



Pedagogická
fakulta
Faculty
of Education

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Pedagogická fakulta
Katedra biologie

Diplomová práce

Vliv kuchyňských úprav na obsah
fenolických látek v petrželi zahradní
(*Petroselinum crispum*)

Vypracovala: Bc. Sylva Rajdlíková
Vedoucí práce: Ing. Štěpánka Chmelová, Ph. D.

České Budějovice 2019

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě Pedagogickou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce.

Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovení zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledky obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 25. 4. 2019

Sylva Rajdlíková

Mé poděkování patří především Ing. Štěpánce Chmelové, PhD. za vstřícnost, odborné vedení, trpělivost a cenné rady, které mi během zpracování diplomové práce věnovala.

Dále bych chtěla poděkovat doc. Ing. Evě Dadákové, PhD. za pomoc při identifikaci jednotlivých fenolických látek.

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá stanovením celkového obsahu fenolických látek obsažených v petrželi zahradní (*Petroselinum crispum*). Konkrétně byl sledován vliv vybraných kuchyňských úprav (sušení, var) na obsah fenolických látek ve třech odrůdách petržele zahradní: Atika, Hanácká, Olomoucká.

Nejprve byl stanoven celkový obsah polyfenolů spektrofotometrií za využití Folin-Ciocalteauva činidla v extraktu z čerstvé petržele, další vzorky byly upraveny sušením a varem. Vždy zvlášť pro kořen a nať. Poté byly identifikovány konkrétní zástupci z řad fenolických látek za pomoci vysokoúčinné kapalinové chromatografie z lyofilizovaného materiálu.

Nejvyšší koncentrace fenolických látek byla zjištěna v nati sušené petržele, a to u všech odrůd. Nejvyšší obsah konkrétních fenolických látek – apigenin, kemferol, luteolin byl prokázán v odrůdě Atice, rovněž v nati všech uvedených odrůd.

Klíčová slova: fenolické látky, *Petroselinum crispum*

Abstract

The Master's thesis deals with the determination of the total content of phenolic compounds contained in garden parsley (*Petroselinum crispum*). Specifically, the influence of selected kitchen treatments (drying, boiling) on the content of phenolic compounds of garden parsley was monitored in the following three varieties: Atika, Hanácká, Olomoucká.

First, the total polyphenol content was determined by spectrophotometry using Folin-Ciocalteau reagent in fresh parsley extract, further samples were dried and boiled. It was always done separately for root and stem. Thereafter, specific representatives of the phenolic compounds were identified using high performance liquid chromatography from the lyophilized material.

The highest concentration of phenolic compounds was found in the dried parsley stem in case of all varieties. The highest content of specific phenolic compounds – apigenin, kaempferol, luteolin was found in the Atika variety, and also in the stems of all the mentioned varieties.

Keywords: phenolic compounds, *Petroselinum crispum*

Obsah

1	ÚVOD A CÍLE PRÁCE	7
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
2.1	Metabolismus rostlin	8
2.2	Fenolické látky	8
2.2.1	Přehled jednotlivých fenolických látek	10
2.2.2	Vliv fenolických látek na zdraví člověka	18
2.2.3	Charakteristika očekávaných fenolických látek v petrželi zahradní	19
2.2.4	Metody stanovení fenolických látek	21
2.3	Petržel zahradní (<i>Petroselinum crispum</i>)	25
3	MATERIÁL A METODY	28
3.1	Získání rostlinného materiálu	28
3.2	Úprava materiálu před analýzou	28
3.3	Stanovení celkového obsahu polyfenolů spektrofotometricky	29
3.3.1	Příprava extraktu	29
3.3.2	Popis provedených kuchyňských úprav	29
3.3.3	Stanovení celkového obsahu fenolů s činidlem Folin-Ciocalteu	30
3.4	Stanovení fenolických látek metodou HPLC	30
3.4.1	Stanovení flavonoidních aglykonů v lyofilizovaném materiálu	31
3.5	Použité chemikálie a přístroje	33
3.5.1	Chemikálie	33
3.5.2	Přístroje a pomůcky	33
3.6	Použité programy	34
4	VÝSLEDKY	35
4.1	Celkový obsah fenolických látek	35
4.1.1	Petržel zahradní – čerstvá	35
4.1.2	Petržel zahradní – extrakt po povaření	37
4.1.3	Petržel zahradní – výluh po povaření	39
4.1.4	Petržel zahradní – extrakt sušené petržele	41
4.2	Identifikace konkrétních fenolických látek	43
4.2.1	Luteolin	44
4.2.2	Apigenin	45
4.2.3	Kemferol	47
5	DISKUZE	49
6	ZÁVĚR	52

1 Úvod a cíle práce

Petržel zahradní (*Petroselinum crispum*) je jedním z rodu miříkovitých rostlin, které mají hojné uplatnění v potravinářství. Zprvu byla člověkem pouze sbírána, rostla původně v celém Středomoří v hornatých a skalnatých terénech. Zlom nastal až kolem roku 742, kdy začala být pěstována kolem lidských příbytků.

Nejčastěji je petržel přidávána, ať již v podobě kořene či nati, do velkého množství pokrmů. Prochází často typickými kulinářskými úpravami, jimiž jsou zejména var, sušení či lyofilizace (sušení mrazem).

Díky obsahu biologicky aktivních látek našla petržel uplatnění v alternativní medicíně. Zejména v ní přítomné rostlinné polyfenoly vykazují významné antioxidační účinky a přispívají k prevenci civilizačních chorob.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jak vybrané kuchyňské úpravy (vaření a sušení) ovlivňují množství fenolických látek v petrželi zahradní, jak v kořeni, tak i v její nadzemní části – nati.

Nejprve byl stanoven celkový obsah polyfenolů spektrofotometricky za využití Folinova činidla na základě redukčních vlastností polyfenolů. Množství polyfenolů bylo zjišťováno v čerstvé petrželi, v extraktu po povaření (20 minut), ve výluhu z povařené petržele a v nasušených vzorcích.

Dále bylo sledováno, které konkrétní fenolické látky budou obsaženy v různých částech rostliny. Tato identifikace byla provedena za využití metody HPLC (vysokoúčinné kapalinové chromatografie) z lyofilizovaného materiálu.

2 Literární přehled

2.1 Metabolismus rostlin

Ve spojitosti se studiem látek produkovaných rostlinami se velmi často užívá termín primární metabolismus (primární metabolit) a sekundární metabolismus (sekundární metabolit). Metabolity vznikají na základě metabolických procesů odehrávajících se v tělech rostlin.

Primární metabolity jsou takové sloučeniny, které jsou nezbytné při základních procesech a udržují rostliny při životě. Primární metabolismus se odehrává ve všech rostlinných organizmech, jeho produkty jsou pro tyto organizmy v podstatě totožné (Vodrážka, 2002). Jedná se především o nukleové kyseliny, bílkoviny, lipidy, sacharidy. Primární metabolity zajišťují růst, vývoj a reprodukci.

V případě **sekundárních metabolitů** jde o chemické sloučeniny, které nejsou nutné pro základní životní funkce. Jejich biosyntéza navazuje na primární metabolismus a úloha některých sloučenin nemusí být vždy zcela jasná. I přes tento fakt byla u některých sekundárních metabolitů prokázána funkce, pro rostliny nepostradatelná, např. funkce signálních molekul (Svršek, 1997). Mezi nejvýznamnější představitele této skupiny patří: flavanoidy, lignany, kumariny, rotenoidy a stilbeny (Harmatha, 2005).

2.2 Fenolické látky

Fenolické látky, často označované jako rostlinné fenoly či polyfenoly, reprezentují velice různorodou skupinu látek, z nichž se velké množství řadí mezi sekundární metabolity (Míka, 2001). Harmatha (2005) uvádí, že až 40 % organicky vázaného uhlíku představuje fenolické struktury, vyskytující se v živých rostlinných organizmech, tak i v jejich odumřelých částech.

Fenolické látky v rostlinách jsou obecně popisovány jako sekundární metabolity, pro které je typická přítomnost alespoň jednoho aromatického kruhu substituovaného nejméně jednou hydroxylovou skupinou, často značená jako „kyselá“. Tato skupina se může vyskytovat volně či vytvářet pomocí dalších vazeb konjugované sloučeniny. V takovémto případě by mezi fenolické látky byly řazeny i skupiny sekundárních metabolitů (alkaloidy – morfin, terpeny – thymol), které patří k jiným chemickým skupinám. Z toho důvodu je nutné pro přesnější vymezení skupiny fenolických látek uvažovat i hledisko jejich biosyntézy (Bruneton, 1999).

Pestrá řada chemických struktur fenolických látek začíná jednoduchými molekulami s jedním aromatickým kruhem a končí u komplexních polymerů, jako jsou třísloviny a lignin.

Složení	Počet uhlíků	Typy fenolických látek	Příklady
C_6	6	jednoduché fenoly, benzochinony	katechol, hydrochinon
C_6-C_1	7	fenolické kyseliny/aldehydy	kyselina salicylová
C_6-C_2	8	acetofenony, benzofurany	isobenzofuranon
C_6-C_3	9	fenylpropanoidy, benzopyrany (kumariny)	chromen
C_6-C_4	10	naftochinony	juglon
C_6-C_5	11	ageratochromeny	prekocen
$(C_6)_2$	12	dibenzofurany, bifenyly	difenylether
$C_6-C_1-C_6$	13	dibenzopyrany, benzofenony, xantony	difenylmethan, fluoren
$C_6-C_2-C_6$	14	stilbeny, antrachinony	resveratrol, emodin
$C_6-C_3-C_6$	15	flavonoidy, izoflavony, chalkony	kvercetin, genistein
$C_6-C_4-C_6$	16	norlignany (difenylbutadieny)	hinokiresinol
$C_6-C_5-C_6$	17	norlignany (conioidy)	sugiresinol
$(C_6-C_3)_2$	18	lignany, neolignany	
$(C_6-C_3-C_6)_2$	30	biflavonoidy	amentoflavon
$(C_6-C_3-C_6)_n$	n	kondenzované taniny	gallotaniny
$(C_6-C_3)_n$	n	ligniny	
$(C_6)_n$	n	katecholmelaniny	rostlinné pigmenty

Tab. č. 1 Nejběžnější typy fenolických látek v rostlinách seřazeny podle počtu uhlíků
(Harmatha, 2005)

Tato skupina sloučenin může vznikat dvojím způsobem, obě cesty vedou k tvorbě aromatických sloučenin (Míka, 2001):

1. typicky přes kyselinu shikimovou, která spěje od monosacharidů ke vzniku aromatických AMK (aminokyselin), konkrétně se jedná o fenylalanin a tyrosin. Dalším krokem je deaminace, jejíž výsledkem je kyselina skořicová a její četné deriváty (kyselina benzoová, acetofenony, kumariny, lignany a ligniny).

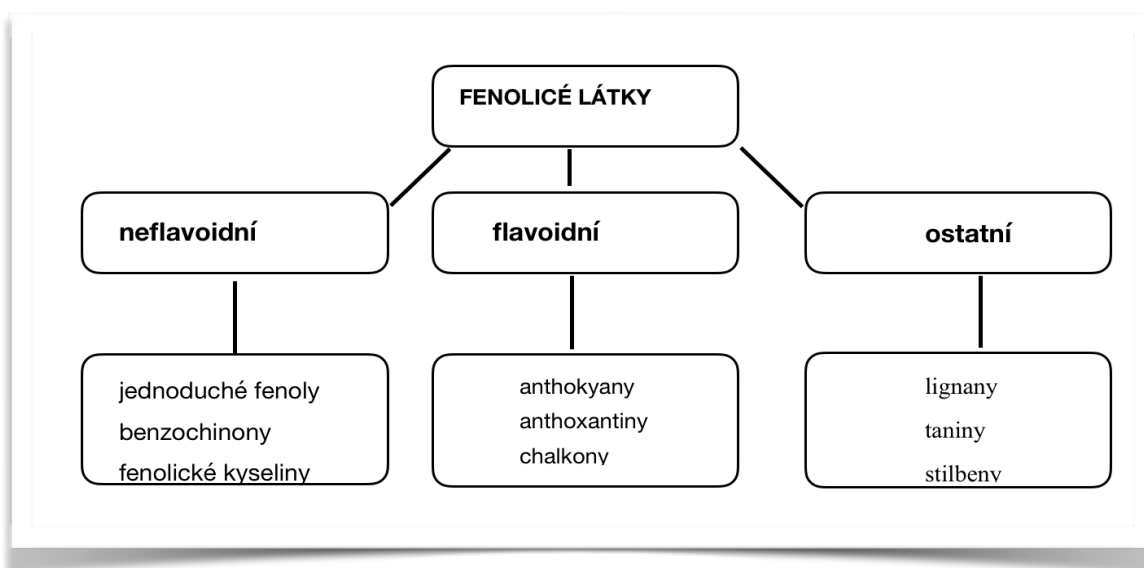
2. méně častěji polyacetálovou biosyntézou, která začíná acetátem a směřuje k tvorbě polyketidů, vznikajících díky Claisenově či aldolové kondenzaci. Na konci této dráhy se získávají následující produkty: chromony, isokumariny, orcinoly, depsidy, depsidony, xanthyony a chinony.

Rostlinné fenoly lze tedy označit za přírodní, bezdusíkaté sloučeniny, jejichž aromatická jádra jsou výsledkem metabolismu kyseliny shikimové či polyacetátu, přesněji kombinací obou. Právě tento duální původ je důvodem velké rozmanitosti chemických struktur fenolických látek (Bruneton, 1999).

2.2.1 Přehled jednotlivých fenolických látek

Rostlinné fenoly lze rozřadit dle struktury do tří základních skupin: neflavonoidní, flavonoidní a ostatní látky. Do těchto skupin patří množství dalších látek, které jsou pak pro přehlednost uvedeny na obrázku č. 1.

Za nejvýznamnější skupinu fenolických látek se mohou považovat flavonoidy, především anthokyany, anthoxantiny a chalkony. Druhou kategorií, tedy látky neflavonoidní povahy, představují jednoduché fenoly, benzochinony a fenolické kyseliny, zejména deriváty kyseliny skořicové a benzoové. Rostlinné fenoly jako lignany taniny či stilbeny jsou řazeny do zvláštního oddílu nazvaného jako ostatní (Kalač, 2001). Všechny tyto skupiny jsou následně podrobněji popsány.

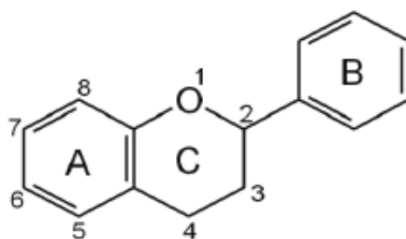


Obrázek č. 1 Základní rozdělení polyfenolů (Kalač, 2001)

Flavonoidy

Flavonoidní látky jsou nejvíce prozkoumanou skupinou rostlinných fenolů. Jde o všeobecně se vyskytující rostlinná barviva, kterých bylo doposud popsáno více jak 4500 typů. Dávají barvu květům plodům a někdy i listům, fungují také jako ko – pigmenty. Podílejí se také na ochraně pletiv před škodlivým UV-B zářením (Míka, 2001).

