

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra chemie**



**Vliv stresového faktoru sucha na obsah glykoalkaloidů  
brambor (*Solanum tuberosum* L.)**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Vendula Matoušková**

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

© 2016 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv stresového faktoru sucha na obsah glykoalkaloidů brambor (*Solanum tuberosum* L.)" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 8.4.2016

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Zoře Kotíkové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a pomoc při psaní této diplomové práce. Dále děkuji rodině za podporu během celého mého studia.

# Vliv stresového faktoru sucha na obsah glykoalkaloidů brambor (*Solanum tuberosum* L.)

## Souhrn

Brambory jsou významná a nezastupitelná plodina. Důležité jsou jak z hlediska jejich použití, tak jejich příznivého nutričního složení. Dále jsou význačným zdrojem vitamínů, minerálních látek a antioxidantů. Mimo látek zdraví prospěšných obsahují brambory i látky škodlivé. Jsou to látky cizorodé nebo přirozeně se vyskytující, kam patří toxické glykoalkaloidy. Glykoalkaloidy jsou sekundární metabolity rostlin. Glykoalkaloidy brambor mají v rostlině ochrannou funkci, zvýší svoji syntézu za stresových podmínek např. při napadení škůdci, mechanickém poškození nebo za zvýšeného světla a tepla. V bramborách bylo zjištěno několik glykoalkaloidů. Hlavní, které tvoří 95 % jejich obsahu, jsou  $\alpha$ -chaconin a  $\alpha$ -solanin. Jejich toxicita spočívá v inhibici acetylcholinesterázy a porušováním buněčných membrán. V hlíze bramboru je jejich obsah rozložen nerovnoměrně. Obsah glykoalkaloidů brambor je ovlivněn mnoha faktory, jako jsou například stanoviště, ročník, odrůda, způsob pěstování a skladování. V České republice je maximální přípustný limit glykoalkaloidů stanoven legislativou na 200 mg/kg čerstvé hmoty brambor. V běžně pěstovaných odrůdách jejich množství zdaleka nedosahuje stanovenému hygienickému limitu. Metody stanovení glykoalkaloidů v bramboru jsou hlavně chromatografické. Nejčastěji se používá HPLC (vysoce účinná kapalinová chromatografie). V provedeném pokusu se stanovil obsah majoritních glykoalkaloidů  $\alpha$ -chaconinu a  $\alpha$ -solaninu u čtyř odlišných odrůd – Milva, Marabel, Laura a Valfí. Zkoumal se stres suchem na jejich obsah za předpokladu jejich kumulace v porovnání s dvěma dalšími variantami – závlaha zaléváním a kapková závlaha. Obsahy glykoalkaloidů byly změřeny metodou UHPLC/MS/MS. Ze získaných výsledků se dospělo k závěru, že obsah glykoalkaloidů je odrůdově závislý. Stres suchem nejspíš může zvyšovat jejich obsah. V našem pokusu se to jednoznačně neprokázalo. Důležitý je výběr odrůdy za podmínek teplého a suchého ročníku pěstování. Vhodné pro tyto podmínky se ukázaly odrůdy Milva a Marabel. Za předpokladu dodržení obecných zásad pro pěstování, skladování a kulinární úpravy, nepředstavují glykoalkaloidy pro konzumenta riziko.

**Klíčová slova:** brambory, glykoalkaloidy, solanin, chaconin, UHPLC/MS/MS, stres suchem

# **Effect of drought stress factor on glycoalkaloid contents in potato (*Solanum tuberosum* L.)**

## **Summary**

Potatoes are an important and irreplaceable crop. This kind of crop is very important not only for its use but also for its nutrition composition. There are also a prominent source of vitamins, minerals and antioxidants. Outside substances beneficial to health and potatoes contain harmful substances. These substances are foreign or naturally occurring, which include toxic glycoalkaloids. Glycoalkaloids are secondary metabolites of plants. Glycoalkaloids in potatoes have protective function it can increase the synthesis for example in case of pest infestations, mechanical damage or in case of too much light and heat. The potatoes were found several glycoalkaloids. Main, which constitutes 95 % of their content, are  $\alpha$ -chaconine and  $\alpha$ -solanine. Their toxicity is inhibition of acetylcholinesterase and breaking the cell membranes. The potato tuber its content is distributed unevenly. The quantity of glycoalkaloids is affected by many factors as for example place, year, kind, the way how the crops are grown and storage. In Czech Republic the maximum allowed limit of glycoalkaloids in potatoes were made by legislation on 200 mg/kg fresh potato matter. In the commonly grown varieties of the amount is far below the hygienic limit. The methods for isolation of glycoalkaloids in potatoes are mainly chromatographic. The most commonly used HPLC (high performance liquid chromatography). In performed experiment was determined the content of majority glycoalkaloid  $\alpha$ - chaconinu and  $\alpha$ -solaninu at four different kinds - Milva, Marabel, Laura and Valfi. Drought stress has been studied for their content, assuming their accumulation in comparison with the other two variants - irrigation watering and drip irrigation. The glycoalkaloids content were measured by the UHPLC/MS/MS. The obtained results concluded that the content of glycoalkaloids is the variety dependent. Drought stress can probably increase their content. In our experiment, it positively did not. Important is the choice of kind in case if expectation a hot and dry year of growing. Kinds Milva and Marabel are very good in these conditions. In the case of general principles for cultivation, storage and cooking, the glycoalkaloids does not vision a risk for the consumer.

**Keywords:** potatoes, glycoalkaloids, solanine, chaconine, UHPLC / MS / MS, drought stress

# Obsah

<b>1 Úvod.....</b>	<b>8</b>
<b>2 Cíl práce.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Vědecké hypotézy.....</b>	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Lilek brambor (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....</b>	<b>10</b>
<b>3.2 Chemické složení bramboru.....</b>	<b>10</b>
3.2.1 Sacharidy.....	10
3.2.2 Bílkoviny.....	11
3.2.3 Tuky.....	11
3.2.4 Vitamíny.....	11
3.2.5 Barviva.....	12
3.2.6 Minerální látky.....	12
3.2.7 Antioxidanty.....	12
3.2.8 Rizikové látky.....	13
<b>3.3 Glykoalkaloidy.....</b>	<b>13</b>
3.3.1 Chemická charakteristika glykoalkaloidů.....	13
3.3.2 Glykoalkaloidy brambor.....	14
3.3.3 Distribuce glykoalkaloidů v rostlině.....	16
3.3.4 Toxický účinek.....	17
3.3.5 Příznivé účinky.....	18
3.3.6 Faktory ovlivňující obsah glykoalkaloidů v bramboru.....	18
3.3.7 Vliv kulinárního zpracování na obsah glykoalkaloidů v bramboru.....	19
3.3.8 Doporučení.....	20
<b>3.4 Metody stanovení glykoalkaloidů.....</b>	<b>21</b>
3.4.1 Chromatografické metody.....	21
3.4.1.1 Tenkovrstvá chromatografie.....	21
3.4.1.2 Plynová chromatografie.....	22
3.4.1.3 Kapalinová chromatografie.....	22
3.4.2 Kapilární izotachoforéza.....	23
3.4.3 Biochemické metody.....	24
3.4.4 MALDI-TOF MS.....	24
<b>3.5 UHPLC-ESI-MS/MS.....</b>	<b>24</b>
3.5.1 Hmotnostní spektrometrie.....	24
<b>4 Materiál a metoda stanovení.....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Rostlinný materiál.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2 Popis stanoviště pokusu.....</b>	<b>27</b>

<b>4.3</b>	<b>Podmínky pokusu.....</b>	<b>28</b>
<b>4.4</b>	<b>Příprava laboratorního vzorku.....</b>	<b>29</b>
<b>4.5</b>	<b>Stanovení sušiny .....</b>	<b>29</b>
<b>4.6</b>	<b>Přístroje a chemikálie .....</b>	<b>30</b>
4.6.1	Seznam chemikálií.....	30
4.6.2	Seznam přístrojů .....	30
<b>4.7</b>	<b>Stanovení obsahu <math>\alpha</math>-solaninu a <math>\alpha</math>-chaconinu metodou UHPLC-ESI-MS/MS</b>	<b>30</b>
4.7.1	Příprava vzorku.....	30
4.7.2	UHPLC-ESI-MS/MS metoda .....	31
4.7.3	Identifikace a kvantifikace.....	32
<b>4.8</b>	<b>Statistické vyhodnocení .....</b>	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>40</b>
<b>8</b>	<b>Seznam literatury .....</b>	<b>41</b>
<b>9</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>45</b>

# 1 Úvod

Lilek brambor (*Solanum tuberosum* L.) patří do čeledi lilkovité, pěstuje se pro své hlízy jako jednoletá rostlina. Brambory jsou velice významná a nezastupitelná plodina. Významné je jejich použití jako krmivo pro zvířata, průmyslové zpracování na výrobu škrobu a lihu, a v neposlední řadě jako potravina pro lidstvo. V České republice je průměrná spotřeba brambor za rok na osobu kolem 70 kg. Z nutričního hlediska se jedná o velmi hodnotnou potravinu, má vyvážené zastoupení sacharidů, bílkovin a tuků. Navíc jsou brambory významným zdrojem vitaminů a minerálních látek. Kromě těchto prospěšných látek obsahují i látky zdravý škodlivé. A to látky přirozeně se vyskytující v rostlině nebo látky cizorodé jako jsou rezidua pesticidů nebo těžké kovy. Brambory syntetizují toxické látky – glykoalkaloidy. Glykoalkaloidy jsou sekundární metabolity a mají v rostlině ochrannou funkci. Majoritní glykoalkaloidy v lilku bramboru jsou  $\alpha$ -solanin a  $\alpha$ -chaconin. Jejich toxický účinek spočívá v inhibici acetylcholinesterázy a porušováním buněčných membrán. Hygienický limit těchto sloučenin je stanoven na 200 mg/kg celých neloupaných hlíz. V běžně dostupných odrůdách brambor jejich množství zdaleka nedosahuje stanovené hranici. Na obsah toxických glykoalkaloidů v hlíze působí hned několik faktorů. Jejich množství je ovlivněno odrůdou, ročníkem, stanovištěm, způsobem pěstování, způsobem skladování aj. Glykoalkaloidy jsou značně termostabilní, k jejich snížení v bramboru při kulinární úpravě dochází zejména odstraněním slupky.



## **2 Cíl práce**

Cílem práce bylo stanovit obsah majoritních glykoalkaloidů v různých odrůdách brambor. Dále zhodnotit vliv stresu suchem na jejich obsah.

### **2.1 Vědecké hypotézy**

Na základě studia odborné literatury byly navrženy tyto hypotézy:

1. Míra akumulace glykoalkaloidů v bramborách je podmíněna typem odrůdy.
2. Vlivem stresu suchem dochází k nárůstu toxických glykoalkaloidů v hlízách brambor.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Lilek brambor (*Solanum tuberosum* L.)

Lilek brambor patří do čeledi lilkovité (*Solanaceae*), stejně tak jako lilek rajče, lilek černý, durman obecný, blín černý a další. Je to vytrvalá rostlina se svazčitými kořeny a podzemními oddenkovými hlízami. Její větvená hranatá lodyha dorůstá výšky 60 – 100 cm. Listy má lichozpeřené s 3 až 5 páry vejčitých lístků. Pětčetné květy jsou bílé, růžové nebo fialové. Doba květu je od června do srpna. Plodem je zelená až žlutozelená 2 – 4 cm velká bobule. Lilek brambor jakožto významná zemědělská plodina se pěstuje jako jednoletá rostlina pro hlízu (Slavík, 2000).

Brambory byly dovezeny do Evropy v druhé polovině 16. století, po objevení Nového světa španělskými dobyvateli. Původně lidé odmítali přijmout brambor jako potravinu a využívali je pouze jako krmivo pro hospodářská zvířata. Bída, války a neúroda obilí přispěly k rozšíření brambor jako lidské potraviny. Dnes patří brambory mezi základní nezastupitelné potraviny. Roční průměr spotřeby brambor v České republice se udává okolo 70 kg na osobu. Kromě toho, že jsou brambory velmi oblíbenou a chutnou potravinou, jsou i nutričně významné. Jsou zdrojem energie, bílkovin, vitamínů a minerálů. Mimo těchto prospěšných látek mohou hlízy brambor obsahovat i látky škodlivé. A to látky přirozeně se vyskytující, kam patří glykoalkaloidy nebo cizorodé, to jsou např. rezidua pesticidů nebo těžké kovy. Obsah těchto látek je daný vnitřními a vnějšími vlivy (Čepl, 2012).

### 3.2 Chemické složení bramboru

Hlíza bramboru obsahuje asi 20 % sušiny a 80 % vody v závislosti na odrůdě, ročníku a skladování. Sušinu tvoří hlavně sacharidy (11-18 %), dusíkaté látky (2 %) a minimum tuků. Brambora svým složením tří hlavních složek odpovídá zdravé a vyvážené stravě, kdy více jak polovina energetického příjmu by měla být hrazena sacharidy, bílkovin by mělo být okolo 15 % a tuku méně jak jedna třetina. Konzumací 100 g brambor tělo přijme 300KJ, z toho 275 KJ sacharidů, 20 KJ bílkovin a 5 KJ tuků (Čepl et al., 2012).

#### 3.2.1 Sacharidy

Významnou část sušiny brambor tvoří škrob. Hlízy určené pro konzumní brambory ho obsahují 11-16 %, pro hlízy určené pro zpracovatelský průmysl je limitní hodnota škrobu

18 %. Škrob má hlavně zásobní funkci, je pohotovou zásobou glukózy. V buňkách bramborových hlíz je uložen v podobě micel – škrobových zrn. Lasturovitá škrobová zrna jsou obvykle velká od 15 µm do 50 µm. Rozmístění škrobu je v hlíze nerovnoměrné, nejvyšší obsah je v oblasti centrálního kruhu cévních svazků. V syrových bramborách je škrob málo stravitelný, je málo přístupný pankreatických amylázám. Jeho stravitelnost se zvýší tepelnou úpravou bramboru. Kromě škrobu jsou v hlíze bramboru další polysacharidy, které označujeme jako vlákninu. Ta zajišťuje správné rozdělení potravy v žaludku a střevech a umožňuje peristaltiku střev. Další sacharidy, které se vyskytují v hlíze, jsou sacharóza, glukóza a fruktóza. Obsah těchto sacharidů je závislý na podmínkách skladování (Čepl et al., 2012).

