

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie**

**VYUŽITÍ UPLC/ESI-MS PRO SLEDOVÁNÍ ZMĚN
OBSAHU ANTHOKYANINŮ V PRŮBĚHU
ZPRACOVÁNÍ ROSTLINNÝCH PRODUKTŮ**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2011

Lucie Ignasová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

**VYUŽITÍ UPLC/ESI-MS PRO SLEDOVÁNÍ ZMĚN
OBSAHU ANTHOKYANINŮ V PRŮBĚHU
ZPRACOVÁNÍ ROSTLINNÝCH PRODUKTŮ**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce: Lucie Ignasová

Studijní obor: Ekochemie

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Barbora Papoušková, Ph.D.

Olomouc 2011

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

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne.....

.....

Podpis

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce, RNDr. Barboře Papouškové, Ph.D., za její nekončící trpělivost a ochotu, se kterou se mi věnovala při řešení otázek spojených se vznikem této práce.

Souhrn

V této práci byly studovány anthokyaniny obsažené v plodech brusnice borůvky (*Vaccinium myrtillus* L.) a bezu černého (*Sambucus nigra* L.). Byl hodnocen kvalitativní a kvantitativní rozdíl mezi syrovými plody a plody tepelně upravenými do podoby sirupu a marmelády. Ke studiu anthokyaninů byla využita metoda UPLC/ESI-MS.

V plodech borůvky bylo nalezeno celkem 15 anthokyaninů: Cn-3-gal, Cn-3-glu, Cn-3-ara, Dp-3-gal, Dp-3-glu, Dp-3-ara, Pn-3-gal, Pn-3-glu, Pn-3-ara, Pt-3-gal, Pt-3-glu, Pt-3-ara, Mv-3-gal, Mv-3-glu a Mv-3-ara. V plodech černého bezu byly nalezeny 4 anthokyaniny: Cn-3,5-diglu, Cn-3-sam, Cn-3-Glu a Cn-3-sam-5-glu. Anthokyaninový profil byl stejný u syrových plodů, sirupů i marmelád.

Z kvantitativního hlediska obsahovaly plody poměrně vysoké koncentrace anthokyaninů (12,46 mg/g v borůvkách, v bezu černém 5,392 mg/g). Tepelnou úpravou ovoce došlo ke snížení obsahu anthokyaninů ve výsledných produktech. Marmelády obsahují o 57 % (borůvková marmeláda) a o 54 % (bezová marmeláda) méně anthokyaninů než syrové plody. U sirupů je obsah anthokyaninů menší o 59 % (borůvkový sirup) a 57 % (bezový sirup) v porovnání se syrovými plody.

Summary

The subject of this thesis was a study of anthocyanin profile in blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and in elderberry (*Sambucus nigra* L.). The qualitative and quantitative difference between fresh fruit and fruit after thermal processing (syrup, jam) was assessed. The anthocyanins were analysed using UPLC/ESI-MS.

Fifteen anthocyanins were identified in fresh blueberry fruit, namely Cn-3-gal, Cn-3-glu, Cn-3-ara, Dp-3-gal, Dp-3-glu, Dp-3-ara, Pn-3-gal, Pn-3-glu, Pn-3-ara, Pt-3-gal, Pt-3-glu, Pt-3-ara, Mv-3-gal, Mv-3-glu and Mv-3-ara. In the fresh elderberry fruit there were identified four anthocyanins: Cn-3,5-diglu, Cn-3-sam, Cn-3-Glu and Cn-3-sam-5-glu. The anthocyanin profile showed no significant difference among fresh fruit, a syrup and a jam.

From the quantitative point of view, the fresh fruit contained relatively high amount of anthocyanins (12,46 mg/g blueberry, 5,392 mg/g elderberry). It was observed that the concentration of anthocyanins in products had decreased after the heat-treating process of the fruit. The blueberry jam contains 57 % less anthocyanins than fresh fruit and the elderberry jam contains 54 % less anthocyanins than the fresh fruit. The blueberry syrup contains 59 % less anthocyanins than fresh fruit and the elderberry syrup contains 57 % less anthocyanins than fresh fruit.

Obsah

1. Úvod	1
2. Teoretická část	2
2.1. Anthokyaniny	2
2.1.1. Výskyt a funkce anthokyaninů	2
2.1.2. Struktura anthokyaninů	2
2.1.3. Stabilita anthokyaninů	5
2.1.4. Barevnost anthokyaninů	7
2.1.5. Biosyntéza anthokyaninů	7
2.1.6. Vliv anthokyaninů na lidské zdraví	9
2.1.7. Brusnice borůvka a její anthokyaniny	9
2.1.8. Bez černý a jeho anthokyaniny	10
2.1.9. Anthokyaniny v džemech a sirupech	11
2.2. Metody studia anthokyaninů	13
2.2.1. Princip metody UPLC/ESI-MS	13
2.2.2. Metody analýzy anthokyaninů	15
2.2.3. Využití LC/MS pro analýzu anthokyaninů	16
3. Experimentální část	18
3.1. Vzorky	18
3.1.1. Syrové plody	18
3.1.2. Marmelády	18
3.1.3. Sirupy	18
3.2. Chemikálie	19
3.3. Přístroje a vybavení	19
3.4. Úprava vzorků k analýze	20
3.5. Příprava standardů	21
3.6. Příprava mobilních fází	21
3.7. Sběr a vyhodnocování dat	21
4. Výsledky a diskuse	22
4.1. Optimalizace separace	22
4.2. Kvalitativní vyhodnocení	26

4.2.1.	Borůvky	26
4.2.2.	Černý bez	32
4.3.	Kvantitativní vyhodnocení	39
4.3.1.	Borůvky	39
4.3.2.	Bez černý	44
5.	Závěr	46
6.	Literatura	48
7.	Seznam použitých zkratk	51
8.	Přílohy	1

1. Úvod

Anthokyaniny jsou rostlinná barviva, která jsou běžně přítomná v květech, listech a plodech rostlin. Jsou příčinou růžového, červeného, fialového i modrého zbarvení různých odstínů. Mají velice pozitivní vliv na zdraví člověka – snižují riziko výskytu kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny a dalších civilizačních chorob. Potenciální využití anthokyaninů je také v oblasti potravinářského průmyslu, kde by mohla sloužit jako náhrada umělých barviv. Jistou nevýhodou je jejich relativně snadná degradace, jelikož jsou stále pouze v poměrně úzkém rozmezí hodnot pH a teploty.¹

Izolace anthokyaninů z rostlinných materiálů se provádí extrakcí, extrakt se obvykle ještě přečistí. Instrumentální metoda, která byla v této práci použita ke studiu anthokyaninových barviv, je spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem.

Tato práce se zaměřuje na studium anthokyaninů v plodech brusnice borůvky (*Vaccinium myrtillus* L.) a bezu černého (*Sambucus nigra* L.). K analýze byly použity jak syrové plody ve zmraženém stavu, tak plody tepelně zpracované do podoby džemů a sirupů. Cílem této studie bylo identifikovat jednotlivé anthokyaniny, obsažené ve vzorcích, a dále porovnat, nakolik se bude lišit obsah anthokyaninů v tepelně neupravených a v tepelně zpracovaných plodech. Ze získaných dat lze vyvodit závěry o rozdílné prospěšnosti konzumace syrových a tepelně zpracovaných plodů.

2. Teoretická část

2.1. Anthokyaniny

2.1.1. Výskyt a funkce anthokyaninů

Anthokyaniny jsou ve vodě rozpustná přírodní barviva, která patří do velké skupiny flavonoidů. Barevná škála, kterou tato barviva poskytují, začíná u lososově růžové, přes červenou a fialovou, až po temně modrou v závislosti na pH a struktuře. Anthokyaniny se vyskytují v květech, plodech a listech krytosemenných rostlin. Někdy mohou být přítomny i v kořenech, stoncích, semenech nebo hlízách. Na úrovni buňky jsou anthokyaniny lokalizovány ve vakuolách.¹

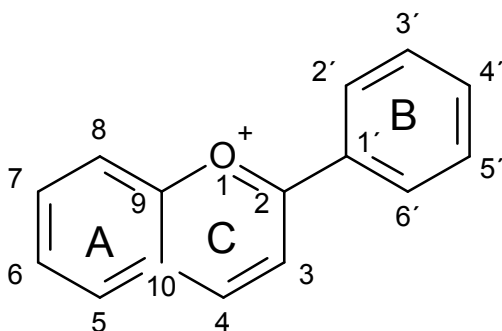
Anthokyaniny plní v organismu rostliny několik různých funkcí. Je zde jistá souvislost mezi biosyntézou anthokyaninů ve vegetativních orgánech a stresem rostliny. Předpokládá se, že zvýšené množství anthokyaninů je reakcí na býložravce, houbové a virové patogeny, výkyvy teplot, UV záření, sucho, přízemní ozon nebo herbicidy.¹ Souhrnně lze říci, že anthokyaniny poskytují ochranu před mnoha stresovými faktory.

V květech a plodech anthokyaniny navíc plní i roli specifického atraktantu. Účelem je přilákat opylovače nebo ptáky či jiné živočichy, kteří by zajistili rozptyl semen. Existuje dokonce spojitost mezi barvou květu a druhem opylovače. Byly porovnávány květy kejklířky šarlatové (*Mimulus cardinalis*) a kejklířky Lewisovy (*Mimulus lewisii*). Kejklířka šarlatová obsahuje převážně pelargonidinové anthokyaniny a její květy jsou jasně červené. Kejklířka Lewisova obsahuje navíc i cyanidinové anthokyaniny a květy mají růžovou barvu. Ačkoli jsou tyto dvě rostliny velmi blízké příbuzné, barva květu způsobuje, že kejklířka šarlatová je opylována kolibříky, kdežto kejklířku Lewisovu opylují čmeláci.²

2.1.2. Struktura anthokyaninů

Anthokyaniny se skládají z aglykonů (anthokyanidinů), cukrů a v mnoha případech také z organických kyselin, které jsou na cukr navázány esterovou vazbou.

Anthokyanidiny jsou tvořeny patnácti-uhlíkatou kostrou, která má podobu tří kruhů: dva fenylové kruhy (A a B) jsou spojeny tří-uhlíkatým mostem (C kruh) (Obr. 1). Jednotlivé anthokyanidiny se pak od sebe liší substituenty, které jsou navázané na těchto kruzích.



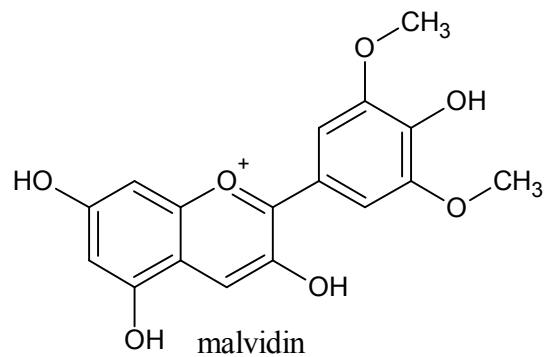
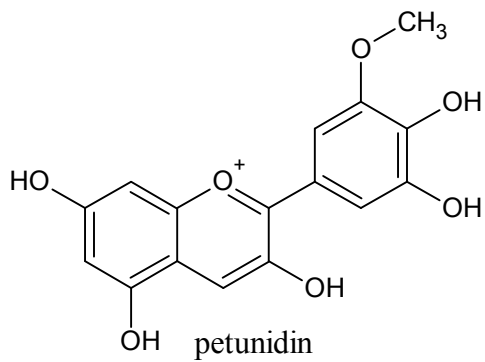
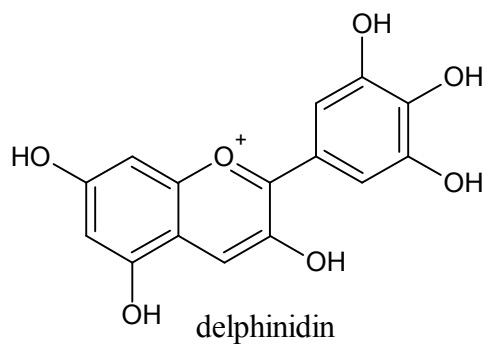
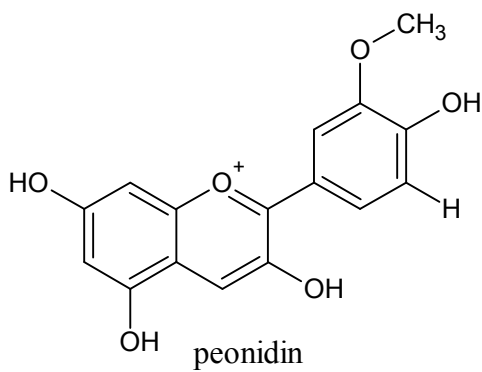
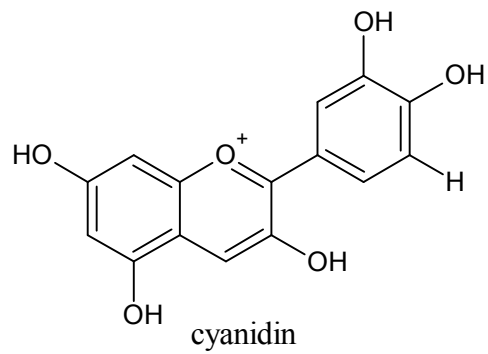
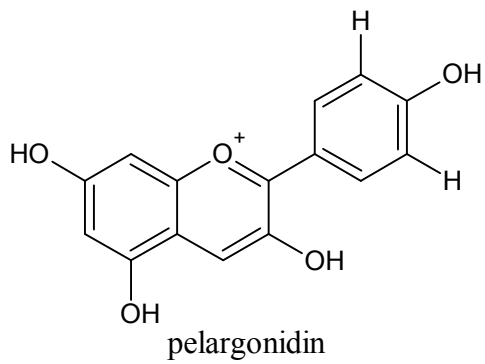
Obr. 1 Základní struktura anthokyanidinu s číslováním

Nejběžněji se v anthokyaninech vyskytuje těchto 6 základních anthokyanidinů: cyanidin, delphinidin, pelargonidin, peonidin, petunidin a malvidin (Obr. 2). Celkem je již známo kolem 30 různých anthokyanidinů.¹

Sacharidovou složku anthokyaninů mohou tvořit jak monosacharidy, tak disacharidy i trisacharidy. Nejčastěji se vyskytujícím monosacharidem je glukosa, dále pak rhamnosa, galaktosa, xylosa a arabinosa, nejvzácnějším monosacharidem je glukuronová kyselina. Z disacharidů se v anthokyaninech nejčastěji vyskytují sophorosa, rutinosa, sambubiosa, lathyrosa, robinobiosa a další.¹

Sacharidy jsou na anthokyanidin navázány O-glykosidovou vazbou. Tuto vazbu nejčastěji najdeme na pozici 3 anthokyanidinu. Další možná glykosylace je na pozicích 5, 7, 3', nebo 5'. Velmi vzácně se vyskytují i anthokyaniny s glykosidovou vazbou na pozici 4', které byly identifikovány v červené cibuli (*Allium cepa*).³

Sacharidové části anthokyaninů bývají často acylovány organickými kyselinami. Mohou to být jak aromatické kyseliny (p-kumarová, kávová, ferulová, sinapová a 3,5-dihydroxykoičová kyselina), tak alifatické kyseliny (malonová, octová, jablečná, šťavelová, jantarová a vinná).¹

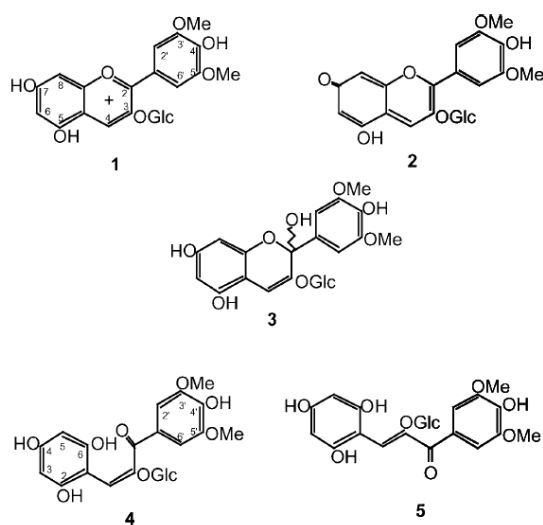


Obr. 2 Nejhojněji zastoupené anthokyanidiny v přírodě

2.1.3. Stabilita anthokyaninů

Stabilita anthokyaninů závisí na mnoha faktorech: hodnotě pH, teplotě, světle, přítomnosti volných cukrů, kyseliny askorbové nebo enzymů. Podrobněji pojednáme o vlivu pH a teploty.

Změny chemické struktury anthokyaninů v závislosti na hodnotě pH je jev, který byl v literatuře popsán mnoha autory.⁴⁻⁶ V silně kyselém prostředí ($\text{pH} < 2$) převažuje forma tzv. flavyliového kationtu, který zbarvuje roztok do červena. Flavyliový kation se po deprotonaci mění na chinoidní bázi. Ve slabě kyselém a neutrálním prostředí dochází k hydrataci flavyliového kationtu za vzniku hemiketalu (též hemiacetal nebo karbinolová báze). Hemiketaly jsou bezbarvé. Hemiketal tautomerizuje na chalcon otevřením kruhu, vznikají 2 izomery (E a Z). Kromě silně kyselých roztoků, ve kterých převažuje flavyliový kation, je chalconová forma konečným produktem, vyskytujícím se v mírně kyselém, neutrálním a zásaditém prostředí.⁶ Obrázek ukazuje možné strukturální formy malvidin-3-glukosidu (Obr. 3).⁷



Obr. 3 Změny ve struktuře malvidin-3-glukosidu: flavyliový kation (1), chinoidní báze (2), hemiketal (3), chalcon (4,5)

Potraviny s obsahem anthokyaninů bývají před konzumací často tepelně zpracovány. Použití vysokých teplot při zpracování je ale spojeno s degradací anthokyaninů. Rozsah degradace anthokyaninů závisí na podmínkách procesu tepelného zpracování (teplota, doba zahřívání, pH, přítomnost kovových iontů, přítomnost enzymů, atd.). Obecně lze říci, že se vzrůstající teplotou a dobou zahřívání klesá obsah anthokyaninů ve výsledném produktu.

Tepelná degradace anthokyaninů probíhá v několika krocích. Byly popsány dva různé mechanismy degradace. Buďto je prvním krokem otevření kruhu za vzniku glykosidu chalkonu, následně dojde k deglykosylaci chalkonu, který je dále přeměněn na konečný produkt. Druhý mechanismus popisuje jako první krok postupnou deglykosylaci až na anthokyanidin. Následuje rozštěpení anthokyanidinu na deriváty benzaldehydu, které mají původ v A-kruhu, a deriváty kyseliny benzoové, které vznikly z B-kruhu. Mechanismus degradace závisí především na hodnotě pH.^{8,9}

Ve dvou studiích byly porovnávány mechanismy tepelné degradace pelargonidinových a cyanidinových anthokyaninů při různých hodnotách pH. V prvním případě, při pH = 1, došlo nejprve k deglykosylaci anthokyaninů a poté ke štěpení aglykonu na konečné produkty. Cyanidin poskytl 2,4,6-trihydroxybenzaldehyd a 3,4-dihydroxybenzoovou kyselinu. Pelargonidin se degradoval na 2,4,6-trihydroxybenzaldehyd a 4-hydroxybenzoovou kyselinu.⁸ Ve druhém případě byl studován mechanismus degradace při pH = 3,5 u stejných anthokyaninů jako v první studii. Tady ale prvním krokem nebyla deglykosylace, nýbrž otevření kruhu za vzniku glykosylovaného chalkonu. Teprve poté došlo k deglykosylaci a vzniklý chalkon se rozštěpil na stejné produkty jako v první studii.⁹

Rychlost tepelné degradace anthokyaninů lze vyjádřit jako $t_{1/2}$, tedy poločas rozkladu. Na rychlost degradace má opět vliv pH. Se zvyšujícím se pH, hodnoty $t_{1/2}$ klesají, tedy rychlost degradace roste.¹⁰ Také struktura anthokyaninu má vliv na rychlost degradace. Záleží na typu aglykonu, druhu a množství navázaných cukrů a na případné acylaci. Bylo zjištěno, že acylované anthokyaniny se degradovaly pomaleji než neacylované, přičemž hodnoty $t_{1/2}$ u acylovaných anthokyaninů závisí na druhu navázané kyseliny.⁸

2.1.4. Barevnost anthokyaninů

Barevná paleta, kterou anthokyaniny v přírodě vytvářejí, je poměrně široká. Vznik velkého množství odstínů několika barev umožňuje jev nazývaný ko-pigmentace. Ko-pigmentace spočívá v interakci mezi anthokyaninem a ko-pigmentem za vzniku molekulového nebo komplexního asociátu. Důsledkem ko-pigmentace je změna nebo nárůst intenzity zabarvení. Předpokládá se, že ko-pigmentace je hlavním mechanismem stabilizace barvy v rostlinách.^{11,12}

Ko-pigmenty jsou takové systémy, které jsou bohaté na π -elektrony. Ty mohou asociovat s flavyliovým kationtem, který je na elektrony poměrně chudý. Taková asociace poskytuje ochranu před navázáním peroxidů nebo oxidu siřičitého na flavyliový kation. Ko-pigmenty jsou samy o sobě bezbarvé, ale při interakci s anthokyaniny dochází k bathochromnímu posunu, tedy posunu v absorpci světla směrem k vyšším vlnovým délkám. Ko-pigmenty mohou být flavonoidy, alkaloidy, aminokyseliny, organické kyseliny, nukleotidy, polysacharidy, kovy nebo další anthokyaniny.¹¹

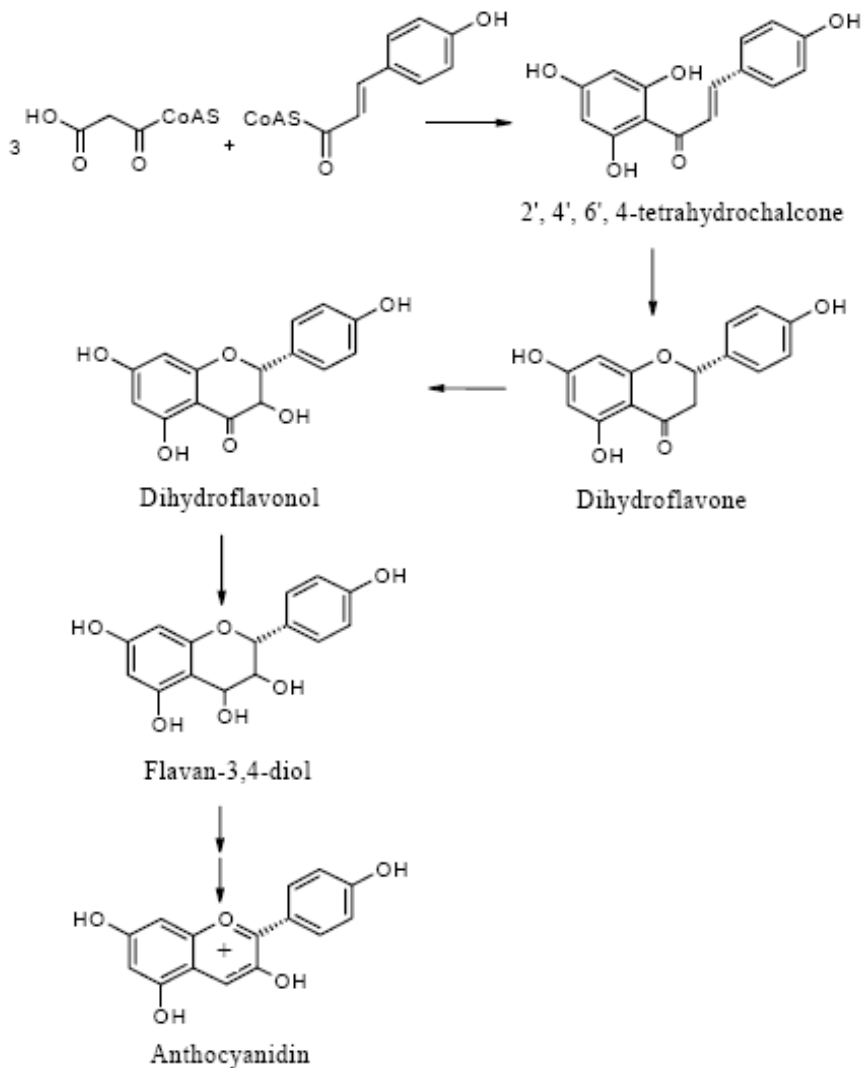
Ko-pigmentace může probíhat různými způsoby. V případě, že ko-pigment je další anthokyanin, jedná se o vlastní asociaci (self association) nebo o intramolekulární ko-pigmentaci. Pokud je ko-pigmentem kov, jde o komplexaci. Jestliže je ko-pigmentem sloučenina s volnými elektronovými páry, mluvíme o intermolekulární ko-pigmentaci.

