



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 klinických a preklinických oborů

Bakalářská práce

Biologicky aktivní látky v neobvyklých druzích zeleniny

Vypracovala: Soňa Vocílková
Vedoucí práce: RNDr. Naděžda Vrchotová, CSc.

České Budějovice 2015

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá stanovením obsahu fenolových látek v neobvyklých druzích zeleniny při různém způsobu pěstování. Byly vybrány tyto neobvyklé druhy zeleniny: laskavec trojbarevný (*Amaranthus tricolor*), kopretina věncová (*Chrysanthemum coronarium*), hořčice čínská – listová (*Brassica rapa* var. komatsuna), hořčice čínská (*Brassica juncea*), mizuna a mibuna (*Brassica rapa* ssp. japonica). Tyto neobvyklé druhy se řadí mezi asijskou listovou zeleninu, která se v současnosti začíná rozšiřovat po celém světě.

Listová zelenina obsahuje mimo jiné i fenolové látky, mezi které se řadí i rozsáhlá skupina flavonoidů. Flavonoidy jsou významné svojí biologickou aktivitou, snadnou dostupností a především pozitivními účinky na lidský organismus.

Vybraná listová zelenina byla vypěstována na pokusném pozemku ve skleníku a na volné ploše. Obsahy fenolových látek byly stanoveny metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Ve vybraných rostlinách byly stanoveny obsahy dominantních látek. V laskavci trojbarevném byly stanoveny deriváty kávové kyseliny a rutin. V kopretině věncové byla stanovena chlorogenová kyselina, dikafeoylchinová kyselina a dikafeoylsukcinylchinová kyselina. V hořčici čínské – listové a hořčici čínské byly stanoveny deriváty flavonolů a fenolové kyseliny. V mizuně a mibuně byly stanoveny deriváty flavonolů, fenolové kyseliny a indoly.

Byly zjištěny významné rozdíly obsahových látek mezi skleníkem a záhonem. Ve většině případů bylo více obsahových látek na záhoně.

Klíčová slova: fenolové látky, flavonoidy, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, *Amaranthus tricolor* L., *Chrysanthemum coronarium* L., *Brassica rapa* var. komatsuna, *Brassica juncea*, *Brassica rapa* ssp. japonica

Abstract

My bachelor thesis dealt with determination of content of some phenolic compounds in some rare sorts of vegetable like *Amaranthus tricolor*, *Chrysanthemum coronarium*, *Brassica rapa* var. komatsuna, *Brassica rapa* ssp. japonica var. mizuna and mibuna, *Brassica juncea*. These uncommon species belonged to the asian leaf vegetable. At the present time these species are restrained over the whole world.

Besides vitamins, these species of leaf vegetable contain also phenolic compounds like flavonoids, which reveal significant biological activity with positive effects on human health.

The above mentioned sorts of vegetable were cultivated both on the experimental field on the open air and also in glasshouse. The content of phenolic derivatives was determined by high-performance liquid chromatography. In the selected plants were found these dominant compounds: *Amaranthus tricolor* contained derivatives of caffeic acid and rutin, in *Chrysanthemum coronarium* chlorogenic acid, dicaffeoyl acid and dicaffeoyl-succinylquinic acid.

In the plants *Brassica rapa* var. komatsuna and *Brassica juncea* were determined derivatives of flavonols and phenolic acid, in varieties mizuna and mibuna derivatives of flavonols, phenolic acid and indols.

Significant differences in the content of studied compounds was found between the plants cultivated under open air and in glasshouse. The plants cultivated under the open air have significantly higher content of studied compounds than those cultivated in glasshouse.

Keywords: phenolic compounds, flavonoids, high - performance liquid chromatography, *Amaranthus tricolor* L., *Chrysanthemum coronarium* L., *Brassica rapa* var. komatsuna, *Brassica juncea*, *Brassica rapa* ssp. japonica

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 (datum)

.....

Soňa Vocílková

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí práce paní RNDr. Naděždě Vrchotové, CSc. za cenné rady, odborné vedení a připomínky při zpracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat doc. Ing. Evě Dadákové, Ph.D., za pomoc při pěstování rostlinného materiálu.

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Cíle práce	9
3	Literární část	10
3.1	Fenoly.....	10
3.1.1	Fenolové kyseliny a jejich deriváty	11
3.1.2	Flavonoidy	12
3.2	Neobvyklé druhy zeleniny	13
3.3	Listová zelenina	13
3.4	Vybrané druhy neobvyklé zeleniny	14
3.4.1	Laskavec trojbarevný (<i>Amaranthus tricolor</i> L.).....	14
3.4.2	Chryzantéma – kopretina věncová (<i>Chrysanthemum coronarium</i> L.)	15
3.4.3	Hořčice čínská – listová (<i>Brassica rapa</i> var. <i>komatsuna</i>)	17
3.4.4	Hořčice čínská (<i>Brassica juncea</i>)	18
3.4.5	Mizuna (<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>japonica</i>)	20
3.4.6	Mibuna (<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>japonica</i>)	21
3.5	Abiotické podmínky pěstování zeleniny	22
3.6	Kapalinová chromatografie	22
3.6.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie	23
4	Praktická část	29
4.1	Materiál	29
4.1.1	Pěstování.....	29
4.1.2	Sušení.....	29
4.1.3	Chemikálie a standardy.....	29
4.1.4	Laboratorní sklo a přístroje.....	30
4.2	Metody	30
4.2.1	Extrakce fenolových látek z rostlin	30
4.2.2	Stanovení fenolových látek metodou HPLC	31
5	Výsledky a diskuze	33
5.1	Laskavec trojbarevný	33
5.2	Kopretina věncová	35
5.3	Brukvovité.....	37
5.3.1	Hořčice čínská - listová.....	39
5.3.2	Hořčice čínská.....	41
5.3.3	Mizuna	42
5.3.4	Mibuna.....	43
6	Závěr	45
7	Seznam informačních zdrojů	47
8	Přílohy.....	52
8.1	Seznam příloh.....	56

Seznam použitých zkratk

HPLC vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)

LC kapalinová chromatografie (liquid chromatography)

MS hmotová spektrometrie (mass spectrometry)

var. varieta (varietas)

ssp. poddruh (subspecies)

RT retenční čas (retence time)

UV ultrafialové spektrum (ultraviolet)

DAD detektor s diodovým polem (diode array detector)

FLD fluorescenční detektor (fluorescence detector)

VIS viditelné spektrum (visible)

RP reverzní fáze (reverse phase)

1 Úvod

Rostliny obsahují metabolity, které se dělí na primární a sekundární. Primární metabolity zajišťují základní životní funkce. Jsou to sacharidy, proteiny, lipidy a nukleové kyseliny. Sekundární metabolity chrání rostliny před vnějšími vlivy jako je ultrafialové záření, ochrana proti býložravcům, před různými patogeny a jinými nepříznivými podmínkami. Mezi sekundární metabolity patří např. terpenoidy, alkaloidy, fenoly a polyamidy. S ohledem na široké rozšíření fenolových látek a vysoký obsah v rostlinách, jsou fenolové látky běžnou součástí lidské potravy. Nejběžnějšími rostlinnými polyfenoly jsou fenolové kyseliny, flavonoidy a lignany (Berhow a Vaughn, 1999, Slanina a Táborská, 2004, Maňásková, 2013).

Neobvyklé druhy zeleniny (laskavec trojbarevný, kopretina věncová, hořčice čínská, hořčice čínská – listová, mibuna, mizuna) jsou bohatým zdrojem rostlinných polyfenolů.

Fenolové sloučeniny jsou v potravě důležité pro své biologické účinky (antikarcinogenní, antioxidační, antialergické, antibakteriální, antivirové a protizánětlivé). Zabraňují vzniku zánětlivých procesů. Příjem fenolových sloučenin v potravě je spojován se snížením výskytu závažných onemocnění zejména kardiovaskulární choroby, rakoviny a další. Působit mohou i proti tvorbě krevních sraženin a tím i snižují výskyt infarktu myokardu, mozkové mrtvice nebo plicní embolie (Pietta, 2000, Slanina a Táborská, 2004). Tyto látky nás chrání před oxidačním poškozením. To je děj, při kterém dochází k poškození různých struktur vlivem volných radikálů. Volné radikály jsou důležité pro funkci našeho organismu, ale za určitých okolností mohou organismus poškodit. Mezi známé flavonoidy patří rutin, chlorogenová kyselina a jiné (Ürgeová, 2010, Šípek, 2000, ÚZEI, 2014).

Hlavním cílem této bakalářské práce je zjistit rozdílné obsahy fenolových látek ve skleníku a na záhonu. Dále seznámení se s metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). HPLC se velmi často používá pro stanovení fenolových sloučenin. Pomocí této metody byl stanoven obsah dominantních látek, jako jsou deriváty kyseliny kávové, chlorogenové a rutin.

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 fenolových sloučenin kapalinovou chromatografií.
- Stanovení obsahů vybraných fenolových sloučenin ve vybraných druzích zeleniny vypěstované na pokusném pozemku, zpracovat výsledky.

3 Literární část

3.1 Fenoly

Polyfenolické sloučeniny tvoří různorodou skupinu sekundárních metabolitů, které jsou přítomny v lidské stravě. Fenolové látky se řadí mezi přírodní antioxidanty. Antioxidanty prodlužují údržnost potravin tak, že je chrání před poškozením oxidací. Chemické změny potravin způsobené oxidací různých obsahových látek, negativně ovlivňují výživovou, hygienicko-toxikologickou a senzoryckou (vůni, chuť, barvu) hodnotu. Přírodní antioxidanty jsou získávány z rostlin především jako extrakty. Rostlinné fenoly mají různé vlastnosti, jsou to chinoidní barviva, přírodní oxidanty, přírodní toxické látky nebo senzorycky aktivní látky (Fresco et al., 2006, Velíšek, 1999).

V tab.1 jsou znázorněny hlavní skupiny fenolových sloučenin.

Tab.1: Hlavní skupiny fenolových sloučenin

Počet uhlíků	Základní skelet	Skupina fenolů
6	C ₆	jednoduché fenoly, benzochinony
7	C ₆ -C ₁	fenolové (benzoové) kyseliny
8	C ₆ -C ₂	acetofenony, fenyloctové kyseliny
9	C ₆ -C ₃	fenolové (skořicové) kyseliny, fenylpropeny, kumariny, chromony
10	C ₆ -C ₄	naftochinony
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	xanthony
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	stilbeny, antrachinony
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	flavonoidy, isoflavonoidy
18	(C ₆ -C ₃) ₂	lignany, neolignany
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	biflavonoidy
n	(C ₆ -C ₃) _n	lignin
	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	flavolany

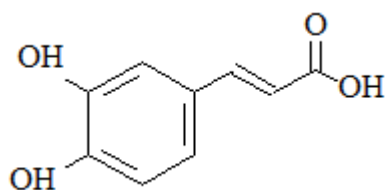
3.1.1 Fenolové kyseliny a jejich deriváty

Fenolové kyseliny převážně se strukturou C₆-C₁ (benzoová kyselina a její deriváty) a se strukturou C₆-C₃ (skořicová kyselina a její deriváty) jsou součástí všech rostlinných materiálů. Fenolové kyseliny a jejich deriváty vykazují antioxidační účinky. Aktivita závisí na počtu hydroxylových skupin v molekule. Aktivnějšími antioxidanty jsou skořicové kyseliny a *o*-difenoly (např. kávová kyselina a její depsid chlorogenová kyselina). Aktivitu vykazují i další deriváty fenolových kyselin například glykosidy a amidy. Nejběžnějšími estery fenolových kyselin jsou depsidy (depsidy jsou polyfenolové sloučeniny složené ze dvou nebo více monocyklických aromatických jednotek spojených pomocí esterové vazby), (Velíšek, 1999, Hillenbrand, 2004).

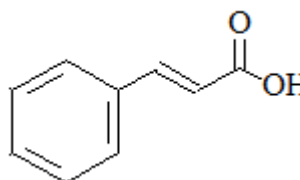
Velmi rozšířená chlorogenová kyselina je zástupcem 3-depsidů odvozených od chinové kyseliny. Všechny přírodní estery chinové kyseliny se značí obecným názvem chlorogenová kyselina (Velíšek, 1999).

Na obrázku 1, 2, 3 a 4 jsou znázorněny fenolové kyseliny: kávová, skořicová, ferulová a chlorogenová.

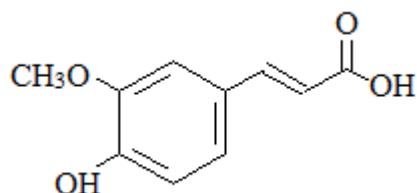
Obr. 1 : Kávová kyselina



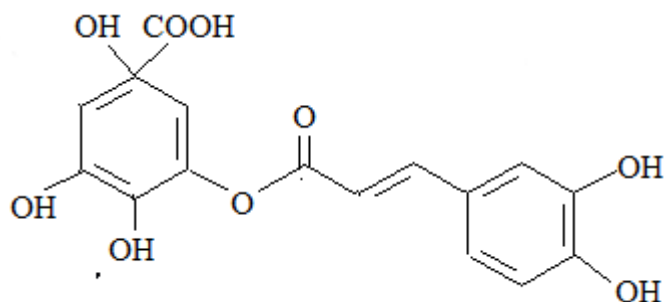
Obr. 2 : Skořicová kyselina



Obr. 3 : Ferulová kyselina



Obr. 4 : Chlorogenová kyselina



3.1.2 Flavonoidy

Flavonoidní látky neboli flavonoidy jsou velmi rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů obsahujících v molekule dva benzenové kruhy spojené tříuhlíkovým řetězcem. Všechny flavonoidní látky je v současnosti známo více než 4000 a stále se v různých rostlinných zdrojích nacházejí nové sloučeniny.

