

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



**Vliv kuchyňského zpracování na obsah glykoalkaloidů
v barevných odrůdách brambor**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Petra Kosová

Obor studia: Kvalita a zpracování zemědělských produktů

Vedoucí práce: Ing. Zora Kotíková, Ph.D.

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci “Vliv kuchyňského zpracování na obsah glykoalkaloidů v barevných odrůdách brambor” jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 7.4.2017

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Zoře Kotíkové, Ph.D., za její cenné rady a připomínky, které tuto práci obohatily. Dále děkuji za vstřícnost a trpělivost při vedení mé diplomové práce.

Vliv kuchyňského zpracování na obsah glykoalkaloidů v barevných odrůdách brambor

Souhrn

Studium obsahu glykoalkaloidů v bramborových hlízách je důležité ze sensorického hlediska, protože již při obsahu nad 150 mg na 1 kg čerstvé hmoty mohou mít hlízy hořkou chuť. A při vyšším obsahu glykoalkaloidů v hlízách, spojených s nadměrnou konzumací brambor, se mohou projevit toxické účinky glykoalkaloidů zažívacími až neurologickými problémy.

V této diplomové práci byl stanoven obsah hlavních glykoalkaloidů v bramborových hlízách devíti odrůd. Byly testovány tři odrůdy se žlutou dužninou, tři odrůdy s fialovou dužninou a tři odrůdy s červenou dužninou. Vzorky hlíz jednotlivých odrůd byly hodnoceny za syrova a také tepelně opracované, vařené a pečené.

Pro stanovení obsahu glykoalkaloidů v hlízách byla využita kapalinová chromatografie s detekcí pomocí hmotnostního spektrometru (UHPLC-ESI-MS/MS).

Nejvyšší obsah glykoalkaloidů z hodnocených odrůd měla žlutá odrůda Bohemia (400,44 mg/kg sušiny), následovaná fialovou odrůdou Valfi (347,34 mg/kg sušiny). Naopak nejnižší obsah glykoalkaloidů byl stanoven ve žluté odrůdě Dali (179,25 mg/kg sušiny) a červené odrůdě Red Emmalie (189,04 mg/kg sušiny). Lze konstatovat, že barva dužniny nemá vliv na obsah glykoalkaloidů v hlízách. Toto tvrzení je doložené statistickým zhodnocením výsledků.

Tepelnou úpravou hlíz dochází k částečnému snížení obsahu α -solaninu a α -chaconinu vůči obsahu v syrových hlízách. Ve vařených hlízách došlo k poklesu α -solaninu o 53,64 % a α -chaconinu o 44,33 %. V pečených hlízách α -solanin klesl o 46,20 % a α -chaconin o 34,58 %. Významnější rozdíly v poklesu glykoalkaloidů mezi hlízami se žlutou, fialovou a červenou dužninou nebyly nalezeny. Z výsledků je ale patrný výrazný pokles v obsahu glykoalkaloidů v závislosti na odrůdě.

Zajímavý je také poměr mezi α -solaninem a α -chaconinem v syrových hlízách a tepelně opracovaných hlízách. V tepelně opracovaných hlízách došlo ke změně poměru α -solaninu a α -chaconinu v důsledku rozdílné degradace jednotlivých glykoalkaloidů. Například v české odrůdě Bohemia byl stanoven poměr α -solaninu a α -chaconinu v syrové hlíze na 1:1,77, ve vařené hlíze 1:2,42 a v pečené hlíze 1:2,33. Tyto výsledky ukazují na nižší stabilitu α -solaninu během tepelného zpracování hlíz.

Klíčová slova: Brambory, Odrůdy, Glykoalkaloidy, Kulinární úpravy, UHPLC-ESI-MS/MS

The influence of culinary processing on glycoalkaloid content in pigmented potato tubers

Summary

Study of glycoalkaloids in the potato tubers is important from a sensory viewpoint, since already at a content of 15 mg per 1 kg of fresh material may have a bitter taste of tubers. When a higher content of glycoalkaloids in tubers, associated with excessive consumption of potatoes, may show toxic effects glycoalkaloids by digestive and neurological problems.

In this thesis was determined content main glycoalkaloids in potato tubers of nine varieties. They were tasted three varieties with yellow flesh, three varieties with purple flesh and three varieties with red flesh. Samples of tuber varieties were evaluated raw and heat treatment, cooking and baking.

To determine the content of glycoalkaloids in tubers the liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UHPLC-ESI-MS/MS) was used.

The highest content of glycoalkaloids were determined by yellow variety Bohemia (400.44 mg/kg dry matter), followed purple variety Valfi (347.34 mg/kg dry matter). The lowest content of glycoalkaloids were determined in yellow varieties Dali (179.25 mg/kg dry matter) and red varieties Red Emmalie (189.04 mg/kg dry matter). It can be stated that the color of flesh does not affect the content of glycoalkaloids in tubers. This statement is supported by statistical evaluation of results.

Heat treatment of tubers leads to partial reduction of the content of α -solanine and α -chaconine from the contents in the raw tubers. The cooked tubers decreased α -solanine of 53.46 % and α -chaconine of 44.33 %. In baked tubers α -solanine decreases by 46.20 % and α -chaconine of 34.58 %. Significant differences in the decrease of glycoalkaloids between tubers with yellow, purple and red pulp not found. The results are apparent significant decrease in the content of glycoalkaloids in depending on the variety.

Interesting it is also the ratio α -solanine and α -chaconine between raw tubers and heat treatment tubers. In heat treatment tubers changing the ratio of α -solanine and α -chaconine due to differential degradation of individual glycoalkaloids. For example, in Czech variety Bohemia was determined the ratio of α -solanine and α -chaconine in raw tubers 1:1.77, while the boiled tubers 1:2.42 and baked tubers 1:2.33. These results demonstrate the lower stability of α -solanine during heat treatment of tubers.

Keywords: Potatoes, Variety, Glycoalkaloids, Culinary processing, UHPLC-ESI-MS/MS

OBSAH

1. Úvod.....	7
2. Cíl práce.....	8
3. Literární rešerše	9
3.1 Biologická charakteristika bramboru.....	9
3.2 Látky obsažené v bramborové hlíze	9
3.3 Glykoalkaloidy v rostlině bramboru	10
3.3.1 Charakteristika a vlastnosti glykoalkaloidů	12
3.3.2 Struktura glykoalkaloidů.....	13
3.3.3 Syntéza glykoalkaloidů.....	16
3.4 Faktory ovlivňující obsah glykoalkaloidů v hlízách.....	19
3.5 Povolené množství glykoalkaloidů v hlízách a jejich účinky.....	20
3.5.1 Nežádoucí účinky glykoalkaloidů	20
3.5.2 Příznivé účinky glykoalkaloidů	22
3.6 Metody analýzy glykoalkaloidů.....	22
3.6.1 Extrakce	23
3.6.2 Chromatografické metody	23
3.6.3 Hmotnostní spektrometrie.....	26
3.6.4 Imunochemická analýza	27
3.7 Vliv kulinárních úprav na obsah glykoalkaloidů v hlízách	28
3.7.1 Loupání a krájení hlíz	29
3.7.2 Vařené hlízy	30
3.7.3 Pečené nebo smažené hlízy.....	30
4. Materiál a metody	33
4.1 Odrůdy vybrané pro experiment a jejich charakteristika.....	33
4.2 Způsob pěstování bramborových hlíz.....	34
4.3 Zpracování hlíz laboratorního dílčího vzorku	35
4.4 Chemikálie využité na přípravu vzorků a jejich analýzu.....	35
4.5 Postup přípravy vzorků pro analýzu na UHPLC	36
4.6 Podmínky analytické metody.....	36
4.7 Identifikace a kvantifikace	38
4.8 Statistické vyhodnocení dat	38
5. Výsledky	39
5.1 Vliv kulinárních úprav na obsah glykoalkaloidů	41
6. Diskuze	45
7. Závěr	48
8. Seznam literatury	49
9. Přílohy.....	55

1. Úvod

Brambory jsou jednou ze základních složek lidské výživy. Obsahují nutričně významné látky jako vitamíny, hlavně vitamin C, antioxidanty, vlákninu a minerální látky a jsou také důležitým zdrojem energie. Brambory navíc obsahují toxické látky, které jsou rostlinou syntetizovány (glykoalkaloidy) nebo pochází z chemického ošetření brambor v zemědělství (dusičnany, těžké kovy a pesticidy).

Glykoalkaloidy jsou přirozenou součástí ochranných systémů rostlin. Jedná se o složité chemické produkty sekundárního metabolismu rostlin. Ke zvýšené produkci glykoalkaloidů dochází vlivem stresových situací, jako jsou nepříznivé klimatické podmínky, poranění či napadení škůdci. Po chemické stránce jsou glykoalkaloidy glykosidy tvořené z bazického aglykonu solanidinu a sacharidové části, složené z monosacharidů, dle konkrétního druhu glykoalkaloidu. Sacharidovou část α -solaninu tvoří galaktosa, glukosa a rhamnosa, v α -chaconinu tvoří sacharidovou část glukosa a dvě molekuly rhamnosy.

V bramborové hlíze tvoří α -solanin a α -chaconin 95 % glykoalkaloidů, v nižším zastoupení obsahují hlízy také β -solanin, β -chaconin, γ -solanin, γ -chaconin, α -solamarin a β -solamarin. V České republice je v celých neloupaných hlízách maximální přípustné množství 200 mg glykoalkaloidů na 1 kg. Glykoalkaloidy při běžných koncentracích, 20-100 mg na 1 kg čerstvých hlíz, ovlivňují senzorické vlastnosti brambor a spoluvytvářejí chuť a vůni tepelně upravených brambor.

Glykoalkaloidy jsou termostabilní, k jejich degradaci dochází při teplotách nad 243 °C, odolávají mražení i sušení, nerozkládají se vařením, pečením ani mikrovlnným ohřevem, přesto během kulinárního zpracování dochází k částečnému snižování jejich obsahu. Značný podíl glykoalkaloidů lze odstranit oloupáním hlízy. K výraznému snížení obsahu celkových glykoalkaloidů dochází u rozkrájených oloupaných brambor, kdy v důsledku vyplavení škrobu se ztrácí i část glykoalkaloidů. Uvádí se také, že smažení výrazně snižuje celkový obsah glykoalkaloidů (až o 40 %), a to díky kombinaci působení vysoké teploty (170 až 180 °C) a přítomnosti oleje, který proniká do dužniny a usnadňuje tak vyplavení či rozklad glykoalkaloidů.

2. Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo stanovit obsah hlavních glykoalkaloidů ve vybraných odrůdách brambor s odlišným zabarvením dužniny. Porovnat a statisticky zhodnotit obsahy glykoalkaloidů v běžných odrůdách brambor s odrůdami s netradiční barvou dužniny. Dalším cílem práce bylo porovnat a statisticky zhodnotit retenci glykoalkaloidů v hlízách při různých kulinárních úpravách.

2.1 Vědecké hypotézy

Na základě studia odborné literatury byly navrženy tyto hypotézy:

1. Obsah a vzájemný poměr hlavních glykoalkaloidů brambor je závislý na odrůdě.
2. Červeně a fialově zbarvené odrůdy vykazují vyšší obsahy glykoalkaloidů v hlízách.
3. Vlivem kulinárních úprav dochází k degradaci glykoalkaloidů v hlízách.

3. Literární řešerše

Tradiční česká kuchyně využívala obiloviny (pšenici, žito, oves, proso, pohanku), luštěniny (hrách, fazol, čočku) a zeleninu (vodnici, tuřín, mrkev). Brambory se do Evropy dostaly až po objevení Ameriky ve 2. polovině 16. století. Zpočátku byly krmivem pro hospodářská zvířata. Do lidské stravy se rozšířily v důsledku válek, hladu a neúrody obilí. Postupně se brambory staly naší nejdůležitější kuchyňskou potravinou (Čepl a kol., 2012). V České republice se ročně zkonzumuje průměrně 66 kg brambor na osobu (Anon, 2015).

3.1 Biologická charakteristika bramboru

Brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum* L.) je jednoletá bylina z botanického rodu lilek (*Solanum*) z čeledi lilkovitých (*Solanaceae*). Společnou vlastností všech lilkovitých je, že obsahují řadu jedovatých glykosidů a alkaloidů (Rybáček a kol., 1988). Rostlina bramboru má část nadzemní (listy, květy, plody, nadzemní stonek) a část podzemní (hlíza, kořeny, podzemní stonek, stolon), viz obrázek 1 v příloze 1 (Schulzová a Hajšlová, 2007).

Bramborová hlíza slouží jako vegetativní rozmnožovací orgán. Z mateřské hlízy prvně vyrůstá listová růžice a vytváří se kořenová soustava. Následuje růst natě a tvorba pupenů na stonku. Současně s tvorbou pupenů dochází k zakládání dceřiných hlíz ze stolonů. V období kvetení a tvorby bobulí dochází také k narůstání hlíz. Proces narůstání hlíz se odvíjí od ranosti odrůdy, nejrychleji růst hlíz probíhá u raných odrůd, pomaleji u pozdních odrůd. Během vegetace se z mateřské hlízy odčerpávají zásobní látky a ta odumírá. Spolu s ní odumírají všechny nadzemní i podzemní orgány až na semena a dceřiné hlízy (Rybáček a kol., 1988).

Podle způsobu využití rozlišujeme odrůdy konzumních a průmyslových hlíz. Podle délky vegetační doby rozlišujeme odrůdy velmi rané, rané, polorané, polopozdní a pozdní (Rybáček a kol., 1988).

3.2 Látky obsažené v bramborové hlíze

Brambory jsou velmi hodnotnou základní potravinou, protože obsahují řadu nutričně důležitých látek (Čepl a kol., 2012).

Hlíza bramboru obsahuje asi 20 % sušiny a 80 % vody, v závislosti na odrůdě, době sklizně a na délce a způsobu skladování. Sušinu tvoří zejména sacharidy (11-18 %), dusíkaté látky (2 %) a malé množství tuků (0,1 %) (Čepl a kol., 2012). Hlízy bramboru obsahují také nutričně

významné látky jako vitamíny, zejména vitamín C, antioxidanty, vlákninu a minerální látky (Schulzová a Hajšlová, 2007).

Brambory jsou také zdrojem nežádoucích látek, jejichž obsah závisí na vnitřních a vnějších faktorech. Mezi nežádoucí látky patří látky syntetizované vlastní rostlinou (glykoalkaloidy, kalysteginy, inhibitory proteáz, lektiny) (Čepl a kol., 2012; Tajner-Czopek a kol., 2012), látky z chemizace zemědělství (dusičnany, těžké kovy, zbytky pesticidů) a látky vznikající tepelnou úpravou (akrylamid) (Čepl a kol., 2012).

Vyšší obsah glykoalkaloidů mají hlízy vystavené silnému osvětlení či hlízy poraněné. Těžké kovy se do hlíz dostávají během pěstování na kontaminovaných půdách, dusičnany při silném přehnojení dusíkem (Schulzová a Hajšlová, 2007) a rezidua pesticidů při jejich nadměrné aplikaci (Čepl a kol., 2012).

3.3 Glykoalkaloidy v rostlině bramboru

Většina pletiv bramboru obsahuje toxické, hořké glykoalkaloidy (Čepl a kol., 2012), které patří k ochranným mechanismům rostliny proti chorobám a škůdcům. Nejvýznamnější glykoalkaloidy izolované z listů a hlíz druhu *Solanum* jsou uvedeny v tabulce I. Po chemické stránce jsou glykoalkaloidy glykosidy tvořené z aglykonu a sacharidové části (Zrůst, 2004).

Tabulka I: Glykoalkaloidy izolované z bramboru (Zrůst, 2004)

Glykosid	Aglykon	Sacharidová část
α -solanin	solanidin	solatriosa
β -solanin	solanidin	solabiosa
γ -solanin	solanidin	galaktosa
α -chaconin	solanidin	chacotriosa
β_1 -chaconin	solanidin	chacobiosa
β_2 -chaconin	solanidin	chacobiosa
γ -chaconin	solanidin	glukosa
dehydrocommersonin	solanidin	commertetraosa
demissin	demissidin	lycotetraosa
commersonin	demissidin	commertetraosa
solasonin	solasodin	solatriosa
α -tomatin	tomatidin	lycotetraosa

Glykoalkaloidy se vyskytují v různých částech rostliny, v listech, stoncích, květech, bobulích, hlízách i klíčcích (Opletal a Šimerda, 2008). Jejich distribuci v rostlině uvádí tabulka II. V rostlině jsou glykoalkaloidy rozděleny nerovnoměrně, nejvíce jich je soustředěno na místech s vysokou metabolickou aktivitou. Nadzemní část rostliny obsahuje 10x až 20x více glykoalkaloidů než hlíza. Velmi mnoho glykoalkaloidů je obsaženo v bobulích (Zrůst, 2004), až 4200 mg na 1 kg čerstvé hmoty (Schulzová a Hajšlová, 2007).

Tabulka II: Výskyt alkaloidů v rostlině v mg na kg čerstvé hmoty (Zrůst, 2004)

Část rostliny	Obsah alkaloidů (mg/kg)	Část rostliny	Obsah alkaloidů (mg/kg)
květ	3000-5000	velké hlízy nad 40 g	10-150
stonek	20-40	malé hlízy 10-40 g	90-400
list	400-1000	tenká slupka	300-650
kořen	700-1000	dužnina	1-100
matečná hlíza	20-200	klíčky	2000-10 000

Hlíza bramboru obsahuje 20 až 100 mg glykoalkaloidů na 1 kg čerstvé hmoty. Jejich koncentrace je nejvyšší v povrchových vrstvách, směrem do středu klesá (Schulzová a Hajšlová, 2007). Nejvíce glykoalkaloidů obsahuje slupka, korová vrstva pod slupkou, oblasti oček na hlíze, místa poranění hlízy a klíčky (Čepl a kol., 2012). Schématický průřez bramborovou hlízou je znázorněn na obrázku 2 v příloze 1.

Ve slupce, která představuje 2 až 3 % hmotnosti hlízy, je obsaženo 83 až 96 % všech glykoalkaloidů, což odpovídá 300 až 640 mg glykoalkaloidů na 1 kg brambor. Korová vrstva představuje 10 až 12 % hlízy a obsahuje 3 až 14 % glykoalkaloidů, čili 150 až 1068 mg glykoalkaloidů na 1 kg brambor. A dřevina obsahuje 1 až 3 % glykoalkaloidů, což je 1 až 100 mg glykoalkaloidů na 1 kg brambor. V očkách a klíčcích je vysoký obsah glykoalkaloidů, až 5500 mg na 1 kg brambor (Zrůst, 2004). Rozložení glykoalkaloidů v hlíze je pro přehlednost shrnuto do tabulky III.

Po oblasti oček má vysoký obsah glykoalkaloidů korová vrstva. V prstenci cévních svazků obsah glykoalkaloidů klesá a ve vnější a vnitřní dřevině dosahují nepatrných hodnot. Mezi korunkovou a pupkovou částí hlízy nebyly zjištěny významné rozdíly v obsahu glykoalkaloidů (Zrůst, 2004). Při dlouhodobém skladování dochází k migraci glykoalkaloidů směrem do středu hlízy (Wolfe, 1987).

Tabulka III: Rozložení glykoalkaloidů v hlíze (Zrůst, 2004)

Část hlízy	Obsah GA v mg/kg čisté hmoty
Celá hlíza	11-150
Slupka, 2-3 % hlízy	300-640
Korová vrstva, 10-12 % hlízy	150-1068
Dřevina	1-100
Očka a klíčky	až 5500

3.3.1 Charakteristika a vlastnosti glykoalkaloidů

Glykoalkaloidy jsou přírodní dusíkaté látky. Jedná se o toxické látky, které jsou přirozenou součástí ochranných systémů rostlin (Schulzová a Hajšlová, 2007). Glykoalkaloidy jsou složité chemické produkty sekundárního metabolismu rostlin (Aniszewski, 2007). K jejich zvýšené

produkci dochází vlivem stresových situací, jako jsou nepříznivé klimatické podmínky či napadení škůdci (Schulzová a Hajšlová, 2007).

