

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Chemická oxidace anthokyaninů

Vypracoval:

Petr Zajíček

Studijní program:

B 1407 Chemie

Studijní obor:

Chemie

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne

Chtěl bych poděkovat panu doc. RNDr. Petru Bednářovi, Ph.D. za cenné rady a odbornou pomoc při psaní tohoto textu.

OBSAH

| | |
|---|----|
| Obsah | 4 |
| Souhrn | 5 |
| Summary | 6 |
| 1. ÚVOD | 7 |
| 2. TEORETICKÁ ČÁST | 9 |
| 2.1. Anthokyaniny, volné radikály a antioxidační kapacita | 9 |
| 2.2. Chemická oxidace | 15 |
| 2.3. Osud anthokyaninů v organismu | 17 |
| 2.4. Možnosti využití anthokyaninů pro prevenci nemocí a jejich léčbu | 22 |
| 2.5. Transformace anthokyaninů při zrání vín | 24 |
| 2.6. Analýza anthokyaninů | 28 |
| 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 31 |
| 3.1. Chemikálie, přístroje a podmínky analýzy | 31 |
| 3.2. Příprava reakční směsi a její analýza | 33 |
| 4. VÝSLEDKY A DISKUSE | 34 |
| 5. ZÁVĚR | 42 |
| 6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 43 |

SOUHRN

Anthokyaniny patří mezi rostlinná barviva, která způsobují červené až modré zbarvení v rostlinném světě. Existují v odlišných formách za různých podmínek ve vodném roztoku. Nejintenzivnější barevná forma je flavyliový kation. Anthokyaniny spolu s ostatními flavonoidy tvoří nedílnou součást lidské stravy, a proto je významné studium jejich osudu v organismu (tj. biochemické vlastnosti a metabolismus).

Mezi významné vlastnosti anthokyaninů patří jejich silné antioxidační vlastnosti a schopnost vychytávat volné radikály. Studium chemických změn anthokyaninů během oxidace může přispívat k porozumění procesům *in vivo*, a proto je chemická oxidace hlavním tématem této práce. Teoretická část se zabývá vlastnostmi anthokyaninů, jejich antioxidační kapacitou a vlivem na lidské zdraví.

V experimentální části byla provedena oxidace cyanidin-3-galaktosidu peroxidem vodíku. Byly analyzovány degradační produkty pomocí UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) s UV-Vis detekcí kombinovanou s hmotnostní spektrometrií. Během reakce anthokyaninu s peroxidem vodíku byl objeven ion o hodnotě m/z 483,1078. Podrobnější interpretace s ním spojených MS spekter dovolila přiřadit tento ion přímému aduktu anthokyaninu s peroxidem vodíku. Během fragmentace tohoto iontu byla pozorována a pomocí měření přesných hodnot m/z jednoznačně potvrzena ztráta cukru a následný rozpad C kruhu anthokyanidinového skeletu.

Kromě toho byly pozorovány další oxidační produkty, avšak díky nízké intenzitě odpovídajících iontů nebyla jejich struktura odhalena a je předmětem dalšího výzkumu.

SUMMARY

Anthocyanins are plant pigments that are responsible for the red and blue colors in plant world. They exist in different forms dependent on conditions in aqueous solution. The most intensive colored form is the flavylium cation. Since anthocyanins (together with other flavonoids) represent an integral part of human diet, it is of a high importance to know their fate in body (i.e. bioavailability and metabolism).

Among important properties of anthocyanins belong their ability to serve as efficient antioxidants and to scavenge free radicals. Obviously, the knowledge of anthocyanin changes during their oxidation can approach the processes in vivo. The chemical oxidation of anthocyanins is the main objective of this work. Theoretical part involves properties, oxidation, antioxidant capacity and influence on human health of anthocyanins.

In experimental part the oxidation of cyanidin-3-galactoside by hydrogen peroxide was studied. Degradation products were analyzed by ultra-performance liquid chromatography with UV-Vis detection combined with mass spectrometry. During reaction of anthocyanin with hydrogen peroxide an ion at m/z 483,1078 was found. The detailed interpretation of related MS spectra allowed to ascribe this ion to a direct adduct of anthocyanin with hydrogen peroxide. During the fragmentation of this ion the loss of galactoside and consequent cleavage of C-ring of anthocyanidin skeleton was observed and unambiguously confirmed by exact mass measurement.

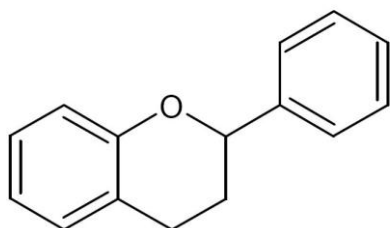
Beside some other minor oxidation products were observed. However, due to a low intensity of appropriate ions their structure was not revealed and they are objectives of further research.

1. ÚVOD

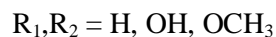
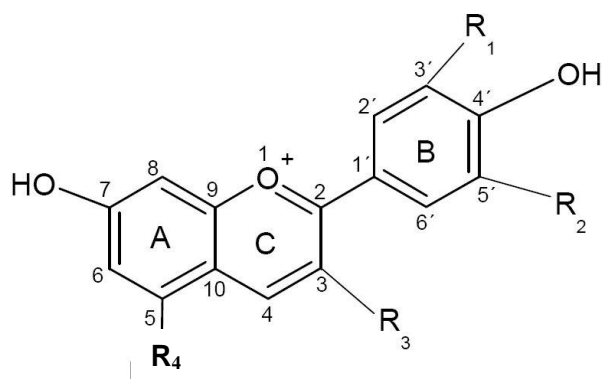
Anthokyaniny patří mezi přírodní rostlinná barviva objevená již v 19. století. Jméno těchto polyfenolických látkám dal roku 1835 německý botanik Ludwig Marquart. Název je odvozen z řeckého anthos, což znamená květ, a kyanos, což znamená modrý¹. V současnosti se rapidně zvyšuje počet prací zabývajících se těmito látkami zejména z důvodu jejich prokázaných pozitivních účinků na lidské zdraví.

Charakteristickou vlastností těchto látek je jejich barevnost. Barva a její intenzita v roztoku je však velmi závislá na pH, přítomnosti komplexujících iontů, dalších fenolických látek a také na teplotě.

Struktura anthokyaninů byla objasněna počátkem 20. století. Jde o glykosylované hydroxyderiváty či methoxyderiváty 2-fenylbenzopyryliových solí. Anthokyaniny můžeme na základě jejich struktury zařadit mezi polyfenoly, přesněji potom do skupiny flavonoidů. Základní látkou, od které jsou flavonoidy odvozeny, je flavan (Obr. 1). Z něj je odvozen flavyliový kation (Obr. 2), který je základní strukturou anthokyaninů. Anthokyaniny obsahují aglykon i cukernou část, zatímco anthokyanidiny jen aglykon.



Obr. 1 Struktura flavanu



Obr. 2 Struktura flavyliového kationtu

Anthokyaniny jsou obsaženy především v buněčných vakuolách v bobulích či jiných plodech vyšších rostlin. Řada těchto plodů je součástí potravy člověka nebo výchozí surovinou pro potravinářský průmysl. Jako složka potravy se tak anthokyaniny dostávají do těla člověka. Mohou se zde podílet na biochemických procesech, a tak ovlivňovat řadu faktorů.

Odhaduje se, že člověk žijící ve Spojených státech denně přijme 180-215 mg anthokyaninů. Oproti tomu jiná studie, které se podrobili dobrovolníci ve Finsku, poukázala na příjem 47 mg anthokyaninů denně. Se zvýšenou konzumací přírodních plodů obsah anthokyaninů přijatých organismem významně narůstá, proto lze vysvětlit tato odlišná čísla různě složeným jídelníčkem v odlišných geografických oblastech. Příjem ostatních flavonoidů činí 20-25 mg za den^{2,3}.

Mnohé vědecké studie a experimenty poukazují na to, že anthokyaniny mají antioxidační vlastnosti a řadu dalších pozitivních účinků na zdraví člověka. Ovšem objasnění mechanismů mnoha biochemických procesů, na kterých se anthokyaniny podílí, zatím nebylo uspokojivě provedeno. Také metabolismus anthokyaninů není ještě plně prozkoumán. Je zde řada nevyřešených problémů, které jsou předmětem vědeckého bádání. Přesto z existujících vědeckých poznatků o anthokyaninech již řada nachází své uplatnění. Předpokládá se, že anthokyaniny mohou snižovat riziko nebezpečí koronárních srdečních chorob (tedy chorob cév vyživujících srdce), které mohou skončit infarktem.

Anthokyaniny vykazují rovněž antikarcinogenní a antimutagenní vlastnosti. Schopnost reagovat s radikály, a tak zamezit jejich interakci s organismem, je jednou z významných vlastností anthokyaninů. Zajímavé je, že schopnost likvidace těchto radikálů anthokyaniny se zvyšuje s rostoucím pH. Při vyšším pH vzniká chinonová forma s vysoce konjugovaným systémem π -elektronů umožňujícím efektivní stabilizaci (zhášení) volných radikálů⁴. Různé pH v lidském těle pak ovlivňuje antioxidační aktivitu v jednotlivých tkáních a orgánech. Připomeňme, že pH v žaludku se pohybuje kolem 1, ve slinách 6,8 a oproti tomu pH krve kolem 7,4 což výrazně ovlivňuje zhášecí schopnosti i retenci anthokyaninů v jednotlivých tkáních, a tím i jejich chemické přeměny⁵.

Některé anthokyaniny již našly pro své léčivé účinky uplatnění v praxi. Lze zmínit například glykosylovaný delphinidin a glykosylovaný cyanidin, které jsou jako součást extraktu z borůvek (*Vaccinium myrtillus*) používány k léčbě poruch mikrocirkulace v zesláblých vlasečnicích⁶.

Anthokyaniny snadno podléhají chemickým přeměnám. Vzhledem k jejich struktuře a vlastnostem budou snadno oxidovány. Vlastnosti oxidovaných barviv se budou od původních látek výrazně lišit. Hlavním tématem této práce je studium chemických přeměn anthokyaninů zejména s ohledem na oxidaci.

2 . TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Anthokyaniny, volné radikály a antioxidační kapacita

Volné radikály jsou vysoce reaktivní částice s nepárovým elektronem. Právě díky vysoké reaktivitě jsou velmi nebezpečné pro organismus. Pokud je volných radikálů v organismu příliš mnoho, posouvá se rovnováha mezi oxidanty a antioxydanty ve prospěch oxidantů, a tak dochází k oxidačnímu stresu. Volné radikály vznikají v mitochondriích při buněčném dýchání anebo jako produkty metabolismu. Mohou napadat molekuly tvořící buňky, buněčné membrány a DNA u níž mohou vyvolat mutace. Dochází k neřízeným neenzymatickým oxidacím. Chemickou změnou napadené látky dochází ke spuštění mechanismu, který může vyústit v řadu zdravotních problémů a nemocí, například rakovinu.

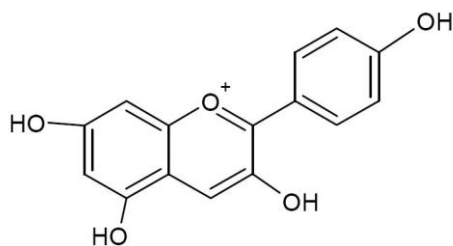
Mezi kyslíkaté radikály patří hydroxylový radikál (OH^\bullet), peroxylový radikál (OOH^\bullet), superoxidový radikál ($\text{O}_2^{\bullet-}$) a mezi velmi reaktivní kyslíkaté částice (ROS - reactive oxygen species) můžeme též řadit molekulu kyslíku v singletovém stavu.

Reakcí anthokyaninu s radikálem vznikají radikálové produkty anthokyaninu, které mohou být stabilní díky výše zmíněné chinonové formě. Tím, že radikály preferují reakci s anthokyaniny, jsou před oxidací chráněny tkáně nebo orgány, kde jsou tyto antioxydanty zadržovány.

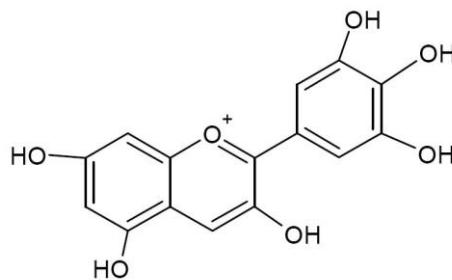
Významnou úlohu při vzniku radikálů hraje peroxid vodíku, který vzniká v organismu přeměnou superoxidu pomocí superoxidodismutasy a snadno proniká přes buněčné membrány. V organismu je likvidován glutathionperoxidasou přeměnou na vodu nebo katalasou přeměnou na vodu a molekulární kyslík. V případě nedostatku enzymů v organismu se peroxid nestačí odbourávat a v přítomnosti železa jako katalyzátoru mohou z peroxidu vznikat hydroxylové radikály. Jedná se o tzv. Fentonovu reakci v kyselém prostředí:



Tato reakce může být potlačena anthokyaniny substituovanými v polohách 3',4', 5' nebo 3', 4' hydroxyskupinami (viz Obr. 2) pomocí jejich schopnosti chelatovat kationty železa, mědi, cínu a hliníku⁷. Tedy například pelargonidin (Obr. 3) chelatační vlastnosti nemá, ale delphinidin (Obr. 4) ano. Pokud tedy má přítomný anthokyanin chelatační vlastnosti, lze očekávat lepší antioxidační vlastnosti.



