

Laboratorní hodnocení stravitelnosti sacharidů v potravinách a krmivech s možností predikce glykemického indexu

Jana Bradová, Lenka Štěrbová, Petra Smrčková

METODIKA PRO PRAXI



Výzkumný ústav rostlinné
výroby, v.v.i., Praha 6 –
Ruzyně



VŠCHT PRAHA

Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze

2015

Metodika vznikla za finanční podpory MZe ČR a je výsledkem řešení projektu NAZV QJ1310219 „Pšenice se specifickým složením a vlastnostmi škrobu pro potravinářské a průmyslové účely“ a projektu RO0415 „Udržitelné systémy a technologie pěstování zemědělských plodin pro zlepšení a zkvalitnění produkce potravin, krmiv a surovin v podmínkách měnícího se klimatu“.

©Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha
©Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

ISBN 978-80-7427-191-5

Kolektiv autorů:

Ing. Jana Bradová (40 %), bradova@vurv.cz

Ing. Lenka Štěrbová, Ph.D. (40 %), sterbova@vurv.cz

Ing. Petra Smrčková, (20 %), Petra.Smrckova@vscht.cz

Oponenti:

Ing. František Kůst

Odbor rostlinných komodit - MZe Praha

MZe ČR Praha

doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.

Katedra speciální produkce rostlinné, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Metodika byla schválena Odborem rostlinných komodit Ministerstva zemědělství ČR, osvědčení č. 69174/2015-MZe-17221.

Seznam zkratek

GI - glykemický index

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie

AcCN - acetonitril

FSF – volná fruktóza (free sugar fructose)

FSG - volná glukóza (free sugar glucose)

RAG - rychle dostupná glukóza (rapidly available glucose)

SAG - pomalu dostupná glukóza (slowly available glucose)

TG - celková glukóza (total glucose)

RDS - rychle stravitelný škrob (rapidly digestible starch)

SDS - pomalu stravitelný škrob (slowly digestible starch)

RS - rezistentní škrob (resistant starch)

G20 - uvolněná glukóza po 20 min. enzymatické reakce

G120 - uvolněná glukóza po 120 min. enzymatické reakce

GOPOD - kolorimetrický set glukoso-oxidáza/peroxidáza

USP - specifikace enzymatické aktivity podle lékopisu Spojených států amerických (U. S. Pharmacopeia)

SEM – standardní chyba průměru (standard error of the mean)

OBSAH

1. CÍL METODIKY	7
2. ÚVOD	7
2.1 Sacharidy - klasifikace	7
2.2. Glykemický index - GI	8
2.3. Metody stanovení glykemického indexu	9
2.3.1. Klinické <i>in vivo</i> testy	9
2.3.2. Laboratorní metoda <i>in vitro</i>	10
3. VLASTNÍ POPIS METODIKY	11
3.1. Technické vybavení	11
3.1.1. Přístroje a zařízení	11
3.1.2. Laboratorní sklo, laboratorní pomůcky	12
3.1.3. Chemikálie	12
3.1.4. Enzymy	12
3.2. Příprava standardních roztoků	13
3.3. Příprava vzorků	15
3.5. Analytické postupy měření celkové stravitelnosti sacharidů <i>in vitro</i>	15
3.4.1. Stanovení obsahu volných cukrů metodou HPLC	15
3.4.1.1. Příprava vzorků (HPLC)	15
3.4.1.2. Stanovení obsahu glukózy a fruktózy (HPLC)	16
3.4.1.3. Výpočet obsahu glukózy a fruktózy (HPLC)	17
3.4.2. Stanovení obsahu rychle dostupné glukózy, pomalu dostupné glukózy, celkové glukózy metodou HPLC	18
3.4.2.1. Příprava vzorků (HPLC)	18
3.4.2.2. Stanovení obsahu glukózy v získaných frakcích metodou HPLC	21
3.4.2.3. Výpočty obsahu glukózy ve frakcích (HPLC)	21
3.4.3. Stanovení obsahu volných cukrů spektrofotometrickou metodou	21
3.4.3.1. Příprava vzorků (spektrofotometrická metoda)	22
3.4.3.2. Stanovení obsahu glukózy (spektrofotometrická metoda)	22
3.4.3.3. Výpočet obsahu glukózy (spektrofotometrická metoda)	23
3.4.4. Stanovení obsahu rychle dostupné glukózy, pomalu dostupné glukózy, celkové glukózy spektrofotometrickou metodou	23
3.4.4.1. Příprava vzorků (spektrofotometrická metoda)	23
3.4.4.2. Stanovení obsahu glukózy v získaných frakcích (spektrofotometrická metoda)	24
3.4.4.3. Výpočty obsahu glukózy ve frakcích (spektrofotometrická metoda)	25

3. 5. Rovnice pro výpočet frakcí glukózy resp. škrobu	25
3.6. Výpočet glykemického indexu GI	26
4. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“	27
5. POPIS UPLATNĚNÍ.....	28
6. EKONOMICKÉ ASPEKTY.....	28
7. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	29
8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	30

1. CÍL METODIKY

Cílem metodiky bylo vyvinout analytickou metodu, která stanoví enzymatickou dynamiku stravitelnosti sacharidů obsažených v potravě a současně umožní odhad resp. *in vitro* screening glykemického indexu (GI) u různých potravin a surovin, z nichž je finální produkt vyroben. Metoda může částečně nahradit finančně náročné klinické testy stanovení GI na dobrovolnících, nutriční testy na zvířatech, nalezne uplatnění v potravinářském průmyslu, v krmivářství, ve šlechtění a při mapování nutričních vlastností zrna genetických zdrojů obilovin či brambor.

2. ÚVOD

2.1 Sacharidy - klasifikace

Sacharidy patří spolu s bílkovinami a tuky mezi hlavní živiny. Jsou vytvářeny v buňkách zelených rostlin z oxidu uhličitého a vody za přítomnosti slunečního záření. Sacharidy jsou důležitým zdrojem energie lidí na celém světě a ovlivňují mnoho metabolických a fyziologických pochodů v těle, včetně činnosti mozku a fyzické výkonnosti a nacházejí se v semenech a hlízách rostlin (obilniny, pseudoobilniny, luskoviny, brambory a další plodiny). Sacharidy jsou tráveny a absorbovány různou rychlostí v tenkém střevě v závislosti na jejich botanickém původu a formě dané potraviny. Strava obsahující velké množství rychle stravitelných sacharidů, které zvyšují hladinu glukózy v krvi a inzulínovou odezvu, může mít nepříznivý dopad na lidské zdraví a naopak strava bohatá na pomalu stravitelné sacharidy může chránit proti různým chronickým onemocněním. Vliv kvality sacharidů v potravě na zdraví člověka vede k jejich členění, které bere tento aspekt v úvahu. V tabulce 1 je uvedena klasifikace sacharidů v potravinách, která byla vyvinuta na základě studií provedených u lidí, charakterizující sacharidy jak z pohledu chemického složení, tak na základě pravděpodobného místa, rychlosti a míry trávení. Škrob patří mezi fyziologicky a hospodářsky nejdůležitější polysacharidy, jeho nutriční hodnota souvisí se strukturou molekuly a s modifikací upravující biologickou dostupnost – mechanickou, tepelnou nebo chemickou. Podle úrovně stravitelnosti může být škrob rozdělen do tří kategorií: rychle stravitelný škrob (rapidly digestible starch – RDS), pomalu stravitelný škrob (slowly digestible starch – SDS) a rezistentní škrob (resistant starch – RS). Úroveň RDS úzce souvisí s hodnotou glykemického indexu, u kterého se předpokládá, že zvyšuje pravděpodobnost vzniku cukrovky a prediabetes, kardiovaskulárních chorob a obezity. Předností SDS je pomalý nárůst postprandiální hladiny glukosy v krvi, přičemž její hladinu udržuje na konstantní úrovni. Oproti tomu křivka rychle stravitelného škrobu má vysoké maximum a následný rychlý pokles. Hormonální a metabolické odezvy odpovídají postprandiální glykémii. Pozitivní důsledky SDS se projevují ve fyzické a duševní výkonnosti organismu, v pocitu sytosti a umožňují řízení diabetu. Naproti tomu rezistentní škrob není rozštěpen enzymy v tenkém

střevě, ale přechází až do tlustého střeva. RS se tak řadí mezi nevyužitelné polysacharidy, má tedy podobnou funkci jako vláknina, do které bývá i zařazován. V tlustém střevě však může být střevní mikroflórou metabolizován na sekundární produkty [1].