Rozeznáváme základní struktury flavonoidů:

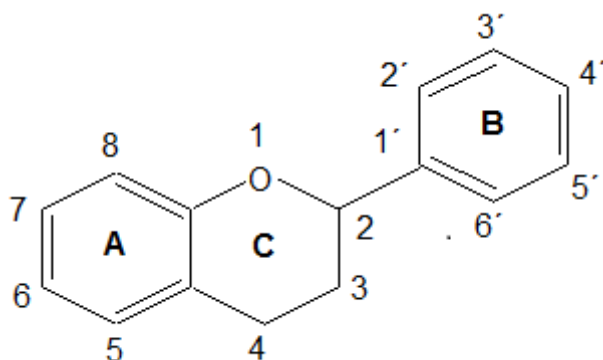
- katechiny
- leukoanthokyanidiny
- flavanony
- flavanonoly
- flavony
- flavonoly
- anthokyanidiny

Strukturně příbuzné jsou:

- chalkony a dihydrochalkony
- aurony

Některé flavonoidy jsou důležitá přírodní rostlinná barviva, jiné jsou významné pro svoji chuť (jsou to trpké a hořké látky nebo jejich prekurzory) nebo mají významné biologické účinky (Velíšek, 1999). Struktura flavonoidů je znázorněna na obr. 5.

Obr. 5 : Základní struktura flavonoidů



3.2 Neobvyklé druhy zeleniny

Neobvyklé druhy zeleniny, pro některé populace jsou základní potravinou, pro jiné exotickou pochoutkou. V České republice se řadí mezi neobvyklou zeleninu například kalabasa, batáty, rebarbora. Dále jsou pro Českou republiku neobvyklé asijské druhy listové zeleniny. Z čeledi brukvovitých je málo známá například roketa a mizuna, z čeledi hvězdnicovitých například kopretina věncová a z čeledi laskavcovitých například laskavec trojbarevný (ÚZEI, 2014).

3.3 Listová zelenina

Listová zelenina je souborný název pro všechny druhy zeleniny, které se pěstují pro jedlé listy např.: salát, zelí, kapusta a jiné. Jedna z vlastností listové zeleniny je rychlý růst. Proto potřebuje dostatek živin, světla a vláhy. Listová zelenina má krátkou vegetační dobu, proto se používá jako doplnění k hlavní plodině. Sklidí se dříve, než by se začala s hlavní plodinou utlačovat. Listová zelenina obsahuje mnoho prospěšných látek. Jedna z nejznámějších je kyselina listová, která je nezbytná pro syntézu

nukleových kyselin, krvetvorbu a zásadní význam má pro normální růst a vývoj plodu (Jůzlová, 2003, Bruchter, 2012).

3.4 Vybrané druhy neobvyklé zeleniny

Vybrané druhy neobvyklé zelenině se dostávají už i do maloobchodních sítí v České republice.

3.4.1 Laskavec trojbarevný (*Amaranthus tricolor* L.)

Taxonomie:

Říše: rostliny

Oddělení: rostliny krytosemenné

Třída: vyšší dvouděložné rostliny

Řád: hvozdíkotvaré

Čeleď: laskavcovité

Druh: laskavec trojbarevný (*Amaranthus tricolor* L.)

latinské synonymum: *Amaranthus gangeticus* L. (Macháček, 2012, Zicha, 2014)

Laskavce jsou zřejmě nejběžnější listovou zeleninou nížinných tropů Afriky a Asie. Druhy laskavce byly opět zviditelněny jako nadějně potravinářské plodiny především kvůli jejich odolnosti vůči suchu, teplu, škůdcům a chorobám, a vysokou výživovou hodnotou semen a listů. Rod *Amaranthus* L. se skládá z 60 až 70 druhů.

Tento rod obsahuje nejméně 17 druhů s jedlými listy a tři druhy obilí pěstované pro jejich semena. Některé druhy jsou považované za plevel, nicméně lidé na celém světě si cení laskavců jako listové zeleniny, obilovin a okrasných rostlin (Sogbohossou a Achigan-Dako, 2014).

Ve všech odrůdách laskavce se z flavonoidů nejvíce vyskytovaly isokvercetin a rutin a hyperosid. Nejhojnější fenolové kyseliny ve všech odrůdách laskavce byly salicylová kyselina, syringová kyselina, gallová kyselina, vanilinová kyselina, ferulová kyselina, *p*-kumarová kyselina a sinapová kyselina. Laskavec trojbarevný je bohatý na karotenoidy, betakyaniny, betalainy, betaxantiny a chlorofyly (Khanam a Oba, 2013).

Na obr. 6 můžeme vidět laskavec trojbarevný.



Obr. 6: Laskavec trojbarevný

3.4.2 Chryzantéma – kopretina věncová (*Chrysanthemum coronarium* L.)

Taxonomie:

Říše: rostliny

Oddělení: rostliny krytosemenné

Třída: vyšší dvouděložné rostliny

Řád: hvězdnicotvaré

Čeleď: hvězdnicovité

Druh: kopretina věncová (*Chrysanthemum coronarium* L.)

česká synonyma: zlateň věncová

zlateň věncová různobarevná

pinardie

latinská synonyma: *Glebionis coronaria* (L.)

Xanthophthalmum coronarium (L.) (Macháček, 2012, Zicha, 2014)

Kopretina věncová je znázorněna na obr. 7.

Listy nebo mladé stonky se jedí syrové nebo vařené. Číňané z listů i květů vaří čaj, mladé výhonky a okvětní lístky používají do salátů a z kořenů připravují čaj proti bolesti hlavy. Jedlá kopretina je bohatá na vitamíny a minerály. Pokud se listy odřezávají těsně nad zemí, tak listy budou znovu obrůstat. Kopretina vyžaduje dostatek vláhy (www.daf.qld.gov.au).

V kopretině věncové se nejvíce vyskytují tři fenolové kyseliny, chlorogenová kyselina, 3,5-dikafeoylchinová kyselina a 3,5-dikafeoyl-sukcinylchinová kyselina. V mladých listech bylo největší množství fenolových kyselin. Minoritní fenolové kyseliny byly p-kumaroylchinová kyselina, feruoylchinová kyselina, kafeoylchinová kyselina a trikafeoylchinová kyselina. Z flavonoidů zde byly nalezeny rutin, luteolin, myricetin a tricín (Chuda et al., 1998; Hosni et al., 2013).



Obr. 7: Kopretina věncová

Čeled' brukvovité (Brassicaceae)

Čeled' brukvovité (dříve křížaté – Cruciferae) zahrnuje 380 rodů a 3200 druhů po celém světě. Rostliny mohou být jednoleté nebo vytrvalé. Nejznámějším druhem je

brukev řepka olejka (*Brassica napus* subsp. *napus* L.) využívána k výrobě řepkového oleje. Méně známé jsou asijské druhy zeleniny: hořčice čínská – listová, hořčice čínská, mizuna a mibuna (Dufek, nedostupné, Jelínek a Zicháček, 1996).

Mezi charakteristické obsahové látky brukvovitých patří především sirné glykosidy zvané glukosinoláty. Tyto látky způsobují štiplavou chuť brukvovitých rostlin. V přiměřeném množství jsou glukosinoláty považovány za látky působící spíše příznivě (Judd et al., 2002, Tůmová, 2006).

Z flavonoidů se zde vyskytují kaempferol, isorhamnetin, kvercetin a jejich glykosidy. Z fenolových sloučenin se vyskytují hydroxybenzoová, hydroxyskořicová, dihydroxyskořicová, hydroxyferulová, ferulová, p-kumarová, sinapová, vanillová a kafeoylchinová kyselina. Kromě fenolových sloučenin se zde nacházejí isothiokyanáty, z nichž je nejvýznamnější sulforafan (Harbaum, 2007, Sivakumar, 2007).

V nadzemních částech a v semenech brukvovitých rostlin se nalézají estery skořicových kyselin s jablečnou kyselinou. V klíčících semenech brukvovitých rostlin se nachází glukosid s antioxidačními účinkami, (*E*)-1-*O*-sinapoyl- β -D-glukopyranosa (Velíšek, 2009).

3.4.3 Hořčice čínská – listová (*Brassica rapa* var. *komatsuna*)

Taxonomie:

Říše: rostliny

Oddělení: rostliny krytosemenné

Třída: vyšší dvouděložné rostliny

Řád: brukvotvaré

Čeleď: brukvovité

Druh: Hořčice čínská – listová (*Brassica rapa* var. *komatsuna*) (obr.8)

české synonymum: brukev řepák

latinské synonymum: *Brassica rapa* var. *pervidis* (Macháček, 2012, Zicha, 2014)

Hořčice čínská – listová je často označována jako japonská špenátová hořčice a může být konzumována v jakékoli fázi. Může dosáhnout výšky 20-35cm a to jen 20 až 30 dnů po zasetí. V dospělosti jsou listy tmavě zelené a asi 18 cm široké a 30 cm vysoké, zatímco řapíky jsou světle zelené a tenké (Larkcom, 1991).

Hořčice čínská – listová je velmi bohatá na vápník. Je běžně používána ke konzumaci především v Japonsku a v mnoha asijských zemích jako krmná plodina. Obvykle se pěstuje na jaře a na podzim. Krátkou dobu toleruje extrémně teplé nebo studené podmínky. Preferuje bohaté jílovité půdy s velkou schopností zadržovat vodu. Kořeny rostou hluboko do půdy, proto se musí zalévat pravidelně a hodně.

Hlavní problém této rostliny jsou mšice a bakteriální hniloby. Škůdci jsou i ptáci, hlavně holubi a vrabci. Sklizeň by měla probíhat při výšce nad 10 cm. Pokud se listy seříznou 2 cm nad úrovní terénu, pak porostou nové výhonky (Larkcom, 1991).



Obr. 8: Hořčice čínská – listová

3.4.4 Hořčice čínská (*Brassica juncea*)

Taxonomie:

Říše: rostliny

Oddělení: rostliny krytosemenné

Třída: vyšší dvouděložné rostliny

Řád: brukvotvaré

Čeleď: brukvovité

Druh: Hořčice čínská (*Brassica juncea*) (obr.9)

česká synonyma: brukev sítinovitá

hořčice indická

hořčice sareptská (Macháček, 2012, Zicha, 2014)

Hořčice čínská je křehká aromatická zelenina, která se může chlubit celou skupinou odrůd a typickou hořčičnou chutí. Existují i odrůdy s výrazným červeným zabarvením žebér a listových čepelí (například RED GIANT), takže jídlu dodají i výrazný barevný akcent. S věkem rostliny se aroma zvyšuje, takže mladé listy mají jen jemný hořčičný akcent a hodí se do salátových směsí (www.daf.qld.gov.au).



Obr. 9: Hořčice listová

Mizuna a mibuna

Tyto odrůdy jsou velice populární japonskou listovou zeleninou se stejným vědeckým názvem. Mizuna i mibuna mohou růst na široké škále typů půdy, ale dávají přednost bohaté, jílovitě půdě s vysokou schopností zadržovat vodu. Společnými škůdci jsou slimáci a bakteriální hniloby. Jejich růžice lze sklízet 2-5 týdnů od osevu. Pokud se pravidelně uřezávají jednotlivé listy, znovu obrůstají. Nejčastěji se používají ke konzumaci v salátech.(Larkcom, 1991)

3.4.5 Mizuna (*Brassica rapa* ssp. *japonica*)

Taxonomie:

Říše: rostliny

Oddělení: rostliny krytosemenné

Třída: vyšší dvouděložné rostliny

Řád: brukvotvaré

Čeleď: brukvovité

Druh: Mizuna (*Brassica rapa* ssp. *japonica*) (Macháček, 2012, Zicha, 2014) (obr. 10)

Latinské synonymum: *Brassica rapa* ssp. *nipposinica*

Mizuna má jemně členité, rozvětvené listy ve tvaru růžice, které jsou tmavě zelené. Tato růžice může růst do výšky až 23 cm a šířky 45 cm. Mizuna je velmi mrazuvzdorná rostlina, je tolerantní jak teplu, tak i chladu. Většinou lépe roste ve vlhkém prostředí. Je-li vystavena suchu, může růst zakrněle. Mizuna roste nejlépe v otevřeném prostoru, a to i přesto že roste obvykle na jaře a na podzim. Pokud má polostín, může růst i v létě (Larkcom, 1991).



Obr. 10: Mizuna

3.4.6 Mibuna (*Brassica rapa* ssp. *japonica*)

Taxonomie:

Říše: rostliny

Oddělení: rostliny krytosemenné

Třída: vyšší dvouděložné rostliny

Řád: brukvotvaré

Čeleď: brukvovité

Druh: Mibuna (*Brassica rapa* ssp. *japonica*) (Macháček, 2012, Zicha, 2014) (obr. 11)

Latinské synonymum: *Brassica rapa* ssp. *nipposinica*

Mibuna je velmi podobná mizuně, i když její listy mají tendenci být delší a užší se zakulacenými špičkami. Mibuna je méně přizpůsobivá extrémním podmínkám než mizuna. Příliš nesnese jarní výkyvy a velké chladno (Larkcom, 1991).



Obr. 11: Mibuna

3.5 Abiotické podmínky pěstování zeleniny

Abiotické podmínky mají ohromný vliv na obsahové látky rostlin. Vysoká intenzita UV záření příznivě ovlivňuje obsah živin a antioxidantů a snižuje kumulaci nitrátů v zelenině. Příznivé světelné podmínky zabezpečují i správný vývin vybarvení a chuťových vlastností plodin (Kopec, 2010).

Teplota je rozhodující pro činnost rostlinné buňky. Optimální teplota je 20-30°C. Teplota ovlivňuje i poměr jednotlivých složek v plodinách. Například v plodech rajčat se při vysokých teplotách tvoří více barviva lykopenu a při nižších teplotách více karotenu. Důležitá je i optimalizace závlahy, během vegetace výrazně zlepšuje podíl první jakosti i látkové složení plodin (Kopec, 2010).

