

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2017

KRISTÝNA VITOUŠOVÁ

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Katedra analytické chemie

Chia semínka jako zdroj antioxidantů a esenciálních mastných kyselin  
Kristýna Vitoušová

Bakalářská práce

2017

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology  
Department of Analytical Chemistry

Chia seeds as a source of antioxidants and essential fatty acids

Kristýna Vitoušová

Bachelor thesis

2017

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kristýna Vitoušová**  
Osobní číslo: **C14504**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Název tématu: **Chia semínka jako zdroj antioxidantů a esenciálních mastných kyselin**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

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

1. S využitím odborné literatury vypracujte rešerši zabývající se antioxidanty a esenciálními mastnými kyselinami v Chia semínkách, která jsou jejich bohatým zdrojem.
2. Zaměřte se na vybrané antioxidanty, které se v daném zdroji vyskytují nejvíce, stručně popište jejich funkci a zhodnoťte případný vliv na lidské zdraví. Stejným způsobem se zaměřte i na přítomné esenciální mastné kyseliny, jejich obsah.
3. V poslední části pak zmiňte práce, které se zabývaly stanovením obsahu daných látek, metodikou a dosaženými výsledky.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Odborné vědecké práce, dostupné v databázích SCOPUS, WOS, Sciencedirect apod.**

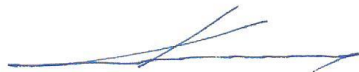
Vedoucí bakalářské práce:

**RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

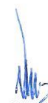
Datum zadání bakalářské práce: **20. února 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Věntuřa, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 19. února 2017

Prohlašuji:

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

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

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

V Pardubicích dne: 23.6. 2017

Kristýna Vitoušová

## Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí práce paní RNDr. Lucii Korecké, PhD. za ochotu, trpělivost a věnovaný čas při psaní této bakalářské práce.

## ANOTACE

Tato bakalářská práce se zaměřuje na nový druh funkční potraviny, a to Chia semena. První část se zabývá obecnou charakteristikou a vlastnostmi Chia semen. Následně je rozebráno jejich složení a obsah nejdůležitějších složek, zejména antioxidantů a esenciálních mastných kyselin. Jsou popsány jejich vlastnosti, využití a vliv na lidské zdraví. A v poslední řadě jsou zmíněny analytické metody, využívané při stanovování uvedených komponent v Chia semenech.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Chia semena, antioxidanty, esenciální mastné kyseliny



## TITLE

Chia seeds as a source of antioxidants and essential fatty acids.

## ANNOTATION

This bachelor thesis focuses on a new type of functional food, Chia seeds. The general characteristics and properties of Chia seeds are mentioned in the first part. Then their composition and content of the most important components, especially antioxidants and essential fatty acids is summarized. Their properties, use and effects on human health are described. Finally, the analytical methods used in determination these components in Chia seeds are mentioned.

## KEYWORDS

Chia seeds, antioxidants, essential fatty acids

## Obsah

0	ÚVOD.....	14
1	CHIA semena .....	15
1.1	Historie a původ .....	15
1.2	Vlastnosti Chia semen.....	16
1.3	Využití Chia semen.....	16
1.4	Vliv na lidský organismus.....	17
2	SLOŽENÍ .....	18
2.1	Bílkoviny.....	18
2.2	Vláknina .....	19
2.3	Minerály .....	19
3	ANTIOXIDANTY .....	20
3.1	Flavonoidy.....	21
3.2	Vitaminy.....	22
	Vitamin C (L – Askorbová kyselina) .....	22
	Vitamin A a karotenoidy .....	23
	Vitamin E.....	25
4	ESENCIÁLNÍ MASTNÉ KYSELINY .....	26
4.1	Kyselina linolová .....	27
4.2	Kyselina linolenová.....	27
4.3	Kyselina arachidonová .....	28
5	METODY STANOVENÍ.....	29
5.1	Antioxidanty.....	29
5.1.1	Stanovení karotenoidů .....	30
5.1.2	Stanovení vitaminů .....	30

5.1.3	Stanovení flavonoidů .....	32
5.1.4	Stanovení antioxidační kapacity a celkového obsahu fenolických látek .....	32
5.1.5	Další metody .....	34
5.2	Esenciální mastné kyseliny .....	34
5.2.1	Analýza složení mastných kyselin .....	35
5.2.2	Další metody .....	37
6	ZÁVĚR .....	38
7	Použitá literatura .....	39

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Šalvěj ( <i>Salvia hispanica L.</i> ) .....	15
Obrázek 2: Chia semena .....	15
Obrázek 3: Kyselina chlorogenová.....	20
Obrázek 4: Kyselina kávová .....	20
Obrázek 5: Kyselina L – askorbová.....	23
Obrázek 6: Retinol .....	23
Obrázek 7: Retinal .....	23
Obrázek 8: $\beta$ – karoten.....	24
Obrázek 9: Vitamin E; $\alpha$ – tokoferol .....	25
Obrázek 10: Kyselina linolová .....	27
Obrázek 11: Kyselina linolenová.....	28
Obrázek 12: Kyselina arachidonová .....	29
Obrázek 13: Přehled metod využívaných pro stanovení mastných kyselin.....	35

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Obsah jednotlivých komponent v Chia semeni .....	18
Tabulka 2: Srovnání obsahu proteinů v Chia semeni a obilí .....	18
Tabulka 3: Obsah makronutrientů v Chia semeni .....	19
Tabulka 4: Obsah mikronutrientů v Chia semeni .....	20

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AA	Kyselina askorbová (Ascorbic acid)
AAR	Antiradikálová aktivita (Antiradical activity)
ALA	Kyselina $\alpha$ – linolenová ( $\alpha$ – Linolenic acid)
BHT	Buthylhydroxytoluen
CRP	C – reaktivní protein (C – reactive protein)
DAD	Detektor s diodovým polem (Diode array detector)
DCS	Diferenciační skenovací kalorimetrie (Differential scan calorimetry)
DHA	Kyselina dokosaheptaenová (Dokosaheptaenoic acid)
DPPH	Difenylpikrylhydrazyl
EDTA	Ethylendiaminotetraocotvá kyselina
EPA	Kyselina eikosapentaenová (Eicosapentaenoic acid)
FID	Plamenový ionizační detektor (Flame Ionization detector)
FRAP	Stanovení antioxidační aktivity založené na redukci železitých iontů (Ferric ion reducing antioxidant power)
GC	Plynová chromatografie (Gas Chromatography)
GLC	Plynová kapalinová chromatografie (Gas Liquid Chromatography)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography)
IČ	Infračervený
LC	Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
MK	Mastné kyseliny
NIRS	Blízká infračervená spektroskopie (Near – Infrared Spectroscopy)
NMR	Nukleární magnetická rezonance (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)
ORAC	Absorpční kapacita kyslíkových radikálů (Oxygen Radical Absorbance Capacity)
PUFA	Polynenasycené mastné kyseliny (Polyunsaturated fatty acids)
Rf	Retenční faktor
TEAC	Trolox ekvivalentní antioxidační kapacita (Trolox equivalent antioxidant capacity)
TLC	Tenkovrstvá chromatografie (Thin layer chromatography)
UV	Ultrafialové záření

VIS	Viditelné záření
3-DXAs	3- deoxyanthokyanidiny

## 0 ÚVOD

Chia semena, pocházející ze šalvěje hispánské (*Salvia hispanica L.*) jsou plnohodnotnou komplexní potravinou s vynikajícím nutričním obsahem. Rozeznáváme dvě barvy, a to bílou a hnědou. Semena jsou oválná, malých rozměrů v řádech mm, a jejich doporučený denní příjem je maximálně 15 g.

Mají více omega - 3 mastných kyselin než jakékoli jiné přírodní zdroje, ale jsou i bohatá na antioxidanty, vápník, bílkoviny, vlákninu, vitaminy, minerály a sacharidy. Jsou výborným zdrojem energie. Díky vysokému obsahu vlákniny pomáhají i k trávení ostatních živin.

Chia semena dokáží navázat tolik vody, že zvětší svůj objem až 12x. Tvoří jemný a lehce stravitelný gel, který v těle významně ovlivňuje udržení správné hladiny krevního cukru, a to je způsobeno tím, že semena prodlužují proces přeměny sacharidů na glukózu a nedochází k náhlým změnám hladiny krevního cukru. Chia semena mají díky obsahu nutričně významných látek pozitivní vliv na zdraví pokožky, vlasů a nehtů. Působí kladně na kardiovaskulární systém, pomáhají při metabolických poruchách, při bolestech kloubů. Jejich pravidelnou konzumací lze snížit riziko vzniku diabetu, hypertenze, zácpy, ischemické choroby srdeční, zánětů, pomáhají také při prevenci obezity. Semena obsahují látky s antioxidačními a protivirovými vlastnostmi.

Chia semena mají široké využití, kdy se přidávají například do pekařských výrobků, snídaňových cereálií a ovocných, ořechových a semenných směsí <sup>[1, 2, 3, 4]</sup>.

# 1 CHIA semena

## 1.1 Historie a původ

Chia semena (*Salvia hispanica L.*) (Obrázek 1,2) se používala jako složka potravin a byla zvláště dobře známa Indiánům a Mexičanům. Mezi skupinami původních obyvatel starověkého Mexika byly Chia rostliny pěstovány stejně běžně, jako např. kukuřice, a byly jednou z nejdůležitějších obilovin. Chia semena nejsou jen významným zdrojem olejů, ale i řady dalších výživných látek [5].

Jsou součástí lidské stravy již přibližně 5500 let. Byla používána jako hlavní plodina Aztéků, kdy byla nabízena Bohům při náboženských obřadech. Tradičně byla semena používána kmeny Aztéků a Mayů k přípravě lidových léků, pokrmů. V prehistorické době v kolumbijské společnosti to byla po fazolích druhá hlavní plodina. Zatímco Chia semena byla používána jako potraviny, Chia olej byl využíván v kosmetice a na malby. Toto semeno je známo pro své léčivé a nutriční vlastnosti díky vysokému obsahu omega-3 mastných kyselin [2, 3, 6].



Obrázek 1: Šalvěj (*Salvia hispanica L.*) [55]



Obrázek 2: Chia semena [55]



Slovo chia je odvozeno od španělského slova Chian, což znamená mastný, olejnatý <sup>[2]</sup>. Chia (*Salvia hispanica L*) je tropická a subtropická rostlina z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*), na které rostou malá, bílá nebo tmavě hnědá semena bez chuti. Chia semena mají oválný tvar. Jsou přibližně 1,9-2 mm dlouhá, 1-1,4 mm široká a 0,8-1 mm tlustá. Hojně se pěstují v Mexiku, Americe, Kanadě, Chile, Austrálii, na Novém Zélandu a v jihovýchodní Asii <sup>[1, 3, 2, 6]</sup>. Rostlina je jednoletá bylina, kvete v létě, je vysoká asi 1 metr, s obrácenými řapíkatými a zoubkovanými listy, které jsou 4-8 cm dlouhé a 3-5 cm široké. Rostlina může růst v dobře odvodněných, jílových i písčitých půdách s přiměřenou slanou a kyselou tolerancí <sup>[2]</sup>. Chia rostlina je citlivá na denní světlo <sup>[3]</sup>. Chemické složení a nutriční hodnoty Chia semene se mohou lišit v závislosti na klimatických podmínkách a místě růstu <sup>[2, 7]</sup>.

