

Chemické charakteristiky brokolice

Bc. Marie Bačáková

Diplomová práce
2008



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2007/2008

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Marie BAČÁKOVÁ**

Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Chemické charakteristiky brokolice**

Zásady pro vypracování:

1. Fyziologický popis rostliny.
2. Vlastní chemické složení brokolice.
3. Metodika HPLC.
4. Experimentální část.
5. Závěr.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

KLOUDA, P.: Moderní analytické metody. 1. vydání. Ostrava: Nakladatelství Petr Klouda, 1996.

VELÍŠEK, J.: Chemie potravin 2. VŠCHT Praha, Tábor: OSSIS, 1999.

Wilson, K., Walker, J., Principles and Techniques of practical biochemistry, fifth edition, University Cambridge 2000, ISBN 0521651042

Jeffery, E. H., Brown, A.,F., Kurilich, A.,C., Journal of Food Composition Analysis, Variation in content of bioactive components in broccoli, Volume 16, Issue 3, June 2003, p. 323-330

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání diplomové práce:

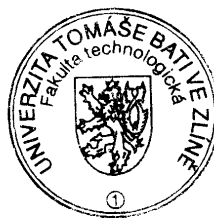
19. listopadu 2007


Termín odevzdání diplomové práce:

31. května 2008

Ve Zlíně dne 2. května 2008


doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan




prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Cílem práce bylo stanovení biologicky aktivních látek brokolice (*Brassica oleracea convar. Italica*) jako je škrob, chlorofyl, fosfor, β -karoten a vitamin C. Pozornost byla také věnována obsahu těžkých kovů. Ke stanovení β -karotenu a vitaminu C byla použita chromatografická metoda HPLC-ECD. Byly vypracovány vhodné extrakční postupy a optimální chromatografické podmínky pro detekci β -karotenu v brokolici.

Klíčová slova: brokolice, β -karoten, vitamin C, HPLC-ECD

ABSTRACT

The aim of this work was to specify biological active substances in broccoli (*Brassica oleracea convar. Italica*) such as starch, chlorophyll, phosphorus, β -carotene and vitamin C. Consideration was given to amount of heavy metals as well. For determination of β -carotene and vitamin C chromatographic method based on HPLC-ECD was used. Suitable procedure for extraction and installation of optimal chromatographic methods of β -carotene from broccoli was developed.

Keywords: broccoli, β -carotene, vitamin C, HPLC-ECD

Poděkování, motto

Chtěla bych poděkovat vedoucí bakalářské práce Ing. Daniele Kramářové, PhD. za velmi cenné připomínky k danému tématu, odborné vedení a trvalý zájem při vypracování diplomové práce. Ráda bych zároveň chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvolněno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně 12. května 2008

.....

Podpis diplomanta

OBSAH

<u>OBSAH</u>	<u>6</u>
<u>ÚVOD.....</u>	<u>10</u>
<u>I. TEORETICKÁ ČÁST</u>	<u>11</u>
<u>1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA BROKOLICE</u>	<u>12</u>
1.1 PŮVOD BROKOLICE.....	12
1.2 PĚSTOVÁNÍ BROKOLICE	14
1.3 ÚDRŽNOST A SPOTŘEBA BROKOLICE	14
1.4 VLIV BROKOLICE NA LIDSKÉ ZDRAVÍ.....	15
<u>2 FYZIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY BROKOLICE</u>	<u>18</u>
2.1 AMINOKYSELINY	18
2.2 MINERÁLNÍ LÁTKY	18
2.3 VITAMINY	20
2.4 PŘIROZENÁ BARVIVA.....	30
2.4.1 KAROTENOIDY	30
2.4.2 CHLOROFYLY.....	32
2.4.3 FLAVONOIDY	32
2.5 ROSTLINNÉ FENOLY	33
2.6 SACHARIDY	34
2.7 LIPIDY	36
2.7.1 MASTNÉ KYSELINY	36
2.8 PŘIROZENÉ TOXICKÉ SLOŽKY POTRAVIN	37
<u>3 OPTICKÉ METODY</u>	<u>39</u>
3.1 POLARIMETRIE	39
3.2 ULTRAFIALOVÁ A VIDITELNÁ SPEKTROMETRIE	40
3.3 ATOMOVÁ ABSORPČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE	41
3.3.1 PŘÍSTROJE A POMOCNÁ ZAŘÍZENÍ.....	41
3.3.2 ATOMOVÝ ABSORPČNÍ SPEKTROFOTOMETR GBC 933	42
3.3.3 ANALYZÁTOR AMA 254	42
<u>4 VYSOCEÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC).....</u>	<u>44</u>

4.1	CHROMATOGRAFICKÁ SEPARACE.....	44
4.2	MOBILNÍ A STACIONÁRNÍ FÁZE	45
4.3	PŘÍSTROJE A POMOCNÁ ZAŘÍZENÍ	46
4.3.1	ZÁSOBNÍK MOBILNÍ FÁZE	47
4.3.2	ČERPADLA	47
4.3.3	DÁVKOVACÍ VENTILY	47
4.3.4	PŘEDKOLONA.....	48
4.3.5	KOLONA	48
4.3.6	DETEKTORY	48
5	<u>STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ KVANTITATIVNÍCH ANALÝZ</u>	52
II.	<u>PRAKTICKÁ ČÁST</u>	54
6	<u>METODIKA.....</u>	55
6.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	55
6.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	56
6.3	METODY	57
6.3.1	STANOVENÍ SUŠINY BROKOLICE.....	57
6.3.2	STANOVENÍ OBSAHU ŠKROBU V BROKOLICI DLE EWERSE	58
6.3.3	STANOVENÍ OBSAHU FOSFORU VANADIČNANOVOU METODOU	59
6.3.4	SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ CHLOROFYLŮ V BROKOLICI	60
6.3.5	STANOVENÍ B-KAROTENU METODOU HPLC-ECD	61
6.3.5.1	Extrakce β -karotenu z brokolice.....	61
6.3.5.2	Stanovení chromatografických podmínek pro detekci β -karotenu metodou HPLC-ECD	62
6.3.5.3	Stanovení vhodného potenciálu pro měření kalibrační křivky β -karotenu a β -karotenu v reálném vzorku brokolice metodou HPLC-ECD.....	63
6.3.5.4	Kalibrační křivka pro stanovení β -karotenu metodou HPLC-ECD.....	63
6.3.5.5	Vlastní stanovení obsahu β -karotenu ve vzorcích brokolice.....	64
6.3.6	TITRAČNÍ STANOVENÍ VITAMINU C V BROKOLICI	64
6.3.7	STANOVENÍ VITAMINU C V BROKOLICI METODOU HPLC-ECD	66
6.3.7.1	Kalibrační křivka pro stanovení vitamínu C v brokolici metodou HPLC-ECD.	66
6.3.7.2	Vlastní stanovení vitamínu C v brokolici metodou HPLC-ECD.....	67

6.3.8	STANOVENÍ TĚŽKÝCH KOVŮ V BROKOLICI ATOMOVOU ABSORPČNÍ SPEKTROFOTOMETIÍ (AAS)	
	67	
6.3.8.1	Stanovení rtuti analyzátozem AMA 254	67
6.3.8.2	Stanovení olova a kadmia atomovou absorpční spektrofotometrií	67
7	<u>VÝSLEDKY A DISKUZE</u>	69
7.1	VÝSLEDKY A PŘESNOST STANOVENÍ SUŠINY BROKOLICE.....	69
7.2	VÝSLEDKY A PŘESNOST STANOVENÍ OBSAHU ŠKROBU V BROKOLICI DLE EWERSE	70
7.3	VÝSLEDKY A PŘESNOST STANOVENÍ OBSAHU FOSFORU VANADIČNANOVOU METODOU	71
7.4	VÝSLEDKY A PŘESNOST SPEKTROFOTOMETRICKÉHO STANOVENÍ CHLOROFYLŮ V BROKOLICI.....	73
7.5	VÝSLEDKY A PŘESNOST STANOVENÍ B-KAROTENU METODOU HPLC-ECD75	
7.5.1	VÝSLEDKY EXTRAKCE B-KAROTENU Z BROKOLICE	75
7.5.2	VÝSLEDKY STANOVENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK PRO DETEKCI B-KAROTENU METODOU HPLC-ECD	78
7.5.3	VÝSLEDKY STANOVENÍ VHODNÉHO POTENCIÁLU PRO MĚŘENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY B-KAROTENU A STANOVENÍ B-KAROTENU V REÁLNÉM VZORKU BROKOLICE METODOU HPLC-ECD	79
7.5.4	VÝSLEDKY A PŘESNOST STANOVENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY B-KAROTENU METODOU HPLC-ECD	79
7.5.5	VÝSLEDKY A PŘESNOST VLASTNÍHO STANOVENÍ OBSAHU B-KAROTENU VE VZORCÍCH BROKOLICE	80
7.6	VÝSLEDKY A PŘESNOST TITRAČNÍHO STANOVENÍ VITAMINU C V BROKOLICI	81
7.7	VÝSLEDKY A PŘESNOST STANOVENÍ VITAMINU C METODOU HPLC-ECD83	
7.7.1	VÝSLEDKY STANOVENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY VITAMINU C V BROKOLICI METODOU HPLC-ECD	83

7.7.2	VÝSLEDKY A PŘESNOST VLASTNÍHO STANOVENÍ VITAMINU C V BROKOLICI METODOU HPLC-ECD.....	85
7.8	VÝSLEDKY A PŘESNOST STANOVENÍ TĚŽKÝCH KOVŮ V BROKOLICI ATOMOVOU ABSORPČNÍ SPEKTROFOTOMETRIÍ (AAS)	86
7.8.1	VÝSLEDKY A PŘESNOST STANOVENÍ RTUTI POMOCÍ ANALYZÉRU AMA 254.....	86
7.8.2	VÝSLEDKY A PŘESNOST STANOVENÍ OLOVA A KADMIA NA PŘÍSTROJÍ GBC 933 AA87	
	<u>ZÁVĚR.....</u>	<u>91</u>
	<u>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</u>	<u>93</u>
	<u>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</u>	<u>98</u>
	<u>SEZNAM OBRÁZKŮ</u>	<u>99</u>
	<u>SEZNAM TABULEK.....</u>	<u>100</u>
	<u>SEZNAM PŘÍLOH.....</u>	<u>101</u>

ÚVOD

Ve společenství funkčních potravin je zelenina ceněna velmi vysoko. Brokolice je pro svůj obsah vitaminů a minerálních látek odborníky často označována za jednu z nejzdravějších zelenin. Světová zdravotnická organizace (WHO) vydala doporučení konzumovat ovoce a zeleninu pětikrát denně (jak v čerstvé, tak i v kuchyňsky či konzervářsky zpracované formě) v celkovém množství cca 0,5 kg na osobu a den. Předpokládá se, že většina lidí denně přijímá jen asi 20 až 50 % z tohoto doporučeného množství.

Bereme-li v úvahu nedostatky ve výživě obyvatelstva České republiky, je nutno poukázat především na nadměrný příjem sacharidů, nedostatečný příjem vlákniny a nedostatek vitamínu C. Nadbytečný příjem sacharidů je způsoben jejich nevhodnou skladbou. Je konzumováno příliš mnoho jednoduchých sacharidů a málo stravy obsahující nerozpustnou vlákninu. Spotřeba vitamínu C u průměrného obyvatele České republiky činí pouze 80 % doporučeného množství. Právě brokolice je dobrým řešením všech těchto problémů. Obsahuje jak nerozpustnou vlákninu, která pozitivně působí na trávicí trakt, tak i vysoké množství vitamínu C a je vhodná i pro diabetiky.

Brokolice je známá především pro svůj proti-rakovinový účinek, protože zabraňuje karcinogenním látkám v ničení DNA. Látka sulforafan (patřící mezi glukosinoláty), hojně obsažená v brokolici, totiž negativně ovlivňuje růst a množení *Helicobacter pylori*, bakterii zodpovědnou za rakovinu žaludku. Vědecké poznatky dále prokázaly, že pravidelná konzumace brokolice chrání organismus před vznikem plicních nádorů u kuřáků, před rakovinou tlustého střeva, děložního čípku, prostaty, močového měchýře, kůže a účinná je také v prevenci kardiovaskulárních chorob. Tyto účinky na lidský organismus jsou přisuzovány látkám isothiokyanátům, což jsou rozkladné produkty glukosinolátů.

Další léčivé účinky spočívají v tom, že zlepšuje trávení a napomáhá prevenci zácpy. Také podporuje metabolismus sacharidů a bílkovin, což se projevuje především při práci svalů. Zlepšuje imunitní systém, pomáhá při poruchách spánku, účinkuje proti překyselení organismu a je doporučována i při léčbě nemocí z ozáření.

Je vhodné konzumovat brokolici třikrát týdně. Mnoho lidí ji pro svou typickou chuť ztrácuje, ale výčet pozitivních účinků na lidské zdraví hovoří jasně pro zařazení této zeleniny do běžného jídelníčku.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA BROKOLICE

latinský název: *Brassica oleracea convar. italica*

český název: Brokolice chřestová nebo Kapusta chřestová

anglický název: Broccoli

Zelí, brokolice, květák, kedluben, kadeřávek a růžičková kapusta, kapusta, čínské zelí, ředkev, křen a řeřicha zahradní, patří do velké skupiny rostlin z čeledi **brukvovitých** (*Brassicaceae*). [1] Brokolice je víceletá nebo jednoletá brukvovitá rostlina, ze které se sklízí nevyvinutá květenství zelené, žluté nebo fialové barvy. [2]



Obr.1: Brokolice chřestová

1.1 Původ brokolice

Jméno brokolice (*Brassica oleracea convar. italica*) je italského původu, odvozené od lanského slova *brachium*, které znamená „paže“ nebo „výhonek“. Brokolice pochází z východního Středomoří. Prvními pěstiteli byli staří Římané. Z Itálie se brokolice postupně dostávala do ostatních evropských zemí. [2] V 18. století se začala s oblibou pěstovat v Anglii, ale její největší popularita začala kupodivu stoupat až po druhé světové válce, kdy se její konzumace rozšířila prakticky po celé Evropě. [3]

U nás se brokolice výrazněji rozšířila v 80. a 90. letech 20. století, i když první původní odrůda výhonkové brokolice Vitamina byla vyšlechtěna v Olomouci již v roce 1963. Její-

mu rozšíření výrazně pomohly studie identifikující komplex látek, které brokolice obsahuje, a jednoznačně ji zařadily do kategorie „superzdravých“ zelenin. [4]

Existuje několik základních druhů brokolice - **výhonková**, **hlávková** a **květáková**. U nás je rozšířená především brokolice výhonková. Středová růžice je největší, boční jsou menší a sklízí se postupným odřezáváním těchto růžic (zdužnatělá květenství). [3]

Nejznámější odrůdy výhonkové brokolice jsou:

- **Vitamina** – remontující (obrustající) odrůda stonkového typu pro postupnou sklizeň růžic. Rostlina je v dospělosti bohatě větvená, středové růžice mají průměr 8 - 10 cm, boční – vyrůstající z paždí listů – jsou drobnější.

- **Calabrese** – italská odrůda s dobře větvenou rostlinou a postupným vývojem růžiček. [4]

Brokolici je chuťově podobný květák „Romanesco“, který se na pultech našich zelinářských obchodů již pomalu začal objevovat. Květák Romanesco (*Brassica oleracea L. convar. botrytis Alef var. botrytis L.*) má zelenožlutou barvu a tvarově představuje růžice uspořádané do pyramidy. Má pevnější konzistenci než klasický květák. Je zdrojem vitamínu B₉ (kyseliny listové) a vitamínu C. V jedné 100 g porci Romanesca je téměř celá denní denní dávka vitamínu C pro dospělého osobu a 30 % doporučené denní dávky vitamínu B₉. [5]



Obr.2: Květák „Romanesco“

Tabulka 1: nutriční hodnoty brokolice odpovídající 100 g čerstvé hmoty: [6]

Voda	g	92,55
Energie	kcal	22, 00
Energie	kJ	92,00
Proteiny	g	3,17
Lipidy	g	0,49
Minerální látky	g	0,93
Sacharidy	g	2,85

1.2 Pěstování brokolice

Ve střední Evropě mohou být košťáloviny pěstovány v polních podmínkách od konce března do konce října či listopadu. Brokolice vyžaduje obdobné pěstitelské postupy jako květák, je však méně náročná, takže není problém pěstovat ji v našich zahradách. [7] Letní a podzimní květák a brokolice vyžadují půdy hlubší, humózní, hlinité až jílovitohlinité s dobrou údržností vody. Optimální pH půdy je pro košťáloviny v rozmezí 6 a 6,5. [8]

Rozložení pěstitelských oblastí v Evropě dovoluje zachování celoroční nabídky: výrazně pozdně podzimní a zimní dominuje v Itálii (oblast Puglia) i ve Španělsku (Murcia, Almeria). Klimatické podmínky dovolují celoroční pěstování brokolice v údolí řeky Ebro na severovýchodě Španělska. Nabídka brokolice z Bretaně a Porýní je vymezena měsíci květen - listopad, nizozemská, britská a většina německé na červenec - polovinu listopadu. Největšími evropskými exportéry květáku a brokolice jsou Francie a Španělsko. Francouzský export v uplynulých deseti letech stagnuje, zatímco španělský značně roste. Itálie produkuje především pro domácí spotřebu, v porovnání s předchozími zeměmi je její vývoz nevýznamný. [9]

1.3 Údržnost a spotřeba brokolice

Hlavní stinnou stránkou brokolice zůstává její relativně krátká životnost při skladování, způsobená předčasným žloutnutím a rychlou ztrátou turgoru, což znamená, že velmi rychle ztrácí svou přitažlivost pro spotřebitele. Výsledky z předešlé tříleté studie financované DEFRA (Department for Environment, Food and Rural Affairs), realizované výzkumnou organizací HRI (Horticulture Research International) ukazují, že rozdíly v životnosti při

skladování mohou být způsobeny změnami v podmínkách pěstování před sklizní, včetně faktorů jako například stres z teploty a vodního režimu. Tato práce také zdůrazňuje vliv genetických rozdílů na životnost při skladování a rovněž skutečnost, že horší odrůdy mohou mít nižší obsah antioxidantů. [10]

Průměrná spotřeba květáku (a brokolice, neboť statistika kromě zahraničního obchodu tyto zeleniny neeviduje samostatně) dosahuje 4,30 kg na osobu za rok (ve SRN 2,60 kg, ve Velké Británii 4,03 kg, v zemích EU jen 0,59 kg v roce 2000). Na rozdíl od ČR, kde je podíl spotřeby brokolice na celkové spotřebě stále velmi nízký, pouze 6,77 % (tj. 0,30 kg na osobu za rok) a na spotřebě se ze dvou třetin podílí dovoz (2 123 t v roce 2000), stoupl podíl spotřeby brokolice ve velké Británii z 10,82 % roku 1993 na 29,52 % roku 2000 (1,20 kg/os./rok). [8] Současné údaje o spotřebě brokolice nejsou k dispozici.

1.4 Vliv brokolice na lidské zdraví

Brokolice může sloužit jako prevence: rakoviny prsu, tlustého střeva, močového měchýře, prostaty, kůže, srdečních onemocněních, vysokého krevního tlaku a vrozených vad. Dále je uvedeno několik studií, které se zabývají zdravotními účinky brokolice. Např. studie prováděná na 1300 lidech ukázala, že pravidelná konzumace květáku a brokolice **chrání před rakovinou** lépe, než jiné druhy zeleniny. Experti radí, že nejlepší možností jak snížit riziko rakoviny je jíst vyváženou dietu obsahující hodně ovoce a zeleniny. Konzumace květáku jednou týdně je spojena se snížením rizika rakoviny o 52 %, brokolice snižuje riziko o 45 %. [11]

Na Ústavu preventivního lékařství v Brně zjišťovali **antimutagenní aktivitu** brokolice šťávy ošetřené vysokotlakou metodou a to 500 MPa po dobu 10 min. Tento způsob ošetření potlačuje růst mikroorganismů při zachování nutričně cenných látek. Isothiokyanáty – štěpné produkty glukosinolátů, kterých je brokolice bohatým zdrojem, vykazují výrazné antimutagenní a antikancerogenní účinky. [12]

Nedávná studie Univerzity v Illinois ukázala, že společná konzumace brokolice a rajčat **snižuje riziko rakoviny prostaty** u mužů. Krysy krmené kombinací brokolice a rajčat vykazovaly zmenšení nádorů ve větší míře, než krysy krmené běžnou stravou. Další studie zabývající se rakovinou prostaty poukazuje na látku indol-3-karbinol (13C), obsaženou v brukvovité zelenině, která zabraňuje reprodukci rakovinných buněk.[13, 14]

Expres genů v nádorech může vést k rezistenci vůči lékům, což bývá hlavní překážkou při léčbě nádorových onemocnění, jako je rakovina plic. Isothiokyanáty, jako např. sulforafan, které obsahuje brukvovitá zelenina, jsou známy jako látky, které podporují detoxifikační enzymy. Tyto složky výživy, které utváří **detoxifikační systém** by měly být podrobně zkoumány, než budou doporučeny jako chemoterapeutikum, protože mohou mít další účinky v kombinaci s chemoterapeutickými léky. [15]

Rakovina tlustého střeva a plic mají vážné důsledky na lidské zdraví. Oběma druhům rakoviny se dá předcházet konzumací zeleniny. Studie hodnotí poslední poznatky v mechanismu rakoviny tlustého střeva a plic v souvislosti s prevencí, při které se uplatňuje zelenina. Je nutné provádět studie, které se zabývají kombinací fytochemikálií a zeleniny, protože pomáhají stanovit změny exprese genů v tlustém střevě, ale obzvláště v plicích. [16]

Další studie se zabývají vlivem brukvovité zeleniny na rakovinu močového měchýře. Vědci z univerzity v Texasu analyzovali stravu 697 lidí, u kterých byla diagnostikována rakovina močového měchýře a 708 lidí, kteří byli zdraví. Byli rozdělení podle stáří, pohlaví a etnika. Průměrný denní příjem brukvovité zeleniny byl znatelně nižší u lidí s rakovinou, než u zdravých jedinců. Strava obsahující brukvovitou zeleninu má za následek **snížení rizika rakoviny močového měchýře** až o 29 %. Protirakovinný vliv brukvovité zeleniny by měli brát v potaz hlavně lidé s vyšším rizikem rakoviny močového měchýře, kterými jsou hlavně muži, kuřáci a starší lidé (nad 64 let). [17, 18]

Brokolice je bohatá na flavanoid nazývaný se kampeferol. Studie prováděná v letech 1984 - 2002 ukazuje, že u žen jejichž strava obsahovala více kampeferolu, bylo prokázáno **snížení rizika rakoviny vaječníku** až o 40 % v porovnání s ženami, které jedí stravu méně bohatou na kampeferol. [17]

Brokolice obsahuje také glukosinoláty, zvláště glukorafanin, který je pekurzorem sulforafanu. Sulforafan ničí bakterii *Helicobacter pylori*, zodpovědnou za **vředovou chorobu žaludku**. Právě tato bakterie je považovaná za původce většiny případů **rakoviny žaludku**. Po laboratorní úpravě byl sulforafan podáván lidem, kterým léčba antibiotiky nepomáhala. V pokusech se zjistilo, že sulforafan povzbuzuje tvorbu bílkovin, které působí proti faktorům způsobující rakovinu. [19]



Obr. 3: *Helicobacter pylori*

Brokolice však není vhodná jen jako prevence rakoviny žaludku, ale podle nejnovějších výzkumů **chrání také kůži** před zhoubnými následky poškození vzniklých působením ultrafialového záření. I zde hraje významnou roli sulforafan, který podle studie Univerzity Johna Hopkinse, pomáhá zlepšení stavu poškozených buněk kůže po opalování a snižuje tak riziko rakoviny. [17] Dokazuje to také studie prováděná na myších, kterým byl podáván sulforafan a u nichž bylo prokázáno snížení rizika růstu nádorů na kůži. [20]

Semena brokolice jsou vydatným zdrojem kyseliny erukové, která je škodlivá pro lidské zdraví. O kyselině erukové se ví, že vykazuje různé negativní účinky na organismus (myokardiální lipidomy, myokardiální nekrosy a narušení oxidační fosforylace). V přepočtu na čerstvou hmotu je obsah kyseliny erukové následující: květy: $0,8 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, výhonky: $320 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, semena: $12\,100 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Na základě těchto výsledků lze předpokládat, že květy a výhonky brokolice podstatně nepřispívají k celkovému příjmu kyseliny erukové ze stravy. [21]

Brokolice obsahuje v hojné míře také glukosinoláty, které mají antimutagenní faktor a svým působením snižují riziko tvorby nádorů. [22] Obsah glukosinolátů a jejich rozkladných produktů v brokolici závisí na genotypu, prostředí a způsobu pěstování. Existují studie zabývající se vlivem těchto faktorů na obsah bioaktivních látek v brokolici. [23]

Byly navrženy a vyhodnoceny možnosti vývoje nových „funkčních potravin“ ke snížení rizika specifických druhů rakoviny. Brokolice byla vyhodnocena jako velmi vhodná potrava, která se do značné míry podílí na snižování rizika rakoviny. Byly studovány do hloubky chemické charakteristiky fytochemických látek brokolice a jejich vliv na bioaktivní složení látek v brokolici. [24]

2 FYZIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY BROKOLICE

2.1 Aminokyseliny

Aminokyseliny se v potravinách nacházejí jako stavební jednotky všech bílkovin, peptidů a také volné. V přírodních materiálech bylo prokázáno asi 700 různých aminokyselin. Některé z nich jsou rozšířeny zcela obecně, jiné se vyskytují jen v určitých druzích rostlin, živočichů, či v jiných organismech. [25]

Z 23 aminokyselin běžně přítomných v bílkovinách dovedou vyšší živočichové a člověk syntetizovat v dostatečném množství ve svém organismu pouze 15, zbývající musí být dodávány v dostatečném množství v potravě. K těmto nezbytným aminokyselinám, tzv. esenciálním, patří: lysin, leucin, isoleucin, fenylalanin, methionin, threonin, valin a tryptofan. [26]. V brokolici se vyskytuje 18 aminokyselin, jejich přehled a množství uvádí příloha I.

2.2 Minerální látky

Minerální látky potravin obvykle definujeme jako prvky obsažené v popelu potravin nebo přesněji jako prvky, které zůstávají ve vzorku potravin po úplné oxidaci organického podílu na oxid uhličitý, vodu aj. Minerální podíl tvoří u většiny potravin 0,5-3 % hmot. Přehled obsahu minerálních látek v brokolici je uveden v příloze II. Přehled obsahu doporučených denních dávek minerálních látek je uveden v příloze III.

Vápník se v potravinách rostlinného původu nalézá ve formě rozličných solí, z nichž např. fytinát a oxalát jsou nevstřebatelné, takže je organismus nemůže využít. [26] Stupeň resorpce vápníku ze špenátu, kde převládající formou je oxalát vápenatý, bývá kupříkladu jen 2-5 %. [27] U brokolice nebyl tento údaj nalezen.

Zdrojem **železa** pro člověka bývají potraviny živočišného i rostlinného původu. V potravinách rostlinného původu bývá železo vázáno v různých komplexech, zvláště s alifatickými hydroxykyselinami, aminokyselinami, thioly, fenoly, ale i s polysacharidy, polynukleotidy, peptidy atd. Z hlediska výživy jsou nevyužitelné těžce rozpustné soli, např. fytinát železitý, dále polyhydroxyželezité komplexy, popř. i jiné komplexy. [26] Dobrým zdrojem železa je právě i brokolice.

V zelených rostlinách je převážná část **hořčíku** vázána jako centrální atom v chlorofylu, látky nezbytné pro fotosyntetické děje. [26] Chlorofyly jsou prakticky jediná přírodní zelená barviva, která se navíc vyskytují přírodě v téměř neomezeném množství. V potravinách se vyskytuje hlavně chlorofyl *a* a chlorofyl *b*, které jsou součástí vyšších rostlin v poměru přibližně 3:1.

Řada potravin rostlinného původu s vysokými koncentracemi **fosforu** obsahuje značné množství málo rozpustné fytové kyseliny a jejich solí fytátů. Brokolice se řadí mezi rostliny s nízkým obsahem fytové kyseliny. [27] Vhodným zdrojem fosforu, kromě mléčných výrobků a luštěnin, je také brokolice.

Draselné ionty se podílejí na důležitém transportním systému, při kterém transport sodných iontů z buněk směrem ven je spjat s transportem draselných iontů směrem dovnitř. Jde o tzv. spřaženou neutrální pumpu. Jiná situace je v rostlinách, kde draselným iontům připadá mimořádná úloha při řízení metabolických procesů. Hlavním zdrojem draslíku pro člověka jsou tedy potraviny rostlinného původu. Dobrým zdrojem jsou fazole, špenát, brokolice atd.

Zinek je součástí mnoha enzymů, např. *karboanhydrázy*, *alkoholdehydrogenázy*, některých *peptidas*, *esteras* atd. V živočišných a rostlinných potravinách bývá zinek vázán v různých komplexech. Nejčastěji se zinek váže přes thiolové skupiny, mimo jiné např. pomocí cysteinu. Známé jsou i jeho vazby s histidinem, někdy též s kyselinou L-askorbovou. Jeho dobrým zdrojem jsou některé obilniny, luštěniny, maso, játra a některé zeleniny jako je opět brokolice. [26]

Měďnaté ionty jsou součástí aktivních center řady enzymů, zejména *oxidoreduktáz*. [27] Zdrojem mědi je i brokolice.

