

Optimalizace extrakčního postupu pro stanovení antioxidační aktivity luštěnin

Bc. Monika Kopřivová

Diplomová práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Monika Kopřivová**
Osobní číslo: **T12827**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Optimalizace extrakčního postupu pro stanovení
antioxidační aktivity luštěnin**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Obecná charakteristika luštěnin.
2. Charakteristika antioxidantů.
3. Možnosti stanovení antioxidační aktivity.

II. Praktická část

1. Návrh různých způsobů extrakce pro stanovení antioxidační aktivity luštěnin.
2. Stanovení antioxidační aktivity metodami ABTS a DPPH u vybraných druhů luštěnin.
3. Statistické vyhodnocení výsledků, jejich diskuze a formulace závěrů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] TIWARI, Brijesh a Narpinder SINGH. Pulse Chemistry and Technology. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2012. ISBN 978-1-84973-331-1.

[2] POKORNY, Jan, Nedyaalka YANISHLIEVA a Michael GORDON. Antioxidants in Food: Practical Applications. Cambridge: Woodhead Publishing, 2001. ISBN 978-1-85573-463-0.

[3] DECKER, Eric A., Ryan J. ELIAS a Julian D. MCCLEMENTS. Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications. Volume 1: Understanding Mechanisms of Oxidation and Antioxidant Activity. Oxford: Woodhead Publishing, 2010. ISBN 978-1-84569-648-11.

[4] XU, Baojun J. a Sam K. C. CHANG. A Comparative Study on Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Legumes as Affected by Extraction Solvents. Journal of Food Science. 2007, 72(2), 159-166. ISSN 0022-1147.

[5] DJORDJEVIC, Tijana M., Slavica S. ŠILER-MARINKOVIC a Suzana I. DIMITRIJEVIC-BRANKOVIC. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content in Some Cereals and Legumes. International Journal of Food Properties. 2011, 14(1), 175-184. ISSN 1094-2912.

[6] NITHIYANANTHAM, Srinivasan, Subramanian SELVAKUMAR a Perumal SIDDHURAJU. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Two Different Solvent Extracts from Raw and Processed Legumes, Cicer arietinum L. and Pisum sativum L. Journal of Food Composition and Analysis. August 2012, 27(1), 52-60. ISSN 0889-1575.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Zuzana Bubelová, Ph.D.**
Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce: **10. ledna 2014**

Termín odevzdání diplomové práce: **25. dubna 2014**

Ve Zlíně dne 3. února 2014


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: KOPŘIVOVÁ MONIKA

Obor: THEVP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 8.4.2014

Kopřivová

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, použije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídá k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce bylo nalézt nejvhodnější postup extrakce luštěnin pro následné stanovení antioxidační aktivity. Analýza byla provedena u čočky belugy, čočky červené, hrachu zeleného, cizrny, mungo fazolí a adzuki fazolí. K extrakci byla zvolena tři různá extrakční činidla a zároveň tři různé způsoby extrakce. Antioxidační aktivita byla stanovena metodami ABTS a DPPH. Naměřené hodnoty se výrazně lišily v závislosti na použitém činidle a typu extrakce, zejména u čočky a fazolí. U metody ABTS se antioxidační aktivita luštěnin pohybovala v rozmezí 0,21 – 103,63 mmol.kg⁻¹. Metodou DPPH byla zjištěna antioxidační aktivita v rozmezí 184,07 – 19 629,36 mg.kg⁻¹. Nejvyšší extrakční účinnost měl 70% aceton a dynamická extrakce, naopak nejméně účinný byl 80% metanol a statické provedení extrakce.

Klíčová slova: luštěniny, antioxidační aktivita, ABTS, DPPH, metanol, etanol, aceton

ABSTRACT

The aim of this thesis was to find the most suitable procedure for extracting legumes for subsequent determination of antioxidant activity. The analyses were performed in beluga lentils, red lentils, green peas, chickpeas, mung beans and adzuki beans. Three different extraction solvents and three different methods of extraction were chosen. The antioxidant activity was determined using the ABTS and DPPH methods. Obtained values varied greatly depending on the solvent used and the type of extraction, particularly in the case of lentils and beans. Antioxidant activity (ABTS method) of legumes ranged from 0,21 to 103,63 mmol.kg⁻¹, while antioxidant activity (DPPH method) varied in the range from 184,07 to 19 629,36 mg.kg⁻¹. The highest extraction efficiency was determined using 70% acetone and dynamic extraction, the least effective were 80% methanol and still extraction.

Keywords: legumes, antioxidant activity, ABTS, DPPH, methanol, ethanol, acetone

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí své diplomové práce Ing. Zuzaně Bubelové, Ph. D. za její ochotu, odborné vedení, cenné rady a čas, který mi věnovala v průběhu vzniku této práce.

Dále bych chtěla poděkovat své rodině za pomoc a obrovskou podporu po celou dobu mého studia.

Motto:

„Vzdělání je to, co nám zůstane, když zapomeneme všechno, co jsme se naučili ve škole.“

Karel Čapek

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 CHARAKTERISTIKA LUŠTĚNIN.....	13
1.1 ANATOMICKÁ STAVBA ZRNA	13
1.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ LUŠTĚNIN	14
1.2.1 Bílkoviny	14
1.2.2 Sacharidy	15
1.2.3 Lipidy	15
1.2.4 Minerální látky	15
1.2.5 Vitaminy.....	16
1.2.6 Antinutriční a toxické látky.....	16
1.3 VÝZNAM LUŠTĚNIN V LIDSKÉ VÝŽIVĚ.....	17
1.4 PĚSTOVÁNÍ LUSKOVIN	19
1.4.1 Pěstování luskovin na zrno v České republice	19
1.4.2 Pěstování luskovin na zrno ve světě.....	19
1.5 HOSPODÁŘSKY VÝZNAMNÍ ZÁSTUPCI	20
1.5.1 Hrách setý (<i>Pisum sativum</i> L.)	20
1.5.2 Fazol obecný (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	21
1.5.3 Čočka jedlá (<i>Lens culinaris</i> Med.)	21
1.5.4 Cizrna beraní (<i>Cicer arietinum</i> L.).....	22
1.5.5 Sója luštinatá (<i>Glycine max</i> L.)	22
1.5.6 Bob obecný (<i>Vicia faba</i> L.)	23
1.5.7 Lupina (<i>Lupinus</i> Tourn.)	23
1.5.8 Víkev (<i>Vicia</i> L.).....	24
1.5.9 Vigna (<i>Vigna Savi</i>).....	24
2 CHARAKTERISTIKA ANTIOXIDANTŮ	25
2.1 ROZDĚLENÍ ANTIOXIDANTŮ	25
2.2 PŘÍRODNÍ ANTIOXIDANTY	26
2.2.1 Vitamin C	26
2.2.2 Vitamin E	27
2.2.3 Karotenoidy	28
2.2.4 Fenolické sloučeniny	28
2.2.4.1 Fenolické kyseliny	29
2.2.4.2 Flavonoidy	29
2.2.4.3 Stilbeny	31
2.2.4.4 Lignany	31
2.3 ANTIOXIDANTY LUŠTĚNIN	31
3 MOŽNOSTI STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY	33

3.1	EXTRAKCE.....	33
3.2	METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY	34
3.2.1	Metoda ABTS	34
3.2.2	Metoda DPPH	35
3.2.3	Metoda ORAC	36
3.2.4	Metody hodnotící eliminaci lipidové peroxidace.....	36
3.2.5	Metoda FRAP.....	36
II	PRAKTICKÁ ČÁST	38
4	CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	39
5	METODIKA PRÁCE.....	40
5.1	CHEMIKÁLIE	40
5.2	PŘÍSTROJE A POMŮCKY	40
5.3	ANALYZOVANÉ VZORKY	40
5.4	PŘÍPRAVA A EXTRAKCE VZORKŮ	41
5.5	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU ABTS	42
5.5.1	Kalibrační křivka pro metodu ABTS	43
5.6	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU DPPH	43
5.6.1	Kalibrační křivka pro metodu DPPH	44
5.7	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ.....	44
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	45
6.1	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU ABTS	45
6.2	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METODOU DPPH	50
	ZÁVĚR	57
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	59
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	66
	SEZNAM OBRÁZKŮ	67
	SEZNAM TABULEK.....	68
	SEZNAM PŘÍLOH.....	69

ÚVOD

Luštěniny jsou zralá suchá semena rostlin náležících do rozsáhlé čeledi bobovitých. Mezi hospodářsky nejvýznamnější zástupce patří hrách, fazol, čočka, cizrna, sója, bob, lupina, vikev a vigna. Luštěniny jsou tradiční složkou lidské výživy, nicméně v současné době je jejich spotřeba ve většině vyspělých zemí velmi nízká. Naopak pro obyvatelstvo rozvojových jsou luštěniny důležitou komoditou, zejména pro vysoký obsah bílkovin. Ač nejsou tyto bílkoviny plnohodnotné, svou kvalitou se velmi blíží bílkovinám živočišným. Luštěniny jsou také bohatým zdrojem sacharidů, vitaminů skupiny B a minerálních látek. V několika posledních letech se luštěniny dostávají do popředí zájmu jako významný zdroj antioxidantů, především fenolických látek [1], [2], [3].

Antioxidanty jsou sloučeniny různé chemické povahy, které chrání biologické systémy před oxidačním stresem způsobeným volnými radikály. S tím je spojena jejich schopnost zpomalovat procesy stárnutí organismu a také se podílet na prevenci řady civilizačních chorob, jako např. kardiovaskulární onemocnění, rakovina, diabetes aj. K nejvýznamnějším přírodním antioxidantům patří vitaminy E, C a karotenoidy. Mnohem více jsou však v rostlinných materiálech zastoupeny polyfenoly, které mají navíc podle řady experimentálních studií vyšší účinek než antioxidační vitaminy [4], [5].

Zvýšený zájem o antioxidanty se projevil rovněž ve snaze co nejpřesněji kvantifikovat antioxidační aktivitu potravin a jiných biologických materiálů. Byla vyvinuta celá řada metod založených na různých principech. K nejvýznamnějším patří metody ABTS a DPPH, které hodnotí schopnost vzorku inhibovat syntetické volné radikály. Kromě vlastního stanovení antioxidační aktivity je však třeba věnovat pozornost také volbě extrakčního postupu, který může zásadně ovlivnit výtěžek antioxidačních složek z analyzovaného materiálu [6].

První kapitola teoretické části práce pojednává o luštěninách, jejich anatomické stavbě, chemickém složení, významu v lidské výživě a pěstování v ČR i ve světě. Stručně jsou charakterizováni hospodářsky významní zástupci. Druhá kapitola je věnována antioxidantům, jejich členění a mechanismu působení. Jsou zde popsány nejdůležitější přírodní antioxidanty, přičemž hlavní pozornost je věnována fenolickým látkám, které jsou nejvýznamnějšími antioxidačními složkami luštěnin. Třetí kapitola je pak zaměřena na extrakci antioxidantů a metody stanovení antioxidační aktivity.

V praktické části byly na vybrané druhy luštěnin aplikovány navržené extrakční postupy a byla stanovena antioxidační aktivita metodami ABTS a DPPH. U získaných výsledků byl sledován vliv extrakčního činidla a způsobu provedení extrakce na antioxidační aktivitu luštěnin.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA LUŠTĚNIN

Pod pojmem luštěniny jsou označována semena luskovin, což jsou vyšší dvouděložné rostliny patřící do čeledi bobovitých (*Fabaceae* nebo *Leguminosae*), dříve motýlokvtých (*Papilionaceae*) či vikvovitých (*Viciaceae*). Spolu s obilovinami jsou vzhledem k zrnu a jeho obdobnému složení a technologickému zpracování či uskladnění zařazovány mezi zrniny. Luskoviny mají tradiční uplatnění v lidské výživě i jako složka krmných směsí pro hospodářská zvířata. Významné jsou rovněž z agronomického hlediska, a to svou schopností poutat vzdušný dusík, čímž příznivě ovlivňují půdní úrodnost [1], [7].

Luskoviny jsou starými kulturními plodinami, nicméně mladšími než obiloviny. Nejstarší doklady o pěstování luskovin, konkrétně hrachu a čočky, pocházejí z Turecka z období kolem 5 500 př. n. l. Planě rostoucí luskoviny byly člověku známy ještě mnohem dříve. Hrách, čočka, bob a cizrna patřily k důležitým potravinám klasického starověku. Římané pěstovali také lupinu a vikev setou. Do našich krajů však luskoviny přišly mnohem později. Fazol, který patří mezi prastaré kulturní plodiny amerických Indiánů, se do Evropy dostal až po objevení Ameriky. Rovněž podzemnice olejná a sója dorazily do Evropy teprve na počátku 19. století, ačkoliv sója je starou kulturní rostlinou Číny [3], [7].

1.1 Anatomická stavba zrna

Semena většiny luskovin mají velmi podobnou anatomickou stavbu. Na povrchu se nachází kožovité osemení, pak u některých luskovin následuje endosperm a uvnitř semene je uložen zárodek složený ze dvou děloh (kotyledonů) a klíčku [1].

Osemení je na povrchu kryto tenkou blankou (kutikulou). Pod ní je vrstva vysokých sloupkovitých buněk postavených těsně vedle sebe, tzv. palisádových. Tyto buňky dodávají slupce pevnost a mohou obsahovat barviva, která dodávají semenům barvu. Pod nimi se nachází vrstva pohárkových buněk. Pohárkové buňky mají oba konce rozšířené, takže mezi jejich středními částmi vznikají mezibuněčné prostory způsobující pružnost slupky. Pod vrstvou těchto buněk je tenkostěnný parenchym s cévními svazky, který v hlubších vrstvách přechází v houbovitý parenchym [1], [7].

Endosperm se vyskytuje pouze u bílkovinných luštěnin. Nachází se pod parenchymem a tvoří pouze malou část zrna. Může být buď plně vyvinutý, složený z vnějších buněk aleuronových a vnitřních většinou slizových, nebo může být zachován jen jeho zbytek [1].

Kotyledony tvoří 80 – 90 % zrna. Na povrchu mají tenkou pokožku a jsou tvořeny velkými, parenchymatickými buňkami. Podle jejich obsahu se luštěniny dělí na škrobnaté a bílkovinné. U většiny luštěnin (hrách, čočka, fazol, bob, vikev) jsou vyplněny škrobovými zrny, která jsou si vzájemně podobná, mají oválný tvar a uprostřed štěrbinu ve tvaru S, často rozvětvenou. Kotyledony bílkovinných luštěnin jsou z převážné části vyplněny bílkoviny a škrobových zrn obsahují jen minimum [1], [2].

1.2 Chemické složení luštěnin

Chemické složení luštěnin se liší v závislosti na odrůdě, původu, klimatických a půdních podmínkách, agrotechnice a dalších faktorech. Semena obsahují zpravidla 9 – 13 % vlhkosti. Sušina je tvořena převážně bílkoviny, sacharidy, tuky a minerálními látkami. V menším množství jsou zastoupeny vitaminy a fenolické sloučeniny [1].

1.2.1 Bílkoviny

Bílkoviny jsou přítomny převážně v kotyledonech. Jejich obsah je mezidruhově značně rozdílný a dosahuje rozpětí mezi 20 až 45 %. Diference se vyskytují i mezi různými odrůdami jedné plodiny v závislosti na agrotechnice a pěstebních podmínkách [8]. Např. v suchých a teplých oblastech je obsah proteinů zpravidla vyšší než v oblastech přímořského klimatu. Nejnižší obsahy byly zjištěny v cizrně a některých druzích fazolí, avšak i ty jsou asi třikrát vyšší než v rýži (6,4 %). Naopak nejvyšší obsah bílkovin má lupina (44,3 %) a sója, která průměrně obsahuje kolem 35 %, některé geneticky modifikované druhy sóji dokonce 45 % [1], [3].

Bílkoviny luštěnin lze rozdělit do dvou skupin. Do první skupiny jsou řazeny zásobní proteiny, které ve zralých semenech tvoří převážnou část přítomných bílkovin. Jsou zastoupeny zejména globuliny, mezi něž můžeme zařadit legumin, konglutin, fazeolin, glycinin, vicilin aj. Druhou skupinou jsou stavební složky membrán, buněčných stěn a také funkční prvky buňky, např. enzymy. Jedná se především o albuminy a gluteliny, přičemž obsah těchto proteinů je vyšší v období vývoje semene. U zralých semen luskovin je poměr přítomných bílkovinných frakcí obvykle následující: 70 % globuliny, 10 – 20 % albuminy a 10 – 20 % gluteliny [1], [7].

1.2.2 Sacharidy

Sacharidy tvoří u většiny luskovin hlavní podíl semene, jsou obsaženy v množství 41,7 až 64,1 %. Výjimkou je sója (32 %), podzemnice olejná (21,6 %) a lupina (28,2 %). Největší část přítomných sacharidů tvoří zpravidla škrob a ostatní polysacharidy. Zastoupeny jsou také oligosacharidy, z nichž nejvýznamnější jsou rafinóza, stachyóza, verbaskóza a ajugóza. Jejich obsah značně kolísá i v rámci stejného druhu luskoviny, průměrná hodnota je v rozmezí 3 – 4 %. Dále je v semenech přítomna sacharóza a v množství obvykle do 1 % monosacharidy glukóza, fruktóza a galaktóza [3], [9].

Z neškrobových polysacharidů jsou ve formě nerozpustné vlákniny přítomny celulóza, některé hemicelulózy a lignin. Ve formě rozpustné vlákniny jsou v semenech obsaženy pektiny, rostlinné gummy, slizy a některé další hemicelulózy. Luštěniny jsou velmi dobrým zdrojem vlákniny, její obsah kolísá v rozmezí 12,7 – 30,5 %. Nejvíce vlákniny bylo stanoveno v čočce, nejméně v adzuki fazolích. U některých druhů je hlavní složkou vlákniny celulóza (např. hrách, červené fazole), u jiných převažují hemicelulózy (např. čočka, lupina) [1], [3].

1.2.3 Lipidy

Luštěniny se vyznačují nízkým obsahem lipidů, pohybujícím se v rozmezí 1 – 2 %. Výjimku tvoří opět sója, která obsahuje průměrně 17,7 % lipidů, a podzemnice olejná, jež obsahuje přes 45 % tuku. Sója a podzemnice se proto v potravinářství využívají rovněž k získávání olejů a jsou v tomto případě zařazovány mezi olejninu. Vyšším obsahem lipidů se vyznačuje také lupina (16,5 %) a cizrna (5,6 %). Lipidy jsou v semenech luskovin uloženy zejména ve formě triacylglycerolů, v menším množství jsou zastoupeny mono- a diacylglyceroly, volné mastné kyseliny, steroly, fosfolipidy a glykolipidy. Složení mastných kyselin je příznivé, převažují nenasycené mastné kyseliny (55 – 85 %), z nichž se nejvíce vyskytuje kyselina olejová a linolová. V sóji se nachází větší množství kyseliny α -linolenové. Zastoupení jednotlivých mastných kyselin se liší podle odrůdy a podnebí; luštěniny mírného pásu obsahují zpravidla více nenasycených mastných kyselin než druhy pocházející z tropických oblastí [3], [10].