## 1.2 Vlastnosti Chia semen

Černě zbarvená semena jsou častější. Černě a bíle zbarvená semena jsou od sebe navzájem mírně odlišná. Bílá semena jsou větší, silnější a širší než černá semena. Průměrný obsah vody v černých semenech je 7,2 % a v bílých 6,6 % <sup>[3]</sup>. Když se semena namočí do vody, ze semen se uvolní velké množství slizovitého gelu, který semena obklopuje <sup>[5]</sup>. Sliz Chia semen může být extrahován hydratací celých semen při teplotě 200 °C po dobu 2 hodin v poměru 1:40 semena a vody. Po hydrataci se vytvoří želatinový roztok, který může být shromážděn a vysušen, pokud je udržována teplota 500 °C po dobu 10 hodin <sup>[3]</sup>. Biologická hodnota Chia semena je lepší než u obilovin, a to díky vyššímu obsahu vápníku, hořčíku a draslíku než např. v mléce. Nepřítomnost lepku v Chia semeni je další dobrou vlastností Chia, protože může být používáno pacienti trpící celiakií (nesnášenlivost lepku). Semena obsahují dobře vyvážený poměr esenciálních a neesenciálních aminokyselin <sup>[2]</sup>.

Studie <sup>[8, 9]</sup> ukazují, že semena mohou absorbovat vodu, a to až 12násobek jejich hmotnosti. Tato vlastnost je užitečná v potravinářském průmyslu. Suchá semena mohou být skladována delší dobu kvůli výrazně vyšší koncentraci přírodních antioxidantů <sup>[3]</sup>.

## 1.3 Využití Chia semen

Spotřeba Chia semen ve stravě je hlavně ve formě vyextrahovaného oleje, který je využíván v různých potravinářských produktech, jako jsou cukrovinky, sušenky, zákusky, zálivky, cereální tyčinky, ovocné šťávy, pečivo, želé, jogurty, stejně jako doplňky zdravé výživy. Chia výhonky se používají do salátů, Chia semeno je určeno k přípravě nápojů a cereálních příkrmů, kdy jsou

konzumovány v syrové formě. Olej vyextrahovaný z listů Chia se využívá také jako vůně a koření. Schválení Chia semen novou potravinou Evropským parlamentem vedl k častějšímu využití Chia semen. V současné době jsou chia semena široce používána pro extrakci biologicky aktivních látek, a pro přípravu funkčních potravin [2].

Chia semena a extrahovaný olej jsou také používány v krmivech pro hospodářská zvířata se zvýšeným obsahem polynenasycených mastných kyselin, kde napomáhají ke snížení hladiny cholesterolu v mase a vaječných výrobcích [1]. Chia se považuje za potravinu bez škodlivých účinků [2]. Semena namočená ve vodě nebo v ovocných šťávách byly a stále jsou v některých oblastech konzumovány také jako osvěžující nápoj [10].

#### **1.4 Vliv na lidský organismus**

Studie [11, 12] uvádějí, že látky obsažené v semenech *Salvia hispanica L.* pomáhají udržovat v séru správnou hladinu lipidů, zvyšují index sytosti, působí preventivně proti kardiovaskulárním onemocněním, poruchám nervového systému a proti cukrovce, hypertenzi, mají protizánětlivé a antioxidační účinky, protisrážlivé, projímavé, proti úzkosti, analgetické, zlepšují vidění a imunitu a mají pozitivní účinky spojené s prevencí obezity. Je již známo, že Chia nemají alergenní, anti-nutriční a toxické účinky na lidské zdraví [1, 2, 7].

Chia je jednou z mála rostlin, které obsahují ve vysokých koncentracích esenciální oleje, které se používají pro přípravu doplňků stravy kapslí obsahující omega - 3 mastné kyseliny [2]. Zdraví prospěšné vlastnosti semen byly rovněž zmíněny v souvislosti s léčbou obstrukce očí neboli zvýšeném slzení a dýchacích potížích [10].

## 2 SLOŽENÍ

Chia semeno obsahuje bílkoviny, sacharidy, vlákninu, vitaminy, antioxidanty, minerály, sušinu a lipidy. (viz Tabulka 1) <sup>[1, 7, 3]</sup>.

**Tabulka 1: Obsah jednotlivých komponent v Chia semeni <sup>[1]</sup>**

Složka	g/100 g
Bílkoviny	22-24
Sacharidy	26-41
Vláknina	18-30
Sušina	91-93
Lipidy	32-39
Popel, vitaminy, minerály	4-6

Byl sledován i obsah těžkých kovů v semenech, ale ten spadá do bezpečných mezí spolu s toxickými mykotoxiny <sup>[2]</sup>. Výtěžek oleje bílých semen je asi 33,8 % a černých semen 32,7 %. Složení bílkovin a mastných kyselin obou typů semen se také liší. Chia semen obsahují větší množství proteinu ve srovnání s jinými druhy obilí, jako je pšenice, oves, ječmen, rýže a kukuřice (viz Tabulka 2) <sup>[2, 3]</sup>.

**Tabulka 2: Srovnání obsahu proteinů v Chia semeni a obilí <sup>[3]</sup>**

Potravina	Obsah proteinu v g/100 g
Chia semena	16,54
Pšenice	11,8
Oves	13,6
Ječmen	11,5
Rýže	6,8
Kukuřice	11,1

*Salvia hispanica L* obsahuje v průměru 30,74 % celkových lipidů. Chia obsahují v průměru 40 % jejich celkové hmotnosti ve formě oleje <sup>[3]</sup>.

### 2.1 Bílkoviny

Výsledkem studií <sup>[13, 14, 15]</sup> je, že příjem 25 % bílkovin z celkového množství energie vede ke snížení obsahu tuku. Pravidelná konzumace Chia semen může pomoci se snížením nadváhy u mužů i žen. Hlavní strukturou proteinů v Chia semenu je globulin, který tvoří asi 52 % z celkového obsahu bílkovin s molekulární hmotností v rozmezí od 15-50 kDa <sup>[2]</sup>.

## 2.2 Vlákna

Chia semeno obsahuje také velké množství vlákniny, která může absorbovat až 15krát víc vody, než je samotná hmotnost semena, je tedy zodpovědná za vázání vody. [2]. Vlákna je jednou z nejdůležitějších součástí zdravé výživy. Vlákna obsažená v potravinách je důležitou komponentou vzhledem k jejímu prospěchu na zdraví. Celkový obsah vlákniny chia semen je mnohem vyšší, než je přítomnost v několika druzích obilí, ovoci a zelenině, jako jsou kukuřice, mrkev, špenát, banán, hrušky, jablka, kiwi. Nerozpustná vlákna Chia je schopna zadržovat vodu.

Příjem dostatečného množství vlákniny je spojen s prevencí kardiovaskulárních chorob, jako infarkt myokardu, cévních onemocnění, mrtvice, obezity, hypertenze, hyperglykémie, hyperlipidémie, rakoviny a snižuje riziko diabetu 2. typu tím, že zpomaluje proces trávení a uvolňování glukózy. Vlákna nemůže být plně strávena a absorbována v tenkém střevě, ale fermentuje v tlustém střevě. Na základě jejích fyzikálně – chemických vlastností a funkcí je vlákna dělena do dvou forem: nerozpustná vlákna, která zvětšuje objem stolice, a tím brání tvorbě divertikulózy neboli zánětlivého onemocnění střev a snižuje riziko karcinogenních onemocnění střev, a rozpustná vlákna, která se fermentuje částečně nebo zcela v tlustém střevě. Konzumace vlákniny je také spojena se zvýšeným pocitem sytosti a sníženým pocitem hladu. Zlepšuje peristaltiku střev a snižuje hladinu cholesterolu v krvi. [2, 3].

## 2.3 Minerály

Chia semena obsahují makronutrienty jako jsou vápník, fosfor a hořčík s vyšším obsahem než jiné obilniny, jako jsou pšenice, rýže, oves nebo kukuřice (viz Tabulka 3). Dále vyšší obsah železa, než je ve špenátu a játrech. A z mikronutrientů obsahují selen, měď, železo, mangan, molybden, sodnou sůl a zinek (viz Tabulka 4) [2].

**Tabulka 3: Obsah makronutrientů v Chia semeni [2]**

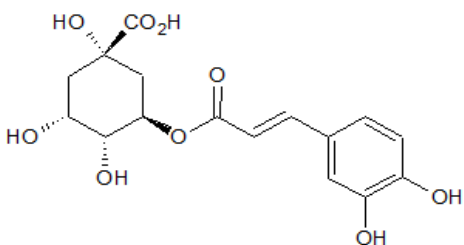
Složka	mg / 100 g
Vápník	631
Draslík	407
Hořčík	335
Fosfor	860

**Tabulka 4: Obsah mikronutrientů v Chia semeni** <sup>[2]</sup>

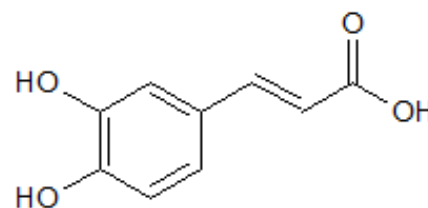
Složka	μg/100 g
Selen	55,2
Měď	0,924
Železo	7,72
Mangan	2,72
Molybden	0,2
Sodná sůl	16
Zinek	4,58

### 3 ANTIOXIDANTY

Chia semena jsou také zdrojem antioxidantů, zejména kyseliny chlorogenové (Obrázek 3) a kávové (Obrázek 4), myricetinu, kvercetinu a kaemferolu. Antioxidanty obecně chrání srdce i játra, zpomalují procesy spojené se stárnutím a mají antikarcinogenní vlastnosti <sup>[2, 3, 10]</sup>.



**Obrázek 3: Kyselina chlorogenová** <sup>[23]</sup>



**Obrázek 4: Kyselina kávová** <sup>[23]</sup>

Jako antioxidanty neboli inhibitory oxidace, označujeme všechny látky, které svou přítomností zpomalují autooxidační reakce. V praxi se nejčastěji využívají v potravinářském průmyslu k ochraně tuků. Některé tuky a oleje obsahují přirozené antioxidanty, a to hlavně tokoferoly. Přirozené antioxidanty jsou obvykle účinné, ale zároveň drahé. Proto se potraviny častěji stabilizují antioxidanty syntetickými <sup>[16]</sup>.

