

Stanovení vybraných antioxidantů a antioxidační aktivity u směsí müsli s jedlými květy

Ondroušková Kristýna

Bakalářská práce
2018

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav analýzy a chemie potravin
akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kristýna Ondroušková**
Osobní číslo: **T14266**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie a řízení v gastronomii**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Stanovení vybraných antioxidantů a antioxidační aktivity u směsi mšlí s jedlými květy**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Stručně charakterizovat použité obiloviny a jedlé květy z hlediska jejich chemického složení a stability polyfenolických biologicky aktivních látek, které obsahují.
2. Stručně shrnout principy metod použitých v experimentální části.

II. Praktická část

1. Připravit cereální směsi s jedlými květy dle zadané surovinové skladby.
2. Vyextrahovat polyfenolické látky z matrice vzorků.
3. Stanovit celkový obsah polyfenolických látek metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem, stanovit antioxidační aktivitu metodami ABTS a DPPH, stanovit jednotlivé polyfenolické kyseliny pomocí HPLC.
4. Diskutovat získané výsledky a formulovat závěry práce.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

- [1]INOIPA, T., SRIJARANAI, S., TUNTULANI, T., NGEONTAE, W., New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. Food Research International. 2011, 44, 798 806
- [2] TUCKER, G., L. CARRIER, J. SIMCOX, H. MARSON, P. SWATSITANG, A. SALTER a D. GRAY. Cereals as a source of dietary antioxidants. Using Cereal Science and Technology for the Benefit of Consumers. Elsevier, 2005, s. 102 . DOI: 10.1533/9781845690632.4.102. ISBN 9781845694791.
- [3] SHAHIDI, Fereidoon a Priyatharini AMBIGAIPALAN. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects A review. Journal of Functional Foods. 2015, 18, 820–897 DOI: 10.1016/j.jff.2015.06.018. ISSN 17564646.
- [4] MASISI, Kabo, Trust BETA a Mohammed H. MOGHADASIAN. Antioxidant properties of diverse cereal grains: A review on in vitro and in vivo studies. Food Chemistry .2016, 196, 9097 DOI:10.1016/j.foodchem.2015.09.021. ISSN 03088146.
- [5] BENVENUTI, Stefano, Elisa BORTOLOTTI a Rita MAGGINI. Antioxidant power, anthocyanin content and organoleptic performance of edible flowers. Scientia Horticulturae .2016, 199, 170–1777. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.12.052. ISSN 03044238.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Daniela Sumczynski, Ph.D.**

Ústav analýzy a chemie potravin

Datum zadání bakalářské práce: **2. února 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. května 2018**

Ve Zlíně dne 2. února 2018


doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan




doc. Ing. Jiří Mlček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: DANDROŇKOVÁ KRISTÝNA

Obor: TRŽ

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 20.3.2018

.....


¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací;

(1) Vysoká škola neviditelně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlédnutí veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3;

ABSTRAKT

Práce se zabývá přípravou modelových cereálních směsí s přidavkem jedlých květů s využitím netradičních vloček. Cílem práce bylo stanovit u těchto směsí vybrané chemické jakostní znaky. Byly vypracovány extrakční postupy pro izolaci volných, konjugovaných a vázaných polyfenolů s jejich následnou identifikací a kvantifikací pomocí HPLC-UV. Dále bylo u těchto frakcí stanoveno celkové množství polyfenolů a antioxidační aktivita metodami s ABTS a DPPH. Nejvyšší množství polyfenolů bylo naměřeno u bezlepkové směsi, která obsahovala jáhly, vločky černé quinoi, z olejnatých semen konopná semínka a jedlé květy chrpy červené a květy slézu. Nejnižší množství polyfenolů obsahoval vzorek, v němž byly obsaženy ovesné vločky, vločky kamutu, konopná semínka a jedlé květy chrpy a slézu.

Klíčová slova: netradiční cereálie, müsli, jedlé květy, polyfenoly, antioxidační aktivita

ABSTRACT

The thesis deals with the preparation of model cereal mixtures with the addition of edible flowers and with the use of non-traditional flakes. The aim of the work was to determine selected chemical parameters in these mixtures. Extraction procedures were developed for the isolation of free, conjugated and bound polyphenols with their subsequent identification and quantification by HPLC-UV. In addition, the total amount of polyphenols and antioxidant activity using ABTS and DPPH were determined in these fractions. The highest amounts of polyphenols were founded in a gluten-free mixture containing millet, quinoa black flakes, hemp seeds and edible red cornflower and mallow flowers. The lowest amount of polyphenols contained a sample containing oat flakes, kamut flakes, hemp seeds, and edible cornflower and mallow flowers.

Keywords: non-traditional cereals, muesli, edible flowers, polyphenols, antioxidant activity

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce doc. Ing. et Bc. Daniele Sumczynski, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a cenné rady, které mi poskytovala v průběhu vypracování mé bakalářské práce. Poděkování také patří Ing. Lence Fojtíkové za pomoc při analytických stanovení v laboratořích. Ráda bych také poděkovala svojí rodině, zejména rodičům, kteří mě morálně i finančně podporovali během celého studia.

Práce byla podpořena grantem UTB ve Zlíně IGA/FT/2018/006.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 OBILOVINY POUŽÍVANÉ PRO VÝROBU VLOČEK	11
1.1 STAVBA OBILNÉHO ZRNA	11
1.2 BÍLKOVINY A AMINOKYSELINY	12
1.3 SACHARIDY	13
1.3.1 Monosacharidy a oligosacharidy.....	13
1.3.2 Polysacharidy	13
1.4 LIPIDY	13
1.5 VITAMÍNY A MINERÁLNÍ LÁTKY	14
1.6 POLYFENOLICKÉ LÁTKY	14
1.6.1 Fenolové kyseliny	14
1.6.2 Flavonoidy.....	15
2 JEDLÉ KVĚTY	16
2.1 ZÁKLADNÍ PŘEHLED JEDLÝCH KVĚTŮ.....	17
2.2 BÍLKOVINY A AMINOKYSELINY	17
2.3 SACHARIDY	17
2.4 LIPIDY	18
2.5 VITAMÍNY A MINERÁLNÍ LÁTKY	18
2.6 POLYFENOLICKÉ SLOUČENINY.....	18
2.6.1 Fenolické kyseliny	18
2.6.2 Flavonoidy.....	18
3 OSTATNÍ SUROVINOVÉ KOMPONENTY POUŽÍVANÉ DO MÜSLISMĚSÍ	19
3.1 OŘECHY A OLEJNATÁ SEMENA	19
3.2 OVOCE	19
4 PRINCIPY METOD POUŽÍVANÉ V EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI	20
4.1 SPEKTROFOTOMETRIE	CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.
4.2 STANOVENÍ POLYFENOLŮ FOLIN-CIOCALTEUOVOU METODOU.....	20
4.2.1 Stanovení antioxidační aktivity.....	21
4.3 METODA S DPPH	21
4.4 METODA S ABTS	21
4.5 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE	21
II PRAKTICKÁ ČÁST	23
5 CÍL PRÁCE	24
6 METODIKA PRÁCE	25
6.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A POMŮCKY	25
6.1.1 Chemikálie	25

6.2	ZAŘÍZENÍ.....	25
	OBRÁZEK 3- KAPALINOVÝ CHROMATOGRAF.....	26
6.3	PŘÍPRAVA CEREÁLNÍCH SMĚSÍ S JEDLÝMI KVĚTY	26
6.3.1	Příprava vloček.....	26
6.3.2	Příprava cereálních müsli směsí.....	27
6.4	EXTRAKCE POLYFENOLICKÝCH FRAKČÍ.....	31
6.4.1	Extrakce volných frakcí polyfenolů	31
6.4.2	Extrakce konjugovaných frakcí polyfenolů	31
6.4.3	Extrakce vázaných frakcí polyfenolů.....	31
6.5	STANOVENÍ CELKOVÉHO MNOŽSTVÍ POLYFENOLŮ FOLIN-CIOCALTEUOVOU METODOU	32
6.5.1	Kalibrační křivka pro stanovení celkového množství polyfenolů.....	32
6.6	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU S DPPH	33
6.6.1	Příprava zásobního a pracovního roztoku	33
6.6.2	Měření antioxidační aktivity metodou s DPPH	33
6.6.3	Kalibrační křivka pro stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH.....	33
6.7	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU S ABTS	34
6.7.1	Příprava radikálu ABTS	34
6.7.2	Příprava reakční směsi	34
6.7.3	Měření antioxidační aktivity vzorků metodou s ABTS	34
6.7.4	Kalibrační křivka pro stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS.....	34
6.8	STANOVENÍ PROFILU JEDNOTLIVÝCH POLYFENOLŮ METODOU HPLC	35
6.8.1	Sestavení kalibračních křivek pro jednotlivé polyfenoly.....	35
7	VÝSLEDKY DISKUZE.....	36
7.1	VÝSLEDKY STANOVENÍ CELKOVÉHO MNOŽSTVÍ POLYFENOLŮ FOLIN- CIOCALTEUOVOU METODOU.....	36
7.1.1	Kalibrační křivka pro stanovení obsahu polyfenolů	37
7.1.2	Kalibrační křivka pro stanovení antioxidační aktivity s DPPH	40
7.2	VÝSLEDKY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY S ABTS.....	40
7.2.1	Výsledky stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS u směsí müsli.....	41
7.2.2	Kalibrační křivka pro stanovení antioxidační aktivity metodou s ABTS.....	42
7.3	VÝSLEDKY STANOVENÍ POLYFENOLICKÉHO PROFILU POMOCÍ HPLC	43
7.3.1	Kalibrační křivky pro stanovení polyfenolického profilu metodu HPLC.....	52
	ZÁVĚR	53
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	54
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	59
	SEZNAM OBRÁZKŮ	60
	OBRÁZEK 3- KAPALINOVÝ CHROMATOGRAF.....	60
	SEZNAM TABULEK.....	61
	SEZNAM PŘÍLOH.....	63

ÚVOD

V současné době se klade velký důraz na nutriční hodnotu potravin. Díky velké rozmanitosti a poměrně lehké dostupnosti sortimentu se začaly využívat i netradiční nebo méně tradiční suroviny, které nutriční hodnotu potravin mohou zvýšit. Jedná se hlavně o zařazení obilovin, které vykazují antioxidační aktivitu nebo mají snížený glykemický index. Další možností je cereální směsi obohatit dalšími složkami jako například ovocem, které jsou zdrojem především jednoduchých sacharidů, olejnatými semeny, ořechy nebo například jedlými květy, které jsou součástí lidské výživy od pradávna. Jedlé květy kromě toho, že zvyšují estetický vzhled pokrmů, obohacují pokrmy o zdraví prospěšné látky, například antioxidanty. V posledních letech, s nárůstem počtu lidí trpících celiakií, jsou čím dál více vyžadovány obiloviny, které neobsahují lepek.

Cílem této práce je připravit modelové müsli směsi, které budou obsahovat optimální poměr tradičních i méně tradičních obilovin, jedlých květů a dalších příměsí a připravit cereální směsi v lepkové i bezlepkové podobě. U těchto pak následně stanovit vybrané jakostní znaky.

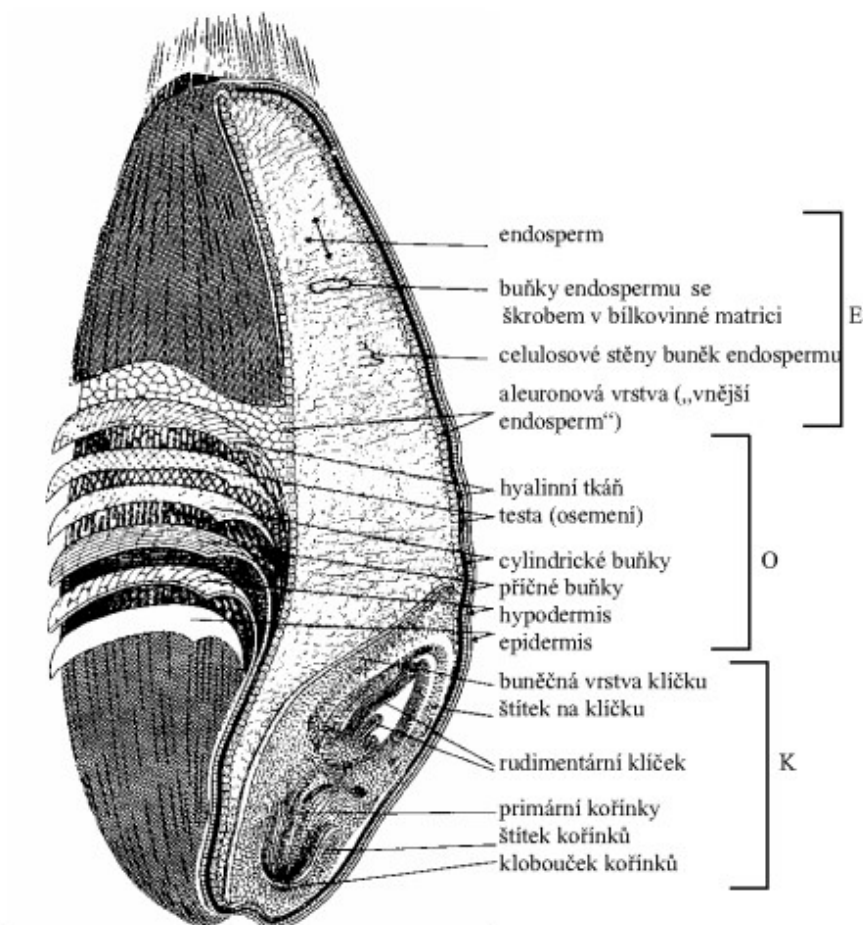
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 OBILOVINY POUŽÍVANÉ PRO VÝROBU VLOČEK

Většina obilovin patří do čeledi lipnicovité (*Poaceae*), ale např. pohanka patří do čeledi rdesnovité (*Polygonaceae*). Obilovinou můžeme označit plod rostliny obilniny. Obiloviny s vyšší nutriční hodnotou nazýváme pseudoobiloviny. Příkladem pseudoobiloviny je například pohanka a quinoa, které jsou dobrým zdrojem niacinu a riboflavinu. Obiloviny čeledi lipnicovité mají díky stejnému botanickému původu podobné chemické složení a uspořádání obalových a podobalových vrstev zrna. Dále se podobají v zastoupení mastných kyselin a jednotlivých aminokyselin. Pro výrobu vloček se používají celá obilná zrna, někdy i s klíčkem [1].

1.1 Stavba obilného zrna

Obiloviny dělíme na pluchaté a nahé (bezpluché). Tvar a velikost obilovin se může lišit pro stejný druh obilovin, například vlivem klimatických podmínek, kvalitou půdy a hnojením. Každá obilka se skládá ze třech částí: obalových vrstev, endospermu a klíčku [2].



Obrázek 1–Podélný řez pšeničným zrnem a znázornění jeho morfologických vrstev O vrstva přechází při mletí do otrub, E do mouky, K odstraněny s klíčkem [3].

Obalové vrstvy chrání obilku před vnějšími vlivy a tvoří asi 8 – 12,5 % její celkové hmotnosti. Jsou z velké části složeny z nerozpustných polysacharidů typu celulózy [1].

Endosperm tvoří cca 85 % hmotnosti zrna a je to technologicky nejvýznamnější část. $\frac{3}{4}$ hmotnosti endospermu představuje škrob, bílkoviny zaujímají 10 % hmotnosti.

Klůček je díky vysokému obsahu lipáz a lipoxygenáz a přítomným lipidům při mlýnských technologiích zpravidla odstraňován [2, 4].

1.2 Bílkoviny a aminokyseliny

Bílkoviny jsou složeny z aminokyselin, které jsou spojeny navzájem peptidovou vazbou. Lze je dělit dle rozpustnosti podle Osborna na albuminy (rozpuštěné ve vodě), globuliny (rozpuštěné v roztocích solí), prolamin (rozpuštěné v 70 – 90% etanolu) a gluteliny (rozpuštěné jen z části ve slabých roztocích kyselin a zásad). Při hnětení pšeničné mouky vytváří gliadiny a gluteiny za přítomnosti kyslíku a vody pevný gel, který se nazývá lepek. Vypraný lepek se

průměrně skládá z 90 % z proteinů, 8 % lipidů a ze 2 % sacharidů v sušině. Přítomnost lepku je nežádoucí pro lidi, kteří trpí celiakií (nesnášenlivostí na lepek) [2, 5, 6].

Nejvýznamnější aminokyselinou obilovin je kyselina glutamová, která se převážně vyskytuje ve formě glutaminu. Mezi další aminokyseliny patří prolin a leucin, limitující aminokyselina je lyzin [2, 5, 7]. Mezi další molekuly bílkovinné povahy řadíme také enzymy, mezi nejvýznamnější enzymy obilovin řadíme α -amylázu, β -amylázu, β -glukanázu a proteázy [4].

1.3 Sacharidy

1.3.1 Monosacharidy a oligosacharidy

Volné monosacharidy se nachází převážně v klíčku, a to v nepatrném množství. Nejvíce zastoupenými monosacharidy jsou z pentóz ribóza, arabinóza a xylóza a z hexóz jsou to glukóza, fruktóza, galaktóza a manóza [2]. Mezi oligosacharidy vyskytující se v obilovinách patří maltóza, izomaltóza a celobióza, minoritně sacharóza [6].

1.3.2 Polysacharidy

Hlavním polysacharidem v obilovinách je škrob, který slouží jako zdroj energie a vyskytuje se převážně v endospermu (60–75%). Škrob se skládá ze dvou frakcí amylozy a amylopektinu. Základní stavební jednotkou amylozy i amylopektinu je maltóza. Amylopektin se skládá ještě z další jednotky a tou je izomaltóza. Škrob celkově tvoří za přítomnosti vody a tepla gelovitý maz. Po ochlazení se vytvoří pružný gel, to má za následek vláčnost výrobků [8, 9].

