

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů



Glykemický index potravin a jeho stanovení

Bakalářská práce

Autor práce: Aneta Špiláčková

Vedoucí práce: doc. Ing. Lenka Kouřimská, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Glykemický index potravin a jeho stanovení" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13. 4. 2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Lence Kouřimské, Ph.D. za odborné vedení práce, její rady, ochotu a vstřícný přístup při jejím vytváření. Děkuji také všem, kteří nějakým způsobem přispěli ke zkvalitnění mé práce.

Glykemický index potravin a jeho stanovení

Souhrn

Cílem této práce bylo vypracovat literární rešerši na dané téma se zaměřením na analytické metody odhadu glykemického indexu potravin.

Tato bakalářská práce je rozdělena do tří hlavních kapitol. První kapitola popisuje obecnou charakteristiku glykemického indexu a faktory, které ovlivňují glykemický index potravin. V této kapitole je popsáno jaký vliv mají potraviny s nízkým a vysokým glykemickým indexem na zdraví a hladinu glykémie u člověka. Další část této kapitoly se zabývá celou řadou faktorů, které mohou ovlivnit absolutní množství glukózy v krvi do 2 hodin po jídle. V druhé kapitole je vysvětleno měření glykémie konvenční a kontinuální metodou. Poukazuje na výhody a omezení každé z těchto metod.

Třetí nejobsáhlejší kapitola se zabývá metodami stanovení glykemického indexu potravin. Tato kapitola je rozdělena na dvě části. První část popisuje klinické metody též nazývané metody *in vivo* a druhá část se zabývá analytickými metodami označovány jako *in vitro*. Klinická metoda vyžaduje měření hladiny krevní glykémie po požití testované potraviny u zdravých dobrovolníků. Díky této metodě můžeme spolehlivě stanovit glykemický index potravin, ale je limitována finanční i časovou náročností. Provádění těchto testů podléhá přísným pravidlům a schvalovacímu procesu etické komise.

Analytické metody jsou založeny na principu nasimulovaného lidského trávení. Při zjišťování glykemického indexu potravin pomocí *in vitro* lze použít metodiky indexu hydrolýzy. Výsledné hodnoty indexu hydrolýzy jsou pouhou předpovědí GI potravin. Další popsanou metodikou je měření rychle a pomalu dostupné glukózy a škrobu v potravinách. Je založena na měření glukózy uvolněné z testované potraviny během časové inkubace a standardizovaných podmínek pomocí HPLC. Poslední metoda zahrnuje štěpení potravin, následně HPLC analýzu cukrů a cukerných alkoholů. Údaje získané z HPLC analýzy jsou zpracovány pomocí umělé neuronové sítě ke zjištění předpovídané hodnoty GI potraviny.

V závěru práce jsou uvedeny výhody a nevýhody obou metod. Je porovnána spolehlivost, pracnost a nákladovost analytických metod s metodami klinického stanovení.

Klíčová slova: glykemický index, stanovení, glykémie, *in vivo*, *in vitro*

Glycaemic index of food and its determination

Summary

The purpose of this thesis was to elaborate a literature recherche on a given theme with focus on analytical methods to estimate the glycaemic index of food.

This bachelor thesis is divided into three main chapters. First chapter describes general characteristics of glycaemic index of foods and influencing factors. In this chapter states the influence of high and low glycaemic index foods on health, wellbeing and glycaemia in humans. Subsequent part of this chapter is dealing with many other factors that influence the absolute amount of glucose in blood in 2 hour interval after meal.

Chapter two initiates into conventional and continual methods of glycaemia measurement. It highlights the advantages and limitations of each of these methods.

Third, the most extensive chapter is dealing with methods of glycaemic index assessment. This chapter is broken down into two parts. First part specifies clinical methods that are also called *in vivo*, and the second part is focusing on *in vitro* methods. Clinical methods require blood glycaemia measurement in healthy volunteers after consuming a test meal. With this method we are able to reliably state the glycaemic index of certain foods. The limiting factor of this method is that it is rather time-consuming and it requires higher financial means. These measurements take place under a strict control, according to guidelines and only with the approval of ethical committee.

Analytical methods are based on simulation of human digestion. *In vitro* methods use hydrolysis index to obtain the glycaemic index. The final values are only an assessment of glycaemic index of given food. Other method that is described is measurement of fast and slowly available glucose and starch in given test foods. It is based on measurement of released glucose from the test food with HPLC method, time incubation and standardized conditions. Last method includes partitioning of a test food, and subsequent HPLC analysis of carbohydrates and sugar alcohols. The HPLC results are processed in artificial neural network to reveal glycaemic index values.

The advantages and disadvantages of each mentioned method are stated in conclusion of this work. I compared and contrasted reliability, elaborateness, budget demands of analytical methods with clinical assessment methods.

Keywords: glycemic index, determination, glycaemia, *in vivo*, *in vitro*

Obsah

1 Úvod	2
2 Cíl práce	3
3 Definice.....	4
3.1 Glykemická zátěž	4
3.2 Rozdělení potravin podle glykemického indexu	6
3.3 Potraviny s nízkým glykemickým indexem.....	6
3.4 Potraviny s vysokým glykemickým indexem	6
3.5 Faktory ovlivňující glykemický index potravin	7
3.5.1 Metody vaření	7
3.5.2 Způsob zpracování.....	8
3.5.3. Druh škrobu.....	8
3.5.4. Vláknina	8
3.5.5. Sacharidy.....	8
3.5.6. Tuk.....	9
3.5.7. Kyseliny	9
4 Měření glykémie	10
4.1 Konvenční metody.....	10
4.2 Kontinuální měření glykémie	10
5 Metody stanovení.....	12
5.1 Měření in vivo	12
5.1.1 Enzymaticky.....	12
5.1.1.1 Mezilaboratorní studie	15
5.1.1.2 Testování analýzy odezvy sacharidů	16
5.1.1.3 Zjišťování rychle dostupné glukózy	19
5.1.2 Pomocí kontinuálního monitorování hladiny glukózy	22
5.2 In vitro studie	25
5.2.1 Metodika indexu hydrolýzy	25
5.2.2 <i>In vitro</i> měření rychle dostupné glukózy v potravinách	28
5.2.3 <i>In vitro</i> metoda s použitím umělé neuronové sítě	31
6 Závěr	35
7 Seznam použité literatury.....	37
8 Seznam použitých zkratk.....	41

1 Úvod

V poslední době trápí lidstvo civilizační choroby, na jejichž vzniku se podílí především moderní životní styl. Mezi příčiny vzniku patří např. stres, kouření, nedostatek pohybu, nedostatečná konzumace zeleniny a ovoce, příjem kaloricky bohatých jídel, přezlazení či přesolování. Doporučení snížit příjem tuků a nahradit je zejména sacharidy není příliš vhodné, protože za vznik obezity a kardiovaskulárních nemocí nesou odpovědnost také sacharidy. Nevhodné složení a množství sacharidů zvyšují hladinu krevního cukru. Čím více po jídle stoupne glykémie, tím více se musí vyplavit inzulínu a tím je větší tendence k ukládání tuku v organismu. Je důležité znát glykemický index potravin, protože vhodná strava může působit jako účinná prevence. Glykemický index by neměl být používán jako jediné kritérium pro výběr zdravých potravin, protože je do značné míry modulován dalšími faktory. Mezi tyto faktory lze zařadit lidské emoce, předchozí jídlo a další složky ve smíšeném jídle a mohou významně ovlivnit aktuální reakci na koncentraci krevní glukózy u jedince.

Glykemický index je číselný údaj, který vyjadřuje hodnocení glykemické odpovědi na požití potravin obsahující 50 g sacharidů. Vypočítává se jako poměr hodnoty glykémie za 2 hodiny po příjmu dané potravin a hladiny krevního cukru po požití ekvivalentního množství referenční potravin, kterou je glukóza. Potravin s nízkým GI prodlužují pocit sytosti, nedochází k velkým výkyvům hladiny glykémie jako u potravin s vysokým GI.

V této práci jsou popsány metody, které se používají při zjišťování glykemického indexu potravin a to za použití zejména analytických a klinických metod. Je porovnávána pracnost a spolehlivost instrumentálních metod odhadu glykemického indexu potravin s metodami klinického stanovení glykemického indexu na základě měření krevní glykémie

2 Cíl práce

Glykemický index potravin je jedním z nutričních faktorů získávající stále vyšší zájem u spotřebitelů i lékařů. Jeho vlastní stanovení je náročné, proto jsou hledány jiné analytické možnosti jeho odhadu bez potřeby stanovení glykemické odezvy potravin.

Hypotéza: Stanovení glykemického indexu potravin na základě určení hladiny krevní glykémie po konzumaci potravin lze nahradit metodami analýzy dané potravin. Cílem práce bylo zpracovat literární rešerši se zaměřením na analytické metody odhadu glykemického indexu potravin.

3 Definice

Glykemický index (GI) je klasifikován potenciálem zvýšení krevní glukózy po konzumaci potravy obsahující sacharidy. Je definován jako plocha pod vzestupnou částí křivky odezvy krevní glukózy po konzumaci 50 g dostupných sacharidů testované potravy vyjádřená jako procento odezvy na stejné množství sacharidů z referenční potravy, požití stejnou osobou (Chlup et al., 2008). Podle glykemického indexu jsou potraviny seřazeny na stupnici, pořadí na této stupnici závisí na tom, v jakém rozsahu sacharidy obsažené v dané potravine zvýšily hladinu cukru v krvi. Referenční potravina má hodnotu GI 100, se kterou jsou ostatní potraviny srovnávány. Jako referenční potravina je používána glukóza (Miller, 2002; Brand-Miller et al., 2003). Hodnoty GI různých potravin jsou znázorněny v tabulce č. 1.

Glykemický index specifických jídel či potravin je určen především povahou spotřebovaných sacharidů a dalšími faktory stravy, které mají vliv na stravitelnost živin nebo sekreci inzulínu.

Potraviny obsahující sacharidy, které jsou rychle stravitelné, mají vysoký glykemický index, protože odezva hladiny krevní glukózy je rychlá a vysoká. Naopak pomalu stravitelné sacharidy mají nízký glykemický index a glukóza je uvolňována do krevního řečiště postupně. Obecně platí, že většina potravin bohatých na rafinované sacharidy má vysokou hodnotu GI, zatímco neškrobová jídla jako je zelenina, ovoce a luštěniny, má sklon k nízkému glykemickému indexu.

3.1 Glykemická zátěž

V roce 1997 byla představena glykemická nálož (GL) výzkumníky Harvardské univerzity k hodnocení celkové glykemického efektu v porci potravy. GL udává množství dostupných sacharidů v porci potravy. Čím vyšší je GL, tím větší je očekávaná hodnota hladiny glukózy v krvi. Dlouhodobá konzumace stravy s relativně vysokou glykemickou náloží je spojena se zvýšeným rizikem diabetu 2. typu a s ischemickou chorobou srdeční. Hodnoty GL jsou vypočteny pro většinu z potravin, podle následujícího vzorce:

Glykemická nálož = GI x obsah stravitelných sacharidů v jedné porci [g] : 100

Potraviny s podobným GI se mohou navzájem výrazně lišit obsahem sacharidů, což se odrazí na hodnotě glykemické nálože. Potraviny s nízkou glykemickou náloží mají vždy nízký

glykemický index, ale ty potraviny, které mají GI střední nebo vysoký mohou mít hodnoty glykemické zátěže nízké, ale i vysoké. Např. mrkev má vysoký GI, ale nízkou GL, na rozdíl od brambor, které mají obě hodnoty vysoké (Foster-Powell et al., 2002; Ludwig, 2002).

Tabulka č. 1 Tabulka hodnot glykemického indexu a glykemické nálože vybraných potravin

Potravina	Glykemický index (průměr ± SE) [%]	Velikost porce	Množství stravitelných sacharidů v porci [g]	Glykemická zátěž
ananas	59 ± 8	120 g	13	8
banán	52 ± 4	120 g	24	12
jablko	38 ± 2	120 g	15	6
mrkev	47 ± 16	80 g	6	3
čočka	29 ± 1	150 g	18	5
rýže bílá	56 ± 7	150 g	43	24
dlouhozrnná				
rýže hnědá	55 ± 7	150 g	33	18
bílý chléb	70 ± 0	30 g	14	10
žitný chléb	58 ± 6	30 g	14	8
brambory bílé	50 ± 9		28	14
vařené		150 g		
špagety bílé	38 ± 3	180 g	48	18
mléko plno tučné	27 ± 4	250 ml	12	3
tyčinka Mars	65 ± 3	60 g	40	26
mléčná čokoláda	43 ± 3	50 g	31	13
Bebe sušenky				
Dobré ráno	51 ± 9	50 g	33	19
čokoládové				

Zdroj: Foster-Powell et al., 2002

3.2 Rozdělení potravin podle glykemického indexu

Hodnoty GI jsou rozděleny do tří kategorií:

- Nízký glykemický index - GI = 0 – 55
- Střední glykemický index - GI = 56 – 69
- Vysoký glykemický index - GI > 70 (Pi-Sunyer, 2002)

3.3 Potraviny s nízkým glykemickým indexem

V roce 1997 Světová zdravotnická organizace (WHO) a Organizace pro potraviny a zemědělství (FAO) vydala doporučení, aby lidé v průmyslových zemích založili svůj způsob stravování na potravinách s nízkým glykemickým indexem, aby se tak zabránilo nejčastěji vyskytovaným civilizačním chorobám, jako je ischemická choroba srdeční, diabetes a obezita (Foster-Powell et al., 2002).