Alkaloidy obsažené v bramborové hlíze patří do skupiny steroidních alkaloidů tzv. solanidiny. Jedná se o hořké, termostabilní sloučeniny nerozpustné ve vodě, jejichž degradaci dochází až při teplotách nad 230 °C (Schulzová a Hajšlová, 2007). Barceloux (2008) uvádí, že je možné v 1 litru vody při 25 °C rozpustit 1,38 mg α -solaninu. Glykoalkaloidy odolávají mražení i sušení, naopak v kyselém prostředí dochází k jejich hydrolyze (Schulzová a Hajšlová, 2007).

Glykoalkaloidy při běžných koncentracích (20-100 mg/kg) ovlivňují senzorické vlastnosti brambor a spoluvytvářejí chuť a vůni tepelně upravených brambor (Schulzová a Hajšlová, 2007).

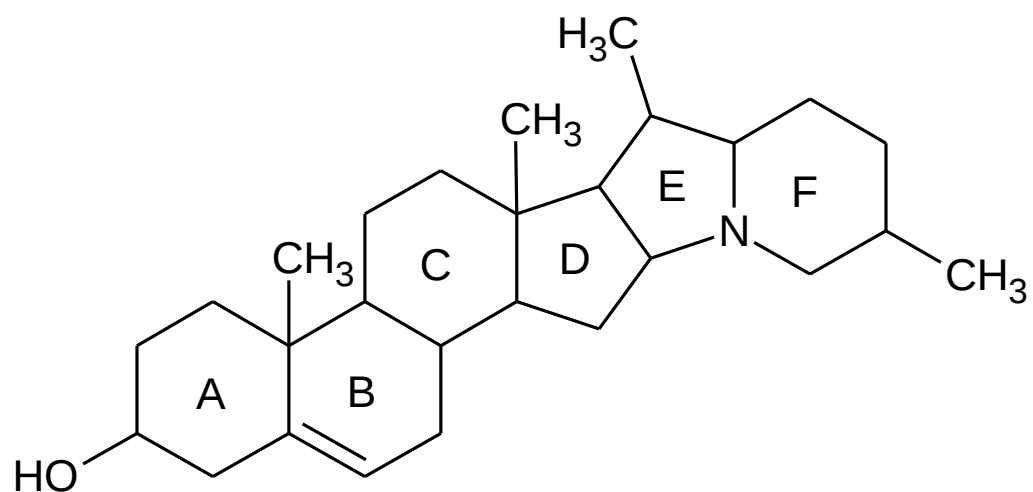
3.3.2 Struktura glykoalkaloidů

Molekula steroidního glykoalkaloidu má 3 strukturní části:

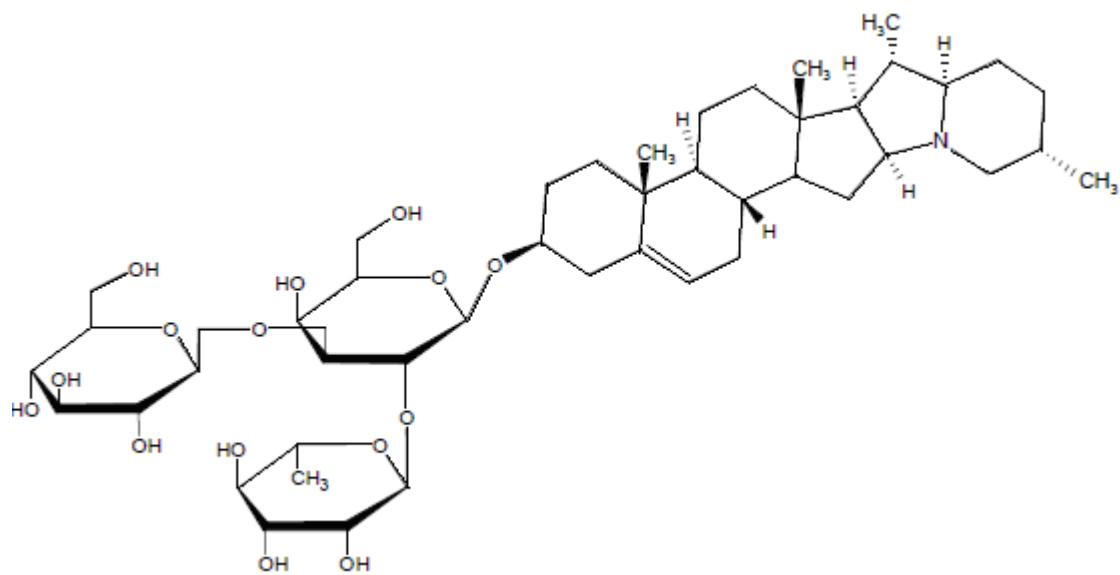
- polární hydrofilní sacharidovou část
- nepolární lipofilní steroidní část
- heterocyklickou bazickou část (Zrůst, 2004).

Směs příbuzných glykoalkaloidů obsažených v bramborových hlízách má společný aglykon (solanidin, viz obrázek 1), tudíž shodnou lipofilní a bazickou část. Liší se sacharidovou částí molekuly (Zrůst, 2004). Sacharidovou část solaninů tvoří galaktosa, glukosa a rhamnosa, u chaconinů tvoří sacharidovou část glukosa a rhamnosa, viz tabulka IV (Barceloux, 2008).

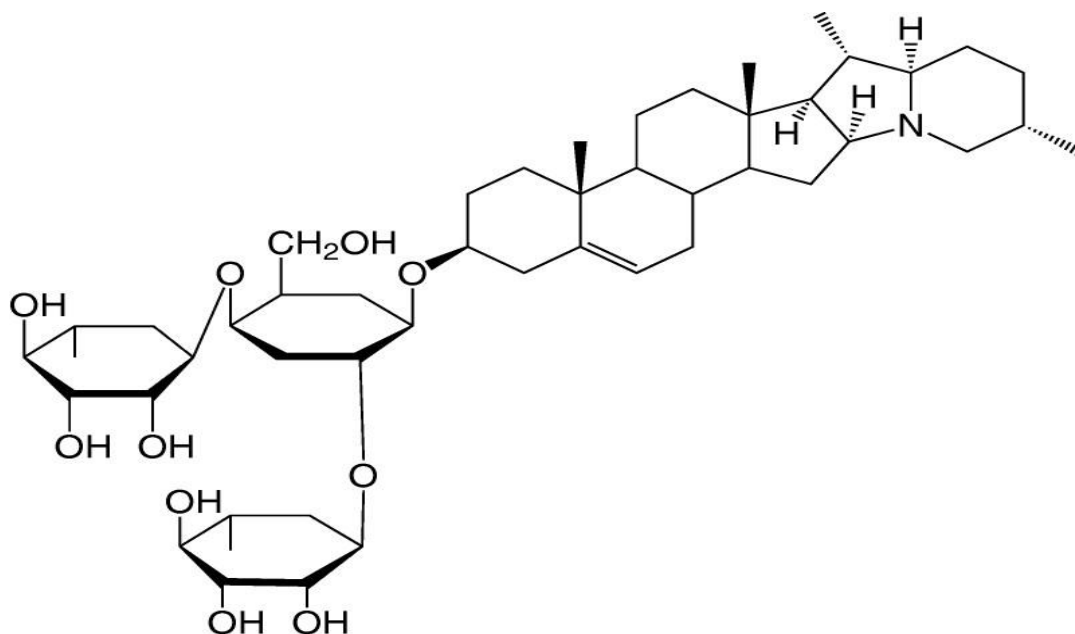
Hlavními glykoalkaloidy jsou α -solanin, viz obrázek 2 a α -chaconin, viz obrázek 3, které tvoří asi 95 % celkového obsahu glykoalkaloidů v konzumních bramborách. Poměr α -solaninu a α -chaconinu bývá 1:1,25 (Čepl a kol., 2012).



Obrázek 1: Chemická struktura solanidinu (Smith a kol., 1996)



Obrázek 2: Chemická struktura α -solaninu (Schulzová a Hajšlová, 2007)



Obrázek 3: Chemická struktura α -chaconinu (Schulzová a Hajšlová, 2007)

Kulturní odrůdy brambor obsahují vedle hlavních glykoalkaloidů (α -solaninu a α -chaconinu) také minoritní glykoalkaloidy, např. β -solanin, β -chaconin, γ -solanin, γ -chaconin a další (Schulzová a Hajšlová, 2007). Forma „ β “ nebo „ γ “ se od formy „ α “ liší počtem vázaných molekul sacharidů, viz tabulka IV (Zrůst, 2004). V planých druzích brambor mohou tyto minoritní složky tvořit podstatnou část celkových glykoalkaloidů (Schulzová a Hajšlová, 2007).

Tabulka IV: Struktura solaninu a chaconinu (Zrůst, 2004)

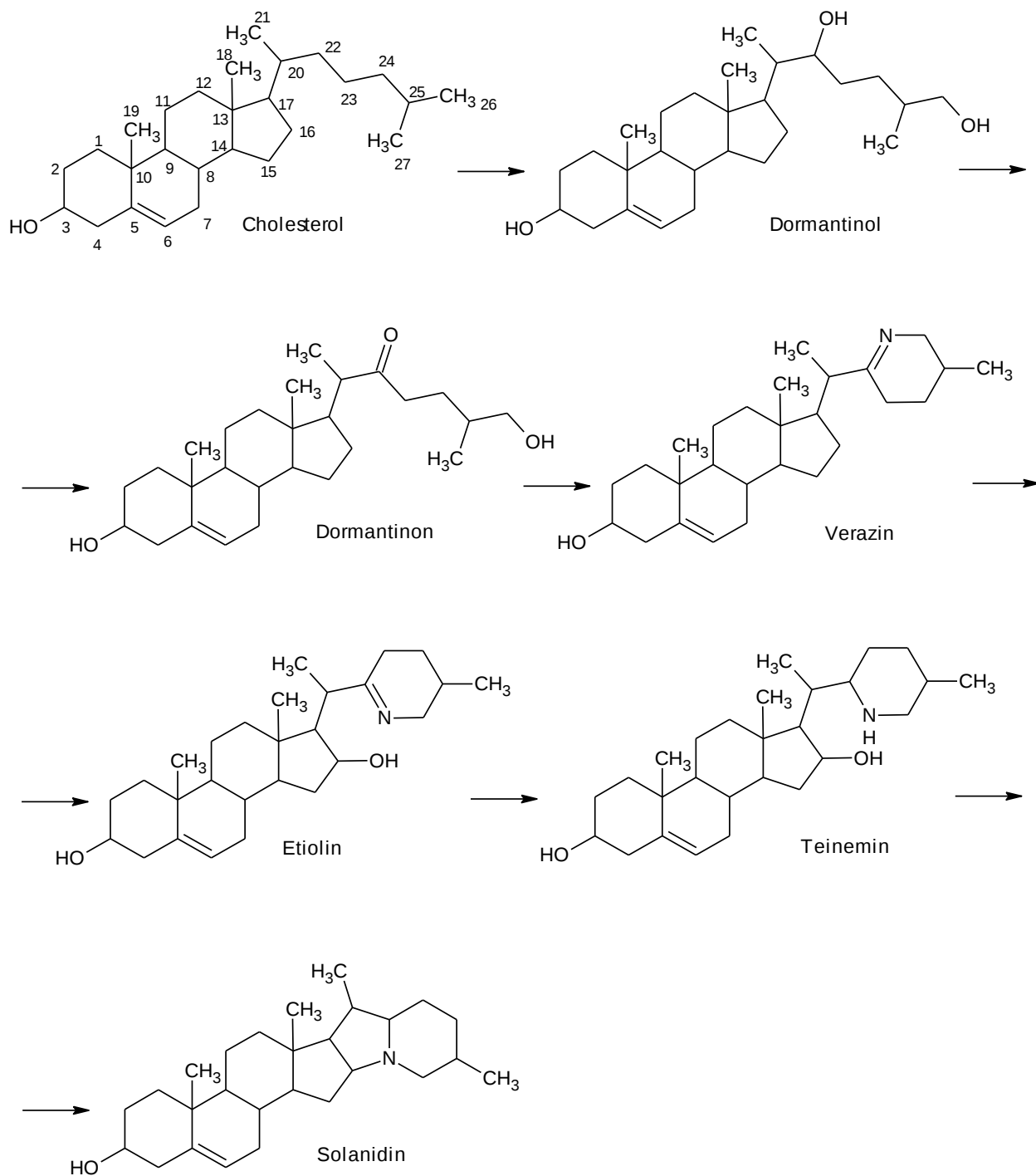
Glykosid	Struktura
α -solanin	solanidin + galaktosa + glukosa + rhamnosa
β_1 -solanin	solanidin + galaktosa + glukosa
β_2 -solanin	solanidin + galaktosa + rhamnosa
γ -solanin	solanidin + galaktosa
α -chaconin	solanidin + glukosa + rhamnosa + rhamnosa
β_1 -chaconin	solanidin + glukosa + rhamnosa
β_2 -chaconin	solanidin + glukosa + rhamnosa
γ -chaconin	solanidin + glukosa

3.3.3 Syntéza glykoalkaloidů

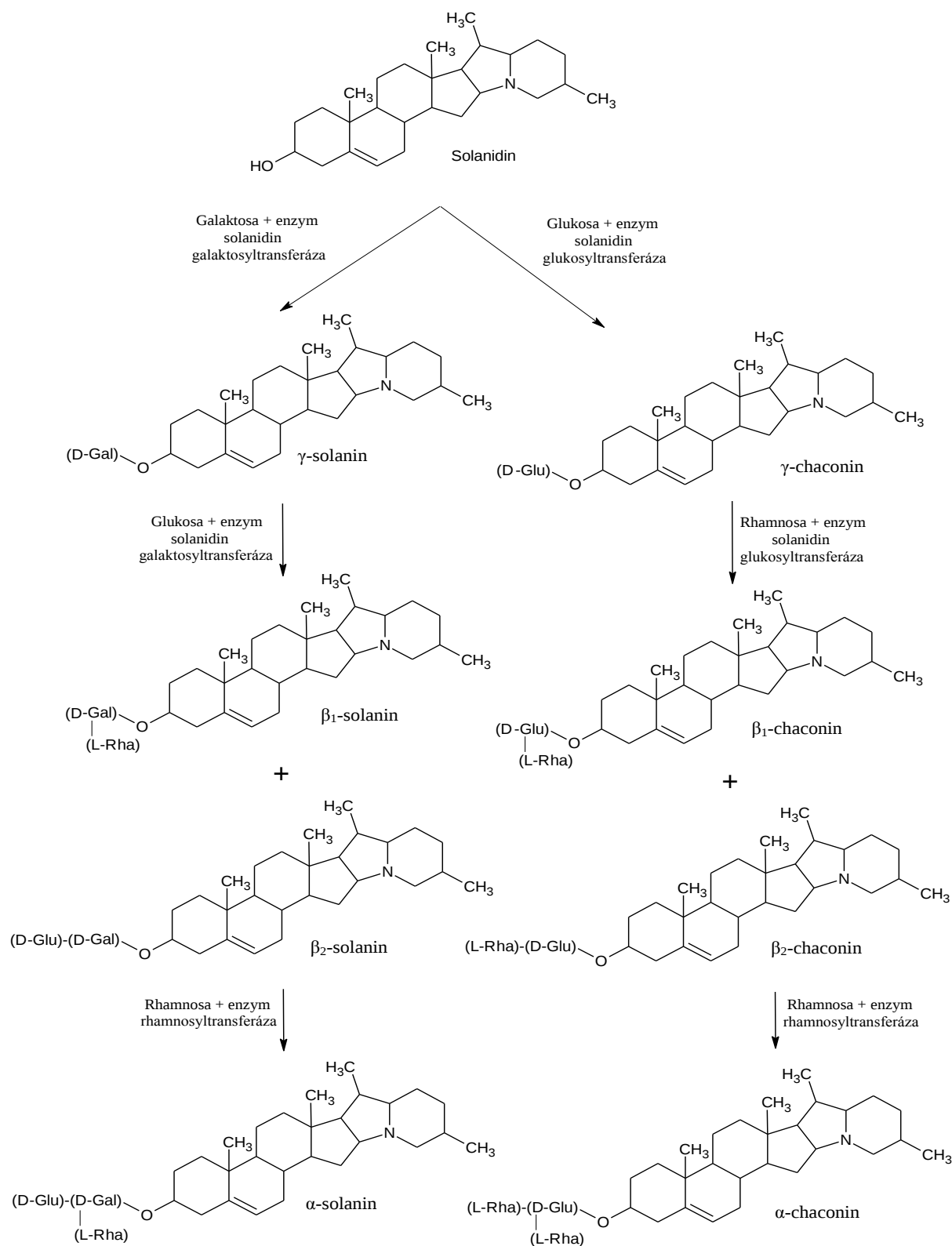
Biosyntéza glykoalkaloidů začíná během klíčení a vrcholu dosahuje v období květu (Friedman, 2006). Centrem biosyntézy glykoalkaloidů jsou buňky felodermu, které se nacházejí ve slupce (peridermis) (Vinter, 2006). Výchozí látkou pro syntézu steroidních glykoalkaloidů je cholesterol. Syntéza solanidinu z cholesterolu probíhá rychle, zatímco jeho přeměna na glykosid probíhá pomalu, v závislosti na dostupnosti glykosidových cukerných složek. Kromě toho je vyžadována přítomnost enzymů solanidin galaktosyltransferázy a solanidin glukosyltransferázy, které umožní glykosylaci solanidinu na γ -solanin a γ -chaconin. A také přítomnost enzymu rhamnosyltransferázy, jejímž prostřednictvím dochází k přeměně β -solaninu a β -chaconinu na α -solanin a α -chaconin (Ginzberg a kol., 2009).

Vznik solanidinu je zahájen hydroxylací cholesterolu na C22 a C26 za vzniku dormantinolu, který se oxiduje na C22 na dormantinon. Aminací dormantinonu na C26 vzniká verazin s uzavřeným kruhem F. Z verazinu se postupně syntetizuje etiolin, teinemin a nakonec dochází k uzavření kruhu E za tvorby solanidinu, viz obrázek 4 (Ginzberg a kol., 2009).

Navázáním galaktosy na solanidin pomocí enzymu solanidin galaktosyltransferázy vzniká γ -solanin. Navázáním glukosy, za katalýzy enzymem solanidin glukosyltransferázy, vzniká z γ -solaninu β -solanin, ze kterého navázáním rhamnosy za pomoci enzymu rhamnosyltransferázy vzniká α -solanin. Analogicky ve stejném pořadí vzniká ze solanidinu také γ -chaconin, β -chaconin a α -chaconin. Enzym solanidin glukosyltransferáza katalyzuje syntézu γ -chaconinu z glukosy a solanidinu. Stejný enzym také umožňuje připojení rhamnosy za vzniku β -chaconinu. Navázáním další molekuly rhamnosy na β -chaconin pomocí enzymu rhamnosyltransferázy vzniká α -chaconin (McCue a kol., 2007). Syntéza α -solaninu a α -chaconinu ze solanidinu je znázorněna na obrázku 5.



Obrázek 4: Syntéza solanidinu z cholesterolu (Attia, 2012; Guidechem, 2017; Ferrer-Hernández a kol., 2016; Pubchem, 2017a, b; ChemSpider, 2015)



Obrázek 5: Syntéza α -solaninu a α -chaconinu ze solanidinu (McCue a kol., 2007; Barceloux, 2008)

3.4 Faktory ovlivňující obsah glykoalkaloidů v hlízách

Největší vliv na množství steroidních glykoalkaloidů v hlízách bramboru má odrůda (Schulzová a Hajšlová, 2006). V závislosti na odrůdě vykazují bramborové hlízy různý obsah α -solaninu a α -chaconinu (Ruprich, 2010). Na druhém místě je vliv stanoviště, tedy půdní a klimatické podmínky (Zrůst, 2004). Dále obsah glykoalkaloidů v hlízách ovlivňuje fyziologická zralost hlíz, mechanické poškození hlíz, intenzita a typ světelného záření, podmínky skladování, teplota apod. Ke zvýšení obsahu glykoalkaloidů přispívá sucho, nadprůměrná délka slunečního svitu nebo hnojení dusíkatými hnojivy (Schulzová a Hajšlová, 2006).

Obsah glykoalkaloidů v hlíze závisí na fyziologickém stavu rostliny. Nejvyšší obsah byl zjištěn u malých hlíz v časném stadiu jejich tvorby. Předpokládá se, že obsah glykoalkaloidů v hlíze se nemění, dochází pouze k jejich naředění. Během vegetace se hmota hlíz zvyšuje a koncentrace obou hlavních glykoalkaloidů klesá (Zrůst, 2004).