V obalových vrstvách má největší zastoupení celulóza a pentózany, které významně přispívají k obsahu vlákniny. Vlákna se podílí na tvorbě konzistence tráveniny a ulehčuje průchod střevním traktem [2, 10]. Mezi nejznámější pentózany (hemicelulózové polymery) patří arabinoxylany [11].

1.4 Lipidy

Nejvíce lipidů se nachází v klíčku a aleuronové vrstvě. Zrno pšenice je tvořeno převážně glycerolem esterifikovaným kyselinou linolovou a olejovou. Mezi polární lipidy můžeme

řadit fosfatidy, jejichž nejvýznamnějším zástupcem je fosfatidylecholin. Oxidační změny lipidů způsobují nežádoucí senzorické změny, jako je žluknutí. V zrnech se nachází 2 – 12 % lipidů. Největší zastoupení lipidů se nachází v zrnech ovsa a prosa [12].

1.5 Vitamíny a minerální látky

Vitamíny se vyskytují převážně v klíčku a obalových vrstvách. V endospermu se vyskytují jen minimálně, výjimkou je kyselina pantotenová. V obalových vrstvách se nachází riboflavin, tiamin, v klíčcích se navíc vyskytují i tokoferoly. V pšeničných a ječných zrnech byly zaznamenány vysoké koncentrace kyseliny nikotinové ($9,3\text{--}70,2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), tiaminu a riboflavinu ($1,0\text{--}4,3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), kyseliny listové ($0,3\text{--}1,8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a pantotenové ($1,5\text{--}14,6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) [2, 13].

Sumu minerálních prvků můžeme nazývat jako „popel“, což je anorganický zbytek po spálení. Nejvyšší obsah popela se nachází v obalových vrstvách, aleuronové vrstvě a klíčku, v celých zrnech je celkový obsah popela v rozmezí 1,25 – 2,50 %. Nejčastějšími minerálními prvky popela jsou hořčík, vápník, železo a draslík [1].

Tabulka 1 Obsah minerálních prvků u vzorku pšenice jarní z Turecka v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ [14]

	Zn	Cu	Fe	Mn	Mo	B
Pšenice jarní	$23,4 \pm 2,0$	$7,4 \pm 0,8$	$32,5 \pm 3,0$	$45,8 \pm 5,6$	$5,3 \pm 0,6$	$11,0 \pm 1,2$

1.6 Polyfenolické látky

Mezi polyfenolické látky řadíme polyfenolické kyseliny, flavonoidy, kumariny, stilbeny a lignany. Lignin je polymerní polyfenolická látka, která se v přírodě hojně vyskytuje. Jelikož se vyskytuje na povrchu zrn, bývá často ze zrn odstraněn při technologickém zpracování. Ligninové polymery jsou navzájem zesíťovány s polysacharidy přes feruláty s obalovými vrstvami. Ty jsou napojeny na arabinoxylanové polymery [4].

1.6.1 Fenolové kyseliny

Vyšší koncentrace fenolových kyselin se pak vyskytují v otrubách a zbylých obalových vrstvách obilných zrn. Fenolické kyseliny se vyskytují nejvíce ve vázaných formách jako konjugáty se sacharidy, mastnými kyselinami nebo proteiny. Nejčastěji se vyskytují jako deriváty kyselin hydroxyskořicových (kyselina ferulová, kávová, chlorogenová, *p*-kumarová) a hydroxybenzoových (protocatechinová, *p*-hydroxybenzoová, vanilová) [13].

1.6.2 Flavonoidy

Jsou to nejčastěji se vyskytující polyfenoly ve výživě. Hlavní skupiny flavonoidů ve výživě tvoří flavanoly, flavanony, flavony, flavonoly, antokyanidiny, leukoantokyanidiny a izoflavonoidy. Vyskytují se v oplodí všech obilovin, nejvyšší koncentrace byly zjištěny v otrubách. V největších koncentracích byly zaznamenány rutin, kvercetin a epikatechin [15].

Jednou podskupinou flavonoidů jsou antokyaniny. Patří mezi nejrozšířenější skupinu rostlinných barviv. Antokyaniny jsou rozpustné ve vodě, a jsou zodpovědné za červené, fialové a modré zbarvení. V potravinách se nejčastěji vyskytuje těchto 6 antokyanů: kyanidin (fialový), pelargonidin (červený), peonidin (fialový), delphinidin (purpurově modrý), petunidin (purpurově modrý) a malvidin (purpurový), které se glykosidicky váží na sacharidové jednotky [16].

2 JEDLÉ KVĚTY

Obsah bílkovin, sacharidů, lipidů a vitamínů se od jiných rostlin, například listové zeleniny, příliš neliší. Obsahují i velké množství látek s antioxidačním účinkem – fenolické látky a karotenoidy [17]. Jedlými květy se zabývá vyhláška č. 331/1997 Sb. ve znění pozdějších předpisů a ta definuje koření jako části rostlin jako kořeny, oddenky, kůra, listy, nať, květy, plody, semena nebo jejich části, uvedené v příloze č. 2, v nezbytné míře technologicky zpracované a užívané k ovlivňování chutě a vůně potravin [18]. Další vyhláška, která musí být zohledněna je vyhláška č. 225/2008 Sb. ve znění pozdějších předpisů, která stanovuje požadavky na doplňky stravy a obohacování potravin. Tato vyhláška určuje podmínky některých druhů rostlin, které části rostlin mohou být použity a nejvyšší přípustné množství, které může být použito v denním množství [19].

Z výživového hlediska lze jedlé květy rozdělit na tři části. První z nich je pyl, ačkoliv je jeho množství velmi malé, je poměrně bohatým zdrojem bílkovin, aminokyselin a sacharidů, karotenoidů a flavonoidů, jeho chuť však není zrovna příjemná [20]. Druhou složkou je nektar, jedná se o sladkou kapalinu, která obsahuje vyváženou směs cukrů, aminokyselin a fenolických látek, dále alkaloidy a terpenoidy [20]. Třetí skupina zahrnuje okvětní lístky a další části rostliny. Ty jsou také dobrým zdrojem výše uvedených sloučenin, a navíc obsahují velké množství vitamínů a antioxidantů [20].



Obrázek 2 – Jedlé květy A – Jiřina, B – Růže, C – Měsíček, D – Chrpa [21]

2.1 Základní přehled jedlých květů

U některých druhů zelenin se konzumují hlavně jejich květy, jsou to například – brokolice, květák, artyčoky, tykev a pažitka [21]. Měsíček zahradní obsahuje silice, které mají protizánětlivé účinky, působí bakteriocidně. Některé druhy chryzantém mají vysoký obsah fenolicých sloučenin a vykazují vysokou antioxidační aktivitu. Jedlé květy růží se používají jako ozdoby moučníků nebo pro výrobu sirupů a zmrzlin. Obsahují bioflavonoidy a třísloviny. Topolovky mají vysoký obsah antokyanů a využívají se hlavně pro barvení sirupů, pampeřlišky obsahují hořčiny, fytoosteroly, třísloviny a silice. Heřmáněk, se dnes používá i v čerstvém stavu jako ozdoba některých pokrmů. Mnohé další květy se používají jako přísada do čajů například jasmín a lípa. Existují desítky dalších rostlin, které jsou zdrojem jedlých květů, například, lichořeřišnice, bez černý, kopretina, merlík, levandule, chrpa a mnohé další [21, 22].

2.2 Chemické složení jedlých květů

Jedlé květy obsahují velké množství vody 80 –90 %.

Tabulka 2 Obsah vody některých jedlých květů v % [23]

	Lichořeřišnice větší	Měsíček zahradní	Plamatka zelná
Vlhkost (%)	89,3 ± 0,2	83,4 ± 0,2	81,7 ± 0,1

2.2.1 Bílkoviny a aminokyseliny

Celkový obsah bílkovin v jedlých květech byl stanoven pod 3%. Nejvyšší zastoupení bílkovin se nachází v pylu. Nejzastoupenější aminokyselinou je prolin, který se nachází převážně v nektaru. Dalšími aminokyselinami, které se často vyskytují v jedlých květech, jsou tryptofan a esenciální aminokyselina lyzin [20, 21].

2.2.2 Sacharidy

Monosacharidy se nachází převážně v nektaru jedlých květů, který obsahuje nejvíce glukózu a fruktózu. Z oligosacharidů je to pak sacharóza. Z nerozpustných sacharidů obsahují vlákninu v rozmezí od 4,51 – 10,11 % v závislosti na druhu jedlého květu. V průběhu stárnutí jedlého květu může docházet ke zvýšení obsahu sacharózy [21, 24].

2.2.3 Lipidy

Jedlé květy obsahují velmi malé množství lipidů. Nejvíce se jich vyskytuje v pylu. Nejvíce zastoupené jsou polynenasycené mastné kyseliny, které převládají nad nasycenými. Nejzastoupenější jsou kyseliny linolová a linolenová. Z nasycených mastných kyselin obsahují kyselinu palmitovou a v nepatrném množství byla zjištěna i přítomnost ω -3 nenasycené mastné kyseliny eikosapentaenové [20, 25].

2.2.4 Vitamíny a minerální prvky

Květy jsou dobrým zdrojem vitamínu E, také obsahují kyselinu L-askorbovou [25]. Jedlé květy jsou i poměrně bohatým zdrojem minerálních prvků, v největším zastoupení je to železo, zinek, měď, stroncium, mangan a draslík. Z výživového hlediska je zajímavé, že obsahují daleko vyšší koncentrace draslíku než sodíku. Koncentrace vápníku je v jedlých květech velmi nízká. Ostatní prvky jako fosfor, hořčík, sodík a síra byly detekovány v nízkých koncentracích [21, 23].

2.2.5 Polyfenolické sloučeniny

Jedlé květy okrasných rostlin vykazují vysokou antioxidační aktivitu a mají výrazný inhibiční účinek na volné radikály [26].

2.2.5.1 Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny jsou zastoupeny především ve formě esterů, především hydroxyskořicovými kyselinami. Mezi fenolické kyseliny jedlých květů patří především kyselina chlorogenová. Další velmi hojně zastoupenou kyselinou v jedlých květech je kyselina gallová [27, 28].

2.2.5.2 Flavonoidy

Nejvýznamnější flavonoid v jedlých květech je luteolin-7-O-glukosid. Dosahuje nejvyššího antioxidačního účinku. Mezi další hojně zastoupené flavonoidy patří katechin, kaempferol a kvercetin. Většina flavonoidů se nachází v okvětních lístcích, velká část je jich glykosylována. Plně rozkvetlé květy vykazují mnohem větší zastoupení flavonoidů než na začátku kvetení [28, 29]. Červené a růžové květy obsahují až 10 mg kyanidin-3-glukozidu na 10g. Koncentrace antokyanových barviv ve žlutých a modrých květech se pohybuje v rozmezí od 5 do 10 mg kyanidin-3-glukozidu na 10g. Bílé květy vykazují extrémně nízké hodnoty, a to pod 1 mg [27, 28].

3 OSTATNÍ SUROVINOVÉ KOMPONENTY POUŽÍVANÉ DO MÜSLISMĚSÍ

3.1 Ořechy a olejnatá semena

Dle vyhlášky č. 157/2003 Sb. ve znění pozdějších předpisů se skořápkovými plody rozumí plody nebo semena vlašských ořechů, lískových ořechů, mandlí, kešu ořechů, arašídů, para ořechů, kokosových ořechů, piniových ořechů. Ořechy jsou dobrým zdrojem ω -3 mastných kyselin a také lipidů, což může vést při skladování k oxidačním pochodům. Také obsahují vitamín E, a to především ve formě β - a γ -tokoferolů [29, 30].

3.2 Ovoce

Ovoce, které se přidává do müsli, bývá velmi často kandováno v cukerných roztocích, také bývá sušené nebo lyofilizované (sušení mrazem). Ovoce se do cereálních směsí přidává pro vysoký obsah sacharidů, vlákniny, vitamínů a antioxidantů. Hlavními antioxidačními látkami jsou vitamín C a E, polyfenolické látky a z nich pak flavonoidy a antokyany. Do směsí se obvykle přidává bobulové ovoce jako například borůvky, brusinky, rybíz, dále například jablka, meruňky, švestky, jahody a maliny [30, 31].

4 PRINCIPY METOD POUŽÍVANÉ V EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI

Absorpční spektrometrie se využívá především ke stanovení koncentrace látek v roztoku a řadí se mezi spektrální metody. Absorpční spektrum látky představuje závislost absorbance na vlnové délce při konstantní koncentraci látky a tloušťce vrstvy. Pro zjištění koncentrace je důležitý vztah mezi absorpčním spektrem látky, tloušťkou vrstvy a hodnotu absorbance, tento vztah popisuje Lambert-Beerův zákon, z něhož vyplývá,

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot b \cdot c(1)$$

kde A představuje absorbanci při určité vlnové délce, ε_{λ} představuje molární absorpční koeficient látky při vlnové délce λ , b je tloušťka absorpční vrstvy a c je látková koncentrace dané látky v roztoku [32, 33]. Při spektrofotometrickém měření a následném kvantitativním vyhodnocení se vychází z kalibračního grafu. Pro koncentrace, kde platí Lambert-Beerův zákon, je závislost lineární. Absorbance je lineárně závislá na látkové koncentraci absorbující látky a je to bezrozměrná veličina. Absorbanci lze vypočítat ze vztahu:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)(2)$$

kde I_0 je intenzita světla, které vstupuje do kyvety a I představuje intenzitu světla vystupujícího z kyvety [33, 34].

4.1 Stanovení polyfenolů Folin-Ciocalteuho metodou

Jedná se o spektrofotometrickou metodu, při níž se měří absorbance jednotlivých vzorků a následně se zjistí koncentrace celkových polyfenolů. Folin-Ciocalteuovo činidlo je tvořeno směsí dvou kyselin, a to kyseliny fosforečno-wolframové a fosofečno-molybdenové, a ty se po oxidaci polyfenolů redukují na směs modrých oxidů wolframu. Při reakci dochází v zásaditém prostředí k oxidaci fenolických sloučenin a dochází ke změně barvy ze žluté na modrou. Tyto modré pigmenty mají maximální absorpci v závislosti na složení fenolových směsí a pH, které se upravuje přidáním 20% uhličitanu sodného [35]. Modré zbarvení je úměrné celkovému množství přítomných polyfenolů a nejlépe absorbuje při vlnové délce 765 nm. Celkový obsah polyfenolů je nejčastěji vyjádřen jako ekvivalentní množství standardu kyseliny gallové v mg na 1 kg vzorku [35, 36].

4.2 Stanovení antioxidační aktivity

Metody pro stanovení antioxidační aktivity jsou nejčastěji založeny na mechanismu transferu atomu vodíku. Nejznámější metody pro stanovení antioxidační aktivity jsou metody hodnotící schopnost eliminovat radikály. Do této skupiny patří metoda s využitím ABTS kation-radikálu (2,2'-azinobis(3-etyl-2,3-dihydrobenzotiazol-6-sulfonové kyseliny) a metoda s využitím DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu) [37, 38].

4.2.1 Metoda s DPPH

Metoda spočívá v reakci testované látky s volným stabilním radikálem 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylem. V metanolovém roztoku je DPPH v radikálové formě a redukce DPPH antioxidanty se projeví odbarvením roztoku (úbytkem absorbance). Absorbance se nejčastěji měří při 515 nm spektrofotometricky a měří se po uplynutí určitého času. Reakce radikálu DPPH s antioxidanty zkoušeného vzorku se provádí výhradně v prostředí s organickými rozpouštědly. Radikálová aktivita se vyjadřuje jako ekvivalentní množství troloxu v mg nebo mmol na 1 kg vzorku [39, 40].

4.2.2 Metoda s ABTS

Metoda je založena na schopnosti zhaset 2,2'-azinobis-3-etyl-2,3-dihydrobenzotiazol-6-sulfonovou kyselinu, neboli kation-radikál ABTS. Zhášení radikálu ABTS antioxidanty se stanovuje spektrofotometricky na základě změn absorpčního spektra ABTS, nejčastěji při vlnové délce 734 nm. Radikál ABTS se generuje v reakční směsi oxidací ABTS s různými sloučeninami, nejčastěji peroxodisíranem draselným. Jako rozpouštědlo se používá voda nebo metanol. Antioxidační aktivita se vyjádří jako ekvivalentní množství troloxu v 1 kg vzorku, jelikož jako standard je u této metody použit trolox. Jako standard lze použít i kyselinu askorbovou nebo butylhydroxyanizol (BHA) [41, 42].