Význam ko-pigmentace je patrný u skladování anthokyaninů ve vakuolách. Ve vakuolách buněk se pH pohybuje v rozmezí od 4 do 6, je zde tedy slabě kyselé prostředí. Anthokyaniny se v takovém prostředí vyskytují ve svých bezbarvých formách. Právě díky interakcím mezi anthokyaniny a ko-pigmenty se barevné formy anthokyaninů stabilizují a nedochází k hydrataci flavyliového kationtu za vzniku bezbarvých forem anthokyaninů.^{11,12}

2.1.5. Biosyntéza anthokyaninů

Biosyntéza anthokyaninů je složitý, několikastupňový proces (Obr. 4)¹³. Při syntéze se nejprve vytvářejí meziprodukty, které pak mohou být dále přeměněny na anthokyaniny nebo jiné flavonoidy. Prvním krokem biosyntézy je kondenzace tří molekul malonyl koenzymu A s kumaroyl koenzymem A. Reakci katalyzuje enzym chalkonsynthasa, vzniká první meziprodukt, kterým je 2',4',6',4-tetrahydroxychalkon. Enzym chalkonisomerasa katalyzuje isomeraci tetrahydroxychalkonu na flavanon (dihydroflavon). Flavanony jsou klíčovým

meziproduktem při syntéze flavonů, isoflavonů nebo dihydroflavonolů. Syntéza anthokyaninů dále pokračuje přeměnou flavanonu na dihydroflavonol enzymem flavanon-3-hydroxylasou. Následuje redukce dihydroflavonolu na flavan-3,4-diol, katalyzovaná enzymem dihydroflavonol-3-reduktasou. Flavan-3,4-diol je poté oxidován, dehydratován a nakonec glykosylován až na anthokyanin.¹⁴



Obr. 4 Biosyntéza anthokyanidinu (zjednodušeně)

2.1.6. Vliv anthokyaninů na lidské zdraví

Anthokyaniny mají na zdraví člověka velmi pozitivní vliv. V lidském těle se chovají jako antioxidanty, jejich antioxidační aktivita je dokonce vyšší než u vitamínu E, vitamínu C nebo beta karotenu.¹⁵ Pravidelná konzumace anthokyaninů snižuje riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění, jako je arterioskleróza, která vznikají ukládáním cholesterolu na vnitřních stěnách cév.¹⁶ Z mnoha výzkumů také vyplynulo, že anthokyaniny vykazují protirakovinné vlastnosti.¹⁷

Příkladem je studie, zaměřená na protirakovinné vlastnosti anthokyaninů, obsažených v malinách a ostružinách. Anthokyaniny byly extrahovány do hexanu a byl zkoumán jejich protirakovinný účinek vůči lidským nádorovým buňkám plic, tlustého střeva, prsu a žaludku. Extrakty anthokyaninů prokazatelně inhibovaly proliferaci nádorových buněk.¹⁸

Anthokyaniny mají příznivý vliv také na nervovou soustavu člověka. Mohou složit jako prevence proti Alzheimerově chorobě. U starších lidí dochází často k postupnému zhoršování paměti. Skupině starších lidí se zhoršenou pamětí byly po dobu 12 týdnů podávány doplňky stravy obsahující borůvkovou šťávu. Po 12 týdnech bylo pozorováno zlepšení některých paměťových funkcí, což dokazuje pozitivní působení anthokyaninů na mozkové neurony. Doplňky stravy s obsahem borůvek byly doporučeny jako prevence proti degradaci neuronů nebo ke zmírnění příznaků neurodegradace.¹⁹

Anthokyaniny jsou také účinné proti virovým chorobám. Tyto účinky byly zkoumány na skupině pacientů, kteří byli nakaženi virem chřipky typu A nebo B. Pacientům byl jako medikament podáván sirup z černého bezu, jehož účinnou složkou byly anthokyaniny cyanidin-3-glukosid a cyanidin-3-sambubiosid. Skupina pacientů, která tento lék užívala, se uzdravila dříve (3 – 4 dny) než pacienti, kterým bylo podáváno placebo (uzdravení nejdříve za 6 dní). Výzkum potvrdil účinnost anthokyaninů proti virům chřipky a poukazuje na tradici užívání sirupu z černého bezu v lidovém léčitelství.²⁰

2.1.7. Brusnice borůvka a její anthokyaniny

Brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus* L.) je známá rostlina z čeledi vřesovcovitých. Je to keřík, vysoký asi do 50 cm, s přímými, bohatě větvenými zelenými a hranatými větvemi. Listy jsou střídavé, vejčitě okrouhlé, špičaté, na okraji jemně zubaté, opadavé. Květy jsou nejčastěji narůžovělé. Kalich má 4 – 5 tupých laloků. Koruna je kulovitě baňkovitá,

s kratičkými zoubky. Plodem jsou černé, modře ožíněné a mnohosemenné bobule. Kvete od poloviny května do konce června. Plody zrají od července do srpna. Borůvka je rozšířená v Evropě, v severní Asii a v Severní Americe. U nás je hojná ve světlých, obzvláště jehličnatých lesích, na humózní, nepříliš suché půdě od nížin do alpského pásma.²¹

V lidovém léčitelství se používají především listy a plody borůvky, které obsahují velké množství tříslovin. V listech jsou také obsaženy glukokininy, které snižují hladinu cukru v krvi. Čaj ze sušených listů se proto používal jako lék při cukrovce. Výtažky z plodů se též užívaly při průjemových onemocněních, ke zpevnění cévních stěn a ke zlepšení ostrosti zraku.²²

Kromě lidového léčitelství potvrzuje pozitivní účinky borůvek i současná medicína. V plodech brusnice borůvky byl prokázán vysoký obsah fenolických sloučenin, jako jsou fenolické kyseliny (deriváty kyseliny benzoové a skořicové), třísloviny, stilbeny a flavonoidy (anthokyaniny, flavonoly a flavanoly). Dále obsahují menší množství karotenoidů a vitamínu C. Tyto sloučeniny jsou známé svými skvělými antioxidačními vlastnostmi. Anthokyaniny obsažené v borůvkách mají pozitivní vliv na oběhovou soustavu, kupříkladu zlepšují prokrvení oční bulvy a umožňují lepší vidění za šera a ve tmě. Konzumace borůvek je proto velmi doporučovaná.²³

Identifikací jednotlivých anthokyaninů v plodech borůvky se zabývalo mnoho autorů.²⁴⁻²⁷ Obecně lze říci, že anthokyaniny vyskytující se v borůvkách jsou neacylované monoglykosidy. Z šesti běžně se vyskytujících anthokyanidinů se v borůvkách nenachází pouze pelargonidin. Konkrétně byly identifikovány tyto anthokyaniny: delphinidin-3-glukosid, delphinidin-3-galaktosid, delphinidin-3-arabinosid, cyanidin-3-glukosid, cyanidin-3-galaktosid, cyanidin-3-arabinosid, peonidin-3-glukosid, peonidin-3-galaktosid, peonidin-3-arabinosid, petunidin-3-glukosid, petunidin-3-galaktosid, petunidin-3-arabinosid, malvidin-3-glukosid, malvidin-3-galaktosid a malvidin-3-arabinosid. Doposud bylo identifikováno těchto 15 anthokyaninů, nicméně výskyt a množství jednotlivých anthokyaninů se může lišit v závislosti na odrůdě borůvek. Porovnáním borůvek s ostatním drobným ovocem můžeme konstatovat, že borůvky mají velmi široký anthokyaninový profil.

2.1.8. Bez černý a jeho anthokyaniny

Bez černý (*Sambucus nigra L.*) je keř nebo strom z čeledi bezovitých. Dorůstá výšky až 6 m. Ve kmenech a větvích se uvnitř nachází silná, bílá dřevina. Kůra mladých větvíček je

zelená, s četnými bradavičkami vzdušných otvorů. Stará kůra je rozpukaná, hnědavě sivá. Listy jsou lichozpeřené, oválné nebo vejčité, na okraji ostře pilovité, na rubu hustě pokryté hvězdicovitými chlupy. Drobné pětipaprsčité žlutobílé květy tvoří ploché, bohaté chocholíkaté vrcholíky. Kalich je zelený, trubkovitý. Kvete od začátku května do poloviny června. Plody jsou kulovité bobule (peckovičky) až 6 mm velké a v době zralosti černé. Jejich šťáva má krvavě červenou barvu. Bez černý se vyskytuje v Evropě a Přední Asii. U nás je velmi častým druhem od nížin až do podhorského stupně. Často roste u plotů, na rumištích, v lesích, hájích a křovinách.²¹

Květy bezu obsahují glykosidy, silice a třísloviny. Odvar z květů se používá ke snížení horečky, podporuje pocení, podává se při nachlazení k uvolnění dýchacích cest. Plody obsahují silice, barviva, vitaminy A a C. Plody černého bezu jsou velice účinné při bolestivých zánětech nervů (trojklaný nerv).²²

Vědecké studie také potvrzují pozitivní účinky černého bezu na zdraví člověka. V plodech černého bezu bylo nalezeno velké množství flavonoidů, především anthokyaninů, dále vitaminy B₂ a B₆, vitamin C, kyselina listová, beta karoten, biotin a nikotinamid. Výsledky mnoha studií dokládají antioxidační a antivirové vlastnosti černého bezu (je velmi účinný při chřipkových onemocněních), pravděpodobný je i protirakovinný účinek.²⁸

Anthokyaniny obsažené v plodech černého bezu se od anthokyaninů v borůvkách výrazně liší. Především, všechny identifikované anthokyaniny v černém bezu byly deriváty cyanidinu, žádné další anthokyanidiny nebyly identifikovány.²⁹⁻³¹ Dále pak anthokyaniny neobsahují pouze monosacharidy, ale i disacharidy (sambubiosa). Autoři udávají přítomnost cyanidin-3-sambubiosidu, cyanidin-3-glukosidu a cyanidin-3-sambubiosid-5-glukosidu. Někteří autoři také identifikovali malé množství cyanidin-3,5-diglukosidu.³¹

2.1.9. Anthokyaniny v džemech a sirupech

V lidské stravě se s tepelně zpracovaným ovocem setkáme především ve formě džemů, marmelád, kompotů a sirupů. Jelikož při procesech tepelného zpracování ovoce dochází k degradaci anthokyaninů, není konzumace těchto výrobků v porovnání s čerstvým ovocem už tak výhodná. Proto je třeba hledat takové podmínky zpracování ovoce, při kterých by zůstalo zachováno co největší množství anthokyaninů.

Obsah anthokyaninů v připraveném džemu závisí na druhu a odrůdě použitého ovoce. Byly porovnávány džemy, připravené za stejných podmínek z malin, švestek a višni. Nejprve byl proměřen obsah anthokyaninů v čerstvém ovoci. Nejvyšší obsah byl naměřen u višni (odrůda Kroeker), nejnižší u švestek (odrůda Methley). Poté byl z ovoce připraven džem. Ve výsledném produktu byl pak proměřen obsah anthokyaninů. Překvapivě, nejvíce anthokyaninů obsahoval malinový džem, u něhož došlo k degradaci pouze 11 % z celkového množství anthokyaninů, ve srovnání se švestkovým džemem (odrůda Balaton), u něhož degradovalo 79 % anthokyaninů. Je zřejmé, že různé druhy anthokyaninů vykazují různou stabilitu vůči teplotě.³²

Velmi zajímavý je vliv cukru na stabilitu anthokyaninů při přípravě džemu. Na tento problém se zaměřila nedávná studie, která zkoumala rozdíly v degradaci anthokyaninů v přítomnosti cukru a bez přítomnosti cukru. Byly připraveny dva rozdílné vzorky. Prvním vzorkem byly rozmačkané borůvky, k nimž byla přidána voda. Druhý vzorek byly borůvky, k nimž byl přidán cukr, pro vytvoření džemu. Tyto vzorky byly zahřívány po dobu 15, 20 a 25 minut. Následně byla provedena extrakce a stanovení anthokyaninů u všech vzorků. Výsledky ukazují, že u vzorků, které byly zahřívány 15 a 20 minut, měla přítomnost cukru pozitivní vliv, tedy degradace anthokyaninů byla nižší, než u vzorku bez přítomnosti cukru. Vzorky, které byly zahřívány 25 minut, však vykazují opačný efekt, tedy přítomnost cukru způsobila zvýšenou degradaci anthokyaninů oproti vzorkům bez cukru. Při zahřívání po dobu 25 minut došlo k zahuštění džemu a tím i zkoncentrování cukru až na hodnotu 80 g cukru/100 g džemu. Lze tedy vyvodit závěr, že čím je obsahu cukru v džemu vyšší, tím jsou anthokyaniny více náchylné k degradaci.³³

Podobná studie se zaměřila na stanovení anthokyaninů v klasickém džemu a v džemu bez přidaného cukru. Anthokyaniny byly stanovovány ihned po přípravě džemů a pak v průběhu skladování po dobu 6 měsíců. Po zhotovení džemu bylo množství anthokyaninů v obou vzorcích velmi podobné. V průběhu skladování pak docházelo k postupné degradaci anthokyaninů u obou druhů džemů, ale džem s přidaným cukrem vykazoval větší úbytky v obsahu anthokyaninů než džem bez přidaného cukru. I v tomto případě byl prokázán negativní vliv cukru na stabilitu anthokyaninů.³⁴

Podmínky skladování tepelně zpracovaného ovoce mají na stabilitu anthokyaninů významný vliv. Zásadní jsou především teplota při skladování a doba skladování. Malinový

džem byl skladován po dobu 6 měsíců při teplotách 20°C, 30°C a 37°C. Při teplotě 30°C a 37°C došlo k vysokým poklesům obsahu anthokyaninů již během prvního měsíce. Při teplotě 20°C docházelo během prvních 3 měsíců k rovnoměrnému poklesu v obsahu anthokyaninů.³⁵ Vliv teploty skladování na degradaci anthokyaninů dokládá také studie borůvkových extraktů. Extrakty byly skladovány po dobu 60 dnů při teplotách -20°C, 6°C, 23°C a 35°C. Nejvíce anthokyaninů (78 %) zůstalo zachováno u vzorku, který byl skladován při -20°C, kdežto vzorek, skladovaný při 35°C, obsahoval 50 % původního množství anthokyaninů.³⁶ Lze vyvodit závěr, že pro zachování co největšího množství anthokyaninů by měly být ovocné produkty skladovány při nízkých teplotách a co nejkratší dobu.

U vlastnoručně vyrobených džemů a sirupů si můžeme zajistit optimální podmínky skladování. Problém ale nastává u komerčně dostupných výrobků. Zákazník není schopen zjistit, jak dlouho a při jakých podmínkách byl výrobek skladován. Proto se může stát, že zakoupený výrobek je z hlediska obsahu anthokyaninů bezcenný. Studie, provedená na 5 různých komerčně dostupných jahodových džemech, předkládá pro spotřebitele velmi nepříznivé výsledky. U tří z těchto džemů nebyly anthokyaniny vůbec detekovány, u dvou vzorků byly nalezeny jen v malém množství.³⁷

2.2. Metody studia anthokyaninů

2.2.1. Princip metody UPLC/ESI-MS

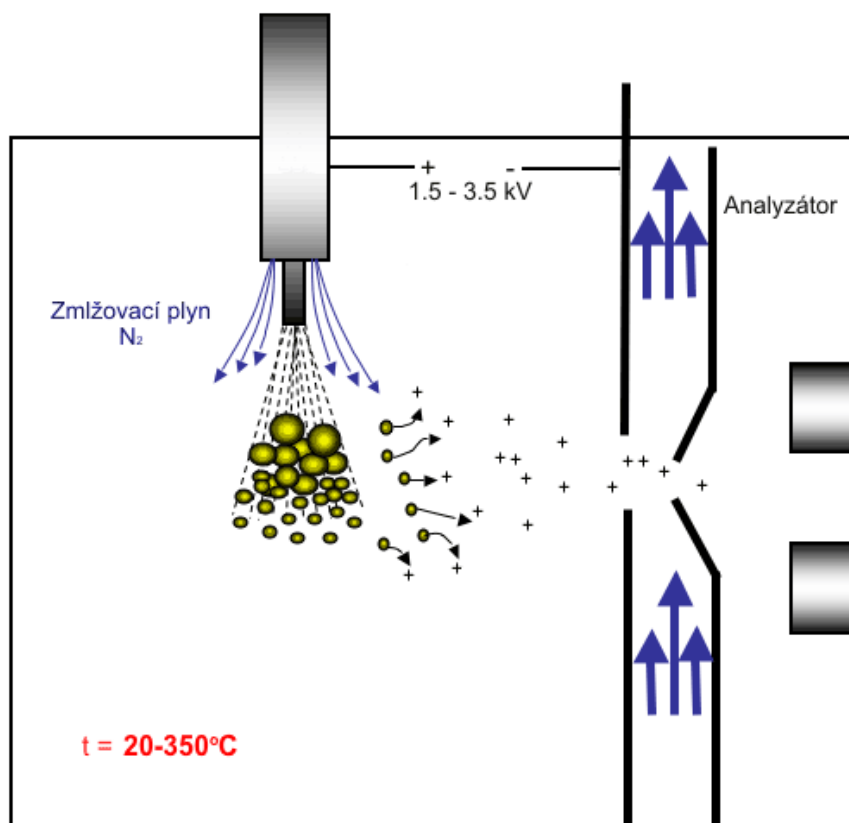
Chromatografie je jedna z nejpoužívanějších separačních metod. Spočívá v dělení směsi látek mezi dvěma fázemi – stacionární a mobilní. Mechanismus dělení spočívá v rozdílné retenci složek na stacionární fázi. Málo zadržované látky jsou mobilní fází unášeny rychleji než složky, které se na stacionární fázi poutají silněji, a tím se opožďují. U vysokoúčinných kapalinových chromatografických technik (HPLC, UHPLC) je mobilní fází kapalina, která prochází kolonou, naplněnou stacionární fází, pomocí vysokého tlaku.³⁸

HPLC a UPLC jsou dvě podobné chromatografické techniky. Rozdíl mezi nimi spočívá především ve velikosti částic stacionární fáze. Velikost částic stacionární fáze je u UPLC menší (1,7 μm) než u HPLC. Čím jsou částice menší, tím větší zpětný tlak na koloně vzniká. Proto je třeba mít k UPLC výkonnější čerpadlo, aby byl zajištěn plynulý průchod mobilní fází přes kolonu (pracuje se s tlaky kolem 100 MPa). Nicméně potřeba speciálního

technického vybavení (čerpadlo, kolona) je asi jedinou nevýhodou. Výhody, které UPLC přináší, jsou: kratší doba analýzy, menší spotřeba mobilní fáze, zvýšení účinnosti (větší počet teoretických pater), lepší rozlišení, zvýšení citlivosti.^{39,40}

V současnosti patří mezi nejběžnější kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi (RP), která se vyznačuje použitím nepolární stacionární fáze a polární fáze mobilní. Využívá se rozdělení mezi tyto dvě fáze na základě různé rozpustnosti. Kapalná stacionární fáze je fyzikálně nebo chemicky navázána na nosiči. Nosičem bývá obvykle silikagel, jehož modifikace se provádí navázáním funkčních skupin (-C₁₈, -C₈, -CH₃, -NH₂, -CN,...). Mobilní fázi bývají vodné roztoky methanolu, acetonitrilu, dioxanu, diethyletheru a tetrahydrofuranu. Analyt je na stacionární fázi většinou poután jen slabšími disperzními silami, rozhodující je polarita mobilní fáze.³⁸

Hmotnostní spektrometrie je metoda určování hmotností atomů, molekul a jejich částí, po jejich převedení na ionty. Klíčovou operací je tedy ionizace vzorku. Pro kombinaci technik LC a MS se ionizace často provádí elektrosprejem. Kapalná fáze je přivedena do kovové kapiláry, na níž je vloženo napětí (obvykle jednotky kilovoltů). Z konce kapiláry jsou pak sprejovány velmi drobné kapičky kapalné fáze, které mají vysokou hustotu povrchového náboje. Proud horkého inertního plynu (obvykle dusíku) kapičky vysušuje, čímž dochází ke zvyšování hustoty povrchového náboje, rozpadu na stále menší kapičky, až nakonec vznikne plynný ion, který je veden dále do hmotnostního analyzátoru.