Významný vliv na produkci glykoalkaloidů má mechanické poškození hlíz, např. nakopnutí, naražení, překrojení, oloupání. Lehce poškozená hlíza může obsahovat 2x až 3x více glykoalkaloidů. Vlivem vyorávání nebo mechanického poranění se může obsah glykoalkaloidů zvýšit během následujících 7 hodin ze 100 mg na 1 kg čerstvé hmoty na 150 mg na 1 kg čerstvé hmoty, jsou-li brambory ve tmě. Pokud jsou poraněné hlízy ponechány na světle, může se obsah glykoalkaloidů ze 100 mg na 1 kg čerstvé hmoty zvýšit na 300 až 750 mg na 1 kg čerstvé hmoty (Opletal a Šimerda, 2008).

Účinkem světla dochází, v závislosti na intenzitě a délce expozice, k zezelenání hlízy. Souvisí to se syntézou chlorofylu, která je intenzivnější za vyšší teploty (Zrůst, 2004). Syntéza chlorofylu je doprovázena tvorbou a tedy zvyšováním obsahu glykoalkaloidů. Jejich nárůst závisí na intenzitě světla, délce expozice (Schulzová a Hajšlová, 2006) a také odrůdě, jelikož byla doložena velká variabilita mezi odrůdami v tvorbě glykoalkaloidů vlivem světla (Friedman, 2006). Zelené hlízy obsahují až 2x více glykoalkaloidů než nezelené. Dennímu světlu jsou hlízy vystaveny po silných deštích, které odplaví navršenou hlínu a také během sklizně. Tvorba glykoalkaloidů je za světla 3x až 4x rychlejší než za tmy (Zrůst, 2004).

Také délka skladování a skladovací teplota ovlivňují syntézu glykoalkaloidů v hlíze. Při nízké teplotě (0 až 8 °C) se glykoalkaloidy tvoří méně než při skladování hlíz při teplotě 15 až 24 °C (Zrůst, 2004). Během skladování dochází k největšímu nárůstu glykoalkaloidů ve vnějších vrstvách hlízy (Friedman, 2006). Vhodně uskladněné brambory (teplota do 10 °C, tma

a relativní sucho) obsahují glykoalkaloidy pod 100 mg na 1 kg čerstvé hmoty. Problémem je také klíčení během skladování. Klíčky mohou obsahovat až 10 g glykoalkaloidů na 1 kg čerstvé hmoty (Opletal a Šimerda, 2008).

Ideální způsob skladování bramborových hlíz je při teplotě 3 až 4 °C a vlhkosti v rozmezí 87 až 95 %. Během doby skladování hlíz je důležité také dobré větrání (Schulzová a Hajšlová, 2007).

3.5 Povolené množství glykoalkaloidů v hlízách a jejich účinky

Potravinářské úřady v mnoha zemích schválily maximální limit 200 mg celkových glykoalkaloidů na 1 kg čerstvé hmoty neloupaných bramborových hlíz, které jsou určeny pro lidskou spotřebu (Petersson a kol., 2013). V České republice je obsah glykoalkaloidů regulován vyhláškou Ministerstva zdravotnictví č. 53/2002 Sb. Vyhláška určuje přípustné množství 200 mg glykoalkaloidů na 1 kg celých neloupaných hlíz (Schulzová a Hajšlová, 2007). Konzumní odrůdy brambor mají obsah glykoalkaloidů pod tímto limitem. Při dodržení vhodných podmínek pěstování, sklizně a skladování, nejsou konzumenti vystaveni riziku otravy.

V evropských zemích přijme průměrný konzument denně asi 1 mg glykoalkaloidů na 1 kg tělesné hmotnosti. Otravu může vyvolat denní příjem 2 až 5 mg glykoalkaloidů na 1 kg tělesné hmotnosti, smrtelná dávka je 3 až 6 mg na 1 kg tělesné hmotnosti (Friedman, 2006).

3.5.1 Nežádoucí účinky glykoalkaloidů

Skutečná toxicita glykoalkaloidů závisí na tom, zda jsou přijímány v malých dávkách dlouhodobě nebo jednorázově ve velkém množství. Jednorázový příjem glykoalkaloidů je toxičtější. Jejich účinek může být také ovlivněn ostatními složkami brambor či pokrmu, které mohou účinek glykoalkaloidů potlačovat nebo potencovat (Friedman, 2006). Dlouhodobý příjem nízkých dávek glykoalkaloidů může způsobit toxicitu v důsledku kumulace glykoalkaloidů v organismu (Ginzberg a kol., 2009).

Rozdíl mezi dávkou glykoalkaloidů přijatou z běžných a tzv. nebezpečných (nezralých nebo klíčících) brambor je velmi malý (Opletal a Šimerda, 2008). Například z porce 500 g brambor přijme dospělý člověk 0,7 až 0,9 mg glykoalkaloidů na 1 kg tělesné hmotnosti, což odpovídá pouze jedné čtvrtině toxické, popřípadě smrtelné dávky (Zrůst, 2004).

Příznaky otravy se dostavují v rozmezí půl hodiny až 12 hodin (Opletal a Šimerda, 2008). Při intoxikaci vyvolávají glykoalkaloidy nejprve zažívací potíže (nevolnost, zvracení, žaludeční křeče, průjem) (Benda a kol., 2000) v důsledku narušení membrány zažívacího traktu (Schulzová a Hajšlová, 2006). Mechanismus vedoucí k narušení buněčné membrány glykoalkaloidy je následující, aglykon glykoalkaloidu vytvoří komplex se steroly v buněčné membráně, čímž způsobí změnu v její struktuře. Změnou struktury buněčné membrány dochází k narušení membrány, úniku buněčného obsahu a smrti buňky (Friedman, 2006).

Posléze se při otravách objevují i neurologické potíže (bolesti hlavy, halucinace, závratě, ospalost) (Benda a kol., 2000), které jsou způsobeny inhibicí enzymu acetylcholinesterázy v centrální nervové soustavě (Schulzová a Hajšlová, 2006). Podmínkou pro inhibici acetylcholinesterázy je přítomnost postranního sacharidového řetězce (Friedman, 2006).

Kromě střevní sliznice jsou poškozovány další tkáně, do kterých jsou vstřebané alkaloidy transportovány (Opletal a Šimerda, 2008). Obecně bývají alkaloidy soustředěny především do jater, dále do ledvin, srdce, plic a mozku (Friedman, 2006). α -Solanin má tendenci hromadit se v ledvinách, slezině, plicích, tuku, srdci, mozku a krvi. α -Chaconin se hromadí především v plicích, játrech, slezině, kosterním svalstvu, ledvinách a slinivce (Wolfe, 1987).

Z gastrointestinálního traktu se lépe vstřebává α -chaconin (Wolfe, 1987), a má na lidský organismus výrazně toxičtější účinek než α -solanin (Rytel, 2012).

Toxicita glykoalkaloidů klesá v kyselém prostředí, protože za těchto podmínek nemohou glykoalkaloidy se steroly membrán tvořit komplexy (Zrůst, 2004). V kyselém prostředí žaludku podléhají glykoalkaloidy hydrolýze kyselinou chlorovodíkovou. Prvně vznikají z α -solaninu a α -chaconinu příslušné β_1 - a β_2 -glykosidy, ze kterých dále vznikají příslušné γ -glykosidy a konečným produktem hydrolýzy je aglykon solanidin, který je v kyselém prostředí stabilní (Schulzová a Hajšlová, 2007). Experimenty bylo prokázáno, že aglykon má slabší toxické účinky než glykosidy (α -solanin a α -chaconin) (Zrůst, 2004). Je to dáno i tím, že se aglykon obtížněji vstřebává z gastrointestinálního traktu než glykosid, aglykon prochází střevy a ve velké míře se vylučuje stolicí (Opletal a Šimerda, 2008).

α -Chaconin je vylučován žlučí a stolicí (Barceloux, 2008), α -solanin je vylučován také močí (Wolfe, 1987). Eliminace glykoalkaloidů probíhá v opačném pořadí jejich syntézy, to znamená, že dochází k rozkladu od α -chaconinu a α -solaninu k jejich aglykonu, solanidinu (Barceloux, 2008).

3.5.2 Příznivé účinky glykoalkaloidů

Friedman (2006) uvádí také příznivé účinky glykoalkaloidů a aglykonů, jako je snížení hladiny cholesterolu, u morčat působily tyto látky antipyreticky a antiflogisticky. Při injekčním podávání solaninu do břicha potkanů, bylo pozorováno snížení hladiny cukru v krvi.

α -Solanin a α -chaconin také posilují odolnost proti mikrobiální a virové infekci. Inhibují růst různých bakterií, například *Salmonella*, *Corynebakterie*, také byl prokázán jejich účinek na inhibici viru Herpes. α -Chaconin potlačuje vaginální kandidózy způsobené kvasinkou *Candida albicans*. Antimikrobiální účinek je výsledkem narušování buněčných membrán mikroorganismů, výše popsaným mechanismem (Friedman, 2006).

U α -solaninu, α -chaconinu, β -chaconinu, γ -chaconinu a solanidinu byl dále zkoumán vliv na ničení nádorových buněk. Všechny uvedené sloučeniny inhibovaly růst nádorových buněk, samostatně i v synergické směsi (Friedman, 2006).

Jedinou nevýhodou je, že tyto příznivé účinky glykoalkaloidů nejsou zatím prokázány po perorálním podání, neboli po konzumaci brambor. K docílení těchto účinků u laboratorních zvířat, musely být izolované glykoalkaloidy podány injekčně (Friedman, 2006).

3.6 Metody analýzy glykoalkaloidů

Pro získání objektivních výsledků je důležité analyzovat vzorky co nejdříve po jejich odběru nebo zvolit takové podmínky skladování, které omezí změny v obsahu glykoalkaloidů ve vzorcích. Nejvhodnější je vzorky lyofilizovat (Zrůst, 2004).

Vzorkování, extrakce a čištění vzorků je u všech metod stejné. Aby výsledky analýz byly dostatečně reprezentativní, doporučuje se odebrat minimálně 15 hlíz od jedné odrůdy (Zrůst, 2004). Před extrakcí je potřeba provést homogenizaci vzorku. Při homogenizaci nemá docházet ke zbytečnému zahřívání materiálu. Poté následuje vlastní extrakce, kdy současně dochází k přečištění vzorku (Dobšíková a kol., 2012).

Často používaným extrakčním činidlem pro vyluhování glykoalkaloidů je směs methanolu a vody, která se někdy okyseluje kyselinou octovou nebo směs chloroformu a methanolu v poměru 2:1. Doba extrakce glykoalkaloidů v ultrazvukové lázni u čerstvých hlíz se doporučuje na dobu 2 minut, u lyofilizovaných vzorků může být doba extrakce až 15 minut (Zrůst, 2004).

Metody pro stanovení glykoalkaloidů můžeme rozdělit do dvou skupin. V první skupině jsou metody pro stanovení celkového obsahu glykoalkaloidů, jedná se o gravimetrii, titrace nebo

spektrofotometrii. Metody ve druhé skupině slouží ke stanovení obsahu individuálních glykoalkaloidů, jedná se o chromatografii, hmotnostní spektrometrii a imunochemické metody (ELISA, RIA) (Zrůst, 2004).

3.6.1 Extrakce

Při zpracování vzorků rostlinného původu se používají různé extrakční metody. Extrakci přechází směs složek z jedné fáze do druhé. Podle typu složek rozlišujeme:

- Extrakci z kapaliny do kapaliny (LLE) – metoda umožňuje rozdělit složky mezi dvě nemísitelné kapaliny, sledovaná složka přechází do rozpouštědla, v němž je lépe rozpustná (Dobšíková a kol., 2012). LLE se dnes využívá méně, protože vyžaduje velké množství organických rozpouštědel. Z této metody se vyvinuly metody nové: extrakce malým množstvím rozpouštědla (několik ml) ve speciální nádobě, extrakce malým množstvím rozpouštědla za vysokého tlaku a teploty, extrakce horkou vodou pod tlakem a další (Picó, 2012).
- Extrakce z kapaliny na pevnou fázi (LSE) – sledovaná složka kapalného vzorku má vyšší afinitu k pevné fázi než k rozpouštědлу (Dobšíková a kol., 2012). Při extrakci se na povrchu pevné fáze může zachytit analyt a nečistoty poté zůstávají v kapalné fázi nebo se na pevné fázi zachytí nečistoty a analyt zůstává v kapalné fázi (Záruba a kol., 2016).
- Extrakce z pevné fáze do kapaliny (SLE) – vzorek se sledovanou složkou tvoří pevnou fázi a rozpouští se ve vhodném rozpouštědle (polárním nebo nepolárním) (Dobšíková a kol., 2012) nebo tekutinou v nadkritickém stavu (CO₂ nebo směs CO₂ a methanolu) (Záruba a kol., 2016).

3.6.2 Chromatografické metody

Moderní chromatografické metody vycházejí z principu papírové chromatografie, kterou poprvé použil k analýze M. S. Cvět roku 1903 při úspěšné separaci směsi rostlinných barviv (Picó, 2012).

Chromatografie je fyzikálně-chemická metoda určená k separaci vícesložkových směsí. Složky jsou separovány mezi dvě fáze, z nichž jedna je stacionární a druhá mobilní. Mobilní fáze se přesouvá přes vrstvu stacionární fáze (Picó, 2012). Kolonou jsou pomaleji unášeny analyty,

které jsou stacionární fází poutány silněji a tím dochází k rozseparování složek ve vzorku (Klouda, 2003).

Optimalizace chromatografické metody zahrnuje volbu chromatografických podmínek tak, aby látky ve směsi byly dokonale separovány a citlivě detekovány v co nejkratším čase. Optimalizace metody je převážně experimentální proces (Nováková a kol., 2013).

3.6.2.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Při tenkovrstvé chromatografii dochází k separaci látek v tenké vrstvě stacionární fáze účinkem mobilní fáze. Sorbentem obvykle bývá silikagel, který může být modifikovaný látkami o různé polaritě. Sorbent je nanesen v rovnoměrné vrstvě na skleněném, kovovém či plastovém podkladu. Mobilní fází bývá směs rozpouštědel o různé polaritě, často s přídavkem kyseliny nebo amoniaku pro potlačení ionizace sledovaných analytů (Dobšíková a kol., 2012).

Tenkovrstvá chromatografie je velmi vhodná pro separaci, analýzu a čištění alkaloidů (a jejich metabolitů). Poskytuje analýzu kvalitativní a částečně i kvantitativní. Vzorek určený pro TLC by měl obsahovat alespoň 50 až 100 µg alkaloidů (Aniszewski, 2007).

3.6.2.2 Kapalinová chromatografie (LC)

Kapalinovou chromatografii dělíme na chromatografii na normální fází (NPC), kde má mobilní fáze menší polaritu než fáze stacionární. Záchyt složek narůstá s rostoucí polaritou. U kapalinové chromatografie na reverzní fází (RPC) má mobilní fáze větší polaritu než stacionární fáze. Záchyt složek narůstá s rostoucí hydrofóbností (Picó, 2012).

V kapalinové chromatografii je analyzovaný materiál absorbován stacionární fází a vyluhován fází mobilní (Dobšíková a kol., 2012). Za separaci složek mezi dvě fáze je zodpovědná povrchová absorpce, iontová výměna, relativní rozpustnost a další mechanismy (Aniszewski, 2007).

Mobilní fází je kapalina, nejčastěji to bývají organická rozpouštědla a voda (Dobšíková a kol., 2012). Při přípravě mobilní fáze je potřeba použít rozpouštědla a aditiva přidávaná do mobilní fáze nejvyšší čistoty. Volba mobilní fáze závisí na typu analytu a jeho fyzikálně-chemických vlastnostech, na zvoleném chromatografickém módu a na stacionární fází (Nováková a kol., 2013). Stacionární fází tvoří náplň chromatografické kolony. Nejběžnější

stacionární fáze jsou na bázi silikagelu, který může být různě modifikován (Dobšíková a kol., 2012).

Součástí kapalinového chromatografu jsou: zásobník mobilní fáze s vysokotlakým čerpadlem, manuální či automatický dávkovač vzorku, chromatografická kolona, detektor a záznamové zařízení, viz obrázek 3 v příloze 1 (Dobšíková a kol., 2012).

Klasická kapalinová chromatografie nemá potřebnou účinnost, proto byla vyvinuta metoda vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC) (Klouda, 2003). Pro separaci složek vzorku je vyžadována stacionární fáze s velmi malými částicemi (2 až 10 μm), které kladou prostupující kapalině značný odpor. Proto je nutné pracovat za vysokého tlaku až 35 MPa (Dobšíková a kol., 2012; Klouda, 2003; Záruba a kol., 2016).

Nejrozšířenější chromatografickou metodou pro stanovení glykoalkaloidů v syrových či zpracovaných hlízách je vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) na reverzní fázi (Barceloux, 2008). Jako mobilní fáze se používá směs acetonitrilu, methanolu a vody a jako stacionární fáze se používá silikagel C18 (Nováková a kol., 2013). Nejčastěji používaným detektorem je fotometrický detektor měřící při vlnové délce do 215 nm (Zrůst, 2004) nebo se využívá detekce pomocí hmotnostního spektrometru (Nováková a kol., 2013).

3.6.2.3 Plynová chromatografie (GC)

U plynové chromatografie můžeme rozlišit uspořádání plyn-pevná látka (GSC), které se používá při separaci permanentních plynů a nízkovroucích uhlovodíků. K analýze alkaloidů se používá plynová chromatografie v uspořádání plyn-kapalina (GLC) (Aniszewski, 2007).

Plynová chromatografie umožňuje kvalitativní i kvantitativní způsob analýzy alkaloidů (Aniszewski, 2007). Nevýhodou této metody je případná částečná degradace analyzovaných alkaloidů za vysokých teplot (asi 300 °C) během nástřiku a separace složek (Schulzová a Hajšlová, 2007).

U plynové chromatografie se jako mobilní fáze používá nosný plyn (dusík, helium apod.). Stacionární fází může být pevný absorbent (oxid hlinitý, oxid křemičitý) umístěný v chromatografické koloně nebo kapalná fáze chemicky navázaná na vnitřní stěnu kolony. Vzorek je vstřikován do proudu zahřátého nosného plynu a přechází tak do plynné fáze (Záruba a kol., 2016).

S mobilní fází prochází vzorek chromatografickou kolonou, jejíž teplota udržuje plynný stav vzorku. Čas nutný k rozseparování jednotlivých složek směsi (retenční čas) je pro danou složku charakteristický. Výstupem naměřených dat je chromatogram (Záruba a kol., 2016).

Plynový chromatograf tvoří zdroj a regulátory průtoku nosného plynu, dávkovací zařízení, chromatografická kolona, termostat, detektor, zesilovač signálu a záznamové zařízení, viz obrázek 4 v příloze 1 (Dobšíková a kol., 2012).

3.6.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je využívána pro identifikaci a studium chemické struktury organických sloučenin. Umožňuje určování hmotnosti atomů, molekul a jejich fragmentů po převedení na kladně nebo záporně nabitě ionty. Ionty se poté separují podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje (m/z) (Dobšíková a kol., 2012).

K separaci iontů dochází při průchodu vzorku elektromagnetickým polem, proto musí být vzorek nejprve ionizován (Picó, 2012). K ionizaci vzorku se běžně využívá elektronová a chemická ionizace. Při elektronové ionizaci (EI) jsou molekuly vzorku v plynném stavu ionizovány interakcí s proudem vysokoenergetických elektronů emitovaných žhaveným vláknem a urychlených elektrostatickým polem. Předaná energie vede ke ztrátě elektronu a vzniku molekulárního ion-radikálu $M^{+\bullet}$ ($M + e^- \rightarrow M^{+\bullet} + 2 e^-$) (Záruba a kol., 2016). U chemické ionizace (CI) vznikají ionty chemickou reakcí (Klouda, 2003). Zde je do iontového zdroje kromě vzorku přiváděn tzv. reakční plyn, např. methan, který je proudem vysokoenergetických elektronů ionizován dříve než vzorek. Molekuly vzorku jsou následně ionizovány přenosem protonu z ionizovaného reakčního plynu ($M_A + CH_5^+ \rightarrow M_A^+ + CH_4$) (Záruba a kol., 2016). Vyhovující ionty jsou po separaci detekovány detektorem a pomocí vyhodnocovacího zařízení se stanovuje jejich četnost (Dobšíková a kol., 2012).

