

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra Chemie



Obsah vybraných antioxidantů a antioxidační aktivita v obilkách nových odrůd pšenice seté (*Triticum aestivum* L.), pšenice jednozrnky (*T. monococcum* L.) a dvouzrnky [*T. dicoccum* Schübl (Schränk)]

Bakalářská práce

Autor práce: Kristina Jírů

Vedoucí práce: prof. Ing. Jaromír Lachman, CSc.

2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Obsah vybraných antioxidantů a antioxidační aktivita v obilkách nových odrůd pšenice seté (*Triticum aestivum* L.), pšenice jednozrnky (*T. monococcum* L.) a dvouzrnky [*T. dicoccum* Schübl (Schränk)] vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne.....

.....
podpis autora práce

Poděkování

Chtěla bych poděkovat za odborné vedení svému vedoucímu práce panu prof. Ing. Jaromíru Lachmanovi, CSc., dále paní Doc. Ing. Aleně Hejtmánkové, CSc. a Ing. Kateřině Hejtmánkové, PhD. za odbornou konzultaci a jazykovou korekturu.

Souhrn

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) patří k základním pěstovaným komoditám. Obilné zrno je kromě cenného obsahu bílkovin a škrobu významným zdrojem biologicky aktivních látek, jako jsou např. polyfenolické látky a vitamin E (tokoferoly a tokotrienoly). Polyfenolické sloučeniny a vitamin E vykazují antioxidační účinky. Bylo prokázáno, že antioxidanty se podílejí na snížení rizika vzniku nádorových a kardiovaskulárních onemocnění. V poslední době se pozornost obrací na historicky starší odrůdy zemědělských plodin, v neposlední řadě díky vysokému obsahu biologicky aktivních látek. Předmětem bakalářské práce bylo srovnání obsahu polyfenolických látek, vitaminu E a antioxidační aktivity v odrůdách pšenice seté a starších pluchatých pšenic jednozrnky a dvouzrnky.

Ke stanovení vitaminu E, celkové antioxidační aktivity a celkového obsahu polyfenolických látek byly vybrány dvě odrůdy pšenice jednozrnky – *Escana* a *Schwedisches Einkorn*, dvě odrůdy pšenice dvouzrnky – *Rudico* a *Kahler Emmer* a tři odrůdy pšenice seté - *Granny*, *Kärtner Früher* a *SW Kadrijl*.

Obsah vitaminu E v jednotlivých odrůdách byl stanoven metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí s elektrosprejovou ionizací (HPLC-ESI/MS/MS). V pšenici jednozrnce byl stanoven významně vyšší obsah tokotrienolů (77 %) v porovnání s tokoferoly (23 %), ve dvouzrnce bylo nalezeno více tokotrienolů (58 %) než tokoferolů (42 %), zatímco v pšenici seté bylo zaznamenáno vyšší zastoupení tokoferolů (55 %) v porovnání s tokotrienoly (45 %). Bylo zjištěno, že β -tokotrienol je majoritní forma vitaminu E v pšenici jednozrnce a dvouzrnce, zato v pšenici seté tvoří majoritní složku α -tokoferol.

Ke zjištění celkové antioxidační aktivity (TAA) bylo použito spektrofotometrického měření vzorku s radikálem 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH^{*}). Naměřené hodnoty byly vyjádřeny jako ekvivalenty Troloxu. Pšenice dvouzrnka vykazovala nejvyšší TAA (237,45 mg Troloxu/kg sušiny), zatímco pšenice jednozrnka nejnižší (184,15 mg Troloxu/kg sušiny). Hodnota TAA pšenice seté byla nižší v porovnání s pšenicí dvouzrnkou, ale vyšší než v pšenici jednozrnce (199,1 mg Troloxu/kg sušiny).

Celkový obsah polyfenolických látek byl stanoven spektrofotometricky použitím činidla Folin-Ciocalteuova činidla. Naměřené hodnoty byly vyjádřeny jako ekvivalenty gallové kyseliny. Nejvyšší množství polyfenolických látek bylo nalezeno v pšenici dvouzrnce (672 mg.kg⁻¹). Pšenice jednozrnka obsahovala méně polyfenolických látek v porovnání s pšenicí dvouzrnkou (549 mg.kg⁻¹). Celkový obsah polyfenolických látek se v pšenici seté značně lišil vzájemně mezi odrůdami - *Granny* (601 mg.kg⁻¹), *SW Kadrijl* (534 mg.kg⁻¹) a *Kärtner Früher* (502 mg.kg⁻¹).

Klíčová slova: antioxidanty, vitamin E, *Triticum*, HPLC–ESI/MS/MS, TAA, DPPH, polyfenolické látky, Folin-Ciocalteu

Summary

Spring wheat (*Triticum aestivum* L.) is currently one of the most important food crop worldwide. Wheat grain contains starch and proteins and contributes significantly to antioxidant income with beneficial healthy effects too. The wheat is source of antioxidants for example - polyphenolic compounds and vitamin E (tocopherols and tocotrienols). It was established that antioxidants reduce risk of genesis of cancer and cardiovascular diseases. The attention is focused on historically older varieties of crops because of high content of compounds with biological effects. The aim of this thesis was comparison of total content of polyphenolic compounds, determination of vitamin E and antioxidant activity in varieties of spring wheat and older einkorn and emmer wheat.

These varieties of wheat were analysed - *Escana* and *Schwedisches Einkorn* (einkorn wheat), *Rudico* and *Kahler Emmer* (emmer wheat) and *Granny*, *Kärtner Früher* and *SW Kadrijl* (spring wheat).

Determination of vitamin E was performed by high performance liquid chromatography – electrospray ionisation tandem mass spectrometry (HPLC–ESI/MS/MS). The significant higher content of tocotrienols (77 %) compared with tocopherols (23 %) was determined in einkorn wheat. Emmer wheat contained more tocotrienols (58 %) than tocopherols (42 %). There it was found higher content of tocopherols (55 %) compared with tocotrienols (45 %). It was registered β -tocotrienol is major form of vitamin E in both einkorn wheat and emmer wheat, while α -tocopherol is the major form in spring wheat.

Determination of total antioxidant activity (TAA) was performed by spectrophotometric measurement with radical 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]). Measurement was standardised as equivalent Trolox. Emmer wheat had the highest TAA (237,45 mg Trolox/kg dry mass), while einkorn wheat had the lowest (184,15 mg Trolox/kg dry mass). In spring wheat was determined lower TAA than in emmer wheat, but higher compared with einkorn wheat (199,1 mg Trolox/kg dry mass).

Determination of total content of polyphenolic compounds was performed by spectrophotometric measurement with Folin-Ciocalteu reagent. Measurement was standardised as equivalent gallic acid. The highest amount of polyphenolic compounds was determined in emmer wheat (672 mg.kg⁻¹). Einkorn wheat contained less polyphenolic compounds than emmer wheat (549 mg.kg⁻¹). Amount of polyphenolic compounds was very different between varieties to each other in spring wheat - *Granny* (601 mg.kg⁻¹), *SW Kadrijl* (534 mg.kg⁻¹) and *Kärtner Früher* (502 mg.kg⁻¹).

Key words: antioxidants, vitamin E, *Triticum*, HPLC – ESI/MS/MS, TAA, DPPH, polyphenolic compounds, Folin-Ciocalteu reagent

Obsah

1. Úvod	1
2. Cíl práce	2
3. Literární rešerše	3
3.1 Pšenice	3
3.1.1 Botanický popis	3
3.1.2 Chemické složení zrna	3
3.1.2.1 Sacharidy	3
3.1.2.2 Lipidy	4
3.1.2.3 Bílkoviny	4
3.1.2.4 Minerální látky	4
3.1.2.5 Antioxidační látky	5
3.1.3 Kvalita pšeničného zrna	5
3.1.4 Pšenice setá	6
3.1.4.1 Pěstování ozimé pšenice seté	6
3.1.5 Pšenice jednozrnka	9
3.1.6 Pšenice dvouzrnka	9
3.2 Antioxidační látky	10
3.2.1 Obecný mechanismus působení	10
3.2.2 Reaktivní kyslíkové částice	10
3.2.3 Exogenní antioxidanty	11
3.2.3.1 Isoprenoidní antioxidanty	11

3.2.3.1.1 Tokoly	11
3.2.3.1.2 Karotenoidy	14
3.2.3.2 Fenolové antioxidanty	17
3.2.3.2.1 Fenolické kyseliny	17
3.2.3.2.2 Flavonoidy	18
3.2.3.3 Vitamin C	21
3.2.4 Měření antioxidační aktivity	23
3.2.4.1 Celková antioxidační aktivita	23
3.2.4.1.1 Metody založené na eliminaci syntetických radikálů	24
3.2.4.1.2 Vyhodnocování měření	25
3.2.5 Stanovení antioxidačních látek	26
3.2.5.1 Celkový obsah polyfenolických látek	26
3.2.5.2 Identifikace a kvantifikace	27
4. Materiál a metody	28
4.1 Použité chemikálie	28
4.2 Instrumentace	28
4.3 Použitý rostlinný materiál	29
4.1 Příprava analytického vzorku	29
4.5 Stanovení vitamínu E	29
4.6 Stanovení celkové antioxidační aktivity	30
4.7 Stanovení celkového obsahu polyfenolů	31
4.8 Statistické vyhodnocení	32

5. Výsledky a diskuse	33
5.1 Stanovení vitamínu E	33
5.2 Stanovení celkové antioxidační aktivity	37
5.3 Stanovení celkového obsahu polyfenolů	38
6. Závěr	40
7. Seznam literatury	41
8. Seznam použitých zkratk a symbolů	47
9. Přílohy	49

1. Úvod

Mnohé rostliny využívané jako zdroj potravy obsahují řadu různých biologicky účinných látek. Významnou skupinu těchto látek tvoří antioxidanty. Antioxidantům obsaženým v potravinách rostlinného původu se věnuje značná pozornost z důvodu jejich terapeutických efektů na lidský organismus. Bylo prokázáno, že antioxidanty snižují riziko vzniku chronických onemocnění např. rakovinných či kardiovaskulárních, neboť jsou schopny eliminovat působení tzv. reaktivních kyslíkových částic (ROS – reactive oxygen species). ROS přítomné v živých biologických systémech jsou schopny oxidovat proteiny, lipidy a rovněž nukleové kyseliny, čímž narušují jejich chemickou strukturu. Pozměnění chemické struktury může poté vést k iniciaci některé z degenerativních chorob.

Antioxidanty lze z hlediska původu vzniku rozdělit na endogenní a exogenní. Některé antioxidanty, jmenovitě α -lipoová kyselina či koenzym Q₁₀, mohou být současně exogenní i endogenní. Endogenní antioxidanty jsou produkovány samotným organismem a zastávají velmi specifické funkce, např. superoxiddismutáza nebo kataláza. Exogenní antioxidační látky do organismu pronikají z vnějšího prostředí, tj. přijímáním potravin rostlinného původu. Jedná se o sloučeniny mající ve svém ochranném působení v organismu široký záběr. Mezi exogenní antioxidační látky, běžně se vyskytující v zelenině, ovoci a obilninách, patří především polyfenolické sloučeniny, vitaminy E, C a karotenoidy.

Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) představuje hlavní zemědělsky využívanou obilninu na celém světě. K rozdílným vlastnostem jednotlivých odrůd pšenice se přihlíží při výběru jejího zpracování na požadované produkty. Přítomnost např. vyššího obsahu lepku v pšenici vyhovuje pekařským účelům, zatímco výrazněji žlutě zbarveného pšeničného semene se využívá k výrobě těstovin.

Pšenice dvouzrnka [*Triticum dicoccum* Schübl (Schrank)] a jednozrnka (*Triticum monococcum* L.) jsou historicky staršími odrůdami pšenice. Jejich výnos je nízký v porovnání s pšenicí setou, jejich přínos však spočívá v možném zvýšení kvality a pestrosti potravinových výrobků.

Pšeničné produkty obsahují velké množství nutričně důležitých složek a jsou rovněž významným zdrojem antioxidačních látek ve výživě člověka.

1. Cíl práce

Cílem této práce bylo:

- 1) stanovit a porovnat obsah vitamínu E v pšenici seté, jednozrnce a dvouzrnce
- 2) stanovit a porovnat celkovou antioxidační aktivitu v pšenici seté, jednozrnce a dvouzrnce
- 3) stanovit a porovnat obsah celkových polyfenolů v pšenici seté, jednozrnce a dvouzrnce

Hypotézy:

- 1) pšenice jednozrnka, dvouzrnka a setá se významně liší v obsahu vitamínu E
- 2) pšenice jednozrnka a dvouzrnka a setá mají jiné zastoupení jednotlivých tokolů
- 3) pšenice jednozrnka, dvouzrnka a setá se liší v obsahu polyfenolických látek
- 4) pšenice jednozrnka, dvouzrnka a setá vykazují míru antioxidační aktivity
- 5) obsah biologicky aktivních látek je ovlivněn odrůdou, druhem i ročníkem pěstování

3. Literární rešerše

3.1 Pšenice

Pšenice je významným zdrojem antioxidantních látek ve výživě člověka (Hidalgo et al., 2006). V dnešní době se z obilnin v České republice pěstuje nejvíce pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) (Novák a Skalický, 2009). Pšenice dvouzrnka [*Triticum dicoccum* Schübl (Schränk)] a jednozrnka (*Triticum monococcum* L.) jsou historicky staršími odrůdami pšenice. Jejich výnos je nízký v porovnání s pšenicí setou, a však jejich přínos spočívá ve zvyšování kvality a pestrosti potravinových výrobků (Moudrý et al., 2005; Konvalina et al., 2009).

3.1.1 Botanický popis

Z botanického hlediska se pšenice (*Triticum*) zařazuje do třídy rostlin jednoděložných (*Liliopsida*), řádu lipnicotvarých (*Poales*), čeledi lipnicovitých (*Poaceae*) a podčeledi vlastních lipnicovitých (*Pooidaeae*) (Novák a Skalický, 2009).

Triticum je jednoletá (jarní i ozimá forma) rostlina s květenstvím staženým v lichoklas. Klásky jsou 2-5květé, bezosinné, u některých kulturních forem se vyskytují křivé osiny. Obilky (plody) jsou válcovité, červenohnědé a nahé. Obilka je tvořena aleuronovou vrstvou, která představuje významný zdroj bílkovin. Výživa embrya je zajišťována prostřednictvím zásobního pletiva, triploidního endospermu (Novák a Skalický, 2009).

Pšenice má svazčitý kořen tvořený tenkými adventivními kořeny. Stonek (stéblo) se nevětví. Internodia jsou přerušována uzlinami (nody). Čárkovité listy přisedají ke stéblu. (Novák a Skalický, 2009). Důležitým rozpoznávacím znakem je přítomnost krátkého, po okraji vroubkovaného jazýčku a malého ochmýřeného ouška na listu (Špaldon, 1986).

3.1.2 Chemické složení zrna

3.1.2.1 Sacharidy

V pšeničném zru je přítomno vysoké množství sacharidů. Jedná se především o polysacharid škrob, dále celulosu, hemicelulosy, pentosany; oligosacharidy, monosacharidy a sacharidy

jako součást komplexů s lipidy a bílkovinami – glykolipidy a glykoproteiny. Obsah škrobu v obilce se pohybuje v rozmezí 50 - 70 % v závislosti na odrůdě a podmínkách prostředí. Škrob se významně uplatňuje v pekárenské technologii a ovlivňuje např. kvalitu lepku (Prugar a Sýkorová, 2008).

3.1.2.2 Lipidy

Podíl lipidů vyskytujících se v obilce odpovídá 1,5 - 3 %. Tyto lipidy tvoří jednak vlastní tuky složené hlavně z linolové a olejové kyseliny, a také fosfatidy, jež obsahují kyselinu fosforečnou a dusíkatou bázi. Typickým představitelem je lecitin s dusíkatou bázi cholinem. Hlavní podíl lipidů je koncentrován do klíčkové části zrna. Přítomnost lipidů hraje významnou roli při skladování obilí a mouky. Oxidační přeměny tuků vedou ke žluknutí, což nežádoucím způsobem ovlivňuje sensorické vlastnosti. V pekárenské technologii lipidy ovlivňují biochemické přeměny během kynutí a pečení (Prugar a Sýkorová, 2008).