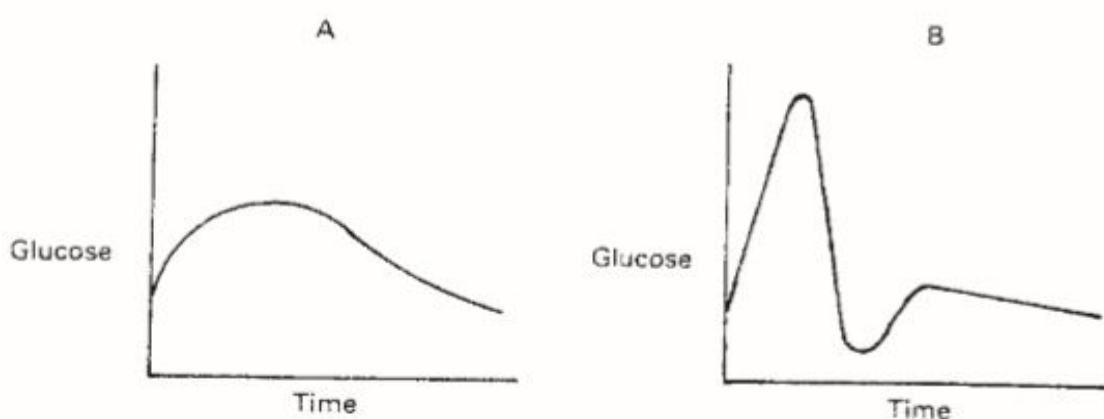
Studie Santose et al. (2015) ukázaly, že příjem jídel s nízkým glykemickým indexem udržuje hladinu glukózy v krvi bez velkých výkyvů, zlepšuje lipidový profil a koncentraci lipoproteinů. Na obrázku č. 1 je znázorněn vzrůst krevní glykémie jak po jídle s nízkým GI, tak po jídle s vysokým glykemickým indexem. Pomalu stravitelné sacharidy jsou obecně považovány za vhodné při dietě spojené s léčbou metabolických poruch, včetně diabetu a hyperlipidémie. Ovládnutí postprandiální glykémie je důležitým cílem v udržování zdraví a prevenci nemocí. Z tohoto důvodu roste zájem o prosazování stravy, nejen se zaměřením na absolutní množství energie nebo živin, ale také stravy, která bere v potaz postprandiální glykemickou odpověď (Santos et al., 2015). Obecně platí, že pro všechny lidi je konzumace potravin s nízkým GI prevencí civilizačních onemocnění, a tyto potraviny snižují hladinu inzulínu a inzulínovou rezistenci (Leeds, 2002).

3.4 Potraviny s vysokým glykemickým indexem

Vysoký glykemický index a glykemická zátěž, jsou spojovány se zvýšeným rizikem chronických onemocnění. Příjem jídel s vysokým glykemickým indexem může zvýšit postprandiální hladinu glukózy v krvi, což vede k vysoké poptávce po inzulínu (Santos et al., 2015). Koncentrace krevní glukózy je pevně regulována homeostatickým regulačním systémem. Hyperglykémie stimuluje sekreci inzulínu, podporuje vychytávání glukózy ze svalové a tukové tkáně. Hypoglykémie vyvolává sekreci glukagonu, adrenalinu, kortizolu a růstových hormonů, konkrétně těch hormonů, které jsou antagonisté inzulínových dějů

a obnovují glykémii. Po konzumaci jídel s vysokým GI dochází k rychlému vstřebávání glukózy a také ke klesání koncentrace krevní glykémie, často až do hypoglykemického rozmezí, v důsledku vysoké hladiny inzulínu a nízké hladiny glukagonu. Dlouhodobě konzumovaná strava s vysokým glykemickým indexem, která je obvykle také strava s vysokým obsahem energie, může zvýšit riziko rozvoje obezity, diabetu II. typu a ischemické choroby srdeční (Ludwig, 2002).

Obrázek č. 1 Hypotetický účinek stravy s nízkým (A) nebo vysokým (B) glykemickým indexem na postprandiální hladinu glukózy v krvi



Zdroj: Jenkins, 2002

3.5 Faktory ovlivňující glykemický index potravin

Existuje celá řada faktorů, které mohou mít vliv na absolutní množství glukózy v krvi (v průběhu zkušebního období) do 2 hodin po jídle. Mezi ně patří rychlost vyprazdňování žaludku a velikost odezvy inzulínu, stupeň žvýkání, koncentrace amylózy ve střevě a přítomnost dalších složek potravy (Englyst, 1996).

3.5.1 Metody vaření

Teplota, množství vody a doba vaření ovlivňují glykemický index potravin. Během vaření, působením vody a vysokých teplot se rozšíří škrobová zrna a to v různé míře. Potraviny obsahující škrob tak nabobtnají, pečené brambory jsou snadněji stravitelné a mají vyšší glykemický index než potraviny, u kterých dochází méně často k želatinizaci škrobových zrn, jako jsou ovesné vločky, hnědá rýže a špagety vařené „al dente“.

Například glykemický index pečených brambor je 85 a hnědé rýže je 50 (Willet, 2001; Brand-Miller et al., 2003).

3.5.2 Způsob zpracování

Broušení, válcování a frézování škrobových zrn zmenšuje velikost částic a usnadňuje vstřebávání vody a zahajuje funkci trávicích enzymů. Zpracováním může dojít k odstranění vnější vláknité vrstvy zrna, která zpomaluje působení enzymů na vnitřní škrob. Obecně jemně frézované mouky mají vysoký GI, zatímco mouky hrubé mají větší velikost částic, ale nižší glykemický index (Willet, 2001; Brand-Miller et al., 2003).

3.5.3. Druh škrobu

V potravinách se nachází škrob, který je tvořen dvěma molekulami - amylosem a amylopektem. Tyto molekuly svým poměrem ovlivňují rychlost absorpce tráveniny a také glykemický index. Amylose má nevětvenou strukturu, a proto jsou hůře stravitelná. Naopak amylopektin tvoří rozvětvené molekuly, které obsahují několik tisíc glukózových jednotek, lépe se štěpí a tudíž i tráví. A proto platí, že čím vyšší je poměr amylose k amylopektinu, tím pomalejší je trávení potravin a nižší GI (Singh et al., 2010).

Luštěniny a basmati rýže mají vyšší poměr amylose k amylopektinu, a mají tak nižší GI než potraviny s vyšším obsahem amylopektinu. Například glykemický index rýže basmati je 58, ale instantní rýže má GI = 87 (Brand-Miller et al., 2003).

3.5.4. Vlákna

Vliv vlákniny na hodnotu glykemického indexu není zcela objasněn (Pi-Sunyer, 2002). Někteří vědci Brand-Miller et al. (2003) se domnívají, že rozpustná vlákna, která zahušťuje směs potravy v trávicím traktu, zpomaluje průchod tráveniny zažívacím traktem a umožňuje pozvolné vstřebávání sacharidů. To má za následek nižší reakci krevní glukózy a nižší GI. Luštěniny a celozrnné výrobky obsahují rozpustnou vlákninu a mají nízký glykemický index (Brand-Miller et al., 2003).

3.5.5. Sacharidy

Glykemický index je také ovlivněn typem sacharidu v potravinách. Sacharóza neboli běžně používaný řepný cukr, který se skládá z glukózy a fruktózy, má nižší glykemický index

než samotná glukóza, protože polovina molekul sacharózy se skládá z fruktózy a to je typ cukru, který vyvolává velmi malou reakci cukru v krvi (Brand-Miller et al., 2003). Glykemický index sacharózy je 68 a u glukózy je GI = 100. Přidáváním sacharidů do pokrmů se překvapivě glykemický index nesníží (Pi-Sunyer, 2002).

3.5.6. Tuk

Tuky obsažené v potravinách zpomalují evakuaci žaludku a to vede ke zpomalení absorpce sacharidů ve střevě, která má za následek mírnější vzestup hladiny krevní glukózy. Potraviny bohaté na tuk mají nižší GI než podobné potraviny, která ale neobsahují tuk. Například GI bramborových lupínku je 57, hranolek 75 a pečených brambor 85. Nicméně to neznamená, že bramborové lupínky jsou lepší volbou než nutričně více výživné pečené brambory (Willet, 2001; Brand-Miller et al., 2003).

3.5.7. Kyseliny

Přidáním organických kyselin do stravy snížíme glykemický index, protože kyselé prostředí zpomaluje vyprazdňování žaludku i stravitelnost sacharidů. Zvýšením kyselosti přidáním octa nebo citronové šťávy do potravin vede ke snížení GI a odezvy hladiny cukru v krvi (Pi-Sunyer, 2002; Brand-Miller et al., 2003).

4 Měření glykémie

4.1 Konvenční metody

Konvenční metody umožňují měření hladiny glykémie v domácím prostředí což je výhodné především pro diabetiky. Většinou je vzorek krve odebrán píchnutím do prstu, následně je koncentrace glukózy změřena na glukometru. Glukometr je konstruován jako lehké a malé zařízení („kapesní velikosti“), které je napájené baterií a pracuje na principu vyhodnocování elektrochemického nebo fotometrického signálu.

I když vlastní testování (tzv. selfmonitoring) je považováno za významný pokrok v monitorování hladiny glukózy, je ale omezeno určitým počtem testů v průběhu 24 hodin. Takové testování zanedbává střídání hladiny glykémie během noci, a proto je tato metoda už méně používána. Bývá stále častěji nahrazována kontinuální elektrochemickou metodou, při níž získáváme přesnější kontrolu glykémie, díky častějšímu měření (Wang, 2001; Blevins, 2010).

4.2 Kontinuální měření glykémie

Kontinuální monitory jsou přístroje, které zjišťují koncentraci glukózy v reálném čase. Proto se okamžitě na displeji monitoru zobrazuje aktuální hodnota glykémie. Monitor dostává informaci o koncentraci glukózy v intersticiální tekutině, tato hodnota koreluje s koncentrací glukózy v plazmě. Na rozdíl od klasického selfmonitoringu lze osobám trpícím diabetem průběžně upravovat léčbu, aniž by musela být odebrána kapilární nebo žilní krev. Hodnota koncentrace glukózy v intersticiální tekutině se však ve srovnání s koncentrací v plazmě může o několik minut opožďovat (tzv. lag fáze). Délka tohoto zpoždění je ovlivňována rychlostí poklesu či vzestupu koncentrace glukózy v plazmě.

Monitorování glukózy se označováno jako kontinuální, ve skutečnosti je koncentrace glukózy měřena přerušovaně a do monitoru je ukládána průměrná hodnota z určitého počtu měření. Pro každý monitorovací systém je specifická délka intervalu i počet měření, z nichž se průměrná hodnota vypočítává.

Pomocí kontinuálního monitorování glykémie lze získat nejvíce informací o změnách koncentrace glukózy v krvi. Nejspolehlivější výsledky poskytují podkožní senzory, které jsou označovány také jako biočipy. Kontinuálního monitorování lze využít při různých situacích. Především mezi ně patří léčba diabetu a udržování homeostázy u nediabetiků po traumatu,

u kterých se hyperglykémie vyskytuje pouze dočasně. Použití kontinuálního monitorování glukózy se prokázalo i při stanovování glykemického indexu potravin.

Implantace glukózového biočipu má svá omezení. Je nutné, aby byl přesně dodržován stanovený postup. Kontinuální monitor umožňuje předpovědět, zda v průběhu následujících 15 až 30 minut lze očekávat vývoj hypoglykémie nebo hyperglykémie. Poskytuje informace o aktuální koncentraci glukózy a kromě toho informaci o trendu jejího vývoje. Nálezy jsou interpretovány v příslušném počítačovém softwaru.

Ke kontinuálnímu měření glykémie se dnes používají především čtyři technologické postupy, k nimž patří: 1. transkutánní senzory, 2. mikrodialýza kůže, 3. neinvazivní kožní a oční přístroje k měření koncentrace glukózy, 4. senzory pro použití na odděleních intenzivní péče (Peterson, 2009).

