UPLC-TOF-MS, Waters, USA) (**Tab. I a II**).

Tab. I: Charakteristiky kapalinové chromatografie

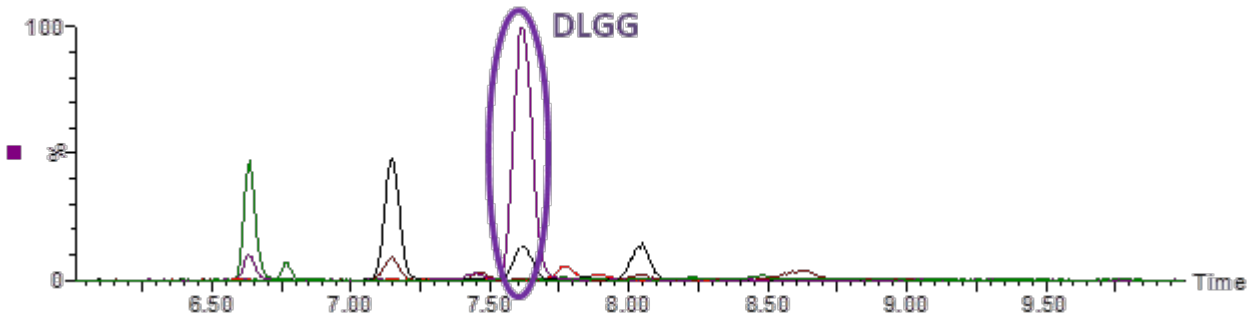
kolona	HSS T3, 100 mm x 2,1 mm, 1,8 µm (Waters, USA)
teplota kolony	40°C
objem nástřiku	3 µl
mobilní fáze	10 mM mravenčan amonný v methanolu 10 mM mravenčan amonný ve vodě
průtok	0,3 ml/min

Tab. II: Podmínky hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní rozsah m/z	100 – 1200
Typ ionizace	ESI+
Napětí na kapiláře	0,8 kV

Výsledky a diskuze:

Za účelem sledování výskytu galaktolipidů byl vyvinut extrakční postup pro izolaci galaktolipidů ze vzorků potravin a potravních doplňků. Získané extrakty byly analyzovány pomocí vyvinuté metody ultra účinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Metoda byla aplikována na komerční vzorek potravního doplňku z šípků. V analyzovaném vzorku potravního doplňku bylo celkem detekováno 11 galaktolipidů (**Obr. 1**). Pro neexistenci potřebných standardů však bylo stanoveno pouze jejich relativní zastoupení ve vzorku. Seznam detekovaných galaktolipidů, parametry jejich detekce a relativní zastoupení jsou uvedeny v **Tab. III**. Jediným kvantitativně stanoveným galaktolipidem je majoritně detekovaný DLGG přítomný v koncentraci až 101 mg/kg, znázorněný na **Obr. 1** fialově.



Obr. 1: Chromatogram galaktolipidů detekovaných ve vzorku potravního doplňku

Tab. III: Detekované galaktolipidy a jejich relativní zastoupení

Sumární vzorec	MK sn-1/sn-2	Molekulová hmotnost	Sledovaný adukt $(M+NH_4)^+$	Relativní zastoupení (%)
MGDG				
$C_{43}H_{76}O_{10}$	16:0/18:3	752,5438	770,5782	0,8
$C_{45}H_{74}O_{10}$	18:3/18:3	774,5438	792,5626	42,0
$C_{45}H_{76}O_{10}$	18:2/18:3	776,5438	794,5782	11,5
$C_{45}H_{78}O_{10}$	18:1/18:3	778,5595	796,5939	1,9
DGDG				
$C_{49}H_{86}O_{15}$	16:0/18:3	914,5966	932,6310	3,1
$C_{49}H_{88}O_{15}$	16:0/18:2	916,6123	934,6467	12,3
$C_{49}H_{90}O_{15}$	16:0/18:1	918,6279	936,6623	2,6
$C_{51}H_{54}O_{15}$	18:3/18:3	936,5810	954,6154	18,8
$C_{51}H_{86}O_{15}$	18:2/18:3	938,5966	956,6310	3,5
$C_{51}H_{88}O_{15}$	18:1/18:3	940,6123	958,6467	1,3
$C_{51}H_{92}O_{15}$	18:0/18:2	944,6436	962,6750	2,2

Závěr:

Byla vyvinuta metoda pro stanovení obsahu galaktolipidu DLGG ve vzorcích potravních doplňků. Vyvinutá metoda je vhodná pro studium vlivu podmínek skladování a zpracování potravních doplňků na hladinu obsažených galaktolipidů. Metoda bude proto testována na dalších komerčních vzorcích potravních doplňků. Bude nadále zkoumána možnost detekce a stanovení obsahu dalších galaktolipidů.

Poděkování:

Tato studie vznikla za podpory MŠMT COST LD14092 a účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20/2014).

Literatura:

Guella, G.; Frassanito, R.; Mancini, I. A new solution for an old problem: the regiochemical distribution of the acyl chains in galactolipids can be established by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry* **2003**, *17*, 1982–1994.

Christensen L. Galactolipids as Potential Health Promoting Compounds in Vegetable Foods. *Nutrition & Agriculture* **2009**, *1*, 50–58.

Wenzig, E.; Widowitz, U.; Kunert, O.; Chrubasik, S.; Bucar, F.; Knauder, E.; Bauer, R. Phytochemical composition and in vitro pharmacological activity of two rose hip (Rosa canina L.) preparations. *Phytomedicine* **2008**, *15*, 826–835.

Larsen E.; Kharazmi A.; Christensen L.; Christensen B. An Antiinflammatory Galactolipid from Rose Hip (Rosa canina) that Inhibits Chemotaxis of Human Peripheral Blood Neutrophils in Vitro. *Journal of Natural Products* **2003**, *66*, 994–995.

P 17

ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA POTRAVNÍCH DOPLŇKŮ NA BÁZI MIKROŘAS

Fenclová M.[1], Jírů M.[1], Zachariášová M.[1], Hajšlová J.[1]
[1)] Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6

Úvod a cíle studie

Konzumace doplňků stravy vyrobených na bázi mikrořas je v moderní společnosti velmi populární. Mezi nejrozšířenější patří doplňky s obsahem řas *Chlorella sp.* a *Spirulina sp*. - jejich obliba je podpořena vrůstajícím výskytem civilizačních onemocnění, u nichž je uváděna souvislost s působením volných radikálů. Biomasa mikrořas je totiž ceněna nejen pro svou nutriční a energetickou hodnotu, ale také pro vysoký obsah řady různých látek s antioxidačními účinky.
Hodnocení antioxidační aktivity je jedním z významných nástrojů bioprospekce mikrořas, při níž jsou hledány pozitivně působící biologicky aktivní látky, potenciálně využitelné pro aplikace v medicíně, kosmetice ad. Obecné schéma bioprospekce mikrořas spočívá v extrakci co nejširšího spektra potenciálně zajímavých látek a následném testování biologických aktivit získaného extraktu (popř. extraktů). Extrakční frakce, vykazující některou z biologických aktivit, jsou poté podrobeny necílovému screeningu s konečnou identifikací konkrétních látek, které jsou za aktivitu zodpovědné.
Cílem této práce bylo zhodnocení antioxidační aktivity (i) komerčně dostupných doplňků stravy vyrobených z mikrořas *Chlorela sp.* a *Spirulina sp.* a (ii) vlastních mikrořas z kmenů *Chlorella sp*., *Schizotrichum sp.*, *Scenedesmus sp.*, *Trachydiscus sp.* a *Schyzochytrium sp.*. Pro tyto účely byla vyvinuta metoda třístupňové extrakce, pokrývající velké množství potenciálních antioxidačních látek, lišících se svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, a tudíž i extraktibilitou (peptidy, polysacharidy, vitaminy, lipidy a mastné kyseliny, barviva a další). Antioxidační aktivita výsledných extraktů byla testována pomocí čtyř různých spektrofotometrických metod: metodou zhášení volných radikálů (DPPH), metodou zhášení prekurzorů oxidativních reakcí (Griessova metoda), metodou stanovení obsahu celkových polyfenolů a metodou stanovení obsahu celkových flavonoidů.

Dedikace: *Tato studie byla realizována za finanční podpory projektu Centrum kompetence pro výzkum biorafinací (TE01020080).*

Experimentální část

Chemikálie, materiál

Použité chemikálie: fenylpikrylhydrazyl (DPPH), nitroprusid sodný, hydrogen fosforečnan sodný dodekahydrát, dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, Greissův reagent, chlorid hlinitý, quercetin, octan draselný, Folin-Ciocalteuovo činidlo, floroglucinol, dimethylsulfoxid (DMSO) a metanol byly zakoupeny od Sigma Aldrich (USA) a uhličitan sodný byl zakoupen u firmy lach:ner (ČR). Rozpouštědla Hexan, isopropanol a etanol byly od firmy Merck (USA). Absorbance byla měřena na Epoch Microplate Spectrophotometer BioTek (USA).

Vzorky

Vzorky pro testování antioxidační aktivity zahrnovaly jednak komerčně dostupné doplňky stravy s obsahem mikrořas (n=7), jednak vzorky vlastní biomasy mikrořas poskytnuté v rámci projektu Centrum kompetence pro výzkum biorafinací (n=9). Přehled je uveden v **Tab. I**.

Tab. I: Přehled testovaných vzorků

Vzorky doplňků stravy			
1	Febico Organic Chlorela	5	Febico Organic Spirulina
2	King Dharmsa Chlorela	6	Shaanxi Spirulina
3	Neobotanics Chlorela Bio	7	Neobotanics Spirulina Bio
4	King Dharmsa Spirulina		
Vzorky biomasy mikrořas			
8	*Chlorela sp.*	13	*Trachydiscus minutus*_B
9	*Schizotrichum sp.*	14	*Chlorela fusca*
10	*Scenedesmus sp.*	15	*Schyzochytrium sp.*
11	*Chlorela sp.*	16	*Trachydiscus minutus*_C
12	*Trachydiscus minutus*_A		

Extrakce analytů

Optimalizace extrakce (porovnání řady rozpouštědel z pohledu extrahovatelnosti cílových látek z matrice) byla provedena na modelovém vzorku řasy *Trachydiscus minutus*. Výsledný postup spočívá ve třístupňové extrakci vzorku:

I. Extrakce vodou – extrakce polárních sloučenin, např. organických kyselin, monosacharidů, polysacharidů, aminokyselin
II. Extrakce 80 % metanolem – extrakce např. fosfolipidů, mastných kyselin, xantofylů
III. Extrakce směsí hexan / isopropanol (50:50, v/v) – pro extrakci např. triacylglycerolů, tokoferolů, karotenoidů

V prvním kroku extrakce byla zvažována teplota přidané vody – pro extrakci polysacharidů je vhodnější horká voda, u některých z dalších látek s antioxidační aktivitou by ovšem za těchto podmínek mohlo docházet k degradaci. Proto byly u všech testovaných vzorků paralelně provedeny dvě varianty extrakce – horkou i studenou vodou.

Podrobný postup: Do skleněné zkumavky bylo naváženo 10 mg vzorku, 1 g balatiny a přidáno 0,5 ml vody. Vzniklá suspenze byla 2 min homogenizována pomocí vortexu, následoval přídavek 5,5 ml horké / studené vody (80 °C / 20 °C) a opětovná homogenizace pomocí vortexu po dobu 2 min. Směs byla převedena do PTFE centrifugační kyvety a odtředěna (10 000 rpm, 5 min). Výsledný extrakt byl odebrán a uchován pro analýzu při -20 °C (**extrakt I**). Zbytek vzorku byl následně extrahován 6 ml 80 % metanolu. Po homogenizaci pomocí vortexu (2 min) a odstředění (10 000 rpm, 5 min) byl extrakt odebrán a uchován pro analýzu při -20 °C (**extrakt II**). Ke zbytku vzorku bylo poté přidáno 6 ml směsi hexan / isopropanol (50:50, v/v), opět následovala homogenizace pomocí vortexu (2 min) a odtředění (10 000 rpm, 5 min). Výsledný extrakt byl odebrán, odpařen do sucha na rotační vakuové odparce, převeden do alikvotního podílu 10 % DMSO (např. 1 ml extraktu byl odpařen a převeden do 1 ml 10 % DMSO) a uchován pro analýzu při -20 °C (**extrakt III**).

Stanovení antioxidační aktivity

Všechny testované metody byly pro účely studie optimalizovány pro provedení na mikrotitračních destičkách, což významně snižuje spotřebu použitých standardů a ostatních chemikálií.

Metoda DPPH

Je považována za jednu ze základních metod pro stanovení antioxidační aktivity. Jde o reakci difenylpikrylhydrazylu – DPPH aantioxidantu, kdy dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Reakce se projevuje poklesem absorbance na 517 nm. Antioxidační aktivita jednotlivých extraktů byla vyjádřena jako % zhášecí aktivity, která se vypočítá podle vztahu: $\mathbf{\% \text{ zhášení} = (A_{kontrola} - (A_{vzorek} - A_{blank}) / A_{kontrola}) \times 100}$

Do jamky (vzorek) bylo napipetováno 100 µl extraktu a k němu přidáno 200 µl DPPH. Do kontrolní jamky (kontrola) bylo místo extraktu napipetováno 100 µl extrakčního rozpouštědla

(voda, 80% metanol a 10% DMSO) a 200 µl DPPH. Jelikož extrakty řas absorbují i samy o sobě, bylo nutné od absorbance vzorku odečíst blanky (100 µl extraktu + 200 µl metanolu). Inkubace probíhala ve tmě po dobu 15 minut, absorbance byla měřena při vlnové délce 517 nm.

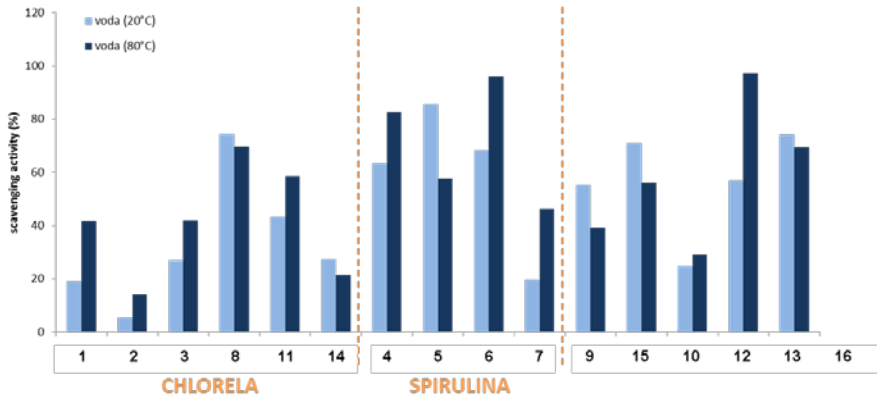
Griessova metoda
Tento postup je založen na tom, že nitroprusid sodný ve vodném prostředí při fyziologickém pH spontánně generuje oxid dusnatý, který reaguje s kyslíkem za produkce dusitanových iontů, které jsou pak stanoveny pomocí Griessova reagentu. Zhášeče oxidu dusnatého soutěží s kyslíkem a tím snižují produkci dusitanových iontů. Antioxidační aktivita byla stejně jako u předchozí metody vyjádřena jako % zhášení. V případě extraktu II bylo pro účely této metody nutné provést odpaření metanolu a převedení do odpovídajícího objemu vody. Do jamky bylo nejdříve napipetováno 100 µl extraktu a k němu přidáno 100 µl nitroprusidu sodného (20mM roztok ve fosfátovém pufru). Následovala inkubace za pokojové teploty po dobu 60 minut. Poté bylo přidáno 100 µl Griessova reagentu a po deseti minutách byla změřena absorbance při vlnové délce 562 nm. Kontrolní jamky a blanky byly připraveny stejným způsobem jako při předchozí metodě.

Stanovení celkových flavonoidů
Celkový počet polyfenolů byl stanoven pomocí kolorimetrické metody s využitím chloridu hlinitého v etanolu. Chlorid hlinitý tvoří velmi stabilní kyselé komplexy s C-4 keto skupinou a také s C-3 nebo C-5 hydroxylovou skupinou flavonů a flavonolů. K 50 µl extraktu bylo přidáno 10 µl 10% chloridu hlinitého, 10 µl 1M octanu draselného a 240 µl deionizované vody. Následovala inkubace za pokojové teploty po dobu 30 minut, absorbance byla měřena při vlnové délce 240 nm. V tomto případě se neměřily blanky. Pro tvorbu kalibrační řady posloužil flavonoid quercetin.

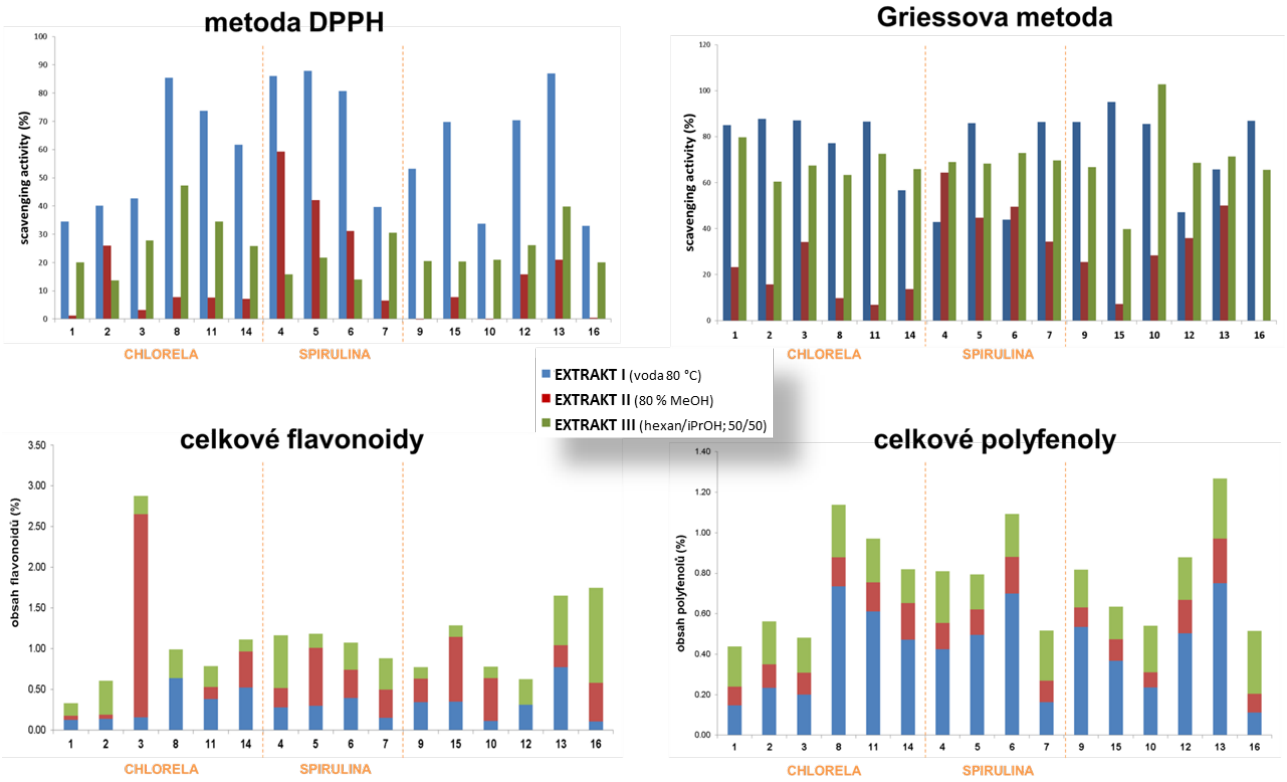
Stanovení celkových polyfenolů
Stanovení celkového obsahu fenolů bylo provedeno standardní fotometrickou metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem (roztok fosfomolybdenanu amonného). Princip metody spočívá v reakci činidla s redukujícími látkami (polyfenoly) za vzniku modrého komplexu. Do jamky s 15 µl extraktu bylo přidáno 165 µl Folin-Ciocalteuova činidla naředěného vodou (1/9, *v/v*). Po třech minutách bylo ke směsi přidáno 60 µl uhličitanu sodného a 80 µl deionizované vody. Inkubace probíhala 60 minut za pokojové teploty, absorbance byla měřena při vlnové délce 725 nm. Stejně jako při stanovení flavonoidů nebyly odečítány blanky. Pro tvorbu kalibrační řady posloužil floroglucitol.

Výsledky a diskuze

Pro porovnání účinnosti extrakce antioxidačních látek horkou/studenou vodou byla v obou vodných extraktech stanovena antioxidační aktivita metodou DPPH. Jak je patrné z **Obr. 1**, pro většinu vzorků byla antioxidační aktivita obou extraktů srovnatelná, či vyšší v případě použití horké vody. Z tohoto důvodu bylo stanovení antioxidační aktivity dalšími metodami provedeno pouze pro extrakty II a III vycházející z extraktu I získaného extrakcí horkou vodou. Data jsou uvedena na **Obr. 2**.



Obr. 1: Antioxidační aktivita ve vodných extraktech vzorků (stanovení metodou DPPH)



Obr. 2: Zhodnocení antioxidační aktivity v extraktech vzorků (metoda DPPH, Griessova metoda, stanovení celkových flavonoidů a polyfenolů)

Závěr

- ✓ Byla vyvinuta metoda třístupňové extrakce, umožňující připravit z velmi malé navážky vzorku (100 mg) tři extrakty o různé polaritě – pro účely bioprospekce tak může být ze studovaných mikrořas získáno široké spektrum potenciálně přítomných biologicky aktivních látek.
- ✓ U extraktů reálných vzorků mikrořas a doplňků stravy byla stanovena jejich antioxidační aktivita – nejvyšší hodnoty byly většinou pozorovány ve vodných extraktech.
- ✓ U doplňků stravy s obsahem řasy *Spirulina sp*. byla oproti ostatním vzorkům často pozorována vyšší antioxidační aktivita metanolového extraktu. Výjimkou byl doplněk Neobotanics Chlorela Bio – tento vzorek se výrazně odlišoval vysokým obsahem flavonoidů v metanolovém extraktu.
- ✓ Různorodost profilů antioxidační aktivity, pozorovaná u extraktů jednotlivých vzorků stejné řasy, ukazuje na významný vliv podmínek růstu a zpracování řasy na výsledný obsah biologicky aktivních látek.

Literatura

Ebrahimzadeh, M.; et al. Antioxidant and free radical scavenging activity of h. Officinalis l. Var. Angustifolius, v. Odorata, b. Hyrcana and c. Speciosum. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences.* **2010**, *23* (1), 29–34.

Oliveira, A.; et al. Ficus carica L.: Metabolic and biological screening. *Food and Chemical Toxicology.* **2009**,*47*, 2841–2846.

Kiranmai, M.; et al. Comparison of total flavanoid content of Azadirachta indica root bark extracts prepared by different methods of extraction. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* **2011**, 2 (3), 254–261.

Morales-Soto, A.; et al. Antioxidant capacity of 44 cultivars of fruits and vegetables grown in Andalusia (Spain). *Food Research International* **2014**, *58*, 35–46.

P 18

ANALÝZA VITAMINU D V KRMIVECH METODOU UPLC-MS/MS

Bolechová M. (1, 2), Kosubová P. (1), Nehybová Z. (1), Mrkvicová M. (1)

(1) Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno,
(2) Ústav Chemie a technologie ochrany životního prostředí, Fakulta chemická, VUT v Brně

Některé formy vitamínu D, zejména cholekalciferol (vitamín D3), ergokalciferol (vitamín D2) a 25-hydroxycholekalciferol, jsou zahrnuty v Registru doplňkových látek ve Společenství, podle nařízení (ES) č. 1831/2003 a mohou být tedy přidávány do krmiv a krmných surovin. Zároveň jsou legislativně nastaveny maximální obsahy těchto látek v krmivech v závislosti na účelu zkrmování. Obohacování krmiv současně různými formami vitamin D je zakázáno, popřípadě striktně řízeno příslušnou legislativou [1, 2].

Množství cholekalciferolu v kompletních krmivech, premixech a minerálních krmivech kontroluje Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně. Postup pro stanovení této látky je založen na normované metodě BS EN 12821:2009 [3], která je validována. Vzorek se nejdříve alkalicky hydrolyzuje a poté extrahuje (kapalina-kapalina). Analýza extraktu probíhá pomocí ultra-účinného kapalinového chromatografu ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií s elektronovou ionizací a detekcí kladně nabitých iontů (UPLC-MS/MS). V případě analýzy komplexních matric, je ke vzorku navíc přidán vnitřní standard.

Od roku 2012 bylo touto metodou analyzováno cca 180 vzorků. Vzorky, nevyhovující deklaraci pro vitamín D, se vyskytovaly pouze ojediněle.

Vitamín D se může přirozeně vyskytovat i v některých přírodních složkách pro výrobu kompletních krmiv. Tím může být i ovlivněno konečné množství této látky v kompletním krmivu, které je vitamínem D uměle obohaceno. Proto byla přítomnost vitamínu D v surovinách pro výrobu krmiv zjišťována a bylo posuzováno, zda by nalezené množství mohlo mít vliv na deklarovanou hladinu, popřípadě na legislativní limity pro vitamín D v krmivech.

V současné době se ověřují možnosti rozšíření metody o další, v tuku rozpustné vitamíny a podobné látky, jako jsou vitamín A, vitamín E, ergokalciferol, 25-hydroxycholekalciferol, 7-dehydrocholesterol a dihydrotachysterol.

P 19

ÚČINNOST ANTIOXIDANTŮ PŘI OCHRANĚ TOKOFEROLŮ BĚHEM SMAŽENÍ POTRAVIN NA PÁNVI

Fišnar J., Réblová Z.
Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6

Úvod

Během smažení potravin na pánvi může docházet k významným ztrátám tokoferolů (vitaminu E) [1-3], které v největší míře vznikají při předehřívání oleje na pánvi (tj. ještě před samotným smažením potraviny) [4]. Tyto ztráty mohou být sníženy dodržováním podmínek dobré výrobní praxe, tj. především regulací teploty oleje a doby jeho předehřívání [4]. Tato pravidla však lze jen obtížně dodržovat například v domácnosti, kde spotřebitel nemůže optimalizovat a často ani zcela kontrolovat podmínky předehřívání oleje a smažení. Druhou možností snížení ztrát tokoferolů proto může být pravděpodobně použití antioxidantů.

V literatuře lze najít poměrně dostatek prací studujících schopnost různých antioxidantů ochraňovat tokoferoly [5-17], a to za různých podmínek, včetně smažení (resp. fritování) nebo zahřívání oleje (jeho vyšší vrstvy) na teplotu přibližně 180 °C [13-17]. Avšak prací studujících schopnost antioxidantů ochraňovat tokoferoly během smažení potravin na pánvi (či zahřívání oleje na teplotu smažení v tenké vrstvě) je nedostatek [3], i když (jak již bylo uvedeno) ztráty tokoferolů mohou být za těchto podmínek vysoké [1-4] a mohou se pravděpodobně podílet na často nedostatečném příjmu vitaminu E [18, 19].

Cílem této práce bylo proto studium účinnosti 7 vybraných antioxidantů při ochraně tokoferolů (α-tokoferolu) během zahřívání slunečnicového oleje na pánvi. Testovány přitom byly sloučeniny (askorbylpalmitát, gallová kyselina, kávová kyselina, BHA, kvercetin a katechin), které již dříve (za odlišných podmínek) prokázaly schopnost ochraňovat tokoferoly [6, 8, 12, 16, 17] a rosmarinová kyselina, která doposud nebyla při ochraně tokoferolů testována, avšak na základě její struktury se lze domnívat, že tokoferoly ochraňuje [20]. Cílem tak bylo především kvantifikovat protekční schopnost vybraných antioxidantů za zvolených podmínek.

Experimentální část

Příprava olejů a jejich zahřívání na pánvi

Ke slunečnicovému oleji byl přidán buď samotný aceton (kontrolní vzorek bez antioxidantů) nebo acetonový roztok antioxidantu, tak aby přídavek antioxidantu do oleje činil 500 mg/kg. Po promíchání byly vzorky ponechány přes noc za teploty místnosti, aby došlo k odpaření acetonu. Druhý den bylo vždy 16 g (± 1 %) oleje naváženo na teflonovou pánev o průměru 17 cm, která byla následně zahřívána na elektrické topné desce o teplotě 220 °C po dobu 8 minut, resp. teplotě 280 °C po dobu 4 minut. Teplota oleje dosáhla v prvním případě po 4 minutách zahřívání 180 °C a poté kolísala v rozmezí 180 a 185 °C. Ve druhém případě rostla teplota oleje po celou dobu zahřívání a to až na hodnotu přibližně 220 °C. Za všech zvolených podmínek byly provedeny vždy 3 pokusy.

Stanovení tokoferolů:

Tokoferoly byly stanoveny metodou HPLC s amperometrickou detekcí za následujících podmínek:

- *mobilní fáze:* směs acetonitrilu (pro HPLC, J. T. Baker) a methanolu (pro HPLC, Lach-Ner) v objemovém poměru 1:1, obohacená $LiClO_4$ (0,02 mol/l; p.a., Sigma Aldrich) a NaCl (0,005 mol/l; p.a., Lachema);
- *průtok m. fáze:* 1 ml/min (čerpadlo LCP 4020.31 v nekovovém provedení; Ecom Praha);
- *nástřik:* 20 μl (nástřikový ventil Rheodyne 7725);
- *kolona:* 200 x 4,6 mm, plněná sorbentem Hypersil ODS o zrnitosti 5 μm (Hewlett Packard, USA);
- *teplota kolony:* 28 °C (termostat chromatografických kolon LCO 101; Ecom Praha);

- *detekce:* amperometrická; detektor HP 1049A (Hewlett Packard) v tříelektrodovém zapojení, s uhlíkovou měrnou a argentochloridovou referentní elektrodou; detekční potenciál 1,05 V; proudový rozsah 500 μA; po každé analýze bylo provedeno elektrochemické čištění povrchu pracovní elektrody, při kterém byl na elektrody střídavě vkládán potenciál +1,5 V (0,5 s), -0,5 V (0,5 s) a detekční potenciál (0,3 s), celý cyklus byl opakován 10krát;
- *příprava vzorku:* 2-2,5 g oleje bylo odváženo (s přesností na 0,1 mg) do odměrné baňky o objemu 25 ml, rozpuštěno v acetonu a doplněno týmž rozpouštědlem po rysku;
- *zpracování signálu:* chromatografická datastanice Clarity (DataApex).

Výsledky a diskuze

Za zvolených podmínek byly ztráty α-tokoferolu ve slunečnicovém oleji bez přídavku antioxidantů (blank) přibližně 80 % původního obsahu (teplota oleje 180 °C, doba zahřívání 8 minut), resp. 66 % původního obsahu (maximální teplota oleje 220 °C, doba zahřívání 4 minuty; Graf č. 1 a 2). Tj. původní obsah α-tokoferolu se snížil z 580 mg/kg na 116, resp. na 198 mg/kg, což odpovídá našim předchozím výsledkům [4].

Všechny testované antioxidanty byly za daných podmínek schopné ochraňovat α-tokoferol (Graf č. 1 a 2) s výjimkou BHA při zahřívání oleje na teplotu 220 °C, kde ochranný efekt tohoto antioxidantu nebyl statisticky významný. Největší schopnost ochraňovat α-tokoferol pak měly askorbylpalmitát a gallová kyselina, které výrazně ochraňovaly tokoferoly i za dalších experimentálních podmínek [16, 21]. Tyto antioxidanty snižovaly ztrátu α-tokoferolu vždy o více než polovinu, a to přestože účinnost antioxidantů se obecně se zvyšující se teplotou snižuje, a často i zcela mizí [22], například v důsledku rozkladu těchto antioxidantů [23].

Závěr

Přídavek vhodných antioxidantů (zejména gallové kyseliny a askorbylpalmitátu) do smažících tuků a olejů je možností, jak snížit ztráty tokoferolů během přípravy smažených pokrmů na pánvi (a tím také zvýšit často nedostatečný příjem vitaminu E). Tento přístup může být vhodný zejména v domácnostech, kde běžný spotřebitel nemá často dostatek možností jak optimalizovat a kontrolovat podmínky smažení (zejména teplotu oleje a dobu jeho předehřívání).

Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č.20/2014).

Literatura

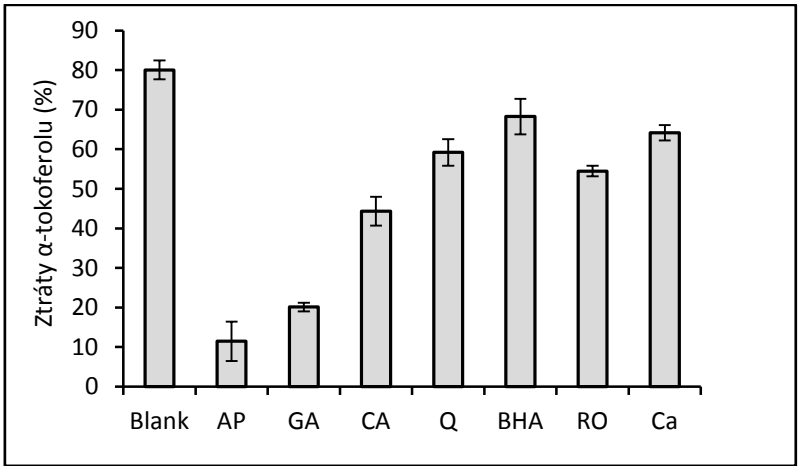
[1] Kalogeropoulos N., Mylona A., Chiou A., Ioannou M.S., Andrikopoulos N.K.: Retention and distribution of natural antioxidants (α-tocopherol, polyphenols and terpenic acids) after shallow frying of vegetables in virgin olive oil. **LWT - Food Science and Technology 40 (2007)** 1008-1017.

[2] Kalogeropoulos N., Chiou A., Mylona A., Ioannou M.S., Andrikopoulos N.K.: Recovery and distribution of natural antioxidants (α-tocopherol, polyphenols and terpenic acids) after pan-frying of Mediterranean finfish in virgin olive oil. Food Chemistry 100 (2007) 509-517.

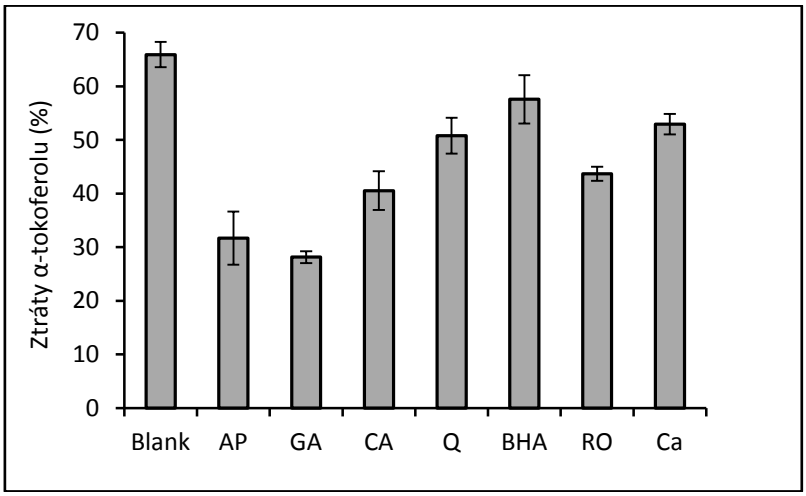
[3] Chiou A., Kalogeropoulos N., Salta F. N., Efstathiou P., Andrikopoulos N.K.: Pan-frying of French fries in three different edible oils enriched with olive leaf extract: Oxidative stability and fate of microconstituents. **LWT - Food Science and Technology 42 (**2009) 1090-1097.

[4] Fišnar J, Réblová Z.: Tocopherol losses during pan-frying. European Journal of Lipid Science and Technology, in press.