3.1.2.3 Bílkoviny

Bílkoviny obsažené v obilce jsou považovány za látky s největším významem z hlediska technologického a dále pro svou výživovou a krmnou hodnotu. Jejich obsah v sušině běžně činí 12 - 13 %. V pšeničném zrně je zastoupeno následujících osm esenciálních aminokyselin: lysin, valin, leucin, isoleucin, fenylalanin, threonin, methionin a tryptofan. V aleuronové vrstvě a v klíčku se nalézá relativně nejvyšší podíl bílkovin. V endospermu ubývá množství bílkovin směrem do středu (Prugar a Sýkorová, 2008).

3.1.2.4 Minerální látky

Obsah minerálních látek v pšeničném zrně se nejčastěji pohybuje v rozsahu 1,7 - 2,0 %, v závislosti na odrůdě a půdních podmínkách. Zrno obsahuje průměrně ve 100 g sušiny asi 450 mg fosforu, 380 mg draslíku, 160 mg síry, 140 mg hořčíku, 60 mg vápníku, 30 mg sodíku, 5 mg železa, 4,5 mg manganu, 3 mg zinku, 2,5 mg bóru, 0,7 mg mědi a nepatrně ještě další minerální prvky. Největší množství minerálních prvků je nahromaděno v klíčku a v obalech zrna (Prugar a Sýkorová, 2008).

3.1.2.5 Antioxidační látky

Vitaminy vykazují antioxidační účinky a představují další skupinu látek, nacházející se v zrně pšenice, která je pro člověka i hospodářská zvířata nutričně významná. Ve 100 g sušiny je průměrně obsaženo 3,0 mg tokoferolů (forma vitamínu E), 0,01 mg α -karotenu (provitamin vitamínu A), 0,45 mg thiaminu (vitamin B1) a 0,4 mg pyridoxinu (vitamin B6). Vitaminy jsou většinou soustředěny v klíčku a v aleuronové vrstvě obilky. O tyto části však světlé mouky bývají při mlýnském zpracování ochuzeny (Prugar a Sýkorová 2008).

Obsah jednotlivých forem vitamínu E - tokoferolů a tokotrienolů se vzájemně druhově a odrudově liší. Pšenice jednozrnka i dvouzrnka obsahuje průkazně více tokotrienolů než pšenice setá (Hejtmánková et al., 2010). Ze současných studií se usuzuje, že tokotrienoly by mohly být biologicky účinnější než tokoferoly. Tokotrienoly zabraňují např. vzniku neurodegenerativních onemocnění a rakovině prsu (Therriault et al., 1999; Watson and Preedy, 2009). Pšeničné zrno je rovněž zdrojem polyfenolických látek, o nichž je známo, že působí výrazně antioxidačně. Polyfenolické látky jsou koncentrovány ve vnějších vrstvách zrna (Katina et al., 2007). Mezi významné polyfenolické látky obsažené v zrně patří hydroxyskořicové kyseliny - ferulová, kávová, *p*-kumarová, syringová a vanilová (Okarter et al., 2010).

Karotenoidy lze rovněž zařadit mezi významné antioxidační látky vyskytující se v obilce. Pšenice jednozrnka obsahuje průkazně vyšší množství karotenů v porovnání s pšenicí setou a dvouzrnkou (Hidalgo et al., 2006).

3.1.3 Kvalita pšeničného zrna

Odrůda je základním faktorem, který ovlivňuje jakost zrna jako suroviny pro potravinářskou výrobu. V mnoha znacích se jednotlivé odrůdy liší, a tudíž je při výběru nutné zohlednit jejich užitný směr. Základní kritérium hodnocené u všech registrovaných odrůd představuje pekárenská jakost. Odrůdy jsou zařazovány do následujících kategorií:

- potravinářská pšenice s pekárenskou jakostí (výroba kynutých těst)
- potravinářská pšenice s pečivářskou jakostí (výroba sušenek)

- krmná pšenice
- surovina pro výrobu škrobu
- surovina pro výrobu bioethanolu

Nevýhodou odrůd s vysokou pekařskou jakostí, bývá nižší výnosová úroveň, u některých i malá odolnost k chorobám (Prugar a Sýkorová, 2008).

3.1.4 Pšenice setá

Ke vzniku prvních forem pšenice seté došlo spontánním křížením pšenice dvouzrnky a trávy *Aegilops squarrosa* (Stehno et al, 2008). Význam pšenice seté v ČR vyplývá z jejího dominantního postavení ve struktuře obilnin i ostatních plodin pěstovaných na orné půdě, kde zaujímá asi 30 % plochy. Přestože se největší podíl (60 %) zkrmuje, větší část osevních ploch pšenice je využívána s cílem dosažení potravinářské kvality, která je realizována za vyšší ceny. Nadbytečné objemy pšenice se zpracovávají např. pro výrobu bioethanolu (Prugar a Sýkorová, 2008). Pšenice se pěstuje ve dvou formách – jarní a ozimá. Přednost se dává pěstování ozimé formě (vyšší výnos) (Špaldon, 1986).

3.1.4.1 Pěstování ozimé pšenice seté

Zařazení v osevním postupu

Pšenice ozimá je ze všech obilnin nejnáročnější na předplodinu, neboť ta podstatně mění půdní prostředí a vlastnosti, jež jsou důležité jednak pro růst rostlin, jednak pro tvorbu výnosu i jeho kvalitu. Vhodnými předplodinami ozimé pšenice jsou v našich podmínkách jeteloviny, luskoviny, vojtěška, ozimá řepka a organicky hnojené okopaniny (Zimolka et al., 2005).

Zpracování půdy

Předset'ová příprava zahrnuje orbu nebo minimalizační zpracování. Orba se provádí 2-3 týdny před setím do hloubky 18 - 22 cm. Vysévá se od 15.9. - 5.10. (podle výrobní oblasti) do hloubky 3 - 4 cm (Palík et al, 2009) s roztečí řádků 12,5 – 17 cm (Zimolka et al., 2005). Výsevek činí 3,5 - 5,5 MKS/ha (dle termínu setí) (Zimolka et al., 2005).

Výživa a hnojení

Pšenice patří mezi plodiny se střední spotřebou živin. Vyžaduje hluboké, hlinité až jílovité půdy se slabě kyselou až neutrální reakcí (Zimolka et al., 2005).

Celková dávka dusíku se aplikuje během vegetace a je rozdělena do tří dávek - regenerační, produkční a kvalitativní (Zimolka et al, 2005).

Regenerační hnojení se provádí brzy na jaře v dávce 40 - 60 kg/ha použitím např. ledku amonného se síranem amonným (DASA) (Zimolka et al. 2005).

Produkční dávka se aplikuje na počátku sloupkování a činí 20 - 45 kg/ha. Kvalitativní hnojení se realizuje ve fázi metání v dávce 10 - 20 kg (Zimolka et al. 2005). Pro produkční a kvalitativní hnojení je možné použít hnojiva DAM 390 (hnojivo obsahující dusičnan amonný a močovinu) a LAV 27 % (hnojivo obsahující dusičnan amonný a mletý vápenec) (Palík et al, 2009).

Nedostatek dusíku pro rostlinu může způsobovat zesvětlení listů, horší odnožování, nevyrovnanost porostu a rovněž negativně ovlivňuje kvalitu zrna (Zimolka et al, 2005).

Doporučená dávka fosforu činí 40 - 50 kg P₂O₅ a provádí se před orbou (Palík et al., 2009). Nedostatek fosforu se projevuje menší intenzitou odnožování, krátkými, slabými stébly a fialováním listů (Zimolka et al., 2005).

Palík (2009) doporučuje dávku draslíku asi 23 kg/ha hnojivem NPK před orbou. Důležitým příznakem nedostatku draslíku je viditelná změna stavu rostliny. Stéblo se zkracuje a rostlina vytváří velké množství odnoží (Zimolka et al., 2005).

Ochrana ozimé pšenice

Základ dobrého porostu pšenice tvoří kvalitní mořené osivo. Moření slouží jako ochrana především proti snětím a fusariím (Palík et al., 2009).

Ochrana proti plevelům

Omezit zaplevelení lze vhodnou předplodinou a mechanickým nebo chemickým zničením vzešlých plevelů (Palík et al., 2009).

Podzimní aplikací herbicidů je řešena likvidace chundelky metlice, citlivých a odolných dvouděložných plevelů výdrolu řepky (Palík et al., 2009), na jaře především svízelu a pcháče. Hojně užívané přípravky jsou Quartz super a Stomp 400 SC (Tichý et al., 2003).

Ochrana proti chorobám

Výskyt chorob, škůdců a plevelů značně ovlivňuje agrotechnika (osevní postup, zpracování půdy), odrůda (odolnost). Z virových chorob lze jmenovat zakrslost pšenice a žlutou zakrslost ječmene. Ochrana proti virozám spočívá v hubení přenašečů (mšice, kříš) a v likvidaci výdrolu (Palík et al., 2009).

Z houbových chorob lze zmínit plíseň sněžnou, fusariosu, komplex chorob pat stébel, padlí travní, braničnatku plevovou, rez travní a sněť mazlavou (Zimolka et al., 2005). Aplikace fungicidů (přípravky Swing Top, Horizon atd.) probíhá především na jaře (stéblolam, plíseň sněžná, fusarioza), ale také na podzim (rzi) (Palík et al., 2009).

Ochrana proti škůdcům

Mezi škůdce napadající pšenici patří např. bzunka ječná, hrbáč osenní, kohoutek černý, bejlmorky, třásněnky a mšice. Poškození těmito škůdci není však tak závažné. Ochrana se běžně neprovádí (Zimolka et al., 2005).

Regulátory růstu

Regulátory růstu se aplikují ve fázi konce odnožování. Jejich působení spočívá ve zvýšení odolnosti proti poléhání a rovněž také v podpoře a vyrovnání odnoží. Polehlost porostu pšenice negativně ovlivňuje její kvalitu. Přípravky Moddus a Cerone 480 jsou běžně využívány jako regulátory růstu (Palík et al., 2009).

Sklizně

Porost pšenice se sklízí na přelomu žluté a plné zralosti přímou jednofázovou sklizní žacími mlátičkami. Termín sklizně připadá na konec července až začátek srpna za optimální vlhkosti 15 %. Výnos pšenice seté činí 4 - 7 t/ha (Zimolka et al., 2005).

3.1.5 Pšenice jednozrnka

Pšenice jednozrnka (*Triticum monococcum* L.) patří ke starším málo prošlechtěným pluchatým druhům obilí. Výnos jednozrnky je sice nízký v porovnání s pšenicí setou, na druhé straně představuje cenný zdroj biologicky účinných látek. Významným znakem jednozrnky je rovněž odolnost k některým chorobám. Tyto vlastnosti se využívají především ke zlepšování široce pěstovaných druhů (pšenice setá a tvrdá). Z hlediska kvality však tento druh není příliš vhodný pro pekařské využití, ale používá se pro výrobu sušenek a celé řady nekynutých výrobků (Konvalina et al., 2009).

3.1.6 Pšenice dvouzrnka

Pšenice dvouzrnka [*Triticum diccicum* Schübl (Schränk)] je pluchatá obilnina starší než pšenice setá. Dvouzrnka nebyla nikdy šlechtěna a v současnosti lze nalézt zejména krajové odrůdy a plané formy. Dvouzrnka měla významnou roli ve výživě starobylých národů. Vzhledem ke vzrůstajícím požadavkům na pestrost a kvalitu potravinářských výrobků zájem o tento druh pšenice stoupá, neboť představuje významný zdroj biologicky účinných látek. Pěstuje se v extrémních horských podmínkách v Pyrenejích a Alpách (Konvalina et al., 2009).

3.2 Antioxidační látky

3.2.1 Obecný mechanismus působení

Pro antioxidanty je příznačné, že jsou schopny inhibovat oxidační procesy, a tím snižovat negativní vliv reaktivních kyslíkových částic (Kim et al., 2006). Během metabolismu přirozeně dochází k uvolňování těchto reaktivních částic (Smirnov, 2005). K vysvětlení oxidačních přeměn vznikajících působením kyslíku lze použít teorii radikálových řetězových reakcí. V průběhu oxidace jsou patrné tři fáze: iniciace, propagace a terminace. Fáze iniciace je rozhodující, neboť již v této fázi se štěpením molekul uvolňují radikály (Pospíšil, 1968). Inhibiční účinek antioxidantů spočívá zejména v tom, že interakcemi s radikály si vzájemně poskytují elektrony, a tím je inaktivují (Smirnov, 2005).

3.2.2 Reaktivní kyslíkové částice

Reaktivní kyslíkové částice (ROS) poškozují strukturu biomolekul (proteinů, nukleových kyselin) (Smirnov, 2005), což může iniciovat např. mutaci DNA a vést k nekontrolovanému množení zmutovaných buněk, a následně ke vzniku rakoviny. ROS mohou mít negativní dopad rovněž na kardiovaskulární systém, protože narušují povrch výstelky arterií, což vede k tvorbě cholesterolových nánosů (Passwater a Novotná, 2002). Vliv ROS na organismus není však výlučně nepříznivý. Pozitivní význam ROS spočívá například v tom, že chrání živé biologické systémy před průnikem patogenů (Passwater a Novotná, 2002; Smirnov, 2005).

Reaktivní kyslíkové částice, zahrnující jednak hydroperoxylové (resp. superoxidové), peroxylové a hydroxylové volné radikály, jednak peroxid vodíku, vznikají interakcemi metabolismu. Struktury radikálů znázorňuje Obrázek 1. Reaktivita ROS stoupá v řadě počínající peroxidem vodíku, končící hydroxylovým radikálem (Smirnov, 2005). Vyšší reaktivita volných radikálů je dána přítomností nepárového elektronu (Brdička, 1972).



Obr.1 Chemické struktury vybraných radikálů (převzato z: Smirnov, 2005)

a) hydroperoxylový radikál b) hydroxylový radikál c) peroxylový radikál

d) superoxidový radikál (ionizovaná forma HO_2^\bullet)

3.2.3 Exogenní antioxidanty

Pro živočichy včetně člověka představují přírodní exogenní antioxidanty látky esenciální. To znamená, že jejich tělo není schopné si je samo syntetizovat, nýbrž je odkázáno na jejich příjem potravou (Passwater a Novotná, 2002). Jisté odlišnosti v molekulární struktuře jednotlivých přírodních antioxidantů je dělí do dvou větších skupin: isoprenoidní a fenolové. Třída isoprenoidních antioxidantů zahrnuje tokoly a karotenoidy (Smirnov, 2005). Druhou třídu tvoří fenolické kyseliny a flavonoidy (Beta et al., 2004).

K jednomu z nejčastějších exogenních antioxidantů patří L-askorbová kyselina (vitamin C). Vitamin C vykazuje synergický antioxidační efekt s tokoferoly, a proto bývá někdy spojován se skupinou isoprenoidních antioxidantů, a však v porovnání s nimi vykazuje patrné odlišnosti ve struktuře i v chemické povaze (Smirnov, 2005).

