

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Pedagogická fakulta

Katedra aplikované chemie

Diplomová práce

**Vliv podmínek pěstování na biologicky  
aktivní látky v netradiční listové zelenině**

## Prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci s názvem Vliv podmínek pěstování na biologicky aktivní látky v netradiční listové zelenině jsem zpracovala samostatně pouze s použitím pramenů citovaných v seznamu použité literatury.

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

Datum:

Podpis studenta:

### **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucí diplomové práce paní doc. Ing. Evě Dadákové, Ph.D. za obrovskou trpělivost, obětavost, odborné vedení a cenné připomínky a rady v průběhu zpracování této práce. Také bych chtěla poděkovat paní Ing. Tamaře Pelikánové za pomoc s přípravou a zpracováním vzorků k následné analýze a v neposlední řadě moc děkuji své rodině a přátelům za neúnavnou oporu a podporu po celou dobu studia.

## Abstrakt

V současné době se většina zeleniny, která je vyprodukována na evropském kontinentě, vypěstuje ve sklenících. Tento způsob skýtá značnou řadu výhod: nižší spotřebu vody a tepla, ochranu proti škůdcům či meteorologickým jevům, jako jsou například kroupy, a tím pádem i vyšší výtěžnost. Nicméně, jednou z podstatných nevýhod těchto zařízení je fakt, že sklo není propustné pro UV-B záření, které podporuje biosyntézu flavonoidů, látek, jež mají blahodárné antioxidační účinky pro lidský organismus. Tento nežádoucí vliv je možné eliminovat instalací LED (Light-Emitting Diode, česky elektroluminiscenční dioda) osvětlení do skleníků. Je to z toho důvodu, že tato svítidla poskytují široké spektrum elektromagnetického záření čili vlnových délek, které rostliny využívají pro celou řadu svých procesů.

V této diplomové práci byl zkoumán vliv podmínek pěstování na obsah biologicky aktivních látek, zejména kvercetinu a kemferolu v netradičních druzích asijské listové zeleniny, konkrétně Namenii, Sagami, Golden Lion, Choy Sum a Tatsoi. Všechny zmíněné odrůdy byly pěstovány ve dvou osevech (jarní a podzimní) ve skleníku a na záhoně v letech 2019-2021.

Nejvyšší koncentrace celkového kvercetinu byla zaznamenána u jarního osevu Namenie vypěstované v roce 2019 na záhoně 1241 mg/kg sušiny. Rovněž nejvyšší obsah celkového kemferolu 1753 mg/kg sušiny byl zjištěn u Namenie, jednalo se o podzimní osev roku 2020, rovněž vypěstovaný na záhoně. Po přepočtu na čerstvou hmotu byly získány stejné výsledky, hodnota u kvercetinu byla 103 mg/kg čerstvé váhy a u kemferolu 142 mg/kg čerstvé váhy.

**Klíčová slova:** brukvovité, netradiční asijská zelenina, kvercetin, kemferol, UHPLC, FAR

## Abstract

Currently, most of the vegetables that are produced on the European continent are released in greenhouses. This method offers a considerable number of advantages, such as lower amount of water and heat consumption, protection against pests or meteorological phenomena, such as hail, and thus higher yields. However, one of the major disadvantages of these devices is the fact that glass is not permeable to UV-B radiation, which supports the biosynthesis of flavonoids, substances that have beneficial antioxidant effects for the human organism. This undesirable effect can be eliminated by installing LED (Light-Emitting Diode) lighting in greenhouses. This is because these lights provide a wide spectrum of electromagnetic radiation, i.e. wavelengths that plants use for a whole range of their processes.

In this diploma thesis, the influence of growing conditions on the content of biologically active substances, especially quercetin and kaempferol in non-traditional types of Asian leafy vegetables, namely Namenia, Sagami, Golden Lion, Choy Sum and Tatsoi, was investigated. All the mentioned varieties were grown in two crops (spring and autumn) in the greenhouse and on the seedbed in the years 2019-2021.

The highest concentration of total quercetin was recorded in the spring seed of Namenia grown in 2019 on the seedbed 1241 mg/kg of dry matter. Also, the highest content of total kaempferol 1753 mg/kg of dry matter was found in Namenia, it was the autumn period of 2020, also grown in a seedbed. When converted to fresh weight, the results were the same, the value for quercetin was 103 mg/kg of fresh weight and for kaempferol 142 mg/kg of fresh weight.

**Key words:** Brassicaceae, non-traditional Asian vegetable, quercetin, kaempferol, UHPLC, PAR

## Seznam použitých zkratek

4CL - 4-kumaroyl-CoA-ligasa

ATP – adenosintrifosfát

C4H – cinamát-4-hydroxylasa

CHS – chalkonsynthasa

DAHP - 3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfátsynthasa

F3H – flavanon-3-hydroxylasa

GR – globální radiace [ $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ ]

IR – infračervené spektrum záření

NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát

PAL – fenylalanin-amoniak-lyasa

PAR – fotosynteticky aktivní radiace [ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ ]

pH – záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů

PHE – fenylalanin

ROS – reaktivní formy kyslíku

TRP – tryptofan

TYR – tyrosin

UHPLC – ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie

UV – ultrafialové spektrum záření

UV-VIS – ultrafialové-viditelné spektrum záření

# Obsah

1. Úvod .....	9
2. Literární přehled.....	10
2.1. Netradiční asijská zelenina.....	10
2.1.1. Namenia ( <i>Brassica rapa</i> var. <i>rapa</i> ) .....	10
2.1.2. Pak Choi – odrůda Sagami ( <i>Brassica rapa</i> var. <i>chinensis</i> ) .....	10
2.1.3. Pak Choi – odrůda Golden Lion ( <i>Brassica rapa</i> var. <i>chinensis</i> ).....	10
2.1.4. Choy Sum ( <i>Brassica rapa</i> var. <i>parachinensis</i> , <i>Brassica chinensis</i> var. <i>parachinensis</i> ).....	11
2.1.5. Tatsoi ( <i>Brassica rapa</i> var. <i>rosularis</i> ).....	11
2.2. Rostlinné fenolické látky .....	13
2.2.1. Biosyntéza flavonoidů .....	13
2.2.1.1. Šikimátová dráha .....	13
2.2.1.2. Fenylypropanoidová dráha .....	15
2.2.2. Působení flavonoidů v rostlinách.....	16
2.3. Účinek rostlinných polyfenolů na lidský organismus .....	17
2.4. Sluneční záření .....	19
2.4.1. Globální sluneční záření ( $Q$ ) [ $W \cdot m^{-2}$ ].....	20
2.4.2. Přímé sluneční záření ( $I_h$ ).....	22
2.4.3. Rozptýlené sluneční záření ( $i$ ) .....	22
2.4.4. Fotosynteticky aktivní radiace.....	23
2.4.5. Fotosyntéza .....	23
2.4.5.1. Chlorofyl .....	24
2.4.5.2. Fotoreceptory .....	25
2.5. Analytická separační metoda – UHPLC.....	26
2.5.1. Instrumentace v ultra vysokoučinné kapalinové chromatografii .....	27
2.5.1.1. Čerpadlo.....	28
2.5.1.2. Dávkovač.....	28
2.5.1.3. Kolona .....	28
2.5.1.4. Detektor.....	29
3. Cíle práce.....	32
4. Experimentální část .....	33
4.1. Použité chemikálie a přístroje.....	33
4.1.1. Chemikálie .....	33
4.1.2. Laboratorní sklo a přístroje.....	33

4.2.	Příprava rostlinného materiálu .....	34
4.3.	Metodika zpracování vzorků .....	34
4.4.	Stanovení flavonoidních aglykonů.....	35
4.5.	Použité statistické metody .....	36
4.6.	Modelové zpracování dat.....	36
4.6.1.	Vyhodnocení dat.....	37
4.6.1.1.	Kalibrační data pro kvercetin.....	38
4.6.1.2.	Kalibrační data pro kemferol .....	39
5.	Výsledky a diskuse .....	40
5.1.	Stanovení sušiny a celkového obsahu sledovaných flavonoidů .....	40
5.1.1.	Rok 2019 .....	40
5.1.1.1.	Namenia .....	41
5.1.1.2.	Sagami .....	44
5.1.1.3.	Golden Lion .....	44
5.1.1.4.	Tatsoi .....	45
5.1.1.5.	Porovnání obsahů ve skleníku.....	45
5.1.1.6.	Porovnání obsahů na záhoně .....	46
5.1.2.	Rok 2020 .....	46
5.1.2.1.	Namenia .....	47
5.1.2.2.	Sagami .....	48
5.1.2.3.	Choy Sum.....	48
5.1.2.4.	Tatsoi .....	49
5.1.2.5.	Porovnání obsahů ve skleníku.....	49
5.1.2.6.	Porovnání obsahů na záhoně .....	50
5.1.3.	Rok 2021 .....	50
5.1.3.1.	Namenia .....	51
5.1.3.2.	Tatsoi .....	51
5.1.3.3.	Porovnání obsahů ve skleníku.....	52
5.1.3.4.	Porovnání obsahů na záhoně .....	52
5.2.	Korelace se slunečním zářením.....	53
5.2.1.	Korelace obsahu kvercetinu s meteorologickými údaji.....	53
5.2.2.	Korelace obsahu kemferolu s meteorologickými údaji.....	54
6.	Závěr .....	56
7.	Použitá literatura .....	58



## 1. Úvod

Listová zelenina patřící do čeledi brukvovitých je oblíbená zelenina, která má krátkou vegetační dobu a je velmi nenáročná na pěstování. Jedná se o zeleninu, která se využívá v gastronomiích celého světa. Díky obsahu biologicky aktivních látek, zejména antioxidantů, přispívá její pravidelná konzumace k prevenci zejména tzv. civilizačních onemocnění. Tyto druhy listové zeleniny jsou obvykle pěstovány v různých podmínkách (volná půda, skleníky). Pěstitelská zařízení ovlivňují mimo jiné intenzitu a spektrum dopadajícího záření. U některých obsahových látek, zejména polyfenolů, to může mít významný vliv na jejich zastoupení a obsah.

Cílem této diplomové práce bude zjistit, jaký vliv mají podmínky pěstování na obsah vybraných obsahových látek v netradiční listové zelenině.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Netradiční asijská zelenina

#### 2.1.1. **Namenia** (*Brassica rapa* var. *rapa*)

Namenie se řadí mezi netradiční řapíkovou zeleninu, jež má dlouhou historii. Její chuť je lehce kyselá a díky obsahu hořčicových olejů rovněž lehce pálivá. Mezi hlavní výhody řadíme velmi vysokou výnosnost, která je způsobena jejím rychlým růstem, a také možností výsevu i na podzim, jelikož je to zelenina krátkého dne. Další výhodou je pak to, že kromě listů se mohou konzumovat i řapíky, které se odřezávají kousek nad zemí a oddělí se od nich lístky, které jsou křupavé a šťavnaté. Společně se přidávají například do polévek. Využití namenie je dosti obdobné jako u špenátu (<https://www.osiva-semena.cz/ostatni/1016-namenia-brassica-rapa-osivo-namenie-200-ks.html>; <https://www.semena.cz/ostatni-asijska-zelenina/1016-namenia-brassica-rapa-semena-200-ks.html>, nedatováno).

#### 2.1.2. **Pak Choi – odrůda Sagami** (*Brassica rapa* var. *chinensis*)

Sagami je odrůdou brukve čínské neboli též čínského zelí patřící do skupiny asijské listové zeleniny. Jeho řapíky jsou bílé s jemně kořeněnou chutí, zatímco oválné, širší a ploché tmavě zelené listy mají jemnou a vynikající chuť. Tato odrůda vyniká svým rychlým růstem. Sklizeň se uskutečňuje po 40-50 dnech, kdy listy dosáhnou velikosti zhruba 15–20 cm (<https://www.osiva-semena.cz/ukoncene-produkty/1877-pak-choi-sagami-brassica-rapa-var-rosularis-osivo-pak-choi-150-ks.html>, nedatováno). Používají se v syrové formě do salátů, nebo se tepelně upravují, ale můžeme se setkat také se sušenou podobou (<https://www.semena.cz/ukoncene-produkty/2118-pak-choi-cinske-zeli-sagami-brassica-rapa-var-rosularis-semena-150-ks.html>, nedatováno).

#### 2.1.3. **Pak Choi – odrůda Golden Lion** (*Brassica rapa* var. *chinensis*)

Další odrůdou Pak Choi neboli čínského zelí je Golden Lion, česky Zlatý lev. Jedná se o rychle rostoucí, nenáročnou asijskou zeleninu se žlutozelenými listy a úzkými stonky, kterou je možné po celý rok pěstovat doma. Mezi přednosti brukve čínské bezesporu patří takřka zanedbatelný obsah kalorií, z tohoto důvodu se doporučuje jako ideální strava při redukčních dietách, dále pak vysoký obsah

antioxidantů, jejichž vliv má blahodárné detoxikační a antisklerotické účinky, což znamená, že pomáhá snižovat hladinu cholesterolu (<https://www.semena.cz/ukoncene-produkty/1638-pak-choi-zlaty-lev-brassica-chinensis-semena-02-g.html>, nedatováno). Co se využití týče, je Golden Lion vhodný především pro přímou konzumaci ve formě salátů (<https://www.osiva-semena.cz/ukoncene-produkty/1609-pak-choi-golden-lion-asijska-zelenina-prodej-semen-asijske-zeleniny-02-gr.html>, nedatováno).

#### **2.1.4. Choy Sum** (*Brassica rapa* var. *parachinensis*, *Brassica chinensis* var. *parachinensis*)

Choy Sum, někdy zvaná též Choi Sum nebo Choi Sam je netradiční listovou zeleninou využívanou především v asijské gastronomii. Název Choy Sum je přepisem hongkongské kantonštiny, jehož doslovný překlad zní „srdce zeleniny“. V některých případech může být známa také jako „Čínské kvetoucí zelí“. Její původ je datován do období před 15. stoletím do oblasti jižní Číny. Patří rovněž do skupiny listových zelenin z rodu brukve (*Brassica*) a do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*) (YANLIN, 2020).

Jedná se o zvláštní odrůdu čínského zelí, jejíž chuť je podobná chřestu (<https://www.semena.cz/ostatni-listova-zelenina/1226-choi-sum-fubbi-brassica-parachinensis-semena-choi-sum-100-ks.html>, nedatováno). Nejvhodnější použití tato zelenina najde především v pokrmech asijské kuchyně, například známé jídlo wok nebo jako přísada do různých salátů. Choy Sum je nenáročná zelenina, která rychle roste, je navíc velice jednoduchá na pěstování, a jejíž výsev můžeme provádět v období od května do srpna. Jediné podmínky, které je potřeba splnit jsou, aby měla rostlina kolem sebe dostatečný prostor pro svůj růst, uvádí se kolem 30 cm, a pak je nutné sklídit zeleninu dříve, než začne kvést (<https://www.osiva-semena.cz/ostatni/1216-choi-sum-fuubi-brassica-parachinensis-osivo-asijske-zeleniny-100-ks.html>, nedatováno).

#### **2.1.5. Tatsoi** (*Brassica rapa* var. *rosularis*)

Posledním druhem netradiční asijské zeleniny, který zde zmíníme, je Tatsoi, jemuž obchodníci někdy přezdívají japonský salát. Tatsoi je svou chutí podobná například ředkvičkám či kedlubnům. Je to zelenina s bohatým obsahem vitamínů C, A

a K, dále  $\beta$ -karotenů a minerálů jako jsou fosfor (P), draslík (K), vápník (Ca) a železo (Fe). Co se vzhledu rostliny týče, je kompaktního vzrůstu, její listy mají tmavě zelenou barvu, zakulacený tvar připomínající lžičku a jsou jemné struktury s jemnou chutí. Spolu s bílými stonky, které měří kolem 5-10 cm, utváří hustou růžici čítající 50-80 výhonků. Pokud jsou listy ještě mladé, vydávají silné aroma. Obrovskou výhodou této rostliny je její odolnost vůči chorobám (<https://www.semena.cz/ostatni-asijska-zelenina/1230-tatsoi-brassica-rapa-var-rosularis-semena-100-ks.html>, nedatováno) a výjimečná odolnost vůči chladu (uvádí se až do  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), proto je možné pěstovat ji i pod sněhem. Sklizeň se provádí po 45 dnech a je nutné, aby se listy konzumovaly ihned po odtržení, protože rychle zasychají (<https://www.nasezahrada.com/tatsoi-tenhle-asijsky-salat-muzete-sklizet-po-cely-rok/>, 2020). Využití je obdobné jako u předešlých druhů, tudíž v syrové podobě na zeleninové saláty, jako přísada do sendvičů, polévek, pánve wok a jiných asijských pokrmů, či po tepelné úpravě smažením (<https://www.osiva-semena.cz/ostatni/1230-tatsoi-brassica-rapa-var-rosularis-osivo-tatsoi-100-ks.html>, nedatováno).

## 2.2. Rostlinné fenolické látky

Rostlinné fenolické látky, jejichž součástí jsou právě flavonoidy, jsou pozoruhodně rozmanitou skupinou produktů sekundárního metabolismu rostlin. V současné době je známo přes deset tisíc různých struktur, jejichž základní jádro je tvořeno molekulou flavanu (VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J., 2009b). Tyto sloučeniny zaujímají v rostlinách mnoho nepostradatelných funkcí, mezi něž patří ochrana proti patogenům, škůdcům a hmyzu, regulace růstu a vývoje rostliny, dále se uplatňují při rostlinné reprodukci, a to jednak při lákání opylovačů, tak při distribuci semen. Rovněž mají za následek typické podzimní zbarvení listů u mnoha druhů rostlin, což bylo v poslední době shledáno jako ochranný mechanismus proti oxidativnímu poškození buněk listů, neboť se tímto zlepšuje efektivita získávání živin během buněčného stárnutí neboli senescence, ale především slouží jako ochrana fotosyntetického aparátu proti poškození ultrafialovým zářením (ROMANI A., *et al*, 2002, WINKEL-SHIRLEY B., 2002). O tomto účinku se ještě zmíníme v další podkapitole.