Ukázalo se, že **selen** může do jisté míry zastoupit vitamin E a že je pravděpodobně účinným inhibitorem oxidace lipidů v organismu. V živočišných a rostlinných organismech byl selen prokázán ve formě některých selenových analogů siřných aminokyselin, např. jako selenocystein. [26]

V živočišných i rostlinných organismech bývá obsažen velký počet rozmanitých **siřných sloučenin**, fyziologicky účinných: siřné aminokyseliny, sulfatidy, acetyl-SCoA, thiolové enzymy, kyselina lipoová aj. V mnoha rostlinách se nalézá ještě značný počet dalších sloučenin síry, např. siřné heteroglykosidy. Produkty enzymově katalyzované hydrolýzy někte-

rých těchto glykosidů patří ke strumigenům, což jsou látky, které vyplavují jod z těla. Naproti tomu některé deriváty cysteinsulfoxidu, nalézající se v rostlinách čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*) a lilkovitých, mají poměrně silný antihypercholesterolemický účinek. [26]

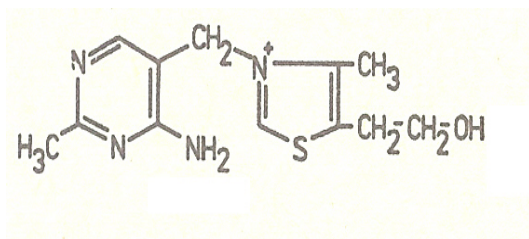
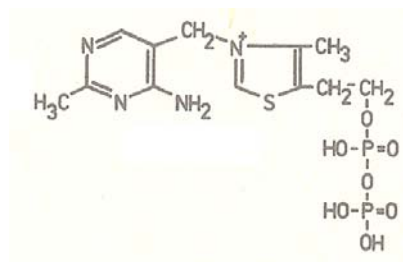
Rostliny přijímají toxické prvky jednak z půdního roztoku kořenovým systémem, jednak z atmosféry depozicí zejména na povrchu listů (foliární příjem). Mezi rostliny, které silně akumulují **olovo a kadmium** z půdy patří špenát, hlávkový salát a některé olejniny. Např. špenát, který patří do stejné čeledi jako brokolice, obsahuje 0,01-0,29 mg.kg⁻¹ olova a 0,01-0,39 mg.kg⁻¹ kadmia. Tolerovaná denní dávka olova činí 50 µg a kadmia 67-83 µg (při tělesné hmotnosti 70 kg). Při intoxikaci olovem nebo kadmiem mohou být poškozeny ledviny a játra. [27]

Koncentrace **rtuti** ve většině potravin se pohybují v desetitisícinách až setinách mg.kg⁻¹. Tolerovatelná dávka celkové rtuti pro dospělého člověka činí 50 µg (při tělesné hmotnosti 70 kg). Hlavní orgány, které jsou poškozeny při intoxikaci rtutí jsou ledviny a mozek. [27]

2.3 Vitaminy

V potravinách se vitaminy vyskytují v proměnlivém množství zpravidla od µg.kg⁻¹ po stovky až tisíce mg.kg⁻¹ podle druhu vitamínu, druhu potraviny a způsobu jejího zpracování. Obsah vitaminů v potravinách ovlivňuje kromě genetických předpokladů daného organismu mnoho dalších faktorů. U potravin rostlinného původu je významný zejména stupeň zralosti, klimatické podmínky během růstu, především množství srážek, hnojení, posklizňové skladování a zpracování. [27] Obsah vitaminů v brokolici udává příloha IV a doporučené denní dávky vitaminů udává příloha V.

Thiamin (Vitamin B₁), [3-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-4-methyl-5-(2-hydroxyethyl) thiazoliumchlorid] je krystalická látka, která je ve vodě při laboratorní teplotě velmi dobře rozpustná. [26] Thiamin se vyskytuje především jako volná látka a ve formě fosforečných esterů, jako thiamindifosfát nebo thiamintrifosfát. [27]

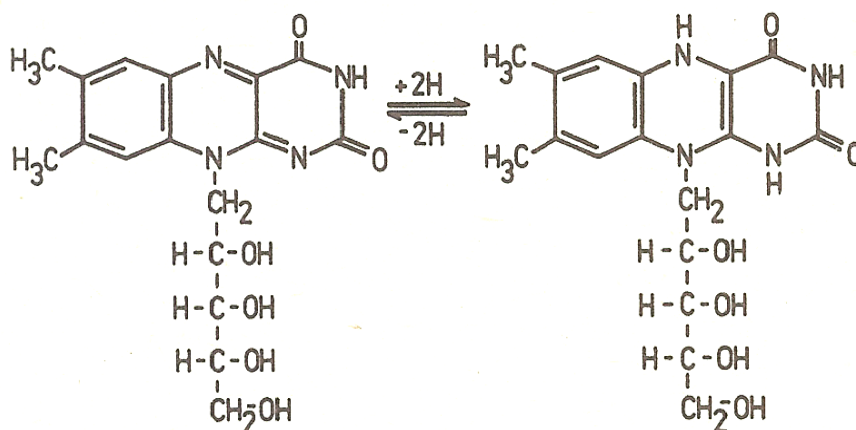
Vitamin B₁ – thiamin

Thiamindifosfát, TDP

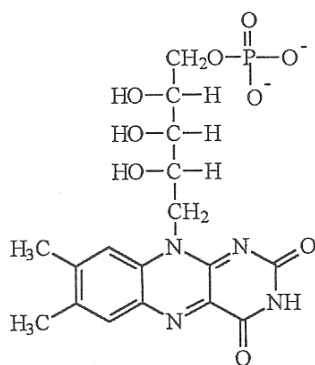
Avitaminosa thiaminu je známá jako nemoc „beri-beri“, která se ve své typické formě projevowała u osob živených převážně loupánou rýží. [26] Tato nemoc se projevuje nervovými příznaky, atrofií svalů, poruchami srdeční činnosti a úbytkem kosterního svalstva. [28]

Hlavním zdrojem thiaminu v potravinách jsou pivo, játra, maso, vejce, mléko, špenát, brokolice atd. Ztráty při vaření u listové zeleniny jsou asi 40 %. [27]

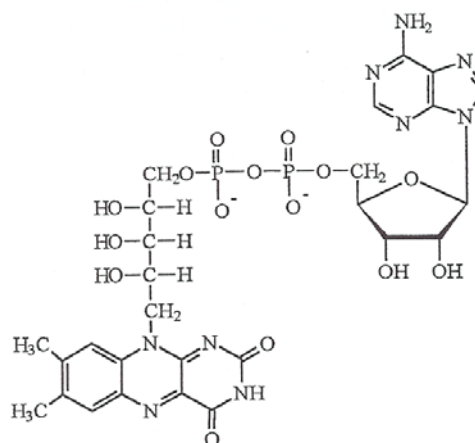
Riboflavin (Vitamin B₂) patří do skupiny látek zvaných flaviny. Základem struktury riboflavinu je isoalloxazinové jádro, na které je vázán ribitol, alditol ovozený od D-ribosy.

Vitamin B₂ – riboflavin

Riboflavin se vyskytuje v biochemických systémech ve formě koenzymů oxidoredukčních enzymů. Nejběžnějšími jsou flavinmononukleotid (FMN) a flavinadeninukleotid (FAD).



FMN

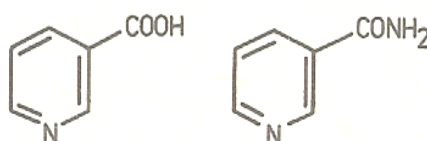


FAD

V neutrálních a alkalických roztocích je velmi labilní a rozkládá se za vzniku fyziologicky neúčinných rozkladných produktů. Je velmi citlivý především na světelné záření. Účinkem světla v neutrálním nebo kyselém prostředí přechází odštěpením postranního řetězce na lumiflavin, v alkalickém prostředí poskytuje za stejných podmínek lumichrom.

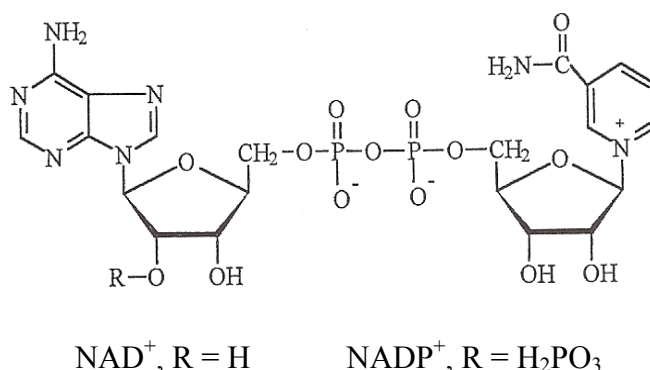
Avitaminosa se projevuje zánětlivými změnami sliznic a kůže, eventuálně i nervovými poruchami. K nejbohatším zdrojům riboflavinu patří játra, vejce, sýr a maso a také brokolice. Během technologického a kulinářského zpracování potravin dochází ke ztrátám riboflavinu především vyluhováním. [26]

Niacin (Vitamin B₃), je společným označením pro **kyselinu nikotinovou a její amid**. [27]



Kyselina nikotinová a nikotinamid

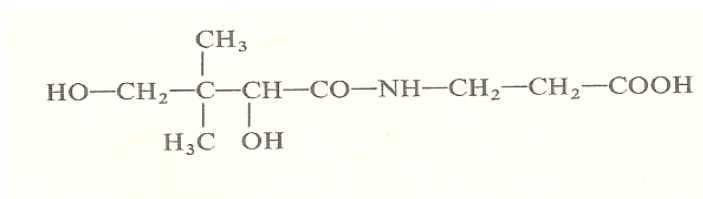
Kyselina nikotinová i její amid jsou stejně fyziologicky účinné. [26] Nikotinamid je součástí nikotinamidadeninukleotidu (NAD⁺) a nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADP⁺).



Nukleotidy obsahující amid kyseliny nikotinové jsou koenzymy *pyridinových dehydrogenáz*. Nedostatek kyseliny nikotinové v potravě způsobovala dříve pelagru, která se projevovala poruchami nervovými, kožními a chorobami trávicího ústrojí.

Nejbohatším zdrojem kyseliny nikotinové jsou kvasnice, z hlediska výživového maso, vnitřnosti a také brokolice. V rostlinných pletivech převažuje kyselina nikotinová, v živočišných tkáních její amid. [26]

Kyselina panthotenová neboli vitamin B₅ (D-(+)- α,γ -dihydroxy- β -dimethylbutyryl- β' -alanin) je většinou viskózní, slabě nažloutlá olejovitá látka. Je velmi dobře rozpustná ve vodě, v roztoku je stabilní v rozmezí pH 5,5 až 7,0. Při zahřátí s kyselinami a alkáliemi se snadno štěpí. [26]

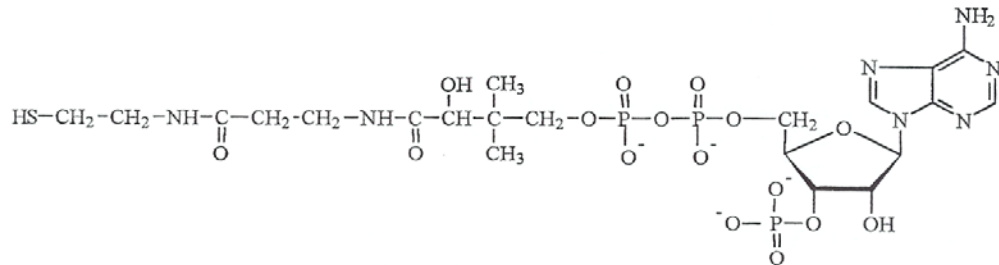


Vitamin B₅ – Kyselina pantotenová

Kyselina pantothenová je složkou koenzymu A, který přenáší zbytek kyseliny octové a jiných karboxylových kyselin ve formě acetyl-SCoA. Koenzym A se podílí na řadě metabolických pochodů (β -oxidaci mastných kyselin, citrátovém cyklu, metabolismu aminokyselin, tuků a sacharidů). [26] Koenzym A zasahuje také do biosyntézy cholesterolu, steroidních hormonů, porfyrinu a hemoglobinu.

Kyselina pantothenová se v biochemických systémech vyskytuje ještě v další formě a to vázaná v nosném proteinu označovaném jako ACP-SH (ACP, Acyl Carrier Protein), který má významnou úlohu při biosyntéze mastných kyselin. [28]

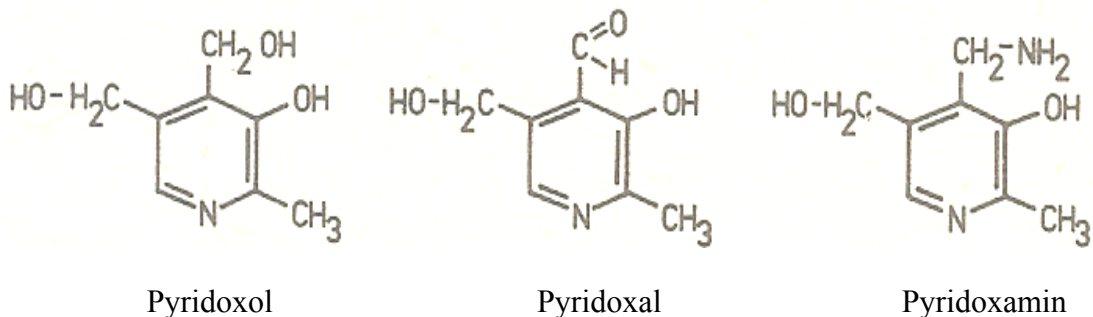
Její nedostatek se projevuje degenerativními zánětlivými změnami na sliznicích, především dýchacího a trávicího systému.



CoA-SH

Dobrymi zdroji kyseliny pantothenové jsou kromě kvasnic především vnitřnosti, jako játra, ledviny apod., z ostatních potravin pak vejce a listová zelenina, dále pak brokolice.

Pojmem **pyridoxin** (Vitamin B₆) se označují všechny tři fyziologicky účinné formy vitamínu B₆, tzv. pyridoxinová triáda, tvořená pyridoxolem, pyridoxalem a pyridoxaminem [26]

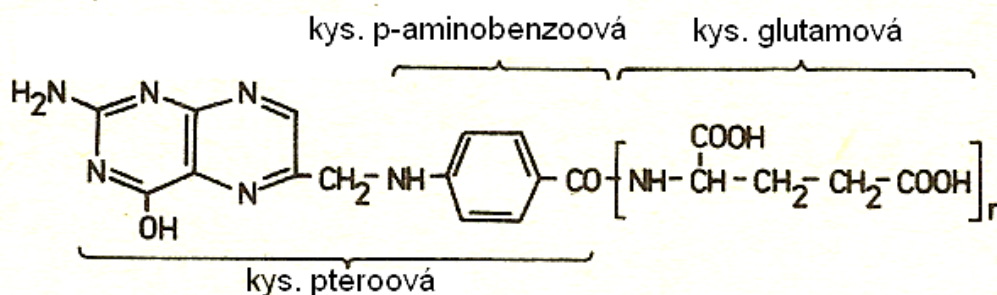


V biochemických procesech vystupuje pyridoxin ve formě fosfátových derivátů pyridoxal-fosfátu a pyridoxaminfosfátu. Pyridoxalfosfát se jako kofaktor *dekarboxylas* zúčastňuje reakcí v metabolismu aminokyselin. [28]

V potravinách rostlinného původu se vyskytuje hlavně pyridoxol a pyridoxal. Nejběžnější formou je 5'-O-(β-D-glukopyranosyl)pyridoxol, který v ovoci a zelenině reprezentuje 5 - 80 % celkového obsahu vitamínu. [27]

Nedostatek pyridoxinu způsobuje především nervové poruchy. K nejbohatším zdrojům pyridoxinu patří droždí, maso, játra, obiloviny a některé druhy zelenin, kam patří také brokolice. [26]

Kyselina listová neboli vitamin B₉ je N-(2-amino-4-hydroxy-6-pteridylmethyl)-p-aminobenzoylglutamová kyselina. Kromě této kyseliny se vyskytují v přírodě její další deriváty nazývané foláty. Kyselina listová je látka krystalická, žluté barvy, při záhřevu se rozkládá.



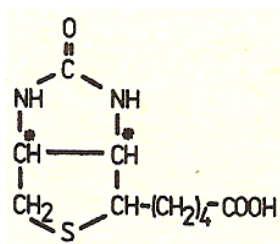
Vitamin B₉ - kyselina listová

Aktivní formy kyseliny listové se v enzymových systémech podílejí na přenosu jednouhlikatých radikálů, především methylu, hydroxymethylu, formylu a karboxylu. [26] Hraje také důležitou úlohu v metabolismu aminokyselin. Uplatňuje se také v syntéze a opravách poškozených nukleových kyselin, při tvorbě krevních buněk a některých součástí nervových tkání. Je esenciální pro vlastní růst a optimální fungování nervového systému a kostní dřeně. [29]

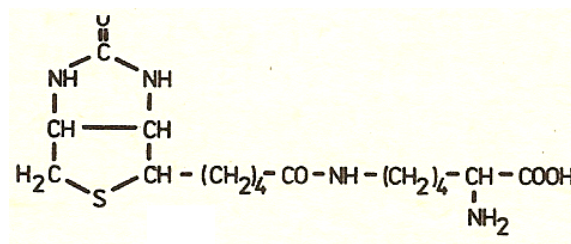
Při jejich nedostatku v potravě dochází k poruchám tvorby krve. Dobrymi zdroji kyseliny listové jsou zelené části rostlin, to znamená zelenina a v menší míře ovoce. Ze živočišných tkání jsou nejbohatším zdrojem kyseliny listové játra. V biologických substrátech je kyselina listová často vázána na bílkoviny. [26]

Dostatečný příjem folátů snižuje riziko výskytu defektů neurální trubice u novorozenců, kardiovaskulárních chorob a některých forem rakoviny. Obsah folátů v brokolici byl stanoven na 63 μg.100g⁻¹. [30]

Biotin [(+)-cis-2-(4-karboxybutyl)-3,4-(2-oxo-3,4-imidazolidino)thiofan], za svůj vysloveně hydrofilní charakter vděčí jednak karboxylové skupině, ale také, a to především, vázané močovině.



Biotin



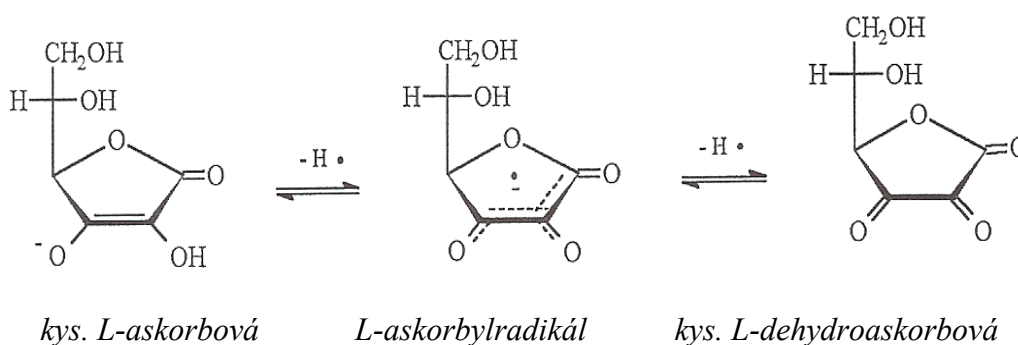
Biocytin

V přirozených systémech je biotin součástí některých *ligas*, které katalyzují inkorporaci nebo přenos oxidu uhličitého. Je také koenzymem *karboxylas* a uplatňuje se při biosyntéze mastných kyselin. [26] Komplex aktivního biotinu s proteinem se označuje BCCP (*Biotin Carboxyl Carrier Protein*). [28]

Zdrojem biotinu je řada potravin, avšak koncentrace vitamínu ve většině z nich obvykle bývá nízká. Biotin je částečně přítomen jako volná látka (mléko, ovoce, zelenina) a částečně vázaný na bílkoviny (živočišné tkáně, rostlinná semena) [27].

Nedostatek biotinu v organismu člověka je extrémně vzácný. Deficienční symptomy zahrnují anorexii, zvracení, dermatosu a ztrátu vlasů. [31] Biotin se vyskytuje v těchto potravinách: maso, játra, vejce, mléko, listová zelenina a taktéž v brokolici.

Vitamin C tvoří L- askorbová a L-dehydroaskorbová kyselina. Kyselina L-askorbová je bílá krystalická látka, dobře rozpustná ve vodě. Snadno se oxiduje vzdušným kyslíkem na kyselinu L-dehydroaskorbovou. V biologických systémech katalyzují oxidaci kyseliny askorbové přímo nebo nepřímo různé enzymy jako *askorbáza*, *peroxidáza*, *cytochromoxidáza* a jiné.



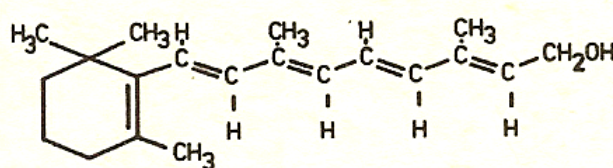
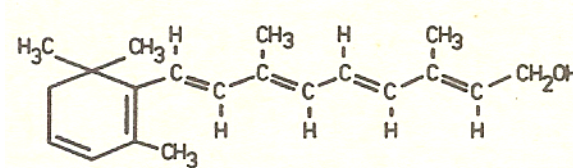
Obr. 4: Oxidace kyseliny L-askorbové

Kyselina askorbová se v biologických systémech účastní hlavně přenosu elektronů v oxidačně redukčních systémech. Podílí se na některých hydroxylačních pochodech (hydroxylace prolinu apod.). Kyselina L-dehydroaskorbová má vzhledem k reverzibilnímu redoxnímu systému stejnou fyziologickou účinnost jako kyselina askorbová. [26]

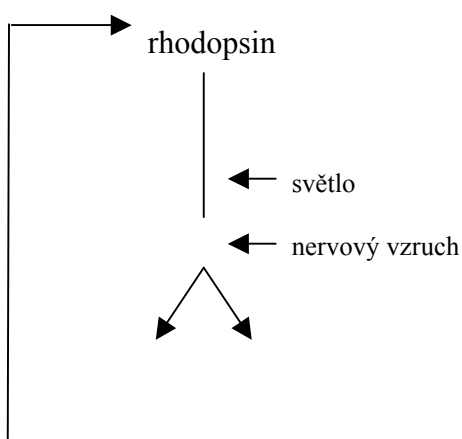
Vitamin C je důležitý, ve vodě rozpustný antioxidant působící v biologických tkáních, kde snadno vychytává reaktivní kyslíkové a dusíkaté radikály a tím efektivně chrání ostatní substráty před oxidativním poškozením. Působí rovněž jako antioxidant při regeneraci α -tokoferolů, když při eliminaci radikálů rozpustných v tuku vznikají tokoferoxylové radikály, přičemž se mění na askorbylový radikál. [32]

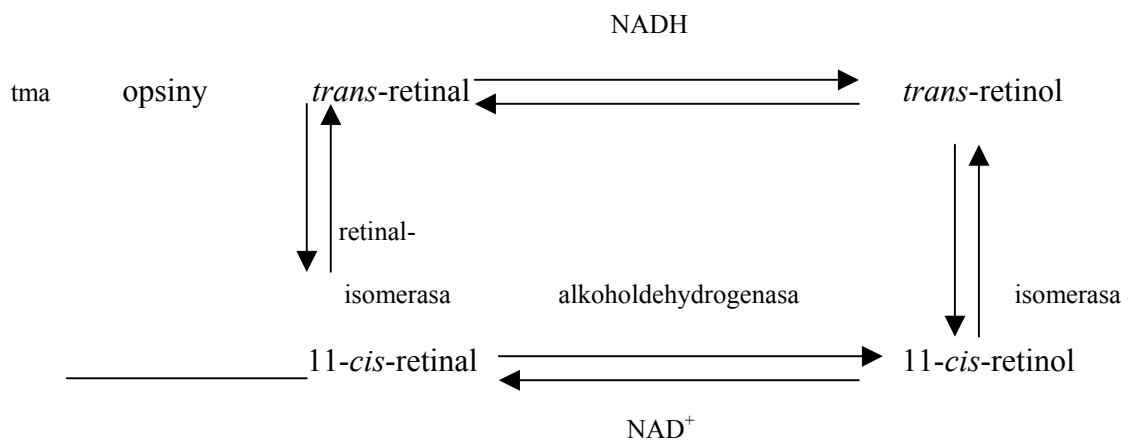
V potravinách rostlinného původu je zpravidla 90-95 % vitamínu přítomno ve formě askorbové kyseliny, zbytek tvoří dehydroaskorbová kyselina. Nejbohatším zdrojem vitamínu C je ovoce a zelenina. Nejvyšší obsah vitamínu C má čerstvé ovoce a zelenina. [27] Studie uvádí, že obsah vitamínu C v brokolici se pohybuje v rozmezí od 40,6 do 107 mg.100 g⁻¹. [33]

Účinnou formou vitamínu A jsou **retinoly** a **retinaly**. Retinol obsahuje ve své molekule β -jononový kruh a pět konjugovaných dvojných vazeb, z nichž čtyři v postranním řetězci mohou vytvářet příslušné *cis* a *trans*-izomery.

Vitamin A₁Vitamin A₂

Retinol má velký význam při fotorepci v oční sítnici (Waldův cyklus). [26] Tento cyklus umožňuje převod světelných impulsů na nervové vzruchy. [28]



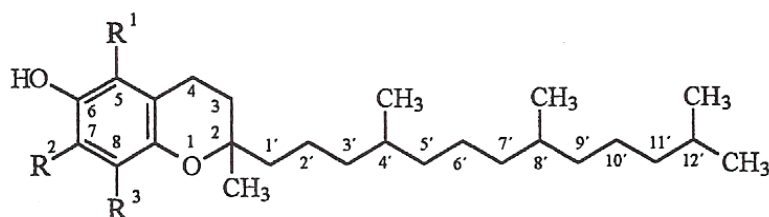


Obr.5: Waldův cyklus

Retinol a neoretinol se vyskytují pouze v živočišných materiálech, zatímco v rostlinných systémech se nacházejí pouze provitaminy vitaminu A, prekurzory retinolu – **karotenoidy**.

Dobrym zdrojem fyziologicky účinných karotenoidů, zvláště β -karotenu, jsou především některé druhy ovoce a zeleniny (mrkev, špenát, petržel, brokolice a rajská jablčka). [26]

Do skupiny **tokoferolů**, neboli vitamin E řadíme látky, které jsou odvozeny od tokolu (2-methyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)-6-hydroxychromanu a tokotrienolu (2-methyl-2-(4',8',12'-trimethyldecyl-3';7',11-trienyl-6-hydroxychromanu). Základní látkou je α -tokoferol (5,7,8-trimethyltokol).



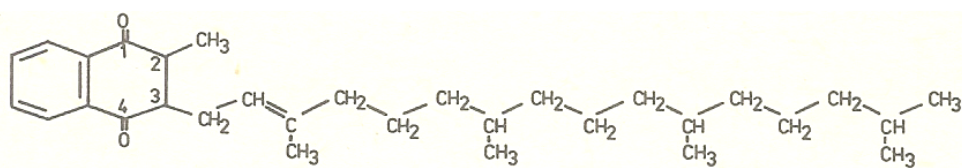
$R^1 = H$	$R^2 = H$	$R^3 = H$	tokol
$R^1 = CH_3$	$R^2 = CH_3$	$R^3 = CH_3$	α -tokoferol
$R^1 = CH_3$	$R^2 = H$	$R^3 = CH_3$	β -tokoferol
$R^1 = H$	$R^2 = CH_3$	$R^3 = CH_3$	γ -tokoferol
$R^1 = H$	$R^2 = H$	$R^3 = CH_3$	δ -tokoferol

Nejúčinnější je α -tokoferol. Podle Joffa a Harrise klesá účinnost v pořadí tokoferolů α - > β - > γ - > δ -tokoferol v poměru 100 :40 (5 až 8) : 1.

Při nižších teplotách jsou stále vůči alkáliím a za vyšších teplot se rozkládají. Jsou velmi citlivé na kyslík a velmi snadno se oxidují. Ultrafialovým zářením se tokoferoly rychle rozkládají. Významné jsou zejména antioxidační vlastnosti tokoferolů. [26] Vitamin E v lidském organismu působí jako účinný antioxidant membrán, který aktivně vstupuje do řetězové reakce, přerušuje kaskádu reakcí volných radikálů a chrání biomembrány před oxidativním útokem těchto radikálů. Nejsilnějším antioxidantem ze skupiny tokoferolů je α -tokoferol, který je zároveň nejhojněji zastoupen v lidském organismu. [34]

Vitamin E se nachází především v potravinách rostlinného původu, v menším množství v potravinách živočišného původu. [27] Hlavním zdrojem tokoferolů jsou oleje z obilných klíčků a rostlinné oleje. Ve větším množství jsou obsaženy rovněž v másle, vejčích, luštěninách a v brokolici. [26]

Vitamin K₁ neboli **fylochinon** obsahující hexahydrotetraprenylový řetězec ftyl (2-methyl-3-tytyl-1,4-naftochinon) se vyskytuje v potravinách rostlinného původu. Další látkou je vitamin K₂ (menachinon-n, 2-methyl-3-multiprenyl-1,4-naftochinon,). Vitamin K₃ (menadion, 2-methyl-1,4-naftochinon) je syntetická látka.

Vit. K₁ - fyllochinon

K nežádoucím reakcím a ztrátě aktivity vitamínu K dochází působením světla (fotodegradace na řadu produktů), při reakci s redukčními činidly a v alkalickém prostředí.