Hmotnostní spektrometrie obsahuje vstup vzorků, iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor iontů a vyhodnocovací zařízení, viz obrázek 5 v příloze 1. Spektrometr se často používá v kombinaci se separačním zařízením, např. chromatografickou kolonou (Picó, 2012). Takovéto spojení dovoluje řešit problémy chemické a strukturní analýzy, především přírodních materiálů a bioproduktů (Záruba a kol., 2016).

3.6.3.1 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS)

Plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií se úspěšně využívá při separaci komplexních směsí alkaloidů. Tato metoda vyžaduje oba přístroje, chromatograf i spektrometr. Plynová chromatografie je vhodná k separaci, zatímco hmotnostní spektrometrie umožňuje identifikaci analytů (Aniszewski, 2007).

3.6.3.2 Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC/MS)

Pomocí kombinace HPLC/MS lze také stanovit obsah minoritních glykoalkaloidů (Schulzová a Hajšlová, 2007). Nejběžnější metodou ionizace při analýze organických látek ve směsi nebo při stopové analýze jsou techniky ionizace za atmosférického tlaku, například ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace (APCI) a fotoionizace (APPI) (Záruba a kol., 2016).

Další způsob ionizace vzorků představuje metoda desorpční ionizace za účasti matrice MALDI (Matrix-assisted laser desorption/ionization). Jedná se o kombinaci HPLC/MALDI-MS, čili kombinaci separační kapalinové metody s hmotnostní spektrometrií, za ionizace vzorku pomocí laseru a vhodné matrice. Metoda vyžaduje zařízení schopné akceptovat vypařování rozpouštědla při ionizaci analytu (Záruba a kol., 2016).

V metodě MALDI slouží k tvorbě iontů pro hmotnostní analýzu paprsek pulzujícího laseru. Měřený vzorek z kolony se smísí s velkým množstvím substrátu, který je schopen absorbovat foton z UV-laseru. Směs substrátu a vzorku se nanese na destičku, na které vykrytalizuje. Energie získaná z pulzního laseru způsobí desorpci molekul vzorku, které vstupují do hmotnostního spektrometru, viz obrázek 6 v příloze 1 (Záruba a kol., 2016).

Metodou MALDI-TOF MS lze stanovit jednotlivé glykoalkaloidy (Schulzová a Hajšlová, 2007).

3.6.4 Imunochemická analýza

Imunochemické metody využívají interakce antigenu se specifickými protilátkami za vzniku, většinou barevného, imunokomplexu antigen-protilátka. Některé protilátky jsou velmi specifické a vážou se pouze k jedné substanci, jiné reagují se skupinou látek podobné chemické struktury. Určení vzniklého imunokomplexu je umožněno navázáním označeného analytu, kterým může být enzym, fluorescenční látka či radioaktivní izotop (Dobšíková a kol., 2012).

Imunochemické metody umožňují stanovit celkový obsah glykoalkaloidů, ale nerozliší α -solanin od α -chaconinu. Tyto metody nevyžadují extrakci ani čištění vzorku. Jedná se o rychlé, specifické a vysoce citlivé metody (Schulzová a Hajšlová, 2007).

V metodě ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) se k označování používá enzym peroxidáza, β -D-galaktosidáza nebo alkalická fosfatáza. Aktivita enzymu je přímo úměrná koncentraci volného alkaloidu ve vzorku (Aniszewski, 2007).

RIA metoda (Radioimmunoassay) je založena na reakci antigenu se specifickou protilátkou v přítomnosti radioaktivně značeného antigenu jako indikátoru, který umožňuje kvantifikaci. Značený antigen soupeří s neznačeným antigenem o vazebná místa na protilátce (Anon, 2016a). Protilátka reaguje s přítomnými antigeny za tvorby značeného a neznačeného komplexu antigen-protilátka (Aniszewski, 2007). Množství značeného komplexu je nepřímo úměrné množství stanovovaného neznačeného antigenu. Nevýhodou této metody je práce s radioaktivní látkou (Anon, 2016a).

3.7 Vliv kulinárních úprav na obsah glykoalkaloidů v hlízách

Woolfe (1987) ve své studii uvádí porovnání různých způsobů tepelné úpravy brambor (klasické a mikrovlnné vaření, pečení, smažení na tuku). Závěrem studie bylo, že výrazné snížení celkových glykoalkaloidů nastalo pouze při smažení. Friedman (2006) uvádí, že domácí kulinářské procedury jako jsou vaření, pečení a smažení, nevedou k významným změnám v obsahu glykoalkaloidů. Tyto procedury snižují obsah glykoalkaloidů v hlízách bramboru mnohem méně než jejich oloupání (Rytel, 2012).

Kulinární úpravy snižují množství vody v hlízách, takže se obsažené látky zahušťují a skutečné změny během přípravy nelze posoudit, je-li obsah látek vyjádřen na čerstvou hmotu. Proto se obsah látek v upravených bramborách převádí na sušinu (Woolfe, 1987).

Při vaření hlízy ve slupce je obsah vody snížen o 1 až 2 %, vařené oloupané nebo nakrájené hlízy mají vyšší % ztráty vody (Woolfe, 1987). U hranolek klesá smažením obsah vody o 24 % (Anon, 2017), u lupínků až o 97 až 98 % (Rybáček a kol., 1988).

3.7.1 Loupání a krájení hlíz

V hlízách jsou glykoalkaloidy lokalizovány ve slupce nebo těsně pod ní ve vrstvě 1,5 až 3 mm silné. Ve slupce je 3x až 10x vyšší koncentrace glykoalkaloidů než v dužnině (Ostrý a kol., 2010). Proto lze oloupáním odstranit až 80 % celkových glykoalkaloidů (Tajner-Czopek a kol., 2014). Čím tenčí vrstva se loupáním odstraní, tím v hlíze zůstává více glykoalkaloidů (Tajner-Czopek a kol., 2012). Slupka syrových brambor obsahuje průměrně 30 až 1000 mg glykoalkaloidů na 1 kg slupek (Ostrý a kol., 2010). Autoři Rytel a kol. (2005) upozorňují, že samotné loupání nestačí k odstranění velké části glykoalkaloidů. A to hlavně v odrůdách hlíz, které mají tendenci glykoalkaloidy hromadit.

Jednou z prvních činností při domácím i průmyslovém zpracování brambor bývá loupání. Rovnoměrné odstranění slupky do hloubky 1,5 mm sníží hmotnost malé hlízy (50 g) asi o 50 % a hmotnost velké hlízy (200 g) se sníží asi o 10 % (Woolfe, 1987).

Oloupáním škrabkou vznikne odpad představující 5 % z hmotnosti hlízy. Při průmyslovém zpracování hlíz musí být loupání efektivní, aby se minimalizovaly ztráty syrové hmoty a produkce odpadů. Ztráty loupáním závisejí na velikosti a tvaru hlízy, hloubce oček a délce skladování (Woolfe, 1987). Používá se loupání mechanické, loupání loužením, to je loupání v 5 až 20% roztoku hydroxidu sodného o teplotě 75 až 95 °C, a dále se používá parní loupání, což je loupání pod vysokým tlakem, 0,6 až 0,9 MPa, kde doba působení páry při loupání se pohybuje v rozmezí 5 až 70 s nebo lze použít kombinaci loupání loužením a párou (Rytel a kol., 2011; Rytel, 2012; Woolfe, 1987).

Ke krájení brambor při průmyslovém zpracování hlíz slouží mechanický kráječ nebo vodní kráječ, jehož konstrukce odpovídá výslednému produktu (proužkům, kostkám apod.) (Rytel a kol., 2011). Při výrobě hranolků se brambory krájí na proužky o průřezu 1 x 1 cm a délce 6 až 7 cm, při výrobě lupínků se brambory krájí na plátky o tloušťce 1,2 až 2 mm (Rybáček a kol., 2007).

Nakrájením hlíz lze pouze nepatrně snížit obsah glykoalkaloidů v meziproduktech nebo hotových produktech (Rytel a kol., 2011). Nakrájením se však zvětšuje povrch vystavený vodě a zvyšují se ztráty živin vyluhováním (Woolfe, 1987).

3.7.2 Vařené hlízy

Nejběžnější formou domácí přípravy brambor je jejich uvaření buď ve slupce, nebo po oloupání. Experimenty prokázaly, že brambory uvařené ve slupce a poté oloupané obsahují více živin než brambory oloupané předem (Woolfe, 1987).

Vaření brambor ve vodě příliš nesnižuje obsah glykoalkaloidů, z důvodu jejich nízké rozpustnosti. Obsah glykoalkaloidů v uvařených bramborách se slupkou byl snížen o 4 až 6 %, při mikrovlnném vaření brambor činil pokles glykoalkaloidů až 15 % (Ostrý a kol., 2010). Vařením brambor bez slupky klesl obsah glykoalkaloidů v průměru o 45,7 % (Zrůst, 2004).

Ve studii, kterou provedli Nema a kol. (2008), je uvedeno, že vařené brambory nemohou zezelenat ani vytvářet α -solanin, protože vařením jsou zničeny enzymy nutné k těmto reakcím. Avšak chlorofyl a α -solanin vzniklý před vařením není touto tepelnou úpravou ovlivněn.

Zrůst (2004) se zabýval pokusy, při kterých sledoval změny obsahu glykoalkaloidů vlivem vaření v bramborách českých odrůd. Vařením bramborových hlíz ve slupce klesl obsah glykoalkaloidů v průměru o 23,2 mg na 1 kg čerstvé hmoty. Průměrný pokles glykoalkaloidů ve vařených hlízách bez slupky činil 50,9 mg na 1 kg čerstvé hmoty, viz tabulka V (Zrůst, 2004).

Tabulka V: Vliv vaření na celkový obsah glykoalkaloidů v hlízách (Zrůst, 2004)

Odrůda	Celkový obsah glykoalkaloidů v mg/kg čerstvé hmoty		
	Syrové hlízy se slupkou	Vařené hlízy se slupkou	Vařené hlízy bez slupky
Velmi raná	90,2	70,5	49,3
Raná	75,5	57,4	31,8
Poloraná	84,0	67,4	37,8
Polopozdní a pozdní	123,3	84,7	50,7

3.7.3 Pečené nebo smažené hlízy

Studie prokázaly, že smažení usnadňuje průnik oleje do dužniny, při vysoké teplotě 170 až 180 °C a dochází tak k odstranění vyplavením či rozkladem asi 40 % glykoalkaloidů. Glykoalkaloidy difundují z brambor do oleje a vnikají do dalších brambor, je-li stejný olej znovu použit ke smažení, může způsobit navýšení obsahu glykoalkaloidů v konečných výrobcích. Obsah glykoalkaloidů v hranolcích i lupíncích lze minimalizovat používáním oloupaných,

nakrájených, omytých brambor a častými výměnami oleje na smažení (Nema a kol., 2008). Při zpracování barevných hlíz na hranolky došlo k výraznému poklesu v obsahu glykoalkaloidů ve srovnání s obsahem v syrových oloupaných hlízách (Tajner-Czopek a kol., 2014).

Podle Friedmana (2006) nevede smažení při teplotě 150 °C k významné změně v obsahu glykoalkaloidů, ale při teplotě 210 °C může úbytek glykoalkaloidů po 10 minutách smažení dosáhnout až 40 %. Prahová teplota, nad kterou obsah glykoalkaloidů výrazně klesá, je 170 °C. Glykoalkaloidy jsou termostabilní, k jejich degradaci je nutná vysoká teplota a také horký olej (Rytel, 2012).

Rytel a kol. (2005) zkoumali vliv různých fází výroby hranolků na obsah glykoalkaloidů. Během procedur při výrobě hranolků došlo k poklesu obsahu glykoalkaloidů v meziproduktech i v konečném produktu ve srovnání se surovinou, viz tabulka VI. Nejvíce glykoalkaloidů bylo odstraněno během loupání, blanšívání a smažení. Hotové hranolky obsahovaly pouze 7 % glykoalkaloidů vzhledem k surovině (Rytel a kol., 2005).

Tabulka VI: Obsah glykoalkaloidů během výroby hranolků v průmyslu (Rytel a kol., 2005)

Fáze zpracování	α -Solanin (mg/kg sušiny)	α -Chaconin (mg/kg sušiny)	Celkový obsah glykoalkaloidů (mg/kg sušiny)
syrový neloupaný brambor	57	152	209
brambor po oloupání	36	91	127
brambor po předehtřívání	29	71	100
brambor po krájení	26	60	86
proužky po 1. fázi blanšívání	18	45	63
proužky po 2. fázi blanšívání	17	38	55
proužky po sušení	14	29	43
hranolky po 1. fázi smažení	7	13	21
hranolky po 2. fázi smažení	6	8	14

Sizer a kol. (1980) zjistili, že během smažení bramborových lupínků nedochází k poklesu glykoalkaloidů, naopak dochází ke zvýšení jejich koncentrace vlivem ztráty vody. Prokázali také,

že odstraněním slupky z plátků brambor se výrazně snížil celkový obsah glykoalkaloidů v hotových lupíncích.

Tajner-Czopek a kol. (2012) uvádí, že u smažených výrobků, jako lupínků byl pokles glykoalkaloidů o 83 % a u hranolků po 1. smažení o 92 %, po 2. smažení o 94 %. K obdobnému závěru došli ve své studii autoři Rytel a kol. (2005). Uvádí, že smažením hranolků v 1. fázi došlo ke snížení obsahu glykoalkaloidů o 90 % a po 2. fázi smažení o 93,3 %.

Sůl, olej a jiné aromatické látky přidávané do lupínků mohou překrývat hořkou chuť výrobku, a tím také vyšší obsah glykoalkaloidů v původních hlízách (Wolfe, 1987).

4. Materiál a metody

Experimentální část této diplomové práce je zaměřená na stanovení obsahu glykoalkaloidů v bramborových hlízách syrových a tepelně upravených (vařených a pečených). Glykoalkaloidy byly ve vzorcích brambor stanoveny pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (UHPLC-ESI-MS/MS).

4.1 Odrůdy vybrané pro experiment a jejich charakteristika

Pro experiment bylo vybráno 9 odrůd brambor s různou barvou dužniny, které byly vypěstovány na experimentálním pozemku Výzkumného ústavu bramborářského ve Valečově. Brambory byly pěstovány podle zásad běžné agrotechniky.

Pro experiment byla vybrána německá odrůda Salome, což je velmi raná konzumní odrůda s nízkým výnosem krátce oválných až oválných hlíz (Kořínková-Selfertová, 2005). Odrůda Salome má světle žlutou dužninu a žlutou slupku, viz obrázek 7 v příloze 1. Je charakterizována jako varný typ AB. Hlízy po uvaření netmavnou (Anon, 2014). Odrůda Salome je odolná proti napadení virovými chorobami a mechanickému poškození (Kořínková-Selfertová, 2005).

Česká odrůda Bohemia je raná až poloraná konzumní odrůda s vysokým výnosem kulovito-oválných hlíz s mělkými očky (Kučera, 2012). Slupka je žlutá, jemná a hladká. Dužnina sytě žlutá, pevné konzistence, viz obrázek 8 v příloze 1. Odrůda Bohemia je vhodná pro přímý konzum, na praní, loupání a balení. Jedná se o varný typ BA, hlízy netmavnou po oloupání, ani po uvaření (Anon, 2010). Odrůda Bohemia je vysoce odolná proti rakovině brambor a hád'átku bramborovému. Vysokou odolnost vykazuje tato odrůda také proti virovým a skládkovým chorobám, plísní a strupovitosti (Kučera, 2012). Při pěstování vyžaduje půdy s rovnoměrným zásobením živinami a vyrovnaným vláhovým režimem (Anon, 2010).

Holandská raná konzumní odrůda Dali poskytuje vysoký výnos velkých oválných hlíz. Hlízy mají hladkou žlutou slupku a žlutou dužninu, viz obrázek 9 v příloze 1. Varný typ této odrůdy je BA (Kubíček, 2016). Hlízy jsou vhodné ke konzumaci, pečení ve slupce, pro saláty a vaření ve slupce i po oloupání. Po uvaření jsou hlízy pevné a netmavnou. Odrůda Dali je odolná vůči hád'átku bramborovému a rakovině brambor (Anon, 2016b).

Česká odrůda Valfi je poloraná až polopozdní konzumní odrůda. Brambor má modrofialovou slupku s modře mramorovanou dužninou, viz obrázek 10 v příloze 1. Hlízy jsou oválné, středně velké až velké. Odrůda Valfi je řazena k varnému typu BC, jedná se o rozvářivější typ hlíz.

Z hlediska obsahu zdraví prospěšných látek je odrůda Valfi vhodnější než žlutomasé odrůdy brambor. Hlízy jsou zdrojem anthokyanových přírodních barviv, které se vyznačují antioxidační aktivitou. Odrůda Valfi je méně odolná ke strupovitosti a je náchylná k plísni bramboru v nati (Domkářová, 2010).

Německá odrůda Violette (Blaue Elise) má středně rané oválné hlízy a velmi dobrý výnos. Odrůda je charakteristická modrou slupkou a fialovou dužninou, viz obrázek 11 v příloze 1 (Anon, 2016c).

Vitelotte je francouzská odrůda brambor známá také pod názvem modrý francouzský lanýž. Odrůda má dlouhé oválné, středně velké hlízy s hlubokými očky. Silná slupka má černo-modrou barvu a dužnina je fialovo-modrá s bílým nepravidelným mramorováním, viz obrázek 12 v příloze 1. Jedná se o pozdní odrůdu s nízkými výnosy (Anon, 2016d).

Skotská středně pozdní odrůda Highland Burgundy Red (Red kardinál) poskytuje dobré výnosy. Hlíza je dlouze oválná s červenou slupkou a červeno-bíle mramorovanou dužninou, viz obrázek 13 v příloze 1 (Anon, 2016g).

Odrůda Herbie 26 je česká raná odrůda, která má středně velké oválné hlízy. Slupka je světle vínové barvy zakrývající žlutě-růžovou mramorovanou dužninu s výraznou kortikální vrstvou, viz obrázek 14 v příloze 1 (Anon, 2016f).

Red Emmalie (Rote Emma) je německá středně raná odrůda mající podlouhlé hlízy s plochými oky. Hlízy mají červenou lesklou slupku a červenou dužninu, viz obrázek 15 v příloze 1. Výnosy této odrůdy jsou velmi nízké (Anon, 2016e).

4.2 Způsob pěstování bramborových hlíz

Uvedených devět kultivarů brambor (*Solanum tuberosum* L.) bylo pěstováno standardními postupy na poli ve Valečově v České republice (49°38'49,6''N 15°29'48,9''E) od srpna do října 2014 (Kotíková a kol., 2016).

Po sklizni byly hlízy mechanicky vyčištěny, omyty a zkontrolovány na mechanické a fyziologické poškození nebo onemocnění. Pro experiment byly použity pouze mechanicky a fyziologicky nepoškozené zdravé hlízy o hmotnosti 20 až 100 g. Vzorek z pole představovalo 30 kg náhodně vybraných hlíz vždy od dané odrůdy, ze kterého byl v laboratoři připraven dílčí vzorek skládající se z 20 hlíz (Kotíková a kol., 2016).

Následně byl všechn rostlinný materiál uskladněn na 5 mĚsíců v chlazené komoře při teplotě 4 °C, relativní vlhkosti 85 až 90 % a temnu (Kotíková a kol., 2016).

4.3 Zpracování hlíz laboratorního dílčího vzorku

Laboratorní dílčí vzorek každé odrůdy byl tvořen 20 hlízami v rozmezí hmotnosti 20-100 g. Laboratorní vzorky byly analyzovány syrové nebo po kulinářské úpravě, vařené a pečené.

Hlízy byly omyty, osušeny a neoloupané rozčtvrceny. Z každé hlízy dané odrůdy byla použita jedna čtvrtina na syrovou variantu, druhá čtvrtina na variantu určenou k vaření, třetí čtvrtina na variantu určenou k pečení a čtvrtá čtvrtina byla vyřazena (Kotíková a kol., 2016).

