



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

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

## **Sledování biologicky aktivních látek v asijské zelenině z čeledi Brukvovité**

# **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

**Autor:** Martina Svobodová

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

České Budějovice 2019

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Sledování biologicky aktivních látek v asijské zelenině z čeledi Brukvovité jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě 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 výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2019

.....

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Evě Dadákové, Ph.D. za odborné vedení, připomínky a za poskytnuté cenné rady při zpracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Tamaře Pelikánové za pomoc při přípravě vzorků k analýze. Také děkuji své rodině za trpělivost a podporu nejen při psaní bakalářské práce, ale i během celého studia.

# Sledování biologicky aktivních látek v asijské zelenině z čeledi Brukvovité

## Abstrakt

V bakalářské práci je sledován obsah polyfenolických látek v netradiční listové zelenině v různou roční dobu. Mezi experimentálně zkoumanou zeleninu jsou zařazeny: hořčice čínská zelená (*Brassica rapa var. komatsuna*), hořčice čínská červená (*Brassica juncea (L.) Czern.*), mizuna a mibuna (*Brassica rapa ssp. japonica (L.)*). Ač se jedná o asijskou listovou zeleninu, v současné době je rozšířena i u nás a lze ji sehnat jak v podobě semen, tak i jako listy pro konzumaci. Proto je otázka obsahu prospěšných biologicky aktivních látek tak aktuální. Do skupiny fenolických látek řadíme flavonoidy, které jsou lehce dostupné a významná je i jejich biologická aktivita. Zelenina má díky flavonoidům antioxidační vlastnosti, což zabraňuje peroxidaci lipidů a jsou tak likvidovány volné radikály. Tato vlastnost je prospěšná i pro člověka, a proto se flavonoidní látky používají i v lékařství. Mohou předcházet vzniku chronických onemocnění, jako je kardiovaskulární onemocnění nebo ateroskleróza. Flavonoidům se také připisují preventivní účinky proti rakovině a diabetu mellitu.

Vzorky brukvovité listové zeleniny byly vypěstovány v roce 2017 na pokusném pozemku Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích na volné ploše záhonu v jarním a podzimním osevu. Pro naměření obsahu flavonoidních látek byla využita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Ve vybrané zelenině byly sledovány tyto látky: myricetin, morin, luteolin, kvercetin, apigenin a kemferol. Bohužel myricetin, morin, luteolin a apigenin se pomocí HPLC detekovat nepodařilo. Pro výsledné srovnání s odbornými články byly naměřeny koncentrace pouze kvercetinu a kemferolu. Doba osevu neměla ve většině vzorků vliv na výsledný obsah kvercetinu a kemferolu. Pouze vzorek hořčice čínské červené z podzimního osevu obsahoval více biologicky aktivních látek.

**Klíčová slova:** polyfenoly, flavonoidy, kvercetin, kemferol, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, vliv flavonoidů na člověka, *Brassicaceae*

## **Monitoring of biologically active substances in Asian vegetables from Brassicaceae family**

### **Abstract**

The Bachelor thesis is monitoring the content of polyphenolic substances in non-traditional leafy vegetables at different times of the year. Specific samples were experimentally studied, such as: green mustard (*Brassica rapa* var. *komatsuna*), red mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern.), mizuna and mibuna (*Brassica rapa* ssp. *Japonica* (L.)). Although the samples are Asian leafy vegetables, they are now widely used in the Czech Republic and can be found both in the form of seeds and as leaves for consumption. Therefore, the issue of beneficial biologically active substances is topical. The phenolic group includes flavonoids that are easily available and their biological activity is also significant. Vegetables have antioxidant properties due to flavonoids, which prevent lipid peroxidation and eliminate free radicals. This property is also beneficial to humans, and therefore flavonoid substances are also used in medicine. They can prevent the emergence of chronic diseases such as cardiovascular disease or atherosclerosis. Flavonoids are also attributed to preventive effects against cancer and diabetes mellitus.

Samples of cruciferous leafy vegetables were grown in 2017 on the experimental plot of the Faculty of Agriculture of the University of South Bohemia in České Budějovice on the open area of the flowerbed in spring and autumn sowing. The high performance liquid chromatography method was used to measure the content of flavonoid substances.

The following substances were studied in selected vegetables: myricetin, morin, luteolin, quercetin, apigenin and kaempferol. Unfortunately, myricetin, morin, luteolin and apigenin were not detected by HPLC. Concentrations of only quercetin and kaempferol were measured for final comparison with expert articles. The sowing time did not affect the measured contents quercetin and kaempferol in most of the samples. Only a specimen of Chinese red mustard from autumn sowing contained more biologically active substances.

**Keywords:** polyphenols, flavonoids, quercetin, kaempferol, high performance liquid chromatography, the effect of flavonoids on humans, *Brassicaceae*

## OBSAH

1	ÚVOD .....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Biologicky aktivní látky.....	9
2.1.1	Fenoly .....	9
2.1.1.1	Polyfenoly.....	9
2.1.1.1.1	Flavonoidy.....	10
2.1.1.1.1.1	Flavony.....	12
2.1.1.1.1.2	Flavonoly.....	13
2.1.1.1.2	Fenolické kyseliny .....	15
2.1.1.1.3	Taniny (trísloviny) .....	16
2.1.1.1.4	Stilbeny .....	16
2.1.1.1.5	Lignany .....	16
2.1.2	Vliv polyfenolů na zdraví člověka.....	17
2.1.2.1	Protirakovinné účinky .....	17
2.1.2.2	Účinky podporující srdce .....	18
2.1.2.3	Účinky v prevenci diabetu mellitu .....	19
2.2	Rostliny z čeledi Brukvovité.....	19
2.2.1	Hořčice čínská zelená (Brassica rapa var. Komatsuna).....	20
2.2.1.1	Pěstování.....	21
2.2.1.2	Využití v kuchyni .....	21
2.2.2	Hořčice čínská červená (Brassica juncea Czern.).....	22
2.2.2.1	Pěstování.....	22
2.2.2.2	Využití v kuchyni .....	22
2.2.3	Mibuna (Brassica rapa ssp. japonica) .....	23
2.2.3.1	Pěstování.....	23
2.2.3.2	Využití v kuchyni .....	23
2.2.4	Mizuna (Brassica rapa ssp. japonica) .....	24
2.2.4.1	Pěstování.....	24

2.2.4.2	Využití v kuchyni .....	24
2.3	Analytické separační metody .....	25
2.3.1	Chromatografie .....	25
2.3.1.1	Příprava vzorku k analýze .....	26
2.3.1.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....	27
2.3.2	Kapilární elektromigrační metody .....	28
3	CÍLE PRÁCE .....	30
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	31
4.1	Odběr rostlinného materiálu .....	31
4.2	Úprava vzorků k analýze .....	31
4.3	Seznam pomůcek a přístrojů .....	32
4.4	Seznam chemikálií a standardu .....	32
4.5	Stanovení flavonoidních aglykonů v lyofilizovaném materiálu .....	32
4.6	Metodika stanovení polyfenolických látek metodou HPLC .....	33
4.7	Analytická koncovka .....	34
4.7.1	Chromatografické podmínky .....	34
5	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	36
5.1	Kalibrace .....	36
5.1.1	Kalibrace kvercetinu .....	37
5.1.2	Kalibrace kemferolu .....	37
5.2	Naměřené hodnoty a pomocné výpočty analýzy .....	38
5.3	Standard .....	39
5.4	Hořčice čínská zelená .....	41
5.5	Hořčice čínská červená .....	43
5.6	Mibuna .....	44
5.7	Mizuna .....	46
6	ZÁVĚR .....	48
7	SEZNAM LITERATURY .....	49
8	SEZNAM PŘÍLOH A OBRÁZKŮ .....	54
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	55
10	PŘÍLOHY .....	56

# 1 ÚVOD

Polyfenolické látky patří stejně jako vitamíny a karotenoidy mezi přírodní antioxidanty. Antioxidanty jsou pro lidský organismus důležité, protože zabráňují oxidačnímu stresu (Seong et al., 2016). Polyfenoly jsou organické látky součástí rostlin, díky nimž je rostlina chráněna před patogeny či slunečním zářením. Jsou obsaženy hlavně v ovoci a zelenině. Jejich význam nalézáme v prevenci onemocnění a v boji proti smrtelným nemocem jako je rakovina, neurodegenerativní a kardiovaskulární choroby (Khanam et al., 2012).

Flavonoidy jsou polyfenolické sloučeniny, které se vyskytují vždy v potravinách rostlinného původu. Flavonoidy se rozlišují podle stupně oxidace na flavony, flavonoly a další (Ignat et al., 2011). Mezi flavony patří apigenin a luteolin (Babu et al., 2013). Zástupci flavonolů jsou kemferol, kvercetin a myricetin (Velíšek a Hajšlová, 2009b). Všechny chemické vzorce těchto sloučenin v této práci byly vytvořeny v programu ChemSketch.

Tyto látky se stanovují vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). HPLC byla využita v experimentální části bakalářské práce (Dadáková a Chmelová, 2017).

Cílem bakalářské práce je stanovit obsah vybraných flavonoidních aglykonů v netradiční asijské listové zelenině, a to za pomoci vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Dalším cílem bakalářské práce je shromáždit informace o biologicky aktivních fenolických sloučeninách, jejich zdravotních účincích na lidský organismus a metodách jejich stanovení.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 *Biologicky aktivní látky*

Velký počet vědců jako například Khanam (2012), Soengas (2012) či Beidokhti et al. (2017) se ve svých studiích zabývá obsahem biologicky aktivních látek, jako jsou polyfenolické sloučeniny, a jejich vlivem na lidské zdraví. Díky biologickým účinkům fenolů se tyto látky využívají jako přírodní antioxidanty (přirozené toxické složky potravin), anebo sama rostlina tyto látky (fytoalexiny) využívá jako obrannou složku (Velíšek a Hajšlová, 2009b).

#### 2.1.1 *Fenoly*

Fenoly jsou jednoduché aromatické sloučeniny, s nízkou molekulovou hmotností, ale i velké a komplexní trísloviny a odvozené polyfenoly (Velíšek a Hajšlová, 2009b). Fenolické sloučeniny se vyskytují ve vysoké koncentraci v rostlinné potravě (Slanina a Táborská, 2004). Jsou syntetizovány ve vyšších rostlinách, čímž se chrání před nepříznivými vlivy, jako jsou například UV záření, změny teplot, dostupnost vody a jiné. První suchozemské rostliny se tak díky fenolickým látkám lépe aklimatizovaly při přechodu z vodního prostředí (Dadáková a Chmelová, 2017). Fenolické sloučeniny jsou známé jako antioxidanty (Velíšek a Hajšlová, 2009b). Aromatické sloučeniny vytváří komplexy s ionty přechodných prvků. Antioxidační vlastnosti fenolů mají souvislost s jejich reakcí s kovovými ionty (Velíšek a Hajšlová, 2009a).

##### 2.1.1.1 *Polyfenoly*

Polyfenoly se skládají z jednoho nebo více aromatických cyklů s větším množstvím navázaných hydroxylových skupin (Dadáková a Chmelová, 2017). Rostlinné polyfenoly zhasí reaktivní kyslíkové radikály a omezují také tvorbu radikálů chelatací iontů přechodných kovů. Hlavně kationty železa produkují vysoce reaktivní hydroxylové radikály. Tomuto ději se připisuje ochranný účinek (Slanina a Táborská, 2004; Ignat et al., 2011).

Studie prokázaly, že konzumace těchto přírodních látek má za následek snížený výskyt rakoviny či kardiovaskulárních chorob. Snížení rizika kardiovaskulárních onemocnění o více než 50 % je dáno do souvislosti právě s konzumací polyfenolů v potravě. Dále tyto polyfenoly v potravě mohou chránit organismus před některými formami rakoviny

a byly u nich tedy prokázány antikarcinogenní účinky. Mechanismy účinku polyfenolů pracují na úrovni přenosu signálu. Mají tedy pod kontrolou buněčný cyklus, apoptózu a angiogenezi (Slanina a Táborská, 2004).

Polyfenoly mají redukční i antioxidační účinky. Jsou tak účinnější než některé vitamíny. Denní příjem je odhadován na 1 g. Nejvíce polyfenolických sloučenin je obsaženo ve víně, kávě, černém čaji, ovocných džusech, čokoládě, ovoci a pivě (Slanina a Táborská, 2004). Polyfenoly jsou vstřebávány převážně v tenkém a tlustém střevě. Avšak polyfenoly, které jsou součástí nápojů jako například v zeleném čaji, se resorbují již v dutině ústní (Slanina a Táborská, 2004).

Polyfenoly se dělí do několika tříd podle počtu aromatických kruhů a na konstrukční prvky, které tyto kruhy váží navzájem. Hlavní skupiny polyfenolů jsou:

- 1) flavonoidy,
- 2) fenolické kyseliny,
- 3) taniny (hydrolyzovatelné a kondenzované),
- 4) stilbeny,
- 5) lignany (Ignat et al., 2011).

Nejrozšířenější a nejrozmanitější skupinou polyfenolů v druhu Brassica jsou flavonoidy (Velíšek a Hajšlová, 2009b).

#### **2.1.1.1.1 Flavonoidy**

V rostlinách, a tedy i v zelenině, se vyskytují biologicky aktivní flavonoidy, jinak také nazývané bioflavonoidy (Mindell a Mundis, 2000). Flavonoidy jsou sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností složené z 15 atomů uhlíku, uspořádaných v konfiguraci C6-C3-C6 (Ignat et al., 2011). Molekula flavonoidů se skládá ze dvou benzenových kruhů A a B spojených tří uhlíkovým můstkem, obvykle ve formě dalšího heterocyklického kruhu C (Velíšek a Hajšlová, 2009b). Aromatický kruh A je odvozen od dráhy acetat/malonát, zatímco kruh B je odvozen od fenylalaninu přes šikimát (Cook a Samman, 1996; Ignat et al., 2011; Babu et al., 2013).

Flavonoidy působí v rostlině jako primární antioxidant. Jejich funkce je prodloužit použití potravin tím, že je chrání před oxidací (Seong et al., 2016). Ta vede ke žluknutí tuků a dalších oxidujících se složek potravin. Důsledkem žluknutí tuků jsou chemické

změny, které mají negativní výživové, chemické, toxické a senzorické důsledky (Cook a Samman, 1996; Velíšek a Hajšlová, 2009b). Antioxidační aktivita všech dihydroxyderivátů je díky hydroxylovým skupinám v polohách C-3' a C-4' vysoká, zvyšuje se však ještě více navázáním hydroxylové skupiny v B kruhu. Závisí také na množství a vzájemném uspořádání hydroxylových skupin (Velíšek a Hajšlová, 2009b; Dadáková a Chmelová, 2017).

Chloroplast obsahuje flavonoidy, které mohou doplnit působení jiných inhibitorů, jako jsou karotenoidy v boji proti ROS (reaktivní formě kyslíku). Tyto antioxidační flavonoidy jsou "spojeny" s chloroplasty a účinně zachytí singletový kyslík. Flavonoidy uvnitř chloroplastu během buněčné dehydratace zachovávají celistvost obalových membrán, a to předchází oxidačnímu poškození. (Agati, 2012).

Flavonoidy se rozlišují podle stupně oxidace C3 řetězce a jeho substituce na:

- a) flavanoly,
- b) flavony,
- c) flavanony,
- d) katechiny,
- e) anthokyanidiny,
- f) isoflavony,
- g) dihydroflavonoly,
- h) chalkony (Cook a Samman, 1996; Ignat et al., 2011).

$\beta$ -glykosidy jsou nejčastěji se vyskytující formou flavonoidů. Jako sacharid je připojena rhamnosa, glukosa, glukoronová kyselina, galaktosa a jiné. Dále mohou být navázány jeden glykosyl anebo 2 nebo 3 hydroxyly polyfenolu. Na aglykon nebo sacharid se může substitucí navázat hydroxykyselina, například jablečná nebo gallová (Slanina a Táborská, 2004; Molnár-Perl a Füzfa 2005).

