

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



**Vliv různých způsobů skladování na stabilitu anthokyanů
v plodech borůvek (*Vaccinium myrtillus* L.)**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Anna Martanová

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Zora Kotíková, Ph.D.

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Vliv různých způsobů skladování na stabilitu anthokyanů v plodech borůvek (*Vaccinium myrtillus* L.)“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 5. 4. 2017 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala především své vedoucí práce, Ing. Zoře Kotíkové, Ph.D., za její odborné rady a vstřícné jednání. Dále bych ráda poděkovala všem, kteří mě v mé práci trpělivě podporovali.

Vliv různých způsobů skladování na stabilitu anthokyanů v plodech borůvek (*Vaccinium myrtillus* L.)

Souhrn

Tato diplomová práce se zabývá vlivem různých způsobů skladování na stabilitu anthokyanů v plodech borůvek. V teoretické části práce byla na základě nastudované literatury popsána brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus* L.), anthokyanová barviva a jejich stabilita, je zde také zpracován přehled nejpoužívanějších metod jejich stanovení v rostlinných materiálech. V metodické části práce jsou popsány metody stanovení obsahu a míry degradace anthokyanů v borůvkách při různých způsobech skladování. Anthokyanová barviva obsažená v borůvkách byla podrobena kyselé hydrolyze, jejich obsah byl vyjádřen ve formě volných aglykonů – anthokyanidinů. Při první analýze bylo provedeno měření obsahu anthokyanidinů v čerstvých borůvkách, dále proběhla příprava vzorků do různých variant skladování. Byly testovány tři varianty skladování – vzorky usušené při 80 °C, vzorky lyofilizované a mražené. V průběhu osmiměsíčního skladování bylo provedeno pět dalších měření míry degradace anthokyanů v čase. Vzorky byly analyzovány vždy ve třech paralelních opakováních. Pro analýzu byl použit hmotnostní spektrometr 3200 QTRAP s trojitým kvadrupólem s ESI ionizací spojený s kapalinovým chromatografem typu UHPLC. Hodnoty byly následně zprůměrovány a vyhodnoceny pomocí grafů a tabulek. Výsledky diplomové práce ukázaly, že nejšetnější variantou uchování vzorku byla lyofilizace, a to zejména pro první dva měsíce skladování. V tomto období množství anthokyanů v této variantě téměř nekleslo. Varianta mražení byla také vhodnou metodou pro uchování vzorku. Mražení bylo vyhodnoceno jako výhodná metoda uchování vzorku spíše pro dlouhodobější skladování, jelikož hodnoty klesaly v závislosti na čase pozvolněji a při posledním odběru vykazovaly vyšší hodnoty než varianta borůvek lyofilizovaných. Varianta borůvek sušených byla oproti předchozím variantám nejméně stabilní. K rapidnímu poklesu všech anthokyanů došlo již samotným sušením, v závislosti na čase hodnoty klesaly i nadále. Ve variantě sušení byl jako nejstabilnější anthokyanidin vyhodnocen petunidin, naopak jako nejméně stabilní byly vyhodnoceny kyanidin a delfinidin. Ve variantách mražení a lyofilizace byl jako nejstabilnější vyhodnocen delfinidin, jako nejméně stabilní petunidin ve variantě mražení a kyanidin ve variantě lyofilizace.

Klíčová slova: Brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus* L.), Anthokyany, Anthokyanidiny, Stabilita, Sušení, Mražení, Lyofilizace, UHPLC

The influence of various storage conditions on the stability of anthocyanins in blueberries (*Vaccinium myrtillus* L.)

Summary

This diploma thesis deals with the influence of different storage methods on the stability of anthocyanins in the fruits of blueberries. The theoretical part describes blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.), anthocyanin pigments and their stability based on the studied literature. Moreover, an overview of the most common methods for their determination in plant materials is given. The methodical part depicts the methods of determining the content and the extent of the degradation of anthocyanins in blueberries using the different ways of storage. Anthocyanin dyes contained in the blueberries were subjected to acid hydrolysis and their content was expressed in the form of free aglycones - anthocyanidins. During the initial analysis, the measurement of the content of anthocyanidins in the fresh blueberries was done. Furthermore, a sample preparation was carried out applying the different storage methods. Three storage variants were tested – dried samples at 80 ° C, lyophilized and frozen samples. During the eight-month storage, five further measuring of the degradation rate of anthocyanins in time was performed. All samples were analyzed in triplicates. A mass spectrometer 3200 QTRAP with triple quadrupole and ESI ionization, coupled with a liquid chromatograph, type UHPLC was used for the analysis. Afterward, the values were averaged and presented using graphs and tables. The results of the thesis pointed out that the least intrusive variant of preserving the sample was lyophilisation, especially than for the first two months of storage. The amount of the anthocyanins did not changed during this period. Moreover, also the freezing variant was a suitable method for preserving the sample. Freezing was assessed as the favorable method for preserving the sample for longer periods since the value has decreased in the relation to time more gradually and during the final collection have shown higher values than the variant of the lyophilized blueberries. The variant of dried blueberries was the least stable compared to the previous variants. The rapid decline of anthocyanins occurred already during drying, depending on the time the values continued to decline. In the variant of drying, petunidin was evaluated as the most stable anthocyanidin, while cyanidin and delphinidin were determined as the least stable. Delphinidin was determined to be the most stable anthocyanin in the variant of both freezing and lyophilization whilst the least stable the anthocyanins were petunidin in the variant of freezing and cyanidin in the variant of lyophilization.

Keywords: Blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.), Anthocyanins, Anthocyanidins, Stability, Drying, Freezing, Lyophilization, UHPLC

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíl práce	2
2.1 Stanovené hypotézy	2
2.2 Cíle práce	2
3 Literární část	3
3.1 Brusnice borůvka	3
3.1.1 Botanická charakteristika.....	3
3.1.2 Chemické složení plodů borůvek.....	3
3.1.3 Možnosti využití plodů borůvek	4
3.2 Anthokyanová barviva	5
3.2.1 Základní charakteristika anthokyanových barviv	5
3.2.2 Struktura anthokyanů	5
3.2.3 Biosyntéza, metabolismus anthokyanů.....	6
3.2.4 Funkce anthokyanů v rostlinách	9
3.2.5 Vliv anthokyanů v borůvkách na lidské zdraví	9
3.2.6 Stabilita anthokyanů	12
3.2.7 Metody stanovení anthokyanů	17
4 Experimentální část	23
4.1 Rostlinný materiál	23
4.2 Popis skladovacích a konzervačních podmínek.....	23
4.3 Pomůcky a chemikálie	24
4.4 Přístroje	24
4.5 Příprava vzorků	25
4.6 Stanovení sušiny vzorků	25
4.7 Tvorba kalibrace a spektrofotometrické stanovení přesné koncentrace standardů anthokyanidinů.....	26
4.8 UHPLC/MS/MS analýza anthokyanidinů.....	27

4.9	Výsledky	28
4.9.1	Optimalizace metody pro stanovení jednotlivých anthokyanidinů pomocí HPLC 28	
4.9.2	Obsah a složení anthokyanidinů v čerstvých borůvkách	29
4.9.3	Míra degradace anthokyanidinů při různých způsobech skladování	30
4.9.4	Nejšetrnější způsob skladování.....	38
5	Diskuze	40
6	Závěr.....	43
7	Seznam literatury	44

1 Úvod

Strava má člověku chutnat a sytit ho, podporovat a upevňovat jeho zdraví, nadále by měla být prevencí pro zdraví a pokud možno by měla léčivým či hojivým účinkem vracet zdraví poškozené (Farnworth, 2004).

Vývoj výživy lze rozdělit na několik období. Prvním obdobím je „Věk potravy pro přežití“. V tomto období, které trvalo až do 20. století, bylo pro výrobce i pro strážníky nejdůležitější, aby potravin bylo po celé zemi dostatek, a to nejen nárazově, ale po celý rok. Často se stávalo, že hrozil katastrofální nedostatek potravin. Tento stav je však bohužel k nalezení na zemi ještě dnes. Dalším vývojovým obdobím pro výživu byl „Věk pohodlného stravování“. Pro toto období byla charakteristická pohodlnost. Vznikaly předpřipravené potraviny, polotovary. Stravování mělo člověku zabrat co nejméně času. V tomto období vznikly také řetězce rychlého stravování. Rozvoj byl i ve vynálezech, které se týkaly výbavy kuchyní. Závratným zařízením byla mikrovlnná trouba. Ve třetím tisíciletí se vývoj posunul opět dál. Období, které právě probíhá, je „Věk funkční potravy a funkčního stravování“. Spotřebitele nezajímá pouze uspokojení smyslů, důležitou vlastností je i funkčnost. Spotřebitel požaduje nutraceutické účinky stravy (účinky, které mají podpořit, zachovat či příznivě ovlivnit navrácení zdraví) (Petr et al., 2004). I v této moderní době jsme ve shodě s Hippokratem, který už za dávných časů říkal: „*Potrava je Tvým lékem*“.

Borůvky lze zařadit mezi tzv. funkční potraviny, potraviny, které obsahují nutraceuticky významné látky pro člověka. Zejména anthokyany jsou řazeny mezi nejcennější složky, které borůvky vyzdvihují. Anthokyany mohou mít pozitivní vliv při léčbě kardiovaskulárních onemocnění, při diabetu mellitu a řadě dalších onemocnění. Mohou také hrát roli při pomalejším stárnutí organismu (prevence pádů, udržování paměti). Anthokyany jsou však také látky s kolísavou stabilitou. Mnoho faktorů jako je pH, teplota, světlo aj. jejich stabilitu ovlivňuje. Člověk však jejich zpracováním může obsažené množství v nich ovlivnit.

2 Cíl práce

2.1 Stanovené hypotézy

1. Brusnice borůvka je kvalitativně i kvantitativně bohatým zdrojem anthokyanových barviv.
2. Způsob skladování významně ovlivňuje retenci anthokyanů v plodech borůvek.

2.2 Cíle práce

1. Optimalizovat metodu stanovení jednotlivých anthokyanů pomocí HPLC.
2. Stanovit obsah a složení majoritních anthokyanů v čerstvých borůvkách.
3. Stanovit míru degradace anthokyanů při různých způsobech skladování.
4. Ze získaných výsledků určit nejšetrnější způsob uchování vzorků borůvek.

3 Literární část

3.1 Brusnice borůvka

Brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus* L.) patří mezi všem dobře známou rostlinu. Nejvýznamnější jsou její plody, které se vyznačují jak specifickou chutí, tak i specifickým zabarvením.

3.1.1 Botanická charakteristika

Na světě je známo mnoho druhů borůvek. Pro oblast Šumavy je nejtypičtější brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus* L.). Pochází ze Severní Ameriky. Brusnice borůvka patří mezi keřovité rostliny, čeledi vřesovcovité. Je to nízký keřík, který má poléhavý dřevnatý kmínek, bohatě větvený, se vzpřímenými, trojhrannými zelenými větévkami. Listy brusnice borůvky jsou vejčitého tvaru, mírně zašpičatělé, velmi krátce řapíkaté a na zimu opadavé. Jednotlivé květy vyrůstají v úžlabí listů na 3 – 5 mm dlouhých stopkách. Jsou čtyř nebo pětičetné. Zabarvení květů je nazelenalé, narůžovělé až nafialovělé. Plodem brusnice jsou modročerné bobule, asi 10 mm velké, ojíňené, červeně nebo modře barvící, s vytrvalým kalichem na vrcholu. Borůvky hojně rostou ve světlých jehličnatých lesích, někde i v listnatých lesích a na rašeliništích, především na kyprých, vlhkých a kyselých půdách. Do květu se dostávají v květnu a v červnu. Sběr plodů probíhá zejména v červenci, i když ponejvíce záleží na přírodních podmínkách, tudíž v červnu a v srpnu může být sklizeň také hojná (Jablonský et Bajer, 2007; Haragsim, 2013).

3.1.2 Chemické složení plodů borůvek

Plod brusnice borůvky se skládá ze dvou hlavních složek, z vody a sacharidů (Tabulka 1). Ostatní složky jsou v nízkém procentuálním zastoupení. Kvalitativní zastoupení látek, které borůvka obsahuje, je však velice široké. Zahrnuje i rozmanité druhy anthokyanových barviv (anthokyaniny odvozené od kyanidinu, petunidinu, malvidinu, delphinidinu, peonidinu, pelargonidinu), aromat (3-metylbutyraldehyd, hexanal, pentanal) a plynů (dusík, kyslík, oxid uhličitý) (Kennedy, 2014).

Tabulka 1 Složení plodu brusnice borůvky

Obsahovaná látka	Obsah (%)
Voda	84
Cukry	10
Fruktóza	48
Glukóza	40
Sacharóza	2
Aminokyseliny	<1
Kyselina glutamová	23
Kyselina aspartová	18
Leucin	17
Arginin	8
Alanin	4
Mastné kyseliny	<1
Kyselina linolová	30
Kyselina linoleová	19
Kyselina olejová	18
Kyselina palmitová	6
Barviva	
Aroma	
Plyny	

(Kennedy, 2014)

3.1.3 Možnosti využití plodů borůvek

Brusnice borůvka má široké využití. Nejčastěji se využívají její bobule, které lze konzumovat čerstvé, sušené, zmražené nebo tepelně opracované. Mohou se jíst zcela samotné jako osvěžující ovoce nebo jako součást dezertu. Někdy však může být borůvka klíčovou částí hlavního jídla. Tímto pokrmem jsou všem dobře známé jihočeské borůvkové knedlíky a oblíbený borůvkový koláč. Stonky a listy brusnice borůvky však také nejsou zanedbatelné. Jsou častou součástí léčivých tinktur či čajových směsí.

Při mapování „borůvkových“ výrobků lze tvrdit, že je borůvka oblíbenou surovinou, neboť borůvková příchuť, barva či aroma jsou velmi vyhledávaná komponenta potravin. Existuje mnoho výrobků, jejichž jsou součástí. I český trh je toho důkazem. Téměř v každém obchodě lze zakoupit mražené borůvkové knedlíky, borůvkové jogurty, nápoje, sušenky, cereálie, ale i čaje nebo žvýkačky.

3.2 Anthokyanová barviva

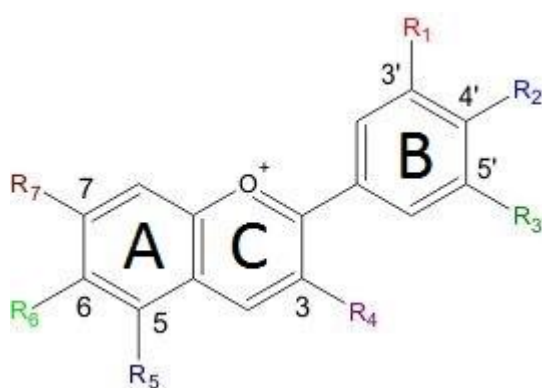
3.2.1 Základní charakteristika anthokyanových barviv

Anthokyanová barviva jsou jednou z nejdůležitějších skupin barviv. Jsou to látky řazené mezi ve vodě rozpustné flavonoidy, které spadají do velké skupiny látek nazývaných polyfenoly. Již bylo identifikováno přes 600 druhů těchto barviv. Anthokyanová barviva se nacházejí hojně v ovoci a zelenině, v květinách a dalších rostlinách. Jsou velice nápadná, neboť dávají barvu okvětním plátkům, plodům, případně i listům (červené zelí). Anthokyanová barviva zabarvují rostlinu modře, fialově, růžově, červeně či oranžově (Pojer et al., 2013).

Dnes jsou anthokyanová barviva zkoumána především pro pozitivní účinek na lidské zdraví. Zájem vzbuzují zvláště jejich antioxidační účinky, které mohou hrát roli v prevenci různých onemocnění souvisejících s oxidačním stresem (Wallace et al., 2013).

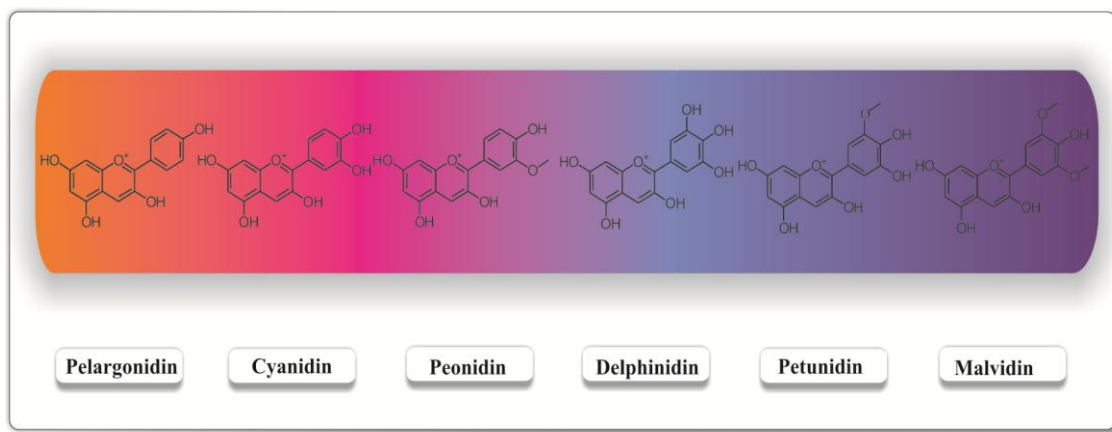
3.2.2 Struktura anthokyanů

Molekula anthokyanů se skládá z anthokyanidinu (necukerná část molekuly – aglykon) a z jednoho nebo více glykosidicky vázaných cukerných zbytků (D-glukosa, L-rhammosa, D-galaktosa a L-arabiosa) (Bartl et al., 2013a; Bartl et al., 2013b). Anthokyanidin je složen z aromatického jádra (A) připojeného k heterocyklickému kruhu (C), který obsahuje kyslík, a je navázán vazbou C-C na třetí aromatické jádro (B) (Obrázek 1). Na aglykon se O-glykosidickou vazbou váže jeden nebo více sacharidových zbytků, nejčastěji na pozice C3, C5 nebo C7. Pro glykosylovanou formu anthokyanidinu je používán termín anthokyan.