Flavonoidy jsou strukturně odvozeny od flavanu, což je kyslíkatá heterocyklická sloučenina se systematickým názvem 2-fenylchroman, jejímž substituentem je v poloze C-2 fenyl, jehož struktura je uvedena na obrázku č. 2



Obr. č. 2 Obecný vzorec flavonoidů

Flavonoidy se hojně se vyskytují v některých semenech, zejména v aleuronové vrstvě, která bývá velmi často odstraněna během konečných úprav např. mouky a loupané rýže. Vyskytují se také v kaprad'orostech, přesličkách a ve velkém množství i v krytosemenných rostlinách čeledi *Asteraceae*, kde bylo nalezeno až 30 různých druhů flavonoidů (Hampl a Lapčík, 1996).

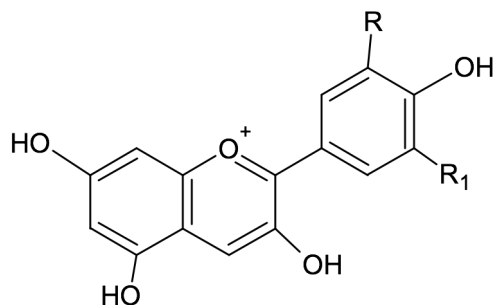
Flavonoidní látky lze pro jejich početnost rozřadit do několika dalších skupin, odlišujících se zejména svými substituenty. Jde o anthokyany, anthoxantiny (flavonoly, flavony, isoflavony, flavanony, flavonony, katechiny) a chalkony (Kalač, 2001).

Anthokyany

V české odborné literatuře označovány také jako anthokyaniny. Jedná se o největší skupinu rostlinných barviv rozpustných ve vodě a ve velkém množství případů způsobují

zbarvení různého ovoce, květů či zeleniny. Jsou nositeli červené, růžové, lila, purpurové, modré či fialové barvy. (Balík, 2010).

Anthokyany vyskytující se přirozeně jsou z chemického hlediska heteroglykosidy, složené z cukerné složky a aglykonu, v tomto případě anthokyanidinu, který je odvozen od 2 fenylnbenzo-pyriliového kationtu (flavilový kation). Jejich barevná škála závisí na daném aglykonu, přítomnosti minerálních solí a samozřejmě na pH (Bruneton, 1999).



Obrázek č. 3 Strukturní vzorec anthokyanů

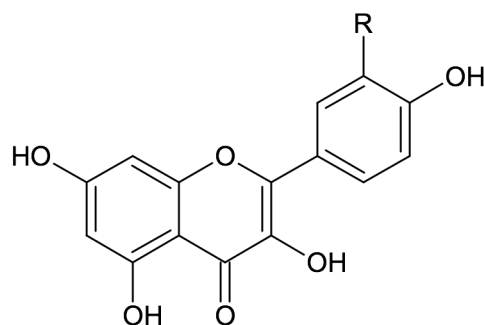
V kyselém prostředí mají červené zbarvení, při dalším zvyšování hodnoty pH dochází k posunu rovnováhy k bezbarvé karbinolové bázi, červené zbarvení slábne. Když pH dosáhne hodnoty v intervalu pH 4,0 - 4,5 dojde k úplnému odbarvení. Při dalším nárůstu pH se navrácí purpurově červené zbarvení pouze za přítomnosti volné hydroxy – skupiny. S posunem pH do hodnot vyšších než 7,5 se tvoří modré zabarvení (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Pomocí klinických testů bylo dokázáno, že antokyaniny zlepšují propustnost a pružnost cév. Anthokyaninové pigmenty mají také antioxidační účinky, podílí se na odstraňování volných radikálů (Míka, 2001).

Anthoxantiny

Flavonoly

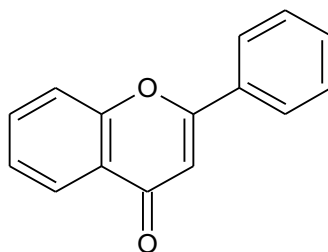
Reprezentují spolu s flavony většinu známých látek flavonoidní povahy, kdy v kruhu A (obr. č. 2) je v 90 % případů substituce 2 skupinami fenolických hydroxylů na C5 a C7. V rostlinách se flavonoly nejčastěji vyskytují ve formě glykosidů. Mezi nejznámější patří kemferol (R=H), kvertecin (R=OH), myricetin, morin a rutin (Velíšek a Hajšlová, 2009).



Obrázek č. 4 Strukturní vzorec flavonolů

Flavony

Flavonům narozdíl od flavonolů chybí hydroxylové skupiny. Nalézají se především v rostlinách, velmi málo pak v ovoci a zelenině a řadí se mezi žlutá barviva. Spolu s anthokyaniny jsou zodpovědné za barevné odstíny okvětních lístků mnoha rostlin. Hlavními představiteli jsou luteolin (R=OH) a apigenin (R=H) (Míka, 2001). Flavony luteolin a apigenin jsou podrobněji popsány v oddíle očekávané fenolické látky v petrželi zahradní.

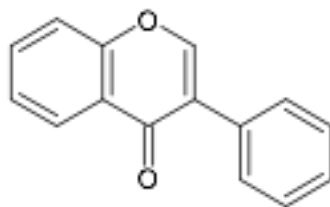


Obrázek č. 5 Strukturní vzorec Flavonů

Isoflavonoidy

V současnosti je známo kolem 900 isoflavonoidů, avšak ve vyšších koncentracích byla jejich přítomnost prokázána pouze v čeledi bobovitých (*Fabaceae*) (Velíšek a Hajšlová, 2009). V menší míře se isoflavony vyskytují v čeledi laskavcovité, růžovité a kosatcovité. Po potravinářské stránce stojí za zmínění výskyt isoflavonů v sojových bobech a produktů z nich vytvořených (<http://www.bezpecnostpotravin.cz>).

Isoflavonoidy v rostlinách představují skupinu označovanou jako fytoalexiny. Jedná se o látky, které jsou vytvářeny rostlinou pro přirozenou obranu proti patogenním činitelům, jimiž jsou nejčastěji nižší houby (Míka, 2001).



Obrázek č. 6 Strukturní vzorec isoflavonoidů

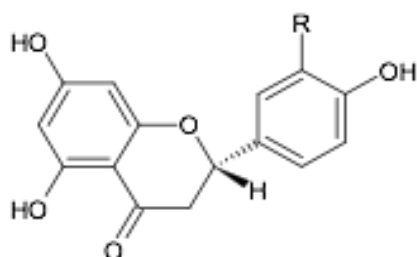
Isoflavony v některých případech mohou vykazovat estrogení účinek, díky chemické podobnosti s estrogeny jsou schopny se navázat na estrogení receptory a působit pozitivně proti rakovině prsu či prostaty, mají i protizánětlivé účinky (Rýdlová, 2015).

Flavanony

Pro flavanony je typická absence 2,3 - dvojně vazby a přítomnost alespoň jednoho asymetrického středu. Hojně se vyskytují spíše v citrusových plodech, například za hořkost grepu jsou zodpovědné právě flavanony. Hlavními zástupci jsou následující látky: naringerin (R=H), hesperidin (R=OH) a jejich glykosidy (Kalač, 2001; Míka, 2001; Velíšek, 2009).

Jako většina fenolických látek i naringerin vykazuje určité vlastnosti, které se staly předmětem studia v souvislosti s onemocněním diabetes mellitu. Fernandes (2009) prokázal, že naringerin může zlepšit metabolismus glukózy a lipidů a je prospěšný při prevenci diabetických komplikací.

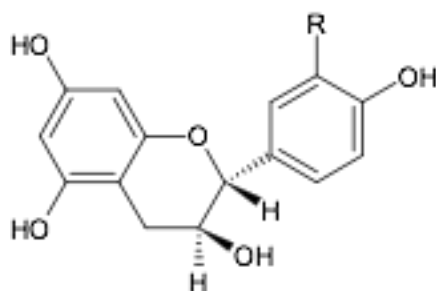
Druhým nejčastěji vyskytujícím se flavanonem je hesperidin, který se v poměrně velkém množství nachází v citrusových plodech, zejména v pomerančích, citrónech a v pomelu (Velíšek a Hajšlová, 2009).



Obrázek č. 7 Strukturní vzorec flavanonů

Katechiny

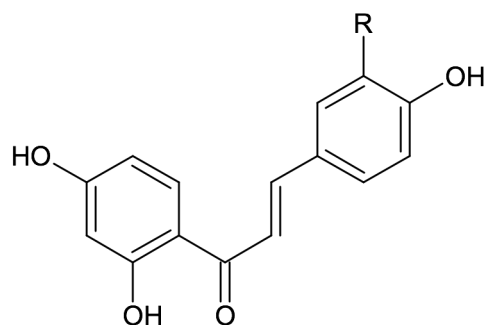
Flavanoly, respektive 3-flavanoly, vyskytující se v monomerní formě označujeme jako katechiny. Tyto fenolické látky byly identifikovány ve vysoké koncentraci jako součást zeleného čaje, kde představují 20–30 % sušiny čajových lístků. V nižších koncentracích jsou součástí ovoce (meruněk), ale i jiných potravin např. čokolády. Mezi nejznámější flavan-3-oly patří afzelechin (R=H) či katechin (R=OH) (Velíšek a Hajšlová, 2009).



Obrázek č. 8 Strukturní vzorec katechinů

Chalkony

Poslední podskupinou favoidních látek jsou právě zmíněné chalkony, popřípadě dihydrochalkony. Obecně se vyskytují jako květní barviva, která způsobují žlutá zbarvení rostlin. Ve většině případů se o chalkonech mluví v souvislosti s čeledí bobovité – *Fabaceae*. Hlavními představiteli jsou isolikviritigenin, butein (Middleton a kol., 2000).



Obrázek č. 9 Strukturní vzorec chalkonů

Ostatní látky patřící mezi fenolické

Do skupiny látek označovaných jako ostatní fenolické látky patří látky odlišující se strukturou i vlastnostmi od výše zmíněných. Jedná se o **lignany, třísloviny a stilbeny**.

Třísloviny nebo-li taniny jsou skupinou jejíž vymezení není jednoznačné. Nejčastěji je akceptována charakteristika, která odráží jejich nejvýznamnější vlastnosti. Jde o rostlinné polyfenoly, rozpustné ve vodě s molekulovou hmotností 500–5000 Da, srážejí bílkoviny. Charakteristická je pro ně svíravá, trpká chuť (Reis Giada, 2013).

Třísloviny lze rozdělit do dvou velkých skupin, jejichž chemický význam je zcela odlišný:

Hydrolyzovatelné třísloviny obsahují esterovou vazbu, kterou lze snadno rozrušit použitím kyselé katalýzy či enzymově. Touto reakcí dojde k uvolnění základních stavebních kamenů, kterými ve většině případů bývá D-glukosa a deriváty kyseliny gallové. Tento typ taninů je typický pro duby a některé léčivé rostliny (Kalač, 2001).

Kondenzované třísloviny narozdíl od první skupiny nemají esterovou vazbu, z toho důvodu nemohou být štěpitelné ani minerálními kyselinami. Jsou odvozeny od 3-flavan-3-olu. Pojmenování kondenzované třísloviny je trochu zavádějící, protože i hydrolyzovatelné taniny mohou za určitých okolností podléhat kondenzačním reakcím (Míka, 2001).

Lignany

Lignany jsou skupinou poměrně jednoduchých difenolů, připomínající molekulární stavbou ligniny. Charakteristickým znakem je přítomnost 2,3 - dibenzylbutanu jako základní jednotky jejich struktury. V rostlinných tělech zajišťují chemickou ochranu proti působení hmyzu, mikroorganismů a působení jiných rostlin (Perlín, 2011). Lignany jsou obsaženy v mnoha potravinách rostlinného původu, nejvyšší obsah byl nalezen ve lněných semenech. Také zelenina, čaj, obilné otruby a luštěniny jsou dostatečnými zdroji vzhledem ke konzumovanému množství těchto potravin. Některé lignany mají uplatnění nejen jako antioxidanty, ale i jako fytoestrogeny a látky s anti karcinogenním účinkem (Velíšek a Hajšlová, 2009).

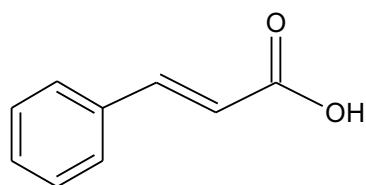
Stilbeny

Stilbeny patří mezi tzv. stilbenoidy, konkrétně se jedná o látky se dvěma benzenovými jádry, která jsou spolu spojeny pomocí ethenového můstku. Jejich zastoupení v rostlinném těle je minimální, nejčastěji jsou součástí slupek drobného ovoce např. rybízu či hroznového vína. Mezi nejznámější stilbeny se řadí resveratrol. Stilbeny jsou hojně využívány pro své fungistatické účinky (Kaniová, 2015).

Látky neflavoidní povahy

Mezi neflavoidní látky se řadí jednoduché fenoly, benzochinony a fenolické kyseliny. Jednoduché fenoly se vyskytují v rostlinách zřídka, výjimku představuje hydrochinon přítomný v tělech rostlin čeledi růžovité, vřesovcovité. Hlavními jednoduchými fenoly charakterizující tuto skupinu jsou katechol, quajakol, floroglucinol. Tyto látky se nejčastěji objevují ve formě glykosidu difenolu či jako monomethyl etheru (Míka, 2001).

Nejrozsáhlejší skupinou látek neflavoidních jsou fenolické kyseliny, které jsou v literatuře vymezeny jako organické látky s nejméně jednou karboxylovou skupinou (-COOH) a jednou fenolickou hydroxylovou skupinou (-OH). V praxi se pod tímto označení rozumí kyselina benzoová, kyselina skořicová, včetně jejich derivátů (Kalač, 2001).



Obrázek č. 10 Strukturní vzorec kyseliny skořicové

Běžné fenolické kyseliny se odvozují od :

- benzoové kyseliny (C6 – C1):
 - kyselina gallová
 - kyselina vanilinová
- kyseliny *trans*-skořicové (C6-C3)
 - kyselina p – kumarová
 - kyselina ferulová
 - kyselina sinapová
 - kyselina kávová

Všechny výše uvedené látky odvozené od kyseliny *trans*-skořicové se vyskytují v rostlinách ve velké míře, avšak málokdy jako volné látky. Většina z nich je přítomna ve formě esterů, amidů či ve vazbě se sacharidy. Nejobvyklejší látkou tohoto typu je kyselina chlorogenová (5-kofeylchinová kyselina), ta se ve velkém množství vyskytuje v kávových zrnech. Dále pak kyselina ferulová, která je složkou vlákniny (Slanina a Táborská, 2004).

2.2.2 Vliv fenolických látek na zdraví člověka

V posledních 10 letech se výzkumu obsahu fenolických látek v potravinách věnuje velká pozornost, protože jejich příjem v potravě je uváděn ve spojení se snížením výskytu závažných chorob.

