

Stanovení flavonoidů v obilovinách spektrofotometricky

Mgr. Pavlína Marešová

Diplomová práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Mgr. Pavlína MAREŠOVÁ**
Osobní číslo: **T10935**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Stanovení flavonoidů v obilovinách
spektrofotometricky**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Stručně charakterizovat obiloviny a jejich význam pro lidskou výživu
2. Popsat chemické složení obilovin s důrazem na pšenici a rýži
3. Podrobněji charakterizovat fenolické látky s důrazem na flavonoidy
4. Popsat metodu spektrofotometrie a stručně zmínit další možnosti stanovení flavonoidů

II. Praktická část

1. Vypracovat extrakční postup pro následné spektrofotometrické stanovení flavonoidů v obilovinách
2. Rozpracovat metodu stanovení flavonoidů s $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ v prostředí etanolu s přídavkem NaNO_2 a NaOH
3. Stanovit flavonoidy spektrofotometricky u vybraných druhů obilovin
4. Vypracovat diskuzi a formulovat závěr

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. KOPÁČOVÁ, O. Trendy ve zpracování cereálií s přihlédnutím zejména k celozrnným výrobkům, 1. vydání, Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2007
2. MORRIS, P. C., BRYCE, J. H. Cereal Biotechnology, Woodhead Publishing, 2002
3. VELÍŠEK, J. Chemie potravin 3, 1. vydání, Tábor: OSSIS, 1999
4. HEIM, K. E., TAGLIAFERRO A. R., BOBILYA D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, The Journal of Nutritional Biochemistry, Vol. 13, Issue 10, 2002
5. SOMMER, L. a kol. Základy analytické chemie II., Brno: Vutium, 2000

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Daniela Sumczynski, Ph.D.

Ústav analýzy a chemie potravin

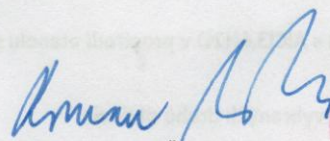
Datum zadání diplomové práce:

11. února 2013

Termín odevzdání diplomové práce:

17. května 2013

Ve Zlíně dne 11. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.

děkan




doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové 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 obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byla jsem seznámena s tím, že na moji diplomovou 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. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ 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 § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou 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 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 využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové 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 13. 5. 2013

.....

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 nevydělečně 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 nahlížení 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:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ 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, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihledne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Diplomová práce je zaměřena na studium obsahu flavonoidů ve dvou druzích obilovin – pšenice a rýže. Teoretická část zahrnuje charakteristiku obilovin, fenolických látek s důrazem na flavonoidy a jednotlivé metody jejich stanovení. V praktické části je uveden postup přípravy vzorků pomocí různých extrakčních metod a spektrofotometrického stanovení s použitím $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ v prostředí etanolu s přídavkem NaNO_2 a NaOH . Nejvyšší obsah flavonoidů v analyzovaných vzorcích byl naměřen ve vzorku neloupané černé rýže Khaw Dam. Výsledky studie ukazují, že nejvhodnější extrakční metodou pro následné spektrofotometrické stanovení flavonoidů v obilovinách je 1 hodinová extrakce metanolem pomocí ultrazvuku.

Klíčová slova: pšenice, rýže, flavonoidy, spektrofotometrické stanovení

ABSTRACT

Diploma thesis is focused on the study of flavonoid content in two types of cereals - wheat and rice. The theoretical part includes characteristics of cereals, phenolic compounds with emphasis on flavonoids and various methods for their determination. The practical part describes a procedure of sample preparation using different extraction methods and spectrophotometric determination using $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in the environment of ethanol with the addition of NaNO_2 and NaOH . The highest content of flavonoids in the analyzed samples was measured in a sample of black paddy rice Khaw Dam. The study results show that the best extraction method for subsequent spectrophotometric determination of flavonoids in cereals is 1 hour extraction with methanol using ultrasound.

Keywords: wheat, rice, flavonoids, spectrophotometric determination

Chtěla bych poděkovat vedoucí diplomové práce Ing. Daniele Sumczynski, Ph.D., za cenné rady, připomínky a odborné vedení práce. Dále děkuji Ing. Lence Fojtíkové za pomoc při analytických stanoveních v laboratoři. Rovněž patří velké díky mým rodičům za podporu během celého studia.

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka. Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Ve Zlíně 13. 5. 2013

.....

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 OBILOVINY	12
1.1 CHARAKTERISTIKA	12
1.2 STAVBA A SLOŽENÍ ZRNA	13
1.2.1 Obalové vrstvy	13
1.2.2 Klíček	15
1.2.3 Endosperm.....	15
1.3 CHEMICKÉ SLOŽENÍ ZRNA.....	15
1.3.1 Sacharidy	16
1.3.2 Bílkoviny.....	17
1.3.3 Lipidy	18
1.3.4 Vitaminy.....	19
1.3.5 Minerální látky	20
1.3.6 Další složky obilovin.....	21
1.4 VÝZNAM PRO LIDSKOU VÝŽIVU	22
1.5 PRODUKCE	23
1.6 PŠENICE.....	25
1.6.1 Dělení	25
1.6.2 Charakteristika	26
1.6.3 Produkce.....	26
1.7 RÝŽE	27
1.7.1 Dělení	27
1.7.2 Obchodní druhy	28
1.7.3 Produkce.....	29
2 FENOLICKÉ LÁTKY	31
2.1 FENOLOVÉ KYSELINY	32
2.2 PROANTOKYANIDINY.....	33
2.3 AVENANTRAMIDY	33
2.4 LIGNANY	34
2.5 ALKYLREZORCINOLY.....	34
2.6 FLAVONOIDY	34
2.6.1 Struktura.....	35
2.6.2 Chemická stabilita	35
2.6.3 Resorpce a metabolismus.....	36
2.6.4 Antioxidační aktivita.....	36
2.6.5 Zástupci flavonoidů v obilovinách.....	37
2.6.6 Účinky na zdraví	39
3 METODY STANOVENÍ FLAVONOIDŮ	40

3.1	MOLEKULÁRNÍ ABSORPČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE V UV/VIS OBLASTI.....	40
3.2	PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE – GC	43
3.3	VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE – HPLC.....	44
3.4	KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA – CE	45
II	PRAKTICKÁ ČÁST	47
4	CÍL PRÁCE	48
5	METODIKA	49
5.1	CHEMIKÁLIE	49
5.2	PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	49
5.3	CHARAKTERISTIKA VZORKŮ	50
5.4	PŘÍPRAVA VZORKŮ	54
5.4.1	Odběr a homogenizace vzorku	54
5.4.2	Příprava extraktů pro následné spektrofotometrické stanovení	55
5.5	SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ FLAVONOIDŮ	55
5.6	PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍHO ROZTOKU RUTINU A SESTROJENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY	56
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	57
6.1	VÝSLEDKY MĚŘENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY	57
6.2	VÝSLEDKY STANOVENÍ OBSAHU FLAVONOIDŮ ZA VYUŽITÍ 1 HODINOVÉ EXTRAKCE V METANOLU/OKYSELENÉM METANOLU POMOCÍ ULTRAZVUKU	58
6.3	VÝSLEDKY STANOVENÍ OBSAHU FLAVONOIDŮ ZA VYUŽITÍ 24 HODINOVÉ EXTRAKCE V METANOLU/OKYSELENÉM METANOLU.....	61
6.4	POROVNÁNÍ EXTRAKČNÍCH METOD	63
	ZÁVĚR	66
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	68
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	75
	SEZNAM OBRÁZKŮ	77
	SEZNAM TABULEK.....	78

ÚVOD

Obiloviny představují významnou skupinu zemědělských produktů mající značný vliv na výživovou bilanci populace, na které se celosvětově podílí z 60 až 70 %, v případě chudých rozvojových zemí i z více. V poslední době představují nejvyšší objemy světové produkce pšenice a rýže, jejichž zástupci byli zvoleni jako vzorky k analýze v praktické části studie. Obiloviny jsou zdrojem řady cenných nutrientů. Obecně známý je jejich obsah energeticky důležité složky – škrobu, vlákniny jako činitele podporujícího činnost trávicího traktu, bílkovin, lipidů s převážným podílem nenasycených mastných kyselin, ve vodě rozpustných vitaminů skupiny B a řady minerálních látek. Méně jsou však zmiňovány biologicky aktivní fenolické látky, mezi něž se řadí i flavonoidy, které vykazují řadu zdraví prospěšných vlastností. V obilovinách představují co do počtu relativně malou skupinu, která však díky svým antioxidačním vlastnostem může mít značný vliv na lidské zdraví.

Teoretická část této diplomové práce popisuje obecnou charakteristiku a chemické složení obilovin s důrazem na pšenici a rýži. Podrobněji charakterizuje jednotlivé fenolické látky se zaměřením na stanovované flavonoidy. Dále popisuje různé alternativy metod, které jsou vhodné pro stanovení flavonoidů. Hluběji se zabývá metodou molekulární absorpční spektrofotometrie v UV/VIS oblasti, která byla použita ke stanovení flavonoidů v obilovinách v praktické části této diplomové práce.

Cílem praktické části je stanovit vhodný extrakční postup pro následné spektrofotometrické stanovení, optimalizovat metodu stanovení flavonoidů ve vzorcích obilovin s použitím $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ v prostředí etanolu s přidávkem NaNO_2 a NaOH a kvantitativně stanovit jejich obsah.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 OBILOVINY

Obiloviny neboli cereálie, z anglického slova „cereals“, vděčí za svůj název římské bohyni Ceres – bohyně plodnosti a úrody. Pro většinu lidstva představují základní nutriční potřebu, a to nejen přímo formou stravy, ale i nepřímo jako krmivo pro zvířata [42]. Pro lidskou výživu se především používá zrno obilovin [32]. Vegetativní části těchto rostlin mohou být dále využity jako krmivo, na produkci siláže nebo k získání slámy, která slouží jako podestýlka pro zvířata či k výrobě biopaliva [42]. Obiloviny patří mezi nejvýznamnější potravinářské rostliny díky své schopnosti tvorby vhodného a hodnotného energetického zdroje – škrobu, zajištění většiny potřebných bílkovin i některých vitaminů. Jsou vysoce přizpůsobivé k různým klimatickým podmínkám a při jejich pěstování je možné použít mechanizaci, což usnadňuje získání vysokých výnosů na velkých pěstebních plochách bez nároků na fyzickou práci. Obilka se navíc dá snadno přepravovat a je skladovatelná až po dobu několika let [7].

1.1 Charakteristika

Botanicky se obiloviny řadí do skupiny jednoděložných travin – latinsky zvaných *Gramineae* a většina z nich do čeledi lipnicovitých – latinsky zvaných *Poaceae*. Výjimkou je např. pohanka z čeledi rdesnovitých – latinsky *Polygonaceae* a amarant z čeledi amarantovitých – latinsky *Amaranthaceae*, které se v poslední době začaly hojně uplatňovat [50].

Kromě kukuřice patří běžné obiloviny mezi dvoudomé rostliny, pro které je charakteristické, že každá rostlina nese samčí orgány – tři prašníky (u rýže šest) i samičí orgány – semeník nesoucí dvě blizny. V případě kukuřice se samčí květy rodí v klasech na vrcholové latě zvané střapec a samičí květy se rodí v řadách obilek na zduřelých špičkách postranních větví palice [42]. Jako zástupci skupiny travin sdílejí následující vegetativní znaky, které však mají vyvinuty v různém stupni: nápadné uzly na stonku, samostatný list na každém uzlu, listy uložené v protilehlé pozici, listy skládající se z pláště a čepele, tendence tvořit větve v uzlech a náhodné kořeny u základů uzlů, spodní větve mohou zapustit kořeny a vyvinout se do stonků jako odnoží [33].

1.2 Stavba a složení zrna

Částí obilovin, která se výhradně využívá pro lidskou výživu, je jejich jednosemenný suchý plod zvaný nažka. U čeledi lipnicovitých se nažka nazývá obilkou, obecně zrnem. Jeho morfologická skladba je zhruba stejná u všech druhů obilovin, liší se však tvarem (od tenkých protáhlých po kulatá), hmotností, velikostí a podílem jednotlivých vrstev [36]. Skutečnou velikost zrna ovlivňuje mnoho faktorů jako např. odrůda, klimatické podmínky (dešťové srážky, sluneční svit, teplota a nadmořská výška), kvalita půdy a agrotechnika. V tabulce č. 1 jsou patrné rozdíly ve velikosti i hmotnosti tisíce zrn (HTZ) jednotlivých obilovin [36]. Charakteristickým znakem obilovin je to, zda má zrno pluchy nebo je nahé. Zrna nahá mají pšenice, kukuřice a žito tzn., že při mlácení vypadne samostatné zrno bez obalů. Ječmen, oves a rýže mají zrna pluchatá, která se před dalším zpracováním musí loupat a obrousit od pluch a klíčků [50].

Tab. 1 Rozdíly velikosti a hmotnosti tisíce zrn (HTZ) jednotlivých obilovin

Obilovina	Délka (mm)	Šířka (mm)	HTZ (g)
Pšenice	5 – 8	2,5 – 4,5	27 – 48
Žito	4,5 – 10	1,5 – 3,5	15 – 40
Ječmen	8 – 14	1,0 – 4,5	32 – 36
Oves	6 – 13	1,0 – 4,5	32
Rýže	5 – 10	1,5 – 5,0	27
Kukuřice	8 – 17	5 – 15	150 – 600
Čirok	3 – 5	2 – 5	8 – 50

Přirozenou funkcí po vyžrání semen obilovin – obilek, je uchovat životaschopnost zárodku nové rostliny. K tomu slouží různé chemické složky uložené v jednotlivých anatomických částech semene. Každá obilka je tvořena z obalových vrstev, klíčku a endospermu [32].

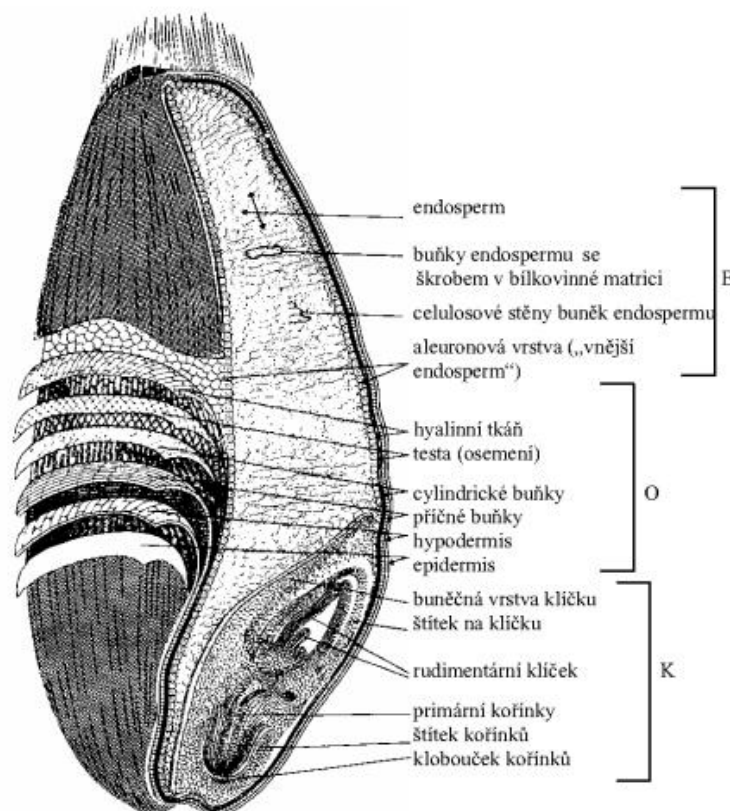
1.2.1 Obalové vrstvy

Obalové vrstvy tvoří cca 8 – 14 % hmotnosti zrna. Jsou tvořeny několika vrstvami buněk, chrání klíček a endosperm před jejich vysycháním a mechanickým poškozením. Obaly se skládají z oplodí a osemení a v mlýnské technologii bývají označovány jako otruby [29].

Nejsvrchnější vrstvou zrna je **oplodí** (pericarp), která je tvořena nerozpustnými a obtížně bobtnajícími látkami, hlavně celulórou. Má za úkol chránit zrno před mechanickým poškozením a účinky vody a škodlivých látek [50]. Oplodí tvoří pokožka (epidermis), buňky podélné (epicarp), buňky příčné (mesocarp) a buňky hadicové (endocarp) [29].

Další vrstva se nazývá **osemení** neboli perisperm a dělí se na vrstvu barevnou a hyalinní (skelnou). Jsou zde uloženy buňky s barvivy, která určují vnější barevný vzhled zrna. Obsahuje také polysacharidové látky omezeně bobtnající a vážící vodu, čímž určitým způsobem přispívají k udržení rovnováhy vlhkosti zrna [36].

Mezi obalovými vrstvami a endospermem se nachází měkká jednoduchá vrstva s velkými buňkami zvaná **aleuronová vrstva**. Obsahuje vysoký podíl protoplazmatických bílkovin (cca 30 %) a minerálních látek, díky kterým se při vymílání aleuronové vrstvy výrazně zvyšuje jejich obsah (popel) v mouce. Vzhledem k blízkosti k endospermu a snadné vymílatelnosti se někdy označuje jako tzv. vnější endosperm. Obrázek č. 1 znázorňuje podélný řez pšeničným zrnem, kde jsou vyznačeny jednotlivé morfologické vrstvy [36]. Vrstva označená písmenem E přechází při mletí do mouky, vrstva O přechází do otrub a poslední vrstva K je odstraňována spolu s klíčkem [50].



Obr. 1 Podélný řez pšeničným zrnem

1.2.2 Klíček

Klíček neboli embryo představuje vlastní zárodek nové rostliny a současně je nositelem genetických informací [32]. Tvoří nejmenší část obilky – u pšenice tvoří cca 3 % hmotnosti obilky, u kukuřice až 15 %. Od endospermu je oddělen štítkem obsahujícím až 33 % bílkovin. Klíček obsahuje mnoho živin, mezi které patří bílkoviny, aminokyseliny, jednoduché cukry, vitaminy rozpustné ve vodě, hlavně tiamin a vitamin E. Také obsahuje značné množství tuku, kvůli kterému je nutné před mlýnským zpracováním klíček odstranit, jinak by velmi rychle podléhal oxidačním a enzymatickým změnám a vznikla by žluklá chuť výrobků [29]. Hmotnostní podíl klíčku v zrna kukuřice (13 % hm.) je značně rozdílný oproti ostatním obilovinám (pšenice 3 % hm.). Proto také v místech, kde se pěstují větší objemy kukuřice na zrno, je efektivní vyrábět z klíčků olej [36].

1.2.3 Endosperm

Nazývá se vnitřním obsahem zrna a představuje jeho největší hmotnostní podíl, až 86 %. Je tvořen velkými hranolovitými buňkami a obsahuje zásobní látky pro klíčící rostlinu – škrob a bílkoviny. Endosperm tedy zajišťuje výživu zárodku a při zpracování tvoří podstatnou část finálního produktu (mouky, škroby) [29]. Pšeničná mouka je tvořena téměř čistým rozdrceným pšeničným endospermem. Převážnou část endospermu (3/4) tvoří škrob a zhruba 10 % bílkovina, která je velmi významná pro pekárenskou technologii. Její kolísavý obsah a rozdílná kvalita je rozhodující pro pekárenskou zpracovatelskou kvalitu pšeničné mouky [32]. Při výživě a krmení je endosperm hlavním zdrojem energie a bílkovin [29].

