



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Studies

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

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zdravotně sociální fakulta  
Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

# Biologicky aktivní látky v čerstvých jedlých výhoncích

Vypracovala: Alena Pošustová

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

České Budějovice 2016

## Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá stanovením obsahu vybraných fenolických látek v čerstvých jedlých výhoncích při různém způsobu pěstování. Pro tuto bakalářskou práci byly vybrány tyto druhy jedlých klíčků z následujících botanických druhů: čočka jedlá (*Lens culinaris* Medik.), vigna zlatá (*Vigna radiata* (L.) Wilezek), pohanka obecná (*Fagopyrum esculentum* Moench), cizrna beraní (*Cicer arietinum* L.), sója luštinatá (*Glycine max* (L.) Merrill).

Jedlé výhonky mimo jiné obsahují i fenolické látky. Mezi tyto sloučeniny se řadí i rozsáhlá skupina flavonoidů. Flavonoidy jsou bezprostředně významné svou biologickou aktivitou a zejména pak pozitivními účinky na organismus člověka. V posledních letech se tak díky těmto skutečnostem zvyšuje zájem o jejich výzkum.

Vybrané jedlé výhonky byly vypěstovány přímo v laboratoři a to za různých světelných podmínek. Obsahy fenolických látek byly poté stanoveny metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV VIS detektorem a MS detektorem.

Stanovení bylo zaměřeno na nejčastěji se vyskytující fenolické aglykony: kvercetin, kemferol, luteolin, apigenin a myricetin. V čočce jedlé byl stanoven luteolin (123 mg/kg sušiny) a kemferol (249 mg/kg sušiny). Ve vigne zlaté byly identifikovány polyfenolické sloučeniny vitexin a isovitexin. V pohance obecné byl stanoven kvercetin (156 mg/kg sušiny) a v cizrně beraní byl identifikován kemferol (8 mg/kg sušiny). V sóji luštinaté byly identifikovány polyfenolické sloučeniny daidzin, daidzein, genistin a genistein.

Z výsledků bylo zjištěno, že větší obsahy fenolických sloučenin se nachází u rostlin pěstovaných na světle. Domnívám se, že je to díky UV záření, které má vliv na obsah fenolických sloučenin.

**Klíčová slova:** fenolické látky, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, *Lens culinaris* Medik., *Vigna radiata* (L.) Wilezek, *Fagopyrum esculentum* Moench, *Cicer arietinum* L., *Glycine max* (L.) Merrill

## Abstract

The bachelor thesis deals with the content of selected phenolic substances in fresh edible sprouts during various methods of cultivation. There were selected five kinds edible sprouts from the following species: Lentil *culinaris* (*Lens culinaris*, Medik.), Vigna (*Vigna radiata* (L.) Wilezek), Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench), Chickpea (*Cicer arietinum* L.), Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill).

Edible sprouts among other things contain also phenolic substances. The extensive group of flavonoids is also ranges among these compounds flavonoids are significant in consequences of its biological activity and particularly positive impacts on human organism. Thanks to these facts there is increase of the interests for their further research over recent years.

Selected edible sprouts were grown directly in laboratory during various lighting conditions. The contents of phenolic substances were determined by High Performance Liquid Chromatography method with UV VIS detector and MS detector.

The assessment was focused on the most often occurred phenolic aglycons: quercetin, kaempferol, luteolin, apigenin and myricetin. In *Lentil culinaris* there was determined luteolin (123 mg/kg of dry mass) and kaempferol (249 mg/kg of dry mass). In *Vigna* there were identified polyphenolic substances vitexin and isovitexin. In buckwheat there was determined quercetin (156 mg/kg of dry mass) and in chickpea kaempferol (8 mg/kg of dry mass). In soybean there were found polyphenolic substances daidzin, daidzein, genistin and genistein.

The higher contents of phenolic substances were found in all samples from by plants grown on light. It is probably due the UV lighting, which has the impact on the content of substances.

**Key words:** phenolic substances, High Performance Liquid Chromatography, *Lentil culinaris* Medik., *Vigna radiata* (L.), Wilezek, *Fagopyrum esculentum* Moench, *Cicer arietinum* L., *Glycine max* (L.) Merrill

## **Prohlášení**

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2016

.....

Alena Pošustová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala paní doc. Ing. Evě Dadákové, Ph.D., vedoucí mé bakalářské práce, za cenné rady, odborné vedení a postřehy při zpracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Tamaře Pelikánové za pomoc v laboratoři a RNDr. Naděždě Vrchotové, CSc. za pomoc při identifikaci polyfenolických sloučenin.

## Obsah

1	Úvod .....	10
2	Cíle práce .....	11
3	Literární část .....	12
3.1	Rostlinné fenolické látky .....	12
3.1.1	Rozdělení rostlinných fenolů .....	13
3.1.2	Rozšířené rostlinné fenolické látky .....	13
3.1.3	Fenolické kyseliny .....	13
3.1.4	Flavonoidy .....	15
3.1.4.1	Klasifikace flavonoidů .....	16
3.1.4.1.1	Katechiny .....	16
3.1.4.1.2	Leukoanthokyanidiny .....	16
3.1.4.1.3	Flavanony .....	17
3.1.4.1.4	Flavanonoly .....	17
3.1.4.1.5	Flavony .....	17
3.1.4.1.6	Flavonoly .....	18
3.1.4.1.7	Anthokyaniny .....	18
3.1.4.1.8	Chalkony .....	19
3.1.4.1.9	Dihydrochalkony .....	19
3.1.4.1.10	Aurony .....	19
3.1.4.1.11	Isoflavony .....	19
3.1.4.1.12	Neoflavony .....	20
3.1.4.2	Biologické účinky flavonoidů .....	20
3.1.5	Příjem polyfenolů z potravy .....	20
3.2	Luskoviny .....	21
3.3	Luštěniny .....	22
3.4	Vybrané druhy jedlých výhonků .....	22
3.4.1	Čočka jedlá ( <i>Lens culinaris</i> Medik.) .....	23

3.4.2	Cizrna beraní ( <i>Cicer arietinum</i> L.).....	25
3.4.3	Vigna zlatá ( <i>Vigna radiata</i> (L.) Wilezek) .....	26
3.4.4	Sója luštinatá ( <i>Glycine max</i> (L.) Merrill) .....	28
3.4.5	Pohanka obecná ( <i>Fagopyrum esculentum</i> Moench).....	31
3.5	Stanovení fenolických látek .....	32
3.6	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	33
3.6.1	Princip separace látek .....	34
3.6.2	Přístroje pro HPLC .....	35
3.6.2.1	Čerpadla pro HPLC.....	36
3.6.2.2	Dávkování vzorků .....	36
3.6.2.3	Kolony pro HPLC .....	37
3.6.2.4	Náplně a eluenty.....	37
3.6.2.5	Detektory.....	38
3.6.3	Kvalitativní analýza .....	38
3.6.4	Kvantitativní analýza .....	39
3.6.5	Využití HPLC v praxi .....	39
3.6.6	Chromatografie v dnešní době.....	39
4	Praktická část.....	41
4.1	Materiál .....	41
4.2	Pěstování a odběr rostlinného materiálu .....	41
4.3	Úprava rostlinného materiálu.....	42
4.4	Chemikálie a standardy .....	43
4.5	Laboratorní sklo a přístroje .....	44
4.5.1	Metodika stanovení.....	45
4.5.1.1	Stanovení flavonoidních aglykonů v lyofilizovaném materiálu .....	45
4.5.1.2	Měření flavonoidních aglykonů .....	46
4.6	Použité programy .....	48
5	Výsledky a diskuze.....	50
5.1	Čočka jedlá.....	50
5.2	Vigna zlatá .....	52

5.3	Pohanka obecná.....	52
5.4	Cizrna beraní .....	54
5.5	Sója luštinatá .....	55
6	Závěr.....	57
7	Seznam informačních zdrojů .....	58
8	Přílohy .....	62
8.1	Seznam příloh.....	64



## **Seznam použitých zkratek**

HPLC – Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)

LC – Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)

MS – Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)

SPE – Extrakce pevným sorbentem (Solid-Phase Extraction)

LOQ – Mez stanovitelnosti (Limit of Quantification)

DAD – Detektor s diodovým polem (Diode Array Detector)

WHO – Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

LDL – Lipoproteiny s nízkou hustotou (Low-Density Lipoproteins)

var. – Varieta (Varietas)

FAO – Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organization)

ACE – Angiotensin konvertující enzym (Angiotensin Convert Enzyme)

UV – Ultrafialové spektrum (Ultraviolet)

VIS – Viditelné spektrum (Visible)

# 1 Úvod

Fenolické látky spadají do skupiny rostlinných sekundárních metabolitů. Jsou nám známy jak primární tak sekundární metabolity. Primární metabolity obstarávají základní životní funkce. Do této skupiny patří sacharidy, lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. Metabolity sekundární naopak vykonávají ochrannou funkci rostlin před zevními vlivy, jako je například ultrafialové záření, ochrana před různorodými patogeny či proti jiným nepříznivým podmínkám. Mezi tyto sekundární metabolity řadíme např. alkaloidy, fenoly, polyamidy či terpenoidy. Fenolické sloučeniny jsou hojně rozšířené a zastoupené v potravinách, proto jsou běžnou součástí lidské stravy. Příjem fenolických sloučenin působí pozitivně proti vzniku krevních sraženin a tím je tak snižováno riziko výskytu infarktu myokardu či mozkové mrtvice. Mezi nejznámější rostlinné polyfenoly patří flavonoidy, fenolové kyseliny, a lignany. <sup>(13,25)</sup>

Velmi významnou skupinou fenolických látek jsou flavonoidy, které mají pozitivní účinky na zdraví člověka. Jsou význačnou součástí lidské stravy (zelenina, ovoce, čaj, červené víno). Konzumace potravin obsahující vysoký podíl těchto flavonoidů může fungovat jako prevence při léčbě rakoviny a chrání před aterosklerózou. <sup>(13, 29, 30)</sup>

Pro tuto práci byla vybrána jako analytická metoda vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Tato metoda se pro stanovení flavonoidů a fenolických látek používá velmi často. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je metodou velmi citlivou, přesnou a s její pomocí můžeme analyzovat i vzorky malých koncentrací. <sup>(28, 30)</sup>

Prvotním cílem této bakalářské práce je získat souhrn informací o účincích flavonoidů na lidský organismus. Dále pak seznámit se s metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), jež se pro stanovení těchto fenolických látek používá velmi hojně. V neposlední řadě pak objevit rozdílné obsahy vybraných fenolických látek v jedlých výhoncích vypěstovaných na světle a ve tmě.

## 2 Cíle práce

Cíle této bakalářské práce jsou:

- Podrobná literární rešerše zaměřená na rostlinné polyfenoly, jejich výskyt v čerstvých rostlinných potravinách, jejich biologické účinky a možnosti jejich stanovení.
- Seznámení s metodikou stanovení vybraných fenolických sloučenin kapalinovou chromatografií.
- Stanovení obsahů vybraných fenolických sloučenin ve vybraných čerstvých klíčcích připravených v laboratoři, zpracování výsledků.

## 3 Literární část

### 3.1 Rostlinné fenolické látky

Rostlinné fenoly vytváří velmi pestrou skupinu sloučenin, jež je z chemického pohledu velice heterogenní. Tvoří rozsáhlou a rozmanitou skupinu metabolitů sekundárních, které se nacházejí v lidské potravě. V množství případů se jedná o látky, které mají význam i v technologické praxi. V některých rostlinách se vyskytují ve vysokých koncentracích. <sup>(9, 10, 35)</sup>

Rozmanitá řada chemických struktur fenolických látek započíná jednoduchými molekulami s jedním aromatickým kruhem a končí u značně komplexních polymerů, kterými jsou například třísloviny či lignin. Primárním strukturálním znakem fenolických látek je výskyt alespoň jednoho aromatického kruhu substituovaného nejméně jednou kyselou hydroxylovou skupinou, jenž je volná či utváří dalšími vazbami (etherické, esterové, glykosidické) další sloučeniny. Tento rys je však k definici fenolických látek nedostatečný, neboť by tak do této skupiny musely být též řazeny některé alkaloidy (morfin) a terpeny (thymol), tedy sekundární metabolity, které patří k jiným chemickým skupinám. K vymezení skupiny fenolických látek se tedy dále využívá kritéria jejich biosyntézy. <sup>(10)</sup>

Rostlinné fenolické látky se vytváří jednou ze dvou klíčových drah, které vedou k tvorbě aromatických sloučenin a to běžně přes shikimáty či méně často polyacetátovou biosyntézou. <sup>(10)</sup>

Mnohé z fenolických látek mají výrazné biologické účinky, a proto jsou řazeny mezi obranné látky rostlin tzv. fytoalexiny, přírodní antioxidanty či přirozené toxické složky potravin. Dále vykazují oxidační, redukční a chelatační vlastnosti. <sup>(16)</sup>

Nejzásadnější místo ve skupině rostlinných fenolických látek mají flavonoidní látky, vyznačující se molekulovým seskupením  $C_6 - C_3 - C_6$ , které je utvořeno dvěma aromatickými kruhy spojenými navzájem alifatickým řetězcem o třech uhlících. Pouze rostliny a mikroorganismy disponují schopností syntetizovat aromatické jádro, proto jsou v rostlinné říši všudypřítomné. Živočišné druhy jsou tak závislé na příjmu těchto

látek z potravy, popřípadě na symbióze s mikrobiální populací, která vede k produkci těchto metabolitů. <sup>(9, 10)</sup>

### **3.1.1 Rozdělení rostlinných fenolů**

- fenolické kyseliny a jejich deriváty
- deriváty kumarinu
- deriváty stilbenu
- třísloviny
- flavonoidy
- prenylované flavonoidy
- isoflavonoidy
- ostatní fenolické látky <sup>(11)</sup>

### **3.1.2 Rozšířené rostlinné fenolické látky**

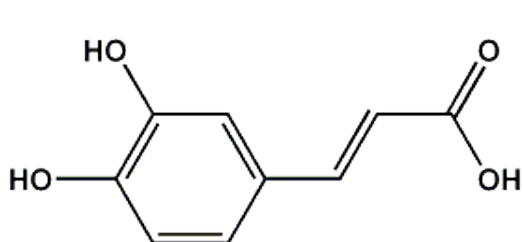
Nejrozšířenějšími rostlinnými polyfenoly bývají flavonoidy a fenolické kyseliny, které pokládáme za významné biologicky aktivní látky. Celkový příjem polyfenolů zajišťují flavonoidy, které se podílí asi dvěma třetinami, dále pak fenolické kyseliny, které obstarávají asi jednu třetinu a jiné polyfenoly tvoří jen malou část. <sup>(13, 14)</sup>

### **3.1.3 Fenolické kyseliny**

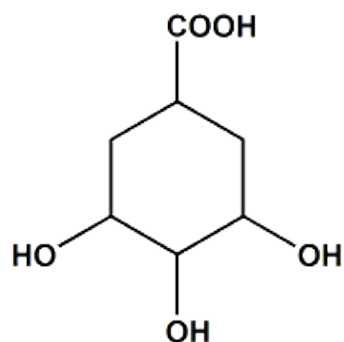
V rostlinách se nejčastěji vyskytují ve formě esterů. V takovéto formě se karboxylem váží na hydroxylové skupiny organických kyselin či sacharidů. Kyselina chlorogenová, která se ve vysokém množství vyskytuje v kávě, patří právě mezi nejběžnější fenolickou kyselinou. Konzumenti kávy tak přijímají v šálku kávy zhruba 50-150 mg právě této kyseliny. Nadměrná konzumace může proto vést k tomu, že člověk přijímá více fenolických kyselin než flavonoidů. Dále se tato kyselina může vyskytovat i v ovoci, bramborách či v jiných druzích zeleniny. Například kyselina skořicová se vyskytuje ve většině olejnatých semen a tvoří estery s cukry. Dalšími

zástupci fenolických kyselin je kyselina ferulová, která je součástí vlákniny, kyselina gallová a neméně významná kyselina kávová. Zástupci fenolických kyselin jsou uvedeni na obr. 1. <sup>(13, 24)</sup>