3.2.3.1 Isoprenoidní antioxidanty

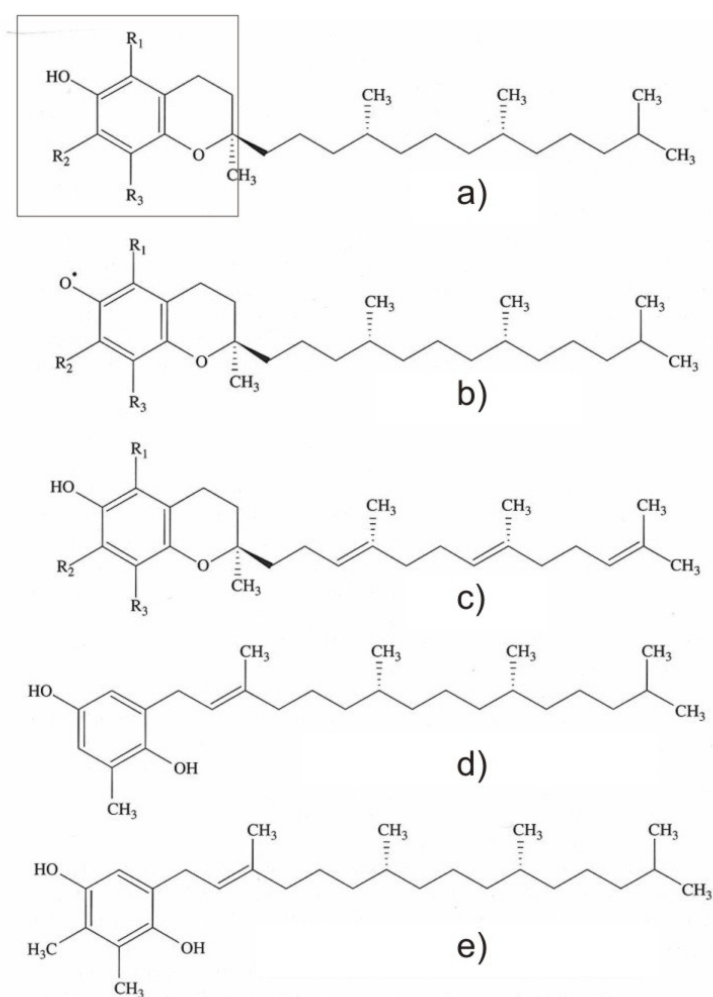
Isoprenoidní antioxidanty patří do skupiny terpenů (isoprenoidů). Jedná se o rozsáhlou skupinu látek na bázi polymerů, přičemž společným základem terpenů je monomerní jednotka 2-methyl-but-1,3-dien známější pod triviálním názvem isopren (Pacák, 1978). Isoprenoidní antioxidanty mají hydrofobní charakter, což je dáno jejich chemickou strukturou (Sofrová et al., 2005).

3.2.3.1.1 Tokoly

Směs jednotlivých izomerů tokoferolů a tokotrienolů je označována souhrnným názvem vitamin E (Smirnov, 2005).

Chemická struktura

Hydrofobní řetězec, vycházející biochemicky z fytolu, (Sofrová et al., 2005) může obsahovat jednak vazby jednoduché, pak se jedná o tokoferoly, jednak dvojné vazby, a v takovém případě se hovoří o tokotrienolech (Obr.2). Každá skupina tokolů vytváří čtyři stereoisomery α , β , γ , δ , jež se liší počtem a polohou methylových skupin na dihydrochromenu (Smirnov, 2005). Dihydrochromen je benzhomologem pyranu, chromenu (Pacák, 1978). Dihydrochromenový systém je zvýrazněn pomocí čtverce na Obrázku 2.



Obr.2 Struktury tokolů a jejich biochemických intermediátů: a) α -tokoferol (je-li R₁, R₂, R₃ = CH₃), β -tokoferol (je-li R₁ a R₃ = CH₃ a R₂ = H), γ -tokoferol (je-li R₁ = H a R₂ a R₃ = CH₃), δ -tokoferol (je-li R₁ a R₂ = H a R₃ = CH₃) (převzato z: Velíšek a Hajšlová, 2009) b) α -tokoferoxylový radikál (je-li R₁, R₂, R₃ = CH₃) (převzato z: Smirnov, 2005) c) α -tokotrienol (je-li R₁, R₂, R₃ = CH₃), β -tokotrienol (je-li R₁ a R₃ = CH₃ a R₂ = H), γ -tokotrienol (je-li R₁ = H a R₂ a R₃ = CH₃), δ -tokotrienol (je-li R₁ a R₂ = H a R₃ = CH₃)

Biogenní význam

Tokoforely jakožto antioxidanty hrají klíčovou roli ve vyrovnávání oxidačního stresu u živočichů i rostlin, neboť působí redukčně na reaktivní kyslíkaté částice, které jsou uvolňovány při metabolických dějích, jmenovitě během odbourávání lipidů β -oxidací a rovněž při fotosyntéze (Smirnoff, 2005).

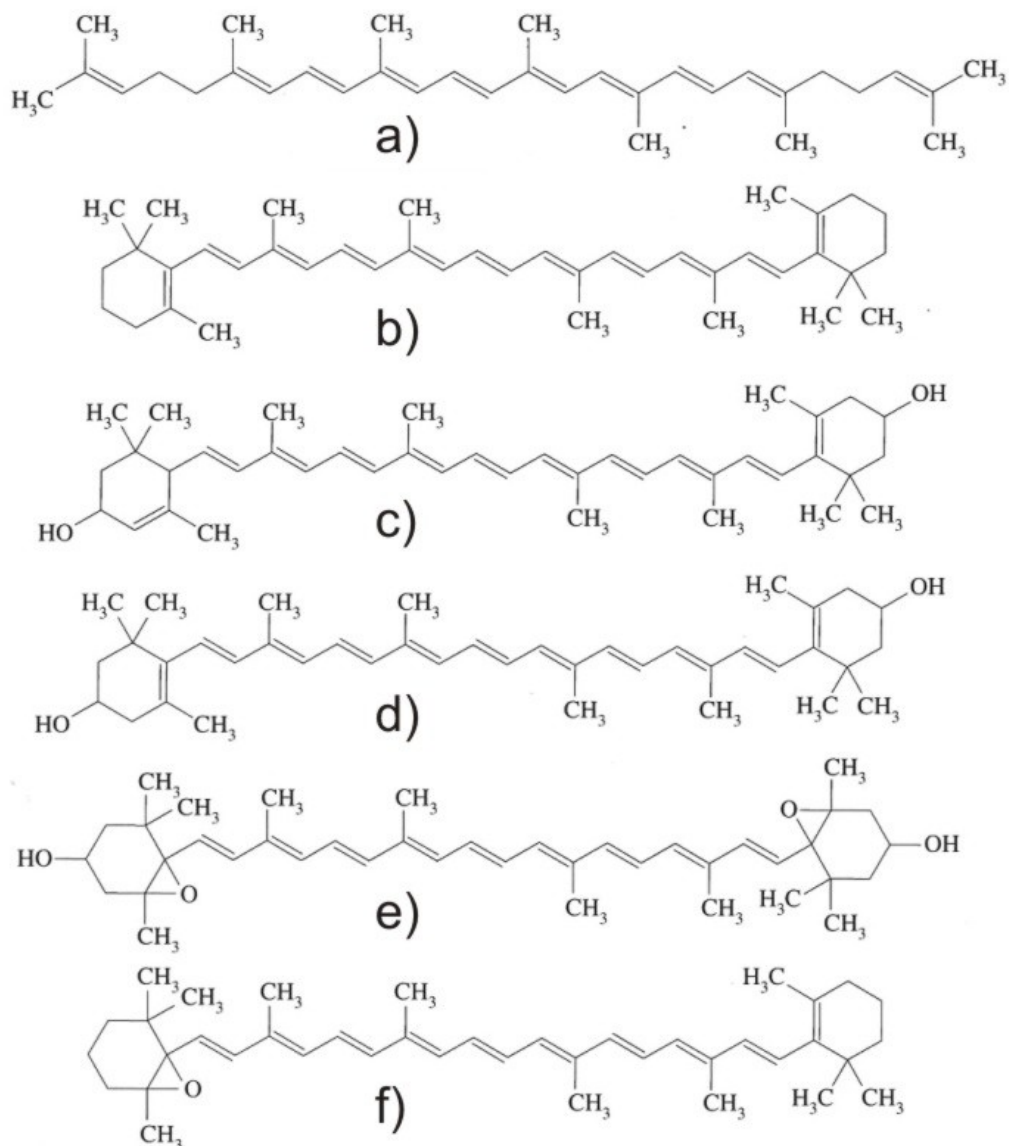
Bylo prokázáno, že vitamin E má vliv na rozmnožovací schopnost vyšších živočichů člověka nevyjímaje. Avitaminosa může být příčinou neplodnosti, potratů nebo degenerace epitelu pohlavních žláz. Hlavní zdroje vitaminu E představují klíčkový olej, zelenina a luštěniny (Pacák, 1978). Běžně uváděná doporučená denní dávka vitaminu E pro dospělého člověka činí 8 - 12 mg. Z některých současných studií však vyplývá, že optimální množství vitaminu E, které by měl člověk za den přijmout, převyšuje doporučovanou denní dávku čtyřicetkrát (Passwater a Novotná, 2002).

3.2.3.1.2 Karotenoidy

Karotenoidy způsobují oranžové, žluté a červené zbarvení květů a plodů. Rozlišují se dvě velké skupiny karotenoidů - karoteny a xantofyly (Hidalgo et al., 2006).

Chemická struktura

Karoteny jsou tetraterpenoidní uhlovodíky, zatímco xantofyly, deriváty karotenu, nesou navíc ve své molekule kyslíkaté skupiny (např. hydroxylové, epoxidové, karboxylové) (Obr.4). Zavedení takovéto funkční skupiny do molekuly karotenu se navenek projeví změnou zbarvení. Struktura obou skupin karotenoidů se zakládá na existenci dlouhého systému (3 - 11) konjugovaných dvojných vazeb a přítomnosti celkově čtyřiceti uhlíků v jejich molekule (Obr.4). Nejstálejším prostorovým uspořádáním karotenoidů je *all trans* (Sofrová et al., 2005).



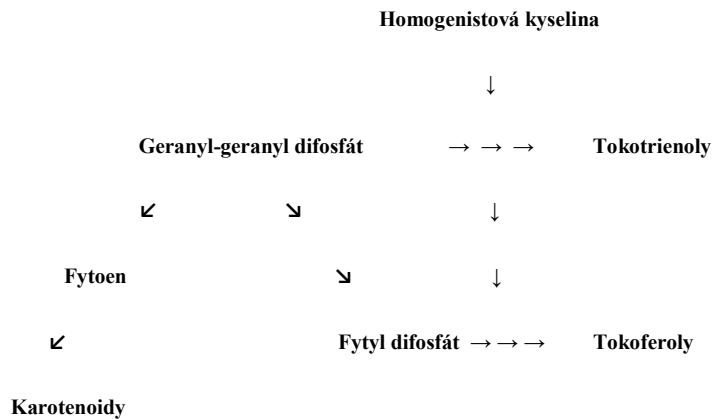
Obr.4 Struktury karotenoidů a produktu jejich metabolismu: a) lykopen b) β -karoten c) lutein d) zeaxanthin e) violaxanthin f) β -karoten-5,6-epoxid (převzato z: Sofrová et al., 2005)

Fyzikálně-chemické vlastnosti

Karoteny a xantofyly mají hydrofobní povahu (Hidalgo et al., 2006). Rozpouštějí se snadno v nepolárních organických rozpouštědlech (např. benzen, chloroform) (Pacák, 1997). Systém konjugovaných vazeb způsobuje jejich nestálost v izolovaném stavu. Snadno podléhají oxidaci, zejména na světle (Sofrová et al., 2005).

Biosyntéza

Biosyntéza karotenoidů probíhá analogickým způsobem jako biosyntéza tokolů. Vychází rovněž z geranyl-geranyl difosfátu, který dalšími kondenzačními reakcemi poskytuje fytoen. Fytoen je prekurzorem karotenoidů (Smirnov, 2005). Schéma biosyntézy karotenoidů zjednodušeně ukazuje Obrázek 5.

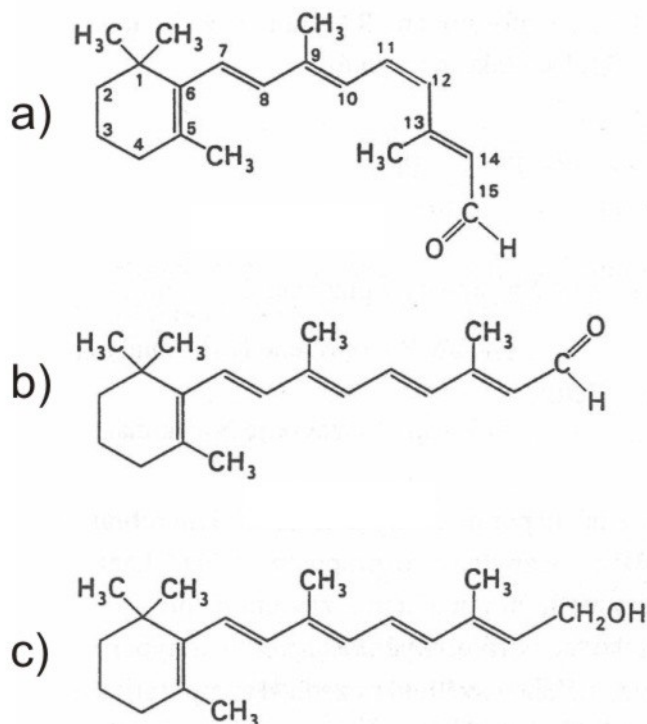


Obr.5 Biosyntéza karotenoidů (převzato z: Smirnov, 2005)

Biogenní význam

Karotenoidy jsou lokalizovány na thylakoidní membráně chloroplastu. Pro rostliny jsou nepostradatelné v procesu fotosyntézy, neboť dokážou pohlcovat světelné záření, a tudíž mohou plnit funkci tzv. doplňkových světlosběrných pigmentů. Funkce světlosběrných pigmentů spočívá ve schopnosti rozšířit spektrum fotosynteticky účinného záření. Po zvýšení obsahu energie v molekule karotenoidů např. po absorpci kvanta světelného záření dochází k izomerizační reakci. Přeměna 11-*cis*-retinalu na *all-trans* retinal a následná fotolýza poskytující produkt *all-trans* retinol (vitamin A) (Obr. 6) podmiňují u živočichů recepci světla ve světločivných orgánech (Sofrová et al., 2005).

Důležitými prekurzory vitamínu A jsou listnaté části zelených rostlin (Hidalgo et al., 2006). Na syntéze vitamínu A se významně podílí β -karoten, který se v těle živočichů enzymatickým působením symetricky štěpí na dvě molekuly vitamínu A (Sofrová et al., 2005). Avitaminosa může zapříčínovat poruchy vidění (Hidalgo et al., 2006). Průměrná denní potřeba vitamínu A pro dospělého člověka činí 0,9 mg (Brinch-Pedersen et al., 2007).



Obr.6 Struktury reaktantů a produktů izomerizační reakce: a) 11-*cis*-retinal b) *all-trans*-retinal c) *all-trans* retinol (vitamin A) (převzato z: Sofrová et al., 2005)

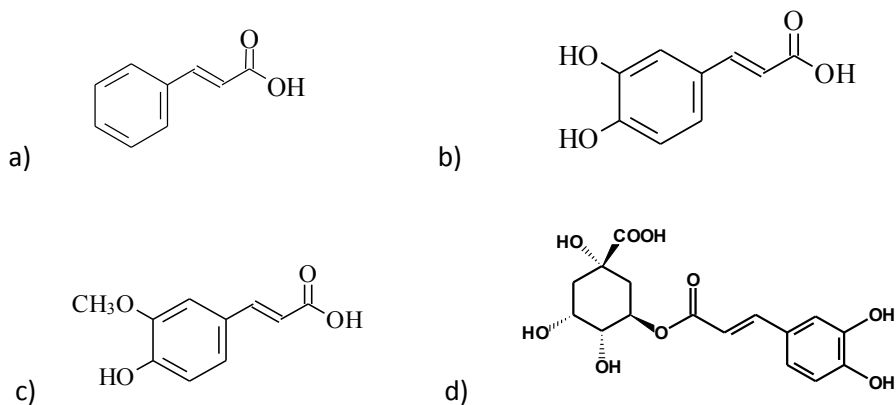
3.2.3.2 Fenolové antioxidanty

Fenolové antioxidanty lze rozdělit do dvou početných skupin sloučenin: fenolické kyseliny a flavonoidy. Oběma skupinám látek je společné, že obsahují ve svých molekulách jedno nebo více benzenových jader (Čevorová, 2009).

3.2.3.2.1 Fenolické kyseliny

Chemická struktura

Struktura fenolických kyselin se odvozuje od skořicové kyseliny, která je nejjednodušší nenasyčenou aromatickou kyselinou (Pacák, 1978). Hydroxylace, O-methylace, O-glykosylace a esterifikace značně modifikují základní strukturu fenolických kyselin (Miller et al., 2000). Struktury některých fenolických kyselin jsou ukázány na Obrázku 7.