Obr. 5 Elektrosprej

V hmotnostním analyzátoru dojde k rozdělení iontů podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Hmotnostním analyzátozem může být kvadrupólový analyzátor, průletový analyzátor (TOF), iontová past, iontová cyklotronová rezonance a další. Rozdělené ionty pak putují k detektoru. Výsledkem je hmotnostní spektrum, z něhož můžeme vyčíst informace o kvalitě, kvantitě, struktuře a izotopovém zastoupení analytů.⁴¹

2.2.2. Metody analýzy anthokyaninů

Jedna z nejjednodušších a nejlevnějších metod pro studium anthokyaninů je chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Při použití této metody se obvykle postupovalo tak, že se anthokyaniny nejprve podrobily hydrolýze, a pak se jednotlivé složky (aglykokony, cukry) identifikovaly metodou TLC pomocí standardů. V dnešní době se TLC pro studium anthokyaninů nepoužívá samostatně, ale spolu s dalšími analytickými technikami (HPLC, MS, NMR).^{27,42}

Mezi poněkud méně standardní instrumentální techniky, které lze použít pro analýze anthokyaninů patří kapilární elektroforéza (CE). Tato separační metoda je vhodná pro

sloučeniny s nábojem, jako jsou například anthokyaniny. Autoři uvádějí dosažení lepší separace, kratší dobu analýzy a menší spotřebu vzorku než u HPLC. Experiment se obvykle provádí jako kapilární zónová elektroforéza s detektorem diodového pole (CZE-DAD). Kapilára z křemenného skla může být naplněna kyselým elektrolytem (anthokyaniny se vyskytují ve formě flavyliového kationtu) nebo bazickým elektrolytem (anthokyaniny jsou ve formě chinoidní báze). Anthokyaniny se separují podle náboje a podle poměru náboje a velikosti. Spojením kapilární elektroforézy a hmotnostní spektrometrie (CE/MS) vzniká velmi vhodná technika pro studium anthokyaninů, která je alternativou k HPLC/MS.⁴³ Použití CE/MS pro analýzu anthokyaninů bylo popsáno mnoha autory, například při identifikaci anthokyaninů z ibišku súdánského (*Hibiscus sabdariffa* L.)⁴⁴ nebo při studiu anthokyaninů ve vínech.⁴⁵

Pro studium struktury anthokyaninů je nejlepším nástrojem nukleární magnetická rezonance (NMR). Tato technika je ale poměrně drahá, proto se nepoužívá pro rutinní práci, ale obvykle jen v případech, kdy je třeba objasnit nebo potvrdit strukturu anthokyaninu. Měření se realizuje jako H-1 NMR nebo C-13 NMR. Pro provedení měření se vyžaduje izolovaný a vysoce čistý vzorek anthokyaninu.⁴⁶

2.2.3. Využití LC/MS pro analýzu anthokyaninů

Chromatografie na reverzních fázích je nejběžnější metodou, používanou k separaci anthokyaninů.⁴⁷ Separace se provádí na C₁₈ kolonách (oktadecylovaný silikagel), někdy se používají také polystyrenové kolony. Mobilní fáze je směs vody a organického rozpouštědla (methanol nebo acetonitril), přičemž poměr vody a organické složky se v průběhu separace mění (separace s gradientovou elucí). Hodnota pH mobilní fáze je udržována pod 2, aby byly zajištěny optimální podmínky pro existenci flavyliového kationtu. K okyselení mobilní fáze se obvykle používá kyselina octová, mravenčí nebo trifluoroctová.

Pořadí výstupu jednotlivých anthokyaninů z kolony závisí především na jejich složení. Anthokyanidiny eluují v pořadí: delphinidin, cyanidin, petunidin, pelargonidin, peonidin, malvidin. Toto pořadí je určeno polaritou jednotlivých anthokyanidinů. Nejpolárnější delphinidin vychází z kolony jako první, nejméně polární malvidin jako poslední. Přítomnost cukrů zvyšuje retenci anthokyaninů, diglukosidy eluují před monoglykosidy. Acylace anthokyaninů se také podílí na zvýšení retence. Acylované anthokyaniny mají ve srovnání s neacylovanými anthokyaniny vyšší retenční časy.

K detekci se používá DAD (diode-array detector), absorbance anthokyaninů se obvykle měří při vlnové délce 520 – 546 nm, při níž nedochází k absorpci jiných polyfenolických sloučenin.⁴⁸⁻⁵⁰

Kromě výše uvedeného DAD detektoru je spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií již další rutinní metodou pro analýzu anthokyaninů. Tato metoda v sobě kombinuje separaci kapalinové chromatografie se selektivitou a citlivostí hmotnostního spektrometru. Hmotnostní spektrometrie nabízí množství různých způsobů ionizace vzorku. Pro studium anthokyaninů byly použity například ionizace elektrosprejem (ESI),⁵¹ ionizace za atmosférického tlaku (API),⁵² bombardování urychlenými atomy (FAB),⁵³ chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI),⁵⁴ ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI),⁵⁵ a další.

Jako iontový zdroj byl v této práci používán elektrosprej. Pro analýzu anthokyaninů je možné pracovat jak v pozitivním (ESI+), tak v negativním (ESI-) módu. Při práci v negativním módu je na kapiláru vloženo napětí záporné polarity. Mobilní fáze může mít mírně bazické pH, při kterém se anthokyaniny vyskytují ve formě nesoucí buď žádný a nebo záporný náboj (deprotonizace nestabilní fenolátové formy). Anthokyaniny jsou ale v alkalickém prostředí nestabilní a rozkládají se (viz kapitola Stabilita anthokyaninů) a proto se tato metodika běžně nepoužívá. V pozitivním módu je na kapiláru vloženo napětí kladné polarity. Mobilní fáze má silně kyselé pH (≤ 2), anthokyaniny jsou přítomny ve stabilní formě flavyliového kationtu. Jistou nevýhodou tohoto systému představuje právě využití agresivní, silně kyselé mobilní fáze, která má výrazné korozivní účinky. I přes tento nedostatek se v drtivé většině případů využívá této metodiky a to z důvodu mnohem vyšší citlivosti než u ESI-.

3. Experimentální část

3.1. Vzorky

3.1.1. Syrové plody

Plody brusnice borůvky byly posbírány z divoce rostoucích keřů v jehličnatých lesích Moravskoslezských Beskyd v srpnu 2010. Borůvky byly zbaveny hrubých nečistot (listy, větvičky) a část byla vložena do skleněných vzorkovnic. Po naplnění byly vzorkovnice až do doby analýzy skladovány ve zmraženém stavu. Zbytek nasbíraných plodů byl použit k výrobě marmelády a sirupu.

Plody bezu černého byly sesbírány z keřů planě rostoucích v lesích a na mezích v lokalitě Bruzovic u Frýdku-Místku. Plody byly zbaveny hrubých nečistot, byly odstraněny nezralé plody. Část nasbíraných plodů byla vložena do skleněných vzorkovnic. Po naplnění byly vzorkovnice až do doby analýzy skladovány ve zmraženém stavu. Zbytek nasbíraných plodů byl použit k výrobě marmelády a sirupu.

3.1.2. Marmelády

Jeden kilogram borůvek (bezu) byl rozmixován ručním mixérem na kaši. K rozmixovanému ovoci bylo přidáno 500 g přípravku Želírovací cukr úsporný 2:1 (vyrábí Labeta a.s., složení: cukr, guar, xanthan, pektin, kyselina askorbová, kyselina citronová, sorban draselný) a směs byla dobře promíchána. Směs byla přivedena k varu a vařila se po dobu pěti minut. Do vzniklé marmelády byly vmíchány 2 lžičky kyseliny citronové a marmeláda byla nalita do skleněných vzorkovnic. Po vychladnutí byly vzorkovnice uloženy do mrazničky, kde byly skladovány až do doby analýzy.

3.1.3. Sirupy

Jeden kilogram ovoce byl rozmixován ručním mixérem na kaši. Rozmixované ovoce se nechalo odležet v chladnu po dobu 48 hodin. Poté bylo ovoce vylisováno, k dalšímu postupu byla použita získaná šťáva. Šťáva byla zahřátá na teplotu 85 °C, odstavena ze zdroje tepla, do šťávy byl nasypán jeden kilogram cukru a směs byla intenzivně míchána až do úplného rozpuštění cukru. Roztok byl znovu zahřát na 85 °C, odstaven ze zdroje tepla a

vzniklý sirup byl po zchladnutí nalit do skleněných vzorkovnic. Vzorkovnice byly skladovány v mrazničce až do doby analýzy.

3.2. Chemikálie

Kyselina chlorovodíková, 35 %, p.a., LACH-NER, s.r.o.

Methanol, gradient grade, BioSolve B.V.

Deionizovaná voda, Lab Water Purification Systems, Millipore

Kyselina mravenčí, 98 %, p.a., SIGMA-ALDRICH

Kyselina trifluoroctová, 99 %, p.a., FLUKA

Acetonitril, gradient grade, MERK

Standardy anthokyaninů, CARL ROTH:

Malvidin-3-galaktosid (primulin)

Malvidin-3-glukosid (oenin)

Delphinidin-3-galaktosid

Cyanidin-3-galaktosid

3.3. Přístroje a vybavení

UPLC, Waters ACQUITY™ UPLC System (Milford, USA)

Kolona: Waters ACQUITY UPLC BEH C-18, 1,7 μm (2,1 x 50 mm)

Chromatografické podmínky měření: uvedeny v kapitole Optimalizace separace (kap. 4.1.)

Hybridní hmotnostní spektrometr Q-TOF Premier, Waters Corporation (Milford, USA)

Ionizační technika: ESI+ (Z-spray)

Podmínky měření na hmotnostním spektrometru:

Napětí na kapiláře: +3,2 kV

Teplota zdroje: 120°C

Teplota desolvatačního plynu: 150°C

Průtok desolvatačního plynu: 450 l/hod

Kolizní energie pro MS experiment: 5 eV

Kolizní energie pro MS/MS experiment: rampa 15-50 eV

SPE kolonky, styrene-divinylbenzene, Strata SDB-L, phenomenex, USA

Centrifuga, Denver Instrument, Německo

Ultrazvuková lázeň, Merci, s.r.o., Německo

Odparka, EVATERM, Česká republika

3.4. Úprava vzorků k analýze

Úprava sirupu spočívala v přečištění pomocí SPE. SPE kolonky byly nejprve aktivovány 3 ml 0,01 % (v/v) roztoku HCl v methanolu, poté promyty 3 ml 0,01 % (v/v) roztoku HCl ve vodě. Na kolonku bylo naneseno 250 µl sirupu. Kolonka byla promyta 3 ml 0,01 % roztoku HCl ve vodě, čímž byly odstraněny balastní látky. Anthokyaniny byly z kolonky vymyty 3 ml 0,01 % roztoku HCl v metanolu (byl získán objem 2,9 ml). Ze získaného extraktu anthokyaninů bylo odebráno 250 µl a tento podíl byl v odparce odpařen do sucha.

K analýze plodů byl odebrán asi 1 g plodu borůvek (bezu), který byl přesně zvážen. Plody byly rozetřeny v třecí misce a zality 5 ml extrakčního činidla (70 % methanolu, 30 % vody a 1 % trifluoroctové kyseliny; v/v/v)⁵⁶. Extrakční směs byla vložena na 10 minut do ultrazvukové lázně. Extrakt byl odebrán a tuhý podíl byl znovu extrahován 5 ml extrakčního činidla a vložena na 10 minut do ultrazvukové lázně. První a druhý extrakt byly smíchány a vloženy na 5 minut do centrifugy (1200 rpm). Po centrifugaci bylo odebráno 250 µl supernatantu, který byl odpařen téměř do sucha. 250 µl supernatantu bylo dále odebráno pro přečištění pomocí SPE, a to za stejných podmínek, jaké jsou popsány u přečištění sirupu. Celý objem extraktu získaného po SPE byl odpařen do sucha.

K přesně zváženému vzorku marmelády (asi 1 g) bylo přidáno 15 ml extrakčního činidla (70 % methanolu, 30 % vody a 1 % trifluoroctové kyseliny; v/v/v). Extrakční směs byla vložena na 10 minut do ultrazvukové lázně, přičemž došlo k úplnému rozpuštění

marmelády v roztoku činidla. Roztok byl vložen na 5 minut do centrifugy (1200 rpm). Ze supernatantu bylo odebráno 250 μ l a odpařeno do sucha. 250 μ l supernatantu bylo dále odebráno pro přečištění pomocí SPE, a to za stejných podmínek, jaké jsou popsány u přečištění sirupu. Celý objem extraktu získaného po SPE byl odpařen do sucha.

Před samotnou LC/MS analýzou byly vysušené extrakty rozpuštěny v 250 μ l mobilní fáze (5 % roztok kyseliny mravenčí v acetonitrilu; v/v).

3.5. Příprava standardů

Standardy anthokyaninů (malvidin-3-galaktosid, cyanidin-3-galaktosid a delphinidin-3-galaktosid) byly přesně naváženy a naředěny roztokem 0,12 % trifluoroctové kyseliny, 5 % acetonitrilu ve vodě (v/v/v) na výsledné koncentrace roztoků anthokyaninu 1 mg/ml. Poté byla připravena směs těchto tří anthokyaninů tak, aby koncentrace každého anthokyaninu ve směsi byla 25 mg/l. Tato směs byla použita k testování mobilních fází.

Z roztoků anthokyaninů o koncentraci 1 mg/l byly připraveny kalibrační roztoky jednotlivých anthokyaninů. Kalibrační roztoky měly koncentraci 5 mg/l; 40 mg/l; 70 mg/l; 100 mg/l.

3.6. Příprava mobilních fází

Testování byly podrobeny dvě různé mobilní fáze: mobilní fáze obsahující kyselinu mravenčí a mobilní fáze obsahující kyselinu trifluoroctovou.

Byly připraveny mobilní fáze A a B s obsahem kyseliny trifluoroctové. Byla připravena mobilní fáze A o složení 0,12 % TFA, 5 % ACN ve vodě. Následně byla připravena mobilní fáze B o složení 0,12 % TFA v acetonitrilu.

Byly připraveny mobilní fáze A a B s obsahem kyseliny mravenčí. Byla připravena mobilní fáze A o složení 5 % FA ve vodě (v/v). Následně byla připravena mobilní fáze B o složení 5 % FA v acetonitrilu (v/v).

3.7. Sběr a vyhodnocování dat

Naměřená data byla interpretována s využitím programu MassLynx 4.1., Waters Software, USA.

4. Výsledky a diskuse

4.1. Optimalizace separace

Pro optimalizaci metodiky analýzy anthokyaninových barviv jsem vycházela z již používaného postupu využívajícího kyselinu trifluoroctovou jako ion-párovací činidlo, které zvyšuje retenci anthokyaninů na koloně.

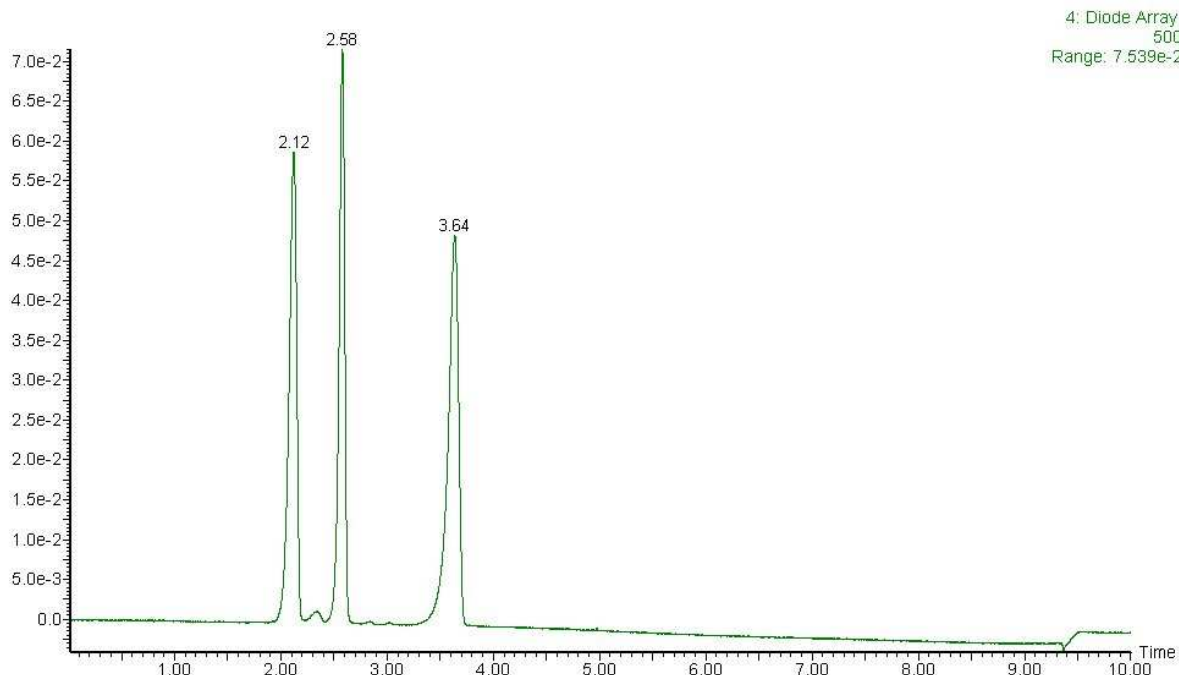
Tato metodika byla testována na modelové směsi tří anthokyaninů: cyanidin-3-galaktosidu, delphinidin-3-galaktosidu a malvidin-3-galaktosidu. Na chromatografickém záznamu byla sledována především účinnost separace, vyjádřená hodnotou rozlišení, dále kapacitní faktor a retenční časy anthokyaninů. Tabulka (Tab. I) shrnuje profil gradientu a parametry píků. Obrázek (Obr. 6) ukazuje chromatogram modelové směsi za těchto podmínek.

Tab. I Profil gradientu + parametry píků na chromatogramu

čas (min)	mob. fáze A (%)	mob. fáze B (%)	anthokyanin	ret. čas (min)	rozlišení	kapacitní f.
0	100	0	Dp-3-gal	2,12		7,56
4	90	10			2,88	
7	55	45	Cn-3-gal	2,58		9,40
9	10	90			4,98	
9,1	100	0	Mv-3-gal	3,64		13,68
10	100	0				

Rozlišení bylo spočítáno podle vzorce: $R_{1,2} = \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{0,5 \times (Y_1 + Y_2)}$, kde $t_{R,1}$ a $t_{R,2}$ jsou retenční časy dvou sousedních píků; Y_1 a Y_2 jsou šířky píků na úrovni nulové linie.

Kapacitní faktor byl spočítán podle vzorce: $k_i = \frac{t_{R,i} - t_M}{t_M}$, kde $t_{R,i}$ je retenční čas i -té složky; t_M je mrtvý čas.



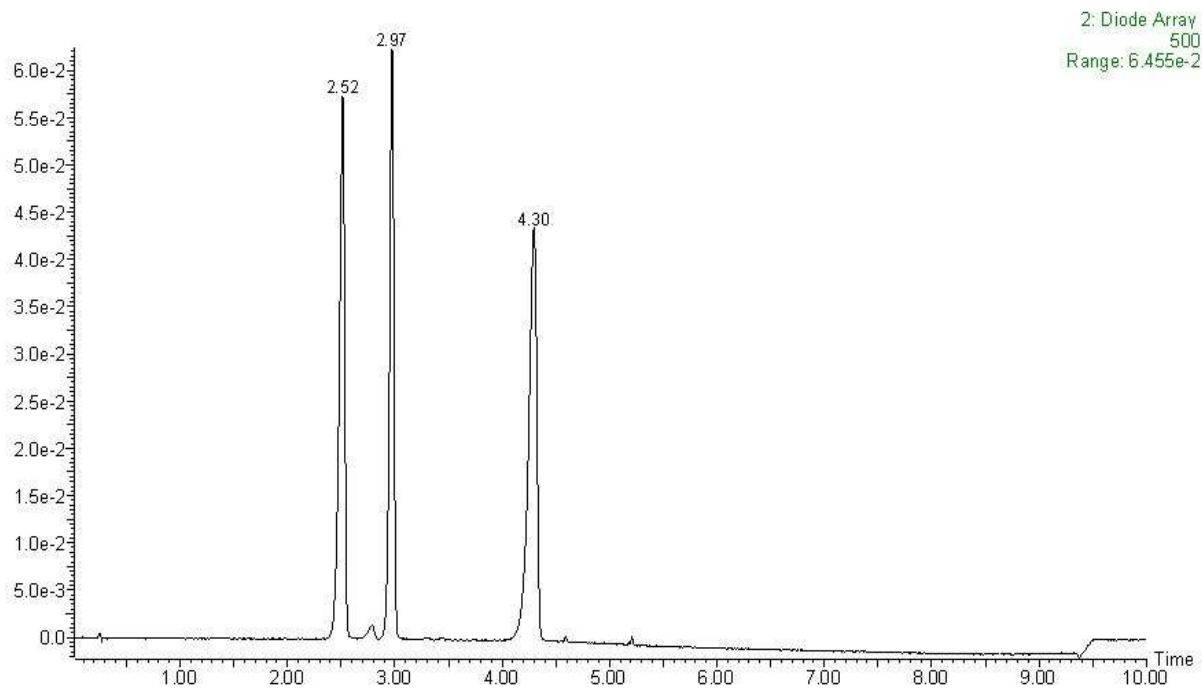
Obr. 6 Chromatogram modelové směsi, mobilní fáze s obsahem TFA

Výsledky ukazují, že separace standardů v tomto systému je dostačující, nicméně bylo nezbytné prozkoumat riziko suprese ionizace v iontovém zdroji tvorbou iontových párů. Z tohoto důvodu byla na místo kyseliny trifluoroctové testována kyselina mravenčí.