1.2.4 Minerální látky

Minerální látky jsou v luštěninách zastoupeny v množství 3 – 4 %, což je více než v obilovinách. Z makroprvků je nejvíce zastoupen draslík, fosfor, vápník a hořčík. Poměr

mezi vápníkem a fosforem není optimální, avšak o něco příznivější než u obilovin (Ca:P = 1:3). Z oligoprvků je prostřednictvím luštěnin dodáváno železo (nejvíce v čočce) a zinek. Z mikroprvků obsahují semena luskovin kobalt, molybden, vanad, jód, fluor, mangan a měď [11], [12].

1.2.5 Vitaminy

Luštěniny jsou poměrně dobrým zdrojem vitaminů skupiny B. V menším množství jsou zastoupeny také vitaminy C, E, biotin a provitaminy A. Vyšší obsah vitamínu C se nachází v naklíčených semenech nebo v zahradních luskovinách, které se počítají k luskové zelenině. Obsah tiaminu je stejný nebo vyšší než v obilovinách, pohybuje se v rozmezí od 0,3 do 1,6 mg.100 g⁻¹. Obsah riboflavinu je nižší, zpravidla činí 0,1 až 0,4 mg.100 g⁻¹. Nikotinové kyseliny se v luštěninách nachází přibližně 2,0 mg.100 g⁻¹, v podzemnici olejné dokonce více než 16 mg.100 g⁻¹. Semena luskovin jsou též dobrým zdrojem kyseliny listové, např. jedna porce vařené čočky obsahuje asi 45 % doporučeného denního příjmu kyseliny listové pro dospělého člověka [3], [5], [11].

1.2.6 Antinutriční a toxické látky

V luštěninách se nachází řada složek, které snižují využitelnost živin nebo vykazují toxický účinek. Jejich přítomnost má pravděpodobně význam jako ochrana semene před napadením hmyzem či patogenními mikroorganismy. Některé z těchto látek však mohou mít také příznivé účinky na lidský organizmus (viz podkapitola 1.3), proto je jejich zařazení do této skupiny pouze zjednodušující. Tradičně se mezi antinutriční a toxické látky luštěnin zahrnují:

- **Inhibitory proteáz** – proteiny nebo polypeptidy vytvářející s proteolytickými enzymy stabilní komplexy, čímž dochází ke ztrátě jejich enzymové aktivity. Inhibitory proteáz jsou většinou termolabilní, proto je lze inaktivovat teplem [11].
- **Kyselina fytová** – hlavní zásobní forma fosforu využívaného při klíčení semen, obvykle obsahuje kolem 50 – 80 % z celkového obsahu fosforu. Vyskytuje se především jako smíšená vápenatá a hořečnatá sůl, která se nazývá fytin. Tvoří zpravidla kolem 1 % sušiny semene [8], [13].

- **Lektiny** – bílkoviny nebo glykoproteiny se schopností vazby na sacharidy. Intravenózně jsou vysoce toxické, některé vykazují toxicitu i při orální aplikaci. Obsah těchto látek se u většiny luštěnin pohybuje v rozmezí 0,01 – 0,2 %, ve fazolích mohou tvořit až 1 %. Jejich biologická aktivita se snižuje tepelným opracováním a máčením [11], [13].
- **Saponiny** – různorodá skupina heteroglykosidů, které se vyznačují hořkou chutí a detergenčními účinky. Obsah saponinů v semenech luskovin je značně proměnlivý i v rámci stejného druhu, obecně se pohybuje v rozmezí 0,01 % (podzemnice olejná) až po 6 % (cizrna beraní) [13].
- **Třísloviny** – fenolické látky hořké až svíravé chuti. Jejich zastoupení v luštěninách je opět značně proměnlivé, např. v sóji se nachází v množství do 0,045 %, ve fazolích až do 2 % [13].
- **Kyanogenní glykosidy** – glykosidy nitrilů 2-hydroxykyselin, jejichž hydrolýzou dochází k uvolnění toxického kyanovodíku [3].
- **Estrogenní látky** – látky, které svým účinkem připomínají pohlavní hormony estrogenery. Hlavními fytoestrogeny jsou izoflavony, pterokarpany a lignany. Nejvíce těchto látek se nachází v sóji [13].
- **Lathyrogeny** – pod tímto pojmem jsou označovány toxické aminokyseliny a jejich deriváty, nacházející se zejména v semenech některých hrachorů a vikví [13].

1.3 Význam luštěnin v lidské výživě

Luštěniny jsou z nutričního hlediska velmi hodnotnou potravinou. Mají význam především jako zdroj bílkovin, které se svojí kvalitou řadí hned za bílkoviny živočišného původu. Kvůli nedostatku sirných aminokyselin a tryptofanu nejsou tyto bílkoviny plnohodnotné, nicméně mají vyšší biologickou hodnotu než bílkoviny obilovin [8]. V porovnání s nimi obsahují více lyzinu, leucinu, argininu, kyseliny asparagové a glutamové. Na druhou stranu proteiny cereálií obsahují více sirných aminokyselin [2]. Kombinací luštěnin a obilovin ve stravě proto dojde k vyváženému příjmu esenciálních aminokyselin, což má význam zejména v rozvojových zemích, kde je horší dostupnost živočišných zdrojů bílkovin [3].

Pro nízký obsah tuku jsou luštěniny vhodnou potravinou také pro obyvatelstvo vyspělých zemí s vysokým příjmem tuku ve stravě. Lipidy luštěnin mají navíc příznivou skladbu a jsou zdrojem esenciálních mastných kyselin linolové a α -linolenové. Přínosem je i obsah fosfolipidu lecitinu, který se nachází ve větším množství v sóji. Jediným negativem je, že lipidy luštěnin poměrně snadno podléhají oxidačnímu a hydrolytickému žluknutí, jehož důsledkem je tmavá barva a hořká chuť [5], [8].

Luštěniny obsahují řadu látek, jež jsou spojovány se sníženým rizikem kardiovaskulárních chorob, rakoviny, diabetu, chronických zánětů, nervové degenerace a dalších chronických onemocnění. V této souvislosti je tradičně zmiňována vláknina, antioxidační vitaminy C, E a karotenoidy, v posledních letech se však přikládá větší význam také fenolickým sloučeninám a fytosterolům [14]. Za určitých podmínek mohou pozitivně působit i některé antinutriční či toxické látky. Kyselina fytová snižuje riziko rakoviny tlustého střeva a pravděpodobně i rakoviny prsu. Saponiny jsou zase schopny tvorbou nerozpustných komplexů s cholesterolem snižovat jeho vstřebávání z potravy [8]. Izoflavony mají silnou antioxidační aktivitu, působí proti osteoporóze, menopauzálním symptomům a byly u nich prokázány protirakovinné účinky [5].

Luštěniny však mají pro použití v lidské výživě určitá omezení. Příčinou je zejména přítomnost antinutričních a toxických látek. Inhibitory proteáz snižují stravitelnost a absorpci bílkovin. Podobně působí třísloviny, které snižují absorpci zejména esenciálních aminokyselin metioninu a lyzinu. Kyselina fytová zase snižuje vstřebatelnost minerálních látek (zejména fosforu, vápníku, železa a zinku), které váže do nevyužitelných komplexů. Saponiny způsobují hemolýzu červených krvinek, což má za následek uvolňování hemoglobinu do krevního řečiště [3], [8]. Při konzumaci syrových nebo nedostatečně tepelně ošetřených luštěnin se může projevit toxický účinek přítomných lektinů, vyvolávající žaludeční potíže, průjemy a zvracení. Nejvíce toxické jsou lektiny některých fazolí, lektiny ostatních luštěnin mají toxicitu nízkou [13].

Dalším omezením je přítomnost oligosacharidů, které nejsou štěpeny trávicími enzymy a dostávají se do tlustého střeva, kde jsou rozkládány přítomnými bakteriemi za tvorby značného množství plynu, což je příčinou nadýmání. Jejich obsah lze velmi účinně (až na 20 % původní hodnoty) snížit klíčením nebo namáčením před tepelnou úpravou [15].

I přes uvedená negativa, která lze navíc překonat vhodnou úpravou i frekvencí podávání, jednoznačně převažují přednosti luštěnin v lidské výživě. Obliba této komodity u obyvatelstva tomu však vždy neodpovídá. Průměrná spotřeba luštěnin je v různých oblastech světa značně rozdílná, pohybuje se v rozmezí 2 – 20 kg na osobu a rok, přičemž přední příčku v současnosti zaujímá Indie. Celosvětový průměr činí asi 7 kg/osobu/rok. V ČR je konzumace luštěnin velmi nízká, průměrná spotřeba již několik let stagnuje na hodnotách mírně nad 2 kg/osobu/rok. Dle doporučení odborníků by se měla zvýšit alespoň na dvojnásobek [8], [16].

1.4 Pěstování luskovin

1.4.1 Pěstování luskovin na zrno v České republice

Pěstování luskovin má v ČR dlouholetou tradici. Plochy, na nichž se tyto plodiny pěstovaly, byly v dávné minulosti několikanásobně vyšší než nyní. Rovněž struktura využití luskovin byla jiná, převažovalo krmivářské využití nad potravinářským. Nicméně v posledních letech se luskoviny dostávají do výrazného útlumu, což se projevuje především poklesem jejich osevních ploch. Ty v ČR poklesly až na úroveň kolem 1 % orné půdy. Hlavní příčinou tohoto neblahého vývoje je silná konkurence ze strany importu sójových bobů, či jejich pokrutin do EU a ČR a jiné převážně ekonomické faktory. Ke snižování ploch luskovin na zrno navíc přispívá i pokračující pokles stavů hospodářských zvířat [8], [16].

V minulých letech stagnovala výměra pěstování luskovin na zrno na úrovni kolem 30 000 ha. V roce 2011 však došlo k výraznému propadu osevní plochy luskovin na 22 316 ha. Převážnou část této plochy tvořil hrách pěstovaný na výměře 17 189 ha (77 %). Osevní plocha lupiny klesla na 1 547 ha (7 %) a plocha ostatních luskovin na zrno byla 3 580 ha (16 %). Mezi ostatní luskoviny se v současné době řadí bob obecný, peluška, vikve (panonská, huňatá, setá), čočka a luskovino-obilní směsky [16].

1.4.2 Pěstování luskovin na zrno ve světě

Nejpěstovanější luskovinou ve světovém měřítku je sója. Z hlediska hospodářského významu a užití zejména pro produkci jedlého oleje se sója zahrnuje mezi olejninu. Celosvětová výměra sóji by podle odhadu USDA z prosince 2012 měla v marketingovém roce 2012/2013 dosáhnout 108,97 mil. ha a celosvětová produkce 267,72 mil. tun. Globální

spotřeba sóji by měla činit 261,25 mil. tun. Hlavními světovými producenty jsou v současnosti USA, Brazílie, Argentina, Čína a Indie [17].

Světová sklizňová plocha ostatních luskovin pěstovaných na zrno činí dle statistiky FAO kolem 74 mil. ha, z toho nejvíce plochy zaujímá fazol (29 mil. ha), cizrna (12 mil. ha), vigna (10 mil. ha). Následuje hrách (7 mil. ha), čočka (4 mil. ha), bob (2,5 mil. ha), vikve a lupiny. Více než 50 % sklizňových ploch luskovin se nachází v Asii a asi 28 % v Africe. Nicméně intenzita pěstování je na těchto kontinentech nedostatečná a dosahované výnosy velmi nízké (v průměru 0,5 – 0,8 tun.ha⁻¹). Největším světovým producentem luštěnin je Indie (cca 15 mil. tun ročně) [16], [17].

Za posledních 20 let se světový obchod s luštěninami více než ztrojnásobil. Jeho výše závisí každoročně na úrovni produkce luštěnin v zemích s převahou poptávky a na jejich finančních možnostech. Aktuálně patří mezi největší vývozce luštěnin Kanada, Čína, USA a Myanmar. Největšími dovozci luštěnin jsou Indie, Turecko, Egypt a USA. Každoroční globální užití luštěnin (s výjimkou sóji) činí zhruba 60 mil. tun, z toho užití k lidské výživě představuje zhruba 65 % (převážně v rozvojových zemích), krmné užití cca 25 % (zejména v rozvinutých zemích) a zbylých 10 % připadá na osivo a ostatní účely [16].

1.5 Hospodářsky významní zástupci

1.5.1 Hrách setý (*Pisum sativum* L.)

Hrách setý patří k nejstarším kulturním plodinám. Přesto je jeho původ pro značnou různorodost vyskytujících se forem poměrně nejasný. Pravděpodobně pochází ze Středomoří a Malé Asie. V ČR je v současnosti nejpěstovanější luskovinou, avšak jeho osevní plochy se neustále snižují. Celosvětově je nejvíce hrachu pěstováno v Indii, Číně a Brazílii (70 % světové produkce), v USA, Kanadě, Austrálii, Rusku a na Ukrajině. Hlavním exportérem je v současné době Kanada [12], [18].

Rod *Pisum* zahrnuje dva botanické druhy – *Pisum sativum* L. a *Pisum fulvum*, který se však vyskytuje pouze jako planá forma. Botanický druh *Pisum sativum* se dále člení na subspecies a variety, u nichž dosud není zcela jednoznačná taxonomie. Není zpochybněna existence dvou subspecií: *Pisum sativum* subsp. *sativum* (hrách setý polní) a *Pisum sativum* subsp. *arvense* (hrách rolní – peluška). Suchá semena hrachu setého jsou využívána jako potravinu, krmivo nebo surovina pro výrobu škrobu. Hrách rolní je především pícní plodina, vyu-

žívaná ke krmení zvířat. Jako tzv. zahradní hrách je pěstován hrách dřeňový (*Pisum sativum* subsp. *sativum* var. *medullare*), jehož nezralá semena jsou používána pro přímý konzum a pro konzervářské účely. Další varietou je hrách cukrový (*Pisum sativum* subsp. *sativum* var. *saccharatum*), z něhož se konzumují nezralé lusky jako plodová zelenina [8], [18].

1.5.2 Fazol obecný (*Phaseolus vulgaris* L.)

Fazol je po sóji druhou nejrozšířenější luskovinou na světě, avšak v ČR bylo jeho velkovýrobní pěstování ukončeno a současná spotřeba fazolu je u nás kryta převážně dovozem. Osevní plochy fazolu dnes podle odhadu dosahují kolem 3 ha, přitom ještě v 90. letech minulého století zaujímal 300 – 900 ha. Fazol je pěstován téměř výhradně pro potravinářské účely, zkrmuje se pouze odpad získaný při úpravě semen [8].

Rod *Phaseolus* zahrnuje asi 36 druhů, z nichž většina je původem ze Střední a Jižní Ameriky, část z Asie. V podmínkách středoevropského klimatu se pěstuje zejména fazol obecný (*Phaseolus vulgaris* L.) a fazol šarlatový či mnohokvětý (*Phaseolus coccineus* L.), který je pěstován jako okrasný, některé odrůdy však lze využívat i pro konzum. Ve velmi teplých oblastech může být pěstován i fazol měsíční (*Phaseolus lunatus*). Fazol obecný má dvě variety lišící se vlastnostmi lodyhy: fazol keříčkový (var. *nanus*) a fazol popínavý (var. *vulgaris*). Jako fazol polní je využíván především fazol keříčkový, jako zahradní fazol obě variety. V obou případech je možná jak konzumace dozrálých semen, tak sklizeň a potravinářská úprava nedozrálých lusků [5], [19].

1.5.3 Čočka jedlá (*Lens culinaris* Med.)

Čočka se řadí spolu s hrachem k nejstarším pěstovaným luskovinám. Z hlediska potravinářského využití je nejžádanějším druhem, jelikož vyniká poměrně dobrou stravitelností a vařivostí, kdy se na rozdíl od ostatních luštěnin nemusí před tepelnou úpravou namáčet. Průměrná roční spotřeba čočky v ČR se dlouhodobě pohybuje na úrovni 4 – 6,5 tis. tun, přičemž převážné množství je kryto dovozem zejména z Kanady, která je největším světovým exportérem čočky. Velkovýrobně se čočka na našich polích již nepěstuje, pouze v klimaticky vhodných oblastech se produkují malá množství v úhrnu asi do 1 tis. tun [8], [20].

Taxonomie rodu *Lens* prošla mnoha změnami. Podle nejnovější klasifikace zahrnuje tento rod čtyři druhy, a to kulturní druh *Lens culinaris* Medikus a planě rostoucí druhy *Lens ervoides*, *Lens nigricans* a *Lens lamottei*. Druh *Lens culinaris* Medikus se dále člení na čtyři subspecie: subsp. *culinaris*, subsp. *orientalis*, subsp. *tomentosus* a subsp. *odemensis*. Na trhu je v současnosti k dostání celá řada odrůd v různých barevných odstínech (semena žlutá, šedá, červená, šedozelená aj.) i velikostech (velkozrnné a drobnozrnné odrůdy) [21].

1.5.4 Cizrna beraní (*Cicer arietinum* L.)

Po sóji a fazolu je cizrna třetí nejpěstovanější luskovinou na světě. Její světová produkce se pohybuje kolem 8,5 mil. tun ročně. Pochází pravděpodobně z jihovýchodního Turecka nebo Sýrie, kde byla vyšlechtěna z planě rostoucího druhu *Cicer reticulatum*. Cizrna je významnou luskovinou teplých a suchých oblastí, které nejsou pro ostatní jedlé luskoviny vyhovující. Pěstuje se zejména ve stepním a subtropickém pásu – v Africe, Mexiku, Indii a Číně. V Evropě je cizrna pěstována přibližně na 100 tis. ha v zemích kolem Středozemního moře. Dříve se pěstovala v malém měřítku i na jižní Moravě, v současné době pokračuje pouze šlechtění krmných typů. Pro její pěstování v ČR nejsou optimální podmínky, především se obtížně dosahuje potřebné sumy teplot za vegetaci [8], [22].

Podle barvy semene a geografického rozšíření jsou rozlišovány dva typy cizrny. Typ „kabuli“ pocházející z oblastí kolem Středozemního moře se semeny světlé barvy a typ „desi“ původem z Indie se semeny tmavé barvy a zpravidla menší velikosti. Semena typu kabuli se využívají v potravinářství k přímé spotřebě po uvaření, ke konzervářským účelům, k výrobě kávových náhražek nebo cizrnové mouky. Semena typu desi se uplatňují jako bílkovinná složka krmných směsí [22].

1.5.5 Sója luštinatá (*Glycine max* L.)

Sója je jedna z nejstarších kulturních rostlin, nejpěstovanější luskovina i olejnina a zároveň čtvrtá nejrozšířenější plodina na světě. Rod *Glycine* zahrnuje velký počet druhů, které většinou rostou planě v Asii, Africe a Americe. U nás je zastoupen jediným druhem *Glycine max* L. Svým složením i možnostmi využití zaujímá sója zvláštní postavení v lidské výživě. V potravinářství jsou využívána celá semena, sójová mouka, sójové bílkovinné koncentráty, izolované sójové bílkoviny a sójový lecitin. Pěstování této plodiny v ČR vycházelo donedávna z přesvědčení, že zde pro ni nejsou optimální klimatické podmínky. Sója je

původem z Východní Asie, má vysoké nároky na teplo a zároveň vyžaduje dostatečnou vlhkost prostředí. Významným krokem k jejímu pěstování ve střední Evropě byly nové odrůdy vyšlechtěné koncem 20. století v Kanadě ve stejných zeměpisných šířkách. Světovým trendem v pěstování sóji jsou odrůdy na bázi GMO, které v roce 2006 zaujímaly přes 50 % sklizňové plochy plodiny [8], [12].