V potravinách rostlinného původu se vyskytuje výhradně vitamin K₁, který je běžnou složkou buněk specializovaných na fotosyntézu (chloroplastů). Bohatým zdrojem vitamínu K jsou hlavně zelené listové zeleniny (v zelených listech z okraje hlávky je 3-6 krát vyšší obsah vitamínu, než ve žlutých listech uvnitř hlávky). [27]

2.4 Přirozená barviva

2.4.1 Karotenoidy

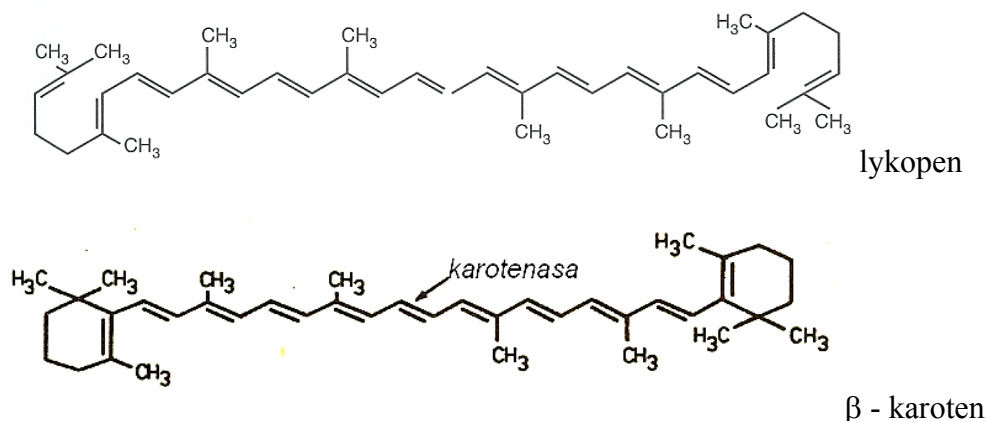
Karotenoidní barviva tvoří skupinu žlutých, oranžových, červených až fialových pigmentů, které ve většině případů doprovázejí chlorofyly v rostlinách. Jsou to především β -karoten, lutein, violaxanthin a neoxanthin. [26] Karotenoidy nacházející se v brokolici uvádí následující tabulka:

Tabulka 2: Obsah karotenoidů v brokolici [6]

Karotenoid	Obsah [$\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$]
β -karoten	1573
α -Karoten	0
β -kryptoxanthin	0
Lykopen	0
Lutein + zeaxanthin	1121

Z hlediska chemického složení je lze rozdělit na karoteny a xantofyly. Karotenoidní barviva jsou nenasycené sloučeniny tvořící řadu isomerů. V přirozených systémech se však nejčastěji vyskytují v all-trans-konfiguraci. Všechny lze odvodit od lykopenu, hlavního pig-

mentu rajčat, šípků a jiných plodů. Izomerací a cyklizací lykopenu lze postupně odvodit γ -, α - a β - karoten.



Karotenoidní barviva, která ve své molekule obsahují β -jononový kruh, jsou fyziologicky významná, neboť plní funkci provitaminu A. Z hlediska přirozených barviv je další důležitou karotenoidní látkou lutein (β -xanthofyl), rozšířený v rostlinách především v chloroplastech. [26]

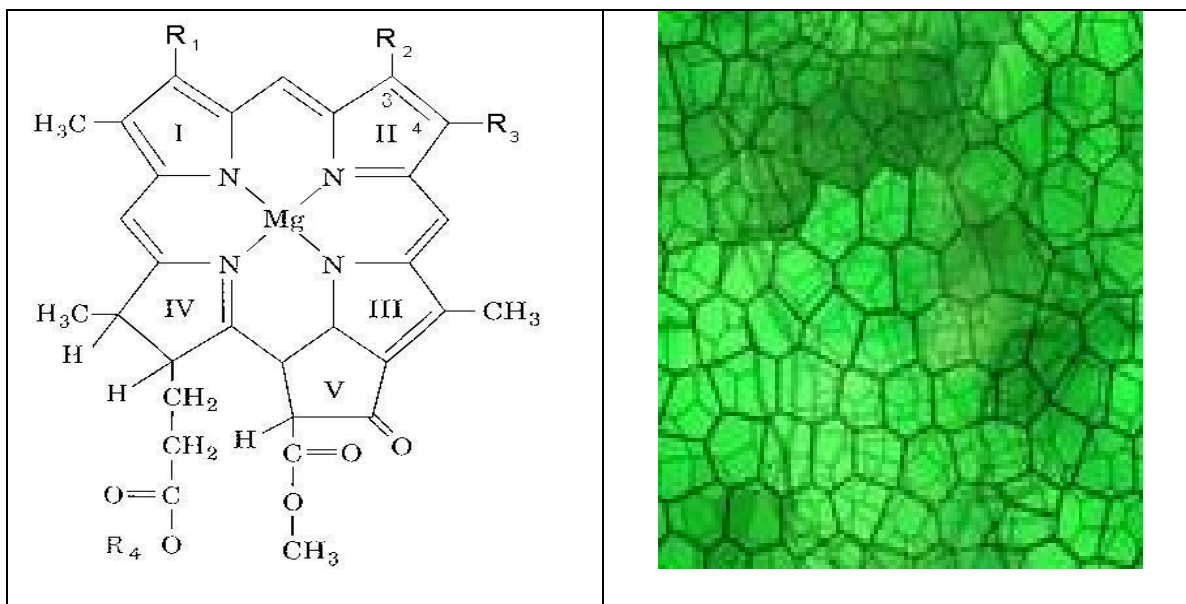
Studie zaměřená na ztrátu β -karotenu ve vařené brokolici během skladování při 1°C , 5°C a později při 10°C během 14 dnů dokazuje, že β -karoten zůstává po tuto dobu stabilní. [35] Brokolice je poměrně bohatá na β -karoten. Studie zabývající se obsahem β -karotenu v brokolici a jeho antioxidačními vlastnostmi uvádí jeho obsah v rozmezí od 0,04 do $2,7 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. [33]

Karotenoidy, a tedy i β -karoten jsou důležité biologické sloučeniny, které mohou inaktivovat elektronicky excitované molekuly, tento proces se nazývá zhášení (quenching). Příkladem takové molekuly je singletový molekulární kyslík (O_2), který vzniká fotochemickou reakcí, enzymaticky nebo při procesu peroxidace lipidů v membránách (fotoexcitace, chemiexcitace). Lidský organizmus používá celou řadu obranných systémů a faktorů proti působení reaktivního kyslíku, z nichž některé jako enzymy *superoxidová dizmutáza* a *glutathionová peroxidáza*, jsou geneticky zakódovány, ale jiné, mezi nimi i karotenoidy, jsou dodávány nutriční cestou. Nejnovější studie prokazují, že ještě účinnější „vychytávač“ kyslíkových radikálů než β -karoten je lykopen. [36,37]

2.4.2 Chlorofyly

Chlorofylová barviva (chlorofyly) jsou skupinou zelených barviv, která se nachází v pletivech zajišťující fotosyntézu. [38] Molekuly chlorofylu jsou specificky uloženy v proteinových pigmentových komplexech, které se nazývají fotosystém. Nacházejí se v chloroplastech. Funkce chlorofylu je absorbovat světlo a přenést jeho energii do specifických reakčních center fotosystému. Chlorofyl má podobnou strukturu a je produkován stejnými metabolickými drahami jako porfyrinové pigmenty jako je např. hem. [39]

Jejich téměř jediné využití je jako potravinářská barviva, ale velká nestabilita zabraňuje většímu rozšíření. Chlorofyly jsou jako potravinářská barviva téměř ve všech zemích akceptována. [38]



Obr. 6: Chlorofyl

Obr. 7: Chlorofyl uložený v chloroplastech

2.4.3 Flavonoidy

Flavonoidy jsou barevné sloučeniny uplatňující se v rostlinných systémech. V přírodě se vyskytují jak ve formě volné, tak i glykosidicky vázané. Obě formy jsou barevné a téměř stejně stálé. [26] Hlavním zástupcem této početné skupiny jsou flavonoly. Nejznámější jsou kvercetin a kampeferol. Kvercetin je všudypřítomný v ovoci a zelenině. Kampeferol se nachází převážně v listové zelenině a ovoci. [40]

S výjimkou anthokyanů jsou málo pestré (světle až citronově žluté) a během technologických operací ani během skladování potravin se nemění do té míry, aby podstatným způsobem ovlivnily zpracovávané potraviny.

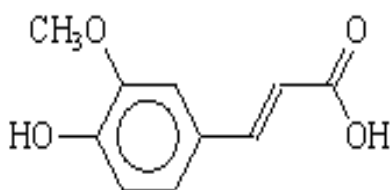
Barevná intenzita může být pozměněna tvorbou komplexních sloučenin flavonoidů s těžkými kovy. Některé flavonoidy ovlivňují i chuťové vlastnosti rostlinných materiálů. Flavonoidní látky jsou rovněž důležitými antioxidanty. [26]

Mezi nejdůležitější flavonoidy obsažené v brokolici patří kampeferol, který má výrazný vliv na snížení rizika rakoviny vaječníků u žen. [17]

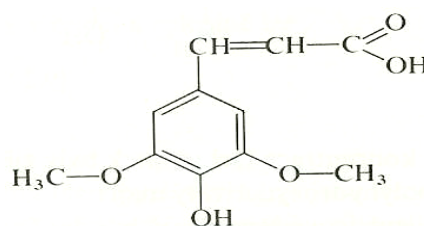
2.5 Rostlinné fenoly

V brokolici se nachází tyto podskupiny rostlinných fenolů: hydroxybenzoové a hydroxyskořicové kyseliny, chalkony a aurony.

Hydroxybenzoové a hydroxyskořicové kyseliny jsou v rostlinné říši velmi rozšířeny a vyskytují se téměř ve všech rostlinách. V brokolici se nachází především dvě hydroxyskořicové kyseliny a to 4-hydroxy-3-methoxyskořicová (ferulová), a 4-hydroxy-3,5-dimethoxyskořicová (sinapová).



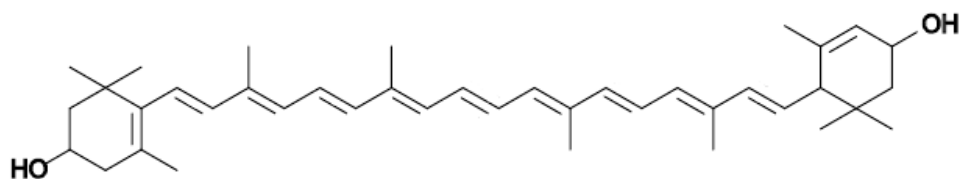
Kyselina ferulová



Kyselina sinapová

Uvedené kyseliny se vyskytují ve volné formě jen v nízkých koncentracích. V přírodě jsou převážně zastoupeny ve formě esterů a byly rovněž nalezeny jako aglykony glykosidů. Nejvyšší koncentrace těchto látek byly zjištěny v listech zelených rostlin. [26]

Skupina **chalkonů** a **auronů** není v rostlinách příliš zastoupena. Vyskytují se především v okvěti různých rostlin. [26] Z chalkonů obsažených v brokolici je nejznámější lutein.



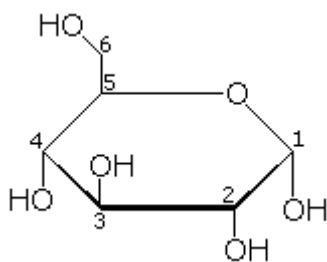
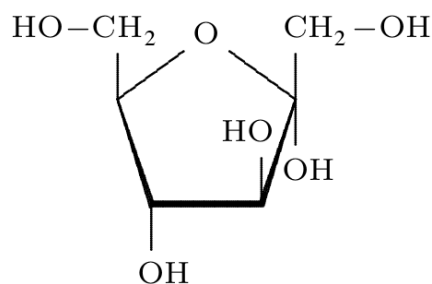
lutein

Lutein společně se zeaxantinem patří zároveň mezi karotenoidy s preventivním účinkem proti onemocnění zraku, degeneraci makuly spojené se stárnutím a očním zákalem. Prevence očních chorob prostřednictvím stravy je proto vysoce aktuální. Obsah luteinu v tepelně upravené brokolici je 2,2 mg.100 g⁻¹ čerstvé hmoty. [41]

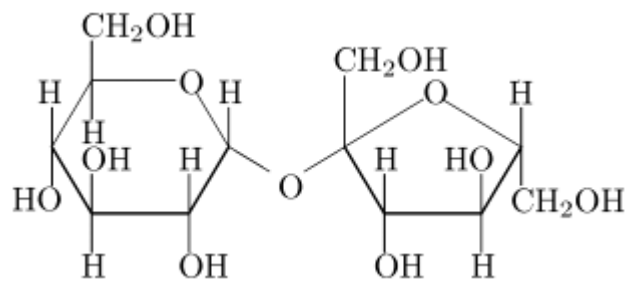
2.6 Sacharidy

Sacharidy neboli cukry jsou nejrozšířenější složkou potravy. Chemickým složením jsou sacharidy polyhydroxyaldehydy nebo polyhydroxyketony nejméně se třemi alifaticky vázanými uhlíkovými atomy. Obsah hlavních sacharidů a vlákniny v brokolici je uveden v příloze VI.

Hlavními monosacharidy brokolice jsou **glukosa** a **fruktosa**. V malém množství jsou přítomny další monosacharidy (arabinosa, xylosa aj.)

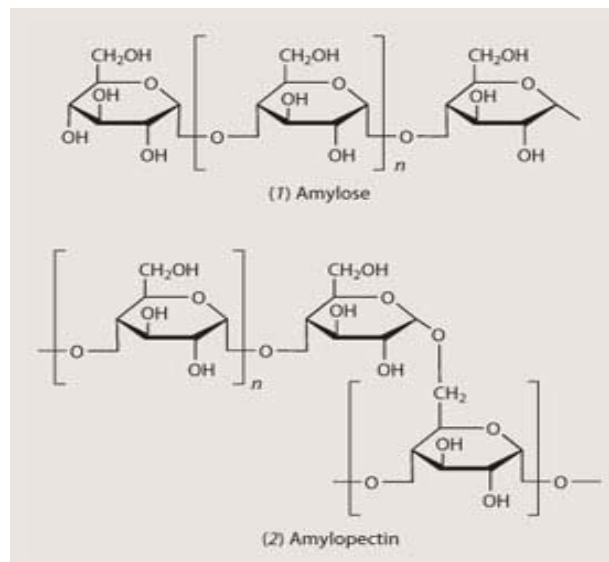
 α -D-glukosa α -D-fruktosa

Z oligosacharidů se v brokolici vyskytuje pouze **sacharosa**. Sacharosa se vyskytuje ve vegetativních částech rostlin, např. v listech a stoncích.



Sacharosa

Hlavním zásobním polysacharidem brokolice je **škrob**. Na rozdíl od ovoce obsah škrobu zráním roste, vyšší obsah bývá v přezrálých zeleninách. [27] V brokolici se vyskytuje malé množství škrobu, které je především vázané na celulosu.



Škrob

Dalším polysacharidem brokolice je celulóza a hemicelulóza (**vláknina**), která je stavební součástí celozrnných potravin, zejména zeleniny a ovoce. Tvoří ji dlouhé řetězce glukózových molekul. Vlákna má významné příznivé vlastnosti: váže část tuků (i cholesterol) a obsah celulózy zvětšuje objem stolice. [42]

2.7 Lipidy

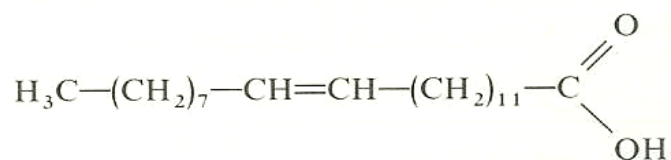
2.7.1 Mastné kyseliny

Z hlediska výživy jsou nejvýznamnější složkou lipidů mastné kyseliny. V brokolici se vyskytují tyto skupiny mastných kyselin (MK): nasycené mastné kyseliny, nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou (monoenoové) a nenasycené mastné kyseliny s několika dvojnými vazbami (polyenoové), kam patří kyselina linolenová [8]. Celkový obsah lipidů v brokolici je 0,49 g.100 g⁻¹. [6] Následující tabulka udává obsah mastných kyselin v brokolici.

Tabulka 3: Obsah mastných kyselin v brokolici: [6]

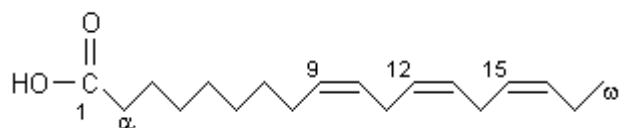
Mastné kyseliny	Obsah [g.100 g ⁻¹]
Nasycené MK	0,050
Monoenoové MK	0,026
Polyenoové MK	0,130

Neobvyklou strukturu má **kyselina eruková** (*cis*-11-dokosenová), která je přítomna v semenech rostlin brukvovitých, hořčičných nebo řepkových. [26]



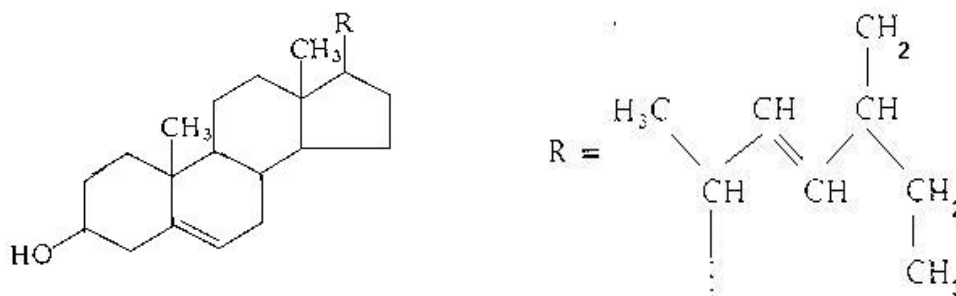
Kyselina eruková

V brokolici se také nachází **kyselina linolenová**, která obsahuje tři dvojně vazby. [25]



3,7, α-linolenová kyselina

Hlavní podíl doprovodných látek lipidů tvoří steroly. Jako steroly označujeme alicyklické alkoholy. Vyskytují se buď volné nebo vázané na mastné kyseliny či aromatické kyseliny. V brukvovitých rostlinách je obsažen **brassikasterol**.



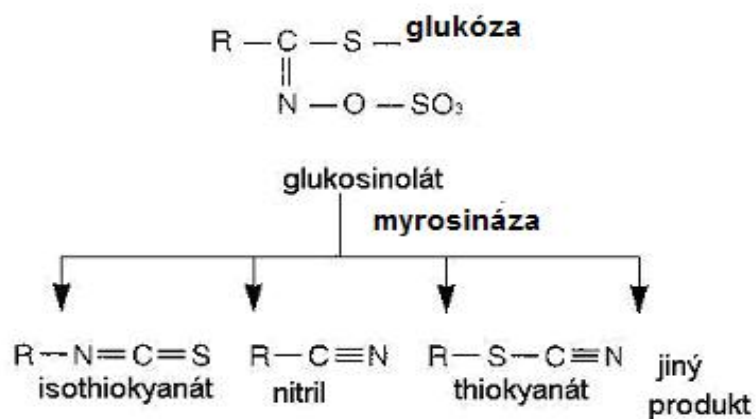
Brassikasterol

2.8 Přirozené toxické složky potravin

Nejčastěji se setkáváme s různými strumigeny (goitrogeny), lathyrogeny, karcinogeny a mutageny. [26] Mezi látky mající jak toxické tak antimutagenní a antikancerózní účinky, patří **glukosinoláty**, které jsou v brokolici i ve všech zeleninách rodu *Brassica* obsaženy v hojné míře.

Glukosinoláty (GSL) se vyskytují především v semenech, ale jsou přítomny ve všech vegetativních a dalších částech rostlin čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Jejich hlavním zdrojem v potravě člověka je zelí, květák, kapusta, kedluben a v současné době také brokolice a čínské zelí. Obsah glukosinolátů v brukvovitých zeleninách je značně proměnlivý v závislosti na druhu zeleniny, odrůdě, podmínkách během vegetace a dalších. Jako příklad je v příloze VII uveden obsah glukosinolátů v zeleninách. Odhaduje se, že denní příjem glukosinolátů je zhruba 50 mg, u vegetariánů dokonce 110 mg, což je množství srovnatelné kupříkladu s denním příjmem vitamínu C. Běžně se v zelenině vyskytuje několik různých glukosinolátů, jejichž zastoupení je charakteristické pro danou zeleninu.

Glukosinoláty jsou stabilní látky pouze v nepoškozených rostlinných pletivech. V poškozených buňkách jsou rychle hydrolyzovány zde přítomným enzymem *myrosinázou*. Obecně rozšířené aromatické a idolové glukosinoláty poskytují nestále isothiokyanáty a thiokyanáty. [43]



Obr. 8: Produkty degradace glukosinolátů [43]

Hlavní glukosinoláty brokolice jsou především glukorafanin, glukobrassicin a sulforafan. [44] Sulforafan se uvolňuje porušením rostlinných buněk při kousání brokolice. Syrová brokolice obsahuje této látky málo, zato v brokolici, která je lehce povařená (přibližně při 60°C), jí najdeme dvakrát až třikrát tolik. [45]

3 OPTICKÉ METODY

3.1 Polarimetrie

V polarimetrii se využívá schopnosti opticky aktivních látek stáčet rovinu polarizovaného světla doprava nebo doleva. Paprsek světla má elektrickou a magnetickou složku. Jejich vektory jsou na sebe kolmé. Nepolarizované světlo kmitá ve všech rovinách, které proložíme paprskem. Rovinně (lineárně) polarizované světlo kmitá pouze v jedné rovině proložené paprskem (elektrická složka v jedné, magnetická složka v druhé, na ni kolmé rovině). Kruhově (cirkulárně) polarizované světlo kmitá tak, že elektrický (a magnetický) vektor koná rotační pohyb ve směru paprsku. Směr rotace může být doprava (R) nebo doleva (L). Míří-li paprsek do našeho oka, pak rotace doprava znamená pohyb vektoru ve směru hodinových ručiček. Rovinně polarizované světlo je složeno z doprava a doleva kruhově polarizovaného světla shodné frekvence a amplitudy.

Opticky aktivní jsou látky, jejichž molekuly nelze ztotožnit s jejich zrcadlovým obrazem. Jednou z nejčastějších příčin této nesymetrie molekuly je přítomnost asymetrického uhlíku. Asymetrický uhlík nese čtyři odlišné substituenty. Pravo a levotočivá forma téže látky se označují jako optické enantiomery (antipody). Smícháme-li oba enantiomery dané sloučeniny v poměru jedna ku jedné, získáme opticky neaktivní racemickou směs.

Opticky aktivní látka má různý index lomu pro složky doprava a doleva kruhově polarizovaného světla. Složka paprsku, pro kterou je index lomu nižší, se proto pohybuje rychleji než druhá. Mezi složkami vzniká fázový rozdíl, protože rychlejší paprsek má větší vlnovou délku. Vektorový součet obou složek dává rovinu polarizovaného světla pootočenou doprava nebo doleva. Fázový rozdíl a úhel otočení roviny polarizovaného světla je tím větší, čím více molekul opticky aktivní látky stojí v cestě paprsku. Platí vztah:

$$\alpha = [\alpha]_D^{20} l c$$

α je úhel otočení roviny polarizovaného světla [$^{\circ}$],

l je tloušťka vrstvy opticky aktivní látky [dm],

c je koncentrace látky v [$\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$],

$[\alpha]_D^{20}$ je měrná otáčivost (při teplotě 20°C , vlnová délka sodíkové výbojky).

Měrná otáčivost se rovná úhlu otočení roviny polarizovaného světla pro tloušťku vrstvy 1 dm a koncentraci roztoku $1 \text{ kg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Optická otáčivost se měří polarimetry. Rovinně polarizované světlo se získává průchodem paprsku Nicolovým hranolem. [46]

V této diplomové práci byl pomocí polarimetrické metody stanoven škrob v brokolici.

3.2 Ultrafialová a viditelná spektrometrie

Podstatou je absorpce ultrafialového a viditelného záření (200-800 nm) zředěnými roztoky molekul. Při absorpaci dochází k excitaci valenčních elektronů. Proto tato spektra nazýváme elektronová a spektrometrii elektronovou spektrometrií. Měření zářivého toku neboli fotometrie je podstatou přístrojů pro tuto (i další optické metody).

Optické přístroje, jimiž objektivně měříme a hodnotíme emisní nebo absorpční spektra látek, označujeme jako spektrometry. Na kyvetu obsahující roztok vzorku dopadá zářivý tok Φ_0 . Prošlý zářivý tok je ochuzen o odražené, rozptýlené a absorbované záření.

Transmittance T [%] je relativní část prošlého záření:

$$T = \frac{\phi}{\phi_0} \cdot 100 \quad ,$$

Φ_0 je dopadající zářivý tok,

Φ je prošlý zářivý tok,

Je-li absorpance záření nulová, transmittance je jednotková (100%).

Absorbance (extinkce) je záporný dekadický logaritmus transmittance:

$$A = -\log T = \log \frac{\phi_0}{\phi} \quad ,$$

Lamertův – Beerův zákon:

$$A = \varepsilon_{\lambda} c l \quad ,$$

ε_{λ} je molární absorpční koeficient (konstanta pro danou látku za daných podmínek při

určité vlnové délce [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^{-1}$],

c je látková koncentrace absorbující látky [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$],

l je tloušťka absorbující vrstvy [46].

V této diplomové práci byly spektrofotometrickou metodou stanoveny chlorofyly a obsah fosforu.

3.3 Atomová absorpční spektrofotometrie

Podstatou metody je absorpce vhodného elektromagnetického záření volnými atomy v plynném stavu. Při absorpci záření nastává excitace elektronu. Absorbovat se bude právě takové záření, které splňuje podmínku:

$$E_1 - E_0 = \frac{hc}{\lambda_1},$$

kde E_0 je energie základní hladiny a E_1 je energie excitované hladiny.

Proto je vhodné jako zdroj záření použít takový prvek, který chceme stanovovat. Ten nám emisí záření bude poskytovat právě požadované vlnové délky. Z uvedené podmínky je zřejmé, že se bude absorbovat pouze část záření, která svými vlnovými délkami odpovídá rezonančním čarům. Rezonančních čar je mnohem méně než emisních. Proto je absorpční spektrum jednodušší než emisní. Pro měření se bere čára, pro kterou je splněna největší absorbance záření. Sleduje se absorbance, která je podle Lambertova-Beerova zákona přímo úměrná koncentraci stanovovaného prvku:

$$\log \frac{I_0}{I},$$

kde I_0 je intenzita budícího záření a I je intenzita záření po průchodu absorbujícím prostředím (plamenem). [46,47]

3.3.1 Přístroje a pomocná zařízení

Čárovým zdrojem je výbojka s dutou katodou. Katodou je dutý molybdenový drát. Lampa osahuje argon (neon). Po vložení napětí 400 V vzniká doutnavý výboj, kdy ionizované atomy vzácného plynu bombardují kov, uvolněné atomy kovu se srážkami excitují a při deexcitaci vysílají potřebné záření. Atomizátor slouží k převedení vzorku do stavu volných atomů. Jeho teplota by měla být dostatečná k atomizaci, ale nižší, než je třeba k excitaci atomů. Potřebná teplota je kolem 2000 až 3000°C.

Plamenový atomizátor pracuje na principu pneumatického zmlžování nebo ultrazvukového rozprašování roztoku vzorku. Aerosol vzorku je vnášen plynem do plamene. Tady se ato-

mizuje. Plamen je dlouhý 10 až 12 cm, aby absorpční dráha byla co nejdelší. Podle druhu paliva a odkysličovadla se dosahuje různých teplot. Příklady kombinací jsou propan – vzduch (2100°C) nebo acetylen – oxid dusný (2900°C). Tento atomizátor umožňuje měřit stálý signál. [46]



Obr. 9: Atomový absorpční spektrofotometr

V této diplomové práci byly metodou AAS stanoveny obsahy těžkých kovů: rtuť, olovo a kadmia.

3.3.2 Atomový absorpční spektrofotometr GBC 933

Model GBC 933 AA je jednopaprsková verze atomového absorpčního spektrofotometru. Zdrojem záření je výbojka s dutou katodou, jejíž zářivý tok je modulován elektricky přerušováním napájecího proudu přesně stanovenou frekvencí, se kterou je elektronicky synchronizován frekvenčně laděný zesilovač. Přístroj je vybaven mřížkovým monochromátorem střední disperze s fokální vzdáleností 333 mm. Šířka vymezeného spektrálního intervalu je v rozmezí 0,2-1 nm. K detekci relativních intenzit je přístroj vybaven univerzálním fotonásobičem s pracovním rozsahem 185-900 nm. [48]

3.3.3 Analyzátor AMA 254

Analyzátor AMA 254 (Altec, ČR) je jednoúčelový atomový absorpční spektrometr, vyvinutý a vyráběný v ČR. Využívá se pro stanovení celkového obsahu rtuť v pevných i kapalných vzorcích bez potřeby předchozí úpravy vzorku (rozkladu, separace). Spektrometr využívá principu generování par kovové rtuť tepelným rozkladem vzorku ve spalovací trubici s následným zachycením a zakoncentrováním na zlatém amalgamátoru, opětovným

tepelným vypuzením a detekcí. Tímto je dosaženo vysoké citlivosti bez závislosti na matici. Nosným plynem je kyslík. Orientační mez detekce je 0,01 ng Hg. Funkční schéma přístroje je uvedeno v příloze IX.