Po provedení několika experimentů s FA byly nalezeny optimální podmínky gradientové eluce a teploty kolony. Tabulka (Tab II) shrnuje profil gradientu a parametry píků. Tento gradientový profil byl vyhodnocen jako vyhovující pro analýzu anthokyaninů a byl používán při všech dalších analýzách anthokyaninů v této práci. Obrázek (Obr. 7) představuje chromatogram modelové směsi při optimálních podmínkách.

Tab. II Optimální profil gradientu + parametry píků na chromatogramu

čas (min)	mob. fáze A (%)	mob. fáze B (%)	anthokyanin	ret. čas (min)	rozlišení	kapacitní f.
0	100	0	Dp-3-gal	2,52		9,08
4	90	10			5,29	
7	55	45	Cn-3-gal	2,97		10,88
9	10	90			11,82	
9,1	100	0	Mv-3-gal	4,30		16,20
10	100	0				



Obr. 7 Chromatogram modelové směsi při optimálním profilu gradientu, mobilní fáze s FA

Dále byly prováděny testy s různou teplotou kolony. Z testovaných teplot 30°C, 35°C, 40°C a 45°C byla vybrána z důvodu menšího zpětného tlaku na koloně jako optimální teplota 35°C, při které následně probíhaly všechny další analýzy prováděné v této práci. Obecně teplota kolony měla na separaci anthokyaninů zanedbatelný efekt, pouze se zvyšující se teplotou docházelo ke snižování retenčních časů anthokyaninů.

Zde jsou shrnuté chromatografické podmínky zoptimalizované metody pro analýzu anthokyaninů:

Složení mobilní fáze:

mob. fáze. A: 5% FA ve vodě;

mob. fáze B: 5% FA v acetonitrilu

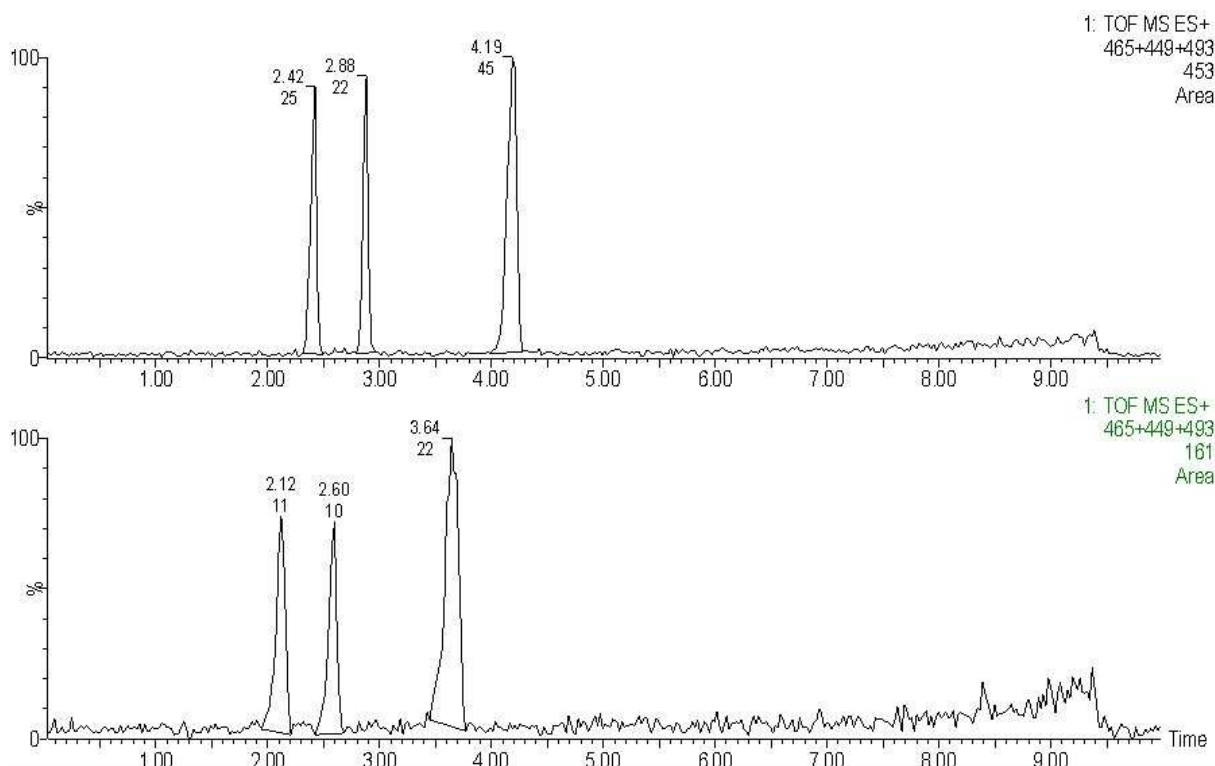
Profil gradientu: viz Tab. II

Teplota kolony: 35°C

Průtok: 0,6 ml/min

Takto zoptimalizovaná metoda mohla být porovnána s metodou až doposud používanou při analýze anthokyaninů – tedy metodou, která používá mobilní fázi s kyselinou trifluoroctovou.

Srovnáním těchto dvou různých mobilních fází byl potvrzen předpoklad, že použitím mobilní fáze s kyselinou mravenčí se dosahuje lepších výsledků, než u mobilní fáze s kyselinou trifluoroctovou. Dva chromatogramy (Obr. 8) ukazují píky delphinidin-3-galaktosidu, cyanidin-3-galaktosidu a malvidin-3-galaktosidu. Ze záznamu je vidět zlepšení chromatografického rozlišení píků a z hmotnostně-spektrického hlediska též zvýšení odstupu signál/šum.



Obr. 8 Chromatogramy směsi delphinidin-3-galaktosidu, cyanidin-3-galaktosidu a malvidin-3-galaktosidu při použití mobilní fáze s FA (horní spektrum) a mobilní fáze s TFA (spodní spektrum)

V tabulce (Tab. III) je vyhodnocen rozdíl ploch píků při použití mobilní fáze s kyselinou mravenčí oproti mobilní fázi s kyselinou trifluoroctovou. Z tabulek vyplývá, že při použití mobilní fáze s FA došlo k průměrnému zvětšení plochy píku o 135,5 % ve srovnání s mobilní fází s TFA. Největší zvětšení bylo zjištěno u delphinidin-3-galaktosidu, nejmenší u cyanidin-3-galaktosidu.

Tab. III Nárůst hodnot ploch píků při použití mobilní fáze s FA

FA			
	zvětšení plochy píku	zvětšení v %	prům. zvětšení (%)
delphinidin-3-galaktosid	15,8	158,3	135,5
cyanidin-3-galaktosid	12,8	122,4	
malvidin-3-galaktosid	27,6	125,7	

Získané výsledky naznačují, že pro použitý systém (kolona BEH C-18) je vhodnější používat mobilní fázi s přidavkem kyseliny mravenčí. Bylo zjištěno, že přidavek kyseliny trifluoroctové sice také umožňuje kvalitní separaci na reverzní fázi odolné proti nízkému pH, nicméně hodnoty rozlišení a kapacitního faktoru jsou ve všech případech nižší.

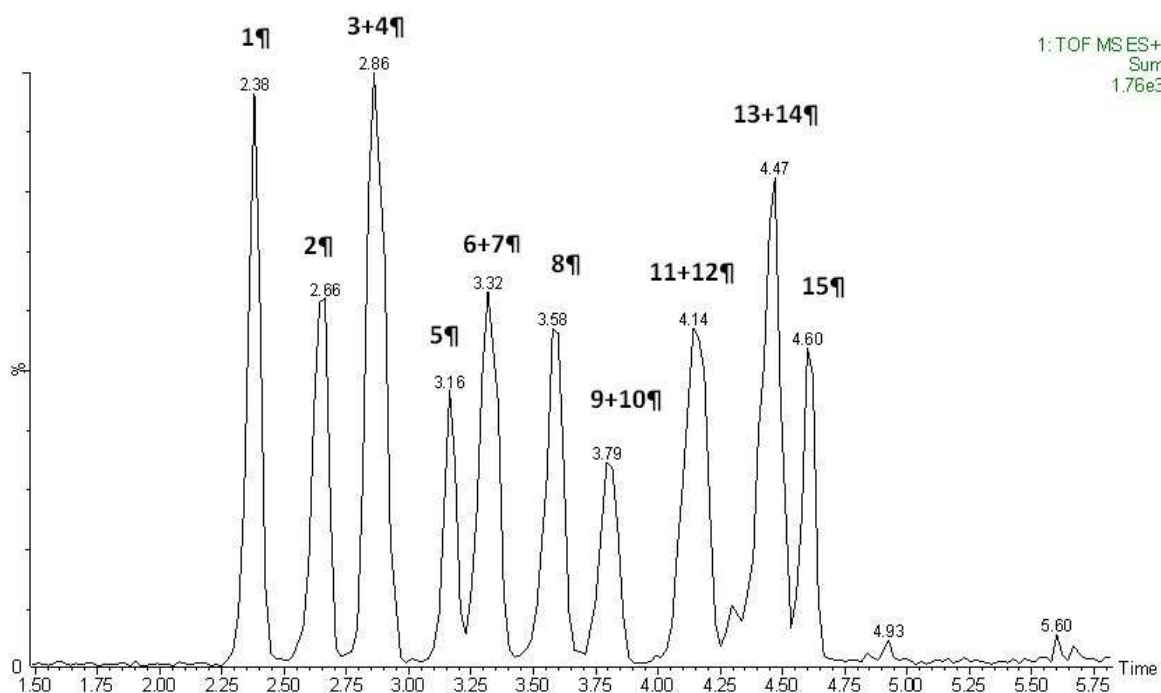
Zároveň bylo pozorováno, že metoda s TFA měla v průměru o 14 % nižší retenci analytů. Tento jev svědčí o tom, že TFA v průběhu separačního děje netvoří efektivní iontové páry, nicméně její přítomnost v iontovém zdroji významně potlačuje ionizaci.

4.2. Kvalitativní vyhodnocení

Získané extrakty z plodů, marmelád a sirupů byly proměřeny s využitím optimalizované metodiky UPLC/MS. Jednotlivé anthokyaniny byly identifikovány na základě retenčních časů, produktů cílené fragmentace izolovaných iontů a měření přesných hmotností.

4.2.1. Borůvky

Chromatogram (Obr. 9) extraktu plodů borůvek ukazuje na záznamu z DAD při 500 nm 10 výrazných píků. Z tvaru některých píků je patrné, že docházelo ke koeluci anthokyaninů s blízkými retenčními časy. Prozkoumáním hmotnostního spektra bylo nalezeno celkem 15 anthokyaninů (Tab. IV).



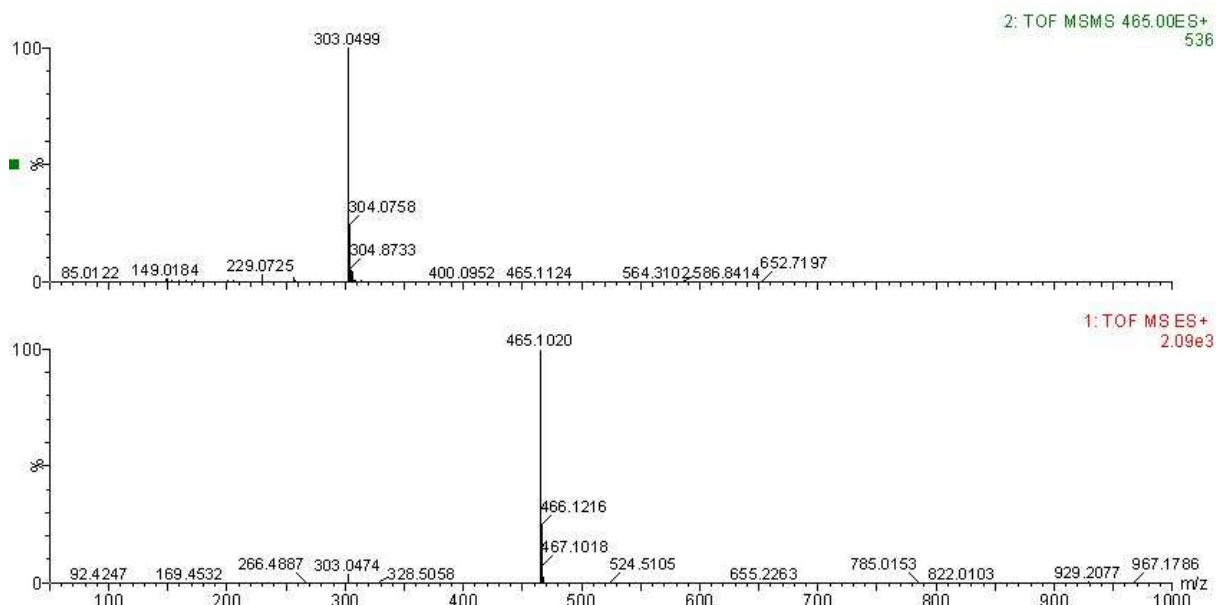
Obr. 9 Chromatogram rekonstruovaný pro hmoty nalezených anthokyaninů

Tab. IV Anthokyaniny identifikované v extraktu z borůvek

pík č.	ret. čas (min)	m/z v MS spektru	m/z v MS/MS spektru (100%)	anthokyanin	vypočtená molekul. hmotnost	ppm	element. složení
1	2,35	465,1016	303	Dp-3-gal	465,1033	3,7	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂
2	2,62	465,1005	303	Dp-3-glu	465,1033	6	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂
3	2,82	449,1042	287	Cn-3-gal	449,1084	9,4	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁
4	2,86	435,0916	303	Dp-3-ara (xyl?)	435,0927	2,5	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₁
5	3,14	449,1086	287	Cn-3-glu	449,1084	0,4	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁
6	3,3	479,1197	317	Pt-3-gal	479,1190	1,5	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₂
7	3,3	419,0959	287	Cn-3-ara (xyl?)	419,0978	4,5	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₀
8	3,56	479,1175	317	Pt-3-glu	479,1190	3,1	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₂
9	3,78	463,1233	301	Pn-3-gal	463,1240	1,5	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁
10	3,78	449,1100	317	Pt-3-ara (xyl?)	449,1084	3,6	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁
11	4,1	463,1220	301	Pn-3-glu	463,1240	4,3	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁
12	4,1	493,1353	331	Mv-3-gal	493,1346	1,4	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂
13	4,28	433,1145	301	Pn-3-ara (xyl?)	433,1135	2,3	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀
14	4,43	493,1339	331	Mv-3-glu	493,1346	1,4	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂
15	4,58	463,1230	331	Mv-3-ara (xyl?)	463,1240	2,2	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁

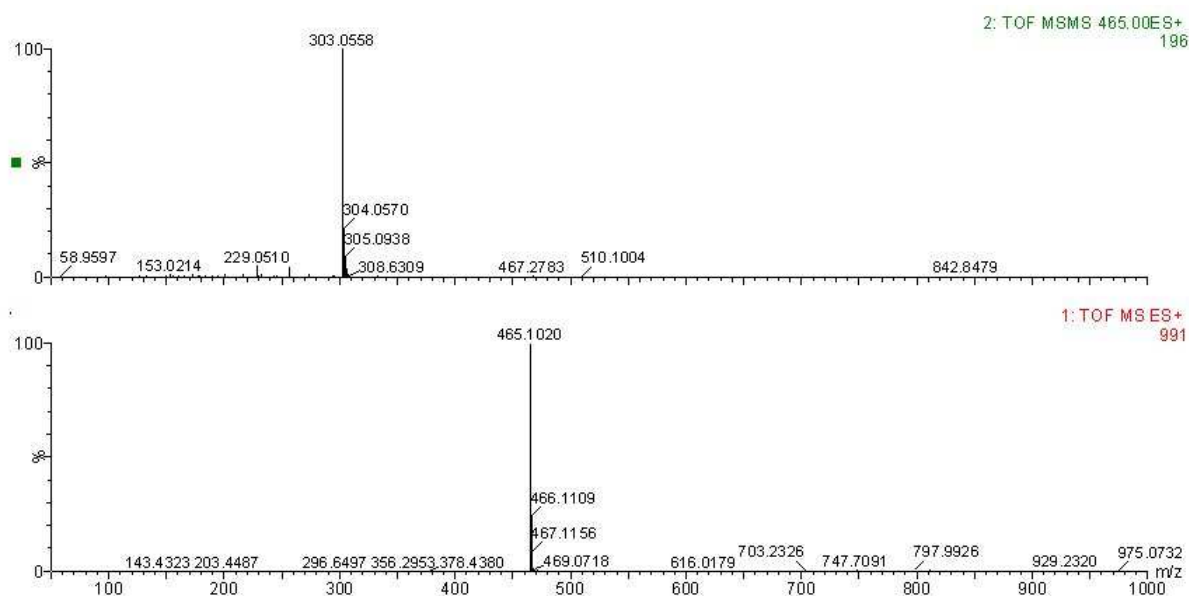
Příklad postupu identifikace iontů bude demonstrován na 3 objevených derivátech delphinidinu. Ve spektru byly identifikovány 3 deriváty delphinidinu: delphinidin-3-galaktosid (pík č. 1; $m/z = 465$; ret. čas = 2,35 min), delphinidin-3-glukosid (pík č. 2; $m/z = 465$; ret. čas = 2,62 min) a delphinidin-3-arabinosid (pík č. 4; $m/z = 435$; ret. čas = 2,86 min).

Zprůměrováním MS spekter přes pík č. 1 a korekcí na pozadí bylo získáno MS spektrum s iontem $m/z = 465$. Byla provedena cílená fragmentace tohoto iontu a v MS/MS spektru se objevil fragment o $m/z = 303$ (Obr. 10). Můžeme tedy říci, že anthokyanidem tohoto anthokyaninu byl delphinidin, což potvrzuje i měření přesné hmoty tohoto fragmentu. Změřená molekulová hmotnost fragmentu byla 303,0499; vypočtená molekulová hmotnost delphinidinu je 303,0505; chyba činí 2,0 ppm.



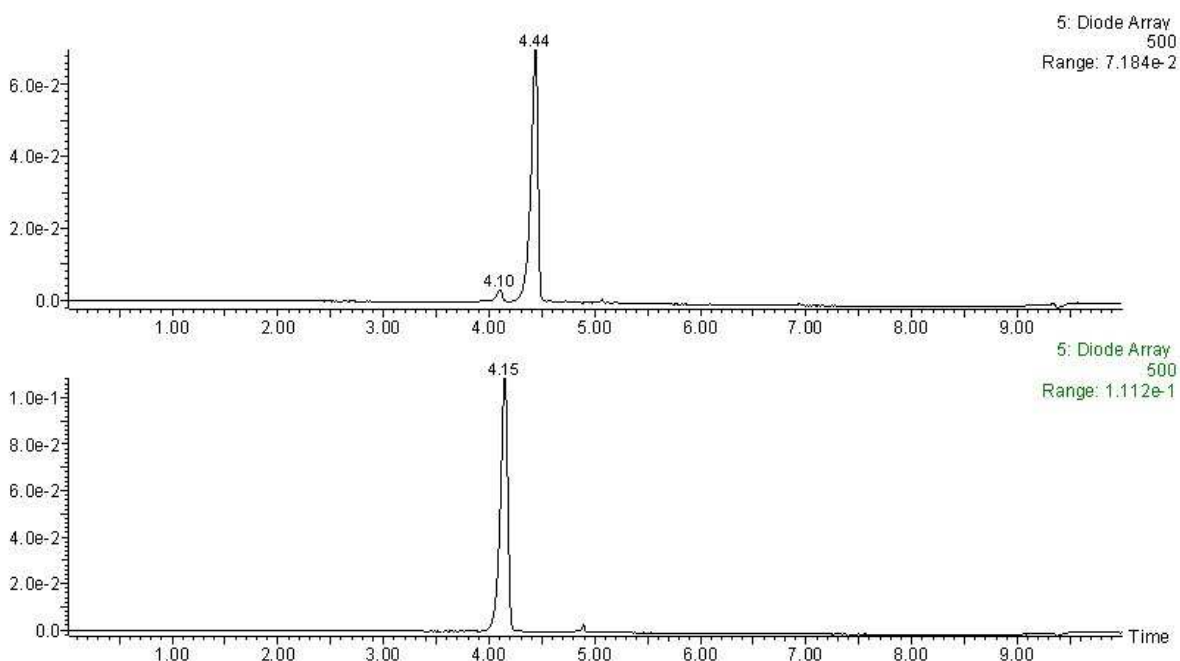
Obr. 10 MS spektrum píku č. 1 (spodní obrázek) a MS/MS spektrum píku č. 1 (horní obrázek).

Pík č. 2 ($m/z = 465$) a pík č. 1 ($m/z = 465$) jsou dva izomerní anthokyaniny, protože mají totožné m/z . Cílenou fragmentací poskytují oba anthokyaniny stejné fragmenty o $m/z = 303$, tedy delphinidin (Obr. 11). Molekulová hmotnost fragmentu ($m/z = 303$) a rodičovského iontu ($m/z = 465$) se od sebe liší o 162. Tato hodnota může být přisouzena dvěma monosacharidům: glukose nebo galaktose. Pík č.1 ($m/z = 465$) byl identifikován jako delphinidin-3-galaktosid, pík č.2 ($m/z = 465$) jako delphinidin-3-glukosid. Identifikace cukerné složky anthokyaninu se opírá o provedený experiment se standardy anthokyaninů.



Obr. 11 MS spektrum píku č. 2 (spodní obrázek) a MS/MS spektrum píku č. 2 (horní obrázek); spektra jsou totožná jako u píku č.1

Odlišení glukosidů a galaktosidů bylo provedeno na základě experimentu se standardy primulinem (malvidin-3-galaktosid) a oeninem (malvidin-3-glukosid). Na chromatografickou kolonu byl nejprve nastříknut roztok standardu primulinu. Chromatogram primulinu ukazuje pík v retenčním čase 4,15 min. Poté byl na kolonu nastříknut roztok standardu oeninu. Chromatogram oeninu ukazuje pík v retenčním čase 4,44 min (Obr. 12).