[5] Fišnar J: Diplomová práce. Vliv vnějších podmínek na schopnost fenolových kyselin ochraňovat tokoferoly (diplomová práce), Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2011.
[6] Zhu Y.Q., Huang Y., Tsang D., Chen Y.Z.: Regeneration of alpha-tocopherol in human low density lipoprotein by green tea catechin. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47 (1999) 2020-2025.
[7] Facino R.M., Carini M., Aldini G., Calloni M.T., Bombardelli E., Morazzoni P.: Sparing effect of procyanidins from *Vitis vinifera* on vitamin E: *In vitro* studies. Planta Medica 64 (1998) 343-347.
[8] Zhou B., Wu M.L., Yang L., Liu L.Z.: Evidence for α-tocopherol regeneration reaction of green tea polyphenols in SDS micelles. Free Radical Biology & Medicine 38 (2005) 78-84.
[9] Hiramoto K., MiuraY., Ohnuki G., Kato T., Kikugawa K.: Are water-soluble natural antioxidants synergistic in combination with alpha-tocopherol? Journal of Oleo Science 51 (2002) 569-576.
[10] Lotito B.S., Fraga G.C.: Catechins delay lipid oxidation and α-tocopherol and β-carotene depletion following ascorbate depletion in human plasma. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 225 (2000) 32-38.
[11] Bandarra N.M., Campos R.M., Batista I., Nunes M.L., Empis J.M.: Antioxidant synergy of alpha-tocopherol and phospholipids. Journal of the American Oil Chemists' Society 76 (1999) 905-913.
[12] Pazos M., Sánchez L., Medina I.: α-Tocopherol oxidation in fish muscle during chilling and frozen storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53 (2005) 4000-4005.
[13] Kajimoto G., Okajima N., Takaoka M., Yoshida H., Shibahara A.: Effects of catechins on thermal decomposition of tocopherol in heated oils. Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science 41(1988) 213-218.
[14] Gordon M.H., Kouřimská L.: Effect of antioxidants on losses of tocopherols during deep-fat frying. Food Chemistry 52 (1995) 175-177.
[15] Simonne A.H., Eitenmiller R.R.: Retention of vitamin E and added retinyl palmitate in selected vegetable oils during deep-fat frying and in fried breaded products. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46 (1998) 5273-5277.
[16] Réblová Z., Fišnar J., Tichovská D., Doležal M., Joudalová K.: Effect of temperature and oil composition on the ability of phenolic acids to protect naturally present α-tocopherol during the heating of plant oils. Czech Journal of Food Sciences 30 (2012) 351-357.
[17] Kajimoto G., Kanomi Y., Kawakami H., Hamatani M.: Effects of antioxidants on the oxidative stability of oil and of tocopherol in oil during heating. Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science 45 (1992) 291-295.
[18] Maras J.E., Bermudez O.I., Qiao N., Bakun, P.J., Boody-Alter E.L., Tucker K.L.: Intake of alpha-tocopherol is limited among US adults. Journal of the American Dietetic Association 104 (2004) 567-575.
[19] Rodríguez-Palmero M., Castellote-Bargalló A. I., López-Sabater C., de la Torre-Boronat C., Rivero Urgell M.: Assessment of dietary nutrient intakes: analysed vs. calculated values. Food Chemistry 61 (1998) 215-221.
[20] Mukai K., Mitani S., Ohara K., Nagaoka S.I.: Structure-activity relationship of the tocopherol-regeneration reaction by catechins. Free Radical Biology & Medicine 38 (2005) 1243-1256.
[21] Gordon M.H., Kouřimská L.: The effects of antioxidants on changes in oils during heating and deep frying. Journal of the Science of Food and Agriculture 68 (1995) 347-353.
[22] Réblová Z.: Effect of temperature on the antioxidant activity of phenolic acids. Czech Journal of Food Sciences 30 (2012) 171-177.
[23] Wada S., Fang X.: The synergistic antioxidant effect of rosemary extract and alpha-tocopherol in sardine oil model system and frozen-crushed fish meat. Journal of Food Processing and Preservation 16 (1992) 263-274.



Graf č. 1 – Ztráty α-tokoferolu během zahřívání slunečnicového oleje na pánvi po dobu 8 minut při teplotě oleje 180 °C (blank – kontrolní vzorek oleje bez antioxidantu, AP – askorbylpalmitát, GA – gallová kyselina, CA – kávová kyselina, Q – kvercetin, BHA – butylhydroxyanisol, RO – rosmarinová kyselina, Ca – katechin).



Graf č. 2 – Ztráty α-tokoferolu během zahřívání slunečnicového oleje na pánvi po dobu 4 minut na teplotu oleje 220 °C (blank – kontrolní vzorek oleje bez antioxidantu, AP – askorbylpalmitát, GA – gallová kyselina, CA – kávová kyselina, Q – kvercetin, BHA – butylhydroxyanisol, RO – rosmarinová kyselina, Ca – katechin).

P 20

OXIDAČNÍ A POLYMERAČNÍ PRODUKTY V TEPELNĚ NAMÁHANÝCH OLEJÍCH A TUCÍCH

Šimková Š., Pohořelá B., Roubíčková I., Pánek J.
Ústav analýzy potravin a výživy, VŠHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6

Úvod

Zahřívání olejů a tuků za vysoké teploty a přítomnosti vzduchu vede k tvorbě oxidačních a polymeračních produktů, ať těkavých či netěkavých. Tyto rozkladné produkty mohou mít nepříznivý vliv na chuť, vůni, barvu, texturu, nutriční hodnotu a hygienicko-toxikologickou kvalitu potravin. Za nejrizikovější jsou přitom považovány zejména degradační produkty se střední a nižší molekulovou hmotností, k nimž se řadí relativně méně toxické dimery, cyklické monomery a karbonylové deriváty mastných kyselin. Pro posuzování celkového stupně degradace olejů a tuků se používá parametr obsahu polymerních triacylglycerolů, oxidačních produktů a obsahu celkových polárních látek.

Materiál a metody

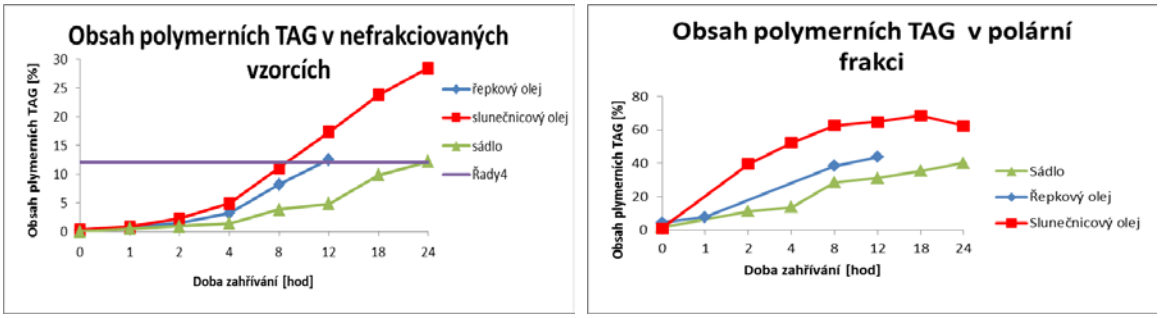
Řepkový olej, slunečnicový olej a vepřové sádlo byly zahřívány na topné desce 15 minut až 24 hodin při teplotě 180°C. Oleje a tuky byly poté frakcionovány metodou IUPAC 2.507 na koloně silikagelu elučními rozpouštědly o rostoucí polaritě a tím získány nepolární a polární frakce. V obou frakcích byly analyzovány polymerní triacylglyceroly (pTAG) a oxidační produkty.
pTAG byly stanovovány vysokoúčinnou vylučovací chromatografií (HPSEC) s refraktometrickým detektorem HP 1047 A (Hewlett Packard, USA) nastaveným na teplotu 30°C. Princip dělení složek tuku a oleje je na základě rozdílu velikosti molekuly. Byla použita kolona PL-gel Mixed-E 300 mm x 7,5 mm x 3 µm (Agilent, USA). Tetrahydrofuran (HPLC, Merck, USA) byl použit jako mobilní fáze o průtoku 0,6 ml/min. Nástřik byl 5 µl automatickým dávkovačem HP 1050 (Hewlett Packard, USA). Obsah pTAG byl vyhodnocen pomocí programu CSW 1.6. (Data Apex, ČR).
Oxidační produkty byly stanovovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s refraktometrickým detektorem HP 1047 A (Hewlett Packard, USA) nastaveným na teplotu 35°C. Dělení oxidovaných a neoxidovaných triacylglycerolů se děje na základě jejich polarity, která zahrnuje počet uhlíků v molekule (délku jednotlivých mastných kyselin), počet dvojných vazeb a vliv případného substituentu (hydroperoxid, hydroxyderivát atd.). Byla použita kolona Purospher RP – 18 250 mm x 4 mm x 5 µm (Merck, USA) vyhřívaná na 40°C a mobilní fáze aceton: acetonitril: methanol v poměru 4:2:1 (v/v/v) o průtoku 1 ml/min. Nástřik byl 100 µl automatickým dávkovačem HP 1050 (Hewlett Packard, USA). Obsah oxidačních produktů byl vyhodnocen pomocí programu CSW 1.6. (Data Apex, ČR).

Rozsah oxidace a následných reakcí mastných kyselin v řepkovém oleji byl sledován, po převedení mastných kyselin na methylestery dle metody IUPAC 2.301 s modifikací pro vnitřní standard (nonadekanová kyselina), pomocí plynové chromatografie s hmotnostním detektorem. Analýzy methylesterů mastných kyselin byly provedeny na přístroji Agilent 7820 A (Agilent, USA) s hmotnostním detektorem Agilent 5975 (Agilent, USA). Byla použita kolona Innowax 19091N-133 (Agilent, USA) 30 m x 250 µm x 0,25 µm a následující teplotní program: 110°C, 5°C/min; 245°C (40 min). Jako hmotnostní analyzátor byl použit jednoduchý kvadrupol. Průtok nosného plynu, helia, byl 1 ml/min. Pro kvantifikaci mastných kyselin byla použita metoda vnitřního standardu.

Výsledky a diskuze

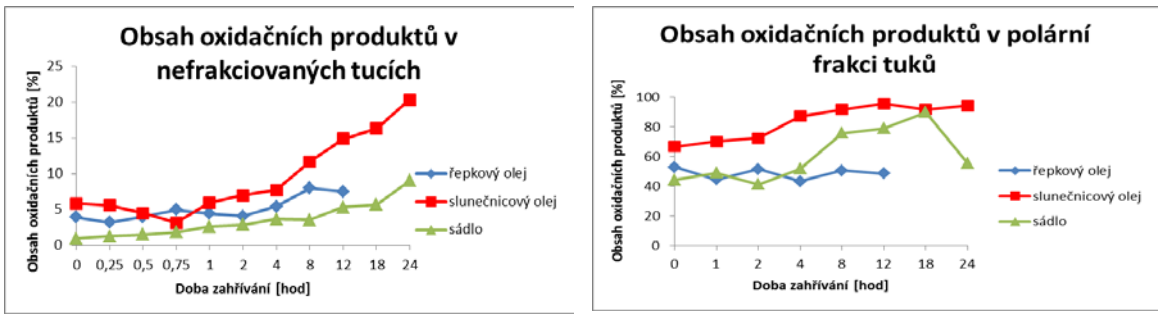
Hygienický limit pro obsah polymerních triacylglycerolů není legislativně určen, nicméně uzančně se za nejvyšší přípustnou hodnotu považuje 12 %. Obsah polymerních triacylglycerolů u nefrakcionovaných vzorků postupně stoupal s dobou zahřívání. Po 24hodinovém zahřívání slunečnicového oleje obsah pTAG stoupl na 28 %. V nepolární frakci byl obsah pTAG nulový.

Veškeré polymery byly eluovány v polární frakci. Lze tedy předpokládat, že se bude jednat o oxidované polymery. Po 24hodinovém zahřívání vzrostl obsah pTAG v této frakci na 62 % u slunečnicového oleje, 48 % u sádla a po 12hodinovém zahřívání u řepkového oleje na 43 %.



Obr. 1 Obsah polymerních TAG v nefrakciovaných vzorcích a v polární frakci

Obsah oxidačních produktů stoupal s prodlužující se dobou zahřívání. Obsah u řepkového oleje a sádla nebyl nijak vysoký (0-9 %), zatímco u slunečnicového oleje vzrostl až na 20 %. V nepolární frakci se obsah oxidačních produktů pohyboval v rozmezí 0-5 %, zatímco v polární frakci vzrostl u sádla na 55 % a u slunečnicového oleje na 94 %.



Obr. 2 Obsah oxidačních produktů v nefrakciovaných vzorcích a v polární frakci

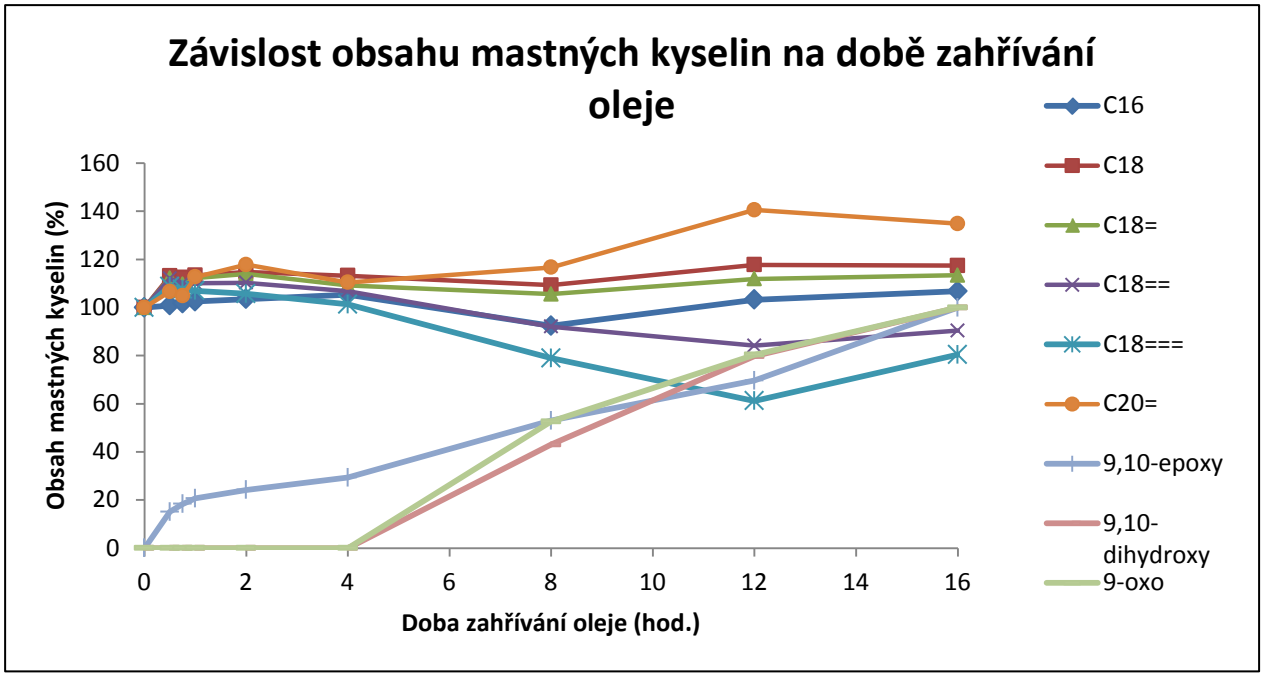
Řepkový nízkoerukový olej patří mezi vysoce nenasycené a tudíž výrazně oxylabilní a termolabilní rostlinné oleje. Ve srovnání se slunečnicovým olejem má výrazně nižší obsah oxylabilní linolové kyseliny. Na druhé straně obsahuje (podobně jako např. sójový olej) vyšší množství (až 10 %) ještě labilnější linolenové kyseliny. Právě linolenová kyselina tento olej výrazně destabilizuje, takže ve výsledku je jeho termostabilita ve srovnání se slunečnicovým olejem nižší nebo srovnatelná, přestože celkový obsah oxylabilních polyenových kyselin je v řepkovém oleji nižší. V pokusu byl řepkový olej zahříván na teplotu 180 °C, což jsou podmínky, které jsou běžně užívány pro hodnocení termostability a oxidační stability oleje a do určité míry i simulují podmínky při smažení.

Z uvedených výsledků je vidět, že obsah nasycených a monoenových mastných kyselin zůstává po celou dobu zahřívání prakticky neměnný. Během zahřívání dochází k výrazné oxidaci linolové a zejména linolenové kyseliny. Jejich obsah v řepkovém oleji po 16 hodinách klesá na 77 % v případě linolové kyseliny a na 47 % u linolenové kyseliny. Dále je uvedena dynamika tvorby tří typických oxidovaných mastných kyseliny – 9,10-epoxystearové, 9,10-dihydroxystearové a 9-oxostearové kyseliny. Obsah epoxystearové a dihydroxystearové kyseliny roste v průběhu záhřevu prakticky lineárně a v 16. hodině záhřevu již je obsah těchto derivátů srovnatelný s obsahem palmitové kyseliny. Identita těchto tří uvedených kyselin je prokázána analýzou hmotnostního spektra a srovnáním s literárními údaji. V tabulce I nejsou uvedeny mastné kyseliny s obsahem pod 1 % veškerých mastných kyselin – eikosanová (arachová), eikosadienová, heneikosanová, dokosanová

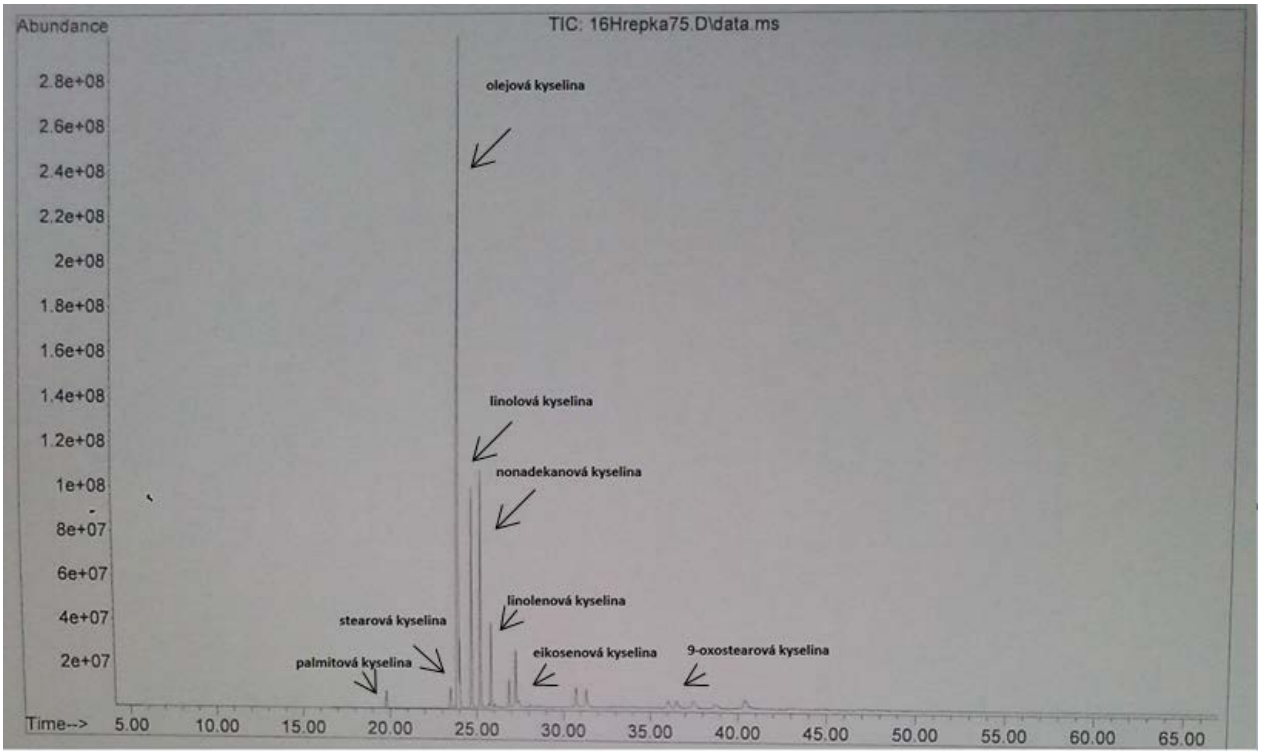
(behenová), dokosenová (eruková), trikosanová, trikosenová, tetrakosanová a tetrakosenová. Další potenciální oxidované deriváty buď nebyly s dostatečnou spolehlivostí identifikovány nebo byly pod mezí stanovitelnosti.

Tab. I Obsah mastných kyselin v zahřívaných vzorcích (mg /kg vz.)

Kyselina	0 h	30 min	45 min	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	16 h
C 16:0	4508	4545	4583	4620	4665	4750	4164	4654	4812
C 18:0	6317	7144	7100	7161	7252	7150	6905	7436	7415
C 18:1	217987	244641	239113	244563	248508	238005	230158	243915	247173
C 18:2	64062	71761	70476	70526	70629	68452	58962	53925	49715
C 18:3	29717	32323	31966	31789	31403	30096	23468	18195	13898
C 20:1	15294	16309	16046	17236	18020	16884	17844	21491	20622
9,10-epoxystearová	0	794	965	1089	1276	1546	2793	3665	5265
9,10-dihydroxystearová	0	0	0	0	0	0	1965	3639	4563
9-oxostearová	0	0	0	0	0	0	477	729	907



Obr. 7 Závislost obsahu mastných kyselin na době zahřívání oleje



Obr. 4 Chromatogram mastných kyselin v řepkovém oleji po 16 hodinovém záhřevu

Závěr

Nejstabilnější tuk z hlediska obsahu tvorby polymerních triacylglycerolů a oxidačních produktů se jeví sádlo, následované řepkovým olejem. Naopak slunečnicový olej je nejméně stabilní při podmínkách, které imitují proces smažení. Tokoferoly přítomné v řepkovém a slunečnicovém oleji se velmi rychle degradují a na průběh oxidace za této vysoké teploty prakticky nemají vliv. Stabilita je v tomto případě ovlivněna pouze obsahem a složením polyenových kyselin. Obsah nasycených a monoenových kyselin byl během zahřívání prakticky neměnný. Oproti tomu, esenciální mastné kyseliny podléhaly poměrně výraznému rozkladu. To dokazuje, že smažicí oleje, kdy při smažení jsou podmínky pro oxidaci daleko příznivější, nemohou být reálně dobrým zdrojem esenciálních mastných kyselin.

Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č.20/2014).

Použitá literatura

1. IUPAC b– Comission on Oils, Fats and Derivatives: Method 2.507 – Determination of polar compounds in frying fats, In: Standard Methods for the analysis of oils, fats and derivatives. 7th Edition, Paquot C., Hautfenne A., Eds., Blackwell Sci. Publications, Oxford, 1987.
2. IUPAC - Comission on Oils, Fats, and Derivatives: Methods 2.301 – Preparation of the Fatty Acid Methyl Esters. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, 7th Edition, Paquot C., Hautfenne A., Eds., Blackwell Sci. Publications, Oxford, 1987.
3. Berdeaux O., Velasco J., Márquez-Ruiz G., Dobarganes C.: Evolution of Short-Chain Glycerol-Bound Compounds During Thermoxidation of FAME and Monoacid TAG, J. Amer. Oil Chem. Soc., 79, 279-285, 2002
4. Velasco J., Marmesat S., Márquez-Ruiz G., Dobarganes C.: Formation of Short-Chain Glycerol-Bound Oxidation Products and Oxidised Monomeric Triacylglycerols During Deep-Frying and Occurence in Used Frying Fats. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 106, 728-735, 2004

P 21

KVALITA VYBRANÝCH SMAŽENÝCH POTRAVIN NA ČESKÉM TRHU

Mekhanoshina L., Réblová Z.
Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6

ÚVOD

Smažení je jednou z nejpoužívanějších a nejpopulárnějších metod přípravy pokrmů. Zvýšená konzumace smažených potravin však může být spojena s některými riziky. Jedná se například o zvýšený příjem tuku a soli či možný vyšší příjem *trans*- a nasycených mastných kyselin nebo derivátů monochlorpropandiolu. Specifické riziko pak představuje možný vyšší příjem látek vznikajících během tepelného namáhání smažicího tuku a smažených potravin, jako jsou například heterocyklické aminy, akrylamid a oxidační produkty lipidů [1-3].

Posledně jmenovaná skupina látek, tj. oxidační produkty lipidů a některé další látky vznikající během smažení ve smažicí lázni, vykazuje jen malou akutní toxicitu. Vyšší opakovaný příjem těchto látek však představuje nezanedbatelné riziko, zejména v souvislosti se vznikem a rozvojem kardiovaskulárních a nádorových onemocnění [4]. Pro zajištění bezpečnosti smažených potravin a včasnou výměnu smažicí lázně se odborná doporučení shodují na maximálním akceptovatelném obsahu veškerých polárních látek 24 %, resp. maximálním obsahu polymerních triacylglycerolů (pTAG) 12 % [5]. Přitom obsah pTAG má (zejména vzhledem k vyšší spolehlivosti analytických výsledků) lepší vypovídací hodnotu [6]. Příslušné limity však nejsou zakotveny ani v české, ani evropské legislativě a předchozí studie realizované jak v České republice [7, 8], tak v jiných zemích [9-12] ukázaly, že významný podíl vzorků (zejména z restaurací a dalších stravovacích služeb) tyto limity překračuje. Proto byla v posledních dvou letech realizována poměrně rozsáhlejší studie monitorující aktuální stav v kvalitě smažených potravin na českém trhu, a to z hlediska obsahu polymerních triacylglycerolů v těchto potravinách.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Analyzované vzorky:

Celkem bylo v běžné tržní síti, resp. různých typech stravovacích služeb zakoupeno 80 vzorků smažených potravin, rozdělených do 4 kategorií:

- hranolky z mezinárodních řetězců rychlého občerstvení (fast-foodů; 10 vzorků)
- hranolky a chipsy z trhů a bister (26 vzorků)
- hranolky předsmažené a hluboce zmrazené (10 vzorků)
- balené výrobky zahrnující průmyslově vyrobené chipsy a snacky (34 vzorků)

Příprava vzorků:

Rozemletý vzorek byl extrahován petroletherem za teploty místnosti. Poté byla směs přefiltrována a extrakt byl odpařen na vakuové rotační odparce při teplotě lázně max. 40 ºC. Odparek byl rozpuštěn v aktuální mobilní fázi a získaný roztok byl vysušen bezvodým síranem sodným.

Stanovení polymerních triacylglycerolů:

Polymerní TAG byly stanoveny pomocí gelové vysokoúčinné kapalinové chromatografie s refraktometrickou detekcí (HPLC-SEC-RID) za následujících podmínek:

- mobilní fáze: tetrahydrofuran
- průtok m. fáze: 0,6 ml/min
- nástřik: 5 µl
- předkolona: 50 * 7,5 mm, PL-gel Mixed-E, velikost částic 5 µm (Hewlett Packard)
- kolona: 300 * 7,5 mm, PL-gel Mixed-E, velikost částic 3 µm (Agilent Technologies)
- detekce: refraktometrická; detektor HP 1047A (Hewlett Packard); teplota detektoru 30 °C
- zpracování signálu: chromatografická datastanice Clarity (DataApex)
- kvantifikace: metoda vnitřní normalizace, tj. výsledek byl vyjádřen v % z veškerého přítomného tuku

VÝSLEDKY A DISKUZE

Při porovnání obsahu pTAG v tuku různých kategorií smažených potravin (viz Tab. 1) je vidět, že u balených výrobků zahrnujících průmyslově vyrobené chipsy a snacky je obsah pTAG typicky nejmenší (průměrně přibližně 1,6 %). To může souviset s vysokou efektivitou výroby těchto potravin spojenou s používáním kontinuálního smažení, kdy je nutné do smaživí lázně velmi často doplňovat čerstvý olej.

Také u dalších analyzovaných průmyslově vyráběných potravin, tj. u předsmažených hluboce zmrazených bramborových hranolků, je obsah pTAG v tuku těchto výrobků poměrně nízký (průměrně přibližně 4,6 %) a u žádného z analyzovaných vzorků nepřekročil 12 %. Typicky vyšší obsah polymerních TAG u předsmažených hluboce zmrazených bramborových hranolků (než u chipsů a podobných snack výrobků) pak pravděpodobně souvisí s výrazně nižším obsahem tuku u těchto potravin, což snižuje nutné množství a četnost dolévání čerstvého oleje do smažící lázně.

Jak je dále patrné z Tab. 1, u smažených bramborových hranolků z různých provozoven mezinárodních řetězců rychlého občerstvení (fast-foodů) také žádný z analyzovaných vzorků nepřesáhl limitní obsah polymerních triacylglycerolů 12 %. Tato skutečnost pravděpodobně svědčí o dobře nastavených vnitřních systémech kontroly jakosti, i když tomuto stavu výrazně napomáhá také velký podíl smažení na přípravě pokrmů v těchto provozech, a tedy nutnost častějšího doplňování smažicích lázní čerstvým olejem.

Naproti tomu u hranolků a chipsů z vánočních a farmářských trhů a malých lokálních bister téměř 20 % vzorků překročilo doporučený limitní obsah polymerních triacylglycerolů 12 % z veškerého přítomného tuku (viz Tab. 1).

Zjištěný stav u jednotlivých typů smažených potravin obecně odpovídá dříve publikovaným výsledkům [7-12]. Významné je přitom především srovnání se studií realizovanou v ČR před přibližně 15 lety (viz Tab. 2), kde lze pozorovat jisté zlepšení v kvalitě smažených bramborových hranolků nabízených v různých typech stravovacích služeb.

ZÁVĚR

Na základě výsledků této studie lze konstatovat, že dostatečně častá výměna smažicí lázně není problémem při průmyslové výrobě smažených potravin. Naproti tomu při přípravě smažených potravin ve stravovacích službách není kvalitě smažicích lázní a jejich přiměřeně včasné výměně doposud věnována dostatečná pozornost (s výjimkou velkých mezinárodních řetězců nabízejících rychlé občerstvení). Tuto situaci je nutné výrazně zlepšit, pravděpodobně především zahrnutím dané problematiky do příslušných legislativních předpisů a zavedením související kontroly ze strany dozorových orgánů.

PODĚKOVÁNÍ

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č.20/2014)

LITERATURA

[1] Zhang Q., Saleh A.S.M., Chen J., Shen Q.: Chemical alterations taken place during deep-fat frying based on certain reaction products: A review. Chemistry and Physics of Lipids 165 (2012) 662-681

[2] Boskou G., Andrikopoulos N.K.: Food hazards associated with frying, in Frying of Food: Oxidation, Nutrient and Non-Nutrient Antioxidants, Biologically Active Compounds and High Temperatures (ed. by Boskou B., Elmadfa I.). CRC Press, Boca Raton, US 2010, 265-310

[3] Saguy I.S., Dana D.: Integrated approach to deep fat frying: engineering, nutrition, health and consumer aspects. Journal of Food Engineering 56 (2003) 143-152

[4] Réblová Z., Peprná T.: Představují tuky a oleje po smažení zdravotní riziko? Chemické Listy 107 (2013) 271-276

[5] Anonynous (2000): Recommendations for frying oils discussed and adopted by the delegates. 3rd International Symposium on Deep-Fat Frying, March 20-21, Hagen/Westphalia, Germany. k dispozici na: http://www.dgfett.de/material/recomm.php (použito dne 25.04.2014)

[6] Deutsche Geselschaft für Fettwisenschaft: 9th Proficiency test – Final report (ed. by Gertz Ch.). DGF, Frankfurt 2003
[7] Réblová Z.: Obsah polymerních lipidů ve vybraných potravinách na českém trhu, XXXII. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, Skalský Dvůr u Bystřice nad Pernštejnem (28.-30.5.2001)
[8] Dostálová J., Šatrová K., Leitnerová D., Brát J., Doležal M., Réblová Z.: Složení a jakost tuku v bramborových hranolcích a chipsech, ve Sborník konference Výživa a zdraví (bez editora). ALWAC, Teplice 2010, 60-65
[9] Croon L.B., Rogstad A., Leth T., Kiutamo, T.: A comparative study of analytical methods for quality evaluation of frying fat. Fette Seifen Anstrichmittel 88 (1986) 87-91
[10] Skrokki A.: Test used for examining the quality of frying oils. Fat Science and Technology 97 (1995) 384-386
[11] Gertz Ch.: Chromatographische methoden bei der untersuchung von fritierfetten. Fette Seifen Anstrichmittel 88 (1986) 475-480
[12] Dobarganes M.C., Márquez-Ruiz G.: Calidad de las grasas de fritura en el sector de restauración de Andalucía. Grasas y Aceites. 46 (1995) 115-120

Tab. 1: Obsah pTAG v tuku různých typů smažených potravin

Typ výrobku	Počet vzorků	Průměrný obsah pTAG (%)	Minimální obsah pTAG (%)	Maximální obsah pTAG (%)	Počet vzorků s obsahem pTAG vyšším než 12 %
Balené výrobky zahrnující průmyslově vyrobené chipsy a snacky	34	1,58	0,39	5,23	0
Hranolky předsmažené a hluboce zmrazené	10	4,55	0,89	11,01	0
Hranolky z fast-foodů	10	5,90	1,74	10,86	0
Hranolky a chipsy z vánočních a farmářských trhů a bister	26	7,95	1,10	18,10	5

Tab. 2: Obsah pTAG v tuku různých typů smažených potravin – výsledky studie realizované v ČR v letech 1999 až 2002 [7]

Typ výrobku	Počet vzorků	Průměrný obsah pTAG (%)	Minimální obsah pTAG (%)	Maximální obsah pTAG (%)	Počet vzorků s obsahem pTAG vyšším než 12 %
Balené výrobky zahrnující průmyslově vyrobené chipsy a snacky	40	1,63	0,22	4,37	0
Hranolky předsmažené a hluboce zmrazené	20	2,55	1,29	5,88	0
Hranolky z fast-foodů, trhů a bister	40	9,81	1,75	32,62	11

P 22

MASTNÉ KYSELINY V SEMENECH SLIVONÍ (*PRUNUS DOMESTICA* L.)

Sabolová M.[1], Sus J.[2], Roubíčková I.[1], Papírníková J.[2], Doležal M.[1], Šimková S.[1], Pánek J.[1]
[1] Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha [2] Katedra zahradnictví, ČZU Praha

Souhrn
Bylo analyzováno složení mastných kyselin tuku semen 25 odrůd slivoní. Mastné kyseliny byly, po převedení na methylestery, stanoveny kapilární plynovou chromatografií s plamenovým ionizačním detektorem. Konfirmace identity byla realizována pomocí GC-MS. Výrazně majoritní kyselinou je olejová kyselina – obsah se pohybuje v rozmezí 52 – 72 %, s průměrnou hodnotou 65 %. Ve větším množství se vyskytuje i linolová (18 – 35 %, průměrně 24 %) a palmitová kyselina (5 – 7 %, průměrně 6 %). Zastoupení těchto tří majoritních kyselin by mohlo být určitým charakteristickým znakem tuku jader rodu *Prunus*. Ve významnějším množství se vyskytuje ještě stearová (2 %), asklepová (1 %) a palmitolejová kyselina (0,8 %). Obsah ostatních kyselin (včetně linolenové kyseliny) je pod 0,02 %. Jedna odrůda pološvestek (Jubileum) se od ostatních výrazně odlišuje obsahem nasycených mastných kyselin – obsah palmitové kyseliny je 10,3 % a obsah všech nasycených kyselin 14,3 %. To ukazuje, že šlechtěním lze i u poměrně stabilních rodů a kultivarů dosáhnout určité změny i v tvorbě primárních metabolitů.

Klíčová slova: mastné kyseliny, jádra, *Prunus domestica*

Úvod
Slivoň (*Prunus* L.) je druhově rozsáhlý a hospodářsky významný rod, patřící do čeledi *Rosaceae*, který je zastoupen více než 200 druhy keřů a stromů. Je široce rozšířen v mnohých zemích světa, zejména na severní polokouli (Euroasie) jako důležitý komponent nelesních přirozených a pěstovaných společenstev (Özcan 2000, Bortiri et al. 2006, Muráňová a kol. 2011). Rod *Prunus* zahrnuje mnoho druhů ovoce jako švestky a příbuzné druhy např. meruňky, mandloně, višně, třešně, broskvoně a je důležitým rodem z ekonomického hlediska. Hodně druhů poskytuje jedlé plody, olej, dřevo a některé jsou významné jako okrasné rostliny (např. Sakura ozdobná). Plody jsou důležitou součástí stravy v mnohých tropických a subtropických zemích, jako dobrý zdroj sacharidů, vitaminů, minerálních látek a vlákniny (Gao and Mazza 1995, Lee and Wen 2001, Gilani et al. 2010). Zpracovatelské závody mají velké množství ovocných semen jako „odpad“, který je v současné době využíván jenom minimálně. Z jader např. meruněk je přitom možné získat významné množství oleje, bílkovin a vlákniny (Femenia et al. 1995). Pro pražení jsou využívány zatím pouze semena mandloní a meruněk („persico“). Olej se semen *Prunus domestica* je používán v kosmetickém průmyslu. Literárních údajů o složení semen slivoní (*Prunus domestica* L.) je poměrně málo (Zlatanov and Janakieva 1998, Gunstone 2006, Matthäus and Özcan 2009) a charakterizaci složení mastných kyselin u velké skupiny semen švestek žádná. Mandle a meruňky jsou praženy a konzumovány jako pochutina (meruňky pod názvem „persico“), a stejný potenciál by mohly mít i semena slivoní (*Prunus domestica* L.) na základě složení mastných kyselin, charakteristického pro celý rod *Prunus* (viz tab I). Pro tohle využití semen slivoní hovoří i fakt, že získávání semen slivoní je jednodušší než semen meruněk.