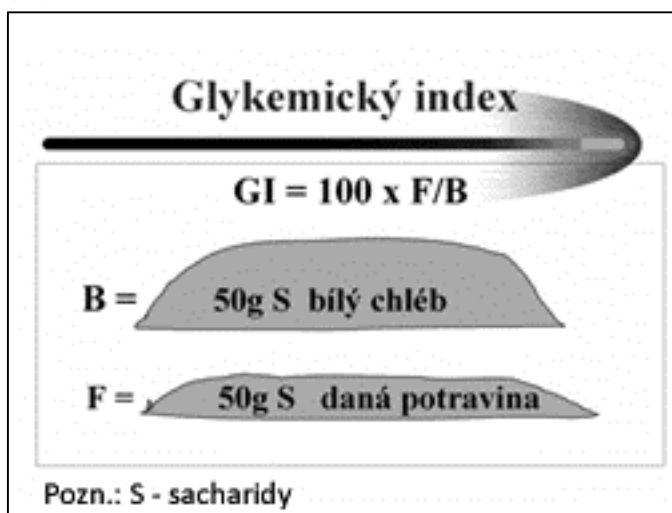
Tabulka 1: Klasifikace sacharidů v potravinách rostlinného původu [2]

Kategorie, složka	Poznámka
Jednoduché cukry Mono- a disacharidy (a jejich alkoholy)	Fyziologická odezva závisí na původu a rychlosti uvolňování Volná glukóza + glukóza ze sacharózy = FSG
Oligosacharidy Maltodextriny Rezistentní sacharidy s krátkým řetězcem (nestravitelné-oligosacharidy)	Měřené jako RDS Fermentovány v tlustém střevě - mohou stimulovat růst bifidobakterií
Škrob Rychle stravitelný škrob (RDS) Pomalu stravitelný škrob (SDS) Rezistentní škrob (RS)	RDS + rychle uvolněná FSG = rychle dostupná glukóza (RAG) SDS + pomalu uvolněná FSG = rychle dostupná glukóza (SAG) Nepodléhá trávení v tenkém střevě
Neškrobové polysacharidy Neškrobové polysacharidy buněčných stěn rostlin – vláknina	Zpomalují vstřebávání glukózy a ostatních živin; fermentovány v různém rozsahu v tlustém střevě
Ostatní neškrobové polysacharidy	Potravinová aditiva; méně významné složky potravy; fermentovány v různém rozsahu v tlustém střevě

2.2. Glykemický index - GI

Centrálním bodem metabolismu sacharidů je molekula glukózy. Ve vztahu k rychlosti, s jakou je glukóza v potravině dostupná se po jídle mění hladina krevního cukru v těle (glykémie). Ta je v lidském těle za normálních podmínek stálá a je udržována regulačními mechanismy. Přechodně se hladina krevního cukru zvyšuje po jídle a v závislosti na čase tvoří křivku, jejíž amplituda a strmost je odvozena právě od dostupnosti glukózy v dané potravině a ovlivněna regulačními mechanismy hormonální soustavy člověka. Dostupnost glukózy z dané potravy je proto klíčovým faktorem ovlivňujícím nutriční vlastnosti sacharidů. Odlišná dynamika uvolňování glukózy do krve po konzumaci potravy je velmi dobře popsána glykemickým indexem (GI) potravy. Glykemický index zjednodušeně vyjadřuje rychlost, za jakou se komplexní sacharidy obsažené v přijímané potravě přemění v trávicím traktu na glukózu, která se dostane do krevního oběhu. Vyjádření glykemického indexu je relativní hodnocení této rychlosti vůči glukóze, která má index hodnoty 100 (Obr. 1).

Obr. 1: Glykemický index (GI)



(převzato z http://www.bajk.cz/data/clanek.asp?id_clanek=507)

Čím rychleji dokáže potravina zvýšit hladinu glukózy v krvi, tím má potravina vyšší glykemický index. Nejvyšších hodnot dosahují jednoduché sacharidy, nejnižších komplexní sacharidy. Glykemický index v potravíně je ovlivněn mnoha faktory, jako je třeba množství vlákniny, obsah tuků, kyselin, sacharózy nebo technologické zpracování. Klasifikování sacharidů podle jejich glykemického indexu doporučili organizace WHO a FAO [3, 4].

Hodnocení potravin podle glykemického indexu je používáno ve zdravé výživě, redukční dietě a diabetické dietě. Zdravá výživa je prevencí nadváhy a obezity, a také proti různým onemocněním, např. inzulinové rezistenci a následně i diabetes mellitus 2. typu. V diabetické dietě má glykemický index význam při udržování stálé hladiny glukózy v krvi. Potraviny s nízkým GI se na redukci hmotnosti podílejí zvětšením pocitu sytosti a podporou metabolismu lipidů na úkor metabolického využití sacharidů. Naopak konzumace potravin s vysokým GI vede k rychlému výkyvu postprandiální glykemie. Může tak prohlubovat pocit hladu a tím stimulovat chuť k jídlu, urychlovat uvolnění adrenalinu a kortizolu podporující ukládání energie získávané z jídla do tělesného tuku. Současné studie ukazují, že vysoký glykemický index potravy je rizikovým faktorem vzniku diabetu, kardiovaskulárních chorob a obezity [5].

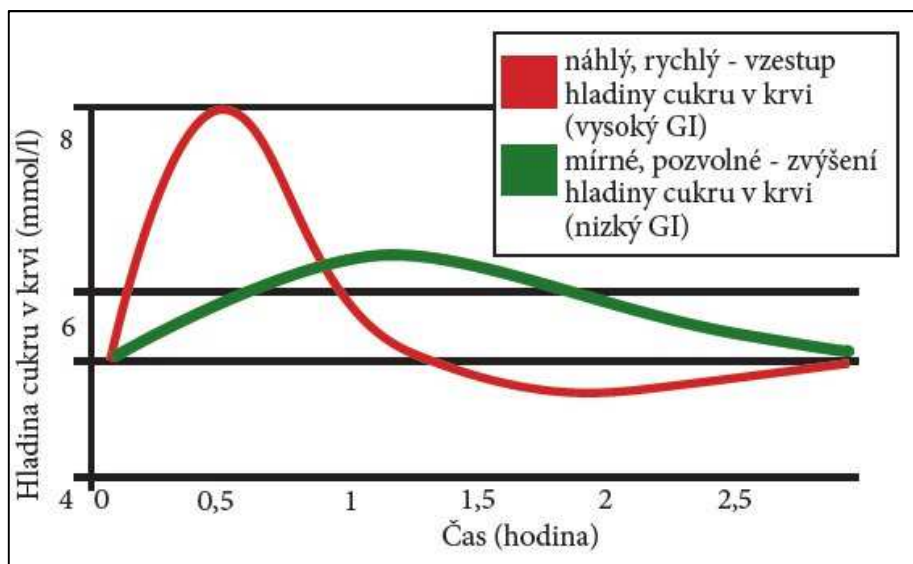
2.3. Metody stanovení glykemického indexu

2.3.1. Klinické *in vivo* testy

Klasický způsob stanovení GI je prováděn stanovením hladiny glukózy po požití 50g porce sledované potraviny zdravým dobrovolníkem, přičemž jako referenční potravina slouží roztok glukózy, nebo bílé pečivo (Obr. 2). Byť jde o spolehlivý a zavedený způsob stanovení nutričních vlastností potraviny, má určité nevýhody, které jeho používání limitují. Klinické testy zahrnující práci s lidskými dobrovolníky jsou náročné jak finančně, tak i organizačně. Navíc jejich provádění podléhá přísným pravidlům a schvalovacímu procesu etické komise. To jsou důvody, proč u konkrétních výrobků mnozí výrobci nechtějí glykemický index

stanovovat a existují pouze obecné tabulky, byť je to zcela proti současnému trendu informovaného zákazníka.