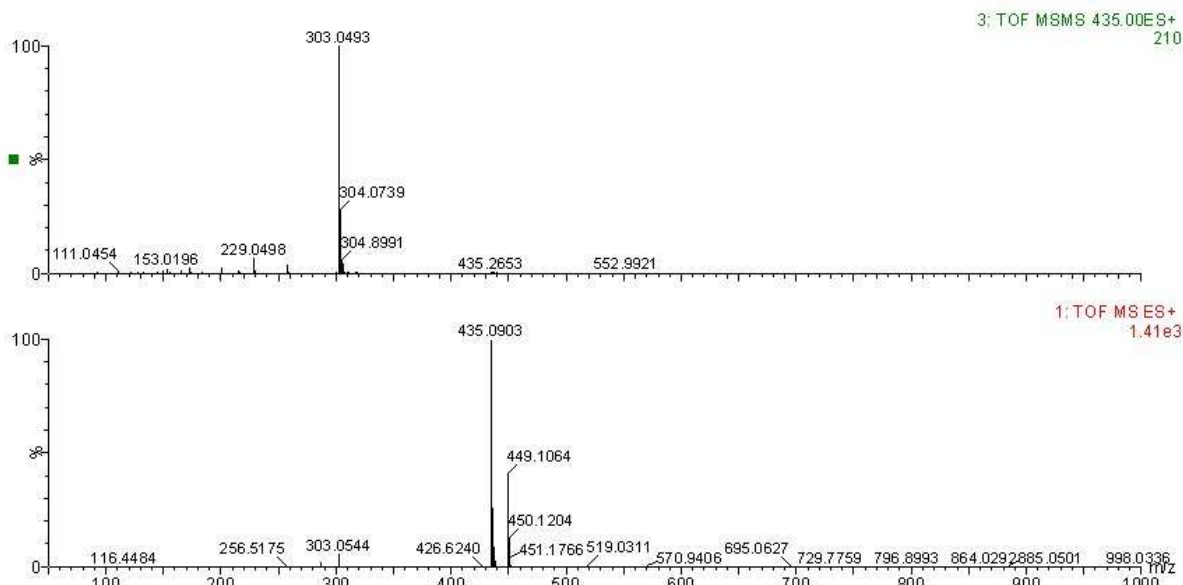


Obr. 12 Chromatogram primulinu (spodní obrázek) a chromatogram oeninu (horní obrázek) při vlnové délce 500 nm

Z těchto dat lze vyvodit závěr, že na koloně, používané v této práci, dochází při výskytu galaktosidu a glukosidu téhož anthokyanidinu k separaci těchto dvou izomerů, přičemž galaktosidy mají nižší retenční čas než glukosidy. Na základě retenčních časů je tedy možné galaktosidy a glukosidy téhož anthokyanidinu od sebe odlišit. V extraktu z borůvek je tedy pík č.1 ($m/z = 465$) delphinidin-3-galaktosid, pík č.2 ($m/z = 465$) je delphinidin-3-glukosid, což dokazují retenční časy těchto dvou izomerních anthokyaninů.

V extraktu z borůvek byl identifikován ještě jeden anthokyanin, jehož anthokyanidinem byl delphinidin. Je to pík č. 4. Tento pík má $m/z = 435$. Na MS spektru je rovněž vidět i menší pík o $m/z = 449$, což je způsobeno koelucí dvou anthokyaninů. Izolací daného iontu 435 a jeho následnou fragmentací v kolizní cele byl eliminován vliv koelujících složek. Na MS/MS spektru je vidět pík o $m/z = 303$, tedy delphinidin (Obr. 13). Rozdíl molekulových hmotností mezi rodičovským iontem a fragmentem je 132. Tato molekulová hmotnost odpovídá ztrátě jedné pentosy – arabinosy nebo xylosy. Jelikož další nástroje k identifikaci (NMR, standardy anthokyaninů) této pentosy nebyly k dispozici, může být pík č. 4 vyhodnocen jako delphinidin-3-pentosid. S ohledem na autory, kteří se zabývali identifikací anthokyaninů v borůvkách²⁴⁻²⁷, je pravděpodobné, že diskutovaná pentosa je arabinosa. Xylosa doposud v anthokyaninech z borůvek identifikována nebyla. Nicméně tento

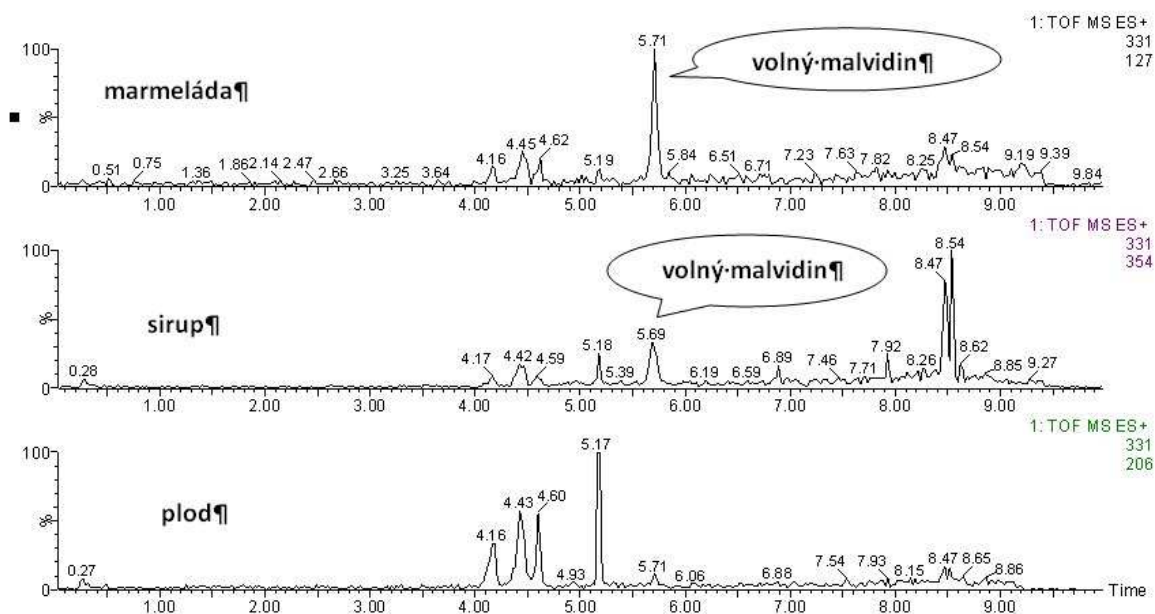
předpoklad nelze za daných podmínek dokázat. Tato úvaha platí pro všechny anthokyaniny označené v tabulce jako arabinosidy.



Obr. 13 MS spektrum píku č. 4 (spodní obrázek) a MS/MS spektrum píku č. 4 (horní obrázek)

Další nalezené anthokyaniny byly identifikovány analogickým způsobem jako deriváty delphinidinu. Souhrnně lze říci, že anthokyaniny, identifikované ve vzorku borůvek jsou monoglykosidy delphinidinu, cyanidinu, peonidinu, petunidinu a malvidinu. Cukerná složka je reprezentována glukosou, galaktosou a s největší pravděpodobností arabinosou. Acylace organickými kyselinami nebyla u patnácti majoritních anthokyaninů zjištěna, nicméně na chromatogramu jsou za píky majoritních anthokyaninů pozorovatelné i malé píky minoritních anthokyaninů, které by vzhledem k vyššímu retenčnímu času mohly být acylovány. Identifikace těchto minoritních anthokyaninů bude předmětem dalšího výzkumu.

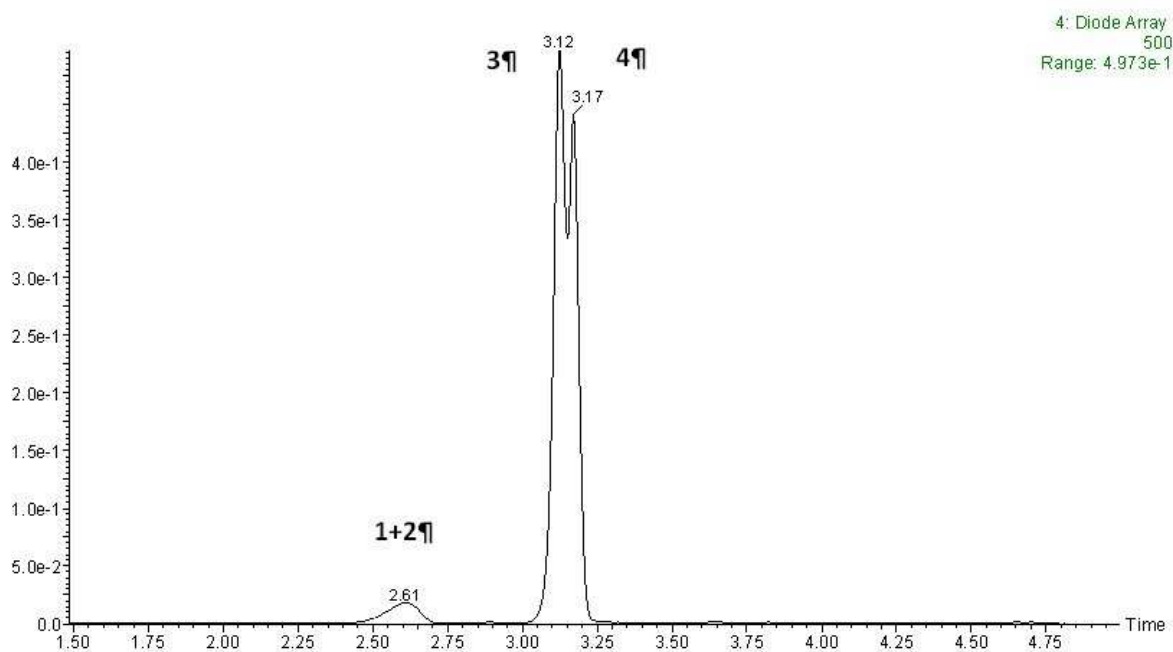
Prezentované výsledky jsou ve shodě se současně dostupnými literárními prameny.²⁴⁻²⁷ Anthokyaninový profil popsáný pro plod borůvky je totožný také u džemu a sirupu z borůvek. Chemická přeměna vlivem vysoké teploty ani úplný rozklad některého z derivátů nebyl pozorován. V případě tepelně upraveného ovoce byly ale nalezeny volné anthokyanidiny, vzniklé působením vysokých teplot, které se v syrovém ovoci nevyskytují. Na obrázku (Obr. 14) je vidět pík volného malvidinu pouze u vzorku marmelády a sirupu, nikoli u syrového plodu.



Obr. 14 Výskyt volného malvidinu u tepelně zpracovaných borůvek

4.2.2. Černý bez

Analýzou extraktu z plodů černého bezu je možné na chromatogramu při 500 nm vidět dva píky, přičemž u druhého píku je patrná nedokonalá separace dvou anthokyaninů (Obr. 15). Prozkoumáním hmotnostního spektra byly objeveny celkem 4 anthokyaniny (Tab. V).

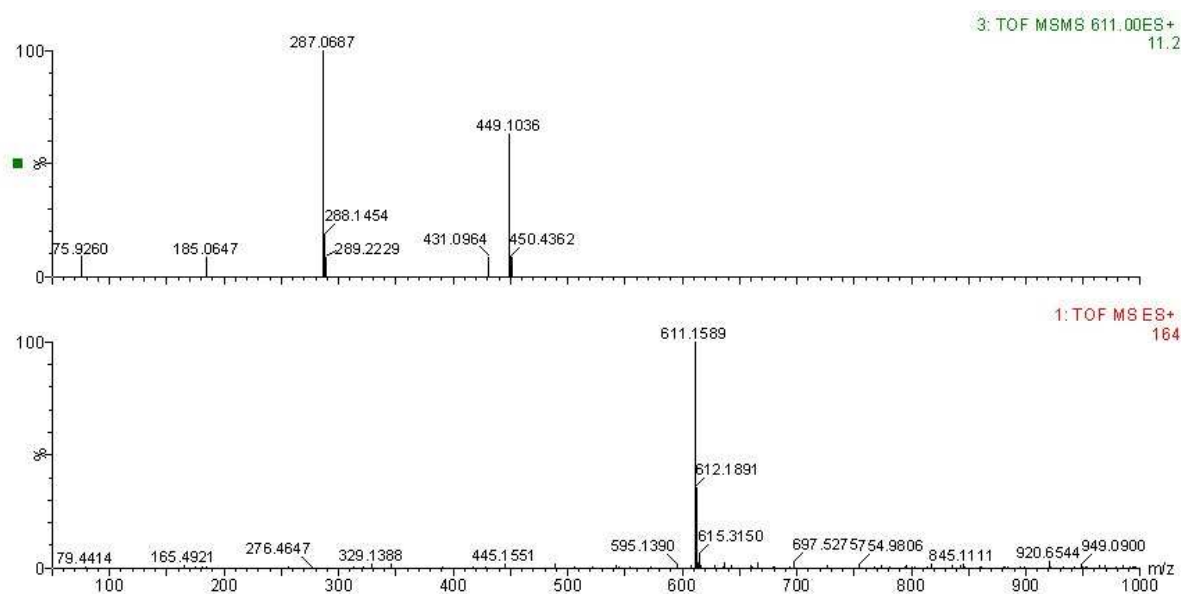


Obr. 15 Chromatogram extraktu z černého bezu při 500 nm.

Tab. V Anthokyaniny identifikované v extraktu z bezu černého

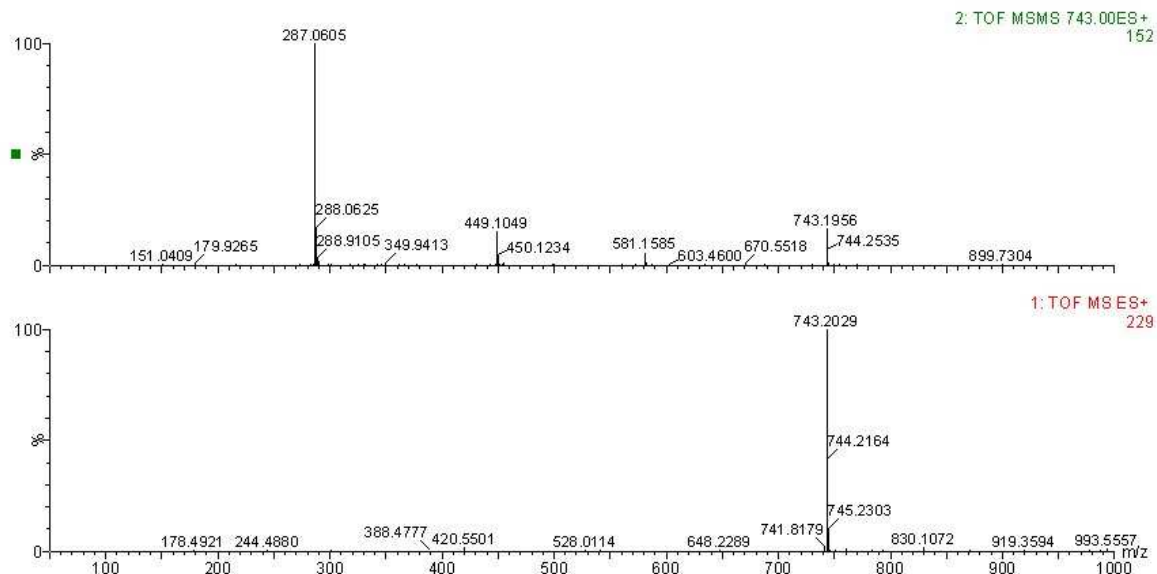
pík č.	ret. čas (min)	m/z v MS spektru	m/z v MS/MS spektru	anthokyanin	vypočtená molekul. hmotnost	ppm	element. složení
1	2,61	611,1591	287; 449	Cn-3,5-diglu (gal?)	611,1612	3,4	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆
2	2,61	743,2024	287; 449; 581	Cn-3-sam-5-glu (gal?)	743,2035	1,5	C ₃₂ H ₃₉ O ₂₀
3	3,13	449,1078	287	Cn-3-glu	449,1084	1,3	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁
4	3,17	581,1521	287	Cn-3-sam	581,1506	1,5	C ₂₆ H ₂₉ O ₁₅

Zprůměrováním MS spekter přes pík č. 1 a korekcí na pozadí bylo získáno MS spektrum s ionty m/z 611 a 743 (koeluce). Po izolaci iontu 611 a fragmentaci v kolizní cele byly v MS/MS spektru pozorovány dva fragmenty o m/z 449 a 287 (Obr. 16). Z těchto fragmentů lze vyčíst, že rozdíl molekulových hmotností mezi rodičovským iontem a prvním fragmentem je 162. Stejně i rozdíl molekulových hmotností mezi prvním a druhým fragmentem je 162. Ztráta molekulové hmotnosti 162 odpovídá ztrátě glukosy nebo galaktosy. Fragment o m/z = 287 je anthokyanidin cyanidin (potvrzeno měřením přesné hmoty). Prvním anthokyaninem černého bezu je tedy cyanidin-3,5-dihexosid. Jelikož další nástroje k identifikaci (NMR, standardy anthokyaninů) nebyly k dispozici, nelze určit, zda dané hexosy jsou glukosy nebo galaktosy. S ohledem na autory, kteří se zabývali identifikací anthokyaninů v černém bezu²⁹⁻³¹, je pravděpodobné, že diskutované hexosy jsou glukosy. Galaktosa doposud v anthokyaninech z černého bezu identifikována nebyla. Nicméně tento předpoklad nelze za daných podmínek dokázat.



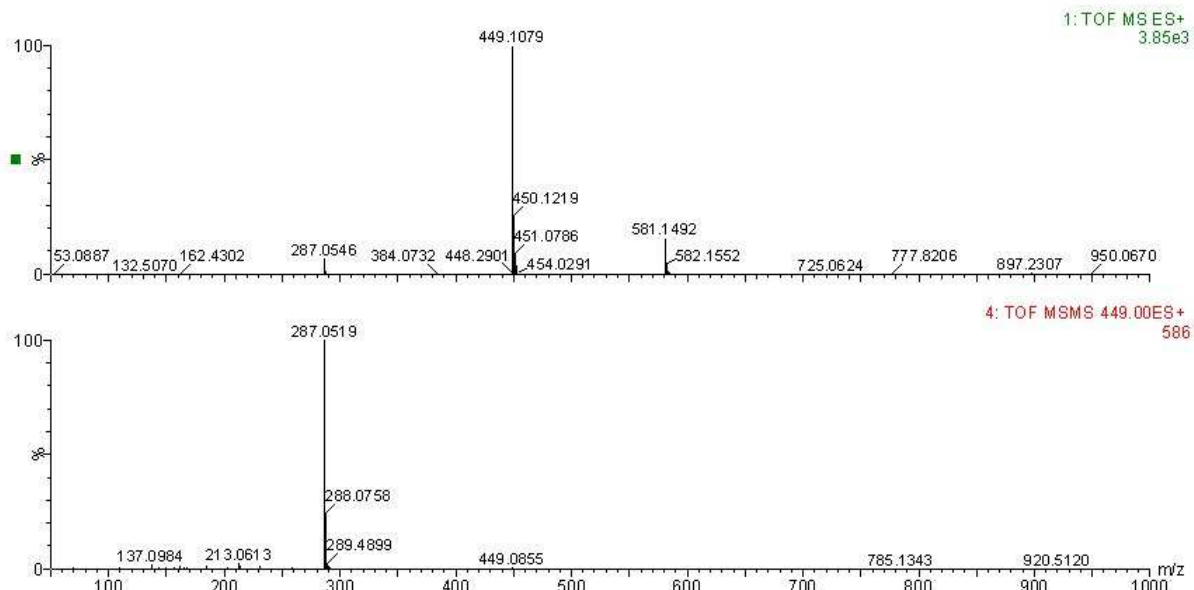
Obr. 16 MS spektrum píku č. 1 (spodní obrázek) a MS/MS spektrum píku č. 1 (horní obrázek)

Ion o $m/z = 743$ poskytl po izolaci a cílené fragmentaci v MS/MS spektru několik fragmentů (Obr. 17). Je zde patrný rodičovský ion o $m/z = 743$, fragment o $m/z = 581$, fragment o $m/z = 449$ a fragment o $m/z = 287$. Rozdíl molekulové hmotnosti mezi rodičovským iontem ($m/z = 743$) a prvním fragmentem ($m/z = 581$) je 162, což odpovídá ztrátě hexosy (glukosy). Rozdíl molekulové hmotnosti mezi rodičovským iontem ($m/z = 743$) a druhým fragmentem ($m/z = 449$) je 294. Tento rozdíl odpovídá ztrátě disacharidu sambubiosy. Posledním fragmentem o $m/z = 287$ je anthokyanidin cyanidin. Z průzkumu fragmentů tedy vyplývá, že anthokyanin o $m/z = 743$ je cyanidinový derivát, který je glykosylován sambubiosou a glukosou (galaktosou). Z literatury²⁹⁻³¹ lze předpokládat, že se jedná o cyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid, nicméně potvrzení tohoto předpokladu by vyžadovalo použití vhodné metody, např. NMR.



