

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Michaela Krocová

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko – technologická

Stanovení biologicky aktivních látek obsažených v merlíku čilském

Bakalářská práce

2023

Michaela Krocová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Michaela Krocová**
Osobní číslo: **C20117**
Studijní program: **B0531A130025 Chemie**
Téma práce: **Stanovení biologicky aktivních látek obsažených v merlíku čilském**
Téma práce anglicky: **Determination of biological active compounds in quinoa**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na využití moderních analytických technik v analýze fenolických látek s antioxidačním účinkem v merlíku čilském (quinoa). Zaměřte se na úpravu vzorku před analýzou a analýzu různých typů extraktů pomocí separačních technik v kapalné fázi. Věnujte se rovněž spektrofotometrickým technikám pro sledování antioxidační kapacity vzorku.
2. Poznatky z literatury využijte pro analýzu antioxidační kapacity extraktů připravených z výše zmíněné pseudoobiloviny pomocí spektrofotometrických metod.
3. Výsledky prezentované v literatuře porovnejte a kriticky zhodnoťte.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **7. února 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Stanovení biologicky aktivních látek obsažených v merlíku čilském 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 27. 06. 2023

Michaela Krocová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí práce doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za odborné vedení, věnovaný čas strávený při konzultacích, ochotu, trpělivost a o cenné rady při vypracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přítelovi za podporu během mého studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se věnuje stanovením biologicky aktivních látek obsažených v merlíku čilském pomocí moderních analytických metod. Nejprve je uveden popis merlíku čilského, chemické složení, zpracování a jeho využití. Dále jsou také uvedeny pozitivní účinky na zdraví a stručně popsány teoretické základy separačních technik v kapalně fázi a metod sledujících antioxidační aktivitu látek. Experimentální část práce je věnována stanovení antioxidační kapacity extraktů připravených z merlíku čilského pomocí spektrofotometrických metod.

KLÍČOVÁ SLOVA

Merlík čilský, antioxidační aktivita, extrakce, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

TITLE

Analysis of biologically active compounds of quinoa using modern analytical methods

ANNOTATION

This bachelor thesis is devoted to the determination of biologically active substances contained in Quinoa using modern analytical methods. Firstly, a description of quinoa, its chemical composition, processing, and uses is given. The health benefits are also presented and the theoretical basis of liquid phase separation techniques and methods monitoring the antioxidant activity of the compounds are briefly described. The experimental part of the work deals with the determination of the antioxidant capacity of extracts prepared from quinoa by spectrophotometric methods.

KEYWORDS

Quinoa, antioxidant activity, extraction, high performance liquid chromatography

OBSAH

ÚVOD	13
1 Teoretická část	14
1.1 QUINOA.....	14
1.1.1 Charakteristika	14
1.1.2 Pěstování a zpracování	15
1.1.3 Saponiny	16
1.1.4 Chemické složení	16
1.2 Antioxidanty	19
1.2.1 Fenolické látky	20
1.3 Úprava vzorku	23
1.3.1 Extrakce kapalina-kapalina	23
1.3.2 Extrakce na pevné fázi	24
1.3.3 Soxhletova extrakce	24
1.4 Stanovení celkového obsahu fenolických látek a flavonoidů	25
1.4.1 Metoda dle Folin-Ciocalteua	25
1.4.2 Celkový obsah flavonoidů.....	25
1.5 Stanovení antioxidační kapacity.....	25
1.5.1 Metoda DPPH	25
1.5.2 Metoda ABTS	26
1.5.3 Metoda FRAP.....	27
1.5.4 Metoda ORAC.....	27
1.6 Separční techniky	27
1.6.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	27
1.6.2 Plynová chromatografie	28
1.7 Analýza quinoy či jiných pseudoobilovin.....	30
1.7.1 Úprava a extrakce vzorků	30
1.7.2 Stanovení antioxidační kapacity	31
1.7.3 Stanovení antioxidantů pomocí chromatografických technik	31
1.8 Pozitivní účinky a využití quinoy pro lidský organismus	32
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34

2.1 Pomůcky a použité chemikálie	34
2.1.1 Chemikálie	34
2.1.2 Pomůcky	34
2.1.3 Zařízení	35
2.2 Vzorky.....	35
2.3 Pracovní postupy.....	36
2.3.1 Úprava a extrakce vzorků	36
2.3.2 Spektrofotometrické metody	37
3 VÝSLEDKY A DISKUZE	38
3.1 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS.....	38
3.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH.....	40
3.3 Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP.....	43
3.4 Stanovení celkového obsahu fenolických látek	45
ZÁVĚR.....	47
POUŽITÁ LITERATURA	48

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Rostlina merlíku čilského [8]	14
Obrázek 2: Semena quinoj [9]	15
Obrázek 3: Struktura kyselin odvozených od kyseliny benzoové [19]	20
Obrázek 4: Struktura kyselin odvozených od kyseliny skořicové [19]	20
Obrázek 5: Zrna kaňiwa (<i>Chenopodium pallidicaule</i>) [23]	21
Obrázek 6: Rostlina kiwicha (<i>Laskavec ocasatý Amaranthus caudatus</i>) [22]	21
Obrázek 7: Základní struktura flavonoidů [24]	22
Obrázek 8: Soxhletův extraktor [46]	24
Obrázek 9: Strukturní vzorec Troloxu	26
Obrázek 10: Strukturní vzorec TPTZ	27
Obrázek 11: Schéma kapalinového chromatografu	28
Obrázek 12: Schéma plynové chromatografie	29
Obrázek 13: Plamenově ionizační detektor	29
Obrázek 14: Naklíčená semena quinoj [48]	33
Obrázek 15: Salát z vařené quinoj [49]	33
Obrázek 16: Závislost úbytku absorbance v procentech na době reakce pro metodu ABTS ...	38
Obrázek 17: Kalibrační křivka závislosti úbytku A na množství Troloxu v dávkovaném objemu pro metodu ABTS	39
Obrázek 18: Antioxidační aktivita různých extraktů získaných ze vzorků quinoj pomocí metody ABTS	39
Obrázek 19: Závislost úbytku absorbance v procentech na době reakce pro metodu DPPH ...	41
Obrázek 20: Kalibrační křivka v závislosti úbytku A na množství Troloxu v dávkovaném objemu pro metodu DPPH	41
Obrázek 21: Antioxidační aktivita různých extraktů získaných ze vzorků quinoj pomocí metody DPPH	42
Obrázek 22: Kalibrační křivka v závislosti úbytku A na množství Troloxu v dávkovaném objemu pro metodu FRAP	43
Obrázek 23: Antioxidační aktivita různých extraktů získaných ze vzorků quinoj pomocí metody FRAP	44
Obrázek 24: Kalibrační křivka v závislosti úbytku A na množství kyseliny gallové v dávkovaném objemu	45

Obrázek 25 :Antioxidační aktivita různých extraktů získaných ze vzorků quinoj pomocí Folin-Ciocalteuova činidla	46
---	----

Tabulka 1: Přibližné chemické složení quinoj (tepelně neupravené) ve srovnání s bílou rýží (střednězrnnou, syrovou, neobohacenou) a žlutým kukuřičným zrnem [14].	17
---	----

Tabulka 2: Výživové hodnoty ve 100 g vzorku, údaj z obalu výrobku.....	35
--	----

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AAPH	[2,2'-azobis-2-amidinopropan hydrochlorid]
Abs	absorbance
ABTS	[2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)]
DPPH	[1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl) hydrazyl]
DPPH-H	difenylypikrylhydrazyl
Fe ³⁺ TPTZ	Fe ³⁺ -2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin
FRAP	metoda stanovení antioxidační aktivity založená na redukci železitých komplexů (Feric reducing antioxidant potential)
GAE	ekvivalent kyseliny gallové
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ORAC	metoda stanovení antioxidační aktivity založená na zhášení
SPE	extrakce na tuhém sorbentu
TAA	celková antioxidační aktivita
TEAC	antioxidační kapacita ekvivalentní standartní látce Troloxu
TFC	celkový obsah flavonoidů
TPC	celkový obsah fenolických látek (Total phenolic content)

ÚVOD

Merlík čilský jiným názvem Quinoa patří do čeledi laskavcovitých rostlin. Přirozeně se vyskytuje v Jižní Americe v oblastech And, především v oblasti Peru, Chile, Brazílii či Kolumbii. Nemá na pěstování příliš velké nároky, lze ho pěstovat v jakémkoli kontinentu bez ohledu na terén nebo pH substrátu. Quinoa se řadí společně například s amarantem a pohankou mezi pseudoobiloviny. Při užívání quinoj a jeho extraktů byly zaznamenány pozitivní léčivé účinky na lidský organismus, obsahuje správně vyvážený obsah všech živin nezbytných pro správné fungování našeho těla. Využívá se především pro jeho antioxidační vlastnosti, které zmírňují v těle oxidační stres.

Quinoa je bohatým zdrojem biologicky aktivních látek, převážně sacharidů, lipidů, vitamínů, aminokyselin, mastných kyselin, fenolů, polyfenolů a dalších. Látky s antioxidačními účinky můžeme analyzovat pomocí různých spektrofotometrických metod. Nejvíce používané jsou DPPH nebo ABTS. Pro zjištění přesného složení se využívají chromatografické metody. Množství biologicky aktivních látek se může lišit v závislosti na tom, jaké jsou klimatické podmínky, poddruh rostliny, doba sklizně a zralost. Každá část rostliny (zrna, listy nebo klíčky) je cenná a využitelná.

Zrna quinoj se vyznačují jemnou oříškovou chutí. Proto se skvěle hodí jako příloha k hlavnímu jídlu, lze ji využít i k přípravě dezertů a salátů.

1 Teoretická část

1.1 QUINOA

1.1.1 Charakteristika

Quinoa (merlík čilský, *Chenopodium quinoa*) je jednoletá dvouděložná bylina (Obrázek 1), která před mnoha lety vznikla v andských komunitách. Vyznačuje se vysokou odolností vůči zasolení, suchu a chladu, proto se tato pseudoobilnina z čeledi laskavcovitých (*Amaranthaceae*) může pěstovat v různých klimatických oblastech [1].

Význam semen quinoj jako zdroj potravy je dán její vysokou nutriční hodnotou. Quinoa je bohatá na bílkoviny, nenasycené mastné kyseliny, vitamíny, minerály, vlákninu a další živiny. Kromě toho je dobře vyvážená a bohatá na esenciální aminokyseliny. Má nízký obsah tuku, cukru a nulový obsah cholesterolu. Merlík čilský obsahuje také mnoho bioaktivních složek, jako jsou proteinoaktivní peptidy, polyfenoly a saponiny. Semena quinoj jsou oválná a dvoudomá o průměru přibližně 1,4-1,6 mm mají navíc vynikající podíl škrobu a neutrálních lipidů. Jsou dokonalým příkladem funkční potravy, snižují riziko různých onemocnění a působí pozitivně na zdraví člověka. Zelené listy, klíčky a mikroklíčky quinoj jsou stejně tak jako zrna quinoj nutričně bohaté a zdraví prospěšné, vykazují antimikrobiální, protirakovinné, antidiabetické, antiobezitní, antioxidační a kardioaktivní účinky. Díky své nutriční hodnotě je považována za víceúčelovou zemědělskou plodinu a díky absenci lepku je vhodná i pro lidi trpící celiakií [2-5].



Obrázek 1: Rostlina merlíku čilského [8]

Zrna merlíku čilského jsou potažena saponiny ve formě triterpenových glykosidů, které dodávají semenům nežádoucí hořkou chuť [6].

Každá z odrůd quinoj má svou specifickou barvu, přičemž hlavní komerční odrůdy mají žlutou (bílou), červenou nebo černou barvu (Obrázek 2). Rozmanitost barev přítomných mezi semeny je dána pigmentem betaninem a jeho izomerem izobetaninem, které řadíme pod specifickou skupinu fytochemikálií [7].



Obrázek 2: Semena quinoj [9]

1.1.2 Pěstování a zpracování

Merlík čilský roste ve velmi odlišných klimatických podmínkách. Je to plodina odolná vůči suchu a s nízkými nároky na vodu. Je schopna růst v oblastech, kde se roční úhrn srážek pohybuje v rozmezí 200-400 mm, ale lze ji pěstovat i v jižním Chile, kde roční úhrn srážek dosahuje až 3000 mm. Silná tolerance byla prokázána i vůči dalším stresovým podmínkám, jako jsou slané půdy a chladné klima. Lze ji pěstovat na různých typech půd, včetně okrajových půd, v širokém rozmezí zasolení půdy (od pH 6,0 do 8,5). Kromě toho snáší široké rozmezí teplot od přibližně -1 do 35 °C. Škodlivé účinky zasolení na růst rostlin jsou spojeny s nízkým vodním potenciálem půdního roztoku (vodní stres), nerovnováhou ve výživě, specifickými účinky iontů (solný stres) nebo kombinací těchto různých faktorů. Během vzniku a rozvoje solného stresu v rostlině jsou ovlivněny všechny hlavní procesy. Abiotické stresy mohou také způsobit významné změny v obsahu a složení sekundárních metabolitů. Typickým příkladem jsou polyfenolické látky [10, 11].

Tradičně se vaří jako celá zrna, podobně jako rýže, nebo se mele na mouku a vyrábí se z ní těstoviny nebo chléb. Mimo to lze quinou zpracovávat extruzí, sušením v bubnu či autoklávováním. Mezi komerční výrobky řadíme těstoviny, chléb, sušenky, muffiny, cereálie, nápoje, vločky, dětská výživa a různé doplňky stravy [12].

1.1.3 Saponiny

Zrna jsou obalena saponiny, které patří do třídy triterpenových glykosidů. Jsou hořké a pěnové, a proto musí být z povrchu důkladně opláchnuty, aby si zrna zachovala dobrou chuť. Pěstování quinoe je tedy zatíženo vysokou spotřebou vody, což může v dnešní době, kdy jsou zásoby vody omezené, působit nemalé potíže [13,14].

Množství saponinů v quinoe je ovlivněno vývojovou fází plodiny, které je nízké v době větvení a zvýšené v době kvetení. Sucho může způsobit pokles tvorby saponinů až o 45 %. Pokud quinoa obsahuje nízkou koncentraci saponinu znamená to, že její semena mají sladkou chuť. Saponiny se také uplatňují jako silný insekticidní nebo obranný účinek vůči komplexní škále býložravců, např. ptákům, hmyzu, a dokonce i mikrobiálním infekcím [15].

1.1.4 Chemické složení

Přestože quinoa není tak rozšířená jako pšenice nebo žito, zájem o její konzumaci postupně roste díky jejímu atraktivnímu nutričnímu složení. Její semena vykazují úplnou absenci lepku, vysoký obsah mastných kyselin, vitamínů, minerálních látek, vlákniny a bílkovin s větším množstvím aminokyselin. Kromě tohoto bohatého nutričního složení bylo zjištěno, že semena obsahují velké množství bioaktivních látek, jako jsou karotenoidy, vitamin C a fenolické sloučeniny, které mají antikarcinogenní, antialergické a protizánětlivé účinky a také snižují riziko kardiovaskulárních onemocnění [16, 26]

Tabulka 1: Přibližné chemické složení quinoy (tepelně neupravené) ve srovnání s bílou rýží (střednězrnnou, syrovou, neobohacenou) a žlutým kukuřičným zrnem [14].