Varianta syrových hlíz byla dána do igelitového sáčku a zamrazena na -22 °C. Varianta hlíz určená na vaření byla vložena do vroucí vody na 20 minut. Po vyjmutí materiálu a jeho ochlazení, byly hlízy vloženy do igelitového sáčku a zamrazeny na -22 °C. Varianta hlíz na pečení byla rozložena na plech a pečena v horkovzdušné troubě Venticell 111 (BMT, Medical Technology, Ltd., Brno, Česká republika) při 180 °C po dobu 45 minut. Po upečení a jejich vychladnutí byly hlízy vloženy do igelitového sáčku a zamrazeny na -22 °C (Kotíková a kol., 2016).

Všechny zmrazené vzorky byly následně lyofilizovány (Lyovac GT2, Steris, Hürth, Německo). Lyofilizace syrových i kulinárně upravených vzorků trvala 100 hodin, čímž se získal požadovaný suchý materiál s konstantní hmotností. Dále byly vzorky pomlety na laboratorním mlýnku HR 2185 (Philips, Amsterdam, Nizozemí), homogenizovány a analyzovány (Kotíková a kol., 2016).

4.4 Chemikálie využité na přípravu vzorků a jejich analýzu

α -Solanin $\geq$ 95 % (Sigma-Aldrich, USA)

α - Chaconin $\geq$ 95 % (Sigma-Aldrich, USA)

Methanol p.a. (Lachner, Česká republika)

Acetonitril HPLC grade, (Lachner, Česká republika)

Kyselina mravenčí 99 % (Acros Organics, USA)

Octan amonný 99,999 % (Sigma-Aldrich, USA)

Deionizovaná voda

4.5 Postup přípravy vzorků pro analýzu na UHPLC

Na analytických vahách (Kern&Sohn GmbH, Německo) bylo naváženo přibližně 0,3 g lyofilizovaného homogenizovaného vzorku do plastové uzavíratelné kyvety. Do kyvety se vzorkem bylo přidáno 20 ml 80% methanolu. Kyveta byla promíchávána na vortexu (Basic 3, IKA, KG, Staufen, Německo) 1 minutu a poté byla na 10 minut umístěna do ultrazvukové lázně (PS 04, Powersonic-Notus, Ltd., Vráble, Slovensko) k podpoření homogenizace a rozpustnosti částic vzorku. Následovalo odstředění vzorku na odstředivce (5810R, Eppendorf, Hamburg, Německo) po dobu 7 minut při 5000 rpm a 20 °C. Supernatant byl převeden do 50 ml odměrné baňky, ke zbylému sedimentu bylo přidáno dalších 20 ml 80% methanolu a celý postup extrakce byl proveden ještě jednou. Supernatant v 50 ml odměrné baňce byl doplněn po rysku 80% methanolem a řádně promíchán. V dalším kroku byl vzorek zfiltrován přes nylonový mikrofiltr NY 0,22 μm a v poměru 1:1 byl naředěn 80% methanolem do vialky. Každý vzorek byl připraven ve třech opakováních.

Obsah α -solaninu a α -chaconinu ve vzorcích byl stanoven metodou UHPLC-ESI-MS/MS.

4.6 Podmínky analytické metody

Analytická kolona: Kinetex C18 (30x2,1 mm, S 1,7 μm)

Mobilní fáze: acetonitril : methanol : voda : 0,1M octan amonný (100 : 50 : 275: 25 v/v/v/v),
pH = 4 (pomocí kyseliny mravenčí), izokratická eluce

Průtok: 0,3 ml/min

Nástřik: 1 μl

Teplota kolony: 40 °C

Doba analýzy: 6 minut

Detekce: ESI-MS/MS

Podmínky MS detekce glykoalkaloidů jsou uvedeny v tabulce VII a VIII.

Tabulka VII: Podmínky ve zdroji

Ochranný plyn	30 psi
Kolizní plyn	střední
Napětí zdroje	5500 V
Teplota	650 °C
Zmlžovací plyn	60 psi
Turboplyn	60 psi

Tabulka VIII: Parametry MS metody pro stanovení glykoalkaloidů

MRM pozitivní iontový mód									
analyt	přechod	Q1 hmota [Da]	Q3 hmota [Da]	čas [ms]	DP [V]	EP [V]	CEP [V]	CE [V]	CXP [V]
α -chaconin	kvantifikační	852,64	98,2	100	166	10,5	32	121	4
	konfirmační	852,64	380,4	100	166	10,5	32	101	4
α -solanin	kvantifikační	868,62	98,1	100	136	10,5	46	121	4
	konfirmační	868,62	398,5	100	136	10,5	46	97	6

DP – deklasterační potenciál; EP – vstupní potenciál; CEP – vstupní potenciál do cely; CE - kolizní energie; CXP - výstupní potenciál z cely

4.7 Identifikace a kvantifikace

Identifikace analytů ve vzorcích byla provedena porovnáním kvantifikačního a konfirmačního přechodu a retenčního času vzorků a retenčních časů standardů. Výsledky byly vyhodnoceny metodou kalibrační přímky. Rozsah kalibrační přímky byl 0,05–5 µg/ml pro α -chaconin i α -solanin.

4.8 Statistické vyhodnocení dat

Výsledky α -solaninu a α -chaconinu získané analýzou na UHPLC-ESI-MS/MS byly zpracovány v programu STATISTICA 12. Ke statistickému zhodnocení dat byla použita metoda analýzy rozptylu (ANOVA) dvojného třídění na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. K podrobnějšímu vyhodnocení výsledků byl použit Tukeyův HSD test.

5. Výsledky

Průměrné obsahy α -solaninu a α -chaconinu stanovené ze třech paralelních opakování všech 27 vzorků jsou shrnuty v tabulce IX.

Tabulka IX: Výsledky obsahu α -solaninu a α -chaconinu v hlízách

Odrůda	syrová hlíza		vařená hlíza		pečená hlíza	
	α -solanin	α -chaconin	α -solanin	α -chaconin	α -solanin	α -chaconin
	(mg / kg sušiny)		(mg / kg sušiny)		(mg / kg sušiny)	
Salome	68,84	143,47	37,78	93,55	37,74	87,13
Bohemia	144,38	256,06	55,71	134,83	63,05	147,12
Dali	51,55	127,70	27,89	75,92	31,95	89,14
Valfi	142,24	205,10	47,90	81,35	70,81	112,11
Violetta	55,15	158,80	29,03	90,38	36,12	122,30
Vitelotte	133,04	175,49	68,88	99,78	62,73	110,95
HBR*	94,53	206,23	63,90	156,06	73,72	179,54
Herbie 26	89,10	181,98	31,95	80,63	38,05	95,13
RE**	82,62	106,43	36,32	56,70	49,33	77,99

* HBR Highland burgundy red

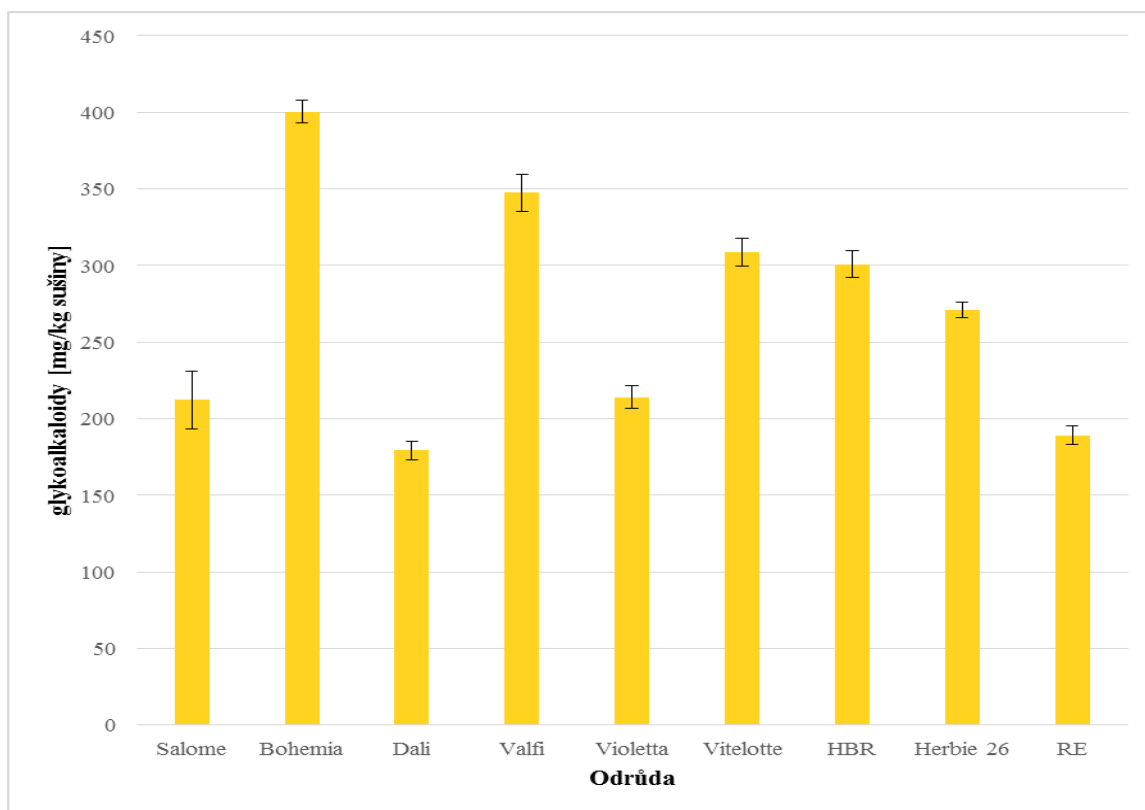
**RE Red Emmalie

Mezi hlízami vybraných odrůd byly při statistickém hodnocení potvrzeny rozdíly v obsahu α -solaninu i α -chaconinu v závislosti na odrůdě, viz tabulka I a IV v příloze 2. Z tabulky IX lze vyčíst, že nejnižší obsah α -solaninu byl naměřen v odrůdě Dali (51,55 mg/kg sušiny) a Violetta (55,15mg/kg sušiny). Nejvíce α -solaninu bylo nalezeno v odrůdě Bohemia (144,38 mg/kg sušiny) a Valfi (142,24 mg/kg sušiny).

Nejnižší obsah α -chaconinu byl stanoven v odrůdě Red Emmalie (106,43 mg/kg sušiny) a Dali (127,70 mg/kg sušiny), naopak nejvyšší obsah α -chaconinu byl stanoven v odrůdě Bohemia (256,06 mg/kg sušiny) a Highland burgundy red (206,23 mg/kg sušiny).

Žlutomasé odrůdy (Salome, Bohemia, Dali) mají přibližně stejný obsah glykoalkaloidů jako odrůdy s fialovou (Valfi, Violetta, Vitelotte) a červenou dužninou (Highland burgundy red, Herbie 26, Red Emmalie), jak také znázorňuje obrázek 6. Toto tvrzení bylo také prokázáno

statistickou analýzou. Tabulka VIII a XI v příloze 2 dokládá, že barva dužniny hlíz nehraje roli v obsahu α -solaninu, ani v obsahu α -chaconinu.



Obrázek 6: Celkový obsah glykoalkaloidů u odrůd se žlutou, fialovou a červenou dužninou

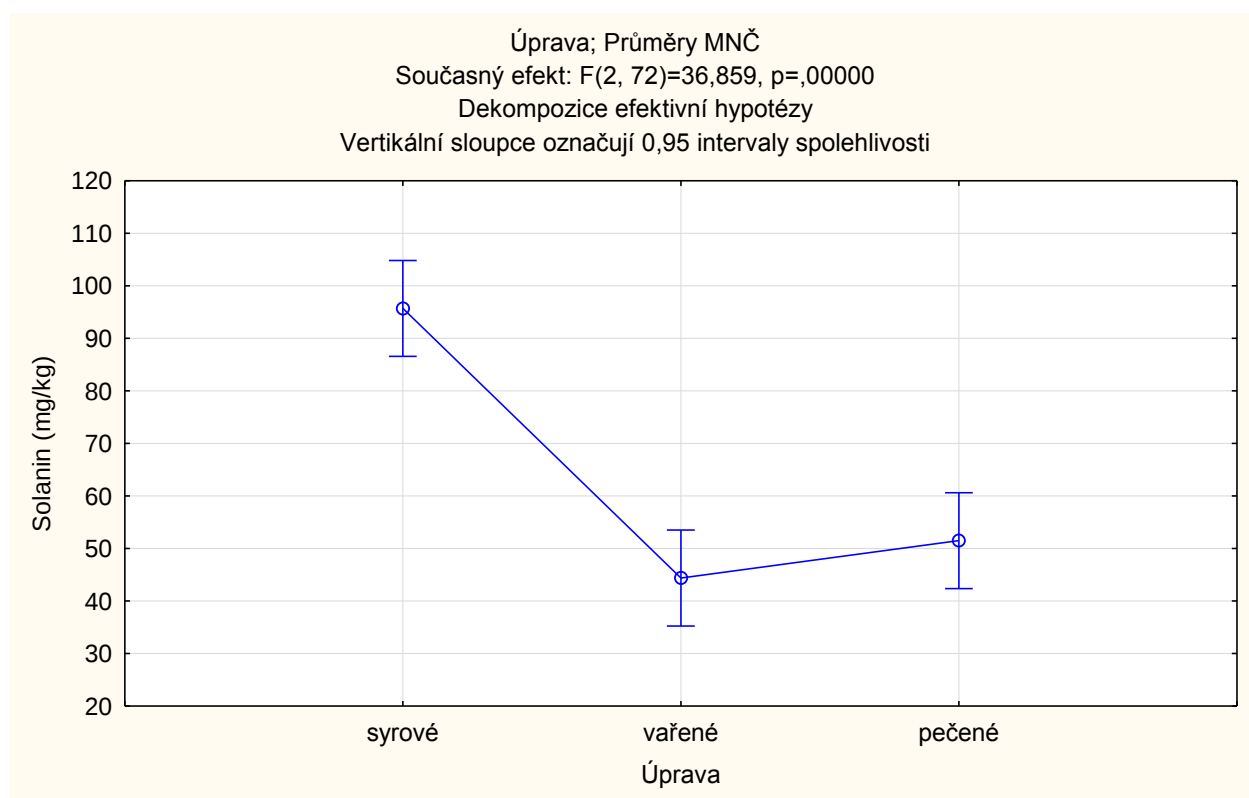
* HBR Highland burgundy red; ** RE Red Emmalie

Nejvyšší obsah glykoalkaloidů byl stanoven ve žluté odrůdě Bohemia (400,44 mg/kg sušiny), za kterou následovala fialová odrůda Valfi (347,34 mg/kg sušiny). Naopak nejnižší obsah glykoalkaloidů byl stanoven u žluté odrůdy Dali (179,25 mg/kg sušiny) a červené odrůdy Red Emmalie (189,04 mg/kg sušiny). Dle uvedených výsledků lze říci, že obsah glykoalkaloidů v hlízách nezávisí na barvě dužniny, ale na odrůdě.

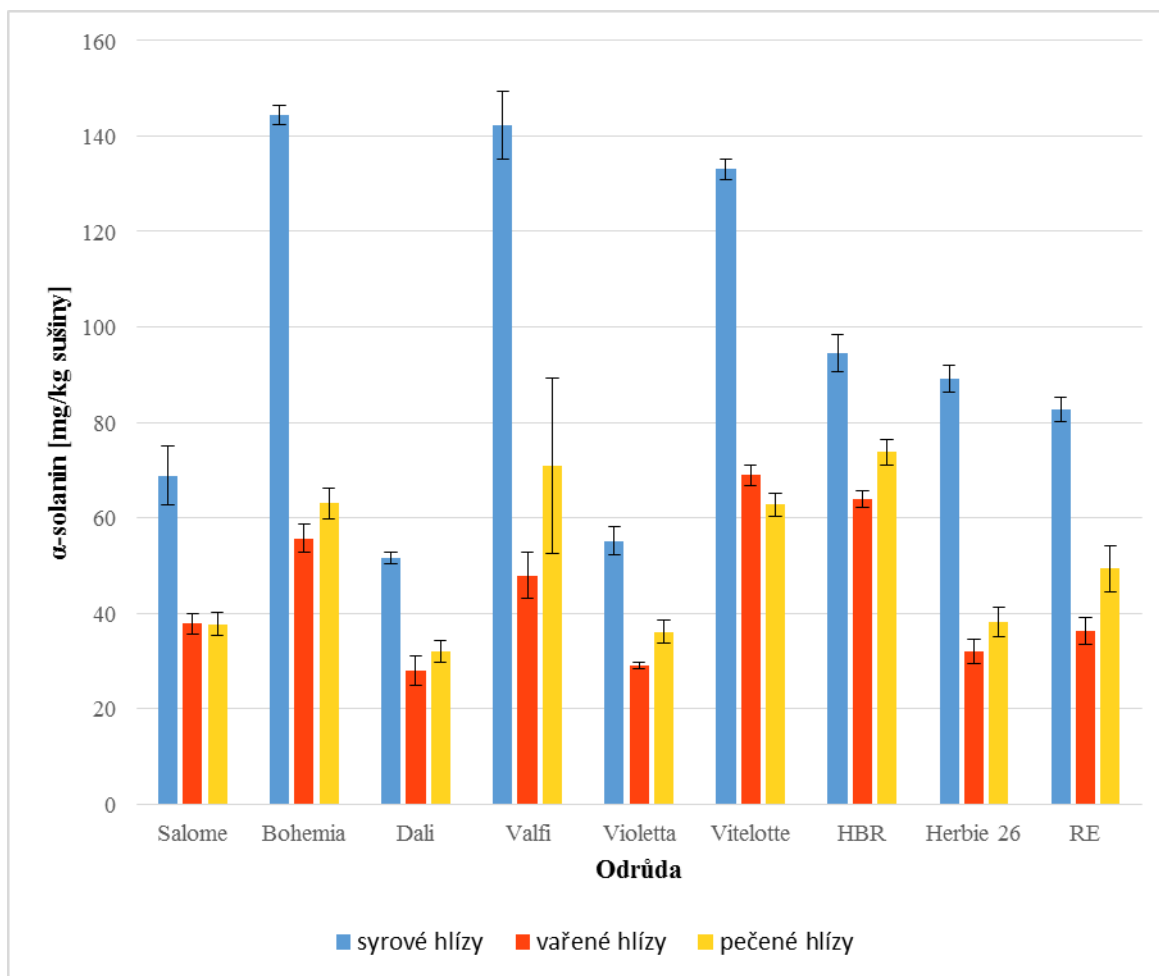
Poměr α -solaninu a α -chaconinu v sušině syrových hlíz se pohyboval v rozmezí 1:1,29 až 1:2,88, v závislosti na odrůdě. Nejvyšší poměr α -solaninu a α -chaconinu byl nalezen v odrůdě Violetta (1:2,88) a naopak nejnižší v odrůdě Red Emmalie (1:1,29).

5.1 Vliv kulinárních úprav na obsah glykoalkaloidů

Na obrázku 7 je patrné, že tepelnou úpravou hlíz lze výrazně snížit obsah α -solaninu oproti hlízám syrovým. Rozdíl v poklesu α -solaninu mezi hlízami vařenými a pečenými není statisticky průkazný, jak dokládá tabulka III ze statistického hodnocení v příloze 2. Největší pokles α -solaninu u vařených hlíz, při srovnání s hlízami syrovými, byl stanoven v odrůdě Valfi (o 94,33 mg/kg sušiny). Nejnižší úbytek α -solaninu vařením byl zaznamenán v odrůdě Dali (o 23,65 mg/kg sušiny). U pečených hlíz byl obsah α -solaninu snížen nejvíce v odrůdě Salome (o 81,33 mg/kg sušiny), nejméně v odrůdě Violetta (o 19,03 mg/kg sušiny). Variabilita obsahu α -solaninu v syrových, vařených a pečených hlízách vybraných odrůd je znázorněna na obrázku 8.