Tabulka I – Základní složení mastných kyselin některých zástupců rodu Prunus (Zlatanov and Janakieva 1998, Gunstone 2006, Matthäus and Özcan 2009)

Mastná kyselina	Obsah MK (%)		
	Meruňka	**Mandle**	**Slivoň**
Olejová	62 - 72	62 - 67 (77)	57 – 74
Linolová	19 – 28	17 – 25 (30)	17 – 31
Palmitová	5 – 7	5 – 7	4 - 7
Stearová	1 – 2	1 - 2	2
Linolenová	0,1	0,1	0,1 – 0,2

Experimentální část

Slivoň (*Prunus domestica* L.). Bylo sledováno složení mastných kyselin u semen 25 odrůd slivoní z různých pomologických skupin (Tabulka II). Stromy byly pěstovány na experimentálním pozemku ČZU v Praze – Troji, Podhoří (20°7´22.486´´N,14°23´58.181´´E, 196 m.n.m) v písčitohlinité dobře propustné půdě. Osm let staré stromy byly v plné plodnosti a dobré zdravotní kondici. Jednalo se o odrůdy s vyšším stupněm tolerance nebo s rezistencí vůči virové šarce. Stromy byly těsně po odkvětu ošetřeny insekticidním přípravkem proti pilatce a průběžně byly odstraňovány stromy napadené virovou šarkou. Plody byly sklízeny v optimální době (začátek konzumní zralosti). Sušení nepoškozených jader probíhalo na filtračním papíru proudem vzduchu za běžné pokojové teploty.

Tabulka II - Analyzované odrůdy slivoní (*Prunus domestica* L.)

Název odrůdy	**Pomologický typ slivoně**	**Země původu**
Amátka (HL703)	pološvestka	ČR
Amers	pološvestka	USA
Čačanská lepotica	pološvestka	Srbsko
Haganta	pološvestka	Německo
Jojo	pološvestka	Německo
Jubileum	pološvestka	Švédsko
Stáňa (HL619)	pološvestka	ČR
Topfive	pološvestka	Německo
Tophit	pološvestka	Německo
Topking	pološvestka	Německo
Topstar plus	pološvestka	Německo
Valor	pološvestka	Kanada
Elena	švestka	Německo
Presenta	švestka	Německo
Top 2000	švestka	Německo
Toptaste	švestka	Německo
Althanova	renklóda	ČR
Ontario	renklóda	USA
Oulinská	renklóda	ČR
Rheingold	Slíva (žlutá)	Německo
Nancyska	mirabelka	Francie
Dezertnaja	myrobalán	Rusko
Myrobalán červenopol M42	myrobalán	ČR
Žilienka	podnožová slíva	Rakousko

Extrakce tuku. Tuk z rozemletých semen (navážka přibližně přesně 5g) byl extrahován pomocí směsi rozpouštědel petrolether: diethylether v poměru 90:10 (2x50 ml). Extrakce probíhala 15 minut na ultrazvukové lázni.

Stanovení mastných kyselin. Stanovení mastných kyselin pomocí plynové kapilárni chromatografie s plamenovou ionizační detekcí (GC-FID) proběhlo po transesterifikaci přítomných lipidů za vzniku methylesterů mastných kyselin. Transesterifikace byla provedena methanolickým

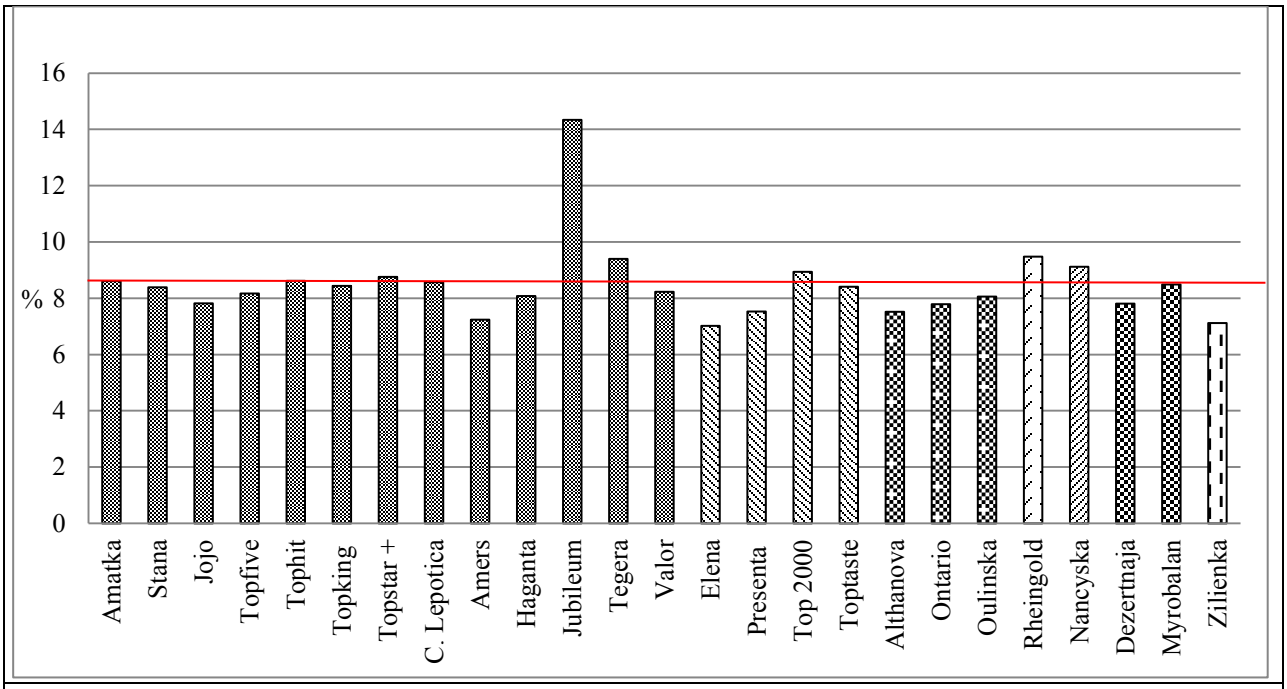
roztokem hydroxidu draselného za katalýzy fluoridem boritým (IUPAC 1987, Method 2.301). Vzniklé methylestery byly analyzovány metodou kapilární plynové chromatografie na přístroji Agilent 6890 (Palo Alto, USA) s plamenově ionizačním detektorem, s kapilární kolonou SP-2560 se zakotvenou fází *bis*-cyanopropyl siloxane (100 m x 0,25 m; 0,20 µm film; Supelco, Bellefonte, USA). Teplota nástřiku a detektoru byla 220°C, teplotní program kolony byl nastaven na 175°C po dobu 30 minut, následně se teplota zvyšovala na 210°C rychlostí 1°C/min. a při této teplotě se udržovala 40 minut. Nosným plynem byl dusík s průtokem 1ml/min. Pro kvantifikaci mastných kyselin byla použita vnitřní normalizace (součet obsahu mastných kyselin = %). Konfirmace identity byla provedena pomocí GC-MS.

Výsledky a diskuze

Výsledky analýzy složení nejvíce zastoupených mastných kyselin v semenech slivoní jsou srovnatelné s výsledky jiných autorů viz tabulka III.

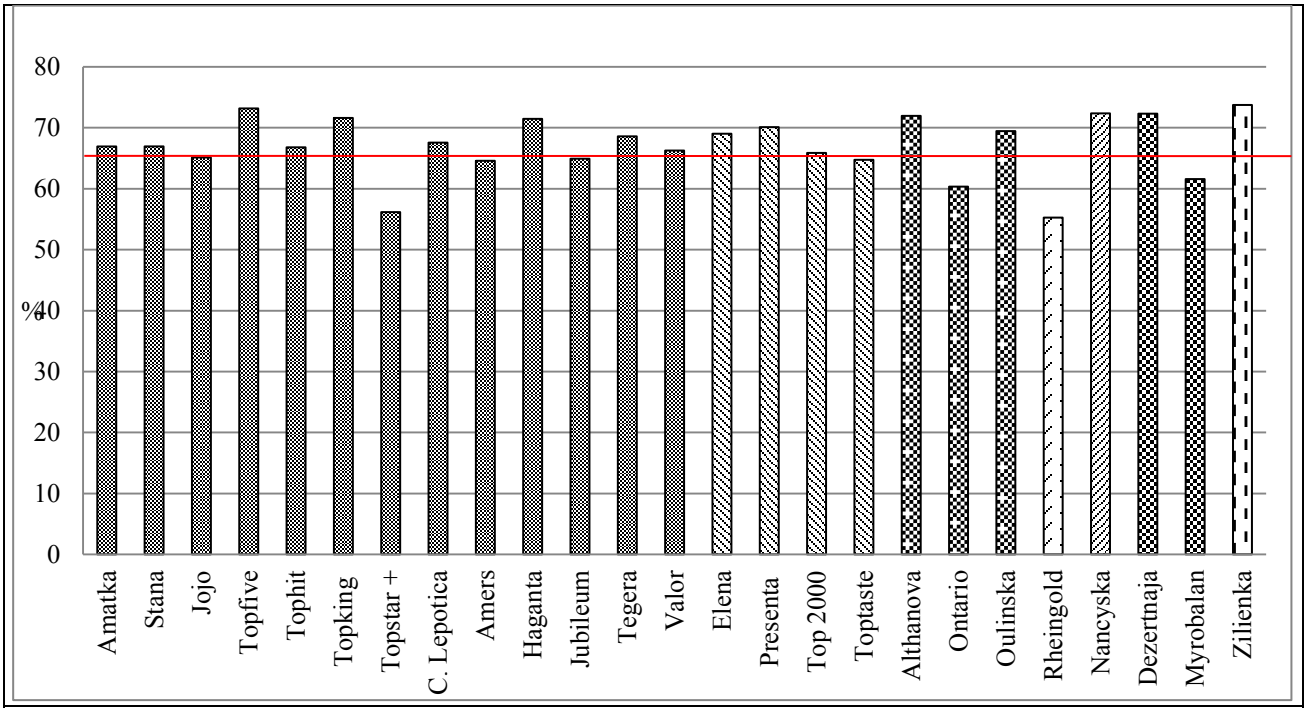
Tabulka III Obsah nejvíce zastoupených mastných kyselin a linolenové kyseliny v semenech slivoní

Mastná kyselina	Obsah MK v jádrech slivoní (%)		
	Zlatanov and Janakieva (1998)	Gunstone (2006)	Matthäus and Özcan (2009)
Olejová	71	71	64 - 79
Linolová	18	16	10 - 27
Palmitová	9	x	5 - 7
Stearová	4	x	1
Linolenová	0,3	x	0,1 – 0,2

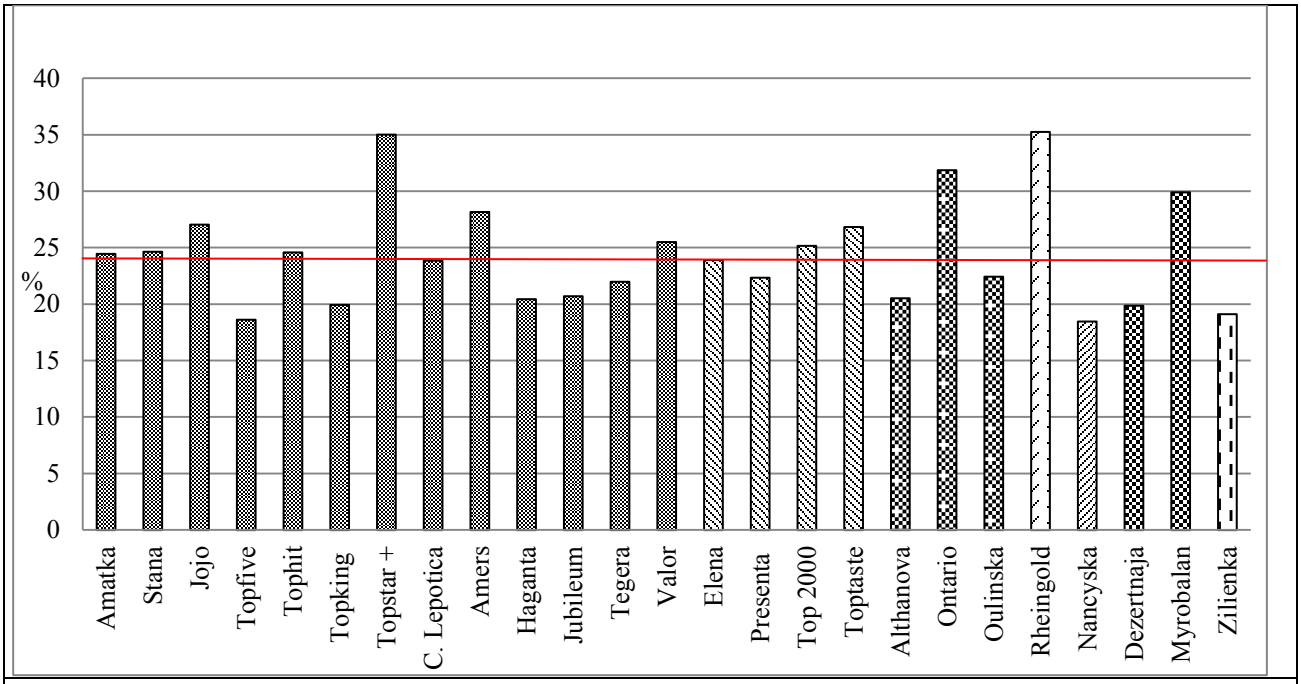


Obr. 1 Obsah nasycených mastných kyselin (včetně medianu)

Všech 25 analyzovaných odrůd mělo velmi podobné složení mastných kyselin, charakteristické pro rod *Prunus*. Obsah nasycených mastných kyselin (SFA) se u všech analyzovaných odrůd pohyboval kolem průměrné hodnoty 8,5%. Výjimkou je varianta Jubileum (obr. 1) s výrazně vyšším obsahem SFA (14 %). Obsah mononenasycených mastných kyselin (MUFA) zastoupených převážně olejovou kyselinou (obr. 2) a polynenasycených mastných kyselin (PUFA), reprezentovaných zejména linolovou kyselinou (obr. 3) se u sledovaných odrůd pohybuje kolem průměrných hodnot 67 % (MUFA) a 24,4 % (linolová kyselina).



Obr. 2 Obsah mononenasycených mastných kyselin (včetně medianu)



Obr. 3 Obsah linolové kyseliny (včetně medianu)

Nejvíce zastoupenou mastnou kyselinou v semenech slivoní byla olejová kyselina (52 – 72 %), následovaná linolovou (18 – 35 %), palmitovou (5 – 7 %) a stearovou kyselinou (kolem 2 %). Ve významnějším množství se dále vyskytovala asklepová (do 1 %) a palmitoolejová kyselina (0,7 – 1 %). Obsah ostatních mastných kyselin (včetně arachové kyseliny) byl pod 0,2 %. Semena obsahovala do 0,02 % linolenové kyseliny, což je typické pro rod *Prunus*. Gunstone (2006) a jiní autoři uvádějí hodnoty kolem 0,1 %. Jedná se pravděpodobně o analytickou chybu, koeluci s Δ-9 *cis*- eikosenovou kyselinou. Obsah *trans*-nenasycených mastných kyselin byl pod limitem detekce.

Závěr

Semena švestek měly podobné složení mastných kyselin, jaké mívají semena mandloní a meruněk. Jádra analyzovaných odrůd slivoní mají vhodné složení mastných kyselin pro pražení a pro jejich použití jako pochutiny (oříšky). Je to hlavně díky dostatečnému množství linolové kyseliny (požadavek je alespoň 15 - 20%), která zaručí vytvoření správného aroma. Díky nepřítomnosti linolenové kyseliny mají jádra vyšší stabilitu vůči nadměrné oxidaci v průběhu jejich pražení a skladování.

Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20/2014).

Literatura

Bortiri, E., Heuvel, B.V., Poíier, D.: Phylogenetic analysis of morphology in *Prunus* reveals extensive homoplasy. Plant Systematics and Evolution, 259 (2006) 53-71.

Gao L, Mazza G.: Characterization, quantification, and distribution of anthocyanins and colorless phenolics in sweet cherries. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43 (1995) 343–346.

Gilani, S. A., Qureshi, R. A., Khan, A. M., Potter, D.: A molecular phylogeny of selected species of genus *Prunus* L. (*Rosaceae*) from Pakistan using the internal transcribed spacer (ITS) spacer DNA. African Journal of Biotechnology, 9 (2010) 4867-4872.

Gunstone, F.D.: Minor speciality oils. Nutraceutical and Specialty Lipids and their co-products (ed. F. Shahidi), Taylor & Francis Group, Boca Raton, New York, London, 2006, p 555, ISBN 1-57444-499-9.

Lee, S., Wen, J.: A phylogenetic analysis of *Prunus* and the *Amygdaloideae* (*Rosaceae*) using ITS sequence of nuclear ribosomal DNA. American Journal of Botany, 88 (2001) 150-160.

Matthäus, B., Özcan, M.: Fatty acid and tocopherol contents of some *Prunus* spp. kernel oils. Journal of Food Lipids, 16 (2009) 187 – 199.

Muráňová K., Ďurišová Ľ., Ferus P., Bežo M., Baranec T.: Morfometrická a cytometrická charakterizácia genotypov *Prunus* x *Fructicans* z okrajových zón agrobiocenóz. Acta phytotechnica et zoo technica, 2 (2011) 32-36.

Özcan, M.: Composition of some apricot (*Prunus armeniaca*) kernels grown in Turkey. Acta Alimentaria 29 (2000) 289-293.

Zlatanov, M., Janakieva, I. 1998. Phospolipid composition of some fruit-stone oils of *Rosaceae* species. Fett/Lipid, 100 (1998) 312-315.

P 23

STANOVENÍ ESTERŮ 3-MCPD A GLYCIDOLU PŘI TRANSESTERIFIKACI TUKŮ

Rybinskaya A.[1], Tesařová M. [2], Filip V. [2], Šmidrkal J. [2], Ilko V. [1], Doležal M. [1]
[1] – Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha
[2] – Ústav mléka, tuků a kosmetiky, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha

Úvod

3-MCPD (3-chlorpropan-1,2-diol) a glycidol (2,3-epoxypropan-1-ol) patří ke skupině tzv. procesních kontaminantů, což znamená, že mohou vznikat v potravinách při jejich technologickém zpracování. Tyto látky byly prokázány jako potenciálně karcinogenní a genotoxické. Vyskytují se v různých potravinářských komoditách, buď volné nebo esterově vázané [1,2]. Vysoké obsahy esterů 3-MCPD byly zjištěny v rafinovaných palmových olejích [1], zatímco panenské oleje tyto kontaminanty neobsahovaly. Bylo prokázáno, že deodorace je jedním z technologických procesů, který může vést ke vzniku esterů 3-MCPD a glycidolu [3,4]. Vzhledem k širokému použití rostlinných olejů v potravinářském průmyslu přecházejí tyto látky jako součást receptury do potravinářských výrobků.

Jednou ze základních složek pro výrobu emulgovaných tuků (margarínů) a pokrmových tuků je tzv. strukturní tuk. Ten byl donedávna vyráběn technologií parciální katalytické hydrogenace živočišných tuků a rostlinných olejů, ale v současné době převažují technologie založené na transesterifikaci triacylglycerolů. Transesterifikace je katalyzována buď alkalickými katalyzátory neselektivně, nebo enzymaticky za použití imobilizovaných lipas. V případě přeesterifikace regiospecifickou *sn*-1,3-lipasou se acyly vázané v poloze *sn*-2 reakce neúčastní.

Cílem této práce bylo zjistit, zda při transesterifikaci tuků nedochází ke vzniku esterů 3-MCPD a glycidolu. Dosud totiž žádné studie zkoumající vznik esterů 3-MCPD a glycidolu při transesterifikaci tuků nebyly publikovány.

Materiál a metody

Experimentální část spočívala v analýze připravených modelových systémů (viz Tabulka 1). Oliol – slunečnicový olej s vysokým obsahem olejové kyseliny (Palma Group, a.s., SK), kokosový olej (MPD plus Rakovník, s.r.o, CZ), methylester laurové kyseliny (Fluka Chemie GmbH, CH), tetrabutylammonium chlorid (Aldrich, D) a molekulární síto 0.3 nm Art-No. 5704 (Merck, D) byly zakoupeny. Lipozyme 435 - nespecifická lipasa (NL) z *Candida antarctica* a Lipozyme RM IM *sn*-1,3 specifická lipasa (SL) z *Rhizomucor miehei* byly dodány firmou Novozyme A/S (DK). Kokosový olej byl plně hydrogenován na Ústavu mléka, tuků a kosmetiky na VŠCHT Praha.

Tab.1. Popis modelových směsí

Číslo modelové směsi	Složení	Poměr komponentů
1	slunečnicový olej	-
2	slunečnicový olej + zcela ztužený kokosový tuk	1:1
3	slunečnicový olej + methyl-laurát	1:2, 1:3

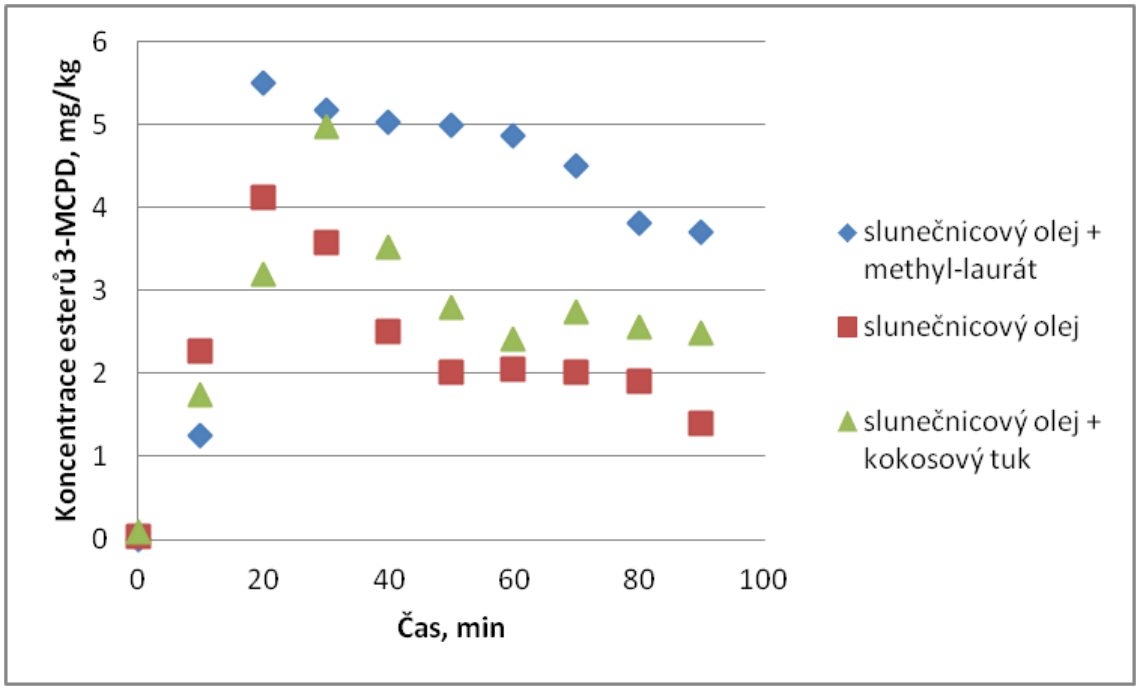
Do každé modelové směsi byl přidán katalyzátor transesterifikace, buď chemický, nebo enzymový. Jako chemický katalyzátor byl použit methoxid sodný (CH_3ONa), teplota reakce byla 100 °C. Enzymovým katalyzátorem byla buď specifická, nebo nespecifická lipáza, při reakční teplotě 80 °C. Během transesterifikace byly z každé modelové směsi v pravidelných intervalech odebírány vzorky a stanovena koncentrace esterů 3-MCPD a glycidolu. V případě chemické transesterifikace byly odebíraly vzorky každých 10 min a celková doba reakce činila 1,5 h. Enzymaticky katalyzovaná transesterifikace probíhala 4 h, s pravidelným odběrem vzorků každou hodinu. Estery 3-MCPD a glycidolu byly stanoveny metodou GC/MS [5] za pomoci deuterovaných vnitřních standardů sledovaných analytů: palmitoyl glycidolu-d_5 a 1,2-dipalmitoyl-3-MCPD. U každého vzorku odebraného z modelové směsi byla provedena dvě paralelní stanovení.

Pro stanovení analytů byl použit plynový chromatograf Agilent 7820A (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) s kvadrupólovým hmotnostním detektorem Agilent 5975 a kapilární kolonou Equity-1 (30 m x 250 µm x 1,0 µm, Supelco, USA). Nastřikován byl 1 µl vzorku v režimu pulsed splitless. Počáteční teplota termostatu 80 °C byla udržována 1 min a pak byla zvyšována rychlostí 10 °C/min na teplotu 170 °C, dále rychlostí 3 °C/min na teplotu 200 °C, potom rychlostí 15 °C/min na konečnou teplotu 300 °C. Teplota injektoru byla 250 °C. Jako mobilní fáze bylo použito helium o průtoku 0,8 ml/min.

Hmotnostní detektor pracoval v SIM modu (single ion monitoring), kdy byly snímány ionty o m/z: 147, 150, 196, 201, 240 a 245. Estery 3-MCPD byly stanoveny podle poměru ploch iontů 147 a 150, jejichž eluce byla potvrzena ionty 196 a 201. Estery glycidolu byly stanoveny též podle poměru ploch iontů 147 a 150, ale pro konfirmaci byly používány ionty 240 a 245. Množství esterů 3-MCPD a glycidolu bylo vyjádřeno jako ekvivalent volného 3-MCPD a glycidolu.

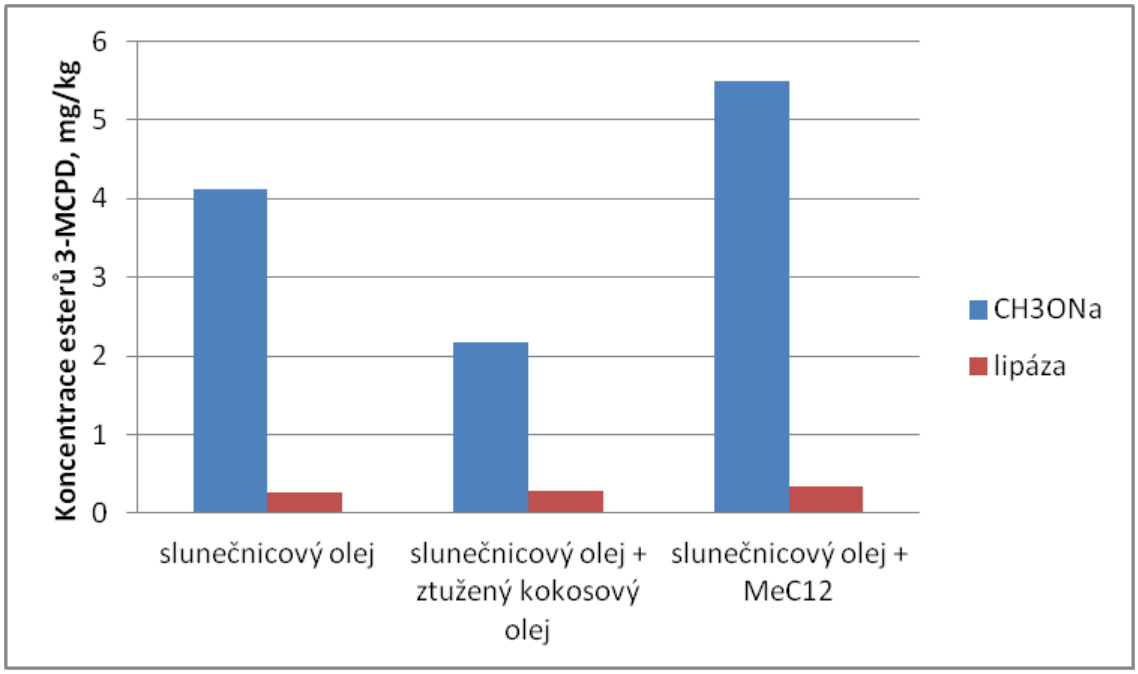
Výsledky a diskuze

Byly připraveny tři modelové směsi lišící se svým složením. Transesterifikace těchto směsí byla prováděna dvěma způsoby: 1) za použití chemického katalyzátoru 2) enzymaticky. Při použití methoxidu sodného jako katalyzátoru transesterifikace koncentrace esterů 3-MCPD rychle rostla v průběhu prvních 20 min a dále jen mírně klesala. Průběh tvorby a degradace esterů 3-MCPD je zachycen na obrázku 1 pro všechny tři modelové směsi. Maximální koncentrace esterů 3-MCPD se ve všech modelových směsích nacházely v rozmezí 4550 až 5485 µg/kg. Koncentrace esterů glycidolu také prudce stoupala v počáteční fázi transesterifikace a po dosažení maximální hodnoty 1500 až 1700 µg/kg mírně klesala.

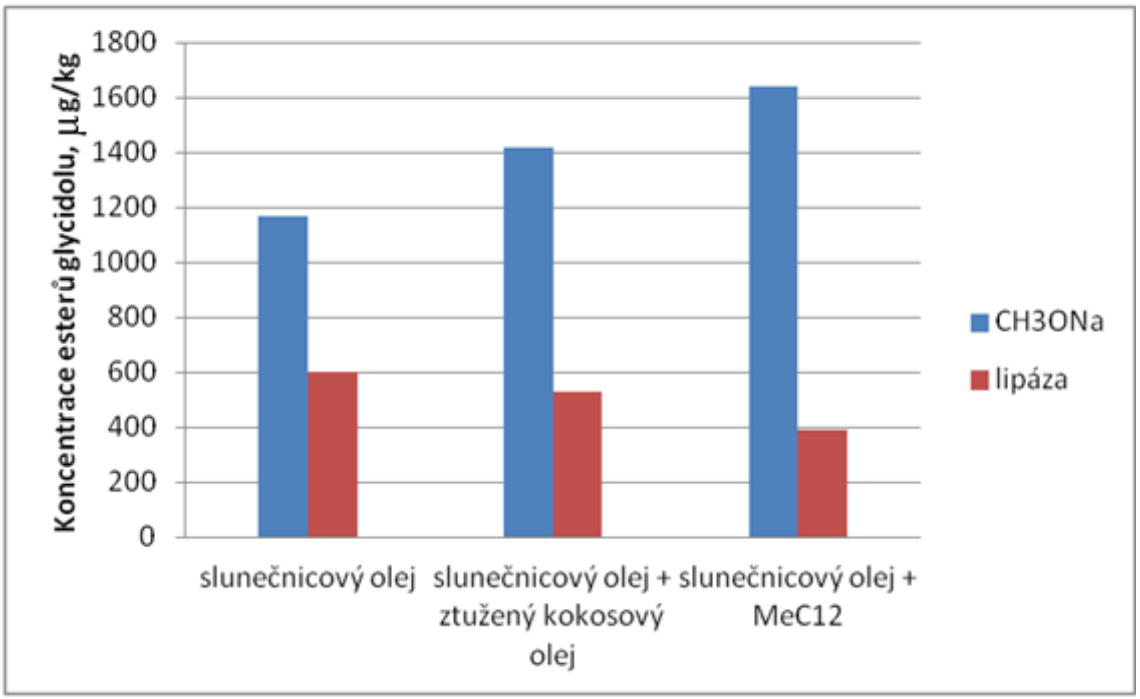


Obr. 1. Koncentrace esterů 3-MCPD v závislosti na čase v modelových směsích č. 1 - 3 při použití chemického katalyzátoru

Při použití enzymatického katalyzátoru se estery 3-MCPD a glycidolu tvořily ve značně menším množství, než při použití methoxidu sodného (viz obrázek 2 a 3).

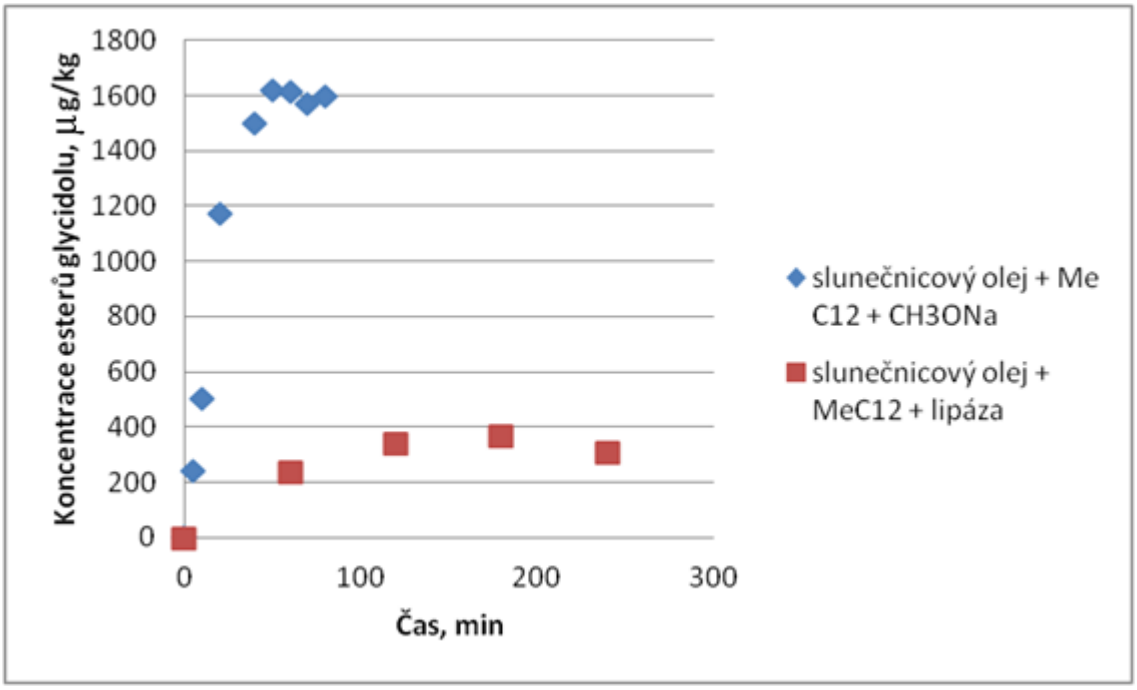


Obr.2. Porovnání maximálních koncentrací esterů 3-MCPD vzniklých transesterifikací katalyzovanou chemicky a enzymaticky



Obr.3. Porovnání maximálních koncentrací esterů glycidolu vzniklých transesterifikací katalyzovanou chemicky a enzymaticky

V případě enzymové transesterifikace byla tvorba esterů 3-MCPD a glycidolu pomalejší než za použití chemického katalyzátoru. Průběh tvorby a degradace esterů glycidolu zachycený na obrázku 4 pro modelovou směs č. 3 byl podobný i pro modelové směsi č. 1 a 2. na Obr.4. Pro příklad byla zvolena modelová směs č.3 obsahující slunečnicový olej a methyl-laurát a tvorba esterů glycidolu. Všechny ostatní modelové směsi jak v případě esterů glycidolu, tak i v případě esterů 3-MCPD vypadají podobně.



Obr. 4. Porovnání koncentrace esterů glycidolu v závislosti na čase při alkalicky a enzymaticky katalyzované transesterifikaci modelové směsi slunečnicového oleje a methylesteru laurové kyseliny

Závěr

Použití alkalického katalyzátoru vedlo ke vzniku značně většího množství esterů 3-MCPD než použití lipáz v procesu transesterifikace pro všechny modelové směsi. Největší rozdíl byl pozorován ve směsi slunečnicového oleje s methylesterem kyseliny laurové (5485 µg/kg proti 340 µg/kg esterů 3-MCPD). Stejná tendence je pozorována i u esterů glycidolu (1640 proti 390 µg/kg).