živiny (g/100 g)	quinoa	bílá rýže	žluté kukuřičné zrno
voda	13,3	12,9	10,4
energie (kcal)	368	360	365,0
celkový protein	14,1	6,6	9,4
celkový tuk	6,1	0,6	4,7
sacharidy	64,2	79,3	74,3
vláknina	7,0	-	7,3
minerály (mg/100 g)			
vápník	47,0	9,0	7,0
železo	4,6	0,8	2,7
hořčík	197,0	35,0	127,0
zinek	3,1	1,2	2,2
sodík	5,0	1,0	35,0
vitamíny (mg/100 g)			
thiamin	0,36	0,07	0,39
vitamín B5	0,77	1,34	-
vitamín B6	0,49	0,15	0,62

1.1.4.1 Proteiny

Merlík čilský obsahuje velké množství bílkovin, které poskytují všechny druhy esenciálních aminokyselin. Obsah bílkovin v mladých (30-45 dní starých) suchých listech quinoy se pohybuje od 28,2 do 37,0 g/100 g v sušině, obsah bílkovin v zrnech quinoy se pohybuje od 9,1 do 15,7 g/100 g, což ukazuje, že sušené listy quinoy obsahují vyšší množství bílkovin než zrna. Hlavní bílkovinné složky jsou globuliny 37 % a albuminy 35 %. Díky vysoké stravitelnosti quinoy je její biologická hodnota vyšší než u jiných obilovin, jako je rýže, pšenice a kukuřice. Podobá se biologické hodnotě hovězího masa. Proto je často vyhledávaný zdroj živin u osob s nedostatkem bílkovin ve stravě [4, 5, 17].

1.1.4.2 Sacharidy

Škrob

Škrob v sušině quinoxy tvoří 58,1-64,2 % a vyznačuje se vysokou rozpustností a stravitelností. Skládá se ze dvou glukózových polymerů – amylozy a amylopektinu. Obsah amylozy ve škrobu v sušině quinoxy obvykle bývá nízký, nicméně se může pohybovat v rozpětí od 3 do 20 %. Naopak amylopektin tvoří přibližně 90 % škrobu. Má relativně nízký stupeň polymerace, což znamená, že vytvořený krystal škrobu je rozpustnější a stravitelnější, protože s velikostí se zvětšuje plocha pro vazbu vody a enzymatické trávení. Červená quinoa obsahuje lehce stravitelný škrob, který může být vhodnou volbou potravin pro kojence a starší osoby, zatímco u bílé quinoxy má škrob menší bobtnavost a lze jej použít do nudlových výrobků [7].

Vláknina

Quinoa je ve srovnání s jinými obilovinami bohatá na vlákninu. Celkový obsah vlákniny činí 8-13 %, což je více než u rýže či kukuřice. Podle rozpustnosti se v rostlinách rozlišují dva typy vlákniny, rozpustná a nerozpustná. Mezi rozpustnou vlákninu patří pektin a gumy, protože jsou rozpustné ve vodě, zatímco polysacharidy, celulóza a hemicelulóza jsou ve vodě nerozpustné, a tedy tvoří nerozpustnou vlákninu. Zrna quinoxy obsahují přibližně 78 % nerozpustné a 22 % rozpustné vlákniny. Celkové složení vlákniny se při extruzi snižuje, zatímco obsah rozpustné se zvyšuje [4, 17].

1.1.4.3 Lipidy

Obsah lipidů v quinoxe se pohybuje v rozmezí 5,3–4,5 %, přičemž stupeň nenasycenosti je okolo 70–89 %, což je pozitivní pro lidské zdraví. Ve srovnání s amarantem, pohankou a pšenicí je zde větší poměr nenasycených lipidů k nasyceným. Hlavními složkami quinoového oleje jsou omega-3 a omega-6 mastné kyseliny. Tyto látky pomáhají snižovat riziko kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny prsu a rakoviny trávicího traktu [17, 18].

1.1.4.4 Minerály

Quinoa je zdrojem bohatých minerálních látek v biologicky dostupných formách. Obsah popela je měřítkem celkového množství minerálních látek přítomných v potravíně. V listech quinoy se pohybuje od 2,1 do 20,0 %. Zrna obsahují mnohem více vápníku, hořčíku, železa, mědi a zinku než ostatní druhy obilovin. Klíčením lze zvýšit obsah železa, vápníku a zinku o 39 %, 49 % a 20 %. Bylo zjištěno, že 100 g quinoy může u dospělého člověka pokrýt denní potřebu hořčíku, manganu, mědi a železa, zatímco u fosforu a zinku může pokrýt 40-60 % denní potřeby [4, 17].

1.1.4.5 Vitamíny

Quinoa je velmi dobrým zdrojem některých vitamínů, jako je například thiamin, kyselina listová, vitamín C (kyselina askorbová) a také vitamíny B6 a B5. Obsah kyseliny listové je dokonce nejvyšší ve srovnání s ostatními obilovinami. Denní potřebu kyseliny listové a vitamínu B6 u dospělého člověka pokryje pouze 100 g quinoy. Obsah vitamínu E (tokoferoly) v quinoe je také o něco vyšší než v kukuřici, amarantu, pohance a pšenici. Množství tokoferolů se pohybuje kolem 971-1764 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ sušiny quinoy, což se liší podle barvy zrna [17, 18].

1.2 Antioxidanty

Antioxidanty jsou látky, které zabraňují vzniku volných radikálů, které jsou škodlivé pro lidský organismus. Snižují tak riziko degenerativních onemocnění způsobených vlivem oxidačního stresu. Díky velkému obsahu látek s antioxidační aktivitou by quinoa mohla být považována za funkční potravinu pro prevenci různých onemocnění [4].

Antioxidanty mohou být různě klasifikovány podle zdroje, funkce, mechanismu reakce nebo podle chemické struktury. Látky, které dokáže sám organismus produkovat nebo přijímat formou potravy, nazýváme přirozené antioxidanty. Mezi ně například patří polyfenoly. Jedná se o bioaktivní sekundární rostlinné metabolity, které jsou hojně zastoupeny v běžně konzumovaných potravinách rostlinného původu. Polyfenolické látky se dělí na flavonoidy, fenolické kyseliny a třísloviny, které působí jako silné antioxidanty. Dále mezi přirozené antioxidanty patří kyselina askorbová, kyselina močová a bilirubin. Přírodní antioxidant může být modifikován a stát se syntetickým produktem. To znamená, že by se jednalo o syntetické antioxidanty. Příkladem je kyselina askorbová (vitamín C), kdy se modifikací stává z hydrofilní látky, látka lipofilní [4].

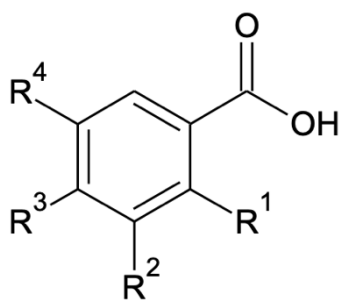
1.2.1 Fenolické látky

Quinoa obsahuje nejméně 23 různých fenolických sloučenin [19], přičemž nejvíce jsou v semenech quinoj zastoupené kvercetin a kyselina ferulová. Obsah fenolických látek je zde větší než u rýže, pšenice, ječmene, prosa nebo pohanky. Je třeba poznamenat, že celkový obsah fenolických látek (TPC) je ovlivněn barvou, genotypem a podmínkami růstu quinoj. Celkový obsah fenolických látek v extraktech je možné stanovit spektrofotometricky pomocí Folin – Ciocalteuova činidla [15, 17, 20].

1.2.1.1. Fenolické kyseliny

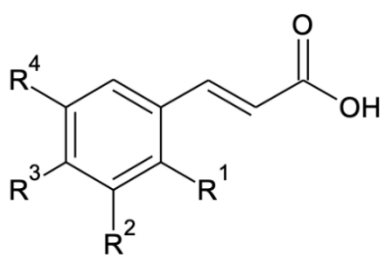
Tyto kyseliny obsahují v molekule jeden benzenový kruh, na nějž jsou navázány hydroxylové a karboxylové skupiny. Tato skupina látek může být rozdělena do dvou podskupin, podle jejich struktury, a to hydroxyskořicové a hydroxybenzoové kyseliny (Obrázek 3, Obrázek 4) Do hydroxybenzoových kyselin spadá například kyselina 4-hydroxybenzoová, vanilová, galová a syringová. Hlavními zástupci hydroxyskořicových kyselin jsou kyselina p-kumarová, kávová, ferulová a sinapová [27].

V semenech quinoj byly z fenolických kyselin identifikovány především kyselina vanilová, protokatechová, ferulová, kávová, p-kumarová, 4-hydroxybenzoová a 8,5-diferulová a jejich deriváty [19, 27,61].



Kyselina	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Galová	H	OH	OH	OH
Vanilová	H	OCH ₃	OH	H
Syringová	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Salycilová	OH	H	H	H
4-hydroxybenzoová	H	H	OH	H

Obrázek 3: Struktura kyselin odvozených od kyseliny benzoové [19]



Kyselina	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
p-kumarová	OH	H	OH	H
o-kumarová	OH	H	H	H
Kávová	H	OH	OH	H
Ferulová	H	OCH ₃	OH	H
Synapová	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

Obrázek 4: Struktura kyselin odvozených od kyseliny skořicové [19]

Ve třech různých zrnech pseudoobilovin bylo stanoveno složení fenolických kyselin a následně zjištěno několik rozdílů. Konkrétně se jednalo o andské pseudoobiloviny quinoa (*Chenopodium quinoa*), kaňiwa (*Chenopodium pallidicaule*, Merlík bledý) a kiwicha (*Amaranthus caudatus*). Zatímco kaňiwa je jiný druh quinoy (Obrázek 5), kiwicha je druh amaranthu (Obrázek 6) [19].

Významný rozdíl byl zjištěn v obsahu kyseliny ferulové, přičemž merlík bledý (kaňiwa) měl nejvyšší a kiwicha nejnižší obsah. Vzorky plodiny kaňiwa obsahovaly méně kyseliny vanilové, ale více kyseliny kávové a ferulové než quinoa. Obsah celkových fenolických kyselin byl vyšší u quinoy než u laskavce ocasatého (kiwicha). Tyto odlišnosti vyplývají především z rozdílů ve vzorcích, zda se jednalo o celou rostlinu či pouze o semeno. Také podle toho, jaká z metod byla použita. Obsah fenolických kyselin v jiných obilovinách, jako je oves, ječmen, kukuřice, rýže, proso a pohanka, je stejně velký (25-60 mg/100 g) jako ve zde studovaných andských pseudoobilovinách [19, 21].



Obrázek 5: Zrna kaňiwa (*Chenopodium pallidicaule*) [23]

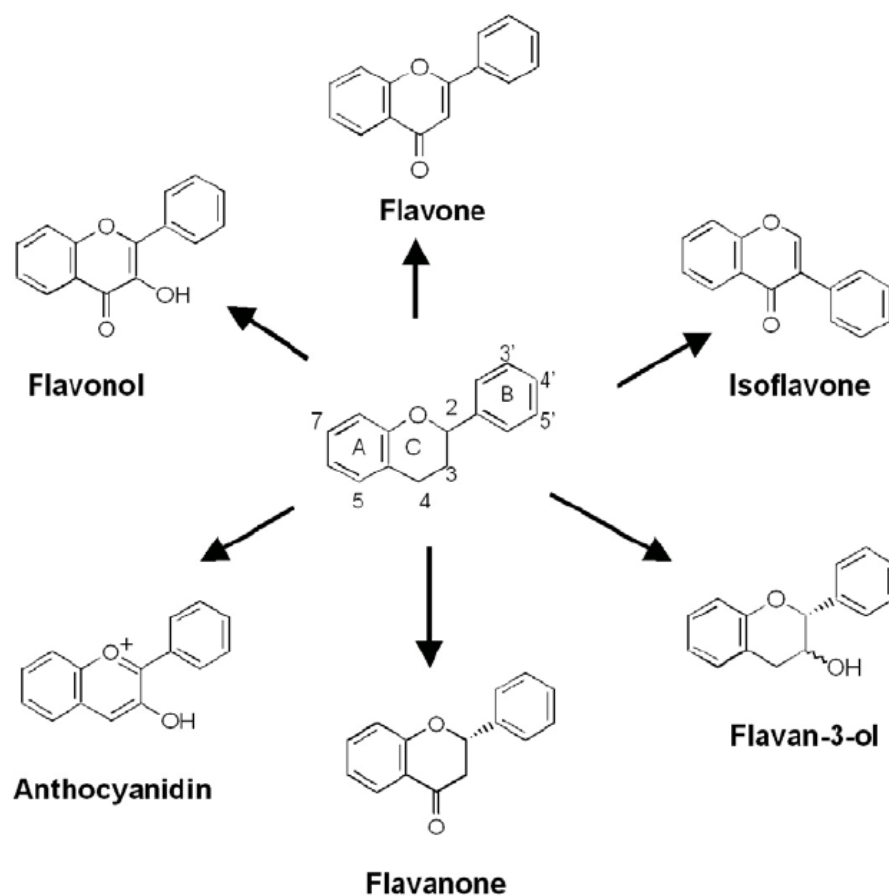


Obrázek 6: Rostlina kiwicha (*Laskavec ocasatý Amaranthus caudatus*) [22]

1.2.1.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou organické chemické sloučeniny (fenoly) a řadí se mezi nejběžnější a nejrozšířenější představitele rostlinných fenolů. Tato skupina ve své struktuře obsahuje dvě benzenová jádra propojené tříuhlíkovým řetězcem a kyslíkovým heterocyklem (Obrázek 7). Flavonoidy jsou přírodní žluté barviva, která poskytují rostlinám zbarvení. Základní flavonoidní látky jsou katechiny, anthokyany, flavanony, flavanoly, flavony, leukoanthokyanidiny a isoflavony. Tyto látky se od sebe liší strukturou, stupněm oxidace a substitucí. Podle počtu a polohy hydroxy skupin se určuje síla antioxidační aktivity. Ke kvalitativnímu a kvantitativnímu stanovení těchto látek se využívají převážně chromatografické metody, jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) nebo plynová chromatografie (GC), nebo spektrofotometrické metody. [28].

V quinoe jsou převážně zastoupené flavonoidy flavanolového typu, jako je kvercetin a kaempferol a jejich glykosidy. V některých druzích byl rovněž nalezen myricetin, rhamnetin nebo isorhamnetin [19, 54].



Obrázek 7: Základní struktura flavonoidů [24]

1.2.1.3 Betalainy

Betalainy jsou ve vodě rozpustné dusíkaté rostlinné pigmenty hydrofilní povahy se slibným bioaktivním potenciálem. Chemicky je lze rozdělit na žluté betaxanthiny a fialové betakyany. Betaxanthiny jsou kondenzační produkty kyseliny betalamové a různých aminosloučenin. Mezi betakyany patří konjugáty kyseliny betalamové s deriváty *cyklo*-3,4-dihydroxyfenylalaninu. Společná přítomnost obou typů pigmentů vytváří oranžové a červené odstíny [30].

