

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2017

Kateřina Jořtová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení složek křenu selského

Kateřina Joštová

Bakalářská práce

2017

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kateřina Joštová**
Osobní číslo: **C14044**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Stanovení složek křenu selského**
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. V první části bakalářské práce se věnujte chemickému složení křenu selského. Zaměřte se hlavně na látky ovlivňující organoleptické vlastnosti a výživové hodnoty této rostliny.
2. V druhé části popište přípravu vzorku a analytické metody a postupy použitelné pro stanovení látek vyskytujících se v křenu. Zaměřte se na separační metody stanovení.
3. Získané poznatky kriticky zhodnoťte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Tomáš Hájek, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce:

20. února 2017

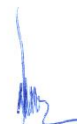
Termín odevzdání bakalářské práce:

7. července 2017



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2017

Prohlášení autora

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 29.6.2017

Kateřina Joštová

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu práce Ing. Tomášovi Hájkovi, za odborné vedení, cenné rady a připomínky, které mi poskytoval v průběhu vypracování bakalářské práce.

Poděkování patří i mé rodině, která mi byla během celého studia oporou.

ANOTACE

Tato práce pojednává o chemickém složení křenu selského. V první části je rozebráno jeho složení, zejména obsah vitamínu C, glykosionáty a produkty jejich rozkladu tedy izothiokyanáty. V další části práce je uvedeno, jak se dají jednotlivé složky křenu analyzovat.

KLÍČOVÁ SLOVA

Křen selský, isothiokyanáty, glykosionáty, enzym peroxidáza.

TITLE

Determination of compounds in horseradish

ANNOTATION

This thesis is focused on the composition of horseradish. The first part concerns the amount of present vitamin C, glucosinolates and the outcome of their decay, isothiocyanates. Other parts of this thesis contain analytical approaches for each ingredient.

KEYWORDS

Horseradish, glycosionates, isothiacyanates, enzyme peroxidase.

OBSAH

0	Úvod.....	12
1	Křen selský	13
1.1	Pěstování a sběr křenu.....	13
1.2	Chemické složení křenu	14
1.2.1	Voda.....	14
1.2.2	Minerální látky.....	15
1.2.2.1	Sodík, draslík.....	15
1.2.2.2	Vápník, hořčík	15
1.2.2.3	Fosfor.....	16
1.2.3	Vitamíny	16
1.2.3.1	Vitamín C	17
1.2.4	Glykosinoláty.....	17
1.2.5	Enzym peroxidáza.....	19
1.3	Organoleptické vlastnosti křenu.....	20
1.4	Výživové hodnoty křenu	21
1.5	Zdravotní účinky konzumace křenu.....	21
1.6	Antioxidační aktivita křenu.....	23
1.7	Využití křenu.....	24
2	Stanovení látek v křenu selském.....	26
2.1	Příprava vzorku	26
2.2	Analytické metody a postupy pro stanovení látek v křenu	26
2.2.1	Stanovení obsahu vody a sušiny	26
2.2.2	Stanovení obsahu bílkovin.....	27
2.2.3	Stanovení obsahu lipidů.....	29
2.2.4	Stanovení obsahu sacharidů.....	30
2.2.5	Stanovení hrubé vlákniny	31

2.2.5.1	Stanovení hrubé vlákniny podle Henneberga a Stohmanna	31
2.2.6	Stanovení celkové antioxidační aktivity	32
2.2.6.1	Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH	33
2.2.7	Stanovení obsahu polyfenolických látek	34
2.2.7.1	Extrakční postupy	34
2.2.7.2	Spektrofotometrické postupy	35
2.2.7.3	Stanovení celkových polyfenolů	35
2.2.7.4	Vysokoučinná kapalinová chromatografie	37
2.2.8	Stanovení glykosionátů	38
2.2.9	Stanovení isothiokyanátů	41
2.2.10	Stanovení glykosinolátů a isothiokyanátů kapilární elektroforézou	41
3	ZÁVĚR	43
4	Použitá literatura	44

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Křen selský a jeho kořen (vpravo) [1].....	13
Obrázek 2 Chemická struktura kyseliny L-askorbové [8]	17
Obrázek 3 Zástupci glykosinolátů v kořenu křenu selském A - sinirgin, B - glukonasturin, C - glukobrassicin, D - neoglukobrassicin [9]	18
Obrázek 4 Hem [11]	19
Obrázek 5 Trojrozměrná reprezentace rentgenové krystalové struktury izoenzymu C křenové peroxidázy C [11]	20
Obrázek 6 Analyzátor vlhkosti KERN -MLS 50-3D [28].....	27
Obrázek 7 Aparatura pro extrakci (vlevo) a Soxhletův nástavec (vpravo) [29].....	29
Obrázek 8 Chemická struktura DPPH radikálu [35].....	33
Obrázek 9 Základní schéma kapalinového chromatografu [39].....	37
Obrázek 10 Chromatogram [38]	38
Obrázek 11 GLS v extraktu z křenu: glukoiberin (1), sinirgin (2), 2-methylsulfonyloxyethyl-GSL (3), glukonapin (4), glukochlearin (5), glukonringianin (6), glukosativin (7), glukobinin (8), 4-hydroxyglukobrassicin (9), 5-hydroxyglukobrassicin (10), glukokapparili nebo glukobrassicinapin (11), glucotropaeolin (12), glucobrassicin (13), gluconasturtiin (14), 4-methoxyglucobrassicin (15) a glucoarabishirsutain (16) [40].	39
Tabulka 1 Průměrné složení čerstvého křenu [4]	14
Tabulka 2 Průměrný obsah minerálních látek v čerstvém křenu [4]	15
Tabulka 3 Průměrný obsah vitamínů v čerstvém křenu [4].....	16
Tabulka 4 Přehled celkového obsahu polyfenolů ve vybraných druzích zeleniny [23]	24
Tabulka 5 Stanovení redukujících cukrů podle Luffa – Schoorla [27].....	31
Tabulka 6 Molekulové vzorce, triviální názvy a retenční časy GLS přítomných v křenu [40]40	
Tabulka 7 Obsah GLS- sinirginu a glukonasturinu v křenu selském [45].....	42

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ATP	adenosin trifosfát
BHA	butyl hydroxyamisol
BHT	butyl hydroxytoluen
CE	kapilární elektroforéza
CE-MEKC	kapilární elektroforézy pomocí micelární elektrokinetické chromatografie
ČSN	české technické normy
DDD	doporučená denní dávka
DPPH	difenylpikrylhydrazyl
DPPH-H	difenylpikrylhydrazin
FAD	úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GLS	glykosinoláty
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRPC	izoenzym C
ISO	mezinárodní normy
ITC	isothiokyanáty
LC	kapalinová chromatografie
LC-ESI-MS	kapalinová chromatografie s elektro sprejovou ionizací a hmotnostní spektrometrií
Mr	molekulová hmotnost
TAA	celková antioxidační aktivita
TEAC	stanovení TAA pomocí Troxolu
TPC	celkový obsah fenolů

0 ÚVOD

Křen selský zná asi každý, ale málokdo ví, co tato užitečná rostlina vlastně obsahuje. Cílem této práce je čtenáře seznámit se složkami křenu. Mezi významné složky patří vitamín C, jehož obsah tvoří dokonce jednu třetinu doporučené denní dávky pro člověka. Další složkou jsou glykosionáty, jejichž rozkladem vznikají isothiokyanáty. Tyto látky jsou zodpovědné za štiplavou chuť a aroma, kterým se křen vyznačuje.

Křen je velmi důležitá rostlina z čeledi brukvovitých. V minulosti se používali křenové placky, které se přikládali na omrzliny nebo klouby postižené revmatismem. Křen se používal i na podporu trávení. Dnes se však jako léčivá rostlina používá pouze v lidovém léčitelství. Své uplatnění nachází zejména v potravinářském průmyslu, kde se kvůli své štiplavé chuti podává k masovým pokrmům, nebo se také používá jako konzervant či koření. Tato rostlina nachází uplatnění ale i v kosmetice, kde se používá pro čištění a dezinfekci pleti.

1 KŘEN SELSKÝ

Křen selský (*Armoracia rusticina*) se řadí do čeledi brukvovitých. Je pěstován zejména pro svůj silně aromatický kořen, který nachází využití jako zelenina, koření, konzervant některých druhů zeleniny, například červené řepy a okurek, ale i jako léčivý prostředek. Je u něho důležité, aby se používal syrový, tedy tepelně nezpracovaný, jinak nevyniknou jeho prospěšné vlastnosti. Jedná se o vytrvalou rostlinu, která se vyznačuje mohutným válcovitým kořenem, ze kterého vyrůstají růžice listů a květní lodyhy dlouhé až 2 metry, jak můžeme vidět na obrázku 1 [1,2].



Obrázek 1 Křen selský a jeho kořen (vpravo) [1]

1.1 Pěstování a sběr křenu

Jedná se o vytrvalou rostlinu, která je odolná proti mrazům i suchu. Pro pěstování vyžaduje hlubokou humózní půdu, ale ne příliš těžkou. Nevhodné jsou převážně půdy zamokřené a sléhavé. Řízky křenu o tloušťce 2 až 3 cm a délce 10 cm se vysazují do dobře připravené a vyhnojené půdy přibližně do hloubky 30 cm a vzdálené od sebe 70 cm. Během prvního roku pěstování vyrostou z pupenů výhony až k půdnímu povrchu. Během vegetace je nutno rostlinu přihnojovat, kypřit půdu na povrchu kolem rostliny a v době sucha zalévat. Ve druhém roce již tyto výhony zesílí do konzumní velikosti. Při pěstování je také důležité každý rok na jaře odhrnout půdu okolo rostliny až k původní části rostliny a nechat na ní jen 2 až 3 výhony, zbylé je potřeba otrhat, jinak by se křen rozrostl do okolí a stal by se z něho nepříjemný plevel [2].

Existuje i modernější způsob pěstování, který je výhodný zejména z časového hlediska. Na rozdíl od předchozího postupu se jedná o jednoleté pěstování. Principem je výsadba řízků o délce nejméně 20 až 25 cm a tloušťce 5 až 10 cm, které se vysadí kolmo do půdy tak, aby dolní část řízku končila 10 cm pod zemí a horní část těsně nad povrchem.

Křen sklízíme co nejpozději na podzim, tedy těsně před příchodem silnějších mrazů. Kořeny z půdy vyryjeme a následně je očistíme. Slabší se upraví nožem a použijí se na jaře pro další výsadbu. Silnější kořeny se nechají a společně s těmi slabšími se skladují v písku ve sklepě nebo v hlubším pařeništi, aby neztratili svou chuť a aroma [2].

1.2 Chemické složení křenu

Přestože zelenina, mezi kterou je křen řazen, většinou obsahuje značné množství vody, vyniká křen v obsahu sušiny, která se pohybuje mezi 31–34 % [3].

V následující tabulce je uveden přehled základních složek křenu.

Tabulka 1 Průměrné složení čerstvého křenu [4]

Složka	Obsah v čerstvém křenu [g/100 g křenu]
Voda	73,8
Bílkoviny	7,7
Tuky	0,7
Sacharidy	13
Vláknina	7,5
Sůl	0,015

1.2.1 Voda

V souvislosti s potravinami se spolu s dalšími látkami, jako jsou bílkoviny, tuky, sacharidy, vitamíny a minerální látky, řadí mezi látky nezbytně nutné pro normální funkci živých organismů, kde se uplatňuje hlavně v tepelném hospodářství organismů, jako transportní médium živin, produktů metabolismu a plynů, dále jako rozpouštědlo nebo disperzní prostředí a jako látka účastnící se reakcí, tedy jako reaktant.

V potravinách dochází často ke změně obsahu vody, a to jak při skladování, tak i při jejich zpracování. Ke ztrátě vody dochází odpařováním při skladování bez obalů nebo v obalech, které jsou schopny propouštět vodu nebo vodní páru. Dále při tepelném zpracování potravin sušením, vařením, pečením, smažením nebo pražením apod. [5].

1.2.2 Minerální látky

Další prvky, které se v potravinách nacházejí označujeme jako minerální látky, které se dále dělí podle obsahu v dané potravine na majoritní, minoritní a stopové prvky [5].

Nejvíce se v křenu nachází draslík, jehož průměrný obsah je 587 mg/100g čerstvého křenu. Další významnou látkou je vápník a fosfor. Přehled nejvýznamnějších minerálních látek včetně jejich průměrného obsahu v čerstvém křenu je uveden v následující tabulce.

