

# **Stanovení antokyanových barviv v technologicky zpracovaných rostlinných maticích**

Bc. Jana Sczeponiaková

---

Diplomová práce  
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana Sczeponiaková**  
Osobní číslo: **T14426**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie potravin**  
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Stanovení antokyanových barviv v technologicky zpracovaných rostlinných maticích**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Chemie a stabilita polyfenolických látek s bližším zaměřením na rostlinné matrice ovoce a obilovin.
2. Chemie, stabilita a možnosti stanovení antokyaninových barviv.

### II. Praktická část

1. Příprava vzorků ovoce a obilovin pro následné stanovení antokyaninových barviv.
2. Modifikace extrakčních postupů pro stanovení antokyaninových barviv.
3. Vypracování metodiky pro stanovení antokyaninových barviv spektrofotometricky a pomocí HPLC.
4. Aplikace metodik na zpracované vzorky.
5. Diskuze a závěr.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

- [1] SUMCZYNSKI, D., BUBELOVÁ, Z., SNEYD, J., ERB-WEBER, S., MLČEK, J. (2015). Total phenolics, flavonoids, antioxidant activity, crude fibre and digestibility in non-traditional wheat flakes and muesli. *Food Chemistry*, 174, 319325.
- [2] SUMCZYNSKI, D., BUBELOVÁ, Z. (2015). Stanovení nutričních charakteristik, vlákniny a stravitelnosti barevných druhů rýže. *Chemické listy*, 109(2), 147150.
- [3] XIA, N., WANG, J.-M., GONG, Q., YANG, X.-Q., YIN, S.-W., & Qi, J.-R. (2012). Characterization and in vitro digestibility of rice protein prepared by enzyme-assisted microfluidization: Comparison to alkaline extraction. *Journal of Cereal Science*, 56(3), 482489.
- [4] ESCARNOT, E., AGNEESSENS, R., WATHELET, B., & PAQUOT, M. (2010). Quantitative and qualitative study of spelt and wheat fibres in varying milling fractions. *Food Chemistry*, 122(3), 857863.

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Daniela Sumczynski, Ph.D.**

Ústav analýzy a chemie potravin

Datum zadání diplomové práce:

**3. února 2017**

Termín odevzdání diplomové práce:

**28. dubna 2017**

Ve Zlíně dne 3. února 2017



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*děkan*



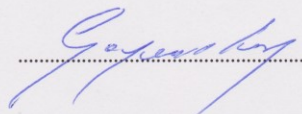
doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně .....





---

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## ABSTRAKT

Diplomová práce byla zaměřena na stanovení obsahu antokyanových barviv v technologicky zpracovaných rostlinných matricích. Z technologických úprav pro dané vzorky byly použity lyofilizace a tepelná úprava varem. Celkový obsah antokyanových barviv byl stanoven spektrofotometricky a profil antokyanových barviv metodou HPLC. Nejvyšší obsah antokyanových barviv u lyofilizovaného ovoce byl naměřen ve vzorku borůvek odrůdy „Fialka“ a u vzorků obilovin v syrovém zrně u rýže s černými obalovými vrstvami z Číny. Po tepelné úpravě varem byl zaznamenán pokles antokyanových barviv o více jak 60 %.

**Klíčová slova:** ovoce, obiloviny, flavonoidy, antokyany, tepelná úprava, lyofilizace, spektrofotometrie, HPLC

## ABSTRACT

This thesis was focused on the study of the content of anthocyanin dyes in technologically processed plant matrices. Lyophilization and heat treatment were applied from the technological treatments for testing samples. The total anthocyanin dyes were determined by spectrophotometry and individual antocyan dyes by HPLC. The highest content of anthocyanin dyes in lyophilized fruit was measured in Blueberries „Fialka“ and in Chinese rice cereal with black packing layers. After heat treatment of rice, the decrease of anthocyanin dyes of more than 60 % was recorded.

**Key words:** fruit, cereals, flavonoids, anthocyanins, heat adjustment, lyophilization, spectrophotometry, HPLC

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Daniele Sumczynski, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a velmi cenné rady, které mi poskytovala při vypracování mé diplomové práce. Dále děkuji Ing. Lence Fojtíkové a Ing. Martině Mrázkové za pomoc v laboratoři. Velké díky patří mé rodině, která mě podporovala v průběhu celého studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
<b>1 POLYFENOLICKÉ LÁTKY</b> .....	<b>11</b>
1.1 FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI POLYFENOLŮ.....	11
1.2 ROZDĚLENÍ POLYFENOLICKÝCH LÁTEK.....	12
1.2.1 Fenolové kyseliny.....	12
1.2.2 Flavonoidy.....	13
1.2.3 Lignany.....	19
1.2.4 Stilbeny.....	20
<b>2 ANTOKYANOVÁ BARVIVA</b> .....	<b>22</b>
2.1 CHEMICKÉ SLOŽENÍ ANTOKYANŮ .....	23
2.2 STABILITA ANTOKYANOVÝCH BARVIV.....	24
<b>3 MOŽNOSTI STANOVENÍ ANTOKYANOVÝCH BARVIV</b> .....	<b>26</b>
3.1 SPEKTROFOTOMETRIE.....	26
3.2 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE.....	29
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>34</b>
<b>4 CÍL EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE</b> .....	<b>35</b>
<b>5 MATERIÁL A METODIKA PRÁCE</b> .....	<b>36</b>
5.1 CHEMIKÁLIE.....	36
5.2 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	37
5.3 CHARAKTERISTIKA VZORKŮ .....	39
5.3.1 Ovoce .....	39
5.3.2 Obiloviny.....	39
5.4 PŘÍPRAVA VZORKŮ.....	42
5.4.1 Příprava ovoce – postup lyofilizace .....	42
5.4.2 Příprava obilovin.....	43
5.5 PŘÍPRAVA EXTRAKTŮ PRO NÁSLEDNÉ SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ.....	43
5.6 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ CELKOVÝCH ANTOKYANŮ .....	45
5.6.1 Příprava pufrů.....	45
5.6.2 Spektrofotometrické stanovení TAC pro matrice ovoce.....	46
5.6.3 Spektrofotometrické stanovení TAC pro matrice obilovin.....	47
5.7 STANOVENÍ JEDNOTLIVÝCH ANTOKYANŮ POMOCÍ HPLC .....	48
5.7.1 Chromatografická analýza antokyanů .....	48
5.8 STATISTICKÁ ANALÝZA .....	48
<b>6 VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>49</b>



6.1	STANOVENÍ ANTOKYANOVÝCH BARVIV.....	49
6.2	VÝSLEDKY SPEKTROFOTOMETRICKÉHO STANOVENÍ CELKOVÝCH ANTOKYANOVÝCH BARVIV .....	49
6.2.1	Postup extrakce pro matrici ovoce .....	49
6.2.2	Postup extrakce pro obilné matrice .....	50
6.2.3	Výsledky stanovení celkových antokyanů vzorků lyofilizovaného ovoce .....	49
6.2.4	Výsledky stanovení obsahu celkových antokyanů u tepelně opracovaných obilných zrn.....	50
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>65</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>67</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>72</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>73</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>74</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>75</b>

## ÚVOD

Antokyany jsou rostlinné pigmenty, které se řadí do skupiny flavonoidů. Chemicky se jedná o skupinu sekundárních metabolitů polyfenolů, které jsou ve významné míře zastoupeny v potravě. Z hlediska chemické struktury je to rozmanitá struktura chemicky příbuzných látek, které se dělí do několika tříd a podtříd. V běžných potravinách rostlinného původu se nacházejí v různých poměrech. Fyziologické působení polyfenolů je funkcí jejich chemického charakteru a biologické dostupnosti. Účinky polyfenolů mohou být pozitivní (antikarcinogenní, antioxidační, antimutagenní, antibakteriální, antiparazitární, atd.), ale i negativní (karcinogenita, genotoxicita, tyreoidní toxicita, interakce s farmaky). Při technologických postupech používaných při výrobě potravin, při skladování, anebo při konečné úpravě potravin dochází ke změně obsahu polyfenolů. Všechny faktory tak společně ovlivňují zastoupení polyfenolů v potravě a také jejich využitelnost.

Z potravinářského hlediska jsou antokyany významnou skupinou barviv, která se používají více jak sto let. Jejich význam se stoupajícím zájmem spotřebitelů o přírodní látky velice roste.

Diplomová práce se zabývá stanovením antokyanových barviv v ovoci a v obilovinách. Z technologického hlediska byly použity metody tepelná úprava varem a lyofilizace.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 POLYFENOLICKÉ LÁTKY

Jednu z největších skupin rostlinných metabolitů podílejících se na ochraně rostliny před UV-zářením a patogeny tvoří polyfenolické látky. Mají antioxidační, antikarcinogenní, antimutagenní, antiparazitární, antibakteriální a antidiabetický účinek. Působí proti vzniku zánětů, kardiovaskulárním a neurodegenerativním onemocněním, mají hepatoprotektivní a antikariogenní účinek. V dnešní době jsou však významné i některé negativní účinky těchto látek (karcinogenita/genotoxicita, tyreoidní toxicita, antinutritivní působení, interakce s léčivy), proto je důležité přistupovat ke konzumaci vyššího množství polyfenolových látek s určitou obezřetností (Süli et al., 2014). Vyšší obsah polyfenolů obsahují i netradiční druhy obilovin (Sumczynski et al., 2015).

### 1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti polyfenolů

Pro odpovídající zaměření polyfenolických látek je vhodné znát jejich dělení do skupin, které vše mohou ovlivnit. Polyfenoly lze rozdělit na základě chemické struktury, jejich fyzikálně-chemických vlastností a obsahu v potravinách (Manach, 2004). Ve struktuře molekuly je rozpustnost polyfenolových sloučenin dána poměrem polárních a nepolárních skupin. Rozpustnost ve vodě zvyšují polární hydroxylové skupiny, zatímco nepolární metoxy skupiny rozpustnost ve vodě snižují. V lipidech se tím však rozpustnost zvyšuje a také stoupající pH ve vodě rozpustnost zvyšuje. Více rozpustné ve vodě jsou glykosidy polyfenolů (Franco et al., 2008).

Barva, chuť a hořkost jsou organoleptické vlastnosti potravin, které souvisí se strukturou fenolů. Za významný znak zralosti i kvality jakékoli rostlinné potraviny se považuje barevnost. Barevnou nestejnorodost kromě samotných polyfenolů podmiňují i konjugace s různými sacharidy nebo s dalšími polyfenolickými látkami a jejich vzájemné působení s kovy (Velíšek a Hajšlová, 2009). Antokyanová barviva jsou z polyfenolických látek nejrozšířenější a v přírodě jsou to pigmenty zbarvené červeně až modře (Rop a kol., 2005).

Často určují barvu různých druhů zeleniny a ovoce. V přírodě se vyskytují antokyanany buď volné, nebo glykosidicky vázané. Obě formy jsou barevné a jejich stabilita je zhruba stejná. V rostlinách je množství antokyanů různé. Největší výskyt antokyanů se nachází u rostlin v epidermálních vrstvách (Velíšek a Hajšlová, 2009). V přírodě bylo již identifikováno více než 635 antokyanů (He and Giusti, 2010).

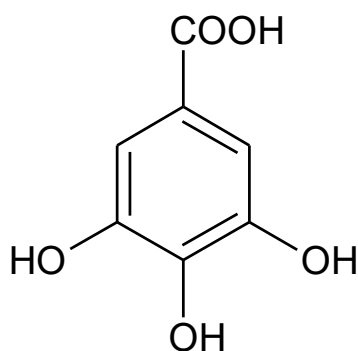
## 1.2 Rozdělení polyfenolických látek

Polyfenoly se dělí na 4 základní skupiny, které se dále rozdělují do dalších tříd (Manach, 2004; Velíšek a Hajšlová, 2009).

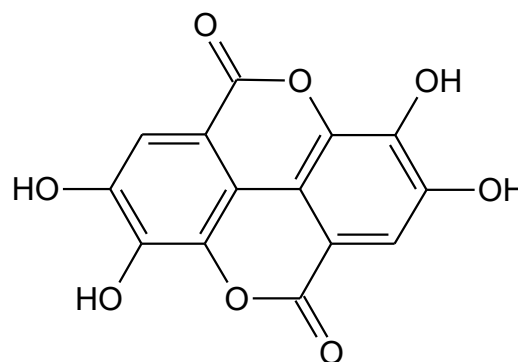
### 1.2.1 Fenolové kyseliny

#### a) Deriváty kyseliny benzoové

Kyselina gallová je významným derivátem kyseliny benzoové a je ze skupiny polyfenolů nejvíce zastoupena v potravinách (Velíšek a Hajšlová, 2009). Clifford and Scalbert (2000) uvádí, že součástí složitějších struktur, hydrolyzovatelných tříslovin jsou kyselina gallová a ellagová (např. elagotaniny v bobulovém ovoci, galotaniny v mangu). Jako další významné deriváty kyseliny benzoové jsou kyselina gentisová, syringová, salicylová, veratrová, *p*-hydroxybenzoová, vanillová a protokatechová.



Kyselina gallová



Kyselina ellagová

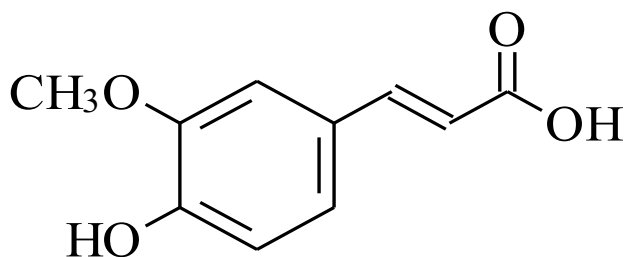
#### b) Deriváty kyseliny skořicové

Tato skupina obsahuje kyseliny *p*-kumarovou, kávovou, sinapovou a ferulovou. Tyto kyseliny se vyskytují ve volném stavu zřídka. Největší výskyt je ve zpracovávaných potravinách, které byly podrobeny zmrazování, sterilizaci nebo fermentaci. Formy vázané jsou zejména glykosylované deriváty, nebo estery kyseliny chinové, šikimové, resp. vinné.

Borůvky, švestky, kiwi, višně, třešně a jablka mají nejvyšší obsah derivátů kyseliny skořicové. Kyselina kávová je zastoupena v potravinách nejvíce, ať už ve volné nebo esterifikované formě. V odrůdách ovoce zastupuje 75 – 100 % celkového obsahu derivátů

hydroxyskořicových kyselin. Nejvyšší koncentrace derivátů hydroxyskořicových kyselin se nacházejí u zralého ovoce pod povrchem a ve slupce. Koncentrace v průběhu zrání klesá (Manach, 2004).

Kvasničková (2001) uvádí, že největší pozornost v poslední době je věnována kyselině ferulové, která je obsažena v nízkých koncentracích v řadě zemědělských produktů. Asi nejvíce zastoupena je v cereálních zrnech (patří mezi deriváty kyseliny skořicové), může tvořit až 90 % z celkových polyfenolů. Ve výživě jsou proto obiloviny hlavním zdrojem kyseliny ferulové. Kyselina ferulová je obsažena především ve vnějších částech zrna. 98 % z celkového obsahu kyseliny ferulové obsahují aleuronové vrstvy a oplodí pšeničného zrna. Na obsahu kyseliny ferulové v různých pšeničných moukách se tedy přímo podílí úroveň vymletí. Otruby jsou hlavním zdrojem polyfenolických látek. V pšeničné a ovesné mouce je přibližně stejné množství polyfenolů ( $70 - 90 \text{ mg.kg}^{-1}$  v sušině), asi 3x více obsahuje mouka kukuřičná. Několik dimerů kyseliny ferulové se vyskytuje v cereáliích, které tvoří můstky mezi hemicelulózovými řetězci (Manach, 2004). Kyselina ferulová má antioxidační i antimikrobiální účinek (pomeranče chrání před zkažením) (Kvasničková, 2001).

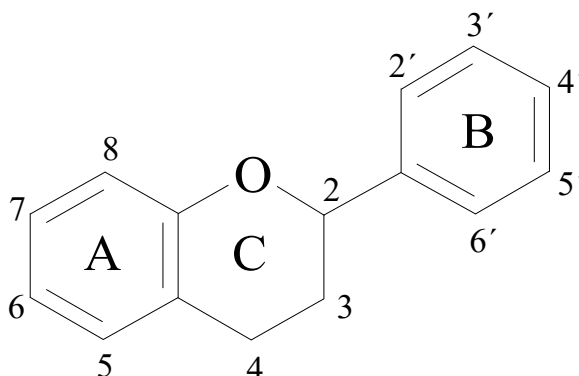


Kyselina ferulová

### 1.2.2 Flavonoidy

Vodrážka (2007) uvádí, že flavonoidy tvoří rozsáhlou skupinu rostlinných látek, jejichž molekuly obsahují flavanový cyklický skelet. V dnešní době je známo více než 400 zástupců flavonoidních látek a stále se objevují nové. Základem jejich struktury je tedy flavan, který je sestaven ze dvou benzenových jader spojených pyranovým kruhem. Ve formě O-glykosidů se nejčastěji vyskytují přírodní flavonoidy. Jejich molekula je tvořena aglykonem

(základní struktura polyfenolů) a cukernou složkou (Süli et al., 2014). Rop a kol. (2005) uvádí, že jsou to žlutá barviva, která jsou svým složením nejvíce příbuzná antokyanům.