Reference

[1] Zelinková Z., Svejkovská B., Velíšek J. and Doležal M.: *Fatty acid esters of 3-chloropropane-1,2-diol in edible olis.* Food Addit. Contam., **23**, 1290-1298 (2006)
[2] Svejkovská B., Novotný O., Divinová V., Réblová Z., Doležal M., Velíšek J.: *Esters of 3-chloropropane-1,2-diol in foodstuffs.* Czech J. Food Sci., **22**, 190-196 (2004)
[3] Franke K., Strijowski U., Fleck G., Pudel F. (2009): Influence of chemici refining process and oil type on bound 3-chloro-1,2-propanediol contents in palm oil and rapeseed oil, Food science and Technology, 42, 1751–1754
[4] Weisshaar R. (2011): Fatty acid esters of 3-MCPD: Overview of occurence and exposure estimates, Eur. J. Lipid Sci.Technol., 113, 304–308
[5] Ermacora A., Hrncirik K.: *A Novel Method for Simultaneous Monitoring of 2-MCPD, 3-MCPD and Glycidyl Esters in Oils and Fats.* J. Am. Oil Chem. Soc., **90**, 1-8 (2012)

P 24

OBSAH α-GALAKTOSIDŮ V KLÍČENÝCH LUŠTĚNINÁCH

Winterová R., Novotná P., Landfeld A.
Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i., Radiová 7, 102 31 Praha 10 – Hostivař

Abstrakt

Klíčení je velmi účinným prostředkem, jak snížit nadýmavost po požití luštěnin. Při klíčení se štěpí těžko stravitelné α-galaktosidy (zejména stachyosa, rafinosa a verbascosa) na jednodušší formy a luštěniny jsou lépe stravitelné. Během tří let řešení grantu jsme stanovili obsah α-galaktosidů a cukrů (fruktosa, glukosa, sacharosa) ve velkém množství (59) vzorků luštěnin (sója, hrách, cizrna, vigna) klíčených různými způsoby a suchá semena luštěnin byla zvolena jako porovnávací vzorky. U suchých semen luštěnin jsme zjistili, že sója má z nich nejvyšší obsah sacharosy, následuje hrách, cizrna a nejméně vigna. Semena suchá i naklíčená všech stanovovaných luštěnin obsahují vyšší podíl stachyosy než rafinosy. Suchá semena hrachu a vigny dva dny naklíčených semen obsahovala rovněž podíl verbaskosy (u ostatních vzorků nebyla zjištěna). Před pár lety se objevila publikace o sóji, která vyzvedá námi použitou metodu klíčení luštěnin, jako metodu otevírající široké pole možností výroby na sóji založených výrobků nevyvolávajících nadýmání, Feng et al. (2008). V této práci je však pokročeno ještě dále, než jen aplikace klíčení k odbourání α-galaktosidů. Je uplatněna metoda, při níž se na klíčená předem mikrobiálně dekontaminovaná semena masivně inokuluje kulturní plíseň užívaná při přípravě plísňového sójového "sýra" tempeh. Ta vyvolává v klíčených semenech plísňový stres, což vede k tvorbě látek s antimikrobiálními účinky, které se souhrnně nazývají fytoalexiny, Feng et al. (2007).

Byl zkoumán vliv klíčení na odbourávání α-galaktosidů po napadení klíčených luštěnin kulturní plísní *Rhizopus oligosporus* (používá se při výrobě tempehu). Vzorky bez inokulace a s inokulací plísní měly statisticky nevýznamně rozdílný obsah α-galaktosidů. Byl stanoven obsah cukrů a α-galaktosidů v jogurtech vyrobených ze sojového nápoje připraveného z 2 dny klíčené sóji v porovnání s jogurtem vyrobeným z nápoje z namočené soji. Obsah sacharosy byl vyšší u jogurtů z namočené soji. Sójové jogurty z klíčené soji obsahují více fruktosy a glukosy. Nejvíce znatelný je rozdíl α-galaktosidů u jogurtů z klíčené soji oproti jogurtům z namočené soji, hlavně u stachyosy.

Materiál a metody

Metodika stanovení α-galaktosidů v sóji

Vzorek naklíčených sójových bobů byl homogenizován, lyofilizován a odtučněn na Soxhletu. Z takto upraveného vzorku byl získán etanolový extrakt varem na vodní lázni pod zpětným chladičem. Bílkoviny v extraktu byly sráženy roztoky Carreze I a II. Poté byl extrakt zfiltrován a etanol z extraktu odpařen na vakuové odparce. Zbytek extraktu po odpaření etanolu byl doplněn na určitý objem a zfiltrován přes mikrofiltr.

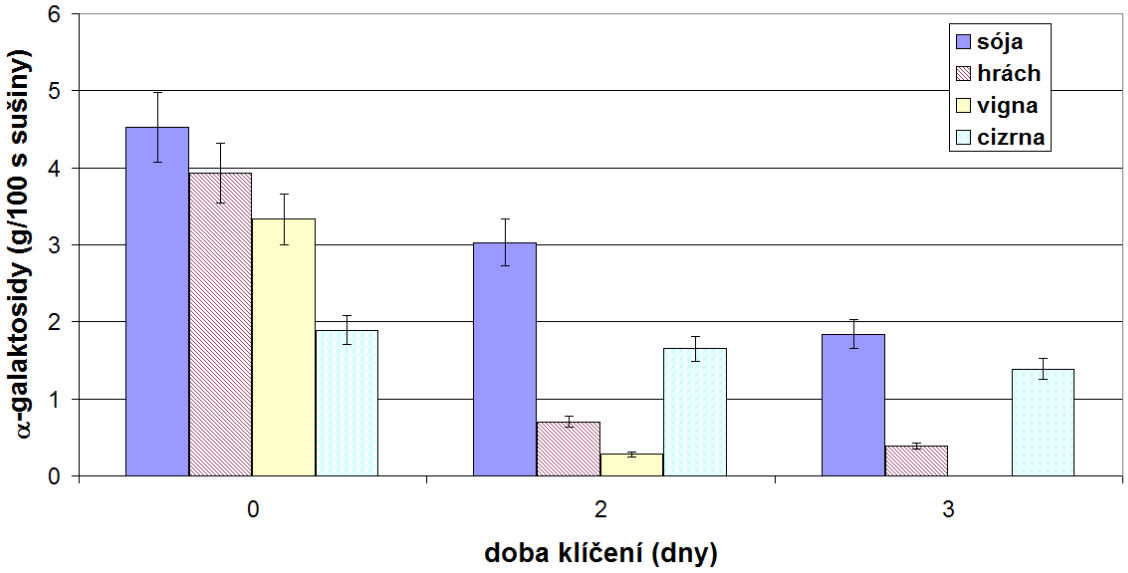
Analýza na kapalinovém chromatografu

podmínky: použitá kolona Lichrospher 100-NH2 (4 x 250 mm, 5um)
mobilní fáze směs acetonitrilu a deionizované vody, ACN:DH2O= 80:20
průtok 1,3 ml/min.

Výsledky a diskuse

Klíčením došlo vždy k poklesu α-galaktosidů o 50 – 70 %. Pokles byl tím vyšší, čím delší byla doba klíčení. Byla provedena analýza rozptylu (pomocí programu QC Expert) a bylo zjištěno, že je statisticky významný rozdíl mezi obsahem α-galaktosidů v nenaklíčených a naklíčených semenech sóji. V obr. 1 je znázorněn průměrný obsah α-galaktosidů v luštěninách (dodavatel Kalma k.s.) při submerzním klíčení (ve vodě s probubláváním). V obr. 2 je vidět průměrný obsah α-galaktosidů v sóje klíčené povrchově (na tácech).

Obr. 1 Průměrný obsah α-galaktosidů v luštěninách při klíčení, klíčeno submerzně (ve vodě s probubláváním vzduchu) při teplotě 25 °C, dodavatel luštěnin Kalma k.s.



Obr. 2 Průměrný obsah α-galaktosidů v sóje při klíčení, klíčeno povrchově (na tácech), dodavatel sóji Kalma k.s..

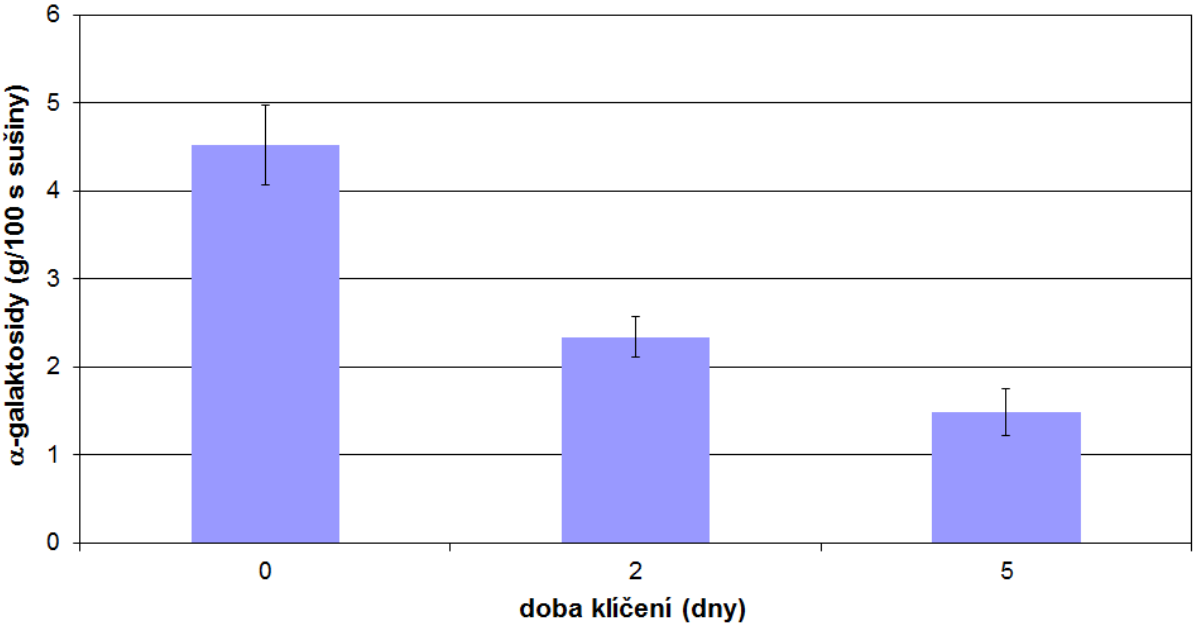


Foto 1 – klíčená sója

Foto 2 – klíčený hrách

Foto 3 – klíčená vigna

Foto 4 – klíčená cizrna

Závěry

Sója a další luštěniny obsahují značné množství nestravitelných oligosacharidů (α- galaktosidů), mezi něž patří zejména stachyosa a rafinosa, případně verbaskosa. Tyto látky nejsou štěpeny v tenkém střevě a jsou rozkládány až v tlustém střevě přítomnými mikroorganismy za vzniku plynů, což způsobuje nadýmání. Nadýmavost lze snížit přídavkem koření a bylinek (kmín, anýz, libeček, majoránka, saturejka, bazalka, estragon, tymián) při přípravě pokrmů. Klíčení je dalším, velmi účinným prostředkem, jak lze snížit nadýmavé účinky luštěnin. S delší dobou klíčení dochází k většímu poklesu obsahu α-galaktosidů. Luštěniny jsme klíčili více způsoby – probubláváním ve vodě (submerzně), povrchově (na tácech), s různými přídavky Persterilu (horší klíčivost) a v PET lahvích s proplachováním několikrát denně, což se nám nejlépe osvědčilo. Klíčení snížilo obsah α-galaktosidů oproti neklíčeným semenům o 50 – 70 %.

Poděkování

Tato práce byla podpořena projektem MZe QI111B053 „Nové postupy pro využití zemědělských surovin a produkci hlavních druhů potravin zvyšující jejich kvalitu, bezpečnost, konkurenceschopnost a výživový benefit spotřebiteli“.

Použitá literatura

Feng S., Saw Ch.L., Lee Y.K., Huang D., (2007), Fungal-stressed germination of black soybeans leads to generation of oxooctadecadienoic acids in addition to glyceollins,Journal of Agricultural and Food Chemistry,55,8589-8595

Feng S., Saw Ch.L., Lee Y.K., Huang D., (2008), Novel process of fermenting black soybean yogurt with dramatically reduced flatulence-causing oligosaccharides but enriched soy phytoalexins, Journal of Agricultural and Food Chemistry,56,10078-10084

P 25

PŘEHLED VÝROBKŮ Z KLÍČENÝCH LUŠTĚNIN PŘIPRAVENÝCH PRO APLIKACI V PRAXI

Strohalm J.[1], Novotná P.[1], Landfeld A.[1], Kýhos K.[1], Kýhosová H.[1], Houška M.[1], Ondřejková Z [2]., Kortánková V.[2], Dostálová J.[2]
1)Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i., Radiová 7, 102 31 Praha 10 – Hostivař
2)Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, Technická 5, 166 28 Praha

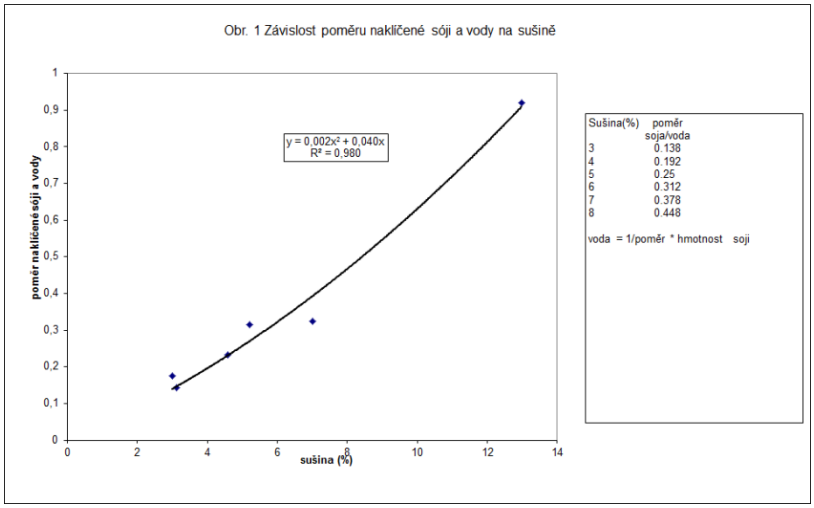
Abstrakt

Cílem práce byla příprava výrobků z naklíčené sóji, hrachu, vigny a cizrny. Ve VÚPP byly připraveny z uvedených naklíčených luštěnin nápoje a jogurty o různých sušinách. Z vyrobeného sójového jogurtu o sušině 7,4 % byly připraveny dva slané dipy. První byl ochucen křenem, rajčatovým pyré a hořčicí a druhý měl příchuť česneku a rajčat. Dle senzorického hodnocení byla lepší varianta s křenem. Na dipy byl udělen užitný vzor č. 26206 - Studená omáčka ze sójového jogurtu. Dále byly vyrobeny sladké ochucené jogurty ve třech variantách (varianty obsahovaly 1. mletá skořice + vanilkový cukr, 2. med, karamel, Caro, 3. borůvkový džem). Nejlépe byl hodnocen jogurt s borůvkami. Byl připraven i tempeh z neklíčené i naklíčené sóji. Tempeh z neklíčené sóji byl prorostlý bílou plísní a chuťově byl přijatelný. Z klíčené sóji měl tempeh štiplavou a nakyslou příchuť. Z klíčené vigny jsme připravili pasterovaný tavený sýr s vignou a to variantu jen se solí nebo se solí a česnekem. Na tento výrobek byl udělen užitný vzor č. 26322 - Výrobek z naklíčené vigny a taveného sýra. Z hrachu jsme připravili hrachový plátek, na který byl udělen užitný vzor č. 26207 - Výrobek z naklíčeného hrachu. Plátek měl přijatelnou konzistenci podobnou jako má pečená sekaná nebo bramborový knedlík. Z okary byly připraveny na VŠCHT pomazánky slané (s tuňákem, celerová s vejci) a sladké (skořicová s ananasem, čokoládová s mandlemi). Na tyto pomazánky byl udělen užitný vzor č. 26323 - Pomazánka z okary. Na karbanátek z naklíčené cizrny byl udělen užitný vzor č. 26205 - Karbanátek z naklíčené cizrny.

Materiál a metody

Výroba sójového mléka pro přípravu jogurtu a dipů

Sója byla po namočení klíčena po dobu 2 dnů uložená do PET lahví s děrovaným dnem v klimatizovaném boxu při teplotě 25 °C. V průběhu dne byla proplachována vlažnou vodou a klíčila ve vlhkém prostředí. Namočením a klíčením vzrostla hmotnost ze 100 % na 273 %. Chtěli jsme vyrobit sójové mléko o sušině cca 7%, U obr. č. 1 - závislosti poměru naklíčené sóji a vody na sušině jsme pro příslušnou hmotnost sóji vypočítali množství přidané vody. Naklíčená sója byla rozmixována s přídavkem vody a po dávkách se vařila po dobu 15 minut při teplotě 96,5 ±0,5 °C. Následovalo oddělení mléka a okary scezením. Celkem bylo získáno po scezení v průměru 81 % sójového mléka o refrakci 8 %, sušině 7,2%, a 19 % okary o sušině 23,7 %.



Výroba sójového jogurtu

Sójové mléko bylo vytemperováno na teplotu 38,5°C a po smíchání se sušenou jogurtovou kulturou rozlito do skleniček následně umístěných do teplovzdušné komory a uchovaných při teplotě 38°C po dobu 17 hod. Hotové jogurty byly vychlazeny na 5 °C. Sušina jogurtů byla 7,4 % a pH 4,2. Vzhledem k tomu, že sójové jogurty konzumují lidé s nesnášenlivostí laktózy, upustili jsme od přídavků z kravského mléka a použili jsme sušenou jogurtovou kulturu z Milcom a.s. Pro porovnání byly připraveny jogurty z klíčené a z namočené sóji. U těchto jogurtů byl stanoven obsah vitamínů B1, B2, B6 a niacinu. Dále byl stanoven obsah sacharidů (fruktóza, glukosa a sacharóza) a α-galaktosidů (rafinosa a stachyosa). Vzorky byly podrobeny mikrobiologickému rozboru. Obsah vitamínů B1 a B2 je v jogurtu ze sóji dva dny klíčené vyšší než v jogurtu ze sóji přes noc namočené ve vodě. Naopak obsah vitamínu E je vyšší u jogurtu ze sóji namočené. Obsah vitamínů B6 a niacinu je opět o trochu vyšší u jogurtů z klíčené sóji. Obsah sacharózy je vyšší u jogurtů z namočené sóji. Sójové jogurty z klíčené sóji obsahují více fruktózy a glukózy. Nejvíce znatelný je pokles galaktosidů u jogurtů z klíčené sóji oproti jogurtům z namočené sóji, hlavně u stachyosy. Galaktosidy představují součet obsahu rafinosy a stachyosy.

Příprava klíčené vigny a aplikace do výrobku

Vigna byla namočena do druhého dne, pak vložena do PET lahví s děrovaným dnem a ty dány do klimatizovaného boxu (teplota 25 °C). V průběhu dne byla proplachována vlažnou vodou, tj. vigna klíčila pouze ve vlhkém prostředí. Nárůst hmotnosti ze 100 % na 375 %. Mixováním s přidanou vodou a následným vařením byla získána obdoba mléka a okary, pro kterou se nenašlo vhodné použití pro její vzhled a chuť.

Pro aplikaci byla připravena jen jemně nasekaná, opláchnutá naklíčená semena vigny, která byla zapracována do taveného sýru v množství 20 – 23 %. Konzumace většího množství naklíčené vigny není doporučována. Po zabalení byl výrobek pasterován při 80-90 °C po dobu 20 min. Výsledky zkoušek ukazují, že v chladničce se pasterované sýry „zaleží“ a nekazí se. Senzorické hodnocení prokázalo, že sůl s česnekem vhodně zakrývají chuť naklíčené vigny.

Obr. 2 – Naklíčená semena vigny a její zapracování do taveného sýru

Výsledky a diskuse

Příprava a senzorické hodnocení ochucených sójových jogurtů a dipů

Z vyrobeného sójového jogurtu o sušině 7,4 % byly vybrány připravené 2 slané dipy a 3 sladké ochucené jogurty vždy ve třech variantách různých poměrů surovin. Dip 1 měl příchuť s křenem, rajčatovým pyré a hořčicí a dip 2 měl příchuť se sušeným česnekem a rajčatovým pyré. Sladké sójové jogurty měly příchuť jogurt 1- mletá skořice + vanilkový cukr, jogurt 2 – med, karamel, Caro, jogurt 3 – borůvkový džem. Z vybraných senzorických deskriptorů byly hodnoceny vzhled, vůně, chuť, sójová chuť, kyselost, slanost (dipy) nebo sladkost (jogurty), konzistence a celkový dojem. K senzorickému hodnocení byla vybrána stupnicová metoda s grafickou stupnicí - úsečkou dlouhou 100 mm s vyznačením znaménka, jehož poloha byla úměrná vjemu sledovaného znaku např. vzhled 0-vynikající, 100-odporný. Dále byly pořadovou metodou srovnány trojice vzorků

stejné příchuti a seřazeny od nejlepšího (1) k nejhoršímu (3). Z dipů byl senzoricky lépe hodnocen vzorek s příchutí křenu. Z ochucených jogurtů byl nejlépe hodnocen vzorek jogurtu s borůvkami. Tabulka č. 1 ukazuje výpis ze senzorického hodnocení – celkový dojem u hodnocených dipů i ochucených jogurtů.

Tab. 1 - Senzorické hodnocení příklad - celkový dojem

	dip křen, rajče, hořčice pH4,1	dip česnek, rajče pH4,2	jogurt skořice, vanilka pH4,1	jogurt med, karamel, Caro pH4,2	jogurt borůvka pH3,9
bodů	34	44	40	40	20
	19	46	10	5	16
	13	56	24	8	15
	4	25	7	5	5
	19	56	34	21	21
	41	33	44	31	30
	39	69	19	28	39
	22	48	27	35	35
	10	39	3	6	17
průměr	22,3	46,2	23,1	19,9	22,0
sm.odchylka	13,0	13,2	14,6	14,1	10,8
rozptyl	170,0	174,4	213,6	200,1	115,8
hodnota I	10,0	10,2	11,2	10,9	8,3
mez dolní	12,3	36,1	11,9	9,0	13,7
mez horní	32,4	56,4	34,3	30,8	30,3
Studentův t-test	a	a	a	a	a
součet bodů	201	416	208	179	198

Obr. 3 - Vítězný dip a ochucený jogurt

Příprava klíčeného hrachu, hrachové hmoty a aplikace do výrobku – hrachového plátku

Hrách byl namočen do druhého dne, pak klíčen v PET lahvích s děrovaným dnem umístěných v klimatizovaném boxu při teplotě 25 °C. Hrách klíčil pouze ve vlhkém prostředí za občasného proplachování vodou. Nárůst hmotnosti ze 100 % na 259 %.

Naklíčený hrách byl rozmixován s přídavkem vody, čímž vznikl základ hrachového mléka, který se vařil po dobu 15 minut při teplotě 85 °C, byla to velmi hustá kaše. Uvařením se získala hrachová hmota, do které byla přidána voda, aby se docílilo výsledné sušiny 20 %. Do hrachové hmoty, bylo přidáno 15 % sušeného bílku, česnekový prášek a kuchyňská sůl. Důkladně promíchaná směs byla naplněna do umělých střev a pasterována ve vodní lázni při teplotě 92 °C po dobu 45 minut. Po zchlazení byl výrobek nakrájen na plátky, vložen do varného sáčku po 3 - 5 kusech, vakuován a sterilizován při teplotě 90 - 92 °C po dobu 30 minut a poté uložen do chladničky.

Při senzorickém hodnocení bylo konstatováno, že plátek má přijatelnou konzistenci podobnou jako pečená sekaná nebo bramborový knedlík. Chuťově byl dobrý, ohřátím se trochu zmírnila chuť česneku, který by mohl být doplněn či nahrazen další kořením, např. majoránkou nebo pepřem. Výrobek je možno použít jako hrachovou sekanou pro vegetariány, osmaženou v trojobalu, nebo jen jako hrachový knedlík např. například se špenátem a s opečenou cibulkou.

Obr. 4 – Plátek po rozkrojení a finální výrobek

Závěr

Optimalizace přípravy luštěnin vedoucí k odbourání flatulentních α-galaktosidů díky klíčení byla v navržených recepturách dosažena. Bylo rovněž docíleno pestrosti navrženého sortimentu. Udělení pěti užitných vzorů svědčí o možném širokém použití naklíčených luštěnin pro obohacení zdravého jídelníčku.

Poděkování

Tato práce byla podpořena projektem MZe QI111B053 „Nové postupy pro využití zemědělských surovin a produkci hlavních druhů potravin zvyšující jejich kvalitu, bezpečnost, konkurenceschopnost a výživový benefit spotřebiteli“.

P 26

DART MASS SPECTROMETRY FOR RAPID SCREENING AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF CHOLESTEROL IN EGG PASTA

Al-Balaa D.[1], Kružík V.[1], Rajchl A.[1], Čížková H.[1]
[1)] Ústav konzervace potravin, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6

INTRODUCTION

Egg pasta criteria have been prescribed in legislation including the U.S. Code of Federal Regulation, and the Italian regulations. As a result, Cholesterol determination of egg pasta has been considered as one of the widely adopted procedures for ensuring the final pasta quality and the conformity with such regulations. By considering that cholesterol is the main indicator for the addition of egg yolk to these kinds of products.

Cholesterol or 3β-Hydroxy-5-cholestene is a member of polycyclic compounds named as steroids. It occurs in the free form, esterified to long-chain fatty acids (cholesterol esters), and in other covalent and non-covalent linkages. Cholesterol concentrations in eggs are highly variable and fluctuate over a wide range e.g. in whole chicken egg and egg yolk from 3.7 to 6.8 $mg.g^{-1}$ and from 10.7 to 17.0 $mg.g^{-1}$, respectively. The main reasons are due to the influences of some biological and environmental factors the storage conditions and elevated temperatures during the technological processes. Considering those factors, it is important to continuously monitor it levels in both raw and processed products.

Various methods were employed for cholesterol determination in egg containing food products including colorimetric method and enzymatic methods. Besides, instrumental methods like gas chromatography coupled to various detectors (GC-FID or MS), and high performance liquid chromatography (HPLC-UV, RI or MS). For most of mentioned methods, cholesterol extraction was carried out either by direct or indirect saponification and a single or multistage solvent extraction followed by purification, concentration and sometimes derivatization. Such extraction steps were found to give precise and accurate results but at the same time, they were time consuming, laborious and their application was accompanied with environmental concerns.

The aim of presented study was to develop a rapid and reliable method for cholesterol determination in dried eggs and egg pasta using the modern atmospheric pressure DART technique, where DART ion source was coupled to a time-of-flight mass spectrometer (TOF/MS). The simplification of the cholesterol extraction was also considered in this study. Such simplification included modifying the direct saponification extraction or applying a simple solvent extraction using various solvents. Furthermore, the results of developed method were compared with the conventional GC-FID method results.

MATERIALS AND METHODS

Samples: Samples of dried eggs (n=13) were obtained from producing companies for monitoring purposes, in addition to a set of samples of egg pasta samples (n=13) obtained either from producers or from the Czech markets.

Sample Preparation: 1) Direct solvent extraction method: 1 g Dried egg powder sample was soaked in 10 mL solvent (ethanol or hexane) for 5 min in an ultrasonic bath then extracted for 3 min using an Ultra-Turrax homogenizer (8000 rpm). The suspension was then filtered through a filtration paper and filtrate (0.1 g mL^{-1}) was then collected. Similar steps were carried out for extraction of egg pasta samples aside from sample weight extracted (2 g of samples were extracted in 10 mL of solvent corresponding to 0.2 g mL^{-1}) and soaking duration (5 min). 2) The conventional saponification extraction: samples were prepared based on saponification of sterols in sample, followed by a multi-stage extraction in non-polar solvent then evaporation and reconstitution of residue in ethanol. 3) The simplified saponification extraction is characterized by extraction with a proper solvent in centrifuge tube followed by non-heated saponification for a portion of the

supernatant. The samples were analyzed by DART-TOF MS after method optimization and by the validated GC-FID method.

RESULTS AND DISCUSSION

The primary phase of the experiments was focused to validate a DART-TOF MS method for cholesterol determination by studying various DART operating parameters and their effect on the produced ions intensities. Running DART in the positive mode, usually prevails the protonation of cholesterol and deuterated cholesterol with dehydration to produce $[M + H^- H_2O]^+$. These characteristic ions with m/z ratios 369.36 and 375.40, respectively, were employed for quantitation purposes. The molecular ions $M^{+\cdot}$ were observed for both analytes as a result of direct ionization, their m/z ratios were 386.39 for cholesterol and 392.42 for deuterated cholesterol (Fig. 1).

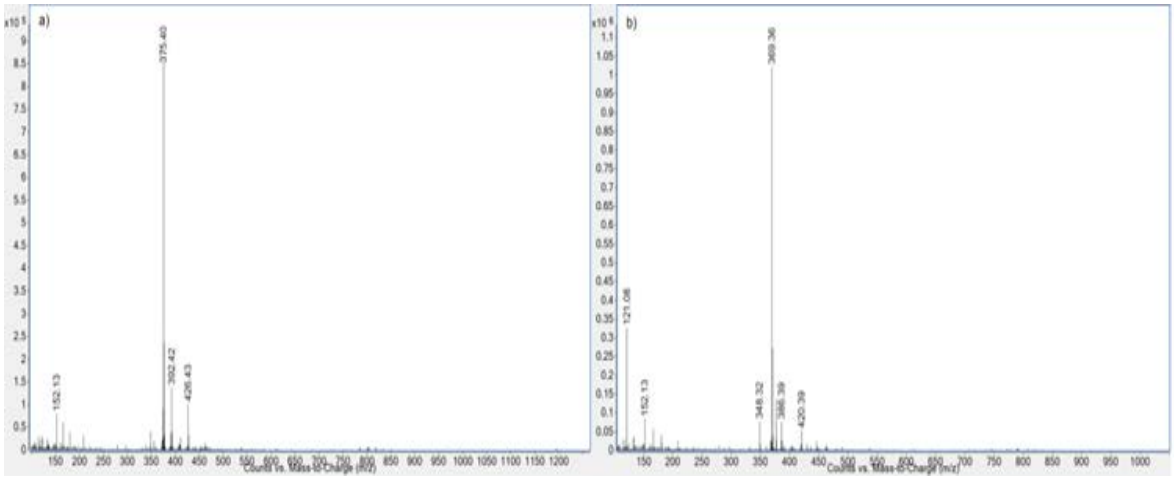


Figure 1: DART/TOF-MS mass spectra of standards (500 mg L-1) measured at temperature 350^{0}C of a) Cholesterol 2,2,3,4,4,6-d6, b) cholesterol both dissolved in ethanol

Subsequent construction of multi-point calibration curves (standard or matrix matched) allowed accurate quantitative measurements to be achieved, whereas the linearity of the matrix matched calibration curve in the range 5-1500 mg L^{-1}; (n=4), was found to be (R^2= 0.9975), unlike the external calibration curve where accurate quantification was not attainable (Fig. 2).

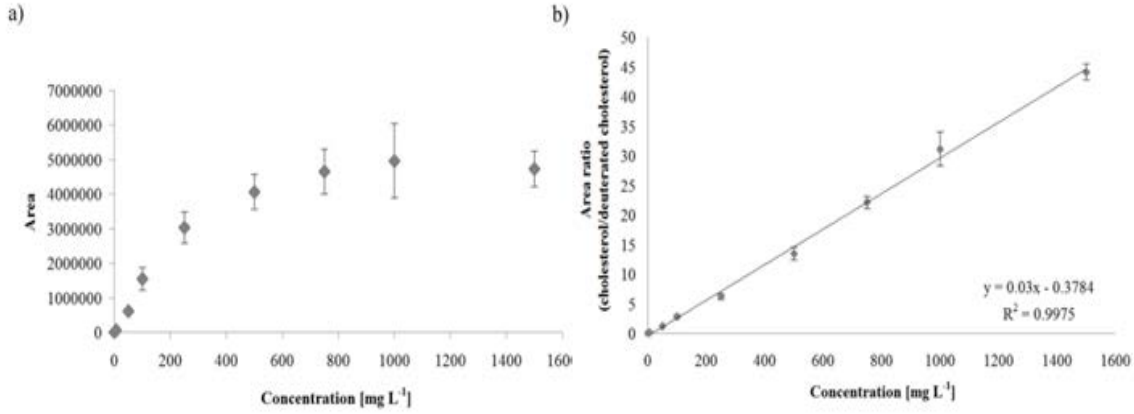


Figure 2: Constructed calibration curves (n=4) obtained by DART/TOF-MS measurement of cholesterol standards. a) external calibration b) internal calibration employing cholesterol to deuterated cholesterol peak area ratios (R2=0.9975).

In order to obtain the appropriate intensity of target ions, a careful optimization of ionization gas flow rate and temperature is required. The selected reaction gas flow was 3.5 L min^{-1}, as recommended by the manufacturer. Determination of the DART optimum gas heater temperature was completed by analysis of Cholesterol standard (500 mg L^{-1}) at desorption gas temperatures at 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 and 500 ^{0}C, the temperature of 350 °C provided a

convenient response when compared with lower temperatures which resulted in poor intensities of target analytes, or when compared with higher temperatures where a risk of degradation could be expected, (Fig.3).

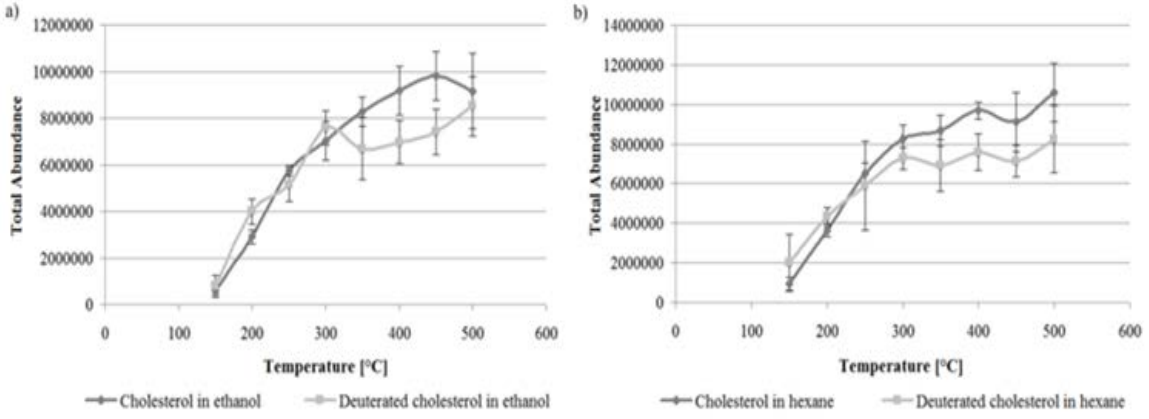


Figure 3: The impact of gas ionization temperatue changing on total ion currents (TICs) collected by DART-TOF/MS measurement (n=4) of cholesterol and deuterated cholesterol standards dissolved in either a) ethanol or b) hexane (500 mg L-1).

The simplifications of the sample extraction procedure were evaluated. The obtained recovery and repeatability values of the tested extraction methods are shown in (Table 1).

Table 1: Comparison between the tested cholsterol extraction procedures

	Conventional extraction	**Simple extraction without saponification**	**Simplified saponification extraction**
Time [min]	95	15-20	35
Recovery [%]	97-112	93-95	93-112
Repeatability [%]	7.2	5.3-7.9	10-15

The direct solvent extraction procedure was selected because of its rapidity and the accepted efficiency. Cholesterol was identified in sample extracts, (Fig 4), and the areas corresponding to their relative abundances were integrated. No significant difference between solvents used (ethanol and hexane) was observed for both the acquired spectrum and the calculated concentrations. Furthermore, the limit of detection (LOD) was found to be 0.03 mg g^{-1} and the limit of quantification was equal to 0.05 mg g^{-1}.

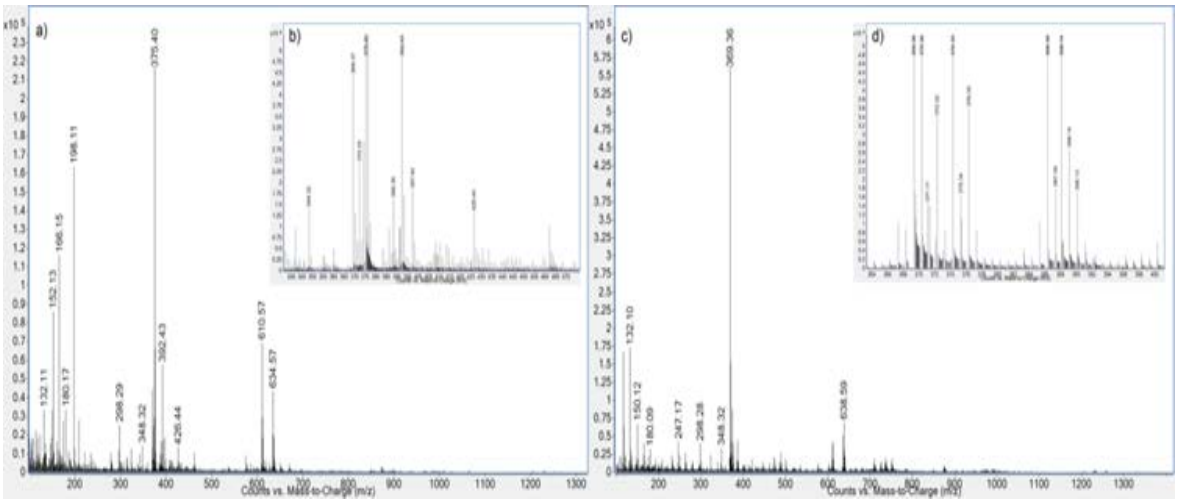


Figure 4: DART/TOF-MS mass spectra of samples extract in ethanol with addition of deuterated cholesterol (50 mg L-1). a) mass spectrum of egg pasta, b) magnified spectrum of egg pasta, c) mass spectrum of egg powder, d) magnified spectrum of egg powder.