4.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie) je analyticko-separační metoda, která slouží k identifikaci, separaci a kvantifikaci obsahu sledovaných látek. Základní podmínkou kapalinové chromatografie je zajištění interakce mezi separovanou látkou a stacionární fází, za chromatografických podmínek. Mobilní fáze procházející kolonou obsahuje směs rozpuštěných analytů, které interagují se stacionární fází. Pro různé látky je to různá rychlost a různý čas průchodu kolonou. Tento čas se nazývá retenční. Kapalinový chromatograf se

skládá ze čtyř hlavních částí: vysokotlakého čerpadla, které slouží pro transport mobilní fáze, zařízení pro dávkování vzorku, chromatografické kolony, která slouží pro separaci látek, a detektoru [43, 44, 45]. Mobilní fáze jsou zpravidla směsi organických rozpouštědel nebo vodné roztoky pufrů, které bývají do HPLC dákovány ze skleněných lahví. Stacionární fáze je umístěna v koloně. Jako stacionární fáze se používají polární ne-modifikované absorbenty, nejčastěji je to silikagel nebo oxid hlinitý, nově také anorganické kompozity např. na bázi zirkonu. V případě RP-HPLC lze jako mobilní fázi použít redestilovanou vodu, pufrů (fosfátové, octanové aj.), metanol, acetonitril, trifluoroctovou kyselinu, kyselinu mravenčí aj. Nejpoužívanější stacionární fází je oktadecylový nebo oktylový uhlovodíkový řetězec [46, 47].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo připravit vločky z jednotlivých druhů obilovin a z nich následně připravit cereální směsi s přídavkem jedlých květů dle receptur. Následně z těchto směsí extrahovat volné, konjugované a vázané frakce polyfenolů. U těchto frakcí potom stanovit množství celkových polyfenolů Folin-Ciocalteuovou metodou (jako standard použít kyselinu gallovou) a stanovit antioxidační aktivitu s ABTS a DPPH (jako standard použít trolox). Posledním úkolem bylo identifikovat a kvantifikovat obsah jednotlivých fenolických sloučenin pomocí HPLC-DAD. Vyhodnocená data byla dále statisticky zpracována.

6 METODIKA PRÁCE

6.1 Použité chemikálie a pomůcky

6.1.1 Chemikálie

- Redestilovaná voda
- Octan sodný (Penta, ČR)
- Metanol (Penta, ČR)
- Folin-Ciocalteuovo činidlo (Sigma Aldrich, Německo)
- Uhličitan sodný (Lachema, ČR)
- Kyselina gallová (Acros Organics, Belgie)
- Trolox (Sigma Aldrich, Německo)
- ABTS (2,2'-azinobis(3-etyl-2,3-dihydrobenzotiazol-6-sulfonová kyselina) (Sigma Aldrich, Německo)
- DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) (Sigma Aldrich, Německo)
- Standardy (3,4-dihydroxybenzoové kyseliny, 4-hydroxy-benzoové kyseliny, epigalokatechinu, katechinu, kyselin vanilové, chlorogenové, kávové, syringové, epikatechinu, kyselin *trans-p*-kumarové, ferulové, sinapové, elagové, *trans-2*-hydroxyskořicové, rutinu, protokatechin esteru, resveratrolu, kvercetin, kaempferolu a kyseliny *trans*-skořicové)

6.1.2 Zařízení

- Elektrický mlýnek a vložkovač (Waldner Biotech Combi Star, Rakousko)
- vodní lázeň (Memmert, Německo)
- Mikropipety s nastavitelným objemem
- Analytické váhy (Afa 210 LC, Schoeller, ČR)
- Ultrazvuková lázeň (Memmert, Německo)
- Odstředivka (EBA 20, Hettich Zentrifugen, Německo)
- UV/VIS spektrofotometr (Lambda 25, Perkin Elmer, USA)
- HPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, MA, USA)
- Odstředivka (Dynamica, ČR)
- Běžné laboratorní pomůcky a sklo



Obrázek 3 – Kapalinový chromatograf Dionex Ultimate 3000

6.2 Příprava cereálních směsí s jedlými květy

Nejprve byly vyrobeny vločky z celých obilných zrn, ke kterým byly dále přidány další surovinové komponenty. Jako celá zrna byla zakoupena pšenice kamut, pšenice odrůdy Dickkopf, černá rýže, pšenice odrůda Richard a černá quinoa. Odrůdy Richard a Dickkopf byly dodány přímo od pěstitelů (prof. Dr. Agr. Jana Sneyd, Hochschule für Wirtschaft und Umwelt Nürtingen-Geislingen, Stuttgart, Německo a firmy Bäckerhaus Veit, Německo). Další druhy vloček (špaldové, ovesné, pohankové, jáhlové a vločky z teffu) byly zakoupeny v obchodní síti. Jedlé květy byly poskytnuty od firmy Oxalis. Ovoce bylo také zakoupeno v obchodní síti: ananas byl kandován v cukerném roztoku, meruňky a brusinky byly sušeny v proudu teplého vzduchu, jahody, borůvky a maliny byly lyofilizované a švestky, hrušky byly zakoupeny také sušené. Ořechy a olejninu (para, mandle) i semínka (chia, konopná) byla také zakoupena v obchodním řetězci. Suroviny byly skladovány nejdéle po dobu jednoho měsíce při teplotě do 25 °C.

6.2.1 Příprava vloček

Vločky byly vyrobeny pomocí hydrotermálního ošetření a rozválcovány na vločkovači Combi Star. Vločky byly vyrobeny z celých zrn, které byly krátce povařeny ve vodě o teplotě 95 °C 2 – 15 minut, dále byly scezeny a osušeny v horkovzdušné sušárně po dobu 10 – 60 minut. Po osušení byla zrna zpracována na vločky na vločkovači. Na vločky byly zpracovány: černá rýže, pšenice kamut, Dickkopf a Richard a quinoa černá.

6.2.2 Příprava cereálních müsli směsí

Bylo připraveno 6 druhů cereálních müsli směsí, z toho tři obsahovaly lepkové obiloviny a tři byly bezlepkové. K připraveným vločkám byly přidány ostatní suroviny (ořechy a olejiny, ovoce a jedlé květy) dle zadané receptury, v poměru 70 % obilovin a 30% všech ostatních složek. Směs byla homogenizována tyčovým mixérem.



Obrázek 4 – Surovinová skladba cereálních směsí

Na obrázku 4 jsou připraveny suroviny na přípravu müsli směsí. Vždy jedna varianta s lepkem a druhá bez lepku. Talíř č. 1 obsahuje suroviny uvedené v tabulce č. 3. Talíř č. 2 je směs připravená bez lepku, jeho receptura je uvedena v tabulce č. 4. Talíř č. 3 je bez lepku a receptura je uvedena v tabulce č. 6 a talíř č. 4 je bez lepku a receptura je uvedena v tabulce č. 7.

Cereální směsi obsahující lepek:

Tabulka 3 Směs müsli č.1

Vzorek 1	Množství[g]
Ovesné vločky	35
Richard vločky	35
Chia semínka	2
Para ořechy	5
Meruňky	10
Ananas	10
Zelený čaj	2
Jasmín květ	1

Tabulka 4 Směs müsli č.2

Vzorek 2	Množství[g]
Ovesné vločky	35
Kamut vločky	35
Konopná semínka	2
Para ořechy	5
Švestky	10
Hrušky	10
Sléz květ	1
Červená chrpa květ	2

Tabulka 5 Směs müsli č.3

Vzorek3	Množství[g]
Špaldové vločky	35
Dickkopf vločky	35
Mandle	7
Brusinka	15
Malina	5
Ibišek květ	2
Chřpa modrá květ	1

Bezlepkové cereální směsi:

Tabulka 6 Směs müsli č.4

Vzorek 4	Množství[g]
Pohanka vločky	40
Rýžové vločky	25
Quinoa černá vločky	5
Chia semínka	2
Para ořechy	5
Meruňky	10
Ananas	10
Zelený čaj	2
Jasmín květ	1

Tabulka 7 Směs müsli č.5

Vzorek 5	Množství [g]
Jáhly	35
Quinoa černá vločky	35
Konopná semínka	2
Para ořechy	5
Švestky	10
Hrušky	10
Sléz květ	1
Červená chrpa květ	2

Tabulka 8 Směs müsli č.6

Vzorek 6	Množství [g]
Pohanka vločky	40
Jáhly vločky	25
Teff vločky	5
Mandle	7
Brusinka	15
Malina	5
Ibišek květ	2
Chrpa modrá květ	1

6.3 Extrakce polyfenolických frakcí

6.3.1 Extrakce volných frakcí polyfenolů

Od každého vzorku bylo do čtyř větších lékovek naváženo 1,5 g pomletého vzorku s přesností na 0,1 mg. Ke každé navážce bylo přidáno 15 ml 80% metanolu. Lékovky byly uzavřeny a dány na míchačku a po 1 hodinu se obsah extrahoval. Po hodině se nechaly stát 10 minut v klidu a extrakt byl odsát Pasteurovou pipetou do keramické odpařovací misky. Takto získaný extrakt byl na vodní lázni odpařen do sucha. Zbytek po extrakci byl znovu extrahován s 10 ml 80% metanolu. Po extrakci byl vzorek opět ponechán 10 minut v klidu a extrakt byl odsát Pasteurovou pipetou a byl přidán k prvnímu odpařenému extraktu do keramické misky a znovu byl odpařen do sucha. Takto byly získány 4 misky s odpařenými extrakty. Dvě odpařovací misky z původních čtyř byly postupně zregenerovány 10 ml 80% metanolu tak, aby mohl být odparek kvantitativně převeden do odměrné baňky na 10 ml. Odměrné baňky byly na 1 minutu vloženy do ultrazvukové lázně, přefiltrovány přes syring filtr (nylon 0,2 μm) a dávkovány do vialek. Zbytek extraktu byl ponechán na další analýzy. Tento extrakt obsahoval volné polyfenoly.

6.3.2 Extrakce konjugovaných frakcí polyfenolů

Zbylé 2 misky z předchozí extrakce volných polyfenolů byly postupně zregenerovány 10 ml 0,2 mol.dm⁻³NaOH a kvantitativně převedeny do menších tmavých lékovek. Do lékovek bylo vloženo míchadlo a byly ponechány 4 hodiny hydrolyzovat pod dusíkem. Po 4 hodinách bylo upraveno pH pomocí 6 mol.dm⁻³HCl na 3–5. Poté byly vzorky odstředěny na odstředivce (4321g na 20 minut) a přefiltrovány přes syring filtr (nylon 0,2 μm) do tmavé vialky. Zbytek extraktu byl ponechán pro další analýzy. Extrakt obsahoval konjugované polyfenoly.

6.3.3 Extrakce vázaných frakcí polyfenolů

Pevný zbytek po extrakci volných polyfenolů v tmavé lékovce byl zalit 20 ml 0,2 mol.dm⁻³NaOH a nechán 4 hodiny hydrolyzovat pod dusíkem. Po uplynutí doby bylo pomocí 6mol.dm⁻³HCl upraveno pH na 3–5. Vzorky byly odstředěny na odstředivce (Dynamics, 12300g, 15 min) a přefiltrovány přes syring filtr (nylon 0,2 μm). Takto vzniklý roztok obsahoval vázané polyfenoly.



Obrázek 5 – Extrahování vzorků na míchačce



Obrázek 6 – Odpařování vzorků při extrakci

6.4 Stanovení celkového množství polyfenolů Folin-Ciocalteuho metodou

Ke stanovení byly použity extrakty, připravené dle postupu uvedeného v kapitole 6.3. Pět ml destilované vody bylo pipetováno do 10 ml odměrné baňky, dále bylo přidáno 200 μ l extraktu vzorku a 0,5 ml Folin-Ciocalteuova činidla. K tomu bylo přidáno 1,5 ml 20% uhlíčitanu sodného a následně byla odměrná baňka doplněna destilovanou vodou po rysku. Vzorek byl důkladně promíchán a po 30 minutách byla měřena absorbance na spektrofotometru Lambda 25 při vlnové délce 765 nm oproti blanku. Z naměřených hodnot bylo vypočítáno celkové množství polyfenolů ve vzorku pomocí lineární regrese. Celkové množství polyfenolů bylo vyjádřeno jako ekvivalentní množství mg kyseliny gallové v 1 g vzorku.

6.4.1 Kalibrační křivka pro stanovení celkového množství polyfenolů

Při tomto stanovení byla použita jako standard kyselina gallová. Byl vytvořen zásobní roztok rozpuštěním kyseliny gallové v metanolu na koncentraci 4 000 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Kalibrační křivka byla připravena ředěním na koncentrace 50, 100, 200, 400, 600 a 800 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. 5 ml destilované vody bylo pipetováno do 10ml odměrné baňky, dále bylo přidáno 200 μ l standardu, 0,5 ml

Folin-Ciocalteuova činidla, k tomu bylo přidáno 1,5 ml 20% uhličitanu sodného. Nakonec byla odměrná baňka doplněna destilovanou vodou po rysku. Na spektrofotometru byly změněny jednotlivé koncentrace při vlnové délce 765 nm. Následně byla sestavena kalibrační křivka jako závislost absorbance na koncentraci kyseliny gallové.

6.5 Stanovení antioxidační aktivity metodou s DPPH

6.5.1 Příprava zásobního a pracovního roztoku

Rozpuštěním 24 mg DPPH ve 100 ml metanolu byl připraven zásobní roztok radikálu. Dále byl připraven pracovní roztok smícháním 10 ml zásobního roztoku a 45 ml metanolu. Připravený pracovní roztok byl použit jako blank a byl spektrofotometricky proměřen při vlnové délce 515 nm.

6.5.2 Měření antioxidační aktivity metodou s DPPH

Do zkumavky bylo napipetováno 8,55 ml pracovního roztoku a 450 μ l extraktu vzorku. Zkumavky s takto připraveným roztokem byly důkladně promíchány a ponechány 60 minut bez přístupu světla. Po 60 minutách byly vzorky měřeny spektrofotometrem při vlnové délce 515 nm. Pomocí rovnice lineární regrese se z úbytku absorbance přepočtené na hodnoty inaktivace vypočte ekvivalentní množství mg troloxu na 1 g vzorku.

6.5.3 Kalibrační křivka pro stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Standardem při této metodě byl trolox. Rozpuštěním standardu v metanolu na koncentraci 800 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ byl vytvořen zásobní roztok. Kalibrační řada byla vytvořena ředěním zásobního roztoku o koncentraci 40, 80, 120, 160 a 200 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. K 8,55 ml pracovního roztoku bylo přidáváno 450 μ l jednotlivé koncentrace. Takto připravené roztoky byly ponechány 60 minut ve tmě a následně spektrofotometricky měřeny při vlnové délce 515 nm. Takto byly získány hodnoty úbytku absorbance a z těchto hodnot byla sestrojena kalibrační křivka jako závislost inaktivace na koncentraci troloxu. Celková antioxidační aktivita byla vypočítána z rovnice lineární regrese jako ekvivalentní množství g troloxu v 1 g vzorku.

6.6 Stanovení antioxidační aktivity metodou s ABTS

6.6.1 Příprava radikálu ABTS

Do 10ml odměrné baňky bylo naváženo 0,018 g ABTS a odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. K tomu bylo přidáno 0,2 ml roztoku peroxidisíranu draselného o koncentraci $0,06 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, který byl připraven rozpuštěním 0,162 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ v 10 ml destilované vody. Reakční směs byla 16 hodin ponechána při laboratorní teplotě bez přístupu světla. Cílem bylo vytvoření ABTS radikálu.

6.6.2 Příprava reakční směsi

Smícháním 63,5 ml $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ CH_3COONa a 136,5 ml $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ CH_3COOH byl připraven octanový pufr o pH 4,3. Takto připravený pufr byl smíchán s ABTS radikálem v množství 97,5 ml pufru a 2,5 ml ABTS radikálu. Reakční směs byla dále měřena spektrofotometricky při vlnové délce 734 nm. Octanový pufr o pH 4,3 byl použit jako blank. Měření reakční směsi oproti připravenému blanku se získá hodnota absorbance. Tato hodnota byla dále použita pro výpočet inaktivace.

6.6.3 Měření antioxidační aktivity vzorků metodou s ABTS

Do odměrné baňky bylo napipetováno 12 ml připravené reakční směsi z předchozí kapitoly a 150 μl extraktu vzorku. Směs byla ponechána 30 minut v temnu a po uplynutí této doby byla měřena absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 734 nm.

Celková antioxidační aktivita byla vypočtena z rovnice lineární regrese a vyjádřena jako ekvivalentní množství μmol troloxu na 1 g vzorku.

6.6.4 Kalibrační křivka pro stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Pro tuto metodu byl jako standard použit trolox. Rozpuštěním standardu v metanolu byl vytvořen zásobní roztok o koncentraci $800 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Ředěním byla připravena kalibrační řada o koncentracích 100, 200, 400 a $600 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Takto připravené vzorky byly ponechány 30 minut bez přístupu světla a po uplynutí této doby byla spektrofotometricky změřena absorbance při vlnové délce 734 nm. Z naměřených hodnot byla sestavena kalibrační křivka jako závislost inaktivace na koncentraci troloxu. Z rovnice lineární regrese byla vypočtena celková antioxidační aktivita, který byla vyjádřena jako ekvivalentní množství troloxu v μmol na 1 g vzorku.

6.7 Stanovení profilu jednotlivých polyfenolů metodou HPLC

Připravené extrakty vzorků z kapitoly 6.3 byly analyzovány (chromatograficky separovány) na chromatografu HPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, MA, USA) s detektorem (UV/VIS) a autosamplermem. Pro stanovení byla použita kolona Kinetex C18 (150 x 4,6 mm; 2,6 μm).

Chromatografické podmínky:

- objem nástřiku na kolonu 10 μl ,
- mobilní fáze A: redestilovaná voda:kyselina octová (99:1),
- mobilní fáze B: redestilovaná voda:acetonitril:kyselina octová (67:32:1),
- eluce gradientová: v 0 min 10 % B, 0–10 min do 20 % B, 10 – 16 min 20 – 40 % B, 16 – 20 min 40 – 50 % B, 25 – 26 min 50 – 70 % B, 26 – 30 min 70 % B, 30 – 40 min 70 – 10 % B, 40 – 45 min 10 % B,
- termostat kolony nastaven na 30 $^{\circ}\text{C}$,
- průtok mobilní fáze 1 ml.min⁻¹.

K vyhodnocení dat byl použit program Chromeleon™ 7.2 Chromatography Data System (Thermo Scientific, MA, USA). Byla odečtena plocha píku pro jednotlivé analyty v příslušném retenčním čase při vlnové délce 275 nm.

