

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

PEDAGOGICKÁ FAKULTA

KATEDRA APLIKOVANÉ CHEMIE

**Listová zelenina jako zdroj výživově významných fenolických
látek**

Daniela Tröstlová

Vedoucí diplomové práce: Ing. Eva Dadáková, Ph.D.

2014

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Obsah vybraných fenolických látek v salátových rostlinách“ vypracovala samostatně, s použitím literatury uvedené v seznamu.

V Českých Budějovicích

Dne 16.1.2014

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí diplomové práce Ing. Evě Dadákové, Ph.D. za odborné vedení, připomínky a rady. Také děkuji RNDr. Naděždě Vrchotové CSc. za poskytnutí výsledků z HPLC.

Abstrakt

Tato práce pojednává o obsahu fenolických látek v salátových rostlinách. Část této rozsáhlé skupiny rostlinných látek tvoří flavonoidy, které jsou významné svoji lehkou dostupností a významnou biologickou aktivitou. Do popředí pozornosti se dostává především rutin a kvercetin. Tyto látky se vyznačují příznivými biologickými účinky. Mají antioxidační vlastnosti, zabraňují peroxidaci lipidů a likvidují volné radikály. Flavonoidní látky jsou používány v lékařství a mohou předcházet vzniku chronických onemocnění, jako je kardiovaskulární onemocnění nebo ateroskleróza.

Obsah fenolických látek ve vybraném vzorku byl stanoven metodou micelární elektrokinetické kapilární chromatografie (MECC) a metodou kapalinové chromatografie (HPLC) u deseti druhů salátových rostlin. Pro analýzu byl použit lyofilizovaný materiál.

Největší obsah kvercetinu byl nalezen u listového salátu pěstovaného na venkovním záhoně. Hodnota 48 600 mg/kg sušiny vysoce převyšovala obsahy kvercetinu ostatních rostlin. Z dalších fenolických látek byly nalezeny kyseliny rozmarinová, chlorogenová a kávová. Dále byly nalezeny deriváty kyseliny kávové a barviva.

Abstract

The present work treats the amount of phenolic substances in salad plants. A part of this vast plant group is made of flavonoids, which are important by their accessibility and significant biological activity. Quercetin and rutin are in the main focus of this work. They are noted for their favourable biological effects. Having antioxidant qualities, they prevent and stop the lipid peroxidation and they dispose of free radicals. Flavonoids are used in medicine and can prevent the formation of chronic diseases, such as cardiovascular disease or atherosclerosis.

The amount of phenolic substances in the chosen sample of ten salad plants was determined by means of micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) and by high-performance liquid chromatography (HPLC). We have used a freeze-dried material for the analysis.

The utmost amount of quercetin was found in lettuce grown on outside garden. 48 600 mg/kg of dry matter highly exceeded the amount of quercetin in other plants. There were other phenolic substances as well: rosmarinic acid, caffeoylquinic acid and caffeic acid. Among others, we found derivatives and colourants of caffeic acid as well.

Obsah

I. Literární část	4
1. Rostlinné metabolity	4
1.1.Fenolické látky	5
1.1.1. Fenolické kyseliny	7
2. Flavonoidy	9
2.1.Popis	9
2.2.Struktura	10
2.3.Vlastnosti	12
2.4.Flavony	13
2.5.Metabolismus flavonoidů	14
2.5.1. Kyselina šikimová	15
2.5.2. Metabolismus	16
2.6.Využití	17
3. Salátové rostliny	19
3.1.Popis a vlastnosti	19
3.2.Čekanka	20
3.2.1. Popis	20
3.2.2. Zdravotní účinky	21
3.2.3. Použití v kuchyni	22
3.2.4. Použití a výskyt	22
3.3.Endivie	22
3.3.1. Popis	22
3.3.2. Zdravotní účinky	23
3.3.3. Použití v kuchyni	23
3.3.4. Použití a výskyt	23
3.4.Fenykl řapíkatý	24
3.4.1. Popis	24
3.4.2. Zdravotní účinky	24
3.4.3. Použití v kuchyni	24

3.4.4.	Použití a výskyt	24
3.5.	Lebeda zahradní	25
3.5.1.	Popis	25
3.5.2.	Zdravotní účinky	25
3.5.3.	Použití v kuchyni	25
3.5.4.	Výskyt a použití	26
3.6.	Kozlíček polní	26
3.6.1.	Popis	26
3.6.2.	Zdravotní účinky	26
3.6.3.	Použití v kuchyni	27
3.6.4.	Použití a výskyt	27
3.7.	Roketa setá	27
3.7.1.	Popis	27
3.7.2.	Zdravotní účinky	28
3.7.3.	Použití v kuchyni	28
3.7.4.	Použití a výskyt	28
3.8.	Salát	28
3.8.1.	Popis	28
3.8.2.	Zdravotní účinky	29
3.8.3.	Použití v kuchyni	29
3.8.4.	Hlávkové saláty	29
3.8.4.1.	Máslovy salát	29
3.8.4.2.	Ledový salát	29
3.8.5.	Listové saláty	29
3.9.	Perila křovitá	30
3.9.1.	Popis	30
3.9.2.	Zdravotní účinky	30
3.9.3.	Použití v kuchyni	30
3.9.4.	Použití a výskyt	31
4.	Analytické metody	32
4.1.	Význam separačních metod	32

4.2.	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	33
4.3.	Kapilární elektromigrační metody	34
4.3.1.	Kapilární zónová elektroforéza	34
4.3.1.1.	Uspořádání kapilární zónové elektroforézy	34
4.3.1.2.	Princip kapilární zónové elektroforézy	35
4.3.2.	Micelární elektrokinetická chromatografie	36
II.	Cíle práce	37
III.	Experimentální část	38
1.	Zpracování rostlinného materiálu	38
2.	Použité chemikálie, sklo a přístroje	39
2.1.	Laboratorní sklo a přístroje	39
2.2.	Chemikálie a standardy	40
2.3.	Příprava pracovních roztoků a standardů	40
3.	Stanovení celkového obsahu kvercetinu metodou MECC	41
3.1.	Metodika stanovení	41
3.1.1.	Stanovení celkového kvercetinu	41
3.1.2.	Měření na kapilární elektroforéze	42
4.	Stanovení vybraných fenolických látek metodou HPLC	42
4.1.	Příprava extraktu	42
4.2.	Zjištění vybraných fenolických látek metodou HPLC	42
4.3.	Schéma použitého gradientu	43
IV.	Výsledky a závěr	44
1.	Diskuse	44
1.1.	Stanovení obsahu celkového kvercetinu	45
1.2.	Chromatografické profily jednotlivých salátových rostlin	46
2.	Závěr	57
V.	Použitá literatura	58
VI.	Přílohy	62

I. Literární část

Rostlinné organismy patří mezi primární výrobce organické hmoty a kyslíku. Jsou schopny akumulovat sluneční energii a poskytnout velkou škálu přírodních látek. Přibližně 90 % z třiceti tisíc známých látek pochází z rostlinných materiálů. Pro člověka jsou rostliny nejen poskytovatelem mnoha chemických sloučenin, ale patří i k důležitým zdrojům potravy a stavebního materiálu. Rostoucí zájem o jejich biochemii a biotechnologii je tedy pochopitelný a právě proto jsou v dnešní době předmětem mnoha výzkumů.

1. Rostlinné metabolismy

Z funkčního hlediska metabolismy dělíme na primární a sekundární. Primární metabolismy jsou tvořeny cestami odbourávání a biosyntézy sacharidů, lipidů, bílkovin a nukleových kyselin. Jsou to látky, jež vznikají při základních funkcích rostliny a slouží ke stavbě buněk. Tento metabolismus je v hlavních rysech stejný pro všechny organismy. Na primární metabolismus navazuje metabolismus sekundární.

Sekundární metabolismy slouží k udržení života rostliny a k pokračování svého druhu. Látky sekundárního metabolismu vznikají především při změnách vlivů prostředí. Příkladem jsou stresové situace jako teplotní změny, změna slunečního svitu, či při ohrožení patogeny. Rostliny je využívají při reprodukci, růstu a expresi genu. Jejich syntéza je velmi energeticky náročná a využívá společné intermediáty s primárními metabolismy. Jedná se o šikimovou kyselinu a její metabolismy, některé aminokyseliny, krátké mastné kyseliny, puriny a intermediáty citrátového cyklu. Zjednodušeně jsou definovány jako produkty metabolismu, které nemají žádnou důležitou funkci pro producenta, ale jsou schopny mu poskytnout určité výhody. Tato definice je však velmi nepřesná. Důkazem pro jejich důležitost v životě organismů je udržení genetické informace po milion let. Avšak na rozdíl od primárních metabolitů jejich nedostatek neznámá smrt, i když může způsobovat snižování odolnosti. Některé sekundární metabolismy jsou unikátní pro určitou fylogenetickou skupinu organismu a jsou důležité pro systematiku. U rostlin, jelikož nemají vylučovací soustavu, mohou být tyto metabolismy považovány za látky odpadní. Naopak mnohé z nich získaly během vývoje vlastnosti napomáhající rozmnožování. Jedná se

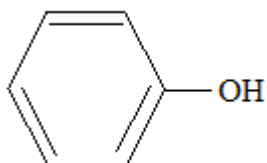
hlavně o hormony, ale svoji roli hrají i barevné či pachové látky. Etologický význam mají látky odpuzující a toxické, kam patří alkaloidy, srdeční glykosidy a ropuší jedy.

Mezi sekundární metabolity zařazujeme terpenické látky, steroidy a fenolické látky. Jejich důležitým stavebním materiálem jsou kódované aminokyseliny nebo jejich prekursory např. šikimát, acetyl- a sukcinyl-CoA a sacharidy. Avšak u sacharidů mohou vznikat problémy se zařazením. Jsou považovány někdy za látky primárního a někdy za látky sekundárního metabolismu (Malolepsza a Urbanek, 2000, Vodrážka, 1999).

1.1. Fenolické látky

Za fenolické látky považujeme ty sloučeniny, které obsahují hydroxylovou funkční skupinu (-OH), která je vázána přímo na aromatický kruh. Základní sloučeninou je zde fenol (C_6H_5OH).

Obr. č. 1 Fenol



Jak již bylo zmíněno, fenolické látky zařazujeme do sekundárních metabolitů. Patří mezi velmi různorodou skupinu s velkou rozmanitostí struktur, která je syntetizována v cyklu kyseliny šikimové ($C_7H_9O_5$, trihydroxycyklohexenkarboxylová kys.). Počet identifikovaných fenolických látek jde do tisíců (Harmatha, 2002, Malolepsza a Urbánek, 2000).

Základní meziprodukty fenolických látek, které vznikají v biogenetických drahách, jsou dva až tři. Z těchto klíčových meziproduktů dále vznikají tisíce dalších derivátů. Příkladem je kyselina skořicová a její deriváty: kyselina kumarová, kávová a ferulová. Z nich potom vznikají specifickými hydroxylacemi, dehydrogenacemi, oxidacemi, esterifikacemi apod. meziprodukty druhého stupně (Harmatha, 2002, Malolepsza a Urbánek, 2000).

Fenolické sloučeniny jsou také prekurzory látek, které jsou označovány jako látky způsobující barevné změny. Tento proces se nazývá enzymové hnědnutí (např. u brambor). Pro člověka jsou tyto změny brány jako negativní. Klady fenolických látek najdeme v jejich antimutagenních a antikarcinogenních účincích. Další jejich schopnost je vyvazovat volné radikály a toxické kovy a indukce karcinogen-detoxikačního systému (Hajšlová et al., 2007).

Rostlinné fenolické látky lze rozdělit podle počtu uhlíků a jejich vzájemných vazeb (Harmatha, 2002).

jednoduché fenoly	enzofenony a dibenzopyrany
fenolické kyseliny	antrachinony a stilbeny
acetofenony, benzofurany, izobenzofurany	flavonoidy a chalkony
fenylpropanoidy, benzopyranoidy, kumariny	lignany a neolignany
naftochinony	kondenzované taniny
ageratochromeny a prekoceny	lignin
dibenzofurany	katecholmelaniny

Dělení fenolických látek podle Harmathy je jedno z mnoha. K dalším klasifikacím lze použít buď hledisko struktury látek: terpeny, flavonoidy, chinony aj., hledisko jejich biogeneze, tedy od čeho jsou odvozené: aminokyseliny, cukry, různé organické kyseliny aj., nebo hledisko funkčnosti: barviva, fytohormony, fytoncidy aj. Avšak stále neznáme funkce všech sekundárních metabolitů a ani jejich přesný vznik. Žádné z těchto rozdělení tedy nelze uplatnit ve všech situacích. Proto se při přehledu často setkáváme s kombinacemi těchto hledisek (Vodrážka, 1999).

Dělení dle Vodrážky:	alkaloidy
	barviva
	aromatické a hydroaromatické sloučeniny
	heteroglykosidy
	etherické oleje, pryskyřice a kaučuky
	látky s regulačními, informačními a ochrannými funkcemi

1.1.1. Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny patří mezi obvyklý typ sekundárních metabolitů a ve zkoumaných rostlinách byly často přítomny. Především kyselina rozmarinová, chlorogenová a kávová.

Spolu se svými deriváty hrají fenolické kyseliny významnou roli při obraně organismu. Trna a Táborská uvádějí, že tyto kyseliny mají velmi rozsáhlý výskyt a jsou k nalezení ve velkém množství potravin, především v ovoci a zelenině. Tvoří jednu třetinu polyfenolů v potravě (www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf).

Chlorogenová kyselina(5-caffeoylchinová kyselina) je významným antioxidantem, který se vyskytuje především v kávě a v hlohových plodech. Působí proti virům a bakteriím. Tato fenolická kyselina se často využívá i při redukčních dietách. Zamezuje absorpci sacharidů a aktivuje metabolismus jater. Patří mezi nejběžnější derivát kyseliny kávové. Dále autoři uvádí, že šálek kávy obsahuje až 150 mg této kyseliny (www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf). V lidském těle podléhá redukčním a hydrolytickým reakcím. Bakteriálními esterázami je hydrolyzována na kyselinu kávovou a chinovou (Brancová, 2008).

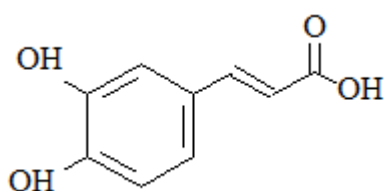
Kyselina rozmarinová má antivirové a antioxidační účinky. V lékárnách jsou dostupné přípravky s přídavkem kyseliny rozmarinové proti tvorbě oparů (Carnat et al., 1998). Tato kyselina je esterem kyseliny kávové a 3,4-dihydrofenylnléčné kyseliny. Poprvé byla izolována z rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis L.*). Avšak nalézá se i v celé řadě jiných rostlin. Vysoké množství kyseliny rozmarinové je obsaženo v černohlávku obecném. U této kyseliny bylo prokázáno značné množství farmakologicky zajímavých vlastností, příkladem je chemoprotektivní funkce²⁰. Díky těmto vlastnostem se čím dál častěji dostává do popředí zájmů ve výzkumech (Jirovský, 2007).

Kyselina kávová (kyselina 3,4-dihydroxyskořicová) existuje ve své základní formě, ale i jako derivát. S jednou jednotkou této kyseliny se setkáme u fenylesteru kyseliny kávové a chlorogenové. Spojíme-li dva kruhy kyseliny kávové esterovou vazbou, vznikne nám kyselina rozmarinová. U tří kruhů je to kyselina lithospermová. V lidském těle kyselina kávová podléhá methylaci, konjugaci nebo kombinaci obojího. Metabolismus jejich derivátů doposud není přesně zjištěn. U některých derivátů je základním krokem

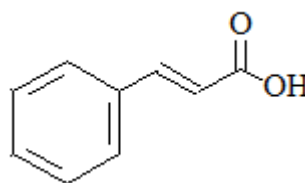
rozvolnění esterové vazby a uvolnění kyseliny kávové. U druhé poloviny derivátu nastává deaktivace celé nebo částečné molekuly (Brancová, 2008).

Většina fenolických kyselin se nevyskytuje v rostlinách ve svém základním stavu, ale ve formě glykosidů a esterů. Příkladem se může stát kyselina ferulová, která se váže esterovou vazbou na hemicelulózu (Slanina a Táborská, 2004).