Fenolické látky přijímané v potravě mají mimo jiné pozitivní vliv na lidský organismus. Vykazují tzv. antioxidační vlastnosti. Jejich účinek spočívá v potlačení, zneškodnění, případných toxických forem kyslíku. Polyfenoly mohou snižovat riziko vzniku

rakoviny. Jejich protinádorový vliv tkví v tom, že jsou schopny zastavit růst karcinogenních buněk, nebo mohou vyvolat programovanou buněčnou smrt tzv. apoptózu (Andrs a Volf, 2008).

Polyfenoly se mohou mimo jiné podílet na zlepšení stavu trávicího traktu, podporují normální hladinu cukru v krvi, podílí se na potlačování zánětů a pomáhají v boji s kardiovaskulárním onemocněním. V tomto případě dochází k potlačení lipidové peroxidace, která je vyvolána volnými radikály. Polyfenolické látky také kladně ovlivňují průtok krve a vasorelaxaci, tím předchází vzniku aterosklerózy (Štípek, 2000).

Všechny prospěšné vlastnosti připisované působení fenolických látek na lidský organismus proběhly při studiích v laboratorních podmínkách či pokusech na zvířatech, při kterých byly polyfenoly dávkovány v jiném množství, mnohem větším, než je obvykle dostupné z potravy. Z tohoto důvodu nelze stanovit obecné doporučení příjmu pro populaci (Mandelová, 2006).

2.2.3 Charakteristika očekávaných fenolických látek v petrželi zahradní

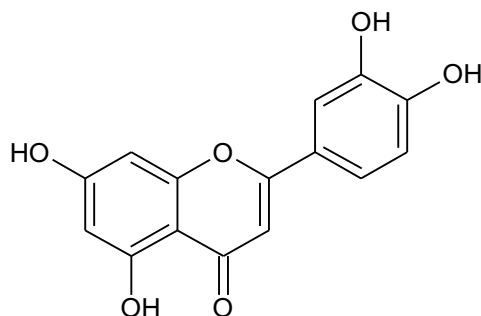
Luteolin

Luteolin je jedním z nejběžnějších flavonoidů, který se hojně vyskytuje v některých rostlinných produktech, např. v brokolici, pepři, tymiánu, celeru či v petrželi. Výzkumy prokázaly, že luteolin má prospěšné ochranné účinky na nervovou soustavu. Vykazuje také antioxidační a imunomodulační vlastnosti (Velíšek, 2009). Rostliny bohaté na luteolin byly používány již v čínské tradiční medicíně pro léčbu různých onemocnění, jako je hypertenze, zánětlivé onemocnění a rakovina.

Ve výzkumu prováděném Hendriksem (2005) byl podán luteolin (50 mg/den) potkanům s EAE (Experimentální autoimunitní encefalomyelitida). Bylo zjištěno, že díky perorálnímu, tak i intraperitoneálnímu podávání luteolinů došlo k potlačení odchylek v chování, zabránění relapsu a snížení zánětu a axonálního poškození.

EAE je zánět mozku vyskytující se především u hlodavců. Jde o zánětlivé demyelinizační onemocnění centrální nervové (CNS). Zpravidla je EAE studována jako zvířecí model lidských demyelinizačních onemocnění, mezi které se řadí roztroušená skleróza nebo akutní diseminovaná encefalomyelitida (Shamsizadeh a Moghaddamhadi, 2017).

Další klinické studie ukazují možnost použití luteolinu a zlepšení stavu u autismu, diabetes mellitu druhého typu a některých typu rakovin.



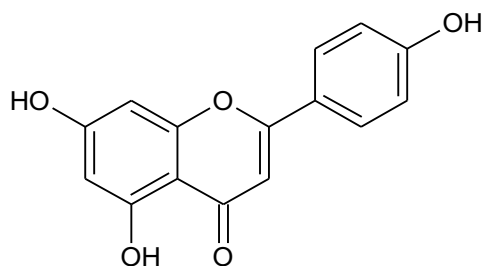
Obrázek č. 11 Luteolin

Apigenin

Apigenin (4,5,7-trihydroxyflavon) je přírodní flavon, který se nachází v mnoha rostlinách. Spolu s naringeninem, tangeritinem a baicaleinem má mnoho biologických vlastností. Apigenin je v hojném množství obsažen v běžném ovoci a zelenině, především v petrželi a celeru, dále v pomerančích, čaji, heřmánku a v pšeničných klíčcích, červeném vínu, rajčatové šťávě a v jiných potravinách rostlinného původu (Patočka, 2012).

Bylo prokázáno, že apigenin vyvolává stav zvaný “autophagia”, jakýsi druh buněčného spánku, tím přispívá k tzv. chemopreveci ovoce a zeleniny. Apigenin má podobu žluté krystalické látky, v minulosti využívané k barvení vlny. Zajímavé jsou však zejména jeho bioaktivní účinky, pro které se stal velmi sledovanou strukturou. Bylo prokázáno, že vykazuje významné protizánětlivé, antioxidační a protikarcinogenní vlastnosti (Navrátilová, Patočka, 2012).

V průběhu rakoviny je klíčovým zlomem tvorba metastáz. Proto je nezbytné najít mechanismy bránící či blokující právě tuto tvorbu. Zdá se, že apigenin má mechanismus, který by mohl inhibovat tvorbu metastáz pomocí multifunkčního buněčného proteinu (C 26) na povrchu buněk (Shields, 2017).

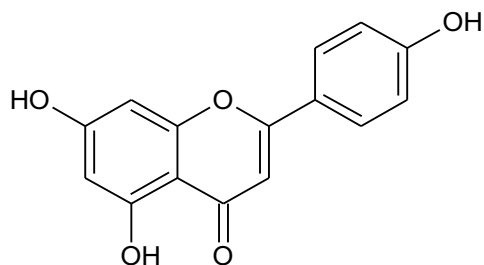


Obrázek č. 12 - Apigenin

Kemferol

Kemferol neboli kaempferol je rostlinný flavanoid izolovaný z různých druhů ovoce, zeleniny či bylin. Především z grapefruitu, různých druhů vilínu, stračku, celeru, brokolice aj. (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Kemferol je žlutá krystalická pevná látka s teplotou tání 276-278 °C, málo rozpustná ve vodě, avšak dobře rozpustná v horkém ethanolu a diethyletheru. Tato biologicky aktivní sloučenina má mnoho farmakologických účinků, např. antioxidační, protizánětlivé, antimikrobiální, antidiabetické a protinádorové. V současné době je zvažován jako jedna z možných léčeb rakoviny, díky účinkům snižující oxidativní stres (Shields, 2017).



Obrázek č. 13 Kemferol

2.2.4 Metody stanovení fenolických látek

Některé fenolické látky lze určit přímo, označují se jako viditelné. Klasickým příkladem jsou anthokyaniny z květů. Jiné jsou detekovatelné po ozáření UV zářením nebo rozlišitelné pomocí barevných reakcí. Všechny tyto výše uvedené metody slouží pouze pro kvalitativní určení (Míka, 2001).

Pokud jde, ale o přesné zjištění množství fenolických látek obsazeného v rostlinném materiálu, pak se využívají metody spadající do druhé části, tedy kvantitativní určení. Zde se nejčastěji využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie, která je podrobně popsána níže. Před vlastním stanovením pomocí chromatografu či spektrofotometru, musí dojít k oddělení určovaných složek či rušících elementů ze směsi.

2.2.4.1 Chromatografie

Chromatografie je obecně jedna z nejdůležitějších separačních metod, které jsou využívány pro dělení, identifikaci a stanovení velkého množství látek, organických i anorganických. Používá se nejvíce k dělení mezi dvěma fázemi. Fází pohyblivou (mobilní) představuje vždy plyn či kapalina.

Fáze nepohyblivá (stacionární) může mít v chromatografii odlišné formy. Pro jednoduchost pochopení je jakákoliv forma stacionární fáze označována jako sorbent (Křížek a Šíma, 2015).

Klasická chromatografie je založena na principu kolon plněných sorbentem, přes kterou prochází určitou rychlostí mobilní fáze. V okamžiku, kdy dojde ke styku obou fází s dělenými látkami vzorku, dochází k vzájemným interakcím, které nadále rozhodují, jak bude separační proces probíhat. Dle typů těchto interakcí lze rozdělit jednotlivé chromatografické metody:

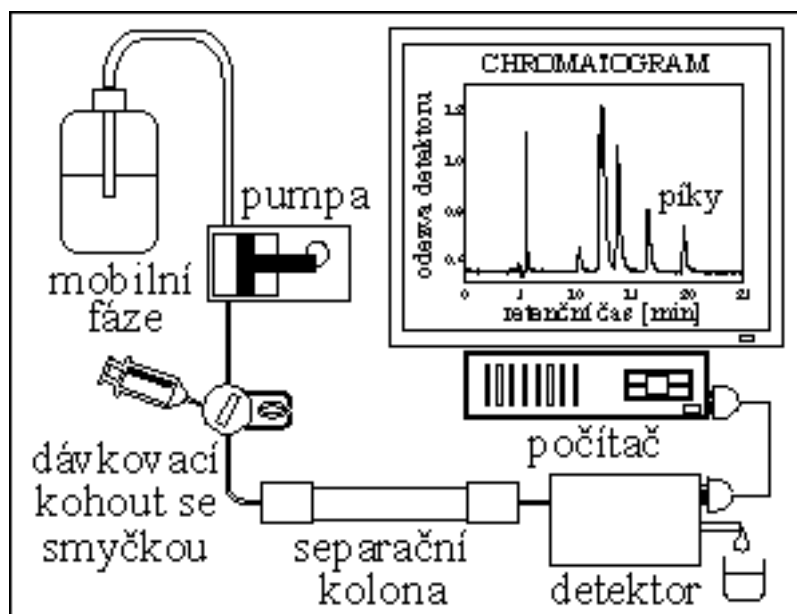
1. plynová rozdělovací chromatografie
2. plynová adsorpční chromatografie
3. kapalinová rozdělovací chromatografie
4. gelová permeační chromatografie
5. kapalinová adsorpční

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je moderní separační technika, která je schopna rozdělit složité multikomponentní směsi s vysokou účinností a v krátkém čase. Zakladateli této techniky, která s časem dospěla téměř k dokonalosti jsou Martin a Synge. Již oni si byli vědomi, že pro dosažení velké efektivity je potřeba použít sorbenty s malou velikostí částic, což vede k nezbytnému použití vysokých tlaků mobilní fáze, a tím je zajištěn dostatečný průtok mobilní fáze na koloně (Záruba, 2016).

K velkému rozvoji HPLC došlo v sedmdesátých letech dvacátého století. Až poté, kdy se povedlo zvládnout techniku čerpání mobilních fází pod vysokým tlakem pomocí vysokotlakých čerpadel, ta do té doby nebyla spolehlivá (Opekar, 2010). Dnes se využívají spíše kontinuálně pracující pulzující čerpadla pístová či membránová. S každým pohybem membrány dopředu se vytlačí malý objem mobilní fáze do systému. Pohyblivá fáze putuje na separační kolonu, kde dochází k rozdělení jednotlivých složek směsi na základě různě dlouhé interakce jednotlivých složek se sorbentem. Na konci sestavy je umístěn detektor, který zaznamenává jednotlivé složky v eluentu.

Výsledkem analýzy je tzv. chromatogram, kde rozdělené složky mohou být identifikovány dle píků chromatogramu (Coufal, 1996).



Obrázek č. 14 Kapalinový chromatograf (Coufal, 1996)

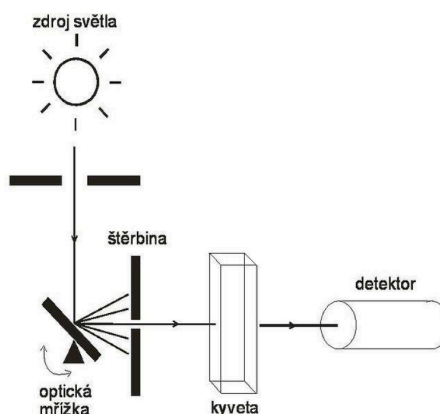
V současnosti se využívají různé varianty provedení HPLC. Dle tzv. chromatografických modů můžeme rozdělit techniky vysokoúčinné kapalinové chromatografie do následujících skupin:

- adsorpční chromatografie
- vylučovací chromatografie
- chromatografie na reverzních fázích
- afinitní chromatografie
- iontově – výměnná chromatografie
- hydrofobně interakční chromatografie
- iontově párová chromatografie
- hydrofilně interakční chromatografie
- iontová chromatografie
- chirální separace

2.2.4.2 Detekce pomocí UV záření – Spektrofotometr

Spektrofotometrie je optická metoda, která patří mezi molekulové absorpční spektrometrie. Její podstatou je absorpce záření roztokem v intervalu vlnových délek 190–800 nm. Látky, schopné pohltit určité vlnové délky, připadají lidskému oku barevné (Křížek, Šíma, 2015). Pokud dochází k měření při jedné vlnové délce, metoda se označuje jako fotometrie.

Při spektrofotometrických měřeních se využívá faktu, že absorbance je přímo úměrná koncentraci barevné látky, lze proto spektrofotometrii využít pro určení koncentrace stanovovaného vzorku.



Obrázek č. 15 Spektrofotometr (Záruba, 2016)

Uvnitř spektrofotometru dochází k rozkladu světla pomocí monochromátoru, nejčastěji v podobě mřížky či hranolu. Ten má za úkol jednak rozložit světlo na jednotlivé složky a separovat konkrétní vlnovou délku. Takto rozložené světlo prochází kyvetou (uvnitř vzorek) a dopadá na detektor, vyhodnocující intenzitu (Záruba, 2016).

Pro určení stanovovaných vzorků je důležité zvolit vhodný standart. Výsledky se získávají na základě porovnání hodnot absorbance vzorku s absorbancí standartního roztoku.

2.3 Petržel zahradní (*Petroselinum crispum*)

Petržel zahradní byla v posledních desetiletí trochu opomíjenou, ale stále velmi zdravou zeleninou. Řadíme ji s blízkce příbuzným celerem do čeledi miříkovitých (*Apiaceae*). Útlum jejího pěstování byl způsoben pěstováním pastináku, jenž má v gastronomii stejné využití. Avšak pro vysoký obsah zdraví prospěšných látek se opět petržel vrátila do vedení. Dnes se pěstuje ve všech světadílech. V Evropě je největším pěstitelem Francie a Holandsko (Storl, 2017).

Na počátku byla petržel pouze sbírána, až později v dobách Karla Velikého (742 až 814) začala být pěstována v blízkosti lidských sídel – už jako zelenina. Dalším významným vývojem prošla tato zelenina během 16. století, jednak začala být rozlišována naťová a kořenová petržel, poté se také dostala do Anglie a později do zámoří (Troníčková, 1989).