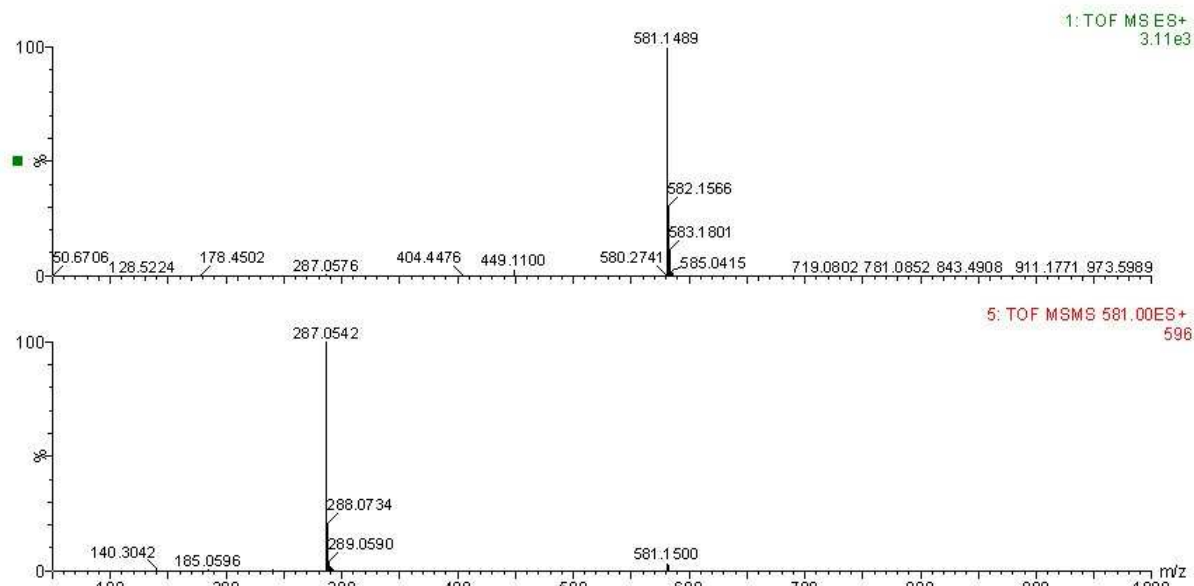
Obr. 17 MS spektrum píku č. 2 (spodní spektrum) a MS/MS spektrum píku č. 2 (horní spektrum)

Zprůměrováním MS spekter přes pík č. 3 a korekcí na pozadí bylo získáno MS spektrum s ionty m/z 449 a 581 (nedokonalá separace). Po cílené fragmentaci iontu 449 se v MS/MS spektru zobrazil pík o $m/z = 287$ (Obr. 18). Tato molekulová hmotnost odpovídá anthokyanidinu cyanidinu. Rozdíl molekulové hmotnosti mezi rodičovským iontem a fragmentem je 162, což odpovídá ztrátě glukosy nebo galaktosy. Jelikož byly cyanidin-3-glukosid i cyanidin-3-galaktosid identifikovány už v extraktu z borůvek, můžeme pík č. 3 identifikovat porovnáním retenčních časů (viz Tab. IV). Pík č. 3 je cyanidin-3-glukosid.



Obr. 18 MS spektrum píku č. 3 (horní spektrum) a MS/MS spektrum (spodní spektrum)

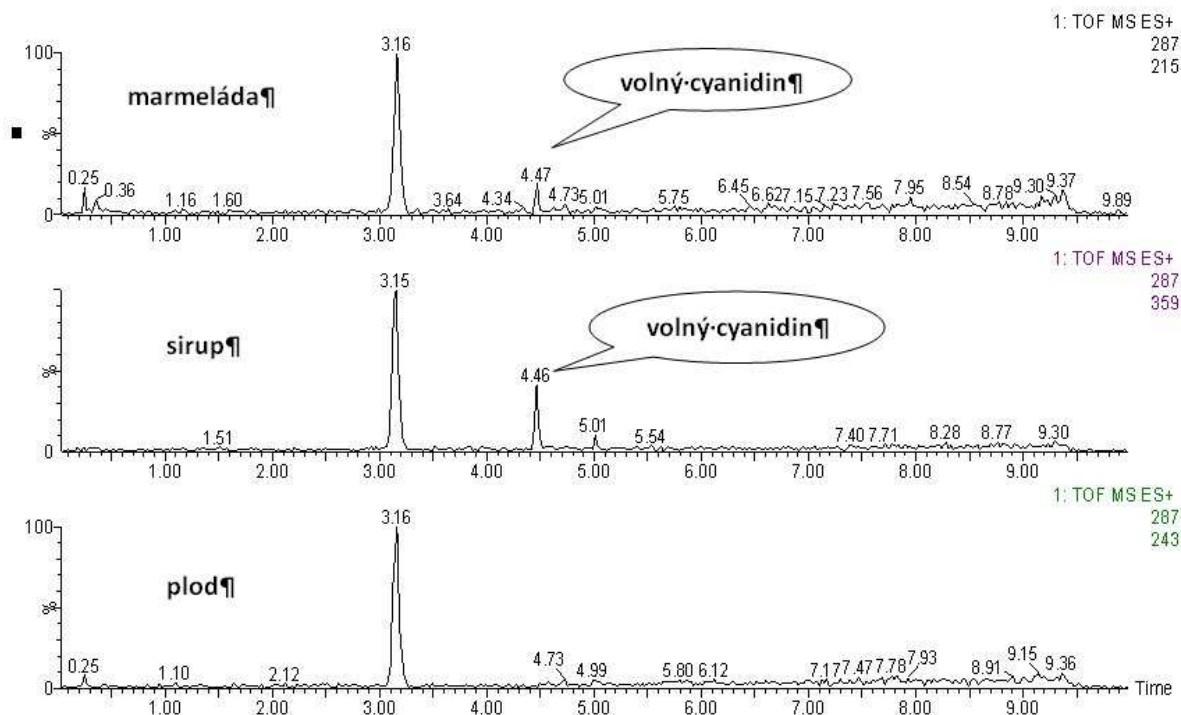
Zprůměrováním MS spekter přes pík č. 4 a korekcí na pozadí bylo získáno MS spektrum s ionty m/z 581 a 449 (nedokonalá separace). Po cílené fragmentaci iontu 581 se v MS/MS spektru objevil pík o $m/z = 287$ (Obr. 19). Můžeme tedy konstatovat, že i čtvrtý anthokyanin obsahuje anthokyanidin cyanidin. Rozdíl molekulových hmotností mezi rodičovským iontem a fragmentem je 294. Tato molekulová hmotnost odpovídá ztrátě disacharidu sambubiosy. Pík č. 4 je tedy cyanidin-3-sambubiosid.



Obr. 19 MS spektrum píku č. 4 (horní obrázek), MS/MS spektrum píku č. 4 (spodní obrázek)

Byla popsána identifikace 4 anthokyaninů, nalezených v černém bezu. Všechny nalezené anthokyaniny jsou deriváty cyanidinu, cukernou složku tvoří jak monosacharidy (s největší pravděpodobností glukosa), tak disacharidy (sambubiosa). Acylace organickými kyselinami nebyla zjištěna. Tyto výsledky jsou ve shodě s vědeckými články, které se zabývají identifikací anthokyaninu v černém bezu.²⁹⁻³¹ Anthokyaninový profil je shodný pro plody, marmeládu i sirup. Chemická přeměna vlivem vysoké teploty ani úplný rozklad některého z derivátů nebyl pozorován.

I u černého bezu se ve vzorcích sirupu a marmelády vyskytl volný anthokyanidin. Aglykon cyanidin byl nalezen pouze u sirupu a marmelády, ve vzorcích plodu nalezen nebyl (Obr. 20).

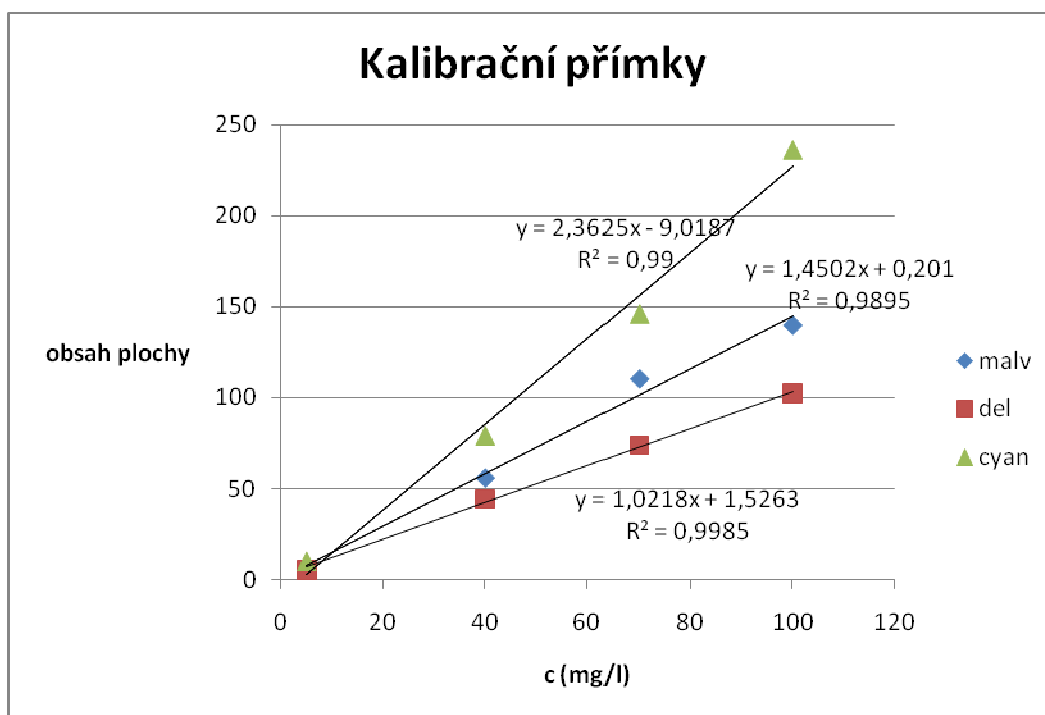


Obr. 20 Volný cyanidin ve vzorcích černého bezu

V souvislosti s identifikací anthokyaninů v černém bezu bych chtěla zmínit podezření na výskyt dalšího anthokyaninu, který v přehledové tabulce není uveden. Ve spektru byl objeven druhý pík o $m/z = 611$, který by mohl být delphinidovým derivátem, pravděpodobně glykosylovaný rutinosou, nicméně získaná data nebyl dostatečně průkazná. Potvrzení této domněnky bude vyžadovat další doplňující analýzy.

4.3. Kvantitativní vyhodnocení

Po identifikaci nalezených anthokyaninů bylo provedeno kvantitativní vyhodnocení. Na obrázku (Obr. 21) jsou kalibrační přímky, které vznikly proměření kalibračních roztoků tří standardů anthokyaninů: cyanidin-3-galaktosidu, delphinidin-3-galaktosidu a malvidin-3-galaktosidu. Kalibrační roztoky měly koncentraci 5 mg/l, 40 mg/l, 70 mg/l a 100 mg/l. Ze získaných rovnic přímek pak byly metodou lineární regrese spočítány koncentrace jednotlivých anthokyaninů ve vzorcích.



Obr. 21 Kalibrační přímky standardů anthokyaninů

Jak je vidět z obrázku, stejně koncentrované roztoky standardů anthokyaninů nevyvolávaly stejnou odezvu. Pro stanovení anthokyaninu ve vzorku proto byla vždy použita rovnice přímky, která měla se stanovovaným anthokyaninem stejný anthokyanidin (např. všechny identifikované anthokyaniny odvozené od delphinidinu byly vztahovány k rovnici přímky $y = 1,0218x + 1,5263$).

4.3.1. Borůvky

U všech píků anthokyaninů byl na základě třech opakovaných měření zjištěn průměrný obsah plochy pod píkem a z rovnice přímky byla vypočtena koncentrace

anthokyaninu, která byla ještě přepočtena na příslušné zředění vzorku. Jelikož v extraktu z borůvek byly nalezeny také peonidinové a petunidinové anthokyaniny, u nichž nebyla provedena kalibrace na příslušné standardy, byla koncentrace těchto anthokyaninů stanovena z rovnice přímky standardu malvidin-3-galaktosidu: $y = 1,4502x + 0,201$.

V tabulkách (Tab. VI, Tab. VII) jsou shrnuty obsahy koncentrace anthokyaninů vypočtené lineární regresi z rovnice přímky a výsledné koncentrace anthokyaninů v mg/g vzorku.

Tab. VI Koncentrace anthokyaninů vypočtená z rovnice přímky

anthokyanin	koncentrace anthokyaninu mg/l				
	plod	plod SPE	sirup	marmeláda	marmeláda SPE
Dp-3-gal	101,9±2,6	109,9±3,2	65,06±3,77	57,32±0,60	56,25±3,77
Dp-3-glu	73,37±6,00	78,27±1,46	93,05±6,91	49,69±0,79	54,39±0,37
Cn-3-gal	25,15±3,00	27,61±2,08	18,72±5,10	19,27±0,65	21,93±2,09
Dp-3-ara	88,35±5,81	88,74±11,22	37,75±7,21	27,87±1,14	33,54±1,01
Cn-3-glu	21,04±4,68	22,48±1,33	43,01±14,40	20,71±2,76	23,80±2,69
Pt-3-gal	38,27±2,34	42,89±0,48	28,69±4,30	18,13±1,76	19,17±1,57
Cn-3-ara	18,08±3,10	20,75±1,52	17,49±3,08	11,44±1,09	13,34±0,97
Pt-3-glu	51,44±6,81	61,37±2,60	77,64±4,99	31,17±0,36	37,37±2,82
Pn-3-gal	7,378±1,270	10,00±1,21	8,757±2,510	5,516±0,410	5,447±0,840
Pt-3-ara	24,82±2,21	31,72±0,27	15,79±1,94	8,481±0,230	8,481±1,090
Pn-3-glu	20,82±0,46	22,82±1,82	51,51±7,39	18,07±0,04	21,51±2,55
Mv-3-gal	51,16±0,44	56,47±2,93	48,96±5,93	19,38±1,93	21,72±0,22
Pn-3-ara	4,688±0,690	5,102±0,220	4,895±0,750	2,137±0,160	2,206±0,150
Mv-3-glu	92,40±1,88	103,6±5,4	150,7±17,0	54,06±5,25	56,27±0,88
Mv-3-ara	38,75±1,33	44,61±4,45	27,37±2,38	8,688±0,220	9,860±1,720
suma	657,6±30,1	726,3±28,0	689,4±87,7	351,9±11,3	385,3±5,9

Tab. VII Výsledná koncentrace anthokyaninů uvedená v mg/g vzorku

anthokyanin	koncentrace anthokyaninu (mg/g)				
	plod	plod SPE	sirup	marmeláda	marmeláda SPE
Dp-3-gal	1,930±0,049	2,082±0,061	0,4776±0,0714	0,8740±0,0114	0,8576±0,0714
Dp-3-glu	1,390±0,114	1,483±0,028	0,6831±0,1309	0,7576±0,0150	0,8293±0,0070
Cn-3-gal	0,4766±0,0569	0,5231±0,0394	0,1374±0,0966	0,2938±0,0123	0,3344±0,0396
Dp-3-ara	1,674±0,110	1,682±0,213	0,2772±0,1366	0,4249±0,0216	0,5114±0,0191
Cn-3-glu	0,3988±0,0887	0,4261±0,0252	0,3158±0,2729	0,3157±0,0523	0,3628±0,0510
Pt-3-gal	0,7252±0,0443	0,8128±0,0091	0,2106±0,0815	0,2765±0,0334	0,2923±0,0298
Cn-3-ara	0,3427±0,0587	0,3932±0,0288	0,1284±0,0584	0,1744±0,0207	0,2034±0,0184
Pt-3-glu	0,9748±0,1291	1,163±0,049	0,5700±0,0946	0,4752±0,0068	0,5698±0,0534
Pn-3-gal	0,1398±0,0241	0,1895±0,0229	0,0643±0,0476	0,0841±0,0078	0,0830±0,0159
Pt-3-ara	0,4704±0,0419	0,6011±0,0051	0,1159±0,0368	0,1293±0,0044	0,1293±0,0207
Pn-3-glu	0,3946±0,0087	0,4325±0,0345	0,3782±0,1400	0,2754±0,0008	0,3280±0,0483
Mv-3-gal	0,9696±0,0083	1,070±0,055	0,3594±0,1124	0,2954±0,0366	0,3312±0,0042
Pn-3-ara	0,0888±0,0131	0,0967±0,0042	0,0359±0,0142	0,0326±0,0030	0,0336±0,0028
Mv-3-glu	1,751±0,036	1,963±0,102	1,106±0,322	0,8243±0,0995	0,8579±0,0167
Mv-3-ara	0,7344±0,0252	0,8454±0,0843	0,2010±0,0451	0,1325±0,0042	0,1503±0,0326
suma	12,46±0,57	13,76±0,53	5,061±1,662	5,366±0,214	5,874±0,112

Výpočet výsledné koncentrace je uveden na příkladech:

$$c = \frac{\frac{101,9}{10^6} \times 250 \times 40}{0,5277} = 1,93 \text{ mg/g (pro vzorky plodu)}$$

Koncentrace anthokyaninů, získaná z kalibrační přímky (101,9 mg/l), byla přepočtena na objem 250 µl, násobena čtyřiceti (z 10 ml extraktu byly odebráno 250 µl) a dělená navázkou vzorku (0,5277 g).

$$c = \frac{\frac{65,06}{10^6} \times 250 \times \frac{2,9}{0,25}}{0,395} = 0,4776 \text{ mg/g (pro vzorky sirupu)}$$

Koncentrace anthokyaninů, získaná z kalibrační přímky (65,06 mg/l), byla přepočtena na objem 250 µl, násobena $\frac{2,9}{0,25}$ (z 2,9 ml extraktu byly odebráno 250 µl a odpařeno do sucha) a dělená navázkou vzorku (objem sirupu k analýze byl 0,250 ml = 0,395 g).

$$c = \frac{\frac{57,32}{10^6} \times 250 \times 60}{0,9838}$$

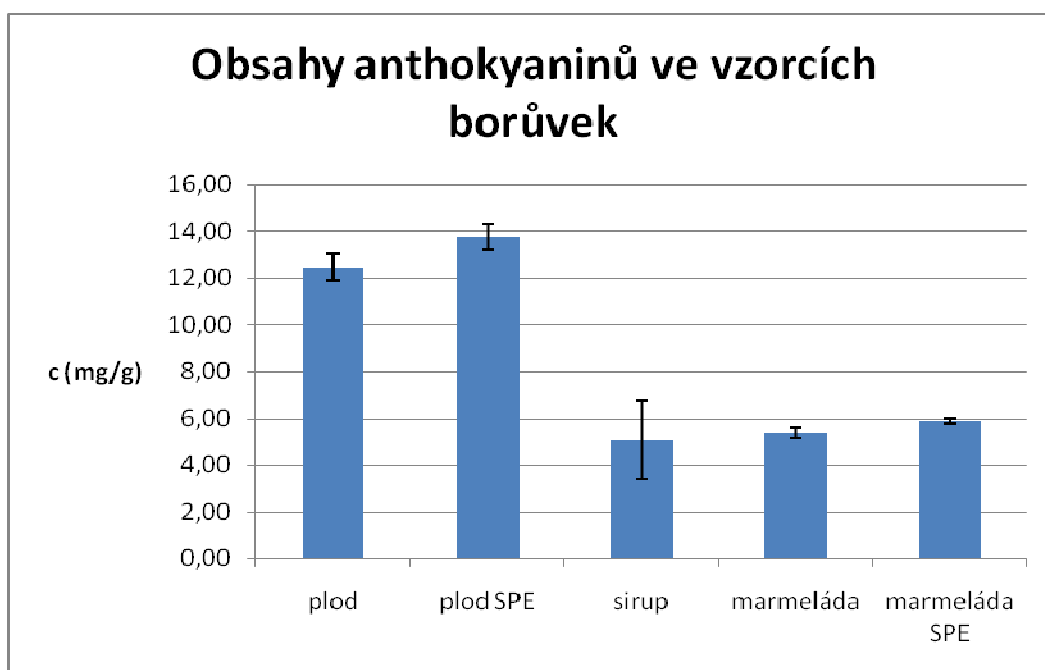
Koncentrace anthokyaninů, získaná z kalibrační přímky (57,32 mg/l), byla přepočtena na objem 250 μl, násobena šedesáti (z 15 ml extraktu byly odebráno 250 μl) a dělená navázkou vzorku (0,9838g).

Z tabulek můžeme vyčíst několik důležitých údajů. Nejvíce zastoupeným anthokyaninem v borůvkách je delphinidin-3-galaktosid, nejmenší množství bylo zjištěno u peonidin-3-arabinosidu. Celkové množství anthokyaninů v plodech borůvky je 12,46 mg/g (13,76 mg/g v případě přečištění extraktu pomocí SPE).

V případě borůvkové marmelády můžeme pozorovat pokles koncentrace u všech anthokyaninů. Tento pokles je zapříčiněn působením vysokých teploty při přípravě marmelády. Z rozdílu sumárních koncentrací anthokyaninů mezi plody a marmeládou lze vypočítat, že marmeláda obsahuje o 57 % méně anthokyaninů než syrové plody. Z hlediska obsahu anthokyaninů je tedy pro člověka prospěšnější konzumovat syrové plody, navíc marmelády často obsahují i značné množství přidaného cukru, což pro lidský organismus také není příliš vhodné.

V případě sirupu byla zjištěna koncentrace anthokyaninů 5,061 mg/g. Porovnáním se syrovými plody zjistíme, že koncentrace anthokyaninů poklesla o 59 %. U sirupu tedy také došlo k tepelné degradaci anthokyaninů. Konzumace sirupu je méně vhodná než konzumace syrového ovoce, jelikož v sirupu je obsaženo značné množství přidaného cukru. Porovnání sirupu a marmelády naznačuje, že sirup obsahuje méně anthokyaninů a více přidaného cukru než marmeláda (1 kg cukru na 0,75 l borůvkové šťávy u sirupu; 0,5 kg cukru na 1 kg borůvek u marmelády). Sirup je tedy ke konzumaci nejméně vhodný.

Ve sloupcovém grafu (Obr. 22) je zachycen rozdíl mezi obsahy anthokyaninů ve vzorcích plodu, sirupu a marmelády z borůvek.



Obr. 22 Sloupcový graf – porovnání obsahu anthokyaninu v jednotlivých vzorcích borůvek

Co se týče porovnání mezi vzorky přečištěnými SPE a nepřečištěnými SPE, vycházejí u přečištěných vzorků vyšší koncentrace anthokyaninů. Tyto výsledky potvrzují, že při přečištění vzorku pomocí SPE dojde k odstranění balastních látek, které jinak mohou v případě koeluce snižovat ionizaci.

4.3.2. Bez černý

Koncentrace anthokyaninů identifikovaných v bezu černém byly také stanovovány pomocí kalibrační přímky. Jelikož všechny identifikované anthokyaniny jsou odvozeny od cyanidinu, byla použita rovnice přímky standardu cyanidin-3-galaktosidu: $y = 2,3625x - 9,0187$. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách (Tab. VIII, Tab. IX).