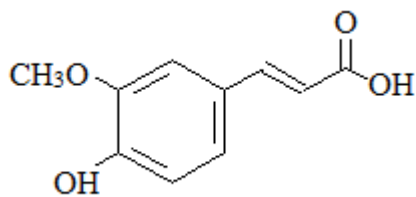
Obr. č. 2 Kyselina kávová



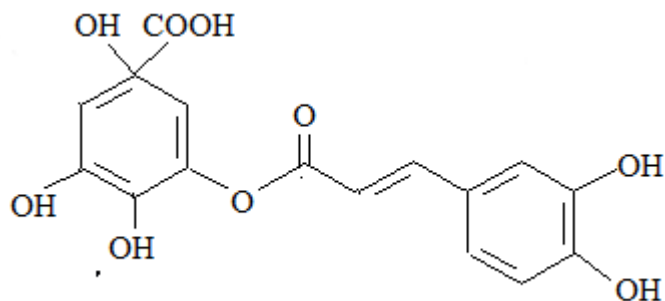
Obr. č. 3 Kyselina skořicová



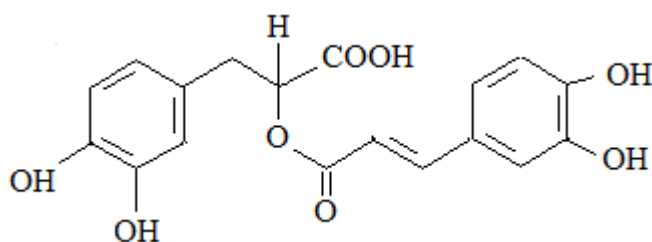
Obr. č. 4 Kyselina ferulová



Obr. č. 5 Kyselina chlorogenová



Obr. č. 6 Kyselina rozmarinová



2. Flavonoidy

2.1. Popis

V současné době se mnoho studií zabývá flavonoidními látkami. Je to dáno jejich četností výskytu a zdravotními účinky na lidský organismus. Pozornost se soustřeďuje především na kvercetin a rutin.

Je známo více jak deset tisíc flavonoidních sloučenin (Malolepsza a Urbanek, 2000). Jsou to látky vznikající jako sekundární metabolity jen v rostlinách a proto je zvířata mohou přijímat pouze v potravě. V rostlinách jsou tyto látky soustředěny nejvíce v nadzemních částech a to především v plodech, listech a květech. Méně často pak v kůře, v podzemních částech bylo zjištěno jen malé množství. Spolu s anthokyaniny se podílí na zbarvení ovoce, zeleniny a květů. Barvy jsou od světle růžové až do červené, od světle fialové až do tmavě modré (Hertog et al, 1992a)

Rozdíl v celkovém obsahu flavonoidních látek je způsoben odlišností podmínek, ve kterých jsou pěstovány (Ismail et al., 2003). Příkladem je listový salát, studovaný v této práci, který byl pěstován volně a ve skleníku. Množství obsahu fenolických látek je natolik odlišné, že by se mohlo zdát, že se jedná o jiný druh rostliny.

Dalším důležitým faktorem ovlivňující obsah je zralost rostliny (DuPont et al., 2000).

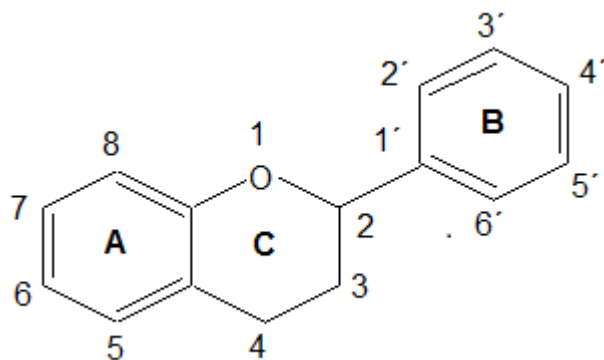
2.2. Struktura

Flavanový skelet se skládá ze dvou substituovaných benzenových kruhů (A a B) a pyranového kruhu C, napojeného na kruh A. Heterocyklus C, obsahující kyslíkový atom, je odpovědný za typické reakce flavonoidů. Fenyl B může být napojen na pyranový kruh v pozici 2 (normální flavonoidy), 3 (isoflavonoidy) nebo 4 (neoflavonoidy) Další klasifikace je založena na stupni oxidace pyranového kruhu (Vodrážka, 1999).

Základní sloučeninou je tedy heterocyklický flavan, tvořen dvěma benzenovými kruhy spojeny heterocyklickým pyranem. Z něho odvozujeme společný základ flavonoidů bifenylypyran (C6- C3- C6) (Hollman, 1998).

Hlavní rozdíl mezi flavony a flavonoly je navázaná (-OH) skupina v poloze C3 u flavonolů (Hertog et al., 1992a).

Obr. č. 7 Struktura flavonoidů



Dělení flavonoidních látek (Slanina a Táborská, 2004)

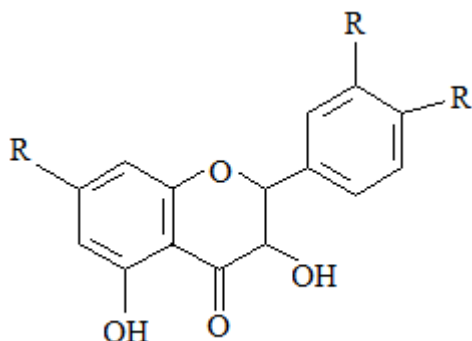
flavony	anthokyanidy
flavonony	leukoanthokyaniny
flavonoly	chalkony
flavonoly	dihydrochalkony
izoflavony	aurony
anthokyaniny	katechiny

Biosyntéza flavonoidů vychází z fenylalaninu a probíhá přes skořicovou kyselinu a další fenylpropanové sloučeniny. Z fenylalaninu pochází jádro B a atomy uhlíku 2, 3, 4, z jádra C. Zbylé uhlíkové atomy poskytují acetát a malonát (Vodrážka, 1999).

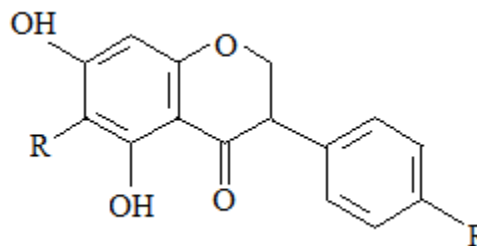
Flavonoidy se často vyskytují ve formě O-glykosidů, které jsou tvořeny cukernou a necukernou složkou. Necukerná složka se nazývá aglykon, který nebývá jako samostatně stojící jednotka. Cukernou složkou bývá nejčastěji D-glukóza. Dále můžeme najít D-galaktózu, L- rhamnózu, L- arabinózu, D-xylózu. Známe na osmdesát typů cukrů vázaných na flavonoidy, jejichž postavení se může měnit (Hollman et al., 1996).

Většina z hlavních glykosidů je substituovaná v pozici 3 a mezi nejhojnější deriváty patří deriváty kvercetinu (Rhodes a Price, 1997). V přírodě je nalezeno až sto sedmdesát devět různých kvercetinových glykosidů (Hollman et al., 1996).

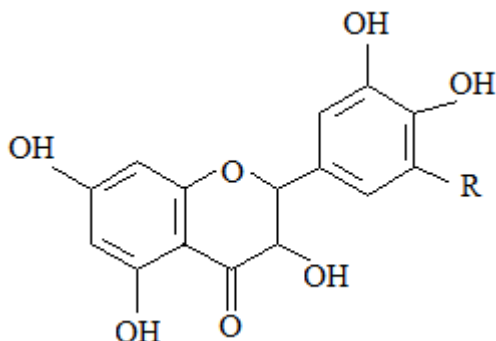
Obr. č. 8 Flavonoly



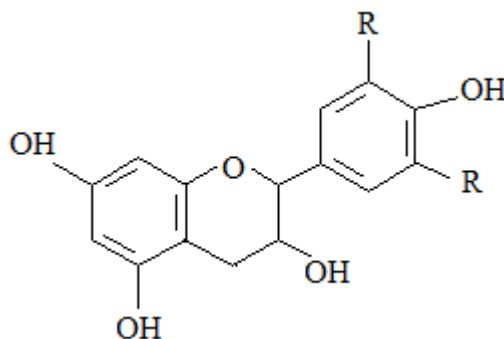
Obr. č. 9 Isoflavony



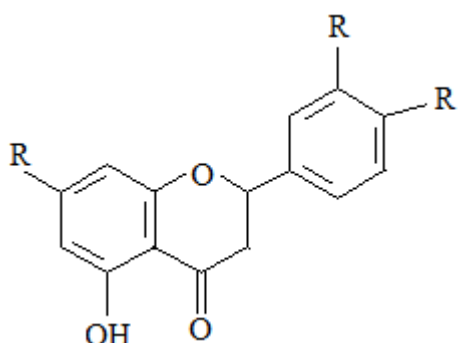
Obr. č. 10 Flavan-3-oly (katechin)



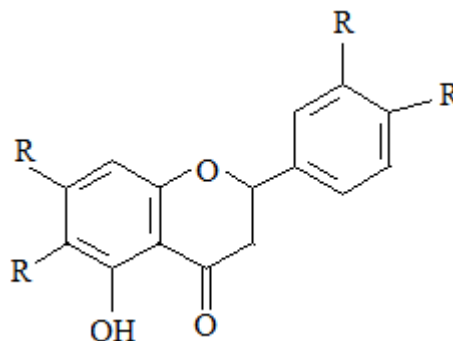
Obr. č. 11 Anthokyanidiny



Obr. č. 12 Flavonony



Obr. č. 13 Flavony



2.3. Vlastnosti

V buňce se flavonoidy vyskytují ve vakuolách. Volné radikály a aktivní sloučeniny kyslíku jsou kvůli fotosyntetický transport elektronů přítomné v chloroplastech. Avšak peroxid vodíku se dokáže dostat přes membránu chloroplastů a reakcí s flavonoidy tak vytváří flavonoidní fenoxylový radikál. Ten dále reaguje s kyselinou askorbovou za vzniku dehydroaskorbového radikálu. Ten se cytosolickou dehydroaskorbátreduktázou mění zpět na kyselinu askorbovou (Velíšek, 1999).

Flavonoidy zamezují peroxidaci lipoproteinů, nahromadění plaku, kapilární permeabilitě a křehkost vlásečnic. Důležitou roli hrají antioxidantní vlastnosti (Cook a Samman, 1996).

Antioxidantní schopnost flavonoidů je závislá na počtu a poloze hydroxylových skupin. Ideální likvidační schopnosti má o-dihydroxy struktura, dvojná vazba mezi uhlíky C2-C3 a 4-oxo funkční skupinu v kruhu C a 3 a 5 -OH skupiny na kruzích A a C (Cook a Samman, 1996).

V některých studiích bylo pojednáváno o mutagenitě některých flavonoidů. Jednalo se především o kvercetin, kempferol a myricetin. Tyto studie spustily obavy z těchto látek. Avšak jednalo se o mutagenitu kvercetinu v bakteriálních systémech. U savců mutagenita nebyla dokázána. Řešila se i karcinogenita, která byla opřena o důkazy, ale jiné studie karcinogenitu nepotvrdily (Hertog et al., 1992a).

Zlepšují pružnost cév a červených krvinek. Působí tak na zlepšení cirkulace krve a zásobení tkání kyslíkem. U srdečního svalu působí na jeho kontrakci a tedy i korigují množství krve, které projde srdcem do tkání. Jsou důležité při zvýšené hladině cholesterolu (<http://symbinatur.com/Antioxidanty-I-clanek-755.html>).

Antioxidační vlastnosti fenolických látek zkoumal Ismail et al (2003). Zaměřil se na pět druhů zeleniny a to na cibuli, špenát, zelí, kapustu a brukev zelnou. Dle studie měla největší antioxidační vlastnosti cibule. Následoval špenát a srovnatelné vlastnosti projevilo zelí a brukev zelná. Na posledním místě skončila kapusta. Avšak na výsledky má vliv i ekologické hledisko. Při pěstování záleží na teplotě, světle a vlhku. Při změnách podmínek se pořadí může měnit (Ismail et al., 2003).

V minulém století provedl Hertog et al. mnoho výživových studií, které se týkaly dlouhodobého příjmu flavonoidních látek a jejich účinku na lidský organismus. Výzkum byl proveden v několika evropských státech, v Japonsku a v Americe a byl zaměřen většinou na mužskou populaci. U vybraných jedinců sledoval jejich životní styl a způsob stravování. Hodnotil hlavně složení stravy, kde hledal významné zdroje flavonoidů: cibule, čaj a jablka. Byla zjištěna zvýšená úmrtnost na nemoci srdce, cév a některých druhů rakoviny, ale všechny studie prokázaly snižování úmrtnosti při pravidelném příjmu polyfenolů (Hertog et al., 1993, Hertog et al., 1995., Hertog et al., 1997).

2.4. Flavonoly

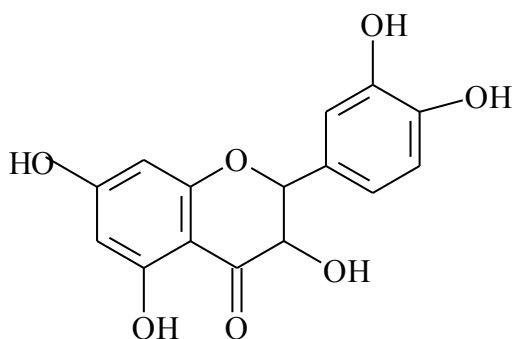
Základ tvoří hydroxyderiváty flavonu, obsahující v pozici 4 flavanového skeletu oxoskelet. Přesná struktura flavonu je známa asi jen u tři sta z nich. Nejběžnější polohy hydroxylových skupin na flavonovém skeletu jsou 3 a 7. Flavony s hydroxylovou skupinou se často nazývají flavonoly a jsou považovány za podskupinu flavonů (Vodrážka, 1999).

Flavonoly se nejčastěji vyskytují jako glykosidy. Cukernou složku zastupuje glukóza, ale lze najít i rhamnózu, xylózu a různé další di- a trisacharidy. U kvercetinu najdeme (-OH) skupinu na 3, 5, 7, 3' a 4' uhlíku. Je to barvivo slupek cibule, čaje, pylu kukuřice, chmele a aglykonu tabákových glykosidů kvercitinu a rutinu. Kvercitin se skládá z kvercetinu a zbytku rhamnózy, u rutinu je kvercetin navázán na disacharid z glukózy

a rhamnózy. Rutin a kvercetin jsou typické příklady barevných flavonolových glykosidů (Vodrážka, 1999).

Kvercetin likviduje hydroxidové anionty, hydroxyradikály, lipidové peroxyradikály a tvoří cheláty s některými ionty kovů (Cook a Samman, 1996). Kvercetinové glykosidy ramnetin a firetin brzdí tuberkulózní bacily. Samotný kvercetin tlumí virové onemocnění. Kvercetin je znám nejen ve své volné formě, ale i jako kvercetin-3-O-glukosid, kvercetin-4-O-glukosid a kvercetin-3-O-rhamnosid. Kvercetin-3-O-rhamnoglukosid je znám jako rutin a používá se do léků proti křehkosti kapilár. Rutin působí na revmatické choroby dále má schopnost pomáhat při degenerativních očních vadách a pomáhat při jejich regeneraci (Stratil, 2003, www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf).

Obr. č. 15 Kvercetin



2.5. Metabolismus flavonoidů

Metabolismus flavonoidů není jednotný a není doposud znám u všech flavonoidů. Je to dáno díky nejednotné struktuře (Cook a Samman, 1996). Vstřebávání, metabolismus a následná distribuce pravděpodobně záleží na typu glykosidu (Hollman a Katan, 1998).

2.5.1. Kyselina šikimová

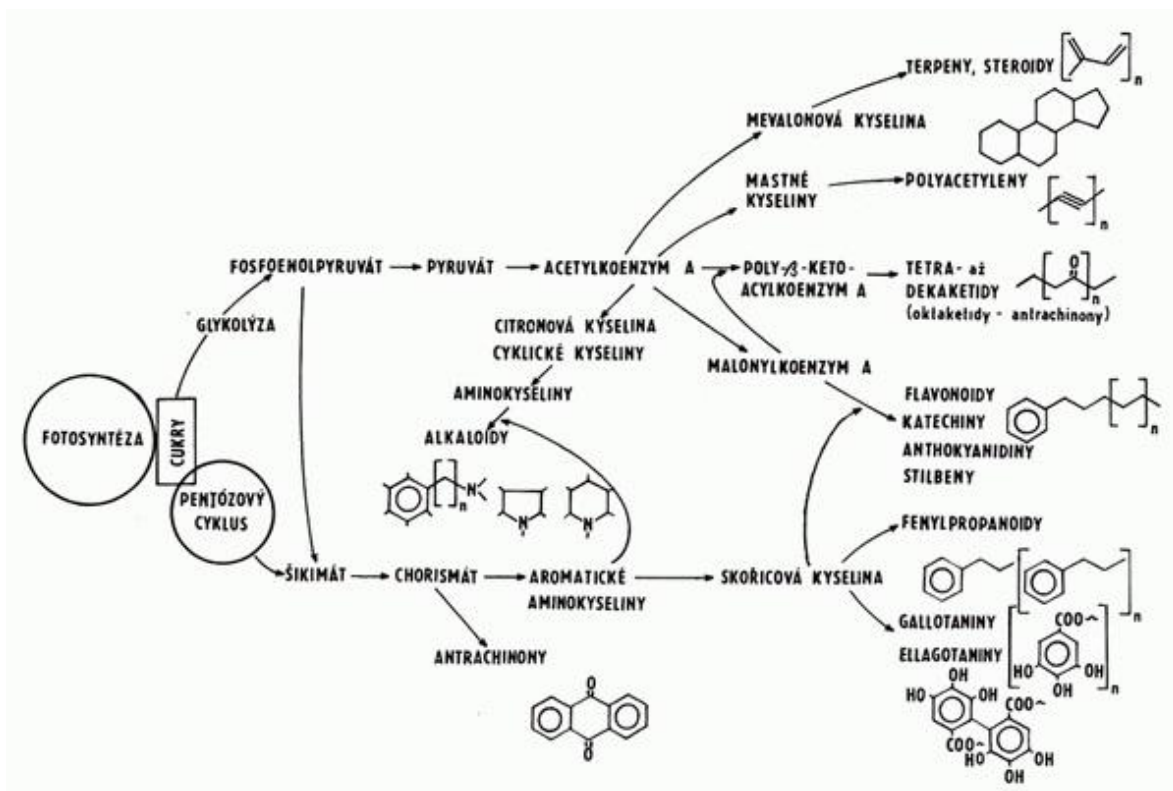
Kyselina šikimová byla poprvé izolována z plodu badyáníku pravého. Jeho japonské pojmenování shikimino-ki dalo potom název celé rostlině. V mnoha biosyntézách tvoří tato kyselina důležité meziprodukty. Je klíčová pro tvorbu aromatických aminokyselin fenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu, ze kterých vznikají další sekundární metabolity.