### **3.2.2 Bílkoviny**

Střední hodnota obsahu dusíkatých látek (hrubých bílkovin) je většinou uváděna 2 % v původní hmotě. To je asi 10 % v sušině. Nebílkovinné dusíkaté látky (50 % zastoupení z celkového množství dusíkatých látek) jsou děleny na volné aminokyseliny (15 %), aminy asparagin a glutamin (23 %) a ostatní dusíkaté látky (12 %). Bílkoviny jsou nejvýznamnějším podílem komplexu dusíkatých látek. Jejich obsah kolísá ve značném rozpětí od 34 do 70 %. Průměrně tvoří bílkoviny 58 % z celkového množství dusíkatých látek. V metabolismu bramborové rostliny jsou nezastupitelné. Mají významnou roli v interakci s ostatními látkami, jako jsou cukry, fenoly, hormony aj. Bílkoviny bramboru jsou z nutričního pohledu jedny z nejkvalitnějších rostlinných bílkovin. Mají příznivou hodnotu indexu esenciálních aminokyselin, které ve srovnání s vaječným standardem dosahují hodnoty 83 %. Brambory jsou ceněny vysokým obsahem lyzinu. Aminokyseliny cystein, methionin, někdy i izoleucin jsou označovány jako limitující (Čepl et al., 2012).

### **3.2.3 Tuky**

Obsah tuků v hlíze brambor je velmi nízký, něco okolo 0,1 %. Nejvíce se jich nachází ve slupce (Čepl et al., 2012).

### **3.2.4 Vitamíny**

Brambor obsahuje několik vitamínů, jak rozpustných ve vodě (vitamín C, vitamíny řady B), tak rozpustných v tucích (karotenoidy - provitamíny, tokoferol, vitamín K). Vitamíny se vyskytují hlavně v dužině kolem cévních svazků. Nejvýznamnější obsah má vitamín C.

Brambory jsou jeho dostupným a levným zdrojem. Přesto velmi důležitým z hlediska krytí celkové denní potřeby organismu. Obsah vitamínu C se během vegetace zvyšuje. Na podzim po uskladnění čerstvě sklizených hlíz jeho obsah rychle klesá, poté se jeho úbytek zpomaluje. Na jaře pak zůstává v hlízách vitamínu ještě 40 – 70 % z původního obsahu. Hlízy brambor obsahují průměrně 20 mg vitamínu C/100g čerstvé hmoty. Jeho obsah klesá v hlízách kulinární úpravou. Je významným antioxidantem. Obsahy všech vitamínů v bramboru jsou závislé na odrůdě a počasí (Čepl et al., 2012).

### **3.2.5 Barviva**

Dužnina bramborových hlíz obsahuje rostlinné pigmenty, které jsou nositelem zbarvení. Karotenoidy jsou nositelem žlutého zbarvení. Působením světla se barva brambor mění do zelena. To je způsobeno tvorbou chlorofylu. Dále se v hlízách mohou vyskytovat flavonoly, flaviny a flavony. Odrůdy, které vykazují modré nebo červené zbarvení obsahují antokyany. Ty jsou rozpuštěny v buněčné šťávě buněk peridermu a ve vnější korové vrstvě (Čepl et al., 2012).

### **3.2.6 Minerální látky**

Průměrný obsah minerálních prvků v hlíze bramboru je 1,1 %. Některé jsou esenciálními katalyzátory metabolismu rostliny, jiné jsou přítomny v hlíze jen proto, že byly přítomny v půdním roztoku s esenciálními prvky. Významný je draslík, jehož obsah je v průměru 1,7 – 2 % v sušině. Draslík vyvažuje poměr draslíku a sodíku ve stravě. Vztah těchto dvou prvků je důležitý z hlediska regulace nervových pochodů organismu. Má vliv na utváření celkové chuti brambor. Z ostatních minerálních látek obsažených v hlíze lze uvést vápník, měď, železo, hořčík, mangan, fosfor a zinek. Zvláštní postavení má selen, který působí spolu s vitamínem E v buněčném antioxidačním obranném systému, tak že zastavuje reakci volných radikálů (Čepl et al., 2012).

### **3.2.7 Antioxidanty**

Antioxidanty jsou látky, které omezují aktivitu silně oxidativních kyslíkových radikálů, tím že snižují pravděpodobnost jejich vzniku nebo je převádějí do méně reaktivních či nereaktivních forem. Brambory jsou velmi bohatým zdrojem antioxidantů vzhledem k jejich spotřebě v lidské výživě. Antioxidanty mají antiaterosklerotický účinek, inhibují hromadění cholesterolu v krevním séru, snižují riziko koronárních srdečních onemocnění a redukují

volné radikály. Mezi významné antioxidanty obsažené v bramborových hlízách patří polyfenoly, karotenoidy, vitamin C, tokoferoly, selen a kyselina  $\alpha$ -lipoová (Lachman et al., 2005).

### 3.2.8 Rizikové látky

Kromě nutričně významných látek brambory mohou obsahovat látky škodlivé, antinutriční. Mezi ně patří přirozeně se vyskytující glykoalkaloidy nebo látky cizorodé (dusičnany, těžké kovy, rezidua pesticidů) nebo látky vznikající až tepelnou úpravou brambor jako je akrylamid. Obsah těchto látek je ovlivněn vnějšími i vnitřními vlivy. Dusičnany se do potravin mohou dostat nadměrným hnojením a rezidua pesticidů jejich nadměrnou aplikací. Těžké kovy se mohou objevit v hlízách, které byly pěstované na kontaminovaných půdách. (Čepl et al., 2012).

## 3.3 Glykoalkaloidy

Glykoalkaloidy patří mezi sekundární metabolity rostlin. Jsou to produkty metabolismu organismu, které nemají zásadní funkci v metabolismu producenta, ale mohou mu poskytovat selektivní výhody. Avšak některé sekundární metabolity získaly během vývoje i základní důležité funkce např. rostlinné hormony. Jiné mají ekologický význam jako atraktanty nebo naopak mají ochrannou funkci v těle rostliny. To jsou látky odpuzující, obranné nebo útočné. Sekundární metabolity mohou fungovat také jako kofaktory enzymů, stavební materiál buněčných stěn nebo jako skladovací formy uhlíku a dusíku aj. (Vodrážka, 2002). Glykoalkaloidy brambor slouží jako přirozená ochrana proti hmyzu a jiným škůdcům. Bylo prokázáno, že inhibují růst plísně bramborové (Friedman, 2004).

### 3.3.1 Chemická charakteristika glykoalkaloidů

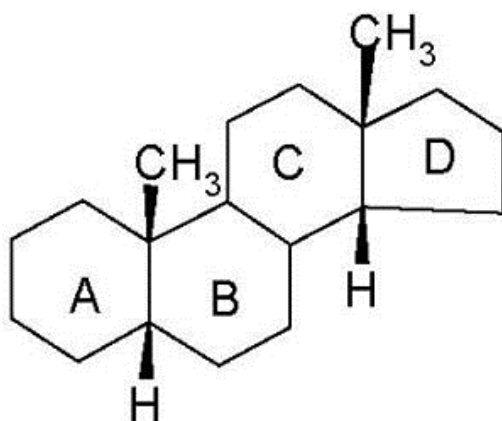
Základní skelet dusíkatých steroidních glykoalkaloidů je odvozen od cholestanu (Obrázek 1), který se skládá ze tří kondenzovaných šestičlenných kruhů a jednoho pětičlenného kruhu.

Steroidní glykoalkaloidy se dělí podle aglykonu do 5 skupin:

- solanidany
- spirosolany, spiroaminoketaly
- 22,26-epiminocholstany
- $\alpha$ -epiminocyklohemiketaly

- 3-aminospirostany

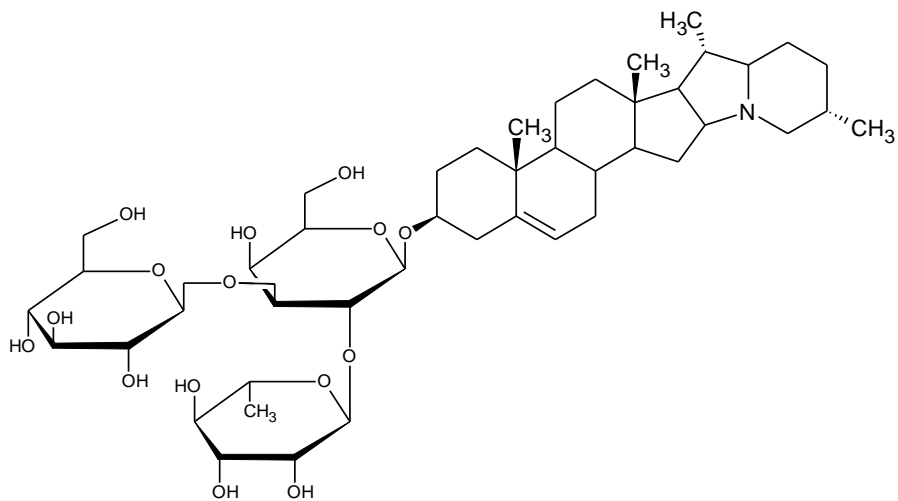
Aglykony glykoalkoidů, které jsou obsaženy v rostlinách potravinářsky významných, jsou  $3\beta$ -hydroxyderiváty odvozené od solanidanu nebo spirosolanu. Deriváty solanidanu jsou solanidin a demissidin. Deriváty spirosolanu jsou solasodin a tomatidenol (Velíšek a Hajšlová, 2009). Na aglykony jsou vázány cukry (lineární a rozvětvené tetrasacharidy, trisacharidy a také di- a monosacharidy) prostřednictvím hydroxylové skupiny v poloze C-3 (Hajšlová et Schulzová, 2007).



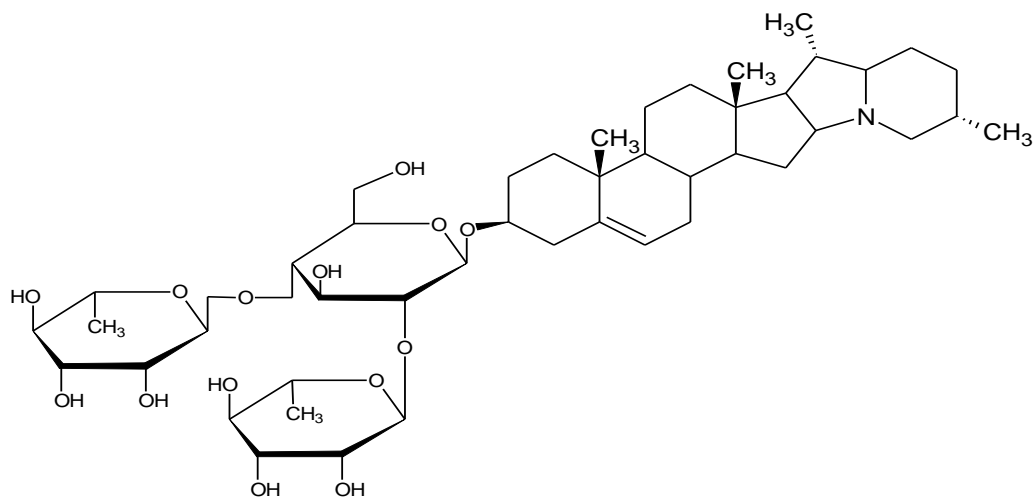
**Obrázek 1** Cholestan

### 3.3.2 Glykoalkaloidy brambor

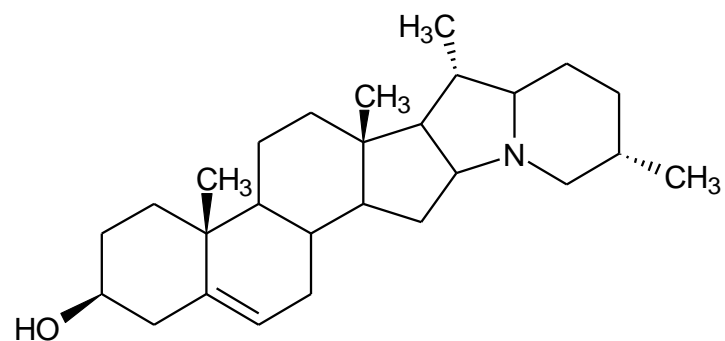
Steroidní glykoalkaloidy lilku brambor jsou často označovány jako pseudoalkaloidy nebo glykosidy. Glykoalkaloidy jsou složeny ze tří částí. Z polární hydrofilní sacharidové části, nepolární lipofilní steroidní části a heterocyklické dusíkaté báze. Steroidní část s dusíkatou bází tvoří tzv. aglykon. Tyto sloučeniny jsou u bramboru většinou označovány hromadným názvem solanin. Doposud je jich známo přes dvacet. Hlavní glykoalkaloidy bramboru, které tvoří 95 % z celkového množství, jsou  $\alpha$ -solanin a  $\alpha$ -chaconin (Obrázek 2 a 3). Obě tyto sloučeniny mají stejný aglykon solanidin (Obrázek 4), liší se jen v sacharidové části (Zrůst, 2004a). Poměr  $\alpha$ -chaconinu/ $\alpha$ -solaninu se udává v rozmezí 0,82 – 2,62 (Andre et al., 2009). Vedle  $\alpha$ -formy těchto sloučenin existují i  $\beta$ - a  $\gamma$ - formy, které se liší v počtu navázaných molekul sacharidů (Zrůst, 2004a). V Tabulce 1 je uvedena struktura alkaloidů vyskytujících se v rostlinách brambor.



**Obrázek 2**  $\alpha$ -solanin



**Obrázek 3**  $\alpha$ -chaconin



**Obrázek 4** Solanidin

**Tabulka 1** Struktura jednotlivých glykoalkaloidů (Zrůst, 2004a)

<b>Sloučenina</b>	<b>Struktura</b>
$\alpha$ -solanin	soladinin + galaktosa + glukosa + rhamnosa
$\beta$ 1-solanin	soladinin + galaktosa + glukosa
$\beta$ 2-solanin	soladinin + galaktosa + rhamnosa
$\gamma$ -solanin	soladinin + galaktosa
$\alpha$ -chaconin	soladinin + glukosa + rhamnosa + rhamnosa
$\beta$ 1-chaconin	soladinin + glukosa + rhamnosa
$\beta$ 2-chaconin	soladinin + glukosa + rhamnosa
$\gamma$ -chaconin	soladinin + glukosa

### 3.3.3 Distribuce glykoalkaloidů v rostlině

GA se v rostlině bramboru vyskytují velice nerovnoměrně. Vyšší hodnoty jsou typické hlavně pro zóny zvýšené metabolické aktivity. V nadzemních částech je jejich obsah 10-20krát vyšší než v hlízách (Jůzl et al., 2008). V hlíze jsou hlavní glykoalkaloidy nejvíce zastoupeny v první 1 mm vrstvě od vnějšího povrchu, jejich obsah klesá směrem ke středu. Zastoupení  $\alpha$ -solaninu a  $\alpha$ -chaconinu je nerovnoměrné, ale nejvyšší obsah je kolem oček na povrchu hlíz. Odstraněním 3 – 4 mm slupky před vařením se odstraní téměř všechny glykoalkaloidy. Celkové množství klesá s rostoucí velikostí hlíz (Friedman, 2006). Distribuci glykoalkaloidů v různých částech rostliny bramboru znázorňuje Tabulka 2.