Obr. 3 Struktura pelargonidinu

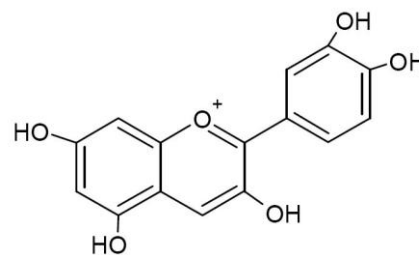


Obr. 4 Struktura delphinidinu

Podle antioxidačních schopností můžeme anthokyaniny porovnávat s jinými antioxidanty. Bylo vypracováno mnoho metod dovolujících porovnání antioxidační kapacity. Jednou z metod je TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity). Metoda je založena na porovnání antioxidační kapacity sledovaného antioxidantu s Troloxem (ve vodě rozpustný derivát vitamínu E používaný jako standard). Jako zdroj radikálů se používá 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát (ABTS). Při reakci s antioxidantem se modrý ABTS mění na bezbarvou formu a tato barevná změna se měří spektrofotometricky⁸.

Jinou metodou pro porovnávání antioxidační kapacity je ORAC (Oxygen radical absorbance capacity), která opět využívá jako standard již výše zmiňovaný Trolox. Metoda je založena na oxidativní degradaci fluoreskující molekuly (například fluoresceinu) způsobené volnými radikály vzniklými zahřátím azoiniciátoru (radikálového iniciátoru). Volné radikály degradují fluoreskující molekulu, a to se projeví poklesem fluorescence. Tento pokles je potlačován přítomností antioxidantu. Jeho účinnost se tedy určuje fluorimetricky⁹.

Odlíšné antioxidační vlastnosti jednotlivých anthokyaninů jsou dány jejich odlišnou strukturou. Výše zmíněné umístění hydroxyskupin na základním skeletu a jejich počet přímo ovlivňuje antioxidační kapacitu. Z Tabulky 1 je vidět, že pelargonin má hodnoty antioxidační kapacity podle TEAC i ORAC nižší než cyanidin (Obr. 5). To lze vysvětlit porovnáním struktury těchto anthokyaninů.



Obr. 5 Struktura cyanidinu

Tabulka 1. Antioxidační kapacita vybraných anthokyaninů⁵

| | TEAC(pH 7,4)* | ORAC(pH 7,0)* |
|-------------------------|---------------|---------------|
| pelargonidin | 1,23 | 1,54 |
| cyanidin | 4,12 | 2,24 |
| delphinidin | 5,11 | 1,81 |
| malvidin | 2,71 | 2,01 |
| cyanidin-3-O-β-glukosid | 2,94 | 3,49 |
| malvidin-3-O-β-glukosid | 1,89 | 1,40 |

Podíváme-li se na strukturu pelargonidinu, je vidět, že flavyliový kation je hydroxyskupinami substituován v polohách 3, 5, 7, 4', zatímco cyanidin je substituován navíc v poloze 3', a právě tato hydroxylová skupina se tedy zřejmě podílí na zvýšení antioxidační kapacity. Jak bylo již výše zmíněno antioxidační kapacita je závislá na pH. Bylo zjištěno, že u anthokyaninů substituovaných více než jednou hydroxy skupinou na B kruhu s rostoucím pH roztoku vzrůstá TEAC (antioxidační kapacita). Tedy například u cyanidinu či delphinidinu s rostoucím pH antioxidační kapacita prudce vzrůstá, ale u pelargonidinu se příliš nemění. Pokud ovšem bude na cyanidinu či delphinidinu navázán glukosid, není vzrůst antioxidační kapacity s rostoucím pH tak strmý.

Prokázána je také inhibice neenzymatické peroxidace lipidů některými anthokyaniny nebo produkty jejich degradace. Peroxidace je destruktivní proces, kdy interakce radikálu s lipidem vede ke vzniku lipidového radikálu, který pak reakcí s molekulovým kyslíkem poskytne lipidový peroxid. Během peroxidace je nezbytná přítomnost kovu (většinou ionty železa či mědi), který funguje jako katalyzátor. Jde o významnou degradaci, protože lipidy jsou v hojné míře zastoupeny v buněčných membránách. Ty jsou pak poškozeny a je narušena jejich semipermeabilita¹⁰. Navíc peroxidací vznikají toxické produkty jako například 4-hydroxyalkeny nebo malondialdehyd, které se mohou navázat na volné aminoskupiny proteinů, což může vést k jejich agregaci. Lipoperoxidace působí negativně i na DNA, kdy dochází k poškození dusíkatých bází DNA. Inhibitorem těchto procesů s velkou efektivitou je delphinidin a cyanidin, pelargonin pak působí v menší míře, což je ve shodě s poznatky uvedenými výše. Obecně zde platí, že u glykosylovaných anthokyaninů efektivita inhibice klesá. U malvidin-3-glukosidu byla dokonce při působení určité dávky v organismu paradoxně zaznamenána podpora lipidové oxidace. Míra inhibice je tedy závislá na velikosti podané dávky.

Jiná studie, kde byla hodnota antioxidační kapacity srovnávána pomocí maximální inhibiční (zamezující, tlumící) koncentrace IC_{50} , (maximální koncentrace zkoušené látky potřebná k 50% inhibici; v našem případě odbourání radikálu), ukázala obdobné dopady struktury jednotlivých anthokyaninů na antioxidační vlastnosti. Byla testována schopnost odbourání hydroxylových a superoxidových radikálů pomocí pelargonidin-3-glukosidu, cyanidin-3-glukosidu a delphinidin-3-glukosidu a následně srovnána s účinkem jejich aglykonů. U všech třech glykosylovaných anthokyaninů se ukázala obdobná hodnota IC_{50} pro hydroxylový radikál. U aglykonů schopnost zachytávat hydroxylové radikály klesala v pořadí

pelargonidin > cyanidin > delphinidin se zvětšujícím se potřebným množstvím k 50 % utlumení radikálů. Tento trend u hydroxylového radikálu je v rozporu s již zmiňovaným faktem, že vícečetná substituce B kruhu podporuje antioxidační účinky. Substituce B kruhu tedy zvyšuje celkovou antioxidační kapacitu, ale selektivně pro jednotlivé radikály nemusí tento trend platit.

U superoxidových radikálů výsledky prokázaly delphinidin jako nejsilnější anthokyanin pro zachytávání tohoto radikálu. Podíváme-li se na Tabulku 2, lze pozorovat, že u superoxidového radikálu schopnost jeho likvidace u anthokyaninů klesá v pořadí delphinidin > cyanidin > pelargonidin, a tento trend není závislý na faktu, zda jde o aglykon či glykosylovaný anthokyanin¹¹.

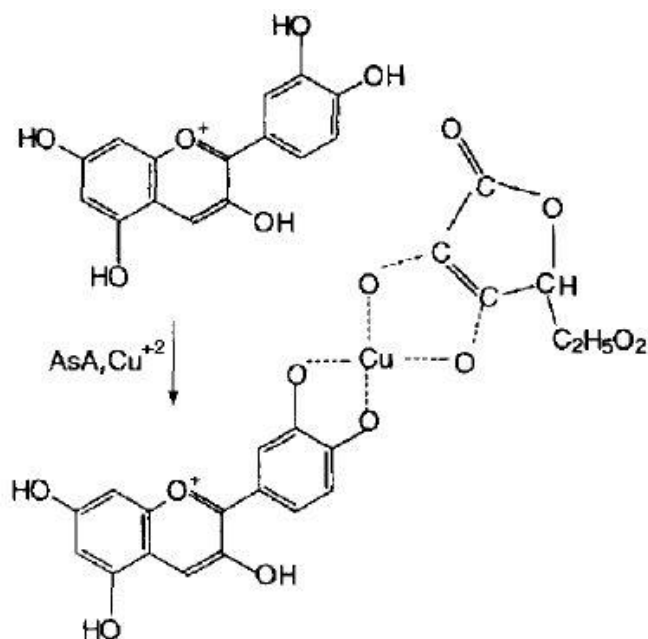
Tabulka 2. Účinnost zachytávání hydroxylového a superoxidového radikálu jednotlivými anthokyaniny

| IC ₅₀ (μmol.dm ⁻³) | | | |
|---|---|--|---|
| | schopnost zachytávat (OH [•]) ¹¹ | schopnost zachytávat (O ₂ ^{•-}) ¹¹ | schopnost zachytávat (O ₂ ^{•-}) ⁷ |
| pelargonin-3-glukosid | 35,1 ± 2,5 | 80,3 ± 1,8 | |
| cyanidin-3-glukosid | 35,9 ± 2,5 | 12,4 ± 0,9 | |
| delphinidin-3-glukosid | 34,1 ± 1,6 | 1,6 ± 0,1 | |
| pelargonidin | 8,5 ± 1,0 | 54,5 ± 6,4 | 420 |
| cyanidin | 36,7 ± 1,6 | 13,4 ± 0,7 | 22 |
| delphinidin | >100 | 2,6 ± 0,4 | 2,4 |

Mezi výše zmíněné reaktivní kyslíkaté částice lze také zařadit peroxynitrit (ONOO⁻), který vzniká reakcí superoxidového radikálu s oxidem dusnatým. Jde o látku se silnými oxidačními vlastnostmi. S tyrosinem reaguje za vzniku 3-nitrotyrosinu. Ten byl detekován v organismu postiženém aterosklerosou (kornatění tepen v důsledku ukládání tuků do jejich stěn, které může vést k infarktu myokardu či cévní mozkové příhodě). Nitrace tyrosinu může být inhibována anthokyaniny, které reagují s peroxynitritem. Prokázána a experimentálně provedena byla inhibice za pomoci pelargonidinu. Jeho reakcí s peroxynitritem vznikala p-hydroxybenzoová kyselina, která byla nitrována na 4-hydroxy-3-nitrobenzoovou kyselinu. Jak pelargonidin, tak jeho degradační produkt p-hydroxybenzoová kyselina projevily inhibiční vlastnosti proti vzniku nitrovaného tyrosinu¹².

Schopnost anthokyaninů potlačovat oxidační stres byla testována a prokázána in vivo. Zajímavý byl experiment, kdy byla reperfúze jater po ischemii využita jako modelový příklad

oxidačního stresu u testovaných kryš. Princip spočívá v nedostatečném prokrvení jater, kdy v nich dojde ke vzniku řady toxických látek a díky nepřístupu kyslíku a zamezení odvodu metabolitů dochází k ischemickému poškození. Náhlé znovuprokrvení (reperfúze) přinese do poškozených míst kyslík, který zde ochotně reaguje za vzniku radikálů. V poškozeném orgánu tak dochází k oxidačnímu stresu, který se projevuje poruchami různých biomolekul, obzvláště dochází k lipoperoxidaci fosfolipidů buněčných membrán. Výsledkem je další poškození postiženého orgánu, i celého organismu, protože toxické zplodiny jsou rozváděny oběhovým systémem do celého těla. Během experimentu byla kryšám podávána strava obohacená na cyanidin-3-glukosid. Aplikovaný cyanidin-3-glukosid či jeho metabolity působily aktivně jako antioxidant místo glutathionu přítomného v játrech, jehož úbytek byl v době po požití dávky vyrovnán. Dále bylo zjištěno, že obsah kyseliny askorbové (dalšího významného antioxidantu) v játrech zpočátku klesal, nicméně po určité době byl opět navýšen vlivem přítomných anthokyaninů. Na tomto experimentu můžeme vidět, že přítomnost anthokyaninu a jeho následných metabolitů pomohla zamezit oxidativnímu poškození organismu¹³.



Obr. 6 Vznik komplexu anthokyanin-kov-koenigment¹⁴

Mezi hojně se vyskytující antioxidanty v živočišné i rostlinné říši patří i výše zmíněná kyselina askorbová. Její pokles v organismu pod určitou míru je nežádoucí a vede ke vzniku oxidačního stresu. Je známo, že přítomnost těžkých kovů podporuje oxidační stres. Například účast železa jako katalyzátoru se podílí na vzniku hydroxylových radikálů z peroxidu vodíku

(viz výše zmíněná Fentonova reakce). Jsou-li v organismu přítomné anthokyaniny, chrání kyselinu askorbovou před oxidací velmi zajímavým způsobem využívajícím paradoxně právě přítomnost kovu. Díky hydroxyskupinám na B kruhu v polohách 3' a 4' může docházet k chelataci. Navázáním kovu se znemožní jeho zapojení se do oxidačních procesů, kov dále nemůže indukovat oxidaci kyseliny askorbové. Jiným vysvětlením může být, že dochází ke kopigmentaci (Obr. 6), kdy se vytvoří komplex anthokyanin-kov-kopigment, kde kopigmentem je kyselina askorbová, která je navázáním na kov chráněna před oxidací¹⁴. Kopigment je bezbarvá látka, která interakcí s barvivem ovlivní zabarvení roztoku, v němž se tyto dvě komponenty nachází¹⁵.