### 2.2.1. Biosyntéza flavonoidů

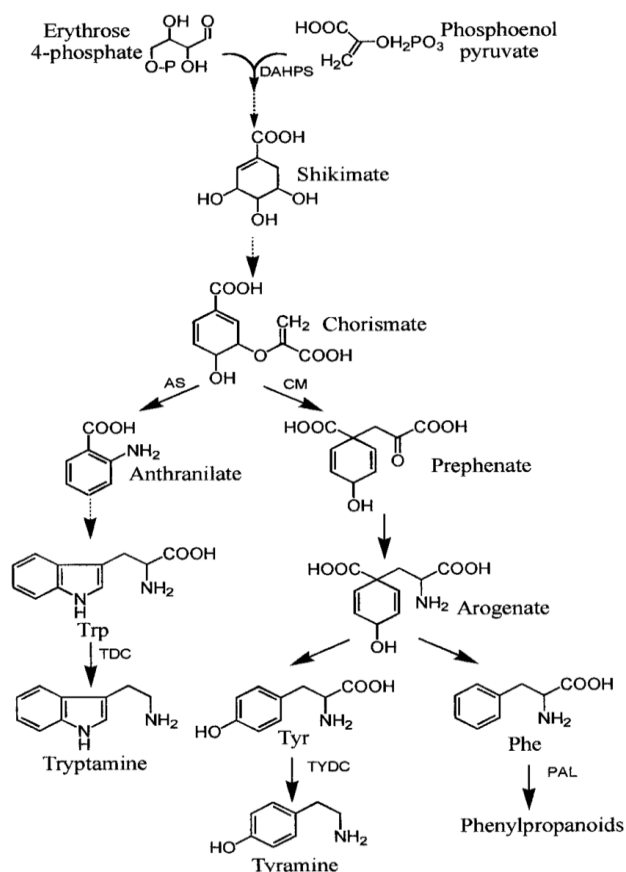
Na biosyntéze flavonoidů se podílí mnoho faktorů, jak exogenních, mezi které můžeme zařadit světlo, dále stresory, jako například nízkou teplotu, infekci či ránu, způsobenou například poškozením býložravci, tak endogenních, kam patří například některé regulátory růstu, především auxin a ethylen, ale také nutriční faktory (GUO J., *et al*, 2008).

Biosyntéza flavonoidních látek probíhá na endoplasmatickém retikulu a je dána kombinací dvou metabolických drah: šikimátové a fenylpropanoidové. U nižších organismů, zejména u hub, slouží jako alternativní způsob syntézy polyfenolů polyketidová dráha (BOND C. *et al*, 2016). Vzhledem k tomu, že jako prekurzor k syntéze slouží esenciální aminokyselina, nemohou polycyklické fenoly syntetizovat živočichové, jedná se konkrétně o aminokyseliny fenylalanin (PHE) a tryptofan (TRP).

#### 2.2.1.1. Šikimátová dráha

Šikimátová dráha je hlavní metabolickou drahou vedoucí k syntéze aromatických sloučenin, jmenovitě tyrosinu, tryptofanu a fenylalaninu, které vznikají sloučením vstupních molekul erythrosa-4-fosfátu, který je meziproduktem

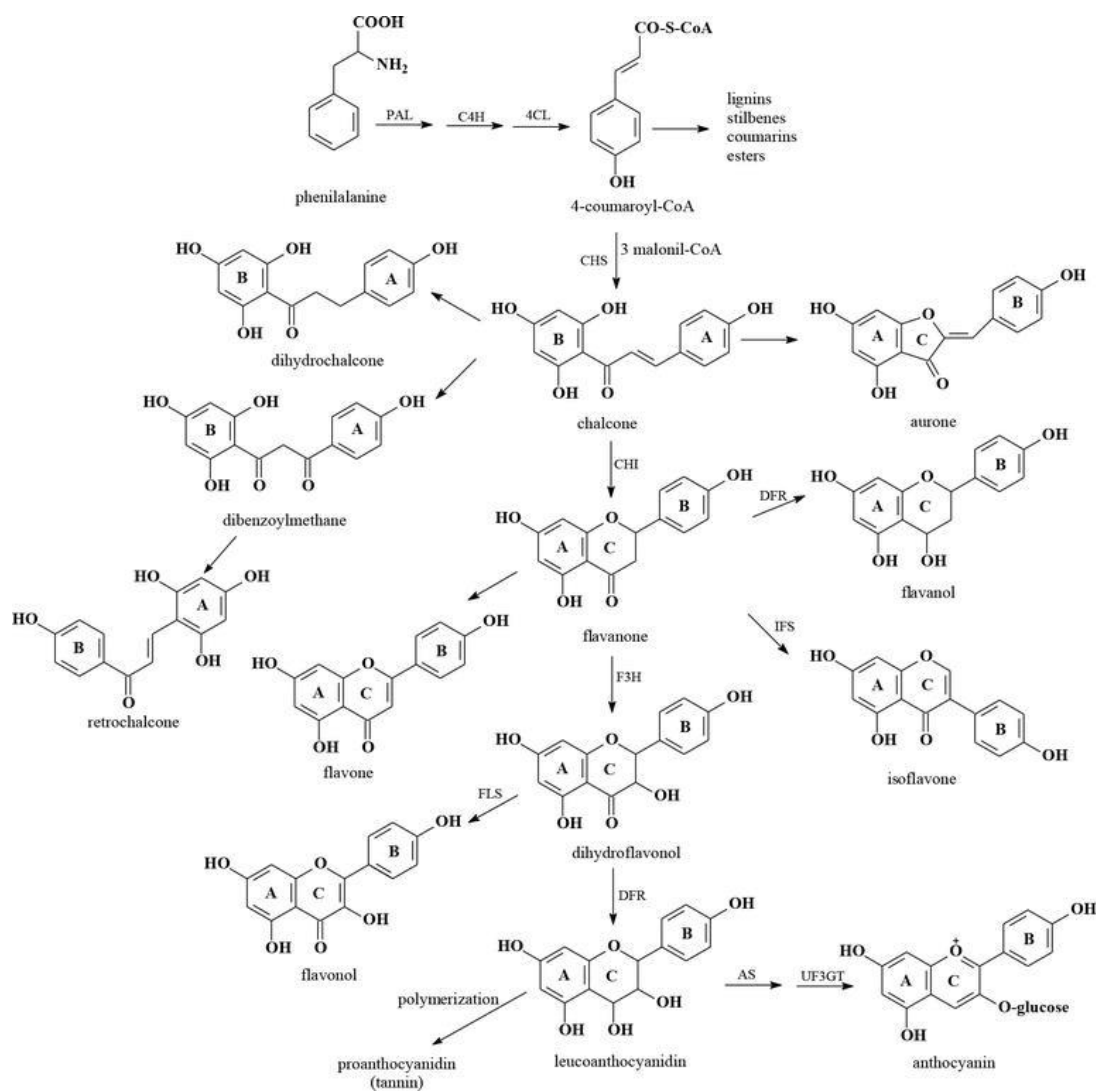
pentosofosfátového cyklu a fosfoenolpyruvátu, který do reakce přichází jako meziproduct glykolýzy. Tato reakce je katalyzována enzymem 3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfátsynthasou (DAHPS) a dává vzniknout sloučenině 3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfátu. V dalším kroku vzniká působením 3-dehydrochinátsynthasy molekula 3-dehydrochinátu. Dále se pomocí 3-dehydrochinátdehydratasy odštěpí molekula vody a vznikne 3-dehydrošikimát, který je katalytickým enzymem šikimátdehydrogenasou následně přeměněn na šikimát. Následně dojde za spotřeby molekuly ATP (adenosintrifosfátu) k fosforylaci vzniklého šikimátu a vznikne šikimát-3-fosfát, z něhož následnou katalýzou 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát-synthasy a připojením další molekuly fosfoenolpyruvátu vzniká 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát. Posledním krokem dochází k tvorbě chorismátu, který slouží jako primární prekurzor pro tvorbu již zmíněných aromatických aminokyselin (HERMANN K. M., 1995).



Obrázek 1. Schéma šikimátové dráhy (zdroj: orion.chemi.muni.cz, nedatováno)

### 2.2.1.2. Fenylopropanoidová dráha

Fenylopropanoidová biosyntetická dráha je po šikimátové dráze druhou nejdůležitější metabolickou cestou. Klíčovým enzymem, který celý proces spouští, je fenyloalanin-amoniak-lyasa (PAL), která deaminuje tyrosin vzniklý v předchozí dráze a dává vzniknout kyselině skořicové. Ta je v dalším kroku přeměněna na kyselinu *p*-kumarovou pomocí cinamát-4-hydroxylasy (C4H). Následně dojde k připojení koenzymu A (CoA) a vzniká 4-kumaroyl-CoA, tuto reakci katalyzuje 4-kumaroyl-CoA-ligasa (4CL). Tento meziprodukt vstupuje do reakce se třemi molekulami malonyl-CoA, kdy se za současné katalýzy, které se účastní enzym chalkonsynthasa (CHS), vytvoří chalkon. Tato molekula pak slouží jako hlavní prekurzor pro tvorbu flavonoidů (FERRER J.-L., *et al*, 2008).



Obrázek 2. Schéma biosyntézy flavonoidů (zdroj: KOES R. E. *et al*, 1994)

### 2.2.2. Působení flavonoidů v rostlinách

Flavonoidy působí jako bariéra pro škodlivé ultrafialové záření díky jejich adsorpčnímu maximu v UV oblasti. Byly provedeny některé studie o vlivu slunečního záření (UV-A a UV-B) na polyfenolové složení listového salátu (*Lactuca sativa*) a bylo prokázáno, že UV absorbance extraktů z listů při 270, 300 a 330 nm byla významně snížena, pokud bylo vyloučeno okolní UV-B záření (KRIZEK D. T. *et al*, 1998).

Koncentrace fenylypropanoidů, zejména flavonoidů, se značně zvyšují v rostlinách vystavených širokému spektru environmentálních stresů abiotického i biotického původu (ROBERTS M. R., PAUL N. D., 2006), pravděpodobně využívající ROS (Reactive Oxygen Species, česky reaktivní formy kyslíku) a oxid dusnatý (NO) jako běžné signální složky (MACKERNESS S. A. H. *et al*, 2000); TAYLOR L. P., GROTEWOLD E., 2005). Biosyntéza flavonoidů se zvyšuje hlavně vlivem UV-B záření, přestože flavonoidy nevybavují listy nejúčinnějším UV štítem ve srovnání s jinými fenylypropanoidy, např. deriváty kyseliny hydroxyskořicové (HARBORNE J. B., WILLIAMS CH. A., 2000).

Bylo navrženo, že flavonoidy mohou fungovat jako lapače reaktivních forem kyslíku (YAMASAKI H. *et al*, 1997; AGATI G. *et al*, 2009) a modulátory transportu auxinu (PEER W. A., MURPHY A. S., 2007). kromě toho, že absorbují to nejenergičtější krátké sluneční vlnové délky (ROZEMA J. *et al*, 1997). Tyto funkce odpovídají široce uváděnému nárůstu obsahu kvercetinu vyvolanému UV zářením v poměru ke kemferolu, luteolinu nebo apigeninu (MARKHAM K. R. *et al*, 1998; RYAN K. G. *et al*, 1998).

Existují rovněž nové poznatky, že flavonoidy hrají roli v odolnosti vůči toxicitě hliníku u kukuřice (KIDD P. S., *et al*, 2001).

Závislost obsahu flavonoidů na pěstebních podmínkách není ani zdaleka prozkoumána u většiny užitkových rostlin. Vzhledem k výživové důležitosti flavonoidů je potřeba výzkum rozšířit na významné zdroje flavonoidů, jako je třeba zelenina.



### 2.3. Účinek rostlinných polyfenolů na lidský organismus

Flavonoidy jsou dnes předmětem studia především díky svým příznivým účinkům na lidské zdraví. V roce 1936 byl pro látky flavonoidní povahy navržen pojem vitamín P, právě díky jejich pozitivnímu účinku na cévy. Nicméně bylo od tohoto označení brzy upuštěno, protože s definicí vitamínu se vlastnosti flavonoidů přímo neshodovaly (MOBH S., 1939).

Flavonoidy jsou dobře známé pro své antioxidační vlastnosti, zejména ty, které obsahují ortho 3',4'-dihydroxy substituent v kruhu B, jako je kvercetin, luteolin a kyanidin (RICE-EVANS C. *et al*, 1997). Hydroxylové skupiny přítomné na uhlících C4, C3' a C4' výrazně zvyšují antioxidační potenciál dané sloučeniny (LIEN E. J. *et al*, 1999). Výzkum NOROOZI M. *et al*, (1998) rovněž dokazuje, že aglykony, jako jsou kvercetin, kemferol, myricetin či luteolin, mají oproti jejich konjugovaným formám (např. kvercetin-3-glukosid nebo rutin) vyšší antioxidační aktivitu. Zajímavé je, že se uvádí, že transkripční faktory biosyntézy flavonoidů jsou ovlivněny změnami redoxního potenciálu rostlinných buněk (AGATI G., TATTINI M., 2010).

Během studií, které probíhaly *in vivo* i *in vitro* byly vyhodnoceny mnohé biologické funkce flavonoidů, jako je například modulace enzymové aktivity, inhibice buněčné proliferace nebo potlačení nežádoucích účinků volných radikálů. Potencionální využití mohou tyto látky uplatnit proti alergiím, zánětům, průjmům, dále jako antibiotika na léčbu vředových onemocnění (BRAVO L., 1998). Další nezastupitelnou roli hrají flavonoidy společně s dalšími antioxidanty, jako je vitamín C nebo E, v zabraňování peroxidaci lipidů ve fosfolipidové dvojvrstvě, kterou způsobují volné kyslíkové radikály (ROS), jež mohou způsobovat poruchy genetické informace organismu, a tím pádem poškozovat strukturu či funkci bílkovin nebo lipidů (ROSS J., KASUM C. M., 2002). Dále flavonoidy zamezují ukládání cholesterolu do cévních stěn, zesilují jejich tloušťku, zlepšují pružnost (permeabilitu) cév, a tudíž jejich vlastnosti přispívají ke snížení rizika výskytu infarktu myokardu a dalších kardiovaskulárních onemocnění či vzniku rakoviny (BLOCK G. *et al*, 1992).

Epidemiologické studie spojují stravu bohatou na polyfenoly s nižším výskytem kardiovaskulárních či karcinogenních chorob (CARTEA M. E. *et al*, 2011). Červený listový salát (*Lactuca sativa* L.) je stále důležitější plodinou a dobrým potravinovým zdrojem polyfenolů, protože obsahuje několik fenolových kyselin

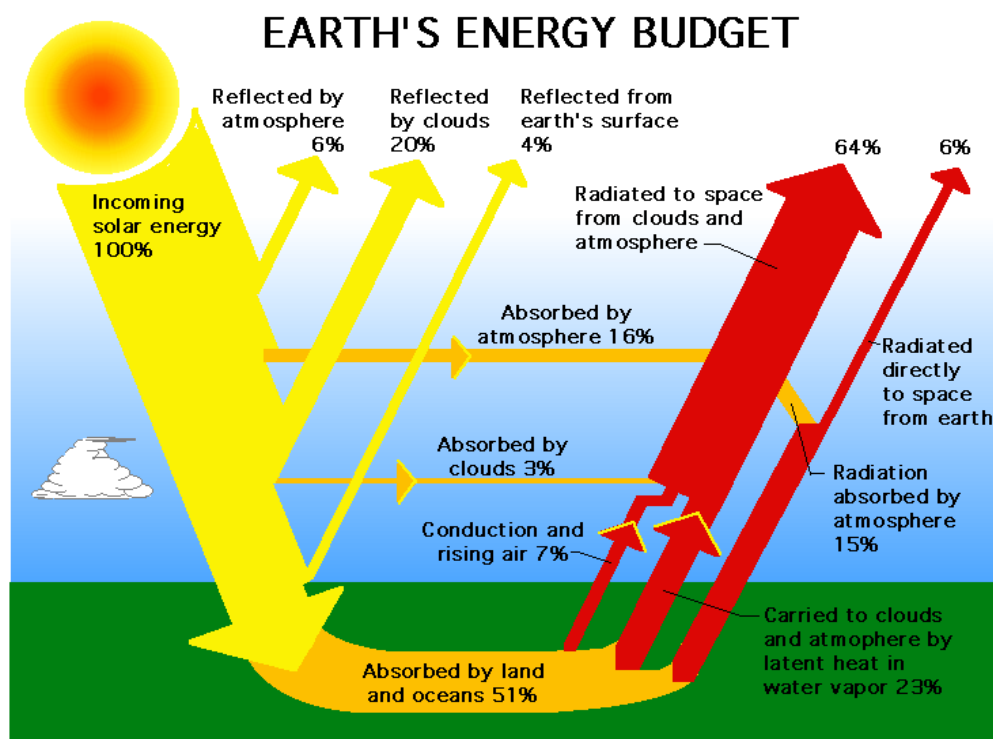
(deriváty kyseliny kávové) a flavonoidní glykosidy kvercetin, luteolin a kyanidinu (LLORACH R. *et al*, 2008). Přestože hlávkový salát není zelenina nejbohatší na polyfenoly, stále poskytuje značné množství denního příjmu polyfenolů, protože se běžně konzumuje v syrovém stavu a ve velkém množství (DUPONT M. S. *et al*, 2000).

Největší zastoupení ze všech flavonoidů zaujímá flavonol kvercetin, který je v lidské stravě přijímán hlavně ve formě čajů, jablek či cibule. Dalším důležitým zdrojem této sloučeniny je červené víno, které je mimo jiné zodpovědné i za tzv. francouzský paradox. Jedná se o jev popisující vztah mezi nižším výskytem akutních srdečních příhod, za současné konzumace nenasycených mastných kyselin a pitím červeného vína, který převažuje u populací žijících v oblasti Středomoří. Právě flavonoidy v něm obsažené jsou přinejmenším částečně zodpovědné za tuto výživovou anomálii (COOK N. C., SAMMAN S., 1996).

## 2.4. Sluneční záření

Sluneční záření nebo také solární radiace přináší většinu energie, jež se na Zemi vyskytuje. Jedná se o soubor elektromagnetického záření neboli elektromagnetických vln, které leží v oblastech od gama záření ( $\gamma$ ), přes ultrafialové (UV), viditelné a infračervené (IR) záření, až po radiové vlny, popřípadě tok hmotných částic zemskou atmosférou (VYSOUDIL M., 2006). Celkové množství této energie vyzářené Sluncem, které k nám v celém svém spektru dopadá na horní hranici atmosféry a jež je vztaženo na jednotku plochy, se nazývá solární konstanta. Na základě měření prováděných družicemi se její hodnota uvádí  $1366 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ .

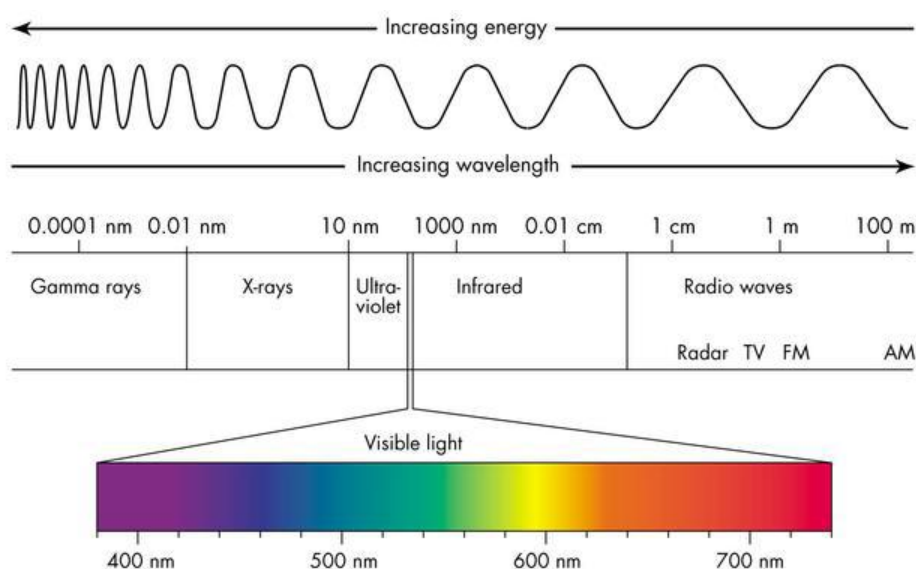
Celková bilance elektromagnetického záření, které k nám přichází od Slunce se dá rozdělit na dílčí kategorie: světelná energie reflektovaná neboli odražená a absorbovaná neboli pohlcená, a to buď atmosférou nebo zemským povrchem. Od atmosféry je v důsledku reflexe zpět do vesmíru odraženo asi 6 % energie, dalších 20 % je odraženo oblačností a zhruba 4 % odráží zemský povrch. Co se absorbovaného záření týče, atmosférické plyny, především vodní pára, ozon ( $\text{O}_3$ ) nebo kyslík ( $\text{O}_2$ ), pohltní až 16 % a oblačností je absorbováno jen kolem 3 % sluneční energie. Zbylých přibližně 51 % slunečního záření je pohlceno zemským povrchem a oceány (OLIVER J E., 2005).



Obrázek 3. Celková energetická bilance (zdroj: NASA GPM, nedatováno)

Vznik sluneční energie se uskutečňuje termonukleárními reakcemi neboli termojadernými fúzí v jádru Slunce, kde se při teplotě okolo 15 milionů °C a velmi vysokého tlaku slučují atomy vodíku za vzniku atomů hélia, doprovázené uvolněním obrovského množství energie ve formě fotonů. Fotony mají různou energii, a tudíž různou vlnovou délku  $\lambda$ , přičemž zde platí vztah: čím větší je energie fotonu, tím menší je jeho vlnová délka, tím pádem i lepší pronikavost. Právě většina těchto vlnových délek je nám prezentována formou barevného spektra. Nejvyšší energii má  $\gamma$  záření, nejnižší pak radiové vlnění.

Rostliny jsou pro své reakce schopné využívat elektromagnetické záření v rozmezí od zhruba 280 nm do 800 nm.



Obrázek 4. Schéma elektromagnetického záření (zdroj: Cyberphysics, 2014)

#### 2.4.1. Globální sluneční záření ( $Q$ ) [ $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ ]

Globální solární radiace (Global Radiation, GR) je definována jako tok krátkovlnného záření, které je směřováno dolů. Pro zjištění této hodnoty je potřeba sečíst dvě veličiny, konkrétně přímou solární radiaci, respektive její vertikální složku a rozptýlenou solární radiaci, jež dopadá na vodorovnou plochu pod prostorovým úhlem  $2\pi$ . Tyto veličiny budou popsány v následujících podkapitolách. Stejně jako rozptýlené sluneční záření, tak i globální radiace se pohybují v rozmezí vlnových délek mezi 0,2 až 10  $\mu\text{m}$  (SOBÍŠEK B., 1993).

Intenzita slunečního záření není rovnoměrná, ovlivňuje ji zejména výška Slunce nad obzorem, čím je Slunce níž, tím je nižší intenzita, dále pak oblačnost, ale také vzrůstající zakalenost atmosféry, takzvaná turbidita, která je způsobena pevnými či zkapalněnými částicemi aerosolu, na nichž dochází k rozptylu nebo absorpci světelného záření. V oblastech za severním či jižním polárním kruhem činí nejvyšší hodnoty globální solární radiace  $800 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ , zatímco v rovníkových oblastech za přítomnosti oblaků, jejichž míra odrazivosti (albedo) může dosáhnout až 70 %, může hodnota globálního slunečního záření dosáhnout až  $1500 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$  (SOBÍŠEK B., 1993).

Vzorec pro výpočet intenzity globální solární radiace pak vypadá následovně:

$$Q = (I \cdot \sin h) + i$$

kde  $I$  vyjadřuje intenzitu přímé solární radiace,  $h$  představuje výšku Slunce nad obzorem, respektive jeho funkci *sinus* a veličina  $i$  je vyjádřením intenzity rozptýlené solární radiace (VYSOUDIL M., 2006).

V dnešní době existuje množství přístrojů, které jsou schopné měřit hodnoty globálního slunečního záření, mezi nejvýznamnější patří takzvané pyranometry, někdy se používá též název solarimetr, který byl zaveden polským meteorologem W. Gorczyńským. Mechanismus pyranometru pracuje zejména na termoelektrickém principu. Jedná se o diferenční termočlánek, jehož funkcí je indikace teplotního rozdílu dvou povrchů, jeden pohlcuje dopadající krátkovlnné záření, zatímco druhý toto krátkovlnné záření neabsorbuje, popřípadě je zastíněn. Tentýž mechanismus využívá také diferenční bimetal v Robitzschově bimetalickém pyranografu nebo teploměr Arago-Davyova pyranometru. Dalšími typy pyranometrů mohou být: Molla-Gorczyńského pyranometr, destilační pyranometr, lucimetr a sférický (kulový) pyranometr. Čidla přístrojů jsou většinou chráněna dvěma skleněnými polokoulemi (SOBÍŠEK B., 1993).



Obrázek 5. Pyranometr CMP11 (zdroj: Kipp & Zonen)

#### 2.4.2. Přímé sluneční záření ( $I_h$ )

Přímá solární radiace je charakterizována jako tok krátkovlnného záření, které přichází z malého prostorového úhlu, jehož osu tvoří střed Slunce a dopadá na plochu, která je k ose tohoto úhlu kolmá. Změna intenzity souvisí jednak s prodlužující se dráhou slunečních paprsků, tedy čím delší je paprsek, tím nižší intenzita (klesání Slunce nad obzorem), tak se vzrůstajícím zakalením atmosféry. V případě, že je Slunce zastíněno oblaky, je intenzita přímé solární radiace zemského povrchu rovna nule. Měřicí přístroje pro zjišťování intenzity záření se nazývají pyrheliometry nebo aktinometry. Pokud chceme změřit délku záření, používáme heliografy (SOBÍŠEK B., 1993).

#### 2.4.3. Rozptýlené sluneční záření ( $i$ )

Rozptýlená neboli difúzní solární radiace je popisována jako krátkovlnné záření, které je směřováno dolů a dopadá na vodorovnou plochu pod prostorovým úhlem  $2\pi$  při současném zakrytí slunečního disku, tedy odklonění přímé solární radiace. Vznik je zapříčiněn rozkládáním slunečního záření na částechkách aerosolu rozptýleného v atmosféře, jako jsou ledové krystalky, vodní kapičky, pylová zrna či vulkanický popel apod., ale také na molekulách vzduchu. Molekuly vzduchu rozptylují sluneční záření o celkové velikosti, která je rovna převrácené hodnotě čtvrté mocniny vlnové délky. V atmosféře se nejvíce rozptylují fialové a modré barvy, protože mají nejkratší vlnové délky. Z tohoto důvodu se nám jeví obloha jako modrá. Intenzita

difúzního solárního záření je opačná ku přímému slunečnímu záření, to znamená, že jeho velikost roste se zvyšujícím se zakalením atmosféry a nabývá hodnot mezi 70 až do  $700 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ . K měření této veličiny se využívají difúzometry (SOBÍŠEK B., 1993).

#### 2.4.4. Fotosynteticky aktivní radiace

Fotosynteticky aktivní radiace nebo také záření (Photosynthetic Active Radiation, PAR, česky FAR) je oblast slunečního spektra ležící mezi vlnovými délkami 400 až 700 nm, která je využívána rostlinami při fotosyntetickém procesu. Znalost této veličiny nám může poskytnout klíčové vstupy pro výpočty a modelování biomasy a lesnické produkce, růstu rostlin, ale také přírodního osvětlení skleníků (GARCÍA-RODRÍGUEZ A. *et al*, 2021).

Fotosyntetická hustota proudění fotonů  $Q_p$  [ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ] se měří a převádí na energetické jednotky pomocí McCreeova konverzního faktoru ( $4,57 \mu\text{mol}\cdot\text{J}^{-1} \pm 3 \%$ ) v závislosti na klimatických faktorech (AKITSU *et al*, 2015).

#### 2.4.5. Fotosyntéza

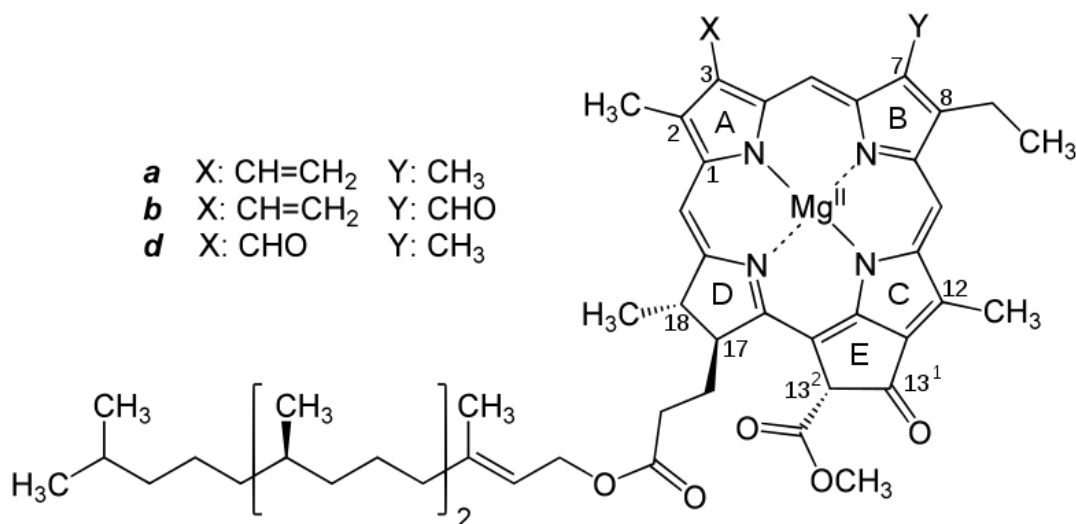
Fotosyntéza je nejpozoruhodnějším a nejvýznamnějším fyziologickým procesem, který má na Zemi zásadní význam pro všechny živé organismy. Její princip spočívá v absorpci světelné energie fotoautotrofními organismy, které ji společně s fixací vzdušného oxidu uhličitého ( $\text{CO}_2$ ) a fotolýzou vody ( $\text{H}_2\text{O}$ ) využívají k syntéze energetických organických sloučenin za současného uvolnění kyslíku ( $\text{O}_2$ ) jako odpadního produktu. Tento biochemický proces probíhá ve dvou fázích – první fáze, též světelná a druhá neboli temnostní fáze (RYPLOVÁ R., 2014).

Nejvýznamnější morfologickou strukturou rostlin podílející se na fotosyntéze je list. V jeho nitru se nacházejí malé organely chloroplasty, jež jsou nejmenší strukturální a zároveň funkční jednotkou, schopnou absorbovat záření a zabudovávat uhlík z fixovaného oxidu uhličitého do sacharidů. Chloroplast je tvořen dvojitou cytoplazmatickou membránou, vnější a vnitřní, pod níž se nachází stroma. Ve stromatu jsou umístěny membránové struktury zvané thylakoidy, které tvoří sloupcovité útvary, které se nazývají grana, nebo také granální thylakoidy. Druhým typem jsou stromatální thylakoidy, které již grana netvoří. V membráně thylakoidů jsou vázány rostlinné fotosyntetické pigmenty – chlorofyly. Uvádí se, že list je tvořen přibližně

$5 \cdot 10^9$  chloroplastů, přičemž v každém z nich je přítomno asi 600 milionů molekul chlorofylu (PROCHÁZKA S. *et al*, 1998).

### 2.4.5.1. Chlorofyl

Chlorofyly jsou nejvíce důležitými fotosyntetickými pigmenty. Nacházejí se v zelených rostlinách, sinicích a některých řasách uloženy v speciálních organelách – chloroplastech, kde jsou vázány na molekulu proteinu. V současné době je známo celkem sedm typů chlorofylů: bakteriochlorofyl a bakterioviridin, dále chlorofyly *a*, *b*, *c*, *d* a *e*, přičemž nejdůležitější jsou modrozelený chlorofyl *a* a žlutozelený chlorofyl *b*. Jedná se o zelené tetrapyrrolové barvivo, které ve svém centru obsahuje iont hořčíku (Mg). Barevně je zelený, protože absorbuje červenou ( $\lambda = 640\text{--}700$  nm) i modrou ( $\lambda = 430\text{--}460$  nm) část světelného spektra a zbytek odráží (KINCL M., KRPEŠ V., 2006).



Obrázek 6. Struktura chlorofylu *a*, *b*, *d* (zdroj: Yikrazuul, 2009)

Biosyntéza chlorofylu je v mnohém podobná biosyntéze hemu. Prvním krokem je připojení glutamátu na tRNA a vznik glutamyl-tRNA. Tato sloučenina může být použita jednak pro syntézu dalších proteinů, tak i pro syntézu chlorofylů. Glutamyl-tRNA je metabolizován na glutamyl-1-semialdehyd, který se dále za pomoci enzymu 5-aminolevulátsythasy přeměňuje na kyselinu 5-aminolevulovou. Následně se kondenzací a současnou dehydratací 2 mol 5-ALA (kys. 5-aminolevulová) vytvoří monopyrrol porfobilinogen. Celý proces je katalyzován enzymem 5-aminodehydratasou. Porfobilinogen je již cyklickou molekulou a obsahuje pyrrolové jádro. Čtyři molekuly porfobilinogenu dávají vzniknout protoporphyrinu IX, který obsahuje porfyrin. Do něj může být zabudováno železo (Fe), a to enzymem Fe-



chelatasou, v takovém případě vzniká hem, z něhož lze získat cytochrom či fytochrom, nebo pomocí enzymu Mg-chelatasy dojde k zabudování hořčíku (Mg) a vzniká tak protochlorofylid *a*, který je změněn na chlorofylid *a* činností enzymu reduktasy a fotochemickou reakcí za spotřeby dvou fotonů a jednoho NADPH. Po připojení fytolu pak vzniká chlorofyl *a*, jehož oxidací lze získat chlorofyl *b* (BEALE S. I., 1999).

#### 2.4.5.2. Fotoreceptory

Fotoreceptory se vyvíjely postupně s tím, jak se rostliny adaptovaly na příjem světelné energie. Doposud byly charakterizovány tři typy fotoreceptorů:

(1) Červený farred-reverzibilní chromoprotein, fytochrom pro absorpci červeného a daleko červeného světla (600-750 nm).

(2) Kryptochromy, které zprostředkovávají několik reakcí modrého světla a UV-A (320-500 nm). Nedávno byl identifikován další chromoprotein absorbující modré světlo, fototropin, jako fotoreceptor zprostředkující fototropismus.

(3) Fotoreceptory pro UV-B (282-320 nm). Dosud však nebyly izolovány (BRIGGS W. R., OLNEY M. A., 2001; GILIBERTO L. *et al*, 2005).

Všechny tři typy těchto fotoreceptorů by mohly potenciálně snímat signál UV-A (MANCINELLI A. L., 1986). UV-A reakce u *Arabidopsis* by mohly být nahrazeny modrým světlem (FEINBAUM R. I. *et al*, 1991; FUGLEVAND G. *et al*, 1996), což ukazuje na zapojení UV-A/modrých fotoreceptorů. Některé geny biosyntézy antokyanů, tj. CHS a F3H, jsou však indukovány pouze po expozici UV-A (ZHOU B. *et al*, 2007). Obě dráhy UV-B i UV-A/modrá zahrnují reverzibilní fosforylaci proteinů a vyžadují syntézu proteinů. Signalizace UV-B a UV-A/modrého světla se proto liší od fytochromové signální transdukční dráhy regulující expresi CHS u jiných druhů (CHRISTIE J. M., JENKINS G. I., 1996).

Jak se ukazuje, světelné záření registrované fotoreceptory, reguluje zřejmě obsah fenolických látek tím, že ovlivňuje aktivitu enzymů biosyntetických drah.

## 2.5. Analytická separační metoda – UHPLC

Analytická metoda UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography, ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie nebo Ultra High Pressure Liquid Chromatography, ultra vysokotlaká kapalinová chromatografie), někdy též UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography, ultra účinná kapalinová chromatografie), je nová separační technika v oblasti analýzy látek. Jedná se o modifikovanou formu již známé techniky vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) (<https://www.chromservis.eu/c/uhplc-in-details?lang=CZ>, nedatováno). Tato separační technika má široké spektrum použitelnosti prakticky ve všech průmyslových odvětvích, ať už se jedná o farmaceutický průmysl, klinické metody, bioanalýzu, tak i bezpečnost potravin, identifikaci metabolitů či rutinní screening (BASHARAT R. *et al*, 2021).

Hlavním rozdílem mezi těmito metodami je v první řadě zrnitost kolon – u HPLC pracujeme se sorbenty o velikosti zrn v rozpětí 3-50  $\mu\text{m}$ , ovšem nejčastěji v rozmezí 5-10  $\mu\text{m}$ , zatímco UHPLC využívá velikost zrn menší než 2  $\mu\text{m}$ , nejčastěji však 1,7  $\mu\text{m}$ . Dalším podstatným rozdílem je poté tlak v kolonách, v případě HPLC nabývají tlaky v kolonách hodnot 1-60 MPa, zatímco u UHPLC se mohou pohybovat až kolem 100 MPa. Z tohoto důvodu je potřeba používat kratší kolony (ROGE A. B. *et al*, 2011). Vzhledem k vysokým tlakům je rovněž potřeba zvolit odolnější materiály, kterými jsou nejčastěji ocel nebo pozlacená ocel, PEEK (polyetheretherketon) anebo pak kombinace ocel-PEEK.

Tato separační technika poskytuje oproti klasické vysokoúčinné kapalinové chromatografii několik předností, konkrétně zvýšení separační účinnosti, a to právě vlivem zmenšení zrnitosti sorbentu, dále zvýšení citlivosti, snížení meze detekce, kratší dobu analýzy látek, snížení nákladů a v neposlední řadě také poskytnutí většího množství kvalitativních informací (NARWATE B. M. *et al*, 2014).