Tab. VIII Koncentrace anthokyaninů vypočtena z rovnice přímky

anthokyanin	koncentrace anthokyaninu v mg/l				
	plod	plod SPE	sirup	marmeláda	marmeláda SPE
Cn-3,5-diglu	6,442±0,281	6,442±0,042	7,966±0,721	8,177±0,133	7,966±0,121
Cn-3-sam-5-glu	9,913±1,070	9,913±0,242	12,49±2,04	12,24±0,91	12,58±0,08
Cn-3-glu	76,83±15,05	86,10±18,09	45,47±22,59	70,36±0,41	75,44±8,23
Cn-3-sam	69,17±3,18	77,26±7,34	54,82±23,16	73,96±7,26	79,97±0,11
suma	162,4±19,0	179,7±25,6	120,8±44,4	164,7±6,6	175,9±8,3

Tab. IX Výsledná koncentrace anthokyaninů uvedená v mg/g vzorku

anthokyanin	koncentrace anthokyaninu v (mg/g)				
	plod	plod SPE	sirup	marmeláda	marmeláda SPE
Cn-3,5-diglu	0,2139±0,0053	0,2139±0,0008	0,1529±0,0137	0,1236±0,0025	0,1204±0,0023
Cn-3-sam-5-glu	0,3292±0,0203	0,3292±0,0046	0,2399±0,0387	0,1851±0,0172	0,1902±0,0015
Cn-3-glu	2,552±0,285	2,860±0,343	0,8732±0,4281	1,064±0,008	1,140±0,156
Cn-3-sam	2,297±0,060	2,566±0,139	1,052±0,439	1,118±0,138	1,209±0,002
suma	5,392±0,360	5,969±0,485	2,319±0,841	2,490±0,125	2,660±0,157

Pro výpočet koncentrací anthokyaninů ve vzorcích černého bezu bylo využito stejných vzorců jako u vzorků borůvek.

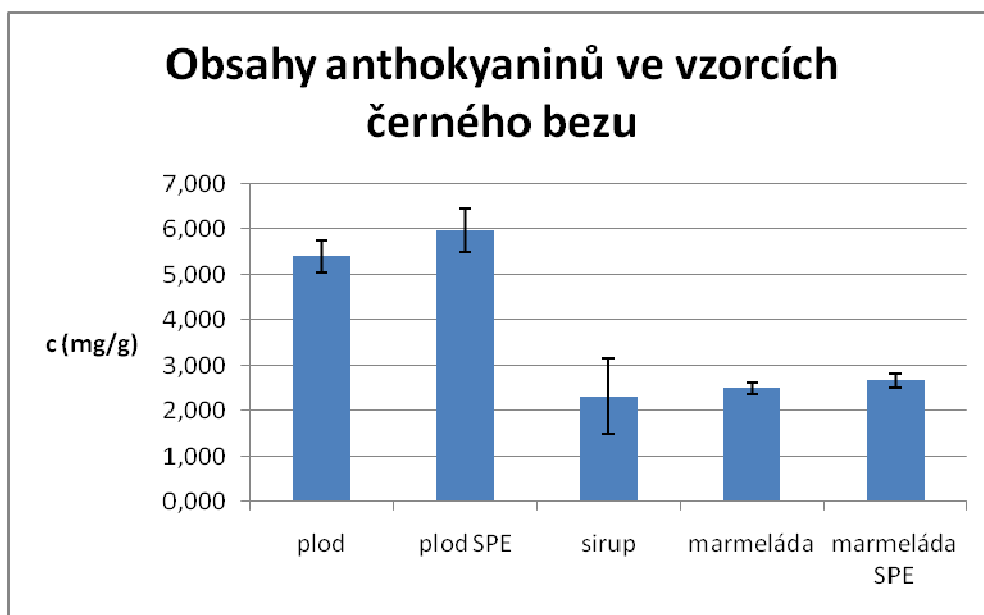
V plodech černého bezu byly nalezeny dva anthokyaniny majoritní: cyanidin-3-glukosid a cyanidin-3-sambubiosid a dva anthokyaniny minoritní: cyanidin-3,5-diglukosid (galaktosid?) a cyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid (galaktosid?). Největší koncentrace byla zjištěna u cyanidin-3-glukosidu, nejnižší u cyanidin-3,5-diglukosidu. Celková koncentrace všech anthokyaninů v černém bezu je 5,392 mg/g (5,969 mg/g v případě přečištění vzorku pomocí SPE).

U vzorků marmelády byl pozorován úbytek anthokyaninů vlivem zahřívání bezu při výrobě marmelády. V případě marmelády z černého bezu se koncentrace anthokyaninů snížila o 54 %.

U sirupu z černého bezu došlo rovněž k degradaci anthokyaninů vlivem zahřívání. Koncentrace anthokyaninů v sirupu byla o 57% nižší než u syrového ovoce.

Nicméně v případě černého bezu nezbývá než konzumovat plody tepelně upravené do podoby marmelády nebo sirupu, protože bobule v syrovém stavu jsou poměrně trpké a nehodí se k přímé konzumaci.

Obrázek (Obr. 23) zachycuje srovnání obsahu anthokyaninů v jednotlivých vzorcích černého bezu.



Obr. 23 Sloupcový graf – porovnání obsahu anthokyaninu v jednotlivých vzorcích černého bezu

5. Závěr

Anthokyaniny jsou předmětem zájmu mnoha vědců, jelikož bylo prokázáno jejich pozitivní působení na zdraví člověka. Tato práce se zaměřovala na identifikaci a kvantifikaci anthokyaninů ve vzorcích plodů, sirupů a marmelád z brusnice borůvky (*Vaccinium myrtillus* L.) a bezu černého (*Sambucus nigra* L.).

Pro analýzu anthokyaninů byla použita metoda UPLC/ESI-MS. Tato metoda je pro analýzu anthokyaninů stále častěji využívána. Mobilní fáze pro UPLC obsahuje kyselinu, aby se zajistil výskyt anthokyaninů ve stabilní flavyliové formě. V této práci jsem se zabývala optimalizací metody, při níž se mobilní fáze okyseluje kyselinou mravenčí. Tato metoda při srovnání s metodou, která využívá kyselinu trifluoroctovou, dosahuje z hlediska kvalitativních parametrů jednoznačně lepších výsledků. Zavedení metody s kyselinou mravenčí v analýze anthokyaninů s sebou přináší značné výhody, především zvýšení citlivosti pro případnou detekci minoritních anthokyaninů.

V brusnici borůvce bylo identifikováno 15 anthokyaninů. Tyto anthokyaniny jsou monoglykosidy delphinidinu, cyanidinu, malvidinu, petunidinu a peonidinu. Cukerná složka je zastoupena glukosou, galaktosou a pravděpodobně arabinosou. Anthokyaniny obsažené v borůvkách nejsou acylovány organickými kyselinami. V černém bezu byly nalezeny čtyři anthokyaniny, všechny založené na anthokyanidinu cyanidinu. Cukernou složku zde reprezentuje monosacharid glukosa a disacharid sambubiosa, acylace organickými kyselinami taktéž nebyla zjištěna.

Sumární obsah anthokyaninů v plodech borůvky byl 12,46 mg/g, v bezu černém 5,392 mg/g. Plody borůvky tedy obsahovaly jak širší profil anthokyaninů, tak celkově větší množství anthokyaninů. Při tepelném zpracování plodů došlo ke snížení obsahu anthokyaninů ve výsledných produktech (marmeládách a sirupech). Marmelády obsahovaly o 57 % (borůvková marmeláda) a o 54 % (bezová marmeláda) méně anthokyaninů než syrové plody. Sirupy obsahují o 59 % (borůvkový sirup) a 57 % (bezový sirup) méně anthokyaninů, než syrové plody. Z výsledků této práce lze vyvodit závěr, že borůvky jsou vhodnější ke konzumaci v syrovém stavu, jelikož obsahují výrazně vyšší množství anthokyaninů než marmelády či sirupy. Konzumaci sirupu nebo marmelád bych doporučila pouze v případě, že není k dostání čerstvé ovoce, například v zimních měsících. Totéž doporučení lze aplikovat i

na plody černého bezu, ale v tomto případě bude konzument pravděpodobně odrazen od konzumace syrových plodů jejich trpkou chutí. Nicméně černý bez je cenný zdroj anthokyaninů a proto v tomto případě připadá v úvahu konzumace bezu v chuťově lepších úpravách, jako jsou marmelády nebo sirupy.

6. Literatura

1. *Flavonoids : Chemistry, Biochemistry and Applications*. Edited by Andersen Ø. M. and Markham K. R., Norway , CRC Press, 2006.
2. Wilbert S. M., Schemske D. W., Bradshaw H. D.: *Biochem. Syst. Ecol.* 25, 437 (1997).
3. Fossen T., Slimestad R., Andersen Ø. M.: *Phytochemistry.* 64, 1367 (2003).
4. Brouillard R., Dubois J. E.: *J. Am. Chem. Soc.* 99, 1359 (1977).
5. Brouillard R., Delaporte B.: *J. Am. Chem. Soc.* 99, 8461 (1977).
6. McClelland R. A., Gedge S.: *J. Am. Chem. Soc.* 102, 5838 (1980).
7. Asenstorfer R. E., Iland P. G., Tate M. E., Jones G. P.: *Anal. Biochem.* 318, 291 (2003).
8. Sadilova E., Stintzing F. C., Carle R.: *J. Food Sci.* 71, C504 (2006).
9. Sadilova E., Carle R., Stintzing F. C.: *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 1461 (2007).
10. Kirca A., Ozkan M., Cemeroglu B.: *Food Chem.* 101, 212 (2007).
11. Castanedo-Ovando A., Pacheco-Hernandez M. D., Paez-Hernandez M. E., Rodriguez J. A., Galan-Vidal C. A.: *Food Chem.* 113, 859 (2009).
12. Mlodzinska E.: *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.* 51, 7 (2009).
13. Jordheim M.: *Isolation, identification and properties of pyranoanthocyanins and anthocyanin forms*. Bergen, 2007, Dizertační práce, University of Bergen.
14. Cooper-Driver G. A.: *Phytochemistry.* 56, 229 (2001).
15. Kowalczyk E., Krzesinski P., Kura M., Szmigiel B., Blaszczyk J.: *Pol. J. Pharmacol.* 55, 699 (2003).
16. Reed J.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42, 301 (2002).
17. Hou D. X.: *Curr. Mol. Med.* 3, 149 (2003).
18. Bowen-Forbes C. S., Zhang Y. J., Nair M. G.: *J. Food Compos. Anal.* 23, 554 (2010).
19. Krikorian R., Shidler M. D., Nash T. A., Kalt W., Vinqvist-Tymchuk M. R., Shukitt-Hale B., Joseph J. A.: *J. Agric. Food Chem.* 58, 3996 (2010).
20. Zakay-Rones Z., Thom E., Wollan T., Wadstein J.: *J. Int. Med. Res.* 32, 132 (2004).

21. Randuška D., Šomšák L., Háberová I.: *Barevný atlas rostlin*. Obzor, Bratislava 1983.
22. Korbelář J., Endris Z., Krejča J.: *Naše rostliny v lékařství*. Avicenum, Praha 1974.
23. Szajdek A., Borowska E. J.: *Plant Food Hum. Nutr.* 63, 147 (2008).
24. Tian Q. G., Giusti M. M., Stoner G. D., Schwartz S. J.: *J. Chromatogr. A* 1091, 72 (2005).
25. You Q., Wang B. W., Chen F., Huang Z. L., Wang X., Luo P. G.: *Food Chem.* 125, 201 (2011).
26. Borges Q., Degeneve A., Mullen W., Crozier A.: *J. Agric. Food Chem.* 58, 3901 (2010).
27. Kader F., Rovel B., Girardin M., Metche M.: *Food Chem.* 55, 35 (1996).
28. Vlachojannis J. E., Cameron M., Chrubasik S.: *Phytother. Res.* 24, 1 (2010).
29. Jordheim M., Giske N. H., Andersen O. M.: *Biochem. Syst. Ecol.* 35, 153 (2007).
30. Chandra A., Rana J., Li Y. Q.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 3515 (2001).
31. Inami O., Tamura I., Kikuzaki H., Nakatani N.: *J. Agric. Food Chem.* 44, 3090 (1996).
32. Kim D. O., Padilla-Zakour O. I.: *J. Food Sci.* 69, S395 (2004).
33. Queiroz F., Oliveira C., Pinho O., Ferreira I. M. P. L. V. O.: *J. Agric. Food Chem.* 57, 10712 (2009).
34. Howard L. R., Castrodale C., Brownmiller C., Mauromoustakos A.: *J. Agric. Food Chem.* 58, 4022 (2010).
35. Garcia-Viguera C., Zafrilla P., Artes F., Romero F., Abellan P., Tomas-Barberan F. A.: *J. Sci. Food Agric.* 78, 565 (1998).
36. Srivastava A., Akoh C. C., Yi W. G., Fischer J., Krewer G.: *J. Agric. Food Chem.* 55, 2705 (2007).
37. Pinto M. D., Lajolo F. M., Genovese M. I.: *Plant Food Hum. Nutr.* 62, 127 (2007).
38. Motyka K., Hlaváč J.: *Stručný přehled separačních metod*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2009.
39. Novakova L., Matysova L., Solich P.: *Talanta.* 68, 908 (2006).
40. Jastrebova J., Strandler H. S., Patring J., Wiklund T.: *Chromatographia.* 73, 219 (2011).

41. Štulík K. a kol.: *Analytické separační metody*. Karolinum, Praha 2004.
42. Honda K., Tsutsui K., Hosokawa K.: *Sci. Hortic.* 82, 125 (1999).
43. Saenz-Lopez R., Fernandez-Zurbano P., Tena M. T.: *J. Chromatogr. A* 1052, 191 (2004).
44. Segura-Carretero A., Puertas-Mejia M. A., Cortacero-Ramirez S., Beltran R., Alonso-Villaverde C., Joven J., Dinelli G., Fernandez-Gutierrez A.: *Electrophoresis* 29, 2852 (2008).
45. Bednář P., Papoušková B., Müller L., Barták P., Stávek J., Pavloušek P., Lemr K.: *J. Sep. Sci.* 28, 1291 (2005).
46. Zanatta C. F., Cuevas E., Bobbio F. O., Winterhalter P., Mercadante A. Z.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 9531 (2005).
47. da Costa C. T., Horton D., Margolis S. A.: *J. Chromatogr. A* 881, 403 (2000).
48. Romani A., Mulinacci N., Pinelli P., Vincieri F. F., Cimato A.: *J. Agric. Food Chem.* 47, 964 (1999).
49. Morata A., Gomez-Cordovez M. C., Suberviola J., Bartolome B., Colomo B., Suarez J. A.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 4084 (2003).
50. Goncalves B., Landbo A. K., Knudsen D., Silva A. P., Moutinho-Pereira J., Rosa E., Meyer A. S.: *J. Agric. Food Chem.* 52, 523 (2004).
51. Glassgen W. E., Seitz H. U., Metzger J. W.: *Biol. Mass Spectrom.* 21, 271 (1992).
52. Baldi A., Romani A., Mulinacci N., Vincieri F. F., Casetta B.: *J. Agric. Food Chem.* 43, 2104 (1995).
53. Bakker J., Bridle P., Honda T., Kuwano H., Saito N., Terahara N., Timberlake C. F.: *Phytochemistry* 44, 1375 (1997).
54. Harris C. S., Burt A. J., Saleem A., Le P. M., Martineau L. C., Haddad P. S., Bennett S. A. L., Arnason J. T.: *Phytochem. Anal.* 18, 161 (2007).
55. Marczak L., Kachlicki P., Kozniewski P., Skirycz A., Krajewski P., Stobiecki M.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 3949 (2008).
56. Barnes J. S., Nguyen H. P., Shen S., Schug K. A.: *J. Chromatogr. A* 1216, 4728 (2009).

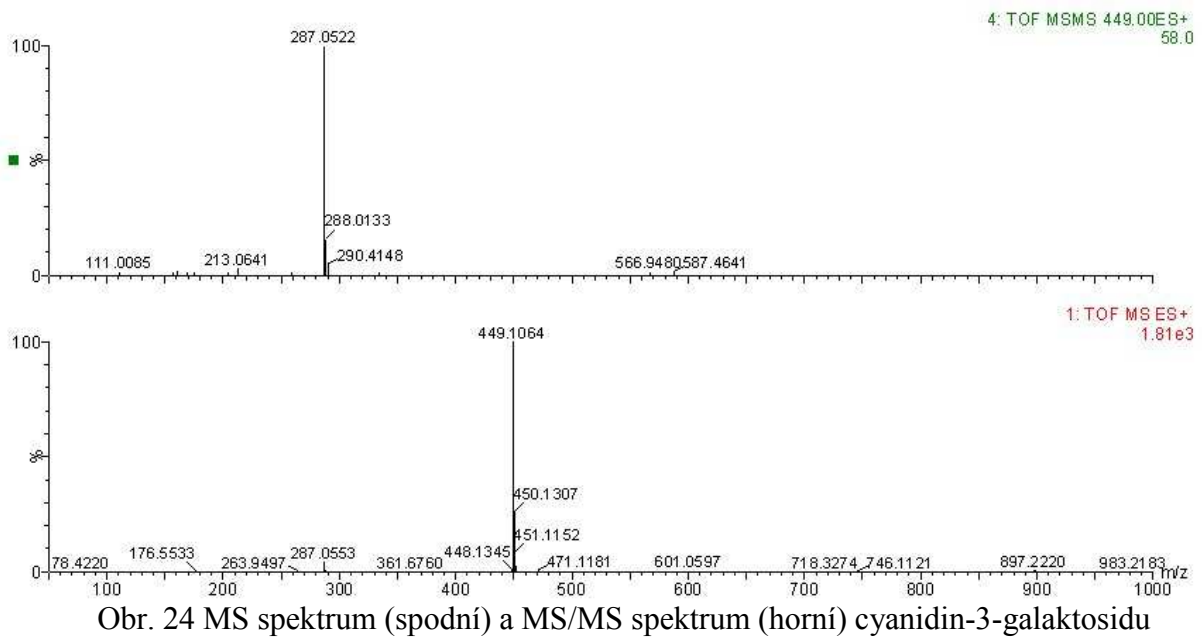
7. Seznam použitých zkratek

UHPLC, UPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie
ESI	ionizace elektrosprejem
MS	hmotnostní spektrometrie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
RP	chromatografie na reverzních fázích
LC	kapalinová chromatografie
TOF	analyzátor doby letu
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
NMR	nukleární magnetická rezonance
C(Z)E	kapilární (zónová) elektroforéza
DAD	detektor diodového pole
API	ionizace za atmosférického tlaku
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
FAB	bombardování urychlenými atomy
MALDI	desorpce laserem za účasti matrice
ESI+(-)	elektrosprej v pozitivním (negativním) módu
SPE	extrakce tuhou fází
TFA	kyselina trifluoroctová
FA	kyselina mravenčí
ACN	acetonitril
Cn	cyanidin
Dp	delphinidin
Pn	peonidin
Pt	petunidin

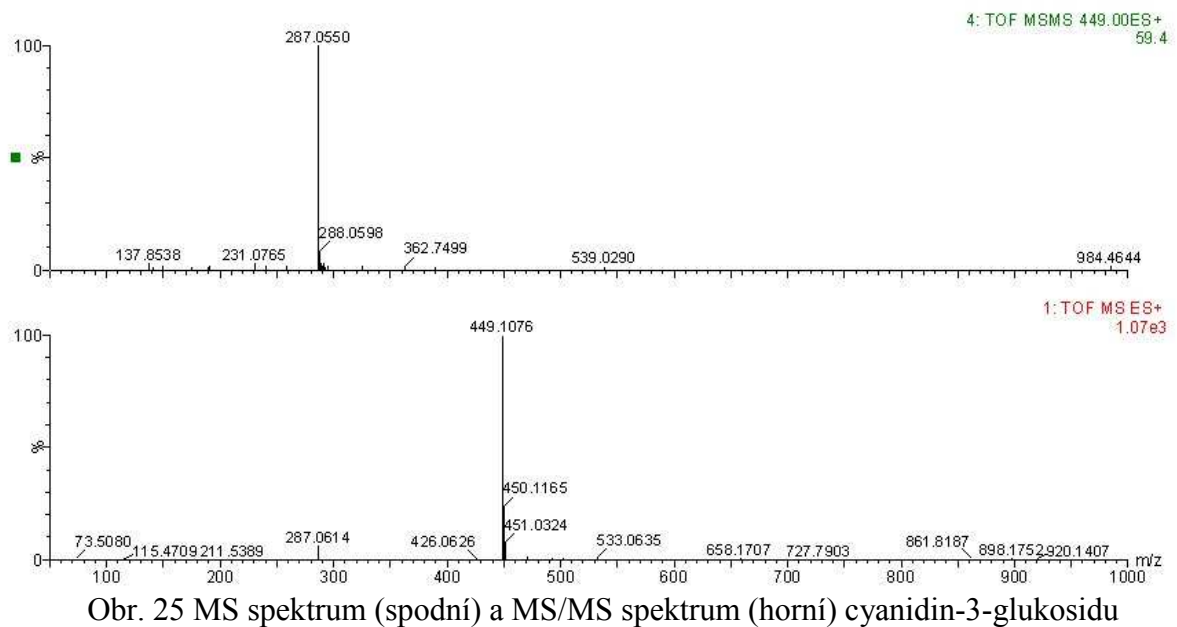
Mv	malvidin
Ara	arabinosid
Gal	galaktosid
Glu	glukosid
Xyl	xylosid
Sam	sambubiosid

8. Přílohy

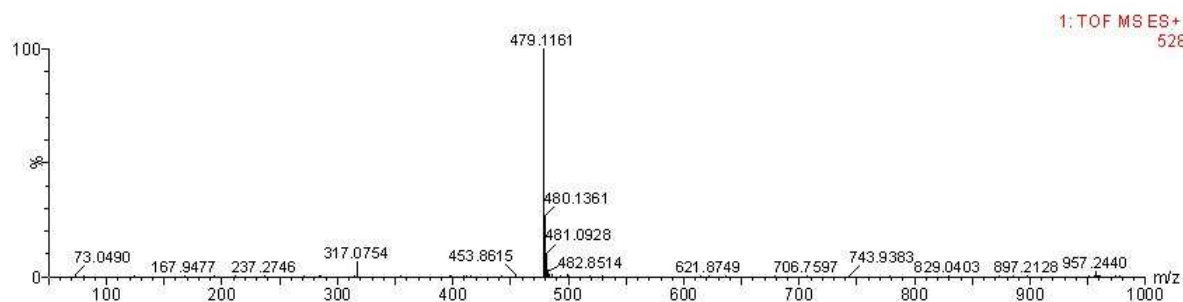
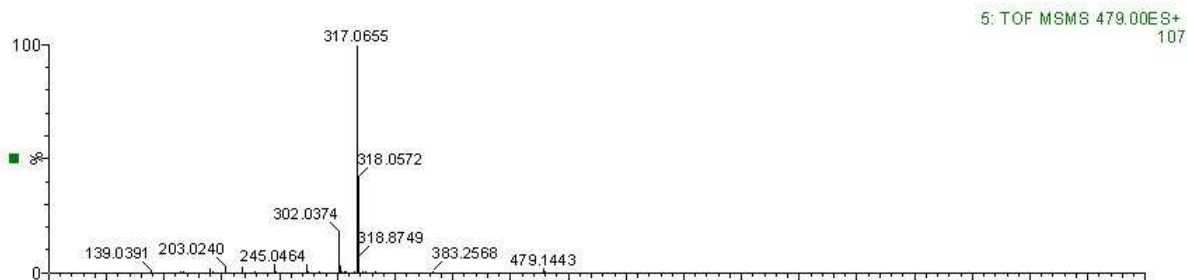
Přílohy obsahují MS spektra a MS/MS spektra zbývajících 12 anthokyaninů, identifikovaných v borůvkách, která nebyla zařazena do kapitoly Kvalitativní vyhodnocení anthokyaninů v borůvkách.