Anthokyaniny se významně podílí rovněž na ochraně rostlinných buněk. Spolu s dalšími druhy flavonoidů působí jako UV filtr a chrání rostlinu před vznikem volných radikálů. Pokud rostliny strádají (nejsou vyživovány nebo jsou vystavovány vysokým teplotám, případně suchu), často dochází ke zvýšení produkce anthokyaninů v organismu. Právě při takovém strádání totiž vznikají v buňkách toxické produkty oxidací, které mohou být potlačeny navýšením množství anthokyaninů. Na tomto příkladě je patrné, že antioxidační účinky anthokyaninů jsou využity i v rostlinné říši a příroda s nimi jako antioxidanty počítá.

2.2. Chemická oxidace

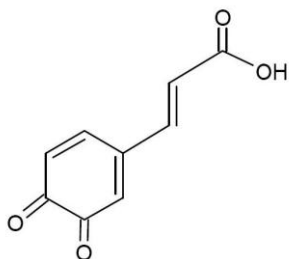
Většina vědeckých studií se zabývá oxidací anthokyaninů v rostlinách, jejich plodech a ve víně během jejich zrání nebo oxidací anthokyaninů při jejich retenci v tkáních a orgánech. Velmi málo studií popisuje chemickou oxidaci izolovaného anthokyaninu. Většina autorů studuje vliv oxidace na kvalitu potravin a pracuje tedy se složitou směsí různých antioxidantů, kde jednotlivé procesy mohou být vzájemně ovlivněny.

Mezi oxidanty vhodně přibližujícími oxidativní rozklad anthokyaninů během biologických procesů se řadí vzdušný kyslík (O_2), peroxid vodíku (H_2O_2) a peroxyinitrit ($ONOO$). Oxidace anthokyaninu peroxyinitritem probíhá nejlépe u delphinidin-3-glukosidu, jeho reaktivita s peroxyinitritem byla šestkrát vyšší než u ostatních anthokyaninů¹⁶.

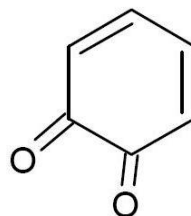
Peroxid vodíku byl rovněž použit ve studii, kdy měl simulovat mírné oxidační podmínky při skladování jahod. Byl pozorován úbytek anthokyaninu (pelargonidin-3-glukosid) ve vzorku a po určité době ve vzorku byla detekována kyselina p-hydroxybenzoová a polymerní struktury. Nešlo o čistě chemickou oxidaci bez přítomnosti enzymů, reakce probíhala v biochemicky aktivním prostředí¹⁷.

Jiná studie popisovala degradaci cyanidin-3-glukosidu v litchi (exotické ovoce). Použit byl opět peroxid vodíku a byl pozorován úbytek anthokyaninů a odbarvení roztoku. Degradace probíhala rychleji v přítomnosti železnatých iontů, kdy docházelo k Fentonově reakci¹⁸. Tyto dvě práce se jako jedny z mála zabývají oxidací anthokyaninu za použití peroxidu vodíku.

Oxidace může probíhat také reakcí s o-chinonovou formou například kyseliny kávové (Obr. 7) nebo katecholu (Obr. 8). Tyto látky vznikají jako primární oxidační produkty



Obr. 7 Struktura kyseliny kávové
v o-chinonové formě



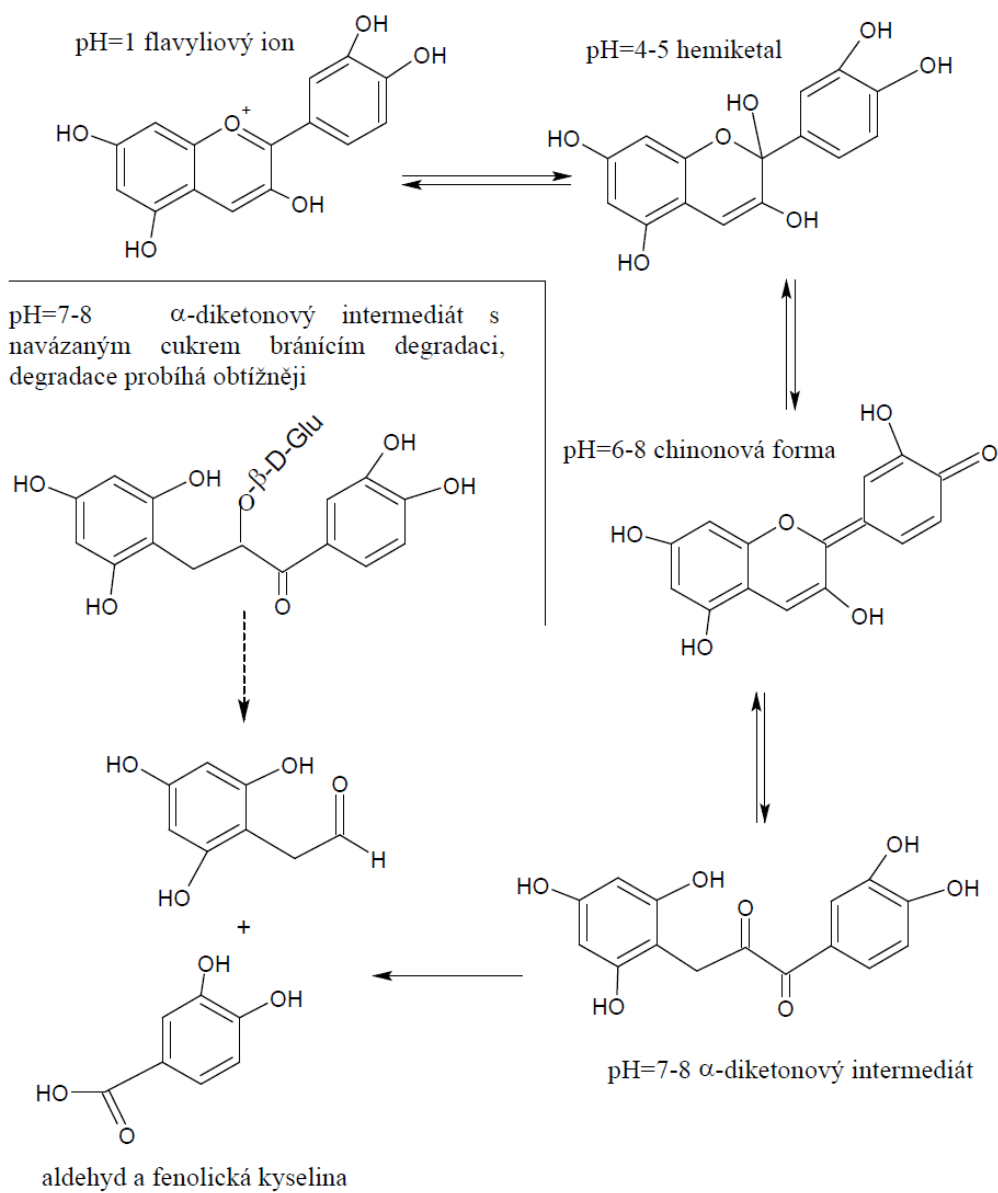
Obr. 8 Struktura katecholu v o-chinonové formě

v brusinkách. Sekundárně oxidují anthokyaniny, což vede ke změně zbarvení bobule. Experimentem bylo prověřeno, že kyselina kávová v o-chinonové formě reagovala s pelargonidinem v reakční směsi bez přítomnosti enzymů¹⁹.

Jiné příklady chemické oxidace bez biochemických systémů nebyly v literatuře nalezeny. Chemické oxidaci se věnuje experimentální část této práce.

2.3. Osud anthokyaninů v organismu

Anthokyaniny se jako přirozená součást potravy dostávají do organismu, kde jsou dále rozváděny do různých tkání. Samotné aglykony jsou za fyziologických podmínek málo stálé (stále jsou v kyselém prostředí). S počtem hydroxy a methoxyskupin na B-kruhu klesá stabilita aglykonu v neutrálním roztoku²⁰. Glykosylované anthokyaniny jsou v neutrálním prostředí stálejší, protože navázaný cukr brání degradaci velmi nestabilního α -diketonového intermediátu (Obr. 9) na fenolické kyseliny a aldehyd. Glykosylace navíc stericky brání

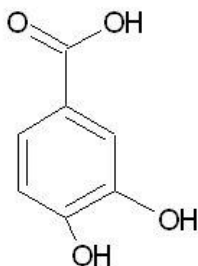


Obr. 9 Vznik velmi nestabilního α -diketonového intermediátu u aglykonů²⁰

dimerizaci anthokyaninů.

K chemickým změnám anthokyaninů v organismu už dochází změnou fyziologických podmínek jejich prostředí před samotnou absorpcí do dané tkáně či orgánu. Právě tyto změny jsou často klíčové pro efektivní absorpci dané látky a její biologickou aktivitu, která je podmíněná schopností zadržet anthokyaniny a jejich metabolity jednotlivými tkáněmi a orgány, kde pak mohou tyto látky a jejich metabolity aktivně působit a podílet se na řadě biochemických procesů.

Příkladem nestálosti aglykonu oproti glykosylovanému anthokyaninu ve fyziologickém prostředí může být experiment, kdy u testovaných krys bylo zjištěno, že cyanidin-3-glukosid obsažený v potravě byl po vstřebání organismem hydrolyzován β -glukosidasou ve střevě na cyanidin, ale v krevní plazmě nebyl cyanidin detekován, zatímco cyanidin-3-glukosid a 3,4-dihydroxybenzoová kyselina (kyselina protokatechová) ano (Obr. 10).



Obr. 10 Kyselina protokatechová vzniklá z cyanidinu.

Určité množství aglykonu cyanidinu bylo nalezeno pouze v lačníku (části tenkého střeva). Kyseliny protokatechové bylo v plazmě zhruba osmkrát více než cyanidin-3-glukosidu. Toto zjištění poukazuje, že pokud je cyanidin absorbován do kardiovaskulárního systému, je v daných fyziologických podmínkách nestálý a je degradován na protokatechovou kyselinu. Ta zde může protektivně působit vůči karcinogenům. Navíc tato kyselina spolu s cyanidin-3-glukosidem zvyšuje antioxidační vlastnosti v dané krevní plazmě. Fenolické kyseliny s více než jednou hydroxyskupinou vykazují totiž antioxidační vlastnosti. Cyanidin-3-glukosid byl oběhovým systémem transportován dále. Byla potvrzena jeho přítomnost v tkáni ledvin, v játrech však nikoli.

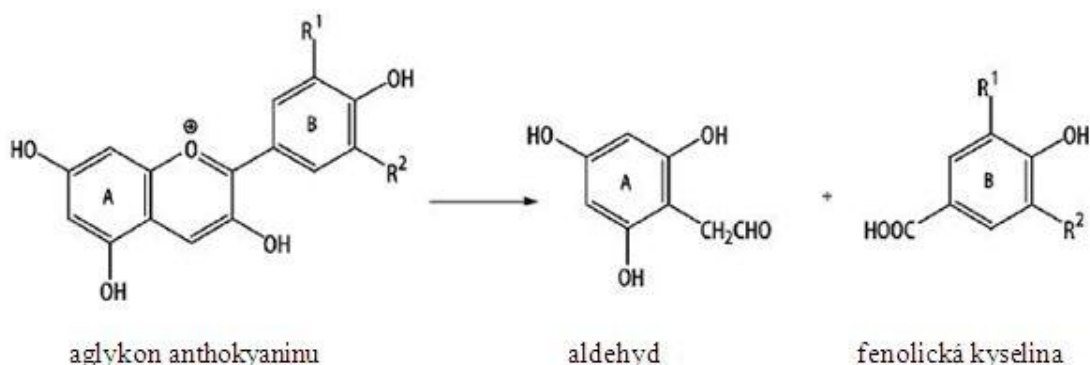
V ledvinách a játrech byl také detekován cyanin-3-glukosid dvakrát methylovaný (v polohách 3' a 4'), přičemž jeho obsah v ledvinách byl dvojnásobný než v játrech. V krevní

plazmě tento metabolit nalezen nebyl. Lze předpokládat, že methylovaný cyanidin-3-glukosid vznikl v játrech methylací hydroxyskupin v polohách 3' a 4' na B-kruhu cyanidinu za účasti katechol-O-methyltransferasy²¹.

Významnou úlohu v degradaci anthokyaninů hraje střevní mikroflóra. Podílí se na deglukosylaci i následné degradaci anthokyaninu na fenolickou kyselinu. Fenolické kyseliny jsou vůči další degradaci střevní mikroflórou poměrně odolné. Degradována v malé míře je jen kyselina protokatechová. Která kyselina vznikne, záleží na substituci B-kruhu původního aglykonu (Obr. 11 a Tabulka 3).