3.6 Kapalinová chromatografie

V současnosti jsou využívány tři varianty kapalinové chromatografie. Nízkotlaká kolonová kapalinová chromatografie se pro analytické účely využívá jen výjimečně a nachází uplatnění převážně v oblasti preparativní, při čištění směsi látek. Zejména pro svou instrumentální jednoduchost a nenáročnost provedení se pro analytické i mikropreparativní účely používá technika planární chromatografie. V současnosti má v

analytické chemii dominantní postavení vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), (Opekar, 2002).

Kapalinová chromatografie zahrnuje všechny chromatografické způsoby separace, kdy je mobilní fáze kapalná. S ohledem na experimentální uspořádání hovoříme o kapalinové chromatografii v otevřeném systému (papírová a tenkovrstvá chromatografie) a v uzavřeném systému (především HPLC), (Drbal a Křížek 1998).

Princip separace složek

Pro separace se využívá adsorpce, rozdělování mezi dvě fáze na základě různé rozpustnosti, iontové výměny, biospecifických interakcí (molekulové rozpoznávání) a síťovém efektu (Štulík, 2004).

Kvalitativní analýza

Důležitá je znalost retenčních dat chromatografovaných látek. Identifikace se provádí porovnáním retenčního času a spekter (UV, VIS, hmotnostního) stanovované látky a standardu, který byl separován za stejných podmínek. Existuje i elektrochemická detekce (Drbal a Křížek, 1998).

Kvantitativní analýza

Základem pro kvantitativní vyhodnocení je plocha pod eluční křivkou. Nejčastěji se pro kvantitativní stanovení používá součin výšky píku s šířkou píku v polovině výšky píku. Většinou však chromatografy bývají vybaveny integrátorem plochy píků (Drbal a Křížek, 1998).

3.6.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je pokročilou a instrumentálně náročnou technikou kapalinové chromatografie. V HPLC je dosahováno vysoké účinnosti separačního procesu použitím kolon naplněných stacionární fází o malé a dobře definované velikosti částic. Separační kolony pro HPLC se vyznačují vysokou hustotou a homogenitou náplně stacionární fáze a tedy i velkým hydrodynamickým odporem. Pro

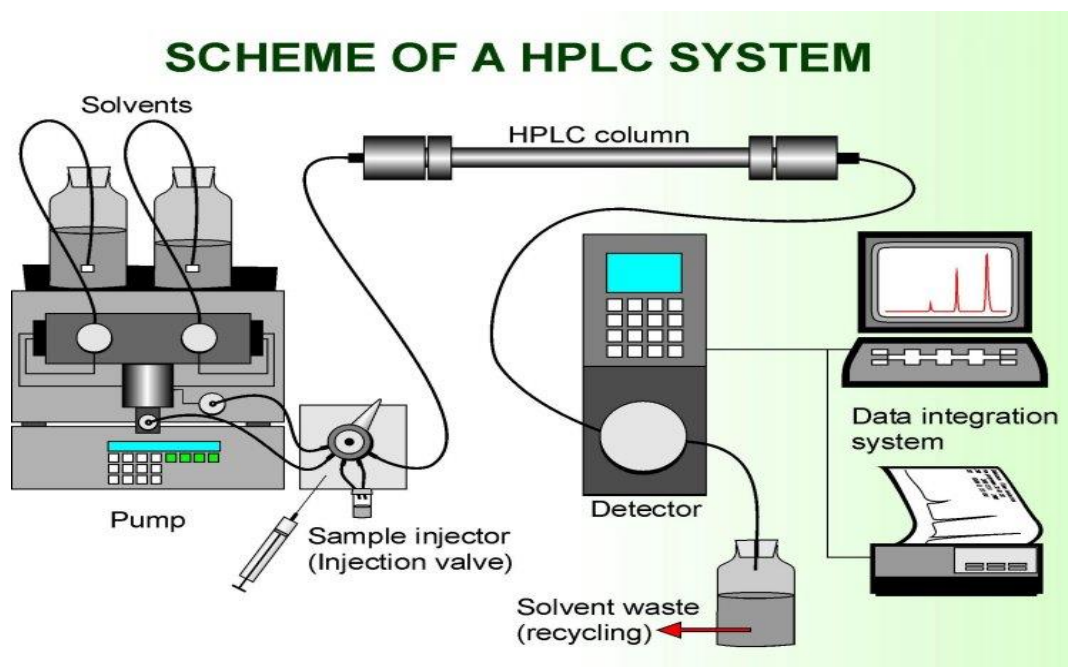
dosažení dostatečného průtoku mobilní fáze (řádově ml/min.) je nutno aplikovat přetlak jednotek až desítek MPa (Opekar, 2002).

Velkou výhodou HPLC je široká oblast použitelnosti. Lze analyzovat ionty, polární i nepolární látky, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární složky. Mezi další výhody patří, že složením mobilní fáze můžeme ovlivňovat separaci. Nevýhodou je, že vyžaduje náročnou instrumentaci a komplikací je i složitý mechanismus separace.

Pokud použijeme polární stacionární fázi, jsou kolonou nejméně zadržovány nepolární komponenty vzorku a naopak, při použití nepolární stacionární fáze jsou nejméně zadržovány polární látky (Štulík, 2004).

Přístroje pro HPLC

Mobilní fáze je během isokratické eluce vedena ze zásobníku přes odplyňovač do vysokotlakého čerpadla. Při gradientové eluci se komponenty mobilní fáze ze zásobníku přivádějí do směšovače, kde se programově v zvoleném poměru mísí a následně postupují do čerpadla. Z čerpadla je mobilní fáze vedena přes tlumič pulzů čerpadla do kolony. Bezprostředně za kolonou je připojen detektor. Vyhodnocení naměřených dat zajišťuje příslušné obslužné software (Drbal a Křížek, 1998).



Obr. 12: Schéma HPLC

Na obr. 12 je znázorněno schéma HPLC, kde můžeme vidět pumpu, nástřík mikrostříkačkou pomocí „stop flow“ ventilu, kolonu, detektor a softwarový systém, který zajišťuje vyhodnocení naměřených dat.

Čerpadla pro HPLC

Čerpadla zajišťují průtok mobilní fáze. Musí být vyrobeny z materiálů odolných vůči korozi. Nejvíce se pracuje s tlaky od 1 do 60 MPa, při průtocích mobilní fáze od 0,1 do 10 ml.min⁻¹. Proto je dáována přednost kontinuálně pracujícím pulzujícím čerpadlům pístovým anebo membránovým. Při každém pohybu pístu nebo membrány vpřed dochází k vytlačení malého objemu mobilní fáze. Pulzace je tlumena buď pomocí dalšího čerpadla pracujícího v opačné fázi anebo pomocí tlumiče pulzů. Moderní čerpadla jsou doplněna elektronicky řízenými zpětnovazebnými systémy, reziduální tlakové pulzace přímo ovládají otáčky motoru (Drbal a Křížek, 1998 Churáček, 1990 Opekar, 2002).

Dávkování vzorků

Ustupujícím způsobem je nástřík mikrostříkačkou pomocí tzv. „stop flow“ ventilu. Tento ventil umožní krátkodobé rozpojení systému čerpadlo – kolona a po nástříku dojde opět ke spojení těchto částí. Převažujícím způsobem nástříku vzorku je použitím šesticestného kohoutu s dávkovací smyčkou. Smyčka o známém a konstantním objemu se naplní vzorkem, potom se kohout přepne do druhé polohy a eluent protéká smyčkou a vnese vzorek do kolony (Drbal a Křížek, 1998).

Je třeba dbát na to, aby vzorky byly při dávkování dokonale rozpuštěny nejlépe v rozpouštědle o stejném složení jako má mobilní fáze. Popř. pokud se ve vzorku nacházejí tuhé částičky, tak je odfiltrovat (Churáček, 1990).

Kolony pro HPLC

Volba vhodné kolony má rozhodující význam, neboť výsledek analýzy je určován především kvalitou kolony a její náplní. Separační kolony musí odolat vysokému tlaku mobilní fáze. Používají se rovné kolony o délce 10–150 cm, nejčastěji 10-20cm o

vnitřním průměru 0,2-2 cm. Obvykle bývají vyrobeny z nerez oceli nebo speciálních materiálů (Drbal a Křížek, 1998, Churáček, 1990, Opekar, 2002).

Přírodní vzorky, které obsahují mnoho balastních látek, mohou předčasně znehodnotit kolony. Proto se před vlastní kolonu zařazuje ochranná předkolona, která je levnější a chrání separační kolonu (Drbal a Křížek, 1998).

Kolony pro HPLC jsou plněny profesionálně. Velikost zrn sorbentu se pohybuje mezi 3-50 μm , nejčastěji mezi 5-10 μm (Drbal a Křížek, 1998).

Náplně a eluenty pro chromatografii

- Silikagel je polární adsorbent. Má slabě kyselé vlastnosti a silně zadržuje bazické látky. Obvykle bývá amorfní struktury, snadno přijímá vodu. Jeho běžná aktivace je při 180 °C.
- Alumina je krystalická forma Al_2O_3 . Povrch zrn je bazický. Používá se k oddělení slabě kyselých složek vzorku. Aktivuje se zahřátím na 400 °C po dobu 6-16 hodin.
- Florisil (křemičitan hořečnatý) je slabě kyselý polární adsorbent (Drbal a Křížek, 1998).

Povrch adsorbentu je obsazován molekulami eluentu. Poté co je vzorek vnesen do kolony, musí molekula složky vytěsnit z povrchu adsorbentu odpovídající počet molekul eluentu. Velký vliv na tento stav má adsorbční energie eluentu, která je dána velikostí interakce mezi eluentem a povrchem adsorbentu. Velikost interakce mezi eluentem a povrchem adsorbentu se nazývá eluční síla. Interakce mezi složkou a eluentem nejsou tak významné (Drbal a Křížek, 1998).

Z běžných rozpouštědel má nejvyšší polaritu voda a nejnižší hexan. Čím větší je eluční síla rozpouštědla, tím pevněji je eluent adsorbován a tedy složka je adsorbovaná méně (Drbal a Křížek, 1998).

Detektory

Nejčastějšími typy detektorů jsou pŕtokový fotometrický a fluorimetrický detektor. Eluát protéká tzv. měrnou celou malého objemu s velkou optickou délkou, často 5-10 μl

při šířce 10 mm. Absorbance analyzovaných látek je zaznamenávána při jejich absorpčních maximech. Moderní detektory umožňují proměnlivě a programově měnit vlnovou délku. Tzv. diode array detektor (DAD) je schopný proměřit ve zvoleném okamžiku celé UV/VIS spektrum dané látky. Získává kvalitativní údaje o sledované složce. Méně běžným je refraktometrický detektor. Ten registruje změny indexu lomu eluátu a používá se pro látky, které nemají potřebnou absorpci (Drbal a Křížek, 1998, Opekar, 2002).

Chromatografie v současnosti

Chromatografické separační techniky se neuvěřitelně rychle vyvíjí.

Současné trendy HPLC:

- zkracování kolon a zmenšování velikosti sorbentu,
- používání kolon s menším vnitřním průměrem tj. mikro a kapilárních kolon,
- komplexní miniaturizace celých separačních systémů,
- důraz na automatizaci analýz,
- využití ultravysokých tlaků v chromatografii,
- stále rostoucí význam techniky LC-MS

Doby analýz na krátkých kolonách (5 cm, 2 cm i menších) určených pro tzv. rychlou chromatografii bývají okolo 1 až 2 minut. Tyto kolony jsou s výhodou užívány především pro tzv. vysokoprostupné (high-throughput) analýzy v oblastech, kde jsou denně zpracovávány stovky až tisíce vzorků. První komerční systém pro ultravysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (UPLC) schopný vytvářet tlaky okolo 100 MPa (Waters). První komerční HPLC- čip s LC-MS rozhraním (Agilent Technologies), který využívá mikrofluidní technologii a sjednocuje na ploše menší než kreditní karta obohacovací kolonu, analytickou kolonu, šesticestní ventil, elektrosprejovou jehlu, elektrické kontakty a identifikační mikročip.

Jestliže se jedná o separační módy HPLC, tak dělení na reverzních fázích (RP) je neustále nejrozšířenější technikou, přitom dominantní postavení mají již tradičně

partikulární vázané fáze na bázi silikagelu. Ze silikagelových RP jsou dlouhodobě nejpopulárnější C18 modifikace s tím, že tyto fáze představovaly kolem 50 % všech RP kolon nově uváděných na trh v roce 2005.

S velkým odstupem následují modifikace C8 (13 %), fluorované fáze, alkylované fáze s řetězcí delšími než 18 uhlíků, fenylové fáze, fáze se zabudovanou polární funkční skupinou, C4 modifikace a další. Vedle silikagelových partikulárních sorbentů se v moderní RP-HPLC stále více prosazují materiály nové, jako např. anorganickoorganické hybridy a modifikované oxidy kovů. Velmi perspektivní jsou také monolitické kolony.

Současné trendy sorbentů:

- porézní
- neporézní a povrchové porézní
- perfúzní
- monolity

Kvalita sorbentů se neustále zvyšuje díky vyšší čistotě vstupních surovin, detailnější kontrole výrobních procesů a využití nových poznatků.

Vysoce čistý silikagel se stále dobře osvědčuje jako výchozí matrice pro přípravu moderních vázaných fází. Ovšem hybridní anorganicko-organické materiály navíc vykazují vynikající odolnost vůči alkalickému prostředí. Nadějně jsou pravděpodobně i stacionární fáze založené na oxidech zirkonia a titanu. Velmi perspektivní, a dosud ani zdaleka nevyčerpanou oblastí jsou monolitická média. (Sýkora et al., 2007).

4 Praktická část

4.1 Materiál

4.1.1 Pěstování

Rostlinný materiál byl vypěstován v létě 2014 na pokusném pozemku Zemědělské fakulty (České Budějovice, kampus JU, N 48°58'29,528'', E 14°26'52,057''). Použito bylo osivo z maloobchodní sítě značky Semo Smržice. Všechny testované rostliny byly vypěstovány jak na volné ploše, tak ve skleníku.