Tabulka 2 Průměrný obsah minerálních látek v čerstvém křenu [4]

Složka	Obsah v čerstvém křenu [mg/100 g křenu]
Draslík	587
Vápník	93,7
Fosfor	80,5
Hořčík	25
Sodík	6
Zinek	1,4
Železo	1,3
Selen	0,2

1.2.2.1 Sodík, draslík

Jak je uvedeno v tabulce výše čerstvý křen obsahuje ve 100 g 587 mg draslíku. V lidském těle se vyskytuje převážně uvnitř buněk. Jeho hlavní funkcí je udržovat osmotický tlak vně i uvnitř buňky a acidobazickou rovnováhu, podílí se ale i na aktivaci glykolytických enzymů a enzymů dýchacího řetězce [5,6].

1.2.2.2 Vápník, hořčík

Hořčík se v lidském těle vyskytuje hlavně v kostře, dále je v měkkých tkáních v pankreatu, játrech a v kosterním svalstvu. 99 % z celkového množství vápníku v lidském organismu je v kostře a zubech ve formě fosforečnanu vápenatého. Pro tělo jsou velmi důležitými prvky, neboť hořčík se využívá při všech reakcích, ve kterých figuruje ATP a účastní se stabilizace makromolekul DNA. Vápník má tedy funkci stavební, podílí se na nervové a svalové činnosti a je nezbytný pro srážlivost krve [5,6].

1.2.2.3 Fosfor

Fosfor je další prvek, který je součástí kostí a zubů. Hmotnostní poměr mezi vápníkem a fosforem v kostí je cca 2. Jedná se o důležitý prvek pro metabolismus, účastní se fosforylace, je součástí ATP, fosfoproteinů, fosfolipidů a samotné DNA. Nedostatky tohoto prvku se téměř nevyskytují a nadbytek se projevuje zhoršením vstřebáváním vápníku [5,6].

1.2.3 Vitamíny

Vitamíny jsou organické nízkomolekulární sloučeniny, které si organismus není schopen vytvořit, jsou tedy esenciální. Z chemického hlediska jsou velmi rozmanitou skupinou, přičemž mezi jednotlivými vitamíny neexistuje po chemické stránce žádný strukturní vztah, podle kterých by se daly dělit do jednotlivých skupin. Proto se vitamíny dělí podle jiného znaku, a to podle rozpustnosti. Na základě toho se pak dělí na vitamíny rozpustné v tucích a ve vodě. Mezi vitamíny rozpustné v tucích patří vitamín A (retinol), D (kalciferol), E (tokoferol) a vitamín K (kyselina askorbová). Skupina vitamínů B, kam patří vitamíny B₁ (thiamin), B₂ (riboflavin), B₃ (kyselina nikotinová) B₆ (pyridoxin), B₁₂ (kyanokobalamin), dále kyselina listová a pantothenová se pak řadí do skupiny vitamínů rozpustných ve vodě [7].

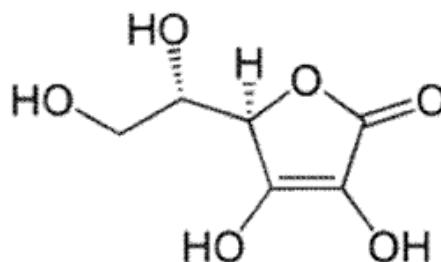
Křen obsahuje vysoké množství vitamínu C, vitamíny skupiny B, převážně B₁, B₂ a B₆. Dále obsahuje i malé množství provitamínu A a minerální látky. Jejich průměrný obsah můžete vidět v následujících tabulkách [3].

Tabulka 3 Průměrný obsah vitamínů v čerstvém křenu [4]

Složka	Obsah v čerstvém křenu [mg/100 g křenu]
Vitamín C	152
Vitamín B ₃	0,60
Vitamín B ₆	0,18
Vitamín B ₁	0,14
Vitamín B ₂	0,11

1.2.3.1 Vitamín C

Kyselina askorbová je základní biologicky aktivní sloučeninou, přičemž aktivitu vitamínu C vykazuje pouze kyselina L–askorbová, která je zobrazena na obrázku č. 2 [5].



Obrázek 2 Chemická struktura kyseliny L-askorbové [8]

Tento vitamín se v organismu podílí na významných hydroxylačních reakcích, biosyntéze mukopolysacharidů, prostaglandinů, dále se účastní absorpce iontových forem železa a jeho transportu, dále stimuluje transport sodných, chloridových a vápenatých iontů a uplatňuje se při metabolismu cholesterolu a drog [5].

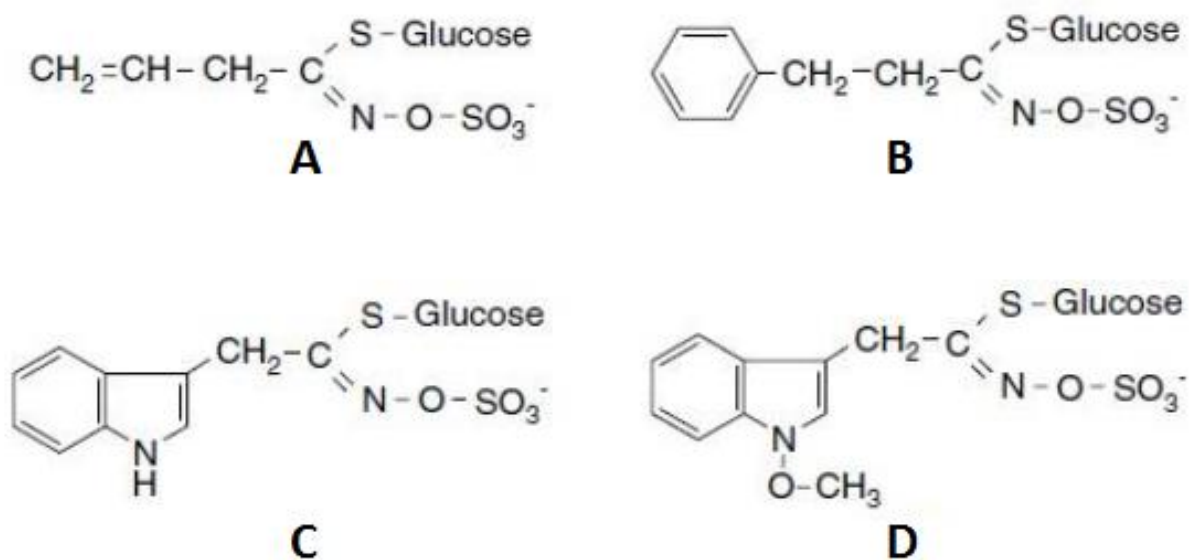
Jak již bylo uvedeno, křen obsahuje velké množství vitamínu C a to v průměru 152 mg/100 g čerstvého křenu. Proto se také uvádí, že zelenina pokryje přibližně 30–40 % doporučené denní dávky tohoto vitamínu [5,6].

Obsah vitamínu C závisí na odrůdě křenu, délce skladování, podmínkách pěstování ale i na půdě a klimatických podmínkách v průběhu vegetačního období. Kosson a Horbowicz zkoumali vlivy skladování po dobu 10 měsíců na dvou odrůdách křenu – polského a maďarského. Po 10ti měsících zjistili, že se obsah vitamínu C při skladování snižuje. U křenu polského byl zjištěn úbytek vitamínu C 32,8 mg/100 g čerstvého vzorku křenu, z původních 119,6 mg. U křenu z Maďarska byl úbytek větší, a to 70,8 mg/100 g čerstvého křenu, ale původně obsahoval 227,1 mg vitamínu C/100 g čerstvého vzorku. Došli tedy k závěru, že po skladování měl stále větší obsah vitamínu C křen z Maďarska [3].

1.2.4 Glykosinoláty

Křen obsahuje vysoké koncentrace glykosinolátů. Jsou to sloučeniny, které mají vázaný atom síry a molekulu glukózy [5]. Při jejich rozkladu, v závislosti na reakčních podmínkách (pH a přítomnosti železa), vznikají převážně nitrily, isothiokyanáty, thiokyanáty, methoxymethyl isothiokyanát [6]. Obvykle křen obsahuje osm různých glykosinolátů, které se dělí na základě aminokyselin, ze kterých vznikají, do 3 skupin – na alifatické, aromatické

a indolové. Nejčastějšími prekurzory jsou methionin (alifatické), tryptofan (indolové) a fenylalanin (aromatické). Alifatické glykosinoláty odvozené od methioninu jsou nejrozšířenější skupinou látek v čeledi brukvovitých. V křenu je hlavním zástupcem této skupiny sinigrin (2-propenyl glukosinolát) (obrázek 3A), jehož obsah v plně vyvinutém křenovém kořenu je přibližně 83 % [9].



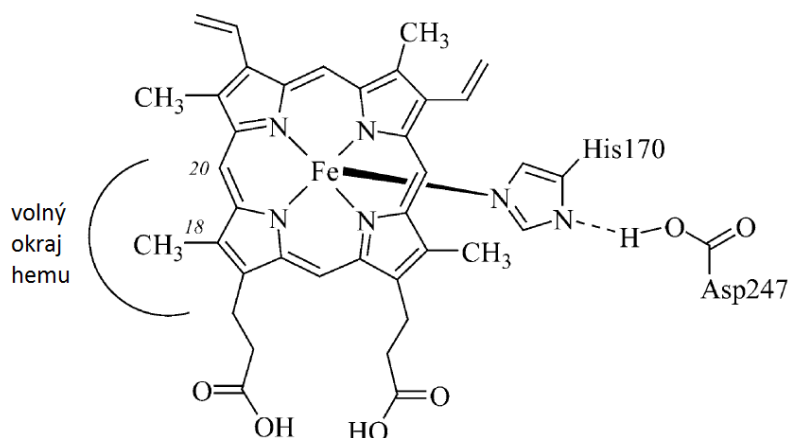
Obrázek 3 Zástupci glykosinolátů v kořenu křenu selském
A - sinigrin, B - glukonasturin, C - glukobrassicin, D - neoglukobrassicin [9]

Druhým nejvíce zastoupeným glykosinolátem je glukonasturin (2-fenylathylglucosionát) (obrázek 3B), odvozený od aminokyseliny fenylalaninu, který tvoří přibližně 11 % všech přítomných glukosinolátů v křenu a řadí se mezi aromatické. Indolové glykosinoláty, odvozené od tryptofanu, v křenu nejsou moc zastoupeny. Hlavními zástupci této skupiny jsou glukobrassicin (3-indolmethyl glucosinolát) (obrázek 3C) a neoglukobrassicin (N-mektoxy-3-indolymethylglucosinolát) (obrázek 3D) [9].

Glykosinoláty jsou součástí obranného systému proti býložravcům a patogenům. Po přerušení tkáně pletiv se hydrolyzují, za přítomnosti enzymu myrosinázy, na glukózu a na další produkty, jako jsou například isothiokyanáty, nitrily a thiokyanáty, nazývané jako hořčičné oleje. Strouhaná kořenová tkáň křene obsahuje více než 20 různých hořčičných olejů [9].

1.2.5 Enzym peroxidáza

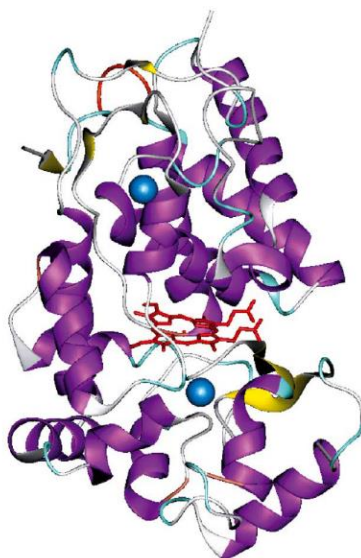
Křen je i bohatým zdrojem peroxidázy, enzymu obsahujícího hem, který využívá peroxid vodíku k oxidaci nejrůznějších organických a anorganických sloučenin [10].



Obrázek 4 Hem [11]

Ačkoli se termín křenová peroxidáza používá poněkud obecně, kořen rostliny obsahuje řadu výrazných izoenzymů peroxidázy, jejichž izoenzym C (HRP C) je v křenu zastoupen nejvíce. Všechny peroxidázové enzymy se nyní dělí do dvou skupin. Zdá se tedy, že každý druh rostliny obsahuje "sadu" peroxidázových izoenzymů, které mohou katalyzovat řadu různých reakcí. Termín "peroxidáza" se začal využívat až ke konci devatenáctého století, díky dílu Roberta Chodata a Alexeje Nikolajevič Bacha na Ženevské univerzitě, které zahájilo další výzkumy peroxidázy z kořene křenu a dalších rostlinných zdrojů. Některé z jejich pozorování podnítily energickou diskusi o povaze oxidáz a peroxidáz, které byly později popsány v knize Davida Keilina, která byla dalším významným přispěvatelem v oblasti peroxidázy. Ačkoli Bach a Chodat získali hrubý přípravek z křenové peroxidázy, čistý enzym byl izolován až prostřednictvím následných studií Richarda Willsty a Huga Theorelly [12].