1.3 Chemické složení zrna

Chemické složení většiny obilovin se navzájem příliš neliší. Větší proměnlivost ve složení je mezi různými varietami jednoho druhu. Vliv na chemické složení zrna mají lokální klimatické a půdní podmínky i dané agrotechnické opatření v průběhu roku [36]. Základními stavebními složkami obilných zrn jsou především sacharidy a bílkoviny, v malých množstvích také lipidy, minerální látky a nejméně obsaženy jsou vitaminy, barviva a další složky, které mají různé růstové regulační a genetické funkce [32].

1.3.1 Sacharidy

Hlavní podíl obilného zrna tvoří sacharidy. Můžeme je rozdělit podle jejich stupně polymerizace na monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy [33]. V klíčku jsou především soustředěny monosacharidy a disacharidy, které zde mají významné biologické funkce. Hlavní zástupce polysacharidů – škrob je výhradně obsažen v endospermu zrna. Celulóza se nachází ve vnějších obalových vrstvách, kde plní funkci mechanické ochrany zrna, a společně s ní i nerozpustné pentózaný. Rozpustná část pentózanů je naopak v podobalových vrstvách osemení a v aleuronové vrstvě [50].

Zástupci **monosacharidů**, pentózy i hexózy, existují v několika izomerických formách. Ve zralých obilných zrnech se volné monosacharidy vyskytují v nepatrném množství a mají malý význam. Velmi důležité jsou však jako složky polymerů, a to jak díky jejich podílu ve strukturálních a zásobních složkách zrna, tak i na vlastnostech zrna a jeho produktů během zpracování. Nejčastěji se vyskytující zástupci pentóz jsou xylóza a arabinóza, které se nachází v obalových vrstvách a buněčných stěnách endospermu. Nejdůležitější zástupce hexóz je glukóza, jako jednotka škrobu, celulózy a β -glukanů [33].

Oligosacharidy jsou tvořeny molekulami monosacharidů spojenými glykosidickými vazbami. Vyskytují se ve velmi malých koncentracích. Mezi nejvýznamnější oligosacharidy z hlediska technologie patří maltóza a izomaltóza. Maltóza, složená ze dvou molekul glukóz pojených vazbou α -1,4-glykosidovou, je předposledním produktem hydrolyzy škrobu. Ve větším podílu se vyskytuje u narušeného zrna, které vzniká předčasným naklíčením za tepla a vlhka v době sklizně nebo nevhodným skladováním. Izomaltóza je složená také ze dvou molekul glukóz pojených vazbou α -1,6-glykosidovou. V klíčku je obsažena především sacharóza složená z molekuly glukózy a fruktózy [50].

Typickým představitelem zásobních **polysacharidů**, které jsou pro organismus zdrojem či rezervoárem energie, je **škrob**. Jeho obsah v parenchymatických buňkách endospermu tvoří 60 – 75 % sušiny obilek. Je složen ze dvou frakcí – amylózy a amylopektinu [32]. Jejich základními stavebními jednotkami jsou molekuly maltózy a izomaltózy. V obilných škrobech jsou amylóza a amylopektin zastoupeny v různém poměru. Většinou se uvádí poměr zhruba 25 % amylózy a 75 % amylopektinu. Amylóza je rozpustná ve vodě za studena a amylopektin ve vodě pouze bobtná [50]. Škrob je obecně ve studené vodě nerozpustný, pouze bobtná. Za tepla (nad 60 °C) škrobová zrna mazovají a viskozita

vzniklého mazu se prudce zvyšuje [29]. Po ochlazení se vytvoří pružný škrobový gel, který je nositelem vláčnosti a vody ve střídě pekařských výrobků, což je jeden ze dvou hlavních významů škrobu. Druhým je význam škrobu jako představitele zdroje zkvasitelných cukrů pro kvasinky při kypření těsta [32].

Zástupci neškrobových polysacharidů jsou zejména celulóza, hemicelulózy a β -glukany. **Celulóza** je složena z polymerů, které jsou tvořeny glukózovými jednotkami spojenými vazbou β -1,4-glykosidovou. Spolu s dalšími neškrobovými polysacharidy tvoří buněčné stěny a v rostlinách jsou základním stavebním materiálem rostlinným pletiv. Jsou základem vlákniny, která je důležitou součástí potravy a má příznivé účinky na zdraví [50].

Hemicelulózy jsou pestrou skupinou látek, která se dělí na pentózy ve vodě nerozpustné, doprovázející celulózu v buněčných stěnách, a rozpustné neboli slizy. Obsah hemicelulóz je rozdílný u jednotlivých obilovin. Ve značné míře jsou obsaženy především v žitné mouce [32]. Žitné pentózy s vodou tvoří vysoce viskózní koloidní roztoky. Vážou na svůj hmotnostní podíl několikanásobné množství vody v porovnání s lepkovými bílkovinami. Proto spolu se škrobem tvoří základ struktury žitných těst [50].

Poslední zmíněné **β -glukany** jsou rozpustné polysacharidy, které se ve větší míře vyskytují v ječmeni a ovsu. Mají také schopnost vytvářet vysokoviskózní gely, čímž zvyšují a prodlužují vláčnost výrobků a vykazují příznivé fyziologické účinky [36].

1.3.2 Bílkoviny

Tyto nejvýznamnější dusíkaté látky obilovin určují technologickou jakost surovin [29]. Jejich obsah se pohybuje v rozmezí 6 – 15 %. Průměrný obsah proteinů v zrně pšenice se uvádí v množství 12,6 g a v zrně hnědé rýže v množství 7,5 g na 100 g sklizeného zrna. Molekuly proteinů tvoří 100 a více aminokyselin, které jsou spojené ponejvíce peptidovou vazbou [36].

V obilovinách se nacházejí bílkoviny protoplazmatické – albuminy, globuliny a zásobní – prolaminy a gluteliny, které jsou obsaženy v endospermu [32]. Zástupci obilných prolaminů jsou pšeničný a žitný gliadin, ječný hordein a kukuřičný zein. Gluteliny jsou reprezentovány pšeničným gluteninem a rýžovým oryzeinem [29]. Pšeničné bílkoviny – gliadin a glutenin po přidání vody omezeně bobtnají a za současného hnětení s přítomností vzdušného kyslíku jsou schopny vytvořit pružný gel nazývaný lepek. Jeho charakteristickými vlastnostmi jsou tažnost, pružnost, plasticita a schopnost bobtnat ve

zředěném roztoku kyseliny mléčné. Lepek tvoří trojrozměrnou síť peptidických řetězců vzájemně propojených různými vazbami a můstky, a tím vytváří strukturu těsta. Lze jej vyizolovat z těsta vypíráním proudem vody, kdy po vyplavení látek rozpustných ve vodě a škrobu nám zůstane tzv. „mokrý lepek“. Vypraný lepek obsahuje v sušině průměrně 90 % proteinů, 8 % lipidů a 2 % sacharidů [29, 50].

Dominantní aminokyselinou obilovin je kyselina glutamová, která se výhradně vyskytuje jako glutamin. Naopak velice nízký obsah je lyzinu, kvůli kterému je obilná bílkovina pro člověka neplnohodnotná, lyzin je limitující aminokyselinou obilovin [32]. Obsah a skladba jednotlivých aminokyselin cereálních bílkovin se liší v závislosti na odrůdě a pěstebních podmínkách. Obsahy esenciálních aminokyselin v g na 100 g proteinu přítomných v pšenici a rýži jsou uvedeny v následující tabulce č. 2 [36].

Tab. 2 Esenciální aminokyseliny v pšenici a rýži

AMK g.100 g ⁻¹ proteinu	Phe	His	Ile	Leu	Lyz	Met	Thr	Trp	Val
Pšenice (tvrdá)	4,6	2,0	3,0	6,3	2,3	1,2	2,4	2,4	3,6
Rýže (hnědá)	5,2	2,5	4,1	8,6	4,1	2,4	4,0	1,4	5,8
Rýže (loupaná)	5,2	2,5	4,5	8,1	3,9	1,7	3,7	1,3	6,7

* Phe – fenylalanin, His – histidin, Ile – izoleucin, Leu – leucin, Lyz – lyzin, Met – metionin, Thr – treonin, Trp – tryptofan, Val – valin

1.3.3 Lipidy

Lipidy se u obilovin vyskytují v malém množství. Obsah v sušině se pohybuje v množství od 1 – 3 % u pšenice, ječmene, rýže a žita do 5 – 9 % u kukuřice či ovsa. Nejvíce jsou obsaženy v klíčku (cca 64 %), jehož hmotnostní podíl představuje 2,54 % celého zrna. Zatímco v endospermu, i když tvoří více než 80 % zrna, se vyskytují v množství pouhých 3,3 % [36]. Jednoznačně převládající mastnou kyselinou je kyselina linolová. Spolu s dalšími nenasycenými kyselinami tvoří více než 75 % mastných kyselin. To předurčuje vysokou nutriční hodnotu lipidů obilovin, ale také nestabilitu, jelikož nenasycené mastné

kyseliny velmi snadno podléhají oxidaci, která má za následek hydrolytické žluknutí mouk při delším skladování. To se projeví zvýšením kyselosti. V obilovinách se vyskytují také lipofilní pigmenty, zejména karotenoidy žluté a oranžové barvy [50]. Následná tabulka č. 3 zobrazuje profil jednotlivých druhů mastných kyselin obsažených v g na 100 g cereálních produktů – pšeničná mouka bílá, rýže hnědá neloupaná a rýže bílá neloupaná [36].

Tab. 3 Profil mastných kyselin ve vybraných cereálních produktech

MK g.100 g ⁻¹	Nasyčené MK	cis-mono- nenasyčené MK	Polynenasycené MK		
			celkové cis	n-6	n-3
Pšeničná mouka bílá	0,16	0,13	0,51	0,48	0,03
Rýže hnědá, neloupaná	0,74	0,66	0,98	0,94	0,04
Rýže bílá, neloupaná	0,85	0,91	1,29	1,26	0,03

1.3.4 Vitaminy

Vitaminy se v obilovinách vyskytují především v klíčku a v aleuronové vrstvě. Vitamin A neboli retinol je obsažen v klíčcích ve formě svého provitaminu β -karotenu. Obiloviny se považují za hlavní zdroj vitamínu B₁ (tiamin), který je v klíčcích a aleuronové vrstvě. Vitamin B₂ (riboflavin), který se řadí k flavinům, se také nachází především v klíčku. Ve značném množství v pšenici a ječmeni se vyskytuje vitamin B₃ (niacin), který je lokalizován v aleuronové vrstvě, a proto jeho hlavní podíl přechází do otrub. Je odolný vůči oxidaci a je termostabilní. Dále jsou obsaženy též vitamin B₅ (kyselina pantotenová) a vitamin B₆ (pyridoxin) [29]. Podle stupně vymletí světlých mouk zůstává cca 10 – 20 % původního obsahu vitamínu skupiny B v zru. V pšenici a ječmenu jsou ve vyšších množstvích přítomni další zástupci vitamínu skupiny B, a to kyselina nikotinová a nikotinamid. V pšeničných klíčcích se navíc vyskytuje ve značné koncentraci lipofilní vitamin E, který se z nich izoluje na výrobu vitaminových preparátů ve farmaceutickém průmyslu [32]. Obsah některých z výše zmíněných vitaminů obilovin je uveden v tabulce č. 4 v mg na 100 g vybraných cereálií [36].

Tab. 4 Obsah vitaminů v pšeničné mouce a rýži

mg.100 g ⁻¹	Vitamin E mg.100 g ⁻¹	Vitamin B ₁ mg.100 g ⁻¹	Vitamin B ₂ mg.100 g ⁻¹	Vitamin B ₃ μg.100 g ⁻¹	Vitamin B ₆ μg.100 g ⁻¹	Folát μg.100 g ⁻¹
Pšeničná mouka bílá	0,30	0,31 [*]	0,03	3,60 [*]	0,15	22
Pšeničná mouka celozrnná	1,40	0,47	0,09	8,20	0,50	57
Rýže bílá, rychlouvarná	(0,10)	0,41	0,02	5,80	0,31	20
Rýže hnědá, neloupaná	0,80	0,59	0,07	6,80	N	49

^{*} fortifikovaná mouka, () – odhad, N – nebylo stanoveno

1.3.5 Minerální látky

Představují anorganický zbytek po spálení rostlinného materiálu zvaný „popel“. Jeho koncentrace je nejvyšší v obalových vrstvách, proto jeho obsah vzrůstá se stupněm vymletí. Naopak nejnižší koncentrace je v endospermu. V celých zrnech se jeho obsah pohybuje mezi 1,25 až 2,5 %. Zrna a celozrnné produkty obsahují značné množství draslíku, železa, hořčíku, zinku a vápníku. V nižších koncentracích se vyskytuje řada stopových prvků, jako například selen. Obiloviny mají nízký obsah sodíku [36]. Minerální látky mají svůj technologický význam, jelikož mlýnsko-technologický proces a příprava mouk se řídí i podle obsahu popela [29]. Přehled a obsah jednotlivých minerálních látek obsažených v pšeničné mouce a rýži uvádí následná tabulka č. 5 [36].

Tab. 5 Obsah minerálních látek v pšeničné mouce a rýži

mg.100 g ⁻¹	Sodík	Draslík	Vápník	Hořčík	Železo	Zinek	Selen (μg)
Pšeničná mouka bílá	3	150	140*	20	2,0*	0,6	2
Pšeničná mouka celozrnná	3	340	38	120	3,9	2,9	6
Rýže bílá, rychlovarná	4	150	51	32	0,5	1,8	13
Rýže hnědá, neloupaná	3	250	10	110	1,4	1,8	10

* fortifikovaná mouka

Rodríguez et al. [51] zjišťovali hodnoty výše uvedených minerálních látek a stopových prvků ve sbírce pšeničných planých forem z Kanárských ostrovů. Stanovili následující průměrné koncentrace jednotlivých minerálních látek: sodík ($102 \pm 52 \text{ mg.kg}^{-1}$), draslík ($4363 \pm 386 \text{ mg.kg}^{-1}$), vápník ($351 \pm 62 \text{ mg.kg}^{-1}$), hořčík ($1163 \pm 155 \text{ mg.kg}^{-1}$), železo ($40,0 \pm 5,5 \text{ mg.kg}^{-1}$), zinek ($32,1 \pm 2,9 \text{ mg.kg}^{-1}$) a selen ($67,7 \pm 40,4 \text{ μg.kg}^{-1}$). Antoine et al. [4] stanovovali také hodnoty těchto minerálních látek a stopových prvků v bílé a hnědé rýži na jamajském trhu. Následuje výčet zjištěných průměrných koncentrací jednotlivých minerálních látek: sodík (6 mg.kg^{-1} ; $15,1 \text{ mg.kg}^{-1}$), draslík (913 mg.kg^{-1} ; 2157 mg.kg^{-1}), vápník (127 mg.kg^{-1} ; 104 mg.kg^{-1}), hořčík (371 mg.kg^{-1} ; 1205 mg.kg^{-1}), železo ($22,3 \text{ mg.kg}^{-1}$; $20,1 \text{ mg.kg}^{-1}$), zinek ($15,6 \text{ mg.kg}^{-1}$; $20,2 \text{ mg.kg}^{-1}$), selen ($0,108 \text{ mg.kg}^{-1}$; $0,131 \text{ mg.kg}^{-1}$).

1.3.6 Další složky obilovin

Příznivé účinky na zdraví člověka mohou vykazovat další látky obsažené v obilovinách, které jsou označovány jako fytochemikálie neboli rostlinné bioaktivní látky [36]. Antioxidační vlastnosti těchto látek snižují riziko vzniku chronických onemocnění, včetně rakoviny, kardiovaskulárních onemocnění a cukrovky [44]. Mezi fytochemikálie patří zástupci skupiny polyfenolů – flavonoidy, ale i další antioxidanty tokotrienoly, tokoferoly a karotenoidy, které pomáhají tělu zbavit se škodlivých volných radikálů, které by mohly

poškodit DNA buňky a vyvolat některé formy rakoviny a dalších nemocí [3]. Tyto látky jsou soustředěny převážně v aleuronové vrstvě, některé v oplodí, osemeni a klíčku [68]. V malých množstvích byly v obilovinách také identifikovány fytoestrogeny, které mohou hrát roli v ochraně proti některým druhům rakoviny prostaty a prsu [3]. V pšeničných moukách jsou obsaženy oxidační enzymy lipoxygenáza a peroxygenáza, které hrají významnou roli při určování funkčních vlastností mouky během zpracování. Nicméně v kontaktu s jejich substráty, kterými jsou právě fytochemikálie, ovlivňují nutriční vlastnosti pšeničných zrn a jejich stabilitu během skladování [68].

Na druhou stranu jsou obiloviny zdrojem antinutričních látek, které mohou mít naopak negativní vliv na výživu organismu. Jedná se hlavně o relativně hojně se vyskytující fytáty, které tvoří nerozpustné komplexy s minerálními látkami (především se železem, zinkem a s vápníkem), čímž snižují jejich biologickou dostupnost, a tím dochází ke snížení jejich absorpce v organismu [33]. Rozsah ovlivnění nutriční hodnoty z důvodu těchto reakcí se odvíjí od řady faktorů, jako jsou množství hydrolyzovaného fytátu během zpracování, koncentrace fytátu a minerálních látek v potravíně, množství fytátu degradovaného v trávicím traktu a také způsob stravování a celkový nutriční stav jedince [36]. Kyselina fytová, účinná chelatační látka mnoha esenciálních minerálních živin, představuje 1 – 5 % sušiny obilovin a jedlých luštěnin [65]. Negativně mohou působit také fenolické látky ze skupiny flavonoidů – taniny, z důvodu jejich schopnosti tvořit komplexy s bílkovinami, a tím snižovat jejich stravitelnost [36].

1.4 Význam pro lidskou výživu

Pro většinu celosvětové populace představují potraviny na bázi obilovin jeden z nejdůležitějších zdrojů energie a ostatních živin. Obiloviny jsou zejména bohatým zdrojem škrobu, který poskytuje značné množství energie. Ta je uvolněna ze škrobu rozkladem škrobových polymerů ve formě glukózy absorbované do krevního oběhu [33]. Vlákna obilovin tvořená převážně z neškrobových polysacharidů, jako jsou celulóza, hemicelulózy a β -glukany, je významná pro činnost trávicího traktu. Podporuje růst fyziologické mikroflóry tlustého střeva, zvyšuje činnost střev, a tím působí preventivně proti zácpě. Je důležitá i v prevenci kardiovaskulárních onemocnění nebo cukrovky 2. typu, a to díky pozitivnímu vlivu na hladinu cholesterolu či glukózy v krvi [64].