Sklizeň rostlin nadzemních částí proběhla přibližně po čtyřech měsících od osevu.

4.1.2 Sušení

Rostlinný materiál se ihned po odběru zmrazil (-16°C) a do 1 měsíce od odběru se lyofilizoval (-50°C, 24 hodin). Lyofilizovaný materiál byl homogenizován na laboratorním mlýnku.

Tento materiál byl uchováván v uzavřených vzorkovnicích v mrazicím boxu (-18°C).

4.1.3 Chemikálie a standardy

Chemikálie:

- methanol, Merck, LiChrosolv gradient grade for liquid chromatography
- acetonitril, Merck, LiChrosolv gradient grade for liquid chromatography
- ortofosforečná kyselina, Fluka p.a.
- destilovaná voda

Standardy:

- chlorogenová kyselina, Sigma Aldrich
- rutin, Sigma Aldrich
- tryptofan, Sigma Aldrich

UV spektra standardů jsou uvedeny v příloze 1, 2, a 3.

4.1.4 Laboratorní sklo a přístroje

Sklo:

- odměrné válce
- zkumavky
- kalibrované zkumavky
- zkumavky s víčkem s teflonovým těsněním
- Pasteurovo pipety
- plastové vzorkovnice pro uchování lyofilizovaného materiálu

Přístroje:

- laboratorní mlýnek, Grindomix GM 200
- lyofilizátor, Alpha 1-4 LD plus, Christ
- analytické předvážky, Sartorius
- analytické váhy, Sartorius
- třepačka, ÚOCHB, Schaker R5
- automatické pipety, Brand
- centrifuga, Universal 32 R, Hettich
- vodní lázeň, VL 05
- chladnička a mraznička, Bosch
- HPLC:
 - pumpa: Systém Hewlett – Packard (HP 1050 HPLC, USA)
 - detektor: G1315B DAD detektor (Agilent)
 - kolona: Luna C18 (2), (150 x 2 mm, 3 um), (Phenomenex, USA)

4.2 Metody

4.2.1 Extrakce fenolových látek z rostlin

Nejprve jsem si připravila 60% methanol. Poté jsem si navážila vzorky 0,25g.

Testované odrůdy:

- * laskavec trojbarevný

- * kopretina věncová
- * hořčice čínská – listová
- * hořčice čínská
- * mizuna
- * mibuna

Z každého rostlinného materiálu, jak ze skleníku tak i ze záhonu byly připraveny tři vzorky (extrakty).

Extrakce:

1. Do vzorku (0,25g) jsem přidala 3 ml 60% methanolu, a řádně jsem jej protřepala.
2. Vzorek jsem vložila do termostatu při 50°C na 30 min a po 10 min jsem jej protřepávala.
3. Pak jsem vzorek centrifugovala při 3500 otáčkách na 10 min při 20°C.
4. Dále jsem ze vzorku odebrala supernatant do kalibrovaných zkumavek.
5. K sedimentu jsem přidala 1 ml 60% methanolu a řádně protřepala.
6. Vzorek jsem opět centrifugovala při 3500 otáčkách na 10 min při 20°C.
7. Znovu jsem odebrala supernatant do stejných kalibrovaných zkumavek.
8. K sedimentu jsem opět přidala 1 ml 60% methanolu a řádně protřepala.
9. Vzorek jsem opět centrifugovala při 3500 otáčkách na 10 min při 20°C.
10. Naposled jsem odebrala supernatant do stejných kalibrovaných zkumavek.

Promíchala jsem supernatant. Objem extraktu jsem odečetla v kalibrovaných zkumavkách a převedla do malých vialek. Vzorky byly uchovány při -18°C až do měření HPLC.

Extrakty byly použity pro stanovení fenolových látek metodou HPLC.

4.2.2 Stanovení fenolových látek metodou HPLC

Vzorky extraktu byly měřeny na kapalinovém chromatografu (viz kapitola 4.1.4). HPLC na kterém je měřeno, je znázorněn v příloze 5.

Pro analýzu byly použity tyto mobilní fáze:

voda+acetonitril+kyselina fosforečná (objem/objem/objem)

Mobilní fáze A: 5% acetonitril + 0,1% k. fosforečná

Mobilní fáze B: 80% acetonitril + 0,1% k. fosforečná

Použit byl tento gradient:

0. min ... 98% A + 2% B

40. min ... 58% A + 42% B

42. min ... 20% A + 80% B

Byl nastaven průtok 0,25 ml/min, teplota na koloně byla nastavena na 25°C a objem nástřiku byl 5µl. Měřeno bylo v rozsahu 190 – 600 nm.

Jednotlivé vrcholy byly měřeny při 220 nm a počítány podle dostupných standardů. Celková plocha chromatogramu od RT 0 min do 42 min byla měřena při 220 nm a 355 nm. Celková množství obsahových látek na chromatogramu byla počítána následovně:

$$y = \text{plocha (při 220nm nebo při 355 nm)} * \text{ředění} * \text{objem extraktu /navážka}$$

Takto spočítané relativní hodnoty lze navzájem porovnávat.

Absorbance při 220 nm je charakteristická pro nejvíce fenolových látek, zatímco absorbance při 355 nm je charakteristická např. pro flavonoly (rutin).

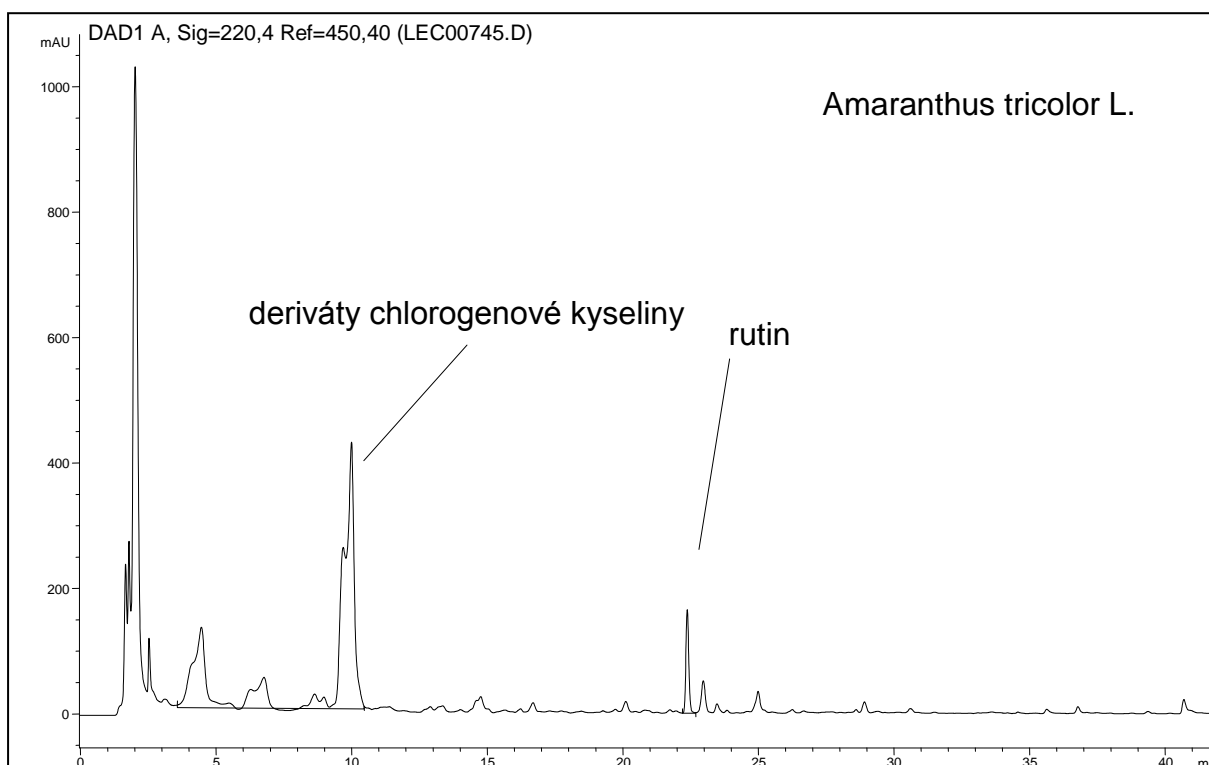
Všechny standardy nebyly dostupné. Fenolové kyseliny měly stejné nebo podobné spektrum jako chlorogenová kyselina, a proto byla použita kalibrační křivka chlorogenové kyseliny. Deriváty flavonolů byly stanoveny podle kalibrační křivky rutinu. Indoly byly stanoveny podle kalibrační křivky tryptofanu. Indoly jsou primární metabolity. Byly stanoveny pro svou čistotu píků a dominantnost.

Látky byly identifikovány podle literatury, retenčních časů a spekter (UV a hmotnostního). Data hmotnostních spekter poskytla RNDr. Naděžda Vrchotová, CSc.

Pro vyhodnocení a zpracování výsledků byl použit program ChemStation for LC 3D. Data byla vypočítána pomocí MS Office Excel (průměr, směrodatná odchylka, Studentův t-test).

5 Výsledky a diskuze

5.1 Laskavec trojbarevný

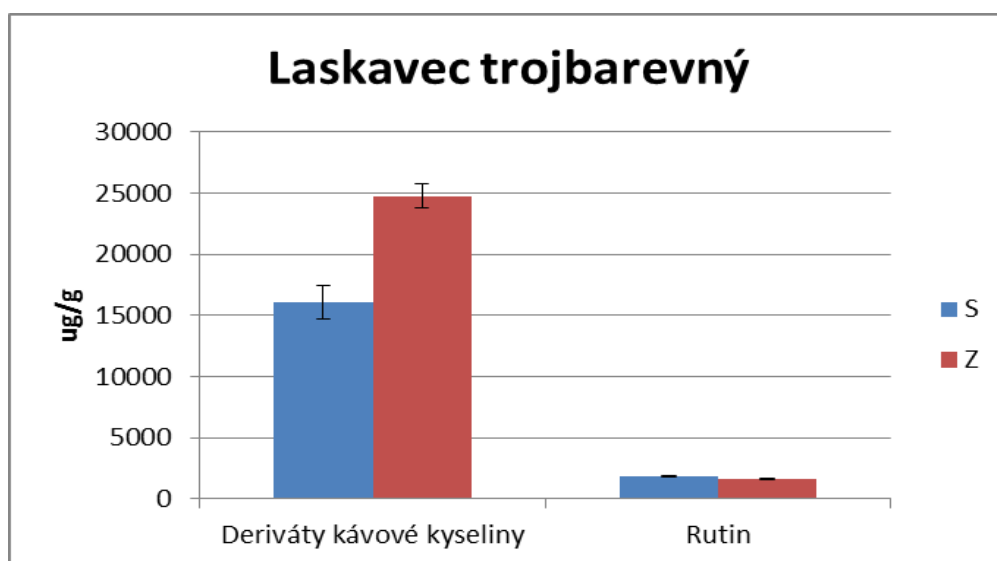


Obr. 13: Chromatografický profil extraktu laskavce trojbarevného při 220 nm

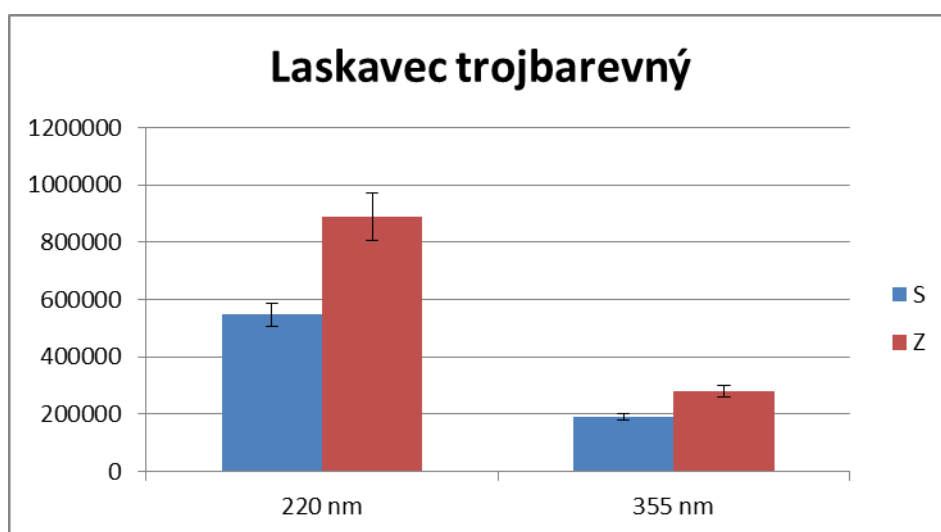
Chromatografický profil extraktu laskavce trojbarevného je na obr. 13. Dominantní látky jsou rutin a deriváty chlorogenové kyseliny. Suma derivátů chlorogenové kyseliny byla od retenčního času (RT) 3,5 min do RT 10,5 min. Obsah derivátů chlorogenové kyseliny dosahoval ve skleníku 16 mg/g a na záhoně 24,7 mg/g (obr.14) a rozdíl je statisticky významný. Obsah rutinu ve skleníku byl 1,8 mg/g a na záhoně byl 1,6 mg/g a tento rozdíl, i když je malý, je statisticky významný.

V celkové ploše chromatogramu při 220 nm bylo obsahových látek až o třetinu více na záhonu než ve skleníku. V celkové ploše při 355 nm byl také rozdíl obsahových látek statisticky významný. Na záhoně bylo více obsahových látek (obr.15).

Statisticky významné rozdíly jsou uvedeny v příloze 6.