Tabulka 3 Aglykony anthokyaninů a z nich odvozené fenolické kyseliny²⁰

| Anthokyanin | Vzniklá fenolická kyselina |
|--------------|----------------------------|
| cyanidin | kyselina protokatechová |
| malvidin | kyselina syringová |
| peonidin | kyselina vanilová |
| pelargonidin | kyselina 4-hydroxybenzoová |



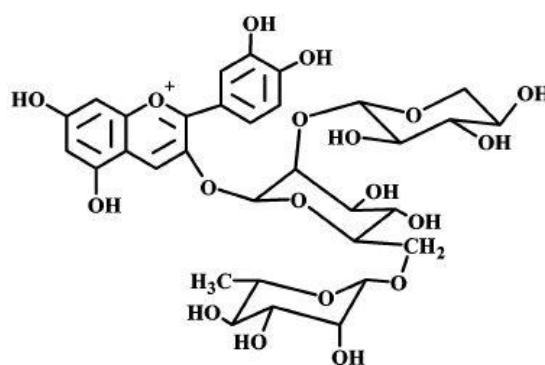
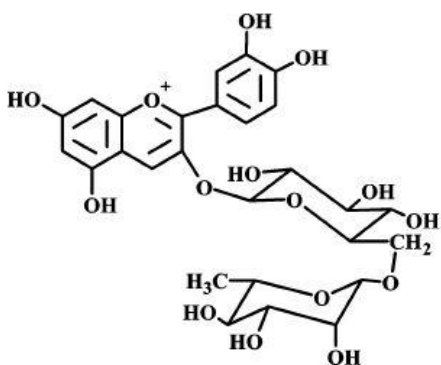
Obr. 11 Degradace anthokyaninu za vzniku příslušné fenolické kyseliny²⁰.

Kromě glukosidů může střevní mikroflóra hydrolyzovat také glukuronidy, sulfáty, amidy, estery a laktony (vnitřní cyklické estery). V přítomnosti střevní mikroflóry snadno dochází k štěpení kruhů (v případě degradace anthokyaninu na fenolickou kyselinu), dekarboxylaci, demethylaci a dehydroxylaci. Glukuronidace a methylace probíhá převážně v játrech a střevech²².

Významnou roli v metabolismu anthokyaninů hraje enzym polyfenoloxidas, která štěpí anthokyaniny na bezbarvé produkty. Optimální pH pro aktivitu polyfenoloxidasy je kolem 6. Důležitým faktem je, že oxidace anthokyaninů polyfenoloxidasou vzrůstá v přítomnosti katecholu. Mechanismus je takový, že katechol je zoxidován fenolasou na o-

benzochinon, který dále oxiduje anthokyaniny a tím urychlí jejich celkovou oxidaci. Stejným mechanismem přispívá k oxidaci anthokyaninů také přítomnost chlorogenové kyseliny. Obecně jsou anthokyaniny slabým substrátem pro polyfenoloxidasu, což může být dáno sterickým bráněním cukerné části navázané na flavyliový kation²³.

Vstřebání vícenásobně glykosylovaných anthokyaninů je mnohem omezenější. Příkladem může být porovnání vstřebávání cyanidin-3-rutinosidu (Obr. 12) a cyanidin-3-xylosylrutinosidu (Obr. 13).



Obr. 12 Struktura cyanidin-3-rutinosidu²⁴.

Obr. 13 Struktura cyanidin-3-xylosylrutinosidu²⁴.

Tyto anthokyaniny obsažené v malinách (denní dávka 2,7 g anthokyaninu) byly podávány dobrovolníkům během jednoho týdne. Cyanidin-3-xylosylrutinosidu, který tvořil 26 % z přítomných anthokyaninů v podávané stravě, bylo v moči nalezeno více, než cyanidin-3-rutinosidu, který tvořil 60 % obsažených anthokyaninů²⁴. Tento experiment poukazuje, že retence anthokyaninů v organismu závisí na tom, jak složité substituenty jsou navázány v poloze 3. Čím jsou cukerné substituenty složitější, tím je anthokyanin méně zadržován v organismu a tím méně je metabolizován.

V moči byly nalezeny i další metabolity. Hojně byly zastoupeny methylované deriváty cyanidinu, cyanidin-3-rutinosidu a peonidinu. V určitém množství byl detekován také methylovaný derivát cyanidin-3-xylosylrutinosidu, což znamená, že methylace probíhá i u triglykosylovaných anthokyaninů *in vivo*²⁴.

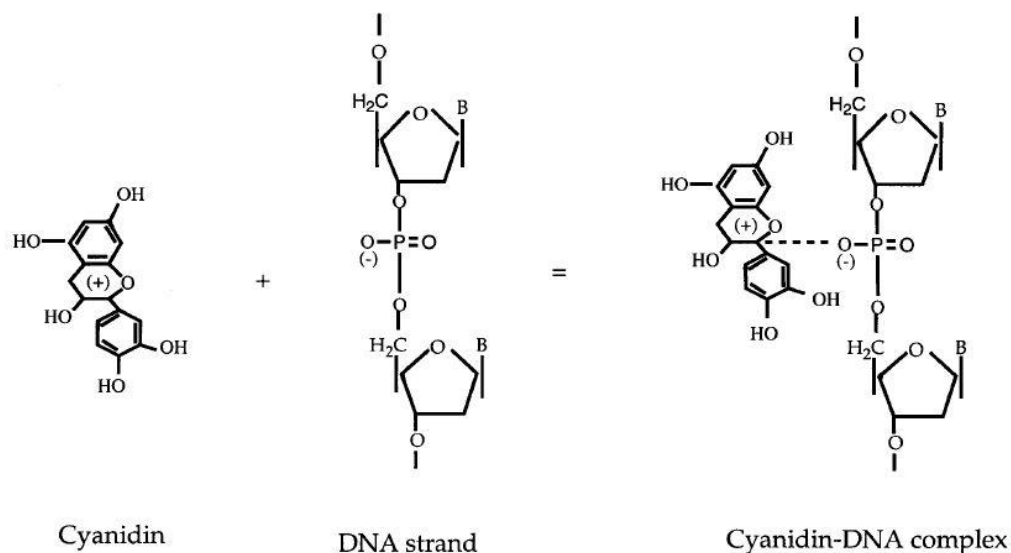
Přestože metabolismus anthokyaninů není ještě plně prozkoumán a je středem pozornosti mnoha současných vědeckých studií, základní mechanismus lze shrnout následovně: Po vstřebání organismem dochází ve střevě k hydrolýze glukosidů β -glukosidasou. Vzniklé aglykony jsou z významné části degradovány na fenolické kyseliny.

Nerolozžené glykosidy a aglykony přecházejí do jater, kde mohou být methylovány, glukuronidovány nebo sulfatovány. Obecně lze říci, že běžné anthokyaniny jsou v organismu snadno zadržovány a metabolizovány.

2.4. Možnosti využití anthokyaninů pro prevenci nemocí a jejich léčbu

Kromě antioxidačních účinků anthokyaninů zmíněných v předchozích kapitolách je třeba zmínit procesy, kdy anthokyaniny přispívají k ochraně organismu jiným mechanismem než zachytáváním volných radikálů a likvidací reaktivních kyslíkatých species. Zmínit lze chelatační vlastnosti způsobené hydroxysubstituenty na B kruhu nebo ochranu DNA před oxidativním poškozením pomocí vzniku komplexu anthokyanin-DNA. DNA jako taková je velmi citlivá na poškození volnými radikály (zejména hydroxylovými vznikajícími Fentonovou reakcí z peroxidu vodíku), kdy dochází k přetržení vlákna a hydroxylaci bází, což vede ke genetickým změnám. Pokud není poškození opraveno, nebo je opraveno nesprávně, vede k roztržení DNA vlákna, aktivaci poly(ADP-ribose)polymerasy a reakci vedoucí k apoptóze (odumření).

Pomocí poškození DNA lze i vysvětlit toxicitu H_2O_2 v organismu. Je známo, že DNA je schopna vázat Fe^{2+} . Vazba mezi dvojmocným železem a fosfátovou páteří je snadno přístupná pro H_2O_2 . Vznikem komplexu anthokyaninu s DNA lze Fentonově reakci zabránit. Jsou dvě pravděpodobné možnosti vzniku komplexu. Buď vzniká kovalentním navázáním anthokyaninu na DNA přes vazbu s kovem, anebo je možný vznik přímé nekovalentní vazby anthokyaninu s fosfátovou páteří (Obr. 14), přičemž druhý proces se zdá reálnější. Nicméně působení kovu při vzniku komplexu nelze vyloučit²⁵.



Obr. 14 Vznik nekovalentního komplexu anthokyanin-DNA²⁵

Anthokyaniny jsou zkoumány i ve vztahu k rakovině. Je studován jejich vliv na organismus postižený zhoubným bujením, ale také možnost jejich uplatnění v prevenci rakoviny. Některé laboratorní studie poukázaly na možnosti potlačení karcinogeneze

působením anthokyaninů, nicméně k plnému objasnění možného protirakovinného účinku in vivo v lidském organismu v uspokojivé míře zatím nedošlo²⁶.

Zhoubné bujení může být potlačeno mechanismem, kdy anthokyanin ovlivní buněčný cyklus působením na proteiny, které cyklus regulují. Bylo zjištěno, že anthokyanidiny projevují in vitro větší inhibiční vlastnosti než anthokyaniny²⁷. Dále byla pozorována určitá selektivita, kdy anthokyaniny inhibovaly výrazně více růst rakovinných buněk v porovnání s buňkami zdravými^{28,29}. Mechanismus tohoto selektivního působení není znám.

Pro vývoj i pro fungování organismu hraje významnou úlohu tzv. apoptóza, což je plánované odumření buňky, které slouží k regulaci zdravých buněk v organismu. U rakovinných buněk je tato regulace porušena. Léčivý účinek anthokyaninů proti rakovinným buňkám může být způsoben zvýšením mitochondriálního membránového potenciálu, kdy uvolnění cytochromu c z mitochondrií do okolí buňky spustí apoptózu mechanismem založeným na úpravě a aktivaci kaspas (typ cysteinproteasy) a na nich závislých anti a proapoptotických proteinů.

Anthokyaniny dále mohou potlačovat angiogenezi, což je vytváření nových krevních kapilár, probíhající například při hojení ran, ale také růstu nádoru a metastáz (druhotné ložisko nádorových buněk vzniklé odtržením části nádorových buněk), kdy nové kapiláry zajistí přísun živin a kyslíku do místa nádoru.

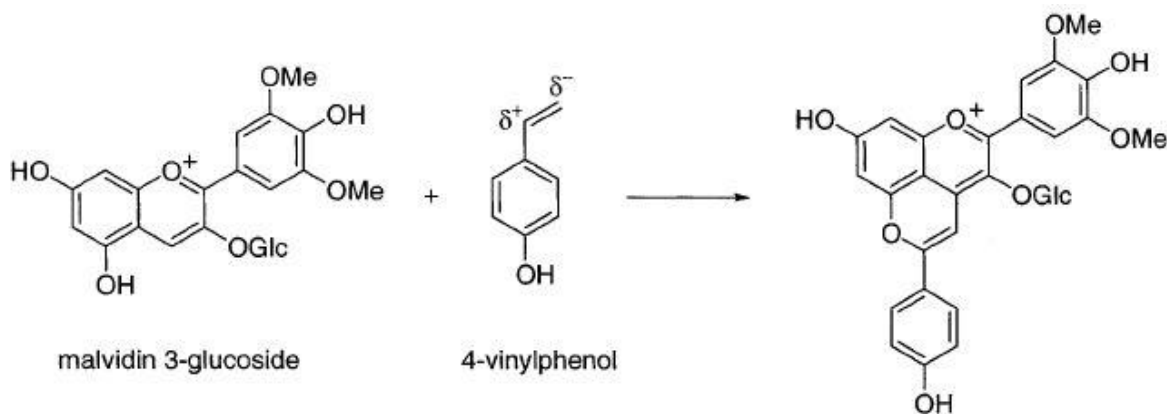
Bohužel epidemiologické studie u lidí neprokázaly inhibici zhoubného bujení ani preventivní protektivní působení zvýšením příjmem anthokyaninů v potravě. Prokázáno bylo jen snížení oxidativního poškození DNA, zvýšení hladiny glutathionu při jeho nedostatku v organismu a další procesy související s antioxidačními vlastnostmi anthokyaninů.

Anthokyaniny vykazují inhibici růstu zhoubných buněk, podněcování apoptózy a další antikancerogenní vlastnosti in vitro v rozmezí koncentrací 10^{-6} až 10^{-4} mol.dm⁻³. Koncentrace anthokyaninů v lidské krvi po konzumaci jimi obohacené stravy se pohybuje v rozmezí 10^{-8} až 10^{-7} mol.dm⁻³ nebo mnohem níže²⁷. Je otázkou, zdali by větší koncentrace anthokyaninů v lidském organismu poskytovaly stejné efekty, jako při pokusech in vitro. Nejasné také je, zda jsou tyto efekty způsobené samotnými anthokyaniny nebo jejich metabolity. Klíčovou oblastí je nyní prozkoumání možností zvýšení absorpce anthokyaninů a jejich metabolitů nezbytné pro chemoprevenci lidské rakoviny v tkáních, zažívacím traktu a kůži³⁰.