Hlavním zdrojem betalainů je červená řepa a amarant, který se také řadí mezi pseudoobiloviny. Do pseudoobilovin patří i quinoa, což znamená, že také obsahuje betalainy. Důvodem barevnosti zrn quino (žlutá, červená, černá) jsou právě tyto pigmenty. Quinoa obsahuje betacyaniny a betaxanthiny, které vykazují velmi silnou antioxidační aktivitu, která je mimo jiné hodnocena také pomocí metody DPPH (1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl) [25].

1.3 Úprava vzorku

Před samotnou extrakcí je potřeba vzorek dobře upravit. Prvním krokem je mletí vzorku na požadovanou velikost částic. Čím menší částice, tím dochází k větší interakci s rozpouštědlem a zvyšuje se účinnost extrakce. Následně se zpravidla provádí sušení a homogenizace vzorku. Připravené vzorky se uchovávají v temnu a chladu až do okamžiku, kdy jsou podrobeny různým druhům extrakcí [36].

1.3.1 Extrakce kapalina-kapalina

Jedná se o jednu z nejpoužívanějších extrakčních metod, která zpravidla slouží k extrakci analytu z vodné fáze do organického rozpouštědla, které je s vodou nemísitelné (hexan, diethylether, ethyl acetát). Na základě rozdělovacího koeficientu pak dochází k přechodu stanovované látky z jednoho rozpouštědla do druhého. Volba organického rozpouštědla ovlivňuje selektivitu a také účinnost extrakce. Kontakt mezi fázemi je taktéž důležitý, to lze umožnit například třepáním (dělicí nálevka, třepačka) nebo pomocí odstředivky. Tato metoda má výhody ve své jednoduchosti (nenáročné provedení a vybavení). Naopak mezi nevýhody patří tvorba emulzí, vysoká spotřeba organických rozpouštědel, časová náročnost a nutnost odpaření rozpouštědla [37].

1.3.2 Extrakce na pevné fázi

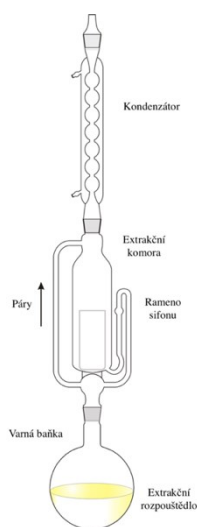
Extrakce na pevné fázi či na tuhém sorbentu (SPE) je založena na interakci sledovaných látek se sorbentem umístěným zpravidla v plastové kolonce. Jako sorbenty se využívají buď polární fáze (silikagel, oxid hlinitý), nepolární fáze nebo iontoměniče (katex, anex).

SPE se provádí v pěti následujících krocích. Nejprve se kolonka propláchne vhodným rozpouštědlem, čímž se aktivuje pevná fáze. Následně se nadávkuje vzorek a poté dochází opět k promývání kolonky od zbytků matrice vzorku. Dále kolonku vysušíme proudem inertního plynu (dusík). Nakonec dochází k promývání kolonky elučním rozpouštědlem, eluát se jímá a dále zpracovává. Výhody této metody jsou menší množství vzorku než u extrakce kapalina-kapalina, extrakce je rychlejší, levnější a snadno automatizovatelná [37].

1.3.3 Soxhletova extrakce

Jedná se o klasický postup extrakce rozpouštědlem z tuhé matrice. Funguje na principu rektifikační kolony. Extrakční patrona s tuhým vzorkem se umístí do Soxhletova extraktoru zobrazeného na Obrázek 8. Ve varné baňce je předloženo extrakční rozpouštědlo, které je zahříváno a tím dochází k jeho odpaření. Následně jsou páry kondenzovány v chladiči a čisté rozpouštědlo teče do patrony ve které je vzorek. Rozpouštědlo extrahuje rozpustné látky a vrací se zpět do varné baňky. Tento proces je opakován, dokud nejsou požadované komponenty ze vzorku vyextrahovány v dostatečném množství [40]. Po ukončení extrakce je rozpouštědlo vydestilováno a ve varné baňce zůstávají pouze extrahované látky [40].

Soxhletova extrakce je velmi jednoduchá metodika, která vyžaduje malé zaškolení, dokáže extrahovat větší množství vzorku než většina nejnovějších alternativ (mikrovlnná extrakce).



Obrázek 8: Soxhletův extraktor [46]

Pořizovací náklady na tuto metodu nejsou vysoké. Největší nevýhodou Soxhletovy extrakce je dlouhá doba potřebná k extrakci. Další nevýhodou může být ztráta termolabilních látek, protože extrakce probíhá při teplotě varu rozpouštědla, při které nemusí být všechny látky stabilní. Automatizace Soxhletovy extrakce je velmi obtížná [40, 45].

1.4 Stanovení celkového obsahu fenolických látek a flavonoidů

1.4.1 Metoda dle Folin-Ciocalteua

Tato metoda slouží ke stanovení celkového obsahu fenolických látek (TPC). Folin-Ciocalteuovo činidlo je tvořeno kyselým komplexem fosforečnanu molybdenového a wolframového. Po inkubační době dochází k redukci tohoto činidla fenolickými látkami v zásaditém prostředí za vzniku modrého zbarvení. Intenzita tohoto zbarvení se měří při vlnové délce 765 nm. Výsledky se uvádí jako ekvivalentní množství kyseliny gallové, která se používá jako standard [47].

1.4.2 Celkový obsah flavonoidů

Pro zjištění celkového obsahu flavonoidů (TFC) se používají dva postupy. V tom prvním je do vzorku přidán roztok chloridu hlinitého, který lze využít pouze u kyselých roztoků (v přítomnosti kyseliny nebo acetátového pufru) a je selektivní pouze pro flavonoly. Měření absorbance se provádí v rozsahu vlnových délek 404-430 nm. Pro vyjádření výsledků se používají jako standardní sloučeniny různé flavonoly (kvercetin, rutin nebo galangin). Ve druhém postupu se do vzorku přidává dusitan sodný v alkalickém prostředí. Tato metoda je založena na nitraci libovolného aromatického kruhu, který na sobě váže katecholovou skupinu se třemi nebo čtyřmi polohami. Po přidání AlCl_3 se tvoří žlutý roztok komplexu, po přidání NaOH roztok zčervená. Hodnota absorbance se měří při 510 nm. Jako standardní sloučenina pro stanovení výsledků se používá katechin [50].

1.5 Stanovení antioxidační kapacity

1.5.1 Metoda DPPH

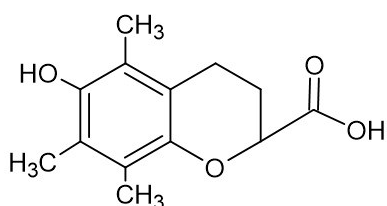
Metoda DPPH se řadí k jedné z nejoblíbenějších spektrofotometrických metod pro stanovení antioxidační kapacity čistých sloučenin i komplexních směsí, např. rostlinných extraktů. Pro stanovení se využívá 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH), který v roztoku methanolu nebo ethanolu vytváří stabilní volný radikál. DPPH radikál má tmavě purpurovou barvu vlivem působení antioxidantů se roztok radikálu odbarvuje.

Úbytek absorbance je měřen při vlnové délce 515 nm. Jako standardní látka se zpravidla používá Trolox, což je ve vodě rozpustný analog vitamínu E (Obrázek 9). Výsledky se vyjadřují jako ekvivalentní množství standardu Troloxu na 1 g nebo 1 ml vzorku (TEAC) [31].

Celková antioxidační aktivita (TAA) je vyjádřena jako procento inhibice DPPH radikálu a počítá se podle rovnice:

$$\%TAA = \left(\frac{Abs_{blank} - Abs_{vzorku}}{Abs_{blank}} \right) \cdot 100,$$

kde TAA je celková antioxidační aktivita a Abs je absorbance [32].



Obrázek 9: Strukturální vzorec Troloxu

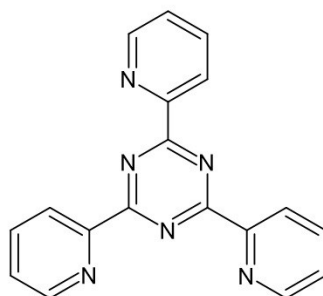
1.5.2 Metoda ABTS

Metoda ABTS je společně s metodou DPPH nejpoužívanější pro měření antioxidační aktivity. Využívá se zde 2,2-Azino-bis(3-ethyl-benzothiazolin-6-sulfonová kyselina) (ABTS), u které se vytváří barevný radikálový kationt $ABTS^{•+}$, reakcí ABTS s $K_2S_2O_8$, MnO_2 nebo také hemoglobinem s H_2O_2 . V přítomnosti antioxidantů dochází ke zhášení radikálu a odbarvení původně zelené roztoku. Míra tohoto odbarvení se měří při vlnové délce 734 nm. Procentuální úbytek zbarvení se přepočítá na ekvivalentní množství standardu Troloxu (TEAC). Nevýhodou této metody oproti DPPH je horší dostupnost radikálu, ten musí být generován před stanovením. Naopak lze detekovat antioxidační aktivitu i lipofilních antioxidantů [33, 34, 35].

1.5.3 Metoda FRAP

Principem této metody je schopnost antioxidantů redukovat komplex železitého iontu s 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazinem (Fe^{3+} -TPTZ) na modrý komplex s iontem železnatým (Fe^{2+} -TPTZ) (Obrázek 10), který má absorpční maximum při vlnové délce 593 nm.

Míra zbarvení roztoku je úměrná redukčním účinkům daného antioxidantu. Pomocí standardu Troloxu se přepočítává na TEAC [37]. Tato metoda poskytuje vysoce reprodukovatelné výsledky a je vhodná pro antioxidanty, které reagují rychle (například kyselina askorbová) [38].



Obrázek 10: Strukturální vzorec TPTZ

1.5.4 Metoda ORAC

Při metodě ORAC dochází ke generování kyslíkových a peroxylových radikálů. Následně se hodnotí schopnost látek zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci. Jedná se o fluorescenční metodu, která se zabývá měřením oxidační degradace fluorescenční molekuly po smíchání s iniciátorem volných radikálů, při níž se používá AAPH (2,2'-azobis-2-amidinopropan hydrochloridem) jako generátor volných radikálů a fluorescein jako cílová molekula. Fluorescence se měří při excitační vlnové délce 485 nm a emisní vlnové délce 600 nm. [39,40]. Jako standard se obvykle používá kyselina gallová nebo Trolox [39, 41].

1.6 Separační techniky

1.6.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

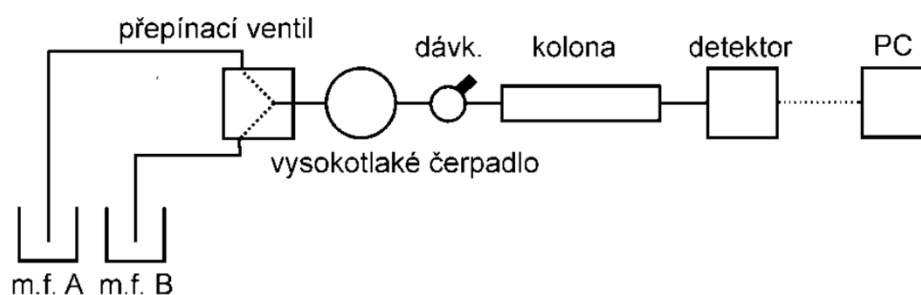
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie patří k nejúčinnějším separačním metodám, která vyniká především dobrou opakovatelností a robustností. Tato metoda je vhodná zejména pro dělení organických méně těkavých kapalných a tuhých látek, které jsou rozpustné ve vodě, v organických rozpouštědlech či zředěných kyselinách.

Jedná se o separaci analytů na základě rozdělení mezi stacionární a mobilní fází. Stacionární fází je zpravidla pevná látka a mobilní fáze je vždy kapalina [51, 52].

Podle polarity mobilní a stacionární fáze rozlišujeme v HPLC dva základní chromatografické systémy. Pokud máme systém s obrácenými fázemi, znamená to, že mobilní fáze je polárnější než stacionární. V opačném případě se jedná o systém s normálními fázemi. Běžnější je systém s obrácenými fázemi, kde se využívá nepolární stacionární fáze, nejčastěji chemicky modifikovaný silikagel nějakou nepolární skupinou (oktadecyl, oktyl, atd.) Jako mobilní fáze se používá směs polárních rozpouštědel např. voda-methanol [51, 52].

Kapalinový chromatograf (Obrázek 11) se skládá z dávkovacího zařízení, vysokotlakého čerpadla, kolony a detektoru. Důležitou částí chromatografického systému je čerpadlo, které čerpá mobilní fázi chromatografickým systémem. Musí být odolné a schopné odolávat velmi vysokým tlakům (40–80 MPa) a musí zajišťovat přesný a reprodukovatelný průtok mobilní fáze. Po nadávkování pomocí šesticestného dávkovacího ventilu je vzorek veden na chromatografickou kolonu, kde dochází k separaci. Kolona je nejčastěji vyrobena z ocele, skla či plastu o průměru 3-6 mm a délce 5-25 cm. Po průchodu vzorku separační kolonou jsou analyty v mobilní fázi detekovány v průtokové cele detektoru.

Na detektory jsou kladeny vysoké nároky, jako je vysoká citlivost, nízký šum, příznivá cena a univerzálnost. Nejčastěji se používají detektory spektrofotometrické, refraktometrické, fluorescenční, elektrochemické a vodivostní. HPLC je oproti plynové chromatografii složitější a zpravidla méně účinná [51, 52].

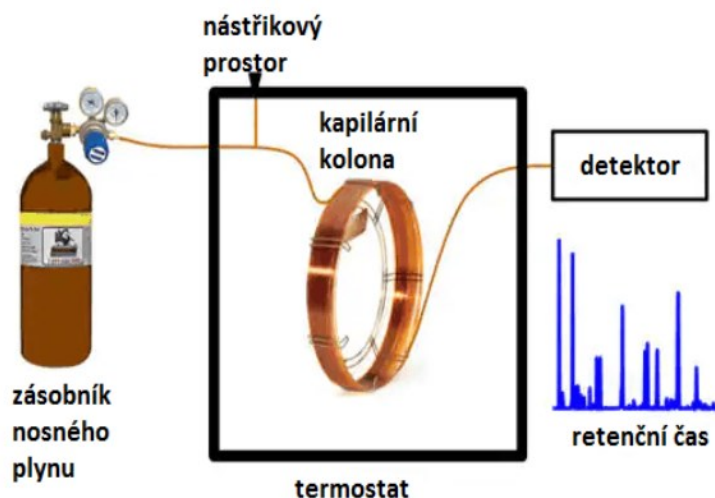


Obrázek 11: Schéma kapalinového chromatografu

1.6.2 Plynová chromatografie

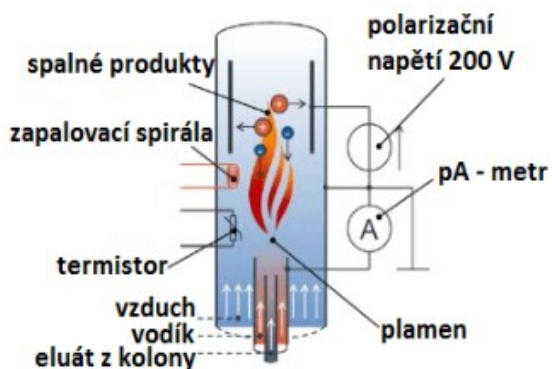
Jedná se o fyzikálně – chemickou metodu, při které dochází k separaci směsi látek mezi dvě fáze, mobilní plynnou a stacionární pevnou či kapalnou. Využívá se pro separaci plyných látek nebo látek těkavých, které lze převést do plynného stavu.