Obrázek 1 Chemická struktura anthokyanidinu (<http://www.food-info.net/uk/colour/antocyanin.htm>).

Mezi nejznámější a nejčastější aglykony tvořící 90 % všech anthokyanů jsou řazeny kyanidin, pelargonidin, peonidin, petunidin, delphinidin a malvidin (Obrázek 2). Těchto šest lze pozorovat v přírodě nejčastěji (Wallace et al., 2013). Podle počtu vázaných molekul sacharidů se rozlišuje 19 skupin anthokyanů (Tanaka et al., 2008). Anthokyanany bývají často acetylovány organickými kyselinami (octovou, *p*-kumarovou, jantarovou, šřavelovou, kávovou, ferulovou, aj.) (Tesoriere et al., 2002).



Obrázek 2 Chemická struktura a zabarvení šesti hlavních anthokyanidinů (Anaga et al., 2013).

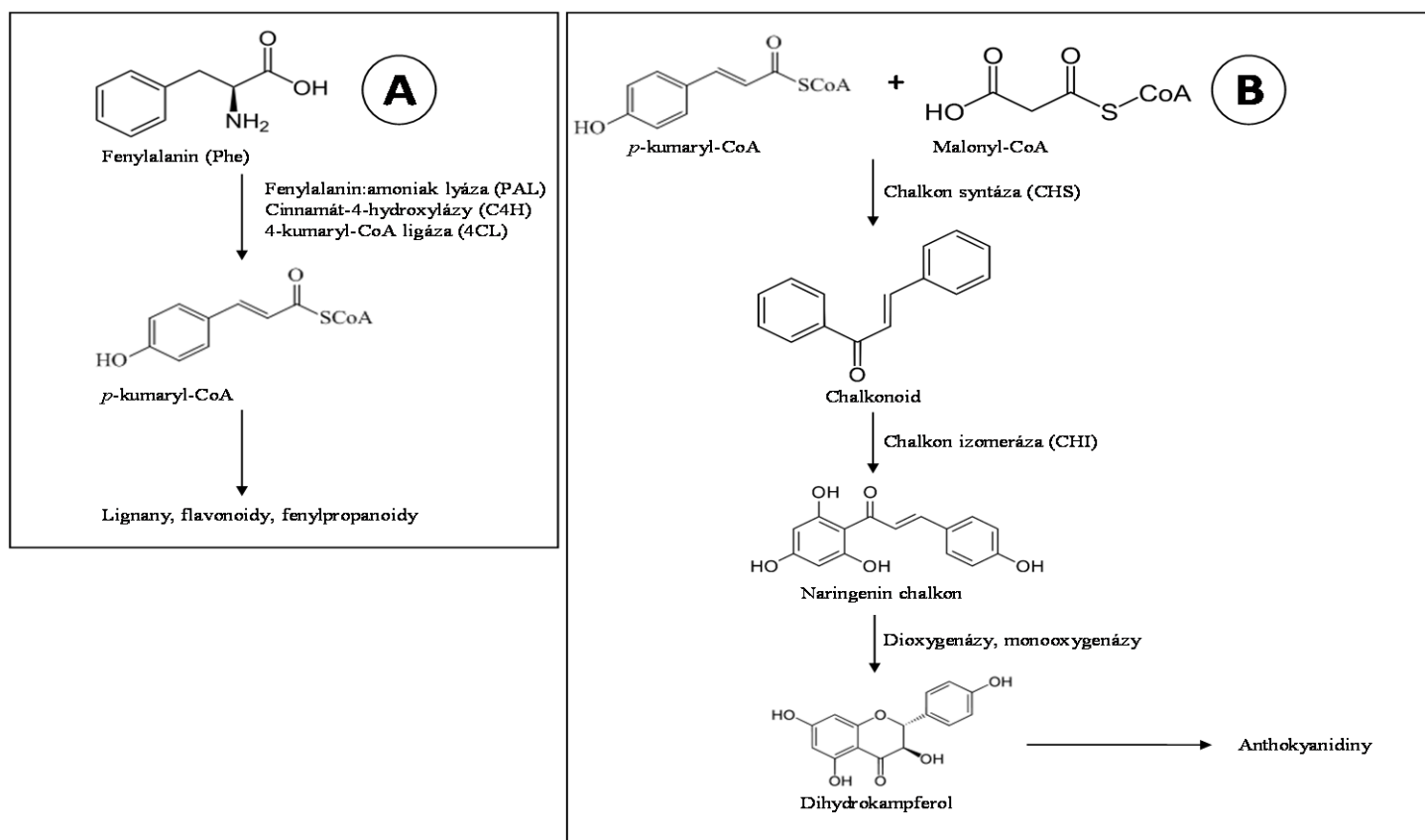
3.2.3 Biosyntéza, metabolismus anthokyanů

Biosyntéza anthokyanů je velmi složitý proces katalyzovaný řadou enzymů, který je rozdělený do dvou hlavních částí: A – syntéza prekurzorů fenylypropanových derivátů a B – vlastní syntéza anthokyanů. Schéma obou částí je uvedeno na Obrázku 3 (Delvago-Vargas et al., 2000).

V první části (část A) je aminokyselina fenylyalanin (Phe) přeměněna na aktivovanou 4-hydroxyskořicovou kyselinu (*p*-kumaryl-CoA) za součinnosti tří různých enzymů: fenylyalanin-amoniak lyázy (PAL), cinnamát-4-hydroxylázy (C4H) a 4-kumaryl-CoA ligázy (4CL). Výsledný *p*-kumaryl-CoA je hlavním prekurzorem řady fenolických sloučenin, kterými jsou flavonoidy, lignany a další fenylypropanové deriváty (Delvago-Vargas et al., 2000; Harbone, 1988; Holton et Cornish, 1995).

V druhé části (část B) dochází ke kondenzaci *p*-kumaryl-CoA se třemi molekulami aktivované malonové kyseliny (malonyl-CoA) za vzniku molekuly chalkonoidu. Klíčovým enzymem této syntézy je chalkon syntáza (CHS), která umožňuje realizaci této složité

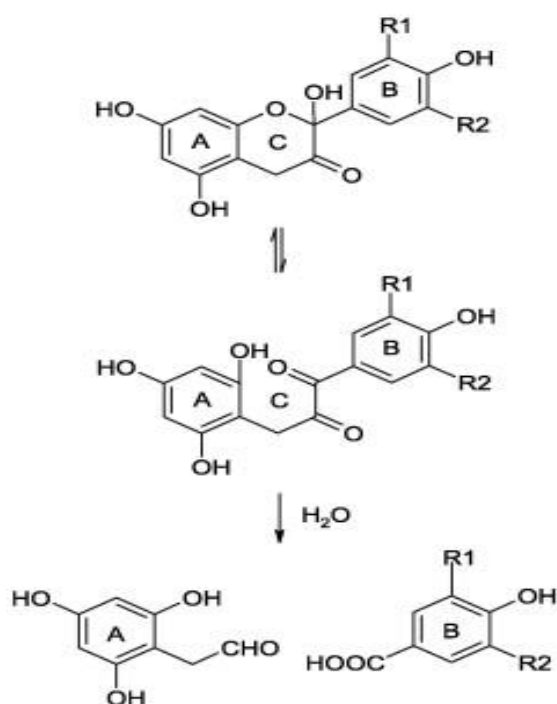
a energeticky náročné reakce. V dalším kroku dochází ke stereospecifické izomeraci chalkonoidu na naringenin za pomoci enzymu chalkon izomerázy (CHI). Naringenin je obecným prekurzorem flavonoidů a isoflavonoidů a je dále přeměněn na dihydrokampferol za součinnosti enzymů dioxygenáz nebo monooxygenáz v závislosti na druhu rostliny. Dihydrokampferol následně podléhá přeměně na bezbarvé leukoanthokyanidiny za pomoci enzymu dihydroflavonol-4-reduktázy, které jsou poté transformovány na barevné anthokyanidiny. Přeměna bezbarvé formy na barevnou není dosud přesně charakterizována, zatím je pouze známo, že přeměna zahrnuje sled oxidačních a dehydratačních reakcí. V posledním kroku jsou anthokyanidiny glykosylovány na anthokyany enzymem UDP-glukóza:flavonoid 3-O-glukosyl transferázou (Delvago-Vargas et al., 2000; Harbone, 1988; Holton et Cornish, 1995).



Obrázek 3 Biosyntéza anthokyanů (Delvago-Vargas et al., 2000).

V posledních letech vzrůstá zájem o biologickou aktivitu anthokyanů a s tím související metabolismus, který ještě není zcela prozkoumán. Anthokyanany i ostatní flavonoidy jsou prokázány antioxidanty, dále jsou zkoumány na možné antiaterosklerotické, antikarcinogenní a protizánětlivé účinky. Uvádí se, že denní průměrný příjem anthokyanů se pohybuje v rozmezí 180 – 250 mg/den. S potenciálně prospěšnými účinky fenolických sloučenin souvisí jejich biologická dostupnost a metabolická přeměna v těle. Laboratorními studiemi bylo prokázáno, že pouze 0,016 – 0,11 % anthokyanů je vyloučeno z těla v nezměněném stavu, což svědčí o rapidní metabolické přeměně. V krevní plazmě byly ve velmi nízkých koncentracích detekovány methyl-deriváty anthokyanů, v moči byly nalezeny nízké koncentrace konjugátů s kyselinou glukuronovou (Keppler et al., 2005).

Anthokyanany jsou stabilní vůči chemickým reakcím, ale působením střevní mikroflóry dochází k odštěpení molekuly sacharidu, tzv. bakteriální deglykosylaci, a uvolnění volného aglykonu. Anthokyanidiny jsou stabilní v kyselém pH, ale velmi nestabilní v neutrálním pH, kde dochází k otevření chromanového cyklu a vzniku velmi reaktivního α -diketonu, který se dále rozpadá na fenolovou kyselinu a fenolický aldehyd. Obecné schéma degradace anthokyanidinu je uvedeno na Obrázku 4. Mezi nejvýznamnější metabolity anthokyanů patří fenolické sloučeniny s antioxidantními účinky: kyselina 3,4-dihydroxybenzoová, kyselina syringová, kyselina vanilová, kyselina gallová, kyselina floroglucinolová a aldehyd floroglucinolu (Keppler et al., 2005).



Obrázek 4 Degradace anthokyanů (Keppler, 2005).

3.2.4 Funkce anthokyanů v rostlinách

Přítomnost anthokyanů v rostlinách je znatelná na první pohled. Dávají barvu květům a plodům rostlin. K nalezení jsou však i v jiných částech rostliny, jako jsou kořeny, stonky a listy. V květech a plodech mají funkci lákadla pro opylovače nebo pro jiné živočichy, jež zajišťují rozmnožování rostliny. V ostatních částech je lze považovat za ochránce rostliny proti nadměrnému světlu, potlačují fotoinhibici a fotooxidativní poškození buněk listu (Cooper-Driver, 2001).

Biosyntéza anthokyanů je pro rostlinu velice náročný proces. Energie, kterou rostlina vydá pro jejich syntézu, je však úměrná pozitivním funkcím anthokyanů v rostlině. Kromě předchozích uvedených pozitiv pravděpodobně pomáhají anthokyaniny rostlině zvládat nízké teploty prostředí, překonávat období sucha, díky svým antioxidačním vlastnostem také chrání rostliny proti oxidativnímu působení přízemního ozonu. Některé studie také poukazují na antimikrobiální a antimykotické vlastnosti anthokyanů (Chalker-Scott, 1999).

3.2.5 Vliv anthokyanů v borůvkách na lidské zdraví

Již v dávné minulosti byly borůvky zařazovány do lidské stravy. Byly součástí tradiční přírodní medicíny používané Indiány v Severní Americe, Evropany a Číňany (Konczak et Zhang, 2004).

Anthokyaniny jsou látky, které nejvíce zodpovídají za příznivé účinky borůvek na lidské zdraví. Nejedna studie poukazuje na příznivý vliv anthokyanů obsažených v borůvkách (Liu et al., 2014; Konczak et Zhang, 2004; Ware, 2016). Např. výzkumný tým farmakologického pracoviště v Českých Budějovicích prokázal, že již 120 ml borůvek dokáže zajistit optimální přívod polyfenolů do lidského organismu, jehož pozitivní dopad na lidský organismus je dokázán (Kalová et al., 2012).

Anthokyaniny vykazují silné antioxidační vlastnosti. Tyto vlastnosti mají díky fenolické struktuře, která napomáhá přeměňovat vysoce reaktivní formy kyslíku (peroxyd, peroxyd vodíku, hydroxylové radikály) na formy méně reaktivní nebo nereaktivní. Působením reaktivních forem kyslíku vzniká tzv. oxidativní stres (Wang et Stoner, 2008). Oxidativní stres v organismu je spojen se vznikem a rozvojem mnoha chorobných stavů. Patří k nim kardiovaskulární onemocnění, diabetes mellitus, nádorové bujení, šedý zákal, zánět, některé

neurologické choroby aj. Oxidativní stres a volné radikály s ním spojené urychlují i celkové stárnutí organismu (Vokurka, 2014).

Jedním ze zajímavých poznatků je, že se v mozku nachází receptory, které jsou schopny na sebe vázat polyfenolové sloučeniny. Tato skutečnost se uvádí jako podklad pro pozitivní účinek polyfenolů na mozek a celou nervovou soustavu. Příznivé účinky byly pozorovány i u člověka. Zejména neurologické poruchy, okulární degenerace, mozková mrtvice nebo demence, které vzrůstají se stoupajícím věkem, mohou být adekvátním příjmem polyfenolů pozitivně ovlivněny (Kalová et al., 2012). Mezi tyto polyfenolové látky patří i anthokyany. Na jejich pozitivní působení poukazuje např. studie, do níž byla zařazena skupina lidí s průměrným věkem 76 let, která měla mimo jiné zhoršenou paměť. Testované skupině lidí byl po dobu 12 týdnů podáván džus z borůvek a byl zjišťován jeho vliv na mozkové funkce. Po ukončení výzkumu bylo zjištěno, že se u skupiny lidí užívající borůvkový džus výrazně zlepšily paměťové funkce. Dalším pozitivem byl náznak snížení příznaků deprese a také pokles glykémie (Krikorian et al., 2010).

Udržení rovnováhy a tím schopnost předejít pádům patří mezi závažný problém zvláště u starší populace. Riziko pádů lze posoudit podle diagnostického nástroje paní Tinettiové. Tento nástroj (diagnostická skórovací tabulka) je rozšířen po celém světě a lze ho aplikovat i v české verzi (Janečková et al., 2012). Pozitivní vliv příjmu borůvek na rovnováhu je zřejmě podmíněn nejen jejich působením na nervovou tkáň, ale i příznivým ovlivněním paměti a prostorové představivosti. Pro dokázání těchto skutečností proběhl výzkum, jehož předmětem byly speciálně vytvořené krysy, tzv. Fisherovy krysy. Zvířatům byla podávána dávka borůvek, jež by odpovídala u člověka dávce 120 ml borůvek. Zjištění bylo pozitivní. Krysy konzumující dávky borůvek na tom byly znatelně lépe. Celý pokus lze s přepočteným věkem a dávkou borůvek aplikovat i na člověka (Kalová et al., 2012). Polyfenoly, které jsou přítomné v borůvkách, jsou povzbuzujícími látkami pro neuronální funkce a celkovou činnost mozku. Do popředí můžeme postavit pozitivní ovlivnění paměti (Beattie et al., 2005).

Problematika příznivého vlivu borůvek na zrak má za sebou dlouhou historii. Již po druhé světové válce přišli angličtí letci s tvrzením, že konzumace borůvek jim zlepšuje noční vidění (James, 2011). Ač všechny podklady nebyly vědecky ověřeny, lze se domnívat, že konzumace borůvek může přírodní cestou potlačit degenerativní pochody u zraku. Borůvku lze zařadit jako podpůrnou látku při léčbě onemocnění sítnice a jako prevenci proti šedému zákalu (Jablonský et Bajer, 2007; James, 2011).

Pozitivní dopad anthokyanů na lidský zrak dokazuje také např. studie, které se zúčastnilo 12 respondentů, jimž byla podávána dávka 50 mg anthokyanů v podobě džusu černého bezu. U zúčastněných respondentů se velmi snížila prahová hodnota adaptace oka na tmu. V této studii byl proveden ještě další pokus, kde bylo zkoumáno 21 respondentů, kteří byli mírně krátkozrací. U respondentů byla sledována funkce oka po dvouhodinovém používání počítače. Při námaze oka (sledování počítače) dochází na krátkou dobu ke zhoršení zaostřování. Respondenti, jimž byl podán džus z černého rybízu s obsahem 50 mg anthokyanů, měli hodnoty dioptrií před i po pokusu stejné. Respondenti, jimž bylo podáno pouze placebo, zaostřovali hůře, počet dioptrií byl navýšen (Nakaishi, 2000).

Pozitivní účinky polyfenolů na cévní onemocnění jsou známější spíše ve spojení s vinnou révou. Borůvky však nejsou, co se týká účinku, nikterak v pozadí (Balík, 2008; Basu, 2010). Fenolické sloučeniny obsažené v borůvkách podporují cévní systém a zlepšují oběh krve po celém těle (Kašparová, 2009; Ware, 2016). Bylo provedeno mnoho studií, které se touto problematikou zabývaly. Lze vyvodit závěr, že již při konzumaci 120 ml borůvek jedenkrát týdně dojde ke značnému poklesu rizika pro kardiovaskulární systém. Po konzumaci borůvek je snížen oxidativní stres, je zvýšena kapacita pro antioxidanty a je snížena oxidace LDL tuků, které se ukládají do stěn tepen a způsobují tzv. aterosklerózu (Kalová et al., 2012).

