

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2018

Denisa Vraná

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Využití moderních analytických technik pro analýzu biologicky aktivních
látek obsažených v pseudoobilovinách

Denisa Vraná

Bakalářská práce

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Denisa Vraná**
Osobní číslo: **C15074**
Studijní program: **B2802 Chemie a technická chemie**
Studijní obor: **Chemie a technická chemie**
Název tématu: **Využití moderních analytických technik pro analýzu biologicky aktivních látek obsažených v pseudoobilovinách**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na využití moderních analytických technik v analýze fenolických látek s antioxidačním účinkem ve vybraných pseudoobilovinách (pohanka, amarant). Zaměřte se na úpravu vzorku před analýzou a analýzu různých typů extraktů pomocí separačních technik v kapalně fázi. Věnujte se rovněž spektrofotometrickým technikám pro sledování antioxidační aktivity.
2. Výsledky prezentované v literatuře porovnejte a kriticky zhodnoťte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce:

Ing. Kateřina Pravcová

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce:

20. února 2018

Termín odevzdání bakalářské práce:

4. července 2018



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 29. 6. 2018

Denisa Vraná

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce paní doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, vstřícnost a připomínky, které mi v průběhu zpracování práce poskytla. Dále bych chtěla poděkovat konzultantce Ing. Kateřině Pravcové za její čas, pomoc a cenné rady. Poděkování patří také všem, kteří mě během studia podporovali, zejména mé rodině.

ANOTACE

Tato bakalářská práce, napsaná formou literární rešerše, se věnuje analýze biologicky aktivních látek obsažených v pseudoobilovinách. V teoretické části se zabývá charakteristikou a chemickým složením pohanky a amarantu. Dále pak charakteristikou antioxidantů, zejména fenolických sloučenin, které vykazují antioxidační aktivitu. V druhé polovině práce jsou popsány analytické metody, jako je extrakce, vysokoúčinná kapalinová chromatografie a spektrofotometrické metody vhodné pro měření látek vykazující antioxidační aktivitu.

KLÍČOVÁ SLOVA

amarant, pohanka, fenolické sloučeniny, antioxidační aktivita, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, spektrofotometrické metody

TITLE

Modern Analytical Techniques in Analysis of Biological Active Compounds in Pseudocereals

ANNOTATION

This bachelor thesis is written in a form of a literary research. It contains the analysis of biologically active compounds contained in pseudocereals. The theoretical part deals with the characteristics and chemical compositions of buckwheat and amaranth. In addition, it provides characteristics of antioxidants, mainly phenolic compounds, which show antioxidant activity. The second part of the thesis describes analytical methods, such as extraction, high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods which are frequently used for measuring compounds with antioxidant properties.

KEYWORDS

amaranth, buckwheat, phenolic compounds, antioxidant activity, high performance liquid chromatography, spectrophotometric methods

OBSAH

ÚVOD	11
1 Teoretická část	12
1.2 Pseudoobiloviny.....	12
1.3 Amarant	14
1.3.1 Charakteristika.....	14
1.3.2 Anatomie a složení zrna	15
1.3.3 Chemické složení	16
1.4 Pohanka.....	21
1.4.1 Charakteristika.....	21
1.4.2 Anatomie a složení zrna	24
1.4.3 Chemické složení	25
1.5 Antioxidanty	30
1.5.1 Fenolické sloučeniny	30
1.6 Analytické metody	33
1.6.1 Extrakce.....	34
1.6.2 Chromatografické metody	35
1.6.3 Spektrofotometrické metody	37
1.7 Analýza fenolických sloučenin z pseudoobilovin	39
1.7.1 Úprava a extrakce vzorku.....	39
1.7.2 Stanovení fenolických sloučenin pomocí HPLC.....	40
ZÁVĚR	42
POUŽITÁ LITERATURA.....	43

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 – Semena nejběžnějších pseudoobilovin	12
Obrázek 2 – Rostlina a semena amarantu	14
Obrázek 3 – Příčný a podélný řez amarantového zrna.....	15
Obrázek 4 – Pohanková semene	22
Obrázek 5 – Květy, listy a zrna pohanky	23
Obrázek 6 – Vzhled pohankových zrn	24
Obrázek 7 – Podélný a příčný řez pohankového zrna.....	24
Obrázek 8 – Antioxidační mechanismus fenolických sloučenin	30
Obrázek 9 – Základní struktury flavonoidů	33
Obrázek 10 – Schéma přístroje pro HPLC.....	36
Obrázek 11 – Chromatogram fenolických sloučenin pohanky při 280, 330 a 350 nm.....	41
Tabulka 1 – Chemické složení pseudoobilovin vztažené na sušinu ve srovnání s pšenicí....	13
Tabulka 2 – Chemické složení tří druhů amarantu	16
Tabulka 3 – Porovnání aminokyselin obsažených v amarantu, kukuřici a pšenici.....	17
Tabulka 4 – Minerální látky obsažené v amarantu	20
Tabulka 5 – Vitaminy obsažené v amarantovém zrně	20
Tabulka 6 – Chemické složení pohanky obecné a pohanky tatarské.....	25
Tabulka 7 – Porovnání aminokyselinového složení pohanky a rýže	26
Tabulka 8 – Minerální látky obsažené v drcené pohance a ve slupce	28
Tabulka 9 – Vitaminy obsažené v pohankovém zrně	29
Tabulka 10 – Nejběžnější fenolické kyseliny	32
Tabulka 11 – Typy analytických metod stanovující celkovou antioxidační aktivitu.....	34

SEZNAM ZKRATEK

A	absorbance
AAPH	2,2'-azobis-2-amidinopropan hydrochlorid
ABTS	kyselina 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová
CE	kapilární elektroforéza
DAD	detektor diodového pole
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
ESI	ionizace elektrosprejem
FAE	ekvivalentní množství kyseliny ferulové
FRAP	stanovení antioxidační aktivity založené na redukci železitých iontů
GAE	ekvivalentní množství kyseliny gallové
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MS	hmotnostní spektrometr
NMR	nukleární magnetická rezonance
NP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s normálními fázemi
ORAC	schopnost látky zhášet kyslíkové radikály
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi
TAA	celková antioxidační aktivita
TE	ekvivalentní množství Troloxu
TEAC	Trolox ekvivalentní antioxidační kapacita
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TPC	celkový obsah fenolických sloučenin
TPTZ	tripyridyltriazinový komplex
Trolox	kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelná oblast

ÚVOD

V posledních letech roste zájem o produkty z alternativních rostlin, které vykazují pozitivní vliv na lidské zdraví. Mezi tyto alternativní rostliny patří i tzv. pseudoobiloviny, jako je amarant, pohanka a quinoa. Zdraví prospěšné účinky pseudoobilovin jsou způsobeny především vysokým obsahem biologicky aktivních látek, které se jako sekundární metabolity vyskytují v rostlinách. Sekundární rostlinné metabolity fungují jako eventuální prostředky ke snížení chronického onemocnění nebo mohou významně přispět k jeho prevenci.

Jsou tedy velmi výkonnou a hlavně přirozenou součástí léčby. Největší podíl biologicky aktivních látek koncentrovaných v pseudoobilovinách vykazují fenolické sloučeniny, které se vyznačují antioxidační aktivitou. Působením antioxidantů se zabraňuje výskytu volných radikálů, které způsobují oxidační stres. Pro stanovení těchto sloučenin a jejich antioxidační aktivity se používá různých metod a analytických nástrojů. Patří mezi ně např. kapalinová chromatografie, plynová chromatografie, kapilární elektroforéza, spektrofotometrické metody a další.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.2 Pseudoobiloviny

Z botanického hlediska se jedná o nepravé obiloviny, které jsou svým složením a využitím semen velmi podobné běžným obilovinám, jako je například pšenice, ječmen, žito, rýže a další. Na rozdíl od běžných obilovin jsou pseudoobiloviny dvouděložné rostliny [1,2,4].

Mezi nejběžnější pseudoobiloviny patří pohanka, amarant a quinoa (obrázek 1). Tyto nepravé obiloviny jsou si podobné chemickým složením semen (tabulka 1). Amarant je z hlediska bílkovinného složení o něco významnější než quinoa a pohanka. Naopak z hlediska obsahu vlákniny a biologicky aktivních látek s antioxidačními vlastnostmi, konkrétně fenolických sloučenin, je významnější pohanka [2].



Obrázek 1 – Semena nejběžnějších pseudoobilovin [46]

Semena pseudoobilovin mají vysokou nutriční hodnotu, proto mohou mít pozitivní vlastnosti na lidské zdraví. Využívají se k prevenci proti různým chronickým onemocněním, jako je třeba kardiovaskulární onemocnění, ateroskleróza nebo rakovina. Pseudoobiloviny neobsahují prolaminy, což je směs bílkovin nazývané také jako gluten neboli lepek, proto jsou tyto potraviny vhodné i pro lidi, kteří trpí celiakií. Celiakie je imunitní nesnášenlivost lepku, která se projevuje autoimunitním zánětem sliznice tenkého střeva. Z tohoto důvodu jsou pseudoobiloviny zahrnovány do dietních a výživových jídelníčků [2,4]. Patří mezi tzv. přirozenou výživu, proto mohou nahradit i některá syntetická léčiva. Navíc jsou oproti syntetickým léčivům dostupnější a ekonomičtější [30].

Amarant, quinoa a pohanka obsahují vysoce kvalitní proteiny, které jsou stravitelné a biologicky dostupnější než proteiny konvenčních obilovin, a to především kvůli vynikajícímu složení esenciálních aminokyselin, které dané proteiny tvoří. Pseudoobiloviny

se také vyznačují obsahem vitaminů, především vitaminu E. Důležité jsou i jiné biologicky aktivní látky s antioxidačními vlastnostmi jako jsou fenolické kyseliny, flavonoidy, taniny, saponiny a další. Lipidy amarantu, quinoj a pohanky jsou charakterizovány vysokým stupněm nenasycenosti, což je žádoucí z hlediska výživy. Navíc vysoké množství vlákniny zlepšuje metabolismus těchto lipidů. Dále obsahují škrob a důležité minerály. Mezi dominantní minerály patří například fosfor, draslík, železo, hořčík, vápník nebo zinek [1,2,5].

Z hlediska tohoto složení se v posledních letech staly pseudoobiloviny jedny z nejvyhledávanějších alternativních plodin na potravinářském trhu, tím se zintenzivnil i výzkum pseudoobilovin ve všech oblastech. Ale i přes to, že se jejich poptávka značně zvýšila, jsou pseudoobiloviny ve srovnání s běžnými obilovinami stále nevyužité [1].

Tabulka 1 – Chemické složení pseudoobilovin vztažené na sušinu ve srovnání s pšenicí [1,2,3,5]

Druhy semen	Proteiny [% (m/m)]	Lipidy [% (m/m)]	Škrob [% (m/m)]	Vláknina [% (m/m)]	Minerální látky [% (m/m)]
Amarant	14,0–16,5	5,6–10,3	55,1–67,3	11,1–20,6	2,4–3,3
Quinoa	11,0–16,5	4,1–7,5	64,3–70,4	12,88–19,7	2,3–3,8
Pohanka	10,4–14,2	1,3–3,4	58,5–69,4	6,7–9,9	1,4–2,1
Pšenice	11,6–14,3	1,7–2,3	61–78,4	2,8–6,5	1,4–2,2

Jelikož jsou pseudoobiloviny na rozdíl od běžných obilovin bohaté nejen na proteiny, ale také na lipidy, vlákninu, vitaminy a minerální látky, mohou rozšiřovat, nebo dokonce i nahrazovat obiloviny jako jsou pšenice, rýže, kukuřice a další [2].

1.3 AMARANT

1.3.1 Charakteristika

Amarant, známý také jako laskavec, je řazen do čeledi laskavcovitých (*Amaranthaceae*). Rod *Amaranthus* se skládá přibližně z 60 druhů, ale pouze tři druhy jsou používány pro produkci zrna v potravinářském průmyslu (*Amaranthus Hypochondriacus*, *Amaranthus Cruentus* a *Amaranthus Caudatus*) [5]. Svým využitím semen jsou podobná obilovinám, ale mezi ně se neřadí. Z botanického hlediska se jedná o tzv. pseudoobilovinu. Kromě použití amarantového zrna, se také používají listy a natě, které slouží jako zelenina pro lidi či krmiva pro zvířata. Jiné druhy jsou považovány za plevely nebo jako okrasné rostliny [6,8].