6.7.1 Sestrojení kalibračních křivek pro jednotlivé polyfenoly

Standards jednotlivých polyfenolických kyselin, stilbenu a flavonoidů byly naváženy s přesností na 0,1 mg a kvantitativně převedeny do 100ml odměrné baňky a doplněny redestilovanou vodou po rysku. Nejprve byl vytvořen zásobní roztok o koncentraci 800 mg.l⁻¹. Ze zásobního roztoku se pro každou látku vytvoří kalibrační řada do 10ml odměrných baněk o koncentracích 50, 100, 200, 400 a 600 mg.l⁻¹. Jednotlivé roztoky byly chromatograficky proměřeny za stejných podmínek jako extrakty. Kalibrační křivky byly sestaveny jako závislost plochy píku na koncentraci standardu v mg.l⁻¹.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

Z obilovin (ovsa, pšenice odrůdy Richard, kamutu, špaldy, pšenice odrůdy Dickkopf, pohanky, rýže, quionoi, jáhel a teffu) byly vyrobeny vločky a z nich byly následně za přídavků dalších komponent vyrobeny cereální směsi. Z těchto směsí byly následně vyextrahovány volné, vázané a konjugované polyfenoly. U vzorků müsli směsí byl změřen celkový obsah polyfenolů a dále jejich antioxidační aktivita. Dále byly stanovovány jednotlivé polyfenolické kyseliny pomocí HPLC. Vzorky byly skladovány v odměrných baňkách při chladírenských teplotách do 8 °C.

7.1 Výsledky stanovení celkového množství polyfenolů Folin-Ciocalteuho metodou

Extrakce jednotlivých polyfenolických frakcí byla provedena postupem uvedeným v kapitole 6.3. Výsledné hodnoty obsahu polyfenolů jsou uvedeny v ekvivalentním množství kyseliny gallové (GAE) v mg na 1 g vzorku.

Tabulka 9 Výsledky obsahu celkových polyfenolů v jednotlivých frakcích müsli obsahujícího lepek

	Frakce polyfenolů (mg GAE.g ⁻¹) ± SD			
	volné	konjugované	vázané	celkové
vzorek 1	4,90 ± 0,10 ^a	4,00 ± 0,12 ^a	1,10 ± 0,05 ^a	10,00 ± 0,09 ^a
vzorek 2	2,80 ± 0,07 ^b	2,20 ± 0,08 ^b	0,90 ± 0,04 ^b	5,90 ± 0,05 ^b
vzorek 3	2,60 ± 0,03 ^c	1,00 ± 0,07 ^c	3,30 ± 0,13 ^c	6,90 ± 0,08 ^c

SD – směrodatná odchylka

Hodnoty ve sloupcích, které mají stejné písmenné indexy, mezi sebou nevykazují statisticky významný rozdíl ($P \geq 0,05$). Hodnoty ve sloupcích, které mají odlišné písmenné indexy, se mezi sebou statisticky liší ($P < 0,05$).

Ve volných a konjugovaných frakcích u vzorku č. 1 bylo naměřeno vyšší množství polyfenolů, a to 4,90 a 4,00 %. Naopak, vzorek č. 3 vykazoval nejvyšší hodnoty polyfenolů ve vázaných frakcích. Celkově nejvíce polyfenolů bylo zjištěno u vzorku č. 1, a to (10,00 mg GAE.g⁻¹). Nejnížší celková koncentrace polyfenolů byla zjištěna u vzorku č. 2 (5,90 mg GAE.g⁻¹). Dle získaných výsledků se od sebe všechny vzorky v jednotlivých frakcích polyfenolů statisticky liší.

Tabulka 10 Výsledky obsahu polyfenolů v jednotlivých frakcích v bezlepkovém müsli

	Frakce polyfenolů (mg GAE.g ⁻¹) ± SD			
	volné	konjugované	vázané	celkové
vzorek 4	6,40 ± 0,29 ^a	11,34 ± 0,22 ^a	2,09 ± 0,10 ^a	19,83 ± 0,20 ^a
vzorek 5	10,75 ± 0,27 ^b	11,28 ± 0,16 ^a	2,31 ± 0,26 ^b	24,34 ± 0,22 ^b
vzorek 6	9,69 ± 0,26 ^c	11,06 ± 0,28 ^b	2,39 ± 0,11 ^b	23,14 ± 0,21 ^c

SD – směrodatná odchylka

Hodnoty ve sloupcích, které mají stejné písmenné indexy, mezi sebou nevykazují statisticky významný rozdíl ($P \geq 0,05$). Hodnoty ve sloupcích, které mají odlišné písmenné indexy, se mezi sebou statisticky liší ($P < 0,05$).

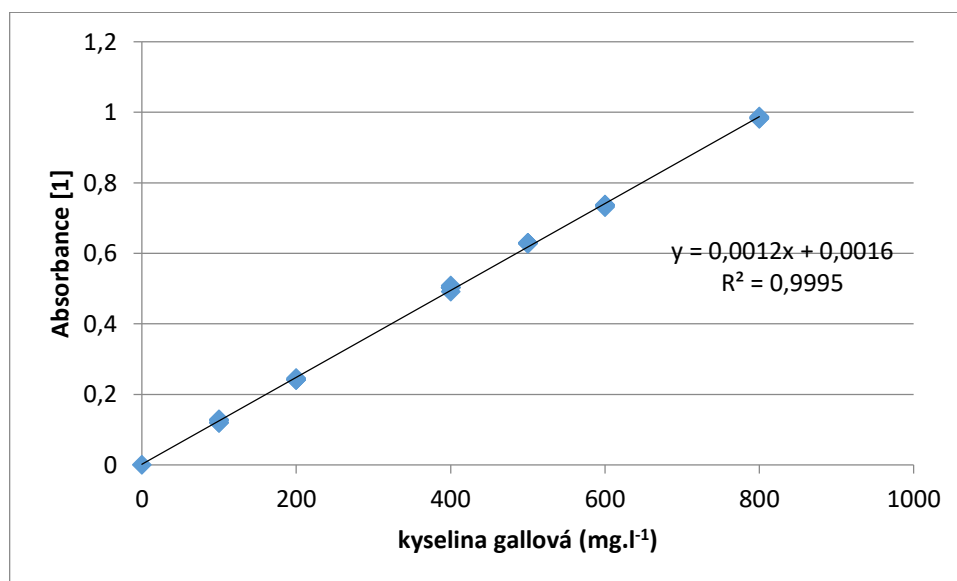
V bezlepkových müsli směsích byla naměřena nejvyšší celková koncentrace polyfenolů u vzorku č. 5, a to 24,34 mg GAE.g⁻¹ a nejnižší u vzorku č. 4 (19,83 mg GAE.g⁻¹). Dále bylo zjištěno, že nejvyšší koncentrace polyfenolů se nacházela v konjugovaných frakcích, a to u všech tří vzorků, a nejnižší koncentrace byly stanoveny u frakcí vázaných. Porovnávat konkrétní výsledky a diskutovat konkrétní hodnoty měřených veličin je velmi složité, jelikož tyto směsi nebyly dosud nikde publikovány. Je ale možno uvést některé naměřené hodnoty surovinových komponent těchto směsí. Podle Rocchettiet al. (2017) se pohybuje obsah polyfenolů u černé rýže a quinoi v rozmezí od 0,8 – 1,4 mg GAE.g⁻¹. Vyšší koncentrace stanovení u těchto vzorků jsou způsobeny jistě přítomností dalších látek bohatých na polyfenoly, jako je ovoce a jedlé květy.

7.1.1 Kalibrační křivka pro stanovení obsahu polyfenolů

Standardem pro stanovení polyfenolů byla kyselina gallová. Kalibrační křivka byla sestrojena podle postupu popsaného v kapitole 6.4.1 a byla sestrojena jako závislost absorbance na koncentraci kyseliny gallové v mg.l⁻¹. Z rovnice lineární regrese $y = 0,0012x + 0,0016$ ($R^2=0,9995$) byl vypočten obsah polyfenolů.

Tabulka 11 Hodnoty pro sestavení kalibrační křivky na stanovení polyfenolů

Koncentrace kyseliny gallové [mg.l ⁻¹]	Průměrná absorbance [1]
0	0,000
100	0,143
200	0,248
400	0,506
500	0,632
600	0,794
800	0,989



Graf 1 – Závislost absorbance na koncentraci kyseliny gallové

7.2 Výsledky stanovení antioxidační aktivity metodou s DPPH

Pro stanovení antioxidační aktivity metodou s DPPH byly použity extrakty vzorku dle postupu uvedeného v kapitole 6.3. Stanovení antioxidační aktivity bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 6.5. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalentní množství troloxu v mg na 1 g vzorku.

Tabulka 12 Výsledky stanovení antioxidační aktivity metodou s DPPH u müsli směsí obsahujících lepek

	Frakce polyfenolů (mg TE.g ⁻¹) ± SD			
	volné	konjugované	vázané	celkové
vzorek 1	2,30 ± 0,01 ^a	1,35 ± 0,03 ^a	0,87 ± 0,04 ^a	4,52 ± 0,01 ^a
vzorek 2	1,14 ± 0,05 ^b	0,76 ± 0,05 ^b	0,84 ± 0,04 ^a	2,74 ± 0,05 ^b
vzorek 3	1,72 ± 0,10 ^c	0,41 ± 0,03 ^c	0,70 ± 0,05 ^b	2,83 ± 0,06 ^c

SD směrodatná odchylka

Hodnoty ve sloupcích, které mají stejné písmenné indexy, mezi sebou nevykazují statisticky významný rozdíl ($P \geq 0,05$). Hodnoty ve sloupcích, které mají odlišné písemné indexy, se mezi sebou statisticky liší ($P < 0,05$).

U metody s DPPH byla zjištěna nejvyšší celková antioxidační aktivita u vzorku č. 1, a to (4,52 mg TE.g⁻¹) a nejnižší u vzorku č. 2, a to 2,74 mg TE.g⁻¹. Nejvyšší antioxidační aktivita byla naměřena u volných frakcí. Výsledky jsou v souladu s množstvím polyfenolů z předchozího měření. Polyfenoly jsou totiž pokládány za skupinu látek s vysokými antioxidačními účinky. Mezi další významné antioxidanty kromě polyfenolů se řadí také například karotenová nebo xantofylová barviva.

Tabulka 13 Výsledky stanovení antioxidační aktivity metodou s DPPH u bezlepkového müsli

	Frakce polyfenolů (mg TE.g ⁻¹) ± SD			
	volné	konjugované	vázané	celkové
vzorek 4	5,46 ± 0,31 ^a	3,11 ± 0,11 ^a	1,83 ± 0,05 ^a	10,40 ± 0,16 ^a
vzorek 5	7,92 ± 0,39 ^b	3,14 ± 0,15 ^b	1,80 ± 0,10 ^a	13,85 ± 0,20 ^b
vzorek 6	7,95 ± 0,38 ^b	0,41 ± 0,03 ^c	1,77 ± 0,10 ^b	12,86 ± 0,22 ^c

SD směrodatná odchylka

Hodnoty ve sloupcích, které mají stejné písmenné indexy, mezi sebou nevykazují statisticky významný rozdíl ($P \geq 0,05$). Hodnoty ve sloupcích, které mají odlišné písemné indexy, se mezi sebou statisticky liší ($P < 0,05$).

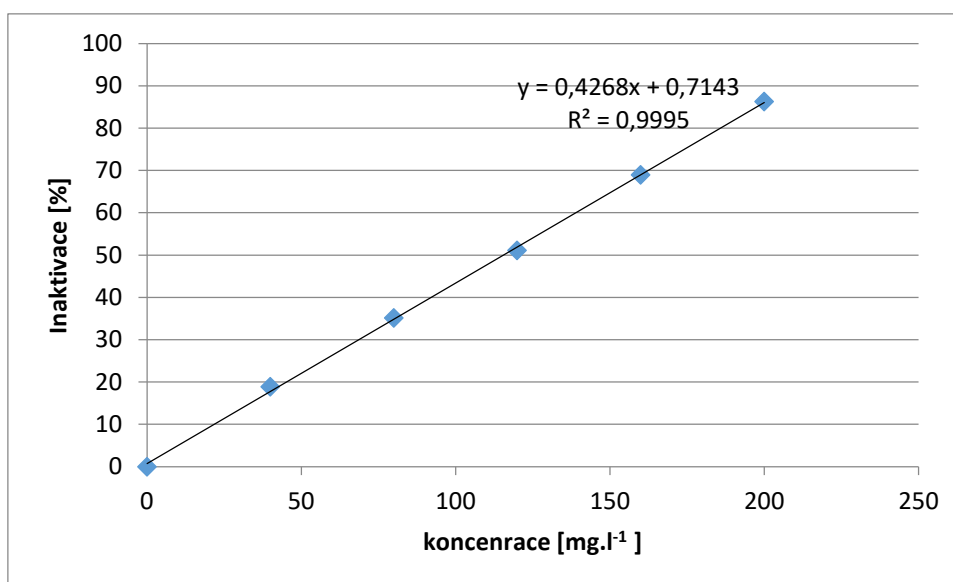
U bezlepkových müsli směsí byla naměřena celková nejvyšší antioxidační aktivita u vzorku č. 5, a to 13,85 mg TE.g⁻¹ a nejnižší u vzorku č. 4 (10,40 mg TE.g⁻¹). Nevyšší antioxidační aktivitu vykazovaly vzorky ve volných frakcích. Stejně jako u směsí obsahujících lepek tak i u bezlepkových směsí hodnoty antioxidační aktivity a celkové množství polyfenolů spolu korelují. K vysokému obsahu polyfenolů u vzorku č.5 přispěly vločky černé quinoi, konopná semínka a zajisté i jedlé květy.

7.2.1 Kalibrační křivka pro stanovení antioxidační aktivity s DPPH

Pro stanovení antioxidační aktivity metodou s DPPH byl jako standard použit trolox. Kalibrační křivka byla sestrojena podle postupu uvedeného v kapitole 6.5.3 a výsledná antioxidační aktivita byla vyjádřena jako ekvivalentní množství troloxu v mg na 1 g vzorku.

Tabulka 14 Hodnoty závislosti koncentrace na inaktivaci metodou s DPPH

Koncentrace [mg.l^{-1}]	Inaktivace [%]
0	0
40	18,90
80	35,12
120	51,12
160	68,96
200	86,27



Graf 2 – Kalibrační křivka závislosti inaktivace na koncentraci troloxu (metoda s DPPH)

7.3 Výsledky stanovení antioxidační aktivity s ABTS

Nejprve byla provedena extrakce podle postupu uvedeného v kapitole 6.3. Úbytek absorbance byl měřen proti pufru při vlnové délce 724 nm na spektrofotometru Lambda 25. Úbytek absorbance byl přepočten na % inaktivace. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost inaktivace na koncentraci troloxu pomocí lineární regrese byla antioxidační aktivita přepočtena na ekvivalentní množství troloxu v μmol na 1 g vzorku.

7.3.1 Výsledky stanovení antioxidační aktivity metodou s ABTS u směsí müsli

Tabulka 15 Výsledky stanovení antioxidační aktivity u směsí müsli s lepem

	Frakce polyfenolů ($\mu\text{mol TE.g}^{-1}$) \pm SD			
	volné	konjugované	vázané	celkové
vzorek 1	$7,76 \pm 0,30^a$	$9,07 \pm 0,37^a$	$2,70 \pm 0,18^a$	$19,53 \pm 0,28^a$
vzorek 2	$9,29 \pm 0,31^b$	$8,26 \pm 0,28^b$	$2,90 \pm 0,10^a$	$20,45 \pm 0,22^b$
vzorek 3	$8,44 \pm 0,23^c$	$8,37 \pm 0,15^b$	$3,97 \pm 0,12^b$	$20,78 \pm 0,17^b$

SD směrodatná odchylka

Hodnoty ve sloupcích, které mají stejné písmenné indexy, mezi sebou nevykazují statisticky významný rozdíl ($P \geq 0,05$). Hodnoty ve sloupcích, které mají odlišné písmenné indexy, se mezi sebou statisticky liší ($P < 0,05$).

U metody s ABTS byla zjištěna nejvyšší antioxidační aktivita u vzorku č. 2 ($20,45 \mu\text{mol TE.g}^{-1}$), a č. 3 ($20,78 \mu\text{mol TE.g}^{-1}$). Výsledky metody s ABTS nekorelují s obsahem polyfenolů a antioxidační aktivitou zjištěnou metodou DPPH. Důvodem je nejspíš i rozdíl v mechanismu při zhašení radikálů ABTS a DPPH. Metoda ABTS je obecně považována za citlivější [16].

Tabulka 1 Výsledky stanovení antioxidační aktivity u bezlepkových směsí müsli

	Frakce polyfenolů ($\mu\text{mol TE.g}^{-1}$) \pm SD			
	volné	konjugované	vázané	celkové
vzorek 4	$26,66 \pm 0,95^a$	$8,33 \pm 0,32^a$	$16,95 \pm 0,68^a$	$51,94 \pm 0,62^a$
vzorek 5	$21,97 \pm 0,72^b$	$6,33 \pm 0,15^b$	$16,36 \pm 0,32^a$	$44,66 \pm 0,50^b$
vzorek 6	$21,98 \pm 0,85^b$	$4,03 \pm 0,27^c$	$18,14 \pm 0,67^b$	$44,15 \pm 0,65^c$

SD směrodatná odchylka

Hodnoty ve sloupcích, které mají stejné písmenné indexy, mezi sebou nevykazují statisticky významný rozdíl ($P \geq 0,05$). Hodnoty ve sloupcích, které mají odlišné písmenné indexy, se mezi sebou statisticky liší ($P < 0,05$).