Mezi nejrozšířenější flavonoidy patří oligomerní proanthokyanidiny a flavanoly (katechiny). Jejich denní dávka je více než 100 mg. Oligomerní proanthokyanidiny, obsažené v ovoci, čokoládě a červeném víně, zužují cévy a působí svíravě. Ovoce, čokoláda a zelený čaj jsou též zdrojem katechinů (Slanina a Táborská, 2004; Dower et al., 2016; Dadáková a Chmelová, 2017). Flavonoidy tvoří 2/3 příjmu všech přirozených fenolů (Dadáková a Chmelová, 2017).

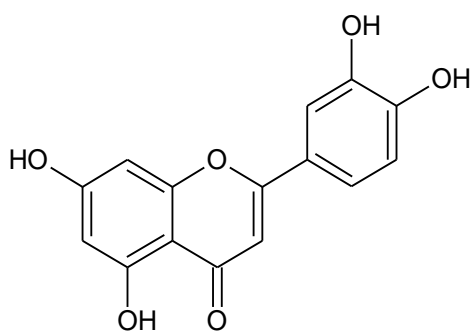
Flavonoidy jsou absorbovány z gastrointestinálního traktu lidí a zvířat a jsou vylučovány nezměněny. Jejich metabolity jsou z těla vylučovány močí (Cook a Samman, 1996). Tyto látky byly sledovány pro jejich aktivitu na bakterie rezistentní vůči některým běžným antibiotikům a také pro jejich antimikrobiální aktivitu (Seong et al., 2016).

#### **2.1.1.1.1 Flavony**

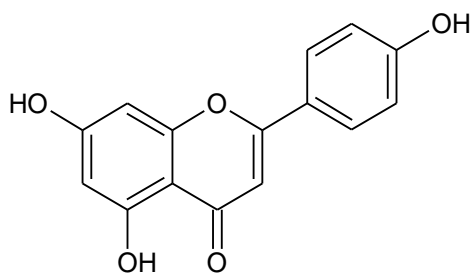
Flavony se nacházejí v celeru, petrželi, paprice a mnoha léčivých bylinách. Hlavní dietní flavony jsou luteolin (obr. 1) a apigenin (obr. 2) (Lachman et al., 2012). Rostliny obsahující apigenin, jako je například heřmánek, byly použity v tradiční medicíně k léčbě různých druhů onemocnění a apigenin byl uznán jako potenciální chemopreventivní činidlo. Léčba apigeninem snižuje hyperglykémii (Erlund, 2004; Babu et al., 2013).

Flavony jsou žluté pigmenty rostlin. Často jsou substituované v C-5 a C-7 kruhu. Jako substituenty jsou zde zastoupeny hydroxylová a methoxylová skupina. Další flavony jako tricetin a chrysin se vyskytují méně často (Velíšek a Hajšlová, 2009b).

Isoflavony jsou součástí větší skupiny fytoestrogenů a jsou obsaženy v sóje. Tvoří však malou část celkově přijímaných flavonoidů. Isoflavony, flavony a flavanony (obsažené v citrusovém ovoci) jsou celkově malou součástí denní dávky polyfenolů (Slanina a Táborská, 2004).



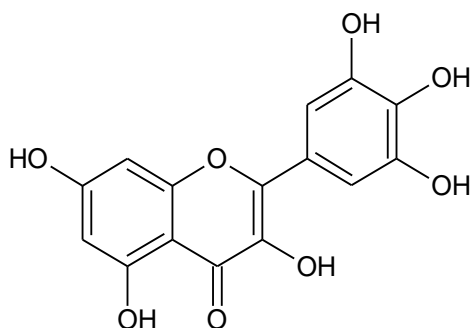
Obrázek 1 Luteolin



Obrázek 2 Apigenin

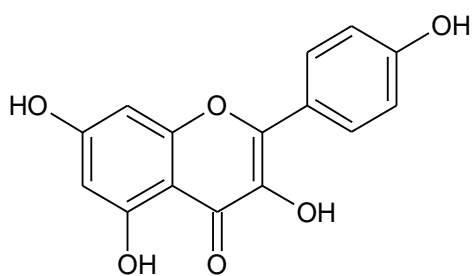
#### 2.1.1.1.2 Flavonoly

Hlavními flavonoly jsou kemferol, kvercetin a myricetin (obr. 3). (Slanina a Táborská, 2004; Babu et al., 2013).



Obrázek 3 Myricetin

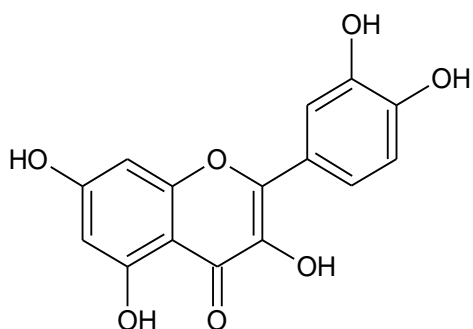
Kemferol (obr. 4) potlačuje vysokou hladinu glukosy v plazmě, a proto se může stát novým antidiabetickým činidlem. Je obsažen v brokolici (Babu et al., 2013).



Obrázek 4 Kemferol

Kvercetin (obr. 5) zabraňuje oxidaci lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL) skrze volné radikály (Khanam et al., 2012; Dadáková a Chmelová, 2017). Potlačuje růst rakovinných buněk, ještě před vznikem nádoru. V počáteční fázi rakovinného bujení tlumí jeho další růst a dokáže zastavit i vznik metastáz. Zdravé buňky chrání před změnami vyvolanými nádorem (Cook a Samman, 1996; Mindell a Mundis, 2000). Inhibuje působení histaminu a tlumí tím zánětlivé změny a alergické projevy. Je

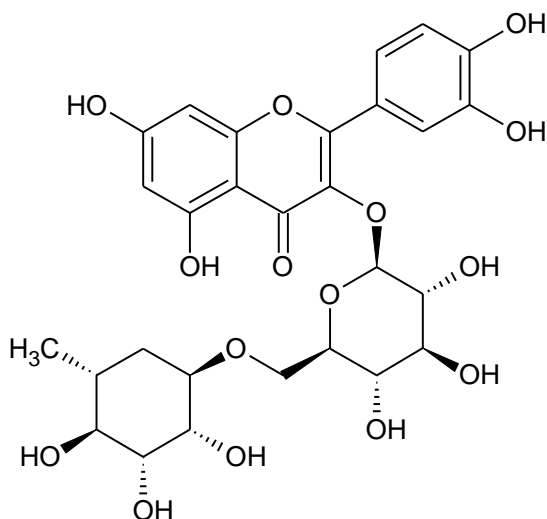
obsažen v cibuli, citrusových plodech, melounu, ananasu a tykvi. Posiluje imunitní systém (Mindell a Mundis, 2006). Díky antitrombotiku a vazoprotektivním účinkům je schopen se vázat na destičkové membrány i bez úchyty radikálů (Cook a Samman, 1996). Vyšší příjem kvercetinů byl spojen s nižším rizikem astmatu a rakoviny plic a došlo ke snížení rizika diabetu 2. typu. Díky vyššímu příjmu kvercetinů byla u osob s ischemickou chorobou srdeční prokázána nižší mortalita (Erlund, 2004).



Obrázek 5 Kvercetin

Kvercetin a kemferol se vyskytují hlavně jako glykosidy. Existují triviální názvy glykosidů odvozených od kvercetinu, kterých je více než 179, avšak běžně se používají systematické názvy (Molnár-Perl a Füzfa, 2005; Velíšek a Hajšlová, 2009b; Dadáková a Chmelová, 2017).

Rutin (obr. 6) je nejznámějším a nejdostupnějším glykosidem kvercetinu. Je to netoxická látka a v trávicím ústrojí má antimikrobiální účinky (Opletal a Skřivanová, 2010). Rutin (dříve vitamín P) má vliv na pružnost a permeabilitu krevních kapilár, a proto se využívá jako léčivo k léčbě žilních onemocnění (Slanina a Táborská, 2004; Velíšek a Hajšlová, 2009b). Květenství bezu černého je velmi bohaté na flavonol rutin, kde je ho asi 20 g na kg sušeného květenství. Rutin se nalézá i v různých částech rostliny pohanky a mladých listech laskavce neboli amarantu (Dadáková a Chmelová, 2017).



Obrázek 3 Rutin

Tyto glykosidy mohou být hydrolyzovány a absorbovány v lidském žaludku silnou kyselinou. Podobným mechanismem (kyselou hydrolyzou) jsou analyzovány flavonoidy pomocí HPLC (Seong et al., 2016).

Stejně tak jako flavony jsou flavonoly žlutá barviva. V poloze C-3, C-5, C-7 a C-4' mají hydroxylovou skupinu. Odlišnost mezi nimi najdeme v substituci v poloze C-3' a C-5'.

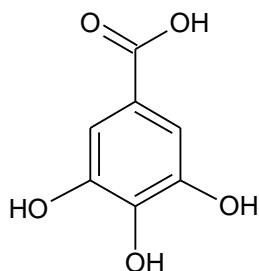
V cibuli, čaji a ovoci jsou obsaženy flavonoly. Jsou nejčastěji studovány díky jejich komerční dostupnosti a také díky jejich biologické aktivitě (Slanina a Táborská, 2004).

#### 2.1.1.1.2 Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny tvoří asi jednu třetinu dietních fenolů, které mohou být přítomny v rostlinách ve volných a vázaných formách (Ignat et al., 2011; Dadáková a Chmelová 2017). Vázané fenoly mohou být spojeny s různými složkami rostlin přes esterové, etherové nebo acetalové vazby (Ignat et al., 2011). Mezi fenolické kyseliny patří kyselina kávová, ferulová a gallová. Ty jsou součástí rostlin jako estery. Kyselina chlorogenová (ester kyseliny kávové) je asi v 50-150 mg obsažena v šálku kávy. Proto člověk, který pije kávu, přijímá více fenolických kyselin než flavonoidů. Dalšími zdroji této kyseliny jsou ovoce, brambory a další druhy zeleniny. Kyselina ferulová je složkou vlákniny. Kyselina gallová se v gallotaninech váže na glukosu (Slanina a Táborská, 2004).

### 2.1.1.1.3 Taniny (trísloviny)

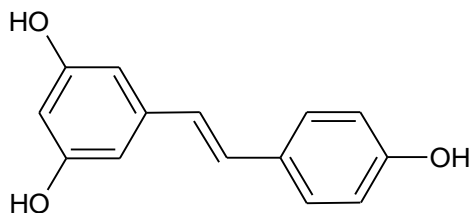
Taniny tvoří třetí skupinu polyfenolů. Mají relativně vysokou molekulovou hmotnost. Dělí se na hydrolyzovatelné a kondenzované taniny. Proanthokyanidiny (kondenzované taniny) jsou polymerní flavonoidy. Hydrolyzovatelné taniny jsou deriváty kyseliny gallové (kyselina 3,4,5-trihydroxybenzoová) (obr. 7) (Ignat et al., 2011).



Obrázek 7 Kyselina gallová

### 2.1.1.1.4 Stilbeny

Malé množství stilbenů je přítomno v lidské stravě. Hlavním zástupcem je resveratrol (obr. 8), který existuje jak v cis, tak i v trans isomerních, většinou glykosylovaných formách. Rostlina je díky nim odolná vůči infekci patogenními organismy a vůči stresovým stavům. Tato látka snižuje riziko infarktu a cévní mozkové příhody, tím že brání tvorbě krevních sraženin. Díky resveratrolu se v těle vytváří méně LDL cholesterolu a také blokuje vývoj nádorových buněk (Mindell a Mundis, 2006). Resveratrol je obsažen ve vinných hroznech (Dadáková a Chmelová, 2017). Existují i potravinové doplňky pro prevenci v dávce 60 mg za den (Mindell a Mundis, 2006). Stilbeny jsou obsaženy u více než 70 druhů rostlin (Ignat et al., 2011).



Obrázek 8 Resveratrol

### 2.1.1.1.5 Lignany

Lignany vznikají oxidační dimerizací dvou fenylpropanů. Jsou většinou přítomné v přírodě ve volné formě. O lignany a jejich syntetické deriváty roste zájem kvůli potencionálnímu využití v chemoterapii rakoviny a díky jejich dalším farmakologickým účinkům (Ignat et al., 2011).



### **2.1.2 Vliv polyfenolů na zdraví člověka**

Flavonoidy mají rozsáhlé biologické vlastnosti, které podporují lidské zdraví a pomáhají snížit riziko onemocnění (Craig, 1999; Liu et al., 2008; Seong et al., 2016).

Údaje z různých epidemiologických studií naznačují, že konzumace ovoce a zeleniny je spojena se snížením rizika stárnutí, zánětu, rakoviny, kardiovaskulárních chorob, Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby (Molnár-Perl a Füzfai, 2005; Hossain et al., 2015; Dadáková a Chmelová, 2017). Kromě toho bylo také prokázáno, že flavonoidy mají antivirové, cytotoxické, antiulcerogenní a karcinostatické účinky (Craig, 1999; Liu et al., 2008). Byliny, které jsou bohaté na flavonoidy, vitamín C nebo karotenoidy, mohou zvýšit funkci imunitního systému (Craig, 1999; Di Carlo et al., 1999; Hossain et al., 2015).

Listová zelenina obsahuje hydrofilní i lipofilní antioxidanty. Většina antioxidantů je hydrofilní a přispívá k udržení fyziologického zdraví hydrofilních orgánů. Lipofilní antioxidanty jsou nezbytné pro lipofilní orgány, jako je mozek, buněčná membrána a kůže (Hossain et al., 2015). Systém vnitřních antioxidantů, specializovaných sloučenin a enzymů, reguluje radikálové formy sloučenin na minimální množství. U všech dobře fungujících organismů je tento vnitřní systém doplněn systémem vnějších, dietárních antioxidantů, získaných z potravy (Dadáková a Chmelová, 2017). V současné době jsou antioxidanty důležité pro podporu zdraví a prevence různých onemocnění spojených s reaktivní formou kyslíku (ROS) (Hossain et al., 2015). Reaktivní formy kyslíku ROS jsou vyvíjeny během dýchání aerobních buněk. Za normálních fyziologických podmínek je redoxní stav důsledně kontrolován antioxidanty (Soengas et al., 2012; Hossain et al., 2015; Seong et al., 2016). Vzrůstající příjem dietních antioxidantů může přispět k udržení antioxidačního stavu, a tedy i normální fyziologické funkci živého systému (Hossain et al., 2015). Brukvovité plodiny patří mezi zeleniny, které mají nejvyšší antioxidační aktivitu. Vysoký příjem brukvovité zeleniny snižuje riziko chronických onemocnění, jako jsou kardiovaskulární a jiné degenerativní choroby (Soengas et al., 2012).

#### **2.1.2.1 Protirakovinné účinky**

V několika běžně používaných rostlinách (například česnek, kurkuma, zázvor nebo kořen lékořice) byly detekovány látky působící preventivně proti rakovině. Flavonoidy

inhibují nitraci a tvorbu DNA s karcinogeny, inhibují hormonální účinky a spojené metabolické dráhy s vývojem rakoviny a vyvolávají detoxifikaci (Craig, 1999). Antioxidanty jsou sloučeniny, které mohou zpomalovat oxidaci jiných molekul inhibicí iniciace nebo šířením oxidační řetězové reakce způsobené volnými radikály a tím mohou snížit oxidační poškození lidského těla. Flavonoidy v denní stravě mohou zvýšit buněčnou antioxidační obranu a prodloužit zdravý život. Celková plazmatická antioxidační kapacita (TAC) listové zeleniny se odráží od její schopnosti inhibovat tvorbu volných radikálů (Khanam et al., 2012). Kvercetin inhibuje buňky rakoviny prsu u lidí in vitro inhibicí exprese mutovaného proteinu plazmatické membrány P. Protein P je tumor supresorového proteinu a hraje klíčovou roli při apoptóze (Di Carlo et al., 1999; Dadáková a Chmelová, 2017).