2.5. Transformace anthokyaninů při zrání vín

Jednou z hlavních složek potravy obsahující anthokyaniny jsou červená vína. Anthokyaniny se zde účastní procesu zrání, transformují se a zapříčiňují kondenzační reakce a vznik kondenzovaných a polymerních pigmentů. Tyto děje se projevují barevnými změnami daného vína a také například v poklesu trpkosti (látky přispívající k trpkosti vína se zabudují do vznikajících struktur a tím se změní chuťové vlastnosti).

Tyto reakce logicky významně souvisí s množstvím kyslíku a oxidačními procesy probíhajícími ve víně. Proto je zde kondenzačním procesům věnována samostatná kapitola. Některé pigmenty vznikají tvorbou pyranového kruhu mezi uhlíkem 4 a hydroxyskupinou v poloze 5 na aglykonu. Jejich vznik lze demonstrovat na reakcích anthokyaninu s 4-vinylfenoly³¹. Pokud malvidin-3-glukosid ve víně reaguje s 4-vinylfenolem, dochází ke vzniku pigmentu A (Obr. 15).

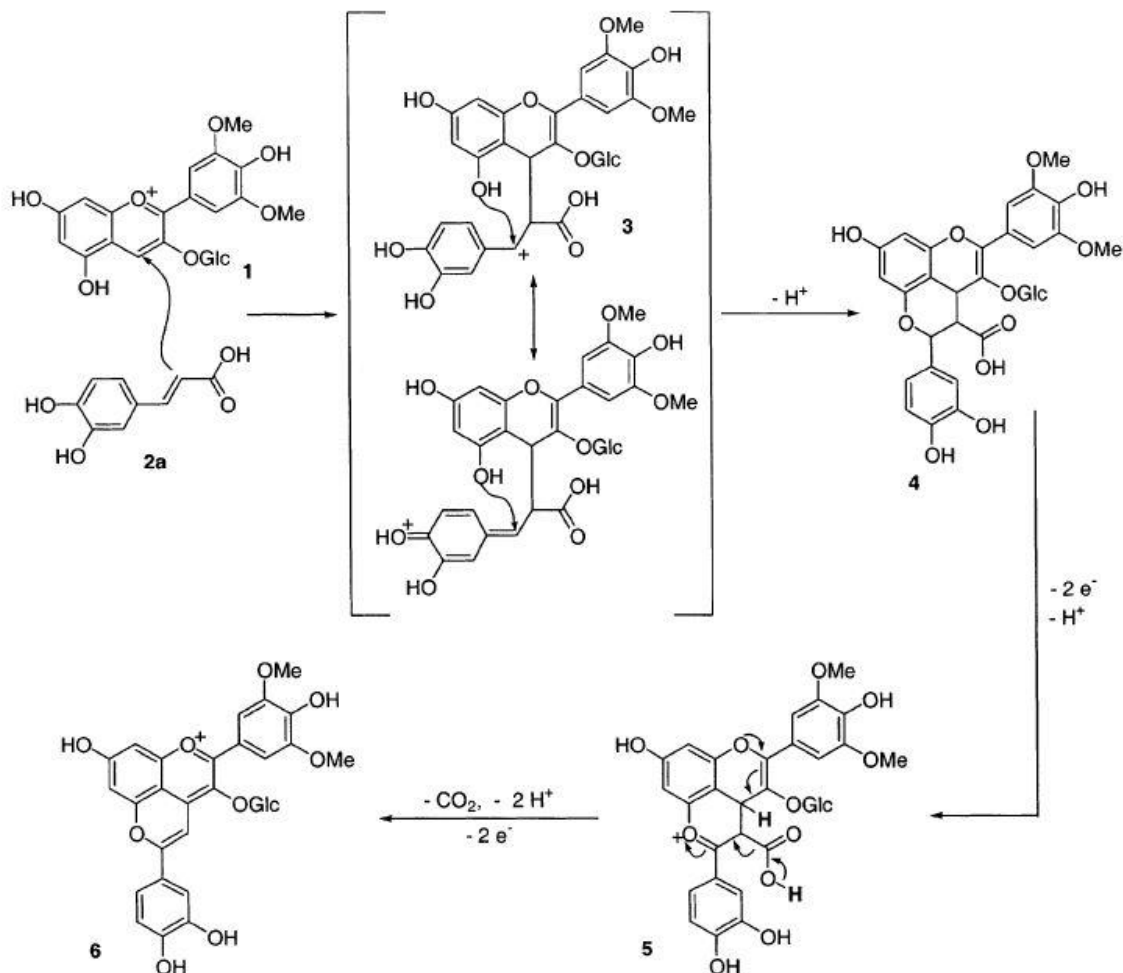


Obr. 15 Možný mechanismus vzniku pigmentu A reakcí anthokyaninu s 4-vinylfenolem³¹

K reakci nezbytný 4-vinylfenol mohou během zrání vína enzymatickou cestou poskytnout některé druhy kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*) dekarboxylací kyseliny p-kumarové (4-hydroxyskořicové). Nabízí se myšlenka, že dekarboxylovány mohou být i jiné kyseliny. Například dekarboxylací kyseliny kávové (3,4-dihydroxyskořicové) by vznikl 4-vinylcatechol, který by obdobným mechanismem dále reagoval s anthokyaninem za vzniku pinotinu A.

Většina vědeckých studií ale poukazuje na přítomnost 4-vinylfenolu ve zrajících vínech, zatímco přítomnost 4-vinylcatecholu nebyla pozorována, což předpokládá jiný mechanismus vzniku, který není založen na přítomnosti 4-vinylcatecholu. Tento

mechanismus je založený na reakci anthokyaninu s kyselinou odvozenou od kyseliny skořicové. V případě vzniku pinotinu A tedy dochází k reakci anthokyaninu přímo s kyselinou kávovou (Obr. 16).

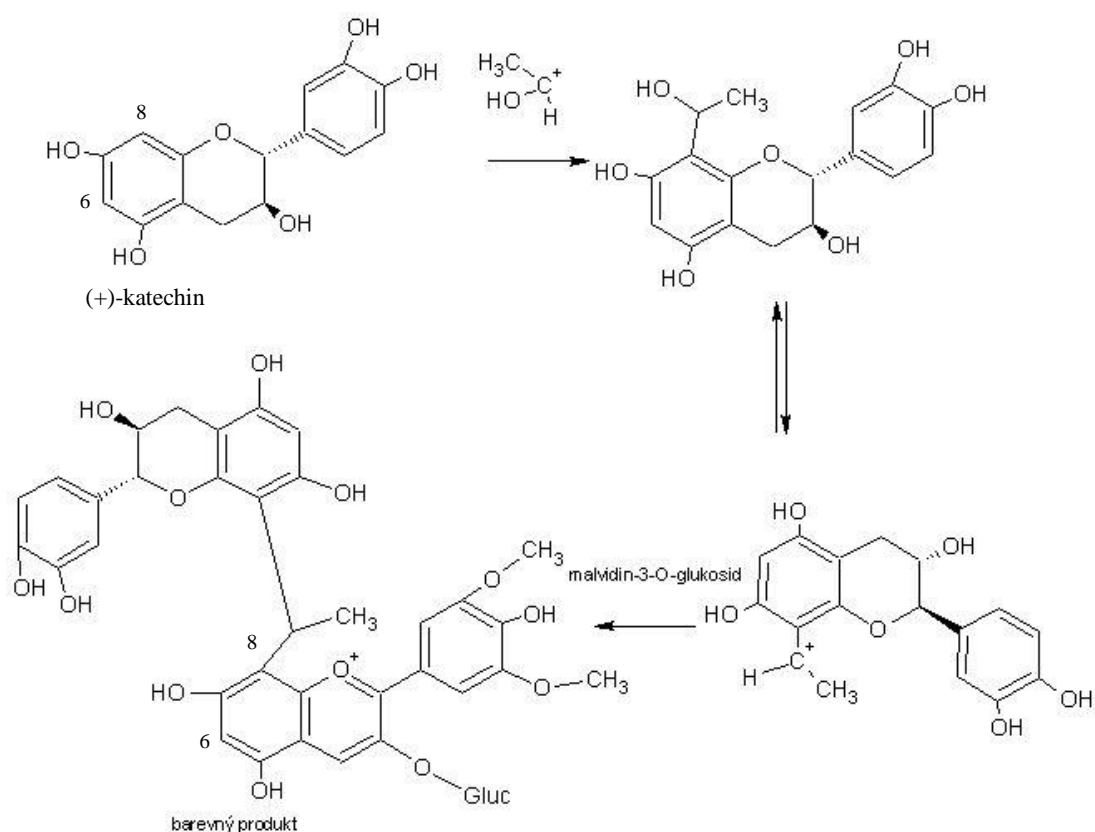


Obr. 16 Vznik pinotinu A reakcí malvidin-3-O-glukosidu s kyselinou kávovou³².

Vznik čtvrtého kruhu je zahájen vznikem vazby mezi uhlíkem 4 na anthokyaninovém skeletu, kde se projevuje elektrofilní charakter pyryliového kruhu, a α -nukleofilním uhlíkem kyseliny kávové. Výsledný intermediát projevuje elektron-deficitní charakter, nicméně elektron-donorové skupiny na aromatickém jádře kyseliny kávové stabilizují vznik tohoto intermediátu. Z něj se vytvoří intramolekulárně pyranový kruh. Výsledný pinotin A potom vznikne následnou oxidací a dekarboxylací³².

Významnou roli při kondenzaci některých anthokyaninů během zrání vína hraje acetaldehyd. Ten je přítomen v řadě potravin, ovoci, zelenině, mléčných výrobcích či různých nápojích. Vzniká také při kvašení v hroznech oxidací ethanolu nebo dekarboxylací kyseliny

pyrohroznové. Význam acetaldehydu při zrání vína lze pozorovat při jeho reakci s katechinem v přítomnosti malvidin-3-O-glukosidu. V kyselém prostředí je acetaldehyd protonizován a vzniká karbokation. Na ten může být nukleofilní adicí navázán katechin. Vzniklá adiční sloučenina může následně vytvořit opět karbokationtový intermediát. Ten může potom reagovat s malvidin-3-O-glukosidem navázáním přes ethylový můstek na malvidin v poloze 8. Vznikne tak barevný produkt (Obr. 17). S aldehydovým karbokationtem vzniklým během reakce reaguje pouze katechin, u malvidin-3-O-glukosidu nebyla tato interakce pozorována.



Obr. 17 Vznik barevného pigmentu (se zabudovaným anthokyaninem) za pomoci aldehydu

Tyto kondenzační reakce vyvolané přítomností acetaldehydu probíhají snáze bez přítomnosti anthokyaninů. Anthokyaniny totiž reagují s karbokationtovým intermediátem pouze za vzniku vazby na uhlíku 8, zatímco katechin vytváří kovalentní vazbu jak v poloze 8, tak i v poloze 6. Důsledkem toho reakce s anthokyaniny zakončuje polymerační reakci, zatímco navazování flavanolů udržuje chod polymerace. Jeden vzniklý polymer tedy může obsahovat maximálně dva navázané anthokyaniny. Pokud vznikne trimer obsahující flavanol a dva anthokyaniny, je jasné, že už nemůže dojít k navázání další jednotky. Naopak pokud bude trimer složen z jednoho anthokyaninu a dvou flavanolů, může se navázáním další

jednotky změnit na tetramer. Byly také zjištěny procesy, kdy reagovaly dva trimery či tetramery za vzniku polymeru a uvolnění dvou anthokyaninových jednotek. Takové procesy samozřejmě urychlují růst polymerních struktur. Vazba zprostředkovaná ethylovým můstkem mezi dvěma flavanoly je v kyselých podmínkách labilnější než takto zprostředkovaná vazba mezi anthokyaninem a flavanolem. Toto tvrzení je potvrzeno thiolýzou, při které jsou barevné dimery stabilnější než bezbarvé. Vzniklé pigmenty s ethylovým můstkem jsou stářejší než látky, ze kterých vznikly. Jedním z možných vysvětlení je vznik nekovalentních struktur sandwichového typu z těchto pigmentů³³.

Výše uvedené procesy poukázaly, jak přítomnost acetaldehydu výrazně přispívá k tvorbě polymerních struktur při zrání vína. Vznik potřebného množství acetaldehydu ve víně je podmíněn také dobrým provzdušněním, což poukazuje na důležitost výběru materiálů, ze kterých se vyrábí zátky pro láhve, ve kterých je víno archivováno. Polymeračními reakcemi mohou být zapojovány do polymerů i jiné látky, například taniny (třísloviny), čímž dochází k poklesu obsahu jejich volné formy ve víně, a tím také poklesu trpkosti, kterou způsobují. Vznikem složitějších pigmentů je také zvýšena intenzita barvy vyzrálého vína. Příliš vysoká koncentrace acetaldehydu ve víně ale může vést k nadměrnému vzniku polymerů a anthokyanino-tanninových komplexů, které se projeví zákalem a vznikem usazenin ve víně.