S antioxidanty je spojeno několik významných pojmů. Nevyváženost mezi oxidanty a antioxidanty ve prospěch oxidantů, které potenciálně vedou k poškození, se nazývá oxidační stres. Oxidanty se tvoří jako normální produkt aerobního metabolismu, ale mohou být produkovány za patofyziologických podmínek. Pokud je antioxidantů nepotlačí, budou tyto vysoce reaktivní sloučeniny reagovat neenzymaticky se strukturou některých buněčných nebo extracelulárních složek, jako jsou buněčné membrány, lipoproteiny, proteiny, sacharidy, DNA

a RNA. Oxidační stres má významný podíl na vzniku zánětlivých onemocnění (artritida, vaskulitida, glomerulonefritida (onemocnění ledvin), lupus erythematosus (autoimunitní onemocnění), syndromu respirační tísně u dospělých, ischemického onemocnění (srdeční onemocnění, mrtvice, střevní ischemie), rakoviny, hemochromatózy, žaludečních vředů, hypertenze, neurologických onemocněních (roztroušená skleróza, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, svalová dystrofie), a onemocnění související s kouřením a alkoholem [17, 18, 19, 20].

Dalším důležitým pojmem je antioxidační obrana. Každá molekula může být jak oxidačním, tak redukčním činidlem. To je dáno redukčním potenciálem molekuly, s níž reaguje. Komplexní endogenní antioxidační obranný systém byl vyvinut pro potlačení oxidačního poškození a oxidačního stresu. Endogenní antioxidační obrana má enzymatické i neenzymatické složky, které brání tvorbě radikálů, odstraňují radikály, opravují oxidační poškození a odstraňují poškození molekuly. Endogenní antioxidační obrana, která je produkována samotnými buňkami, se skládá ze složek jako je glutathion, thioredoxin a různé antioxidační enzymy [17, 18, 19].

Nejdůležitějšími přírodními antioxidanty jsou kyselina askorbová, kyselina citronová a jejich soli, tokoferoly a extrakty koření [21].

Antioxidační aktivita různých rostlinných extraktů je specifická podle typu a koncentrace fenolických sloučenin, které obsahují. Při skladování olejů, tuků a jiných potravin obsahujících tuky je oxidace lipidů i přes široké využití několika antioxidantů stále hlavní příčinou zhoršení kvality potravin. Přidáním antioxidantů k tukům a olejům v potravinách, v nichž jsou přítomné, je účinné při zpomalení oxidace lipidů [10, 22].

### **3.1 Flavonoidy**

Chia semena jsou bohatá na fenolické sloučeniny, kdy bylo prokázáno, že vykazují antioxidační vlastnosti. U antioxidačních fenolických látek bylo zjištěno, že mají zdraví prospěšné vlastnosti a také poskytují ochranu před degenerativními nemocemi, jako jsou kardiovaskulární onemocnění, rakovina, cukrovka a divertikulóza. Několik testů *in vitro* potvrdilo, že tyto polyfenoly mají vysokou antioxidační kapacitu a jejich přítomnost je spojena s nižší úrovní autooxidace lipidů [3].

Flavonoidy jsou barevné sloučeniny uplatňující se v rostlinných systémech [16]. Fenolické sloučeniny jsou také všudypřítomné ve stravovacích rostlinách. Syntetizují se ve velkých odrůdách patřící do několika molekulárních rodů, jako jsou deriváty kyseliny benzoové,

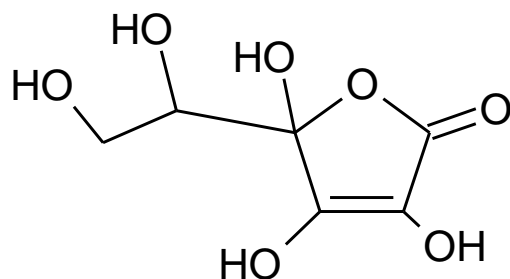
flavonoidy, proanthokyanidiny, stilbeny, kumariny, lignany a ligniny. Bylo izolováno více než 8000 rostlinných fenolů. Rostlinné fenoly jsou antioxidanty díky vlastnostem fenolických hydroxylových skupin, které dávají vodík <sup>[17]</sup>.

### 3.2 Vitaminy

Vitaminy jsou esenciální složky potravin, které si organismus neumí sám vytvářet a musí je přijímat potravou. Vitaminy zastupují v organismu několik funkcí: nejdůležitější z nich je katalytický účinek při řadě reakcí látkové přeměny. Potřeba jednotlivých vitaminů se u různých organismů liší. Nedostatek vitaminů v potravě se projevuje různými poruchami, které v té méně závažné formě označujeme jako hypovitaminózy, v té závažnější formě hypervitaminózy. Dlouhodobý nedostatek vitaminů může způsobit až smrt. Důležitým rozdělovacím znakem vitaminů je jejich rozpustnost, podle níž lze vitaminy rozdělit na rozpustné ve vodě (hydrofilní) a rozpustné v tucích (lipofilní). Významnými zdroji vitaminů jsou potraviny, jako je maso a masné výrobky, mléko a mléčné výrobky, vejce (hlavně žloutek), chléb a jiné cereální výrobky, ovoce a zelenina <sup>[16, 23]</sup>.

#### Vitamin C (L – Askorbová kyselina)

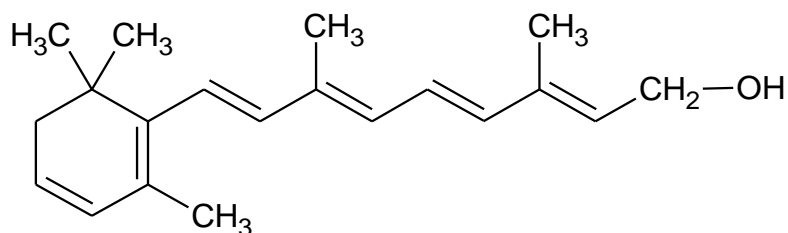
Kyselina L – askorbová (*Obrázek 3*) je dobře rozpustná ve vodě. Je to bílá krystalická látka. Chová se jako silně disociovaná kyselina. Snadno se oxiduje vzdušným kyslíkem na dehydroaskorbovou kyselinu. Oxidaci katalyzují některé běžné kovy, především soli měďnaté a železité. Jeho biochemická funkce není zcela známa. Je kofaktorem některých oxidoreduktáz, účastní se hydroxylace kolagenu tím, že regeneruje ferro-formu hydroxylačního enzymu, dále hydroxylace steroidů a jiných sloučenin a je součástí obranných mechanismů vůči chorobám a jiným poškozením. L – Askorbová kyselina také patří mezi zachytávače volných radikálů, ale v přítomnosti iontů železitých naopak zvyšuje jejich tvorbu. Proto jeho příjem do organismu je nutno regulovat v únosných hranicích. Doporučená denní dávka pro člověka je 50–60 mg. Kyselina L-askorbová je obsažena v rostlinách, v největším množství v šípčích, černém rybízu, zelené paprice, citronech a pomerančích. Při nedostatku vitamínu C nejprve vysychá kůže, člověk hubne, má pocit únavy a poději se objevují příznaky skorbutu (kurdějí): podkožní krvácení, krvácení z dásní, vypadávání zubů, náchylnost k infekcím <sup>[16, 23, 24]</sup>.



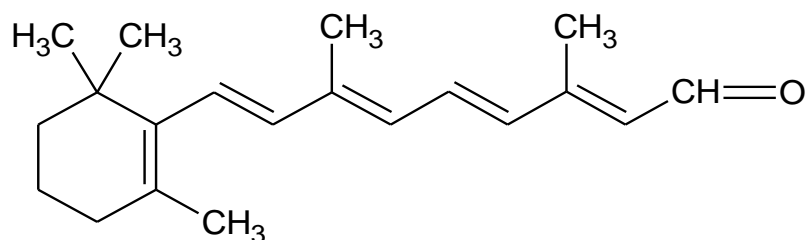
Obrázek 3: Kyselina L – askorbová <sup>[23]</sup>

### Vitamin A a karotenoidy

Vitamin A patří mezi vitamíny rozpustné v tucích. Účinnou formou vitaminu A jsou retinol (Obrázek 6) a retinal (Obrázek 7).



Obrázek 4: Retinol <sup>[23]</sup>

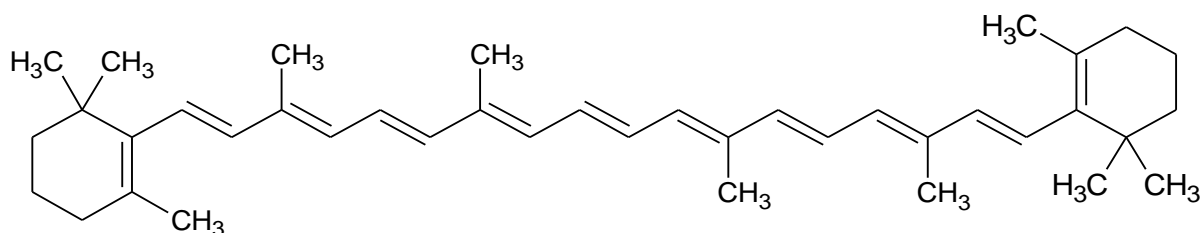


Obrázek 5: Retinal <sup>[23]</sup>

Vyskytují se pouze v živočišných materiálech, zatímco v rostlinách jsou přítomné pouze provitamíny, prekurzory retinolu, karotenoidy. Vitaminy A jsou produkty enzymové degradace těchto prekurzorů, která probíhá ve stěně tenkého střeva. Jde o tmavě červenou látku, která se na světle a vzduchu rozkládá. Do látkové přeměny zasahuje na více místech; stimuluje růst



živočišných buněk, správný vývoj kosterních tkání a normální reprodukci. Má velký vliv na biosyntézu glykoproteinů a steroidů a uvolňování lysozomových enzymů a u rostlin se účastní přenosu kyslíku, který se uvolňuje při fotosyntéze fotolýzou vody v chloroplastech. Nejznámější je úloha vitamínu A v biochemii zrakového vjemu. Dobrým zdrojem fyziologicky účinných karotenoidů, zvláště  $\beta$  – karotenu (Obrázek 8), jsou především některé druhy ovoce a zeleniny (mrkev, špenát, petržel, rajská jablčka). Nejvýznamnějším zdrojem vitamínu A jsou rybí tuk, máslo a játra. Projevy avitaminózy jsou šeroslepost, v pozdějším stádiu se ještě projevují změnami epiteliální tkáně, zastavením růstu a degenerací reprodukčních orgánů. Dlouhodobý nedostatek vyvolává vypadávání vlasů, krvácení z nosu, bolesti zubů. Uvádí se, že zásoba vitamínu A je jedním z faktorů přirozené ochrany organismu před zhoubným bujením. Doporučená denní dávka pro člověka je 1 mg <sup>[16, 23, 24]</sup>.