Borůvky a anthokyaniny obsažené v nich mají pozitivní vliv i na metabolismus. Snižují hladinu cholesterolu v krvi a napomáhají k optimalizaci krevního cukru. Užíváním borůvek však nelze u diabetiků nahradit jejich dietu, borůvky mohou užívat jako látky podpůrné (Kašparová, 2009; Kalová et al., 2012). Polyfenoly ovlivňují také metabolismus kostní tkáně. Přírůstek kostní tkáně je vyšší díky zvýšené činnosti osteoblastů za současného ztlumení činnosti osteoklastů. Konzumace borůvek stimuluje i odbourávání látek pro tělo cizích. Karcinogeny jsou odbourávány rychleji a i jejich vylučování z těla je rychlejší (Kalová et al., 2012).

Borůvky jsou předmětem zájmu nejen ve spojitosti s prevencí rakoviny prostaty u mužů, ale i v souvislosti s jinými druhy nádorového bujení (Kašparová, 2009). Vitamin C, prekurzory vitamínu A, anthokyaniny a další složky, jež borůvky obsahují, pomáhají díky své antioxidační kapacitě chránit buňky před poškozením volnými radikály. Tyto antioxidanty

zpomalují růst nádorových buněk, snižují zánět v těle a zabraňují určitým druhům rakoviny (jícen, ústa, slinivka břišní, střevo aj.) (Kalová et al., 2012).

3.2.6 Stabilita anthokyanů

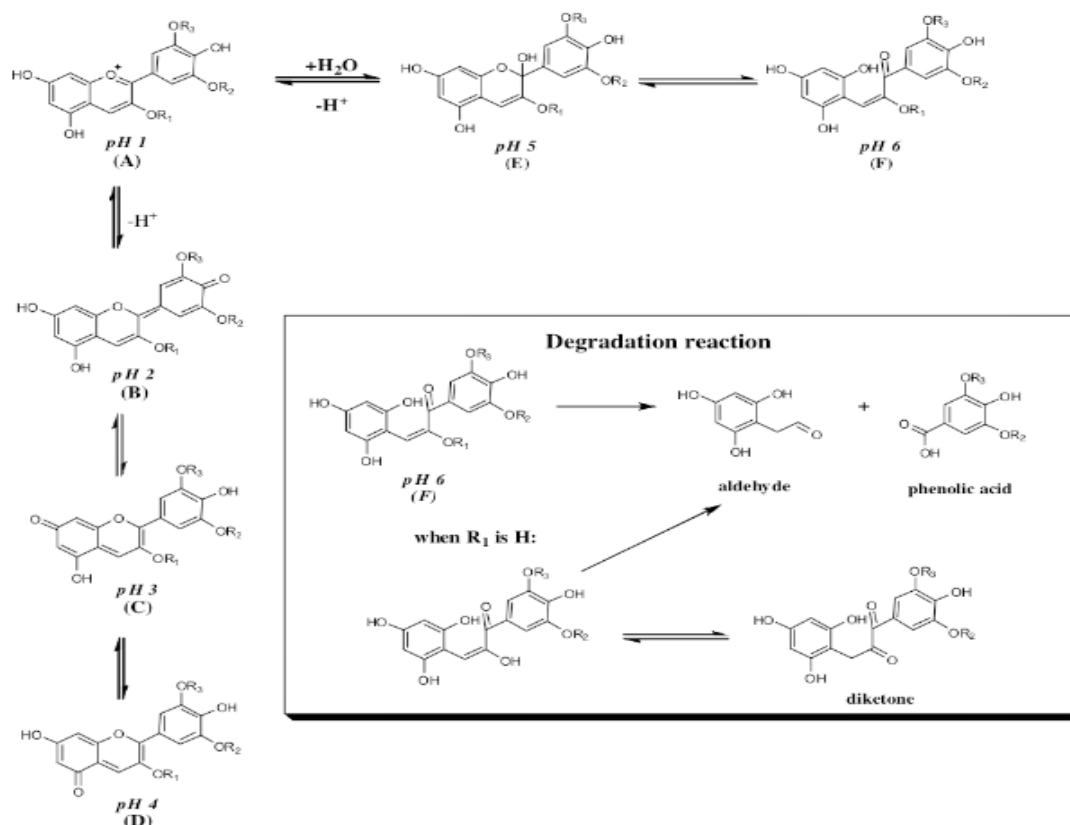
Izolované anthokyaniny jsou vysoce nestabilní a velmi citlivé k degradaci. Je celá řada faktorů, které jejich stabilitu ovlivňují. Mezi hlavní faktory se řadí struktura molekuly, přítomnost enzymů, pH prostředí, přítomnost kyslíku, jejich koncentrace, teplota, přítomnost flavonoidů, bílkovin a kovových iontů. Po reakci s některými těmito faktory dochází ke změně barvy, nebo k úplnému odbarvení (Hellström et al., 2013).

3.2.6.1 Vliv struktury

Již samotná struktura určitých anthokyanů ovlivňuje jejich stabilitu. Vliv má především druh vázaných skupin (hydroxylové, methoxylové, acylové skupiny) a počet či druh vázaných cukrů (monosidy, biosidy aj.) (Neradová et al., 2016). Barviva s větším počtem hydroxylových skupin vykazují spíše modrý odstín a jsou i méně stabilní. Deriváty s methoxy- skupinami mají červený odstín, metylace reaktivní hydroxy- skupiny vede ke zvýšení stability těchto sloučenin. Anthokyanidiny, které obsahují methoxy- skupiny, jsou peonidin, petunidin a malvidin. Glykosidy jsou stabilnější než příslušné aglykony. Acylací anthokyanů se zvyšuje rozpustnost ve vodě a tím je snížena citlivost na změny pH prostředí. Touto reakcí jsou rovněž chráněny cukerné jednotky proti degradaci glukosidázami (Peprná, 2011).

3.2.6.2 Vliv pH

Anthokyaniny se mohou nacházet v rozdílné chemické formě, která závisí na pH prostředí (Obrázek 3). Při pH 1 převládá flavyliový kationt (A), který vykazuje červené až fialové zabarvení. V této formě jsou anthokyaniny nejstabilnější. V rozmezí pH 2-4 pigmentům dominuje chinonická forma (B-D), která disponuje modrým zabarvením. Pokud se pH ještě zvýší (5-6), chinoidní báze se změní v bezbarvou karbinolovou bázi (E), nebo v bezbarvý chalkon (F). Při pH vyšším než 7 jsou anthokyaniny degradovány v závislosti na substituované skupině (Casteñedo-Ovando et al., 2009).



Obrázek 5 Vliv pH na strukturu anthokyanů (Casteñedo-Ovando et al., 2009).

3.2.6.3 Kopigmentační efekt

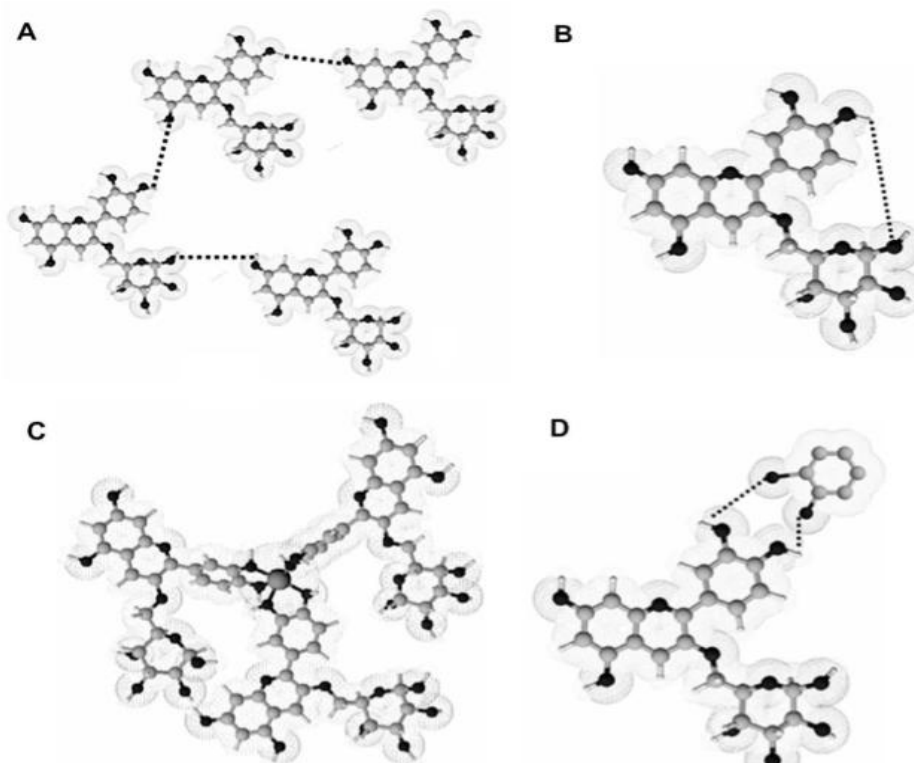
Kopigmentace je chemický proces, při kterém tvoří pigmenty komplexy s dalšími organickými sloučeninami nebo s kovovými ionty. Kopigmentace způsobuje změnu barvy pigmentu nebo změnu intenzity zbarvení. Anthokyaniny tvoří komplexy např. s flavonoidy, alkaloidy, aminokyselinami, kovy či jinými anthokyaniny. Zajímavé jsou především komplexy tvořené s bílkovinami, polysacharidy a flavonoidy.

Obvykle je v tomto uskupení zastoupen anthokyan a nějaká bezbarvá látka. Vznik komplexu či jiného produktu s anthokyanem zvyšuje stabilitu zbarvení. Zvláště v potravinářství je tento jev ceněn, neboť barevnost je jeden z hlavních požadavků, jež jsou na produktech vyžadovány (Syamaladevi et al., 2011).

Kopigmenty jsou bohaté na π elektrony, které jsou schopny vázat flavyliový iont, který má méně elektronů. Kopigmentace tedy chrání anthokyaniny před nukleofilním útokem vody a jinými sloučeninami (peroxydy a oxid siřičitý), ty se vážou ve flavyliovém iontu do polohy 4. Voda se váže do polohy 2 a má za následek vznik karbinolové pseudobáze a následnou ztrátu barvy. Komplexy anthokyanů se strukturou o-difenolů s kovy (Al, K,

Fe, Cu, Ca, Sn aj.) mohou stabilizovat barvu produktů, ale také způsobit nežádoucí změnu zbarvení. Např. komplex anthokyan a cín, který lze nalézt v konzervách, mění červenou barvu plodů na fialovou (jahody) (Cooper-Driver, 2000; Syamaladevi et al., 2011).

Reakce anthokyanů s kopigmenty se může uskutečnit několika různými způsoby v závislosti na interagující sloučenině (Obrázek 6). Prvním způsobem je asociace (Obrázek 6, A), druhým je intramolekulární kopigmentace (Obrázek 6, B), třetím je kovový komplex (Obrázek 6, C), čtvrtým je intermolekulární kopigmentace (Obrázek 6, D). Další varianta může vzniknout tehdy, pokud je kopigmentem anthokyan. V tomto případě se jedná o asociaci nebo intramolekulární kopigmentaci (Obrázek 6, A nebo B). Při interakci s kovem vzniká komplexotvorná reakce (Obrázek 6, C). V případě reakce kopigmentu s volnými elektronovými páry probíhá intermolekulární kopigmentace (Obrázek 6, D). Během nejsložitějších reakcí může být kopigmentace uskutečněna navázáním aglykonu, cukru, kopigmentu a protonů, všech ve stejnou dobu (Casteñedo-Ovando et al., 2009).



Obrázek 6 Interakce anthokyanů s kopigmenty (Casteñedo-Ovando et al., 2009).

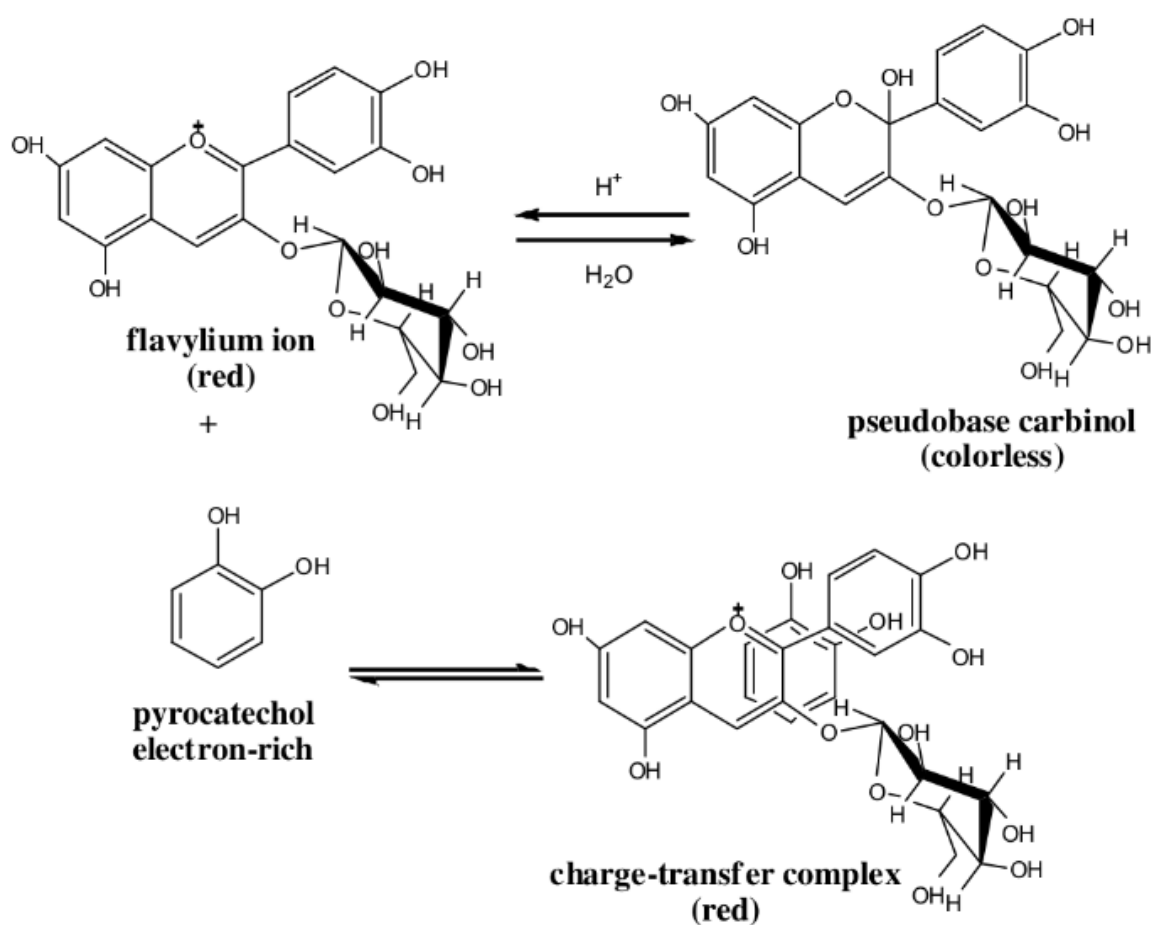
V případě, že je kopigmentem další fenolická sloučenina, jedná se o interakci přechodnou – kvůli nedostatku chemických vazeb. Přechodná interakce je důsledkem tzv. π - π interakce. Díky π - π interakci v kruzích spojených slabou vazbou je elektronová hustota převedena z kruhu obsahujícího více elektronů na kruh s menším počtem elektronů,

tak jako je flavyliový iont, který je v anthokyanech pozitivně nabit a je pak vhodným kandidátem pro tvorbu komplexů, díky přenosu náboje, s elektron-bohatými substráty.

Výsledná kopigmentace je založena na dvou efektech:

1) Tvorbě π - π komplexu (důsledkem je změna spektrálních vlastností molekul flavyliového iontu, zvýšení absorpční intenzity a vlnové délky).

2) Stabilizace flavyliové struktury π - π komplexem (důsledkem je přesun rovnováhy takovým způsobem, že se zvyšuje intenzita červené barvy (Obrázek 7)).



Obrázek 7 Stabilizace anthokyanu tvorbou komplexu s fenolovou sloučeninou (Casteñedo-Ovando et al., 2009).

Rozsah kopigmentačního efektu je tedy závislý na pH, neboť při nízkých hodnotách pH jsou všechny anthokyaniny ve flavyliové formě a při vyšších hodnotách pH je anthokyanin ve formě karbinolové pseudobáze, která je bezbarvá. Kopigmentační efekt je patrný u slabě kyselého prostředí (pH 4-6), kde anthokyaniny existují ve svých bezbarvých formách (Casteñedo-Ovando et al., 2009; Cooper-Driver, 2000).

3.2.6.4 Teplota a světlo

Anthokyaniny vykazují vysokou reaktivitu, a proto jsou i snadno degradovány působením různých faktorů. Světlo a teplota patří mezi vlivy, které způsobují jejich rozklad. Teplota způsobuje logaritmickou destrukci barviv s dobou zahřívání. Rozkladné reakce však neovlivňuje pouze teplota. Patříčnou roli v tomto případě hraje i struktura samotné sloučeniny. Při působení teploty na 3-glykosidy dochází k otevření struktury a vzniku chalkonu, který se následně přeměňuje na hnědě zbarvené produkty. Při degradaci 3-5-diglykosidů vznikají v první řadě diglykosidy kumarinů.

Skladování v temnu a chladu je pro anthokyaniny nejvýhodnější a nejšetnější. Barviva mohou být úspěšně skladována po několik týdnů při teplotě 2 – 4 °C. Acylací anthokyaninů dochází ke zvýšení stability vůči působení teploty a světla. Ochranný efekt vykazují rovněž některé složky systému. Tyto složky reagují s barvivem a vznikají tak stabilnější oligomerní pigmenty, jejichž množství se zvyšuje s dobou skladování (Peprná, 2011).