Pro přenos metod z vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) do ultra účinné kapalinové chromatografie (UHPLC) je pro požadovanou aplikaci nejprve nutné optimalizovat selektivitu a účinnost kolony. Tento proces zahrnuje následující čtyři kroky (<https://www.chromservis.eu/c/uhplc-in-details?lang=CZ>, nedatováno):

a) zvolení délky kolony

Vzhledem ke snižování velikosti zrn sorbentu, ale současnému zachování délky kolony, dochází ke zvýšení počtu teoretických pater. Z tohoto důvodu je možné kolonu zkrátit bez toho, aby došlo ke ztrátě rozlišení (<http://www.hplc.cz/UPLC/>, nedatováno).

b) optimalizování nástřikového objemu

Snižováním délky kolony a jejího vnitřního průměru dochází ke snížení celkového objemu a kapacity vzorku. V důsledku toho je podstatné zajištění kompatibility rozpouštědla vzorku se složením mobilní fáze, aby se zamezilo případné změně selektivity, snížení účinnosti či nereprodukovatelnosti retenčních časů (<http://www.hplc.cz/UPLC/>, nedatováno).

c) nastavení průtoku

Nastavením průtoku je nutné docílit toho, aby byla zajištěna adekvátní lineární rychlost u menší kolony, zároveň je nutné se zmenšením průměru kolony snížit průtok mobilní fáze tak, aby byla zachována totožná lineární rychlost, jež je důležitá pro zachování účinnosti (<http://www.hplc.cz/UPLC/>, nedatováno).

d) nastavení časového programu

Po splnění předešlých třech kroků je při přenosu metody z HPLC do UHPLC potřeba nastavit počátek gradientu, a to konkrétně tak, aby k interakcím docházelo ve stejnou dobu (<http://www.hplc.cz/UPLC/>, nedatováno).

### **2.5.1. Instrumentace v ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografii**

Aby mohla být využita zvýšená rychlost analýzy, vynikající rozlišení, větší citlivost poskytovaná malou velikostí částic a práce s vysokými tlaky, bylo nezbytně nutné vypracovat návrhy s pokročilou technologií v základních přístrojích pro ultra vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, to znamená v čerpadle, autosampleru, detektoru, datovém vyhodnocovacím systému a servisní diagnostice. Základní přístrojové vybavení UHPLC bude popsáno v následujících podkapitolách (ASHOK K. *et al*, 2012).

### **2.5.1.1. Čerpadlo**

Ideální čerpadla pro UHPLC mají kapacitu dodávat rozpouštědla při vyšším tlaku kolem 100 MPa pro optimální průtok s maximální účinností napříč 15 cm dlouhou kolonou naplněnou částicemi o velikosti 1,7  $\mu\text{m}$ . UHPLC používá dvě sériová čerpadla s tlakovým limitem 100 MPa a mají vestavěné ventily pro výběr rozpouštědla, které mají schopnost zvolit přesný poměr rozpouštědla až ze čtyř rozpouštědel (ASHOK K. *et al*, 2012).

### **2.5.1.2. Dávkovač**

Systém UHPLC se svým správcem vzorků s průtokovou jehlou řeší tři konstrukční výzvy pro spolehlivý výkon: robustní utěsnění jehly při vyšším tlaku, minimalizaci šíření extrakolonového pásma pro úzké píky a provádění bezpulzního injekčního procesu pro ochranu kolony před extrémními výkyvy tlaku. Když je injekce zahájena, vstříkovací ventil odkloní tok z jehly, aby shromáždil vzorek z lahvičky. Jehla se zasune do lahvičky, kde dojde k odebrání přesného objemu požadovaného vzorku, a poté se vrátí do injekčního portu. Jehla je tlačena proti vnitřnímu těsnicímu povrchu portu, vstříkovací ventil se otáčí a vzorek je vtlačen do vstříkovacího portu. Disperzi vzorku lze minimalizovat udržováním menší vzdálenosti mezi vstříkovacím portem a vstříkovacím ventilem. Po vstříknutí vzorku se jehla po určitou dobu promývá, aby se minimalizoval přenos vzorku (NARWATE B. M. *et al*, 2014).

### **2.5.1.3. Kolona**

V současnosti se na trhu nachází nepřeberné množství různých typů kolon, lišících se jejich délkou, průměrem, velikostí částic, velikostí pórů, nebo materiálem. Nejčastěji se však délka kolon pohybuje mezi 5 až 10 cm a průměr buď 1 mm nebo 2,1 mm. Jak již bylo zmíněno, kolony pro ultra vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii jsou vyrobeny z malých částic o velikosti menší než 2  $\mu\text{m}$ . V současné době prakticky každá firma vyvíjející instrumentaci pro kapalinovou chromatografii, nabízí kolony, které lze použít technikou UHPLC (ASHOK K. *et al*, 2012). Jednotlivé skupiny kolon se liší typem stacionárních fází:

C18 a C8 kolony: Jedná se o kolony s lineárním alkylovým řetězcem, které patří mezi nejvýhodnější pro techniku UHPLC, protože je lze použít v širokém rozmezí pH. Trifunkční ligandy poskytují stabilitu při nízkém pH, která je

kombinována s vysokou stabilitou pH 1,7  $\mu\text{m}$  částic, aby se dosáhlo co nejširšího použitelného provozního rozsahu pH.

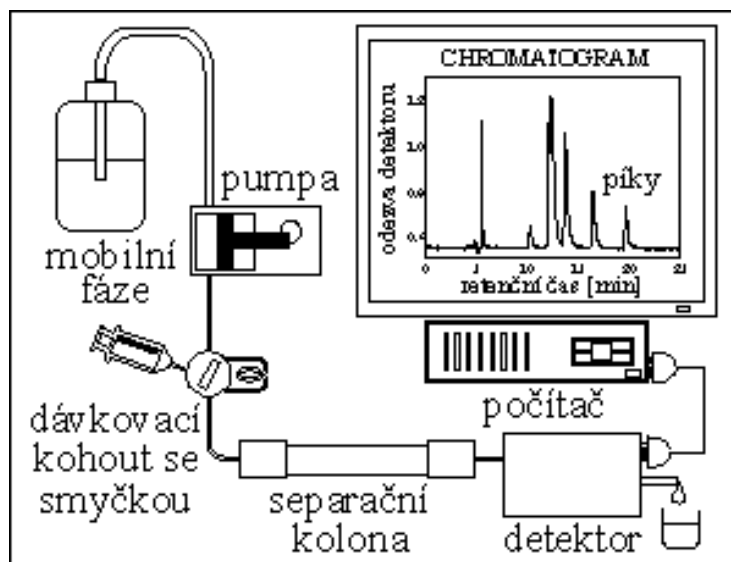
Shield R18 kolony: obsahují polární skupinu karbamátu, poskytují selektivitu pro UHPLC, používají se jako doplňkové ke kolonám C18 a C8.

Fenylové kolony: mají trifunkční C6 alkylethyl mezi fenylovými kruhy a silylovou funkční skupinou.

Amidové kolony: kombinace trifunkčně vázané amidové fáze poskytuje výjimečnou životnost kolony. Usnadňují použití široké škály oblasti pH, konkrétně od 2 do 11.

#### **2.5.1.4. Detektor**

Detektory využívané pro ultra vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii musí mít vysokou vzorkovací frekvenci, aby byla umožněna citlivá detekce a spolehlivá kvantifikace vytvořených úzkých píků (šířka píku  $< 1\text{s}$  poloviční výšky), ale také minimální rozptyl (objem), takže se neztratí separace dosažená na koloně. Detektor také vyžaduje novou elektroniku a firmware podporují ethernetovou komunikaci, která se přizpůsobí vysoké datové rychlosti. Potenciální zvýšení citlivosti UHPLC je odhadováno na 2-3násobek hodnoty získané pomocí HPLC, v závislosti na metodě detekce. Pro tyto účely jsou vhodné detektory s fotodiodovým polem (PDA, PDA  $e\lambda$ ) a laditelné UV-VIS (TUV) detektory. Datové rychlosti těchto detektorů jsou až 80 Hz se specifikací nízkého šumu, konkrétně 10 Au se širokým rozsahem spektrální analýzy až do 500 nm (PDA detektor) a 800 nm ( $e\lambda$  detektor). Aby se zabránilo šíření pásu a kolísání koncentrace, používají se nízkoobjemové světlovodné průtokové cely z optických vláken, které obsahují vnitřně reflexní povrch z teflonu AF, který eliminuje vnitřní absorpci použitím principu úplného vnitřního odrazu pro zlepšení účinnosti přenosu světla (NARWATE B. M. *et al*, 2014). Detekce s pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) byla rovněž použita s UHPLC (ROGE A. B. *et al*, 2011).



Obrázek 7. Schéma kapalinového chromatografu (zdroj: Pavel Coufal, 1996)



Obrázek 8. Agilent 1290 Infinity II HPLC (zdroj: [www.agilent.com](http://www.agilent.com))



Obrázek 9. ACQUITY UPLC M-Class System (zdroj: [www.waters.com](http://www.waters.com))



Obrázek 10. Jasco LC-4000 UHPLC System (zdroj: [www.jascoinc.com](http://www.jascoinc.com))

### 3. Cíle práce

Cílem této diplomové práce je:

- (1) vypracování literárního přehledu zaměřeného na biosyntézu rostlinných fenolů a vliv podmínek pěstování na obsah biologicky aktivních látek,
- (2) pěstování vybraných druhů netradiční listové zeleniny z čeledi brukvovitých jako modelové rostliny,
- (3) pěstování zeleniny v různých podmínkách – dvojí osev za rok, pěstování ve skleníku a na záhoně,
- (4) v získaném materiálu stanovit vybrané obsahové látky ze skupiny polyfenolů,
- (5) zjištění souvislostí obsahu vybraných látek a podmínek pěstování (doba a místo pěstování, meteorologické podmínky).



## 4. Experimentální část

### 4.1. Použité chemikálie a přístroje

#### 4.1.1. Chemikálie

methanol (Merck, Německo)

kyselina askorbová (Merck, Německo)

kyselina  $\alpha$ -naftyloctová (Lachema, Česká republika)

kyselina chlorovodíková (Lachema, Česká republika)

acetonitril (Merck, Německo)

hydrogenuhlíčitan sodný (Lachema, Česká republika)

apigenin (Aldrich Chemie, Německo)

kemferol (Aldrich Chemie, Německo)

kvercetin (Aldrich Chemie, Německo)

luteolin (Aldrich Chemie, Německo)

morin (Aldrich Chemie, Německo)

myricetin (Aldrich Chemie, Německo)

Všechny použité chemikálie měly analytickou čistotu.

#### 4.1.2. Laboratorní sklo a přístroje

chladnička s ledničkou (Bosch Cooler, Německo)

lyofilizátor Alpha 1-2/LD plus (Christ, Německo)

laboratorní nožový mlýn Grindomix GM 200 (Retsch, Německo)

analytické váhy AB204 (Mettler Toledo, Švýcarsko)

základní laboratorní vybavení (Fischer Scientific, Pardubice, Česká republika)

vodní lázeň termostatovaná míchaná EL-20R (Kavalier, Česká republika)

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

odstředivka Sigma 2-5 (Sigma Zentrifugen, Německo)

SPE kolonky RP-18 (Merck, Německo)

kolona Zorbax Eclipse SB-C18 (Agilent, USA)

kapalinový chromatograf Agilent 1200 Series Rapid Resolutions (Agilent, USA)

## **4.2. Příprava rostlinného materiálu**

Všechny testované vzorky listové zeleniny (Namenia, Sagami, Golden Lion, Choy Sum a Tatsoi) byly vypěstovány na pokusném školním pozemku Zemědělské fakulty v kampusu Jihočeské univerzity (České Budějovice, N 48°58'29.528'', E 14°26'52.057'') v letech 2019, 2020 a 2021. Osiva byla zakoupena od firmy Semena.cz. Všechny testované odrůdy byly vypěstovány volně a v běžně upravené zemině na ploše pozemku, konkrétně ve skleníku a na záhoně. Bohužel se nepodařilo po celou dobu řešení práce pěstovat totožné odrůdy, které byly testovány v mojí bakalářské práci, protože z epidemiologických důvodů nebylo možné koupit osiva. Zelenina nebyla během vegetace hnojena ani nijak chemicky ošetřována.

Po sklizni se nechal rostlinný materiál pečlivě očistit a byly z něj odebrány všechny jedlé části, které se běžně konzumují, to znamená nadzemní zelené. Všechny rostlinný materiál se následně nechal nakrájet na části o maximální tloušťce 0,5 cm, byl okamžitě zamražen při teplotě -16 °C, a poté do 1 měsíce od odběru po dobu 24 hodin lyofilizován při teplotě -50 °C a tlaku 0,1 mbar. Dále se lyofilizovaný materiál nechal na laboratorním mlýnku homogenizovat a až do analýzy byl uložen v plastových vzorkovnicích a v mrazícím boxu o teplotě -16 °C.

## **4.3. Metodika zpracování vzorků**

V rostlinném materiálu se v naprosté většině případů molekuly flavonoidních aglykonů vážou na sacharid a tím vytvářejí takzvané glykosidické formy. Oproti těmto formám je výskyt volných aglykonů prakticky zanedbatelný. Vzhledem k tomu, že se v přírodních materiálech od každého aglykonu vyskytuje obrovské množství konkrétních glykosidů, je proto velmi obtížné stanovit jejich jednotlivé obsahy. Nicméně, počet jednotlivých aglykonů, které vytvářejí glykosidy, je podstatně nižší. Množství všech forem flavonoidních glykosidů se dá posoudit podle celkového obsahu konkrétních flavonoidních aglykonů.

Pro tento účel byla zvolena taková metoda, při níž byly vzorky podrobeny kyselé hydrolyze, díky čemuž došlo k uvolnění všech aglykonů, přesněji rozštěpením

přítomných glykosidů (DADÁKOVÁ E. *et al*, 2001). Volné aglykony byly následně ze vzorku izolovány pomocí metody sorpce na tuhé fázi (SPE) a stanoveny metodou UHPLC.

Byly sledovány celkem dva nejběžnější flavonoidní aglykony, konkrétně kvercetin a kemferol.

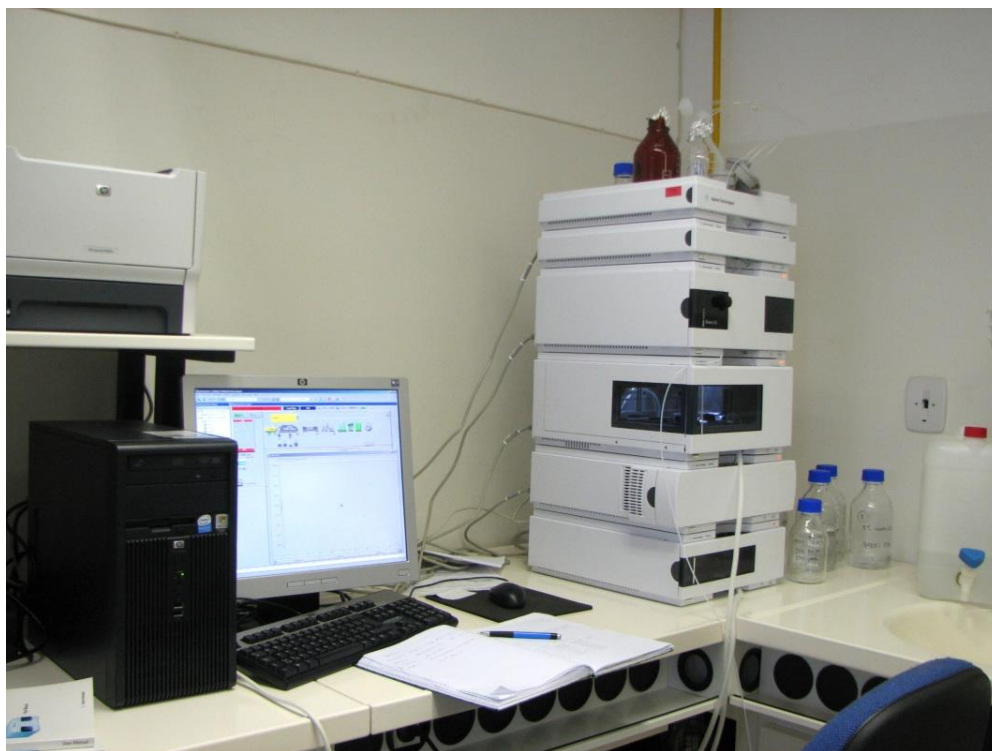
#### **4.4. Stanovení flavonoidních aglykonů**

Stanovení vybraných flavonoidů bylo provedeno pomocí metody, která byla vyvinuta na tomtéž pracovišti (DADÁKOVÁ E., KALINOVÁ J., 2010), kde byla tato diplomová práce vytvořena. Nejprve byla vytvořena směs přibližně 0,25 g homogenizovaného a lyofilizovaného materiálu s 5 ml 6M kyseliny chlorovodíkové (HCl), 80 ml kyseliny askorbové, 12,5 ml methanolu a 7,5 ml destilované vody. Tato směs byla v 500ml baňce následně pod zpětným chladičem a na vodní lázni při teplotě 90 °C hydrolyzována po dobu dvou hodin. Po vychladnutí se obsah baňky nechal zneutralizovat 2 g hydrogenuhličitanu sodného (NaHCO<sub>3</sub>), a poté byl s pomocí 12,5 ml methanolu (CH<sub>3</sub>OH) a vody převeden do odstředivací kyvety, kde byl postupně třikrát odstředěn při 3000 otáčkách a době trvání 1 cyklu 10 minut. Vzniklé supernatanty byly následně v 600ml kádince doplněny vodou na 200 ml a pomocí nasyceného roztoku NaHCO<sub>3</sub> bylo upraveno pH na hodnotu 3. Tento upravený roztok byl poté za sníženého tlaku zfiltrován přes filtr ze skleněných vláken. Vzniklý filtrát byl následně kvantitativně převeden do 500ml odměrné baňky.

Aby mohly být všechny roztoky použity k sorpci na tuhé SPE fázi, bylo je potřeba desetkrát naředit, a to připraveným 5% roztokem methanolu. K tomuto účelu byly použity kolonky RP-18 (Merck), které byly nejprve kondicionovány promytím 10 ml methanolu a 10 ml vody. Následně došlo k promytí vzorků, po němž byly kolonky promyty 10 ml vody, a poté po dobu 20 minut sušeny procházejícím vzduchem. Zachycené látky byly vymyty do měrné vialky s pomocí 1,4 ml methanolu. Roztok vnitřního standardu, kterým byla zvolena kyselina  $\alpha$ -naftyloctová o koncentraci 2 mg/ml a v množství 100  $\mu$ l, byl následně přidán k eluátu v měrné vialce.

Všechny vzorky byly měřeny na ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografii. Byl použit kapalinový chromatograf typu Agilent 1200 Series Rapid Resolutions americké firmy Agilent Technologies s kolonou Zorbax Eclipse SB-C18 s parametry 4,6x50 mm a zrněním 1,8  $\mu$ m, rovněž značky Agilent. Jako mobilní fáze

se použily dvě různé směsi. První směs byla tvořena 5% acetonitrilem, 0,1% kyselinou mravenčí a vodou. Druhým typem mobilní fáze byla směs 0,1% kyseliny mravenčí s acetonitrilem. Analýza probíhala při teplotě 25 °C po dobu 15 minut, průtok mobilní fáze činil 1 ml/min, objem nástřiku 5  $\mu$ l a mez detekce analytu byla nastavena na 270 nm.



