

Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH u netradičních obilovin

Bc. Veronika Jančová

Diplomová práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Jančová**
Osobní číslo: **T11110**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH u netradičních obilovin**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Stručné pojednání o chemickém složení obilovin.
2. Charakterizace metod pro stanovení antioxidační aktivity v potravinách s důrazem na metodu s použitím DPPH.

II. Praktická část

1. Optimalizace extrakčních postupů při metodě DPPH s použitím metanolu jako hlavního extrakčního rozpouštědla.
2. Nastavení metodiky stanovení antioxidační aktivity s využitím DPPH v oblasti netradičních druhů cereálií.
3. Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH u netradičních vzorků obilovin.
4. Formulace diskuze a závěru.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] HRABĚ, J., HOZA, I., ROP, O. Technologie výroby potravin rostlinného původu, vyd. 1, Zlín, 2005, ISBN 8073183722

[2] PRAKASH, A. Antioxidant activity, Medallion Laboratories, Analytical Progress, 2001

[3] BLOIS, M.S. Antioxidant determinants by the use of a stable free radical Nature 181, 1199 (1958)

[4] ALGERR, M.S.M., Polymer science dictionary, Springer, 1997, ISBN 0412608707

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Daniela Sumczynski, Ph.D.

Ústav analýzy a chemie potravin

Datum zadání diplomové práce:

16. ledna 2013

Termín odevzdání diplomové práce:

2. května 2013

Ve Zlíně dne 4. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ..JANČOVÁ VERONIKA.....

Obor: THVP.....

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 22. 4. 2013

.....Jančová.....

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 vzdělávacímu 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 přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Diplomová práce obsahuje charakteristiku obilovin, antioxidační aktivity a antioxidantů, definování jednotlivých metod sloužících ke stanovení antioxidační aktivity se zaměřením na metodu DPPH. Dále je zde popsáno využití metody DPPH v oblasti cereálií. Praktická část je zaměřena na stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH ve vzorcích netradičních cereálií s využitím extrakce pomocí metanolu jako hlavní extrakční složky.

Klíčová slova: cereálie, antioxidační aktivita, DPPH

ABSTRACT

The thesis contains the characteristics of cereal, antioxidant activity and antioxidants definition of the method used to determine the antioxidant activities focused on DPPH method. The use of DPPH methods in cereals is also described. The practical part is focused on the determination of antioxidant activity by DPPH in samples of non-traditional cereals with using the metanol-based extraction procedure.

Keywords: cereals, antioxidant activity, DPPH

Chtěla bych poděkovat paní Ing. Daniele Sumczynski, Ph.D., za odborné vedení, trpělivost, rady a čas, který mi poskytla při zpracovávání diplomové práce. Další poděkování bych věnovala své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 OBILOVINY	13
1.1 TECHNOLOGICKY VÝZNAMNÉ SLOŽKY ZRNA.....	14
1.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ OBILNÉHO ZRNA	15
1.2.1 Sacharidy.....	15
1.2.2 Vláknina obilovin.....	17
1.2.3 Proteiny	18
1.2.4 Lipidy	19
1.2.5 Vitamíny a minerální látky.....	20
1.2.6 Další složky obilovin.....	21
1.3 OBILOVINY A JEJICH VLIV NA LIDSKÉ ZDRAVÍ	22
2 ANTIOXIDANTY A JEJICH ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA	24
2.1 ANTIOXIDANTY	24
2.1.1 Stručná charakteristika některých antioxidantů	26
2.1.1.1 Tokoferoly a tokotrienoly (vitamin E).....	26
2.1.1.2 Kyselina askorbová (vitamin C)	26
2.1.1.3 Karotenoidy	26
2.1.1.4 Fenolové kyseliny	27
2.1.1.5 Flavonoidy	27
2.1.1.6 Estery kyseliny gallové.....	27
2.1.1.7 Antokyany.....	27
2.2 VOLNÉ RADIKÁLY	27
3 CHARAKTERISTIKA METOD PRO STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY V POTRAVINÁCH S DŮRAZEM NA METODU DPPH	29
3.1 METODA DPPH.....	29
3.1.1 Trolox	30
3.1.2 DPPH.....	30
3.1.3 Metanol	31
3.2 ORAC (OXYGEN RADICAL ABSORBANCE CAPACITY)	32
3.3 DMPD	32
3.4 FRAP (FERRIC REDUCTION ABILITY OF PLASMA)	33
3.5 ABTS.....	33
4 VYUŽITÍ METODY DPPH V OBLASTI CEREÁLÍ	34

4.1	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY MLETÝCH FRAKČÍ, VYBRANÝCH DRUHŮ OBILOVIN.....	34
4.2	ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA PŠENICE OZIMÉ (<i>TRITICUM AESTIVUM</i>)	35
4.3	OBSAH FYTOCHEMIKÁLIÍ A ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA BAREVNÝCH A NEBAREVNÝCH DRUHŮ RÝŽE.....	36
4.4	ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA SEMEN AMARANTU, QUIONI A JEJICH KLÍČKŮ BĚHEM JEJICH RŮSTU	37
4.5	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY POHANKY	38
4.6	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY SUROVÉHO EXTRAKTU ČIROKU.....	39
II	PRAKTICKÁ ČÁST	40
5	CÍL EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI PRÁCE.....	41
6	METODIKA	42
6.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	42
6.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A LABORATORNÍ VYBAVENÍ	42
6.3	CHARAKTERISTIKA ANALYZOVANÝCH VZORKŮ	43
6.3.1	Pšenice ozimá.....	43
6.3.2	Pšenice špalda	43
6.3.3	Kamut.....	44
6.3.4	Pšenice červená bio	44
6.3.5	Dlouhozrná rýže Lagris.....	45
6.3.6	Rýže červená biolinie	45
6.3.7	Rýže červená natural	46
6.3.8	Bio mléčná rýže kulatozrná loupaná	46
6.3.9	Grünkern	46
6.3.10	KhawDam	47
6.3.11	Jasmínová rýže hnědá	47
6.3.12	Jasmínová rýže červená.....	48
6.3.13	Basmati natural.....	48
6.3.14	Lila Reis	49
6.3.15	Rýže černá natural	49
6.3.16	Příprava vzorků pro následnou extrakci.....	50
6.4	OPTIMALIZACE EXTRAKČNÍCH POSTUPŮ PŘI METODĚ DPPH S POUŽITÍM METANOLU JAKO HLAVNÍHO EXTRAKČNÍHO ČINIDLA	50
6.4.1	Extrakční činidla	51
6.4.2	Testované způsoby extrakce	51
6.4.2.1	Extrakce v ultrazvuku	51
6.4.2.2	24 h extrakce na třepačce.....	52
6.5	NASTAVENÍ METODIKY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY S VYUŽITÍM DPPH V OBLASTI NETRADIČNÍCH DRUHŮ CEREÁLÍ	53
6.5.1	Příprava zásobního a pracovního roztoku DPPH.....	53
6.5.2	Příprava reakční směsi	53
6.6	PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍ KŘIVKY	54
7	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	55

7.1	VÝSLEDKY EXTRAKCÍ	55
7.2	VÝSLEDKY MĚŘENÍ KALIBRAČNÍ PŘÍMKY	56
7.3	VÝSLEDKY SPEKTROFOTOMETRICKÉHO MĚŘENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU DPPH	58
7.4	POROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ A HODNOTY ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY UVEDENÉ V ODBORNÝCH ČLÁNCÍCH.....	68
ZÁVĚR		70
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....		71
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....		81
SEZNAM OBRÁZKŮ		82
SEZNAM TABULEK.....		84
SEZNAM GRAFŮ		85

ÚVOD

Obiloviny mají mezi zemědělskými plodinami a také potravinovými výrobky zásadní postavení. Ze zdravotního hlediska jsou významné především celozrnné výrobky, které působí příznivě na celou řadu závažných onemocnění. Jedná se především o cévní onemocnění, onemocnění srdce, diabetes a rakovinu. Pro lidskou výživu se z obilovin využívá výhradně zrna, které je bohaté na nutriční složky nezbytně důležité pro lidský organizmus. Zdrojem energie jsou sacharidy, bílkoviny a v menší míře tuky, nacházející se převážně v klíčku. Obiloviny jsou také cenným zdrojem vitaminů, zejména skupiny B a E a minerálních látek (hořčík, fosfor, vápník aj.) Významnou část také tvoří látky s antioxidačním působením, mezi ně můžeme zařadit fytoestrogeny, flavonoidy, izoflavonoidy a antokyanová barviva. Antioxidanty působí již v malých koncentracích. Jsou to látky, které omezují aktivitu volných radikálů, snižují jejich pravděpodobnost výskytu, nebo je převádějí do méně reaktivního stavu.

Teoretická část diplomové práce je zaměřena na charakteristiku cereálií, definování antioxidační aktivity a snižující charakteristika pojmů antioxidanty a radikály. Dále jsou zde popsány metody stanovení antioxidační aktivity se zaměřením na metodu DPPH.

Praktická část je zaměřena na stanovení antioxidační aktivity ve vybraných vzorcích netradičních cereálií, zejména v barevných a nebarevných druzích rýže a netradičních druzích pšenice. Je zde popsána metodika, přístroje, pomůcky, analyzované vzorky, výsledky měření a jejich srovnání s hodnotami v odborných člancích.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 OBILOVINY

Obiloviny provázejí lidskou společnost od nepaměti. Náznaky pěstování obilovin na základě historických poznatků se datují k 12 – 10 tisíciletí před naším letopočtem. Cereálie si v průběhu tisíciletí udržely výlučné postavení základní potravin. K přednostem obilovin patří obsah sušiny, která se pohybuje kolem 85 % a právě díky ní, jsou obilné suroviny údržné a dobře skladovatelné [1, 2].

Botanicky je řadíme mezi traviny (*Gramineae*). Téměř všechny známé obiloviny patří do čeledi lipnicovité (*Poaceae*). Výjimku tvoří pohanka, patřící do čeledi rdesnovité (*Polygonaceae*), amarant z čeledi laskavcovitých (*Amaranthaceae*) či quinoa (merlík chilský) z čeledi merlíkovitých (*Chenopodiaceae*). Cereálie jsou zdrojem cenných substancí, které vykazují celou řadu příznivých zdravotních účinků [3, 4]. Chemické složení a biologická dostupnost živin se pohybuje mezi druhy a odrůdami zrn a může být ovlivněna formou zpracování. Obilná zrna poskytují významné množství energie, bílkovin a vybraných mikronutrientů [5]. Obsahují značné množství vlákniny, sacharidů, bílkovin, vitaminů skupiny B a E, minerálních látek včetně hořčíku, zinku a železa [6]. Dále jsou bohaté na fytoestrogeny, flavonoidy a celou řadu chemických látek vykazujících antioxidační aktivitu. Mezi dnes již běžné druhy obilovin v naší republice patří pšenice, ječmen, žito, oves, kukuřice, proso, bér, čirok, triticales, rýže, pohanka, amarant a quinoa [4, 5]. Nejdůležitější netradiční obilninou a zároveň potravou pro více než polovinu světové populace je rýže [7]. Tato plodina se dnes již pěstuje po celém světě včetně Asie, Severní a Jižní Ameriky, Evropské Unie, Středního východu a Afriky [8]. Zrna rýže jsou pluchatá s tuhými celulózovými obaly [9]. Rýže je jednou z nejhodnotnějších potravin. Přes 85 % její energie tvoří komplexní cukry. Existují důkazy, že tyto vstřebané sacharidy jsou příznivé pro řízenou dietní výživu metabolických poruch jako je diabetes nebo hyperlipidémie. Na tuzemském trhu se můžeme setkat s rýží bílou, ze které jsou odstraněny všechny obaly, rýží hnědou natural, která nemá odstraněnou poslední obalovou vrstvu bohatou na vitaminy a minerály, rýží pololoupanou, která má slupku jen částečně broušenou, rýží ve varných sáčcích a rýží parboiled [4, 7].



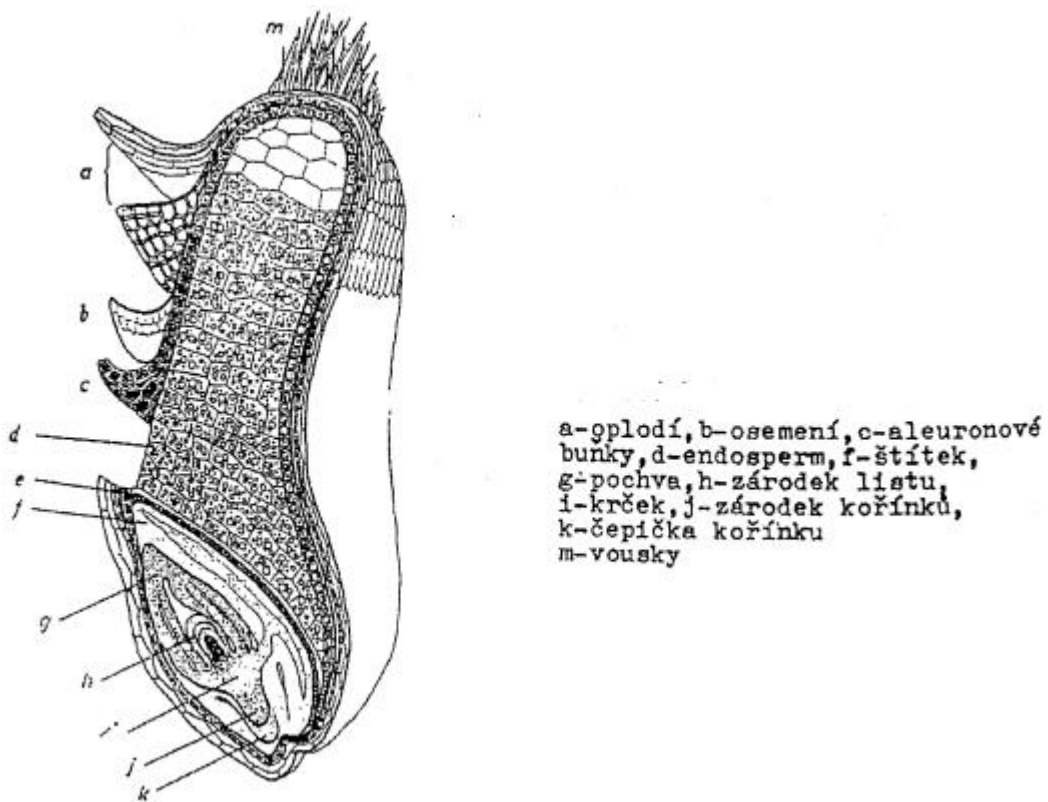
Obrázek 1 Rýže setá [4]

Obiloviny se využívají pro lidskou výživu (trvanlivé pečivo, extruzní výrobky, těstoviny, ječné kroupy, ovesné vločky, kaše aj.), pro krmné účely, k průmyslovým a jiným účelům. Například sladovnický ječmen slouží pro výrobu sladu a piva, z pšenice a kukuřice se získává škrob, jehož deriváty mají široké uplatnění (škrobový a glukózový sirup, modifikované škroby), řada dalších se používá k výrobě alkoholických nápojů [2].

1.1 Technologicky významné složky zrna

Obilky jsou semena obilovin, jejichž přirozenou funkcí je uchování životaschopnosti zárodku nové rostliny. Mezi hlavní anatomické části obilky patří obalové vrstvy, endosperm a klíček. Obalové vrstvy chrání obilku před mechanickým poškozením, v mlýnské technologii jsou označovány jako otruby. Vnější obalové vrstvy jsou složeny převážně z nerozpustných polysacharidů typu celulózy, podpovrchové vrstvy také obsahují polysacharidy, které s vodou bobtnají nebo se částečně rozpouští a jsou schopny velmi pevně vázat vodu [2]. Vnější obalové vrstvy jsou zdrojem vlákniny, minerálních látek, vitaminů skupiny B a antioxidantů. U rýže jsou obalové vrstvy odstraňovány frézováním, čímž dochází ke ztrátě většiny nutričních složek. Proto se dnes využívá biofortifikace s cílem zlepšení nutriční kvality pomocí transgenního inženýrství [10, 11]. Mezi obalovými vrstvami a endospermem se nachází vrstva aleuronová, která je bohatá

na bílkoviny a minerální látky. Největší část zrna tvoří endosperm. Endosperm zaujímá 82 – 84 % hmotnosti zrna a je technologicky nejvýznamnější částí zrna. Je tvořen buňkami krychlového tvaru bohatých na bílkoviny a enzymy, které hrají důležitou roli v klíčícím procesu. Obsah minerálních látek a vlákniny je velmi nízký [12]. Další částí obilného zrna je klíček. Ten slouží jako zárodek nové rostliny. Klíček je od endospermu oddělen štítkem, který obsahuje až 33 % bílkovin. Je bohatý na jednoduché cukry, bílkoviny, aminokyseliny a vitaminy nerozpustné ve vodě (zejména vitamin E), taktéž se zde vyskytují vitaminy skupiny B. Další obsahovou látkou jsou lipidy, převážně tuky, kvůli nim jsou klíčky před mletím z obilky odstraňovány [1].



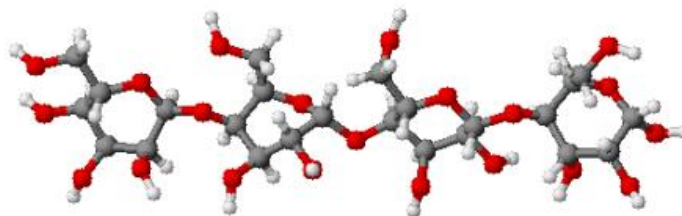
Obrázek 2 Struktura obilného zrna [1]

1.2 Chemické složení obilného zrna

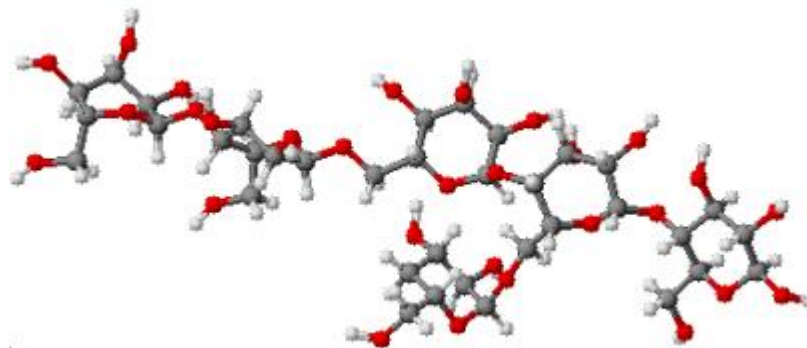
1.2.1 Sacharidy

Obsah volných monosacharidů ve zralém obilném zrně je poměrně nízký. V bílé rýži zaujímají pouze 0,3 – 0,6 %, v rýži hnědé se pohybují v rozmezí 0,6 – 1,4 %. Monosacharidy se nacházejí převážně v klíčku a mezi nejdůležitější zástupce patří arabinóza, xylóza, glukóza, fruktóza, galaktóza a manóza. Taktéž oligosacharidy

se vyskytují ve velmi nízkých koncentracích. Z technologického hlediska jsou nejvýznamnější skupinou polysacharidy. Typickým představitelem této skupiny je škrob [1, 13]. Ten se nachází převážně v endospermu a je zdrojem energie. Hlavními složkami škrobu jsou lineární amyulóza a větvený amylopektin [14]. Škrob je ve studené vodě nerozpustný, v teplé vodě nad 60 °C mazovatí. Důležitý proces probíhající vlivem enzymů se nazývá hydrolýza škrobu. Tyto enzymy nazývané amylázy škrobový substrát ztekucují a zcukřují. Hydrolýzou α -amylázou vznikají rozpustné škroby, β -amyláza je enzym zcukřující. Hydrolyzuje vazby od neredukujícího konce řetězce tak, že se vždy oddělí obě poslední glukóзовé jednotky ve formě maltózy. Amylózu štěpí úplně, amylopektin rozkládá z 60 % [1]. Škrob je hlavní součástí rýže a také důležitá součást mnoha rýžových výrobků. V potravinářském průmyslu je rýžový škrob využíván zejména jako zahušřovadlo [15]. Studie prokázaly, že molekulární vlastnosti amyulózy jako je délka řetězce, či molekulová hmotnost, mají vliv na viskozitu, lepivost při vaření a rychlost retrogradace škrobu této netradiční obiloviny. Polysacharidy rýže se tráví pomalu a tím umožňují tělu využívat uvolněnou energii po mnohem delší dobu. Rozsah a rychlost stravitelnosti škrobu jsou měřeny metodami, které jsou vyvinuty ve snaze napodobovat lidské trávení [13, 16, 17].