Obr.7 Struktury fenolických kyselin: a) skořicová kyselina b) kávová kyselina c) ferulová kyselina d) chlorogenová kyselina (převzato z: Čevorová, 2009)

Fyzikálně-chemické vlastnosti

Fenolické kyseliny se poměrně snadno rozpouští ve vodě (Miller et al., 2000). S rostoucím počtem hydroxylových skupin navázaných na benzenovém jádře, stoupá rovněž polarita jednotlivých kyselin (Pacák, 1978). Hydrofobnější deriváty např. chlorogenová kyselina nebo ferulová kyselina se v rostlině vyskytují ve formě esterů (Miller et al., 2000; Cabrita et al., 2008).

Biosyntéza

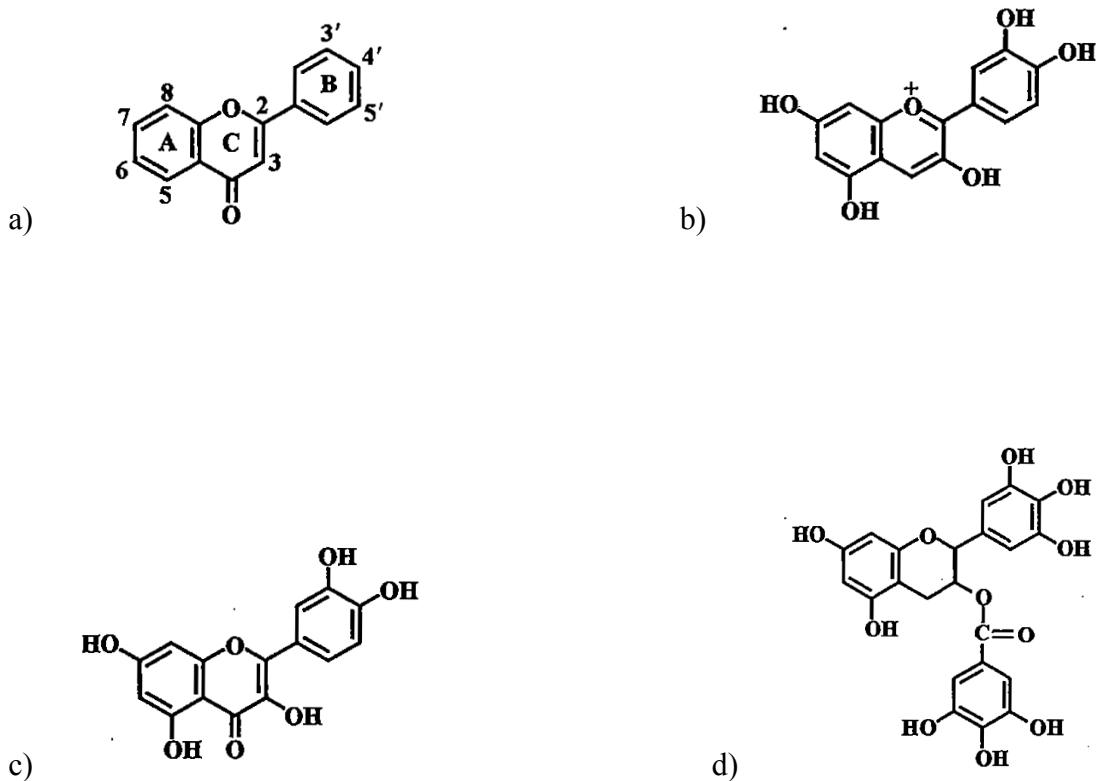
Prvním krokem biochemické cesty je katalyzovaná deaminace fenylalaninu na *trans* izomer skořicové kyseliny (Obr.9). Enzymatickým působením na *trans*-skořicovou kyselinu dojde ke vzniku fenolických kyselin (hydroxyskořicové kyseliny - HCAs) (Smirnov, 2005).

3.2.3.2 Flavonoidy

Flavonoidy patří mezi pyranová barviva. Jedná se o velmi rozsáhlou skupinu sloučenin, která zahrnuje flavony, flavonoly, flavanoly, flavanony a anthokyanidiny (Pacák, 1978).

Chemická struktura

Základní struktura flavonoidů je uvedena na Obrázku 8. Systém kondenzovaných kruhů označených písmeny A a C se nazývá benzpyriliový. Benzpyriliový systém bývá v polohách 3, 5, 7 substituován hydroxylovými skupinami (Pacák, 1978).



Obr.8 Struktury vybraných flavonoidů: a) základní struktura flavonoidů b) kyanidin

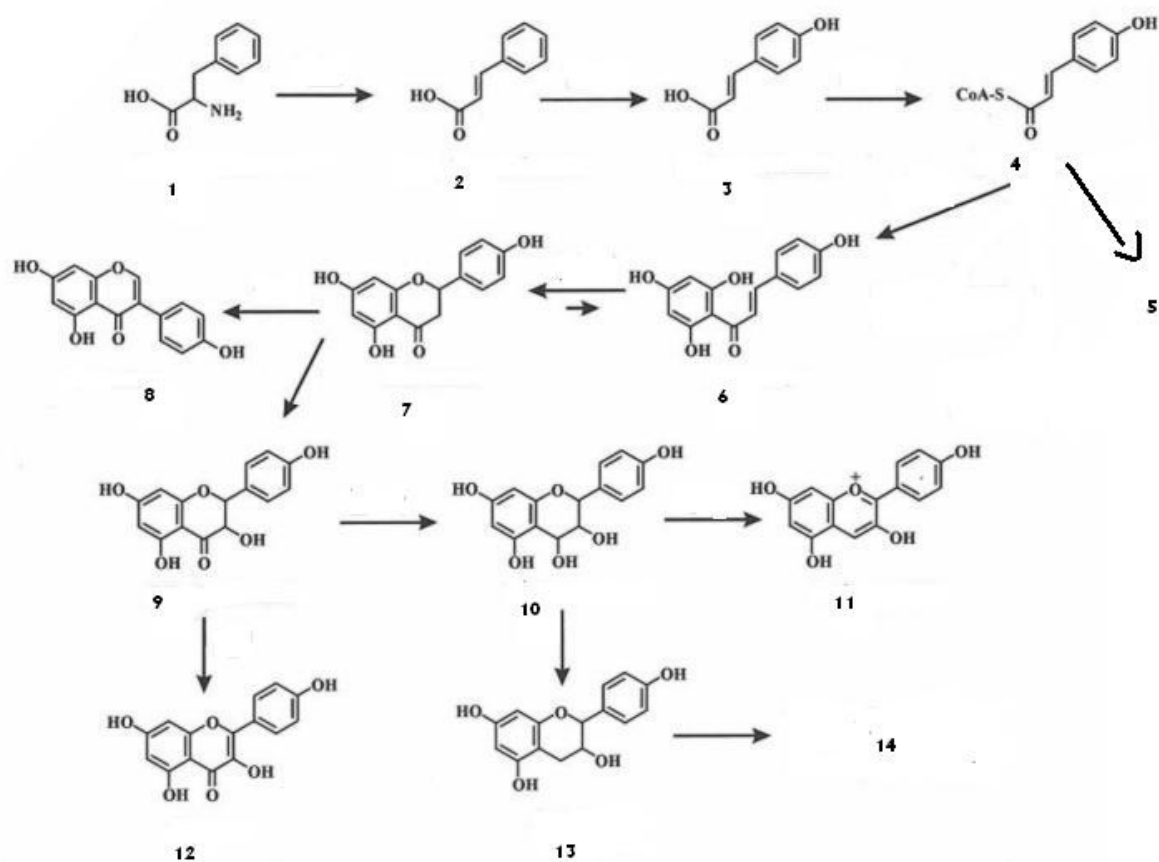
c) kvercetin (flavonol) d) flavan-3-ol (převzato z: Smirnof, 2005)

Fyzikálně-chemické vlastnosti

Většina flavonoidů se relativně dobře rozpouští v horké vodě. V porovnání s fenolickými kyselinami jsou polárnější (Basařová et al., 2004). Flavonoidy jsou velmi rozmanitě zbarveny. Flavony se barví dožluta, flavonoly do hnědé až oranžové barvy, anthokyanidiny od modré přes fialovou až do červené. Barva některých flavonoidů značně závisí na hodnotě pH prostředí a rovněž na přítomnosti iontů kovů (Pacák, 1978).

Biosyntéza

Syntéza samotných flavonoidů začíná kondenzační reakcí interemediátu *p*-kumaroyl-CoA, Tato kondenzace poskytuje flavonoid chalkon, který podstupuje izomerizační reakci za vytvoření flavanonu a následně flavonolu (Obr.9). Meziprodukt dihydroflavonol je výchozí látkou reakci, při níž se redukuje až na flavonol (Obr.9). Syntéza proanthokyanidinů vychází z flavanolu. Anthokyanidin se syntetizuje z meziproductu flavan-3,4-diolu (Smirnoff, 2005).



Obr.9 Biosyntéza fenolických antioxidantů: 1. Fenylnalanin 2. *trans*-skořicová kyselina 3. *p*-kumarová kyselina 4. *p*-kumaroyl koenzym A 5. Hydroxyskořicové kyseliny 6. Chalkon 7. Flavanon 8. Isoflavon 9. Dihydroflavonol 10. Flavan-3,4-diol 11. Anthokyanidin 12. Flavonol 13. Flavan-3-ol (katechin) 14. Proanthokyanidiny (taniny) (převzato z: Smirnoff, 2005)

Biogenní význam flavonoidů a fenolických kyselin

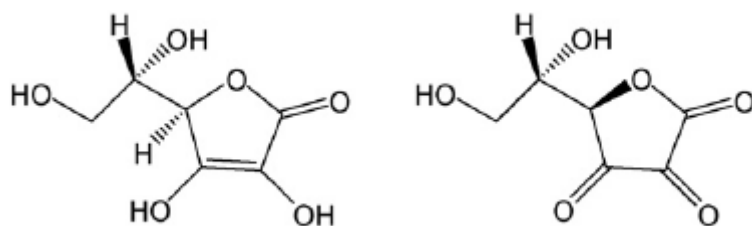
Fenolické antioxidanty hrají důležitou roli v ochraně rostliny před extrémním působením ultrafialového záření, radiace, emisního znečištění a nízkých teplot. Rostlina je schopna se jejich přispěním bránit oxidačnímu stresu, vyvolaném expozicí vůči nepříznivým abiotickým vlivům (Arendt et al., 2010).

Teprve v poslední době začíná být významu fenolických látek v lidské stravě věnována patřičná pozornost. Epidemiologické studie poukazují na jistou korelaci mezi zvýšeným příjmem fenolických antioxidantů a snížením rizika vzniku nádorového či kardiovaskulárního onemocnění (Wang et al, 2005). Za hlavní zdroje fenolických antioxidantů jsou považovány ovoce, čaj, červené víno, káva, ale rovněž obilniny. Průměrný denní příjem fenolických antioxidantů doporučený pro dospělého člověka činí asi 100 mg (Arendt et al., 2010).

3.2.3.3 Vitamin C

Chemická struktura

Vitamin C neboli L-askorbová kyselina je chemicky laktonem 2-oxo-L-gulonové kyseliny (Obr.10). Obsahuje dvě kyselé hydroxylové skupiny v enol uspořádání na jedné dvojně vazbě a chová se jako jednosytná kyselina (Čevorová, 2007; Pacák, 1978). Odštěpením vodíku přechází v L-dehydroaskorbovou kyselinu (Obr.10) (Pacák, 1978).



a)

b)

Obr.10 Struktura vitaminu C a jeho redukované formy: a) L-askorbová kyselina b) L-dehydroaskorbová kyselina (převzato z: Smirnoff, 2005)

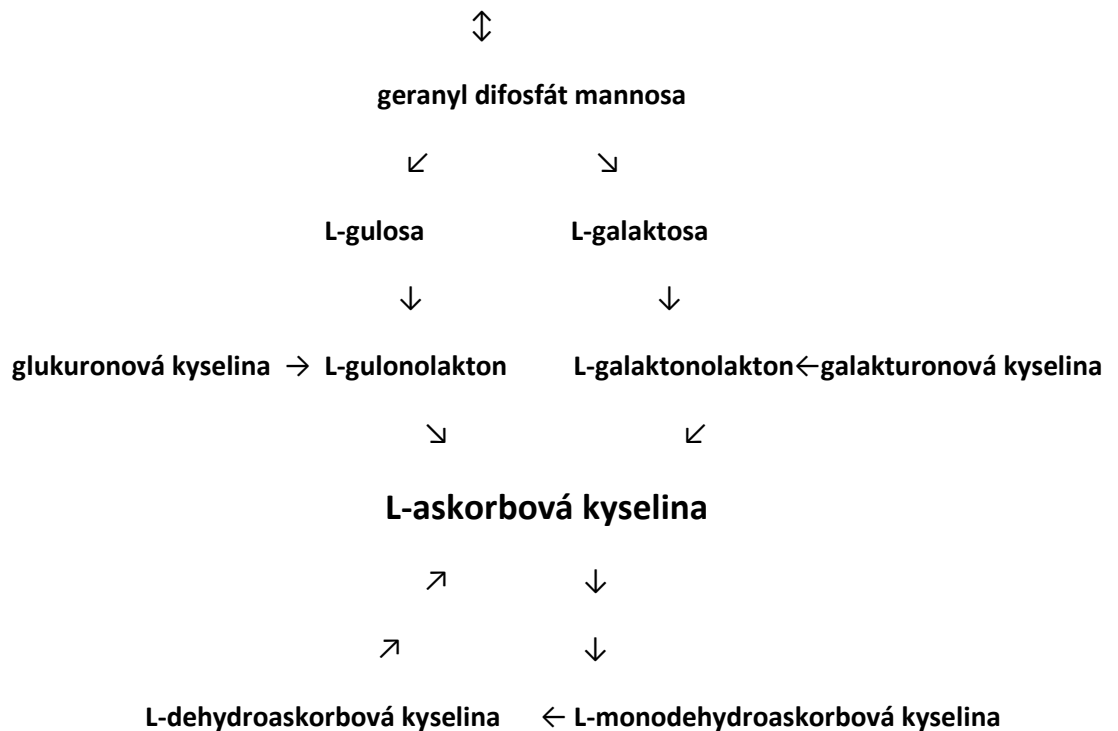
Fyzikálně-chemické vlastnosti

Vitamin C je bílá krystalická látka, která se velmi ochotně rozpouští ve vodě i v alkoholech, není však rozpustná v nepolárních rozpouštědlech (např. ether, chloroform, benzen). Vitamin C vykazuje silné redukční účinky (Čevorová, 2007).

Biosyntéza

Biosyntéza vitaminu C vychází z metabolismu sacharidů. Geranyl difosfát mannosy podléhá přeměně v L-gulosu a L-galaktosu. Přes meziprodukty L-gulonolakton a L-galaktonolakton dochází ke vzniku L-askorbové kyseliny (Obr.11) (Sofrová et al., 2005).

fruktosa-6-fosfát ↔ mannosy-6-fosfát ↔ mannosy-1-fosfát



Obr.11 Biosyntéza L-askorbové kyseliny (převzato z: Smirnov, 2005)

Biogenní význam

Vitamin C je obsažen zejména v některých rostlinných plodech (citrusové ovoce), ale hojně se vyskytuje rovněž např. v šípkách. Jeho nedostatek se projevuje onemocněním zvaným skorbut neboli kurděje (Pacák, 1978). Bylo pozorováno synergické působení vitaminu C a vitaminu E.

Doporučená denní dávka vitamínu C činí pro dospělého člověka 250-1000 mg (Passwater a Novotná, 2002).

3.2.4 Měření antioxidační aktivity

Antioxidační aktivitu lze měřit jednak chemickými metodami, jednak fyzikálními. Fyzikální metody stanovení antioxidační aktivity nesledují bezprostředně chemickou reakci nebo změny obsahu jednotlivých látek, nýbrž změnu fyzikálních vlastností, která tyto procesy provází. Jako příklad lze uvést elektronovou spinovou rezonanci či stanovení chemiluminiscence (Fidler a Kolářová, 2009).

Princip měření antioxidační aktivity chemickými metodami bude podrobněji vysvětlen v následující kapitole.

3.2.4.1 Celková antioxidační aktivita

Většina přírodních antioxidantů se vyskytuje ve složitých směsích, jejichž složky mohou reagovat s radikály různými mechanismy. Proto je snahou charakterizovat antioxidační aktivitu směsných vzorků jako celku. Pro vzájemné porovnávání antioxidačních účinků různých směsí byl zaveden pojem tzv. celková antioxidační aktivita (TAA/C - total antioxidant activity/capacity) (Fidler a Kolářová, 2009).