The results of DART-TOF MS real samples measurement were compared to the results obtained by GC-FID measurement. Egg pasta results showed a good correlation between the analyses (R^2 =0.90, R^2_{crit} =0.31, *p=0.05*, for given number of samples *n=13*), (Fig. 5). But, the recovery of cholesterol of the DART-TOF MS method was 13 % lower in average, whereas results were shown to be lower by 30% in some cases. In sum, cholesterol concentrations in analyzed egg pasta were in the range of 0.14 – 0.73 mg g^{-1}, corresponding to 3.58 – 18.13 and 3.20 – 21.65 as average egg content (%), for DART-TOF MS and GC-FID measurements, respectively.

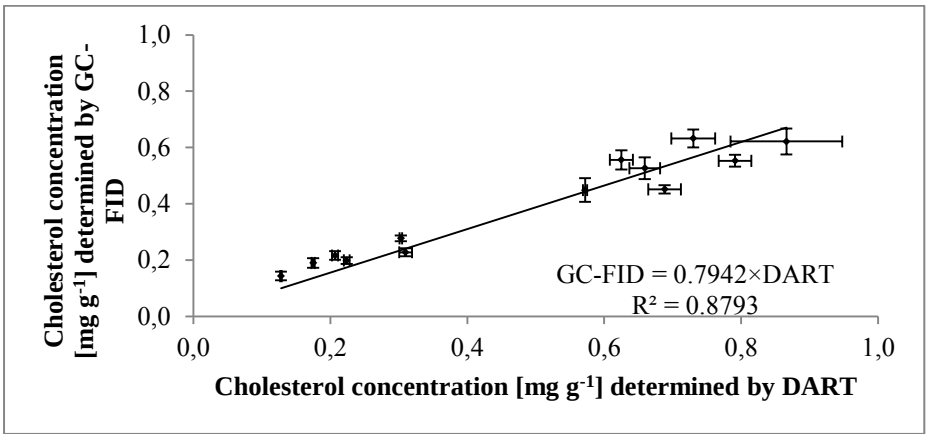


Figure 5: Correlation between cholesterol concentrations [mg g-1] in egg pasta, determined by DART-TOF/MS and GC-FID methods.

DART-TOF MS cholesterol concentrations of egg powder were in the range between 9.47 – 13.10 mg g^{-1}, whereas for GC-FID measurement, in the range of 10.75 – 17.25 mg g^{-1}. Correlation between DART-TOF MS and GC-FID results (R^2 =0.58, R^2_{crit} =0.31, *p=0.05*, for given number of samples *n=13*) was weaker when compared to egg pasta results.

CONCLUSIONS

In the present work, a convenient and efficient method has been developed for rapid qualitative and quantitative analysis of cholesterol in egg pasta. A simple extraction procedure followed by DART-TOF/MS had been performed. The use of cholesterol 2,2,3,4,4,6-d6 as an internal improved quantitation capability within studied concentration ranges. The optimized DART-TOF/MS method enabled the detection of cholesterol at levels > 0.03 mg g^{-1} of that matrix. The results of DART-TOF/MS and GC-FID results showed a good agreement, so taking into consideration time reduction of sample analysis, the developed DART-TOF/MS method represents a remarkably suitable alternative.

DART-TOF/MS promote a simultaneous accurate mass measurement and offers structural information for identification of several matrix components with minimal sample treatment, this method represent a potential tool for complex characterization of the quality using a combined markers in future studies.

ACKNOWLEDGMENT

Financial support was secured from specific university research (Ministry of Education, Youth and Sports No. 20/2014): A1_FPBT_2014_006.

REFERENCES

- T.T.N. Dinh, L.D. Thompson, M.L. Galyean, J.C. Brooks, K.Y. Patterson, L.M. Boylan. Cholesterol content and methods for cholesterol determination in meat and poultry. Compr. Rev. Food Sci. F. 2011, 10, 269.
- H. Čížková, H., V. Prokorátová, M. Voldřich, F. Kvasnička, V. Soukupová. Determination of Egg Content in Pasta. Czech J. Food Sci., 2004, 6, 197.
- J.-M. Park, I.-S. Jeong, B.-M. Kwak, J.-H. Ahn, D. Leem, J. Jeong, J.-M. Kim. Application of rapid sample preparation method and monitoring for cholesterol content in chicken egg and egg powder. Korean J. Food Sci. An., 2013, 33, 672.

- R.B. Cody, J.A. Laramée, J.M. Nilles, H.D. Durst. Direct analysis in real time (DARTtm) mass spectrometry. JEOL News. 2005, 40, 8.
- J. Hajslova, T. Cajka, L. Vaclavik. Challenging applications offered by direct analysis in real time (DART) in food-quality and safety analysis. Trends Anal. Chem.. 2011, 30, 204.
- R.B. Cody, A.J. Dane. Soft ionization of saturated hydrocarbons, alcohols and nonpolar compounds by negative-ion direct analysis in real-time mass spectrometry. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2013, 24, 329.

P 27

HODNOCENÍ EXPOZICE ČLOVĚKA POLYCYKLICKÝM AROMATICKÝM UHLOVODÍKŮM

Slováková M., Stupák M., Zuzánková J., Hajšlová J., Pulkrabová J.
Ústav analýzy potravin a výživy, VŠCHT Praha

Polycyklické aromatické uhlovodíky jsou všudypřítomné kontaminanty životního prostředí, u některých z nich byl prokázán karcinogenní potenciál. Lidský organismus je polycyklickým aromatickým uhlovodíkům vystavován různými cestami, hlavním zdrojem expozice člověka je dietární příjem, v oblastech s vysokou kontaminací ovzduší (hustá doprava, těžký průmysl) je pak významný příjem inhalací.

V rámci prezentované studie byly zhodnoceny zdroje expozice matek žijících ve 2 lokalitách ČR s různou úrovní znečištění ovzduší (Karviná, České Budějovice). Po dobu jednoho týdne byla odebírána celodenní strava matek a byla sledována úroveň kontaminace ovzduší v dané lokalitě. Vzorky stravy a filtry z velkoobjemových aktivních vzorkovačů byly analyzovány pomocí nově optimalizovaných a validovaných analytických postupů pro stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků s využitím plynové chromatografie v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

Tato studie byla realizována v rámci projektu GAČR č. P301/13-13458S – „Dopady znečištění ovzduší na genom novorozenců".

P 28

NOVÝ ZJEDNODUŠENÝ POSTUP IZOLÁCIE BENZO[*A*]PYRÉNU Z ÚDENÝCH MÄSOVÝCH VÝROBKOV

Semanová J.[1] , Skláršová B.[1] , Suranová M.[1] , Šimko P.[2]
[1)] Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Výskumný ústav potravinársky, Bratislava;
[2)] súčasné pracovisko: STU, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Bratislava

Súhrn

Benzo[*a*]pyrén (BaP) patrí medzi polycyklické aromatické uhľovodíky (PAU), ktoré tvoria významnú skupinu potravinových kontaminantov. Vyskytujú sa prakticky vo všetkých zložkách potravinového reťazca a ich dôležitosť je umocnená skutočnosťou, že zahŕňa v sebe najviac zlúčenín s preukázaným karcinogénnym účinkom na živý organizmus. Cieľom práce bolo vyvinúť a verifikovať nový zjednodušený postup na izoláciu BaP z údených klobás pomocou urýchlenej extrakcie rozpúšťadlom (ASE). Postup vyvinutý v tejto práci spája extrakciu a čistenie do jediného kroku, čím zabraňuje stratám analytu a taktiež šetrí čas, rozpúšťadlá a chemikálie. Oproti tradičným extrakčným technikám má teda ASE mnoho výhod, čo môže byť užitočné najmä pre rutinné analýzy BaP v údených mäsových výrobkoch.

Úvod

Všeobecne platí, že PAU sa tvoria pri nedokonalom spaľovaní fosílnych palív a iných foriem organickej hmoty. Z tohto dôvodu ich možno nájsť vo všetkých častiach životného prostredia čiže aj v potravinách. PAU sa taktiež tvoria počas tepelných procesov pri výrobe alebo príprave potravín ako je napríklad pečenie, grilovanie, vyprážanie alebo údenie [1].

ASE je plne automatizovaná a spoľahlivá technika prípravy vzoriek, ktorá kombinuje zvýšenú teplotu a tlak na dosiahnutie rýchlej a účinnej izolácie analytov z rôznych matríc. Pri klasických postupoch extrakcie nepolárnym rozpúšťadlom je tuk koextrahovaný spolu s BaP frakciou a získaný extrakt vyžaduje často veľmi náročnú purifikáciu, najčastejšie metódami gélovej permeačnej chromatografie (GPC) a SPE [2, 3]. V tejto práci sme na odstránenie čistiaceho kroku po extrakcii priamo do extrakčnej cely použili aktivovaný silikagél ako sorbent zabraňujúci extrakcii interferujúcich zlúčenín do BaP frakcie [4].

Experimentálna časť

Boli otestované tri úrovne obsahu BaP – 0,4; 5 a 10 $\mu g.kg^{-1}$ vo vzorkách so štandardným prídavkom.

Izolácia BaP frakcie z údených klobás sa uskutočnila v zariadení Accelerated Solvent Extraction System ASE 350 od firmy DIONEX. Na dno 33-ml extrakčnej cely sa vložil celulózový filter. Na filter sa do cely naváţilo 10g aktivovaného silikagélu. 1g zhomogenizovanej vzorky zmiešaný so sušiacim činidlom (poly(acrylic acid), partial sodium salt-*graft*-poly(ethylene oxide)) sa umiestnil do extrakčnej cely na vrstvu silikagélu. Na vrch vzorky bol umiestený ďalší celulózový filter a cela sa uzavrela. Extrakcia n-hexánom prebehla v troch samostatných statických cykloch, pričom dĺžka jedného cyklu bola 10 minút. Podmienky extrakcie boli nasledovné: teplota 100 °C, tlak 10 MPa, flush volume 60% a purge time 120 s. Po skončení extrakcie boli extrakty kvantitatívne prenesené do odparovacej banky, odparené dosucha na rotačnej vákuovej odparke s reguláciou tlaku a následne rozpustené v metanole.

HPLC podmienky

HPLC analýza sa uskutočnila pomocou zostavy Shimadzu (Kjóto, Japonsko) pozostávajúcej z pumpy C-20AD, autosamplera SCL-20A, degassera DGU-20A5, termostatu kolón CTO-20A, CBM-20A, detektora s diódovým poľom PDA SPD-M20A a fluorescenčného detektora RF-10AXL. Analytická separácia bola uskutočnená na chromatografickej kolóne Zorbax Eclipse XDB-C18 (100 mm x 4,6 mm, 1,8 µm) spojenej s predkolónou Zorbax Eclipse PAH (12,5 mm x 4,6 mm x 5 µm) (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA).

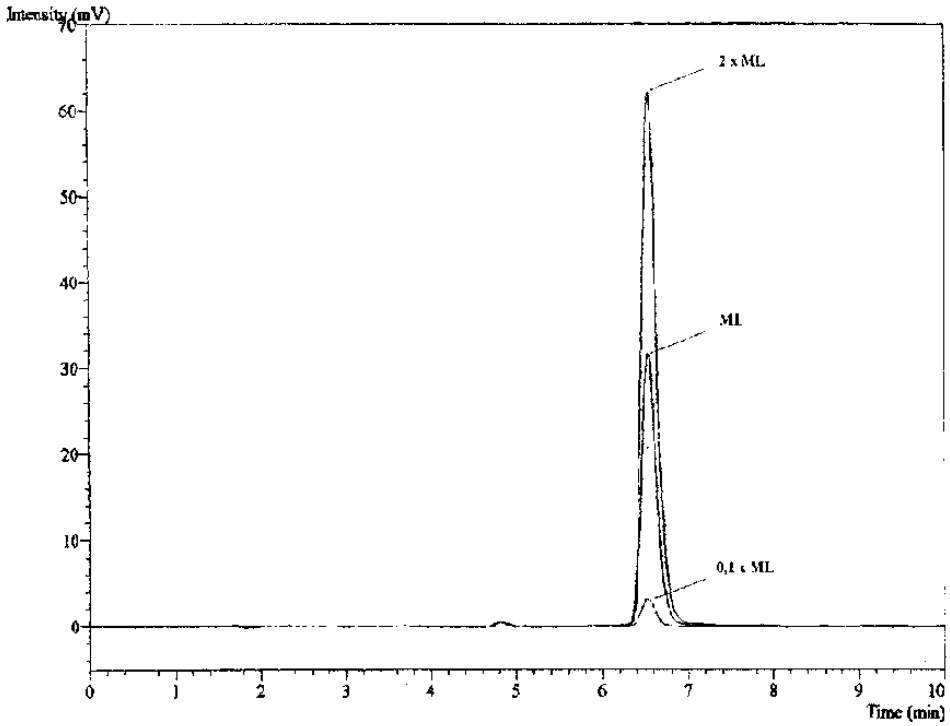
Výsledky a diskusia

Kvantifikácia

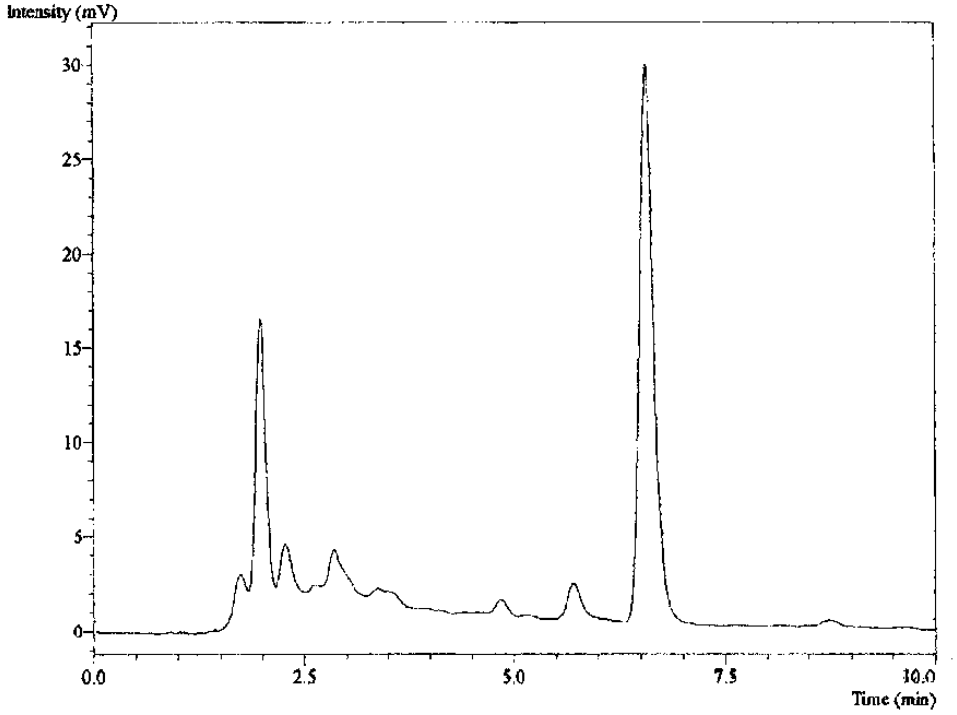
Na stanovenie obsahu BaP vo vzorkách bola použitá metóda vonkajšieho štandardu. Sledovala sa linearita metódy v rozsahu koncentrácii štandardných roztokov o koncentráciách od 0,1 $ng.ml^{-1}$ po 15 $ng.ml^{-1}$. Na vytvorenie kalibračnej čiary bola použitá metóda lineárnej regresie na závislosť plochy píku od koncentrácie roztoku. HPLC chromatogramy štandardných roztokov BaP sú zobrazené na obrázku 1. Obrázok 2. zobrazuje chromatogram údenej klobásy so štandardným pridavkom BaP 5 $\mu g \cdot kg^{-1}$.

Verifikácia

Metóda bola verifikovaná podľa kritérií uvedených v Nariadení Európskej Únie č. 2007/333/EC [5]. V tabuľke 1. sú tieto kritériá uvedené. Na základe nameraných dát sú parametre vyvinutej metódy (štandardný prídavok, LOD, LOQ, presnosť metódy, výťažnosť a linearita) vyhovujúce a uvedené v tabuľke 2. Presnosť (precision) metódy bola hodnotená výpočtom Horratovho kritéria pre 3 levely obsahu BaP 0,4; 5 a 10 $\mu g.kg^{-1}$ za podmienok reprodukovateľnosti (R) a opakovateľnosti (r). Výsledok opakovateľnosti sa získal šiestimi meraniami tej istej vzorky v krátkom časovom intervale pre každý level obsahu. Výsledky pre reprodukovateľnosť sa získali šiestimi meraniami pri zmene pracovníka, prístroja (detektora) a v iný deň analýz. LOD a LOQ boli vypočítané pomocou softvéru QC Expert (TriloByte – Statistical Software, Pardubice, Czech Republic).



Obrázok 1.: HPLC-FLD chromatogramy štandardných roztokov BaP (ML – Max. Level = 5 $\mu g \cdot kg^{-1}$).



Obrázok 2.: HPLC-FLD chromatogram údenej klobásy so štandardným prídavkom BaP 5 $\mu g \cdot kg^{-1}$

Parameter	Kritérium
Použiteľnosť	potraviny špecifikované v nariadení (ES) č. 1881/2006
Špecifickosť	bez matricových alebo spektrálnych interferencií, overenie pozitívnej detekcie
Presnosť	$HORRAT_r$ a $HORRAT_R$ menej ako 2
Výťažnosť	50 – 120%
Limit detekcie (LOD)	$\leq 0{,}30\ \mu g \cdot kg^{-1}$
Limit stanovenia (LOQ)	$\leq 0{,}90\ \mu g \cdot kg^{-1}$

Tabuľka 1.: Kritériá účinnosti pre metódy analýzy BaP (Commission Regulation 333/2007/EC [5])

	Targeted spiking content [$\mu g.kg^{-1}$]	Mean introduced content [$\mu g.kg^{-1}$]	R^2	LOD [$\mu g.kg^{-1}$]	LOQ [$\mu g.kg^{-1}$]	Precision		Recovery [%]
						$HORRAT_r$	$HORRAT_R$	
BaP	0,4	0,41	0,99	0,1	0,2	0,3	0,2	103
	5	4,33				0,2	0,1	87
	10	9,33				0,2	0,3	93

Tabuľka 2.: Validačné parametre a linearita (R^2) HPLC-FLD metódy pre kvantifikáciu BaP v údenej klobáse

Záver

Mnoho autorov študovalo aplikáciu ASE na izoláciu PAU z údených mäsových výrobkov. Všetky tieto ASE extrakcie boli nasledované ďalším krokom, napríklad GPC alebo SPE, alebo boli extrakty zmiešané s kyselinou sírovou a Florisilom, čo predĺžilo trvanie izolácie a potrebu použitia väčšieho množstva rozpúšťadla, chemikálií a sorbentu. Náš nový zjednodušený postup kombinuje extrakciu a čistenie do jedného kroku, čím výrazne skracuje dobu izolácie BaP. Výsledky validačných experimentov taktiež preukázali, že metóda je vhodná pre stanovenie PAU v údených mäsových produktoch, keďže splnila všetky požiadavky, ktoré Nariadenie Európskej Komisie (ES) č. 836/2011 kladie na metódy používané pre úradnú kontrolu PAU v potravinách.

Poďakovanie:
Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja pod číslom APVV-0168-10.

Literatúra

1. SIMKO P. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives. J*ournal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.* 2002, 770(1-2), 3-18.
2. DJINOVIC J, POPOVIC A, JIRA W. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in different types of smoked meat products from Serbia. *Meat Science*. 2008, 80(2), 449-56.
3. JIRA W. Polycyclic aromatic hydrocarbons in German smoked meat products. *European Food Research and Technology*. 2010, 230(3), 447-55.
4. DIONEX. Application Note 359 - Extraction of Contaminants, Pollutants, and Poisons from Animal Tissue Using Accelerated Solvent Extraction (ASE).
5. NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 333/2007, ktorým sa stanovujú metódy odberu vzoriek a metódy analýzy na úradnú kontrolu hodnôt olova, kadmia, ortuti, anorganického cínu, 3-MCPD a benzo(a)pyrénu v potravinách.

P 29

PRODLOUŽENÍ ÚDRŽNOSTI TEPELNĚ NEOPRACOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ POMOCÍ VYSOKÉHO TLAKU

Šimoniová A., Škorpilová T., Adamcová M., Pipek P.
Ústav konzervace potravin, VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6

Abstrakt

Údržnost tepelně neopracovaných masných výrobků je zajištěna kombinací několika překážek, zejména uchováním při nízké teplotě. Avšak i přesto je údržnost těchto výrobků omezená. Ošetření vysokým tlakem, které se osvědčilo u tepelně opracovaných masných výrobků, by tak mohlo inaktivovat část mikroorganismů a prodloužit údržnost těchto výrobků. Vzorky čajovek byly vystaveny působení dvou tlaků (400 a 500 MPa) a byl sledován vliv na přítomnou mikroflóru, oxidaci lipidů, texturu a barvu výrobků. Ze získaných dat je patrné, že se podařilo prodloužit údržnost těchto výrobků bez významného ovlivnění senzorických vlastností.

ÚVOD

Tepelně neopracované masné výrobky jsou údržné jen po omezenou dobu. Jejich údržnost je zajištěna několika faktory, mezi které patří složky udicího kouře, přídavek dusitanu sodného (solicí směs), nízké pH a a_w, vysoký obsah tuku, startovací kultury a zejména uchování při chladírenské teplotě. Vysokotlaké ošetření, které se osvědčilo u tepelně opracovaných výrobků, tak může přispět k prodloužení údržnosti a zvýšení bezpečnosti výrobku.
Vliv vysokého tlaku na patogenní mikroflóru je různý a je závislý na podmínkách procesu a na vlastnostech ošetřovaného produktu. Důležitými faktory ovlivňujícími účinek vysokotlakého ošetření jsou použitý tlak, teplota, čas a v neposlední řadě sem patří i parametry výrobku jako je pH, aktivita vody, obsah solí a počáteční počty mikroorganismů. Vysoký tlak má inhibiční vliv na celou řadu mikroorganismů, jako např.: *Escherichia coli O157:H7*, *Campylobacter jejuni, Listeria monocytogenes* či *Staphylococcus aureus* [Rendueles et al., 2011; Hugas et al., 2002].
Aymerich et al. (2008) a Hugas et al. (2002) se shodují, že mikrobiální buňky inhibuje kombinace výše zmíněných faktorů působících při ošetření vysokým tlakem. Prvním místem tlakového poškození je cytoplasmatická membrána, jejíž permeabilita a osmotické a transportní vlastnosti jsou pozměněny. Dochází k denaturaci bílkovin, inaktivují se enzymy odpovědné za metabolické pochody v buňce a v neposlední řadě dochází ke změnám při replikaci a transkripci.
Tlak může ovlivnit i další vlastnosti výrobku jako je barva, textura a množství produktů oxidace mastných kyselin. Barva je více ovlivněna u syrového masa než u masných výrobků; její změna závisí především na obsahu vody v masném produktu. Zatímco v šunkách s vysokým obsahem vody se po ošetření tlakem zvýšila světlost L^* a klesly hodnoty souřadnic a^* a b^*, na šunky s nízkým obsahem vody měl vysoký tlak zanedbatelný vliv [Bajovic et al., 2012]. Stejně jako barva, ani textura masných výrobků není díky jejich struktuře významně ovlivněna. V tuku je množství hydrofobních vazeb, které jsou obzvláště citlivé na účinky tlaku. Z tohoto důvodu patří lipidy mezi nejvíce zasažené složky potravin při vysokotlakém ošetření [Medina-Meza et al., 2014]. Marcos et al. (2007) a Hugas et al. (2002) tvrdí, že vysoký tlak nenarušuje stabilitu vitamínů a nízkomolekulárních látek zodpovědných za chuť a vůni, proto je zajímavou alternativou inaktivace mikroorganismů například u fermentovaných masných výrobků.

MATERIÁL A METODY

Cílem práce bylo zjistit, zda je pomocí vysokého tlaku možné prodloužit údržnost tepelně neopracovaných masných výrobků, jak toto ošetření ovlivní vlastnosti výrobku.
Pro měření byly použity vzorky tepelně neopracovaných roztíratelných salámů – čajovek.
Příprava vzorků

Vzorky čajovek byly vakuově zabalené do PEPA sáčků odolných působení vysokého tlaku a ošetřeny tlakem 400 nebo 500 MPa po dobu 10 minut. Podmínky při tlakovém ošetření jsou uvedeny v tab. I. Tlakové ošetření proběhlo ve spolupráci s VÚP Praha. Po ošetření byly vzorky uskladněny při teplotě 2 °C společně s kontrolními vzorky.

Tab. VI: Podmínky při vysokotlakém ošetření

	Teplota [°C]		Tlak [MPa]		Doba náběhu na tlak [s]
	Začátek ošetření	Konec ošetření	Maximální tlak	Minimální tlak	
Prostředí 1	7,0	16,7	408,4	407,3	39
Vzorek 1	11,1	14,6			
Prostředí 2	6,1	18,1	508,5	504,1	42
Vzorek 2	9,8	14,0			

Metody

- ***Stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM)***

Celkový počet mikroorganismů byl stanoven na živné půdě GTK podle normy ČSN EN ISO 4833, kultivace se uskutečnila aerobně 48 hodin při 30 °C.

- ***Stanovení thiobarbiturového čísla (TBARS)***

Při stanovení stupně oxidace se vycházelo z postupu popsaného Tarladgisem (1960), s tím rozdílem, že ke vzorku byl přidán butylhydroxytoluen jako antioxidant.

- ***Hodnocení textury***

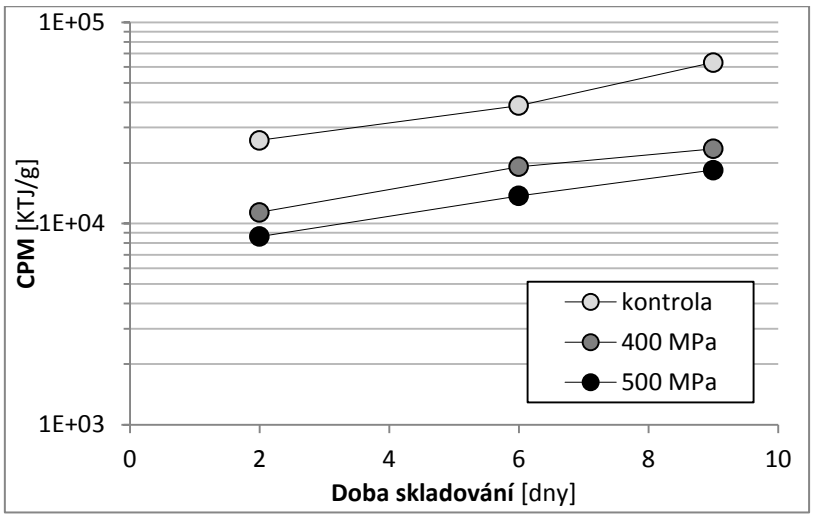
Textura čajovek se hodnotila pomocí penetrační metody na přístroji Instron. Výška vzorku byla 25 mm, rychlost vpichování nástavce do vzorku byla 50 $mm.min^{-1}$ do hloubky 50 % vzorku.

- ***Hodnocení barvy***

Barva byla hodnocena pomocí reflexního spektrometru Minolta CM2600, měřenými veličinami byly světlost L^* a odstín pro červenou barvu a^*.

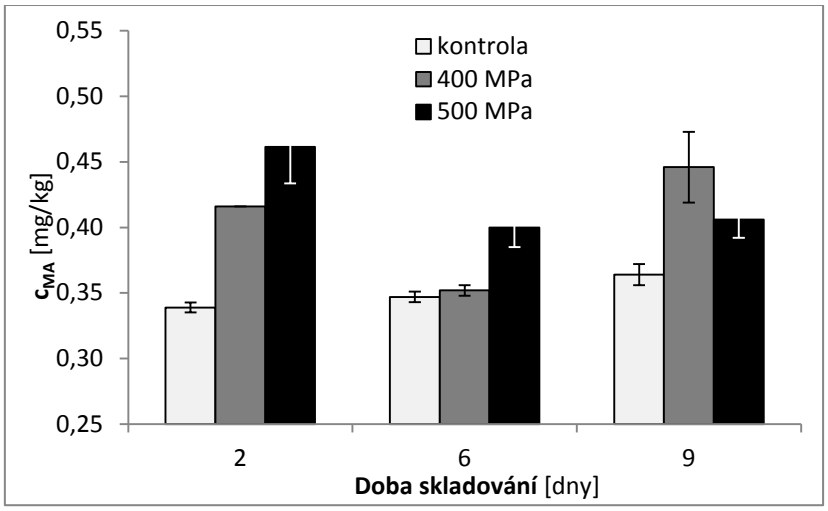
VÝSLEDKY A DISKUSE

Ošetřením vysokým tlakem (400 a 500 MPa) došlo ke snížení celkových počtů mikroorganismů (obr. 1). Při použití tlaku 500 MPa došlo ke snížení přítomné mikroflóry na třetinu původního množství; při použití tlaku 400 MPa bylo snížení přítomné mikroflóry menší. Potvrdily se zde údaje z literatury, kde byl vysoký tlak použit na jiné potraviny s obdobnými výsledky [Garriga et al., 2004; Bajovic et al., 2012]. Na konci experimentu byly rozdíly v množství CPM větší než po tlakovém ošetření, což mohlo být způsobeno větší kontaminací neošetřených vzorků na začátku.



Obr. 8: Závislost celkového počtu mikroorganismů na době skladování a tlaku

Ošetření vysokým tlakem způsobilo mírné zvýšení thiobarbiturového čísla, charakterizující oxidaci mastných kyselin (obr. 2). Zvýšení TBARS po tlakovém ošetření bylo pravděpodobně způsobeno strukturálními změnami bílkovin v buněčné membráně, což přispělo k větší oxidaci [Beltran et al., 2003]. Množství oxidačních produktů však nepřekročilo mez vnímatelnou spotřebitelem (0,8 mg.kg^{-1}), a to ani při následujícím skladování, kdy naopak koncentrace TBARS klesala.



Obr. 9: Závislost thiobarbiturového čísla na použitém tlaku a době skladování

Vlivem působení tlaku došlo ke zpevnění textury čajovek v průměru o 15 % (tab. II). Větší rozdíl je možné pozorovat v případě tlaku 500 MPa; toto zpevnění může být způsobeno změnou kvartérní struktury bílkovin [Bajovic et al., 2012]. Pevnost výrobku se dále zvyšovala i v průběhu skladování, a to u všech tří vzorků podobně.

Tab. VII: Vliv ošetření vysokým tlakem na pevnost výrobku

Doba skladování [dny]	kontrola	400 MPa	500 MPa
2	0,7420	0,8123	0,8356
6	0,7609	0,8508	0,8718
9	0,8516	1,0750	1,1067

Vliv vysokotlakého ošetření na barvu (hodnoceno na základě souřadnice a^* a L^*) nebyl významný ($p = 0{,}001$).

ZÁVĚR

Ze získaných dat vyplývá, že ošetření vysokým tlakem vedlo ke snížení celkových počtů mikroorganismů, což může přispět k prodloužení údržnosti a zvýšení bezpečnosti výrobků. Nepatrné zvýšení thiobarbiturového čísla nepřekročilo senzoricky postřehnutelnou mez, barva ovlivněna nebyla. Ošetření vysokým tlakem vedlo ke zpevnění struktury výrobků.

Poděkování
Studie se uskutečnila za podpory Ministerstva zemědělství (NAZV) v rámci projektu QI111B053.
Autoři děkují pracovníkům VÚPP Praha, zejména panu Janu Strohalmovi za tlakové ošetření vzorku na jejich zařízení a rovněž výrobnímu podniku za poskytnutí vzorků pro měření.

Literatura

- Aymerich, T., Picouet, P. A., Monfort, J. M (2008).: Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*,, 78, 114 – 129.
- Bajovic, B., Bolumar, T., Heinz, V. (2012): Quality considerations with high pressure processing of fresh and value added meat products. *Meat Science*, 92, 280 – 289.
- Beltran, E., Pla, R., Yuste, J., Mor-Mur, M. (2003): Lipid oxidation of pressurized and cooked chicken: role of sodium chloride and mechanical processing on TBARS and hexanal values. *Meat Science*, 64, 19-25.
- Garriga, M., Grèbol, N., Aymerich, M. T., Monfort, J. M., Hugas, M. (2004): Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial meat products over its shelf life. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 451 – 457.
- Hugas, M., Garriga, M., Monfort, J. M. (2002): New mild technologies in meat processing: High pressure as a model technology. *Meat Science*, 62, 359 – 371.
- Marcos, B., Aymerich, M. T., Dolors Guardia, M., Garriga, M. (2007): Assessment of high hydrostatic pressure and starter culture on the quality properties of low-acid fermented sausages. *Meat Science*, 76, 46 – 53.
- Medina-Meza, I. G., Barnaba, C., Barbosa-Cánovas, G. V. (2014): Effects of high pressure processing on lipid oxidation: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 22, 1 – 10.
- Rendueles, E., Omer, M. K., Alvseike, O., Alonso-Calleja, C., Capita, R., Prieto, M. (2011): Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *LWT – Food Science and Technology*, 44, 1251 – 1260.
- Tarladgis, B. G., Watts, B. M., Yonathan, M. (1960): Distillation method for the determination of malonaldehyde ın rancid foods. *J. of American Oil Chemistry Society*, 37(1), 44–48.

P 30

VLIV KLIMATICKÝCH ZMĚN NA ZMĚNY ZDRAVOTNÍHO STAVU RYB

Bušová M.[1], Brázdová M.[2], Opatřilová R.[2], Osička R.[3], Špičák V.[3], Kodýtek J.[3]
[1]Ústav biochemie a biofyziky, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř.1/3 612 42 Brno
[2]Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř.1/3 612 42 Brno
[3]Rybníkářství Pohořelice a.s., Vídeňská 717, 691 23 Pohořelice

ABSTRAKT
Ryby jsou citlivé k působení exogenního amoniaku z vnějšího prostředí i endogenního amoniaku, který vzniká jako produkt vlastního metabolismu proteinů. Za určitých okolností může ryby ohrozit na životě a ve velkochovu způsobit velké ekonomické škody. Tato studie je zaměřena na kapra obecného (*Cyprinus carpio* L., 1758) z prostředí velkochovu v období výlovu a po přemístění na sádky a dále na ryby různé druhové skladby přirozeně se vyskytující na lokalitě severní Moravy.

Klíčová slova: ryby, kapr obecný, teplota vody, amoniak exogenní a endogenní, autointoxikace

ÚVOD
Amoniak je pro obratlovce i v nízkých koncentracích vysoce toxická látka. Zdrojem amoniaku v těle ryb je proces deaminace aminokyselin pocházejících z potravy, které nejsou využity pro syntézu proteinů de novo. Deaminace probíhá především v játrech, ledvinách, svalovině a ve střevě ryb. Vodní prostředí umožňuje rybám kontinuálně vylučovat amoniak vznikající jako produkt vlastního metabolismu pasivní difůzí prostřednictvím žaber.
Rovnováha mezi produkcí a utilizací volného amoniaku je rozhodující pro udržení dobrého zdravotního stavu ryb. Pokud se ryby pohybují v prostředí s vysokou koncentrací amoniaku, může být exkrece endogenního dusíkatého odpadu trávení narušena nebo i zcela zastavena.
Rovnováha mezi produkcí amoniaku a jeho exkrecí může být narušena i mnoha dalšími faktory. Ryby, které jsou vyčerpány fyzicky nebo stresem nebo ryby hladovějící zvyšují produkci amoniaku a jsou mnohem citlivější k exogennímu amoniaku v prostředí. Za určitých okolností může být organismus ryb ohrožen produkty vlastního metabolismu. Tímto závažným stavem je autointoxikace amoniakem, která může vést až k masivním úhynům v chovech ryb. Vysoké plasmatické koncentrace amoniaku za tohoto stavu způsobují symptomatické změny, které jsou obdobné jako projevy vysokých externích koncentrací amoniaku. Koncentrace amoniaku může být v krevní plasmě zvýšena i více než 5 -10 krát. K autointoxikaci může dojít při náhlém výrazném poklesu teploty vody, zvláště po nakrmení ryb.