1.5.6 Bob obecný (*Vicia faba* L.)

Bob obecný je dalším zástupcem historicky nejstarších luskovin. Svůj původ má v severní Africe a jihozápadní Asii. Podmínky pro pěstování bobu v Evropě včetně ČR jsou poměrně příznivé, nicméně v praxi je výnosový potenciál vyšlechtěných odrůd využíván jen omezeně. Hlavními příčinami je citlivost bobu k výkyvům povětrnostních podmínek a nedodržování komplexních zásad agrotechniky. Osevní plochy bobu v ČR dlouhodobě klesají a od roku 2009 přestal být v rámci statistiky ČSÚ samostatně sledován. V roce 2012 činila výměra bobu kolem 600 ha, přičemž většina byla pěstována pro osivářské účely [16], [23].

Druh *Vicia faba* L. se dále člení na tři variety podle velikosti semen vyjádřené jako hmotnost tisíce semen (HTS). Jsou to bob zahradní neboli svinský (*Vicia faba* L. var. *major*) o HTS 1100 až 2500 g, bob polní neboli koňský (*Vicia faba* L. var. *equina*) o HTS 350 až 1100 g a bob drobnosemenný (*Vicia faba* L. var. *minor*) o HTS 280 až 350 g. Bob koňský je pěstován pro krmné účely, bob zahradní slouží i jako potravinu. Kromě suchých zralých semen je možná také konzumace nezralých semen a lusků [8], [11].

1.5.7 Lupina (*Lupinus Tourn.*)

Lupina, známá rovněž pod názvem vlčí bob, je velmi obsáhlý rod čítající kolem 300 druhů. U nás jsou pěstovány pouze 3 kulturní druhy: lupina bílá (*Lupinus albus* L.), lupina žlutá (*Lupinus luteus* L.) a lupina úzkolistá (*Lupinus angustifolius* L.). Za hlavní nedostatek lupin byl v minulosti pokládán obsah alkaloidů v semenech. Vyšlechtění nových odrůd tzv. „sladké lupiny“ s nepatrným obsahem alkaloidů a vysokým obsahem bílkovin vedlo k obnovenému zájmu o pěstování a využití lupiny jak ke krmným účelům, tak i k lidské výživě. Největším světovým producentem a exportérem semen lupiny je Austrálie, která ročně vyprodukuje kolem 1 mil. tun, čímž zajišťuje 80 – 85 % světové produkce. V Evropě se lupina pěstuje nejvíce v Německu, Francii, Španělsku, Polsku, Ukrajině a Rusku [8], [24].

1.5.8 Vikev (*Vicia L.*)

Vikve jsou představitelem luskovin pěstovaných téměř výhradně ke krmným účelům, kdy se využívají v podobě čerstvé zelené píce, případně silážované hmoty. Semena obsahují velké množství antinutričních látek, mají hořkou chuť a zvířata je nerada přijímají. V dobách rozvinuté živočišné výroby měly vikve v ČR velký hospodářský význam, nicméně v posledních letech jejich pěstování stagnuje na ploše kolem 200 ha. Známý jsou u nás dvě formy vikve – ozimé a jarní. K ozimým formám patří dva druhy, a to vikev huňatá syn. písečná (*Vicia villosa*) a vikev panonská (*Vicia pannonica*). Jako jarní forma je pěstována vikev setá (*Vicia sativa*), která je rozšířená v různých oblastech Evropy i světa, má mnoho forem a krajových odrůd, které se morfologicky odlišují. Ve Středomoří je využívána rovněž vikev narbonská (*Vicia narbonensis*), která se spíše podobá bobu [8], [16].

1.5.9 Vigna (*Vigna Savi*)

Rod *Vigna* je blízký příbuzný s rodem *Phaseolus*, proto jsou často u některých botanických druhů tyto dva pojmy navzájem zaměňovány. V minulosti byla vigna vedena jako druh fazol zlatý (*Phaseolus aureus* syn. *Phaseolus mungo*) nebo *Phaseolus radiatus*. Rod *Vigna* zahrnuje asi 170 druhů, z nichž 120 se vyskytuje v Africe, 22 v Indii a několik v Americe a Austrálii. Ve statistikách jsou zpravidla uváděny pouze druhy *mungo*, *angularis*, *radiata* a *aconitifolia*. Do ČR se vigna začala dovážet koncem minulého století. Suchá, vyzrálá semena se používají ke klasické úpravě vařením, oblíbená je také konzumace naklíčených semen [8], [25].

2 CHARAKTERISTIKA ANTIOXIDANTŮ

V posledních letech se neustále zvyšuje výskyt civilizačních onemocnění, která jsou vyvolána kromě jiného také nepříznivým působením volných radikálů. Jde především o reaktivní kyslíkové radikály (např. superoxid, hydroxylový radikál, peroxy) a dusíkaté radikály (oxid dusnatý, oxid dusičitý). Tyto radikály vstupují do reakcí s biologicky významnými sloučeninami, zejména lipidy, bílkovinami a nukleovými kyselinami, pozměňují jejich strukturu a tím narušují jejich původní funkci. Řetězové reakce iniciované radikály vedou k následným strukturálním změnám buněk, k poškození tkání, orgánů a důležitých funkcí v organismu. Přirozené reparativní procesy organismu zpravidla nejsou schopny poškození biomolekul samy plně eliminovat [26], [27].

K obraně proti škodlivým účinkům exogenních i endogenních volných radikálů využívá organismus v zásadě dva mechanismy: rozklad radikálů antioxidačními enzymy a eliminaci jejich aktivity přirozenými endogenními antioxidanty [28]. Podle tradiční definice jsou antioxidanty molekuly, které – jsou-li přítomny v malých koncentracích ve srovnání s látkami, jež by měly chránit – mohou zabraňovat nebo omezovat oxidační destrukci těchto látek [26]. V konečném důsledku tak antioxidanty slouží jako prevence vzniku řady degenerativních onemocnění, podporují funkci imunitního systému a zpomalují procesy stárnutí. Jejich účinků se využívá rovněž v potravinářském průmyslu, kde prodlužují údržnost potravin a chrání je proti zkáze způsobené oxidací [29].

2.1 Rozdělení antioxidantů

Antioxidanty jsou značně nehomogenní skupinou látek a lze je členit podle různých hledisek. Základním a nejjednodušším je rozdělení podle původu:

- přírodní antioxidanty, které se v potravinách vyskytují přirozeně
- syntetické antioxidanty, jež jsou do potravin přidávány záměrně [13].

Dále můžeme antioxidanty rozdělit podle zdroje jejich získávání na:

- endogenní, které si dokáže lidský organismus sám syntetizovat (např. enzym kataláza, glutation, kyselina močová)
- exogenní, jež jsou získávány z potravy (např. vitamin C, E) [30].

Někteří autoři používají rovněž členění antioxidantů podle mechanismu působení:

- primární antioxidant, které přímo reagují s volnými radikály (kyselina askorbová, tokoferoly, fenolické látky, galláty)
- sekundární antioxidant rozkládající hydroperoxydy ve stabilní produkty (např. cystein, kyselina lipoová)
- sloučeniny eliminující přítomný kyslík
- sloučeniny, které váží do komplexů katalyticky působící kovy [13].

2.2 Přírodní antioxidanty

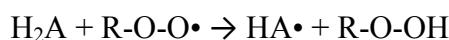
Z rostlinných materiálů bylo izolováno nesčetné množství antioxidantů, které zpravidla slouží jako součást obranného systému rostlin. Mezi nejvýznamnější přírodní antioxidanty jsou tradičně řazeny vitaminy C, E a karotenoidy. V průběhu posledních desetiletí však bylo zjištěno, že větší význam a zastoupení mají sloučeniny polyfenolické povahy, jako jsou flavonoidy, fenolické kyseliny aj. Hlavními přírodními zdroji těchto látek jsou ovoce, zelenina, luštěniny, obiloviny, čaje, vína a také aromatické a léčivé byliny. Celkový denní příjem polyfenolů z různých zdrojů se odhaduje na 1 g a je tedy vyšší než příjem antioxidantů vitamínů. V řadě experimentálních studií bylo navíc prokázáno, že antioxidantní aktivita mnoha rostlinných fenolických látek je vyšší než účinek antioxidantů vitamínů [4], [26].

2.2.1 Vitamin C

Biologicky aktivní formou vitamínu C je kyselina L-askorbová a produkty její oxidace, kterými jsou L-monodehydroaskorbová a L-dehydroaskorbová kyselina. Jedná se o vitamin rozpustný ve vodě. V lidském organismu plní celou řadu důležitých funkcí, především se účastní biosyntézy polysacharidů, absorpce iontových forem železa, jeho transportu a uplatňuje se také v metabolismu cholesterolu. Významnými zdroji vitamínu C jsou šípky, rakytník, černý rybíz, paprika, citrusové ovoce a brambory [31], [32].

Antioxidantní vlastnosti vitamínu jsou dány reakcemi s aktivními formami kyslíku a oxidovanými formami vitamínu E. Ty zajišťují ochranu vitamínu E a membránových lipidů před oxidační destrukcí. Ochrannou funkci má i pro labilní formy kyseliny listové. Reakci kyseliny

liny askorbové s peroxylovým radikálem mastné kyseliny (R-O-O•), případně s alkoxylovým radikálem (RO•), lze schematicky znázornit následující rovnicí [31]:

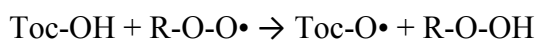


Vzniklý askorbylradikál (HA•) již není schopen vyvolat další řetězovou reakci a dehydrogenázou se regeneruje zpět na askorbovou a dehydroaskorbovou kyselinu. Účinek vitamínu C se zvyšuje, pokud se použije v kombinaci s tokoferoly. Ty reagují přednostně s volnými radikály lipidů a vzniklé radikály tokoferolů jsou posléze redukovány kyselinou askorbovou zpět na tokoferoly. Na základě několika studií bylo zjištěno, že při podávání vitamínu C ve formě doplňků stravy v dávkách nad 500 mg/den může docházet k přeměně antioxidačního účinku na prooxidační [31], [33].

2.2.2 Vitamin E

Jako vitamin E jsou označovány čtyři tokoferolové a čtyři tokotrienolové izomery, jejichž společnou strukturální jednotkou je chromanový cyklus s nasyceným nebo nenasyceným izoprenoidním postranním řetězcem, který zapříčiňuje rozpustnost v tucích. Vitamin E je obsažen především v rostlinných olejích lisovaných za studena, obilných klíčcích, zelené listové zelenině, luštěninách a ořechách [34], [35].

Antioxidační aktivita vitamínu E se uplatňuje zejména při ochraně lipidů buněčných membrán a lipoproteinů přítomných v plazmě. Tokoferoly při reakci s peroxylovými radikály lipidů (R-O-O•) fungují jako donory vodíku a redukuje je na hydroperoxy (R-O-OH), čímž dochází k přerušení řetězové radikálové reakce [31]:



Vzniklý radikál tokoferolu (Toc-O•) již není dostatečně reaktivní na to, aby štěpil další molekuly lipidů. Naopak může opět reagovat s peroxylovými radikály za vzniku stabilních produktů nebo je regenerován zpět do své přirozené antioxidační formy působením vitamínu C. Tokoferoly mají rovněž schopnost zhaset singletový kyslík nebo s ním mohou reagovat za vzniku různých oxidačních produktů [27], [34].

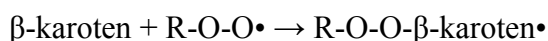
Za nejúčinnější antioxidant je obecně považován α -tokoferol, následuje β , γ a δ -tokoferol. Tokotrienoly jsou méně účinné než odpovídající tokoferoly. V potravinách však pořadí antioxidační aktivity jednotlivých forem vitamínu již není tak jednoznačné. Závisí na mnoha faktorech, především na složení nenasycených mastných kyselin, stabilitě vznikajících

radikálů a přítomnosti dalších antioxidantů. Kromě zmíněné kyseliny askorbové může účinnost vitamínu E zvyšovat také selen [29], [31].

2.2.3 Karotenoidy

Karotenoidy tvoří rozsáhlou skupinu žlutých, oranžových a červených lipofilních barviv, které obvykle v rostlinách doprovázejí chlorofyly, nalezneme je však také u hub, mikroorganismů a živočichů. Po chemické stránce se jedná o nenasycené polyenové sloučeniny složené z izoprenových jednotek. Lze je rozdělit na dvě hlavní skupiny: karoteny, což jsou bezkyslíkaté uhlovodíky, a od nich odvozené kyslíkaté sloučeniny xantofyly. Karotenoidy, jež obsahují ve své struktuře alespoň jeden β -jononový kruh, mají funkci provitaminu A. Nejvýznamnější je β -karoten, α a γ -karoten a β -kryptoxanthin [34], [36].

Karotenoidy poskytují antioxidační ochranu v systémech obsahujících lipidy a také *in vivo*. Mechanismus jejich působení je odlišný od mechanismu kyseliny askorbové a tokoferolů. Hydroperoxylový radikál vznikající při autooxidaci lipidů není redukován na hydroperoxid, nýbrž je zachycen konjugovaným polyenovým systémem za vzniku relativně stabilních radikálů [31]:



Tyto radikály se následně rozkládají za odštěpení alkoxylového radikálu ($\text{R-O}\cdot$) a stabilizují se za vzniku epoxidů, karbonylových sloučenin a dalších produktů. β -karoten a lykopen jsou rovněž velmi efektivní při zhášení singletového kyslíku. Jejich účinnost se ještě zvyšuje v přítomnosti tokoferolů, které chrání karoteny před oxidací [37].

2.2.4 Fenolické sloučeniny

Fenolické látky, zejména polyfenoly, jsou nejpočetnější skupinou antioxidantů v rostlinné říši. Jejich společným strukturním znakem je přítomnost jednoho či více benzenových jader substituovaných nejméně jednou hydroxylovou skupinou. Pokud je těchto skupin ve struktuře více, pak hovoříme o polyfenolech. Právě počet a umístění hydroxylových skupin je jedním z hlavních faktorů, který ovlivňuje antioxidační aktivitu. K jejímu zvýšení přispívá také přítomnost dalších substitucí aromatického kruhu, zejména substituce alkylovými skupinami v *o*- nebo *p*-poloze. Podle řady studií jsou fenolické sloučeniny účinnějšími antioxidanty než vitamin E, C a karotenoidy [38], [39].

Antioxidační účinek fenolických sloučenin je přičítán několika mechanismům. Jedním z nich je přímá reakce s volnými radikály, jejíž podstata je obdobná jako u vitamínu C a E. Fenolické látky při této reakci poskytují peroxylovým, alkoxylovým, případně dalším radikálům atom vodíku, čímž přerušují řetězovou radikálovou reakci. Samy se přitom přeměňují na málo reaktivní fenoxylový radikál nebo neradikálové chinoidní struktury. Flavonoidy a některé další polyfenoly mohou inhibovat enzymy, které jsou zodpovědné za produkci volných radikálů. Řada polyfenolů je navíc schopna vytvářet chelátové vazby s kovy, zejména s dvojmocným železem a mědí, které se účastní tvorby reaktivních kyslíkových radikálů. [38], [40].

Vzhledem k tomu, že fenolické sloučeniny tvoří velmi rozmanitou skupinu látek, lze se v literatuře setkat s různými variantami jejich klasifikace. K nejčastějším patří rozdělení podle struktury uhlíkového skeletu, kdy jsou rozeznávány tyto hlavní třídy: fenolické kyseliny, flavonoidy a méně rozšířené stilbeny a lignany [41].

2.2.4.1 Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny se rozdělují na dvě základní skupiny, a to deriváty kyseliny hydroxybenzoové a deriváty kyseliny hydroxyskořicové. Z derivátů kyseliny benzoové jsou nejvýznamnější kyselina *p*-hydroxybenzoová, protokatechová, gallová, vanilová a syringová. Obvykle ve vyšších koncentracích se vyskytují deriváty kyseliny skořicové, které jsou považovány za silnější antioxidanty. K nejběžnějším patří kyselina kávová, ferulová, sinapová a *p*-kumarová. Volné formy uvedených kyselin se v rostlinných materiálech vyskytují jen velmi málo, mnohem více jsou přítomny jejich estery, glykosidy a amidy. Do této skupiny lze zařadit také kondenzované třísloviny, v nichž jsou fenolické kyseliny esterifikovány polyhydroxysloučeninami, nejčastěji glukózou [36], [42].

2.2.4.2 Flavonoidy

Flavonoidy tvoří velmi rozsáhlou skupinu fenolických sloučenin. V přírodě bylo identifikováno více než 10 000 flavonoidních látek a stále jsou objevovány další. Jejich základní stavební jednotkou je flavan, který se skládá ze dvou benzenových jader spojených pyranovým kruhem. Vyskytují se jako volné nebo častěji ve formě glykosidů. Flavonoidy jsou značně diskutovány pro své příznivé účinky na lidské zdraví, které mají souvislost zejména s jejich silnou antioxidační aktivitou. Ta je u některých flavonoidních látek až 50x vyšší

než u vitamínu C a E. Bylo prokázáno, že flavonoidy mají rovněž protizánětlivé, antivirové, antialergické a antitrombotické účinky. Podle chemické struktury lze flavonoidní látky dále rozdělit do těchto kategorií: flavonoly, flavony, flavanony, izoflavony, antokyanidiny, flavanoly a chalkony [34], [43], [44].

Flavonoly a flavony jsou velmi rozšířenými žlutými barvivy rostlin. Mezi nejběžnější flavonoly patří kvercetin, kaempferol a myricetin, jež se vyskytují především jako glykosidy. Významným glykosidem kvercetinu je rutin, který chrání kyselinu askorbovou před oxidací katalyzovanou kovovými ionty. O něco méně se v rostlinách vyskytují flavony, jejichž hlavními zástupci jsou glykosidy apigeninu a luteolinu [13], [45].

Flavanony jsou bezbarvé až světle žluté sloučeniny, které se ve významnějších koncentracích nacházejí pouze v citrusových plodech. Mezi nejvýznamnější flavanony patří naringenin, který je hlavní složkou glykosidů v grapefruitech, a hesperetin tvořící hlavní součást glykosidů pomerančů a citronů [13], [45].

Izoflavony jsou kromě silné antioxidační aktivity významné především svými estrogenními účinky, některé vykazují také antimikrobní účinky. Jejich výskyt je omezen téměř výhradně na luštěniny, zejména sóju, kde jsou zastoupeny především daidzein, genistein, glycitein a jejich glykosidy. Nejaktivnějším antioxidantem je daidzein [46].

Antokyanidiny a zvláště jejich glykosidy antokyaniny jsou jedny z nejrozšířenějších polyfenolických látek a velmi často jsou hlavním nositelem barvy rostlinných materiálů. Jedná se o oranžová, červená, fialová a modrá barviva, která jsou rozpustná ve vodě. K nejvýznamnějším patří pelargonidin, kyanidin, delfinidin, peonidin, petunidin a malvidin [34].