U bezlepkových směsí byla zjištěna metodou ABTS nejvyšší celková antioxidační aktivita u vzorku č. 4 ($51,94 \mu\text{mol TE.g}^{-1}$). K vysoké antioxidační aktivitě u tohoto vzorku přispívají zejména konopná semínka, která jsou velmi bohatá na antioxidanty, nebo také květy Chrysy. E. Marian al. (2017) ve své studii uvádí, že chrpa je vynikající zdrojem antioxidantů. Nejnižší antioxidační aktivitu vykazoval vzorek č. 6 ($44,15 \mu\text{mol TE.g}^{-1}$). Nejvyšší antioxidační

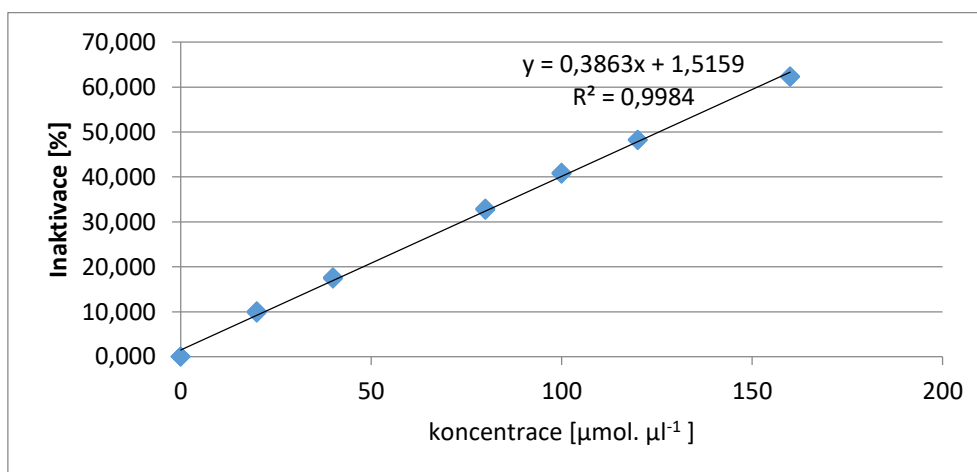
aktivita byla naměřena ve volných frakcích a nejnižší ve frakcích konjugovaných. Dle naměřených hodnot byla zjištěna statisticky shodná antioxidační aktivita u vzorku č. 5 a 6 ve volných frakcích a ve vázaných u vzorků č. 4 a 5.

7.3.2 Kalibrační křivka pro stanovení antioxidační aktivity metodou s ABTS

Jako standard byl použit trolox, jako u předchozí metody. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost inaktivace na koncentraci troloxu v $\mu\text{mol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Kalibrační křivka byla sestrojena podle postupu popsaného v kapitole 6.6.4. Z rovnice lineární regrese $y = 0,3863x + 1,5159$ (hodnota spolehlivosti $R^2=0,9984$) byla vypočítána hodnota antioxidační aktivity.

Tabulka 2 Hodnoty závislosti absorbance na koncentraci troloxu (metoda s ABTS)

koncentrace [$\mu\text{mol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$]	Inaktivace [%]
0	0
20	9,93
40	17,53
80	32,77
100	40,76
120	48,23
160	62,28



Graf 3 – Kalibrační křivka závislosti inaktivace na koncentraci troloxu (metoda s ABTS)

7.4 Výsledky stanovení polyfenolického profilu pomocí HPLC

V cereálních směsích s jedlými květy byly analyzovány a detekovány profily jednotlivých fenolických sloučenin v jednotlivých frakcích.

Tabulka 3 Výsledky stanovení profilu fenolických sloučenin ve volných frakcích u vzorků obsahujících lepek

[$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3
Gallová	28,4 \pm 0,8 ^a	10,8 \pm 0,1 ^b	4,7 \pm 0,2 ^c
3,4-dihydroxybenzoová	14,4 \pm 0,5 ^a	16,4 \pm 0,3 ^b	10,2 \pm 0,1 ^c
4-hydroxybenzoová	N.D	N.D	N.D
Epigallokatechin	1016 \pm 4 ^a	N.D	35,2 \pm 0,3 ^b
Katechin	18,3 \pm 0,3	N.D	N.D
Vanilová	N.D	17,2 \pm 0,7 ^a	19,3 \pm 0,4 ^b
Chlorogenová	N.D	9,3 \pm 0,2 ^a	4,06 \pm 0,21 ^b
Kávová	433 \pm 12,3	N.D	N.D
Syringová	8,46 \pm 0,19 ^a	18,1 \pm 0,3 ^b	17,9 \pm 0,7 ^c
Epikatechin	6,67 \pm 0,25 ^a	38,5 \pm 1,2 ^b	31,9 \pm 0,5 ^c
<i>trans-p</i> -kumarová	N.D	3,67 \pm 0,12 ^a	0,09 \pm 0,01 ^b
Ferulová	33,7 \pm 1,9 ^a	30,0 \pm 1,1 ^b	8,51 \pm 0,35 ^c
Sinapová	27,5 \pm 1,2 ^a	N.D	8,22 \pm 0,34 ^b
Elagová	388 \pm 5 ^a	19,6 \pm 0,8 ^b	5,85 \pm 0,26 ^c
Rutin	81,9 \pm 2,1 ^a	11,7 \pm 0,3 ^b	4,01 \pm 0,16 ^c
<i>trans-2</i> -hydroxyskořicová	1,91 \pm 0,08 ^a	1,68 \pm 0,07 ^b	2,68 \pm 0,12 ^c
Protokatechin ester	2,34 \pm 0,09 ^a	16,7 \pm 0,7 ^b	1,39 \pm 0,06 ^c
Resveratrol	N.D	N.D	N.D
<i>trans</i> -skořicová	N.D	N.D	N.D
Kvercetin	N.D	N.D	N.D
Kaempferol	N.D	N.D	N.D

SD směrodatná odchylka, N.D. – látka nebyla detekována

Hodnoty v řádcích, které mají stejné písmenné indexy, mezi sebou nevykazují statisticky významný rozdíl ($P \geq 0,05$). Hodnoty v řádcích, které mají odlišné písmenné indexy, se mezi sebou statisticky liší ($P < 0,05$).

U vzorku č. 1 byl nejvíce zastoupený epigallokatechin, jehož koncentrace dosahovala 1016 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, nejméně zastoupená byla kyselina *trans-2*-hydroxyskořicová (1,91 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Vzorek neobsahoval 4-hydroxybenzoovou, vanilovou, chlorogenovou *trans-p*-kumarovou kyselinu. Vzorek č. 2 obsahoval nejvyšší koncentrace epikatechinu, a to 38,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a nejméně stejně jako vzorek č. 1 kyselinu *trans-2*-hydroxyskořicovou (1,68 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Vzorek neobsaho-

val epigallokatechin, katechin, kyselinu kávovou a sinapovou. Vzorek č. 3 byl nejvíce zastoupen epigallokatechinem ($35,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) a nejméně *trans-p*-kumarovou kyselinou ($0,09 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Vzorek neobsahoval katechin a kyselinu kávovou. Ani jeden ze vzorků neobsahoval kyselinu 4-hydroxybenzoovou, resveratrol, *trans*-skořicovou kyselinu, kvercetin a kaempferol.

Tabulka 4 Výsledky stanovení profilu fenolických sloučenin v konjugovaných frakcích u vzorků obsahujících lepek

$[\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}]$	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3
Gallová	$10,8 \pm 0,3^a$	$4,01 \pm 0,08^b$	$8,66 \pm 0,34^c$
3,4-dihydroxybenzoová	$10,3 \pm 0,4^a$	$10,4 \pm 0,3^a$	$9,29 \pm 0,23^b$
4-hydroxybenzoová	N.D	N.D	N.D
Epigallokatechin	N.D	N.D	N.D
Katechin	N.D	N.D	N.D
Vanilová	N.D	N.D	N.D
Chlorogenová	920 ± 5^a	$7,03 \pm 0,18^b$	$28,6 \pm 1,0^c$
Kávová	N.D	N.D	N.D
Syringová	$15,2 \pm 0,2^a$	$14,6 \pm 0,2^b$	$1,20 \pm 0,05^c$
Epikatechin	N.D	$64,38 \pm 2,82$	N.D
<i>trans-p</i> -kumarová	$0,17 \pm 0,01^a$	$3,15 \pm 0,08^b$	$0,68 \pm 0,02^c$
Ferulová	$26,9 \pm 1,1^a$	$16,1 \pm 0,6^b$	$12,3 \pm 0,6^c$
Sinapová	$25,5 \pm 1,0^a$	$1,75 \pm 0,07^b$	$12,3 \pm 0,5^c$
Elagová	$16,4 \pm 0,7$	N.D	N.D
Rutin	$26,6 \pm 1,2$	N.D	N.D
<i>trans</i> -2-hydroxyskořicová	$1,31 \pm 0,04$	N.D	N.D
Protokatechin ester	$3,18 \pm 0,12^a$	$1,36 \pm 0,05^b$	N.D
Resveratrol	N.D	N.D	N.D
<i>trans</i> -skořicová	N.D	N.D	N.D
Kvercetin	N.D	N.D	N.D
Kaempferol	N.D	N.D	N.D

SD směrodatná odchylka, N.D. – Nebyla nalezena žádná koncentrace

Hodnoty v řádcích, které mají stejné písmenné indexy, mezi sebou nevykazují statisticky významný rozdíl ($P \geq 0,05$). Hodnoty v řádcích, které mají odlišné písmenné indexy, se mezi sebou statisticky liší ($P < 0,05$).

Nejvíce zastoupenou fenolickou kyselinou v konjugovaných frakcích u vzorku č. 1 je kyselina chlorogenová ($920 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) a nejméně zastoupená je *trans-p*-kumarová kyselina ($0,17 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Vzorek č. 2 obsahuje nejvíce epikatechinu ($64,38 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) a nejméně protokatechin esteru ($1,36 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Vzorek č. 3 byl nejvíce zastoupen kyselinou chlorogenovou ($28,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) a nejméně *trans-p*-kumarovou kyselinou. Ani jeden vzorek neobsahoval

4-hydroxybenzoovou kyselinu, epigallokatechin, katechin, vanilovou kyselinu, kyselinu kávovou, resveratrol, *trans*-skořicovou kyselinu, kvercetin a kaempferol.

Tabulka 5 Výsledky stanovení profilu fenolických sloučenin ve vázaných frakcích u vzorků obsahujících lepek

[$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3
Gallová	$0,97 \pm 0,03^a$	N.D	$2,47 \pm 0,11^b$
3,4-dihydroxybenzoová	$2,67 \pm 0,10^a$	$4,88 \pm 0,18^b$	$2,84 \pm 0,16^a$
Chlorogenová	$17,1 \pm 0,7$	N.D	N.D
Ferulová	N.D	N.D	$119 \pm 4,00^c$

SD směrodatná odchylka, N.D. – Nebyla nalezena žádná koncentrace

Hodnoty v řádcích, které mají stejné písmenné indexy, mezi sebou nevykazují statisticky významný rozdíl ($P \geq 0,05$). Hodnoty v řádcích, které mají odlišné písmenné indexy, se mezi sebou statisticky liší ($P < 0,05$).

Ve vázaných frakcích byl zjištěn velmi nízký obsah fenolických sloučenin. U vzorku č. 1 byla nejvíce zastoupena kyselina chlorogenová ($17,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), u vzorku č. 2 byla naměřena pouze jedna fenolická kyselina, a to kyselina 3,4-dihydroxybenzoová. U vzorku č. 3 byla nejvíce zastoupena kyselina ferulová ($119 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

Tabulka 6 Výsledky stanovení celkového profilu fenolických sloučenin u vzorků obsahujících lepek

[$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3
Gallová	40,1 \pm 0,3 ^a	14,8 \pm 0,1 ^b	15,8 \pm 0,2 ^b
3,4-dihydroxybenzoová	27,4 \pm 0,3 ^a	31,8 \pm 0,2 ^a	22,4 \pm 0,1 ^b
4-hydroxybenzoová	N.D.	N.D.	N.D.
Epigallokatechin	1016 \pm 4 ^a	N.D.	35,1 \pm 0,3 ^b
Katechin	18,3 \pm 0,3	N.D.	N.D.
Vanilová	N.D.	17,2 \pm 0,7 ^a	19,3 \pm 0,4 ^b
Chlorogenová	937,1 \pm 4,4 ^a	16,2 \pm 0,1 ^b	32,6 \pm 0,5 ^c
Kávová	433 \pm 12,3	N.D.	N.D.
Syringová	23,7 \pm 0,2 ^a	32,7 \pm 0,2 ^b	19,1 \pm 0,2 ^c
Epikatechin	6,6 \pm 0,2 ^a	102 \pm 2 ^b	31,9 \pm 0,5 ^c
<i>trans-p</i> -kumarová	0,17 \pm 0,01 ^a	6,82 \pm 0,09 ^b	0,76 \pm 0,02 ^a
Ferulová	60,7 \pm 1,5 ^a	46,2 \pm 0,8 ^b	140 \pm 3 ^c
Sinapová	53,0 \pm 1,1 ^a	1,75 \pm 0,07 ^b	35,2 \pm 0,5 ^c
Elagová	405 \pm 4 ^a	19,6 \pm 0,8 ^b	5,8 \pm 0,2 ^c
Rutin	108 \pm 2 ^a	11,7 \pm 0,3 ^b	4,01 \pm 0,16 ^c
<i>trans</i> -2-hydroxyskořicová	3,22 \pm 0,06 ^a	1,68 \pm 0,07 ^b	2,68 \pm 0,12 ^b
Protokatechin ester	5,52 \pm 0,10 ^a	18,11 \pm 0,65 ^b	1,39 \pm 0,06 ^c
Resveratrol	N.D.	N.D.	N.D.
<i>trans</i> -skořicová	N.D.	N.D.	N.D.
Kvercetin	N.D.	N.D.	N.D.
Kaempferol	N.D.	N.D.	N.D.

SD směrodatná odchylka, N.D. – Nebyla nalezena žádná koncentrace

Hodnoty v řádcích, které mají stejné písmenné indexy, mezi sebou nevykazují statisticky významný rozdíl ($P \geq 0,05$). Hodnoty v řádcích, které mají odlišné písmenné indexy, se mezi sebou statisticky liší ($P < 0,05$).

Nejvyšší koncentrace epigallokatechinu byla detekována u vzorku č. 1. Tento výsledek může být způsoben např. přítomností zeleného čaje ve vzorku, jelikož Shahidi et al. (2015) ve své studii uvádí, že převládající fenolickou kyselinou v zeleném čaji je právě epigallokatechin. Naopak nejméně zastoupená fenolická sloučenina u vzorku č. 1 byla kyselina *trans-p*-kumarová. Vzorek č. 2 obsahoval nejvíce epikatechinu a nejméně kyseliny sinapové. Vzorek č. 3 byl nejvíce zastoupen kyselinou ferulovou a nejméně kyselinou *trans-p*-kumarovou. V žád-

ném z těchto vzorků nebyly nalezeny žádné koncentrace kyseliny 4-hydroxybenzoové, resveratrolu, *trans*-skořicové kyseliny, kvercetin a kaempferolu. Vysoká koncentrace kyseliny ferulové ve vzorku je zajisté dána přítomností pšeničných vloček Pšenice obsahuje řadu sloučenin, například kyselinu ferulovou, kávovou, syringovou, *p*-kumarovou. Z těchto je primární kyselinou kyselina ferulová, pšeničná zrna obsahují až 90 % této kyseliny z polyfenolických kyselin [28].

Tabulka 7 Výsledky stanovení profilu fenolických sloučenin ve volných frakcích u bezlepkových vzorků

[$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	vzorek 4	vzorek 5	vzorek 6
Gallová	$25,6 \pm 1,0^a$	113 ± 2^b	$3,69 \pm 0,16^c$
3,4-dihydroxybenzoová	$93,3 \pm 2,4^a$	$26,7 \pm 0,8^b$	$77,9 \pm 2,8^c$
4-hydroxybenzoová	N.D	N.D	N.D
Epigallokatechin	623 ± 9	N.D	N.D
Katechin	$31,1 \pm 1,4$	N.D	N.D
Vanilová	N.D	$15,5 \pm 0,4^a$	$18,5 \pm 0,4^b$
Chlorogenová	1021 ± 11^a	N.D	$6,18 \pm 0,29^b$
Kávová	N.D	$1,46 \pm 0,05$	N.D
Syringová	N.D	$17,1 \pm 0,7$	N.D
Epikatechin	$8,39 \pm 0,43^a$	$26,0 \pm 0,6^b$	$80,3 \pm 1,2^c$
<i>trans-p</i> -kumarová	$0,30 \pm 0,01^a$	$4,00 \pm 0,05^b$	$0,04 \pm 0,01^c$
Ferulová	$39,4 \pm 1,9^a$	$37,7 \pm 1,0^b$	N.D
Sinapová	$39,8 \pm 1,6^a$	$60,8 \pm 2,3^b$	N.D
Elagová	355 ± 10^a	135 ± 3^b	$8,32 \pm 0,27^c$
Rutin	124 ± 5^a	$14,6 \pm 0,6^b$	$19,7 \pm 0,85^c$
<i>trans</i> -2-hydroxyskořicová	$1,69 \pm 0,04$	N.D	N.D.
Protokatechin ester	$5,10 \pm 0,21^a$	$12,22 \pm 0,56^b$	$1,53 \pm 0,12^c$
Resveratrol	N.D.	N.D.	N.D.
<i>trans</i> -skořicová	N.D.	N.D.	N.D.
Kvercetin	N.D.	N.D.	N.D.
Kaempferol	N.D.	N.D.	N.D.