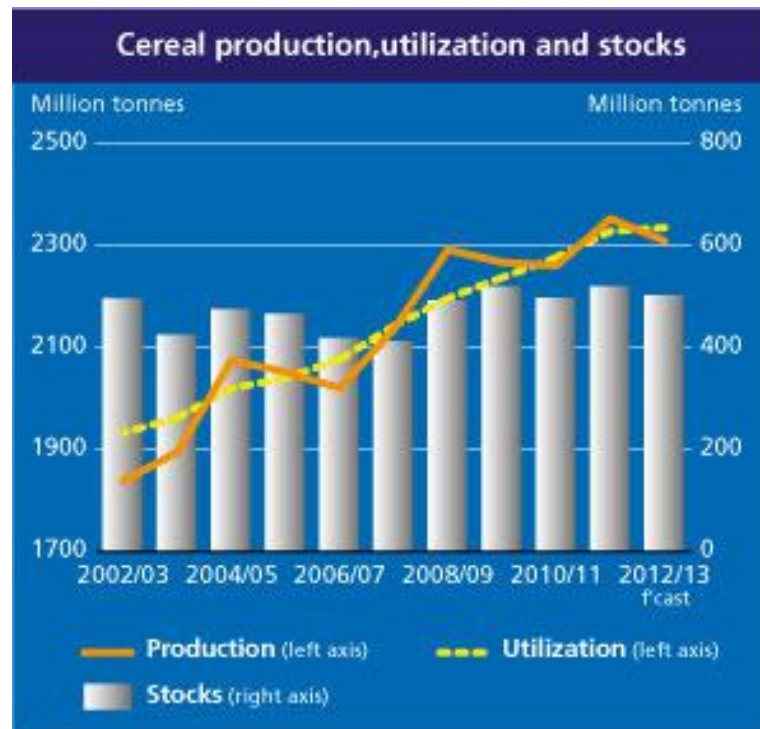
Další důležitou živinou obilovin jsou bílkoviny, které však z důvodu velmi nízkého obsahu esenciální aminokyseliny lyzinu, jsou považovány za neplnohodnotné. Výjimkou je žito, které má hlavní limitující aminokyselinu tryptofan [36]. Pro zvýšení kvality obilných bílkovin je vhodná jejich kombinace spolu s bílkovinami jiných potravin jako např. mléčných, vaječných či bílkovin svaloviny masa [64].

Obsah lipidů v obilovinách je poměrně malý, vyskytují se převážně v klíčku. Nenasycené mastné kyseliny, z nichž jednoznačně převládá kyselina linolová, tvoří více než 75 % všech mastných kyselin. Díky nim mají obilné lipidy značnou nutriční hodnotu, nicméně jsou také příčinou nestability mastných kyselin po hydrolýze tuků způsobené lipázami při delším skladování mouk [36].

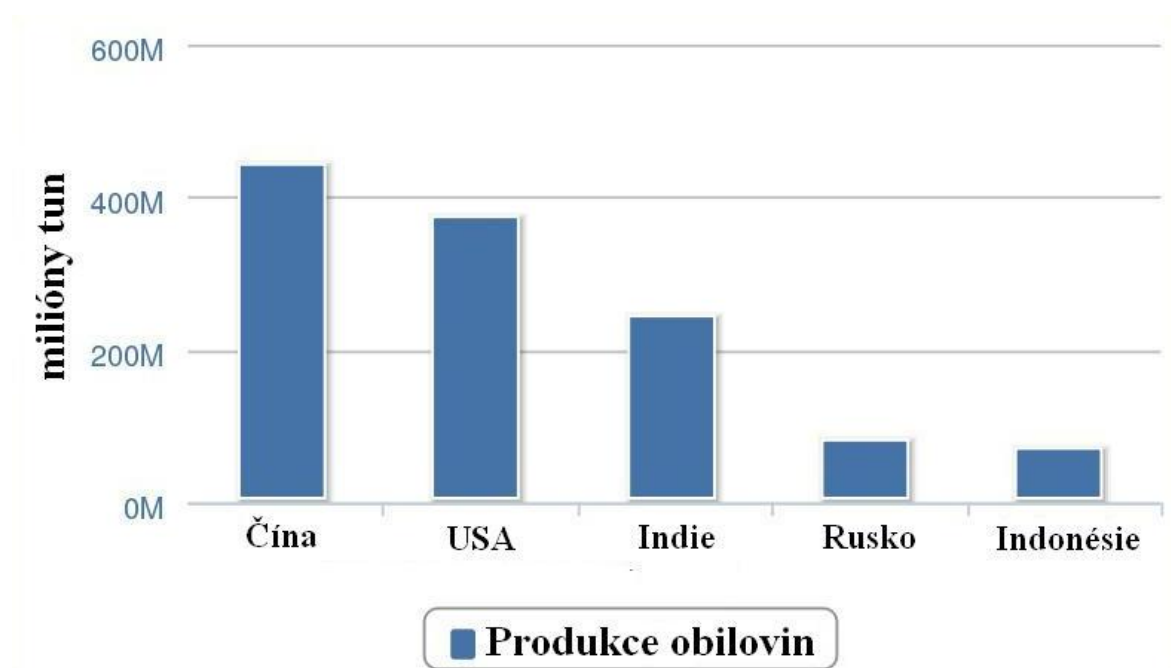
Obiloviny jsou také zdrojem vitaminů, které jsou pro člověka esenciální, jelikož si je lidský organizmus nedokáže syntetizovat v dostatečném množství k pokrytí svých potřeb a je nutné je dodávat stravou. Obsahují především vitaminy skupiny B (tiamin, riboflavin, pyridoxin, kyselinu nikotinovou a pantotenovou), které se vyskytují převážně v obalových vrstvách a klíčku, kde jsou doprovázeny i vitamínem E s významnými antioxidačními vlastnostmi [33]. Celá zrna a celozrnné produkty obsahují také značné množství minerálních látek, a to především vápník, železo, hořčík, draslík a zinek. V nižších koncentracích se v nich vyskytuje řada stopových prvků jako například selen, jehož množství je závislé na obsahu selenu v půdě [36].

1.5 Produkce

Podle nejnovější statistiky FAO (Food and Agriculture Organization, Organizace pro výživu a zemědělství) ze dne 11. dubna 2013 je světová produkce obilovin v sezóně od července 2012 do června 2013 odhadována na 2309 miliónů tun. Celkové zásoby jsou odhadovány ve výši 2826 miliónů tun, z toho 2335 miliónů tun bude využito na produkci potravin, krmiva a průmyslové účely. Pro obchodní účely se odhaduje 303 miliónů tun a zbylých 500 miliónů tun představují konečné zásoby. Na obrázku č. 2 je zobrazen graf, který znázorňuje vývoj hodnot produkce, využití a konečných zásob obilovin v časovém období od roku 2002 do roku 2013 [67]. Mezi 5 hlavními producenty obilovin ve světě patří Čína, USA, Indie, Rusko a Indonésie. Obrázek č. 3 zobrazuje graf, který uvádí průměrnou hodnotu produkce obilovin v jednotlivých státech v letech 2002 – 2010 [15].



Obr. 2 Produkce, využití a konečné zásoby obilovin



Obr. 3 Průměrná produkce obilovin pěti nejvýznamnějších producentů v letech 2002 –2010

Obilovinou s nejvyšší světovou produkcí, zaznamenanou v roce 2009 ve výši 817 miliónů tun, byla kukuřice. Druhou nejvíce produkovanou obilovinou byla rýže s více než 685 milióny tun v roce 2008. Mezi její největší producenty patří Čína, Indie, Indonésie a Pákistán. Přibližně stejná hodnota produkce jako u rýže byla v roce 2008 zaznamenána u třetí nejprodukovanější obiloviny – pšenice, která je základní potravinou hlavních

civilizací v Evropě, Asii a Severní Americe po více než 8000 let [31]. Dalších pět obilovin tvoří také významný podíl na světové výživě, produkci potravin a nápojů. V pořadí podle jejich celosvětové produkční tonáže jimi jsou: ječmen, čirok, proso, oves a žito [42].

1.6 Pšenice

Tato dominantní obilovina většiny zemí světa včetně ČR se taxonomicky řadí do rodu *Triticum* [36]. Jedná se o plodinu pěstovanou již ve starověku, která původně pochází z oblasti Blízkého Východu [42].

1.6.1 Dělení

Rod *Triticum* se dále dělí do tří odrůd, které se liší počtem chromozomů. První skupinou jsou „primitivní“ diploidní pšenice se 14 chromozomy, které byly používány již v Neolitu a stále jsou do jisté míry pěstovány v Evropě. Zástupcem je pšenice jednozrnka (*Triticum monococcum*, zvaná „einkorn“) a její planá forma *Triticum boeoticum*, kterou lze nalézt na Balkáně a ve východním Středomoří. Další skupinu tvoří tetraploidní pšenice s 28 chromozomy. Planou formou je *Triticum dicoccoides*, ze které pocházejí pšenice dvouzrnka (*Triticum dicoccum*) a pšenice tvrdá (*Triticum durum*), vhodná pro výrobu těstovin. Dále zde patří pšenice naduřelá (*Triticum turgidum*), pšenice polská (*Triticum polonicum*), pšenice Perská (*Triticum carthlicum*) a pšenice Timofejevova (*Triticum timopheevi*), které však mají relativně malý ekonomický význam. Třetí skupinu představují pšenice hexaploidní se 42 chromozomy. Předpokládá se, že diploidní a tetraploidní pšenice by mohly být předky právě těchto moderních pšenic. V současnosti nejčastěji pěstovanou hexaploidní pšenicí je pšenice setá (*Triticum aestivum*) a její poddruh – subsp. *vulgare*, který se používá pro výrobu chleba [42].

Z botanického hlediska lze pšenici rozdělit na čtyři variety podle barvy (bílá a červená) a osinatosti klasu (osinatý a bezosinný). Většina našich odrůd patří do variety s klasem bílým bezosinatým [47]. Červená pšenice je charakteristická svou načervenalou či mírně fialovou barvou obilky, což je způsobeno přítomností flavonoidů, díky kterým vykazuje antioxidační účinky [24].

Z pěstitelského hlediska se pšenice setá dělí na ozimé, které se vysévají na podzim a jsou sklizeny na začátku léta, a pšenice jarní vysévané na jaře a sklizené na konci léta, které však mají obecně nižší výnosy než zimní. Pšenice mohou být klasifikovány také z hlediska

zpracovatelského na měkké a tvrdé, dle tvrdosti zrna. V kontinentální evropské terminologii se za tvrdé pšenice považují ty, které se používají pro výrobu těstovin, zatímco ostatní jsou měkké [42].

1.6.2 Charakteristika

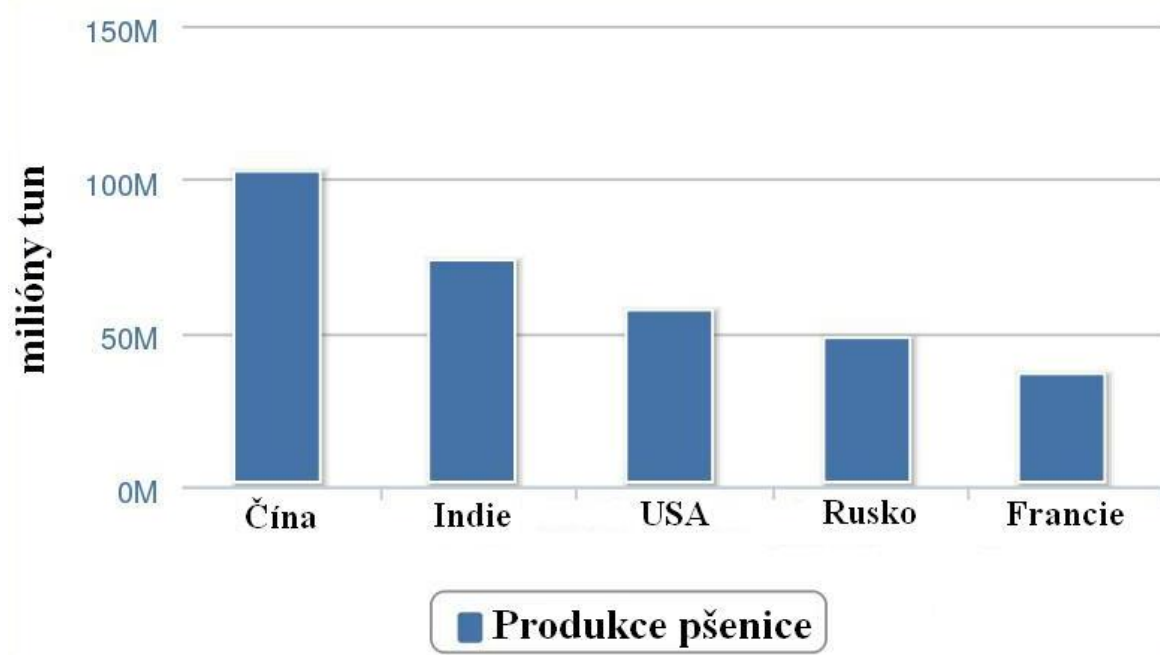
Klas pšenice seté je nelámavý, s osinami nebo bez osin. Plevy a pluchy jsou vejčitého nebo podlouhle vejčitého tvaru se zjevným kýlem. Obilky, suché jednosemenné plody, jsou nahé, na průřezu oblé s vystouplým klíčkem a ochmýřením na protější straně [36]. Na obrázku č. 4 jsou postupně vyobrazeny pšeničný porost, detail klasu bezosinné variety a semena [47].



Obr. 4 Pšeničný porost, detail klasu a semena

1.6.3 Produkce

Díky značnému množství druhů a odrůd a jejich schopnosti přizpůsobit se je možné pšenici pěstovat téměř po celém světě [36]. Podle údajů z FAOSTAT (Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database, Statistická databáze Organizace pro výživu a zemědělství) patří mezi 5 největších světových producentů pšenice Čína, Indie, USA, Rusko a Francie. Na přelomu roku 2007/2008 se vyprodukovalo 610 miliónů tun, což představovalo cca 29 % světové produkce obilovin ve stejném období. Více než 73 % vypěstované pšenice bylo určeno pro lidskou spotřebu, necelých 17 % připadlo na výrobu krmiva pro zvířata a zbytek byl použit na ostatní účely [18]. Na obrázku č. 5 je znázorněna průměrná produkce v letech 2002 – 2010 pěti největších světových producentů pšenice [15].



Obr. 5 Průměrná produkce pěti nejvýznamnějších producentů pšenice v letech 2002 – 2010

V České republice je pšenice nejvýznamnější obilovinou. Tvoří 51 až 52 % celkové plochy obilovin a díky svým relativně vysokým a stabilním výnosům představuje pro většinu výrobních oblastí ČR produkční jistotu. Roční produkce u nás je přibližně 4 milióny tun, což odpovídá cca 55 % roční produkce obilovin. Na mouku a potravinářské výrobky se spotřebuje cca 1 200 tisíc tun (30 % průměrné produkce), na osivo připadá spotřeba cca 190 tisíc tun (4,7 % průměrné produkce) a zbylých cca 2 600 tisíc tun (65 % průměrné produkce) se použije na výrobu krmiva, export a další průmyslové využití [46].

1.7 Rýže

Rýže je nejrozšířenější obilovinou pro přímou konzumaci. Pochází z tropické a subtropické jihovýchodní Asie a je jednou z nejstarších kulturních rostlin světa [36]. Písemné důkazy o pěstování rýže v Číně sahají až do třetího tisíciletí před n. l. Na území Evropy se dostala mnohem později, a to v osmém století do Španělska. První rýžoviště byla založena v Itálii v roce 1522. Právě z italského výrazu „riso“ byl pravděpodobně odvozen český název – rýže [48].

1.7.1 Dělení

Předkem domestikovaných druhů rýže je pravděpodobně jejich planý druh *Oryza rufipogon*. Nejběžněji pěstovaným druhem je rýže setá (*Oryza sativa*). Další druh rýže tzv.

rýže africká (*Oryza glabberima*) byla domestikována v západní Africe a je stále důležitou plodinou tropické Afriky. Pěstují se dvě hlavní linie rýže, a to vodní (nížinná), která se pěstuje ponořením ve vodě až do doby sklizně. Ta je výše výnosná než rýže suchá (horská), která je pěstována na suché zemi. Dále se rozlišují dva hlavní poddruhy rýže seté. Prvním poddruhem je *Oryza sativa* subsp. *japonica* typická pro většinu severních a jižních oblastí s delšími fotoperiodami [42]. Z hlediska vařivých vlastností má nelepivá a dobře oddělitelná zrna. Dalším poddruhem je *Oryza sativa* subsp. *indica*, která roste v dalších tropických oblastech. Její zrna během vaření rychle měknou a stávají se kašovými [33]. Oba poddruhy se od sebe vzájemně liší tvarem zrna. Japonská rýže má dlouhé zrno ve tvaru tyčinky a indická rýže má krátké zrno, širší oválného tvaru [32]. Na obrázku č. 6 můžeme vidět rýži setou - *Oryza sativa* v její krátko- i dlouhozrnné podobě [43].



Obr. 6 Krátkozrnná a dlouhozrnná rýže

1.7.2 Obchodní druhy

V mezinárodním obchodě se vyskytují druhy rýže: bílá – white, která má oloupaný, obroušený a leštěný endosperm, hnědá či červená – brown, red, cargo obsahující poslední obalovou vrstvu spolu s vitaminy a minerálními látkami a rýže zlomková a poškozená – paddy, kterou tvoří částečně obrušované zlomky bílých zrn [32]. Dále se můžeme setkat s rýží ve varných sáčcích, instantní a parboiled. Poslední zmíněná rýže parboiled se upravuje speciálním technologickým způsobem, který byl patentován zhruba před padesáti lety v USA. Jde o čtyřfázovou hydrotermickou úpravu zrna, během které se neloupaná rýže nejprve namočí a poté se působením vysokotlaké páry vpraví dovnitř zrna rozpuštěné minerální látky a vitaminy z jeho povrchových vrstev. Poté následuje běžná úprava zrna loupáním, leštěním, po které však tyto látky v zrně nadále zůstávají. Působením vysokých teplot současně dochází ke změně struktury škrobu, což se odrazí na vařivosti rýže, která si udržuje sypkou konzistenci a nelepí se ani po delším vaření či stání při zvýšené teplotě.

Syrová parboiled rýže má žlutou barvu, po uvaření se však změní na zářivě bílou. V této úpravě se prodává i rýže natural. Parboiled rýže je z výživového hlediska hodnotnější než běžná rýže, a to díky obsahu vitaminů skupiny B, hořčíku, fosforu, vápníku a železa [36].