3.2.6.5 Kyslík, peroxidy, enzymy

Vzdušný kyslík způsobuje oxidaci anthokyaninů. Barevné anthokyaniny přeměňuje na bezbarvé, případně hnědě zbarvené látky. Vzdušný kyslík může působit přímo na samotné anthokyaniny a nebo může působit přes jiné k oxidaci náchylnější sloučeniny.

I reakce s enzymy může zapříčinit ztrátu barvy anthokyaninů. Např. glykosidázy hydrolyzují glykosidové vazby anthokyaninů za vzniku příslušného cukru a aglykonu. Ten je nestabilní a samovolně se rozkládá na bezbarvé deriváty. Polyfenoloxidázy se uplatňují v reakcích enzymového hnědnutí. Tyto enzymy se přirozeně vyskytují v rostlinách, jsou uloženy v plastidech rostlinných buněk. Aktivita enzymů závisí na druhu, odrůdě a stáří rostlinného materiálu, podmínkách kultivace a na způsobu zpracování. Samotné polyfenoloxidázy nemohou rozkládat anthokyaninová barviva. Vždy vyžadují přítomnost jiného substrátu (kyselina kávová, chlorogenová). Tyto *o*-difenolové kyseliny poté podlehnou oxidaci katalyzované polyfenoloxidázami. Zoxidují na příslušné *o*-chinony a jejich prostřednictvím oxidují anthokyaniny, které přechází v hnědě zbarvení. Tvorba chinonů je při oxidační degradaci barviv pomocí polyfenoloxidázy nezbytná. Jejich redukcí může být tomuto procesu zabráněno. Jako redukční činidlo může působit kyselina askorbová, která je donorem vodíku a přeměňuje tak chinony zpět na jejich hydroxyformu. Nicméně v přítomnosti kyslíku působí vitamín C spíše jako prooxidant a dochází tak k destrukci obou

sloučenin. Aktivita polyfenoloxidázy může být inhibována přidavkem oxidu siřičitého nebo tepelným ošetřením produktu (Peprná, 2011).

3.2.7 Metody stanovení anthokyanů

Množství anthokyanových barviv v ovoci a zelenině vypovídá o barvě a kvalitě plodu. Jelikož mají anthokyany velice podobné vlastnosti jako ostatní flavonoidy, není jejich izolace z matrice jednoduchá.

Pro stanovení anthokyanů existuje několik variant metod. Mezi starší metody se řadí separační techniky, jako je papírová chromatografie (PC) a tenkovrstvá chromatografie (TLC). Tyto dvě techniky však už ustoupily do pozadí. V současné době se běžně používají vysokoúčinné chromatografické techniky (HPLC, UHPLC), které se často spojují s detekčními metodami spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti spektra (UV/VIS), hmotnostní spektrometrie (MS), nebo nukleární magnetická rezonance (NMR). Další metodou pro stanovení anthokyanů může být také kapilární elektroforéza (CE) (Casteñedo-Ovando et al., 2009).

3.2.7.1 Extrakční techniky

Anthokyany jsou sloučeniny, které mají díky navázaným substituentům polární povahu, která je důležitá pro jejich extrakci z biologické matrice. Pro jejich vyšší polaritu jsou nejběžněji extrahovány za pomoci vodné směsi etanolu, metanolu nebo acetonu. Tyto směsi způsobují ko-extrakci nefenolických látek, jako jsou cukry, organické kyseliny a proteiny, a proto vyžadují tyto extrakty ještě následné purifikace.

Jelikož jsou anthokyany nejstabilnější v kyselém prostředí, tak se do extrakčních směsí přidávají okyselující komponenty. Nejběžněji je používána zředěná kyselina chlorovodíková nebo mravenčí v metanolu. Metody, u nichž je použit metanol, bývají neúčinnější. Díky své toxicitě je však v potravinářském průmyslu upřednostňován etanol. Směs etanolu a vody v poměru 80:20 by měla být stejně účinná jako za použití metanolu.

Při okyselování extrakčních rozpouštědel je nutné vyhnout se silným kyselinám, neboť acetylované anthokyany by mohly být degradovány a glykosidická vazba by mohla být narušena. Pokud bychom chtěli docílit silnější extrakce, lze přidat oxid siřičitý. Anthokyany reagují s HSO_3^- ionty, tím se zvyšuje jejich rozpustnost a difúze skrz buněčnou membránu (Casteñedo-Ovando et al., 2009; Delgado-Vargas, 2000).

3.2.7.2 Separační techniky

Počáteční pokusy separace anthokyanů byly založeny na základě adsorpce na chromatografický papír (papírová chromatografie) nebo na jiný vhodný adsorbent (tenkovrstvá chromatografie). I dnes je tenkovrstvá chromatografie široce využívána, neboť tato technika má nepřetržité inovace a stále vykazuje jisté výhody, jako je jednoduchost a finanční nenáročnost. Avšak nepochybně hlavním pokrokem v posledních letech ve výzkumu anthokyanů (separace a kvantifikace) představuje vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) (Delgando-Vargas, 2000).

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) se řadí mezi nejčastěji používané separační metody. HPLC má vysokou účinnost, dobrou opakovatelnost a robustnost. Tato metoda má široké uplatnění. Je vhodná pro dělení organických méně těkavých kapalných a tuhých látek, které jsou rozpustné ve vodě, v organických rozpouštědlech nebo zředěných kyselinách.

HPLC je založena na separaci analytů na základě jejich distribuce mezi stacionární a mobilní fází. Jak už z názvu vyplývá, mobilní fází je vždy kapalina. Stacionární fáze je zakotvená v chromatografické koloně. Během separace dochází k mnoha typům interakcí. Uplatňují se interakce analytů s mobilní fází, interakce mobilní fáze se stacionární fází a interakce analytů se stacionární fází.

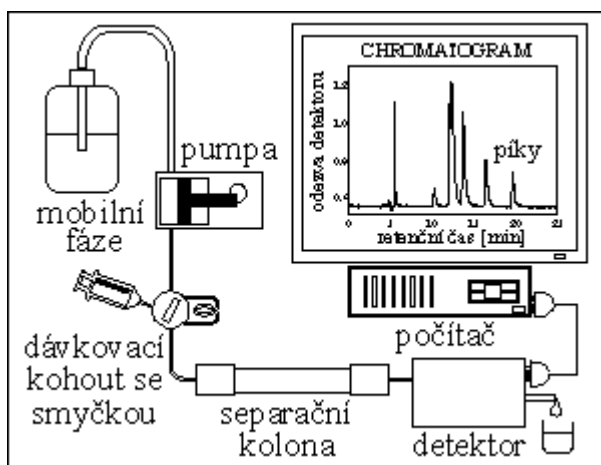
Konkrétní analýza probíhá tak, že chromatograf dávkuje vzorky pomocí dávkovacího ventilu do mobilní fáze. Ta unáší jednotlivé složky vzorku na kolonu, kde dochází k opakovanému ustanovení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází a k separaci analytů dle fyzikálně-chemických vlastností. Po průchodu separační kolonou jsou analyty v mobilní fází detekovány v průtokové cele detektoru. Měřenou veličinou může být fluorescence, absorbance, index lomu, elektrická vodivost aj. Výstupním krokem analýzy je chromatogram, jenž zaznamenává tzv. píky. Výška a plocha píku potom slouží ke kvantitativnímu vyhodnocení. Kvantitativní analýza se provádí na principu odečtení výsledku z kalibrační křivky.

Jako náplň kolon (stacionární fáze) se používají polární nemodifikované adsorbenty (silikagel, méně často oxid hlinitý) nebo náplně s chemicky vázanými stacionárními fázemi na

silikagelovém nosiči. Jako mobilní fáze se většinou užívá voda, organická rozpouštědla a jejich směsi (Coufal, 1996; Douša, 1999-2016; <http://labmet.zshk.cz/vyuka/hplc.aspx>).

Hojně zastoupenou a v této práci využitou metodou je rozdělovací kapalinová chromatografie (LLC). Je to druh kapalinové chromatografie, při níž se analyty rozdělují mezi dvě nemísitelné kapalně fáze. Mobilní fáze unáší analyty přes stacionární fázi, kterou je též kapalina, zakotvená na pevném nosiči. Retenční časy analytů jsou dány tím, jak jsou analyty rozpustné v každé z obou fází rozdílné polarity. Nejdříve byla v LLC používána polární stacionární fáze, zatímco mobilní fáze byla nepolární. V tomto případě se jedná o chromatografii na normálních fázích (Normal-Phase Chromatography – NPC). Normální se nazývá jen z toho důvodu, že byla používána dříve než druhý případ, chromatografie na obrácených fázích (Reversed-Phase Chromatography – RPC). U RPC je stacionární fáze nepolární kapalina a mobilní fáze je polární kapalina. U NPC je nejméně polární analyt eluován jako první, nejvíce polární analyt je eluován jako poslední. U RPC je tomu přesně naopak (Kluda, 2003).

Instrumentace vysokoúčinné kapalinové chromatografie



Obrázek 8 Instrumentace HPLC (Coufal, 1996)

Kapalinová chromatografie se obvykle skládá z čerpacího systému, dávkovacího zařízení, chromatografické kolony, detektoru a zařízení na zpracování dat.

Mobilní fáze je do systému přiváděna z jednoho nebo více zásobníků mobilní fáze a protéká obvykle konstantní rychlostí chromatografickou kolonou a poté detektorem. Na zásobník mobilní fáze je připojen čerpací systém, který má za úkol zajistit přívod mobilní fáze kontrolovanou průtokovou rychlostí, bez kolísání tlaku a bez příměsí vzduchových

publin. Mobilní fáze je přiváděna s konstantním složením (izokratická eluce) a nebo se složením, které je dáno podle předem nastaveného programu (gradientová eluce). Další částí kapalinové chromatografie je dávkovací zařízení, které dávkuje roztok vzorku do protékající mobilní fáze na horní konec kolony nebo blízko něj. Dávkovací zařízení musí být schopno pracovat při vysokém tlaku. Používají se zařízení, která jsou vybavena dávkovací smyčkou o konstantním nebo proměnném objemu pro ruční nebo automatické dávkovače (Ministerstvo zdravotnictví ČR, 2015). K separaci látek dochází na chromatografické koloně. Používají se kolony náplňové. Jsou to úzké dlouhé trubice různé délky a průměrů. Pro běžné analýzy jsou kolony zhotoveny z nerezové oceli. Obvykle bývají poměrně krátké (10 – 25 cm). Vnitřní průměr kolony bývá 2,1 mm do 5 mm. Běžný průtok eluentu je 1 ml/min. Náplňový materiál pro analytické metody má průměr 1 – 10 μm (Klouda, 2003). Na kolonu poté navazuje detektor. Detektor je zařízení, které monitoruje změny ve složení mobilní fáze měřením fyzikálních nebo chemických veličin. Na detektory jsou kladeny mnohé požadavky. Ve skutečnosti však nelze všem požadavkům vyhovět. Každý detektor se tomu „ideálnímu“ přibližuje pouze některými vlastnostmi. Mezi důležité požadavky, jež jsou na detektor kladeny, je možnost detekce všech přítomných látek (univerzálnost), aby odezva detektoru byla okamžitá a lineární v co nejširším koncentračním rozmezí, dále je požadovaná vysoká citlivost a nízká úroveň šumu. Požadavek je kladen i na robustnost vůči změnám tlaku, průtoku mobilní fáze, teploty a další (Douša, 1999 – 2016). Nejběžněji používanými detektory jsou spektrofotometry pro měření v ultrafialové a viditelné oblasti (UV/VIS), včetně detektorů s diodovým polem (Ministerstvo zdravotnictví ČR, 2015). Tyto detektory se běžně využívají pro analýzu anthokyanů (Delgado-Vargas, 2000). Spektrofotometry jsou fotometrické detektory, které měří absorbanci eluátu vycházejícího z kolony. Pro správnou citlivost detektoru musí být zajištěna dostatečná absorpční dráha průtočné kvyety, jíž prochází paprsek. Jednodušší spektrofotometry měří při jedné vlnové délce v ultrafialové oblasti, složitější potom dovolují nastavení vlnové délky pomocí monochromátoru. Detektory s diodovým polem se řadí mezi ty složitější. Tyto detektory jsou schopny proměřit celé absorpční spektrum v definované oblasti vlnových délek a uložit ho do paměti. (Klouda, 2003). Dalšími hojně využívanými detektory jsou také fluorescenční spektrofotometry, diferenční refraktometry (RI), elektrochemické detektory (ECD), detektory na bázi rozptylu světla, aerosolové detektory nabitých částic (CAD), hmotnostní spektrometry (MS), detektory pro měření radioaktivity nebo jiné speciální detektory (Ministerstvo zdravotnictví ČR, 2015). Hmotnostní spektrometrie je způsob detekce, který se v dnešní době také hojně využívá při analýze anthokyanů (Casteñeda-Ovando et al., 2009). Hmotnostní spektrometrie (Mass

Spectrometry – MS) je technika, která převádí vzorek na ionizovanou plynnou fázi a vytvořené ionty odděluje podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje (m/z). Prvním krokem při této technice je tedy odpaření vzorku, dále následuje ionizace, akcelerace iontů do hmotnostního analyzátoru (kvadrupólový analyzátor, iontová past, hmotnostní analyzátor FT-ICR, hmotnostní spektrometr TOF-MS, aj.), separace iontů hmotnostním filtrem a posledním krokem je samotná detekce iontů. (Klouda, 2013).

Kapalinová chromatografie a stanovení anthokyanů

Kapalinová chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC) je nejpoužívanější metodou pro stanovení anthokyanů. V RP-HPLC se využívá opačného sledu fází. Pevná fáze kolony je naplněna polymerem, na jehož povrchu jsou navázány nepolární, nejčastěji oktadecylové řetězce. Velikost částic vázaných ve stacionární fázi se běžně pohybuje od 3 do 5 μ m. Pohyblivá fáze je polární, tvořena z vodné a organické fáze (např. metanol) a dále z malého množství kyseliny (kyselina fosforečná, chloristá, octová, mravenčí). Kyseliny je zapotřebí kvůli zachování nízkého pH prostředí, kdy se pigmenty vyskytují ve formě stabilního flavinového kationtu. V tomto typu chromatografie se retenční časy snižují podle toho, jak roste polarita, která stoupá s rostoucím počtem –OH skupin v molekule anthokyanu. Barviva jsou eluována z kolony v pořadí: delfidin, kyanidin, petunidin, pelargonidin, peonidin a malvidin (Peprná, 2011).

HPLC bývá spojována s UV/VIS/DAD detektorem. Veškeré flavonoidy vykazují vysokou absorpci v rozmezí vlnových délek 250 – 270 nm. Anthokyaniny vykazují vysokou absorpci ve viditelné oblasti spektra v rozmezí vlnových délek 520 – 560 nm (Delgado-Vargas, 2000).

Mladší metodou je HPLC spojovaná s hmotnostní spektrometrií. Hmotnostní detekce je velmi citlivá metoda, která umožňuje jak identifikaci, tak kvantifikaci neznámých sloučenin ze vzorku.

Pro správný průběh analýzy je důležitý výběr vhodné ionizační techniky a typ analyzátoru. Pro ionizaci anthokyanů je vhodná ESI ionizace (ionizace elektrosprejem) nebo APCI ionizace (chemická ionizace za atmosférického tlaku). Oba dva způsoby jsou vysoce citlivé a vykazují dobrou ionizační stabilitu. Jako analyzátor se využívá průletový analyzátor (TOF), kvadrupólový analyzátor (Q; QqQ) a iontová past (IT) (Casteñeda-Ovando et al., 2009; Peprná, 2011).

Výhodné je i spojení NMR (nukleární magnetické rezonance) s HPLC. Toto spojení vysvětluje lépe strukturu neznámých sloučenin v surovém rostlinném extraktu (Casteñeda-Ovando et al., 2009).

3.2.7.3 Další metody stanovení anthokyanů

Další metodou pro stanovení anthokyanů může být pH diferenciální metoda. Tato metoda slouží pro určení celkových monomerních anthokyanů. Pomocí spektrálních charakteristik anthokyanů lze získat důležité informace o složení (kvalitativním i kvantitativním). pH diferenciální metoda využívá schopnosti anthokyanů podléhat strukturální transformaci anthokyanového chromatoforu v závislosti na změně pH prostředí. Změny transformace jsou měřeny pomocí optické spektrofotometrie. pH diferenciální metoda je rychlá a jednoduchá metoda vhodná pro kvantifikaci monomerních anthokyanů (Giusti et Wrolstad, 2001).

Zřejmě nejmladší metodou stanovení anthokyanů je kapilární elektroforéza (první analýza pomocí kapilární elektroforézy 1996). Kapilární elektroforéza je vhodnou metodou pro separaci, identifikaci a kvantifikaci anthokyanů (Casteñeda-Ovando et al., 2009).

4 Experimentální část

4.1 Rostlinný materiál

Vzorek pro tuto práci byl pořízen v srpnu 2015 v šumavském lese ve Včelné pod Boubínem. Borůvky byly nasbírány ručně do plastové misky (asi 1200 g). Následně byly převezeny do laboratoře ČZU v Praze.

V laboratoři byl čerstvě dovezený vzorek rozdělen na čtyři části (varianty). První variantu tvořily čerstvé borůvky, které byly ihned použity pro stanovení obsahu anthokyanidinů v čerstvých borůvkách. Druhou variantu tvořily borůvky, které byly následně usušeny. Třetí variantu tvořily borůvky, které byly zamrazeny, borůvky ve čtvrté variantě byly nejprve zamrazeny a poté lyofilizovány.