**Obrázek 6:  $\beta$  – karoten** <sup>[23]</sup>

Karotenoidy jsou žluté až červenofialové látky, které se snadno rozkládají působením světla, a ještě snadněji UV zářením. Rovněž tvoří komplexy s bílkoviny. Karotenoidy nejsou rozpustné ve vodě, avšak v tucích a organických lipofilních rozpouštědlech se rozpouštějí. V tucích vykazují karotenoidní barviva za určitých podmínek mírný antioxidační účinek. Karotenoidní barviva se používají i k dobarvování potravin <sup>[16]</sup>.

Karotenoidy jsou všudypřítomné v rostlinné říši a bylo zjištěno až 1000 přirozeně se vyskytujících variant. Nejméně 60 karotenoidů se vyskytuje v ovoci a zelenině, běžně konzumovaných člověkem. Vedle karotenoidů provitamínu A jsou  $\alpha$  – a  $\beta$  – karoteny a  $\beta$  – kryptoxanthin, lykopen a hydroxykaroteny (xantofyly) lutein a zeaxanthin hlavní karotenoidy přítomné ve stravě. Jejich hlavní úloha v rostlinách souvisí se světlem sklizně jako pomocnými složkami a kalení excitovaných molekul, které by mohly vzniknout během fotosyntézy <sup>[17]</sup>.



## 4 ESENCIÁLNÍ MASTNÉ KYSELINY

Mastné kyseliny obsahují uhlík, vodík a kyslík a mohou být rozděleny do následujících skupin na základě délky uhlíkového řetězce. MK s krátkým řetězcem (C2-C4), MK se středně dlouhým řetězcem (C6-C10), MK s dlouhým řetězcem (C12-C20) a MK s dlouhým řetězcem (více než C22). Mastné kyseliny mohou být také rozděleny podle nasycených mastných kyselin, které neobsahují žádné dvojně vazby nebo jiné funkční skupiny v řetězci. Nenasycené mastné kyseliny jsou dále rozděleny do mononenasycených mastných kyselin obsahující jednu dvojnou vazbu v řetězci, tak polynenasycených mastných kyselin, které obsahují 2 a více dvojných vazeb v řetězci [25, 23].

Esenciální mastné kyseliny jsou zvláštní skupinou polyenových mastných kyselin. Tato skupina se vyznačuje tím, že obsahuje na 6. a 9. atomu uhlíku dvě dvojně vazby s cis-konfigurací. Jediným zdrojem esenciálních mastných kyselin jsou lipidy, jejichž denní spotřeba se u dětí a mladistvých pohybuje mezi 4 a 10 g, u dospělého člověka je poměrně nižší 200 mg. Esenciální mastné kyseliny se účastní výstavby buněčných membrán, jsou prekurzory prostaglandinů; mají důležitou funkci v orgánech, jako jsou játra, srdce, ledviny, nervová tkáň apod. Nenasycené polyenové mastné kyseliny jsou viskózní, slabě nažloutlé kapaliny, které jsou dobře rozpustné v nepolárních organických rozpouštědlech i v alkoholech. Chemické vlastnosti jsou podobné vlastnostem monoenových kyselin, ale oxidují se na vzduchu podstatně snáze, takže je lze udržet v původním stavu velmi obtížně. Esenciální mastné kyseliny jsou v čistém stavu bezbarvé kapaliny nebo nízkotající voskovité látky. Za sníženého tlaku vřou za částečného rozkladu, avšak jejich estery lze bez rozkladu vakuově destilovat. Volné kyseliny jsou ve vodě nerozpustné, rozpouštějí se však dobře v méně polárních rozpouštědlech [16].

Chia semena obsahují malé procento nasycených mastných kyselin a jsou bohaté na polynenasycené mastné kyseliny (PUFA). Hlavními mastnými kyselinami v oleji z Chia semen seřazenými podle hojnosti byla kyselina linolenová > linolová kyselina > palmitová – olejová kyselina > stearová kyselina [1, 2, 21, 22, 25].

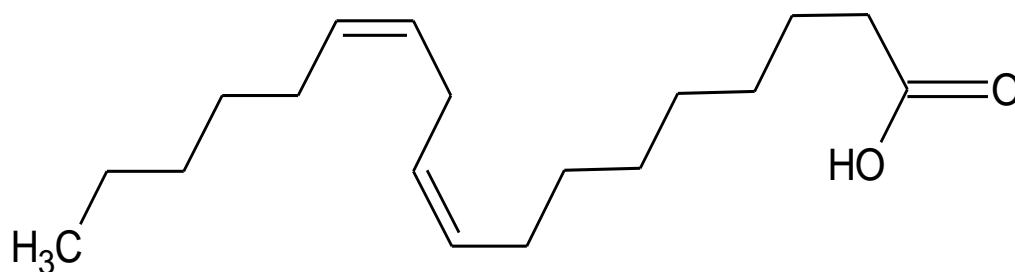
Omega - 3 nenasycené mastné kyseliny jsou užitečné při prevenci, řízení a léčení hyperlipidémie, hyperglykémie a hypertenze [3]. Omega - 3 mastné kyseliny mají řadu fyziologických funkcí v lidském těle. Omega – 3 je skupina mastných kyselin, a to kyseliny  $\alpha$  – linolenové (ALA), eikosapentaenové (EPA) a dokosahexaenové (DHA), které snižují riziko kardiovaskulárních onemocnění. Omega-6 je skupina mastné linolové a arachidonové kyseliny.

Ze všech známých zdrojů potravin, Chia obsahuje největší koncentraci těchto mastných kyselin. Průměrně obsahuje asi 64 % omega-3 a 19 % omega-6 mastných kyselin. V lidské stravě je ALA obvykle odvozena z rostlinných zdrojů, zatímco EPA a DHA jsou přijímány z ryb, doplňků z rybiho tuku a dalších mořských potravin. Nejbohatším zdrojem ALA je olej z Chia semen s obsahem 60 % [2, 26 22, 25].

Vysoký obsah polynenasycených mastných kyselin ale způsobuje nižší stabilitu oleje z Chia semen. Kromě toho při zpracování semen při vysokých teplotách se snižuje obsah esenciálních mastných kyselin, což se projevuje v průběhu skladování při pokojové teplotě [1]. Jak výtěžnost oleje, tak složení mastných kyselin je ovlivněno několika faktory, jako jsou odrůdy semen, metody předběžného upravování, podmínky skladování semen a postupy redukce. Polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem jsou velmi citlivé na oxidaci, která je považována za závažný problém, který často vede ke snížení doby trvanlivosti, funkčnosti, nutriční hodnoty potravin [1, 16].

#### 4.1 Kyselina linolová

Nejvýznamnější polyenovou a také esenciální mastnou kyselinou v potravě člověka je kyselina linolová (Obrázek 10), která se v organismu přeměňuje na kyselinu arachidonovou. Vyskytuje se bohatě v rostlinných olejích, v menším množství v živočišných tucích. Představuje asi 90 % esenciálních mastných kyselin v dietě [16].

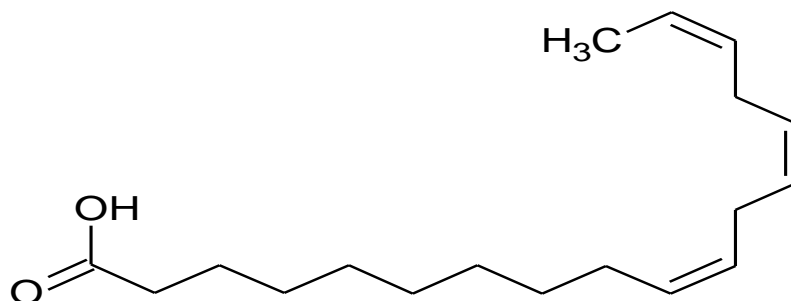


Obrázek 8: Kyselina linolová [16]

#### 4.2 Kyselina linolenová

Linolenová kyselina (Obrázek 11) s třemi dvojnými vazbami často doprovází linolovou kyselinu v rostlinných lipidech, obvykle však bývá přítomna v malém množství. Je nežádoucí, protože se rychle kazí a zhoršuje organoleptické vlastnosti výrobku a její biologická účinnost

jako esenciální mastná kyselina je velmi nepatrná <sup>[16]</sup>. Ze všech známých rostlinných zdrojů obsahuje nejvyšší podíl 60 %. Tato mastná kyselina patří do skupiny omega-3 mastných kyselin, která je nezbytná pro normální růst a vývoj lidského těla a hraje důležitou roli v prevenci a léčbě koronárních onemocnění hypertenzi, diabetu, artritidě, jiných zánětlivých a autoimunitních poruch a rakoviny <sup>[21, 27, 22]</sup>.



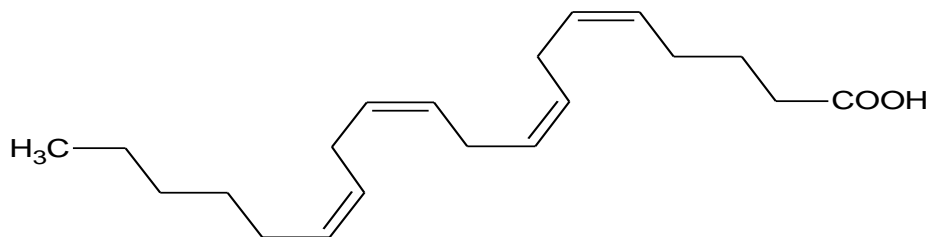
**Obrázek 9: Kyselina linolenová <sup>[23]</sup>**

Linolová a linoleová kyselina, které patří k základním polynenasyceným mastným kyselinám, nemohou být lidským tělem syntetizovány a musí být dodávány prostřednictvím stravy <sup>[25, 23]</sup>. Obě kyseliny zmírňují nadměrnou hladinu cholesterolu v krvi, zvyšují permeabilitu buněčné membrány a zabraňují tkáním myokardu a ateroskleróze. Díky těmto kyselinám lze zpomalit stárnutí, zejména pokožky, brání alergickým reakcím a podporují růst vlasů. <sup>[25]</sup>.

Obsah kyseliny linolové a  $\alpha$ -linolenové je také používán jako vhodný indikátor Chia semen pro začlenění do zdravých potravin pro náročné spotřebitele. Na počátku skladování, surová a zpracovaná Chia semena představovala nejvyšší hodnoty linolové a  $\alpha$ -linolenové kyseliny. Tyto hodnoty měly tendenci mírně klesat během skladování. Během skladování byl pozorován výrazný pokles obsahu kyseliny linolové u zpracovaných vzorků Chia semen. Maximální pokles množství linolové (35 %) a  $\alpha$ -linolenové (18%) mastné kyseliny byl pozorován v autoklávovaných vzorcích <sup>[1]</sup>.

### **4.3 Kyselina arachidonová**

Kyselina arachidonová (*Obrázek 12*), která má čtyři dvojně vazby, je nejdůležitější esenciální mastnou kyselinou pro metabolismus člověka. V potravě se však vyskytuje jen v malém množství, ale organismus ji dokáže syntetizovat z linolové kyseliny za přítomnosti biotinu <sup>[16]</sup>.