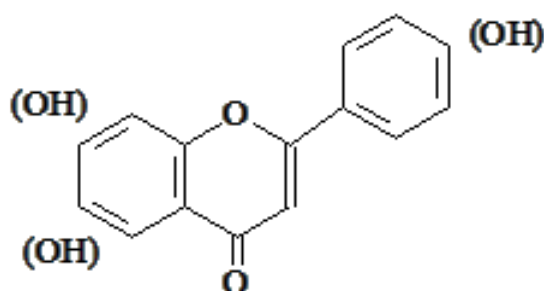


Základní struktura flavonoidů

#### a) Flavony

Flavony jsou zejména glykosidy luteolinu a apigeninu. Některé obiloviny, např. pšenice a proso, obsahují C-glykosidy flavonů. Ovoce citrusové obsahuje velké množství polymetoxylovaných flavonů hlavně ve slupce: nobiletin, tangeretin a sinensetin. Tyto polymetoxylované flavony jsou více hydrofóbní (Süli et al., 2014). Vodrážka (2007) ve své publikaci uvádí, že je známa struktura 300 přírodních flavonů. Pro obiloviny jsou charakteristické kyslíkaté a uhlíkaté glykosidy flavonů, především odvozené od luteolinu, chrysoeriolu a apigeninu. Na složení polyfenolického komplexu pokukazuje silná antioxidační aktivita zrn ječmene. Ta je v závislosti na odrůdě ječmene způsobena především třemi hlavními fenolickými typy sloučenin flavanů-3-olů (více jak 85 %), hydroxyskořicovými kyselinami (asi 10 %) a flavony (méně než 5 % celkového obsahu polyfenolů). Právě vysokým obsahem flavanů-3-olů a flavanů-3,4-diolů se ječmen odlišuje od ostatních obilovin a tato skupina představuje hlavní složku antioxidační aktivity.





Flavony

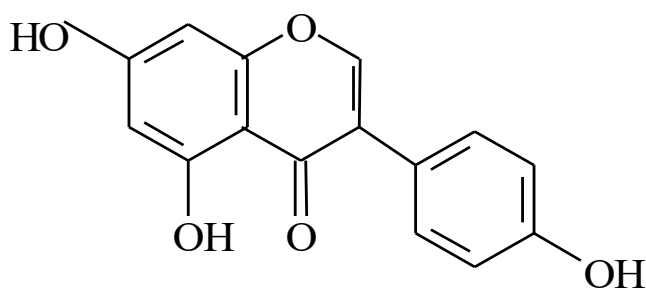
Jedinečným zdrojem avenantramidů, které se v jiných obilovinách nevyskytují je oves. Vysoké koncentrace se nacházejí ve vnějších vrstvách zrna. Avenantramidy jsou charakterizovány jako skupina nových alkaloidů, která obsahuje deriváty kyseliny antranilové spojené s deriváty kyseliny hydroxyskořicové. V zrně ovsa byly identifikovány tři flavony – asperigin, tricín a luteolín (Brindzová et al. 2005). Avenantramidy vykazují antioxidační a antiaterogenní účinky (Dykes and Rooney, 2007). Také Brindzová (2005) konstatuje, že při konzumaci ovsa byly prokázány výrazné, zdají se být prospěšné účinky, jako je např. snížení cholesterolu, úprava hladiny glukózy v krvi, redukce rizika věcnových onemocnění srdce a snížení pravděpodobnosti vzniku rakoviny.

### b) Flavonoly

Mezi flavonoly jsou zařazeny kemferol, kvercetin a myricetin, které se vyskytují zejména jako glykosidy. Zvláště vysoký obsah kvercetinu je v cibuli ve slupkách červených odrůd. (Velíšek a Hajšlová, 2009). Jinak jsou v potravinách přítomny v nízkých koncentracích. Dalšími zdroji jsou kapusta, brokolice, pórek a borůvky. Konjugované sacharidy jsou nejčastěji glukóza nebo ramnóza, ale mohou být navázány i jiné cukry nebo jejich deriváty, např. galaktóza, xylóza, kyselina glukuronová. Flavonoidy se hromadí ve vnějších tkáních (slupka a listy), protože jejich biosyntézu stimuluje světlo. Právě toto je důvod, kdy může být u jednotlivých kusů ovoce z téhož stromu rozdílná koncentrace flavonoidů, dokonce i různé strany téhož druhu kusu ovoce se mohou lišit v závislosti na expozici slunečního záření (Aguilera et al., 2011).

### c) Izoflavony

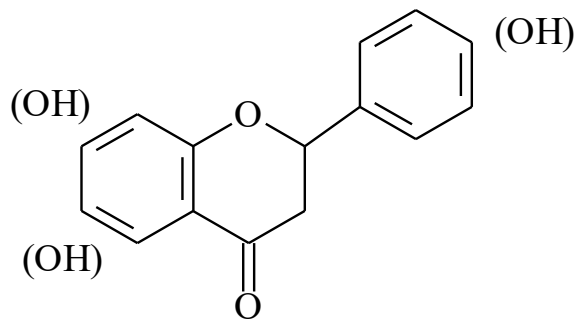
Izoflavony jsou flavonoidy, které mají podobnou strukturou jako estrogen. Tato strukturální podobnost je důvodem, že jsou členěny jako fytoestrogeny. Izoflavony se nacházejí téměř výhradně v luštěninách (Aguilera et al., 2011). Z potravinářského hlediska je významný jejich obsah pouze v sójových bobech a ve výrobcích ze sójových bobů (Velíšek a Hajšlová, 2009). Obsahují tři hlavní sloučeniny: daidzein, genistein a glycitein, obvykle v koncentračním poměru 1,0:1,0:0,2. Tyto izoflavony se nacházejí ve 4 formách: aglykon, 7-O-glukosid, 6-O-acetyl-7-O-glukosid a 6-O-malonyl-7-O-glukosid (Süli et al., 2014).



Izoflavony

### d) Flavanony a flavanonoly

Flavanony se v potravinách nacházejí zřídka a jako barviva nemají téměř žádný význam (Velíšek a Hajšlová, 2009). Nacházejí se v rajčatech a některých aromatických rostlinách (např. máta), ale ve vysokých koncentracích jsou přítomny pouze v citrusových plodech. Hlavními jsou naringenin v grapefruitech, hesperetin v pomerančích a eriodyktiol v citróněch (Süli et al., 2014). V ořeších podzemnice se vyskytují flavanonoly, jejichž glykosidy nejsou pro potravinářství příliš významné (Velíšek a Hajšlová, 2009).

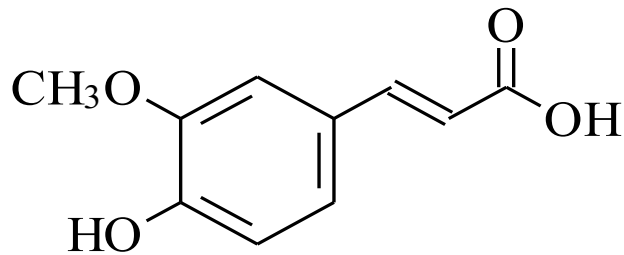


Flavanony

### e) Flavanoly (katechiny a proantokyanidiny)

Katechiny jsou flavanoly ve formě monomeru a proantokyanidiny se nacházejí ve formě polymerní. Katechiny jsou obsaženy v mnoha druzích ovoce a to zvláště v bobulovém ovoci (Lakenbrink et al., 2000).

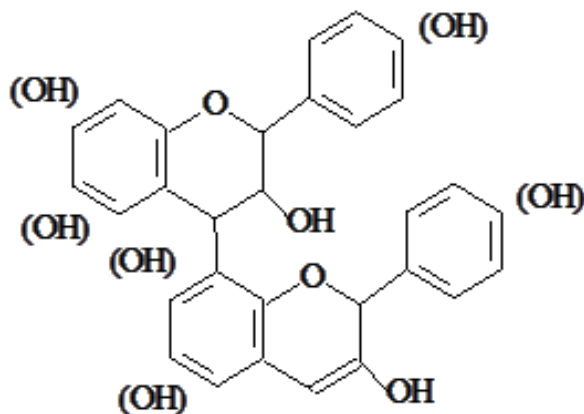
Pekal et al.(2011) uvádí, že hlavními flavanoly v ovoci jsou katechin a epikatechin, zatímco gallokatechin, epigallokatechin a epigallokatechin-gallát se nacházejí v semenech některých druhů luštěnin, v hroznech a také jsou obsaženy v čaji.



Katechin

Proantokyanidiny byly izolovány u mnoha druhů rostlin a jsou součástí lidské výživy (Lakenbrink et al., 2000). Proantokyanidiny, významné také jako kondenzované třísloviny (taniny), mohou být dimery, oligomery a polymery. V jablkách na výrobu moštu je průměrný stupeň jejich polymerace 4 – 11 a kondenzované třísloviny tvoří komplexy s bílkovinami slin a tím jsou zodpovědné za svíravý, trpký vjem chuti ovoce (aronie, hrozny, broskve, jahody, jablka, hrušky aj.), nápojů (víno, jablečný mošt, čaj, pivo atd.) a

za hořkost čokolády (Santos-Buelga and Scalbert, 2000). V průběhu zrání se trpkost mění a při dosažení zralosti ovoce často i mizí. Nejvyšší obsah byl stanoven v plodech arónie (6640 mg v čerstvých bobulích). Spolu s velkým množstvím antokyanů (14800 mg) jsou tyto hodnoty nejvyšší, jaké kdy byly v rostlinách stanoveny (Wu et al., 2006).



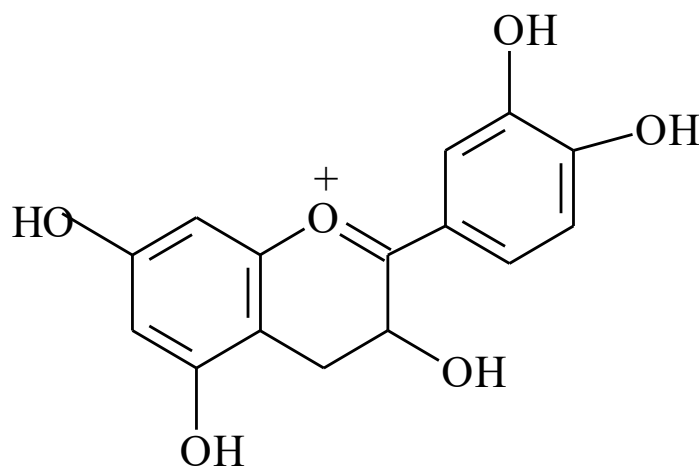
Proantokyanidiny

## f) Antokyany

Nejvýznamnější rostlinná barviva flavonoidního charakteru se nazývají antokyany a bylo izolováno a strukturně charakterizováno asi 100 jejich zástupců (Vodrážka, 2007). Jsou to pigmenty, které jsou rozpuštěné ve vakuolární tekutině epidermálních plodů a květů. Dávají růžovou, červenou, modrou nebo fialovou barvu. Jejich zbarvení závisí na pH. Bezbarvé jsou při pH 4 – 4,5. Každý rostlinný druh má svá typická antokyanová barviva (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Antokyany v rostlinách relativně dobře odolávají degradaci světlem, změnám pH a oxidaci. Glykosylace výrazně zamezuje degradaci, obvykle glukózou v pozici 3 a také esterifikace různými organickými kyselinami (např. kyselinou citrónovou a jablečnou) a fenolickými kyselinami. Antokyany jsou stabilizované tvorbou komplexů s jinými flavonoidy. V lidské stravě jsou antokyany zastoupeny v některých odrůdách obilovin a také v některých listových a kořenových zeleninách (zelí, lilek, cibule, fazole, ředkvičky). Nejvíce zastoupeny jsou v ovoci, zvláště v bobulovém, a z nápojů v červeném víně. Kyanidin je nejběžnější antokyan v potravinách. Obsah antokyanů v potravinách je přiměřený intenzitě zbarvení a se zráním ovoce se hodnoty zvyšují. Antokyany se nacházejí hlavně ve slupce, s výjimkou

některých druhů ovoce, kde je nalezneme i v dužině (třešně a jahody). Díky pozitivním účinkům na lidský organizmus a také dobré rozpustnosti ve vodě tvoří velice zajímavou skupinu přírodních pigmentů (Manach, 2004).



Kyanidin

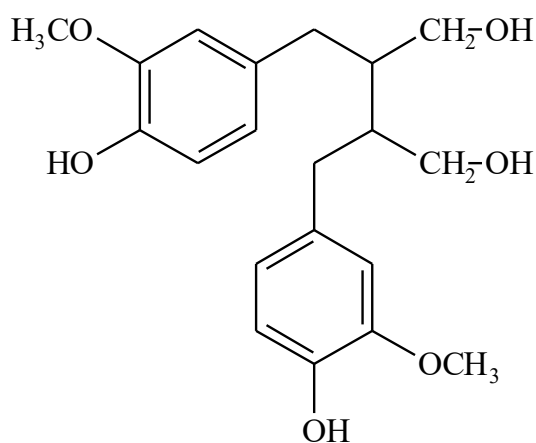
### g) Chalkony a dihydrochalkony

Chalkony a dihydrochalkony nejsou příliš zastoupeny v potravinářsky významných rostlinách. V alkalickém prostředí z flavanonů vznikají chalkony a v kyselém prostředí na ně konvertují. Nejznámějším zástupcem dihydrochalkonů je floridzin (floreitin-6-O- $\beta$ -D-glukosid) nalezený výhradně v jablkách. Jako umělá sladidla se využívají dihydrochalkony připravené redukcí neohesperidinu a naringinu, které mají intenzivní sladkou chuť (Velíšek a Hajšlová, 2009).

### 1.2.3 Lignany

Lignany jsou polyfenolové látky. V rostlinách se vyskytují v nízkých koncentracích. V poslední době se studie zabývají i protinádorovými účinky lignanů. V lidské stravě se vyskytuje nejčastěji těchto 6 různých lignanů: pinorezinol, laricirezinol, mediorezinol, matairesinol, syringarezinol a sekoizolaricirezinol. Jako nejhojnějšími zdroji lignanů jsou lněná a sezamová semínka. Stopové množství je nalezeno i v ovoci (broskve, meruňky, jeřáb, pomeranče, ananas, brusinky, maliny, kiwi, jahody, švestky a hrušky), v zelenině (česnek,

lilek, chřest, brokolice, rajčata, cibule, mrkev, okurky), v obilovinách (ječmen, pšenice, triticale, žito) a z nich vyrobených celozrnných mouk, v nápojích (čaj, káva, zeleninové a ovocné šťávy, pivo, víno), v luštěninách (fazole, čočka, sója, cizrna), slunečnicových semenech, kešu ořechách, rostlinných olejích a v pohance (Manach, 2004). Při technologickém zpracování, které využívá moderní techniky mletí je společně se slupkami a vlákninou oddělena i frakce lignanů. Z toho vyplývá, že lidská strava není na lignany bohatá (Machovská, 2012). Lignany se nacházejí také v některých obilovinách a v zeleninových semenech (semena dýně). Působí jako antioxidanty a mají antimikrobiální účinky (Perlín, 2006).

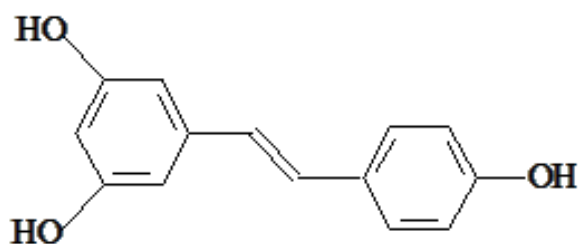


Sekoizolaricirezinol

#### 1.2.4 Stilbeny

Strukturou jsou stilbeny velmi podobné flavonoidům. Vyskytují se pouze zřídka, a to volně nebo vázané ve formě glykosidů. Známé jsou jejich antioxidační a antikarcinogenní účinky. Nejvýznamnějším stilbenem je resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilben), je to přirozeně se vyskytující fytoalexin. Má dva geometrické izomery *cis* a *trans*. V rostlinách se vyskytují obě formy, ale ve větším množství *trans*-izomer. Resveratrol je běžnou součástí lidské diety. Nejvyšší obsah je ve vinné révě (červené víno 2 – 6 mg·l<sup>-1</sup>, bílé víno 0,2 – 0,8 mg·l<sup>-1</sup>), zelenině (červené zelí, brokolice) a ořechách (arašídy). Slouží jako prevence před kardiovaskulárními chorobami, snižuje hladinu cholesterolu v krvi, má protinádorové a protizánětlivé účinky (Šmidrkal et al., 2001). Má mnohem výraznější antioxidační a chemoprotektivní účinky než *cis*-izomer. *Trans*-konfigurace derivátů kyseliny skořicové může přecházet po

expozici UV-zářením na *cis*-izomer (Bajčan et al., 2011). Resveratrol se nachází ve slupkách hroznů, červeném víně, arašídech, borůvkách a brusinkách, pohance (Manach, 2004). Vykazuje biologickou aktivitu, která se projevuje výraznými antikoagulačními vlastnostmi, inhibuje oxidaci lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL) a zvyšuje podíl lipoproteinů s vysokou hustotou (HDL), čímž snižuje riziko kardiovaskulárních chorob, pohlcuje volné radikály (Šmidrkal et al., 2001).