Obr. 10: Analyzátor AMA 254 [49]

4 VYSOCEÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC)

Chromatografie je separační proces, při kterém se látky rozdělují mezi dvě nemísitelné fáze, jednu pohyblivou (mobilní) a druhou nepohyblivou (stacionární), na základě fyzikálně-chemických interakcí, jako jsou adsorpce, rozpouštění, iontová výměna apod. [50]

V nedávné době došlo k velkému rozvoji technologie kolonové kapalinové chromatografie, která vede k používání nových a menších praktických velikostí stacionárních fází, které jsou schopné vydržet velké tlaky. [51]

Základní výhodou HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) je široký obor použitelnosti (lze analyzovat až 80 % veškerých známých látek, které se podstatně liší v chemických i fyzikálních vlastnostech). Další předností je možnost účinně ovlivňovat separaci nejenom volbou stacionární fáze, ale rovněž změnami složení mobilní fáze, protože kapalná mobilní fáze není pouze interním nosičem vzorků, ale podílí se přímo na interakcích rozpuštěných látek se stacionární fází. [50]

V HPLC je nejdůležitější přesnost analýzy, neboť se v ní odráží důvěryhodnost výsledků získaných při dané analýze. Přesnost v HPCL závisí na kvalitě kontroly instrumentálních a separačních podmínek. Správnost metody je dána možnostmi kalibrovat systém standardy o známém složení. [50]

4.1 Chromatografická separace

Chromatografickou separaci látek v koloně lze provést třemi rozdílnými technikami:

1. Frontální
2. Vytěšňovací
3. Eluční

Současná praxe využívá výhradně eluční chromatografii. Její princip spočívá v tom, že chromatografickým systémem protéká konstantní rychlostí mobilní fáze o určitém složení a fyzikálních vlastnostech, jejíž složky neinteragují se stacionární fází v koloně. Do proudu této mobilní fáze se nastříkují směsi látek ve formě úzké symetrické zóny. [52]

Jednotlivé složky jsou eluovány v pořadí rostoucí velikosti interakce se stacionární fází a jsou odděleny čistou mobilní fází. Plocha uzavřená píkem a základní linií (symetrické píky) slouží k zjištění obsahu složky ve vzorku. [46]

4.2 Mobilní a stacionární fáze

Zadržování látek rozpuštěných v mobilní fázi – solutů – kolonou se nazývá retence, zatímco vymývání solutů z kolony se nazývá eluce. Mobilní fázi se říká eluční činidlo a její schopnost vymývat látky z kolony se posuzuje relativním parametrem eluční síly. Mobilní fáze o vyšší eluční síle vymývá látky z kolony rychleji, než mobilní fáze o nižší eluční síle. Rozpouštědla, seřazená podle stoupající eluční síly, tvoří tzv. eluotropní řadu. Látky lze eluovat třemi způsoby [50]:

1. Izokraticky
2. Skokem
3. Gradientem

Pokud se celá chromatografická separace provádí s použitím mobilní fáze o konstantním složení, tedy o konstantní eluční síle, jde o techniku izokratické eluce. Pokud se ovšem eluční síla mobilní fáze podle určitého programu zvyšuje v průběhu separace, pak jde o techniku gradientové eluce. [50]

Isokratická separace může být prováděna pomocí jednoduché pumpy za použití jednoho rozpouštědla nebo dvou rozpouštědel smíchaných v určitém poměru. Gradientová eluce obecně používá jednotlivé pumpy, která přivádí rozpouštědlo v určitém množství, které se volí gradientovým programem. [51]

Gradientová eluce souvisí se změnou rozdělovacích konstant jednotlivých složek vzorku v čase a to v důsledku změny složení mobilní fáze, změny pH, teploty, koncentrace komplexotvorného činidla. Eluční chromatografie je nejčastěji používaným postupem v analytické chromatografii. Poloha píku v chromatogramu je odrazem velikosti interakce složky vzorku s chromatografickým systémem a slouží k její identifikaci. [46]

V současné době se jako stacionární fáze používají pórovité částice silikagelu o průměru 1 - 5 μm . Umožňují separace s podstatně vyšší účinností, přičemž se dosahuje i vyšší kapacity kolony pro dávkované vzorky a zvyšuje se rychlost analýzy. Účinnost separace vzrůstá s klesajícím průměrem částic. Zavádí se kolony o velmi malém vnitřním průměru. Jde o tzv. mikrokolony s vnitřním průměrem kolem 1 mm a o tzv. kapilární kolony s vnitřním průměrem od jednotek do desítek μm , nejčastěji skleněné nebo z roztaveného oxidu křemičitého, jejichž vnitřní stěny jsou pokryty filmem stacionární fáze. [46,50,52]

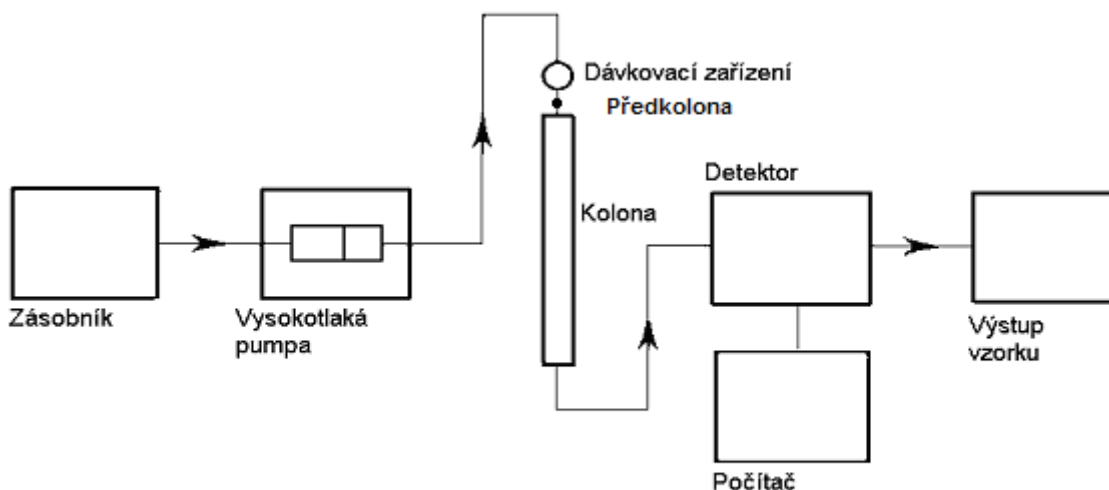
Silikagel je charakterizován průměrem pórů ($5 \cdot 10^{-6}$ až $25 \cdot 10^{-6}$ mm), specifickým povrchem (od 100 do $860 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) a specifickým objemem ($0,7$ až $1,2 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$). Na povrchu silikagelu jsou volné silanolové $-\text{Si}-\text{OH}$ a siloxanové $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$ skupiny. Koncentrace silanolových skupin je nejdůležitějším faktorem při separaci, naopak siloxanové jsou nežádoucí, neboť způsobují nespecifické interakce. V adsorpční chromatografii s polárními adsorbenty se používají nepolární rozpouštědla jako mobilní fáze. Postupem času převládly separace s fázemi méně polárními než fáze mobilní. Zatímco adsorbční chromatografie se hodí pro separace směsi látek nízkomolekulárních, sloučenin lipofilního charakteru a geometrických izomerů, homologické řady látek se nejlépe dělí chromatografií s obrácenými fázemi. Reverzní fáze se nehodí pro separace silných kyselin a bází, neboť silikagel, který slouží jako nosič reverzní fáze, se rozkládá při extrémních hodnotách pH. Na povrchu silikagelu jsou už zmíněné volné hydroxylové (silanolové) skupiny $-\text{Si}-\text{OH}$ s aktivním vodíkovým atomem, který může být nahrazen různými organickými skupinami a tak mohou být připraveny stacionární fáze s různými vlastnostmi. V současné době je většina komerčně vyráběných stacionárních fází siloxanového typu $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{R}$. Takto se vyrábějí např. fáze se skupinami $-\text{Si}-\text{C}-\text{Si}-\text{ethyl}$, $-\text{Si}-\text{C}-\text{Si}-\text{hexyl}$, $-\text{Si}-\text{C}-\text{Si}-\text{oktyl}$, $-\text{Si}-\text{C}-\text{Si}-\text{odktadecyl}$, $-\text{Si}-\text{C}-\text{Si}-\text{fenyl}$, $-\text{Si}-\text{C}-\text{Si}-\text{amino}$ a další. Vysoce účinné kolony, vyžadují k dosažení optimálních průtokových rychlostí vysokých tlaků (jednotky až desítky MPa). [46,50,52]

4.3 Přístroje a pomocná zařízení

- Zásobník mobilních fází
- Čerpadla
- Dávkovací zařízení
- Předkolona
- Kolona
- Detektory

Mobilní fáze se přivádí ze zásobníku do vysokotlakého čerpadla, které ji přes dávkovací zařízení vzorku dopravuje do kolony. Na výstupu z kolony je připojen detektor, jehož signál se zpracovává na počítači. Pro gradientovou eluci je zapotřebí dvou nebo více zásobníků pro složky mobilní fáze a zařízení pro jejich směšování. Někdy je nezbytné převádět složky vzorku na deriváty, takže systém může obsahovat zařízení pro derivatizaci. Řada vzorků obsahuje balastní látky, proto se do systému zařazuje předkolona, ve které se tyto

látky zachytí. Některé přístroje umožňují odplynění mobilní fáze. Čerpadlo musí zajistit definovaný a konstantní průtok mobilní fáze. [50]



Obr. 11: Schéma uspořádání chromatografu (HPLC) [51]

4.3.1 Zásobník mobilní fáze

Mobilními fázemi jsou pro RP-HPLC acetonitril, *iso*-propanol, ethanol, methanol, voda a pufrý. Používají se buď jednotlivě, nebo jejich mísitelné směsi. Pro dělení bazických nebo slabě kyselých látek je velmi důležité pH, protože ionizované formy těchto látek mají pro vázanou fázi C18 menší afinitu než látky neutrální a budou eluovány rychleji. [53]

4.3.2 Čerpadla

Moderní instrumentace umožňuje pracovat s tlaky až 60 MPa. Důležitá je vysoká přesnost a reprodukovatelnost průtoků v celé škále pracovních tlaků. Čerpadla bývají dělena na pulzní a bezpulzní, používají se pístová, membránová. Materiálem pro výrobu čerpadel v HPLC je nejčastěji nerezová ocel. [52]

4.3.3 Dávkovací ventily

V současné době se používá dávkování pomocí dávkovacích ventilů, které umožňují podstatně přesnější dávkování a nevyžadují zastavení toku mobilní fáze. Dávkovací ventily jsou vícecestné ventily s vyměnitelnou dávkovací smyčkou. Smyčkové dávkovače umožňují dávkovat libovolný objem vzorku mikrostříkačkou do smyčky při atmosferickém tla-

ku. Po naplnění smyčky se její obsah vymyje pootočením ventilu mobilní fáze do kolony. [50]

4.3.4 Předkolona

Předklony bývají nejčastěji umístěny mezi dávkovačem a chromatografickou kolonou. Jednotlivé části kapalinového chromatografu se nejčastěji spojují nerezovými kapilárami s minimálním mrtvým objemem. Termostatovat lze kolonu i detektor i celý okruh vedení mobilní fáze. S chemicky vázanými fázemi se obvykle pracuje v rozsahu 10 až 65°C. [50]

4.3.5 Kolona

Kolony pro HPLC jsou z materiálu, který musí odolávat relativně vysokým pracovním tlakům a zároveň chemickému působení mobilních fází a separovaných složek. Materiálem chromatografických kolon je většinou antikorozivní ocel nebo speciálně tvrzené borosilikátové sklo, lze použít i kombinaci obou materiálů. Pro analytické aplikace se převážně používají kolony plněné pórovitými náplněmi o průměru 1-10 μm o délce 5-30 cm a vnitřním průměrem 3-4 mm. Účinnost separace, doba analýzy a pracovní tlak se zvyšují s rostoucí délkou kolony a naopak klesají s rostoucím průměrem částic náplně. Při práci s kolonami o průměru menším než 2 mm se jedná o tzv. mikrokolonovou kapalinovou chromatografii, jejíž výhodou je hlavně snížení spotřeby mobilní fáze i vzorku a zvýšení citlivosti detekce. Charakter stacionární fáze závisí na chromatografickém systému. V HPLC se často vyskytují pojmy "normální fáze" a "reverzní fáze". U normálních fází jsou funkční skupiny stacionární fáze polární, mobilní fází bývá nepolární rozpouštědlo (pentan, hexan). Chromatografie na tzv. systémech s obrácenými fázemi (RP, Reversed-Phase, asi v 80 % všech aplikací HPLC) používá chemicky vázanou nepolární stacionární fázi jako je oktasilan nebo oktadecylsilan a mobilní fází je polární rozpouštědlo, jako je systém voda/acetónitril nebo voda/methanol. Mobilní fáze v systému RP je polární. [52,54]

4.3.6 Detektory

Chromatografický detektor je zařízení na identifikování přítomnosti vzorku nebo kvantitativní sledování její koncentrace v eluátu. Detektor v podstatě sleduje vhodným snímačem jednu nebo současně několik vlastností eluátu a převádí jejich změny na elektrické signály, které je možné po zesílení zvoleným způsobem zaznamenat (zapisovač). V některých pří-

padech detektor určuje i vybrané vlastnosti eluovaného vzorku (molární hmotnost, absorpční spektrum apod.). [55]

Základní podmínkou použitelnosti detektoru je lineární závislost odezvy v širokém koncentračním rozmezí stanovované látky a plná automatizace záznamu. [53]

Detektor by měl mít co nejvyšší citlivost detekce solutu a co nejnižší hodnotu meze detekce. Základní linie detektoru (tj. hodnota signálu za nepřítomnosti solutu) by měla mít co nejnižší hodnotu, co nejmenší šum a neměla by vykazovat drift (únik, tj. pomalý systematický posun). Je žádoucí, aby detektor byl stejně citlivý ke všem detekovaným solutům a aby jeho signál co nejméně závisel od experimentálních podmínek.

Nejvíce se v praxi používají spektrofotometrické detektory. Jsou selektivní, takže základním požadavkem je, aby při dané vlnové délce detekovaná látka absorbovala co nejvíce. Vlnovou délku lze programovat. Mezi další používané detektory patří fluorimetrické, refraktometrické, elektrochemické nebo kombinace s hmotnostní spektrometrií (LC-MS). [46,50]

Fotometrické detektory se zakládají na měření změn intenzity světla způsobenými vymýváním vzorku. [52] Většina organických látek absorbuje v oblasti UV záření, některé i ve viditelné oblasti světla. Světlo zdroje prochází průtokovou celou, intenzita prošlého paprsku je měřena fotonásobičem, kontinuálně se snímá signál eluovaných složek. [56]

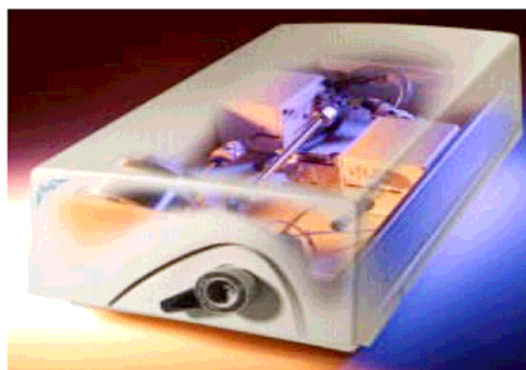
Elektrochemický detektor - ESA Coulochem III multi umožňuje měřit v tzv. DC-módu tzn., že aplikovaný potenciál je konstantní během celého analytického měření. V elektrochemickém detektoru eluent prochází skrz průtokovou kyvetu a poskytuje vhodné potenciály a kontroluje proudění. Citlivost ECD je významně lepší než pro mnoho jiných běžně užívaných režimů z detekce pro HPLC (například UV absorbance). Selektivita ECD spočívá v tom, že jestliže se z kolony vymývají dvě a více látek a mají-li různý oxidační nebo redukční potenciál, můžeme vybrat potenciál tak, že budeme selektivně detekovat pouze jednu z těch látek. ECD využívá dvou typů detekce. U amperometrického detektoru eluent teče po povrchu elektrody. Většina elektroaktivních prvků směsi teče na povrchu elektrody a nereaguje. Pouze 5-15 % elektroaktivních látek reaguje s touto elektrodou. U coulometrického detektoru eluent protéká pórovitou grafitovou elektrodou. Detektor tak může poskytnout zvýšenou citlivost. Proud je pak úměrný koncentraci vzorků. [51, 57]

Elektrochemický detektor Coulochem III může obsahovat dvě cely. Standardní analytická

cela model 5010A poskytne potenciál pro oxidaci nebo redukci vzorků. Cela obsahuje dvě sériově zapojené komory, každá komora obsahuje pórovitou grafitovou coulometrickou elektrodu a dvojitou referenční elektrodu. Ochranná cela model 5020 je užívaná pro oxidované nebo redukované elektrolytické aktivní součásti vzorků, které by mohly být přítomny jako nečistoty v mobilní fázi. Ochranná cela je obvykle umístěna mezi čerpadlem a nástřikem. Elektrochemická cela je místo, kde nastane oxidace nebo redukce analytu a proud, který je tak vytvořen, je převedený na výstupní napětí potenciostatu, kde se tento signál zpracovává. Potenciál je po celou dobu měření konstantní (DC mód) a proud je měřený jako funkce času. Operační výhody coulometrického detektoru jsou takové, že signální odezva je velmi stabilní, signální rozsah může být maximální, plocha píku a výška píku pro vzorek jsou předvídatelné, coulometrická detekce může poskytnout navíc selektivitu a lepší odezvu pro nevratné analýzy. [57]



Obr. 12: Coulochem III



Obr. 13: Kolona Coulochemu III

Fluorescenční detektor je založen na principu fluorescence. V podstatě jde o schopnost látek absorbovat ultrafialové záření a pak vysílat záření o vyšší vlnové délce, které se měří fotonásobičem kolmo na směr vstupujícího záření. [46]

Vodivostní (průtokové) detektory se používají na měření vodivosti elektrolytů, ale i neelektrolytů, které tvoří ve vodě rozpustné vodivé komplexy. [55]

Hmotnostní detekce (LC/ MS) je založena na snímání hmotnostního spektra během eluce látek. Je velmi výhodný pro strukturní analýzu a identifikaci látek ve složitých směsích. Technicky výhodné pro přímé napojení je používání mikrokolon a kapilárních kolon. [56]

Refraktometrická detekce je založena na intenzitě světla odraženého optickým rozhraním sklo-kapalina, které je citlivou funkcí indexu lomu proudící kapaliny, kterou je možné měřit s vysokou citlivostí. Jedná se o měření změn indexu lomu v závislosti na koncentraci vzorku v mobilní fázi. [55]

V této diplomové práci byl metodou HPLC-ECD stanoven β -karoten a vitamin C.

5 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ KVANTITATIVNÍCH ANALÝZ

Výsledky statistické analýzy hodnotíme podle správnosti, tj. schopnosti metody kvantitativně určovat danou veličinu, dále podle přesnosti, tj. schopnosti metody poskytovat konzistentně stejné výsledky pro řadu opakovaných stanovení a podle reprodukovatelnosti, tj. schopnosti metody poskytovat konzistentně stejné výsledky pro nezávislá měření, prováděná se stejným vzorkem a stejným postupem různými pracovníky v různých laboratořích.

Analytická chyba představuje rozdíl mezi nalezeným obsahem analytu (x) a jeho skutečným obsahem (μ) ve vzorku. Malé, nepravidelné odchylky od skutečné hodnoty se určují statisticky ze souboru paralelních (opakovaných) analýz. Ovlivňují přesnost (reprodukovatelnost) či opakovatelnost stanovení. Aritmetický průměr všech výsledků se zpravidla nejvíce blíží skutečné hodnotě:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{n} \quad (1)$$

Základní charakteristikou nahodilých chyb je odhad směrodatné odchylky:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \left(\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right)} \quad (2)$$

Ve skutečnosti máme k dispozici jen omezený počet výsledků, který je podstatně menší než $n \rightarrow \infty$ a tudíž je směrodatná odchylka závislá na počtu paralelních výsledků. Byl definován Studentův koeficient t , který charakterizuje Studentovo rozložení náhodných odchylek pro daný stupeň volnosti (daný počet výsledků analýz a použitou hladinu významnosti $1-\alpha$). Nejlepším vyjádřením pro průměrný výsledek ze série paralelních stanovení je vztah: [58]

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{\sqrt{s}}{t} \cdot n \quad (3)$$

Tabulka 4: Kvantily $t(n)$ Studentova rozdělení o n stupních volnosti: [59]

t(n)	α		
n	0,05	0,01	0,001
1	12,71	63,66	636,58
2	4,30	9,93	31,60
3	3,18	5,84	12,92
4	2,78	4,60	8,60
5	2,57	4,03	6,87
6	2,45	3,71	5,96
7	2,37	3,50	5,41
8	2,31	3,36	5,04
9	2,26	3,25	4,78
10	2,23	3,14	4,59

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 METODIKA

6.1 Použité chemikálie

Hexan (Penta Praha)

Aceton (Penta Praha)

Ethanol (Chemapol Praha)

Chloroform (dodavatel Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

2,6-dichlorfenolindofenol (LOBA, Chemie Wien, Fischamend)

Kyselina šťavelová (Chemapol Praha)

Kyselina L-askorbová (Spofa Praha)

Uhličitan vápenatý (Chemapol Praha)

Mořský písek (Chemapol Praha)

Kyselina chlorovodíková (dodavatel Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

Carrez I, 30 hmot.% ZnSO₄ (Chemapol Praha)

Carrez II, 15 hmot.% K₄[Fe(CN)₆] (Chemapol Praha)

Koncentrovaná kyselina sírová (Chemapol Praha)

Peroxid vodíku (dodavatel Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

Kyselina dusičná (Chemapol Praha)

Vanadičnan amonný (Chemapol Praha)

Molybdenan amonný (Chemapol Praha)

Methanol čistoty pro HPLC (Sigma Aldrich, Riedel-del Haën, SRN)

Kyselina fosforečná (Chemapol Praha)

Standard β-karotenu (Sigma Aldrich, Riedel-del Haën, SRN)

Kapsle β-karotenu (Walmark, a.s.)

Destilovaná a redestilovaná voda

6.2 Použité přístroje a pomůcky

Temperovaná vodní lázeň a třepačka (Memmert, SRN)

Předvážky (Kern, SRN)

Lednice (Samsung- Calex, CZ)

Polarimetr (POL 1, Optica microscopes)

Spektrofotometr (Spekol 11, Carl Weiss, Jena)

Mineralizační hnízda (Digesdahl)

Odparka (RVO 400 A, Ingos)

Běžné laboratorní sklo a pomůcky

Speciální zřízení:

- Aparatura pro HPLC – ECD (ESA-Coulochem III)
 - analytická cela 5010 A
 - guard cela 5020
 - detektor Coulochem III
 - dávkovací ventil analytický smyčkový (20 μ l)
 - kolona SUPELCOSIL C8, 5 μ m (15 cm x 4,6 mm, Supelco, USA)
 - PC s vyhodnocovacím programem Chemstation - Instrument 1, (Agilent, USA)

Dávkovací stříkačka (Hamilton, USA)

Mikrofiltry 0,45 μ m, Nylon (Supelco, USA)

Mikrofiltry na mobilní fázi 0,2 μ m (Supelco, USA)

- Atomová absorpční spektrofotometrie
 - atomový absorpční spektrometr (AVANTA, výrobce GBC Austrálie, GBC 933A)
 - atomizátor: grafitová kyveta (GBC GF 3000, výrobce GBC Austrálie)

- katodová lampa pro olovo (Photron Lamps, Austrálie)
- katodová lampa pro kadmium (Photron Lamps, Austrálie)
- PC (operační software GBC 906/908/909 AA, Austrálie)
 - Analyzátor AMA 254 (Advanced Mercury Analyser)
- uspořádání: jednopaprskový přístroj, sériové uspořádání měřících kyvet
- zdroj zařízení: nízkotlaká rtuťová výbojka
- počítač PC
- detektor křemíková UV dioda

6.3 Metody

6.3.1 Stanovení sušiny brokolice

Principem je vážkové stanovení sušiny po dokonalém odpaření vody s použitím nasávací hmoty (mořského písku). Do hliníkové misky s tyčinkou bylo nasypáno 20 - 25 g písku a miska byla zvážena na analytických vahách. Z dobře homogenizovaného vzorku brokolice (Španělsko, I. jakost, maloobchod) bylo odváženo 5 g s přesností na 0,0001 g a vzorek byl pomocí tyčinky promíchán s pískem. Hliníková miska byla vložena do sušárny vyhřáté na 105 °C. Po asi čtvrt hodině byla miska vyjmuta a obsah byl opatrně promíchán a poté byl opět vložen do sušárny. Po půl hodině byly vzorky opět důkladně promíchány. Po hodině a půl sušení při teplotě 105 °C byla miska vyjmuta, vložena do exsikátoru. Pak byla miska zvážena a znovu vložena na hodinu a půl do sušárny. Poté opět následovalo prochlazení vzorku v exsikátoru a bylo opět provedeno opakované vážení. Vzorek byl sušen až po dosažení konstantní hmotnosti. Výsledky jsou uvedeny v kapitole 7.1.

Výpočet sušiny brokolice v hmot. %:

$$s = \frac{m_2 - m_1}{n} \cdot 100 \quad (4),$$

kde s je sušina v hmot.%,

m_2 je hmotnost misky se vzorkem brokolice po sušení [g],

m_1 je hmotnost misky s pískem a tyčinkou [g],

n je navážka vzorku [g].

6.3.2 Stanovení obsahu škrobu v brokolici dle Ewerse

Vhodnou metodou pro stanovení škrobu je polarimetrie. Metoda dle Ewerse využívá principu hydrolýzy pomocí zředěné kyseliny chlorovodíkové na glukosu. Do 100 ml odměrné baňky bylo naváženo 5 g brokolice (ČR, II. Jakost, zakoupena v Intersparu) s přesností na 0,0001 g, bylo přidáno 25 ml roztoku HCl o složení 1,124 hmot. %. Obsah baňky byl kroužením důkladně promíchán a stěny byly spláchnuty dalšími 25 ml tohoto roztoku HCl. Potom byla baňka vložena do vroucí vodní lázně a zahřívána přesně 15 minut. Během prvních 3 min byla baňka promíchávána stále ponořená ve vodní lázni. Po 15 minutách byla baňka vyjmuta z vodní lázně, bylo přidáno dalších 20 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové a vzorek se ochladil. Následně bylo provedeno vyčeření podle Carreze. Při čiření byl nejprve přidán 1 ml Carrez I. Směs byla důkladně promíchána a pak byl přidán 1 ml Carrez II. A opět byla směs promíchána. Po 5 minutách byla baňka doplněna po značku destilovanou vodou a roztok byl zfiltrován. První podíly filtrátu byly vráceny zpět na filtr. U čirého filtrátu vytemperovaného na 20 °C byl změřen na polarimetru úhel otočení α . Výsledky měření jsou uvedeny v kapitole 7.2.

Výpočet obsahu škrobu v hmot. % byl proveden podle následujícího vzorce:

$$X = \frac{\alpha \cdot 100}{[\alpha]_{\lambda}^t \cdot l \cdot n} \quad (5),$$

kde α je úhel otočení [°],

l je tloušťka vrstvy (délka polarimetrické trubice) [dm],

n je navážka vzorku [g],

$[\alpha]_{\lambda}^t$ je specifická optická otáčivost při teplotě t a vlnové délce [°].

pro (škrob brokolice 184 °)

6.3.3 Stanovení obsahu fosforu vanadičnanovou metodou

Vzhledem k relativně malému obsahu fosforu v potravinách se využívají citlivé kolorimetrické metody, založené na reakci kyseliny fosforečné s molybdenanem amonným. [60]. Stanovení fosforu bylo prováděno ve dvou krocích: mineralizace vzorku brokolice a vlastní stanovení fosforu.

Do mineralizační baňky byl navážen 1g brokolice (Španělsko, I. jakost, maloobchod) s přesností na 0,0001 g. Bylo naváženo pět vzorků. Ke vzorku bylo přidáno 7 ml koncentrované H_2SO_4 a vzorek byl ponechán na mineralizačních hnízdech 30 minut. Pomocí nálevky bylo přidáno přibližně 5 ml 30% H_2O_2 . Zmineralizované vzorky byly kvantitativně převedeny do 250 ml odměrných baněk a doplněny destilovanou vodou po rysku.

Před vlastním stanovením fosforu byly připraveny tyto reagensy:

1. HNO_3 – zředěná 1:2 destilovanou vodou (na 1 l bylo použito 333 ml koncentrované kyseliny a 666 ml destilované vody).
2. Vanadičnan amonný – 2,5 g vanadičnanu amonného bylo rozpuštěno v 500 ml vroucí vody, po ochlazení bylo přidáno 20 ml koncentrované HNO_3 . Roztok byl doplněn destilovanou vodou na 1l celkového objemu.
3. 5 % roztok molybdenanu amonného – 50 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ bylo rozpuštěno v 800 ml vody ohřáté na 50°C. Po rozpuštění molybdenanu a jeho následného ochlazení byl objem doplněn po rysku na 1 l.
4. Reagenční směs – kyselina dusičná, vanadičnan amonný a molybdenana amonný byly v uvedeném pořadí smíchány v poměru 1:1:1.