Ke zjišťování TAA se často užívá těchto chemických metod: měření založené na eliminaci syntetických stabilních radikálů (DPPH test, ABTS test) nebo kyslíkových radikálů - ORAC (oxygen radical absorbance capacity) (Thaipong et al., 2006), metoda FRAP (Ferric reducing antioxidant potential) (Fidler a Kolářová, 2009) nebo např. biochemická metoda založená na inhibici lipoxigenasové aktivity (Karabín et al., 2006).

DPPH a ABTS metody využívají syntetických radikálů, které iniciační reakcí jiné látky přecházejí ve svou radikálovou formu, která je barevná a relativně stabilní. V přítomnosti antioxidačně aktivních složek extrahovaných ze vzorku potravin se redukuje, a tím odbarvuje. Rychlost a míra odbarvení jsou úměrné antioxidační aktivitě vzorku (Zloch et al., 2004).

Princip metody ORAC spočívá ve vytvoření peroxylového radikálu fykoeritrinu, a to jeho oxidací činidlem ABAP (2,2'-azobis-2-methyl-propionamidin). Radikál se určuje kvantitativně fluorimetricky a hodnotí se rychlost úbytku signálu po přidání testovaného vzorku (Zloch et al., 2004).

Metoda FRAP využívá k posouzení antioxidační aktivity schopnosti antioxidantů redukovat železité ionty (Ou et al., 2002). Po redukcí železitých komplexních sloučenin (např. 2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazinu)) dochází k tvorbě fialových produktů (Fidler a Kolářová, 2009).

Metoda inhibice lipoxygenasové aktivity se používá pro určení antioxidačních schopností zejména v ječmenných a sladových extraktech. Sleduje se koncentrace spotřebovaného kyslíku (Karabín et al., 2006).

Metoda spoluoxidace β -karotenu v linoleátovém modelovém systému byla adaptována pro potřeby pivovarství. β -karoten se přidává do vzorku a spolu s ním je podroben oxidaci. Spektrofotometricky se měří pokles absorbance β -karotenu v přítomnosti antioxidantů a bez nich (Karabín et al., 2006).

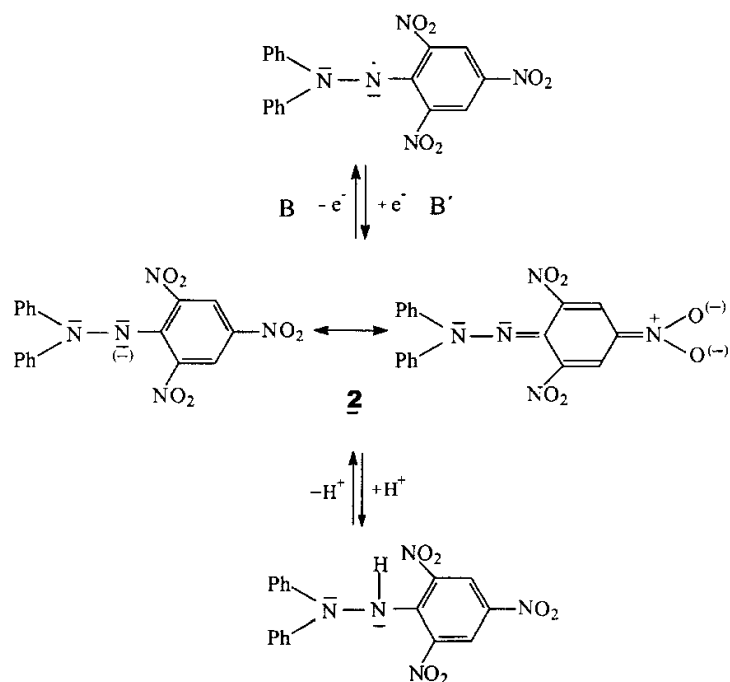
Ke stanovení TAA je možné rovněž použít elektrochemickou metodu např. cyklickou voltametrii, která využívá redoxních vlastností molekul v roztoku (Martinez et al., 2006).

3.2.4.1.1 Metody založené na eliminaci syntetických radikálů

Jedná se o metody, jejichž základem pro měření celkové antioxidační aktivity je použití stabilního radikálu DPPH[•] nebo ABTS^{•+} (Thaipong et al., 2006). (Prugar a Sýkorová, 2008).

DPPH test

Tento test je založen na schopnosti volného radikálu 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH[•]) reagovat s donory vodíku. Chemická struktura tohoto radikálu umožňuje, aby byl akceptorem vodíku, čímž vzápětí přechází do formy stabilní diamagnetické molekuly. DPPH[•] vykazuje silnou absorpci v UV-VIS spektru s absorpčním maximem při 515 nm. Pro měření TAA fenolických antioxidantů je nejvhodnější právě použití DPPH testu (Lachman a Šulc, 2006).



Obr.12 Reakční mechanismus přeměny radikálu DPPH[•] na redukovanou formu (Ph = fenyl) (převzato z: Zhuang, 1999)

ABTS test

Principem metody je sledování inaktivace radikálového kationtu ABTS^{•+} způsobené přidavkem antioxidační látky. ABTS^{•+} má silnou absorpenci v oblasti 600 - 750 nm. ABTS^{•+} je generován z ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonátu) za použití např. K₂S₂O₈ nebo systému H₂O₂/peroxidasa. Pro celkovou stabilitu systému je nutné, aby neradikálová forma ABTS byla v nadbytku v porovnání s radikálovým kationtem ABTS^{•+}. V porovnání s DPPH testem vykazuje tato metoda nižší selektivitu pro měření TAA fenolických antioxidantů (Lachman a Šulc, 2006).

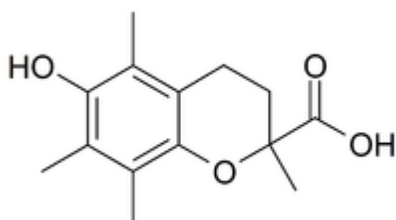
3.2.4.1.2 Vyhodnocování měření

Vyhodnocovat výsledky měření TAA lze dvěma způsoby:

- a) z kalibrační křivky
- b) procentem inhibice

Testy DPPH a ABTS jsou vyhodnocovány metodou kalibrační křivky (Lachman a Šulc, 2006). K sestavení kalibrační křivky se používají hodnoty koncentrací standardních látek (Trolox, gallová kyselina, vitamin C, aj.) (Lachman a Šulc, 2006).

Tzv. TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) určuje antioxidační aktivitu vzorku ekvivalentní určitému množství standardu Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) (Obr.13). Pro čisté látky je TEAC definována jako milimolární koncentrace Troloxu odpovídající antioxidační aktivitě testované látky o koncentraci 1mmol.l⁻¹ (Fidler a Kolářová, 2009).



Obr.13 Chemická struktura Troloxu (převzato z: Apak et al., 2004)

Pomocí procenta inhibice se antioxidační aktivita vyjadřuje v metodách inhibice lipoxygenasové aktivity a spoluoxidace β -karotenu v linoleátovém modelovém systému (Karabín et al., 2006). Procentem inhibice lze však vyhodnocovat i výsledky jiných metod stanovení TAA (TEAC a ORAC) (Chi et al., 2004).

3.2.5 Stanovení antioxidačních látek

Vlastnímu stanovení předchází příprava vzorku zahrnující extrakci, při níž dochází k uvolnění analytu z rostlinného materiálu do roztoku (Prugar a Sýkorová, 2008). Volba extrakčního činidla závisí na polaritě analytu (Ryynanen et al., 2004)

3.2.5.1 Celkový obsah polyfenolických látek

Polyfenolické látky reagují se specifickými činidly, a tím vytvářejí barevné produkty. Absorbance (úměrná koncentraci) barevných produktů se měří spektrofotometricky při dané

vlnové délce. Ke zjištění celkového obsahu polyfenolických látek se hojně užívá metody Folin-Ciocalteu (Lachman a Šulc, 2006).

V metodě Folin-Ciocalteu se pracuje se specifickým činidlem (směs fosfowolframanu sodného ($\text{Na}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) a fosfomolybdenanu sodného ($\text{Na}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) v zásaditém prostředí (vodný roztok Na_2CO_3). Fenolické látky jsou v bazickém médiu rychle oxidovány, zatímco fosfomolybdenové a fosfowolframové soli jsou redukovány na modře zbarvený komplex. Celkový obsah fenolických látek je stanoven spektrofotometricky při vlnové délce $\lambda = 765 \text{ nm}$ (Lachman a Šulc, 2006).

3.2.5.2 Identifikace a kvantifikace

K identifikaci a kvantifikaci jednotlivých antioxidačních látek se běžně používá chromatografických metod. Separace antioxidačních látek je nejčastěji uskutečňována pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC - high performance liquid chromatography), okrajově se využívá plynové chromatografie (Ryynanen et al., 2004) či kapilární zónové elektroforézy (Vaheer et al., 2010). HPLC je pro stanovení těchto látek často spojena s fluorimetrickou, elektrochemickou (Ryynanen et al., 2004) či spektrofotometrickou detekcí (Sanchez et al., 2002; Verma et al., 2009). Novější metody využívají detekce na základě tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) (Hejtmánková et al., 2010; Rozenberg et al., 2003).

Princip chromatografického stanovení

Proces analýzy této metody je možno rozdělit do dvou základních kroků. V prvním kroku dochází k fyzickému oddělení složek analyzovaného vzorku. Druhý krok spočívá v detekci čistých komponent. Podstatou dělicího procesu komponent vzorku při chromatografii je opakované ustavování rozdělovacích rovnováh vzorku mezi dvěma fázemi, tzv. mobilní a stacionární fází. Mobilní fáze unáší vzorek prostorem, v němž dochází k separaci, kdežto stacionární fáze představuje nepohybující se náplň separačního prostoru. Interakcemi komponent vzorku se stacionární i mobilní fází dochází k jejich selektivnímu brzdění a tím k jejich separaci. Výsledkem samotné analýzy je záznam odezvy detektoru na čase – tzv. chromatogram. Zóny separovaných látek procházející detektorem jsou zaznamenány jako charakteristické koncentrační profily s maximem, tzv. chromatografické píky. Z polohy píku lze vyčíst kvalitativní údaj, tj. o jakou látku se jedná, z plochy píku získáme kvantitativní informaci, tj. kolik té dané látky se nachází ve vzorku (Opekar et al., 2007).

4. Materiál a metody

4.1 Použité chemikálie

- methanol, super gradient (min. 99,9 %, Lachner, ČR)
- 25 % roztok amoniaku ve vodě, p.a. (Lachner, ČR)
- redestilovaná voda (z redestilačního přístroje GFL 2104 (Německo))
- deonizovaná voda (z přístroje Millipore, Francie)
- pyrokatechol, > 99,5 % (Sigma – Aldrich, Německo)
- hexan, min. 95,0 % (Penta, ČR)
- hydroxid draselný, min. 85 % (Lachema, ČR)
- dusík 4.0 (Linde, ČR)
- standardní látka DL- α -tokoferol, 98,2 % (GC CALBIOCHEM, Kanada)
- sada tokoferolů a tokotrienolů (CALBIOCHEM, Kanada)
- DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) (Sigma – Aldrich, Německo)
- Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) (Sigma - Aldrich, Německo)
- 20 % vodný roztok uhličitanu sodného, p.a. (Lachner, ČR)
- Folin-Ciocalteu činidlo ($\text{Na}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ a $\text{Na}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ v 20 % Na_2CO_3) (Penta, ČR)

4.2 Instrumentace

- laboratorní klasová mlátička (Katedra zemědělských strojů, TF ČZU)
- magnetické míchadlo IKA RET kontrol - visc C (ILABO, ČR)
- vortex IKA MS 3 Basic (ILABO, ČR)
- elektrický mixér HR 2158 (PHILIPS)
- analytické váhy (Kern&Sohn GmbH (Německo))
- rotační vakuová odparka (BÜCHI Rotavapor, BÜCHI Laboraltechnik AG, Švýcarsko)
- kapalinový chromatograf HPLC – Ultimate 3000 RS (Dionex, USA) s hmotnostním detektorem 3200 QTRAP (AB Sciex, USA)
- UV - VIS spektrofotometr Spectronic Helios γ (Spectronic Unicam, Anglie)

4.3 Použitý rostlinný materiál

Analyzované vzorky pšenice byly získány ze sbírky České genové banky a z Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze - Ruzyni. Byly vybrány dvě odrůdy pšenice jednozrnky – *Escana* a *Schwedisches Einkorn*, dvě odrůdy pšenice dvouzrnky – *Rudico* a *Kahler Emmer* a tři odrůdy pšenice seté – *Granny*, *Kärtner Früher* a *SW Kadrlj*.

4.4 Příprava analytického vzorku

Vzorky byly nejprve zbaveny pluch pomocí laboratorní klasové mlátičky. Před vlastní extrakcí byly vzorky homogenizovány pomocí elektrického mixeru.

4.5 Stanovení vitamínu E

Do zkumavky bylo naváženo přibližně 0,4 g zhomogenizovaného vzorku pšenice. Ke vzorku bylo přidáno 200 μl pyrokatecholu o koncentraci 0,2 $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 10 ml 1 M methanolickeho roztoku KOH. Ze zkumavky se vzorkem byl odstraněn kyslík proudem dusíku a směs byla promíchána na vortexu. Poté byla zkumavka umístěna do vodní lázně na 15 minut při teplotě 80 °C a každých 5 minut byla krátce promíchána na vortexu. Následně byla zkumavka vložena do připravené ledové tříště a po ochlazení byly do této směsi přidány 1 ml destilované vody a 5 ml hexanu. Směs byla promíchávána na vortexu po dobu jedné minuty a pak byly odebrány 3 ml hexanového alikvotu do odpařovací baňky a hexan byl odpařen do sucha jemným proudem dusíku. Odparek byl znovu rozpuštěn v 0,5 ml methanolu a přes membránový nylonový filtr (0,22 μm) převeden do vialky a podroben chromatografické analýze.

Podmínky HPLC-ESI/MS/MS analýzy:

analytická kolona: Pinnacle DB C18 (50 x 2,1 mm; 1,9 μm) (RESTEK, USA)

složení mobilní fáze: 6 mM NH_3 v H_2O : methanol (3:97) (v/v)

průtok: 0,25 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$

teplota kolony: 25 °C

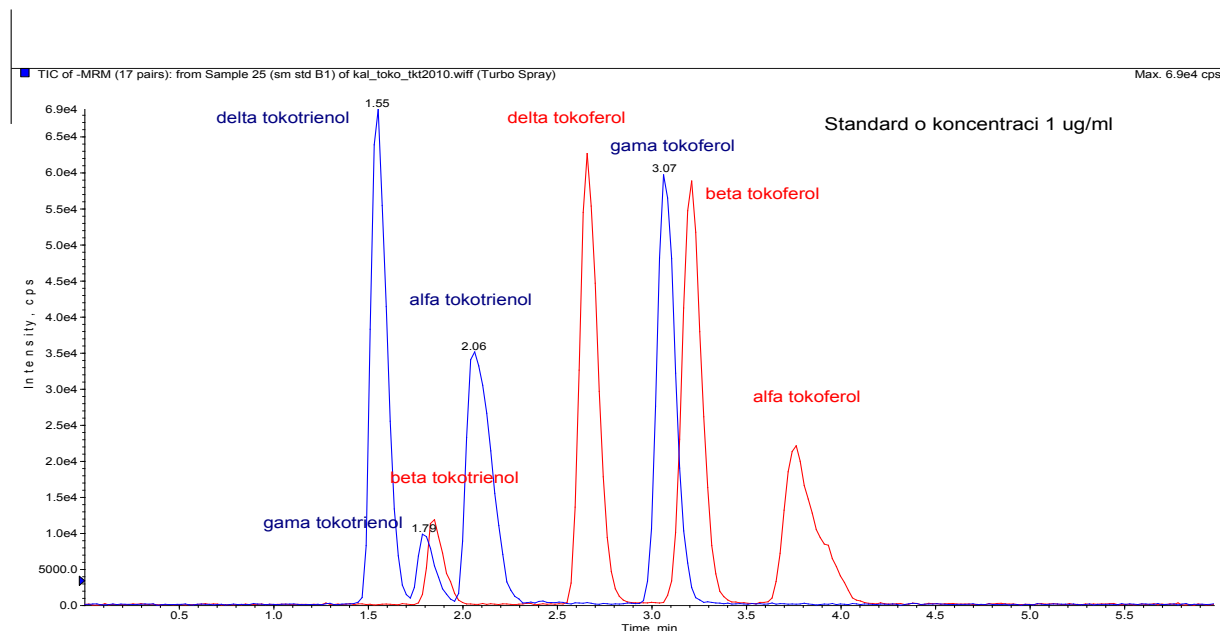
nástřikový objem: 0,5 μl

doba analýzy: 12 minut

Přítomnost 6 mM NH_3 umožňuje elektrosprejovou ionizaci analytu v negativním módu

podmínky detekce: iontový zdroj ESI, detekční mód MS-MS, ionizace negativní

Příklad chromatogramu jednotlivých tokolů je uveden na Obrázku 14. β -tokotrienol a γ -tokotrienol se nepodařilo zcela separovat na použité koloně. K téže situaci došlo rovněž v případě dělení izomerů β , γ -tokoferolu. Kalibrace byla lineární pro všechny tokoly v testovaném rozsahu $0,1 - 10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.