5 Metody stanovení

V současné době jsou k určení glykemického indexu potravin ve většině zemí po celém světě používány klinické metody též nazývané metody *in vivo*. Při této metodě je konkrétní potravina zkonsumována testovaným člověkem a glykemická reakce potravin je prezentována jako procento referenční potravin. Ke každé dílčí potravíně je stanovena specifická hodnota glykemického indexu (Goni et al., 1997). Nevýhodou *in vivo* studií je však jejich časová náročnost a cena, proto byly vyvinuty rychlé analytické metody (*in vitro*) (Goni et al., 1997; Englyst et al., 2003). Je třeba upozornit, že hodnoty GI stanovené *in vitro* ne vždy důsledně korelují s *in vivo* hodnotami (Urooj a Puttaraj, 2002). Analytické metody jsou sice rychlejší, a však neposkytují číselné hodnoty glykemického indexu, ale pouze údaj o glykemické odpovědi, a to zda je vysoká, střední nebo nízká.

Byly také prokázány rozdíly v *in vitro* a *in vivo* měření GI. *In vitro* způsoby měření mohou odhadnout biologickou odpověď sacharidů potravin, protože sacharidy jsou citlivé na trávicí enzymy a to je základním faktorem jak pro *in vivo* tak pro *in vitro* reakce (Araya et al., 2002). Několik studií prokázalo, spojitost mezi GI a glukózou dostupnou *in vitro* (Menezes et al., 1996; Englyst et al., 1999; Parada a Aguilera, 2009).

5.1 Měření *in vivo*

Klasický způsob stanovení GI metodou *in vivo* dle doporučení FAO/WHO vyžaduje stanovení hladiny glukózy po požití 50 g dostupných sacharidů sledované potravin zdravými dobrovolníky (nejméně sedmi) většinou v průběhu tří dnů. Přesto, že díky této metodě můžeme spolehlivě stanovit GI potravin, má i určité nevýhody, které omezují její používání. Klinické testy zahrnující práci s lidskými dobrovolníky jsou náročné jak finančně tak i časově. Provádění těchto testů podléhá přísným pravidlům a schvalovacímu procesu etické komise. To jsou důvody, kvůli kterým nechtějí výzkumníci stanovovat glykemický index u konkrétních výrobků a dosud existují pouze obecné tabulky s hodnotami glykemického indexu (Magaletta et al., 2010).

5.1.1 Enzymaticky

El (1999), Englyst et al. (2003), Granfeldt et al. (2006), Oboh a Agu (2010) stanovovali glykemický index potravin pomocí enzymatické metody *in vivo*. K těmto testům byli přijati pouze zdraví jedinci s normálním indexem tělesné hmotnosti, jejichž výsledné

hodnoty GI byly zprůměrovány. Po konzumaci testované potraviny dobrovolníky byl GI stanoven z krve dobrovolníků pomocí glukózo-oxidázové metody. Do výpočtů GI byly zahrnuty pouze hodnoty vzestupu glykémie nad hodnotu nalačno. Pokud hladina glukózy klesla pod tuto hranici, tato oblast byla zanedbána.

Měření bylo prováděno ráno po celonočním lačnění. Testovaným osobám byly odebrány vzorky kapilární krve z prstu nalačno a následně také v časových intervalech po požití potraviny, u které byla zjišťován hodnota glykemického indexu. V průběhu testu bylo také povoleno pít a to nejčastěji kohoutkovou pitnou vodu či vodu destilovanou.

K většině analýz bylo k dispozici množství obsahující 50 g sacharidů a 50 g glukózy jako kontrolní potraviny. Píchnutím do prstu byly odebrány vzorky kapilární krve před jídlem a pak v různě dlouhých intervalech (většinou v 15ti či 30ti minutových) a to maximálně do dvou hodin od začátku konzumace testovaného jídla (El, 1999; Englyst et al., 2003; Granfeldt et al., 2006; Oboh a Agu, 2010).

Enzym je chemicky jednoduchá či složená bílkovina, která umožňuje katalyzovat reakci a urychlovat její průběh. K tradičnímu stanovení glukózy v krvi se používá glukózo-oxidázová reakce, při níž enzym glukózo-oxidáza katalyzuje oxidaci glukózy kyslíkem a vzniká kyselina glukonová a peroxid vodíku (Uwadaira et al., 2011).

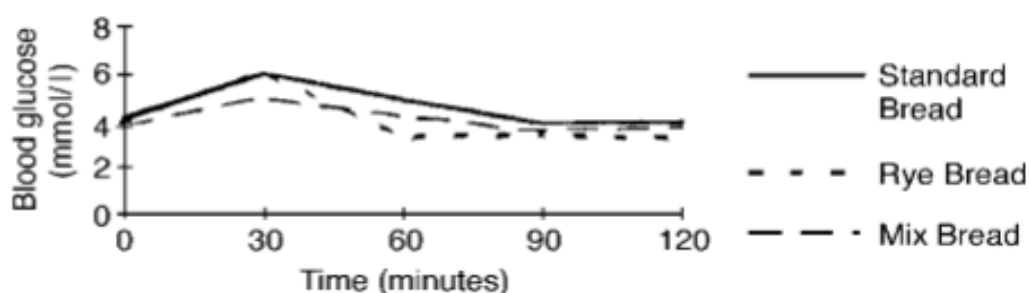
Průběh reakce: $\text{glukóza} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{glukonová kyselina}$

Během *in vivo* studii (Carob House, Brazil, 1998) byly dobrovolníkům podávány dávky rohovníkových tablet, které obsahují 26 g dostupných sacharidů a 26 g glukózy jako referenční potraviny (Foster-Powell et al., 2002; Menezes et al., 2009). Při této studii byly také častěji odebírány vzorky krve a to po 0, 15, 30, 45, 60, 90 a 120 minutách (Santos et al., 2015).

Při určování GI u některých druhů chlebů se zúčastnilo studie deset zdravých dobrovolníků, žen i mužů ve věku 19–35 let. Každému z nich bylo ráno po celonočním půstu podáváno ke konzumaci 50 g sacharidů a to buď standardního chleba, žitného chleba nebo smíšeného chleba. Jednotlivé zkoušky trvaly tři dny od sebe a u každého jedince byla testována pokaždé jedna z uvedených testovaných potravin. Dobrovolníci měli zkonzumovat chleby v průběhu 6 minut a na zapití jim byla k dispozici kohoutková voda. Následně byly píchnutím do prstu odebrány vzorky krve nalačno (0 min) a po 30, 60, 90 a 120 minut od

začátku konzumace testovaného jídla. Průměrný přírůstek odpovědi krevní glukózy po konzumaci tří chlebů je znázorněn na obrázku č. 2. Krevní vzorky byly odebrány do zkumavek a nechaly se zmrazit při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ před analýzou glukózy pomocí glukózo-oxidázové metody s použitím spektrofotometru (Beckman Instruments). Plochy pod křivkami glukózové odezvy pro každý chléb byly vypočteny geometricky. GI se vypočítal vyjádřením plochy glykemické odezvy chleba smíšeného a žitného jako procento průměrné plochy odezvy chleba standardního přijatého stejným jedincem. Takto získané hodnot glykemického indexu byly zprůměrovány pro získání výsledné hodnoty GI pro chleby, které se navzájem liší. Hodnota GI standardního chleba je 100, žitného chleba 72 ± 5 a smíšeného chleba 57 ± 4 (El, 1999).

Obrázek č. 2 Průměrný přírůstek odpovědi krevní glukózy ($x \pm \text{SE}$) u deseti zdravých dobrovolníků po konzumaci tří chlebů



Zdroj: El, 1999

V další studii se Oboh a Agu (2010) zabývali změnou glykémie po konzumaci cowpea (zrno luskovin konzumovaných v Nigérii). Tato zrna byla předem upravena loupáním a vařením a následně dalšími postupy rozemleta na hustou pastu, kterou zkonzumovali testovaní jedinci. Během testování měli dobrovolníci k dispozici 300 ml destilované vody. Každá porce obsahovala 50 g glukózy. Ke stanovení glukózy v krvi byly odebrány vzorky krve po celonočním půstu a následně 30, 60, 120, 180 minut po konzumaci zrn cowpea. Následně byly tyto vzorky odstředovány po dobu 10 minut při 4000 otáčkách za minutu. Glukóza byla stanovena metodou glukózo-oxidázovou (Barham a Trinder 1972), za použití spektrofotometru (Oboh a Agu, 2010). Křivky krevní glukózy byly interpretovány z hodnot glykémie pro každého jednotlivce po dobu 0-180 minut pro kontrolní a zkušební jídlo. Dílčí plochy pod křivkou odezvy krevní glukózy pro 50 g sacharidů pro testované potraviny

a kontrolní potraviny (glukózy) byly vypočteny pomocí lichoběžníkového pravidla (Gilbaldi a Perrier 1982). Hodnoty GI a GL byly vypočteny metodou podle Salmerona et al. (1997) a Jenkinse et al. (1981). Výsledek této studie ukazuje, že hladina glukózy v krvi prudce vzrostla v průběhu 30 minut a následně rychle klesla. Nicméně, zkušební vzorky vykazovaly zvýšení glykémie až po 1 hodině a tato hladina se začala postupně snižovat mezi 120 a 180 minutou po kontumaci (Oboh a Agu, 2010).

Ke stanovení GI cereálních výrobků byly po odebrání vzorků krve měřeny koncentrace glukózy v plazmě za použití enzymatické metody (Roche Diagnostica, Basileji, Švýcarsko). Přírůstkové plochy pod křivkami odezvy hladiny glukózy v krvi byly vypočteny s použitím pravidelného lichoběžníku. Hodnota GI pro testované potraviny byla vypočtena jako přírůstková plocha pod křivkou odezvy hladiny glykémie pro testované potraviny a vyjádřená jako procento průměrné přírůstkové plochy pod křivkou odezvy krevní glukózy. Hodnota GI potravin byla vypočtena jako průměr hodnot GI pro daný výrobek (Englyst et al., 2003).

5.1.1.1 Mezilaboratorní studie

Další studií jsou mezilaboratorní studie, při kterých glykemický index potravin stanovuje více výzkumných skupin. Aplikace GI je složitá, protože hodnota GI mnoha běžných potravin stále není známa. Kromě toho na rozdíly v hodnotách GI podobných potravin stanovených v různých výzkumných střediscích by mohly mít vliv rozdíly ve struktuře škrobu nebo stravitelnosti, změny v metodice nebo účinky náhodných odchylek (Wolever et al, 1991). Je náročné zjistit, jak hodně každý z těchto faktorů přispívá ke změně GI. Proto hlavním cílem této studie bylo zjistit velikost kolísání hodnot GI u stejných potravin, které byly stanoveny zkušenými výzkumníky za použití jejich obvyklých postupů v různých laboratořích po celém světě.

Ke studii byly použity čtyři potraviny: instantní bramborová kaše, dlouhozrnná rýže, špagety z bílé mouky a ječmen. Tyto potraviny, byly vybrány proto, že poskytují širokou škálu hodnot GI. Byly zakoupeny v Torontu a poslány kurýrem do zúčastněných laboratoří s návody na vaření. Kromě toho, každý z výzkumných skupin určil hodnotu GI pravidelného bílého chleba vyrobené v jejich oblasti. Bezvodá glukóza rozpuštěná ve vodě, byla v každém výzkumném centru použita jako referenční potravina. Každé jídlo bylo podáváno po částech, které poskytují 50 g dostupných sacharidů, definovaných jako rozdíl celkového množství

sacharidů a vlákniny. V každém výzkumném centru bylo přijato ke studii 8-12 zdravých osob bez diabetu. Dobrovolníci byli studováni v dopoledních hodinách po 10-12 h hladovění přes noc. Po odebrání vzorku krve na lačno, měli tito jedinci sníst testované jídlo do 15 min, poté jim byly odebrány další vzorky krve po 15, 30, 45, 60, 90 a 120 min od začátku konzumace. V průběhu studie měli jedinci k dispozici vodu, kávu a čaj s mlékem dle potřeby, ale bez cukru.

Dvě centra měřila kapilární krevní glykémii za použití automatického analyzátoru (YSI Stat2300, Yellow Springs, OH, USA). Jedno centrum měřilo kapilární glukózu v krvi pomocí glukózo-oxidázy po smíchání 1 ml 0,025M roztoku hydroxidu sodného a 50 ml 0,3M $ZnSO_4$ s 50 ml kapilární krve. Čtyři střediska měřila hladinu glukózy v plazmě metodou hexokinázovou, dvě získáním plazmy z krve kapilární a dvě z krve žilní. Díky těmto studiím bylo zjištěno, že hodnoty GI potravin jsou přesněji stanoveny pomocí kapilární krve. Koncentrace glukózy v žilní krvi, je nižší než v krvi kapilární, protože krev teče z arteriálního do žilního oběhu pomocí kapilár a periferní tkáně odstraňují část glukózy. Zvýšení krevního inzulínu a glukózy po jídle stimuluje odstraňování glukózy tkáněmi. To znamená, že rozdíl v koncentraci glukózy mezi arteriální a venózní krví je větší po jídle než při hladovění, což vede k menšímu nárůstu glukózy v žilní krvi.