**Tabulka 2** Obsah glykoalkaloidů v různých částech rostliny (Milner et al., 2011)

<b>Část rostliny</b>	<b>obsah glykoalkaloidů v mg/kg čerstvé hmoty</b>
květy	2150-5000
listy	230-1000



stonek	23-33
kořeny	180-400
hořká hlíza	250-800
celá hlíza	10-150
slupka (2-3 % z hlízy)	300-640
korová vrstva (10-12 % z hlízy)	150-160
dužina	12-100
klíčky	2000-7300

### 3.3.4 Toxický účinek

Na toxicitu glykoalkaloidů bylo upozorněno již v roce 1924, když byly objeveny různé koncentrace právě steroidních glykoalkaloidů v sérech lidí v závislosti na množství zkonsumovaných brambor. V minulosti bylo zaznamenáno několik otrav i smrtelných, steroidními glykoalkaloidy. Poslední případ je z Německa z roku 1951, kdy dvouleté dítě zemřelo třináct dní po požití bobulí bramboru. Od té doby se počet otrav snížil, díky rozsáhlé osvětě o nebezpečnosti zelených a naklíčených brambor. Díky pokusům na laboratorních zvířatech byl zjištěn mechanismus účinku GA (Jůzl et al., 2008). Inhibují acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu, tím působí na centrální nervovou soustavu. Také ovlivňují činnost trávicí soustavy tím, že porušují funkci membrán (Linhart, 2012). Otrava se u člověka projevuje zvracením, bolestmi břicha, průjmem a neurologickými příznaky jako je neklid blouznění, otupění a halucinace. Další doprovodné symptomy mohou být horečka, rychlý a slabý puls, zrychlený dech, nízký tlak krevní, změny barvy pokožky a vidění. Letální dávka pro člověka se udává 3 až 6 mg/kg tělesné hmotnosti. To je srovnatelné se strychninem nebo arsenikem. Zvířata jsou mnohem méně citlivá na účinky GA než lidé (Jůzl et al., 2008). Vstřebání glykoalkaloidů v gastrointestinálním traktu je nízké. Intestinální bakterie napomáhají jejich detoxikaci tak, že je hydrolyzují za vzniku aglykonu solanidinu, který se téměř nevstřebává. Glykoalkaloidy jsou z těla vyloučeny močí a výkaly poměrně rychle, během 12 hodin (Lachman et al., 2001). Pokusy na zvířatech bylo zjištěno, že  $\alpha$ -chaconin je

toxičtější než  $\alpha$ -solanin. Proto je důležité, aby byl poměr  $\alpha$ -chaconin/ $\alpha$ -solanin co nejnižší (Andre et al., 2009).

V České republice je v zákoně o potravinách stanoven hygienický limit glykoalkaloidů na 200 mg/kg čerstvé hmoty. Je to maximální přípustné množství sumy  $\alpha$ -solaninu a  $\alpha$ -chaconinu v celých neloupaných hlízách.

### **3.3.5 Příznivé účinky**

Mezi příznivé účinky glykoalkaloidů patří inaktivace viru herpes simplex. U myši byla prokázána ochrana proti infekci Salmonella typhi. Glykoalkaloidy také zvyšují účinnost anestetik, tím že inhibují cholinesterázu. Dále bylo prokázáno snížení cholesterolu v plazmě u křečků a inhibice růstu rakovinových buněk tračníku a jater (Friedman, 2004).

### **3.3.6 Faktory ovlivňující obsah glykoalkaloidů v bramboru**

Obsah glykoalkaloidů v běžně používaných odrůdách je 20 – 100 mg/kg. Na jejich obsah v hlízách má vliv hned několik faktorů: stanoviště, ročník, odrůda, vliv světla, doba skladování, dále také mechanické poškození hlíz, naklíčení nebo způsob pěstování.

Podle doposud provedených pokusů bylo zjištěno, že stanoviště je jedním z nejvýznamnějších faktorů. Brambory pěstované na suchých a teplých stanovištích většinou obsahují větší množství glykoalkaloidů (Mazurczyk, 1998).

Dále je významný i ročník, tedy podmínky pro růst rostlin. Stres sucha, vysoké teploty a nadprůměrná doba slunečního svitu ve vegetaci tvoří se vzájemným působením typu odrůdy předpoklad pro kumulaci GA v hlízách (Jůzl et al., 2008). Z provedeného pokusu bylo pozorováno významné zvýšení koncentrace GA za suchem stresovaných podmínek u většiny použitých odrůd a to o 43 až 50 % (Bejarano et al., 2000).

Vliv odrůdy je většinou v literatuře kladen na první místo. Hodnoty GA se u různých odrůd značně liší. Z provedeného pokusu, kdy byl zkoumán vliv odrůdy, barva dužiny, stanoviště a ročník byl prokázán jako rozhodující vliv na obsah celkového množství glykoalkaloidů genotyp brambor (Hamouz et al., 2014). Hodnota GA je závislá nejen na ročníku, stanovišti a odrůdě, ale také na vzájemné interakci odrůda x stanoviště a odrůda x ročník (Zrůst, 2004b).

Dalším faktorem je světlo. To indukuje tvorbu GA v hlíze současně a nezávisle na sobě se syntézou chlorofylu. K zezelenání hlíz a tedy nárůstu obsahu GA dochází hlavně po silných

deštích, kdy je splavena ornice a hlízy jsou tak vystaveny dennímu světlu. V zelených hlízách je vždy vyšší obsah GA než v nezelených. Působení světla na tvorbu GA a chlorofylu se liší podle vlnové délky a intenzity světla. S přibývajícím světelnou intenzitou se množství chlorofylu v hlíze zvyšuje. Obsah GA k tomu přibývá paralelně. Nejsilnější syntézu GA vyvolává emise světla spektrálních barev modré až fialové. Ozáření UV světlem má za následek také vyšší obsah GA v hlíze, zazelenání zde nebylo zpozorováno. Kromě intenzity a délky světla působí i doba osvětlení, teplota a typ odrůdy (Jůzl et al., 2008). To potvrzuje i provedený pokus, kdy světlem indukovaná syntéza glykoalkaloidů byla také významně ovlivněna odrůdou. K nárůstu glykoalkaloidů došlo v odrůdách, které jsou typické svým vysokým přirozeným obsahem glykoalkaloidů (Hejtmánková, 2011).

Jelikož hlízy brambor většinou nejsou ihned po sklizni zpracovány, dalším významným faktorem je doba skladování. To souvisí i s teplotou skladovacích podmínek (Jůzl et al., 2008). Obecně se pro prevenci tvorby glykoalkaloidů doporučuje vyšší teplota a nižší relativní vlhkost. Při dlouhodobém skladování nebyl prokázán nárůst glykoalkaloidů (Hejtmánková, 2011).

Významným faktorem, který zvyšuje syntézu GA, je mechanické poškození hlízy. Nakopnutí, naražení, překrojení brambory způsobí dvojnásobný až trojnásobný nárůst GA. Poškození nejspíše vyvolá syntézu glykoalkaloidů ve stresovaných pletivech (Jůzl et al., 2008).

U ekologicky pěstovaných brambor se předpokládá, že rostlina bude produkovat větší množství přirozených toxických látek. Musí se bránit sama proti napadení. Brambory takto pěstované dosahují vyšších hodnot než brambory pěstované konvenčně. Avšak rozdíly se nepokládají za statisticky významné (Friedman, 2006).

Nebyl prokázán ani vliv hnojení dusíkem v konvekčním zemědělství na obsah GA (Diviš, 2007).

### **3.3.7 Vliv kulinárního zpracování na obsah glykoalkaloidů v bramboru**

Glykoalkaloidy jsou velmi termostabilní. K jejich tepelné degradaci dochází při teplotách 230-280 °C. Aglykony nepodléhají rozkladu ani při teplotách 280-320 °C. Glykoalkaloidy odolávají mražení i sušení, nerozkládají se ani vařením, pečením, pářením či mikrovlnným ohřevem (Jůzl et al., 2008).

Nejvýraznějším snížením glykoalkaloidů v bramboru a výrobcích z nich se dosáhne oloupáním hlízy, tedy odstraněním slupky. Sníženému obsahu se docílí i výluhem. Výluhem dělených hlíz do oplachových vod nebo výluhem při vaření. Přídavkem 0,3% kyseliny octové se zvýší obsah solaninu ve výluhu a tak se sníží jeho množství ve vařených hlízách až o 84 % (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Naopak ke zvýšenému obsahu glykoalkaloidů může dojít u mechanicky zpracovaných hlíz, které jsou dále tepelně opracované s delší časovou prodlevou. Vyšší obsah mají výrobky s nízkým obsahem vody např. extrudované. Při sušení dochází k pětinasobnému zakoncentrování glykoalkaloidů oproti syrovým hlízám (Jůzl et al., 2008).

Byl proveden pokus, ve kterém byl zkoumán vliv loupání a tří druhů tepelné úpravy brambor (vaření, pečení a mikrovlnný ohřev). U všech tří metod bylo pozorováno snížení celkového obsahu glykoalkaloidů, ale jako nejvýhodnější tedy nejvyšší snížení obsahu GA se prokázalo u uvaření loupaných hlíz (Lachman et al., 2013).

Podobný pokus byl proveden u brambor s barevnou dužinou. Kromě vlivu loupání, vaření a pečení na obsah GA u modrých a červených brambor byl zkoumán jejich obsah ve zpracovaných výrobcích. Celkový obsah GA se snížil o 8 % u neloupaných vařených hlíz, o 39 % u oloupaných vařených hlíz v porovnání se syrovou bramborou. Nejvyšší pokles obsahu GA byl zaznamenán u smažených bramborových lupínků (průměr asi 83 % v porovnání s původní hodnotou suroviny) a smažených hranolků (o 94 %) (Tajner-Czopek et. Al., 2012).

Kulinárními úpravami se obsah glykoalkaloidů mění rozdílně v závislosti na odrůdě i ročníku (Jůzl et al., 2008).

### **3.3.8 Doporučení**

Doporučení pro šlechtitele, pěstitele, prodejce a spotřebitele (Jůzl et al., 2008):

- Ovlivňovat a kontrolovat hladinu glykoalkaloidů v nových odrůdách.
- Stanovit limit 100 mg glykoalkaloidů na 1 kg čerstvé hmoty hlíz pro nově šlechtěné konzumní odrůdy bramboru.
- Pěstovat odrůdy s nižším (80 mg GA/kg č.h.) až nejvýše středním obsahem (80-160 mg GA/kg č.h. hlíz).
- Dodržovat správnou agrotechniku.

- Sklízet hlízy až po fyziologickém dozrání.
- Zabránit mechanickému poškození při sklizni.
- Nevystavovat zbytečně hlízy světlu.
- Skladovat hlízy za optimálních podmínek.
- Vyhnout se konzumaci netradičních a neregistrovaných odrůd, silně mechanicky poškozených a zelených hlíz.
- Odstraňovat slupky a vykrajovat očka.
- Oloupané, rozkrájené a nastrouhané hlízy ihned tepelně zpracovat.

### **3.4 Metody stanovení glykoalkaloidů**

#### **3.4.1 Chromatografické metody**

Chromatografie je separační analytická metoda, která využívá mnohokrát opakované ustanovení rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými fázemi. Jedná se o kvalitativní i kvantitativní analýzu složitých látek. Podstata metody je distribuce složek směsi mezi nepohyblivou stacionární fází a pohyblivou mobilní fází (Scott, 1994).

Chromatografie se dělí:

- podle typu fází (kapalinová, plynová, superkritická)
- podle typu uspořádání (sloupcová, papírová, na tenké vrstvě)
- podle principu dělení (adsorpční, gelová, iontová, afinitní)

##### **3.4.1.1 Tenkovrstvá chromatografie**

Principem této metody je separace jednotlivých látek mezi postupující pohyblivou (mobilní) fází rozpouštědla a pevnou (stacionární) fází na tenké vrstvě. Stacionární fáze je nejčastěji hliníková destička pokrytá silikagelem. Pro stanovení glykoalkaloidů se jako mobilní fáze se používá chloroform-methanol v poměru 19:1, chloroform-ethanol- 1% amoniak v poměru 2:2:2 a etylacetát-pyridin-voda v poměru 3:1:3. Pro detekci se používá Dragendorffovo činidlo (směs bazického dusičnanu bismutitého, kyseliny octové a jodidu draselného), chlorid antimonitý a jód (Zrůst, 2004a).

#### 3.4.1.2 Plynová chromatografie

Mobilní fázi je plyn, nazýván také nosný plyn. Nejčastěji je jím vodík, dusík a helium. Stacionární fáze je umístěna v koloně. U kolon náplňových to může být buď pevná látka (aktivní uhlí, silikagel, oxid hlinitý) nebo vysokovroucí kapalina. Stacionární fáze u kapilární kolony je nanášena v tenké vrstvě přímo na upravenou vnitřní stěnu křemenné kapiláry (Poole, 2012). Tato separační metoda je využívána pro kvalitativní i kvantitativní stanovení glykosidů i aglykonů. Nevýhoda této metody je potřeba zařazení derivatizace u analýzy glykosidů a použití vysokých teplot nástřiků a separace. Při vyšších teplotách dochází k částečné degradaci analyzovaných látek. Podmínky analýzy také negativně ovlivňují životnost kolony. Vyšší životnost, účinnost dělení a stabilitu má kolona kapilární s chemicky vázanými fázemi. V současnosti je nejvíce rozšířena technika spojení plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS). Toto spojení využívá vysokou separační účinnost plynové chromatografie a cenné strukturální informace hmotnostní spektrometrie. U GC/MS se používají tzv. tvrdé ionizační techniky, kam patří elektronová a chemická ionizace (Zrůst, 2004a).

#### 3.4.1.3 Kapalinová chromatografie

Podstata separace látek v kapalinové chromatografii je různá afinita složek analytu k mobilní a stacionární fázi. Čím větší afinitu látka ke stacionární fázi má, tím více je zbrzděn její pohyb chromatografickým systémem. Postupováním vzorku kolonou se vytvářejí rovnovážné stavy na základě různých interakcí mezi vzorkem a stacionární fází, vzorkem a mobilní fází a také mezi stacionární a mobilní fází. Nejvýznamnější z kapalinové chromatografie je bezpochyby vysoko účinná kapalinová chromatografie (HPLC High Performance Liquid Chromatography). Mobilní fází je kapalina. Stacionární fází je film příslušné látky na povrchu nosiče nebo pevný absorbent. Metoda HPLC se dělí na chromatografii na normální fází a chromatografii na reverzní (obrácené) fází. U normální HPLC je stacionární fáze více polární než fáze mobilní. Reverzní HPLC má stacionární fází méně polární než mobilní fází. Chromatografie na reverzní fází je více využívanou metodou. Jako mobilní fáze se u této metody používá např. voda, metanol, acetonitril a jejich směsi v různých poměrech, pufrů a další. Její složení může významným způsobem ovlivňovat celou analýzu, hlavně kvalitu separace (Fanali et al., 2013).