SD směrodatná odchylka, N.D. – Nebyla nalezena žádná koncentrace

Hodnoty v rádcích, které mají stejné písmenné indexy, mezi sebou nevykazují statisticky významný rozdíl ($P \geq 0,05$). Hodnoty v rádcích, které mají odlišné písmenné indexy, se mezi sebou statisticky liší ($P < 0,05$).

Nejvíce zastoupená kyselina u vzorku č. 4 byla kyselina chlorogenová ($1021 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), naopak nejméně zastoupená kyselina byla kyselina *trans-p*-kumarová ($0,30 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Nejvyšší koncentrace z polyfenolů vzorku č. 5 byla detekována u kyseliny elagové ($135 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) a nejnižší u kyseliny kávové ($1,46 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Šestý vzorek obsahoval nejvíce epikatechinu ($80,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) a nejméně *trans-p*-kumarové kyseliny ($0,04 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). V bezpečkových směsích nebyly detekovány ve volných frakcích koncentrace kyseliny 4-hydroxybenzoové, resveratrolu, *trans*-skořicové kyseliny, kvercetinu a kaempferolu.

Tabulka 8 Výsledky stanovení profilu fenolických sloučenin v konjugovaných frakcích u bezpečkových vzorků

[$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	vzorek 4	vzorek 5	vzorek 6
Gallová	$23,2 \pm 1,0^a$	155 ± 3^b	N.D
3,4-dihydroxybenzoová	182 ± 4^a	$52,5 \pm 1,7^b$	178 ± 3^c
4-hydroxybenzoová	$4,78 \pm 0,22^a$	$20,5 \pm 0,9^b$	$8,29 \pm 0,24^c$
Epigallokatechin	N.D	N.D	N.D
Katechin	$16,9 \pm 0,8$	N.D	N.D
Vanilová	N.D	$16,4 \pm 0,7$	N.D
Chlorogenová	264 ± 2^a	$18,0 \pm 0,6^b$	$33,7 \pm 1,0^c$
Kávová	N.D	N.D	N.D
Syringová	N.D	$10,4 \pm 0,3$	N.D
Epikatechin	N.D	$66,8 \pm 1,0$	N.D
<i>trans-p</i> -kumarová	$2,41 \pm 0,05^a$	$0,10 \pm 0,02^b$	$0,46 \pm 0,05^c$
Ferulová	$34,2 \pm 1,2^a$	$24,6 \pm 0,7^b$	$4,15 \pm 0,11^c$
Sinapová	$27,1 \pm 1,1^a$	$6,12 \pm 0,28^b$	N.D
Elagová	$8,75 \pm 0,43^a$	$72,7 \pm 0,88^b$	N.D
Rutin	$44,8 \pm 2,02^a$	$3,31 \pm 0,11^b$	$2,76 \pm 0,09^c$
<i>trans</i> -2-hydroxyskořicová	$1,37 \pm 0,06$	N.D	N.D
Protokatechin ester	N.D	N.D	N.D
Resveratrol	N.D	N.D	N.D
<i>trans</i> -skořicová	N.D	N.D	N.D
Kvercetin	N.D	N.D	N.D
Kaempferol	N.D	N.D	N.D

SD směrodatná odchylka, N.D. – Nebyla nalezena žádná koncentrace

Hodnoty v řádcích, které mají stejné písmenné indexy, mezi sebou nevykazují statisticky významný rozdíl ($P \geq 0,05$). Hodnoty v řádcích, které mají odlišné písmenné indexy, se mezi sebou statisticky liší ($P < 0,05$).

Koncentrace fenolických sloučenin u konjugovaných frakcí jsou značně nižší než u volných frakcí. Vzorek č. 4 obsahoval nejvyšší koncentraci kyseliny chlorogenové ($264 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) a nejnižší *trans*-2-hydroxyskořicové kyseliny ($1,37 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). U vzorku č. 5 byly naměřeny nejvyšší koncentrace kyseliny gallové ($155 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) a nejnižší *trans*-*p*-kumarové kyseliny ($0,10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). U vzorku č.6 byly detekovány nejvyšší koncentrace 3,4-dihydroxybenzoové kyseliny ($178 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) a nejnižší *trans*-*p*-kumarové kyseliny ($0,46 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Konjugované frakce neobsahovaly epigallokatechin, kyselinu kávovou, protokatechin ester, resveratrol, *trans*-skořicovou kyselinu, kvercetin a kaempferol ani v jednom ze vzorků.

Tabulka 9 Výsledky stanovení profilu fenolických sloučenin ve vázaných frakcích u bezlepkových vzorků

$[\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}]$	vzorek 4	vzorek 5	vzorek 6
Gallová	N.D	N.D	N.D
3,4-dihydroxybenzoová	$17,1 \pm 0,5^a$	N.D	$18,9 \pm 0,8^b$
Chlorogenová	160 ± 2	N.D	N.D
<i>trans</i> - <i>p</i> -kumarová	$0,33 \pm 0,11$	N.D	N.D
Ferulová	$78,5 \pm 2,9^a$	$29,3 \pm 0,4^b$	$29,5 \pm 1,1^b$

SD směrodatná odchylka, N.D. – Nebyla nalezena žádná koncentrace

Hodnoty v řádcích, které mají stejné písmenné indexy, mezi sebou nevykazují statisticky významný rozdíl ($P \geq 0,05$). Hodnoty v řádcích, které mají odlišné písmenné indexy, se mezi sebou statisticky liší ($P < 0,05$).

U vázaných frakcí bylo detekováno pouze 5 fenolických sloučenin. Vzorek č. 4 obsahoval nejvíce kyseliny chlorogenové ($160 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), u vzorku č. 5 byla detekována pouze jedna sloučenina, a to kyselina ferulová s koncentrací $29,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Vzorek č.6 obsahoval kyselinu 3,4-dihydroxybenzoovou ($18,9 \mu\text{g}/\text{g}$) a kyselinu ferulovou ($29,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

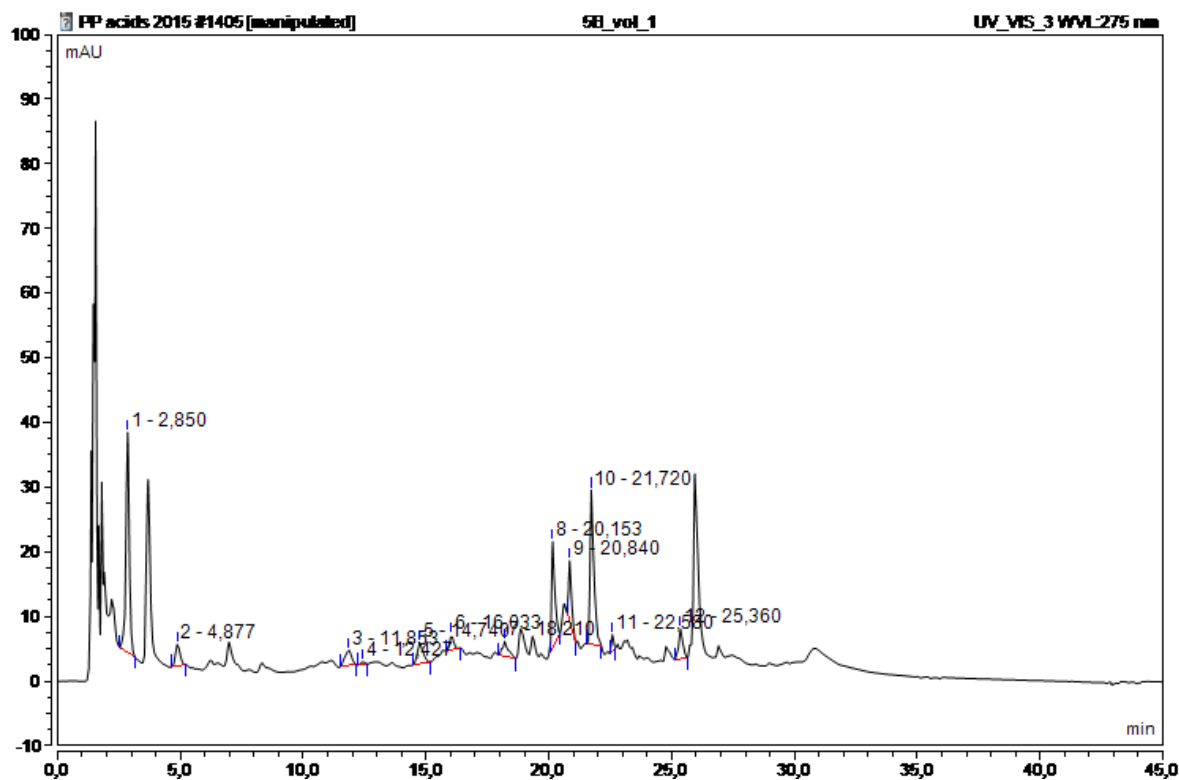
Tabulka 10 Výsledky stanovení celkového profilu fenolických sloučenin u bezpečkových vzorků

[$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	vzorek 4	vzorek 5	vzorek 6
Gallová	48,8 ± 1,0 ^a	268 ± 3 ^b	3,69 ± 0,16 ^c
3,4-dihydroxybenzoová	292 ± 2 ^a	78,2 ± 1,1 ^b	275 ± 2 ^c
4-hydroxybenzoová	4,78 ± 0,22 ^a	20,5 ± 0,9 ^b	8,29 ± 0,24 ^c
Epigallokatechin	623 ± 9	N.D.	N.D.
Katechin	18,3 ± 0,3	N.D.	N.D.
Vanilová	48,1 ± 0,1	N.D.	N.D.
Chlorogenová	1446 ± 4 ^a	18,0 ± 0,6 ^b	39,9 ± 0,7 ^c
Kávová	N.D.	1,46 ± 0,05	N.D.
Syringová	N.D.	27,5 ± 0,5	N.D.
Epikatechin	8,39 ± 0,43 ^a	92,9 ± 0,9 ^b	80,3 ± 1,2 ^c
<i>trans-p</i> -kumarová	3,04 ± 0,07 ^a	4,10 ± 0,04 ^a	0,50 ± 0,04 ^b
Ferulová	152 ± 2 ^a	91,7 ± 0,7 ^b	33,7 ± 1,0 ^c
Sinapová	67,0 ± 1,3 ^a	67,0 ± 2,1 ^a	N.D.
Elagová	364 ± 5 ^a	208 ± 2 ^b	8,32 ± 0,27 ^c
Rutin	169 ± 4 ^a	17,9 ± 0,4 ^b	22,4 ± 0,7 ^c
<i>trans-2</i> -hydroxyskořicová	3,06 ± 0,05	N.D.	N.D.
Protokatechin ester	5,10 ± 0,21 ^a	12,2 ± 0,5 ^b	1,53 ± 0,12 ^c
Resveratrol	N.D.	N.D.	N.D.
<i>trans</i> -skořicová	N.D.	N.D.	N.D.
Kvercetin	N.D.	N.D.	N.D.
Kaempferol	N.D.	N.D.	N.D.

SD směrodatná odchylka, N.D. – Nebyla nalezena žádná koncentrace

Hodnoty v řádcích, které mají stejné písmenné indexy, mezi sebou nevykazují statisticky významný rozdíl ($P \geq 0,05$). Hodnoty v řádcích, které mají odlišné písmenné indexy, se mezi sebou statisticky liší ($P < 0,05$).

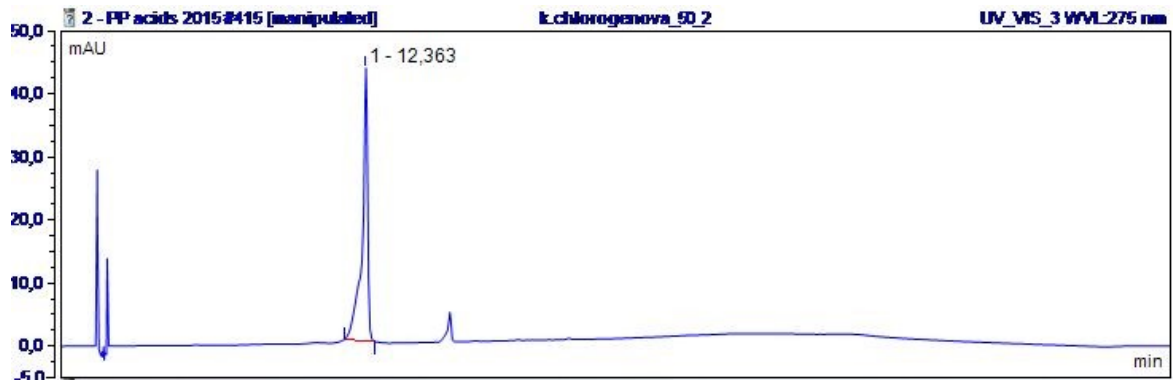
U bezpečkových vzorků byla nejzastoupenější kyselina chlorogenová, která byla nejvíce zastoupena u vzorku č. 4. Mezi další fenolické sloučeniny, které se vyskytovaly ve vyšším množství, patří kyseliny ferulová a elagová, dále rutin a epikatechin. Amarowitz et al. (1996) uvádí, že hojně se vyskytující kyselinou v zeleném čaji, kromě epigallokatechinu, je právě epikatechin. Mezi další kyseliny vyskytující se v zeleném čaji ve vyšším množství je například kyselina gallová. Ve studii Shahidi et al. (2015) bylo zjištěno, že kyselina chlorogenová je hojně zastoupena například v květech ibišku.



Obrázek 7 – Ukázka chromatogramu u vzorku č. 5 (volná frakce)

Tabulka 11 Retenční časy standardů

	retenční čas [min]
Gallová	2,850
3,4-dihydroxybenzoová	4,877
Vanilová	11,853
Kávová	12,427
Syringová	14,704
Epikatechin	16,033
<i>trans-p</i> -kumarová	18,210
Ferulová	20,840
Sinapová	22,580
Elagová	25,360
Rutin	25,360



Obrázek 8 – Ukázka chromatogramu kalibrační křivka kyseliny chlorogenové

7.4.1 Kalibrační křivky pro stanovení polyfenolického profilu metodu HPLC

Kalibrační křivky byly sestaveny podle postupu uvedeného v kapitole 6.7.1a jsou uvedeny v Příloze I.

ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce byla popsána stavba obilného zrna a jeho chemické složení a chemické složení jedlých květů. Dále byly popsány principy metodik pro stanovení polyfenolů a antioxidační aktivity, princip spektrofotometrie a stanovení polyfenolů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Nejvíce polyfenolů v müsli směsích je obsaženo ve vzorku č. 5. To bylo způsobeno přidavkem konopných semínek, slézu a chrpy, které jsou bohaté na polyfenoly. K vysokému množství polyfenolů zajisté přispěla i černá quinoa. V bezlepkových směsích se polyfenoly nejvíce vyskytovaly v konjugovaných frakcích, u směsí s lepkem to bylo ve frakcích volných.

Metodou s DPPH bylo zjištěno, že nejvyšší antioxidační aktivitu vykazuje vzorek č. 5. Výsledek měření koreluje s množstvím polyfenolů ve vzorku, jelikož polyfenoly jsou přispěvateli k antioxidační aktivitě. U metody ABTS byla zjištěna nejvyšší antioxidační aktivita u vzorku č. 4. Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazovaly vzorky ve volných frakcích. Rozdíl ve výsledcích zjištěných metodou s DPPH a s metodou ABTS je nejspíš způsoben rozdílným mechanismem při zhášení radikálů.

Při detekci fenolických sloučenin pomocí HPLC bylo zjištěno, že nejzastoupenější kyselinou byla kyselina chlorogenová. Další hojně zastoupené fenolické sloučeniny byly kyselina ferulová, epigallokatechin, kyselina gallová a elagová. Tyto sloučeniny se také vyskytovaly převážně ve volných frakcích.

Celková koncentrace polyfenolů a antioxidační aktivita byla zjištěna vyšší u bezlepkových směsí než u směsí, které obsahovaly lepek. Toto může být právě důsledkem výběru netradičních obilovin s barevnými obalovými vrstvami a také přidavkem jedlých květů.

Výroba müsli směsí s jedlými květy by mohlo vést nejen ke zvýšení nutriční hodnoty, ale jsou také dobrým zdrojem biologicky aktivních látek, především antioxidantů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KUČEROVÁ, J., *Technologie cereálií*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2008. ISBN 978-80-7157-811-6
- [2] PŘÍHODA, J., SKŘIVAN, P., HRUŠKOVÁ, M., *Cereální chemie a technologie I*, Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2003. ISBN 80-7080- 530-7
- [3] HOSENEY, RC., 1994. *Principles of Cereal Science and Technology*. 2nd ed, American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.
- [4] MENON, Ravi, Tanhia GONZALEZ, Mario FERRUZZI, Eric JACKSON, Dan WINDERL a Jay WATSON. *Oats—From Farm to Fork*. s. 1. Advances in Food and Nutrition Research. vol. 77, Pages 1 - 55. 2016.
- [5] KENT, Normal Leslie and A.D. EVERS. *Kent's Technology of cereals: an introduction for students of food science and agriculture*. 4th ed. Exeter, UK: BPC Wheatons Ltd. ©1994. ISBN 978-1-59124-108-9.
- [6] ARENDT, E., ZANNINI, E., *Cereal grains for the food and beverage industries*, 2013, ISBN. 978-0-85709-413-1.
- [7] SHEWRY, Peter R. *Improving the protein content and composition of cereal grain*. Journal of Cereal Science .2007, vol. 46, iss. 3, s. 239–250. ISSN 0733-5210.
- [8] KADLEC, P., A KOLEKTIV, *Technologie potravin I*, Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2007. ISBN 80-7080-509-9.4
- [9] WIJNGAARD, Hilde Henny and Elke K. ARENDT. *Buckwheat*. Cereal Chemistry 2006, vol. 83, iss. 4, s. 391–401. ISSN 0009-0352
- [10] HAGER, A. S., WOLKER, A., JACOB, F., ZANNINI, E., ARENDT, E. K., *Nutritional properties and ultra-structure of commercial gluten free flours from different botanical sources compared to wheat flours*. Journal of Cereal Science, 2012, vol. 56, pp. 239 – 247.
- [11] DODEVSKA, Margarita S. et al., *Characterisation of dietary fibre components in cereals and legumes used in Serbian diet*. Food Chemistry [online]. 2013, vol. 141, iss. 3, s. 1624–1629. ISSN 0308-8146.