Obrázek 11. Použitý kapalinový chromatograf Agilent 1200 Series Rapid Resolutions  
(zdroj: doc. Ing. Eva Dadáková, Ph.D., katedra aplikované chemie, 2022)

#### 4.5. Použité statistické metody

Pro vyhodnocení získaných dat byl použit program ChemStation 3 (Agilent), dále MS Office Excel 2016, konkrétně jeho matematicko-statistické nástroje a mezi popisné charakteristiky byly zahrnuty: průměrná hodnota, směrodatná odchylka, korelace a regresní analýza.

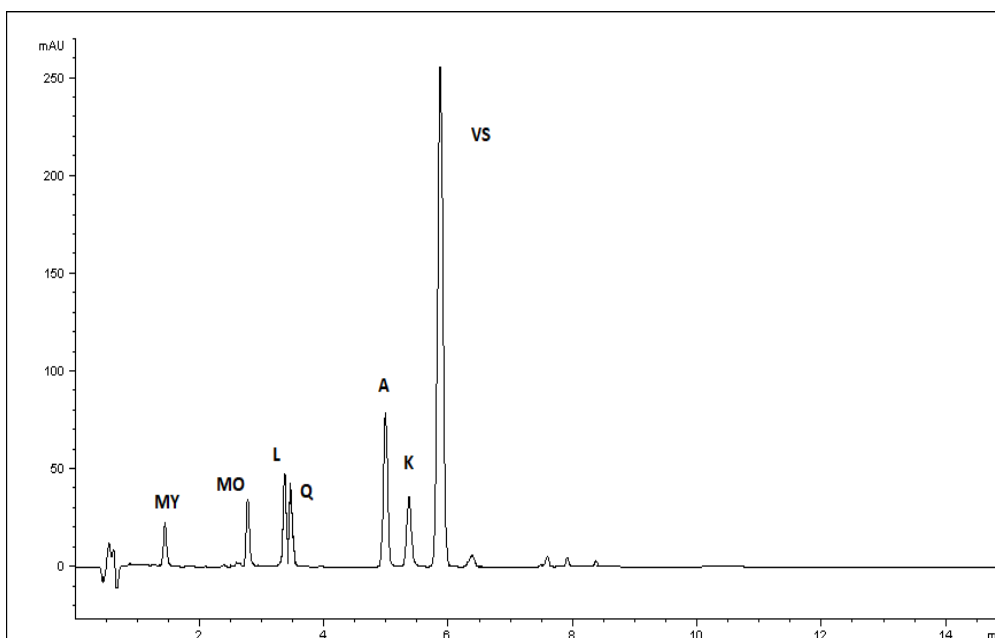
#### 4.6. Modelové zpracování dat

V diplomové práci se porovnávají hodnoty stanovovaných flavonoidů kvercetin a kemferolu z jarních a podzimních osevů ve skleníku a na záhoně, konkrétně z let 2019, 2020 a 2021. Nicméně, pro korelaci s absorbovaným slunečním zářením bylo možné vyhodnotit data pouze z jarních osevů 2019 a 2020. Je to z toho důvodu, že v roce 2021 a během podzimních osevů v letech 2019 a 2020 byla

poškozena meteorologická stanice, proto nebyly k dispozici potřebné meteorologické údaje.

#### 4.6.1. Vyhodnocení dat

Pro analytickou odezvu byl použit poměr ploch píků identifikovaných druhů flavonoidů, především kvercetin a kemferolu ku vnitřnímu standardu. Kvantifikace obsahu byla provedena pomocí kalibrační závislosti, pro jejíž sestavení sloužily roztoky, které byly připravené ze zásobních roztoků v pracovním rozsahu 5-100 µg/ml. Mez detekce byla 1 mg/kg, mez stanovitelnosti 5 mg/kg sušiny. Všechny vzorky byly analyzovány dvakrát, výsledek je jejich aritmetickým průměrem, dále je uvedena směrodatná odchylka.



Obrázek 12. Záznam analýzy standardního měření aglykonů

Symbol v chromatogramu	Sloučenina
MY	Myricetin
MO	Morin
L	Luteolin
Q	Kvercetin
A	Apigenin
K	Kemferol
VS	Vnitřní standard

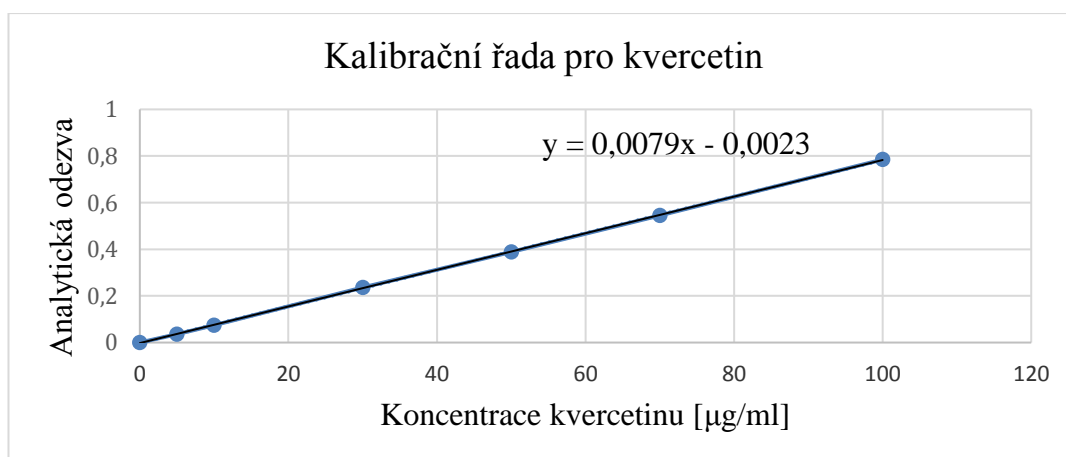
Tabulka 1. Legenda k vyznačeným aglykonům ve chromatogramech

#### 4.6.1.1. Kalibrační data pro kvercetin

Pro správné vyhodnocení dat analyzovaných vzorků bylo potřeba vytvořit kalibrační rovnici. Nejprve se vypočetla relativní odezva podílem odezvy stanovovaného kvercetinu ku odezvě vnitřního standardu. Následně byly do grafu vloženy na osu  $x$  hodnoty koncentrace kvercetinu a na osu  $y$  hodnoty relativní odezvy.

Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Odezva kvercetinu	Odezva vnitřního standardu	Relativní odezva
0	0	1368,2	0
5	48,6	1343,8	0,036166096
10	103,2	1398,6	0,073788074
30	318	1343,3	0,23673044
50	529,7	1365,1	0,388030181
70	745	1366,5	0,545188438
100	1043	1329	0,784800602

Tabulka 2. Kalibrační řada pro kvercetin



Obrázek 13. Kalibrační křivka pro flavonol kvercetin

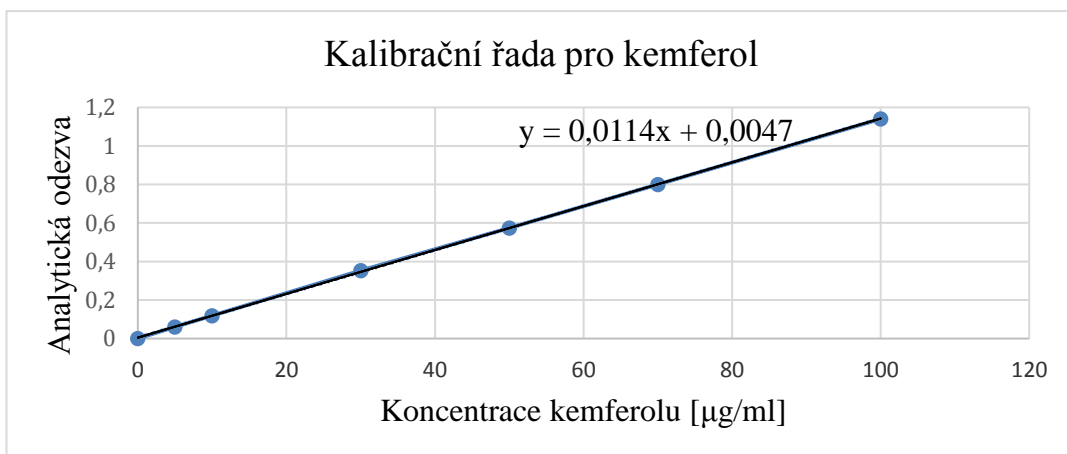
Po dosazení kalibračních hodnot pro kvercetin do grafu vyšla kalibrační rovnice:  $y = 0,0079x - 0,0023$ , korelační koeficient  $R^2 = 0,9999$ .

#### 4.6.1.2. Kalibrační data pro kemferol

Pro správné vyhodnocení dat analyzovaných vzorků bylo potřeba vytvořit kalibrační rovnici. Nejprve se vypočetla relativní odezva podílem odezvy stanovovaného kemferolu ku odezvě vnitřního standardu. Následně byly do grafu vloženy na osu  $x$  hodnoty koncentrace kemferolu a na osu  $y$  hodnoty relativní odezvy.

Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Odezva kemferolu	Odezva vnitřního standardu	Relativní odezva
0	0	1345	0
5	82,5	1366,2	0,0603865
10	160,8	1348,8	0,1192171
30	489	1385	0,3530686
50	789,7	1374,6	0,5744944
70	1133,3	1416,6	0,8000141
100	1548,5	1358,1	1,1401959

Tabulka 3. Kalibrační řada pro kemferol



Obrázek 14. Kalibrační křivka pro flavonol kemferol

Po dosažení kalibračních hodnot pro kemferol do grafu vyšla kalibrační rovnice:  $y = 0,0114x + 0,0047$ , korelační koeficient  $R^2 = 0,9999$ .

## 5. Výsledky a diskuse

### 5.1. Stanovení sušiny a celkového obsahu sledovaných flavonoidů

Aby bylo možné porovnání vyhodnocených koncentrací jednotlivých flavonoidních aglykonů, tedy kvercetin a kemferol s literárními daty, byla použita data o sušině zkoumaného materiálu, který byl získán lyofilizací jednotlivých vzorků. Pro lepší orientaci se rovněž využívají hodnoty, které jsou přepočtené na čerstvou hmotu. Ty lze získat tak, že se podíl čerstvého a lyofilizovaného materiálu vynásobí průměrnou koncentrací sledované látky ve vzorku.

#### 5.1.1. Rok 2019

V roce 2019 se podařilo vypěstovat totožné odrůdy jako v mé bakalářské práci, tedy Namenia, Sagami, Golden Lion a Tatsoi. První (jarní) osev probíhal v období od 29.4. do 11.6., druhý (podzimní) osev pak v období od 20.8. do 2.10.

Jarní osev	Vzorek	Čerstvý materiál (g)	Lyofilizovaný materiál (g)	Sušina (%)
Skleník	Namenia	110,36	8,21	7,44
	Sagami	192,33	9,41	4,89
	Golden Lion	124,44	6,94	5,58
	Tatsoi	106,38	6,72	6,32
Záhon	Namenia	49,49	4,1	8,28
	Sagami	101,66	9,78	9,62
	Golden Lion	33,78	3,19	9,44
	Tatsoi	26,87	2,87	10,68

Tabulka 4. Stanovení sušiny materiálu v jarním osevu 2019

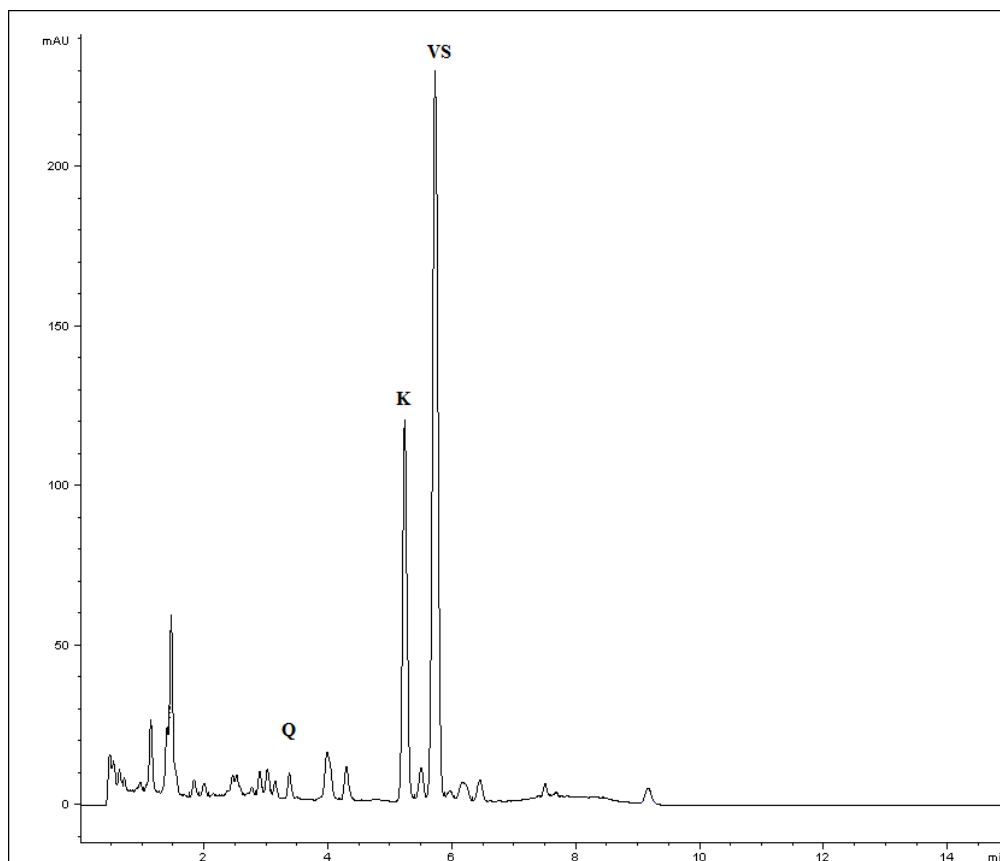


Podzimní osev	Vzorek	Čerstvý materiál (g)	Lyofilizovaný materiál (g)	Sušina (%)
Skleník	Namenia	93,21	5,71	6,13
	Sagami	16,71	1,01	6,04
	Golden Lion	2,63	0,17	6,46
	Tatsoi	nevyrostla		
Záhon	Namenia	43,4	4,01	9,24
	Sagami	90,01	8,29	9,21
	Golden Lion	52,58	3,9	7,42
	Tatsoi	nevyrostla		

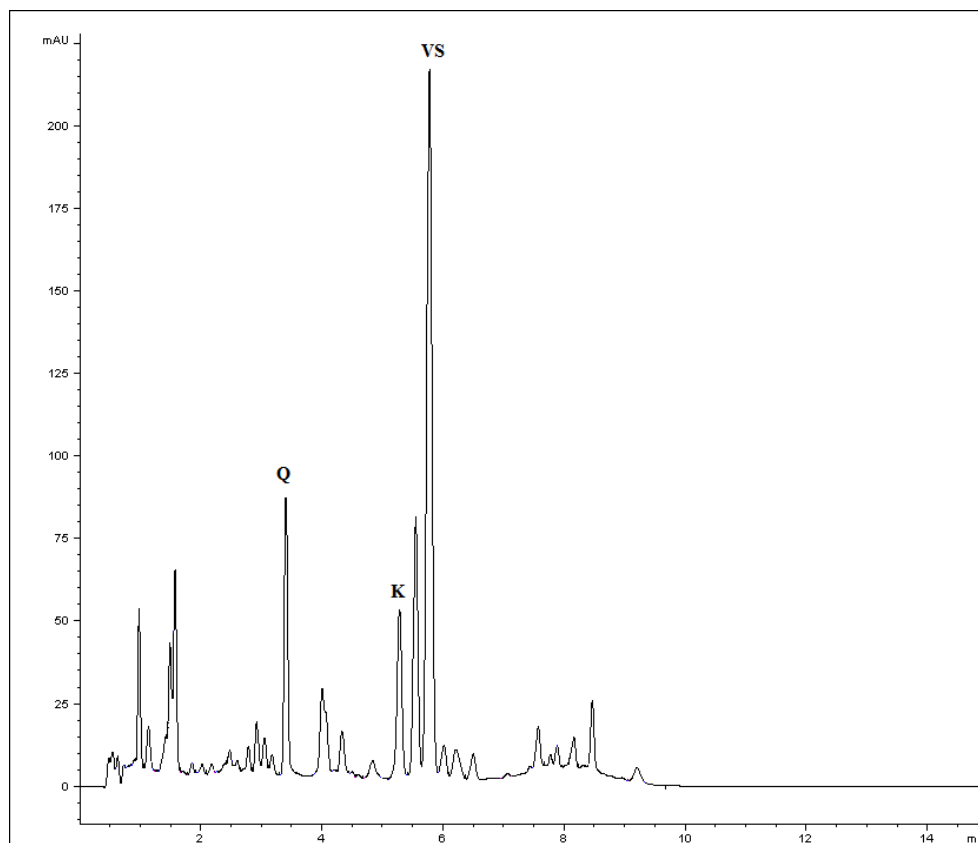
Tabulka 5. Stanovení sušiny materiálu v podzimním osevu 2019

#### 5.1.1.1. Namenia

Ze záznamu Namenie vyplývá, že jarní osev pěstovaný ve skleníku vykázal největší množství kemferolu  $1354 \pm 31,17$  mg/kg sušiny a obsah kvercetinu byl pouze  $136 \pm 3,91$  mg/kg sušiny, zatímco obsah kvercetinu ve vzorku pěstovaném na záhoně byl s hodnotou  $1241 \pm 18,97$  mg/kg sušiny téměř desetinásobně vyšší. Obsah kemferolu byl vypočten na  $667 \pm 18,30$  mg/kg sušiny.