### ***2.1.2.2 Účinky podporující srdce***

Nejčastější příčinou onemocnění koronární arterie je výskyt a vývoj aterosklerotických plátů v koronárních tepnách, které blokují krevní cévy. To narušuje normální tok krve a tím může dojít k zástavě srdce. Kardiovaskulární onemocnění jsou dnes celosvětově hlavní příčinou nemocnosti a úmrtnosti obyvatelstva. Ovoce, zelenina a luštěniny s nízkým obsahem nasycených tuků, spolu s pravidelným aerobním cvičením jsou prevencí pro každého, kdo má zvýšené riziko kardiovaskulárního onemocnění (Gan et al., 2015; Dower et al., 2016).

Bylo prokázáno, že polyfenoly chrání lipoproteiny s nízkou hustotou oxidace, a tak zabraňují tvorbě aterosklerotických plátů (Seong et al., 2016). Předpokládá se, že oxidační modifikace LDL cholesterolu hraje klíčovou roli během aterosklerózy. Ateroskleróza je chronické zánětlivé onemocnění, při kterém dochází k ukládání tuku do stěn cév (Hollman a Katan, 1999). Rostliny s obsahem antokyanů jsou účinné při inhibici oxidace LDL cholesterolu a agregaci trombocytů, díky tomu mohou poskytnout určitou ochranu proti srdečním onemocněním (Cook a Samman, 1996; Craig, 1999; Kochar, 2011). Anthokyaniny mohou být také užitečné pro léčbu cévních poruch a kapilární křehkosti (Cook a Samman, 1996; Craig, 1999). Podporují také uvolnění kardiovaskulárních hladkých svalů a tím snižují vysoký krevní tlak a brání poruchám srdečního rytmu (Craig, 1999; Liu et al., 2008; Seong et al., 2016). Flavonoidy zvyšují tvorbu endoteliálního prostacyklinu a snižují vaskulární tlak (Craig, 1999; Erlund, 2004; Gan et al., 2015).

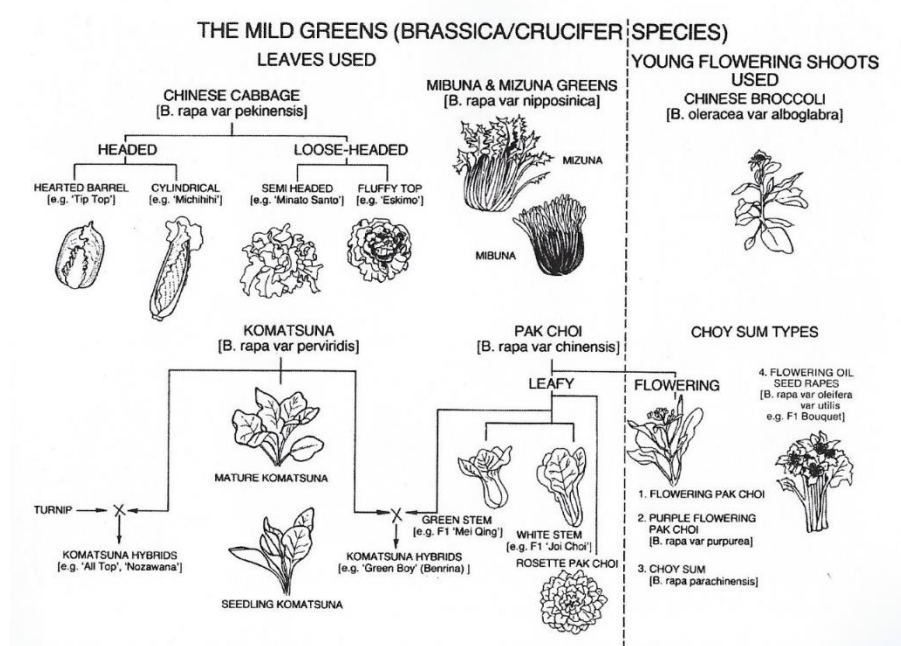
### **2.1.2.3 Účinky v prevenci diabetu mellitu**

Diabetes mellitus (DM) je komplexní metabolická porucha, která je důsledkem nedostatku inzulínu, jeho nedostatečným účinkem nebo kombinací obojího. DM se rozděluje na dva typy. DM 1. typu se řadí mezi autoimunitní poruchy. Imunitní systém jedince ničí pankreatické  $\beta$ -buňky, které za normálních okolností produkují hormon inzulín. Postupem času tyto buňky inzulín neprodukují a dojde k úplnému nedostatku vlastního inzulínu. DM 2. typu je způsoben více příčinami. Mezi hlavní se řadí obezita (nadměrný příjem kalorií), nevhodné složení stravy, malá fyzická aktivita, stres a kouření. V podstatě jde o vznik inzulínové rezistence v periferních tkáních, kterou doprovází zhoršená sekrece až defekt inzulínu z  $\beta$ -buněk. Dochází také ke středně těžké až těžké apoptóze  $\beta$ -buněk a zvýšené tvorbě glukózy v játrech (Babu et al., 2013). Příroda je vynikajícím zdrojem antidiabetických léčiv a rostliny jsou cennými doplňky stravy ke zlepšení kontroly glykemie a prevence dlouhodobých komplikací u diabetu 2. typu. Hypoglykemické účinky ovoce a zeleniny mohou být způsobeny jejich povzbuzující povahou na pankreatické  $\beta$ -buňky pro sekreci inzulínu nebo obsahem bioaktivních sloučenin, jako jsou flavonoidy, alkaloidy a antokyany, které působí jako molekuly podobné inzulínu nebo inzulínové sekretagogy (zvyšují vylučování inzulínu z  $\beta$ -buněk pankreatu) (Babu, 2013; Beidokhti et al., 2017). Flavonoidy snižují hladinu glukózy, plazmatického cholesterolu a triglyceridů a zlepšují aktivitu jaterní glukokinázy vyšším uvolňováním inzulínu z pankreatických buněk (Beidokhti et al., 2017). Flavonoidy snižují apoptózu a podporují proliferaci pankreatických  $\beta$ -buněk. Regulují metabolismus glukózy v hepatocytech, tím zlepšují stav hyperglykémie. Zvyšují absorpci glukózy v kosterním svalu a tukové tkáni (Babu, 2013).

## **2.2 Rostliny z čeledi Brukvovité**

Brukvovitá zelenina má antioxidační vlastnosti a je přírodním zdrojem vitamínu C. Mezi brukvovité patří například brokolice, kapusta kadeřavá i růžičková, zelí, květák, kedluben a další (obr. 9). V této zelenině jsou obsaženy například flavonoidy, indoly a sulforafan. Ty podporují tvorbu enzymů, které dokáží potlačit růst nádorů. Estrogen je inaktivován indolem a tím je potlačen vznik nádoru prsu (Mindell a Mundis, 2000; Kubát, 2002; Mindell a Mundis, 2006).

Epidemiologické studie prokázaly, že díky vyšší konzumaci brukvovité zeleniny se snižuje riziko tvorby chemicky indukované rakoviny, tj. která je vyvolaná vysokým příjmem karcinogenů. Je to zásluhou produktů rozkladu glukosinolátů. Dále mají v brukvovité zelenině význam: L-askorbová kyselina,  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten, dimethylthiosulfínát, fenolické antioxidanty a vláknina (Velíšek a Hajšlová, 2009b). Myricetin, kvercetin a kemferol jsou hlavními flavonoidy v rostlinách z čeledi Brassicaceae (Seong et al., 2016).



Obrázek 9 Asijské listové zeleniny čeledi Brassicaceae. Zdroj: Larkcom, 1991

### 2.2.1 Hořčice čínská zelená (*Brassica rapa* var. *Komatsuna*)

Hořčice čínská zelená (obr. 10) roste v přízemní růžici. Jedná se o rostlinu jednoletou. Listy obsahují vitamín C, využívá se jejich léčivých a dietetických vlastností. Má baktericidní vlastnosti a také podporuje chuť k jídlu. Hořčičná silice je obsažená v celé rostlině, hlavně v semenech. Díky ní má pepnou chuť. Při krátkých dnech vyrůstá v bohatou listovou růžici a během dlouhých letních dnů vybíhá do květů (Pekárková, 2002). Listy jsou tmavě i světle zelené, hladké nebo lehce zkadeřené s dužnatými řapíky (Pekárková, 1997). Pochází z Tibetu a z oblasti hranic Indie s Čínou. Pěstuje se hlavně ve východní Asii. Využívají se její listy, avšak na Dálném východě využívají i její zdužnatělé květní stonky a kořeny (Hlava et al., 1998; Pekárková, 2002).

### 2.2.1.1 Pěstování

U nás se pěstuje pouze kadeřavá forma. Semena se vysévají velmi brzo na jaře nebo v červenci v řádcích širokých 0,3–0,4 m. Seje se do hloubky 10 mm asi 10 g semene na plochu 10 m<sup>2</sup>. Konzumace je možná již po 25 dnech o výsadby (příloha 1 obr. 1) (Pevná et al., 1985; Deppe, 2018). V létě může vyběhnout do květu, ještě před vytvořením řádné růžice. Listy snesou mráz až -10 °C, proto je možné v teplejších oblastech jejich přezimování (Pekárková, 1997). Odolává chorobám, ale musíme ji chránit před škůdci (Pekárková 2002).

### 2.2.1.2 Využití v kuchyni

Usušené a rozemleté listy se využívají jako koření. Mladé listy mají jemnou pikantní chuť, v pozdější fázi vývoje je však její chuť ostřejší (Pekárková, 2002; Deppe, 2018). Za syrova se z listů připravuje salát. (Pekárková, 2002). I květní stonky se konzumují jako salát. Hořčici je možné nakládat nebo zakonzervovat (Pekárková, 1997; Deppe, 2018).



Obrázek 10 Hořčice čínská zelená. Zdroj: Semo.cz

## 2.2.2 Hořčice čínská červená (*Brassica juncea Czern.*)

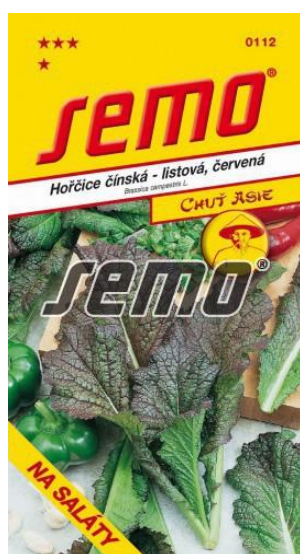
Hořčice čínská červená (obr. 11) (jinak také brukev sítinová) je jednoletá asijská zelenina, která dokáže přezimovat ve skleníku, pěstuje se i v truhlíku. Obsahuje až 10x více vitamínu C než citrony. V Číně se hořčice čínská pěstuje od nepaměti. Má široké, velké červeno-zelené listy (Pekárková, 1997; Deppe, 2018). Má málo kalorií a velké množství antioxidantů. Pro ženy v menopauze je užitečná, protože je chrání před rakovinou prsu a srdečními chorobami (Boutenko, 2015)

### 2.2.2.1 Pěstování

Pěstuje se 20-35 dní v létě a kolem 60 dnů v zimě. Pro jarní sklizeň se vysévá v polovině března. Roste velmi rychle, tím pádem nevybíhá do květu. Všechny plevele okolo sebe přeroste a zahubí (příloha 1 obr. 2). Když se seřízne 2 cm nad povrchem půdy, listy znovu dorůstají. Protože je pálivá, zvířata ji nekonzumují a veškerá úroda se dá sklízet (Deppe, 2018).

### 2.2.2.2 Využití v kuchyni

Za syrová má ohnivě pálivou chuť, která se povařením zjemní. Vývar z hořčice je jasně zelený a chutný. Sušením se pálivá chuť vytratí. Používá se na bylinné čaje. Mladé lístky se využívají jemně nakrájené do salátů, poté je možné vynechat pepř. Na rozdíl od špenátu i po uvaření (dušení) zachovává svůj objem, takže se spotřebuje menší množství (Pekárková, 2002; Deppe, 2018).



Obrázek 11 Hořčice čínská červená. Zdroj: Semo.cz

### 2.2.3 Mibuna (*Brassica rapa ssp. japonica*)

Mibuna (obr. 12) stejně jako mizuna má tenké, bílé a šťavnaté řapíky. Velmi hustá růžice hladkých štíhlých listů, které jsou úzké bez vykrojení a světlezelené barvy se zakulaceným vrcholem, je vysoká přibližně 30–45 cm. Dobře snáší chlad (Larkcom, 1991).

#### 2.2.3.1 Pěstování

Na jaře, v létě a na podzim vyroste rostlina od zasetí po první sklizeň za 30-40 dnů. Je nenáročná, vhodná i pro zimní sklizeň a k zimnímu rychlení v truhlících, kdy je její vegetační období 50–60 dnů. Sklízí se jednotlivé listy, nebo celé růžice (příloha 1 obr. 3). Mibunu není vhodné pěstovat v extrémně horkých ani chladných stanovištích jako mizunu (Larkcom, 1991).

#### 2.2.3.2 Využití v kuchyni

Na západě se mibuna používá jako salátová zelenina. Může se také použít v teplé kuchyni do polévek nebo jako součást směsi zeleniny dušená nebo osmažená s masem (Deppe, 2018).



Obrázek 12 Mibuna. Zdroj: Semo.cz

#### 2.2.4 Mizuna (*Brassica rapa ssp. japonica*)

Mizuna (obr. 13) patří mezi skupinu východoasijských listových zelenin. Má pikantní chuť (Pekárková, 2000). Mizuna je listový typ kořenové zeleniny (vodnice). Roste v mírném klimatu, ale může se pěstovat i při nízkých teplotách. Rostlina je jednoletá. Sklízí se celé listy. Roste v nízké, dekorativní růžici, až 40 cm široké. Dřípené, velké a lesklé listy mají tenké, bílé a šťavnaté řapíky (Pekárková, 2000; Pekárková, 2002). Mizuna obsahuje velké množství antioxidantů, které snižují riziko rakoviny (Boutenko, 2015).

##### 2.2.4.1 Pěstování

Může se pěstovat celoročně. Snáší letní velmi vysoké teploty, ale i mrazy do -10 °C (Pekárková, 2002; Boutenko, 2015). Je odolná k letnímu vyběhání do květů. Není potřeba předpěstování, vysévá se přímo na stanoviště. Vysévá se do řádků v 5–10cm vzdálenosti. Může se sklízet po 2 až 3 týdnech (příloha 1 obr. 4). Rostliny, které se sklízí po 8 až 10 týdnech, se vysévají ve vzdálenostech 30 x 40 cm. Při podzimní sklizni listů se semena vysévají v pozdním letním období. Jakmile se rostlina seřízne asi 2 cm nad zemí, dá se sklízet opakovaně, až pětkrát (Pekárková, 2002).

##### 2.2.4.2 Využití v kuchyni

Mizuna se využívá ve všech vývojových stádiích. Jestliže chceme mladé listy, musí se sklízet dříve, než budou hrubé a přestárlé. Ty se pak jako čerstvé využívají na salát. Starší listy se vaří nebo nakládají (Pekárková, 2002).



Obrázek 13 Mizuna. Zdroj: Semo.cz



### 2.3 Analytické separační metody

Separační metody jsou vysoce selektivní a analyzují se tak komplexní vzorky se složitými makromolekulami. Analýza se provádí ve dvou krocích:

- 1) separační krok,
- 2) detekční krok.

Během separačního kroku se fyzicky oddělí složky vzorku a při detekčním kroku se určí konkrétní makromolekula (Křížek a Šíma, 2015).

Separační metody lze rozdělit do dvou skupin. Mezi první skupinu separačních metod, kdy se analyzovaná látka rozdělí mezi dvě fáze, patří chromatografie. Molekuly analytu se u všech typů chromatografických separací rozdělují mezi dvě nemísitelné fáze: stacionární a mobilní fázi. Druhá skupina metod je založena na separaci látek působením pole. U elektromigračních metod je užito elektrické pole. Mezi elektromigrační metody řadíme elektroforézu. U hmotnostní spektrometrie se k separaci částic analytu užívá magnetické pole (Opekar et al., 2005; Křížek a Šíma, 2015).

Spektrofotometrické metody poskytují velmi užitečné kvalitativní a kvantitativní informace. Ve skutečnosti je spektroskopie hlavní technika používaná pro kvantifikaci různých tříd polyfenolů díky své jednoduchosti a nízké ceně (Ignat et al., 2011).