Kyselina šikimová vzniká při metabolismu cukrů. Je syntetizována z erythróza-4-fosfátu, která vzniká jako meziprodukt fotosyntézy, ta reaguje s fosfoenolpyruvátem za vzniku kyseliny 2-keto-3-deoxy-7-fosfo-D-araboheptonové, ze které v dalším kroku vzniká kyselina 3-dehydrochinová a její následující redukcí kyselina chinová. Ta se v rostlinných organismech nalézá jak volná, tak vázaná na fenolické látky. Po dehydrataci kyseliny chinonové vzniká kyselina 3-dehydrošikimová a následnou redukcí vznikne kyselina šikimová. Existuje mnoho mezistupňů, které vedou až ke kyselině šikimové, ale jako první bod vzniku je označováno spojení fosfoenolpyrohroznové kyseliny s erythróza-4-fosfátem.

U aromatických aminokyselin se nachází při biosyntese ještě další mezistupně, kdy cíleným meziproduktem je kyseliny chorismová. Vyšší rostliny tvoří z těchto aminokyselin sekundární metabolity typu alkaloidů a dále přes skořicovou kyselinu, lignin, flavonoidy, kumariny, třísloviny, aryl-, glukosinoláty, kyanogenní glykosidy apod. Kyselina chorismová může být prekurzorem sekundárních metabolitů i sama, příkladem jsou naftochinony, antrachinony, chloramfenikoly či aminobenzoové a hydroxybenzoové kyseliny (<http://www.biotox.cz/toxikon/rostliny/biosyntesa.php>).

Badyáník pravý (*Illicium religiosum*, Hook) je původem z Číny a Indie. V dnešní době roste ve většině tropických a subtropických oblastí. Dosahuje 18 metrů. Plody jsou tobolky uspořádané do osmicípé hvězdy. Do Evropy byl přivezen sirem Thomasem Cavendichem koncem 16. století Používá se jako koření, v kosmetice, při výrobě alkoholů, v léčitelství na revmatismus, nadýmavosti a proti bolestem zad. Plody obsahují esenciální oleje. V Asii se jeho dřevo používá i na výrobu červeného nábytku. Jeho chuť se přirovnává ke známějšímu anýzu (Kýbal a Kaplická, 1988).

Obr. č. 16 Metabolismus kyseliny šikimové



<http://www.biotox.cz/toxikon/rostliny/biosyntesa.php>

2.5.2. Metabolismus

Odhadovaný příjem flavonoidů je 1g/den (Hertog et al., 1992b). Tento příjem záleží ve velké míře na výživových návycích. Bylo zveřejněno, že Japonci mají zvýšený příjem flavonoidů díky pití zeleného čaje (). Člověk přijímá tyto látky průměrně v 44 mg z cereálií, 79 mg z brambor, 45 mg z ořechů, 162 mg ze zeleniny, 290 mg ovoce a 420 mg je tvořeno Coca colou, čajem, kávou, pivem a vínem (Formica a Regelson, 1995).

Vstřebávání, metabolismus, následná distribuce a vylučování je u člověka málo prostudovaná oblast. Více se tyto děje zkoumají u zvířat. Vstřebávání flavonoidů typu glykosidů, které jsou obsažené v potravě, je považováno za zanedbatelné. Pouze flavonoidy bez cukerných složek tzv. volné flavonoidy, byly studované, díky své propustnosti přes střevní stěnu. Přesto ve střevě a v játrech probíhá metabolismus flavonoidů. Bakterie

tlustého střeva degradují strukturu flavonoidů rozštěpením heterocyklu a hydrolyzací konjugátu pravděpodobně umožňují vstřebávání uvolněných aglykonů. Předpokládají se tři typy štěpení kruhu u katechinu, flavonolů, flavonu a flavanonů, vedoucím k různým fenolickým kyselinám nebo jejich laktonům (Hollman a Katan, 1998).

Podle studie Hollmana a Katana (1998) bylo dokázáno kvantitativní vstřebávání různých forem kvercetinů. I když flavonoidní aglykony, jak bylo řečeno výše, jsou schopné projít přes střevní stěnu, u aglykonu kvercetin tak bylo pouze u 1 % aglykonů. U krys byla při orálním požití aglykonu kvercetin úspěšnost 20 %. U lidí s ileostomií byla úspěšnost 24%. Absorpce glykosidů je tedy možná. Vstřebaný kvercetin se z krve vylučuje velmi pomalu a pozvolna. Následující farmakokinetické studie dokázaly výrazné rozdíly ve vstřebání a biologické použitelnosti flavonoidů. Pravděpodobně záleží na typu glykosidu (Hollman a Katan, 1998).

Za dominující flavonoid se považuje kvercetin. Jako první byl izolován Szentem Gyorgyiem v roce 1936. Vyskytuje se v běžných potravinách jako cibule, jablka, kapusta, červené víno, zelený a černý čaj.

V cibuli byl naměřen obsah kvercetinů dle Trny a Táborské 300 mg/kg čerstvé hmoty, v kapustě okolo 100 mg/kg (www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf).

Formica a Regelson (1995) uvádí obsah kvercetinů 284-486 mg/kg u cibule, 110 mg/kg u kapusty, 30 mg/kg u brokolice, 14 mg/kg u vína a 7 mg/kg u džusu (Formica a Regelson, 1995).

Podle studie Arabbiho et al. (2004), která se zabývala celkovým obsahem flavonoidů, obsahuje bílá cibule 48-56 mg/100 g čerstvé hmoty, červená cibule 40-100 mg/100 g, červené zelí 67-67,2 mg/100 g a v čekance 18-38 mg/100 g. U ovoce se větší obsah flavonoidů objevil v kůře: 125-170 mg/100 g. Ve dřeni byl obsah 35-44 mg/100 g (Arabbi et al., 2004) Podle studie DuPont et al (2000) byl obsah flavonoidů 0,3-229 µg/g čerstvé hmoty v listových salátech a 44-248 µg/g čerstvé hmoty v endivii (DuPont et al., 2000).

2.6. Využití

U flavonoidů byl dokázán antiseptický a močopudný účinek. Dále se přidávají do léků proti kornatění tepen a na úpravu kolísavého krevního tlaku. Byla vykázána i schopnost derivátu kyseliny kávové blokovat nitrobuněčné signály vyvolané LDL a blokovat jeho cytotoxický účinek (www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf).

Flavonoidy jako látky s antioxidantními vlastnostmi se používají velmi často v lékařství. Zkoumá se jejich účinek na rakovinotvorné buňky nebo spíše jejich používání jako prevence proti vzniku rakoviny. U zvířat probíhá studie používání flavonoidů na základě inhibice nádorového bujení (Hollman a Katan, 1998). Probíhají výzkumy ohledně isoflavonů a jejich účinku při prevenci vzniku nádorů prsu a osteoporózy (www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf).

Byl prokázán kladný vliv na degenerující nemoci mozkových neuronů: Parkinsonova a Alzheimerova choroba (Dasgupta a Bratati, 2005).

Mají antivirové, antibakteriální, protialergenní a protizánětlivé účinky a dále vliv na imunitní systémy. Předpokládá se potenciální role v prevenci rakoviny (Lachman et al., 1999). Používají se jako vychytávače volných radikálů (Cook a Samman, 1996).

3. Salátové rostliny

3.1. Popis a vlastnosti

Používání salátových rostlin za účelem potravy je znám po tisíciletí. Nyní se ale nepoužívají jen jako doplňkové potraviny zlepšující zdravotní stav člověka. Ale čím dál větší skupině obyvatelstva, jako jsou vegetariáni a vegani, slouží tyto rostliny k hlavní části potravy. Na trhu je tak k dostání nepřeberné množství druhů. Zájem je o ně díky malému energetickému obsahu a chuťové a vizuální přitažlivosti.

Je to zelenina nabitá vitamíny, minerály, vlákninou a skupinou fytochemických látek, které mohou snižovat rizika onemocnění srdce, očí a některých druhů rakoviny.

Obsah výživově významných sloučenin:

beta-karoten,	kyselina listová
chlorofyl,	lutein a zeaxantin
indoly,	sulforafan
isothiokyanáty	vápník
vitamín K	

Beta-karoten působí jako antioxidant. Je schopný posilovat imunitu a je účinný proti volným radikálům. Vstřebání lze zlepšit přidáním olivového oleje. Chlorofyl je rostlinné barvivo, které má schopnost pozastavit změnu buněk do prekancerózního stádia. Indoly slouží k blokaci činnosti estrogenu. Pomáhají ochraňovat organismus před vznikem rakoviny. Isothiokyanáty jsou fytochemické látky, které jsou příčinou štiplavosti některých druhů listové zeleniny. Spolu s indoly se podílejí na ochraně organismu před vznikem rakoviny. Vědci se domnívají, že isothiokyanáty mohou působit proti jedům ze životního prostředí. Kyselina listová je známa pod jménem vitamín B. Pomáhá předcházet některým vývojovým vadám plodu a ovlivňuje srdeční činnost. Lutein a zeaxantin patří ke karotenoidům. Pomáhají chránit zrak před oční degenerací (Biggs et al., 2004).

Sulforafan je látka bránící organismus před škodlivými karcinogeny. Vápník se často vyskytuje v salátových rostlinách spolu se šťavelany, které brání správnému vstřebávání. V listové zelenině se často vyskytuje i vitamín K, který je nepostradatelný pro srážení krve. Může zhoršovat účinnost léků na ředění krve (Ismail, 2003).

3.2. Čekanka

Latinsky: *Cichorium intybus (L)*

Čeď: *Cichoriaceae*

Způsob pěstování: venkovní záhon, krytí netkanou textilií

3.2.1. Popis

Čekanky patří mezi dvouleté rostliny. Pěstují se pro výrobu kávovinové cikorky a její listy se přidávají do salátů. Čekanky patří mezi často pěstované rostliny díky své odolnosti proti mrazu a chorobám a své nenáročnosti na klimatu. Jediné, co je pro ně důležité, je úrodná půda s dostatkem vláhy. Existují dvě základní formy: čekanka k rychlení a čekanka hlávková.

Květenství tvoří úbory, konečné nebo úžlabní, jednotlivé nebo po několika pohromadě. Postranní bývají přisedlé nebo velmi krátce stopkaté, konečné sedí na kuželovité, až 7 cm dlouhé stopce. Drobné kvítky, které sedí na společném lůžku, tvoří dohromady miskovité květenství, tzv. úbor, který se podobá jednomu velkému květu. Kvítky, které úbor skládají, jsou jazykovité, světle modré, zřídka bílé nebo růžové, na rubu žláznaté. Semeník se za plodu mění v obvejčitou nažku s úzkým, štětinatým lemlem.

Listeny jsou naspodu úboru ve dvou řadách a tvoří zákrov. Ten drží kvítky pohromadě a slouží jako jejich ochrana než se vyvinou. Samostatné kvítky mají spodní semeník skládající se ze dvou plodolistů, které obsahují pouze jedno vajíčko. Na vrcholu semeníku je řada malých, skoro neviditelných štětin, které slouží jako kalich.

Čekanka obecná je vytrvalá bylina, která má kořen válcovitého tvaru. Lodyha je 15 - 150 cm vysoká, tuhá a hranatá, lysá nebo častěji chlupatá, v horní části rozkladitě větvena. Listy jsou lysé nebo vespod s tuhými chlupy. V nejspodnější vrstvě jsou řapíkaté

a kracovitě laločnaté. Dolní lodyžní listy se podobají předcházejícím, avšak přisedají uťatou nebo hrázovitou bází, hořejší listy jsou podlouhlé až kopinaté, přisedají uťatou nebo srdčitou bází. Jazykovité květy tvoří úbor a před polednem bývají zavřené.

Hlávkové čekanky

Hlávkové čekanky se pěstují na venkovních záhonech. Po výsevu se jako první objevuje jen přízemní růžice. Až za nějaký čas se postupně objevují květy. Tyto čekanky jsou odolnější proti hnilobám než hlávkový salát. Vyžadují kyprou půdu bohatou na živiny a dostatek dusíku. Jejich výsev je v polovině července a sklizeň se provádí až začátkem zimy. Čekanky snesou mráz až do -7°C .

Hlávkové čekanky známe ve dvou formách: zelenolisté a červenolisté.

Hlávková čekanka zelená

Tvoří protáhlé hlávky světlezelených listů, které slouží ke konzumaci. Jejich chuť je nahořklá a pro mnoho lidí nepříjemná, i když jsou hořčiny zdravotně ceněné látky. Hořkost zanikne přidáním oleje. Pomůže i propláchnutí vodou.

Hlávková čekanka červená

Tvoří kulaté hlávky červenofialových listů. Jsou mrazuvzdornější než čekanky zelené a mají větší hořkost. U nás jsou známé jen pár let.

3.2.2. Zdravotní účinky

Listy obsahují vitamín C, vitamín B a minerální látky, vlákninu a hořčiny, které stimulují činnost jater, žlučníku a střev. Dále mají vysoký obsah draslíku, vápníku, fosforu, hořčíku, sodíku, železa, manganu, zinku a mědi. Čekanku tvoří z 94 % voda, proteiny představují 1 %. Tento údaj je pro zeleninu velmi velké a významné množství. Sacharidy netvoří ani 1 % a tuky v čekance téměř nenajdeme (0,1 %).

3.2.3. Použití v kuchyni

Listy čekanky se přidávají do zeleninových salátů. Lze je dusit a zapékat. Salátová čekanka je díky působení hořkých látek a minimálnímu obsahu tuků lehce stravitelná, výborná pro diabetiky a dietáře.

3.2.4. Použití a výskyt

Čekanka obecná roste u cest, na mezích, na pastvinách, náspech a na jiných pustých místech. Roste téměř po celé Evropě, severní Africe a v Asii se vyskytuje u Bajkalského jezera. Zplaněle roste ve východní Asii, Jižní Americe, jižní Africe a na Novém Zélandu.

Čekanka se od dávných dob používá v lidovém lékařství. Z pražených kořenů nekvetoucích rostlin se vyrábí cikorka, která se používá jako náhražka kávy nebo jako přísada do kávy. U nás se rostlina pěstuje zejména v Polabí. Cikorka je známá asi od roku 1600. V západní Evropě se pěstuje čekanka pro list, který chutná nahořkle a pojídá se jako salát.

3.3. Endivie (šterbák)

Latinsky: *Cichorium endivia* (L)

Čeleď: *Cichoriaceae*

Způsob pěstování: venkovní záhon, pařeniště, fóliovník, skleník

3.3.1. Popis

Endivie je jednoletá někdy dvouletá rostlina vysoká 30 - 100 cm. Přízemní listy jsou hodně vykrajované a lysé. Okraje jsou výrazně zubaté s dužnatým středním žebrem. Květy jsou světle modré až bílé a jsou uspořádané do úborů. Obvodové i středové květy jsou jazykovité. Plod je nažka a na svém vrcholu má jen velmi kratičký chmýr.

Tato rostlina má dvě varianty. První varianta je endivie, u které jsou listy hojně zkadeřené, a karioly, u které jsou listy celokrajné, různě široké

Endivie

Endivie vytvářejí přízemní růžice nebo lehce naznačené hlávky. Odolávají mrazům v teplotním rozmezí do -5°C . Listy obsahují hořčiny. U nás se pěstuje velmi málo, je známá spíše v západní Evropě. Endivie potřebuje výživnou půdu s dostatkem vláhy a dusíku.

3.3.2. Zdravotní účinky

Endivie se používá k posílení trávicího traktu, k ulehčení stavu při onemocnění dnou a k léčení bolavých očí.

3.3.3. Použití v kuchyni

Endivie se používá samostatně nebo společně s listovým salátem a dalšími druhy salátových rostlin k přípravě různých zeleninových salátů, kam se přidávají vnitřní srdíčka. Vnější listy se vaří nebo dusí. Je vhodné salát ze štěrbáku doplnit o ostrý dressing.