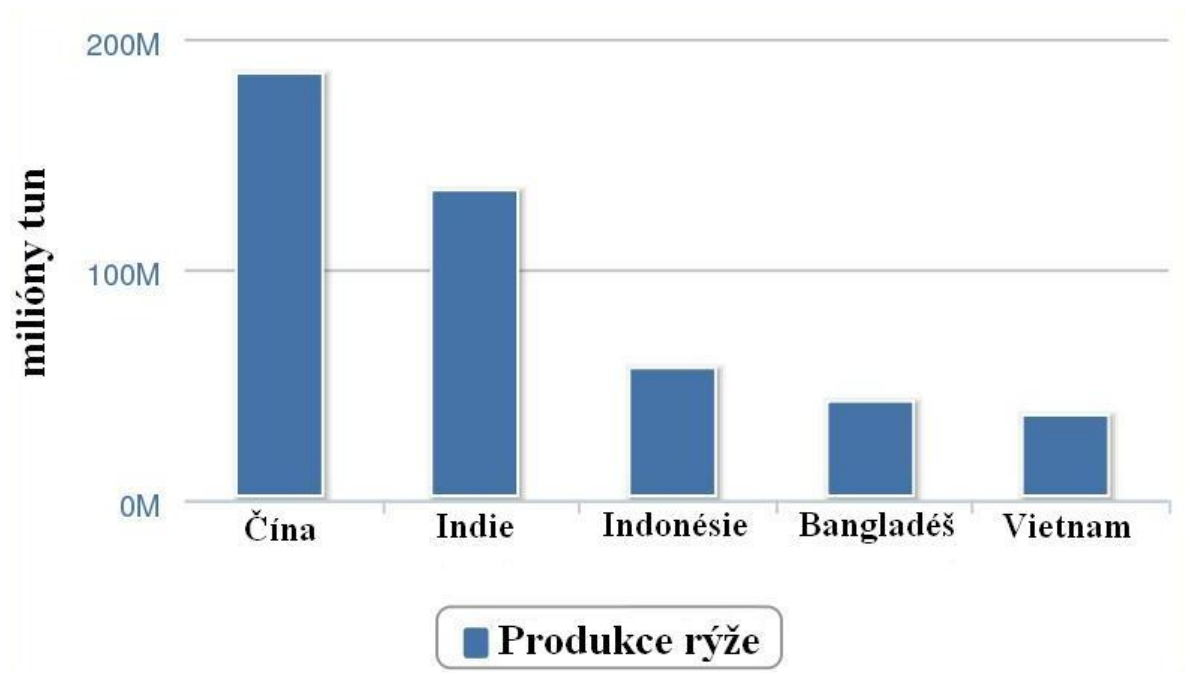
V poslední době se na trhu můžeme setkat s novými druhy rýže, jako jsou rýže basmati s jemnou chutí a oříškovým nádechem, rýži carnaroli a jasmínovou. Oblíbenou je také rýže divoká (indiánská, planá neboli Wild rice, *Zizania aquatica*), která se získává z plané vodní trávy rostoucí v Kanadě a v USA v oblasti Velkých jezer. Často se používá v kombinaci s rýží hnědou či pšenicí a její nutriční hodnota je poměrně vysoká [36]. Na následujícím obrázku č. 7 je rýže divoká - *Zizania aquatica* a její zrna [21, 43].



Obr. 7 Rýže divoká a její zrna

1.7.3 Produkce

Rýže je ponejvíce pěstována v asijských a afrických zemích a zčásti také v Americe [50]. Dle statistik uvedených ve FAOSTAT patří mezi pět nejdůležitějších producentů rýže ve světě Čína, Indie, Indonésie, Bangladéš a Vietnam. Podle zveřejněných údajů se v letech 2007/2008 vyprodukovalo 441 miliónů tun, což tvořilo necelých 21 % celkové produkce obilovin v daném období. Vyvezlo se zhruba 7 % z celkového množství vyprodukované rýže a cca 379 miliónů tun bylo použito pro potravinářské účely [19]. Obrázek č. 8 zobrazuje průměrnou produkci v letech 2002 – 2010 pěti největších světových producentů rýže [15].



Obr. 8 Průměrná produkce pěti nejvýznamnějších producentů rýže v letech 2002 – 2010

2 FENOLICKÉ LÁTKY

Celozrnné obiloviny obsahují mnoho zdraví prospěšných látek, mezi které se kromě vlákniny, vitaminů a minerálních látek řadí i fytochemikálie zahrnující právě fenolické látky [14]. Tyto sekundární metabolity rostlin se obecně zapojují do obrany rostlin proti působení ultrafialového záření a agresivitě patogenů [40].

Strukturálně obsahují jedno nebo více aromatických jader, na které je kovalentně vázaná jedna hydroxylová skupina v případě monomerů, nebo více hydroxylových skupin u vysoce polymerovaných sloučenin zvaných polyfenoly [5]. Většina přírodních fenolických látek je přítomna v konjugované formě s mono- a polysacharidy (glykosidy). Mohou se však vyskytovat i jako funkční deriváty, jako jsou estery a metylestery [20]. Polyfenoly mají obrovskou variabilitu ve své struktuře a následně ve své funkci. V současnosti bylo identifikováno více než 8000 fenolických struktur v rostlinách, a to obvykle ve formě glykosidů [10].

Fenolické látky vykazují silné antioxidační vlastnosti, díky nimž mohou spolu s antioxidačními vitaminy a enzymy chránit před oxidačním stresem způsobeným nadměrnými reaktivními formami kyslíku a dalšími radikály. Hrají tak roli v prevenci degenerativních onemocnění, zejména rakoviny, kardiovaskulárních a neurodegenerativních onemocnění [60], ačkoli donedávna byly považovány odborníky na výživu za antinutrienty kvůli nežádoucímu účinku taninů na stravitelnost proteinů [9]. V potravinářském průmyslu dále roste zájem o rostlinné materiály bohaté na fenolické látky z důvodu jejich schopnosti zpomalit oxidační degradaci lipidů, a tím zlepšit kvalitu a nutriční hodnotu potravin [66].

Jsou obsaženy ve všech potravinách rostlinného původu, proto tvoří nedílnou součást lidské stravy [9]. Bylo prokázáno, že hrají významnou roli pro zdraví člověka. Vysoký příjem potravin bohatých na polyfenoly byl spojen se snížením rizika mnoha chronických chorob, včetně rakoviny, kardiovaskulárních onemocnění, chronického zánětu a dalších degenerativních onemocnění [60]. Hlavními zdroji polyfenolů ve stravě jsou ovoce a nápoje, jako čaj, káva a víno. Čokoláda, s vysokým obsahem flavonoidů, spolu s obilovinami, zeleninou a semeny luskovin přispívají také k jejich celkovému dennímu příjmu, který je odhadován mezi 150 – 1000 mg [10].

Většina literárních zdrojů týkajících se rostlinných fenolů je zaměřena hlavně na ty obsažené v ovoci, zelenině, vínu a čaji, ačkoliv mnohé z nich (např. fenolové kyseliny a flavonoidy) se vyskytují také v obilovinách. Navíc získávání fenolických látek z obilovin má řadu výhod. V porovnání s ovocem a zeleninou jsou obilná zrna suchá, snadno dlouhodobě skladovatelná a možná také jednodušeji zpracovatelná do stabilních koncentrátů. Díky tomu mohou obiloviny poskytovat řadu přijatelných, zdraví prospěšných složek v potravinách. V obilném zrně se převážně vyskytují v oplodí (pericarp). Mohou se získat oloupaním zrna k produkci otrub, které se mohou dále přidat do potravin, čímž se zvýší jejich obsah vlákniny a nutriční vlastnosti [14].

Mezi hlavní skupiny fenolických látek, které byly stanoveny v celozrnných obilovinách, patří fenolové kyseliny, flavonoidy, kondenzované taniny, avenantramidy, lignany a alkylresorcinoly [14].

2.1 Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny jsou polyfenolické sloučeniny, které mohou být dále rozděleny do dvou hlavních tříd na deriváty kyseliny benzoové a deriváty kyseliny skořicové [40]. Mezi zástupce derivátů kyseliny benzoové patří kyselina vanilová a salicylová, zatímco deriváty kyseliny skořicové jsou kyselina ferulová a kávová [63]. Jejich výskyt byl zaznamenán ve všech obilovinách, a to jak ve volné, tak ve vázané formě. Volné fenolové kyseliny jsou lokalizovány ve vnější vrstvě pericarpu a extrahují se pomocí organických rozpouštědel [14]. Uvolnění vázaných kyselin je možné provést kyselou nebo alkalickou hydrolyzou nebo pomocí enzymů [60]. Hlavní hydroxyskořicovou kyselinou vyskytující se v obilovinách je kyselina ferulová. Vyskytuje se zejména ve vnější části zrna. V pšeničném zrně byl stanoven její obsah v hodnotě cca 80 – 2000 mg.100 g⁻¹ sušiny [52].

Žilić, S. et al. [68] chromatograficky analyzovali jednotlivé fenolové kyseliny v otrubách pšenice seté a tvrdé. Převládající fenolovou kyselinou byla kyselina ferulová s koncentrací v rozmezí od 5502,05 do 9160,92 mg.kg⁻¹, což odpovídá asi 95 – 99 % obsahu celkových kyselin v zrně. Dále byla detekována také kyselina *p*-kumarová a *p*-hydroxybenzoová. Hung, P. V. et al. [30] stanovovali obsah fenolových kyselin ve volných a vázaných fenolových extraktech zrn voskové (bez amylozy) pšenice pomocí HPLC. Píky všech složek byly detekovány při 280 nm. V této studii byly zjištěny tři fenolové kyseliny, a to kyselina ferulová, kumarová a *p*-hydroxybenzoová, ačkoliv i kyselina vanilová

a skořicová mohou být přítomny. Obsah kyseliny ferulové byl nejvyšší ve vázané formě ve vnější části pšeničného zrna v množství $374,4 \pm 3,4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ vzorku. Zatímco kyselina *p*-hydroxybenzoová a kumarová byly přítomny ve větším množství ve volné formě než ve vázané. Mattila, P. et al. [41] kvantifikovali obsah celkových fenolových kyselin metodou HPLC po alkalické a kyselé hydrolyze. Nejvyšší obsah byl zaznamenán v otrubách pšenice v množství $4527 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a žita v množství $4190 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Celozrnné mouky těchto zrn obsahovaly 1342 a $1366 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ v daném pořadí. V obilných produktech byly nalezeny zejména kyselina ferulová, sinapová a *p*-kumarová.

2.2 Proantokyanidiny

Kondenzované taniny neboli proantokyanidiny či prokyanidiny jsou složeny z jednotek flavanolů [26]. Taniny jsou schopny navázat proteiny, sacharidy a minerální látky, čímž snižují jejich stravitelnost. Podílejí se na trpkosti potravin. Vykazují vysokou antioxidační aktivitu *in vitro* ve srovnání s monomerními fenolickými látkami. Navíc mohou mít antikarcinogenní, gastroprotektivní a protivředové účinky, mohou snižovat hladinu cholesterolu a příznivě působit na močové cesty. Tyto látky se nacházejí v široku ve formě polymerů a v ječmeni ve formě mono-, di- či trimerů. Jejich oddělení a kvantifikace podle stupně polymerace je možná použitím metody HPLC s fluorescenční detekcí. V ječmenu byly například stanoveny v množství $0,74 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a v široku v množství $7,88 - 21,97 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ [2]. Finocchiaro et al. [17] stanovili spektrofotometricky při 540 nm obsah proantokyanidinů ve vzorcích červené rýže v rozmezí od $93,30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ do $118,56 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, v závislosti na genotypu, a ve vzorcích černé rýže v množství $153,07 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

2.3 Avenantramidy

Avenantramidy se skládají z derivátu kyseliny antranilové spojeného s derivátem kyseliny hydroxyskořicové. Nacházejí se především v ovesných vločkách [14]. Byly zaznamenány jejich silné protizánětlivé a antioxidační vlastnosti, včetně schopnosti inhibice oxidace LDL [60]. Mattila, P. et al. [41] detekovali množství avenantramidů v ovesných produktech metodou HPLC po extrakci 80% metanolem. Zjistili, že ovesné vločky ($26 - 27 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) jich obsahují přibližně dvakrát více než ovesné otruby ($13 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Mezi tři hlavní avenantramidy vyskytující se v ovsu patří avenantramid 1, 3 a 4, známí také jako

avenantramid B, C a A [2]. Dimberg, L. H. et al. [13] stanovili pomocí metody HPLC množství avenantramidů A v ovesném zrně v rozsahu od 40 do 132 mg.kg⁻¹.

2.4 Lignany

Lignany se řadí k fytoestrogenům, které se vyskytují především ve lněném semínku, ale také v ječmeni, ovsu, pšenici, triticales a žitu. Jejich množství v těchto obilovinách se pohybuje v rozmezí od 8 do 299 μg.100g⁻¹ [14]. V rostlinách byly identifikovány sekoizolaricirezinol a matairezinol, které jsou metabolizovány střevní mikroflórou na savčí lignany enterodiol a enterolakton [40]. Lignany jsou biologicky dostupné, s antioxidačními vlastnostmi a předpokladem ke snížení rizika srdečních onemocnění, rakoviny prsu, prostaty a tlustého střeva [14].

2.5 Alkylrezorcinyly

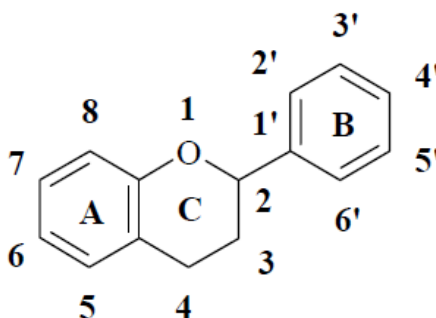
Alkylrezorcinyly jsou deriváty 1,3-dihydroxybenzenu s lichým počtem uhlíkových řetězců na benzenovém jádře v pozici C-5. Nachází se v otrubách pšenice, žita, triticales a ječmene. Mají antibakteriální a antimykotické vlastnosti a *in vitro* antioxidační aktivitu [14]. Mattila, P. et al. [41] stanovovali množství alkylrezorcinylů v obilných produktech pomocí HPLC po extrakci ve 100% metanolu. Uvádí, že jejich obsah v otrubách pšenice byl v hodnotě 3225 mg.kg⁻¹ a v celozrnné mouce v hodnotě 759 mg.kg⁻¹.

2.6 Flavonoidy

Představují rozsáhlou třídu sekundárních rostlinných fenolů o nízké molekulové hmotnosti, které se vyznačují flavanovým jádrem [26]. Výzkum flavonoidů má počátek zřejmě v roce 1936, kdy maďarský vědec Albert Szent-Gyorgi zkoumal součinnost mezi vitamínem C a dosud neidentifikovanými kofaktory z kůry citrónu, které nejprve nazval „citrin“ později „vitamin P“ [53]. Dosud bylo identifikováno více než 4000 flavonoidů vyskytujících se převážně v listech, semenech, kořenech a květech rostlin, kde zajišťují ochranu proti ultrafialovému záření, patogenům a býložravcům [26]. Jejich název pochází z latinského „flavus“ (žlutý) a mnohé z nich jsou zodpovědné za zbarvení květin nebo listů na podzim [23]. V potravinách jsou obsaženy především ve formě glykosidů a polymerů, které jsou dále v různém rozsahu štěpeny v trávicím traktu [26]. Denní příjem flavonoidů stravou je odhadován na 1 – 2 g [53].

2.6.1 Struktura

Základem struktury flavonoidů je flavan, který se skládá ze dvou benzenových kruhů (A a B) a heterocyklického pyranového kruhu C. Jedná se o charakteristické uspořádání uhlíkatého skeletu C6–C3–C6 [62]. Obrázek č. 9 znázorňuje obecnou strukturu a systém používaný pro číslování uhlíků jádra flavonoidů [16]. Flavonoidy se liší svým uspořádáním hydroxylových, metylových a glykosidických postranních skupin a spojením mezi A a B kruhem [53]. Během metabolismu jsou hydroxylové skupiny přidávány, metylovány, sulfátovány a glukuronidovány [26]. Značná část flavonoidů je glykosylována. Nejčastěji navázaným cukrem bývá glukóza, ramnóza, méně pak galaktóza, arabinóza, xylóza [8]. V rostlinách se flavonoidy často vyskytují jako O-glykosidy nebo C-glykosidy. O-glykosidy mají cukernou složku navázanou na –OH skupinu aglykonu obvykle v pozici 3 nebo 7, zatímco u C-glykosidů je navázaná obvykle na 6-C nebo 8-C aglykonu [53].



Obr. 9 Základní struktura flavonoidů

2.6.2 Chemická stabilita

Barva flavonoidů se odvíjí podle prostředí, ve kterém se nacházejí. V neutrálním a kyselém prostředí jsou bezbarvé. V zásaditém prostředí se zabarvují do žluté až žluto-oranžové barvy [11]. Antokyany, jedni ze zástupců skupiny flavonoidů, mají v kyselém pH červenou barvu a v zásaditém pH modrou [62]. Teplotní stabilita flavonoidů se odvíjí od prostředí extrakčních rozpouštědel. Byl studován vliv extrakčního prostředí metanolu, etanolu a vody na standardní roztoky rutinu a kvercetin v teplotním rozsahu od 40 do 120 °C. V případě metanolu a etanolu byl zjištěn velmi pozvolný pokles koncentrací standardů, který při teplotě 120 °C vykazoval hodnotu 20 %. Zato při extrakci stlačenou vodou nastal pokles již při počáteční teplotě 40 °C. S rostoucí teplotou klesala koncentrace standardů k nulové hodnotě [27].

2.6.3 Resorpce a metabolismus

Resorpce se odvíjí od dávky, způsobu podání, předchozí stravy, mikrobiální populace střeva apod. [26]. Před tím, než mohou být flavonoidy z rostlinné stravy absorbovány, musí být uvolněny žvýkáním, činností trávicích šťáv a nakonec mikroorganismy tlustého střeva [28]. Většina flavonoidů, s výjimkou flavanolů (katechiny a proantokyanidiny), jsou v rostlinách přítomny jako glykosidy, což určuje, že mohou být absorbovány až po metabolizaci bakteriálními enzymy v tlustém střevě. Pouze flavonoidové aglykony a glukosidy (vázané na glukózu) mohou být absorbovány již v tenkém střevě, kde jsou rychle metabolizovány za vzniku metylovaných, sulfátovaných či glukuronidovaných metabolitů [39]. Tyto reakce jsou velmi efektivní, výsledkem je nepřítomnost volných flavonoidových aglykonů v plazmě nebo moči. Absorpce z tenkého střeva je účinnější než z tlustého střeva a vede k vyšším hodnotám v plazmě. Flavonoidy, které nemohou být absorbovány z tenkého střeva a absorbované flavonoidy vylučované žlučí, jsou štěpeny mikroorganismy v tlustém střevě za vzniku fenolových kyselin. Ty mohou být dále absorbovány a jejich hodnoty lze měřit v plazmě a moči [28]. Obecně platí, že biologická dostupnost flavonoidů je relativně nízká v důsledku omezené absorpce, rozsáhlé metabolizace a rychlé eliminace [39].

2.6.4 Antioxidační aktivita

Jejich ochranné účinky v biologických systémech spočívají ve schopnosti přenášet elektrony na volné radikály, chelatovat kovové kationty, aktivovat antioxidační enzymy, redukovat α -tokoferolové radikály a inhibovat oxidázy [26].