Obrázek 3 Struktura amyulózy [18]



Obrázek 4 Struktura amylopektinu [18]

Dalšími představiteli polysacharidů je celulóza, hemicelulóza a rostlinné slizy. Celulóza je základním buněčným polysacharidem buněčných stěn rostlin. Tento lineární polymer obsahuje až 15 000 D-glukózových zbytků spojených $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidovými vazbami. Jelikož lidský organizmus neobsahuje enzymy, které by štěpily tuto vazbu, prochází celulóza v nezměněné podobě trávicím traktem a plní tak funkci vlákniny. Celulózová vlákna ve stěně rostlinných buněk jsou navzájem propojena hmotou, která se skládá z necelulózových polysacharidů a proteinů. Ve dřevě tato hmota obsahuje hemicelulózy a lignin. Hemicelulózy jsou polysacharidy necelulózové povahy a řadíme mezi ně heteroglukany, heteroxylany, heteromanany aj. Lignin, polymer fenolového typu doprovázející celulózu v ovoci, zelenině a obilovinách, však polysacharidem není [19].

Další skupinu polysacharidů tvoří rostlinné slizy. Jedná se o směs polysacharidů vyskytujících se v různých orgánech rostlin. Vzhledem k jeho vysoké variabilitě, co se týká chemického složení, plní v rostlinách mnoho fyziologických funkcí. Hydroxylové skupiny v polysacharidech mají schopnost vázat velké množství vody, čímž mohou rostlinám pomoci odolávat proti suchu [1, 20].

1.2.2 Vlákna obilovin

Vlákna je definovaná jako jedlá část rostlinných materiálů, kterou nemohou pankreatické a gastrointestinální enzymy rozložit. Jedná se o komplexní sacharidy často také někdy označované jako neškrobové polysacharidy. Do této skupiny řadíme celulózu, hemicelulózu, lignin, pektin a další. Vlákna obsahují všechny obiloviny. Podle rozpustnosti v trávicím ústrojí ji dělíme na vlákna rozpustnou a nerozpustnou. Rozpustná vlákna má schopnost vázat vodu a tím navozuje větší pocit sytosti. Mezi rozpustnou vlákna patří pektin, nerozpustnou např. celulóza. Vlákna je důležitá pro správnou funkci zažívacího traktu. Příznivě působí na střevní motilitu a peristaltiku s pozitivním efektem na posouvání střevního obsahu. Tím omezuje celou řadu nemocí trávicího traktu jako např. zácpu, hemoroidy či rakovinu tlustého střeva. Vlákna také zpomaluje vstřebávání jednoduchých cukrů ze střeva, čímž zabraňuje výkyvům krevní glukózy a inzulinu. Dále je schopna ve střevě na sebe vázat cholesterol a pomáhá tak zabraňovat srdečním a cévním onemocněním [21, 22].

Problémem je, že v našem potravinářském průmyslu se obiloviny zpracovávají z pohledu zdraví ne moc vhodným způsobem. Před samotným mletím je většina obalových vrstev,

kteří jsou právě bohaté na vlákninu, odstraňována. Kromě vlákniny se během zpracování ztrácejí také minerální látky, esenciální mastné kyseliny a vitaminy. Takto zpracované obiloviny pak obsahují vyšší množství škrobu a díky absenci vlákniny se lépe odbourávají v zažívacím traktu, čímž vedou k větším výkyvům hladiny krevního cukru a k vyšší sekreci inzulínu [22].

1.2.3 Proteiny

Obsah bílkovin má důležité dopady na nutriční kvalitu zrna, jak pro lidskou výživu, tak pro hospodářská zvířata a na jejich funkční vlastnosti při zpracování. Zralá zrna obilovin obsahují podle druhů a odrůd 9 – 13 % bílkovin v sušině. Obilné bílkoviny můžeme klasifikovat podle morfologického původu, biologické funkce, chemického složení či rozpustnosti v různých rozpouštědlech [9, 23]. Mezi jednotlivými obilovinami v rámci základních stavebních látek, aminokyselin, velký rozdíl není. Převažující aminokyselinou je kyselina glutamová, dále prolin. Je nutné upozornit na velmi nízký obsah lyzinu. Díky jeho malému obsahu není obilná bílkovina pro člověka plnohodnotná, proto se doporučuje obilná strava doplňovat vhodnými zdroji bohatými na tuto aminokyselinu např. bílkovinou mléčnou. Vyšší obsah lyzinu obsahuje rýže. Pro srovnání obsah lyzinu v rýži činí $(3,2 - 4 \text{ g} \cdot 16 \text{ g} \cdot \text{N}^{-1})$, v pšenici je ho $(2,9 \text{ g} \cdot 16 \text{ g} \cdot \text{N}^{-1})$ [3, 13].

Zvláštní postavení má bílkovina pšeničná, která jako jediná vytváří s vodou pružný gel nazývaný lepek. Na tvorbě lepku se podílí zásobní proteiny (gliadiny a gluteniny), které zaujmají téměř 50 % celkového obsahu proteinů, albuminové a globulinové frakce tvoří asi 25 % obsahu celkových bílkovin [1, 23]. Hlavní znaky lepku určující fyzikální vlastnosti jsou: pružnost, tažnost, bobtnavost a plasticita. Žitné těsto, jehož kostrou není bílkovinný gel, ale je tvořeno převážně na bázi polysacharidů, tyto vlastnosti nemá. Lepek vytváří konstituci těsta tím, že vytváří trojrozměrnou síť peptidických řetězců navzájem propojených různými vazbami a můstky. Hlavní roli zde hrají především disulfidové můstky mezi jednotlivými aminokyselinami [1, 3]. Obsah bílkovin v rýži je ve srovnání s ostatními obilovinami nižší, avšak bílkoviny rýže jsou považovány za jedny z nejkvalitnějších. Hlavním proteinem rýže je glutelin oryzenin, který tvoří asi 80 % celkového obsahu bílkovin. Tato bílkovina je rozpustná ve zředěných roztocích kyselin a zásad, avšak rozpustnost ve vodě je značně omezena. Obsah bílkovin v bílé rýži se pohybuje v rozmezí 5,3 – 13,4 %, v rýži hnědé 6,7 – 13,5 %. Rýže neobsahuje lepek, proto je tomuto rýžovému proteinu přisuzována značná pozornost vzhledem k jeho nutričním a zdravotním vlastnostem [13, 24].

Obilovina	Albumin	Globulin	Gliadin	Glutelin
Pšenice	leukosin 14,7	edestin 7,0	gliadin 32,6	glutenin 45,7
Žito	44,4	10,2	sekalin 20,9	sekalinin 24,5
Ječmen	12,1	8,4	hordein 25,0	hordenin 54,5
Oves	20,2	avenalin 11,9	gliadin 14,0	avenin 53,9
Rýže	10,8	9,7	oryzin 2,2	oryzenin 77,3
Kukuřice	4,0	2,8	zein 47,9	zeanin 45,3

Obrázek 5 Proteiny obilovin a jejich složení (%) [25]

1.2.4 Lipidy

Lipidy jsou rozsáhlou, významnou skupinou organických látek, běžně se vyskytujících v přírodě. Jejich společnými vlastnostmi je nerozpustnost, nebo pouze částečná rozpustnost ve vodě. Rozpustné jsou v organických rozpouštědlech (hexan, benzen, aceton, chloroform aj.) Z chemického hlediska jsou to nejčastěji estery alkoholu glycerolu a vyšších mastných kyselin. Obilná zrna jsou na lipidy poměrně chudá. Průměrně zjištěné obsahy lipidů po extrakci éterem se pohybují kolem 1,9 %. Vyšší množství tuků pak obsahuje klíček. Hmotnostní podíl klíčku zaujímá pouze 2,54 % zrna, ale podíl lipidů v něm obsažených tvoří až 64 %. Tuk obilných klíčků je z výživového hlediska velmi cenný, proto se z nich lisuje olej. Tuky obilovin jsou nažloutlé olejovité kapaliny, které obsahují nenasycené mastné kyseliny v množství 18 – 25 %. Z tohoto množství převažuje kyselina linolová (48 – 57 %), kyselina olejová (16 – 18 %) a kyselina linolenová (5 %). Převládající linolová kyselina velmi snadno podléhá oxidaci, což má za následek žluknutí mouky při delším skladování [9]. Z dalších lipidů jsou zde obsaženy fosfatidy, mezi jejichž zástupce řadíme fosfatidylcholin a fosfatidyletanolamin. Při skladování vlhkého obilí působí enzym glycerolfosfatáza, díky němu dochází k uvolňování kyseliny fosforečné z těchto lipofilních sloučenin, což má za následek zvyšování kyselosti mouky [1]. Mezi doprovodné látky lipidů můžeme zařadit lipofilní barviva s převládajícími dvěma druhy pigmentů a to xantofyly a karotenoidy. Vyšší obsah těchto barviv najdeme převážně v pšenici tvrdé.

Z karotenoidů je zejména důležitý β -karoten, který je významným prekurzorem vitamínu A. Mezi další barviva avšak ne už hydrofobního charakteru patří antokyany. Tyto sekundární metabolity rostlin jsou zodpovědné za červené či černé zbarvení určitých druhů rýže, dalších obilovin, ale také ovoce a zeleniny [26].

1.2.5 Vitaminy a minerální látky

Vitaminy jsou v obilovinách soustředěny především v klíčku a aleuronové vrstvě. Převládají vitaminy skupiny B a to zejména tiamin, riboflavin a niacin. Obsahují taktéž značné množství vitamínu E. Vitamin B₁₂ však v obilovinách obsažen není, vitamin C pouze v minoritním množství v klíčku [1, 6].

Minerální látky se souhrnně označují jako popel a představují anorganický zbytek, který je získán po spálení rostlinného materiálu. Obsah popela v celých zrnech se pohybuje kolem 1,25 – 2,5 %, u rýže až kolem 5 %, přičemž jeho koncentrace je nejvyšší v obalových vrstvách, nejnižší v endospermu. Nejvyšší podíl minerálií tvoří oxid fosforečný, draselný, hořečnatý a vápenatý. Cereálie mají nízký obsah sodíku, který se v rýži prakticky nevyskytuje. Na draslík jsou obiloviny bohaté. Převládajícím mikroprvkem je železo, jehož obsah v pšenici činí 33 – 66 mg.kg⁻¹, u rýže 28 mg.kg⁻¹, taktéž u rýže převládá oproti ostatním cereáliím selen v množství 10 – 13 $\mu\text{g}.100\text{g}^{-1}$. [1, 4, 27].

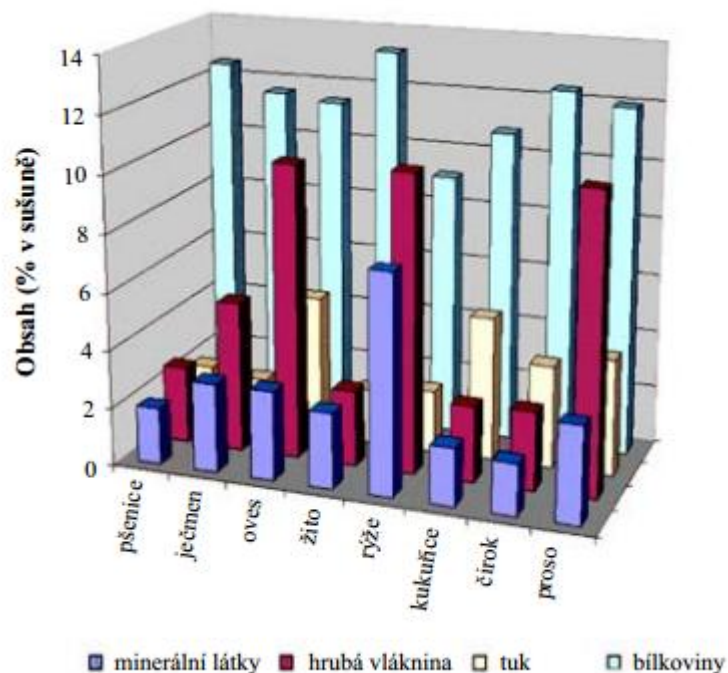
Produkt	Vitamin E	Thiamin	Riboflavin	Niacin ekvivalent (μg)	Vitamin B ₆ (μg)	Folát (μg)
Pšeničná mouka bílá	0,30	0,31*	0,03	3,60*	0,15	22
Pšeničná mouka celozrnná	1,40	0,47	0,09	8,20	0,50	57
Rýže bílá, rychlovarná	(0,10)	0,41	0,02	5,80	0,31	20
Rýže hnědá, neloupaná	0,80	0,59	0,07	6,80	N	49
Popcorn, neochucený	11,03	0,18	0,11	1,70	0,20	3
Ovesná mouka instantní	1,50	0,90	0,09	3,40	0,33	60
Ječné kroupy perlové	0,40	0,12	0,05	4,80	0,22	20
Žitná mouka celozrnná	1,60	0,40	0,22	2,60	0,35	78
Prosná mouka	stopy	0,68	0,19	2,80	N	N

* fortifikovaná mouka, N – není věrohodný údaj, () – odhad

Obrázek 6 Obsah vitaminů ve vybraných cereáliích (mg.100 g⁻¹) [4]

1.2.6 Další složky obilovin

Mezi další složky obsažené v obilovinách pouze v nízkém množství řadíme kyselinu fytovou, cholin, kyselinu *p*-aminobenzoovou a již už zmíněná antokyanová barviva. Kyselina fytová představuje hlavní zásobárnu fosforu [3]. V semenech rostlin váže 50 – 85 % fosforu. Tato přirozeně vznikající sloučenina v buňkách je známa také pod názvem jako fytát nebo inozitolhexakisfosfát. V pšenici fytát zaujímá 1,13%, v hnědé rýži 0,89 %. Na jedné straně je považována za antinutriční látku, která snižuje využití fosforu, zinku, mědi a vápníku u lidí a zvířat. Na druhé straně potlačuje tvorbu reaktivních radikálů katalyzovanou železem a vykazuje také anticholesterolemický účinek [28]. Na tuto kyselinu jsou bohaté zejména obalové vrstvy, naopak její množství v endospermu je nízké. Cholin představuje velký význam pro neuromotorickou činnost lidského organismu, v obilném zrně je rozložen téměř rovnoměrně. Kyselina *p*-aminobenzoová je důležitým růstovým faktorem. Najdeme ji převážně v obalových vrstvách [3, 29]. Antokyaniny patří k nejrozšířenějším rostlinným pigmentům. Nejčastěji se vyskytují ve formě glykosidů. Tato barviva jsou dobře rozpustná ve vodě a zodpovídají za červené, fialové a modré zbarvení rostlin. Stupeň zbarvení je závislý na pH prostředí. Antokyaninům jsou přisuzovány také antioxidační účinky, a dnes se ve velké míře využívají ve farmakologickém průmyslu. Např. antokyaniny v borůvkách se příznivě uplatňují proti mikrobiálním infekcím a poruchám vidění. Jsou nestálé a citlivé na oxidaci [30, 31].



Obrázek 7 Orientační hodnoty obsahu složek v neloupaném zrna různých obilovin [4]

1.3 Obiloviny a jejich vliv na lidské zdraví

Cereálie a výrobky z nich jsou cenným zdrojem živin jak ve stravě lidí, tak i zvířat. Představují vyvážený zdroj živin a jsou považovány za hlavní potravu lidstva. Dnes se často setkáváme s pojmem „celozrnný výrobek“. Za celozrnné výrobky jsou považovány ty, které obsahují úplné obilné zrna. Jak už bylo výše uvedeno, obilné zrna se skládá z obalových vrstev, endospermu a klíčku. Pokud se zrna drtí nebo vločkují s cílem získat celozrnný výrobek, musí být v celozrnném produktu zachovány všechny tři zmíněné složky ve stejném poměru jako v originálním zrna [4, 32].

Cereální výrobky jako základní potraviny by měly být zahrnuty aspoň v jednom denním jídlu. Obilná zrna jsou významným zdrojem sacharidů, bílkovin a vlákniny. Na základě nedávných zdravotních poznatků bylo zjištěno, že konzumace cereálních výrobků snižuje riziko srdečních onemocnění, diabetu typu 2, některých typů rakoviny a pomáhá regulovat tělesnou hmotnost [33]. Díky obsahu neškrobových polysacharidů jsou cereálie také zdrojem vlákniny. Vysoký obsah vitamínu E obsaženého v klíčku příznivě ovlivňuje reprodukční systém a díky jeho silnému antioxidačnímu účinku zpomaluje stárnutí buněk. Tiamin působí proti onemocnění beri-beri, degeneraci mozkových buněk, čímž tlumí riziko rozvoje depresí. Niacin vykazuje pozitivní účinky při léčbě schizofrenie, pelagry

a vykazuje pozitivní vliv na kvalitu kůže. Obilná zrna jsou bohatá také na fenolové kyseliny a saponiny. V nižších množstvích se zde vyskytují flavonoidy a fytoestrogeny. Tyto sloučeniny vykazují antioxidační působení, čímž přispívají dalším pozitivním aspektům ku zdraví [5, 34].

Avšak ne všichni mohou cereální výrobky konzumovat. Důvodem je intolerance lepku, která je příčinou onemocnění zvané celiakie. Jedná se o celoživotní onemocnění, jehož jedinou účinnou léčbou je přísné dodržování konzumace bezlepkových výrobků. Mezi obiloviny, které neobsahují lepek, patří např. rýže, kukuřice, pohanka a amarant [35].



Obrázek 8 Cereálie, cereální [36]

2 ANTIOXIDANTY A JEJICH ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA

Antioxidační kapacita je definována jako schopnost látky, sloučeniny nebo směsi látek inhibovat rozklad různých sloučenin. V souvislosti s analýzou vzorků pro vzájemné porovnání antioxidačního působení byl zaveden pojem antioxidační aktivita. Čili antioxidační aktivita kvalifikuje kapacitu biologického vzorku eliminovat volné radikály. V komplexním pojetí se hovoří o celkové antioxidační kapacitě, která představuje souhrn všech látek s antioxidačním účinkem ve vzorku. U metody DPPH, na kterou je diplomová práce zaměřena se výsledek obvykle vyjadřuje ve vztahu k tzv. troloxu nebo kyselině askorbové. Jde o poměr antioxidačního účinku vzorku k roztoku troloxu nebo kyselině askorbové [37].