Vylučování amoniaku žábrami může být výrazně omezeno jejich poškozením. Stres narušuje osmoregulační funkce u ryb. Déletrvající stres může vést k poškození žaber na buněčné úrovni a tím výrazně přispívá k autointoxikci. Výlov, veškeré manipulace s rybami včetně transportu, náhlý pokles teploty vody a změny v obsahu rozpuštěného kyslíku patří k hlavním faktorům, které mohou vést u ryb ke stavu autointoxikace amoniakem.

Cílem naší studie bylo zjištění objektivních podmínek kapra obecného těsně po výlovu a posouzení jeho adaptace na změnu prostředí po přemístění do sádek a porovnání se stavem u ryb žijících v přirozeném prostředí s příjmem přirozené potravy bez příkrmu.

MATERIÁL A METODIKA
Pro studii byly vybrány ryby z produkčního rybníka při výlovu a po umístění na sádkách. Do studie byl zařazen kapr obecný (*Cyprinus carpio* L.) linie Pohořelický lysec o tržní velikosti, pocházející ze standardních podmínek chovu s přirozeným zdrojem potravy a přikrmováním. Ryby z chovu byly tržní velikosti o váze 2,0 ± 0,3 kg. Ryby byly usmrceny po předcházejícím hlubokém omráčení a krev byla odebrána heparinizovanou jehlou. Odběry krve byly situovány do podzimního období, kdy nastává vzhledem ke klimatickým podmínkám k útlumu metabolismu a ryby přestávají

přijímat potravu. Odběry krve byly rozvrženy tak, aby bylo podchyceno období těsně před výlovem, výlov a období po výlovu v pravidelných časových intervalech. Ryby po výlovu byly převezeny standardním způsobem na sádky za zachování přepravních podmínek pro živé ryby. Voda v sádkách byla intenzivně provzdušňována stálým přítokem. Počet ryb v každém odběrovém termínu byl přibližně stejný, krve ryb byly vždy odebrány od 12 až 13 kusů kapra obecného.
První odběr krve ryb se uskutečnil 2 týdny před výlovem, druhý odběr byl uskutečněn po výlovu a transportu po jednom dni pobytu ryb na sádkách, třetí a čtvrtý odběr se uskutečnil v pravidelných 2-týdenních odstupech po předcházejícím odběru. Všechny ryby k odběru krve pocházely vždy ze stejné sádky a byly vybrány náhodným výběrem s přihlédnutím k přibližně srovnatelné velikosti.
Druhá skupina ryb ve studii pocházela z rybníka na severní Moravě. Ryby se zde vyskytují přirozeně a živí se přirozenými zdroji potravy bez přikrmování. V průběhu letního období byly odebrány vzorky krve na amoniak stejnou metodou u nahodile ulovených ryb. Druhová skladba ryb byla různorodá a byly zastoupeny ryby druhu plotice obecná (*Rutilus rutilus* L., 1758), jelec tloušť (*Leuciscus cephalus* L., 1758), cejnek malý (*Blicca bjoerkna* L., 1758), okoun říční (*Perca fluviatilis* L., 1758), candát obecný (*Sander lucioperca* L., 1758) a kapr obecný (*Cyprinus carpio* L., 1758). V zimním období byly odběry krve provedeny u druhu plotice obecná (*Rutilus rutilus* L., 1758). Plotice byly sloveny při výlovu rybníka a byly umístěny ve venkovní nádrži s vodou o objemu 100 l.

Pro měření koncentrací amoniaku v krvi byl použit Blood Ammonia Meter, PocketChemBA (Japan) po provedené kalibraci. Koncentrace amoniaku byla měřena v plné krvi ihned po odběru. Výsledky koncentrace amoniaku v krvi odečteny s přesností na 1,0 µmol/l.

Pro vyhodnocení fyzikálně-chemických parametrů vody byly zaznamenány teplotní údaje ve °C a rozpuštěný kyslík v mg/l. Obsah rozpuštěného kyslíku ve vodě byl měřen analyzátorem CyberScan PCD 650 (Eutech Instruments, USA), údaje ze sádek byly poskytnuty pro účely této studie obsluhou sádek.

VÝSLEDKY A DISKUSE

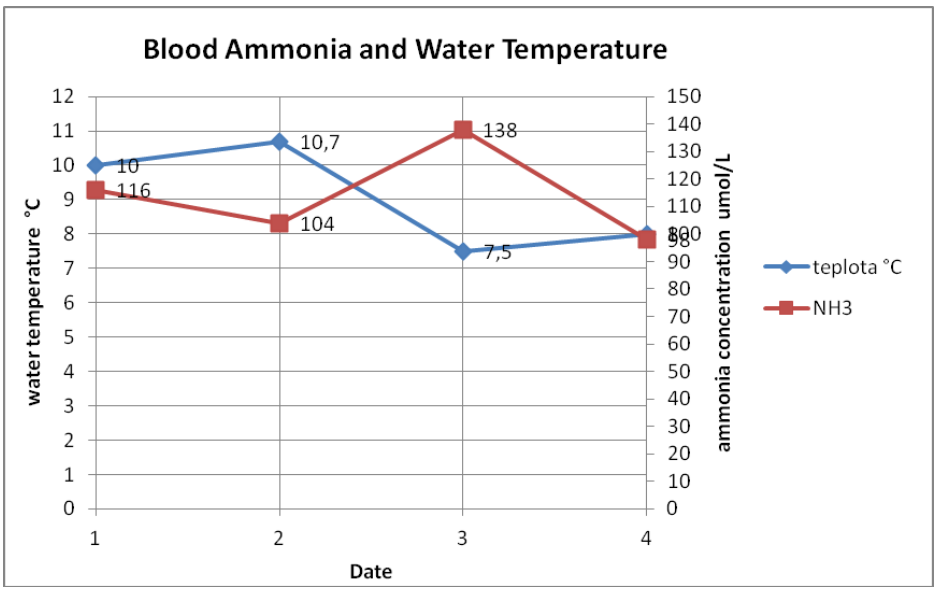
Výsledky koncentrace amoniaku v krvi ryb byly pro jednotlivé odběrové intervaly průměrovány a byla vypočtena směrodatná odchylka měření. Počty ryb z chovu zařazených do studie a počet analyzovaných vzorků krve jsou uvedeny v tabulce TAB 1.

TAB 1. Počet vzorků krve k analýze

Date	Quantity of fish	Blood samples*
1.	12	11
2.	12	11
3.	13	12
4.	12	11

Pozn. * z analýzy byly vyloučeny vysrážené vzorky krve

Výsledky naměřených průměrných koncentrací amoniaku v krvi kapra z chovu v jednotlivých odběrových termínech se pohybovaly v intervalu od 98,3 ± 56µmol/l do 138,7 ± 31 µmol/l. Přehled změn koncentrací amoniaku v krvi ryb s průběhem teplotních změn v jednotlivých termínech odběru je uveden v grafu 1.



Graf 1. Průběh teplot a koncentrací amoniaku v krvi kapra z chovu ve sledovaném období

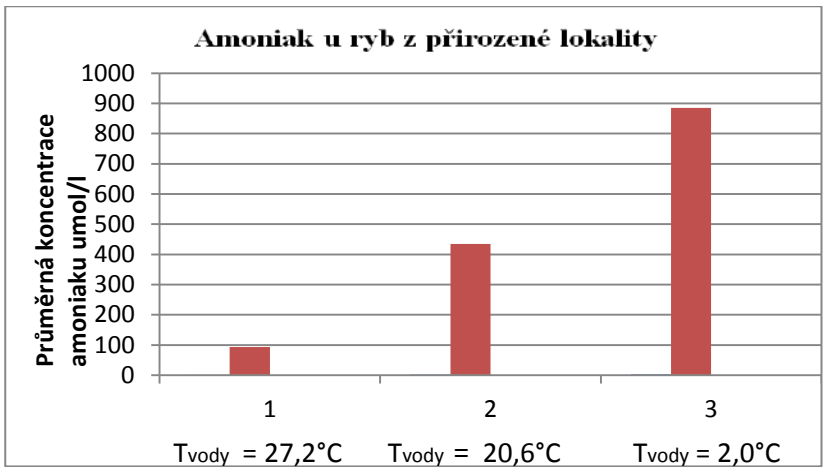
Současně s teplotními parametry byl monitorován i obsah rozpuštěného kyslíku ve vodě. Koncentrace rozpuštěného kyslíku byla ve všech odběrových termínech ve vodě ze sádky v rozmezí hodnot od 5,0 mg/l do 6,6 mg/l. Voda z chovného rybníka měla obsah rozpuštěného kyslíku v lovišti v době výlovu 3,7 mg/L. Přehled hodnot rozpuštěného kyslíku ve vodě je uveden v tabulce TAB 1.

TAB 1. Koncentrace rozpuštěného kyslíku

Date	Dissolved oxygen (mg/L)
1.	6,0
2.	6,6
3.	5,0
4.	5,0

Dále bylo odebráno v letním období 10 vzorků krve ryb pocházejících z přirozeného prostředí při rekreačním rybaření na rybníce bez produkčního chovu. Krve byly odebrány u nahodile ulovených ryb různé druhové skladby. Průměrná koncentrace amoniaku v krvi ryb z přirozené lokality odebrané v letním období byla 93,0 ± 24,5 µmol/l (plotice a jelec). Teplota vody v rybníku byla v den odběru krve ryb 27,2°C. Druhý odběrový termín se uskutečnil 14 dní po prvém odběru. Teplota vody v době odběru klesla během 2 dní na 20,6 °C. Průměrná koncentrace amoniaku u ryb byla v tomto odběrovém termínu 435,0 ± 74,3 µmol/l (okounek, candát, plotice a kapr). Při tomto odběru byl zaznamenán pokles teploty vody v rybníku oproti předchozímu období náhlou klimatickou změnou teploty vody o 6,6°C.

Další odběr krve na stanovení koncentrace amoniaku u ryb z přirozených podmínek byl proveden v prosinci, kdy ryby druhu plotice obecná byly po předchozím podzimním odlovu umístěny 5 týdnů ve venkovním prostředí v plastové nádrži o objemu 100 l. Odběr se uskutečnil 1 den po náhlém poklesu venkovních teplot pod bod mrazu. Průměrná koncentrace amoniaku v krvi ryb byla naměřena u plotice 885 ± 177,8 µmol/l. Z uvedených výsledků jsou patrné rozdíly v koncentraci amoniku v krvi ryb podle situace, ve které se ryby nacházejí. Přehled výsledků u ryb z přirozeného prostředí je v grafu 2.



Graf 2 Průměrné koncentrace amoniaku v krvi přirozeně se vyskytujících různých druhů ryb

Hlavním faktorem odpovídajícím za výši hladiny amoniaku v krvi je výživový stav. Pokud se ryby nacházejí v období, ve kterém je příjem potravy zpomalen nebo zcela zastaven, dají se očekávat nízké hladiny amoniaku v krvi. Významný vliv však na ryby mají změny podmínek prostředí, jako je stres (manipulační, teplotní, chemismus vody a jiné). Teplota vody, zvláště její prudký pokles, značnou měrou zpomalí metabolické pochody a přispěje zvláště u ryb po nakrmení ke zvýšené kumulaci amoniaku a zpomalení detoxikačních pochodů. V extrémních případech, kdy koncentrace amoniaku vystoupí nad kritickou hodnotu, která je u kaprovitých ryb až nad 1000 µmol/l, je může ohrozit autointoxikací na životě.

Za zdravotní stav ryb a kvalitu rybího masa odpovídají do velké míry podmínky, ve kterých jsou ryby chovány a kvalita vodního prostředí včetně manipulací s rybami. Velký vliv má stálost klimatických podmínek a zvláště teplota vody. Při náhlých změnách teploty souvisejících mnohdy s jejich přemístěním do nádrží o nižší teplotě vody po výlovu může dojít ke změnám zdravotního stavu až případně k úhynům ryb.

V souladu s naším předpokladem byly i výsledky sledování hladin amoniaku u přirozeně se vyskytujících ryb. Hodnoty amoniaku v krvi ryb v zimním období byly dosti vysoké. Ryby však ani při tomto zvýšení nevykazovaly ještě známky autointoxikace, ani jiné změny zdravotního stavu. Pro zlepšení podmínek bylo rybám zahájeno provzdušňování.

ZÁVĚR

Ryby jsou citlivé ke stresu i ke změnám vodního prostředí. Mají vybudovány mechanismy, které je mohou před těmito změnami a jejich nebezpečnými účinky do určité míry chránit.

Naše studie neprokázala žádné významně zvýšené koncentrace amoniaku u chovaných ryb v produkčním rybníku po výlovu ani po přemístění ryb do sádek. Zvýšení koncentrace amoniaku v krvi uprostřed sledovaného období souviselo s výraznou změnou klimatických podmínek náhlým ochlazením a snížením teploty vody v sádkách. Zvýšení koncentrace amoniaku nebylo pro ryby nebezpečné a neohrozilo jejich zdravotní stav. Tato studie potvrdila dobrou úroveň adaptace ryb na výlov a transport do sádek bez významného zvýšení koncentrací amoniaku v krvi.

Se zdravotním stavem ryb a manipulacemi před vlastním usmrcením a technologickým zpracováním rybího masa souvisí i výsledná kvalita a jakost i údržnost rybí svaloviny. Všechny faktory, které ovlivňují zdravotní stav ryb tedy přispívají k výsledné kvalitě rybího masa.

Poděkování: Tato práce vznikla díky finanční podpoře Institucionálního výzkumu VFU Brno a projektu IGA VFU Brno 34/2014/FVHE. Autorky práce děkují Rybníkářství Pohořelice a.s. za vstřícný přístup a pomoc při realizaci této studie.

LITERATURA:

Cameron, J.N. – Heisler, N. 1983. Studies of Ammonia in the Rainbow Trout:Physico-chemical Parameters, Acid –Base Behaviours and Respiratory Clearance. In *Journal of Experimental Biology,* vol.105, p.107-125.

Mazeaud, MM., Mazeaud, F., Donaldson, EM. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. In *Transactions of the American Fisheries Society,* vol 106, p.201-212

Svobodová, Z. 1970. The level of N-ammonia and urea in the blood serum and brain of healthy and ammonia –intoxicated carp (*Cyprinus carpio* L.). In *Bulletin,* RIFCH Vodňany, p.113-118.

Svobodová, Z., Groch, L., Máchová, J., Faina, R., Vykusová, B., Smolíková, B. 1997a. Accidental kills of common carp due to ammonium autointoxication. In Kolářová et al. *Health protection of fish. Bulletin RI Vodňany*, p. 185-193

Randall,D.J., Tsui,T.K.N. 2002. Ammonia toxicity in fish. In *Marine Pollution Bulletin,* vol. 45, 2002, Issues 1-12, p.17-23.

Wright, P. A., Steele, S. L., Huitema, A. Bernier, N. J. 2007. Induction of four glutamine synthetase genes in brain of rainbow trout in response to elevated environmental ammonia. J. Exp. Biol. Vol.210, 2905-2911.

P 31

TĚŽKÉ KOVY V SLADKOVODNÍCH RYBÁCH Z LOKALIT OKRESU ŽĎÁR NAD SÁZAVOU

Kleckerová A., Vičarová P., Dočekalová H., Pelcová P.
Ústav chemie a biochemie, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

ÚVOD

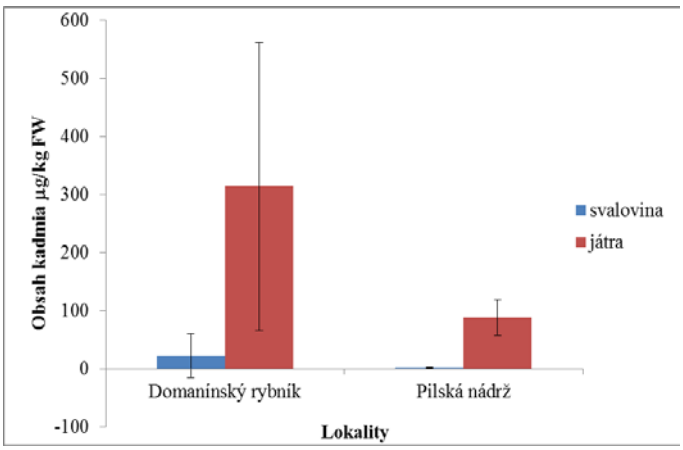
Znečištění životního prostředí těžkými kovy je rostoucím problémem celého světa [1]. Těžké kovy se do životního prostředí dostávají z různých zdrojů, jako jsou: průmysl, zemědělství, doprava, fosilní paliva aj. [2]. Mezi nejvíce toxické těžké kovy patří kadmium, olovo, rtuť a jejich anorganické a organické sloučeniny [3]. Jednou z významných negativních vlastností kadmia, olova a rtuti, je jejich značná schopnost kumulovat se ve vodních organismech. Konečným článkem potravního řetězce ve vodních tocích a nádržích jsou ryby. Obsahy těžkých kovů v rybách tak indikují jednak znečištění povrchových vod a také určují hygienickou kvalitu rybího masa [4] [5]. Koncentrace jednotlivých forem těžkých kovů jsou závislé na mnoha faktorech, jako např. na biologických procesech, redoxním potenciálu, iontové síle, pH aj. [4], [6].

MATERIÁL A METODY

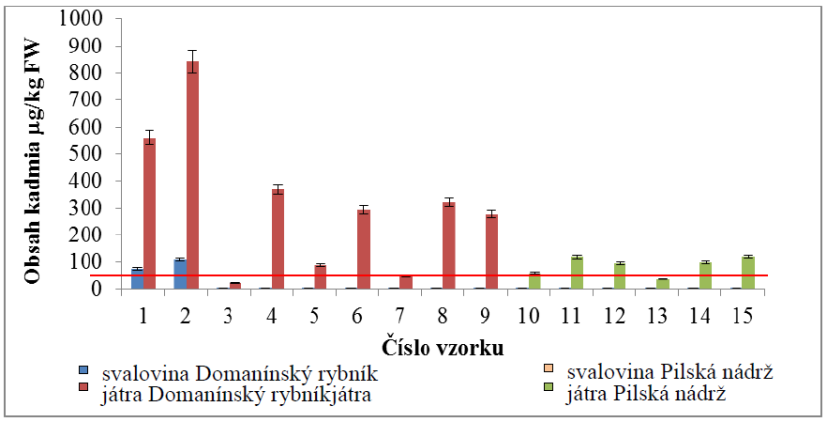
Kapr obecný (latinsky *Cyprinus carpio*) byl loven v oblasti okresu Žďár nad Sázavou, a to ve dvou lokalitách: Pilská nádrž a Domanínský rybník. Lov probíhal v období od dubna do srpna 2013. Po usmrcení a vykuchání byl odebrán vzorek ocasní svaloviny o hmotnosti 10 g a vzorek celých jater, následně byly tyto vzorky dány do polyethylenového sáčku, popsány a uloženy do mrazícího boxu při teplotě -20°C. U každé ryby byl zaznamenán: rodový a druhový název ryby, hmotnost i délka ryby, pohlaví a oblast odchytu. Pro celkové stanovení rtuti ve svalovině a játrech byl použit spektrometr AMA 254, Altec a pro stanovení celkového obsahu kadmia a olova byl použit spektrometr ContrAA 700, Analytik Jena. Celému měření předcházela lyofilizace a mineralizace. Pro lyofilizaci analyzovaných vzorků byl použit lyofilizátor Power Dry LL 3000, Thermo Scientific, po dobu 7 dní. Poté byly vzorky zhomogenizovány a uchovávány v plastových nádobkách v mrazícím boxu při teplotě -20°C. Rozklad vzorků byl proveden pomocí přístroj MW ETHOS SEL, Milestone, v prostředí koncentrované kyseliny dusičné, vody a peroxidu vodíku.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Ve třiceti vzorcích tkání ryb, vylovených na Českomoravské vrchovině (v Domanínském rybníce a Pilské nádrži), byly stanoveny obsahy kadmia, olova a rtuti pomocí atomové absorpční spektrometrie. Vzorky kapra obecného byly rozděleny dle lokality a dle druhu analyzované tkáně (svalovina ocasu a játra). Následně byly porovnávány obsahy jednotlivých prvků v dané tkáni. V případě vzorků z Pilské nádrže bylo celkově analyzováno 12 vzorků (6 vzorků ocasní svaloviny, 6 vzorků jater), z Domanínského rybníka bylo 18 vzorků (9 vzorků svaloviny ocasu, 9 vzorků jater). Významně vyšší obsahy kadmia byly zjištěny ve vzorcích z Domanínského rybníka v porovnání se vzorky z Pilské nádrže (Obr. 1). Obsah kadmia v jednotlivých vzorcích je znázorněn na obrázku 2. Z obrázku 1 je patrné, že obsah kadmia je v játrech vyšší než ve svalovině. K podobným závěrům došli Visnjic-Jeftic et al. [7], kteří rovněž nalezli u ryb vyšší obsah kadmia v játrech než ve svalovině. Vyšší obsah kadmia v játrech je vysvětlován tím, že zde dochází k jeho metabolizaci, jak ve své publikaci uvádí Komínková [8]. Pouze u dvou vzorků (1, 2) byl překročen limit daný Nařízením Evropské komice ES 1881/2006 s doplňujícím nařízením ES 420/2011 [9, 10], který je stanoven na 50 $\mu g.kg^{-1}$.

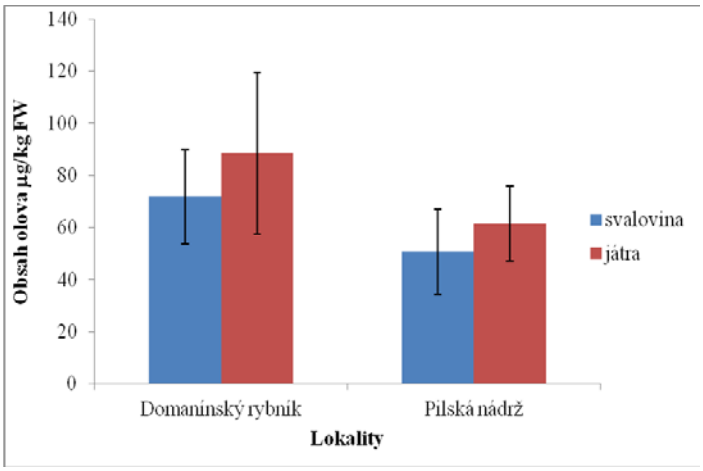


Obr. 1: *Obsah kadmia ve svalovině ocasu a v játrech kaprů vylovených ze dvou lokalit*

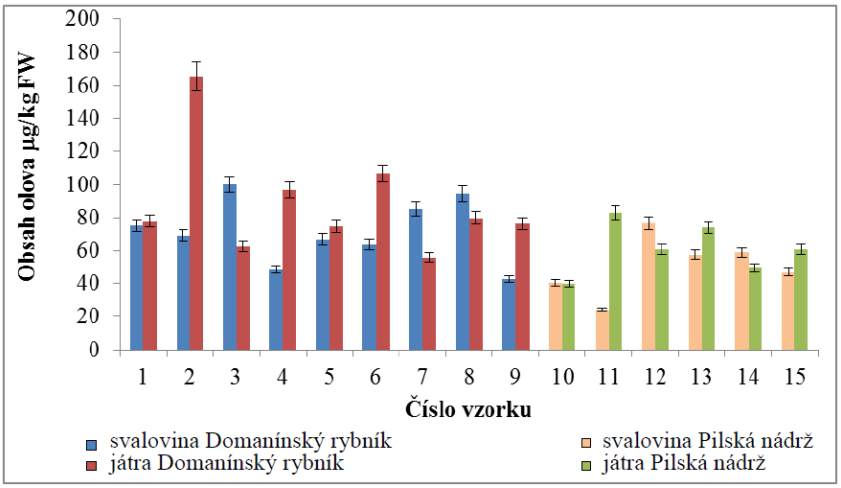


Obr. 2: *Obsahy kadmia v jednotlivých vzorcích*

Průměrný obsah olova (Obr. 3, 4) byl vyšší ve vzorcích z Domanínského rybníka než z Pilské nádrže. Obsah olova v jednotlivých vzorcích je uveden na obrázku 4. V případě olova není možno ze získaných výsledků jednoznačně určit, v kterém orgánu – játra, ocasní svalovina – je koncentrace olova vyšší, záleží zde na jednotlivých vzorcích. V žádném ze vzorků nedošlo k překročení limitů daných Nařízením ES [9, 10].

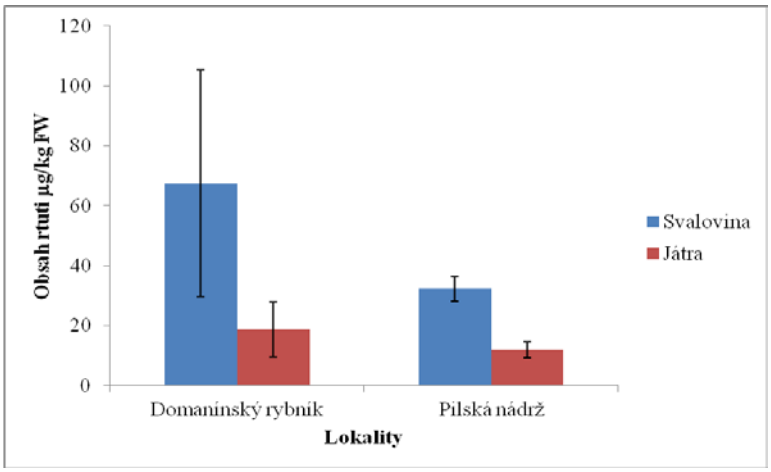


Obr. 3: *Obsah olova ve svalovině ocasu a v játrech kaprů vylovených ze dvou lokalit*

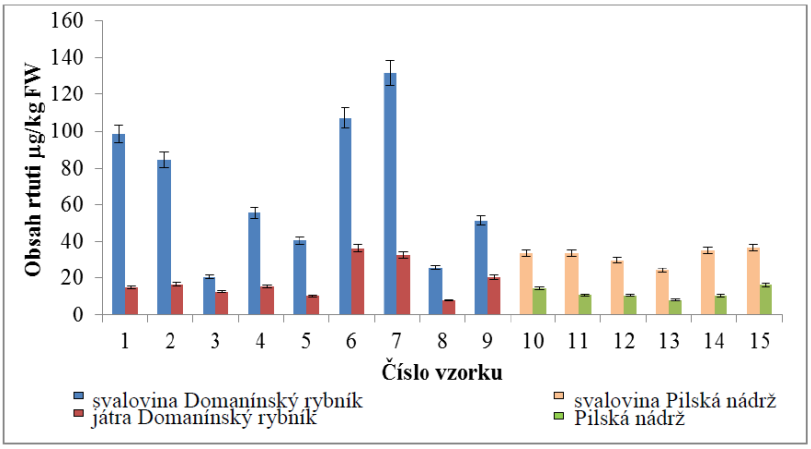


Obr. 4: *Obsahy olova v jednotlivých vzorcích*

Průměrný obsah rtuti, jak ve svalovině, tak i v játrech, byl vyšší ve vzorcích z Domanínského rybníka než z Pilské nádrže (Obr. 5, 6). Z obrázku je patrné, že obsah rtuti byl vyšší ve svalovině než v játrech. Obdobné výsledky byly nalezeny ve studii Kubecová a Švehla [11], kdy byl také zjištěn vyšší obsah rtuti ve svalovině ryb. Studie Svobodová et al. [12] uvádí, že vyšší obsah rtuti ve svalovině a nízký v játrech udává nízkou nebo žádnou kontaminaci lokalit. V případě kontaminace lokalit by byl vyšší obsah v játrech než ve svalovině.



Obr. 5: *Obsah rtuti ve svalovině ocasu a v játrech kaprů vylovených ze dvou lokalit*



Obr. 6: *Obsahy rtuti v jednotlivých vzorcích*

ZÁVĚR

Byl prokázán rozdíl v obsahu kovů mezi vybranými lokalitami (Pilská nádrž a Domanínský rybník), obsah všech stanovovaných těžkých kovů (kadmium, olovo a rtuť) byl vyšší v Domanínském rybníce než v Pilské nádrži. Za příčinu lze přepokládat nedávné odbahňování rybníka Skalský dvůr, který je hlavním přítokem Domanínského rybníka a také blízkost k hlavnímu silničnímu tahu. Obsah kadmia byl nalezen vyšší v játrech než ve svalovině. Obsah olova byl u vzorků z obou lokalit v obou studovaných tkáních srovnatelný, rozdíly byly pouze mezi jednotlivými jedinci. Dále byl zjištěn rozdíl mezi koncentracemi rtuti v analyzovaných tkáních, ve svalovině ocasu byl obsah vyšší než v játrech. Naměřená data byla ve všech případech, kromě kadmia, ve shodě s limity danými Nařízením ES (kadmium - 50 $\mu g.kg^{-1}$, olovo - 30 $\mu g.kg^{-1}$, rtuť - 500 $\mu g.kg^{-1}$. Konzumace studovaného kapra obecného z hlediska obsahu rtuti a olova tedy nepředstavuje žádné zdravotní riziko pro konzumenta.

Poděkování: Práce byla podpořena projektem CZ.1.07/2.2.00/28.0302 Inovace studijních programů AF a ZF MENDELU směřující k vytvoření mezioborové integrace.

POUŽITÁ LITERATURA

[1] KOUBA A., BUŘIČ M., KOZÁK P.; 2010: Bioaccumulation and effects of heavy metal in crayfish: A review, *Aquaculture*, 350: 71 – 74 s.
[2] KORKMAZ G. F., KESER R., AKCAY N., DIZMAN S.; 2012: Radioactivity and heavy metal concentration of some commercial fish species consumend in the Black Sea Region of Turkey, *Chemosphere*, 87: 356 – 361 s.
[3] TUZEN M.; 2009: Toxic and essential trace elemental contents in fish species from the Black Sea, *Food and Chemical Toxicology*, 47: 1785 – 1790 s.
[4] BENCKO V., CIKRT M., LENER J.; 1995: Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka, 2. Vydání, Grada Pulishing, Praha, ISBN: 80-7169-150-X, 288 s.
[5] CIBULKA J.; 1991: *Pohyb olova, kadmia a rtuti v biosféře*, Academica Praha, ISBN: 80-200-0401-7, 367 s.
[6] DJEDJIBEGOVIC J., LARSSEN T., SKRBO A., MARJANOVIČ A., SOBER M.; 2012: Contents of cadmium, copper, mercury and lead in fish from the Neretva river (Bosna a Herzegovina) determined by inductively coupled plasma mass spektrometry (ICP-MS), *Food Chemistry*, 131: 469 – 476 s.
[7] VISNJIC-JEFTIC, Z.; JARIC, I.; JOVANOVIC, L.; SKORIC, S.; SMEDEREVAC-LALIC, M.; NIKCEVIC, M.; LENHARDT, M.: Heavy metal and trace element accumulation in muscle, liver and gills of the Pontic shad (Alosa immaculata Bennet 1835) from the Danube River (Serbia), Microchemical Journal 95, 2010, 341-344 s.
[8] KOMÍNKOVÁ, D.: Ekotoxikologie, ČVUT, Praha, 2008, ISBN: 978-80-01-04058-4, 156 s.
[9] NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách
[10] NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 420/2011, kterým se mění Nařízení komice č. 1881/2006, který, se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách
[11] KUBECOVÁ, J.; ŠVEHLA, J.: Obsah rtuti v rybách z údolní nádrže Jordán v Táboře, Sborník konference – Pitná voda 2008, České Budějovice, 2008, ISBN: 978-80-354-2034-8, 401-406 s.
[12] SVOBODOVÁ, Z.; KRUŽÍKOVÁ, K.; KENŠOVÁ, R.; SEDLÁČKOVÁ, L.; JARKOVSKÝ, J.; POLESZCZUK, G.: The correlation between fish mercury liver/muscle ratio and high and low levels of mercury contamination in Czech localities, International Journal of elektrochemical science 8, 2013, 45-56 s.

P 32

HODNOCENÍ KVALITY MASA POMOCÍ PROFILŮ TĚKAVÝCH LÁTEK

Vytejčková S.[1], Hradecký J.[1], Hajšlová J.[1], Poustka J.[1]
1) Ústav analýzy potravin a výživy, Technická 5, 160 28, Praha-Dejvice

Úvod:

Maso je celosvětově konzumovaná komodita se specifickým aroma, které se mění v průběhu skladování (tzv. zrání). Výzkum byl proto zaměřen na velmi sledovanou problematiku čerstvosti a kvality různých druhů mas. Vzhledem k tomu, že profil těkavých látek je do jisté míry typický pro jednotlivé druhy masa a dobu skladování, lze ho využít k charakterizaci vzorků. Profily těkavých látek získané v průběhu skladování drůbežího masa (0-168 hod) byly vyhodnoceny metodami multivariační statistické analýzy. Na základě této statistické analýzy byly identifikovány markery s cílem vytvořit metodiku vhodnou pro predikci zralosti a kvality skladovaného masa. V naší studii bylo pro měření fingerprintů těkavých látek masa vhodné aplikovat metodu head-space mikroextrakce na tuhou fázi (HS-SPME) v kombinaci s plynovou chromatografií a hmotnostně-spektrometrickým detektorem s analyzátorem doby letu (GC/TOFMS).

Tato studie byla realizována s podporou Evropské Komise - projekt SUCCIPACK (Development of active, intelligent and sustainable food PACKaging using PolybutyleneSUCCInate; FP7-KBBE-2011-5-289196) a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (MSMT No. 20/2013).

Chemikálie:

- Chlorid sodný, p.a. (Lach-Ner, ČR)
- Směs alkanů C_8-C_{20} (Sigma-Aldrich, ČR)

Vzorky:

Vzorky byly zakoupeny ve firmě RADEV a zabaleny do běžně používaného obalového materiálu PA/PE. Skladovány byly ve speciálně vyhrazené lednici při 4 °C.

Analyzovaný materiál:

- Kuřecí prsa čerstvá syrová
- Krůtí prsa čerstvá syrová
- Krůtí prsa uzená

Příprava vzorků:

Vzorek byl homogenizován (mixérem) a navážen do 10 ml vialek pro SPME. Do vialek bylo navažováno 2 g homogenátu, přidáno 2 ml nasyceného roztoku NaCl a následně byly vialky uzavřeny víčkem se septem. Takto připravené vzorky byly měřeny metodou HS-SPME/GC/MS.

Identifikace látek:

Identifikace vybraných analytů byla provedena pomocí knihovny hmotnostních spekter a následně potvrzena porovnáním retenčních indexů vypočtených a získaných z knihovny NIST 2008. Pro zjištění naměřených retenčních indexů byla změřena směs standardních alkanů za stejných podmínek jako při stanovení vlastních vzorků.

Software ChromaTOF provedl automatickou dekonvoluci koeluovaných látek (přibližně 170 analytů), dále srovnání intenzit jednotlivých analytů mezi všemi vzorky (na základě retenčních časů a podobnosti spekter), normalizace ploch píků a následné statistické porovnání. Naměřená data byla statisticky vyhodnocena pomocí multivariační analýzy a softwaru SIMCA.