3.3.4. Použití a výskyt

Tato rostlina se u nás pěstuje jako zelenina, vzácně zplaňuje v teplejších oblastech, např. v Polabí a Poděbradech. Pro konzumaci se listy vybělují. Vnější listy se svazují tak, aby se světlo nedostalo ke středovým listům. Někdy se celé hlávky obalují slámou. Vybělené listy se vyznačují jemnější chutí než listy zelené. Endivie obsahuje nahořklý glykosid intybin, který se neztrácí ani tepelnou úpravou, a dodává jídlům zajímavou chuť. Některým strávníkům je nahořklá chuť nepříjemná. Podařilo se vyšlechtit kultivar s minimálním množstvím glykosidů, takže se setkáme i se sladkou odrůdou endivie.

Rostlina se vyskytuje ve formě jarní a ozimé. Jarní brzy dozrává a většinou se tepelně upravuje. Ozimá forma je hojně olistěná a nijak se tepelně neupravuje. Používá se na přípravu salátů. Dříve se endivie hojně vysévala jako krmivo pro husy. Je náročná na slunce, polostín a vlhko,

3.4. Fenykl řapíkatý

Latinsky: *Foeniculum vulgare (L)*

Čeled': *Apiaceae*

Způsob pěstování: venkovní záhon, pařeniště, fóliovník, krytý netkanou textilií

3.4.1. Popis

Fenykl řapíkatý má podobné silné aroma jako známý fenykl sladký. Hlíza vyrůstá již po roce a je těsně nad zemí a je zploštělá ze stran. Mladé hlízy lze jíst i bez kuchyňských úprav. Díky líbivému vzhledu tuto rostlinu i její další formy často nacházíme na okrasných záhonech. Fenykl je dvouletá rostlina. V našich klimatických podmínkách se fenyklu dobře daří. Není náročný na teplo a je velmi odolný proti škůdcům. Hlízu nesklízíme najednou, ale postupně, dokud nepřijdou velké mrazy. Nevyužité rostliny lze skladovat ve sklepě.

3.4.2. Zdravotní účinky

Fenykl má protikřečové účinky ve střevech, má močopudný vliv, ulehčuje odkašlání a účinkuje proti nadýmání, kde se plody dávají do větropudných čajů. U rodiček podporuje tvorbu mléka.

3.4.3. Použití v kuchyni

Fenykl se používá jako koření, které je oblíbené hlavně ve Francii a Itálii. Má nasládlou chuť, která připomíná anýz. Proto se přidává k dochucení chleba, různých cukrovinek a sladkého pečiva. Dále se využívá hodně u rybích polévek, tvarohových a sýrových jídel, omáček, bylinkového másla a salátů. Používá se i při konzervaci červená řepy a okurek, u přípravy dušeného masa, nebo při výrobě likérů. Nadrobno nakrájené čerstvé lístky nahrazují mátu v jogurtových zálivkách.

3.4.4. Použití a výskyt

Varianty fenyklu velmi dobře snášejí chladné podmínky. Přežijí i mrazy na začátku zimy. Jsou odolné k chorobám a škůdcům. Pro pěstování je důležitý termín výsevu.

Nejlepší doba bývá polovina července. Rostlina totiž v letních dnech vybíhá už v prvním roce do květu. Protáhne hlízy, stonek naroste do výšky až 100 cm a vytvoří se žluté květní okolíky. Zároveň se prudce zhorší kvalita hlíz ke konzumování. Proto je nutné vysazovat fenykl v letních měsících, aby své hlízy mohl vyvíjet v krátkém dni na podzim.

3.5. Lebeda zahradní

Latinsky: *Atriplex hortensis* (L)

Čeled': *Chenopodiaceae*

Způsob pěstování: venkovní záhon

3.5.1. Popis

Lebeda je jednoletá rostlina. Dorůstá do výšky 150 cm. Vyznačuje se oproti špenátu delším obdobím na sklizeň a menším obsahem kyseliny šťavelové než špenát. Je to velmi nenáročná rostlina. Snadno se pěstuje a vyroste i v půdě, která je chudá na živiny a vláhu. Jediné, co jí vadí, je přesazování. Listy jsou krátce řapíkaté, dužnaté, vejčitě podlouhlé, ale také téměř okrouhlé, celokrajné nebo vykrajovaně zubaté, velké 1 x 0,5cm. Listy lze sklídit pár měsíců po zasetí. Květenství je na bázi olistěné, se zelenožlutými od sebe oddělenými květy. Listeny jsou trojúhelníkovité či kosočtverečné, občas trojlaločné. Známe ji ve třech formách; zelené, žluté a červené. V zahrádkách často zplaňuje a nejde se jí zbavit

3.5.2. Zdravotní účinky

Lebeda zahradní se používala ve středověku proti nemocím jater a plic. Používá se na čištění krve a posílení odolnosti. Proto se někdy přidává do čajových směsí s čistícím a posilujícím účinkem. Rostlina obsahuje látky, jejichž účinky nejsou doposud známy.

3.5.3. Použití v kuchyni

V kuchyni se připravuje stejným způsobem jako špenát. Ale ve srovnání s ním má jemnější chuť díky nižšímu obsahu kyseliny šťavelové. Mladé listy jsou výborné připravené jako špenát, dají se míchat spolu s listy kopřiv a jahod. Vhodné jsou do

zeleninových salátů a do polévek. Z listů se vaří smetanové omáčky a červená forma je barví na růžovo, kdy se antokyany při vaření vylouhují do vody a vařené listy jsou potom zelené. Nebo je můžeme připravovat na sladko. Starší listy je lepší spařit horkou vodou nebo přímo povařit. Nasekanými listy lebedy se dochucují pečená nebo grilovaná masa. Z lebedy jde udělat i chutný čaj.

3.5.4. Výskyt a použití

Lebed je asi 250 druhů rozšířených po celém světě. Nevyskytují se pouze v tropech, ale v subtropích je jejich největší výskyt. Lebedy se vyskytují v blízkosti lidských obydlí, v půdách bohatých na dusík. Rostlina roste na suchých stanovištích v blízkosti moře: na Kanárských ostrovech, Madeiře, severozápadní Africe, ve Španělsku a Portugalsku. Všechny barevné variace lebedy jsou velmi dekorativní, a proto se lebeda pěstuje i jako okrasná rostlina

3.6. Kozlíček polní (kozlíček polníček)

Latinsky: *Valerianella* (L)

Čeled': *Valerianaceae*

Způsob pěstování: venkovní záhon, pařeniště, fóliový tunel, krytí netkanou textilií, skleník

3.6.1. Popis

Kozlíček je jednoletá a velmi drobná rostlina, která se sklízí v zimních měsících. U nás se pěstuje velmi často a snadno. Je to velmi nenáročná, všestranně otužilá a mrazuvzdorná rostlina. Dá se sklízet celou zimu, ale nesmí prorůst plevelem. Konzumuje se pouze čerstvý a sklízet se dá celá listová růžice. Rostliny se dají sklídit již po 2 měsících. Kozlíček obsahuje více vitamínů jak listové saláty. Vypěstovaný v krytém prostředí se vyznačuje jemnější chutí

3.6.2. Zdravotní účinky

V mladých listech polníčku nalezneme vysoké množství vitamínu C, dokonce 1,5 x více než v citronech, a také vitamín A a E. Z minerálních látek obsahuje kozlíček železo,

hořčík, draslík, vápník a samozřejmě kyselinu listovou a betakarotén. Kvůli obsahu vitamínů je kozlíček vhodný pro posílení imunity. Dále podporuje krvetvorbu a látkovou přeměnu v buňkách. Kozlíček pomáhá zvyšovat odolnost proti stresu a lze ho poddávat u lidí se sklonek k depresím. Zlepšuje soustředění i výkonnost a celkově zvyšuje duševní vitalitu.

3.6.3. Použití v kuchyni

Kozlíček je vhodný pro všechny druhy redukčních diet. Vysoký obsah vitamínu C pomáhá zužitkovat bílkoviny z potravy. Nejčastěji je používán do salátových směsí či samostatný s výraznějším dresinkem. Lze ho najít i jako zelenou oblohu. Dá se upravit do pokrmů jako špenát, ale tepelnou úpravou se ničí vysoký obsah vitamínu C. Dále se syrové listy dají rozmixovat a poddávat ve formě smetanové polévky

3.6.4. Použití a výskyt

Vyskytuje se často jako polní plevel pocházející z jižní Evropy. Najdeme ho na polích, okrajích cest, na mezích, náspech a na loukách.

3.7. Roketa setá

Latinsky: *Eruca sativa* (Mill.)

Čeleď: *Brassicaceae*

Způsob pěstování: venkovní záhon, pařeniště, fóliový tunel, krytí netkanou tkaninou, skleník

3.7.1. Popis

Roketa může dosáhnout až 50 centimetrů. Svoji výškou a tvarem připomíná řepku olejku, avšak má bílé květy. Listy se podobají listům pampelišky, ale jsou užší. U nás lze roketu vypěstovat v domácích podmínkách. Vyklíčí za krátkou dobu na vatě nebo ji můžeme zasadit do substrátu. Roste od jara do podzimu a lístky se průběžně podle potřeby otrhávají. Často se zaměňuje s rukolou (*Rucola selvatika*) a někdy se ani nerozlišují. Liší

se pouze minimálně tvarem a chutí. Použitím si jsou velmi podobné. U nás se semínka rukoly obtížně shání.

3.7.2. Zdravotní účinky

Obsahuje mnoho vitamínů a tím prospívá lidskému zdraví. Svým obsahem vitamínů C a betakarotenu předčí ostatní salátové rostliny a napomáhá tak k posílení imunity.

3.7.3. Použití v kuchyni

Roketu najdeme v tradičních italských jídlech. Tato rostlina se výborně hodí k rajčatům, česneku nebo k bazalce. Pro svou štiplavou hořkou chuť se přidává do salátů, na pizzy a těstoviny a nalezneme ji i na masových směsích.

3.7.4. Použití a výskyt

Tato rostlina je nejrozšířenější na Apeninském poloostrově. Kromě Itálie se však používá a pěstuje prakticky po celém světě, protože je velice přizpůsobivá různým přírodním podmínkám.

3.8. Salát

Latinsky: *Lactuca sativa* (L)

Čeleď: *Asteraceae*

Způsob pěstování: venkovní záhon, pařeniště, fóliový tunel, fóliovník, skleník, krytí netkanou textilií, nádoby

3.8.1. Popis

Salát je přizpůsobený na změny počasí. Pěstuje se po celý rok. Konzumuje se většinou čerstvý, ale velmi rychle roste a za suchého období vybíhá do květu, kdy jeho listy hrubnou a hořknou. Salát je velmi náročný na světlo, proto je hlavní období pěstování od května do listopadu. Salát vysazený v zimě nemá dostatek přirozeného světla a tím se zvyšuje obsah dusičnanů. Nejzdravější salát je z venkovního záhonu.

3.8.2. Zdravotní účinky

Salát obsahuje velké množství kyseliny listové, která je pro člověka nepostradatelná. Tato kyselina je důležitá pro plodnost a její nedostatek způsobuje vady při vývoji plodu. Salát dále obsahuje vitamín C, hořčík, draslík, železo, křemík a fluor. Je bohatým zdrojem vlákniny a posiluje obranyschopnost a naše srdce.

3.8.3. Použití v kuchyni

Hlávkový salát je jeden z nejstarších druhů zeleniny, je snadno stravitelný, má vysokou biologickou hodnotu a je oblíbený pro velké možnosti jeho úpravy v kuchyni.

3.8.4. Hlávkový salát

Patří k nejrozšířenějším salátům. Má dvě formy: máslový a ledový salát.

3.8.4.1. Máslový salát

Patří sem všechny odrůdy, které se rychle ve skleníku a které přezimují. Jejich hlávky mají jemné vnitřní listy, obvodové listy jsou tužší a při úpravě se odstraňují. Jsou náchylné k vadnutí.

3.8.4.2. Ledový salát

Vytváří velké a pevné hlávky křehkých listů. Nevybíhají a dobře se uchovávají. Dorostlé hlávky se musí včas sklídit, jinak trpí zahníváním listů.

3.8.5. Listové saláty

Netvoří uzavřené hlávky, ale jen růžice listů. Všechny listy jsou jemné, jako vnitřní listy salátů hlávkových. Sklízíme je uříznutím celé růžice nebo postupným othráváním jednotlivých listů.

3.9. Perila křovitá

Latinsky: *Perilla frutescens*

Čeleď: *Lamiaceae*

Způsob pěstování: venkovní záhon, pařeniště, fóliový tunel, fóliovník, skleník, krytí netkanou textilií, nádoby

3.9.1. Popis

Černá kopřiva, jak je bylině přezdíváno, je původem z Číny, kde se nejčastěji pěstují dvě odrůdy. První je perila křovitá (*Perilla frutescens*, také označována jako *Mentha perilloides*) a perila kadeřavá (*Perilla crispata*). Oba druhy dorůstají do výšky až jednoho metru. Listy mají vejčitý tvar se zvlněným okrajem, uvnitř plastickou žilnatinu a jsou vyšlechtěné do různých barev, jako je zelená, červená, bílá aj. Na počátku letního období se na rostlinách objevují drobné fialové květy. Perilu lze snadno pěstovat ze semen.

3.9.2. Zdravotní účinky

V čínské medicíně se perila používá po staletí. Buď samostatně nebo v kombinaci s dalšími bylinkami. Tato rostlina se používá díky svým antialergickým, antiseptickým, antikarcinogenním a antioxidačním účinkům. Listy (čínsky *Zi su ye*) a plody (*Zi su zi*) perily křovité, obsahují velké množství esenciálních mastných kyselin, které napomáhají snižování cholesterolu. Semena perily obsahují alfa pinen, apigenin, beta sitosterol, fenylypropanoid, karyophylen, myristicin, dále také vitamíny A, B, C, K a éterické oleje. Listy perily pomáhají rozpouštět hlen z dýchacích cest, má příznivý vliv na kašel a astma. Používá se při gynekologických problémech a alergiích, potlačuje uvolňování histaminu, který spouští alergické reakce. Celkově je vhodná pro posílení imunitního systému. Je obsažena v mastech proti dermatitidě a ekzémům.

3.9.3. Použití v kuchyni

Listy perily mají citrónovou, příjemně kořeněnou a nasládlou příchut'. Najdeme ji v mnoha čínských pokrmech, nejčastěji s krabím masem nebo dalšími korýši. Listy perily se v těchto pokrmech používají nejen díky své chuti, ale i díky své schopnosti neutralizovat

jed, který se v jejich mase velmi často vyskytuje. Výtažek z listů této bylinky se používá i jako konzervant.

3.9.4. Použití a výskyt

Do Evropy byla perila přivezena z Číny, kde roste v nadmořské výšce okolo 1 200 metrů. Rostlině se daří na otevřených, slunných místech, kde jsou půdy dobře zásobeny živinami. Má antibakteriální, antiseptický účinek. Používá se při snižování horečky a proti nadýmání. V kuchyni ji najdeme jako koření.

(Kýbal a Kaplická, 1988, Biggs et al., 2005, Pekarová, 2000, Kincl et al., 1987, Greinerova et al., 1993, <http://www.receptyonline.cz/lebeda-zahradni--2566.html>

<http://www.atlasrostlin.cz/hledej?q=lactuca+sativa>, <http://www.receptyonline.cz>

<http://www.ireceptar.cz/zahrada/uzitkova-zahrada/vypestujte-si-fenykl/>).

4. Analytické metody

4.1. Význam separačních metod

V přírodě se většina látek vyskytuje pouze ve směsích. Základním úkolem analytické chemie je tyto chemické látky z těchto směsí izolovat a stanovit jejich identitu a množství. Proto mnoho chemických odvětví musí používat tzv. separační metody. A to jak pro výrobu, tak i pro práci v mikroanalytickém měřítku. Mnoho ze separačních metod je velmi starých a používaly se již v dávných dobách, kdy názvu chemika odpovídalo pojmenování alchymista. To se týká sedimentace, číření, srážení, extrakce, absorpční filtrace, krystalizace a destilace. Tyto metody se používají dodnes, i když postupem času došlo k modernizaci. Avšak tyto metody nedostačují k separaci látek navzájem si velmi podobných, jaké nacházíme v rostlinných materiálech. Proto byly hledané nové směry separace, které by tyto směsi dokázaly rozdělit. Jeden z nich, založený na rozdílné absorpční schopnosti produktů obdobných vlastností, vedl k objevu absorpční chromatografie (Mikeš et al., 1980).

Ruský botanik a chemik Cvet (1872-1919) se zabýval pigmenty v chloroplastech. Při filtraci pigmentů petroletherovým roztokem úzkou skleněnou kolonkou, kterou naplnil uhlíčitanem, objevil, že směs se rozdělila na barevné proužky podle míry absorpce složek na absorbent. Zóny barevných proužků postupovaly kolonkou jinou rychlostí. Proužky postupovaly kolonkou, i když přestal přilévat roztok se směsí pigmentů a přiléval pouze rozpouštědlo. Postupem času došlo až k jejich rozdělení. Cvet nazval výsledek tohoto procesu chromatogram a metodu chromatografickou. Obsah kolony buď pak vytlačoval z trubice, rozřezával a extrahoval každou zvlášť, nebo pokračoval s přiléváním rozpouštědla, až se zóny z trubice postupně vymyly a jejich roztoky odpařil (Mikeš et al., 1980).