#### 2.3.1 Chromatografie

Principem chromatografie je ustavení rozdělovací rovnováhy analytu mezi mobilní a stacionární fázi. V prostoru, kde dochází k separaci, je analyt unášen mobilní fází. V tomto separačním prostoru je obsažena i nepohyblivá (stacionární) fáze. Sorbent (stacionární fáze) mohou být částičky pevné látky nebo to může být kapalina na povrchu inertního nosiče nebo kapalina uvnitř kapiláry. Do chromatografické kolony naplněné sorbentem se nastříkne analyt, při tomto nástřiku vznikne eluční pás (zóna). Jakmile analyt projde separačním prostorem, opakovaně interaguje se stacionární fází (Opekar et al., 2005; Křížek a Šíma, 2015). Oddělené látky analytu se díky této interakci postupně zbrzdí a tím se rozdělí. Jakmile vystoupí první složka analytu z kolony, detektor zaznamená její přítomnost v eluátu a vykreslí eluční pík (křivku). Podle toho, kolik obsahoval analyt složek, je zaznamenán i počet elučních píků (křivek) v grafu. Pořadí, v němž vyjdou složky analytu z kolony, je závislé na velikosti interakce

se stacionární fází (čím je větší interakce, tím je vyšší hodnota retenčního – elučního času) a na době setrvání analytu v koloně (Holzbecher et al., 1987; Křížek a Šíma, 2015). Vazebná síla interakce je úměrná míře brzdění (Opekar et al., 2005).

Každá z dělených látek má odlišnou velikost vzájemně působících sil a různou povahu interakcí vůči stacionární a mobilní fázi. Podle typu vzájemných interakcí, které postupně oddělí části analytu, se chromatografické metody dělí na: adsorpční, rozdělovací chromatografie, iontově výměnné, gelové nebo afinitní chromatografie. Avšak při separacích dochází ke kombinacím těchto mechanismů. Toto označení se již dnes nepoužívá (Holzbecher et al., 1987).

Dnes se používá dělení chromatografických metod podle toho, v jakém skupenském stavu je mobilní fáze. V plynové chromatografii je tato fáze v plynném skupenství, u kapalinové chromatografie v kapalném. Jakmile je pára v nadkritické teplotě a tlaku použita jako mobilní fáze, jedná se o superkritickou fluidní chromatografii (Opekar et al., 2005; Křížek a Šíma, 2015).

Kapalinová chromatografie (LC) se obvykle provádí při pokojové teplotě, ale teploty se zvyšují až na 40 ° C. Tehdy se doporučuje zkrátit dobu analýzy (Liu et al., 2008). Kapalinové chromatografie existují 3 typy: nízkotlaká kolonová kapalinová chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a planární chromatografie. Nízkotlaká kolonová kapalinová chromatografie se využívá při čištění směsí látek. Planární chromatografie je instrumentálně jednoduchá a nenáročná. Její užití nalezneme v analýze a mikropreparaci (Opekar et al., 2005). Mobilní fáze je vždy kapalina. Podle uspořádání se dělí na LC v otevřeném systému (papírová a tenkovrstvá chromatografie) a v uzavřeném systému (HPLC) (Křížek a Šíma, 2015). Technika kapalinové chromatografie je dnes nejlepší analytickou metodou ke studiu polyfenolů z různých biologických zdrojů a je nejúčinnějším nástrojem při studiu struktury fenolických sloučenin (Ignat et al., 2011).

### ***2.3.1.1 Příprava vzorku k analýze***

Extrakce na pevné fázi (SPE) je jedna z nejúčinnějších a nejjednodušších metod přípravy vzorku. Využívá nízkých nákladů, předbalené jednorázové kazety, hledané sloučeniny se oddělí od ostatních aplikací směsi vzorku na vhodně zvolenou pevnou látku – sorbent a poté se selektivně vymývají požadované složky. Účinnost SPE závisí

na druhu sorbentu, objemu vzorku, pH, obsahu organického modifikátoru a objemu elučního rozpouštědla (Liu et al., 2008). Ve většině případů je sorbentem křemík spojený s C<sub>18</sub> a roztokem vzorku, rozpouštědla jsou obvykle mírně okyselena, aby se zabránilo ionizaci flavonoidů (Liu et al., 2008; Ignat et al., 2011). Pomocí SPE je tedy stanovovaná látka zakoncentrována z velkého objemu kapalného vzorku do malého objemu vymývacího roztoku (Liu et al., 2008).

Vodný methanol jako extrakční rozpouštědlo zajišťuje extrakci aglykonů a flavonoidních glykosidů, v závislosti na čase, teplotě atd. (Molnár-Perl a Füzfa, 2005). Pevné vzorky jsou obvykle nejprve homogenizovány. Využívá se sušení (mrazem) nebo zmrazení kapalným dusíkem. Dalším krokem je izolace analytu. Pro stanovení polyfenolů se používá SPE. Ta je stále nejrozšířenější technikou, hlavně díky snadnému použití a širokému uplatnění (Liu et al., 2008).

Čistící stupeň je kritickou částí metody, odstranění potenciálních rušivých součástí se mění podle rostlinné matrice, která má být analyzována (Ignat et al., 2011).

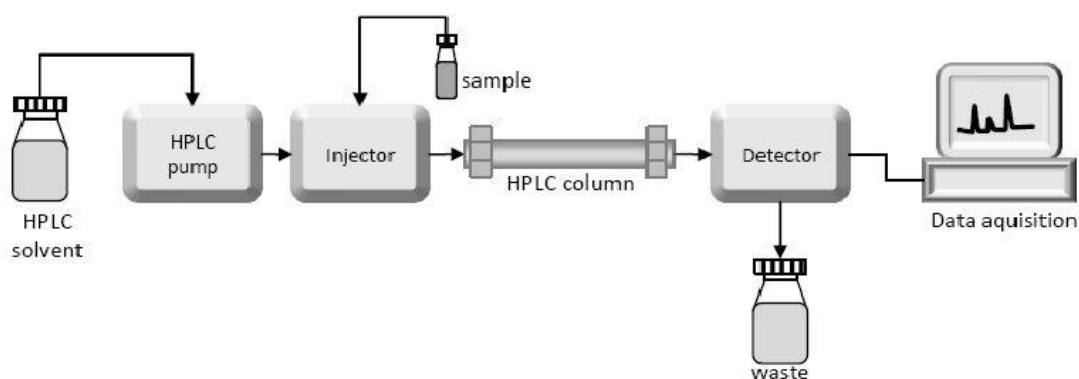
### **2.3.1.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie**

Název High Performance Liquid Chromatography ve zkratce HPLC lze do češtiny přeložit jako: vysokoučinná kapalinová chromatografie (obr. 14). Pro dosažení vysoké účinnosti separačního procesu jsou použity kolony naplněné stacionární fází s malými a dobře definovanými částicemi. Čím jsou částice menší, tím je separace účinnější. Částice uvnitř separační kolony jsou homogenní, mají stejný tvar (kulovitý) a stejnou velikost. Mají vysokou hustotu a tím i velký hydrodynamický odpor (Štulík, 2005; Křížek a Šíma, 2015). Mobilní fáze není inertní. Musí být vždy kapalná, musí proudit v dostatečně silném proudu, aby vznikl přetlak jednotek až desítek MPa. Proto se používají pumpy, které čerpají mobilní fázi přes kolonu. Kolony jsou vyrobené ze speciálního skla nebo ocelové tlustostěnné trubice, aby odolaly vysokému tlaku mobilní fáze. Pro co nejcitlivější detekci analytů by měla mobilní fáze ukázat v detektoru co nejmenší signál (Opekar et al., 2005; Štulík, 2005). Hned za kolonou je připojen detektor, ten je propojen s PC, který zaznamenává rozdělené složky směsi, a tedy průběh analýzy (Opekar et al., 2005; Křížek a Šíma, 2015).

Analyty jsou organické méně těkavé kapaliny a tuhé látky rozpustné v organických rozpouštědlech (nejběžnější je methanol a acetonitril), vodě nebo v anorganických pufrch (Holzbecher et al., 1987; Xiang et. al, 2006; Křížek a Šíma, 2015).

Rozdíl mezi analytickou a preparativní metodou spočívá v tom, že analytická HPLC neslouží k získání vzorku, zatímco preparativní HPLC je čistí a usiluje o izolaci čisté látky ze směsi (Andersen a Markham, 2006).

Neznámá látka se rozpozná a vyhodnotí na základě srovnání jejího retenčního času a standardu, který byl separován současně za stejných podmínek. Jednoznačnou identifikaci sloučeniny poskytne použití hmotnostního detektoru. Toto srovnání se provádí v opakování. Výsledkem analýzy je eluční křivka zaznamenaná detektorem. Vynásobíme-li hodnotu výšky píku hodnotou šířky v polovině výšky píku, získáme kvantitativní výsledek (Křížek a Šíma, 2015).



Obrázek 14 Schéma kapalinové chromatografie. Zdroj: laboratoryinfo.com

### 2.3.2 Kapilární elektromigrační metody

Mezi elektromigrační metody patří zónová elektroforéza, izotachoforéza, izoelektrická fokusace, elektrokinetická chromatografie a elektrochromatografie. Účinkem elektrického pole projde analyt separačním prostorem a dojde k oddělení částí analytu (Opekar et al., 2005). Pojem migrace se označuje pohyb částic v důsledku působení stejnosměrného elektrického pole. Částice, které mají jiný rozměr a odlišnou velikost náboje, mají tím pádem i odlišnou rychlost a je možné je od sebe separovat. Pohyb těchto částic závisí také na podmínkách prostředí, ve kterém dochází k separaci a na velikosti elektrického náboje (Opekar et al., 2005; Křížek a Šíma, 2015).

Elektrochemická detekce fenolů je založena na základě jejich redoxních vlastností. Protože většina flavonoidů je elektroaktivní díky přítomnosti fenolických skupin, elektrochemická detekce může být také použita. Tato technika se rychle rozvíjí a široce se používá pro analýzu léčiv a byla také použita pro analýzu flavonoidů. Kapilární elektroforéza má ve srovnání s konvenčními chromatografickými metodami mnoho cenných výhod, tj. vynikající účinnost separace, vysoké rozlišení, krátký čas analýzy, snadnou automatizaci a nízkou spotřebu rozpouštědel a vzorků. Kapilární elektroforéza se dále dělí na: kapilární zónová elektroforéza (CZE), micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) a kapilární elektrochromatografie (CEC) (Liu et al., 2008).

V těchto pracích (Molnár-Perl a Füzfa 2005; Liu et al., 2008; Ignat et al., 2011) byla kapilární elektroforéza použita jako analytická koncovka.

### 3 CÍLE PRÁCE

Listová zelenina může být zdrojem fenolických sloučenin, které působí v lidském těle jako antioxidanty a mají proti rakovině, kardioprotektivní a antidiabetické účinky. Mezi nejvýznamnější polyfenoly patří kvercetin, myricetin, kemferol, apigenin, luteolin a morin. Tyto sloučeniny byly analyzovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Hlavní cíle této práce jsou:

- vypracování literární rešerše o biologicky aktivních fenolických sloučeninách a jejich zdravotních účincích a prospěšném vlivu na lidské zdraví, o méně známých druzích brukvovité listové zeleniny,
- pořízení vzorků několika druhů asijské brukvovité zeleniny a jejich úpravy pro účely analýzy,
- stanovení obsahu nejvýznamnějších polyfenolických látek metodou HPLC,
- porovnání hodnot naměřených z jarního a podzimního osevu a dosažených výsledků s daty z odborných článků.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Odběr rostlinného materiálu

Pro analýzu byly vybrány čtyři druhy asijské listové zeleniny z čeledi Brukvovité (tab. 1).

Tabulka 1 Druhy asijské listové zeleniny použité k analýze

	Název česky	Název latinsky
1	Hořčice čínská zelená	<i>Brassica rapa</i> var. <i>Komatsuna</i> (L.)
2	Hořčice čínská červená	<i>Brassica juncea</i> (L.) Czern.
3	Mizuna	<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>japonica</i> (L.)
4	Mibuna	<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>japonica</i> (L.)

Vzorky listové zeleniny byly pěstované v jarním a podzimním osevu na záhonech pokusného pozemku Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích ZF (kampus JU, N 48°58'29.528'', E 14°26'52.057''). Jarní osev započal v květnu a podzimní osev v srpnu roku 2017. Všechny testované odrůdy byly pěstovány na volné ploše pozemku v běžně upravené zemině.

Všechna osiva vyprodukovala firma Semo Smržice u Prostějova a byla zakoupena v lokální obchodní síti (Zahradní centrum Klíma, České Budějovice).

### 4.2 Úprava vzorků k analýze

Vypěstovaná zelenina byla postupně odebírána a upravena pro účely analýz. Z rostlin byly vybrány kuchyňsky využívané části (zelená nadzemní) a byly povrchově očištěny.

Veškerý rostlinný materiál byl pokrácen na části silné maximálně 0,5 cm a vzorek byl homogenizován promícháním. Bezprostředně po sklizni byl zmrazen na teplotu -16 °C a do 1 měsíce od odběru lyofilizován v lyofilizátoru. Lyofilizace je velice šetrný způsob mrazení a odstranění vody. Probíhala při teplotě -50 °C a tlaku 0,1 mbar po dobu 24 hodin. Voda tak přímo sublimuje – z pevné do plynné fáze. Suchý lyofilizovaný materiál byl zhomogenizován na laboratorním mlýnku a homogenní materiál byl uchováván do analýzy v uzavřené plastové vzorkovnici v mrazícím boxu při teplotě -18 °C.

### **4.3 Seznam pomůcek a přístrojů**

- technické laboratorní sklo
- laboratorní mlýnek Retsch (Německo)
- analytické váhy Mettler Toledo (USA)
- lyofilizátor Gregor Instruments (ČR)
- kombinovaná lednice Bosch (Německo)
- termostatová vodní lázeň L-20R Fisher Scientific (ČR)
- odstředivka Sigma (Německo)
- pH-metr Eutech Instruments
- magnetická míchačka Heidolph MR Hei-Mix S
- filtrační zařízení Sigma
- filtry ze skleněných vláken GF/C Whatman (Velká Británie)
- přístroj na SPE extrakci (z vývojové dílny Zemědělské fakulty)
- kolonky SPE LiChrolut RP-18 (40-63  $\mu\text{m}$ ) 500 mg 3 ml Standardní PP-kolona (Merck, Německo)
- kapalinový chromatograf Agilent 1200 Series Rapid Resolutions (Agilent Technologies, USA)
- chromatografická kolona Zorbax Eclipse SB-C18 (Agilent) o parametrech 4,6 x 50 mm se zrněním 1,8  $\mu\text{m}$  (USA)

### **4.4 Seznam chemikálií a standardu**

- kyselina chlorovodíková, methanol, hydrogenuhličitan sodný (Lachema, Brno)
- kyselina askorbová (Merck, Německo)
- kyselina  $\alpha$ -naftyloctová (Spolana, Neratovice)
- kvercetin, kemferol, myricetin, luteolin, morin apigenin (Extrasynthese, Francie)
- demineralizovaná voda, připravovaná na zařízení firmy Premier (USA)

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

Touto metodou byl stanoven celkový obsah flavonoidních aglykonů, které se za podmínek metody uvolnily z glykosidů přítomných v materiálu.

Flavonoidy se v rostlinném materiálu vyskytují v naprosté většině jako glykosidické formy. V glykosidu je molekula flavonoidního aglykonu vázána na sacharid. Naproti tomu obsah volných aglykonů je velmi nízký.



Množství druhů glykosidů každého aglykonu je v přírodních materiálech velké a bylo by velmi obtížné stanovit jednotlivě obsah každého z nich. Počet aglykonů, které glykosidy vytvářejí, je poměrně omezen. Obsah všech forem flavonoidních glykosidů se tedy dá posoudit podle celkového obsahu příslušných flavonoidních aglykonů. Proto byla zvolena metoda, při které byl materiál podroben kyselé hydrolyze, a všechny přítomné glykosidy se v tomto prostředí rozštěpily a uvolnily aglykon. Volné aglykony byly ze vzorku izolovány metodou sorpce na tuhé fázi (SPE) a stanoveny po rozdělení metodou HPLC. Bylo sledováno šest nejběžnějších flavonoidních aglykonů (myricetin, morin, luteolin, kvercetin, apigenin a kemferol).