- [12] HLEBOWICZ, Joanna et al. *Effect of commercial breakfast fibre cereals compared with corn flakes on postprandial blood glucose, gastric emptying and satiety in healthy subjects: a randomized blinded crossover trial*. Nutrition Journal. 2007, vol. 6, art. no. 22. ISSN 1475-2891
- [13] PRUGAR, J., *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí*, Praha: VÚPS, 2008. ISBN 978-80-86576-28-2
- [14] DEMIRBAS, A., *β -Glucan and mineral nutrient contents of cereals grown in Turkey*, Food Chemistry, 2005, vol. 90, pp. 773 – 777.
- [15] OKARTER, Neal et al. *Phytochemical content and antioxidant activity of six diverse varieties of whole wheat*. Food Chemistry [2010, vol. 119, iss. 1, s. 249–257. ISSN
- [16] KOTÁSKOVÁ, EVA, *Stanovení polyfenolů, flavonoidů a studie antioxidační aktivity u směsi mouk miličky habešské*, Zlín 2014. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav analýzy a chemie potravin
- [17] MLČEK J., ROP O. *Freshedible flowers of ornamental plants – A new source of nutraceutical*. Department of Food Technology a Microbiology, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlin. 2011
- [18] Vyhláška Ministerstva zemědělství 331/1997, kterou se §18 písm. a), d), h), i), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro koření, jedlou sůl, dehydratované výrobky a ochucovadla a hořčici. Dostupné také z <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-331> [cit 2018-04-22]
- [19] Vyhláška 225/2008, kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin Dostupné také z : <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/2008-225> [cit 2018-04-22]
- [20] AWIKA, JOSEPH M. et al. *Processing of sorghum (Sorghum bicolor) and sorghum products alters procyanidin oligomer and polymer distribution and content*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2003, vol. 51, iss. 18, s. 5516–5521. ISSN 0021-8561.
- [21] NAVARRO-GONZÁLEZ, Inmaculada, Rocío GONZÁLEZ-BARRIO, Verónica GARCÍA-VALVERDE, Ana BAUTISTA-ORTÍN a María PERIAGO. *Nutritional Composition and Antioxidant Capacity in Edible Flowers: Characterisation of*

- Phenolic Compounds* by HPLC-DAD-ESI/. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2015, **16**(1), 805-822. DOI: 10.3390/ijms16010805. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/16/1/805>]
- [22] MLČEK J., *Jedlé květy v gastronomii*. Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [23] CHEN, Nai-Hua a Sherrie WEI. *Factors influencing consumers' attitude towards the consumption of edible flowers*. *Food Quality and Preference*. 2017, **56**, 93-100 DOI: 10.1016/j.foodqual.2016.10.001. ISSN 09503293.
- [24] BOOTHROYD, Peter. a Xuân Nam. PHẠM. *Socioeconomics on micorenovation in Vietnam: the origin, evolution*. Singapore: Institute of Southeast Asian Studies, 2000.
- [25] SOTELO, Angela, Semei LÓPEZ-GARCÍA a Francisco BASURTO-PEÑA. *Content of Nutrient and Antinutrient in Edible Flowers of Wild Plants in Mexico*. *Plant Foods for Human Nutrition* 2007, **62**(3), 133-138 [cit. 2018-02-24]. DOI: 10.1007/s11130-007-0053-9. ISSN 0921-9668. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11130-007-0053-9>
- [26] REVANAPPA, S. B., PARAMAHANS, V. S., *Phenolic acid profiles and antioxidant activities of different wheat (Triticum aestivum L.) varieties*, *Journal of Food Biochemistry*, 2011 [27] PIRES, Tânia C.S.P., Maria Inês DIAS, Lillian BARROS a Isabel C.F.R. FERREIRA. *Nutritional and chemical characterization of edible petals and corresponding infusions: Valorization as new food ingredients*. *Food Chemistry* [online]. 2017, **220**, 337-343 DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.10.026. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616316430>
- [28] SHAHIDI, Fereidoon and Priyatharini AMBIGAIPALAN. *Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A Review*. *Journal of Functional Foods* [online]. 2015, vol. 18, s. 820– 897, part B. ISSN 1756-4646.
- [29] Vyhláška 157/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro čerstvé ovoce a čerstvou zeleninu, zpracované ovoce a zpracovanou zeleninu, suché skořápkové plody, houby, brambory a výrobky z nich, jakož i další způsoby jejich označování. Dostupné také z: <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/2003-157> [cit 2018-04-22]

- [30] ALASALVAR, Cesarettin, Magdalena KARAMAĆ, Ryszard AMAROWICZ a Fereidoon SHAHIDI. *Antioxidant and Antiradical Activities in Extracts of Hazelnut Kernel (Corylus avellana L.) and Hazelnut Green Leafy Cover*. Journal of Agricultural and Food Chemistry [online]. 2006, **54**(13), 4826-4832 [cit. 2018-02-27]. DOI: 10.1021/jf0601259. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0601259>
- [31] BORGES, Gina, Alexandra DEGENEVE, William MULLEN a Alan CROZIER. *Identification of Flavonoid and Phenolic Antioxidants in Black Currants, Blueberries, Raspberries, Red Currants, and Cranberries* †. Journal of Agricultural and Food Chemistry [online]. 2010, **58**(7), 3901-3909 DOI: 10.1021/jf902263n. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf902263n>
- [32] Klouda P., *Moderní analytické metody*, Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2003. 2. vyd., ISBN :80-863369-07-0.
- [33] SINICA, A., *Spektrofotometrie ve viditelné oblasti spektra*. Dostupné na: <http://www.vscht.cz/anl/lach1/5>
- [34] Studijní materiál: Spektrofotometrie. Dostupné na: <http://www.unium.cz/materialy/vut/fekt/3-cviceni-abch-10-m28667-p3.html>
- [35] BERKER, Kadriye Isil, Dilek OZYURT, Birsen DEMIRATA a Resat APAK. *Solid-Phase Extraction Spectrophotometric Determination of Total Antioxidant Capacity in Antioxidant-poor Samples by Using the Ferric-Ferrozine Method*. Analytical Sciences [online]. 2017, **33**(6), 683-689 DOI: 10.2116/analsci.33.683. ISSN 0910-6340. Dostupné z: https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/33/6/33_683/_article
- [36] CICCIO, N., LANORTE, T. M., PARAGGIO, M., VIGGIANO, M., LATTANZIO, V., *A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts*, Mikrochemical Journal, 2009.
- [37] SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; Lamuela-Raventos, R.M. *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by Folin-Ciocalteu reagent*. Method. Enzymol. 1999, 299, 152-178.
- [38] ŠULC M., LACHMAN J., HAMOUZ K., ORSÁK M., DVOŘÁK P., HORÁČKOVÁ V., *Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity červených a fialových odrůd brambor*, Chemické Listy 101, 584–591 (2007)

- [39] FLOEGEL, A., KIM, D., CHUNG, S., KOO, S., CHUN, O., Comparison of *ABTS/DPPH* assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2011, vol. 24, pp. 1043 – 1048
- [40] ALVAREZ-JUBETE, L., WIJNGAARD, H., ARENDT, E.K., GALLAGHER, E., *Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa, buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking*, *Food Chemistry*, 2010.
- [41] ALVAREZ-JUBETE, L., WIJNGAARD, H., ARENDT, E. K., (2010). *Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa, buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking*. *Food Chemistry*, 119(2), 770–778.
- [42] DVOŘÁKOVÁ M., DOSTÁLEK P., HULÍN P.: *Analytical Methods for Determination of Polyphenols in SweetWort, Wort and Beer*. *Kvasný Průmysl*. 52, 2006.
- [43] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2
- [44] GALLARDO, C.; JIMÉNEZ, L.; GARCÍA-CONESA, M. T.: *Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions*. *Food Chemistry* 2006, 99, 455-463.
- [45] VERA DE ROSSO, V.; MERCADANTE, A.Z., HPLC–PDA–MS/MS of *Anthocyanins and Carotenoids from Dovyalis and Tamarillo Fruits*. *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY* [online].
Dostupný z WWW: <apps.isiknowledge.com>. ISSN 0021-8561
- [46] RE R., PELLEGRINI N., PROTEGGENTE A., PANNALA A., YANG M., RICEEVANSC., 1999. *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*, *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231–1237.
- [47] *Studijní materiál : Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABTS	2,2'-azinobis(3-etyl-2,3-dihydrobenzotiazol-6-sulfonová kyselina)
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
GAE	Gallic Acid Equivalent, Ekvivalentní množství kyseliny gallové
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Vysokoučinná kapalinová chromatografie
N.D.	Not detected, Nebyla nalezena žádná koncentrace
TE	Trolox Equivalent, Ekvivalentní množství troloxu
S.D.	Standard deviation, Směrodatná odchylka

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 5– Podélný řez pšeničných zrnem.....	14
Obrázek 6 – Jedlé květy.....	18
Obrázek 7 – Kapalinový chromatograf.....	28
Obrázek 8 – Surovinová skladba cereálních směsí.....	29
Obrázek 5 – Extrahování vzorků na míchačce.....	34
Obrázek 6 –Odpařování vzorků při extrakci.....	34
Obrázek 7–Ukázka chromatogramu u vzorku č. 5.....	54
Obrázek 8–Ukázka chromatogramu	55

SEZNAM TABULEK

Pozor opravit názvy tabulek

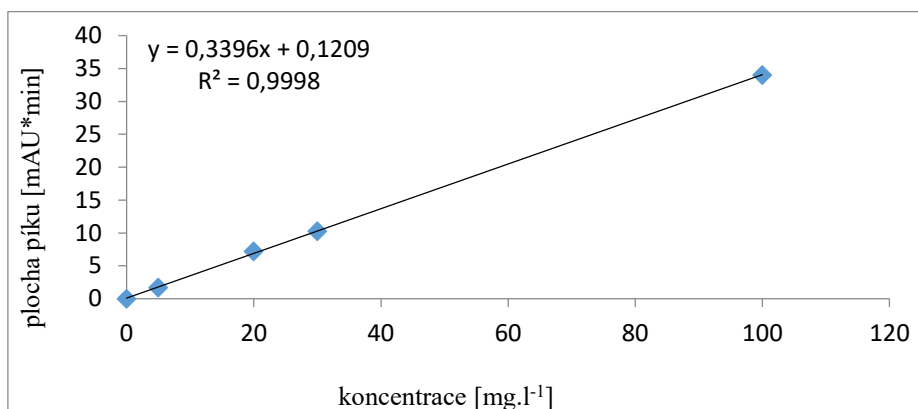
Tabulka č. 1 – Obsah minerálních prvků u pšenice jarní.....	16
Tabulka č. 2 – Obsah vody některých jedlých květů.....	19
Tabulka č. 3 – Směsmüsli č. 1.....	30
Tabulka č. 4 – Směsmüsli č. 2.....	30
Tabulka č. 5 – Směsmüsli č. 3.....	31
Tabulka č. 6 – Směsmüsli č. 4.....	31
Tabulka č. 7 – Směsmüsli č. 5.....	32
Tabulka č. 8 – Směsmüsli č. 6.....	32
Tabulka č. 9 – Výsledky obsahu polyfenolů v jednotlivých frakcích u směsí obsahujících lepek	39
Tabulka č. 10 – Výsledky obsahu polyfenolů v jednotlivých frakcích u bezlepkové směsi	40
Tabulka č. 11 – Hodnoty pro sestavení kalibrační křivky na stanovení kyseliny gallové	41
Tabulka č. 12 – Výsledky stanovení antioxidační aktivity metodou s DPPH u müsli směsí obsahujících lepek	42
Tabulka č. 13 – Výsledky antioxidační aktivity metodou s DPPH u bezlepkového müsli.....	43
Tabulka č. 14 – Naměřené hodnoty	43
Tabulka č. 15 – Výsledky stanovení antioxidační aktivity u směsí müsli s lepkem.....	44
Tabulka č. 16 – Výsledky stanovení antioxidační aktivity u bezlepkových směsí müsli	44

Tabulka č. 17 – Hodnoty závislosti absorbance na koncentraci troloxu (metoda s ABTS)	45
Tabulka č. 18 – Výsledky stanovení profilu fenolických sloučenin ve volných frakcích u vzorků obsahujících lepek	46
Tabulka č. 19 – Výsledky stanovení profilu fenolických sloučenin v konjugovaných frakcích u vzorků obsahujících lepek	47
Tabulka č. 20 – Výsledky stanovení profilu fenolických sloučenin ve vázaných frakcích u vzorků obsahujících lepek	48
Tabulka č. 21 – Výsledky stanovení celkového profilu fenolických sloučenin u vzorků obsahujících lepek	49
Tabulka č. 22 – Výsledky stanovení profilu fenolických sloučenin ve volných frakcích u bezpečkových vzorků	50
Tabulka č. 23 – Výsledky stanovení profilu fenolických sloučenin v konjugovaných frakcích u bezpečkových vzorků	51
Tabulka č. 24 – Výsledky stanovení profilu fenolických sloučenin ve vázaných frakcích u bezpečkových vzorků	52
Tabulka č. 25 – Výsledky stanovení celkového profilu fenolických sloučenin u bezpečkových vzorků	52
Tabulka č. 26 – Retenční časy standardů	54

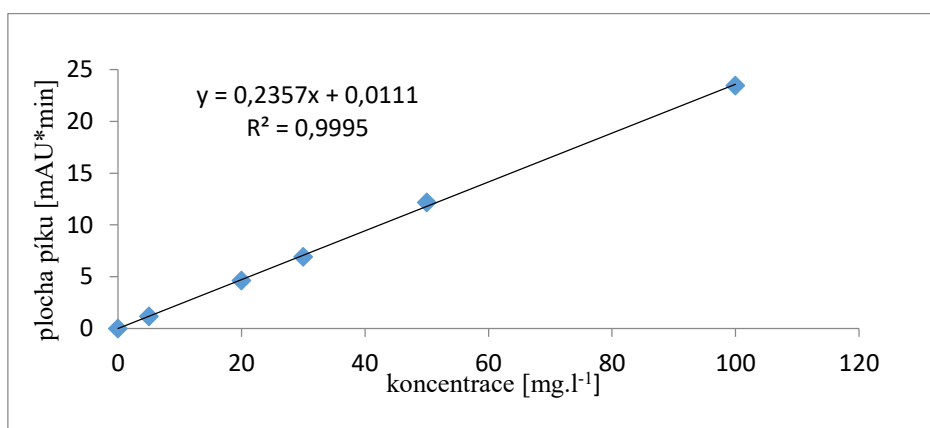
SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 – Kalibrační křivky pro stanovení jednotlivých polyfenolů metodou HPLC

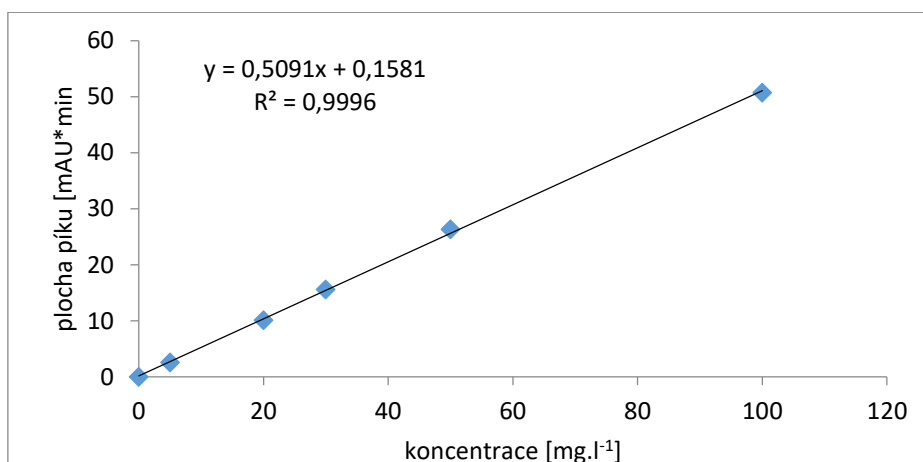
PŘÍLOHA P I: KALIBRAČNÍ KŘIVKY PRO STANOVENÍ JEDNOTLIVÝCH POLYFENOLŮ METODOU HPLC



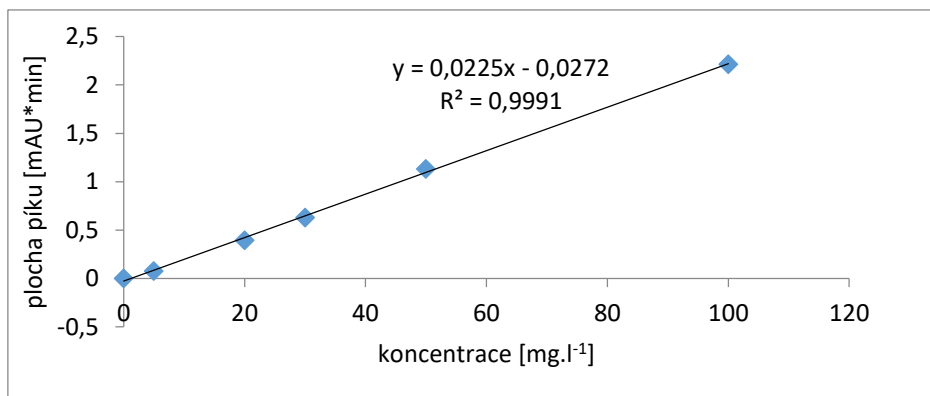
Graf 4 – Kalibrační křivka kyseliny gallové