Schéma plynového chromatografu je uvedeno na Obrázek 12. Nejprve je nadávkovaný vzorek unášen mobilní fází (nosným plynem) do kolony, kde se jednotlivé složky vzorku separují na základě různé silné schopnosti se poutat na stacionární fázi. Látky, které se zadržují málo, vystupují z kolony nejdříve a mají nejkratší eluční čas. Naopak látky, které se zadržují silně, vycházejí z kolony později. Složky, které opustí kolonu, se indikují pomocí vhodného detektoru. Poloha píku udává druh látky (kvalitativní analýza) a plocha píku udává množství látky (kvantitativní analýza) [37, 53].



Obrázek 12: Schéma plynové chromatografie

U detektorů je důležitá rychlost odezvy, citlivost a zanedbatelný šum. Nejběžnějšími detektory v plynové chromatografii jsou tepelně vodivostní a plamenově ionizační detektor (Obrázek 13) či detektor elektronového záchytu [37, 53].



Obrázek 13: Plamenově ionizační detektor

1.7 Analýza quinoj či jiných pseudoobilovin

1.7.1 Úprava a extrakce vzorků

Nejdůležitější částí před analýzou námi sledovaných látek je úprava vzorku. Musí se vybrat vhodný postup úpravy abychom zabránili, co nejmenší degradaci analyzovaných látek. Dále je zapotřebí vybrat vhodný typ extrakce a rozpouštědlo, které zaručí co nejlepší výsledky separace sledovaných látek z matrice.

Semena quinoj musí být vyčištěna a až do použití se skladují v polyethylenových nádobách v chladu. Před samotnou extrakcí je nutné zrna rozemlít a prosít. Takto připravená zrna quinoj ve formě jemného prášku se zabalí a uchovávají se při pokojové teplotě na suchém a tmavém místě. Další důležitou částí je zbavení lipofilních látek, a to nejčastěji extrakcí hexanem [33, 61, 65] poté se vzorky vysuší pod dusíkem a tím se zabrání oxidaci fenolických látek. Poté následuje příprava extraktů vhodným typem rozpouštědla a extrakce [33, 55, 56, 61].

Po úpravě vzorků quinoj a jiných pseudoobilovin (amaranth, pohanka) následuje extrakce vhodným rozpouštědlem, například ethanol, methanol, aceton nebo jejich vodné roztoky, například 80% methanol [38, 58, 66]. Okyselením extraktů dochází ke zvýšení extrakční účinnosti, proto se často do vodných roztoku organických rozpouštědel přidává slabá nebo zředěná silná kyselina [33, 38, 61, 66]. Extrakce je obvykle podpořena protřepáváním na rotační třepače [67].

Po extrakci se vzorek pomocí centrifugy [38, 61] oddělí na vzorek a organickou fázi. Následně je rozpouštědlo (organická fáze) analyzována nebo odpařena odfoukáním pomocí dusíku [33, 67]. Poté se vysušené extrakty uchovávají v chladu až do analýzy [55, 57-59, 61].

Pro uvolnění vázaných fenolických sloučenin z glykosidických a esterových vazeb se provádí kyselá a alkalická hydrolyza [55, 60]. Existují také tzv. enzymatické hydrolyzy [60], které simulují procesy probíhající během trávení v žaludku. Nejčastěji se používá alkalická hydrolyza, která probíhá většinou za pomoci NaOH po dobu 4 h při pokojové teplotě [55, 60, 61]. Po ukončení hydrolyzy se do směsi přidává kyselina chlorovodíková (pH 2), čímž se podpoří následná extrakce fenolických látek do organického rozpouštědla (ethylacetát nebo diethylether). Kyselá hydrolyza naproti tomu využívá kyselinu chlorovodíkovou za vysoké teploty (85 °C) po dobu 1 h [55, 60, 61]. Uvolněné fenolické látky se následně extrahují ethylacetátem nebo diethyletherem. Po extrakci se organické rozpouštědlo vysuší a odparky se před analýzou rozpouští ve vhodném rozpouštědle [55, 60, 61].

1.7.2 Stanovení antioxidační kapacity

Pro stanovení antioxidační kapacity se využívají spektrofotometrické metody. Mezi nejběžněji používané metody se řadí metoda ABTS, DPPH, FRAP a ORAC.

Extrakty zrn různě barevné quinoy byly testovány na antiradikálovou kapacitu sledováním jejich účinku na volný radikál ABTS^{•+}. Aktivita byla zaznamenána a porovnána s aktivitou Troloxu. Pokles koncentrace radikálu byl pozorován u všech vzorků, ale nejvyšší antiradikálová kapacita byla zjištěna u červenofialové odrůdy, která obsahuje více betalainů. Objev betaxanthinů a identifikace nových betacyaninů v zrnech quinoy vysvětlují rozmanitost barev přítomné v této jedlé pseudoobilnině [30].

Pomocí metody DPPH a FRAP byla stanovena antioxidační aktivita u hořkých a sladkých semen quinoy po jejich tepelné úpravě [62]. Semena před a po úpravě varem byla opakovaně extrahována vodným roztokem 80% methanolu. Z výsledků bylo patrné, že semena hořké quinoy měla vyšší antioxidační kapacitu než semena sladké quinoy, což mohlo být způsobeno ztrátou látek s antioxidační kapacitou ve vroucí vodě. Zajímavé je, že hodnoty antioxidační kapacity měřené metodou FRAP u semen hořké quinoy byly trvale vyšší než hodnoty měřené metodou DPPH. Pravděpodobná příčina nižších hodnot u DPPH by mohla být způsobena přítomností sloučenin nereaktivních vůči volným radikálům DPPH. Naopak u semen sladké quinoy byly hodnoty získané oběma metodami (FRAP a DPPH) podobné, což mohlo být způsobeno obsahem karotenoidů a jiných sloučenin, jejichž absorpční spektra se s DPPH překrývala. Ukázalo se, že obě odrůdy (sladká i hořká) jsou bohatým zdrojem antioxidačních sloučenin [62].

Antioxidační kapacita extraktů mouky z quinoy byla rovněž hodnocená pomocí metody ORAC. Pomocí této metody byly naměřeny u mouky z quinoy pozoruhodně vyšší hodnoty antioxidační kapacity než u pšenice. Byly použité 4 různé extrakční postupy k získání extraktů hydrofilních a lipofilních sloučenin a také volně rozpustných a nerozpustných vázaných fenolických látek. Bylo zjištěno, že mouka z quinoy obsahuje snadno přístupné antioxidanty a je tudíž vhodnější pro konzumaci oproti běžně používané pšenici [42].

1.7.3 Stanovení antioxidantů pomocí chromatografických technik

Pomocí HPLC analýzy bylo v extraktech ze semen quinoy identifikováno šest fenolických sloučenin [20, 29]. Jednalo se o volné fenolické sloučeniny, které odpovídaly kyselině vanilové, *p*-hydroxybenzoové, *p*-kumarové a ferulové a flavonoidům kvercetin a kaempferolu.

Nejlepších extrakčních účinků bylo dosaženo při teplotě 60 °C, pomocí 80% ethanolu bez využití ultrazvuku. Semena quinoi lze považovat za dobrý zdroj přirozeně se vyskytujících antioxidačních sloučenin, které by mohly mít potenciální využití v potravinářském průmyslu [20, 29, 42].

Pomocí plynové chromatografie se často analyzují těkavé vonné látky obsažené v přírodních matricích a stanovuje se tak jejich aroma profil. U quinoi je aroma důležitou vlastností, která ovlivňuje preference spotřebitelů. Různě zbarvená semena quinoi vykazují různé nutriční vlastnosti, avšak rozdíly v jejich aromatickém profilu nejsou dostatečně prozkoumány. Quinoa má podobné aroma jako vařená rýže a to škrobové, obilné až ořechové, dále může mít quinoa travnatou, karamelovou či ovocnou příchut' [43].

Při vaření a dalších tepelných procesech používaných při úpravě potravin dochází ke změně aroma profilu, a to zpravidla spuštěním různých chemických reakcí, jako je Maillardova reakce a oxidace lipidů. Například procesy sušení horkým vzduchem podporují tvorbu těkavých látek, jako jsou alkoholy, kyseliny a estery [43, 44].

V posledních letech se při detekci stopových těkavých složek uplatňuje plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s iontovou mobilitou. Touto technikou bylo v semenech vařené a syrové quinoi identifikováno 61 sloučenin, které patřily do osmi kategorií: aldehydy, estery, ketony, alkoholy, kyseliny, terpeny, heterocykly a sulfidy. Zatímco u vařené quinoi bylo detekováno velké množství aldehydů a alkoholů, u bílých semen quinoi byla zjištěna vysoká koncentrace těkavých sloučenin s travnatým (*n*-hexanol) a zeleným ((*E*)-2-oktenal, (*E*)-2-heptenal) aromatem, a to před i po vaření. Oproti tomu vařená semena černé quinoi vykazovala vysoký obsah ovocných látek (methylhexanoát a fenylacetaldehyd). Výsledky této studie jsou užitečné pro pochopení aromatických vlastností quinoi a užitečné při výběru quinoi různých barev ke konzumaci [43].

1.8 Pozitivní účinky a využití quinoi pro lidský organismus

Quinoa má pozitivní účinky na lidské zdraví a funkčně předchází různým onemocněním, jako je cukrovka, alergie, rakovina či zánětlivá onemocnění. Může snižovat riziko kardiovaskulárních onemocnění, proto jsou semena quinoi považována za funkční potraviny. V semenech quinoi je přibližně 10 % vlákniny, což je více než v rýži, kukuřici a pšenici (0,4 %, 1,7 %, resp. 2,7 %). Nestavitelnost vlákniny v tenkém střevě navíc nabízí několik příznivých účinků, například usnadňuje vstřebávání dalších živin obsažených v této obilovině na úrovni tlustého střeva [16].

Existuje několik forem konzumace quinoy. Konkrétně lze semena fermentovat a vyrábět z nich pivo. Naklíčené klíčky quinoy (Obrázek 14) lze mimo jiné přidávat i do salátů (Obrázek 15) [16]. Další možné využití je v bezlepkovém chlebu nebo v hnědém chlebu smíchaném s pšeničnou moukou, v polévkách, kojenecké výživě či jako alternativa rýže. Quinoa navíc díky vysoké kvalitě bílkovin slouží jako cenné krmivo pro zvířata. Má ekonomický potenciál v potravinářském průmyslu, protože lze využít celou rostlinu [11].



Obrázek 14: Naklíčená semena quinoy [48]



Obrázek 15: Salát z vařené quinoy [49]

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Pomůcky a použité chemikálie

2.1.1 Chemikálie

- Metanol pro HPLC (Sigma Aldrich, USA)
- *n*-hexan (Sigma Aldrich, USA)
- DPPH: 2,2 – Difenyl -1-pikrylhydrazyl (Sigma Aldrich, USA)
- Folin & Ciocalteu činidlo (Sigma Aldrich, USA)
- Uhličitan sodný (Merck, Německo)
- Kyselina gallová (Penta, ČR)
- ABTS: 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonová kyselina) diamonná sůl (Sigma Aldrich, USA)
- Peroxodisíran draselný (Penta, ČR)
- Trolox: (±) -6 – Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-karboxylový kyselina (Merck)
- Octan sodný (Penta, ČR)
- Kyselina octová (Penta, ČR)
- Chlorid železitý (Penta, ČR)
- TPTZ: (2, 4, 6- tris(2-pyridyl) -s-triazin) (Sigma Aldrich, USA)
- Aceton (Sigma Aldrich, USA)
- Kyselina mravenčí (Penta, ČR)
- Hydroxid sodný (Penta, ČR)
- Destilovaná voda

2.1.2 Pomůcky

- Centrifugační zkumavky 50ml
- Stříkačky 1 ml
- Stříkačkové filtry 13 mm, 0,45 μm (Labicom, ČR)
- Navažovací pomůcky, laboratorní nádoby
- Skleněné vialky 4 ml
- Špičky pro pipety
- Skleněná kyveta (S/G10, optická délka 10 mm, Fisher Scientific, ČR)

2.1.3 Zařzení

- UV/VIS spektrometr UV-2450 (Shimadzu, Japonsko)
- Analytické váhy (Sartorius, Německo)
- Automatické pipety (Sartorius, Německo)
- Handy step (BRAND, Německo)
- Ultrazvuková lázeň
- Centrifuga (Fisher Scientific, ČR)

2.2 Vzorky

Pro přípravu extraktů byla využita bílá a červená quinoa. V Tabulka 2 jsou znázorněny výživové hodnoty pro tyto vzorky.

Tabulka 2: Výživové hodnoty ve 100 g vzorku, údaj z obalu výrobku

Výživové hodnoty na 100 g (Quinoa bílá – Menu gold)	
Energetická hodnota	1470 kJ/ 349 kcal
Tuky	6,1 g
z toho nasycené mastné kyseliny	0,8 g
Sacharidy	54 g
z toho cukry	1,1 g
Bílkoviny	12 g
Vláknina	14 g
Sůl	0,01 g
Výživové hodnoty na 100 g (Quinoa červená – countrylife)	
Energetická hodnota	1590 kJ/ 380 kcal
Tuky	6,0 g
z toho nasycené mastné kyseliny	1,0 g
Sacharidy	68 g
z toho cukry	0 g
Bílkoviny	12 g
Vláknina.	-
Sůl	0,01 g

2.3 Pracovní postupy

2.3.1 Úprava a extrakce vzorků

Nejprve bylo do centrifugačních zkumavek (50 ml) odváženo 2 g vzorku bílé a červené quinoy. Následně bylo přidáno 15 ml *n*-hexanu pro odstranění tuků ze vzorků. Po 10 minutové extrakci na třepačce byly zkumavky vloženy do centrifugy a horní hexanová fáze byla odstraněna. Tento proces byl proveden celkem třikrát. Poté byly vzorky vysušeny pod dusíkem. Takto připravené vzorky byly následně podrobeny různým typům extrakcí.

2.3.1.1 Extrakce volných fenolických látek

Při jednoduché extrakci byly fenolické látky extrahovány pomocí 30 ml různých rozpouštědel. Byl testován 70% methanol, 70% aceton a 70% methanol okyselený 1% HCOOH. Extrakce probíhala 15 minut a po odstředění (8000 rpm, 5 minut) byla horní organická vrstva odebrána a přefiltrována. Dále byla testována dvojnásobná extrakce, která se ve velké míře využívá u vzorků obilovin. Testovaný vzorek byl nejprve extrahován 70% acetonem a poté byl kapalný podíl extrahován 30 ml směsí diethylether-ethylacetát (1:1). Po odstředění byla horní organická fáze odebrána a odpařena pod proudem dusíku. Vzniklý odparek byl pro analýzu rozpuštěn ve 4 ml 50% methanolu a přefiltrován pomocí stříkačkového filtru.