Současný botanický systém bere petržel jako kovariety nebo jiné nižší jednotky jediného druhu *Petroselinum crispum*, petržel zahradní. *Petroselinum crispum convar, crispum* je kadeřavá petržel, kudrnka – *Petroselinum crispum convar vulgare* je listová petržel a *radicosum* je kořenová petržel. Ve všech případech se jedná o tzv. dvouletky, které v prvním roce tvoří listovou růžici a zdužnatělý vřetenovitý kořen. V dalším roce tvoří květ na rýhované lodyze (Storl, 2017).

Nároky na pěstování jsou obdobné mrkvi. Vyžaduje střední teploty, vysokou vzdušnou a půdní vlhkost. Velmi se jí daří ve vzdušných slunečných polohách, v dostatečně hlubokých půdách. Petržel má vysokou odolnost vůči mrazu, a tak kořeny v našich podmínkách dobře přezimují (Malý, 1998).

Kořenová petržel se vysévá na rovné záhony či hrůbky. Během výsevu na rovném povrchu se volí meziřádková vzdálenost 0,45 m. Vysévá se od března do hloubky asi 2 cm. Naťová petržel se pěstuje z výsevů v březnu, či v polovině července. Během raných výsevů je dobré zakrývání netkanou textilií, tím se urychlí vzcházení a zároveň se sníží nebezpečí

vybíhání do květu. U listové petržele se upřednostňuje vyšší výsevek a užší řádky - 0,3 m (Malý, 1998).

U kořenové petržele jsou preferovanější odrůdy s polodlouhým kořenem, které se snadněji sklízí. Při pěstování pro nať jsou vhodné odrůdy naťové petržele se zkadeřenými listy. Listy mají mít celistvý charakter a neměly by být odkloněné od řapíku (Troníčková, 1989).

Nejrozšířenějším škůdcem petržele zahradní jsou larvy hmyzu vrtule celerové – *Euleia heraclei*, patřící k blanokřídlému hmyzu. Tyto larvy okusují listy, ty následně usychají a odumírají. Dalšími škůdci živíci se listy jsou mšice mrkvová (*Psila rosae*) a sviluška chmelová (*Tetranychus urticae*).

Škůdcem napadající kořeny jsou háďátka, patřící mezi drobné hlístice. Svou přítomností na kořenech způsobují odchylky a větvení kořenů (Greenwood a Halstead, 2010).

Kromě škůdců mohou být porosty petržele poškozovány také nemocemi např. septoriova skvrnitost listů, způsobena houbami *Septoria petroselini*. Mnohem závažnějším onemocněním je padlí petržele, způsobené houbou *Erysiphe heraclei*. Zde je jedinou obranou spálení či zakopání porostu hluboko do půdy.

Petržel zahradní byla známa již před dovozem tropického koření, ale ještě před tím, než se dostala do zelené kuchyně, našla uplatnění v zelené lékárně. Petrželové silice, obsažené v nati i kořenech, zejména apiol a myristicin, dráždí ledviny a způsobují zvýšené vylučování moči. Obě látky jsou také součástí urologických čajů. Apiol spolu s myristicinem způsobují stahy dělohy a vedou k jejímu překrvení i k překrvení trávicího traktu. Z tohoto důvodu není vhodné konzumovat petržel ve větších dávkách během těhotenství (Skorňakov, Jeník, Větvička, 1991).

Mimo již výše zmíněných silic obsahuje petržel také ostatní látky. Ve všech částech se nachází vápník, fosfor, draslík, hořčík a mangan. Kořeny petržele obsahují vitamíny A, B, C, E. V nati listové petržele je přítomno 250 až 400 mg vitamínu C a provitamínu A, zatímco kořenová má asi jen desetinu vitamínu C (Skorňakov, Jeník, Větvička, 1991).

Přehled odrůd petržele kořenové		
Název odrůdy	Typ	Použití
'Alba'	polopozdní	konzum i skladování
'Atika'	raný	přímý konzum
'Konika'	středně raný	konzum i skladování včetně natě
'Hanácká'	polopozdní	konzum i skladování
'Jadran'	středně raný	konzum i skladování
'Olomoucká dlouhá'	pozdní	konzum i skladování
'Orbis'	polopozdní	konzum i skladování
'Osborne'	polopozdní	dlouhodobé skladování

Obr. č. 16 – Přehled odrůd petržele kořenové (zdroj vlastní)

Petržel je označována jako tzv. super potravina neboli superfood. Obsahuje již zmíněnou silicovou směs (myristicin, limonen, eugenol a alfa-thujen) a také velké množství flavonoidů (apiin, apigenin, crisoeriolu a luteolin), které vykazují velmi silné antioxidační účinky. Petržel dokonce obsahuje 3 x více vitamínu C než citrusové plody, který je důležitý pro imunitní systém.

V petrželi se vyskytuje také velké množství chlorofylu, ten napomáhá čištění krve a podílí se na tvorbě červených krvinek. Důležitou složkou je kyselina listová, obsažena v nadzemních částech rostliny, podílející se na redukci zánětů vyvolaných homocysteinem. Kyselina listová má také význam během těhotenství, je nesmírně důležitá pro správný vývoj plodu, také působí jako prevence proti rakovině (Storl, 2017).

3 Materiál a metody

3.1 Získání rostlinného materiálu

Vzorky tří odrůd petržele zahradní (Atika, Hanácká, Olomoucká) byly vypěstovány v roce 2018 na soukromém záhonu o ploše 30 m² v kraji Vysočina, konkrétně v blízkosti humpolecka (49.5497269 N, 15.3141044E). Pro tuto oblast je typickým půdním typem kambizem, která je současně nejrozšířenějším půdním typem po celé České republice. Úrodnost kambizemí je různá, obvykle klesá se vzrůstající nadmořskou výškou.

Odrůdy petržele byly taktéž vysázeny na pokusném pozemku Pedagogické fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, zde však díky nepřízni klimatických podmínek (zaplavení pěstitelské části), nebyly získány žádné vzorky ke zpracování. Všechna osiva byla z produkce firmy Semo a zakoupena v místní obchodní síti. Sklizeň proběhla 26. září 2018 a týž den byly rostliny opracovány v laboratoři Pedagogické fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Celkem bylo vypěstováno 20 rostlin petržele zahradní od každé odrůdy. Výše zmíněné odrůdy byly pěstovány v běžně upravené zemině.

Získaný rostlinný materiál byl zpracován pomocí dvou separačních analytických metod. Nejprve byl stanoven celkový obsah polyfenolů za využití Folinova činidla. Poté byly identifikovány konkrétní zástupci fenolických látek za pomoci vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Postupy obou metod jsou popsány v následujících kapitolách.

3.2 Úprava materiálu před analýzou

Před vlastní analýzou proběhla následující úprava rostlinných vzorků. Všechn materiál byl nejprve očištěn. Dále od sebe byly odděleny zelené nadzemní části (nať) a podzemní části (kořen) jednotlivých odrůd. Materiál z kořene byl nejprve rozkrájen na části o síle maximálně 0,5cm a odpovídající část takto zpracovaného materiálu byla bezprostředně zamrazena při teplotě (-16 °C) a během jednoho měsíce od odběru lyofilizována (0,1 mbar, - 50 °C, 24 hodin). Po lyofilizaci byla provedena homogenizace na laboratorním mlýnku. Stejnorodý materiál byl uzavřen do plastové vzorkovnice v mrazicím zařízení při teplotě - 18 °C až do doby uskutečnění analýzy pomocí HPLC.

Zbytek rostlinného materiálu byl rozdělen do odpovídajících poměrů a zpracován nejčastěji prováděnými kulinářskými úpravami, jimiž je petržel v běžném životě zpracovávána: var, sušení. U každého vzorku bylo provedeno ještě stanovení sušiny.

3.3 Stanovení celkového obsahu polyfenolů spektrofotometricky

3.3.1 Příprava extraktu

Jako extrakční směs byl použit 60 % roztok methanolu. Navážených 20 g vzorku petržele (kořen/nat') bylo zhomogenizováno s 80 ml 60 % methanolu a převedeno do Erlenmeyerovy baňky. Baňka byla poté zakryta alobalem a extrakce proběhla do 24 hodin.

3.3.2 Popis provedených kuchyňských úprav

Ještě před vlastní přípravou extraktu sloužící k měření celkového obsahu polyfenolů, proběhly jednotlivé kulinářské úpravy, kterými bývá petržel nejčastěji zpracovávána. Dle Gajdůšky a kol. (1999) vedou kuchyňské úpravy k rozsáhlým změnám ve výživové i senzorické hodnotě. Vzorky kořene a natě petržele zahradní byly zpracovány následujícími kuchyňskými úpravami:

- a) **vaření** – je úprava, kdy daný vzorek je rovnoměrně zahříván ze všech stran vařící tekutinou nebo párou o teplotě kolem 100 °C, do které je ponořen. V našem případě byl vzorek o dané hmotnosti (20 g) umístěn do sáčku s H₂O v poměru 1:1, pečlivě uzavřen a vložen do teplé vody. Vaření trvalo 20 minut. Následovně proběhla filtrace a příprava prvního vzorku k měření – extrakt po povaření. Materiál prošlý varem, H₂O a v ní obsažené látky, byl opětovně použit pro přípravu dalšího vzorku – tzv. výluh po povaření.
- b) **sušení** – druhou a zároveň poslední úpravou bylo sušení. Jedná se o fyzikálně-chemický děj, kdy je ze suroviny odstraněna přebytečná voda, jejím odpařením do okolního prostředí. Tento děj lze urychlit zahřátím okolního vzduchu, tzv. sušení za tepla, které zde bylo provedeno prostřednictvím teplovzdušné sušárny BMT při 105 °C do konstantní hmotnosti.

Jiné kulinářské úpravy nebyly použity z důvodu již zmíněného, a to, že petržel zahradní se nejčastěji v gastronomii používá při přípravě polévek jako dochucovadlo právě v podobě čerstvé zeleniny, která se vaří či v sušené formě.

3.3.3 Stanovení celkového obsahu fenolů s činidlem Folin-Ciocalteu

Tato metoda je využívána pro stanovení celkového obsahu polyfenolů v potravinách (Brune a kol., 1991). Principem je redukční reakce fenolických sloučenin s Folin-Ciocalteovým činidlem, což je roztok wolframových a molybdenových oxidů. Touto reakcí vznikají modře zbarvené produkty s maximální absorpcí při 765 nm. Folin-Ciocalteovo činidlo je nespecifické a identifikuje všechny fenolové skupiny, i ty vázané na proteiny (Waterhouse, 2002).

Připravené extrakty byly nejprve zfiltrvány. Dále byl odpipetován 1 ml výše uvedeného extraktu petržele do 50 ml odměrné baňky, kde již bylo 20 ml destilované vody. Poté byl přidán 1 ml Folin-Ciocalteouva činidla a obsah byl lehce protřepán. Po třech minutách bylo přidáno 5 ml 20 % roztoku Na_2CO_3 , promícháno a doplněno destilovanou vodou po rysku odměrné baňky. Nechala se proběhnout reakce a po 30 minutách byla změřena intenzita zbarvení v kyvetách při vlnové délce 765 nm proti slepému vzorku (nulový obsah kyseliny gallové). Pro každý vzorek bylo měření provedeno třikrát.

Výsledky byly získány odečtením z kalibrační křivky, která představuje lineární závislost absorbance na koncentraci kyseliny gallové a objemu extraktu petržele. Celkem bylo zpracováno 72 vzorků, z toho 18 vzorků bylo připraveno ze sušené petržele, zbytek z čerstvé.

3.4 Stanovení fenolických látek metodou HPLC

Flavonoidy obsažené v petrželi zahradní se vyskytují většinou v glykosidické podobě. V glykosidu je vytvořena vazba mezi molekulou flavonoidního aglykonu a sacharidem. Obsah volných aglykonů je poměrně nízký.

Počet typů glykosidů každého aglykonu je v přírodních materiálech velký a je nereálné stanovit jednotlivě množství každého z nich. Z tohoto důvodu se stanovuje celkový obsah příslušných flavonoidních aglykonů. Volí se metoda, při které je vzorek nejprve vystaven kyselé hydrolyze a všechny přítomné glykosidy se rozštěpí a dojde k uvolnění aglykonu. Dále dochází k oddělení volných aglykonů metodou SPE (sorpcce na tuhé fázi) a stanovení po rozdělení metodou HPLC. Bylo monitorováno šest následujících nejběžnějších aglykonů: myricetin, morin, luteolin, kvercetin, apigenin a kemferol.

3.4.1 Stanovení flavonoidních aglykonů v lyofilizovaném materiálu

Pro stanovení jednotlivých flavonoidních aglykonů byla použita analytická metoda, která vychází z publikované práce (Dadáková a kol., 2001). Níže je popsána metoda, při které se určí celkový obsah flavonoidních aglykonů uvolněných z glykosidů přítomných v lyofilizovaném materiálu.

Nejprve se připraví do varné baňky následující směs: 0,25 g lyofilizovaného stejnorodého materiálu, 80 mg kyseliny askorbové, 7,5 ml destilované vody, 5 ml 6 M HCL a 12,5 ml methanolu. Tato směs se hydrolyzuje pod zpětným chladičem zhruba 2 hodiny na vodní lázni při teplotě 90 °C. Varná baňka se směsí se nechá zchladnout a po vychlazení na požadovanou teplotu se přidají 2g Na HCO₃, čímž dojde k neutralizaci. Obsah směsi se převede do odstředivací kyvety za pomoci 12,5 ml methanolu a vody, postupně se 3 x odstředí po dobu 10 minut při 3000 otáčkách. Po odstředění vznikne tekutina nad sedimentem označována jako supernatant. Dále se v kádince o objemu 600 ml spojí jednotlivé supernatanty a doplní se vodou na 200 ml. V tomto okamžiku je nutné ještě upravit hodnotu pH na 3 přidáním nasyceného roztoku NaHCO₃. Takto připravený roztok se zfiltruje pomocí filtru ze skleněných vláken za sníženého tlaku. Následovně se filtrát kvantitativně převede do odměrné baňky o objemu 500 ml.

Před vlastní sorpcí SPE, která je realizována na kolonách, musí být všechny vzorky ředěny 5% roztokem methanolu. Vlastní ředění se provádí s ohledem na očekávaný obsah aglykonů a dle obsahu doprovodných látek, nejčastěji barviv. Následně dochází k sorpci na tuhé fázi (SPE). Při SPE se využívají kolonky RP-18, přizpůsobené promytím 10 ml methanolu a 10 ml vody, poté je kolonka sušena po dobu 20 minut proudem vzduchu. Látky, které se zachytily, se vymyjí pomocí 1,4 ml methanolu do odměrné vialky. K vymytému roztoku se přidá roztok vnitřního standartu, jímž je kyselina α -naftyloctová - 2 mg/ml, v množství 100 μ l.

Takto připravené vzorky jsou měřeny na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu (HPLC), konkrétně se jedná o kapalinový chromatograf Agilent 1200 Series Rapid Resolutions s kolonou Zorbax Eclipse SB-C18 o rozměrech 4,6 x 50 mm se zrní o průměru 1,8 μ m. Mobilní fáze je zde A: 5 % acetonitril, 0,1 % kyselina mravenčí, voda, B: 0,1% kyselina mravenčí, acetonitril.