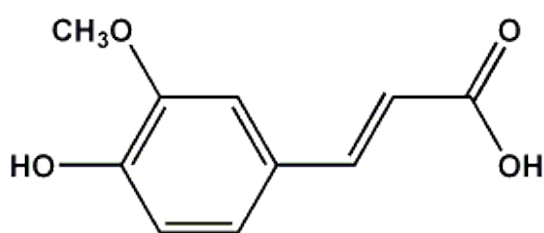
Obr. 1 Zástupci fenolických kyselin



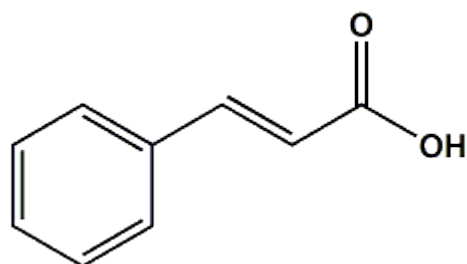
Kávová kyselina



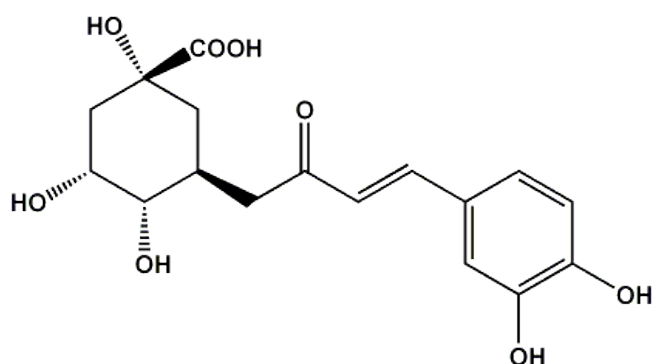
Gallová kyselina



Ferulová kyselina



Skořicová kyselina

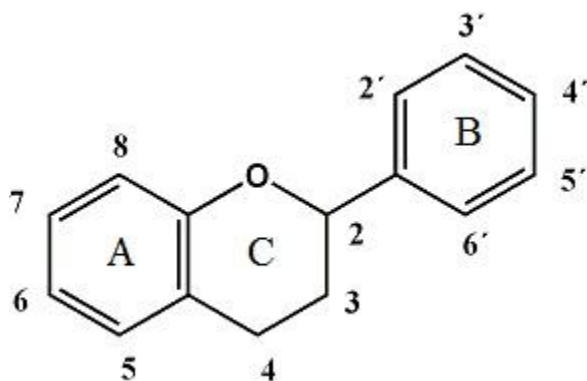


Chlorogenová kyselina

### 3.1.4 Flavonoidy

Flavonoidy jsou známy jako přírodní barviva rostlinného původu. Některé flavonoidní látky jsou významné pro svou chuť (hořké a trpké látky či jejich prekurzory) či pro své biologické účinky. Právě tyto látky jsou výjimečné tím, že udávají barvu květům, plodům a v některých případech i listům. Flavonoidy jsou chemické sloučeniny, které spadají do rozsáhlé skupiny rostlinných fenolů. V jejich molekule se nachází dva benzenové kruhy (kruh A a C), které spojuje tříuhlíkatý řetězec. Takováto struktura je označována jako uspořádání C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Všechny tři kruhy bývají substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami, přičemž se jednotlivé deriváty liší pouze stupněm substituce a oxidace. <sup>(10,13, 15, 16)</sup>

Flavonoidy se v rostlinách vyskytují převážně jako β-glykosidy a sacharidovou složku vytváří nejčastěji glukóza, rhamnóza, galaktóza, kyselina glukuronová či jiný sacharid. Jsou nacházeny v potravě rostlinného původu. V dnešní době se odhaduje množství flavonoidních látek okolo 5000 a stále se v různých rostlinách objevují nové sloučeniny, proto toto číslo neustále roste. Základní struktura těchto látek je znázorněna na obr. 2. <sup>(10, 13, 16)</sup>



Obr. 2 Základní struktura flavonoidů

### 3.1.4.1 Klasifikace flavonoidů

Podle stupně oxidace C3 řetězce rozeznáváme základní strukturní třídy flavonoidů:

- katechiny
- leukoanthokyanidiny
- flavanony
- flavanonoly
- flavony
- flavonoly
- anthokyany <sup>(16)</sup>

Strukturně příbuzné třídy:

- chalkony
- dihydrochalkony
- aurony
- isoflavony
- neoflavony <sup>(16)</sup>

#### 3.1.4.1.1 Katechiny

Jsou to deriváty flavanu, které se vyskytují v rostlinných materiálech. Pokud nebyly katechiny v rostlinném materiálu prokázány, lze předpokládat, že jsou přítomny alespoň v polymerních formách. Tuto třídu flavonoidů přijímáme zejména v čokoládě, ovoci a čaji. <sup>(9, 13)</sup>

#### 3.1.4.1.2 Leukoanthokyanidiny

Leukoanthokyanidiny jsou opět deriváty flavanu, které se v přírodě vyskytují i glykosidicky vázané (leukoanthokyany). Vyskytují se především v monomerní formě, přičemž jsou v přírodě velmi rozšířené. V přirozených materiálech se vyskytují společně s katechiny. <sup>(9, 13)</sup>



#### 3.1.4.1.3 Flavanony

Jejich přítomnost je prokázána v citrusovém ovoci. Flavanony či jejich glykosidy nejsou příliš pozoruhodné, poněvadž se v rostlinném materiálu vyskytují v malých koncentracích. Denní příjem těchto polyfenolů tvoří maximálně několik desítek miligramů. <sup>(9, 13)</sup>

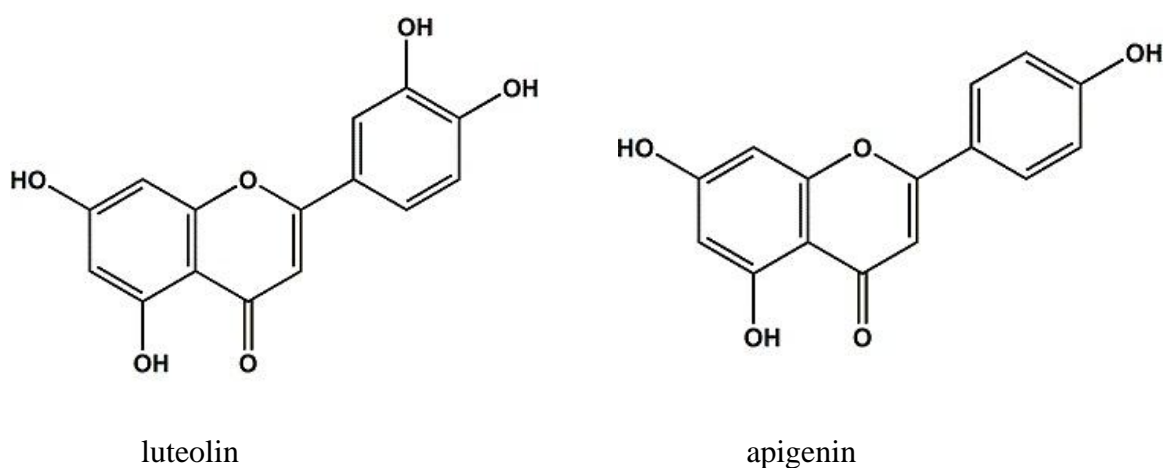
#### 3.1.4.1.4 Flavanonoly

Jejich rozšíření v rostlinném materiálu není tak zřetelné jako u ostatních flavonoidů, proto nejsou tolik významné. <sup>(9)</sup>

#### 3.1.4.1.5 Flavony

Patří mezi nejrozšířenější žlutá barviva rostlin. V rostlinné říši se volně vyskytují pouze zřídka, daleko rozšířenější jsou jejich glykosidy. Vyšší koncentrace těchto látek bývají v povrchových vrstvách, zatímco ke středu se jejich koncentrace snižuje. Příkladem mohou být jablka. Jejich slupky obsahují 0,47-18,8 mg flavonolů na gram materiálu, ovšem v dřeni je jejich obsah téměř nulový. Zástupci flavonů uvedeni na obr. 3. <sup>(9, 10, 13)</sup>

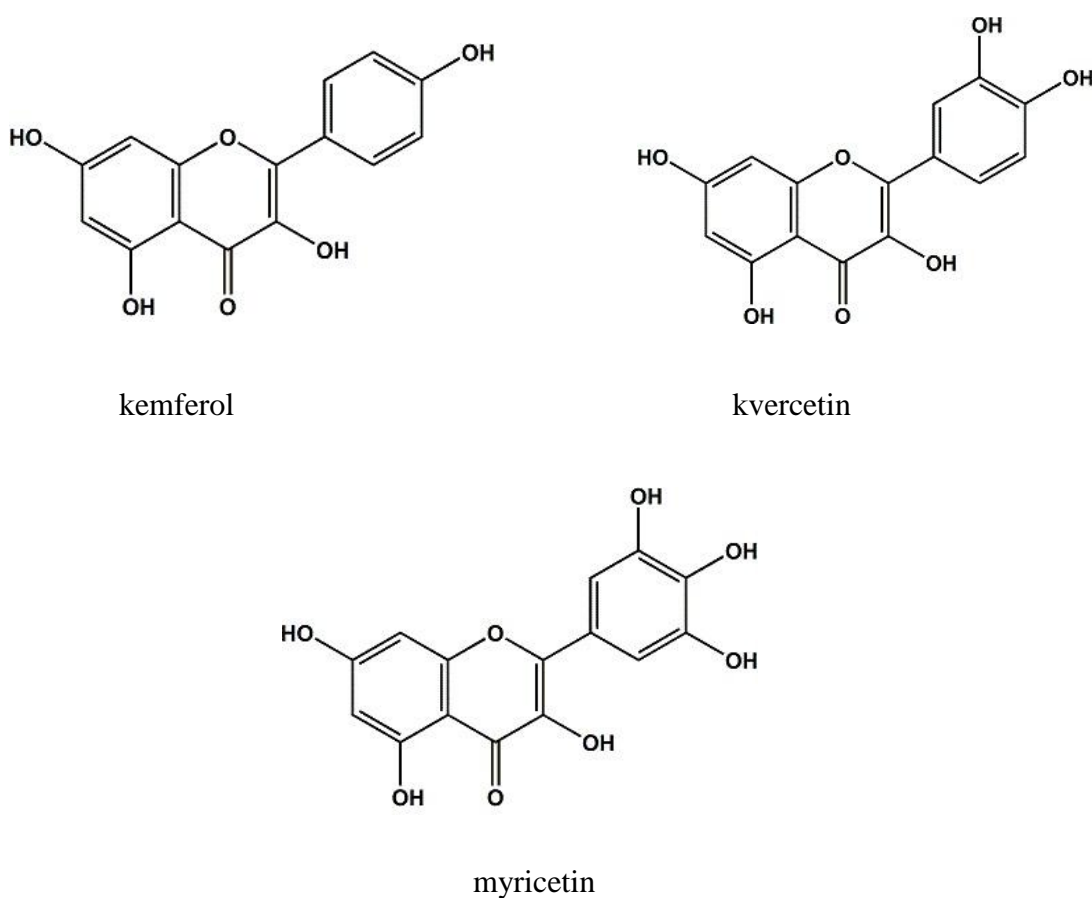
Obr. 3 Zástupci flavonů



### 3.1.4.1.6 Flavonoly

Jedná se o přirozená žlutá barviva. Vyskytují se hlavně v ovoci, zelenině (cibule) či v nápojích (čaj), avšak jejich denní příjem nečiní více jak 20 mg. Mezi neodmyslitelné zástupce flavonolů patří kvercetin, kemferol a myricetin. Kvercetin a jeho deriváty (rutin aj.) patří k nejvíce bádaným flavonoidům. Zástupci flavonolů uvedeni na obr. 4. (9, 10, 13, 32)

Obr. 4 Zástupci flavonolů



### 3.1.4.1.7 Anthokyaniny

Těž označovány jako anthokyaniny jsou nejrozsáhlejší skupinou ve vodě rozpustných rostlinných barviv. Anthokyaniny jsou glykosidy anthokyanidinů. Řadí se mezi jedny z nejrozšířenějších polyfenolických látek v přírodě. Doposud bylo

v přírodních zdrojích objeveno asi 300 různých anthokyanů. Nemalé množství druhů ovoce, zeleniny či květin vděčí právě jim za svoji barevnou rozmanitost (oranžová, fialová, červená a modrá barva). Jsou například barevnými pigmenty ovoce či červeného vína. Obsah anthokyanů v rostlinném materiálu se postupně mění a to jak z hlediska kvantitativního, tak i kvalitativního. Toto je hlavní příčinou barevné různorodosti rostlinných tkání. Jejich denní příjem je velmi odlišný, ale může dosahovat až 200 mg. <sup>(9, 11, 13, 16)</sup>

#### 3.1.4.1.8 Chalkony

U velkého množství rostlin mají význam jako květní barviva. V rostlinách jsou však zastoupeny v minimálních koncentracích. <sup>(10, 16)</sup>

#### 3.1.4.1.9 Dihydrochalkony

Nejnámějším přírodním dihydrochalkonem je florentin a jeho glykosidy, které vyvolávají hořkou chuť. Vyskytují se v jablkách a jablečných výrobcích. <sup>(9)</sup>

#### 3.1.4.1.10 Aurony

V rostlinné říši jsou přítomna jako květní barviva. V potravinářských materiálech však už tak významnými nejsou. <sup>(10, 16)</sup>

#### 3.1.4.1.11 Isoflavony

Jejich vyšší koncentrace byla prokázána pouze u rostlin z čeledi bobovité (Fabaceae). Vyskytují se především v sóji či ve výrobcích ze sójových bobů. Mají estrogenní, ale i toxické účinky a řadíme je mezi fytoestrogeny. Jejich příjem odpovídá přibližně 30-40 mg/den. <sup>(13, 16)</sup>

#### 3.1.4.1.12 Neoflavony

Typickým zástupcem je dalbergin. Vyskytují se u stromů rodu *Dalbergia* (bobovité, Fabaceae), které rostou v teplejších oblastech Asie a Ameriky. <sup>(16)</sup>

#### 3.1.4.2 Biologické účinky flavonoidů

Flavonoidy disponují protizánětlivými, protisklerotickými a protinádorovými účinky. Mnoho z nich se nachází v červeném víně, zeleném čaji či černém čaji. Právě ve zmíněném červeném víně se nachází flavonoidy resveratrol a kvercetin, které chrání organismus před aterosklerózou. Podle epidemiologických studií, flavonoidy obsažené v zelenině a ovoci vykazují ochranný účinek proti rakovině, mrtvici a ischemické chorobě srdeční. Neméně podstatnou vlastností je i to, že flavonoidy chelatují železo a tím tak mohou tlumit oxidační stres tkání. <sup>(19, 29, 31)</sup>