Obr.14 Chromatogram směšného standardu o koncentraci $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (podmínky analýzy uvedeny výše)

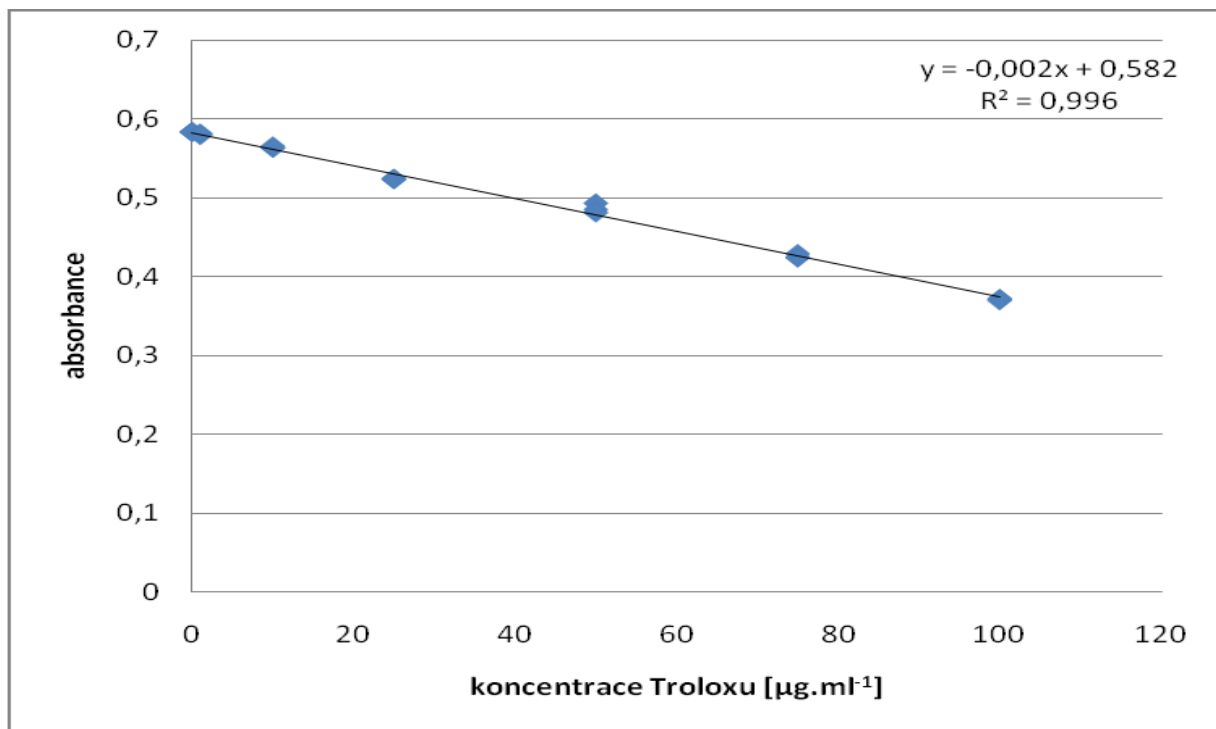
4.6 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Do 100 ml odměrné baňky bylo naváženo přibližně 5,0 g homogenizovaného vzorku a toto množství bylo rozpuštěno v methanolu, poté bylo doplněno methanolem na celkový objem 100 ml a ponecháno 24 hodin stát a extrahovat.

Roztok radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH[•]) byl připraven rozpuštěním množství odpovídajícímu špičce lžičky ve 20 ml methanolu a následným promícháním na magnetickém míchadle. Z extraktu vzorku bylo odebráno 30 ml a odpařeno na rotační vakuové odparce do sucha. Odparek byl pak rozpuštěn v 1 ml methanolu. Ke spektrofotometrickému měření bylo odebráno 50 μl .

Spektrofotometr byl vynulován na čistý methanol. Roztok radikálu DPPH byl naředěn methanolem na absorbanci $A = 0,6 \pm 0,01$. Do plastové kyvety o délce $l = 1 \text{ cm}$ bylo automatickou pipetou nanášeno 2 ml roztoku radikálu DPPH a 50 μl vzorku a promícháno ručním míchadlem. Po dvou minutách byla změřena absorbance této směsi při vlnové délce $\lambda = 515 \text{ nm}$.

Pro vyhodnocení měření byla použita metoda kalibrační přímky (Obr.15). Z naměřených hodnot absorbancí byla vyhodnocena antioxidační aktivita vyjádřená v ekvivalentech Troloxu.



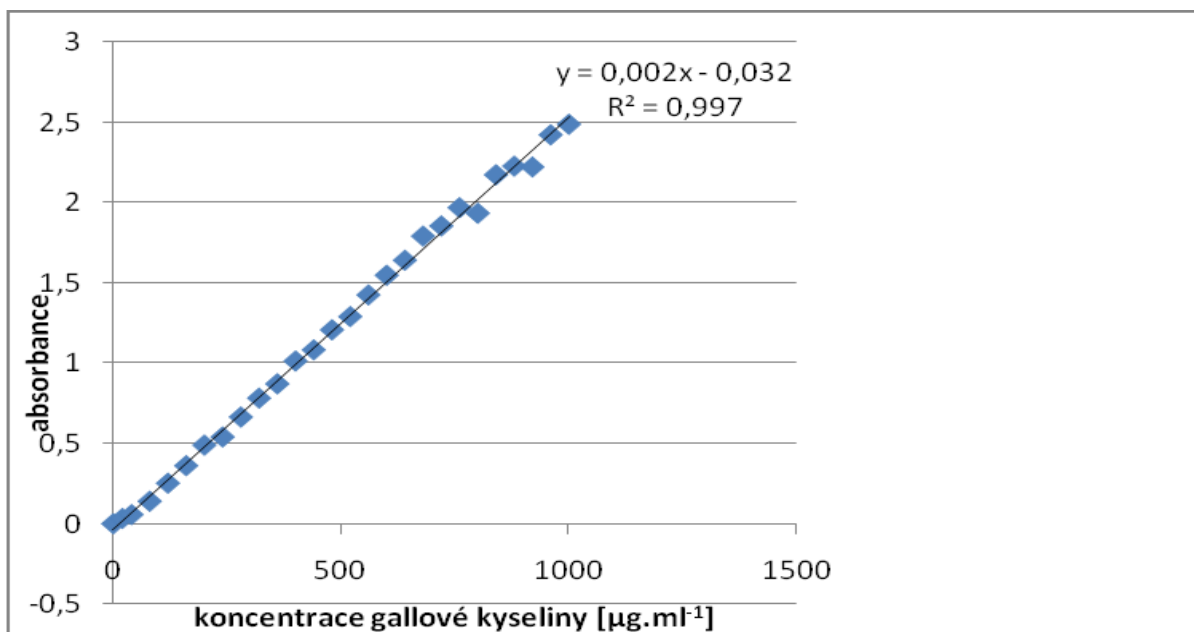
Obr.15 Kalibrační křivka pro vyhodnocení TEAC

4.7 Stanovení celkového obsahu polyfenolů

Z připraveného extraktu (viz kap. 4.6) byl pomocí automatické pipety odebrán alikvotní podíl 5 ml do 50 ml odměrné baňky. K tomuto množství roztoku vzorku bylo přidáno přibližně 5 ml redestilované vody, přesně 2,5 ml Folin-Ciocalteau činidla a 7,5 ml 20% vodného roztoku Na₂CO₃. Směs byla doplněna redestilovanou vodou na celkový objem 50 ml a promíchána. Pak byla ponechána 2 hodiny odstát.

Po uplynutí dvou hodin byla spektrofotometricky změřena absorbance vzorku při vlnové délce $\lambda = 765$ nm proti slepému vzorku (5 ml methanolu).

Měření bylo vyhodnoceno metodou kalibrační přímky (Obr.16). Z naměřených hodnot absorbancí byla vyhodnocena antioxidační aktivita vyjádřená v ekvivalentech gallové kyseliny.



Obr.16 Kalibrační přímka pro vyhodnocení obsahu celkových polyfenolů

4.8 Statistické vyhodnocení

Všechna měření byla provedena v pěti paralelních opakováních. Ke statistickému vyhodnocení bylo využito softwaru Statistica 9.0 (StatSoft) založeném na parametrických a neparametrických testech. Byla provedena vícefaktorová analýza rozptylu (ANOVA) na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

5. Výsledky a diskuse

5.1 Stanovení vitamínu E

Ve všech vybraných odrůdách byla zjištěna přítomnost α -tokoferolu, β -tokoferolu, α -tokotrienolu a β -tokotrienolu (Tab.1. a Tab.2.). Pouze v obou odrůdách jednozrnky *Escana* a *Schwedisches Einkorn* (z roku 2009) byl také detekován δ -tokotrienol (Tab.2.). V ostatních odrůdách byl obsah δ -tokotrienolu pod mezí detekce (LOD = 0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (Tab.1., Tab.2.).

Tab.1 Obsahy tokolů v jednotlivých odrůdách pšenice seté, jednozrnky a dvouzrnky (rok 2008)

odrůda	α -tokoferol [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	β -tokoferol [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	α -tokotrienol [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	β -tokotrienol [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	δ -tokotrienol [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]
SW Kadrilj	9,95±1,16	4,07±0,50	2,00±0,10	9,68±0,31	<LOD*
Granny	7,60±0,44	3,87±0,21	1,51±0,14	7,88±0,49	<LOD
Kärtner Früher	12,20±1,05	4,67±0,34	1,84±0,03	9,31±0,20	<LOD
Escana	7,85±0,44	1,68±0,07	5,19±0,35	8,89±0,59	<LOD
Schwedisches Einkorn	5,19±0,30	1,06±0,07	3,15±0,07	8,48±0,11	<LOD
Rudico	6,94±0,76	3,63±0,37	1,75±0,13	8,31±0,62	<LOD
Kahler Emmer	7,11±0,77	2,91±0,22	1,44±0,06	7,13±0,34	<LOD

*) Hodnota LOD δ -tokotrienolu činí 0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

Z Tab.1. je patrné, že odrůdy pšenice seté - *SW Kadrilj*, *Granny* a *Kärtner Früher* i pšenice dvouzrnky - *Rudico* a *Kahler Emmer* obsahují více α -tokoferolu a β -tokotrienolu v porovnání s β -tokoferolem a α -tokotrienolem. V odrůdách pšenice jednozrnky *Escana* a *Schwedisches Einkorn* byl zaznamenán vyšší obsah β -tokotrienolu, α -tokotrienolu a α -tokoferolu v porovnání s obsahem β -tokoferolu.

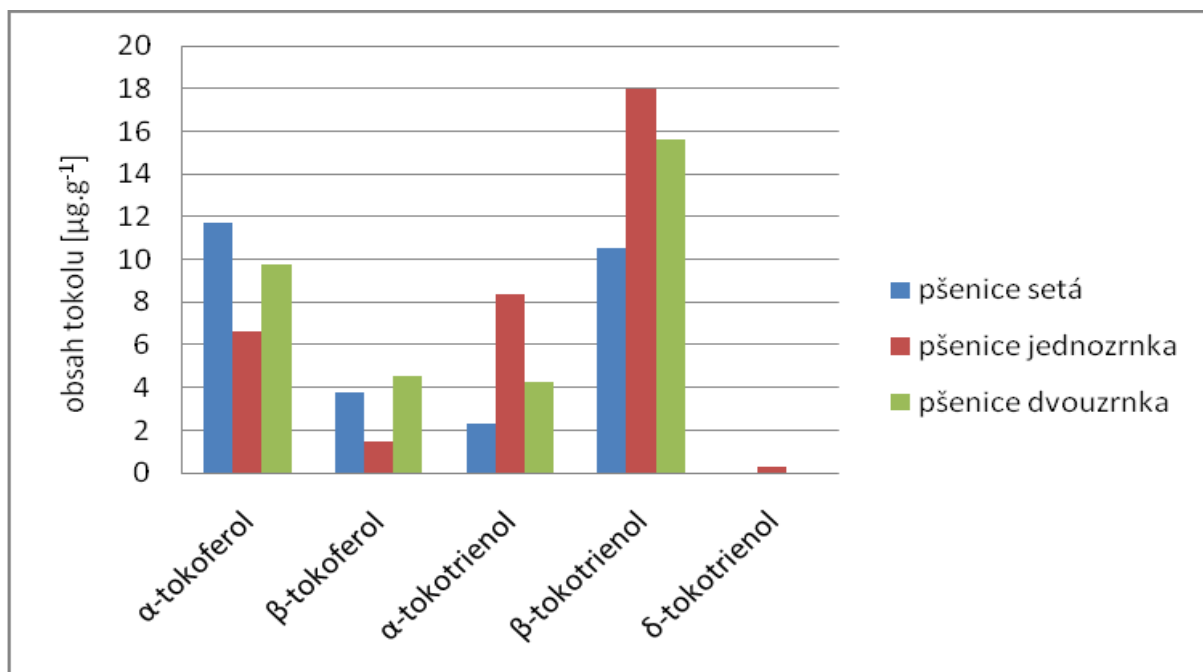
Tab.2 Obsahy tokolů v jednotlivých odrůdách pšenice seté, jednozrnky a dvouzrnky (rok 2009)

odrůda	α -tokoferol [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	β -tokoferol [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	α -tokotrienol [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	β -tokotrienol [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	δ -tokotrienol [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]
SW Kadrilj	9,95±1,16	4,07±0,50	2,00±0,10	9,68±0,31	<LOD*
Granny	7,60±0,44	3,87±0,21	1,51±0,14	7,88±0,49	<LOD
Kärtner Früher	12,20±1,05	4,67±0,34	1,84±0,03	9,31±0,20	<LOD
Escana	7,85±0,44	1,68±0,07	5,19±0,35	8,89±0,59	<LOD
Schwedisches Einkorn	5,19±0,30	1,06±0,07	3,15±0,07	8,48±0,11	<LOD
Rudico	6,94±0,76	3,63±0,37	1,75±0,13	8,31±0,62	<LOD
Kahler Emmer	7,11±0,77	2,91±0,22	1,44±0,06	7,13±0,34	<LOD

*) Hodnota LOD δ -tokotrienolu činí 0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

V odrůdách *SW Kadrilj*, *Granny* a *Kärtner Früher* (Tab.2.) byl v roce 2009 stanoven shodně s předchozím rokem vyšší obsah α -tokoferolu a β -tokotrienolu než β -tokoferolu a α -tokotrienolu. Výrazně vyšší množství β -tokotrienolu bylo nalezeno v odrůdách pšenice jednozrnky - *Escana*, *Schwedisches Einkorn* i dvouzrnky - *Rudico* a *Kahler Emmer* v porovnání s ostatními z identifikovaných tokolů (Tab.2.).

Rozdíly v zastoupení tokoferolů a tokotrienolů ve vybraných druzích pšenice jsou znázorněny v Obrázku 17.