Analýza probíhá při teplotě 25 °C, detekce vzorku při 270 nm. Poté byl na kolonu nastříknut vzorek o velikosti vzorku 5 µl. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1ml/ min a celý proces trval zhruba 15 minut.

Pro vyhodnocení slouží poměr ploch píků identifikovaných flavonoidů a vnitřního standardu. Určení množství obsahu aglykonu se provádí pomocí kalibrační závislosti. Nejprve jsou připraveny roztoky pro sestavení kalibračních závislostí, tyto roztoky jsou nachystány ze zásobních roztoků v rozsahu 5–100 µg/ml. Mez stavitelnosti je 1 mg/kg, mez detekce 5 mg/kg sušiny. Všechny vzorky byly analýze podrobeny 2 x (nať i kořen). Výsledkem je aritmetický průměr s uvedením směrodatné odchylky. Tyto analýzy probíhaly ve spolupráci s katedrou aplikované chemie Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

3.5 Použité chemikálie a přístroje

3.5.1 Chemikálie

destilovaná a redestilovaná voda (Merck, Německo)

Folin – Ciocalteuovo činidlo (Merck, Německo)

methanol 60 % (Merck, Německo)

hydrogenuhličitan sodný (Penta, ČR)

kyselina gallová (Merck, Německo)

α -naftyloctová kyselina (Lachema, ČR)

L-askorbová kyselina (Merck, Německo)

chlorovodíková kyselina (Lachema, ČR)

acetonitril (LiChrosovl Reag. Ph. Eur, Merck)

EDTA (LachNer, ČR)

kyselina mravenčí (Penta, ČR)

3.5.2 Přístroje a pomůcky

Sada laboratorního skla: (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)

Skleněné filtrační zařízení (Sigma Aldrich, ČR)

Zkumavky s víčkem s teflonovým těsněním

Analytické váhy AB 204 (Mettler Toledo, Švýcarsko)

Technické váhy Kern (Merck, Německo)

Pipety automatické, objem 20-200 μ l a 100-1000 μ l Transferpette (Treff AG, Švýcarsko)

Kombinovaná lednička s chladničkou (Bosch Cooler, Německo)

Teplovzdušná sušárna ULM (Memmert, Německo)

Magnetické míchadlo (Heidolph, Německo)

SPE kolonky RP-18 (Merck, Německo)

Dávkovač kapalin 5 ml (Sklo Union, ČR)

SPE izolační jednotka (vývojové dílny JU, ČR)

Filtry ze skleněných vláken GF/C (Whatman, Velká Británie)

Filtrační papír Filtrak (Filtrak GmbH, Německo)

Kapalinový chromatograf Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC Systém (Agilent Technologies, USA), detektor DAD UV VIS (Agilent Technologies, USA)

Kolona Zorbax SB-C8 (4,6 x 150 mm, zrnitost částic stacionární fáze 5 μm) (Agilent Technologies, USA)

Kolona Zorbax SB-C18 (4,6 x 50 mm, zrnitost částic stacionární fáze 1,8 μm) (Agilent Technologies, USA)

Biochrom WPA Lightwave II spektrofotometr (WPA Biochrom, UK)

Biochrom Libra S11 (WPA Biochrom, UK)

3.6 Použité programy

Výsledky byly zpracovány do tabulek a grafů pomocí programu Microsoft Office 365 Excel.

4 Výsledky

4.1 Celkový obsah fenolických látek

Stanovení celkového obsahu polyfenolických látek bylo provedeno spektrofotometricky na přístroji Biochrom Libra S11 při vlnové délce 765 nm. Jednotlivé vzorky byly stanovovány oproti standartu, jímž byla kyselina gallová. Analýza proběhla nejdříve pro výchozí surovinu – čerstvou petržel.

Nejprve byly stanoveny celkové obsahy fenolických látek vždy v kořeni a nati u jednotlivých odrůd petržele zahradní: Olomoucká, Hanácká, Atika. Množství polyfenolů bylo sledováno jednak v čerstvých vzorcích, a pak následovaly běžné kuchyňské úpravy, kterými je petržel nejčastěji zpracovávána, konkrétně sušení a var (20 min). U varu byla analyzována jak povařená hmota, tak i výluh přímo po povaření. Výsledky celkového obsahu fenolických látek jsou uvedeny v mg/kg čerstvé hmoty a zaokrouhleny na tři platné číslice.

4.1.1 Petržel zahradní – čerstvá

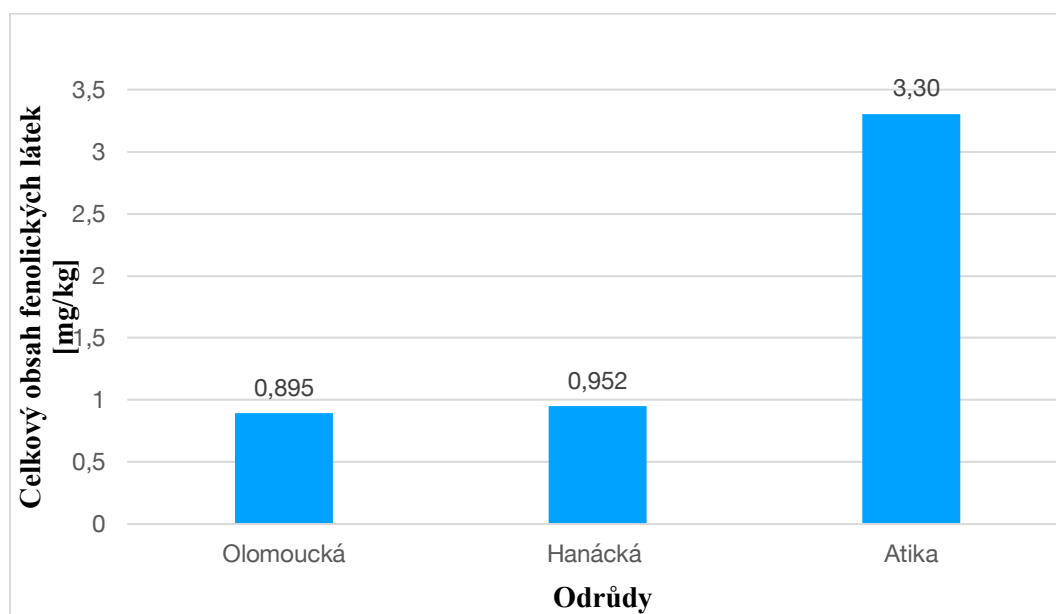
Všechny vzorky čerstvé petržele byly analyzovány třikrát, výsledné hodnoty jsou průměrnými hodnotami tří paralelních opakování.

Z níže uvedené tabulky vyplývá, že největší obsah fenolických látek v kořeni obsahuje jednoznačně odrůda Atika 3, 30 mg/kg \pm 2,67. Obdobné množství polyfenolů v kořeni se nachází u zbývajících dvou odrůd, jejichž naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce. Pro přehlednost slouží graf č. 1.

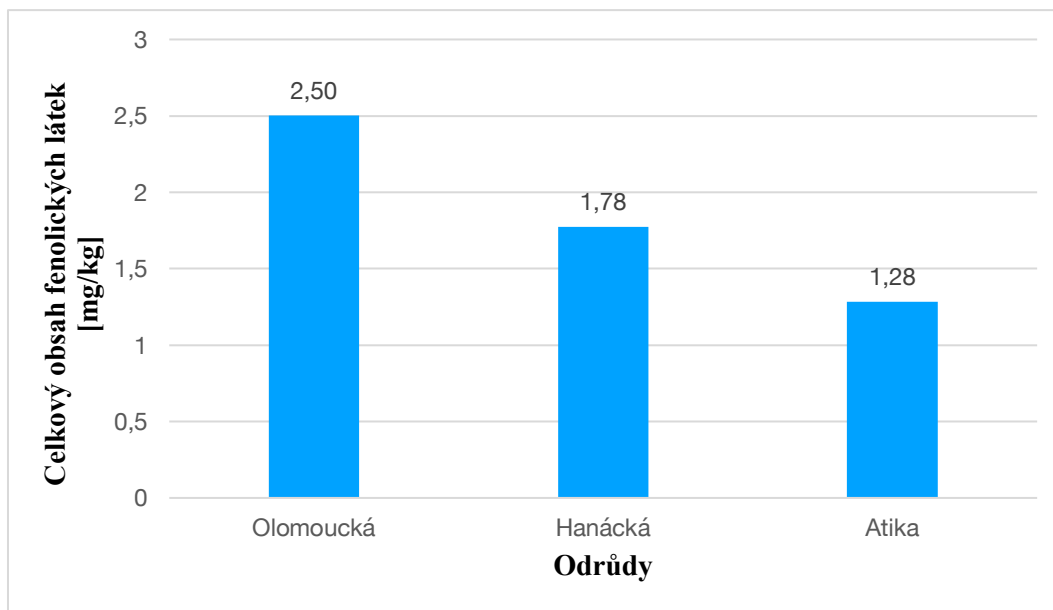
Naopak v nati byl stanoven největší obsah celkových fenolů v Olomoucké odrůdě, konkrétně 2,50 \pm 1,25 mg/kg. Dále jsou zde již patrnější rozdíly, co se týče obsahu fenolických látek oproti situaci v kořeni. Hanácká petržel 1,78 \pm 0,618 mg/kg a Atika má nejnižší obsah bioaktivních látek v nati 1,28 \pm 0,288 mg/kg. Pro názornost slouží graf č. 2.

Petržel zahradní čerstvá		mg/ kg		
KOŘEN				
	X_{min}	X_{max}	SD	\bar{x}
Olomoucká	0,868	0,948	0,046	0,895
Hanácká	0,889	0,977	0,055	0,952
Atika	1,41	5,19	2,67	3,30
NAŘ				
	X_{min}	X_{max}	SD	\bar{x}
Olomoucká	2,48	2,53	1,25	2,50
Hanácká	1,41	2,49	0,618	1,78
Atika	0,952	1,46	0,288	1,28

Tabulka č. 2 Obsah polyfenolů v čerstvé petrželi zahradní



Graf č. 1 Množství polyfenolů v kořeni čerstvé petržele



Graf č. 2 Množství polyfenolů v nati čerstvé petržele

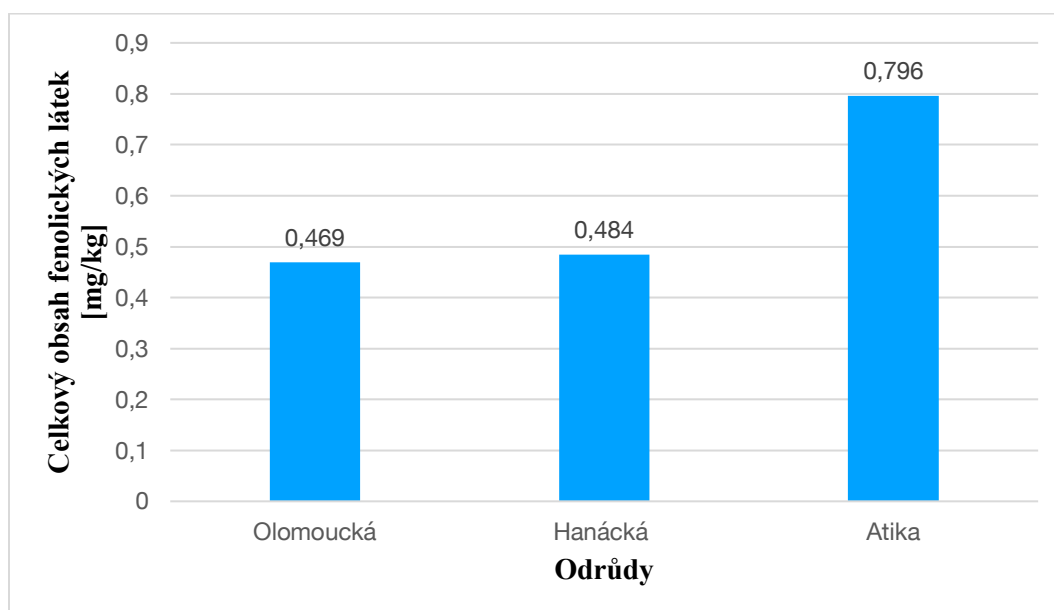
4.1.2 Petržel zahradní – extrakt po povaření

V extraktu kořene po povaření byly naměřeny následující hodnoty polyfenolů viz tabulka č. 3. Největší obsah fenolických látek v kořeni opět vykazovala odrůda Atika, přesně $0,796 \pm 0,269$ mg/kg. Odrůdy Olomoucká a Hanácká měly obsah polyfenolů obdobný. Obě hodnoty přesahovaly $0,45$ mg/kg, přesné hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 3.

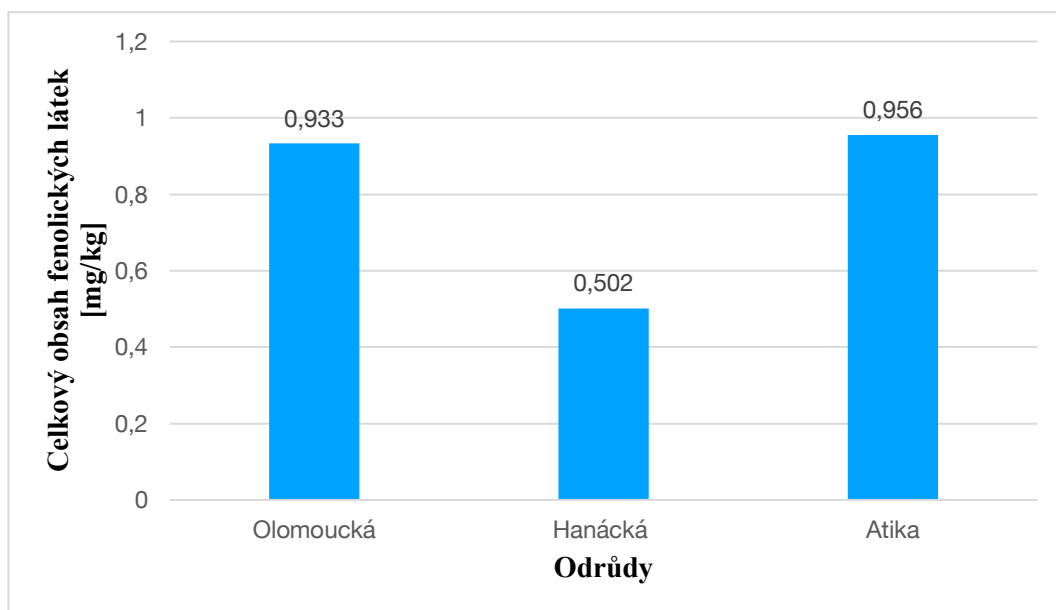
Poněkud odlišná situace množství polyfenolů nastala při měření v extraktu po povaření petržele v nati. Nejvyšší obsah polyfenolů je opět v Atice – $0,956 \pm 0,008$ mg/kg. Téměř stejné množství se vyskytuje i u Olomoucké odrůdy, konkrétně $0,933 \pm 0,001$ mg/kg. Množství fenolických látek v Hanácké odrůdě se nijak významně neliší od hodnoty naměřené v kořeni. Pro znázornění výsledků slouží grafy č. 3 a 4.