2.3.1.2 Alkalická hydrolýza

Alkalická hydrolýza byla provedena pomocí 20 ml 4M NaOH po dobu 4 h na třepačce. Po hydrolýze byl roztok okyselen pomocí HCl na pH 2 a uvolněné fenolické látky byly extrahovány do směsi diethylether-ethylacetát (1:1). Pro oddělení organické fáze byl vzorek odstředěn a organická fáze byla odpařena. Odparek byl rozpuštěn ve 4 ml 50% methanolu a přefiltrován přes stříkačkové filtry s póry o průměru 0,45 μm .

2.3.1.3 Kyselá hydrolýza

Při kyselé hydrolýze bylo k upravenému vzorku přidáno 20 ml 1M HCl a roztok byl povařen 45 minut při 90 °C. Poté byl vzorek ochlazen a následně extrahován do směsi diethylether-ethylacetát (1:1). Horní organická fáze byla odpařena a odparek byl rozpuštěn ve 4 ml 50% methanolu a přefiltrován.

2.3.2 Spektrofotometrické metody

2.3.2.1 Metoda ABTS

20 mg ABTS bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody. Následně bylo přidáno 200 μ l $K_2S_2O_8$. Roztok byl ponechán za nepřístupu světla v lednici po dobu cca 16 hodin. Druhý den bylo ze zásobního roztoku odpipetováno 2,5 ml do 100 ml odměrné baňky a doplněno po rysku destilovanou vodou. Ke 3 ml směsi bylo přidáno 50 μ l vzorku a řádně promícháno. Pro tuto metodu byl zjištěn optimální čas reakce 60 min. Po uplynutí inkubační doby byl změřen úbytek absorbance při vlnové délce 734 nm. S každou časovou řadou byl souběžně proměřen i slepý pokus, kde extrakt nahradilo extrakční činidlo. Výsledná antioxidační aktivita je vyjádřena jako inhibice roztoku v % (viz rovnice (1)). Přes kalibrační závislost byla tato inhibice roztoku přepočítána na ekvivalentní množství standardu Troloxu na 1 g vzorku.

$$\text{inhibice (\%)} = \frac{A_{blk} - A_{vz}}{A_{blk}} \cdot 100 \quad (1)$$

A_{blk} = absorbance slepého pokusu, A_{vz} = absorbance vzorku

2.3.2.2 Metoda DPPH

Standardní roztok byl připraven odvážením 4 mg DPPH do 25 ml odměrné baňky a doplněno methanolem po rysku. Pracovní roztok byl připraven naředěním standardního roztoku 1:4. Absorbance pracovního roztoku by se měla pohybovat v rozmezí 0,8-0,9. Ke 3 ml pracovního roztoku bylo přidáno 50 μ l vzorku a směs byla důkladně promíchána. Čas doby inkubace byl optimalizován na 30 minut. Po uplynutí reakčního času byl změřen úbytek absorbance při vlnové délce 515 nm. S každou časovou řadou byl opět souběžně proměřen i slepý pokus, kde extrakt nahradilo extrakční činidlo. Dle předchozího vzorce byl úbytek absorbance přepočítán na procenta inhibice roztoku. Pomocí kalibrační řady standardu Troloxu byla absorbance přepočítána na ekvivalentní množství této látky v 1 g vzorku.

2.3.2.3 Metoda FRAP

Reakční směs byla složena z TPTZ, $FeCl_3$ a octanového pufru v poměru 1:1:10. Z takto připraveného roztoku bylo následně odpipetováno 3 ml do vialek a přidáno 50 μ l vzorku. Inkubační doba byla na 10 minut. Po uplynutí reakčního času byl změřen úbytek absorbance při vlnové délce 593 nm. Stejným postupem byl zároveň proměřen slepý pokus, kde místo extraktu vialka obsahovala extrakční činidlo. Pomocí kalibrační řady byla naměřená absorbance přepočítána na ekvivalentní množství standardu Troloxu v 1 g vzorku.

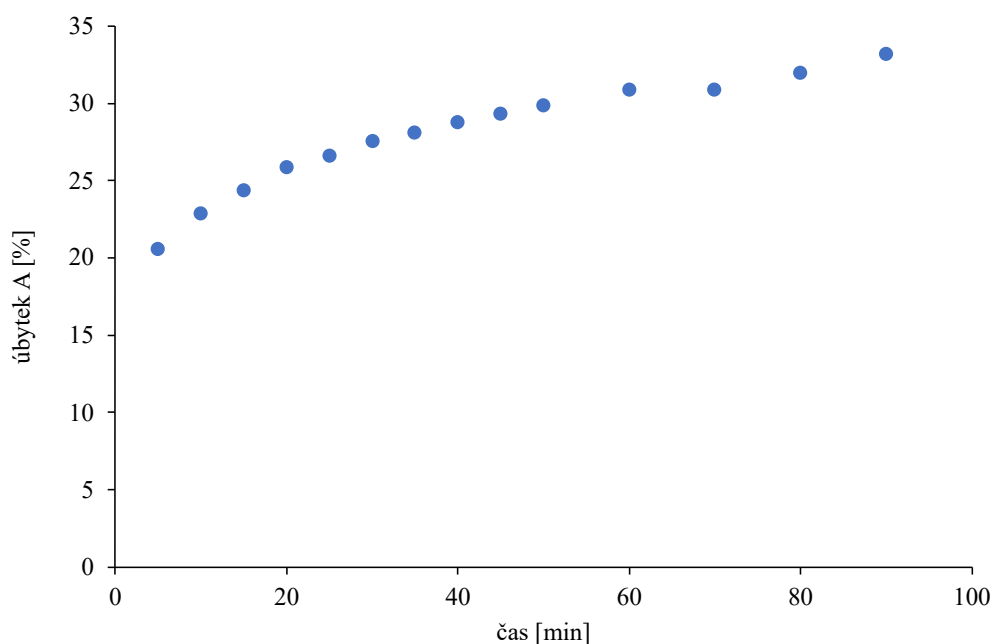
2.3.2.4 Stanovení celkového množství fenolických látek (TPC)

Pracovní roztok pro stanovení celkového množství fenolických látek byl připraven naředěním 2 M Folin-Ciocalteuova činidla destilovanou vodou v poměru 1:20. Ke 2 ml činidla bylo přidáno 50 μ l vzorku. Směs byla promíchána a po 5 minutách přidán 1 ml 7,5% roztoku Na_2CO_3 . Po dalších 30 minutách se proměřila absorbance u všech vzorků při 750 nm. Stejným způsobem byl proměřen i slepý pokus, kde byl extrakt nahrazen extrakčním činidlem. Obsah fenolických látek byl přepočítán pomocí kalibrační křivky a vyjádřen jako ekvivalentní množství kyseliny gallové v 1 g vzorku.

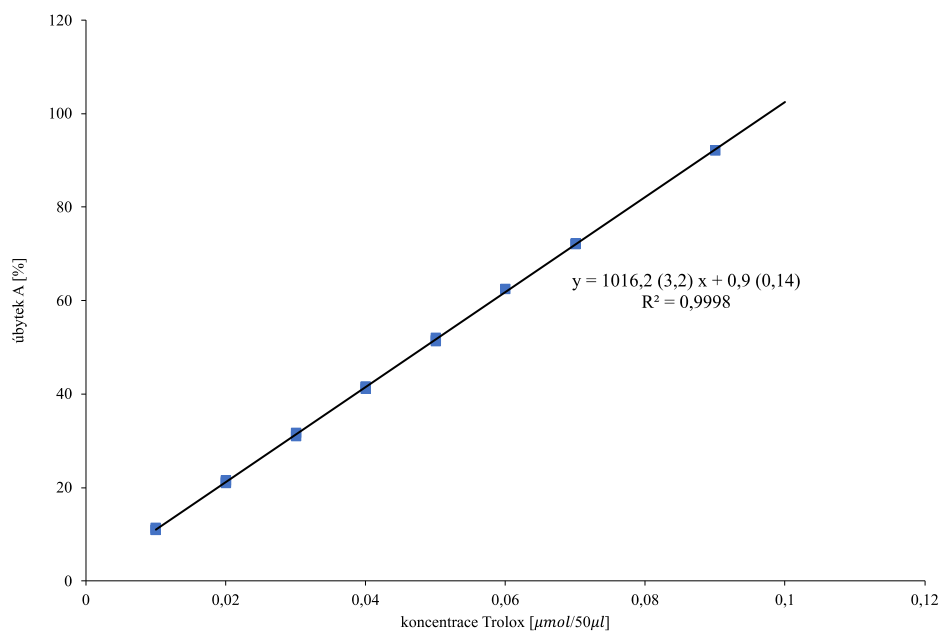
3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Pro stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS byla nejprve optimalizována doba reakce antioxidantů přítomných ve vzorku s reakčním činidlem. Jak je patrné ze závislosti úbytku absorbance na reakční době (Obrázek 16), pro reakci je optimální čas 60 minut. Za stejných podmínek byly proměřeny kalibrační roztoky standardu Troloxu a byla sestavena kalibrační křivka (Obrázek 17), která sloužila k přepočtu úbytku absorbance u změřených vzorků na TEAC. Kalibrační křivka byla sestavena pomocí deseti kalibračních bodů v rozmezí koncentrací 0,01 až 0,1 μ mol Troloxu/50 μ l a je spolu s rovnicí regrese a odchylkami jednotlivých parametrů uvedena na Obrázek 17.

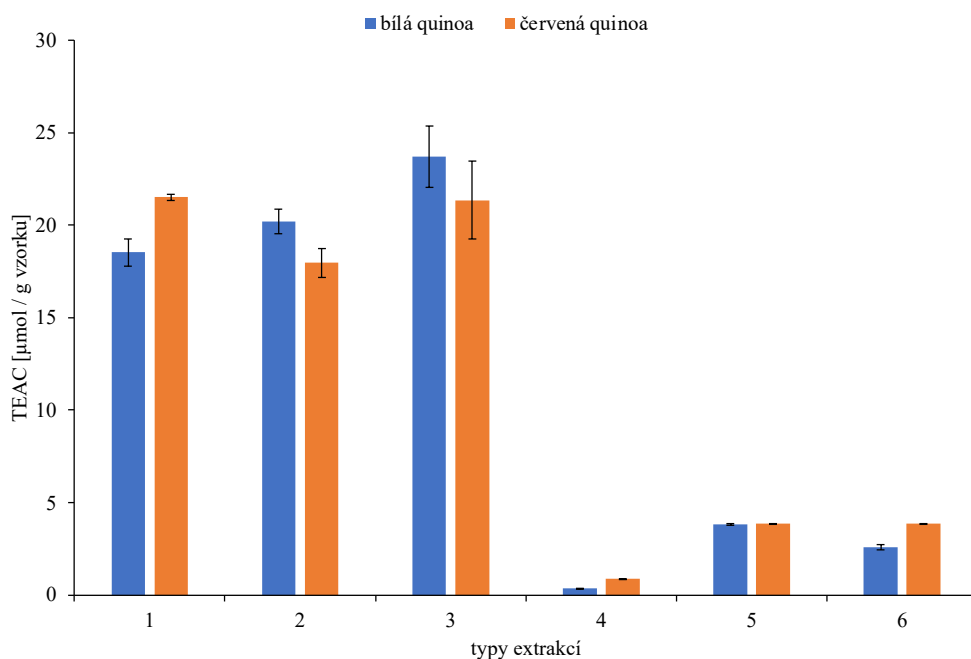


Obrázek 16: Závislost úbytku absorbance v procentech na době reakce pro metodu ABTS



Obrázek 17: Kalibrační křivka závislosti úbytku A na množství Troloxu v dávkovaném objemu pro metodu ABTS

Následně byly proměřeny jednotlivé extrakty připravené z bílé a červené quino, které byly připraveny pomocí postupu uvedeného v experimentální části (kapitola 2.3.1). U každého vzorku bylo provedeno pět měření a hodnoty byly následně vyjádřeny jako TEAC (μmol Troloxu na 1 g vzorku). Na základě vypočtených průměrných hodnot byl vytvořen sloupcový graf (Obrázek 18), kde je možné vidět rozdíl v antioxidační aktivitě jednotlivých extraktů a usuzovat tak na účinnost extrakce pro obsažené antioxidanty.

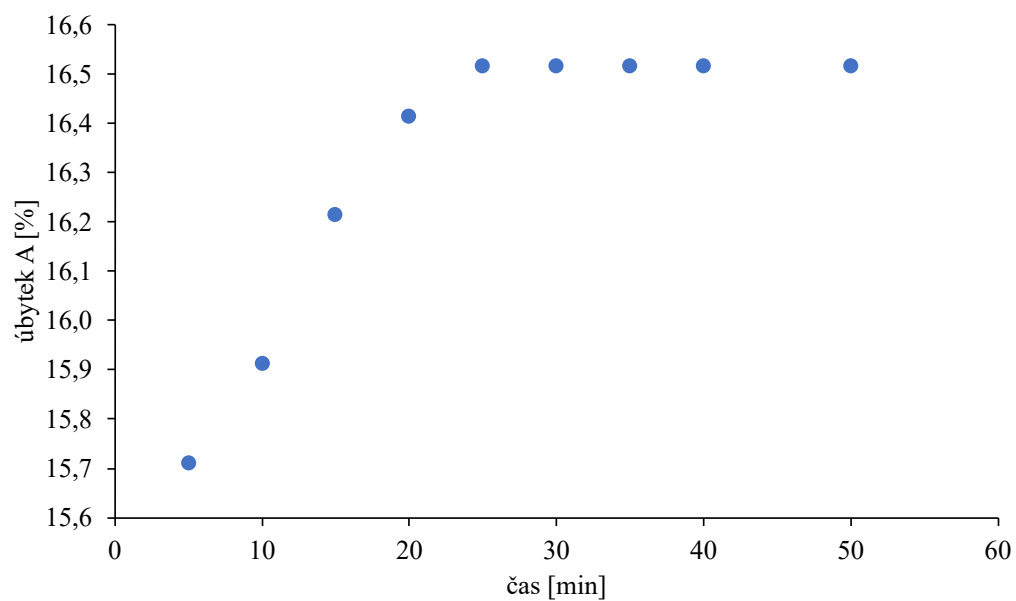


Obrázek 18: Antioxidační aktivita různých extraktů získaných ze vzorků quino pomocí metody ABTS 1-70% methanol, 2-70% aceton, 3-70% methanol + kyselina mravenčí, 4- vícenásobná extrakce (aceton—diethylether-ethylacetát), 5- kyselá hydrolýza, 6- alkalická hydrolýza