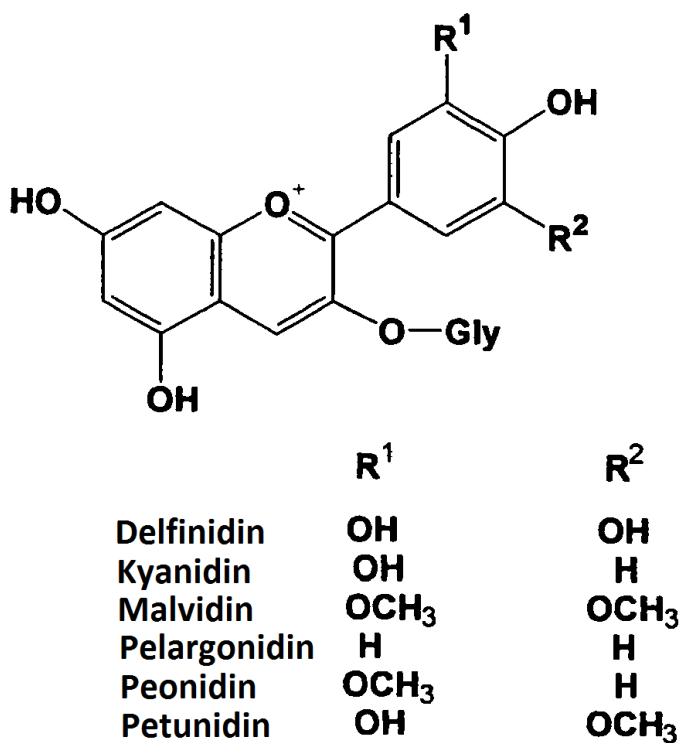


Resveratrol



## 2 ANTOKYANOVÁ BARVIVA

Přírozně vyskytující se antokyany jsou heteroglykosidy a skládají se ze dvou složek. Tou první je složka cukerná, reprezentována pěti hlavními sacharidy (D-glukóza, D-galaktóza, D-xylóza, L-ramnóza a jako poslední L-arabinóza). Druhou složku antokyanů tvoří necukerná složka (aglykon), která se nazývá antokyanidin a ten je barevnou částí antokyanů. Tvoří se z proantokyaninů a leukoantokyaninů. Ve větší koncentraci se barvivo ukládá v exokarpu, nebo mezokarpu. Koncentrace antokyanů během vegetace vzrůstá a v období zralosti dosahuje maximální hodnoty. Doposud bylo identifikováno 15 antokyanidinů, z nichž se v bobulovinách nejčastěji vyskytují kyanidin, pelargonidin, peonidin, malvidin, delphinidin a petunidin. Nejvýznamnějším zdrojem antokyanů je drobné, tmavě zbarvené ovoce jako jsou bezinky, jeřáb černý, černý rybíz, modré kultivary vinné révy, borůvky, třešně, zimolez a maliny (Velíšek, 2002).



Antokyanidiny

## 2.1 Chemické složení antokyanů

Intenzitu a barevný tón ovlivňuje stejné pH prostředí antokyaninů. Při nízkých hodnotách pH (3,1 – 4,5) mají antokyaniny červenou barvu, při vyšších fialovou až modrou (pH 4,4 – 6,3), při velmi vysokých šedozelenou (pH 8,0 – 9,8). Antokyaniny jsou stabilnější v kyselém prostředí než v neutrálním a alkalickém. Působením vysoké teploty se mění barva antokyaninů, přičemž vznikají degradační produkty.

Změny v chemické struktuře jsou způsobeny hlavně rozdílem v počtu hydroxylových a metoxylových skupin v molekule, v množství cukerných částí připojených na fenolické molekuly a také do jisté míry v počtu a povaze alifatických nebo aromatických skupin s ní souvisejících. Skupiny cukrů jsou nejčastěji připojeny jako 3-monosidy, 3-biosidy, 3-triosidy, 3,5-diglukosidy nebo 3,7-diglukosidy (Patras et al., 2010).

Antokyaniny, které jsou nejcitlivější, reagují na kyselost prostředí. Postupným zvyšováním pH se posouvá rovnováha ve prospěch nebarvené karbonylové formy. Při pH 4,0 – 4,5 dojde u antokyanů zcela k vyblednutí. I v prostředí oxidu siřičitého dochází k částečnému odbarvení, protože SO<sub>2</sub> se naváže na oxoniový kyslík, čímž se zruší chromoforní charakter takto vzniklé sloučeniny. Vazba siřičitého iontu na oxoniový kyslík je však labilní a časem, zejména při vyšší teplotě, se původní struktura antokyanu obnoví ( Patras et al., 2010).

Kyslík je také důležitý v rozkladných procesech antokyanů. Jeho přítomnost může urychlit degradaci antokyanů buď přímo, prostřednictvím přímých oxidačních mechanismů, nebo působením oxidačních enzymů. V přítomnosti kyslíku enzym polyfenoloxidáza katalyzuje oxidaci kyseliny chlorogenové na chinon. Chinon reaguje s antokyaniny a tvoří hnědé kondenzační produkty. Bylo prokázáno, že pelargonidin-3-glukosid je degradován mechanismem zahrnujícím reakci mezi chinonem nebo sekundárními produkty oxidace vytvořenými z chinonu a antokyanovými pigmenty (Patras et al., 2010).

Současné poznatky dokazují, že obecně konzervace za vysoké teploty může ovlivnit hladinu antokyanů v plodech. Dochází k degradaci antokyanů a k tvorbě polyfenolických rozkladných produktů. Při degradaci kyanidin-3-glukosidu vzniká kyselina 4-hydroxybenzoová nebo, jako u pelargonidin-3-glukosidu, po hydrolýze dochází k odštěpení kruhu B a následné degradaci kruhu C za vzniku floroglucinaldehydu (2,4,6-trihydroxybenzaldehydu). Při degradaci pelargonidinu vzniká i protokachetová kyselina.

Degradační produkty jsou postupně nahrazeny bezbarvými produkty v důsledku další oxidační degradace (Patras et al., 2010).

Během technologických operací je tedy nutné udržet vhodné kyselé prostředí při použití vyšší teploty, využívat krátké tepelné zásahy a eliminovat přístup kyslíku a světla (Šimko et al., 2008).

Antokyany jsou velmi citlivé na ionizující záření, například ozářením jahodového džusu dávkou  $5000 \text{ J.kg}^{-1}$  poklesne koncentrace antokyanových barviv až o 55 % (Máriássyová, 2002).

Oliveira et al. (2010) se zabývá zkoumáním obsahu antokyanů a antokyanidinů a zachováním jejich antiradikálové aktivity u kultivarů *Vaccinium corymbosum* L. před a po uvaření. Největší zastoupení měl aglykon malvinidin, pak cyanidin, petunidin a delphinidin. Potvrdilo se, že se zvyšující se teplotou se obsah antokyanů snižoval. Nicméně vařené plody si zachovaly, nebo dokonce měli zvýšenou antiradikálovou aktivitu. Celkové výsledky potvrzují, že vařené plody mohou sloužit jako dobrý zdroj bioaktivních látek.

## 2.2 Stabilita antokyanových barviv

Nestabilním prostředím pro antokyany je i vysoká koncentrace cukrů, z čehož vyplývá, že ovocné šťávy a různé džusy, do nichž byl přidán cukr, obsahují snížené množství přítomných antokyanů oproti neslazeným (Žoldošová, 2003).

Antokyanová barviva se rozkládají při vysokých teplotách. S nárůstem teploty na začátku lze zaznamenat růst barevné intenzity, který odpovídá procesu štěpení glykosidu na aglykony, jejich stabilita je však nižší než u odpovídajících glykosidů, a proto v pozdějších fázích zahřívání dochází k rychlému poklesu intenzity zabarvení pod původní hodnotu. V průběhu technologického zpracování je nutné udržet vhodné kyselé prostředí při použití vyšší teploty, využívat krátké tepelné zásahy a eliminovat přístup kyslíku a světla (Šimko et al., 2008).

Tepelná degradace antokyanů závisí na povaze a míře zahřívání. Porozuměním mechanismu rozkladu je předpokladem pro maximalizaci nutriční kvality. Například míra degradace antokyanů se zvyšuje během zpracování a skladování s rostoucí teplotou. Prvním degradačním krokem je hydrolýza cukerné složky a tvorba aglykonu, což umožňuje vznik cyklických aduktů. Stabilita v 60 % roztoku sacharózy nebo invertního cukru je podstatně

vyšší ve srovnání s alkoholickým roztokem. Zvýšením teploty se rozkládá pyroliový kruh a vzniká z něj chalkon, přičemž dále vznikají kumarinové glykosidové deriváty se ztrátou kruhu B. Zjistilo se, že vazba aglykon-cukr je labilnější než ostatní aminoglykosidové vazby při pH 2 – 4, avšak při pH 1 jsou všechny glykosidové vazby hydrolyze přístupné. Vysoká teplota v kombinaci s vysokým pH zhoršuje výsledný obsah antokyanů v plodech (Partras et al., 2010). Z výzkumů vyplývá, že stabilita antokyanů nacházejících se v pasterizované borůvkové šťávě, se během skladování při teplotě 4 °C po dobu 38 týdnů zmenšovala minimálně, přičemž při 20 °C se koncentrace za stejný čas snížila o 50 % (Hřines and Aaby, 2000).

Na stabilitu antokyanových barviv pozitivně působí přídavky organických kyselin, například jablečné, vinné, malonové, jantarové a citrónové. Kvalitu antokyanů a jejich stabilitu ovlivňuje i složení antokyanového komplexu, z nichž byly získány. Jejich nejvýznamnějším zdrojem je drobné, tmavě zbarvené ovoce. I když je zdrojů ovoce s obsahem antokyanů velké množství, u většiny z nich by byla průmyslová výroba barviv ekonomicky nezajímavá. Ve světě se jako komerční zdroje antokyanů používají hrozny, plody černého bezu, třešně a černý rybíz. Barvivo se ze surovin extrahuje vodno-alkoholickým roztokem. Extrakcí získaný roztok se po filtraci zahušťuje vakuovou destilací při teplotě 35 – 45 °C na koncentraci více než 50 hmot. % rozpustné sušiny (Jeřábková a Pšenáková, 2004).

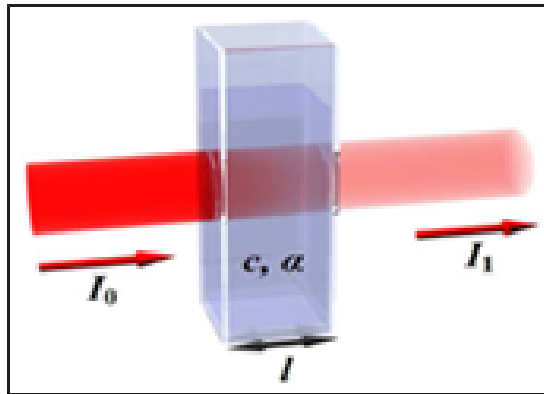
### 3 MOŽNOSTI STANOVENÍ ANTOKYANOVÝCH BARVIV

Dříve se používala pro stanovení antokyanů papírová chromatografie a chromatografie na tenké vrstvě (TLC). V současné době se používají běžně spektrofotometrické metody, které jsou rychlé, levné a snadné. Stabilitu antokyanů lze hodnotit podle absorpce před a po degradaci barviva. Orientačně lze stabilitu antokyanů hodnotit také podle rozdílu absorpce při rozdílných hodnotách pH (diferenční metoda), přičemž se vyjadřuje tzv. degrační index. Široce používaná metoda pro stanovení profilu antokyanů je HPLC, neboli vysokoúčinná kapalinová chromatografie, detektorem s diodovým polem, spojení s hmotnostní detekcí nebo s magnetickou rezonancí (Castaneda, 2009; Welch, 2008).

#### 3.1 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je optická analytická metoda, která využívá interakce hmoty a elektromagnetického záření. Jde o metodu, při níž je sledována absorpce záření po průchodu hmotou. U spektrofotometrie je zkoumána absorpce procházejícího záření při různých vlnových délkách (Kalina a kol., 2013). Pokud roztokem prochází spojité záření (tj. záření nejrůznějších vlnových délek), dochází v určitých intervalech vlnových délek ke snížení jeho intenzity. Množství absorbovaného záření je přímo úměrné množství analyzované látky. Při spektrofotometrii se měří vlastnosti vzorku např. koncentrace. Jako blank se používá roztok neobsahující analyzovanou látku. Měřená veličina se nazývá transmitance (propustnost), což je poměr intenzity záření prošlého ( $I$ ) k intenzitě záření dopadajícího ( $I_0$ ). Při průchodu záření vzorkem dochází k zeslabení jeho intenzity. Intenzita prošlého záření je tedy menší než intenzita záření dopadajícího (Klouta, 2003).

Nejčastějšími typy vzorků proměřovaných v absorpční spektrofotometrii jsou zředěné roztoky jednoho druhu absorbujících molekul v neabsorbujícím rozpouštědle (Kalina a kol., 2013).



Obrázek 1 – Průchod paprsku přes kyvetu se vzorkem

$$T = I/I_0 \quad (1)$$

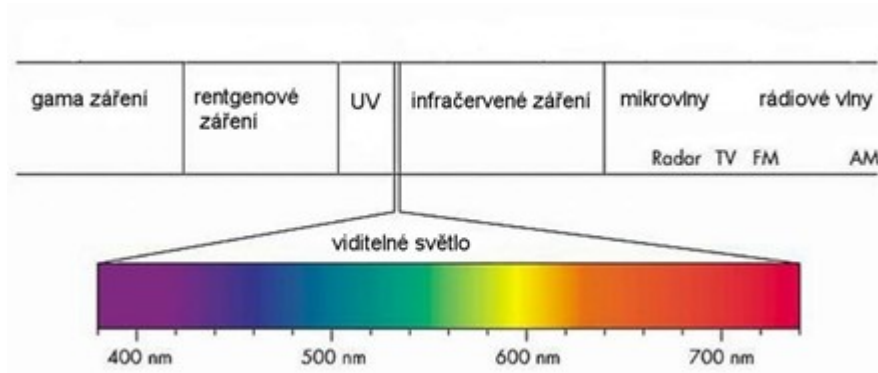
Kde:

T = transmittance (propustnost)

I = Intenzita prošlého záření

$I_0$  = Intenzita dopadajícího záření

T nabývá hodnot 0 – 1 (0 – 100 %) a udává, jaká část vstupujícího záření vychází ze zkoumaného prostředí. Látky, u nichž se T (v oblasti VIS) blíží 100 %, jsou průhledné, a ty které jsou blíže 0 %, jsou neprůhledné. Transmittance je nepřímo úměrná koncentraci. To znamená, že čím vyšší je koncentrace látky, tím méně záření vzorek propustí, tj. méně záření projde kyvetou a méně záření dopadne na detektor (Rovenska, 2005).



Obrázek 2 – Spektrum elektromagnetického záření (Rovenska, 2005)

Veličina popisující zeslabení intenzity světla při průchodu materiálem se nazývá absorban-  
ce. Je nejčastěji měřenou veličinou, protože je ve valné většině případů lineárně závislá na  
koncentraci. Absorbance i transmittance jsou bezrozměrné veličiny (Rovenská, 2005).

$$A = -\log T = \log I_0 / I \quad (2)$$

Kde:

A = absorbance

Látkám s vysokou transmittancí přísluší malá absorbance a naopak. Dle Lambert-Beerova  
zákona je absorbance při dané  $\lambda$  úměrná tloušťce absorbující vrstvy (l) a molární koncen-  
traci (c) absorbující látky:

$$A = \varepsilon \lambda c l \quad (3)$$

Kde:

$\varepsilon$  = molární absorpční koeficient [ $\text{dm}^{-3}\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ] = [ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]

$\lambda$  = vlnová délka dané látky

c = koncentrace [ $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]

l = tloušťka absorbující vrstvy [cm].



Lambert-Beerův zákon platí pro monochromatické elektromagnetické záření nízkých koncentrací. Absorbance nabývá hodnot od nuly a výše. Pro praktická měření mívají význam hodnoty  $A < 1$ , protože vyšší hodnoty již bývají málo přesné. Hodnoty pro optimální oblast absorbcí jsou od 0,2 – 0,8 (Klouda, 2003).

Metoda kalibrační křivky je založena na porovnávání signálu vzorku se sérií standardů obsahujících vhodně zvolené koncentrace vzorku. V celém jejím rozsahu je nejvýhodnější lineární tvar křivky. Rovnice kalibrační přímky je dána vztahem:

$$S = a + b * c \quad (4)$$

Kde:

S = hodnota signálu

a = úsek určený přímkou na ose y

b = směrnice přímky

c = koncentrace

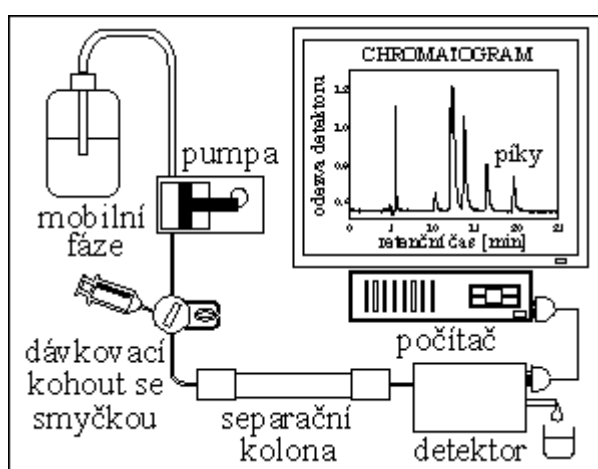
Kalibrační závislosti stanovíme koncentraci vzorku tím, že do rovnice přímky dosadíme hodnotu signálu vzorku a vypočteme jeho koncentraci (Machalíček, 2010).