Při této studii byla použita pro výpočet GI průměrná hodnota alespoň tří opakovaných pokusů standardní potraviny. Nejpřesnější určení glykemického indexu může být dosaženo spíše pomocí kapilární krve než pomocí žilní krve, ale je zapotřebí prospektivní studie, která to potvrdí. Odhadovaná směrodatná odchylka pro hodnoty GI získané z různých laboratoří pro stejné potravinářské výrobky je 9,0. Nalézání způsobů, jak snížit intraindividuální změny v glykemické odpovědi může být nejvíce efektivní strategie s cílem zlepšit přesnost měření hodnot GI (Wolever et al., 2003).

5.1.1.2 Testování analýzy odezvy sacharidů

Následujícím výzkum zahrnuje dvě studie a účelem té první bylo určit možné rozdíly v hodnotách glykemického indexu testovaného jídla v závislosti na jeho chemickém složení. Analytické metody byly použity k výpočtu zatížení dostupných sacharidů, což znamená za použití diferencovaných sacharidů (celkové množství sacharidů minus nerozpustná vláknina (DF)) jako jsou jednoduché sacharidy vs. stravitelné škroby (celkový obsah škrobu minus nestravitelný škrob (RS)) u potravin s nízkým GI. Druhá studie zkoumá charakteristiku glykemické křivky testovaného večerního jídla bohatého na nestravitelné sacharidy před

testováním GI následující ráno. Tento výzkum navazuje na mezilaboratorní studii (Wolever et al., 2003).

Glykemický index v této studii je definován jako přírůstek plochy pod křivkou glykémie (AUC), který následuje po konzumaci daného jídla, vyjádřen jako procento dané plochy odpovídající sacharidové zátěži referenčního produktu. Inzulinový index (II) může být vypočten stejně jako GI, z postprandiálního nárůstu inzulinémie. Obecně platí, že inzulinová odpověď odpovídá glykemické odpovědi. Mnoho nízko glykemických škrobnatých potravin často obsahuje rezistentní škrob (RS), který je odolný vůči trávení a vstřebávání, následkem toho pomaleji vzrůstá hladina cukru v krvi a inzulinu, což je stále častěji spojeno se zdravotními výhodami. Potraviny s nízkým GI zlepšují toleranci glukózy v krvi u zdravých jedinců i diabetiků (Granfeldt et al., 2006).

Studie 1: Vliv analytické metody pro odhad zatížení dostupnými sacharidy. Stanovení GI a II z cereálních jídel.

Testované produkty semena ječmene (Pot barley from Goudas Food Products, Concord, ON, Canada) a špagety vyrobené ze 100% tvrdé pšenice (Unico, Concord, ON, Canada). Množství obsahovaných sacharidů v ječmeni a špagetách, bylo získáno rozdílem celkových sacharidů a nestavitelné vlákniny. Vzorky byly analyzovány s použitím metody AOAC (AOAC 1995). Toto měření umožňuje odhad obsažených sacharidů, ale neodečte množství nestravitelných škrobů, což vede ke zkreslení výsledků. Na tomto odhadu, který je v souladu s doporučeným postupem pro stanovení GI (FAO/WHO, 1998). K poskytnutí 50 g dostupných sacharidů bylo potřeba 79,6 g nevařeného ječmene a 72,3 g syrových špaget. Ke zpřesnění množství stravitelného škrobu bylo použito *in vitro* měření a porce ječmenných zrn byly dodatečně upraveny na 93,9 g. *In vitro* metoda je založená na žvýkání a enzymatické inkubaci za fyziologických podmínek (Akerberg et al., 1998). Následně byl ječmen vařen po dobu 20 minut, dokud nebyla absorbována veškerá voda. Špagety byly vařeny v přebytku vody (500 ml) po dobu 15 minut. Jako referenční potravina byl použit bílý chléb, pečený v domácí pekárně. Po vychladnutí byla odstraněna kůrka chlebu, poté byl chléb nakrájen na plátky, zvážen a zmražen. Množství stravitelného škrobu bylo analyzováno podle Holm et al. (1986). Bylo potřeba 120,9 g bílého chleba pro poskytnutí 50 g stravitelného škrobu.

Hodnoty glykémie a inzulinémie byly stanoveny pro špagety i ječmen ve srovnání s bílým pšeničným chlebem. Bylo testováno 10 zdravých dobrovolníků, čtyři ženy a šest mužů, ve věku 24-33 let. Podmínkou bylo, aby testované osoby vyhovovaly normálním

hodnotám BMI a neužívaly žádné léky. Testovaná jídla byla podávána se 150 ml vody, překapávanou kávou nebo čajem, do žádného nápoje nebylo přidáno mléko ani cukr. Subjektům byla podávána testovací jídla a referenční chléb v různém pořadí vždy ve stejnou dobu ráno po celonočním hladovění. Jídla měla být snědena během 10 minut. Vzorky kapilární krve byly odebrány píchnutím do prstu před jídlem a dále v 15, 30, 45, 60, 90 a 120 minutových intervalech pro analýzu glukózy a po 0, 15, 30, 45, 90 a 120ti minutách pro analýzu inzulínu. Koncentrace glukózy v krvi byla stanovena glukózo-oxidázo-peroxidázovým činidlem a koncentrace inzulínu v séru byla stanovena metodou ELISA (Biorad, Coda Automated EIA Analyzer). ELISA je metoda používající monoklonální protilátky proti určitým epitopům inzulínu. Vzorky se známým obsahem inzulínu, kontrolní vzorky a neznámé vzorky jsou pipetovány do jamek. Po inkubační době je mikrotitrová destička promyta pro odstranění nenavázaných protilátek a inkubována roztokem substrátu. Výsledek je získán spektrofotometricky.

GI a II hodnoty byly vypočteny z přírůstkových ploch (AUC) postprandiální glykémie a inzulínu. Výsledné hodnoty GI a II významně nebyly ovlivněny změnou velikosti porce zrn ječmene ze 79,6 g na 93,9 g. Ve výsledcích nebyly žádné rozdíly mezi GI a II v 90 a 120 minutě po jídle. Výsledné hodnoty GI získány 90 minut po konzumaci zrn ječmene byly 53 a 59. Získané hodnoty II (90 min) pro dvě různě velké porce ječmene byly stejné (± 50) bez ohledu na velikost studované dávky. Dále, GI (90 min) a II (90 min) špaget byl stanoven na 54 a 53, v daném pořadí. Množství nestravitelného škrobu v semenech ječmene bylo 15,2 % a množství vlákniny (DF) 12,1 %. Takže celkové množství nestravitelných sacharidů, to je DF a RS, v ječmenných jídlech bylo vysoké (Granfeldt et al., 2006).

Studie 2: Vliv složení potravin zkonsumovaných večer před testem na GI a II

V této studii bylo testováno 14 zdravých dobrovolníků, sedm žen a sedm mužů ve věku 24–34 let, s normálním BMI. Nesměli užívat žádné léky. Večer před testem měli dobrovolníci za úkol jíst jednu ze tří večeří, špagety nebo zrna ječmene nebo bílý pšeničný chléb. K pití měli k dispozici 150 ml vody, kávu nebo čaj a to vše bez přidání mléka a cukru. Testovaného rána po celonočním hladovění jim bylo naservírováno 50 g stravitelného škrobu v podobě kupovaného bílého chleba. Byla odstraněna kůrka chleba, poté byl chléb nakrájen na plátky, zvážen a zmražen. Snídaně byla snědená během 10 minut. Krevní vzorky byly odebrány v intervalech před jídlem a dále 15, 30, 45, 70, 95, 120 a 180 min po jídle pro

analýzu glukózy a 15, 30, 45, 95, 120 min pro analýzu inzulínu. Koncentrace glukózy v krvi byla stanovena stejnou metodou jako ve studii 1.

Špagety a zrna ječmene měly stejnou glykemickou a inzulinemickou odpověď přestože měly velmi rozdílné složení nestravitelných sacharidů (2,2 g špagety, zrna ječmene 16,1 g). Průměrné hodnoty glukózy ráno v den testu na lačno se významně nelišily. Zatím co koncentrace glukózy v krvi po konzumaci jedné z definovaných večeří a následné konzumaci kupovaného chleba k snídani v den testu se značně lišila. 30 min po snídani, byla pozorována výrazně nižší odezva krevní glukózy po večeři s jádry ječmene v porovnání se špagetami nebo bílým chlebem. Ranní hodnoty glykémie po těstovinách ve srovnání s bílým pšeničným chlebem jako večerním jídlem se významně nelišily.

U inzulínu 30 minut po snídani byla pozorována výrazně nižší odpověď inzulínu po večeři se zrny ječmene v porovnání se špagetami nebo bílým chlebem. 45 minut po snídani byla inzulínová odpověď u jedinců konzumujících k večeři špagety nebo ječmen výrazně nižší ve srovnání s jedinci večeřícími bílý pšeničný chléb. Přírůstek inzulínu v prvních 90ti minutách po jídle byl významně menší u zrn ječmene než u bílého chleba.

Ve studii Wolevera et al. (1988) bylo zjištěno, že hladina glykemické odpovědi je výrazně nižší ráno po nízko glykemické večeři (čočka), než po vysoko glykemické večeři (glukóza). K podobnému tvrzení dospěli také ve své studii Thorburn et al. (1993), kde zjistili, že tolerance glukózy v dopoledních hodinách po večeři z ječmene se významně zvýšila ve srovnání s večeří obsahující rýži. Kromě rozdílných hodnot GI se tyto večeře liší také složením živin a obsahem vlákniny. Večeře s nízkým GI byla podstatně bohatším zdrojem vlákniny v obou těchto studiích. Dosud dostupné údaje naznačují, že glykemický index měřený ráno po celonočním hladovění, může být ovlivněn volbou jídla předchozí večeře (Granfeldt et al., 2006).

5.1.1.3 Zjišťování rychle dostupné glukózy

Klasifikace sacharidů na chemickém podkladu bere v úvahu místo, množství a rozsah digesce sacharidů v potravě. Klasifikace rozděluje sacharidy na cukry, škroby, látky neškrobové povahy. Dále jsou sacharidy řazeny podle rychlosti absorpce v tenkém střevě do skupin na rychle dostupné glukózy (RAG) a pomalu uvolňované glukózy (SAG).

Sacharidy jsou tráveny, absorbovány v různém množství a rozsahu v rámci tenkého střeva člověka v závislosti na původu sacharidu a formě sacharidů v jídle. Bylo podotknuto, že jídla obsahující velké množství RAG způsobující nárůst glukózy a insulinové odpovědi

mají negativní vliv na zdraví. Ve výzkumech Englysta et al. (1999), bylo prokázáno riziko vyvinutí diabetu 2. typu a to zvláště u lidí s nízkým příjmem vlákniny, zato vysokou glykemickou dávkou v konzumovaných potravinách. Sacharidy s postupným vstřebáváním mohou bránit chronickým onemocněním. Klinické studie s pacienty s diabetem poukázaly na zlepšení zdravotního stavu u diety s vyšším příjmem vlákniny, která je pomalu vstřebávána.

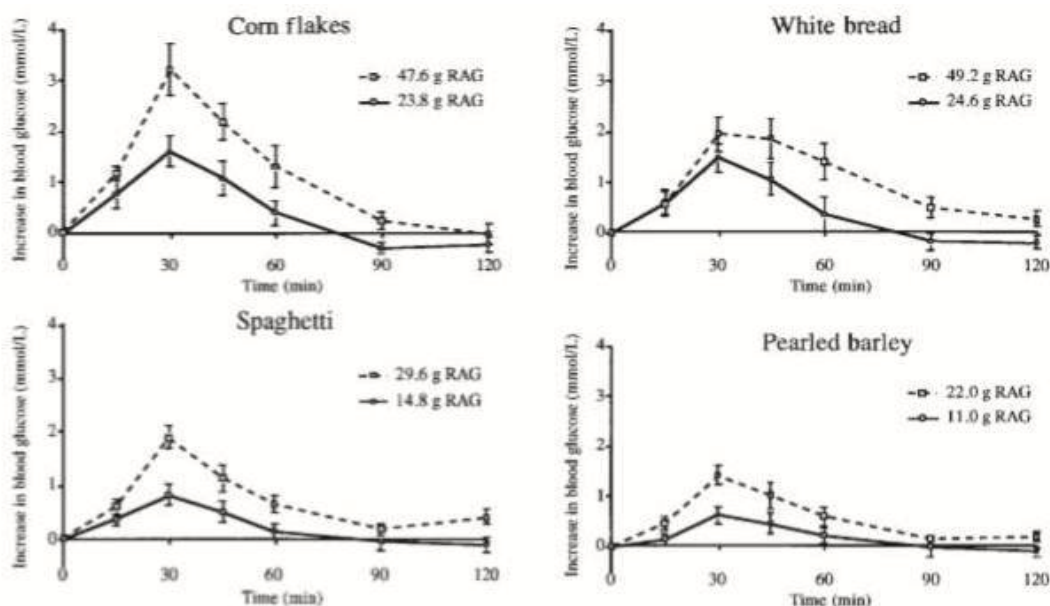
Lidská strava obsahuje mnoho typů sacharidů, z nichž každý přispívá k různým fyziologickým reakcím. Škrob je považován za velmi pomalu stravitelný sacharid, což vede k mírné glykemické odezvě. Nicméně, míra a rozsah, ve které se škrob rozštěpí a vstřebává, a výsledná odpověď glukózy a inzulínu, se značně liší v závislosti na zdroji a stupni zpracování potravin.