Flavanoly jsou bezbarvé sloučeniny, jejichž základní strukturní složku tvoří flavan-3-ol. Monomery se označují jako katechiny, polymerní formy se nazývají proantokyanidiny. Katechin a epikatechin jsou hlavními flavanoly ovoce, zatímco v luštěninách, hroznech révy vinné a především v čaji jsou nejvíce zastoupeny gallokatechin a epigallokatechin [45].

Chalkony nejsou v rostlinné říši příliš zastoupeny, mají však význam jako barviva květů mnoha rostlin, dřevní hmoty stromů a semen luštěnin. K nejznámějším patří butein, izobutrin a koreopsin [13].

2.2.4.3 *Stilbeny*

Jako stilbeny jsou označovány *cis*- a *trans*-izomery 1,2-difenyletylenu. Vedle antioxidačních vlastností vykazují i estrogenní účinky a lze je proto zařadit rovněž mezi fytoestrogeny. V porovnání s ostatními skupinami fenolických sloučenin jsou v rostlinné říši zastoupeny mnohem méně. V literatuře nejvíce diskutovaným stilbenem je resveratrol, který je obsažen zejména ve slupkách bobulí modrých odrůd révy vinné. Již delší dobu je známo, že resveratrol snižuje riziko srdečních onemocnění a v současné době jsou intenzivně zkoumány jeho antikarcinogenní účinky [47], [48].

2.2.4.4 *Lignany*

Lignany jsou difenolické látky, které patří rovněž do skupiny fytoestrogenů. Nejvíce lignanů se nachází v semenech lnu, která obsahují sekoizolariciresinol (až 3,7 g.kg⁻¹ sušiny) a v menším množství matairesinol. Dobrým zdrojem jsou i další olejnatá semena, luštěniny, obiloviny, ovoce a zelenina. Lignany byly také identifikovány jako hlavní antioxidační složka fenolické frakce olivového oleje. Podle provedených experimentálních studií vykazují lignany antikarcinogenní účinky, zejména proti rakovině prsu a prostaty [45], [49].

2.3 Antioxidanty luštěnin

Za antioxidační účinky luštěnin jsou zodpovědné především fenolické sloučeniny, z nichž převažují flavonoidy a fenolické kyseliny. Nicméně i vitamin C, ačkoliv je v luštěninách přítomen v malém množství, má poměrně vysoký podíl na jejich antioxidační kapacitě. V menší míře k ní přispívají také karotenoidy a vitamin E, který je v luštěninách zastoupen pouze tokoferoly [5]. Převážná část přítomných antioxidantů je soustředěna v osemení. Vyšší antioxidační účinky jsou zpravidla pozorovány u intenzivně zbarvených druhů luštěnin, jejichž osemení je bohaté na antokyanová barviva [30]. Zastoupení antioxidačních látek v semenech luskovin může být také značně ovlivněno technologickým zpracováním a klíčením. Zatímco u fazolí a hrachu se antioxidační aktivita klíčením podstatně zvyšuje, u čočky je naopak pozorován pokles [50].

V semenech většiny druhů fazolí byly jako hlavní antioxidanty identifikovány flavonoly kaempferol v rozmezí 13,8 – 209,4 µg.g⁻¹ a kvercetin v rozmezí 6,9 – 23,5 µg.g⁻¹. Z fenolických kyselin byly nalezeny především kávová, vanilová, ferulová, *p*-kumarová a sinapová [5]. V osemení červených fazolí byla prokázána přítomnost antokyanů kyanidin-3-

glykosidu a pelargonidin-3-glykosidu. Z antokyanů černých fazolí tvoří 56 % delphinidin-3-glykosid, 26 % petunidin-3-glykosid a 18 % malvidin-3-glykosid [30]. V naklíčených fazolích byly objeveny izoflavony daidzein a genistein [50].

Osemení čočky je bohaté zvláště na katechiny a jejich polymery proantokyanidiny, v menším množství jsou obsaženy glykosidy kvercetinu, myricetinu, luteolinu a apigeninu. Z katechinů je nejvíce zastoupen (+)-katechin-3-glukóza, (+)-katechin a (-)-epikatechin. V kotyledonech jsou přítomny hlavně fenolické kyseliny, z nichž převažuje *p*-hydroxybenzoová. Zajímavé bylo zjištění, že osemení čočky obsahuje také stilben *trans*-resveratrol-5-glykosid [5], [50].

V hrachu setém jsou převažujícími antioxidanty flavonoly a fenolické kyseliny. Amarowicz a Troszynska uvádí obsah kaempferolu $0,51 \text{ mg.g}^{-1}$ a kvercetinu $0,14 \text{ mg.g}^{-1}$. Dále zjistili, že semena hrachu průměrně obsahují $0,32 \text{ mg.g}^{-1}$ kyseliny ferulové, $0,07 \text{ mg.g}^{-1}$ kyseliny vanilové, $0,07 \text{ mg.g}^{-1}$ kyseliny sinapové, $0,06 \text{ mg.g}^{-1}$ kyseliny *p*-kumarové a $0,02 \text{ mg.g}^{-1}$ kyseliny kávové [51].

Z antioxidantů cizrny jsou nejvýznamnější flavonoly kvercetin, kaempferol a myricetin. Prokázány byly také izoflavony genistein a daidzein, jsou však přítomny pouze v malém množství v porovnání se sójou, která má 15x vyšší obsah genisteinu a 28x vyšší obsah daidzeinu. Dále byly v extraktech cizrny identifikovány deriváty kyseliny benzoové a skořicové, přičemž v syrové i vařené cizrně převládaly kyseliny chlorogenová, gallová a *p*-kumarová [5].

3 MOŽNOSTI STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY

Prohloubení poznatků o roli antioxidantů v prevenci řady onemocnění a jejich schopnosti zpomalovat procesy stárnutí vedlo k rozvoji metodiky pro posouzení antioxidační aktivity různých přírodních látek. Jednou z možností je testování reaktivity individuálních izolovaných látek vůči jednotlivým volným radikálům. Většinu přírodních antioxidantů však přijímáme v potravě jako součást složitých směsí, jejichž složky mohou reagovat s různými radikály různými mechanismy a mohou se též vzájemně ovlivňovat. Proto je často snaha charakterizovat antioxidační aktivitu směsných vzorků i jako celku [6], [27].

Pro vzájemné porovnávání antioxidačních účinků různých směsí byl v souvislosti s analýzou potravinových vzorků zaveden pojem celková antioxidační aktivita (TAA – total antioxidant activity), která kvantifikuje kapacitu vzorku biologického materiálu eliminovat volné radikály [6].

3.1 Extrakce

Vlastnímu stanovení antioxidační aktivity vždy předchází izolace cílových složek z biologického materiálu. Běžně používanou separační technikou je extrakce, při níž látky obsažené ve vzorku postupně přechází do vhodného extrakčního činidla. Účinnost extrakce závisí na několika faktorech, jako jsou polarita extrakčního rozpouštědla, velikost částic analyzovaného materiálu, teplota, čas a další extrakční podmínky. Zásadní význam má volba extrakčního činidla. Přírodní antioxidanty jsou strukturálně různé látky a mají proto také různou polaritu, přičemž většina je jen mírně rozpustná ve vodě. Pro izolaci polárnějších antioxidantů se používají obvykle vodné roztoky metanolu, etanolu a acetonu, zatímco méně polární sloučeniny vyžadují použití etylacetátu nebo chloroformu. Z tohoto důvodu nelze určit jedno univerzální extrakční činidlo, které by bylo vhodné pro extrakci všech antioxidačních složek přítomných v analyzované matici [34], [52].

Extrakce antioxidantů z pevných rostlinných materiálů jako je ovoce, zelenina, luštěniny či obiloviny, se nejčastěji provádí pomocí vody nebo vodných roztoků organických rozpouštědel. Pro extrakci antioxidantů luštěnin byla v různých experimentálních studiích vyzkoušena již celá řada extrakčních činidel, jako např. absolutní metanol, 80% metanol, 70% metanol, absolutní etanol, 80% etanol, 70% etanol, 80% aceton, 70% aceton, 70% aceton s přidávkem kyseliny octové a další varianty. Konkrétní důvody pro výběr těchto rozpouš-

tědel však nebyly uvedeny. Proto nebyl vliv zvoleného extrakčního činidla na kvalitu extrakce a následné stanovení antioxidační aktivity dosud uspokojivě objasněn [30], [53].

Kromě různých extrakčních rozpouštědel existují také různé varianty vlastního provedení extrakce. Běžně se uplatňuje extrakce statická, při níž se vhodně upravený vzorek po přidání extrakčního činidla ponechá po dobu několika hodin stát. Účinnější je extrakce dynamická, která je nejčastěji realizována třepáním vzorků na laboratorní třepačce. Někteří autoři uvádí také použití magnetického míchadla. Někdy se můžeme setkat i s kombinací uvedených postupů, kdy se vzorek nejprve extrahuje dynamicky a poté se ponechá ještě několik hodin stát. Optimální doba průběhu extrakce není přesně stanovena, v praxi se však nejčastěji volí 24 až 48 hodin. Všechny další podmínky extrakce by měly být takové, aby nedocházelo k nadměrné oxidaci analyzovaného materiálu, působení vysokých teplot, enzymatickým reakcím a jiným chemickým změnám cílových sloučenin [34], [53], [54].

3.2 Metody stanovení antioxidační aktivity

V literatuře byla popsána již řada metod používaných ke stanovení antioxidační aktivity. Protože přírodní antioxidanty mohou působit různými mechanismy, jsou také postupy hodnotící míru antioxidačního působení založeny na různých principech. V zásadě je lze rozdělit do dvou skupin – na metody hodnotící schopnost vzorku eliminovat radikály a dále na metody posuzující redoxní vlastnosti látek [6], [55].

Metody založené na hodnocení schopnosti eliminovat radikály využívají buď syntetické stabilní radikály (ABTS, DPPH) nebo kyslíkové radikály (např. metoda ORAC). Zvláštní skupinou jsou metody testující schopnost inhibovat či zpomalovat peroxidaci lipidů. Metody hodnotící redoxní vlastnosti látek vycházející z faktu, že neenzymové antioxidanty fungují jako redukční činidla a při reakci s oxidanty jsou schopny je redukcí inaktivovat (např. metoda FRAP) [6], [27].

3.2.1 Metoda ABTS

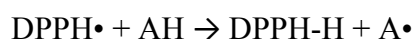
Tato metoda patří pro svou jednoduchost, rychlost a spolehlivost k nejpoužívanějším metodám stanovení celkové antioxidační aktivity. Je založená na schopnosti testované látky zhášet syntetický stabilní kation-radikál $ABTS^{++}$ (2,2'-azinobis(3-etyl-2,3-dihydrobenzotiazol-6-sulfonát)). V reakční směsi se kation-radikál $ABTS^{++}$ generuje oxidací. Běžně se používá systém $ABTS/H_2O_2$ /peroxidáza nebo $ABTS$ /metmyoglobin/ H_2O_2 .

Využit lze rovněž chemickou oxidací ABTS, např. peroxodisíranem draselným nebo oxidem manganičitým. Vzorek antioxidantu se do reakční směsi přidává buď již při generování radikálu, častěji je však přidáván až po jeho vytvoření. Zhášení radikálu $ABTS^{•+}$ se sleduje spektrofotometricky na základě změn absorpčního spektra (reakční směs se odbarvuje). Úbytek absorbance se měří zpravidla při vlnové délce 734 nm [6], [56].

TAA je hodnocena parametrem TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), který vyjadřuje antioxidační kapacitu vzorku ekvivalentní definovanému množství syntetického derivátu vitamínu E s názvem Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2- karboxylová kyselina). Pro čisté látky je TEAC definována jako milimolární koncentrace Troloxu mající stejnou antioxidační aktivitu jako testovaná látka při koncentraci 1 mmol.l^{-1} . Pro směsi TEAC udává koncentraci Troloxu v mmol.l^{-1} , která je rovná antioxidační aktivitě vzorku [6].

3.2.2 Metoda DPPH

Metoda používající DPPH je jednou ze základních metodik pro posouzení antiradikálové aktivity čistých látek i různých směsí. Princip spočívá v reakci vzorku se stabilním syntetickým radikálem DPPH (1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl). V radikálové formě je DPPH zbarven do tmavě fialova a vykazuje silnou absorpci v UV/VIS spektru. Při reakci s antioxidantem (AH) nebo radikálem ($R•$) je redukován na DPPH-H (difenylpikrylhydrazin) či jinou stabilní formu, což se projevuje odbarvením roztoku [57]:



Pokles absorbance je měřen po uplynutí dané doby spektrofotometricky při vlnové délce 515 nm. Reakci lze sledovat i metodou elektronové spinové rezonance nebo HPLC. Použití detekce HPLC, při níž je hodnocen pík radikálu DPPH, je výhodné především u barevných vzorků, kdy se na rozdíl od spektrofotometrie zbarvení vzorků eliminuje. Antioxidační aktivitu zjištěnou metodou DPPH lze vyjádřit několika způsoby. U směsných vzorků se nejčastěji uvádí v jednotkách standardu Troloxu nebo v ekvivalentech kyseliny askorbové. Běžně se získané hodnoty vyjadřují parametrem IC50, který udává množství antioxidantu, jež má schopnost eliminovat 50 % radikálu DPPH [57], [58].

3.2.3 Metoda ORAC

Metoda ORAC hodnotí schopnost analyzované látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci. Detekce spočívá ve sledování úbytku fluorescence proteinu v důsledku ztráty jeho konformace, která je způsobena poškozením kyslíkovými radikály. Peroxylové radikály se generují pomocí sloučeniny AAPH (2,2'-azobis-(izobutyrimidamid)-dihydrochlorid), hydroxylové radikály jsou generovány systémem $H_2O_2 + Cu^{2+}$. V původní metodě ORAC je používán protein β -fykoerytrin, který však má při stanovení antioxidační kapacity polyfenolů určitá omezení, jako jsou nízká fotostabilita či nežádoucí interakce s fenolickými látkami. Pro zpřesnění metody byl proto jako vhodnější fluorescenční sonda navržen fluorescein [27], [59].

3.2.4 Metody hodnotící eliminaci lipidové peroxidace

K hodnocení vlivu antioxidantů na lipidovou peroxidaci bylo vyvinuto mnoho metod, od jednoduchých, které jsou prováděny s jednoduchými lipidy a v jednoduchých fázových systémech, až po složitější biologické modely simulující situaci *in vivo*. K nejjednodušším patří metody založené na detekci produktů peroxidace linolové kyseliny, jejímž iniciátorem je obvykle AAPH. Produkty peroxidace jsou sledovány spektrofotometricky při vlnové délce 234 nm. Pro stanovení TAA se často používá spřažená oxidace linolové kyseliny a β -karotenu vzdušným kyslíkem. Antioxidační účinek látek je hodnocen spektrofotometricky při 470 nm podle spotřeby β -karotenu [6], [27].

Jednou z nejpoužívanějších metod je TBA-MDA. Princip spočívá ve stanovení jednoho ze sekundárních produktů lipidové peroxidace malondialdehydu (MDA) na základě jeho barevné reakce s tiobarbiturovou kyselinou (TBA). Reakce je detekována spektrofotometricky při vlnové délce 532 nm. Pro vyšší specifičnost metody se používá detekce pomocí HPLC [6].

3.2.5 Metoda FRAP

Metoda je založena na redoxní reakci, při níž antioxidační složky vzorku redukují železité komplexy TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin)), ferrikyanid aj., které jsou téměř bezbarvé. Redukcí vznikají barevné železnaté produkty (např. berlínská modř) a je sledováno zvýšení absorbance při 593 nm, které je mírou antioxidační aktivity vzorku. Výsledky jsou vztahovány na ekvivalentní množství standardu, kterým je obvykle Trolox, kyselina gallo-

vá či epikatechin. Metoda však má určitá omezení, která spočívají v tom, že měření probíhá při nefyziologicky nízkém pH (3,6) a nejsou zachyceny s komplexem pomalu reagující polyfenoly a tioly. Vznikající Fe^{2+} je navíc *in vivo* jedním z reaktantů Fentonovy reakce. Metoda FRAP tak vyjadřuje pouze schopnost látek redukovat železité ionty a s celkovou antioxidační aktivitou vzorku nemusí pozitivně korelovat [6], [60].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo nalézt nejvhodnější extrakční postup pro stanovení antioxidační aktivity vybraných druhů luštěnin metodami ABTS a DPPH. Pro dosažení tohoto cíle byla provedena literární rešerše, na jejímž základě byly navrženy extrakční postupy pro stanovení antioxidační aktivity luštěnin. Zvolené postupy byly v rámci laboratorního měření aplikovány na vybrané vzorky luštěnin a následně byla stanovena antioxidační aktivita metodami ABTS a DPPH. Získané výsledky byly statisticky vyhodnoceny a diskutovány s podobně zaměřenými pracemi.

5 METODIKA PRÁCE

5.1 Chemikálie

Metanol (Ing. Petr Lukeš, ČR)

Etanol (Ing. Petr Lukeš, ČR)

Aceton (Ing. Petr Lukeš, ČR)

ABTS diamonná sůl (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina octová (Penta, ČR)

Octan sodný trihydrát (Penta, ČR)

Peroxodisíran draselný (Ing. Petr Lukeš, ČR)

DPPH (Sigma-Aldrich, Německo)

Trolox (Sigma-Aldrich, Německo)

5.2 Přístroje a pomůcky

Elektrický mlýnek COMBI STAR (Waldner Biotech, Rakousko)

Laboratorní třepačka LT2 (Kavalier, ČR)

Spektrofotometr Libra S6 (Biochrom Ltd., Velká Británie)

Analytické váhy Voyager Pro VP214C (Ohaus, Švýcarsko)

Předvážky KB600-2 (Kern & Sohn, Německo)

Běžné laboratorní sklo a pomůcky

5.3 Analyzované vzorky

Pro účely této diplomové práce byli vybráni hlavní zástupci napříč luštěninami, tzn. čočka, hrách, fazole a cizrna. U čočky a fazolí byly zvoleny barevnější druhy, u nichž se očekává vysoká antioxidační aktivita. Konkrétně bylo pro analýzu vybráno těchto 6 vzorků: čočka beluga (černá), čočka červená, cizrna, hrách zelený, fazole adzuki a fazole mungo. Luštěniny byly zakoupeny v prodejně zdravé výživy ve Zlíně. Do provedení analýzy byla zakoupená spotřebitelská balení uchovávána za předepsaných podmínek, tj. v suchu, temnu,

chladu a relativní vlhkosti do 70 %. Bližší charakteristika vzorků je uvedena v Tab. 1. Fotografie analyzovaných luštěnin byly vloženy do přílohy P I.