2.1 Antioxidanty

Antioxidační látky v potravinách hrají důležitou roli ochranného faktoru. Vědecké důkazy naznačují, že tyto látky snižují riziko chronických onemocnění, včetně rakoviny a srdečních chorob. Primárními zdroji přirozeně se vyskytujícími antioxidantů jsou obiloviny, ovoce a zelenina. Silné antioxidační účinky vykazují také některé byliny či koření zejména z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*), jako je šalvěj, oregano a tymián [38, 39]. Nejvýznamnějšími přírodními antioxidanty jsou tokoferoly a tokotrienoly (vitamin E), askorbová kyselina (vitamin C), fenolové látky (především flavonoidy, fenolové kyseliny, jednoduché fenoly, stilbeny) a karotenoidy, přičemž nejvíce zastoupenými antioxidanty v potravě jsou flavonoidy a fenolové kyseliny. V potravinách lze obsah antioxidačních látek nad přirozenou hladinu navýšit přidáním dalších antioxidantů. Toho se využívá především pro prodloužení trvanlivosti, zabránění vzniku nežádoucí chuti a vůně, nebo pro dosažení vyšší nutriční hodnoty potravin obsahujících snadno oxidovatelné složky. Antioxidanty dodané do potravin by měly být zdravotně nezávadné, účinné v nízkých koncentracích, snadno aplikovatelné, neměly by vykazovat nežádoucí aroma a chuť. Taktéž by měly být cenově dostupné. Kromě přírodních antioxidantů jsou také používány syntetické antioxidanty jako např. (butylhydroxyanizol) BHA, (butylhydroxytoluen) BHT nebo estery kyseliny gallové. I přestože jsou velmi účinné a stabilní, díky jejich nepříznivým účinkům na lidské zdraví je jejich použití v mnoha zemích omezeno [40, 41].

Antioxidační účinek látek vyplývá z jejich specifické struktury. Např. u tokoferolů, flavonoidů, čili látek fenolového typu závisí přerušení radikálové řetězové reakce na počtu a poloze hydroxylových skupin a typu dalších substituentů. Skutečnost, že převážná část antioxidantů je kovalentně vázána na buněčnou stěnu, je třeba pro jejich získávání použít různých rozpouštědel např. vodu, etanol, metanol, aceton, či různé kombinace těchto rozpouštědel [40, 42].

Pro stanovení antioxidační aktivity se používá nespočet metod a pracovních postupů, které obecně poskytují vzájemně odlišné výsledky. Přestože je tato skutečnost dobře známa, často nejsou identifikovány či dokumentovány faktory způsobující rozmanitost v hodnotách stanovených různými metodami. Mezi faktory ovlivňující antioxidační aktivitu patří koncentrace antioxidantu, přítomnost jiných antioxidantů, oxidovaný substrát, použité rozpouštědlo při reakcích vzorku, homogenita či vícefázovost sledovaného systému, pH, přítomnost dalších složek, oxidační činidlo, fyzikální faktor, parciální tlak kyslíku, teplota, přítomnost iontů kovů aj. Hlavním úkolem antioxidantů je schopnost vychytávat volné radikály [38, 43].

Obiloviny

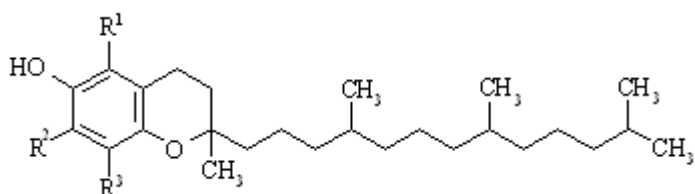
pšenice (<i>Triticum sativum</i>)	fenolové kyseliny (estery, glykosidy), tokoferoly, flavonoidy, fosfolipidy
žito (<i>Secala cereale</i>)	fenolové kyseliny (estery, glykosidy), tokoferoly, flavonoidy, fosfolipidy
Ječmen (<i>Hordeum vulgare</i>)	tyrosin, tyramin, fenolové kyseliny (estery, glykosidy), tokoferoly, fosfolipidy, lignany
oves (<i>Avena sativa</i>)	avenanthraminy, fenolové kyseliny (estery, glykosidy), tokoferoly, fosfolipidy
rýže (<i>Oryza sativa</i>)	flavony (isovitexin), fenolové kyseliny (estery, glykosidy), tokoferoly

Obrázek 9 Přírodní antioxidanty v obilovinách [44]

2.1.1 Stručná charakteristika některých antioxidantů

2.1.1.1 Tokoferoly a tokotrienoly (vitamin E)

Z rostlinných zdrojů bylo izolováno 8 derivátů, které vykazují biologické účinky vitaminu E a zároveň tvoří jeho strukturu. Tento vitamin patří k významným antioxidantům, a proto je také považován za faktor zpomalující stárnutí organismu. Vitamin E omezuje neenzymové působení molekulárního kyslíku na dvojně vazby mastných kyselin vázaných v tkáňových lipidech. V játrech se snadno oxiduje za vzniku tokoferylchinonů, které mohou být redukovány na tokoferylhydrochinony, jejichž cyklizací vznikají opět tokoferoly. Jedinou obilovinou, která obsahuje všech 8 izomerů vitaminu E je ječmen [19, 45].



Obecný vzorec tokoferolů

2.1.1.2 Kyselina askorbová (vitamin C)

Jedná se o vitamin dobře rozpustný ve vodě. V kyselém, neutrálním i alkalickém prostředí za katalytického působení kovů (např. Fe, Cu) snadno podléhá oxidaci za vzniku kyseliny L-dehydroaskorbové. Jeho extracelulární funkce spočívají v ochraně granul LDL proti oxidaci, dále redukuje železo z potravy a tím blokuje reakce, jejichž produkty jsou karcinogenní nitrózaminy. Zvyšuje aktivitu fagocytů a tím zvyšuje hladinu protilátek. Zdrojem tohoto vitaminu je ovoce a zelenina. Ve zralém obilí se nevyskytuje [19].

2.1.1.3 Karotenoidy

Jedná se o skupinu žlutých, oranžových, červených a fialových barviv nerozpustných ve vodě, často doprovázejících chlorofyly v rostlinách. Jejich základní struktura je tvořena izoprenoidními jednotkami. Karotenoidy, obsahující ve své molekule β -jononový kruh, plní funkci vitaminu A. Z obilovin je na karotenoidy bohatá pšenice tvrdá [9, 19].

2.1.1.4 Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny se v rostlinách nacházejí nejčastěji ve formě esterů, v nichž se váží karboxylem na hydroxylové skupiny organických kyselin nebo sacharidů. Jako zástupce této skupiny můžeme zmínit kyselinu kávovou, ferulovou, chlorogenovou nebo gallovou [46].

2.1.1.5 Flavonoidy

V dnešní době je známo asi 6400 druhů flavonoidů. Jejich základní strukturu tvoří flavanové jádro, nebo 2-fenylbenzopyren. Tato struktura je také charakteristická pro flavony, flavanony, izoflavony a neoflavony. V rostlinných materiálech se nejčastěji vyskytují ve formě glykosidů. Právě tato forma jim umožňuje větší rozpustnost v běžných fyziologických podmínkách, zároveň snižuje jejich reaktivitu a zabezpečuje lepší stabilitu [46].

2.1.1.6 Estery kyseliny gallové

Estery kyseliny gallové neboli galláty se v potravinách rostlinného původu nacházejí ve velmi malém množství. Jedná se o bílé krystalické látky s charakteristickým aroma. Jsou vhodné zejména pro stabilizaci živočišných tuků [47].

2.1.1.7 Antokyany

Jedná se o přírodní bezdusíkatá, ve vodě rozpustná barviva zbarvena červeně až modře. Jsou velmi reaktivní, tudíž nestálé. Na jejich stabilitu má vliv nízká teplota a kyselé prostředí. Chemicky jsou to heteroglykosidy, jejichž aglykony jsou nazývané jako antokyanidiny. Každý rostlinný druh obsahuje charakteristické antokyanové pigmenty v různém obsahu [30, 48].

2.2 Volné radikály

Volné radikály jsou vysoce reaktivní látky, které jsou v biologickém systému přítomny z mnoha různých zdrojů např. působením výfukových plynů, kouření, UV záření [38]. Jedná se o látky s nepárovými elektrony, které jsou často přirozenou složkou lidského organismu. Převážné působení radikálů má na lidské zdraví negativní vliv, avšak pozitivním účinkem je schopnost bílých krvinek využívat tyto látky k ničení

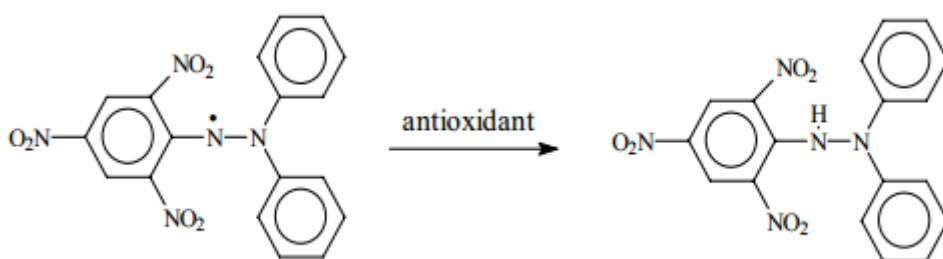
mikroorganismů. Na druhou stranu poškozují biomolekuly, oxidují mastné kyseliny za tvorby peroxidů, taktéž způsobují oxidaci nukleových kyselin, proteinů a tím způsobují celou řadu degenerativních onemocnění [38, 49].

Volné radikály jsou považovány za spolupůvodce celé řady civilizačních onemocnění. Svým působením se podílejí na vzniku diabetu, očních chorob (šedý zákal), kožních onemocnění, imunitních onemocnění, revmatických zánětech kloubů. Podporují stárnutí, neurodegenerativní onemocnění jako je Parkinsonova a Alzheimerova choroba a také hrají významnou roli při vzniku rakovinných onemocnění. Volné radikály a jejich metabolické produkty jsou v organismu eliminovány působením antioxidantů. V případě, že dojde k porušení rovnováhy radikálů a antioxidantů, nastává stav, který je často nazýván jako oxidační stres, který zapříčiňuje výše zmíněné negativní zdravotní následky [49].

3 CHARAKTERISTIKA METOD PRO STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY V POTRAVINÁCH S DŮRAZEM NA METODU DPPH

3.1 Metoda DPPH

Test s využitím stabilního 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylového radikálu (DPPH•) je běžně využívanou metodou pro stanovení antiradikálové aktivity čistých syntetických antioxidantů, izolovaných přírodních látek, rostlinných extraktů a potravin. Jedná se o rychlou, jednoduchou a nenákladnou metodu, která může být široce využívána u pevných a kapalných vzorků. Principem reakce je redukce radikálu DPPH• za vzniku DPPH-H [38, 50]. DPPH v metanolu vytváří intenzivní fialové zbarvení, které se v přítomnosti antioxidantu odbarvuje do žluta. Odbarvení je snadno pozorovatelné pouhým okem. Rychlost a rozsah odbarvení je úměrný antioxidační účinnosti analyzované látky (extraktu) [50, 51, 52]. (Pokles absorbance je měřen při vlnové délce 515 – 520 nm. Reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky. Antioxidační látky mohou být rozpustné ve vodě, v tuku, či vázány na buněčnou stěnu. Proto pro jejich efektivní získání je nutná extrakce [38, 53, 54].



Reakce DPPH• s antioxidantem za vzniku DPPH-H [50]

Antioxidační aktivita může být vyjádřena různými způsoby, včetně procenta použitého činidla či rychlosti oxidační inhibice. Jednodušší způsob, jak prezentovat antioxidační aktivitu metodou DPPH je použití společného referenčního standardu, kterým je trolox nebo kyselina askorbová [38].

Antioxidační působení látky můžeme také vyjádřit jako účinnou koncentraci antioxidantu, která je potřebná k redukci 50 % radikálu DPPH •. Takto vyjádřenou antioxidační aktivitu označujeme jako EC₅₀ [50].

Další možností výpočtu je inhibice radikálu, kterou lze vyjádřit vztahem

$$I (\%) = [(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}] * 100 \quad (1)$$

kde:

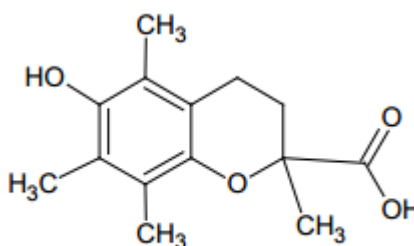
I.....inhibice radikálu DPPH v %,

A_{blank}.....absorbance získaná při slepém pokusu,

A_{sample}.....absorbance analyzovaného vzorku [55].

3.1.1 Trolox

Celým názvem (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) je ve vodě rozpustný derivát vitamínu E se silnými antioxidačními účinky. Taktéž je dobře rozpustný ve 100% etanolu a metanolu. Jedná se o bílý prášek o 97% čistotě běžně používaný jako standard u metod detekujících antioxidační aktivitu. V lékařství je účinný jako přídatná léčba u některých typů rakoviny [56, 57].

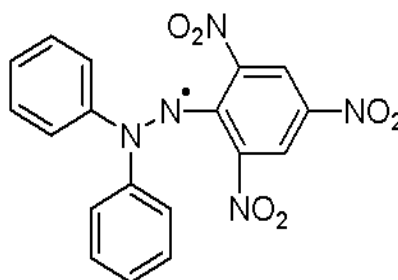


Trolox

3.1.2 DPPH

DPPH neboli 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl je stabilní, intenzivně fialový krystalický prášek. Je často používán jako činidlo v kvantitativním stanovení antioxidační aktivity pro spektrofotometrickou analýzu [58, 59].

Tuto sloučeninu o sumárním vzorci $C_{18}H_{12}N_5O_6$ a čistotě větší než 85 % nabízí řada chemických firem např. jako je Sigma Aldrich. DPPH je nerozpustný ve vodě, za to dobře rozpustný v etanolu a metanolu [60].



(5)

2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl

3.1.3 Metanol

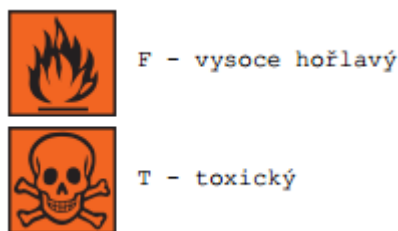
Metanol je nejběžněji používaným rozpouštědlem a také extrakčním činidlem v metodě využívající DPPH. Jedná se o vysoce toxickou, těkavou, čirou a hořlavou kapalinu etanolového zápachu [61]. V nízkých koncentracích je přirozenou složkou lihovin a jeho obsah je závislý na typu alkoholického nápoje. Malé množství metanolu vzniká hydrolyzou pektinů ovoce, které bylo použito ke kvašení. Slouží jako výchozí surovina k výrobě bionafty, je součástí ostříkovačů autoskel, kapalin do kopírek a v chemickém průmyslu je rozšířeným rozpouštědlem. Riziko otravy představují nekvalitní lihoviny obsahující toxikologicky významné množství metanolu. Stejně jako jiné alkoholy působí excitačně, vyšší dávky působí narkoticky na CNS. Nejzávažnější je však toxicita jeho metabolitů a to kumulace kyseliny mravenčí v sítnici a očním nervu. Působí trvalé poruchy zraku. Působením enzymu alkoholdehydrogenázy se rychle přeměňuje na formaldehyd, z něho pak vzniká kyselina mravenčí. Ta se velmi pomalu oxiduje na oxid uhličitý a vodu. Minimální toxická dávka čistého metanolu činí asi $0,1 \text{ ml.kg}^{-1}$. V průměru se udává kolem 10 ml. Hladina metanolu v krvi nutně vyžaduje léčbu antidotem, kterým je etanol nebo fomepizol. Včasné podání těchto látek minimalizuje tvorbu metabolitů [62].

Chemický vzorec: CH_3OH

Molární hmotnost: $32,04 \text{ g.mol}^{-1}$

Bod tání: $-98 \text{ }^\circ\text{C}$

Bod varu: $64,5 \text{ }^\circ\text{C}$ (1013 hPa) [63].



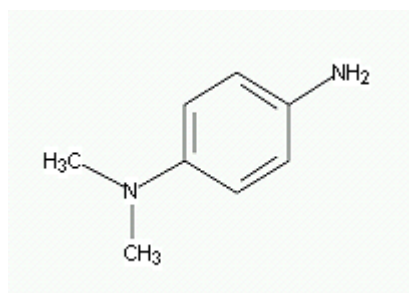
Obrázek 10 Výstražné symboly na obalu metanolu [64]

3.2 ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Tato metoda slouží k měření antioxidační aktivity v biologickém vzorku. Biologickými vzorky mohou být tělesné tekutiny lidí nebo zvířat (plazma, moč, sérum, sliny), rostlinné extrakty, zemědělské, potravinářské produkty či farmaceutické výrobky. Výhodou ORAC je široké spektrum aplikace. Tato metoda může být využita jak u lipofilních, tak u hydrofilních vzorků [65]. Principem je měření zániku fluorescence fluoresceinů v důsledku reakce s volnými radikály generovanými důsledkem termického rozkladu (2,2'-azobis-2-metyl-propanimidamidu). Přítomnost antioxidantů v systému chrání fluoresceiny před oxidací a tím zpomaluje jejich odbarvení. Hodnota ORAC je vyjádřena ve vztahu ke standardu, kterým je trolox (analog vitamínu E) v μmol na gram tuhého vzorku či litr v případě vzorků tekutých [66].

3.3 DMPD

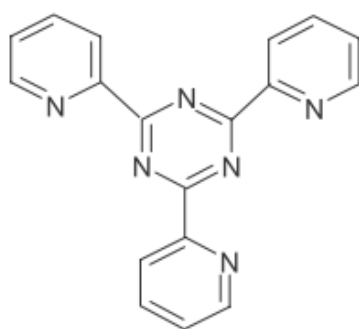
Sloučenina DMPD (N,N-dimethyl-1,4-diaminobenzen) je působením železité soli v roztoku převedena na relativně stabilní a barevnou radikálovou formu $\text{DMPD}\cdot+$. Sloučeniny s antioxidační aktivitou jsou schopny $\text{DMPD}\cdot+$ radikály zhasět a tím dochází k odbarvení roztoku a poklesu absorbance [67].



N,N-dimethyl-1,4-diaminobenzen

3.4 FRAP (Ferric Reduction Ability of Plasma)

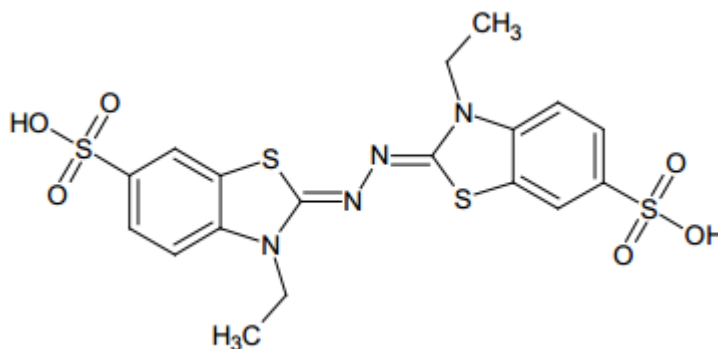
FRAP metoda je založena na redukci železitých komplexů na železnaté formy. Při nízkém pH v přítomnosti antioxidantu se železitý tripyridyltriazinový komplex (TPTZ) redukuje na železnatou formu. Redukce se projeví vznikem intenzivně modrého zbarvení s absorpčním maximem 593 nm. Antioxidační aktivita se vyhodnocuje na základě získané kinetické reakce jako závislost koncentrace vytvořeného dvojmocného železa z koncentrace antioxidantu [68].