O pokrok chromatografie se potom zasloužili Kuhn, Ledere, Winterstain, Tiselius, Claessun, Synge, Martin, Condsden, Gordon, Porath, Flodin a mnoho dalších.

Analytické metody lze dělit na oblast kvalitativní či kvantitativní. Kvalitativní analýza se zabývá všemi látkami zastoupenými ve zkoumaném materiálu. Kvantitativní analýza zjišťuje celkové množství vybraných látek.

Na analýzu flavonoidů je nutno použít takové metody, které zvládnout rozpoznat směsi látek, jež mají podobný charakter. Proto se využívá při jejich rozpoznání vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), kapilární elektroforéze (CE) a její modifikace micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)

4.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Tato metoda se pro určování flavonoidů používá nejčastěji (Tomlinson et al., 2003). Zahrnuje pouze takové chromatografické způsoby separace, kdy je mobilní fáze pouze kapalná. Pokud hovoříme o vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC), jedná se o kapalinovou chromatografii v uzavřeném systému (Drbal a Křížek, 1999).

Rozdíl mezi obyčejnou a vysokoúčinnou chromatografií je ve zmenšení kolony, snížení průtoku, menší spotřeba mobilní fáze a kratší čas analýzy. Při analýze díky tomu dochází ke zhoršení snadnosti průtoku mobilní fáze a tedy i ke zvýšení tlaku na mobilní fázi. Kapalinová chromatografie nerozdělí směsi uhlovodíků na jednotlivé látky, ale jen na skupiny látek s podobnou strukturou (Štulík a kolektiv, 2005).

Mobilní fáze je při isokratické eluci vedena ze zásobníku přes odplyňovač do vysokotlakého čerpadla. Při gradientové eluci se komponenty mobilní fáze přivádějí ze zásobníku do směšovače. Tam se podle programu mísí v určitém poměru a potom jdou do čerpadla. Zde mobilní fáze prochází tlumičem pulsů čerpadla do kolony. Kolona je většinou vyrobena z nerez oceli nebo speciálního skla. Za kolonou najdeme detektor. Ten je spojen se zapisovačem nebo s PC. Ty slouží k registraci průběhu analýzy. Za detektorem může být dán sběrač frakcí mobilní fáze. Ten slouží k zachycení separované složky vzorku (detailní identifikace). Pro dávkování vzorku se používá nejčastěji šesticečný kohout s dávkovací smyčkou. Ta má konstantní známý objem, který se naplní vzorkem. Kohout se přepne na druhou polohu, kdy eluent protéká smyčkou a vnese vzorek do kolony. Pro vysoko účinnou kapalinovou chromatografii se používá kolona 10 až 100 cm dlouhá, s vnitřním průměrem od 0,2 - 2 cm. U nečistot, které by mohly předčasně znehodnotit kolonu, se používají tzv. ochranné předklonky. Dávají se před vlastní kolonu. Pro detekci je často používán průtokový fotometrický či fluorimetrický detektor. Eluát protéká měrnou

celou malého objemu s velkou optickou délkou ($V=5-10 \mu\text{m}$, $l=10 \text{ mm}$). Poté je zaregistrována absorbance eluátu. Je důležité použít vhodnou vlnovou délku, která odpovídá absorpčnímu maximu studované látky. Moderní přístroje jsou již vybaveny detektory s proměnlivou a programově měnitelnou vlnovou délkou (Drbal a Křížek, 1999).

4.3. Kapilární elektromigrační metody

Tyto metody jsou založeny na odlišné pohyblivosti nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Ta závisí na velikosti náboje, velikosti a tvaru molekuly, prostředí separace a síle elektrického pole. Samotná separace se uskutečňuje nejčastěji v křemenných kapilárách o průměru několik desítek mikrometrů. Výhodou této metody je její rychlost a malá spotřeba vzorku i činidel. První elektromigrační metody se prováděly již v 19. století. Již v roce 1897 zjistil F. Kohlrausch vztah mezi koncentrací a pohyblivostí iontů v elektrickém poli (Štulík a kolektiv, 2005). V roce 1991 byla provedena první elektroforéza, která byla použita na identifikaci flavonoidních látek (Krejčí, 2007).

Mezi elektromigrační metody zařazujeme šest základních typů. Jejich rozdělení je podle použitého média v kapiláře. Nejčastěji se používá kapilární zónová elektroforéza a micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (Štulík a kolektiv, 2005).

4.3.1. Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza patří mezi nejjednodušší elektromigrační metody. Používá se na stanovení organických i anorganických sloučenin, kde se stanovované ionty liší svoji molekulovou hmotností, tvarem a nábojem. Dělení probíhá na základě různé mobility těchto iontů (Štulík a kolektiv, 2005).

Od roku 1892 je známo, že anorganické částice v koloidním roztoku působením elektrického pole nenáhodně putují. V roce 1948 získal za sestavení elektroforetické aparatury Nobelovu cenu za chemii švédský vědec Arne W. Tiselius.

4.3.1.1. Uspořádání kapilární zónové elektroforézy

Separace probíhá na kapilárách, které jsou nejčastěji vyrobené z křemene. Na svém povrchu jsou kryty vrstvou polyamidu. Propojení křemene a polymeru je důležité pro pružnost kapilár a napomáhá odstraňovat jejich křehkost. Pokud by došlo k jejich oddělení, kapilára by se stala velmi křehkou a mohlo by dojít k jejímu zlomení. Délka kapilár se pohybuje mezi 20 až 100 cm a jejich průměr 25-75 μm . Někdy se uvádí i 100 μm . Následuje nádobka se základním elektrolytem, který je tvořen vodním roztokem pufru. Jako roztok se nejčastěji používá tetraboritan sodný. Dále nádobka se vzorkem, zdroj vysokého napětí s výstupem na platinové elektrody a jako poslední je zapojen detektor. Ten bývá připevněn na kapiláře a napojen na počítač, který zaznamenává signál v čase. V UV/Vis je nejpoužívanějším detektorem absorpční detektor. Dále se používají detektory fluorescenční, amperometrické, vodivostní či radioaktivní. Je známo i spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií, avšak toto napojení je poměrně složité (Štulík a kolektiv, 2005).

4.3.1.2. Princip kapilární zónové elektroforézy

Metoda CE využívá dva transportní systémy. První je elektroforetická migrace iontů v elektrickém poli a druhý je elektroosmotický tok kapaliny kapilárou, na kterou je vkládáno napětí. Elektroforetickou migrací rozumíme děje, kdy jsou ionty v elektrickém poli přitahovány k opačně nabitě elektrodě. Elektroosmotický tlak (EOF), jinak nazývaný jako elektroosmóza, je tok kapaliny kapilárou, na kterou působí napětí desítky kilovoltů mezi elektrody na koncích kapiláry. Pokud naplníme křemennou kapiláru roztokem elektrolytu, nastane na vnitřní stěně k hydrolyze siloxanových skupin a vzniknou skupiny silanolové. Ty dále podléhají disociaci, čímž se vnitřní povrch kapiláry pokryje disociovanými křemičitanovými skupinami. Tímto dějem získává vnitřní stěna negativní náboj a uvolněné protony utvoří kladně nabitou vrstvu v roztoku přilehlém k vnitřní straně kapiláry. Vložení napětí mezi elektrodami způsobí pohyb hydratovaných vodíkových iontů směrem ke katodě. Tyto protony se obalí molekulami vody a strhají všechny roztok uvnitř kapiláry směrem ke katodě, čímž vznikne elektroosmotický tok.

Použití tetraboritového sodného jako roztok elektrolytu je výhodné díky rychlé generaci EOF a tím zkrácení celé analýzy, dále neabsorbuje viditelné světlo a tudíž umožňuje

citlivou detekci UV již od 190 nm. Důležitou výhodou je i to, že jeho příprava je velmi snadná. Používá se obvykle roztok o koncentraci 20 mmol l⁻¹ a pH 9,1. Nevýhodou je ale jeho velká vodivost již při nízké koncentraci, která způsobuje zahřívání kapiláry (Štulík a kolektiv, 2005, Drbal a Křížek, 1999).

Jak bylo řečeno, elektroforéza využívá schopnost nabitých částic pohybovat se v elektrickém poli, přičemž rychlost pohybu částic je závislá na velikosti celkového povrchového náboje, velikosti a tvaru molekuly a její koncentraci v roztoku.

Rychlost molekuly při elektroforetické separaci lze vyjádřit:

$$\frac{v}{E} = C \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0}{\eta} \zeta$$

kde ζ je elektrokinetický potenciál (V), v je lineární rychlost pohybu částice (m · s⁻¹), E je intenzita elektrického pole (V · m⁻¹) a η viskozita prostředí (Pa · s), ε_r je relativní permitivita kapaliny, ε_0 permitivita vakua, C konstanta závislá na tvaru částic a na tloušťce elektrické dvojvrstvy (např. pro kulovité částice o poloměru r a velkou efektivní tloušťku dvojvrstvy l , kde $r/l < 0,1$, je $C = 2/3$, pro tenkou dvojvrstvu ($r/l > 100$) je $C = 1$) (Heiger, 2000).

4.3.2. Micelární elektrokinetická chromatografie

Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) umožňuje separaci nejen elektricky nabitých látek, ale i neutrálních a to jak hydrofilních, tak i hydrofobních. Jde o techniku, která leží mezi elektroforézou a chromatografií. K separaci neutrálních látek dochází v důsledku jejich rozdílné interakce s micelami, které tvoří v kapiláře tzv. pseudostacionární fázi. Micely vznikají přidávkem dostatečného množství tenzidu do pufru (Štulík a kolektiv, 2005). Tento tenzid je v nadkritické koncentraci (10-20 mmol.l⁻¹) a tak dojde k vytvoření tzv. micel. Hydrofobní konce tenzidu jsou obráceny do středu micely a hydrofilní část je nasměrována do roztoku. Vznikne dynamická rovnováha mezi volnými molekulami tenzidu a molekulami vázanými na micely. Tato rovnováha způsobuje neustálé vytváření a rozpady micel. Doba, po kterou se bude látka zdržovat v micelle, závisí na její polaritě (Drbal a Křížek, 1999)

II. Cíle práce

Fenolické sloučeniny mají antioxidační účinky a napomáhají obraně proti onemocněním cév a srdce. Z literární rešerše vyplynulo, že v salátových rostlinách lze nalézt mnoho těchto látek. Svou biologickou aktivitou mezi fenolickými látkami vyniká kvercetin. Z fenolických kyselin pak kyseliny kávová, rozmarinová a chlorogenová.

Pro stanovení celkového obsahu kvercetinu byla použita metoda kapilární elektroforézy. Pro stanovení obsahu ostatních fenolických látek byla zvolena metoda HPLC.

Cílem práce je (1) stanovit obsah celkového kvercetinu v souboru salátových rostlin, (2) zjistit zastoupení vybraných fenolických látek v salátových rostlinách

III. Experimentální část

1. Zpracování rostlinného materiálu

Pro analýzu bylo zvoleno 10 druhů salátových rostlin. Z toho byly všechny pěstované.

Tab. č. 1 Přehled salátových rostlin

čekanka červená hlávková	<i>Cichorium intybus L</i>
čekanka zelená hlávková	<i>Cichorium intybus L</i>
endivie	<i>Cichorium endivia L</i>
fenykl řapíkatý	<i>Foeniculum vulgare L.</i>
lebeda zahradní	<i>Atriplex hortensis L</i>
perila křovitá	<i>Perilla frutescens</i>
kozlíček polní	<i>Valerianella locusta L</i>
roketa setá	<i>Eruca sativa Mill</i>
salát ledový	<i>Lactuca sativa L. var. capitata L</i>
salát listový zelený	<i>Lactusa sativa L. var. capitata L</i>

Všechna osiva vyprodukovala firma Semo Smržice u Prostějova a byla zakoupena v lokálním hobby obchodu v roce 2010.

Zakoupené druhy listové zeleniny byly vypěstovány v roce 2010 na pokusném pozemku PF (České Budějovice, Čtyři Dvory). Vypěstovaná zelenina byla postupně odebírána a upravena pro účely analýz. Z rostlin byly odstraněny kuchyňsky nevyužívané části a byly povrchově očištěny. Dále byla rostlina rozdělena na menší oddíly a vzorek byl homogenizován promícháním.

Získaný rostlinný vzorek byl zmražen při teplotě -16°C a byl lyofilizován do jednoho měsíce po sklizni. Lyofilizace probíhala při teplotě -46°C a tlaku 0,015 mbar po dobu 24 hodin.

Suchý materiál byl zhomogenizován na laboratorním mlýnku a homogenní materiál byl uchováván do analýzy v uzavřené plastové nádobě při teplotě -16°C.

2. Použité chemikálie, sklo a přístroje

2.1. Laboratorní sklo a přístroje

sada laboratorního skla (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)
analytické váhy AB 204 (Mettler Toledo, Švýcarsko)
technické váhy Kern (Německo)
odstředivka Sigma 2 – 5 (Sigma Laborzentrifugen, Německo)
dávkovač kapalin 5 ml (Sklo Union, ČR)
pipety automatické, objem 20 – 200 µl a 100 – 1000 µl Transferpette (Treff AG, Švýcarsko)
vodní lázeň termostatovaná míchaná EL – 20 R (Kavalier, ČR)
kapilární elektroforéza SpectraPhoresis 2000 (Thermo Separation Product, USA)
SPE izolační jednotka (vývojové dílny JU, ČR)
filtry ze skleněných vláken GF/C (Whatman, Velká Británie)
filtrační papír Filtrak (Filtrak GmbH, Německo)
ultrazvuková lázeň Sonorex RK 31 (Německo)
SPE kolonky RP- 18 (Merck, Německo)
pH – metr Inolab – 1, s elektrodou SenTix 61 (WTW, Německo)
kolona: Phenomenex Luna C18 (2), 3 µm, 2 x 150 mm
centrifuga (Hettich Universal 32 R, Německo)
laboratorní mlýnek (Grindomix GM 200, Německo)
lyofilizátor Alpha 1-2 (Christ, Německo)
kombinovaná lednička s chladničkou (Bosch Cooler, Německo)
teplovzdušná sušárna ULM (Memmert, Německo)
Centrifuga universal 32 R, hettich , zentrifugen,
HPLC: HP1050 (Hewlett Packard, USA)
DAD detektor G1315B (Agilent, USA)

2.2. Chemikálie a standardy

tetraboritan sodný (borax) (Sigma Chemicals, USA)

laurylsíran sodný (Sigma Chemicals, USA)

kyselina chlorovodíková (Lachema, ČR)

kyselina boritá (Lachema, ČR)

hydrogenuhlíčan sodný (Lachema, ČR)

hydroxid sodný (Lachema, ČR)

kyselina 1 – naftyloctová (Lachema, ČR)

kyselina L – askorbová (Merck, Německo)

kvercetin (Aldrich Chemie, Německo)

methanol (Penta Chrudim, ČR)

demineralizovaná voda (Premier, USA)

metanol (lichrosolf, Real.ph eur, Merck)

acetonitril (lichrosolf, Real.ph eur, Merck)

kyselina o-fosforečná 85% (Fluka),

Standardy: káвовá kyselina

rozmarinová kyselina

chlorogenová kyselina (vše Sigma-Aldrich)

Všechny chemikálie měly analytickou čistotu.

2.3. Příprava pracovních roztoků a standardů

Roztoky standardu kvercetinu o koncentraci 1 mg/ml a standard kyseliny 1-naftyloctové o koncentraci 2 mg/ml byly připravovány ve 100 % metanolu. Tyto roztoky byly uchovány v temnu. Teplota 4 stupně Celsia.

Zásobní roztoky káвовé, rozmarinové a chlorogenové kyseliny byly připravovány o koncentraci 1 mg/ml ve 100% methanolu a uschovávány při -18°C.

K promívání kapiláry byly připravovány 0,1 M roztok kyseliny chlorovodíkové a 1 M a 0,1 M roztok hydroxidu sodného.

Jako ředící roztok byl používán 5 % metanol (v/v) ve vodě. Hodnota pH byla upravena na 3,5 s 1 M kyselinou chlorovodíkovou.

3. Stanovení celkového obsahu kvercetinu metodou MECC

3.1. Metodika stanovení

Metoda stanovení kvercetinu vychází z publikace (Dadáková et al. 2001). Byla vyvinuta na pracovišti, kde byla zpracována tato diplomová práce a byla modifikována pro potřeby stanovení kvercetinu v salátových rostlinách. Metoda dle Dadákové et al. (2001) vychází z původní metody stanovení flavonoidů metodou HPLC (Hertog et al., 1992b). Na jejich základě byla vypracována metoda zpracování biologického vzorku, kterou lze použít pro analýzu pomocí kapilární elektroforézy. Při použití kapilární elektroforézy musí být vzorek přečištěním zbaven zbytečných doprovodných látek.