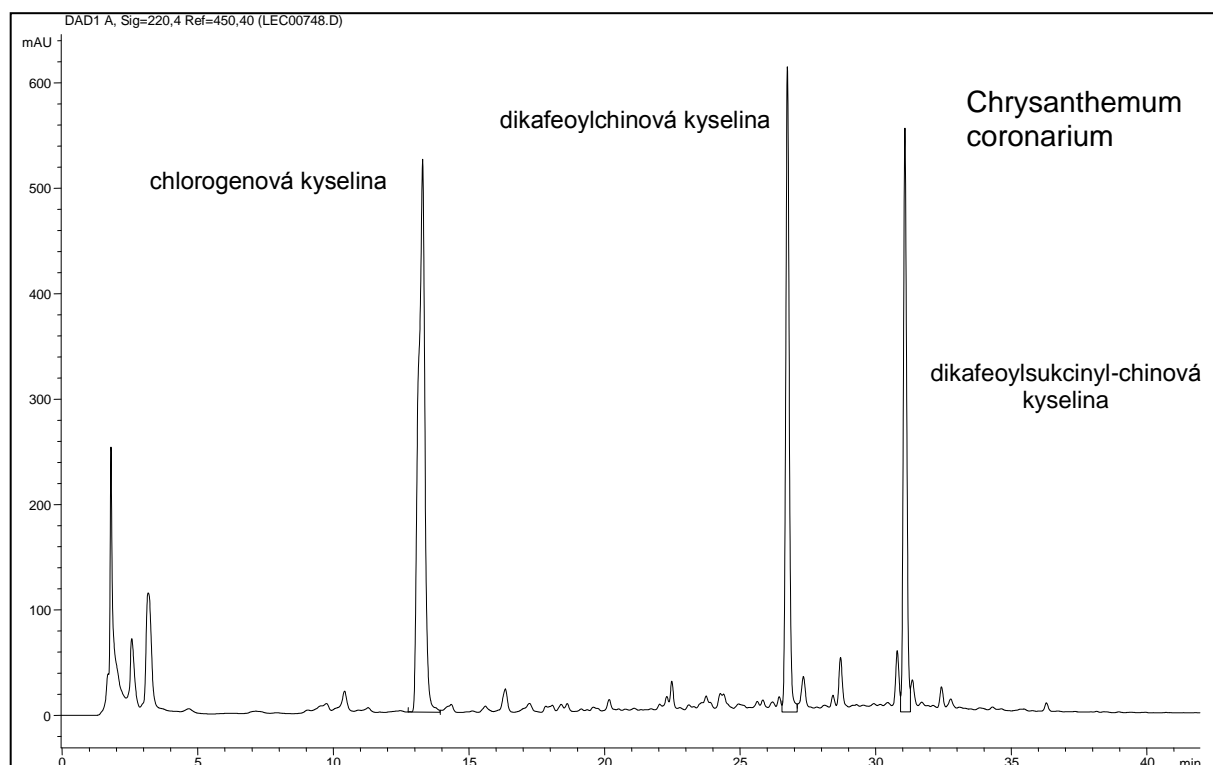
Obr. 14: Vliv pěstování na obsah derivátu kávové kyseliny a rutinu v listech laskavce



Obr. 15: Vliv pěstování na obsah látek absorbujících při 220 nm a 355 nm

5.2 Kopretina věncová

V kopretině věncové jsou dominantní látky chlorogenová kyselina, dikafeoylchinová kyselina a dikafeoylsukcinyl-chinová kyselina.

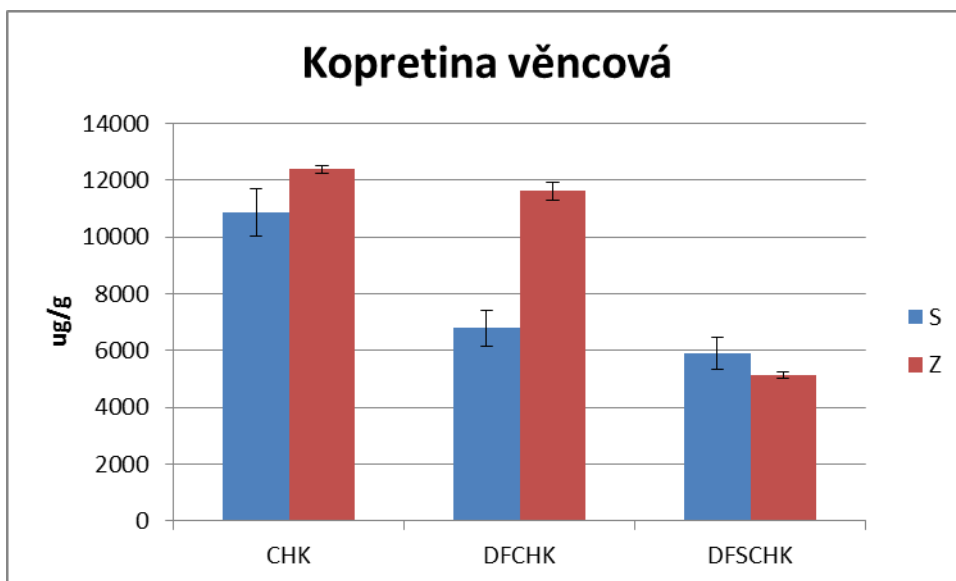


Obr. 16: Chromatografický profil extraktu kopretiny věncové při 220 nm

Chromatografický profil extraktu kopretiny věncové je na obr. 16. Obsah chlorogenové kyseliny dosahoval ve skleníku 11 mg/g a na záhoně 12,4 mg/g, je zde nepatrný statistický rozdíl. Obsah dikafeoylchinové kyseliny byl ve skleníku 6,8 mg/g a na záhoně byl 11,6 mg/g. Na záhoně je více jak o třetinu obsahu dikafeoylchinové kyseliny než ve skleníku a to je významný statistický rozdíl. Rozdíl obsahů dikafeoylsukcinylchinové kyseliny ve skleníku a na záhonu není statisticky významný rozdíl, ale ve skleníku bylo této kyseliny méně (obr. 17).

V celkové ploše chromatogramu při 220 nm bylo obsahových látek na záhonu a ve skleníku téměř stejně, statistický rozdíl není významný. V celkové ploše při 355 nm byl statistický rozdíl, na záhoně bylo více obsahových látek (obr. 18).

Statisticky významné rozdíly jsou uvedeny v příloze 6.

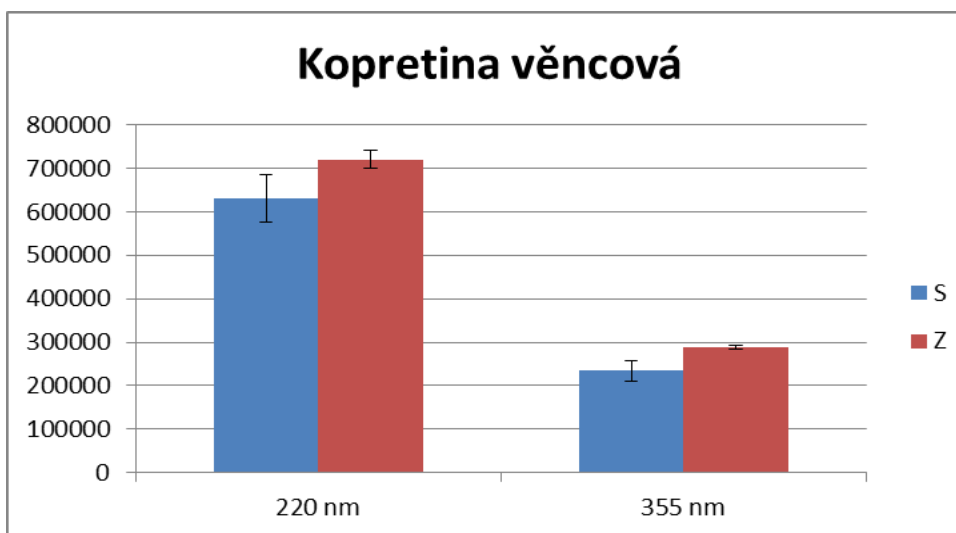


Obr. 17: Vliv pěstování na obsah chlorogenové kyseliny, dikafeoylchinové kyseliny, dikafeoylsukcinyl–chinová kyselina v listech kopretiny věncové

CHK.....chlorogenová kyselina

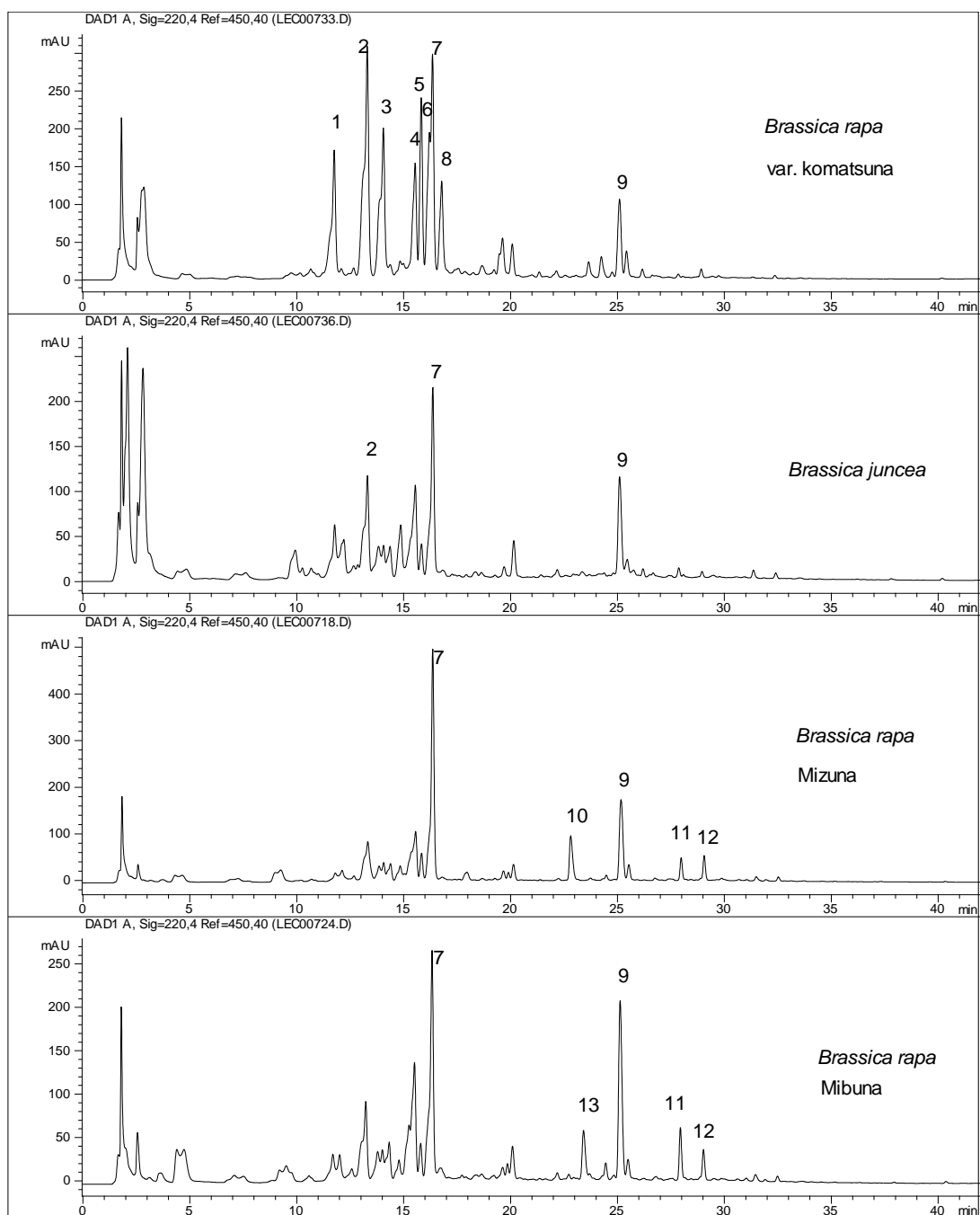
DFCHK.....dikafeoylchinová kyselina

DFSCHK.... dikafeoylsukcinyl-chinová kyselina



Obr. 18: Vliv pěstování na obsah látek absorbujících při 220 nm a při 355 nm

5.3 Brukvovité



Obr. 19: Chromatografické profily extraktů zkoumaných brukvovitých rostlin

1, 8 ... deriváty flavonolů

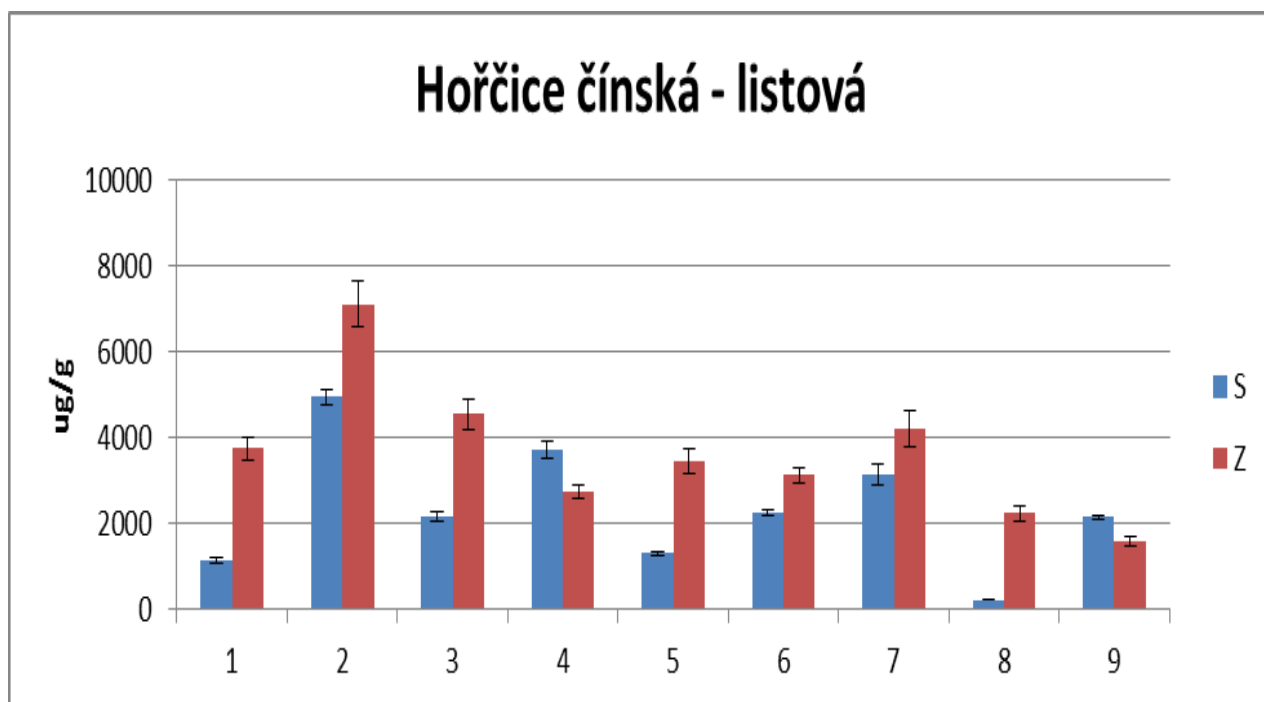
2 isoramnetin-3-O-soforotriosid-7-O-glukosid

- 3 kemferol-3-O-kafeoylsoforosid-7-O-glukosid
- 4 kemferol-3-O-sinapoyldiglukosid-7-O-glukosid
- 5 kemferol-3-O-glukosid-7-O-glukosid
- 6 kemferol-3-O-feruoylsofrosid-7-O-glukosid
- 7 isoramnetin-3-O-glukosid-7-O-glukosid
- 9 směs dvou fenolových kyselin, jednou z nich je sinapoyljablečná kyselina
- 10, 13... indoly
- 11, 12... fenolové kyseliny

Ve všech vybraných brukvovitých rostlinách se nacházely stejné látky, ale v různém množství. U každé vybrané odrůdy se vyhodnocovaly pouze dominantní látky. A v případě mizuny a mibuny se stanovovaly i indoly, primární metabolity. Indoly měly čisté píky, proto byly také stanoveny.