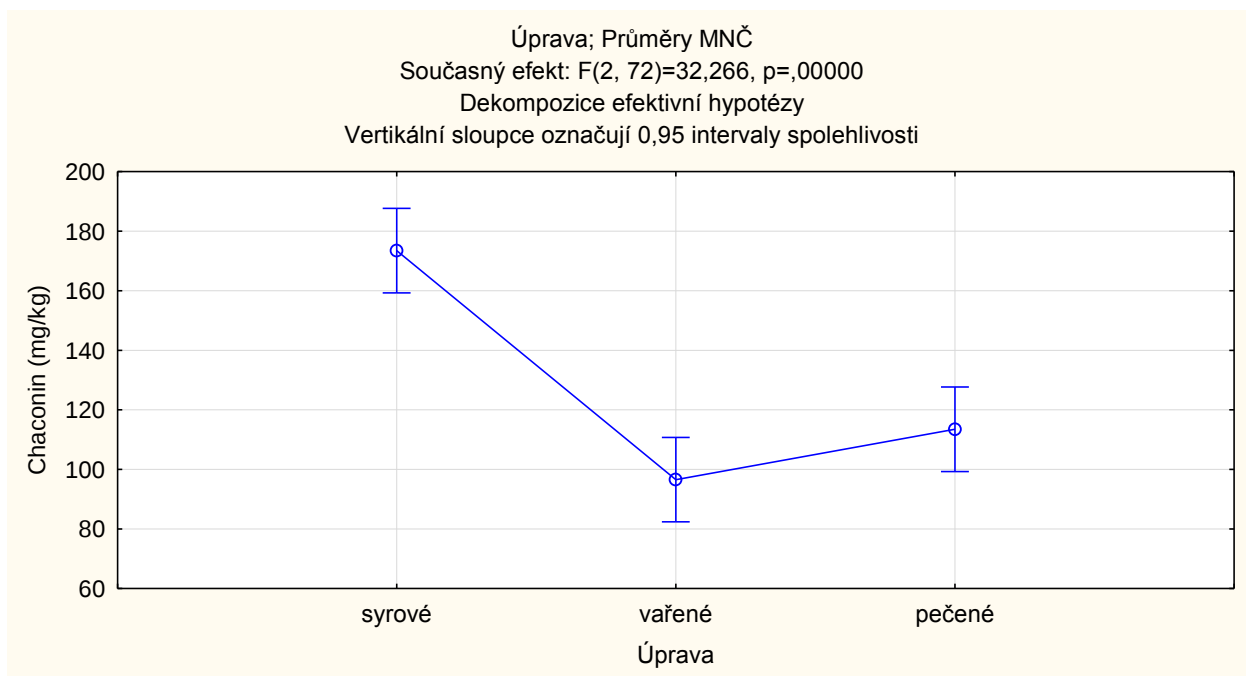


Obrázek 7: Porovnání úbytku α -solaninu mezi syrovou a tepelně upravenou hlízou

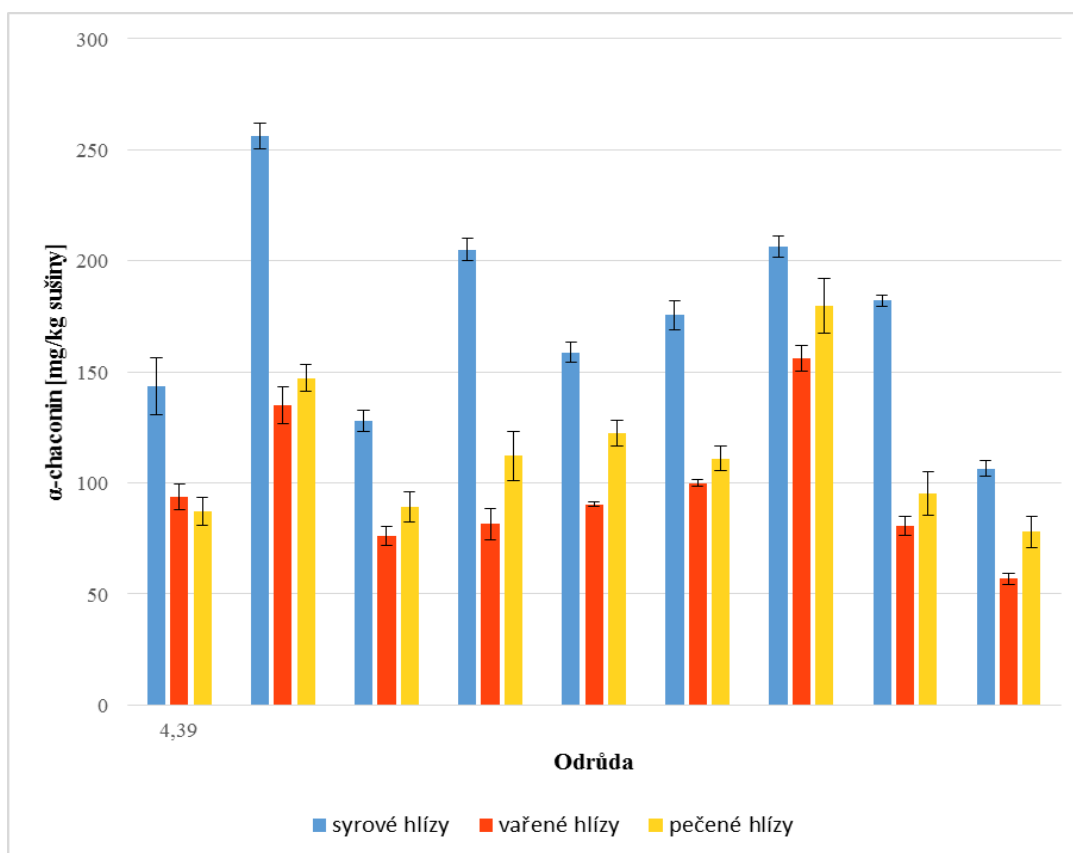


Obrázek 8: Obsah α -solaninu v hlízách vybraných odrůd

Podle tabulky XII v příloze 2 nebyly nalezeny statisticky průkazné rozdíly v poklesu α -chaconinu mezi tepelně upravenými hlízami. Větší úbytek α -chaconinu byl nalezen ve vařených hlízách, než v hlízách pečených, viz obrázek 9. Největší pokles α -chaconinu ve vařených hlízách byl nalezen v odrůdě Valfi (o 123,75 mg/kg sušiny), nejnižší byl stanoven v odrůdě Red Emmalie (o 49,72 mg/kg sušiny). Pečením hlíz byl pokles α -chaconinu nejvíce zaznamenán v odrůdě Bohemia (o 108,94 mg/kg sušiny), naopak nejnižší pokles byl stanoven v odrůdě Highland burgundy red (o 26,69 mg/kg sušiny). Variabilita obsahu α -chaconinu v syrových, vařených a pečených hlízách vybraných odrůd je znázorněna na obrázku 10.



Obrázek 9: Porovnání úbytku α -chaconinu mezi syrovou a tepelně upravenou hlízou



Obrázek 10: Obsah α -chaconinu v hlízách vybraných odrůd

Zajímavou oblastí experimentální části práce bylo zhodnocení poměru α -solaninu a α -chaconinu v sušině syrových a tepelně upravených hlíz dle tabulky X. Poměr α -solaninu a α -chaconinu sušiny syrových hlíz se pohyboval v rozmezí 1:1,29 až 1:2,88, v závislosti na odrůdě. V sušině vařených hlíz byl nalezen poměr α -solaninu a α -chaconinu v rozmezí 1:1,45 až 1:3,11 a v sušině pečených hlíz se poměr α -solaninu a α -chaconinu pohyboval v rozmezí 1:1,58 až 1:3,39, taktéž v závislosti na odrůdě.

Tabulka X: Poměr α -solaninu a α -chaconinu v hlízách

Odrůda	syrová hlíza		vařená hlíza		pečená hlíza	
	α -solanin	α -chaconin	α -solanin	α -chaconin	α -solanin	α -chaconin
	poměr		poměr		poměr	
Salome	1	2,08	1	2,48	1	2,31
Bohemia	1	1,77	1	2,42	1	2,33
Dali	1	2,48	1	2,72	1	2,79
Valfi	1	1,44	1	1,70	1	1,58
Violetta	1	2,88	1	3,11	1	3,39
Vitelotte	1	1,32	1	1,45	1	1,77
HBR*	1	2,18	1	2,44	1	2,44
Herbie 26	1	2,04	1	2,52	1	2,50
RE**	1	1,29	1	1,56	1	1,58

* HBR Highland burgundy red

**RE Red Emmalie

V tepelně opracovaných hlízách došlo ke změně poměru α -solaninu ku α -chaconinu. Tato změna je důsledkem vyšší tepelné degradace α -solaninu než α -chaconinu, což lze doložit tabulkou IX a XII v příloze 2. Přepočítáním uvedených hodnot, mezi syrovou a vařenou hlízou pro procentuální porovnání poklesu α -solaninu a α -chaconinu, byl učiněn závěr, že pokles α -solaninu ve vařených hlízách činil v průměru 53,64 %, zatímco pokles α -chaconinu jen 44,33 %. Taktéž pokles α -solaninu a α -chaconinu mezi syrovou a pečenou hlízou je znatelný. Pečením byl obsah α -solaninu snížen v průměru o 46,20 % a obsah α -chaconinu o 34,58 %.

6. Diskuze

Barceloux (2008) uvádí, že potravinářské úpravy jako vaření, pečení a smažení výrazně nemění obsah glykoalkaloidů v hlízách. Autoři Tajner-Czopek a kol. (2012) ve své studii tvrdí, že tepelným opracováním hlíz, jako je vaření, pečení, smažení nebo sušení, lze odstranit jen určité množství glykoalkaloidů.

Ostrý a kol. (2010) došli k závěru, že vaření brambor ve vodě příliš nesnižuje obsah glykoalkaloidů. Varem lze snížit obsah glykoalkaloidů maximálně o 3,5 % (Barceloux, 2008). Ostrý a kol. (2010) uvádí, že vařením brambor ve slupce lze snížit obsah glykoalkaloidů o 6 %. Zatímco v pokusu, který provedl Zrůst (2004), byl u brambor vařených ve slupce pokles glykoalkaloidů až o 24,2 %.

Nema a kol. (2008) ve své práci uvádí, že vaření brambor nakrájených na kostky či proužky výrazně snižuje obsah glykoalkaloidů. Protože během vaření nakrájených hlíz dochází k vyluhování rozpustných látek z otevřených buněk hlízy a současně s tím dochází ke zvyšování obsahu nerozpustných látek v sušině hlíz (Rytel a kol., 2011).

Po uvaření oloupaných hlíz byl podle studie Tajner-Czopek a kol. (2012) nalezen pokles glykoalkaloidů o 39 % ve srovnání se syrovou neloupanou hlízou. Zrůst (2004) ve své studii dosáhl vařením oloupaných hlíz snížení glykoalkaloidů o 54,3 %. V experimentu této práce bylo vařením syrových neloupaných rozkrojených hlíz dosaženo poklesu glykoalkaloidů o 55,6 %. Velká variabilita mezi výsledky od uvedených autorů je dána analyzováním odlišných odrůd, rozdílných velikostí hlíz a jejich odlišnou úpravou.

Velmi zajímavou oblastí je také možnost porovnat pokles glykoalkaloidů při vaření hlíz se žlutou, fialovou a červenou barvou dužniny. Mezi odrůdami se žlutou (Salome, Bohemia, Dali), fialovou (Valfi, Violetta, Vitelotte) a červenou dužninou (Highland burgundy red, Herbie 26 a Red Emmalie) nebyl dle statistického hodnocení, doloženého tabulkou VIII a XI v příloze 2, nalezen rozdíl. To znamená, že snížení obsahu glykoalkaloidů mezi různobarevnými odrůdami je srovnatelné. Lachman a kol. (2013) ve své studii pro hodnocení poklesu glykoalkaloidů v hlízách s fialovou a červenou dužninou, použil odlišný způsob vaření hlíz. Pro analýzu si uvařili oloupané hlízy, zatímco do experimentu v této práci byly použity hlízy vařené rozčtvrcené a neloupané. Lachman a kol. (2013) použili odrůdy s fialovou dužninou (Valfi, Violetta a Blaue St. Galler), kde pokles glykoalkaloidů byl 70,7 %. Podobně na tom byly odrůdy s červenou dužninou (Highland burgundy red a Red Emmalie), u kterých množství celkových

glykoalkaloidů bylo sníženo o 70,3 %. Důležité je, že rozdíly v poklesu celkových glykoalkaloidů mezi hlízami s fialovou a červenou dužninou ve studii autorů Lachman a kol. (2013) byly rovněž srovnatelné.

Lachman a kol. (2013) ve své studii také sledovali pokles glykoalkaloidů během pečení. Pečení způsobilo průměrné snížení obsahu glykoalkaloidů o 49 %. V experimentu této práce byl obsah glykoalkaloidů pečením snížen o 40,4 %. Pokles glykoalkaloidů při pečení mezi odrůdami se žlutou, fialovou a červenou dužninou nepředstavuje statisticky výrazný rozdíl, viz tabulka VIII a XI v příloze 2.

Barceloux (2008) tvrdí, že významnější degradace glykoalkaloidů začíná při teplotách nad 170 °C. Záhřev hlíz na 210 °C po dobu 10 minut redukuje obsah glykoalkaloidů o 40 %. Ostrý a kol. (2010) uvádí, že procesy jako pečení a smažení nesníží obsah glykoalkaloidů, protože jsou tepelně stabilní. Naproti tomu, v experimentální části této práce bylo prokázáno, že pečením lze obsah glykoalkaloidů snížit o 40,4 % a ve studii autorů Lachman a kol. (2013) bylo pečením degradováno až 49 % glykoalkaloidů. V experimentu této práce a ve studii autorů Lachman a kol. (2013) byly použity stejné podmínky pečení hlíz, horkovzdušná trouba se 180 °C a doba pečení 45 minut, ale podmínky se lišily úpravou hlíz. Jelikož autoři Lachman a kol. (2013) pekli neloupané hlízy rozřezané na kousky o velikosti 1,5x1,5x1,5 cm, bylo působení tepla na glykoalkaloidy intenzivnější než působení tepla na glykoalkaloidy pouze v rozčtvrcených neloupaných hlízách a tudíž došlo k výraznějšímu poklesu obsahu glykoalkaloidů.

Velmi sledovaným faktorem u hlíz je poměr α -solaninu a α -chaconinu. Důvodem je vyšší toxicita α -chaconinu než α -solaninu. Proto je také žádoucí, aby poměr α -solaninu a α -chaconinu byl co nejnižší. Čepl a kol. (2012) udává poměr α -solaninu a α -chaconinu 1:1,25. Nema a kol. (2008) uvádí poměr α -solaninu a α -chaconinu 1:3. Tajner-Czopek a kol. (2012) tvrdí, že poměr α -solaninu a α -chaconinu je závislý na odrůdě, s čímž se také shodují výsledky experimentu této práce uvedené v tabulce X. V experimentu byl poměr α -solaninu a α -chaconinu v syrových hlízách v rozmezí 1:1,3 až 1:2,9.

V tepelně opracovaných hlíz si lze všimnout změny poměru α -solaninu a α -chaconinu oproti obsahu glykoalkaloidů v syrových hlízách. Ve vařených hlíz došlo ke změně poměru α -solaninu a α -chaconinu z rozmezí 1:1,3 až 1:2,9 na 1:1,5 až 1:3,1 a u pečených hlíz na 1:1,6 až 1:3,4, vždy v závislosti na odrůdě. Tato změna je důsledkem snadnější degradace α -solaninu než α -chaconinu, což lze doložit tabulkou IX a XII ze statistického hodnocení výsledků v příloze 2,

kdy po přepočítání uvedených hodnot, mezi syrovou a vařenou hlízou pro procentuální porovnání poklesu α -solaninu a α -chaconinu, byl učiněn závěr, že pokles α -solaninu ve vařených hlízách činil v průměru 53,6 %, zatímco pokles α -chaconinu jen 44,3 %. Také pokles α -solaninu a α -chaconinu mezi syrovou a pečenou hlízou je znatelný. Pečením byl obsah α -solaninu snížen v průměru o 46,2 % a obsah α -chaconinu o 34,6 %.

Limit glykoalkaloidů v konzumních hlízách je stanoven maximálně na 200 mg na 1 kg čerstvé hmoty. Cílem šlechtitelů tedy je, aby nové odrůdy měly nízký obsah glykoalkaloidů, nejlépe do 100 mg na 1 kg čerstvé hmoty. Šlechtitelé tak vytvářejí rezervu v maximálním obsahu glykoalkaloidů pro pěstitele brambor. Protože při pěstování brambor může dojít ke zvýšení obsahu glykoalkaloidů v důsledku sucha a působením světla na odhrnutou hlízu, poté také při vyorávání hlíz může dojít k poškození hlízy a nárůstu obsahu glykoalkaloidů.

Důležité je zmínit, že když jsou dodrženy správné podmínky pěstování, sklizně a skladování, nejsou konzumenti vystaveni riziku otravy, protože konzumní odrůdy brambor obsahují glykoalkaloidy pod uvedeným limitem. Navíc obsah glykoalkaloidů je snížen při oloupání hlíz nebo jejich tepelném opracování.

7. Závěr

Z informací získaných v experimentální části, doložených statistickým vyhodnocením, lze říci, že obsah a poměr hlavních glykoalkaloidů (α -solaninu a α -chaconinu) závisí na odrůdě. Z literatury lze doplnit, že obsah glykoalkaloidů je dále ovlivněn podmínkami pěstování brambor, mechanickým poškozením hlíz během jejich sběru a také podmínkami skladování hlíz. Ze sledovaných faktorů obsah glykoalkaloidů nezávisí jediné na barvě dužniny hlíz.

Poměr α -solaninu a α -chaconinu v sušině syrových a tepelně upravených hlíz je taktéž odrůdovou záležitostí. Poměr α -solaninu a α -chaconinu v sušině syrových hlíz se pohyboval v rozmezí 1:1,29 až 1:2,88. V tepelně opracovaných hlízách, vůči hlízám syrovým, došlo ke změně poměru α -solaninu a α -chaconinu. Tato změna je důsledkem vyšší tepelné degradace α -solaninu než α -chaconinu.

Odrůdy hlíz s fialovou a červenou dužninou nemají vyšší obsah celkových glykoalkaloidů než odrůdy se žlutou dužninou. Dle statistické vyhodnocení je jejich obsah srovnatelný.

Tepelnou úpravou hlíz lze výrazně snížit obsah α -solaninu a α -chaconinu oproti jejich obsahu v hlízách syrových. Pokles α -solaninu ve vařených hlízách činil v průměru 53,64 %, zatímco pokles α -chaconinu jen 44,33 %. Pečením byl obsah α -solaninu snížen v průměru o 46,20 % a obsah α -chaconinu o 34,58 %.

8. Seznam literatury

Aniszewski, T. 2007. Alkaloids – Secrets of Life. Elsevier. Amsterdam. p. 335. ISBN: 0444527362.

Anon 2010. Šlechtění a množení brambor – Bohemia [online]. [cit. 2016-08-05]. Dostupné z <<http://www.vesa-velhartice.cz/cz/bohemia.htm>>.

Anon 2014. Seznam doporučených odrůd bramboru – konzum, škrob [online]. [cit. 2016-09-01]. Dostupné z <http://eagri.cz/public/web/file/350966/Brambor_2014.pdf>. ISBN: 9788074010873.

Anon 2015. Spotřeba potravin – 2015 [online]. Český statistický úřad. [cit. 2017-01-23]. Dostupné z <<https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba-potravin-2015>>.

Anon 2016a. Radioimunoanalýza (RIA) [online]. WikiSkripta. ISSN 1804-6517. [cit. 2017-02-27]. Dostupné z <[http://www.wikiskripta.eu/index.php/Radioimunoanal%C3%BDza_\(RIA\)](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Radioimunoanal%C3%BDza_(RIA))>.

Anon 2016b. Rané odrůdy – Odr [online]. [cit. 2016-09-01]. Dostupné z <<http://www.zd-popelin.cz/index.php?s=clanky&clanek=16&m=menu2&jmeno=Odr>>.

Anon 2016c. Violetta (Blaue Elise) [online]. [cit. 2016-09-01]. Dostupné z <<https://www.kartoffel-mueller.de/Exotische-Sorten/Violetta.html>>.

Anon 2016d. Brambor Vitelotte [online]. [cit. 2016-09-01]. Dostupné z <<http://www.farmpirate.com/cs/varieties/brambor-vitelotte>>.

Anon 2016e. Ellenberg'sKartoffelvielfalt GbR [online]. [cit. 2016-09-01]. Dostupné z <<http://www.kartoffelvielfalt.de/onlineshop/produkte.php?show=detail&cat=1&subcat=&rt=75>>.

Anon 2016f. Herbie 26 [online]. [cit. 2016-09-01]. Dostupné z <<http://www.guendels-kulturstall.de/mobile/smartphone/kartoffel-infos/sortenbeschreibung/herbie-26.php>>.