Tab. 1. Charakteristika analyzovaných vzorků luštěnin

Označení	Název	Hmotnost balení	Distribuce	Země původu
A	Čočka beluga (černá)	500 g	Davert	Kanada
B	Čočka červená neloupaná	500 g	Zdraví z přírody	Turecko
C	Cizrna, římský hrách	500 g	Zdraví z přírody	Kanada
D	Hrách zelený loupaný půlený	500 g	Zdraví z přírody	Kanada
E	Mungo fazole barevná	500 g	Zdraví z přírody	Čína
F	Fazole adzuki	500 g	Zdraví z přírody	Čína

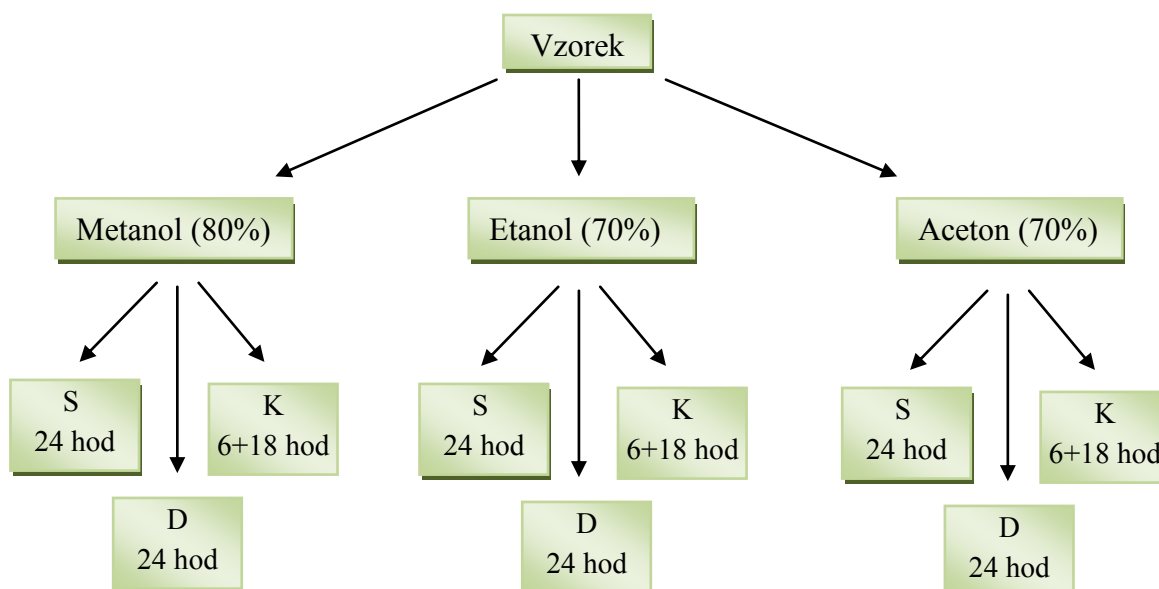
5.4 Příprava a extrakce vzorků

Vzorky luštěnin byly pro účinnější extrakci upraveny rozemletím v mlýnku na jemný prášek. Do provedení vlastní analýzy byly takto zpracované vzorky uchovávány v uzavřených lahvičkách z tmavého skla za předepsaných podmínek po dobu nejdéle jednoho týdne.

Pro účely extrakce byl do suchých a čistých tmavých lahviček odvážen na analytických vahách 1 g vzorku, přičemž každý druh luštěniny byl extrahován ve třech vyhotoveních. Ke každé navážce bylo přidáno 10 ml příslušného extrakčního činidla. K extrakci byla zvolena tři extrakční činidla, která byla po prostudování odborných prací vyhodnocena jako nejčastěji používaná, a to sice 80% vodný roztok metanolu, 70% vodný roztok etanolu a 70% vodný roztok acetonu. Dále byly zvoleny tři různé způsoby vlastního provedení extrakce – statická, dynamická a jejich kombinace. Při extrakci statické se vzorky ponechaly stát po dobu 24 hodin na temném místě při laboratorní teplotě. Extrakce dynamická byla realizována třepáním vzorků na laboratorní třepače v temnu opět po dobu 24 hodin. Při kombinované extrakci byly vzorky nejprve po dobu 6 hodin v temnu třepány a posléze umístěny na temné místo, kde se ponechaly 18 hodin stát. Zvolené extrakční postupy jsou modifikací

metodiky podle Xu a Changa, 2007 [53], Nithiyantham et al., 2012 [61] a Loganayaki et al., 2011 [62]. Pro lepší názornost je postup extrakce vzorků schematicky znázorněn na Obr. 1.

Po skončení extrakce byl každý vzorek přefiltrován přes filtrační papír o velikosti pórů 3 μm a získané filtráty byly odebírány pro jednotlivá stanovení.



Pozn.: S – statická extrakce, D – dynamická extrakce, K – kombinovaná extrakce

Obr. 1. Schéma postupu extrakce vzorků

5.5 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Kation-radikál $\text{ABTS}^{+\cdot}$ byl generován reakcí ABTS diammonné soli s peroxodisíranem draselným. Rozpuštěním 0,018 g ABTS v 10 ml destilované vody byl připraven roztok o výsledné koncentraci 3,5 mmol.l^{-1} . Roztok peroxodisíranu draselného byl připraven rozpuštěním 0,162 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ v 10 ml destilované vody na konečnou koncentraci 0,06 mmol.l^{-1} . Roztoky byly smíchány v poměru 50:1 (ABTS: $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) a vzniklá směs byla ponechána po dobu 16 hodin ve tmě při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byla připravena reakční směs smícháním čerstvě připraveného octanového pufru o pH 4,3 s vygenerovaným radikálem $\text{ABTS}^{+\cdot}$ v poměru 39:1. Ke 12 ml reakční směsi bylo odpipetováno 150 μl extraktu

vzorku. Vzniklý roztok byl ponechán reagovat po dobu 30 minut v temnu při laboratorní teplotě a poté byl změřen spektrofotometricky úbytek absorbance při vlnové délce $\lambda = 734$ nm proti octanovému pufru (A_1). Při stejné vlnové délce byla změřena absorbance reakční směsi proti pufru (A_0). Úbytek absorbance byl vyjádřen v % podle vztahu:

$$\frac{A_0 - A_1}{A_0} \cdot 100$$

Výsledky byly dosazeny do rovnice regrese kalibrační křivky a přepočítány na ekvivalentní množství standardu Troloxu. Každá extrakce byla provedena ve třech opakováních a každé opakování následně třikrát proměřeno na spektrofotometru ($n = 9$).

5.5.1 Kalibrační křivka pro metodu ABTS

Ze zásobního roztoku Troloxu o koncentraci $0,04 \mu\text{mol} \cdot 25\mu\text{l}^{-1}$ byly ředěním s metanolem (resp. etanolem, acetonem) připraveny kalibrační řady roztoků o koncentraci $0,00125 - 0,04 \mu\text{mol} \cdot 25\mu\text{l}^{-1}$. Postup měření byl totožný jako při vlastním stanovení analyzovaných vzorků, pouze byly namísto nich k reakční směsi přidávány jednotlivé koncentrace standardu. Z naměřených hodnot absorbance byla sestavena kalibrační křivka závislosti úbytku absorbance v % na koncentraci Troloxu v $\text{nmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Každý bod kalibrační křivky byl proměřen 3x.

5.6 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Nejprve byl připraven zásobní roztok rozpuštěním $0,024$ g DPPH v metanolu (resp. etanolu, acetonu) ve 100 ml odměrné baňce. Smícháním 10 ml zásobního roztoku s 45 ml příslušného extrakčního činidla byl připraven pracovní roztok DPPH. K analýze bylo do kádinky pipetováno $450 \mu\text{l}$ extraktu vzorku a $8,55$ ml pracovního roztoku. Směs se ponechala reagovat po dobu 60 minut ve tmě při laboratorní teplotě a po uplynutí této doby byla spektrofotometricky změřena absorbance (A_1) při vlnové délce $\lambda = 515$ nm proti metanolu (resp. etanolu, acetonu). Stejným způsobem byla proměřena absorbance pracovního roztoku DPPH (A_0). Úbytek absorbance byl vyjádřen v % podle vztahu:

$$\frac{A_0 - A_1}{A_0} \cdot 100$$

Pomocí regresní rovnice kalibrační křivky byl úbytek absorbance převeden na ekvivalentní množství Troloxu. Každá extrakce byla provedena ve třech opakováních a každé opakování následně třikrát proměřeno na spektrofotometru ($n = 9$).

5.6.1 Kalibrační křivka pro metodu DPPH

Pro sestavení kalibrační křivky u metody DPPH byl jako standard použit rovněž Trolox, jehož rozpuštěním v metanolu (resp. etanolu, acetonu) byl připraven zásobní roztok o koncentraci 800 mg.l^{-1} . Ředěním byla sestavena kalibrační řada roztoků v rozsahu koncentrací $20 - 120 \text{ mg.l}^{-1}$ pro Trolox v metanolu, $20 - 80 \text{ mg.l}^{-1}$ v etanolu a $70 - 190 \text{ mg.l}^{-1}$ v acetonu. Jednotlivé koncentrace byly smíchány s pracovním roztokem DPPH a po 60 minutách stání ve tmě byla měřena absorbance směsi při vlnové délce $\lambda = 515 \text{ nm}$. Z naměřených hodnot byla sestavena kalibrační křivka závislosti úbytku absorbance v % na koncentraci Troloxu v mg.l^{-1} . Každý bod kalibrační křivky byl proměřen 3x.

5.7 Statistické vyhodnocení

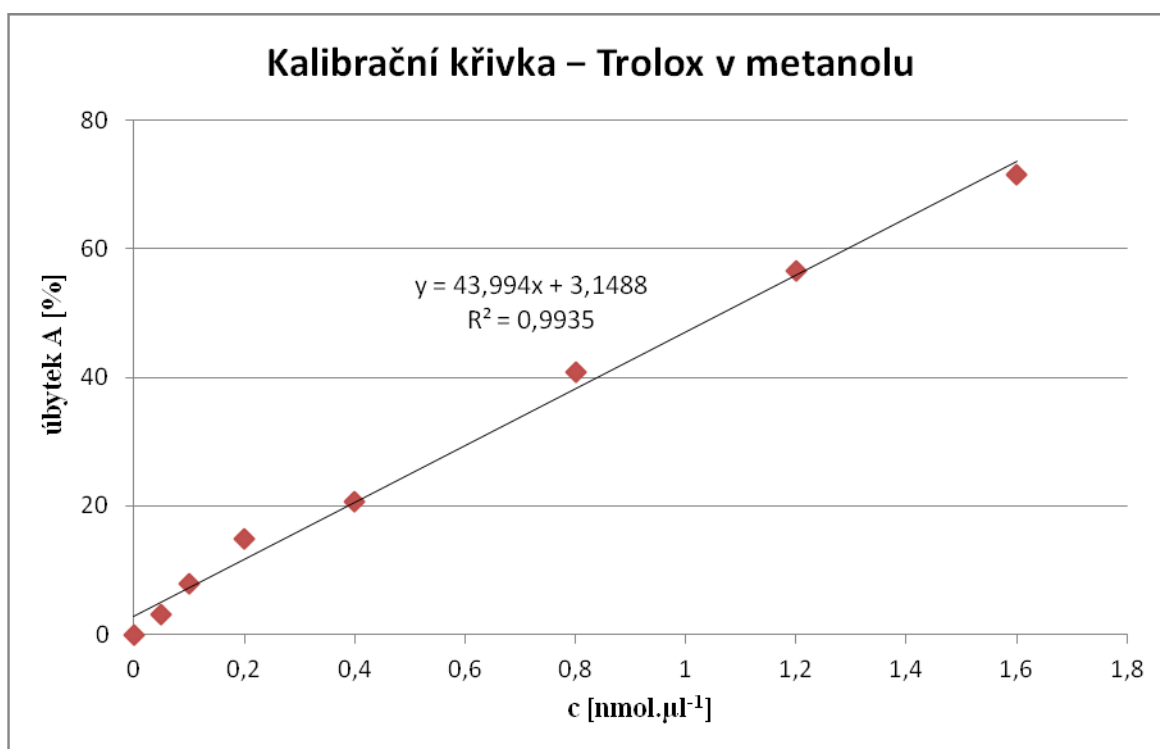
Všechny výsledky byly vyhodnoceny statistickým programem StatK25 na hladině významnosti 5 %. K hodnocení byl zvolen parametrický test srovnávající střední hodnoty dvou nezávislých výběrů. Směrodatné odchylky a variační koeficienty byly vypočítány v programu MS Excel.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

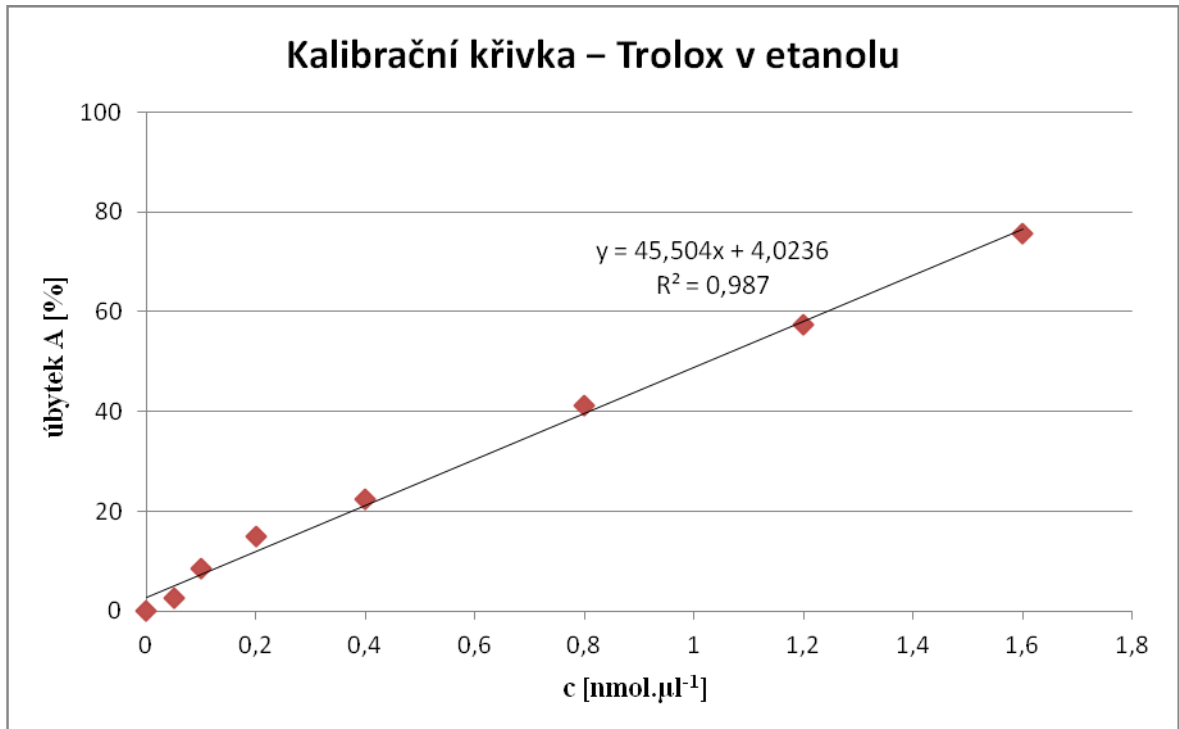
Ke stanovení celkové antioxidační aktivity extraktů luštěnin byly zvoleny metody hodnotící schopnost vzorku eliminovat syntetické stabilní radikály, a to metody ABTS a DPPH. Extrakce vzorků luštěnin byla provedena třemi různými extrakčními činidly a zároveň třemi různými způsoby dle metodiky popsané v kapitole 5.4. U získaných hodnot byl zjišťován vliv použitého extrakčního postupu na antioxidační aktivitu luštěnin.

6.1 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

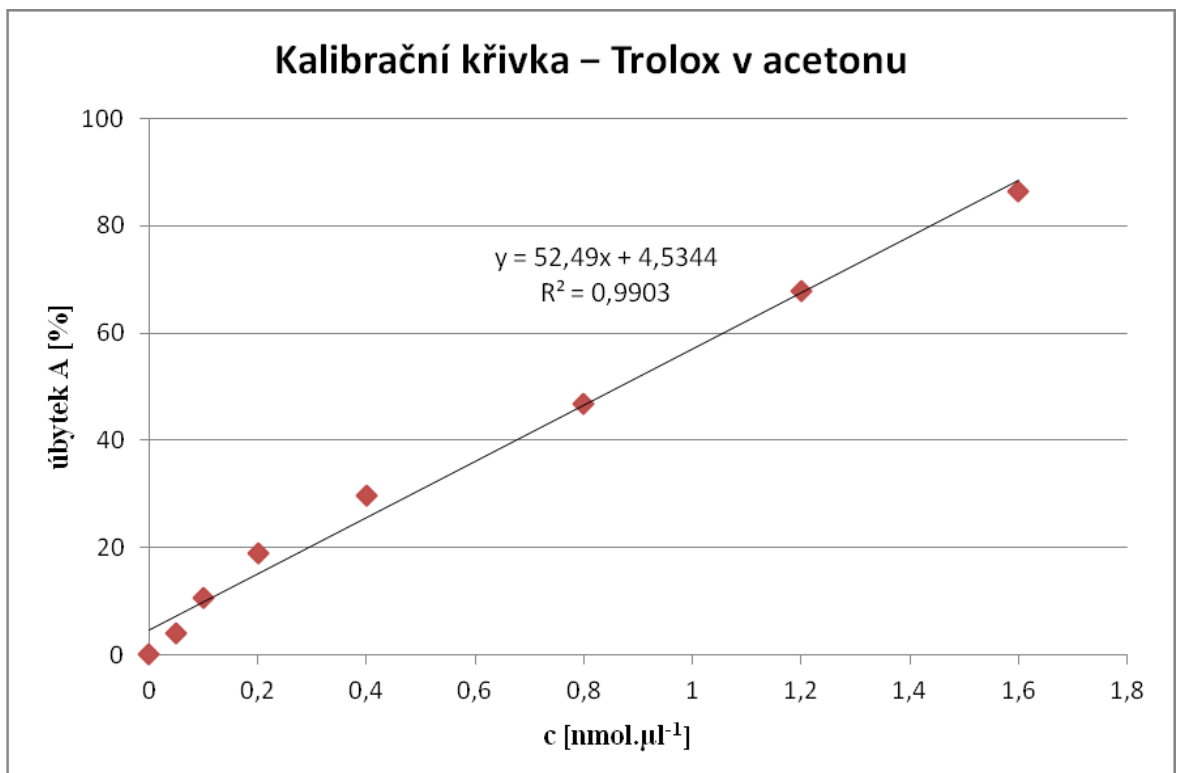
Antioxidační aktivita vzorků luštěnin byla stanovena metodou používající ABTS dle postupu uvedeném v kapitole 5.5. Kalibrace byla provedena na kalibrační řadu roztoků Troloxu v metanolu, resp. etanolu a acetonu. Kalibrační křivky zobrazující závislost úbytku absorbance na koncentraci Troloxu v metanolu, etanolu a acetonu, včetně rovnice regrese a korelačního koeficientu jsou uvedeny na Obr. 2. – 4.



Obr. 2. Kalibrační křivka Troloxu v metanolu pro metodu ABTS



Obr. 3. Kalibrační křivka Troloxu v etanolu pro metodu ABTS



Obr. 4. Kalibrační křivka Troloxu v acetonu pro metodu ABTS

Dosažením zjištěného úbytku absorpance jednotlivých vzorků luštěnin do regresní rovnice byla vypočtena antioxidační aktivita, která byla vyjádřena parametrem TEAC v mmol na 1 kg vzorku. Průměrné hodnoty antioxidační aktivity v závislosti na použitém extrakčním postupu jsou uvedeny v Tab. 2.