V této studii bylo testováno osm zdravých, neobézních jedinců (5 žen 23–56 let a 3 muži 24–57 let). Jeden den před testováním se měli dobrovolníci vyhnout nadměrné fyzické námaze a konzumaci alkoholu. V den testu po celonočním hladovění jim byla odebrána glukóza na lačno, pak v různém pořadí snědli testovaná jídla s obsahem RAG od 11 do 49 g a byla jim změřena postprandiální hladina glukózy po 15, 30, 45, 60, 90 a 120 min od začátku konzumace jídla. Hladina celé glukózy v krvi byla měřena metodou hexokinázovou.

Testované potraviny použité k této studii: kukuřičné lupínky, bílý chléb, vařené špagety z bílé pšeničné mouky a vařený ječmen. Tyto potraviny měly různé množství RAG a SAG, a složení sacharidů. Existují důkazy, které ukazují, že glykemická odpověď je pravděpodobně závislá na dávce RAG ≤ 50 g a proto porce zkušebních jídel byly tak velké, aby obsahovaly 25 g (malá porce) nebo 50 g (velká porce) sacharidů. RAG se lišilo od 11 po 49 g v dané porci. Malé porce jednotlivých jídel vážily 117 g ječmen, 85 g špagety, 31,5 g kukuřičné lupínky a 59 g bílý chléb. Velké porce měly dvojnásobnou hmotnost. Voda byla doplněna tak, aby celková hmotnost každého jídla byla 500 g.

Glykemická odpověď byla vypočtena jako přírůstková oblast pod křivkou nad koncentrací glukózy nalačno, kde byla ignorována jakákoliv hodnota vyskytující se pod hodnotou půstu, podle rovnice dané Wohlerem et al. (1991). Hlavní změna v hladině koncentrace glukózy v krvi ze všech 8 testovaných jídel, a sice dvou různě velkých porcí každé testované potraviny je znázorněna na obrázku č. 3. Lineární regresní analýza malých a velkých porcí byla provedena pro zjištění hodnoty glykemické odpovědi individuálně pro každého jednotlivce i pro obsah RAG testovaných jídel. U 7 z 8 jedinců byl korelační koeficient významný, regresní koeficient se však mezi jednotlivci značně lišil (Englyst et al., 1999).

Obrázek č. 3 Glykemická odezva 8 testovaných jídel obsahujících různé množství rychle dostupné glukózy (RAG). Špagety a ječmen obsahující malé množství RAG, kukuřičné lupínky a bílý chléb obsahující velké množství RAG a každá potravina byla konzumována ve dvou porcích s 25 g (-) a 50 g (----) dostupné glukózy



Zdroj: Englyst et al., 1999

Dále byl zkoumán vztah mezi příjmem RAG a glykemickou odpovědí. Výchozím bodem pro analýzu byl předpoklad, že pro všechny dobrovolníky je glykemická odpověď přímo úměrná RAG. Procentuální hodnota změny RAG odpovídá stejné procentuální změně glykemického indexu. Kdybychom brali v potaz odlišnosti účastníků studie, RAG by vysvětlovalo 70 % zbylých rozdílů ve výsledcích.

Obě měření GI i RAG ukazují, jak mohou být fyziologické vlastnosti sacharidů ovlivněny typem a zpracováním potravin. Bílý chléb, kukuřičné lupínky a špagety jsou příkladem vysoce zpracovaných potravin. Škrob v chlebu a v kukuřičných lupínkách je plně želatinovaný, a proto by mohly být rychle tráveny, tyto potraviny mají vysoké hodnoty RAG. Špagety však mají nízkou hodnotu RAG, která brání enzymatické hydrolýze škrobu. V mnoha rostlinných potravinách, jako jsou luštěniny a minimálně zpracovaná obilná zrna, jsou živiny zabudovány do buněčných stěn, které zpomalují uvolňování a tedy i trávení a vstřebávání škrobů a cukrů, tyto potraviny mají nízké hodnoty RAG, proto je pravděpodobné, že hodně dostupných sacharidů v těchto potravinách, budou SAG (Englyst et al., 1999).

5.1.2 Pomocí kontinuálního monitorování hladiny glukózy

Glykemický index je měřítkem schopnosti potravy zvýšit hladinu glukózy po jeho konzumaci. Bylo prokázáno, že kontinuálním monitorováním glukózy (CGM) získáme stejné hodnoty GI ve srovnání s tradičními metodami. Nicméně, nebyl dosud použit žádný standardizovaný protokol pro měření GI, který bere v úvahu variabilitu interindividuální (mezi jednotlivci) a fyziologické glykemické odezvy potravin.

Cílem této studie bylo pomocí tabulkového procesoru vytvořeného v softwaru Microsoft Excel 2000 usnadnit zpracování získaných dat s využitím rychlé, automatické a přesné metodologie CGM k měření GI.

Testu se podrobilo dvacet zdravých (nediabetických) jedinců, kteří konzumovali 50 gramů glukózy nebo čtyři alternativní potraviny (čokoláda, jablečná dětská výživa, rýžové chlebičky, nebo jogurt) na snídani a večeři po dobu 1 týdne. Všichni dobrovolníci byli požádáni, aby nic nejedli po dobu 10 hodin před snídaní a 4 hodin před večeří a také, aby snědli danou porci testované potravy během 5 minut. Bylo jim doporučeno během konzumace vypít 300 ml vody, čaje nebo kávy. V průběhu dne (kromě snídaně, večeře a v příslušném postprandiálním období) mohli jíst jakékoli jídlo za předpokladu, že celkový denní příjem energie udržují na stejné úrovni ($\pm 10\%$).

Softwarový program DegifXL byl vyvinut pomocí tabulky Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, WA). Data z CGM Solutions™ softwaru byla zpracována podle standardizovaného protokolu, vyžadující především tým vyškolených osob s předpokládanou schopností spolupracovat se studijním protokolem, části testovacích potravin, z nichž každá obsahuje 50 g sacharidů, hardwaru osobního počítače, CGM a glukometry, softwaru-MS Excel 2000, CGM Solutions softwaru a DegifXL. Pomocí nového tabulkového procesoru DegifXL se čas potřebný pro zpracování údajů snížil z 2000 na 160 minut ve srovnání s dosud používanými manuálními metodami. DegifXL v kombinaci s kontinuálním monitorováním glukózy, se stal efektivním a účinným nástrojem pro rutinní měření GI.

CGM senzor se zavádí pod kůži na břicho, kde zůstávána po celou dobu vyšetření. Testované osoby byly požádány, aby předtím, než začnou konzumovat testované potraviny, vždy zadali do monitoru, jakou potravinu budou konzumovat. Na konci zkušební období, byly údaje CGM staženy do počítače a následně přeneseny z CGM Solutions softwaru

(Medtronic, MiniMed) do tabulky. CGM Solutions software ukládá hodnoty koncentrací intersticiální tekutiny glukózy do speciálního adresáře (Chlup et al., 2008).

Matematické principy a vzorce

Obrázek č. 4 znázorňuje přírůstkovou plochu pod křivkou krevní glukózy (IAUC), která se stanoví výpočtem (integrace, jako součet všech 24 lichoběžníkové oblasti) podle vzorce:

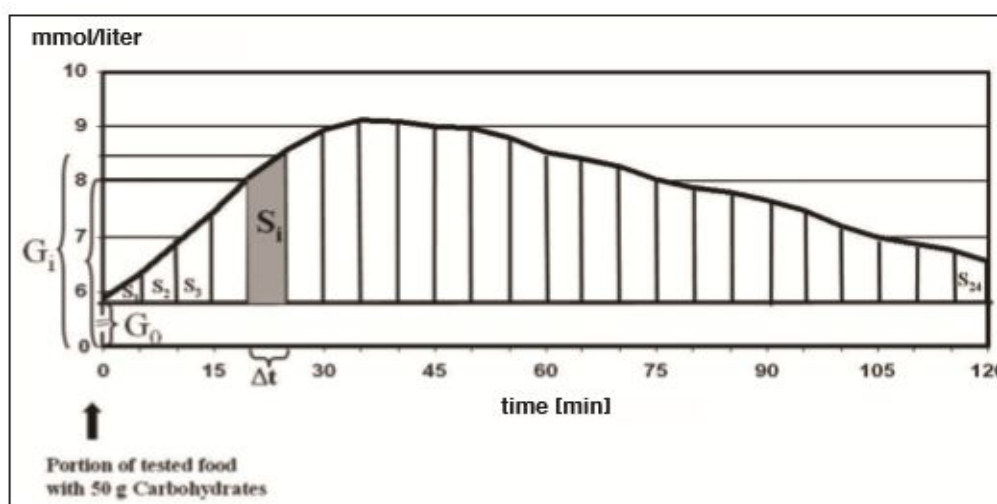
$$S_i = ((G_i - G_0) + (G_{i-1} - G_0) / 2) \times \Delta t$$

$$IAUC = \sum S_i \quad i = 1, \dots, 24$$

Kde G_i je koncentrace glukózy v určitém čase, G_0 je počáteční koncentrace glukózy, $\Delta t = 5$ minut. Platí pro $G_i < G_0$, $S_i = 0$

Pomocí tabulkového procesoru DegifXL lze G_0 definovat dvěma způsoby. Za prvé se G_0 hodnota se může rovnat hodnotě koncentrace glukózy v intersticiální tekutině (ISFG) na začátku konzumace, přičemž výsledné hodnoty jsou popsány jako IAUC 1 a GI 1. Za druhé G_0 můžeme definovat jako průměr z pěti hodnot ISFG předcházejících (25 minut) začátku konzumace jídla, umožňující výpočet IAUC 2 a GI 2. Za účelem vyloučení možného vlivu ISFG odlehlých hodnot je průměrná hodnota G_0 vypočítána ve dvou krocích: nejdříve se vypočítá průměr pěti ISFG hodnot a následně jsou vyloučeny ty hodnoty, které překročily empiricky definovaný interval (průměr ISFG $\pm 0,3$ mmol/l). Konečnou hodnotu G_0 získáme zprůměrováním hodnot v klidu.

Obrázek č. 4 Přírůstková plocha pod křivkou krevní glukózy



Zdroj: Chlup et al., 2008

GI pro konkrétní testovanou potravinu se vypočte jednotlivě pro každého dobrovolníka podle vzorce: $GI = (\text{průměr IAUC}_{\text{testované potraviny}} / \text{průměr IAUC}_{\text{glukózy}}) \times 100 [\%]$

Konečný průměr GI se vypočítá z vypočtených hodnot glykemických indexů všech jednotlivců.

S použitím systému CGM DegifXL bylo celkem provedeno 300 testů (pro každou z pěti testovaných potravin 60 testů) a z toho 277 testů bylo provedeno úspěšně. Získaná data byla zpracována asi 12 krát rychleji při použití DegifXL než při použití konvenčních metod. Některé statistiky jsou k dispozici okamžitě po zpracování dat, avšak dodatečný statistický software umožňuje vymezení rozsahu variability mezi testováním u stejného jedince a variabilitu GI pro danou potravinu. U testovaných dobrovolníků nebyly během získávání hodnot GI pěti různých potravin zjištěny žádné technické problémy. Mezi naměřenými hodnotami GI nebyly významné rozdíly. Souhrnně řečeno, výhodou tohoto nového protokolu je, že automatizuje výpočet GI. Dále pomocí softwaru DegiXL jsou vypočteny střední hodnoty GI konkrétních potravin jednotlivě pro každého dobrovolníka a tyto hodnoty mohou být rychle srovnány s příslušnými průměrnými hodnotami GI všech testovaných osob ve skupině.

Dříve byly široce používány konvenční metody ke stanovení GI. Nicméně, tyto metody jsou časově náročné a stále ne zcela standardizované. V této studii byl použit pro kalibraci CGM glukometr Advance systém (Hypoguard, Woodbridge, UK). U snímače CGMS, který je po dobu 8 dní zaveden pod kůži, nebyly objeveny žádné nežádoucí účinky. Všechna měření ISFG se provádějí stejným způsobem a pro zpracování dat je také použit stále stejný algoritmus. DegifXL vypočítává počáteční hladinu glukózy v krvi dvěma různými způsoby, buď pomocí nulové hodnoty času, nebo průměre z pěti glukóz, měřené 25 minut před jídlem. Další zkoušky jsou nezbytné k určení, zda výpočet IAUC 2 by dal lepší výsledky.