4.2 Popis skladovacích a konzervačních podmínek

Borůvky v první variantě byly použity pro okamžité stanovení výchozí hodnoty anthokyanidinů obsažených v čerstvých borůvkách. Druhá varianta byla sušena při 80 °C po dobu 24 hodin a následně byla uchovávána v plastových uzavíratelných sáčkách v exikátoru. Třetí varianta byla zamrazena při -18 °C a po celou dobu pokusu byla skladována v mrazicím boxu. Čtvrtá varianta byla nejprve zamrazena při -18 °C, následně byla lyofilizována (100 hodin, za temna). Lyofilizované borůvky byly vloženy do plastových uzavíratelných sáčků a po celou dobu pokusu byly skladovány v exikátoru.

Celý pokus trval 8 měsíců (srpen 2015 – březen 2016). V průběhu pokusu bylo provedeno celkem šest měření v různých časových intervalech (zhruba po dvou měsících). První měření bylo provedeno 18. 8. 2015, kdy byl změřen obsah anthokyanidinů v čerstvých plodech borůvek a kdy proběhla příprava dalších variant vzorků. První měření prokázalo absenci pelargonidinu ve vzorcích, a proto již nebyl v dalších měřeních zkoumán.

Druhé měření proběhlo 31. 8. 2015, kdy byly analýze podrobeny tři varianty různého skladování vzorků. Varianta borůvek sušených při 80 °C, varianta borůvek lyofilizovaných a varianta borůvek mražených, všechny varianty různého skladování byly analyzovány ve třech opakováních. Další měření proběhla 7. 10. 2015, 15. 12. 2015, 10. 2. 2016 a 23. 3. 2016. Všechna měření byla provedena obdobně jako měření první.

4.3 Pomůcky a chemikálie

- Kádinky
 - Uzavíratelné skleněné lahvičky
 - Varné kamínky
 - Odměrné baňky
 - Jednorázové rukavice
 - Ochranné brýle
 - Stříkačky
 - PVDF mikrofiltry
 - Pipety
 - Vialky
-
- Metanol
 - Kyselina chlorovodíková
 - Standardy anthokyanidinů (pelargonidin, kyanidin, peonidin, delfinidin, petunidin, malvidin)
 - Kyselina mravenčí
 - Acetonitril

4.4 Přístroje

- Lyofilizátor (Lyovac GT2, Steris)
- Laboratorní mlýnek (A11 basic, IKA)
- Přístroj na přípravu deionizované vody (Simplicity UV, EMD Millipore)
- Sušička (Venticell 111, BMT)
- Ultrazvuková lázeň (PS 04, Powersonic- Notus)
- UV/VIS spektrofotometr (Helios γ , Thermo Spectronic)
- Hmotnostní spektrometr (Hybridní trojitý kvadrupól s lineární iontovou pastí, 3200 QTRAP AB Sciex, ESI ionizace)
- Kapalinový chromatograf (UHPLC, UltiMate 3000 RS, Thermo Fisher Scientific)
- Analytické váhy (770-14, KERN)
- Kombinovaná lednička s mrazicím boxem (LCv 4010 MedLine, LIEBHERR)

- Ponorný mixér (4191, BRAUN)
- Software (Analyst 1.4, AB Sciex; Chromeleon 6.8, Thermo Fisher Scientific; Excel 2007, Microsoft)

4.5 Příprava vzorků

Vzorky čerstvých borůvek byly umístěny do kádinky a pomocí ponorného mixéru byly homogenizovány. Po homogenizaci borůvek byly na analytických vahách naváženy vzorky do skleněných uzavíratelných lahvíček, navážky se pohybovaly kolem 150 mg. K naváženým vzorkům bylo přidáno 50 ml 2,7 M HCl v metanolu. Před uzavřením lahvíček byl přidán do každé z nich varný kamínek. Takto připravené vzorky byly vloženy na 10 minut do ultrazvukové lázně, která byla nápomocna k ještě důkladnější dezintegraci matrice a extrakci anthokyanidinů. Po ultrazvukové lázni byly lahvíčky pečlivě dotaženy a poté byly umístěny do laboratorní sušičky, kde byly hydrolyzovány po dobu 2 hodin při 90 °C. Po ohřátí vzorků bylo nutné ještě znovu dotáhnout uzávěry lahvíček. Po uplynutí dvou hodin byly vzorky vloženy do chladicí vodní lázně. Po ochlazení jim byly opatrně povoleny uzávěry. Vychlazené vzorky byly kvantitativně převedeny pomocí metanolu do 100ml odměrných baněk. Následně byla baňka metanolem doplněna po rysku a vzorek byl pečlivě promíchán. Část hydrolyzátu byla převedena do kádinek a poté byla přefiltrována přes 0,22 µm PVDF mikrofiltr. Vzorek byl naředěn 2:3 pomocí 1M HCl do tmavých skleněných vialek (400 µl vzorku + 600 µl 1M HCl). Takto připravené vzorky byly použity pro analýzu anthokyanidinů metodou UHPLC/MS/MS.

Příprava vzorků při dalších měřeních v čase byla realizována obdobným způsobem. Jediným rozdílem bylo využití laboratorního mlýnku k homogenizaci sušených a lyofilizovaných borůvek. V případě mražených borůvek byl stejně jako u čerstvých borůvek použit ponorný mixér. Navážka mražených borůvek činila přibližně 150 mg. U sušených a lyofilizovaných borůvek bylo navažováno přibližně 20 mg.

4.6 Stanovení sušiny vzorků

Procento sušiny bylo stanoveno z rozdílu hmotností čerstvého a usušeného vzorku. Pro stanovení sušiny bylo použito 30 g vzorku, které bylo sušeno při 105 °C po dobu 48 hodin do konstantní hmotnosti. Obsah sušiny činil 14,52 %.

4.7 Tvorba kalibrace a spektrofotometrické stanovení přesné koncentrace standardů anthokyanidinů

Na začátku pokusu byly připraveny zásobní roztoky všech standardů o koncentraci 50 µg/ml. Standardy anthokyanidinů byly připraveny v 1M HCl v metanolu. Zásobní roztoky poté byly uloženy do ledničky (4 °C), neboť byly používány i při dalších měřeních. Ze zásobních roztoků byl před každým měřením připraven pracovní směsný standard o koncentraci 2 µg/ml. Z tohoto standardu byla vytvořena kalibrační řada o koncentracích 0,01 – 2 µg/ml.

Standardy anthokyanidinů vykazují jistou nestabilitu v čase, proto bylo nutné před každou analýzou změřit přesnou koncentraci těchto standardů. Samotné měření probíhalo na UV/VIS spektrofotometru. Pro měření absorbance a následného stanovení přesné koncentrace standardů musel být vždy připraven roztok každého standardu o koncentraci 1 µg/ml. Do 10ml odměrných baněk bylo odpipetováno 200 µl od každého ze zásobních roztoků a následně byly baňky doplněny po rysku 0,1% HCl v metanolu. Přesná koncentrace byla dopočítána pomocí molárních extinkčních koeficientů (EC; Tabulka 2) jednotlivých analytů v příslušném rozpouštědle po změření absorbance při vlnové délce maxima absorpce (λ_{\max}).

Tabulka 2 Extinkční koeficienty anthokyanidinů

Analyt	MW	EC	λ_{\max}	Rozpouštědlo
Pelargonidin	306,7	32400	523	0,1% HCl: metanol
Kyanidin	322,7	34500	538	0,1% HCl: metanol
Peonidin	336,7	36600	536	0,1% HCl: metanol
Delfinidin	338,7	38800	548	0,1% HCl: metanol
Petunidin	352,8	36200	547	0,1% HCl: metanol
Malvidin	366,8	38750	546	0,1% HCl: metanol

4.8 UHPLC/MS/MS analýza anthokyanidinů

Chromatografické podmínky separace

Chromatografická kolona: Kinetex C18 (2,1 x 30 mm; 1,7 µm; Phenomenex)

Mobilní fáze: A: 1% kyselina mravenčí ve vodě, B: 1% kyselina mravenčí v acetonitrilu

Nástřik vzorku: 1 µl

Teplota kolony: 25 °C

Teplota autosampleru: 10 °C

Celkový čas analýzy: 7 minut

Eluce: gradientová

Gradient: 0 – 1 min 10 % B, 1 – 5 min 50 % B, 5 – 5,1 min 10 % B, 5,1 – 7 min 10 % B

Průtok: 350 µl/min

Parametry MS metody detekce

Parametry MS metody detekce jednotlivých analytů jsou uvedeny v samostatné Tabulce 3.

Tabulka 3 Parametry zdroje a parametry MS metody stanovení jednotlivých analytů

Parametry zdroje		Analyt	Retenční čas [min]	Parametry analytů						
				Q1 [Da]	Q3 [Da]	DP [V]	EP [V]	CEP [V]	CE [V]	CXP [V]
Ochranný plyn [psi]	20	Kyanidin		287,1	137,2	73,5	10,0	19,9	51,0	3,5
Kolizní plyn [psi]	střední		2,42	287,1	213,0	79,6	10,0	19,9	35,0	3,5
Napětí zdroje [V]	1500	Peonidin		301,0	201,1	62,3	10,0	19,9	43,0	3,5
Teplota [°C]	700		2,86	301,1	286,2	55,4	10,0	19,9	43,0	3,5
Zmlžovací plyn [psi]	20	Delfinidin		303,1	229,1	69,1	10,0	20,3	51,0	3,5
Turboplyn [psi]	40		1,74	303,1	173,3	69,1	10,0	20,3	39,0	3,5
		Petunidin		317,1	245,1	56,8	10,0	20,7	43,0	3,5
			2,54	317,1	302,1	62,7	10,0	20,7	45,0	3,5
		Malvidin		331,1	315,3	55,3	10,0	19,5	47,0	3,5
			2,91	331,1	287,1	53,9	10,0	19,5	42,0	3,5

- DP – deklasterační potenciál
- EP – vstupní potenciál
- CEP – vstupní potenciál do cely
- CE – kolizní energie
- CXP – výstupní potenciál z cely

4.9 Výsledky

Cílem práce bylo optimalizovat metodu pro stanovení jednotlivých anthokyanů pomocí HPLC, stanovit obsah a složení majoritních anthokyanů v čerstvých borůvkách, stanovit míru degradace anthokyanů při různých způsobech skladování a nadále ze získaných výsledků určit nejšetrnější způsob uchování vzorků borůvek.

4.9.1 Optimalizace metody pro stanovení jednotlivých anthokyanidinů pomocí HPLC

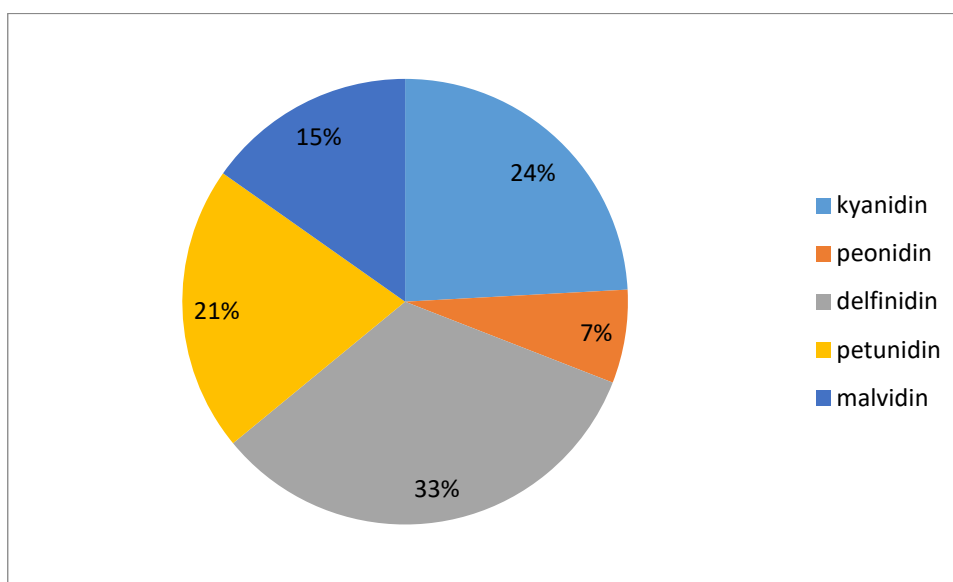
V této práci byly analyzovány jednotlivé anthokyanidiny obsažené v plodech borůvek. Celá analýza probíhala pomocí hmotnostního spektrometru 3200 QTRAP s trojitým kvadrupólem s ESI ionizací spojeného s kapalinovým chromatografem typu UHPLC. Bližší popis optimalizované metody a podmínek průběhu analýzy je již popsán v kapitole 4.8.

Tato metoda byla zvolena na základě patričních důvodů. Jedním z hlavních důvodů byla velká experimentální náročnost stanovení celé řady všech anthokyanů přítomných

v borůvkách spojená s velmi komplikovanou identifikací všech těchto různě glykosylovaných a acetylovaných anthokyanů. Neopomenutelným důvodem volby byla i velká finanční náročnost pořízení všech potřebných standardů anthokyanů. Z výše zmíněných důvodů byla zvolena metoda stanovení aglykonů – anthokyanidinů, které byly pomocí kyselé hydrolyzy uvolněny z jejich glykosylovaných a acetylovaných forem. Hmotnostní detekce byla zvolena z důvodu velmi dobré ionizace analytů v podmínkách ESI a také, protože oproti UV/VIS detekci (HPLC/DAD) vykazovala podstatně vyšší citlivost pro jednotlivé analyty.

4.9.2 Obsah a složení anthokyanidinů v čerstvých borůvkách

Při analýzách byly ve vzorcích borůvek identifikovány anthokyanidiny: kyanidin, peonidin, delfinidin, petunidin a malvidin. Pelargonidin, jeden ze šesti běžně se vyskytujících anthokyanidinů, nebyl ve vzorcích borůvek identifikován. Na Obrázku 9 je znázorněno procentuální zastoupení anthokyanidinů v čerstvém vzorku borůvek. Tabulka 4 uvádí jejich průměrný obsah, který byl vyjádřen v $\mu\text{g/g}$ sušiny. Z obrázku i tabulky je viditelné, že dominantním anthokyanidem borůvek je delfinidin, který tvoří 33,0 % z celkového množství. Petunidin, kyanidin a malvidin se vyskytují v množství menším (21,0 %, 24,0 % a 15,0 %). Peonidin tvoří minoritní složku anthokyanidinového profilu borůvek (7,0 %).



Obrázek 9 Procentuální zastoupení anthokyanidinů v čerstvém vzorku

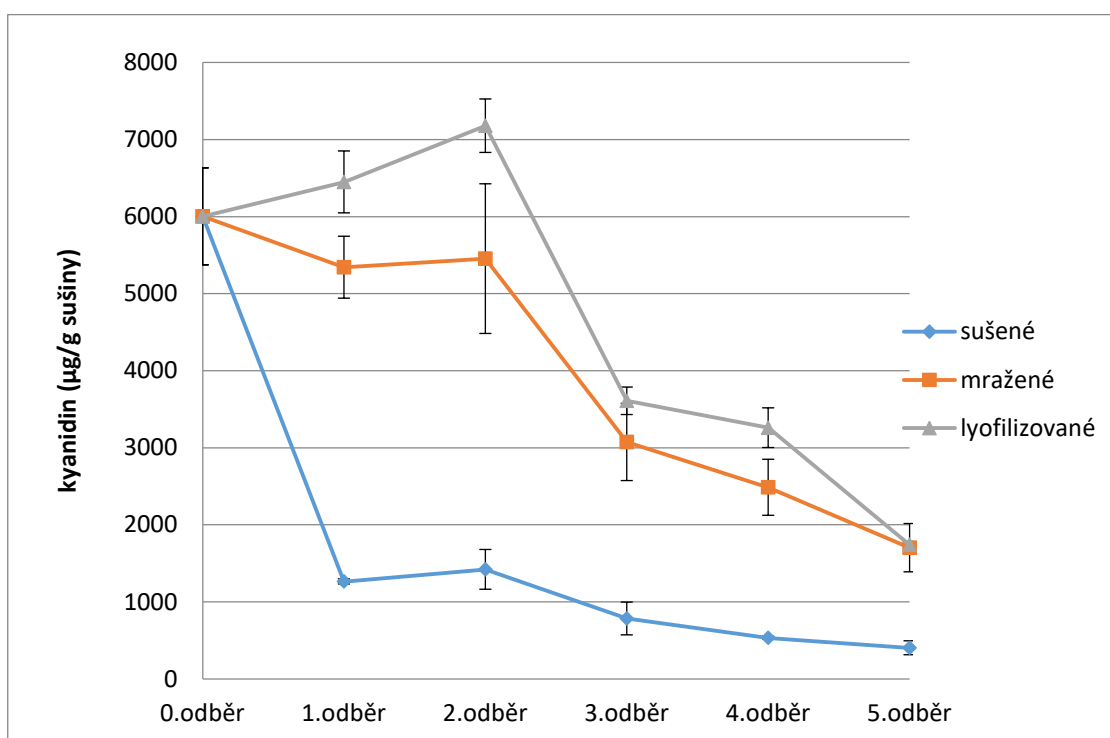
Tabulka 4 Obsah anthokyanidinů v čerstvém vzorku

Anthokyanidin	kyanidin	peonidin	delfinidin	petunidin	malvidin
Obsah μg/g suš.	6002	1687	8239	5155	3787

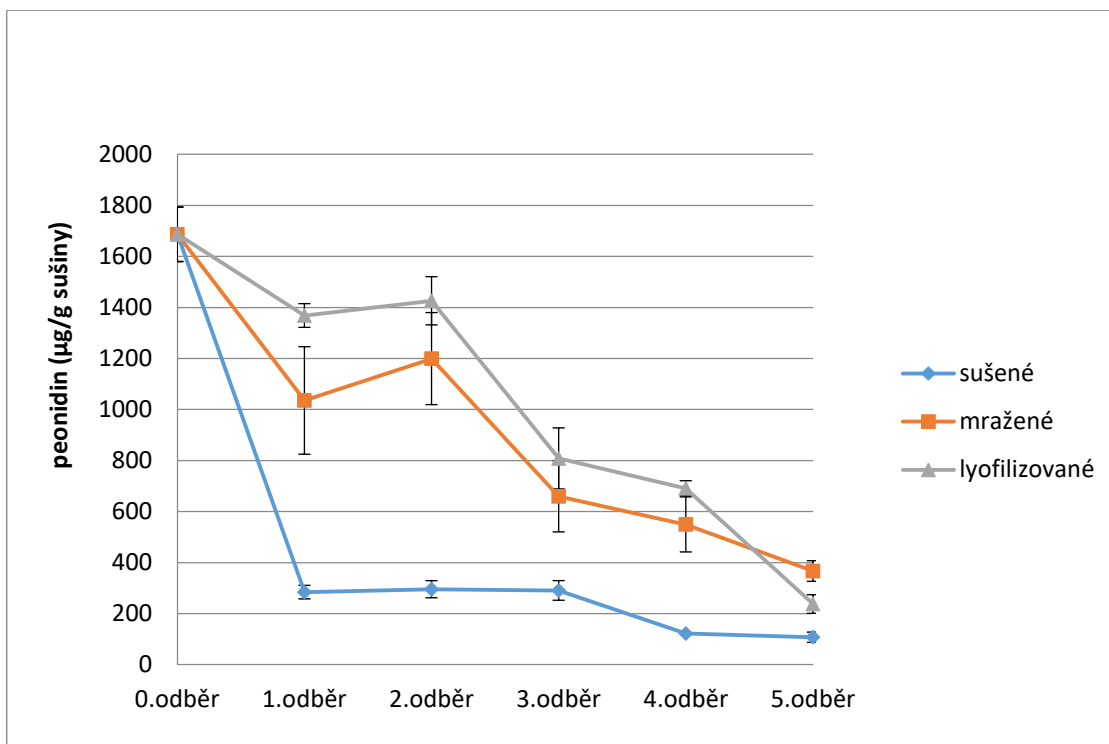
4.9.3 Míra degradace anthokyanidinů při různých způsobech skladování

V této diplomové práci byl sledován vliv třech různých způsobů skladování na obsah a zastoupení anthokyanidinů v borůvkách. Sušení při 80 °C, mražení a lyofilizace. Odlišné způsoby skladování měly různý vliv na retenci jednotlivých anthokyanidinů v borůvkách. Následující obrázky (Obrázek 10 – Obrázek 14) zobrazují změny hladin jednotlivých anthokyanidinů v závislosti na způsobu skladování a čase.