#### 3.1.5 Příjem polyfenolů z potravy

Mezi zdroje těchto látek patří například ovoce, zelenina, čaj, vláknina, chmel, víno, aromatické či léčivé rostliny. Nejvýznamnější biologické účinky jsou účinky antioxidační, protirakovinotvorné, antimikrobiální a protizánětlivé. Zvýšená pravidelná konzumace ovoce, zeleniny či jiných potravin rostlinného původu je spojována s nižší incidencí tzv. civilizačních onemocnění. Jsou shromážděny důkazy o pozitivním účinku nejen nutričních, ale i mimo nutričních faktorů této potravy (polyfenoly, flavonoidy aj.). Přesto však není rozumné preferovat pouze určitý druh potravy, který vykazuje vysoký obsah fenolických látek. Je spíše doporučována pravidelná konzumace širokého sortimentu rostlinné stravy. WHO vydala doporučení, podle kterého je vhodné spotřebovat denně 400 g ovoce a zeleniny na osobu. Takovéto množství odpovídá cca. 250 g zeleniny (3 porce zeleniny) a 150 g ovoce (2 porce ovoce). <sup>(12, 20)</sup>

## 3.2 Luskoviny

Řadí se mezi hospodářsky velmi významné jednoleté rostliny z čeledi bobovitých (Fabaceae). Doposud jsou však tyto plodiny nedoceněné. Do této čeledi dále patří jeteloviny (pícniny) a řada vytrvalých rostlin (akát aj.). Podle druhu jejich semena obsahují 19-40 % bílkovin, mnoho vitamínů a minerálních látek. Velký význam mají v racionální výživě lidí a ovšem také jako krmivo hospodářských zvířat. <sup>(6, 8)</sup>

Luskoviny lze pěstovat podle různých užitkových směrů a to na zrno, na lusky, zelenou hmotu, zelené hnojení aj. Svým rozsáhlým kořenovým systémem, který prostupuje do hlubších vrstev ornice, zlepšují stav a úrodnost půdy. Je tak prokázáno, že užitím luskovin jako předplodin v osevu dosáhneme vyššího výnosu obilovin. V symbióze s hlízkovými bakteriemi získají vzdušný dusík, který využívají jak pro svou potřebu, tak i pro obohacení půdy dusíkem. Tento dusík využívají plodiny pěstované po nich. <sup>(6, 8, 21)</sup>

Mnoho druhů luskovin má původ ve Středomoří (velkozrný hrách, čočka, vikev, bob, hrachor, lupina). V roce 1985 se nejhojněji pěstovala sója (52 mil ha.), dále fazol (26 mil ha.), hrách polní a zahradní (9,7 mil ha.), bob (9,2 mil ha.) a čočka (2,3 mil ha.). Za nejmladší luskovinu je považována vikev, která se jako kulturní plodina začala pěstovat až počátkem druhé poloviny 19. století. <sup>(8)</sup>

Luskoviny disponují vysokým obsahem vitamínů skupiny B (thiamin, riboflavin, niacin, pyridoxin, kyselina listová), který má v dnešní době při neustále se zvyšující neuropsychické zátěži organismu velký význam. Ceněnou složkou je také podíl minerálních látek (fosfor, vápník, hořčík, železo, zinek, měď, kobalt, molybden, jód, fluor, vanad) a vlákniny. Luskoviny ze všech zemědělských plodin obsahují největší podíl bílkovin. Obsah hrubých bílkovin u hrachu, fazolů, čočky odpovídá 22-25 %, u sóje 38 %. Bílkoviny živočišného původu (maso, vejce, mléko) však mají vyšší biologickou hodnotu než bílkoviny v luskovinách, což vyplývá z aminokyselinové skladby. V bílkovině luskovin postrádáme především metionin, leucin, tryptofan či valin. Při kombinaci bílkovin luskovin a bílkovin živočišného původu dosáhneme toho, že chybějící aminokyseliny dodáme organismu právě z bílkovin živočišných. Podle

FAO by měl být denní příjem bílkovin 80 g bílkovin, z toho alespoň polovina má být rostlinného původu. <sup>(6, 8)</sup>

Luskoviny jsou význačné i svým množstvím purinových látek, proto při onemocnění močových cest není doporučena jejich konzumace. Zahradní luskoviny mají rovněž vysoký podíl karotenu a vitamínu C, který ovšem v suchých luskovinách není. V současné době je velmi diskutovatelným tématem obsah dusičnanů v potravinách, tedy i v luskovinách, které jsou konzumovány čerstvé. Obsah dusičnanů by neměl přesáhnout hranici 15 mg na 100 g. Sója je známá mimo jiné i pro svůj obsah nenasycených mastných kyselin (kyselina linolová, lecitin, tokoferolů a karotenu). <sup>(8)</sup>

Luskoviny se pěstují velmi snadno a dobře, nepotřebují žádný prostor pro předpěstování. Pro domácí pěstování jsou vhodné hrách cukrový, hrách dřevný, fazol keříčkovitý (zelené lusky), fazol keříčkovitý (žluté lusky), fazol keříčkovitý (na semeno), fazol tyčkový, fazol šarlatový či bob zahradní. <sup>(21)</sup>

### **3.3 Luštěniny**

Jsou to semena některých luskovin, které mají hodnotu v potravinářství a krmivářství. Osobitými znaky luskovin je jejich vysoký obsah bílkovin (v semenech či v celé nadzemní části) a symbióza s hlízkovými bakteriemi, které umožňují biologickou fixaci dusíku. <sup>(6)</sup>

### **3.4 Vybrané druhy jedlých výhonků**

Vybrané druhy jedlých výhonků jsou volně dostupné v maloobchodních sítích v České republice.

### **Čeled': bobovité (Fabaceae)**

Tato čeled', dříve označována jako motýlokvěté (Leguminosae) je v našich geografických podmínkách doma. Zástupce nacházíme jak mezi užitkovými a okrasnými rostlinami tak i dřevinami. Vyznačují se střídavě složenými listy s palisty.

Květy mají složené a jejich květenství se podobá tvaru hroznu či hlávky. Plodem je lusk. Do této čeledi se řadí pínčiny, luštěniny a léčivky. Na zahradě je nacházíme nejčastěji v podobě klasického zeleného hrášku či zelené fazolky. Lusky cukrového hrachu se konzumují celé bez vyloupání, ovšem velké pnoucí fazole se mohou upravit jako zelené fazolky nebo se nechají dozrát a upraví se jako vydatné luštěniny. Bob zahradní se setkal s velkou pozorností v Anglii, u nás jsou pro jeho pěstování však také příznivé podmínky. <sup>(21, 22)</sup>

Typickým znakem bobovitých rostlin je jejich atypický metabolismus, díky kterému si potřebu dusíku zajišťují vlastními silami. Touto vlastností se liší od ostatních rostlin. Jev byl nejspíše způsoben nedostatkem dusíku v půdě. Na kořenech rostlin tak nalézáme typické hlízky, ve kterých se nachází hlízkové bakterie. Vázání dusíku ze vzduchu je tak silné, že vyplní nejen potřebu konkrétního druhu, ale jeho přebytek zůstane v půdě a využijí ho tak rostliny následně pěstovány. <sup>(21)</sup>

Nejběžnější zástupci jsou například: jetel luční (*Trifolium pretense*), čičorka pestrá (*Securigera varia*), janovec metlatý (*Cytisus scoparius*), kručinka barvířská (*Genista tinctoria*), hrachor luční (*Lathyrus pratensis*), podzemnice olejná (*Arachis hypogaea*), hrách setý (*Pisum sativum*) či fazol obecný (*Phaseolus vulgaris*). <sup>(22)</sup>

### **3.4.1 Čočka jedlá (*Lens culinaris* Medik.)**

Taxonomie:

Říše: rostliny

Oddělení: krytosemenné

Třída: vyšší dvouděložné rostliny

Řád: bobotvaré

Čeleď: bobovité

Rod: čočka

Druh: čočka jedlá (*Lens culinaris* Medik.)

České synonymum: čočka kuchyňská

Latinská synonyma: *Lens esculenta* Moench,

*Ervum lens* L.,

Cicer lens Willd,  
Lens adans <sup>(18)</sup>

Čočka vzhledem pro své kulinářské vlastnosti je nejhojněji vyhledávanou luskovinou u nás. Má vysoký obsah vitamínů skupiny B, minerálních látek a také její nutriční hodnota je vysoká. Její semena se od starodávna využívají jako plnohodnotná a oblíbená potravina, která je velmi dobře stravitelná. Po kuchyňské úpravě se semena používají ke konzervaci či k přímé konzumaci. Tento rod má u nás pouze jednoho zástupce a to čočku jedlou. Je to jednoletá rostlina se zpeřenými listy, bledě modrými květy, které jsou v chudých hroznech. Lusky jsou 1-2 semenné. Semena tohoto druhu jsou diskovitého tvaru, různé barvy obsahující škrob, tuky, cukry a dusíkaté látky. <sup>(4, 6, 8)</sup>

Čočka je pradávna kulturní plodina, které se daří v teplejších oblastech v lehčích hlinitějších půdách. Řadí se mezi dlouhodobní rostliny. Je suchovzdorná a teplomilná. Jsou nám známy odrůdy čočky jak velkosemenné (macrocarpa) tak i malosemenné (microcarpa). Při sklizni čočky dochází k jejímu značnému vydrolování, a proto je potřeba provádět její sklizeň těsně před tvrdou zralostí. <sup>(4)</sup>

V dnešní době dochází ke šlechtění čočky, které přispívá ke zvýšenému výnosu semen a tak i k zlepšení některých užitkových vlastností a ukazatelů nutriční hodnoty. <sup>(4)</sup>

Tento rod má dohromady pět druhů, přičemž čtyři z toho jsou plané (*L. lenticela*, *L. nigricans*, *L. kotschyana*, *L. orientalis*) a jeden druh kulturní (*L. esculenta*). Plané druhy tohoto rodu nejsou doposud dostatečně prozkoumané z ohledu možnosti využití jako genetických zdrojů ve šlechtění kulturní čočky. Pravlastí čočky jsou horské oblasti jihozápadní Asie. <sup>(4, 5)</sup>





Obr. 5 Čočka jedlá <sup>(38)</sup>

### 3.4.2 Cizrna beraní (*Cicer arietinum* L.)

Taxonomie:

Říše: rostliny

Oddělení: krytosemenné

Třída: vyšší dvouděložné rostliny

Řád: bobotvaré

Čeleď: bobovité

Rod: cizrna

Druh: cizrna beraní (*Cicer arietinum* L.) <sup>(18)</sup>

Česká synonyma: cizrník obecný

hrách římský

Cizrna patří mezi význačné jedlé luskoviny suchých oblastí jihozápadní Asie a Středozeří. Vyskytuje se hlavně v teplých a suchých oblastech světa, kde nahrazuje ostatní jedlé luskoviny, které jsou například napadeny škůdci. Pěstuje se převážně v zemích kolem Středozeřího moře. Často bývá označována jako hrách suchých zemí. Radí se mezi jednoleté byliny s nápadně nafouklými 1-3 semennými lusky. Semena jsou

kulovitého či hranatého tvaru různé barvy, která jsou velmi hodnotná a využívá se jich jako hrachu. Semen se využívá v potravinářském průmyslu (příprava konzerv, makaronů, salámů, cukrářských výrobků, kávových náhražek aj.) či v krmivářství. Jako pochutina je známa vařená cizrna, která se praží. <sup>(4)</sup>

Cizrna ke svému vypěstování vyžaduje teplo a světlo, avšak nároky na vláhu má malé. Hnojení dusíkem vyžaduje pouze u vyčerpaných půd, jinak se obejde bez něho. <sup>(6)</sup>



Obr. 6 Cizrna beraní <sup>(39)</sup>

### 3.4.3 Vigna zlatá (*Vigna radiata* (L.) Wilezek)

Taxonomie:

Říše: rostliny

Oddělení: krytosemenné

Třída: vyšší dvouděložné rostliny

Řád: bobotvaré

Čeleď: bobovité

Rod: vigna

Druh: vigna zlatá (*Vigna radiata* (L.) Wilezek)

Česká synonyma: vigna mungo

fazole mungo

Latinská synonyma: Phaseolus aureus Roxb.

Phaseolus radiatus

Vigna mungo var. Aureus <sup>(18)</sup>

Mungo fazole obsahují velmi pestrou škálu výživových látek, díky kterým dokážou chránit naše zdraví. Tato luskovina se běžně vyskytovala v Indii a to již někdy 1500 let před naším letopočtem. Postupem času se šířila po celém světě. Bylo prokázáno, že fazole mungo jsou vysoce efektivní při inhibici oxidace LDL cholesterolu, jež se řadí k nejsilnějším rizikovým faktorům budoucího kardiovaskulárního onemocnění. Oxidované částice se nakupí v endotelu a zahájí řadu zánětlivých událostí, které vedou k vytvoření pěnových buněk. Právě tento děj je klíčový faktor pro rozvoj aterosklerózy. <sup>(26)</sup>

Výzkumy na potkanech prokázaly, že podáváním extraktů z naklíčených mungo fazolí po dobu jednoho měsíce dochází k významnému snížení systolického krevního tlaku. Takovýto účinek je přisuzován obsaženým peptidům, které způsobují snížení aktivity angiotensin-konvertujícího enzymu (ACE), jenž může zvyšovat krevní tlak kaskádou vlivů. Také dlouhodobý nedostatek hořčičku může prohloubit kardiovaskulární onemocnění a právě fazole mungo jsou vynikajícím zdrojem hořčičku. O fazolích mungo tak můžeme říct, že jsou hodnotným zdrojem polysacharidů, avšak mají nízký glykemický index a hladinu cukru v krvi po jídle zvyšují jen pozvolna. Tento děj hraje v prospěch zejména diabetiků. <sup>(26)</sup>

Další studie prokázala, že konzumaci fazolí spolu s jídlem s vysokým glykemickým indexem zpomalíme celkovou reakci organismu po jídle a po pravidelném užívání dosáhneme i snížení hladiny plazmatického C peptidu. Tím tak docílíme měřitelného zlepšení v metabolismu glukózy a citlivosti na inzulín. <sup>(26)</sup>

Další význačné průzkumy prokázaly účinky těchto fazolí i v protinádorové aktivitě. Nejhojněji ovlivňují nádorová onemocnění tlustého střeva. Fazole mungo mají velké množství nerozpustné vlákniny, z které bakteriální fermentací v tlustém střevě vzniká kyselina máselná. Právě tato mastná kyselina je odpovědná za značnou ochranu proti rakovině tlustého střeva ochranou DNA. <sup>(26)</sup>

Pro unikátní rozložení bílkovin a vlákniny tyto luskoviny spadají do skupiny dietních potravin, které bojují proti obezitě. Mungo fazole je bohatá také na důležité vitamíny (kyselina listová) a prvky (železo, draslík). Kupříkladu v hrnku uvařených fazolí najdeme v průměru: 321,0 mcg kyseliny listové, 15,4 g vlákniny, 0,6 mg manganu, 97,0 mg hořčíku, 0,3 mg thiaminu, 2,8 mg železa, 0,3 mg mědi a 537,0 mg draslíku.<sup>(26)</sup>



Obr. 7 Vigna zlatá<sup>(40)</sup>

#### **3.4.4 Sója luštinatá (*Glycine max* (L.) Merrill)**

Taxonomie:

Říše: rostliny

Oddělení: krytosemenné

Třída: vyšší dvouděložné rostliny

Řád: bobotvaré

Čeleď: bobovité

Rod: sója

Druh: sója luštinatá (*Glycine max* (L.) Merrill)

Latinská synonyma: *Dolichos soja* L.

*Glycine gracilis* Skvortzov

*Glycine hispida* (Moench) Maxim.