V této studii byl GI zjišťován u zdravých dobrovolníků. Předběžné výsledky dalších studií ukazují, že hodnoty jednotlivých GI u osob s diabetem 1. a 2. typu nejsou statisticky odlišné. DegiXL umožňuje, také provést detailní zpracování dat u osob s diabetem. Konzumace potravin s vysokým glykemickým indexem, nemá značný vliv na následné zhoršení glykemické kontroly u diabetu 1. typu (Chlup et al., 2008).

5.2 *In vitro* studie

In vitro studie jsou založeny na principu nasimulovaného žaludečního a střevního prostředí, ve kterém je stejné pH, teplota, trávicí enzymy a glykémie analyzována ve stejných časových intervalech jako u *in vivo* studií. Laboratorní výzkumy, které byly provedeny k určení GI potravin *in vitro*, pouze odhadují pravděpodobnou rychlost trávení sacharidů a absorpci glukózy v tenkém střevě. Tato metodologie může být použita jako jednodušší a levnější způsob měření GI oproti metodě *in vivo*. Výzkumníci Jenkins et al. (1987), Ross et al. (1987), Englyst et al. (1999), Araya et al. (2002) vykazovali souvislost mezi měřením štěpení sacharidů *in vitro* a měřením glykemického indexu potravin. Došli k tvrzení, že není nutné ke stanovení hodnot GI potravin používat pouze pracné metody *in vivo* (Brand-Miller a Holt, 2004).

5.2.1 Metodika indexu hydrolýzy

Při zjišťování GI rohovníkových tablet a rohovníkové mouky pomocí *in vitro* techniky byl glykemický index stanoven indexem hydrolýzy (HI). Tato studie byla založena na uvolnění glukózy po enzymatickém zpracování tablet rohovníku a rohovníkové mouky.

Glykemický index karobové mouky byl zkoumán pouze *in vitro*, protože požití takhle velkého množství tohoto produktu je obtížné. *In vitro* metoda pro hodnocení indexu hydrolýzy byla stanovena podle Goni et al. (1997) a Waltera et al. (2005).

Vzorky obsahovaly 300 mg rohovníkové mouky nebo rohovníkových tablet a byly rozpuštěny v 10 ml destilované vody. pH vzorků bylo upraveno hydroxidem sodným za přídavku proteázy, dále etanolu a enzymu α -amylázy. Vzorky byly inkubovány při 37 °C v třepací vodní lázni. Následně byly odebrány vzorky z každé zkumavky po 0, 15, 30, 45, 60, 90 a 120 minutách. Tyto podíly byly zahřívány při 100 °C po dobu 15 minut, a zchlazeny na konci inkubace. Po 45 minutách se přidaly 3 ml pufru s octanem sodným (pH 4,75) a 80 μ l amyl-glukosidázy pro hydrolýzu vyhnílého škrobu na glukózu. Každý vzorek byl analyzován kolorimetrickou enzymatickou sadou Glukóza-PP (ANALISA®) pro stanovení koncentrace glukózy.

Míra štěpení sacharidů pro analýzu *in vitro* byla vyjádřena jako procento sacharidů hydrolyzovaných v různých časech (0, 15, 30, 45, 60, 90 a 120 min) a byly také vypočteny jejich plochy pod křivkami (AUC). Hodnoty indexu hydrolýzy byly vypočteny jako vztah mezi plochou pod křivkou konkrétního vzorku ve srovnání s AUC glukózy, jako referenční

potravin. Výsledné hodnoty HI jsou pouhou předpovědí GI potravin (Gibson, 2011). Glykemický index byl stanoven pomocí matematického modelu navrženého Goni et al. (1997), v návaznosti na rovnici $GI = 39,71 + 0,549 HI$ (Santos et al., 2015).

Účelem následující studie bylo zkoumat *in vitro* metodu při stanovování GI potravin a určit jeho spolehlivost výsledků. Způsob *in vitro* metody pro hodnocení stravitelnosti škrobu byl již dříve objasněn potravinářským výzkumem. Dochází především k mechanickému narušení a trávení na základě proteázy a následné inkubaci pomocí pankreatické α -amylázy. Tato metoda umožňuje výpočet indexu hydrolýzy.

Každý vzorek potravin s obsahem 2 g sacharidů byl nakrájený na plátky a namletý do baňky s přidavkem 20 ml 0,1M pufru fosforečnanu draselného při teplotě 37 °C. Následně byly vzorky homogenizovány pomocí homogenizátoru Altra Turrax při konstantní rychlosti a propláchnuty dalšími 20 ml roztoku pufru. pH vzorků bylo sníženo na 2,5 kyselinou fosforečnou a dodáním 1 ml pepsinu. Dále byly vzorky umístěny do 37 °C vodní lázně, kde byly míchány po dobu 1 hodiny, aby tak simulovaly čas, po který se potraviny vyskytují v lidském žaludku. Následně bylo opět zvýšeno pH na 6,8 za přidavku pufru KOH a 2 ml enzymu α -amylázy. Celý obsah baňky byl převeden do dialyzační zkumavky, která byla uzavřena a umístěna do baňky obsahující 500 ml roztoku pufru. Baňka byla následně vložena do třepací vodní lázně, kde byl pufrovací roztok extrahován každých 30 minut, za účelem stanovení rychlosti hydrolýzy sacharidů z dialyzační zkumavky do roztoku pufru.

Redukované cukry byly stanoveny pomocí infračerveného spektrofotometru (MilkoScan). Výsledné hodnoty byly vyneseny do grafu a následně byla stanovena plocha pod křivkou (AUC). Index hydrolýzy byl vypočten stejným způsobem jako u jiných studií a to jako vztah mezi AUC specifické potravin ve srovnání s AUC maltózy jako referenční potravin. Dle následující rovnice:

$$\text{AUC testované potravin} / \text{AUC referenční potravin} = \text{Index hydrolýzy potravin}$$

Aby bylo možné stanovit vztah mezi odvozenými hodnotami HI a hodnotami GI, byly hodnoty indexu hydrolýzy korelovány se známými hodnotami GI stanovenými pomocí *in vivo* analýzy (Gibson, 2011).

Na základě publikovaných hodnot GI, byly vybrány vzorky potravin tak, aby byly zastoupeny všechny tři rozsahy glykemického indexu, a sice vysoký, střední a nízký GI. Maltóza a bílý chléb byly v průběhu studie použity jako kontrolní vzorky.

Metodou *in vivo* byly stanoveny hodnoty nízkého GI v rozmezí od 0 do 55 a hodnoty vysokého GI 70 a větší. V tabulce 2 jsou porovnány průměrné hodnoty HI testovaných vzorků s předem stanovenými hodnotami GI. Například průměrná hodnota HI bílého chlebu je 70, zatímco indikace GI pro bílý chléb je údajně 72.

Zdravotní důsledky potravin s odlišným obsahem sacharidů se váží převážně k následujícím kategoriím jako je vysoký, střední nebo nízký GI, a nikoli na jejich specifické hodnoty glykemického indexu. Korelace mezi zjištěnými hodnotami HI a známými údaji GI poskytuje přesvědčivý důkaz o tom, že metoda HI je schopna generovat orientační hodnoty GI pro jídla bohaté na sacharidy. Tato rychlá analytická metoda by mohla být prospěšná v průběhu vývoje produktů a jejich rozdělení do kategorií s vysokým, středním a nízkým glykemickým indexem (Gibson, 2011).

Tabulka č. 2 Hodnoty koncentrace v průběhu času plochy pod křivkou (AUC), index hydrolýzy (HI) a glykemický index (GI) pro maltózu a bílý chléb byly testovány během jednoho pokusu

	AUC	HI	GI
maltóza	77,4	100	100
bílý chléb	51,9	67	72
± SE	0,008	11,9	-
vzorek 1	56	72,3	-
vzorek 2	51,6	66,7	-
vzorek 3	49,7	64,1	-
vzorek 4	49,8	64,3	-
vzorek 5	50,6	65,3	-
vzorek 6	50,1	64,7	-
vzorek 7	55,4	71,5	-

Poznámka: HI byl stanoven jako: (AUC vzorku / AUC maltózy) x 100

Zdroj: Gibson, 2011

5.2.2 *In vitro* měření rychle dostupné glukózy v potravinách

V této studii dochází k měření RAG, SAG a škrobů *in vitro* měřením glukózy uvolněné z testované potraviny během časové inkubace a standardizovaných podmínek pomocí HPLC. Předpokládá se, že RAG jsou důležité elementy potravy určující glykemickou odpověď. V této studii se poukazuje na významnost vztahu mezi *in vitro* měřením RAG a glykemickou odpovědí *in vivo*. Jednoduché *in vitro* měření RAG a SAG má souvislost s fyziologickým stavem a mohlo by být použito jako pomůcka k výzkumu množství, typu a formy sacharidů v potravě pro benefity našeho zdraví. Metoda modifikovaná Englystem et al. (1992) používá kalorimetr, zatímco tato studie používá HPLC, což má větší potenciál v přesném měření i jiných cukrů, než je glukóza (Englyst et al., 1999).

Příprava vzorků

Standardizovaný roztok byl vytvořen smícháním 40 g/l arabinózy s 50% nasycenou benzoovou kyselinou. Vázaný cukr byl ve formě 50 g/l glukózy a 25 g/l fruktózy ve vodě s 50% nasycenou benzoovou kyselinou. Cukerné směsi byly vysušeny do konstantní hmotnosti a uchovány v podtlaku v oxidu fosforečném před samotným použitím. Použité enzymy – pepsin (Sigma), amyloglukosidáza (Novo Nordisk), pankreatická lipáza (Sigma) a invertáza (Merck). Celkem bylo připraveno 18 vzorků (Englyst et al., 1999).

***In vitro* měření glukózy a fruktózy**

Vzorky potravin (s obsahem < 0,6 g sacharidů) byly zváženy s přesností na miligram a dány do 50ml propylenové centrifugy, kde byly smíchány s 5 ml vnitřního standardu arabinózy a 20 ml vody. Zkumavky byly uzavřeny, intenzivně zamíchány a vloženy do vodní lázně (100 °C po 30 min), pak při 37 °C byly chlazeny. Následně bylo přidáno 0,3 ml invertázy, pak 0,2 ml etanolu a znovu byly zkumavky promíchány. V této části měření bylo zjištěno množství glukózy a fruktózy (Englyst et al., 1999).

***In vitro* měření RAG, SAG, celkové glukózy a frakce škrobu**

Vzorky potravin (s obsahem < 0,6 g sacharidů) byly zváženy s přesností na miligram a dány do 50 ml propylenové centrifugační zkumavky, do které se dále přidal roztok vnitřního standardu (5 ml arabinózy) a 10 ml čerstvě připraveného roztoku pepsinu a guarové gummy (5 g/l pepsinu a 5 g/l guarové gummy v 0,05 mol/l HCl). Po smísení obsahu byly zkumavky

vloženy do vodní lázně o teplotě 37 °C po dobu 30 minut, aby došlo k hydrolyze proteinů pepsinem. Po té do každé zkumavky byl přidán pufr (5 ml octanu sodného) mající pH 5,2. Směs byla znova inkubována v 37 °C.

Přidáním skleněných kuliček do zkumavek došlo k mechanickému narušení struktury vzorků v třepací vodní lázni. Guarová guma brání vzniku suspenze a sedimentace vzorku, stejně tak, jako zachovává viskozitu vzorku.

Jedna zkumavka byla vyjmuta z vodní lázně a bylo do ní přidáno 5 ml enzymatické směsi. Tento vzorek byl okamžitě uzavřen a převrácením byl jeho obsah opatrně promíchán ještě předtím, než byl vzorek vložen do třepací vodní lázně. V minutových intervalech byla enzymová směs přidávána také do zbylých vzorků a každá zkumavka byla vyjmuta z lázně přesně 20 minut poté, co byla přidána směs enzymů. Dále je 0,2 ml každého vzorku bylo smícháno s 4 ml etanolu a tak došlo k zastavení hydrolyzy. Takto byly získány vzorky G₂₀, jedná se o glukózu měřenou po dvaceti minutách inkubace enzymy.

Ihned po odebrání vzorků byly zkumavky vráceny do třepací vodní lázně. Po dalších 100 minutách (celkově po 120 minutách inkubace) byly odebrány další 0,2 ml vzorku a přidány 4 ml etanolu, takhle byly připraveny vzorky G₁₂₀.