#### **4.6 Metodika stanovení polyfenolických látek metodou HPLC**

1. Každý homogenizovaný lyofilizovaný materiál jsem analyzovala dvakrát. Při každém cyklu jsem zpracovala 4 vzorky.
2. Příprava vzorků: Na skleněné lodičce jsem navážila 0,25 g s přesností na 0,0001 g homogenizovaného lyofilizovaného vzorku. Poté ji kvantitativně převedla do 100 ml varné baňky a hmotnost jsem si zaznamenala.
3. Dále jsem do baňky přidala 80 mg kyseliny askorbové, 7,5 ml destilované vody, 5 ml 6M HCl a 12,5 ml methanolu.
4. Tato směs v baňce byla hydrolyzována a zahřívána ve vodní lázni pod zpětným chladičem 2 hodiny při teplotě 90 °C. Po uplynutí varné doby byla baňka odstraněna z vodní lázně. Nechala se 10 minut vychladnout, ale stále byla zapojena pod zpětným chladičem.
5. Do vychladlé baňky jsem přidala 2 g NaHCO<sub>3</sub> a tím se obsah zneutralizoval.
6. Pomocí 12,5 ml methanolu jsem celý obsah převedla do odstředivací kyvety. Obsah kyvety jsem doplnila destilovanou vodou přibližně na stejný objem a vzorek byl odstředován 15 minut při 3500 otáčkách. Tento odstředivací proces proběhl u každého vzorku třikrát. Supernatant jsem odlila do 600 ml kádinky a v každém mezikroku jsem baňku vypláchla destilovanou vodou.
7. Do této 600ml kádinky jsem doplnila destilovanou vodu na hodnotu 200 ml. Na magnetickém míchadlu byl vzorek mísen s nasyceným roztokem NaHCO<sub>3</sub>, který jsem po kapkách přidávala a tím upravila pH na hodnotu 3. pH bylo měřeno pH metrem.
8. Vzniklý roztok byl filtrován přes filtr ze skleněných vláken za sníženého tlaku na vakuovém filtračním zařízení. Poté jsem nalila 5 ml methanolu, aby se vymyly

zachycené částice. Filtrát jsem kvantitativně převedla do 500ml odměrné baňky a doplnila destilovanou vodou po rysku. Obsah baňky jsem důkladně promíchala.

9. Roztok byl naředěn v poměru 1:10 kvůli vysoké koncentraci stanovovaných sloučenin. Jako ředící roztok jsem použila 5% roztok methanolu. Takto připravený roztok jsem použila pro sorpci na tuhé fázi (SPE) (příloha 2 obr. 2).
10. Popsanou kolonku RP-18 (Merck) jsem upravila dvojitým promytím 2,5 ml methanolu a dvojitým promytím 2,5 ml destilované vody. Do této kondicionované kolonky jsem nalévala roztok vzorku. Jakmile vzorek protekl, promyla jsem kolonku 4 x 2,5 ml destilované vody. Poté byla kolonka sušena 20 minut procházejícím vzduchem.
11. Zachycené látky byly promyty pomocí 2 x 0,7 ml methanolu do měrné vialky. Do vialky s eluátem jsem přidala 100 µl roztoku vnitřního standardu (kyselina  $\alpha$ -naftyloctová, 2 mg/ml)

#### **4.7 Analytická koncovka**

Vzorky byly měřeny na kapalinovém chromatografu Agilent 1200 Series Rapid Resolutions (výrobce: Agilent Technologies, USA) s UV-VIS detektorem (příloha 2 obr.1).

K analýze byla použita chromatografická kolona Zorbax Eclipse SB-C18 (výrobce: Agilent Technologies) o rozměrech 4,6 x 50 mm se zrněním sorbentu 1,8 µm.

##### **4.7.1 Chromatografické podmínky**

Mobilní fáze se skládá ze dvou částí: fáze A a B. Fáze A byla složena z 5% acetonitrilu, 0,1% kyseliny mravenčí a vody; fáze B z 0,1% kyseliny mravenčí v 100% acetonitrilu. Pro analýzu byl nastaven gradient v tomto složení: 0 - 1 minuta: 20 - 25 % B, 1–5 minuta: 25–30 % B, 5–7 minuta: 30–50 % B, 7–9 minuta: 50–20 % B. Poté proběhla kondicionace kolony dlouhá 6 minut při počátečním složení mobilní fáze (20 % B). Mobilní fáze protékala rychlostí 1 ml/min. Analýza probíhala při 25 °C, přítomnost analyzovaných látek byla detekována při 270 nm.

Poměr ploch píků identifikovaných aglykonů a vnitřního standardu byl použit jako analytická odezva. Pomocí kalibrační závislosti byla provedena kvantifikace obsahu. Roztoky pro sestavení kalibrační křivky byly připraveny ze zásobních roztoků

v pracovním rozsahu 5–100 µg/ml. Mez detekce je 1 mg/kg a mez stanovitelnosti 5 mg/kg sušiny. Analýza všech vzorků byla provedena 2x, výsledky každého druhu byly zprůměrovány aritmetickým průměrem a byla dopočítána směrodatná odchylka. Veškeré výsledky byly vypočítány pomocí nástrojů v programu MS Office Excel.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

V našich podmínkách se jako listová zelenina nejčastěji vyskytuje ledový salát, špenát, čekanka listová, kapusta a vzhledově podobná analyzovaným listovým zeleninám i roketa setá nebo řeřicha. Tato zelenina je také nejčastěji analyzována pro svůj obsah biologicky aktivních látek. V diskuzi lze proto nalézt srovnání s těmito známějšími listovými zeleninami.

Analyzovaná listová zelenina je zeleninou krátkého dne. Pěstuje se v dubnu a srpnu, kdy jsou dny kratší a zelenina tak může vyrůst pouze do listů. Zatímco kdyby byla vyseta v červenci, díky horkým a dlouhým dnům vyběhne do květů. U nás se pěstuje hlavně na jaře. V této bakalářské práci lze nalézt srovnání obsahu biologicky aktivních látek z jarního a podzimního osevu a zjistit tak, kdy je výhodnější zeleninu pěstovat.

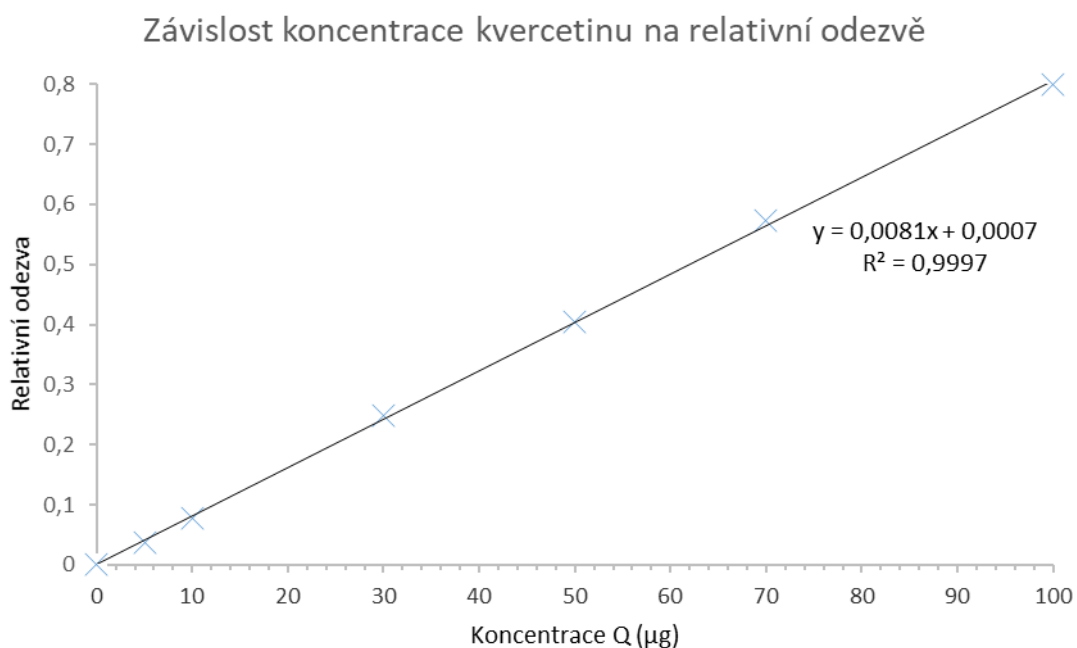
### 5.1 *Kalibrace*

Pro výpočet obsahu stanovované látky se pracuje s metodou kalibrační závislosti, tj. byly naměřeny za stejných podmínek vzorky o známé koncentraci stanovované látky, v tomto případě koncentrace od 0 do 100  $\mu\text{g}/1 \text{ ml}$  vzorku. Měření poskytlo výsledky pro kvercetin, kemferol a vnitřní standard, který byl ke každému vzorku přidán, aby se korigovaly nepřesnosti při měření. Jako analytická odezva byla použita relativní plocha píku kvercetinu nebo kemferolu, tj. poměr plochy píku kvercetinu (tab. 2) nebo kemferolu (tab. 3) proti ploše píku vnitřního standardu. Byl vytvořen graf kalibrační závislosti pro kvercetin (obr. 15) a kemferol (obr. 16), kde byla vynesena na ose x koncentrace a na ose y relativní odezva. Výsledkem výpočtu byla lineární kalibrační závislost a rovnice této závislosti. Byla také vyčíslena hodnota koeficientu spolehlivosti R. Čím více se hodnota R blížila 1, tím byla přímka lineárnější. Z rovnice přímky byl vypočítán obsah aglykonů.

### 5.1.1 Kalibrace kvercetinu

Tabulka 2 Hodnoty kalibrace kvercetinu

Koncentrace ( $\mu\text{g}$ )	Odezva kvercetinu	Odezva VS	Relativní odezva
0	0	1345	0
5	55,2	1459,8	0,0378134
10	108,4	1389,3	0,0780249
30	336,4	1358,8	0,2475714
50	567,5	1404,8	0,4039721
70	784,2	1369,6	0,5725759
100	1107,6	1387,1	0,7985005

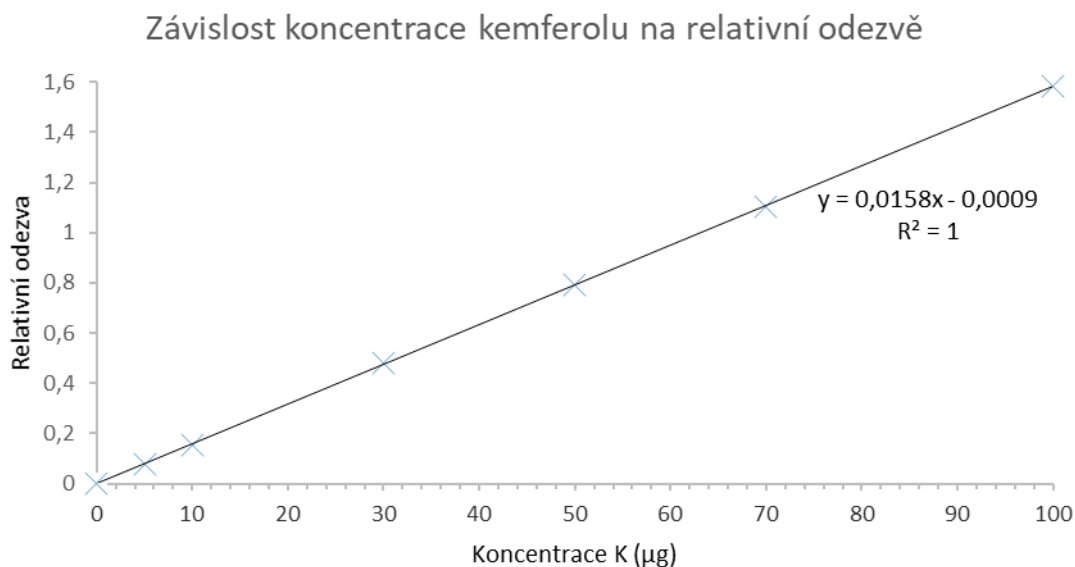


Obrázek 15 Závislost koncentrace kvercetinu na relativní odezvě

### 5.1.2 Kalibrace kemferolu

Tabulka 3 Hodnoty kalibrace kemferolu

Koncentrace ( $\mu\text{g}$ )	Odezva kvercetinu	Odezva VS	Relativní odezva
0	0	1420	0
5	109,7	1404,1	0,078128338
10	220,8	1438,5	0,153493222
30	680,5	1422,9	0,478248647
50	1109,9	1399,3	0,793182305
70	1555,5	1411,8	1,101784955
100	2221,6	1402,8	1,583689763



Obrázek 16 Závislost koncentrace kemferolu na relativní odezvě

## 5.2 Naměřené hodnoty a pomocné výpočty analýzy

V tabulkách (příloha 3) jsou zaneseny hodnoty navážek lyofilizovaného materiálu. Pomocí analýzy byla změřena odezva kvercetinu/kemferolu a odezva standardu. Dále je v tabulkách zahrnuto ředění vzorků. Vzorky, vzhledem k použité technice SPE – sorpce na tuhé fázi (prolévání přes kolonky), se musely ředit kvůli obsahu doprovodných látek. SPE sorpce je čistící a koncentrační operace, kterou se nežádoucí látky ze vzorku odstraní. Po hydrolýze bylo získáno 500 ml velmi zředěného vzorku a analytický přístroj pracuje až od určité koncentrace, tj. mez stanovitelnosti nebo mez detekce. Nebylo by možné detekovat analyty ve zředěném roztoku. Při SPE se selektivně z velkého množství zakoncentrují pouze analyzované látky a odteče voda a další složky (sacharidy, polární látky), které by v analýze způsobovaly nečistoty. Z SPE sorpce byly zakoncentrovány zachycené látky do 1 ml vzorku k analýze. Ten se nechal zanalyzovat a byla získána data pro diskuzi.

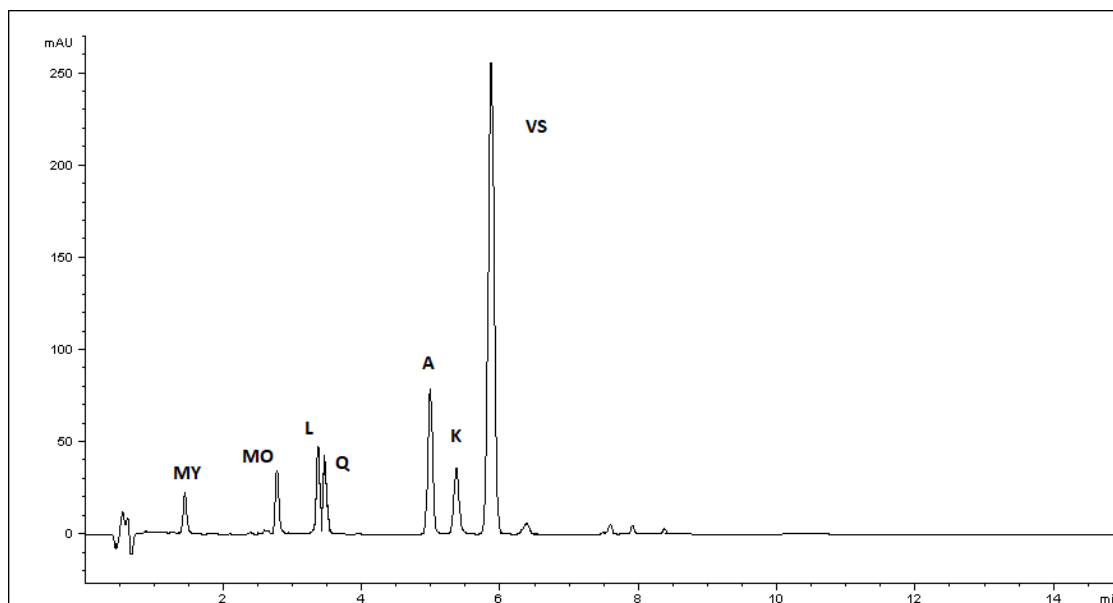
Naměřená odezva kvercetinu/kemferolu se vydělila odezvou VS a byla získána relativní odezva u každého konkrétního vzorku. Relativní odezva je parametr  $y$  a byl dopočítán parametr  $x$ , což je obsah kvercetinu/kemferolu v  $\mu\text{g}$  v 1 ml vzorku v měrné vialce. Avšak vzorek byl ředěn 10krát, proto se musí obsah kvercetinu/kemferolu vynásobit 10. Dopočítané hodnoty kvercetinu z jarního (příloha 3 tab. 1) a podzimního osevu (příloha 3 tab. 2) a kemferolu z jarního (příloha 3 tab. 3) a podzimního osevu (příloha 3 tab. 4)

jsou vypsány níže. Obsah biologicky aktivních látek se udává v jednotkách mg/kg, proto se musí vypočítat přímou úměrou nejprve obsah kvercetinu/kemferolu v  $\mu\text{g}$  na 1000 g a přepočítá se na mg/kg. Každá listová zelenina byla analyzována dvakrát. Z těchto dvou hodnot obsahu kvercetinu/kemferolu v mg/kg byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Analýza pracuje s obvyklou chybou do 5 %.