Stacionární fáze je tvořena mikročásticemi silikagelu o velikosti 3-10  $\mu\text{m}$ , na kterých je navázána vlastní stacionární fáze. Tou mohou být nepolární uhlovodíky C8- oktan, C18- oktadekan nebo uhlovodíky s polárnější funkční skupinou (např. -CN).

Kapalinový chromatograf tvoří tyto hlavní části: zásobní lahve s mobilní fází, vysokotlaká pumpa, dávkovač, kolona a detektor. Mobilní fáze je ze zásobních lahví vedena přes vysokotlakou pumpu do kolony, poté do detektoru a nakonec do odpadu. Dávkovač nadávkuje vzorek do proudu mobilní fáze, vzorek je jí unášen do kolony, kde se jednotlivé složky vzorku separují. Z kolony vede výstup do detektoru, kde dojde k detekci jednotlivých složek. Signál z detektoru je zaznamenán pomocí počítače.

U HPLC metody se používají tyto detektory: spektrofotometrický, hmotnostní spektrometr, fluorescenční a refraktometrický detektor a další. Liší se od sebe principem funkce, konstrukcí, selektivitou, citlivostí a mezí detekce (Fanali et al., 2013).

#### UHPLC (Ultra-High Performance Liquid Chromatography)

Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie je současným trendem v kapalinové chromatografii. U UHPLC se využívají kolony s částicemi menšími jak 2  $\mu\text{m}$ . Celý separační proces probíhá za velmi vysokých tlaků (okolo 100 MPa). Výhody oproti HPLC jsou: kratší doba analýzy, menší spotřeba rozpouštědla, zvýšení separační účinnosti, zvýšení citlivosti (Roge et al., 2011).

#### 3.4.2 Kapilární izotachofóréza

Kapilární izotachofóréza (CIPT, ITP = Capillary Isotachopheresis) je elektromigrační separační technika, která dělí ionty na základě jejich rozdílných elektroforetických mobilit. Roztok dělených iontů je dávkován jako rozhraní dvou rozdílných pufrů. Jeden pufr před vzorkem se nazývá vedoucí (leading) a obsahuje iont mající náboj stejného znaménka, ale větší elektroforetickou pohyblivost než všechny separované ionty. Druhý pufr za vzorkem se nazývá koncový (terminating). Ten obsahuje iont stejného znaménka jako dělené ionty, ale má menší elektroforetickou pohyblivost než všechny dělené ionty. Každý separovaný iont vytváří během analýzy vlastní zónu. Zóny všech dělených iontů jsou uzavřeny mezi vedoucí a koncový pufr a jsou seřazeny bezprostředně za sebou podle klesající elektroforetické pohyblivosti dělených iontů. ITP je technika použitelná pro molekuly pouze s nábojem.

Během jednoho pokusu lze dělit a detekovat jen jeden druh iontů, kladné nebo záporné (Cazes, 2001).

Je to separační technika, která využívá vlastnosti heterocyklické dusíkaté části molekuly glykoalkaloidů. Odděluje vedle sebe glykoalkaloidy a jejich aglykony. Neumí však separovat solanin od chaconinu. Výhodou této techniky jsou nízké provozní náklady (Zrůst, 2004a).

### **3.4.3 Biochemické metody**

Tyto metody většinou nepotřebují extrakci ani čištění vzorku, přitom jsou rychlé, velmi specifické a citlivé. Nevýhodou je vysoká cena. Nelze jimi oddělit solanin od chaconinu. Používají se pro screening velkého množství vzorků, hlavně pro šlechtitelské účely. Patří sem metody ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) a RIA (Radioimmunosay) (Hajšlová et Schulzová, 2007).

### **3.4.4 MALDI-TOF MS**

MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) je ionizace laserem za účasti matrice. Patří mezi měkké ionizační techniky. Určena pro ionizaci molekul s velkou molekulovou hmotností. Vzorek je společně s matricí nanesen na MALDI terčík. Energie krátkého laserového pulsu je absorbována matricí a následně dojde k lokální desorpci matrice a analytu. Excitované molekuly matrice jsou stabilizovány přenosem protonu na analyt nebo dochází ke kationizaci molekul analytu za vzniku iontů analytu. Ionty jsou následně urychleny do hmotnostního analyzátoru. Nejčastěji ve spojení s TOF (Time-of-flight) analyzátozem (Holčapek, 2016).

Metoda nevyžaduje čištění a koncentrování vzorku před analýzou. Tato technika umožňuje stanovení jednotlivých glykoalkaloidů za poměrně krátkou dobu a to 10 až 15 vzorků během dvou hodin. Nevýhoda je vysoká pořizovací cena přístroje (Hajšlová et Schulzová, 2007).

## **3.5 UHPLC-ESI-MS/MS**

### **3.5.1 Hmotnostní spektrometrie**

Hmotnostní spektrometry (MS) jako detektory patří v HPLC do skupiny spojených technik. Jsou velmi specifické. Poskytují údaje z chromatogramu a krom toho i spektrální údaje o identitě látky. Jsou používány jako standardní detektory pro bioanalytické a environmentální



aplikace, potravinovou analýzu, metabolomiku, proteomiku, v neposlední řadě jsou využívány pro vývoj a výzkum nových lékových struktur (Nováková et Douša, 2013).

Celý proces identifikace a kvantifikace látek hmotnostním spektrometrem se skládá ze třech kroků. Jako první musí dojít k ionizaci vzorku, kdy jsou neutrální molekuly převedeny na ionty pomocí iontového zdroje. Poté následuje rozdělení iontů dle poměru hmotnost/náboj ( $m/z$ ) ve hmotnostním analyzátoru. Nakonec dojde k detekci iontů a zesílení signálu v detektoru. Zároveň dochází ke sběru dat pomocí sofistikovaného softwaru jako u každé instrumentální metody (Nováková et Douša, 2013).

Součástí přístroje je i vakuový systém, sonda pro zavádění vzorků, iontová optika sloužící pro urychlení a fokusaci iontů a počítač na ovládání a ladění přístroje, sběr a zpracování dat.

Pro ionizaci analytů existuje široká škála ionizačních technik. Volí se podle těkavosti látky, tepelné stability, molekulové hmotnosti a polaritě látky. Neexistuje univerzální iontový zdroj. Ve spojení s HPLC se používají techniky ionizace za atmosférického tlaku tzv. měkké ionizační techniky. Znamená to, že při ionizaci vznikají protonované  $[M+H]^+$  molekuly (záznam kladných iontů) a deprotonované molekuly  $[M-H]^-$  (záznam záporných iontů). Nedochází tak k silné fragmentaci jako u tvrdých ionizačních technik. Mezi ionizace za atmosférického tlaku (API – atmospheric pressure ionization) patří ionizace elektrosprejem (ESI – electrospray ionization), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI – atmospheric pressure chemical ionization) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI – atmospheric pressure photoionization). Nejšetrnější je ionizace elektrosprejem, proto je používána pro analýzu velkých molekul, jako jsou proteiny a jiné biomolekuly (Nováková et Douša, 2013).

Typy hmotnostních analyzátorů (Nováková et Douša, 2013):

- Q kvadrupól
- QqQ trojitý kvadrupól
- IT iontová past
- LIT lineární kvadrupólová iontová past
- Orbitální past
- TOF analyzátor doby letu
- B magnetický sektorový analyzátor
- ICR iontová cyklotronová rezonance

Výběr analyzátoru určují tyto důležité parametry:

- Hmotnostní rozsah neboli maximální měřitelná hodnota  $m/z$
- Rozlišení – schopnost separovat dva sousední ionty
- Účinnost
- Správnost hmoty
- Lineární dynamický rozsah
- Rychlost a citlivost

Trendy v oblasti hmotnostních analyzátorů jsou tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) a vývoj hybridních analyzátorů. Tandemová hmotnostní spektrometrie je spojení dvou hmotnostních analyzátorů. První analyzátor provádí výběr prekurzoru. Poté dochází k jeho kolizně indukované disociaci a fragmentaci. Druhý analyzátor provádí hmotnostní analýzu produktových iontů. Hmotnostní tandemová spektrometrie je prováděna buď v čase, nebo v prostoru. Pokud jsou všechny tři kroky provedeny ve třech odlišných zónách, jedná se o provedení v prostoru. Takto je to u multisektorových magnetických analyzátorů, u trojitého kvadrupólu nebo u hybridních analyzátorů. Pokud se jedná o provedení v čase, jsou kroky procesu ve stejném prostoru, ale v jiné časové následnosti. Sem patří lineární iontová past, kvadrupólová iontová past a iontová cyklotronová rezonance. Hybridní analyzátor je spojení dvou různých typů analyzátorů s cílem získat ty nejlepší vlastnosti z obou analyzátorů. Vznikají tak spojení sektorových analyzátorů a kvadrupólu, spojení kvadrupólu a analyzátoru doby letu, kvadrupólu a iontové cyklotronové pasti, lineární iontové pasti s iontovou cyklotronovou pastí nebo lineární iontová past a orbitrap (Nováková et Douša, 2013).

#### Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupólový analyzátor se skládá ze čtyř stejných kovových tyčí kruhového průřezu o délce 20-30 cm. Na dvě protilehlé tyče je vloženo kladné stejnosměrné napětí. Na dvě protilehlé zbývající je vloženo záporné stejnosměrné napětí. Na všechny je superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí. Ion je převeden do středu osy kvadrupólu, kde začne oscilovat. Oscilace jsou stabilní pouze pro ion s určitou hodnotou  $m/z$  v daný časový okamžik a určitý poměr  $U/V$ , ten projde kvadrupólem a dostane se na detektor. Všechny ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Plynulou změnou hodnot stejnosměrného napětí  $U$  a amplitudy  $V$  jsou po sobě propuštěny všechny ionty na detektor (Holčapek, 2016).

## 4 Materiál a metoda stanovení

### 4.1 Rostlinný materiál

Do pokusu byly vybrány čtyři rozdílné odrůdy brambor: Marabel, Milva, Laura a Valfi. Všechny testované odrůdy byly dodány katedrou rostlinné výroby ČZU v Praze. Sadba odrůd Marabel, Milva a Laura byla zakoupena od Europlant šlecht. spol. s.r.o., Valfi od Výzkumného ústavu bramborářského Havlíčkův Brod. V Tabulce 3 je uvedena podrobná charakteristika testovaných odrůd.

**Tabulka 3** Odrůdy (Vokál, 2003)

Odrůda	Délka vegetační doby	Varný typ	Země původu	Tvar hlízy	Barva slupky	Barva dužiny	Hlavní užití
Marabel	raná	BA-A	D	oválný	žlutá	žlutá	konzum
Laura	poloraná	B-BC	D	dlouze oválný	červená	tmavě žlutá	konzum
Milva	poloraná	A-B	D	kulovito-oválný	žlutá	žlutá	konzum
Valfi	poloraná až polopozdní	B-C	CZ	oválný	modrá	modrostrakatá	speciální využití k výrobě barevných pokrmů

### 4.2 Popis stanoviště pokusu

Pokus byl proveden na demonstračním poli ČZU v Praze. Pole se nachází 290 m.n.m. Půdní druh je hlinitý. Půdní typ pole je černozem. Jedná se o výrobní oblast řepařskou. Hodnota pH půdy je 7,5. Obsah humusu je 2,75 %. Průměrný roční úhrn srážek na stanovišti činí 590 mm.

### 4.3 Podmínky pokusu

Na demonstrační pole bylo vysázeno 15 ks sadbových brambor od každé odrůdy a od každého typu závlahy (závlaha zaléváním, kapková závlaha, stres suchem). Sadba byla provedena ve dvou opakováních. Spon výsadby činil 30 cm x 70 cm. Pole bylo rozděleno na tři části. První část pole byla zavlažována zaléváním. Zalévalo se průměrně 3 x týdně v množství vody 10 l/m<sup>2</sup> dle počasí. Druhá část pole byla zavlažována kapkovou závlahou stejným objemem vody. Kapková závlaha byla spuštěna vždy přes noc. Třetí část pole byla stresována suchem, tedy nebyla nijak jinak zavlažována nežli srážkami. V Příloze 1 je uvedena mapa pokusného pole. Sadba proběhla 16.4.2015, sklizeň pak 26.8.2015. Brambory byly pěstovány dle zásad běžné agrotechniky. Na pole bylo aplikováno 500 kg NPK /ha před vlastní výsadbou. Během vegetace byl aplikován postřik proti plísním Ridomil a postřik proti mandelince bramborové Spintor.

Následující Tabulka 4 uvádí průměrné teploty vzduchu a sumu srážek za každý měsíc v roce 2015. Data jsou získána z Meteorologické stanice ČZU v Praze. Tabulka 5 uvádí dlouhodobou charakteristiku počasí na pokusném stanovišti Praha – Suchdol. Z porovnání hodnot teploty vzduchu naměřených v roce 2015 a hodnot dlouhodobých se měsíc duben ukázal jako teplý, květen a červen jako normální, červenec byl silně teplý a srpen dokonce mimořádně teplý. V porovnání úhrnu srážek se duben ukázal jako normální, květen až červenec jako suchý a srpen byl normální (Kožnarová et Klabzuba, 2002).

**Tabulka 4** Průměrná teplota a úhrn srážek za měsíce duben až srpen 2015

<b>Měsíc</b>	duben	květen	červen	červenec	srpen
<b>Průměrná teplota[°C]</b>	10,79	13,65	16,77	21,55	22,61
<b>Suma srážek [mm/měsíc]</b>	22,2	31,9	38,6	31,6	59,7

**Tabulka 5** Dlouhodobá charakteristika počasí na stanovišti Praha – Suchdol (Kožnarová, 2005)

<b>Měsíc</b>	duben	květen	červen	červenec	srpen
<b>Průměrná teplota [°C]</b>	9,1	14,2	17,6	19,3	18,7
<b>Úhrn srážek [mm/měsíc]</b>	35	58	66	78	67

#### **4.4 Příprava laboratorního vzorku**

Ze sklizených brambor byly vybrány zdravé hlízy průměrné velikosti a tvaru, tak aby byl zajištěn reprezentativní vzorek. Na přípravu laboratorního vzorku byly odebrány 4 hlízy od každé odrůdy a od každého typu závlahy. Celkem bylo vybráno 48 hlíz. Všechny hlízy byly omyty vodou a osušeny na filtračním papíru. Poté byly hlízy rozděleny na čtvrtiny, z každé rozdělené hlízy byla odebrána jedna čtvrtina, tj. čtyři čtvrtiny hlíz, které tvořily laboratorní vzorek. Takto připravené vzorky brambor byly zmrazeny a poté vloženy do lyofilizátoru na 120 hodin. Lyofilizované vzorky byly nakrájeny na drobno a následně homogenizovány v laboratorním mlýnku. Po homogenizaci byly převedeny do plastových uzavíratelných sáčků a v této podobě byly uloženy do exikátoru do doby analýzy.