2,4,6-tri-(2pyridyl)-s-triazin (TPTZ)

3.5 ABTS

Metoda ABTS, taktéž označována jako metoda TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) je založena na zhášení syntetického stabilního radikálového kationu $ABTS^{\bullet+}$. Reakce $ABTS^+$ s látkou se sleduje spektrofotometricky. ABTS má výraznou modrozelenou barvu a v přítomnosti antioxidantu se redukuje a odbarvuje. Snížení absorpce po přidání antioxidantu je přímo úměrná počtu $ABTS^{\bullet+}$ radikálů. Absorbance vzniklého kationtu $ABTS^{\bullet+}$ se nejčastěji měří při 600 nm [69].



ABTS

4 VYUŽITÍ METODY DPPH V OBLASTI CEREÁLIÍ

Metoda DPPH je využívána ke stanovení antioxidační aktivity nejen v cereáliích a výrobcích z nich, ale také v široké škále potravinářského průmyslu a biologického výzkumu. Dokazuje to celá řada článků, které najdeme v bakalářské práci, která slouží jako podklad této diplomové práce.

4.1 Stanovení antioxidační aktivity mletých frakcí, vybraných druhů obilovin

V mnoha zemích jsou obiloviny hlavní složkou lidské stravy nebo krmiv pro zvířata. Epidemiologické studie dokazují, že spotřeba celozrnných produktů snižuje ischemickou chorobu srdeční, diabetes a karcinogenní onemocnění. Tyto příznivé účinky jsou připisovány řadě bioaktivních látek obsažených v obilném zrnu. Jedná se zejména o skupinu antioxidantů. Mezi ně můžeme zařadit tokoferoly, flavonoidy, fenolové kyseliny, saponiny a fytoestrogeny. Z fenolových kyselin zde převládají ferulové kyseliny, které představují až 90 % celkových polyfenolů. Nejvyšší koncentrace těchto sloučenin najdeme v obalových vrstvách zrna. Celkový obsah polyfenolů je v obilovinách velmi variabilní, závisí na rozmanitosti obiloviny a také způsobech zpracování (frézování). Hlavní složkou obilovin je endosperm, který zaujímá až 83 % celého zrna a během mletí je hlavním zdrojem bílé mouky. Obalové vrstvy tzv. otruby zaujímají 14,5 % a jsou z obilného zrna často odstraňovány a jsou často součástí krmiva pro zvířata. Klíček tvoří pouhé 2,5 % zrna. Účelem frézování je oddělit otruby a klíčky od endospermu a získat tak maximální množství mouky za minimálních provozních nákladů a při zachování vysoké jednotné kvality. Antioxidační působení vzorků bylo měřeno pomocí metody FRAP a DPPH, na kterou bude kladen důraz. Jako rostlinný materiál bylo použito několik druhů obilovin a to pšenice, oves, špalda, triticales, žito a ječmen. Tyto vzorky byly rozemlety pomocí laboratorního mlýnku na jemnou mouku (MF I.), mouku (MF II.), jemné otruby (MF III.) a hrubé otruby (MF IV.). Poté byly 20 h extrahovány etanolem v poměru 1:80 a centrifugovány. 25 μ l těchto extraktů bylo smícháno se 100 ml roztoku DPPH (0,012 g DPPH ve 100 ml metanolu). Tyto reakční směsi byly po 10 minut inkubovány při laboratorní teplotě a proměřeny při vlnové délce 550 nm za použití přístroje Biotek Reader. Radikálová aktivita vzorků byla vyjádřena v mg troloxu ekvivalentní antioxidační aktivitě na 1 g sušiny. Nejvyšší úbytek absorbance u mouky v roce 2009 vykazoval ječmen, pšenice špalda a nejnižší hodnota byla naměřena u pšenice.

Stejné pořadí bylo zachováno při proměřování antioxidační aktivity v roce 2010. U otrub v roce 2009 taktéž nejvyšší úbytek absorbance byl vypočten u ječmene a triticales, nejnižší u špaldy a ovsu. Taktéž v roce 2010 se pořadí těchto obilovin nezměnilo.

Z naměřených výsledků vyplynulo, že nejsilnější antioxidační působení vykazoval extrakt z ječmene. Už z literatury je známo, že ječmen vyniká svým zdrojem antioxidačních látek. Taktéž je obtížné porovnávání výsledků z různých studií vzhledem k variabilitě experimentálních podmínek [70].

4.2 Antioxidační aktivita pšenice ozimé (*Triticum aestivum*)

Pšenice obsahuje pestrou škálu bioaktivních látek, které mohou přispět k antioxidační aktivitě. Mezi tyto bioaktivní komponenty patří karotenoidy, tokoferoly, tokotrienoly, fenolové kyseliny, fytové kyseliny, fytoosteroly a flavonoidy. Odhaduje se, že flavonoidy tvoří přibližně 2/3 fenolických látek v naší stravě a jejich nejvyšší koncentrace je soustředěna v aleuronové vrstvě. Obsah těchto biologicky aktivních látek je ovlivněn řadou environmentálních faktorů, jako je zeměpisná šířka, klimatické variace, nadmořská výška, typ půdy a další. Cílem této práce bylo zhodnocení antioxidační aktivity bílé mouky pšenice ozimé, celozrnné mouky a otrub.

Pšeničná zrna byla pomleta pomocí laboratorního mlýnku, který umožňuje získat 4 frakce: mouka I, II, a otruby III, IV. 2 g těchto vzorků byly smíchány s 15 ml 80% metanolu, následně umístěny na 15 min do ultrazvukové lázně. Po odstředění bylo 0,6 ml extraktu smíseno s 0,9 ml roztoku DPPH, který byl připraven rozpuštěním 12,5 mg DPPH v 100 ml 80% metanolu. Reakční směs byla uchována v temnu a po 30 min byla měřena absorbance při vlnové délce 515 nm proti slepému vzorku (0,9 ml roztoku DPPH + 0,6 ml 80% metanol). Slepý vzorek byl měřen v čase $t=0$, vzorek v čase $t=30$. Z těchto poznatků byl procentuální úbytek absorbance vypočten z následující rovnice:

$$\% \text{ úbytek absorbance} = [(Abs_{(t=0)} - Abs_{(t=30)}) / Abs_{(t=0)}] * 100 \quad (2)$$

Vypočítaný procentuální úbytek absorbance u bílé mouky činil pouhých 23,26 %, u mouky celozrnné 49,57 % a u otrub 76,47 %. Jelikož bílá mouka obsahuje dvakrát méně flavonoidů než mouka celozrnná, tudíž i její antioxidační aktivita je nižší [71].

4.3 Obsah fytochemikálií a antioxidační aktivita barevných a nebarevných druhů rýže

Rýže (*Oriza sativa*) je jednou z důležitých obilovin na světě a také hlavním exportním produktem Thajska. Jako každodenní potrava je používána zejména v asijských zemích. Je zdrojem mnoha bioaktivních živin, zejména fytochemikálií. Na světě existuje široká škála kultivarů rýže obsahujících barevné pigmenty a právě tyto druhy jsou bohaté na fenolické sloučeniny, antokyanová barviva s výraznou antioxidační aktivitou. Existují důkazy, že fenolické látky působí jako antioxidanty tím, že brání oxidaci LDL lipoproteinů, agregaci krevních destiček a červených krvinek. Působí také jako antimutagenní a antikarcinogenní činidla. Tyto sloučeniny jsou součástí každodenní stravy, léčiv a potravinových doplňků. Kyanidin-3-O-β-D-glukopyranosid patří mezi nejrozšířenější antokyanové barvivo fialové rýže. Je známo pro své chuťové a zdraví prospěšné vlastnosti. Tato studie byla zaměřena na stanovení fytochemikálií, antokyanových barviv, obsah celkových fenolů, fytoových kyselin, γ-oryzanolu a antioxidační aktivity. Použitým rostlinným materiálem bylo 12 kultivarů barevné i nebarevné rýže. Tyto vzorky pocházely ze Surin Rice Centra Severovýchodního Thajska. Semena rýže byla pomleta na jemný prášek. 7 g tohoto prášku bylo extrahováno ve 21 ml různých rozpouštědel (metanol, destilovaná voda, hexan a etylacetát). Extrakce byla provedena 1h na třepačce. Za sníženého tlaku při teplotě 50 °C bylo pomocí rotační odparky odstraněno rozpouštědlo. Antioxidační aktivita rýžových extraktů byla měřena pomocí DPPH testu. Jako standard byl použit BHA. Všechna měření byla provedena ve 3 vyhotoveních. Výpočet antioxidační aktivity:

$$\text{DPPH (\%)} = (1 - \frac{A_{\text{simple}}}{A_{\text{control}}}) * 100 \quad (3)$$

kde:

A_{simple}absorbance vzorku

A_{control}absorbance kontroly (metanol + DPPH)

Zjištěné hodnoty prokázaly vyšší antioxidační aktivitu barevné rýže oproti druhům bezbarvých díky obsahu antokyanových barviv, které působí jako silná redukční činidla. Z použitých extrakčních činidel se nejúčinnějším ukázal metanol. Vysokou antioxidační aktivitu vykazoval také etanolový extrakt [72].

4.4 Antioxidační aktivita semen amarantu, quioni a jejich klíčků během jejich růstu

Využití amarantu a quinoi se v posledních letech rozšířilo nejen ve společné stravě, ale také ve stravě lidí s potravinovou alergií na lepek, celiakií. Tyto pseudoobiloviny mají vysokou nutriční hodnotu, která je spojena s kvalitou a množstvím bílkovin, tuků a antioxidantů. Rostlinným materiálem byla semena amarantu (*Amaranthus cruentus*) odrůdy Aztek a Rawa pocházejících z východního Polska, semena quinoi (*Chenopodium quinoa*) pocházejících z Bolívie. Semena amarantu a quinoi byla ponechána ve vodě po dobu 3 hodin. Klíčky byly pěstovány po dobu 4 – 7 dnů po výsevu při teplotě 20 °C. Polovina kultivaru byla ponechána na denním světle, druhá polovina ve tmě. 1 g jednotlivých rozdrcených vzorků byl po dobu 2h extrahován v rozpouštědle (metanol + 0,16 mol.dm⁻³ HCl + voda). Poměr těchto sloučenin činil 8:1:1. Extrakty byly odděleny dekantací a znovu extrahovány ve 40 ml 70% acetonu opět po dobu 2 h. Po odstředění byly vzorky uchovány v mrazáku při teplotě - 20 °C. Antioxidační účinek byl měřen metodou DPPH podle způsobu Yen a Chena (1995) s úpravou dle Bartona a Folta (2006). Do kyvet obsahujících rostoucí objemy vzorků (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,45, a 0,6 ml) s odpovídajícími objemovými díly metanolu, tak aby celkový objem byl 1 ml, bylo přidáno 0,4 ml metanol-acetátového pufru. Do každé kyvety byl nepipetován 1 ml roztoku DPPH a po 24 h byla při vlnové délce 514 nm měřena absorbance reakční směsi. Celková antioxidační kapacita byla přepočtena na ekvivalentní množství troloxu (mmol.kg⁻¹). Nejvyšší antioxidační aktivita byla naměřena u semen quinoi, nejnižší u semen amarantu odrůdy Rawa. Naměřené hodnoty semen amarantu byly srovnatelné, či nižší, než údaje získané z měření různých odrůd pšenice. Vysokou antioxidační aktivitu vykazovaly klíčky amarantu a quinoi pěstované při denním světle, u klíčků pěstovaných za tmy bylo antioxidační působení výrazně nižší.

Touto studií bylo prokázáno, že tyto alternativní plodiny vykazují značnou antioxidační aktivitu a jejich použití ve stravě je významným zdrojem potravy s vysokou výživnou hodnotou [73].

4.5 Stanovení antioxidační aktivity pohanky

Pohanka je známá svým obsahem antioxidačních látek, vitaminů B₁, B₂, E a fenolických sloučenin jako je rutin, kvercetin aj. Kromě toho pohanková zrna vykazují vyšší antioxidační aktivitu než jiná obilná zrna (Zielinsky a Kozłowska, 2000). Mezi antioxidační sloučeniny zodpovědné za vysokou aktivitu v pohankových slupkách patří fenolické sloučeniny zahrnující flavonoidy, zatím co v pohankových kroupách jsou to katechininy. K určení antioxidační aktivity byla použita spektrofotometrická metoda DPPH. Rostlinným materiálem bylo několik kultivarů pohanky pocházejících z regionu Kyushu v Japonsku. Po rozemletí obilek bylo 0,6 g pohankové mouky extrahováno v 6 ml 80% etanolu. Extrakce probíhala v uzavřené zkumavce. Roztok byl zahřán na 80 °C a po 30 min inkubaci ochlazen a odstředěn po dobu 10 min. (3000 ot.min⁻¹). Reagent DPPH byl rozpuštěn v 99,9% etanolu na konečnou koncentraci 0,4 mmol.dm⁻³. Reakční směs se skládala z 0,3 ml 0,4 mmol.dm⁻³ DPPH, 0,3 ml 200 mmol.dm⁻³ pufru (pH=6), 0,3 ml 20% etanolu, 0,24 80% metanolu a 0,06 ml zředěného pohankového extraktu. Právě přidáním pohankového extraktu byla zahájena reakce, po 20 min byla měřena absorbance při vlnové délce 520 nm. Jako kontrolní směs byl připraven roztok troloxu rozpuštěním v 80% etanolu na konečnou koncentraci 0,2 mmol.dm⁻³. Radikálová činnost DPPH byla hodnocena poklesem absorbance a vyjádřena jako ekvivalentní množství troloxu na 1 ml vzorku, vypočtena z kalibrační křivky. Naměřená antiradikálová činnost se pohybovala od 0,497 do 1,233 μmol ekv. troloxu na 1 ml vzorku. Velmi vysoké hodnoty byly naměřeny u odrůd Phapal a Mitephapal pocházejících z Nepálu. Druhou skupinou s vysokým antioxidačním účinkem jsou druhy pocházející z Francie a Kanady. Uschimoko 9, pocházející z Číny ukázala nejnižší antioxidační aktivitu a to 0,497 μmol ekv. troloxu na 1 ml vzorku. Aktivita japonských odrůd se pohybovala v rozmezí 0,581 – 0,922 μmol ekv. troloxu.ml⁻¹ [74].



Obrázek 11 Loupaná semena pohanky seté (*Fagopyrum esculentum*) [75]

4.6 Stanovení antioxidační aktivity surového extraktu čiroku

Čirok (*Sorghum bicolor*) je důležitou potravinovou plodinou v mnoha částech světa. Tato alternativní plodina je bohatá na fytochemikálie jako jsou třísloviny fenolické kyseliny, antokyany a fytosteroly. Nedávné studie dokázaly antioxidační, antikarcinogenní účinky. Pohanka má taktéž blahodárny účinek na kardiovaskulární systém a podílí se na snižování cholesterolu. Všechny odrůdy čiroku pocházely ze zemědělského družstva v Kangwonu. 2 g jemně pomletého osiva z každé odrůdy čiroku byly 24 h extrahovány 100% metanolem při pokojové teplotě. Každý roztok byl potom zfiltrován pomocí Whatman filtračního papíru č. 42. Prostřednictvím rotační odparky při teplotě 40 °C byly použité extrakty odpařeny. Po suspendaci ve vodě byly surové extrakty rozděleny a smíchány s hexanem, etylacetátem, n-butanolem a vodou. Účinky rostlinných extraktů na radikálovou činnost DPPH byly studovány pomocí modifikované metody Shimada, Fujikawa, Yahara a Nakamura (1992). Roztok DPPH byl připraven zředěním 0,15 ml DPPH se 4 ml metanolu. 1 ml této směsi byl přidán k připravenému vzorku čiroku. Reakční směs byla protřepána a inkubována při pokojové teplotě. Po 30 min byla měřena absorbance výsledného roztoku při vlnové délce 517 nm proti blanku. Inhibiční procento bylo vypočteno dle následující rovnice [76].

$$\% \text{ inhibice} = [1 - (\text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{kontrol}}] * 100 \quad (4)$$

Naměřené hodnoty udává obrázek č. 12

Cultivars	RC ₅₀ ^b (μg/μl)	Cultivars	RC ₅₀ ^b (μg/μl)
Gumeunchalsusu	4.0 ± 0.0	Bitjarususu	23.3 ± 1.1
Ginjangmoksusu	6.6 ± 1.1	Susongsaengi	8.3 ± 0.5
Kkachisusu	129.0 ± 1.7	Sikyungsusu	6.0 ± 0.5
Kkachisusu(daerip)	60.6 ± 1.5	Ilbanchalsusu	6.6 ± 0.5
Kkomadansusu	6.3 ± 0.5	Jangmoksusu	8.6 ± 0.5
Neulsusu	8.0 ± 0.0	Jangsususu	4.6 ± 1.1
Mesusu	7.0 ± 0.0	Jaeraejongsusu	6.3 ± 0.5
Moktaksusu	5.6 ± 0.5	Joburangsusu	6.6 ± 1.1
Mongdangsusu	5.6 ± 0.5	Chalsusu(RDA)	6.0 ± 1.0
Bulkeunsaeksusu	5.6 ± 0.5	Chalsusu(2)	9.6 ± 0.5
Bulkeunjangmoksusu	9.0 ± 1.0	Heuinsusu	7.0 ± 0.0
Bulkeunjangsususu	5.3 ± 0.5	Heuinjangmoksusu	6.3 ± 0.5
Bulkeunchalsusu	6.0 ± 1.0		
α-tocopherol	12.0	BHT ^d	34.0
BHA ^c	14.0	Ascorbic acid	<2

Obrázek 12 Činnost DPPH radikálu ve vybraných odrůdách čiroku [76]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI PRÁCE

Cílem této diplomové práce je stanovení antioxidační aktivity netradičních druhů cereálií metodou DPPH za využití různých způsobů extrakce s metanolem. Analyzovanými vzorky budou pomletá zrna různých druhů pšenice a zrna barevných a nebarevných druhů rýže. Pomocí několika extrakčních činidel budou z těchto druhů netradičních obilovin připraveny extrakty. Extrakce bude probíhat 60 min v ultrazvuku, nebo 24 h ve tmě. Poté budou extrakty odstředěny a zfiltrány. Vzorky poté budou ponechány reagovat s pracovním roztokem DPPH a tato reakční směs bude po dobu 60 minut ponechána v temnu. Pomocí spektrofotometru Libra S6 bude měřena absorbance při vlnové délce 515 nm proti příslušnému použitému extrakčnímu činidlu. Cílem bude také zhodnotit jednotlivé extrakce.

6 METODIKA

6.1 Použité chemikálie

- DPPH (Sigma Aldrich, Německo)
- Metanol (Chrudim)
- Destilovaná voda, destilační aparatura
- HCl (37%, Lukeš, Uherský Brod)
- Carrez I + Carrez II (30% síran zinečnatý + 15% hexakvanoželeznatan draselný)
- Trolox (Sigma Aldrich, Německo)

6.2 Použité přístroje a laboratorní vybavení

Běžné laboratorní vybavení

- Analytické váhy (Adam, AFA-210 LC)
- Ultrazvuková lázeň
- Tmavé lékovky
- Erlenmayerovy baňky
- Kádinky, nálevky, odměrné baňky, pipety aj.
- Mikropipety (Biohit Proline 1 – 100 μ l, 100 – 1000 μ l)
- Odstředivka
- Spektrofotometr Libra S6 (Biochrom)



Obrázek 13 Analytické váhy AFA-210 LC



Obrázek 14 Mikropipeta 100 – 1000 μ l

6.3 Charakteristika analyzovaných vzorků

K analýze bylo použito celkem 15 vzorků, z toho 11 vzorků barevné a bezbarvé rýže a 4 vzorky pšenice (Kamut, bio červená, ozimá, špalda).