Pro stanovení antokyanů při hodnocení barevných roztoků se nejčastěji používá spektrofotometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti spektra. Absorpční charakteristiky závisí na hodnotě pH, přítomnosti a polohy acylové skupiny a polaritě rozpouštědla. Podle obsahu rušivých látek v roztocích lze použít přímé nebo diferenční metody (Takácsová a Pavelková, 2009).

### 3.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie se velmi často používá k separaci a identifikaci jednotlivých antokyanů. Je to separační metoda, při které se oddělují – separují složky obsažené ve vzorku. Papírová a tenkovrstvá chromatografie patří mezi historicky používané techniky k separaci antokyanů (Balík, 2010). Nejčastěji používanou metodu ke stanovení jednotlivých antokyanů představuje vysokoúčinná kapalinová chromatografie neboli HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Vysokých účinností se dosahuje použitím stacionár-

ních fází, které obsahují malé částice pravidelného tvaru a jednotné velikosti, které homogenně vyplňují kolonu. Tím se dosahuje účinností řádově desítek tisíc pater na metr kolony. Metoda je založena na principu separace analytů na základě jejich distribuce mezi mobilní a stacionární fází. Nejpoužívanější druhy stacionárních fází jsou chemicky modifikované fáze na bázi silikagelu s C8 (oktylový uhlíkový řetězec), s C18 (oktadecylový uhlíkový řetězec) a s CN (kyanoskupina) řetězci, které jsou stabilní v širším rozsahu pH (Welch et al., 2008).



Obrázek 3 – Systém kapalinové chromatografie (Coufal, 1996)

Složení chromatografu je následující: zásobník mobilní fáze, vysokotlaká pumpa, dávkovací kohout, separační kolona, detektor, vyhodnocovací zařízení - počítač. Mobilní fáze je čerpána ze zásobníku do vysokotlaké pumpy. Při gradientové eluci aparatura obsahuje zásobníky s více kapalinami a tzv. směšovací zařízení, které určuje výsledné složení mobilní fáze. Ta protéká z vysokotlaké pumpy do dávkovacího zařízení umístěného před vstupem do kolony (Bobříková, 2016). Díky menší náročnosti se preferuje použití autosamplerů (Coufal, 1996). Po výstupu z kolony jsou jednotlivé separované složky vzorku převáděny do detektoru. Získané informace z detektoru jsou přiváděny do vyhodnocovacího zařízení. (Bobříková, 2016).

Metodu HPLC lze rozdělit na normální a reversní, přičemž při normální metodě HPLC je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní a při reversní metodě HPLC je stacionární fáze

naopak méně polární než fáze mobilní. Pro reversní metodu HPLC se užívá označení RP HPLC (Reverse Phase HPLC) a je nejpoužívanější metodou v praxi (Michálková, 2011).

### 3.2.1 Charakteristika chromatografického procesu

Tento proces je založen na rozdílné distribuci dělených látek ve směsi mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze; pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární). Mobilní fází je kapalina, která je přiváděna do chromatografického systému pomocí vysokotlaké pumpy za vysokého tlaku. Stacionární fází bývá tuhá látka, popřípadě kapalina ukotvena na tuhém nosiči. Dělením jednotlivých komponent směsi dochází k opakovanému ustavování rovnováhy dělených látek mezi mobilní a stacionární fází. Složky mezi těmito dvěma fázemi lze popsat distribuční konstantou (Bobříková, 2016).

Při gradientové eluci se složení mobilní fáze programově mění ve prospěch eluční složky, která je silnější. Pro separaci složek směsi, které mají odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti je tento typ eluce nejvhodnější (Bobříková, 2016).

### 3.2.2 Veličiny charakterizující chromatografický proces

Zadržování rozpuštěné látky stacionární fází způsobuje, že migruje menší rychlostí, než je průměrná rychlost mobilní fáze. Molekula složky stráví v koloně určitou dobu, která se nazývá retenční čas  $t_R$ . Tato doba se dělí na čas, který molekula setrvává v mobilní fází – mrtvý retenční čas  $t_M$  a čas strávený ve stacionární fází – redukovaný retenční čas  $t'_R$ . (Bobříková, 2016))

- A. **Retenční objem** je objem mobilní fáze, který musí projít kolonou od nástřiku vzorku na kolonu do dosažení maxima chromatografického píku.
- B. **Retenční čas** je celkový čas, který uplyne od nástřiku vzorku na kolonu do dosažení maxima chromatografického píku.
- C. **Kapacitní faktor**, udává poměr látkového množství rozpuštěné látky ve stacionární fází k jejímu látkovému množství v mobilní fází a určuje míru zadržování solutu v koloně.

$$k' = \frac{(nA) s}{(nA) m} \quad (5)$$

Kde:

$k'$  = kapacitní faktor

$(n_A)_s$  = látkové množství rozpuštěné látky ve fázi stacionární

$(n_A)_m$  = látkové množství rozpuštěné látky ve fázi mobilní

**D. Distribuční konstanta  $K_D$**  je konstanta, která udává poměr rovnovážných koncentrací solutu ve fázi stacionární a ve fázi mobilní.

$$K_D = \frac{[A]_s}{[A]_m} = \frac{(n_A)_s}{(n_m)_s} \times \frac{V_m}{V_s} \quad (6)$$

Kde:

$K_D$  = distribuční konstanta

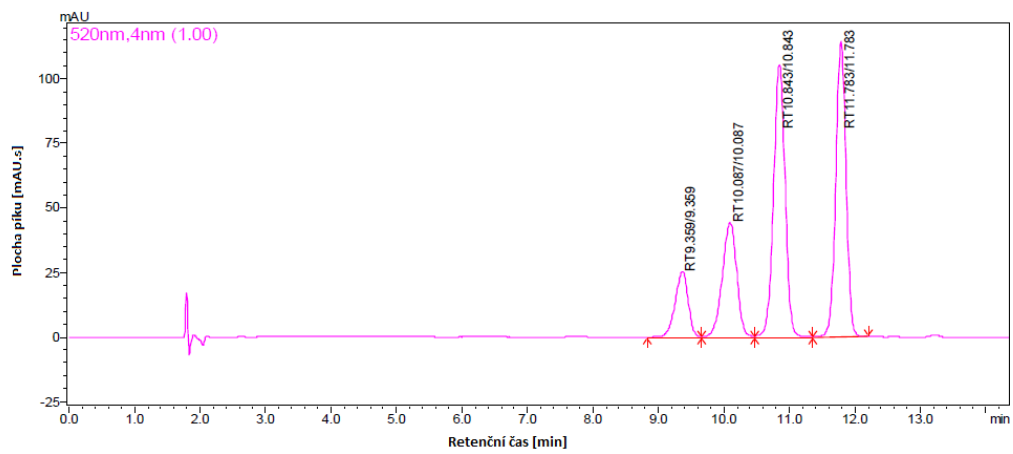
$(n_A)_s$  = látkové množství složky A ve fázi stacionární

$(n_A)_m$  = látkové množství složky A ve fázi mobilní

$V_m$  = objem fáze mobilní

$V_s$  = objem fáze stacionární (Bobříková, 2016)

Pro pokročilejší separaci monomerních antokyanů, kondenzovaných struktur barviv a derivátů se využívá i mikroseparačních technik, jako je kapilární chromatografie (CLC, Capillary Liquid Chromatography) nebo kapilární zónová elektroforéza (CZE, Capillary Zone Electrophoresis) (Balík, 2010).



Obrázek 4 – Ukázkový chromatografický záznam

(Bobříková, 2016)

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 CÍL EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE

Cílem teoretické části práce bylo popsat chemickou strukturu a stabilitu polyfenolických látek s bližší charakterizací antokyanových barviv, zaměřit se na rostlinné matrice ovoce a obilovin a následné možnosti stanovení antokyanových barviv.

Cílem experimentální části práce byla příprava vzorků ovoce a obilovin pro následné stanovení antokyanových barviv. Pro jejich stanovení bylo nutno zavést metodiku spektrofotometrickou i HPLC. Pro dosažení cíle bylo nezbytné provést optimalizace extrakce a podmínek pro metodiky spektrofotometrie a HPLC. Vybrané druhy ovoce byly nejprve lyofilizovány a následně proběhlo stanovení antokyanů. V obilovinách byly stanovovány antokyaniny před a po tepelné úpravě varem.

## 5 MATERIÁL A METODIKA PRÁCE

### 5.1 Chemikálie

Metanol (Ing. Petr Lukeš, Penta, ČR)

Kyselina chlorovodíková (Ing. Petr Švec, Penta, ČR)

Chlorid draselný (Chemapol, Praha)

Trihydrát octanu sodného (Ing. Petr Švec, Penta, ČR)

Acetonitril (SIGMA ALDRICH, Německo)

Kyselina mravenčí (SIGMA ALDRICH, Německo)

Kyselina octová (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

Destilovaná voda (AQUAOSMOTIC systém, Tišnov, ČR)

Standardy antokyanů (CHROMSERVIS, s.r.o.)

- myrtilin-3-glukosid
- keracyanin-3-glukosid
- callistephin-3-glukosid
- peonidin-5-glukosid
- kyanidin-3-glukosid
- pelargonidin-3-glukosid
- peonidin-3-glukosid
- malvidin-3-glukosid



## 5.2 Přístroje a zařízení

Analytické váhy Kern (Alfa 210 LC, Schoeller, CZ)

Temperovaná vodní lázeň s třepačkou Memmert (Německo)

Ultrazvuková lázeň (PS 04000A), (Notus Powersonic, SK)

Laboratorní třepačka LT2 (Kavalier, ČR)

Elektrický mlýnek a vločkovač Combi-Star (Waldner, Biotech, Rakousko)

UV/VIS spektrofotometr (Lambda 25, Perkin Elmer, USA)

HPLC (HPLC Dionex UltiMate 3000, detektor – UV/VIS)



Obrázek 5 – Kapalinový chromatograf

pH metr (Hanna Instrument, USA)

Centrifuga (Dinamica, Velocity 13 $\mu$ , )

Automatická pipeta 1000  $\mu$ l

Dávkovač Brand Handy Step

Vortex

Nylonový mikrofiltr Lut Syringe (13mm, 0,45 $\mu$ l)

Kolona YMC-Triart C18

Běžné laboratorní vybavení



Obrázek 6 – Elektrický mlýnek a vločkovač

## 5.3 Charakteristika vzorků

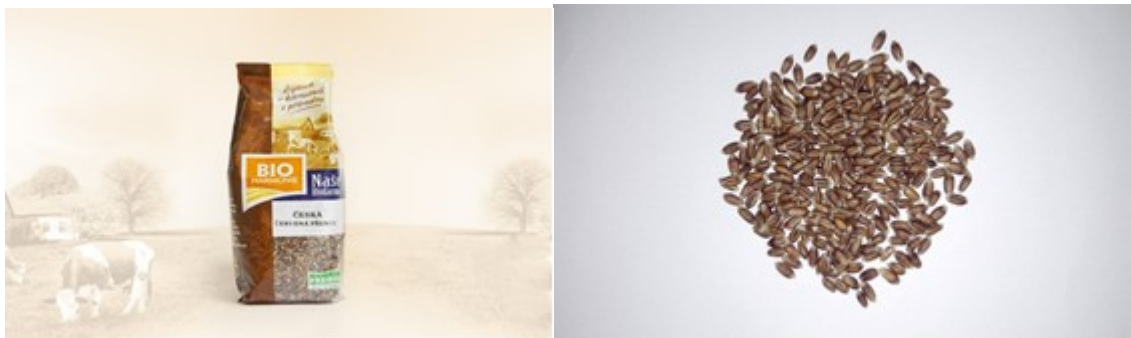
### 5.3.1 Ovoce

Vzorky ovoce byly poskytnuty Školním zemědělským podnikem v Žabčicích, pracoviště Lednice – Mendelova univerzita v Brně.

Mezi analyzovanými druhy ovoce byly rybíz 'Ben Hope', dřín 'Fruchtal', zimolez 'Remont', jeřáb 'Granatnaja', aronie 'Nero', angrešt 'Neguš' a borůvka 'Fialka'.

### 5.3.2 Obiloviny

Vzorek pšenice české s červenými obalovými vrstvami byl zakoupen v rámci obchodní sítě ČR s deklarací BIO produktu. Pšenice česká červená byla vypěstována na ekofarmě pana Jana Hlaváče v oblasti jihomoravské Pálavy.



Obrázek 7 – Pšenice s červenými obalovými vrstvami

Vzorky pšenice Rotkorn a Rothalm byly poskytnuty Hochschule für Wirtschaft und Umwelt Nürtingen-Geislingen, Stuttgart, Německo a Bäckerhaus Veit, GmbH, Bempflingen, Německo. Oba druhy pšenice pochází ze sklizně 2016.



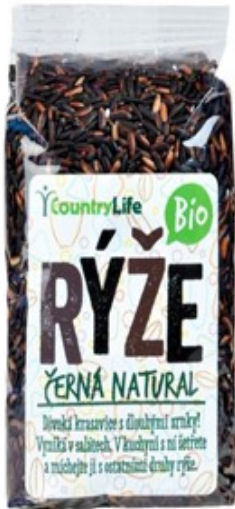
Obrázek 8 – Pšenice 'Rothalm' (vlevo) a 'Richard' (vpravo)

Vzorek lila rýže byl zakoupen v obchodní síti ČR. Je to směs rýží, která pochází z Laosu.



Obrázek 9 – Rýže 'Lila'

Vzorek rýže s černými obalovými vrstvami natural byl zakoupen v obchodní síti ČR.



Obrázek 10 – Rýže natural s černými obalovými vrstvami

Vzorek rýže s černými obalovými vrstvami z Číny byl zakoupen v USA. Pochází z Purcell Mountain farms.



Obrázek 11 – Čínská rýže s černými obalovými vrstvami



Tabulka 1 – Popis a označení vzorků

Vzorek	Označení vzorku
Rybíz 'Ben Hope',	O1
Dřín 'Fruchtal'	O2
Zimolez 'Remont'	O3
Jeřáb 'Granatnaja'	O4
Aronie 'Nero',	O5
Angrešt 'Neguš'	O6
Borůvky 'Fialka'	O7
Pšenice s červenými obalovými vrstvami	P1
Pšenice 'Rothalm'	P2
Pšenice 'Richard'	P3
Rýže 'Lila	R1
Rýže natural s černými obalovými vrstvami	R2
Čínská rýže s černými obalovými vrstvami	R3

## 5.4 Příprava vzorků

### 5.4.1 Příprava ovoce – postup lyofilizace

Připravené vzorky byly zhomogenizovány ve třecí misce a následně naváženy do hliníkových misek. Poté byly vzorky ovoce zmrazeny rychlým zmražením vzorku na teplotu - 60 °C aby nedošlo k narušení struktury ovoce tvorbou krystalků ledu. Dalším krokem byla lyofilizace vzorku po dobu 48 hod v lyofilizátoru ALPHA 1-4LSC. Při teplotě - 60 °C došlo k sublimačnímu sušení vzorků ovoce. Nakonec byly vzorky připraveny k analýze ve formě sušeného ovoce a uskladněny v chladničkové teplotě uzavřené v PE sáčku na vzorky.

### 5.4.2 Příprava obilovin

Všechny vzorky obilovin určené k analýze před tepelnou úpravou byly rozemlety na mlýnku Combi Star. Zhomogenizované vzorky byly uloženy do PP lahví k následnému stanovení antokyanových barviv. Vzorky určené k analýze po tepelné úpravě byly naváženy v množství 20 g a připraveny tak, že k příslušnému vzorku byla přidána destilovaná voda a vzorek se vařil po dobu uvedenou v tabulce, než byl dovařen. Při vaření byla naměřena teplota 80 – 85 °C. Vzorek byl ponechán v Petriho misce na usušení a následně byl rozemlet do práškové konzistence a uložen k analýze na suchém místě v PP lahvích. V tabulce č. 2 a č. 3 jsou uvedeny jednotlivé vzorky s konkrétními navážkami, množstvím použité destilované vody a dobou varu vzorku.

Tabulka 2 – Technologické údaje vzorku pšenice

Vzorek	Navážka na vaření (g)	Voda (ml)	Var 85 (°C)
P1	20,0023	380	50 min
P2	20,0099	320	41 min
P3	20,0017	330	37 min

Tabulka 3 – Technologické údaje vzorku rýží

Vzorek	Navážka na vaření (g)	Voda (ml)	Var 85 (°C)
R1	20,0053	250	29 min
R2	20,0055	210	21 min
R3	20,0054	260	34 min

### 5.5 Příprava extraktů pro následné spektrofotometrické stanovení

Připravené vzorky k analýze byly naváženy na analytických vahách s přesností na 0,1 mg. Od každého vzorku bylo naváženo příslušné množství v rozmezí 1 – 5 g do lékovek. Každý vzorek byl navažován minimálně 3x a dále byl smíchán s extrakčním činidlem v množství 10 ml.