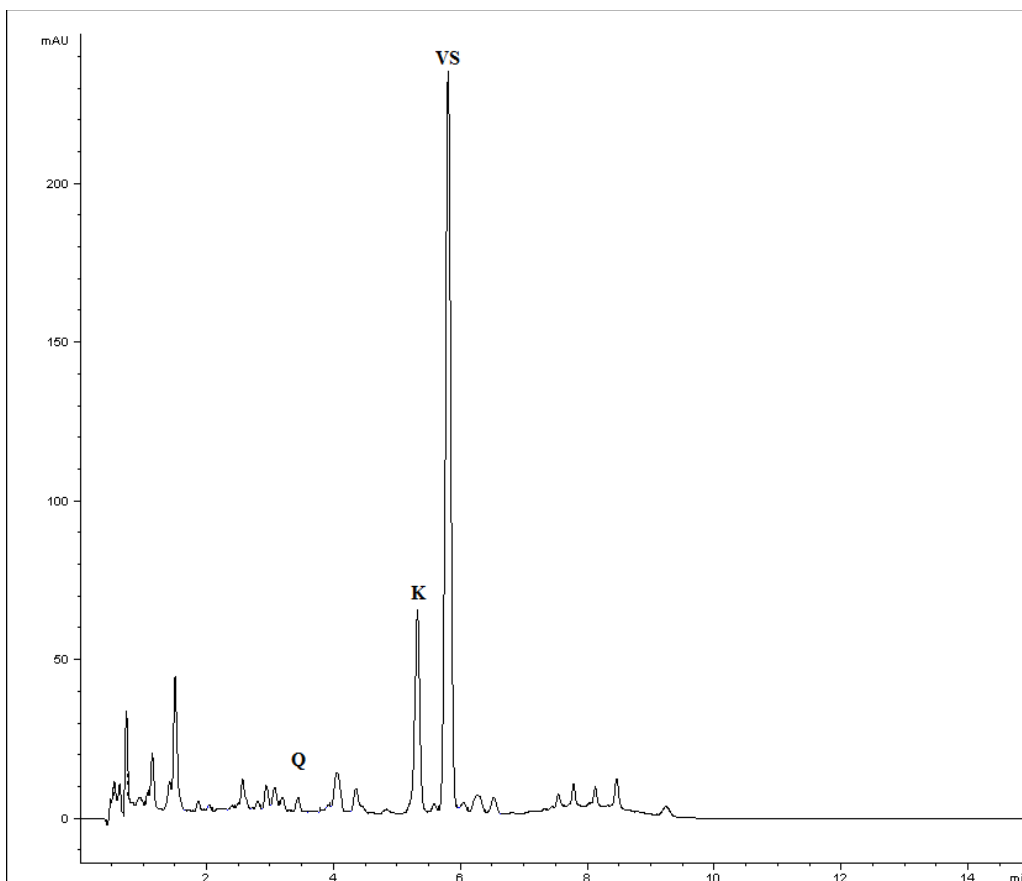


Obrázek 15. Záznam analýzy jarního osevu *Namenie* pěstované ve skleníku

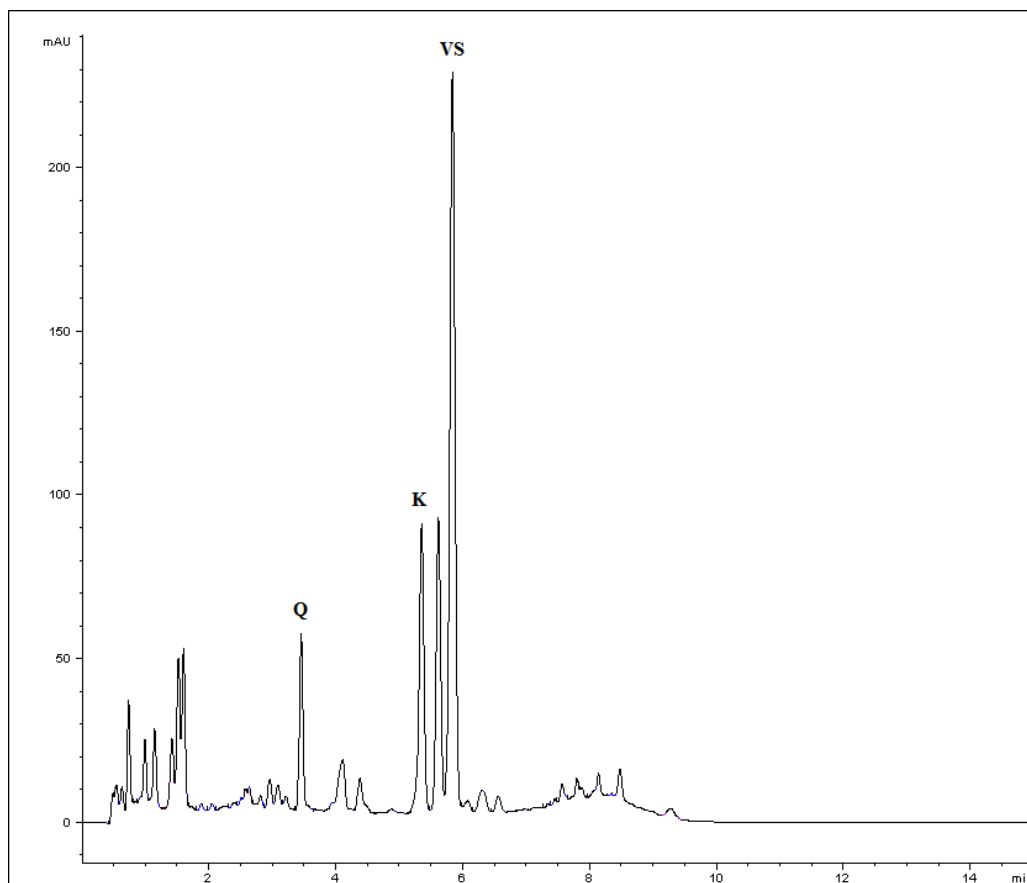


Obrázek 16. Záznam analýzy jarního osevu *Namenie* pěstované na záhoně

V podzimním osevu vykazala Namenie rovněž nízký obsah kvercetinů  $80 \pm 0,02$  mg/kg sušiny a obsah kemferolu  $893 \pm 0,91$  mg/kg sušiny, v případě, že byla pěstována ve skleníku. V případě, že byla pěstována na záhoně, koncentrace obou flavonolů dosáhly poměrně vysokých hodnot, kvercetin byl změřen na  $769 \pm 23,51$  mg/kg sušiny a kemferol dokonce  $1205 \pm 12,60$  mg/kg sušiny.



Obrázek 17. Záznam analýzy podzimního osevu Namenie pěstované ve skleníku



Obrázek 18. Záznam analýzy podzimního osevu *Namenie* pěstované na záhoně

#### 5.1.1.2. Sagami

V prvním osevu *Sagami* pěstované na záhoně byly vyšší obsahy obou sledovaných flavonoidů než ve skleníku. Hodnota kvercetinu byla  $591 \pm 14,74$  mg/kg sušiny a kemferolu  $603 \pm 14,09$  mg/kg sušiny. Ve skleníku byl obsah kvercetinu stanoven na  $92 \pm 4,38$  mg/kg sušiny a obsah kemferolu  $458 \pm 2,77$  mg/kg sušiny.

Analýza druhého osevu vykazovala hodnoty kvercetinu  $76 \pm 7,55$  mg/kg sušiny a  $405 \pm 0,73$  mg/kg sušiny v případě kvercetinu u vzorku pěstovaného ve skleníku, na záhoně pak byly naměřeny hodnoty  $480 \pm 12,68$  mg/kg sušiny kvercetinu a  $750 \pm 7,80$  mg/kg sušiny kemferolu.

#### 5.1.1.3. Golden Lion

*Golden Lion* pěstovaný v jarním osevu ve skleníku obsahoval  $120 \pm 7,20$  mg/kg sušiny kvercetinu a  $497 \pm 35,16$  mg/kg sušiny kemferolu. Celkový obsah prvně zmíněného flavonolu ve vzorcích ze záhonu byl stanoven na  $972 \pm 7,97$  mg/kg sušiny, zatímco obsah kemferolu byl  $581 \pm 9,40$  mg/kg sušiny.

Podzimní osev ve skleníku se u Golden Lion pohyboval v hodnotách  $35\pm 0,27$  mg/kg sušiny u kvercetinů a  $129\pm 5,73$  mg/kg sušiny kemferolu. Na záhoně byl zaznamenán nejvyšší obsah kemferolu, a to  $1437\pm 2,90$  mg/kg sušiny, celkový obsah kvercetinů byl změřen na  $731\pm 6,81$  mg/kg sušiny.

#### **5.1.1.4. Tatsoi**

Tatsoi v prvním osevu rovněž vykazovala nízké hodnoty obsahu kvercetinů, přesněji  $169\pm 9,73$  mg/kg sušiny, obsah kemferolu byl stanoven na  $638\pm 11,72$  mg/kg sušiny. U vzorku, který byl vypěstován na záhoně, byl obsah kemferolu nižší než ve skleníku, jeho hodnota byla vypočtena na  $371\pm 4,06$  mg/kg sušiny, ale koncentrace kvercetinů byla téměř čtyřnásobná s hodnotou  $653\pm 27,69$  mg/kg sušiny.

Vzhledem k tomu, že podzimní osev Tatsoi nebyl úspěšný (zelenina nevyrostla), nebyly k dispozici žádné údaje o koncentracích vybraných flavonoidů, tedy kvercetinů ani kemferolu.

#### **5.1.1.5. Porovnání obsahů ve skleníku**

V roce 2019 bylo při pěstování ve skleníku zaznamenáno nejvyšší množství kvercetinů u Tatsoi z prvního osevu, jehož hodnota činila  $169\pm 9,73$  mg/kg sušiny. Tato hodnota by se dala přirovnat ke Komatsuně, kterou podrobil výzkumu KYRIACOU M. C. *et al*, (2019) a zjistil koncentraci 148 mg/kg sušiny. Naopak nejnižší naměřené množství kvercetinů, přesněji  $35\pm 0,27$  mg/kg sušiny, bylo stanoveno ve druhém osevu, a to u Golden Lion. LI Z. *et al*, (2018) ve své práci zkoumal celkem 12 druhů brukvovitých zelenin a případě čínského zelí vyšel celkový obsah kvercetinů 44 mg/kg sušiny. Tento obsah by se dal přirovnat ke mnou zjištěné koncentraci.

V případě kemferolu byl nejvyšší obsah naměřen u Namenie vypěstované během jarního osevu, konkrétně  $1354\pm 31,17$  mg/kg sušiny. Vzhledem k tomu, že touto zeleninou se doposud výzkumy nezabývaly, můžeme tento výsledek porovnat s odrůdou brukve čínské (Pak Choi), kterou rovněž zkoumal LI Z. *et al*, (2018) také pomocí metody UHPLC. Výsledná koncentrace kemferolu byla stanovena na 1033 mg/kg sušiny, tedy zhruba o 300 mg/kg nižší. Naopak nejnižší obsah kemferolu byl zjištěn rovněž u odrůdy Golden Lion během podzimního osevu. Jeho hodnota byla

129±5,73 mg/kg sušiny. Při výzkumu obsahu flavonoidů ve špenátu, který provedl DEHKHARGHANIAN M. *et al*, (2010), byl stanoven obsah kemferolu 242 mg/kg sušiny, tedy téměř dvojnásobně větší.

#### **5.1.1.6. Porovnání obsahů na záhoně**

Během pěstování na záhoně byl v roce 2019 zaznamenán nejvyšší obsah kvercetin u Namenie z prvního osevu. Hodnota činila 1241±18,97 mg/kg sušiny. Podobnou hodnotu kvercetin naměřil KYRIACOU M. C., *et al*, (2019) u Mibuny, jejíž koncentrace byla stanovena o 101 mg/kg méně, tedy 1140 mg/kg sušiny. Druhý osev Sagami vykázal nejnižší obsah kvercetin, 480±12,68 mg/kg sušiny, který je možné přirovnat k výzkum DEHKHARGHANIAN M. *et al*, (2010), kde byl ve špenátu stanoven obsah kvercetin 403 mg/kg sušiny.

Nejvyšší obsah kemferolu byl naměřen u podzimního osevu Golden Lion, konkrétně 1437±2,90 mg/kg sušiny. Toto množství můžeme porovnat s odrůdou Choy Sum, kterou rovněž podrobil výzkumu LI Z. *et al*, (2018). V tomto případě bylo množství kemferolu stanoveno na 1087 mg/kg sušiny, což je o v porovnání s mým měřením o více než 300 mg/kg méně. V jarním osevu byl stanoven nejnižší obsah kemferolu o hodnotě 371±4,06 mg/kg sušiny, a to u Tatsoi. Toto množství je téměř poloviční v porovnání s listovou zeleninou Kailan neboli čínskou brokolicí, která byla předmětem výzkumu LI Z. *et al*, (2018). Její obsah byl roven 681 mg/kg sušiny.

#### **5.1.2. Rok 2020**

V roce 2020 byla vlivem epidemiologické situace horší dostupnost osiv, z tohoto důvodu byla odrůda Golden Lion nahrazena jiným druhem netradiční listové zeleniny, konkrétně odrůdou Choy Sum. Jarní osev probíhal v období mezi 13.5. až 16.6., podzimní osev mezi 20.8. až 22.9. Výsledné koncentrace stanovovaných flavonolů byly pro tento rok modelově přepočteny na čerstvou váhu.

Jarní osev	Vzorek	Čerstvý materiál (g)	Lyofilizovaný materiál (g)	Sušina (%)
Skleník	Namenia	143,74	8,26	5,75
	Sagami	255,01	11,24	4,41
	Choy Sum	178,83	8,62	4,82
	Tatsoi	158,17	7,71	4,87
Záhon	Namenia	111,71	9,51	8,51
	Sagami	163,68	13,01	7,95
	Choy Sum	120,36	10,58	8,79
	Tatsoi	88,46	7,63	8,63

Tabulka 6. Stanovení sušiny materiálu v jarním osevu 2020

Podzimní osev	Vzorek	Čerstvý materiál (g)	Lyofilizovaný materiál (g)	Sušina (%)
Skleník	Namenia	214,45	10,39	4,84
	Sagami	269,6	11,56	4,29
	Choy Sum	129,12	7,24	5,61
	Tatsoi	53,16	3,24	6,09
Záhon	Namenia	155,23	12,52	8,07
	Sagami	252,5	18,06	7,15
	Choy Sum	217,51	17,07	7,85
	Tatsoi	215,66	16,13	7,48

Tabulka 7. Stanovení sušiny materiálu v podzimním osevu 2020

#### 5.1.2.1. Namenia

V jarním osevu Namenie, která byla pěstována ve skleníku, bylo stanoveno celkové množství kvercetinu na  $91 \pm 9,08$  mg/kg sušiny (5 mg/kg čerstvé váhy), zatímco obsah kemferolu byl vyšší,  $1024 \pm 42,64$  mg/kg sušiny (59 mg/kg čerstvé

váhy). U vzorku pěstovaného na záhoně byla koncentrace kemferolu také vyšší, konkrétně  $1388 \pm 20,25$  mg/kg sušiny (118 mg/kg čerstvé váhy), celkový obsah kvercetinů se rovnal  $669 \pm 14,05$  mg/kg sušiny (57 mg/kg čerstvé váhy) a jednalo se o druhou nejvyšší naměřenou koncentraci, nicméně po přepočtu na čerstvou váhu dokonce nejvyšší.

Podzimní osev přinesl u Namenie pěstované na záhoně nejvyšší koncentraci kemferolu, kde bylo zjištěno  $1753 \pm 42,61$  mg/kg sušiny (142 mg/kg čerstvé váhy), také koncentrace kvercetinů byla velmi vysoká, zde bylo naměřeno  $689 \pm 19,08$  mg/kg sušiny (56 mg/kg čerstvé váhy). Hodnoty obsahů sledovaných látek u vzorku pěstovaného ve skleníku rovněž vykazaly převahu kemferolu, přesněji  $1024 \pm 26,19$  mg/kg sušiny (50 mg/kg čerstvé váhy), za to obsah kvercetinů byl velmi nízký,  $57 \pm 1,63$  mg/kg sušiny (3 mg/kg čerstvé váhy).

#### **5.1.2.2. Sagami**

V prvním osevu byl u Sagami vypěstované na záhoně vyhodnocen obsah kemferolu na  $561 \pm 43,49$  mg/kg sušiny (4 mg/kg čerstvé váhy). Po přepočtu na čerstvou váhu se jednalo o nejnižší množství. Obsah kvercetinů byl stanoven na  $419 \pm 17,86$  mg/kg sušiny (33 mg/kg čerstvé váhy). U vzorku vypěstovaného ve skleníku byla vypočtena koncentrace kemferolu  $303 \pm 14,76$  mg/kg sušiny (13 mg/kg čerstvé váhy) a množství kvercetinů  $61 \pm 7,18$  mg/kg sušiny (3 mg/kg čerstvé váhy).

Co se druhého osevu týče, tak u Sagami pěstované ve skleníku bylo naměřeno nejnižší množství celkového kvercetinů  $52 \pm 0,80$  mg/kg sušiny (2 mg/kg čerstvé váhy), obsah kemferolu byl  $416 \pm 23,09$  mg/kg sušiny (18 mg/kg čerstvé váhy). Odrůda vypěstovaná na záhoně obsahovala  $392 \pm 2,58$  mg/kg sušiny (28 mg/kg čerstvé váhy) kvercetinů a  $645 \pm 3,02$  mg/kg sušiny (46 mg/kg čerstvé váhy) kemferolu.

#### **5.1.2.3. Choy Sum**

V jarním osevu Choy Sum byla zjištěna nejnižší koncentrace kvercetinů  $49 \pm 4,50$  mg/kg sušiny (2 mg/kg čerstvé váhy), a to ve vzorku pěstovaném ve skleníku, množství kemferolu v sušině bylo rovněž nejnižší, konkrétně  $268 \pm 11,26$  mg/kg sušiny (13 mg/kg čerstvé váhy). Obsah kvercetinů u Choy Sum pěstované na záhoně byl



stanoven na  $542 \pm 29,96$  mg/kg sušiny (48 mg/kg čerstvé váhy) a obsah kemferolu byl  $748 \pm 26,28$  mg/kg sušiny (66 mg/kg čerstvé váhy).

Celkové obsahy kvercetinu a kemferolu byly v podzimním osevu této odrůdy vypěstované na záhoně poměrně podobné, první zmíněný flavonol dosáhl hodnoty  $461 \pm 35,00$  mg/kg sušiny (36 mg/kg čerstvé váhy) a druhý flavonol  $404 \pm 16,77$  mg/kg sušiny (32 mg/kg čerstvé váhy). Vzorek vypěstovaný ve skleníku vykazoval vyšší množství kemferolu, konkrétně  $515 \pm 27,68$  mg/kg sušiny (29 mg/kg čerstvé váhy), množství kvercetinu bylo vypočteno na  $63 \pm 1,29$  mg/kg sušiny (4 mg/kg čerstvé váhy).

#### **5.1.2.4. Tatsoi**

První osev Tatsoi vypěstovaný ve skleníku byl vyhodnocen následovně: celkový obsah kvercetinu  $51 \pm 2,25$  mg/kg sušiny (2 mg/kg čerstvé váhy), taktéž nejnižší koncentrace při přepočtu na čerstvou váhu, obsah kemferolu  $429 \pm 11,94$  mg/kg sušiny (21 mg/kg čerstvé váhy). V případě záhonu byla naměřeny hodnoty kvercetinu  $563 \pm 4,42$  mg/kg sušiny (49 mg/kg čerstvé váhy) a kemferolu  $619 \pm 0,07$  mg/kg sušiny (53 mg/kg čerstvé váhy).