Nastavení parametrů během měření

SPME

Inkubační doba	10 min
Inkubační teplota	60 °C
Použité vlákno	PDMS/DVB/CX
Rychlost agitátoru	500 otáček/min
Rychlost agitátoru při extrakci	100 otáček/min
Extrakční doba	10 min
Desorpční doba	1 min

GC

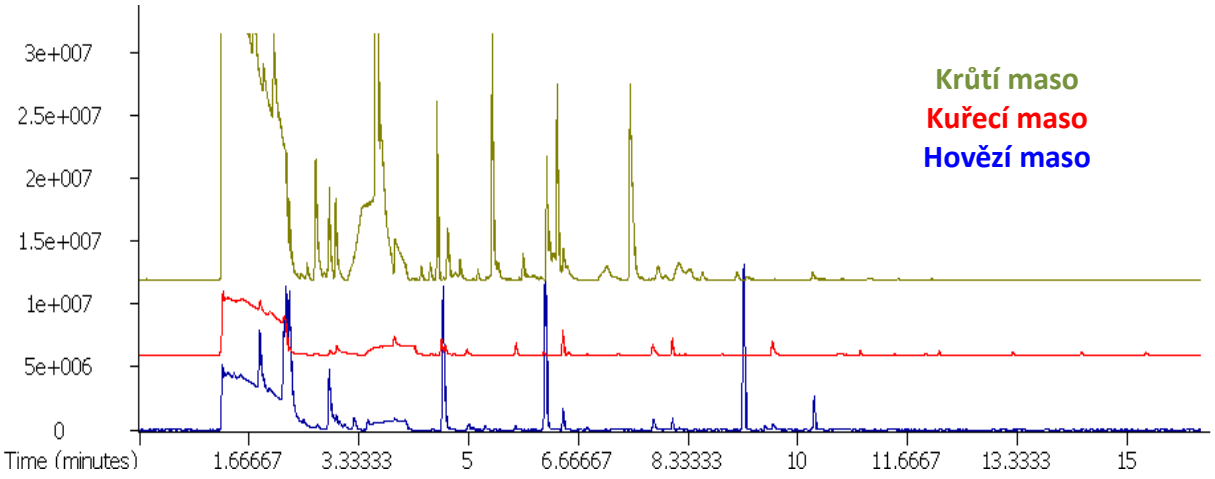
Kolona	HP-Carbowax (30m×20 µm×25 µm
Nosný plyn	helium
Nástřik	Splitless (perioda 1 min)
Průtok	konstantní (1 ml/min)
Teplota nástřiku	230 °C
Teplotní program	40 °C po dobu 1 min
	následně programováno 13°C/min do 260 °C s výdrží 5 min
Celková doba analýzy	19,923 min

TOF/MS

Rozsah m/z	30-500
Akviziční rychlost	10 spekter/s
Napětí detektoru	2600
Ionizační energie	-70 V
Teplota iontového zdroje	200 °C
Teplota transferline	230 °C

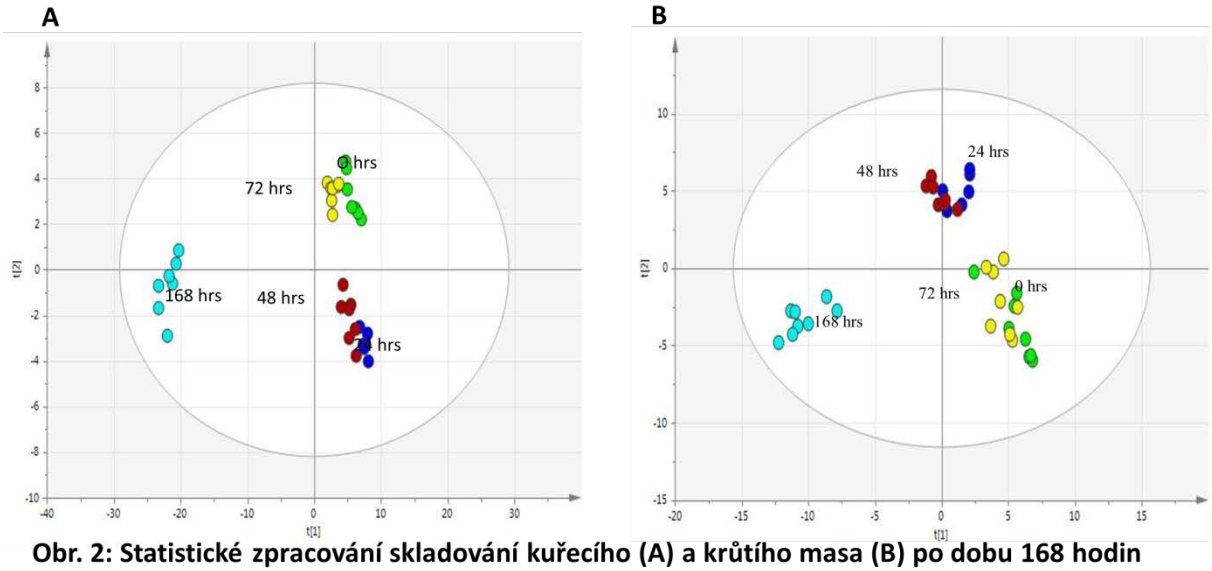
Výsledky a diskuse:

Obr. 1 ukazuje specifický profil těkavých látek u jednotlivých druhů čerstvého masa. Můžeme zde pozorovat tzv. fingerprinty u hovězího, kuřecího a krůtího masa.

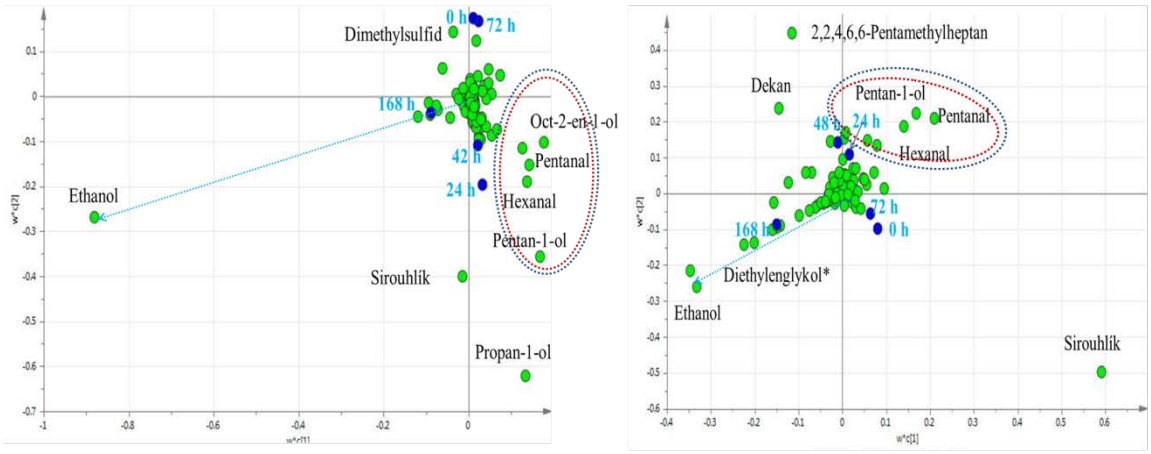


Obr. 1: Přeložené chromatogramy jednotlivých druhů masa

Pomocí statistického zpracování dat bylo pozorováno seskupování totožných skladovacích časů u jednotlivých matric (kuřecí a krůtí maso). K oddělení těchto časů došlo především kvůli relativnímu zastoupení charakteristických těkavých látek vzorků (**Obr. 2A a 2B**). Kromě přirozeně přítomných látek byly identifikovány i markery prokazující mikrobiální aktivitu (ethanol, acetoin) – dominantní pro 168 hod. Dále při skladování masa dochází k oxidaci lipidů (pentanal, hexanal, oct-2-en-1-ol), což je jev dominantní pro skladovací časy 24 a 48 hod. Zajímavé je uskupování skladovacích časů 0 a 72 hod. Typické pro tyto skladovací časy jsou analyty dimethylsulfid a sirouhlík, což jsou látky přirozeně přítomné v mase a zároveň vznikají během skladování mikrobiálním působením (**Obr. 3**).

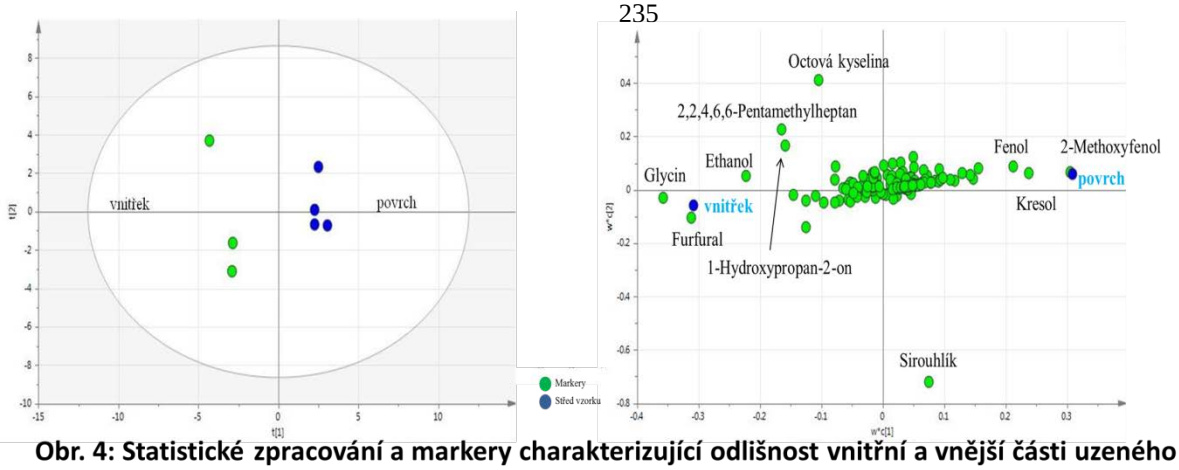


Obr. 2: Statistické zpracování skladování kuřecího (A) a krůtího masa (B) po dobu 168 hodin



Obr. 3: Markery charakterizující odlišnost v jednotlivých skladovacích časech

Při testování uzeného krůtího masa nebyly po dobu 168 hodin pozorovány žádné látky charakterizující mikrobiální zkázu nebo oxidaci lipidů. Tato skutečnost byla předpokládána v souladu s konzervačním účinkem uzení. Byly identifikovány látky pocházející z udícího kouře/kapaliny (2-furaldehyd, 1-hydroxypropan-2-on) a látky vznikající při spalování dřeva (fenol, kresol, 2-methoxyfenol). Bylo zjištěno, že některé látky pouze ulpívají na povrchu masa a těžší produkty spalování prostupují až do vnitřní části masa. Proto byly zvlášť skladovány vnitřní a povrchové části masa. Pro ilustraci je přiložen **Obr. 4** dokazující rozdíly ve vnitřní a vnější části masa.



Obr. 4: Statistické zpracování a markery charakterizující odlišnost vnitřní a vnější části uzeného krůtího masa

Seznam použité literatury:

1. Cañedo A., Fernández-García E., Nuñez M.: Volatile compounds in fresh meats subjected to high pressure processing: Effect of the packaging material. *Meat Science 2009, 81, 321–328.*

2. Brewer M.: Irradiation effects on meat flavor. A review. *Meat Science 2009, 81, 1–14.*

3. Nollet Leo M. L.: Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality. *Blackwell Publishing Professional: USA, 2007.*

P 33

KONTAMINANTY V OBALOVÝCH MATERIÁLECH NA BÁZI PAPÍRU

Vápenka L.[1], Vavrouš A.[2], Votavová L.[1], Dobiáš J.[1]
[1] Ústav konzervace potravin, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, Praha 166 28
[2] Oddělení pro chemickou bezpečnost výrobků, Statní zdravotní ústav, Šrobárova 48, Praha 100 42

Úvod

Pro necílený screening výskytu xenobiotik ve vybraných obalových materiálech na bázi papíru používaných v ČR bylo metodou plynové chromatografie ve spojení s hmotnostním detektorem analyzováno 34 vzorků těchto obalových materiálů. Byla použita jak technika stanovení profilu těkavých látek po extrakci na tuhou fázi tak metoda stanovení látek po extrakci papíru do organických rozpouštědel (hexan a methanol). Oběma postupy bylo identifikováno 64 různých látek. Mezi nejvýznamnější z nich patří: estery kyseliny ftalové, fotoiniciátory (především u papírů s potiskem), rozpouštědla pro tiskařské barvy, katalyzátory reakcí při výrobě papíroviny a bisfenol A. Zároveň byl zjištěn významný rozdíl mezi množstvím těchto látek ve vzorcích s obsahem recyklovaného papíru a bez něho.

Vzorky

Stanovení byla provedena na 34 vzorcích papírů používaných pro přímý styk s potravinami. Obsah recyklovaného papíru ve vzorcích se pohyboval od 0 do 100 %. Z toho 6 vzorků mělo 0% obsah recyklátu papíru, 2 vzorky obsahovaly max. 20 % recyklátu a 26 vzorků obsahovalo 100 nebo min. 90 % recyklátu. Analyzovány byly i dva vzorky s barevným potiskem. Plošná hmotnost analyzovaných papírů se pohybovala od 80 do 200 g/m^2.

Příprava vzorků

Analýzy byly provedeny z 0,5 g vzorku rozřezaného na části o velikosti 3 × 3 mm. V případě použití techniky extrakce na tuhou fázi SPME (solid phase microextraction) bylo 0,5 g vzorku navažováno přímo do vialky a dále analyzováno. V případě použití techniky kapalného nástřiku bylo 0,5 g vzorku extrahováno v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut do 10 ml rozpouštědla (hexan nebo methanol). Extrakty byly extrakty slity a odpařeny do sucha na vakuové rotační odparce při 35 °C. Suchý odparek byl rozpuštěn ve 2 ml daného rozpouštědla, přefiltrován přes filtr do vialky a dále analyzován.

Analýza vzorků

Necílený screening vzorků byl proveden metodou plynové chromatografie a to jak technikou s kapalným nástřikem tak technikou extrakce SPME v headspace prostoru nad vzorkem umístěným ve vialce. U obou typů instrumentace byly použity stejné chromatografické podmínky, tak aby mohlo dojít k vzájemnému porovnání chromatogramů získaných oběma technikami.

Instrumentace a podmínky měření:

- GC-MS s kapalným nástřikem
    - Plynový chromatograf Agilent 6890 s hmotnostním detektorem Agilent 5973N
    - Electron impact ionization 70 eV; Teplota zdroje 230 °C; Quad 150 °C
    - Kapilární kolona DB-5 (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm)
    - Mobilní fáze: Helium; konstantní průtok 1 ml/min; lineární rychlost 36 cm/s
    - Nástřik: 1 µl; Split 1:1; teplota, 250 °C
    - Tepelný režim kolony: 40 °C po 1 min; nárůst na 325 °C rychlostí 10 °C/ min; 15 min při 325 °C

- SPME GC-MS
    - Plynový chromatograf Agilent 7890 s hmotnostním detektorem Agilent 5975C
    - Podmínky SPME: teplota extrakce 40 °C; extrakční čas 1800 s; desorpční čas 240 s
    - Kolona a další podmínky měření byly shodné s metodou GC-MS s kapalným nástřikem.

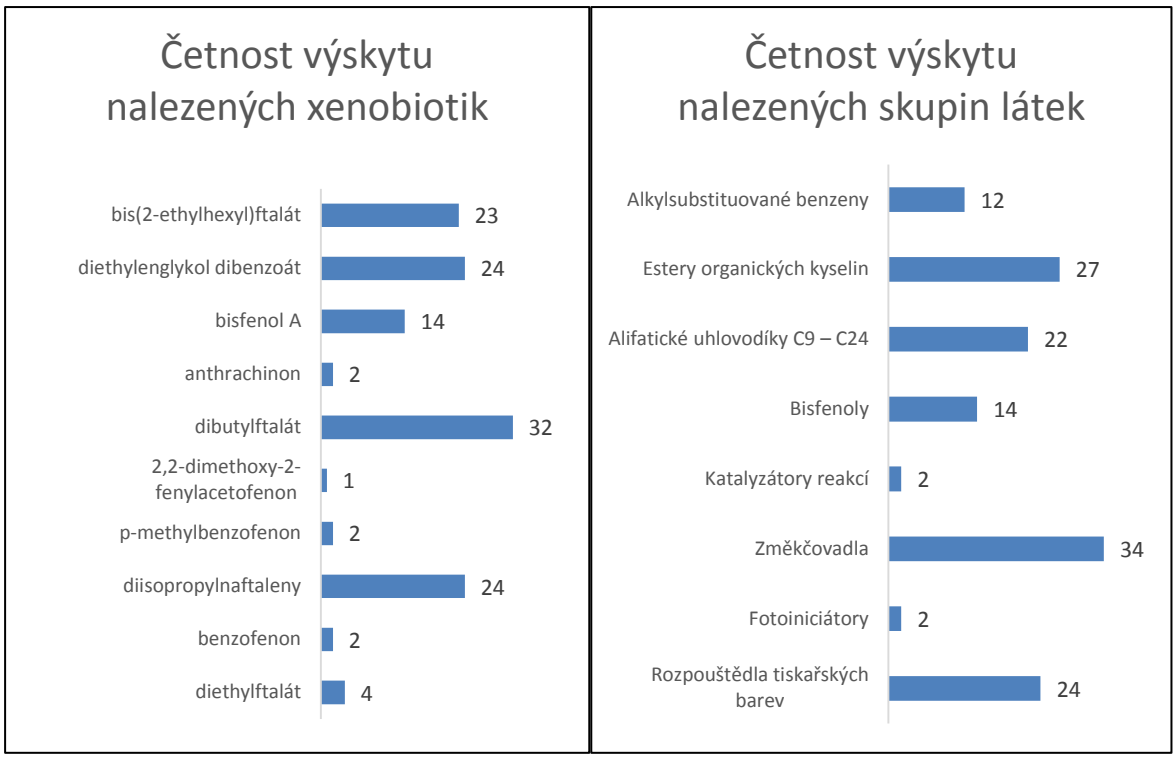
Výsledné chromatogramy a z nich získané záznamy hmotnostních spekter byly vyhodnocovány pomocí programu NIST MS Search Program 2.0 pracujícím s knihovnou spekter NIST 11.

Výsledky

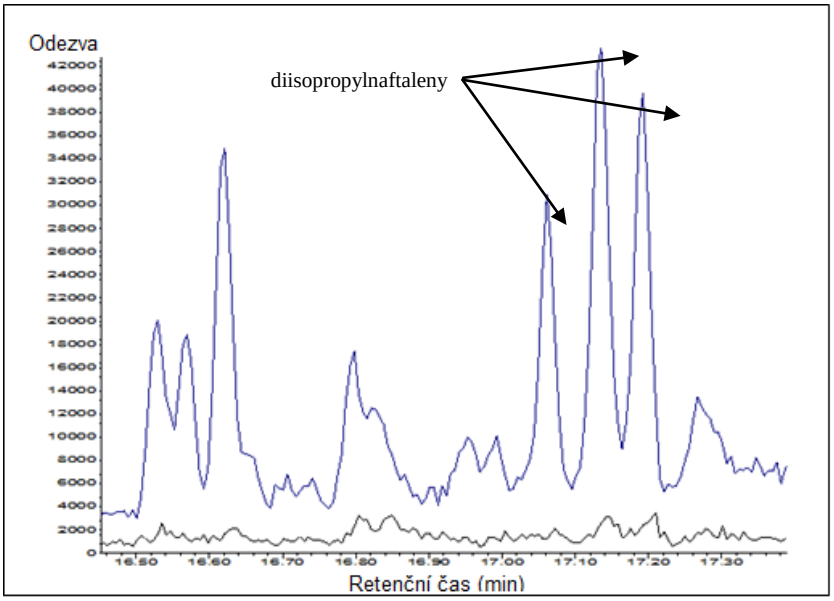
Použitými technikami (kapalný nástřik a SPME) bylo identifikováno 64 různých látek obsažených v papíru. Některé z těchto látek mohou být přirozeně přítomné (např.: fytosteroly – stigmastanol, deriváty terpenoidů atd.), ale další nalezené látky jsou typickými xenobiotiky. Nejvýznamnější xenobiotika nalezéná v papíru jsou uvedena na obrázku 1, kde je uvedena i četnost výskytu těchto látek. Na obrázku 1 je dále znázorněna četnost výskytu jednotlivých skupin látek identifikovaných v testovaných vzorcích papíru. Z výsledků je patrné, že nejčastěji se v papírech vyskytovala změkčovadla (především dibutylftalát, diethylenglykol dibenzoát a bis(2-ethylhexyl)ftalát), další významnou skupinou jsou residua rozpouštědel tiskařských barev, např. isomery diisopropylnaftalenu. Ty se vyskytovaly pouze v papírech s významným obsahem recyklátu, jak je patrné i z porovnání chromatogramů vzorku papíru vyrobeného bez přídavku recyklátu a vzorku s obsahem recyklátu 100 % (obrázek 2). Diisopropylnaftaleny se do papíru dostávají právě z procesů recyklace. V analyzovaných papírech se velmi často vyskytovaly i alifatické uhlovodíky (C9 až C24). Nálezy některých z těchto látek v papírech, např. diisopropylnaftalenu, esterů kyseliny ftalové, byly již v literatuře popsány. [1-3]

Nižší uhlovodíky (C9 až C12) byly ve vzorcích nalezeny při použití techniky SPME, vyšší uhlovodíky byly nalezeny především při použití techniky a metody pro kapalný nástřik vzorku. Problematika obsahu uhlovodíků v recyklovaných papírech, především pak tzv. MOSH (Mineral Oil Saturated Hydrocarbons) a MOAH (Mineral Oil Aromatic Hydrocarbons) je velmi často popisována v odborné literatuře a touto problematikou se intenzivně zabývá i Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA). [4]

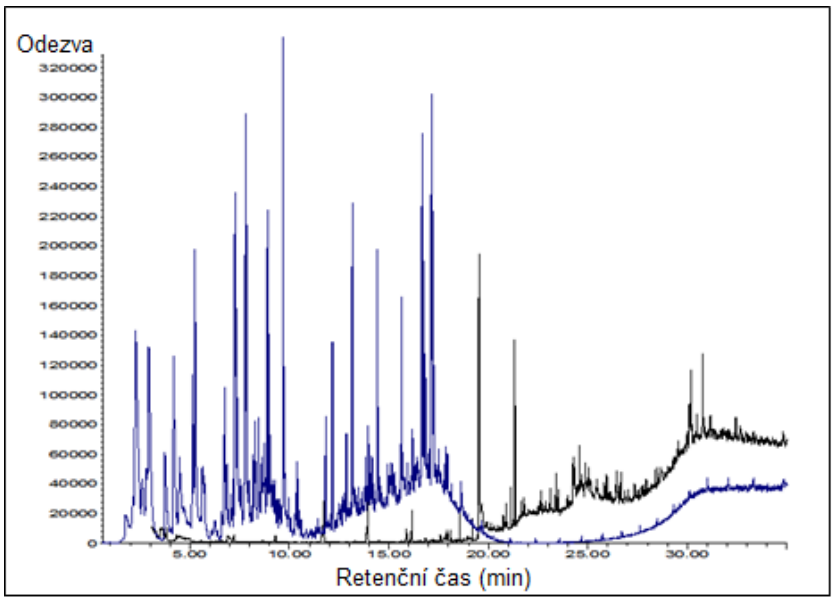
Techniky kapalného nástřiku a SPME byly do určité míry komplementární, jak je patrné z obrázku 3, kdy výhodou techniky SPME je možnost identifikovat ve vzorcích papíru látky těkavější než rozpouštědlo použité pro extrakci papíru, které při přípravě vzorku pro kapalný nástřik vytěkají při odpaření rozpouštědla.



Obrázek 1 Grafické znázornění četnosti výskytu xenobiotik a nalezených skupin látek při necíleném screeningu vzorků papíru



Obrázek 2 Porovnání typických chromatogramů vzorku papíru bez přídavku recyklátu (černá křivka) a vzorku s obsahem recyklátu 100 % (modrá křivka).



Obrázek 3 Porovnání chromatogramů totožného vzorku papíru získaného při použití techniky stanovení s kapalným nástřikem (černá křivka) a metodou SPME (modrá křivka).

Závěr

Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí je vhodnou instrumentální metodou pro necílený screening xenobiotik ve vzorcích obalových papíru. Analyzováno bylo 34 vzorků, ve kterých bylo nalezeno přes 64 různých látek. Dále bylo zjištěno, že metoda analýzy vzorku po extrakci do organického rozpouštědla je komplementární s metodou analýzy vzorku pomocí SPME v jeho headspace prostoru. Papíry s recyklátem obsahovaly mnohem vyšší zastoupení xenobiotik než vzorky papíru bez recyklátu, přičemž vhodným markerem obsahu recyklátu mohou být isomery diisopropylnaftalenu.

Údaje uvedené v této práci jsou prvou částí výsledků výzkumného projektu zaměřeného na systematické studium výskytu xenobiotik v papírových obalech potravin, jehož výsledky by měly být využity pro tvorbu evropské legislativy týkající se požadavků pro materiály na bázi papíru určených pro přímý kontakt s potravinami. [5]

Poděkování

Tato práce byla financována z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č.20/2014): A1_FPBT_2014_006 a z výzkumného projektu MZ ČR (projekt č. NT/14375).

Literatura

1. Triantafyllou, V. I.; Akrida-Demertzi, K.; Demertzis, P. G.: A study on the migration of organic pollutants from recycled paperboard packaging materials to solid food matrices. *Food Chemistry,* 2007, 101: 1759-1769.
2. Binderup, M.-L.; Pedersen, G. A.; Vinggaard, A. M.; Rasmussen, E. S.; Rosenquist, H.; Cederberg, T.: Toxicity testing and chemical analyses of recycles fibre-based paper for food contact. *Food Additives and Contaminants*, 2002, 19 :13-28.
3. Suciu, N. A.; Tiberto, F.; Vasileiadis, S.; Lamastra, L.; Trevisan, M.: Recycled paper-paperboard for food contact materials: Contaminants suspected and migration into foods and food simulant. *Food Chemistry,* 2013, 141: 4146-4151.
4. Scientific Opinion on Mineral Oil Hydrocarbons in Food, EFSA Journal 2012;10(6):2704.
5. Výzkumný projekt Ministerstva zdravotnictví ČR (projekt č. NT/14375 - 3): Identifikace zdravotních rizik z potravinářských obalů na bázi papíru a lepenky.

P 34

HODNOCENÍ KVALITY NĚMECKÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ V POROVNÁNÍ S ČESKÝMI

Saláková, A., Kameník, J., Pavlík, Z.
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav hygieny a technologie masa, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno

Abstrakt
Masné výrobky jsou chuťově a celkově senzoricky velice oblíbené pro konzumenty a to jak v České Republice, tak i okolních zemích. Pestrost sortimentu masných výrobků je umožněna řadou faktorů: skladbou a vlastnostmi hlavních druhů masa, rozdílnou kvalitou druhů masa a jeho anatomických částí, stupněm mělnění masa, použitím mnoha vedlejších surovin a pomocných látek, velkého sortimentu obalů a tvarem výrobků, použitím mnoha druhů koření, použitím rozdílných technologických postupů včetně volby různých konzervačních metod, různými způsoby předkládání výrobků ke spotřebě atd. Cílem práce bylo hodnocení čtyř druhů masných výrobků (Junior, párky, špekáčky, šunkový salám) od českého výrobce a čtyř druhů masných výrobků od německého výrobce. U výrobků byla provedena senzorická analýza (celkový vzhled, konzistence, vzhled v nákroji, vůně a chuť) a základních chemických parametrů (obsah tuku, bílkovin, soli, vody). Cílem hodnocení bylo posoudit rozdíly, standardnost a výsledky analýz zhodnotit s platnou českou legislativou. U salámu Junior jsme zjistily nižší podíl tuku, u špekáčků a párků vyšší podíl sušiny, u všech výrobků nižší obsah bílkovin u českého výrobce. Senzoricky na tom byly oba výrobci podobně, stejně tak i s obsahem soli ve výrobcích.

Klíčová slova: senzorická analýza, chemické složení, párky, šunkový salám, Junior, špekáčky

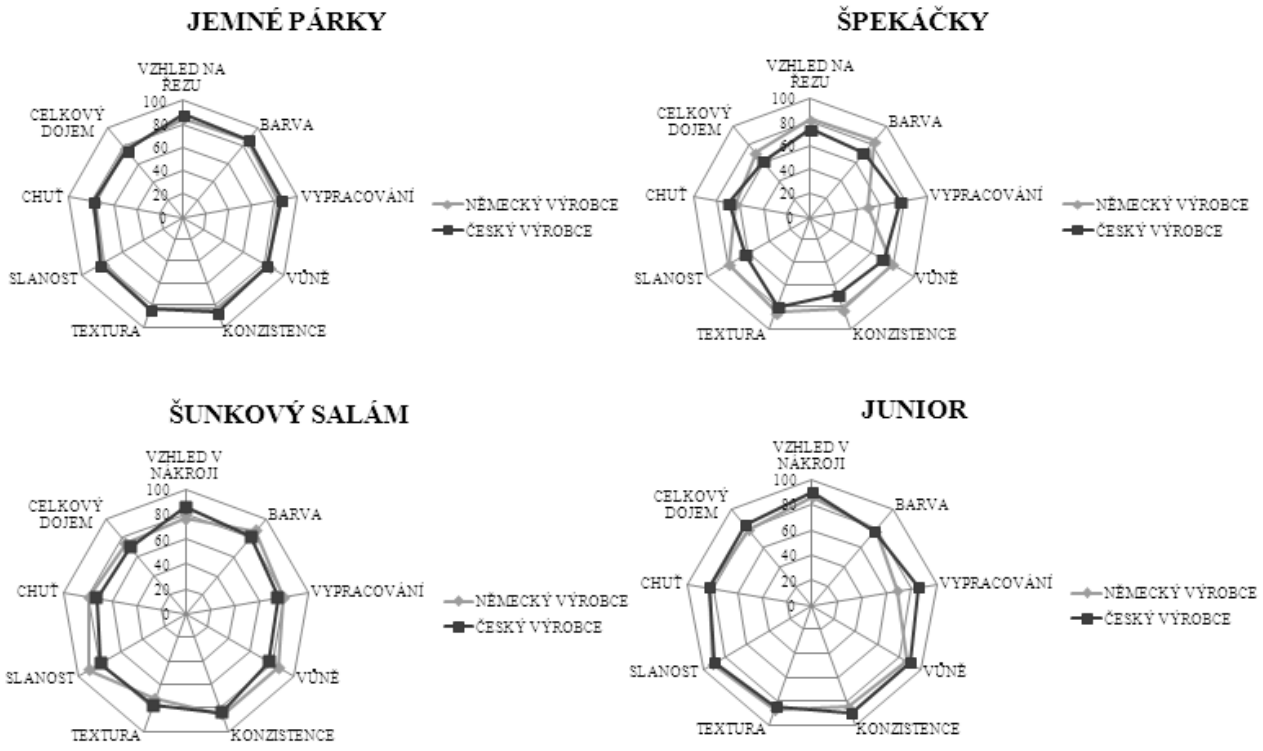
Úvod
Masné výrobky jsou chuťově a celkově senzoricky velice oblíbené pro konzumenty a to jak v České Republice, tak i okolních zemích. Celková kvalita potravin s ohledem na požadavky a přání konzumentů je určována senzorickými vlastnostmi, chemickým složením, fyzikálními vlastnostmi, dobou trvanlivosti, balením a značením (Molnár, 1995; Costell, 2002).
Salám Junior je typickým příkladem jemně mělněného masného výrobku, jehož dílo tvoří výlučně spojka. Při výrobě jemně mělněného díla je hlavním cílem emulgovat tuk a vázat – imobilizovat – přidanou vodu aktivací svalových bílkovin. Vyhláška č. 326/2001 Sb. ve znění pozdějších předpisů povoluje pro salám Junior použití vepřového, hovězího nebo telecího masa, nepřipouští se strojně oddělené maso. Podíl masa ve výrobku je minimálně 40 %, obsah tuku max. 35 %.
Národní legislativa (Vyhláška č.326/2001 Sb.) připouští pro šunkový salám minimálně 55 % masa, obsah tuku max. 20 %. Pro výrobu lze použít jen vepřové a hovězí maso, zakazuje se přídavek strojně odděleného masa.
K výrobě špekáčků lze použít hovězí a/nebo vepřové a/nebo telecí maso, nepřipouští se přídavek strojně odděleného masa. Produkt musí obsahovat nejméně 40 % masa a maximálně 45 % tuku.
Jemné párky patří také do skupiny tepelně opracovaných masných výrobků, k jejichž výrobě lze použít vepřové a/nebo hovězí maso. V receptuře se nepřipouští strojně oddělené maso, výrobek musí obsahovat nejméně 50 % masa a maximálně 35 % tuku (Vyhláška č.326/2001 Sb.).
Cílem práce bylo hodnocení čtyř druhů masných výrobků (salám Junior, jemné párky, špekáčky, šunkový salám) od českého výrobce a čtyř druhů podobných masných výrobků od německého výrobce.

Materiál a metodika
Od českého výrobce byly odebírány čtyři druhy masných výrobků (šunkový salám, špekáčky, jemné párky a salám Junior). Dále byly odebírány výrobky od německého výrobce, pro názornost jsou názvy německých výrobků v českém jazyce, výrobky byly vybírány, tak aby byly podobné

českým výrobkům.. Celkem bylo provedeno od každého výrobce 5 odběrů, tak aby pokrývaly různé výrobní šarže. Každý vzorek byl podroben chemické a senzorické analýze.
Senzorického hodnocení se účastnili proškolení zaměstnanci a studenti (10) Ústavu hygieny a technologie masa, VFU Brno. Hodnocení probíhala v senzorické laboratoři na Ústavu hygieny a technologie masa, která odpovídá požadavkům normy ČSN ISO 8589. Pro hodnocení masných výrobků byly využity nestrukturované grafické stupnice o délce 100 mm se slovním popisem na obou koncích. Levý okraj stupnice označoval plně vyhovující stav parametru (100), pravý okraj stupnice zcela nevyhovující stav parametru (0). Hodnocenými parametry byly: vzhled v nákroji, barva, vypracování, vůně, konzistence, textura, slanost, chuť a celkový dojem.
Chemické analýzy byly provedeny na Ústavu hygieny a technologie masa, vzorky byly odebrány z každého kusu výrobku (cca 150 g) a homogenizovány.
Obsah tuku byl stanoven na přístroji SOXTEC. Jako extrakční činidlo byl použit diethylether. Pro stanovení obsahu sušiny byla použita metoda sušení (ČSN ISO 57 6021) při teplotě 103 ± 2 °C po dobu 24 hodin. Obsah kolagenu byl stanoven spektrofotometricky při vlnové délce 550 nm na spektrofotometru GENESYS^{TM} 6 (Thermo Electron Corporation, USA) jako množství 4 – hydroxyprolinu. Obsah hydroxyprolinu byl získán z kalibrační křivky a přepočten na obsah kolagenu. Obsah čistých svalových bílkovin byl spočten jako rozdíl v obsahu čistých bílkovin a kolagenu. Čisté bílkoviny byly stanoveny po vysrážení nebílkovinných N-látek horkým taninem a následném převodu organického dusíku na anorganický dusík na přístroji KJEHLTEC metodou podle Kjeldahla. Pro přepočet obsahu dusíku na obsah bílkovin byl použit faktor 6,25. Pro stanovení obsahu soli byla použita argentometrická titrace (činidlo K_2CrO_4 a titrováno $AgNO_3$).

Výsledky a diskuse

Výsledky senzorického hodnocení jsou uvedeny na obrázku č. 1. Pro porovnání byly použity průměrné hodnoty z pěti hodnocení (hodnoceno 5 šarží každého výrobku). Výsledky senzorického hodnocení ukazují, že při hodnocení jemných párků nebyly senzorickými hodnotiteli zaznamenány rozdíly mezi výrobci.



Obrázek č. 1: Výsledky senzorického hodnocení masných výrobků

Největší rozdíly byly zjištěny při hodnocení špekáčků, špekáčky německého výrobce byly hodnoceny lépe téměř ve všech parametrech. Výjimku tvoří parametr vypracování, u německého výrobce nebyla tuková vložka se zrněním, tak jak tomu bylo u českého výrobce. Popisy jednotlivých senzorických parametrů vycházely z Vyhlášky č. 326/2001 Sb. ve znění pozdějších předpisů. U salámu Junior a šunkového salámu německý výrobce použil hořčičné semínko.
V tabulce č. 1 a 2 jsou uvedeny výsledky chemických analýz masných výrobků od českého a výsledky podobných masných výrobků od německého výrobce.