Petržel zahradní extrakt po povaření		mg/ kg		
KOŘEN				
	x_{\min}	x_{\max}	SD	\bar{x}
Olomoucká	0,467	0,471	0,002	0,469
Hanácká	0,482	0,485	0,001	0,484
Atika	0,486	0,960	0,269	0,796
NAŤ				
	x_{\min}	x_{\max}	SD	\bar{x}
Olomoucká	0,933	0,935	0,001	0,933
Hanácká	0,489	0,526	0,021	0,502
Atika	0,948	0,963	0,008	0,956

Tabulka č. 3 Obsah polyfenolů v extraktu po povaření petržele zahradní



Graf č. 3 Množství polyfenolů v extraktu z kořene po povaření



Graf č. 4 Množství polyfenolů v extraktu z nati po povážení

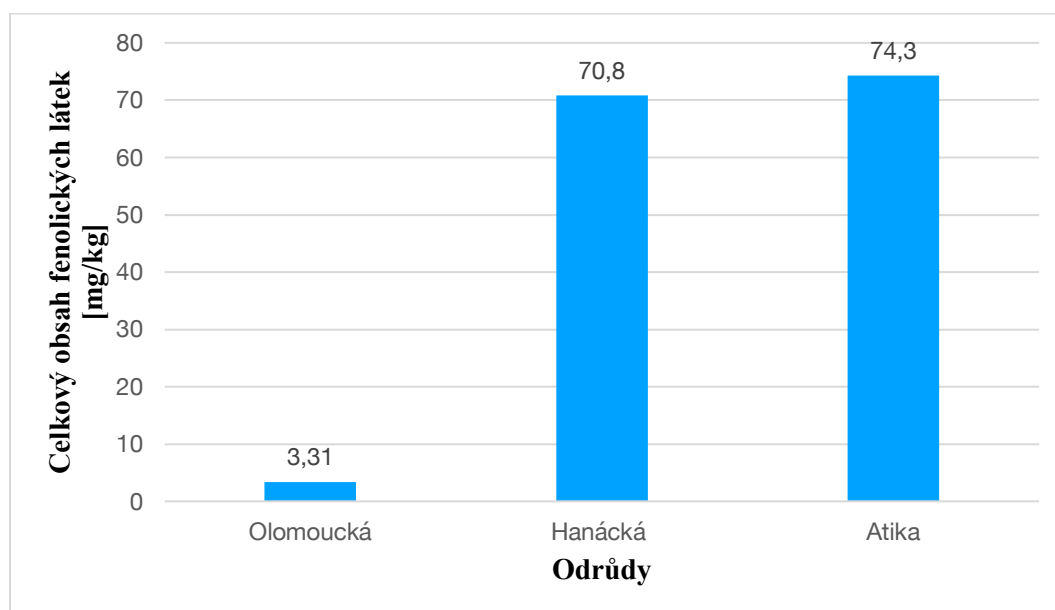
4.1.3 Petržel zahradní – výluh po povážení

Další vzorek byl připraven z výluhu kořene a nati po povážení. Zde je vidět velký nárůst oproti předchozím měřením. Jednoznačně nejvyšší obsah polyfenolů lze sledovat u kořene v Atice – $74,3 \pm 0,603$ mg/kg, Hanácká odrůda vykazuje obdobné množství fenolických látek, přesně $70,8 \pm 0,510$ mg/kg. Olomoucká odrůda pak pouhých $3,31 \pm 0,537$ mg/kg, každý vzorek byl analyzován tři krát, i přes toto měření obsahoval vzorek výluhu kořene po povážení v Olomoucké odrůdě zcela odlišný trend. Pro názornost slouží graf č. 5.

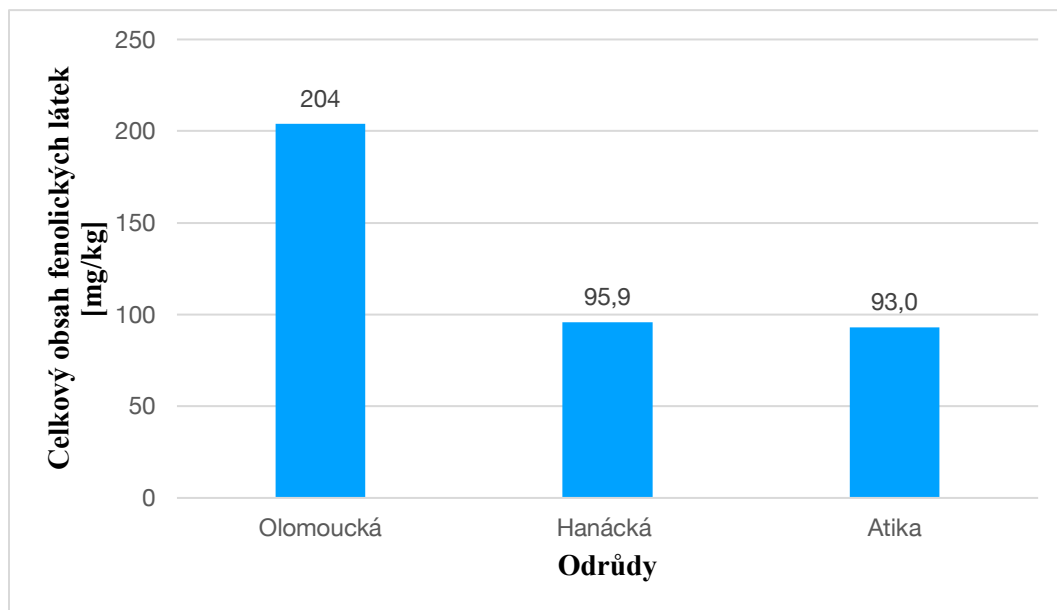
Ve výluhu nati po povážení byl zaznamenán velký nárůst celkového obsahu fenolických látek. Největší množství má vzorek připravený z Olomoucké odrůdy – $204 \pm 1,08$ mg/kg. Poloviční množství pak vykazuje Hanácká odrůda – $95,9 \pm 0,609$ mg/kg a Atika – $93,0 \pm 0,933$ mg/kg. Pro větší přehlednost slouží graf č. 6.

Petržel zahradní – výluh po povaření		mg/kg		
KOŘEN				
	x_{\min}	x_{\max}	SD	\bar{x}
Olomoucká	3,00	3,93	0,537	3,31
Hanácká	70,4	71,4	0,510	70,8
Atika	73,7	74,9	0,603	74,3
NAŘ				
	x_{\min}	x_{\max}	SD	\bar{x}
Olomoucká	202	204	1,08	204
Hanácká	95,2	96,3	0,609	95,9
Atika	92,1	93,9	0,933	93,0

Tabulka č. 4: Obsah polyfenolů ve výluhu po povaření petržele zahradní



Graf č. 5 Množství polyfenolů ve výluhu kořene po povaření



Graf č. 6 Množství polyfenolů ve výluhu natě po povaření

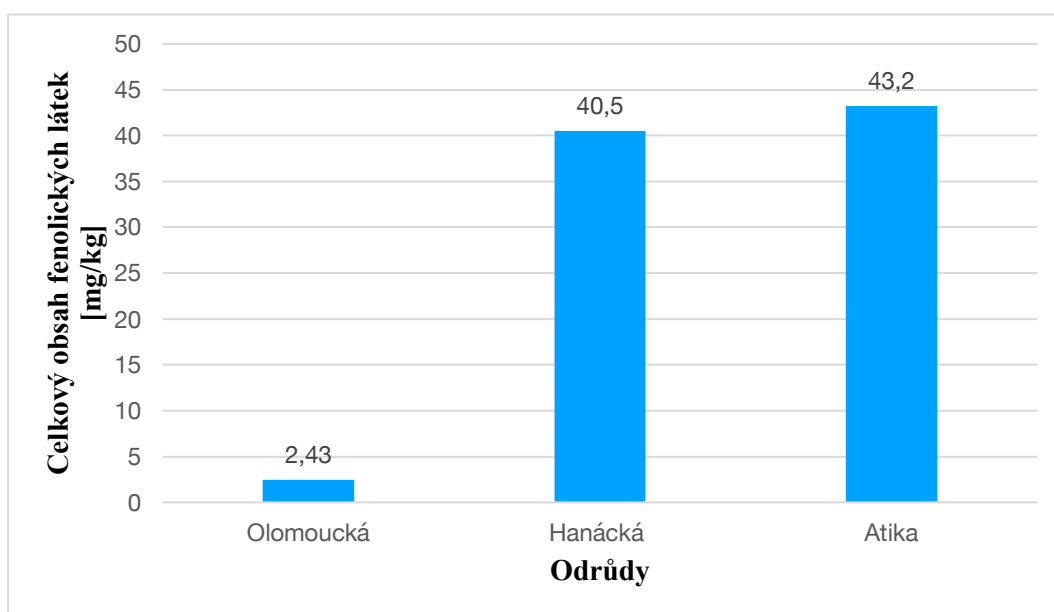
4.1.4 Petržel zahradní – extrakt sušené petržele

Poslední úpravou, po které se sledoval obsah fenolických látek bylo sušení. Sušení proběhlo v teplovzdušné sušárně ULM při teplotě 105 °C. V kořeni byly naměřeny nejvyšší hodnoty u odrůdy Atika – $43,2 \pm 0,167$ mg/kg, podobné hodnoty měl i vzorek Hanácké odrůdy – $40,5 \pm 0,067$ mg/kg. Olomoucká odrůda stejně jako v předchozím případě vykazovala diametrálně nižší hodnotu polyfenolů, pouhé $2,43 \pm 0,013$ mg/kg.

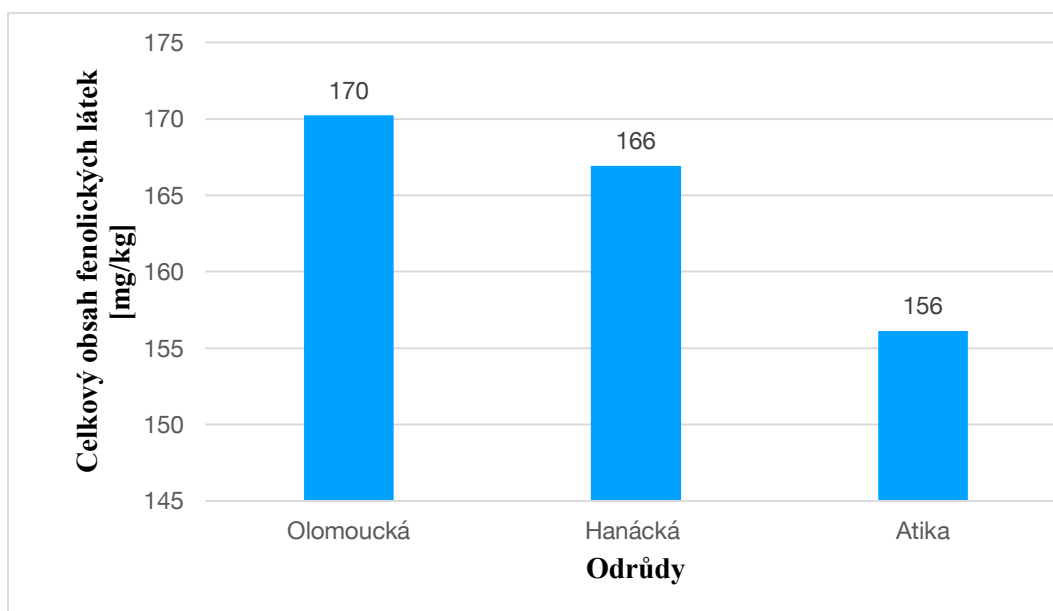
Množství polyfenolů v nati sušené petržele bylo u všech odrůd, jak dokládá tabulka č. 5 obdobné. Nejvyšší množství měla však Olomoucká odrůda – $170 \pm 0,705$ mg/kg, poté Hanácká odrůda $166 \pm 0,363$ mg/kg. Nejméně fenolických látek poskytl vzorek odrůdy Atika, konkrétně $156 \pm 1,24$ mg/kg. Pro větší přehlednost slouží grafy č. 7 a 8.

Petržel zahradní – extrakt sušená		mg/ kg		
KOŘEN				
	X_{min}	X_{max}	SD	\bar{x}
Olomoucká	2,42	2,44	0,013	2,43
Hanácká	40,4	40,6	0,067	40,5
Atika	43,1	43,4	0,167	43,2
NAŘ				
	X_{min}	X_{max}	SD	\bar{x}
Olomoucká	169	170	0,705	170
Hanácká	166	167	0,363	166
Atika	155	157	1,24	156

Tabulka č. 5 Obsah polyfenolů v extraktu sušené petržele zahradní



Graf č. 7 Množství polyfenolů v extraktu kořene sušené petržele



Graf č. 8 Množství polyfenolů v extraktu nati sušené petržele

4.2 Identifikace konkrétních fenolických látek

V další části diplomové práce byla sledována přítomnost následujících fenolických látek: luteolin, kvercetin, apigenin, kemferol, myricetin, morin v lyofilizovaných vzorcích tří odrůd petržele zahradní. Konkrétně s jednalo o odrůdy Atiku, Hanáckou a Olomouckou. Vždy byly stanovovány látky v kořeni a nati (listu) výše zmíněných odrůd a každý z těchto vzorků byl analyzován dvakrát, výsledné hodnoty jsou průměrnými hodnotami dvou paralelních opakování. Ve všech vzorcích se podařilo identifikovat pouze luteolin, apigenin a kemferol. Tabulka č. 6 uvádí legendu k chromatografickému záznamu.

Zkratka	Analyt
MY	myricetin
MO	morin
L	luteolin
Q	kvercetin
A	apigenin
K	kemferol
VS	kys. α -naftyloctová

Tabulka č. 6 Legenda k chromatogramu

Pro snadnější orientaci ve výsledcích je vytvořena tabulka č. 7, kde jsou vysvětleny jednotlivé významy zkratk vyskytujících se v grafech. Naměřené hodnoty jsou zaokrouhleny na 3 platné číslice.