Amarant byl jednou ze základních potravin Aztécké, Mayské a Incké civilizace [5,9]. Dnes se pěstuje ve střední a jižní Americe, Africe a Asii (Čína, Nepál a Indie) [6]. Je extrémně adaptivní vůči nepříznivým podmínkám růstu. Odolává různým teplotám, půdnímu pH (kyselému či alkalickému), dešti, chorobám a škůdcům. Jeho rostliny mají vysoký potenciál pro vznik biomasy a výnos zrna. Jedna rostlina produkuje okolo 50 000 semen [6,9]. Navíc patří mezi tzv. C4-rostliny s více účinnou fotosyntézou, což způsobuje rychlým růst. Tyto C4-rostliny dokážou využít malé množství oxidu uhličitého a zároveň získat větší množství energie v podobě ATP (adenosintrifosfát) [6,10].

Z hlediska vysokých nutričních kvalit amarantu se dnes zvyšuje jeho produkce. Příznivé účinky způsobují látky s antioxidační aktivitou, jako jsou vitaminy C a E, fenolické kyseliny, flavonoidy, saponiny, karotenoidy, a další. Amarant má antialergické, antirakovinotvorné a antioxidační vlastnosti, proto se používá i v lékařství při některých onemocnění [4].



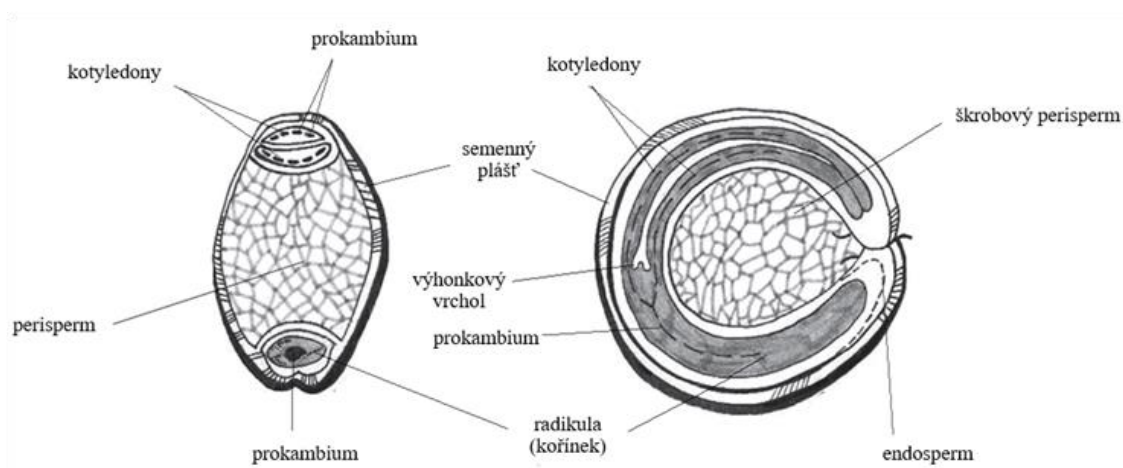
Obrázek 2 – Rostlina a semena amarantu [7]

Amarant je víceletá rostlina (obrázek 2), která se využívá k přímé konzumaci. Dále se využívá jako přírodní potravinářské nebo kosmetické barvivo, kvůli obsahu červeného až fialového pigmentu β -kyaninu [6]. V současnosti tato alternativní plodina přitahuje celosvětovou pozornost a je považována za novou vysoce potenciální plodinu s různým způsobem využití [6].

1.3.2 Anatomie a složení zrna

Velikost amarantového zrna je menší než zrna běžných obilovin. Jeho průměr bývá většinou okolo 0,9 až 1,7 mm a hmotnost jednoho zrna se pohybuje od 0,5–1,2 mg [5,8]. Zbarvení vnější obalové vrstvy semene závisí na odrůdě amarantu. Barva bývá různorodá od bílé, krémové, růžové, hnědé až po černou [2,6].

Semeno je tvořeno embryem, endospermem a perispermem (obrázek 3). Embryo je zárodek kruhového tvaru obklopující perisperm. Je poměrně velké a společně s vnější vrstvou semene obsahuje proteiny, vlákninu, sacharidy, lipidy a minerály. Embryo představuje asi 25 % hmotnosti zrna a společně s vnější vrstvou (semenným pláštěm) tvoří 26 % semene, proto je amarantové zrnko hlavním zdrojem látek, které jsou koncentrovány v embryu [2]. Perisperm se na rozdíl od jednoděložných obilovin skládá z extrémně malých škrobových granulí o průměru 0,8–2,5 μm . Pro srovnání, průměr granulí rýžového škrobu se pohybuje okolo 3–8 μm a 15–100 μm pro bramborový škrob. Endosperm je u zralých semen málo vyvinutý, a tak obsahuje jen malou část semene [6,11].



Obrázek 3 – Příčný a podélný řez amarantového zrna [3]

1.3.3 Chemické složení

Chemické složení a tudíž i nutriční kvalita amarantu je vynikající. Semena a listy obsahují velké množství látek s příznivými účinky na lidské zdraví. Amarantové zrno má téměř dvojnásobné až trojnásobné množství proteinů a lipidů než běžné obiloviny. Dále obsahuje vysoké množství esenciálních aminokyselin, převážně lysinu. Je dobrým zdrojem minerálů, vitaminů a biologicky aktivních látek s antioxidační aktivitou. Ale naopak množství škrobu je o něco nižší než například u pšenice [2,5,13]. Zelené části rostliny obsahují stejně jako zrno proteiny, vlákninu, minerály a vitaminy. Jelikož je obsah proteinů vyšší než u semen, jsou tyto části rostliny zdrojem bílkovinných výtažků s vysokou nutriční kvalitou [4].

Obsah látek se liší především druhem a odrůdou amarantu (tabulka 2) nebo jeho částmi (listy, zrno, stonek). Dále je složení závislé na pěstitelských podmínkách (klíčení, teplota, způsob a místo pěstování, atd.) a způsobu zpracování [5].

Tabulka 2 – Chemické složení tří druhů amarantu [2]

Složení	<i>A. Caudatus</i> [%]	<i>A. Hypochondriacus</i> [%]	<i>A. Cruentus</i> [%]
Proteiny	15,5	17,9	15,5
Lipidy	7,6	7,9	7,7
Vláknina	4,7	2,2	4,4
Sacharidy	68,8	63,6	58,3
Popílek	3,4	3,3	3,3

1.3.3.1 Proteiny

Amarant obsahuje velké množství proteinů. Kvalita proteinů je především závislá na složení aminokyselin (tabulka 3), ze kterých se dané proteiny skládají. Na rozdíl od konvenčních obilovin se amarant vyznačuje mnohem vyšším složením esenciálních aminokyselin [1]. Mezi tyto esenciální aminokyseliny patří zejména lysin, tryptofan a sirmé aminokyseliny. Naopak z pohledu běžných obilovin je nedostačující aminokyselinou leucin [5]. Amarantové proteiny jsou svým aminokyselinovým složením srovnatelné s bílkovinami živočišného původu. Esenciální aminokyseliny jsou pro lidské tělo velmi

důležité. Jelikož si je tělo nemůže samo syntetizovat, přijímají se prostřednictvím potravy. U amarantu bylo zjištěno [2,5], že součet esenciálních aminokyselin je 47,56 g/100 g bílkovin. Amarantové proteiny se vyznačují i velmi vysokou biologickou hodnotou, avšak stravitelnost těchto proteinů se většinou pohybuje kolem 80 %. Pro zlepšení stravitelnosti se zrno amarantu praží [6].

Vzhledem k tomu, že obsahují hlavně globuliny a albuminy a téměř žádné prolaminové bílkoviny (< 3 %), je amarant důležitým zdrojem pro osoby trpící celiakií. Globuliny a albuminy jsou skladovacími bílkovinami, které tvoří velkou část proteinů. Albuminy tvoří asi 40 % z celkových proteinů a globuliny 20 % proteinů [2,6].

Přibližně 65 % proteinů se nachází v embryu a semenné vrstvě a 35 % ve škrobovém perispermu [5]. Celkový obsah proteinů obsažených v zrnu se pohybuje kolem 16 % až 18 %, což je mnohem více než mají běžné obiloviny (8,5–14 % proteinů) [6,13].

Tabulka 3 – Porovnání aminokyselin obsažených v amarantu, kukuřici a pšenici [3, 6]

Aminokyseliny	g/100 g proteinů		
	Amarant	Kukuřice	Pšenice
Lysin	5,1–6,1	2,9	2,6
Leucin	4,2–6,3	12,5	6,8
Valin	3,9–4,7	5,0	4,4
Histidin	2,5–3,0	2,6	2,0
Isoleucin	2,7–4,1	4,0	4,2
Treonin	3,3–4,0	3,8	2,8
Tryptofan	0,9–1,82	0,7	1,2

Lysin

Nejvíce obsaženou aminokyselinou v amarantovém zrnu je už zmiňovaný lysin. Jeho obsah je asi 2krát až 3krát vyšší než u konvenčních obilovin. Lysin je důležitou aminokyselinou podporující růst tkání, svalové hmoty a mozkových buněk, dále je nezbytný pro produkci hormonů, enzymů a protilátek. Výrazně podporuje vstřebávání vápníku v trávicím traktu a tím zlepšuje správný růst a vývoj kostí, hlavně u dětí [3,5,14].

1.3.3.2 Lipidy

Amarantové zrno je dále velmi dobrým zdrojem lipidů. Obsah lipidů je asi 2krát až 3krát vyšší než obsah pohankových lipidů a lipidů jiných konvenčních obilovin [1]. Amarantové lipidy jsou v převážné míře tvořeny nenasycenými mastnými kyselinami, které tvoří více než 75 % lipidů. Nejvíce zastoupenou vyšší nenasycenou mastnou kyselinou je kyselina linolová (35–55 %), která je esenciální a proto nezbytná pro lidskou výživu. Další vyšší mastné kyseliny, které jsou obsaženy v amarantu, jsou nasycené mastné kyseliny, jako je kyselina olejová (18–38 %), kyselina palmitová (20–23 %) a kyselina stearová (3–4 %) [2,5].

Lipidy jsou mimořádně cenné kvůli přítomnosti složek, které se v běžných obilovinách v takovém množství nevyskytují, patří mezi ně např. skvalen, vitamin E a zmiňované esenciální nenasycené mastné kyseliny [1,37].

Skvalen

Skvalen je přírodní organická látka (polynenasycený triterpen), která se vyskytuje jak v živočišných tkáních, tak i v rostlinách. Poprvé byl izolován z jater žraloka. Obsahuje více než polovinu jaterního oleje. V současné době jsou játra žraloka stále hlavním zdrojem skvalenu, ale jejich dostupnost je omezena kvůli ochraně mořských živočichů. Z tohoto důvodu je snaha o využití rostlinného zdroje skvalenu, jako je amarantový olej, olivový olej nebo například rýžový olej. Nejvyšší obsah skvalenu je v amarantovém oleji (6–8 %). Koncentrace v amarantovém zrnu se pohybuje okolo 469,96 mg/100 g [4]. Skvalen je důležitou složkou kožní kosmetiky, snižuje hladinu cholesterolu a reguluje metabolismus lipidů. Dále má antioxidační vlastnosti a pozitivní účinky na lidský imunitní systém [2,18].

1.3.3.3 Sacharidy

Škrob

Amarantový škrob je nejvýznamnější částí amarantu a hlavní zásobní složkou amarantových sacharidů, které obsahují asi 48–69 % celkové sušiny. I přesto, že tvoří hlavní složku amarantového zrna, je jeho výskyt nižší než u běžných obilovin. Je to způsobeno tím, že se nachází v extrémně malých granulích uložených v perispermu. Tyto granule jsou nejmenšími naměřenými škrobovými granulemi ze všech konvenčních obilovin [5,6].

Hlavními složkami škrobu jsou amylopektin a amyulóza, kde největší část představuje amylopektin, který tvoří asi 90 % škrobu. Obsah amyulózy činí 0,1–11,1 % z celkového škrobu a je nižší než u ostatních obilných škrobů [5,6].