Obrázek 12 – Připravené vzorky v lékovkách

**Zkoušené extrakční směsi byly následující:**

Metanol : HCl (1 mol.dm <sup>-3</sup> )	99 : 1 (%)
Metanol : HCl (0,5 mol.dm <sup>-3</sup> )	70:30 (%)
Metanol : HCl (1 mol.dm <sup>-3</sup> )	85: 15 (%)
Metanol : H <sub>2</sub> O : HCl (0,5 mol.dm <sup>-3</sup> )	70:29:1 (%)

Zkoušené způsoby extrakce v kombinaci s příslušným extrakčním činidlem – optimalizace extrakce:

- 30 minutová extrakce na třepačce po dobu 10 minut v ultrazvuku a 8 minut v odstředivce (12300g) s použitou extrakční směsí v poměru 99 % Met : 1 % HCl (1 mol.dm<sup>-3</sup>)
- 30 minutová extrakce na třepačce po dobu 20 minut v ultrazvuku a 15 minut v odstředivce (12300g) s použitou extrakční směsí v poměru 85 % Met : 15 % HCl (1 mol.dm<sup>-3</sup>)
- 30 minutová extrakce na třepačce po dobu 20 minut v ultrazvuku a 15 minut v odstředivce (12300g) s použitou extrakční směsí v poměru 70 % Met : 30 % HCl (0,5 mol.dm<sup>-3</sup>)



- 1 hodinová extrakce na třepačce po dobu 20 minut v ultrazvuku a 15 minut v odstředivce (12300g) s použitou extrakční směsí v poměru 85 % Met : 15 % HCl ( $1 \text{ mol.dm}^{-3}$ )
- 1 hodinová extrakce na třepačce po dobu 20 minut v ultrazvuku a 15 minut v odstředivce (12300g) s použitou extrakční směsí v poměru 70 % Met : 30 % HCl ( $0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$ )
- 1 hodinová extrakce ve vodní lázni po dobu 20 minut v ultrazvuku a 15 minut v odstředivce (12300g) s použitou extrakční směsí v poměru 70 % Met : 29 % H<sub>2</sub>O : 1 % HCl ( $0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$ )
- 30 minutová extrakce ve vodní lázni po dobu 20 minut v ultrazvuku a 15 minut v odstředivce (12300g) s použitou extrakční směsí v poměru 85 % Met : 15 % HCl ( $1 \text{ mol.dm}^{-3}$ )
- 30 minutová extrakce ve vodní lázni po dobu 20 minut v ultrazvuku a 15 minut v odstředivce (12300g) s použitou extrakční směsí v poměru 70 % MET : 30 % HCl ( $0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$ )
- 1 hodinová extrakce ve vodní lázni po dobu 20 minut v ultrazvuku a 15 minut v odstředivce (12300g) s použitou extrakční směsí v poměru 85 % Met : 15 % HCl ( $1 \text{ mol.dm}^{-3}$ )
- 1 hodinová extrakce ve vodní lázni po dobu 20 minut v ultrazvuku a 15 minut v odstředivce (12300g) s použitou extrakční směsí v poměru 70 % Met : 30 % HCl ( $0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$ )

## 5.6 Spektrofotometrické stanovení celkových antokyanů

### 5.6.1 Příprava pufrů

A)  $0,4 \text{ mol.dm}^{-3}$  pufr octanu sodného byl připraven rozpuštěním přesné navážky 5,443 g octanu sodného v 96 ml destilované vody

B)  $0,025 \text{ mol.dm}^{-3}$  pufr chloridu draselného byl připraven rozpuštěním přesné navážky 0,186 g chloridu draselného v 98 ml destilované vody

Připravené roztoky byly následně upraveny pomocí koncentrované HCl a  $0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$  HCl na požadované pH. Pufr octanu sodného byl upraven na pH 4,5 a pufr chloridu draselného na pH 1.

### 5.6.2 Spektrofotometrické stanovení TAC pro matrice ovoce

Celkové antokyany jsou značeny zkratkou TAC (total anthocyanin content). Pro každý analyzovaný vzorek byly použity 4 zkumavky. U vzorků bylo použito ředění 5 – 30x. Z extraktu bylo do každé zkumavky napipetováno 0,5 ml vzorku. Do prvních dvou zkumavek bylo napipetováno ke vzorku 2,5 ml pufru octanu sodného a do dalších dvou bylo přidáno 2,5 ml chloridu draselného. Obsah zkumavek byl promíchán na vortexu. Absorbance vzorků byla měřena na spektrofotometru Lambda 25 při vlnových délkách 510 nm (absorpční maximum majoritního antokyanu – kyanidin-3-glukosidu) a 700 nm. Jako blank byla použita extrakční směs.



Obrázek 13 – Připravené roztoky pro následné spektrofotometrické stanovení TAC před jejich odstředěním

Z každého analyzovaného vzorku byly naměřeny hodnoty absorbance a následně byla vypočtena koncentrace TAC v ekvivalentech kyanidin-3-glukosidu. Výsledné koncentrace byly vyjádřeny v  $\text{mg.l}^{-1}$ , následně přepočteny na navážku vzorku a poté vyjádřeny v  $\text{mg.100 g}^{-1}$ .

### 5.6.3 Spektrofotometrické stanovení TAC pro matrice obilovin

Vzorky pšenice byly připraveny bez ředění. U vzorků rýže bylo použito ředění 10x.

Následná příprava je stejná jako u kapitoly 5.6.2.

**Výpočet korekce absorpance (A) ředěných vzorků:**

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH1} - (A_{510} - A_{700})_{pH4,5} \quad (7)$$

Kde:

A = absorpance zředěného vzorku

$(A_{510})_{pH1}$  = absorpance vzorku v pufru o pH 1 při vlnové délce 510 nm

$(A_{510})_{pH4,5}$  = absorpance vzorku v pufru o pH 4,5 při vlnové délce 510 nm

$(A_{700})_{pH1}$  = absorpance vzorku v pufru o pH 1 při vlnové délce 700 nm

$(A_{700})_{pH4,5}$  = absorpance vzorku v pufru o pH 4,5 při vlnové délce 700 nm

**Výpočet TAC v extraktu**

$$TAC[mg.l^{-1}] = \frac{A \cdot M \cdot f}{\epsilon \cdot l} \cdot 1000 \quad (8)$$

Kde:

A = absorpance zředěného vzorku

M = molární hmotnost kyanidin-3-glukosidu [449,2 g.mol<sup>-1</sup>]

f = faktor ředění

$\epsilon$  = molární extinkční koeficient [26 900 cm<sup>-1</sup>. mol<sup>-1</sup>. l]

l = délka optické dráhy [1cm]

Získaná koncentrace byla přepočítána na mg celkových antokyanů (TAC) ve 100 g ovoce a obilovin.

## 5.7 Stanovení jednotlivých antokyanů pomocí HPLC

Vzorky ovoce a obilovin byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s cílem identifikovat jednotlivé přítomné antokyanany. K dispozici byly standardy antokyanů, pro každý standard antokyanu byla sestrojena kalibrační křivka. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost plochy píku (mAU.s) na koncentraci standardu ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

### 5.7.1 Chromatografická analýza antokyanů

K separaci jednotlivých složek antokyanů byla použita kolona YMC-Triart C18 (150 x 3,0 mm; 5  $\mu\text{m}$ ). Nástřik vzorku byl nastaven na 20  $\mu\text{l}$ . Jako mobilní fáze A byla použita voda a 85% kyselina mravenčí v poměru 90:10. Mobilní fází B byl acetonitril. Rychlost průtoku mobilní fáze byla nastavena na 1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Při měření byla regulována teplota termostatu na 25 °C a celková doba analýzy trvala 35 minut. Při vlnové délce 520 nm se odečítaly plochy píku v porovnání s retenčními časy.

### 5.7.2 Kalibrační křivky

Pro analýzu antokyanů v reálných vzorcích byly nejdříve proměřeny standardy všech antokyanů. Obsah byl zjištěn proměřením kalibrační závislosti metodou externí kalibrace. Kalibrační závislosti jednotlivých standardů jsou uvedeny v kapitole 6.3.1. Identita jednotlivých antokyanů byla potvrzena se standardem a obsah TAC byl vypočítán z regresní rovnice.

## 5.8 Statistická analýza

Naměřené výsledky byly podrobeny statistickému vyhodnocení s využitím parametrického testu, který srovnává střední hodnoty dvou nezávislých souborů (Studentův t-test). Zjištěné výsledky byly vyhodnoceny v programu StatK25. Hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ .

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 Stanovení antokyanových barviv

Antokyanová barviva byla stanovována pomocí metod popsanych v kapitolách 5.6 a 5.7. V diplomové práci jsou výsledky prezentovány jako aritmetické průměry  $\pm$  SD (směrodatná odchylka).

### 6.2 Výsledky spektrofotometrického stanovení celkových antokyanových barviv (TAC)

#### 6.2.1 Postup extrakce pro matrici ovoce

Pro matrice ovoce byla vyhodnocena jako nejvhodnější metoda 1 hodinové extrakce ve vodní lázni po dobu 20 minut v ultrazvuku a 15 minut v odstředivce (12300g) s použitím extrakční směsi v poměru 70 % Met : 29 % H<sub>2</sub>O : 1% HCl (0,5 mol.dm<sup>-3</sup>).

#### 6.2.2 Výsledky stanovení celkových antokyanů vzorků lyofilizovaného ovoce

Výsledné hodnoty obsahu celkových antokyanů stanovených v lyofilizovaném ovoci jsou uvedeny v Tabulce č. 4 a jsou prezentovány jako ekvivalenty kyanidin-3-glukosidu a jsou uvedeny na gram lyofilizátu.

Tabulka 4 – Obsah celkových antokyanů v lyofilizovaném ovoci

Označení vzorku	TAC $\pm$ SD [mg C3G.100 g <sup>-1</sup> ]
O1	238,6 $\pm$ 2,45 <sup>a</sup>
O2	58,1 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>
O3	216,5 $\pm$ 1,06 <sup>a</sup>
O4	86,2 $\pm$ 0,81 <sup>c</sup>
O5	179,7 $\pm$ 1,02 <sup>d</sup>
O6	72,1 $\pm$ 0,26 <sup>e</sup>
O7	358,4 $\pm$ 2,27 <sup>f</sup>

Hodnoty ve sloupci se stejným písemným indexem se vzájemně statisticky neliší ( $p \geq 0,05$ ), hodnoty s různými indexy se navzájem liší ( $p < 0,05$ ).

Z výsledků uvedených v Tabulce 4 je patrné, že nejvyšší množství antokyanových barviv vykazuje vzorek O7 – borůvky 'Fialka' a to 358,4 mg C3G.100 g<sup>-1</sup> a nejnižší množství vzorek s označením O2 – dřín 'Fruchtal' a to 58,1 mg C3G.100 g<sup>-1</sup>. Vzorky O1 a O3 nevykazují statisticky významný rozdíl a proto můžeme říct, že hodnoty celkových antokyanů jsou pro tyto vzorky shodné. Jedná se o vzorek O1 – rybíz 'Ben Hope' a O3 – zimolez 'Remont'. U vzorku O5 – aronie 'Nero' byl naměřen TAC 179,7 mg C3G.100 g<sup>-1</sup>. Horáková (2016) uvádí, že TAC v lyofilizovaném vzorku aronie 'Nero' byl v rozmezí 218 – 236 mg C3G.100 g<sup>-1</sup>. Pro vzorek O1 – rybíz 'Ben Hope' byla hodnota TAC naměřena 238,6 mg C3G.100 g<sup>-1</sup>, zatímco Horáková (2016) ve své práci uvádí, že TAC pro odrůdy rybízu 'Ben Lemond' a 'Ben Gairn' byly v rozmezí 52 – 188 mg C3G.100 g<sup>-1</sup>. Hodnoty stanovené v lyofilizovaných vzorcích mohou mít velké rozpětí z důvodu nedostatečného zlyofilizování vzorků nebo nabírání vzdušné vlhkosti vzorky. Adamczak (2009) uvádí, že dostupná data TAC v ovocných druzích je obtížné porovnávat z důvodu různých analytických metod, metod výpočtů a různých laboratorních podmínek při skladování a sušení.

Sójka et al. (2013) uvádí, že naměřené hodnoty TAC v čerstvém stavu u Aronie 'Nero' se pohybují v rozmezí 616 – 1239 mg C3G.100 g<sup>-1</sup> a Pedersen (2008) uvádí hodnotu TAC pro černý rybíz v čerstvém stavu 168 – 613 mg C3G.100 g<sup>-1</sup>. Dostálová (2016) ve své práci uvádí, že hodnoty TAC se nacházejí v rozmezí 38,99 - 113,76 mg C3G.100g<sup>-1</sup>.

### 6.2.3 Postup extrakce pro obilné matrice

Pro matrice obilovin byla zvolena nejvhodnější metoda 1 hodinové extrakce ve vodní lázni po dobu 20 minut v ultrazvuku a 15 minut v odstředivce (12300g) s použitím extrakční směsi v poměru 85 % Met : 15 % HCl (1 mol.dm<sup>-3</sup>).

#### 6.2.3.1 Výsledky stanovení obsahu celkových antokyanů u vzorků syrových obilných zrn

Výsledné hodnoty obsahu celkových antokyanů (TAC) v zrnech obilnin před tepelnou úpravou jsou uvedeny v Tabulkách č. 5 a 6.

Tabulka 5 – Obsah celkových antokyanů v pšenici před tepelnou úpravou

Označení vzorku	TAC [ mg C3G.100 g <sup>-1</sup> ]
P1	1,1 ± 0,01 <sup>a</sup>
P2	6,3 ± 0,03 <sup>b</sup>
P3	2,5 ± 0,05 <sup>a</sup>

Hodnoty ve sloupci se stejným písemným indexem se vzájemně statisticky neliší ( $p \geq 0,05$ ), hodnoty s různými indexy se navzájem liší ( $p < 0,05$ ).

Množství celkových antokyanů v pšenici před tepelnou úpravou se pohybuje v rozmezí 1,1 – 6,3 mg C3G.100 g<sup>-1</sup>. Mezi vzorky P1 a P3 není statisticky významný rozdíl ( $p \geq 0,05$ ), oproti vzorku P2, kde byl naměřen nejvyšší podíl antokyanových barviv ( $p < 0,05$ ). Celková naměřená hodnota TAC u vzorku P2 – ‘Rothalm’ byla 6,3 mg C3G.100 g<sup>-1</sup>. Bailon et al. (2004) porovnával hodnotu TAC pro jarní pšenici modrou aleuronovou, fialovou pšenici a pšenici s červenými obalovými vrstvami během tří sklizní. Ve fialové pšenici naměřili hodnoty TAC 16 mg C3G.100 g<sup>-1</sup>. U pšenice s červenými obalovými vrstvami naměřili hodnotu TAC 0,5 mg C3G.100 g<sup>-1</sup>. V diplomové práci byla naměřena hodnota TAC pšenice s červenými obalovými vrstvami s označením vzorku P1 v hodnotě 1,1 mg C3G.100 g<sup>-1</sup>. Abdel-Aal et al. (2006) uvádí průměrný obsah antokyanů 10,6 – 15,3 mg C3G.100 g<sup>-1</sup> a uvádí rozsah u odrůdy modré a purpurové pšenici 1,3 – 13,9 mg C3G.100 g<sup>-1</sup>. Při porovnání hodnot naměřených vzorků s literaturou je patrné, že výsledky se od sebe liší.

Tabulka 6 – Obsah celkových antokyanů v rýži před tepelnou úpravou

Označení vzorku	TAC [ mg C3G.100 g <sup>-1</sup> ]
R1	23,5 ± 0,08 <sup>a</sup>
R2	71,7 ± 0,18 <sup>b,c</sup>
R3	81,8 ± 0,21 <sup>c</sup>

Hodnoty ve sloupci se stejným písemným indexem se vzájemně statisticky neliší ( $p \geq 0,05$ ), hodnoty s různými indexy se navzájem liší ( $p < 0,05$ ).

Ve vzorcích rýží s barevnými obalovými vrstvami byla detekovaná výrazně vyšší hodnota celkových antokyanů v porovnání s hodnotami vzorků pšenice. Hodnoty TAC se pohybují v rozmezí 2,35 – 8,18 mg C3G.100 g<sup>-1</sup>. Mezi vzorky R2 a R3 nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ( $p \geq 0,05$ ). U vzorku R3 – rýže s černými obalovými vrstvami z Číny byla detekována statisticky nejvyšší hodnota TAC 8,18 mg C3G.100 g<sup>-1</sup> ( $p < 0,05$ ). Nejmenší množství bylo stanoveno u vzorku R1 – rýže 'Lila' 2,35 mg C3G.100 g<sup>-1</sup>. Pedro et al. (2016) ve své studii uvádí, že naměřené hodnoty TAC se u rýží pohybují nad 10 mg C3G.100 g<sup>-1</sup>. Další studie, kterou uvedl Frank et al. (2016) ukazuje, že hodnoty TAC jsou velice variabilní a naměřené hodnoty rýže s černými obalovými vrstvami v rozmezí 22,3 – 140,3 mg C3G.100 g<sup>-1</sup>. Při porovnání hodnot naměřených vzorků s literaturou je patrné, že výsledky se od sebe liší.

### 6.2.3.2 Výsledky stanovení obsahu celkových antokyanů u tepelně opracovaných obilných zrn

Výsledné hodnoty celkových antokyanů po tepelné úpravě jsou uvedeny v tabulkách č. 7 a 8.

Tabulka 7 – Obsah celkových antokyanů v pšenici po tepelné úpravě

Označení vzorku	TAC [ mg C3G.100 g <sup>-1</sup> ]
<b>P1</b>	0,7 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>P2</b>	1,3 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>P3</b>	0,6 ± 0,01 <sup>a</sup>

Hodnoty ve sloupci se stejným písemným indexem se vzájemně statisticky neliší ( $p \geq 0,05$ ), hodnoty s různými indexy se navzájem liší ( $p < 0,05$ ).