Antioxidační aktivita flavonoidů a jejich derivátů závisí na prostorovém uspořádání funkčních skupin jaderné struktury. Konfigurace a celkový počet hydroxylových skupin má značný vliv na několik mechanismů antioxidační aktivity. Schopnost odstraňování volných radikálů je především připisována jejich vysoké reaktivitě [26]. Stupeň hydroxylace a umístění $-OH$ skupin na B-kruhu má za následek vyšší aktivitu, neboť při odstraňování reaktivních forem kyslíku a dusíku vytvoří relativně stabilní flavonoidové radikály $F-O\cdot$, nebo se chovají jako žádoucí vazebné místo pro stopové kovy [5]. Mechanismus reakce odstraňování volných radikálů díky $-OH$ skupinám flavonoidů je uveden níže:

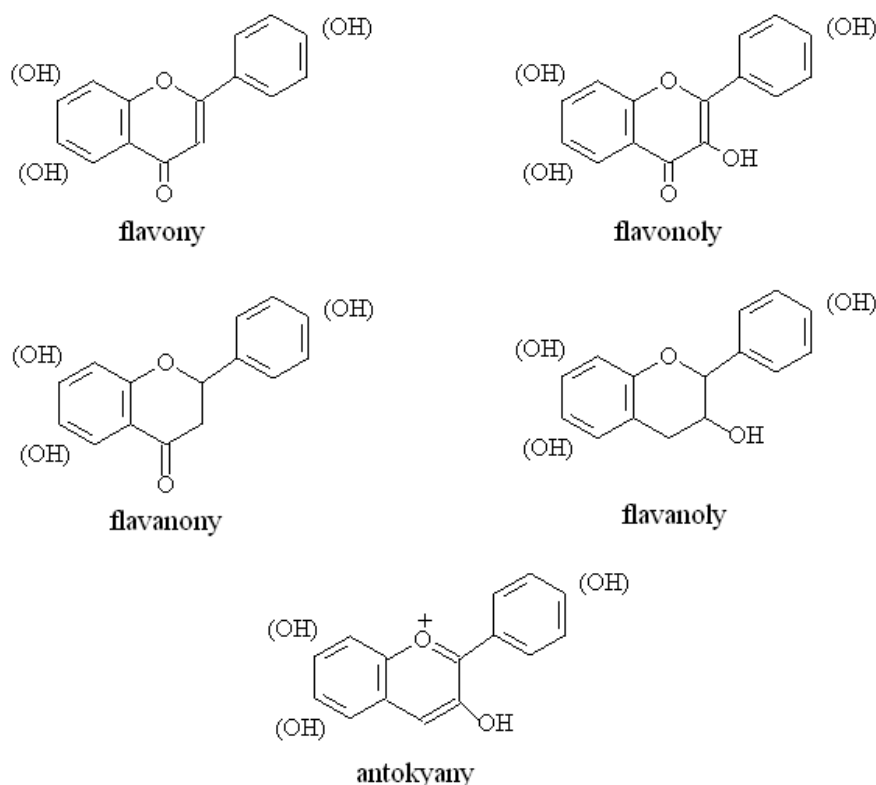


Přítomnost nenasyčené vazby mezi C-2 a C-3 společně se 4-oxo skupinou v C-kruhu zvyšuje schopnost flavonoidů odstraňovat volné radikály [5]. Aglykony jsou obecně silnějšími antioxidanty než jim odpovídající glykosidy [26].

Rozdíly v antioxidační aktivitě mezi polyhydroxylovanými a polymetylovanými flavonoidy jsou s největší pravděpodobností způsobeny jak rozdíly v hydrofóbnosti, tak molekulární uspořádanosti v prostoru [26]. Substitucí hydroxylových skupin v B kruhu skupinami metylovými se mění redoxní potenciál, který potlačuje jejich antioxidační aktivitu [5].

2.6.5 Zástupci flavonoidů v obilovinách

Na základě stupně oxidace pyranového C kruhu se rozlišují následující hlavní skupiny flavonoidů: flavony, flavonoly, flavanony, flavanoly a antokyany [62]. Jejich obecná struktura je uvedena na následujícím obrázku č. 10 [8].



Obr. 10 Obecná struktura hlavních zástupců flavonoidů

Flavonoidy se vyskytují v oplodí všech obilovin. Doposud největší rozsah různých flavonoidů byl zaznamenán v čiroku [14].

Flavony patří společně s flavonoly k nejrozšířenějším žlutým pigmentům rostlin. Často se vyskytujícími flavony jsou především apigenin a luteolin [62]. Výskyt obou zástupců byl

kromě petržele a celeru hlášen i v prosu, ovsu a čiroku [14]. V rýžových otrubách, prosu a pšenici se nacházejí nejběžnější C-glykosidy flavonů – vitexin a orientin [40, 62].

Flavonoly jsou nejvíce rozšířenými flavonoidy v běžně přijímaných potravinách (cibule, jablka, kapusta, zelený a černý čaj) a hlavními zástupci jsou kvercetin a kemferol. Vyskytují se především ve vnějších tkáních rostlin (pokožka, listy), jelikož je jejich biosyntéza stimulována světlem [40]. Jako volné aglykony jsou přítomny minimálně, hlavními formami flavonolů jsou glykosidy [62].

V čiroku a ovsu byly zaznamenány **flavanony**, které se nacházejí především v citrusech [14]. Nejvýznamnějšími zástupci jsou aglykony hesperetin, který je součástí glykosidů pomerančů a citrónů, a naringenin vyskytující se hlavně v grapefruitech. Jsou uloženy v albedu citrusových plodů a jejich obsah se zvyšuje během zrání [62].

Flavanoly existují v monomerní formě jako katechiny a polymerní jako proantokyanidiny [40]. Katechiny se nacházejí především v čaji, ale byly také identifikovány v ječmeni a čiroku [8, 14]. Na rozdíl od jiných tříd flavonoidů flavanoly nejsou v potravinách glykosylovány. Proantokyanidiny, známé jako kondenzované taniny, jsou dimery, oligomery a polymery katechinů [40]. Mají astringentní (svíravé) účinky, a spolu s flavanolovými katechiny se vyskytují v ovoci (jablka, hrušky, hrozny) a nápojích jako např. víno, čaj, čokoláda a kakao [8].

Antokyaniny představují nejrozšířenější a početně velmi rozsáhlou skupinu rostlinných barviv [62]. Tyto ve vodě rozpustné pigmenty jsou zodpovědné za modré, fialové a červené zbarvení v potravinách rostlinného původu [14]. V potravinách má význam následujících 6 antokyanů seřazených sestupně dle četnosti výskytu: kyanidin (fialový), pelargonidin (šarlatově červený), peonidin (fialový), delfinidin (purpurově modrý), petunidin (purpurově modrý) a malvidin (purpurový) [62]. Tyto látky byly stanoveny v oplodí pigmentovaných odrůd obilovin, a to modrého ječmene; růžové, červené, modré a fialové kukuřice; černé rýže; černého čiroku; modré a fialové pšenice. Mletím těchto obilovin do otrub došlo ke koncentraci antokyanů [3]. Abdel-Aal [1] studoval složení a stabilitu antokyanů v modré a fialové pšenici. Po jejich separaci použitím HPLC se ukázalo, že každá pšenice má zřetelný antokyanový profil. V celozrnné pšenici stanovili 93 – 152 mg.kg⁻¹ a v otrubách 236 – 453 mg.kg⁻¹. Antokyaniny získané z přírodních zdrojů se používají jako potravinářská barviva více než 100 let. Jejich nevýhodou však je skutečnost, že mají intenzivní barvu v prostředí o pH < 3,5, což omezuje jejich použití pouze pro kyselé potraviny [62]. Zjistilo

se, že čiroky obsahují unikátní antokyany, takzvané 3-deoxyantokyany, které postrádají –OH skupinu na třetí pozici v C kruhu. Tento znak pravděpodobně zvyšuje jejich stabilitu při vysokém pH prostředí, což je činí dobrými přírodními potravinovými barvivy. Mezi jejich hlavní zástupce v čiroku patří žlutý apigeninidin a oranžový luteolinidin. Výsledky výzkumu ukázaly, že čiroky s černým oplodím měly vyšší obsah 3-deoxyantokyanů než ty s červeným. Produkci otrub ze zrn černého čiroku se koncentrace antokyanů zvýšila téměř sedmkrát [14]. V lidské stravě se antokyany nacházejí v červeném víně, některých odrůdách obilovin, některé listové a kořenové zelenině (lilek, zelí, fazole, cibule, ředkvičky), a nejhorněji v ovoci [40].

2.6.6 Účinky na zdraví

Výzkum flavonoidů a jiných fenolických látek, jejich antioxidačních vlastností a jejich příznivých účinků v prevenci chorob, skutečně začal až po roce 1995, do té doby se o nich zmiňovalo velmi zřídka. Hlavním faktorem, který ovlivňuje výzkum fenolických látek, je jejich značná různorodost a složitost chemických struktur [54].

Příznivé zdravotní účinky flavonoidů jsou připisovány jejich antioxidačním vlastnostem a schopnostem inhibovat peroxidaci lipidů, tvořit stabilní komplexy s redox-aktivními kovy a zmírňovat ostatní procesy zahrnující reaktivní formy kyslíku. Ty totiž prostřednictvím destabilizace membrán, poškození DNA a oxidace LDL přispívají ke stárnutí buněk, mutagenezi, rakovině [26]. Uvádí se, že vykazují protirakovinné, protialergenní, protivirové a protizánětlivé efekty a snižují riziko kardiovaskulárních onemocnění [16]. Dle uvedených informací by mohly v budoucnu flavonoidy, ve formě přírodní, hemisyntetické či syntetické, samostatně nebo v kombinaci s jinými účinnými látkami, sloužit jako účinné léky proti nejčastějším degenerativním onemocněním, jako rakovina, diabetes a kardiovaskulární onemocnění [59].

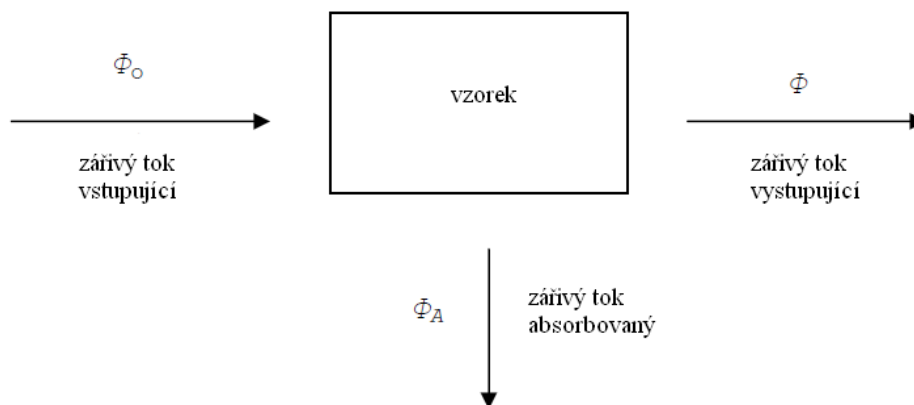
3 METODY STANOVENÍ FLAVONOIDŮ

Detekce a identifikace biologicky účinných látek hraje důležitou roli ve fytochemickém výzkumu. Fenolické látky v rostlinných materiálech se orientačně stanovují pomocí techniky chromatografie na tenké vrstvě (TLC – Thin Layer Chromatography) případně na kolonách. Ke kvalitativnímu a kvantitativnímu stanovení těchto látek se využívají především metody chromatografické, a to plynová a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (GC – Gas Chromatography, HPLC – High Performance Liquid Chromatography), elektromigrační metody – kapilární elektroforéza (CE – Capillary Electrophoresis) a spektrofotometrické v UV/VIS oblasti [35].

3.1 Molekulární absorpční spektrofotometrie v UV/VIS oblasti

Jedná se o jednu z nejužívanějších analytických metod pro stanovování látek v roztocích. Podstatou je měření absorpce vhodného elektromagnetického záření molekulami látek v ultrafialové a viditelné oblasti spektra (v rozsahu vlnových délek cca 200 – 800 nm). Látky absorbující záření s vlnovou délkou pod 380 nm (ultrafialové záření) se jeví jako bezbarvé, a ty absorbující vlnové délky v rozsahu 380 – 770 nm se jeví oku jako barevné [45]. Absorpce záření souvisí s přechodem elektronu mezi dvěma a více energetickými hladinami v molekule. Excitovaná molekula se vrací zpět do základního stavu bez radiace, zářivá energie se mění v tepelnou a zvyšuje se kinetická energie molekul [57].

Při měření absorpce je část ze vstupujícího toku záření Φ_0 absorbována vzorkem jako tzv. absorbovaný zářivý tok Φ_A . V ideálním případě zbytek záření projde a je zaznamenán jako vystupující zářivý tok Φ [56]. Tato skutečnost je schematicky znázorněna na následujícím obrázku č. 11 [56].



Obr. 11 Interakce záření se vzorkem

Podíl zářivého toku vystupujícího Φ a vstupujícího Φ_0 se označuje jako propustnost neboli **transmitance**, která je dána vztahem: $\tau = \Phi / \Phi_0$ [56]. Množství absorbovaného záření určité vlnové délky se vyjadřuje v jednotkách **absorbance**, což je záporně vzatý logaritmus transmitance. Absorbance je definována vztahem $A = -\log \tau = \log (\Phi_0 / \Phi)$ [45].

Kvantitativní analýza absorpčních metod je založena na **Lambertově-Beerově zákonu**, dle kterého platí, že hodnota absorbance **A** při vlnové délce λ je přímo úměrná součinu molárního absorpčního koeficientu ϵ_λ ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), tloušťky vrstvy kvvety **l** (1 cm) a molární koncentrace absorbující látky **c** ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) [49].

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda \cdot l \cdot c$$

Neznámou koncentraci absorbujícího analytu lze vyhodnotit metodou kalibrační křivky nebo metodou standardního přídatku [6].

Žilić et al. [68] stanovovali spektrofotometricky celkový obsah flavonoidů v pěti genotypech pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) a pšenice tvrdé (*Triticum durum*). Po dobu 4 hodin před provedením extrakce volných a vázaných fenolických sloučenin byly vzorky vystaveny působení 4 N NaOH, tím došlo k uvolnění vázaných forem. Následovala úprava pH na hodnotu 2,0 pomocí 6 N HCl a hydrolyzáty byly čtyřnásobně extrahovány ve směsi etylacetát:dietyler (1:1, v/v). Kombinovaný extrakt byl odpařen do sucha pod proudem N_2 a při teplotě 30 °C. Zbytek se rozpustil v 1,5 ml metanolu a přefiltroval přes 0,45 μm nylonový filtr a udržoval se při teplotě 20 °C. Ke stanovení obsahu flavonoidů bylo smícháno 100 ml extraktu s 50 ml 5% NaNO_2 . Po pěti minutách bylo přidáno 500 ml 10 % AlCl_3 . Po sedmi minutách následoval přídatek 250 ml NaOH a směs byla odstředěna při 5000 g po dobu 10 minut. Absorbance supernatantu byla měřena při vlnové délce 510 nm proti slepému vzorku. Celkový obsah flavonoidů byl vyjádřen v mg ekvivalentu katechinu (CE) na kg. Výsledky této studie ukázaly, že flavonoidy byly soustředěny v otrubách pšenic. Průměrný celkový obsah flavonoidů v otrubách pšenice seté byl zjištěn v hodnotě 213,04 a pšenice tvrdé v hodnotě 259,31 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Afify et al. [2] zjišťovali celkový obsah flavonoidů ve třech bílých odrůdách čiroku. Vzorek (1 g) byl smíchán s 10 ml 80% metanolu a poté 2 hodiny třepán. 0,4 ml extraktu celkových flavonoidů bylo přidáno ke 4 ml H_2O a 0,3 ml 5% NaNO_2 . Po pěti minutách byl přidán 10% AlCl_3 v množství 0,3 ml a po dalších 6 minutách 1 M NaOH ve 2 ml. Destilovaná voda byla použita k doplnění na konečný objem 10 ml. Následovalo

spektrofotometrické stanovení při 510 nm proti slepému vzorku. Jako standard byl použit katechin. Celkový obsah flavonoidů v surovém čiroku byl stanoven v rozmezí od 45,91 do 54,69 mg.100g⁻¹ sušiny.

Hung P. V. et al. [30] spektrofotometricky stanovovali celkový obsah flavonoidů jednotlivých frakcí zrn voskové pšenice pomocí kolorimetrické metody s použitím AlCl₃. Volné fenolové sloučeniny byly extrahovány smísením 1 g mouky s 10 ml 80 % etanolu za stálého třepání po dobu 20 min při pokojové teplotě. Suspenze byla odstředěna, použita k opakované extrakci a získal se supernatant. Extrakty volných fenolových sloučenin byly koncentrovány pomocí vakuové odparky a následně doplněny metanolem na konečný objem 10 ml. Poté bylo ke zbytku přímo přidáno 20 ml 2 N NaOH a třepalo se 90 minut při teplotě 60 °C. Dále bylo upraveno pH na hodnotu 2 pomocí 6 N HCl a byla odstředěna sraženina. Volné mastné kyseliny a lipidy byly odstraněny pětinasobnou extrakcí hexanem. Uvolněné fenolové kyseliny byly extrahovány šestkrát etylacetátem. Etylacetátové extrakty byly následně odpařeny do sucha a rozpuštěny v 10 ml metanolu. Ke stanovení obsahu flavonoidů bylo použito vhodné ředění extraktů (0,5 ml) spolu s 1,5 ml 95% etanolu. Poté bylo přidáno 0,1 ml 10% AlCl₃, 0,1 ml 1 M octanu draselného a 2,8 ml destilované vody. Směs se inkubovala 30 minut při pokojové teplotě a absorbance byla měřena při 415 nm pomocí Shimadzu UV-160A spektrofotometru. Obsah flavonoidů byl vypočítán použitím kalibrace standardního alkoholového roztoku rutinu vyjádřený v µg ekvivalentu rutinu (RE) na g vzorku. Nejvyšší obsah celkových flavonoidů byl zaznamenán u vnější části pšeničného zrna v množství 226,5 µg RE.g⁻¹ mouky volných fenolových extraktů a 341,8 µg RE.g⁻¹ mouky vázaných fenolových extraktů. Ostatní části pšeničného zrna, včetně bílé a celozrnné mouky, měly podstatně nižší obsah flavonoidů, z čehož vyplývá, že flavonoidy jsou soustředěny především ve vnější vrstvě pšeničných zrn.