Malé škrobové granule a vysoký obsah amylopektinu, vysvětlují většinu fyzikálních vlastností amarantového škrobu. Vlivem těchto faktorů má vynikající stabilitu při zmrazování a rozmrazování, dále pak dobrou schopnost vázat vodu (bobtnavost). Malé škrobové granule poskytují unikátní funkční vlastnosti potravinářské ale i nepotravinářské aplikace, jako je například zahušťování potravin či škrobení prádla, kosmetické výrobky nebo náhražka tuků [5].

Vláknina

Amarant obsahuje oproti pohance nižší množství vlákniny, ale i přes to je jejím dobrým zdrojem. Obsah vlákniny amarantu závisí na druhu a odrůdě amarantu, tak jako většina amarantových složek [5]. Procentuálně se tento obsah pohybuje okolo 4–5 % celkového množství vlákniny [2,5]

Vláknina je nestravitelný polysacharid, který má velmi příznivé fyziologické účinky pro lidské zdraví, bez ohledu na to jestli se jedná o rozpustnou či nerozpustnou vlákninu. Pomáhá pohybu potravy trávicí soustavou, vstřebává vodu nebo může snižovat hladinu cholesterolu a glukózy v krvi [1].

1.3.3.4 Minerály

Amarantové zrno je dále velmi bohatým zdrojem minerálních látek, které jsou důležité pro lidský organismus. Minerální látky jsou složky potravin, které zůstávají po úplné oxidaci, proto se nazývají popílek. Obsah minerálů je asi dvakrát vyšší než u běžných obilovin, jejich obsah se liší podle odrůdy a způsobu zpracování [6]. Dominantními minerály amarantu jsou fosfor, vápník, železo, draslík a hořčík, dále pak měď, mangan a sodík [6]. Fosfor, draslík a hořčík jsou obsaženy v embryu semene a vápník je uložen v oplodí (perikarpu). Bylo zjištěno [1], že barevné genotypy semen obsahují vyšší koncentraci minerálů hořčíku a vápníku, než bílé genotypy semen. Avšak barva osiva nemá žádný vliv na zbylé minerály, jako jsou draslík, sodík, fosfor ani železo a měď. Obsah jednotlivých minerálů je znázorněn v tabulce 4.

Tabulka 4 – Minerální látky obsažené v amarantu [37]

Složení	mg/100 g
Fe	29,35 ± 0,60
Ca	283,14 ± 5,74
Mg	425,21 ± 8,62
K	770,15 ± 15,61
P	55,59 ± 1,13
Na	4,14 ± 0,08
Mn	4,07 ± 0,08
Cu	1,25 ± 0,03

1.3.3.5 Vitaminy

Z vitaminů můžeme v amarantu najít vitamin B, především riboflavin (vitamin B₂), kyselinu L-askorbovou (vitamin C), kyselinu listovou a celkové tokoferoly (vitamin E) [2,5,6]. Nejdůležitějším vitaminem je vitamin E, který vykazuje důležitou antioxidační aktivitu, čímž se zvyšuje i stabilita amarantového oleje [6]. Obsah jednotlivých vitaminů je znázorněn v tabulce 5.

Tabulka 5 – Vitaminy obsažené v amarantovém zrně [1,3]

Vitamin	mg/100 g sušiny
Thiamin (B ₁)	0,07–0,10
Riboflavin (B ₂)	0,19–0,23
Niacin (B ₃)	1,17–1,45
Kyselina askorbová (C)	3,36–7,24
Celkové tokoferoly (E)	5,7–10,0

1.3.3.6 Fenolické sloučeniny

Zrna a zelené části amarantu obsahují poměrně velké množství biologicky aktivních látek, zejména fenolické sloučeniny, které jsou hlavním zdrojem přírodních antioxidantů. Tyto látky mají zdraví prospěšné vlastnosti, kde dominantní vlastností je právě antioxidační aktivita. Amarantová semena obsahují významné množství fenolických sloučenin cca 2–4 mg/g semena, což je přibližně 3,5–4,5 % celkové sušiny [2].

Mezi nejčastěji obsaženými fenolickými sloučeninami v amarantovém zrně jsou flavonoidy. Hlavním amarantovým flavonoidem je rutin, dále pak isokvercetin a nikotiflorin. Rutin má nejvyšší koncentraci ze všech zmiňovaných flavonoidů (10,1–4,0 µg/g), následně pak nikotiflorin (7,2–4,8 µg/g) a isokvercetin (0,3–0,5 µg/g). Rutin se vyznačuje antioxidační aktivitou, nikotiflorin ochrannými účinky před dysfunkcí mozku a isokvercetin prevencí proti tromboembolii [6].

Další nejčastější skupinou fenolických sloučenin jsou fenolické kyseliny, jako je kyselina gallová a vanilová, kyselina *p*-hydroxybenzoová a stopové množství kyseliny kávové a kyseliny ferulové [6,15]. Kyselina kávová vykazuje přibližně 55,79 µg/g semena, *p*-hydroxybenzoová kyselina 20,89 µg/g a kyselina ferulová 18,41 µg/g [5]. Amarant se dále vyznačuje poměrně velkým obsahem taninů. Tmavá amarantová zrna vykazují větší koncentraci taninů než světlá zrna (104–116 mg/100 g a 80–120 mg/100 g polyfenolických látek) [5].

1.4 Pohanka

1.4.1 Charakteristika

Pohanka, latinsky nazývaná *Fagopyrum*, je řazena do čeledi rdesnovité (Polygonaceae). Mezi nejrozšířenější druhy patří pohanka obecná (*Fagopyrum esculentum* Moench), která bývá nazývána také jako pohanka sladká. Druhým nejpěstovanějším druhem je pohanka tatarská (*Fagopyrum tataricum*), které se také říká pohanka hořká, a to především kvůli vysokému obsahu flavonoidů, které mají hořkou chuť [12,25,29]. Svou kultivací, způsobem využití a chemickým složením semen je velmi podobná konvenčním obilovinám, proto se řadí mezi obiloviny [25]. Z botanického hlediska se však jedná o neobilovinu, tzv. pseudoobilovinu. Má velký význam jako potenciální složka pro lidskou výživu nebo jako krmivo pro zvířata, zejména pro hospodářská zvířata a drůbež [24]. Vzhled pohankových semen je zobrazen na obrázku 4.



Obrázek 4 – Pohanková semene [16]

První výskyt pohanky byl poprvé zaznamenán v jihovýchodní Asii, konkrétně v Číně [1,21]. Tato starověká čínská rostlina se dále rozšířila nejen po celé Asii ale i Evropě. Z Evropy pak byla převezena kolonisty do Ameriky, kde její kultivace výrazně vzrostla [24]. Dlouhý čas se využívala jako běžné krmivo pro zvířata nebo pro výrobu mouky. Postupem času se její použití značně snížilo, přestala se pěstovat a upadla do zapomnění [5].

V dnešní době se její kultivace opět rozšířila, a to především kvůli nutričním vlastnostem látek, které pohanka obsahuje [5]. Hlavními výrobci pohanky jsou Japonsko, Čína, Rusko, Ukrajina, Indie, Polsko a Kanada. Nejčastěji pěstovaným druhem je pohanka obecná. Kultivace pohanky tatarské je v porovnání s pohankou obecnou malá a pěstuje se především pro vlastní spotřebu místních obyvatel [24,25]. Výhoda pěstování této obiloviny je nenáročnost na podmínky pěstění. Dále není náročná na závlivku a je schopna růst na chudých neplodných půdách, ve vyšších nadmořských výškách a horských oblastech [24,34]. Nejvíce se však pohance daří v chladném, vlhkém podnebí. V případě velkých mrazů se odolnost pohanky snižuje [17,21]. Pohanka tatarská má na rozdíl od pohanky obecné lepší toleranci vůči drsným podmínkám a to především větší odolnost proti mrazům [25]. Většinou je pěstována jako pozdní plodina, a to z důvodu rychlého růstu [21].

Od ostatních obilovin se vyznačuje velmi dobrým chemickým složením. Pohanka je bohatým zdrojem vysoce kvalitních proteinů s vyváženým aminokyselinovým profilem. Patří mezi nejbohatší zdroje biologicky aktivních látek s antioxidačními vlastnostmi, jako jsou polyfenoly, rutin a vitaminy. Obsahuje vysoké množství vlákniny a velmi důležitých minerálů, které jsou nezbytné pro lidské tělo [34]. Díky těmto látkám bylo prokázáno, že je schopna zabraňovat různým nemocem a poskytovat širokou škálu

příznivých účinků pro lidské zdraví. Pohanka má protizánětlivé, protirakovinné, antidiabetické a protikarcinogenní účinky. Dále snižuje vysoký krevní tlak, hladinu cholesterolu a glukózy v krvi, tím předchází vzniku kardiovaskulárnímu onemocnění a cukrovky. Kromě toho bylo zjištěno [12], že vykazuje prebiotickou a antioxidační aktivitu. Pohanka patří mezi hlavní složky bezlepkových potravinářských výrobků, které jsou vhodné pro osoby trpící celiakií [12,25].

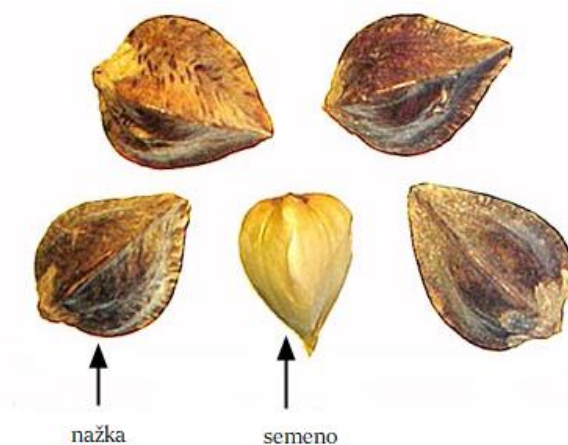
Dnes se pohanka považuje za jednu z nejdůležitějších a nejcennějších alternativních plodin, která má širokosáhlé využití. Je charakteristická svými nutričními vlastnostmi, proto je stále oblíbenou pseudoobilovinou a využívá se v různých formách po celém světě. V celosvětovém měřítku se vyrábí celá řada pohankových potravin, jako je mouka, která se dále zpracovává na výrobu nudlů, dortů, chlebů, těstovin a dalších potravin [27]. Jelikož má pohanka květy (obrázek 5), které na rozdíl od většiny obilovin a jiných pseudoobilovin produkují pyl, používá se také jako zdroj nektaru pro výrobu pohankového medu. K potravě se využívají nejen semena, ale i její listy, které jsou významným zdrojem rutinu. Dále se využívá jako zelené hnojivo [17,24]. Jelikož má pohanka také farmakologické účinky, je považována za alternativní složku medicíny. Proto patří pohanka mezi tzv. víceúčelové potraviny [24].



Obrázek 5 – Květy, listy a zrna pohanky [19]

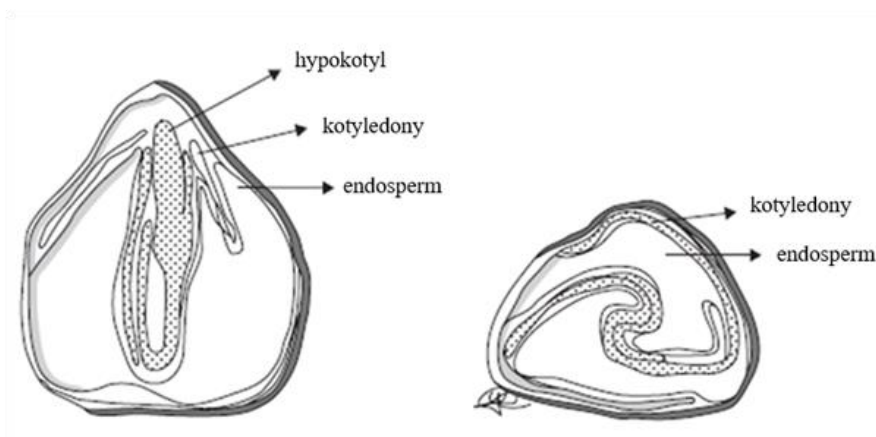
1.4.2 Anatomie a složení zrna

Pohanka produkuje větší zrna než ostatní obiloviny a pseudoobiloviny. Průměr jednoho zrna se pohybuje okolo 4–9 mm, záleží na druhu pohanky [5]. Mají trojúhelníkový (trigonální) tvar, který dělá pohanku jedinečnou (obrázek 6). Tímto tvarem jsou plody pohanky velmi podobné tvarům bukvice. Zrna jsou pokryta tvrdou suchou vnější vrstvou neboli nažkou, která je nepoživatelná a musí se před konzumací oloupat. Barva této vnější vrstvy bývá většinou šedá až hnědá nebo černá [1,2,17].