Množství antokyanů v pšenici po tepelné úpravě se pohybuje v rozmezí 0,6 – 1,3 mg C3G.100 g<sup>-1</sup>. Mezi vzorky P1, P2 i P3 není statisticky významný rozdíl ( $p \geq 0,05$ ). Z výsledků je patrné, že při tepelné úpravě dochází k degradaci antokyanových barviv. Celkové hodnoty antokyanových barviv u vzorků rýží byly vyšší i po tepelné úpravě než u pšenice. Průměrné množství TAC ve vzorcích rýže se pohyboval v rozmezí 32,5 - 9,8 mg



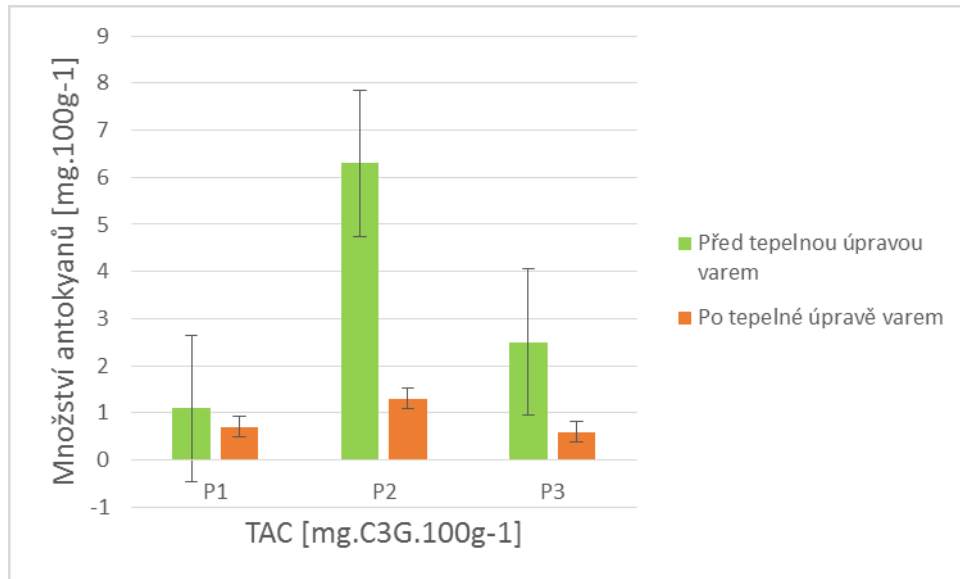
C3G.100 g<sup>-1</sup>. Statisticky stejné množství bylo detekováno ve vzorcích R1 a R2. Nejvyšší množství TAC bylo stanoveno ve vzorku R3 – rýže s černými obalovými vrstvami z Číny a to v množství 32,5 mg C3G.100 g<sup>-1</sup>. Nejnižší množství vykazoval vzorek R2 – rýže natural s černými obalovými vrstvami v množství 9,8 mg C3G.100 g<sup>-1</sup>.

Důležitým vlivem při tepelné úpravě je voda při vaření, do které jsou antokyanová barviva vyluhována a tím vzniká jejich následná ztráta ve vzorku. Další důležitý faktor je kyslík, který urychluje degradaci antokyanů. Kučerová (2014) ve své práci uvedla, že po úpravě pečením zůstane v pečivu 33% antokyanů.

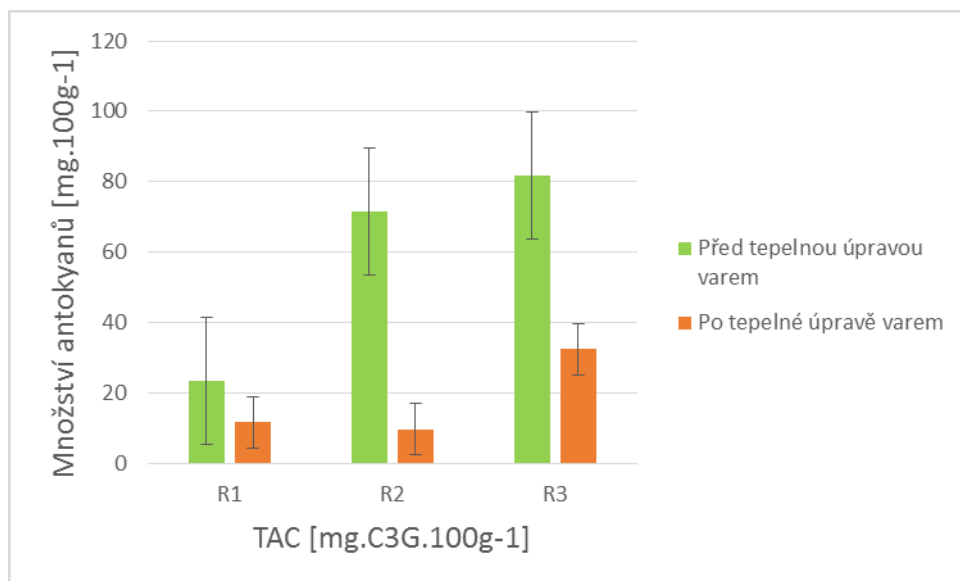
Tabulka 8 – Obsah celkových antokyanů v rýži po tepelné úpravě varem

Označení vzorku	Množství antokyanů [ mg C3G.100 g <sup>-1</sup> ]
R1	11,7 ± 0,11 <sup>a</sup>
R2	9,8 ± 0,01 <sup>a</sup>
R3	32,5 ± 0,14 <sup>b</sup>

Hodnoty ve sloupci se stejným písmenným indexem se vzájemně statisticky neliší ( $p \geq 0,05$ ), hodnoty s různými indexy se navzájem liší ( $p < 0,05$ ).



Graf 1 – Srovnávací graf pšenice před a po tepelné úpravě varem



Graf 2 – Srovnávací graf rýže před a po tepelné úpravě varem

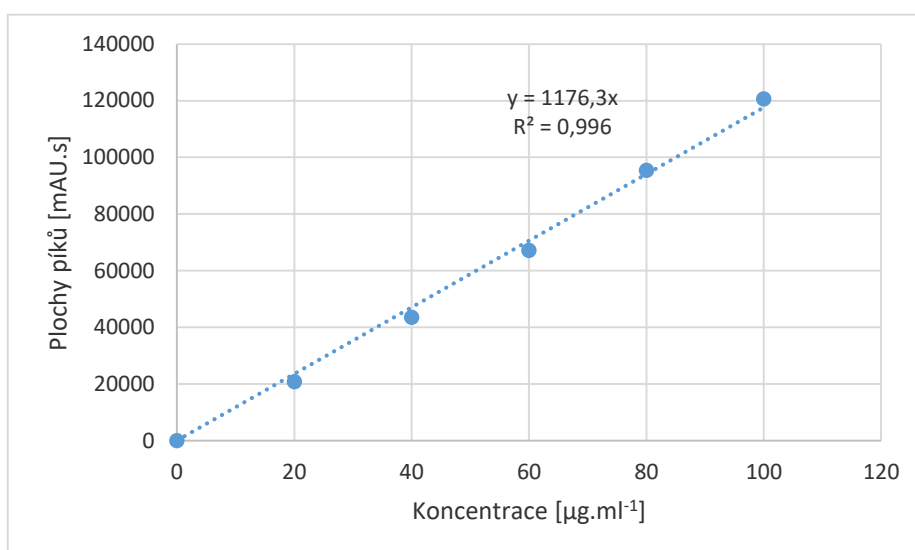
Graf 1 a 2 ukazují hodnoty TAC před a po tepelné úpravě. Z grafů je patrné, že celkový pokles antokyanových barviv je vysoký. U vzorku P1 poklesl TAC o 36,3 % , u vzorku P2 byl zaznamenán nejvyšší pokles, a to o 79,3 %. Vzorek P3 vykázal hodnoty poklesu TAC o 76 %. U vzorku R3 byl zaznamenán pokles TAC o 60,3 %. Nejvyšší pokles hodnot TAC je u vzorku R2, a to o celých 86 % oproti tomu nejnižší pokles hodnot je u vzorku R1, a to o

50,2 %. Dle Bailon et al. (2004) je patrné, že pokles antokyanových barviv po tepelné úpravě je značný. Uvedl, že vzorek pšenice s červenými obalovými vrstvami po degradaci antokyanů obsahoval z 0,5 mg C3G.100 g<sup>-1</sup> 0,2 mg C3G.100 g<sup>-1</sup>.

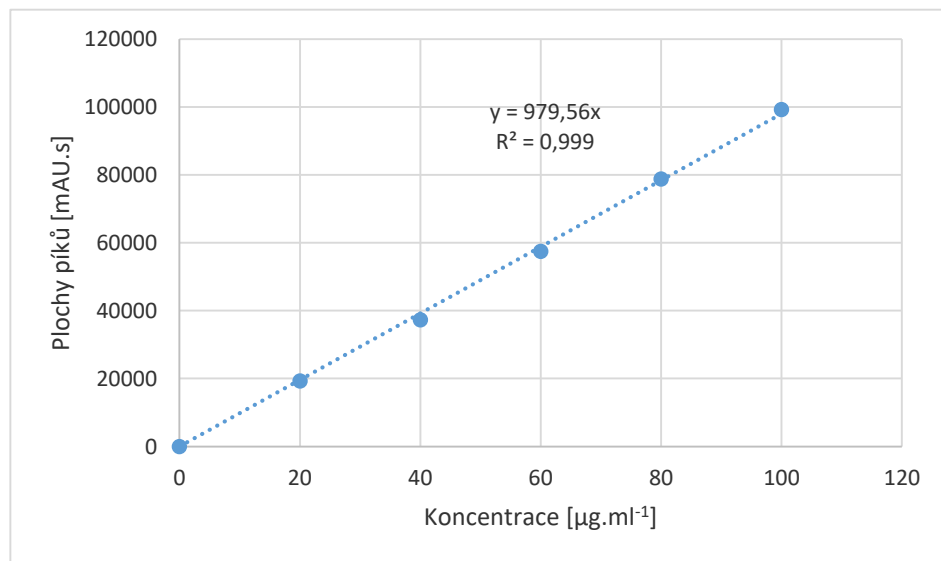
### 6.3 Výsledky měření profilu vybraných antokyanových barviv metodou HPLC

#### 6.3.1 Kalibrační křivky jednotlivých standardů antokyanů

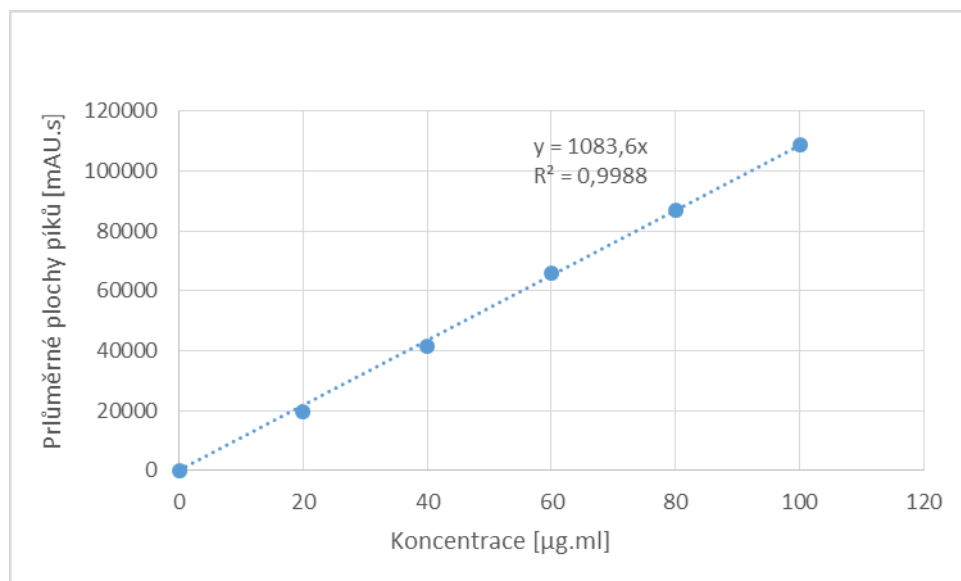
Kalibrační křivka představuje závislost plochy píku na (mAU.s) na koncentraci daného standardu antokyanu (μg.ml<sup>-1</sup>).



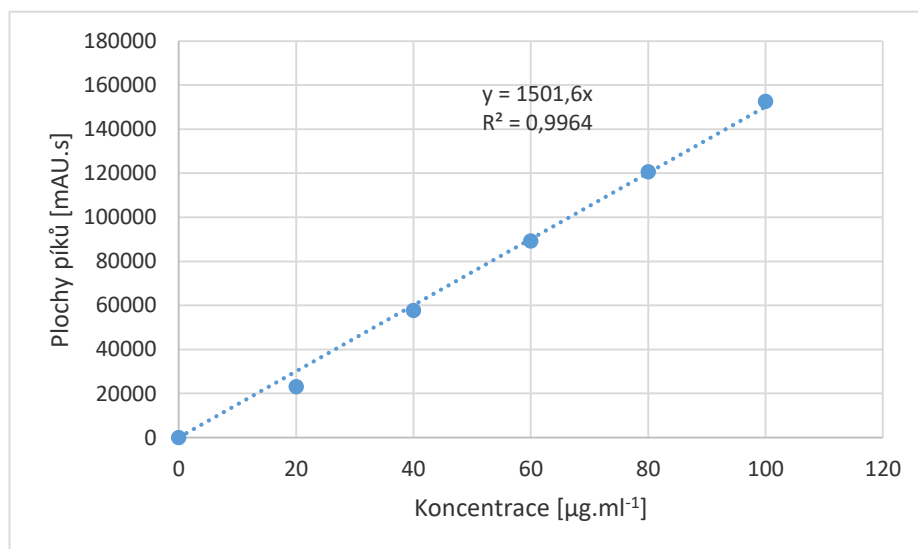
Graf 3 – Kalibrační křivka myrtillin-3-glukosidu



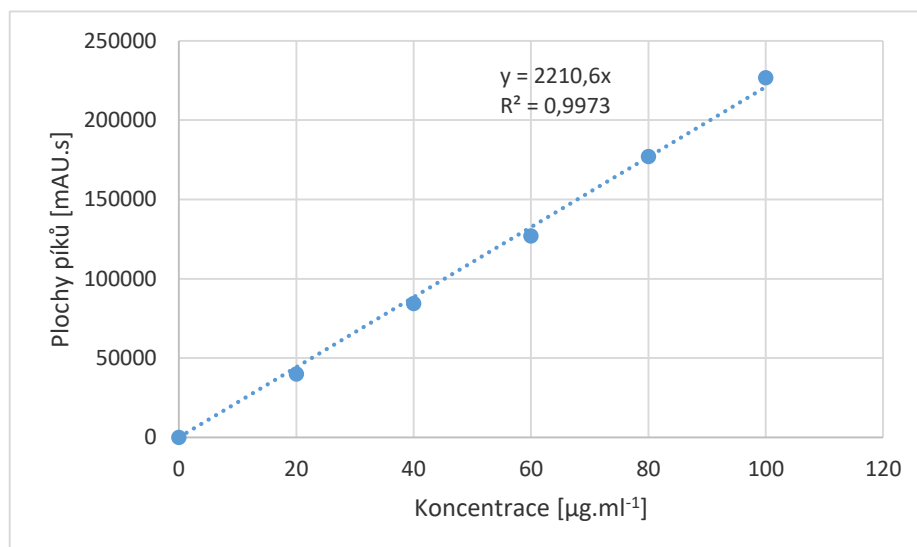
Graf 4 – Kalibrační křivka keracyanin-3-glukosidu



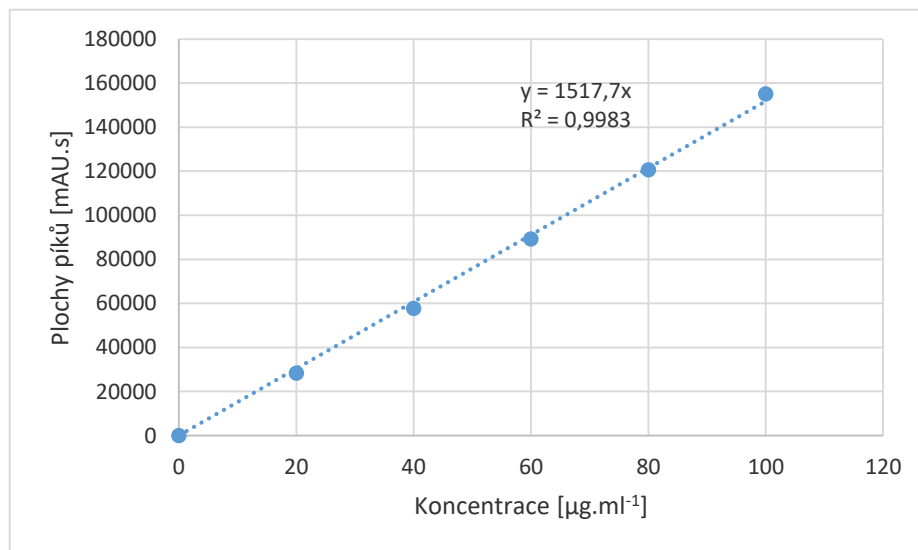
Graf 5 – Kalibrační křivka callistephin-3-glukosidu