Obr. 2: Hladina krevní glukózy u čisté glukózy ■ a testované potraviny ■ (Množství sacharidů v referenční a testované potravíně musí být stejné)



(převzato z <http://www.norbi-update.cz/proc-konzumovat-vyroby-update1/>)

2.3.2. Laboratorní metoda *in vitro*

Již několik let probíhají po celém světě výzkumy, které mají za cíl nahradit klinické testy laboratorní metodou bez nutnosti využívat lidské dobrovolníky. Četné studie [6,7,8,9] potvrdily významnou souvislost mezi úrovní GI a stravitelností polysacharidů resp. podílu rychle a pomalu dostupné glukózy (RAG, SAG). Metoda odhadu glykemického indexu v laboratoři vychází z analýzy stravitelnosti sacharidů enzymovým aparátem, zjednodušeně kopírujícím lidský trávicí systém [2, 6]. Rychle a pomalu dostupná glukóza se stanovuje v několika fázích enzymatické hydrolýzy a celková glukóza (TG) pak po totální hydrolýze. Z naměřených parametrů pak lze určit, jaký bude mít konzumace potraviny vliv na hladinu cukru v krvi konzumenta a odhadnout glykemický index potraviny.

Podle matematických modelů prezentovaných Englystem et al. [2] je glykemická odezva (tj. plocha pod křivkou glykemie závislá na obsahu rychle dostupné glukózy v potravíně.

$$\text{Glykemická odezva} = K(RAG)$$

Konstanta K je obecně závislá na typu potraviny, na daném jedinci a na obsahu sacharidů v konzumované porci. Variabilitu představovanou testovaným jedincem lze eliminovat po vztahování glykemické odezvy k výsledkům pokusu s volnou glukózou (prakticky jde o výpočet glykemického indexu), variabilitu představovanou obsahem sacharidů je možné eliminovat standardním provedením klinických testů se stejným množstvím sacharidů. Variabilita způsobená různými typy potravin je nevyhnutelná, lze však předpokládat, že u potravin s vysokým obsahem glukózových polysacharidů bude nízká. Zařazení dalších proměnných

charakterizujících kvalitu sacharidů do regresního modelu (obsah volné glukózy, pomalu dostupné glukózy a celkové glukózy) by tuto variabilitu mělo snížit.

3. VLASTNÍ POPIS METODIKY

3.1. Technické vybavení

3.1.1. Přístroje a zařízení

- třepací vodní lázeň s nastavitelnou frekvencí třepání (120 RPM) a nastavitelnou teplotou (37°C), která umožní umístit zkumavky horizontálně a podélně ve směru třepání (Obr. 3)
- vodní lázeň s nastavitelnou teplotou (70°C)
- vodní lázeň - 100°C (lze nahradit vaříčem a vhodnou nádobou s víkem)
- laboratorní centrifuga (1500 × g) pro 50ml plastové centrifugační zkumavky
- laboratorní centrifuga (10000 RPM) pro plastové centrifugační mikrozkušavky objemů 1,5 ml a 2,0 ml
- třepačka VORTEX
- magnetická míchačka
- ultrazvuková lázeň
- chladnička s mrazničkou
- HPLC/RI* – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s refraktometrickou detekcí
- UV/VIS** spektrofotometr umožňující měření při $\lambda = 510$

Obr. 3: Vodní lázeň s třepací vložkou s nastavitelnou frekvencí třepání a nastavitelnou teplotou



3.1.2. Laboratorní sklo, laboratorní pomůcky

- plastové konické centrifugační zkumavky s víčkem (50 ml a 15 ml)
- plastové centrifugační mikrozukumavky (2 ml a 1,5 ml)
- vialky *
- spektrofotometrické kyvety, optická dráha 10 mm**
- skleněné kuličky o průměru 14 mm (P-lab; I885811),
- další běžné laboratorní sklo a plast (stojánky, kádinky, skleněné zkumavky, odměrné válce, špičky).
- automatické pipety s rozsahy: 1 -5 ml; 100 -1000 µl; 20 -200 µl; 10-100 µl; 1-10 µl
- osobní ochranné pracovní prostředky.

Pozn: přístroje, zařízení, laboratorní sklo a pomůcky pouze pro - HPLC analýzu; - spektrofotometrickou analýzu**; bez označení- společné pro obě metody*

3.1.3. Chemikálie

V tabulce 2 je uveden seznam všech chemikálií potřebných k analýzám stravitelnosti sacharidů *in vitro* včetně aktuálního výrobce resp. dodavatele (2015).

Tabulka 2: Seznam chemikálií

Název chemický vzorec resp. označení v katalogu		Dodavatel	Katalogové číslo
Síran zinečnatý*	ZnSO4	Ing. Petr Švec – PENTA	25890-30500
Hexakynožeželnatan draselný*	K4Fe(CN)6	Ing. Petr Švec – PENTA	13890-31000
Kyselina octová	CH3COOH	Ing. Petr Švec – PENTA	20000-11000
Octan sodný	CH3COONa	Ing. Petr Švec – PENTA	22750-31000
Hydroxid draselný	KOH	Ing. Petr Švec – PENTA	15520-31000
Kyselina chlorovodíková	HCl	Ing. Petr Švec – PENTA	19360-11000
Acetonitril pro HPLC*	AcCN	Lach-Ner, s.r.o.	20041-ST0
Guarová guma	Guar	SIGMA-ALDRICH spol. s r.o.	G4129
Ethanol absolutní**	C2H5OH	Ing. Petr Švec – PENTA	71250-11000
Glukóza*	C6H12O6	Merck spol . s r.o.	1083370250
Fruktóza*	C6H12O6	Merck spol . s r.o.	1040070250
Pšeničná mouka hladká (PMH)		běžně dostupná v obchodní síti	

Pozn.: Chemikálie potřebné pouze pro - HPLC analýzu*; - spektrofotometrickou analýzu**; bez označení - společné pro obě metody

3.1.4. Enzymy

V tabulce 3 je uveden seznam všech enzymů potřebných k analýzám stravitelnosti sacharidů *in vitro* včetně jejich specifikace a aktuálního výrobce resp. dodavatele (2015).

Tabulka 3: Seznam enzymů

Název	Označení v katalogu	Specifikace	Dodavatel	Katalogové číslo
Pepsin	Pepsin from porcine gastric mucosa	prášek, ≥ 250 units/mg	SIGMA-ALDRICH spol. s r.o.	P7000
Invertáza	Invertin MERCK® zvlhčovač pro výrobu cukrovinek	Sucrose (pH 4.5; 25 °C) ≥ 2400 U/ml, β -Glucosidase $\leq 0,05$ U/ml	Merck spol. s r.o.	1047382500
Pankreatin	Pancreatin from porcine pancreas	prášek 8xUSP	SIGMA-ALDRICH spol. s r.o.	P7545
Amyloglukosidáza	Amyloglucosidase from <i>Aspergillus niger</i>	≥ 300 units/ml, vodný roztok	SIGMA-ALDRICH spol. s r.o.	A7095
GOPOD- kolorimetrický set glukoso-oxidáza/ peroxidáza **	D-Glucose Assay Kit (GOPOD Format)	Činidlo 1: Fosfátový Pufr (48 ml, Ph=7,4) Činidlo 2: Glukosa oxidasa + peroxidasa + aminoantipyrin Činidlo 3: Glukózový standard (1mg/ml)	Megazyme Inc.	K-GLUC

Pozn.: Enzymy potřebné pouze pro - HPLC analýzu*; - spektrofotometrickou analýzu**; bez označení- společné pro obě metody

3.2. Příprava standardních roztoků

Množství roztoků uvedených v této kapitole je kalkulováno jako dostatečné pro analýzu 18 vzorků.