Statisticky významné rozdíly jsou vyznačeny v příloze 7.

5.3.1 Hořčice čínská - listová



Obr. 20: Vliv pěstování na obsah určitých látek v listech hořčice čínské – listové

Vrcholy 1-8 jsou deriváty flavonolů

1 ... derivát flavonolu

2 ... isoramnetin-3-O-soforotriosid-7-O-glukosid

3 ... kemferol-3-O-kafeoylsoforosid-7-O-glukosid

4 ... kemferol-3-O-sinapoyldiglukosid-7-O-glukosid

5 ... kemferol-3-O-glukosid-7-O-glukosid

6 ... kemferol-3-O-feruoylsofosid-7-O-glukosid

7 ... isoramnetin-3-O-glukosid-7-O-glukosid

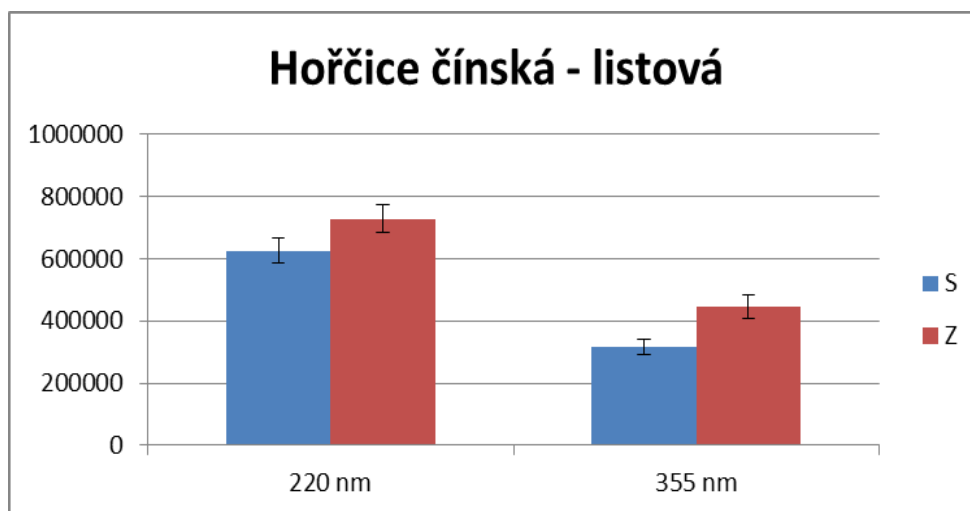
8 ... derivát flavonolu

9 ... směs dvou fenolových kyselin, jednou z nich je sinapoyljablečná kyselina

V hořčici čínské – listové byl rozdíl mezi obsahem všech sledovaných látek statisticky významný (vrcholy 1-8 deriváty flavonolů, vrchol 9 fenolové kyseliny).

Kromě vrcholů 4 a 9 byl obsah stanovovaných látek větší na záhonu než ve skleníku. U

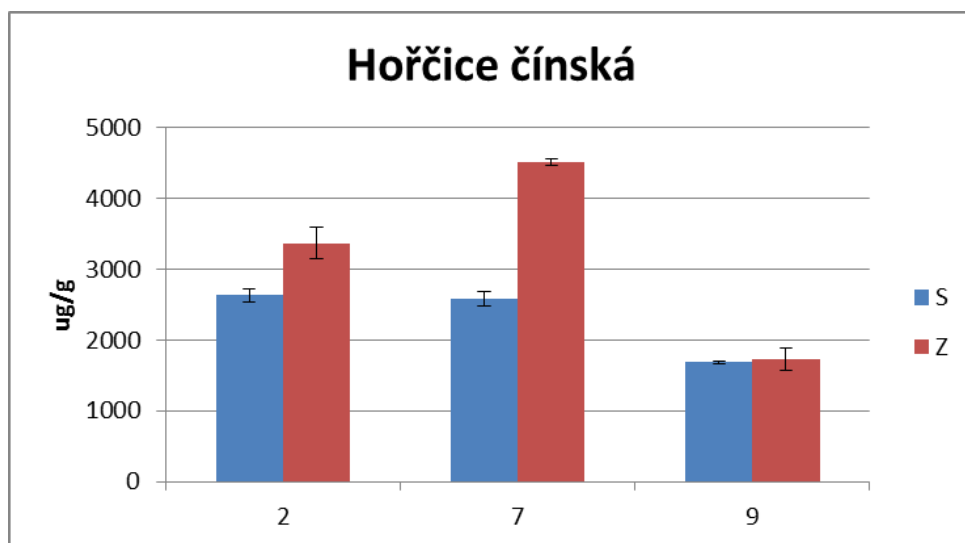
vrcholů 1, 3 a 5 je na záhoně o více jak polovinu větší množství stanovovaných látek. U vrcholu 8 je množství stanovovaných látek dokonce desetkrát větší na záhonu než ve skleníku (obr. 20).



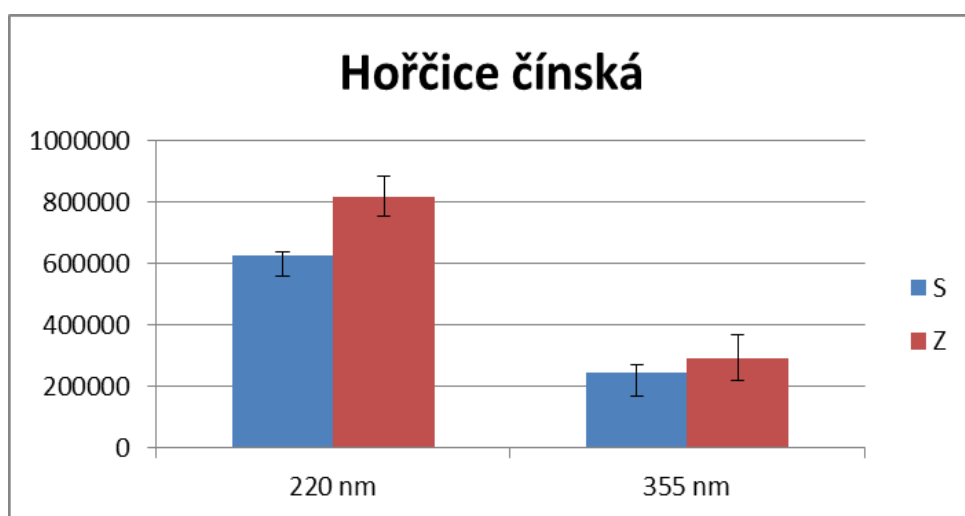
Obr. 21: Vliv pěstování na obsah látek při absorbanci 220 nm a při 355 nm

Rozdíly v obsahu látek měřených při 220 nm a při 355 nm byly statisticky významné. Na záhoně bylo stanovovaných látek více (obr. 21).

5.3.2 Hořčice čínská



Obr. 22: Vliv pěstování na obsah určitých látek v hořčici čínské

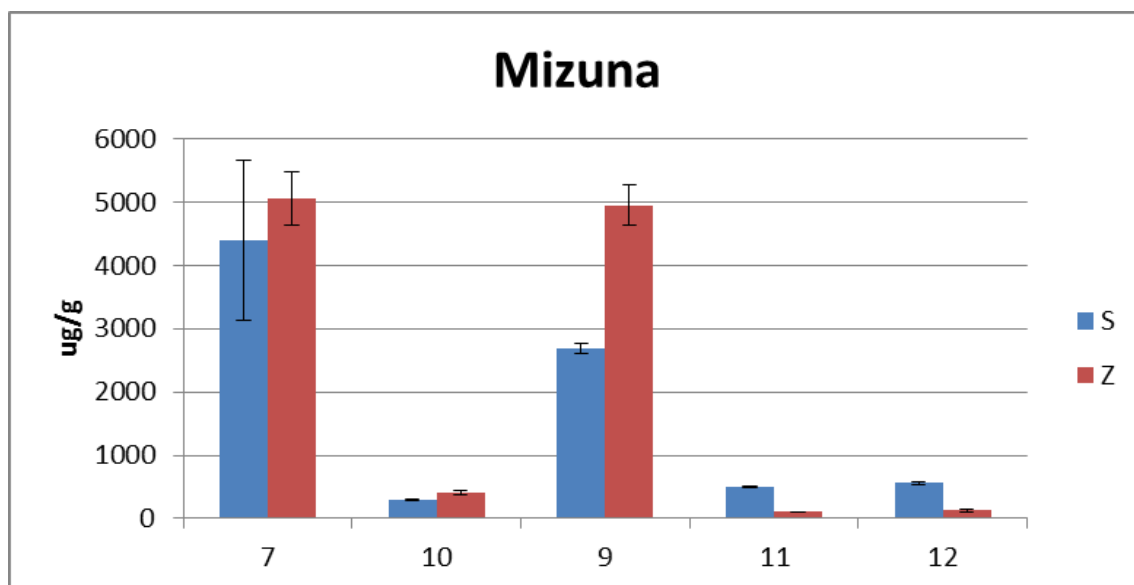


Obr. 23: Vliv pěstování na obsah látek při absorbanci 220 nm a při 355 nm

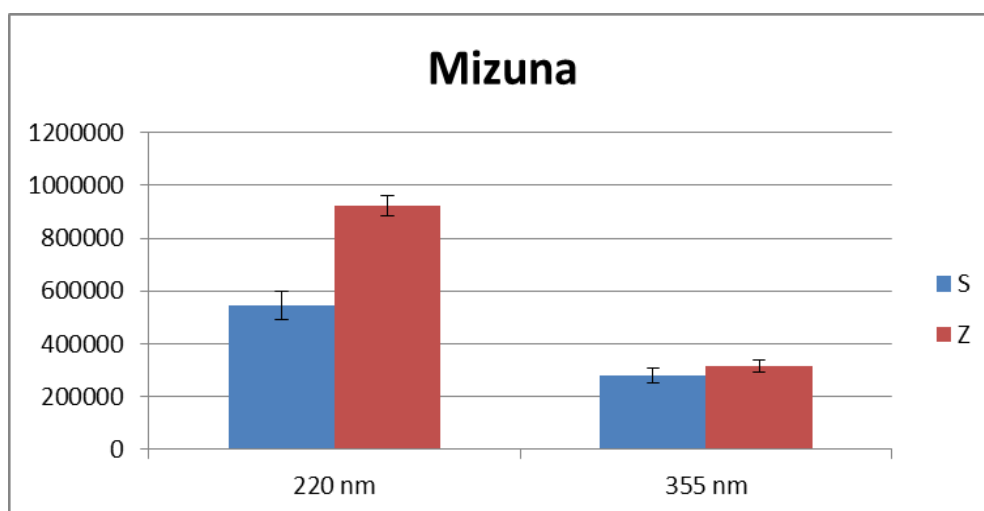
V hořčici čínské byly rozdíly obsahu látek označených jako vrchol 2 a 7 statisticky významné. Větší obsah sledovaných látek byl na záhonu. U vrcholu 9 byl rozdíl statisticky nevýznamný (obr. 22).

Rozdíl obsahových látek měřených při 220 nm byl statisticky významný (na záhoně bylo více obsahových látek), kdežto při 355 nm byl rozdíl nevýznamný. (obr. 23).