5. Standardní roztok pro měření kalibrační křivky – 0,4394 g KH_2PO_4 bylo rozpuštěno v destilované vodě a doplněno na objem 1l. Kalibrační křivka byla sestrojena v následujících koncentracích: 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 1; 1,3 a 1,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (graf 1). Jednotlivé koncentrace z kalibrační křivky byly proměřeny na zařízení Spekol 11 při 442 nm.

Do 50 ml odměrné baňky bylo odpipetováno 25 ml zásobního roztoku vzorku (vzorek po mineralizaci), poté k němu bylo přidáno 15 ml reagenční směsi a vzorek byl promíchán a doplněn destilovanou vodou po rysku. Dále byl připraven slepý pokus (15 ml reagenční směsi bylo odpipetováno do 50 ml odměrné baňky a obsah byl doplněn po rysku). Měření absorbance bylo prováděno při 442 nm na přístroji Spekol 11 (Carl Zeiss).

Následně byla vypočtena koncentrace fosforu [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$] dle vzorce:

$$c = \frac{x \cdot f}{m} \cdot 100, \text{ kde (6)}$$

c je koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$],

x je množství fosforu ve vzorku [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$],

f je faktor ředění [5],

m je navážka vzorku [g].

Výsledky stanovení obsahu fosforu jsou uvedeny v kapitole 7.3.

6.3.4 Spektrofotometrické stanovení chlorofylů v brokolici

Pro stanovení chlorofylů v brokolici byly naváženy 2 g čerstvé hmoty (Španělsko, I.jakost, zakoupena v Kauflandu) s přesností na 0,0001 g. Vzorek byl rozetřen ve třecí misce s několika ml acetonu a s uhličitánem vápenatým (na špičku nože), který byl přidán pro zabránění tvorby feofytinu. Směs byla zfiltrována přes papírový filtr smočený acetonem do 25 ml odměrné baňky. Dalšími dávkami acetonu byla barviva převedena kvantitativně do filtrátu a objem byl doplněn acetonem po značku. V 1 cm kyvetě byla změřena absorbance při vlnových délkách 663 (A_1) a 645 (A_2) oproti acetonu jako blanku.

Výpočet obsahu chlorofylů v [mg.l⁻¹]:

$$\text{Chlorofyl } a = 12,70 \cdot A_1 - 2,69 \cdot A_2 \quad (7)$$

$$\text{Chlorofyl } b = 22,90 \cdot A_2 - 4,68 \cdot A_1 \quad (8)$$

Celková koncentrace obou barviv v [mg.l⁻¹]:

$$\text{Chlorofyl } a + b = 8,02 \cdot A_1 + 20,20 \cdot A_2 \quad (9)$$

Následně byla vypočtena koncentrace chlorofylů v [mg.100g⁻¹] dle vzorce:

$$c = \frac{x \cdot f}{m} \cdot 100, \text{ kde} \quad (10)$$

c je koncentrace [mg.100g⁻¹],

x je množství chlorofylu ve vzorku [mg.ml⁻¹],

f je faktor ředění [25].

Výsledky stanovení obsahu chlorofylů uvádí kapitola 7.4.

6.3.5 Stanovení β -karotenu metodou HPLC-ECD

6.3.5.1 Extrakce β -karotenu z brokolice

Pro extrakci biologicky aktivních látek z brokolice byly použity dva extrakční postupy. Nejprve byla provedena jednoduchá extrakce za použití hexanu, acetonu, ethanolu a chloroformu jako samostatných rozpouštědel a taktéž při kombinaci těchto rozpouštědel. Extrakce byla prováděna za laboratorní teploty (21°C) a ve vodní lázni při 35°C. Poté byla provedena dvojitá extrakce za použití kombinace extrakčních činidel hexan-aceton a hexan-ethanol, která se při jednoduché extrakci jevila jako nejvhodnější. Při extrakci byly vždy všechny vzorky chráněny proti světlu tak, že byly baleny extrakční baňky Al-folií.

První extrakční postup – jednoduchá extrakce

Růžice brokolice (GRABMAIR A-4611 Buchkirchen/Wels, Kaufland) byla rozmixována ručním mixérem na kaši. Ze vzorku bylo odebráno po 5 g do třinácti zábrusových baněk s přesností na 0,0001 g. Poté byla přidána výše uvedená rozpouštědla nebo kombinace rozpouštědel o objemu 10 ml. Extrakce byla prováděna 20 min za laboratorní teploty při použití třepačky a ve vodní lázni při 35 °C, taktéž po dobu 20 min. Extrakční činidlo chloroform bylo použito pouze při laboratorní teplotě. Výsledky jednoduché extrakce udává kapitola 7.5.1.

Druhý extrakční postup – dvojitá extrakce

Pro následné extrakce byla použita kombinace extrakčních činidel vždy v kombinaci s hexanem a to: ethanol-hexan a hexan-aceton ve vodní lázni při 35 °C. Při tomto postupu byla použita čerstvá brokolice (ČR, II. Jakost, zakoupena v Intersparu). 5 g rozmixované brokolice bylo naváženo s přesností na 0,0001 g. Byla prováděna dvojitá extrakce. Pro každou kombinaci činidel byly připraveny dva vzorky. Princip dvojité extrakce spočíval v tom, že po jednoduché extrakci byl přidán opět stejný objem rozpouštědel (10 ml od každého) a následně byly vzorky vloženy do vodní lázně při 35 °C po dobu 20 minut. Po jednotlivých extrakcích byla vždy odebrána horní vrstva pomocí injekční stříkačky do 4 kádinek, které byly uchovávány za nepřístupu světla. První dva vzorky byly přefiltrovány přes jemný filtr a další dva byly vloženy do dělicí nálevky. Vzorky byly následně odpařeny na odparce a poté byly rozpuštěny v 10 ml ethanolu. Výsledky obou postupů jsou zachyceny v kapitole 7.5.1.

6.3.5.2 Stanovení chromatografických podmínek pro detekci β -karotenu metodou

HPLC-ECD

Pro vypracování metodiky měření β -karotenu byl použit standard β -karotenu (Sigma Aldrich) a kapsle β -karotenu (Walmark, a.s.). Složení kapsle: sojový olej, želatina, glycerin, beta karoten, sojový lecitin, barvivo (β -karoten). Obsah kapsle β -karotenu a standard β -karotenu byly extrahovány v ethanolu. Chromatografická separace probíhala na koloně SUPELCOSIL C8, 5 μ m (15 cm x 4,6 mm). Eluce byla prováděna izokraticky s mobilní fází ($\text{CH}_3\text{OH} : \text{rH}_2\text{O} : \text{H}_3\text{PO}_4$ v poměru 99 : 0,5 : 0,5), při teplotě 30°C, průtok mobilní fáze byl stanoven napřed na 1 ml.min⁻¹ a tlak 56 bar. Detekce β -karotenu byla prováděna vždy na dvou kanálech K₁ a K₂ a to s postupně zvolenými potenciály: 100; 200; 300; 400; 500

a 600 mV. Na guard cele G byl zvolen potenciál 750 mV při všech měřeních. Každý vzorek byl proměřen pětkrát při stejném potenciálu. Cílem bylo určit nejvhodnější potenciály pro detekci β -karotenu a jeho retenční čas. Výsledky měření udává kapitola 7.5.2.

6.3.5.3 Stanovení vhodného potenciálu pro měření kalibrační křivky β -karotenu a β -karotenu v reálném vzorku brokolice metodou HPLC-ECD

Dva vzorky brokolice (Španělsko, Jakost I, dovozce: BILLA s.r.o) byly extrahovány podle postupu uvedeného v kapitole 6.3.5.1 metodou dvojité extrakce za použití kombinace rozpouštědel hexan-aceton. Následně byly odpařeny na odparce a bylo přidáno 10 ml ethanolu. Takto upravené vzorky byly vstříknuty na kolonu po filtraci přes filtr nylon 0,45 μ m. Chromatografická separace probíhala na koloně SUPELCOSIL C8, 5 μ m (15 cm x 4,6 mm). Eluce byla prováděna izokraticky s mobilní fází (CH₃OH : rH₂O : H₃PO₄ v poměru 99 : 0,5 : 0,5), při teplotě 30°C, průtok mobilní fáze byl stanoven napřed na 1 ml.min⁻¹ a tlak 61 bar. Vzorky byly proměřeny pětkrát při následujících potenciálech K₁ = 100 mV a K₂ = 200 mV, K₁ = 200 mV a K₂ = 300 mV, K₁ = 300 mV a K₂ = 400 mV, K₁ = 400 mV a K₂ = 500 mV. Cílem bylo zjistit, při jakém potenciálu je nejvhodnější chromatografická detekce β -karotenu v brokolici a při jakém potenciálu je vhodné proměřit kalibrační křivku metodou HPLC-ECD. Výsledky měření udává kapitola 7.5.3.

6.3.5.4 Kalibrační křivka pro stanovení β -karotenu metodou HPLC-ECD

Nejprve byly připraveny standardní roztoky β -karotenu (jako standard byl použit β -karoten od výrobce Sigma Aldrich) o různých koncentracích. Jako první byl připraven standardní roztok o koncentraci 500 μ g.ml⁻¹ tak, že bylo naváženo přesně 0,0500 g β -karotenu do 100 ml odměrné baňky a vzorek byl doplněno ethanolom po rysku. Z toho zásobního roztoku byly získány následující koncentrace standardních roztoků pro měření kalibrační křivky: 50, 100, 250 a 400 μ g.ml⁻¹. Chromatografická separace probíhala na koloně SUPELCOSIL C8, 5 μ m (15 cm x 4,6 mm). Eluce byla prováděna izokraticky s mobilní fází

(CH₃OH : rH₂O : H₃PO₄ v poměru 99 : 0,5 : 0,5) při teplotě 30°C, průtok byl zvýšen na 1,1 ml.min⁻¹ a tlak 63 bar. Kalibrační křivka byla měřena při napětí K₁ = 300 mV a K₂ = 400 mV, přičemž pro sestavení kalibrační křivky byl použit pouze kanál 1 (300 mV) z důvodu přesnějšího stanovení. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost plochy píku [mV.s⁻¹] na koncentraci β -karotenu [μ g.ml⁻¹]. Retenční čas β -karotenu byl

cca 3,6-3,7 min. Každý bod kalibrační křivky byl proměřen pětkrát. Výsledky stanovení kalibrační křivky β -karoteny jsou uvedeny v kapitole 7.5.4.

6.3.5.5 *Vlastní stanovení obsahu β -karotenu ve vzorcích brokolice*

Bylo připraveno 5 vzorků brokolice (Polsko, Jakost I, Interspar) extrakcí podle postupu uvedeného v kapitole 6.3.5.1 za použití kombinace rozpouštědel hexan-aceton. Vzorky byly odpařeny na odparce a poté byl odparek rozpuštěn v 10 ml ethanolu. Alikvotní část vzorku byla přefiltrována před vstřikem na kolonu přes mikrofiltr o velikosti pórů 0,45 μm . Chromatografická separace probíhala na koloně SUPELCOSIL C8, 5 μm (15 cm x 4,6 mm). Eluce byla prováděna izokraticky s mobilní fází ($\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O} : \text{H}_3\text{PO}_4$ v poměru 99 : 0,5 : 0,5), při teplotě 30°C, při průtoku 1,1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a tlaku 61 bar. Detekce β -karotenu byla prováděna pomocí potenciálu vždy na dvou kanálech $K_1 = 300$ mV a $K_2 = 400$ mV. Každý vzorek byl proměřen pětkrát při daném potenciálu. Z důvodu lepší odezvy signálu byl použit kanál $K_1 = 300$ mV pro přesnější stanovení. Poté byly odečteny plochy píku [$\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$]. Následně byla vypočtena koncentrace β -karotenu [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ čerstvé hmoty].

6.3.6 **Titrační stanovení Vitaminu C v brokolici**

K titračnímu stanovení vitaminu C byla využita jeho reakce v kyselém prostředí s 2,6-dichlor-fenolindofenolem. Vitamin C (kyselina L-askorbová) se při titraci 2,6-dichlor-fenolindofenolem oxiduje na kyselinu L-dehydroaskorbovou a 2,6-dichlor-fenolindofenol se redukuje na bezbarvou bázi. Titrace 2,6-dichlor-fenolindofenolem byla prováděna v prostředí 2% kyseliny šťavelové. Prvním přebytkem odměrného roztoku se vzorek zbarvil do růžova.

Před vlastním stanovením byly připraveny následující standardní roztoky:

1. Odměrný roztok 2,6-dichlor-fenolindofenolu o koncentraci 0,001 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$: 0,14504 g 2,6-dichlor-fenolindofenolu bylo rozpuštěno v předvařené destilované vodě a kvantitativně doplněno po rysku do 500 ml odměrné baňky.
2. Kyselina šťavelová (2% roztok): 5 g kyseliny šťavelové bylo rozpuštěno v destilované vodě a bylo doplněno v 250 ml odměrné baňce po značku.

3. Roztok kyseliny L-askorbové o koncentraci 1 mg.l^{-1} : s přesností na 0,0001 g byl navážen 1 g standardního roztoku kyseliny L-askorbové a toto množství bylo rozpuštěno ve 100 ml odměrné baňce v destilované vodě.

Před vlastním stanovením byl určen titr odměrného roztoku 2,6-dichlor-fenolindofenolu o koncentraci $0,001 \text{ mol.l}^{-1}$ na standardní roztok kyseliny L-askorbové o složení 1 mg.l^{-1} . Titr (t) představuje hmotnost kyseliny L-askorbové v mg, která odpovídá 1 ml odměrného roztoku. Do titrační baňky byly odpipetovány 2 ml standardního roztoku kyseliny L-askorbové a 5 ml 2 hmot.% kyseliny šťavelové. Poté byl vzorek titrován odměrným roztokem do růžového zbarvení. Výsledkem byl aritmetický průměr ze tří stanovení. Titr odměrného roztoku 2,6-dichlor-fenolindofenolu udávající hmotnost kyseliny L-askorbové v mg odpovídající 1 ml odměrného roztoku byl vypočítán ze vztahu:

$$t = \frac{VA \cdot cA}{a - s} \quad (11),$$

kde VA je objem standardního roztoku kyseliny L-askorbové odebraný k titraci [2 ml],

cA je koncentrace standardního roztoku [1 mg.l^{-1}],

a je spotřeba odměrného roztoku při stanovení titru [ml],

s je spotřeba odměrného roztoku při slepém pokusu.

Stejným způsobem byl proveden slepý pokus, přičemž 2 ml standardního roztoku kyseliny L-askorbové byly nahrazeny 2 ml roztoku kyseliny šťavelové. Výsledek slepého pokusu byl odečten od objemu barviva spotřebovaného při stanovení titru. Odměrný roztok 2,6-dichlor-fenolindofenolu není stabilní a proto se musel titr určit vždy před vlastním stanovením kyseliny L-askorbové.

Ve třetí misce bylo důkladně rozetřeno asi 10 g brokolice (Španělsko, AgroBest, Kaufland) s přesností na 0,0001 g s mořským pískem. Rozetřený vzorek byl kvantitativně převeden do 50 ml odměrné baňky a ta byla po rysku doplněna 2 hmot. % kyselinou šťavelovou a ponechána 15 minut tak, aby byl vzorek co nejméně vystaven slunečním paprskům. Získaný extrakt byl pak zfiltrován a k titraci byla odpipetována jeho alikvotní část (10 ml), která byla rychle titrována odměrným roztokem do růžového zbarvení. Pro výpo-

čet byl použit aritmetický průměr z pěti stanovení. Každý vzorek byl titrován pětkrát. Výsledky stanovení uvádí kapitola 7.6.

Obsah kyseliny L-askorbové vyjádřený v mg na 100 g čerstvé hmoty byl vypočten dle vzorce:

$$X = \frac{(b - s) \cdot t \cdot 100}{m} \quad (12),$$

kde b je spotřeba odměrného roztoku při stanovení vzorku [ml],

t je titr,

s je spotřeba odměrného roztoku při slepém pokusu,

m je hmotnost vzorku v alikvotní části, která byla titrována [g].

6.3.7 Stanovení vitamínu C v brokolici metodou HPLC-ECD

6.3.7.1 Kalibrační křivka pro stanovení vitamínu C v brokolici metodou HPLC-ECD

S přesností na 0,0001 g bylo naváženo 0,0020 g kyseliny L-askorbové. Navážka byla rozpuštěna ve 250 ml odměrné baňce a doplněna po rysku směsí ($\text{CH}_3\text{OH}:\text{rH}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$ v poměru 99:0,5:0,5). Výchozí koncentrace zásobního roztoku tedy byla $8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ze zásobního roztoku kyseliny L-askorbové byly připraveny dalším ředěním směsí ($\text{CH}_3\text{OH}:\text{rH}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$ v poměru 99:0,5:0,5) kalibrační roztoky o koncentraci 1; 1,5; 2; 2,5; 3 a $4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a analyzovány metodou HPLC.

Chromatografická separace probíhala na koloně SUPELCOSIL C8, $5 \mu\text{m}$ (15 cm x 4,6 mm). Eluce byla prováděna izokraticky s mobilní fází při 30°C a průtoku $1,1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Detekce kyseliny askorbové byla prováděna při potenciálech $K_1 = 600 \text{ mV}$ a $K_2 = 650 \text{ mV}$. Z důvodu lepší odezvy signálu byl použit kanál $K_1 = 600 \text{ mV}$ pro přesnější stanovení. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost plochy píku ($\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$) na koncentraci kyseliny askorbové ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Výsledky stanovení kalibrační křivky vitamínu C jsou uvedeny v kapitole 7.7.1.

6.3.7.2 *Vlastní stanovení vitamínu C v brokolici metodou HPLC-ECD*

S přesností na 0,0001 g bylo naváženo 10 g vzorku brokolice (Polsko, Jakost I, Interspar). Ten byl důkladně rozetřen ve třecí misce s mořským pískem. K rozetřenému vzorku bylo přidáno 50 ml směsi ($\text{CH}_3\text{O}_4 \cdot r\text{H}_2\text{O} : \text{H}_3\text{PO}_4$ v poměru 99:0,5:0,5) a nechal se 15 minut odstát. Získaný extrakt se poté přefiltroval a tím byl získán zásobní roztok pro další ředění. Z každého filtrátu bylo provedeno pět měření. Alikvotní část vzorku byla přefiltrována před vstříkem na kolonu přes mikrofiltr o velikosti pórů 0,45 μm .

Chromatografická separace probíhala na kolone SUPELCOSIL C8, 5 μm (15 cm x 4,6 mm). Eluce byla prováděna izokraticky s mobilnífází při 30°C a průtoku 1,1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Detekce kyseliny askorbové byla prováděna při potenciálech $K_1 = 600$ mV a $K_2 = 650$ mV. Z důvodu lepší odezvy signálu byl použit kanál $K_1 = 600$ mV pro přesnější stanovení. Každý vzorek byl proměřen pětkrát. Výsledky stanovení vitamínu C jsou uvedeny v kapitole 7.7.2. Následně byla vypočtena koncentrace vitamínu C [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ čerstvé hmoty].

6.3.8 Stanovení těžkých kovů v brokolici atomovou absorpční spektrofotometrií (AAS)

6.3.8.1 *Stanovení rtuti analyzátozem AMA 254*

Z různých částí růžice brokolice (Agrobrest, broccoli-murcia, Španělsko, dovozce Kaufland) a také z různých částí košťálu brokolice bylo odebráno pět vzorků. Vzorky byly naváženy s přesností na 0,0001g, navážka vzorků byla 0,1 g a vzorky byly následně vloženy do analyzátoru AMA 254 (Advanced Mercury Analyse) a byla provedena analýza. Výsledky stanovení obsahu rtuti udává kapitola 7.8.1.

6.3.8.2 *Stanovení olova a kadmia atomovou absorpční spektrofotometrií*

Nejprve byla provedena mineralizace vzorků brokolice. Do mineralizační baňky bylo naváženo 0,5 g brokolice (Agrobrest, broccoli-murcia, Španělsko, dovozce Kaufland) s přesností na 0,0001g. Bylo naváženo pět vzorků. Poté bylo přidáno 5 ml koncentrované H_2SO_4 a vzorek byl ponechán na mineralizačních hnízdech. Pomocí nálevky bylo přidáno přibližně 3 ml H_2O_2 (30%). Poté byly vzorky kvantitativně převedeny do 25 ml odměrné baňky a doplněny destilovanou vodou po rysku. Do atomového absorpčního spektrofotometru byla vložena lampa pro olovo. Následně byla proměřena kalibrační křivka pomocí

již připravených kalibračních roztoků o následujících koncentracích olova 0,05, 0,100, 0,200, 0,500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a poté byly proměřeny vzorky. Následně byla provedena výměna lampy pro kadmium a byla také proměřena kalibrační křivka pro kadmium a poté byly opět proměřeny jednotlivé vzorky. Měření bylo provedeno v souladu s příručkou *Flame Method Manual for Atomic Absorption*. [61] Výsledky měření jsou uvedeny v kapitole 7.8.2.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Výsledky a přesnost stanovení sušiny brokolice

Sušina byla stanovena postupem uvedeným v kapitole 6.3.1. Po šestém sušení byly již vzorky považovány za vysušené (hmotnost m_2) a výpočtem pomocí vzorce (4) byl stanoven obsah sušiny (tabulka 5). Při stanovení sušiny vázkovou metodou po dokonalém odpaření vody s použitím mořského písku, byl průměrný obsah sušiny v brokolici stanoven na 14,43 hmot.%, přičemž průměrný obsah vody je tedy 85,57 hmot.%.

Tabulka 5: Výsledky stanovení sušiny v brokolici

miska m_1 [g]	m_2 [g]	navážka n [g]	sušina [hmot.%]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
47,3684	48,0885	5,0146	14,36	0,074	0,00548
45,2327	45,9506	4,9785	14,42	0,014	0,00020
45,3703	46,0995	5,0151	14,54	0,106	0,01124
44,5742	45,3131	5,1348	14,39	0,044	0,00194
45,5036	46,2342	5,0525	14,46	0,026	0,00068
			$\bar{x} = 14,43$		$\Sigma = 0,01952$

Průměrný obsah sušiny v brokolici byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky s podle vzorce (2). Skutečný obsah sušiny stanovovaný vázkovou metodou byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 5. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha = 0,05$) a při čtyřech stupních volnosti 2,78. [58].

Směrodatná odchylka $s = 0,062$

Průměrný obsah sušiny v brokolici

$\mu = 14,43 \pm 0,448$ hmot.% ($\alpha = 0,05$)

Obsah sušiny brokolice	14,43 hmot. %
Obsah vody v brokolici	85,57 hmot. %

Zdroj uvedený v kapitole 1.1 uvádí hodnotu obsahu vody v brokolici $92,55 \text{ g} \cdot 100^{-1}$. Naměřená hodnota v brokolici je menší, což bylo pravděpodobně způsobeno výparem vody během skladování a distribuce.

7.2 Výsledky a přesnost stanovení obsahu škrobu v brokolici dle Ewerse

Obsah škrobu byl stanoven metodou uvedenou v kapitole 6.3.2. Při stanovení škrobu byla použita polarimetrická metoda, která využívá významné vlastnosti sacharidů, jejich optické aktivity. Hodnoty specifických otáčivostí nejsou pro dané látky univerzálními konstantami, nýbrž se vztahují k určitému rozpouštědлу. Roztoky, u nichž se měří úhel otočení musí být dokonale čiré, proto bylo u analyzovaných vzorků provedeno čiření podle Carreze. Čiřícího účinku bylo dosaženo vytvořením objemné sraženiny hexakynoželeznanu zinečnatého. Obsah škrobu v brokolici byl vypočten podle vzorce (5)

Tabulka 6: Výsledky měření obsahu škrobu v čerstvé brokolici

α [°]	X [hmot. %]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
59	3,19	0,012	0,00014
58	3,16	0,018	0,00032
58	3,15	0,028	0,00078
59	3,2	0,022	0,00048
59	3,19	0,012	0,00014
	$\bar{x} = 3,18$		$\Sigma = 0,00188$

Průměrný obsah škrobu v brokolici byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky s podle vzorce (2). Skutečný obsah škrobu stanovovaný metodou dle Ewerse byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 5. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha = 0,05$) a při čtyřech stupních volnosti 2,78. [58]

Směrodatná odchylka $s = 0,019$

Průměrný obsah škrobu v brokolici

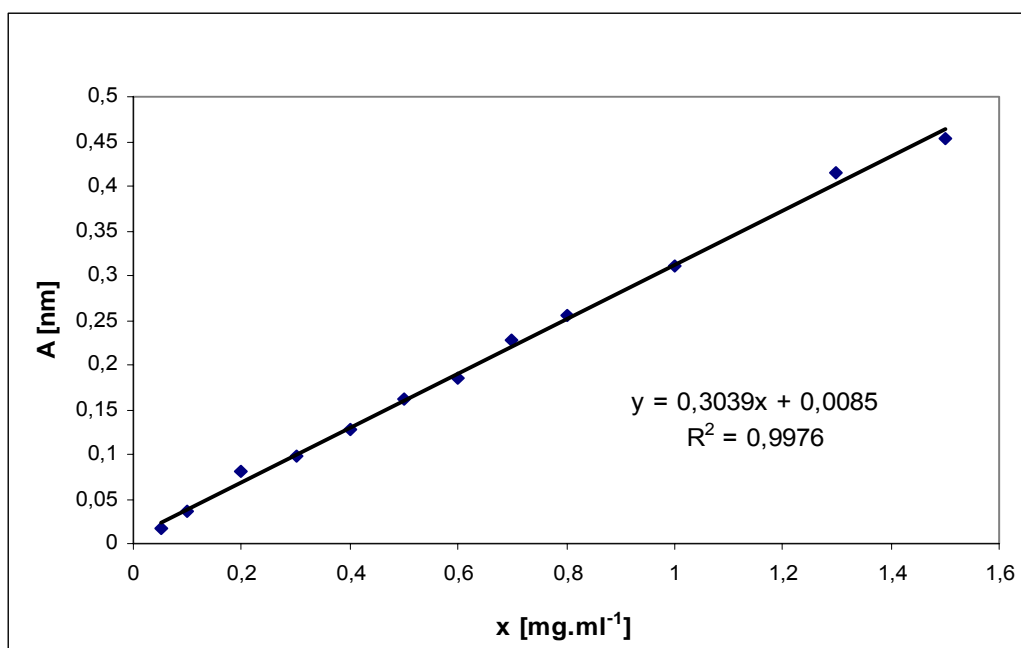
$\mu = 3,18 \pm 0,320$ hmot. % ($\alpha = 0,05$)

Průměrný obsah škrobu v brokolici byl stanoven 3,18 hmot. % (tabulka 6). Obsah škrobu v brokolici není velký, váže se na celulózu.

7.3 Výsledky a přesnost stanovení obsahu fosforu vanadičnanovou metodou

Fosfor byl stanoven pomocí metody uvedené v kapitole 6.3.3. Ze standardních roztoků kyseliny dihydrogenfosforečné byla nejprve vytvořena kalibrační křivka (graf 1) pro stanovení koncentrace fosforu. Poté byla metodou lineární regrese programem vygenerována rovnice kalibrační křivky s korelačním koeficientem $R = 0,9976$, ze které byly dále vypočteny hodnoty koncentrace fosforu [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$].

Graf 1: Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace fosforu



Z naměřených hodnot absorbance byla dosazením do rovnice kalibrační křivky vypočtena koncentrace fosforu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7. Dále byl vypočten obsah fosforu v brokolici v $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ čerstvé hmoty podle vzorce (6).

Tabulka 7: Výsledky stanovení obsahu fosforu v čerstvé brokolici

A [nm]	x [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$]	c [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
0,066	0,1892	94,2982	0,4015	0,1612
0,065	0,1859	93,4077	0,489	0,23912
0,066	0,1892	94,4206	0,5239	0,27447
0,065	0,1859	92,8386	1,0581	1,11958
0,066	0,1892	94,5184	0,6217	0,38651
		$\bar{x} = 93,90$		$\Sigma = 2,18088$

Průměrný obsah fosforu v brokolici byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky s podle vzorce (2). Skutečný obsah fosforu stanovovaný vanadičnanovou metodou byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 5. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha = 0,05$) a při čtyřech stupních volnosti 2,78. [58]

Směrodatná odchylka $s = 0,660$

Průměrný obsah fosforu v čerstvé brokolici

$\mu = 93,90 \pm 1,461 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ($\alpha = 0,05$)

Hlubková nutriční analýza uvedená v knize *The World's Healthiest Foods, Essential Guide to the Healthiest Way of Eating* od George Mateljana uvádí obsah fosforu $65,90 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ čerstvé hmoty a recenzovaná encyklopedie Wikipedie udává podobnou hodnotu $66 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$, tudíž je brokolice považována za jeho velmi dobrý zdroj. Měření ukázalo průměrný obsah fosforu v brokolici $93,90 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$. Vyšší hodnota mohla být způsobena nadměrným hnojením v průběhu pěstování.

7.4 Výsledky a přesnost spektrofotometrického stanovení chlorofylů v brokolici

Stanovení bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 6.3.4. Obsah listových barviv chlorofylu *a* v brokolici byl vypočten podle vzorce (7), chlorofylu *b* podle vzorce (8) a chlorofylu *a + b* podle vzorce (9). Následně byla pomocí vzorce (10) přepočtena koncentrace na $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ čerstvé hmoty.