Shen et al. [55] měřili spektrofotometricky celkový obsah flavonoidů v bílé, červené a černé rýži použitím kolorimetrické metody. Nejprve byla provedena extrakce 1 g vzorku v prostředí metanolu s obsahem 1% HCl po dobu 24 hod při teplotě 24 °C. Tento postup byl dvakrát opakován. Získané extrakty byly odstředěny při 4000 g 15 minut. 0,5 ml vhodně zředěného extraktu nebo standardu bylo odpipetováno do 15ml zkumavek s 2 ml dvakrát destilované vody a 0,15 ml 5% NaNO₂. Po pěti minutách bylo přidáno 0,15 ml 10% AlCl₃.6H₂O a za dalších pět minut byl přidán 1 ml 1 mol.dm⁻³ NaOH. Reakční směs byla dobře promíchána, nechala se 15 minut odstát a následovalo měření absorbance při

415 nm. Celkový obsah flavonoidů byl vypočítán s použitím kalibrační křivky standardu rutinu a vyjádřen v mg RE na 100 g suché hmotnosti. Obsah flavonoidů ve všech třech druzích rýže se pohyboval v rozmezí od 88,6 do 286,3 mg RE.100g⁻¹. Hodnota průměrného obsahu flavonoidů v bílé rýži byla 131,6; v červené rýži 147,2 a v černé rýži 240,6 mg RE.100g⁻¹.

3.2 Plynová chromatografie – GC

Plynová chromatografie byla pro analýzu flavonoidů použita již na počátku šedesátých let 20. století [12]. Nevýhodou této techniky je omezení separace pouze na aglykony flavonoidů, proto je nutným krokem analýzy tzv. derivatizace. Vznik derivátů vede ke zvýšení těkavosti především těch analytů obsahujících hydroxy, karboxy nebo amino skupiny. Výsledkem je zvýšení citlivosti a selektivity při detekci [34]. Ve většině případů dochází při derivatizaci ke vzniku trimetylsilyleterových (TMS) derivátů. Ty jsou dále separovány na koloně s následnou tepelně-vodivostní detekcí. Jednotlivé frakce slouží pro IR a UV/VIS spektroskopii. GC metoda poskytuje vysokou rozlišovací schopnost s nízkými detekčními limity, ale kvůli derivatizaci je náročná na provedení. Analýza flavonoidů metodou GC má v poslední době větší význam pravděpodobně díky rozvoji vysokoteplotní chromatografie a zavedení zlepšených derivatizačních postupů [12]. GC je hlavní chromatografickou metodou používanou pro analýzu zejména fenolových kyselin v rostlinných materiálech [58].

Havsteen [25] identifikoval flavonoidy použitím metody GC-MS (Gas Chromatography with Mass Spectrometry, Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií) v propolisu. Vzorek propolisu (0,5 mg) byl derivatizován v 50 ml pyridinu a 100 ml bis-(trimetylsilyl) triflouro-acetamidu v uzavřené skleněné trubici při teplotě 100 °C. Další vzorek propolisu (1 mg) byl extrahován se 70% etanolem pro získání balzámu a ten byl následně také derivatizován. Složky vzorku byly následně separovány a analyzovány na automatickém GC-MS přístroji. Zjištěné látky mohou být identifikovány pomocí počítačového vyhledávání v referenčních knihovnách obsahujících GC retenční časy a hmotnostní spektra.

3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC

Patří mezi analytické separační metody, při kterých dochází k dělení složek obsažených ve vzorku mezi mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) fází. Pohybem mobilní fáze je vzorek unášen soustavou. Separaci jednotlivých složek ovlivňuje nejen jejich interakce se stacionární fází, ale i složení mobilní fáze. Používají se rozpouštědla různé polarity dle mechanismu separace, změnou vlastností mobilní fáze v systému s danou stacionární fází dojde k ovlivnění pohybu jednotlivých složek a tím i jejich rozdělení [27].

Pro separaci fenolových kyselin a flavonoidů metodou HPLC se téměř výhradně používá uspořádání s reverzní fází na alkylovaných silikagelech C18, UV/VIS detektor s diodovým polem (DAD) a binární rozpouštědlo, které je tvořeno systémem obsahujícím okyselenou vodu (rozpouštědlo A – obvykle zahrnuje vodné kyseliny nebo přísady jako fosfáty) a polární organické rozpouštědlo (rozpouštědlo B – zpravidla čisté nebo okyselené metanolem či acetonitrilem). Oddělení obvykle trvá jednu hodinu při průtokové rychlosti 1,0 – 1,5 ml.min⁻¹ [61]. Všechny flavonoidové aglykony obsahují alespoň jeden aromatický kruh a v důsledku toho efektivně absorbují UV záření. První maximum nacházející se v rozsahu 240 – 285 nm je důsledkem A-kruhu a druhé maximum, které je v rozsahu 300 – 550 nm, je důsledkem substituce a konjugace C-kruhu [58].

Li et al. [38] analyzovali metodou HPLC flavonoidy v různých orgánech pohanky tatarské a pohanky obecné. 0,1 g rozemletého vzorku bylo extrahováno s 5 ml 80% metanolu obsahujícího 10% kyseliny fosforečnou. Následovalo 5 minutové třepání při pokojové teplotě a poté byl vzorek uložen po dobu 1 hod při teplotě 37 °C, během toho byl každých 20 min vortexován 1 min. Po odstředění při 1000 x g po dobu 5 min byl vzniklý supernatant přefiltrován a použit pro analýzu. Následovalo dvounásobné zředění metanolem a vzorky byly stanoveny HPLC přístrojem s UV/VIS detektorem. Analýza byla vyhodnocena při 280 nm, použita byla kolona C18. Mobilní fáze byla připravena ze směsi 0,15% kyseliny octové a metanolu. Průtok byl nastaven při 1,0 ml.min⁻¹, vstřikovací objem byl 20 µl a kolona byla udržována při 30 °C. Kvantifikace jednotlivých flavonoidů byla vypočítána jako ekvivalent odpovídajícího standardu. Jako standardy byly použity rutin a kvercetin. Veškerý obsah byl vyjádřen v µg.mg⁻¹ sušiny. Nejvyšší obsah flavonoidů (převážně rutinu) byl stanoven v květech pohanky obecné v množství 169,66 a pohanky tatarské 177,90 µg.mg⁻¹. V kořenech pohanky obecné bylo zjištěno 1,02 a pohanky tatarské 0,86 µg.mg⁻¹ flavonoidů.

Havsteen [25] popsal analýzu propolisu použitím HPLC jako příklad identifikace flavonoidů v přírodních produktech. Vzorek z propolisu (0,5 mg) byl extrahován metanolem v ultrazvukové lázni po dobu 10 min. Extrakt byl následně filtrován a dávkován do HPLC přístroje. Jako vhodné mobilní fáze uvedli: rozpouštědlo A, voda:kyselina mravenčí (95:5) a rozpouštědlo B, metanol. Látky mohou být eluovány při průtokové rychlosti $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ s použitím lineárního gradientu začínajícího s 30 % B po dobu 15 minut, poté navýšeného na 40 % B po 20 min, 45 % B po 30 min, 60 % B po 50 min, 80 % B po 52 min a 80 % B v 60 min k ustálení sloupce. Látky mohou být detekovány při 290 a 340 nm.

3.4 Kapilární elektroforéza – CE

Jedná se o relativně novou separační techniku ve srovnání s plynovou a kapalinovou chromatografií [34]. Využívá pohybu nabitých částic v elektrickém poli, ke kterému dochází buď přímo v roztoku elektrolytu, nebo v nosném médiu, např. gelu. Podstatou metody je charakteristická rychlost pohybu jednotlivých částic v elektrickém poli, čehož se využívá při analýze či separaci směsí [22]. Kapilární elektroforéza se používá pro analýzu flavonoidů v oblasti výzkumu přírodních produktů, jako jsou rostliny, zelenina, byliny a produkty z nich získané [12]. Na základě provedení paralelní analýzy čajových katechinů a flavinů z čajové infúze metodou CE a HPLC s UV detekcí bylo zjištěno, že reprodukovatelnost hodnot byla přibližně stejná, doba analýzy CE byla 3x kratší (10 minut / 27 minut), nicméně citlivost byla 5x nižší ve srovnání s HPLC [58].

Mezi hlavní elektromigrační techniky patří kapilární zónová elektroforéza (CZE, Capillary Zone Electrophoresis) a micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC, Micellar Electrokinetic Chromatography) s typickým fosfátovým či borátovým pufrem, kapilárami o vnitřním průměru 50 – 100 μm , napětím 10 – 30 kV a objemem nástřiku v rozmezí 10 – 50 μl [12]. CZE pracuje v kontinuálním systému elektrolytů, kde se vzorek umístí do prostředí základního elektrolytu, jehož složení zaručuje konstantní podmínky (tj. homogenní elektrické a chemické pole, pH) v celé separační kapiláře. Vlivem elektrického pole vznikají zóny jednotlivých látek migrujících svou stálou rychlostí. V průběhu času se zóny postupně od sebe vzdalují. MEKC je modifikovaná elektroforetická technika založená na přidání surfaktantů do základního elektrolytu. Tyto látky tvoří nabitě micely, které migrují v kapiláře působením elektrického pole [34].

Následná detekce je obvykle provedena pomocí UV detektorů, ale také jsou používány fluorescenční, ED a MS [12].

Kreft et al. [37] provedli extrakci a následné stanovení rutinu v pohance použitím metody CE. Extrakce byla provedena za použití rozpouštědla s obsahem 60 % etanolu a 5 % amoniaku ve vodě. Extrakty byly analyzovány pomocí CE s $50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ borátovým pufrem (pH 9,3), $100 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ dodecyl sulfátu sodného, při 380 nm. V otrubách pohanky byla stanovena koncentrace rutinu v hodnotách 131 – 476 ppm, v mouce 19 – 168 ppm. Byly také stanoveny průměrné hodnoty koncentrace rutinu v ostatních částech pohanky: v listech – 300 ppm, ve stoncích 1000 ppm a květech 46 000 ppm. Výsledky naznačují, že pohanka by mohla být důležitým nutričním zdrojem flavonoidů.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem praktické části diplomové práce bylo vypracovat extrakční postup pro následné spektrofotometrické stanovení flavonoidů, rozpracovat metodu stanovení flavonoidů s použitím $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ v prostředí etanolu s přídavkem NaNO_2 a NaOH . Následně pak spektrofotometricky stanovit flavonoidy ve vybraných druzích obilovin a jejich množství vyjádřit jako obsah rutinu.

5 METODIKA

5.1 Chemikálie

- metanol – Penta
- etanol
- redestilovaná voda
- HCl – 36%, Penta
- NaNO_2 ($c = 0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$) – dodavatel Ing. Petr Lukeš
- $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($c = 0,3 \text{ mol.dm}^{-3}$) – dodavatel Ing. Petr Švec
- NaOH ($c = 1 \text{ mol.dm}^{-3}$) – dodavatel Ing. Petr Lukeš
- standard Rutin Trihydrat ROTICHROM®~CHR

5.2 Přístroje a zařízení

- elektrický mlýnek a vločkovač Waldner Biotech
- digitální váhy Schoeller AFA-2102C
- ultrazvuková lázeň PS04000A Ultrasonic compact cleaner 4L – powersonic
- odstředivka Hettich zentrifugen D-78532 Tuttlingen
- spektrofotometr Libra S6 biochrom
- mikropipety s nastavitelným objemem v hodnotách 5 – 1000 μl
- běžné laboratorní pomůcky a sklo

5.3 Charakteristika vzorků

Celkem bylo analyzováno 10 vzorků obilovin: 5 druhů pšenice a 5 druhů rýže.

Bio červená pšenice jarní

- země původu – Česká republika, polypropylenové balení o obsahu 300 g



Obr. 12 Bio červená pšenice jarní

Kamut

- země původu – Kanada, polypropylenové balení o obsahu 500 g



Obr. 13 Kamut

Grünkern

- země původu – Rakousko, polypropylenové balení o obsahu 300 g



Obr. 14 Grünkern

Pšenice ozimá

- země původu – Česká republika, polypropylenové balení o obsahu 1 kg



Obr. 15 Pšenice ozimá

Pšenice špalda

- země původu – Česká republika, polypropylenové balení o obsahu 1 kg



Obr. 16 Pšenice špalda

Lila reis (Fialová rýže)

- země původu – Laos, polypropylenové balení o obsahu 500 g



Obr. 17 Lila reis

Rýže červená

- země původu – Francie, polypropylenové balení o obsahu 500 g



Obr. 18 Rýže červená

Rýže basmati natural

- země původu – Řecko, polypropylenové balení o obsahu 500 g



Obr. 19 Rýže basmati natural

Jasmínová rýže červená

- země původu – Thajsko, polypropylenové balení o obsahu 500 g



Obr. 20 Jasmínová rýže červená

Khaw Dam - černá rýže neloupaná, dlouhozrná

- země původu – Laos, polypropylenové balení o obsahu 500 g



Obr. 21 Khaw Dam

5.4 Příprava vzorků

5.4.1 Odběr a homogenizace vzorku

Nejprve byly od každého vzorku rozemlety tři balení na elektrickém mlýnku a vločkovači značky Waldner. Poté byl kvartací odebrán vlastní analytický vzorek, který sloužil pro následné spektrofotometrické stanovení flavonoidů. Vzorky byly rozemlety do práškové

konzistence odpovídající vymletí hladké mouky. Zhomogenizované vzorky byly uloženy do tmavých PP lahví a uzavřeny. Tyto byly skladovány při laboratorní teplotě po dobu max. 14 dní a byly postupně analyzovány.

5.4.2 Příprava extraktů pro následné spektrofotometrické stanovení

Již zhomogenizované vzorky byly váženy na analytických vahách s přesností na 0,1 mg. Od každého vzorku bylo naváženo 5 g. Každý vzorek byl navažován vždy třikrát. Vzorek byl dále smíchán v Erlenmeyerově baňce buď s 15, 12 nebo 10 ml extrakčního činidla. Objem extrakční směsi byl zvolen na základě předpokládaného obsahu flavonoidů ve vzorku.

Jako extrakční činidla byla postupně použita následující rozpouštědla s příslušným způsobem extrakce:

- 1 hodinová extrakce metanolem v ultrazvukové lázni
- 24 hodinová extrakce metanolem ve třepačce při laboratorní teplotě
- 1 hodinová extrakce okyseleným metanolem v ultrazvukové lázni
- 24 hodinová extrakce ve třepačce okyseleným metanolem při laboratorní teplotě.

Okyselený metanol měl složení HCl:metanol:H₂O v poměru 2:80:18.

Po extrakci byla horní vrstva extraktu vzorku kvantitativně převedena pomocí Pasteurovy pipety do odstředivkových zkumavek. Následovalo odstředění extraktu vzorku na odstředivce při 6000 RPM/min po dobu 10 – 20 minut. Po odstředění byl vzorek přefiltrován přes modrý filtrační papír a získaný filtrát byl použit na jednotlivá spektrofotometrická stanovení.

5.5 Spektrofotometrické stanovení flavonoidů

Ke každému stanovení bylo použito 1,7 ml extraktu vzorku spolu se 17 ml 20% etanolu a 0,75 ml 0,5 mol.dm⁻³ NaNO₂. Po 5 minutách bylo přidáno 0,75 ml 0,3 mol.dm⁻³ AlCl₃.6H₂O. Po dalších pěti minutách bylo přidáno 5 ml 1 mol.dm⁻³ NaOH. Poté byla vzniklá směs kvantitativně převedena do odstředivkových zkumavek a odstředěna při 6000 RPM/min po dobu 10 minut. Vzorek byl před spektrofotometrickým stanovením dávkován do kyvet pomocí stříkačky s použitím PTFE mikrofiltru o velikosti pórů 13 µm. Bylo

provedeno měření absorbance na přístroji Libra S6 biochrom při vlnové délce 506 nm. Jako slepý vzorek (blanc) byl použit etanol.

5.6 Příprava zásobního roztoku rutinu a sestavení kalibrační křivky

Jako standard byl použit rutin. Nejprve bylo naváženo 0,1 g standardu s přesností na 0,1 mg, který byl rozpuštěn v metanolu a následně kvantitativně převeden metanolem do 10 ml odměrné baňky. Tímto způsobem byl získán zásobní standardní roztok o koncentraci 10 mg.ml^{-1} , který následně sloužil pro přípravu roztoků kalibrační řady o koncentracích: 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2 a $1,4 \text{ mg.ml}^{-1}$.

Jednotlivé body kalibrační křivky byly podrobeny stejnému pracovnímu postupu, který je uveden v předchozí kapitole. U každého bodu kalibrační křivky byla proměřena absorbance 4 x.

Při přípravě zásobního standardního roztoku rutinu v okyseleném metanolu byla zjištěna jeho nerozpustnost v tomto prostředí, proto nebylo možné dále pokračovat v přípravě roztoků kalibrační řady.

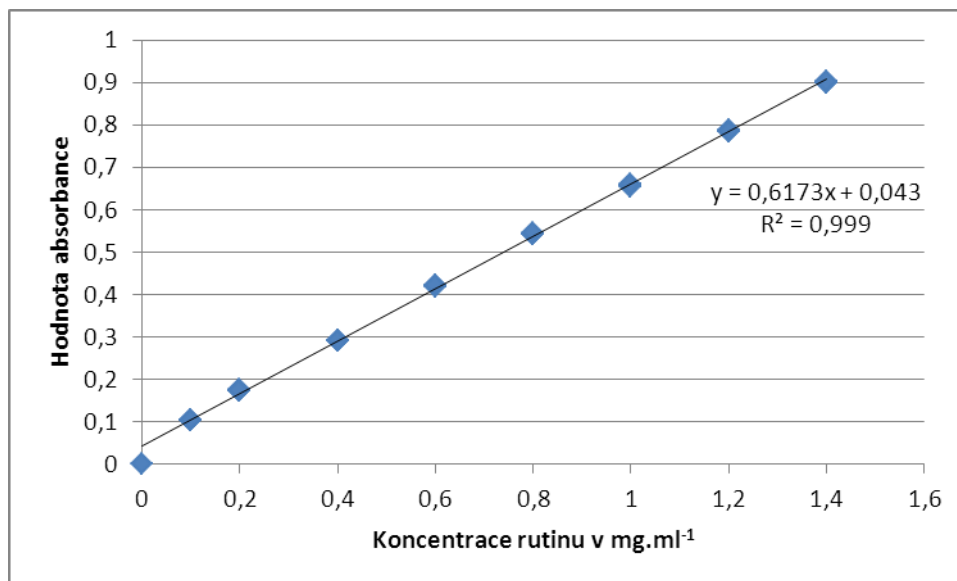
6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Výsledky měření kalibrační křivky

Následující tabulka č. 6 zobrazuje jednotlivé koncentrace roztoků kalibrační řady a jim odpovídající naměřené hodnoty absorbance. Z těchto hodnot byla sestavena níže uvedená kalibrační křivka rutinu v prostředí metanolu (Obr. 22), jejíž rovnice byla použita pro výpočet množství flavonoidů v mg.kg^{-1} ve vzorcích stanovovaných obilovin, přepočtených či vyjádřených právě jako rutin. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost absorbance rutinu na jeho koncentraci (mg.ml^{-1}).