Touto metodou se stanoví celkový obsah kvercetinu, kdy v prvním kroku dojde ke kyselé hydrolyze veškerých glykosidů, které vzorek obsahuje. Dále dojde k úpravám vzorku odstředěním, filtrací a ředěním. Sorpce analytu se provádí na kolonkách SPE a analytická koncovka metodou kapilární elektroforézy v uspořádání s micelotvornou látkou (MECC)

3.1.1. Stanovení celkového kvercetinu

Navážka 0,25 g lyofilizovaného homogenizovaného materiálu byla dána do 100 ml varné baňky. Byl přidán 12,5 ml metanolu, 7,5 ml vody, 80 mg kyseliny askorbové a 5 ml 6 mol.l⁻¹ HCl. Poté následovaly 2 hodiny hydrolyzování pod zpětným chladičem v termostatové vodní lázni při teplotě 85 °C.. Hydrolyzovaný vzorek se nechal vychladnout a poté neutralizovat 2 g NaHCO₃. Dále byl převeden do odstředovací kyvety a odstředěn (15 min., 3500 otáček za min.) Sediment byl nesuspendován pomocí 12,5 ml metanolu a 25 ml vody a odstředěn (15 min., 3500 otáček za min.) Tento postup odstředění byl použit znovu, ale s použitím 37,5 ml vody. Spojené supernatanty byly shromážděny v 600 ml kádince. Doplněny na objem 200 ml vodou a kyselost byla upravena na pH 3 pomocí

NaHCO₃. Roztok byl za sníženého tlaku přefiltrován a filtrát kvantitativně převeden do 500 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku. Roztok byl použit pro SPE na kolonkách. Zachycené látky byly eluovány s 1,4 ml metanolem do měrné vialky. Do vialky byl přidán roztok vnitřního standardu kyseliny 1-naftyloctové v metanolu.

3.1.2. Měření na kapilární elektroforéze

Připravené roztoky byly měřené pomocí kapilární elektroforézy. Byl použit borátový pufr o složení 10 mM tetraboritou sodného, 10 mM kyseliny borité, 20 mM SDS a 15% (v/v) metanolu. pH bylo 9,2, pracovní napětí přístroje 20 kV a laboratorní teplota 25°C. Analyt se odečítal při 270 nm. Mez stanovitelnosti byla 10 mg/kg.

Kvantifikace obsahu kvercetinu byla provedena dle kalibrační závislosti.

4. Stanovení vybraných fenolických látek metodou HPLC

4.1. Příprava extraktu

Pro přípravu extraktu bylo použito 0,25 g materiálu. Vzorek byl extrahován pomocí 3 ml 90 % metanolu. Za laboratorní teploty byl stále protřepáván po dobu 30 minut. Následovala centrifugace (3500 otáček za min., po dobu 10 min.). Dále byl odebrán supernatant a sediment byl nesuspendován ještě dvakrát. a to v 1ml 90% metanolu. Poté byly všechny supernatanty spojeny a byl odečten objem.

4.2. Zjištění vybraných fenolických látek metodou HPLC

Všechny extrakty byly měřeny na kapalinovém chromatografu HP 1050 (Hewlett-Packard, USA) s připojením na DAD detektor (HP 1040, Hewlett-Packard, USA). K analýze byla použita kolona Phenomenex Luna C 18(2), 3µm, 2 x 150 mm

Mobilní fáze se skládala ze tří složek (voda –acetonitril-kyselina fosforečná).

A: 5% acetonitril a 0,1% kyseliny fosforečné (v/v)

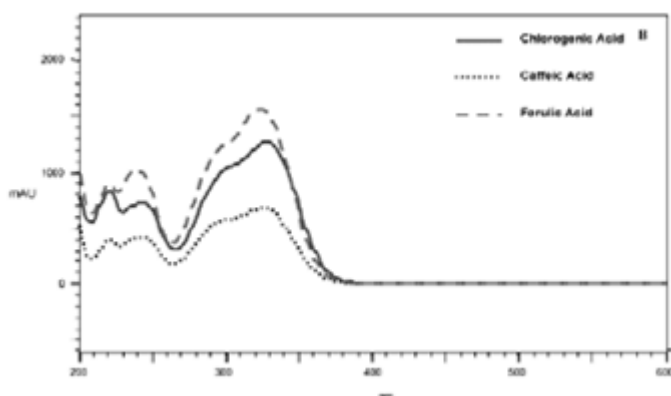
B: 80% acetonitril a 0,1% kyseliny fosforečné (v/v)

4.3. Schéma použitého gradientu

Bylo použito 2 % B na 42% B během 40 minut. Po dobu 5 minut při průtoku 0,25 ml/min. Objem nástřiků vzorku byl 5 μ l při teplotě 25 °C.

Při analýze bylo měřeno spektrum látek v rozsahu 190-600nm. Sledované fenolické látky byly identifikovány srovnáním naměřeného spektra se spektrem standardu a porovnání retenčního času.

Obr. č. 17 DAD spektrum kyseliny kávové, chlorogenové a ferulové



IV. Výsledky a diskuse

1. Diskuse

Flavonoidy jsou látky vyskytující se pouze v rostlinách. Mají blahodárný účinek na zdraví člověka. To potvrzuje i mnoho výzkumů zaměřených na tyto látky. Byly dokázány antioxidační vlastnosti, schopnost likvidovat volné radikály a zabraňování peroxidaci lipidů. bylo velmi obtížné a při zpracování této diplomové práce nereálné. Tato práce byla soustředěna na známé reprezentanty flavonoidních látek.

Obsah celkového kvercetinu v salátových rostlinách byl stanoven metodou MECC. Metoda je velmi jednoduchá a nenáročná. Není potřeba velké množství použitých rozpouštědel ani složité aparatury. Tato metoda byla vyvinuta na pracovišti, kde byla zpracována tato diplomová práce (Dadáková et al., 2001).

Pro stanovení obsahu dalších fenolických látek v Tím snižují riziko civilizačních chorob. Díky tomu se doporučuje konzumace potravin s vyšším obsahem flavonoidů. Člověk je může přijímat pouze v potravě, proto je důležité stanovit obsah flavonoidů v rostlinných materiálech.

Jak bylo uvedeno, flavonoidních látek je okolo deset tisíc (Malolepsza a Urbanek, 2000). Je to velmi bohatá skupina a lze předpokládat, že rostliny budou obsahovat pestrou směs těchto látek. Prozatím nejsou k dispozici všechny standardy flavonoidních látek. Proto stanovení všech druhů flavonoidů by salátových rostlinách, byla použita metoda HPLC s připojením k DAD. Jednalo se o identifikaci fenolických kyselin jako je kyselina rozmarinová, kávová a chlorogenová, dále blíže neurčené deriváty kvercetinu a deriváty jiných flavonolů,

Materiál, který byl použit pro výzkum, byl vypěstován v roce 2010 na pokusném pozemku PF (České Budějovice, Čtyři Dvory).

1.1. Stanovení obsahu celkového kvercetinu

Bylo zkoumáno 10 salátových rostlin. Pro tuto práci byl použit lyofilizovaný materiál. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. č.2 Obsah celkového kvercetinu v lyofilizovaných rostlinách

Druh listové zeleniny	Obsah celkového kvercetinu (mg/kg sušiny.)
salát hlávkový - skleník	7 770
salát hlávkový- záhon	48 600
salát ledový	475
čekanka zelená	86
čekanka červená	1 760
endivie	18,7
fenykl řapíkatý	19,1
kozlíček polní	19,2
roketa setá	2 490
perila křovitá	345

Nejvyšší obsah kvercetinu byl zjištěn u hlávkového salátu, který byl pěstován na venkovním záhonu. Pokud bychom srovnávali obsah celkového kvercetinu hlávkového salátu, který byl pěstován ve skleníku, převyšoval by ho salát vypěstovaný na venkovním záhoně 6,3krát. Za vysoké obsahy lze považovat ještě obsah kvercetinu v rukole a červené čekance. Střední výsledky vykazovaly perila a ledový salát. U fenýklu, polníčku a endivie byly zjištěné obsahy velmi nízké.

Celkový obsah kvercetinu u salátů zkoumal i Arabbi et al. (2004). U salátu venkovního zjistil obsah kvercetinu 18,4 mg/100 g čerstvé hmoty, u červeného salátu 44,9 mg/100 g, u roketky 13,9 mg/100 g a 25,2 mg/100 g u čekanky. Vše bylo měřeno v druhém pololetí 2001. Druhé měření provedl v první polovině roku 2002. U venkovního salátu byl naměřen obsah kvercetinu 20,6 mg/100 g čerstvé hmoty, u červeného salátu 37,5 mg/100 g, u čekanky 3,7 mg/100 g a roketě nebyl zaznamenán (Arabbi et al, 2004).

Pokud bychom srovnávali salátové rostliny a např. léčivé rostliny, v tužebníku jilmovém bylo zjištěno 14 200 mg/kg sušiny (Krejčí, 2007). Tento obsah nedosahuje hodnot zjištěných ve venkovním salátu, ale převyšuje obsahy ostatních rostlin zkoumaných v této práci. Jitrocel kopinatý a meduňka lékařská dosahovaly hodnot podobných jako perila a ledový salát. Kontryhel obecný a bez černý se výsledky podobá salátu ze skleníku.

1.2. Chromatografické profily jednotlivých salátových rostlin

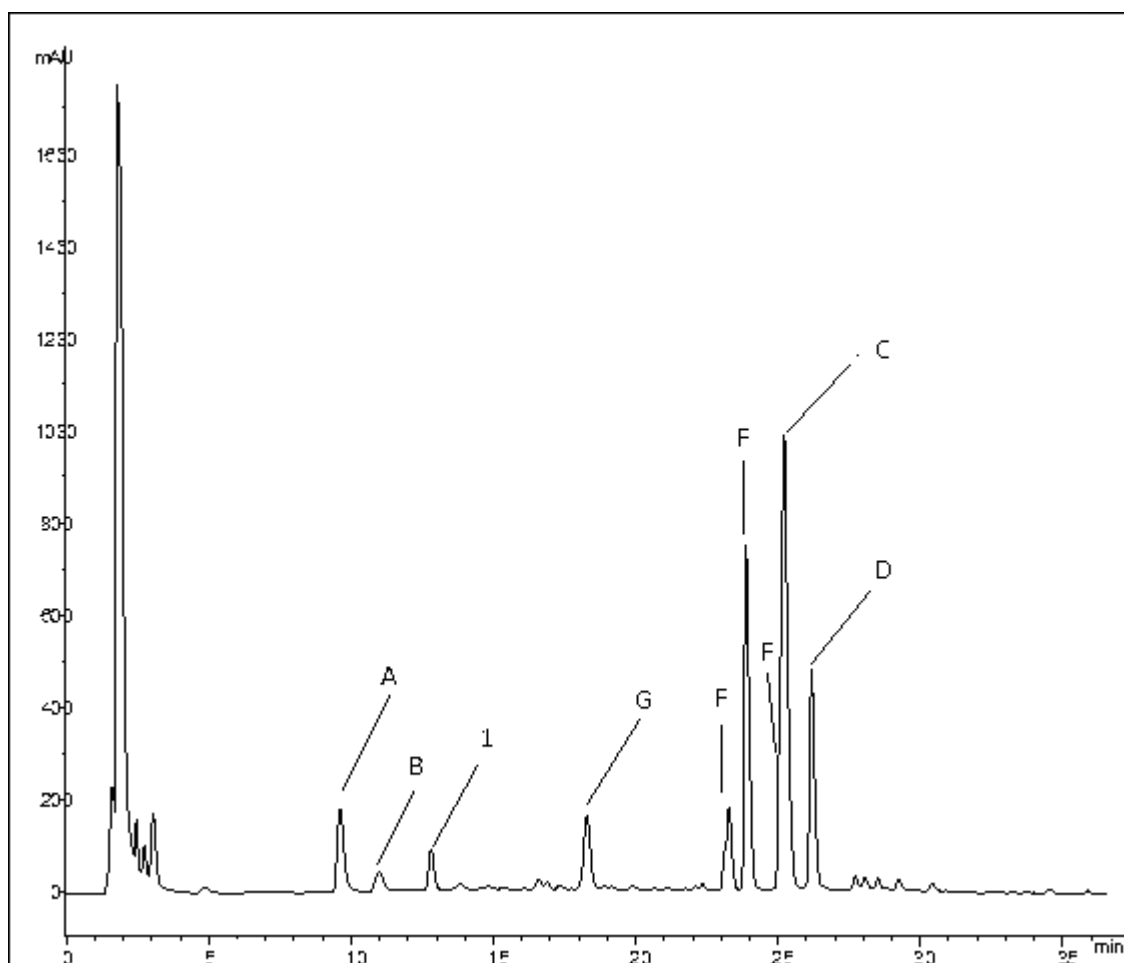
Fenolické látky v salátových rostlinách byly identifikovány metodou HPLC s připojením k DAD. Byly využity standardy, podle kterých proběhlo srovnání retenčních časů a naměřeného spektra se spektrem standardu.

Následující tabulka udává přehled zjištěných fenolických látek spolu s označením jejich vrcholu na chromatogramu.

Tab. č. 2 Fenolické látky identifikované metodou HPLC

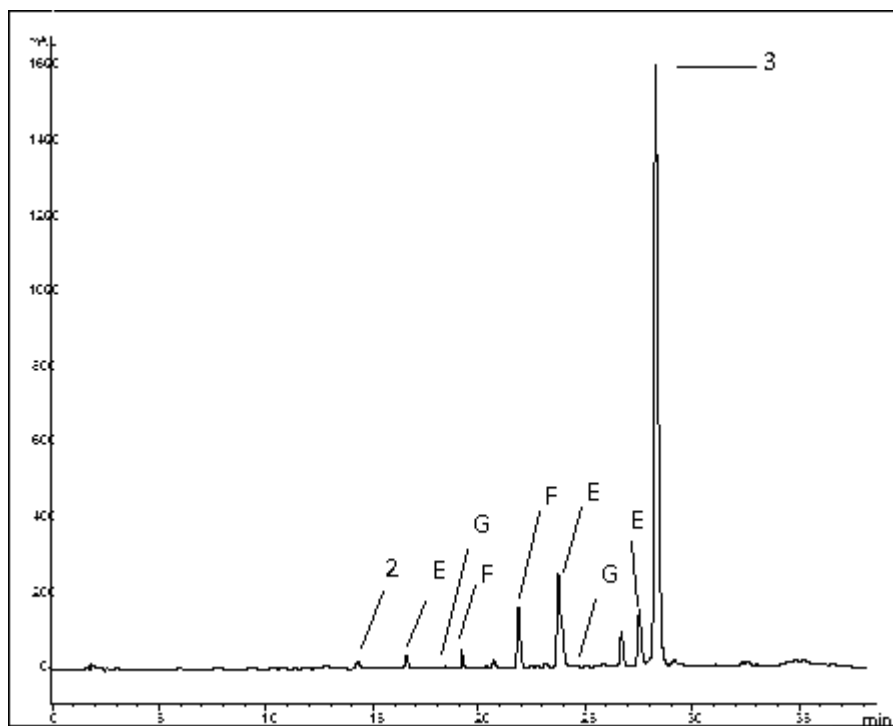
Fenolická sloučenina	Označení vrcholu
chlorogenová kyselina	1
kávová kyselina	2
rozmarinová kyselina	3
tryptofan	A
1.derivát kyseliny kávové	B
2.derivát kyseliny kávové	C
3.derivát kyseliny kávové	D
flavon	E
flavonol	F
barviva	G

Obr. č. 18 Záznam analýzy čekanky červené



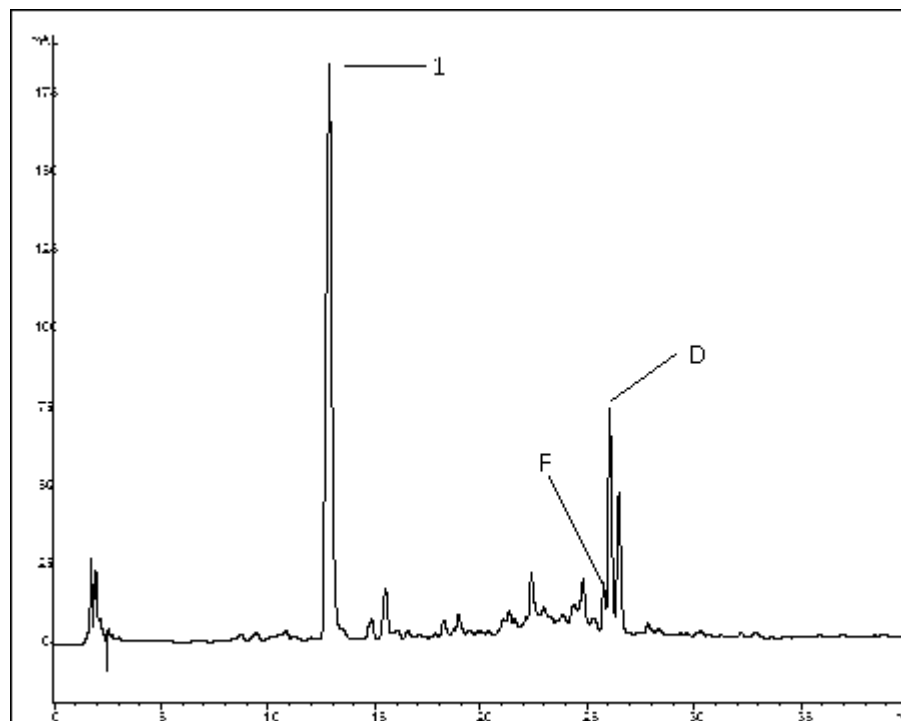
V čekance červené byla zjištěna kyselina chlorogenová (vrchol č. 1). Větší množství vrcholu označovaných písmenem F dále označují přítomnost flavonolů, které se nepovedlo blíže definovat. Chromatogram také ukázal přítomnost barviva (vrchol G). Vrcholy B, C a D poukazují na deriváty kyseliny kávové. Výsledky analýzy čekanky červené a zelené se nijak významně neliší.