Obrázek 10:Kyselina arachidonová <sup>[16]</sup>

## 5 METODY STANOVENÍ

### 5.1 Antioxidanty

V literatuře lze nalézt, že ve vzorcích Chia semen stanovovali například obsah karotenoidů, vitamínů, flavonoidů, antioxidační kapacitu a celkový obsah fenolických látek. Ke stanovení antioxidantů v potravinách je zapotřebí nejprve vhodným způsobem antioxidanty izolovat ze vzorku, nejčastěji selektivní extrakcí. K vlastnímu stanovení se nejčastěji používá různých chromatografických technik (dvourozměrné tenkovrstvé chromatografie, plynové chromatografie nebo vysokotlaké kapalinové chromatografie), kombinovaných někdy se spektrofotometrickým stanovením <sup>[16]</sup>. Dále se hodnotí celkový obsah antioxidantů v potravinách. Principiálně jde tyto metody rozdělit na dvě skupiny: testy inhibiční a redukční testy. Inhibiční testy jsou založeny na schopnosti antioxidantů reagovat nebo neutralizovat volné radikály generované v testovacím systému ORAC (Oxygen Radical Absorbance) <sup>[28]</sup> a TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) <sup>[29]</sup>, zatímco redukční testy jsou založeny na schopnosti antioxidantů redukovat oxidant, který také funguje jako sonda, která změní barvu, když je redukována např. FRAP (Ferric ion reducing antioxidant power <sup>[30,17]</sup>).

Oliviera a kol (2013) prováděli kvalitativní a kvantitativní analýzu karotenoidů, vitamínů a flavonoidů. Analýza byla prováděna v pěti opakováních. Během analýzy byly vzorky a extrakty chráněny před světlem a vzdušným kyslíkem v dusíkové atmosféře. Pro kvalitativní analýzu byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), kdy byly porovnány retenční časy standardů s analyzovanými vzorky stanovované za stejných podmínek a byly identifikovány porovnáním absorpčních spekter standardů s píky vzorků za použití DAD detektoru. Pro kvantifikaci sloučenin nalezených v Chia semenech byly použity kalibrační závislosti pěti

koncentrací standardů, a to vždy v dubletech. Tak byla sestavena lineární závislost plochy píků na koncentraci každé sloučeniny a ze získané z rovnice regrese byla vypočtena skutečná koncentrace [7, 31].

### **5.1.1 Stanovení karotenoidů**

Karotenoidní barviva se nejčastěji stanovují spektrofotometrickými metodami. K izolaci karotenoidních barviv z rostlinných zelených materiálů slouží buď přímá extrakce acetonem nebo extrakce diethyletherem po zmýdelnění alkalickým hydroxidem. Tímto způsobem se ze vzorku odstraní přítomné tuky, které by ve většině případů měly při stanovení karotenoidů rušivý vliv. Pro vlastní separaci jednotlivých karotenoidních barviv po extrakci je využívána především tenkovrstvá chromatografie na oxidu hlinitém a hořečnatém. K identifikaci lze také použít hodnot retenčních faktorů ( $R_f$ ) po rozdělení na papíře s obrácenými fázemi nebo na tenké vrstvě a po eluci rozdělených látek a spektrofotometrické charakterizaci [16, 7, 32, 31].

Rodriguez-Anaya (1996) stanovoval obsah luteinu a zeaxanthinu v Chia mouce. Karotenoidy byly extrahovány do acetonu. Následně byly extrahované pigmenty převedeny do petroletheru. Po odstranění zbytkového acetonu promytím destilovanou vodou byla voda odstraněna přidáním bezvodého síranu sodného. [33]. Pigmenty byly pak znovu rozpuštěny v petroletheru. Pro analýzu byla část extraktu odpařena dusíkem a následně byla analyzována. Karotenoidy byly analyzovány pomocí HPLC s detektorem diodového pole (DAD). Jako mobilní fáze byla použita směs hexanu a isopropanolu v poměru 95:5, s průtokem 2 ml /min. Pro analýzu bylo dávkováno 50  $\mu$ l vzorku. [34] Byla monitorována absorbance při vlnové délce 450 nm [7].

### **5.1.2 Stanovení vitamínů**

#### **Stanovení vitamínu E**

Pinheiro-Sant'ana a kol. (2011) [32] stanovovali obsah celkem 8 složek vitamínu E ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tokoferolů a tokotrienolů) v Chia mouce. K naváženému vzorku byla přidána ultra čistá voda, isopropylalkohol, hexan obsahující 0,05 % butylhydroxytoluenu (BHT), dále bezvodý síran sodný a extrakční směs rozpouštědel: hexan:ethylacetát v poměru 85:15. Extrakt byl zakoncentrován a pro analýzu byla část extraktu odpařena tekutým dusíkem a následně převedena do hexanu. Analýza byla provedena pomocí HPLC s fluorescenční detekcí (290 nm excitace a emise 330 nm). Pro kvantifikaci byla použita metoda standardního přídatku. Jako mobilní fáze

byla použita směs hexanu, isopropanolu a ledové kyseliny octové podle Guinazi M. (2009) [35]. Identifikace složek vitamínu E byla provedena porovnáním retenčního času komerčních standardů s hodnotami získanými pro vzorky analyzované za stejných podmínek [7].

Vitamin E společně s vitaminem A byly stanovovány v rámci studie provedené Ranganna S. (1977) a AOAC (1990). Část homogenizovaného vzorku Chia semen byla extrahována pomocí ethanolického roztoku pyrogallolu a hydroxidu draselného. Po intenzivním třepání a inkubaci po dobu 18 hodin byl přidán petrolether a deionizovaná voda. Po rozdělení byla organická fáze oddělena. Extrakční krok byl dvakrát opakován pouze s hexanem a extrahované organické fáze byly následně smíchány a odpařeny v proudu dusíku. Vzorek byl pro analýzu rozpuštěn v methanolu. Pro HPLC byly použity standardy retinolu a  $\alpha$ -tokoferolu ve 3 koncentracích, byly extrahovány jako vzorky k určení výtěžnosti. Průměrná výtěžnost byla 85,4 % a 39,5 %. Kalibrační křivka byla sestavena o 3 bodech, kdy koncentrace standardů se pohybovaly v rozmezí od 0,66-6,60 mg/l retinolu a 30,22-302,18 mg/l  $\alpha$  – tokoferolu. Analýza HPLC byla provedena na koloně. Byl použit DAD detektor. Jako mobilní fáze byl použit 100 % methanol. Detekční vlnové délky byly 325 nm pro vitamin A a 280 nm pro vitamin E. Byly vyhodnoceny plochy píků. [36, 37, 38].

### **Stanovení vitamínu C**

Campos F. a kol. (2009) stanovovali obsah vitamínu C, tj. kyseliny askorbové (AA) v Chia semenech [39]. Chia semena byla homogenizována a Vitamin C byl extrahován pomocí směsi kyseliny metafosforečné, octové, sírové a EDTA (ethylendiaminotetraoctová kyselina). Extrakt byl centrifugován a následně zfiltrován [7, 36]. Byla použita metoda HPLC s využitím DAD s detekcí při vlnové délce 245 nm. Jako mobilní fáze byla použita ultra čistá voda, která byla upravena na pH 3,0 pomocí pufru, který obsahoval  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , EDTA a  $\text{H}_3\text{PO}_4$  [7].

Melo – Ruíz V. a kol. (2016) stanovovali vitamin C spektrofotometrickou metodou. K filtrovanému vzorku byl přidán octanový pufr (pH 4,0), 2,6 - dichlorfenolindifenol a xylén. Po intenzivním protřepávání byly fáze odděleny a vodná fáze byla odstraněna. Zbytky vody byly ještě odstraněny přidáním bezvodého síranu sodného. Absorbance byla stanovena UV spektrofotometrií při 320 nm za použití xylenu jako blanku. Koncentrace byly vypočteny pomocí kalibrační křivky standardu [36, 37, 38].



### 5.1.3 Stanovení flavonoidů

Stanovení flavonoidů je vzhledem k jejich značné různorodosti velmi obtížné. Již samotné extrakce těchto látek se mohou lišit podle druhu sledovaného flavonoidu. K dělení flavonoidních látek se nejčastěji používá chromatografie na papíře nebo tenké vrstvě. K vlastnímu stanovení je nejběžnější HPLC separace se spektrofotometrickou detekcí <sup>[16]</sup>.

V Chia semenech byly také analyzovány flavonoidy, konkrétně luteolinidin, apigeninidin, 7-methoxyapigeninidin a 5-methoxy-luteolinidin, které jsou řazené do skupiny 3-deoxyantokyanů (3-DXAs). Luteolinu a apigeninu ze skupiny flavonů a naringenin a eriodictyolu patřících mezi flavonony. Tyto sloučeniny byly extrahovány ze vzorku směsí methanolu a kyseliny chlorovodíkové v poměru 99:1. Analýza byla provedena pomocí HPLC s DAD detektorem <sup>[40]</sup>. Mobilní fází byla směs vodného roztoku kyseliny mravenčí a kyseliny mravenčí v acetonitrilu. Detekční vlnové délky byly 480 nm pro 3-deoxyanthocianidiny, 360 nm pro flavony a 280 nm pro flavanony <sup>[7]</sup>.

### 5.1.4 Stanovení antioxidační kapacity a celkového obsahu fenolických látek

V literatuře můžeme dohledat práce, ve kterých se autoři zabývali stanovením antioxidační kapacity pomocí známých metod jako jsou FRAP metoda, DPPH test, metoda TEAC nebo ORAC. DPPH test je založen na schopnosti stabilního volného radikálu DPPH (1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl) reagovat s donory vodíku. DPPH se vyznačuje silnou absorpcí v UV – VIS spektru. Při testu po redukci nastane změna, kdy se roztok odbarví. FRAP metoda je založena na schopnosti redukovat železité komplexy např. s hexakvanoželezitanem draselným nebo chloridem železitým, které jsou téměř bezbarvé a po redukci, kdy vzniknou železnaté komplexy se zbarví do modra <sup>[17, 41]</sup>. Metodou TEAC se stanovuje celková antioxidační aktivita. Výsledná antiradikálová aktivita vzorku je srovnána s antiradikálovou aktivitou syntetické látky Troloxu. Metodou ORAC se ve zkoumaném systému generují kyslíkové radikály a hodnotí se schopnost testované látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci. Detekce je založena na sledování úbytku fluorescence <sup>[42]</sup>.