Tabulka 8: Spektrofotometrické stanovení chlorofylu *a* v brokolici

A_1 (při 663nm)	A_2 (při 645nm)	Chlorofyl <i>a</i> [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	Chlorofyl <i>a</i> [$\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
0,214	0,118	2,40	3,01	0,076	0,00578
0,209	0,116	2,34	2,93	0,004	0,00002
0,208	0,115	2,33	2,91	0,024	0,00058
0,207	0,115	2,31	2,89	0,044	0,00194
0,209	0,116	2,34	2,93	0,004	0,00002
			$\bar{x} = 2,93$		$\Sigma = 0,00832$

Průměrný obsah chlorofylu *a* v brokolici byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky *s* podle vzorce (2). Skutečný obsah chlorofylu *a* stanovovaný spektrofotometrickou metodou byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 5. Hodnota Studentova koeficientu *t* je při testované hladině významnosti ($\alpha = 0,05$) a při čtyřech stupních volnosti 2,78. [58]

Směrodatná odchylka $s = 0,041$

Průměrný obsah chlorofylu *a* v brokolici

$\mu = 2,93 \pm 0,364 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ($\alpha = 0,05$)

Tabulka 9: Spektrofotometrické stanovení chlorofylu *b* v brokolici

A ₁ (při 663nm)	A ₂ (při 645nm)	Chlorofyl <i>b</i> [mg.l ⁻¹]	Chlorofyl <i>b</i> [mg.100g ⁻¹]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
0,214	0,118	1,70	2,13	0,034	0,00116
0,209	0,116	1,68	2,10	0,004	0,00002
0,208	0,115	1,66	2,07	0,026	0,00068
0,207	0,115	1,66	2,08	0,016	0,00026
0,209	0,116	1,68	2,10	0,004	0,00002
			$\bar{x} = 2,10$		$\Sigma = 0,00212$

Průměrný obsah chlorofylu *b* v brokolici byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky *s* podle vzorce (2). Skutečný obsah chlorofylu *b* stanovovaný spektrofotometrickou metodou byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 5. Hodnota Studentova koeficientu *t* je při testované hladině významnosti ($\alpha = 0,05$) a při čtyřech stupních volnosti 2,78. [58]

Směrodatná odchylka $s = 0,020$

Průměrný obsah chlorofylu *b* v brokolici

$\mu = 2,10 \pm 0,256 \text{ mg.100g}^{-1} (\alpha = 0,05)$

*Tabulka 10: Spektrofotometrické stanovení chlorofylu *a* + *b* v brokolici*

A ₁ (při 663nm)	A ₂ (při 645nm)	Chlorofyl <i>a</i> + <i>b</i> [mg.l ⁻¹]	Chlorofyl <i>a</i> + <i>b</i> [mg.100g ⁻¹]	$/x_i - \bar{x}/$	$/x_i - \bar{x}/^2$
0,214	0,118	4,10	5,14	0,11	0,0121
0,209	0,116	4,02	5,03	0,00	0,0000
0,208	0,115	3,99	4,99	0,04	0,0016
0,207	0,115	3,98	4,97	0,06	0,0036
0,209	0,116	4,02	5,02	0,01	0,0001
			$\bar{x} = 5,03$		$\Sigma = 0,0174$

Průměrný obsah chlorofylu *a* + *b* v brokolici byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky *s* podle vzorce (2). Skutečný obsah chlorofylu *a* + *b* stanovovaný spektrofotometrickou metodou byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 5. Hodnota Studentova koeficientu *t* je při testované hladině významnosti ($\alpha = 0,05$) a při čtyřech stupních volnosti 2,78. [58]

Směrodatná odchylka $s = 0,059$

Průměrný obsah chlorofylu *a* + *b* v brokolici

$\mu = 5,03 \pm 0,437 \text{ mg.100g}^{-1} (\alpha=0,05)$

Při použití spektrofotometrické metody byl průměrný obsah listových barviv chlorofylu *a* v brokolici stanoven po extrakci acetonem na $2,93 \text{ mg.100g}^{-1}$, obsah chlorofylu *b* byl stanoven na $2,10 \text{ mg.100g}^{-1}$ a celková koncentrace obou barviv je $5,03 \text{ mg.100g}^{-1}$.

7.5 Výsledky a přesnost stanovení β -karotenu metodou HPLC-ECD

7.5.1 Výsledky extrakce β -karotenu z brokolice

První extrakční postup – jednoduchá extrakce

Extrakce byly provedeny podle postupu uvedeného v kapitole 6.3.5.1. Z tabulky č. 11 vyplývá, že biologicky aktivní látky byly nejlépe extrahovány při použití kombinace rozpouštědel hexan-aceton a etanol-hexan, a to jak při laboratorní teplotě, tak i ve vodní lázni. Bylo vizuálně pozorováno, že kombinace těchto rozpouštědel způsobila nejlepší oddělení fází a přechod biologicky aktivních látek do rozpouštědla, který způsobil tmavě zelené zbarvení horní vrstvy, přičemž nejtmavší zbarvení bylo pozorováno u kombinace rozpouštědel hexan - aceton při 35°C. Také při použití ethanolu ve vodní lázni (35°C) byla rozpustnost dobrá. Při použití ethanolu, acetonu a hexanu jako samostatných rozpouštědel byla extrakce málo účinná. Nejhorší extrakce nastala při použití chloroformu, kdy byla pozorována sraženina. Výsledek jednoduché extrakce je zachycen na obrázcích 14-17. Vzorky byly vyhodnoceny symboly + a - :

- + došlo k oddělení fází
- nedošlo k oddělení fází

Tabulka. 11: Účinnost rozpouštědel na extrakci biologicky aktivních látek brokolice

Rozpouštědlo	Extrakce při laboratorní teplotě (21°C)	Extrakce ve vodní lázni (35°C)
Hexan + aceton	+	+
Ethanol + hexan	+	+
Ethanol + aceton	-	-
Ethanol	-	+
Aceton	-	-
Hexan	-	-
Chloroform	-	-



Obr. 14: Extrakce při laboratorní teplotě Obr. 15: Extrakce při laboratorní teplotě

Obrázek 14 zachycuje výsledek extrakce látek z brokolice za laboratorní teploty 21°C a použití extrakčních činidel bylo následující hexan-aceton, ethanol-hexan a ethanol-aceton. Z obrázků je jasně patrné oddělení fází. Obrázek 15 zachycuje výsledek extrakce za laboratorní teploty 21°C a použití samostatných extrakčních činidel v následujícím pořadí: ethanol, hexan, aceton a chloroform. Fáze již nejsou odděleny tak zřetelně jako na obrázku 14.



Obr. 16: Extrakce při 35°C

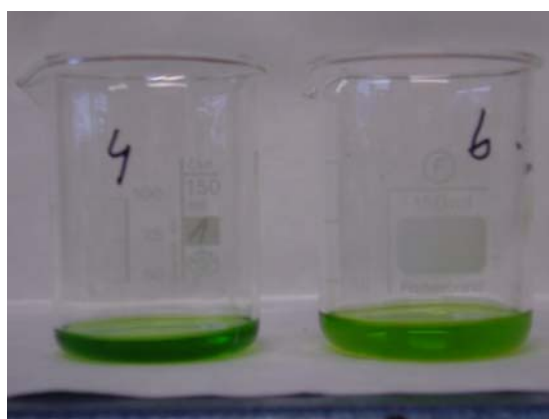


Obr. 17: Extrakce při 35°C

Obrázek 16 zachycuje výsledek extrakce látek z brokolice při použití vodní lázně o teplotě 35°C a použití extrakčních činidel bylo následující ethanol-hexan, hexan-aceton a ethanol-aceton. Oddělení fází u těchto kombinací rozpouštědel je zřetelnější, než na obrázku 17. Obrázek 17 zachycuje výsledek extrakce při použití vodní lázně o teplotě 35°C a použití samostatných extrakčních činidel aceton, hexan a ethanol.

Druhý extrakční postup – dvojitá extrakce

Kombinace rozpouštědel hexan-aceton při 35°C se jevila jako nejlepší, protože byl získán daleko kvalitnější extrakt, než při použití rozpouštědel hexan-ethanol. V dělicí nálevce došlo k oddělení fází u rozpouštědel hexan-ethanol, u rozpouštědel hexan-aceton k oddělení fází nedošlo. Proto jako vhodnější extrakční postup byla vyhodnocena filtrace přes filtrační papír (obrázek 18 a 19).



Obr. 18: Použití dělicí nálevky po extrakci Obr. 19: Extrakty po filtraci přes filtrační papír

Obrázek 18 zachycuje použití dělicích nálevek pro extrakty obsahující hexan-ethanol a hexan-aceton. Obrázek 19 ukazuje extrakt po filtraci za použití rozpouštědel hexan-ethanol a hexan-aceton.

Kombinace rozpouštědel hexan-aceton ve vodní lázni (při 35°C) byla použita při všech extrakcích β -karotenu z brokolice.

7.5.2 Výsledky stanovení chromatografických podmínek pro detekci β -karotenu metodou HPLC-ECD

Kapsle β -karotenu a standard β -karotenu byly proměřeny za podmínek uvedených v kapitole 6.3.5.2. Cílem bylo určit separační detekční podmínky, které jsou nejvhodnější pro stanovení β -karotenu. Dalším úkolem bylo zjistit retenční čas β -karotenu. Z chromatogramů byly vyvozeny tyto závěry:

Standard β -karotenu měl velmi dobrou odezvu při potenciálech $K_1 = 100$ mV a $K_2 = 200$ mV a retenční čas nastal v 3,97 min (chromatogram 1, příloha VIII). Relativně dobrá odezva nastala při potenciálech $K_1 = 200$ mV a $K_2 = 300$ mV, kdy retenční čas β -karotenu byl v 3,96 min. Při potenciálech $K_1 = 300$ mV a $K_2 = 400$ mV byla odezva dobrá pouze při 300 mV a retenční čas byl opět v 3,96 min. Při vyšším zvoleném potenciálu $K_1 = 400$ mV a $K_2 = 500$ mV nastala špatná odezva a dal by se pro kvantitativní detekci použít pouze kanál 1, retenční čas byl stanoven na 3,97 min. Vyšší potenciály $K_1 = 500$ mV a $K_2 = 600$ mV se nedají aplikovat, protože není taková citlivost detektoru. Pro měření se jevily v počátku vhodné potenciály v rozmezí od 100 do 300 mV.

Kapsle β -karotenu měla podobnou odezvu jako standard. Jako nejvhodnější byly vyhodnoceny potenciály do 300 mV. Při potenciálech $K_1 = 100$ mV a $K_2 = 200$ mV nastal re-

tenční čas v 4,088 min. Stejný retenční čas byl naměřen i při potenciálech $K_1 = 200$ mV a $K_2 = 300$ mV, ale nejlepší odezva se jevila při $K_1 = 300$ mV a $K_2 = 400$ mV, kdy lze použít pouze kanál 1 a retenční čas byl stanoven na 4,092 min (chromatogram 2, příloha VIII). Vyšší potenciály již nebyly vyhodnoceny jako vhodné.

7.5.3 Výsledky stanovení vhodného potenciálu pro měření kalibrační křivky β -karotenu a stanovení β -karotenu v reálném vzorku brokolice metodou HPLC-ECD

Postup dvojité extrakce (kapitola 6.3.5.1) a podmínky měření vzorku brokolice byly provedeny podle metody uvedené v kapitole 6.3.5.3. Cílem bylo proměřit vzorky brokolice při různých potenciálech a určit při kterém potenciálu bude nejlepší odezva. Analyzovalo se při postupném zvyšování potenciálů od 100 mV až po 500 mV. Z chromatografické analýzy bylo zjištěno, že nejlepší odezva nastala na kanálech $K_1 = 300$ mV a $K_2 = 400$ mV v retenčním čase 4,204 min. Proto následné měření kalibrační křivky a stanovení β -karotenu ve vzorcích brokolice bude probíhat při těchto potenciálech. Analýza je zachycena v příloze VIII, chromatogram 3.

7.5.4 Výsledky a přesnost stanovení kalibrační křivky β -karotenu metodou HPLC-ECD

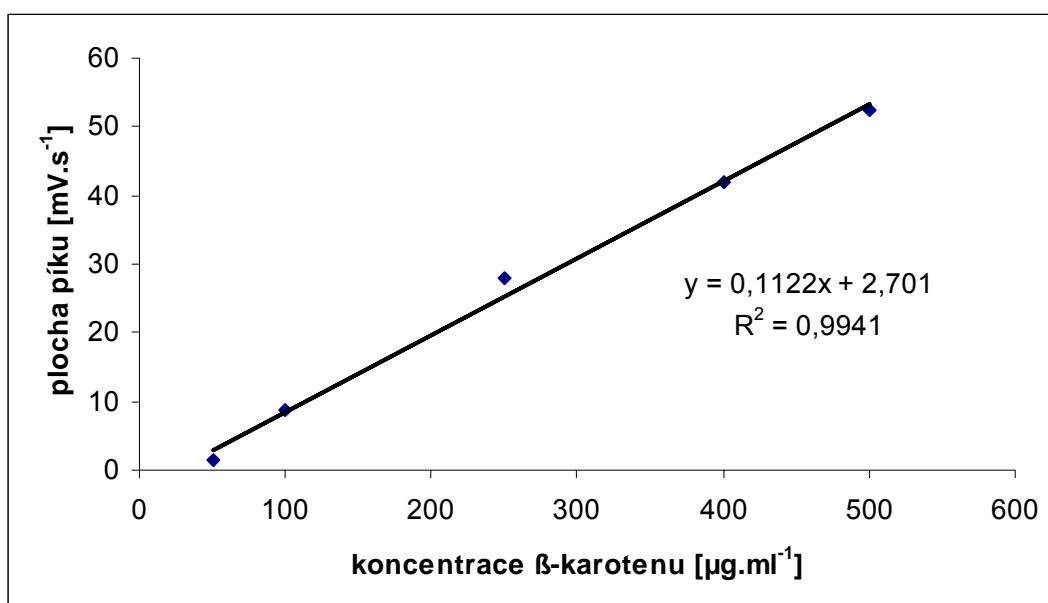
Kalibrační křivka pro chromatografické stanovení β -karotenu metodou HPLC-ECD byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 6.3.5.4. Byly vypočteny průměrné hodnoty ploch píků, které jsou uvedeny v tabulce 12. Průběh analýzy kalibrační křivky je zachycen na chromatogramu 4, v příloze VIII.

Tabulka 12: Kalibrace β -karotenu metodou HPLC-ECD na $K_1 = 300$ mV

Koncentrace β -karotenu [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]	Průměrná plocha píku [$\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$]	Směrodatná odchylka [$\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$]
50	1,36	0,101
100	8,64	0,080
250	28,10	0,330
400	41,82	0,790

Koncentrace β -karotenu [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Průměrná plocha píku [$\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$]	Směrodatná odchylka [$\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$]
500	52,46	0,460

Graf 2: Kalibrační křivka s regresní rovnicí pro stanovení β -karotenu metodou HPLC-ECD na kanálu $K_1 = 300 \text{ mV}$



Z kalibrační křivky byla stanovena rovnice regresní přímky s korelačním koeficientem 0,9941.

7.5.5 Výsledky a přesnost vlastního stanovení obsahu β -karotenu ve vzorcích brokolice

Postup stanovení byl proveden podle metody uvedené v kapitole 6.3.5.5. Retenční čas β -karotenu nastal přibližně ve 3,6 minutě a v tomto čase byly odečteny plochy píků. Retenční čas nastal dříve, než v předchozích případech, protože byl zvětšen průtok kolonou z 1 na 1,1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Průběh analýzy zachycují chromatogramy 5-8 v příloze VIII.

Tabulka 13: Přesnost stanovení β -karotenu metodou HPLC-ECD

Plocha píku [$\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$]	Obsah β -karotenu [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Obsah β -karotenu [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
3,65	8,458	1,691	0,0118	0,00014

Plocha píku [mV.s ⁻¹]	Obsah β-karotenu [μg.ml ⁻¹]	Obsah β-karotenu [mg.100g ⁻¹]	$/x_i - \bar{x}/$	$/x_i - \bar{x}/^2$
3,67	8,636	1,722	0,0199	0,00040
3,65	8,458	1,691	0,0117	0,00014
3,66	8,547	1,703	0,0003	0,00000
3,66	8,547	1,706	0,0033	0,00001
		$\bar{x} = 1,703$		$\Sigma = 0,00068$

Průměrný obsah β-karotenu v brokolici byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky s podle vzorce (2). Skutečný obsah β-karotenu stanovený metodou HPLC-ECD byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 5. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha = 0,05$) a při čtyřech stupních volnosti 2,78. [58]

Směrodatná odchylka $s = 0,0117$

Průměrný obsah β-karotenu v brokolici

$\mu = 1,703 \pm 0,1945 \text{ mg.100g}^{-1} (\alpha = 0,05)$

Plochy píku byly dosazeny do regresní rovnice kalibrační křivky a byly vypočteny koncentrace β-karotenu v jednotlivých vzorcích. Průměrná hodnota β-karotenu v brokolici byla stanovena na $1,703 \text{ mg.100g}^{-1}$. Zdroj uvedený v kapitole 2.4.1. uvádí hodnotu $1,573 \text{ mg.100g}^{-1}$ čerstvé hmoty, což přibližně odpovídá naměřené hodnotě.

7.6 Výsledky a přesnost titračního stanovení vitamínu C v brokolici

Titrační stanovení kyseliny L-askorbové pomocí $0,001 \text{ mol.l}^{-1}$ odměrného roztoku 2,6-dichlor-fenolindofenolu bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 6.3.6. Nejprve byl stanoven titer (t), který představuje hmotnost kyseliny L-askorbové v mg, která

odpovídá 1 ml odměrného roztoku (tabulka 14). Spotřeba titračního činidla na slepý pokus byla 0,1 ml. K výpočtu hodnoty titru t byl použit vzorec (11).

Tabulka 14: Spotřeba odměrného roztoku a výsledky výpočtu titru t

Měření	a [ml]	t
1	14,0	0,1439
2	13,9	0,1449
3	13,4	0,1504
Ø		0,1464

1 ml $0,001 \text{ mol.l}^{-1}$ odměrného roztoku 2,6-dichlorfenolindofenolu odpovídá
0,1464 mg kyseliny L-askorbové
 $t = 0,1464$

K výpočtu obsahu kyseliny L-askorbové byl použit vzorec (12).

Tabulka 15: Titrační stanovení kyseliny L-askorbové

b [ml]	Obsah kyseliny L - skorbové [mg.100g ⁻¹]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
3,55	25,25	0,356	0,12674
3,50	24,64	0,254	0,06452
3,50	24,66	0,234	0,05476
3,50	24,68	0,214	0,0458
3,55	25,24	0,346	0,11972
	$\bar{x} = 24,89$		$\Sigma = 0,41152$

Průměrný obsah vitamínu C v brokolici byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky s podle vzorce (2). Skutečný obsah vitamínu C stanovovaný titrační metodou byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými paramet-

ry uveden v kapitole 5. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha = 0,05$) a při čtyřech stupních volnosti 2,78. [58]

Směrodatná odchylka $s = 0,287$

Průměrný obsah vitamínu C v brokolici

$\mu = 24,89 \pm 0,963 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ($\alpha = 0,05$)

Průměrný obsah kyseliny L-askorbové v brokolici byl stanoven na $24,89 \pm 0,963 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ čerstvé hmoty. Hlubková nutriční analýza uvedená v knize podle knihy *The World's Healthiest Foods, Essential Guide to the Healthiest Way of Eating* od George Mateljana uvádí obsah kyseliny L-askorbové vyšší a to $79,102 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$. Recenzovaná encyklopedie Wikipedia uvádí obsah vitamínu C ještě o něco vyšší a to $89,2 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$. I přesto, že vzorky byly uchovávány ve tmě, mohlo dojít ke ztrátám vitamínu C v důsledku přístupu slunečního světla, další ztráty mohly být způsobeny přístupem vzduchu. K oxidaci mohlo dojít v důsledku dehydrogenačních pochodů při přechodu kyseliny L-askorbové na L – dehydroaskorbovou. Nutriční ztráty mohly nastat i v důsledku nevhodného nebo delšího skladování brokolice. Zdroj uvedený v příloze III ovšem uvádí hodnotu obsahu vitamínu C v brokolici $20,2 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, která přibližně odpovídá naměřené hodnotě.

7.7 Výsledky a přesnost stanovení vitamínu C metodou HPLC-ECD

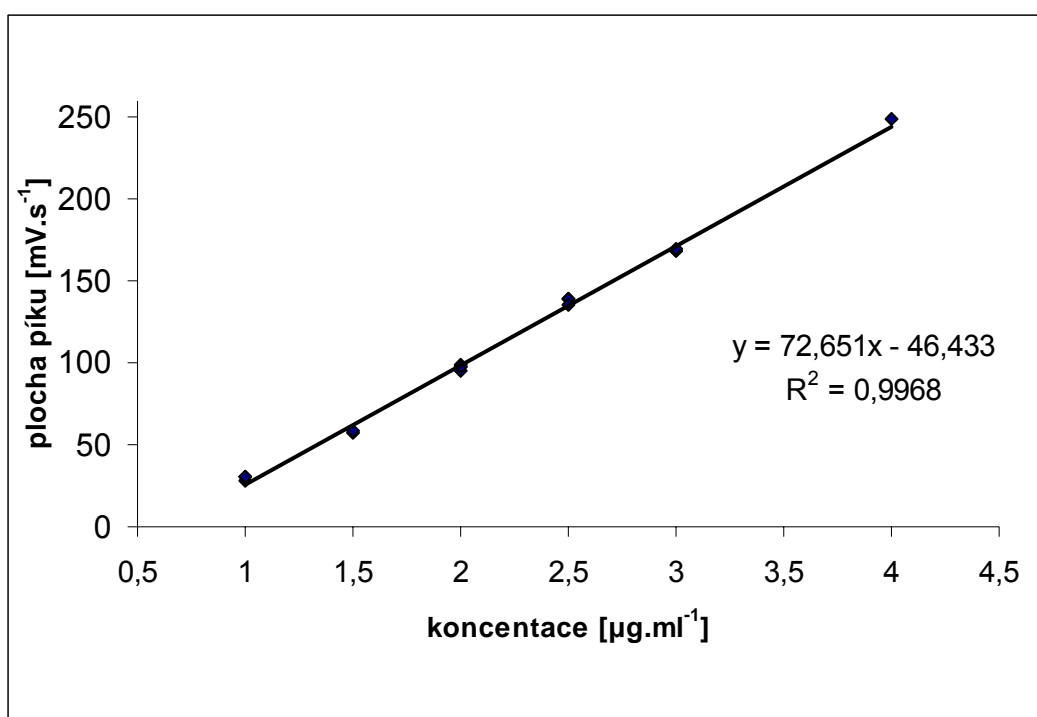
7.7.1 Výsledky stanovení kalibrační křivky vitamínu C v brokolici metodou HPLC-ECD

Kalibrační křivka pro chromatografické stanovení vitamínu C byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 6.3.7.1. Každý bod kalibrační křivky byl proměřen pětkrát a vypočtena odpovídající průměrná plocha píku. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost průměrné plochy příslušného píku na koncentraci kyseliny askorbové. Kalibrační křivka byla měřena za použití kanálů, kde byly stanoveny potenciály $K_1 = 600 \text{ mV}$ a $K_2 = 650 \text{ mV}$. Z důvodu lepší odezvy signálu byl použit první kanál $K_1 = 600 \text{ mV}$ pro přesnější stanovení. Naměřené hodnoty kalibrační křivky ukazuje tabulka 16.

Tabulka 16: Kalibrace vitamínu C metodou HPLC-ECD na $K_1 = 600 \text{ mV}$

Koncentrace kyseliny L – askorbové [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Průměrná plocha píku [$\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$]	Směrodatná odchylka plochy píku ($\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$)
1	29,89	1,201
1,5	57,76	1,073
2	97,25	1,665
2,5	137,85	0,313
3	168,82	0,662
4	249,45	0,618

Graf 3: Kalibrační křivka s regresní rovnicí pro stanovení vitamínu C metodou HPLC na kanále $K_1 = 600 \text{ mV}$.



Z kalibrační křivky byla stanovena rovnice regresní přímky s korelačním koeficientem 0,9968.

7.7.2 Výsledky a přesnost vlastního stanovení vitamínu C v brokolici metodou HPLC-ECD

Stanovení vitamínu C v brokolici bylo prováděno dle postupu uvedeného v kapitole 6.3.7.2. Retenční čas pro vitamin C byl 1,8 min. Průběh chromatografické analýzy ukazuje příloha VIII, chromatogram 9. Výsledky stanovení uvádí následující tabulka:

Tabulka 17: Stanovení vitamínu C v čerstvé brokolici

Plocha píku [mV.s ⁻¹]	Obsah vitamínu C [μg.ml ⁻¹]	Obsah vitamínu C [mg.100g ⁻¹]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
166,45	2,93902	58,60	0,63	0,3969
164,68	2,90585	58,12	0,15	0,0225
160,77	2,85203	57,04	0,93	0,8649
163,56	2,89044	57,81	0,16	0,0256
165,34	2,91485	58,30	0,33	0,1089
		$\bar{x} = 57,974$		$\Sigma = 1,418$

Průměrný obsah vitamínu C v brokolici byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky s podle vzorce (2). Skutečný obsah vitamínu C stanovený titrační metodou HPLC byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 5. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha = 0,05$) a při čtyřech stupních volnosti 2,78. [58]

Směrodatná odchylka $s = 0,5327$

Průměrný obsah vitamínu C v brokolici

$\mu = 57,974 \pm 1,3127 \text{ mg.100g}^{-1} (\alpha = 0,05)$

Průměrný obsah vitamínu C v brokolici stanovený metodou HPLC je $57,97 \text{ mg.100}^{-1}$, což je více než obsah vitamínu C stanovený titračně ($24,89 \text{ mg.100}^{-1}$). Je nutno samozřejmě konstatovat, že rozdíl v množství vitamínu C byl jistě zapříčiněn tím, že se jednalo o zcela jinou brokolici. Metoda HPLC-ECD byla měřena u brokolice, kterou lze zakoupit v dubnu

v maloobchodní síti, kdežto metoda titrační byla provedena v zimních měsících. *The World's Healthiest Foods, Essential Guide to the Healthiest Way of Eating* od George Mateljana uvádí obsah kyseliny L-askorbové vyšší a to 79,102 mg.100g⁻¹. Recenzovaná encyklopedie Wikipedia uvádí obsah vitamínu C ještě o něco vyšší a to 89,2 mg.100g⁻¹. Naopak zdroj uvedený v příloze III uvádí hodnotu obsahu vitamínu C v nižší a to 20,2 mg.100g⁻¹.

7.8 Výsledky a přesnost stanovení těžkých kovů v brokolici atomovou absorpční spektrofotometrií (AAS)

7.8.1 Výsledky a přesnost stanovení rtuti pomocí analyzáru AMA 254

Postup stanovení byl proveden podle metody uvedené v kapitole 6.3.8.1. Naměřené hodnoty obsahu rtuti v růžicích a v košťálu uvádí tabulky 18 a 19.

Tabulka 18: Přesnost stanovení obsahu rtuti v růžici brokolice

Hmotnost vzorku [mg]	Obsah rtuti [ppm]	Obsah rtuti [$\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
96,10	0,000944	0,094	0,000	0,0000
93,50	0,000869	0,087	0,007	0,000049
90,20	0,000934	0,093	0,001	0,000001
92,51	0,000965	0,097	0,003	0,000009
95,12	0,000957	0,099	0,005	0,000025
		$\bar{x} = 0,094$		$\Sigma = 0,0000842$

Průměrný obsah rtuti v růžicích brokolici byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky s podle vzorce (2). Skutečný obsah rtuti stanovovaný metodou AAS byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 5. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha = 0,05$) a při čtyřech stupních volnosti 2,78. [58]

směrodatná odchylka $s = 0,0041$

Průměrný obsah rtuti v růžici brokolice

$$\mu = 0,094 \pm 0,1152 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 19: Přesnost stanovení obsahu rtuti v košťálu brokolice

Hmotnost vzorku [mg]	Obsah rtuti [ppm]	Obsah rtuti [$\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
93,10	0,000565	0,057	0,006	0,000036
94,60	0,000484	0,048	0,003	0,000009
104,30	0,000580	0,058	0,007	0,000049
92,82	0,000428	0,043	0,008	0,000064
93,76	0,000491	0,049	0,002	0,000004
		$\bar{x} = 0,051$		$\Sigma = 0,000162$

Průměrný obsah rtuti v košťálu brokolici byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky s podle vzorce (2). Skutečný obsah rtuti stanovený metodou AAS byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 5. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha = 0,05$) a při čtyřech stupních volnosti 2,78. [58]

$$\text{Směrodatná odchylka } s = 0,0057$$

Průměrný obsah rtuti v košťálu brokolice

$$\mu = 0,051 \pm 0,1358 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

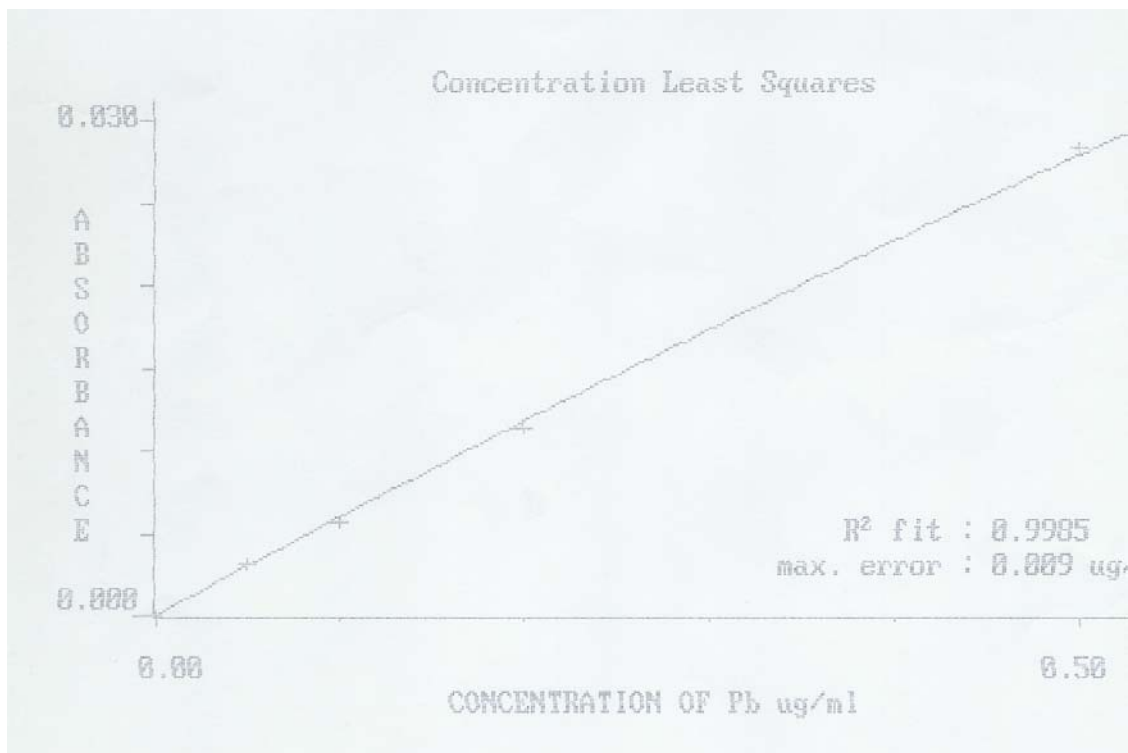
V růžici brokolice byl obsah rtuti naměřen $0,094 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$, v košťálu $0,051 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$. Z uvedených hodnot vyplývá, že koncentrace rtuti v brokolici se blíží nulovým hodnotám. Rtuť se tedy v brokolici příliš neakumuluje. Podle vyhlášky ministerstva zdravotnictví 53/2002 Sb., která byla později zrušena, je nejvyšší přípustné množství rtuti (tj. takové při jehož překročení je potravinu vyloučena z oběhu) v sušině zeleniny $20 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$. Současné maximální limity pro obsah rtuti v zelenině nebyly nalezeny.