Příprava 1 den před použitím – uchovávat v lednici

I. Carrez I; Carrez II *

Carrez I : 30% síran zinečnatý – 30 g ZnSO₄, doplnit dest. vodou do 100 ml

Carrez II: 15% hexakynoželeznatan draselný – 15 g K₄Fe(CN)₆, doplnit dest. vodou do 100 ml; pokud trihydrát, tak navážka m = 17,2 g)

II. Kyselina octová (1mol/l) = 570 μ l CH₃COOH, doplnit dest. vodou do 10 ml

III. Octan sodný (0,5 mol/l) = 6,804 g CH₃COONa, doplnit dest. vodou do 100 ml

IV. Hydroxid draselný (7 mol/l) = 78,547 g KOH doplnit dest. vodou do 200 ml

V. Kyselina chlorovodíková (0,05M) = 0,818ml = 818 μ l 37% HCl doplnit dest. vodou do 200 ml

VI. Reakční činidlo GOPOD (kolorimetrický set glukoso-oxidáza/peroxidáza) [11]**

Obsah činidla 1 kvantitativně převedeme do odměrné baňky a doplníme destilovanou vodou do 1000 ml. Přibližně ve 20 ml tohoto roztoku rozpustíme obsah činidla 2. Převedeme do odměrné baňky a důkladně promícháme. Rozdělíme do 100 ml plastových lahvíček a uchováváme při teplotě -20°C až jeden rok. Před vlastním použitím vytemperujeme na laboratorní teplotu.

Příprava v den analýzy

VII. Roztok pepsin/guarová guma

200 ml 0,05M HCl (roztok V) + 1g pepsinu + 1g guarové gumy

Pozn.: pepsin a guarovou gumu vložit do Erlenmeyerovy baňky s magnetickým míchadlem, začít míchat na magnetické míchačce na sucho a pak přilít požadovaný objem HCl, jinak lze jen obtížně homogenizovat

VIII. Roztok amyloglukosidázy

Předpřipravený od výrobce, pouze vytemperovat

IX. Invertáza

Roztok od výrobce, pouze vytemperovat

X. Směs enzymů

Připravit 6 centrifugačních zkumavek s víčkem (50ml), do každé navážit 3 g pankreatinu + 20 ml dest. vody → uzavřít víčkem, zamíchat na vortexu a 10 min míchat na míchačce → odstředdit 10 min. (1500 × g) → horních 15 ml zakaleného supernatantu z každé zkumavky (celkem 90 ml) se převede pipetou do jedné baňky a přidá se 4 ml amyloglukosidázy (roztok VII) + 6 ml invertázy (roztok VIII) → promíchat

XI. Standard glukózy (1mg/ml) **

Předpřipravený od výrobce, pouze vytemperovat (činidlo 3, enzymový set: D-Glucose assay procedure - GOPOD)

XII. Roztok etanolu (66 % V/V)** = 330 ml absolutního etanolu doplnit destilovanou vodou do 500 ml

Pozn: roztoky pouze pro - HPLC analýzu; - spektrofotometrickou analýzu**; bez označení- společné pro obě metody*

3.3. Příprava vzorků

Pro hodnocení stravitelnosti sacharidů pomocí analytické *in vitro* metody je důležité, aby byly vzorky jídla analyzované ve formě, ve které jsou obvykle konzumovány, respektive u krmiva ve formě, v jaké je zkrmováno. Homogenizace vzorku by měla odpovídat mechanickému rozmělnění při konzumaci.

3.5. Analytické postupy měření celkové stravitelnosti sacharidů *in vitro*

3.4.1. Stanovení obsahu volných cukrů metodou HPLC

3.4.1.1. Příprava vzorků (HPLC)

- navážit takové množství vzorku, aby obsahovalo méně než 0,6 g sacharidů do 50ml plastové zkumavky s přesností na 1 mg
- přidat do každé zkumavky: 25 ml destilované vody + 5 skleněných kuliček a uzavřít
- intenzivně promíchat na vortexu
- umístit do vroucí lázně na 30min
- intenzivně promíchat na vortexu
- ochladit na 37°C
- přidat 3 ml invertázy (roztok IX) do každé zkumavky
- třepat 30 min ve vodní lázni (37°C)- zkumavky v horizontální poloze (120 RPM)
- 1 ml z každého vzorku pipetovat do centrifugační mikrozukavky (objem zkumavky 2ml)
- přidat 100 µl Carrez I a 100 µl Carrez II
- zatřepat a nechat 5 minut stát
- odstředit (5 min, 10000 RPM)
- 0,15 ml supernatantu přenést do další centrifugační mikrozukavky (objem zkumavky 2ml)
- přidat 0,15 ml destilované vody, 0,85 ml acetonitrilu (AcCN), zatřepat a centrifugovat (5 min, 10000 RPM)
- supernatant přenést do vialky a analyzovat na HPLC → podíl FSG (volná glukóza)

3.4.1.2. Stanovení obsahu glukózy a fruktózy (HPLC)

Glukóza a fruktóza jsou stanoveny pomocí separace kapalinovou chromatografií na NH₂ koloně isokratickou elucí 85% acetonitrilem a refraktometrické detekce. Autorské pracoviště provádí analýzy na systému Waters 2695 + Waters 414, analýzy je možné provádět na srovnatelné instrumentaci.

Parametry metody jsou uvedené v tabulce 4, na obrázku 4a a 4b jsou ukázky chromatogramu z analýzy standardního roztoku a vzorku.

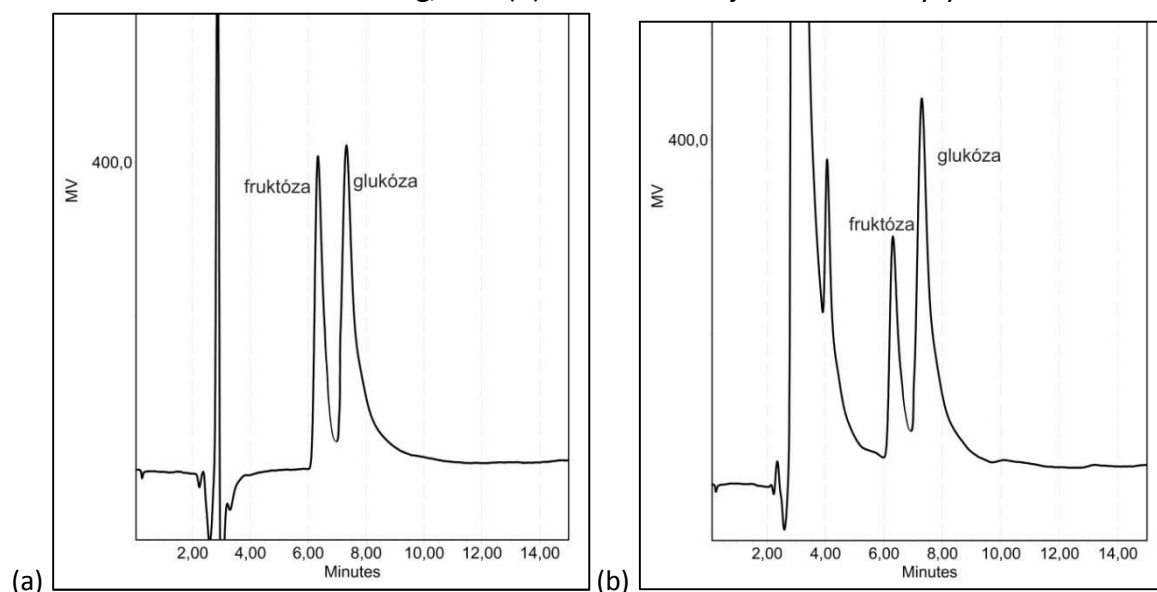
Tabulka 4: Parametry analytické metody

Stacionární fáze	stac. fáze LiChrosorb NH ₂ , 5µm
Kolona	kolona LiChroCART (250 × 4,6 mm)
Teplota kolony	35 °C
Mobilní fáze	Acetonitril: demineralizovaná voda 85:15
Průtok	1 ml/min
Doba analýzy	15 min
Retenční čas fruktózy†	7,4 min
Retenční čas glukózy†	7,9 min
Teplota detektoru	35 °C
Polarita	+
Senzitivita	512
Sampling rate	10 s ⁻¹
Kvantifikace	Externí sada standardů
LOD	0,03 mg/ml
LOQ	0,1 mg/ml
Lineární rozsah	0,1 – 2,5 mg/ml

Pozn.: †retenční čas analytů je pouze orientační, bude se lišit podle použitého systému

Koncentrace glukózy v analyzovaném vzorku je kvantifikována podle plochy píku pomocí kalibrační křivky v rozsahu 0,1 mg/ml – 2,5 mg/ml s 5 – 7 rovnoměrně rozloženými kalibračními body.