Například Da Silva a kol (2017) se zabývali složením Chia semena pěstovaných na různých místech. Kromě analýzy jednotlivých komponent, jako jsou vitaminy, vláknina, mastné kyseliny, minerály, karotenoidy, flavonoidy, určovali i antioxidační kapacitu a celkový obsah fenolických látek. Před vlastní analýzou byla nutná extrakce antioxidantů z Chia semen,

kteřá byla provedena do 70 % acetonu. Pro uchování vzorků před analýzou bylo nutné vzorky zamrazit a musely být chráněny před světlem, aby byla minimalizována degradace aktivních složek. Antioxidační aktivita byla stanovena metodou s využitím radikálu DPPH. Ve zkumavkách chráněných před světlem byl k extraktu přidán methanolický roztok DPPH a směs se smíchala. Po 30 minutách byla měřena absorbance roztoku pomocí spektrofotometru při 517 nm. Kalibrační křivka byla zkonstruována za použití troloxového roztoku. Antiradikálová aktivita (AAR) byla vyjádřena v  $\mu\text{mol}$  troloxu ekvivalentní na g vzorku ( $\mu\text{mol}$  trolox/ g) <sup>[7]</sup>.

Singleton V. L. a kol. (1999) a Matthaus (2002) stanovili celkový obsah fenolických látek Folin – Ciocalteu metodou, kdy k části získaného extraktu bylo přidáno 20 % Folin – Ciocalteu činidlo. To obsahuje molybdenan sodný, wolframnan sodný a další činidla <sup>[43]</sup>. Po homogenizaci a přidavku 7,5 % uhličitanu sodného následovala inkubace 30 minut při laboratorní teplotě. Pro vyhodnocení byla měřena absorbance výsledného zbarvení roztoku při 765 nm. Jako standard pro přípravu kalibrační řady pro kvantifikaci celkového obsahu fenolických látek byla použita kyselina gallová v rozsahu koncentrací 0,005-0,10 mg/ml. Výsledky byly vyjádřeny v mg kyseliny gallové ekvivalentní ke g chia mouky (mg GA/g) <sup>[7, 10, 22, 6, 44, 45]</sup>.

Bray a Thorpe (1954) také stanovili celkovou koncentraci fenolů v surovém extraktu Chia semen, který byl připraven ze dvou vzorků Chia semen následujícím způsobem. Chia semena byla sušena, rozemleta a následně extrahována v Soxhletově extraktoru s petroletherem. Vzorek se nechal sušit na vzduchu a opět se extrahoval v Soxhletově do methanolu. Extrakt byl zakoncentrován. Pak byl přidán 1 – butanol, voda a petrolether. Fenolové složky byly vysráženy do vodné fáze a lyofilizovány. Suché vzorky a standardy byly rozpuštěny v okyseleném methanolu a vodě v poměru 60:40. Postup byl stejný, jako v předešlém stanovení odchyly jsou pouze ve vlnové délce, při které byla měřena absorbance při 750 nm a další odchyly bylo použití jiného standardu, a to kyseliny kávové. Blank byl tvořen činidly a rozpouštědly bez testovacích sloučenin. Koncentrace byla stanovena opět metodou kalibrační křivky <sup>[46, 47]</sup>.

Pro extrakci fenolických sloučenin lze použít vedle acetonu i další extrakční činidla např. diethylether, ethanol, kyselinu chlorovodíkovou v ethanolu <sup>[10, 48, 49, 50]</sup>.

Tsao a Yang (2003) použili metodu pro ovoce a příbuzné produkty pro současné stanovení pěti hlavních skupin fenolických sloučenin: monocyklické fenolové kyseliny, prokyanidiny, anthokyanidiny, flavonoly a dihydrochalkony. Kvantifikace a identifikace různých fenolů v surovém a hydrolyzovaném extraktu byly provedeny pomocí metody HPLC vybavenou DAD,

ten byl nastaven na 280, 320, 360 a 520 nm pro současné sledování fenolů. Mobilní fáze byla binární sestávala z kyseliny octové v octanu sodném (rozpuštědlo A) a acetonitrilu (rozpuštědlo B). Sloučeniny byly identifikovány porovnáním jejich retenčních časů a UV/VIS spektry s hodnotami standardů [10, 51].

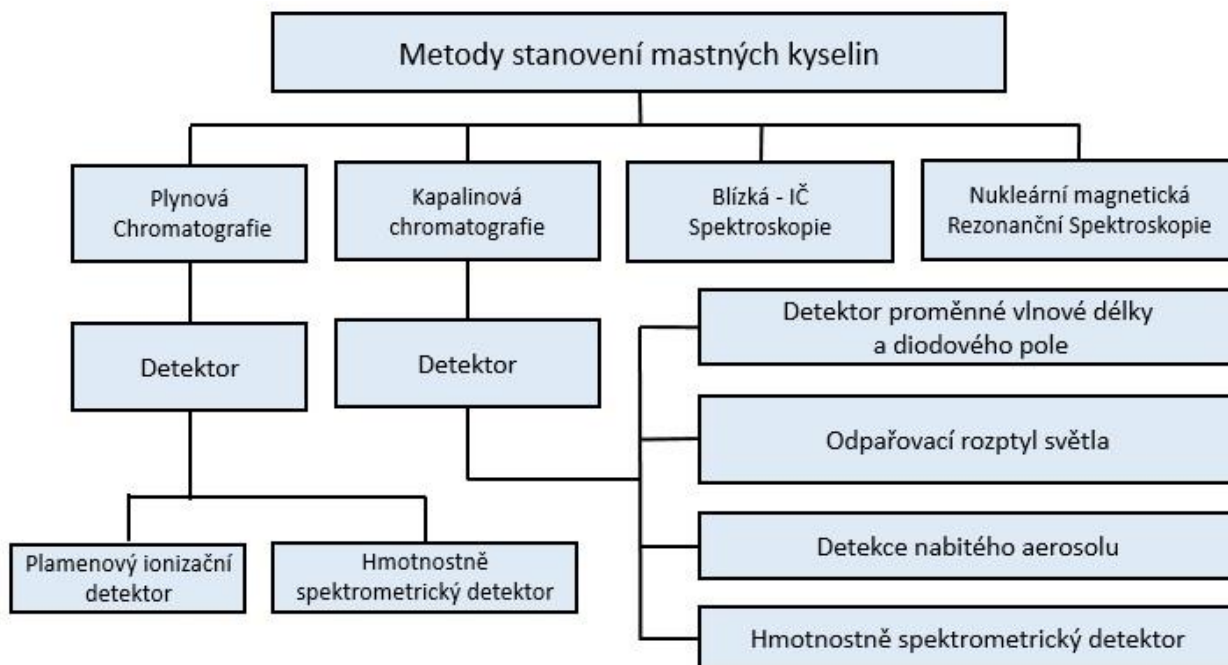
### 5.1.5 Další metody

Dále se ke stanovení fenolických látek používají metody, které zatím nebyly využity konkrétně pro Chia semena. Například tepelně oxidativní rozklad rostlinných olejů a tuků byl studován metodou diferenční skenovací kalorimetrie (DCS). Ne-isotermická metoda DSC má praktickou analytickou hodnotu, protože je jednoduchá, není časově náročná a může být aplikována na analýzu malých vzorků (2-10 mg). Proto musí být provedeno víc než jedno měření, aby se získal komplexní obraz o oxidativním procesu [21, 52, 53]. Dalšími využívanými metodami identifikace fenolických antioxidantů jsou tenkovrstvá chromatografie (TLC) a plynová kapalinová chromatografie (GLC) [46, 54].

## 5.2 Esenciální mastné kyseliny

Jak již bylo zmíněno, Chia semena jsou bohatým zdrojem esenciálních mastných kyselin. Olej z Chia semen je bohatý na polynenasycené mastné kyseliny, zejména kyselinu omega-3  $\alpha$  – linolenovou a kyselinu omega-6 linolovou, které představují velké výhody pro lidské zdraví a zdraví zvířat. U Chia semen lze analyzovat nejen obsah mastných kyselin, ale i obsah sušiny, aminokyselin, surový protein a obsah etherového extraktu dle standardních postupů AOAC (1990) [55, 56]. Proto byly zavedeny metody analýzy mastných kyselin v Chia semenech nebo Chia mouce. Pro kvalitativní a kvantitativní analýzu mastných kyselin se používá několik analytických metod (*Obrázek 13*). Mezi tyto analytické metody zahrnujeme plynovou chromatografii, kapalinovou chromatografii, IČ spektroskopii a NMR spektroskopii [25].

Ke stanovení esenciálních mastných kyselin se dnes používají enzymatické metody s lipoxygenasou nebo plynová chromatografie založená na separaci metylesterů mastných kyselin [16].



**Obrázek 11: Přehled metod využívaných pro stanovení mastných kyselin. Převzato a upraveno z angličtiny [25]**

Před vlastní analýzou je nutné zvolit vhodnou metodou extrakce mastných kyselin z původního materiálu, v tomto případě z Chia semen nebo mouky. Mastné kyseliny lze z Chia semen získat vytlačováním semene, enzymatickou extrakcí, extrakcí rozpouštědlem a extrakcí superkritickými kapalinami, lisováním za studena nebo za tepla, které se liší účinností výtěžku lipidové frakce [1, 57]. Extrakce esenciálních olejů pomocí superkritických kapalin má velký význam díky vysoké čistotě konečných sloučenin, což zvyšuje přidanou hodnotu konečných produktů a jejich cenu na mezinárodním trhu. Extrakce oleje z chia semen pomocí superkritického CO<sub>2</sub> se zdá být dobrou alternativou, protože pracuje při nízkých teplotách, je rychlá a bez zbytkového rozpouštědla v konečném produktu. Nadkritická tekutina je obvykle CO<sub>2</sub>, protože není toxický, hořlavý, což umožňuje regeneraci termolabilních sloučenin [57].

### 5.2.1 Analýza složení mastných kyselin

Pereira da Silva a kol. (2017) sledovali pomocí plynové chromatografie zastoupení mastných kyselin v Chia semeni. Před analýzou byly vzorky podrobeny kyselé hydrolýze s kyselinou chlorovodíkovou po dobu 40 min při 75 °C v prostředí 95 % ethanolu a za přítomnosti kyseliny pyrogalové a triglyceridu kyseliny tridekanové jako vnitřního standardu. Po kyselé hydrolýze byla lipidová frakce extrahována do ethyletheru. Po odpaření

tekutým dusíkem, přidavku 7% fluoridu boritého v methanolu a toluenu a inkubaci ve vroucí lázni byla přidána směs vody, hexanu a bezvodého síranu sodného. Profil mastných kyselin byl stanoven v supernatantu plynovou chromatografií (GC) s plamenově-ionizačním detektorem (FID). Separace probíhala v kapilární koloně s heliem jako nosným plynem. Retenční časy jednotlivých mastných kyselin byly srovnány se standardy a byly vyhodnoceny plochy píků v závislosti na koncentraci vnitřních standardů [74].

V dalších pracích bylo složení mastných kyselin chia oleje stanoveno pomocí plynové chromatografie (GC) za použití kapilární kolony, nosného plynu helia a plamenového ionizačního detektoru (FID). Vzorky byly zmýdelněny KOH v methanolu [58, 59, 60].