5.3.3 Mizuna



Obr. 24: Vliv pěstování na obsah určitých látek v mizuně

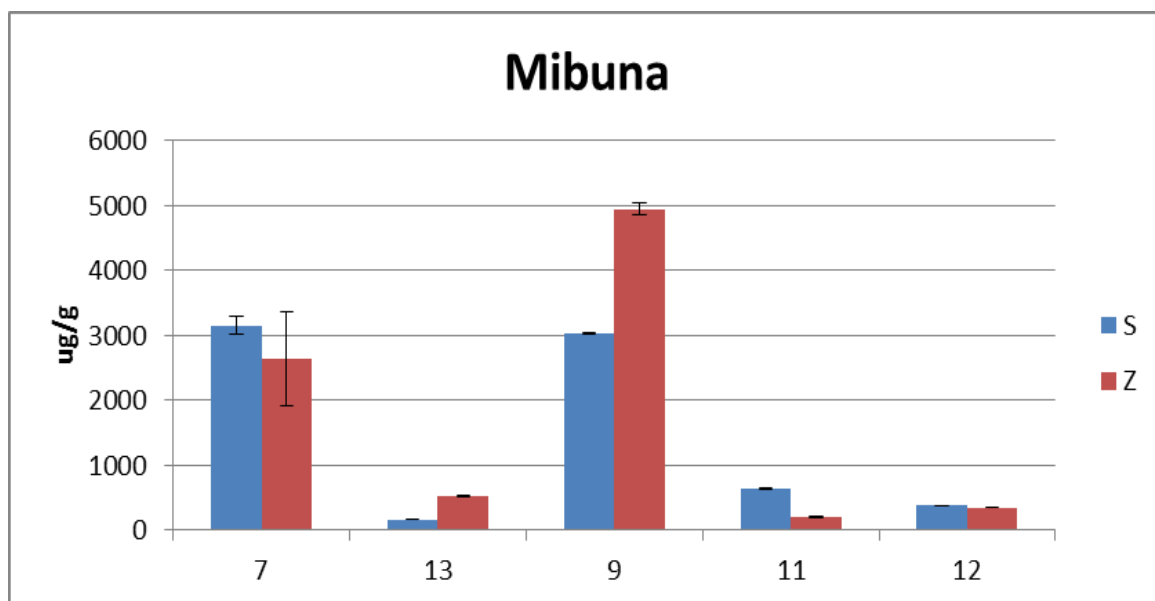


Obr. 25: Vliv pěstování na obsah látek při absorbanci 220 nm a při 355 nm

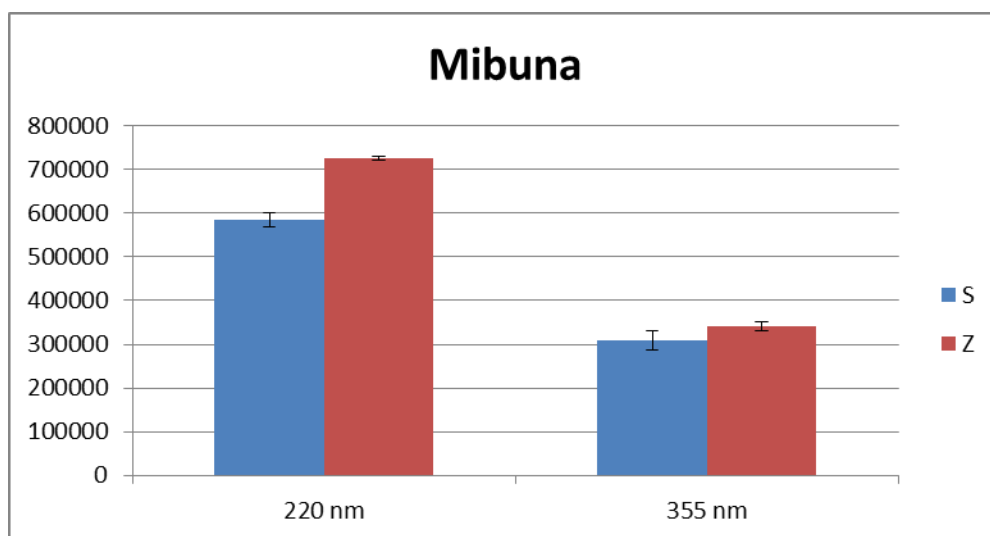
V mizuně byly rozdíly obsahu stanovovaných látek vrcholy označených 9, 11, 12 a 13 statisticky významné. Kromě vrcholu 11 a 12 byl obsah sledovaných látek větší na záhonu. U vrcholu 7 byl rozdíl statisticky nevýznamný (obr. 24).

Rozdíl obsahových látek měřených při 220 nm byl statisticky významný (na záhoně bylo obsahových látek více), kdežto při 355 nm byl rozdíl nevýznamný (obr. 25).

5.3.4 Mibuna



Obr. 26: Vliv pěstování na obsah určitých látek v mibuně



Obr. 27: Vliv pěstování na obsah látek při absorbanci 220 nm a při 355 nm

V mibuně byly rozdíly obsahu stanovovaných látek vrcholy označených 9, 11, 12 a 13 statisticky významné. Větší obsah sledovaných látek byl na záhonu pouze u vrcholů 9 a 13. U vrcholu 7 byl rozdíl statisticky nevýznamný (obr. 26).

Rozdíl obsahových látek měřených při vlnové délce 220 nm byl statisticky významný (na záhoně bylo více obsahových látek), kdežto rozdíl obsahových látek měřených při 355 nm byl nevýznamný (obr.27).

6 Závěr

Obsahy dominantních fenolových látek (především fenolové kyseliny, deriváty flavonolů, rutin) byly měřeny v laskavci trojbarevném, kopretině věncové, hořčici čínské, hořčici čínské - listové, mizuně a mibuně. Rostliny byly vypěstované na pokusném pozemku pro srovnání abiotických podmínek (teplota, vlhkost a především UV záření) ve skleníku a na záhonu.

Většinou ve skleníku je obsahových fenolových sloučenin méně než na záhoně. Domnívám se, že je to hlavně vlivem abiotického stresu - UV záření. Protože fenolové látky slouží rostlině jako ochrana před UV zářením.

V laskavci trojbarevném jsou dominantní látky deriváty chlorogenové kyseliny a rutin. Obsah derivátů chlorogenové kyseliny byl na záhoně až o třetinu větší. Obsah rutinu byl na záhoně nepatrně menší. Oba rozdíly jsou statisticky významné. Obsahy látek při vlnové délce 220 nm a 355 nm byly na záhoně větší.

V kopretině věncové jsou dominantní látky chlorogenová kyselina, dikafeoylchinová kyselina, dikafeoylsukcinyl-chinová kyselina. Kromě dikafeoylsukcinyl-chinové kyseliny byly obsahy dominantních látek na záhoně větší. Obsahy látek při vlnové délce 220 nm jsou téměř stejné, statistický rozdíl není významný. Rozdíl obsahů látek při vlnové délce 355 nm byl statisticky významný, na záhoně bylo obsahových látek více.

V brukvovitých odrůdách se nacházely stejné látky, ale v různém množství. V rostlinách čeledi brukvovitých jsou dominantní látky deriváty flavonolů, fenolové kyseliny a indoly. V množství obsahových látek jsou si nejvíce podobné hořčice čínská – listová a hořčice čínská, mizuna a mibuna. V brukvovitých byly rozdíly obsahů látek při vlnové délce 220 nm statisticky významné, více obsahových látek bylo na záhonu. Při vlnové délce 355 nm byly rozdíly obsahů stanovených látek kromě hořčice čínské – listové statisticky nevýznamné. U hořčice čínské – listové při vlnové délce 355 nm bylo více obsahových látek na záhoně. Látka značená vrchol 9 (směs dvou fenolových kyselin) se chovala v brukvovitých různě. Z výsledků obsahových látek je zřejmé, že jsou si mibuna a mizuna velice podobné.

Sice nebylo měřeno množství chlorofylu, ale i tak byly značně viditelné barevné rozdíly mezi skleníkem a záhonem. Barva rostlinného extraktu ze skleníku byla žlutá nebo světle zelená. Barva rostlinného extraktu ze záhonu byla tmavě zelená. Rostliny pěstované na záhoně obsahovaly více chlorofylu (viz příloha 4).

7 Seznam informačních zdrojů

BERHOW M. A., VAUGHN S. F. (1999): Higher plant flavonoids: Biosynthesis and chemical ecology. Principles and Practises of Plant Ekology. CrC Press. Illinois, USA, str. 423-438.

BRUCHTER, Milan. Zakládáme a udržujeme ekozahradu. Praha: Grada Publishing a.s., 2012, s. 48-49. Česká zahrada. ISBN 8024781131.

CVRČKOVÁ, Dagmar. Pěstujeme listovou zeleninu [online]. 2014. [cit. 2015-03-03]. Dostupné z: <http://www.floranazahrade.cz/pestujeme-listovou-zeleninu/>

DRBAL K., KRÍŽEK M. (1999): Analytická chemie. ZF JCU České Budějovice. ISBN 80-7040-352-7.

DUFEK, Jarmil. Brukvovité. [online]. [cit. 2015-02-05]. Dostupné z: <http://www.kvetena.com/brukvovite.html>

FRESCO, P., F. BORGES, C. DINIZ a M.P.M. MARQUES. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Medicinal Research Reviews*. 2006, vol. 26, issue 6, s. 747-766. DOI: 10.1002/med.20060. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/med.20060>

Garland chrysanthemum. [online]. [cit. 2015-03-50]. Dostupné z: <https://www.daf.qld.gov.au/plants/fruit-and-vegetables/vegetables/asian-vegetables/garland-chrysanthemum>

HARBAUM B., Characterization of Free and Cell-Wall-Bound Phenolic Compounds in Chinese Brassica Vegetables, Kiel, 2007, [cit. 2015-02-03], disertační práce, Ústav lidské výživy a potravinářské vědy

HILLENBRAND, M. et al., Depsides from the Petals of *Papaver rhoeas*, Saarbrücken, *Planta Med* 2004; 70(4): 380-382, DOI: 10.1055/s-2004-818956

HOSNI, K. et al., Secondary metabolites from *Chrysanthemum coronarium* (Garland) flowerheads: Chemical composition and biological activities, *Industrial Crops and Products*, 2013, 44, 263– 271

CHUDA, Y. et al., Contents and Cooking Loss of Three Quinic Acid Derivatives from Garland (*Chrysanthemum coronarium* L.), *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 1437-1439

CHURÁČEK, J. et al. *Analytická separace látek*: Praha, SNTL, 1990, 203- 213. ISBN 80-03-00569-28

JELÍNEK, J., ZICHÁČEK, V. *Biologie*. Olomouc: Fin Publishing, 1996, 1. vydání, 415 stran.

JUDD, et al.. *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. [s.l.] : Sinauer Associates Inc., 2002. ISBN 9780878934034. (anglicky)

JŮZLOVÁ, Jana. *Nové universum: všeobecná encyklopedie A-Ž*. 1. vyd. V Praze: Knižní klub, 2003, s. 593-594. ISBN 80-242-1069-x.

KHANAM, Umma Khair Salma a OBA Shinya, Bioactive substances in leaves of two amaranth species, *Amaranthus tricolor* and *A. hypochondriacus*, *Canadian Journal of Plant Science*, 2013, 93(1): 47-58

KOPEC, Karel. *Zelenina ve výživě člověka*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2010, 159 s. Zdraví. ISBN 978-802-4728-452.

LARKCOM, Joy. Oriental vegetables: the complete guide for garden and kitchen. 1st ed. New York: Kodansha International, 1991, vi, 232 p. ISBN 47-700-1619-0.

MACHÁČEK, T. a et al. Biomach, výpisky z biologie: Kryptosemenné rostliny. [online]. Praha: MACHÁČEK, T., 2012 [cit. 2015-03-01]. Dostupné z: <http://www.biomach.cz/biologie-rostlin/system-a-evoluce-rostlin/krytosemenne-rostliny>

MAŇÁSKOVÁ V., Extrakce fenolových kyselin z rostlinných potravin pevného charakteru, Zlín, 2013, [cit. 2015-02-01], diplomová práce, Ústav technologie potravin

OPEKAR, F., JELÍNEK, I., RYCHLOVSKÝ, P., PLZÁK, Z. *Základní analytická chemie: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2003, 201 s. ISBN 80-246-0553-8.

PIETTA, P. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*. 2000, 63, 1035-1042

SIVAKUMAR G., HPLC screening of anti-cancer sulforaphane from important European Brassica species, Science Direct, Food Chemistry, 2007, 104, 1761–1764

SLANINA J., TÁBORSKÁ E. (2004): Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chem. Listy*, 98, s. 239 – 245.

SOGBOHOSSOU, Olga E.D. a Enoch G. ACHIGAN-DAKO. *Scientia horticulturae: Phenetic differentiation and use-type delimitation in Amaranthus spp. from worldwide origins* [online]. Cotonou: Elsevier, 23.10.2014 [cit. 2015-03-01]. ISSN 0304-4238. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423814004324>

SÝKORA, D., TESAŘOVÁ, E., VOSMANSKÁ, M., ZVOLÁNKOVÁ, M., Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC, *Chem. Listy* 101, 190–199 (2007)

ŠÍPEK, Stanislav. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. 1. vyd. Praha: Grada, 2000, 314 s. ISBN 80-716-9704-4.

ŠTULÍK, K. et al. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004, s. 136-137. ISBN 80-246-0852-9

TŮMOVÁ, Eva. *Přírodní toxické látky ve výživě hospodářských zvířat* [online]. Praha: Výzkumný ústav živočišné výroby, 2006. Dostupné online.

ŮRGEOVÁ, E.; POLÍVKA, L.; PŠENÁKOVÁ, I. Flavonoidy-Rastlinné metabolity s biologickými účinkami. *SLOVAK JOURNAL OF HEALTH SCIENCE*. 2010, 1, 36-43

ÚZEI. *Antioxidanty pro zdraví* [online]. 2014 [cit. 2015-03-03]. Dostupné z: http://www.viscojis.cz/teens/index.php?option=com_content&view=article&id=131%3A115&catid=56%3Avitaminy-a-antioxidanty&Itemid=106

ÚZEI. *Netradiční druhy zeleniny aneb exotika na talíři* [online]. 2014 [cit. 2015-03-03]. Dostupné z: http://viscojis.cz/teens/index.php?option=com_content&view=article&id=74%3A68&catid=105&Itemid=154

VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 2*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999, 304 s. ISBN 80-902-3912-9.

VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999, 342 s. ISBN 80-902-3912-9.