6.3.1 Pšenice ozimá

Pšenice ozimá – produkt kontrolovaného ekologického zemědělství. Balení obsahuje 1000 g. Energetická hodnota/ energie ve 100 g činí 1199 kJ/285 kcal. Obsah bílkovin: 12 g, obsah sacharidů: 57 g a obsah tuků: 1,9 g.



Obrázek 15 Balení pšenice ozimé bio



Obrázek 16 Zrna pšenice ozimé

6.3.2 Pšenice špalda

Tento analyzovaný vzorek je původem z České republiky. Balení obsahuje 1 kg špaldy. Nutriční obsah ve 100 g je 1480 kJ/352 kcal, 16 g bílkovin, 68 g sacharidů a 68 g tuku.



Obrázek 17 Balení pšenice špaldy



Obrázek 18 Zrna pšenice špaldy

6.3.3 Kamut

Obsah balení činil 500 g. Kalorická hodnota/energie na 100g je 1411kJ/337 kcal. Bílkoviny činí 14,2 g, sacharidy 70,4 g, tuky 2,2 g, vláknina 9,1 g.



Obrázek 19 Kamut zrno bio

6.3.4 Pšenice červená bio

Pšenice červená bio byla vypěstována na ekologické farmě na území jižní Moravy. Výrobce je společnost Bio nebio. Hmotnost v balení činí 300 g. Výživové informace jsou následující. Energie: 1385 kJ/331 kcal, bílkoviny: 10,4 g, sacharidy: 74,2 g, tuky: 1,6 g a vláknina: 12,5 g.



Obrázek 20 Zrna pšenice červené



Obrázek 21 Mletá zrna pšenice červené

6.3.5 Dlouhozrnná rýže Lagris

Jedná se o dlouhozrnná loupaná zrna rýže seté balena ve varných sáčcích. Nutriční hodnota ve 100 g vzorku činí 1496 kJ/357 kcal, 6,7 g bílkovin, 80,4 g sacharidů a 0,4 g tuku.



Obrázek 22 Balení dlouhozrnné rýže



Obrázek 23 Dlouhozrnná rýže ve varném sáčku

6.3.6 Rýže červená biolinie

Analyzovaný vzorek biolinie bio červené rýže je produktem ekologického zemědělství. Balení obsahuje 500 g rýže. Nutriční hodnoty nebyly na obale uvedeny.



Obrázek 24 Rýže červená Biolinie

6.3.7 Rýže červená natural

Rýže červená natural je balena do 500 g balení. Země původu této netradiční obiloviny je Řecko. Nutriční hodnoty na obalu nejsou udány.



Obrázek 25 Rýže červená Natural

6.3.8 Bio mléčná rýže kulatozrná loupaná

Původní zemí mléčné rýže je Itálie. Balení obsahuje 500 g rýže. Nutriční hodnota rýže ve 100 g činí 1397 kJ/334 kcal. Obsah živin ve 100 g: bílkoviny 6,7 g, sacharidy 80,4 g a tuky 0,4 g.



Obrázek 26 Zrna bio mléčné rýže

6.3.9 Grünkern

Grünkern je balen v 300 g balení, energetická hodnota činí 1382 kJ/329 kcal. Ve 100 g obiloviny je obsaženo 18,3 g bílkovin, 82,5 g sacharidů a 3 g tuku.



Obrázek 27 Grünkern

6.3.10 KhawDam

KhawDam, jedná se o černou neloupanou dlouhozrnnou rýži pocházející z Laosu. Rýže je balena do 500 g balení. Energetická hodnota ve 100 g je 1520 kJ/359 kcal. Bílkoviny v množství 9,0 g, sacharidy 75,0 g a tuky 2,5 g.



Obrázek 28 Celá zrna KhawDam



Obrázek 29 Pomletá zrna KhawDam

6.3.11 Jasmínová rýže hnědá

Jasmínová rýže hnědá je produktem společnosti El Puente. Pochází z Thajska a je balena v množství 500 g. Energetické hodnoty na obale nejsou uvedeny.



Obrázek 30 Jasmínová rýže hnědá

6.3.12 Jasmínová rýže červená

Analyzovaný vzorek je opět produktem společnosti El Puente. Taktéž jako jasmínová rýže hnědá pochází z Thajska a je balena v 500 g balení. Nutriční obsah na obale není udán.



Obrázek 31 Jasmínová rýže červená

6.3.13 Basmati natural

Basmati natural je rýže pocházející z Řecka. Je balena do 500 g balení. Nutriční hodnoty na obale nejsou uvedeny.



Obrázek 32 Balení rýže Basmati natural



Obrázek 33 Zrna rýže Basmati

6.3.14 Lila Reis

500 g balení této speciální rýže obsahuje 40 % bílé dlouhozrnné rýže, 40 % bílé rýže (lepkavá rýže Kainoy) a 20 % fialové rýže. Tato rýže je velmi zvláštní tím, že po uvaření zcela zčernalí. Nutriční obsah ve 100 g této rýže je 6,8 g bílkovin, 77,8 g sacharidů, 0,6 g tuku, 1461 kJ.



Obrázek 34 500g balení rýže Lila Reis



Obrázek 35 Celá zrna Lila Reis



Obrázek 36 Pomletá zrna Lila Reis

6.3.15 Rýže černá natural

Rýže černá natural pochází ze zemí EU. Je balena do 200 g balení. Více informací o této obilovině na obale není udáno.



Obrázek 37 Balení rýže černé natural



Obrázek 38 Zrna rýže černé

6.3.16 Příprava vzorků pro následnou extrakci

Všechny vzorky byly pomlety pomocí laboratorního mlýnku Waltner Biotech na hrubost jemné mouky. Namleté vzorky byly skladovány v polypropylenových nádobách, skladované při laboratorní teplotě nejdéle 14 dnů.

6.4 Optimalizace extrakčních postupů při metodě DPPH s použitím metanolu jako hlavního extrakčního činidla

Extrakce je separační metoda, při které přechází složky látky v kapalně či tuhé fázi do jiné kapalně fáze. Je vhodná pro izolaci tepelně nestálých látek, protože se může provádět jak za laboratorní teploty, tak za chladu. Obecně platí, že opakovaná extrakce několika menšími podíly rozpouštědla je účinnější než extrakce celým množstvím rozpouštědla. Extrakce z pevné fáze do kapaliny můžeme rozdělit na:

- maceraci
- digesci
- kontinuální extrakci v Soxhletově extraktoru

Macerace je nejjednodušší extrakce, při níž je tuhá fáze smísená s kapalným rozpouštědlem a následně zfiltrována. Digescce je macerace horkým rozpouštědlem.

6.4.1 Extrakční činidla

Jako extrakční činidlo byl použit metanol a testovaná extrakční směs obsahující metanol, HCl a vodu. Extrakční směs obsahující kyselinu chlorovodíkovou byla připravena následně. Do 100 ml odměrné baňky bylo napipetováno 18 ml destilované vody. V digestoři byly k destilované vodě přidány 2 ml HCl, potom byl po rysku dolit metanol. Po uzavření odměrné baňky byla směs promíchána. Jelikož tato koncentrace HCl analýze nevyhovovala, byla stejným způsobem připravena nová extrakční směs v poměru: 0,5 HCl + 19,5 destilovaná voda + 80 metanol.

Kyselina chlorovodíková způsobovala odbarvení pracovního roztoku DPPH. I přes přípravu několika extrakčních směsí, v níž byla tato kyselina v nižší koncentraci, bylo docíleno toho, že tato směs nebyla vhodná pro analýzu s použitím DPPH. Proto bylo dále pracováno se směsí s absencí této kyseliny, tudíž nová extrakční směs, která byla vyzkoušena, měla složení 80 dílů metanolu a 20 dílů destilované vody.

6.4.2 Testované způsoby extrakce

6.4.2.1 *Extrakce v ultrazvuku*

Do vytárované tmavé uzavíratelné lékovky bylo naváženo 5 g pomletého vzorku s přesností na 0,1 mg. Potom bylo ke vzorku napipetováno extrakční činidlo (metanol či metanolvá extrakční směs s vodou.). Pokud šlo o vzorky barevné, extrakčního činidla bylo napipetováno 25 ml, u bezbarvých vzorků 10 ml. Uzavřená lékovka se vzorkem byla vložena na 60 min do ultrazvukové lázně zahřáté na teplotu 40 °C. Jelikož ultrazvuk způsobuje pohyb molekul, které se navzájem o sebe třou a tím se uvolňuje teplo, je nutno pomocí teploměru udržovat stanovenou teplotu. Získané extrakty byly přelity do zkumavek a odstředěny pomocí odstředivky po dobu 10 – 20 minut při 6000 ot.min⁻¹. Po odstředění následovala filtrace. Jedná se opět o metodu dělení heterogenních směsí pevná fáze – kapalina. Roztok prochází filtrační přepážkou, která zachycuje částice pevné fáze, kapalná fáze prochází a nazývá se filtrát. K filtraci byl použit modrý filtrační papír Filtrapak.



Obrázek 39 Ultrazvuk PS04000A

6.4.2.2 24 h extrakce na třepačce

24 hodinová extrakce zahrnuje stejnou přípravu vzorku jako u extrakce v ultrazvukové lázni. Extrakce však probíhá v temnu. Do vytárované Erlenmayerovy baňky je naváženo s přesností na 4 desetinná místa 5 g pomletého vzorku, ke kterému je přidáno extrakční činidlo ve množství, jako je uvedeno v kapitole 6.4.2.1. Uzavřená Erlenmayerova baňka se vzorkem byla 24 hodin ponechána ve tmě. Po ukončení procesu extrakce byly získané extrakty přelity do zkumavek a odstředěny pomocí odstředivky po dobu 10 – 20 minut při 6000 ot.min^{-1} . Po odstředění následovala filtrace. Jedná se opět o metodu dělení heterogenních směsí pevná fáze – kapalina. Roztok prochází filtrační přepážkou, která zachycuje částice pevné fáze, kapalná fáze prochází a nazývá se filtrát. K filtraci byl použit modrý filtrační papír Filtrapak.



Obrázek 40 Odstředivka

6.5 Nastavení metodiky stanovení antioxidační aktivity s využitím DPPH v oblasti netradičních druhů cereálií

6.5.1 Příprava zásobního a pracovního roztoku DPPH

Do vytárované lodičky na analytických vahách navážíme 0,012 g krystalické látky DPPH s přesností na 0,1 mg a toto množství kvantitativně převedeme do 50 ml odměrné baňky. Odměrnou baňku dolijeme metanolem po rysku a uzavřeme zátkou. Pro dostatečné rozpuštění chemikálie DPPH umístíme odměrnou baňku zhruba na 10 minut do ultrazvukové lázně. Ultrazvuk způsobuje tření molekul o sebe a tím zahřívání roztoku, čímž dojde k dostatečnému rozpuštění DPPH. Zásobní roztok se zchladí pod tekoucí vodou nebo se nechá stát v temnu při laboratorní teplotě. Pokud zásobní roztok není použit k analýze, tak jelikož se jedná o relativně stabilní roztok, může být uchováván v mrazáku při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu i několika týdnů.

Pracovní roztok DPPH byl připraven tak, že do kádinky ze zásobního roztoku bylo napipetováno 10 ml zásobního roztoku DPPH, k němuž bylo přidáno 45 ml metanolu. Následně byla změřena absorbance tohoto roztoku při vlnové délce 515 nm proti metanolu jako blanku. Absorbance tohoto roztoku se pohybuje kolem 1 a je označována jako A_0 . Tato hodnota je nezbytná pro výpočet procentuálního úbytku absorbance.

6.5.2 Příprava reakční směsi

Z pracovního roztoku DPPH je následně do kádinek rozpipetováno po 8,55 ml. K tomuto množství pracovního roztoku DPPH je poté přidáno 450 μl extraktu vzorku, který byl získán postupem uvedeným v kapitolách 6.4.2.1 a 6.4.2.2. Každá kádinka byla označena názvem a číslem vzorku a dobou, kdy došlo ke smísení vzorku a pracovního roztoku. Reakční směs byla uložena do tmy a po 60 min byla měřena její absorbance (úbytek absorbance) při 515 nm. Získaná absorbance je označována jako A_1 . Od každého vzorku byly připraveny 2 – 4 reakční směsi, které byly třikrát proměřeny. Pokud se reakční směs začne po aplikaci vzorku odbarvovat, nebo k celkovému odbarvení dojde do 60 minut po uložení na temné místo, je nutno vzorek naředit a připravit novou reakční směs.

6.6 Příprava kalibrační křivky

Pro přípravu sestavení kalibrační křivky pro metodu DPPH byl jako standard použit trolox. Do 200 ml odměrné baňky bylo na analytických vahách naváženo 0,160 g troloxu, čímž byla získána koncentrace 800 mg.l^{-1} . Z toho zásobního roztoku byly do 10 ml odměrných baněk připraveny tyto koncentrace troloxu (20, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 140, 150, 160 mg.l^{-1}). Baňky byly po rysku doplněny metanolem.

Z každé odměrné baňky bylo odpipetováno 450 μl příslušné koncentrace z kalibrační křivky a smíšeno s 8,55 ml pracovního roztoku DPPH. Reakční smě byla ponechána v temnu a po 60 minutách byla proměřena absorbance při vlnové délce 515 nm proti metanolu. Absorbance každé odměrné baňky s požadovanou koncentrací troloxu byla měřena třikrát. Ze získaných hodnot absorbance byl udělán průměr a následně vypočítán procentuální úbytek absorbance dle vzorce:

$$\text{Úbytek absorbance (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] * 100 \quad (5)$$

kde:

A_0absorbance pracovního roztoku DPPH

A_1absorbance reakční směsi (pracovní roztok DPPH + připravená koncentrace troloxu)

Kalibrační křivka byla sestavena jako závislost úbytku absorbance (%) na koncentraci troloxu v mmol.dm^{-3} (mmol.l^{-1}).

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Výsledky extrakcí

Všechny vzorky byly nejprve extrahovány ve 25 ml extrakčního činidla. U nebarevných vzorků však absorbance přesahovala 1,0 tzn, že extrakt vzorku vykazoval tak velmi nízkou antioxidační aktivitu, že nebylo možno v tomto případě metodu použít. Bylo nutno vzorek zakoncentrovat, tudíž nebarevné vzorky byly extrahovány do 10 ml metanolu či 10 ml směsi metanol:voda (80:20). Např. u vzorku bílé dlouhozrné rýže průměrná absorbance dosahovala 1,123, a to z toho důvodu, že se jednalo o rýži s obroušenými obalovými vrstvami. Právě nejvyšší koncentraci antioxidačních látek najdeme v obalových vrstvách, jak uvádí autoři Ivanišová et al. (2012) [70]. Tedy pro nebarevné vzorky bylo pro extrakci zvoleno 10 ml extrakčního činidla. U vzorků pšenice špaldy a ozimé došlo při extrakci k nabobtnání a k počáteční imbibici škrobových zrn. Autor Velíšek definuje imbibici jako přijímání vlhkosti škrobových zrn. Škrobová zrna jsou ve vodě nerozpustná, při zahřevu však množství absorbované vody roste, aniž se poruší jejich integrita. Tento děj je právě nazýván jako imbibice škrobu [77]. V tomto případě bylo nutno zvýšit množství extrakčního činidla na 15 ml. U barevných vzorků bylo množství 25 ml extrakčního činidla dostačující, avšak i u některých došlo vlivem vysoké koncentrace antioxidantů k odbarvení reakční směsi. V tomto případě bylo nutno vzorek zředit, čili snížit koncentraci antioxidačních látek. Ředění v různých poměrech bylo provedeno několikrát. Bylo totiž nutné dosáhnout takového poměru vzorku a činidla, aby se reakční směs zcela neodbarvila a to do 60 minut. Na odbarvení reakční směsi se z velké míry podílela také antokyanová barviva, která vykazují vysoké antioxidační vlastnosti. Tyto látky způsobí redukci radikálu DPPH, což se projeví odbarvením fialového roztoku na žlutou. Absorbance takto odbarveného roztoku je pak neměřitelná. Vzhledem k tomu, že některé z látek vykazujících antioxidační vlastnosti jsou do jisté míry termolabilní, proto byl volen postup optimalizace extrakce s volbou vhodného objemu extrakčního činidla. Dále je možno zvolit zakoncentrování vzorku pomocí vakuové odparky, ovšem s přihlédnutím k bodu varu metanolu toto bylo zavrhnuto. Lépe by bylo možno využít metodu vakuového odpařování s následným chlazením.

Při extrakci reakční směsi obsahující HCl v poměru 2 (HCl) : 18 (destilovaná voda) : 80 (metanol) se reakční směs ihned odbarvila. Nepomohlo ani zředění vzorku. Proto byla připravena nová reakční směs stejného složení, ale v poměru 0,5:19,5:80. Snížením koncentrace HCl došlo opět k odbarvení reakční směsi. Tudiž bylo zjištěno, že HCl není vhodná pro tuto metodiku. Nová extrakční směs obsahovala pouze vodu a metanol v poměru 20:80. Kyselina chlorovodíková napomáhá lepšímu uvolnění vázaných antioxidantů v buněčných stěnách obalových vrstev, jak u ovoce, tak u obilovin. Příkladem je provedená extrakce 10 g čerstvého, homogenizovaného ovoce ve 40 ml extrakční směsi obsahující taktéž HCl, metanol a vodu v poměru 2:80:18 autorky Sengee, která se ve své dizertační práci zabývala stanovením biologických látek v ovoci [78].

U vzorků pšenice ozimé a špaldy byl extrakt směsí silně zakalen. Jelikož pšenice špalda a ozimá jsou bohaté na vysoké množství škrobu, lze předpokládat, že právě ten zákal způsobil. Vzorky byly nejprve zpracovány předepsaným způsobem, čili odstředěny, zfiltrány přes filtrační papír, ale i přesto zákal dále přetrvával. Po aplikaci vzorku do pracovního roztoku byla přes zákal reakční směs neměřitelná. Poté byl znovu připravený extrakt opět odstředěn, přefiltrován přes syring mikrofiltry a opět odstředěn a přefiltrován přes filtrační papír. I přes použití tohoto postupu se zákal nepodařilo odstranit. Další možností pro odstranění zákalu bylo použití Carrezových činidel. Získaný extrakt byl odstředěn a poté byly k němu přidány 3 kapky Carrez I., po 1 minutě 3 kapky Carrez II. Carrezova činidla se používají k vyčeření bílkovin, avšak s bílkovinami jsou strhávány i škroby, na které jsou tyto obiloviny bohaté. Po odstředění, filtraci bylo 450 µl vyčeřeného extraktu smíseno s 8,55 ml pracovního roztoku DPPH. Po smísení se však utvořila sraženina, která byla odstraněna odstředěním a tím byla získána čirá reakční směs, která byla uložena do tmy a po 60 minutách byla měřena absorbance.