Ve druhém osevu byla u Tatsoi, která byla pěstována ve skleníku, rovněž stanovena nízká koncentrace kvercetinu, a to  $68 \pm 1,19$  mg/kg sušiny (4 mg/kg čerstvé váhy), obsah kemferolu byl  $517 \pm 10,30$  mg/kg sušiny (31 mg/kg čerstvé váhy). Celková množství analyzovaných flavonolů, která byla u této odrůdy naměřena u vzorku vypěstovaném na záhoně, se rovnala  $452 \pm 2,82$  mg/kg sušiny (34 mg/kg čerstvé váhy) v případě kvercetinu a  $604 \pm 8,82$  mg/kg sušiny (45 mg/kg čerstvé váhy) v případě kemferolu.

#### **5.1.2.5. Porovnání obsahů ve skleníku**

Pokud budeme brát v potaz celkový obsah flavonoidů, nejvyšší koncentrace byla naměřena u Namenie vypěstované v jarním osevu, konkrétně 6,4 mg/100g čerstvé váhy. YANG R. Y. *et al.*, (2008) zkoumal ve své práci několik druhů asijské zeleniny, mezi nimi například Mizunu, u níž byl obsah flavonoidů stanoven na 9,7 mg/100g čerstvé váhy, dále můžeme zmínit rukolu, ve které bylo vypočteno 45,2 mg/100g čerstvé váhy, to je téměř šestinásobek mnou naměřené koncentrace.

Nejnižší stanovené množství bylo zjištěno rovněž při prvním osevu, a to u odrůdy Choy Sum, přesněji 1,5 mg/100g čerstvé váhy. Tuto zeleninu je možné porovnat s prací DU Y. *et al*, (2022), kde byl stanoven celkový obsah flavonoidů na 3,2 mg/100g čerstvé váhy.

#### 5.1.2.6. Porovnání obsahů na záhoně

Nejvyšší množství celkových flavonoidů bylo vyzkoumáno taktéž u Namenie z podzimního osevu, jeho hodnota byla stanovena na 19,8 mg/100g čerstvé váhy. V porovnání s CHO M. J. *et al*, (2008), kde byly popisovány celkové koncentrace flavonoidů v pěti odrůdách špenátu a hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 180,5 do 370,3 mg/100g čerstvé váhy, je mnou stanovený obsah 9x až takřka 19x nižší.

U odrůdy Sagami vypěstované v jarním osevu, byl změřen nejnižší celkový obsah 3,7 mg/100g čerstvé váhy. Tento výsledek lze přiřadit k podobnému výsledku Pak Choi z výzkumu CAO J. *et al*, (2010), kde byla celková koncentrace 4 mg/100g čerstvé váhy.

#### 5.1.3. Rok 2021

V roce 2021 byl vlivem epidemiologických opatření zamezen vývoz osiv z Číny, proto bylo k dispozici omezené množství vzorků k analýze, konkrétně pouze Namenia a Tatsoi. První osev se uskutečnil v období od 14.5. do 25.6. a druhý osev probíhal v době mezi 19.8. až 1.10.

Jarní osev	Vzorek	Čerstvý materiál (g)	Lyofilizovaný materiál (g)	Sušina (%)
Skleník	Namenia	303,76	16	5,27
	Tatsoi	178,8	9,25	5,17
Záhon	Namenia	146,41	12,82	8,76
	Tatsoi	143,92	11,57	8,04

Tabulka 8. Stanovení sušiny materiálu v jarním osevu 2021

Podzimní osev	Vzorek	Čerstvý materiál (g)	Lyofilizovaný materiál (g)	Sušina (%)
Skleník	Namenia	115,62	7,81	6,75
	Tatsoi	79,08	4,75	6,01
Záhon	Namenia	32,39	2,76	8,52
	Tatsoi	4,1	0,51	12,44

Tabulka 9. Stanovení sušiny materiálu v podzimním osevu 2021

### 5.1.3.1. Namenia

V jarním osevu bylo zjištěno největší množství kemferolu, a to u Namenie vypěstované na záhoně, jeho hodnota činila  $1484 \pm 4,31$  mg/kg sušiny, koncentrace kvercetinu byla stanovena na  $630 \pm 7,41$  mg/kg sušiny. Oproti tomu ve skleníku byl naměřen nejnižší obsah kvercetinu, pouze  $53 \pm 5,51$  mg/kg sušiny, hodnota kemferolu byla  $629 \pm 52,78$  mg/kg sušiny.

Namenia vypěstovaná v podzimním osevu na záhoně vykazovala největší množství kvercetinu, a to  $1004 \pm 32,06$  mg/kg sušiny, zatímco obsah kemferolu byl vypočten na  $749 \pm 0,17$  mg/kg sušiny. Koncentrace kemferolu u této odrůdy byla rovněž velmi vysoká při pěstování ve skleníku, přesněji  $1283 \pm 6,26$  mg/kg sušiny, nicméně hodnota kvercetinu byla zřetelně nižší,  $127 \pm 0,09$  mg/kg sušiny.

### 5.1.3.2. Tatsoi

Velmi nízký obsah kvercetinu,  $75 \pm 2,21$  mg/kg sušiny, byl zaznamenán v prvním osevu u Tatsoi pěstované ve skleníku, kemferol byl stanoven na  $554 \pm 50,36$  mg/kg sušiny. Koncentrace kvercetinu byla vyšší u venkovně vypěstované odrůdy, konkrétně  $611 \pm 22,43$  mg/kg sušiny a koncentrace kemferolu byla  $761 \pm 31,43$  mg/kg sušiny.

Tatsoi ve druhém osevu vypěstovaná ve skleníku obsahovala nejnižší množství kvercetinu,  $62 \pm 2,22$  mg/kg sušiny, obsah kemferolu byl vypočten na  $489 \pm 11,16$  mg/kg sušiny. Oproti tomu byla na záhoně naměřena nejnižší hodnota kemferolu s výsledkem

437±27,89 mg/kg sušiny a téměř totožné množství kvercetinu, a to 441±32,68 mg/kg sušiny.

### 5.1.3.3. Porovnání obsahů ve skleníku

V podzimním osevu Namenie vykázala největší množství obou sledovaných flavonoidů, celkový kvercetin byl stanoven na 127±0,09 mg/kg sušiny a celkový kemferol na 1283±6,26 mg/kg sušiny. Podle BELL L. *et al*, (2015) byl rochetě seté (*Eruca sativa*) stanoven nejvyšší obsah kvercetinu na 700 mg/kg sušiny a 1100 mg/kg sušiny kemferolu, koncentrace kvercetinu je tedy oproti mnou zjištěnému množství mnohem vyšší.

Nejméně kvercetinu bylo nalezeno taktéž u Namenie, ale v jarním osevu, kdy se jeho koncentrace určila na 53±5,51 mg/kg sušiny. Nejnížší obsah kemferolu byl ve druhém osevu Tatsoi, jehož hodnota byla vyhodnocena na 489±11,16 mg/kg sušiny. Pro srovnání, GIORDANO M. *et al*, (2022) stanovil ve svém výzkumu červeného salátu koncentraci kvercetinu na 752 mg/kg sušiny, nicméně obsah kemferolu byl mnohonásobně nižší, pouze 7 mg/kg sušiny.

### 5.1.3.4. Porovnání obsahů na záhoně

Během pěstování na záhoně byly stanoveny nejvyšší koncentrace kvercetinu a kemferolu rovněž u Namenie. Obsah kvercetinu 1004±32,06 mg/kg sušiny se nacházel u podzimního osevu, zatímco 1283±6,26 mg/kg sušiny kemferolu se vyskytovalo u jarního osevu. FRIEDBERGEROVÁ M., (2020) ve své bakalářské práci zjistila obsah kvercetinu 1360±8,01 mg/kg sušiny a obsah kemferolu 993±5,07 mg/kg sušiny, obě hodnoty byly platné pro Namenii v podzimním osevu.

Co se nejmenších obsahů týče, obsahoval je podzimní osev odrůdy Tatsoi, a to 441±32,68 mg/kg sušiny kvercetinu, kemferolu bylo přesněji 437±27,89 mg/kg sušiny. Podle FRIEDBERGEROVÁ M., (2020) byla koncentrace kemferolu vypočtena na 418±4,87 mg/kg sušiny, zatímco obsah kvercetinu u tytéž odrůdy byl vyšší, 704±8,7 mg/kg sušiny.

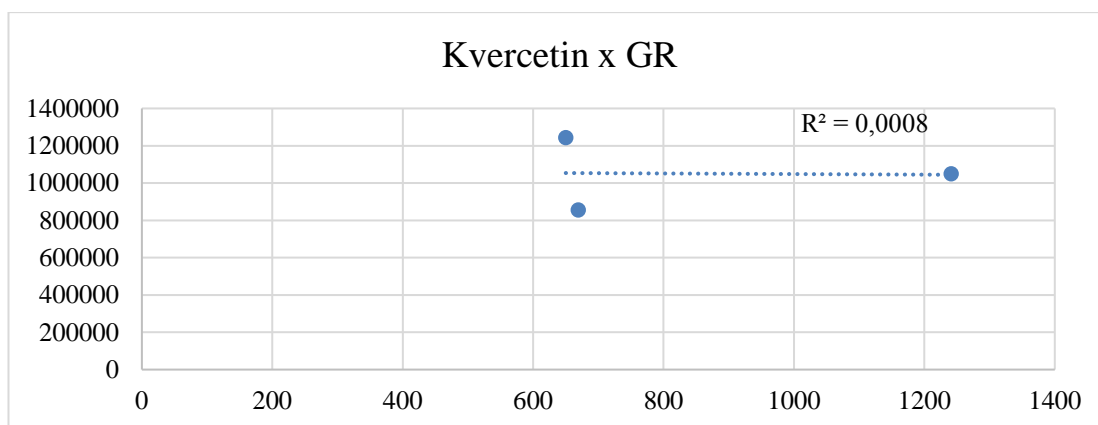
## 5.2. Korelace se slunečním zářením

Vzhledem k absenci potřebných meteorologických údajů byly pro korelaci s absorbovaným slunečním zářením použity pouze hodnoty stanovených flavonoidů odrůdy Namenie vypěstované na záhoně, a to z jarních osevů 2018 (tyto hodnoty byly použity z mé bakalářské práce), dále 2019 a 2020. Korelace se prováděla konkrétně s dvěma veličinami – globální radiací (GR) a fotosynteticky aktivní radiací (PAR). Celkové hodnoty GR a PAR byly vypočítány jako sumy hodnot pro vyznačené období pěstování.

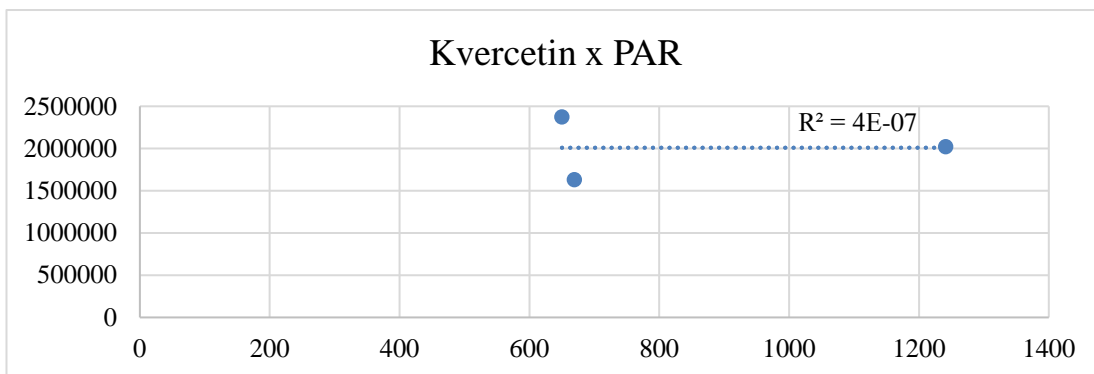
### 5.2.1. Korelace obsahu kvercetinu s meteorologickými údaji

Rok	Celkový obsah kvercetinu [mg/kg sušiny]	Globální radiace (GR) [W·m <sup>-2</sup> ]	Fotosynteticky aktivní radiace (PAR) [μmol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup> ]
2018	650	1244805,3	2375640,6
2019	1241	1050785,8	2021965,47
2020	669	856213,7	1630933,5

Tabulka 10. Množství kvercetinu a absorbovaného záření



Obrázek 19. Korelační závislost obsahu kvercetinu na globální radiaci

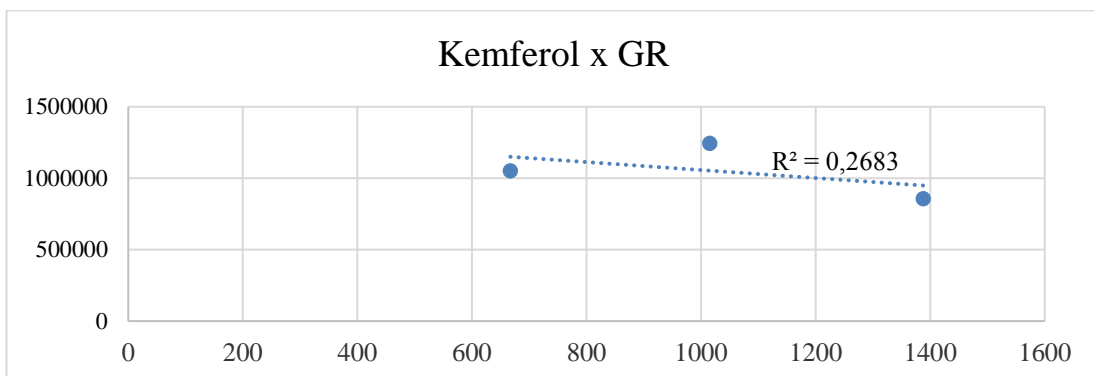


Obrázek 20. Korelační závislost obsahu kvercetinu na fotosynteticky aktivní radiaci

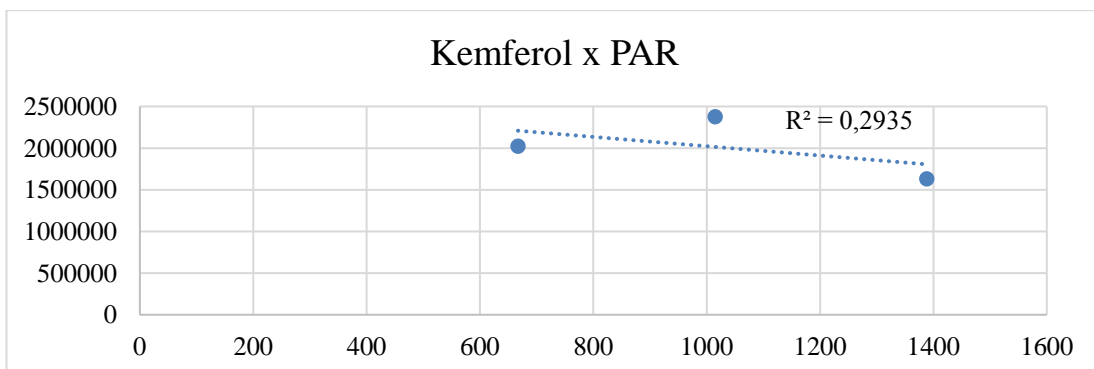
### 5.2.2. Korelace obsahu kemferolu s meteorologickými údaji

Rok	Celkový obsah kemferolu [mg/kg sušiny]	Globální radiace (GR) [W·m <sup>-2</sup> ]	Fotosynteticky aktivní radiace (PAR) [μmol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup> ]
2018	1015	1244805,3	2375640,6
2019	667	1050785,8	2021965,47
2020	1388	856213,7	1630933,5

Tabulka 11. Množství kemferolu a absorbovaného záření



Obrázek 21. Korelační závislost obsahu kemferolu na globální radiaci



Obrázek 22. Korelační závislost obsahu kemferolu na fotosynteticky aktivní radiaci

Z výše uvedených grafů je patrné, že celkové obsahy stanovovaných flavonoidů, tedy kvercetinů či kemferolů, nejsou v korelaci s absorbovanými hodnotami slunečního záření, ať již s globální radiací, tak s fotosynteticky aktivní radiací. Problematika závislosti obsahu vybraných fenolických látek na množství a kvalitě dopadajícího záření je komplikovaná.

## 6. Závěr

Diplomová práce je členěna na literární rešerši, ve které byla s pomocí odborné literatury zpracována kapitola na téma netradičních odrůd asijské listové zeleniny, její charakteristiky, pěstování a využití. Druhá kapitola byla věnována biosyntéze polyfenolických látek a účinkům flavonoidů v rostlinách. Třetí kapitola se zabývala účinky flavonoidů na lidské zdraví. Ve třetí kapitole byly představeny základní charakteristiky sledovaných meteorologických veličin, jako je globální a fotosynteticky aktivní radiace, dále je v návaznosti představena fotosyntéza, jakožto nejdůležitější fyziologický proces a poslední kapitola popisuje použitou analytickou separační metodu – UHPLC.

Pro analýzu biologicky aktivních látek bylo vybráno celkem pět druhů neobvyklé asijské zeleniny – *Namenia*, *Sagami*, *Golden Lion*, *Choy Sum* a *Tatsoi*, které byly pěstované v různých režimech v místních podmínkách na pokusném školním pozemku Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, v letech 2019-2021 ve dvou osevech – jaro a podzim, na dvou stanovištích – skleníku a záhonu. Po sklizni byl materiál očištěn, usušen, namlet a lyofilizován.

V praktické části byly pomocí ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie zkoumány obsahy flavonolů, konkrétně kvercetin a kemferol ve vzorcích výše zmíněných vzorků. Můžeme říct, že se celkově vyšší koncentrace sledovaných flavonoidních aglykonů vyskytovaly během podzimních osevů při pěstování na záhoně.

Nejvyšší obsah celkového kvercetin  $1241 \pm 18,97$  mg/kg sušiny byl zjištěn u jarního osevu *Namenie* během pěstování na záhoně, a to v roce 2019. Rovněž největší obsah celkového kemferolu  $1753 \pm 42,61$  mg/kg sušiny byl zjištěn *Namenie*, tentokrát se jednalo o podzimní osev roku 2020, rovněž na záhoně. Při přepočtu na čerstvou hmotu získáme stejné výsledky, hodnota u kvercetin byla  $103$  mg/kg čerstvé váhy a u kemferolu  $142$  mg/kg čerstvé váhy.