Obsahy zkumavek G₁₂₀ byly intenzivně promíchány a následně byly zkumavky umístěny na 30 minut do vodní lázně s vroucí vodou. Poté byl obsah zkumavek opět promíchán a chlazen v ledové vodě po dobu 15 min. Po přidání 10 ml hydroxidu draselného a promísení obsahu převrácením byly zkumavky horizontálně umístěny do třepací vodní lázně, obsahující ledovou. Po 30 minutách třepání byly zkumavky postupně vyjmuty z ledové vody a k 0,2 ml obsahu vzorku bylo přidáno 1 ml 1 mol/l kyseliny octové a roztok amyloglukosidázy. Zkumavky byly vloženy do vodní lázně 70 °C po dobu 30 minut a následně na 10 minut do vroucí vodní lázně. Zkumavky se zchladily na teplotu místnosti před přidáním 12 ml absolutního etanolu. Takto byl připraven vzorek celkové glukózy (Englyst et al., 1999).

Měření cukrů pomocí HPLC metody

Pro kalibraci byly použity dva standardizované roztoky cukrů. První standard obsahoval 1 ml a byl zředěn vodou do 20 ml, druhý standard obsahoval 10 ml směsi cukru a byl také zředěn vodou do 20 ml. K oběma roztokům bylo přidáno 5 ml roztoku vnitřního standardu a vše bylo dobře promícháno. 0,2 ml této směsi bylo odebráno a přidáno do zkumavek obsahujících 4 ml čistého etanolu. Před HPLC analýzou byly všechny etanolicke

frakce centrifugovány po dobu 5 minut při teplotě místnosti. Množství směsi potřebné pro analýzu závisí na obsahu cukru: 70 μ l pro řepný cukr, G_{20} a G_{120} , 200 μ l pro celkovou glukózu a 70 - 120 μ l pro glukózu, v závislosti na předpokládaném obsahu glukózy ve vzorku. Vzorky byly umístěny do HPLC lahvíček a po přidání 1 ml deionizované vody byly smíchány.

Autosampler (model AS3500, Dionex) byl použit ke vstřikování 20 ml zředěného etanolu. Separace cukrů bylo docíleno pomocí aniontově výměnné analytické kolony (Carbopa PA100, Dionex) a předklony (CarboPac PA10, Dionex) za užití gradientové pumpy (model GP40, Dionex). Nosné roztoky 200 mol roztok NaOH s vodou byly odvdušněny. Z vody byly odstraněny plynné příměsi. Průtok byl nastaven na 0,8 ml/min. Monosacharidy byly detekovány pomocí elektrochemického detektoru (model ED40, Dionex). Reakční doba byla 1 s a výkon detektoru byl 300 nA. Pro sjednocení, porovnání a vyhodnocení výsledků byl použit program na zpracování dat (DX-500, Dionex). Hodnoty RAG, SAG, rychle stravitelného škrobu, pomalu stravitelného škrobu, nerozpustného škrobu a celkového škrobu byly spočítány ze změřených hodnot glukózy, G_{20} , G_{120} a hodnoty celkové glukózy. Hodnoty frakce škrobu byly vyjádřeny jako polysacharidy užitím konvertujícího faktoru 0,9 (Englyst et al., 1999).

In vitro technika, která je v této studii popsána stanovuje RAG, SAG a frakce škrobu měřením množství glukózy uvolněné z testované potraviny během inkubace trávicími enzymy za normalizovaných podmínek. GI je přímým měřítkem glykemické reakce potravin, a tak odráží všechny mechanismy, které mohou mít vliv na glykemickou odezvu. Avšak pro většinu potravin obsahujících sacharidy je obsah RAG téměř jistě významným faktorem ovlivňujícím velikosti GI a v této studii je znázorněna silná korelace mezi publikovanými hodnotami glykemického indexu a hodnotami rychle stravitelé glukózy pro širokou škálu škrobnatých potravin (Englyst et al., 1996).

Tato studie představuje měření glykemické odpovědi testovaných potravin, u nichž byly naměřeny hodnoty RAG a SAG. Fakt, že daná procentuální změna RAG (dosažena změnou typu potraviny nebo množství konzumovaných potravin), je spojena se stejnou procentuální změnou glykemické odpovědi podporuje hypotézu, že příjem RAG je hlavní klíčový faktor, který má vliv na velikost glykemické odpovědi, za podmínek této studie. Výsledky studie ukazují užitečnost měření *in vitro* RAG a SAG pro charakterizaci glykemické odezvy testovaných potravin (Englyst et al., 1999).

5.2.3 *In vitro* metoda s použitím umělé neuronové sítě

Následující studie popisuje jak stanovit GI potravinářského výrobku pomocí analytické metody *in vitro*. Metoda odhadu glykemického indexu v laboratoři je založena na simulovaném lidském trávení celé řady vzorků se známými hodnotami GI stanoveného již dříve metodou *in vivo*. Zahrnuje tedy štěpení potravin za použití kyseliny chlorovodíkové a enzymů, následně HPLC analýzu cukrů a cukerných alkoholů. Údaje získané z HPLC analýzy a informace o složení výrobku jsou zpracovány pomocí umělé neuronové sítě ke zjištění předpovídané hodnoty GI potraviny. Takle metoda je rychlá a nízkonákladová oproti *in vivo* metodám, které ke stanovení GI potravin musí přijmout vyhovující osoby (Magaletta et al., 2010).

Příprava vzorků

Reprezentativní část vzorku se umístí do laboratorního mikronizéru na několik sekund. Míchání je zastaveno právě v té fázi, kdy se vzorek stane dostatečně homogenní pro řízené trávení. Velmi různorodé vzorky jako jsou například sušenky, byly ještě drceny, ale nesmělo dojít k přílišnému narušení struktury potravin, aby byl dílčí vzorek dostatečně reprezentativní pro analýzu. Na konec byly vzorky přemístěny do odběrového kelímku (Magaletta et al., 2010).

Trávení

Množství vzorku, které odpovídá 0,50 g dostupných sacharidů, bylo naváženo do skleněné lahvičky se šroubovacím uzávěrem, do ní bylo přidáno 5 ml H_2O , 10 ml čerstvě připraveného roztoku pepsinu nebo guarové gumy a pět skleněných kuliček. Po uzavření byla lahvička intenzivně promíchána a vodorovně uložena do 37 °C třepací vodní lázně. Lahvička byla třepána po dobu 30 minut, aby došlo k hydrolýze bílkovin pepsinem. Dále byl přidán do lahvičky roztok octanu sodného (5 ml) a enzymový roztok (5 ml: 136 mg/ml pankreatinu, 13,4 U/ml amyloglukosidázy a 25,43 U/ml invertázy), obsah lahvičky se promíchal převrácením. Originální vzorek byl ihned horizontálně umístěn do 37 °C třepací vodní lázně, kde by třepán po dobu 20 min. Obsah lahvičky byl následně ihned přelit do nádoby Mason obsahující 500 ml 66 % etanolu, aby došlo k zastavení enzymové reakce. Mason nádoba byla uzavřena a její obsah byl jednou promísen převrácením. Část obsahu byla filtrována přes rychlý filtrační papír do lahvičky se šroubovacím uzávěrem. Filtrace je nezbytný krok, který

zajistí, aby se glukóza nevyluhovala pomocí 66 % roztoku etanolu. Roztok byl zředěn deionizovanou vodou, poté byl zfiltrován do lahvičky automatického vzorkovače. Nakonec pomocí HPLC metody byl ve vzorku analyzován obsah glukózy, fruktózy, sacharózy, laktózy, galaktózy a maltitolu (Magaletta et al., 2010).

HPLC postup

Do iontového Chromatografu (ICS-3000, Dionex, Sunnyvale, CA) bylo vstříknuto 10 μ l roztoku. Separace bylo dosaženo použitím CarboPac PA-I analytické kolony s Amino Trap kolonou (Dionex) s průtokovou rychlostí 1 ml/min, jako rozpouštědlo byl použit roztok NaOH. Detekce byla provedena pomocí pulzního amperometrického detektoru (Dionex) za použití jedné zlaté pracovní elektrody a referenční elektrody Ag/AgCl (Magaletta et al., 2010).

Kvantifikace cukrů a maltitolu

Slepý vzorek a vzorek smíchaný se standardy (1, 20, 50, a 100 ppm) každého cukru a maltitolu byly vstříknuty do HPLC a tak byla zkonstruována kalibrační křivka. Koncentrace glukózy, fruktózy, laktózy, galaktózy a maltitolu byly vypočteny z kalibrační křivky pomocí ploch píků při různých ředěních vzorků. Koncentrační hodnoty (%) pro každou analyzovanou byly srovnány se slepým vzorkem a vzájemně byly hodnoty odečteny. Výsledkem bylo stanovení pořadí hodnot v jednotlivých tráveninách srovnaných se slepým vzorkem (%) (Magaletta et al., 2010).

Předpověď glykemického indexu

Ke stanovení rovnice pro předpověď glykemického indexu byla použita umělá neuronová síť s použitím softwaru JMP 7.0 (SAS Institute, Cary, NC). Neuronová síť je sada nelineárních rovnic, které předpovídají výstupní veličiny (y) ze vstupních proměnných (x). V podstatě lze říci, že neuronová síť funguje jako nelineární regresní model.

Hodnoty koncentrace cukrů a cukerných alkoholů v konečném roztoku, společně s celkovým procentuálním zastoupením bílkovin, tuků a celkového obsahu vlákniny (TDF) z původního vzorku (stanoveno analýzou za použití standardních metod, nebo výpočtem z jednotlivých složek hodnot) byly vloženy do JMP 7.0 tabulky. Predikční rovnice byla odvozena z dat pro kalibrační sady vzorků potravin se známými hodnotami GI stanovenými *in vivo*. Kalibrační sada je součástí potravinářských výrobků i řady čistých standardů.

Všechny vzorky a standardy byly analyzovány pomocí výše popsaného postupu. Pomocí softwaru byla znázorněna data, která nejlépe popisují vztahy mezi hodnotami GI *in vivo* a nezávislými proměnnými. K zajištění efektivní předpovědi GI vzorků, které nebyly zahrnuty v kalibračním setu, byly do tabulky JMP 7.0 zadány hodnoty koncentrací jednotlivých složek potravin, které budou předpovídat hodnoty GI pomocí dříve odvozené predikční rovnice.

Množství dostupných sacharidů ve vzorku bylo vypočteno jako rozdíl celkového množství sacharidů a celkového množství vlákniny a minus alkoholy cukru jiné než maltitol. Maltitol byl zahrnut mezi dostupné sacharidy, protože má významnou hodnotu GI podle Livesey et al. (2003), zatímco ostatní běžné cukerné alkoholy mají velmi nízké hodnoty GI, a proto byly považovány za nedostupné pro účely této metody. Předpokládané výsledky byly obecně v dobré shodě s výsledky *in vivo*.

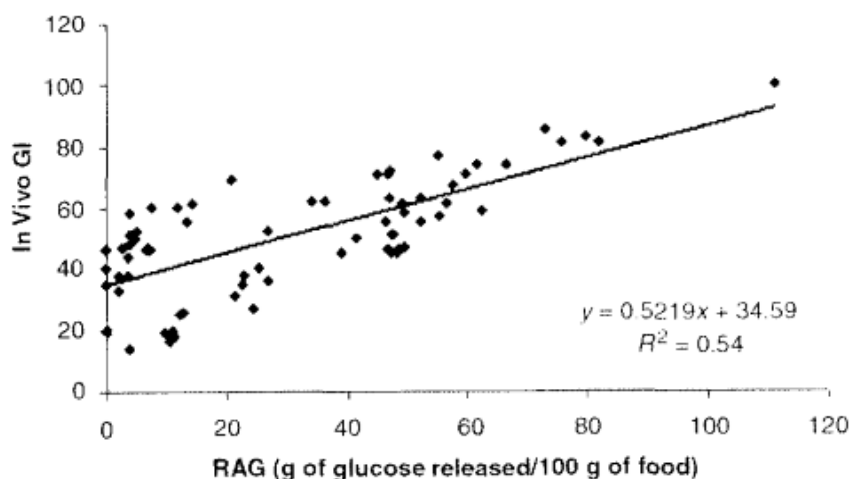
Dosud neexistuje žádný predikční profil sacharózy, protože enzymatická směs obsahuje invertázu, která rozkládá sacharózu na glukózu a fruktózu. Absence sacharózy v rozštěpeném vzorku může být použita jako vnitřní kontrola, zda je směs enzymů přidána do vzorku. Přítomnost sacharózy v natráveném vzorku může být známkou toho, že směs enzymů nebyla řádně připravená, nebo nebyla přidána do vzorku. Pokud se potvrdí, že enzymy byly řádně připraveny, potom přítomnost sacharózy může znamenat, že vzorek obsahuje sloučeniny, které inhibují aktivitu invertázy za podmínek použitých trávení.