Glycine soja

*Glycine ussuriensis* Regel & Maack

Soja hispida Moench

Soja max (L.) Piper <sup>(18)</sup>

Sója se z hospodářského hlediska, které zohledňuje využití produkce, řadí mezi olejninu. Avšak z hlediska biologického patří mezi luskoviny. Řadí se mezi tzv. strategické plodiny, protože ve světovém měřítku zaujímá největší osevní plochy. Do lidského podvědomí se dostala asi před 6-7 tisíci lety. Využívá se jak jako potravina tak i jako krmivo. Její semena ze všech pěstovaných luskovin mají nejvyšší podíl dusíkatých látek. Dále obsahují tuky, lecitin, minerální látky (draslík, hořčík, vápník, fosfor, měď, železo, mangan zinek, nikl, kobalt) a široké spektrum vitamínů (A, B, D, E, K). Sója je zdrojem plnohodnotných bílkovin. V neposlední řadě byl v sóje objeven i isoflavonový glykosid daidzin a genistin. <sup>(5, 6, 7)</sup>

Sója se využívá hlavně v tukovém průmyslu, jehož hlavním produktem je kvalitní sójový olej, ale i extrahované šroty. Její hlavní užití je proto ve výživě hospodářských zvířat v podobě bílkovinné komponenty do krmných směsí. Nejpodstatnější je však uplatnění sóji v racionální výživě lidí, přičemž se využívají celá semena v nejrůznějších úpravách (oříšky, mouky, saláty, šroty) či po technologické úpravě v potravinářském průmyslu, kdy tak získáváme mnoho výrobků (mouka, olej, krupice, mléko, šlehačka, sýry, sójové maso, tuky, polévkové koření, lecitin aj.). <sup>(6)</sup>

Tento rod má množství druhů, avšak většina z nich roste planě v teplých oblastech Asie, Afriky a Ameriky. Jako prvotní oblast vzniku je řazena jihovýchodní Asie (severní a východní Čína). Kulturní druh sóji patří mezi jednoleté rostliny. Květenstvím je hrozen bílé, růžové až fialové barvy. Plodem jsou 1-4 semenné lusky zbarveny do světle hnědé barvy. Semena mají obvykle kulatý, elipsovité či podlouhlý tvar. <sup>(5, 6, 8)</sup>

Šlechtění této plodiny je orientováno na zvýšení obsahu a kvality bílkovin a oleje, reakci na délku světelného dne, výšku rostlin, vyšší fixaci dusíku, odolnost proti chorobám, škůdcům, chladu, suchu aj. V podmínkách České republiky se však šlechtí

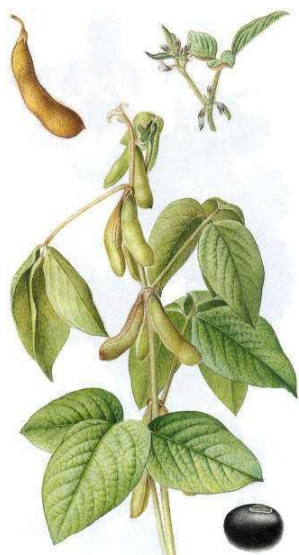
jen zřídka. Sója je plodinou krátkého dne. Reakce odlišných odrůd na změnu délky dne je různá a jsou proto rozděleny do 12 skupin od nejranějších, označených 000, 00, 0 až po nejpozdější kategorii I. – IX. U nás bezpečně dozrávají pouze odrůdy skupin 000 a 00. Na našem území se sója pěstuje pouze v teplejších oblastech. <sup>(6, 7, 8)</sup>

Sója se řadí mezi teplomilné rostliny a je náročná na vláhu. Pro naše životní podmínky jsou vhodné pouze ty odrůdy, které na délku dne výrazně nereagují. V období kvetení, nasazování lusků a tvorby semen má plodina nejvyšší nároky na světlo. <sup>(7)</sup>

Její účinky mají nesmírně příznivý vliv na krevtvorbu, nervovou soustavu či na látkovou výměnu. Prospěch je též znám při léčení cukrovky, krevních chorob, neurastenií, ateroskleróze či při chorobě z ozáření. <sup>(7)</sup>

Konzumace tzv. sójového mléka je vhodná pro alergiky. Naopak konzumace sójových bobů vede ke snížení hladiny krevního cholesterolu, chrání před tvorbou žlučových kamenů či snižují riziko vzniku rakoviny prsu. Jako dietní potravina, kterou sója bezesporu je, není stanovena její maximální dávka, avšak obsahuje velké množství bílkovin, čemuž je potřeba věnovat pozornost. <sup>(7)</sup>

Sója, která je určena pro klíčení, má podobu malých zelených kuliček. Na změkčování různých otoků, boulí či zatvrdlin je hodně využívána sójová mouka formou za tepla připravených kašovitých obkladů. <sup>(7)</sup>



Obr. 8 Sója luštinatá <sup>(41)</sup>

## Čeleď: Rdesnovité

Čeleď rdesnovité (Polygonaceae) obsahuje asi 1120 druhů rostlin, které jsou celosvětově rozšířeny. Vyskytují se především v mírném pásu, několik druhů pak v tropech. Do této čeledi patří byliny, keře i malé stromy - většina druhů roste planě. Mezi hospodářsky významné řadíme reveň (Rheum), která se využívá v medicíně či v potravinářství a pohanku (Fagopyrum), která se užívá k produkci nažek. <sup>(17)</sup>

### 3.4.5 Pohanka obecná (Fagopyrum esculentum Moench)

Taxonomie:

Říše: rostliny

Oddělení: krytosemenné

Třída: vyšší dvouděložné rostliny

Řád: hvozdíkotvaré

Čeleď: rdesnovité

Rod: pohanka

Druh: pohanka obecná (Fagopyrum esculentum Moench) <sup>(18)</sup>

Rod Fagopyrum zahrnuje jednoleté nebo vytrvalé rostliny, které dorůstají přibližně do půlmetrové výšky. Je pěstována jako tzv. kulturní plodina, které se využívá jako potraviny (moučnaté nažky) a z její nati je získáván rutin. Pěstuje se také jako hodnotná píce. <sup>(7, 17)</sup>

Pohankové nažky obsahují větší množství vlákniny. Její kvetoucí nať, případně její slupky mají léčebné účinky. Právě tyto rostlinné části obsahují ve větší míře flavonoid rutin. Dále se zde také vyskytují vitamíny skupiny B, vitamín E, mnoho plnohodnotných bílkovin a řada minerálních prvků, především draslík, fosfor, hořčík, vápník a menší míře pak železo, měď, mangan a zinek. Také obsah cholinu souvisí s léčebnými účinky. <sup>(7)</sup>

Pokud chceme zvýšit pevnost a pružnost cévních stěn, je dobré využít právě natě pohanky. Její užití je tedy výhodné při křečových žilách, hemoroidech, bércových

vředech či při poruchách prokrvení končetin, které jsou charakterizovány červenými nitkami na stehnech. Využívá se také jako prevence proti praskání cév uvnitř organismu, tedy proti mozkovým příhodám. Pohankové natě užíváme v podobě nálevu nebo slupky pomeleme na prášek a konzumujeme 4krát denně půl čajové lžičky. <sup>(7)</sup>

Pohankovou nat' můžeme použít jako drogu do tzv. cévních směsí, kterou můžeme kombinovat s routou, která má též vysoký podíl rutinu, či s květem černého bezu. Lze říci, že pohanka je léčebněm smyslu na výši. <sup>(7)</sup>

Léčebného účinku nažek se využívá zejména v detoxikaci, například v těhotenství, při snižování cholesterolu či při některých střevních chorobách. <sup>(7)</sup>



Obr. 9 Pohanka obecná <sup>(42)</sup>

### 3.5 Stanovení fenolických látek

Některé fenolické látky jsou patrné přímo (např. anthokyaniny), jiné však po ozáření UV zářením nebo odhalené barevnými reakcemi. Dvoudimenzionální papírová chromatografie je stále užívána jako rutinní nástroj identifikace hlavních skupin fenolických látek, které jsou obsažené v alkoholickém extraktu. Tato metoda se může kombinovat i s chromatografií na tenké vrstvě, zejména pro specifikaci produktů kyselé hydrolýzy (v přítomnosti HCl). Technikou plynové chromatografie mohou být rychle a kvantitativně stanoveny jednoduché fenolické látky. Při použití metody kapalinové



chromatografie (HPLC) odpadá potřeba derivatizace a navíc lze i identifikovat a kvantifikovat rostlinné flavonoidy. Zmíněnými dvěma metodami lze separovat i deriváty cis a trans skořicových kyselin a glykosidy jednoduchých fenolických látek. <sup>(10)</sup>

Z dosavadních průzkumů vychází, že biologická aktivita fenolických látek v rostlinném materiálu se sušením podstatně nemění. Negativní účinek na aktivitu fenolických látek má ale samotné zamrazování zelené píce. Různé rody, druhy rostlin mají charakteristické zastoupení fenolických látek. <sup>(10)</sup>

Fenolické látky obsažené v rostlinných produktech působí jako látky vonné a chuťové. Kondenzované třísloviny (zvané flavolany) jsou držiteli trpké chuti, jiné fenolické látky působí jako přírodní barviva (některé chinony, lignany, flavonoidy aj.) a přírodní antioxidanty. <sup>(10)</sup>

V současné době roste zájem o studování těchto přírodních látek, neboť jejich příjem v potravě je dán do souvislosti se snižováním výskytu závažných nemocí (rakovina, kardiovaskulární choroby). Usuzuje se, že za protektivní účinky rostlinných fenolických látek jsou zodpovědné jejich schopnosti zhaset reaktivní kyslíkové radikály a omezovat jejich tvorbu chelatací iontů přechodných kovů (kationtů železa aj.). Ochraňují lipoproteiny nízké hustoty před modifikací oxidací, která zapříčiní rozvoj aterosklerózy. Mohou také pozitivně působit proti vytváření krevních sraženin a tím snižují riziko vzniku infarktu myokardu či mozkové mrtvice. <sup>(13)</sup>

### **3.6 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)**

V dnešní době jsou známy tři varianty kapalinové chromatografie a to nízkotlaká kapalinová chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie a chromatografie na tenké vrstvě. V analytické chemii má v současnosti dominantní postavení právě vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). <sup>(2)</sup>

Vysokoúčinná kapalinová chromatografii vznikla v počátcích 70. let z plynové chromatografie. Tato metoda se využívá pro separaci komplikovaných směsí látek. Vysoké účinnosti této metody se docílí užitím stacionárních fází, obsahující pravidelné, drobné částice shodného tvaru a velikosti, jež homogenně vyplní kolonu. Vysoký tlak (až desítky MPa) zajišťuje průtok mobilní fáze, která je kapalná. Jsou dávkována jen

malá množství vzorku (řádově mikrolitry). Pro detekci jsou potřebné citlivé detektory, které umožní kontinuální monitorování látek na výstupu z kolony. Počítač tento signál detektoru zpracovává. Z výše uvedených informací tak vyplývá, že HPLC požaduje poměrně náročnou instrumentaci. <sup>(1)</sup>

Mezi výhody HPLC se zejména řadí její rozsáhlá oblast použitelnosti. Je možno tak analyzovat ionty, látky polární i nepolární, málo těkavé, vysokomolekulární i tepelně nestabilní složky. Touto metodou lze v průměru analyzovat až 80 % veškerých známých látek. Další výhodou je možnost ovlivnění separace prostřednictvím složení mobilní fáze. Nevýhodou pak je, že vyžaduje náročnější instrumentaci a pak i složitější mechanismus separace. <sup>(1)</sup>

K HPLC se řadí všechny chromatografické způsoby separace, kdy je mobilní fáze v kapalném skupenství. S ohledem na experimentální uspořádání mluvíme o kapalinové chromatografii v otevřeném systému (papírová a tenkovrstvá chromatografie) a v uzavřeném systému (především HPLC). <sup>(27, 28)</sup>

Tato metoda tak slouží kupříkladu ke stanovení fenolických látek, které se v hojné míře vyskytují v rostlinných potravinách. Stanovování těchto látek není snadné. U stanovovaných vzorků potravin je tak v první řadě potřeba provést, než se pustíme do chromatografické HPLC detekce izolaci a extrakci. Selektivní izolaci a extrakci je potřeba zvolit dle matrice, kterou chceme oddělovat. Použitá metoda, která je určena k analýze flavonoidů, má dva hlavní izolační kroky. První krok je klasická izolace provedena vodným methanolem a druhý pak extrakce pevným sorbentem (SPE). Výsledné aglykony jsou tedy určené k HPLC. <sup>(31, 33)</sup>

### **3.6.1 Princip separace látek**

Pro separace se užívá adsorpce, rozdělování mezi dvě fáze na základě různé rozpustnosti (separace na chemicky vázaných fázích), biospecifická interakce (molekulové rozpoznání), iontová výměna a síťový efekt. V chromatografickém systému se často využívá více typů interakcí. <sup>(1)</sup>

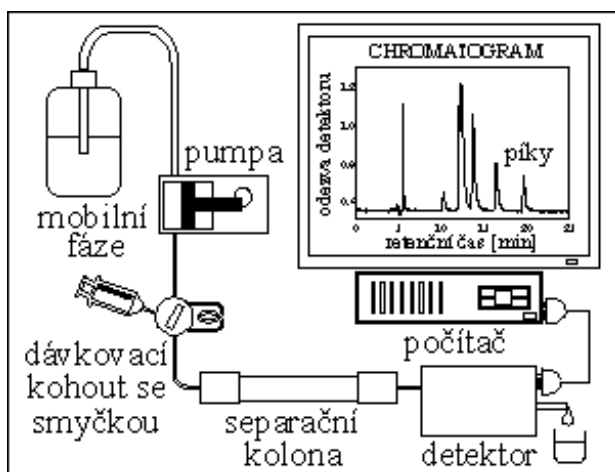
Eluční pořadí vychází z oboustranného vztahu polaritý separovaných látek a polaritý mobilní a stacionární fáze. Volbou jednotlivých rozpouštědel je možno ovlivnit

polaritu mobilní fáze. Jestliže použijeme stacionární fázi polární, budou kolonou nejméně zadržovány nepolární složky vzorku, a naopak při užití stacionární fáze nepolární, budou kolonou nejméně zadržovány polární komponenty vzorku. <sup>(2)</sup>

Při nástřiku vzorku do chromatografické kolony se vytváří zóna, zahrnující směs obou látek ze vzorku. Mobilní fáze tyto látky unáší a následně dochází na koloně naplněné sorbentem k jejich separaci. Jakmile vystoupí první látka z kolony, odhalí detektor přítomnost látky v eluátu a zaznamená tzv. eluční pík. Tento postup se opakuje i při výstupu dalších látek z kolony. Na záznamu zapisovače je tak zaznamenáno několik oddělených elučních píků. Doba, kterou zůstává separovaná látka v koloně, je závislá na četnosti a velikosti interakcí. Tato doba tak určuje pořadí, kdy složka opouští kolonu. Čím jsou větší interakce ve stacionární fázi, tím je i hodnota retenčního (elučního) času větší. <sup>(27, 28)</sup>

### **3.6.2 Přístroje pro HPLC**

Mobilní fáze je během isokratické eluce vedena ze zásobníku přes odplynovač do vysokotlakého čerpadla. Komponenty mobilní fáze se při gradientové eluci ze zásobníku přivádí do směšovače, kde se programově v zvoleném poměru mísí a následně putují do čerpadla. Z čerpadla je mobilní fáze odvedena přes tlumič pulzů čerpadla do kolony. Kolona obvykle bývá vytvořena z nerez oceli či speciálního skla. Bezprostředně za kolonou je napojen detektor. Detektor je pak spojen se zařízením pro registraci průběhu analýzy (zapisovač či počítač s hardwarovou úpravou a vyhodnocovacím softwarem). Vyhodnocení dat, která byla naměřena, obstarává příslušný obslužný software. <sup>(27)</sup>