Obrázek 6 – Vzhled pohankových zrn [16]

Struktura pohankových zrn je, až na některé rozdíly, velmi podobná struktuře konvenčních obilovin. Zrna se skládají z dvouděložného embrya, škrobového endospermu, aleuronové vrstvy a semenného pláště (obrázek 7) [25].



Obrázek 7 – Podélný a příčný řez pohankového zrna [24]

Semenné embryo představuje asi 42 % semene a obsahuje většinu živin, jako jsou oleje, bílkoviny a minerály, proto je také embryo tak významné. Embryo je umístěné v centru endospermu. Má dva kotyledony, které jsou spirálově zabaleny v semeně. Endosperm, který obklopuje embryo, je tvořen velmi malými škrobovými granulemi o velikosti 2–14 µm, které mají mnohoúhelníkový tvar [5]. Tyto škrobové granule jsou mnohem menší než škrobové granule pšenice, ječmene nebo kukuřice. Kolem endospermu je vnější vrstva tzv. aleuronová vrstva, která obsahuje převážně bílkoviny a velkou část minerálních látek. Nejsvrchnější vrstvu tvoří oplodí tzv. nažka, která obsahuje základní živiny a minerály [2,5,25].

1.4.3 Chemické složení

Pohanka se vyznačuje velice dobrým chemickým složením, které se liší především druhem (tabulka 6), genotypem a zpracováním. Pro své chemické složení je velmi žádanou potravinou nejen v potravinářském průmyslu, ale i ve zdravotnictví [5,12,34].

Obsahuje kvalitní bílkoviny a lipidy, velké množství škrobu a minerálů. Dále je dobrým zdrojem biologicky aktivních látek s antioxidačními vlastnostmi, jako jsou fenolické sloučeniny, vitaminy a vláknina [5,22].

Tabulka 6 – Chemické složení pohanky obecné a pohanky tatarské [22]

Složení	v %	
	F. Esculentum	F. Tatarium
Škrob	54,5	57,40
Rozpustné sacharidy	1,6	1,78
Proteiny	12,3	13,15
Lipidy	3,8	3,84
Popílek	2	2,7
Ostatní sloučeniny – organické kyseliny – fenolické sloučeniny – taniny a další	18,4	10,53

1.4.3.1 Proteiny

Proteiny obsažené v pohance jsou důležité hlavně z hlediska vysoké biologické hodnoty aminokyselin, které dané proteiny tvoří. Jsou tvořeny převážně esenciálními aminokyselinami, které mají vyvážený profil (tabulka 7). Biologická hodnota pohankových proteinů je vysoká a pohybuje se nad 90 % [26]. Proteiny se vyznačují, tak jako amarant a quinoa, vysokým obsahem lysinu, který patří mezi esenciální aminokyseliny. Dále pak vysokou koncentrací argininu, kyseliny glutamové a kyseliny asparagové, které však patří mezi neesenciální aminokyseliny. Obsah lysinu je 2,5krát vyšší než u pšenice či rýže [5,24]. Celkové množství proteinů bývá menší než u ostatních pseudoobilovin a pohybuje se okolo 12 %, což je srovnatelné například s pšenicí [26]. Může se však lišit podle druhu, u některých druhů pohanky se proteiny mohou pohybovat až okolo 18 % [34].

Tabulka 7 – Porovnání aminokyselinového složení pohanky a rýže [5]

Aminokyseliny	g/100 g proteinů	
	Pohanka	Rýže
Arginin	9,7	8,6
Kyselina glutamová	18,6	16,5
Kyselina asparagová	11,3	8,8
Leucin	6,4	8,2
Lysin	6,1	3,8
Valin	5,1	6,1
Fenylalanin	4,8	10,5
Treonin	3,9	3,8
Isoleucin	3,8	4,1
Histidin	2,7	2,1
Methionin	2,5	3,6
Tryptofan	2	1,1

Stravitelnost proteinů je relativně nízká (< 80 %), je to způsobeno pravděpodobně přítomností surových vláknin, taninů (1,54–1,76 %), kyseliny fytové a inhibitorů protézy. Některé tyto látky, zejména inhibitory protézy, mohou být pro člověka alergenní. Mezi nejběžnější příznaky patří astma a kožní onemocnění [23].

Pohankový protein je téměř z poloviny složen ze skladovacích bílkovin, jako jsou albuminy (12,5 %), globuliny (64,5 %) a gluteliny (8,0 %). Jelikož obsahují minimální množství prolaminů (< 3 %), jsou vhodné i pro lidi trpící celiakií [24].

Většina pohankových proteinů je uložena v embryu a aleuronové vrstvě (přibližně 65 %), zbylá část se nachází ve škrobovém endospermu (asi 35 %) [1].

1.4.3.2 Lipidy

Obsah lipidů v pohance není až tak významný, ale z pohledu kvality jsou lipidy velmi cennou složkou pohanky. Celkový obsah lipidů obsažených v pohankovém zrna je 1,5–4 % [34], což je asi 2krát až 3krát menší než u amarantu a quinoy, ale srovnatelné s množstvím konvenčních obilovin, jako je například pšenice [2]. Lipidy se vyskytují hlavně v embryu a endospermu zrna. Velkou část lipidů tvoří nenasycené mastné kyseliny (88 %) [5]. Mezi nejrozšířenější vyšší mastné kyseliny patří především kyselina linolová, která tvoří okolo 46 % celkových lipidů. Tato esenciální nenasycená mastná kyselina je též nazývána jako omega-6 kyselina, která je nezbytná pro lidskou stravu. Dalšími vyššími mastnými kyselinami, které se nacházejí v pohance, jsou kyselina olejová (32–40 %) a kyselina palmitová (16–26 %) [34].

Pohankové lipidy obsahují ve srovnání s běžnými obilovinami větší množství nenasycených mastných kyselin, minerálů a vitaminů [24].

1.4.3.3 Sacharidy

Škrob

Škrob je hlavní zásobní složkou pohankového zrna. Tvoří asi 70 % zrna a je nejvíce koncentrován v endospermu v podobě granulí, kde slouží jako energetický materiál pro růst rostliny [34].

Pohankový škrob se skládá ze dvou glukózových polymerů – amylozy a amylopektinu. Obsah amylozy je mimořádně vysoký, vyšší než u amarantu, a pohybuje se okolo 20–28 %, někdy může dosahovat hodnoty až 50 % [2,41]. Amylóza je schopna na sebe vázat lipidy za vzniku komplexů, tím se může snižovat rozpustnost pohankového škrobu, což ovlivňuje

funkční vlastnosti škrobu [1,24]. Zbylou část škrobu tvoří amylopektin. Koncentrace amylopektinu se pohybuje okolo 72–75 % [41].

Vláknina

Celkový obsah vlákniny se pohybuje okolo 40 %, kde převážnou část tvoří nerozpustná vláknina, kam patří celulóza a lignin. Kvůli jejich velkému obsahu se značně snižuje stravitelnost bílkovin, a tím i stravitelnost celé pohanky [1,2].

1.4.3.4 Minerály

Pohanka je zdrojem důležitých minerálů, jako je zinek, měď, draslík, hořčík, železo, mangan, fosfor a selen. Obsahuje více minerálních látek než ostatní obiloviny, s výjimkou vápníku [12,27]. Minerály pohanky jsou koncentrovány v embryu, částečně i v aleuronové vrstvě a semenném plášti [2]. Obsah minerálů v pohance může být závislý na různých faktorech, jako jsou podmínky růstu, druh pohanky nebo zpracování [36]. Pohanka tatarská vykazuje větší množství minerálů než pohanka obecná [5,28]. Koncentrace minerálů v jednotlivých částech pohankového zrna je uveden v tabulce 8.

Tabulka 8 – Minerální látky obsažené v drcené pohance a ve slupce [20]

Složení	mg/100 g	
	Prášek	Slupka
Ca	14,5 ± 0,3	97,4 ± 6,0
Mg	248,0 ± 3,0	112,0 ± 1,0
P	379,0 ± 3,0	127,0 ± 3,0
K	411,0 ± 3,0	1267,0 ± 38,0
Zn	2,79 ± 0,02	1,24 ± 0,06
Cu	0,63 ± 0,03	0,61 ± 0,01
Mn	0,89 ± 0,01	9,16 ± 0,28

1.4.3.5 Vitaminy

Pohanka je také velmi významným zdrojem vitaminů. Nejvíce zastoupené vitaminy jsou vitaminy B, vitaminy C (kyselina askorbová) a vitaminy E (tokoferoly). Obecně platí, že pohanka tatarská má vyšší množství vitaminů (vitaminu B a tokoferolu), než pohanka obecná [2,5]. Obsah vitaminu v pohance obecné je zobrazen v tabulce 9.

Tabulka 9 – Vitaminy obsažené v pohankovém zrně [1]

Vitaminy	mg/100 g
β -karoten (A)	0,21
Thiamin (B ₁)	0,46
Riboflavin (B ₂)	0,14
Niacin (B ₃)	1,8
Kyselina askorbová (C)	5,0
Celkové tokoferoly (E)	5,5

1.4.3.6 Fenolické sloučeniny

Mezi nejvíce zastoupené fenolické sloučeniny patří polyfenoly, konkrétně flavonoidy, jako je rutin nebo kvercetin [5,28]. Dále pak fenolové kyseliny, flavony, fytosteroly a tokoferoly. Obsah fenolických sloučenin je 2krát až 5krát vyšší než například u ovesa nebo ječmene [1].

Nejvýznamnějšími fenolickými kyselinami jsou kyselina *p*-hydroxybenzoová (11,0 mg/100 g), kyselina kávová (8,5 mg/100 g) a kyselina ferulová (1,2 mg/100 g). Pohanka dále obsahuje poměrně velké množství taninů (0,4–1,7 g/100g) a flavonoidů. Celkový obsah flavonoidů pohanky obecné je 2,42 g/100 g sušiny. Pohanka tatarská obsahuje až 7 g/100 g flavonoidů [5].

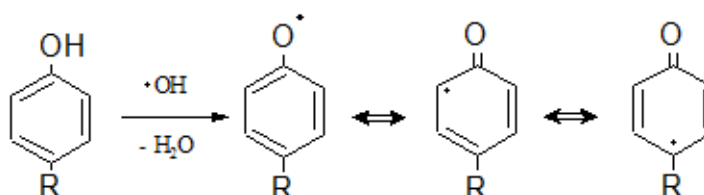
Rutin

Rutin je nejvýznamnější biologicky aktivní látkou obsaženou v pohance. Jeho obsah je vyšší než u ostatních pseudoobilovin a běžných obilovin. Z tohoto důvodu se pohanka stává velice přínosnou složkou ve farmaceutickém průmyslu. Rutin patří mezi flavonoidy a má velmi příznivé vlastnosti pro lidské zdraví. Snižuje hladinu cholesterolu v krvi a aktivitu

lipidů. Navíc má antioxidační vlastnosti a snižuje vznik rakoviny [2]. Koncentrace rutinu v semenech pohanky tatarské je vyšší (0,8–1,7 % sušiny) než u semen pohanky obecné (0,01 % sušiny) [28].

1.5 ANTIOXIDANTY

Antioxidanty jsou sekundární rostlinné metabolity, které působí proti oxidačnímu stresu. Oxidační stres, způsobený látkami s oxidační aktivitou, uvolňuje volné kyslíkové radikály nebo méně časté dusíkové radikály. Výskyt těchto volných radikálů může vést ke zrychlení procesu stárnutí a mnoha dalším závažnějším zdravotním problémům, jako je narušení přirozené obranyschopnosti organismu, kardiovaskulární onemocnění nebo dokonce i zvýšení rizika vzniku zhoubného bujení [30,40,49]. Kvůli těmto nežádoucím procesům může nastat nerovnováha mezi oxidačním a antioxidačním účinkem. Proto se ke snížení oxidačního stresu používají už zmiňované sekundární metabolity s antioxidačně obranným systémem, které se většinou přijímají formou ovoce, zeleniny či obilovin. Antioxidanty jsou v oblasti biochemického a farmakologického výzkumu významné a neustále se nalézají další látky s těmito blahodárnými účinky, které jsou prospěšné pro lidské zdraví. Mezi antioxidanty patří fenolové kyseliny, flavonoidy, taniny, saponiny, terpenoidy, steroly a další [30,40]. Antioxidační mechanismus fenolických sloučenin je znázorněn na obrázku 8.