Obr. č. 19. Záznam analýzy perily křovité



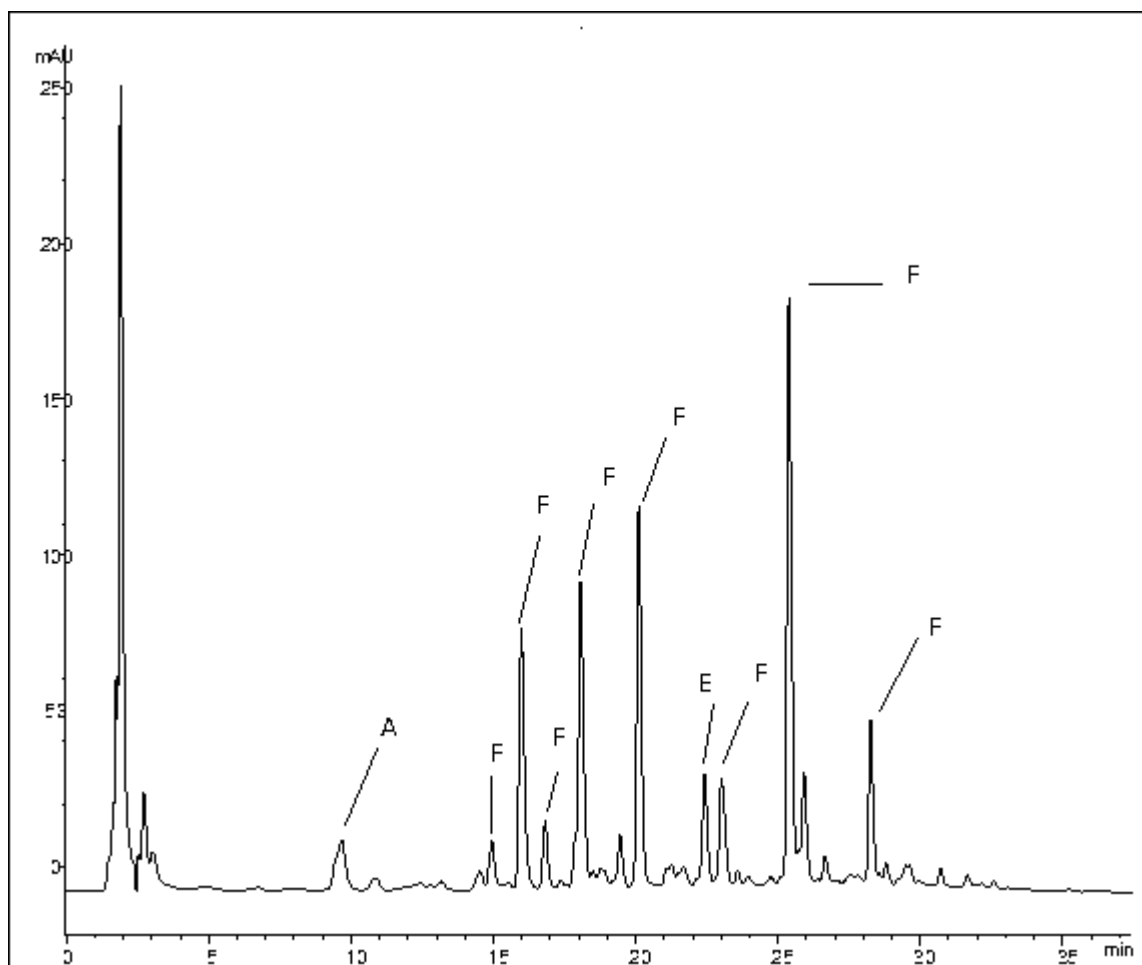
Perila křovitá obsahuje kyselinu kávovou (vrchol č. 2) a velké množství kyseliny rozmarinové (vrchol č. 3). Byla zjištěna i přítomnost barviv. Dále se vyskytovaly flavony a flavonoly.

Obr. č. 20 Záznam analýzy kozlíčku polního



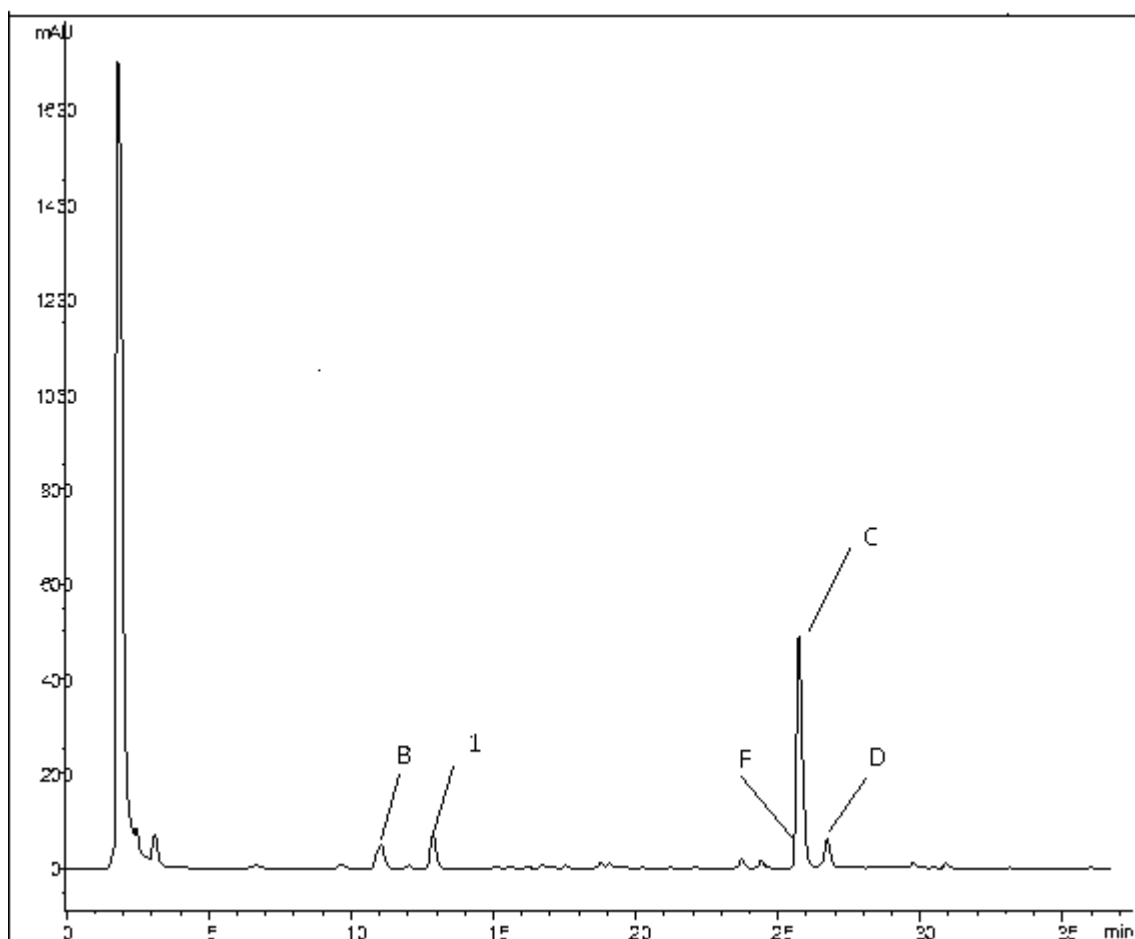
Chromatografický záznam polníčku ukázal vysoký obsah chlorogenové kyseliny (vrchol č. 1) a přítomnost dalších flavonolů a derivátů kyseliny kávové.

Obr. č. 21 Záznam analýzy lebedy zahradní



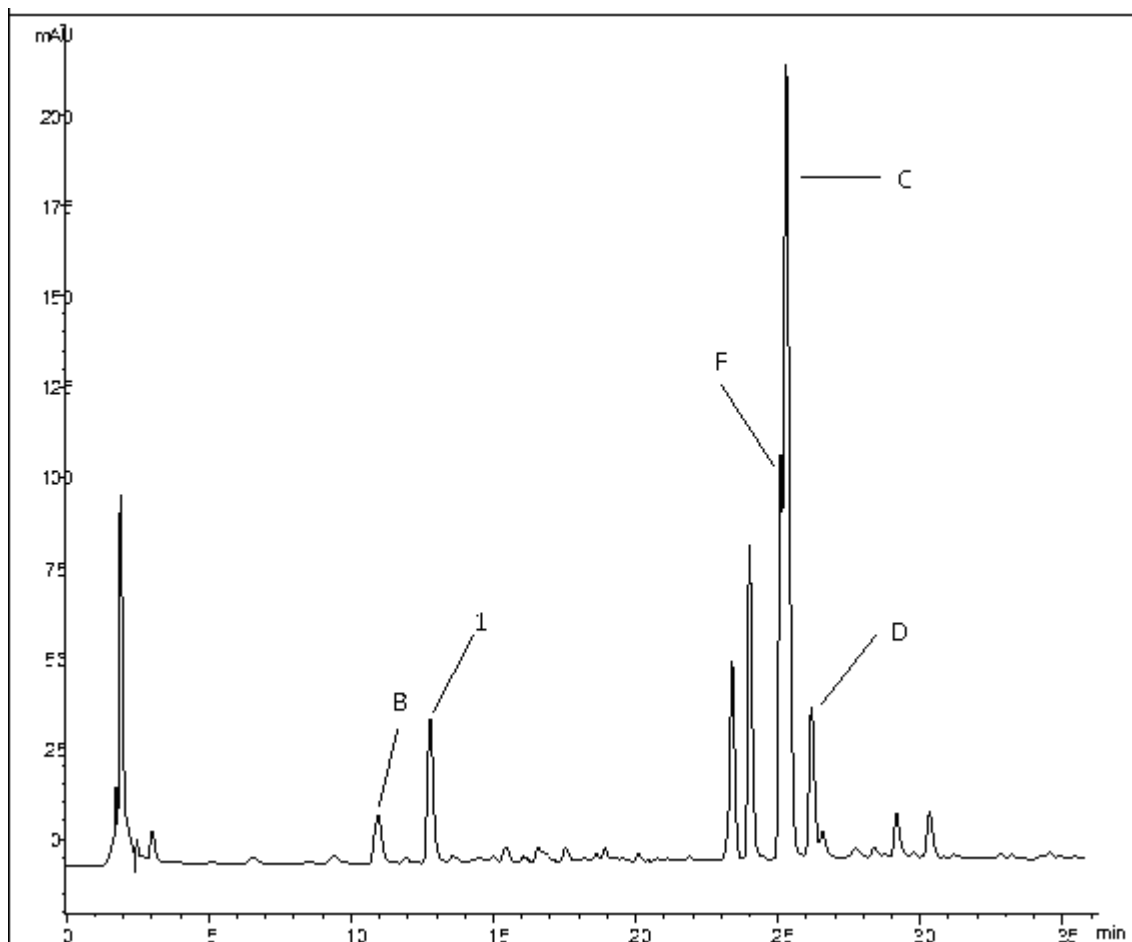
V lebedě zahradní byl nalezen tryptofan (vrchol A) a dále blíže neurčitelné flavonoly a flavony.

Obr. č. 22 Záznam analýzy listového salátu ze skleníku



V listovém salátu pěstovaném ve skleníku byla nalezena kyselina chlorogenová (vrchol č. 1) a deriváty kyseliny kávové (vrchol B, C, D).

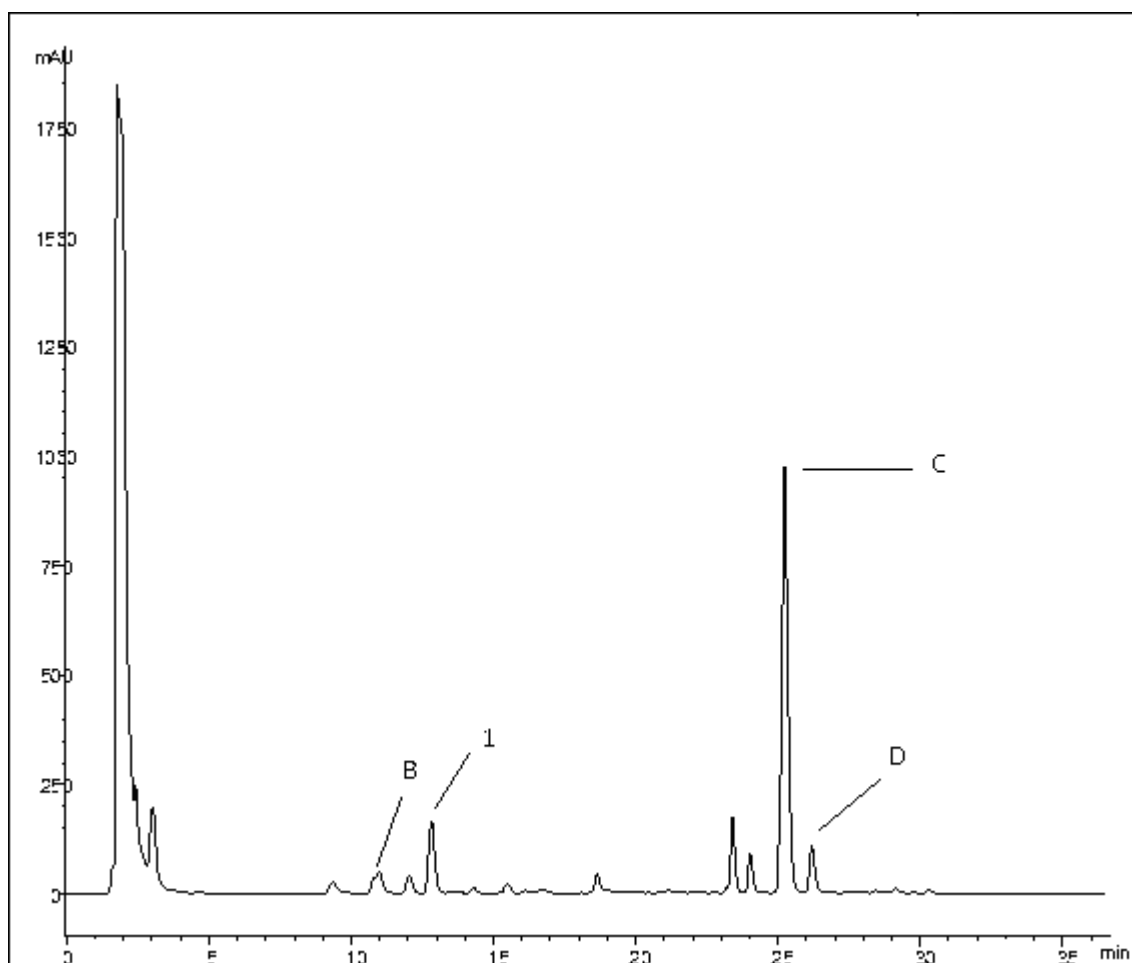
Obr. č. 23 Záznam analýzy listového salátu ze záhonu



Dle Romani bylo v salátu nalezeno: kyselina kávová a její deriváty, dále rutin, kvercetin a jeho deriváty a jako poslední kyselina chlorogenová (Romani et al, 2001)

V námi provedené analýze byla taktéž nalezena kyselina chlorogenová a deriváty kyseliny kávové, avšak samostatná kyselina kávová nalezena nebyla.