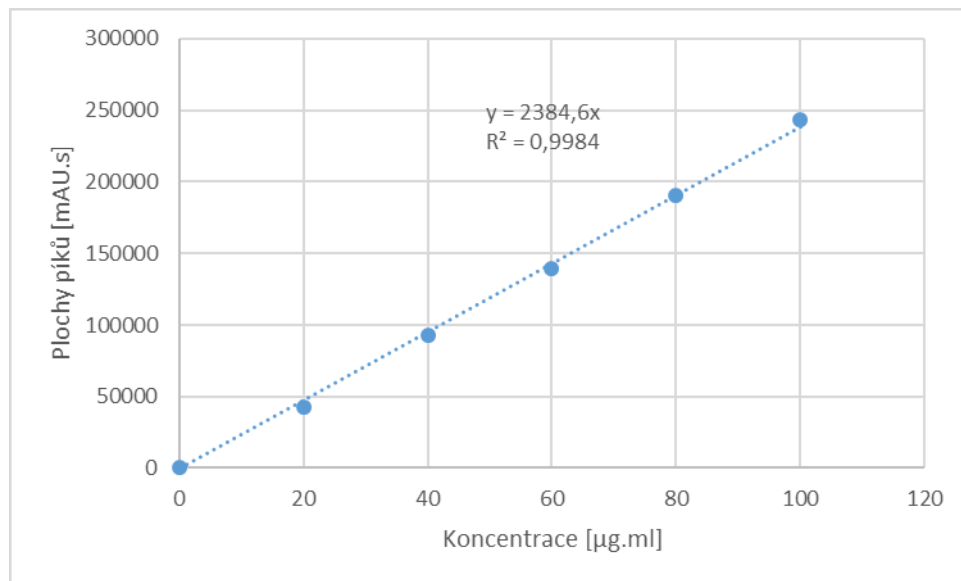
Graf 6 – Kalibrační křivka peonidin-5-glukosidu



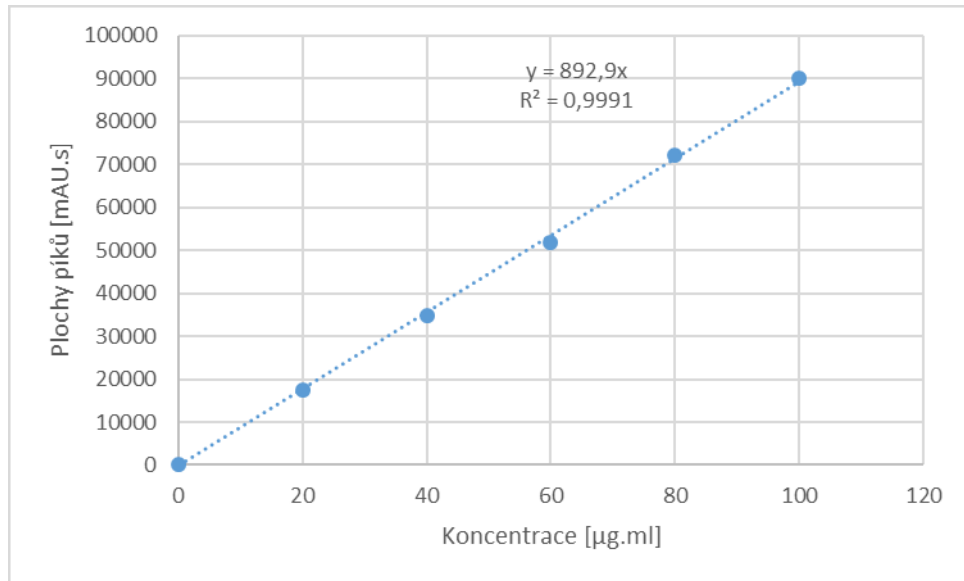
Graf 7 – Kalibrační křivka kyanidin-3-glukosidu



Graf 8 – Kalibrační křivka pelargonidin-3-glukosidu



Graf 8 – Kalibrační přímka peonidin-3-glukosidu, osa x



Graf 9 – Kalibrační přímka malvidin-3-glukosidu

### 6.3.2 Výsledky stanovení obsahu jednotlivých antokyanů metodou HPLC u vzorků ovoce

Výsledky stanovení obsahu jednotlivých antokyanů vzorků lyofilizovaného ovoce jsou uvedeny v tabulce č. 9 a jsou uvedeny na gram lyofilizátu.

Tabulka 9 – Koncentrace jednotlivých antokyanů v ovoci

Antokyan [ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ]	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7
<b>Myrtillin-3-glukosid</b>	33,77 ± 6,01	n.d.	n.d.	5,60 ± 0,68	n.d.	1,17 ± 0,58	n.d.
<b>Keracyanin-3-glukosid</b>	382,97 ± 19,29	3098 ± 12,11	n.d.	253,65 ± 8,08	255,87 ± 27,56	774,5 ± 5,63	458,26 ± 3,93
<b>Callistephin-3-glukosid</b>	1467,66 ± 52,56	39,97 ± 0,41	324,05 ± 13,39	645 ± 18,64	29,57 ± 63,40	2697,84 ± 19,60	159,34 ± 1,27
<b>Peonidin-5-glukosid</b>	28,39 ± 3,16	1,80 ± 0,04	2,80 ± 0,14	0,11 ± 0,01	8,39 ± 1,66	0,85 ± 0,02	672,98 ± 8,92
<b>Kyanidin-3-glukosid</b>	1,44 ± 0, 0,08	0,68 ± 0,06	0,06 ± 0,01	n.d.	1,28 ± 0,15	0,07 ± 0,01	n.d.
<b>Pelargonidin-3-glukosid</b>	0,10 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,73 ± 0,05	n.d.	0,16 ± 0,07	n.d.	0,52 ± 0,34
<b>Peonidin-3-glukosid</b>	n.d.	0,24 ± 0,01	1,03 ± 0,21	n.d.	n.d.	8,20 ± 0,24	0,94 ± 0,07
<b>Malvidin-3-glukosid</b>	n.d.	0,56 ± 0,03	0,61 ± 0,01	n.d.	0,41 ± 0,15	68,08 ± 0,76	0,22 ± 0,06

n.d. = nebylo detekováno



Z Tabulky 9 vyplývají následující výsledky.

Myrtillin-3-glukosid byl detekován ve vzorcích O1, O4 a O6. Jeho nejvyšší množství 33,77  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  vykazoval vzorek O1 – rybíz ‘Ben Hope’ a nejnižší množství 1,17  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  vzorek O6 – angrešt ‘Neguš’. U vzorků O2, O3, O5 a O7 nebyl tento antokyan detekován.

Keracyanin-3-glukosid byl naměřen u vzorků O1, O2, O4, O5, O6 a O7. Nejvyšší množství 3098,85  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  bylo naměřeno u vzorku O2 – dřín ‘Fruchtal’ a nejnižší množství 253,65  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  u vzorku O4 – jeřáb ‘Granatnaja’. U vzorku O3 nebyl tento antokyan detekován.

Callistephin-3-glukosid byl detekován u každého zkoumaného vzorku. Nejvyšší naměření množství 2957,31  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  bylo u vzorku O5 – aronie ‘Nero’ a nejnižší množství 39,97 u vzorku O2 – dřín ‘Fruchtal’.

Peonidin-5-glukosid byl detekován u všech vzorků. Jeho nejvyšší množství 672,98  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  bylo naměřeno u vzorku O7 – borůvka ‘Fialka’ a nejnižší množství 0,11  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  bylo naměřeno u vzorku O4 – jeřáb ‘Granatnaja’.

Kyaninidin-3-glukosid nebyl detekován u vzorků O4 a O7. Nejvyšší množství tohoto antokyanu 1,44  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  bylo naměřeno u vzorku O1 – rybíz ‘Ben Hope’ a nejnižší množství 0,06  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  bylo naměřeno u vzorku O6 – angrešt ‘Neguš’.

Pelargonidin-3-glukosid nebyl detekován pouze u jednoho vzorku, a to u vzorku O4. U ostatních vzorků, kde byl detekován, byla koncentrace v rozsahu 0,01 – 0,73  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Peonidin-3-glukosid byl nedetekován u dvou vzorků, a to u vzorků O4 a O5. Nejvyšší koncentrace 8,2  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  byla naměřena u vzorku O6 – angrešt ‘Neguš’. Nejnižší koncentrace tohoto antokyanu byla naměřena u vzorku O1 – rybíz ‘Ben Hope’, a to 0,04  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Nejvyšší naměřená hodnota malvidin-3-glukosidu byla u vzorku O6 – angrešt ‘Neguš’, a to 68,08  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . U vzorku O4 nebyl tento antokyan detekován. U ostatních vzorků se koncentrace pohybovala v rozmezí 0,02 – 0,61  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Horáková (2016) ve své práci uvádí, že lyofilizované plody aronie obsahují převážně kyanidiny.

### 6.3.3 Výsledky stanovení jednotlivých antokyanů metodou HPLC u vzorků pšenice

Výsledky pšenice jednotlivých antokyanů jsou uvedeny v Tabulce č. 10.

Tabulka 10 – Koncentrace jednotlivých antokyanů v pšenici

Antokyan [μg.g <sup>-1</sup> ]	P1	P2	P3
Myrtillin-3-glukosid	n.d.	n.d.	n.d.
Keracyanin-3-glukosid	0,11 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,55 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,04 <sup>a</sup>
Callistephin-3-glukosid	0,05 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,02 <sup>b</sup>	n.d.
Peonidin-5-glukosid	0,12 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,57 ± 0,15 <sup>b</sup>	0,04 ± 0,02 <sup>c</sup>
Kyanidin-3-glukosid	n.d.	0,14 ± 0,03	n.d.
Pelargonidin-3-glukosid	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>	n.d.
Peonidin-3-glukosid	n.d.	1,93 ± 0,18	n.d.
Malvidin-3-glukosid	0,06 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,5 ± 0,18 <sup>b</sup>	n.d.

Hodnoty v řádcích se stejným písemným indexem se vzájemně statisticky neliší ( $p \geq 0,05$ ), hodnoty s různými indexy se navzájem liší ( $p < 0,05$ ). n.d. = nebylo detekováno

Z naměřených výsledků z Tabulky 10 je patrné:

Myrtillin-3-glukosid byl jediný antokyan, který nebyl detekován v žádném vzorku.

Nejvyšší koncentrace keracyanin-3-glukosidu 1,55 μg.g<sup>-1</sup> byla naměřena u vzorku P2 – pšenice 'Rothalm', nejnižší koncentrace 0,11 μg.g<sup>-1</sup> u vzorku P1 – pšenice s červenými obalovými vrstvami.

Callistephin-3-glukosid nebyl detekován u vzorku P3 – pšenice 'Richard'. Nejvyšší hodnota tohoto antokyanu byla naměřena u vzorku P2 – pšenice 'Rothalm', nejnižší hodnota byla naměřena u vzorku P1 – pšenice s červenými obalovými vrstvami.

Peonidin-5-glukosid byl detekován u všech vzorků. Jeho nejvyšší hodnota 1,57 μg.g<sup>-1</sup> byla naměřena u vzorku P2 – pšenice 'Rothalm' a nejnižší hodnota 0,04 μg.g<sup>-1</sup> u vzorku P3 – pšenice 'Richard'.

Kyanidin-3-glukosid byl detekován pouze u vzorku P2 – pšenice 'Rothalm', a to v koncentraci 0,14 μg.g<sup>-1</sup>.

Pelargonidin-3-glukosid byl detekován u vzorku P1 – pšenice s červenými obalovými vrstvami a P2 – pšenice 'Rothalm'. U vzorku P1 byla koncentrace  $0,01 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . U vzorku P2 byla naměřena koncentrace  $0,02 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Peonidin-3-glukosidu byl detekován pouze u vzorku P2 – pšenice 'Rothalm' s koncentrací  $1,93 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Malvidin-3-glukosid byl nedetekován u vzorku P3 – pšenice 'Richard'. Vzorek P1 – pšenice s červenými obalovými vrstvami vykazoval koncentraci  $0,06 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  a u vzorku P2 – pšenice 'Rothalm' byla naměřena koncentrace  $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ .

ABDEL-AAL and HUCL (2003) stanovili hlavní antokyany v purpurové pšenici: kyanidin-3-glukosid, pelargonidin-3-glukosid, peonidin-3-glukosid a peonidin-3-rutinosid. Kyanidin-3-glukosid a peonidin-3-rutinosid byly stanoveny i ve vzorku pšenice s modrým zrnem.

#### 6.3.4 Výsledky stanovení jednotlivých antokyanů metodou HPLC u vzorků rýže

Naměřené koncentrace jednotlivých antokyanů jsou uvedeny v Tabulce č. 11.

Tabulka 11 – Koncentrace jednotlivých antokyanů v rýži

Antokyany [ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ]	R1	R2	R3
Myrtilin-3-glukosid	$3,08 \pm 0,33^a$	$12,32 \pm 0,51^{b,c}$	$11,82 \pm 0,61^c$
Keracyanin-3-glukosid	$6,07 \pm 0,07^a$	$2,61 \pm 0,22^b$	$12,08 \pm 0,81^c$
Callistephin-3-glukosid	$3,51 \pm 0,33^a$	$17,98 \pm 0,28^b$	$15,51 \pm 0,47^c$
Peonidin-5-glukosid	$41,86 \pm 1,50^a$	$61,85 \pm 2,19^b$	$90,76 \pm 0,89^c$
Cyanidin-3-glukosid	$0,45 \pm 0,08^a$	$1,23 \pm 0,12^{b,c}$	$1,15 \pm 0,70^c$
Pelargonidin-3-glukosid	$0,18 \pm 0,01^a$	$0,37 \pm 0,30^a$	$0,47 \pm 0,37^a$
Peonidin-3-glukosid	$0,17 \pm 0,02$	n.d.	n.d.
Malvidin-3-glukosid	$0,33 \pm 0,04^a$	$0,19 \pm 0,05^b$	$0,84 \pm 0,03^c$

Hodnoty v řádcích se stejným písemným indexem se vzájemně statisticky neliší ( $p \geq 0,05$ ), hodnoty s různými indexy se navzájem liší ( $p < 0,05$ ). n.d. = nebylo detekováno

Z Tabulky 11 vyplývají následující hodnoty:

Myrtilin-3-glukosid byl detekován u všech vzorků. Nejvyšší koncentrace  $12,32 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  byla naměřena u vzorku R2 a nejnižší koncentrace  $3,08 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  byla naměřena u vzorku R1 – rýže 'Lila'.

Nejvyšší koncentrace Keracyanin-3-glukosidu  $12,08 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  byla naměřena u vzorku R3 – rýže s černými obalovými vrstvami z Číny, nejnižší koncentrace  $2,61 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  u vzorku R2 – rýže natural s černými obalovými vrstvami.

U callistephin-3-glukosidu byla nejvyšší hodnota  $17,98 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  tohoto antokyanu naměřena u vzorku R2 – rýže natural s černými obalovými vrstvami, nejnižší hodnota  $3,51 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  byla naměřena u vzorku R1 – rýže 'Lila'.

Peonidin-5-glukosid byl detekován u všech vzorků. Jeho nejvyšší hodnota  $90,76 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  byla naměřena u vzorku R3 – rýže s černými obalovými vrstvami z Číny a nejnižší hodnota  $41,86 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  u vzorku R1 – rýže 'Lila'.

Kyanidin-3-glukosid byl detekován u všech vzorků. Nejvyšší koncentrace byla naměřena u vzorku R2 – rýže natural s černými obalovými vrstvami, a to  $1,23 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Nejnižší koncentrace byla naměřena u vzorku R1 – rýže 'Lila', a to  $0,45 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Pro pelargonidin-3-glukosid byla detekována u vzorku R3 – rýže s černými obalovými vrstvami z Číny nejvyšší koncentrace  $0,47 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . U vzorku R1 – rýže 'Lila' byla naměřena nejnižší koncentrace, a to  $0,18 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Peonidin-3-glukosid byl detekován pouze u vzorku R1 – rýže 'Lila' s koncentrací  $0,17 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Nejvyšší koncentrace malvidin-3-glukosidu byla naměřena u vzorku R3 – rýže s černými obalovými vrstvami z Číny, a to  $0,84 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Nejnižší koncentrace byla u tohoto antokyanu u vzorku R2 – rýže natural s černými obalovými vrstvami, a to  $0,19 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Abdel et al. (2003) konstatují, že v rýži s černými obalovými vrstvami byly detekovány kyanidin-3-glukosid a peonidin-3-glukosid. Dále konstatují, že rýže s černými obalovými vrstvami obsahuje nejvíce antokyanů mezi všemi zkoumanými obilovinami.