Obrázek 8 – Antioxidační mechanismus fenolických sloučenin [42]

1.5.1 Fenolické sloučeniny

Fenolické sloučeniny patří mezi nejpočetnější skupinu látek, která se vyskytuje v běžných potravinách a doplňcích stravy. Tyto sloučeniny představují skupinu zejména aromatických látek a jejich derivátů. Mají farmakologické vlastnosti, zejména antioxidační, dále pak antimutagenní, antikarcinogenní, protizánětlivé a další prospěšné vlastnosti. Díky těmto vlastnostem jsou fenolické látky potenciálními složkami využívané v medicíně. Mohou příznivě ovlivňovat lidský metabolismus nebo mohou být prevencí proti různým

chronickým onemocněním [30,42]. Kromě blahodárných účinků na člověka mají fenolické sloučeniny také pozitivní účinky na rostliny. Slouží jako ochrana rostlin proti UV záření nebo proti napadení hmyzem. Dále také tvoří základ důležitých barviv pro květiny a ovoce, jako jsou anthokyany [38].

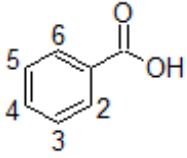
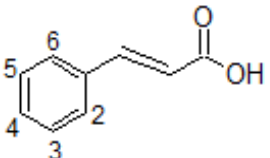
Hlavními zdroji fenolických sloučenin jsou ovoce a nápoje, jako je čaj, červené víno nebo káva, dále pak obiloviny a luštěniny, kde jsou zastoupeny především deriváty kyseliny benzoové a skořicové, flavonoidy a kumariny. Důležitou roli však hrají fenolické látky obsažené v ovoci a zelenině. Jelikož se tyto potraviny většinou konzumují v syrové podobě, obsah přítomných fenolických látek klesá velmi nepatrně. Nejběžnějšími fenolickými sloučeninami, které jsou obsažené v ovoci či zelenině, jsou fenolkarboxylové kyseliny, kumariny a flavanové deriváty. Tyto fenolické sloučeniny se vyskytují v různých částech rostliny, jako je plod (ovoce či semena), listy, kůra nebo květy [30].

1.5.1.1 Fenolické kyseliny

Fenolkarboxylové kyseliny nebo také fenolové kyseliny jsou odvozené od derivátů kyseliny hydroxybenzoové a kyseliny hydroxyskořicové (tabulka 9). Mezi nejčastěji vyskytující se deriváty kyseliny hydroxybenzoové patří kyselina *p*-hydroxybenzoová, kyselina vanilová a kyselina gallová, která se vyskytuje především v ovoci a je většinou vázaná na cukernou složku. Další nejčastější fenolickou kyselinou je kyselina kávová, která je derivátem kyseliny hydroxyskořicové. Kyselina kávová se vyskytuje v zelenině, ovoci, obilninách nebo také v doplňcích stravy. Většinou se vyskytuje ve formě svých derivátů, ve výjimečných případech se vyskytuje jako volná kyselina [30,42]. Mezi deriváty kyseliny hydroxyskořicové patří dále kyselina ferulová a kyselina *p*-kumarová [42].

Většina fenolických kyselin se vyznačuje protizánětlivými a antioxidačními vlastnostmi, které jsou zajímavé nejen pro vědce, ale i pro běžné konzumenty. Stejně tak jako mnoho jiných fenolických sloučenin, patří většina fenolických kyselin mezi antioxidanty [30,42].

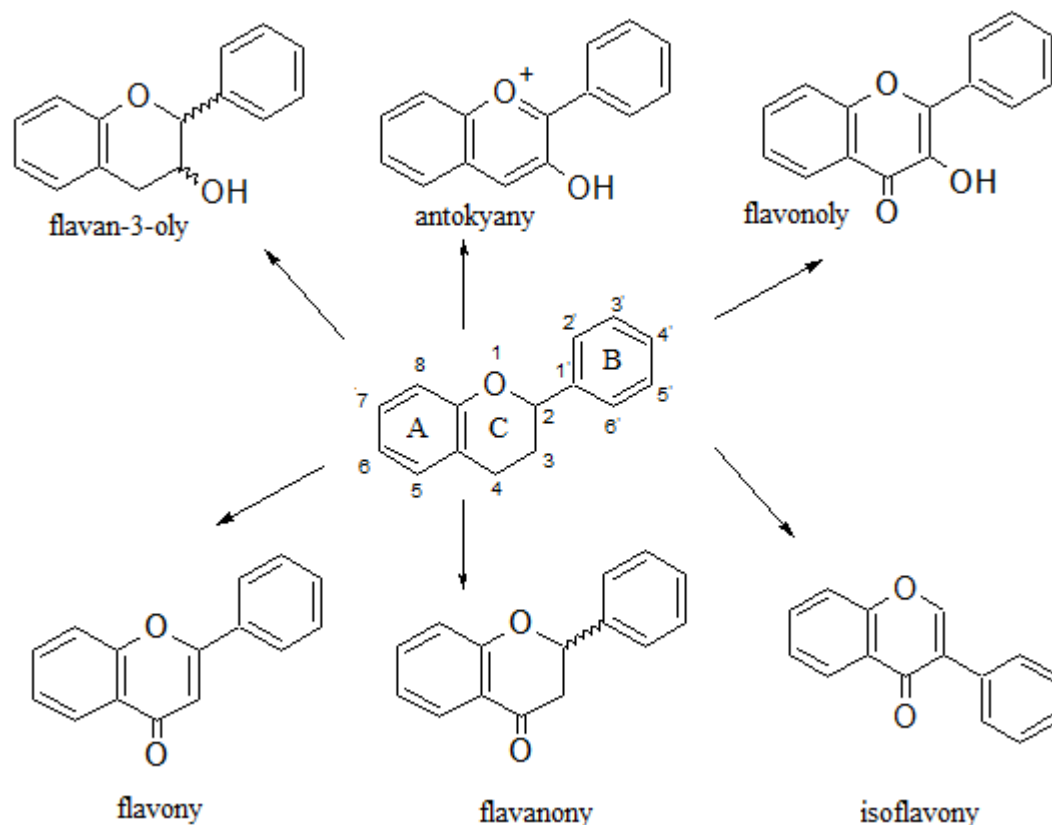
Tabulka 10 – Nejběžnější fenolické kyseliny [42]

Kyselina benzoová	2	3	4	5	Deriváty kyselina benzoové
	H	H	OH	H	Kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová
	H	OH	OH	OH	Kyselina gallová
	OH	H	H	H	Kyselina salicylová
	H	OCH ₃	OH	H	Kyselina vanilová
Kyselina skořicová	2	3	4	5	Deriváty kyseliny skořicové
	H	H	OH	H	Kyselina <i>p</i> -kumarová
	H	OH	OH	H	Kyselina kávová
	H	OCH ₃	OH	H	Kyselina ferulová

1.5.1.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou jedny z nejčastěji vyskytujících se rostlinných fenolických sloučenin, které se dělí na anthokyanidiny, flavan-3-oly, flavonoly, flavanony, flavony a isoflavony (obrázek 9). Nejrozšířenějšími flavonoidy v lidské stravě jsou flavonoly. Flavonoidy se přirozeně vyskytují v ovoci, zelenině, obilovinách, čokoládě a nápojích jako je čaj a víno. Flavonoidy mají dobrou biologickou dostupnost a navíc vykazují biologickou aktivitu důležitou pro lidské zdraví, která je ovlivněna chemickou povahou látky [39]. Flavonoidy mají další důležité funkce, například chrání rostliny před UV zářením a různými viry, bakteriemi a plísněmi [32].

Flavonoidy jsou účinnými přirozenými rostlinnými antioxidanty, které jsou schopny vychytávat volné radikály. Ale i přes to, že je jejich příjem vysoký, mají asi 100krát až 1000krát nižší koncentraci než koncentrace jiných antioxidantů, jako je například vitamin C, kyselina močová a glutathion [39,49].



Obrázek 9 – Základní struktury flavonoidů [39]

1.6 Analytické metody

Existuje několik analytických metod, které se využívají k separaci a stanovení organických a anorganických složek. Tato studie se zaměřuje především na analytické metody, které izolují a identifikují fenolické sloučeniny z rostlinných extraktů. Dále pak na analytické metody stanovující celkový obsah fenolických látek (TPC – Total Polyphenols Compounds) a celkovou antioxidační aktivitu (TAA – Total Antioxidant Activity). Metody stanovující TPC a TAA jsou založeny na schopnosti eliminovat radikálové látky rostlinných extraktů nebo na redoxních vlastnostech fenolických látek [49,51]. Jako separační metoda se používá extrakce, která zajišťuje zvýšenou koncentraci jedné nebo více složek původního vzorku [31]. Izolované fenolické látky se identifikují vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií nebo metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem, která stanovuje celkový obsah fenolických sloučenin. Pro detekci antioxidační aktivity se využívají spektrofotometrické, fluorescenční nebo luminiscenční metody (tabulka 11) [51].

Tabulka 11 – Typy analytických metod stanovující celkovou antioxidační aktivitu [51]

Testy antioxidační aktivity	Principy metod	Určení konečného produktu
	Chromatografické metody	
HPLC	Separace sloučenin ve směsích probíhá mezi tuhou stacionární fází a kapalnou mobilní fází s různými polaritami při vysokém průtoku a tlaku mobilní fáze	UV-VIS detekce, fluorescence, hmotnostní spektrometrie nebo elektrochemická detekce
GC	Separace sloučenin ve směsích probíhá mezi kapalnou stacionární fází a plynnou mobilní fází	Plamenovou ionizací nebo detektorem tepelné vodivosti
	Spektrometrické metody	
DPPH	Antioxidační reakce s organickým radikálem	Kolorimetrie
ABTS	Antioxidační reakce s organickým radikálem	Kolorimetrie
FRAP	Reakce antioxidačních látek s komplexem Fe^{3+} na komplex Fe^{2+}	Kolorimetrie
PFRAP	Redukce ferrikyanidu draselného s antioxidantem a následná redukce ferrokyanidu draselného s Fe^{3+}	Kolorimetrie
CUPRAC	Redukce Cu^{2+} na Cu^{+} pomocí antioxidantů	Kolorimetrie
ORAC	Reakce antioxidantů s peroxylovými radikály, které jsou indukovány 2,2'-azobis-2-amidinopropan hydrochloridem (AAPH)	Úbytek fluorescenčního signálu
TRAP	Antioxidanty zachytávající radikály	Chemiluminiscenční kalení
	Elektrochemické metody	
Cyklická voltametrie	Potenciál pracovní elektrody se lineárně mění od počáteční hodnoty po konečnou hodnotu a zpět, poté se zaznamená příslušná intenzita proudu	Měření intenzity katodického/anodického píku

1.6.1 Extrakce

Extrakce je separační metoda založená na distribuci složky směsi mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Dělicí schopnost závisí především na selektivní rozpustnosti látek v rozpouštědlech, proto je důležitá volba vhodného rozpouštědla. Volba vhodného rozpouštědla pro extrakční dělení závisí také na výběru mobilní a stacionární fáze

v chromatografii, která se používá pro stanovení vyextrahovaných složek. Extrakční separaci můžeme dělit podle skupenství fází, mezi kterými daná složka přechází [31,35]:

- **Extrakce z pevné fáze do kapalné** je extrakce založena na rozpouštění požadované složky z pevného vzorku vhodným rozpouštědlem.
- **Extrakce mezi dvěma kapalinami** je založena na ustanovení fázové rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými látkami.
- **Extrakce z kapaliny na pevnou fázi** je extrakce, při které se pevnou fází selektivně zachycuje požadovaná složka z roztoku.
- **Extrakce z kapaliny či plynu na pevnou fázi** je extrakce pevnou fází, ve které nastává zakoncentrování analytu absorpcí na polymer pokrývající křemenné vlákno.