Sušina byla vypočítána z navážky čerstvé a lyofilizované listové zeleniny. Sušina v procentech se vypočítá tak, že hmotnost lyofilizovaného materiálu se z jarního (příloha 3 tab. 5) a podzimního osevu (příloha 3 tab. 6) podělí hmotností čerstvého materiálu a vynásobí se 100. Pro konzumenta je nejvíce vypovídající hodnotou o obsahových látkách koncentrace v mg/kg čerstvé hmoty. Abychom získali koncentraci látek v čerstvé hmotě, musíme vynásobit průměrnou koncentraci sušiny hmotnostním zlomkem sušiny pro danou listovou zeleninu, viz tabulky jednotlivé listové zeleniny.

### 5.3 *Standard*

Vzorky listové zeleniny čtyř uznaných odrůd z čeledi Brukvovité byly vypěstovány na jaře a v létě v roce 2017. Tyto vzorky byly analyzovány metodou HPLC. Byla sledována přítomnost těchto látek: myricetin, morin, luteolin, kvercetin, apigenin a kemferol. Podařilo se však detekovat pouze kvercetin a kemferol. Ostatní látky byly naměřeny v tak malé koncentraci, že je nebylo možné detekovat. Níže (tab. 4) je legenda ke chromatografickým záznamům nejen analýzy standardu (obr. 17), podle kterého se aglykony rozpoznávaly, ale i k analýze vzorků. Ostatní píky sice udávají některé biologicky aktivní látky, ale k nim nemáme příslušné standardy. Mohou to být látky příbuzné vzhledem k identifikaci při stejné technice, ale v této práci nejsou vyhodnoceny.



Obrázek 17 Chromatografický záznam standardu

Tabulka 4 Legenda k obrázkům a retenční časy jednotlivých aglykonů

	Zkratka	Analyt	Retenční čas (min)
1	MY	Myricetin	1,45
2	MO	Morin	2,79
3	L	Luteolin	3,40
4	Q	Kvercetin	3,48
5	A	Apigenin	5,02
6	K	Kemferol	5,40
7	VS	Vnitřní standard kyselina $\alpha$ -naftyloctová	5,9

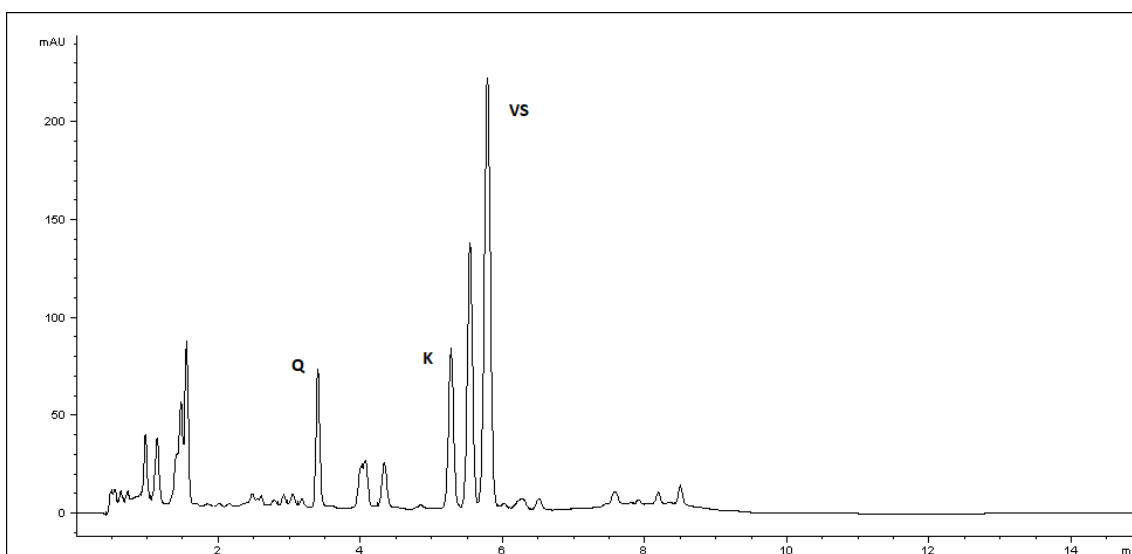


#### 5.4 Hořčice čínská zelená

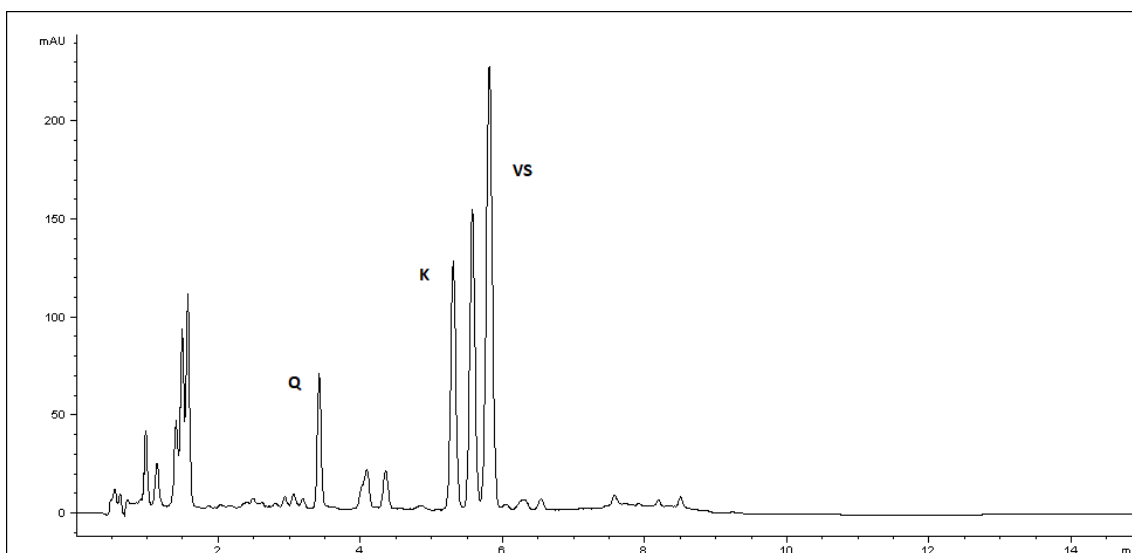
Výsledná koncentrace kvercetinu z jarního osevu  $119 \pm 1,9$  mg/kg a z podzimního osevu  $118 \pm 0,806$  mg/kg čerstvé hmoty je takřka stejná (tab. 5). Doba osevu nemá vliv na obsah kvercetinu v čerstvé listové zelenině. V jarním osevu hořčice čínské zelené (obr. 18) byla koncentrace kemferolu  $94,1 \pm 1,6$  mg/kg čerstvé hmoty výrazně nižší než v pozdějším podzimním osevu z roku 2017. Nejvyšší analyzovaná hodnota hořčice čínské zelené byla koncentrace kemferolu  $148 \pm 0,062$  mg/kg čerstvé hmoty v podzimním osevu (obr. 19). Podle Khanama (2012) v jeho výzkumu byl analyzován kvercetin v koncentraci  $151 \mu\text{g/g} = \text{mg/kg}$ , ovšem není zde stanovena doba osevu. Ta však ani v této práci nehrála roli. Pro koncentraci kemferolu v hořčici čínské nebylo možné nalézt srovnání, proto je zde koncentrace biologicky aktivních látek porovnávána s čekankou listovou. Ve svém výzkumu detekoval Hertog (1994) kemferol v množství 15–91 mg/kg v čekance listové, kdy hodnota 91 mg/kg se blíží naměřené koncentraci z jarního osevu. V článku výzkumu je psáno, že vzorky byly sbírány celoročně. Hertog (1994) ve svém výzkumu naměřil v čekance listové kvercetin o koncentraci 271 mg/kg sušiny. Což je opět nižší koncentrace než naměřená v této práci, a tak lze vyvodit závěr, že hořčice čínská zelená je obsahově bohatší na kemferol než čekanka listová.

Tabulka 5 Obsah aglykonů v hořčici čínské zelené

Měření číslo	Koncentrace (mg/kg) sušiny				Průměr (mg/kg) sušiny		Směrodatná odchylka čerstvé hmoty		Koncentrace (mg/kg) čerstvé hmoty	
	1.	2.	1.	2.	j.	p.	j.	p.	j.	p.
Osev	jarní		podzimní		j.	p.	j.	p.	j.	p.
Q	998	967	954	941	983	948	1,9	0,806	119	118
K	792	765	1192	1193	779	1193	1,6	0,062	94,1	148



Obrázek 14 Chromatografický záznam analýzy hořčice čínské zelené z jarního osevu



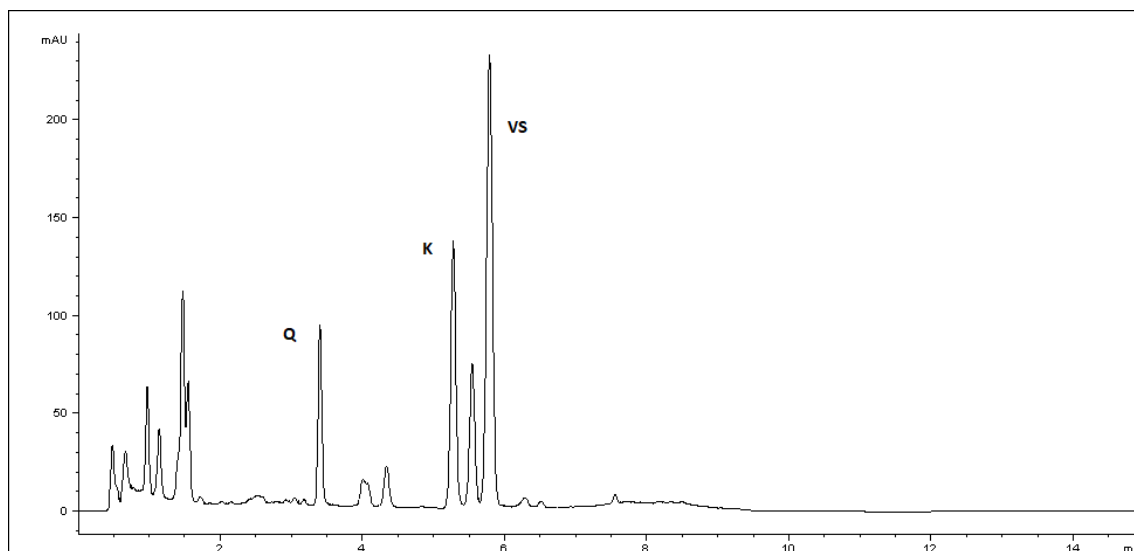
Obrázek 19 Chromatografický záznam analýzy hořčice čínské zelené z podzimního osevu

## 5.5 Hořčice čínská červená

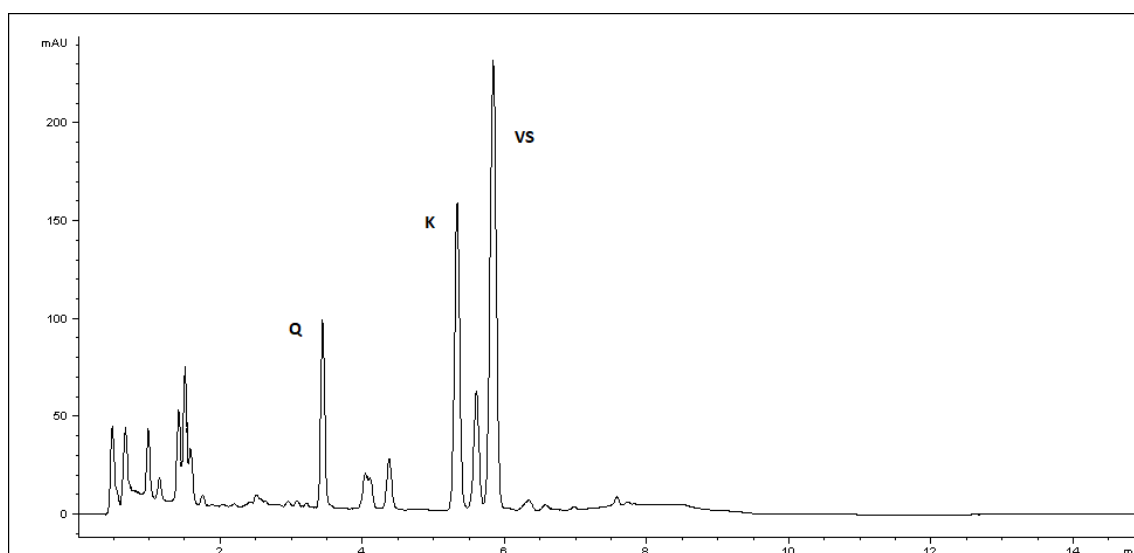
Hodnoty koncentrace kvercetinu jak z jarního  $153 \pm 5,3$  mg/kg, tak podzimního osevu  $157 \pm 8,8$  mg/kg čerstvé hmoty se nijak významně neliší (tab. 6). Tato hodnota je nejvyšší naměřená koncentrace kvercetinu ze všech čtyř analyzovaných listových zelenin. Pro konzumenta, co do obsahu stanovovaných biologicky aktivních látek, je významnější podzimní osev i pro koncentraci kemferolu  $177 \pm 9,8$  mg/kg čerstvé zeleniny (obr. 21). Koncentrace kemferolu analyzovaná z jarního osevu je  $151 \pm 4,3$  mg/kg čerstvé hořčice čínské červené (obr. 20). Výzkumy, které by analyzovaly hořčici čínskou červenou, nejsou známy. Tato listová zelenina by se dala srovnat s kapustou kadeřavou. Je to odrůda druhu brukev zelná (*Brassica oleracea*), kterou analyzoval ve svém výzkumu Andersen (2006) a zjistil tak hodnoty kvercetinu 115 mg/kg a kemferolu 341 mg/kg čerstvé hmoty. Kvercetin by se v této listové zelenině dal srovnat s analyzovanou hodnotou z této práce: průměrnou hodnotou 155 mg/kg čerstvé hmoty, avšak koncentrace kemferolu v kapustě kadeřavé z výzkumu Andersena více než dvojnásobná. Hodnoty kvercetinu v kapustě kadeřavé srovnával také Aherne (2002), kde udává hodnotu 110 mg/kg čerstvé hmoty. K té samé hodnotě kvercetinu 110 mg/kg čerstvé kapusty kadeřavé došel ve svém výzkumu i Hertog (1994). Při této analýze byla detekována koncentrace kemferolu na 211 mg/kg čerstvé hmoty. Tato hodnota se nejvíce podobá analyzovanému výsledku z této práce. Vzorky byly sbírány celý rok, takže je nelze srovnat s konkrétní roční dobou.