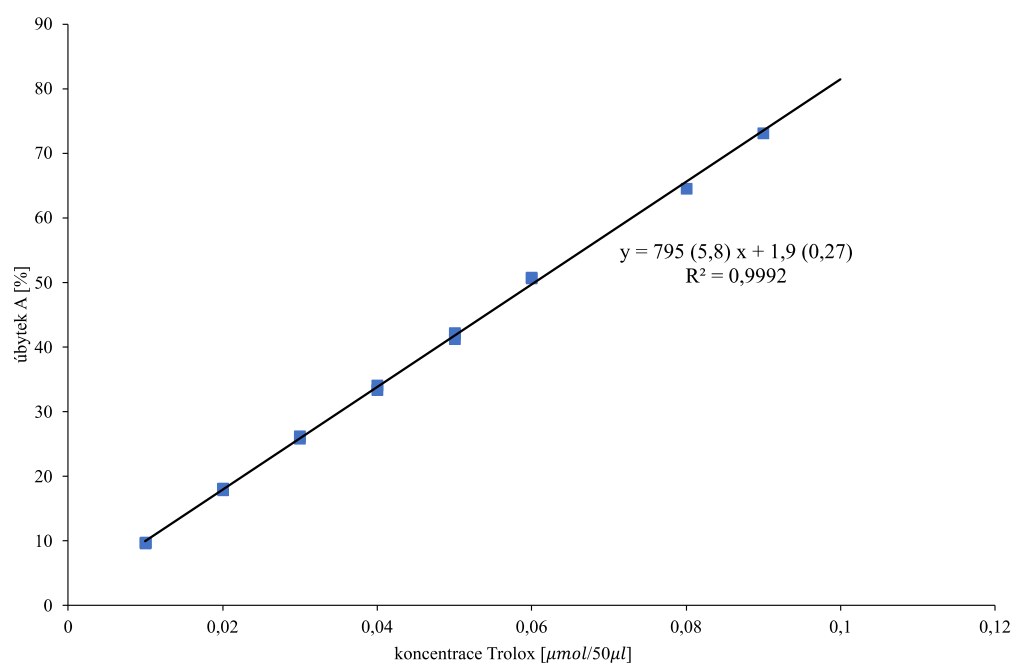
Z Obrázek 18 je patrné, že vysokou antioxidační aktivitu vykazují extrakty připravené pomocí 70% methanolu a acetonu (1,2). Antioxidační aktivita pozorovaná u jednotlivých rozpouštědel se významně neliší, ale je zajímavé, že u červené quinoy je pozorována vyšší antioxidační aktivita u methanolu, zatímco pro bílou quinou je vhodnější rozpouštědlo aceton. Nejvyšší antioxidační aktivitu lze vidět u extrakce 70% methanolem s přidavkem kyseliny mravenčí (3). Okyselením tedy došlo k mírnému podpoření extrakce fenolických kyselin, které zřejmě bez okyselení jsou disociovány a do rozpouštědla nepřechází. Dále byla testována účinnost vícenásobné extrakce nejprve pomocí 70% acetonu a poté pomocí směsi diethylether-ethylacetát, která se tradičně využívá při extrakcích volných fenolických látek z obilovin. Jak je patrné z Obrázek 18, při extrakci přechází do směsi diethylether-ethylacetát (4) pouze malé množství látek s antioxidačními vlastnostmi. Pro uvolnění vázaných fenolických látek byla u vzorků quinoy provedena kyselá a alkalická hydrolyza. Extrakty získané po kyselé hydrolyze (5) vykazují u červené i bílé quinoy srovnatelné hodnoty. U alkalické hydrolyzy (6) byla pozorována nižší antioxidační kapacita u bílé quinoy, což je pravděpodobně způsobené vyšší obsahem esterově vázaných látek s antioxidačními vlastnostmi u červené quinoy. Z chybových úseček je patrné, že nedocházelo k velkým odchylkám při spektrofotometrickém měření. Metodou ABTS jsou zpravidla pozorovány vyšší hodnoty antioxidační aktivity ve srovnání s ostatními spektrofotometrickými metodami, protože reaguje s velkým množstvím antioxidantů.

3.2 Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Pro stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH byla nejprve opět optimalizována reakční doba antioxidantů obsažených ve vzorku s radikálem DPPH. Z Obrázek 19 lze vidět, že optimální čas pro reakci je 30 minut. Za stejných podmínek byly poté proměřeny kalibrační roztoky standardu Troloxu a byla sestavena kalibrační křivka (Obrázek 20), která sloužila k přepočtu úbytku absorbance na TEAC. Kalibrační křivka byla sestavena pomocí deseti kalibračních bodů v rozmezí koncentrací 0,01 až 0,1 μmol Troloxu/50 μl a je spolu s rovnicí regrese a odchylkami jednotlivých parametrů uvedena na Obrázek 20.

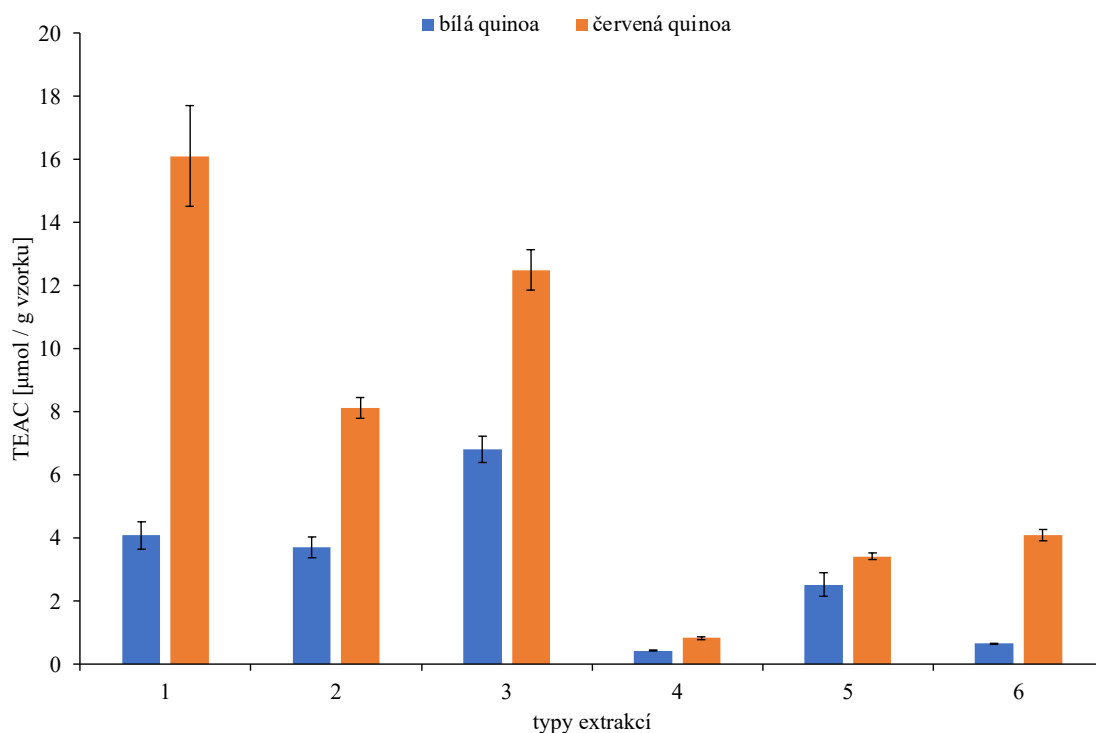


Obrázek 19: Závislost úbytku absorbance v procentech na době reakce pro metodu DPPH



Obrázek 20: Kalibrační křivka v závislosti úbytku A na množství Troloxu v dávkovaném objemu pro metodu DPPH

Pro stanovení antioxidační kapacity optimalizovanou metodou DPPH byly použité stejné vzorky bílé a červené quinoj jako u ABTS metody. Před samotným stanovením byly vzorky upraveny dle postupu uvedeném v experimentální části (kapitola 2.3.1). U každého vzorku bylo provedeno pět měření a hodnoty byly následně vyjádřeny jako TEAC ($\mu\text{mol Troloxu na } 1 \text{ g vzorku}$). Z vypočtených průměrných hodnot byl vytvořen sloupcový graf (Obrázek 21), kde je možné vidět rozdíl antioxidační aktivity u různých extraktů.



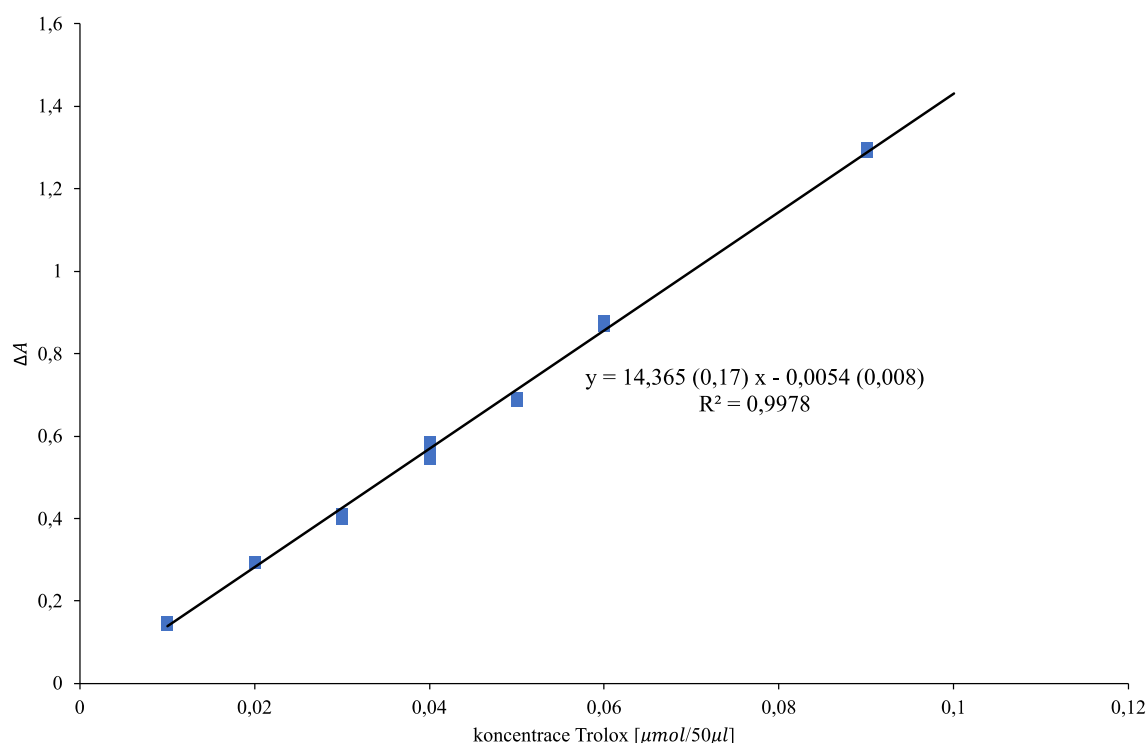
Obrázek 21: Antioxidační aktivita různých extraktů získaných ze vzorků quinoj pomocí metody DPPH
 1-70% methanol, 2-70% aceton, 3-70% methanol + kyselina mravenčí, 4- vícenásobná extrakce (aceton—diethylether-ethylacetát), 5- kyselá hydrolyza, 6- alkalická hydrolyza

Z Obrázek 21 je zřejmé, že červená quinoa obsahuje více látek s antioxidační aktivitou, které reagují s DPPH radikálem než quinoa bílá. U ABTS byly hodnoty červené a bílé quinoj u všech extrakcí srovnatelné. Bílá quinoa zřejmě obsahuje látky, které s DPPH nereagují, proto má menší antioxidační aktivitu než červená quinoa. Dále je patrné, že extrakční účinnost pro látky s antioxidačními vlastnostmi je lepší u 70% methanolu (1) než u acetonu (2). Po přidavku kyseliny mravenčí do 70% methanolu dochází opět k mírnému podpoření extrakce (3). Naopak nejnižší antioxidační aktivitu vykazují extrakty získané několika násobnou extrakcí (aceton-diethylether-ethylacetát) (4). Do směsi diethylether-ethylacetát přechází pouze malé množství látek s antioxidačními vlastnostmi.

Pro uvolnění vázaných fenolických látek byla u vzorků quinoy provedena kyselá a alkalická hydrolýza. Extrakty získané po kyselé hydrolýze (5) vykazují u červené i bílé quinoy srovnatelné hodnoty. Naopak u alkalické hydrolýzy (6) byla pozorována nižší antioxidační kapacita u bílé quinoy, pravděpodobně červená quinoa obsahuje více esterově vázaných látek s antioxidačními vlastnostmi. Je zde také vidět, že extrakty byly připravené s minimální chybou, s výjimkou extrakce 70% methanolem. Metoda DPPH je selektivnější oproti metodě ABTS, a proto má nižší schopnost reagovat s látkami v extraktech.

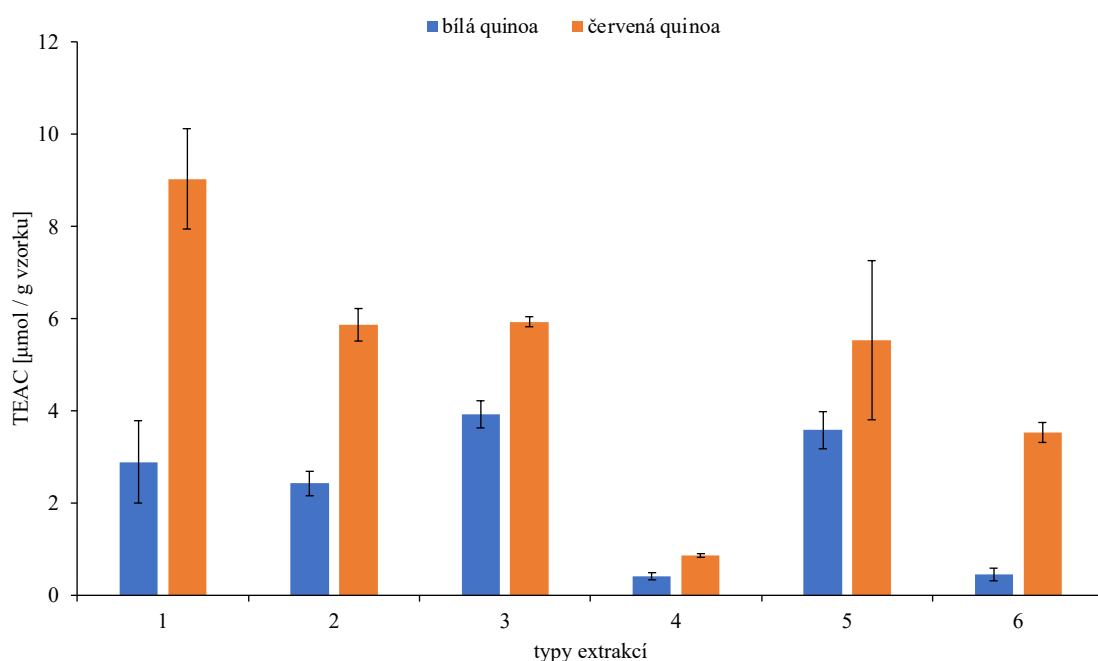
3.3 Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP

Optimalizace metody FRAP je převzatá z diplomové práce [63], ve které autor zjistil optimální reakční dobu 10 minut. Tyto podmínky byly zvoleny pro analýzu veškerých extraktů quinoy a k sestavení kalibrační křivky. Kalibrační křivka byla sestavena pomocí deseti kalibračních bodů v rozmezí koncentrací 0,01 až 0,1 $\mu\text{mol Troloxu}/50 \mu\text{l}$ a je spolu s rovnicí regrese a odchylkami jednotlivých parametrů uvedena na Obrázek 22.