ZICHA, O. BioLib: Profil taxonu [online]. c2014 [2015-03-01]. Dostupné z: <http://www.biolib.cz/taxon/>

Obrázky převzaté z internetu:

Obr. 6: Laskavec trojbarevný (*stažen 16. 3. 2015:*

http://www.plantillustrations.org/illustration.php?id_illustration=119921&mobile=0)

Obr. 7: Kopretina věncová (*stažen 16. 3. 2015:* <http://imgkid.com/chrysanthemum-coronarium.shtml>)

Obr. 8: Hořčice čínská – listová (*stažen 16. 3. 2015:*

<http://www.cnseeds.co.uk/dynamic/shop/26Brassicas/Komatsuna%20%28Mustard%20Spinach%29/>)

Obr. 9: Hořčice čínská (*stažen 16. 3. 2015:* <http://pixshark.com/brassica-juncea-leaves.htm>)

Obr. 10: Mizuna (*stažen 16. 3. 2015:* <http://xanhvasachshop.com/product/salad-mizuna/>)

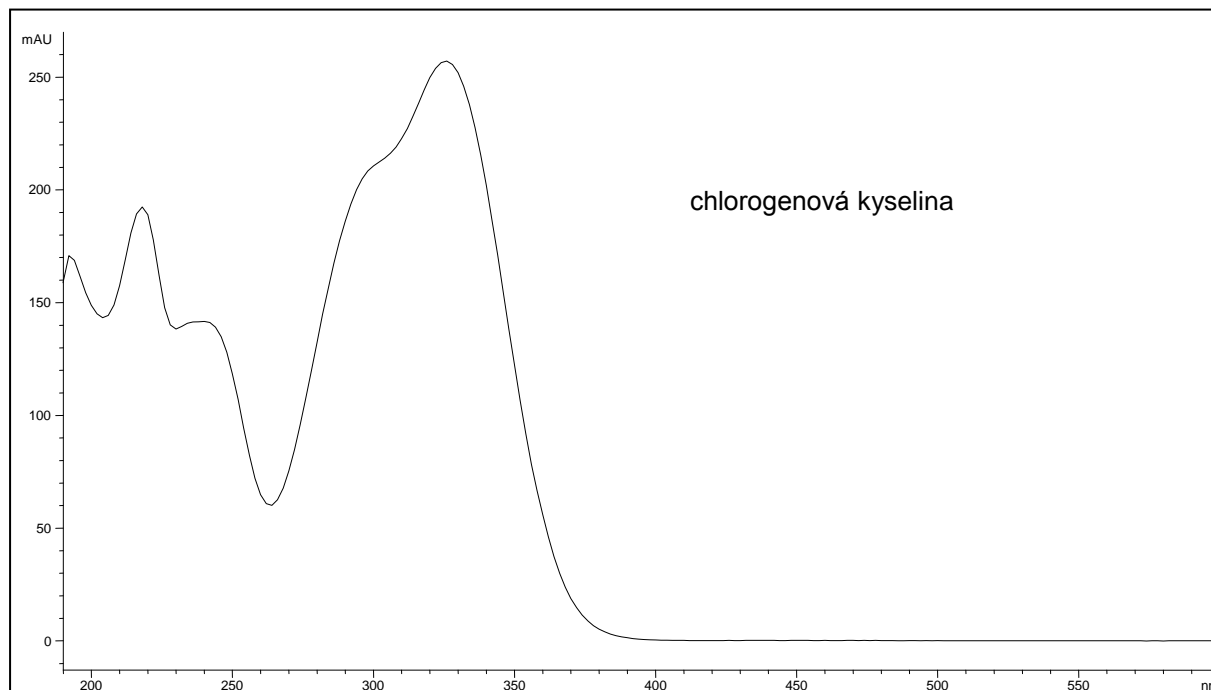
Obr. 11: Mibuna (*stažen 16. 3. 2015:* <http://www.marutane.com/tukena/body.html>)

Obr. 12: Schéma HPLC (*stažen 16. 3. 2015:*

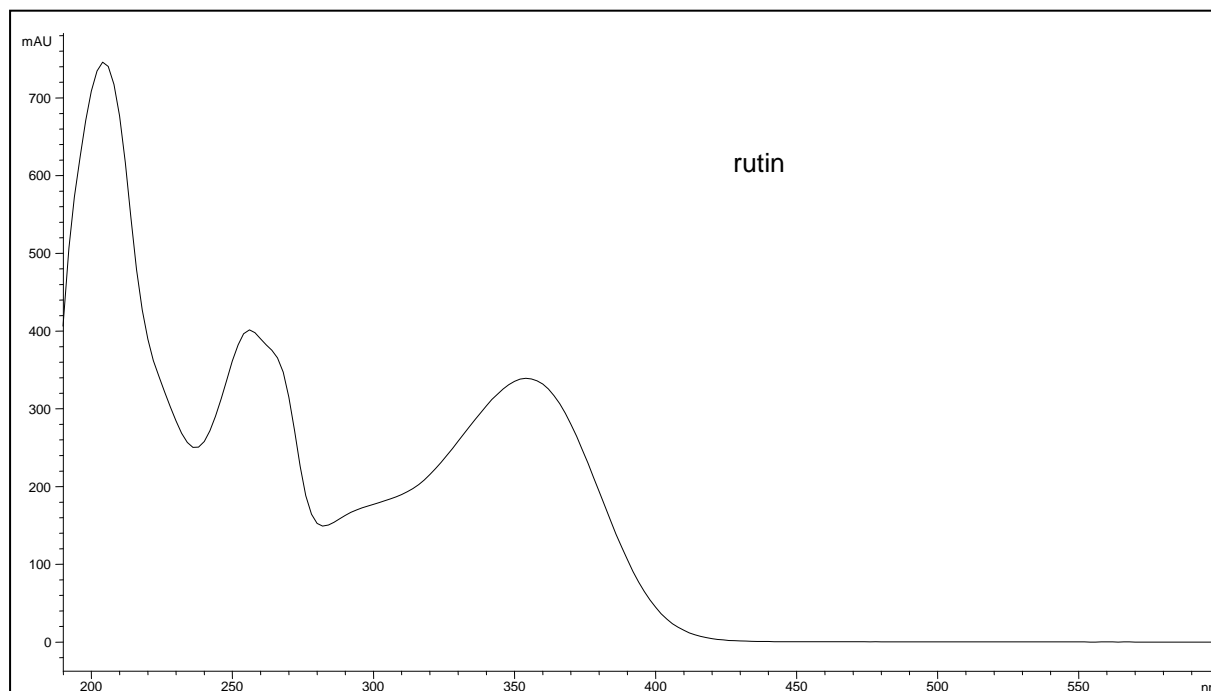
<http://chem.uft.unibremen.de/Chromatography/chrom065.htm>)

8 Přílohy

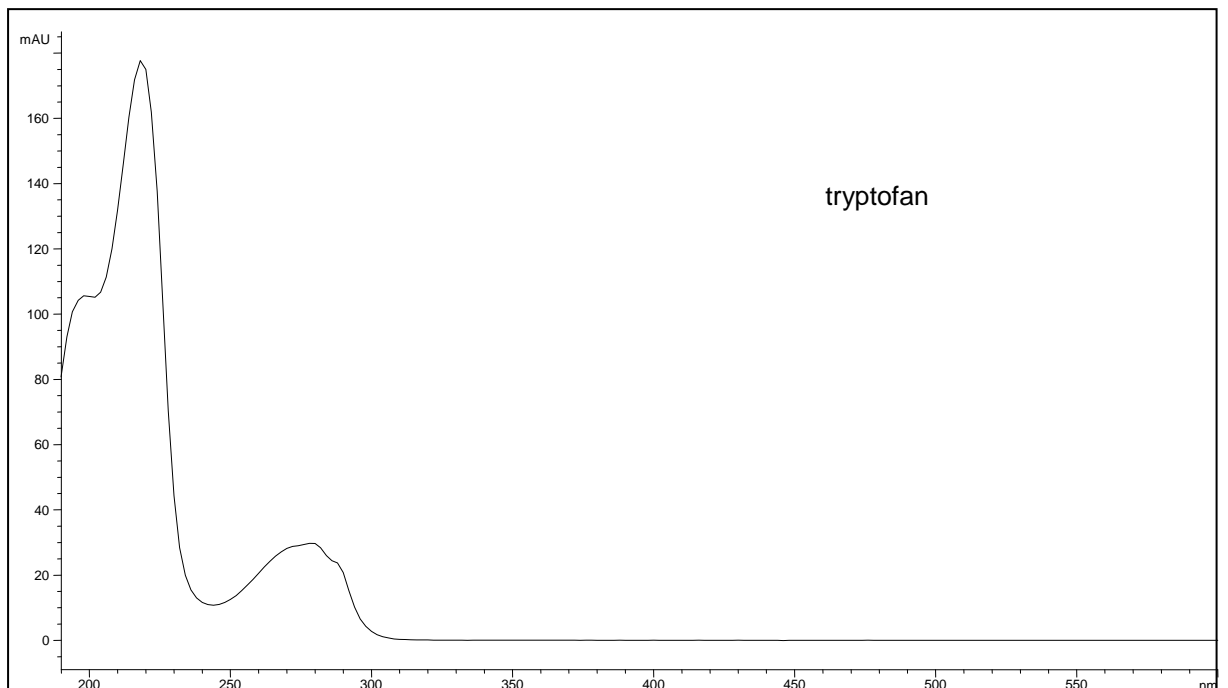
Příloha 1: UV spektrum chlorogenové kyseliny



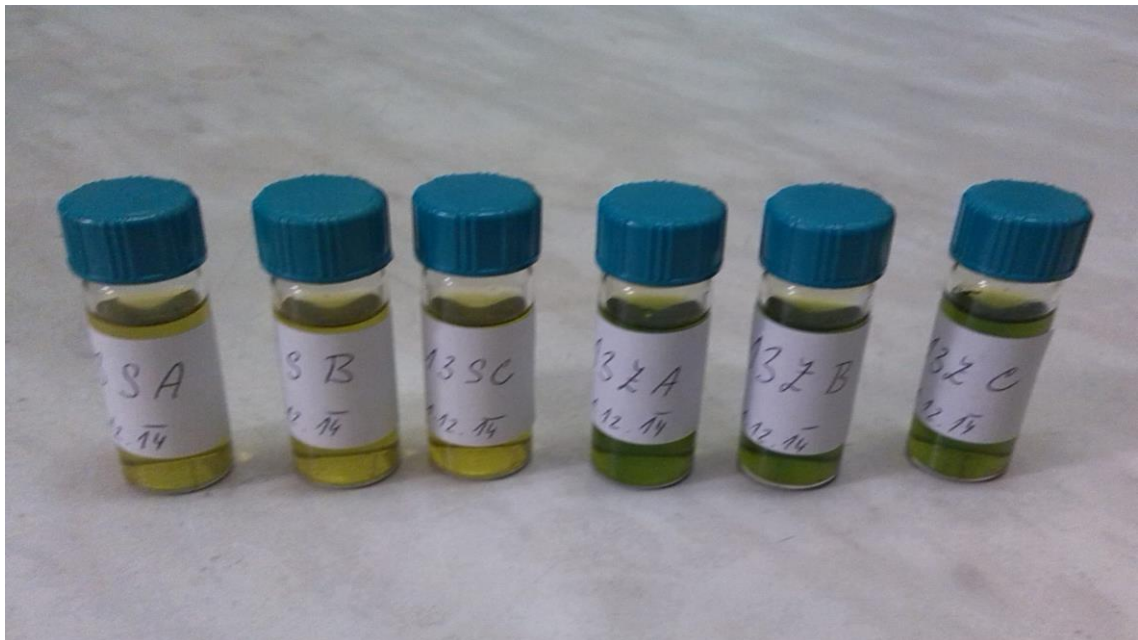
Příloha 2: UV spektrum rutinu



Příloha 3: UV spektrum tryptofanu



Příloha 4: rostlinný extrakt zkoumaných rostlin



V extraktech je vidět barevný rozdíl mezi rostlinami pěstovanými ve skleníku a na záhoně.

Příloha 5: HPLC



Příloha 6: Statisticky významné rozdíly

Rostlina	Stanovované látky	Množství obsahových látek
Laskavec trojbarevný	chlorogenová kyselina	záhon > skleník
	rutin	záhon < skleník
	220 nm	záhon > skleník
	355 nm	záhon > skleník
Kopretina věncová	chlorogenová kyselina	záhon > skleník
	dikafeoylchinová k.	záhon > skleník
	dikafeoylsukcinyl-chinová k.	záhon = skleník
	220 nm	záhon = skleník
	355 nm	záhon > skleník

Příloha 7: Statisticky významné rozdíly u brukvovitých rostlin

Rostlina	Stanovované látky	Množství obsahových látek
Hořčice čínská - listová	1	záhon > skleník
	2	záhon > skleník
	3	záhon > skleník
	4	záhon < skleník
	5	záhon > skleník
	6	záhon > skleník
	7	záhon > skleník
	8	záhon > skleník
	9	záhon < skleník
	220 nm	záhon > skleník
	355 nm	záhon > skleník
Hořčice čínská	2	záhon > skleník
	7	záhon > skleník
	9	záhon = skleník
	220 nm	záhon > skleník
	355 nm	záhon = skleník
Mizuna	7	záhon = skleník
	9	záhon > skleník
	11	záhon < skleník
	12	záhon < skleník
	13	záhon > skleník
	220 nm	záhon > skleník
	355 nm	záhon = skleník
Mibuna	7	záhon = skleník
	9	záhon > skleník
	11	záhon < skleník
	12	záhon < skleník
	13	záhon > skleník
	220 nm	záhon > skleník
	355 nm	záhon = skleník

8.1 Seznam příloh

Příloha 1: UV spektrum chlorogenové kyseliny

Příloha 2: UV spektrum rutinu

Příloha 3: UV spektrum tryptofanu

Příloha 4: rostlinný extrakt zkoumaných rostlin

Příloha 5: HPLC

Příloha 6: Statisticky významné rozdíly

Příloha 7: Statisticky významné rozdíly u brukvovitých rostlin