2.6. Analýza anthokyaninů

Pokud je prováděna analýza anthokyaninů v rostlinném materiálu, je nutno je nejdříve oddělit od matrice. Anthokyaniny jsou rozpustné v polárních rozpouštědlech díky přítomnosti navázaných hydroxyskupin a cukrů. Proto je nejčastěji volena extrakce alkoholem za studena. Za vyšších teplot by se totiž mohly anthokyaniny obsažené ve vzorku rozložit. Extrakční medium lze mírně okyselit, aby se podpořila přítomnost anthokyaninů ve flavyliové formě, a tím se zvýšil extrakční výtěžek. Přílišné okyselení ale může vést k částečné hydrolyze acylovaných kyselin a k dalším nežádoucím chemickým změnám.

Historickými metodami v analýze anthokyaninů jsou papírová a tenkovrstevná chromatografie. Nejvíce využívanou metodou v analýze anthokyaninů je ale v současnosti HPLC (High performance liquid chromatography). Tato metoda umožňuje efektivní separaci barviv od balastních látek a rozlišení jednotlivých anthokyaninů. Retenční charakteristiky lze potom využít pro identifikaci. Naměřené hodnoty se porovnávají s hodnotami získanými při analýze standardů. Standardy jsou komerčně dostupné ve velmi omezené míře. Dostupné látky jsou velmi drahé. Omezená stabilita standardů je rovněž nezanedbatelným problémem.

Analýza anthokyaninů pomocí HPLC nabízí široké možnosti provedení. Mezi nejčastější patří separace na kolonách s reverzními fázemi. Na reverzních fázích retenční čas klesá se zvyšující se polaritou. Polaritu zvyšují navázané cukry a hydroxyskupiny na B kruhu. Nejmenší retenční čas mají diglykosylované anthokyaniny následované monoglykosylovanými anthokyaniny a aglykony. Mezi aglykony má nejmenší retenční čas delphinidin následovaný cyanidinem, pelargonidinem a malvidinem³⁴. Je poměrně dlouhou dobu známo, že rychlost konverze jednotlivých protolytických forem anthokyaninů je poměrně malá. To se při chromatografii projeví rozšířením píků, protože každá protolytická forma má jinou retenci na reverzní fázi. Pro dosažení dobré účinnosti chromatografické separace je nezbytné udržovat v roztoku převládající flavyliovou formu. Toho je ovšem dosaženo při hodnotách pH nižších než 2. Použitím takto kyselých mobilních fází ovšem může docházet k poškození běžných reverzních fází (odštěpení alkylového řetězce). Proto je nutno volit takové stacionární fáze, které jsou proti kyselé hydrolyze chráněny (např. kolony Gemini C18 nebo Acquity BEH C18 atd.).

Detekce se běžně provádí pomocí UV diode-array detektoru (DAD). Její výhodou je získání online knihovny spekter. V kyselém prostředí je flavyliový kation červený a poskytuje absorpční maximum kolem 520 nm, což při měření ve viditelné oblasti spektra zvyšuje

selektivitu detekce. Ta je nezbytná, jsou-li v rostlinném extraktu přítomné i jiné flavonoidy. Změnou struktury anthokyaninu se mění vlnová délka absorpčního maxima. Spektrální charakteristiky anthokyaninů jsou významně závislé na substituentech na B kruhu. Pelargonidin tak má absorpční maximum při 520 nm, cyanidin při 535 nm a delphinidin při 544 nm. Glykosylované anthokyaniny poskytují posun absorpčního maxima zhruba o 10 nm k nižším vlnovým délkám na rozdíl od jejich aglykonů a zároveň snižují molární absorpční koeficient. Lze pozorovat i závislost na počtu navázaných cukrů, diglukosid má nižší vlnovou délku absorpčního maxima než monoglukosid³⁵.

Vzhledem ke zmíněnému nedostatku standardů je kapalinová chromatografie on-line kombinována s hmotnostním spektrometrem. Hmotnostní spektrometrie umožňuje identifikaci barviva na základě měření m/z molekulárního iontu, studia jeho fragmentace, případně měření přesné a správné hmoty, dovolující určit elementární složení. Nespornou výhodou je i zvýšení selektivity (další rozměr separace) a obvykle výborná citlivost a limit detekce.

Důležitá je v MS analýze volba ionizačních podmínek. Mezi rozšířené ionizační techniky patří ionizace elektrosprejem (ESI), která je založena na vzniku jemného aerosolu z analytu rozpuštěného ve vhodném eluentu a následném odpařování a zmenšování povrchu kapiček aerosolu. Protože nesou velký náboj díky vysokému vloženému napětí, zvyšuje se hustota povrchového náboje, až dojde ke coulombické explozi, která vede k rozpadu na ještě menší kapičky s původním rozložením náboje. Opakované coulombické exploze vedou až ke vzniku jednotlivých iontů. Anthokyanin ve flavyliové formě je relativně stálý a proto jej není jednoduché rozbít na fragmenty při lehkých ionizačních podmínkách. Při ionizaci elektrosprejem není fragmentace ve spektrech anthokyaninů dostatečná a proto je pro zvýšení fragmentace výhodné kombinovat ionizaci elektrosprejem s CID (collision induced dissociation) a tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS-MS). V literatuře byla popsána fragmentace běžně se vyskytujících anthokyaninů. Základním procesem je odštěpení cukerných zbytků za tvorby aglykonu. Následnou fragmentací dochází k odštěpování oxidu uhelnatého, vody, methylové skupiny a rovněž k retro-Diels Alderovu štěpení^{36,37}.

Vedle kapalinové chromatografie ve spojení s různými detekčními technikami je v analýze anthokyaninů používána kapilární elektroforéza (CE). Metoda je založená na rozdílné rychlosti pohybu částic v elektrickém poli. Separace je prováděna nejčastěji v křemenných kapilárách. V současné době je u CE preferováno spojení s MS. Předností je

vysoká účinnost, pružnost při optimalizaci selektivity a malá spotřeba vzorku, i základního elektrolytu.

V analýze anthokyaninů je také používána nukleární magnetická rezonance (NMR). Jde o metodu založenou na interakci elektromagnetického záření s jádry měřené látky umístěnými ve vnějším magnetickém poli. Energie dodaná elektromagnetickým zářením způsobí přechod nenulového magnetického momentu do vyššího energetického stavu. Charakteristickou veličinou je chemický posun jádra udávaný v ppm. Výhodou NMR je získání informací o struktuře látek (včetně absolutní konfigurace) a možnost ověření výsledků získaných jinými technikami. Při analýze anthokyaninů nejčastěji bývá provedena frakcionace kapalinovou chromatografií a následuje offline NMR měření frakcí. Online spojení těchto technik je problematické. Je totiž třeba pracovat s deuterovanými mobilními fázemi (vysoké náklady) a dalším problémem je potřebná akumulace spekter (nutnost zpomalení chromatografie)^{15,38}.

V analýze anthokyaninů tedy v současnosti dominuje vysoce účinná kapalinová chromatografie HPLC s rozmanitými způsoby online i offline detekce (UV-Vis, MS, NMR).

3 . EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Chemikálie, přístroje a podmínky analýzy

Chemikálie:

Standard: cyanidin-3-galaktosid (Ideanin chloride); dodaný firmou Carl-Roth (Karlsruhe, Německo)

Rozpouštědlo pro standard: vodný roztok $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HCl (p.a., Lachema, Brno)

Oxidační činidlo: 3% vodný roztok H_2O_2 (připraveno z 30 % roztoku, p.a., Lachema, Brno)

Chemikálie pro přípravu mobilních fází: acetonitril (čistota pro LC-MS; Biosolve, Valkenswaard, Nizozemí), trifluoroctová kyselina (čistota $\geq 99\%$; Sigma-Aldrich; St. Louis, USA), voda (pro chromatografii, Merck, Darmstadt, Německo)

Mobilní fáze: A: 0,12 % (v/v) vodný roztok kyseliny trifluoroctové

B: 0,12 % (v/v) roztok kyseliny trifluoroctové v acetonitrilu

Další chemikálie: leucin-enkefalin (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA), použit pro Lock Mass korekci hodnot m/z.

Přístroje a podmínky analýzy:

Ultra-účinný kapalinový chromatograf (UPLC, Acquity, Waters Corporation, Milford, USA)

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

Ionizační technika: ESI (Z-Spray)

Použitá kolona: Acquity UPLC BEH C18 $1,7\mu\text{m}$ (2,1x50 mm)

Průtok: 0,5 ml/min

Průměrná hodnota zpětného tlaku: 5 266 psi (= 36,3 MPa)

Profil gradientu:

| čas (min) | zastoupení složky A v mobilní fázi (%) |
|-----------|--|
| 0-1 | 98 |
| 1-7 | 98-50 |
| 7-8,5 | 50-0 |
| 8,5-8,8 | 0-98 |
| 8,8-10 | 98 |

Pro získání přesných a správných hodnot m/z byly hmoty korigovány s využitím techniky Lock Mass. Pro tento účel byl referenčním iontovým zdrojem sprejován roztok leucin-enkefalinu (500 ng/mL standardu v 0,1 %, v/v vodném roztoku HCOOH).

Parametry hmotnostního spektrometru:

Sprejovací napětí: +3 kV

Teplota zdroje: 110 °C

Průtok zmlžovacího plynu: 38 L/hod

Desolvační teplota: 170 °C

Průtok desolvačního plynu: 550 L/hod

Kolizní energie pro MS sken:

Pro MS skeny byla nastavena kolizní energie 5 V.

Pro MS/MS skeny byla použita rampa kolizní energie 15-50 V.

Čas jednoho skenu pro MS i MS/MS 0,2 s.

Interscan delay 0,02 s.

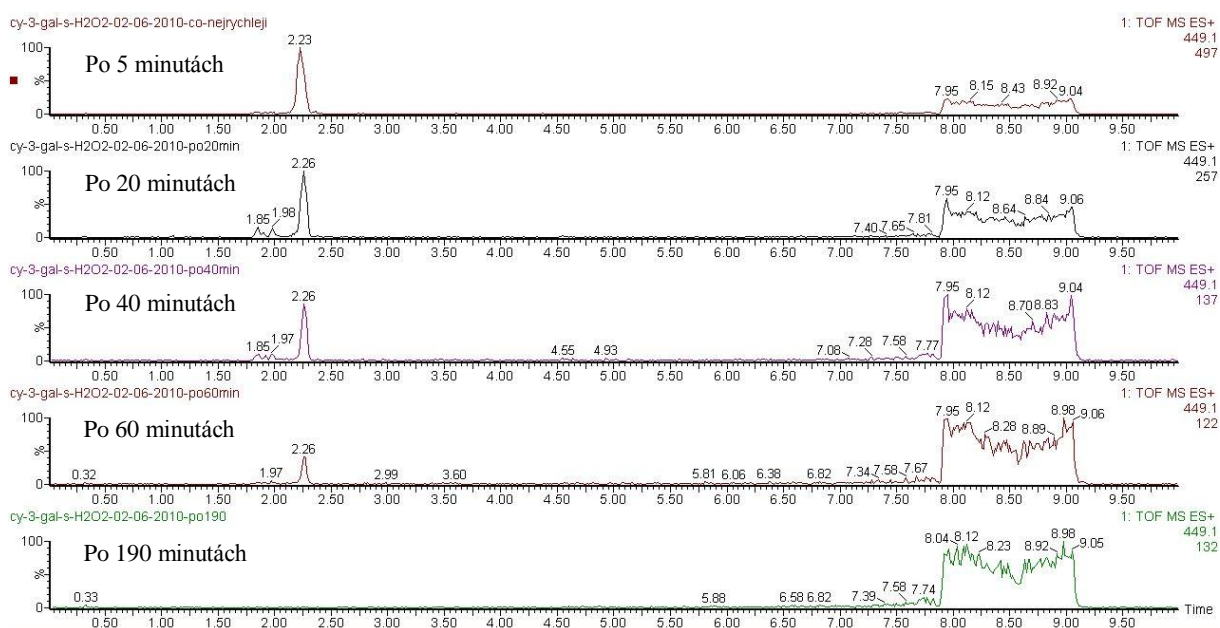
Izolační šířka pro MS/MS experiment byla nastavena na 1 Da (LM Resolution: 15).

3.2. Příprava reakční směsi a její analýza

Bylo naváženo dvakrát 0,5 mg standardu cyanidin-3-galaktosidu. Následně byl připraven kontrolní roztok (0,5 mg standardu, 1000 μl 0,01 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ vodného roztoku HCl) a roztok standardu s peroxidem vodíku (0,5 mg standardu, 900 μl 0,01 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ vodného roztoku HCl, 100 μl 3% vodného roztoku H_2O_2). Oba roztoky byly co nejdříve proměřeny a dále byla provedena analýza po 20, 40 a 60 minutách. Následně byly provedeny fragmentační experimenty a následovala analýza po 190 minutách (opět včetně MS/MS experimentů).