Anon 2016g. Highland Burgundy Red (Red Cardinal) [online]. [cit. 2016-09-01]. Dostupné z <<https://www.kartoffel-mueller.de/Exotische-Sorten/Highland-Burgundy-Red.html>>.

Anon 2017. Technologie zpracování brambor a výroba škrobu [online]. Mendelu. [cit. 2016-11-21]. Dostupné z <http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=6892&typ=html>.

Attia, P. 2012. The straight dope on cholesterol – Part I [online]. Lipid academy, [cit. 2017-02-26]. Dostupné z <<http://eatingacademy.com/nutrition/the-straight-dope-on-cholesterol-part-i>>.

Barceloux, D.G. 2008. Potatoes, tomatoes and solanine toxicity (*Solanum tuberosum* L., *Solanum lycopersicum* L.). Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Toxic Plants and Venomous Animals. pp. 77 – 83.

Benda, V.; Jabůrek, I. a Žďárský, J. 2000. Biologie II: Nauka o potravinářských surovinách. Praha. 196 s. ISBN: 8070804025.

Čepl, J.; Červinková, E.; Čížek, M.; Domkářová, J.; Exnerová, J.; Greplová, M.; Hausvater, E.; Krpálková, A.; Vokál, B. a Zášková, J. 2012. Máme rádi brambory. Ministerstvo zemědělství ČR. Havlíčkův Brod. 111 s. ISBN: 9788074340604.

Dobšíková, R.; Šírká, Z. a Blahová, J. 2012. Farmakologie v produkci potravin. Veterinární a farmaceutická univerzita. Brno. 152 s. ISBN: 9788073056162.

Domkářová, J. 2010. Modré brambory Valfi: Jak pěstovat tuto chutnou a zdravou raritu? [online]. [cit. 2016-09-01]. Dostupné z <<http://www.ireceptar.cz/zahrada/uzitkova-zahrada/modre-brambory-valfi-jak-pestovat-tuto-chutnou-a-zdravou-raritu/>>.

Ferrer-Hernández, A.E.; Coll-Manchado, F.; Pérez-Martínez, C.; Odtiž-del-Toro, P.; Fuentes-Fiallo, V.; Teixeira-de-Souza, P.; Adriano-Parizotto, C.; Teixeira-Militao, J.S.; Torres-Ferrer, M.

a Aiardes-Ferrer, M.A. 2016. Aislamiento de la 16- α -hidroxidormantinona y del dormantinol, a partir de las Holas del *Cestrumtaylori* Britt&Wills. (Isolation 16- α -hidroxidormantinona and dormantinol from leaves *Cestrumtaylori* Britt&Wills.) [online]. Revista Cubana de Química, 28 (1). ISSN 2224-5421. [cit. 2017-02-26]. Dostupné z <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212016000100009>.

Friedman, M. 2006. Potato glykoalkaloids and metabolites: Roles in the plant and in the diet. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54. pp. 8655-8681.

Guidechem 2017. (22S,25S)-Cholest-5-ene-3 β ,22,26-triol [online]. Chemical Trading Guide. [cit. 2017-02-26]. Dostupné z <<http://www.guidechem.com/reference/dic-492194.html>>.

Ginzberg, I.; Tokuhisa, J.G. a Veilleux, R.E. 2009. Potato steroidal glycoalkaloids: Biosynthesis and genetic manipulation. Potato Research, 52. pp. 1-15.

ChemSpider 2015. Etioline [online]. Royal society of chemistry. [cit. 2017-02-26]. Dostupné z <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10181233.html>>.

Klouda, P. 2003. Moderní analytické metody. Nakladatelství Pavel Klouda. Ostrava. 132 s. ISBN: 8086369072.

Kořínková-Selfertová, E. 2005. Nové registrované odrůdy bramboru [online]. [cit. 2016-08-05]. Dostupné z <<http://uroda.cz/nove-registrovane-odrudy-bramboru/>>.

Kotíková, Z.; Šulc, M.; Lachman, J.; Pivec, V.; Orsák, M. a Hamouz, K. 2016. Carotenoid profile and retention in yellow-, purple- and red-fleshed potatoes after thermal processing. Food Chemistry, 197. pp. 992-1001.

Kubíček, P. 2016. Sadbové brambory [online]. [cit. 2016-09-01]. Dostupné z <<http://www.prodejnazahradkar.cz/SadbBram.php>>.

Kučera, T. 2012. České odrůdy brambor – Bohemia [online]. [cit. 2016-08-05]. Dostupné z <<http://ceskeodrudybrambor.webnode.cz/products/bohemia/>>.

Lachman, J.; Hamouz, K.; Musilová, J.; Hejtmánková, K.; Kotíková, Z.; Pazderů, K.; Domkářová, J.; Pivec, V. a Cimr, J. 2013. Effect of peeling and three cooking methods on the content of selected phytochemicals in potato tubers with various colour of flesh. *Food Chemistry*, 138. pp. 1189-1197.

McCue, K.F.; Allen, P.A.; Shepherd, L.V.T.; Blake, A.; Maccree, M.M.; Rockhold, D.R.; Novy, R.G.; Stewart, D.; Davies, H.V. a Belknap, W.R. 2007. Potato glycoesterol rhamnosyltransferase, the terminal step in triose side-chain biosynthesis. *Phytochemistry*, 68. pp. 327-334.

Nema, P.K.; Ramayya, N.; Duncan, E. a Niranjana, K. 2008. Potato glycoalkaloids: formation and strategies for mitigation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88. pp. 1869-1881.

Nováková, L.; Douša, M.; Blatný, P.; Jandera, P.; Planeta, J.; Maier, V. a Znaležiona, J. 2013. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Europrint a.s., Praha. 235 s. ISBN: 9788026042440.

Opletal, L. a Šimerda, B. 2008. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita – antinutriční a toxické látky v krmivech*. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Praha. 71 s.

Ostrý, V.; Ruprich, J. a Škarková, J. 2010. Glycoalkaloids in potato tubers – The effect of peeling and cooking in salted water. National institute of public health, Prague. *Acta Alimentaria*, Vol. 39 (2), pp. 130-135.

Petersson, E.V.; Nahar, N.; Dahlin, P.; Broberg, A.; Tröger, R.; Dutta, P.C.; Jonsson, L. a Sitbon, F. 2013. Conversion of exogenous cholesterol into glycoalkaloids in potato stolte, using two methods for sterol solubilisation. *PLOS ONE*, 8 (12). pp. 1-11.

Picó, Y. 2012. *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*. Academic Press. Elsevier. p. 798. ISBN 978-0-12-384862-8.

Puchem 2017a. Verazine [online]. Open chemistry databáze. [cit. 2017-02-26]. Dostupné z <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/161052#section=Top>>.

Puchem 2017b. Teinemine [online]. Open chemistry databáze. [cit. 2017-02-26]. Dostupné z <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Teinemine#section=Top>>.

Rybáček, V.; Čača, Z.; Fric, V.; Fricová, E.; Šroller, J.; Vstoupal, B.; Daniel, J.; Findejs, R.; Míča, B.; Radil, B.; Rasochová, M.; Rasocha, V.; Tuček, V.; Vokál, B. a Zrůst, J. 1988. Brambory. Státní zemědělské nakladatelství Praha. 360 s. ISBN: 0713488.

Rytel, E.; Golubowska, G.; Lisińska, G.; Peksa, A. a Aniolowski, K. 2005. Changes in glycoalkaloid and nitrate contents in potatoes during French fries processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85. pp. 879-882.

Rytel, E.; Peksa, A.; Tajner-Czopek, A.; Agnieszka, K. a Lisińska, G. 2011. Anti-nutritional compounds in potatoes, depending on the type of raw material and conditions of processing potatoes into food products. *Food*, 5 (1). pp. 15-22.

Rytel, E. 2012. The effect of industrial potato processing on the concentrations of glycoalkaloids and nitrates in potato granules. *Food Kontrol*, 28. pp. 380-384.

Schulzová, V. a Hajšlová, J. 2006. Porovnání produktů ekologického a konvenčního zemědělství. Odborná studie VŠCHT v Praze. Praha. 24 s. ISBN 80-7271-181-4.

Schulzová, V. a Hajšlová J. 2007. Toxické alkaloidy v potravním řetězci člověka. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Praha. 51 s.

Sizer, Ch.E.; Maga, J.A. a Craven, C.J. 1980. Total glycoalkaloids in potatoes and potato chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28 (3). pp. 578-579.

Smith, D.B.; Roddick, J.G. a Jones, J.L. 1996. Potato glycoalkaloids: Some unanswered questions. *Trends in Food Science & Technology* 7. pp. 126-131.

Tajner-Czopek, A.; Rytel, E.; Kita, A.; Peksa, A. a Hamouz, K. 2012. The influence of thermal process of coloured potatoes on the content of glycoalkaloids in the potato products. *Food Chemistry*, 133. pp. 1117-1122.

Tajner-Czopek, A.; Rytel, E.; Aniolowska, M. a Hamouz, K. 2014. The influence of French fries processing on the glycoalkaloid content in coloured-fleshed potatoes. *European Food Research and Technology*, 238. pp. 895-904.

Vinter, V. 2006. Peridermis [online]. [cit. 2017-02-26]. Dostupné z <<http://www.botanika.upol.cz/atlas/anatomie/anatomieCR19.pdf>>.

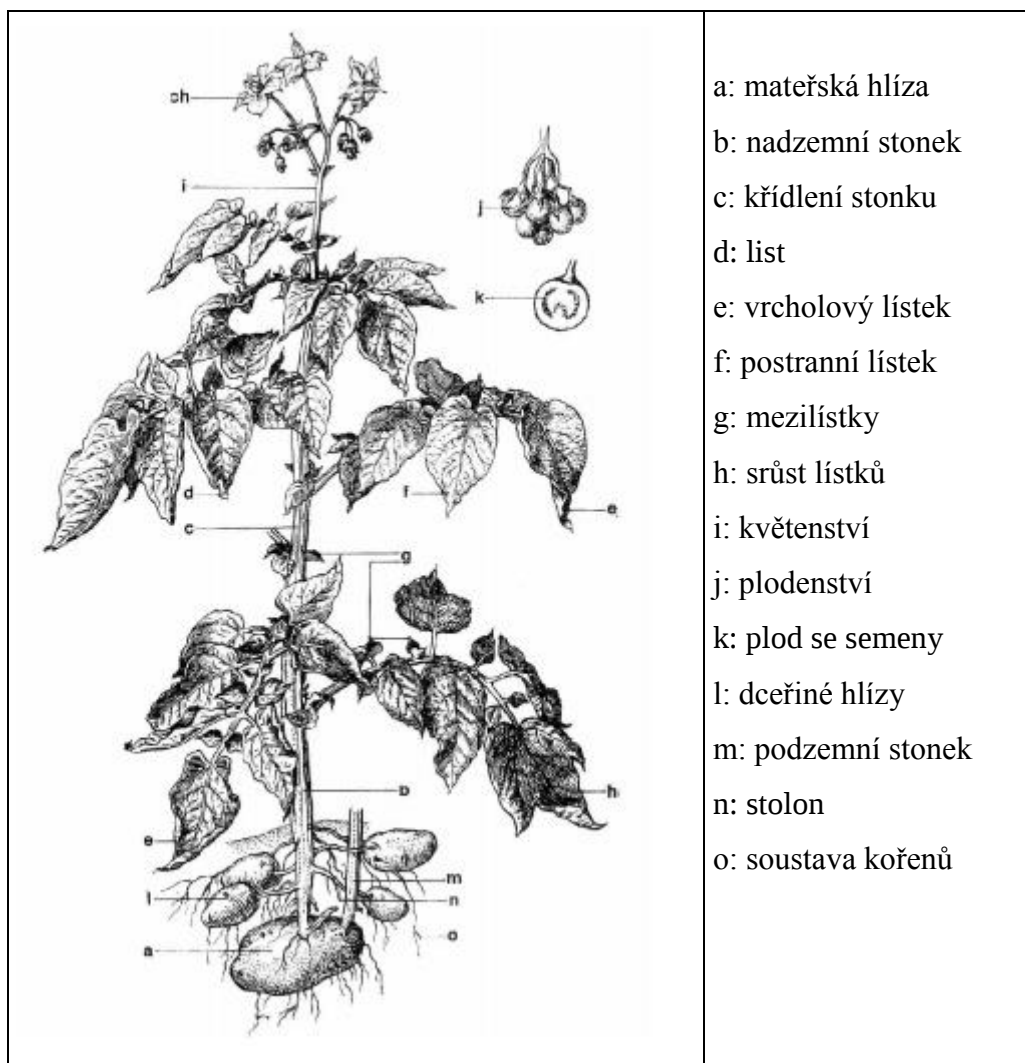
Woolfe, J.A. 1987. *The Potato in the Human Diet*. Cambridge University Press. p. 242. ISBN: 0521326699.

Záruba, K.; Král, V.; Mestek, O.; Řezanka, P.; Setnička, V.; Urban, Š. a Volka, K. 2016. *Analytická chemie 1. a 2. díl. VŠCHT Praha*. 224 s. a 221 s. ISBN: 9788070809501 a 9788070809518.

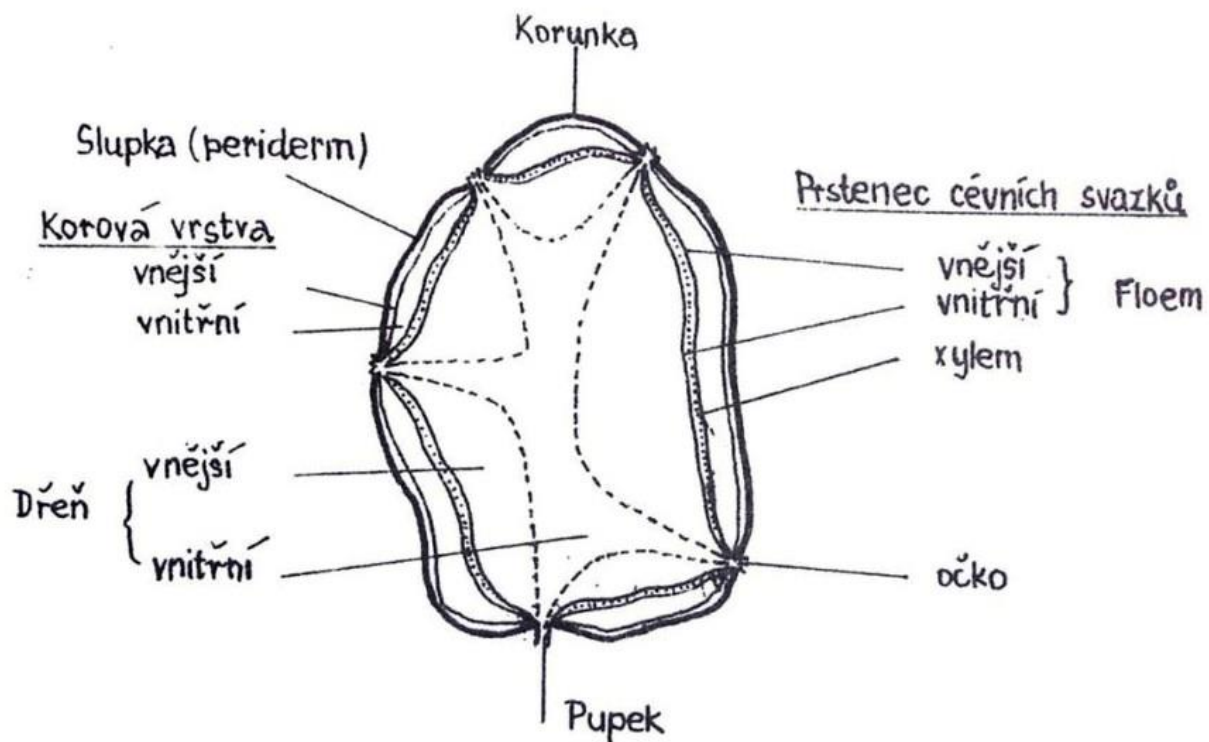
Zrůst, J. 2004. *Glykoalkaloidy u brambor a ostatních komodit*. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Praha. 54 s.

9. Přílohy

Příloha 1: Obrázky

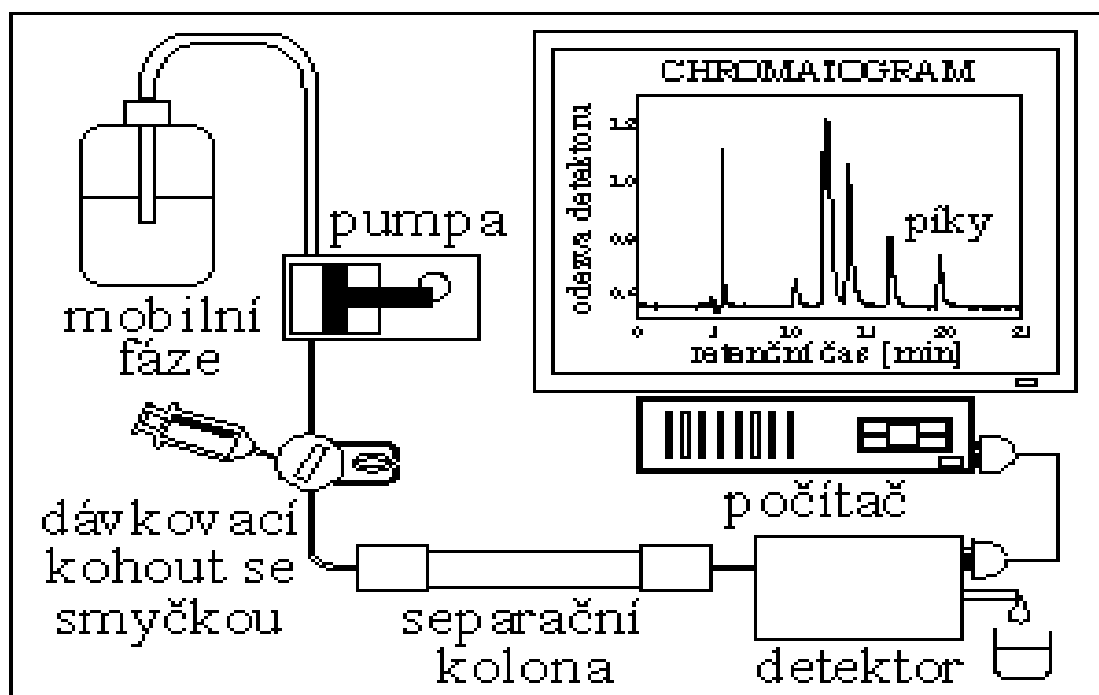


Obrázek 1: Trs bramboru se svými orgány (Benda a kol., 2000)



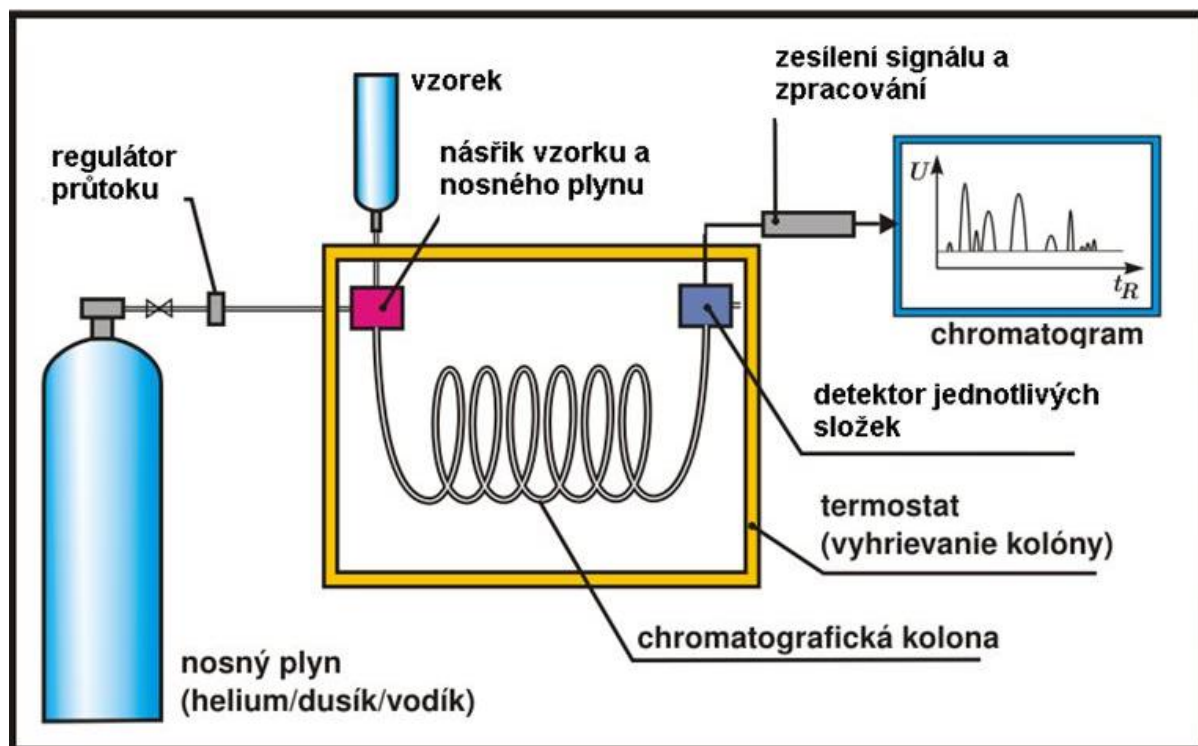
Obrázek 2: Schématický průřez bramborovou hlízou

Dostupné z <http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=6888&typ=html>.