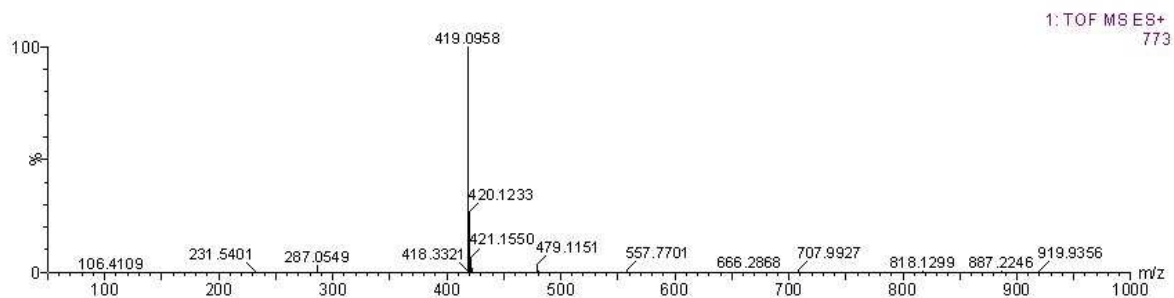
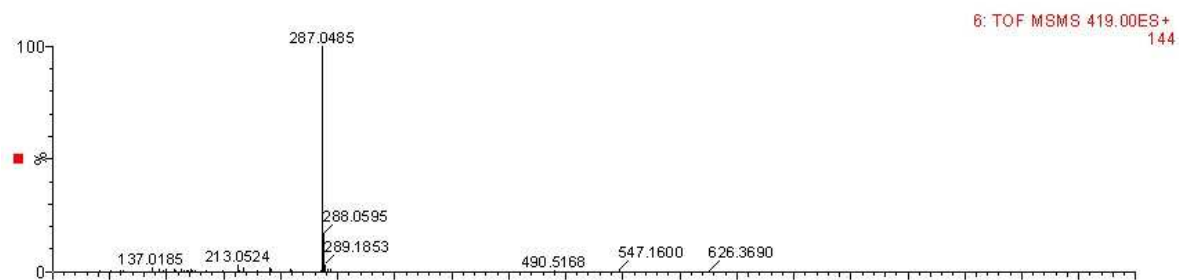
Obr. 24 MS spektrum (spodní) a MS/MS spektrum (horní) cyanidin-3-galaktosidu



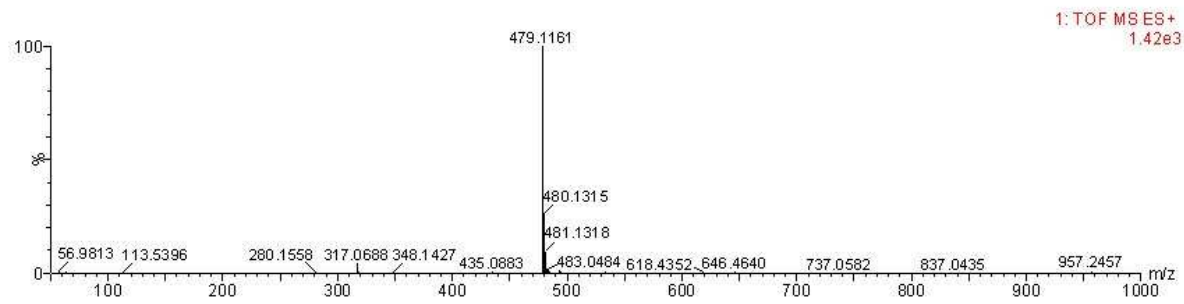
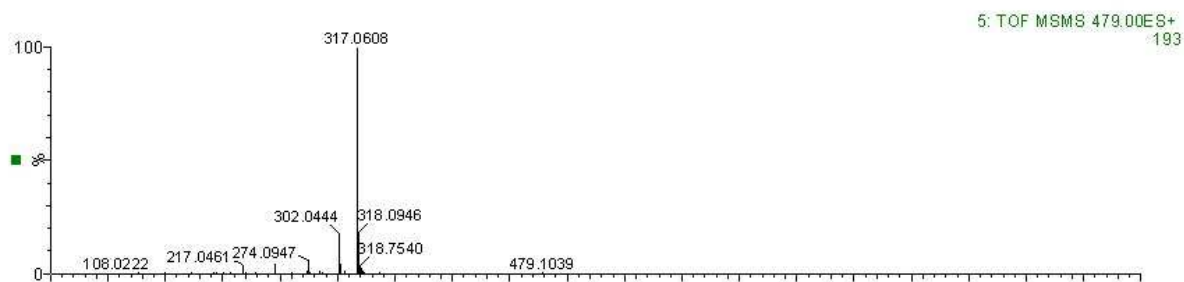
Obr. 25 MS spektrum (spodní) a MS/MS spektrum (horní) cyanidin-3-glukosidu



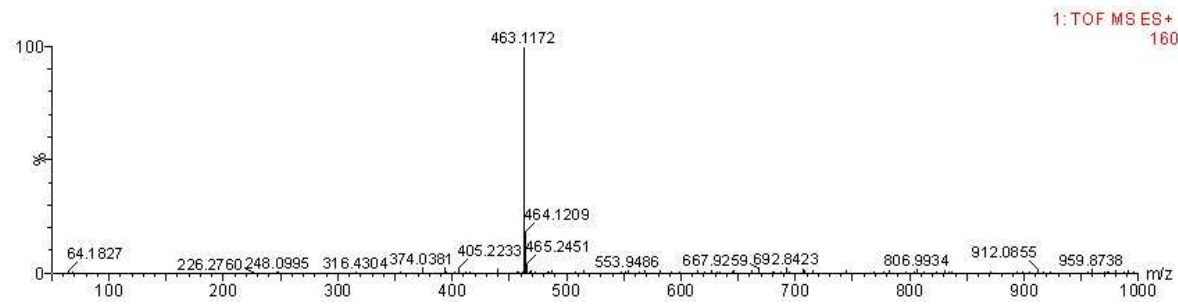
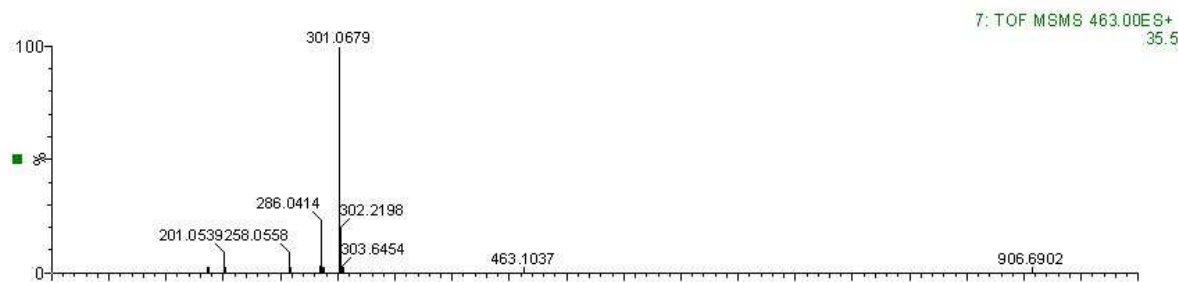
Obr. 26 MS spektrum (spodní) a MS/MS spektrum (horní) petunidin-3-galaktosidu



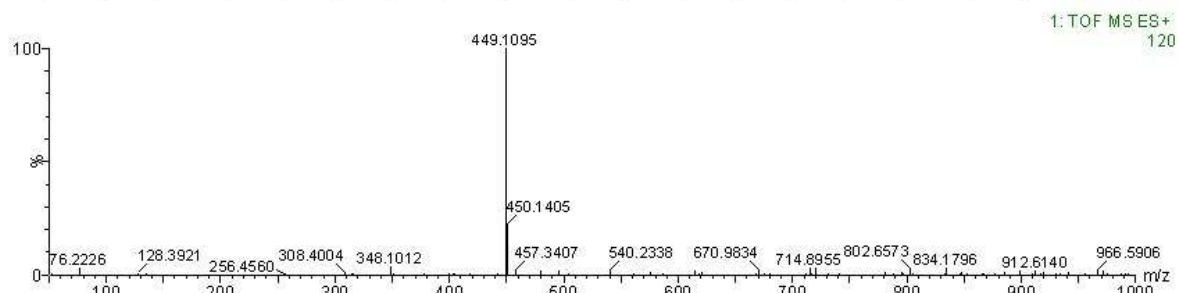
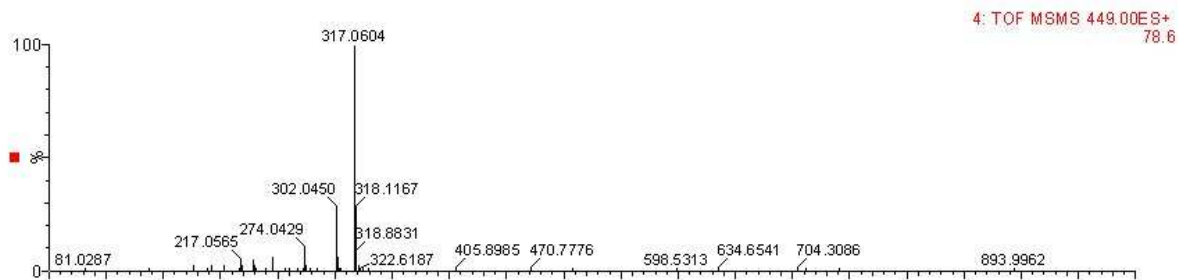
Obr. 27 MS spektrum (spodní) a MS/MS spektrum (horní) cyanidin-3-arabinosidu



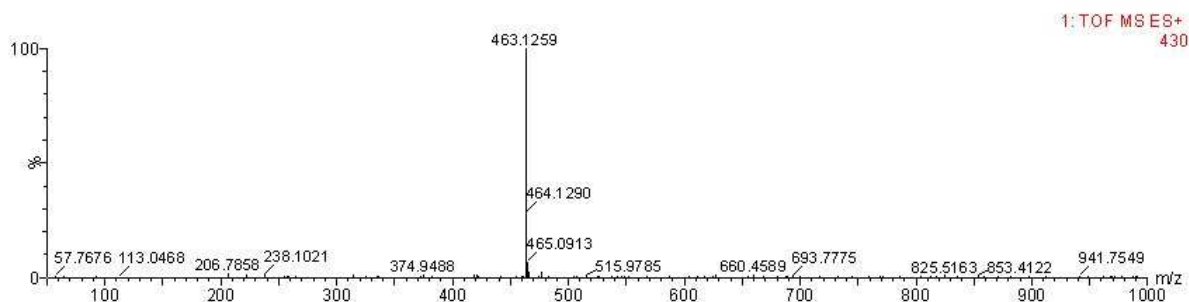
Obr. 28 MS spektrum (spodní) a MS/MS spektrum (spodní) petunidin-3-glukosidu



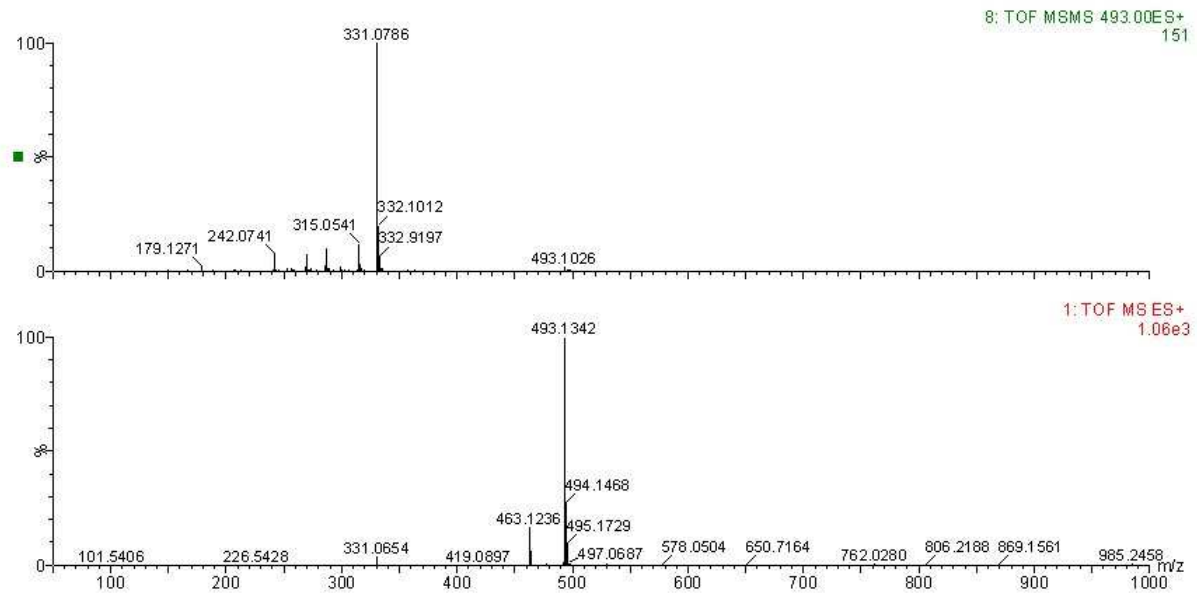
Obr. 29 MS spektrum (spodní) a MS/MS spektrum (horní) peonidin-3-galaktosidu



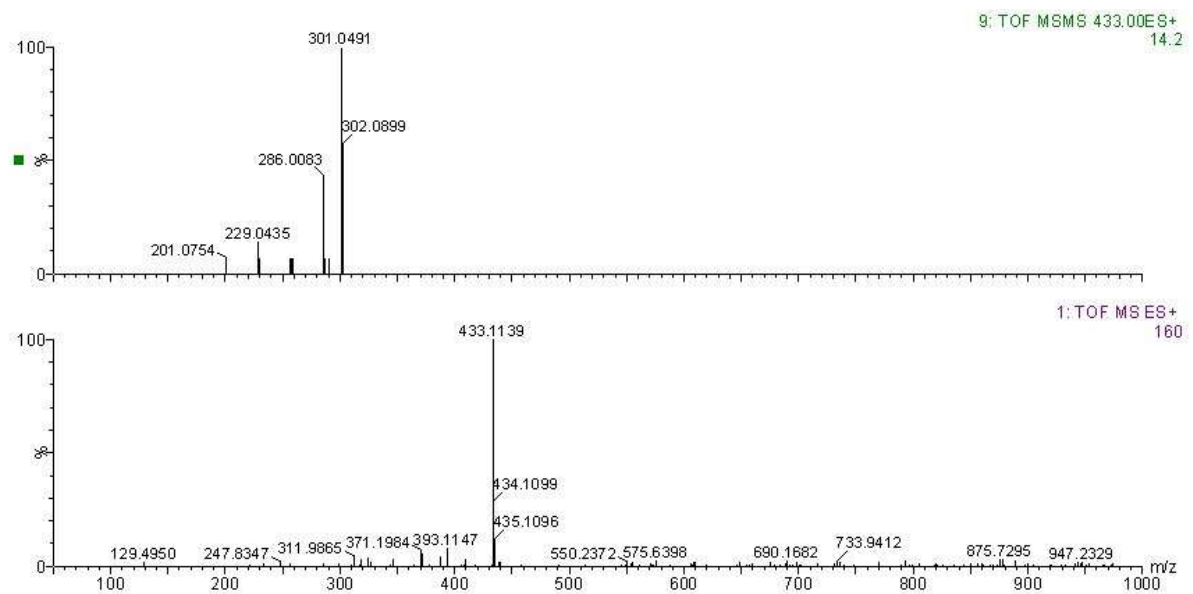
Obr. 30 MS spektrum (spodní) a MS/MS spektrum (horní) petunidin-3-arabinosidu



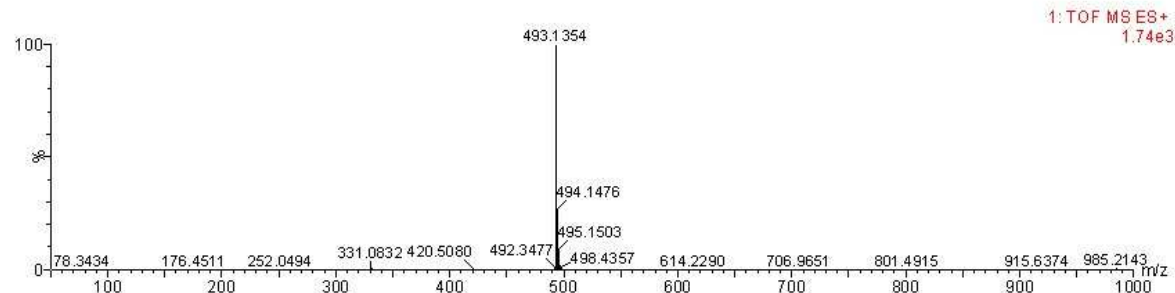
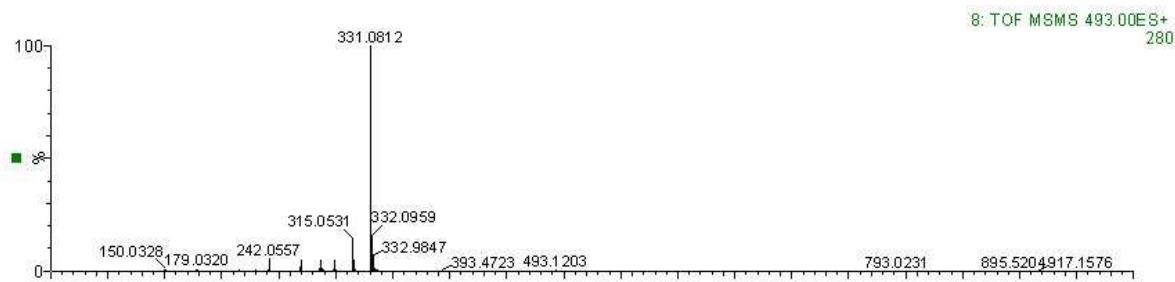
Obr. 31 MS spektrum (spodní) a MS/MS spektrum (horní) peonidin-3-glukosidu



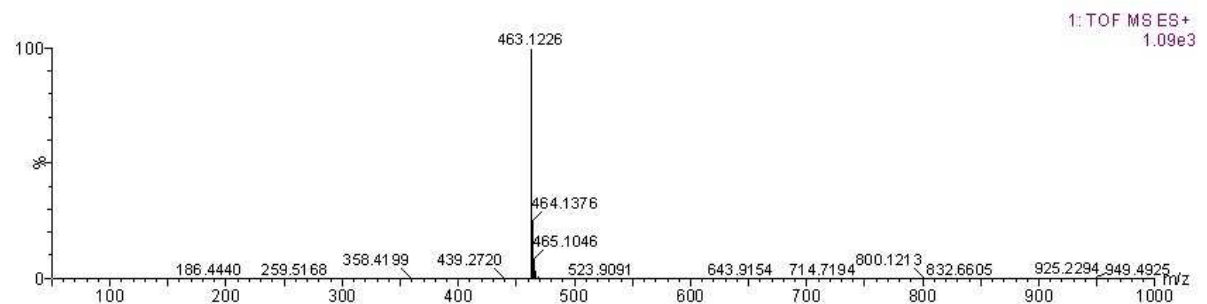
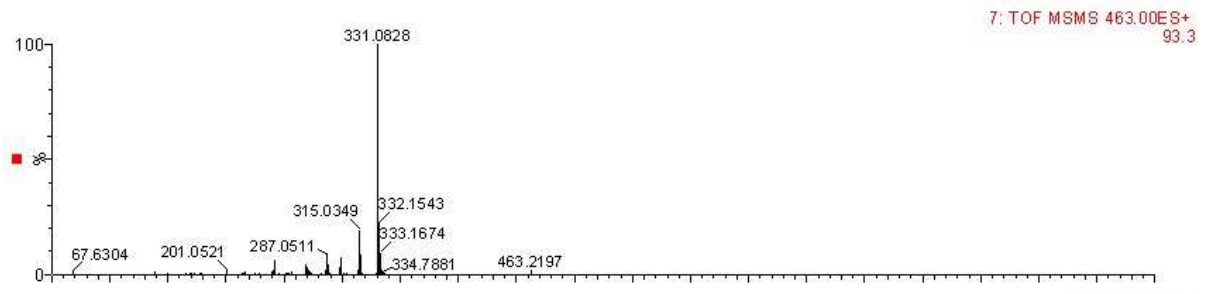
Obr. 32 MS spektrum (spodní) a MS/MS spektrum (horní) malvidin-3-galaktosidu



Obr. 33 MS spektrum (spodní) a MS/MS spektrum (horní) peonidin-3-arabinosidu



Obr. 34 MS spektrum (spodní) a MS/MS spektrum (horní) malvidin-3-glukosidu



Obr. 35 MS spektrum (spodní) a MS/MS spektrum (horní) malvidin-3-arabinosidu