## ZÁVĚR

Tato diplomové práce se zabývá vyhodnocením extrakčních postupů pro stanovení antokyanových barviv v technologicky zpracovaných rostlinných matricích. Jako nejvhodnější extrakce pro spektrofotometrické stanovení lyofilizovaného ovoce byla zvolena metoda jednohodinové extrakce ve vodní lázni, po dobu 20 minut v ultrazvuku a 15 minut na odstředivce s použitím extrakční směsi v poměru 70 % Met : 29 % H<sub>2</sub>O : 1 % HCl (0,5 mol.dm<sup>-3</sup>). Ve vzorcích lyofilizovaného ovoce bylo spektrofotometricky stanoveno nejvíce antokyanových barviv ve vzorku O7 – Borůvky 'Fialka' a nejnižší množství ve vzorku O2 – Dřín 'Fruchtal'. Metoda pro spektrofotometrické stanovení celkových antokyanových barviv pro syrové obiloviny i pro obiloviny po tepelné úpravě varem byla stejná, ale odlišovala se extrakční směsí, která byla v poměru 85 % Met : 15 % HCl (1 mol.dm<sup>-3</sup>). Výsledky spektrofotometrického stanovení celkových antokyanových barviv syrových obilovin byly vyšší oproti výsledkům obilovin po tepelné úpravě. Množství celkových antokyanových barviv v pšenici před tepelnou úpravou bylo v rozmezí 1,1 – 6,3 mg C3G.100 g<sup>-1</sup>. Oproti tomu množství antokyanů v pšenici po tepelné úpravě se pohybovalo v rozmezí 0,6–1,3 mg C3G.100 g<sup>-1</sup>. U vzorku P1 byl zaznamenán pokles celkových antokyanových barviv o 36,3 % , u vzorku P2 o 79,3 % což byl nejvyšší pokles ze vzorků pšenice. U vzorku P3 byl zjištěn pokles o 76 %. Ve vzorcích rýží s barevnými obalovými vrstvami byla detekována výrazně vyšší hodnota celkových antokyanů v porovnání s hodnotami vzorků pšenice. Hodnoty celkových antokyanových barviv rýží před tepelnou úpravou varem se pohybovaly v rozmezí 23,5 - 81,8 mg C3G.100 g<sup>-1</sup> a hodnoty po tepelné úpravě v rozmezí 9,8 – 32,5 mg C3G.100 g<sup>-1</sup>. Nejvyšší pokles hodnot antokyanových barviv byl zjištěn u vzorku R2 – Rothlam a to o 86 % oproti zjištěným hodnotám v syrovém stavu. Nejmenší pokles hodnot byl u vzorku R1 – rýže 'Lila' a to o 50,2 %. Metodou HPLC s detekcí v UV oblasti byly u vybraných vzorků ovoce a obilovin detekovány jednotlivá antokyanová barviva – myrtillin-3-glukosid, keracyanin-3-glukosid, callistephin-3-glukosid, peonidin-5-glukosid, kyanidin-3-glukosid, peonidin-3-glukosid a malvidin-3-glukosid. Nejvyšší koncentrace keracyanin-3-glukosidu byla u vzorku dřín 'Fruchtal'. Další nejvyšší koncentrace byla detekována u callistephin-3-glukosidu u vzorku aronie 'Nero'. Myrtillin-3-glukosid byl jediný antokyan u vzorků pšenice, který nebyl detekován. Nejvyšší koncentrace byla peonidin-5-glukosidu. Vyjma peonidin-3-glukosidu u vzorku R2 a R3, byla u všech vzorků de-

tekována všechna uvedená antokyanová barviva. Závěrem lze říci, že tepelná úprava obilovin má vysoký vliv na koncentraci antokyanových barviv.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

ABDEL-AAL, E. S. M.; YOUNG, J. C.; RABALSKI, I.: Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *J. Agric. Food Chem.*

2006, 54:4696–4704

ABDEL-AAL, E. S. M.; HUCL, P.: Composition and stability of anthocyanins in blue-grained wheat. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51:2174–2180.

ADAMCZAK, Artur, Waldemar BUCHWALD, Jan KOZLOWSKI a Sebastian MIELCAREK. The effect of thermal and freeze drying on the content of organic acids and flavonoids in fruit of European cranberry (*Oxycoccus palustris* Pers.) [online]. , 95-102 [cit. 2017-05-04]. Dostupné z: [http://www.herbapolonica.pl/magazines-files/1423346-Pages%20from%20Herba\\_3-11.pdf](http://www.herbapolonica.pl/magazines-files/1423346-Pages%20from%20Herba_3-11.pdf)

AQUILERA, Y., et al. Phenolic Profile and Antioxidant Capacity of Chickpeas (*Cicer arietinum* L.) as Affected by a Dehydration Process. *Plant Foods Hum Nutr* 2011;66:187–195.

BAJČAN, D., et al. Resveratrol – It's properties and occurrence in foodstuff. *Potravinárstvo* 2011;5:244–248.

BALÍK, J. Anthokyaninová barviva v hroznech a vínech: Anthokyanin pigments in grapes and wines. Vyd. 1. Brno: Mendlova univerzita v Brně, 2010, 108 s. ISBN 978-80-7375-412-9.

BOBRÍKOVÁ, Michaela. Vývoj a validace metody pro stanovení obsahu antokyanů v kultivarech černého rybízu. Hradec Králové, 2016. Diplomová práce. UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE. Vedoucí práce Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

BRINDZOVÁ, L., TAKÁCSOVÁ, M., ŠTURDÍK, E. 2005. Vznik vol'ných radikálů a ich eliminácia prírodnými antioxidantami z ovsa. In *Bulletin potravinárskeho výskumu*, roč. 44, 2005, č. 1-2, s. 27–42.

CASTANEDA–OVANDO, A., PACHECO–HERNÁNDEZ, MA.L., PÁEZ–HERNÁNDEZ, MA.E., RODRÍGUEZ, J.A., GALÁN – VIDAL, C.A: Chemical studie sof anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 2009, ro. 113, . 4, s. 859 – 871. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608010674>

CLIFFORD, M.N, SCALBERT, A. Ellagitannins – occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. *J Sci Food Agricult* 2000;80:1118–1125.

COUFAL, Pavel. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta [online]. 2004 [cit. 2011-05-10]. High Performance Liquid Chromatography, HPLC. Dostupné z WWW: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>

DYKES, L., ROONEY, L. W. 2006. Sorghum and millet phenols and antioxidants. In *J. Cereal Sci.*, č. 44, 2006, s. 236.

ESCRIBANO-BAILÓN, Teresa, Celestino SANTOS-BUELGA a Julián C. RIVAS-GONZALO. Anthocyanins in cereals. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, (1-2), 129-141 [cit. 2017-05-04]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.proxy.k.utb.cz/science/article/pii/S002196730401564X>

FRANCO, D., et al. Polyphenols from plant materials: extraction and antioxidant power. *EJEAFChe* 2008;7:3210–3216.

J. HE, M. M. Giusti. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties, *Annual Review of Food Science and Technology*, 2010, vol 1, s. 163–187

HORÁKOVÁ, Klára. LYOFILIZOVANÉ OVOCE - CHEMICKÉ VLASTNOSTI A MOŽNOSTI ZPRACOVÁNÍ. Brno, 2016. Diplomová práce. VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ. Vedoucí práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

HŘINES, R.F., AABY, K. : Effects of processing temperature on anthocyanins on , total phenolics and antioxidant activity of bilberry juice during storage, (1) *Food Products and raw materials*, 2000.

JARÁBKOVÁ, Z., PŠENÁKOVÁ, I. 2004. *Izolácia endofytických mikroorganizmov ako producentov antokyánov* [online]. Trnava: FPV Univerzity sv. Cyrila a Metoda, 2004.s. 199-206. Dostupné z WWW:

[http://fpv.ucm.sk/katedry/biotechnolog/journal\\_nova\\_biotechnologica/revue\\_nova\\_biotechnologica\\_4\\_1/14\\_Jarabkova.pdf](http://fpv.ucm.sk/katedry/biotechnolog/journal_nova_biotechnologica/revue_nova_biotechnologica_4_1/14_Jarabkova.pdf)

JING, Pu, Li-Hua SONG, Shan-Qi SHEN, Shu-Juan ZHAO, Jie PANG a Bing-Jun QIAN. Characterization of Phytochemicals and Antioxidant Activities of Red Radish Brines during Lactic Acid Fermentation. *Molecules* [online]. 2014, 19(7), 9675-9688 [cit. 2017-05-



02]. DOI: 10.3390/molecules19079675. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/7/9675/>

KALINA, Jiří, Barbora VRHOLOVÁ, Jana KROHOVÁ, Maroš ŠMONDRK a Marek PENHAKER. EXPERIMENT PRO VÝUKU – FOTOMETRIE. Chemické listy [online]. 2013, (108), 172-175 [cit. 2017-04-15]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014\\_02\\_172-175.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014_02_172-175.pdf)

KLOUDA P., Moderní analytické metody, 2. vydání, Klouda Pavel, Ostrava, 2003, s. 9–26, ISBN 80-86369-07-2,

KOTÁSKOVÁ, Eva. Stanovení polyfenolů, flavonoidů a studie antioxidační aktivity u směsi mouk miličky habešské. Zlín, 2014. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve ZLÍNĚ. Vedoucí práce Ing. Daniela Sumczynski, Ph.D.

KUČEROVÁ, Anežka. Kvalita zrna a pekařských výrobků z vybraných genových zdrojů pšenice s modrým a purpurovým zabarvením. Brno, 2014. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně. Vedoucí práce Doc. Ing. Jindřiška Kučerová, Ph.D.

KVASNIČKOVÁ, A. Polyfenolové složky semen černého rybízu [online]. 2003 [cit. 2017-05-04]. Dostupné z: [www.agronavigator.cz](http://www.agronavigator.cz)

LAKENBRINK, C., et al. Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. *J Agric Food Chem* 2000;48:2848–2852.

MACHOVSKÁ, Romana. Obsah fenolických látek v různých odrůdách révy vinné. Zlín, 2012. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Jiří Mlček.

MANACH, C, et al.. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 2005;81 (Suppl.):230S–242S.

MANACH, C., A. SCALBERT, C. MORAND, C. RÉMÉSY a L. JIMÉNEZ. Polyphenols: food sources and bioavailability [online]. 2004 [cit. 2017-05-04]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15113710>

MÁRIÁSSYOVÁ, M. Prídavné potravinárske farbivá- zdroje a výroba. *Trendy v potravinárstve*, roč. 9, 2002, č. 3, s. 5-6.

MACHALÍČEK, Michal. Plynová chromatografie organických sloučenin. Brno, 2010. Bakalářská práce. Masarykova univerzita Přírodovědecká fakulta Ústav chemie. Vedoucí práce RNDr. Marta Farková, CSc.

MICHÁLKOVÁ, Jitka. Stanovení polyfenolických látek ve vybraných potravinách. Zlín, 2011. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Miroslav Fišera.

OLIVEIRA, C., et al. Cooked Blueberries: Anthocyanin and Anthocyanidin Degradation and Their Radical-Scavenging Activity. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58, 9006-9012.

PATRAS, A., et al. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology.* 2010; 21, 3-11.

PEDRO, Alessandra Cristina, Daniel GRANATO a Neiva Deliberali ROSSO. Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability [online]. 2016,191, 12-20 [cit. 2017-05-02].

PEKAL, A., et al. Evaluation of the antioxidant properties of fruit and flavoured black teas. *Eur J Nutr* 2011;50:681–688.

PERLÍN, Ctibor. Lignany v potravinách a ve výživě [online]. 2011 [cit. 2017-05-01]. Dostupné z: [www.agronavigator.cz](http://www.agronavigator.cz)

ROP, Otakar, Pavel VALÁŠEK a Ignác HOZA. Teoretické principy konzervace potravin I. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2005. ISBN 80-731-8339-0.

ROVENSKÁ, Mirka. Principy fotometrických metod. 2005.

SANTOS-BUELGA, C., SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agricult* 2000;80:1094–1117. SÜLI, Judit, Katarína HOMZOVÁ, Anna SOBEKOVÁ, Zuzana BUJDOŠOVÁ a Tatiana HRUŠKOVÁ. POLYFENOLOVÉ LÁTKY V POTRAVINÁCH. *Výživa.* 2014, 17(3), 162-170. Dostupné z WWW: [https://www.researchgate.net/profile/Judit\\_Suli/publication/267095268\\_Fyziologicke\\_ucinky\\_polyfenolov\\_a\\_ich\\_metabolitov\\_v\\_strave/links/544513b50cf2dccb30b7fcfc.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Judit_Suli/publication/267095268_Fyziologicke_ucinky_polyfenolov_a_ich_metabolitov_v_strave/links/544513b50cf2dccb30b7fcfc.pdf)

SUMCZYNSKI, D., BUBELOVÁ, Z., SNEYD, J., ERB-WEBER, S., MLČEK, J. (2015). Total phenolics, flavonoids, antioxidant activity, crude fibre and digestibility in non-traditional wheat flakes and muesli. *Food Chemistry*, 174, 319325

ŠIMKO, J., MATUŠKOVIČ, J., JURÍKOVÁ, T. 2008. Antokyánové farbivá v jedlých zemolezoch vo vzťahu k ostatným nutrientom. In *Mladí vedci 2008- vedecké práce doktorandov a mladých vedeckých pracovníkov*. Nitra : FPV UKF, 2008, s. 170-174. ISBN 978-80-8094-285-4.

ŠMIRDKAL, J., et al. Resveratrol. *Chem Listy* 2001;95:602–609.

TAKÁCSOVÁ, M., PAVELEKOVÁ, I. *Chemická a biologická bezpečnosť potravín a analýza potravín* [online]. [cit. 2017-03-23], s. 283-322. Dostupné z WWW: <http://pdfweb.truni.sk/katchem/VCZV/prilohy/6.kapitola.pdf>

VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravín II*. 3. vyd. Tábor: OSSIS 2009; 623.

VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravín. Rozš. a přeprac.* 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.

VODRÁŽKA, Zdeněk., Pavel VALÁŠEK a Ignác HOZA. *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 978-80200-0600-4.

WELCH, C. R. et al. Recent advance in anthocyanin analysis and characterization. *Current Analytical Chemistry*. 2008, vol. 4, is. 2, p. 75-101.

WU, X., et al. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J Agric Food Chem* 2006;54:4069–4075.

ŽOLDOŠOVÁ, K. 2003. *Antioxidačný vplyv rastlinných pigmentov v ľudskom organizme* [online]. Trnava : PF TU, 2003 [cit. 2017-03-23], s. 31-35. Dostupné z WWW: <http://pdfweb.truni.sk/down/ACTAFP/2003/2003b.pdf>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

CLC	Capillary Liquid Chromatography
CZE	Capillary Zone Electrophoresis
ČR	Česká republika
C3G	Kyanidin-3-glukosid
HCl	Kyselina chlorovodíková
HDL	Lipoproteiny s vysokou hustotou
HPLC	High Performace Liquid Chromatography
n.d.	Nebylo detekováno
LDL	Lipoproteiny s nízkou hustotou
Met	Metanol
pH	Potential of hydrogen
RP-HPLC	Reverse Phase HPLC
S.D.	Standard Deviation - Směrodatná odchylka
TAC	Total anthocyanin content
TLC	Thin-layer chromatography

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 – Průchod paprsku přes kyvetu se vzorkem .....	27
Obrázek 2 – Spektrum elektromagnetického záření (Rovenska).....	28
Obrázek 3 – Systém kapalinové chromatografie (Coufal, 1996).....	30
Obrázek 4 – Ukázkový chromatografický záznam .....	33
Obrázek 5 – Kapalinový chromatograf.....	37
Obrázek 6 – Elektrický mlýnek a vločkovač .....	38
Obrázek 7 – Pšenice s červenými obalovými vrstvami .....	39
Obrázek 8 – Pšenice 'Rothalm' (vlevo) a 'Richard' (vpravo).....	40
Obrázek 9 – Rýže 'Lila' .....	40
Obrázek 10 – Rýže natural s černými obalovými vrstvami .....	41
Obrázek 11 – Čínská rýže s černými obalovými vrstvami.....	41
Obrázek 12 – Připravené vzorky v lékovkách .....	44
Obrázek 13 – Připravené roztoky pro následné spektrofotometrické stanovení TAC před jejich odstředěním .....	46

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 – Popis a označení vzorků .....	42
Tabulka 2 – Technologické údaje vzorku pšenice.....	43
Tabulka 3 – Technologické údaje vzorku rýží.....	43
Tabulka 4 – Obsah celkových antokyanů v lyofilizovaném ovoci .....	49
Tabulka 5 – Obsah celkových antokyanů v pšenici před tepelnou úpravou .....	51
Tabulka 6 – Obsah celkových antokyanů v rýži před tepelnou úpravou .....	51
Tabulka 7 – Obsah celkových antokyanů v pšenici po tepelné úpravě.....	52
Tabulka 8 – Obsah celkových antokyanů v rýži po tepelné úpravě varem.....	53
Tabulka 9 – Koncentrace jednotlivých antokyanů v ovoci.....	60
Tabulka 10 – Koncentrace jednotlivých antokyanů v pšenici.....	62
Tabulka 11 – Koncentrace jednotlivých antokyanů v rýži.....	63

**SEZNAM GRAFŮ**

Graf 1 – Srovnávací graf pšenice před a po tepelné úpravě varem.....	54
Graf 2 – Srovnávací graf rýže před a po tepelné úpravě varem.....	54
Graf 3 – Kalibrační křivka mirtillin-3-glukosidu.....	55
Graf 4 – Kalibrační křivka keracyanin-3-glukosidu .....	56
Graf 5 – Kalibrační křivka callistephin-3-glukosidu .....	56
Graf 6 – Kalibrační křivka peonidin-3-glukosidu.....	57
Graf 7 – Kalibrační křivka kyanidin-3-glukosidu.....	57
Graf 8 – Kalibrační křivka pelargonidin-3-glukosidu.....	58
Graf 9 – Kalibrační přímka malvidin-3-glukosidu .....	59

## **PŘÍLOHA P I: NÁZEV PŘÍLOHY**