Z výsledků uvedených v Tab. 2 lze vyčíst, že nejvyšší antioxidační aktivitu ze všech analyzovaných luštěnin vykazovala čočka beluga, u níž byly naměřeny hodnoty v rozmezí 11,72 až 103,63 mmol.kg⁻¹. Nejvyšší hodnota byla získána u acetonového extraktu při kombinované a dynamické extrakci ($P \geq 0,05$), naopak nejnižší u metanolového extraktu při statickém provedení extrakce ($P < 0,05$). Dále následují fazole adzuki, u nichž byla zjištěna antioxidační aktivita v rozmezí 9,94 – 67,58 mmol.kg⁻¹. Nejvyšší hodnota byla zaznamenána u vzorku extrahovaného kombinovaně acetonem ($P < 0,05$), nejnižší pak u vzorku extrahovaného staticky etanolem. U čočky červené byly naměřeny hodnoty antioxidační aktivity v rozmezí 8,41 – 63,77 mmol.kg⁻¹. Nejvyšší hodnota byla získána u acetonového extraktu při kombinované extrakci ($P < 0,05$), naopak nejnižší u metanolového extraktu při statické extrakci ($P < 0,05$). Následují fazole mungo, u nichž byla zjištěna antioxidační aktivita v rozmezí 4,82 – 39,84 mmol.kg⁻¹, přičemž nejvyšší aktivita byla u extraktu acetonového při extrakci dynamické ($P < 0,05$), zatímco nejnižší opět u extraktu metanolového při extrakci statické ($P < 0,05$). U cizrny byla nejnižší hodnota 3,22 mmol.kg⁻¹ naměřena u vzorku extrahovaného staticky acetonem, naopak nejvyšší hodnota 7,19 mmol.kg⁻¹ u vzorku extrahovaného dynamicky metanolem ($P < 0,05$). Nejnižší antioxidační aktivitu vykazoval hrách zelený, a to v rozmezí 0,21 – 3,37 mmol.kg⁻¹. Nejvyšší hodnota byla zaznamenána u acetonového extraktu při dynamické extrakci ($P < 0,05$), nejnižší pak u etanolového extraktu při statické extrakci ($P < 0,05$).

Až na několik výjimek byly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi hodnotami antioxidační aktivity luštěnin v závislosti na použitém extrakčním činidle. U čočky belugy, čočky červené, mungo fazolí a fazolí adzuki byla nejvyšší antioxidační aktivita naměřena vždy u vzorků extrahovaných 70% acetonem, a to při statickém, dynamickém i kombinovaném provedení extrakce. Naopak nejnižší hodnoty byly zjištěny u vzorků extrahovaných 80% metanolem. Kromě toho si lze povšimnout, že rozdíly mezi hodnotami antioxidační aktivity acetonových extraktů a extraktů zbylých dvou činidel jsou u těchto druhů luštěnin dosti výrazné, zvláště v případě čočky belugy. Oproti tomu u hrachu zeleného a cizrny jsou rozdíly v antioxidační aktivitě mnohem menší.

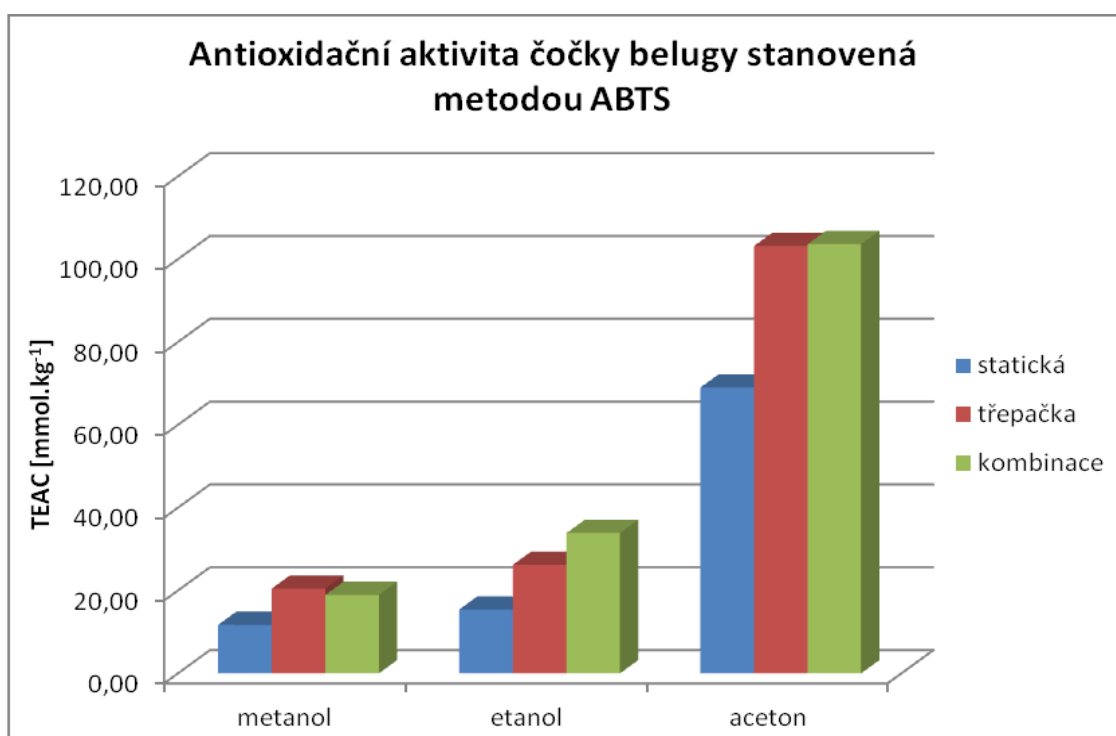
Tab. 2. Antioxidační aktivita vzorků luštěnin stanovená metodou ABTS

Vzorek	Typ extrakce	TEAC (mmol.kg ⁻¹)		
		80% metanol	70% etanol	70% aceton
Čočka beluga	S	11,72 ± 0,50 ^a A	15,42 ± 0,65 ^b A	69,01 ± 0,93 ^c A
	D	20,47 ± 1,04 ^a B	26,21 ± 0,24 ^b B	103,17 ± 0,62 ^c B
	K	18,93 ± 0,58 ^a C	33,87 ± 1,60 ^b C	103,63 ± 3,64 ^c B
Čočka červená	S	8,41 ± 0,48 ^a A	9,86 ± 0,15 ^b A	59,12 ± 2,01 ^c A
	D	12,85 ± 0,67 ^a B	21,60 ± 1,04 ^b B	60,49 ± 0,23 ^c A
	K	11,26 ± 0,61 ^a C	19,26 ± 1,11 ^b C	63,77 ± 0,13 ^c B
Cizrna	S	5,13 ± 0,20 ^a A	3,46 ± 0,18 ^b A	3,22 ± 0,15 ^b A
	D	7,19 ± 0,38 ^a B	5,44 ± 0,07 ^b B	4,92 ± 0,22 ^c B
	K	6,29 ± 0,37 ^a C	5,71 ± 0,23 ^b B	3,81 ± 0,17 ^c C
Hrách zelený	S	1,04 ± 0,05 ^a A	0,21 ± 0,01 ^b A	2,42 ± 0,11 ^c A
	D	1,78 ± 0,07 ^a B	1,95 ± 0,10 ^b B	3,37 ± 0,12 ^c B
	K	1,70 ± 0,08 ^a B	1,63 ± 0,09 ^a C	1,20 ± 0,06 ^b C
Mungo fazole	S	4,82 ± 0,27 ^a A	6,11 ± 0,23 ^b A	15,50 ± 0,05 ^c A
	D	7,23 ± 0,09 ^a B	9,60 ± 0,53 ^b B	39,84 ± 0,96 ^c B
	K	6,86 ± 0,14 ^a C	9,11 ± 0,28 ^b B	32,59 ± 1,09 ^c C
Fazole adzuki	S	10,36 ± 0,06 ^a A	9,94 ± 0,46 ^a A	45,85 ± 0,38 ^b A
	D	15,34 ± 0,02 ^a B	21,64 ± 0,07 ^b B	60,66 ± 2,43 ^c B
	K	14,47 ± 0,53 ^a B	18,11 ± 0,02 ^b C	67,58 ± 2,51 ^c C

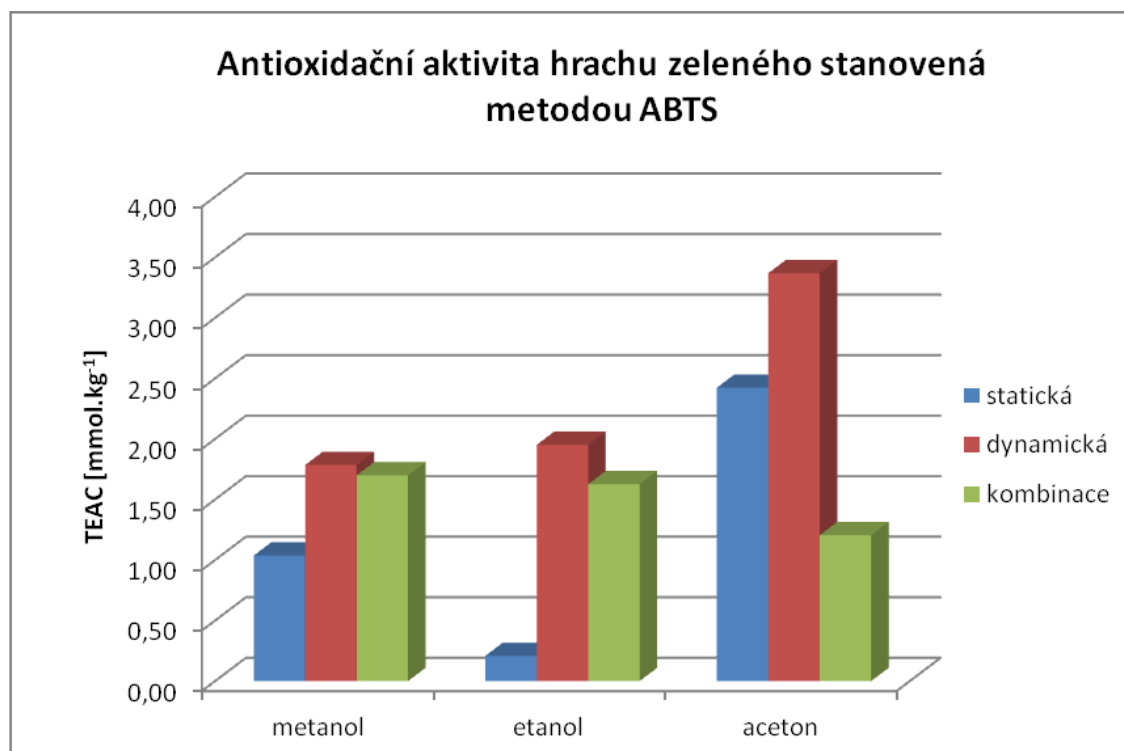
Pozn.: Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± SD (n = 9). Hodnoty ve sloupcích následované stejným velkým písmenem (vliv způsobu extrakce) se statisticky významně neliší ($P \geq 0,05$). Hodnoty v řádcích následované různým horním indexem (vliv extrakčního činidla) se statisticky významně liší ($P < 0,05$). Každý druh luštěniny byl statisticky hodnocen zvlášť.

U hrachu zeleného byl nejúčinnější rovněž aceton, avšak s výjimkou kombinované extrakce, při níž se jako nejúčinnější činidlo projevíly shodně metanol a etanol ($P \geq 0,05$). Zcela odlišná situace nastala v případě cizrny, u níž nejvyšší antioxidační aktivitu vykazovaly vzorky extrahované metanolem, nejnižší vzorky extrahované acetonem. Pro lepší názornost byly hodnoty antioxidační aktivity čočky belugy a hrachu zeleného v závislosti na použitém extrakčním postupu znázorněny také graficky na Obr. 5. a 6.

Vlivem různých rozpouštědel na extrakci antioxidantů cizrny a hrachu se zabývala studie Nithiyantham et al. [61]. Antioxidační aktivita byla stanovena metodou ABTS u vzorků extrahovaných zvláště 80% metanolem a 70% acetonem. V případě cizrny i hrachu se zjištěné hodnoty antioxidační aktivity metanolových a acetonových extraktů od sebe statisticky významně nelišily ($P \geq 0,05$). U námi stanovených hodnot cizrny a hrachu byly sice zaznamenány statisticky významné rozdíly, nicméně ve srovnání s ostatními druhy luštěnin byly tyto rozdíly minimální. To by mohlo naznačovat, že při extrakci antioxidantů cizrny a hrachu zeleného nehraje volba extrakčního činidla zásadní roli.



Obr. 5. Antioxidační aktivita čočky belugy metodou ABTS

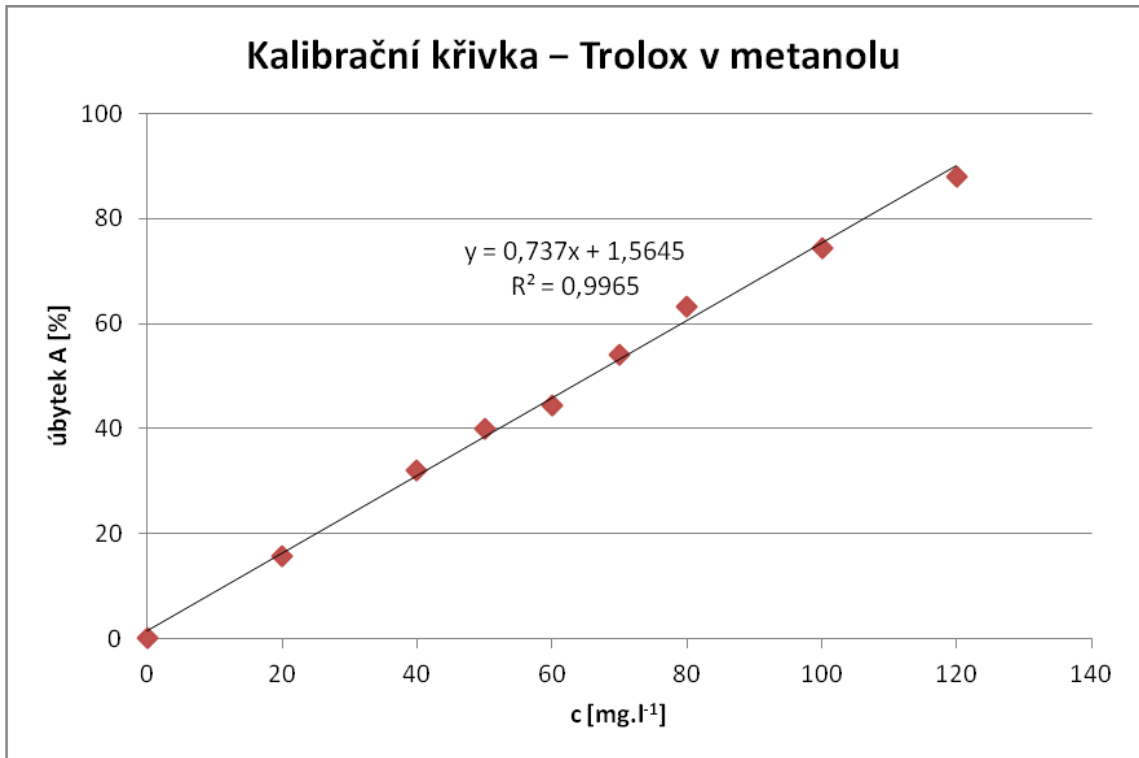


Obr. 6. Antioxidační aktivita hrachu zeleného metodou ABTS

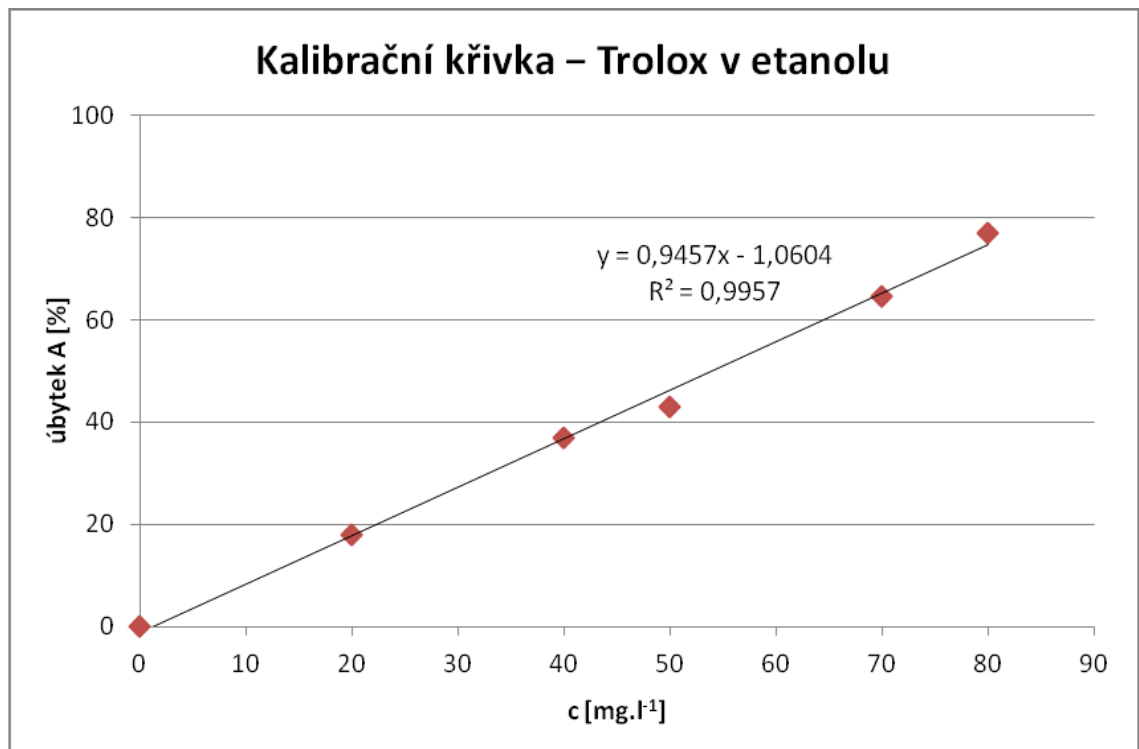
Co se týče způsobu provedení extrakce, i zde byly ve většině případů zaznamenány statisticky významné rozdíly v hodnotách antioxidační aktivity. Jako nejúčinnější se v tomto ohledu projevila extrakce dynamická, v řadě případů však byla stejně účinná nebo i účinnější extrakce kombinovaná. Oproti tomu nejméně efektivní byla extrakce provedená staticky. Tento výsledek byl předpokládán, protože při intenzivním pohybu dochází ke snadnějšímu přestupu látek do extrakčního činidla než při pouhém stání, kde působí jen difúze. To ve své publikaci potvrzují Dai a Mumper [63], kteří uvádí, že konvenční metody jako statická extrakce či Soxhletova extrakce prokazují nízkou účinnost při izolaci rostlinných antioxidantů ve srovnání s jinými metodami.