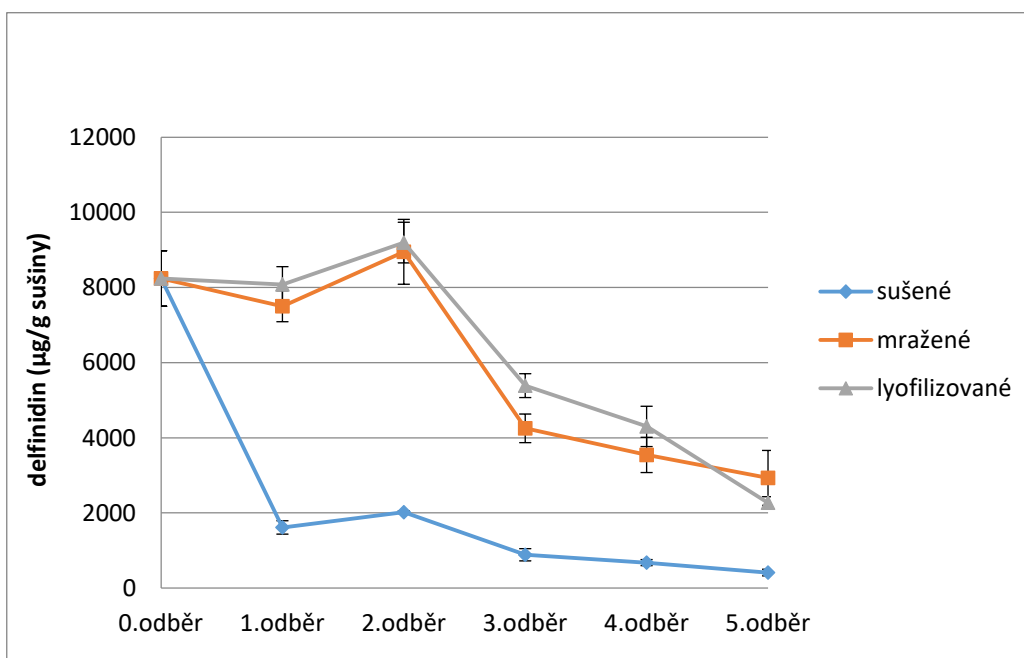
Pro všechny průměrné hodnoty stanovené ze třech paralelních opakování byly vypočteny směrodatné odchylky, které byly do grafu zaneseny jako chybové úsečky.



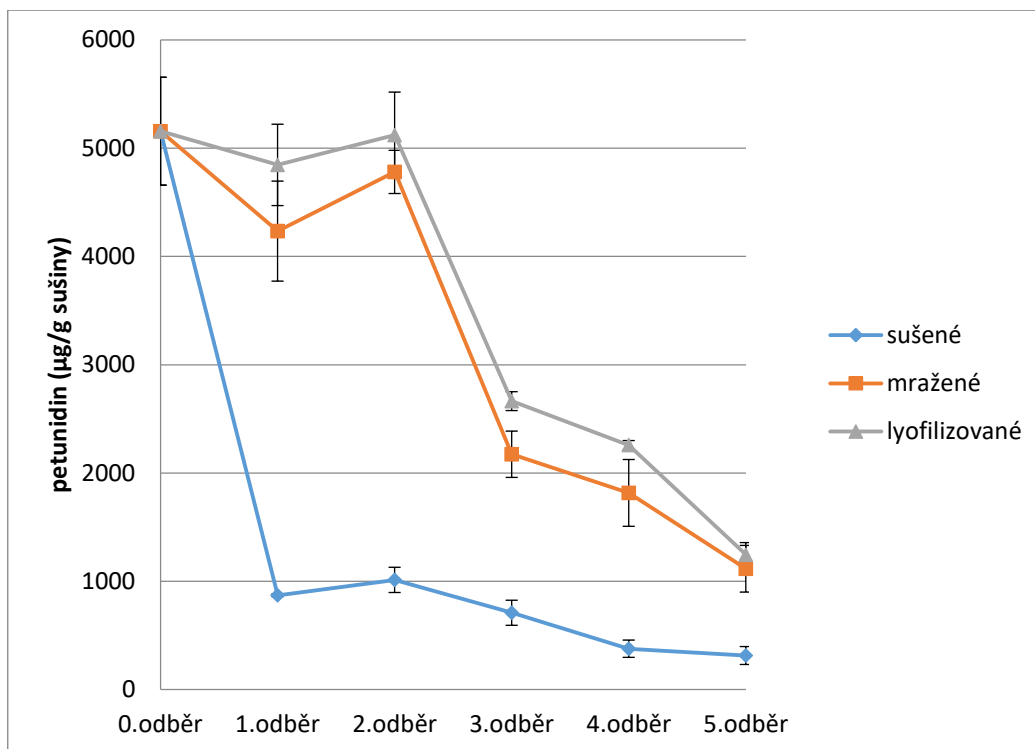
Obrázek 10 Degradace kyanidinu v závislosti na způsobu skladování a čase



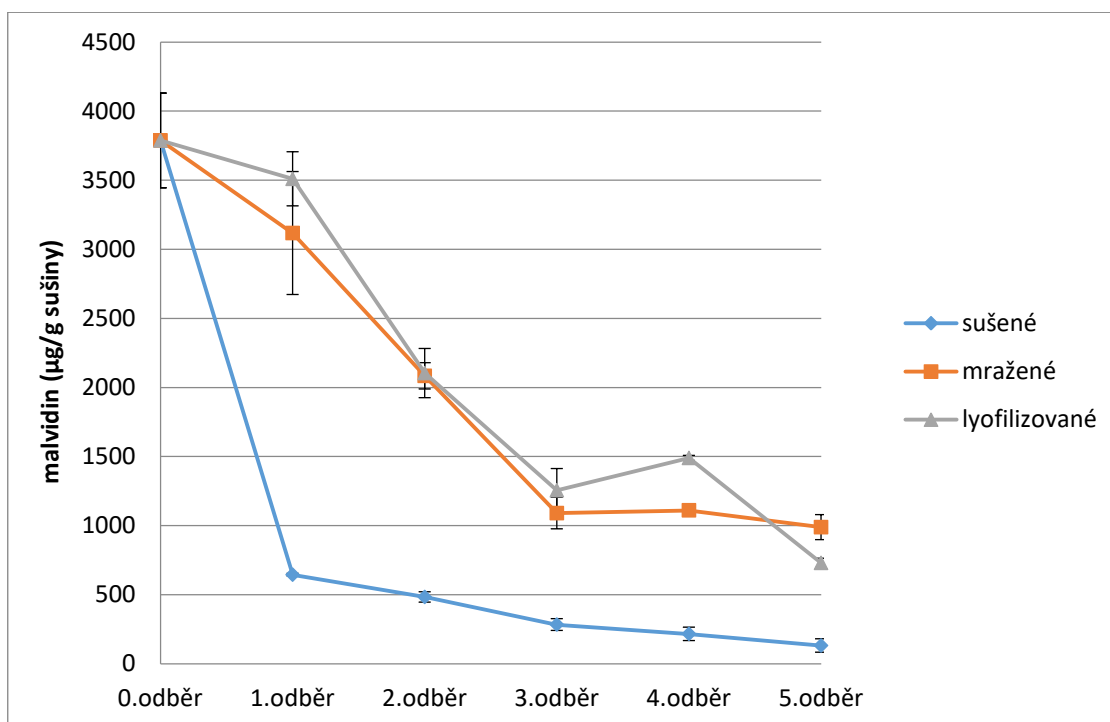
Obrázek 11 Degradace peonidinu v závislosti na způsobu skladování a čase



Obrázek 12 Degradace delphinidinu v závislosti na způsobu skladování a čase



Obrázek 13 Degradace petunidinu v závislosti na způsobu skladování a čase



Obrázek 14 Degradace malvidinu v závislosti na způsobu skladování a čase

Z Obrázku 10 až z Obrázku 14 je patrné, že téměř všechny anthokyanidiny reagovaly na dobu a způsob skladování obdobně.

K největšímu poklesu množství anthokyanidinů došlo ve variantě sušení, a to ihned po usušení vzorku. Obsah kyanidinu klesl o 79,0 %, peonidinu o 83,2 %, delphinidinu o 80,5 %, petunidinu o 83,1 % a malvidinu o 83,0 % z původní hodnoty. Při druhém odběru se obsah všech anthokyanidinů o něco změnil (kyanidin +2,7 %, peonidin +0,7 %, delphinidin +5,0 %, petunidin -3,1 % a malvidin -9,5 %). Při třetím odběru začal obsah anthokyanidinů pozvolna klesat. Obsah kyanidinu klesl na 13,0 %, peonidinu na 17,2 %, delphinidinu na 10,7 %, petunidinu na 7,3 % a malvidinu na 5,7 %. Při dalším odběru se hodnoty opět snižovaly. Při posledním odběru došlo k celkovému poklesu u kyanidinu na 6,7 % (403 µg/g sušiny) z původní hodnoty, u peonidinu na 6,3 % (107 µg/g sušiny) u delphinidinu na 5,0 % (412 µg/g sušiny), u petunidinu 6,1 % (314 µg/g sušiny) a u malvidinu 3,5% (131 µg/g sušiny).

Ve variantách mrazení a lyofilizace byl průběh degradace anthokyanidinů v čase odlišný. Jejich pokles nebyl tak rapidní. Zvláště v prvních dvou měsících uskladnění.

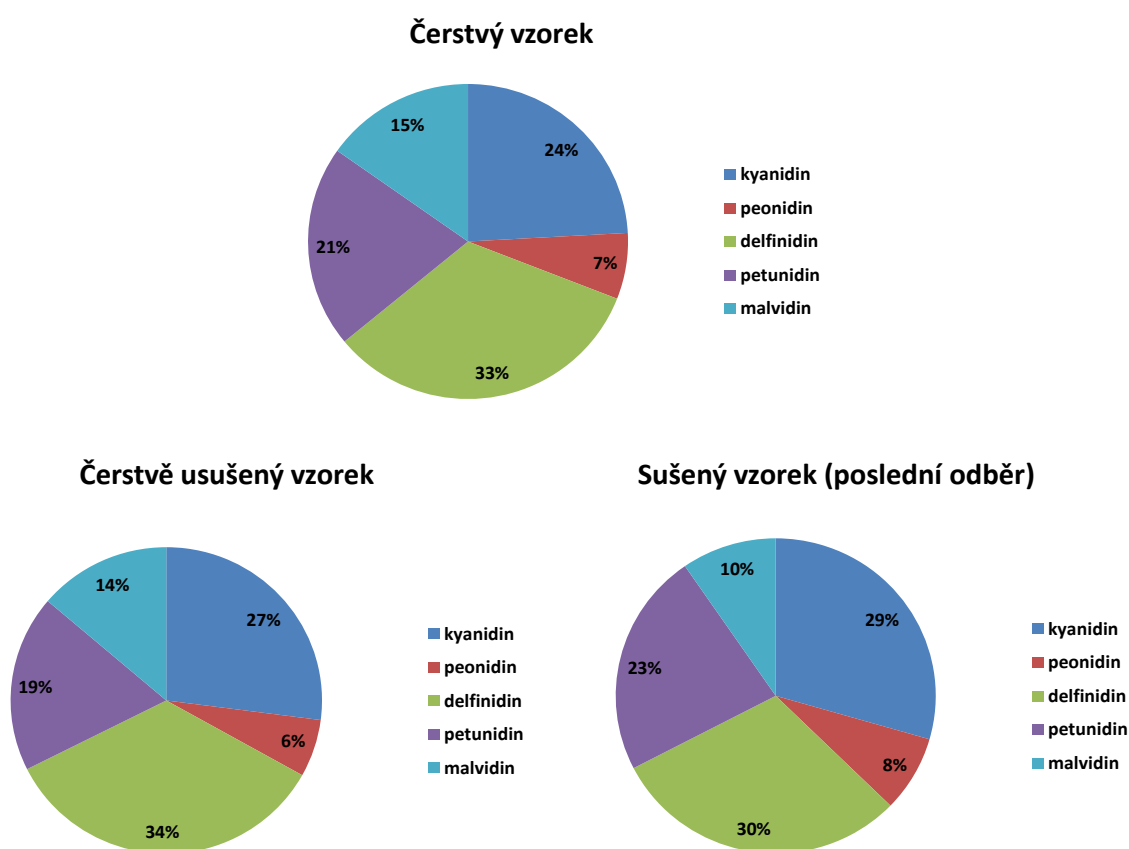
Obsah kyanidinu u čerstvě zmrazeného vzorku klesl na 89,0 %, u lyofilizovaného vzorku dokonce zastoupení kyanidinu stoupl nad hodnoty čerstvých borůvek (na 107,4 %). V čerstvých borůvkách tedy bylo naměřeno 6002 µg/g sušiny, v čerstvě zamrazených 5342 µg/g sušiny a v lyofilizovaných 6448 µg/g sušiny. Peonidin v zamrazených borůvkách klesl na 61,4 %, v lyofilizovaných na 81,1 %. Hodnoty delphinidinu dosahovaly jak u čerstvě zamrazených, tak u čerstvě lyofilizovaných více jak 90,0 % (zamrazené 91,0 %, lyofilizované 98,1 %). I v případě petunidinu došlo pouze k mírnému poklesu. Zamrazené borůvky vykazovaly hodnotu 82,1 %, lyofilizované 94,0 %. Obdobně na tom byl malvidin, jeho obsah v zamrazených borůvkách poklesl na 82,0 % a v lyofilizovaných na 92,0 %.

Druhý odběr vykazoval podobné, případně ještě vyšší hodnoty než odběr první (kyanidin: zamrazený vzorek: 90,8 %, lyofilizovaný vzorek: 119,6 %; peonidin: zamrazený vzorek: 71,0 %, lyofilizovaný vzorek: 84,0 %; delphinidin: zamrazený vzorek: 108,6 %, lyofilizovaný vzorek: 111,6 %; petunidin: zamrazený vzorek: 92,0 %, lyofilizovaný vzorek: 99,3 %; malvidin: zamrazený vzorek: 55,0 %, lyofilizovaný vzorek: 55,6 %). Při porovnání hodnot po druhém odběru je patrné, že malvidin reagoval jinak než ostatní anthokyanidiny, jejichž hodnoty měly tendenci se zvedat nebo klesat pouze nepatrně. Jediné hodnoty malvidinu klesly již po druhém odběru na 55,0 %, což tedy vypovídá o jeho nízké stabilitě s ohledem na dobu skladování. Ve třetím odběru došlo ke značné degradaci i u všech

ostatních anthokyanidinů. U zamrazených vzorků klesaly hodnoty takto: kyanidin na 51,2 %, peonidin na 39,1 %, delfinidin na 51,6 %, petunidin na 42,2 %, malvidin na 29,0 %. Naproti tomu u lyofilizovaných vzorků klesaly hodnoty o něco pozvolněji: kyanidin na 60,1 %, peonidin na 47,9 %, delfinidin na 65,4 %, petunidin na 51,7 %, malvidin na 33,1 %. Při čtvrtém odběru ještě hodnoty poklesly a při posledním odběru se hodnoty začaly podobat hodnotám vzorků sušených.