7.2 Výsledky měření kalibrační přímky

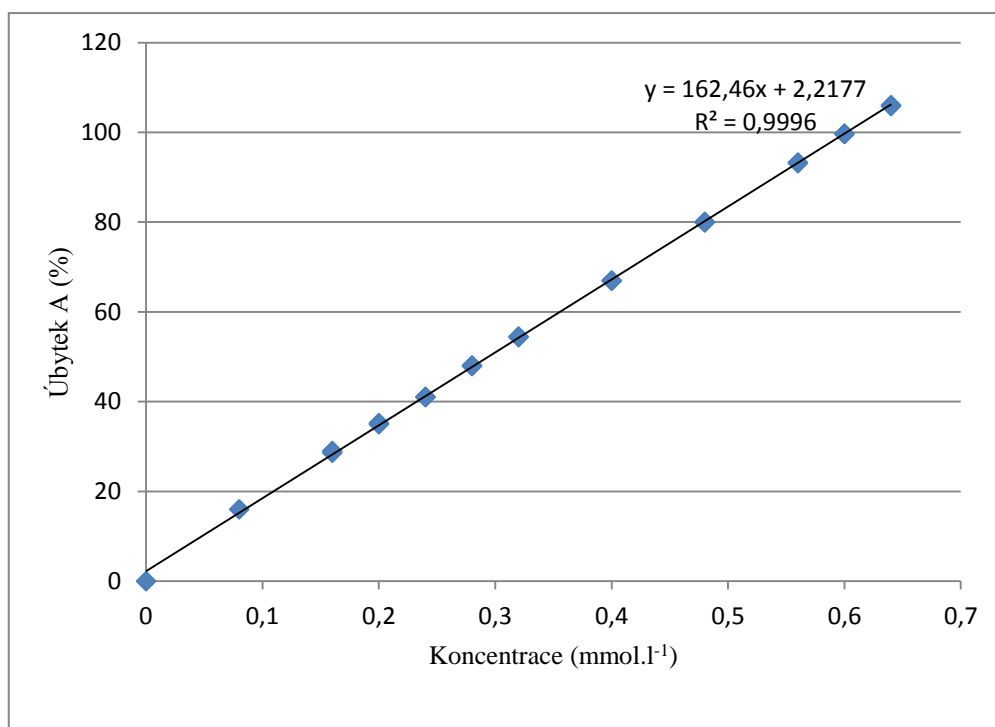
Z hodnot uvedených v kapitole 6.6 byla sestrojena kalibrační křivka. V našem případě hodnota spolehlivosti činila 0,9996. Získaná rovnice lineární regrese byla:

$$y = 162,46 x + 2,2177$$

Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost úbytku absorbance (%) na koncentraci troloxu (mmol.l^{-1})

Tabulka 1 Hodnoty pro sestavení kalibrační křivky

koncentrace mg.l⁻¹	koncentrace mmol.dm⁻³	A0	A1	A2	A3	průměr A	úbytek A [%]
0	0	0	0	0	0	0	0
20	0,08	1,158	1,156	1,157	1,154	1,156	16,00
40	0,16	1,158	1,010	1,011	1,008	1,010	28,61
40	0,16	1,158	1,009	1,007	0,999	1,005	29,01
50	0,20	1,158	0,935	0,933	0,931	0,933	35,23
50	0,20	1,158	0,939	0,938	0,931	0,936	34,97
60	0,24	1,158	0,864	0,865	0,867	0,865	41,07
60	0,24	1,158	0,869	0,868	0,861	0,866	41,02
70	0,28	1,158	0,789	0,787	0,782	0,786	47,92
70	0,28	1,158	0,783	0,786	0,784	0,784	48,07
80	0,32	1,158	0,710	0,711	0,713	0,711	54,37
80	0,32	1,158	0,709	0,710	0,710	0,710	54,52
100	0,40	1,158	0,563	0,567	0,566	0,565	66,98
100	0,40	1,158	0,567	0,567	0,563	0,566	66,95
120	0,48	1,158	0,411	0,411	0,419	0,414	80,08
120	0,48	1,158	0,416	0,415	0,415	0,415	79,93
140	0,56	1,158	0,262	0,263	0,262	0,262	93,15
140	0,56	1,158	0,261	0,261	0,260	0,261	93,29
150	0,60	1,158	0,189	0,184	0,188	0,187	99,65
150	0,60	1,158	0,183	0,189	0,187	0,186	99,71
160	0,64	1,158	0,112	0,114	0,112	0,113	106,07
160	0,64	1,158	0,117	0,114	0,114	0,115	105,87



Graf 1 Kalibrační křivka troloxu

7.3 Výsledky spektrofotometrického měření antioxidační aktivity metodou DPPH

Absorbance všech vzorků byla měřena pomocí spektrofotometru Libra S6. Každý vzorek byl proměřen ve trojím provedení. Taktéž byla proměřena absorbance pracovního roztoku. Z naměřených absorbancí u vzorku byl vypočten procentuální úbytek absorbance dle vzorce:

$$\text{Úbytek absorbance (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] * 100$$

Pro výpočet celkové antioxidační aktivity bylo nutno znát také navážku vzorku, množství extrakčního činidla v ml a popř. ředění. Příklad těchto hodnot udává tabulka 1. Výsledky průměrné celkové antioxidační aktivity jednotlivých extrakcí v $\mu\text{mol troloxu na g } (\mu\text{mol.g}^{-1})$ a směrodatná odchylka jsou uvedeny v tabulkách č. 2, 3, 4 a 5.

Tabulka 2 24 hodinová extrakce metanolem

VZOREK	Navážka (g)	Metanol (ml)	Úbytek A (%)	ředění	Antiox. aktivita ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	$\bar{\Delta}$ Antiox. aktivita ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	Směrodatná odchylka
Lagris dlouhozrná rýže	5,0021	10	38,72		0,449	0,46	0,01
	5,0089	10	40,42		0,469		
	5,0053	10	39,15		0,454		
Biolinie červená rýže	5,0056	25	69,38	1:9	20,53	20,87	0,27
	5,0050	25	71,14	1:9	21,191		
	5,0050	25	70,12	1:9	20,878		
Natural červená rýže	5,0010	25	65,02	1:4	9,662	9,58	0,06
	5,0033	25	64,41	1:4	9,564		
	5,0022	25	64,12	1:4	9,522		
Bio mléčná kulatozrná	5,0050	10	23,15		0,257	0,26	0,00
	5,0091	10	23,49		0,261		
	5,0075	10	23,20		0,258		
KhawDam černá rýže	5,0027	25	71,79	1:15	34,241	34,28	0,29
	5,0032	25	72,62	1:15	34,646		
	5,0035	25	71,19	1:15	33,940		
Hnědá jasmínová rýže	5,0052	10	55,19		0,651	0,65	0,00
	5,0049	10	55,60		0,657		
	5,0050	10	55,21		0,652		
Grünkern	5,0015	10	31,97	1:4	1,831	1,88	0,06
	5,0082	10	34,18	1:4	1,964		
	5,0017	10	32,12	1:4	1,839		
Lila Reis	5,0027	25	35,77	1:4	5,160	5,29	0,15
	5,0065	25	37,99	1:4	5,498		
	5,0052	25	36,12	1:4	5,212		
Basmati natural	5,0010	10	70,31		0,838	0,82	0,02
	5,0060	10	67,25		0,799		
	5,0023	10	68,12		0,812		
Červená jasmínová rýže	5,0036	25	82,04	1:14	36,824	36,58	0,21
	5,0016	25	80,89	1:14	36,308		
	5,0024	25	81,52	1:14	36,593		
Bio pšenice červená	5,0021	25	33,61		0,966	0,92	0,03
	5,0050	25	31,32		0,892		
	5,0042	25	31,85		0,911		
Kamut zrna bio	5,0006	10	37,89		0,439	0,44	0,00
	5,0063	10	37,97		0,439		
	5,0060	10	37,92		0,439		
Černá rýže Natural	5,0029	25	32,65	1:15	14,977	16,10	0,88
	5,0053	25	37,01	1:15	17,115		
	5,0041	25	35,18	1:15	16,218		
Pšenice špalda	5,0025	15	37,39		0,649	0,63	0,01
	5,0005	15	35,47		0,614		
	5,0012	15	35,93		0,622		
Pšenice ozimá	5,0066	15	51,66		0,912	0,91	0,00
	5,0068	15	51,66		0,912		
	5,0062	15	51,73		0,913		

24 hodinovou extrakcí metanolem vykazovala nejvyšší úbytek absorbance s průměrnou procentuální hodnotou 81,5 % červená jasmínová rýže, která obsahovala zároveň nejvyšší množství antioxidantů v hodnotě $36,58 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,21$. Vysoký úbytek absorbance a také množství antioxidantů vykazovala černá neloupaná rýže KhawDam. Zde úbytek absorbance činil 71,9 %, množství antioxidantů $34,28 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,29$. U těchto vzorků je předpokládána vysoká antioxidační aktivita a to z toho důvodu, že se jedná o vzorky barevné, tudíž k antioxidačnímu působení přispívají antokyanová barviva. Naopak nejnižší úbytek antioxidační aktivity byl zjištěn u vzorků bio mléčné kulatozrné rýže (23,3 %), u pšenice bio kamut (37,9 %) a u dlouhozrné rýže Lagris (39,4 %). Množství antioxidantů v těchto nebarevných vzorcích bylo následující: bio mléčná kulatozrná rýže $0,26 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,00$, kamut zrno bio $0,44 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,00$ a dlouhozrná rýže Lagris $0,46 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,01$. U vyjádření antioxidační aktivity se vždy jedná o μmol troloxu na 1 g obiloviny.

Tabulka 3 Hodinová extrakce metanolem v ultrazvuku

VZOREK	Navážka (g)	Metanol (ml)	Úbytek A (%)	ředění	Antiox. aktivita ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	$\bar{\Delta}$ Antiox. aktivita ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	Směrodatná odchylka
Lagris dlouhozrná rýže	5,0071	10	18,91		0,202	0,20	0,00
	5,0049	10	17,91		0,193		
	5,0051	10	18,63		0,202		
Biolinie červená rýže	5,0223	25	45,27	1:4	6,596	6,71	0,11
	5,0196	25	46,95	1:4	6,857		
	5,0187	25	45,83	1:4	6,686		
Natural červená rýže	5,0025	25	39,26	1:9	11,395	10,52	0,62
	5,0031	25	34,89	1:9	10,049		
	5,0030	25	35,12	1:9	10,120		
Bio mléčná kulatozrná	5,0036	10	63,42		0,629	0,63	0,00
	5,0032	10	53,00		0,625		
	5,0030	10	53,12		0,626		
KhawDam černá rýže	5,0000	25	73,38	1:14	32,852	31,21	1,25
	5,0006	25	66,82	1:14	29,820		
	5,0009	25	69,32	1:14	30,972		
Hnědá jasmínová rýže	5,0006	10	65,22		0,776	0,76	0,01
	5,0045	10	62,59		0,743		
	5,0021	10	63,18		0,750		
Grünkern	5,0025	10	36,43	1:4	2,105	2,11	0,01
	5,0047	10	36,85	1:4	2,129		
	5,0032	10	36,39	1:4	2,102		
Lila Reis	5,0050	25	83,56		2,501	2,53	0,03
	5,0002	25	85,97		2,578		
	5,0012	25	83,96		2,515		
Basmati natural	5,0000	10	63,54		0,755	0,78	0,02
	5,0032	10	67,92		0,808		
	5,0015	10	64,12		0,762		
Červená jasmínová rýže	5,0050	25	47,87	1:15	22,458	23,51	1,07
	5,0023	25	52,98	1:15	22,985		
	5,0032	25	49,12	1:15	23,081		
Bio pšenice červená	5,0055	25	43,75		1,277	1,22	0,04
	5,0075	25	40,33		1,174		
	5,0050	25	41,12		1,196		
Kamut zrno bio	5,0010	10	54,45		0,643	0,65	0,00
	5,0015	10	54,78		0,647		
	5,0011	10	54,62		0,645		
Černá rýže Natural	5,0058	25	39,13	1:15	18,156	18,81	0,59
	5,0036	25	42,01	1:15	19,581		
	5,0037	25	40,22	1:15	18,699		
Pšenice špalda	5,0004	15	37,98		0,660	0,66	0,01
	5,0032	15	38,81		0,675		
	5,0030	15	37,56		0,652		
Pšenice ozimá	5,0018	15	41,38		0,723	0,73	0,01
	5,0015	15	41,78		0,730		
	5,0011	15	52,14		0,737		

V případě hodinové extrakce za použití metanolu jako extrakčního činidla bylo nejvyšší množství antioxidantů naměřeno v rýži černé KhawDam v množství $31,21 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 1,25$. Následovala červená jasmínová rýže s obsahem antioxidantů $23,51 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 1,07$. Vysoký obsah byl také stanoven u rýže černé natural, zde obsah antioxidačně aktivních látek činil $18,81 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,59$. Nejnižší hodnoty byly naměřeny u kulatozrné rýže Lagris ($0,20 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,00$), a bio mléčné rýže ($0,63 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,00$). U vyjádření antioxidační aktivity se vždy jedná o μmol troloxu na 1 g obiloviny.

Tabulka 4 24 hodinová extrakce směsí metanol:voda

VZOREK	Navážka (g)	Metanol (ml)	Úbytek A (%)	ředění	Antiox. aktivita ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	$\bar{\Delta}$ Antiox. aktivita ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	Směrodatná odchylka
Lagris dlouhozrná rýže	5,0090	10	26,23		0,295	0,30	0,00
	5,0048	10	26,70		0,301		
	5,0051	10	26,26		0,296		
Biolinie červená rýže	5,0052	25	30,49	1:15	13,908	14,29	0,33
	5,0012	25	31,17	1:15	14,254		
	5,0031	25	32,11	1:15	14,711		
Natural červená rýže	5,0010	25	65,97	1:10	21,579	22,00	0,55
	5,0016	25	69,51	1:10	22,774		
	5,0021	25	66,15	1:10	21,635		
Bio mléčná kulatozrná	5,0013	10	20,98		0,231	0,24	0,01
	5,0047	10	22,45		0,249		
	5,0022	10	21,36		0,235		
KhawDam černá rýže	5,0038	25	43,14	1:15	20,136	19,93	0,16
	5,0053	25	42,35	1:15	19,741		
	5,0046	25	42,72	1:15	19,926		
Hnědá jasmínová rýže	5,0055	10	66,91		0,796	0,80	0,00
	5,0032	10	67,85		0,807		
	5,0039	10	67,12		0,798		
Grünkern	5,0050	10	22,68	1:4	1,258	1,31	0,04
	5,0032	10	34,35	1:4	1,361		
	5,0039	10	23,62	1:4	1,316		
Lila Reis	5,0029	25	42,14	1:4	6,140	6,30	0,16
	5,0005	25	44,54	1:4	6,512		
	5,0022	25	42,75	1:4	6,238		
Basmati natural	5,0039	10	77,94		0,931	0,91	0,02
	5,0060	10	74,51		0,889		
	5,0026	10	75,83		0,906		
Červená jasmínová rýže	5,0028	25	69,31	1:15	33,019	32,26	0,54
	5,0037	25	66,76	1:15	31,759		
	5,0030	25	67,27	1:15	32,014		
Bio pšenice červená	5,0022	25	30,56		0,872	0,90	0,03
	5,0074	25	32,72		0,937		
	5,0052	25	31,36		0,896		
Kamut zrna bio	5,0086	10	25,54		0,287	0,29	0,00
	5,0085	10	26,46		0,298		
	5,0081	10	25,93		0,291		
Černá rýže Natural	5,0017	25	42,87	1:15	20,012	20,35	0,41
	5,0034	25	44,75	1:15	20,929		
	5,0022	25	43,05	1:15	20,098		
Pšenice špalda	5,0031	15	23,01		0,384	0,37	0,01
	5,0026	15	21,86		0,363		
	5,0030	15	22,28		0,370		
Pšenice ozimá	5,0030	15	26,65		0,451	0,44	0,00
	5,0031	15	26,08		0,440		
	5,0028	15	26,17		0,442		

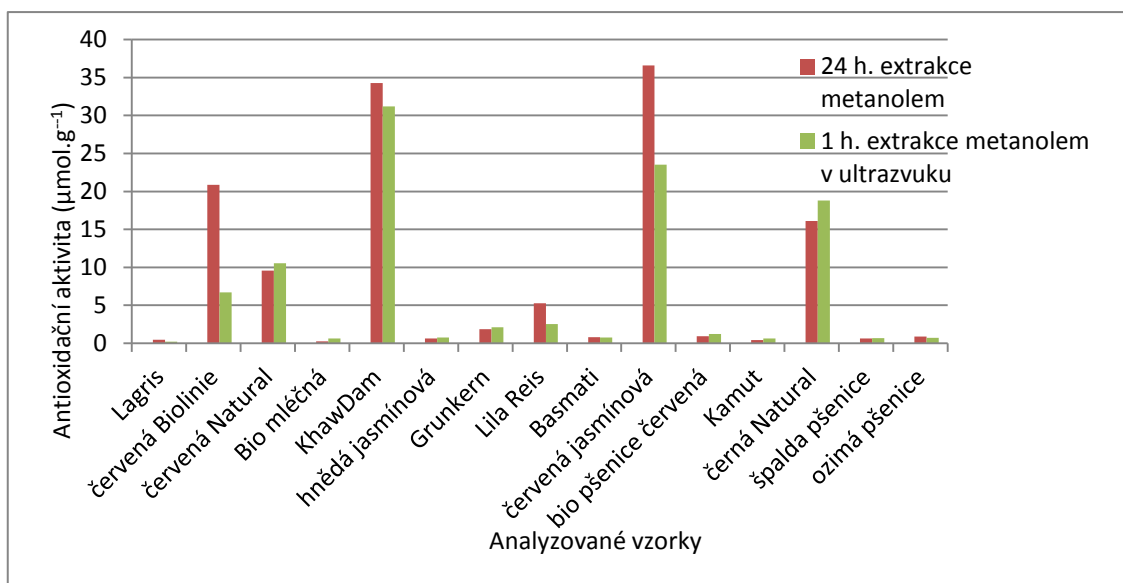
Analýzou obilných vzorků extrahovaných 24 hodin extrakční směsí metanol:voda byl nejvyšší obsah antioxidantů stanoven u červené jasmínové rýže ($32,26 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,54$), dále u červené rýže natural ($22,00 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,55$). Taktéž vysoké množství antioxidantů se pohybovalo v barevných vzorcích rýže černé KhawDam a rýže černé natural. Nejnižší obsah antioxidantů obsahovala bio mléčná rýže ($0,24 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,01$), kamut zrno bio ($0,29 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,00$), a rýže Lagris ($0,30 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,00$). U vyjádření antioxidační aktivity se vždy jedná o μmol troloxu na 1 g obiloviny.