6.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

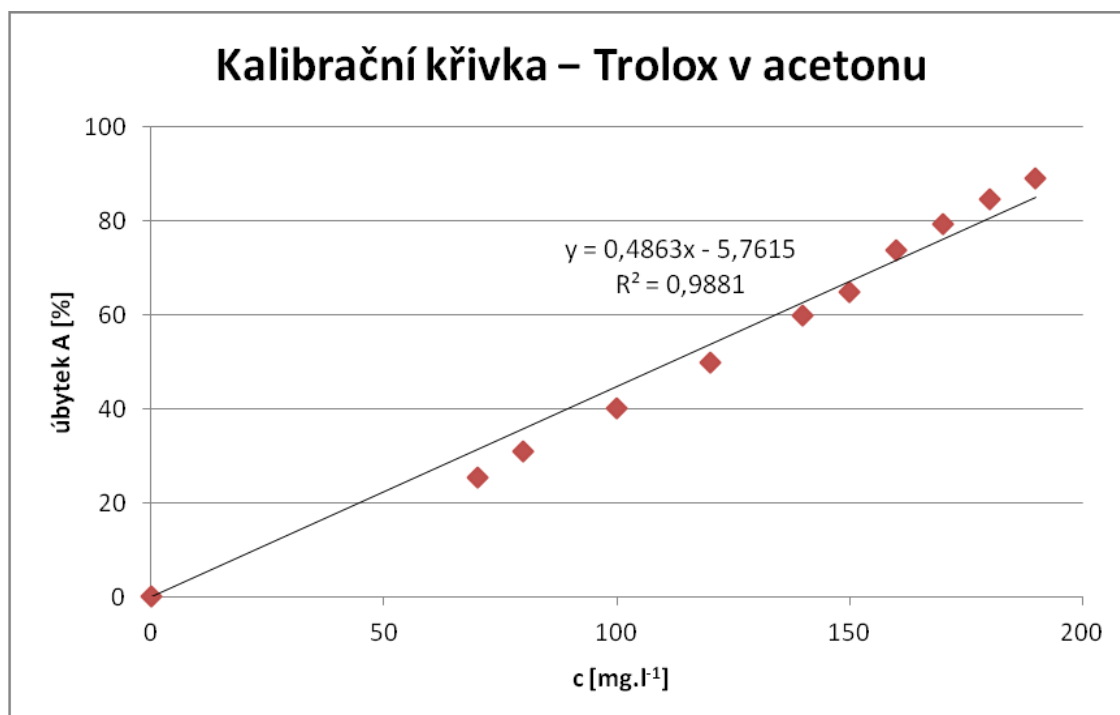
Ke stanovení antioxidační aktivity extraktů luštěnin byla použita také metoda DPPH, provedená postupem uvedeným v kapitole 5.6. Kalibrace byla provedena na kalibrační řadu roztoků Troloxu v metanolu, resp. etanolu a acetonu. Kalibrační křivky znázorňující závislost úbytku absorbance na koncentraci Troloxu v metanolu, etanolu a acetonu, včetně rovnice regrese a korelačního koeficientu jsou uvedeny na Obr. 7. – 9.



Obr. 7. Kalibrační křivka Troloxu v metanolu pro metodu DPPH



Obr. 8. Kalibrační křivka Troloxu v etanolu pro metodu DPPH



Obr. 9. Kalibrační křivka Troloxu v acetonu pro metodu DPPH

Po dosažení vypočítaného úbytku absorpance jednotlivých vzorků luštěnin do regresní rovnice byla vypočtena antioxidační aktivita, která byla vyjádřena jako ekvivalentní množství standardu Troloxu v mg na 1 kg vzorku. Průměrné hodnoty antioxidační aktivity analyzovaných druhů luštěnin v závislosti na použitém extrakčním činidle a způsobu provedení extrakce jsou uvedeny v Tab. 3.

Z hodnot uvedených v Tab. 3. je zřejmé, že metodou DPPH byla nejvyšší antioxidační aktivita zjištěna stejně jako v případě metody ABTS u čočky belugy, a to v rozmezí 758,95 – 19 629,36 mg.kg⁻¹. Následují fazole adzuki s antioxidační aktivitou v rozmezí 184,07 – 17 896,88 mg.kg⁻¹, čočka červená s hodnotami 777,30 – 16 332,24 mg.kg⁻¹ a mungo fazole s hodnotami 545,50 až 8 954,00 mg.kg⁻¹. U těchto druhů luštěnin byla nejvyšší antioxidační aktivita zjištěna u vzorků extrahovaných dynamicky za použití acetonu ($P < 0,05$), naopak nejnižší hodnota u vzorků extrahovaných staticky za použití metanolu ($P < 0,05$). Dále následuje hrách zelený s antioxidační aktivitou v rozmezí 262,89 – 581,78 mg.kg⁻¹. Nejvyšší hodnota byla opět zaznamenána u vzorku, který byl extrahován dynamicky acetonem ($P < 0,05$), nejnižší pak u vzorku extrahovaného staticky etanolem ($P < 0,05$). U cizrny byla nejvyšší hodnota 541,25 mg.kg⁻¹ naměřena při dynamické extrakci acetonem ($P < 0,05$), nejnižší hodnota 203,41 mg.kg⁻¹ při statické extrakci metanolem ($P < 0,05$).

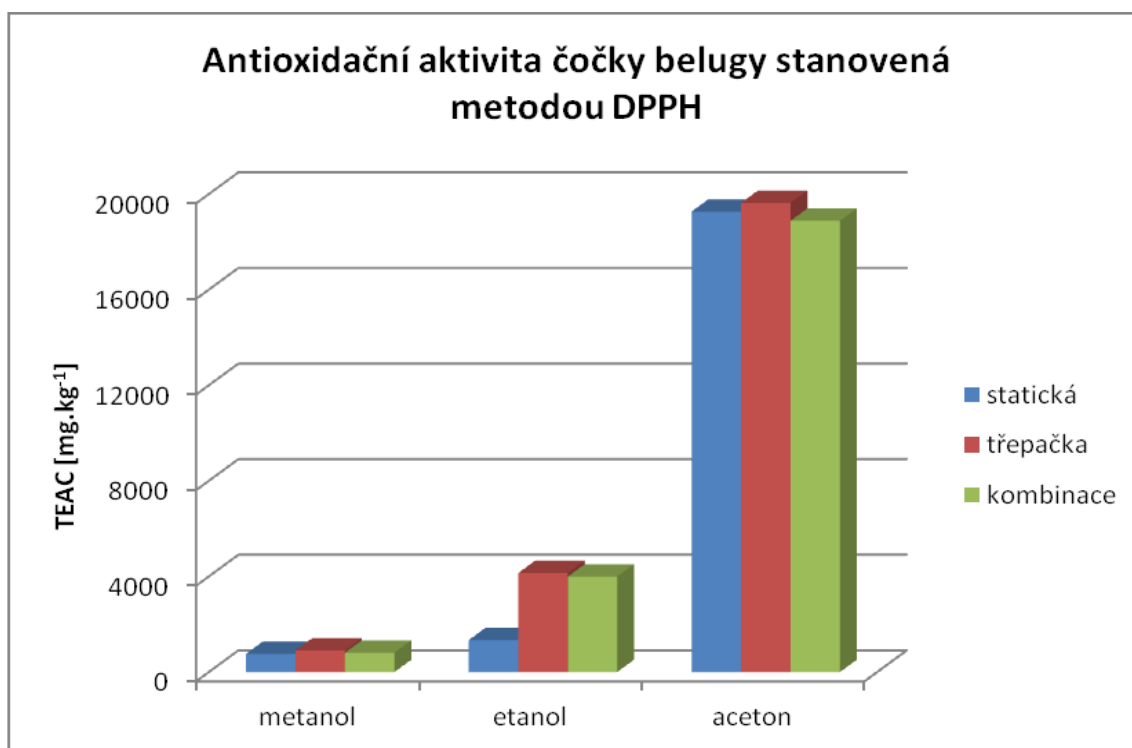
Tab. 3. Antioxidační aktivita vzorků luštěnin stanovená metodou DPPH

Vzorek	Typ extrakce	TEAC (mg.kg ⁻¹)		
		80% metanol	70% etanol	70% aceton
Čočka beluga	S	758,95 ± 37,64 ^a A	1337,45 ± 43,79 ^b A	19266,65 ± 55,78 ^c A
	D	900,59 ± 28,47 ^a B	4141,01 ± 99,59 ^b B	19629,36 ± 102,19 ^c B
	K	807,64 ± 5,34 ^a A	3991,96 ± 30,13 ^b C	18881,41 ± 645,97 ^c A,B
Čočka červená	S	777,30 ± 5,28 ^a A	1615,30 ± 84,01 ^b A	14291,26 ± 260,24 ^c A
	D	918,16 ± 18,61 ^a B	2617,29 ± 118,80 ^b B	16332,24 ± 150,96 ^c B
	K	860,98 ± 11,11 ^a C	2078,35 ± 17,40 ^b C	15299,46 ± 134,83 ^c C
Cizrna	S	203,41 ± 6,66 ^a A	325,47 ± 11,66 ^b A	508,64 ± 5,34 ^c A
	D	419,01 ± 12,06 ^a B	488,95 ± 11,99 ^b B	541,25 ± 4,63 ^c B
	K	419,51 ± 20,99 ^a B	447,27 ± 2,97 ^a C	517,33 ± 5,76 ^b A
Hrách zelený	S	370,54 ± 18,35 ^a A	262,89 ± 9,40 ^b A	427,40 ± 3,89 ^c A
	D	491,36 ± 11,32 ^a B	414,01 ± 11,76 ^b B	581,78 ± 19,97 ^c B
	K	423,16 ± 22,93 ^a C	337,55 ± 6,23 ^b C	500,33 ± 5,17 ^c C
Mungo fazole	S	545,50 ± 26,99 ^a A	706,44 ± 14,27 ^b A	6741,13 ± 309,46 ^c A
	D	833,00 ± 19,71 ^a B	2181,60 ± 68,26 ^b B	8954,00 ± 197,34 ^c B
	K	851,10 ± 30,57 ^a B	1344,18 ± 75,22 ^b C	7924,57 ± 220,92 ^c C
Fazole adzuki	S	184,07 ± 5,64 ^a A	1179,38 ± 27,35 ^b A	12405,78 ± 629,91 ^c A
	D	304,09 ± 7,04 ^a B	3810,58 ± 167,60 ^b B	17896,88 ± 888,44 ^c B
	K	506,93 ± 8,93 ^a C	2981,12 ± 95,22 ^b C	16090,23 ± 999,28 ^c C

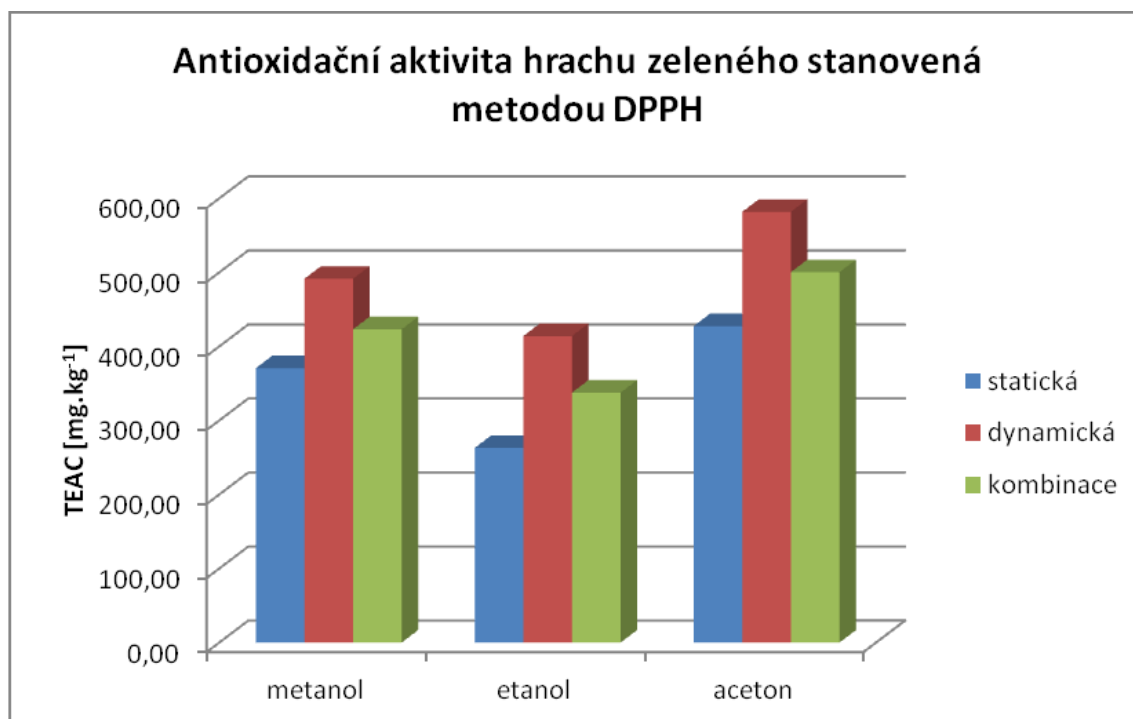
Pozn.: Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± SD (n = 9). Hodnoty ve sloupcích následované stejným velkým písmenem (vliv způsobu extrakce) se statisticky významně neliší ($P \geq 0,05$). Hodnoty v řádcích následované různým horním indexem (vliv extrakčního činidla) se statisticky významně liší ($P < 0,05$). Každý druh luštěniny byl statisticky hodnocen zvlášť.

Stejně jako u metody ABTS, i v případě metody DPPH byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi hodnotami antioxidační aktivity luštěnin v závislosti na použitém extrakčním činidle. U všech analyzovaných druhů luštěnin se jako nejúčinnější extrakční činidlo projevil jednoznačně 70% aceton ($P < 0,05$), který poskytl největší výtěžky antioxidačních složek při statické, dynamické i kombinované extrakci. Naopak nejnižší extrakční účinnost byla zaznamenána u metanolu, s výjimkou hrachu zeleného, u něhož byla nejnižší antioxidační aktivita naměřena vždy u etanolových extraktů ($P < 0,05$).

U čočky belugy, čočky červené, mungo fazolí a adzuki fazolí byl při všech způsobech provedení extrakce pozorován značný rozdíl mezi hodnotami acetonových extraktů a extraktů metanolu a etanolu. Dai a Mumper [63] uvádí, že metanol je obecně účinnější při extrakci polyfenolů s nižší molekulovou hmotností, zatímco vodné roztoky acetonu lépe extrahují vysokomolekulární polyfenoly. To by mohlo vysvětlovat výraznou variabilitu metanolových a acetonových extraktů. V porovnání s tím u hrachu a cizrny nejsou tyto rozdíly příliš výrazné. Tatáž situace byla zjištěna i při stanovení metodou ABTS, u metody DPPH je však tento trend ještě zřetelnější. Pro lepší názornost byly výsledky zpracovány graficky, uvedeny jsou opět hodnoty čočky belugy a hrachu zeleného (Obr. 10. a 11.).



Obr. 10. Antioxidační aktivita čočky belugy metodou DPPH



Obr. 11. Antioxidační aktivita hrachu zeleného metodou DPPH

Výsledky diplomové práce z převážné části korespondují s výsledky srovnávací studie Xu a Changa [53]. V ní byly hodnoceny extrakční účinky metanolu, etanolu a acetonu, navíc v několika různých koncentracích. Extrakce byla provedena kombinovaným způsobem, kdy byly vzorky nejprve 3 hodiny třepány a následně se ponechaly 12 hodin stát v temnu. Antioxidační aktivita byla stanovena metodou DPPH. Z výsledků experimentu vyplývá, že pro extrakci a následné stanovení antioxidační aktivity čočky, černých fazolí, fazolí červená ledvina a zeleného hrachu byl nejúčinnější aceton, a to konkrétně v tomto pořadí koncentrací: 80% aceton > 70% okyselený aceton > 50% aceton. Dále pak následoval 70% etanol a 70% metanol. K odlišným závěrům došli Xu a Chang pouze v případě cizrny, u níž se jako nejvhodnější činidlo projevil 70% metanol, následoval 70% etanol a dále aceton, přičemž mezi použitými koncentracemi nebyl zaznamenán rozdíl ($P \geq 0,05$). Nejmenší extrakční účinek u všech analyzovaných luštěnin vykazoval 100% etanol.

Nithiyantham et al. [61] ve své práci srovnávali účinky extrakce 80% metanolem a 70% acetonem na stanovení antioxidační aktivity cizrny a hrachu také s použitím metody DPPH. Ani tentokrát nezjistili statisticky významné rozdíly mezi hodnotami antioxidační aktivity acetonových a metanolových extraktů ($P \geq 0,05$). To příliš nekorresponduje s námi stanove-

nými výsledky ani s výsledky studie Xu a Changa [53]. Rozdílnost zjištěných dat však může být způsobena drobnými odlišnostmi v pracovním postupu a také různým původem vzorků. Kromě toho je zde vhodné připomenout, že hodnoty antioxidační aktivity různých extraktů cizrny a hrachu stanovené v této diplomové práci se od sebe lišily jen minimálně v porovnání s ostatními druhy luštěnin. Je pravděpodobné, že volba extrakčního činidla není u cizrny a hrachu zásadním kritériem ovlivňujícím stanovení jejich antioxidační aktivity.

Účinky různých extrakčních činidel byly srovnávány také u jiných rostlinných substrátů. Např. ve studii Bae et al. [64] bylo k experimentu použito několik odrůd nepálivých papriček, které byly extrahovány pěti rozpouštědly s různou polaritou, mezi nimi byl i 80% metanol, 100% metanol a 100% aceton. Vzorky extrahované acetonem vykazovaly vyšší antioxidační aktivitu než vzorky extrahované metanolem. Vyšší účinnost acetonu byla zjištěna také v experimentu Musa et al. [65], kde byla stanovována antioxidační aktivita různých extraktů guavy.

Vliv způsobu provedení extrakce se projevil dle očekávání i při stanovení metodou DPPH. Nejlepší extrakční výtěžky poskytla zpravidla extrakce dynamická, v několika případech byla stejně účinná nebo i účinnější extrakce provedená kombinovaným způsobem. V publikovaných studiích byly k extrakci antioxidantů luštěnin a dalších rostlinných materiálů použity nejrůznější techniky, nicméně vzájemným porovnáváním jejich extrakčních účinků se zatím nezabývalo mnoho prací.

Ve studii Musa et al. [65] byl hodnocen vliv několika způsobů extrakce na stanovení antioxidační aktivity guavy metodou DPPH. Dle získaných výsledků byla nejvhodnější extrakce homogenizací pomocí vysoce účinného dispergátoru a extrakce v ultrazvukové lázni. S tím koresponduje srovnávací studie Herrera a Luque de Castro [66], v níž byla jako nejúčinnější metoda k izolaci fenolických látek jahod vyhodnocena ultrazvuková extrakce. Autoři uvádí, že tato technika způsobuje menší degradaci fenolických sloučenin a je také mnohem rychlejší než ostatní běžně používané metody.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo sledovat vliv různých extrakčních činidel a způsobů provedení extrakce na stanovení antioxidační aktivity luštěnin a na základě zjištěných výsledků doporučit nejvhodnější extrakční postup. Touto problematikou se dosud nezabývalo mnoho odborných prací. Nicméně je všeobecně známo, že právě povaha extrakčního rozpouštědla a zvolená technika jsou klíčovými faktory, které ovlivňují výtěžnost antioxidantů z přírodních materiálů. Proto je velmi důležité optimalizovat proces extrakce tak, aby zjištěná antioxidační aktivita co nejlépe odpovídala skutečnému antioxidačnímu potenciálu analyzované matrice.