V zamrazených vzorcích došlo v posledním odběru k poklesu kyanidinu na 28,4 % (1702 $\mu\text{g/g}$ sušiny) z původní hodnoty. Peonidin poklesl na 21,8 % (367 $\mu\text{g/g}$ sušiny), delfinidin poklesl na 35,6 % (2931 $\mu\text{g/g}$ sušiny), petunidin poklesl na 21,6 % (1116 $\mu\text{g/g}$ sušiny) a malvidin poklesl na 26,1 % (988 $\mu\text{g/g}$ sušiny). Lyofilizované vzorky (poslední odběr) vykazovaly tyto hodnoty: kyanidin poklesl na 29,0 % (1742 $\mu\text{g/g}$ sušiny), peonidin poklesl na 14,1 % (238 $\mu\text{g/g}$ sušiny), delfinidin poklesl na 27,6 % (2272 $\mu\text{g/g}$ sušiny), petunidin poklesl na 24,1 % (1244 $\mu\text{g/g}$ sušiny) a malvidin poklesl na 19,3 % (729 $\mu\text{g/g}$ sušiny).

Následující obrázky ukazují na změny profilů jednotlivých anthokyanidinů během různých variant skladování.

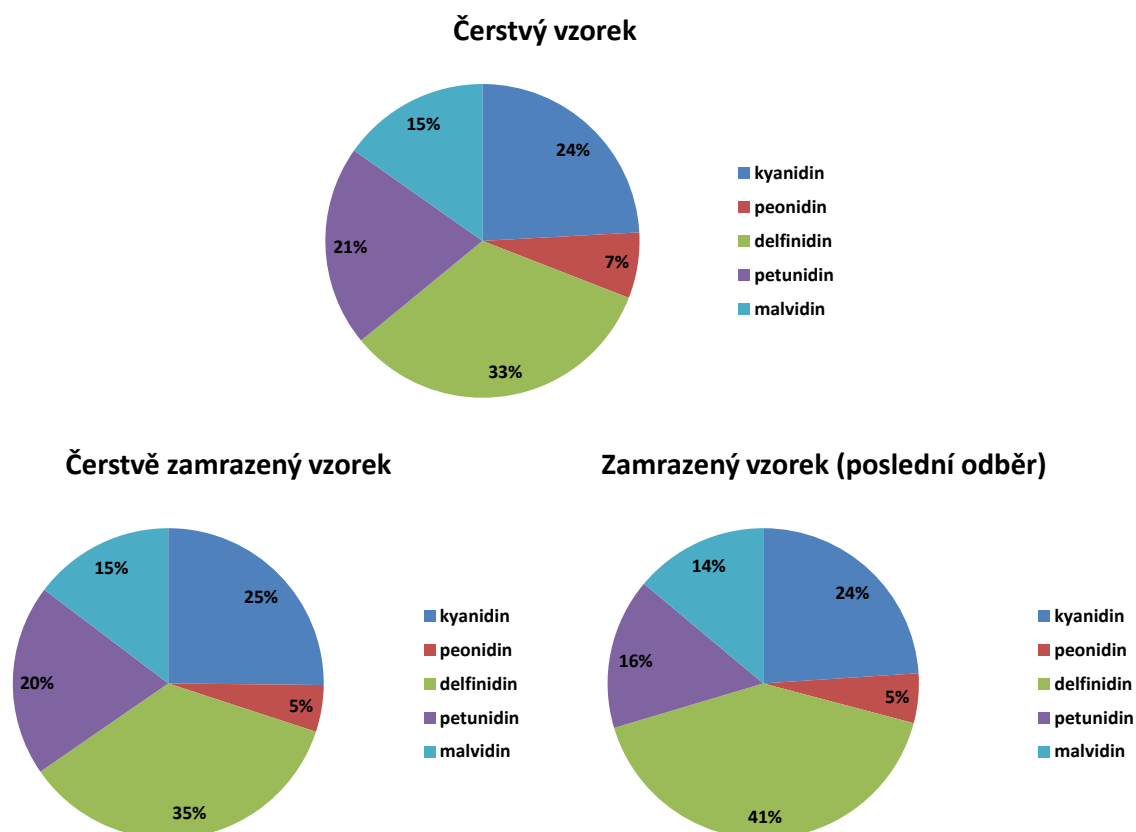


Obrázek 15 Změna anthokyanidinového profilu u varianty sušeného vzorku

Při pohledu na Obrázek 15, který znázorňuje anthokyanidinový profil v čerstvých borůvkách, v čerstvě usušených borůvkách a v usušených borůvkách (poslední odběr), lze vidět, že se anthokyanidinové profily o trochu změnilly. Při porovnání anthokyanidinového profilu čerstvých borůvek a borůvek čerstvě usušených je patrné, že největší změna proběhla u kyanidinu, jehož procentuální zastoupení stoupl o 3,0 %, a u petunidinu, jehož procentuální zastoupení naopak o 2,0 % kleslo. Tyto údaje vypovídají o tom, že kyanidin vykazuje nejvyšší stabilitu vůči vyšším teplotám (sušení při 80 °C), naopak petunidin se jeví jako nejméně stabilní anthokyanidin, co se vyšších teplot týká. U ostatních anthokyanidinů nebyly rozdíly procentuálního zastoupení ztelně rozdílné, vždy se jednalo o +1,0 % nebo o -1,0 %.

Při porovnání obrázků borůvek čerstvě usušených a usušených (poslední odběr) je ztelné, že stoupl procentuální zastoupení petunidinu a peonidinu. Naopak kleslo zastoupení delfinidinu, kyanidinu a malvidinu. Tyto údaje vypovídají o tom, jakou stabilitu vykazovaly anthokyanidiny v usušených borůvkách s ohledem na dobu skladování. Petunidin a peonidin, u nichž se procentuální zastoupení zvedlo, vykazují tedy vyšší stabilitu s dobou skladování než ostatní, u nichž procentuální zastoupení kleslo.

Delfinidin byl však i přes svou nižší stabilitu vůči době skladování v průběhu celé analýzy v sušeném vzorku dominantním anthokyanidinem.

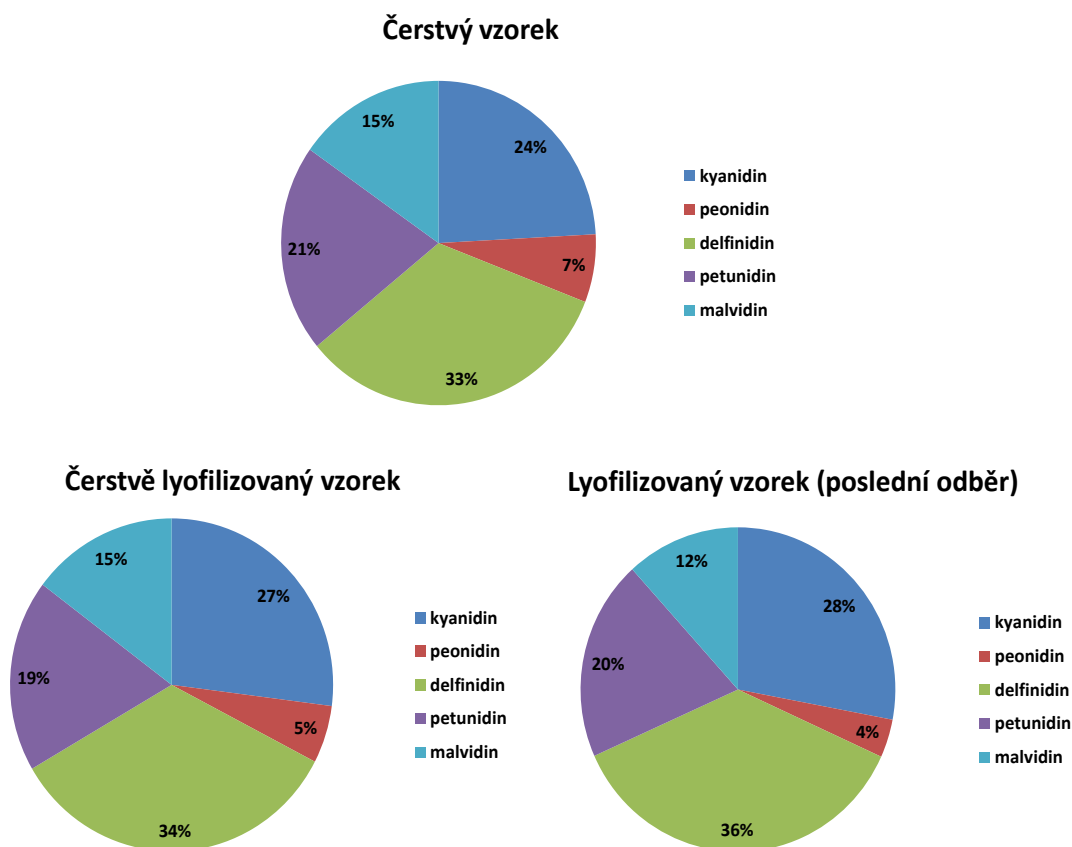


Obrázek 16 Změna anthokyanidinového profilu u varianty zamraženého vzorku

Při pohledu na Obrázek 16, který znázorňuje anthokyanidinový profil v čerstvých borůvkách, v čerstvě zamražených borůvkách a v borůvkách zamražených (poslední odběr) lze vidět, že i v tomto případě se anthokyanidinové profily o trochu změnily. Při porovnání anthokyanidinového profilu čerstvých borůvek a borůvek čerstvě zamražených je patrné, že největší změna proběhla u delfinidinu, jehož procentuální zastoupení stoupl o 2,0 %, a u peonidinu, jehož procentuální zastoupení naopak o 2,0 % kleslo. Tyto údaje vypovídají o tom, že delfinidin vykazuje nejvyšší stabilitu vůči nízkým teplotám v porovnání s ostatními anthokyanidiny, naopak peonidin se jeví jako nejméně stabilní anthokyanidin. U ostatních anthokyanidinů nebyly rozdíly procentuálního zastoupení znatelně rozdílné, vždy se jednalo o +1,0 % nebo o -1,0 %, hodnoty malvidinu se dokonce nijak nezměnily.

Při porovnání obrázků borůvek čerstvě zamražených a zamražených (poslední odběr) je na první pohled patrné, že se nejvíce změnilo procentuální zastoupení delfinidinu, které stoupl o 6,0 %, a profil petunidinu, jehož procentuální zastoupení naopak o 4,0 % kleslo. Z tohoto obrázku lze tedy usoudit, že petunidin vykazuje nízkou stabilitu při nízkých

teplotách s prodlužující se dobou skladování. U delfinidinu je tomu naopak. Při nízkých teplotách za prodlužující se doby skladování vykazuje stabilitu o hodně vyšší než ostatní anthokyanidiny.



Obrázek 17 Změna anthokyanidinového profilu u varianty lyofilizovaného vzorku

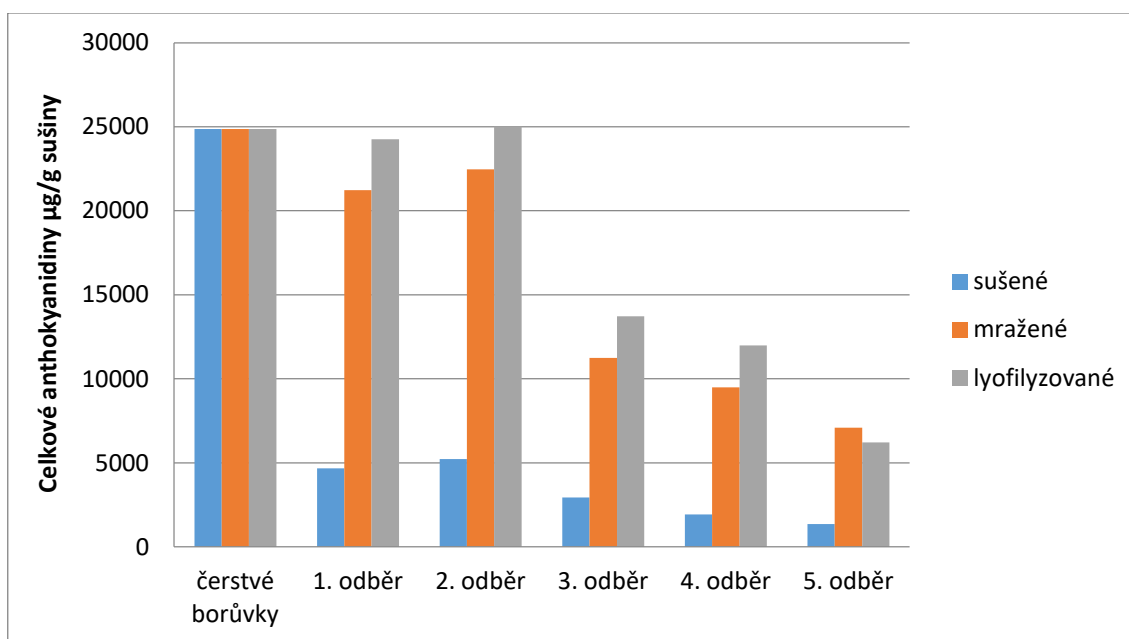
Při pohledu na Obrázek 17, který znázorňuje anthokyanidinový profil v čerstvých borůvkách, v čerstvě lyofilizovaných borůvkách a v borůvkách lyofilizovaných (poslední odběr), lze vidět, že i v tomto případě se anthokyanidinové profily o trochu změnily. Při porovnání anthokyanidinového profilu čerstvých borůvek a borůvek čerstvě lyofilizovaných je zřejmé, že největší změna proběhla u kyanidinu, jehož procentuální zastoupení stoupl o 3,0 %, a u petunidinu a peonidinu, jejichž procentuální zastoupení naopak o 2,0 % kleslo. Tyto hodnoty svědčí o tom, že kyanidin vykazuje nejvyšší stabilitu vůči lyofilizaci v porovnání s ostatními anthokyanidiny, naopak petunidin a peonidin se jeví jako nejméně stabilní anthokyanidiny vůči lyofilizaci. U ostatních anthokyanidinů nebyly rozdíly procentuálního zastoupení ztelně rozdílné. Procentuální zastoupení delfinidinu stoupl o 1,0 % a hodnoty malvidinu zůstaly stejné.

Při vzájemném porovnání obrázků borůvek čerstvě lyofilizovaných a lyofilizovaných (poslední odběr) nezaznamenáme žádné výrazné změny. U těchto vzorků se anthokyanidinový profil změnil nejméně. Zastoupení malvidinu kleslo o 3,0 %, naopak delfinidinu stoupl o 2,0 %. Ostatní anthokyanidiny zůstaly ve stejném zastoupení nebo se jejich relativní zastoupení změnilo jen nepatrně.

4.9.4 Nejšetrnější způsob skladování

Po vyhodnocení výsledků jak jednotlivých anthokyanidinů, tak celkového obsahu zkoumaných anthokyanidinů v analyzovaných vzorcích lze určit jako nejméně šetrnou metodu skladování sušení. Všechny analyzované anthokyanidiny rapidně poklesly (Obrázek 8 – Obrázek 12). Tudíž i celkový obsah analyzovaných anthokyanidinů klesl nejvíce (Obrázek 18).

Na Obrázku 18 jsou hodnoty vzorků čerstvých borůvek brány jako výchozí pro porovnání s ostatními variantami.



Obrázek 18 Celkový obsah anthokyanidinů v závislosti na způsobu skladování a čase

Lyofilizaci lze celkově vyhodnotit jako nejšetrnější způsob konzervace (uchování vzorku). Z Obrázku 18 je patrné, že zejména pro krátkodobé skladování (cca 2 měsíce) je lyofilizace velmi vhodný způsob skladování. Hodnoty při první a druhé analýze byly

srovnatelné s hodnotami borůvek čerstvých, s dobou skladování však začaly hodnoty i v této variantě klesat.

Mražení lze také vyhodnotit jako vhodný způsob uchovávání vzorku. Sice ihned po zamrazení klesly hodnoty o něco více než v borůvkách lyofilizovaných, při dlouhodobějším skladování se však hodnoty začaly srovnávat, a jak znázorňuje Obrázek 18, tak v mražených vzorcích probíhala degradace anthokyanidinů pozvolněji. V poslední analýze byl dokonce naměřený obsah anthokyanidinů v této variantě vyšší než ve variantě lyofilizace.

5 Diskuze

Potravinu nutričně významné se dostávají do popředí zájmu výzkumných týmů, neboť dnešní doba se začíná o tyto potraviny více zajímat. Anthokyaniny, látky, které jsou velice vyzdvihovány pro své pozitivní účinky na lidský organismus, se stávají předmětem zájmu mnoha studií (Kalová et al., 2012; Krikorian et al., 2010; Matsumoto et al., 2003; Priscilla et al., 2013). Borůvky však nejsou jediným zdrojem těchto látek. Dobrým zdrojem anthokyanů je např. i vinná réva, bez černý, třešně, višně a další ovoce. Po zorientování se v příslušné literatuře lze tvrdit, že borůvky a anthokyaniny v nich obsažené nejsou zatím důkladně prozkoumaným tématem. Velké množství studií se zabývá anthokyaniny/anthokyanidiny, jejich stabilitou a metabolismem v souvislosti s nějakou jinou rostlinou, anebo konkrétním produktem – černý rybíz (Nakaishi et al., 2000), jahody (Syamaladevi et al., 2011), lotus (Chen et al., 2013), ovocné džusy (Hellström et al., 2013) a další. Dalším předmětem zájmu bývá i celková antioxidační kapacita, v níž je zmíněna i problematika anthokyanů (Priscilla et al., 2013). V této práci byl sledován vliv uskladnění vzorků borůvek na retenci anthokyanidinů v nich obsažených. Studie, které by se však zabývaly obdobným tématem, zatím nejsou, anebo nejsou dostupné z nám přístupných zdrojů informací.