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

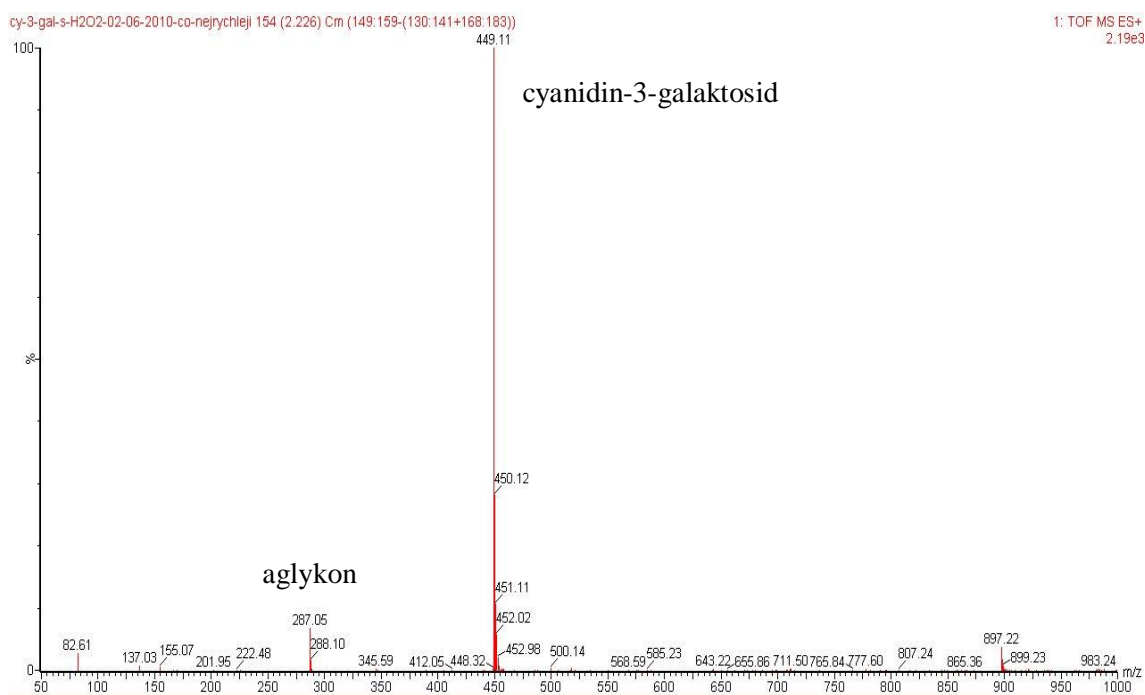
Rozpuštění standardu v $0,01 \text{ mol.dm}^{-3}$ vodného roztoku HCl poskytlo sytě červený roztok. Vzorek s přidaným peroxidem se s časem odbarvoval, což svědčilo o klesání obsahu původního anthokyaninu. Po 190. minutě byl roztok téměř bezbarvý. Úbytek obsahu barviva demonstruje obrázek 18.



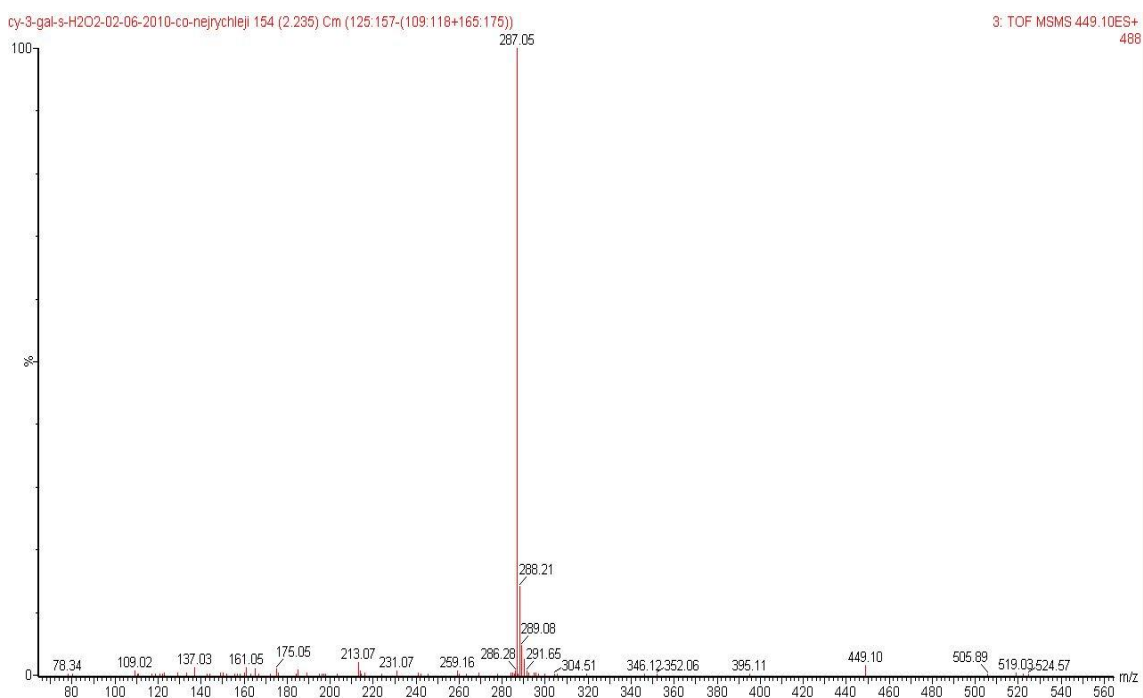
Obr. 18 Úbytek anthokyaninu s postupem času během oxidace (rekonstruovaný chromatogram pro m/z 449,1).

Cyanidin-3-galaktosid eluje s retenčním časem 2,2 min (chromatogram rekonstruovaný pro m/z 449,1). Obr. 19 a 20 potvrzují, že dominantní pík s $t_R = 2,2$ min odpovídá cyanidin-3-galaktosidu. V MS/MS spektru (Obr. 20) lze jednoznačně vidět odštěpení cukru ($\Delta m/z$ 162) a vznik aglykonu.

V analýze po 20 minutách oxidace poklesla intenzita tohoto píku zhruba na polovinu oproti analýze přibližně po 5 minutách, což naznačuje rychlou oxidaci původního anthokyaninu. Obr. 18 rovněž ukazuje, že po 190 minutách oxidace je původní barvivo již zcela přeměněno.



Obr. 19 MS spektrum cyanidin-3-galaktosidu a jeho aglykonu v roztoku



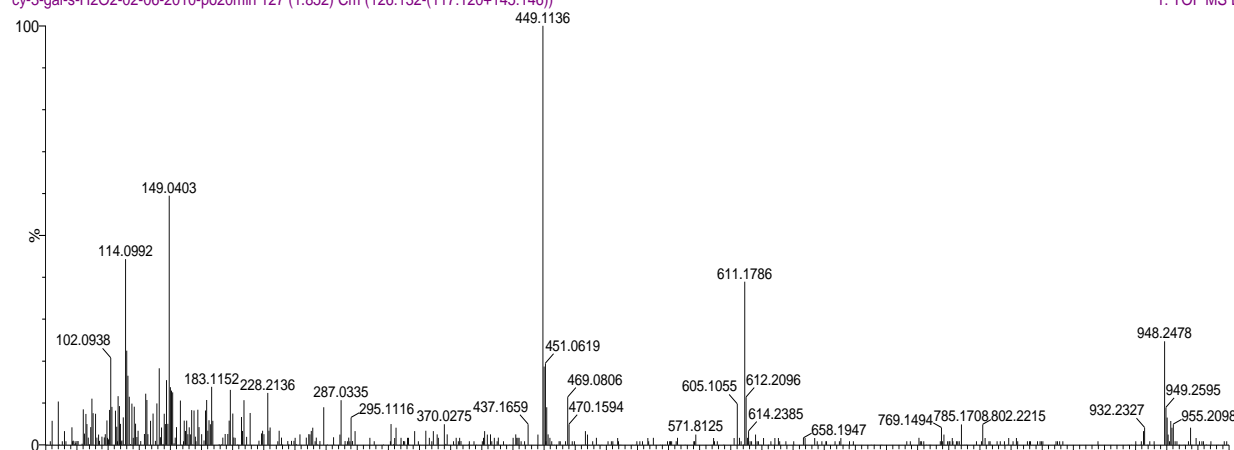
Obr. 20 MS MS spektrum cyanidin-3-galaktosidu

V analýzách po 20 a 40 minutách oxidace jsou patrné píky eluující před vlastním barvivem. Jde o píky, v jejichž spektru (spektru průměrovaném přes daný chromatografický

cyanidin-3-gal-5-full lopp-s-H2O2-3proc-antho-0-5mg-ml-po20min

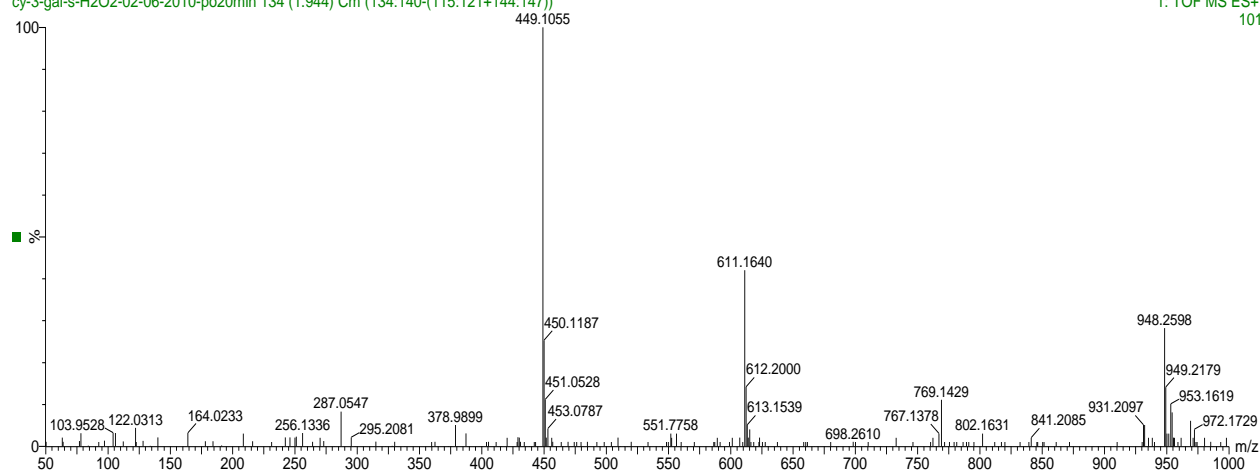
cy-3-gal-s-H2O2-02-06-2010-po20min 127 (1.852) Cm (126:132-(117:120+145:146))

1: TOF MS ES+
125



cy-3-gal-s-H2O2-02-06-2010-po20min 134 (1.944) Cm (134:140-(115:121+144:147))

1: TOF MS ES+
101



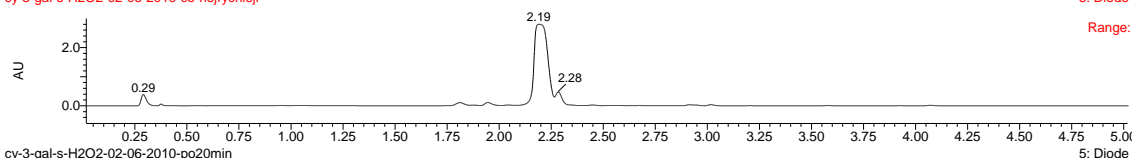
Obr. 21 MS spektra píkú eluujících před barvivem.

pík po odečtení iontů základní linie) se rovněž vyskytuje ion s m/z 948 (Obr. 21). Tento ion doposud nebyl jednoznačně identifikován, ale pravděpodobně je jeho fragmentem cyanidin-3-galaktosid (m/z 449,1). Může tedy jít o látky vznikající interakcí barviva s peroxidem vodíku, jejichž polarita je větší než polarita barviva samotného (eluční pořadí na reverzní fázi). Tyto látky podléhají následnému rozkladu a po 40 minutách dojde k jejich výraznému úbytku.

Na obrázku 22 můžeme vidět chromatogramy s UV-Vis detekcí při vlnové délce 280 nm, tedy v nebarevné oblasti. Dominantní pík zde má v první analýze retenční čas 2,19 min, což koresponduje s dominantním píkem (2,23 min) v předchozích chromatogramech s MS detektorem. Pík se zde po 20. minutě štěpí a začíná se zvětšovat pík s retenčním časem 2,29 min, který dominuje v analýze po 190. minutě.