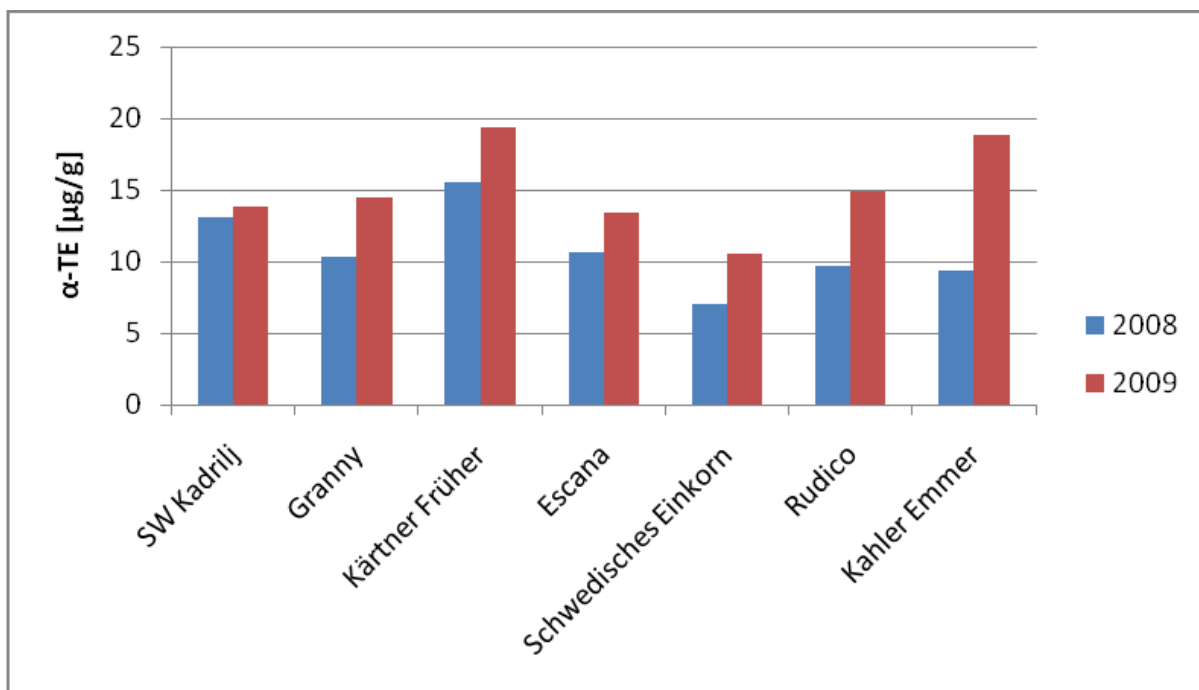
Obr.17 Průměrný obsah jednotlivých tokolů ve vybraných druzích pšenice

Z Obrázku 17 je zřejmé, že nejvíce α -tokoferolu obsahuje pšenice setá, a naopak nejméně pšenice jednozrnka. Množství β -tokoferolu je srovnatelné v pšenici seté a dvouzrnce, nejnižší je v jednozrnce. α -tokotrienol a β -tokotrienol představují majoritní složku naopak v pšenici jednozrnce, což je ve shodě s výsledky Hidalgo et al. (2008). Poměrně vysoký obsah β -tokotrienolu byl nalezen v pšenici dvouzrnce. Přítomnost δ -tokotrienolu byla zjištěna pouze v pšenici jednozrnce. Hidalgo et al. (2006) však δ -tokotrienol v pšenici jednozrnce nenalezl. Z výsledků Hidalgo et al. (2006) rovněž vyplývá, že vysoké zastoupení β -tokotrienolu se nachází jednak v pšenici dvouzrnce, jednak v pšenici seté. Toto tvrzení je částečně v rozporu, neboť podle této práce se β -tokotrienol vyskytuje v pšenici seté minoritně.

Byl vypočten ekvivalent vitamínu E (α -TE), zohledňující účinky jednotlivých tokolů na živý organismus, podle rovnice:

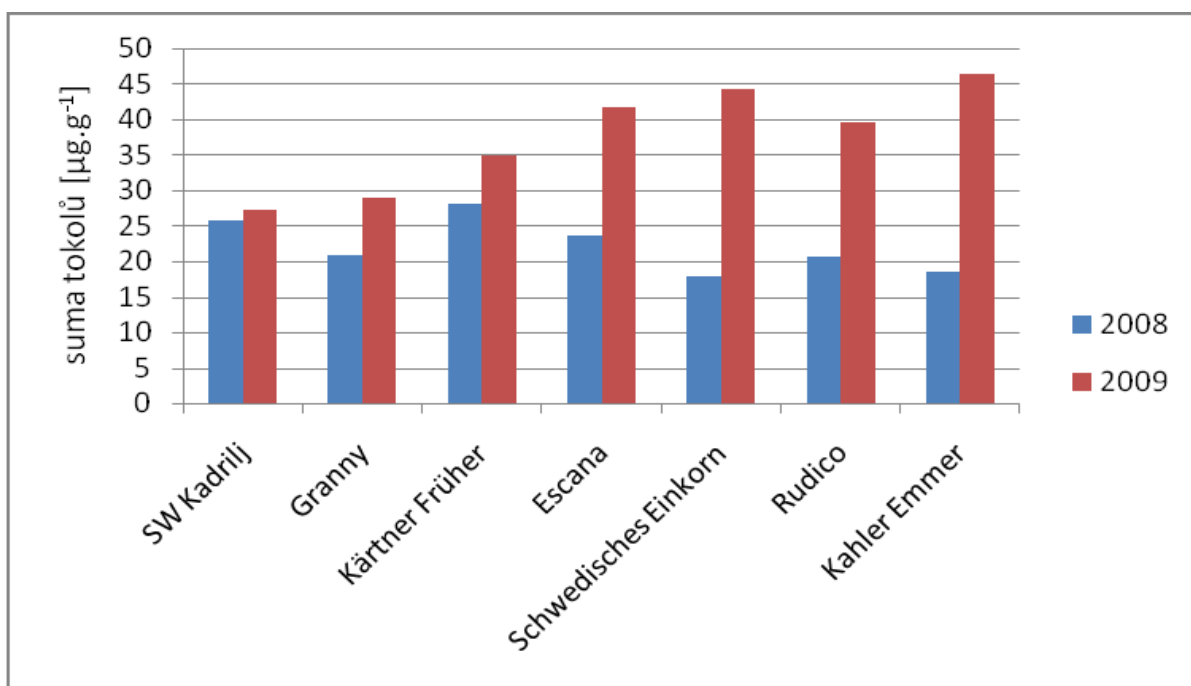
$$\alpha\text{-TE } (\mu\text{g.g}^{-1}) = 1 \times \alpha\text{-tokoferol} + 0,5 \times \beta\text{-tokoferol} + 0,1 \times \gamma\text{-tokoferol} + 0,01 \times \delta\text{-tokoferol} + 0,3 \times \alpha\text{-tokotrienol} + 0,05 \times \beta\text{-tokotrienol} \text{ (Hosmanová a Douša, 2007)}$$

Hodnoty α -TE pro všechny odrůdy jsou uvedeny v Obr.18. Z něj je patrné, že v roce 2009 byl obsah vitamínu E vyšší ve všech testovaných odrůdách. Hodnota α -TE se pohybovala v intervalu od 7,08 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (*Schwedisches Einkorn*, 2008) do 19,35 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (*Kärtner Früher*, 2009).



Obr.18 Hodnota α -TE v odrůdách pšenice seté, jednozrnky a dvouzrnky v jednotlivých letech

Z Obrázku 19 je zřejmé, že hodnoty celkové sumy tokolů byly v roce 2009 vyšší ve všech odrůdách než v roce 2008. V roce 2009 byla celková suma tokolů vyšší v pšenici jednozrnce a dvouzrnce než v pšenici seté, a však tato skutečnost nebyla pozorován v roce 2008 (Obr.19). Hodnota celkové sumy tokolů se pohybovala v rozmezí od $17,88 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (*Schwedisches Einkorn*, 2008) do $46,38 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (*Kahler Emmer*, 2009).



Obr.19 Celková suma tokolů v odrůdách pšenice seté, jednozrnky a dvouzrnky

Dále bylo provedeno statistické vyhodnocení vlivu druhu a roku na obsah tokolů. Statistická významnost byla testována metodou vícefaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ s faktory druh a rok.

Vliv druhu

Na základě statistického vyhodnocení (viz kap. 4.8) s faktory druh a rok bylo zjištěno, že pšenice jednozrnka má statisticky významně nižší obsah tokoferolů než pšenice setá a pšenice dvouzrnka. Mezi pšenicí dvouzrnkou a pšenicí setou nebyl zjištěn průkazný rozdíl v obsahu tokoferolů. Pšenice setá má statisticky významně nižší obsah tokotrienolů než pšenice jednozrnka. V pšenici dvouzrnce nebyl nalezen průkazný rozdíl v obsahu tokotrienolů v porovnání s pšenicí jednozrnkou i pšenicí setou.

Průměrná hodnota tokotrienolů v pšenici jednozrnce činila $23,67 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (celkově ze dvou let), což je téměř dvojnásobný obsah v porovnání s průměrnou hodnotou tokotrienolů v pšenici seté ($12,41 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

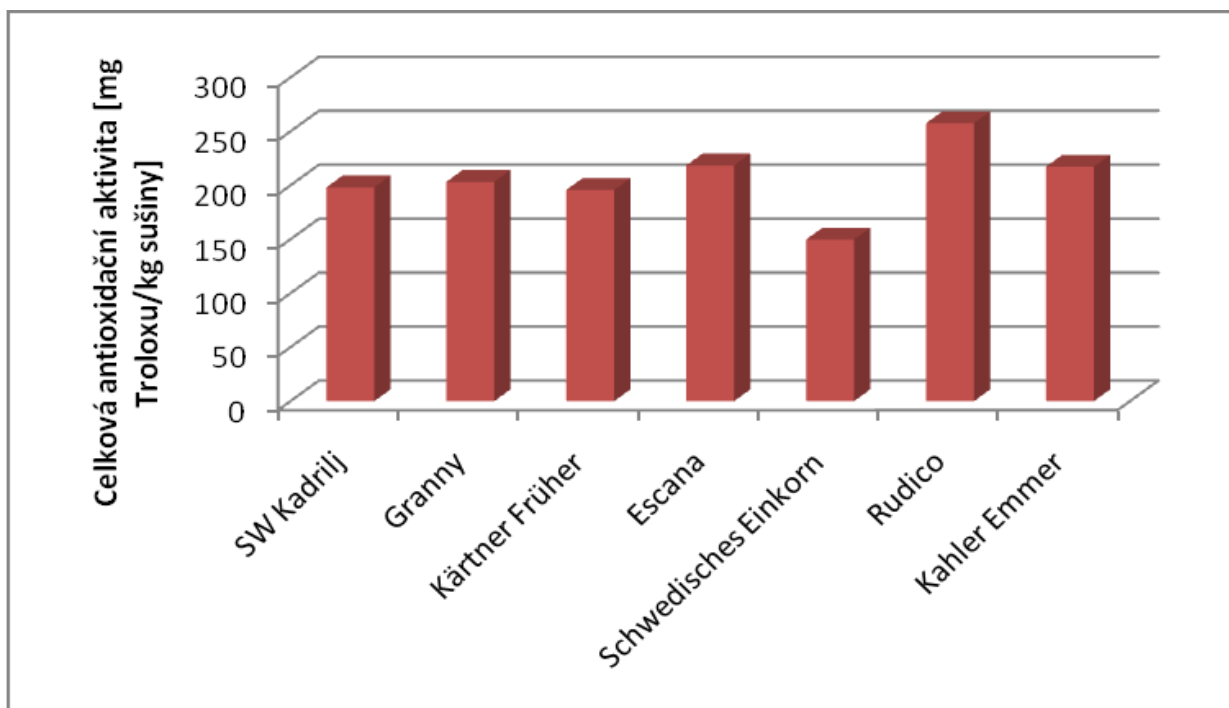
Mezi jednotlivými druhy – pšenicí setou, pšenicí jednozrnkou a pšenicí dvouzrnkou nebyl potvrzen průkazný rozdíl v hodnotě α -TE.

Vliv ročníku

V porovnání let 2008 a 2009 nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v obsahu tokoferolů. V roce 2009 byl nalezen průkazně vyšší obsah tokotrienolů než v roce 2008. Hodnota α -TE v roce 2009 byla statisticky významně vyšší než v roce 2008.

5.2 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Všechny analyzované odrůdy vykazovaly antioxidační aktivitu. Nejvyšší celková antioxidační aktivita (TAA) byla zjištěna v odrůdách pšenice dvouzrnky - *Rudico* a *Kahler Emmer* (Obr.20). V odrůdě pšenice jednozrnky - *Schwedisches Einkorn* bylo stanovena nejnižší hodnota TAA, a však ve druhé odrůdě jednozrnky - *Escana* byla stanovena hodnota TAA srovnatelná s odrůdou *Kahler Emmer*. Hodnoty TAA ve všech třech odrůdách pšenice seté – *SW Kadrlj*, *Kärtner Früher* a *Granny* jsou nižší v porovnání s oběma odrůdami pšenice dvouzrnky, jsou však vyšší než v odrůdě jednozrnky – *Schwedisches Einkorn* (Obr.20).



Obr.20 Hodnoty TAA vybraných odrůd pšenice seté, jednozrnky a dvouzrnky

V průměru pšenice jednozrnka vykazuje nižší hodnotu TAA v porovnání s pšenicí dvouzrnkou a pšenicí setou. Toto zjištění je ve shodě s pokusy Lavelliho et al. (2009) (Tab.3).

Tab.3 Průměrné hodnoty TAA v pšenici seté, jednozrnce a dvouzrnce

druh	TAA [mg Troloxu/kg sušiny]
pšenice setá	199,10
pšenice jednozrnka	184,15
pšenice dvouzrnka	237,45

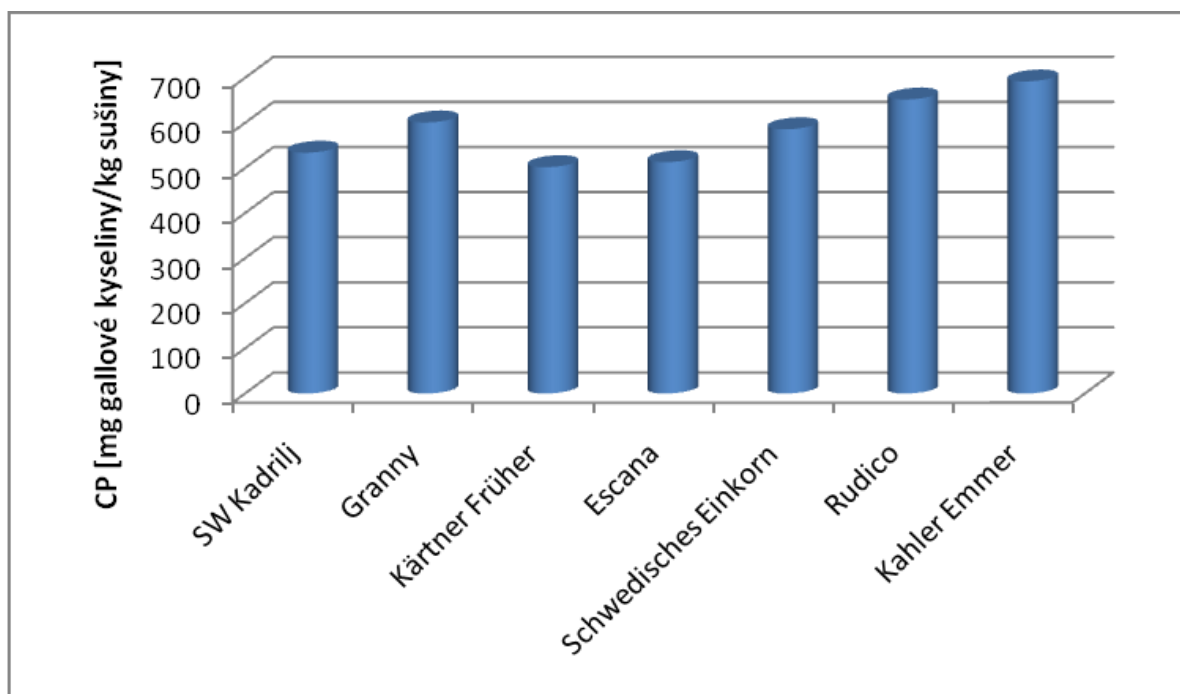
5.3 Stanovení celkového obsahu polyfenolů

Polyfenolické sloučeniny byly obsaženy ve všech analyzovaných odrůdách. Z Obrázku 21 je patrné, že největší množství celkových polyfenolů (CP) bylo nalezeno v obou odrůdách pšenice dvouzrnky – *Rudico* a *Kahler Emmer* (652 mg.kg^{-1} a 692 mg.kg^{-1}). V odrůdě jednozrnky - *Schwedisches Einkorn* (586 mg.kg^{-1}) bylo nalezeno více CP v porovnání s druhou odrůdou jednozrnky - *Escana* (513 mg.kg^{-1}) (Obr.21).