#### **4.5 Stanovení sušiny**

Příprava vzorku na stanovení sušiny proběhla obdobným způsobem. Čtvrtky umytých a osušených brambor byly nakrájeny na drobno. Na každý vzorek bylo použito 7,5 nakrájených brambor.

Vzorky brambor umístěné ve váženkách byly vloženy do sušárny, kde byly sušeny při 105 °C do konstantní hmotnosti (48 hodin). Procento sušiny bylo stanoveno z rozdílu hmotnosti čerstvého a suchého vzorku.

## 4.6 Přístroje a chemikálie

### 4.6.1 Seznam chemikálií

- $\alpha$ -Solanin  $\geq$  95 % (Sigma-Aldrich, USA)
- $\alpha$ -Chaconin  $\geq$  95 % (Sigma-Aldrich, USA)
- Metanol p.a. (Lachner, Česká republika)
- Acetonitril HPLC grade, (Lachner, Česká republika)
- Kyselina mravenčí 99 % (Acros Organics, USA)
- Octan amonný 99,999 % (Sigma-Aldrich, USA)
- Deionizovaná voda

### 4.6.2 Seznam přístrojů

- Analytická váha (Kern&Sohn GmbH, Německo)
- Sušárna Venticell 111 (BMT, Medical Technology, Ltd., Brno, Česká republika)
- Lyofilizátor (Lyovac GT2, Steris, Hürt, Německo)
- Laboratorní mlýnek HR 2185 (Philips, Amsterdam, Nizozemsko)
- Vortex (Basic 3, IKA, KG, Staufen, Německo)
- Ultrazvuková lázeň (PS 04, Powersonic-Notus, Ltd., Vrable, Slovensko)
- Centrifuga (5810R, Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Simplicity UV (Merck Millipore, KGaA, Darmstadt, Německo)
- kapalinový chromatograf Ultimate 3000 RS (Thermo Fisher Scientific, USA)
- kvadrupólový hmotnostní spektrometr 3200 QTRAP (AB Sciex, Danaher, USA)

## 4.7 Stanovení obsahu $\alpha$ -solaninu a $\alpha$ -chaconinu metodou UHPLC-ESI-MS/MS

### 4.7.1 Příprava vzorku

Na analytických vahách bylo naváženo 0,3 g lyofilizovaného homogenizovaného vzorku do plastové uzavíratelné kyvety. Ke vzorku bylo přidáno 20 ml 80% metanolu. Vzorek byl promíchán na vortexu, poté byl umístěn na 10 minut do ultrazvukové lázně k podpoře homogenizace a rozpustnosti částic. Následovalo odstředění vzorku po dobu 7 min při 5000 rpm a 20 °C. Supernatant byl převeden do 50 ml odměrné baňky. Ke zbylému sedimentu bylo

přidáno dalších 20 ml 80% metanolu a celý postup extrakce byl proveden ještě jednou. Supernatant v 50 ml odměrné baňce byl doplněn po rysku 80% metanolem a řádně promíchán. V další fázi byl vzorek přefiltrován přes nylonový mikrofiltr NY 0,22  $\mu\text{m}$  a v poměru 1:1 byl naředěn deionizovanou vodou do vialky. Obsah  $\alpha$ -solaninu a  $\alpha$ -chaconinu ve vzorcích byl stanoven metodou UHPLC-ESI-MS/MS. Každý vzorek byl analyzován ve třech opakováních.

#### 4.7.2 UHPLC-ESI-MS/MS metoda

Obsah glykoalkaloidů ve vzorcích brambor byl stanoven metodou UHPLC-ESI-MS/MS. Analýzy byly provedeny na kapalinovém chromatografu Ultimate 3000 RS (Thermo Fisher Scientific, USA) ve spojení s kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem 3200 QTRAP (AB Sciex, Danaher, USA). Analyty byly ionizovány pomocí ESI ionizace (ionizace elektrosprejem) v pozitivním módu.

Podmínky UHPLC-ESI-MS/MS analýzy:

Analytická kolona: Kinetex C18 (30x2,1 mm; S 1,7  $\mu\text{m}$ ) (Phenomenex, Torrance, CA, USA)

Mobilní fáze: acetonitril : methanol : voda : 0,1 M octan amonný (200:100:550:50) (v/v/v/v), pH=4 (mravenčí kyselina), izokratická eluce

Průtok: 0,3 ml/min

Nástřik: 1  $\mu\text{l}$

Teplota kolony: 40 °C

Doba analýzy: 6 min

MS Podmínky detekce glykoalkaloidů ve vzorcích brambor jsou uvedeny v Tabulce 6 a 7.

**Tabulka 6** Podmínky ve zdroji

<b>Ochranný plyn</b>	25 psi
<b>Kolizní plyn</b>	střední
<b>Napětí zdroje</b>	5500 V
<b>Teplota</b>	650 °C

<b>Zmlžovací plyn</b>	60 psi
<b>Turboplyn</b>	60 psi

**Tabulka 7** Parametry metody pro stanovení glykoalkaloidů

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

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

#### 4.7.3 Identifikace a kvantifikace

Identifikace analytů ve vzorcích byla provedena porovnáním kvantifikačního a konfirmačního přechodu a retenčního času vzorků a retenčních časů standardů. Výsledky byly vyhodnoceny metodou kalibrační přímky. Rozsah kalibrační přímky byl 0,05 – 5  $\mu\text{g/ml}$  pro  $\alpha$ -chaconin i  $\alpha$ -solanin.

#### 4.8 Statistické vyhodnocení

Naměřené hodnoty chaconinu a solaninu byly zpracovány v programu Statistica CZ. Pro statistické zhodnocení byla použita dvoufaktorová ANOVA s interakcemi na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Hodnocené faktory: odrůda a způsob závlahy. Výsledky statistické analýzy jsou uvedeny v Příloze 2.



## 5 Výsledky

Naměřené hodnoty  $\alpha$ -solaninu a  $\alpha$ -chaconinu jsou v celém textu uvedeny v  $\mu\text{g/g}$  sušiny. Všechny výsledky jsou uvedeny v Příloze 3. Stanovená sušina všech testovaných variant je uvedena v Tabulce 8.

Obsah glykoalkaloidů v bramboru (syrová hlíza se slupkou) se dělí na velmi nízký ( $< 50$  mg/kg), nízký (50 – 79 mg/kg), střední (80 – 159 mg/kg), vysoký (160 – 200 mg/kg) a velmi vysoký ( $> 200$  mg/kg) (Zrůst, 2004). Odrůdy Milva a Marabel patří do odrůd s nízkým obsahem GA. Odrůdy Laura a Valfi jsou někde na rozhraní nízké a střední úrovně GA.

Průměrná naměřená hodnota glykoalkaloidů v odrůdě Marabel varianta závlahy zaléváním byla 583  $\mu\text{g/g}$  chaconinu a 390  $\mu\text{g/g}$  solaninu, u stresované varianty 345  $\mu\text{g/g}$  chaconinu a 169  $\mu\text{g/g}$  solaninu a u kapkové závlahy 576  $\mu\text{g/g}$  chaconinu a 275  $\mu\text{g/g}$  solaninu. Ve variantě stresované suchem odrůda Marabel dosáhla nejnižších výsledků. Nejvyšších výsledků dosáhla naopak ve variantě závlahy zaléváním, kde se po přepočtu na čerstvou hmotu blížila stanovené hygienické hranici 200 mg/kg čerstvé hmoty.

Odrůda Milva pěstovaná ve variantě závlaha zaléváním obsahovala průměrně 407  $\mu\text{g/g}$  chaconinu a 188  $\mu\text{g/g}$  solaninu, ve variantě stres suchem 336  $\mu\text{g/g}$  chaconinu a 158  $\mu\text{g/g}$  sušiny solaninu a u kapkové závlahy obsahovala průměrně 525  $\mu\text{g/g}$  chaconinu a 210  $\mu\text{g/g}$  solaninu. Odrůda Milva též jako Marabel dosáhla ve stresované variantě nejnižších výsledků.

V odrůdě Laura byla stanovena průměrná hodnota 382  $\mu\text{g/g}$  chaconinu a 209  $\mu\text{g/g}$  solaninu u závlahy zaléváním, ve stresové variantě 699  $\mu\text{g/g}$  chaconinu a 388  $\mu\text{g/g}$  solaninu a u kapkové závlahy 522  $\mu\text{g/g}$  chaconinu a 285  $\mu\text{g/g}$  solaninu. Ve variantě stresované suchem vykazovala odrůda Laura nejvyšší obsah glykoalkaloidů. Dokonce byl překročen i hygienický limit o více jak jednu čtvrtinu (253,94 mg/kg).

Odrůda Valfi obsahovala průměrně 351  $\mu\text{g/g}$  chaconinu a 199  $\mu\text{g/g}$  solaninu u typu závlahy zaléváním, ve variantě stresované suchem 616  $\mu\text{g/g}$  chaconinu a 314  $\mu\text{g/g}$  solaninu, ve variantě kapková závlaha Valfi průměrně obsahovala 315  $\mu\text{g/g}$  chaconinu a 172  $\mu\text{g/g}$  solaninu. Nejvyšších hodnot glykoalkaloidů dosáhla odrůda Valfi ve variantě stres suchem, kde mírně přesáhla i stanovenou hygienickou hranici (207,03 mg/kg).

Naměřené hodnoty pro chaconin a solanin jsou graficky vyjádřené na Obrázku 5 a 6. Statistické výsledky uvádí Obrázek 7 a 8 a Příloha 2. Z Obrázku 7 a 8 je patné, že odrůdy

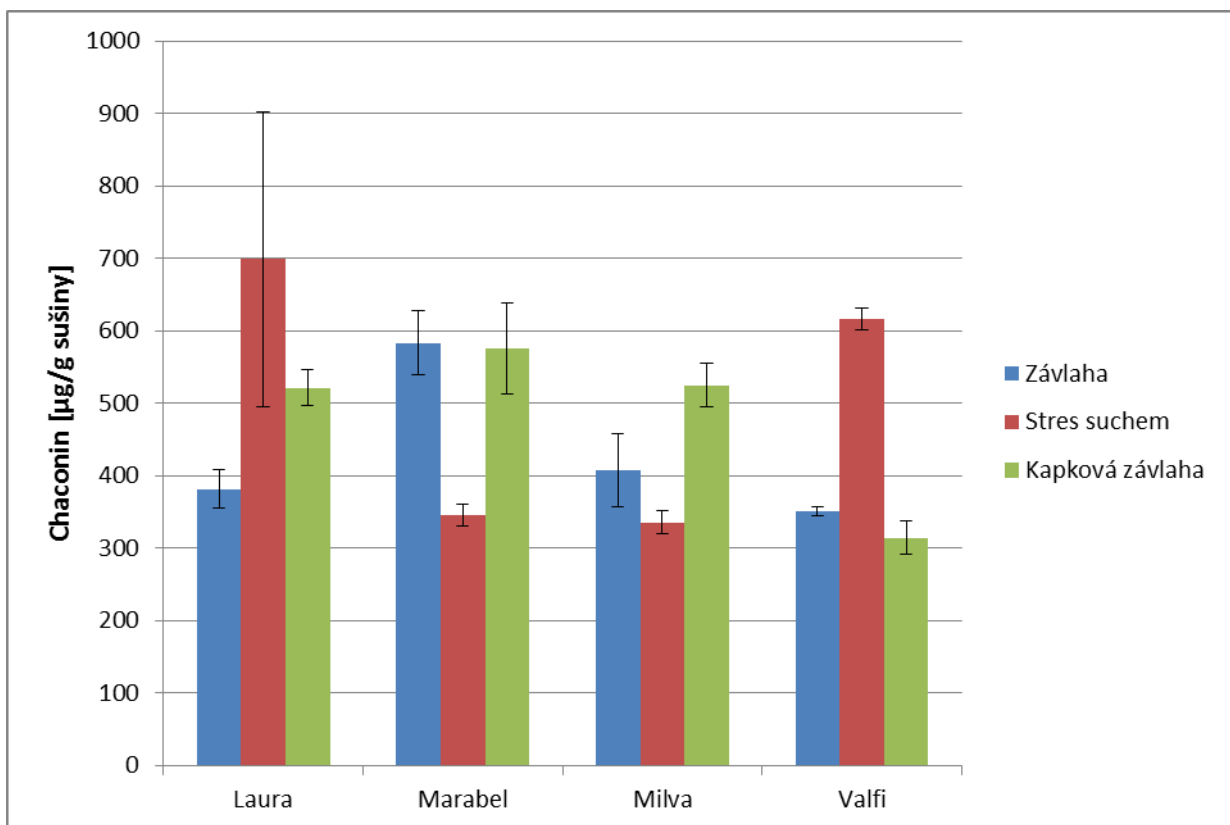
Milva a Marabel jsou průkazně odolnější vůči stresu suchem. Za to odrůdy Laura a Valfi jsou méně odolné vůči stresu suchem, jejich hodnoty jsou zvýšené ve variantě stresované suchem. Byly prokázány významné interakce odrůda x varianta závlahy (Obrázek 4 a 12 v Příloze 2).

Z hlediska odrůdy nejnižších hodnot chaconinu dosáhla odrůda Milva, nejvyšších Laura (viz. Obrázek 2 v Příloze 2). Stejně tomu tak bylo u solaninu (Obrázek 8 v Příloze 2). Typ odrůdy se ukázal jako statisticky průkazný (Obrázek 5 a 10 v Příloze 2).