1.6.2 Chromatografické metody

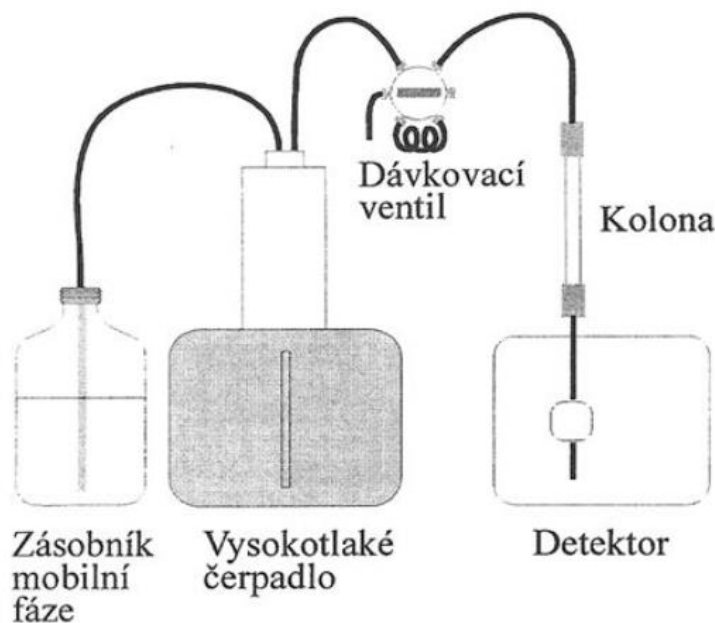
Chromatografické metody jsou separační metody, jejichž podstatou je několikanásobné ustavení rozdělovací rovnováhy vzorku mezi dvěma nemísitelnými fázemi, z nichž jedna je stacionární (nepohyblivá) a druhá mobilní (pohyblivá) [31,33]. Stacionární fáze může být ve formě velmi malých tuhých částic, tenké vrstvy kapaliny nanesené na tuhých částicích nebo filmu kapaliny, který je nanesen na vnitřní straně kapiláry [31,35]. Pohybem mobilní fáze jsou složky vzorku unášeny směrem ke stacionární fázi, kde se mohou zachytávat. Tím se postupně od sebe jednotlivé složky separují. Zachytávání složek ve stacionární fázi závisí především na afinitě složky a stacionární fáze. Čím je afinita vyšší, tím déle se složky vzorku eluují [31,33,35].

Mezi nejzákladnější chromatografické metody patří papírová a tenkovrstvá chromatografie (TLC), která se využívá jako velmi rychlá, jednoduchá a všestranná metoda pro stanovení celkového obsahu fenolických sloučenin v rostlinných extraktech nebo frakcích. Nicméně nejběžnější metodou pro kvantitativní a kvalitativní analýzu fenolických látek je kapalinová chromatografie, konkrétně vysokoúčinná kapalinová chromatografie, tzv. HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Další využívanou chromatografickou metodou je plynová chromatografie (GC – Gas Chromatography). Plynová chromatografie se však ke stanovení fenolických sloučenin využívá jen málo, kvůli nízké těkavosti některých fenolických sloučenin. Volba vhodných metod závisí především na polaritě sloučenin a množství dostupného vzorku [31,32,35,69].

1.6.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie patří mezi nejpoužívanější separační metody díky své jednoduchosti a vysoké účinnosti [31,32]. Stacionární fází je náplň s dostatečně malými částicemi (3–5 μm). Mobilní fází představuje vhodné tzv. eluční činidlo, jako je methanol nebo acetonitril. Vzorek se do proudu mobilní fáze dávkuje manuálně šesticestného ventilu s dávkovací smyčkou o daném objemu nebo automaticky pomocí tzv. autosampleru. Dalším technickým vybavením HPLC je vysokotlaké čerpadlo, které je vyhotoveno z odolného materiálu (nerezová ocel). Vysokotlaké čerpadlo zajišťuje tok mobilní fáze kolonou, kde dochází k samotné separaci látek. Jako chromatografická kolona se používá náplňová kolona různých velikostí. K účinné separaci se používají kolony s dostatečně malým vnitřním průměrem (do 4,6 mm). Za chromatografickou kolonou je umístěn detektor, který detekuje separované látky. Nejběžněji používané jsou spektrofotometrické, fluorimetrické, hmotnostní a elektrochemické detektory [33,35,70].

HPLC se dělí dle fázových systémů na chromatografii v systémech s normálními (NP-HPLC) a obrácenými fázemi (RP-HPLC). Mezi nejčastěji používané patří RP-HPLC, kde stacionární fází je nepolární látka např. chemicky modifikovaný silikagel oktadecylovým řetězcem a mobilní fází je polární eluční činidlo protékající chromatografickou kolonou, např. vodný roztok acetonitrilu nebo methanolu [32,35].



Obrázek 10 – Schéma přístroje pro HPLC [33]

1.6.3 Spektrofotometrické metody

1.6.3.1 Metoda s Folin-Ciocalteuovým činidlem

Tato metoda je jednou z nejjednodušších a nejpoužívanějších analytických metod stanovující celkový obsah fenolických sloučenin (TPC), který se detekuje spektrofotometricky za použití Folin-Ciocalteuového reakčního činidla. Do odměrné baňky se vloží rostlinné extrakty, voda, Folin-Ciocalteuovo činidlo a 20% Na₂CO₃. Směs se doplní vodou po rysku a nechá se v klidu reagovat při laboratorní teplotě cca 2 hodiny [48,67]. Po uplynutí této doby se změří absorbance při vlnové délce 725 nm [50,56] až 765 nm [48,52] pomocí spektrofotometru [48]. Z naměřených hodnot se sestrojí kalibrační křivka a stanoví celkový obsah fenolických látek, který je vyjádřen jako ekvivalentní množství kyseliny gallové (GAE) v mg/kg sušiny [48,50,52,53] nebo jako ekvivalentní množství kyseliny ferulové (FAE) v mg/g sušiny [56].

1.6.3.2 Metoda DPPH

Metoda DPPH je jednou ze základních analytických metod stanovující celkovou antioxidační kapacitu (TAC) biologicky aktivních látek. Tato metoda spočívá v reakci testovaného extraktu obsahujícího bioaktivní látky se stabilním radikálem DPPH· (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) [49]. Stabilní radikál DPPH· se zředí methanolem a udržuje se na chladném a tmavém místě. Připravený pracovní roztok DPPH· se vloží do kyvety a proměří se jeho absorbance (A_0) při vlnové délce v rozmezí 515 nm [48,53,56] až 517 nm [47,49,57,63] pomocí spektrofotometru [48], proti slepému vzorku methanolu. Následně se do kyvety vloží testovaný extrakt společně s pracovním roztokem DPPH·. V kyvetě dojde k redukci radikálu za vzniku DPPH-H. Poté se změří při stejné vlnové délce absorbance zreagované směsi. Měření se provádí několikrát po určitém časovém intervalu, např. po každých 10 minutách (A_{10}) [48]. Detekuje se na základě zvyšujícího se množství antioxidantů přítomných v testovaných extraktech, které snižují DPPH·, a tím mění barvu fialového roztoku na žlutou barvu [57]. Tato barevná změna směsi závisí na koncentraci přítomných fenolických látek. Na základě této změny se vypočítá procento inhibice DPPH, které se zjistí z následující rovnice [48–51]:

$$\text{Inhibice (\%)} = \left[\frac{(A_0 - A_{10})}{A_0} \right] \times 100$$

Celková antioxidační kapacita bývá vyjádřena většinou jako ekvivalentní množství Troloxu (TEAC) v mmol/kg suché hmotnosti [48], ekvivalentní množství kyseliny

L-askorbové [54] nebo v mg DPPH/g suché hmotnosti [57]. Nejběžnějším vyjádřením ekvivalentního množství Troloxu je TEAC₅₀, což je ekvivalentní antioxidační kapacita Troloxu interpolovaná na 50% inhibici [59].

1.6.3.3 Metoda ABTS

Tato metoda využívá sloučeninu ABTS, která nejdříve reaguje s K₂S₂O₈ [47,50,51] nebo MnO₂ [58] za vzniku modrozeleného radikálového kationtu ABTS^{•+}. Vzniklý modrozelený roztok následně reaguje s antioxidanty resp. Troloxem jako antioxidačním standardem, které jsou schopny uvolnit vodíkový atom. Spektrofotometricky se sleduje změna maximální absorbance při dané vlnové délce způsobená odbarvováním. Nejběžnější vlnovou délkou je 734 nm [47,49,50,58]. Odbarvování roztoku je způsobeno snižováním radikálového kationtu ABTS^{•+} v roztoku. Změna absorbance závisí hlavně na délce reakce, vnitřní antioxidační aktivitě a koncentraci ve vzorku. Z naměřených absorbancí jednotlivých standardů se určí výsledná koncentrace fenolických sloučenin v extraktech, která se uvádí jako ekvivalentní množství Troloxu (TEAC) [47,49,51].

1.6.3.4 Metoda FRAP

Metoda FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) je založena na principu redoxních reakcí. Antioxidanty obsažené v testovaných rostlinných extraktech redukují žlutý komplex železitých iontů (Fe^{III}-TPTZ) na tmavě modrý komplex železnatých iontů (Fe^{II}-TPTZ). Poté se změří maximální absorbance zreagované směsi při vlnové délce 593 nm. Absorbance příslušných extraktů se měří v daných časových intervalech, např. po 5–8 minutách. Z naměřených hodnot se sestrojí kalibrační křivka, z které se vypočítá příslušný obsah TAC. Konečný výsledek bývá vyjádřen v mg Troloxu nebo mg kyseliny L-askorbové na kg suché hmotnosti [49–51,54,55] dále se fenolické sloučeniny mohou vyjádřit jako ekvivalentní množství Fe²⁺ na množství suchého vzorku [50,59].

1.6.3.5 Metoda ORAC

Metoda ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) je významnou fluorescenční metodou, která měří antioxidační kapacitu na základě vychytávání peroxylových radikálů antioxidačními látkami [51]. Peroxylové radikály jsou indukovány pomocí AAPH (2,2'-azobis-2-amidinopropan hydrochloridem) při 37 °C [64]. K detekci antioxidační aktivity se používá fluorescein sloužící jako sonda, který se oxiduje peroxylovými radikály, což způsobí snížení fluorescenčního signálu. Jako detektor se používá mikrotitrační čtecí destička s fluorescenčními filtry pracující při vlnové délce 485 nm pro excitaci a 528 nm

pro emisi [61]. Z naměřených hodnot se sestrojí kalibrační křivka, jako standard se využívá Trolox na jehož základě se vyhodnocuje celková antioxidační kapacita [51,61,65].

1.7 Analýza fenolických sloučenin z pseudoobilovin

1.7.1 Úprava a extrakce vzorku

Jako rostlinné vzorky se používají oloupaná semena amarantu a pohanky, která jsou upravena sušením, lyofilizací nebo zmrazením [32]. Nejčastější úpravou je tzv. lyofilizace, která se používá především pro termolabilní sloučeniny. Při lyofilizaci se semena suší vymrazováním a následnou sublimací přítomné vody za nízkého tlaku a teploty, tím se zajistí zachování nutričních látek a vzhled semen [66]. Po této úpravě rostlinného vzorku se provádí drcení a mletí semen na prášek, který se proseje sítem o průměru jednotlivých otvorů 0,3 mm [46] až 0,85 mm [44]. Získaný rostlinný prášek se suší ve vakuové rotační peci při teplotě 40–45 °C po dobu 4 hodin [34,44,45]. Z vysušených vzorků se odstraní lipofilní látky pomocí n-hexanu [32,46,47,56]. Upravené vzorky se zfiltrují a skladují ve tmě při teplotě 4–5 °C až do jejich použití [43,44,47,48].