Obrázek 22: Kalibrační křivka v závislosti úbytku A na množství Troloxu v dávkovaném objemu pro metodu FRAP

Metoda FRAP slouží k měření redukčních vlastností látek obsažených v extraktech, které jsou mírou antioxidační aktivity. Před samotným stanovením byly vzorky upraveny dle postupu uvedeném v experimentální části (kapitola 2.3.1). Každý vzorek se měřil pětkrát a změna absorbance jednotlivých vzorků byla pomocí regresní přímky kalibračního grafu (Obrázek 22) přepočtena na ekvivalentní množství Troloxu a vztažená na 1 g vzorku. Z vypočítaných průměrných hodnot byl vytvořen sloupcový graf (Obrázek 23), kde lze vidět rozdíl redukčních vlastností látek v různých extraktech.

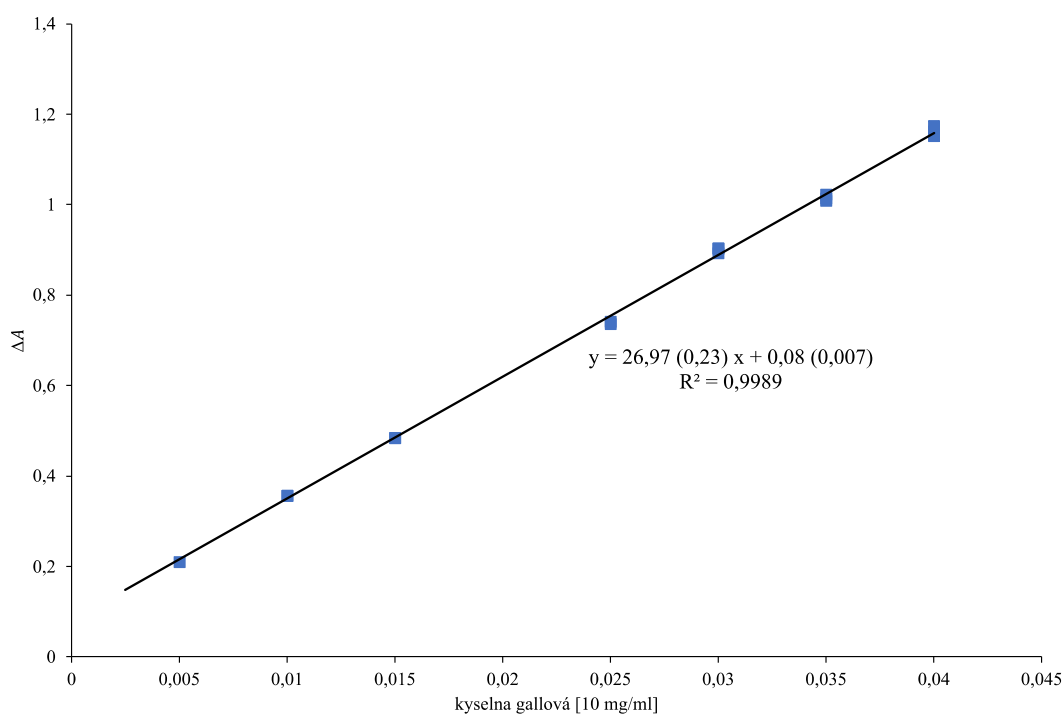


Obrázek 23: Antioxidační aktivita různých extraktů získaných ze vzorků quinoj pomocí metody FRAP
 1-70% methanol, 2-70% aceton, 3-70% methanol + kyselina mravenčí, 4- vícenásobná extrakce (aceton—diethyleter-ethylacetát), 5- kyselá hydrolýza, 6- alkalická hydrolýza

Z Obrázek 23 vyplývá, že červená quinoa má výrazně vyšší redukční vlastnosti oproti bílé quinoe. Opět ve srovnání s metodou ABTS, bílá quinoa obsahuje látky, které s metodou FRAP nereagují. Extrakty methanolu a acetonu, které byly připravené bez okyselení (1,2) a methanolu s přidavkem kyseliny mravenčí (3), nevykazovaly mezi sebou zásadní rozdíl. O trochu vyšší redukční vlastnosti nabývají u čistého methanolu. Dále byla testována vícenásobná extrakce (aceton-diethyleter-etylacetát) (4), kde jsou opět redukční vlastnosti nejnižší. U extraktů připravených po kyselé a alkalické hydrolýze (5,6) vykazuje červená quinoa o něco vyšší hodnoty TEAC než bílá quinoa. Oproti metodám ABTS a DPPH jsou však hodnoty TEAC menší.

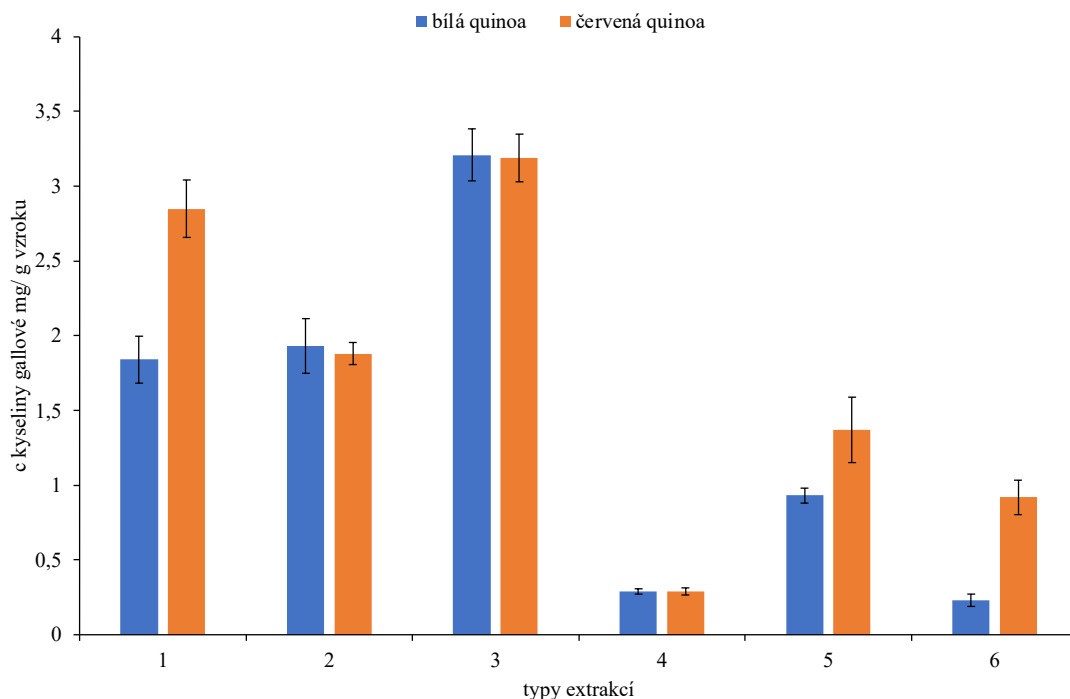
3.4 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Pro stanovení celkového obsahu fenolických látek byla metoda převzatá z diplomové práce [64], ve které autor zjistil optimální reakční dobu 35 minut. Tyto podmínky byly zvoleny pro analýzu všech extraktů připravených z bílé a červené quinoy. Pro kvantitativní vyjádření nárůstu absorbancí určující celkové množství fenolických látek v jednotlivých extraktech byla sestrojena kalibrační křivka závislosti ΔA na množství kyseliny gallové. Kalibrační závislost je spolu s parametry lineární regrese a jejich směrodatnými odchylkami uvedena na Obrázek 24.



Obrázek 24: Kalibrační křivka v závislosti úbytku A na množství kyseliny gallové v dávkovaném objemu

Před samotným stanovením byly vzorky upraveny dle postupu uvedeném v experimentální části (kapitola 2.3.1). U každého vzorku bylo provedeno pět měření. Pomocí kalibrační závislosti byly přepočítány hodnoty nárůstu absorbance u všech sledovaných extraktů na ekvivalentní množství kyseliny gallové (GAE) v 1 g vzorku. Ze získaných průměrných hodnot byl vytvořen sloupcový graf (Obrázek 25), kde lze vidět rozdíl v obsahu fenolických látek v různých extraktech.



Obrázek 25 :Antioxidační aktivita různých extraktů získaných ze vzorků quinoj pomocí Folin-Ciocalteuova činidla 1-70% methanol, 2-70% aceton, 3-70% methanol + kyselina mravenčí, 4- vícenásobná extrakce (aceton—diethylether-ethylacetát), 5- kyselá hydrolyza, 6- alkalická hydrolyza

Z Obrázek 25 vyplývá, že vysoké množství fenolických látek vykazují extrakty připravené pomocí 70% methanolu a acetonu (1,2). U červené quinoj je lepší extrakční účinnost pozorovaná u 70% metanolu. Opět je zde pozorovaný pozitivní vliv přídavku kyseliny mravenčí do extrakčního činidla (3), což způsobilo zvýšení celkového množství fenolických látek v extraktu. Naopak nejnižší množství fenolických látek vykazují opět extrakty s dvojnásobnou extrakcí (4). Důvodem je pravděpodobně ztráta fenolických látek při vícekrokové přípravě, kde do směsi diethylether-ethylacetát nepřechází tolik fenolických látek.

Pro uvolnění vázaných fenolických látek byla u vzorků quinoj provedena kyselá a alkalická hydrolyza. U kyselá i alkalické hydrolyzy (5,6) vykazuje červená quinoa vyšší množství fenolických látek než bílá quinoa. Pravděpodobně červená quinoa obsahuje více esterově vázaných látek s antioxidačními vlastnostmi. Při těchto hydrolyzách mohou nastat výrazné ztráty fenolických látek. To může být způsobené vysokými teplotami a drsnými podmínkami pH. Z Obrázek 25 lze také vidět, že z chybových úseček jednotlivých měření nedocházelo k velkým chybám při samotném spektrofotometrickém měření.

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit antioxidační vlastnosti merlíku čilského (quinoy). Dále bylo popsáno složení této pseudoobiloviny a její využití. Quinoa se považuje za velmi dobrou náhradu pestré stravy, která může představovat rychlý zdroj vyváženého příjmu energie. Obsahuje dvakrát více proteinů než rýže, a proto je vhodná pro vegany a vegetariány, kteří se mohou potýkat s jejich nedostatkem.

V praktické části práce jsem se zaměřila na sledování antioxidační aktivity různých extraktů připravených z quinoy pomocí čtyř různých spektrofotometrických metod (ABTS, DPPH, FRAP, TPC). Nejvyšších hodnot antioxidační aktivity bylo dosaženo metodou ABTS, kde radikál není tak selektivní a reaguje se širším množstvím látek oproti DPPH. U metody FRAP je oproti ABTS a DPPH testována redukční schopnost látek ve vzorku. Poslední metoda sloužila ke stanovení celkového množství fenolických látek.

Z hlediska testování účinnosti extrakce bylo nejvíce látek s antioxidačními vlastnostmi pozorováno u 70% methanolu okyseleného kyselinou mravenčí pro potlačení disociace látek kyselé povahy. Naopak nejméně látek bylo pozorováno u vícenásobné extrakce (aceton-diethyleter-ethylacetát). Kromě volných fenolických látek a antioxidantů byly analyzovány i vázané, které bylo nutné nejprve uvolnit pomocí kyselé či alkalické hydrolyzy.

Dále bylo zjištěno, že červená quinoa má vyšší antioxidační účinky než bílá quinoa, což je zřejmě způsobeno obsahem látek způsobujících danou barvu quinoy, které nejsou obsažené v quinoe bílé. Tyto rozdíly v antioxidační kapacitě bílé a červené quinoy byly pozorované u metod DPPH a FRAP. Tudíž látky, které obsahuje červená quinoa navíc, reagují s radikálem DPPH a mají redukční účinky a jsou tedy měřitelné metodou FRAP.

POUŽITÁ LITERATURA

1. TAYLOR, J.R.N., PARKER, M.L. *Quinoa*. In: *Pseudocereals and Less Common Cereals* [Online]. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, © 2002. [cit. 29. 1. 2023]. ISBN 978-3-662-09544-7. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-662-09544-7_3
2. LIU, J. (2019). Quinoa. In: WANG, J., SUN, B., TSAO, R., ed. *Bioactive Factors and Processing Technology for Cereal Foods* [Online]. Springer, Singapore, © 2019. [cit. 29. 1. 2023]. ISBN 978-981-13-6167-8. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-981-13-6167-8_12
3. OLA, H. Abdelbar, Flower vascularization and fruit developmental anatomy of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) Amaranthaceae. *Annals of Agricultural Sciences*, Volume 63 (1) ,2018, 67-75. ISSN 0570-1783, Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aos.2018.05.002>
4. PATHAN, S. & SIDDIQUI, R. A. (2022) Nutritional Composition and Bioactive Components in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) *Greens: A Review. Nutrients*. [Online] 14 (3), 558. [online]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.3390/nu14030558>
5. DAKHILI, Samira, ABDOLALIZADEH, Leyla, HOSSEINI, Marzieh, HOSSEINI, Seyede, SHOJAEI-ALIABADI, Saeedeh, MIRMOGHATAIE, Leila. Quinoa protein: Composition, structure and functional properties, *Food Chemistry*, Volume 299, 2019,125161, ISSN 0308-8146, Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125161>
6. GUIXING, Ren, CONG, Teng, XIN, Fan, SHENGYUAN, Guo, GANG, Zhao, LIZHEN, Zhang, ZOU, Liang, PEIYOU, Qin. Nutrient composition, functional activity and industrial applications of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), *Food Chemistry*, Volume 410, 2023, 135290, ISSN 0308-8146, Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135290>
7. PENG, M., YIN, L., DONG, J., SHEN, R., & ZHU, Y. (2022). *Physicochemical characteristics and in vitro digestibility of starches from colored quinoa (Chenopodium quinoa) varieties*. *Journal of Food Science*, 87, 2147–2158. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16126>
8. *Quinoa závod zblízka* [online]. In: [cit. 2023-02-23]. Dostupné z: <https://www.istockphoto.com/cs/fotografie/quinoa-závod-zblízka-gm1337268140-418221553>