7.8.2 Výsledky a přesnost stanovení olova a kadmia na přístroji GBC 933 AA

Postup stanovení byl proveden podle metody uvedené v kapitole 6.3.8.2. Byla sestavena kalibrační křivka pro olovo (graf 4) a kadmium (graf 5). Slepý pokus byl stanoven u olova

na $0,059 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a u kadmia na $0,004 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a byl odečten od naměřených hodnot. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulkách 20 a 21.

Graf 4: kalibrační křivka pro stanovení olova metodou AAS



Tabulka 20: Přesnost stanovení koncentrace olova v mineralizátu brokolice

Absorbance [nm]	Obsah olova [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Obsah olova [$\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
0,004	0,002	0,001	0,0006	0,0000
0,003	0,002	0,001	0,0006	0,0000
0,003	0,000	0,000	0,0004	0,0000
0,004	0,000	0,000	0,0004	0,0000
0,004	0,001	0,000	0,0004	0,0000
		$\bar{x} = 0,0004$		$\Sigma = 0,0000$

Průměrný obsah olova v brokolici byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky s podle vzorce (2). Skutečný obsah olova stanovený metodou AAS byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden

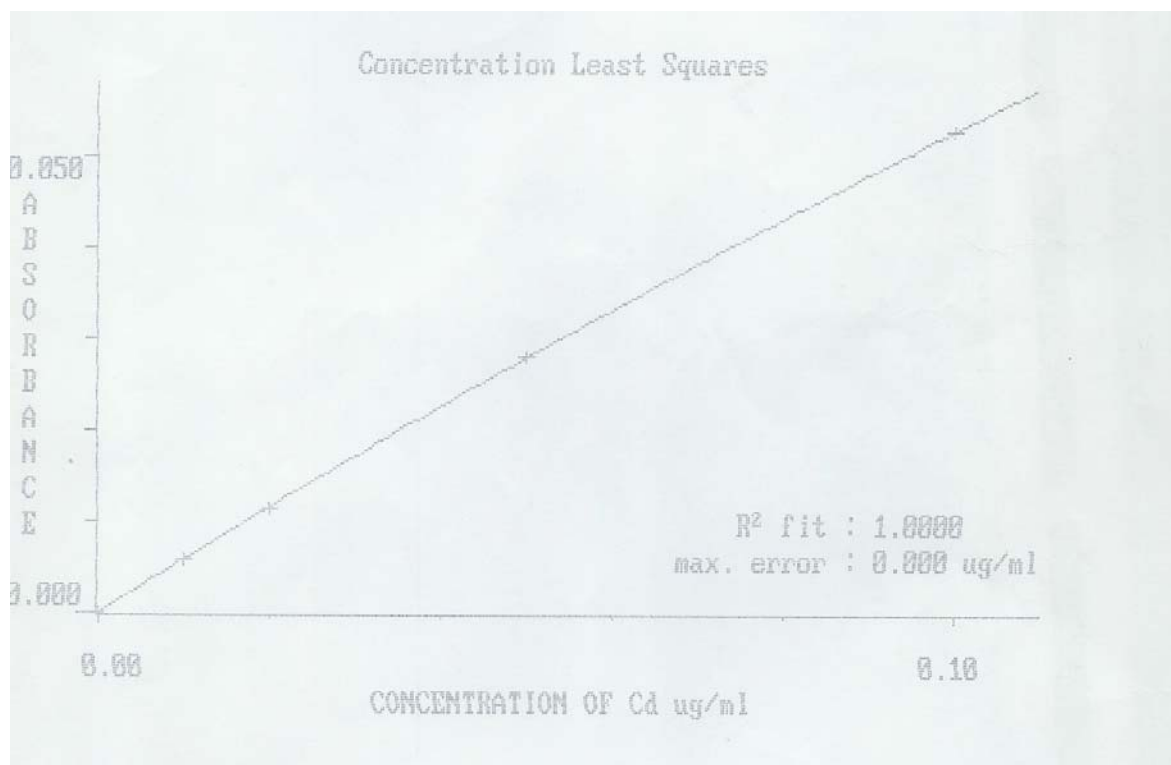
v kapitole 5. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha = 0,05$) a při čtyřech stupních volnosti 2,78. [58]

Směrodatná odchylka $s = 0,00049$

Průměrný obsah olova v brokolici

$\mu = 0,0004 \pm 0,03981 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ($\alpha = 0,05$)

Graf 5: kalibrační křivka pro stanovení kadmia metodou AAS



Tabulka 21: přesnost stanovení koncentrace kadmia v mineralizátu brokolice

Absorbance [nm]	Obsah kadmia [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Obsah kadmia [$\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
0,003	0,0	0,0	0,0	0,0
0,003	0,0	0,0	0,0	0,0
0,003	0,0	0,0	0,0	0,0
0,003	0,0	0,0	0,0	0,0
0,003	0,0	0,0	0,0	0,0
		$\bar{x} = 0,0$		$\Sigma = 0,0$

Z naměřených hodnot vyplývá, že hodnoty obsahu těžkých kovů olova i kadmia jsou ještě nižší než obsah rtuti. Olovo a kadmium se v rostlinných materiálech kumulují méně než rtuť a v brokolici se pohybují kolem nulových hodnot. Kadmium nebylo v brokolici detekováno vůbec. Nařízení komise (ES) č. 466/2001 ze dne 8. března 2001, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, udává tyto hodnoty pro obsah těžkých kovů: maximální limit pro obsah olova v košťálové zelenině je tímto nařízením stanoven na $30 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$, pro kadmium je tento limit stanoven na $20 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

ZÁVĚR

Cílem předložené diplomové práce bylo stanovení biologicky aktivních látek brokolice pomocí analytických metod. V rámci této práce byly testovány optimální extrakční postupy vhodné ke kvantitativní izolaci β -karotenu a vitamínu C z brokolice. Pozornost byla věnována i těžkým kovům obsaženým v brokolici a minerálním látkám. Nejsou opomenuty základní technologické charakteristiky jako je obsah sušiny a škrobu.

Vázkovou metodou byla stanovena sušina. Průměrný obsah sušiny v brokolici byl naměřen $14,43 \pm 0,448$ hmot.%. Obsah škrobu byl stanoven metodou dle Ewerse a jeho průměrný obsah v brokolici byl naměřen $3,18 \pm 0,320$ hmot.%. Fosfor byl stanoven pomocí vanadičnanové metody. Průměrný obsah fosforu v brokolici byl naměřen $93,90 \pm 1,461$ mg. $100g^{-1}$. Obsah fosforu je poněkud vyšší než uvádí literatura, což mohlo být způsobeno nadměrným hnojením v průběhu pěstování. Obsah chlorofylů byl stanoven spektrofotometricky. Průměrný obsah listového barviva chlorofylu *a* v brokolici byl stanoven $2,93$ mg. $100g^{-1}$, obsah chlorofylu *b* byl stanoven na $2,10$ mg. $100g^{-1}$ a koncentrace chlorofylu *a* + *b* je $5,03$ mg. $100g^{-1}$. Obsah chlorofylů nebylo možno ověřit v literatuře. Všechny údaje jsou vždy definovány na 100 g čerstvé hmoty.

β -karoten byl stanoven metodou HPLC-ECD. Izolace β -karotenu z čerstvé hmoty brokolice byla provedena pomocí kombinace rozpouštědel hexan-aceton ve vodní lázni při 35°C. Jako mobilní fáze zde byla použita směs $CH_3OH:H_2O:H_3PO_4$ v poměru 99:0,5:0,5. Byl testován i průtok mobilní fáze, jako nejlepší byl zvolen $1,1$ ml. min^{-1} . Vzorby byly měřeny na koloně SUPELCOSIL-LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5 μ m). Na elektrody bylo vloženo napětí 300 mV a 400 mV a ochranná guard cela byla zvolena 750 mV. Nejlepší odezvy bylo dosaženo při vložení napětí 300 mV, při kterém byl i β -karoten vyhodnocován. Eluce probíhala izokraticky. U tohoto přístroje byla provedena i metoda standardního přídatku, kdy byla ověřena přesnost stanovení β -karotenu a zároveň postup jeho extrakce z reálných vzorků. Průměrný obsah β -karotenu v brokolici byl naměřen $1,703 \pm 0,1945$ mg. $100g^{-1}$, což odpovídá hodnotám citovaným v literatuře.

Vitamin C byl stanoven taktéž metodou HPLC-ECD a i titračně. Titrační stanovení vitamínu C probíhalo v prostředí 2 % kyseliny šťavelové, kdy byly vzorky titrovány 2,6-dichlorfenolindofenolem. Průměrný obsah vitamínu C v brokolici byl naměřen $24,89 \pm 0,963$ mg. $100g^{-1}$. Při stanovení vitamínu C metodou HPLC-ECD byl také testován průtok mobilní fáze. Jako mobilní fáze zde byla použita taktéž směs $CH_3OH:H_2O:H_3PO_4$ v poměru

99:0,5:0,5. Jako nejlepší byl zvolen průtok mobilní fáze opět $1,1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Extrakce vitamínu C byla provedena přímo do této mobilní fáze. Vzorke byly měřeny taktéž na koloně SUPELCOSIL-LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5 μm). Na elektrody bylo vloženo napětí 600 mV a 650 mV a ochranná guard cela byla zvolena 750 mV. Nejlepší odezvy bylo dosaženo při vložení napětí 600 mV. Eluce probíhala izokraticky. Průměrný obsah vitamínu C v brokolici byl naměřen $57,97 \pm 0,739 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$. Rozdíl v množství vitamínu C u obou metod, byl zcela jistě způsoben rozdílností původů vzorků. Titrační metoda byla prováděna v zimních měsících, kdežto při měření metodou HPLC byla použita brokolice zakoupená v měsíci dubnu. Taktéž literatura se v údajích o množství vitamínu C v brokolici rozchází.

Těžké kovy byly stanoveny metodami atomové absorpční spektrofotometrie. Průměrný obsah rtuti v růžici brokolice byl naměřen $0,094 \pm 0,1152 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$. Průměrný obsah rtuti v košťálu brokolice byl naměřen $0,051 \pm 0,1358 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$. Průměrný obsah olova v brokolici byl naměřen $0,0004 \pm 0,03981 \mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$. Kadmium nebylo v brokolici detekováno vůbec. Z výsledků vyplývá, že se těžké kovy v brokolici příliš neakumulují.

Výsledky jednotlivých analýz byly zpracovány pomocí standardních statistických parametrů za použití Studentova rozložení náhodných odchylek pro daný stupeň volnosti. Výsledky byly testovány na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (95 %).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] PRUGAR, J., ZUKALOVÁ, H. *Výživa a potraviny*, Dvojí tvář glukosinolátů, ročník 57, listopad, prosinec 2002, str.184
- [2] BIGGS, M., MC VICAROVÁ, J. *Velká kniha zeleniny, bylin a ovoce*, 1. vydání, Volfox Glabator, Praha 2004, ISBN 80-7207-537-3
- [3] HAVLŮ, K. *Brokolice na 150 způsobů*, vyd. 1., Nakladatelství Vyšehrad 2005, ISBN 80-7021-794-4
- [4] Brokolice-superzdravá zelenina, *Receptář 7*, 2007, s. 14
- [5] OLDŘICHOVÁ, T. Nový zeleninový hit na našem trhu - Romanesco, Dostupné na: URL:
<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=112&ch=1&typ=1&val=9670>
- [6] US department of Agriculture, Agriculture Research service, 2005, USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18. Nutrient Data laboratory Home Page http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl
- [7] KUČEROVÁ M. Brokolice chřestová, *Flóra na zahradě*, červenec 2003
- [8] BARTOŠ, J. Květák a brokolice na českém trhu, 3.3.2003, dostupné na: <http://www.zahradaweb.cz/projekt/clanek.asp?pid=2&cid=879>
- [9] BARTOŠ, J. Produkce a nabídka květáku a brokolice v Evropě, 13.1, 2005, dostupné na: <http://www.zahradaweb.cz/projekt/clanek.asp?pid=2&cid=3073>
- [10] Groower, Britský výzkum životnosti brokolice při skladování 138, 2002, č. 24, s. 7 Vo, 28.2.2004, dostupné na: <http://www.zahradaweb.cz/projekt/clanek.asp?pid=2&cid=2315>
- [11] Broccoli 'stops' prostate cancer, Thursday, 2 August 2007, BBC NEWS, dostupné na <http://news.bbc.co.uk/2/hi/health/6927359.stm>
- [12] SUKOVÁ, I. Antimutagenní aktivita isothiokyanátů, *Hygiena*, 51, 2006, č.1, s. 6-10
- [13] WHITNEY, M., T. Study shows consuming broccoli and tomatoes together more effective in fighting prostate cancer than eating either alone, *Cancer Research magazine*, Wednesday, January 17, 2007.
- [14] JOCELYN, C., WING, A. Indole-3-carbinol mediated cell cycle arrest of LN-CaP human prostate cancer cells requires the induced production of activated p53 tumor suppressor protein, *Biochemical Pharmacology*, Volume 72, Issue 12, 15 December 2006, p. 1714-1723

- [15] HARRIS, E., JEFFERY, H. Sulforaphane and erucin increase MRP1 and MRP2 in human carcinoma cell lines, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, Volume 19, Issue 4, April 2008, p. 246-254
- [16] DE KOK, T., VAN BREDA, S., JOOST, H.M. Mechanisms of colorectal and lung cancer prevention by vegetables: a genomic approach, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, Volume 19, Issue 3, March 2008, p. 139-15
- [17] MATELJANA, G. *The World's Healthiest Foods*, Essential Guide to the Healthiest Way of Eating, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 2006, ISBN 09-76918549-5-3995
- [18] STEINKELLNER H., RABOT, S. Effects of cruciferous vegetables and their constituents on drug metabolizing enzymes involved in the bioactivation of DNA-reactive dietary carcinogens, *Molecular Mechanisms of Anticarcinogenesis an Antimutagenesis*, Volumes 480-481, 1 September 2001, p. 285-297
- [19] HALLÓSY, M. *Dajme zelenú brokolici*, 14. června 2005, dostupné na: URL:<http://www.primar.sk/Page.spx?ID=3997>
- [20] GILLS, J., JEFFERY, E., H., MATUSHESKI, N., V. Sulforaphane prevents mouse skin tumorigenesis during the stage of promotion, *Cancer Letters*, Volume 236, Issue 1, 8 May 2006, p. 72-79
- [21] WEST, L., TSUI, I., BALCH, B., MEYER, K. Determination and Health Implication of the Erucic Acid Content of Broccoli Florets, Sprouts, and Seeds, *Journal of Food Science*, 67 (7), 2002, p. 2641-2643
- [22] MALÝ, I. *Pěstujeme květák, zelí a další košťálové zeleniny*, Grada Publishing, 1. vydání, Praha 2003
- [23] JEFFERY, E. H., BROWN, A.,F., KURILICH, A.,C. Variation in content of bioactive components in broccoli, *Journal of Food Composition Analysis*, Volume 16, Issue 3, June 2003, p. 323-330
- [24] MORENO, D. A, CARVAJAL, M. Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 19 May, 2006
- [25] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 1*, 1. vyd. Tábor: Nakladatelství OSSIS, 1999
- [26] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J. *Chemie potravin*, 1.vyd., Nakladatelství technické literatury, Praha 1983, ISBN 04-815-83
- [27] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*, 1. vyd. Tábor: Nakladatelství OSSIS, 1999
- [28] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D. *Potravinářská biochemie II*, UTB ve Zlíně, březen 2006, ISBN 318-395-1

- [29] BLATNÁ, J. Známe dobře nejmladšího člena skupiny vitaminů-kyselinu listovou?, *Výživa a potraviny*, ročník 60, leden, únor 2005, s.7
- [30] FIEDLEROVÁ, V. HOLASOVÁ, M., VAVREINOVÁ S. Optimalizace metod pro stanovení folátů v zelenině a jejich aplikace, VÚPP Praha, Sborník příspěvků XXXVII. symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, ISSN 1802-1433
- [31] BLATNÁ, J. Biotin, *Výživa a potraviny*, ročník 56, leden, únor 2001, s.14
- [32] CARR, A., FREI, B. Toward a new recommend dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans, *Amer. J. Clin. Nutr.*, 1999, vol. 69, p. 1086-1171
- [33] SIKORA, E., CIEŠLIK, E., LESZCZYŃSKA, T. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing, *Food Chemistry*, Volume 107, Issue 1, 1 March 2008, p. 55-59
- [34] YOUNG, IS., WOODSIDE, JV. Antioxidants in health and disease, *J. Clin. Pathol.*, 2001, vol. 54, p. 176-186
- [35] KIDMOSE, U., HANSEN, M. The influence of post harvest storage, temperature and duration on quality on cooked broccoli florets, *Journal of Food Quality* 22, p. 135-146
- [36] MICHAUD, DS., FESKANICH, D., RIMM, EB. Intake of specific carotenoids and risk of lung cancer in 2 prospective US cohorts., *Amer. J. Clin. Nutr.* 2000, vol 72, p. 990-997
- [37] MONSEN, ER. Dietary reference intakes for antioxidant nutrients: vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids, *J. Amer. Diet. Assoc.*, 2000, vol 100, p.637-640
- [38] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*, 1. vyd. Tábor: Nakladatelství OSSIS, 1999
- [39] Dostupné na URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Chlorophyll>
- [40] MANDELOVÁ, L. Polyfenoly: rozdělení a zdroje v potravě, *Výživa a potraviny*, ročník 60, leden, únor 2005
- [41] JOHNSON, E., J. A Biological Role of Lutein, *Food Reviews International*, 20, 2004, n. 1, p. 1–16.
- [42] NEJEDLÝ, B. Zeleninu vařit nebo nevařit?, *Výživa a potraviny*, ročník 55, květen, červen 2002, s. 88
- [43] VELÍŠEK, J. , Glukosinoláty v zelenině: jejich nežádoucí a prospěšné účinky, *Výživa a potraviny*, ročník 51, červenec, srpen 1996, s.36

- [44] BARBIERI, G., PERNICE, R., MAGGI, A. Glucosinolates profile of *Brassica rapa* L. subsp. *Sylvestris* L. Janch. var. *Esculenta* Hort, *Food Chemistry*, Volume 107, Issue 4, 15 April 2008, p. 1687-1691
- [45] Časopis *Men's health*, Vyzrajte nad rakovinou, září 2003, s.14
- [46] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*, 1. vydání, Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 1996
- [47] Dostupné na URL:
http://cs.wikipedia.org/wiki/Atomov%C3%A1_absorp%C4%8Dn%C3%AD_spektrometrie
- [48] Dostupné na URL: <http://www.vscht.cz/anl/lach2/AAS.pdf>
- [49] Dostupné na URL: <http://www.natur.cuni.cz/lgu/labi07.html>
- [50] PACÁKOVÁ, K., ŠTULÍK, K. *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*, UK Praha, SPN Praha 1986
- [51] WILSON, K., WALKER, J. *Principles and Techniques of practical biochemistry*, fifth edition, University Cambridge 2000, ISBN 0521651042
- [52] CHURÁČEK, J., FRENČÍK, M., ŠKÁRA, B. a kol. *Biochemické laboratorní metody*, Alfa, Praha 1981
- [53] Vysokoúčinná kapalinová chromatografie dosahuje vysoké účinnosti a rychlostní dělení látek, dostupné na URL:
<http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/2006/hypertext/htm/>
- [54] CHURÁČEK, J., JANDERA, P. *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie*, Praha: SNTL, 1984.
- [55] KADOŠ, E., BEREK, D. *Základy kvapalinovej chromatografie*, Alfa, Bratislava, 1978
- [56] HÁBOVÁ, M. Stanovení vitamínu B₂ v produktech živočišného původu, diplomová práce, UTB ve Zlíně, 2006
- [57] SQUADRITO, GL. HPLC-ECD analysis of water-soluble antioxidants in biological symplex, *Free radical biology and medicine* 39, 2005, p. 42, ISSN: 0891-5849“
- [58] HEINDL, J. *Přehled statistických metod zpracování dat: Analýza a metaanalýza*, Praha: Portál, 2005, 2. vydání, s. 586
- [59] LIKEŠ, J., LAGA, J. *Základní statistické tabulky*, Praha: SNTL, 1978

-
- [60] VALÁŠEK, P.: In: *Analýza potravin a přírodních látek - distanční text*, projekt OP RLZ Opatření 3.2 0309, cepac morava 2007
- [61] ANTHANASOPOULOS, N. *Flame Method Manual for Atomic Absorbtion*, Dandenong, Australia, Part No: 01-0019-00.
- [62] MAROUBEK, M., BŘEZINA, P. *Fyziologie a hygiena výživy*, Vyškov 2000, ISBN 80-7231-057-7
- [63] GRASSMAN, B. Dietary Reference Intakes (DRI), Report 4: Vitamine A und K. *Ernahrungs-Umschau*, 2001, vol.48, s. 109-112.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

WHO	World health organization
DEFRA	Department for Enviroment, Food and Rural Affairs.
HRI	Horticulture Research International.
FMN	Flavinmononukleotid
FAD	Flavinadenindinukleotid
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
ACP-SH	Acyl Carrier Protein
CoA	Koenzym A
GSL	Glukosinoláty
UV	Ultrafialová oblast spektra
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
ECD	Elektrochemický detektor
AAS	Atomová absorpční spektrofotometrie

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Brokolice chřestová	12
Obr. 2: Květák „Romanesco“	13
Obr. 3: <i>Helicobacter pylori</i>	17
Obr. 4: Oxidace kyseliny L-askorbové	27
Obr. 5: Waldův cyklus	28
Obr. 6: Chlorofyl	32
Obr. 7: Chlorofyl uložený v chloroplastech	32
Obr. 8: Produkty degradace glukosinolátů	38
Obr. 9: Atomový absorpční spektrofotometr	42
Obr. 10: Analyzátor AMA 254	43
Obr. 11: Schéma uspořádání chromatografu (HPLC)	47
Obr. 12: Coulochem III	50
Obr. 13: kolona Coulochemu III	50
Obr. 14: Extrakce při laboratorní teplotě	77
Obr. 15: Extrakce při laboratorní teplotě	77
Obr. 16: Extrakce při 35°C	77
Obr. 17: Extrakce při 35°C	77
Obr. 18: Použití dělicí nálevky po extrakci	78
Obr. 19: Extrakty po filtrace přes filtrační papír	78

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Nutriční hodnoty brokolice odpovídající 100 g čerstvé hmoty	14
Tabulka 2: Obsah karotenoidů v brokolici	30
Tabulka 3: Obsah mastných kyselin v brokolici	36
Tabulka 4: Kvantily $t(n)$ Studentova rozdělení o n stupních volnosti	53
Tabulka 5: Výsledky stanovení sušiny v brokolici	69
Tabulka 6: Výsledky měření obsahu škrobu v čerstvé brokolici	70
Tabulka 7: Výsledky stanovení obsahu fosforu v čerstvé brokolici	72
Tabulka 8: Spektrofotometrické stanovení chlorofylu a v brokolici	73
Tabulka 9: Spektrofotometrické stanovení chlorofylu b v brokolici	74
Tabulka 10: Spektrofotometrické stanovení chlorofylu $a + b$ v brokolici	75
Tabulka 11: Účinnost rozpouštědel na extrakci biologicky aktivních látek brokolice	76
Tabulka 12: Kalibrace β -karotenu metodou HPLC-ECD na $K_1 = 300$ mV	80
Tabulka 13: Přesnost stanovení β -karotenu metodou HPLC-ECD	81
Tabulka 14: Spotřeba odměrného roztoku a výsledky výpočtu titru t	82
Tabulka 15: Titrační stanovení kyseliny L-askorbové	82
Tabulka 16: Kalibrace vitamínu C metodou HPLC-ECD na $K_1 = 600$ mV	84
Tabulka 17: Stanovení vitamínu C v čerstvé brokolici	85
Tabulka 18: Přesnost stanovení obsahu rtuti v růžici brokolice	86
Tabulka 19: Přesnost stanovení obsahu rtuti v košťálu brokolice	87
Tabulka 20: Přesnost stanovení koncentrace olova v mineralizátu brokolice	88
Tabulka 21: Přesnost stanovení koncentrace kadmia v mineralizátu brokolice	90

SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha P I: Aminokyseliny v brokolici a jejich obsah
- Příloha P II: Minerální látky v brokolici a jejich obsah
- Příloha P III: Doporučené denní dávky minerálních látek
- Příloha P IV: Vitaminy v brokolici a jejich obsah
- Příloha P V: Doporučené denní dávky vitaminů
- Příloha P VI: Obsah hlavních sacharidů a vlákniny v brokolici
- Příloha P VII: Obsah celkového množství GSL v zelenině rodu *Brassica*
- Příloha P VIII: Stanovení β -karotenu a vitamínu C metodou HPLC-ECD
- Příloha P IX: Funkční schéma přístroje AMA 254

PŘÍLOHA P I: AMINOKYSELINY V BROKOLICI A JEJICH OBSAH

Aminokyselina	Obsah [g.100g ⁻¹]
Tryptofan	0,043
Threonin	0,106
Isoleucin	0,104
Leucin	0,170
Lysin	0,198
Methionin	0,048
Cystin	0,039
Fenylalanin	0,128
Tyroxine	0,075
Valin	0,153
Arginin	0,172
Histidin	0,066
Alanin	0,124
Asparagová kyselina	0,360
Glutamová kyselina	0,549
Glycin	0,123
Prolin	0,131
Serin	0,099

[6]

**PŘÍLOHA P II: MINERÁLNÍ LÁTKY V BROKOLICI A JEJICH
OBSAH**

Minerální látka	Množství [mg.100g ⁻¹]
Vápník	108,00
Železo	2,14
Hořčík	22,00
Fosfor	73,00
Draslík	196
Sodík	33,00
Zinek	0,77
Měď	0,042
Selen	1,0 µg.100g ⁻¹
Síra	Není stanovena
Olovo a kadmium	Není stanovena
Rtuť	Není stanovena

[6]

**PŘÍLOHA P III: DOPORUČENÉ DENNÍ DÁVKY MINERÁLNÍCH
LÁTEK**

Minerální látka	Doporučená denní dávka [g]
vápník	0,8
železo	0,01 – 0,015
hořčík	0,4
fosfor	1,5
draslík	2,5 – 5
sodík	0,5
zinek	0,015
síra	0,5 – 1
měď	0,0015-0,003
selen	0,0001
síra	není stanovena

[27,62]

PŘÍLOHA IV: VITAMINY V BROKOLICI A JEJICH OBSAH

Vitamin	Obsah vitamínu	jednotky
Vitamin C	20,2	mg.100g ⁻¹
Thiamin	0,162	mg.100g ⁻¹
Riboflavin	0,129	mg.100g ⁻¹
Niacin	1,221	mg.100g ⁻¹
Pantotenová kyselina	0,322	mg.100g ⁻¹
Vitamin B ₆	0,171	mg.100g ⁻¹
Vitamin B ₉	100	μg.100g ⁻¹
Biotin	obsah neuveden	-----
Vitamin C	20,2	mg.100g ⁻¹
Vitamin A, RAE	131	μg_EAR.100g ⁻¹
Vitamin E (alpha-tokoferol)	1,62	mg.100g ⁻¹
β-tokoferol	0,01	mg.100g ⁻¹
γ-tokoferol, gama	0,16	mg.100g ⁻¹
δ-tokoferol, delta	0,00	mg.100g ⁻¹
Vitamin K	224,0	μg.100g ⁻¹

[6]

RAE (ekvivalenty retinolové aktivity), které byly sestaveny na základě výsledků absorpčních studií v roce 2001, kdy 1 μg RAE = 1 μg all-trans- retinolu = 2 mg β-karotenu v oleji = 12 μg β-karotenu z potravy = 24 μg ostatních karotenoidů – provitaminů A z potravy.