Tabulka 6 Obsah aglykonů v hořčici čínské červené

Měření číslo	Koncentrace (mg/kg) sušiny				Průměr (mg/kg) sušiny		Směrodatná odchylka čerstvé hmoty		Koncentrace (mg/kg) čerstvé hmoty	
	1.	2.	1.	2.						
Osev	jarní		podzimní		j.	p.	j.	p.	j.	p.
Q	1276	1368	1298	1452	1322	1375	5,3	8,8	153	157
K	1270	1344	1461	1633	1307	1547	4,3	9,8	151	177



Obrázek 20 Chromatografický záznam analýzy hořčice čínské červené z jarního osevu



Obrázek 21 Chromatografický záznam analýzy hořčice čínské červené z podzimního osevu

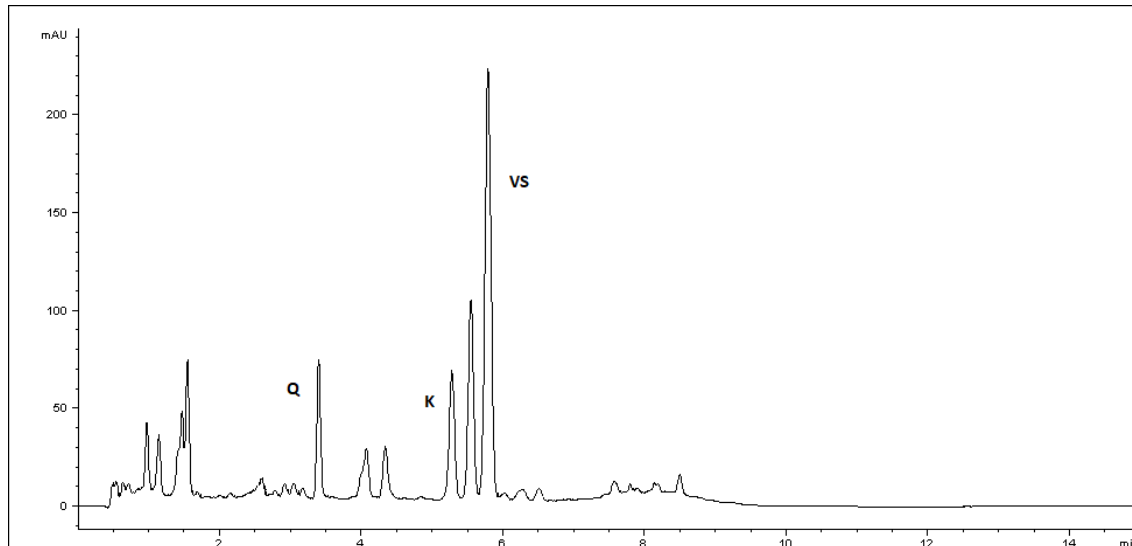
## 5.6 Mibuna

Koncentrace kvercetinu  $131 \pm 0,46$  mg/kg z jarního osevu díky nízké směrodatné odchylce ukazuje opět velmi podobné výsledky z obou analýz (tab. 7). Pro konzumenta je výživově významná mibuna z podzimního osevu (obr. 23). Obsah kvercetinu je  $145 \pm 13$  mg/kg čerstvé hmoty a koncentrace kemferolu  $163 \pm 14$  mg/kg čerstvé hmoty je dvojnásobkem koncentrace z jarního osevu. Koncentrace kemferolu z jarního osevu  $86,6 \pm 1,5$  mg/kg čerstvé hmoty je ovšem ze všech analyzovaných detekovaných fenolických látek nejmenší (obr. 22).

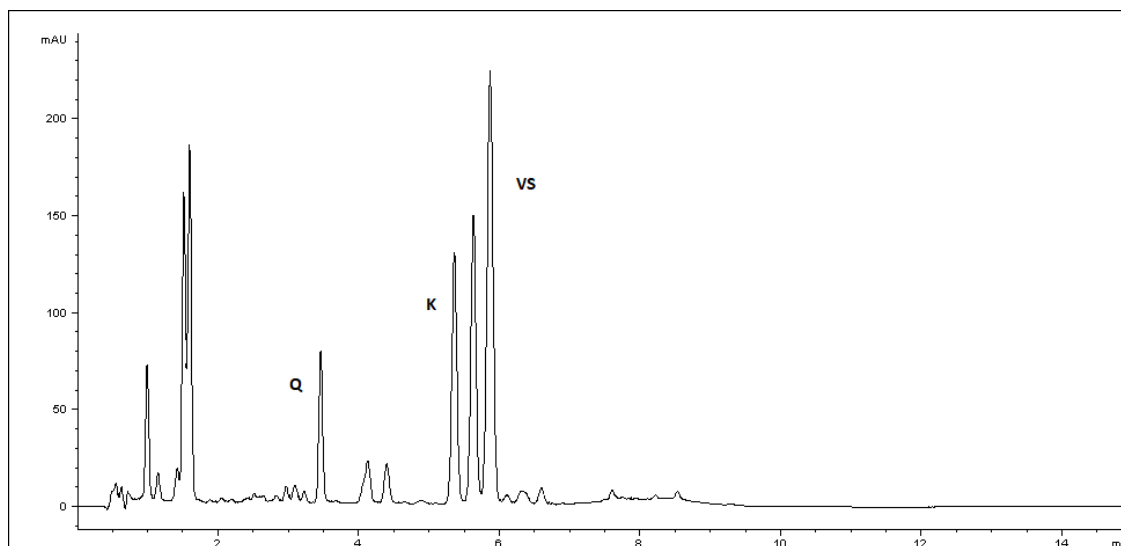
Mibunu lze srovnat s čínským (bok čoj neboli pak čoj) zelím (*Brassica rapa* ssp. *Chinensis*). To analyzoval Khanam (2012) ve svém výzkumu, kde naměřil koncentraci kvercetinu na 167  $\mu\text{g/g}=\text{mg/kg}$  čerstvé hmoty. Ve stejném výzkumu byla analyzována i samotná mibuna, avšak koncentrace kvercetinu byla naměřena pouze 47,4  $\mu\text{g/g}=\text{mg/kg}$  čerstvé hmoty. Vysoké dužnaté stonky má také řeřicha setá z čeledi Brukvovité (*Lepidium sativum*), se kterou by se dala hodnota kemferolu srovnat. Ta podle analýzy Andersena (2006) byla naměřena na 130  $\text{mg/kg}$  čerstvé hmoty. Ovšem i zde není určeno, v kterou roční dobu byla rostlina pěstována, ale s naměřenými průměrnými hodnotami z jarního i podzimního osevu z mého výzkumu by se dala tato hodnota srovnat.

Tabulka 7 Obsah aglykonů v mibuně

Číslo měření	Koncentrace (mg/kg) sušiny				Průměr (mg/kg) sušiny		Směrodatná odchylka čerstvé hmoty		Koncentrace (mg/kg) čerstvé hmoty	
	1.	2.	1.	2.						
Osev	jarní		podzimní		j.	p.	j.	p.	j.	p.
Q	1001	994	1080	1294	998	1187	0,46	13	131	145
K	673	650	1230	1451	662	1341	1,5	14	86,6	163



Obrázek 22 Chromatografický záznam analýzy mibuny z jarního osevu



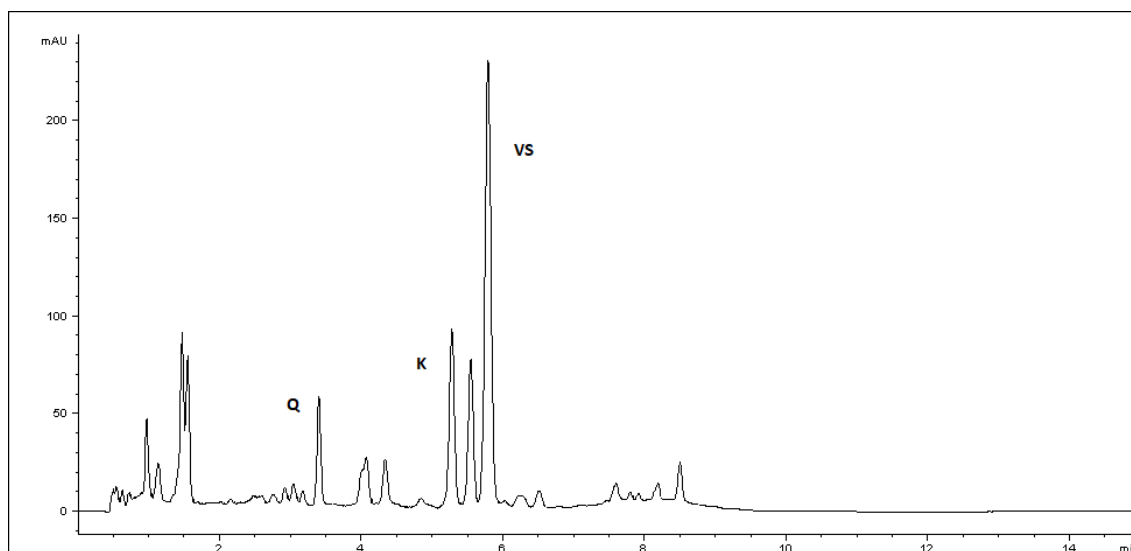
Obrázek 23 Chromatografický záznam analýzy mibuny z podzimního osevu

## 5.7 Mizuna

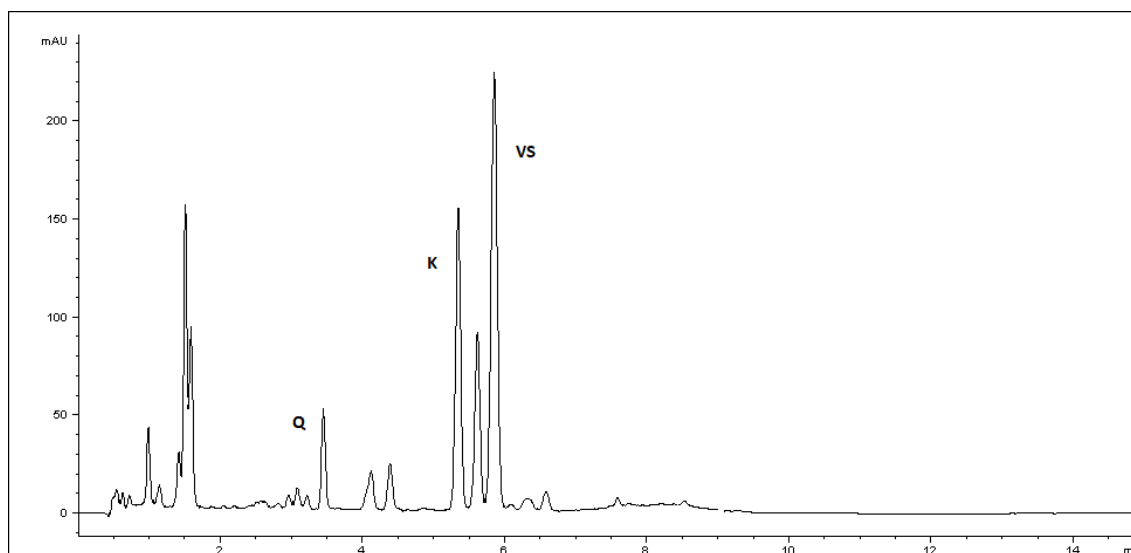
V mizuně z jarního osevu je opět vidět podobná koncentrace kemferolu z obou měření (tab. 8). Koncentrace kemferolu z jarního osevu 105,9 mg/kg čerstvé zeleniny udává spíše podprůměrný výtěžek (obr. 24). Nejvyšší obsah kemferolu (ze všech analyzovaných listových zelenin)  $185 \pm 10,5$  mg/kg čerstvé hmoty byl naměřen v mibuně v podzimním osevu (obr. 25). Pro tuto hodnotu by se vyplatilo mizunu pěstovat spíše na podzim, ale pro obsah kvercetinů  $89,6 \pm 2,99$  mg/kg čerstvé hmoty, jakožto nejnižší hodnoty kvercetinů ze všech analyzovaných listových zelenin, je toto tvrzení v rozporu. Více kvercetinů  $92,4 \pm 1,4$  mg/kg čerstvé hmoty ukázala analýza mizuny z jarního osevu, avšak od koncentrace kvercetinů z podzimního osevu se významně neliší. Khanam (2012) analyzoval v mizuně kvercetin v množství  $70,1 \mu\text{g/g} = \text{mg/kg}$  čerstvé hmoty. V porovnání s naměřenými hodnotami je toto množství o poznání menší. Listový salát zkoumal Andersen (2006) a naměřil kvercetin až 84 mg/kg čerstvé hmoty. Tato hodnota by se dala srovnat s koncentrací kvercetinů v mizuně z podzimního osevu. Průměr je však 30 mg/kg čerstvé hmoty. Množství kemferolu v ledovém salátu ve studii Andersena (2006) bylo tak nízké, že jej nebylo možné detekovat. Khanam (2012) sledoval také obsah kvercetinů v listovém salátu a naměřil 43,3 mg/kg čerstvé hmoty. Co do obsahu kvercetinů, je tedy mizuna bohatší než ledový salát.

Tabulka 8 Obsah aglykonů v mizuně

Číslo měření	Koncentrace (mg/kg) sušiny				Průměr (mg/kg) sušiny		Směrodatná odchylka čerstvé hmoty		Koncentrace (mg/kg) čerstvé hmoty	
	1.	2.	1.	2.	j.	p.	j.	p.	j.	p.
Osev	jarní		podzimní							
Q	746	769	738	789	758	764	1,4	2,99	92,4	89,6
K	864	872	1484	1663	868	1574	0,49	10,5	105,9	185



Obrázek 24 Chromatografický záznam analýzy mizuny z jarního osevu



Obrázek 25 Chromatografický záznam analýzy mizuny z podzimního osevu

## 6 ZÁVĚR

V teoretické části této bakalářské práce byly z odborné literatury popsány polyfenolické látky a jejich pozitivní vliv na zdraví člověka. Nejvíce zastoupenou skupinou polyfenolických látek jsou flavonoly, konkrétně myricetin, morin, luteolin, kvercetin, apigenin a kemferol. Tyto aglykony byly stanovovány v praktické části bakalářské práce.

Analyzovány byly čtyři druhy asijské listové zeleniny z čeledi Brukvovité. Pěstovány byly na záhoně na pozemku Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v jarním (v květnu) a podzimním (v srpnu) osevu v roce 2017. Analýza byla provedena ve dvou opakování metodou HPLC. Z šesti analyzovaných aglykonů byly stanoveny pouze kvercetin a kemferol, ostatní látky byly obsaženy v tak malém množství, že se je nepodařilo detekovat.

Vzorek hořčice čínské červené z jarního osevu obsahoval nejvíce kvercetin, a to  $153 \pm 5,3$  mg/kg čerstvé hmoty a nejvíce kemferolu z jarního osevu měla opět hořčice čínská červená s hodnotou  $151 \pm 4,3$  mg/kg čerstvé hmoty. Pro porovnání obsahu biologicky aktivních látek byly experimentálně zasety rostliny i v podzimním osevu v srpnu, a byla tak zjištěna nejvhodnější doba pro pěstování těchto zelenin. Nejvíce kvercetin z podzimního osevu bylo detekováno v hořčici čínské červené,  $157 \pm 8,8$  mg/kg čerstvé hmoty. Největší množství kemferolu z podzimního osevu bylo naměřeno v mizuně,  $185 \pm 10,5$  mg/kg čerstvé hmoty.

Mibunu je výhodnější pro obsah kemferolu a kvercetin pěstovat na podzim. U ostatních listových zelenin nelze určit vhodnější dobu pěstování.

Záměrem této bakalářské práce je poukázat na prospěšnost konzumace zeleniny pro její obsah polyfenolů. Ty mají vliv na zdraví člověka zejména v prevenci proti rakovině, proti srdečnímu onemocnění a proti diabetu mellitu.