Pracovní názvy:	zkratka
petržel kořenová Atika, kořen	pk at k
petržel kořenová Atika, list	pk at l
petržel kořenová Hanácká, kořen	pk ha k
petržel kořenová Hanácká, list	pk ha l
petržel kořenová Olomoucká, kořen	pk ol k
petržel kořenová Olomoucká, list	pk ol l

Tabulka č. 7 Pracovní názvy vzorků a jejich zkratky

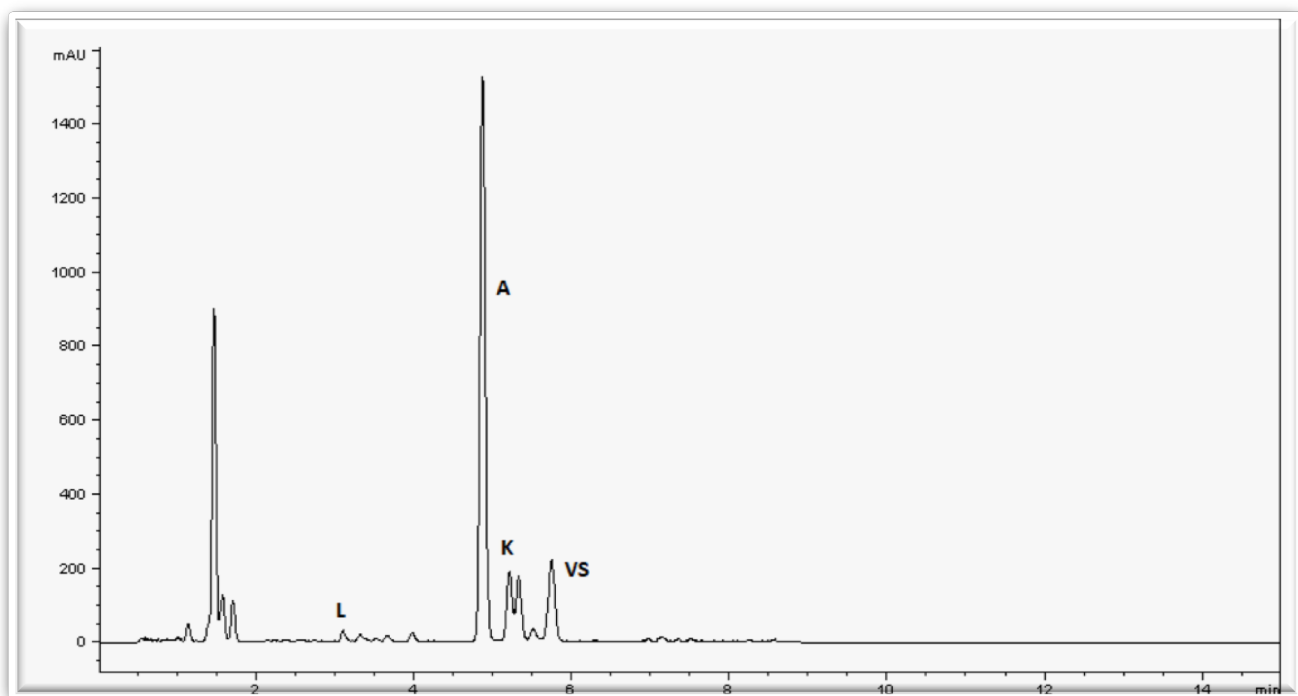
4.2.1 Luteolin

Luteolin je jedním z nejběžnějších flavonoidů, který se vyskytuje v mnohých druzích zeleniny, včetně petržele. Jeho přítomnost v petrželi se tak dala očekávat. Luteolin se vyskytoval v nati všech stanovovaných odrůd petržele, avšak jeho přítomnost v kořeni nebyla prokázána.

Nejvyšší obsah Luteolinu byl zaznamenán v Atice – $202 \pm 11,3$ mg/kg. Dále Olomoucké odrůdě – $139 \pm 1,4$ mg/kg a nejméně polyfenolů vykazovala Hanácká odrůda – $94,6 \pm 10,5$ mg/kg

obsah Luteolinu (mg/kg)				
	X_{min}	X_{max}	SD	\bar{x}
pk at l	194	210	11,3	202
pk ha l	87,2	102	10,5	94,6
pk ol l	138	140	1,4	139

Tabulka č. 8 Obsah Luteolinu



Obrázek č. 17 Chromatografický záznam analýzy petržele zahradní

4.2.2 Apigenin

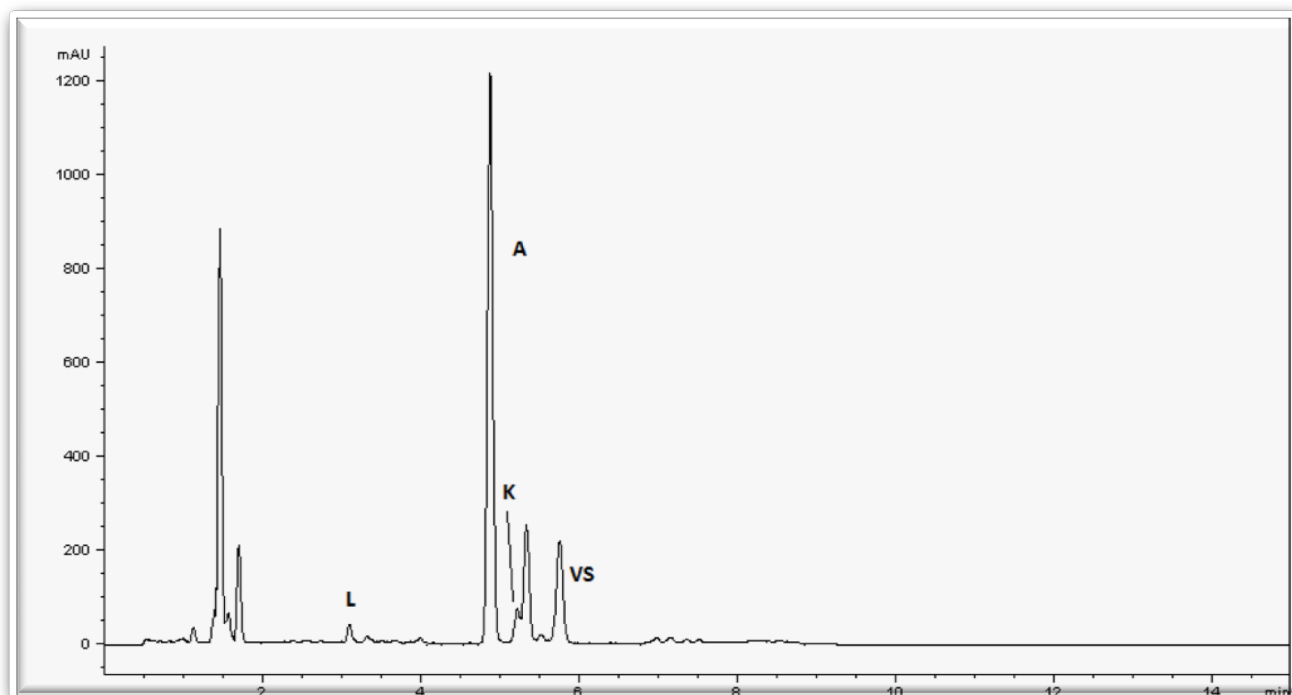
Druhou stanovenou látkou fenolické povahy je apigenin, který se vyskytoval opět ve všech vzorcích odrůd petržele zahradní. Koncentrace apigeninu v mg/kg diametrálně vzrostla ve srovnání s luteolinem a kemferolem. Apigenin byl identifikován jak v nati, tak i v kořeni všech stanovovaných odrůd.

Nejvíce apigeninu obsahoval kořen Atiky $1780 \pm 28,3$ mg/kg. Obdobný obsah vykazoval i kořen Hanácké odrůdy $1665 \pm 21,2$ mg/kg. Nejmenší koncentrace apigeninu byla zaznamenána v kořeni Olomoucké odrůdy, přesně $1210 \pm 70,7$ mg/kg.

V nati byla naměřena nejvyšší koncentrace apigeninu opět v Atice $11\,350 \pm 636$ mg/kg, dále v Olomoucké odrůdě – $9650 \pm 28,3$ mg/kg. Nejnižší obsah pak apigeninu pak měla nať Hanácké odrůdy, konkrétně 8195 ± 417 mg/kg.

Koncentrace Apigeninu		mg/ kg		
KOŘEN				
	X_{min}	X_{max}	SD	\bar{x}
pk at k	1760	1800	28,3	1780
pk ha k	1650	1680	21,2	1665
pk ol k	1160	1260	70,7	1210
NAŤ				
	X_{min}	X_{max}	SD	\bar{x}
pk at l	10900	11800	636	11350
pk ha l	7900	8490	417	8195
pk ol l	9630	9670	28,3	9650

Tabulka č. 9 Obsah Apigeninu



Obrázek č. 18 Chromatografický záznam analýzy petržele zahradní

4.2.3 Kemferol

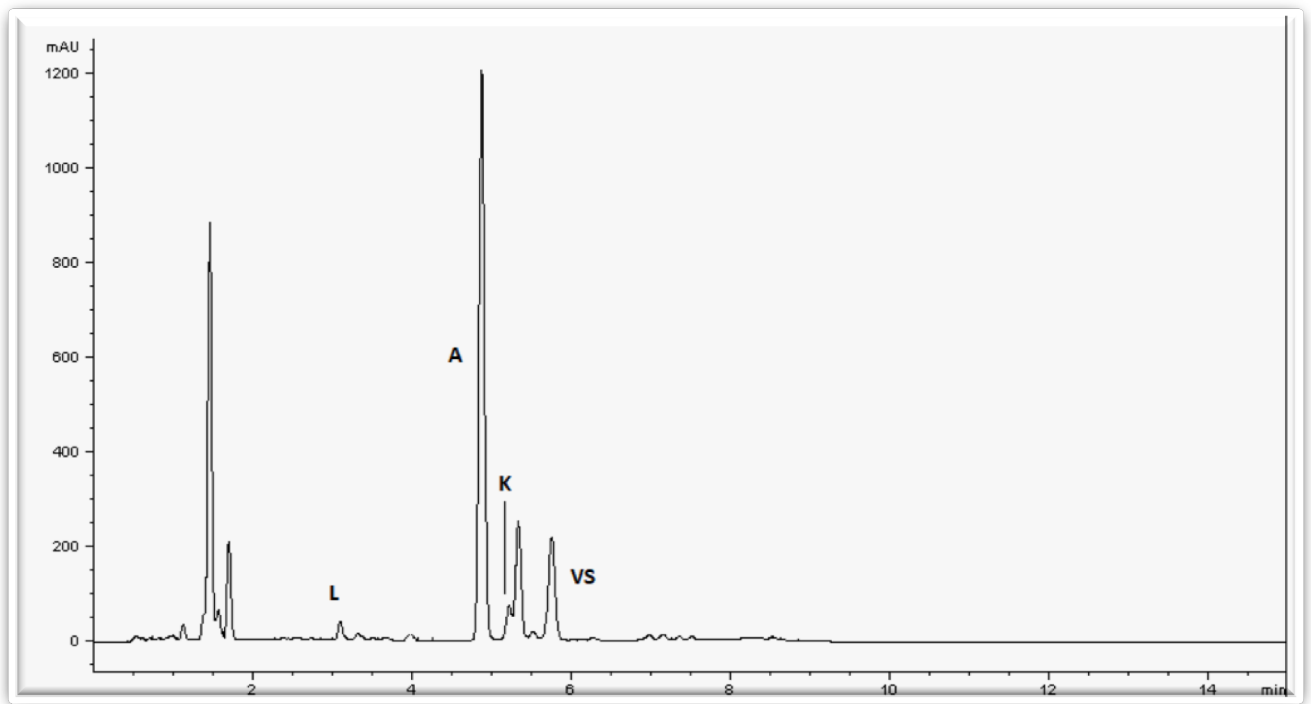
Přítomnost polyfenolu kemferolu byla prokázána ve všech připravených vzorcích, ovšem nedosahovala značných hodnot jako v případě apigeninu. Více kemferolu bylo stanoveno v nati, oproti kořeni, zde byla koncentrace kemferolu podstatně nižší.

Nejvíce kemferolu (v kořeni) bylo identifikováno u odrůdy Atika - $85,5 \pm 0,4$ mg/kg, dále v Hanácké odrůdě $77,4 \pm 3,6$ mg/kg a nejméně posléze v Olomoucké odrůdě $41,5 \pm 6,8$ mg/kg.

V nati byla nejvyšší koncentrace rovněž v Atice 288 ± 111 mg/kg, poté v Olomoucké odrůdě – $258,5 \pm 16,3$ mg/kg a nejnižší koncentrace byla zaznamenána v Hanácké odrůdě, konkrétně $168 \pm 8,5$ mg/kg.

Koncentrace Kemferolu		mg/ kg		
KOŘEN				
	X min	X max	SD	průměr
pk at k	85,2	85,7	0,4	85,5
pk ha k	74,8	79,9	3,6	77,4
pk ol k	36,7	46,3	6,8	41,5
NAŤ				
	X min	X max	SD	průměr
pk at l	209	366	111	288
pk ha l	162	174	8,50	168
pk ol l	247	270	16,3	258

Tabulka č. 10 Obsah Kemferolu



Obrázek č. 19 Chromatografický záznam analýzy petržele zahradní – Atika list

5 Diskuze

Identifikaci a stanovování fenolických látek je věnována v posledních deseti letech velká pozornost, je to dáno především faktem, že většina látek fenolické povahy jsou účinnými antioxidanty. Toto tvrzení podporuje nespočet akademických a vědeckých prací zabývajících se právě studiem polyfenolů. Například Slanina a Táborská (2004) se zabývali příjmem, biologickou dostupností a metabolismem rostlinných polyfenolů u člověka. Wang a kol. (1998) identifikovali fenolické látky ze šalvěže a stanovovali jejich antioxidační aktivitu. Vědeckých prací věnující fenolickým látkám je velké množství a některé z nich jsou popsány také níže.

Tato diplomová práce měla za úkol stanovit celkový obsah polyfenolů ve třech odrůdách petržele zahradní (*Petroselinum crispum*) a sledovat vliv vybraných kuchyňských úprav na množství polyfenolů. Konkrétně se jednalo o následující odrůdy: Atika, Olomoucká, Hanácká. K tomuto účelu byla použita spektrofotometrická metoda s využitím Folin-Ciocalteauva činidla, která je založena na měření absorbance výsledné modré barvy spektrofotometricky při vlnové délce 765 nm.

Celkový obsah polyfenolů byl stanovován jednak v čerstvé petrželi, dále následovaly vybrané kulinářské úpravy, kterými je petržel nejčastěji zpracovávána, tedy var a sušení. Byly připraveny tyto extrakty pro spektrofotometrické měření: extrakt z čerstvé petržele, extrakt po povaření, výluh po povaření a extrakt ze sušené petržele. Vždy zvlášť pro kořen a nať. Každý vzorek byl následně analyzován třikrát. Kvantifikace byla provedena na základě kalibrační křivky kyseliny gallové.

Největší koncentraci fenolických látek vykazoval extrakt ze sušené petržele, konkrétně bylo naměřeno v natí Olomoucké odrůdy 170 mg/kg. Ve výluhu po povaření byly zaznamenány rovněž zvýšené hodnoty fenolických látek. Nať olomoucké odrůdy opět vykazovala zvýšené hodnoty fenolických látek – 204 mg/kg. Poté extrakt z čerstvé petržele a nejnižší hodnota polyfenolů byla naměřena v extraktu ihned po povaření, a to v kořeni Olomoucké odrůdy – 0,469 mg/kg.