Tab. 6 Naměřené hodnoty absorbance kalibračních roztoků

Koncentrace mg.ml^{-1}	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	Průměrná A
0,1	0,102	0,103	0,102	0,104	0,103
0,2	0,175	0,173	0,174	0,172	0,174
0,4	0,292	0,290	0,290	0,291	0,291
0,6	0,419	0,422	0,421	0,420	0,421
0,8	0,541	0,543	0,542	0,544	0,543
1,0	0,657	0,656	0,655	0,660	0,657
1,2	0,785	0,787	0,786	0,784	0,786
1,4	0,901	0,899	0,900	0,902	0,901



Obr. 22 Kalibrační křivka rutinu v prostředí metanolu

Kalibrační křivka rutinu v prostředí okyseleného metanolu nemohla být připravena z důvodu nerozpustnosti standardu v této směsi. Naměřené výsledky absorbance vzorků extrahovaných v prostředí okyseleného metanolu jsou proto vyhodnocovány dle kalibrační křivky rutinu v prostředí metanolu.

6.2 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů za využití 1 hodinové extrakce v metanolu/okyseleném metanolu pomocí ultrazvuku

Po provedení 1 hodinové extrakce vzorků obilovin v prostředí metanolu nebo okyseleného metanolu pomocí ultrazvuku, po přidání příslušných chemikálií dle postupu uvedeného v kapitole 5.5, byly následně naměřeny hodnoty absorbance u celkem 10 druhů vzorků obilovin, 5 druhů pšenice a 5 druhů rýže. Každý ze vzorků byl proměřen třikrát a výsledná hodnota byla zprůměrována. Z rovnice lineární regrese bylo vypočteno množství flavonoidů vyjádřené v mg rutinu na 1 kg čerstvě namletých vzorků (mg RE.kg^{-1}). Výsledné průměrné hodnoty absorbance a průměrného množství flavonoidů (mg RE.kg^{-1}) včetně směrodatné odchylky jsou uvedeny v následujících tabulkách. Tabulka č. 7 uvádí hodnoty zjištěné u vzorků extrahovaných v prostředí metanolu a v tabulce č. 8 jsou zjištěné hodnoty vzorků extrahovaných v okyseleném metanolu.

Tab. 7 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů v obilovinách využitím 1 hodinové extrakce v metanolu

Označení vzorku	Vzorek	Průměrná absorbance	Průměrné množství flavonoidů (mg RE.kg ⁻¹)	Směrodatná odchylka
P1	Bio červená pšenice jarní	0,132	433,74	11,89
P2	Kamut	0,175	427,38	11,67
P3	Grünkern	0,143	322,75	11,48
P4	Pšenice ozimá	0,166	397,37	11,52
P5	Pšenice špalda	0,208	535,48	10,37
R1	Lila reis	0,126	401,68	14,84
R2	Rýže červená	0,215	837,23	12,22
R3	Rýže basmati natural	0,175	639,70	12,23
R4	Jasmínová rýže červená	0,249	999,25	12,39
R5	Khaw Dam	0,587	2640,98	13,96

Průměrné množství flavonoidů stanovené ve vzorcích pšenice (P1 – P5), které byly extrahovány 1 hodinu v metanolu pomocí ultrazvuku, se pohybuje v hodnotách od 322,75 do 535,48 mg RE.kg⁻¹. Ve vzorcích rýže extrahovaných za stejných podmínek byly zjištěny flavonoidy v průměrných hodnotách od 401,68 do 2640,98 mg RE.kg⁻¹. Nejnižší průměrný obsah flavonoidů byl zjištěn u vzorku pšenice grünkern (P3) 322,75 mg RE.kg⁻¹ a naopak nejvyšší obsah byl stanoven u vzorku neloupané černé rýže Khaw Dam (R5) 2640,98 mg RE.kg⁻¹, což představuje vůbec nejvyšší stanovené průměrné množství flavonoidů ze všech použitých extrakčních metod.

Tab. 8 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů v obilovinách využitím 1 hodinové extrakce v okyseleném metanolu

Označení vzorku	Vzorek	Průměrná absorbance	Průměrné množství flavonoidů (mg RE.kg ⁻¹)	Směrodatná odchylka
P1	Bio červená pšenice jarní	0,033	n.d.	-
P2	Kamut	0,017	n.d.	-
P3	Grünkern	0,025	n.d.	-
P4	Pšenice ozimá	0,020	n.d.	-
P5	Pšenice špalda	0,016	n.d.	-
R1	Lila reis	0,039	n.d.	-
R2	Rýže červená	0,065	105,25	7,42
R3	Rýže basmati natural	0,010	n.d.	-
R4	Jasmínová rýže červená	0,117	361,18	10,11
R5	Khaw Dam	0,210	811,48	4,85

n.d. – nebylo detekováno

Při stanovení flavonoidů u vzorků obilovin extrahovaných 1 hodinu v okyseleném metanolu pomocí ultrazvuku byl kvantitativně detekován jejich výskyt pouze u 3 vzorků. U vzorku rýže červené (R2) bylo zjištěno průměrné množství flavonoidů v hodnotě 105,25 mg RE.kg⁻¹ a vzorek jasmínové rýže červené (R4) obsahoval v průměru 361,18 mg RE.kg⁻¹. Nejvyšší obsah flavonoidů byl detekován opět u vzorku neloupané černé rýže Khaw Dam (R5) v množství 811,48 mg RE.kg⁻¹. U zbývajících vzorků byla hodnota naměřené absorbance mimo rozsah kalibrační křivky rutinu, tudíž nebylo možné provést výpočet množství flavonoidů v mg RE.kg⁻¹. K vyhodnocení však byla použita kalibrační křivka, kdy byl rutin rozpuštěn v metanolu. Ve směsi okyseleného metanolu byl rutin nerozpustný. Toto mělo jistě i vliv na samotnou extrakci, kdy za daných nastavených podmínek spektrofotometrické metody, nelze tuto extrakční směs použít.

6.3 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů za využití 24 hodinové extrakce v metanolu/okyseleném metanolu

Po provedení 24 hodinové extrakce vzorků obilovin v prostředí metanolu a okyseleného metanolu při laboratorní teplotě, po přidání příslušných chemikálií dle postupu uvedeného v kapitole 5.5, byly následně naměřeny hodnoty absorbance u celkem 10 druhů vzorků obilovin, 5 druhů pšenice a 5 druhů rýže. Každý ze vzorků byl proměřen třikrát a výsledná hodnota byla zprůměrována. Z rovnice lineární regrese bylo vypočteno množství flavonoidů vyjádřené v mg rutinu na 1 kg čerstvě namletých vzorků (mg RE.kg^{-1}). Výsledné průměrné hodnoty absorbance a množství flavonoidů (mg RE.kg^{-1}) včetně směrodatné odchylky jsou uvedeny v následujících tabulkách. Tabulka č. 9 uvádí zjištěné hodnoty pro vzorky extrahované v prostředí metanolu a v tabulce č. 10 jsou hodnoty pro vzorky extrahované v okyseleném metanolu.

Tab. 9 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů v obilovinách využitím 24 hodinové extrakce v metanolu

Označení vzorku	Vzorek	Průměrná absorbance	Průměrné množství flavonoidů (mg RE.kg^{-1})	Směrodatná odchylka
P1	Bio červená pšenice jarní	0,145	396,28	10,00
P2	Kamut	0,082	151,52	11,00
P3	Grünkern	0,112	266,76	11,86
P4	Pšenice ozimá	0,107	250,02	11,52
P5	Pšenice špalda	0,139	373,12	3,88
R1	Lila reis	0,118	292,47	8,08
R2	Rýže červená	0,149	514,81	8,41
R3	Rýže basmati natural	0,052	45,34	9,22
R4	Jasmínová rýže červená	0,223	872,59	10,11
R5	Khaw Dam	0,337	1429,53	11,22

U vzorků obilovin extrahovaných v metanolu po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě bylo zjištěno průměrné množství flavonoidů v hodnotách od 45,34 do 1429,53 mg RE.kg⁻¹. Nejnižší průměrný obsah flavonoidů ve vzorcích pšenice byl stanoven u kamutu (P2) 151,52 mg RE.kg⁻¹ a ve vzorcích rýže u rýže basmati natural (R3) 45,34 mg RE.kg⁻¹. Nejvyšší průměrné množství flavonoidů ve vzorcích pšenice bylo zjištěno u bio červené pšenice jarní (P1) 396,28 mg RE.kg⁻¹. Vzorek černé rýže Khaw Dam (R5) měl nejvyšší průměrné množství flavonoidů ze vzorků rýže v hodnotě 1429,53 mg RE.kg⁻¹.

Tab. 10 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů v obilovinách využitím 24 hodinové extrakce v okyseleném metanolu

Označení vzorku	Vzorek	Průměrná absorbance	Průměrné množství flavonoidů (mg RE.kg ⁻¹)	Směrodatná odchylka
P1	Bio červená pšenice jarní	0,075	124,30	10,27
P2	Kamut	0,039	n.d.	-
P3	Grünkern	0,049	22,02	9,78
P4	Pšenice ozimá	0,044	13,60	2,74
P5	Pšenice špalda	0,040	n.d.	-
R1	Lila reis	0,080	143,82	10,28
R2	Rýže červená	0,074	152,18	14,83
R3	Rýže basmati natural	0,038	n.d.	-
R4	Jasmínová rýže červená	0,124	395,15	7,42
R5	Khaw Dam	0,213	824,52	11,01

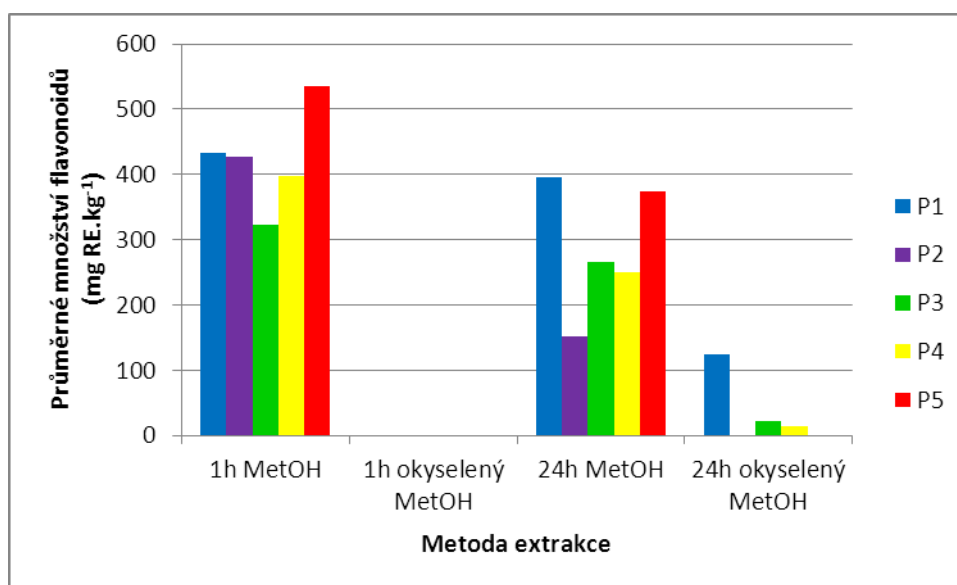
n.d. – nebylo detekováno

Při stanovení množství flavonoidů u vzorků obilovin, které byly extrahovány v metanolu po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě, byla u třech vzorků, a to kamutu (P2), pšenice špaldy (P5) a rýže basmati natural (R3), zjištěna hodnota absorbance mimo rozsah kalibrační křivky rutinu, měření bylo pod hladinou detekce v dané metodě, a tedy nebylo možné provést výpočet množství flavonoidů v mg RE.kg⁻¹. V ostatních vzorcích byl

průměrný obsah flavonoidů stanoven v hodnotách od 13,60 mg RE.kg⁻¹, v případě vzorku pšenice ozimé (P4), do 824,52 mg RE.kg⁻¹, v případě vzorku černé rýže Khaw Dam (R5).

6.4 Porovnání extrakčních metod

Z výsledků uvedených ve výše prezentovaných tabulkách byly sestrojeny grafy pro posouzení vhodnosti jednotlivých typů extrakce pro stanovení flavonoidů ve vzorcích obilovin. V následujícím grafu (Obr. 23) je uvedena závislost stanoveného průměrného množství flavonoidů (mg RE.kg⁻¹) jednotlivých vzorků pšenice (P1 – P5) na zvolené extrakční metodě.

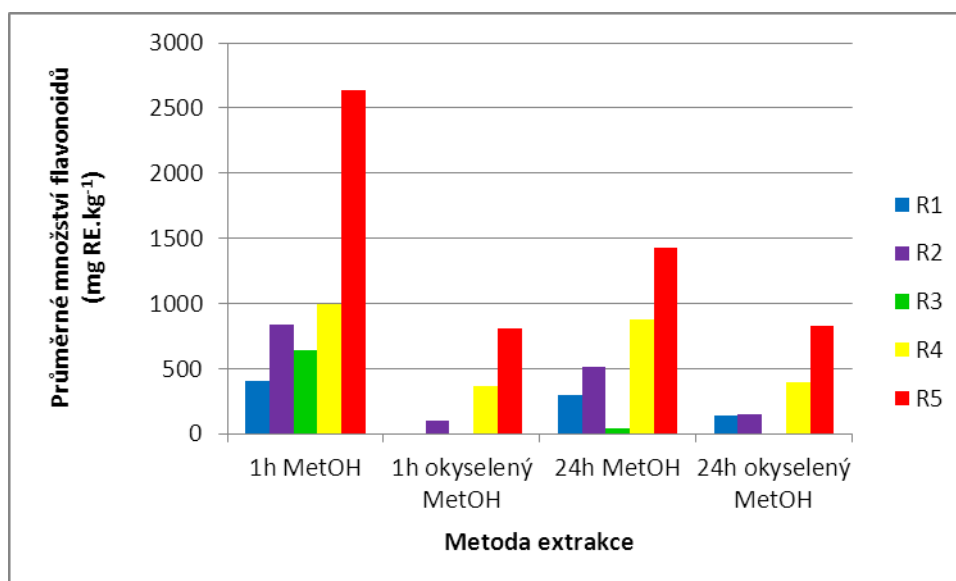


Obr. 23 Množství flavonoidů ve vzorcích pšenice dle metod extrakce

Z grafického znázornění je patrné, že nejvhodnější extrakční metodou pro následné spektrofotometrické stanovení obsahu flavonoidů ve vzorcích pšenice byla 1 hodinová extrakce metanolem pomocí ultrazvuku. Při této metodě bylo vyextrahováno a následně stanoveno nejvyšší množství flavonoidů ve všech vzorcích pšenice (P1 – P5). Naopak naprosto nevhodnou extrakční metodou pro spektrofotometrické stanovení obsahu flavonoidů ve vzorcích pšenice je dle výsledků 1 hodinová extrakce okyseleným metanolem pomocí ultrazvuku, při které nedošlo k vyextrahování flavonoidů u žádného ze vzorků.

Z výsledků zjištěných u jednotlivých detekovaných druhů rýže (R1 – R5), které jsou uvedeny v tabulkách výše, byl sestaven graf (Obr. 24), ve kterém je znázorněna závislost

stanoveného průměrného množství flavonoidů (mg RE.kg^{-1}) jednotlivých vzorků rýže (R1 – R5) na zvolené extrakční metodě.



Obr. 24 Množství flavonoidů ve vzorcích rýže dle metod extrakce

Z grafu je zjevné, že nejvhodnější extrakční metodou pro následné spektrofotometrické stanovení obsahu flavonoidů ve vzorcích rýže byla také 1 hodinová extrakce metanolem pomocí ultrazvuku. Touto metodou bylo vyextrahováno a poté stanoveno nejvyšší množství flavonoidů ve všech vzorcích rýže (R1 – R5). Na rozdíl od extrakce vzorků pšenice nebyla zjištěna metoda, při které by nedošlo k vyextrahování žádných flavonoidů. Jako nejméně vhodnou metodou extrakce vzorků rýže se jeví 1 hodinová extrakce metanolem, při které nedošlo k vyextrahování flavonoidů u vzorků rýže lila reis (R2) a basmati natural (R3). U ostatních vzorků rýže extrahovaných touto metodou byl zjištěn nejmenší průměrný obsah flavonoidů ve srovnání s výsledky vzorků extrahovaných jinými extrakčními metodami.

Při srovnání výsledků obsahu flavonoidů ve vzorcích pšenice extrahovaných v prostředí metanolu po dobu jedné hodiny, které se pohybovaly v rozmezí od $322,75 \text{ mg RE.kg}^{-1}$ (P3) do $535,48 \text{ mg RE.kg}^{-1}$ (P5) s výsledky studie spektrofotometrického stanovení flavonoidů v pšenici seté a tvrdé [68], které byly zjištěny v hodnotách $213,04 \text{ mg CE.kg}^{-1}$ u pšenice seté a $259,31 \text{ mg CE.kg}^{-1}$ u pšenice tvrdé, je patrný značný rozdíl, který může být způsoben odlišnou metodou extrakce, použitím jiného standardu i rozdíly (především ve zbarvení) analyzovaných vzorků. Celkový obsah flavonoidů stanovený spektrofotometricky v bílé, červené a černé rýži s použitím kolorimetrické metody [55], který se pohyboval v rozmezí

od 88,6 do 286,3 mg RE.100g⁻¹, je srovnatelný s obsahem flavonoidů ve vzorcích rýže extrahovaných v metanolu po dobu 1 hodiny, který byl stanoven v hodnotách od 401,68 (R1) do 2640,98 mg RE.kg⁻¹ (R5). Je to dáno podobným dávkováním reagensů v průběhu přípravy extraktů pro následné spektrofotometrické stanovení. Určité patrné rozdíly mohou být způsobeny mírným okyselením metanolu a delší dobou extrakce.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zjistit vhodný extrakční postup pro následné spektrofotometrické stanovení flavonoidů v obilovinách. Byly zkoušeny celkem 4 metody extrakce, a to 1 hodinová extrakce metanolem v ultrazvukové lázni, 1 hodinová extrakce okyseleným metanolem v ultrazvukové lázni, 24 hodinová extrakce metanolem ve třepačce při laboratorní teplotě a 24 hodinová extrakce ve třepačce okyseleným metanolem při laboratorní teplotě. Na základě porovnání výsledných obsahů flavonoidů v analyzovaných vzorcích, které byly extrahovány použitím jednotlivých extrakčních metod, bylo zjištěno, že nejvyšší množství flavonoidů bylo naměřeno u vzorků extrahovaných 1 hodinovou extrakcí metanolem v ultrazvukové lázni. Tudíž byla tato metoda označena za nejvhodnější.

Ke spektrofotometrickému stanovení obsahu flavonoidů bylo zvoleno celkem 10 vzorků obilovin: 5 druhů pšenice (bio červená pšenice jarní, kamut, grünkern, pšenice ozimá a pšenice špalda) a 5 druhů rýže (lila reis, rýže červená, rýže basmati natural, jasmínová rýže červená a Khaw Dam). Extrakty vzorků byly připraveny k následujícímu stanovení přidáním etanolu, NaNO_2 , $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a NaOH v přesně definované časové posloupnosti. Měření absorbance bylo provedeno na přístroji Libra S6 biochrom při vlnové délce 506 nm s použitím etanolu jako slepého vzorku. Pro vytvoření kalibrační křivky byl jako standard zvolen rutin. Při následných výpočtech množství flavonoidů ve vzorcích obilovin se vycházelo z rovnice regresní přímky rutinu v prostředí metanolu a výsledky byly uváděny v $\text{mg RE} \cdot \text{kg}^{-1}$. Kalibrační křivka rutinu v prostředí okyseleného metanolu nebyla sestavena z důvodu jeho nerozpustnosti v této směsi, výsledky absorbance vzorků extrahovaných v tomto prostředí byly hodnoceny dle kalibrační křivky rutinu v prostředí metanolu. U většiny vzorků extrahovaných touto směsí nebyly detekovány žádné flavonoidy, což poukazuje na nevhodnost použití této extrakční směsi za daných podmínek spektrofotometrické metody.