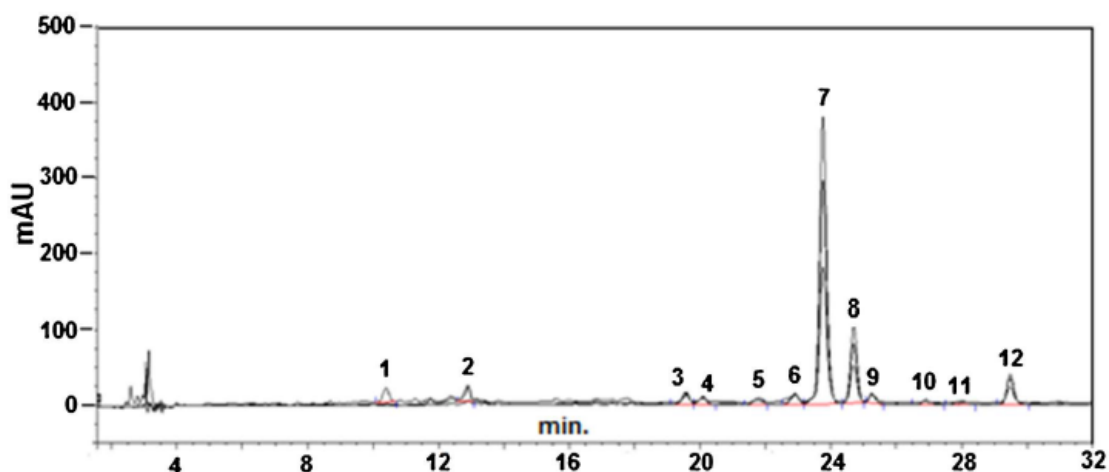
Po úpravě vzorků pohanky a amarantu se provádí extrakce volných fenolických látek vhodným rozpouštědlem, jako je ethanol [32,56], methanol [32,50,53], aceton [32,50] nebo ethylacetát [32,44], dále je možné využít jejich vodné roztoky, např. 80% ethanol [43,45] nebo methanol [43,44,47,48]. Extrakce se obvykle provádí za pomoci magnetického míchání nebo protřepávání [32,44]. Pro zvýšení účinnosti a rychlosti se používá extrakce kapaliny za zvýšeného tlaku a teploty [32]. Po extrakci je směs oddělena pomocí centrifugy a následně jsou extrakty odpařeny do sucha pomocí dusíku. Takto připravené extrakty se uchovávají v chladu při teplotě -20 °C až do analýzy.

Pro analýzu fenolických látek je nutná alkalická či kyselá hydrolyza pro jejich vyvázání z vazeb na buněčnou stěnu. Nejčastěji se hydrolyzuje pomocí NaOH při teplotě 60 °C [56] až 95 °C [45]. Po neutralizaci pomocí HCl (pH=2) následuje extrakce ethylacetátem. Konečné extrakty rostlinných vzorků se vysuší dusíkem při teplotě 35 °C [45]. Extrakty s vázanými fenolickými sloučeninami se skladují při -20 °C až do vyhodnocení analýzy [43,45,56].

1.7.2 Stanovení fenolických sloučenin pomocí HPLC

Před samotnou analýzou se připravené extrakty mírně okyselí, aby se zabránilo ionizaci fenolických sloučenin [69]. Pro detekci těchto látek koncentrovaných v rostlinných extraktech se běžně používají detektory, jako je spektrofotometrický detektor (UV/VIS) [62], detektor s diodovým polem (DAD) [57,61,62], hmotnostní spektrometr (MS) [61,62], nukleární magnetická rezonance (NMR) [32,69] nebo kombinace několika detektorů, jako např. DAD-ESI/MS [32,60,61], kde ESI je ionizace elektrosprejem [32,35,69]. Kapalinová chromatografie se nejčastěji provádí v systému s obrácenými fázemi (RP-HPLC) s kolonami typu C18 [57,60,61,67,68] nebo C8 [35,69], které jsou plněné stacionární fází, jako je silikagel, polyamid nebo oxid křemičitý [32,69]. Mobilní fází bývá methanol a jeho vodné roztoky [62,69], acetonitril [57,67,69] a vodné roztoky kyseliny octové [57], kyseliny mravenčí [61] nebo kyseliny fosforečné [68]. Separace probíhá při teplotách 25 °C [61], 30 °C [67], 35 °C [60,68] nebo 40 °C [55]. Flavonoidy a fenolické kyseliny se obvykle detekují při vlnové délce 280 nm (kyselina skořicová a flavanoly) [61,67] nebo 350 nm (flavonoly a flavony) [61,67]. Separace jednotlivých složek se provádí tzv. izokratickou nebo gradientovou elucí. Jelikož je však obtížné provést izokratickou eluci složitých látek, při které se složení látek nemění, provádí se gradientová eluce. Gradientová eluce probíhá vždy v binárním systému mobilních fází, které se skládají z vodné a organické fáze [33,35].

Přítomnost fenolických sloučenin v rostlinných extraktech se identifikuje porovnáním retenčních časů a UV spektra se standardními vzorky [55]. Kvantitativní analýza fenolických sloučenin se zjišťuje z ploch píků získaného chromatogramu (obrázek 11) nebo se jejich koncentrace vypočítá z kalibrační křivky [55,57,61,67].



Obrázek 11 – Chromatogram fenolických sloučenin pohankových extraktů při 280, 330 a 350 nm

(1) katechin; (2) dihexosid kyseliny kávové; (3) isoorientin; (4) orientin; (5) kaempferol di-hexosid; (6) vitexin; (7) rutin; (8) kvercetin 3-galaktosid; (9) kvercetin 3-O-glukosid; (10) kvercetin pentosid; (11) kaempferol 3-O-rutinosid; (12) kvercetin 3-O-rhamnosid [70]

Pohanka a amarant obsahují velké množství fenolických sloučenin, jako jsou fenolické kyseliny a flavonoidy. Hlavními fenolickými kyselinami v semenech a výhoncích amarantu je kyselina gallová, kyselina *p*-hydroxybenzoová, kyselina ferulová, kyselina vanilová, kyselina *p*-kumarová, kyselina kávová a kyselina skořicová [55,60,68]. Hlavními flavonoidy jsou rutin, kvercetin, vitexin, isovitexin a morin [55]. Mezi běžné fenolické kyseliny pohanky patří kyselina kávová, kyselina gallová, kyselina *p*-kumarová a kyselina vanilová [61,69]. Hlavními flavonoidy jsou rutin a kvercetin, dále pak vitexin, isovitexin, orientin a isoorientin [12,61,70].

ZÁVĚR

Tato práce se věnuje analýze biologicky aktivních látek v pohance a amarantu, které vykazují antioxidační aktivitu. Pohanka a amarant se vyznačují vysokým obsahem flavonoidů a fenolických kyselin. Z tohoto důvodu se provádí kvalitativní a kvantitativní analýza těchto fenolických sloučenin. Před samotnou analýzou je nutné provést úpravu rostlinných vzorků. Z upravených rostlinných vzorků se izolují volné a vázané fenolické sloučeniny pomocí různých typů extrakce. Pro izolaci a dosažení vysokého výtěžku je důležité zvolit vhodné rozpouštědlo a optimální podmínky separace (pH, teplota, čas, poměr jednotlivých složek a další). Izolované fenolické sloučeniny se obvykle stanovují pomocí kapalinové chromatografie, která využívá různých detekcí, jako je DAD detektor nebo MS detektor, který běžně využívá ionizaci elektrosprejem. Fenolické sloučeniny jsou zajímavé především díky své antioxidační aktivitě, která brání vzniku volných radikálů. Pro stanovení celkového fenolického obsahu a celkové antioxidační aktivity se používají spektrofotometrické metody, jako je metoda s Folin-Ciocalteuovým činidlem, DPPH, FRAP, ABTS a ORAC.

Na základě různých studií bylo zjištěno, že nejbohatším zdrojem flavonoidů a fenolických kyselin je pohanka, následně pak amarant. Celkový obsah těchto látek a antioxidační aktivita mohou být ovlivněny kultivací, druhem, zpracováním, či v jaké části rostliny se dané fenolické sloučeniny vyskytují. Je tedy zřejmé, že fenolické sloučeniny a jejich antioxidační aktivita může být optimalizována podmínkami růstu či výběrem vhodné odrůdy, což je důležité především pro výrobce.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] HAROS, Claudia Monika a Regine SCHOENLECHNER. *Pseudocereals: Chemistry and Technology*. 1st ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2017. ISBN 978-1-118-93828-7.
- [2] ALVAREZ-JUBETE, L., E. K. ARENDT a E. GALLAGHER. Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. *Trends in Food Science & Technology*. 2010, 21(2), 106–113.
- [3] VALCÁRCEL-YAMANI, Beatriz a Suzana Caetano DA SILVA LANNES. Applications of Quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd.) and Amaranth (*Amaranthus* Spp.) and Their Influence in the Nutritional Value of Cereal Based Foods. *Food and Public Health*. 2012, 2(6), 265–275.
- [4] OGRODOWSKA, D., R. ZADERNOWSKI, S. CZAPLICKI, D. DEREWIAKA a B. WRONOWSKA. Amaranth Seeds and Products – The Source of Bioactive Compounds. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2014, 64(3), 165–170.
- [5] SCHOENLECHNER, Regine, Susanne SIEBENHANDL a Emmerich BERGHOFER. Pseudocereals. *Gluten-Free Cereal Products and Beverages*. 1st ed. Cambridge: Academic Press, 2008, s. 149–190. ISBN 978-0-12-373739-7.
- [6] ARENDT, Elke K. a Emanuele ZANNINI. *Cereal Grains for the Food and Beverage Industries*. 1st ed. Sawston: Woodhead Publishing, 2013, s. 439–473. ISBN 978-0-85709-413-1.
- [7] Amaranth. *Herbazest* [online]. 2018 [cit. 2018-06-24]. Dostupné z: <https://www.herbazest.com/herbs/amaranth>
- [8] STALLKNECHT, G. F. a R. SCHULZ-SCHAEFFER. Amaranth Rediscovered. New crops. Wiley, New York [online]. 1993, 211–218 [cit. 2018-06-23]. Dostupné z: <https://hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1993/V2-211.html>.
- [9] BRESSANI, R. Amaranth. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2nd ed. Massachusetts: Academic Press, 2003, s. 166. ISBN 9780122270550.
- [10] COIMBRA, Ivia a Roberto SALEMA. *Amaranthus hypochondriacus*: Seed Structure and Localization of Seed Reserves. *Annals of Botany*. 1994, 74(4), 373–379.
- [11] IRVING, D. W. a R. BECKLER. Seed Structure and Composition of Potential New Crops. *Food Structure*. 1985, 4(1), 43–53

- [12] SYTAR, Oksana, Wioletta WIOLETTA BIEL, Iryna SMETANSKA a Marian BRESTIC. Bioactive Compounds and Their Biofunctional Properties of Different Buckwheat Germplasms for Food Processing. *Buckwheat Germplasm in the World*. 1st ed. Chennai: Academic Press, 2018, s. 191–204. ISBN 978-0-12-811006-5.
- [13] PAREDES-LÓPEZ, Octavio. *Amaranth Biology, Chemistry, and Technology*. 1st ed. Boca Raton: CRC-Press, 2018. ISBN 9781315890500.
- [14] ESENCIÁLNI AMINOKYSELINY, *Lysin* [online]. 2018 [cit. 2018-06-22]. Dostupné z: <http://www.aminokyselina.cz/esencialni-aminokyseliny/lysin>
- [15] VENSKUTONIS, Petras R. a Paulius KRAUJALIS. Nutritional Components of Amaranth Seeds and Vegetables: A Review on Composition, Properties, and Uses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2013, 12, 381–412.
- [16] Buckwheat bread recipes & buckwheat flour sourdough. *THE BREAD SHE BAKES* [online]. 2015 [cit. 2018-06-24]. Dostupné z: <https://www.thebreadshebakes.com/2015/12/best-buckwheat-bread-recipes/>
- [17] Common Buckwheat. *AGRI-FACTS* [online]. 2001 [cit. 2018-06-24]. Dostupné z: [https://www1.agric.gov.ab.ca/\\$department/deptdocs.nsf/all/agdex103/\\$file/118_20-2.pdf?OpenElement](https://www1.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/agdex103/$file/118_20-2.pdf?OpenElement)
- [18] ISOPRENOID, Triterpenes. *Encyclopedia Britannica* [online]. 2018 [cit. 2018-06-22]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/isoprenoid#ref1002689>
- [19] Buckwheat characteristic (Fagopyrum esculentum). *Botanical-online* [online]. 2018 [cit. 2018-06-22]. Dostupné z: www.botanical-online/english/buckwheat.htm
- [20] IKEDA, Sayoko, Yosbiko YAMASHITA a Ivan KREFT. Mineral composition of buckwheat by-products and its processing characteristics to konjak preparation. *Fagopyrum* [online]. 1999. 16, 89–94 [cit. 2018-06-23]. Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.537.8364&rep=rep1&type=pdf>
- [21] Other Starch-Yielding Plants. *Encyclopedia Britannica* [online]. 2001 [cit. 2018-06-24]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/technology/cereal-processing/Other-starch-yielding-plants#ref501202>
- [22] GIMÉNEZ-BASTIDA, Juan Antonio a Henryk ZIELIŃSKI. Buckwheat as a Functional Food and Its Effects on Health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015, 63, 7896–7913.