Tabulka 5 Hodinová extrakce směsí metanol:voda v ultrazvuku

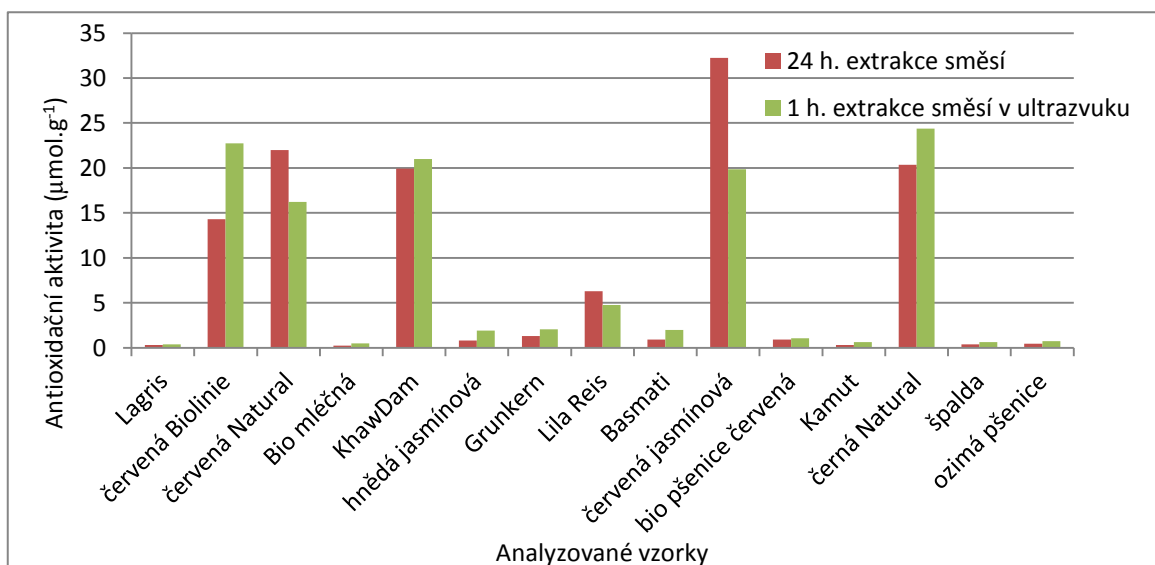
VZOREK	Navážka (g)	Metanol (ml)	Úbytek A (%)	ředění	Antiox. aktivita ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	$\bar{\Delta}$ Antiox. aktivita ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)	Směrodatná odchylka
Lagris dlouhozrná rýže	5,0059	10	33,41		0,384	0,38	0,00
	5,0030	10	32,48		0,372		
	5,0037	10	32,93		0,378		
Biolinie červená rýže	5,0026	25	49,31	1:15	23,178	22,74	0,44
	5,0048	25	47,22	1:15	22,139		
	5,0035	25	48,73	1:15	22,888		
Natural červená rýže	5,0069	25	49,77	1:10	16,076	16,21	0,16
	5,0086	25	50,85	1:10	16,436		
	5,0071	25	49,89	1:10	16,116		
Bio mléčná kulatozrná	5,0084	10	42,25		0,492	0,48	0,01
	5,0038	10	40,69		0,473		
	5,0042	10	41,93		0,489		
KhawDam černá rýže	5,0036	25	47,55	1:14	20,913	20,99	0,14
	5,0034	25	47,45	1:14	20,867		
	5,0030	25	48,12	1:14	21,178		
Hnědá jasmínová rýže	5,0013	10	34,03	1:4	1,958	1,92	0,04
	5,0025	10	32,56	1:4	1,867		
	5,0021	10	33,49	1:4	1,924		
Grünkern	5,0028	10	29,93	1:5	2,046	2,06	0,01
	5,0034	10	30,93	1:5	2,079		
	5,0030	10	30,15	1:5	2,062		
Lila Reis	5,0028	25	27,70	1:5	4,703	4,76	0,06
	5,0037	25	28,47	1:5	4,844		
	5,0030	25	27,93	1:5	4,745		
Basmati natural	5,0006	10	33,14	1:4	1,903	1,98	0,06
	5,0025	10	35,69	1:4	2,059		
	5,0010	10	34,12	1:4	1,963		
Červená jasmínová rýže	5,0015	25	41,08	1:15	19,131	19,87	0,54
	5,0023	25	43,63	1:15	20,383		
	5,0020	25	43,05	1:15	20,099		
Bio pšenice červená	5,0029	25	37,19		1,076	1,05	0,02
	5,0010	25	35,96		1,038		
	5,0015	25	36,23		1,046		
Kamut zrno bio	5,0030	10	51,33		0,604	0,61	0,00
	5,0031	10	52,24		0,615		
	5,0028	10	51,76		0,609		
Černá rýže Natural	5,0039	25	52,12	1:15	24,554	24,36	0,16
	5,0028	25	51,29	1:15	24,151		
	5,0032	25	51,73	1:15	24,366		
Pšenice špalda	5,0032	15	36,71		0,667	0,64	0,02
	5,0030	15	35,99		0,623		
	5,0037	15	36,11		0,625		
Pšenice ozimá	5,0028	15	40,74		0,711	0,72	0,00
	5,0027	15	41,26		0,720		
	5,0022	15	40,93		0,715		

Hodinovou extrakcí vzorků v ultrazvuku směsí metanol:voda, nejvyšší obsah antioxidantů vykazovala rýže černá natural ($24,36 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,16$), druhý nejvyšší obsah antioxidantů byl naměřen ve vzorku červené rýže biolinie, kde obsah antioxidační aktivity činil ($22,74 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,44$). Hodnota kolem $20 \mu\text{mol.g}^{-1}$ byla naměřena u černé rýže KhawDam a červené rýže jasmínové. Velmi nízké obsahy obsahovala opět dlouhozrná rýže Lagris ($0,38 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,00$) a bio mléčná kulatozrná rýže s hodnotou $0,48 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,01$).

Z výpočtů uvedených v tabulkách 2, 3, 4 a 5 vyplývá, že nejnižší antioxidační aktivitu ve všech případech extrakce vykazuje dlouhozrná rýže Lagris, jejíž antioxidační aktivita se pohybuje v rozmezí hodnot $0,20 - 0,46 \mu\text{mol.g}^{-1}$. Druhou nejnižší antioxidační aktivitu vykazovala bio mléčná rýže $0,24 - 0,63 \mu\text{mol.g}^{-1}$. Důvodem nízkého obsahu antioxidačních látek je absence obalových vrstev, které právě jsou na antioxidanty bohaté, jak uvádí autoři Ivanišová et al. (2012) [70]. Tyto rýže také neobsahují barviva, která přispívají k antioxidačnímu účinku. Nízké množství antioxidantů obsahovala také pšenice špalda ($0,37 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,01$), dále pšenice ozimá s hodnotami $0,44 \mu\text{mol.g}^{-1}$. Takto nízké hodnoty se vyskytovaly u tohoto vzorku v případě ultrazvukové extrakce směsí metanol:voda. Nejvyšší obsahy antioxidantů a tudíž i nejvyšší hodnoty antioxidantů byly naměřeny u barevných druhů rýže. K antioxidační aktivitě těchto vzorků z velké míry přispívá obsah antokyanových barviv. Je nutno zmínit, že při extrakci těchto vzorků ve 25 ml extrakčního činidla bylo nutno vzorek ještě naředit příslušným extrakčním činidlem, použitým při téže extrakci. Vysoké poměry ředění 1:15 bylo použito u vzorků např. biolinie červená rýže, KhawDam rýže černá, černá rýže natural a červená rýže jasmínová. U bezbarvých vzorků v převážných případech ředění nebylo nutné. Nejvyšší obsah antioxidantů byl obsažen ve vzorku červené jasmínové rýže při 24 hodinové extrakci metanolem. Obsah antioxidantů činil $36,58 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,21$. Při téže extrakci se vysoké hodnoty pohybovaly u černé rýže KhawDam ($34,28 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,29$) a u rýže červené biolinie ($20,87 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,27$). Černá rýže KhawDam je rýže neloupaná, čili obsahuje obalové vrstvy, takže se předpokládá, že tato rýže na množství antioxidantů bude bohatá. V případě ultrazvukové extrakce směsí se vysoké hodnoty antioxidantů pohybovaly u červené jasmínové rýže, množství antioxidantů zde činilo $32,26 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,54$, u červené rýže natural ($22,00 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,55$) a u rýže černé natural, kde obsah antioxidantů činil $20,35 \mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,41$.



Graf 2 Ukázkový sloupcový graf závislosti antioxidační aktivity na vzorku v případě 24 hodinové extrakce metanolem a hodinové extrakce metanolem v ultrazvuku



Graf 3 Ukázkový sloupcový graf závislosti antioxidační aktivity na vzorku v případě 24 hodinové extrakce směsí a hodinové extrakce směsí v ultrazvuku

Z grafu 2 vyplývá, že nejvyšší obsah antioxidantů byl získán 24 hodinovou extrakcí metanolem, naopak z grafu 3 byla nejvyšší výtěžnost antioxidantů získána hodinovou extrakcí směsí v ultrazvuku.

7.4 Porovnání výsledků a hodnoty antioxidační aktivity uvedené v odborných člancích

Výsledky naměřené v této diplomové práci byly obrazně porovnány s hodnotami, které uvádějí autoři jiných odborných článků. Např. procentuální úbytek absorbance etanolových extraktů různých druhů obilovin naměřený od autorů Ivanišová et al., (2012) u pšenice špaldy se pohyboval v rozmezí 14 – 22 % [70], mnou naměřený úbytek metanolového extraktu se pohyboval mezi 21,86 – 37,98 %. Vyšší procentuální úbytek mohl být způsoben rozdílným extrakčním činidlem. Úbytek absorbance u ječmene činil 20 – 26 %, u žita 13 – 15 %, u ovsa 14 – 16 % a u triticale 13 – 18 %. Vyšší aktivity extraktů byly naměřeny v otrubách. Autoři Lacko-Bartošová a Kobida (2013), kteří se zabývali stanovením obsahu polyfenolů a antioxidační aktivity u pšenice zimní naměřily úbytek absorbance u metanolového extraktu pšeničné mouky 23,26 %, u celozrnné mouky 49,57 % a u pšeničných otrub úbytek absorbance činil 76,47 % [71]. Procentuální úbytek metanolových extraktů pšenice špaldy, ozimé a bio červené naměřené v diplomové práci se pohyboval kolem 31,32 – 51,73 %. Ve článku El-Sayed et al (2008) je průměrná antioxidační aktivita u pšenice špaldy 3,03 – 3,17 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ [79]. Naměřené hodnoty této diplomové práce převyšují až desetinásobek těchto hodnot. Důvodem je různé zpracování a odrůdy vzorků. U autorů Ragaee et al. (2006), kteří se zabývali antioxidační aktivitou u vybraných obilovin, antioxidační aktivita u pšenice činila 4,13 – 4,33 $\mu\text{mol.g}^{-1}$, u ječmene 21,00 $\mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,83$, u prosa 28,83 $\mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,67$, u čiroku 12,17 $\mu\text{mol.g}^{-1} \pm 0,50$ a u žita 195,8 $\mu\text{mol.g}^{-1} \pm 8,82$. Je nutno zmínit že měření reakční směsi bylo provedeno po 10 minutách a jako standard byl použit BHT [80]. Procentuální úbytek absorbance hnědé rýže extrahované ve vodném roztoku metanolu (1:10), jak uvádí Butsat a Siriamornpun (2010), se pohybuje v rozmezí 37,5 – 68,0 % [81]. Výsledky diplomové práce u hnědé rýže, taktéž extrahované v extrakční směsi voda:metanol, se pohybovaly v rozmezí 32,56 – 67,85 %. Naměřené hodnoty u obou analýz jsou velmi podobné. Qiu et al. (2009) udává hodnoty antioxidační aktivity metanolových extraktů u různých druhů různě zpracované rýže. Obsah antioxidační aktivity u rýže bílé je 1,59 $\mu\text{mol.g}^{-1} \pm 4$, u rýže vařené 3,47 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ a směs 3 vzorků (rýže bílá, Basmati a divoká rýže) 3,18 $\mu\text{mol.g}^{-1} \pm 2$. Antioxidační aktivita je vztažena na ekvivalentní množství troloxu [82]. Pasko et. al (2009) vypracovali studii, která uvádí hodnoty netradičních cereálií u amarantu 4,42 mmol ekv. troloxu. $\text{kg}^{-1} \pm 0,5$, u quinoi 38,84 mmol ekv. troloxu. $\text{kg}^{-1} \pm 1,63$ [73].

Hodnoty naměřené v rámci diplomové práce a hodnoty uvedené v odborných člancích jsou z větší míry rozdílné. Rozdílnost spočívá v rozlišném zpracování a druhu vzorku, použití jiných činidel, a času, jak doby extrakce, tak doby působení reakční směsi. Dalším problémem při srovnávání antioxidační aktivity je kromě jiného srovnávacího standardu i jiná koncentrace použitých chemikálií DPPH, jiná koncentrace standardů, taktéž různé pracovní postupy, různá extrakční činidla a směsi extrakčních činidel. Dále je nutno přihlídnout k délce extrakce a době, po kdy byla reakční směs nechána reagovat se vzorkem a poté měřena absorbance. Dalším problematickým článkem je samotná interpretace antioxidační aktivity, tzn., uvádí se % úbytek absorbance, ekvivalent standardu v molech na danou hmotnost vzorku, či v mg na hmotnostní jednotku vzorku apod.

ZÁVĚR

V teoretické části diplomové práce jsme se setkali s charakteristikou obilovin, vymezení pojmů antioxidační aktivity a popisem metod sloužících ke stanovení antioxidační aktivity se zaměřením na metodu DPPH a zároveň jejím využitím.

Cílem této diplomové práce bylo stanovení antioxidační aktivity ve vzorcích rýže a netradičních druzích pšenice. K analýze byla použita metoda DPPH, která je založena na redukci radikálu DPPH• za vzniku DPPH-H. Z naměřených výsledků, uvedených v tabulkách nejvyšší antioxidační aktivitu vykazovaly vzorky barevné, přičemž nejvyšší obsah antioxidantů obsahoval metanolvý extrakt při 24 hodinové extrakci u červené rýže jasmínové. Obsah antioxidantů byl $36,58 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1} \pm 0,21$. Jako standard byl použit trolox. Vysoký obsah antioxidantů vykazovaly barevné vzorky včetně černé rýže KhawDam, černé rýže natural a červených vzorků rýže natural a biolinie. Všechny tyto vzorky byly extrahovány ve 25 ml metanolu či extrakční směsi metanol:voda. Z důvodu vysokých obsahů antioxidantů musely být ještě zředěny použitým extrakčním činidlem.

U nebarevných vzorků byl však problém opačný. Z důvodu velmi nízkých koncentrací byla extrakce provedena v 10 ml extrakčního činidla. Ředění těchto vzorků nutné nebylo. Nejnižší obsah vykazoval metanolvý extrakt ultrazvukem u dlouhozrné rýže Lagris. I přes to, že rýže byla extrahována v 10 ml extrakčního činidla, obsah antioxidantů činil pouze $0,20 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1} \pm 0,00$. Velmi nízký obsah antioxidační aktivity byl také naměřen u bio mléčné kulatozrné rýže a u kamutu. Množství antioxidantů těchto vzorků nepřesahovalo $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$.

Ze sloupcových grafů sestavených na základě závislosti antioxidační aktivity v $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ na druhu analyzovaného vzorku je viditelné, že nejvyšší výtěžek antioxidantů vykazovala 24 hodinová extrakce metanolem a hodinová extrakce směsí v ultrazvuku.

Významné množství antioxidantů bylo zjištěno nejen v cereáliích a výrobcích z nich, ale také v široké škále ovoce, zeleniny a jiných potravin. Antioxidanty se již v malých koncentracích podílí na ochraně lidského organismu proti procesu zvaným oxidace, zpomalují stárnutí buněk a příznivě se uplatňují na eliminaci krevního cukru, cholesterolu, srdečních onemocnění, rozvoje rakoviny aj. Tudíž vyšším příjmem těchto netradičních obilovin můžeme získat pestřejší stravu i s vyšším obsahem antioxidantů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HRABĚ, Jan, HOZA, Ignác, ROP, Otakar. *Technologie výroby potravin rostlinného původu, bakalářský stupeň*. 1 vydání, Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005. ISBN 80-7318-372-2.
- [2] KUČEROVÁ, Jindřiška, PELIKÁN, Miloš, HŘIVNA, Luděk. *Zpracování a zbožiznalství rostlinných produktů*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2007. ISBN 80-7375-088-0.
- [3] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin I*. Vydavatelství VŠCHT v Praze, 2002. ISBN 80-7080-509-9.
- [4] KOPÁČOVÁ, Olga. *Trendy ve zpracování cereálií s přihlédnutím zejména k celozrnným výrobkům*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2007. ISBN 978-80-7271-184-0
- [5] DORDEVIC, Tijana, Slavica ŠILER-MARINKOVIC a Suzana DIMITRIJEVIC-BRANKOVIC. Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudocereals. *Food Chemistry* [online]. 2010, 3 (119) [cit. 2013-01-10]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609009637>
- [6] McKEVITH, Brigid. Nutritional aspects of cereals. *Nutrition Bulletin* [online]. 2004, 29 (2) [cit. 2013-01-10]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1467-3010.2004.00418.x/abstract>
- [7] HU, Peisong et al. Starch digestibility and the estimated glycemic score of different types of rice differing in amylose contents. *Journal of Cereal Science* [online]. 2004, 40 (3) [cit. 2013-01-12]. ISSN 07335210. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521004000669>
- [8] *The Biology and Ecology of Rice (Oryza sativa L.) in Australia*, 2005, Australian Government, Department of Health and Ageing [online]. Office of the Gene Technology regulator [cit. 2013-01-14]. Dostupný z: [http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/rice-3/\\$FILE/biologyrice1.pdf](http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/rice-3/$FILE/biologyrice1.pdf)

- [9] PŘÍHODA, Josef, Pavel SKŘIVAN a Marie HRUŠKOVÁ. *Cereální chemie a technologie I: cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin*. 1. vydání. Praha: VŠCHT, 2004. ISBN 80-7080-530-7
- [10] Whole Grain Council, *What is a Whole Grain?* [online]. [cit. 2013-01-17]. Dostupné z: <http://wholegrainscouncil.org/whole-grains-101/what-is-a-whole-grain>
- [11] SHEN, Yun et al. Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight. *Journal of Cereal Science* [online]. 2009, 49 (1), (106-111) [cit. 2013-01-17]. ISSN 07335210 Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521008001331>
- [12] ŠRÁMKOVÁ, Zuzana, Edita GREGOROVÁ a Ernest ŠTURDÍK. Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. *Acta Chimica Slovaca* [online]. 2009, 2 (1) [cit. 2013-01-17]. ISSN 07335210 Dostupné z: http://acs.chtf.stuba.sk/papers/acs_0041.pdf
- [13] PAVLÁTOVÁ, Viktorie. *Stanovení obsahu aminokyselin ve vybraných druzích rýže*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická, Ústav biochemie a analýzy potravin, 2011.
- [14] JAMES, G. Martha, Kay DENYER a Alan M. MYERS. Starch synthesis in the cereal Endosperm. *Current Opinion in Plant Biology* [online]. 2003, 6 (3) (215 – 222) [cit. 2013-01-19]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526603000426>
- [15] DEVI, A.F. et al. Physical properties of cryomilled rice starch. *Journal of Cereal Science* [online]. 2009, 49 (2) [cit. 2013-02-03]. ISSN 07335210. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521008001938>
- [16] CHEN, Ming – Hsuan et al. Waxy gene haplotypes: Associations with pasting properties in an international rice germplasm collection. *Journal of Cereal Science* [online]. 2008, 48 (3) [cit. 2013-01-19]. ISSN 07335210 Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521008000945>
- [17] SASAKI, Tomoko et. al. Physicochemical characteristics of waxy rice starch influencing the in vitro digestibility of a starch gel. *Food Chemistry* [online]. 2009, 116 (1) [cit. 2013-01-18]. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609002106>