Obr. č. 24 Záznam analýzy salátu ledového

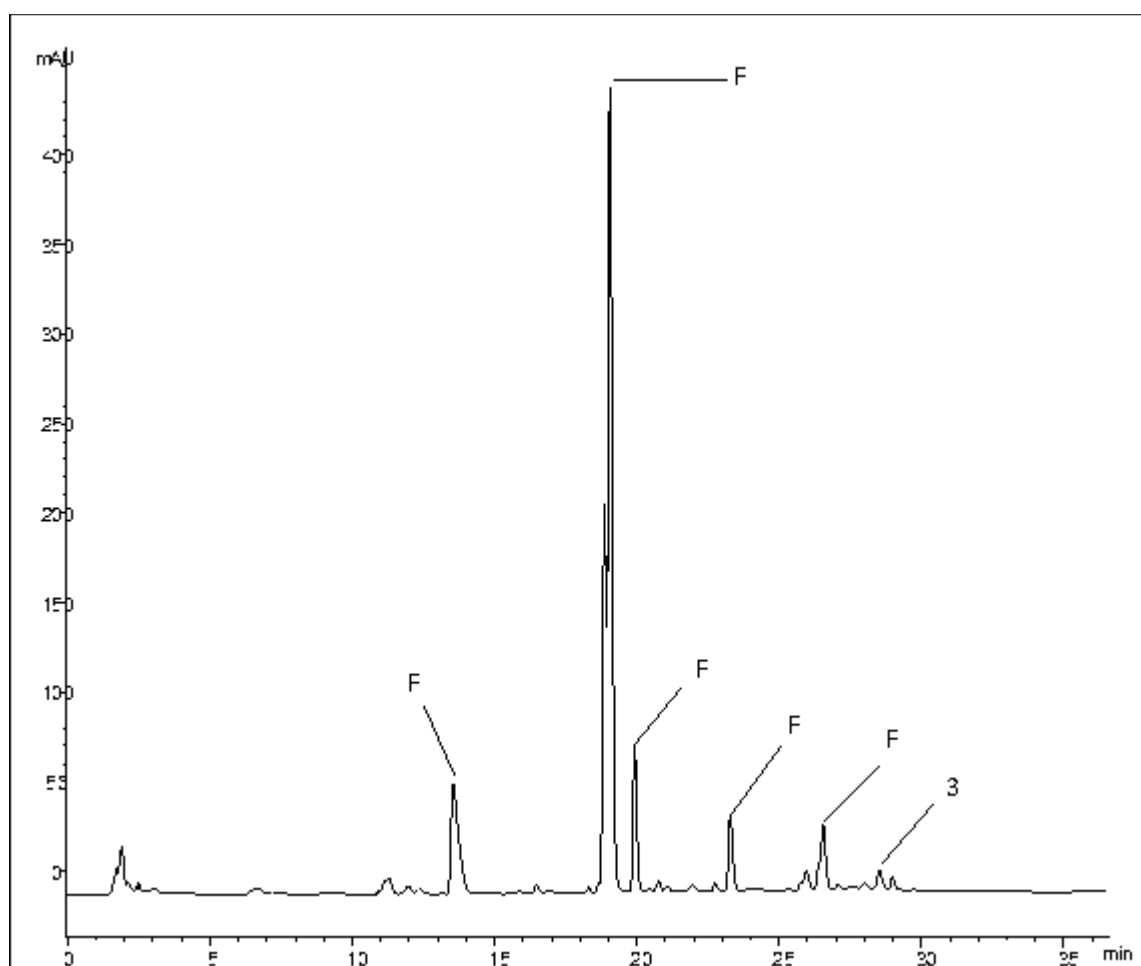


V salátu ledovém byla nalezena kyselina chlorogenová (vrchol č. 1) a tři druhy derivátů kyseliny kávové (vrcholy B,C,D)

DuPonte et al. (2000) zkoumal osm druhů salátu. Obsah fenolických sloučenin se pohyboval v rozmezí 0.3-229 $\mu\text{g/g}$ čerstvé hmoty. V zelených odrůdách byla zjištěna přítomnost pět derivátů kvercetinu a to kvercetin 3-*O*-galaktosid, kvercetin 3-*O*-glukosid, kvercetin 3-*O*-glukuronid, kvercetin 3-*O*-(6-*O*-malonyl)glukosid, kvercetin 3-*O*-rhamnosid. Z dalších látek byl přítomen ještě luteolin 7-*O*glukuronid. V červených variantách byl nalezen cyanidin 3-*O*-glukosid a cyanidin 3-*O*-[(6-*O*-malonyl)glukosid] (DuPont et al., 2000).

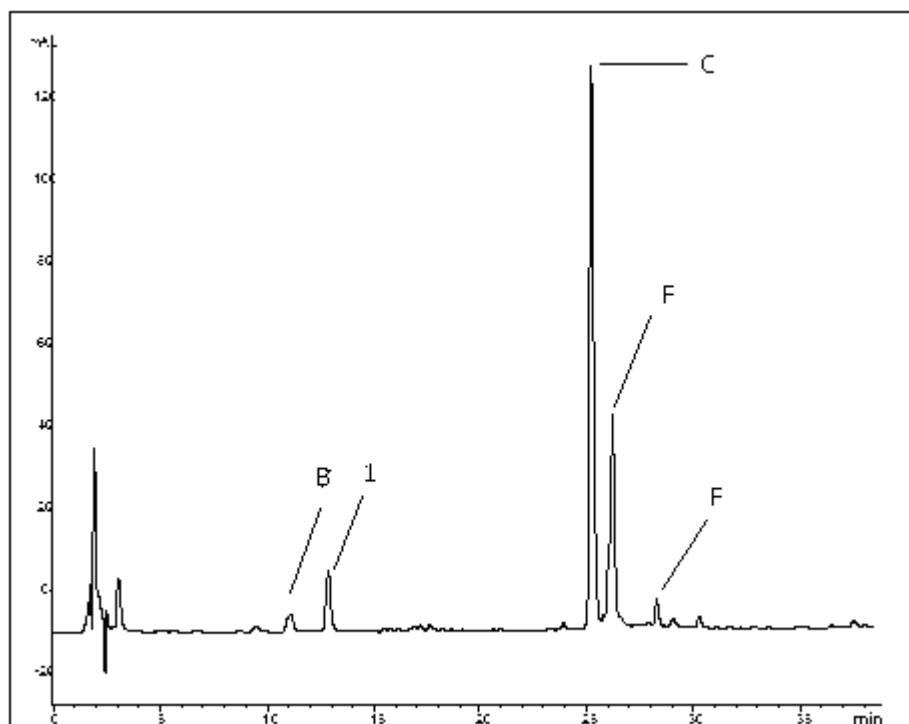
V ledovém salátu byly přítomny deriváty kvercetin 3-*O*-glukosid, kvercetin 3-*O*-(6-*O*-malonyl)glukosid a luteolin 7-*O*glukuronid. Řádově se obsah pohyboval okolo 0,3 µg/g čerstvé hmoty. Pokud srovnáme celkový obsah flavonoidů ledového salátu s odrůdami lollo biondo a lollo rosso, které měly největší obsahy, u nich byla přítomnost flavonoidů 75-90 µg/g čerstvé hmoty (DuPont et al., 2000).

Obr. č. 25 Záznam analýzy rockety seté



Záznam ruky seté prokázal přítomnost kyseliny rozmarinové (vrchol č. 3) a přítomnost neidentifikovatelných flavonolů. Rozdíly mezi rukolou první osev a druhý osev byly minimální.

Obr. č. 26 Záznam analýzy endivie



Záznam endivie prokázal přítomnost kyseliny chlorogenové (vrchol č. 1) a dalších derivátů kyseliny kávové.

Studie DuPontové at al. (2000) prokázala kempferol 3-*O*-glukosid, kempferol 3-*O*-glukuronid a kempferol 3-*O*-[6-*O*-malonyl]glukosid. Zkoumala 3 odrůdy endivie. Odrůda s hladkými listy měla obsah flavonolů 44.3 $\mu\text{g/g}$ čerstvé hmoty, odrůda s hrubými listy 111 $\mu\text{g/g}$ čerstvé hmoty a odrůda karioly 246 $\mu\text{g/g}$ čerstvé hmoty, v té se vyskytoval i kempferol 3-*O*-rhamnosid (DuPont et al.,2000).

Tab. č. 4 Porovnání výskytu fenolických látek v salátových rostlinách identifikovaných pomocí HPLC.

	čekanka červená	čekanka zelená	salát skleník	salát záhon	salát ledový
chlorogenová kyselina	x	x	x	x	x
kávová kyselina					
rozmarinová kyselina					
tryptofan	x				
1. derivát kyseliny kávové	x	x	x	x	x
2. derivát kyseliny kávové	x	x	x	x	x
3. derivát kyseliny kávové	x	x	x	x	x
pigmenty	x	x			

Tab. č. 5 Porovnání výskytu fenolických látek v salátových rostlinách identifikovaných pomocí HPLC.

	kozlíček polní	perila křovitá	roketa 1.osev	roketa 2.osev	Lebeda zahradní	Fenykl řapíkatý	endivie
chlorogenová kyselina	x					x	x
kávová kyselina		x					x
rozmarinová kyselina		x	x	x			
tryptofan					x		
1. derivát kyseliny kávové							x
2. derivát kyseliny kávové							x
3. derivát kyseliny kávové	x					x	
pigmenty		x					

Nejčastěji se v rostlinách vyskytovala kyselina chlorogenová. Kyselina kávová byla zjištěna pouze v perile křovité a v endivii. U perily a roketky byla nalezena kyselina rozmarinová. Dále se velmi často objevily deriváty kyseliny kávové a to hlavně u salátů a čekanek. Obsah pigmentů byl zjištěn pouze u čekanek a perily křovité.

2. Závěr

Rostlinné flavonoidy jsou známé svou lehkou dostupností a svými biologickými vlastnostmi. K nim patří antioxidační vlastnosti, zabraňování peroxidaci lipidů a likvidování volných radikálů. Tyto látky mohou předcházet vzniku chronických onemocnění, jako je kardiovaskulární onemocnění nebo ateroskleróza, a proto se velmi často používají v lékařství.

Závěry vyplývající z řešení zadání diplomové práce lze shrnout:

Obsah fenolických látek byl zkoumán v souboru deseti salátových rostlin.

Nejvyšší obsah celkového kvercetinu v lyofilizovaném materiálu byl nalezen v listovém salátu pěstovaném na záhonu (48 600 mg/kg sušiny). Tímto obsahem vysoce převyšoval ostatní zkoumané rostliny.

Z fenolických látek byly nalezeny fenolické kyseliny a to kyselina kávová, chlorogenová a rozmarinová. Dále byly zjištěny blíže neurčitelné deriváty kyseliny kávové a různé pigmenty.

Výsledky získané metodou HPLC a metodou CE v této diplomové práci dosahují shody. Stanovené údaje o celkovém kvercetinu nebyly doposud v literatuře publikovány.

V. Použitá literatura

- Arabbi P. R., Genovese M. I., Lajolo F. M. (2004) Flavonoids in vegetables fous commonly consumed in Brasil and estimaed ingestion by the brazilian population, journal of agricultural and food chemistry, 52, 1124-1131.
- Biggs. M, Mc Vicarová J., Flowerdew B. (2004): Velká kniha zeleniny, bylin a ovoce, nakladatelství Volvox globator, Praha.
- Brancová P. (2008): Syntéza derivátů kyseliny kávové a jejich toxicita, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno.
- Carnat A. P., Carnat A., fraisse D., Lamaison J. L. (1998): The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. SČSP. *Officinalis*) tea. *Pharm. Acta Helv.*, 72, 301-305.
- Cook N. C., Samman S. (1996): Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.*, 7, 66-76.
- Craig W. J. (1999): Health-promoting properties of common herbst. *Am. J. Clin. Nutr.*, 70, 491-499.
- Dasgupta N., Bratati D. (2005): Antioxidant aktivity of same leafy vegetables of India: A komparative study, *Food Chemismy*, 471-474.
- Drbal K., Křížek M. (1999): Analytická chemie, ZF JU České Budějovice.
- DuPont M. S., Mondin S., Williamson G., Price K. R. (2000): Effect of variety, processing and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. Diet, health and consumer science division, Institute of food research, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UA, United Kingdom, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3957-3964.
- Greinerova K., Weberová A., Michaeli–Achmühleová P. (1993): *Zahrada po celý rok*, nakladatelství Nezávislost, Bratislava, 1993.
- Formica J. V., Regelson W. (1995): Review of the Biology of Quercetin and Related Bioflavonoids, *Chem. Towis*, 1061-1080, Great Britain.

Ismail A., Marjan Z. M., Foong Ch. W. (2003): Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables, *Food Chemistry* ,87,581–586.

Jírovský D. (2007): Vysokoučinné separační techniky v analýze fyziologicky významných látek, Univerzita Palackého, přírodovědecká fakulta, Olomouc.

Hajšlová J., Tomaniová M., Schulzová V., Hubert J., Stejskal V., Nedělník J. (2007): Kritické zhodnocení environmentální zátěže agrárního systému ČR z hlediska produkce bezpečných bioplodin, Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha.

Hartmatha J. (2002): Fenylpropanoid, lignany, jejich biologické účinky. In *Chemie a biochemie přírodních látek*, ÚOCHB, Praha, str. 117-143.

Hertog M. G. L., Hollman P.C.H., Vemena D. P. (1992a): Optimization of quantitative HPLC determinativ of potentially anticarcinogenic flavinoids in vegetables anf fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 2379-2383.

Hertog M. G. L., Hollman P.C.H., Katan M. B. (1992b): Content of potentially anticarcinogenic flavonoidů of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J.Agric. Food Chem.*, 40,2 379-2383.

Hertog M. G. L., Feskens E. J. M., Hollman P. C. H, Katan M. B., Kromhout D. (1993): Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342: 1007-1011.

Hertog M. G. L., Kromhout D., Aravanis Ch., Blackburn H., Buzina R., Fidanza F., Giampaoli S., Jansen A., Menotti A., Nedeljkovic S., Pekkarinen M., Simic B., Toshima H. (1995): Flavonoid intake and long-term risk of coronaryheart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 155: 381-386.

Hertog M. G. L., Sweetnam, P. M., Fehily AM, Elwood P., Kromhout D. (1997): Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly study. *Am J Clin Nutr* 65: 1489-1494.

Heiger D. (2000): High performance capillary electrophoresis: An Introduction, Agilent Technologies, Germany.

- Hollman P. C. H., Hertog M. G. L., Katan M. B. (1996): Analysis and health effects of flavinoids. *Food chem.*, 57 (1), 43-46.
- Hollman P. C. H., Katan M. B. (1998): Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch. Toxicol., suppl.* 2é, 237-248.
- Kincl M., Kubicova S., Zelinka J. (1987): *Základy rostlinné výroby pro učitele 1, Pedagogická fakulta v Ostravě.*
- Krejčí Z. (2007): *Obsah vybraných fenolických látek v léčivých rostlinách, Jihočeská Univerzita, Pedagogická fakulta, České Budějovice.*
- Kýbal J., Kaplická J. (1988): *Naše a cizí koření, Státní zemědělské nakladatelství, Praha*
- Lachman J., Orsák M., Pivec V., Faustová E. (2000): Content of rutin in selected plant sources, *Sci. Agr. Bohem.*, 31, 89-99.
- Malolepsza U., Urbanek H. (2000): Flawonoidy roślinne jako związki biochemiczne czynne, *Plant flavonoids as biochemici aktive compounds, Wiadomości Botanizcne* 44 (3/4): 27-37.
- Mikeš O. a kolektiv (1980): *Laboratorní chromatografické metody, Nakladatelství technické literatury, Praha.*
- Pekarova E. (2000): *Pěstujeme zeleninu, druhé upravené vydání, GRADA Publishing, spol. s.r.o., Praha.*
- Rhodes M. C. J., Price K. R. (1997): Identification and analysis of plant phenolic antioxidants. *Eur. J. Cancer Prev.*, 6, 518-521.
- Romani A., Pinelli P., Galardi C., Sani G., Cimato A., Heimler D. (2001): Polyphenols in greenhouse and open-air-grown lettuce, *Food Chemistry* 79 (2002) 337–342.
- Slanina J., Taborská E. (2004): Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy*, 98, 239-245.
- Stratil P. (1993): *ABC zdravé výživy díl 1., autor vydal vlastním nákladem, Brno.*

Tomlinson C. T. M., Nahar L., Copland A., Kumarasamy Y., Mir-Babayev N.F., Middleton M., Reid R. G., Sarker S. D. (2003): Flavonol glykosides from the seeds of *Agrimonia eupatoria*, *Biochem. Syst. Ecol.*, 31, 439-441.

Velíšek J. (1999): Antioxidanty in *Chemie potravin 3*, OSSIS Tábor, 159-174.

Vodrážka, Z. (1999): *Biochemie*, Akademie věd České republiky, Praha.

www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf

<http://symbinator.com/Antioxidanty-I-clanek-755.html>

<http://www.biotox.cz/toxikon/rostliny/biosyntesa.php>

<http://www.ireceptar.cz/zahrada/uzitkova-zahrada/vypestujte-si-fenykl/>

<http://www.receptyonline.cz/lebeda-zahradni--2566.html>

<http://www.atlasrostlin.cz/hledej?q=lactuca+sativa>

VI. Přílohy

Obrázky listové zeleniny

Příloha č. 1 Celkový pohled na záhon



Příloha č. 2 Salát pěstovaný ve skleníku



Příloha č. 3 Perila křovitá



Příloha č. 4 Salát pěstovaný na venkovním záhoně