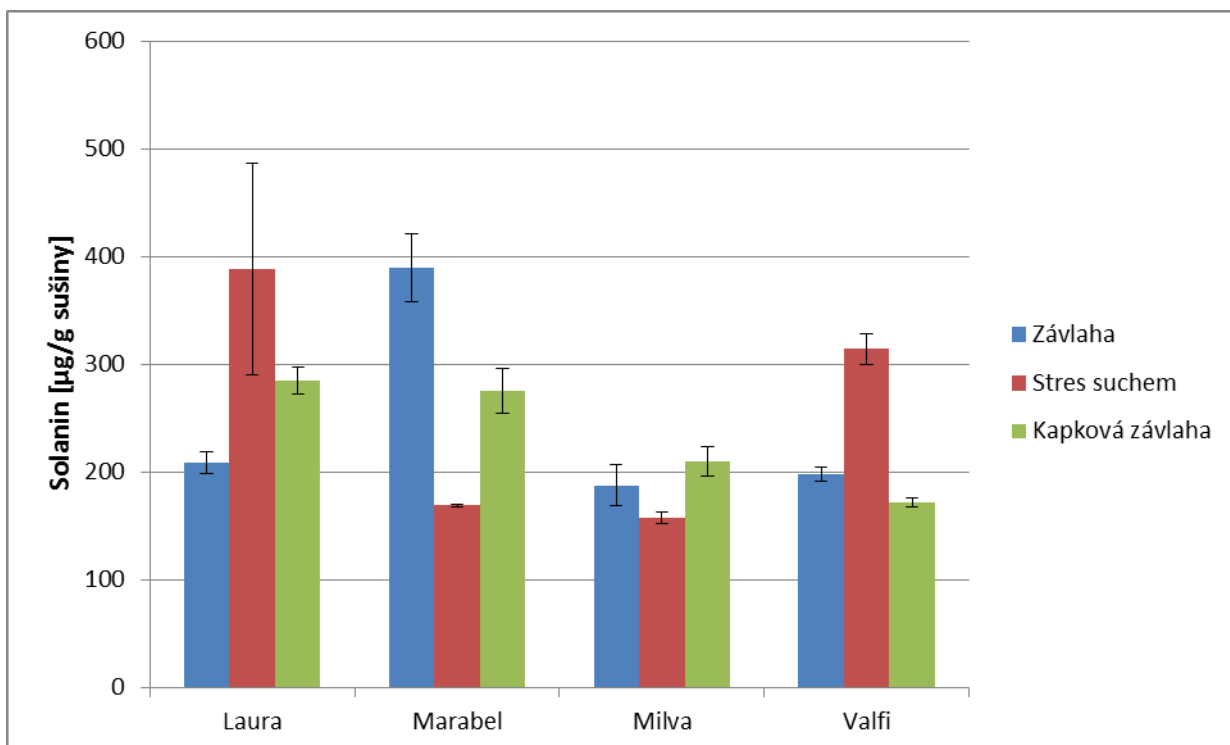
Z hlediska varianty nejvyšších hodnot chaconinu dosáhla varianta stres suchem a nejnižších závlaha zaléváním (Obrázek 3 v Příloze 2). Nejvyšších hodnot solanin dosáhl také ve variantě stres suchem, ale nejnižších u závlahy kapkové (Obrázek 9 v Příloze 2). Varianta se ukázala jako statisticky neprůkazná (Obrázek 6 a 11 v Příloze 2). Neprůkazná byla právě díky významným interakcím, kdy na stres suchem reagovaly odrůdy velmi rozdílným způsobem.

Významné jsou interakce mezi odrůdou a variantou závlahy (Obrázek 4 a 12 v Příloze 2).

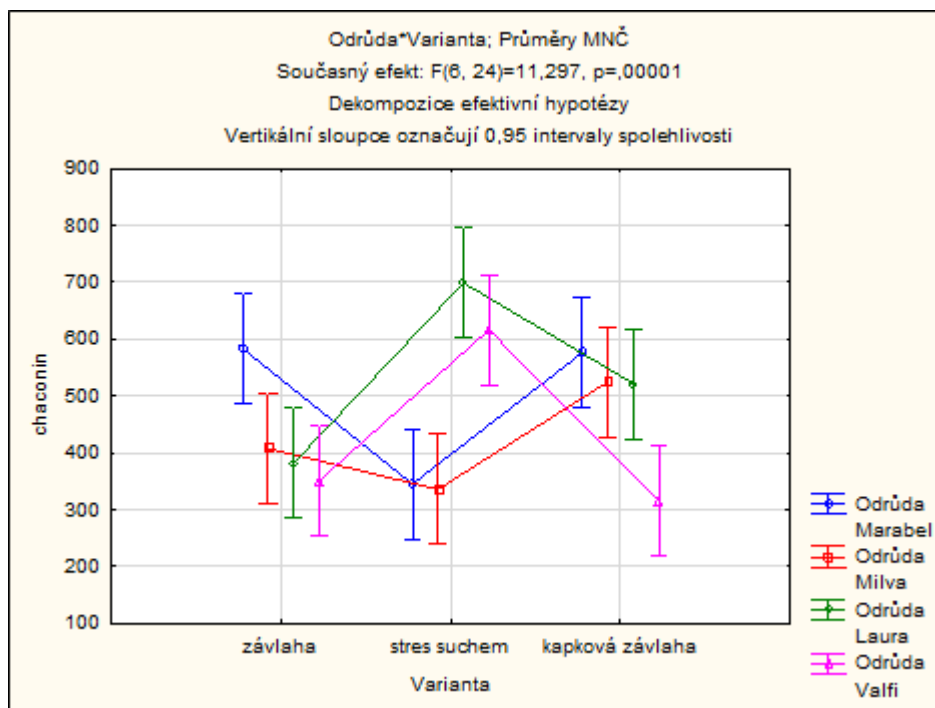
Byl pozorován poměr chaconin/solanin. V pokusu se pohyboval od 1,47 (Marabel závlaha zaléváním) do 2,53 (Milva kapková závlaha). Což odpovídá obecně udávaným hodnotám v literatuře. Průměr poměrů u varianty závlaha zaléváním je 1,81, u stresované 1,98 a u kapkové závlahy 2,06. Průměrně odrůda Marabel dosáhla poměru chaconin/solanin 1,88, odrůda Milva 2,26, Valfi 1,85 a odrůda Laura 1,81. Všechny poměry jsou uvedeny ve výsledcích v Příloze 3.



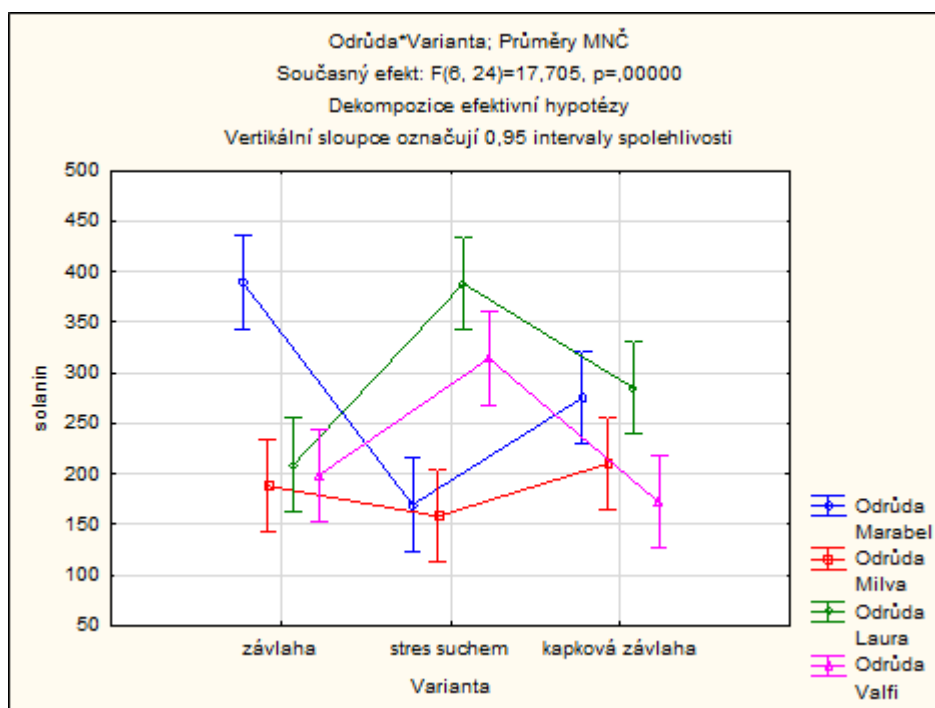
Obrázek 5 Obsah chaconinu



Obrázek 6 Obsah solaninu



**Obrázek 7** Obsah chaconinu



**Obrázek 8** Obsah solaninu

## Sušina

Množství sušiny v hlíze bramboru se udává okolo 20 %, je závislé na druhu odrůdy, termínu sklizně, délky a způsobu skladování. V pokusu bylo stanoveno množství sušiny vzorků, které se pohybovalo od 18,11 % (Marabel kapková závlaha) do 23,36 % (Laura stres suchem). Jednotlivé hodnoty sušiny uvádí Tabulka 8.

**Tabulka 8** Obsah sušiny

Odrůda	Typ závlahy	% sušiny
Marabel	zalévání	20,30
Milva	zalévání	20,37
Laura	zalévání	23,09
Valfi	zalévání	19,52
Marabel	stres suchem	21,26
Milva	stres suchem	19,38
Laura	stres suchem	23,36
Valfi	stres suchem	22,53
Marabel	kapková závlaha	18,11
Milva	kapková závlaha	20,73
Laura	kapková závlaha	21,28
Valfi	kapková závlaha	19,99

## 6 Diskuze

V provedeném pokusu byly změřeny obsahy  $\alpha$ -solaninu a  $\alpha$ -chaconinu v lyofilizovaných vzorcích brambor. Jak již bylo výše zmíněno na jejich obsah má vliv několik faktorů, jako je odrůda, ročník, stanoviště a skladování. Glykoalkaloidy se v rostlině tvoří na obranu ve stresových podmínkách, proto napadení škůdci nebo mechanické poškození zvýší jejich syntézu. V pokusu byl zkoumán vliv stresového faktoru sucha, kde se předpokládá zvýšený obsah GA, v porovnání s dvěma dalšími variantami – závlaha zaléváním a kapková závlaha. Zkoumány byly čtyři různé odrůdy – Milva, Laura, Marabel a Valfi. Tyto odrůdy patří mezi brambory s nízkým až středním obsahem GA. Tedy nepředstavují zdravotní riziko pro konzumenta.

Z pozorovaného stresového faktoru sucha nejvyšších hodnot  $\alpha$ -solaninu i  $\alpha$ -chaconinu dosáhla odrůda Laura. Podobných hodnot dosahovala i odrůda Valfi. Laura a Valfi jsou odrůdy málo odolné vůči stresu suchem. Stres suchem se neprojevil na odrůdách Milva a Marabel. Tyto odrůdy jsou odolné vůči stresu suchem. Různé projevy odrůd na stres suchem potvrzují odrůdovou závislost. U varianty závlaha zaléváním dosáhla nejvyšších hodnot odrůda Marabel. Kapková závlaha nezpůsobila mezi odrůdami významné rozdíly v obsahu glykoalkaloidů.

Ke stejnému závěru dospěli i autoři Papathanasiou et al. (1999) v pokusu provedeném na třech odlišných odrůdách, kde byly brambory vystaveny nízkým teplotám, chladu, vysokým teplotám, podmáčení, stresu suchem a kombinaci stresů. Pouze u jedné odrůdy vzrostl výrazně obsah glykoalkaloidů při stresu suchem i při stresu zamokřením. Autoři došli k podobnému závěru, že odolnost vůči stresu je do velké míry závislá na odrůdě. Ke stejnému zjištění dospěli i autoři Hamouz et al. (2014), kteří zkoumali vliv odrůdy, barvu dužiny, stanoviště a ročník na celkový obsah glykoalkaloidů. Jako rozhodující faktor se projevil genotyp brambor.

Z námi provedeného pokusu a z výsledků jiných studií vyplývá, že obsah glykoalkaloidů je závislý na typu odrůdy brambor.

Další obdobný pokus s pěti andskými odrůdami byl proveden autory Andre et al. (2009). Reakce odrůd na stres suchem byla velice odrůdově specifická. Na dvou odrůdách se stres nijak neprojevil, naproti tomu u ostatních třech vzrostl jejich obsah 2,4 krát, 3,3 krát a 3,9 krát v porovnání s kontrolním vzorkem. Byl pozorován i poměr  $\alpha$ -chaconinu/ $\alpha$ -solaninu. Zdá se,

že stres suchem nemá vliv na tento poměr. Stres suchem je předpokladem pro zvýšenou tvorbu glykoalkaloidů. Potvrzuje to i pokus, kde byl obsah GA zvýšen o 43 – 50 % (Bejarano et al., 2000).

V našem pokusu byly naměřené hodnoty celkově zvýšené. Klimatické podmínky období růstu pokusu byly teplejší a sušší v porovnání s dlouhodobým průměrem. Proto se zvýšené hodnoty GA u provedeného pokusu mohly předpokládat. Odrůdy s deklarovaným nízkým obsahem dosahovaly hodnot vyšších, dokonce byl překročen i hygienický limit u odrůd Laura a Valfi. Stres suchem ovlivňuje množství glykoalkaloidů, statisticky se to podařilo prokázat u dvou odrůd. Jednoznačně se to, ale prokázat nepodařilo.

Kromě sucha i vysoká teplota může zvýšit obsah glykoalkaloidů. Nasimulované podmínky 32 °C přes den a 27 °C v noci při pěstování tří rozdílných odrůd zvýšily obsahy celkových glykoalkaloidů v listech bramboru v porovnání s kontrolními podmínkami 22 °C přes den a 17 °C přes noc. Vliv teploty na poměr glykoalkaloidů nebyl potvrzen (Lafta et Lorenzen, 2000).

Obecně sucho a vysoké teploty snižují výnos a kvalitu brambor všude ve světě. Bylo provedeno mnoho výzkumů na fyziologii, biochemii a genetiku brambor s cílem pochopit základ pro toleranci stresu a tím vyřešit problém produkce za sucha. Mezi faktory způsobující sucho patří nedostatek dešťových srážek, nadměrné množství soli v půdním roztoku nebo zvýšené využití omezených sladkovodních zdrojů na městské a průmyslové použití. Do budoucna se předpokládá, že se globální oteplování bude stupňovat. Proto velkou výzvou zůstává šlechtění nových odrůd, které jsou odolné vůči suchu (Obidiegwu et al., 2015).

Glykoalkaloidy sice mohou být pro konzumenta toxické, ale v rostlině mají nezastupitelnou funkci. Cílem šlechtitelů snížit obsah GA v hlíze bramboru z důvodu bezpečnosti potravin má za následek snížení GA v listech a tím se sníží odolnost rostliny vůči škůdcům a patogenům. Z pozorování vyplývá, že množství a zastoupení GA se v částech rostliny liší. Proto je zájem o vyšlechtění nového kultivaru s nízkým obsahem GA v hlíze a zachováním vysoké úrovně GA v listech rostliny (Ginzberg, 2009).

Pro úplnost pokusu by bylo vhodné provést pokus znovu se stejnými odrůdami, na stejném stanovišti a zhodnotit vliv ročníku.

## 7 Závěr

Cílem práce bylo stanovit obsah majoritních glykoalkaloidů v různých odrůdách brambor a zhodnotit vliv stresu suchem na jejich obsah. Byl proveden pokus se čtyřmi odrůdami – Milva, Laura, Marabel a Valfi. Všechny odrůdy byly pěstovány ve variantách – závlaha zaléváním, kapková závlaha a varianta stresovaná suchem. Stresovaná varianta nebyla zavlažována nijak jinak než srážkami. Období pěstování bylo spíše suché a teplé. Stres suchem je předpoklad pro zvýšenou hladinu glykoalkaloidů v bramboru.