Jedním z cílů této práce bylo určit složení anthokyanů ve vzorcích borůvek. V našich vzorcích bylo identifikováno 5 dominantních anthokyanidinů (kyanidin, peonidin, delfinidin, petunidin a malvidin). Pelargonidin, šestý základní anthokyanidin, nebyl ve vzorcích přítomen. Jako majoritní anthokyanidin byl stanoven delfinidin, jehož obsah činil 33 %. I v jiné studii byl delfinidin stanoven jako majoritní anthokyanidin (Priscilla et al., 2013), zastoupení ostatních anthokyanidinů však již úplně totožné nebylo. Například námi neidentifikovaný pelargonidin byl v práci Priscilla et al. (2013) identifikován a naopak námi identifikovaný petunidin a peonidin v této práci není vůbec zahrnutý. Skutečností, že může být zastoupení anthokyanů odlišné, je i práce, která se zabývá fytochemickým potenciálem polyfenolů obsažených v bobulovitých plodech (Krumphanzlová, 2014). I tato práce zahrnovala stanovení obsahu anthokyanů v borůvkách. Jako dominantní anthokyan byl však určen malvidin. Ve shodě s naší prací pelargonidin také není zmiňován. Není však zmiňován ani peonidin, který v naší práci zastoupení má.

Borůvky se však nekonzumují pouze jako čerstvé bobule. Často jsou zařazeny do jídelníčku i po tepelné úpravě. Nejčastěji se borůvky konzervují mražením a zahříváním. Mezi další moderní metody patří lyofilizace. Dnešní doba často využívá lyofilizované ovoce jako součást různých cereálních výrobků a směsí. Další častou úpravou je také pečení

(borůvkový koláč) nebo sušení (čajové směsi). A na základě těchto úvah byly zvoleny dané způsoby konzervace pro naše vzorky borůvek. Lyofilizaci a zamrazení lze vyhodnotit jako vhodně zvolené metody, u kterých se lze domnívat, že jsou využitelné pro běžný život (zamrazování sezónního ovoce, lyofilizace ovoce do cereálních směsí). Co se však týká konzervace za vyšších teplot, lze se domnívat, že mohly být zvoleny adekvátnější teploty. Sušení při 80 °C po dobu 24 hodin zřejmě nebylo úplně optimálním způsobem. Teplota, která patřičně ovlivňuje stabilitu anthokyanů, byla moc vysoká a působila po dlouhou dobu. Proto pokud bychom chtěli tento výzkum opakovat, měli bychom zvolit vhodnější teploty a kalkulovat i s podmínkami, které člověk konzumující borůvky má ve svých domácnostech. Lze se domnívat, že pokud by byly zvoleny nižší teploty pro sušení (cca 50 °C), tak by i obsah anthokyanidinů byl o něco vyšší, nedocházelo by k tak rapidní degradaci při sušení vzorků.

Pokles anthokyanidinů v závislosti na době skladování se dal předpokládat u všech variant vzorků (díky poznatkům o vlastnostech a stabilitě anthokyanů/anthokyanidinů). Výsledky, které však borůvky vykazovaly ve variantě lyofilizace a mražení při druhém a třetím odběru, byly velice zajímavé. Nejpozoruhodnějším jevem bylo, že množství anthokyanidinů stouplu s určitou dobou skladování. Ve variantě lyofilizace při prvním odběru vykazovaly některé anthokyanidiny dokonce vyšší hodnoty než borůvky čerstvé a při dalším odběru se naměřené hodnoty ještě o něco zvýšily. Ne jinak tomu bylo i v odběru mražených borůvek. V této variantě sice nepřesáhlo množství anthokyanidinů borůvky čerstvé, ale druhý odběr vykazoval u některých anthokyanidinů vyšší hodnoty než odběr první. Tento jev si lze vysvětlit tak, že se anthokyaniny po proběhlé lyofilizaci a zamrazení snáze extrahovaly z matrice, a proto vykazovaly následně vyšší hodnoty. Při těchto procesech zřejmě došlo k narušení pletiv a buněk, díky kterému se anthokyaniny z matrice snáze uvolňovaly. Podobný jev lze zaznamenat i v práci Krumphanzlové (2014), ve které byl sestavován jídelníček s určitým obsahem polyfenolových látek. V této práci byl stanoven malvidin jako majoritní látka, s níž bylo kalkulováno. Obsah malvidinu v borůvkách chlazených byl položen jako rovný jedné a ostatní vzorky a výrobky byly vyjádřeny jako podíl nebo násobek vůči tomuto obsahu. Například obsah u borůvek mražených se rovnal 3,12, což tedy svědčí o tom, že obsah malvidinu byl v těchto vzorcích jednoznačně vyšší než u borůvek chlazených. Cílem práce však bylo sestavit určité jídelníčky a tato skutečnost v práci není nijak objasněna a zhodnocena.

Borůvky, jakožto dobrý zdroj anthokyanů a dalších zdraví prospěšných látek, bychom proto měli zařazovat do našeho jídelníčku. Po zpracování výsledků této práce však vyplývají pro spotřebitele borůvek jistá doporučení. Konzumace čerstvých borůvek je zdraví prospěšná.

Nicméně sklizeň tohoto ovoce probíhá jen jednou do roka, a proto je dobré si borůvky vhodným způsobem konzervovat a uskladnit. Pro krátkodobý způsob skladování je tedy nejvhodnější lyofilizace. Lyofilizované borůvky si zachovají při krátké době skladování téměř všechny zdraví prospěšné anthokyanidiny. Pro dlouhodobé skladování se potom o něco výhodněji jeví zamrazování. Ač je hned po zamrazení pokles anthokyanidinů o něco patrnější než v případě borůvek lyofilizovaných, tak s prodloužením doby skladování se hodnoty začnou vyrovnávat a dle obrázku (Obrázek 18) lze vidět, že následně obsah anthokyanidinů v mražených borůvkách přesáhl obsah anthokyanidinů v borůvkách lyofilizovaných. V případě konzervace sušením je potřeba brát v potaz vlastnosti anthokyanidinů a nevystavovat borůvky příliš vysokým teplotám, neboť vysoké teploty značně urychlují degradaci anthokyanidinů. Proto by bylo vhodné při konzervaci sušením využít nižších teplot a prodloužit dobu sušení, aby bylo dosaženo stejného efektu, ale zachovalo se více prospěšných látek.

6 Závěr

Tato práce si kladla několik cílů. Prvním cílem bylo optimalizovat metodu stanovení jednotlivých anthokyanů pomocí HPLC. Dalším cílem bylo stanovit obsah a složení majoritních anthokyanů v čerstvých borůvkách, stanovit míru degenerace anthokyanů při různých způsobech skladování a ze získaných výsledků určit nejšetrnější způsob uchování vzorků borůvek.

V souladu s prvním cílem byla optimalizována metoda UHPLC/MS/MS, pomocí níž bylo ve vzorcích identifikováno 5 dominantních anthokyanidinů (kyanidin, peonidin, delfinidin, petunidin a malvidin). Pelargonidin, šestý základní anthokyanidin, nebyl ve vzorcích přítomen. Majoritním anthokyanidinem byl stanoven delfinidin. Po vyhodnocení výsledků byla zvolena jako nejšetrnější metoda pro krátkodobé uskladnění vzorku lyofilizace (cca 2 měsíce). Pro dlouhodobé skladování však lze doporučit jako způsob uskladnění mražení, neboť v těchto vzorcích klesaly anthokyanidiny pozvolněji a při posledním odběru vykazovaly dokonce vyšší hodnoty než vzorky lyofilizované. Způsob uchování vzorku sušení byl vyhodnocen jako metoda nejméně šetrná.

7 Seznam literatury

- Anaga, A., Georgiev, V., Ochieng, J., Phill, B., Tsoleva, V. 2013. Production of Anthocyanins in Grape Cell Cultures: A Potencial Source of Raw Materian for Pharmaceutikal, Food, and Cosmetis Industries. 248-267. In: Poljuha, D., Sladonja B. 2013. The Mediterranean Genetic Code – Grapevine and Olive. InTech. p. 322. ISBN: 9789535110675.
- Balík, J., Kyseláková, M., Vrchotová, N., Tříška, J., Kumšta, M., Veverka, J., Híc, P., Totušek, J., Lefnerová, D. Relations between Polyphenols Content and Antioxidant Activity in Vine Grapes and Leaves. Czech Journal of Food Sciences [online]. 26. ledna 2008 [cit. 2014-22-02]. Dostupné z <<http://agriculturejournals.cz/publicFiles/03705.pdf>>.
- Basu, A., Rhone, M., Lyons, T. Berries: emerging impact on cardiovascular health. Nutrition Reviews [online]. Březen 2010. [cit. 2014-27-02]. Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3068482/>>.
- Bartl, P., Tremlová, B., Ošťádalová, M., Čáslavková, P., Eliášová, M., Žďárský, M. 2013a. Stanovení anthokyanů v pšenících s purpurově a modře zbarveným zrnem. Obilnářské listy. XXI (3-4). 75-77.
- Bartl, P., Tremlová, B., Ošťádalová, M., Pokorná, J., Žďárský, M. 2013b. Kvalitativní a kvantitativní stanovení anthokyanů v kultivarech pšenice s modrým a purpurovým zrnem. Potravinářstvo. Special Issue (7). 145-148.
- Beattie, J., Crozier, A., Duthie, G. G. 2005. Potential Health Benefits of Berries. Current Nutrition and Food Science. 1. 75-86.
- Becková, E. 2012. Srovnání obsahu anthokyanových barviv ve vybraných odrůdách bezu černého a vinných hroznů. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Chemická fakulta. Brno. 86 s.
- Casteñedo-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., Galán-Vidal, C. A. 2009. Chemical studie sof anthocyanins: A review. Food Chemistry. 113(4). 859-871.

Coufal, P., High Performance Liquid Chromatography, HPLC [online]. Web.natur.cuni. 2. března 1996. [cit. 2016-11-12]. Dostupné z <<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>>.

Cooper-Driver, G. A. 2001. Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Phytochemistry*. 56(3). 229-236.

Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., Paredes-López, O. 2000. Natural pigments: Carotenoids, Anthocyanins and Betalains – Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Food Science and Nutrition*. 40(3). 173-289.

Delgado-Vargas, F., Paredes-López, O. 2002. Natural colorants for food and nutraceutical uses. CRC Press. p. 327. ISBN: 1587160765.

Douša, M. Základní charakteristiky chromatografického procesu [online]. Hplc.cz. 1999-2016. [cit. 2016-11-12]. Dostupné z <http://www.hplc.cz/Teorie/uvod.html#_Konstanta_KD>.

Douša, M. Teorie HPLC/Základy HPLC [online]. Hplc.cz. 1999-2016. [cit. 2016-11-12]. Dostupné z <<http://www.hplc.cz/>>.

Douša, M., Separace na chromatografické koloně. Hplc.cz. 1999-2016. [cit. 2016-11-12]. Dostupné z <<http://www.hplc.cz/Teorie/resolution.html>>.

Farnworth, E. 2008. Handbook of Fermented Functional Food. CRC Press. p. 600. ISBN: 9781420053265.

Food-Info Since 1999. Anthocyanins and anthocyanidins. [online]. Food-Info.net. 14. srpna 2014. [cit. 2016-10-11]. Dostupné z <<http://www.food-info.net/uk/colour/anthocyanin.htm>>.

Giusti, M. M., Wrolstad, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. [online]. 2001 [cit. 2017-02-02]. Dostupné z <https://www.academia.edu/6873755/Characterization_and_Measurement_of_Anthocyanins_by_UV-Visible_Spectroscopy>.

Haragsim, O. 2013. Včelařské dřeviny a byliny. Grada Publishing. s. 200. ISBN: 9788024784847.

- Harborne, J. B. 1988. The flavonoids: recent adyance. In: Goodwin, T., W. Plant Pigments. Academic Press. London. 298-343.
- Hellström, J., Mattila, P., Karjalainen, R. 2013. Stability of anthocyanins in berry juices stored at different temperatures. *Journal of Food Composition and Analysis*. 31. 12-19.
- Holton, T. A., Cornish., E. C. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell*. 7. 1071-1083.
- HPLC (Vysokoučinná kapalinová chromatografie) [online]. [cit. 2016-11-12]. Dostupné z <<http://labmet.zshk.cz/vyuka/hplc.aspx>>.
- Chalker-Scott, L., 1999. Environmental Significance of Anthocyanins in Plant Stress Responses. *Photochemistry and Photobiology*. 70 (1). 1-9.
- Jablonský, I., Bajer, J. 2007. Rostliny pro posílení organismu a zdraví. Grada Publishing. s. 104. ISBN: 9788024764511.
- James, W. 2011. Vypěstujte si své vlastní léky. Grada Publishing. s. 224. ISBN:9788024736549.
- Janečková, B., Poncarová, E., Kalová, H., Voštová, M., Třísková, Z., Petr, P. Rovnováha a pády jako ošetřovatelský problém. *Prevence úrazů, otrav a násilí* [online]. 2012. [cit. 2014-24-02]. Dostupné z <<http://casopis-zsfju.zsf.jcu.cz/prevence-urazu-otrav-a-nasili/administrace/clankyfile/20130118110118785474.pdf>>.
- Kalová, H., Janečková, B., Petr, P., Verner, M., Bočková, J., Seberová, A., Reban, J. 2012. Borůvky- současné názory na jejich fytochemický potenciál a zdravotní význam. *Prevence úrazů, otrav a násilí*. 8 (1). 85-93.
- Kašparová, M. Borůvka černá. *Praktické lékárenství* [online]. 2009. [cit. 2014-06-02]. Dostupné z <<http://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2009/03/09.pdf>>.
- Kennedy, J. ALL-NATURAL BANANA and other fruits. [online]. 20. prosince 2013. [cit. 2016-10-11]. Dostupné z <<https://jameskennedymonash.wordpress.com/category/infographics/all-natural-banana-and-other-fruits/>>.
- Kepler, K., Humpf, H. U. 2005. Metabolism of anthocyanins and

their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 13. 5195–5205.

Klouda, P. 2003. Moderní analytické metody. Klouda Pavel. Ostrava. s. 132. ISBN: 9788086369075.

Konczak, I., Zhang, W. 2004. Anthocyanins-More Than Nature's Colours. *Journal of Biotechnology*. 5. 239-240.

Krikorian, R., Shidler, M. D., Nash, T. A., Kalt, W., Vinqvist-Tymchuk, M. R., Shukitt-Hale, B., Joseph, J. A. Blueberry Supplementatio Improves Memory in Older Adults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 14. dubna 2010. [cit. 2017-02-03]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2850944/>>.

Krumphanzlová, I. 2014. Fytochemický potenciál polyfenolů obsažený v bobulovitých plodech. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Zdravotně sociální fakulta. České Budějovice. 78.s.

Liu, J., Gao, F., Ji, B., Wang, R., Yang, J., Liu, H., Zhou, F. Anthocyanins – rich extract of wild Chinese blueberry proteus glucolipotoxicity – induced INS832/13 β -cell against dysfunction and dech. *Journal of Food Science and Technology* [online]. březen 2015. [cit. 2016-11-12]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4397289/>>.

Ministerstvo zdravotnictví ČR. 2015. Český lékopis 2009 – Doplněk 2015. Grada Publishing. s. 968. ISBN: 9788024755229.

Mzcr.cz [online]. [cit. 2017-02-18].

Dostupné z <<http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd/hypertext/AJALB.htm>>.

Nakaishi, H., Matsumoto, H., Tominaga, S., Hirayma, M. 2000. Effect of Black Currant Anthocyanoside Intake on Dark Adaptation and VDT Work-induced Transient Refractive alternativ in Healthy Humans. *Alternativ medicine Review*. 5 (6). 553-562.

Neradová, E., Rajchl, A., Čížková, H. 2016. Nedeklarované přibarvování výrobků z červeného a modrého ovoce: možnosti prokázání. *Chemické listy*. 110. 4-10.

Peprná, T. 2011. Anthokyanová barviva ve vybraném ovoci. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Chemická fakulta. Brno. 76 s.

Petr, P., Kalová, H., Soukupová, A. 2004. Strava pro třetí tisíciletí: Prebiotika, probiotika, synbiotika. Revoluce, nebo návrat ke kořenům?. *Auspicia*. 2(12), 90-95.

Pojer, E., Mattivi, F., Johnson, D. and Stockley, C. S. 2013. The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 12. 483–508.

Syamaladevi, R. M., Sablani, S. S., Tang, J., Powers, J., Swanson, B. G. 2011. Stability of Anthocyanins in Frozen and Freeze-Dried Raspberries during Long-Term Storage: In Relation to Glass Transition. *Journal of Food Science*. 76(6). E414-E421.

Tanaka, Y., Sasaki, N., Ohmia, A. 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*. 54. 733-749.

Tesoriere, L., Butera, D., Arpa, D., Di Gaudio F.,Allerga M., Gentile, C., Livrea M. A. 2002. Increased Resistance to Oxidation of Betalain-enriched Human Low Density Lipoproteins. *Free Radical Research*. 37 (6). 689–696.

Vokurka, M. 2014. Patologie pro nelékařské obory. Karolinum press. s. 306. ISBN: 9788024620329.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie [online]. [cit. 2016-12-12]. Dostupné z <http://is.muni.cz/el/1431/podzim2013/C8102/um/HPLC_spec_metody.pdf>

Wallace, T. C., Giusti, M. M. Anthocyanins in Health and Disease. CRC Press. p. 368. ISBN: 9781439894767

Wang, L., Stoner, G. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett* [online]. 20. června 2008. [cit. 2017-01-02]. Dostupné z <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2582525/>>.

Ware, M. Blueberries: Health Benefits, Facts, Research [online]. *Medical News Today*. 15. března 2016. [cit. 2016-10-12]. Dostupné z <<http://www.medicalnewstoday.com/articles/287710.php>>.

7. Kapitola: Chromatografie [online]. [cit. 2017-02-18].

Dostupné z <http://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM_07.pdf>.