Obr. 10 Schéma HPLC <sup>(43)</sup>

### 3.6.2.1 Čerpadla pro HPLC

Tato vysokotlaká čerpadla zajišťují tok mobilní fáze. Musí být vyrobena z materiálů odolných vůči korozi i při užití agresivních mobilních fází. V HPLC se nejhojněji setkáváme s tlaky od 1 do 60 MPa, při průtocích mobilní fáze od 0,1 do 10 ml.min<sup>-1</sup>. Za těchto obtížných tlakových podmínkách bylo proto náročné dávkovat do kolony mobilní fázi bezpulzně. Hodně se proto užívaly lineární dávkovače, u kterých byla vyloučena pulzace mobilní fáze. V dnešní době jsou upřednostňovány kontinuálně pracující pulzující čerpadla pístová či membránová. Při každém pohybu pístu nebo membrány vpřed nastává vytlačení malého objemu mobilní fáze. K tlumení pulzace dochází buď pomocí dalšího čerpadla pracujícího v opačné fázi, anebo pomocí tlumiče pulzů. Moderní čerpadla jsou vybavena elektronicky řízenými zpětnovazebnými systémy, reziduální tlakové pulzace přímo ovládají otáčky motoru. <sup>(2, 3, 27, 28)</sup>

### 3.6.2.2 Dávkování vzorků

Ustupujícím způsobem dávkování vzorků je nástřik mikrostríkačkou pomocí tzv. „stop flow“ ventilu. Ventil poskytne krátkodobé rozpojení systému čerpadlo – kolona a po nástřiku dojde k opětovnému spojení těchto částí. Velmi převažujícím způsobem nástřiku vzorku je použití tzv. šesticestného kohoutu s dávkovací smyčkou. Nejprve

dochází k naplnění smyčky o známém a konstantním objemu vzorkem. Poté dochází k přepnutí kohoutu do polohy dvě, eluent tak proteče smyčkou a vzorek je vnesen do kolony. <sup>(28)</sup>

Na zřetel je třeba brát i to, že vzorky by měly být při dávkování dokonale rozpuštěny. Nejlépe vždy v rozpouštědle o téže složení jako má mobilní fáze. Pokud se ovšem ve vzorku vyskytují tuhé částičky, tak je potřeba je odfiltrovat. <sup>(3)</sup>

### 3.6.2.3 Kolony pro HPLC

Výběr vhodné kolony má prvořadý význam, neboť výsledek chromatografické analýzy je stanoven zejména kvalitou kolony a její náplní. Separční kolony musí odolávat vysokému tlaku mobilní fáze. Pro HPLC jsou typické kolony rovné o délce 10 – 100 cm, nejčastěji 10 – 20 cm o vnitřním průměru od 0,2 – 2 cm. Jsou nejčastěji zhotoveny z nerez oceli či ze speciálního skla. <sup>(2, 3, 28)</sup>

Pokud dochází k dělení složitějších směsí, mohou být kolony řazeny za sebou. Přírodní vzorky, které obsahují více balastních látek, mohou vyvolat předčasné znehodnocení kolony. Z tohoto důvodu se často před vlastní kolonu vhodně umístí ochranná předkolonka. Tato předkolonka se nachází v cenově nižší relaci než kolona a zároveň má i ochrannou funkci pro kolonu. V dnešní době jsou kolony pro HPLC plněny výhradně profesionálně. Velikost zrn sorbentu se nachází mezi 3 – 50  $\mu\text{m}$ , nejčastěji pak mezi 5 - 10 $\mu\text{m}$ . <sup>(28)</sup>

### 3.6.2.4 Náplně a eluenty

Silikagel je polární absorbent, který má slabě kyselé vlastnosti a silně zadržuje bazické látky. Většinou je amorfni struktury. Dokáže snadno přijímat vodu a před jeho aplikací je běžně aktivován při 180 °C. <sup>(27, 28)</sup>

Alumina je krystalická forma  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Povrch zrn na rozdíl od silikagelu je bazický. Běžně se tak může používat k oddělení slabě kyselých složek vzorku. Bývá obvykle aktivován zahříváním na 400 °C po dobu 6-16 hodin. <sup>(27, 28)</sup>

Florisil (křemičitan hořečnatý) je známý jako slabě kyselý polární absorbent. <sup>(27, 28)</sup>

Molekuly eluentu obsazují povrch absorbentu. Když je vzorek vnesen do kolony, musí molekula složky vytěsnit z povrchu absorbentu daný počet molekul eluentu. Na tento stav má zásadní vliv adsorpční energie eluentu. Ta je dána velikostí interakce mezi eluentem a povrchem adsorbentu. Velikost interakce mezi eluentem a povrchem adsorbentu je nazývána jako eluční síla. Méně významné jsou interakce mezi složkou a eluentem. <sup>(27)</sup>

Pentan, jako běžně dostupné rozpouštědlo má nejnižší eluční sílu, naopak voda jí má největší. Čím je větší eluční síla rozpouštědla, tím pevněji je eluent adsorbován a složka tak adsorbována méně. Eluční síla rozpouštědla tak velmi těsně souvisí s jeho polaritou. <sup>(27)</sup>

### 3.6.2.5 Detektory

Nejrozšířenějšími typy detektorů jsou průtokový fotometrický a fluorimetrický detektor. Eluát protéká tzv. měrnou celou malého objemu s velkou optickou délkou, často 5-10 µl při šířce 10 mm. Při vhodně zvolené vlnové délce je zaznamenávána absorbance eluátu. Moderní detektory již umí proměnlivě a programově měnit vlnovou délku. Tzv. diode array detektor (DAD) disponuje schopností proměřit ve zvoleném okamžiku celé UV/VIS spektrum dané složky. Takto získané informace se stávají důležitým kvalitativním údajem o sledované složce. Méně běžným detektorem je refraktometrický detektor. Tento detektor registruje změny indexu lomu eluátu. Je tak vhodný pro látky, které nemají potřebnou absorpci. Používá se například při separacích cukrů a podobných látek. <sup>(2, 28)</sup>

### 3.6.3 Kvalitativní analýza

Klíčovým prvkem je znalost retenčních dat chromatografovaných látek. Identifikace se zakládá na porovnání retenčního času stanovované látky a standardu, který byl separován za stejných podmínek. Jedním z mnoha způsobů identifikace eluovaných látek je připojení chromatografu na hmotnostní spektrometr. Takovéto spojení je řazeno k nejlepším analytickým separačním a identifikačním systémům. <sup>(27, 28)</sup>

### 3.6.4 Kvantitativní analýza

Základním údajem pro kvantitativní vyhodnocení je plocha pod eluční křivkou. Tuto plochu je možno měřit více způsoby. Nejčastěji se pro kvantitativní stanovení používá součin výšky píku s šířkou píku v polovině výšky píku. Moderní chromatografy však bývají vybaveny integrátorem plochy píků, který je v dnešní době běžně součástí řídicího počítače chromatografu.<sup>(27)</sup>

### 3.6.5 Využití HPLC v praxi

Výhoda kapalinové chromatografie vychází ze šetrného stanovení nejrůznějších, zejména organických látek oproti plynové chromatografie, kdy musíme pracovat s látkami za zvýšené teploty. Složky, které nelze běžnými detektory pro HPLC dobře detekovat, se tak musí převést na snáze detekovatelné deriváty. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se tak v dnešní době hojně užívá v průmyslu, zdravotnictví, farmacii a mnoha dalších oborech.<sup>(28)</sup>

### 3.6.6 Chromatografie v dnešní době

Každý rok se v USA koná významná konference Pittcon, kde jsou uvedeny nejnovější trendy a inovace v oblasti analytické chemie.<sup>(23)</sup>

Novodobé trendy HPLC:

- zkrácení kolon a zmenšení velikosti částic sorbentu,
- použití kolon, které mají menší vnitřní průměr (kapilárních a mikro kolon),
- miniaturizace separačních systémů,
- důraz kladený na automatizaci analýz,
- užití ultravysokých tlaků,
- neustále narůstající význam techniky LC-MS<sup>(23)</sup>

Zmenšování sorbentu souvisí se zkracováním chromatografických kolon. Docílí se tak zkrácení dob analýz bez ztráty účinnosti ve srovnání se separacemi, které se provádí na kolonách tradiční délky (25 cm). Doby analýz na krátkých kolonách, které jsou

určeny pro tzv. rychlou chromatografii, bývají kolem 1 až 2 minut. Takovéto kolony jsou užívány zejména pro vysokoprostupné analýzy v odvětví, kde se denně zpracovává sto až tisíc vzorků. <sup>(23)</sup>

Vývoj sorbentů neustále pokračuje a jsou tak na trhu k dostání stále pokročilejší materiály s lepšími vlastnostmi. <sup>(23)</sup>

Mezi současné moderní trendy sorbentů patří:

- porézní sorbenty
- neporézní a povrchové porézní sorbenty
- perfúzní sorbenty
- monolity <sup>(23)</sup>

Kvalita sorbentů neustále stoupá především díky důkladnějším kontrolám výrobních procesů, zvýšené čistotě vstupních surovin, uplatnění nových poznatků atd. <sup>(23)</sup>



## 4 Praktická část

Pro vypracování bakalářské práce byla použita analytická metoda HPLC, která slouží ke stanovení fenolických látek.

### 4.1 Materiál

K analýzám vybraných fenolických látek bylo vybráno pět druhů jedlých výhonků, které se běžně konzumují v České republice. Čtyři vybraní zástupci pochází z čeledi bobovitých a jeden z čeledi rdesnovitých. Pro porovnání obsahu sledovaných fenolických látek bylo těchto pět druhů jedlých výhonků pěstováno za odlišných podmínek. Analyzované rostlinné vzorky uvedeny na obr. 11.

čočka jedlá	<i>Lens culinaris</i> Medik.
cizrna beraní	<i>Cicer arietinum</i> L.
vigna zlatá	<i>Vigna radiata</i> (L.) Wilezek
sója luštinatá	<i>Glycine max</i> (L.) Merrill
pohanka obecná	<i>Fagopyrum esculentum</i>

Obr. 11 Analyzované rostlinné vzorky

Experimentální materiál byl připraven v létě roku 2014 v budově Zemědělské fakulty (České Budějovice, kampus JU). K vypěstování byla použita semena, která byla zakoupena v maloobchodní síti v Českých Budějovicích značky CountryLife. Všechny testované druhy byly pěstovány jednak za světla, jednak ve tmě.

### 4.2 Pěstování a odběr rostlinného materiálu

U těchto pěti vybraných druhů klíčků bylo odváženo potřebné množství suchých semen každého druhu. To znamená, že pro získání 300 g namočených semen jsem si navážila 150 g suchých semen luštěnin a 200 g suchých semen pohanky. Suchá semena jednotlivých druhů byla vždy umístěna do kádinek o objemu 1 l. Poté do každé kádinky

bylo přilito 500 ml převařené vychlazené pitné vody a semena byla namočena po dobu 16 hodin. Semena tak přijala vodu, navýšila svou hmotnost, a to semena luštěnin o 100% a semena pohanky o 50%. Tímto jsem získala potřebných 300 g od každého rostlinného materiálu. Po uplynutí doby byla namočená semena každého druhu rozvážena po 25 g do Petriho misek. Jeden druh klíčku rozvážen vždy do 8 Petriho misek. Poté bylo do Petriho misek ještě přidáno přibližně 5 ml vody stříčkou. Takto byly vzorky rostlinného materiálu připraveny k naklíčení.

Čtyři vzorky od každého druhu rostlinného materiálu, které byly rozváženy na Petriho miskách, byly umístěny do tmy (temná místnost) a čtyři vzorky na světlo (laboratoř) při teplotě 22 °C. Takto rozvážená namočená semena byla jednou za 24 hodin propláchnuta vodou.

Prvotní navážky výhonků jsou uvedeny v příloze 1.

Všechny vybrané testované rostliny byly tedy vypěstovány jak za světla (normálních podmínek), tak za tmy. Odběr rostlinného materiálu probíhal vždy po dnu od osevu po dobu čtyř dnů (viz. příloha 2).

Vždy po uplynutí jednoho dnu jsem jeden vzorek od každého naklíčeného druhu výhonku na Petriho misce odebrala, zvážila, přesunula do polyethylenového sáčku a umístila do mrazničky při teplotě -16 °C. Zbývající vzorky uskladněné na světle a ve tmě jsem prolila 5 ml vody.

Jednotlivá váha klíčků uvedena v příloze 3 a 4.

### **4.3 Úprava rostlinného materiálu**

Veškerý odebraný rostlinný materiál byl po odběru zmrazen (-16 °C) a ihned poté do 1 měsíce od odběru se lyofilizoval. Lyofilizace probíhala při teplotě -80 °C a tlaku 0,0045 mbar po dobu 24 hodin. Čerstvý rostlinný materiál má aktivní enzymové systémy (při delším skladování, nižší teplotě) může dojít ke změnám v zastoupení a obsahu sledovaných látek. Proto jsem vzorky zbavila před analýzou vody (pro delší skladování) procesem zvaný lyofilizace. Takovýto materiál má poté vhodnou konzistenci pro homogenizaci na laboratorním mlýnku. Tento materiál byl poté

skladován v uzavřených plastových vzorkovnicích v mrazicím boxu (-18 °C) až do analýzy.

#### 4.4 Chemikálie a standardy

Všechny níže zmíněné použité chemikálie měly analytickou čistoty p. a., pokud není uvedeno jinak. Pro přípravu roztoků byla použita demineralizovaná voda, připravená na zařízení firmy Premier (USA).

$\alpha$ -naftyloctová kyselina (Lachema, ČR)

L-askorbová kyselina (Merck, Německo)

methanol (LiChrosolv Reag. Ph. Eur, Merck)

acetonitril (LiChrosolv Reag. Ph. Eur, Merck)

mravenčí kyselina (Lachema, ČR)

rozmarýnová kyselina (Sigma Chemicals, USA)

káвовá kyselina (Sigma Chemicals, USA)

chlorogenová kyselina (Sigma Chemicals, USA)

kvercetin (Extrasynthese, Francie)

myricetin (Extrasynthese, Francie)

apigenin (Extrasynthese, Francie)

luteolin (Extrasynthese, Francie)

kemferol (Extrasynthese, Francie)

morin (Extrasynthese, Francie)

## 4.5 Laboratorní sklo a přístroje

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

Skleněné filtrační zařízení (Sigma Aldrich)

Zkumavky s víčkem s teflonovým těsněním

Vialky

Petriho misky

Lžičky

Plastové vzorkovnice pro uchování lyofilizovaného materiálu

Laboratorní mlýnek Grindomix, GM 200

Analytické váhy AB 204 (Mettler Toledo, Švýcarsko)

Technické váhy Kern (Německo)

Odstředivka Sigma 2-5 (Sigma Laborzentrifugen, Německo)

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

Kombinovaná lednička s chladničkou (Bosch Cooler, Německo)

Teplovzdušná sušárna ULM (Memmert, Německo)

Lyofilizátor Alpha 1-4 (Christ, Německo)

Centrifuga 5810 R (Eppendorf)

ph-metr Inolab-1, s elektrodou SenTix 61 (WTW, Německo)

Magnetické míchadlo (Heidolph, Německo)

SPE kolonky RP-18 (Merck, Německo)

Vodní lázeň termostatovaná míchaná EL – 20 R (Kavalier, ČR)

Dávkovač kapalin 5 ml (Sklo Union, ČR)

SPE izolační jednotka (vývojové dílny JU, ČR)

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

Filtrační papír Filtrak (Filtrak GmbH, Německo)

Kapalinový chromatograf Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC Systém (Agilent Technologies, USA), detektor DAD UV VIS (Agilent), použitá kolona: Zorbax SB-C18, 50 mm x 4,6 mm, 1,8  $\mu\text{m}$  velikost částic stacionární fáze (Agilent Technologies)

Kapalinový chromatograf Hewlett Packard HP 1050 (USA), detektor DAD – G1315B, použitá kolona Luna C18, 2 mm x 150mm, 3  $\mu\text{m}$  (Phenomenex, USA)

LC-MS detektor LCQ Accela Fleet (Thermo Fisher Scientific, USA), APCI, detektor PDA, použitá kolona Luna C18, 2 mm x 150 mm, 3  $\mu\text{m}$  (Phenomenex, USA)

#### **4.5.1 Metodika stanovení**

Pro vypracování bakalářské práce byla použita analytická metoda, která byla vyvinuta na pracovišti zemědělské fakulty Jihočeské univerzity, na katedře aplikované chemie. Tato analytická metoda vycházela z publikované práce (Dadáková et al. 2001) a byla využita pro stanovení flavonoidních aglykonů v lyofilizovaném materiálu.