Vliv odrůdy se ukázal jako rozhodující faktor ovlivňující obsah glykoalkaloidů v bramboru. Odrůdy odlišně reagovaly na typ závlahy. Odolnost vůči stresu suchem projevily odrůdy Milva a Marabel. Horší odolnost a vyšší obsahy glykoalkaloidů byly zjištěny u odrůd Laura a Valfi, které přesáhly stanovený hygienický limit 200 mg/kg. Proto je nutné pečlivě vybrat odrůdu za předpokladu suchého a teplého ročníku pěstování nebo v lokalitách, kde tyto podmínky běžně hrozí. Hypotéza, že míra akumulace glykoalkaloidů v bramborách je podmíněna typem odrůdy, byla potvrzena.

Stres suchem se ukázal jako faktor, který může hladinu glykoalkaloidů ovlivnit, ale statisticky se to jednoznačně prokázat nepodařilo. Všechny hodnoty byly zvýšené, na čem se do značné míry mohlo podepsat i abnormálně teplé počasí na stanovišti v roce 2015. Hypotéza, že vlivem stresu suchem dochází k nárůstu toxických glykoalkaloidů v hlízách brambor, byla zamítnuta. Tuto hypotézu se nepodařilo potvrdit z důvodu rozmanitého chování odrůd pěstovaných v podmínkách sucha. Byly zjištěny významné interakce odrůda x varianta závlahy.

Závěrem lze konstatovat, že dodržováním obecných doporučení tj. výběr odrůdy, dodržování zásad správné agrotechniky, správné skladování aj., nepředstavují brambory z hlediska obsahu glykoalkaloidů pro konzumenta nebezpečí. Navíc odstraněním slupky při kulinární úpravě se odstraní většina glykoalkaloidů v hlíze a možné riziko pro konzumenta se sníží na minimum.



## 8 Seznam literatury

Andre, Ch. M., Schafleitner, R., Guignard, C., Oufir, M., Aliaga, C. A. A., Nomberto, G., Hoffmann, L., Hausman, J-F., Evers, D., Larondelle, Y. 2009. Modification of the Health-Promoting Value of Potato Tubers Field Grown under Drought Stress: Emphasis on Dietary Antioxidant and Glycoalkaloid Contents in Five Native Andean Cultivars (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57 (2). p.599-609.

Bejarano, L., Mignolet, E., Davaux, A., Espinola, N., Carrasco, E., Larondelle, Y. 2000. Glycoalkaloids in potato tubers: the effect of variety and drought stress on the  $\alpha$ -solanine and  $\alpha$ -chaconine contents of potatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80. p.2096 – 2100.

Cazes, J. 2001. *Encyclopedia of chromatography*. New York: Marcel Dekker. ISBN 0824705114.

Čepl, J. 2012. Máme rádi brambory: proč jsou brambory zdravé, jak je správně nakupovat i pěstovat, úspěšné projekty PRV a několik osvědčených receptů. Praha: Ministerstvo zemědělství České republiky. s.111. ISBN 978-80-7434-060-4.

Diviš, J. 2007. Obsah dusičnanů a glykoalkaloidů v hlízách brambor z ekologického a konvekčního pěstování. Sborník z konference „Ekologické zemědělství 2007“. s.140-142.

Fanali, S., Haddad, P. R., Lloyd, D., Poole, C., Schoenmakers, P. J. 2013. *Liquid chromatography*. Amsterdam: Elsevier. ISBN 9780124158078.

Friedman, M. 2004. Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds. *Journal of Chromatography A*. vol. 1054. p.143-155.

Friedman, M. 2006. Potato Glycoalkaloids and Metabolites: Roles in the Plant in the Diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (23). p. 8655-8681.

Ginzberg, I., Tokuhisa, J. G., Veilleux, R. E. 2009. Potato Steroidal Glycoalkaloids: Biosynthesis and Genetic Manipulation. *Potato Research*. 52. 1-15.

Hajšlová, J., Schulzová, V. 2007. Toxické alkaloidy v potravním řetězci člověka. Vědecká práce VVF: PROJ/2007/6/deklas.

Hamouz, K., Pazderů, K., Lachman, J., Orsák, M., Pivec, V., Hejtmánková, K., Tomášek, J., Čížek, M. 2014. Effect of cultivar, flesh colour, location and year of cultivation on the glycoalkaloid content in potato tubers. *Plant, Soil and Environment*. 60. (11). p. 512-517. ISSN: 1214-1178.

Hejtmánková, K. 2011. Vliv faktorů na obsah vybraných ukazatelů jakosti hlíz brambor. Doktorská disertační práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Agronomická fakulta. Praha.

Holčapek, M. Hmotnostní analyzátory [online]. Univerzita Pardubice. 2016. [cit. 2016-02-27]. Dostupné z: <[http://holcapek.upce.cz/teaching/03\\_MS\\_analyzatory.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/03_MS_analyzatory.pdf)>

Holčapek, M. Ionizační techniky [online]. Univerzita Pardubice. 2016. [cit. 2016-02-27]. Dostupné z: <[http://holcapek.upce.cz/teaching/02\\_Ionizacni\\_techiky.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/02_Ionizacni_techiky.pdf)>

Jůzl, M., Zrůst J., Hlušek, J. 2008. Rizikové látky v bramboru (*Solanum tuberosum* L.) a ve výrobcích z hlíz: Hazardous substances in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) and potato-tuber products : monografie. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. s.139. ISBN 978-80-7375-167-8.

Kožnarová, V. 2005. Inovace výuky meteorologie a klimatologie. Projekt FRVŠ 3452/2005, MŠMT. FAPPZ ČZU v Praze. 23 posterů.

Kožnarová, V., Klabzuba, J. 2002. Doporučení WMO pro popis meteorologických. resp. klimatologických podmínek definovaného období. *Rostlinná výroba. ČAZV – ÚZPI*. ISSN: 0370-663X. 48 (4). s. 190-192.

Lafta, A. M., Lorenzen, J. H. 2000. Influence of High Temperature and Reduced Irradiance on Glycoalkaloid Levels in Potato Leaves. *Journal of the American Society for Horticultural Science*.

Lachman J., Hamouz K., Orsák M., Pivec V. 2001. Potato glycoalkaloids and their significance in plant protection and human nutrition, *Plant production*. 47. p.181-191.

Lachman, J., Hamouz, K., Musilová, J., Hejtmánková, K., Kotíková, Z., Pazderů, K., Domkářová, J., Pivec, V., Cimr, J. 2013. Effect of peeling and three cooking methods on the content of selected phytochemicals in potato tubers with various colour of flesh. *Food chemistry*. 138 (2-3). p.1189-1197.

- Lachman, J., Hamouz, K., Orsák, M. 2005. Červeně a modře zbarvené brambory – významný zdroj antioxidantů v lidské stravě. *Chemické listy* 99, s.474-482.
- Linhart, I. 2012. *Toxikologie: interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. s.375. ISBN 978-80-7080-806-1.
- Mazurczyk, A. 1998. Vliv genotypu, zralosti ročníku, balení a expozice světla na akumulaci glykoalkaloidů v hlízách brambor. *Bramborářství*. 6 (1).
- Milner, S. E., Brunton, N. P., Jones, P. W., O'Braien, N. M., Collins, S. G., Maguire, A. R. 2011. Bioactives of Glycoalkaloids and Their Aglyconwc from Solanum Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59 (8). p.3454-3484.
- Nováková, L., Douša, M. 2013. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Klatovy: Michal Douša. s.235. ISBN 978-80-260-4244-0.
- Obidiegwu, J. E., Bryan, G. J., Jones, H. G., Prashar, A. 2015. Coping with drought: stress and adaptive responses in potato and perspectives for improvement. *Frontiers in Plant Science*. 6: 542.
- Papathanasiou, F., Mitchell, S. H., Watson, S., Harvey, B. M. R. 1999. Effect of environmental stress during tuber development on accumulation of glykoalkaloids in potato (*Solanum tuberosum* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79. p.1183 – 1189.
- Poole, C. 2012. *Gas chromatography*. Amsterdam: Elsevier. ISBN 978-0-12-385540-4.
- Roge, A. B. Firke, S. N. Dhane, R. M. Gunjkar, V. J., Vadvalkar, S.M. 2011. Novel Achievemnt of HPLC: UPLC. *International Journl of PharmTech Research*. 3 (3). p.1423-1429. ISSN: 0974-4304.
- Scott, R. P. 1994. *Liquid chromatography for the analyst*. New York: Marcel Dekker. *Chromatographic science*. ISBN 0824791843.
- Slavík, B. 2000. *Květena České republiky*. Academia. Praha. s.770. ISBN: 80-200-0306-1.
- Tajner-Czopek, A. – Rytel, E. – Kita, A. – Peksa, A. – Hamouz, K. 2012. The influence of thermal process of coloured potatoes on the content of glykoalkaloids in the potato products. *Food Chemistry*. 133 (4). p.1117-1122. ISSN: 0308-8146.

Velíšek, J., Hajšlová, J. 2009. Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2 sv. ISBN 978-80-86659-17-6.

Vodrážka, Z. 2002. Biochemie. Academia. Praha. s.191. ISBN: 80-200-0600-1.

Vokál, B. 2003. Pěstujeme brambory. Praha: Grada. s.103. ISBN 80-247-0567-2.

Zrůst J. 2004a. Glykoalkaloidy u brambor a ostatních komodit. Vědecká práce VVF: PROJ/2003/19/deklas.

Zrůst, J. Obsah glykoalkaloidů (alfa-chaconinu a alfa-solaninu) v hlízách bramboru (*Solanum tuberosum* L.) a v nejrozšířenějších výrobcích z nich [online]. Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod. Číslo projektu: EP 09600065632004. 2004b. [cit. 2016-02-27]. Dostupné z: <<http://www.agroporadenstvi.cz/default.asp?ids=1979&ch=207&typ=1&val=31579>>

## 9 Přílohy

### Příloha 1 Plán pole

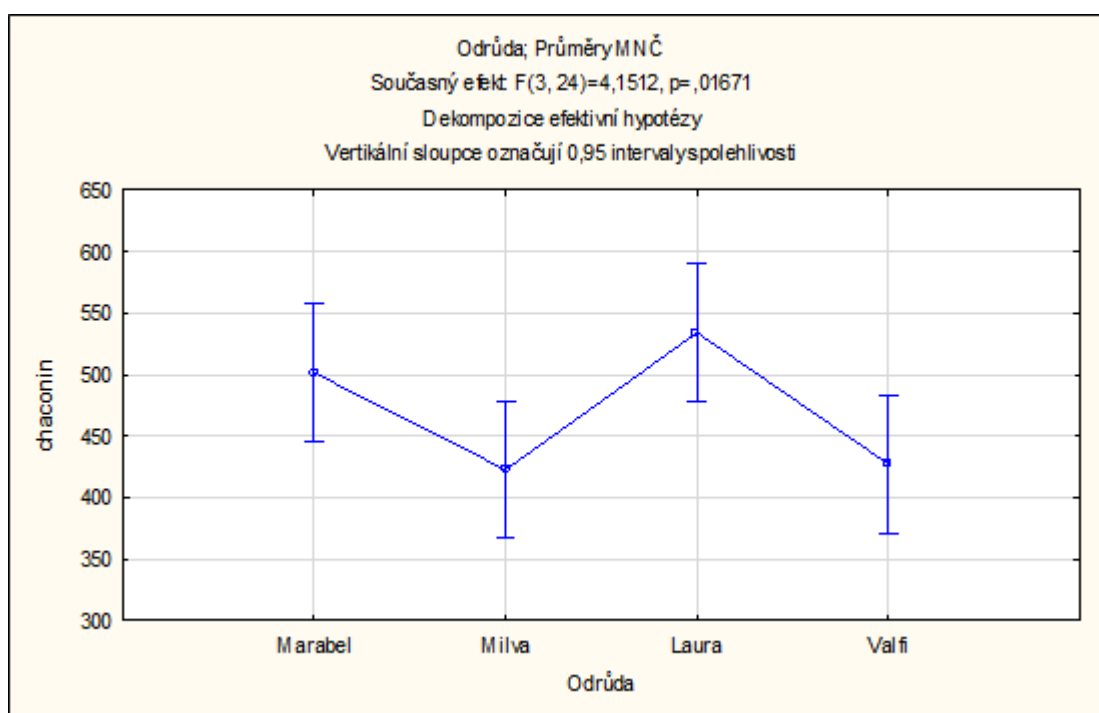
LEGENDA										
1. MARABEL R	3. LAURA PR ružová	IZ = IZOLACE								
2. MILVA PR	4. VALFI PP fialová	iné = brambory už předtým vysazené na políčku							X = neznáma odroda	
	30cm\70cm	0	0	1	2	3	4	5	6	
1	1	IZ iné	IZ iné	IZ X	IZ X	IZ X	IZ X	IZ IMPALA	IZ IMPALA	
2	2	IZ iné	IZ iné	IZ X	IZ X	IZ X	IZ X	IZ IMPALA	IZ IMPALA	
3	3	IZ iné	IZ iné	IZ X	IZ X	IZ X	IZ X	IZ IMPALA	IZ IMPALA	
4	4	IZ iné	IZ iné	IZ X	IZ X	IZ X	IZ X	IZ IMPALA	IZ IMPALA	
5	5	IZ iné	IZ iné	IZ X	IZ X	IZ X	IZ X	IZ IMPALA	IZ IMPALA	
6	6	IZ iné	IZ iné	IZ X	IZ X	IZ X	IZ X	IZ IMPALA	IZ IMPALA	
7	7	IZ iné	IZ iné	IZ X	IZ X	IZ X	IZ X	IZ IMPALA	IZ IMPALA	
8	1	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
9	2	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
10	3	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
11	4	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
12	5	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
13	6	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
14	7	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
15	8	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
16	9	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
17	10	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
18	11	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
19	12	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
20	13	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
21	14	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
22	15	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
23	1	IZ iné	IZ iné	MARABEL	VALFI	LAURA	MILVA	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
24	2	IZ iné	IZ iné	MARABEL	VALFI	LAURA	MILVA	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
25	3	IZ iné	IZ iné	MARABEL	VALFI	LAURA	MILVA	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
26	4	IZ iné	IZ iné	MARABEL	VALFI	LAURA	MILVA	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
27	5	IZ iné	IZ iné	MARABEL	VALFI	LAURA	MILVA	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
28	6	IZ iné	IZ iné	MARABEL	VALFI	LAURA	MILVA	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
29	7	IZ iné	IZ iné	MARABEL	VALFI	LAURA	MILVA	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
30	8	IZ iné	IZ iné	MARABEL	VALFI	LAURA	MILVA	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
31	9	IZ iné	IZ iné	MARABEL	VALFI	LAURA	MILVA	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
32	10	IZ iné	IZ iné	MARABEL	VALFI	LAURA	MILVA	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
33	11	IZ iné	IZ iné	MARABEL	VALFI	LAURA	MILVA	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
34	12	IZ iné	IZ iné	MARABEL	VALFI	LAURA	MILVA	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
35	13	IZ iné	IZ iné	MARABEL	VALFI	LAURA	MILVA	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
36	14	IZ iné	IZ iné	MARABEL	VALFI	LAURA	MILVA	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
37	15	IZ iné	IZ iné	MARABEL	VALFI	LAURA	MILVA	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Závlaha postrekom
38	1	IZ iné	IZ iné	IZ MARABEL	IZ VALFI	IZ LAURA	IZ MILVA	IZ IMPALA	IZ IMPALA	
39	2	IZ iné	IZ iné	IZ MARABEL	IZ VALFI	IZ LAURA	IZ MILVA	IZ IMPALA	IZ IMPALA	
40	3	IZ iné	IZ iné	IZ MARABEL	IZ VALFI	IZ LAURA	IZ MILVA	IZ IMPALA	IZ IMPALA	
41	4	IZ iné	IZ iné	IZ MARABEL	IZ VALFI	IZ LAURA	IZ MILVA	IZ IMPALA	IZ IMPALA	
42	5	IZ iné	IZ iné	IZ MARABEL	IZ VALFI	IZ LAURA	IZ MILVA	IZ IMPALA	IZ IMPALA	
43	6	IZ iné	IZ iné	IZ MARABEL	IZ VALFI	IZ LAURA	IZ MILVA	IZ IMPALA	IZ IMPALA	
44	7	IZ iné	IZ iné	IZ MARABEL	IZ VALFI	IZ LAURA	IZ MILVA	IZ IMPALA	IZ IMPALA	
45	1	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Kapková závlaha
46	2	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Kapková závlaha
47	3	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Kapková závlaha
48	4	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Kapková závlaha
49	5	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Kapková závlaha
50	6	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Kapková závlaha
51	7	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Kapková závlaha
52	8	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Kapková závlaha
53	9	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Kapková závlaha
54	10	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Kapková závlaha
55	11	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Kapková závlaha
56	12	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Kapková závlaha
57	13	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Kapková závlaha
58	14	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Kapková závlaha
59	15	IZ iné	IZ iné	LAURA	MILVA	MARABEL	VALFI	IZ IMPALA	IZ IMPALA	Kapková závlaha