Izoenzym C peroxidázy z křenu obsahuje jeden polypeptid obsahující 308 aminokyselinových zbytků, jejichž sekvence byla určena Welinderem. Dusíkatý zbytek je blokován pyroglutamátem a uhlíkatý zbytek je heterogenní, přičemž některé molekuly postrádají koncové zbytky. Celkový obsah sacharidů v HRP C je poněkud závislý na zdroji enzymu a jsou typické hodnoty mezi 18 a 22 % [11].



Obrázek 5 Trojrozměrná reprezentace rentgenové krystalové struktury izoenzymu C křenové peroxidázy C [11]

Hemová skupina (na obrázku výše červeně zbarvená) se nachází mezi distálními a proximálními doménami, kde každý obsahuje jeden atom vápníku (zobrazený jako modré koule). α -helixiální a β -listové oblasti enzymu jsou zobrazeny fialově a žlutě. Struktura enzymu je z velké části spirálovitá, ačkoli existuje i malá oblast β -listu (viz obrázek 5).

Struktury HRP C a dalších rostlinných peroxidáz tříd III obsahují tři α -helixy, které doplňují jádro peroxidázy. Dvě z nich (spirály F0 a F00) jsou umístěny v dlouhém inzertu, který vykazuje velké změny v sekvenci i počtu zbytků (obrázek 5). Celková integrita struktury v této oblasti je udržována disulfidovou vazbou od Cys177 po Cys209. Co je zvláště zajímavé v případě HRP C je umístění zbytků ve šroubovice F0, které se podílejí na přístupu substrátu a vazbě [11].

1.3 Organoleptické vlastnosti křenu

Za jeho charakteristickou chuť a vůni jsou zodpovědné éterické hořčičné silice, thiokyanáty a isokyanáty [13].

Při strouhání se vlivem enzymu myrosinu z glykosidu sinigrinu odštěpuje ostrý křenový olej, který dráždí čichový nerv. Sušením a vařením se však olej ztrácí [14].

Glykosinoláty poskytují hořkou chuť a aroma v důsledku jejich rozkladu na isothiokyanáty. Studie ukázaly, že v rostlinné tkáni jsou glykosinoláty přítomné v inaktivní formě a uzavřeny ve vakuolách. Jakmile se však vakuoly poruší, dojde k jejich uvolnění, což se projeví specifickým štiplavým aroma [15].

1.4 Výživové hodnoty křenu

Výživová hodnota křenu je ideální pro udržení optimálního zdraví a hubnutí. Protože obecně zelenina nemá velkou energetickou hodnotu a obsahuje hodně vody, doporučuje se jako jedna z hlavních složek při redukci váhy [16].

Zelenina obsahuje i složky, které sami nemají specifický účinek, avšak působí komplexně s ostatními. Proto pravidelné konzumování zeleniny chrání lidský organismus před různými chorobami a má povzbudivý účinek na zdraví [17].

1.5 Zdravotní účinky konzumace křenu

Protože křen na rozdíl od jiné zeleniny jíme méně, považuje se jeho obsah živin za zanedbatelný. Přesto má výrazný odvodňující účinek díky vysokému obsahu draslíku, který je ještě podpořen přítomností hořčičných olejů. Křen také povzbuzuje krevní oběh a snižuje vysoký krevní tlak, protože podporuje prokrvení. Obsah vitamínu C je tak vysoký, že při konzumaci 3 polévkových lžic nastrohaného křenu pokryjeme přibližně polovinu doporučené denní dávky vitamínu C. Je tedy prospěšný hlavně pro náš imunitní systém [18].

Chuťově nepříjemné mohou být i látky, které se v zelenině běžně vyskytují, ale vlivem špatného pěstování se objevují ve vyšších koncentracích. Jedná se o hořčičné silice, které mají i léčivý účinek. Na druhou stranu ale může nadměrná konzumace křenu u citlivých lidí způsobovat alergie. Mezi jeho negativní účinky patří to, že na pokožku působí dráždivě a může vyvolat až puchýře [16].

Hořčičné oleje mají silnou biologickou aktivitu. Kromě štiplavé chuti mají i silnou antibiotickou aktivitu. Přípravky z kořenů křenu se používají k léčbě infekcí močových cest [14].

Křen v malých dávkách povzbuzuje žaludeční a střevní činnosti tím, že stimuluje produkci trávicích šťáv a zvyšuje stravitelnost pokrmů, takže celkově podporuje trávení. Používá se i pro povzbuzení chuti k jídlu, ovšem v malých dávkách, protože při použití vysokých dávek hrozí již zmíněné poškození sliznice. Doporučené množství pro výrobu šťávy z křenu je 150 g křenu a 2 až 3 citróny. Používá se jako diuretikum (léčivo nebo rostlinná droga, které zvyšuje tvorbu moči a podporuje vylučování škodlivin z těla), expektorans (léčivo nebo rostlinná droga, které podporuje uvolnění a odstranění hlenu z dýchací soustavy), antiseptikum (protimikrobiální látka aplikovaná na živou tkáň/ kůži ke snížení rizika infekce, sepse nebo

hniloby) a derivans (léky, které silným drážděním pokožky snižují bolestivý pocit) a to vnitřně, oloupaný a nastrouhaný kořen nebo se z něho připraví sirup. Křen se rozřeže na tenké plátky, které se posypou cukrem a odtékající tekutina pak tvoří potřebný sirup. Denně se užívají 2-3 polévkové lžíce sirupu při zánětech průdušek, jarní únavě, při rekonvalescenci a při nedostatku vitamínu C, kterého jak již bylo zmíněno, obsahuje poměrně velké množství. Při revmatismu se používají obklady z nastrouhaného křenu. Tyto obklady silně prokrví a prohřejí postižené místo, čímž pomáhají rozpustit a vyloučit krystalky kyseliny močové, díky čemu urychlují léčbu zánětu [14,19].

Bylo zjištěno, že glykosinoláty, převážně nejvíce zastoupený sinigrin, a jejich produkty rozkladu, potlačují půdní organismy, jako jsou bakterie, houby a viry, a onemocnění, které způsobují. Mají tedy antimikrobiální účinek. Dále bylo prokázáno že glykosinoláty mají antikarcinogenní účinek, tedy chrání před rakovinou a bojují s choroboplodnými bakteriemi tím, že potlačují rozvojovou fázi vývoje rakovinných buněk a blokují estrogení receptory rakoviny [15].

V posledních letech se zvýšil zájem o hygienu potravin a bezpečnost spotřebitelů, proto se také zvýšila potřeba a výzkum přírodních konzervačních látek namísto syntetických. Protože těkavé látky, jako isothiokyanáty, neovlivňují samotné zpracované potraviny, označují se jako relativně bezpečné konzervační látky. Navíc isothiokyanáty, jak již bylo uvedeno, vykazují biocidní aktivitu proti různým patogenům, včetně hub, bakterií a mnoha dalším druhům hmyzu. Zvláště studie prokázaly, že isothiokyanáty ze sinigrinu (2-propenylglukosinolát) tedy aromatické, účinně inhibují řadu patogenních mikroorganismů při nízké koncentraci a to mnohem lépe, než isothiokyanáty odvozené od alifatických prekurzorů. Lepší antimikrobiální účinky byly prokázány na bakteriích rodu *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Aeromonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Pseudomonas* a *Listeria* [20].

Shin a kol. prováděli studii, kdy sledovali skladovatelnost tofu, což je sýr, který je v posledních letech velmi oblíbený zejména v asijských dietách. Jedná se o potravinu, která má nízký obsah kalorií ale vysoký obsah bílkovin, železa, vápníku, hořčíku a vitamínů, zejména pak typu B. Za jeho krátkou dobu skladovatelnosti může hlavně to, že je velmi náchylný na mikrobiální kontaminaci a rychlému růstu mikrobů, zejména kvůli zmíněnému vysokému obsahu bílkovin a vody. Mnoho výzkumníků uvádí antimikrobiální účinky rostlinných esenciálních olejů. Proto byl také při konzervaci již zmíněného tofu použit křen, resp. isothiokyanáty, které byly z křenu získány. U tofu byl pak sledován nárůst počtu bakterií, přičemž bylo zjištěno, že

při skladování po dobu 10 ti dnů, při teplotě 10 °C a koncentraci isothiokyanátů 300 ppm (tedy 0,03 %), došlo ke značnému potlačení růstu bakterií [21].

1.6 Antioxidační aktivita křenu

Rostliny poskytují bohaté přírodní antioxidanty, které jsou pro lidské zdraví životně důležité. Fenolické sloučeniny, které se běžně vyskytují v rostlinách, jsou biologicky aktivní látky s antiseptickou a vitamínovou aktivitou. Je známo, že fenolické sloučeniny jsou velmi účinné antioxidanty. Na základě těchto studií lze konstatovat, že je velmi důležité vyvinout nejlepší metodu extrakce těchto sloučenin z rostlin [22].

Několik autorů odborných článků, na základě svých studií, zjistili, že křen má vysokou antioxidační aktivitu ve srovnání s butylovaným hydroxyanisolem (BHA), butylovaným hydroxytoluenem (BHT) a α -tokoferolem, které se přidávají do potravin, aby ochránili tuky před oxidací. Mnoho výzkumníků také uvádí vliv různých extrakčních rozpouštědel a postupů na obsah přírodních antioxidantů v extraktech. Pro extrakci fenolů z čerstvého produktu se běžně používají rozpouštědla jako methanol, ethanol, aceton, propanol a ethylacetát. Vlastnosti extrakčních rozpouštědel výrazně ovlivňují naměřený obsah všech fenolů o ± 25 % a antioxidační kapacitu, kde je odchylka až o 30 % u ovoce a zeleniny. Velmi důležitým parametrem je polarita rozpouštědla – vyšší polarita, lepší rozpustnost fenolických sloučenin. Nejvyšší výtěžky (až 22,8 %) jsou získány použitím rozpouštědel na bázi polárního alkoholu. Přidáním vody k ethanolu se zvyšuje rychlost extrakce, ale příliš vysoký obsah vody způsobuje zvýšenou souběžnou extrakci dalších sloučenin a následně nižší koncentrace fenolu v extraktech [22].

Je těžké vytvořit standardní extrakční postup vhodný pro extrakci všech rostlinných fenolů. Výsledky analýz ukázaly, že nejvyšší celkový obsah fenolů (TPC) z křenu se extrahuje pomocí 95% ethanolu extrakčními metodami konvekční i Soxhletovou extrakcí. Ethanol a směsi s vodou se běžně používají pro extrakci fenolů z rostlinných materiálů, protože rostliny obsahují široké spektrum fenolů, které se mohou rozpouštět ve vodné ethanolové směsi [23].

Antioxidanty jsou sloučeniny, které inhibují nebo zpomalují oxidaci jiných molekul tím, že inhibují iniciaci nebo množení oxidačních řetězových reakcí. Existují dvě základní kategorie antioxidantů – syntetické a přírodní. Syntetické antioxidanty jsou obecně sloučeniny s fenolickými strukturami různých stupňů alkylové substituce, zatímco přírodními antioxidanty mohou být fenolické sloučeniny (tokoferoly, flavonoidy a fenolové kyseliny), sloučeniny dusíku (alkaloidy, deriváty chlorofylu, aminokyseliny a aminy) nebo karotenoidy či kyselina

askorbová. Jako antioxidanty se od počátku tohoto století používají syntetické antioxidanty, jako je butylhydroxyanisol (BHA) a butylovaný hydroxytoluen (BHT). Omezení použití těchto sloučenin jsou však uložena kvůli jejich karcinogenitě, čím se značně zvýšil zájem o přírodní antioxidanty. Karotenoidy mají také ochrannou funkci proti oxidativnímu poškození a singletový kyslík je velmi silně potlačen α -karotenem.