Tabulka č. 1: Výrobky českého výrobce

Výrobek	Odběr	Sušina [%]	Tuk [%]	NaCl [%]	Kolagen [%]	ČSB [%]
Jemné párky	1	39,70 ± 0,02	21,84 ± 0,90	2,40 ± 0,00	2,68 ± 0,01	9,05 ± 0,65
	2	40,74 ± 0,05	22,01 ± 0,44	2,54 ± 0,00	2,56 ± 0,07	9,38 ± 0,24
	3	40,42 ± 0,00	22,42 ± 0,07	2,28 ± 0,01	2,48 ± 0,07	8,73 ± 0,91
	4	41,20 ± 0,01	23,69 ± 0,05	2,34 ± 0,08	2,77 ± 0,14	7,94 ± 0,29
	5	40,21 ± 0,27	21,88 ± 0,24	2,52 ± 0,00	2,81 ± 0,02	8,84 ± 0,36
	Průměr	**40,45 ± 0,52**	**22,37 ± 0,83**	**2,42 ± 0,11**	**2,66 ± 0,15**	**8,64 ± 0,56**
Špekáčky	1	42,42 ± 0,44	26,71 ± 0,08	2,77 ± 0,10	1,91 ± 0,01	6,58 ± 0,54
	2	41,69 ± 0,63	24,78 ± 0,70	2,69 ± 0,02	2,02 ± 0,02	6,77 ± 0,87
	3	44,55 ± 0,39	29,32 ± 2,38	2,61 ± 0,05	1,76 ± 0,07	5,89 ± 0,36
	4	45,49 ± 0,58	32,79 ± 1,77	2,46 ± 0,01	2,23 ± 0,04	5,39 ± 1,02
	5	44,41 ± 0,28	27,45 ± 0,15	2,62 ± 0,02	1,94 ± 0,01	7,10 ± 0,45
	Průměr	**43,71 ± 1,50**	**28,21 ± 3,04**	**2,63 ± 0,11**	**1,97 ± 0,16**	**6,47 ± 0,68**
Šunkový salám	1	27,25 ± 0,23	9,15 ± 0,09	2,23 ± 0,04	1,38 ± 0,01	9,55 ± 0,59
	2	26,08 ± 0,09	7,53 ± 0,04	2,19 ± 0,05	1,22 ± 0,09	8,56 ± 0,63
	3	26,65 ± 0,13	8,53 ± 0,24	2,17 ± 0,01	1,32 ± 0,03	8,49 ± 1,15
	4	26,75 ± 0,10	8,27 ± 0,06	2,07 ± 0,09	1,24 ± 0,06	8,39 ± 0,96
	5	28,76 ± 0,23	9,92 ± 1,33	2,21 ± 0,02	1,36 ± 0,04	9,49 ± 0,15
	Průměr	**27,10 ± 0,93**	**8,56 ± 1,02**	**2,17 ± 007**	**1,30 ± 0,08**	**8,90 ± 0,51**
Junior	1	34,43 ± 0,07	12,54 ± 0,04	2,16 ± 0,06	1,74 ± 0,04	9,27 ± 0,41
	2	34,28 ± 0,04	11,55 ± 0,01	2,07 ± 0,05	1,46 ± 0,03	9,09 ± 0,33
	3	35,18 ± 0,02	13,25 ± 0,89	2,29 ± 0,01	1,70 ± 0,01	10,20 ± 0,64
	4	34,68 ± 0,20	12,50 ± 0,13	2,15 ± 0,04	1,72 ± 0,08	9,96 ± 0,63
	5	32,44 ± 0,03	10,26 ± 0,01	2,31 ± 0,03	1,77 ± 0,07	9,46 ± 0,87
	Průměr	**34,20 ± 0,94**	**12,02 ± 1,14**	**2,19 ± 0,10**	**1,68 ± 0,13**	**9,60 ± 0,42**

ČSB – obsah čistých svalových bílkovin

Při porovnání výrobků od českého a německého výrobce jsme zjistily vyšší podíl sušiny u párků a špekáčků od českého výrobce, obsah sušiny u salámů Junior je srovnatelný a u šunkového salámu je obsah sušiny nižší u českého výrobce. Podíl vody je podle Pavlíka et al. (2013a) u šunkového salámu v rozmezí 63 – 77,9 %.
Obsah tuku je u špekáčků od českého výrobce vyšší (absence tukové vložky u německého výrobce), u salámu Junior a šunkového salámu je obsah tuku nižší u českého výrobce. Obsah tuku u špekáčků českých výrobků se podle Pavlíka et al. (2013b) pohybuje v rozmezí 28,2 – 34,2 %. Všechny výrobky jak českého, tak i německého výrobce splňují požadavky platné české legislativy pro obsah tuku v masných výrobcích. Obsah soli je u všech výrobků od německého výrobce nižší.
Při hodnocení obsahu čistých svalových bílkovin (ČSB) byly zjištěny vyšší obsahy u výrobků od německého výrobce. Šunkový salám německého výrobce by dokonce splňoval české legislativní požadavky pro šunku výběrovou – 13 % (Vyhláška č.326/2001 Sb.). Pavlík et al. (2013a) uvádí obsah čistých svalových bílkovin u šunkových salámů od českých výrobců v rozmezí 8,4 – 14,5 %.

Tabulka č. 2: Výrobky německého výrobce

Výrobek	Odběr	Sušina [%]	Tuk [%]	NaCl [%]	Kolagen [%]	ČSB [%]
„Jemné párky“	1	35,76 ± 0,01	21,57 ± 0,03	2,13 ± 0,08	1,47 ± 0,02	9,26 ± 0,21
	2	34,73 ± 0,13	19,93 ± 0,68	2,00 ± 0,03	1,49 ± 0,01	9,78 ± 0,34
	3	38,66 ± 0,21	24,65 ± 0,18	2,11 ± 0,01	1,98 ± 0.09	9,22 ± 0,29
	4	37,65 ± 0,23	24,01 ± 1,75	1,62 ± 0,01	2,05 ± 0,05	9,65 ± 0,28
	5	38,05 ±0,28	22,61 ± 0,34	1,49 ± 0,01	1,94 ± 0,22	9,61 ± 0,41
	Průměr	**36,97 ± 1,48**	**22,55 ± 1,69**	**1,87 ± 0,26**	**1,79 ± 0,25**	**9,50 ± 0,27**
„Špekáčky“	1	33,91 ± 0.09	20,66 ± 0,63	1,98 ± 0,01	1,66 ± 0,02	9,44 ± 0,12
	2	36,70 ± 0,07	23,19 ± 0,23	2,01 ± 0,01	1,52 ± 0,01	8,45 ± 0,05
	3	33,96 ± 0,50	18,98 ± 0,36	2,16 ± 0,01	1,58 ± 0,11	10,52 ± 0,39
	4	36,78 ± 0,34	18,98 ± 0,30	2,06 ± 0,01	1,63 ± 0,06	8,84 ± 0,26
	5	33,89 ± 0,01	20,02 ± 1,18	2,02 ± 0,04	2,03 ± 0,08	8,85 ± 0,04
	Průměr	**35,05 ± 1,38**	**20,36 ± 1,55**	**2,04 ± 0,06**	**1,68 ± 0,18**	**9,22 ± 0,72**
„Šunkový salám“	1	31,62 ± 0,01	11,44 ± 0,03	2,02 ± 0,03	1,16 ± 0,13	13,87 ± 0,21
	2	31,80 ± 0,16	11,24 ± 0,17	2,08 ± 0,03	0,89 ± 0,01	13,80 ± 0,01
	3	32,21 ± 0,27	11,74 ± 0,19	2,12 ± 0,02	1,19 ± 0,01	15,07 ± 0,29
	4	30,40 ± 0,15	10,80 ± 0,63	1,96 ± 0,01	1,07 ± 0,05	13,42 ± 0,22
	5	30,78 ± 0,12	10,81 ± 0,01	2,00 ± 0,01	1,13 ± 0,01	13,47 ± 0,13
	Průměr	**34,36 ± 0,67**	**11,20 ± 0,36**	**2,03 ± 0,06**	**1,09 ± 0,11**	**13,92 ± 0,60**
„Junior„	1	34,89 ±0,11	18,96 ± 0,38	1,85 ± 0,01	1,25 ± 0,05	10,50 ± 0,02
	2	34,40 ± 0,44	19,18 ± 0,13	1,89 ± 0,01	1,08 ± 0,02	10,47 ± 0,02
	3	35,06 ± 0,49	19,82 ± 0,23	1,87 ± 0,05	1,44 ± 0,06	11,54 ±0,22
	4	35,81 ± 0,35	18,79 ± 0,24	1,84 ± 0,03	1,33 ± 0,01	10,52 ± 0,66
	5	35,72 ± 0,10	19,75 ± 0,17	1,88 ± 0,01	1,44 ± 0,10	10,00 ± 0,09
	Průměr	**35,18 ± 0,53**	**19,30 ± 0,42**	**1,86 ±0,02**	**1,31 ±0,14**	**10,61 ±0,50**

ČSB – obsah čistých svalových bílkovin

Poděkování

Příspěvek byl zpracován s podporou institucionálního výzkumu VFU Brno.

Seznam literatury

COSTELL, E. A comparison of sensory methods in quality control. *Food Quality and Preferences*, 2002, vol. 13, no. 6, p. 341-353.

ČSN 57 6021. *Metody zkoušení výrobků z masa a sterilovaných pokrmů v konzervách – stanovení obsahu vody (Referenční metoda)*. Praha : Český normalizační institut 1999.

ČSN ISO 8589 (56 0036). *Senzorická analýza – Obecná směrnice pro uspořádání senzorického pracoviště*. Praha : Český normalizační institut 2005.

MOLNÁR, P. J. A model for overall description of food quality. *Food Quality and Preferences*, 1995, vol. 6, no. 3, p. 341-353.

PAVLÍK et. al. Šunkový salám. *Maso*, 2013a, č. 4., s. 29-33.

PAVLÍK et. al. Špekáčky. *Maso*, 2013b, č. 4., s. 13-18.

Vyhláška č. 326/2001 Sb., kterou se provádí § 18 písm. a), d), g), h), i) a j) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, pro maso, masné výrobky, ryby, ostatní vodní živočichy a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich. *Sbírka zákonů*, 2001, č. 126, s. 7414-7444 ve znění pozdějších předpisů.

P 35

APLIKAČNÉ FORMY STABILIZOVANÝCH POLYFENOLOV HROZNA.

Máriássyová M., Káčerík S., Káčerík P.
GetWell, a.s., Hlavná 561, SK - 951 78 Kolíňany

Úvod

Vinič hroznorodý (*Vitis vinifera L.*) je jedným z prírodných zdrojov antioxidantov. Má vysoký obsah flavonoidov, antokyanínov a polyfenolov (rutín, kvercetín, resveratrol, katechíny, epikatechíny a diméry, triméry a tetraméry prokyanidínov) u ktorých boli potvrdené priaznivé zdravotné účinky (Auger, C. et al. 2004, Chong et al. 2010, Leifert 2008, Spranger et al. 2008, Yi et al. 2005). Biologicky aktívne látky hrozna počas spracovania degradujú, preto bol vyvinutý výrobný postup, pri ktorom sa tieto látky získajú v stabilnej forme.

Cieľom práce bolo overenie technologických vlastností pripravených koncentrátov a možností ich aplikácie vo vybraných potravinárskych komoditách.

Materiál a metódy

Koncentrát stabilizovaných polyfenolov bol pripravený z výliskov tmavých odrôd hrozna (polyfenoly 76,1 $g.kg^{-1}$, antokyány 15,9 $g.kg^{-1}$, pektín 28,3 $g.kg^{-1}$, sušina 90,51%), ako druhotnej suroviny z výroby červeného vína. Úprava zahŕňala alkalické vylúhovanie, neutralizáciu, frakčné delenie, viacnásobné premývanie izopropylalkoholom a rozpustenie vo vodnom roztoku amoniaku, ktorý sa odstránil pri zahusťovaní extraktu na koncentrát s obsahom sušiny najmenej 4 % (Máriássyová et al. 2012). Koncentrát polyfenolov mal nasledovné zloženie - obsah polyfenolov 6,45 $g.l^{-1}$, obsah pektínu 3,82 %, pH 6,5, sušina 8 %.

Antioxidačnú aktivitu sme stanovovali modifikovanou metódou DPPH podľa Brand-Williamsa et al. (1995) a Sánchez-Moreno et al. (1998). Princípom metódy je redukcia stabilného radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH) v metanolickom roztoku v prítomnosti antioxidantov, ktorá sa prejavuje poklesom absorbancie pri 515 nm.
Antioxidačná aktivita je vyjadrená ako % inhibície DPPH radikálu.
% inhibície = $[(A_0 - A_t) / A_0] \times 100$
kde A_0 - absorbancia kontroly v čase t=0 min (roztok DPPH)
A_t - absorbancia v prítomnosti antioxidantu v čase t min.

Obsah polyfenolov sme stanovili spektrofotometricky pri 700 nm po reakcii s Folin-Ciocalteau činidlom (Singleton et al. 1999). Je vyjadrený ako ekvivalent kyseliny galovej ($g.l^{-1}$).

Príprava práškovej formy - ako nosiče boli použité škrob a syloid. Podmienky sušenia: sprayová sušiareň, vstupná teplota sušenia 160°C, výstupná teplota 80°C, prietok 6 až 8 l/ h, pomer nosič : koncentrát 1 : 5.

Testovanie antimiktobiálnej konzervácie podľa Slovenského liekopisu - časť 5.1.3, Bratislava 1997) .

Tepelná stabilita kvapalného koncentrátu zataveného v 10 ml ampulkách bola sledovaná pri teplotách 80, 100 a 120°C v glycerínovom kúpeli. V jednotlivých časových intervaloch sa stanovil obsah polyfenolov a antioxidačná aktivita.

Všetky merania sa uskutočnili trikrát, štatistické hodnotenie údajov sa robilo pomocou programu StatgraphicS 5. Výsledky meraní sú vyjadrené ako priemer a štatistická odchýlka.

Výsledky a diskusia

Sušenie na nosičoch - pripravené koncentráty polyfenolov sa sušili na kavernovanom škrobe a syloide v sprayovej sušiarni. Sušina koncentrátu bola 8 %.

Po sušení mali výstupné produkty sušinu 95 – 97 %, čím sa približne 11-násobne zvýšila koncentrácia účinných látok. Celková antioxidačná aktivita získaných produktov však nebola úmerná zvýšeniu koncentrácie antioxidačne pôsobiacich látok (Tab. 1). Vysoké teploty pri sušení

znížili antioxidačnú aktivitu práškových koncentrátov sušených na syloide o 12%, aktivita koncentrátov sušených na škrobe poklesla o 15%. Po 150 dňoch skladovania bol pokles antioxidačnej aktivity na oboch nosičoch (vyjadrenej ako % inhibície DPPH) 2% oproti aktivite práškových koncentrátov na začiatku skladovania. Na základe uvedených výsledkov je hodnejším nosičom syloid, povolený Potravinovým kódexom SR ako prídavná látka s označením E551, z ktorého sa antioxidačne pôsobiace látky ľahšie extrahovali.

Tab. 1 Charakteristika práškových koncentrátov

nosič			
syloid		škrob	
polyfenoly ($g.l^{-1}$)	DPPH (% inhibície)	polyfenoly ($g.l^{-1}$)	DPPH (% inhibície)
71,33	85,24*	68,65	81,57*

*- riedenie vzorky 200- násobné

Testovaním antimikrobiálnej konzervácie, ktoré robilo akreditované laboratórium Bell Novamann Bratislava sa potvrdili antimikrobiálne vlastnosti pripraveného koncentrátu polyfenolov (Tab. 2).

Koncentrát vyhovuje vo vykonaných skúškach požiadavkám Ph Eur. 5.0 čl.5.1.3. Je vhodný na potlačenie rastu nežiaducej mikroflóry najmä v čerstvých ovocných a zeleninových šťavách. Stabilizovaná višňová šťava aj po 8 dňoch skladovania spĺňala podmienku obchodnej sterility, ktorú definuje Potravinový kódex SR. V nestabilizovanej šťave bol už po 3 dňoch prekročený povolený obsah kvasiniek 2.10^{1} $KTJ.ml^{-1}$, čo sa prejavilo aj pri senzorickom hodnotení chuti (Máriássyová et al. 2014). Na uvedený postup stabilizácie bola podaná patentová prihláška.

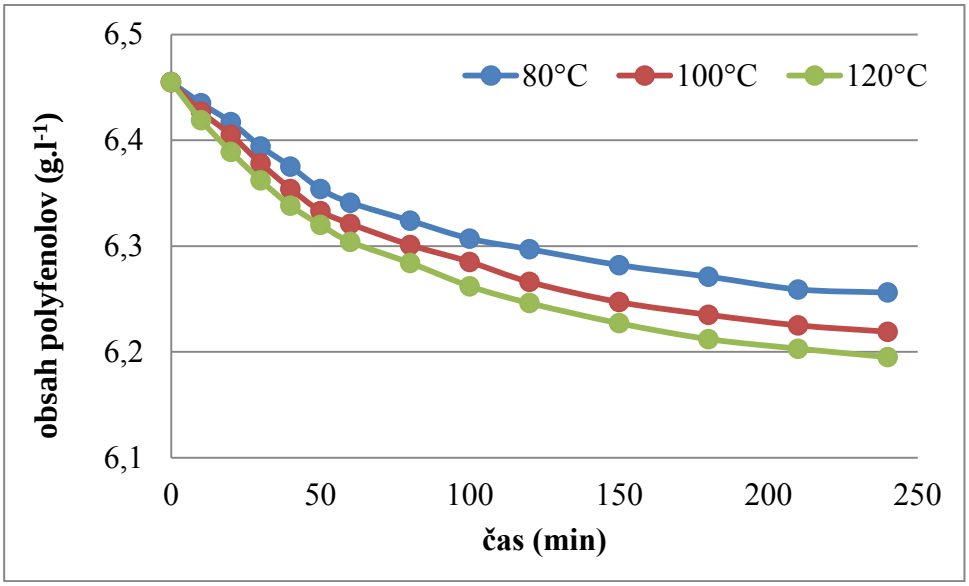
Tab. 2 Testovanie antimikrobiálnej konzervácie

použitý kmeň	1 deň KTJ/0,1 ml	2 deň KTJ/0,1 ml	3 deň KTJ/0,1 ml	8 deň KTJ/0,1 ml	hodnotenie*
Aggregatibacter actinomycetemcomitans CCM 6053	600	0	0	0	vyhovuje
Enterobacter aerogenes CCM 2531	90	14	0	0	vyhovuje
Escherichi coli CCM 3954	400	20	0	0	vyhovuje
Klebsiella pneumoniae subp. Pneumoniae CCM 4415	450	140	20	0	vyhovuje
Streptococcus agalactiae CCM 6187	4	0	0	0	vyhovuje
Streptococcus mutans CCM 7547	7	0	0	0	vyhovuje

KTJ – kolóniu tvoriaca jednotka

* Vyhovuje vo vykonaných skúškach požiadavkám Ph Eur. 5.0 čl.5.1.3 Testovanie antimiktobiálnej konzervácie (Slovenský liekopis, 1997).

Výsledky testovania tepelnej stability kvapalného koncentrátu sú zhrnuté na Obr. 1. Maximálny pokles obsahu polyfenolov bol 4,03±0,11 % pri teplote 120°C. Antioxidačná aktivita meraná metódou eliminácie DPPH radikálu poklesla po 4 hodinách záhrevu pri 80°C o 7,55±0,82 %, pri 100 °C o 8,37±0,95 % a pri 120 °C o 9,21±1,07 %.



Obr. 1 Termostabilita kvapalného koncentrátu polyfenolov

Tieto hodnoty poukazujú na vysokú stabilitu nami pripraveného koncentrátu polyfenolov hrozna v porovnaní s výsledkami iných autorov (Chamorro, S. et al., 2012, Ross et al. 2011), ktorí zistili značný stupeň hydrolýzy jednotlivých skupín polyfenolov pôsobením teploty 100 °C (60 až 85 %).

Záver

Nami vyrobený koncentrát stabilizovaných polyfenolov z výliskov modrých odrôd hrozna je vzhľadom na uvedené technologické a antioxidačné vlastnosti vhodný na zvýšenie biologickej hodnoty najmä tepelne upravovaných potravín napr. kekse, sušienky, chlieb, pasterizované a sterilizované hotové potraviny a pod. Vzhľadom na antimikrobiálne účinky sa môže uplatniť pri výrobe minimálne opracovaných výrobkoch na zvýšenie ich stability.

Poďakovanie

„Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. VMSP-II-0011-09“

Literatúra

Auger, C. et al. Phenolics from commercialized grape extracts prevent early atherosclerotic lesions in hamsters by mechanisms other than antioxidant effect. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2004, **52**, 5297–5302.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activities. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 1995, **28**, 1995, 25-30.

Chamorro, S. et al. Changes in polyphenolic content and antioxidant activity after thermal treatments of grape seed extract and grape pomace. European Food Research and Technology, 2012, 234, 147-155.

Chong, M. F. F., Macdonald, R., Lovegrove, J. A. Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies. In *British Journal of Nutrition*, 2010, **104**, S28–S39.

Leifert, W.R., Abeywardena, M.Y. Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutritional Research*, 2008, **28** (11), 729-737.

Máriássyová, M., Káčerík, S., Káčerík, P. Optimalizácia výroby stabilizovaných polyfenolov. In Zborník z medzinárodnej konferencie XLII. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, Praha, VÚP a VŠCHT, 2012, s.152-155, ISSN - 1802-1433.

Máriássyová, M., Káčerík, S., Káčerík, P. Ovocné a zeleninové šťavy so zvýšenou stabilitou. In Zborník z konferencie s medzinárodnou účasťou Inovácie technológií špeciálnych výrobkov biopotravín pre zdravú výživu ľudí , Nitra, SPU, 2014 (v tlači).

Ross, C. F., Hoye, Jr, C., Fernandez-Plotka, V. C. Influence of Heating on the Polyphenolic Content and Antioxidant Activity of Grape Seed Flour. Journal of Food Science, 2011, 76, C884–C890.

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. Analysis of total polyphenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. *Methods in Enzymology*, 1999, **299**, 152-178.

Slovenský liekopis, 1. Vydanie, Bratislava, Ministerstvo zdravotníctva Slovenskej republiky vo Vydavateľstve HERBA spol. s r. o., 1997, s. 759-762. ISBN: 80-967020-3-3

Spranger, I. et al. 2008. Chemical characterization and antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from grape seeds. Food Chemistry, 2008, **108**, 519–532.

Yi, W.G.; Fischer, J.; Akoh, C.C. Study of anticancer activities of muscadine grape phenolics in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, **53** (22), 8804–8812.

Kontaktná adresa: magda.mariassyova@getwell.sk

P 36

HOMOFERMENTATIVNÍ A HETEROFERMENTATIVNÍ BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ V PEKAŘSKÝCH KVASECH VYROBENÝCH NA BÁZI JEČMENE

Erban V., Eichlerová E., Valenta T., Gabrovská D.
Výzkumný ústav potravinářský Praha, v. v. i.

Abstrakt:
Kvalitu kvasu a chleba ovlivňuje celkové množství bakterií mléčného kvašení (BMK) a poměr mezi heterofermentativními a homofermentativními BMK. Cílem práce bylo sledovat celkové množství bakterií mléčného kvašení (BMK) a procentický poměr heterofermentativních a homofermentativních BMK v typech kvasů vyrobených na bázi ječmene během doby jejich skladování při teplotě 5 °C. Výsledky ukazují, že se vzrůstající dobou skladování se snižuje celkový počet BMK, ale zvyšuje se procentické množství heterofermentativních BMK vůči homofermentativním BMK.
Klíčová slova: kvasy na bázi ječmene, bakterie mléčného kvašení, homofermentativní a heterofermentativní bakterie mléčného kvašení

Úvod

Chuť, vůni a další vlastnosti kvasového chleba vytváří kulturní mikroflóra pocházející z mouky. Jde o dvě skupiny: bakterie mléčného kvašení a kvasinky. Kvasinky jsou nositeli hlavně kypřícího plynu CO2. BMK vyvolávají kvašení homofermentativní nebo heterofermentativní. Homofermentativní BMK využívají glykolýzu pro fermentaci hexos dle Emden-Meyerhofovy cesty. Tato cesta je charakterizována vznikem meziproduktu fruktoso1,6-difosfátu. Vzniká primárně kyselina mléčná. Heterofermentativní BMK využívají jinou cestu pro fermentaci hexos. Za anaerobních podmínek vzniká z hexos ekvimolární množství kyseliny mléčné, etanolu a CO_2.[1,3]

Cílem práce bylo sledovat celkové množství bakterií mléčného kvašení (BMK) a procentický poměr heterofermentativních a homofermentativních BMK v různých typech kvasů vyrobených na bázi ječmene během doby jejich skladování při teplotě 5 °C.

Materiál a metody

Mouky: celozrnná, připravená ze zrna nové bezpluché linie ječmene jarního KM 2084 (označ. b) se zvýšeným obsahem beta-glukanů a zrna pluchaté sladovnické odrůdy ječmene jarního Annabell (označ. a).

Použité typy kvasů: vlastní sbírka 1a, 8a, 11a, 1b, 8b, 11b.

Příprava kvasu: střídání 13,3 g předchozího kvasu a 33,3 g mouky a 50 ml vody, kultivace 17 hod při 20 °C a 13,3 g předchozího kvasu a 33,3 g mouky a 40 ml vody kultivace 5 hod při 30 °C.

Příprava drobenky: drobenka je kvas zahuštěný moukou určený k uchovávání.

K poslední 8. pasáži kvasu (20 °C 17 hod) se přidá mouka v poměru 1:1 a skladuje se do 5 °C. V časových intervalech se obnovuje pasážováním jako kvas.

Stanovení celkového počtu BMK: dle ČSN ISO 13721 - Stanovení počtu bakterií mléčného kvašení. Výsledky jsou udávány v KTJ/g drobenky.

Stanovení heterofermentativních a homofermentativních BMK: Typy drobenek 1a, 8a, 11a, 1b, 8b, 11b byly vyočkovány na diferenční agarové medium pro homofermentativní a heterofermentativní bakterie (HHD) o složení: fruktóza 2,5 g/l, trypton 10,0 g/l, kvasničný extrakt 1,0 g/l, kaseinový hydrolyzát 3,0 g/l, sójový pepton 1,5 g/l, KH2PO4 2,5 g/l, Tween 80 1,0 g/l, bromkrezolová zeleň 20 ml/l, pH média 7,0 2,3.

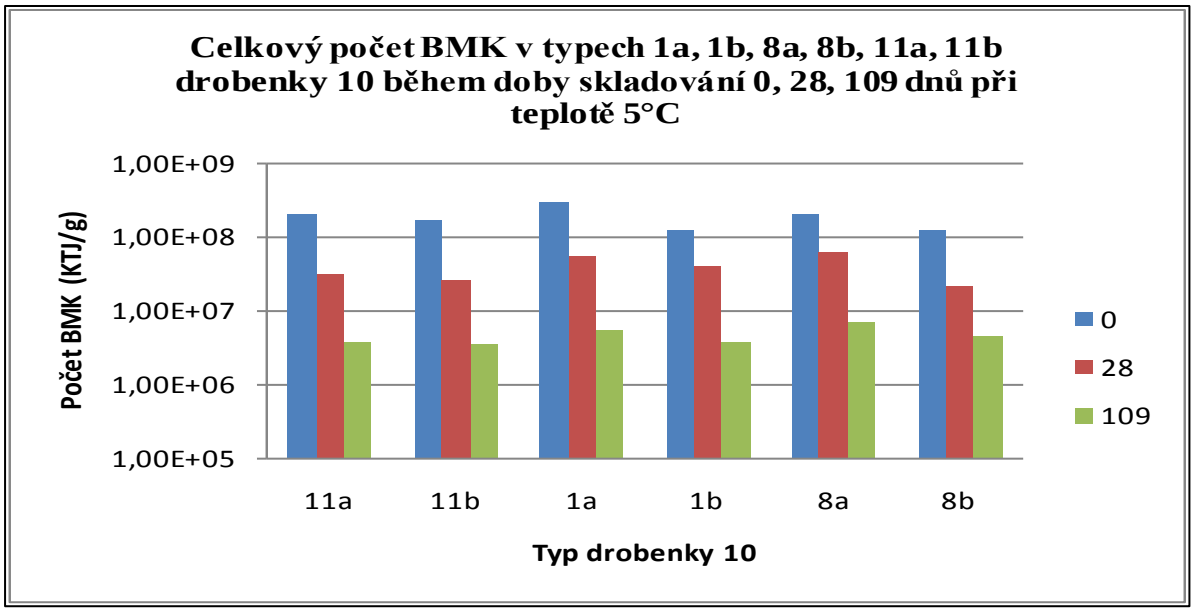
Bakterie byly kultivovány v anaerobním prostředí při teplotě 30°C po dobu 3-5 dnů. Homofermentativní kolonie jsou na tomto médiu zbarveny modře, heterofermentativní bakterie jsou na tomto médiu zbarveny bíle (obr. 1)[2,3]. Pro homofermentativní bakterie byl zvolen kontrolní kmen

CCDM 106 *Enterococcus faecium (obr. 2)*, pro heterofermentativní bakterie kmen FloraPan L-62 *Lactobacillus brevis (obr. 3)*. Výsledky jsou udávány v %.

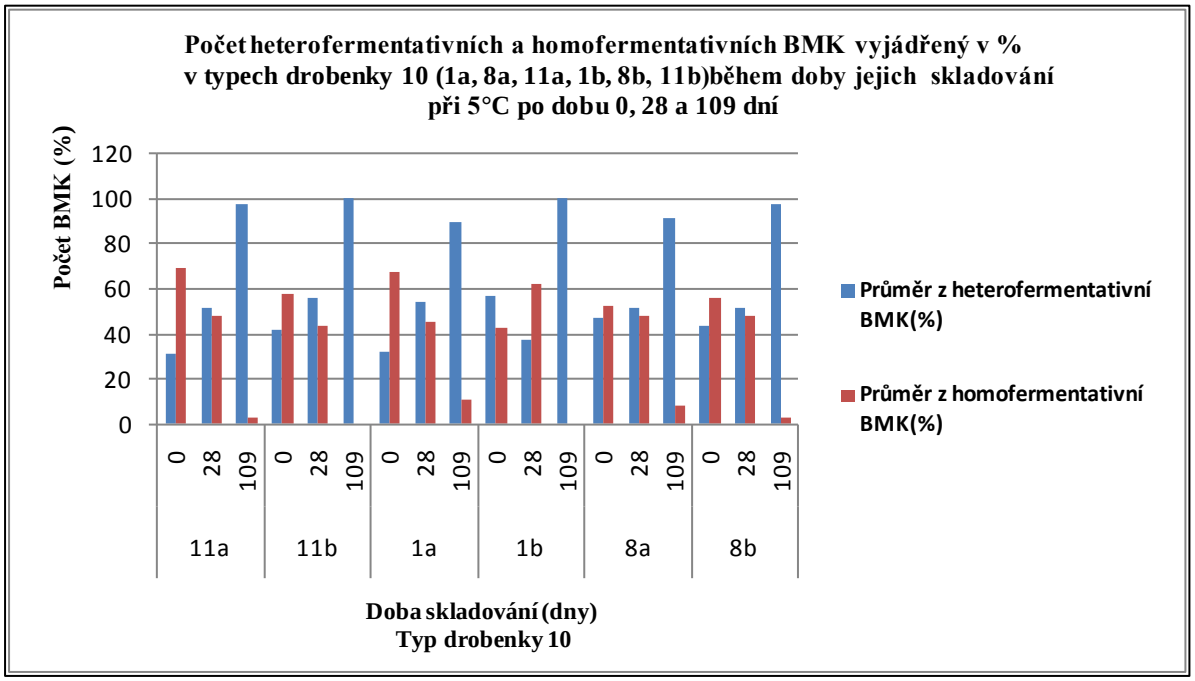
Výsledky a diskuse

Stanovení celkového počtu BMK v drobence 10, typech 1a, 8a, 11a, 1b, 8b, 11b, během doby skladování 109 dnů, prokázalo snižující se celkový počet těchto mikroorganismů o cca 2 řády (viz graf č. 1). Mění se i poměr mezi heterofermentativními a homo-fermentativními BMK. Ve všech typech drobenky 10, se vzrůstající dobou skladování, vzrůstá počet heterofermentativních BMK vůči homofermentativním BMK a po 109 dnech skladování při 5 °C se počet heterofermentativních BMK blíží 100 % (viz graf č. 2).

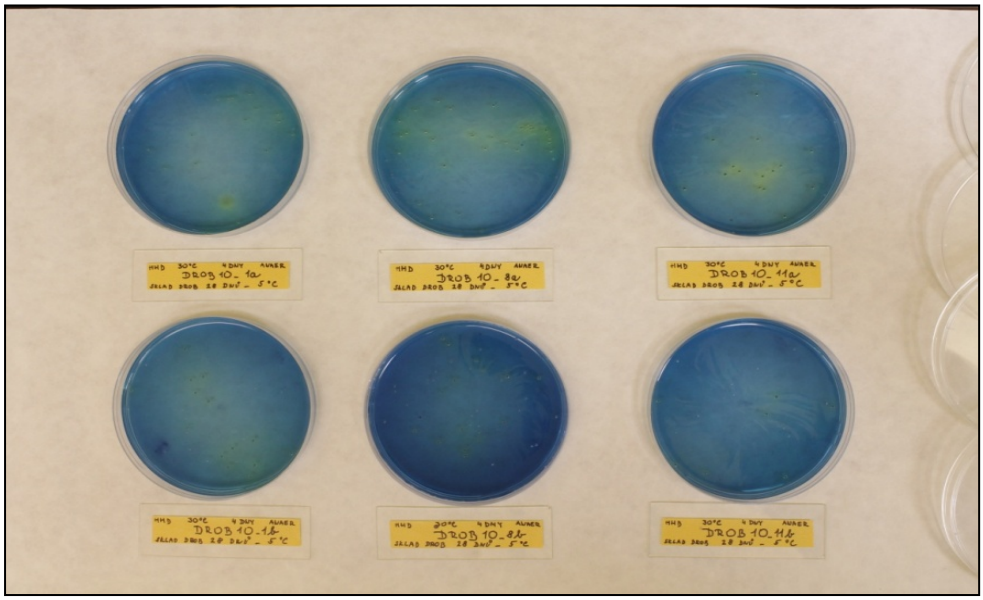
Graf č.1



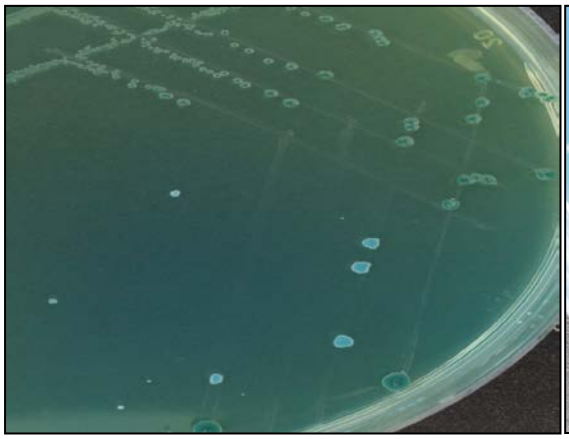
Graf č. 2



Obr.1 Drobenka 10-typ 1a,8a,11a,1b,8b,11b-heterofermentativní a homofermentativní BMK



Obr2.kontrola-homoferment.CCDM 106 *Enterococcus* faecium



Obr.3kontrola-heterofermentativní *FloraPan L-62 Lactobacillus brevis*

Závěr

Během doby skladování drobenek vyrobených na bázi ječmene se snižuje celkový počet BMK a mění se poměr mezi homofermentativními BMK a heterofermentativními BMK ve prospěch heterofermentativních BMK. Tyto procesy by měly být brány v úvahu při stanovování doby trvanlivosti komerčních kvasů pro zajištění kvality, zejména senzorických vlastností následně vyrobených chlebů.

Dedikace

Práce byla podpořena Národní agenturou pro zemědělský výzkum MZe QJ1210257.

Literatura

[1].Wisselinka H.W., Weusthuis R.A., G. Egginka R.A., Hugenholtza J., Grobbena G.J.,: Mannitol production by lactic acid bacteria: a review: International Dairy Journal 12 (2002) 151–161

[2].McDonald L.C., McFeeters R. F, Daeschel M. A., Fleming H. P.:A Differential Medium for the Enumeration of Homofermentativeand Heterofermentative Lactic Acid Bacteria: Applied and Environmental Microbiology, June 1987, p. 1382-1384

[3].Zfifiiga M., Pardo I. and Ferrer S.: An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bakteria: . International Journal of Food Microbiology, 18 (1993) 37-42

[4] Erban V., Eichlerová E, Valenta T., Rysová J.,Vaculová K., Gabrovská D.(2013): Pekařské kvasy na bázi ječmene a jejich stabilita , Úroda 12, vědecká příloha, s.384-387,ISSN 0139-6013

Kontaktní adresa : RNDr. Vladimír Erban, CSc., VÚPP,v.v.i.
Radiová 7, 10231 Praha 10, v.erban@vupp.cz

Sborník příspěvků
XLIV. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin

Vydala: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Technická 5, 166 28 Praha 6
Editoři: Karel Cejpek, Jindřich Špicner
Rok vydání: 2014
Počet stran: 252

Elektronická verze publikace ve formátu PDF.