Obsah CP v odrůdě pšenice seté - *Granny* (601 mg.kg^{-1}) byl vyšší než v ostatních odrůdách pšenice seté - *SW Kadrij* (534 mg.kg^{-1}) a *Kärtner Früher* (502 mg.kg^{-1}) a rovněž v obou odrůdách jednozrnky.

Nejnižší obsah CP byl zaznamenán v odrůdě pšenice seté - *Kärtner Früher* (Obr.21).

Verma et al. (2009) stanovil v pšenici seté průměrně 1660 mg.kg^{-1} . Výsledek Vermy et al. (2009) se výrazně liší v porovnání se zjištěným průměrným obsahem CP v pšenici seté (546 mg.kg^{-1}). Významná diference mezi výsledkem této studie a Vermy et al. (2009) by mohla být způsobena výběrem odrůdy, a dále různými environmentálními faktory.



Obr.21 Celkový obsah polyfenolů v jednotlivých odrůdách pšenice dvouzrnky, jednozrnky a seté

Biologicky účinné látky (tokotrienoly a polyfenolické látky), hojněji se vyskytující právě v pšenici jednozrnky a dvouzrnky, by bylo možné využít ke zkvalitnění a obohacení obilných potravinových produktů.

Uvedené výsledky všech tří stanovení byly prezentovány (viz Přílohy).

6. Závěr

Byly zjištěny rozdíly v obsahu tokoferolů a tokotrienolů v rámci vybraných druhů pšenice. Nejvyšší obsah tokotrienolů byl zaznamenán v pšenici jednozrnce. V pšenici seté bylo naopak nalezeno nejvíce tokoferolů. V porovnání s pšenicí setou byl obsah tokoferolů v pšenici dvouzrnce nižší, naopak tokotrienolů bylo ve dvouzrnce stanoveno více. Rozdíly ve kvalitativním složení tokolů byly v porovnání pšenice seté a jednozrnky statisticky významné, naopak rozdíly mezi pšenicí setou a dvouzrnkou nebyly průkazné. Dále byl zjištěn průkazný vliv ročníku na α -TE v jednotlivých odrůdách. Celková suma tokolů byla vyšší v pšenici jednozrnce a dvouzrnce (rok 2009).

Nejvyšší celkovou antioxidační aktivitu vykazovala pšenice dvouzrnka. V pšenici jednozrnce byla zjištěna nejnižší hodnota celkové antioxidační aktivity (odrůda *Schwedisches Einkorn*), avšak druhá odrůda jednozrnky (*Escana*) vykazovala hodnotu srovnatelnou s odrůdou dvouzrnky (*Kahler Emmer*). Ve všech odrůdách pšenice seté byla stanovena nižší antioxidační aktivita než v pšenici dvouzrnce.

V pšenici dvouzrnce bylo stanoveno nejvíce polyfenolických látek. Celkový obsah polyfenolických látek byl v pšenici seté a jednozrnce nižší v porovnání s pšenicí dvouzrnkou.

Pšenice jednozrnka a dvouzrnka obsahují výrazně vyšší množství antioxidačních látek než pšenice setá. Jednozrnka představuje významný zdroj tokotrienolů, dvouzrnka je naopak význačná pro svůj vysoký obsah polyfenolických látek.

7. Seznam literatury

Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S., E. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (26). 790-798

Arendt K., E., Gallagher E., Jubete A., L., Wijngaard H. 2010. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa, buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chemistry*. 119. 770–778

Basařová, G., Dostálek, P., Hofta, P. 2004. Xanthohumol – chmelová pryskyřice nebo polyfenol? *Chemické Listy*. 98. 825-830

Beta, T., Nam, S., Dexter, E., J., Sapirstein, D., H. 2005. Phenolic Content and Antioxidant Activity of Pearled Wheat and Roller - Milled Fractions. *Cereal Chemistry*. 82 (4). 390–393

Brdička, R., Kalousek, M., Schütz, A. 1972. Úvod do fyzikální chemie, SNTL, Praha, 493 s.

Brinch-Pedersen, H., Soeren, B., Tauris, B. Holm, B., P. 2007. Molecular genetic approaches to increasing mineral availability and vitamin content of cereals. *Journal of Cereal Science*. 46. 308–326

Cabrita, J., M., Torres, M., Palma, V., Alves, E., Patao, R., Freitas C., M., A. 2008. Impact of malolactic fermentation on low molecular weight phenolic compounds. *Talanta*. 74. 1281–1286

Čevorová, M. 2007. Studium elektrochemického chování vybraných antioxidantů průtokovou coulometrií. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta. Olomouc. 36 s.

Čevorová, M. 2009. Sledování antioxidační aktivity průtokovou coulometrií. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta. Olomouc. 59 s.

- Fidler, M., Kolářová, L. 2009. Analýza antioxidantů v chmelu a pivu. *Chemické listy*. 103. 232-235
- Hejtmánková, K., Lachman, J., Hejtmánková, A., Pivec, V., Janovská, D. 2010. *Food Chemistry*. 123. 1267–1274
- Hidalgo, A., Brandolini, A., Pompei, C., Piscozzi, R. 2006. Carotenoids and tocopherols of einkorn wheat (*Triticum monococcum* ssp. *monococcum* L.). *Journal of Cereal Science*. 44. 182–193
- Hidalgo, A., Brandolini, A., Gazza, L. 2008. Influence of steaming treatment on chemical and technological characteristics of einkorn (*Triticum monococcum* L. ssp. *monococcum*) wholemeal flour. *Food Chemistry*. 111. 549–555
- Hosmanová, R., Douša, M. 2007. HPLC stanovení obsahu vitamínu E v krmných surovinách, krmivech a potravinách. *Chemické Listy*. 101. 578-583
- Chi, Ch., W., Ching, Z., Ch., Kai O., Ch., Kwong, W., Ch., Kim, S., K., Rogers, M., S., Chi, P., Pang. 2004. Trolox-equivalent antioxidant capacity assay versus oxygen radical absorbance capacity assay in Plasma. *Clinical Chemistry*. 50 (5). 952-954
- Karabín, M., Dostálek, P., Hofta, P. 2006. Přehled metod pro stanovení antioxidantní aktivity v pivovarství. *Chemické Listy*. 100. 184–189
- Katina, K., Liukkonen, K., H., Kaukovirta-Norja, A., Adlercreutz, H., Heinonen, S., M., Lampi, A., M., Pihlava, J., M., Poutanen, K. 2007. Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye. *Journal of Cereal Science*. 46. 348-355
- Kim, H., K., Tsao, R., Yang, R., Cui, W., S. 2006. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*. 95. 466–473
- Konvalina, P., Capouchová, I., Stehno, Z. Pšenice jednozrnka [online]. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Praha. 31. prosince 2009 [cit. 2010-06-09]. Dostupné z <<http://www.vurv.cz/ekoobilniny/>>

Lachman, J., Šulc, M. 2006. Vybrané metody stanovení obsahu celkových fenolových antioxidantů a jejich antioxidační aktivity v rostlinných produktech. Přednáška na semináři Současné představy a požadavky na kvalitu rostlinných produktů. 29.8.2006 ZF JU v Českých Budějovicích, KJRP ORV ČAZV. Sborník referátů: 14-17. ISBN 807040874X.

Lavelli, V., Hidalgo, A., Pompei, C., Brandolini, A. 2009. Radical scavenging activity of einkorn (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) wholemeal flour and its relationship to soluble phenolic and lipophilic antioxidant content. *Journal of Cereal Science*. 49. 319-321

Martinez, S., Valek, L., Rešetic, J., Ružic, D., F. 2006. Cyclic voltammetry study of plasma antioxidant capacity – comparison with the DPPH and TAS spectrophotometric methods. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 588. 68–73

Miller, H., E., Rigelhof, F., Marquart, L., Prakash, A., Kanter, M. 2000. Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. *Journal of the American College of Nutrition*. 19 (3). 312-19

Okarter, N., Chang-Shu, L., Sorrells M., E., Rui, H., L. 2010. Phytochemical content and antioxidant activity of six diverse varieties. *Food Chemistry*. 119. 249–257

Opekar, F., Jelínek, I., Rychlovský, Z., Plzák, Z. 2007. *Základní analytická chemie*. Univerzita Karlova. Karolinum. Praha. 201 s. ISBN: 9788024605531

Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan J., A., Deemer, K., E., J. 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50. 3122-3128

Pacák, J. 1978. *Stručné základy organické chemie*. SNTL. Praha. 471 s.

Pacák, J. 1997. *Jak porozumět organické chemii*. Univerzita Karlova. Karolinum. Praha. 315 s. ISBN: 8071842613

- Palík, S., Burešová, I., Edler, S., Sedláčková, I., Tichý, F., Váňová, M. 2009. Metodika pěstování ozimé pekárenské pšenice. Agrotest fyto, s.r.o. Kroměříž. 66 s. ISBN: 9788086888071
- Passwater, R., A., Novotná, J. 2002. O antioxidantech. Pragma. Praha. 94 s. ISBN: 8072058975.
- Pathirana-Liyana, M. Ch., Shahidi, F. 2007. Antioxidant and free radicals scavenging activities of whole wheat and milling fractions. Food Chemistry. 101. 1151–1157
- Pospíšil, J. 1968. Antioxidanty. Academia. Praha. 273 s.
- Prugar, J., Sýkorová, S. (eds.). 2008. Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s. a KJRP ČZV. Praha. 327 s. ISBN: 9788086576282
- Rozenberg, R., Ruibal-Mendieta, N., L., Petitjean, G., Cani, P., Delacroix, D., L, Delzenne M., N., Meurens, M., Quetin-Leclercq, J., Habib-Jiwan J., L. 2003. Phytosterol analysis and characterization in spelt (*Triticum aestivum ssp. spelta L.*) and wheat (*T. aestivum L.*) lipids by LC/APCI-MS. Journal of Cereal Science. 38. 189-197
- Sanchez-Machado, D., I., Lopez-Hernandez, J., Paseiro-Losada, P. 2002. High performance liquid chromatographic determination of α -tokoferol in macroalgae. Journal of Chromatography A. 976. 277-284
- Smirnoff, N. 2005. Antioxidants and reactive oxygen species in plants. Blackwell. Oxford. p. 302. ISBN: 1405125292
- Sofrová, D., Tichá, M., Barthová, J., Entlicher, G., Stiborová, M., Novák, F., Hudeček, J., Hladík, J., Krajhanzl, A. 2005. Biochemie základní kurz. Univerzita Karlova. Karolinum. Praha. 241 s. ISBN: 8071849367
- Stehno, Z., Konvalina, P., Dotlačil, L. 2008. Metodika pěstování pšenice dvouzrnky. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Praha. 17 s. ISBN: 9788074270017
- Špaldon, E. Rostlinná výroba. 1986. Příroda. Bratislava. 714 s.

Thaiponga, K., Boonprakoba, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, D., H. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19. 669–675

Therriault, A., Chao, J., T., Wang, Q., Gapor, A., Adeli, K. 1999. Tocotrienol: a review of its therapeutic potential. *Clinical Biochemistry*. 32. 309-319

Tichý, F., Edler, S., Pospíšil, A., Rušák, L., Bartík, J. Důležitost podzimní ochrany pšenice ozimé proti plevelům [online]. *Zemědělský výzkumný ústav Kroměříž, s.r.o. Kroměříž*. 13. ledna 2003 [cit. 2012-03-17]. Dostupné z

<http://www.agrokrom.cz/texty/Obilnarske_listy/Tichy_Dulezitest_podzimni_ochrany_984.pdf>

Vaher, M., Matso, K., Levandi, T., Helmja, K., Kaljurand, M. 2010. Phenolic compounds and the antioxidant activity of the bran, flour and whole grain of different wheat varieties. *Procedia Chemistry*. 2. 76-82

Velišek, J., Hajšlová, J. 2009. *Chemie potravin I. Osis*. Tábor. 580 s. ISBN: 9788086659152

Verma, B., Hucl, P., Chibbar, R., N. 2009. Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions. *Food chemistry*. 116. 947-954

Wang, J., Yao, H., Yuan, X. 2005. Antioxidant activity of feruloylated oligosaccharides from wheat bran. *Food Chemistry*. 90. 759–764

Watson, R., R., Preedy, V., R. 2009. *Tocotrienols: vitamin E beyond tocopherols*. CRC Press. London. p. 422. ISBN: 9781420080377

Zhuang, Q., K., Scholz, F., Pragst, F. 1999. The voltammetric behaviour of solid 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) microparticles. *Elektrochemistry communications*. 1. 406-410

Zimolka, J., Edler, S., Hřivna, L., Jánský, J., Kraus, P., Mareček, J., Novotný, F., Richter R., Říha, K., Tichý, F. 2005. *Pšenice pěstování, hodnocení a užití zrna*. Profi Press. Praha. 180 s. ISBN: 8086726096

Zloch, Z., Čelakovský, J., Aujezdská, A. Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu [online]. Ústav hygieny Lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Plzeň. 6. prosince 2006 [cit. 2012-03-24]. Dostupné z <www.institut-danone.cz/data/studie/pridelene-granty/2004-03.pdf>

8. Seznam použitých zkratek a symbolů

A	absorbance
ABAP	2,2'- azobis-2-methyl- propionamidin
ABTS	2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)
ABTS ⁺	radikálový kationt 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)
<i>all trans</i>	typ prostorového uspořádání molekuly karotenoidu
ANOVA	analýza rozptylu
α -TE	ekvivalent vitamínu E
<i>cis</i>	typ prostorového uspořádání molekul organických sloučenin
Co-A	koenzym-A
C18	oktadecyl
CP	celkové polyfenolické látky
DMPBQ	2,3-dimethyl-5-fytyl-1,4-benzochinon
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPPH	2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DPPH [•]	volný radikál 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazylu
FRAP	metoda využívající antioxidačního potenciálu železitých iontů
HCAs	hydroxyskořicové kyseliny
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ESI	elektrosprejová ionizace
l	délka kyvety
λ	vlnová délka
LOD	mez detekce
MPBQ	2-methyl-6-fytyl-1,4-benzochinon
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
ORAC	metoda využívající kyslíkových radikálů ke zjištění TAA
<i>p</i>	označuje polohu 1,4 substituentů vázaných na aromatickém jádře
Ph	fenyl

ROS	reaktivní kyslíkové částice
TAA/C	celková antioxidační aktivita/kapacita
TEAC	antioxidační kapacita se standardní látkou Trolox
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
UV	ultrafialové sluneční záření
UV - VIS	viditelná oblast ultrafialového slunečního záření

9. Přílohy

Výsledky stanovení vitamínu E byly prezentovány v květnu roku 2011 na Studentské vědecké konferenci ČZU v Praze a v říjnu roku 2011 na evropské Studentské vědecké konferenci ve Wageningenu.

Výsledky stanovení celkového obsahu polyfenolických látek byly prezentovány formou vědeckého článku: Lachman, J., Miholová, D., Pivec, V., **Jírů, K.**, Janovská, D. 2011. Content of phenolic antioxidants and selenium in grain of einkorn (*Triticum monococcum* L.), emmer (*Triticum dicoccum* Schübl [Schrack]) and spring wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *Plant Soil Environment*. 57 (5). 235–243

Výsledky stanovení celkové antioxidační aktivity byly prezentovány formou vědeckého článku: (Lachman, J., Orsák, M., Pivec, V., **Jírů, K.** 2012. Antioxidant activity of grain of einkorn (*Triticum monococcum* L.), emmer (*Triticum dicoccum* Schübl [Schrack]) and spring wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *Plant Soil Environment*. 58 (1). 15–21