Také byl sledován fakt, zda některá z odrůd nebude opakovaně vykazovat vyšší koncentraci fenolických látek než zbývající dvě. Bohužel se takový trend rovněž nepotvrdil.

Z těchto výsledků vyplývá otázka, z jakého důvodu je nejvyšší množství právě v sušené petrželi a také ve výluhu po povaření. Nať je patrně bohatší na obsah těchto sledovaných složek. Skutečnost velké koncentrace fenolických látek v petrželi zahradní ve výluhu po povaření by mohla pramenit z faktu, že během varu došlo k lepšímu uvolňování

fenolických látek, které pak mohly být snadněji extrahovány do rozpouštědla (v tomto případě teplé vody), na rozdíl od extrakce probíhající 24 hodin, kde rozpouštědlem byl methanol. Celkově lze konstatovat, že vyšší koncentraci fenolických látek vykazuje nať oproti kořenu petržele zahradní, což vyplývá z jednotlivých výsledků uvedených v tabulkách v kapitole 4.1.

Další částí diplomové práce byla identifikace konkrétních fenolických sloučenin v lyofilizovaných vzorcích zvolených odrůd petržele zahradní. K tomuto účelu byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Ve vzorcích byly sledovány látky luteolin, kvercetin, apigenin, kemferol, myricetin, morin. Podařilo se však identifikovat pouze luteolin, apigenin a kemferol.

Nejvyšší koncentrace apigeninu byla prokázána v nati odrůdy Atika, přesně $11\,350 \pm 636$ mg /kg. Celkově byl apigenin prokázán jako polyfenol vyskytující se v petrželi zahradní s nejvyšší koncentrací. Fenolická látka Luteolin byla identifikována pouze v nati petržele, nejvyšší koncentraci Luteolinu měla opět odrůda Atika – $202 \pm 11,3$ mg/kg. Stejný trend byl potvrzen i u Kemferolu, opět bylo nejvyšší množství stanoveno právě v Atice. Lze tedy konstatovat, že odrůda Atika obsahuje nejvyšší koncentrace stanovovaných fenolických látek.

Luthria (2008) se zabýval tím, jaký vliv mohou mít různé extrakční parametry (teplota, tlak, velikost, částic, objem usazenin, statický čas a poměr pevné látky k rozpouštědлу) na extrakci fenolických látek z petržele zahradní. Při této studii využil stanovení obsahu polyfenolů pomocí Folin – Ciocalteovy metody a nejvíce zastoupenými látkami fenolické povahy byly pomocí HPLC identifikovány látky apiin a malonyl – apiin. Významný vliv na obsah fenolických látek měla teplota, protože při vyšší extrakční teplotě byl malonyl-apiin částečně degradován na acetylapiin a apiin. Při manipulaci s dalšími parametry nebylo zpozorováno žádné významné ovlivnění na obsah fenolických látek v petrželi zahradní.

Ve své dřívější práci se Luthria (2006) zabýval myšlenkou jaký vliv mohou mít různé extrakční postupy a odlišné polarity použitých rozpouštědel na stanovení obsahu fenolických látek v petrželi zahradní. Pro extrakci bylo použito pět různých postupů, konkrétně třepání, víření, sonikace, míchání a extrakce tlakovou kapalinou a tři různá rozpouštědla (methanol, ethanol a aceton). Bylo zjištěno, že největší extrahovatelnost apiinu je při poměru 50:50 (ethanol: voda).

Další odborná práce zkoumající biologicky aktivní látky v petrželi zahradní, jejímž autorem je Wong (2005), porovnává obsah polyfenolů v petrželi zahradní (*Petroselinum crispum*) s množstvím fenolických látek v listech koriandru (*Coriandrum sativum*). Celkový obsah fenolů byl opět kvantifikován pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Bylo prokázáno, že listová složka petržele měla vyšší koncentraci fenolických látek, než obsahovaly listy koriandru.

Kromě výše zmíněných publikací, které jsou věnovány studiu fenolických látek právě v petrželi zahradní, existuje celá řada odborných textů věnující se stanovování polyfenolů v různých druzích zeleniny či ovoce a výrobcích z nich zhotovených, což dokládá například práce Dinga a kol. (2019), který se zabíral stanovením a identifikací fenolických látek ve čtyřech druzích japonské rýže a čtyřech odrůdách rýže indické. Celkem bylo identifikováno dvanáct fenolických sloučenin. Majoritními polyfenoly byly následující látky: kyselina ferulová, kyselina gallová, kyselina protokatechová. Rovněž bylo prokázáno, že odrůdy japonské rýže mají vyšší koncentraci ve srovnání s druhy rýže indické.

Také Stránská (2017) se ve své práci zaměřuje na identifikaci a stanovení fenolických sloučenin v zelenině rodu *Allium*. Nejvíce zastoupenými látkami zde byly kvercetin a kemferol. Největší množství kvercetinu bylo neměřeno u cibule kuchyňské žluté a nejvíce kemferolu obsahovala pažitka čínská.

Laxová (2018) se zabývá stanovením fenolických a biologicky aktivních látek v plodech planě rostoucího bezu černého a vlivem vybraných kuchyňských úprav (sirup, šťáva) na obsah polyfenolů. Nejvyšší hodnoty dosáhl celkový obsah anthokyanů v sirupu.

Kuchyňková (2007) zkoumala změnu sulforafanu v závislosti na různých kulinářských úpravách. Nejmenší ztráty prokázala při přípravě v páře, dále pak při vložení do teplé vody a následném varu. Největší změna v obsahu sulforafanu byla prokázána při vložení do studené vody a následném varu.

Diplomová práce Kuchyňkové (2007) potvrzuje trend vysledovaný při vlastním vyhodnocení výsledků. Tedy, že pokud je zelenina vložena do teplé vody, nenastane velká ztráta obsahu fenolických látek.

Jak je patrné z předchozího textu, fenolické látky jsou předmětem velkého zájmu vědeckého pozorování, nejen pro svou antioxidační aktivitu, která je hojně zmiňována v odborné literatuře, ale i pro vlastnosti na lidské zdraví, které nebyly doposud zcela objasněny.

6 Závěr

V rámci této diplomové práce byl zkoumán obsah fenolických látek v petrželi zahradní (*Petroselinum Crispum*) a také vliv vybraných kuchyňských úprav na obsah polyfenolů. Předmět zkoumání byly vybrané odrůdy petržele zahradní, konkrétně se jednalo o odrůdy Atika, Hanácká a Olomoucká.

Nejprve byl stanoven celkový obsah fenolických látek v odrůdách petržele zahradní (*Petroselinum crispum*) pomocí spektrofotometrické metody za využití Folin-Ciocalteauva činidla. Poté byly vzorky zpracovány vybranými kuchyňskými úpravami, kterými je petržel nejčastěji zpracovávána, tedy var a sušení. Byly připraveny následující vzorky pro spektrofotometrické měření: extrakt z čerstvé petržele, extrakt po povaření, výluh po povaření a extrakt ze sušené petržele. Vždy zvlášť pro kořen a nať. Nejvyšší koncentrace fenolických látek byla dokázána u všech odrůd v extraktu ze sušené petržele. Dále byly zvýšené hodnoty zjištěny z výluhu po povaření

Další částí diplomové práce bylo stanovení konkrétních fenolických látek obsažených ve výše zmíněných odrůdách. Identifikace konkrétních fenolických sloučenin proběhla za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Byly sledovány látky luteolin, kvercetin, apigenin, kemferol, myricetin, morin. Podařilo se však identifikovat pouze luteolin, apigenin a kemferol. Z toho měl nejvyšší koncentraci apigenin, který byl identifikován, jak v kořeni, tak nati.

Z výsledků lze konstatovat, že nejvyšší obsah konkrétních fenolických látek – apigenin, kemferol, luteolin byl prokázán v odrůdě Atice, konkrétně v nati jednotlivých odrůd.

Hodnoty obsahu fenolických látek získané během zpracování této diplomové práce by bylo zajímavé porovnávat s výsledky získaných během dalších let. Jelikož se petržel zahradní nejčastěji používá jako dochucovadlo především polévek připravených z vývaru, nabízí se možnost sledování koncentrace právě v takto připraveném pokrmu.

7 Seznam literatury

- ANDRS, F.; VOLF, K. Flavonoidy a jejich biologické působení. Praha, 2008. 174 s.
- BALÍK, J. Anthokyaninová barviva v hroznech a vínech: Anthocyanin pigments in grapes and wines. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2010. 108 s. ISBN 978-80-7375-412-9.
- BRUNE, M., HALLBERG, L., SKANBERG, A. B.: Determination of iron-binding phenolic groups in foods. *Journal of Food Science*, vol. 56, 1991, 128–131 s.
- BRUNETON, J. Pharmacognosie, phytochimie plantes médicinales. Paris: Lavoisier, 1999.
- COUFAL, P. High Performance Liquid Chromatography, HPLC. [online]. Praha: Univerzita Karlova, 1996. [cit. 15. 3. 2019]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
- DADÁKOVÁ a kol. Application of micellar electrokinetic capillary chromatography for quantitative analysis of quercetin in plant materials. *Electrophoresis* [online]. 22(8), 1573–1578 [cit. 20. 3. 2019]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/11951923_Application_of_micellar_electrokinetic_capillary_chromatography_for_quantitative_analysis_of_quercetin_in_plant_materials
- DING, CH. Distribution and quantitative analysis of phenolic compounds in fractions of Japonica and Indica rice. Elsevier: Food chemistry, 2019, vol. 274, s. 384–391.
- FERNANDES, H. Effect of Naringerin on Biochemical Parameters in the Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Brazilian archives of biology and technology*, 2009, vol. 52, s. 51–59.
- GAJDŮŠEK, S., DOSTÁLOVÁ, J., OTOUPAL, P. Společné stravování. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1999. 113 s. ISBN 80-7157-395-7.
- GREENWOOD, P.; HALSTEAD, A. Škůdci a choroby v zahradě. Praha: Knižní klub, 2010. 223 s. ISBN 978-80-242-2702-3.
- HAMPL, R.; LAPČÍK, O. Rozličné role flavonoidů v potravě: Ovlivňují pohlavní zralost? *Časopis Vesmír*, 1996, vol. 75, s. 43–46.
- HARMATHA, J. Strukturní bohatství a biologický význam lignanů a jim příbuzných rostlinných fenylypropanoidů, *Chemické listy*, 2005, vol. 99, s. 622–632.

HENDRIKS, J. Flavonoids Influence Monocytic GTPase Activity and Are Protective in Experimental Allergic Encephalitis. *Journal of Experimental Medicine*, 2005, vol. 200, s. 1667–1672.

KALACĚ, P. Organická chemie přírodních látek a kontaminantů. České Budějovice: Zemědělská fakulta, 2001. 120 s. ISBN 80-7040-520-1

KANIOVÁ, L. Analýza šťáv vybraných odrůd černého rybízu. Brno, 2015. 75 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Chemická fakulta.

KŘÍŽEK, M.; ŠÍMA, J. Analytická chemie. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích: Zemědělská fakulta. 2015. 217 s. ISBN 978-80-7394-486-5.

KUCHYŇKOVÁ, Š. Změny obsahových látek v brukvovité zelenině při různé kulinární úpravě. Brno, 2007. 68 s. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta.

LAXOVÁ, L. Biologicky aktivní fenolické látky v drobném ovoci. České Budějovice, 2018. 57 s. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v ČB, Pedagogická fakulta.

LUTHRIA, L. Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. Elsevier: *Food chemistry*, 2008, vol. 107, s. 745–752.

LUTHRIA, L. A systematic approach for extraction of phenolic compounds using parsley (*Petroselinum crispum*) flakes as a model substrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006, vol. 86, s. 1350–1358.

MALÝ, I. Polní zelinářství. Praha: Agrospoj, 1998. 196 s. ISBN 80-239-4232-8.

MANDELOVÁ, L. Antimutagenní aktivita obsahových látek v zelenině a v ovoci. Brno, 2006. 166 s. Disertační práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C.: The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 2000, vol. 52, 673–751.

MÍKA, V. Fenolické látky v lučních rostlinách. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2001. 116 s. ISBN 80-86555-07-0.

NAVRÁTILOVÁ, Z.; PATOČKA, J. Apigenin – Antimutagenní účinky a prevence rakoviny. *Prevence úrazů, otrav a násilí*, 2012, vol. 1, s. 94–102.

OPEKAR, F. Základní analytická chemie. Praha: Karolinum, Učební texty Univerzity Karlovy v Praze, 2010. 204 s. ISBN 97-88024-617-756

PATOČKA, J. Apigenin. [online] 2012. [cit. 30. 3. 2019]. Dostupné z: <http://toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=493>

PERLÍN, C. Lignany v potravinách a ve výživě. Výživa. [online] 2011. [cit. 12. 3. 2019] Dostupné z: <https://www.celostnimediceina.cz/lignany-v-potravinach-a-ve-vyzive.htm>

REIS GIADA, M. Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2013, vol. 82, s. 395-401.

RÝDLOVÁ, I. Identifikace vybraných polyfenolických látek v extraktech léčivých rostlin. Praha, 2015. 84 s. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

SHAMSIZADEH, A.; MOGHADDAMAHMADI, A. The role of natural products in the prevention and treatment of multiple sclerosis. Nutrition and Lifestyle in Neurological Autoimmune Diseases, 2017, s. 249-260.

SHIELDS, M. Chemotherapeutics. Pharmacognosy, 2017, s. 295–313.

SKORŇAKOV, S.; JENÍK, J.; VĚTVIČKA, V. *Zelená kuchyně*. Praha: Lidové nakladatelství, 1991. 399 s. ISBN 80-7022-042-2

SLANINA, J.; Táborská E. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. Chemické listy, 2004, vol. 98, s. 239-245.

STORL, W. Léčivá síla divokých bylin a zeleniny: známá a zapomenutá zelenina. Olomouc: Fontána, 2017. 285 s. ISBN 978-80-7336-885-2

STRÁNSKÁ, L. Biologicky aktivní fenolické látky ve vybraných zeleninách rodu *Allium*. České Budějovice, 2017. 68 s. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v ČB, Zdravotně sociální fakulta.

SVRŠEK, J. Rostlinné jedy. Natura plus [online]. 1997 [cit. 2019-03-06]. Dostupné z: <http://natura.baf.cz/natura/1997/4/9704-6.html>

ŠTÍPEK, S. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. Praha: Grada, 2000. 320 s. ISBN 80-7169-704-4

TRONÍČKOVÁ, E. Zelenina. Praha: Artia, 1985. 223 s. ISBN: 37-012-86

VELÍŠEK, J.; HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin*. Tábor: OSSIS, 2009. 623 s. ISBN 978-80-86659-17-6

VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. Praha: Academia, 2002. 192 s. ISBN 80-200-0600-1

WATERHAUS, A. L.: Determination of Total Phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2002, vol. 6, s. 321–329.

WONG, P. Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. *Food Chemistry*, 2005, vol. 97, s. 505-515.

WANG a kol. Antioxidative Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 1998, vol. 46, s. 4869-4873

ZÁRUBA, K. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. 224 s. ISBN 978-80-7080-950-1.