9. Červená, černá a bílá quinoa semena [online]. In: [cit. 2023-02-23]. Dostupné z: <https://www.istockphoto.com/cs/fotografie/červená-černá-a-bílá-quinoa-semena-gm478769254-67573673?phrase=quinoa%20seed>
10. GÓMEZ-CARAVACA, Ana María, IAFELICE Giovanna, LAVINI, Antonella, PULVENTO Cataldo, CABONI, Maria Fiorenza a MARCONI, Emanuele. Phenolic Compounds and Saponins in Quinoa Samples (*Chenopodium quinoa* Willd.) Grown under Different Saline and Nonsaline Irrigation Regimens: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. American Chemical Society, © 2012, 60 (18), 4620–4627 [cit. 2023-02-24]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf3002125>
11. JACOBSEN, Sven-Erik. Developmental stability of quinoa under European conditions, *Industrial Crops and Products*, Volume 7, Issues 2–3, 1998, Pages 169-174, ISSN 0926-6690, [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(97\)00045-9](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(97)00045-9).
12. Wu, G., Morris, C.F. and Murphy, K.M. Evaluation of Texture Differences among Varieties of Cooked Quinoa: *Journal of Food Science* [online]. 2014, 79 (11), S2337-S2345 [cit. 2023-02-24]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12672>
13. WILSON, Elizabeth. *Quinoa genome sequenced* [online]. *C&EN Global Enterprise* 2017, 95 (7), 8-8 [cit. 2023-02-24]. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cen-09507-notw4>
14. HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) as source of bioactive compounds: A review. *Bioactive Compounds in Health and Disease* [online]. 2019, 2(3), 27–47 [cit. 2023-02-24]. Dostupné z: <https://www.ffhdj.com/index.php/BioactiveCompounds/article/view/556/1191>
15. FARAJZADEH, Zahra, SHAKERIAN, Amir, RAHIMI, Ebrahim, *Chemical, Antioxidant, Total Phenolic and Flavonoid Components and Antimicrobial Effects of Different Species of Quinoa Seeds* [online]. *Egypt. J. Vet. Sci.*, 2020, 51 (1), 43-54 [cit. 2023-02-24]. Dostupné z: <https://ejvs.journals.ekb.eg/>
16. PEREIRA, Eliana, ENCINA-ZELADA, Christian, BARROS, Lillian, GONZALES-BARRON, Ursula, CADAVEZ, Vasco, C.F.R. FERREIRA, Isabel. Chemical and nutritional characterization of *Chenopodium quinoa* Willd (quinoa) grains: A good alternative to nutritious food, *Food Chemistry*, Volume 280, 2019, Pages 110-114, ISSN 0308-8146, Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.068>
17. NG, C. Y., & WANG, M. (2021). The functional ingredients of quinoa (*Chenopodium quinoa*) and physiological effects of consuming quinoa: A review. *Food Frontiers*

- [online]. 2021, 2 (3), 329–356 [cit. 2023-02-24]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/fft2.109>
18. GORDILLO-BASTIDAS, E., DÍAZ-RIIZOLO, D., ROURA, E., MASSANÉS, T., & GOMIS, R. (2016). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), from nutritional value to potential health benefits: An integrative review. *Journal of Nutrition & Food Sciences* [online]. 2016, 6 (3), Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9600.1000497>
 19. REPO-CARRASCO-VALENCIA, Ritva, HELLSTRÖM, K., Jarkko, PIHLAVA, Juha-Matti, MATTILA H., Pirjo. Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*), *Food Chemistry*, 120 (1), 2010, 128-133, ISSN 0308-8146, Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.087>
 20. R.A., Carciochi, GALVÁN, D'Alessandro, G.D., L. and Manrique. (2016), Effect of roasting conditions on the antioxidant compounds of quinoa seeds [online]. *Int J Food Sci Technol*, 2016, 51(4), 1018-1025 [cit. 2023-02-26]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ijfs.13061>
 21. MATTILA, Pirjo, PIHLAVA, Juha-Matti, HELLSTRÖM, Jarkko. Contents of phenolic acids, alkyl – and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products [online]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 8290–8295 [cit. 2023-02-24]. ISSN 00218561. Dostupné z: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-27644595319&origin=inward&txGid=5e159611e0d6c240ed99c3b7eb9ea8d0#metrics>
 22. *Amaranthus caudatus* [online]. In: [cit. 2023-02-26]. Dostupné z: <https://www.istockphoto.com/cs/fotografie/amaranthus-caudatus-gm1346052651-423934169>
 23. *Canihua zrna izolovaná na bílém pozadí. Hromada qaniwy v olivové odměrku. Suchá zrna chenopodium pallidicaule.* [online]. In: [cit. 2023-02-26]. Dostupné z: <https://www.istockphoto.com/cs/fotografie/canhua-zrna-izolovaná-na-b%C3%ADlém-pozad%C3%AD-hromada-qaniwy-v-olivové-odměrku-suchá-gm1399388137-453269815>
 24. *Basic structure of flavonoids.* [online]. In: [cit. 2023-02-26]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Basic-structure-of-flavonoids_fig1_51174448
 25. HENAREJOS-ESCUADERO, Paula, GUADARRAMA-FLORES, Berenice, GUERRERO-RUBIO, M. Alejandra, GÓMEZ-PANDO, Luz Rayda, GARCÍA-CARMONA, Francisco, GANDÍA-HERRERO, Fernando. Development of Betalain

- Producing Callus Lines from Colored Quinoa Varieties (*Chenopodium quinoa* Willd) [online]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66 (2), 467–474 [cit. 2023-02-26]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04642>
26. NOWAK, Verena, CHARRONDIÈRE, Juan DU a U. Ruth. Assessment of the nutritional composition of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) [online]. *Food Chemistry*, 2016(193), 47-54 [cit. 2023-06-07]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.111>.
27. ALU'DATT, M. A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. *Food chemistry*. 2017. 218, 99-106.
28. VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS, 2002, 368 s. ISBN 80-866-5903-8.
29. CARCIOCHI, Ramiro Ariel, MANRIQUE, Guillermo Daniel, DIMITROV, Krasimir. Optimization of antioxidant phenolic compounds extraction from quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds [online]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52, 4396–4404 [cit. 2023-02-26]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1514-4>
30. ESCRIBANO, Josefa, CABANES, Juana, JIMÉNEZ-ATIÉNZA, Mercedes, IBÁÑEZ-TREMOLADA, Martha, GÓMEZ-PANDO, Luz Rayda, GARCÍA-CARMONA, Francisco, GANDÍA-HERRERO, Fernando. Characterization of betalains, saponins and antioxidant power in differently colored quinoa (*Chenopodium quinoa*) varieties [online]. *Food Chemistry*, 2017 (234), 285-294 [cit. 2023-06-07]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.187>.
31. DAWIDOWICZ, Andrzej L., OLSZOWY, Małgorzata, JÓŹWIK-DOLEBA, Małgorzata. Importance of solvent association in the estimation of antioxidant properties of phenolic compounds by DPPH method [online]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52, 4523–4529 [cit. 2023-02-26]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1451-2>
32. MIRANDA, Margarita, VEGA-GÁLVEZ, Antonio, LÓPEZ, Jéssica, PARADA, Gloria, SANDERS, Mariela, ARANDA, Mario, URIBE, Elsa, DI SCALA, Karina. Impact of air-drying temperature on nutritional properties, total phenolic content and antioxidant capacity of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Industrial Crops and Products* [online]. *Journal of Food Science and Technology*, 2010, 32 (3), 258-263 [cit.

- 2023-02-26]. ISSN 0926-6690. Dostupné z:
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.04.019>
33. GORINSTEIN, Shela, VARGAS, Oscar J. Medina, O. JARAMILLO, Nicolas et al. The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. *European Food Research and Technology* [online]. 2007, 225 (2–4), 321–328, Dostupné z:
<https://www.researchgate.net/publication/226531923> The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals
34. PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*. 2004, 98(4), 174–179.
35. RE, Roberta, PELLEGRINI, Nicoletta, PROTEGGENTE, Anna, PANNALA, Ananth YANG, Min Yang a Catherine. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 1999, 26 (9–10), 1231–1237 [cit. 2023-02-26]. ISSN 0891-5849. Dostupné z:
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
36. KOTLAND, Bc. Vojtěch. *Separace lipidů z buněčných tkání* [online]. Brno, 2019 [cit. 2023-06-07]. Dostupné z:
https://www.vut.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=189463.
 Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce prof. Ing. Tomáš Svěrák, CSc.
37. KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
38. PAŠKO, P., SAJEWICZ, M., GORINSTEIN, S., ZACHWIEJA, Z. Analysis of selected phenolic acids and flavonoids in *Amaranthus cruentus* and *Chenopodium quinoa* seeds and sprouts by HPLC. *Acta Chromatographica* [online]. 2008, 20 (4), 661–672 [cit. 2023-02-27]. ISSN 2083-5736. Dostupné z:
<https://doi.org/10.1556/achrom.20.2008.4.11>

39. ARAVENA-SANHUEZA, Felipe, PÉREZ-RIVERA, Mónica, CASTILLO-FELICES, Rosario, MUNDACA-URIBE, Rodolfo, BUSTOS, Aranda, PEÑA FARFAL, Mario a Carlos. Determination of antioxidant capacity (ORAC) of greigia sphacelata and correlation with voltammetric methods. *Journal of the Chilean Chemical Society* [online]. 2020, 65 (3), 4925-4928 [cit. 2023-02-27]. ISSN 0717-9707. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.4067/s0717-97072020000204925>
40. LUQUE DE CASTRO, M.D. a PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A* [online]. 2010, 1217(16), 2383-2389 [cit. 2023-06-07]. ISSN 0021-9673. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.027>
41. ROCCHETTI, Gabriele, LUCINI, Luigi, RODRIGUEZ, Jose M. Lorenzo, BARBA, Francisco J., GIUBERTI, Gianluca. Gluten-free flours from cereals, pseudocereals and legumes: Phenolic fingerprints and in vitro antioxidant properties. *Food Chemistry* [online]. 2019, 271, 157-164 [cit. 2023-02-27]. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.176>
42. LAUS, Maura N., GAGLIARDI, Anna, SOCCIO, Mario, FLAGELLA, Zina, PASTORE, Donato. Antioxidant Activity of Free and Bound Compounds in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Seeds in Comparison with Durum Wheat and Emmer. *Journal of Food Science* [online]. 2012, 77(11), C1150-C1155 [cit. 2023-02-27]. ISSN 00221147. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02923.x>
43. YANG, Xiushi, ZHU, Kaili, GUO, Huimin et al. Characterization of volatile compounds in differently coloured *Chenopodium quinoa* seeds before and after cooking by headspace-gas chromatography-ion mobility spectrometry. *Food Chemistry* [online]. 2021, 348, 129086 [cit. 2023-02-27]. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129086>
44. YANG, Wenjian, YU, Jie, PEI, Fei, MARIGA, Alfred Mugambi, MA, Ning, FANG, Yong, HU, Qiuhui. Effect of hot air drying on volatile compounds of *Flammulina velutipes* detected by HS-SPME–GC–MS and electronic nose. *Food Chemistry* [online]. 2016, 196, 860-866 [cit. 2023-02-27]. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.097>

45. WANG, L., C. L. WELLER a K. T. HWANG. Extraction of Lipids from Grain Sorghum DDG. *Biological Systems Engineering: Papers and Publications* [online]. 2005, 48(5), 1883-1888 [cit. 2023-06-07]. Dostupné z: https://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1095&context=biosysengf_acpub
46. Soxhlet extractor. In: *Chemistry glossary* [online]. b.r. [cit. 2023-05-06]. Dostupné z: https://www.periodni.com/gallery/soxhlet_extractor.png
47. MEDINA, M.B., KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V. Simple and Rapid Method for the Analysis of Phenolic Compounds in Beverages and Grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011-03-09, 59 (5), pp. 1565-1571. DOI: 10.1021/jf103711c. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf103711c>
48. Naklíčená semena [online]. In: . [cit. 2023-02-27]. Dostupné z: <https://www.istockphoto.com/...797>
49. Tabbouleh salát s quinoou, petrželkou a zeleninou [online]. In: . [cit. 2023-02-27]. Dostupné z: <https://www.istockphoto.com/...539>
50. A. PEKAL, K. PYRZYNSKA, Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay, *Food Analytical Methods*, 2014, 7, 1776–1782, Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12161-014-9814-x> [cit. 06.06.2023]
51. ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004, 262 s. ISBN 80-246-0852-9.
52. KEALEY, D. a P. HAINES. *Analytical chemistry*. Oxford: BIOS, 2002, 342 s. Instant notes series. ISBN 18-599-6189-4.
53. ŠEVČÍK, J., G., K., Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Karlova Univerzita [online] 2008 [cit. 2008-05-08] Dostupné z: <http://www.natur.cuni.cz/~sevcik/plyn_chrom.pdf>
54. ZHU, Nanqun, SHENG, Shuqun, LI, Dajie, LAVOIE, Edmond J., KARWE, Mukund V., ROSEN, Robert T. and HO, Chi-Tang. ANTIOXIDATIVE FLAVONOID GLYCOSIDES FROM QUINOA SEEDS (CHENOPODIUM QUINOA WILLD). *Journal of Food Lipids* [online]. 2007, 2001, 37-44 [cit. 2023-06-19]. ISSN 1065-7258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.2001.tb00182.x>
55. HUNG, Pham Van a Naofumi MORITA. Distribution of phenolic compounds in the graded flours milled from whole buckwheat grains and their antioxidant capacities. *Food Chemistry*. 2008, 109(2), 325–331.

56. VOLLMANNOVÁ, A., E. MARGITANOVÁ, T. TÓTH, M. TIMORACKÁ, D. URMINSKÁ, T. BOJŇANSKÁ a I. ČIČOVÁ. Cultivar Influence on Total Polyphenol and Rutin Contents and Total Antioxidant Capacity in Buckwheat, Amaranth, and Quinoa Seeds. *Czech Journal of Food Sciences*. 2013. 31, 589–595.
57. PAŠKO, Paweł, Henryk BARTOŇ, Paweł ZAGRODZKI, Shela GORINSTEIN, Maria FOŁTA a Zofia ZACHWIEJA. Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. *Food Chemistry*. 2009, 115(3), 994–998.
58. ALVAREZ-JUBETE, L., H. WIJNGAARD, E.K. ARENDT a E. GALLAGHER. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chemistry*. 2010, 119(2), 770–778.
59. TANG, Yao, LI, Xihong, ZHANG, Bing, CHEN, Peter X., LIU, Ronghua, TSAO, Rong. Characterisation of phenolics, betanins and antioxidant activities in seeds of three *Chenopodium quinoa* Willd. Genotypes, *Food Chemistry*, Volume 166, 2015, 380-388, ISSN 0308-8146, Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.018>.
60. TANG, Yao, LI, Xihong, ZHANG, Bing, CHEN, Peter X., LIU, Ronghua, TSAO, Rong. Bound Phenolics of Quinoa Seeds Released by Acid, Alkaline, and Enzymatic Treatments and Their Antioxidant and α -Glucosidase and Pancreatic Lipase Inhibitory Effects, *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 2016, 64 (8), 1712-1719, Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05761>
61. STALIKAS, Constantine D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*. 2007, 30(18), 3268-3295.
62. DINI, Irene, Gian Carlo TENORE a Antonio DINI. Antioxidant compound contents and antioxidant activity before and after cooking in sweet and bitter *Chenopodium quinoa* seeds. *LWT – Food Science and Technology* [online]. 2010, 43 (3), 447-451 [cit. 2023-02-26]. ISSN 0023-6438. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.09.010>
63. OTRUSINOVÁ, Bc. Jitka. Analýza fenolických látek obsažených ve vinných hroznech a ve víně. Pardubice, 2008. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D
64. ŠALOMOUNOVÁ, Bc. Tereza. Analýza významných biologicky aktivních látek v různých částech lichořeřišnice větší s využitím HPLC/MS/MS. Pardubice, 2019. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D

65. KUMAR, B. Ramesh. Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2017, 7(6), 349-364.
66. PASKO, PAWEL, HENRYK BARTOŃ, MARIA FOLTA a JADWIGA GWIŹDŹ. Evaluation of Antioxidant Activity of Amaranth (*Amaranthus Cruentus*) Grain and By-Products (Flour, Popping, Cereal). *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*. 2007, 58(1), 35-40.
67. ANDERSEN, Øyvind M. a Kenneth R. MARKHAM. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press: Taylor & Francis Group, 2006. ISBN 9780849320217.