Mnoho přírodních antioxidantů, zejména flavonoidů, vykazuje široký rozsah biologických účinků, včetně antibakteriálních, antivirálních, protizánětlivých, antialergických, antitrombotických a vazodilatačních účinků. Antioxidační aktivita je základní vlastností důležitou pro život. Mnohé z biologických funkcí, jako je antimutagenicita, antikarcinogenita a antiaging, mimo jiné pocházejí z této vlastnosti. Informace o vztahu mezi antioxidační aktivitou a fenolickým obsahem a složením mnoha potravinových rostlin nejsou bohužel k dispozici.

V následující tabulce je přehled celkového obsahu polyfenolů ve vybraných druzích zeleniny [23].

Tabulka 4 Přehled celkového obsahu polyfenolů ve vybraných druzích zeleniny [23]

Vzorek zeleniny	Obsah polyfenolů [mg/100 zeleniny]
Červené brambory	781
Kořen křene	481
Brokolice	290
Mrkev	156
Červená cibule	150
Růžičková kapusta	91
Cuketa	38

1.7 Využití křenu

Křen je velmi důležitá rostlina z čeledi brukvovitých, která představuje téměř 60 % celkové spotřeby v USA. Většina komerčních plodin je rozdrčena na omáčky nebo používána jako potravinářská přísada pro svou ostrou chuť [15].

V minulosti se používali převážně křenové placky, které se přikládali na omrzliny nebo klouby postižené revmatismem, tyto placky dané místo silně prokrvili a ulevili tak od bolesti. Dále byl křen používán i na podporu trávení. Dnes se však jako léčivá rostlina používá pouze v lidovém

léčitelství. Své uplatnění nachází zejména v potravinářském průmyslu, kde se kvůli své štiplavé chuti podává k masovým pokrmům, nebo se také používá jako konzervant [24].

Vzhledem k tomu, že křen je již dlouho používán jako koření na maso a rybí výrobky, považuje se za bezpečnou a přijatelnou potravinu pro spotřebitele. Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) ho schválil jako koření a potvrdil, že je bezpečný. Nicméně použití vysoké koncentrace extraktu z křenu se však nedoporučuje kvůli nepříznivým účinkům na organoleptické vlastnosti potravin [21,25].

Křen najde své uplatnění ale i v kosmetice, kde se po smíchání jeho šťávy a vody, používá pro čištění, regeneraci a dezinfekci mastné pleti. Je však velmi důležité zajistit, aby pokožka s touto vodou nebyla ve styku příliš dlouho, mohlo by dojít k alergickým reakcím [26].

2 STANOVENÍ LÁTEK V KŘENU SELSKÉM

2.1 Příprava vzorku

Vzorek je vybraná část celku, tedy materiálu nebo objektu, který má být analyzován. Je důležité, aby byl reprezentativní, tedy obsahoval všechny složky v takovém hmotnostním či objemovém poměru, v jakém jsou zastoupeny v dané potravine.

Vzorkování, tj. proces odebrání vzorku se řídí platnými normami – ČSN EN ISO normy a ISO normy. U nebalených potravin, jako je právě křen, se odběr vzorku provádí pomocí žlábkových vzorkovačů nebo odkrojením. Před samotným odběrem vzorku je však potřeba křen zbavit veškerých nejdých součástí, které by při analýze překážely. Poté se vzorek rozmělní například pomocí mletí, drcení nebo strouhání [8].

2.2 Analytické metody a postupy pro stanovení látek v křenu

2.2.1 Stanovení obsahu vody a sušiny

Obsah vody se v potravinách stanovuje kvůli technologické a hygienické jakosti potravin, zejména pak kvůli údržnosti a konzistenci, dále kvůli ekonomickému hledisku, aby bylo možné sledovat dodržení daných parametrů a pro možnost stanovit obsah jiných složek v sušině daného vzorku.

Vodu lze v potravinách stanovit dvěma způsoby, přímo i nepřímo. U přímého stanovení se stanovuje přímo obsah vody, za použití destilační metody, chemických metod (dle Kirchera), plynové chromatografie, NIR spektrometrie (spektrometrie v blízkosti infračervené oblasti) nebo pomocí NMR spektrometrie (spektrometrie nukleární magnetické resonance). U nepřímého stanovení obsahu vody se stanovuje obsah sušiny a obsah vody se následně dopočítá. Sušina je hmota vzorku, která zbyde po odstranění vody sušením [5,8].

Obsah vody pak vypočteme pomocí následujícího vzorce (1):

$$\%_{H_2O} = \frac{m}{m_s} \cdot 100 \quad (1)$$

Kde m je hmotnost vzorku před sušením (tedy navážky) a m_s je hmotnost sušiny ve vzorku (tedy ta, co zbyla po vysušení) [27].

Sušinu lze stanovit sušením při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti vzorku. To se provádí buď v sušárnách nebo pomocí speciálních vah pro stanovení vlhkosti [27].

Tyto váhy neboli analyzátory vlhkosti vyrábí například společnost KERN. Příklad toho, jak takový analyzátor může vypadat, můžete vidět na následujícím obrázku.



Obrázek 6 Analyzátor vlhkosti KERN -MLS 50-3D [28]

Analyzátor provede sušení při teplotě, která se předem nastaví, až do konstantní hmotnosti, tedy úplného vysušení vzorku. Na displeji se pak zobrazí obsah sušiny v daném vzorku v % [23].

Při takovém to postupu stanovování sušiny ve vzorcích může dojít k několika chybám. Při samotném sušení se mohou odpařit i těkavé látky, jako například silice, u některých materiálů může dojít k jejich částečné dehydrataci, nebo může docházet k oxidaci lipidů vzdušným kyslíkem, což vede ke zvyšování hmotnosti [27].

2.2.2 Stanovení obsahu bílkovin

Bílkoviny se v potravinách stanovují kvůli posuzování nutriční hodnoty potravin, kdy se stanovuje celkový obsah bílkovin, aminokyselinové složení bílkovin, volné aminokyseliny, dále cizorodý nebo neplnohodnotný obsah bílkovin a jejich stravitelnost [27].

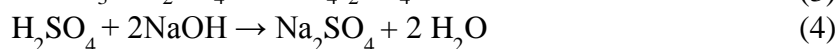
Obsah bílkovin v potravinách lze stanovit Kjeldahlovou metodou, která je mezinárodně uznávaná a univerzální. Spočívá v mineralizaci vzorku kyselinou sírovou za přítomnosti katalyzátoru – elementárního selenu a síranu draselného ($\text{Se} + \text{K}_2\text{SO}_4$), při které se převedou

sloučeniny dusíku na síran amonný $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$. Reakce probíhá při teplotě 340–390 °C po dobu 20–60 minut. Ze vzniklého síranu amonného se pak působením silné zásady uvolní amoniak podle následující rovnice



Vzniklý amoniak lze stanovit více postupy. Buď se jímá do předlohy s odměrným roztokem kyseliny sírové nebo s nadbytkem kyseliny borité. Zle ho stanovit i spektrofotometricky nebo reakcí s formaldehydem.

Prvním postupem je, že se vzniklý amoniak jímá do předlohy odměrným roztokem kyseliny sírové (H_2SO_4) za vzniku síranu amonného. Nadbytek kyseliny sírové se pak stanoví zpětnou titrací hydroxidem sodným. Celé stanovení probíhá dle následujících rovnic [8,27].



Obsah bílkovin se vypočítá dle následujícího vzorce

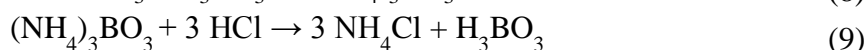
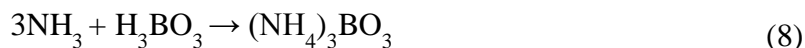
$$m_{\text{bílkovin}} = 6,25 \cdot m_N \quad (5)$$

$$m_N = n_{\text{NH}_3} \cdot M_N \quad (6)$$

$$n_{\text{NH}_3} = 2 [(c \cdot V)_{\text{H}_2\text{SO}_4} - 0,5 \cdot (c \cdot V)_{\text{NaOH}}] \quad (7)$$

Kde 6,25 je tzv. přepočítávací faktor, který závisí na druhu bílkoviny. Protože je obsah dusíku v bílkovinách průměrně 16 %, je faktor roven 6,25 (100/16). Tento faktor je pro mnoho druhů zeleniny specifický, u křenu se ale počítá s obecným. Tedy s 6,25. A m_N je hmotnost dusíku ve vzorku [g].

Vzniklý amoniak lze jímát i do předlohy s nadbytkem kyseliny borité. Při této reakci vzniká boritan amonný, který se dále titruje kyselinou chlorovodíkovou, dle rovnic (8) a (9).



Obsah bílkovin při použití této metody je pak spočítá obdobně jako v předchozím stanovení (rovnice (5) a (6)) pouze s tím rozdílem, že obsah amoniaku se spočítá:

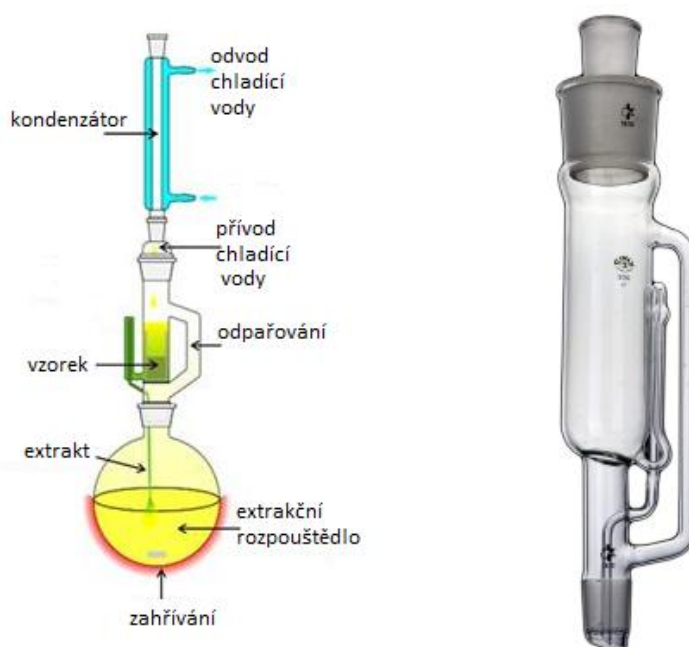
$$n_{\text{NH}_3} = n_{\text{HCl}} = c_{\text{HCl}} \cdot V_{\text{HCl}} \quad (10)$$

Jak již bylo zmíněno amoniak lze stanovit i spektrofotometricky, a to reakcí s Nesslerovým činidlem, což je roztok tetrajodortuřnatanu draselného v roztoku hydroxidu draselném ($K_2(HgI_4)$ v KOH). Vzniká žluto-hnědý roztok, jehož absorbance se měří při 410 nm [8,27].

2.2.3 Stanovení obsahu lipidů

Jak již bylo uvedeno v kapitole 1.4.3. tuky jinými slovy lipidy jsou významnou složkou potravin a tvoří jednu z hlavních živin, které jsou nezbytné pro zdraví a správný vývoj organismu.

Při jejich stanovení je nutné je nejprve izolovat z potravin. To se provádí extrakcí nepolárním až středně polárním rozpouštědlem a následným odpařením rozpouštědla z extraktu. Příkladem takové extrakce je Soxhletova extrakce. Kdy se tuhý vzorek rozmělní a po vysušení se umístí do extrakční patrony, která je umístěna v Soxhletově nástavci, který je i s celou aparaturou na extrakci vyobrazen na obrázku č. 7 [8,27].



Obrázek 7 Aparatura pro extrakci (vlevo) a Soxhletův nástavec (vpravo) [29]

Rozpouštědlo, umístěné v baňce pod nástavcem, se začne zahřívát, čímž se začne odpařovat a dostane se tak do styku se vzorkem, který se bude extrahovat. Celá extrakce trvá 4 – 6 hod při neustálém zahřívání. Po skončení extrakce se rozpouštědlo vypustí výpustním kohoutem a destilační baňka se po vysušení zvaží. Na základě hmotnosti vzorku, který byl vložen

do partony a hmotnosti extraktu se zjistí obsah tuku (S) ve vzorku potravin, dle následujícího vzorce [8,27].

$$S = \frac{m_{\text{vyvážky}}}{m_{\text{navážky}}} \cdot 100 [\%] \quad (11)$$

2.2.4 Stanovení obsahu sacharidů

U potravin se běžně stanovuje obsah dominantního sacharidu, celkový obsah určité skupiny sacharidů nebo jednotlivých monosacharidů a oligosacharidů či polysacharidů. Stanovení všech sacharidů se nepoužívá. U vzorku tuhé potravin se nejprve musí provést jejich rozmělnění a extrakce, při které cukr přechází do extrátu. U něho se poté musí provést čiření, při kterém se odstraní zákal a rozpuštěné nesacharidové látky, které jsou opticky aktivní a ovlivňovaly by tak výsledek analýzy. Čiření se provádí činidly, z nichž nejpoužívanější je Carrezovo činidlo – roztok síranu zinečnatého a hexakynoželednatanu draselného. Dalšími činidly jsou například neutrální síran olovnatý, zásaditý síran olovnatý nebo dusičnan olovnatý, ale i kyselina wolframová, aktivní uhlí a hydroxid hlinitý. Při smísení vzorku s čířidlem vznikne sraženina, která se odfiltruje a zbyde čirý roztok.