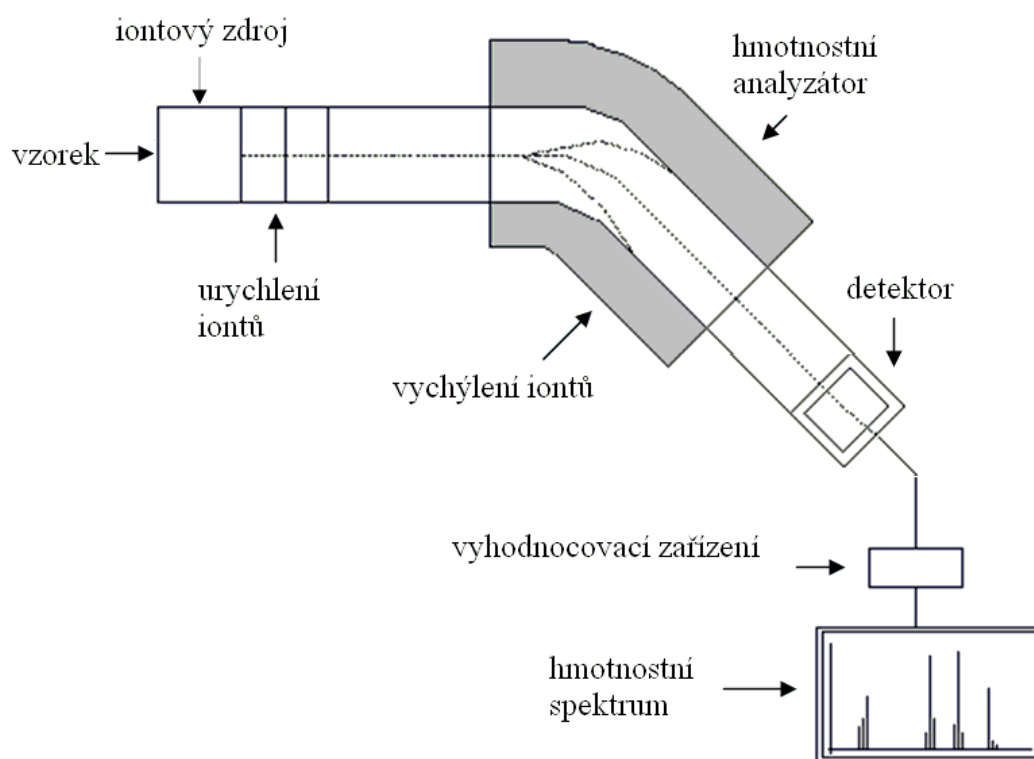
Obrázek 3: Schéma kapalinové chromatografie

Dostupné z <<https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>>.

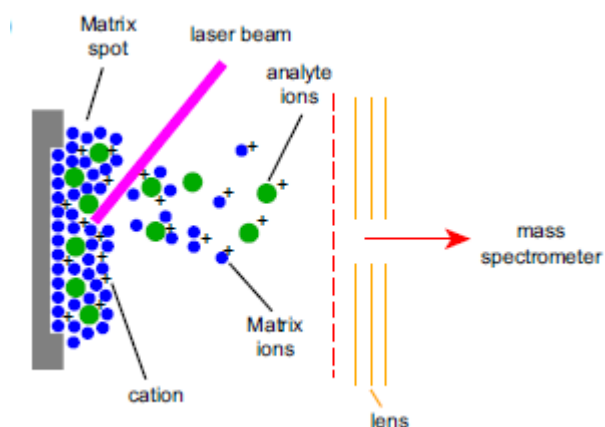


Obrázek 4: Schéma plynové chromatografie

Dostupné z <<http://slideplayer.cz/slide/3648503/>>.

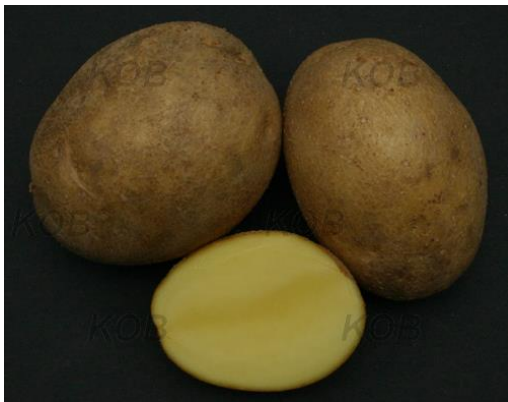


Obrázek 5: Schéma hmotnostního spektrometru (Dobšíková a kol., 2012)



Obrázek 6: Princip ionizační metody MALDI, zd. 39

Dostupné z <<https://www.slideshare.net/aksharanaidu967/maldi-37542167>>.



Obrázek 7: Hlízy odrůdy brambor Salome, 115

Dostupné z <<http://www.katalogbrambor.cz/katalog/detail/203>>.



Obrázek 8: Hlízy odrůdy brambor Bohemia, 114, 102

Dostupné z <www.sadbovezemiaky.sk/cz/vyber-brambor/item/165-zemiaky-bohemia>, <<http://www.vesa-velhartice.cz/cz/bohemia.htm>>.



Obrázek 9: Hlízy odrůdy brambor Dali, 105, 116

Dostupné z <<http://www.prodejnazahradkar.cz/SadbBram.php>>, <<http://www.agrahb.cz/rane.php>>.



Obrázek 10: Hlízy odrůdy brambor Valfi, 117, 118

Dostupné z <<http://www.vubhb.cz/cs/clanky/brambory/valfi-varny-typ-bc>>,
<<http://www.katalogbrambor.cz/katalog/detail/154>>.



Obrázek 11: Hlízy odrůdy brambor Violette, 108, 119

Dostupné z <<https://www.kartoffel-mueller.de/Exotische-Sorten/Violetta.html>>,
<http://www.garden-shopping.de/shop/artikel_206468.html>.



Obrázek 12: Hlízy odrůdy brambor Vitelotte, 109

Dostupné z <<http://www.farmpirate.com/cs/varieties/brambor-vitelotte>>.



Obrázek 13: Hlízy odrůdy brambor Highland Burgundy Red, 122,112

Dostupné z <http://www.garden-shopping.de/shop/artikel_100004.html>,

<<https://www.kartoffel-mueller.de/Exotische-Sorten/Highland-Burgundy-Red.html>>.



Obrázek 14: Hlízy odrůdy brambor Herbie 26, 121.

Dostupné z <<http://tomaten.bplaced.net/Kartoffelfotos/>>.



Obrázek 15: Hlízy odrůdy brambor Red Emmalie, 120, 110

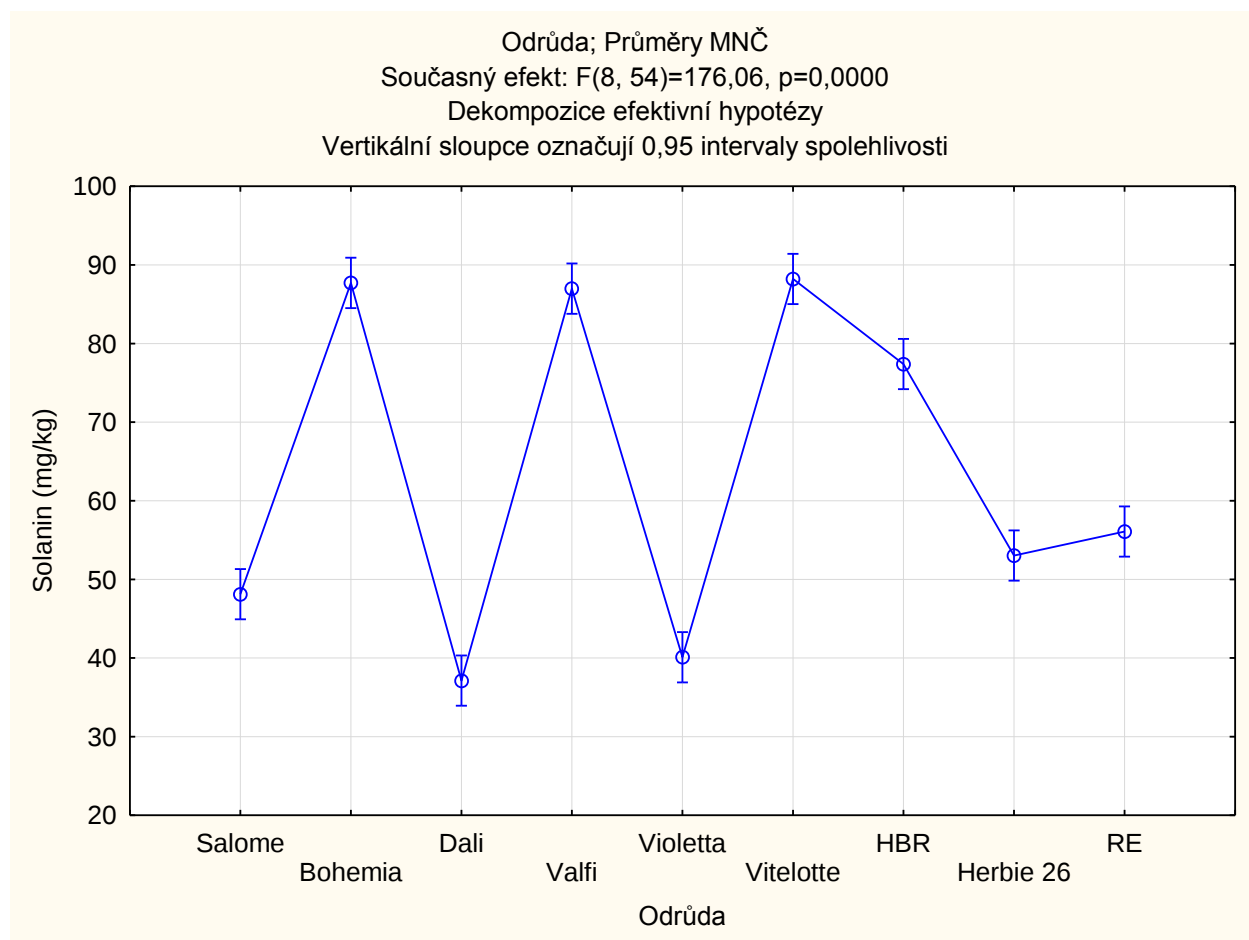
Dostupné z <<https://www.erlesene-kartoffeln.de/produkt/rote-emma-vf-aus-franken/893>,

<<http://www.kartoffelvielfalt.de/onlineshop/produkte.php?show=detail&cat=1&subcat=&rt=75>>.

Příloha 2: Statistické vyhodnocení

Tabulka I

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro Solanin (mg/kg) (Tabulka1) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně (volnosti)	PČ	F	p
Abs. člen	330350,3	1	330350,3	1865,051	0,000000
Odrůda	32261,0	8	4032,6	22,767	0,000000
Úprava	41775,9	2	20888,0	117,927	0,000000
Chyba	12398,9	70	177,1		



Obrázek 1

Tabulka II

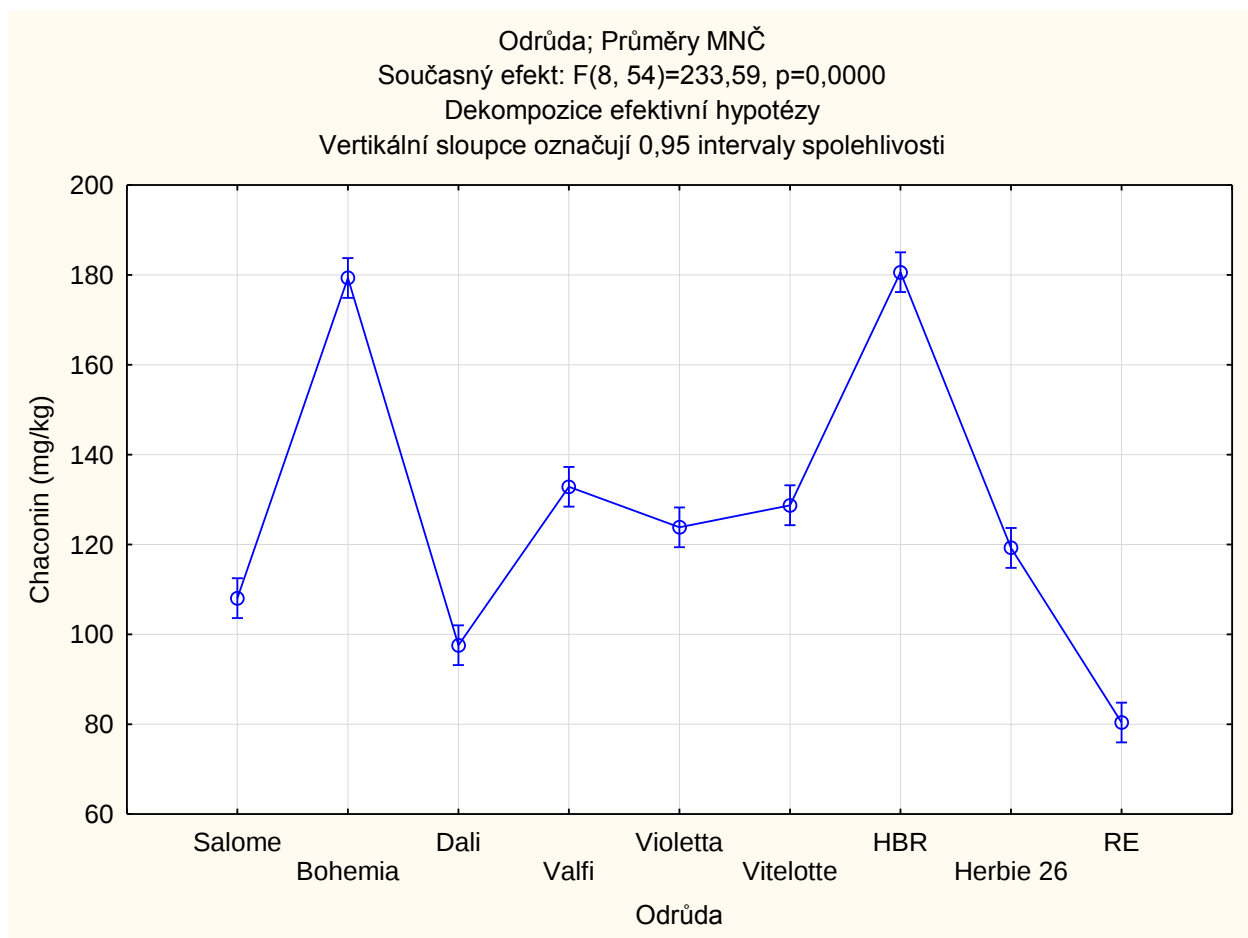
Tukeyův HSD test; proměnná Solanin (mg/kg) (Tabulka1) Homogenní skupiny, alfa = ,05000 Chyba: meziskup. PČ = 177,13, sv = 70,000				
Č. buňky	Odrůda	Solanin (mg/kg) (Průměr)	1	2
3	Dali	37,12889	****	
5	Violetta	40,09889	****	
1	Salome	48,11556	****	
8	Herbie 26	53,03111	****	
9	RE	56,08778	****	
7	HBR	77,38556		****
4	Valfi	86,98333		****
2	Bohemia	87,71333		****
6	Vitelotte	88,21667		****

Tabulka III

Tukeyův HSD test; proměnná Solanin (mg/kg) (Tabulka1) Homogenní skupiny, alfa = ,05000 Chyba: meziskup. PČ = 177,13, sv = 70,000				
Č. buňky	Úprava	Solanin (mg/kg) (Průměr)	1	2
2	vařené	44,37333	****	
3	pečené	51,49889	****	
1	syrové	95,71481		****

Tabulka IV

Jednorozměrné testy významnosti pro Chaconin (mg/kg) (Tabulka1) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy					
Efekt	SČ	Stupně (volnosti)	PČ	F	p
Abs. člen	1323914	1	1323914	5018,264	0,00
Odrůda	82012	8	10252	38,858	0,00
Úprava	88182	2	44091	167,125	0,00
Chyba	18467	70	264		



Obrázek 2

Tabulka V

Tukeyův HSD test; proměnná Chaconin (mg/kg) (Tabulka1) Homogenní skupiny, alfa = ,05000 Chyba: meziskup. PČ = 263,82, sv = 70,000							
Č. buňky	Odrůda	Chaconin (mg/kg) (Průměr)	1	2	3	4	5
9	RE	80,3733				****	
3	Dali	97,5856			****	****	
1	Salome	108,0511	****		****		
8	Herbie 26	119,2456	****	****	****		
5	Violetta	123,8267	****	****			
6	Vitelotte	128,7378	****	****			
4	Valfi	132,8478		****			
2	Bohemia	179,3356					****
7	HBR	180,6111					****

Tabulka VI

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná Chaconin (mg/kg) (Tabulka1) Homogenní skupiny, alfa = ,05000 Chyba: meziskup. PČ = 263,82, sv = 70,000				
	Úprava	Chaconin (mg/kg) (Průměr)	1	2	3
2	vařené	96,5756	****		
3	pečené	113,4878		****	
1	syrové	173,4748			****

Tabulka VII

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro Solanin (mg/kg) (Tabulka1) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně (volnosti)	PČ	F	p
Abs. člen	330350,3	1	330350,3	599,8547	0,000000
Úprava	41775,9	2	20888,0	37,9287	0,000000
Barva dužniny	2805,4	2	1402,7	2,5470	0,084982
Chyba	41854,5	76	550,7		

Tabulka VIII

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná Solanin (mg/kg) (Tabulka1) Homogenní skupiny, alfa = ,05000 Chyba: meziskup. PČ = 550,72, sv = 76,000		
	Barva dužniny	Solanin (mg/kg) (Průměr)	1
1	žlutá	57,65259	****
3	červená	62,16815	****
2	fialová	71,76630	****

Tabulka IX

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná Solanin (mg/kg) (Tabulka1) Homogenní skupiny, alfa = ,05000 Chyba: meziskup. PČ = 550,72, sv = 76,000			
	Úprava	Solanin (mg/kg) (Průměr)	1	2
2	vařené	44,37333	****	
3	pečené	51,49889	****	
1	syrové	95,71481		****

Tabulka X

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro Chaconin (mg/kg) (Tabulka1) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně (volnosti)	PČ	F	p
Abs. člen	1323914	1	1323914	1001,868	0,000000
Úprava	88182	2	44091	33,366	0,000000
Barva dužniny	50	2	25	0,019	0,981435
Chyba	100430	76	1321		

Tabulka XI

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná Chaconin (mg/kg) (Tabulka1) Homogenní skupiny, alfa = ,05000 Chyba: meziskup. PČ = 1321,4, sv = 76,000		
	Barva dužniny	Chaconin (mg/kg) (Průměr)	1
3	červená	126,7433	****
1	žlutá	128,3241	****
2	fialová	128,4707	****

Tabulka XII

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná Chaconin (mg/kg) (Tabulka1) Homogenní skupiny, alfa = ,05000 Chyba: meziskup. PČ = 1321,4, sv = 76,000			
	Úprava	Chaconin (mg/kg) (Průměr)	1	2
	2 vařené	96,5756	****	
	3 pečené	113,4878	****	
1	syrové	173,4748		****