Obr. 4: Ukázky chromatogramu z analýzy (a) standardního roztoku směsi glukózy a fruktózy o koncentraci CGLU = CFRU = 1 mg/ml a (b) vzorku obsahujícího oba analyty



3.4.1.3. Výpočet obsahu glukózy a fruktózy (HPLC)

Obsah volné glukózy ve vzorku vyjádřený v % hmotnosti vzorku.

$$FSG = c_{Glu} * \left(\frac{1,15}{0,15} \right) * \left(\frac{1,2}{1} \right) * \left(\frac{28}{m_{vzorku}} \right) * 10$$

Obsah volné fruktózy ve vzorku vyjádřený v % hmotnosti vzorku

$$FSF = c_{Fru} * \left(\frac{1,15}{0,15} \right) * \left(\frac{1,2}{1} \right) * \left(\frac{28}{m_{vzorku}} \right) * 10$$

c_{Glu} ... koncentrace glukózy v příslušném vzorku získaná kvantifikací pomocí externí kalibrační křivky, vyjádřená v mg/ml

m_{vzorku} ... hmotnost vzorku v gramech

Číselné hodnoty ve vzorcích (přepočítávací koeficienty) jsou odvozeny z konkrétního provedení analýzy podle objemu použitých činidel.

3.4.2. Stanovení obsahu rychle dostupné glukózy, pomalu dostupné glukózy, celkové glukózy metodou HPLC

3.4.2.1. Příprava vzorků (HPLC)

Zjednodušené schématické znázornění pracovního postupu přípravy vzorků pro analýzu stravitelnosti sacharidů metodou HPLC je uvedeno na obrázku 5.

- navážit takové množství vzorku, aby obsahovalo méně než 0,6 g sacharidů do 50ml plastové zkumavky s přesností na 1 mg
- přidat do každé zkumavky: 5 ml destilované vody + 10 ml čerstvě připraveného roztoku pepsin- guarová guma (roztok VII), uzavřít a vortexovat
- temperovat 30 min ve vodní lázni (37°C)
- přidat 5 ml octanu sodného (roztok III; vytemperovaný na 37°C) + 5 skleněných kuliček a uzavřít
- jemně zatřepat a několik minut temperovat ve vodní lázni (37°C)
- z lázně se vyjmout 1. (první) zkumavku (čas 0 – pustit stopky) a přidat 5 ml enzymové směsi (roztok X) → ihned uzavřít, jemně promíchat a umístit horizontálně do 37°C vodní lázně (již třepající - 120 RPM)
- směs enzymů (v objemu 5 ml) postupně přidávat k ostatním vzorkům v 1 min intervalech → ihned uzavřít, jemně promíchat a umístit horizontálně a podélně ve směru třepání do 37°C teplé, třepající vodní lázně
- poté postupně každou další zkumavku vyjmout přesně po 20 min a:

1 ml z každého vzorku pipetovat do centrifugační mikrozukavky (velikost 2 ml) a zkumavku s původním vzorkem ihned vrátit zpět do lázně (nutno hlídat pořadí vzorků, aby byl zachován 20min interval reakce u každého vzorku)
do centrifugační mikrozukavky s 1 ml odebraného vzorku přidat 100 µl Carrez I a 100 µl Carrez II (ukončení hydrolýzy), uzavřít, zatřepat, nechat 5 minut stát, odstředit (5 min, 10000 RPM)
0,15 ml supernatantu přenést do další centrifugační mikrozukavky → přidat 0,85 ml AcCN (acetonitril) a 0,15 ml dest. H₂O, uzavřít, zatřepat a centrifugovat (5 min, 10000 RPM) → supernatant přenést do vialky a analyzovat → podíl G20 (RAG – rychle dostupná glukóza)

- po bezprostředním vrácení každé zkumavky do lázně obsah inkubovat 100 min (celkem 120 min inkubace)
- pak zkumavky v daném pořadí opět vyjímat a:

1 ml z každého vzorku pipetovat do centrifugační mikrozukavky (2ml) a zkumavku s původním vzorkem ihned vrátit zpět do lázně (nutno hlídat pořadí vzorků)
do centrifugační mikrozukavky s 1 ml odebraného vzorku přidat 100 µl Carrez I a 100 µl Carrez II (ukončení hydrolýzy), uzavřít, zatřepat, nechat 5 minut stát, odstředit (5 min, 10000 RPM)

0,15 ml supernatantu přenést do další centrifugační mikrozkušavky (0,2 ml) → přidat 0,85 ml AcCN a 0,15 ml dest. H₂O, uzavřít, zatřepat a centrifugovat (5 min, 10000 RPM) → supernatant přenést do vialky a analyzovat → podíl G120

- poté vzorky intenzivně vortexovat a umístit na 30 min do vřící vodní lázně
- vortexovat a chladit ve vodě s ledem 15 min
- do každé zkumavky přidat 10 ml KOH (roztok IV) → uzavřít, promíchat
- 30 min míchat v horizontální poloze v ledové vodě
- poté zkumavky jednotlivě vyjmout a odebrat 0,2 ml vzorku do centrifugační mikrozkušavky (0,2ml), kde je již napipetován 1ml kyseliny octové (roztok II)
- přidat 40 µl roztoku amyloglukosidázy zředěného 1:7 (5 µl amyloglukosidázy - roztok VIII + 35 µl H₂O = 40 µl na 1 vzorek, uzavřít a promíchat
- umístit na 30 min do vodní lázně (70°C)
- poté přendat na 10 min do vřící vodní lázně
- pak ochladit a přidat 150 µl roztoku Carrez I a 150 µl roztoku Carrez II ke každému vzorku, zatřepat, nechat 5 minut stát a odstředit (5 min, 10000 RPM)
- 0,15 ml supernatantu pipetovat do další centrifugační mikrozkušavky (0,2ml) přidat 0,85 ml AcCN + 0,15 ml H₂O, uzavřít, zatřepat a centrifugovat (5 min, 10000 RPM)
- supernatant přenést do vialky a analyzovat → podíl celkové glukózy (TG)

Zjednodušené schématické znázornění pracovního postupu přípravy vzorků pro analýzu stravitelnosti sacharidů metodou HPLC je uvedeno na Obr. 5.

Poznámky:

Lze analyzovat max. 18 vzorků v jednom analytickém běhu vzhledem k minutovým intervalům při odběru frakce G20, kdy celková doba pro odběry je 20 minut.

Z tohoto důvodu je většina roztoků připravována pro 18 vzorků (viz. 3.3. Příprava standardních roztoků).

Pro kontrolu je vhodné do analyzovaného setu vzorků zařadit standardní vzorek – PMH (Tabulka 2)

```

graph TD
    A[HOMOGENIZOVANÝ VZOREK] --> B[Přidej roztok pepsínu a guarové gumy]
    B --> C[Temperuj 30 min při 37°C]
    C --> D[Přidej octan sodný a skleněné kuličky]
    D --> E[Temperuj při 37°C]
    E --> F[Přidej směs enzymů (pankreatin, amyloglukosidáza, invertáza)]
    F --> G[Inkubuj v třepací lázni při 37°C]
    G --> H[Po 20 min odeber 1 ml vzorku]
    G --> I[Po 100 min odeber 1 ml vzorku]
    H --> J[Promíchej a umísti do vřící vodní lázně na 30 min]
    I --> J
    J --> K[Promíchej a ochlad' k 0°C]
    K --> L[Přidej KOH]
    L --> M[Inkubuj v třepací lázni při 0°C 30 min]
    M --> N[Odeber 0,2 ml vzorku a přidej ho do roztoku CH3COOH]
    N --> O[Přidej amyloglukosidázu]
    O --> P[Inkubuj 30 min při 70°C]
    P --> Q[10 min ve vřící vodní lázni]
    Q --> R[Ochlad', vyčeř Carrézovými činidly, centrifuguj]
    R --> S[0,15 ml vzorku + AcCN → HPLC]
    S --> T[CELKOVÁ GLUKÓZA (TG)]
    R --> U[Vyčeř Carrézovými činidly, centrifuguj]
    U --> V[Odeber 0,15 ml vzorku + AcCN →]
    V --> W[G 120]
    V --> X[G 20 (RAG)]
  
```

3.4.2.2. Stanovení obsahu glukózy v získaných frakcích metodou HPLC

Postup stanovení obsahu glukózy ve frakcích označených jako G20, G120 a TG je totožný s postupem popsáným v Kapitole 3.4.1.2. Stanovení obsahu glukózy a fruktózy (HPLC).