Sacharidy ve vzorku pak lze stanovit mnoha způsoby. Polarimetricky, metodami založenými na stechiometrických reakcích nebo vzniku oxidu měďného.

Při polarimetrickém stanovení sacharidů se měří úhel otočení roviny polarizovaného světla. Nevýhodou této metody je, že pokud vzorek obsahuje více druhů sacharidů, musí se převést na opticky inaktivní, aby bylo možné stanovovat sacharidy postupně [8,27].

Jak bylo výše zmíněno, existují i metody které jsou založeny na stanovení oxidu měďného (Cu_2O). Jednou takovou metodou je metoda dle Luffa-Schoorla, která se používá zejména pro stanovení sacharidů v potravinářských surovinách rostlinného původu. Luffův roztok (směs síranu mědnatého, uhličitanu sodného a citronanu sodného) se smíchá s vyčeřeným extraktem vzorku potravin v poměru 1:1 v Erlenmayerově baňce. Baňka se zahřeje k varu za použití zpětného chladiče a směs se vaří přesně 10 minut. Poté se rychle ochladí pod tekoucí vodou a k vychladlému roztoku se přidá jodid draselný (KI) a okyselí se kyselinou sírovou (H_2SO_4). Takto připravený roztok se ihned titruje roztokem thiosíranu sodného ($\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_3$) do nažloutlého zbarvení. Poté se přidá indikátor, škrobový maz, a dotitruje se do smetanové barvy. Stejným postupem se připraví i tzv. slepý pokus, u kterého se místo extraktu vzorku použije destilovaná voda. Obsah cukrů se pak určí podle tabulky z rozdílů spotřeb $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_3$ [27,30].

Tabulka 5 Stanovení redukujících cukrů podle Luffa – Schoorla [27]

Spotřeba 0,1 M Na ₂ S ₄ O ₃ [ml]	Glukóza, fruktóza, inertní cukr [mg]
1	2,4
2	4,8
3	7,2
4	9,7
5	12,2
6	14,7
7	17,2
8	19,8
9	22,4
10	25,0
11	27,6
12	30,3

2.2.5 Stanovení hrubé vlákniny

Vláknina zahrnuje nevyužitelné polysacharidy a jejich doprovodné látky (lignin) a dělí se na rozpustnou a nerozpustnou. Rozpustná vláknina zahrnuje pektiny, rostlinné gumy, slizy a některé hemicelulózy. Mezi nerozpustnou vlákninu se pak řadí celulóza, lignin a některé hemicelulózy.

Pro stanovení vlákniny je nutné odstranit lipidy ze vzorku, dále je stanovení založeno na hydrolýze a solubilizaci ostatních složek (bílkovin, využitelných sacharidů...) a zvážení zbytku nerozpustného za podmínek dané metody [27].

2.2.5.1 Stanovení hrubé vlákniny podle Henneberga a Stohmanna

Rozpoznání skutečnosti, že nestravitelné oligosacharidy a rezistentní škrob se také fyziologicky chovají jako vláknina, si vyžádala přehodnocení definice vlákniny a následně i přehodnocení metody na její stanovení. Henneberg a Stohmann již v roce 1860 vyvinuli analytický systém pro potraviny. Protože byla identifikovaná vláknina, která nebyla natrávena, vedlo to k vytvoření nového postupu, který spočívá ve dvoustupňové hydrolýze. Nejprve v kyselém a následně v alkalickém štěpení, aby došlo k izolaci nestravitelné (nerozpustné) frakce, tedy té,

kteřá prošla nezměněná tenkým střevem. Tato frakce obsahuje celulózu, některé hemicelulózy a lignin. Současnými metodami se zjišťuje hmotnost zbytku po hydrolyze, od kterého se odečítá hmotnost zbytku tedy popela s příslušnou korekcí [31].

2.2.6 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Jak již bylo zmíněno dříve, antioxidanty prodlužují skladovatelnost potravin a inhibují nebo zpomalují oxidaci jiných molekul tím, že inhibují iniciaci nebo množení oxidačních řetězových reakcí. Existuje mnoho metod a postupů pro jejich stanovení, ovšem tyto stanovení poskytují vzájemně odlišné výsledky.

Za rozdíly ve výsledcích mohou hlavně vnější faktory, které ovlivňují antioxidační aktivitu (TAA). Aktivitu antioxidantů ovlivňuje hlavně jejich koncentrace, oxidovaný substrát, přítomnost jiných antioxidantů, použité rozpouštědlo, pokud se jedná o reakce v roztoku, dále homogenita či vícefázovost systému, pH, přítomnost dalších látek (u potravin hlavně přítomnost bílkovin), oxidační činidla nebo faktor iniciující oxidaci (například světlo), dále teplota a přístup kyslíku [32].

Některé antioxidanty mohou ve vyšších koncentracích vykazovat prooxidační účinek, který je vysoce nežádoucí. Použité rozpouštědlo zas může ovlivnit jejich reaktivitu nebo rozpustnost. Ve vícefázových systémech zas o antioxidačním účinku rozhoduje jejich umístění. To je primárně dané jejich polaritou, ale může být ovlivněna řadou faktorů, jako například u emulzí může jejich umístění ovlivnit emulgátor. Dalším důležitým faktorem, který má vliv na rozdílnou hodnotu mezi antioxidační aktivitou in vitro a účinkem antioxidantů v lidském těle, patří jejich biologická dostupnost, která zahrnuje tři základní kroky – uvolnění antioxidantů z potravinové matice, jejich vstřebávání v trávicím traktu a přestup do buněk [32].

Při stanovení antioxidační aktivity u tuhých vzorků je potřeba nejprve provést jejich extrakci. Problém ovšem je, že při ní část antioxidantů nepřechází do extraktu. Důvody mohou být různé, například přítomnost antioxidantů, které jsou nerozpustné, nebo mohou být vázány kovalentně na nerozpustné složky potravin, ale i to, že část extrahovaných antioxidantů zůstává vázána na extrakční zbytek vodíkovými můstky nebo jinými nekovalentními vazbami, nebo že je část antioxidantů uzavřena v buněčných či jiných strukturách.

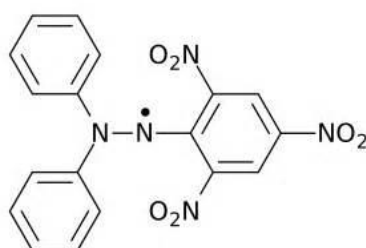
Během trávení se může antioxidační aktivita zvýšit i u extrahovatelných antioxidantů (např. díky hydrolyze rozpustných polymerních forem fenolů nebo glykosidů a esterů). Ovšem

během trávení může docházet i ke ztrátám antioxidantů (pravděpodobně oxidací). Střevní mikroflóra může modifikovat antioxidanty přijímané potravou různými způsoby, čímž může měnit jejich vstřebatelnost včetně / nebo biologické aktivity [32].

Antioxidační aktivitu lze tedy stanovit mnoha způsoby, které se dělí do dvou základních skupin. Na metody hodnotící schopnost eliminovat radikály a na metody posuzující redoxní vlastnosti látek. Do první skupiny, tedy metod založených na eliminaci radikálů, patří metoda používající ABTS radikál (sulfonová kyselina). Jedná se o jednu z nejpoužívanějších metod, při které se testuje schopnost vzorku zhaset kation radikálu $ABTS^+$, která se sleduje spektrofotometricky. Protože výsledná TAA je srovnávána s antiradikálovou aktivitou syntetické látky Troxol, nazývá se tato metoda také metodou TEAC. Další metoda spočívá v reakci vzorku se stabilním radikálem DPPH, kdy se spektrofotometricky sleduje úbytek barevnosti vzorku [33].

2.2.6.1 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Tato metoda slouží ke zjištění TAA čistých látek i různých směsí. Principem je reakce vzorku se stabilním radikálem DPPH – difenylpikrylhydrazyl, jehož strukturní vzorec je na obrázku č.8. DPPH, může být akceptorem vodíku, a tak se při reakci redukuje na DPPH-H (difenylpikrylhydrazin), čímž dochází k poklesu absorbance, která se měří při 517 nm (tedy v oblasti fialového zbarvení) po uplynutí určitého času. [33,34]



Obrázek 8 Chemická struktura DPPH radikálu [35]

U barevných vzorků je výhodné reakci sledovat pomocí HPLC (vysokoučinné kapalinové chromatografii), při které látky rozdělené na koloně reagují kontinuálně s DPPH a spektrofotometricky se vyhodnocuje pík.

U směsných vzorků je možné radikálovou aktivitu vyjádřit v ekvivalentech kyseliny askorbové nebo v jednotkách Troxolu, tedy standardu [33,34].

2.2.7 Stanovení obsahu polyfenolických látek

Nutriční a sensorické účinky fenolických látek obsažených v potravinách se v posledních letech staly centrem pozornosti. Přestože tyto sloučeniny mají obecně prospěšné účinky na zdraví, mohou také snížit dostupnost proteinů a minerálních látek a ovlivnit chuť a barvu potravin. Neexistuje spolehlivá metoda kvantifikace fenolických sloučenin, která by mohla být použita při analýze všech potravin. Navíc ne všechny fenoly přítomné v potravinách mají výživový nebo sensorický význam. Zjištění jejich celkového obsahu v potravinách proto nelze považovat za spolehlivý index fenolických nutričních a sensorických vlastností.

Existují různé metody stanovení fenolických sloučenin, které možno rozdělit na ty, kterými se zjistí celkový fenolický obsah nebo ty, kterými se dokáže určitá skupina nebo třída fenolických sloučenin. Folin Denisův test a pruský modrý test jsou příklady metod používaných pro úplné stanovení fenolů. Naproti tomu vanilinový test se používá jako metoda stanovení katechinů a proanthokyanidinů [36].

Analýza polyfenolových sloučenin je ovlivněna jejich chemickou povahou, použitou extrakční metodou, velikostí částic vzorku, časem a podmínkami skladování, jakož i metodou stanovení, výběrem standardů a přítomností interferujících látek, jako jsou vosky, tuky, terpeny a chlorofyly. Proto není pro extrakci všech fenolů nebo specifické třídy fenolických látek v potravinách zcela vhodný žádný extrakční postup. Rozpustnost polyfenolů se řídí typem použitého rozpouštědla (polarity), stupněm polymerace fenolů, interakcí fenolů s ostatními složkami potravin a tvorbou nerozpustných komplexů [36].

2.2.7.1 Extrakční postupy

Vzhledem k chemické povaze fenolů obsažených v potravinách neexistuje ani žádné univerzální extrakční rozpouštědlo, které by bylo vhodné pro izolaci všech fenolů. Přestože některé fenoly s vysokou molekulovou hmotností a jejich komplexy jsou nerozpustné, extrakty vždy obsahují směs různých tříd fenolických látek rozpustných ve zvoleném rozpouštědle. Obvykle jsou potřeba další kroky k čištění izolátů a k odstranění nežádoucích fenolických a nefenolových látek.

Extrakční doba je dalším faktorem, který ovlivňuje extrakci polyfenolů. Byly zaznamenány doby extrakce od 1 minuty do 24 hodin. Nicméně delší doby extrakce zvyšují možnost oxidace fenolů, pokud do systému rozpouštědel nejsou přidávány redukční činidla. Extrakce polyfenolů z potravinových produktů je rovněž ovlivněna poměrem vzorku k rozpouštědлу [36].

2.2.7.2 Spektrofotometrické postupy

Byla vyvinuta řada spektrofotometrických metod na určení fenolických sloučenin v rostlinných materiálech. Na základě různých principů se tyto testy používají k určení různých strukturálních skupin přítomných ve fenolických sloučeninách. Spektrofotometrické metody mohou určit všechny extrahovatelné fenoly nebo mohou určit specifickou fenolickou látku nebo dané třídy fenolických sloučenin, jako jsou fenolové kyseliny.