Průměrné množství flavonoidů stanovené ve vzorcích pšenice extrahovaných 1 hodinu v metanolu pomocí ultrazvuku bylo zjištěno v hodnotách od 322,75 do 535,48 $\text{mg RE} \cdot \text{kg}^{-1}$ a ve vzorcích rýže v hodnotách od 401,68 do 2640,98 $\text{mg RE} \cdot \text{kg}^{-1}$. Nejnižší průměrný obsah flavonoidů byl stanoven u vzorku pšenice grünkern a naopak nejvyšší průměrný obsah byl zaznamenán u vzorku neloupané černé rýže Khaw Dam. Celkové pořadí vzorků extrahovaných touto metodou podle průměrného obsahu flavonoidů je: grünkern, pšenice

ozimá, lila reis, kamut, bio červená pšenice jarní, pšenice špalda, rýže basmati natural, rýže červená, jasmínová rýže červená a Khaw Dam.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ABDEL-AAL, E.-S.M., HUCL, P. Composition and Stability of Anthocyanins in Blue-Grained Wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, vol. 51, pp. 2174 – 2180.
- [2] AFIFY, A.M., EL-BELTAGI, H.S., EL-SALAM, S.M., OMRAN, A.A. Biochemical changes in phenols, flavonoids, tannins, vitamin E, β -carotene and antioxidant activity during soaking of three white sorghum varieties. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2012, vol. 2, pp. 203 – 209.
- [3] American Cancer Society [online]. 2013. [cit. 2013-02-01]. *Phytochemicals*. Dostupné z WWW:
<<http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/complementaryandalternativemedicine/herbsvitaminsandminerals/phytochemicals>>.
- [4] ANTOINE, J.M.R., HOO FUNG, L.A., GRANT, Ch.N., DENNIS, H.T., LALOR, G.C. Dietary intake of minerals and trace elements in rice on the Jamaican market. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2012, vol. 26, pp. 111 – 121.
- [5] BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K., SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 2006, vol. 99, pp. 191 – 203.
- [6] BARTUŠEK, M., PAZOUREK, J. Chemistry Department at FS MU BRNO [online]. 2003. [cit. 2013-02-19]. *Základy metod analytické chemie*. Dostupné z WWW: <http://chemi.muni.cz/~analytika/bartusek_skripta.pdf>.
- [7] BENDA, V., BABŮREK, I., ŽĎÁRSKÝ, J. *Biologie II, Nauka o potravinářských surovinách*, Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2000. 195 s.
- [8] Biochemický ústav LF MU [online]. 2002. [cit. 2013-02-07]. *Přírodní polyfenolové antioxidanty*. Dostupné z WWW:
<<http://www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf>>.
- [9] BRAVO, Laura. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 1998, vol. 56, pp. 317 – 333.

- [10] CELEP, G.S., RASTMANESH, R. Polyphenol Consumption and Metabolic Diseases. *Journal of Nutritional Disorders & Therapy* [online]. 2013. vol. 3. [cit. 2012-02-07]. Dostupné z WWW: <<http://www.omicsonline.org/2161-0509/2161-0509-3-e106.pdf>>.
- [11] ČEPIČKA, J., KARABÍN, M. Polyfenolové látky piva - přirozené antioxidanty. *Chemické listy*, 2002, č. 96, s. 90 – 95.
- [12] DE RIJKE, E., OUT, P., NIESSEN, M.A.W., ARIESE, F., GOOIJER, C., BRINKMAN, A.T.U. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 2006, vol. 1112, pp. 31 – 63.
- [13] DIMBERG, L.H., THEANDER, O., LINGNERT, H. Avenanthramides—A group of phenolic antioxidants in oats. *Cereal Chemistry*, 1993, vol. 70, pp. 637 – 641.
- [14] DYKES, L., ROONEY, L. W. Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. *Cereal Foods World*, 2007, vol. 52, pp. 105 – 111.
- [15] FAOSTAT [online] [cit. 2012-11-29]. *Food and Agricultural commodities production*. Dostupné z WWW: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>.
- [16] FARKAS, O., JAKUS, J., HÉBERGER, K. Quantitative Structure – Antioxidant Activity Relationships of Flavonoid Compounds. *Molecules*, 2004, vol. 9, pp. 1079 – 1088.
- [17] FINOCCHIARO, F., FERRARI, B., GIANINETTI, A. A study of biodiversity of flavonoid content in the rice caryopsis evidencing simultaneous accumulation of anthocyanins and proanthocyanidins in a black-grained genotype. *Journal of Cereal Science*, 2010, vol. 51, pp. 28 – 34.
- [18] Food Outlook [online]. 2009. [cit. 2012-11-29]. *Wheat*. Dostupné z WWW: <<http://www.fao.org/docrep/011/ai482e/ai482e03.htm>>.
- [19] Food Outlook [online]. 2009. [cit. 2012-11-30]. *Rice*. Dostupné z WWW: <<http://www.fao.org/docrep/011/ai482e/ai482e05.htm#34>>.
- [20] GARCIA-SALAS, P., MORALES-SOTO, A., SEGURA-CARRETERO, A., FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. Phenolic-Compound Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, 2010, vol. 15, pp. 8813 – 8826.

- [21] Gardening For Wildlife [online]. 2006. [cit. 2012-11-30]. *Native Grasses of the Southeast*. Dostupné z WWW: <<http://www.gardening-for-wildlife.com/grasses-southeast.html>>.
- [22] GAŠ, Bohuslav. Kapilární elektroforéza: Separační analytická metoda pro věk mikročipů. *Vesmír*, 2001, roč. 80, č. 7, s. 370 – 373.
- [23] GONZÁLEZ-GALLEGO, J., SÁNCHEZ-CAMPOS, S., TUÑÓN M.J. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutrición Hospitalaria*, 2007, vol. 22, pp. 287 – 293.
- [24] GURSKÁ, Eliška. *Stanovení vlákniny v červené pšenici*. Zlín, 2012. bakalářská práce (Bc.). Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická.
- [25] HAVSTEEN, Bent H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 2002, vol. 96, pp. 67 – 202.
- [26] HEIM, K.E., TAGLIAFERRO, A.R., BOBILYA D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002, vol. 13, pp. 572 – 584.
- [27] HOHNOVÁ, Barbora. *Studium přírodních látek obsažených ve vybraných bylinách a méně obvyklých druzích drobného ovoce* [online]. 2010. 70 s. Disertační práce. Brno: Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. [cit. 2013-02-18]. Dostupné z WWW: <http://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=24796>.
- [28] HOLLMAN, Peter C.H. Absorption, Bioavailability and Metabolism of Flavonoids. *Pharmaceutical Biology*, 2004, vol. 42, pp. 74 – 83.
- [29] HRABĚ, J., ROP, O., HOZA, I. *Technologie výroby potravin rostlinného původu*, Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2005. 178 s. ISBN 80-7318-372-2.
- [30] HUNG, P.V., MAEDA, T., MIYATAKE, K., MORITA, N. Total phenolic compounds and antioxidant capacity of wheat graded flours by polishing method. *Food Research International*, 2009, vol. 42, pp. 185 – 190.
- [31] Information Network on Post-harvest Operations [online] [cit. 2012-11-29]. *Cereals & grains*. Dostupné z WWW:

- <<http://www.fao.org/inpho/inpho-post-harvest-compendium/cereals-grains/en/>>.
- [32] KADLEC, P. a kol. *Technologie potravin I.*, 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. 300 s. ISBN 80-7080-509-9.
- [33] KENT, N.L., EVERS, A.D. *Technology of Cereals (4th Edition)*, Woodhead Publishing [online]. 1994. 352 s. ISBN 978-1-59124-108-9. [cit. 2012-11-28]. Dostupné z WWW:
<http://knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=304&VerticalID=0>.
- [34] KLEJDUS, Bořivoj. *Separace a identifikace isoflavonů v rostlinném materiálu* [online]. 2004. 51 s. Habilitační práce. Univerzita Palackého v Olomouci. [cit. 2013-02-18]. Dostupné z WWW:
<http://www.prf.upol.cz/fileadmin/user_upload/PrF-dokumenty/Vedecka_rada/Habilitace_a_profesury/ukon_hab_prof/Klejdu_Borivoj_hab/hab.prace-Klejdu.pdf>.
- [35] KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V. Rostlinné fenoly v allelopatii. *Chemické listy*, 1999, vol. 93, s. 243 – 248.
- [36] KOPÁČOVÁ, Olga. *Trendy ve zpracování cereálií s přihlédnutím zejména k celozrnným výrobkům*, 1. vyd. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2007. ISBN 978-80-7271-184-0.
- [37] KREFT, S., KNAPP, M., KREFT, I. Extraction of Rutin from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Seeds and Determination by Capillary Electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, vol. 47, pp. 4649 – 4652.
- [38] LI, X., PARK, N.I., KIM, Y.B., KIM, H.H., PARK, C.H., WU, Q., PARK, S.U. Accumulation of flavonoids and expression of flavonoid biosynthetic genes in tartary and rice-tartary buckwheat. *Process Biochemistry*, 2012, vol. 47, pp. 2306 – 2310.
- [39] Linus Pauling Institute [online]. 2008. [cit. 2013-02-07]. *Flavonoids*. Dostupné z WWW: <<http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/flavonoids/>>.

- [40] MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., RÉMÉSY, C., JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2004, vol. 79, pp. 727 – 747.
- [41] MATTILA, P., PIHLAVA, J.M., HELLSTRÖM, J. Contents of phenolic acids, alkyl- and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, vol. 53, pp. 8290 – 8295.
- [42] MORRIS, P. C., BRYCE, J. H. *Cereal Biotechnology*, Woodhead Publishing [online]. 2002. 252 s. ISBN 978-1-59124-026-6. [cit. 2012-11-28]. Dostupné z WWW: <<http://www.knovel.com/knovel2/Toc.jsp?SpaceID=10104&BookID=156>>.
- [43] Nordic Recipe Archive [online]. 2004. [cit. 2012-11-30]. *Cereals and grains*. Dostupné z WWW: <http://www.saunalahti.fi/~marian1/gourmet/i_cereal.htm>.
- [44] OKARTER, N., LIU, C.C., SORRELLS, M.E., LIU, R.H. Phytochemical content and antioxidant activity of six diverse varieties of whole wheat. *Food Chemistry*, 2010, vol. 119, pp. 249 – 257.
- [45] OPEKAR, F., JELÍNEK, I., RYCHLOVSKÝ, P., PLZÁK, Z. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*, 1. vyd. Praha: Karolinum, 2002. 201 s. ISBN 80-2460-553-8.
- [46] PALÍK, S. a kol. *Metodika pěstování ozimé pekárenské pšenice*, Kroměříž: Agrotest fyto [online]. 2009. 68 s. ISBN 978-80-86888-07-1. [cit. 2012-11-29]. Dostupné z WWW: <<http://www.vukrom.cz/vyzkum/ukoncene-2009/qg50041/metodika>>.
- [47] Polní plodiny [online]. 2006. [cit. 2012-11-28]. *Pšenice obecná*. Dostupné z WWW: <<http://vfu-www.vfu.cz/vegetabilie/plodiny/czech/psenice.htm>>.
- [48] Polní plodiny [online]. 2006. [cit. 2012-11-28]. *Rýže*. Dostupné z WWW: <<http://vfu-www.vfu.cz/vegetabilie/plodiny/czech/ryze.htm>>.
- [49] PĚNČÍKOVÁ, Hana. *Analytická chemie a chemická laboratorní cvičení (učební text pro 4. ročník)*, 1. vyd. Brno: Střední průmyslová škola chemická, 2006.
- [50] PŘÍHODA, J., SKŘIVAN, P., HRUŠKOVÁ, M. *Cereální chemie a technologie I: Cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin*, 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2004. 202 s. ISBN 80-7080-530-7.

- [51] RODRÍGUEZ, L.H., MORALES, D.A., RODRÍGUEZ, E.R., ROMERO, C.D. Minerals and trace elements in a collection of wheat landraces from the Canary Islands. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2011, vol. 24, pp. 1081 – 1090.
- [52] ROSA, L.A., ALVAREZ-PARRILLA, E., GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A. *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value, and Stability*. Wiley-Blackwell: Ames [online]. 2010. 380 p. [cit. 2012-02-07]. Dostupné z WWW:
<<http://www.scribd.com/doc/27610163/Fruit-and-Vegetable-Phytochemicals-Chemistry-Nutritional-Value-And-Stability>>.
- [53] SANDHAR, K.H., KUMAR, B., PRASHER, S., PRASHANT, T., SALHAN, M., SHARMA, P. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 2011, vol. 1, pp. 25 – 41.
- [54] SCALBERT, A., JOHNSON, I. T., Saltmarsh, M. Polyphenols: Antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2005, vol. 81, pp. 215 – 217.
- [55] SHEN, Y., JIN, L., XIAO, P., LU, Y., BAO, J. Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight. *Journal of Cereal Science*, 2009, vol. 49, pp. 106 – 111.
- [56] SINICA, Alla. Ústav analytické chemie VŠCHT Praha [online]. 2006. [cit. 2013-02-19]. *Spektrofotometrie ve viditelné oblasti spektra*. Dostupné z WWW:
<http://www.vscht.cz/anl/lach1/5_Foto.pdf>.
- [57] SOMMER, L. a kol. *Základy analytické chemie II.*, 1. vyd. Brno: Vutium, 2000. 347 s. ISBN 80-2141-742-0.
- [58] STALIKAS, Constantine D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 2007, vol. 30, pp. 3268 – 3295.
- [59] TAPAS, A.R., SAKARKAR, D.M., KAKDE, R.B. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2008, vol. 7, pp. 1089 – 1099.
- [60] TSAO, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2010, vol. 2, pp. 1231 – 1246.

- [61] TSAO, R., DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B*, 2004, vol. 812, pp. 85 – 99.
- [62] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*, 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999.
- [63] VERMA, B., HUCL, P., CHIBBAR, R. N. Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions. *Food Chemistry*, 2009, vol. 116, pp. 947 – 954.
- [64] Víš co jíš [online]. 2013. [cit. 2013-01-31]. *Obiloviny v jídelníčku*. Dostupné z WWW:
<<http://www.viscojis.cz/index.php/zakladni-ziviny/533-obiloviny-v-jidelniku>>.
- [65] WANG, K.M., WU, J.G., LI, G., ZHANG, D.P., YANG, Z.W., SHI, C.H. Distribution of phytic acid and mineral elements in three indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Journal of Cereal Science*, 2011, vol. 54, pp. 116 – 121.
- [66] WOJDYŁO, A., OSZMIAŃSKI, J., CZEMERYŚ, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 2007, vol. 105, pp. 940 – 949.
- [67] World Food Situation [online]. 2013. [cit. 2013-04-29]. *FAO Cereal Supply and Demand Brief*. Dostupné z WWW:
<<http://www.fao.org/worldfoodsituation/wfs-home/csdb/en/>>.
- [68] ŽILÍČ, S., SERPEN, A., AKILLIO, G., JANKOVIĆ, M., GÖKMEN, V. Distributions of phenolic compounds, yellow pigments and oxidative enzymes in wheat grains and their relation to antioxidant capacity of bran and debranned flour. *Journal of Cereal Science*, 2012, vol. 56, pp. 652 – 658.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AMK	Aminokyselina
CE	Kapilární elektroforéza
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
ČR	Česká republika
DAD	Spektrofotometrický detektor s diodovým polem
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství
FAOSTAT	Statistická databáze Organizace pro výživu a zemědělství
GC	Plynová chromatografie
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
HTZ	Hmotnost tisíce zrn
IR	Infračervené záření
LDL	Lipoproteiny o nízké hustotě
MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie
MK	Mastná kyselina
MS	Hmotnostní spektrometrie
PP	Polypropylen
PTFE	Polytetrafluorethylen
RE	Ekvivalentní množství rutinu
SD	Směrodatná odchylka
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě
TMS	Trimetylsilyleter
USA	Spojené státy americké

UV Ultrafialová oblast

VIS Viditelná oblast

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Podélný řez pšeničným zrnem	14
Obr. 2 Produkce, využití a konečné zásoby obilovin.....	24
Obr. 3 Průměrná produkce obilovin pěti nejvýznamnějších producentů v letech 2002 – 2010	24
Obr. 4 Pšeničný porost, detail klasu a semena.....	26
Obr. 5 Průměrná produkce pěti nejvýznamnějších producentů pšenice v letech 2002 – 2010	27
Obr. 6 Krátkozrnná a dlouhozrnná rýže.....	28
Obr. 7 Rýže divoká a její zrna	29
Obr. 8 Průměrná produkce pěti nejvýznamnějších producentů rýže v letech 2002 – 2010	30
Obr. 9 Základní struktura flavonoidů.....	35
Obr. 10 Obecná struktura hlavních zástupců flavonoidů.....	37
Obr. 11 Interakce záření se vzorkem	40
Obr. 12 Bio červená pšenice jarní.....	50
Obr. 13 Kamut	50
Obr. 14 Grünkern.....	51
Obr. 15 Pšenice ozimá	51
Obr. 16 Pšenice špalda.....	52
Obr. 17 Lila reis	52
Obr. 18 Rýže červená.....	53
Obr. 19 Rýže basmati natural.....	53
Obr. 20 Jasmínová rýže červená	54
Obr. 21 Khaw Dam.....	54
Obr. 22 Kalibrační křivka rutinu v prostředí metanolu.....	58
Obr. 23 Množství flavonoidů ve vzorcích pšenice dle metod extrakce.....	63
Obr. 24 Množství flavonoidů ve vzorcích rýže dle metod extrakce	64

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Rozdíly velikosti a hmotnosti tisíce zrn (HTZ) jednotlivých obilovin.....	13
Tab. 2 Esenciální aminokyseliny v pšenici a rýži	18
Tab. 3 Profil mastných kyselin ve vybraných cereálních produktech.....	19
Tab. 4 Obsah vitaminů v pšeničné mouce a rýži	20
Tab. 5 Obsah minerálních látek v pšeničné mouce a rýži.....	21
Tab. 6 Naměřené hodnoty absorbance kalibračních roztoků	57
Tab. 7 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů v obilovinách využitím 1 hodinové extrakce v metanolu.....	59
Tab. 8 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů v obilovinách využitím 1 hodinové extrakce v okyseleném metanolu.....	60
Tab. 9 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů v obilovinách využitím 24 hodinové extrakce v metanolu.....	61
Tab. 10 Výsledky stanovení obsahu flavonoidů v obilovinách využitím 24 hodinové extrakce v okyseleném metanolu.....	62