## 7 SEZNAM LITERATURY

1. AGATI, G., AZZARELLO E., POLLASTRI S. a TATTINI M., 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science.*, (196), 67-76, doi: 10.1016/j.plantsci.2012.07.014.
2. AHERNE, S. A. a O'BRIEN N. M., 2002. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. United States: Elsevier Science, 18(Number 1), 75-81.
3. ANDERSEN, Øyvind M., MARKHAM Kenneth R., 2006. *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group. 1256 p. ISBN 08-493-2021-6.
4. BABU, P. V. A., LIU D. a GILBERT E. R., 2013. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 24(11), 1777-1789, doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.06.003.
5. BEIDOKHTI, M. N. a JÄGER A. K., 2017. Review of antidiabetic fruits, vegetables, beverages, oils and spices commonly consumed in the diet. *Journal of Ethnopharmacology*. 201, 26-41, doi: 10.1016/j.jep.2017.02.031.
6. BOUTENKO, V., 2015. *Zelené smoothie recepty: cesta k plnému zdraví*. Hodkovičky: Pragma. 184 s. ISBN 978-80-7349-453-7.
7. COOK, N., 1996. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of the European Ceramic Society*. 7(2), 66-76, doi: 10.1016/S0955-2863(95)00168-9.
8. CRAIG, W. J., 1999. Health-promoting properties of common herbs. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 70(3), 491-499, doi: 10.1093/ajcn/70.3.491s.
9. DADÁKOVÁ, E. a CHMELOVÁ Š., 2017. Flavonoidy - významné rostlinné antioxidanty. PEŠEK, M. a kolektiv. *Dietární antioxidanty v praxi*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, s. 73-88. ISBN 978-80-7394-681-4.

10. DEPPE, C., 2018. *Tao zeleninové zahrady: pěstování rajčat, listové zeleniny, hrachu, fazolí, dýně, radosti a klidu*. Praha: DharmaGaia. 256 s. ISBN 978-80-7436-078-7.
11. DI CARLO, G., MASCOLO N., IZZO A. A. a CAPASSO F., 1999. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*. 65(4), 337-353, doi: 10.1016/S0024-3205(99)00120-4.
12. DOWER, J. I., GELEIJNSE J. M., HOLLMAN P. CH., SOEDAMAH-MUTHU S. S. a KROMHOUT D., 2016. Dietary epicatechin intake and 25-y risk of cardiovascular mortality: the Zutphen Elderly Study: the Zutphen Elderly Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 104(1), 58–64, doi: 10.3945/ajcn.115.128819.
13. ERLUND, I., 2004 Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*. 24(10), 851-874, doi: 10.1016/j.nutres.2004.07.005.
14. GAN, Y., TONG X., LI L., et al., 2015. Consumption of fruit and vegetable and risk of coronary heart disease: A meta-analysis of prospective cohort studies. *International Journal of Cardiology*. 183, 129-137, doi: 10.1016/j.ijcard.2015.01.077.
15. HERTOOG, M. G. L., 1994. *Flavonols and Flavones in Foods and their Relation with Cancer and Coronary Heart Disease Risk*. The Netherlands: Grafisch Service Centrum Van Gils B.V. Wageningen. 151 p. ISBN 90-5485-224-0.
16. HLAVA, B., TÁBORSKÝ V., VALÍČEK P., 1998. *Tropické a subtropické zeleniny: pěstování a využití*. Praha: Brázda, Naše hoby. 148 s. ISBN 80-209-0274-0.
17. HOLLMAN, P.C.H a M.B KATAN. Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*. 1999, 37(9-10), 937-942, doi: 10.1016/S0278-6915(99)00079-4.
18. HOLZBECHER, Z., CHURÁČEK J. a kolektiv, 1987. *Analytická chemie*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury. 663 s. ISBN 04-612-87.

19. HOSSAIN, S. J., SULTANA M. S., IFTEKHARUZZAMAN M., HOSSAIN S. M. a TALEB M. A., 2015. Antioxidant potential of common leafy vegetables in Bangladesh. *Bangladesh Journal of Botany*. 44(1), 51-57, doi: 10.3329/bjb.v44i1.22723.
20. IGNAT, I., VOLF I. a POPA V. I., 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 126, 1821–1835, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.12.026.
21. KHANAM, U. K. S., OBA S., YANASE E. a MURAKAMI Y., 2012. Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. *Journal of Functional Foods*. 4(4), 979-987, doi: 10.1016/j.jff.2012.07.006.
22. KOCHAR, J., GAZIANO J. M. a DJOUSSÉ L., 2011. Dietary Factors and the Risk of Coronary Heart Disease. *Aging and Disease*. 2(2), 149-157. ISSN 2152-5250.
23. KRÍŽEK, M., ŠÍMA J., 2015. *Analytická chemie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. 214 s. ISBN 978-80-7394-486-5.
24. KUBÁT, K, a kolektiv, 2002. *Klíč ke květeně České republiky*. Praha: Academia. 927 s. ISBN 80-200-0836-5.
25. LACHMAN, J., HEJTMÁNKOVÁ A. a ORSÁK M., 2012. Obsah a význam zdraví prospěšných látek v ovoci, zelenině a plodinách. In: *Proceedings of 18th International Conference Reasonable Use of Fertilizers*. Prague: ČZU, November 29, s. 23-28. ISBN 978-80-213-2331-5.
26. LARKCOM, J., 1991 *Oriental vegetables: the complete guide for garden and kitchen*. New York: Kodansha International. 232 p. ISBN 47-700-1619-0.
27. LIU, E. H., QI L.W., CAO J., LI P., LI Ch. Y. a PENG Y. B., 2008. Advances of modern chromatographic and electrophoretic methods in separation and analysis of flavonoids. *Molecules*. (13), 2521-2544, doi: 10.3390/molecules13102521.

28. MINDELL, E., MUNDIS H., MÁČEK M., 2006. *Nová vitaminová bible: nejnovější informace o vitamínech, minerálních látkách, antioxidantech, léčivých rostlinách, o doplňcích stravy, léčebných účincích potravin i lécích používaných v homeopatii*. 2. dopl. přepr. vydání. Praha: Ikar. 572 s. ISBN 80-249-0744-5.
29. MINDELL, E., MUNDIS H., MÁČEK M., 2000. *Vitaminová bible pro 21. století: Vše o vitamínech, které budete v tomto století potřebovat, abyste si zachovali a upevnili zdraví*. Praha: Knižní klub. 303 s. ISBN 80-242-0406-1.
30. MOLNÁR-PERL, I. a FÜZFAI Z., 2005. Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. *Journal of Chromatography A*. 1073(1-2), 201-227, doi: 10.1016/j.chroma.2004.10.068.
31. OPEKAR, F. a kolektiv, 2005. *Základní analytická chemie: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Praha: Karolinum. 201 s. ISBN 978-80-246-1775-6.
32. OPLETAL, L., SKŘIVANOVÁ V. a kolektiv, 2010. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita: Využití látek pro ovlivnění fyziologických procesů hospodářských zvířat*. Svazek 2. Praha: Karolinum. 654 s. ISBN 978-80-246-1801-2.
33. PASSWATER, R. A. a NOVOTNÁ J., 2002. *O antioxidantech*. Praha: Pragma, 94 s. ISBN 80-7205897-5.
34. PEKÁRKOVÁ, E. 1997. *Zelenina*. Praha: BRIO. 128 s. ISBN 80-902209-3-2.
35. PEKÁRKOVÁ, E., 2000. *Pěstujeme zeleninu*. 2. upr. vyd. Praha: Grada Publishing. 150 s. ISBN 80-247-9040-8.
36. PEKÁRKOVÁ, E., 2002. *Pěstujeme salát, špenát a další listové zeleniny*. Praha: Grada, Česká zahrada. 90 s. ISBN 80-247-0283-5.
37. PEVNÁ, V. a kolektiv, 1985. *Listové zeleniny: Naša zahrádka*. Bratislava: Příroda. 81 s.

38. SEONG, G.U., HWANG I. W. a CHUNG S. K., 2016. Antioxidant capacities and polyphenolics of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *Pekinensis*) leaves. *Food Chemistry*. 199, 612-618, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.12.066.
39. SIMLAI, A., CHATTERJEE K. a ROY A., 2014. A Comparative Study on Antioxidant Potentials of Some Leafy Vegetables Consumed Widely in India. *Journal of Food Biochemistry*. 38(3), 365-373, doi: 10.1111/jfbc.12062.
40. SLANINA, J. a TÁBORSKÁ E., 2004. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy*. 98(5), 239-245. ISSN 1213-7103
41. SOENGAS, P., M.E. CARTEA, M. FRANCISCO, T. SOTELO a P. VELASCO., 2012. New insights into antioxidant activity of Brassica crops. *Food Chemistry*. 134(2), 725-733. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.02.169.
42. ŠTULÍK, K., 2005. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum. 264 s. ISBN 80-246-0852-9.
43. VELÍŠEK, J. a HAJŠLOVÁ J., 2009a. *Chemie potravin 1*. 3. rozš. přepr. vydání. Tábor: OSSIS. 580 s. ISBN 978-80-86659-17-6.
44. VELÍŠEK, J. a HAJŠLOVÁ J., 2009b. *Chemie potravin 2*. 3. rozš. přepr. vydání. Tábor: OSSIS. 623 s. ISBN 978-80-86659-17-6.
45. XIANG, Y., LIU Y. a LEE M. L., 2006. Ultrahigh pressure liquid chromatography using elevated temperature. *Journal of Chromatography A*. 1104(1-2), 198-202, doi: 10.1016/j.chroma.2005.11.118.

## **8 SEZNAM PŘÍLOH A OBRÁZKŮ**

Příloha 1 Pěstování na záhoně (obrázky 1-4)

Příloha 2 Vlastní práce (obrázky 1-2)

Příloha 3 Tabulky ke kapitole: 5.2. Naměřené hodnoty a pomocné výpočty analýzy

Obrázek 9 Asijské listové zeleniny čeledi Brassicaceae. Zdroj: Larkcom, 1991

Obrázek 10 Hořčice čínská zelená. Zdroj: Semo.cz

Obrázek 11 Hořčice čínská červená. Zdroj: Semo.cz

Obrázek 12 Mibuna. Zdroj: Semo.cz

Obrázek 13 Mizuna. Zdroj: Semo.cz

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

LDL – nízkodenzitní, „zlý“, „špatný“ lipoprotein (low density lipoprotein)

ROS – Reaktivní forma kyslíku (Reactive oxygen species)

TAC – celková antioxidační kapacita (Total Antioxidant Capacity)

DM – úplavice cukrová, „cukrovka“ (Diabetes mellitus)

var. – varieta (varietas)

ssp. – poddruh (subspecies)

LC – Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)

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

SPE – Extrakce pevným sorbentem (Solid-Phase Extraction)

## 9 PŘÍLOHY

### *Příloha 1 Pěstování na záhoně (obrázky 1-4)*



*Obrázek 1 Hořčice čínská zelená (vlastní zdroj)*



*Obrázek 2 Hořčice čínská červená (vlastní zdroj)*





*Obrázek 3 Mibuna (vlastní zdroj)*



*Obrázek 4 Mizuna (vlastní zdroj)*

*Příloha 2 Vlastní práce (obrázky 1-2)*



*Obrázek 1 HPLC na Zemědělské fakultě JČU (vlastní zdroj)*



*Obrázek 2 Proces pro sorpci na tuhé fázi (SPE) (vlastní zdroj)*

### Příloha 3 Tabulky ke kapitole: 5.2. Naměřené hodnoty a pomocné výpočty analýzy

Tabulka 1 Hodnoty navážky listové zeleniny a analýza kvercetinu z jarního osevu

Pořadí měření, vzorek	Navážka (g)	Odezva Q	Odezva VS	Relativní odezva	Obsah Q na navážku	Obsah Q vynásobený ředěním	Obsah Q (µg/kg)
1. h. č. zelená	0,2542	267,59	1297,4	0,206	25,4	254	998000
2. h. č. z.	0,256	266,65	1325,6	0,201	24,7	247	967000
1. h. č. červená	0,2501	350,38	1351,9	0,259	31,9	319	1280000
2. h. č. č.	0,2575	380,93	1331,7	0,286	35,2	352	1370000
1. mizuna	0,2534	207,79	1350,6	0,154	18,9	189	746000
2. mizuna	0,2566	228,7	1424,3	0,161	19,7	197	769000
1. mibuna	0,252	264,47	1289,4	0,205	25,2	252	1001400
2. mibuna	0,2525	263,89	1293,2	0,204	25,1	251	994000

Tabulka 2 Hodnoty navážky listové zeleniny a analýza kvercetinu z podzimního osevu

Pořadí měření, vzorek	Navážka (g)	Odezva Q	Odezva VS	Relativní odezva	Obsah Q na navážku	Obsah Q vynásobený ředěním	Obsah Q (µg/kg)
1. h. č. zelená	0,2511	261,29	1342,27	0,195	23,9	239	954000
2. h. č. z.	0,2511	253,18	1317,73	0,192	23,6	236	941000
1. h. č. červená	0,2548	364,21	1356,37	0,269	33,06	330,6	1298000
2. h. č. č.	0,2544	383,6	1279,7	0,300	36,9	369	1450000
1. mizuna	0,2507	199,25	1323,65	0,151	18,5	185	738000
2. mizuna	0,2513	218,04	1352,35	0,161	19,8	198,	789000
1. mibuna	0,2517	293,07	1326,9	0,221	27,2	272	1080000
2. mibuna	0,2525	362,36	1365,36	0,265	32,7	327	1290000

Tabulka 3 Hodnoty navážky listové zeleniny a analýza kemferolu z jarního osevu

Pořadí měření, vzorek	Navážka (g)	Odezva K	Odezva VS	Relativní odezva	Obsah K na navážku	Obsah K vynásobený ředěním	Obsah K (µg/kg)
1. h. č. zelená	0,2542	411,772	1297,36	0,317	20,1	201,5	792000
2. h. č. z.	0,256	408,704	1325,38	0,3084	19,6	196	765000
1. h. č. červená	0,2501	677,333	1351,94	0,501	31,8	318	1270000
2. h. č. č.	0,2575	726,891	1331,66	0,546	34,6	346	1340000
1. mizuna	0,2534	465,905	1350,57	0,345	21,9	219	864000
2. mizuna	0,2566	502,148	1424,27	0,353	22,4	224	872000
1. mibuna	0,252	344,36	1289,38	0,267	17	170	673000
2. mibuna	0,2525	333,993	1293,17	0,258	16,4	164	650000

Tabulka 4 Hodnoty navážky listové zeleniny a analýza kemferolu z podzemního osevu

Pořadí měření, vzorek	Navážka (g)	Odezva K	Odezva VS	Relativní odezva	Obsah K na navážku	Obsah K vynásobený ředěním	Obsah K (µg/kg)
1. h. č. zelená	0,2511	633,401	1342,27	0,472	29,9	299	1190000
2. h. č. z.	0,2511	622,351	1317,73	0,472	29,9	299	1190000
1. h. č. červená	0,2548	796,775	1356,37	0,587	37,2	372	1460000
2. h. č. č.	0,2544	838,719	1279,7	0,655	41,5	415	1630000
1. mizuna	0,2507	776,658	1323,65	0,587	37,2	372	1480000
2. mizuna	0,2513	891,71	1352,35	0,659	41,8	418	1660000
1. mibuna	0,2517	647,859	1326,9	0,488	30,96	309,6	1230000
2. mibuna	0,2525	789,117	1365,36	0,578	36,6	366	1450000

Tabulka 5 Stanovení sušiny listové zeleniny v jarním osevu

	Čerstvý materiál (g)	Lyofilizovaný materiál (g)	Sušina (%)	Hmotností zlomek
Hořčice čínská zelená	202,06	24,42	12,09	0,121
Hořčice čínská červená	141,24	16,32	11,55	0,116
Mizuna	172,93	21,09	12,20	0,122
Mibuna	156,56	20,49	13,09	0,131

Tabulka 6 Stanovení sušiny listové zeleniny v podzemním osevu

	Čerstvý materiál (g)	Lyofilizovaný materiál (g)	Sušina (%)	Hmotností zlomek
Hořčice čínská zelená	136,55	16,93	12,40	0,124
Hořčice čínská červená	114,02	13,03	11,43	0,114
Mizuna	159,32	18,69	11,73	0,117
Mibuna	140,83	17,15	12,18	0,122