Mezi spektrofotometrické metody patří vanilínový test, Folin-Denisův test, test pruské modré a Folin-Ciocalteu test, které jsou podrobněji popsány v následujících podkapitolách [36].

2.2.7.3 Stanovení celkových polyfenolů

Test Folin-Denis

Folin-Denisův test je nejrozšířenějším postupem kvantifikace celkových fenolických látek v rostlinných materiálech a nápojích. Redukcí Folin-Denisova činidla, což je fosfomolybdenfosfowolframová kyselina v alkalickém roztoku, který obsahuje fenolické sloučenin, vzniká modrý komplex. Swain a Hillis již v roce 1959 tuto metodu modifikovali pro rutinní analýzu velkého počtu vzorků. Celkové fenoly se stanovují kolorimetricky podle metody Swain a Hillise, kdy se k 0,5 až 1,0 ml roztoku fenolů přidá 7 ml destilované vody a vzniklá směs se dobře promíchá, poté se přidá 0,5 ml Folin-Denisova činidla. Po 3 min se přidá 1 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a celkový objem se doplní destilovanou vodou na 10 ml. Po důkladném promíchání se směs nechá 1 hodinu odležet při pokojové teplotě a poté se odečte absorbance při 725 nm, proti slepému vzorku, který tvoří směs vody a uvedených činidel [36].

Test Folin-Ciocalteu

K určení celkového obsahu fenolů v potravinách se často používá Folin-Ciocalteův test. Folin-Ciocalteuovo činidlo (kyselý roztok fosforečnanu molybdenového a wolframového, který je žlutý) není specifické a detekuje všechny fenolové skupiny nacházející se v extraktech, včetně těch, které se nacházejí v extrahovatelných proteinech. Činidlo reaguje v alkalickém prostředí s fenolickými látkami za vzniku modrého molybdeno-wolframového komplexu. Postup spočívá v přípravě směsi smísením 2,5 ml 10-násobně zředěného činidla Folin-Ciocalteu, 2 ml 7,5% roztoku uhličitanu sodného a 0,5 ml roztoku fenolu. Tato směs

se 15 minut zahřívá při 45°C a poté se měří její absorbance při 765 nm opět proti slepému vzorku, který tvoří směs vody a reakčních činidel. Obsah fenolů se vyjadřuje jako ekvivalent kyseliny gallové nebo ekvivalent katechinu [36].

Katechiny jsou látky složením podobné flavonoidům, které jsou ve vyšších rostlinách značně rozšířeny. Spolu s flavonoidy patří mezi polyfenoly [37].

Test pruské modři

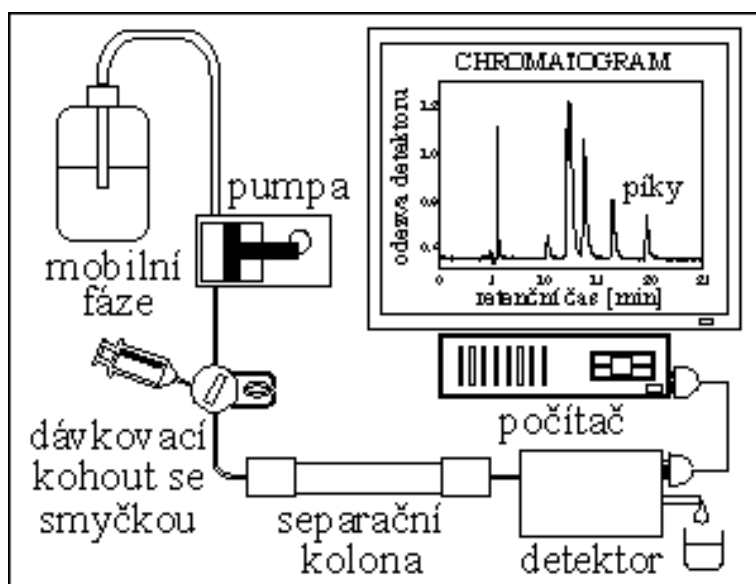
Metoda pruské modři byla navržena společností Price a Butler v roce 1977 pro stanovení fenolů ze zrna čiroku (obilovina pěstovaná například pro výrobu mouky nebo ke krmným a technickým účelům). Spočívá v redukcí železitých iontů na železnaté, polyfenolickými sloučeninami a tvorbě komplexu iont železitý-železnatý, také nazývaný pruská modř. Schopnost polyfenolických sloučenin redukovat železité ionty závisí na jejich vzorci a stupni polymerace. Citlivost této metody na flavonoidy je dostatečná pro měření koncentrací menších než 10^{-4} M. Obsah polyfenolů získaných pruským testem je vždy poněkud nižší než obsah získaný vanilinovým testem, protože katechin používaný jako standard ve vanilinovém testu může vést k nadhodnocení výsledků. Kromě toho může pruský modrý test také podceňovat výsledky, pokud jsou polyfenoly více oxidovány než katechin nebo méně reaktivní než standardní monomer [36].

Postup zahrnuje 1 minutovou rychlou extrakci fenolických sloučenin vodou, následně se ekvivalentní část extraktu zředí destilovanou vodou, aby se odstranila jakákoli rušivá barva. Poté se přidá nadbytek chloridu železitého v 0,1 M kyselině chlorovodíkové (HCl), pro zvýšení stability, aby se zajistila rychlá a úplná reakce. Vzhledem k vlastní nestabilitě zředěného roztoku chloridu železitého je nutno okamžitě přidat ferrikyanid. Polyfenolické sloučeniny se tedy testují kolorimetricky metodou Price a Butler. Kdy se k 6 ml vodného roztoku fenolů přidá 50 ml destilované vody a směs se promíchá. K tomuto roztoku se přidají 3 ml 0,1 M chloridu železitého a ihned se přidají 3 ml 0,008 M roztoku ferrikyanidu draselného. Absorbance se odečítá po 10 minutách stání při pokojové teplotě při 720 nm. Jako slepý pokus se při této metodě používá destilovaná voda [36].

2.2.7.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Protože vzorky často obsahují malé koncentrace polyfenolových látek je potřeba provést extrakci, kterou se získá zakoncentrovaný podíl analyzovaných látek. Ke stanovení polyfenolových látek se dnes nejvíce využívá vysoko účinná kapalinová chromatografie (HPLC z anglického High Performance Liquid Chromatography). Mezi její hlavní výhody patří schopnost analyzovat organické méně těkavé kapalné i tuhé látky, které jsou rozpustné ve zředěných minerálních kyselinách od desítek procent do stotisícin procenta a v rozpětí relativních molekulových hmotností (M_r) od stovky po několika stovek tisíc. Nejpřesnější měření však je při $M_r = 10^2 - 10^4$.

Metoda HPLC je založena na mnohonásobné distribuci vzorku mezi pohyblivou mobilní a nepohyblivou (tuhou) stacionární fází. Nejprve dojde k nástřiku vzorku do chromatografické kolony, kde je unášen mobilní fází ve které látky směsi migrují různou rychlostí a na koloně, která je naplněna sorbentem dojde k jejich dělení [38]. Na obrázku č. 9 je uvedeno základní schéma kapalinového chromatografu.



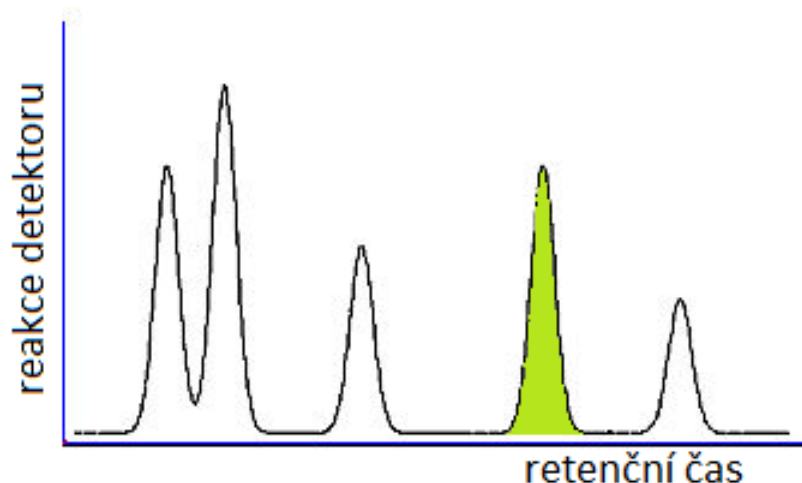
Obrázek 9 Základní schéma kapalinového chromatografu [39]

Chromatografická kolona je naplněna stacionární fází, kterou protéká mobilní fáze. Stacionární fáze je většinou na bázi silikagelu, lze použít i fázi na bázi oxidu hlinitého, oxidu zirkoničitého nebo organických polymerů. Protože má stacionární fáze malý průměr částic, je třeba mobilní fázi čerpat pomocí vysokotlakých čerpadel.

Poté, co z kolony odtéká mobilní fáze, která obsahuje již rozseparované látky analyzovaného vzorku, je zaváděna do detektoru, který detekuje jednotlivé látky. Při průchodu první složkou

vzorku detektorem dojde k zaznamenání píku (eluční vlny). Tento pík se pak tvoří při průchodu další látky kolonou. Čas, který setrvá složka vzorku v koloně závisí na velikosti interakcí látky se stacionární fází a určuje pořadí, ve kterém složka opustí kolonu. Měřením získáme závislosti signálu na čase, který se nazývá chromatogram [38].

Z chromatogramu, viz obrázek č. 10, lze zjistit kvalitativní údaj, tedy o jakou látku se jedná, pomocí polohy píku v chromatogramu (retenční čas). Kvantitativní údaj, tedy množství dané látky ve vzorku, zjistíme pomocí plochy pod píkem (na obrázku znázorněna zeleně) nebo pomocí výšky píku.



Obrázek 10 Chromatogram [38]

Eluční čas (t_R) je doba, od nástřiku vzorku do kolony po maximum píku, eluční objem (V_R) je celkový objem fáze proteklý od nástřiku vzorku po maximum píku. Eluční doba a objem jsou tím větší, čím větší je interakce látky se stacionární fází [38].

2.2.8 Stanovení glykosionátů

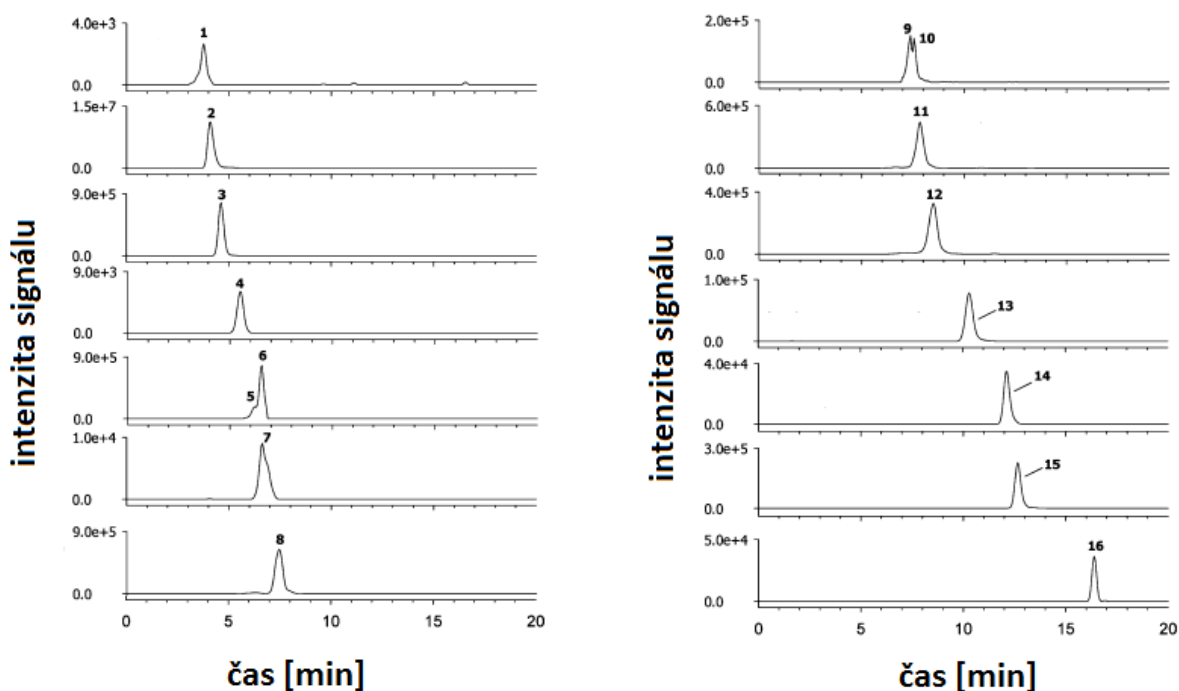
Křen je bohatým zdrojem glukosinolátů (GLS), sloučenin obsahující atom dusíku a síry. Agneta a kol. [40] se zabývali stanovením GLS ve všech částech rostliny křenu, tedy nadzemní i podzemní, a sledovali jejich koncentrace během vegetativního období. Došli k závěru, že celková koncentrace GLS je nejvyšší na začátku růstu a postupně se snižuje po celou dobu růstu rostliny.