Nitrayová S. a kol. (2014) stanovili obsah mastných kyselin s dlouhým řetězcem ve formě esterů ve 3 vzorcích Chia semen, které byly získány z obchodu se zdravou výživou, které byly analyzovány po extrakci petroletherem a následné esterifikaci esterifikačním činidlem jako methylestery mastných kyselin, pomocí plynové chromatografie (GC). Analýza složení mastných kyselin plynovou chromatografií ukázala přítomnost palmitové, stearové, olejové, linolové,  $\alpha$ -linolenové a arachidonové kyseliny ve všech testovacích vzorcích. Navíc byly ve všech vzorcích identifikovány i tři další mastné kyseliny: laurová, myristová a palmitoolejová. Všechny byly přítomné jen ve stopovém množství [55].

Peiretti P.G. a Gai F. (2009) analyzovali mastné kyseliny také jako jejich methylestery. Nejprve bylo třeba vzorky chladit a následně byly lyofilizovány a rozemlety. Dále byla provedena extrakce vzorků semen a rostlin sušených vymrazováním podle (Hara and Radin, 1978) [61], zatímco transesterifikace mastných kyselin byla provedena podle (Christie, 1982) [62] s podmínkami popsány (Chouinardem a kol. 1999) [63]. Analýza byla provedena pomocí plynové chromatografie s kapilární kolonou z taveného oxidu křemičitého. Nosným plynem bylo hélium. Byla měřena plocha píku pomocí, kde byl každý vrchol identifikován a kvantifikován podle čistých methylesterových standardů [64].

Morrison W. R., a kol. (1964) [65] prováděli transesterifikaci mastných kyselin podle popsáných postupů [66, 67, 68]. Extrakty byly esterifikovány směsí fluoridu boritého, methanolu a hexanu. Profil mastných kyselin byl analyzován plynovou chromatografií (GC) s kapilární kolonou z oxidu křemičitého. Byl použit hmotnostně selektivní detektor. Nosný plyn bylo hélium. Vzorky byly dávkovány pomocí automatického dávkovače. Plocha píku byla identifikována a kvantifikována použitím čistých methylesterových standardů [57].

Costantini L. a kol. (2014) stanovovali methylestery mastných kyselin. Pro analýzu byly použity vždy vzorky mouky z Chia semen, které byly rozpuštěny ve směsi chloroformu a methanolu. Po odpaření dusíkem byly transmethylvány fluoridem boritým. Následně byly extrahovány do hexanu a stanoveny kapilární plynovou chromatografií s FID. Nosným plynem bylo helium [22].

Aminokyselinové složení testovaných vzorků bylo analyzováno pomocí iontoměničové chromatografie [69]. Obsah aminokyselin po hydrolyze HCl a Met a Cys po oxidační hydrolyze byl stanoven pomocí automatického analyzátoru [55].

### 5.2.2 Další metody

V literatuře se i pro mastné kyseliny objevují metody, které jsou využívány pro analýzu potravin, ale konkrétně u Chia semen ještě nebyly použity. Jednou z nich je kapalinová Chromatografie (LC). Pro analýzu a oddělení mastných kyselin jsou používány různé typy HPLC. V této technice jsou mastné kyseliny převedeny na různé deriváty. HPLC ukazuje výhody vysoké rychlosti analýzy, rozlišení a citlivosti. Kromě toho teplota použitá při HPLC je nižší než teplota v GC, čímž se snižuje riziko izomerace nenasycených mastných kyselin. Obecně používá k analýze organických kyselin, hydroxyl polynenasycených mastných kyselin, polárních lipidů a lipoproteinů. Další metodou je NIRS (Near – infračervená spektroskopie). Jde o typ fyzikální testovací technologie, která využívá zdroj vyzařovaného záření o známém vlnovém rozsahu 800–2500 nm. NIRS je nedestruktivní a rychlá technika s nízkými provozními náklady. Navíc umožňuje rychlé měření několika vlastností v jediné analýze bez chemických činidel. A poslední využívanou metodou je NMR spektroskopie, která se používá k účinnému studiu molekulární struktury rostlin. Tato technika poskytuje neinvazivně podrobné molekulární informace a může být použita k pochopení přírodních vzorků v jejich původním stavu. NMR se používá k určení píků stanovovaných sloučenin v překrývajících se signálech. Pro Stanovení mastných kyselin v rostlinných olejích pomocí NMR není potřeba předběžné úpravy a zkoumání chromatografického stavu a nevyžaduje kreslení standardní křivky. Navíc obsah různých mastných kyselin lze přesně kvantifikovat přidáním vnitřních standardů (obvykle kyselina benzoová) [25].

## 6 ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsme si přiblížili potravinu nového typu. Chia semena jsou malá, bez chuti. Jsou vynikajícím zdrojem energie. Díky svému bohatému obsahu nutričně významných látek mají pozitivní vliv na zdraví pokožky, vlasů a nehtů.

Chia semena jsou bohatým zdrojem omega - 3 mastných kyselin, antioxidantů, bílkovin, sacharidů, vlákniny, vitaminů a minerálů. Díky vláknině dokáží zajistit pocit sytosti a snížit pocit hladu. Jejich další vynikající vlastností je, že neobsahují lepek. Chia semena mají mnohem vyšší obsah bílkovin než jiné druhy obilí. Obsahují látky, které mají antioxidační a protivirové účinky. Mají široké spektrum pozitivních účinků na lidské zdraví. Působí preventivně proti široké škále onemocnění např. kardiovaskulárnímu onemocnění, poruchám nervového systému a proti cukrovce, infarktu myokardu, hypertenzi. Zatím nejsou známy žádné negativní účinky jako jsou projevy alergických reakcí, otravy aj.

Jde o neutrální potravinu, která se může přidávat do slaných, sladkých, vařených, syrových jídel. Nejčastěji bývá přidávána do cereálií, celozrnných sušenek, pečiva, salátů, ale i se využívají k výrobě osvěžujících nápojů.

Z vlastní zkušenosti mohu uvést, že užívání Chia semen mi osobně prospělo. Cítila jsem se méně unavená, netrpěla jsem tolik na migrény. Výhodou je, že se dají použít v podstatě do jakéhokoli pokrmu. Nejčastěji je používám na osvěžující nápoj a dávám je do vody s plátkem citronu. Přidávám do salátů a do jogurtu.

## 7 Použitá literatura

1. IMRAN M., NADEEM M., MANZOOR M. F., et. al. (2016) Fatty acids characterization, oxidative perspectives and consumer acceptability of oil extracted from pre-treated chia (*Salvia hispanica L.*) seeds. *Lipids in Health and Disease* 15:162. DOI: 10.1186/s12944-016-0329-x
2. ULLAH R., NADEEM M., KHALIQUE A., IMRAN M., MEHMOOD S., JAVID A., HUSSAIN J. (2016) Nutritional and therapeutic perspectives of Chia (*Salvia hispanica L.*) a review . *J Food Sci Technol* ,53 (4), 1750-1758. DOI: 10.1007/s13197-015-1967-0.
3. SURI S., PASSI S. J., GOYAT J., (2016); Chia seed (*Salvia hispanica L.*) A new age functional food. ISBN 978-81-932074-6-8
4. Bezpečnost potravin. *Využití semen chia a vliv na lidské zdraví*[online]. 2013 [cit. 2017-06-28]. Dostupné z: <http://81.0.228.111/vyuziti-semen-chia-a-vliv-na-lidske-zdravi.aspx>
5. BUSHWAY A. A., BELYEA P. R., R. J. BUSHWAY R. J., (1981). Chia seeds as a source of oil, polysaccharide and protein. *Journal of food*, 46, 1349-1350
6. PORRAS-LOAIZA P., JIMÉNEZ-MUNGUÍA M. T., SOSA-MORALES M. E., PALOU E., LÓPEZ-MALO A. (2014) Physical properties, chemical characterization and fatty acid composition of Mexican chia (*Salvia hispanica L.*) *International Journal of Food Science and Technology* 49, 571-577. DOI: 10.1111/ijfs.12339.
7. da SILVA B. P., ANUNCIACAO P. Ch., da SILVA MATYELKA J. C., DELLA LUCIA C. M., STAMPINI DUARTE MARTINO H., PINHEIRO – SANT'ANA H. M. (2017) Chemical composition of Brazilian chia seed grown in different places. *Food Chemistry* 221, 1709-1716. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.10.115. ISSN 0308-8146.
8. MUNOZ J. A., COBOS A., DIAZ O. AND AGUILERA J. M. (2012). Chia seed: microstructure, mucilage extraction and hydration. *Journal of Engineering* 108, 216-224. DOI: 10.1016/j.foodeng.2011.06.037.
9. IXTAINA V. V., NOLASCO S. M., TOMAS M. C. (2012). Oxidative stability of Chia (*Salvia hispanica L.*) seed oil: effect of antioxidants and storage conditions. *Journal of American Oil Chemists Society* 89, 1077-1090. DOI: 10.1007/s11746-011-1990-x.
10. REYES-CAUDILLO E., TECANTE A., VALDIVIA-LÓPEZ M. A. (2008) Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia*



- hispanica L.*) seeds. 107, 656-663. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.08.062. ISSN 0308-8146.
11. JIN F., NIEMAN D. C., SHA W., XIE G., QIU Y., JIA W. (2010).Supplementation of milled Chia seeds increase plasma ALA and EPA in post menopausal women. *Plant Foods Hum. Nutr.* 67:105-110. DOI: 10.1007/s11130-012-0286-0
  12. GUEVARA – CRUZ M., TOVAR A. R., AGUILAR – SALINAS C. A., MEDINA – VERA I., GIL – ZENZENO L., HERNÁNDEZ – VIVEROS I., LOPÉZ – ROMERO P., ORDAZ – NAVA G., CANIZALES – QUINTEROS S., GUILLEN PINEDA L. E., TORRES N. (2012). A dietary pattern including nopal, Chia seed, soy protein and oat reduces serum triglycerides and glucose intolerance in patients with metabolic syndrome. *J. Nutr.* 14:64-69. ISSN: 1541-6100.
  13. SKOV A. R., TOUBRO S., RONN B., HOLM L., ASTRUP A. (1999). Randomized trial on protein vs carbohydrate in ad libitum fat reduced diet for the treatment of obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23: 528-536.
  14. LEJEUNE M. P., KOVACS E.M., WESTERTERP – PLANTENGA M. S. (2005a). Additional protein intake limits weight regain after weight loss in humans. *Br J Nutr* 93:281-289. DOI: 10.1079/BJN20041305
  15. SANDOVAL-OLIVEROS M. R., PAREDES-LOPEZ O. (2013). Isolation and characterization of proteins from Chia seeds (*Salvia hispanica L.*). *J Agric Food Chem.* 61:193-201. DOI: 10.1021/jf3034978
  16. DAVÍDEK J., JANÍČEK G., POKORNÝ J. *Chemie potravin.* SNTL Praha 1983.
  17. CARLSEN M. H., HALVORSEN B. L., BLOMHOF R (2011). Antioxidants in Nuts and seeds. *Nuts & Seeds in Health and Disease Prevention.*6, 55-64. DOI: 10.1016/B978-0-12-375688-6.10006-4
  18. SIES H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* 82, 291-295
  19. SIES H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215, 213-219. ©FEBS 1993
  20. MARITIM A. C., SANDERS R. A. AND WATKINS III J. B. (2003). Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 17 (1): 24-38. DOI:10.1002/jbt.10058.