Pro účely je potřebné zbavit vzorek přečištěním balastních doprovodných látek a analyt dostatečně zakoncentrovat. Zmíněný postup je složen z kyselé hydrolyzy veškerých glykosidů přítomných v analytu. Dále pak následuje úprava vzorku odstředěním, filtrací a ředěním. Sorpce analytu je provedena na kolonkách SPE a analytickou koncovku uskutečňuje metoda kapalinové chromatografie (HPLC).

Schéma sorpce na tuhé fázi uvedeno v příloze 5.

##### **4.5.1.1 Stanovení flavonoidních aglykonů v lyofilizovaném materiálu**

Touto metodou byl stanoven celkový obsah některých flavonoidních aglykonů, které se uvolnily z lyofilizovaného materiálu kyselou hydrolyzou. Bylo tak možno stanovit obsah flavonolů kvercetinu, myricetinu a kemferolu a flavonů luteolinu a apigeninu. Za podmínek metody se přítomné glykosidické formy flavonoidů převedou

na jejich aglykony. Pro posouzení obsahu flavonoidů v rostlinném materiálu je tento postup vhodnější než sledování obsahu jednotlivých glykosidů.

Směs přesně asi 0,25 g lyofilizovaného homogenního materiálu, váženého na analytických vahách s přesností na 0,1 mg byla vložena do 100 ml varné baňky spolu s 80 mg kyseliny askorbové, 7,5 ml destilované vody, 5 ml 6 mol.l<sup>-1</sup> HCl a 12,5 ml methanolu. Tato směs byla 2 hodiny hydrolyzována pod zpětným chladičem v termostátované vodní lázni při teplotě 90 °C. Po vychlazení byl hydrolyzovaný vzorek zneutralizován 2 g NaHCO<sub>3</sub> (vypočtené množství), kvantitativně převeden do odstředivací kyvety pomocí 12,5 ml metanolu a vody a postupně třikrát odstředěn (15 minut, 1000 otáček/minutu). Spojené supernatanty byly shromažďovány v 600 ml kádince, doplněny vodou na objem 200 ml a pH roztoku bylo upraveno na hodnotu pH 3 pomocí nasyceného roztoku NaHCO<sub>3</sub>. Takto upravený roztok byl filtrován přes filtr ze skleněných vláken za sníženého tlaku. Poté byl filtrát převeden (kvantitativně) do odměrné baňky o objemu 500 ml. Podle obsahu kvercetinu se tento roztok ředil připraveným 5% roztokem methanolu o hodnotě pH 3,5. Roztok, připravený tímto způsobem, byl následně použit pro sorpci na tuhé fázi (SPE). Použity byly kolonky RP-18 (Merck), kondiciované promytím 10 ml metanolu a 10 ml vody. Pro promytí vzorku byla kolonka promyta 10 ml vody a 15 minut sušena procházejícím vzduchem. Zachycené látky byly následně eluovány 1,4 ml methanolu do měrné vialky. K eluátu v měrné vialce byl přidán roztok vnitřního standardu (kyselina α-naftyloctová 2 mg/ml) v množství 100 μl.

#### 4.5.1.2 Měření flavonoidních aglykonů

Dále byly všechny vzorky naměřeny na kapalinovém chromatografu Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC System (Agilent Technologies, USA) s AD UV VIS detektorem. Byla použita chromatografická kolona Zorbax SB-C18 (4,6 x 50 mm, zrnitost sorbentu 1,8 μm, výrobce Agilent Technologies).

Použité mobilní fáze byly tvořeny acetonitrilem, vodou a kyselinou mravenčí. Zmíněné složky byly smíchány do dvou typů roztoků:

A: 5% acetonitril, 0,1% kyselina mravenčí, voda

B: 0,1% kyselina mravenčí v 100 % acetonitrilu

Při analýze byl používán gradient následujícího složení (v % fáze B):

0-1 minuta: 20-25% B

1-5 minuta: 25-30% B

5-7 minuta: 30-50% B

7-9 minuta: 50-20% B

Následovalo 6 minut kondicionace kolony při počátečním složení mobilní fáze (20% B). Průtok mobilní fáze byl stanoven na 1ml/min. Průběh analýzy byl při 25°C, odezvy analyzovaných látek byly čteny při 270 nm.

Poměr ploch píků aglykonu a vnitřního standardu je použit jako analytická odezva. Kvantifikace obsahu stanovované látky je provedena na základě kalibrační závislosti. Kalibrace veškerých látek je proměřena v pracovním rozsahu 5-100 µg každé sloučeniny v 1 ml roztoku.

Pro všechny sloučeniny je mez stanovitelnosti (LOQ) 10 mg/kg sušiny. Všechny rostlinné vzorky byly analyzovány dvakrát, uvedené výsledky tedy reprezentují průměr z obou měření s uvedenou odchylkou. Takto získané výsledky byly zaokrouhleny na celá čísla.

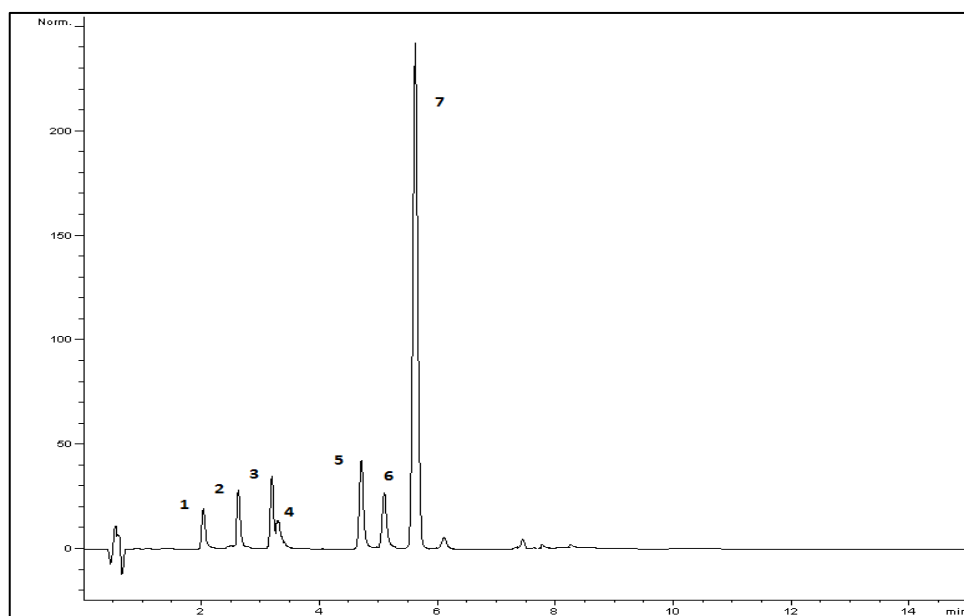
Látky byly rozpoznány a identifikovány podle retenčních časů a absorpčních spekter.

Čtvrtý den kultivace jedlých klíčků nakonec do analýzy zahrnut nebyl. Největším problémem bylo postupné kažení vzorků, což se projevovalo kvašením materiálu a nepříjemným zápachem. Konzumace takového rostlinného materiálu by již nebyla vhodná.

Měření neznámých látek provedla v připravovaných vzorcích RNDr. Vrchotová z analytické laboratoře Centra výzkumu globální změny v. v. i. AV ČR. Pro toto měření byla použita metoda HPLC-MS, kdy postup této metody vycházel z publikované práce (Tříška et al. 2013). Tímto způsobem tak byly identifikovány neznámé látky ve vigně zlaté a v sóji luštinaté.

## 4.6 Použité programy

Pro zpracování a vyhodnocení naměřených dat byl používán program ChemStation 3D (Agilent Technologies). Na závěr byla data vypočítána prostřednictvím Microsoft Office Excel (směrodatná odchylka, průměr).



Obr. 12 Chromatografický záznam standardů aglykonů

1. myricetin
2. morin
3. luteolin
4. kvercetin
5. apigenin
6. kemferol
7. kyselina  $\alpha$ -naftyloctová



	Čočka jedlá	Fazole mungo	Pohanka setá	Cizrna beraní	Sója luštinatá
Původní nenamočená semena	1-N	2-N	3-N	4-N	5-N
Namočená semena před kultivací	1-0-0	2-0-0	3-0-0	4-0-0	5-0-0
TMA-1 den kultivace	1-1-T	2-1-T	3-1-T	4-1-T	5-1-T
TMA-2. den kultivace	1-2-T	2-2-T	3-2-T	4-2-T	5-2-T
TMA-3. den kultivace	1-3-T	2-3-T	3-3-T	4-3-T	5-3-T
SVĚTLO-1. den kultivace	1-1-S	2-1-S	3-1-S	4-1-S	5-1-S
SVĚTLO-2. den kultivace	1-2-S	2-2-S	3-2-S	4-2-S	5-2-S
SVĚTLO-3.den kultivace	1-3-S	2-3-S	3-3-S	4-3-S	5-3-S

Obr. 13 Označení vzorků a jejich kódování

N – původní nenamočená semena

O – namočená semena před kultivací

1, 2, 3 – dny kultivace

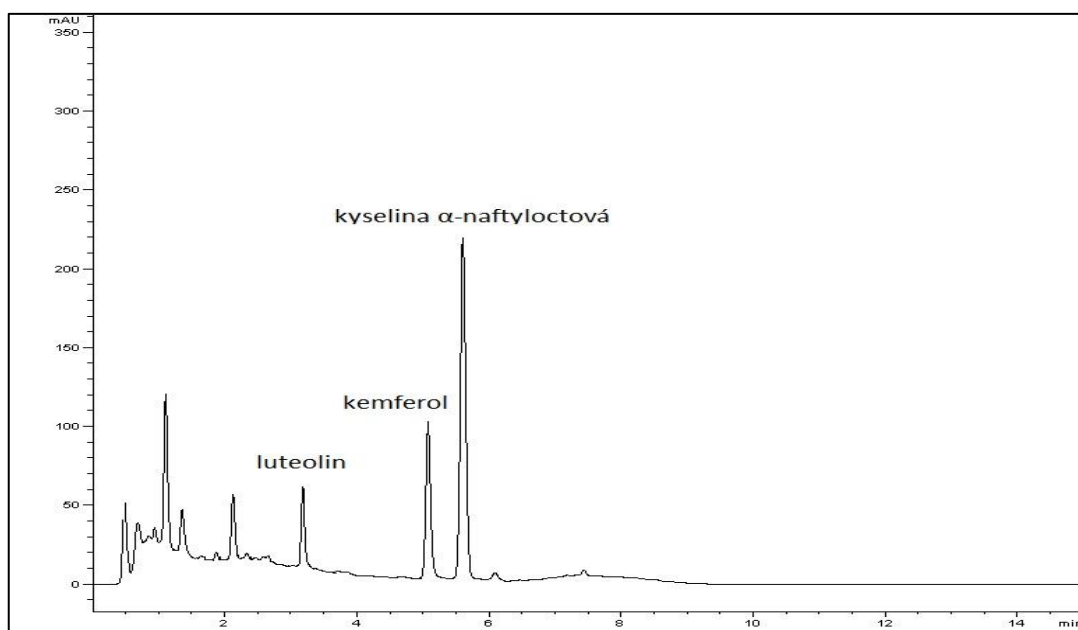
T - tma

S - světlo

## 5 Výsledky a diskuze

### 5.1 Čočka jedlá

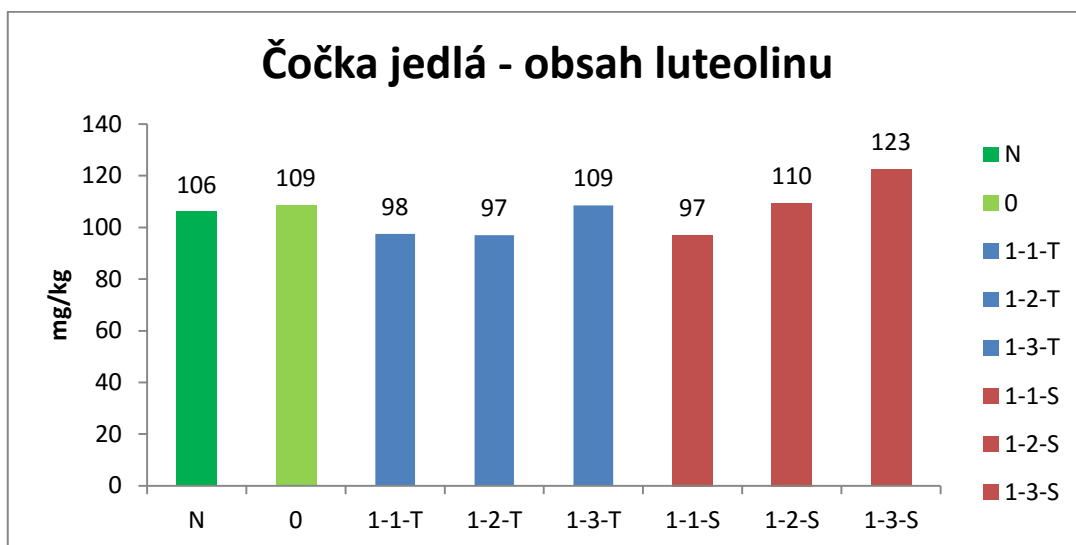
Chromatografický profil extraktu čočky jedlé je uveden na obr. 14. Jak je zřejmé, dominantními látkami jsou kemferol a luteolin.



Obr. 14 Chromatografický profil extraktu čočky jedlé

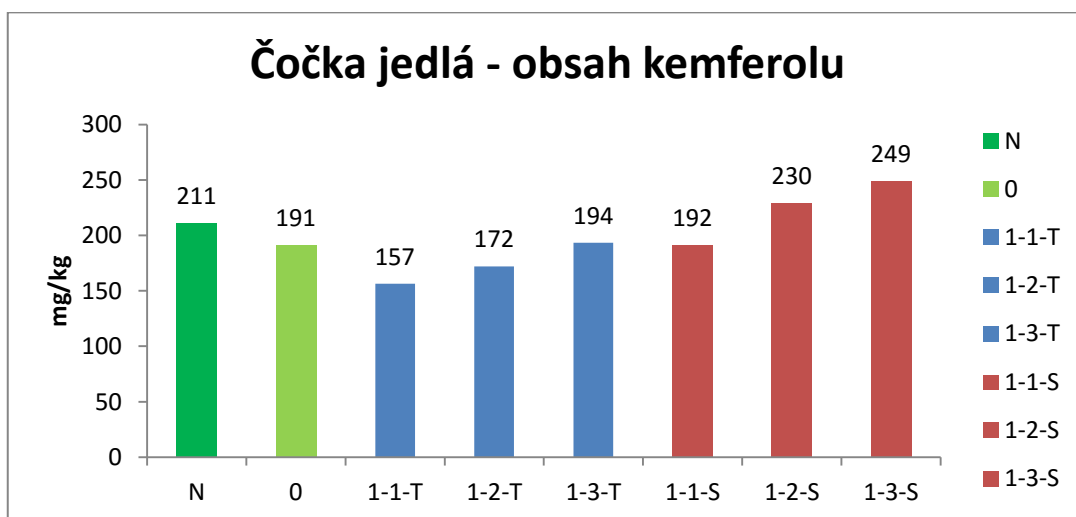
Obsah luteolinu ve vzorcích pěstovaných na světle dosahoval postupně zvyšující se tendence. Tedy to znamená, že první den 97 mg/kg, druhý den 110 mg/kg a třetí den 123 mg/kg. Naopak u vzorků pěstovaných ve tmě se tato zvyšující se tendence tak zřetelně neprojevila (obr. 15). Více obsahových látek luteolinu bylo tedy ve srovnání nalezeno ve vzorcích čočky, které byly pěstovány na světle.