Příprava vzorku je poměrně složitá, neboť je nutné GLS získat z matrice vzorku, která se připraví následujícím způsobem. Křen se nejprve omyje destilovanou vodou, vysuší a rychle zmrazí při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, aby se inaktivoval enzym myrosináza. Poté se lyofilizuje a homogenizuje na jemný prášek pomocí laboratorního mlýnu. Suchý vzorek se umístí do zkumavky a pro extrakci GLS se do každé zkumavky přidá 70% methanol, roztok vnitřního standardu

(jednotlivé GLS) a směs se po promíchání vaří 10 min ve vodní lázni při teplotě 75 °C. Poté se provede centrifugace a vzniklý extrakt se odpaří do sucha při 40 °C, nakonec se rozpustí v malém množství 70% roztoku methanolu a výsledný roztok se použije pro analýzu.

Zatímco kvalitativní analýza se provádí pomocí kapalinové chromatografie (LC) spojené s hmotnostní detekcí s ionizací elektrosprejem. Kvantitativní analýza se provádí pomocí vysoko účinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detekcí (HPLC-UV) vybavené detektorem diodového pole (PDA) [40,42]. Separace se provádí při laboratorní teplotě na koloně Discovery C18 a látky jsou identifikovány za použití MS detektoru: iontové cyklonové rezonance s fournierovou transformací s ionizací elektrosprejem (ESI-FTICR). Mobilní fázi tvoří vodný roztok kyseliny mravenčí (rozpouštědlo A) a acetonitril (rozpouštědlo B). Používá se gradientová eluce a analýza trvá přibližně 20 min.

Na následujícím obrázku č. 11 jsou píky, které odpovídají 16ti různým GLS které lze najít v křenu s retenčními časy od 3,8 do 16,7 minut [40,41].



Obrázek 11 GLS v extraktu z křenu: glucoiberin (1), sinirgin (2), 2-methylsulfonyloxyethyl-GSL (3), glukonapin (4), glukochlearin (5), glukonringianin (6), glukosativin (7), glukobinin (8), 4-hydroxyglukobrasicin (9), 5-hydroxyglukobrassicin (10), glukokapparili nebo glukobrassicanapin (11), glucotropaeolin (12), glucobrassicin (13), gluconasturtiin (14), 4-methoxyglukobrassicin (15) a glucoarabishirsutain (16) [40].

Molekulové vzorce, triviální názvy a retenční čas 16 GLS zjištěných v částech křenu, jsou včetně rozdělení do tříd uvedeny v tabulce č. 6. Mezi sledované třídy tedy patří GLS alifatické,

aromatické a indolové. V nadzemních částech rostliny se vyskytuje více než 98 % GLS alifatických, v kořenech je to více než 73 % celkového obsahu GLS. Naproti tomu obsah aromatických a indolových GLS se výrazně snižoval po celou dobu vývoje a významně vzrostl jen u kořenů. Obě třídy GLS jsou přítomny v přibližně stejných úrovních v obou částech rostliny (každá v průměru asi 1 % v nadzemních částech a 8 % v kořenech).

Počet GLS se lišil mezi jednotlivými částmi rostlin, tedy jak u kořenů, tak u listů. Mladé listy obsahovaly 16 GLS, zatímco dospělé (vyrostlé) kořeny pouze 11. V kořenech nebyl nalezen glukonapin (4), glukochlearin (5), glukonringianin (6), glucotropaeolin (12) [40,42].

Tabulka 6 Molekulové vzorce, triviální názvy a retenční časy GLS přítomných v křenu [40]

Třída	Pík	Molekulový vzorec	Triviální název	Retenční čas [min]
alifatické	1	$C_{11}H_{21}NO_{10}S_3$	glucoiberin	4,3
	2	$C_{10}H_{17}NO_9S_2$	sinigrin	4,4
	3	$C_{10}H_{17}NO_{12}S_3$	2-methylsulfonyloxyethyl-GLS	4,6
	4	$C_{11}H_{19}NO_9S_2$	Gluconapin	5,5
	5	$C_{11}H_{21}NO_9S_2$	Glucocochlearin	6,2
	6	$C_{11}H_{21}NO_9S_2$	Glucoconringianin	6,4
	7	$C_{11}H_{21}NO_9S_3$	Glucosativin	6,5
	8	$C_{15}H_{29}NO_{10}S_3$	Glucoibarin	7,3
	9	$C_{12}H_{21}NO_9S_2$	glukokapparili nebo glukobrassicinapin	7,8
	10	$C_{15}H_{29}NO_9S_3$	glucoarabishirsutain	16,7
aromatické	11	$C_{14}H_{19}NO_9S_2$	Glucotropaeolin	8,5
	12	$C_{15}H_{21}NO_9S_2$	Gluconasturtiin	12,1
indolové	13	$C_{16}H_{20}N_2O_{10}S_2$	4-Hydroxyglucobrassicin	7,4
	14	$C_{16}H_{20}N_2O_{10}S_2$	5-hydroxyglukobrassicin	7,5
	15	$C_{16}H_{20}N_2O_9S_2$	Glucobrassicin	10,3
	16	$C_{17}H_{22}N_2O_{10}S_2$	4-Methoxyglucobrassicin	12,7

Jiný způsob stanovení spočívá v tom, že se vzorky křenu po sklizni zmrazí v tekutém dusíku a skladují při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ maximálně týden. Zmrazené vzorky se poté rozemelou na jemný prášek pomocí mlýnu a takto připravené se mohou skladovat maximálně měsíc. Pro analýzu

pomocí HPLC se práškový vzorek smísí s roztokem methanolu a 10 min se zahřívá při 95 °C. Po pěti minutovém chlazení ledem se přidá vnitřní standard (benzyl- GLS) a provede se centrifugace směsi. Supernatant, tedy tekutina, se přelije do zkumavky a zbytek se opět extrahuje roztokem methanolu. Vzniklý extrakt se vysráží pomocí směsi octanu olovnatého a octanu barnatého, aby se odstranili bílkoviny. Získaný filtrát se po centrifugaci nadávkuje do kolonky C18 obsahující pryskyřici DEAE Sephadex A-25 pro desulfaci s arylsulfatásou na 18 hod. Desulfované vzorky se z kolony vymývají pomocí destilované vody. Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí kapalinové chromatografie na oktadecylsilikagelové koloně s UV detekcí (229 nm) a hmotností detekcí (Q-TOF). Koncentrace GS se vyjadřuje v mikromolech na 1 gram sušiny vzorku. Nejnížší koncentrace sinigrinu, které byly zjištěny, byly 41 $\mu\text{mol/g}$ sušiny vzorku a nejvyšší 80,3 $\mu\text{mol/g}$ sušiny. Koncentrace glukonasturinu byly v rozmezí 3,77 až 10 $\mu\text{mol/g}$ sušiny. Dalším GLS byl glukobrassicin, jehož koncentrace byly od 0,16 do 2,07 $\mu\text{mol/g}$ sušiny. Při této studii byly zjištěny i koncentrace isothiokyanátů, které byly v rozmezí od 37,4 do 47,1 $\mu\text{mol/g}$ sušiny[43].

2.2.9 Stanovení isothiokyanátů

Výraznou chuť křenu způsobují isothiokyanáty, které se uvolňují hydrolýzou z glykosionátu sinigrinu enzymovou myrosionásou.

Měření čistoty ITC se provádí pomocí plynové chromatografie, pro kterou se používá plynový chromatograf série Agilent 6850 vybavený plamenovým ionizačním detektorem (FID) a kapilární kolonou z oxidu křemičitého DB-WAX (30 m x 0,25 mm, tloušťka filmu 0,25 μm). Nástřik vzorku probíhá při teplotě 210 °C a jako mobilní fáze se používá helium. [44].

2.2.10 Stanovení glykosinolátů a isothiokyanátů kapilární elektroforézou

Kapilární elektroforéza (CE) je velmi zajímavou alternativou pro analýzu glykosinolátů, měření aktivity myrosinázy a stanovení isothiokyanátů, protože vyžaduje minimální množství vzorku a skládá se pouze z několika kroků. ITC mají obvykle špatnou UV detekovatelnost, ale mohou být stále určeny po derivatizaci. Tento postup se používá právě pro zvýšení citlivosti a umožnění detekce či separace, nebo k zamezení nežádoucí sorpce látek v kapiláře. U stanovení ITC se derivatizace provádí hydrolýzou na aminy a následným přidáním fluoroforu do molekuly. Ovšem tento postup není možný pro měření aktivity enzymů.

Cílem studie Sándor a kol. [45] bylo vyvinout rychlou a jednoduchou metodu využívající kapilární elektroforézu, konkrétně micelární elektrokinetickou chromatografii (CE-MEKC), pro stanovení glukosinolátů a ITC se zaměřením na sinigrin, allyl isothiokyanát, a gluconasturtiin. Poté byla metoda použita pro určení obsahu glukosinolátů v rostlinách, aktivitu enzymu myrosinázy a rychlosti uvolňování ITC v různých rostlinných extraktech [45].

Pro stanovení aktivity bylo asi 15 g rostlinného materiálu homogenizováno v mlýnech po přidání fosfátového pufru při teplotě 4 °C. Poté byla směs centrifugována a filtrována. Suplementy byly použity pro měření aktivity. Naopak pro stanovení GLS bylo do zkumavky vloženo 10 g rostlinného materiálu a ponořeno do vodní lázně na 30 min, aby došlo k úplné inaktivaci enzymu myrosinázy. Poté se do vařeného rostlinného materiálu přidalo 10 ml methanolu, následovala důkladná homogenizace a centrifugace při 13 000 otáčkách za minutu po dobu 3 minut. Supernatant byl ze zkumavky odpipetován a odpařen dosucha. Před analýzou pomocí CE byly tyto vysušené extrakty rozpuštěny ve vodě a centrifugovány.

Vývoj metod byl prováděn na kapilární elektroforéze PrinCE-C 700, kdy byly použity křemenné kapiláry o délce 60 cm s vnitřním průměrem 50 µm. Na stanovení aktivity a ITC byla testována kratší i delší délka kapiláry vzhledem k detekčnímu okénku. Pokud byl vzorek dávkován na kratším konci, tak byla efektivní délka kapiláry, ve které probíhala separace 7,2 cm. Na druhou stranu při dávkování na delším konci byla efektivní délka kapiláry 52,8 cm. Při stanovení GLS a ITC z křenu bylo zjištěno, že metoda s použitím delší kapiláry separuje látky do 15ti minut. Jedná se tedy o velmi rychlou metodu, jejíž výhodou je i minimální použití rozpouštědel oproti HPLC.

Methanolické extrakty byly stanoveny pro obsah glukosinolátu (sinigrinu a gluconasturtiinu) navrhovanou CE. Stejně extrakty byly testovány na sinigrin a gluconasturtiin pomocí LC-ESI-MS a získané hodnoty byly porovnány. Bylo zjištěno, že obsah glukosinolátů, měřených oběma metodami, tedy metodou kapilární elektroforézy (CE) a metodou LC-ESI-MS, je velmi odlišný. Získané naměřené hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce [45].