- [18] SKÝPALOVÁ, Jana. *Stanovení vybraných chemických parametrů rýže v průběhu skladování a její stravitelnost*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická, Ústav biochemie a analýzy potravin, 2010.
- [19] HOZA, Ignác a Daniela KRAMÁŘOVÁ. *Potravinářská biochemie II*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická, 2008. ISBN 978-80-7318-395-0
- [20] GHANEM, Michel Edmont et. al. Mucilage and polysaccharides in the halophyte plant species *Kosteletzkya virginica*: localization and composition in relation to salt stress. *Journal of Plant Physiology* [online]. 167 (5) [cit. 2013-02-05]. ISSN 01761617. Dostupné z:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0176161709004568>
- [21] FRŮHAUF, Pavel. *Vláknina v dětské výživě*. Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN, Ústav sociálního lékařství z veřejného zdravotnictví, Praha, 2007 Katedra pediatrie IPVZ.
- [22] VÍTEK, Libor. *Jak ovlivnit nadváhu a obezitu*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2008. ISBN 978-80-247-2247-2.
- [23] SHEWRY, R. Peter a Nigel G. HALFORD. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2002, 53 (370) [cit. 2013-02-05]. ISSN 00220957. Dostupné z:
<http://jxb.oxfordjournals.org/content/53/370/947.full>
- [24] XIA, Ning et al. Characterization and In Vitro digestibility of rice protein prepared by enzyme-assisted microfluidization: Comparison to alkaline extraction. *Journal of Cereal Science* [online]. 2012, 56 (2) [cit. 2013-02-09]. Dostupné z:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521012001257>
- [25] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 1*. 2. vydání. Tábor: OSSIS, 2002, ISBN 80-86659-00-3.
- [26] DONG, Yanjun et al. Genomic regions associated with the degree of red coloration in pericarp of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Cereal Science* [online]. 2008, 48 (2), [cit. 2013-02-15]. ISSN 07335210. Dostupné z:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521008000301>
- [27] VSCHT web, *Obiloviny (cereálie) a výrobky z nich* [online]. [cit. 2013-02-15]. Dostupné z: http://web.vscht.cz/koplikr/2_Cere%C3%A1lie.pdf

- [28] STRUNECKÁ, Anna a Jiří PATOČKA. *Kyselina fytová a naše zdraví*, 19. 11. 2006 [online]. [cit. 2013-02-17]. Dostupné z:
<http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=56>
- [29] VACULOVÁ, Kateřina et al. Variabilita obsahu kyseliny fytové v zrně ječmene. *Kvasný průmysl* [online]. 2012, 58 (4) [cit. 2013-02-22]. ISSN 0023-5830. Dostupné z: www.kvasnyprumysl.cz/download.php?clanek=272
- [30] Vzdělávací portál, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Chemie a analýza potravin, 2007 [online]. Dostupné z:
http://utbfiles.cepac.cz/moduly/M0028_chemie_a_analyza_potravin/metodika_II/M0028_chemie_a_analyza_potravin_metodika_ii.pdf
- [31] RAI, J. Heli et al. Antocyanins, Healthier lives through education in nutrition and preventive medicine [online]. 2009. Pennington Nutrition Series 1, [cit. 2013-02-23]. Dostupné z:
http://www.pbrc.edu/training-and-education/pdf/pns/pns_anthocyanins.pdf
- [32] SLAVIN, Joanne. Whole grains and human health. *Nutrition Research Reviews* [online]. 2004, 17 (3) (215 – 222) [cit. 2013-02-23]. Dostupné z:
http://journals.cambridge.org/download.php?file=%2FNRR%2FNRR17_01%2FS0954422404000095a.pdf&code=7b7aa23e59592f15533e435a6523a1b7
- [33] Eufic.org, *Význam celozrnných výrobků* [online]. 2002, [cit. 2013-02-25]. Dostupné z: <http://www.eufic.org/article/cs/nutrition/fibre/artid/celozrnnych-vyrobku/>
- [34] KANU, John Pilip et.al. Production and Evaluation of Breakfast Cereal-Based Porridge Mixed with Sesame and Pigeon Peas for Adults. *Pakistan Journal of Nutrition* [online]. 2009, 8 (9) [cit. 2013-02-25]. ISSN 1680-5194. Dostupné z:
<http://www.pjbs.org/pjnonline/fin1451.pdf>
- [35] GALLAGHER, E., T.R. GORMLEY a E.K. ARENDT. Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2004, 15 (3 – 4) [cit. 2013-02-27]. Dostupné z:
<http://d.yimg.com/kq/groups/2573105/2104386621/name/QUINUA%2520Formulation%2520gluten-free%2520cereal%2520products%5B1%5D.pdf>

- [36] ŠKRAMLÍKOVÁ, Jana. Opravdu víte, co jsou cereálie? [online]. 2011, [cit. 2013-02-27]. Dostupné z:
<http://skramlikova.wordpress.com/author/skramlikova/page/4/>
- [37] KOPŘIVA, Vladimír. *Antioxidační kapacita potravin*. Veterinární a farmaceutická univerzita Doplňkový studijní materiál [online]. Dostupné z:
<http://cit.vfu.cz/ivbp/wpcontent/uploads/2011/07/ANTIOXIDA%C4%8CN%C3%8D-KAPACITA-POTRAVIN.pdf>
- [38] PRAKASH, Aruna, Fred RIGELHOF a Eugene MILLER. Antioxidant Activity. *Medallion Laboratories* [online]. [cit. 2013-02-28]. Dostupné z:
http://www.medlabs.com/downloads/antiox_acti_.pdf
- [39] ABEROUMAND, Ali a S.S DEOKULE. Comparative study on polyphenol content in some food plants. *Asian Journal of Food and Agro-Industry* [online]. 2010, 3 (02) [cit. 2013-02-28]. ISSN 1906-3040.
- [40] PARKÁNYIOVÁ, Jana, Lucie PARKÁNYIOVÁ a Jan POKORNÝ. *Rostliny jako zdroje přírodních antioxidantů*. Praha: VŠCHT, Ústav chemie a analýzy potravin, FPBT [online]. 2003 [cit. 2013-02-28]. ISBN 80-7194-549-8.
- [41] TIVERON, P. Anna et al. Antioxidant Activity of Brazilian Vegetables and Its Relation with Phenolic Composition. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2012, 13 [cit. 2013-02-28]. ISSN 1422-0067.
- [42] SERPEN, Arda et al. Direct measurement of the total antioxidant capacity of cereal products. *Journal of Cereal Science* [online]. 2008, 48 (3) [cit. 2013-02-09]. ISSN 07335210. Dostupné z:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521008001008>
- [43] RÉBLOVÁ, Zuzana. Vliv vnějších faktorů na aktivitu antioxidantů. *Chemické listy* [online]. 2011, 105 [cit. 2013-03-03]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_09_667-673.pdf
- [44] STRATIL, Petr. Aditivní látky. Mendelu Brno [online]. [cit. 2013-03-03]. Dostupné z: http://share.centrax.cz/CPO-9-15_Aditivni_latky_str_409-460.pdf
- [45] BENEŠOVÁ, Karolína et al. Využití moderní separační techniky UPLC ke stanovení vitamínu E v zrně ječmene. *Chemické listy* [online]. 2012, 106 [cit. 2013-03-15]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_07_672-676.pdf

- [46] Analýza fenolických látek a flavonoidů metodou HPLC *Biochemie.cz* [online]. [cit. 2013-03-15]. Dostupné z:
http://biochemie.upol.cz/doc/skripta/emorr/18-21_EMORR_protokoly.pdf
- [47] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. 1. vydání. Tábor: OSSIS, 1999, ISBN 80-902391-5-3.
- [48] VALÁŠEK, Pavel a Otakar ROP. *Základní potravinářské suroviny pro konzervaci*. 1. vydání, Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007. ISBN 978-80-7318-589-3
- [49] Spektrofotometrické metody, Praha: VŠCHT, FPBT, Ústav konzervace potravin a technologie masa *VŠCHT.cz* [online]. [cit. 2013-03-19]. Dostupné z:
http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/navody/oborI/Spektrofotometrie.pdf
- [50] Stanovení antiradikálové aktivity metodou DPPH. *VŠCHT.cz*. [online]. [cit. 2013-03-19]. Dostupné z:
<http://web.vscht.cz/dolezala/LRMCHP/%C3%9Aloha%20%C4%8D.%206%20LabRM%20-%20DPPH.pdf>
- [51] FIDLER, Martin a Lenka KOLÁŘOVÁ. Analýza antioxidantů v chmelu a pivu. *Chemické listy* [online]. 2009, 103 [cit. 2013-03-23]. Dostupné z:
http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_03_232-235.pdf
- [52] LÄNGVIK, Otto. Radikaler och antioxidanter [online]. 2009, [cit. 2013-03-23]. Dostupné z: <http://www.skolresurs.fi/files/Antioxidanter.pdf>
- [53] MARXEN, Kai et al. Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of Some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements. *Sensors* [online]. 2007, 7 [cit. 2013-03-20]. ISSN 1424- 8220. Dostupné z: <http://www.mdpi.org/sensors/papers/s7102080.pdf>
- [54] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy* [online]. 2004, 98 [cit. 2013-03-29]. ISSN 0009-2770. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf
- [55] JEŽKOVÁ, Kateřina et al. Analýza kyseliny L-askorbové v nápojích s využitím techniky MEPS. *Chemické listy* [online]. 2010, 104 [cit. 2013-03-29]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_13_s17-s19.pdf

- [56] Trolox. Santa Cruz Biotechnology.com [online]. [cit. 2013-03-28]. Dostupné z: <http://www.scbt.com/datasheet-200810-trolox.html>
- [57] Trolox. Caymanchem [online]. [cit. 2013-03-28] Dostupné z: <https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/10011659>
- [58] DPPH, Sigma Aldrich. com [online]. [cit. 2013-03-28]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/43180?lang=en®ion=CZ>
- [59] BLOIS, M.S. Antioxidant determinants by the use of a stable free radical *Nature* [online]. 1958, 181 [cit. 2013-03-29].
- [60] IONITA, P. Is DPPH Stable Free Radical a Good Scavenger for Oxygen ActiveSpecies? *Chemical papers* [online]. 2003, 59 (1) [cit. 2013-03-29]. ISSN 1336-9075. Dostupné z: <http://xa.yimg.com/kq/groups/22272220/1597459521/name/591a11.pdf>
- [61] Klinika pracovního lékařství VFN a 1. LF UK, Odborné doporučení pro intoxikaci - metanol [online]. [cit. 2013-03-29]. Dostupné z: www.lkcr.cz/doc/clanky_file/jak-lecit-otravu-metanolem-99324.pdf
- [62] KOLOUCHOVÁ. Základní informace o destilátech, *VSCHT. cz* [online]. Dostupné z: http://www.vscht.cz/homepage/Aktuality_archiv/2012/vysvetleni_destilaty
- [63] Metanol. Merck millipore. com [online]. [cit. 2013-03-27]. Dostupné z: http://www.merckmillipore.com/czech-republic/chemicals/methanol/MDA_CHEM-822283/p_uuid
- [64] Metanol, Bezpečnostní list podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006. *Ekotez.cz* [online]. [cit. 2013-03-27]. Dostupné z: http://www.ekotez.cz/_data_app_downloads/Methanol.pdf
- [65] NINFALI, Paolino et al. Validation of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Parameter as a New Index of Quality and Stability of Virgin Olive Oil. *Journal the American Oil Chemists' Society* [online]. 2002, 79 (10) [cit. 2013-03-26]. Dostupné z: <http://lib3.dss.go.th/fulltext/Journal/J.AOCS/J.AOCS/2002/no.10/v.79n10p977-982.pdf>

- [66] Varšavská lékařská univerzita ve Varšavě, Ústav fyzikální chemie, Farmaceutická fakulta, Výzkum antioxidačního objemu produktu GANO Tea SOD fluorescenční metodou, test ORAC-FL [online]. Dostupné z:
<http://www.ganoexcel.cz/prilohyarchiv/365/ORAC%20-%20Gano%20Tea%20SOD.pdf>
- [67] DOBEŠ, J. et al. Stanovení antioxidační aktivity přírodních antioxidantů pomocí automatického robota a spektrofotometru, *Mendelu.cz* 2012 [online]. Dostupné z:
http://mnet.mendelu.cz/mendelnet2012/articles/39_dobes_669.pdf
- [68] SELECKÝ, Radoslav a Daniela ŠMOGROVIČOVÁ. Antioxidačná aktivita meziproduktov při výrobe piva. *Kvasný průmysl* [online]. 2006, 52 (7-8) [cit. 2013-03-26]. ISSN 0023-5830. Dostupné z:
<http://www.kvasnyprumysl.cz/download.php?clanek=214>
- [69] Interaction between antioxidants and free radicals, Instruction for the Laboratory of Biophysics, [online]. *Biofyzika politechnika Łódzka, pl* [cit. 2013-03-28]. Dostupné z: <http://biofyzika.p.lodz.pl/prezentacje/IFE1.pdf>
- [70] IVANIŠOVÁ, Eva, Miroslav ONDŘEJOVIČ a Stanislav ŠILHÁR. Antioxidant Activity of Milling Fractions of Selected Cereals. *Nova Biotechnologica et Chimica* [online]. 2012, 11 (1) [cit. 2013-03-26]. ISSN 1338-6905. Dostupné z:
http://www.nbcjournal.fpv.ucm.sk/archive/articles_in_press/Ivanisova%20et%20al%202012.pdf
- [71] LACKO-BARTOŠOVÁ, Magdaléna, Tomáš KOSÍK a Ľubmír KOBIDA. Free Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Winter Wheat in Sustainable Farming System. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science* [online]. 2013, 2 [cit. 2013-03-26]. Dostupné z: http://www.jmbfs.org/wp-content/uploads/2013/01/112_jmbs_lacko_bartosova1_fbp_f.pdf
- [72] CHAKUTON, K., D. PUANGPRONPITANG a M. NAKORNRIAB. Phytochemical Content and Antioxidant Activity of Colored and Non-colored Thai Rice Cultivars. *Asian journal of Plant Sciences* [online]. 2012, 11 (6) [cit. 2013-03-26]. ISSN 1682-1397. Dostupné z:
<http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/ajps/0000/48240-48240.pdf>

- [73] PÁSKO, Pawel et al. Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. *Food Chemistry* [online]. 2009, 115 [cit. 2013-03-26]. Dostupné z:
<http://www.bashanfoundation.org/shela/shelaanthocyanins.pdf>
- [74] MORISHITA, Toshikazu et al. Radical-scavenging activity in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) harvested in the Kyushu region of Japan. *Fagopyrum* [online]. 2002, 19 [cit. 2013-03-26]. Dostupné z:
[http://lnmcp.mf.uni-lj.si/Fago/Fagopyrum/Fagopyrum/Each/Fag\(19\)s/Fag\(19\)-89.pdf](http://lnmcp.mf.uni-lj.si/Fago/Fagopyrum/Fagopyrum/Each/Fag(19)s/Fag(19)-89.pdf)
- [75] Pohanka setá (*Fagopyrum esculentum* Moench.), VFU.cz [online]. Dostupné z:
<http://vfu-www.vfu.cz/vegetabilie/plodiny/czech/pohanka.htm>
- [76] KIL, Young Hyun et al. Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum Extract. *Food Chemistry* [online]. 2009, 115 [cit. 2013-03-26]. ISSN 03088146
Dostupné z:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609000764>
- [77] VELÍŠEK, Jan. Chemie potravin 1. 1. vydání. Tábor: OSSIS, 1999, ISBN80-902391-3-7.
- [78] SENGE, Zultsetseg. *Determination of Biological Substances in Fruits*. Doctoral Thesis, Zlín: Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická, 2010
- [79] EL-SAYED, M. Abdel-Aal, Iwona RABALSKI. Bioactive Compounds and their Antioxidant Capacity in Selected Primitive and Modern Wheat Species. *The Open Agriculture Journal* [online]. 2008, 2 [cit.2013-04-15]. ISSN 1874-3315-08.
Dostupné z:
<http://www.benthamsience.com/open/toasj/articles/V002/7TOASJ.pdf>
- [80] RAGAE, Sanaa, Abdel-Aal M. EL-SAYED and Maher NOAMAN. Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. *Food Chemistry* [online]. 2006, 98 [cit.2013-04-15]. Dostupné z:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605004632>
- [81] BUTSAT Sunan, Sirithon SIRIAMORNPNUN. Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran and endosperm of Thai rice. *Food Chemistry* [online]. 2010, 119 (2) [cit.2013-04-15]. Dostupné z:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609008759>

- [82] QIU, Yang et al. Antioxidant properties of commercial wild rice and analysis of soluble and insoluble phenolic acids. *Food Chemistry* [online]. 2010, 121 (1) [cit.2013-04-15]. Dostupné z:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881460901424>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABTS	(2,2-azinobis(3-etyl-2,3- dihydrobenzotiazol-6-sulfonát))
BHA	Butylhydroxyanizol
BHT	Butylhadroxytoluen
DMPD	(N,N-dimethyl-1,4-diaminobenzen)
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
EC	Effective Concentracion
FRAP	Ferric Reduction Ability of Plasma
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
TROLOX	6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboxylová kyselina

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Rýže setá [4].....	14
Obrázek 2 Struktura obilného zrna [1]	15
Obrázek 3 Struktura amyulózy [18].....	16
Obrázek 4 Struktura amylopektinu [18]	16
Obrázek 5 Proteiny obilovin a jejich složení (%) [25]	19
Obrázek 6 Obsah vitaminů ve vybraných cereáliích (mg.100 g ⁻¹) [4].....	20
Obrázek 7 Orientační hodnoty obsahu složek v neloupaném zrně různých obilovin[4].....	22
Obrázek 8 Cereálie, cereální [36]	23
Obrázek 9 Přírodní antioxidanty v obilovinách [44]	25
Obrázek 10 Výstražné symboly na obalu metanolu [64].....	32
Obrázek 11 Loupaná semena pohanky seté (<i>Fagopyrum esculentum</i>) [75].....	38
Obrázek 12 Činnost DPPH radikálu ve vybraných odrůdách čiroku [76].....	39
Obrázek 13 Analytické váhy AFA-210 LC	Obrázek 14 Mikropipeta 100 – 1000 µl.....
Obrázek 15 Balení pšenice ozimé bio	Obrázek 16 Zrna pšenice ozimé.....
Obrázek 17 Balení pšenice špaldy	Obrázek 18 Zrna pšenice špaldy
Obrázek 19 Kamut zrna bio.....	44
Obrázek 20 Zrna pšenice červené	Obrázek 21 Mletá zrna pšenice červené.....
Obrázek 22 Balení dlouhozrné rýže	Obrázek 23 Dlouhozrná rýže
ve varném sáčku	45
Obrázek 24 Rýže červená Biolinie	45
Obrázek 25 Rýže červená Natural	46
Obrázek 26 Zrna bio mléčné rýže.....	46
Obrázek 27 Grünkern.....	47
Obrázek 28 Celá zrna KhawDam	Obrázek 29 Pomletá zrna KhawDam
Obrázek 30 Jasmínová rýže hnědá.....	47
Obrázek 31 Jasmínová rýže červená.....	48
Obrázek 32 Balení rýže Basmati natural	48
Obrázek 33 Zrna rýže Basmati	48
Obrázek 34 500g balení rýže Lila Reis	49
Obrázek 35 Celá zrna Lila Reis	Obrázek 36 Pomletá zrna Lila Reis
Obrázek 37 Balení rýže černé natural	Obrázek 38 Zrna rýže černé
Obrázek 39 Ultrazvuk PS04000A.....	52

Obrázek 40 Odstředivka 52

.

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Hodnoty pro sestavení kalibrační křivky	57
---	----

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Kalibrační křivka troloxu	58
Graf 2 Ukázkový sloupcový graf závislosti antioxidační aktivity na vzorku v případě 24 hodinové extrakce metanolem a hodinové extrakce metanolem v ultrazvuku.....	67
Graf 3 Ukázkový sloupcový graf závislosti antioxidační aktivity na vzorku v případě 24 hodinové extrakce směsí a hodinové extrakce směsí v ultrazvuku	67