Avšak do naší analýzy byla zahrnuta i semena nenamočená či namočená, ale nenaklíčená. Jak je patrné (obr. 15), již tyto vzorky obsahovaly více luteolinu než vzorky, které již byly pěstovány první den na světle či ve tmě.



Obr. 15 Vliv pěstování na obsah luteolinu v čočce jedlé

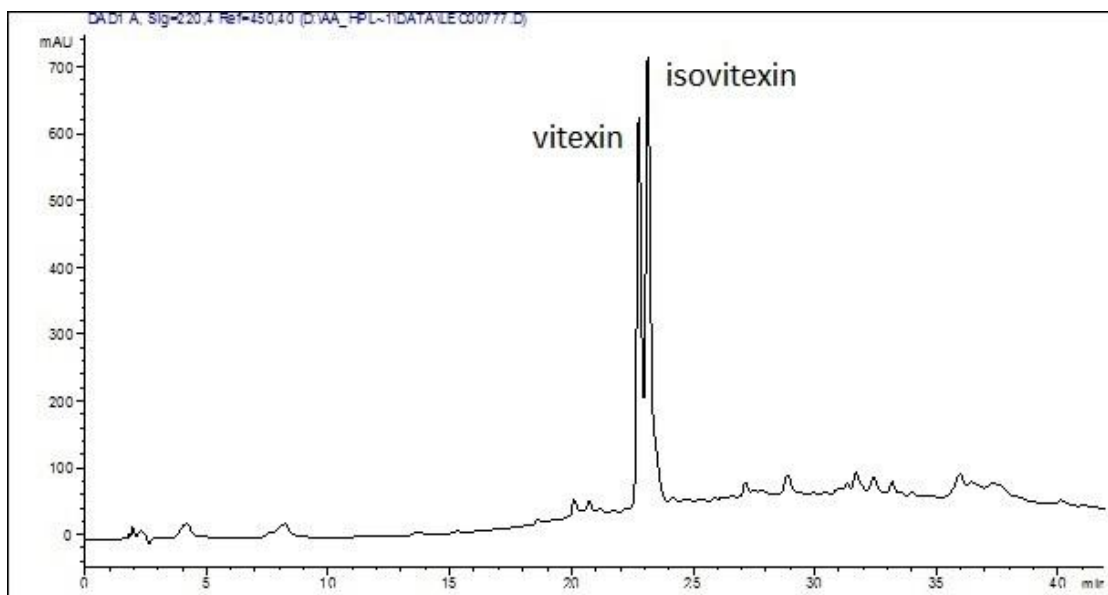
Obsah kemferolu ve vzorcích pěstovaných jak na světle, tak i ve tmě postupně stoupal (obr. 16). Obsahových látek bylo až o čtvrtinu více v rostlinném materiálu pěstovaném na světle. To je zřejmé například při porovnání třetího dne ve tmě, kdy byl obsah kemferolu 194 mg/kg, avšak na světle tomu bylo až 249 mg/kg. Na světle bylo tedy zjištěno více obsahových látek kemferolu.



Obr. 16 Vliv pěstování na obsah kemferolu v čočce jedlé

## 5.2 Vigna zlatá

U tohoto rostlinného materiálu vigny zlaté byly metodou HPLC/MC identifikovány následující polyfenolické sloučeniny: vitexin a isovitexin. Na chromatogramu jsou znázorněny píky obou látek.

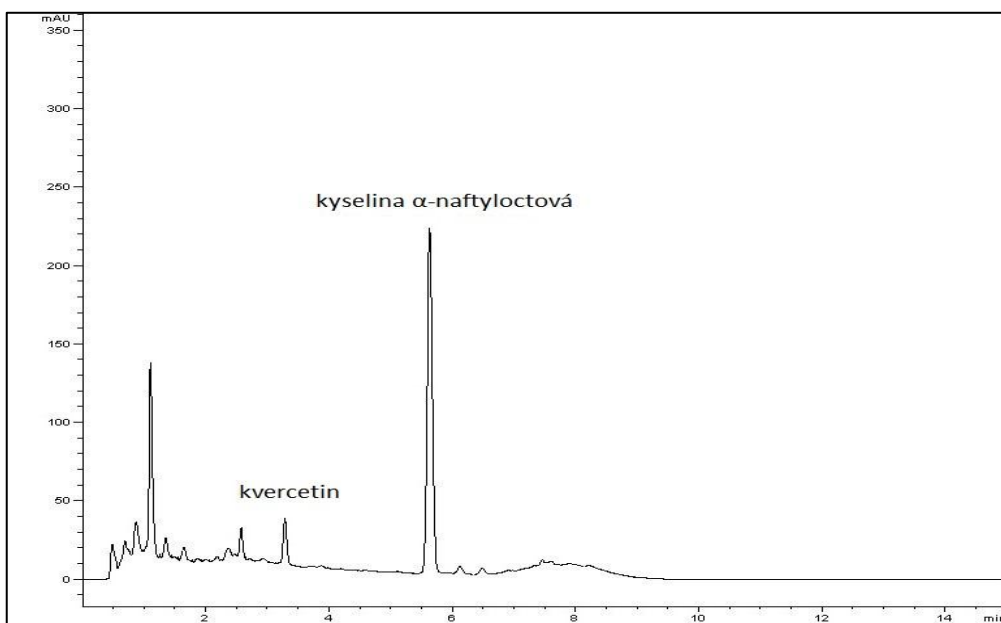


Obr. 17 Chromatografický profil extraktu vigny zlaté

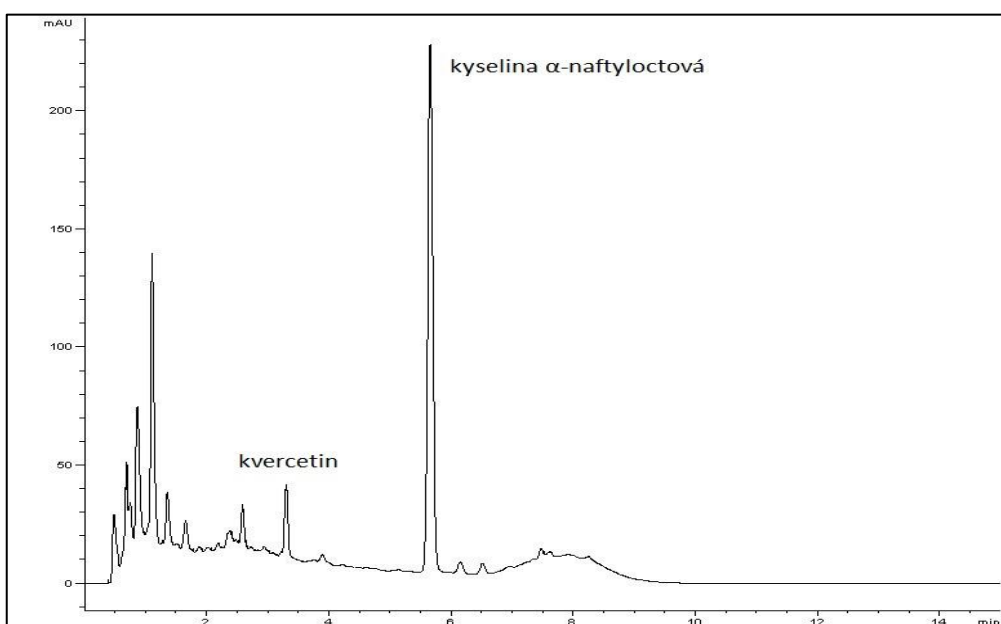
Chromatografický profil extraktu vigny zlaté je znázorněn na obr. 17. Vitexin a isovitexin jsou glykosidy apigeninu. Za podmínek naší metody pravděpodobně nedošlo k jejich hydrolýze, proto ve vzorcích nebyl identifikován apigenin jako aglykon.

## 5.3 Pohanka obecná

V pohance obecné se jako dominantní látka projevil kvercetin. Chromatografický profil extraktu pohanky obecné znázorněn na obr. 18 a 19.



Obr. 18 Chromatografický profil extraktu pohanky obecné 0

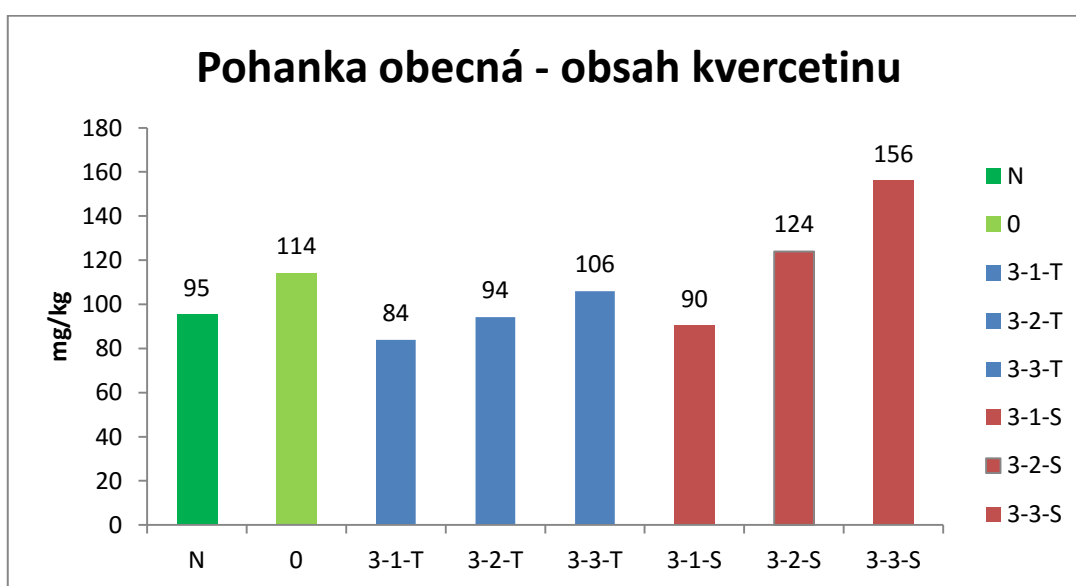


Obr. 19 Chromatografický profil extraktu pohanky obecné 3T

Obsah této látky se každý den pěstování zvyšoval, a to ve vzorcích pěstovaných na světle i ve tmě. Nejvyšší podíl této látky byl zaznamenán třetí den pěstování na světle a to 156 mg/kg.

Obsah kvercetinu dosahoval druhý den ve tmě 94 mg/kg, na světle 124 mg/kg. Obsahových látek bylo tedy až o čtvrtinu více ve vzorcích pěstovaných na světle (obr. 20). Třetí den pěstování ve tmě dosahoval obsah kvercetinu 106 mg/kg, na světle pak 156 mg/kg. Tím bylo dosaženo zjištění, že třetí den bylo dokonce o třetinu více obsahových látek kvercetinu na světle. Rozdíl obsahů kvercetinu na světle a ve tmě je zřejmý a nelze ho přehlédnout. Ve tmě tak bylo identifikováno kvercetinu méně.

Zajímavým poznatkem je také to, že více kvercetinu bylo identifikováno již u semen pouze namočených oproti semenům, která byla jeden den pěstována na světle či ve tmě.

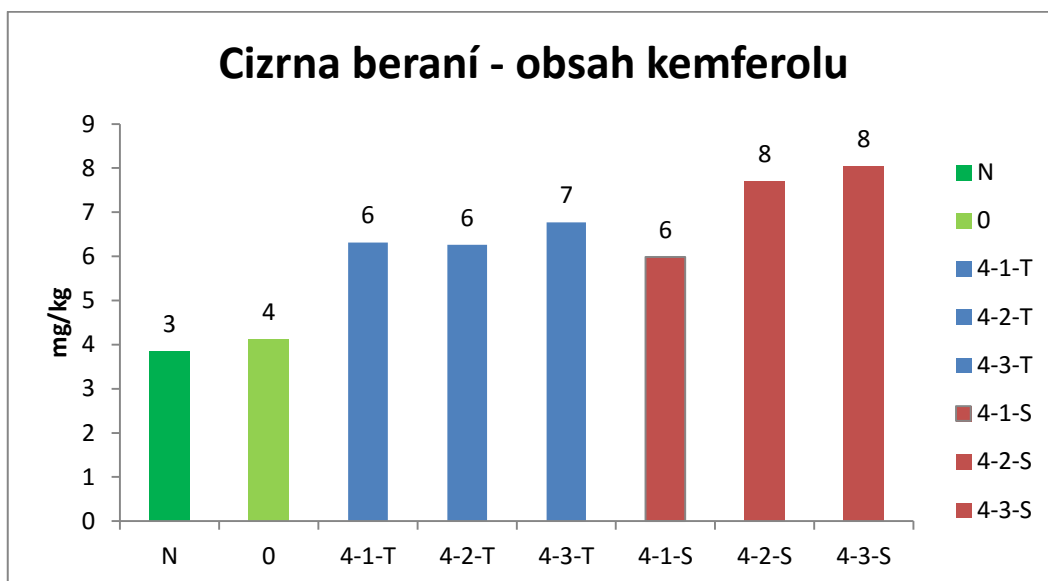


Obr. 20 Vliv pěstování na obsah kvercetinu v pohance obecná

#### 5.4 Cizrna beraní

V cizrně beraní byl objeven jako dominantní látka kemferol. Grafické znázornění kemferolu v cizrně beraní je uvedeno na obr. 21.

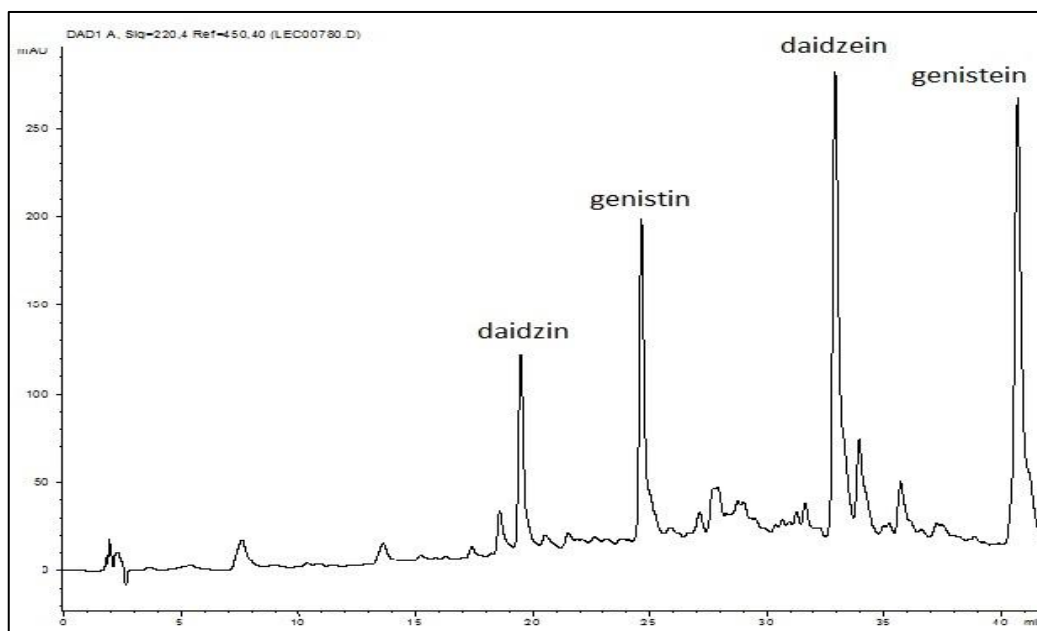
Vzorek nenamočený a vzorek, který byl pouze namočen, ale nekultivován obsahovaly nižší množství zmíněného kemferolu oproti vzorkům, které již klíčily. Pro porovnání, obsah kemferolu třetí den ve tmě činil 7 mg/kg, na světle dosahoval hodnoty 8 mg/kg. Jak je patrné, obsah dominantního kemferolu dosahoval vyšších hodnot ve vzorcích pěstovaných na světle.