Glukóza vykazovala nejstrmější profil křivky předpovědi GI, dále byla následována křivkami laktózy a maltitolu, což je v souladu se známými hodnotami GI *in vivo*, které jsou 100, 46, a 35. Fruktóza a galaktóza jsou cukry s nízkými hodnotami glykemického indexu a jejich profil křivky předpovídající GI je proto plošší. V této studii byly zkoumány také účinky bílkovin a tuků na reakci glykémie u nediatetických jedinců. Bylo zjištěno, že zvýšený obsah bílkovin a tuků sníží odpověď krevní glykémie. Přestože GI je definován jako vlastnost sacharidové frakce potravin i obsah bílkovin nebo tuků v potravinách mají vliv na hodnotu GI. Obsah celkové vlákniny (TDF) v testovaných potravinách byl kompenzován pomocí hmotnosti vzorků, které obsahovaly stejné množství dostupných sacharidů. Neočekává se, že TDF má významný vliv na předpokládanou hodnotu GI. Křivka pro TDF je velmi mírná a má tak negativní vliv na predikci GI.

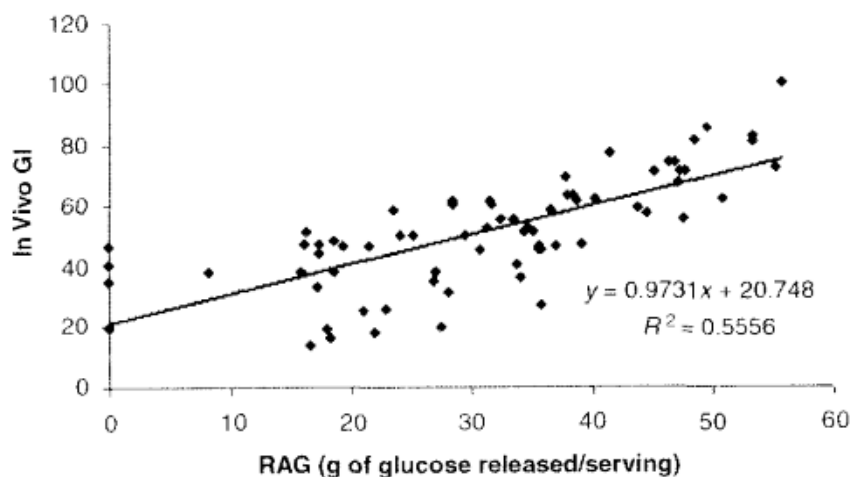
Výsledná data získaná pomocí neuronové sítě byla porovnána s výsledky standardních výpočetních metod. Pro 72 vzorků použitých v této studii, byly výsledky glukózy uvolněné v průběhu trávení převedeny na hodnoty pro RAG. Hodnoty rychle dostupné glukózy jsou vyjádřeny v gramech uvolněné glukózy na 100 g potravin. Tyto výsledky jsou vyneseny do

grafu a to jako GI vs. RAG (g/100 g potravy) a GI vs. RAG (g/porce) jak je znázorněno na obrázcích č. 5 a 6. Výsledky ukazují, jak využití dat neuronové sítě mají za následek zlepšení korelace experimentálních dat s výsledky *in vivo* (Magaletta et al., 2010).

Obrázek č. 5



Obrázek č. 6



Zdroj: Magaletta et al., 2010

Jednou z výhod ze zde popsané metody *in vitro* je, že koreluje s mnohem větším souborem. Každý bod znázorněný v grafu reprezentuje 10 jedinců, takže vzorek kde je v sadě 72 potravin představuje 720 jedinců. Ze statistického hlediska, by to mělo vést k výsledkům, které více vypovídají o celkové populaci, než testování pomocí *in vivo* metody, během které je testováno mnohem méně jedinců (Magaletta et al., 2010)

6 Závěr

Problematika výživy člověka v souvislosti se sacharidy je velmi obsáhlé téma. Glykemický index se sacharidy neodmyslitelně souvisí. Hodnotí sacharidy podle jejich vlivu na postprandiální glykémii. Potraviny s nízkým glykemickým indexem způsobují pomalejší a mírnější glykemickou odpověď zatímco potraviny s vysokým glykemickým indexem způsobují rychlé a výrazné výkyvy glykémie.

Projevuje se stále větší zájem o určení hodnot glykemického indexu potravin nejen u lékařů, ale také u výrobců a spotřebitelů. V této práci byly popsány metody, které jsou používány ke stanovení glykemického indexu. K jeho samotnému stanovení, které není jednoduché, jsou používány klinické a analytické metody.

Obě metody se od sebe liší a byly zjištěny jejich výhody i nevýhody:

Klinická metoda *in vivo* vyžaduje měření hladiny krevní glykémie po požití testované potraviny u zdravých dobrovolníků.

- spolehlivé stanovení glykemického indexu potravin
- získání specifické hodnoty glykemického indexu potravin
- podléhá přísným pravidlům a schvalovacímu procesu etické komise
- finanční a časová náročnost
- je zapotřebí lidských dobrovolníků
- možná variabilita výsledků v rámci jednotlivců, mezi jednotlivci i mezi laboratořemi

Analytické metody *in vitro* jsou založeny na principu nasimulovaného lidského trávení.

- levnější způsob měření glykemického indexu potravin
- jednodušší a rychlejší způsob měření glykemického indexu potravin
- není zapotřebí stanovení glykemické odezvy z krve dobrovolníků
- neposkytují číselné hodnoty glykemického indexu, pouze údaj o glykemické odpovědi
- pouze odhadují pravděpodobnou rychlost trávení sacharidů

Způsob *in vivo* měření hodnot GI potravin je poměrně pracný, časově a finančně náročný. *In vitro* metody, odhadující rychlost trávení sacharidů a absorpci glukózy v tenkém střevě, jsou rychlé a nízkonákladové oproti *in vivo* metodám, které ke stanovení GI potravin musí přijmout vyhovující osoby. Hodnoty GI naměřené *in vivo* mohou být výrazně odlišné pro

stejně potraviny měřené *in vitro*. Je obtížné napodobit všechny lidské trávicí procesy ve zkumavce. Dosud žádná studie *in vitro* nedefinuje sacharidy v potravinách takovým způsobem, aby bylo možné určit jejich trávení ve střevech. Metoda *in vitro* může být vhodná pro určité aplikace jako je například vývoj produktu a výzkum faktorů, které ovlivňují rychlost trávení sacharidů v potravinách. V klinických a epidemiologických výzkumných aplikacích není doporučeno používat hodnoty GI stanovené metodami *in vitro*, protože může dojít k přecenění nebo podcenění pravých hodnot glykemického indexu. Z těchto důvodů nelze nahradit metodu stanovení glykemického indexu potravin na základě určení hladiny krevní glykémie po konzumaci potraviny metodami analýzy dané potraviny.

7 Seznam použité literatury

Araya, H., Contreras, P., Alvina, M., Vera, G., Pak, N. 2002. A comparison between an in vitro method to determine carbohydrate digestion rate and the glyceemic response in young men. *European Journal of Clinical Nutrition*. 56, 735–739.

Blevins, T. C. 2010. Professional continuous glucose monitoring in clinical practice 2010. *Journal of diabetes science and technology*, 4 (2), 440-456.

Brand-Miller, J., Foster-Powell, K., Holt, S. 2003. *The New Glucose Revolution Complete Guide to Glycemic Index Values*. Marlowe.

Brand-Miller, J., Holt, S. 2004. Testing the glycaemic index of foods: in vivo, not in vitro. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58 (4), 700-701.

El, S. N. 1999. Determination of glyceemic index for some breads. *Food chemistry*, 67 (1), 67-69.

Englyst, H. N., Veenstra, J., Hudson, G. J. 1996. Measurement of rapidly available glucose (RAG) in plant foods: a potential in vitro predictor of the glyceamic response. *British Journal of Nutrition*, 75, 327-337.

Englyst, K. N., Englyst, H. N., Hudson, G. J., Cole, T. J., Cummings, J. H. 1999. Rapidly available glucose in foods: an in vitro measurement that reflects the glyceemic response. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69(3), 448-454.

Englyst, K. N., Vinoy, S., Englyst, H. N., Lang, V. 2003. Glycaemic index of cereal products explained by their content of rapidly and slowly available glucose. *British Journal of Nutrition*, 89 (3), 329-339.

Foster-Powell, K., Holt, S. H., Brand-Miller, J. C. 2002. International table of glyceemic index and glyceemic load values: 2002. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76 (1), 5-56.

Gibson, N., Schonfeldt, H. C., Pretorius, B., 2011. Development of a rapid assessment method for the prediction of the glycemic index. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24 (4-5), 750-754.

Goni, I., Garcia-Alonso, A., Saura-Calixto, F. 1997. A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutrition Research*, 17, 427-437.

Granfeldt, Y., Wu, X., Björck, I. 2006. Determination of glycaemic index; some methodological aspects related to the analysis of carbohydrate load and characteristics of the previous evening meal. *European Journal of Clinical Nutrition*, 60 (1), 104-112.

Chlup, R., Sečkař, P., Zapletalová, J., Langová, K., Kudlová, P., Chlupová, K., Jelenová, D. 2008. Automated computation of glycemic index for foodstuffs using continuous glucose monitoring. *Journal of diabetes science and technology*, 2 (1), 67-75.

Jenkins, D. J. A. 2002 Glycemic index: overview of implications in health and disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 266S-273S.

Leeds, A. R. 2002. Glycemic index and heart disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 286S-289S.

Ludwig, D. S. 2002. The Glycemic Index. Physiological Mechanisms Relating to Obesity, Diabetes and Cardiovascular Disease. *JAMA*, vol. 287, no. 18, 2414-2423.

Magaletta, R. L., DiCataldo, S. N., Liu, D., Li, H. L., Borwankar, R. P., Martini, M. C. 2010. In vitro method for predicting glycemic index of foods using simulated digestion and an artificial neural network. *Cereal chemistry*, 87 (4), 363-369.

Menezes, E. W., Giuntini, E. B., Dan, M. C. T., Lajolo, F. M. 2009. New information on carbohydrates in the Brazilian Food Composition Database. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 446-452.

Miller, J. 2002. Contradictions and challenges: A look at the glycemic index. Wheat Foods Council, 1-12.

Oboh, H. A., Agu, K. 2010. The effects of various traditional processing methods on the glycemic index and glycemic load of cowpeas (*Vigna unguiculata*). Journal of food biochemistry, 34 (6), 1332-1342.

Parada, J., Aguilera, J. M. 2009. In vitro digestibility and glycemic response of potato starch is related to granule size and degree of gelatinization. Journal of Food Science, 74, E34-E38.

Peterson, K. 2009. Invazivní a neinvazivní metody kontinuálního monitorování koncentrace glukózy. FONS, roč. 19, č. 2, s. 12-17.

Pi-Sunyer, F. X. 2002. Glycemic index and disease. American journal of clinical nutrition, 76 (1), 290S-298S.

dos Santos, L. M., Tulio, L. T., Campos, L. F., Dorneles, M. R., Krüger, C. C. H. 2015. Glycemic response to Carob (*Ceratonia siliqua* L) in healthy subjects and with the in vitro hydrolysis. Nutrición Hospitalaria, 31 (1), 482-487.

Singh, J., Dartois, A., Kaur, L. 2010. Starch digestibility in food matrix: a review. Trends in Food Science & Technology, 21 (4), 168-180.

Urooj, A., Puttaraj, S. 2002. Glycemic responses to cereal-based Indian food preparations in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and normal subjects. British Journal of Nutrition, 83, 482-488.

Uwadaira, Y., Adachi, N., Ikehata, A., Kawano, S. 2011. Development of a Non-invasive Blood Glucose Sensor Using Short-wavelength Near-infrared Spectroscopy and Its Application to Glycemic Index Determination. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology, 58 (3), 97-104.

Wang, J. 2001. Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges. Electroanalysis, 13 (12), 983.

Willett, W. C. 2001. Eat, drink, and be healthy. New York: Simon & Schuster.

Wolever, T. M. S., Jenkins, D. J. A., Jenkins, A. L., Joss, R. G. 1991. The glycemic index: Methodology and clinical implications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 54, 846–854.

Wolever, T. M. S., Vorster, H. H., Bjorck, I., Brand-Miller, J., Brighenti, F., Mann, J. I., Ramdath, D. D., Granfeldt, Y., Holt, S., Perry, T. L., Venter, C., Wu, X. M. 2003. Determination of the glycaemic index of foods: interlaboratory study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57 (3), 475-482.

8 Seznam použitých zkratek

AOAC	Association of analytical communities
AUC	plocha pod křivkou glykémie
BMI	index tělesné hmotnosti
CGM	kontinuální monitorování glukózy
DF	nerozpustná vláknina
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FAO	Organizace pro potraviny a zemědělství
GI	glykemický index
GL	glykemická nálož
HI	index hydrolýzy
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IAUC	přírůstková plocha pod křivkou glykémie
II	inzulínový index
ISFG	koncentrace glukózy v intersticiální tekutině
např.	například
RAG	rychle dostupná glukóza
RS	nestravitelný (rezistentní) škrob
SAG	pomalou dostupná glukóza
SE	směrodatná odchylka
TDF	celkový obsah vlákniny
tzv.	takzvaně
vs.	versus
WHO	Světová zdravotnická organizace