3.4.2.3. Výpočty obsahu glukózy ve frakcích (HPLC)

Obsah glukózy uvolněné po dvaceti minutách vyjádřený v % hmotnosti vzorku

$$G_{20} = c_{Glu} * \left(\frac{1,15}{0,15} \right) * \left(\frac{1,2}{1} \right) * \left(\frac{25}{m_{vzorku}} \right) * 10$$

Obsah glukózy uvolněné po sto dvaceti minutách vyjádřený v % hmotnosti vzorku

$$G_{120} = c_{Glu} * \left(\frac{1,15}{0,15} \right) * \left(\frac{1,2}{1} \right) * \left(\frac{25}{m_{vzorku}} \right) * 10$$

Obsah celkové glukózy vyjádřený v % hmotnosti vzorku

$$TG = c_{Glu} * \left(\frac{1,15}{0,15} \right) * \left(\frac{1,54}{0,2} \right) * \left(\frac{35}{m_{vzorku}} \right) * 10$$

c_{Glu} ... koncentrace glukózy v příslušném vzorku získaná kvantifikací pomocí externí kalibrační křivky, vyjádřená v mg/ml

m_{vzorku} ... hmotnost vzorku v gramech

Číselné hodnoty ve vzorcích (přepočítávací koeficienty) jsou odvozeny z konkrétního provedení analýzy podle objemu použitých činidel.

3.4.3. Stanovení obsahu volných cukrů spektrofotometrickou metodou

Ke stanovení obsahu glukózy v připravených vzorcích se používá komerčně dostupný enzymový set (D- glukose assay procedure) vyráběný firmou Megazyme (Tabulka 3)

3.4.3.1. Příprava vzorků (spektrofotometrická metoda)

- navážit takové množství vzorku, aby obsahovalo méně než 0,6 g sacharidů do 50ml plastové zkumavky s přesností na 1 mg
- přidat do každé zkumavky: 25 ml destilované vody + 5 skleněných kuliček a uzavřít
- intenzivně promíchat na vortexu
- umístit do vroucí lázně na 30min
- intenzivně promíchat na vortexu
- ochladit na 37°C
- přidat 3 ml invertázy (roztok IX) do každé zkumavky
- třepat 30 min ve vodní lázni (37°C)- zkumavky v horizontální poloze (120 RPM)
- 1 ml z každého vzorku pipetovat do centrifugační zkumavky (objem zkumavky 15 ml) obsahující 2 ml etanolu (roztok XII)
- intenzivně promíchat na vortexu
- zatřepat a nechat 5 minut stát
- odstředit (10 min, 6000 RPM)
- 1 ml supernatantu přenést do další centrifugační mikrozukumavky (objem zkumavky 15ml) a zředit 5 ml destilované vody
- 0,1 ml alikvotní podíl analyzovat spektrofotometricky → podíl FSG (volná glukóza)

3.4.3.2. Stanovení obsahu glukózy (spektrofotometrická metoda)

- z každé centrifugační zkumavky pipetovat dvakrát 0,1 ml supernatantu do skleněných zkumavek
- spolu s každou sadou vzorků měříme 2x glukózový standard a připravujeme jeden slepý pokus.
- glukózový standard: pipetovat dvakrát 0,1 ml glukózového standardu (roztok XI) do skleněných zkumavek
- slepý pokus: pipetovat jednou 0,1 destilované vody do skleněných zkumavek
- přidat 3,0 ml redukčního činidla GOPOD (roztok VI), včetně do 2 glukózových standardů a 1 slepého pokusu
- inkubovat po dobu 20 minut při 50°C ve vodní lázni
- změřit absorbanci při vlnové délce $\lambda = 510$ nm proti slepému pokusu

3.4.3.3. Výpočet obsahu glukózy (spektrofotometrická metoda)

Obsah volné glukózy ve vzorku vyjádřený v % hmotnosti vzorku

$$FSG = \left(\frac{10^{-4}}{A_{GLU}} \right) * \left(\frac{6}{0,1} \right) * \left(\frac{100}{m_{vzorku}} \right) * 88$$

A_{vz} ... absorpance vzorku měřená proti slepému pokusu

A_{GLU} ... absorpance standardu glukosy měřená proti slepému pokusu

m_{vzorku} ... hmotnost vzorku v gramech

Číselné hodnoty ve vzorcích (přepočítávací koeficienty) jsou odvozeny z konkrétního provedení analýzy podle objemu použitých činidel.

3.4.4. Stanovení obsahu rychle dostupné glukózy, pomalu dostupné glukózy, celkové glukózy spektrofotometrickou metodou

Ke stanovení obsahu glukózy v připravených vzorcích se používá komerčně dostupný enzymový set (D- glukose assay procedure) vyráběný firmou Megazyme (Tabulka 3)

3.4.4.1. Příprava vzorků (spektrofotometrická metoda)

- navážit takové množství vzorku, aby obsahovalo méně než 0,6 g sacharidů do 50ml plastové zkumavky s přesností na 1 mg
- přidat do každé zkumavky: 5 ml destilované vody + 10 ml čerstvě připraveného roztoku pepsin- guarová guma (roztok VII), uzavřít a vortexovat
- temperovat 30 min ve vodní lázni (37°C)
- Přidat 5 ml octanu sodného (roztok III; vytemperovaný na 37°C) + 5 skleněných kuliček a uzavřít
- jemně zatřepat a několik minut temperovat ve vodní lázni (37°C)
- z lázně se vyjmout 1. (první) zkumavku (čas 0 – pustit stopky) a přidat 5 ml enzymové směsi (roztok X) → ihned uzavřít, jemně promíchat a umístit horizontálně do 37°C vodní lázně (již třepající - 120 RPM)
- směs enzymů (v objemu 5 ml) postupně přidávat k ostatním vzorkům v 1 min intervalech → ihned uzavřít, jemně promíchat a umístit horizontálně do 37°C vodní lázně (třepající)

- poté postupně každou další zkumavku vyjmout přesně po 20 min a:

0,5 ml z každého vzorku pipetovat do centrifugační kyvety (velikost 50 ml) obsahující 20 ml etanolu (roztok XII) a zkumavku s původním vzorkem ihned vrátit zpět do lázně (nutno hlídat pořadí vzorků, aby byl zachován 20min interval reakce u každého vzorku) odebraný podíl vzorku s etanolem intenzivně promíchat na vortexu a odstředit (10 min, 6000 RPM)
0,1 ml alikvotní podíl analyzovat spektrofotometricky → podíl G20 (RAG – rychle dostupná glukóza)

- po bezprostředním vrácení každé zkumavky do lázně obsah inkubovat 100 min (celkem 120 min inkubace)
- pak zkumavky v daném pořadí opět vyjímat a:

0,5 ml z každého vzorku pipetovat do centrifugační kyvety (velikost 50 ml) obsahující 20 ml etanolu (roztok XII) a zkumavku s původním vzorkem ihned vrátit zpět do lázně (nutno hlídat pořadí vzorků) odebraný podíl vzorku s etanolem intenzivně promíchat na vortexu a odstředit (10 min, 6000 RPM)
0,1 ml alikvotní podíl analyzovat spektrofotometricky → podíl G120

- poté vzorky intenzivně vortexovat a umístit na 30 min do vřící vodní lázně
- vortexovat a chladit ve vodě s ledem 15 min
- do každé zkumavky přidat 10 ml KOH (roztok IV) → uzavřít, promíchat
- 30 min míchat v horizontální poloze v ledové vodě
- poté zkumavky jednotlivě vyjmout a odebrat 0,2 ml vzorku do centrifugační zkumavky (15ml), kde je již napipetováno 2 ml kyseliny octové (roztok II)
- přidat 40 µl roztoku amyloglukosidázy zředěného 1:7 (5 µl amyloglukosidázy - roztok VIII + 35 µl H₂O = 40 µl na 1 vzorek, uzavřít a promíchat
- umístit na 30 min do vodní lázně (70°C)
- poté přendat na 10 min do vřící vodní lázně
- pak ochladit a přidat 10 ml destilované vody ke každému vzorku, intenzivně promíchat na vortexu a odstředit (10 min, 6000 RPM)
- 0,1 ml alikvotní podíl supernatantu analyzovat spektrofotometricky → podíl celkové glukózy (TG)

3.4.4.2. Stanovení obsahu glukózy v získaných frakcích (spektrofotometrická metoda)

Postup stanovení obsahu glukózy ve frakcích označených jako G20, G120 a TG je totožný s postupem popsáním v Kapitole 3.4.3.2. Stanovení obsahu glukózy (spektrofotometrická metoda).