21. IXTAINA V. Y., NOLASCO S. M., TOMAS M. C. (2012). Oxidative stability of Chia (*Salvia hisoanica*L.) seed oil: Effect of antioxidants and storage conditions. *J Am Oil Chem Soc* 89: 1077-1090. DOI: 10.1007/s11746-011-1990-x
22. COSTANTINI L., LUKŠIČ L., MOLINARI R., KREFT I., BONAFACCIA G., MANZI L., MERENDINO N. (2014) Development of gluten – free bread using tartary buckwheat and chia flour rich in flavonoids and omega-3 fatty acids as ingredinets. *Food Chemistry* 165, 232-240. DOI: 10.1016/j.food.chem.2014.05.095 ISSN 0308-8146.
23. VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J. *Chemie potravin 1*. OSSIS, Tábor 2009, 3. vydání. ISBN 978-80-86689-15-2
24. VODRÁŽKA Z., *Biochemie 3*, AcademiaPraha (1993). ISBN 80-200-0471-8
25. ZHUONA W., ZHANG Q., LI N., PU Y., WANG B., ZHANG T. (2017) Comparison of critical methods developer for fatty acid analysis: A review. *J. Sep. Sci.* 40, 288-298. DOI: 10.1002/jssc.2016.00707. ISSN 1615-9306
26. POUDYAL H., PANCHAL S. K., WAANDERS J., WARD L., BROWN L. (2012) Lipid redistribution by  $\alpha$ -linolenic acid - rich chia seed inhibits stearyl – CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet-induced obese rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 23, 153-162. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2010.11.011. ISSN 0955-2863
27. COOREY R., NOVINDA A., WILLIAMS H., JAYASENA V. (2015) Omega- 3 fatty acid profile of eggs from laying hens fed diets supplemented with Chia, Fish Oil, and Flaxseed. *Journal of Food Science* 80, 1, 180-187. DOI: 10.1111/1750-3841.12735.
28. DE LANGE R. J. & GLAZER A. N. (1989). Phycoerythrin fluorescence – based assay for piroxyl radicals: a screen for biologically relevant protective agents. *Analytical Biochemistry* 177 (2), 300-306. DOI:10.1016/0003-2679(89)90056-0
29. MILLER N. J. & RICE-EVANS C. A. (1996). Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Report*, 2, 161-168. DOI: 10.1080/13510002.1996.11747044.
30. BENZIE I. F. F. & STRAIN J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of ‘antioxidant power’: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239 (1), 70-76. DOI: 10.1006/abio.1996.0292
31. De MORAIS CARDOSO L., OLIVIERA D. S., BEDETTI S. F., MARTINO H. S. D. & PINHEIRO-SANT’ANA H. M. (2013). Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) from the Brazilian cardiac: Chemical composition and bioactive compounds. *Fruits* 68, 121-134

32. PINHEIRO-SANT'ANA H. M., GUINAZI M., da SILVA OLIVEIRA D., DELLA LUCIA C. M., de LAZZARI REIS B. & BRANDAO S. C. C. (2011) Method for simultaneous analysis of eight vitamin E isomers in various food by high performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 1218 (17), 8496-8502
33. RODRIGUEZ-ANAYA D. B. (1996) Assesment of the provitamin A contents of food- The Brazilian experience. *Journal of Food Composition and analysis* 9 (3), 196-230
34. PINHEIRO-SANT'ANA H. M., STRINGHETA P. C., BRANDAO S. C. C. & AZEREDO R. M. C. (1998) Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota L.*) prepared by food service. *Food Chemistry* 61 (1), 145-151
35. GUINAZI M., MIRANDA MILAGRES R. C. R., PINHEIRO-SANT'ANA H. M. & CHAVES J. B. P., (2009) Tocofenois e tocotrienois em óleos vegetais e ovos. *Quimica Nova* 32 (8), 2098-2103
36. MELO – RUÍZ V., SCHETTINO – BERMÚDEZ B., RODRIGUEZ – DIEGO J., DÍAZ – GARCÍA R., CALVIO – CARRILLO C., GAZGA – URIOSTE C. (2016) Chia seeds (*Salvia hispanica L*) Wild Plant Rich In Nutrients. *Journal of Life Sciences* 10, 221-227. DOI: 10.17265/1934-7391/2016.05.001
37. A. O. A. C. 1990. Official Methods of Analysis Association of Official Agricultur Chemists. USA
38. RANGANNA S. (1977) Manual of Analysis of Fruit and Vegetable Products. *The Mc Graw Hill Pu. Co. Lim.* 94-102, New Delhi
39. CAMPOS F. M., RIBEIRO S., DELLA LUCIA C., PINHEIRO-SNT'ANA H. M. & STRINGHETA P. C. (2009) Optimization of methodology to analyse ascorbic and dehydroascorbic acid in vegetables. *Quimica Nova*, 32 (1), 87-91
40. YANG L., ALLERD K. F., GEERA B., ALLERD C. D. & AWIKA J. M. (2012) Sorghum phenolics demonstrate estrogenic action and induce apoptosie in nonmalignant colonocytes. *Nutrition and Cancer* 64 (3), 419-427
41. ŠULC M., LACHMAN J., HAMOUZ K., ORSÁK M., DVOŘÁK P. A HORÁČKOVÁ V. (2007). Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity fialových a červených brambor. *Chem. Listy* 101, 584-591.

42. PAULOVÁ H., BOCHOŘÁKOVÁ H., TÁBORSKÁ E. (2004). Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*. *Chem. Listy* 98, 174-179
43. EVERETTE J. D., BRYNAT Q. M., GREEN A. M., ABBEY Y. A., WANGILA G. W. AND WALKER R. B. (2010). Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin – Ciocalteu Reagent. *J. Agric. Food Chem.* 58, 8139-8144. DOI: 10.1021/jf1005935.
44. SINGLETON V. L., ORTHOFER R. & LAMUELA-RAVENTOS R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152-178
45. MATHAUS B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oil seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 3444-3452
46. SILVIA TAGA M., MILLER E. E., PRATT D. E. (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *JAACS*, 61, 5
47. BRAY H. G., THORPE W. V. In *Methods of Biochemical Analysis* edited by GLICK D., WILEY J. and Sons, New York, NY, 1954
48. KIM K. – H., TSAO R., YANG R. & CUI S. W. (2006). Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effects of hydrolysis conditions. *Food Chemistry* 95, 466-473.
49. KOSAR M., DORMAN H. J. D. & HILTUNEN R. (2005). Effects of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected (*Lamiaceae*) species. *Food Chemistry* 91, 525-533
50. NACZK M. & SHAHIDI F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, 95-111
51. TSAO R. & YANG R. (2003). Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A*, 1018, 9-40
52. LITWINIENKO G. (2007). DSC Study of linolenic acid autooxidation inhibited by BHT, dehydrozingerone and olive oil. *J. Therm. Anal. Calorim.* 88: 781-785
53. LITWINIENKO G. KASPRZYCKA – GITTMAN T. (1998). A DSC study on thermoxidation kinetics of mustard oil. *Thermochim Acta* 319:185-191

54. PRATT D. E., Di PIETRO C., PORTER W. L., CIFFEE J. W. (1981). *J. Food Sci.* 47:24
55. NITRAYOVÁ S., BRESTENSKÝ M., HEGER J., PATRIÁŠ P., RAFAY J., SIROTKIN A. (2014). Amino acids and fatty acids profile of Chia (*Salvia hispanica L.*) and flax (*Linum Usitatissimum L.*). *Potravinarstvo*, vol 8, no 1, 72-76. DOI: 10.5219/332. ISSN 1337-0960.
56. A.O.A.C. Association of official analytical Chemists (1990). *Official Methods of Analysis*. 15th ed. AOAC, Arlington, VA
57. ROCHA URIBE J. A., NOVELO PEREZ J. I., CASTILLO KAUIL H., ROSADO RUBIO G., ALCOCER C. G. (2011) Extraction of oil from chia seeds with supercritical CO<sub>2</sub>. *J. of Supercritical Fluids* 56, 174-178. DOI: 10.1016/j.supflu.2010.12.007. ISSN 0896-8446.
58. da SILVA MARINELI R., AGUIAR MORAES É., LENQUISTE S. A., GODOY A. T., EBERLIN M. N., MARÓSTICA Jr. M. R. (2014). Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seed and oil (*Salvia hispanica L.*). *LWT – Food Science and Technology* 59, 1304–1310. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.04.014. ISSN 00023-6438.
59. KRAMER J. K. G., FELLNER V., DUGAN M. E. R., SAUER F. D. S., MOSSOBA M. M. & YURAWECZ M. P. (1997). Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. *Lipids*. 32,1219-1228
60. MARIA E. L., RODRIGUEZ-AMAYA D. B. (1993). Evaluation of a simple and inexpensive method for the methylation of fatty acids with lipids of various fish species. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 53, 27-35
61. HARA A., RADIN N. S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low toxic solvent. *Anal Biochem.* 90, 420-426
62. CHRISTIE W. W. (1982). A simple procedure for rapid transmethylation of glycerlipids and cholesterol esters. *J. Lipid Res.* 23, 1072-1075
63. CHOUINARD P. Y., CORNEAU L., SAEBO A., BAUMAN D. E. (1999). Milk yield and composition during abomasal infusion of conjugated linoleic acids in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82, 2737-2745

64. PEIRETTI P. G., GAI F. (2009) Fatty acid and nutritive quality of chia (*Salvia hispanica L.*) seeds and plant during growth. *Animal Feed Science and Technology* 148, 267-275. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2008.04.006. ISSN 0377-8401.
65. MORRISON W. R., SMITH L. M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethyl acetals from lipids with boron – fluoride – methanol. *J. Lipid Research* 5,600-608. ISSN online 1539-7262
66. CHRISTIE W. (1982) *Lipid Analysis*, second ed, Pergamon Press, Oxford, UK
67. KNAPP D. R. *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*, John Wiley and Sons, Inc., 1997
68. Supelco, *Catalog: Chromatography Products for Analysis and Purification*, 2004
69. LLAMES C. R., FONTAINE J. (1994). Determination of amino acids in feeds: Collaborative study. *Journal of AOAC (Association of official Anal. Chem.)*, vol. 77, no. 5, 1362-1402