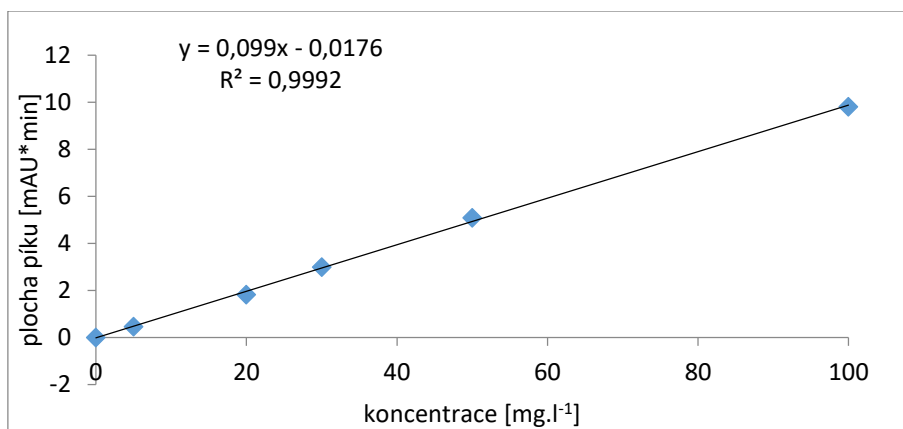
Graf 5 – Kalibrační křivka kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové



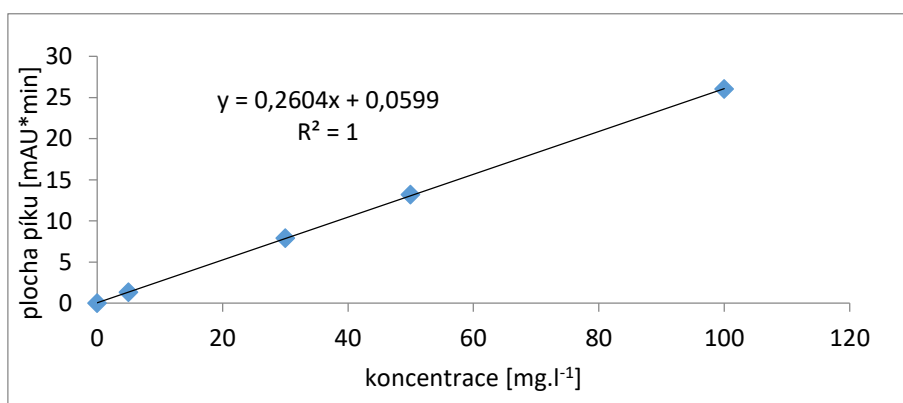
Graf 6 – Kalibrační křivka kyseliny 4-hydroxybenzoové



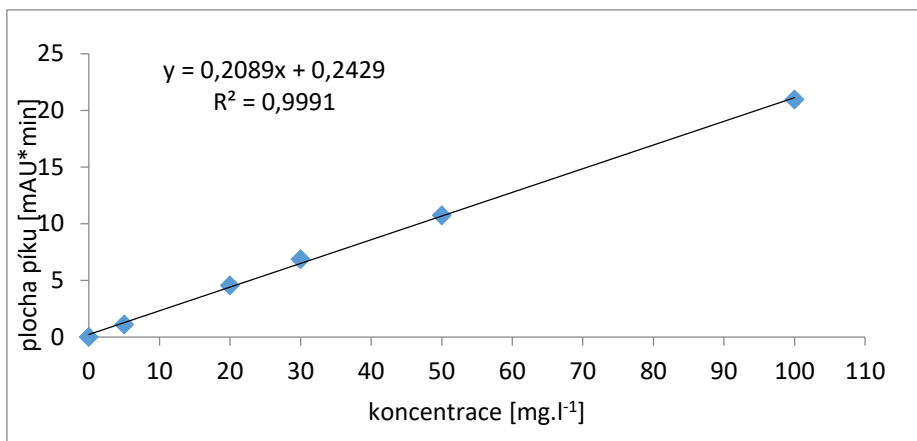
Graf 7– Kalibrační křivka epigallokatechinu



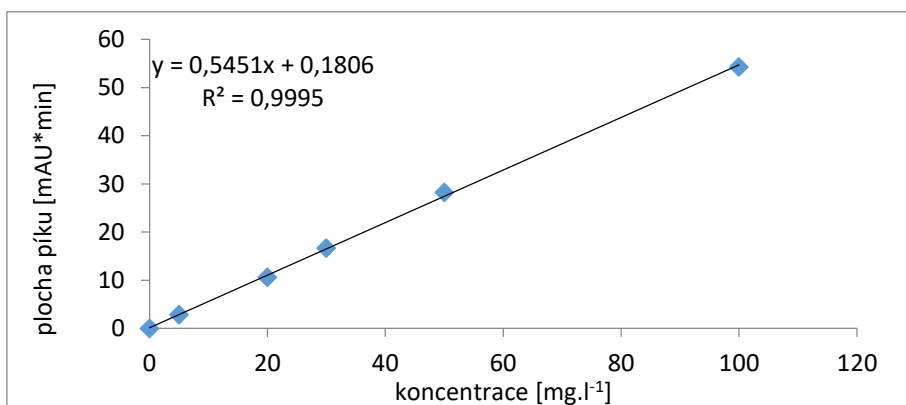
Graf 8 – Kalibrační křivka katechinu



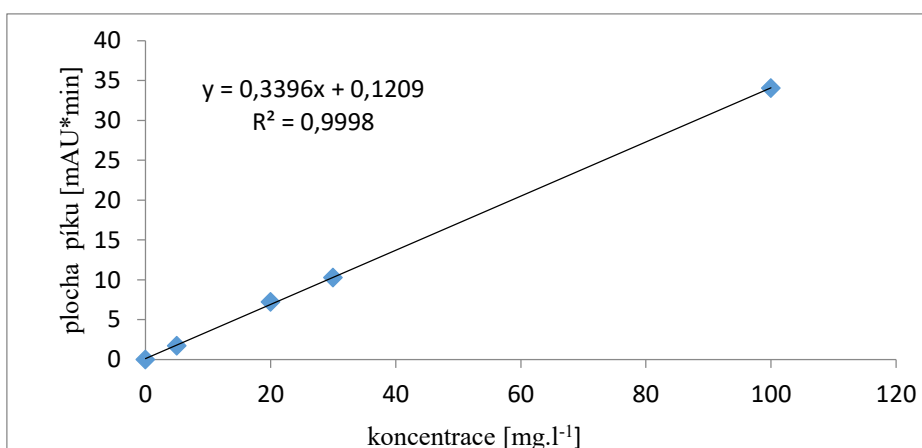
Graf 9 – Kalibrační křivka kyseliny vanilové



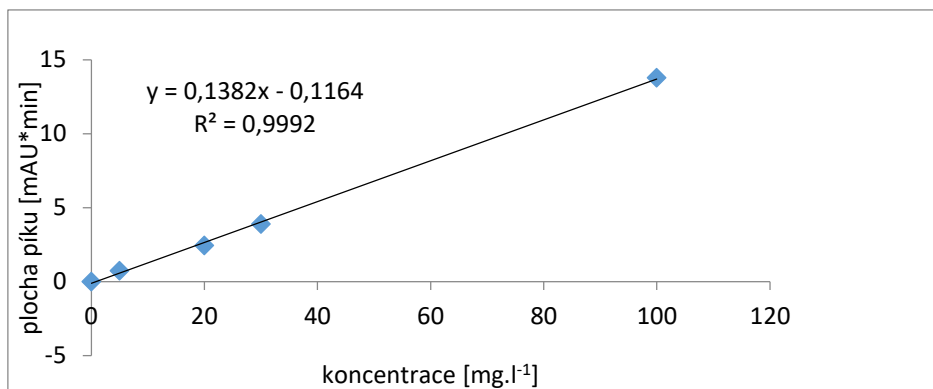
Graf 10 – Kalibrační křivka kyseliny chlorogenové



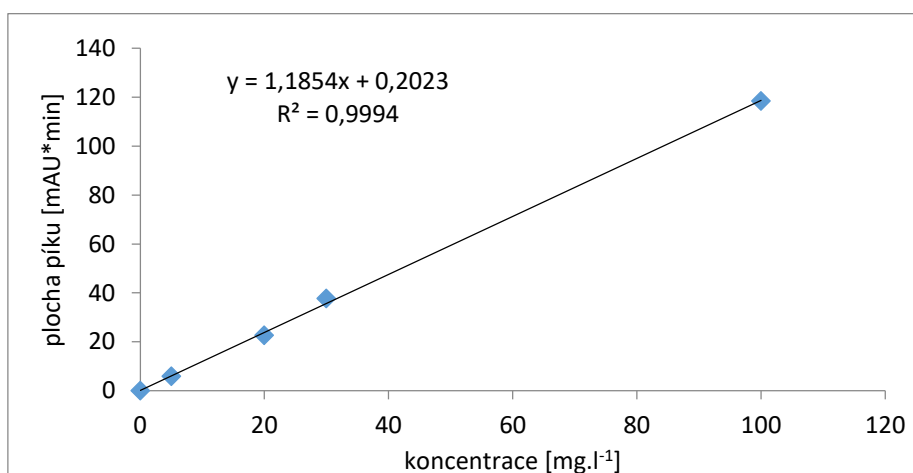
Graf – 11 Kalibrační křivka kyseliny kávové



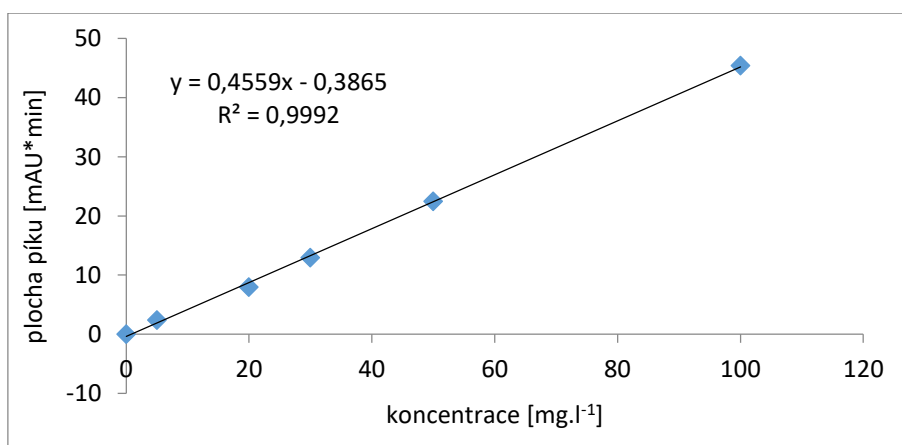
Graf 12– Kalibrační křivka kyseliny syringové



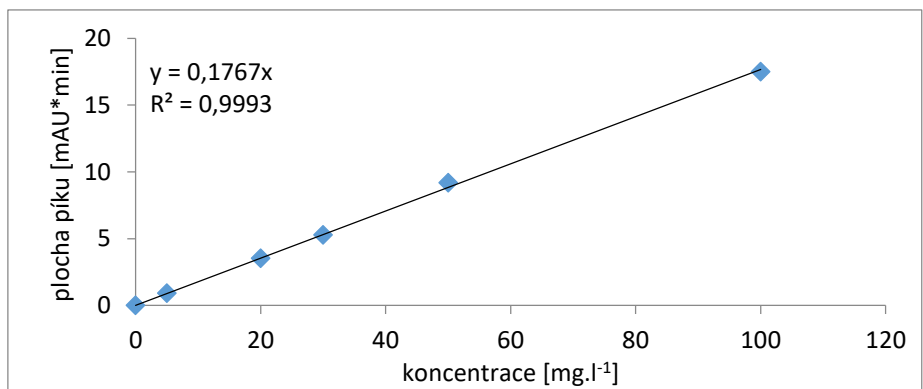
Graf 13 – Kalibrační křivka epikatechinu



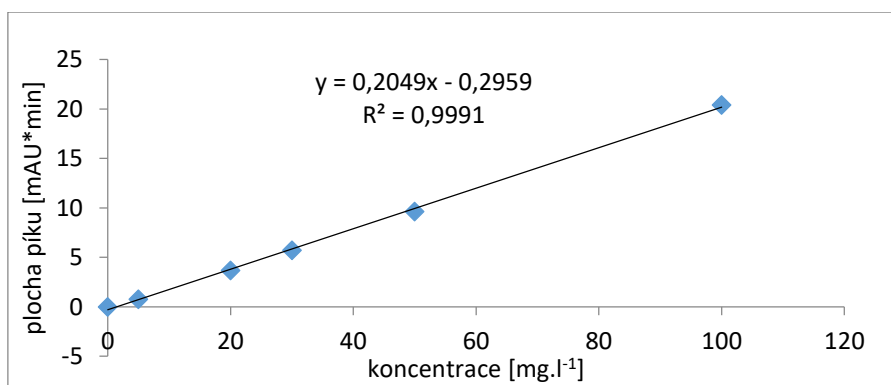
Graf 14 – Kalibrační křivka kyseliny *trans-p*-kumarové



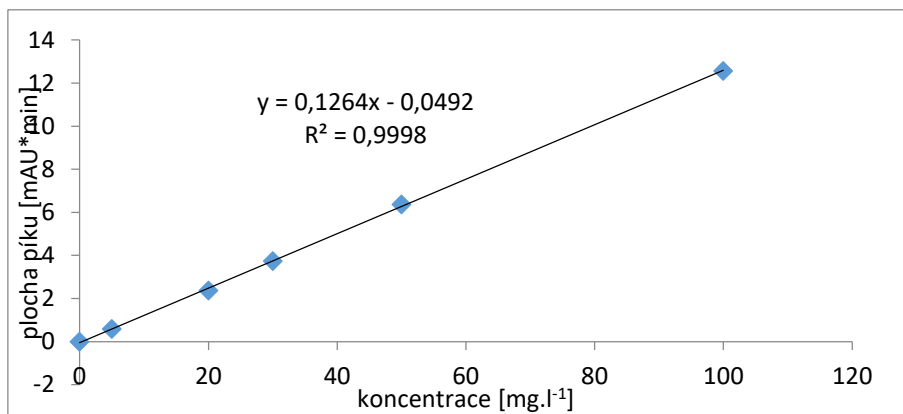
Graf 15 – Kalibrační křivka kyseliny ferulové



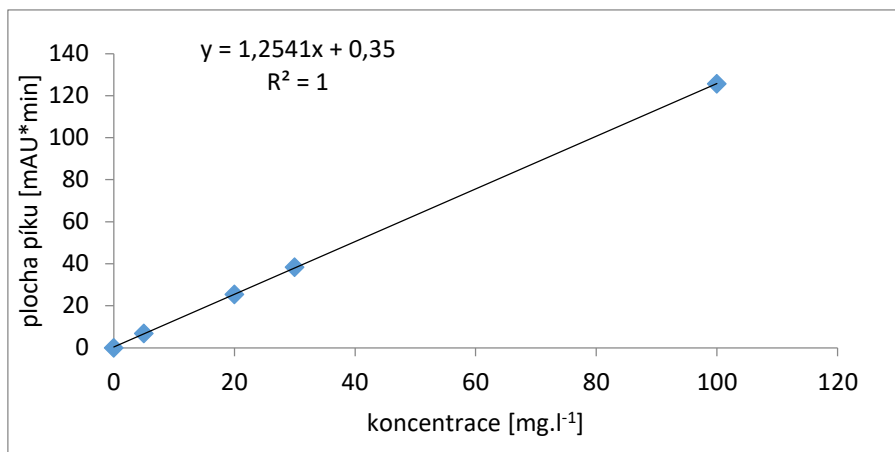
Graf 16 – Kalibrační křivka kyseliny sinapové



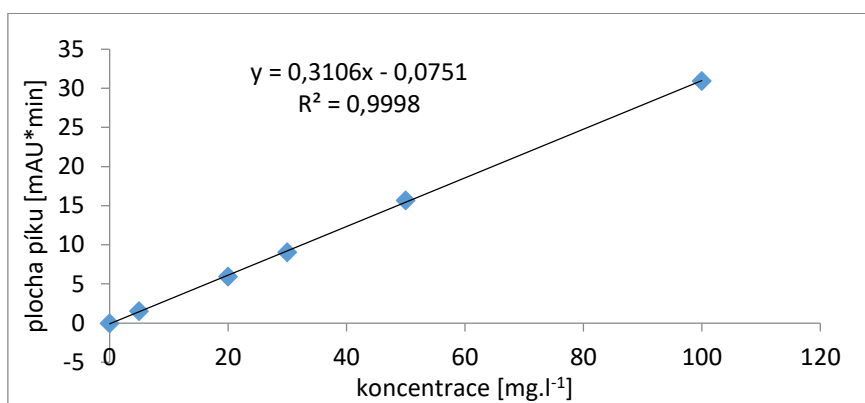
Graf 17 – Kalibrační křivka kyseliny elagové



Graf 18 – Kalibrační křivka rutinu



Graf 19 – Kalibrační křivka kyseliny *trans*-2-hydroxyskořicové



Graf 20 – Kalibrační křivka protokatechin esteru