3.4.4.3. Výpočty obsahu glukózy ve frakcích (spektrofotometrická metoda)

Obsah glukózy uvolněné po dvaceti minutách vyjádřený v % hmotnosti vzorku

$$G_{20} = A_{vz} * \left(\frac{10^{-4}}{A_{GLU}} \right) * \left(\frac{20,5}{0,1} \right) * \left(\frac{25}{0,5} \right) * \left(\frac{100}{m_{vzorku}} \right)$$

Obsah glukózy uvolněné po sto dvaceti minutách vyjádřený v % hmotnosti vzorku

$$G_{120} = A_{vz} * \left(\frac{10^{-4}}{A_{GLU}} \right) * \left(\frac{20,5}{0,1} \right) * \left(\frac{25}{0,5} \right) * \left(\frac{100}{m_{vzorku}} \right)$$

Obsah celkové glukózy vyjádřený v % hmotnosti vzorku

$$TG = A_{vz} * \left(\frac{10^{-4}}{A_{GLU}} \right) * \left(\frac{12,24}{0,1} \right) * \left(\frac{34}{0,2} \right) * \left(\frac{100}{m_{vzorku}} \right)$$

A_{vz} ... absorbance vzorku měřená proti slepému pokusu

A_{GLU} ... absorbance standardu glukosy měřená proti slepému pokusu

m vzorku ... hmotnost vzorku v gramech

Číselné hodnoty ve vzorcích (přepočítávací koeficienty) jsou odvozeny z konkrétního provedení analýzy podle objemu použitých činidel.

3. 5. Rovnice pro výpočet frakcí glukózy resp. škrobu

V reakční směsi (3.4.1. a 3.4.3) byl stanoven obsah volné glukózy (FSG) a v reakční směsi (3.4.2. a 3.4.4.) obsah uvolněné glukózy po dvaceti (G20) a sto dvaceti minutách (G120) a obsah celkové glukózy (TG). Hodnoty pro rychle dostupnou glukózu (RAG), pomalu dostupnou glukózu (SAG), rychle stravitelný škrob (RDS), pomalu stravitelný škrob (SDS),

rezistentní škrob (RS) a celkový škrob (TS) se vypočítají z naměřených hodnot FSG, G20, G120 a TG (rovnice 1-6). Hodnoty pro frakce škrobu byly vyjádřeny jako polysacharidy pomocí faktoru 0,9 [1].

$$RAG = G20 \quad (1)$$

$$SAG = G120 - G20 \quad (2)$$

$$RDS = (G20 - FSG) \times 0,9 \quad (3)$$

$$SDS = (G120 - G20) \times 0,9 \quad (4)$$

$$TS = (TG - FSG) \times 0,9 \quad (5)$$

$$RS = (TG - G120) \times 0,9 \quad (6)$$

3.6. Výpočet glykemického indexu GI

Vzhledem k provedeným klinickým testům na stanovení glykemického indexu, které zahrnovaly 11 referenčních potravin na bázi pšenice (Tabulka 5), jež byly také podrobeny *in vitro* analýze stravitelnosti sacharidů, bylo možné vytvořit regresní model pro výpočet glykemického indexu z hodnot FSG, RDS, SDS a RS.

Vzorec pro výpočet glykemického indexu

$$GI = -21,28 FSG + 53,91 FSG + 0,49 RDS + 1,04 SDS - 0,87 RS$$

Číselné hodnoty uvedené v rovnici jsou regresní koeficienty odvozené z regresního modelu získaného pomocí naměřených dat uvedených v tabulce 5.

Takto postavený model vysvětluje 61 % variability a směrodatná chyba odhadu glykemického indexu je 20,8 bodu. Vzhledem k tomu, že relativní rozptyl hodnot naměřených v klinických testech se pohyboval v rozmezí 13,7 – 35,6 % průměrné hodnoty, jde o srovnatelnou nejistotu výstupních hodnot jako v klinických zkouškách.

Při používání modelu je nutné mít na paměti, že vstupní soubor dat je omezený, neboť díky náročnosti klinických zkoušek nebylo možné otestovat více potravin. Referenční potraviny jsou navíc poměrně homogenní co do složení, s vysokým obsahem škrobu a nízkým obsahem volných cukrů a tuku, který může glykemický index a stravitelnost škrobu velmi ovlivnit. Proto doporučujeme výpočet používat pouze pro potraviny podobného charakteru.

Tabulka 5: Vstupní data pro lineární regresní model k výpočtu GI z hodnot získaných analýzou stravitelnosti sacharidů

Vzorek	FSF	FSG	RDS	SDS	RS	GI ± SEM
cizrna	2,2	0,7	38,1	11,9	18,9	29,3±19,1
špaldové kernoto	0,3	0,4	60,4	15,6	29,0	49,7±14,1
špaldový křehký chlebiček	1,7	1,1	56,1	2,6	1,7	72,3±23,3
špaldové vločky	0,4	0,4	42,3	17,6	5,9	47,0±16,1
čočka červená	1,8	0,5	47,9	11,8	21,6	24,9±18,1
kuskus	1,4	0,5	65,4	9,6	12,1	80,5±22,9
těstoviny	1,7	0,8	33,5	28,3	5,0	71,7±19,1
rýže	0,0	0,2	39,3	27,0	12,9	75,8±28,2
křupky	0,5	0,7	34,2	39,8	15,5	103,0±15,7
pohanka	0,7	0,6	48,5	9,5	5,5	59,5±8,2
polenta	0,4	0,5	37,6	6,0	13,0	78,6±26,3

Pozn.: Výsledky GI jsou uvedeny jako průměr z 9 měření ± standardní chyba průměru

4. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

V České republice dosud nebyla zpracována metodika, ve které by byla popsána *in vitro* laboratorní metoda hodnocení stravitelnosti sacharidů v potravě. Postupy zahrnuté v metodice umožňují charakterizovat nutriční vlastnosti sacharidů a to zejména škrobu, jako fyziologicky a hospodářsky nejdůležitějšího polysacharidu, s ohledem na úroveň a dynamiku jeho stravitelnosti v potravinách, krmivech i výchozích produktech na bázi škrobu. Navržený metodický přístup může efektivně doplnit nutriční testy na zvířatech a za unikátní lze považovat možnost jeho aplikace k odhadu glykemického indexu potravin bez nutnosti náročných klinických testů na lidských dobrovolnících.

Předložená metodika „**Laboratorní hodnocení stravitelnosti sacharidů v potravinách a krmivech s možností predikce glykemického indexu**“ popisuje podrobné pracovní postupy dvou laboratorních přístupů hodnocení stravitelnosti sacharidů lišící se zejména v analytické koncepci. K měření obsahu uvolněné glukózy je možno použít jak metodu spektrofotometrickou, tak metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie s refraktometrickou detekcí. Součástí metodiky je vzorec na výpočet glykemického indexu, vytvořený na základě výsledků získaných výše uvedenými metodami. Takto kompletně zpracovaná metodika nebyla, i v kontextu mezinárodního srovnání, doposud odborné veřejnosti prezentována.

5. POPIS UPLATNĚNÍ

Metodika pro hodnocení stravitelnosti škrobu v potravinách a krmivech s možností predikce glykemického indexu byla koncipována tak, aby byla využitelná v potravinářské i krmivářské praxi a bude poskytnuta široké odborné veřejnosti, která se touto problematikou zabývá. Bezprostřední je uplatnění zde popsaných metod na šlechtitelských pracovištích ve šlechtění nových moderních odrůd obilovin resp. brambor s definovanou nutriční kvalitou. Uplatněním metodiky budou získané poznatky rovněž využitelné v oblastech aplikovaného i základního výzkumu, pro studenty a pedagogy středních i vysokých škol.