V experimentální části práce byly analyzovány vzorky čočky belugy, čočky červené, cizrny, hrachu zeleného, mungo fazolí a fazolí adzuki. Všechny vzorky byly extrahovány po dobu 24 hodin třemi různými extrakčními činidly a třemi odlišnými způsoby, které byly na základě dostupné literatury vyhodnoceny jako nejpoužívanější. U získaných extraktů byla stanovena antioxidační aktivita metodami ABTS a DPPH.

Vliv extrakčních činidel na antioxidační aktivitu luštěnin se projevil následovně:

- u čočky belugy, čočky červené, fazolí mungo, fazolí adzuki a hrachu zeleného byl nejúčinnější aceton, a to při stanovení metodou ABTS i DPPH
- u cizrny byl při stanovení metodou ABTS nejvíce účinný metanol, při stanovení metodou DPPH byl nejúčinnější aceton
- rozdíly mezi hodnotami antioxidační aktivity různých extraktů (zejména acetonových a metanolových) byly u obou druhů čočky i fazolí velmi výrazné, zvláště v případě metody DPPH
- u cizrny a hrachu byly naopak rozdíly mezi antioxidačními aktivitami vzorků extrahovaných odlišnými činidly minimální

Vliv způsobu provedení extrakce se projevil podle očekávání. Z výsledků vyplývá, že:

- u všech druhů luštěnin byla zpravidla nejefektivnější extrakce dynamická, v několika případech však byla stejně nebo i více účinná kombinace dynamické a statické extrakce
- nejmenší extrakční účinek měla jednoznačně statická extrakce

Na základě uvedených skutečností lze doporučit, aby byla extrakce luštěnin pro následné stanovení antioxidační aktivity prováděna dynamickým způsobem za použití acetonu. Pro ještě lepší optimalizaci by bylo vhodné v dalších experimentech porovnat účinky různých koncentrací acetonu. Nabízí se také možnost vyzkoušet další extrakční techniky (např. ultrazvukovou lázeň).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] TIWARI, Brijesh a Narpinder SINGH. *Pulse Chemistry and Technology*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2012. ISBN 978-1-84973-331-1.
- [2] TIWARI, Brijesh, Aoife GOWEN a Brian MCKENNA. *Pulse Foods: Processing, Quality and Nutraceutical Applications*. Burlington: Academic Press, 2011. ISBN 978-0-12-382018-1.
- [3] AYKROYD, Wallace Ruddell, Joyce DOUGHTY a Ann WALKER. *Legumes in Human Nutrition*. Řím: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1982. ISBN 92-5-101181-8.
- [4] SHAHIDI, Fereidoon. *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications*. Urbana: The American Oil Chemists Society, 1997. ISBN 0-935315-77-2.
- [5] YU, Liangli, Rong TSAO a Fereidoon SHAHIDI. *Cereals and Pulses: Nutritional Properties and Health Benefits*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2012. ISBN 978-1-118-22941-5.
- [6] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*. *Chemické listy*. 2004, **98**(4), 174–179. ISSN 0009-2770.
- [7] HRUŠKA, Jaroslav. *Luskoviny*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1955.
- [8] HOUBA, Miroslav a kol. *Luskoviny: pěstování a užití*. České Budějovice: Kurent, 2009. ISBN 978-80-87111-19-2.
- [9] OBENDORF, Ralph L. a Ryszard J. GÓRECKI. Soluble Carbohydrates in Legume Seeds. *Seed Science Research*. 2012, **22**(4), 219–242. ISSN 0960-2585.
- [20] PATTEE, H. E., D. K. SALUNKHE, S. K. SATHE, N. R. REDDY a R. L. ORY. Legume Lipids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1983, **17**(2), 97–139. ISSN 1549-7852.
- [31] TICHÁ, Markéta a Petra VYZÍNOVÁ. *Polní plodiny*. Brno: VFU, 2006. ISBN 80-324-4371-8.

- [12] LAHOLA, Josef a kol. *Luskoviny: pěstování a využití*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1990. ISBN 80-209-0127-2.
- [13] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. Tábor: Osis, 1999. ISBN 80-902391-5-3.
- [44] VENN, Bernard, Frank THIES a Carol O'NEIL. Whole Grains, Legumes, and Health. *Journal of Nutrition and Metabolism*. 2012, **2012**(1), 7–8. ISSN 2090-0724.
- [15] MACHAIAH, Jammala P. a Mrinal D. PEDNEKAR. Carbohydrate Composition of Low Dose Radiation-processed Legumes and Reduction in Flatulence Factors. *Food Chemistry*. 2002, **79**(3), 293–301. ISSN 0308-8146.
- [16] Odbor rostlinných komodit Mze ČR. *Situační a výhledová zpráva: Luskoviny*. Praha: Ministerstvo zemědělství ČR, 2012.
- [57] TYLLER, Roman. Význam, situace, šlechtění a pěstování luskovin. In: *Šlechtitelské listy (Druvod)* [online]. Družstvo vlastníků odrůd, 2013 [cit. 2013-11-19]. Dostupné z: http://www.druvod.cz/files/aktuality/slecht_listy_podzim_2013.pdf
- [18] COUSIN, Roger. Peas (*Pisum Sativum* L.). *Field Crops Research*. 1997, **53**(1), 111–130. ISSN 0378-429.
- [69] GEPTS, Paul a Daniel G. DEBOUCK. Races of Common Bean (*Phaseolus Vulgaris*, *Fabaceae*). *Economic Botany*. 1991, **45**(3), 379–396. ISSN 0013-0001.
- [20] MOUTIS, Suzanne. Lentils. *Canadian Home & Country*. 2006, **161**(1), 22. ISSN 1706-046X.
- [21] SARKER, Ashutosh a William ERSKINE. Recent Progress in the Ancient Lentil. *The Journal of Agricultural Science*. 2006, **144**(1), 19–29. ISSN 1469-5146.
- [22] VASISHTHA, Hina a Rajendra Prasad SRIVASTAVA. Effect of Soaking and Germination on Dietary Fibre Constituents of Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Legume Research*. 2013, **36**(2), 174–179. ISSN 0250-5371.
- [23] DUC, Gérard. Faba Bean (*Vicia faba* L.). *Field Crop Research*. 1997, **53**(1), 99–109. ISSN 0378-4290.

- [24] SUCHÝ, Pavel, Eva STRAKOVÁ a Ivan HERZIG. *Nové poznatky o využití semen rodu Lupinus ve výživě člověka a zvířat*. Praha: Výzkumný ústav živočišné výroby, 2011.
- [25] RESENDE, L. V., P. WINTER, G. KAHL, A. BENKO-ISEPPON a M. V. SIMON. Genetic Diversity and Phylogenetic Relationships in *Vigna Savi* Germplasm Revealed by DNA Amplification Fingerprinting. *Genome*. 2007, **50**(6), 538–547. ISSN 0831-2796.
- [26] VALÁŠEK, Pavel, Aleš HORNA, Ignác HOZA a Bohumila KULICHOVÁ. Přírodní antioxidanty, celková antioxidační kapacita jako moderní faktor hodnocení kvality. In: *Sborník přednášek z XIII. mezinárodní konference Konzervárensko – potravinářské dny 2006*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2006, 51–56. ISBN 80-7318-506-7.
- [27] DECKER, Eric A., Ryan J. ELIAS a Julian D. MCCLEMENTS. *Oxidations in Food and Beverages and Antioxidant Applications. Volume 1: Understanding Mechanisms of Oxidation and Antioxidant Activity*. Oxford: Woodhead Publishing, 2010. ISBN 978-1-84569-648-11.
- [28] KALVACH, Zdeněk a kol. *Geriatric a gerontologie*. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0548-6.
- [29] HUNTER, Beatrice. Antioxidants in Food. *Consumers' Research Magazine*. 1999, **82**(10), 8–9. ISSN 0095-2222.
- [30] POKORNY, Jan, Nedyalka YANISHLIEVA a Michael GORDON. *Antioxidants in Food: Practical Applications*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2001. ISBN 978-1-85573-463-0.
- [31] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 2*. Tábor: Osis, 1999. ISBN 80-902391-4-5.
- [32] HIGDON, Jane. Vitamin C. In: *The Linus Pauling Institute* [online]. Corvallis: Oregon State University, 2006 [cit. 2014-02-06]. Dostupné z: <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/vitaminC/>
- [33] MISTRY, Nalini, Helen R. GRIFFITHS, Joseph LUNEC, Karl E. HERBERT, Ian D. PODMORE a Pratibha MISTRY. Vitamin C Exhibits Pro-oxidant Properties. *Nature*. 1998, **392**(9), 559. ISSN 0028-0836.

- [34] XU, Zhimin a Luke R. HOWARD. *Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals*. Chichester: Wiley, 2012. ISBN 978-0-8138-2391-1.
- [35] BRAMLEY, P. M., I. ELMADFA, A. KAFATOS, F. J. KELLY, Y. MANIOS, H. E. ROXBOROUGH, W. SCHUCH, P. J. A. SHEEHY a K-H. WAGNER. Vitamin E. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000, **80**(7), 913–938. ISSN 1097-0010.
- [36] DAVÍDEK, Jiří, Gustav JANÍČEK a Jan POKORNÝ. *Chemie potravin*. Praha: SNTL, 1983.
- [37] KRINSKY, Norman I. a Kyung-Jin YEUM. Carotenoid-radical Interactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003, **305**(3), 754–760. ISSN 0006-291X.
- [38] RICE-EVANS, Catherine, Nicholas MILLER a George PAGANGA. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds. *Trends in Plant Science*. 1997, **2**(4), 152–159. ISSN 1360-1385.
- [39] RICHLING, Elke. Special: Bioactive Phenolic Compounds. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2011, **55**(1), S5–S6. ISSN 1613-4125.
- [40] KÄHKÖNEN, Marja P., Anu I. HOPIA, Heikki J. VUORELA, Jussi-Pekka RAUHA, Kalevi PIHLAJA, Tytti S. KUJALA a Marina HEINONEN. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1999, **47**(10), 3954–3962. ISSN 0021-8561.
- [47] KARAKAYA, Sibel. Bioavailability of Phenolic Compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2004, **44**(6), 453–464. ISSN 1040-8398.
- [42] LAFAY, Sophie a Angel GIL-IZQUIERDO. Bioavailability of Phenolic Acids. *Phytochemistry Reviews*. 2008, **7**(2), 301–311. ISSN 1568-7767.
- [43] RICE-EVANS, Catherine. Flavonoid Antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*. 2001, **8**(3), 797–807. ISSN 0929-8673.
- [44] BUHLER, Donald R. a Cristobal MIRANDA. Antioxidant Activities of Flavonoids. In: *The Linus Pauling Institute* [online]. Corvallis: Oregon State University, 2000 [cit. 2014-03-07]. Dostupné z: <http://lpi.oregonstate.edu/f-w00/flavonoid.html>

- [45] MANACH, Claudine, Augustin SCALBERT, Christine MORAND, Christian RÉMÉSY a Liliana JIMÉNEZ. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004, **79**(1), 727–747. ISSN 1555-8932.
- [46] VITALE, Daniela. Isoflavones: Estrogenic Activity, Biological Effect and Bioavailability. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2013, **38**(1), 15–25. ISSN 0378-7966.
- [47] LIKHTENSHEIN, Gertz. *Stilbenes. Applications in Chemistry, Life Sciences and Material Science*. Weinheim: WILEY-VCH, 2010. ISBN 978-3-527-32388-3.
- [48] ŠMIDRKAL, Jan, Vladimír FILIP, Karel MELZUCH, Irena HANZLÍKOVÁ, Daniela BUCKIOVÁ a Bohdan KRŮSA. Resveratrol. *Chemické listy*. 2001, **95**(10), 602–609. ISSN 0009-2770.
- [49] GÜLCIN, İlhami, Riad ELIAS, Akcahan GEPDIREMEN a Laurent BOYER. Antioxidant Activity of Lignans from Fringe Tree (*Chionanthus Virginicus* L.). *European Food Research and Technology*. 2006, **223**(6), 759–767. ISSN 1438-2385.
- [50] AMAROWICZ, Ryszard a Ronald B. PEGG. Legumes as a Source of Natural Antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2008, **110**(10), 865–878. ISSN 1438-7697.
- [58] AMAROWICZ, Ryszard a Agnieszka TROSZYNSKA. Antioxidant Activity of Extract of Pea and its Fractions of Low Molecular Phenolics and Tannins. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2003, **53**(12), 10–15. ISSN 1230-0322.
- [52] BIESAGA, Magdalena. Influence of Extraction Methods on Stability of Flavonoids. *Journal of Chromatography A*. 2011, **1218**(18), 2505–2512. ISSN 0021-9673.
- [53] XU, Baojun J. a Sam K. C. CHANG. A Comparative Study on Phenolic Profiles and Antioxidant Activities of Legumes as Affected by Extraction Solvents. *Journal of Food Science*. 2007, **72**(2), 159–166. ISSN 0022-1147.
- [54] DJORDJEVIC, Tijana M., Slavica S. ŠILER-MARINKOVIC a Suzana I. DIMITRIJEVIC-BRANKOVIC. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content in Some Cereals and Legumes. *International Journal of Food Properties*. 2011, **14**(1), 175–184. ISSN 1094-2912.

- [55] SHPIGUN, L. K., N. N. ZAMYATINA, Y. V. SHUSHENACHEV a P. M. KAMILOVA. Flow-injection Methods for the Determination of Antioxidant Activity Based on Free-radical Processes. *Journal of Analytical Chemistry*. 2012, **67**(10), 801–808. ISSN 1061-9348.
- [56] DAWIDOWICZ, Andrzej L. a Małgorzata OLSZOWY. The Importance of Solvent Type in Estimating Antioxidant Properties of Phenolic Compounds by ABTS Assay. *European Food Research and Technology*. 2013, **236**(6), 1099–1105. ISSN 1438-2377.
- [57] BRAND-WILLIAMS, W., M. E. CUVELIER a C. BERSET. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT – Food Science and Technology*. 1995, **28**(1), 25–30. ISSN 0023-6438.
- [58] KEDARE, Sagar a Rajendra SINGH. Genesis and Development of DPPH Method of Antioxidant Assay. *Journal of Food Science and Technology*. 2011, **48**(4), 412–422. ISSN 0022-1155.
- [59] ZULUETA, Ana, Maria J. ESTEVE a Ana FRÍGOLA. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*. 2009, **114**(1), 310–316. ISSN 0308-8146.
- [60] BENZIE, Iris F. a James J. STRAIN. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*. 1996, **239**(1), 70–76. ISSN 0003-2697.
- [69] NITHIYANANTHAM, Srinivasan, Subramanian SELVAKUMAR a Perumal SIDDHURAJU. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Two Different Solvent Extracts from Raw and Processed Legumes, *Cicer arietinum* L. and *Pisum sativum* L. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2012, **27**(1), 52–60. ISSN 0889-1575.
- [62] LOGANAYAKI, N., P. SIDDHURAJU a S. MANIAN. A Comparative Study on *in vitro* Antioxidant Activity of the Legumes *Acacia auriculiformis* and *Acacia ferruginea* with a Conventional Legume *Cajanus cajan*. *CyTA-Journal of Food*. 2011, **9**(1), 8–16. ISSN 1947-6337.

- [63] DAI, Jin a Russell J. MUMPER. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*. 2010, **15**(1), 7313–7352. ISSN 1420-3049.
- [64] BAE, Haejin, G. JAYAPRAKASHA, Kevin CROSBY, John JIFON a Bhimana-gouda PATIL. Influence of Extraction Solvents on Antioxidant Activity and the Content of Bioactive Compounds in Non-pungent Peppers. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2012, **67**(2), 120–128. ISSN 0921-9668.
- [65] MUSA, Khalid Hamid, Aminah ABDULLAH, Khairiah JUSOH a Vimala SUBRAMANIAM. Antioxidant Activity of Pink-Flesh Guava (*Psidium guajava* L.): Effect of Extraction Techniques and Solvents. *Food Analytical Methods*. 2011, **4**(1), 100–107. ISSN 1936-9751.
- [66] HERRERA, Carlos M. a María Dolores LUQUE de CASTRO. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*. 2005, **1100**(1), 1–7. ISSN 0021-9673.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABTS	2,2'-azinobis(3-etyl-2,3-dihydrobenzotiazol-6-sulfonát)
AAPH	2,2'-azobis-(izobutyrimidamid)-dihydrochlorid
ČSÚ	Český statistický úřad
DPPH	1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl
FAO	Food and Agriculture Organization (Organizace pro výživu a zemědělství)
FRAP	Ferric Reducting Antioxidant Potential (schopnost antioxidantu redukovat železité ionty)
GMO	Geneticky modifikovaný organizmus
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HTS	Hmotnost tisíce semen
MDA	Malondialdehyd
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity (kapacita absorbance kyslíkových radikálů)
TAA	Total Antioxidant Activity (celková antioxidační aktivita)
TBA	Tiobarbiturová kyselina
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (antioxidační kapacita ekvivalentní koncentraci Troloxu)
TPTZ	2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin)
USDA	The United States Department of Agriculture (Americké ministerstvo zemědělství)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Schéma postupu extrakce vzorků.....	42
Obr. 2. Kalibrační křivka Troloxu v metanolu pro metodu ABTS.....	45
Obr. 3. Kalibrační křivka Troloxu v etanolu pro metodu ABTS.....	46
Obr. 4. Kalibrační křivka Troloxu v acetonu pro metodu ABTS.....	46
Obr. 5. Antioxidační aktivita čočky belugy metodou ABTS.....	49
Obr. 6. Antioxidační aktivita hrachu zeleného metodou ABTS.....	50
Obr. 7. Kalibrační křivka Troloxu v metanolu pro metodu DPPH.....	51
Obr. 8. Kalibrační křivka Troloxu v etanolu pro metodu DPPH.....	51
Obr. 9. Kalibrační křivka Troloxu v acetonu pro metodu DPPH.....	52
Obr. 10. Antioxidační aktivita čočky belugy metodou DPPH.....	54
Obr. 11. Antioxidační aktivita hrachu zeleného metodou DPPH.....	55

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Charakteristika analyzovaných vzorků luštěnin.....	41
Tab. 2. Antioxidační aktivita vzorků luštěnin stanovená metodou ABTS.....	48
Tab. 3. Antioxidační aktivita vzorků luštěnin stanovená metodou DPPH.....	53

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I Fotografie analyzovaných luštěnin

PŘÍLOHA P I: FOTOGRAFIE ANALYZOVANÝCH LUŠTĚNIN



Čočka beluga



Čočka červená



Cizrna



Hrách zelený



Mungo fazole



Fazole adzuki