Tabulka 7 Obsah GLS- sinirginu a gluconasturinu v křenu selském [45]

Sinirgin [µg/g]		Gluconasturin [µg/g]	
CE	LC-ESI-MS	CE	LS-ES-MS
2 291,8	2 784,4	248,5	244,3

3 ZÁVĚR

Cílem práce bylo vypracovat rešerši zabývající se složením křenu selského a možnostmi stanovení těchto látek. Křen patří společně s wasabi, hořčicí, zelím, brokolicí a dalšími druhy zeleniny do čeledi Brassicaceae. Je to štiplavá rostlina, která má řadu pozitivních účinků. Například zdravotní účinky, kdy se doporučuje na vyšší krevní tlak, protože podporuje krevní oběh, povzbuzuje žaludeční a střevní činnosti tím, že stimuluje produkci trávicích šťáv a zvyšuje tak vstřebatelnost živit v organismu. Pro svůj vyšší obsah vitamínu C má pozitivní účinek i na náš imunitní systém. Snad nejvíce pozoruhodné je, že křen může zabránit rakovině kvůli jeho extrémně vysokým hladinám glukosinolátů. Na druhou stranu má i negativní účinky. Nadměrná konzumace může způsobit poškození sliznice a působí dráždivě na pokožku, kdy může vyvolat až puchýře. Většina zdravotních přínosů je díky vysokému obsahu živin a minerálů, zejména vitamínu C, kyseliny listové, draslíku, vápníku, síry a hořčíku. Z organických chemických látek obsahuje enzym peroxidázu a hořčičné oleje, které vznikají rozkladem glykosionátů.

V druhé části práce jsou rozebrány různé metody, kterými lze složky křenu analyzovat. Pro stanovení fenolických látek existují různé metody, které se mohou dělit na ty, kterými se zjistí celkový fenolický obsah nebo ty, kterými se dokáže určitá skupina nebo třída fenolických sloučenin. Folin Denisův test a pruský modrý test jsou příklady metod používaných pro úplné stanovení fenolů. Naproti tomu vanilinový test se používá jako metoda stanovení katechinů a proanthokyanidinů. Protože křen obsahuje malé koncentrace polyfenolových látek je potřeba provést extrakci, kterou se získá zakoncentrovaný podíl analyzovaných látek. Ke stanovení polyfenolových látek se dnes nejvíce využívá vysoko účinná kapalinová chromatografie, která umožňuje analyzovat organické méně těkavé kapalné i tuhé látky, které jsou rozpustné ve zředěných minerálních kyselinách od desítek procent do stotisícin procenta.

Kapilární elektroforéza (CE) je velmi zajímavou alternativou pro analýzu glykosinolátů, měření aktivity myrosinásy a stanovení isothiokyanátů, protože vyžaduje minimální množství vzorku a skládá se pouze z několika kroků.

4 POUŽITÁ LITERATURA

1. *Vegmania: Křen* [online]. Dostupné z: <http://www.vegmania.cz/vegedie/kren>.
2. DOLEJŠÍ, Antonín. *Zelenina na zahrádce*. 5. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1987, 216 s.
3. KOSSON, Ryszard a Marcin HORBOWICZ. *Effect of Long Term Storage on Some Nutritive Components and Isothiocyanates Content in Roots of Two Horseradish Types*. *Vegetable Crops Research Bulletin*. 2008-01-1, **69**. DOI: 10.2478/v10032-008-0030-3.
4. Hodnoty složení: čerstvý křen. In: *Table Ciqual*. Francie: Francie, 2016. Dostupné z: <https://pro.anses.fr/tableciqual/index.htm>.
5. VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 2*. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-902391-4-5.
6. KORECKÁ Lucie. *Potravinářská biochemie. Přednášky Univerzity Pardubice*. Dostupné z: studijní portál Univerzity Pardubice <https://portal.upce.cz/portal/>.
7. HLÚBIK, Pavol a Libuše OPLTOVÁ. *Vitamíny*. Praha: Grada. ISBN 80-247-0373-4.
8. HÁJEK Tomáš. *Analýza potravin. Přednášky Univerzity Pardubice*. Dostupné z: studijní portál Univerzity Pardubice <https://portal.upce.cz/portal/>.
9. ALNSOUR, Mohammad, Maik KLEINWÄCHTER, Julia BÖHME a Dirk SELMAR. *Sulfate determines the glucosinolate concentration of horseradish in vitro plants *Armoracia rusticana* Gaertn., Mey.* *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013, **93**(4), 918-923. DOI: 10.1002/jsfa.5825.

10. HANSCHEN, Franziska S., Anna BAUER, Inga MEWIS, Claudia KEIL, Monika SCHREINER, Sascha ROHN a Lothar W. KROH. *Thermally Induced Degradation of Aliphatic Glucosinolates: Identification of Intermediary Breakdown Products and Proposed Degradation Pathways*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2012, **60**(39), 9890-9899. DOI: 10.1021/jf302744y.
11. VEITCH, Nigel C. *Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme*. Phytochemistry. 2004, **65**(3), 249-259.
DOI: 10.1016/j.phytochem.2003.10.022
12. LAVERY, Christopher B., Morgan C. MACINNIS, M. Jason MACDONALD, Joanna Basseby WILLIAMS, Colin A. SPENCER, Alicia A. BURKE, David J. G. IRWIN a Godwin B. D'CUNHA. *Purification of Peroxidase from Horseradish (Armoracia rusticana) Roots*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2010, **58**(15), 8471-8476. DOI: 10.1021/jf100786h.
13. BODLÁK, Jiří. *Zdraví máme na talíři: Léčivé i škodlivé účinky potravin*. Příbram: PBtisk, 2002. ISBN 80-7296-016-4.
14. KORBELÁŘ CSS., MUDr. Jaroslav a Zdeněk ENDRIS. *Naše rostliny v lékařství*. 4. Praha: Avicenum, Zdravotnické nakladatelství, 1973. ISBN 08-092-81.
15. LI, Xian a Mosbah M. KUSHAD. *Correlation of Glucosinolate Content to Myrosinase Activity in Horseradish (Armoracia rusticana)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004, **52**(23), 6950-6955. DOI: 10.1021/jf0401827.
16. PEKÁRKOVÁ, E. *Pěstujeme mrkev, ředkvičky, celer a další kořenové zeleniny*. 1.vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2004. 100 s. ISBN 80-247-0744-6.
17. DUFEK, Oldřich. *Zelenina a ovoce v kuchyni*. Praha: Svépomoc, 1989. ISBN 80-7063-004-3.

18. SCHLETT, Siegfried. *100 potravin pro zdraví*. V Praze: Ikar, 2008. ISBN 978-80-249-0991-2.
19. ČERVENÁ, Drahomíra a Karel ČERNÝ. *Léčba výživou: Encyklopedie léčivých potravin*. 2. Martin (SK): Neografie, 2002. ISBN 80-88892-49X
20. JANG, Miran, Eunyoung HONG a Gun-Hee KIM. *Evaluation of Antibacterial Activity of 3-Butenyl, 4-Pentenyl, 2-Phenylethyl, and Benzyl Isothiocyanate in Brassica Vegetables*. Journal of Food. 2010, **75**(7), 412-416. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01833.
21. SHIN, Il-Shik, Jung-Su HAN, Kyu-Duck CHOI, Dong-Hwa CHUNG, Geun-Pyo CHOI a Juhee AHN. *Effect of isothiocyanates from horseradish (Armoracia rusticana) on the quality and shelf life of tofu*. Food Control. 2010, **21**(8), 1081-1086. DOI: 10.1016/j.foodcont.2009.12.030.
22. THOMSONE, Lotila, Ruta GALO BURDA. *Comparison of Different Solvents and Extraction Methods for Isolation of Phenolic Compounds from Horseradish Roots (Armoracia rusticana)*. World Academy of Science, Engineering and Technology. 2012, **6**(4), 236-241.
23. VELIOGLU, Y. S., G. MAZZA, L. GAO a B. D. OOMAH. *Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1998, **46**(10), 4113-4117. DOI: 10.1021/jf9801973.
24. Léčivé bylinky - zdraví z přírody: přehled léčivých rostlin, jejich vlastností a použití. *Křen selský*. Dostupné z: <http://lecive-bylinky.celyden.cz/kren-selsky/>.
25. GUMOWSKÁ, Irena. *Zdraví na talíři: o výživných a léčivých vlastnostech bylin, ovoce a zeleniny*. Praha: ČTK Respo, 1994. ISBN 80-204-0486-4.
26. Bylinky pro všechny. *Křen - účinky na zdraví, co léčí, použití, užívání, využití*. Olomouc, 2010. Dostupné z: <http://www.bylinkyprovsechny.cz/ovoce-zelenina/zelenina/96-kren-ucinky-na-zdravi-co-leci-pouziti-uzivani-vyuziti>.

27. KOPLÍK, Richard. *Základy analýzy potravin: Přednášky z VŠCHT Praha*. Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~koplkr/>.
28. *Laboratoře - metrologie: Prodej a servis laboratorní techniky, kalibrace, validace, teplotní mapy*. Brno. Dostupné z: <http://www.labmet.cz/merici-pristroje/vahy/vahy-pro-stanoveni-susiny-kern>.
29. Extrakce. *ELUC*. Olomoucký kraj. Dostupné z: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/2264>.
30. DAVÍDEK, Jiří a Kolektiv. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1977.
31. MCCLEARY, Barry V. *Dietary fibre analysis*. Proceedings of The Nutrition Society. 2003, **62**(01), 3-9. DOI: 10.1079/PNS2002204.
32. RÉBLOVÁ, Zuzana. *Vliv vnějších faktorů na aktivitu antioxidantů*. Chemické listy. 2011, **105**, 667-673, ISSN 0009-2770.
33. PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. *Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro*. Chemické listy. 2004, **98**, 174-179, ISSN 0009-2770.
34. KARABÍN, Marcel, Pavel DOSTÁLEK a Pavel HOFTA. *Přehled metod pro stanovení antioxidační aktivity v pivovarnictví*. Chemické listy. 2006, **100**, 184-189, ISSN 0009-2770.
35. DPPH. *Everithing*. Dostupné z: http://www.keywordsuggests.com/0zRspVdXEi*yMgY2r8AneDqddqI9yMoFiGTvLMmOufE/
36. FERREDOON, Shahid, AND MARIAN NACZK. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. 2nd ed. London: CRC Press, 2003.

37. Zelený čaj pro relaxaci i zdraví. *ChemPoint: Vedci pro průmysl a praxi*. Brno. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/zeleny-caj-pro-relaxaci-i-zdravi>.
38. HOLZBECHER, Závaš a Jaroslav CHURÁČEK. *Analytická chemie*. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1987. ISBN 04-612-87.
39. Karlova Univerzita: *High Performance Liquid Chromatography HPLC*. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>.
40. AGNETA, Rosa, Anna Rita RIVELLI, Emanuela VENTRELLA, Filomena LELARIO, Giulio SARLI a Sabino Aurelio BUFO. *Investigation of Glucosinolate Profile and Qualitative Aspects in Sprouts and Roots of Horseradish (*Armoracia rusticana*) Using LC-ESI-Hybrid Linear Ion Trap with Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry and Infrared Multiphoton Dissociation*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, **60**(30), 7474-7482. DOI: 10.1021/jf301294h.
41. CATALDI, Tommaso R. I., Filomena LELARIO, Donatella ORLANDO a Sabino A. BUFO. *Collision-Induced Dissociation of the A 2 Isotope Ion Facilitates Glucosinolates Structure Elucidation by Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry with a Linear Quadrupole Ion Trap*. *Analytical Chemistry*. 2010, **82**(13), 5686-5696. DOI: 10.1021/ac100703w.
42. DE MARIA, Susanna, Rosa AGNETA, Filomena LELARIO, Christian MÖLLERS a Anna Rita RIVELLI. *Influence of nitrogen and sulfur fertilization on glucosinolate content and composition of horseradish plants harvested at different developmental stages*. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2016, **38**(4). DOI: 10.1007/s11738-016-2110-1.
43. KU, Kang-Mo, Elizabeth H. JEFFERY, John A. JUVIK a Mosbah M. KUSHAD. *Correlation of Quinone Reductase Activity and Allyl Isothiocyanate Formation Among Different Genotypes and Grades of Horseradish Roots*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015, **63**(11), 2947-2955. DOI: 10.1021/jf505591z.

44. TERADA, Yuko, Hideki MASUDA, Tatsuo WATANABE a Mosbah M. KUSHAD. *Structure–Activity Relationship Study on Isothiocyanates: Comparison of TRPA1-Activating Ability between Allyl Isothiocyanate and Specific Flavor Components of Wasabi, Horseradish, and White Mustard*. Journal of Natural Products. 2015, **78**(8), 1937-1941. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00272.
45. GONDA, Sándor, Attila KISS-SZIKSZAI, Zsolt SZÜCS, Nhat Minh NGUYEN a Gábor VASAS. *Myrosinase Compatible Simultaneous Determination of Glucosinolates and Allyl Isothiocyanate by Capillary Electrophoresis Micellar Electrokinetic Chromatography (CE-MEKC)*. Phytochemical Analysis. 2016, **27**(3-4), 191-198. DOI: 10.1002/pca.2615.