Metodika bude v písemné formě šířena na pořádaných odborných prezentacích a seminářích. V elektronické podobě bude zveřejněna na webových stránkách výrobce a Výzkumného ústavu, v.v.i. (www.vurv.cz).

6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Významným ekonomickým aspektem aplikované metodiky je přínos nových analytických metod k hodnocení nutriční kvality potravin obsahujících sacharidy. Nutriční kvalita je v současné době velmi aktuálním tématem, zejména vzhledem k nárůstu civilizačních chorob jako je diabetes a obezita, a s tím spojené riziko kardiovaskulárních chorob či nádorových onemocnění. Určitým identifikátorem nutriční kvality, který se pojí k potravinám obsahující sacharidy je glykemický index – GI, který popisuje rychlost uvolňování glukózy do krve a může sloužit jako nástroj prevence před vznikem civilizačních chorob, a to zejména diabetu mellitu II. typu. Výběr sacharidových potravin dle jejich glykemického indexu může mít vliv na četné aspekty lidské fyziologie a metabolismu, které mohou dále ovlivnit fyzickou a duševní výkonnost a přispět k prevenci a zvládnutí některých chronických onemocnění. GI je jedním z nejvhodnějších vodítek pro výběr zdraví prospěšných potravin a lze ho doporučit při cestě za zdravým životním stylem.

V současné době však neexistují přesné hodnoty glykemického indexu pro potraviny dostupné na českém trhu. Důležitou roli zde hraje vysoká finanční i časová náročnost klinického testování glykemického indexu potravin. Standardní testy doporučené FAO pro určení GI jedné potraviny (vzorku) se provádí průměrně na 8 dobrovolnících, u kterých je glykémie měřena 8 × během 2 hodin. Při ceně jednoho odběru 30,-Kč a zahrnutí ceny pro GI referenční potraviny činí jen cena analýz pro určení GI jedné potraviny 5 - 6 tis. Kč. Do kalkulace nejsou zahrnuty náklady na organizaci a vyhodnocení testů a rovněž náklady na čas osob účastnících se testování.

V předložené metodice jsou popsány dva analytické postupy, které vedou k odhadu glykemického indexu. Z ekonomického hlediska je v obou případech vždy největší položkou vstupní cena analytického zařízení. V Tabulce 6 je uveden příklad provozních nákladů na

provedení jedné analytické série vzorků, kalkulovaných v rámci podmínek VÚRV, v.v.i. a VŠCHT. Je zřejmé, že výše mzdových i režijních nákladů bude pro jednotlivé podniky specifická. Nicméně z tabulky 6 je patrné, že finanční a časová náročnost laboratorních analýz je podstatně nižší v porovnání se standardními testy.

Dalším přínosem je využití zmíněných analytických metod ve výzkumu krmné kvality z pohledu nutriční kvality obilovin či krmných směsí s částečným nahrazením finančně náročných testů na pokusných zvířatech s přihlédnutím k etické stránce těchto pokusů.

Tabulka 6: Informativní porovnání nákladů na analýzy glukózy metodou HPLC a spektrofotometrickou metodou

HPLC			Spektrofotometrická metoda		
1 analýza: 8 vzorků (2 opakování), 1 standard, 1 slepý pokus			1 analýza: 8 vzorků (2 opakování), 1 standard, 1 slepý pokus		
	Volné cukry	Celková stravitelnost		Volné cukry	Celková stravitelnost
Materiál (Kč); s DPH (21%)	290,-	2328,-	Materiál (Kč); s DPH (21%)	443	2411
Mzda (cca 150 Kč/hod.)	300,-	750,-	Mzda (cca 150 Kč/hod.)	300	750
Režie pracoviště*	159,-	831,-	Režie pracoviště**	215	917
Celkem (Kč)	749,-	3909,-	Celkem (Kč)	958	4078

Pozn.: *V případě VÚRV, v.v.i. fixně kalkulováno 27% z celkových nákladů, **V případě VŠCHT fixně kalkulováno 29 % z celkových nákladů.

7. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- [1] E. Šárka, P. Smrčková, L. Seilerová (2013): Rezistentní a pomalu stravitelný škrob. Chemické Listy 107, 929–935.
- [2] K. N. Englyst, H. N. Englyst, G. J. Hudson, T. J. Cole, J. H. Cummings (1999): Rapidly available glucose in foods: an *in vitro* measurement that reflects the glycemic response. American Journal of Clinical Nutrition, 69: 448–54.
- [3] FAO/WHO (2003). Diet, nutrition and prevention of chronic diseases. In WHO Technical Report Series 916.
- [4] G. Frost, A. Dornhorst (2005): Glycemic Index. Encyclopedia of Human Nutrition. Volume Two. Second Edition. Elsevier Academic Press, 413-419.
- [5] University of Sydney, (2015): Dostupné na www.glycemicindex.com (22. 9. 2015).
- [6] K. N. Englyst, S. Vinoy, H. N. Englyst, V. Lang. (2003): Glycaemic index of cereal products explained by their content of rapidly and slowly available glucose; British Journal of Nutrition, 89: 329–339.

- [7] I. Goni, A. Garcia-Alonso, F. Saura-Calisto. (1997): A Starch Hydrolysis Procedure to estimate glycemic index. *Nutrition Research*, 17: 427 – 437.
- [8] N. Gibson, H. C. Schönfeldt, B. Pretorius. (2011): Development of a rapid assessment method for the prediction of the glycemic index; *Journal of Food Composition and Analysis*, 24: 750–754.
- [9] H. J. Chung, Q. Liu, R. Hoover, T. D. Warkentin, B. Vandenberg, (2008): *In vitro* starch digestibility, expected glycemic index, and thermal and pasting properties of flours from pea, lentil and chickpea cultivars. *Food Chemistry*, 111: 316–321.
- [10] Chapter 4 - The role of the glycemic index in food choice in Carbohydrates in human nutrition, Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, (FAO Food and Nutrition Paper - 66), FAO, Rome, 1998, ISBN 92-5-104114-8, dostupné na: <http://www.fao.org/docrep/w8079E/w8079e00.htm>
- [11] Anon. (2011): D-glucose assay procedure. Firemní literatura, Megazyme, Irsko.

8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Štočková L., Bradová J., Winterová R., Rysová J. (2015): The effect of fat content on starch digestibility in wheat-based biscuits. In: 10th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience, str. 60-63. Prague, Czech Republic, 7. – 9. 10. 2015.
- Smrčková P., Šárka E., Pour V., Chena D. (2015): Sledování obsahu pomalu stravitelného škrobu v laboratorně připravených extrudovaných výrobcích. *Listy cukrovarnické a řepařské*, 5-6: 200-202.
- Štočková L., Winterová R., Smrčková P., Bradová J. (2014): Enzymatic assay for characterization of glucose based polysaccharides digestibility in cereal food - an interlaboratory study. In: Proceedings of the 10th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience, str. 174-177. Prague, Czech Republic, 22. – 24. 10. 2014.
- Štočková L., Bradová J. (2013): Nový přístup k hodnocení glykemického indexu na principu analýzy stravitelnosti sacharidů. *Úroda* 61 (12 věd. př.): 108 – 113.
- Smrčková P., Saglamtas M., Hofmanová T., Koláček J., Chena D., Šárka E. (2014): Effect of process parameters on slowly digestible and resistant starch content in extrudates. *Czech J. Food Sci.*, 32: 503–508.

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Drnovská 507, Praha 6 – Ruzyně, 161 06

Fotografie: Ing. Lenka Štěřbová, PhD.

Vydání: první

Náklad: 250 ks

Grafická úprava: Ing. Lenka Štěřbová, PhD.

Sazba a tisk: powerprint s.r.o., centrum reklamy a tisku

Kamýcká 751/60, Praha 6 – Suchbát, 165 00

Vydáno bez jazykové úpravy

ISBN 978-80-7427-191-5