- [23] ŞENSOY, İlkay, Robert T. ROSEN, Chi-Tang HO a Mukund V. KARWE. Effect of processing on buckwheat phenolics and antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2006, 99(2), 388–393.
- [24] ARENDT, Elke K. a Emanuele ZANNINI. Buckwheat. *Cereal Grains for the Food and Beverage Industries*. 1st ed. Sawston: Woodhead Publishing, 2013, s. 369–408. ISBN 9780857094131.
- [25] ZHU, Fan. Chemical composition and health effects of Tartary buckwheat. *Food Chemistry*. 2016, 203, 231–245.
- [26] EGGUMIVAN, B. O., I. KREFT a B. JAVORNIK. Chemical composition and protein quality of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Plant Foods for Human Nutrition*. 1980, 30(3–4), 175–176.
- [27] IDEDA, Sayoko, Kazue TOMURA, Yoshiko YMASHITA a Ivan KREFT. Nutritional Profile of Minerals in Buckwheat and Its Products. *ISB*[online]. 2001, 8, 485–488 [cit. 2018-06-26]. Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.614.154&rep=rep1&type=pdf>
- [28] BONAFACCIA, Giovanni a Nina FABJAN. Nutritional comparison of tartary buckwheat with common buckwheat and minor cereals. *Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljublj. Kmet.* [online]. 2003, 81(2), 349–355 [cit. 2018-06-25]. Dostupné z: <http://aas.bf.uni-lj.si/september2003/14bonafacia.pdf>
- [29] ZHU, Fan. Buckwheat starch: Structures, properties, and applications. *Trends in Food Science & Technology*. 2016, 49, 121–135.
- [30] OPLETAL, Lubomír. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita*. Svazek 3, Nutraceutika: sekundární metabolity rostlin. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-2084-8.
- [31] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-03-00569-8.
- [32] ANDERSEN, Øyvind M. a Kenneth R. MARKHAM. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press: Taylor & Francis Group, 2006. ISBN 9780849320217.

- [33] OPEKAR, František. *Základní analytická chemie: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0553-8.
- [34] CHRISTA, Karolina a Maria SORAL-ŠMIETANA. Buckwheat Grains and Buckwheat Products – Nutritional and Prophylactic Value of their Components – a Review. *Czech Journal of Food Sciences*. 2008, 26(3), 153–162.
- [35] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [36] IKEDA, Sayoko a Yoshiko YAMASHITA. Buckwheat as a dietary source of zinc, copper and manganese. *Fagopyrum*. 1994, 14, 29–34.
- [37] PALOMBINI, Sylvio Vicentin, Thiago CLAUS, Swami Arêa MARUYAMA, et al. Evaluation of nutritional compounds in new amaranth and quinoa cultivars. *Food Science and Technology*. 2013, 33(2), 339–344.
- [38] DECKER, Eric A., Ryan J. ELIAS a D. Julian MCCLEMENTS. *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications* [online]. 1st ed. New Delhi: Woodhead Publishing Limited, 2010 [cit. 2018-06-26]. ISBN ISBN 978-0-85709-044-7. Dostupné z: <http://197.14.51.10:81/pmb/AGROALIMENTAIRE/Oxidation-1.pdf>
- [39] Flavonoids. *Oregon State University* [online]. 2016 [cit. 2018-06-25]. Dostupné z: <http://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoids>
- [40] JORDÁN, Václav a Marie HEMZALOVÁ. *Antioxidanty: zázračné zbraně*. vyd. 1. Brno: Jota, 2001. ISBN 80-7217-156-9.
- [41] HUNG, Pham Van, Tomoko MAEDA a Naofumi MORITA. Buckwheat Starch: Structure and Characteristics – A Review. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*. 2009, 49(1), 23–28.
- [42] DEY, Tapati Bhanja, Subhojit CHAKRABORTY, Kavish Kr. JAIN, Abha SHARMA a Ramesh Chander KUHAD. Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2016, 53, 60–74.
- [43] KLIMCZAK, I., M. MAŁECKA a B. PACHOŃEK. Antioxidant activity of ethanolic extracts of amaranth seeds. *Nahrung/Food*. 2002, 46(3), 184–186.
- [44] LÓPEZ-MEJÍA, O. Araceli, Aurelio LÓPEZ-MALO a Enrique PALOU. Antioxidant capacity of extracts from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seeds or leaves. *Industrial Crops and Products*. 2014, 53, 55–59.

- [45] PERALES-SÁNCHEZ, Janitzio X. K., Cuauhtémoc REYES-MORENO, Mario A. GÓMEZ-FAVELA, Jorge MILÁN-CARRILLO, Edith O. CUEVAS-RODRÍGUEZ, Angel VALDEZ-ORTIZ a Roberto GUTIÉRREZ-DORADO. Increasing the Antioxidant Activity, Total Phenolic and Flavonoid Contents by Optimizing the Germination Conditions of Amaranth Seeds. *Plant Foods Hum Nutr.* 2014, 69(3), 196–202.
- [46] DRZEWIECKI, J., A. L. MARTINEZ-AYALA, M. A LOZANO-GRANDE, H. LEONTOWICZ, M. LEONTOWICZ, Z. JASTRZEBSKI, P. PASKO a S. GORINSTEIN. In Vitro Screening of Bioactive Compounds in some Gluten-Free Plants. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 2018, 1–14.
- [47] GORINSTEIN, Shela, Oscar J. Medina VARGAS, Nicolas O. JARAMILLO, et al. The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. *European Food Research and Technology.* 2007, 225(2–4), 321–328.
- [48] VOLLMANNOVÁ, A., E. MARGITANOVÁ, T. TÓTH, M. TIMORACKÁ, D. URMINSKÁ, T. BOJŇANSKÁ a I. ČIČOVÁ. Cultivar Influence on Total Polyphenol and Rutin Contents and Total Antioxidant Capacity in Buckwheat, Amaranth, and Quinoa Seeds. *Czech Journal of Food Sciences.* 2013. 31, 589–595.
- [49] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy.* 2004, 98(4), 174–179.
- [50] PAŚKO, Paweł, Henryk BARTOŃ, Paweł ZAGRODZKI, Shela GORINSTEIN, Maria FOŁTA a Zofia ZACHWIEJA. Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. *Food Chemistry.* 2009, 115(3), 994–998.
- [51] PISOSCHI, Aurelia Magdalena a Gheorghe Petre NEGULESCU. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry and Analytical Biochemistry.* 2011, 1(1), 1–10.
- [52] CHRISTA, Karolina a Maria SORAL-ŚMIETANA. Buckwheat Grains and Buckwheat Products – Nutritional and Prophylactic Value of their Components – a Review. *Czech J. Food Sci.* [online]. 2008, 26(3), 153–162 [cit. 2018-06-25]. Dostupné z: <https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/01448.pdf>

- [53] ALVAREZ-JUBETE, L., H. WIJNGAARD, E.K. ARENDT a E. GALLAGHER. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chemistry*. 2010, 119(2), 770–778.
- [54] ĐORĐEVIĆ, Tijana M., Slavica S. ŠILER-MARINKOVIĆ a Suzana I. DIMITRIJEVIĆ-BRANKOVIĆ. Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chemistry*. 2010, 119(3), 957–963.
- [55] PAŠKO, P., M. SAJEWICZ, S. GORINSTEIN a Z. ZACHWIEJA. Analysis of Selected Phenolic Acids and Flavonoids in *Amaranthus cruentus* and *Chenopodium quinoa* Seeds and Sprouts by HPLC. *Acta Chromatographica*. 2008, 20(4), 661–672.
- [56] HUNG, Pham Van a Naofumi MORITA. Distribution of phenolic compounds in the graded flours milled from whole buckwheat grains and their antioxidant capacities. *Food Chemistry*. 2008, 109(2), 325–331.
- [57] MIKULAJOVÁ, Anna, Dominika ŠEDIVÁ, Eva HYBENOVÁ a Silvia MOŠOVSKÁ. Buckwheat cultivars – phenolic compounds profiles and antioxidant properties. *Acta Chimica Slovaca* [online]. 2016, 9(2), 124–129 [cit. 2018-06-25]. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/c04e/7dc47976d937ee65faad909764c8309338ce.pdf>
- [58] GUO, Xu-Dan, Yu-Jie MA, John PARRY, Jin-Ming GAO, Liang-Li YU a Min WANG. Phenolics Content and Antioxidant Activity of Tartary Buckwheat from Different Locations. *Molecules*. 2011, 16, 9850–9867.
- [59] PAŠKO, PAWEŁ, HENRYK BARTOŃ, MARIA FOŁTA a JADWIGA GWIŹDŹ. EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF AMARANTH (*AMARANTHUS CRUENTUS*) GRAIN AND BY-PRODUCTS (FLOUR, POPPING, CEREAL). *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*. 2007, 58(1), 35–40.
- [60] PAUCAR-MENACHO, Luz María, Elena PEÑAS, Montserrat DUEÑAS, Juana FRIAS a Cristina MARTÍNEZ-VILLALUENGA. Optimizing germination conditions to enhance the accumulation of bioactive compounds and the antioxidant activity of kiwicha (*Amaranthus caudatus*) using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*. 2017, 79, 245–252.
- [61] KIPROVSKI, Biljana, Maja MIKULIC-PETKOVSEK, Ana SLATNAR, Robert VEBERIC, Franci STAMPAR, Djordje MALENCIC a Dragana LATKOVIC. Comparison of phenolic profiles and antioxidant properties of European *Fagopyrum esculentum* cultivars. *Food Chemistry*. 2015, 185, 41–47.

- [62] PAUCAR-MENACHO, Luz María, Montserrat DUEÑAS, Elena PEÑAS, Juana FRIAS a Cristina MARTÍNEZ-VILLALUENGA. Effect of Dry Heat Puffing on Nutritional Composition, Fatty Acid, Amino Acid and Phenolic Profiles of Pseudocereals Grains. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2018, 68(4), 103–113.
- [63] VERARDO, Vito, Virginia GLICERINA, Emiliano COCCI, Antonia Garrido FRENICH, Santina ROMANI a Maria Fiorenza CABONI. Determination of free and bound phenolic compounds and their antioxidant activity in buckwheat bread loaf, crust and crumb. *LWT - Food Science and Technology*. 2018, 87, 217–224.
- [64] ROCCHETTI, Gabriele, Giulia CHIODELLI, Gianluca GIUBERTI, Francesco MASOERO, Marco TREVISAN a Luigi LUCINI. Evaluation of phenolic profile and antioxidant capacity in gluten-free flours. *Food Chemistry*. 2017, 228, 367–373.
- [65] PAZINATTO, Caroline, Luciana Gomes MALTA, Gláucia Maria PASTORE a Flavia Maria NETTO. Antioxidant capacity of amaranth products: effects of thermal and enzymatic treatments. *Food Science and Technology*. 2013, 33(3), 485–493.
- [66] NIREESHA, GR., L. DIVYA, C. SOWMYA, N. VENKATESHAN, M. NIRANJAN BABU a V. LAVAKUMAR. Lyophilization/Freeze Drying - An Review. *INTERNATIONAL JOURNAL OF NOVEL TRENDS IN PHARMACEUTICAL SCIENCES*. 2013, 3(4), 87–98.
- [67] QUETTIER-DELEU, Christel, Bernard GRESSIER, Jacques VASSEUR, et al. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000, 72, 35–42.
- [68] OGRODOWSKA, Dorota, Sylwester CZAPLICKI, Ryszard ZADERNOWSKI, Pirjo MATTILA, Jarkko HELLSTRÖM a Marian NACZK. Phenolic acids in seeds and products obtained from *Amaranthus cruentus*. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2012, 51(2), 96–101.
- [69] RIJKE, Eva de, Pieter OUT, Wilfried M.A. NIESSEN, Freek ARIESE, Cees GOOIJER a Udo A.Th. BRINKMAN. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography*. 2006, 1112, 31–63.
- [70] SIRACUSA, Laura, Fabio GRESTA, Elisa SPERLINGA a Giuseppe RUBERTO. Effect of sowing time and soil water content on grain yield and phenolic profile of four buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) varieties in a Mediterranean environment. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2017, 62, 1–17.