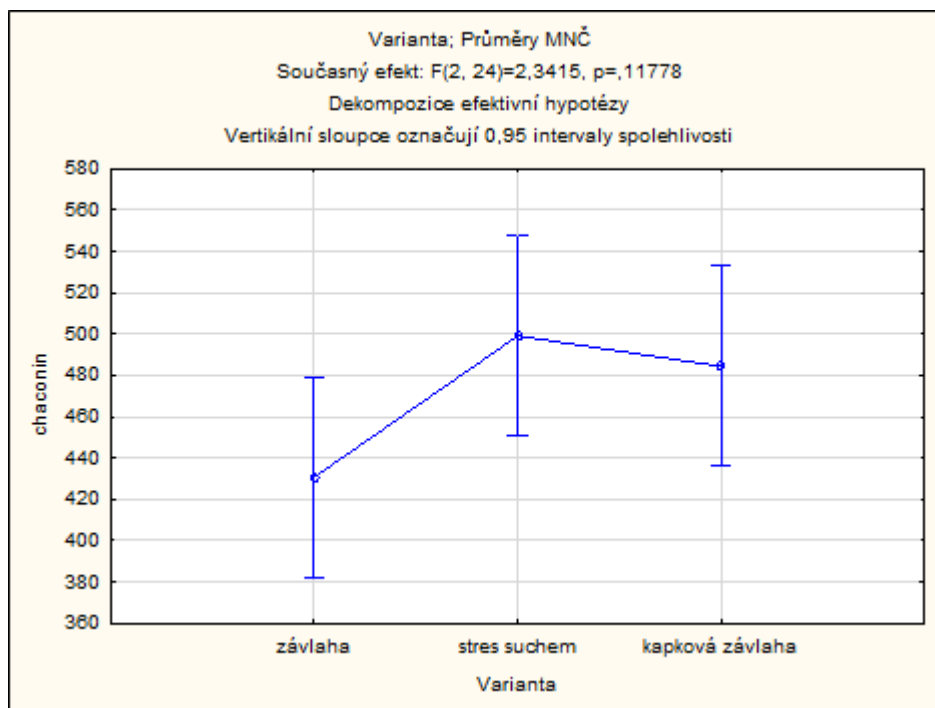
## Příloha 2 Statistické vyhodnocení

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro chaconin (Tabulka dat) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	7998124	1	7998124	1209,121	0,000000
Odrůda	82378	3	27459	4,151	0,016710
Varianta	30977	2	15488	2,341	0,117775
Odrůda*Varianta	448364	6	74727	11,297	0,000005
Chyba	158756	24	6615		

Obrázek 1



Obrázek 2



Obrázek 3

Tukeyův HSD test; proměnná chaconin (Tabulka dat)  
Homogenní skupiny, alfa = ,05000  
Chyba: meziskup. PČ = 6614,8, sv = 24,000

Č. buňky	Odrůda	Varianta	chaconin Průměr	1	2	3	4
12	Valfi	kapková závlaha	314,6598	****			
5	Milva	stres suchem	335,6714	****			
2	Marabel	stres suchem	345,1817	****	****		
10	Valfi	závlaha	350,7420	****	****		
7	Laura	závlaha	381,5763	****	****	****	
4	Milva	závlaha	407,4083	****	****	****	
9	Laura	kapková závlaha	521,5858	****	****	****	****
6	Milva	kapková závlaha	524,8462	****	****	****	****
3	Marabel	kapková závlaha	576,0072		****	****	****
1	Marabel	závlaha	583,2678		****	****	****
11	Valfi	stres suchem	616,3444			****	****
8	Laura	stres suchem	698,9001				****

Obrázek 4



Tukeyův HSD test; proměnná chaconin (Tabulka dat) Homogenní skupiny, alfa = ,05000 Chyba: meziskup. PČ = 6614,8, sv = 24,000				
Č. buňky	Odrůda	chaconin Průměr	1	2
2	Milva	422,6420	****	
4	Valfi	427,2487	****	
1	Marabel	501,4856	****	****
3	Laura	534,0207		****

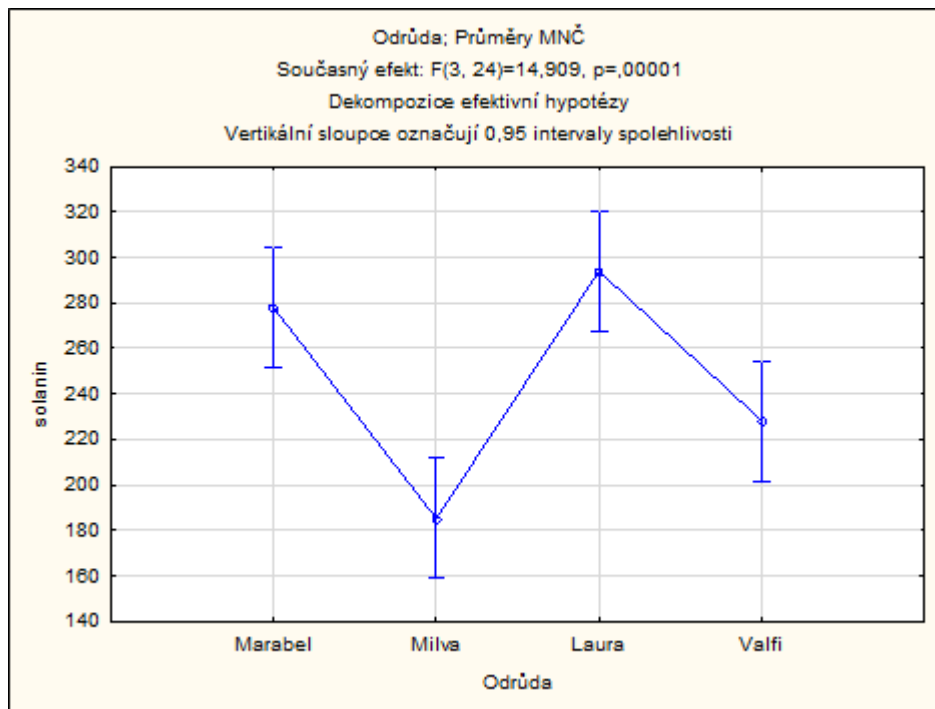
Obrázek 5

Tukeyův HSD test; proměnná chaconin (Tabulka dat) Homogenní skupiny, alfa = ,05000 Chyba: meziskup. PČ = 6614,8, sv = 24,000			
Č. buňky	Varianta	chaconin Průměr	1
1	závlaha	430,7486	****
3	kapková závlaha	484,2748	****
2	stres suchem	499,0244	****

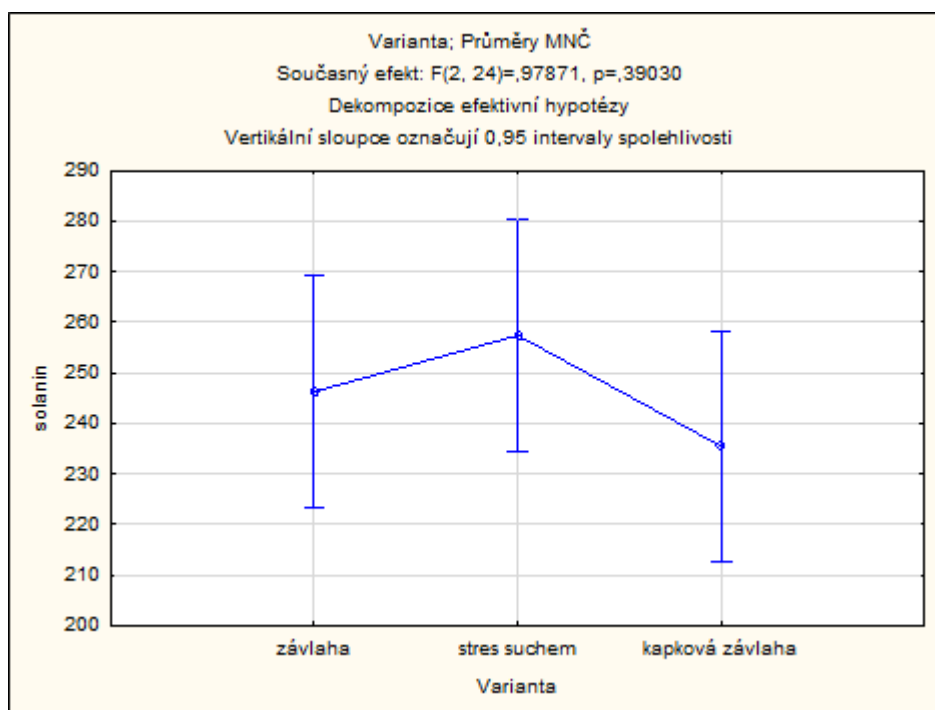
Obrázek 6

Jednorozměrné testy významnosti pro solanin (Tabulka dat) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy					
Efekt	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	2184593	1	2184593	1479,646	0,000000
Odrůda	66038	3	22013	14,909	0,000011
Varianta	2890	2	1445	0,979	0,390297
Odrůda*Varianta	156840	6	26140	17,705	0,000000
Chyba	35434	24	1476		

Obrázek 7



Obrázek 8



Obrázek 9

Tukeyův HSD test; proměnná solanin (Tabulka dat) Homogenní skupiny, alfa = ,05000 Chyba: meziskup. PČ = 1476,4, sv = 24,000					
Č. buňky	Odrůda	solanin Průměr	1	2	3
2	Milva	185,2070	****		
4	Valfi	228,1913	****	****	
1	Marabel	277,9699		****	****
3	Laura	293,9896			****

Obrázek 10

Tukeyův HSD test; proměnná solanin (Tabulka dat) Homogenní skupiny, alfa = ,05000 Chyba: meziskup. PČ = 1476,4, sv = 24,000			
Č. buňky	Varianta	solanin Průměr	1
3	kapková závlaha	235,4188	****
1	závlaha	246,2345	****
2	stres suchem	257,3650	****

Obrázek 11

Tukeyův HSD test; proměnná solanin (Tabulka dat) Homogenní skupiny, alfa = ,05000 Chyba: meziskup. PČ = 1476,4, sv = 24,000									
Č. buňky	Odrůda	Varianta	solanin Průměr	1	2	3	4	5	6
5	Milva	stres suchem	157,9363	****					
2	Marabel	stres suchem	169,2730	****	****				
12	Valfi	kapková závlaha	171,8375	****	****	****			
4	Milva	závlaha	187,7564	****	****	****			
10	Valfi	závlaha	198,6437	****	****	****			
7	Laura	závlaha	208,9785	****	****	****	****		
6	Milva	kapková závlaha	209,9283	****	****	****	****		
3	Marabel	kapková závlaha	275,0772		****	****	****	****	
9	Laura	kapková závlaha	284,8323			****	****	****	****
11	Valfi	stres suchem	314,0927				****	****	****
8	Laura	stres suchem	388,1580					****	****
1	Marabel	závlaha	389,5595						****

Obrázek 12

### Příloha 3 Výsledky měření pokusu

odrůda	typ závlahy	chaconin µg/g sušiny	solanin µg/g sušiny	chaconin/solanin
Marabel	závlaha zaléváním	539	355	1,52
Marabel	závlaha zaléváním	628	416	1,51
Marabel	závlaha zaléváním	583	397	1,47
Milva	závlaha zaléváním	396	185	2,14
Milva	závlaha zaléváním	474	212	2,23
Milva	závlaha zaléváním	352	166	2,12
Laura	závlaha zaléváním	392	212	1,85
Laura	závlaha zaléváním	407	220	1,85
Laura	závlaha zaléváním	345	195	1,77
Valfi	závlaha zaléváním	359	195	1,84
Valfi	závlaha zaléváním	350	208	1,68
Valfi	závlaha zaléváním	343	193	1,78
Marabel	stres suchem	327	168	1,95
Marabel	stres suchem	364	171	2,13
Marabel	stres suchem	345	170	2,03
Milva	stres suchem	315	150	2,10
Milva	stres suchem	355	161	2,20
Milva	stres suchem	337	162	2,07
Laura	stres suchem	540	328	1,65
Laura	stres suchem	570	310	1,84
Laura	stres suchem	987	526	1,88
Valfi	stres suchem	638	327	1,95
Valfi	stres suchem	603	322	1,87
Valfi	stres suchem	608	294	2,07
Marabel	kapková závlaha	652	301	2,17
Marabel	kapková závlaha	576	276	2,09
Marabel	kapková závlaha	500	249	2,01
Milva	kapková závlaha	483	192	2,52
Milva	kapková závlaha	537	212	2,53
Milva	kapková závlaha	554	226	2,45
Laura	kapková závlaha	500	267	1,87
Laura	kapková závlaha	557	290	1,92
Laura	kapková závlaha	508	297	1,71
Valfi	kapková závlaha	332	172	1,93
Valfi	kapková závlaha	330	177	1,86
Valfi	kapková závlaha	282	166	1,69