[63]

PŘÍLOHA P V: DOPORUČNÉ DENNÍ DÁVKY VITAMINŮ

Vitamin	Doporučená denní dávka [mg]
vitamin B ₁	1,1
vitamin B ₂	1,5
vitamin B ₃	16 – 20
vitamin B ₅	7,3
vitamin B ₆	1,7
vitamin B ₉	0,2
biotin	0,03 – 0,1
vitamin C	75-100
vitamin A	0,9
vitamin E	12,5
vitamin K	není přesně stanovena

[28]

**PŘÍLOHA VI: OBSAH HLAVNÍCH SACHARIDŮ A VLÁKNINY
V BROKOLICI**

Sacharidy	Obsah [g.100g ⁻¹]
Cukr celkový	0,38
Sacharosa	0,11
Glukosa	0,10
Fruktosa	0,17
Laktosa	-----
Maltosa	-----
Galaktosa	-----
Škrob	Obsah neuveden
Vláknina	2,70

[6]

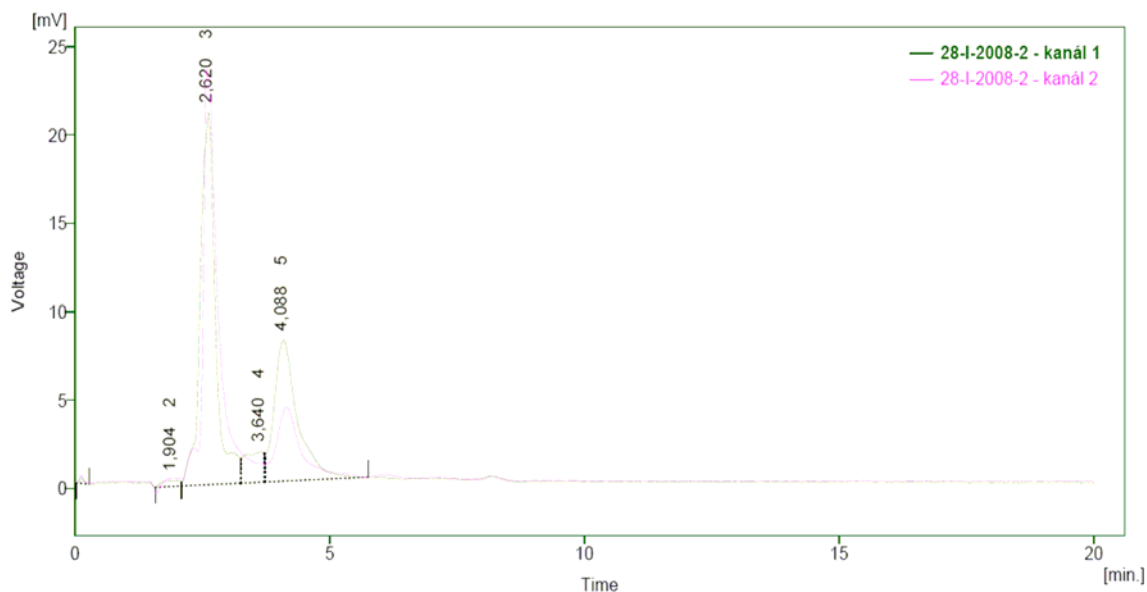
**PŘÍLOHA P VII: OBSAH CELKOVÉHO MNOŽSTVÍ GSL
V ZELENINĚ RODU *BRASSICA***

Druh	GSL [mg.100g ⁻¹]
Hlávkové zelí bílé	26-275
Hlávkové zelí červené	16-120
Kapusta	47-129
Květák	14-208
Brokolice	40-340
Růžičková kapusta	145-394
Kadeřávek	40-140
Kedluben	109-200
Čínské zelí	17-136
Ředkev, ředkvička	4-218
Křen	500
Řeřicha zahradní	95

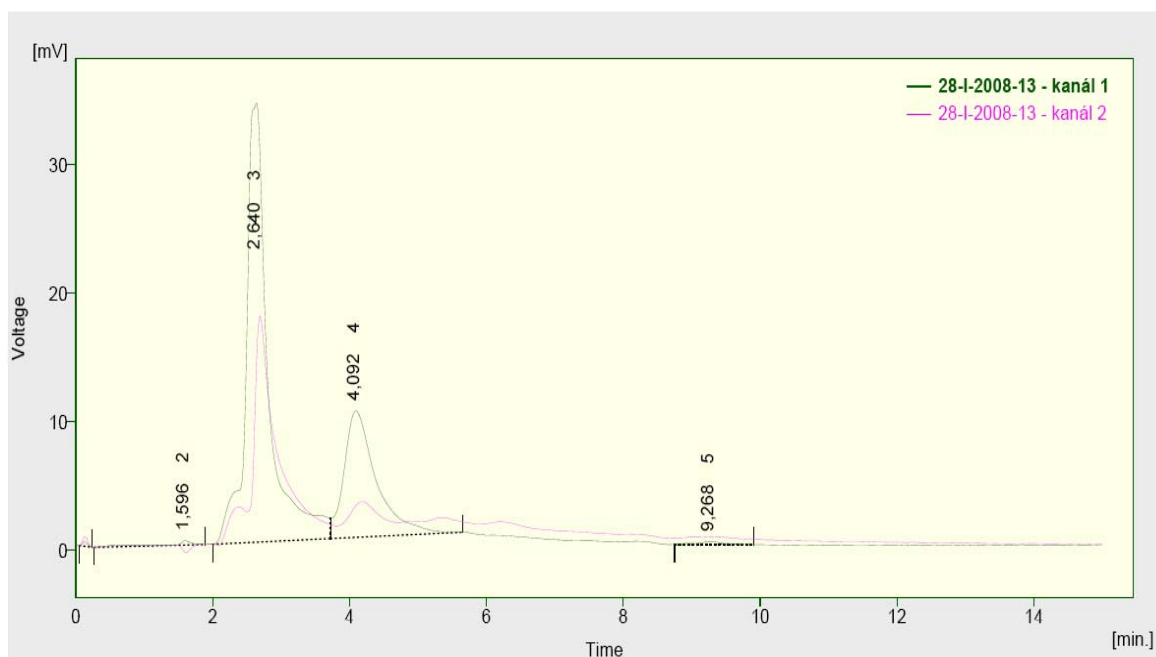
[1]

PŘÍLOHA P VIII: STANOVENÍ β -KAROTENU METODOU HPLC-ECD

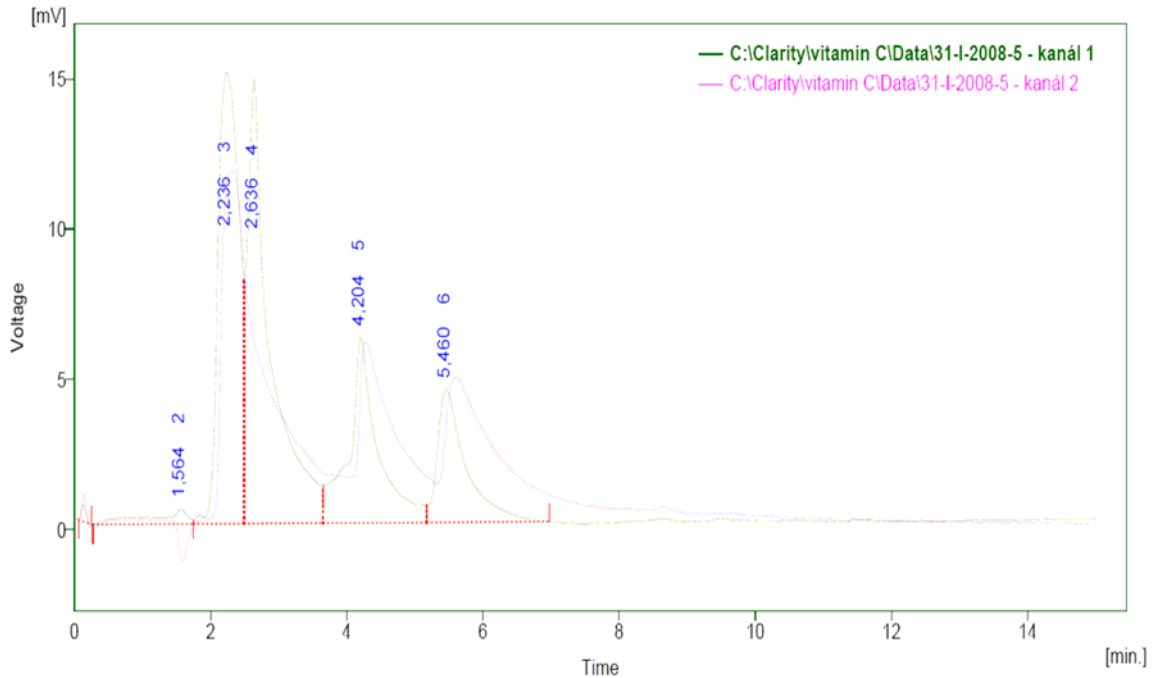
Chromatogram 1: Stanovení chromatografických podmínek pro měření β -karotenu za použití standardu β -karotenu



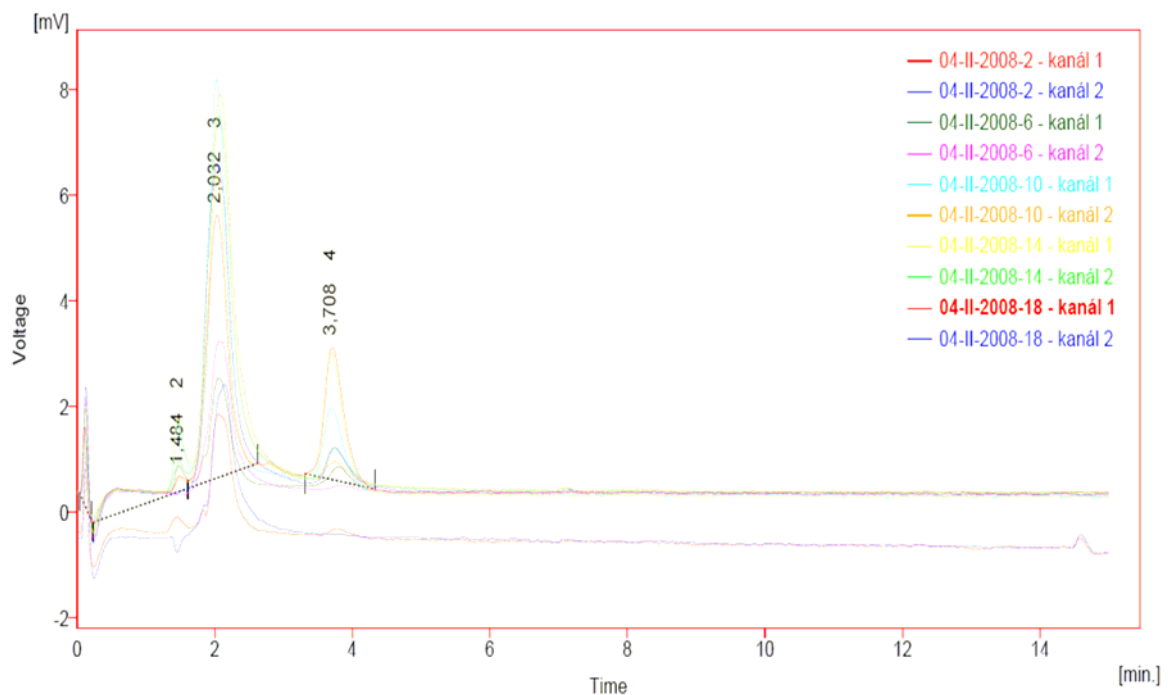
Chromatogram 2: Stanovení chromatografických podmínek pro měření β -karotenu za použití kapsle β -karotenu

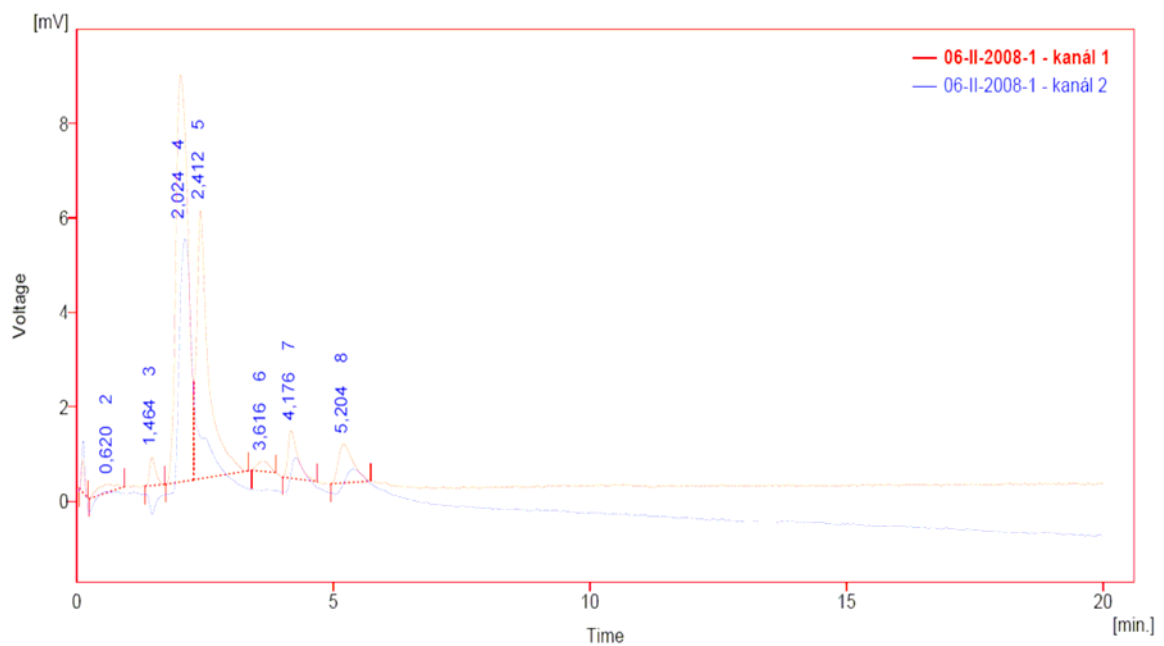
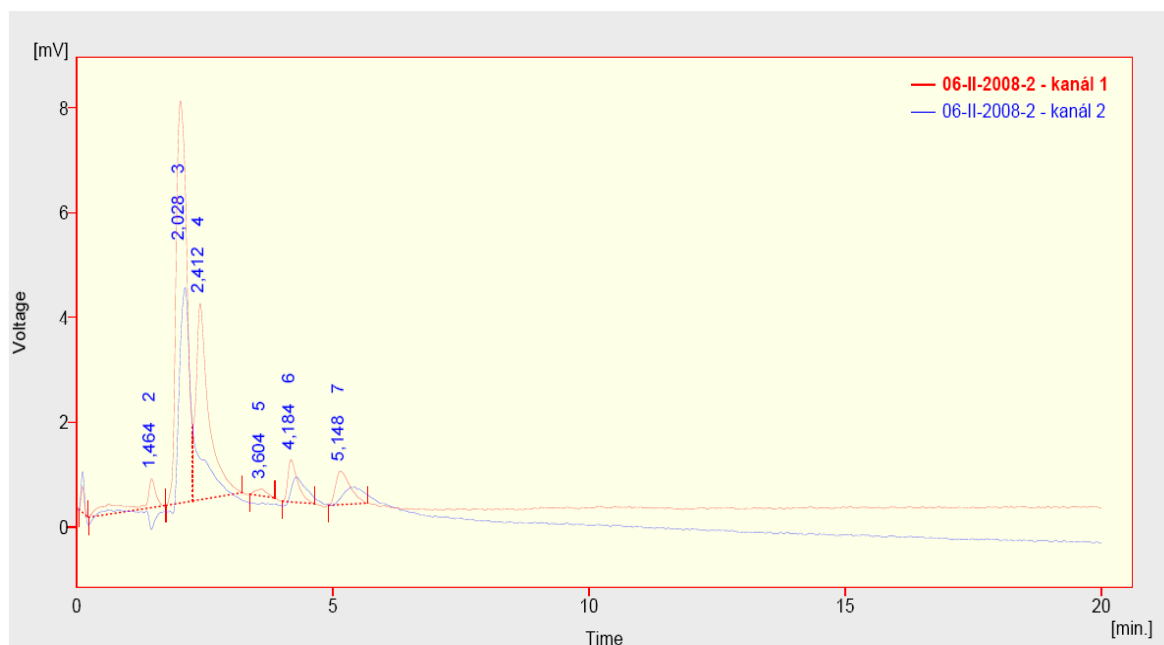


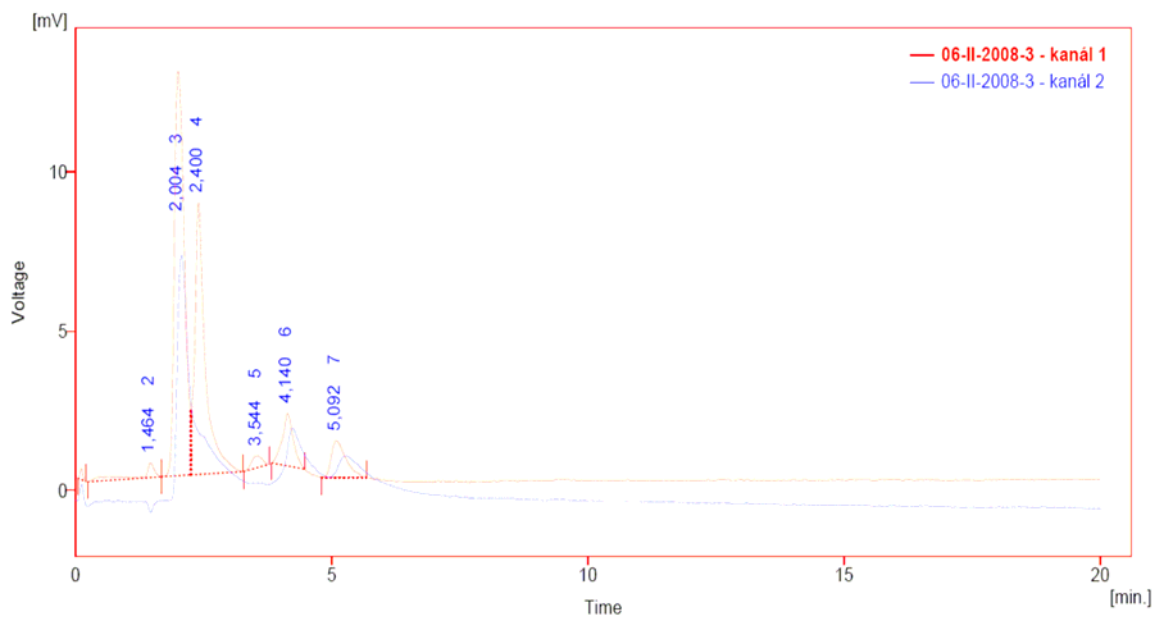
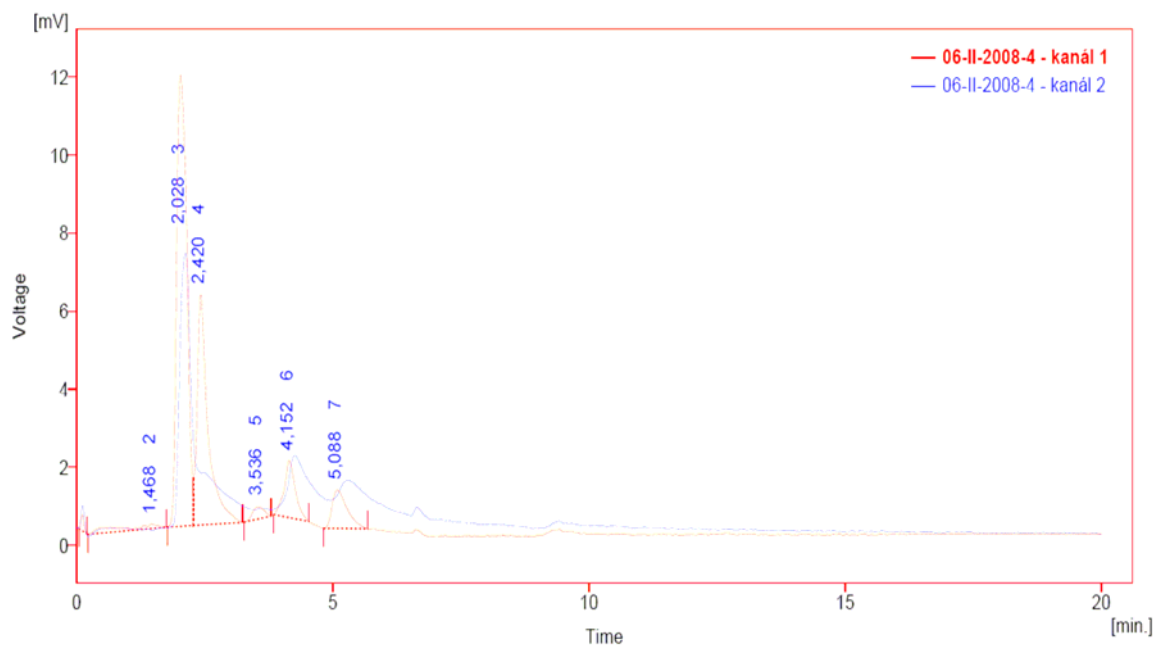
Chromatogram 3: Stanovení vhodného potenciálu pro měření kalibrační křivky β -karotenu a stanovení β -karotenu v reálném vzorku brokolice metodou HPLC-ECD



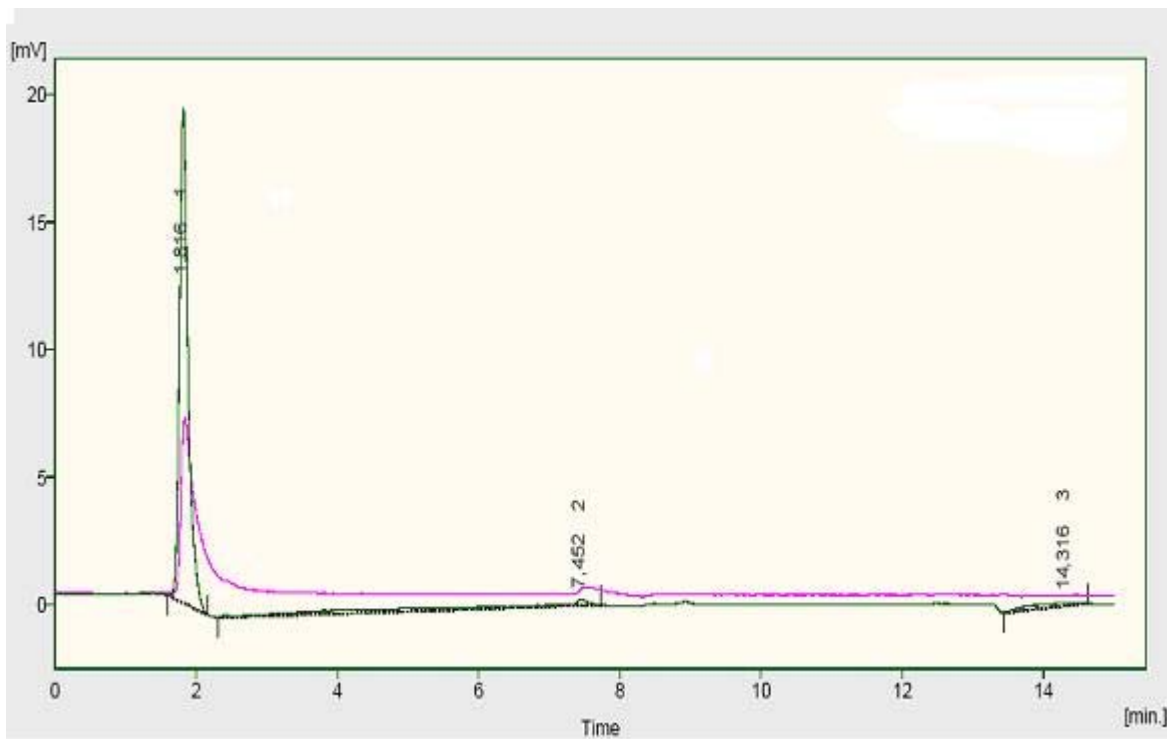
Chromatogram 4: Stanovení kalibrační křivky

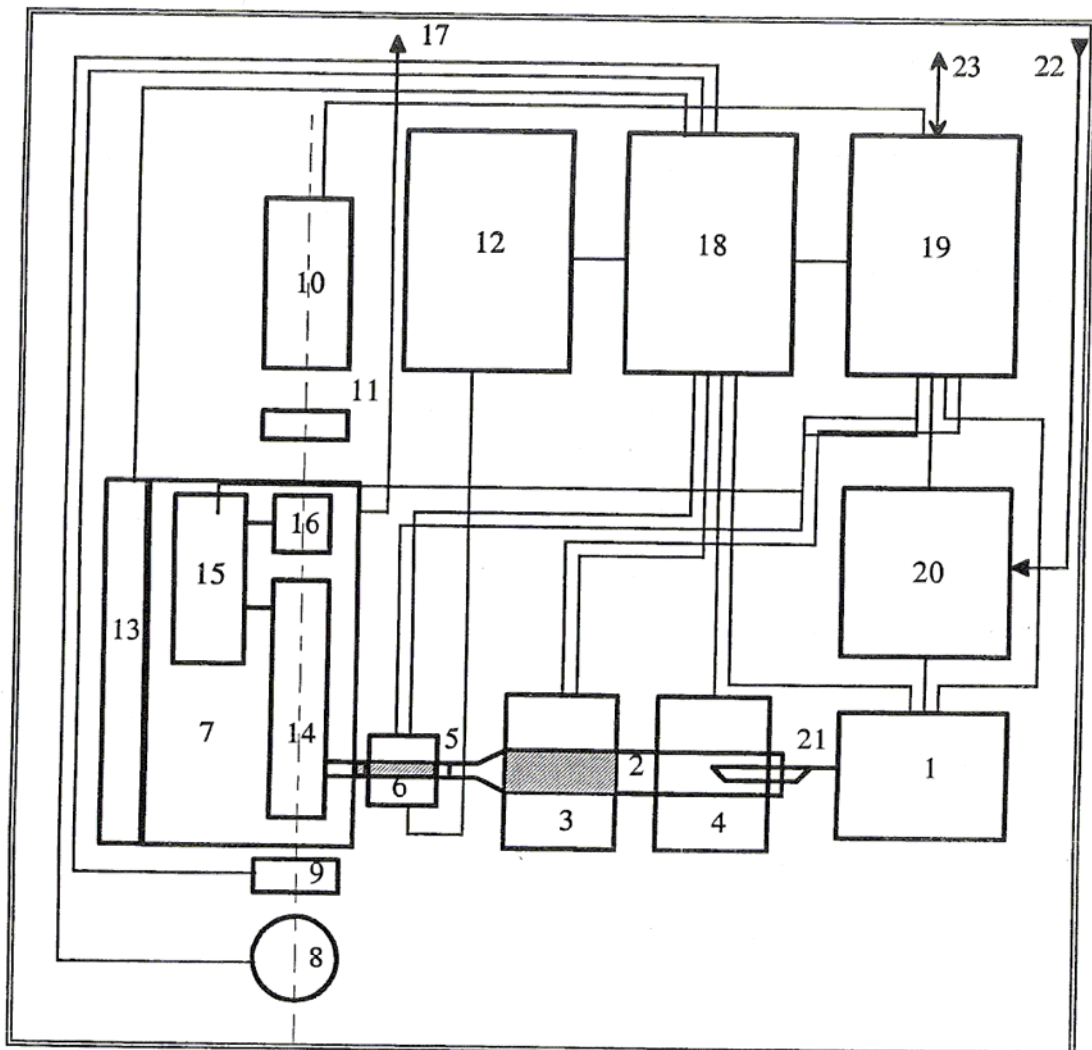


Chromatogram 5: Vlastní stanovení obsahu β -karotenu ve vzorcích brokoliceChromatogram 6: Vlastní stanovení obsahu β -karotenu ve vzorcích brokolice

Chromatogram 7: Vlastní stanovení obsahu β -karotenu ve vzorcích brokoliceChromatogram 8: Vlastní stanovení obsahu β -karotenu ve vzorcích brokolice

Chromatogram 9: Vlastní stanovení vitamínu C v brokolici



PŘÍLOHA P V: FUKČNÍ SCHEMA PŘÍSTROJE AMA 254


Obr: Funkční schéma přístroje AMA 254

1 dávkovací zařízení	9 clonka	17 výstup kyslíku
2 spalovací trubice	10 detektor	18 analogová elektronika
3 katalytická pec	11 interferenční filtr	19 mikro počítač 8051
4 spalovací pec	12 chladicí čerpadlo	20 regulátor průtoku kyslíku
5 amalgamátor	13 topení bloku měř. kyvet	21 dávkovací lodička
6 vypuzovací pec	14 delší měřicí kyveta	22 vstup kyslíku
7 blok měřících kyvet	15 zpožďovací nádobka	23 komunikace s PC
8 rtuťová výbojka	16 kratší měřicí kyveta	