Obr. 21 Vliv pěstování na obsah kemferolu v cizrně beraní

## 5.5 Sója luštinatá

V sóji luštinaté byly identifikovány metodou HPLC/MS následující polyfenolické sloučeniny daidzin, daidzein, genistin a genistein. Chromatografický profil extraktu je znázorněn na obr. 22.



Obr. 22 Chromatografický profil extraktu sóji luštinaté

Tyto polyfenolické sloučeniny jsou tzv. isoflavony. Sójové bílkoviny, a tedy i isoflavony nabyly v poslední době značné pozornosti právě díky jejich roli při zlepšování rizikových faktorů kardiovaskulárního onemocnění a celkového zdraví. <sup>(36)</sup>

Mezi jejich biologické účinky patří významná estrogenní aktivita. Pravidelný příjem těchto sloučenin s potravou, který je zajištěn zejména při konzumaci sójových výrobků ovlivňuje příznivě onemocnění srdce a cév a vznik některých druhů rakoviny.

Publikovaná práce (Sacks, 2006) se zabývá problematikou sójových proteinů, isoflavonů a jejich účinky.



## 6 Závěr

Obsahy dominantních fenolických látek byly stanoveny ve čtyřech zástupcích čeledi Fabaceae (čočka jedlá, cizrna beraní, vigna zlatá, sója luštinatá) a u jednoho zástupce čeledi Polygonaceae (pohanka obecná). Rostlinné materiály byly vypěstovány na světle a ve tmě pro porovnání množství fenolických látek u vybraných druhů.

Fenolické látky (fenolické kyseliny, flavonoidy), které takto byly určeny ve zkoumaném rostlinném materiálu metodou HPLC, patřily mezi flavony a flavonoly.

V čočce jedlé se jako dominantní látky projevíly luteolin a kemferol. Obsah těchto látek byl na světle znatelně vyšší než ve tmě.

Ve vigne zlaté jsou dominantními látkami polyfenolické sloučeniny vitexin a isovitexin. Za podmínek naší metody nejspíše nenastala jejich hydrolýza, a proto ve vzorcích nebyl apigenin identifikován jako aglykon. Tyto sloučeniny byly detekovány metodou HPLC/MC.

V pohance obecné je dominantní látkou kvercetin. Obsah kvercetinu byl na světle až o třetinu vyšší než ve tmě.

V cizrně beraní je dominantní látkou kemferol. Rovněž i zde byl podíl obsahových látek vyšší na světle.

V sóji luštinaté jsou dominantními látkami polyfenolické sloučeniny daidzin, daidzein, genistin a genistein. Tyto zmíněné isoflavony byly detekovány stejným způsobem jako vzorky vigny zlaté, a to metodou HPLC/MC. Nejspíše opět nedošlo k jejich hydrolýze.

Z výsledků vyplývá, že větší obsahy fenolických sloučenin byly zjištěny u rostlin pěstovaných na světle. Ze studií bylo zjištěno, že právě UV záření má vliv na obsah fenolických látek, což výsledky prokazují.

Získané výsledky o obsahu flavonoidních aglykonů v lyofilizovaném materiálu, které jsou uvedené v této práci, nebyly dosud v literatuře publikovány.

## 7 Seznam informačních zdrojů

1. ŠTULÍK, K. et al. Analytické separační metody. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005, 264 s., s. 136-137. ISBN 80-246-0852-9.
2. OPEKAR, F. et al. Základní analytická chemie: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem. 1. vyd. Praha, Karolinum, 2007, 201 s., s. 165-169. ISBN 978-80-246-0553-1.
3. CHURÁČEK, J. et al. Analytická separace látek. 1. vyd. Praha, SNTL, 1990, 384 s., s. 203-213. ISBN 80-03-00569-8.
4. VANČUROVÁ, R., KÜHN, F. Zemědělská botanika 3: systematika rostlin. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1966, 437 s., s. 178-261.
5. GRAMAN, J., ČURN, V. Šlechtění zemědělských plodin (obiloviny, luskoviny). 1. vyd. České Budějovice: ZF JU České Budějovice, 1998, 194 s., s. 161-192. ISBN 80-7040-300-4.
6. HOSNEDL, V., VAŠÁK, J., MEČIAR, L. et al. Rostlinná výroba – II (LUSKOVINY, OLEJNINY). 1. vyd. Praha: Agronomická fakulta ČZU v Praze, katedra rostlinné výroby, 1998, 180 s., s. 1-56. ISBN: 80-213-0153-8.
7. JANČA, J., ZENTRICH, A. J. Herbář léčivých rostlin 4. díl. 1. vyd. Praha: EMINENT, 1996, 287s., s. 28-227. ISBN: 80-85876-20-5.
8. LAHODA, J. et al. Luskoviny pěstování a využití. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1990, 224 s., s. 11-144. ISBN: 80-209-0127-2.
9. DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J. Chemie potravin, 1. vyd. Praha, SNTL, 1983, s. 632.
10. MÍKA, V. et al. Fenolické látky v lučních rostlinách. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2001, s. 116. ISBN: 80-86555-07-0.
11. Dostupné z:  
<http://web.vscht.cz/~koplikr/Rostlinn%C3%A9%20fenoly%20a%20flavonoidy.pdf>, staženo dne 21. 3. 2016.
12. ZLOCH, Z. Zdravotní efekt polyfenolů z hlediska jejich příjmu a využitelnosti. Vojenské zdravotnické listy. 2005, 5, s. 226-229.

13. SLANINA, J., TÁBORSKÁ, E. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chem. listy* 2004, 98, 239-245.
14. CHRISTENSEN, L. P., KAACK, K., FRETTE, X. C. Selection of elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes best suited for the preparation of elderflower extracts rich in flavonoids and phenolic acid. *Eur food Res Technol*, 2008, 227, 2-93-305.
15. VELÍŠEK, J. *Chemie potravin* 3. díl, 2. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, 368 s., s. 19-35. ISBN: 80-86659-03-8.
16. VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin* 2. díl. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, s. 644. ISBN: 978-80-86659-16-9.
17. MOUDRÝ, J., KALINOVÁ, J., PETR, J., MICHALOVÁ, A. *Pohanka a proso*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2005, s. 206. ISBN: 80-7271162-8.
18. ZICHA, O. BioLib: Profil taxonu [online] [2016-03-22] Dostupné z: <http://www.biolib.cz/taxon/>
19. ÚZEI. Antioxidanty pro zdraví [online] 2014 [2016-03-22] Dostupné z: [http://www.viscojis.cz/teens/index.php?option=com\\_content&view=article&id=131%3A115&catid=56%3Avitaminy-a-antioxidanty&Itemid=106](http://www.viscojis.cz/teens/index.php?option=com_content&view=article&id=131%3A115&catid=56%3Avitaminy-a-antioxidanty&Itemid=106)
20. FIDLER, M., KOLÁŘOVÁ, L. Analýza antioxidantů v chmelu piva. *Chemické listy*. 2009, 103, 232-235.
21. CVRČKOVÁ, Dagmar. Pěstování zeleniny - Luskoviny [online]. 2014. [2016-03-22] Dostupné z: <http://www.floranazahrade.cz/pestovani-zeleniny-luskoviny/>
22. Krytosemenné rostliny. Biomach, výpisky z biologie [online]. 2012- [cit. 2016-03-22] Dostupné z: <http://www.biomach.cz/biologie-rostlin/system-a-evoluce-rostlin/krytosemenne-rostliny>
23. SÝKORA, D., TESAŘOVÁ, E., VOSMANSKÁ, M., ZVOLÁNKOVÁ, M. Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC, *Chem. listy* 101, 190–199 (2007)
24. TŮMOVÁ, Eva. Přírodní toxické látky ve výživě hospodářských zvířat [online]. Praha: Výzkumný ústav živočišné výroby, 2006. Dostupné online.

25. MAŇÁSKOVÁ, V., Extrakce fenolových kyselin z rostlinných potravin pevného charakteru, Zlín, 2013, [2016-03-22], diplomová práce, Ústav technologie potravin.
26. Fazolky MUNGO. GoMango [online]. 2016- [cit. 2016-03-22] Dostupné z: <http://www.gomango.cz/fazolky-mungo/>
27. KŘÍŽEK, M., ŠÍMA, J. Analytická chemie. 1. vyd. České Budějovice: ZF JU České Budějovice, 2015, 214 s., s. 178-194. ISBN: 978-80-7394-486-5.
28. DRBAL, K., KŘÍŽEK, M. Analytická chemie. 1. vyd. České Budějovice: ZF JU České Budějovice, 1999, 186 s., s. 158-175. ISBN 80-7040-352-7.
29. ŠTÍPEK, S. et. al. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2000, 314 s. ISBN 80-7169-704-4.
30. DADÁKOVÁ, E., KALINOVÁ, J. Determination of quercetin glycosides and free quercetin in buckwheat by capillary micellar electrokinetic chromatography. *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 1633-1638.
31. MOLNÁR-PERL, I., FÜZHAI, ZS. Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. *Journal of Chromatography A.* 2005, 1073, 201-227.
32. CALDERÓN-MONTAÑO, J. M. A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.* 2011, 11, 298-344.
33. PIETTA, G. P., MAURI, L. P., SIMONETTI, P., TESTOLIN, G. HPLC and MEKC determination of major flavonoids in selected food pools. *Fresenius J Anal Chem.* 1995, 352, 788-792.
34. DADÁKOVÁ, E., PROCHÁZKOVÁ, E., KŘÍŽEK, M. Application micellar electrokinetic capillary chromatography for quantitative analysis of quercetin in plant materials. 2001, *Electrophoresis*, 22, 1573-1578.
35. FRESCO, P. et al. New Insights on the Anticancer Propeties of Dietary Polyphenols. *Medical Research Reviews.* 2006, 26, 747-766.
36. SACKS, F. M. et al. Soy Protein, Isoflavones, and Cardiovascular Health: An American Heart Association Science Advisory for Professionals From the Nutrition Committee [online]. 2006. [2016-04-11] Dostupné z:

<http://circ.ahajournals.org/content/113/7/1034.full?sid=f41f6b81-3798-4686-9bf8-122e7a44358d>.

37. TRÍSKA, J., VRCHOTOVÁ, N., SÝKORA, J., MOOS, M. Separation and Identification of 1,2,4-Trihydroxynaphthalene-1-O-glucoside in *Impatiens glandulifera* Royle. 2013, *Molecules*, 18, 8429-8439.

### **Obrázky převzaté z internetu**

38. Obr. 5 Čočka jedlá (stažen 1. 4. 2016: <http://www.zahradaapriroda.cz/cocka-jedla/>)
39. Obr. 6 Cizrna beraní (stažen 1. 4. 2016: <http://www.biolib.cz/cz/formsearch/?action=execute&searcharea=2&string=cizrna>)
40. Obr. 7 Vigna zlatá (stažen 1. 4. 2016: [http://www.e-herbar.net/main.php?g2\\_itemId=42270](http://www.e-herbar.net/main.php?g2_itemId=42270))
41. Obr. 8 Sója luštinatá (stažen 1. 4. 2016 [http://web2.mendelu.cz/af\\_211\\_multitext/systematika/ucebni\\_text/system/krytosmenne/dvoudelozne/bobovite/Glycine\\_max.html](http://web2.mendelu.cz/af_211_multitext/systematika/ucebni_text/system/krytosmenne/dvoudelozne/bobovite/Glycine_max.html))
42. Obr. 9 Pohanka obecná (stažen 1. 4. 2016 [https://cs.wikipedia.org/wiki/Pohanka\\_obecn%C3%A1](https://cs.wikipedia.org/wiki/Pohanka_obecn%C3%A1))
43. Obr. 10 Schéma HPLC (stažen 26. 4. 2016 <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>)

## 8 Přílohy

Příloha 1: Tabulka zaznamenávající prvotní navážky výhonků

Luštěníiny světlo	Navážka (g)	Luštěníiny tma	Navážka (g)
1/1/S	25,08	1/1/T	25,04
1/2/S	25,01	1/2/T	25,03
1/3/S	25,06	1/3/T	25,03
1/4/S	25,07	1/4/T	25,04
2/1/S	25,05	2/1/T	25,05
2/2/S	25,00	2/2/T	25,00
2/3/S	25,08	2/3/T	25,01
2/4/S	25,06	2/4/T	25,01
3/1/S	25,01	3/1/T	25,00
3/2/S	25,02	3/2/T	25,01
3/3/S	25,00	3/3/T	25,02
3/4/S	25,00	3/4/T	25,00
4/1/S	25,13	4/1/T	24,99
4/2/S	25,20	4/2/T	25,06
4/3/S	25,00	4/3/T	25,08
4/4/S	25,18	4/4/T	25,04
5/1/S	25,06	5/1/T	24,99
5/2/S	24,99	5/2/T	25,14
5/3/S	25,08	5/3/T	25,10
5/4/S	25,16	5/4/T	25,14

Příloha 2: Rozvážená namočená semena



Příloha 3: Tabulka zaznamenávající měnící se váhu klíčků pěstovaných na světle

Luštěniny - světlo	Váha 1. den světlo (g)	Váha 2. den světlo (g)	Váha 3. den světlo (g)	Váha 4. den světlo (g)
1/S	23,81	31,94	27,69	25,11
2/S	22,58	28,13	24,69	17,49
3/S	22,86	29,81	28,76	21,19
4/S	23,69	27,38	26,21	17,58
5/S	22,64	27,59	26,00	19,36

Příloha 4: Tabulka zaznamenávající měnící se váhu klíčků pěstovaných ve tmě

Luštěniny - tma	Váha 1. den tma (g)	Váha 2. den tma (g)	Váha 3. den tma (g)	Váha 4. den tma (g)
1/1/T	24,37	22,87	25,93	27,18
2/1/T	24,44	22,22	24,60	26,70
3/1/T	24,25	22,33	24,75	22,53
4/1/T	23,00	23,36	25,45	24,58
5/1/T	23,23	21,32	21,89	18,88

Příloha 5: Sorpce na tuhé fázi (SPE)



## **8.1 Seznam příloh**

Příloha 1: Tabulka zaznamenávající prvotní navážky výhonků

Příloha 2: Rozvážená namočená semena

Příloha 3: Tabulka zaznamenávající měnící se váhu klíčků pěstovaných na světle

Příloha 4: Tabulka zaznamenávající měnící se váhu klíčků pěstovaných ve tmě

Příloha 5: Sorpce na tuhé fázi (SPE)