Na druhou stranu nejnižší koncentrace se vyskytovaly z převážné většiny během pěstování ve skleníku, a to rovněž při podzimních osevech. Sledováním celkového kvercetin byla stanovena minimální hodnota  $35 \pm 0,37$  mg/kg sušiny u odrůdy *Golden Lion* vypěstované ve skleníku při podzimním osevu roku 2019 a nejnižší koncentrace kemferolu byla vypočtena na  $129 \pm 5,73$  mg/kg sušiny u tytéž



odrůdy za stejných podmínek. Pokud bychom opět brali v potaz přepočet na čerstvou hmotu, byla nejnižší stanovená koncentrace kvercetinu 2 mg/kg čerstvé váhy, nicméně této hodnoty se podařilo dosáhnout hned několikrát, vždy během pěstování ve skleníku, konkrétně u podzimního osevu Golden Lion v roce 2019, dále v jarním osevu roku 2020 u odrůd Choy Sum a Tatsoi, a poté v podzimním osevu Sagami, také v roce 2020. Co se kemferolu týče, jeho nejnižší obsah 4 mg/kg čerstvé hmoty byl zjištěn při jarním osevu odrůdy Sagami vypěstované na záhoně v roce 2020.

## 7. Použitá literatura

AGATI G., STEFANO G., BIRICOLTI S., TATTINI M., (2009): Mesophyll distribution of ,antioxidant‘ flavonoids in *Ligustrum vulgare* leaves under contrasting sunlight irradiance. *Annals of Botany*, 104 (5): 853-861. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp177>

AGATI G., TATTINI M., (2010). Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytologist*, 186 (4): 786–793. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03269.x>

AKITSU T., KUME A., HIROSE Y., IJIMA O., NASAHARA K. N., (2015): On the stability of radiometric ratios of photosynthetically active radiation to global solar radiation in Tsukuba, Japan. *Agricultural and Forest Meteorology*, 209-210: 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2015.04.026>

ASHOK K., GAUTAM S., ANROOP N., RISHBHA S., (2012): UPLC: A preeminent technique in pharmaceutical analysis. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 69 (3): 371-380.

BASHARAT R., KOTRA V., YEN LOONG L., MATHEWS A., MAHAMADSA KANAKAL M., PRAVEENA DEVI CH. B., NYAMATHULLA S., VARALA R., MING L. CH., SAMBASIVA RAO KRS, HARI BABU B., MUJAHID ALAM M., (2021): Ultra Performance Liquid Chromatography (Mini-Review). *Oriental Journal of Chemistry*, 37 (4): 847-857. <http://dx.doi.org/10.13005/ojc/370411>

BEALE S. I., (1999): Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynthesis Research*, 60: 43-73.

BELL L., ORUNA-CONCHA M. J., WAGSTAFF C., (2015): Identification and quantification of glucosinolate and flavonol compounds in rocket salad (*Eruca sativa*, *Eruca vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*) by LC-MS: Highlighting the potential for improving nutritional value of rocket crops. *Food Chemistry*, 172: 852-861. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.116>

- BLOCK G., PATTERSON B., SUBAR A., (1992): Fruit, vegetables, and cancer prevention: A Review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer*, 18 (1): 1–29. <https://doi.org/10.1080/01635589209514201>
- BRAVO L., (1998): Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56 (11): 317–333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
- BOND C., TANG Y., LI L., (2016): *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for mining, studying and engineering fungal polyketide synthases. *Fungal Genetics and Biology*, 89: 52-61. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.01.005>
- BRIGGS W. R., OLNEY M. A., (2001): Photoreceptors in Plant Photomorphogenesis to Date. Five Phytochromes, Two Cryptochromes, One Phototropin, and One Superchrome. *Plant Physiology*, 125 (1): 85-88. <https://doi.org/10.1104/pp.125.1.85>
- CAO J., CHEN W., ZHANG Y., ZHANG Y., ZHAO X., (2010): Content of Selected Flavonoids in 100 Edible Vegetables and Fruits. *Food Science*, 16 (5): 395-402. <https://doi.org/10.3136/fstr.16.395>
- CARTEA M. E., FRANCISCO M., SOENGAS P., VELASCO P., (2011). Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. *Molecules*, 16 (1), 251–280. <https://doi.org/10.3390/molecules16010251>
- COOK N. C., SAMMAN S., (1996): Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7 (2): 66–76. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(95\)00168-9](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(95)00168-9)
- DADÁKOVÁ E., KALINOVÁ J., (2010): Determination of quercetin glycosides and free quercetin in buckwheat by capillary micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Separation Science*, 33: 1633-1638. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900809>
- DADÁKOVÁ E., PROCHÁZKOVÁ E., KRÍŽEK M., (2001): Application of micellar electrokinetic capillary chromatography for quantitative analysis of quercetin in plant materials. *Electrophoresis*, 22: 1573-1578. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200105\)22:8<1573::AID-ELPS1573>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200105)22:8<1573::AID-ELPS1573>3.0.CO;2-B)
- DEHKHARGHANIAN M., ADENIER H., VIJAYALAKSHMI M. A., (2010): Study of flavonoids in aqueous spinach extract using positive electrospray ionisation tandem

quadrupole mass spektrometry. *Food Chemistry*, 121 (3): 863-870.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.007>

DU Y., TAN W. K., ZOU L., LEI J., ONG CH.N., (2022): New insights into the phenolic constituents and their relationships with antioxidant capacity during the growth of a commonly consumed Asian vegetable, *Brassica rapa* var. *parachinensis* (choy sum). *Food Chemistry Advances*, 1: 100038.  
<https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100038>

DUPONT M. S., MONDIN Z., WILLIAMSON G., PRICE K. R., (2000). Effect of variety, processing and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (9): 3957–3964.  
<https://doi.org/10.1021/jf0002387>

FEINBAUM R. L., STORZ G., AUSUBEL F. M., (1991): High intensity and blue light regulated expression of chimeric chalcone synthase genes in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. *Molecular and General Genetics*, 226: 449-456.

FERRER J.-L., AUSTIN M. B, STEWART C. Jr., NOE, J. P., (2008): Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46 (3): 356–370.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.009>

FRIEDBERGEROVÁ M., (2020): Biologicky aktivní látky v netradiční listové zelenině [Bakalářská práce]. České Budějovice, 50 s. Jihočeská univerzita, Pedagogická fakulta, katedra aplikované chemie.

FUGLEVAND G., JACKSON J. A., JENKINS G. I., (1996): UV-B, UV-A, and blue light signal transduction pathways interact synergistically to regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 8 (12): 2347-2357.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.8.12.2347>

GARCÍA-RODRÍGUEZ A., GRANADOS-LÓPEZ D., GARCÍA-RODRÍGUEZ S., DÍEZ-MEDIAVILLA M., ALONSO-TRISTÁN C., (2021): Modelling Photosynthetic Active Radiation (PAR) through meteorological indices under all sky conditions. *Agricultural and Forest Meteorology*, 310: 1-9.  
<https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2021.108627>

- GILIBERTO L., PERROTTA G., PALLARA P., WELLER J. L., FRASER P. D., BRAMLEY P. M., FIORE A., TAVAZZA M., GIULIANO G., (2005): Manipulation of the Blue Light Photoreceptor Cryptochrome 2 in Tomato Affects Vegetative Development, Flowering Time, and Fruit Antioxidant Content. *Plant Physiology*, 137 (1): 199-208. <https://doi.org/10.1104/pp.104.051987>
- GIORDANO M., EL-NAKHEL CH., CARILLO P., COLLA G., GRAIANI G., DI MOLA I., MORI M., KYRIACOU M. C., ROUPHAEL Y., SOTERIOU G. A., SABATINO L., (2022): Plant-Derived Biostimulants Differentially Modulate Primary and Secondary Metabolites and Improve the Yield Potential of Red and Green Lettuce Cultivars. *Agronomy*, 12 (6): 1361. <https://doi.org/10.3390/agronomy12061361>
- GUO J., HAN W., WANG M., (2008): Ultraviolet and environmental stresses involved in the induction and regulation of anthocyanin biosynthesis: a review. *African Journal of Technology*, 7 (25): 4966-4972.
- HARBORNE J. B., WILLIAMS CH. A., (2000): Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55: 481–504. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00235-1)
- HERMANN K. M., (1995): The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *The Plant Cell*, 7 (7): 909–919. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.907>
- CHO M. J., HOWARD L. R., PRIOR R. L., MORELOCK T. (2008). Flavonoid content and antioxidant capacity of spinach genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88 (6): 1099–1106. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3206>
- CHRISTIE J. M., JENKINS G. I., (1996): Distinct UV-B and UV-A/blue light signal transduction pathways induce chalcone synthase gene expression in Arabidopsis cells. *The Plant Cell*, 8 (9): 1555-1567. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.9.1555>
- KIDD P. S., LLUGANY M., POSCHENRIEDER C., GUNSE B., BARCELÓ J., (2001): The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three variety of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*, 52: 1339-1352. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.359.1339>
- KINCL M., KRPEŠ V., (2006): Základy fyziologie rostlin. Ostrava. 220 s. ISBN 80-239-8375-X.

- KRIZEK D. T., BRITZ S. J., MIRECKI R. M., (1998): Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. New Red Fire lettuce. *Physiologia Plantarum*, 103 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1030101.x>
- KYRIACOU M. C., EL-NAKHEL CH., GRAZIANI G., PANNICO A., SOTERIOU G. A., GIORDANO M., RITIENI A., DE PASCALE S., ROUPHAEL Y., (2019): Functional quality in novel food sources: Genotypic variation in the nutritive and phytochemical composition of thirteen microgreens species. *Food Chemistry* 277: 107-118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.098>
- LI Z., LEE H. W., LIANG X., LIANG S., WANG Q., HUANG D., ONG CH. N., (2018): Profiling of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of 12 Cruciferous Vegetables. *Molecules*, 23 (5): 1139. <https://doi.org/10.3390/molecules23051139>
- LIEN E. J., REN S., BUI H.-H., WANG R., (1999): Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (3-4): 285–294. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00190-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00190-7)
- LLORACH R., MARTÍNEZ-SANCHÉZ A., TOMÁS-BARBERÁN F. A., GIL M. I., FERRERES F., (2008): Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chemistry*, 108 (3): 1028–1038. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.032>
- MACKERNESS S. A. H., JOHN C. F., JORDAN B., THOMAS B., (2001): Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Letters*, 489 (2-3): 237-42. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02103-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02103-2)
- MANCINELLI A. L., (1986): Comparison of Spectral Properties of Phytochromes from Different Preparations. *Plant Physiology*, 82 (4): 956-961. <https://doi.org/10.1104/pp.82.4.956>
- MARKHAM K. R., RYAN K. G., BLOOR S. J., MITCHELL K. A., (1998): An increase in luteolin: apigenin ratio in *Marchantia polymorpha* on UV-B enhancement. *Phytochemistry*, 48 (5): 791-794. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00875-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00875-3)
- MOBH S., (1939): Research for Vitamin P. *The Journal of Biochemistry*, 29 (3): 487–501.

- NARWATE B. M., GHULE P. J., GHULE A. V., DARANDALE A. S., WAGH J. G., (2014): Ultra Performance Liquid Chromatography: A new revolution in Liquid Chromatography. *International Journal of Pharmaceutics and Drug Analysis*, 2 (1): 25-34.
- NOROOZI M., ANGERSON W. J., LEAN M. E., (1998): Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 67 (6): 1210–1218. <https://doi.org/10.1093/ajcn/67.6.1210>
- OLIVER J. E., (2005): Encyclopedia of World Climatology. Dordrecht, The Netherlands Springer. 854 s. ISBN 978-1-4020-3266-0.
- PEER W. A., MURPHY A. S., (2007): Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators. *Trends in Plant Science*, 12 (12): 556-563. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.10.003>
- PROCHÁZKA S., MACHÁČKOVÁ I., KREBULE J., ŠEBÁNEK J. *et al*, (1998): Fyziologie rostlin. Praha. Academia. 484 s. ISBN 80-200-0586-2.
- RICE-EVANS C., MILLER N., PAGANGA G., (1997): Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2 (4): 152–159. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2)
- ROBERTS M. R., PAUL N. D., (2006): Seduced by the dark side: integrating molecular and ecological perspectives on the influence of light on plant defence against pest and pathogens. *New Phytologist*, 170 (4): 677–99. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01707.x>
- ROGE A. B., FIRKE S. N., DHANE R. M., GUNJKAR V. J., VADVALKAR S. M., (2011): Novel Achievement of HPLC: UPLC. *International Journal of PharmTech Research*, 3 (3): 1423-1429.
- ROMANI A., PINELLI P., GALARDI C., SANI G., CIMATO A., HEIMLER D., (2002): Polyphenols in greenhouse and open-air-grown lettuce. *Food Chemistry*, 79: 337-342. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00170-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00170-X)
- ROSS J. A., KASUM CH. M., (2002): Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annual Review of Nutrition*, 22: 19-34.

- ROZEMA J., VAN DE STAAIJ J., BJÖRN L. O., CALDWELL M., (1997): UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Trends in Ecology & Evolution*, 12 (1): 22-28. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(96\)10062-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(96)10062-8)
- RYAN K. G., MARKHAM K. R., BLOOR S. J., BRADLEY J. M., MITCHELL K. A., JORDAN B. R., (1998): UV-B radiation induces increase in quercetin: kaempferol ratio in wild-type and transgenic lines of *Petunia*. *Photochemistry & Photobiology*, 68 (3): 323-330. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1998.tb09689.x>
- RYPLOVÁ R., (2014): Fyziologie rostlin. Skriptum pro studující Učitelství přírodopisu pro 2. stupeň ZŠ. České Budějovice. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, pedagogická fakulta. 113 s. ISBN 978-80-7394-499-5.
- SOBÍŠEK B., (1993): Meteorologický slovník výkladový a terminologický. Praha. Academia. 594 s. ISBN 80-85368-45-5.
- TAYLOR L. P., GROTEWOLD E., (2005): Flavonoids as developmental regulators. *Current Opinion in Plant Biology*, 8 (3): 317-323. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.03.005>
- VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J., (2009): Chemie potravin II. Tábor. OSSIS. 644 s. ISBN 978-80-86659-16-9.
- VYSOUDIL M., (2006): Základy fyzické geografie 1: Meteorologie a klimatologie. Olomouc. Univerzita Palackého v Olomouci, přírodovědecká fakulta. 281 s. ISBN 80-244-1455-4.
- WINKEL-SHIRLEY B., (2002): Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Plant Biology*, 5: 218–223. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00256-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00256-X)
- YAMASAKI H., SAKIHAMA Y., IKEHARA N., (1997): Flavonoid–peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Plant Physiology*, 115 (4): 1405-1412. <https://doi.org/10.1104/pp.115.4.1405>
- YANG R. Y., LIN S., KUO G., (2008): Content and distribution of flavonoids among 91 edible plant species. *Journal Clinical Nutrition*, 17: 275-279.
- YANLIN W., GUODONG L., (2020): Production Guide for Choy Sum – An Emerging Asian Vegetable in Florida. Dostupné online na adrese: <https://edis.ifas.ufl.edu/publication/HS1380>



ZHOU B., LI Y., XU Z., YAN H., HOMMA S., KAWABATA S., (2007): Ultraviolet A-specific induction of anthocyanin biosynthesis in the swollen hypocotyls of turnip (*Brassica rapa*). *Journal of Experimental Botany*, 58 (7): 1771-1781.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erm036>

<https://www.osiva-semena.cz/ostatni/1016-namenia-brassica-rapa-osivo-namenie-200-ks.html>, staženo dne 22.06.2022.

<https://www.semena.cz/ostatni-asijska-zelenina/1016-namenia-brassica-rapa-semena-200-ks.html>, staženo dne 22.06.2022.

<https://www.osiva-semena.cz/ukoncene-produkty/1877-pak-choi-sagami-brassica-rapa-var-rosularis-osivo-pak-choi-150-ks.html>, staženo dne 22.06.2022.

<https://www.semena.cz/ukoncene-produkty/2118-pak-choi-cinske-zeli-sagami-brassica-rapa-var-rosularis-semena-150-ks.html>, staženo dne 22.06.2022.

<https://www.osiva-semena.cz/ukoncene-produkty/1609-pak-choi-golden-lion-asijska-zelenina-prodej-semen-asijske-zeleniny-02-gr.html>, staženo dne 22.06.2022.

<https://www.semena.cz/ukoncene-produkty/1638-pak-choi-zlaty-lev-brassica-chinensis-semena-02-g.html>, staženo dne 22.06.2022.

<https://www.osiva-semena.cz/ostatni/1216-choi-sum-fuubi-brassica-parachinensis-osivo-asijske-zeleniny-100-ks.html>, staženo dne 22.06.2022.

<https://www.semena.cz/ostatni-listova-zelenina/1226-choi-sum-fubbi-brassica-parachinensis-semena-choi-sum-100-ks.html>, staženo dne 22.06.2022.

<https://www.nasezahrada.com/tatsoi-tenhle-asijsky-salat-muzete-sklizet-po-cely-rok/>, staženo dne 22.06.2022.

<https://www.osiva-semena.cz/ostatni/1230-tatsoi-brassica-rapa-var-rosularis-osivo-tatsoi-100-ks.html>, staženo dne 22.06.2022.

<https://www.semena.cz/ostatni-asijska-zelenina/1230-tatsoi-brassica-rapa-var-rosularis-semena-100-ks.html>, staženo dne 22.06.2022.

<http://www.hplc.cz/UPLC/>, staženo dne 19.06.2022.

<https://www.chromservis.eu/c/uhplc-in-details?lang=CZ>, staženo dne 19.06.2022.

Zdroje obrázků:

*Obrázek 1. Schéma šikimátové dráhy*

[http://orion.chemi.muni.cz/e\\_learning/=Texty/28-](http://orion.chemi.muni.cz/e_learning/=Texty/28-Sekund%C3%A1rn%C3%AD%20metabolity/28-SekundMetab-1.htm)

[Sekund%C3%A1rn%C3%AD%20metabolity/28-SekundMetab-1.htm](http://orion.chemi.muni.cz/e_learning/=Texty/28-Sekund%C3%A1rn%C3%AD%20metabolity/28-SekundMetab-1.htm), staženo dne 24.06.2022.

*Obrázek 2. Schéma biosyntézy flavonoidů* KOES R. E., QUATTROCCHIO F., MOL J. N. M., (1994): The flavonoid biosynthetic pathway in plants: Function and evolution. *BioEssays*, 16 (2): 123-132. <https://doi.org/10.1002/bies.950160209>, staženo dne 24.06.2022.

*Obrázek 3. Celková energetická bilance* <https://gpm.nasa.gov/education/lesson-plans/global-energy-budget>, staženo dne 25.06.2022.

*Obrázek 4. Schéma elektromagnetického záření*

<https://www.cyberphysics.co.uk/topics/light/emspect.htm>, staženo dne 25.06.2022.

*Obrázek 5. Pyranometr CMP11* <https://www.kippzonen.com/Product/13/CMP11-Pyranometer>, staženo dne 25.06.2022.

*Obrázek 6. Struktura chlorofylu a, b, d*

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=6337441>, staženo dne 26.06.2022.

*Obrázek 7. Schéma kapalinového chromatografu*

<https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>, staženo dne 28.06.2022.