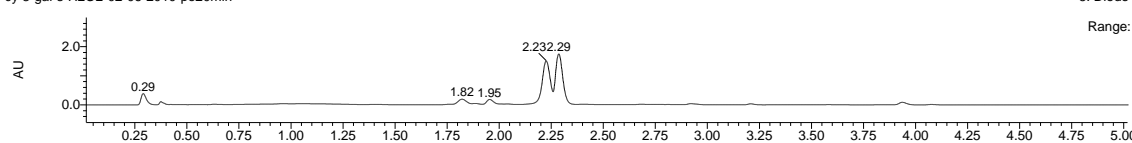
cyanidin-3-gal-5-full lopp-s-H2O2-3proc-antho-0-5mg-ml-po190min
 cy-3-gal-s-H2O2-02-06-2010-co-nejrychleji

5: Diode Array
 280
 Range: 2.802



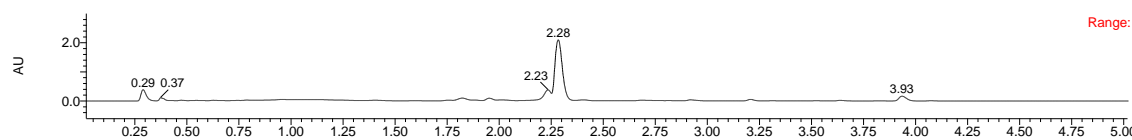
cy-3-gal-s-H2O2-02-06-2010-po20min

5: Diode Array
 280
 Range: 1.754



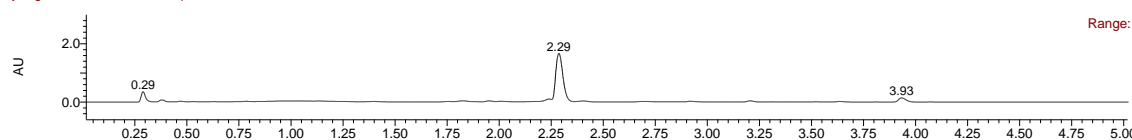
cy-3-gal-s-H2O2-02-06-2010-po40min

5: Diode Array
 280
 Range: 2.104



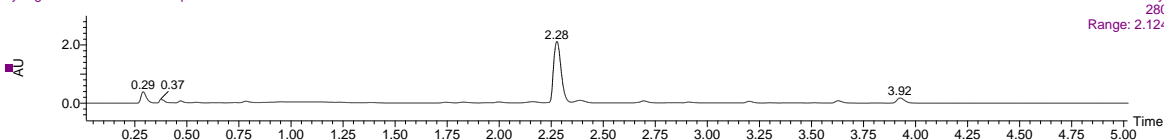
cy-3-gal-s-H2O2-02-06-2010-po60min

5: Diode Array
 280
 Range: 1.676



cy-3-gal-s-H2O2-02-06-2010-po190

5: Diode Array
 280
 Range: 2.124

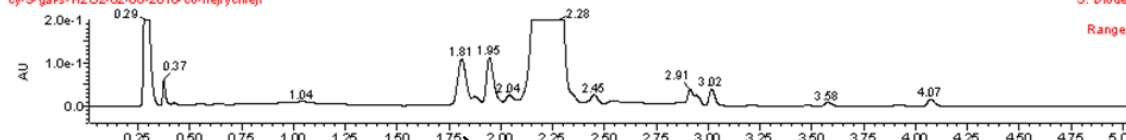


Obr. 22 Chromatogramy s UV-Vis detekcí při vlnové délce 280 nm

Na obrázku 23 (zoom z obr. 22) je patrné, že v průběhu oxidace dochází vedle vzniku dominantního oxidačního produktu (tj. pík s $t_{R}=2,3$ min) také ke tvorbě několika produktů

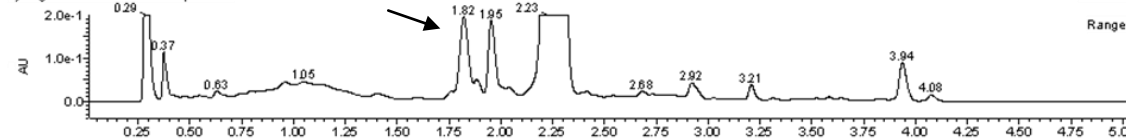
cyanidin-3-gal-5-full lopp-s-H2O2-3proc-antho-0-5mg-ml-po190min
 cy-3-gal-s-H2O2-02-06-2010-co-nejrychleji

5: Diode Array
 280
 Range: 2.802



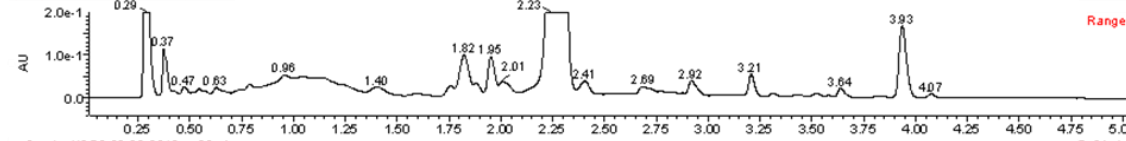
cy-3-gal-s-H2O2-02-06-2010-po20min

5: Diode Array
 280
 Range: 1.754



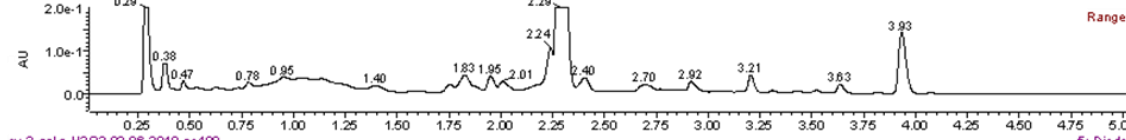
cy-3-gal-s-H2O2-02-06-2010-po40min

5: Diode Array
 280
 Range: 2.104



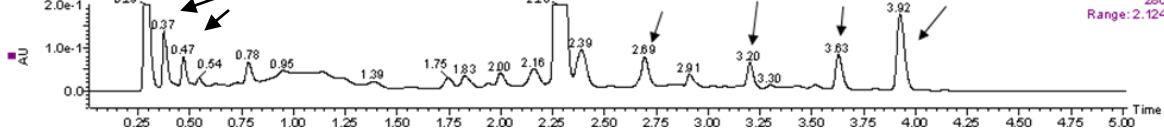
cy-3-gal-s-H2O2-02-06-2010-po60min

5: Diode Array
 280
 Range: 1.676



cy-3-gal-s-H2O2-02-06-2010-po190

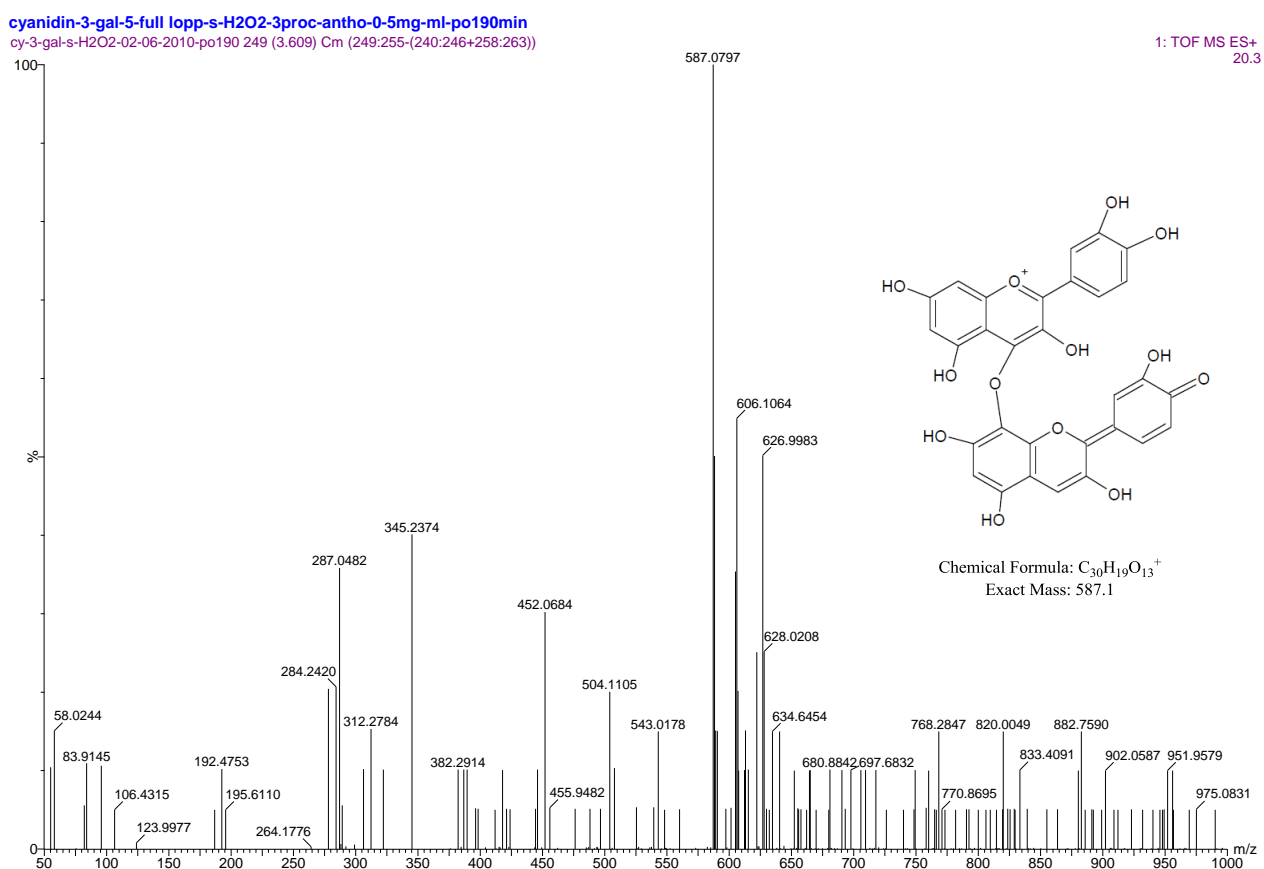
5: Diode Array
 280
 Range: 2.124



Obr. 23 Zoom z chromatogramu na obr. 22

minoritních. Jde o píky s retenčními časy 0,37 min; 0,47 min; 1,81 min; 1,95 min; 2,69 min; 2,91 min; 3,2 min; 3,63 min; 3,92 min. Identita těchto látek nebyla doposud uspokojivě vysvětlena. Spektra získaná průměrováním přes uvedené píky jsou slabá (intenzita přítomných iontů je nízká, což znemožňuje jednoznačnou interpretaci). To lze vysvětlit malou stabilitou oxidačních produktů za podmínek analýzy hmotnostním spektrometrem (zejm. vyšší teplota).

Jako příklad za všechny může posloužit spektrum z píku s retenčním časem 3.63 min (viz obr. 24). Signál pozorovaných iontů je nízký. Základním píkem tohoto spektra je ion s m/z 587. Dále se ve spektru nachází ion odpovídající cyanidinu (m/z 287), který by mohl být



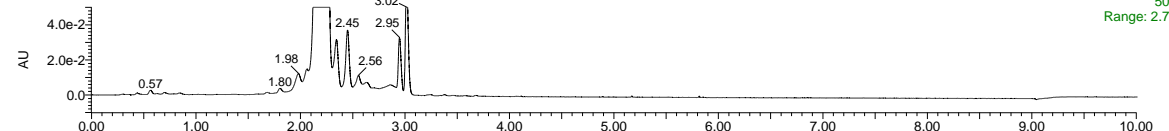
Obr. 24 Spektrum v píku 3.63min (190 min oxidace)

fragmentem iontu poskytujícího základní pík (shodný retenční čas). Dominující ion by mohl být vysvětlen jako dvě cyanidinové jednotky spojené kyslíkovým můstkem. Vzhledem ke zmíněné slabé intenzitě je však toto vysvětlení pouze spekulativní. Obr. 25 ukazuje odpovídající chromatogramy měřené při vlnové délce 500 nm (viditelná oblast spektra). Zde je rovněž patrný postupný pokles odezvy původního barviva.

cyanidin-3-gal-5-full lopp-s-H2O2-3proc-antho-0-5mg-ml-po190min

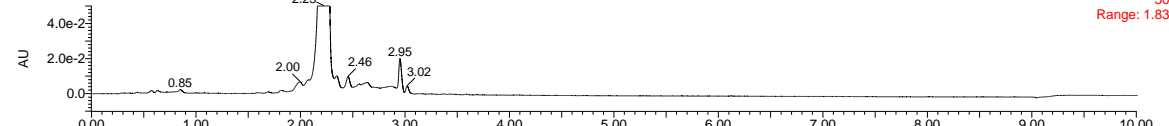
cy-3-gal-s-H2O2-02-06-2010-co-nejrychleji

5: Diode Array
500
Range: 2.71



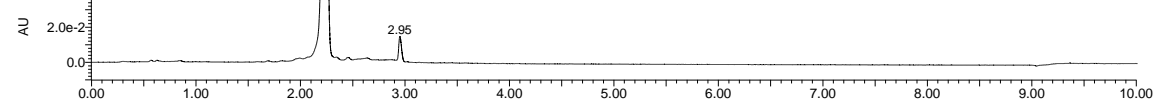
cy-3-gal-s-H2O2-02-06-2010-po20min

5: Diode Array
500
Range: 1.832



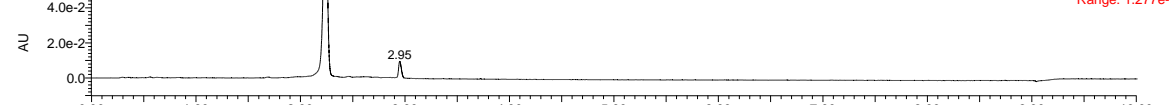
cy-3-gal-s-H2O2-02-06-2010-po40min

5: Diode Array
500
Range: 4.858e-1



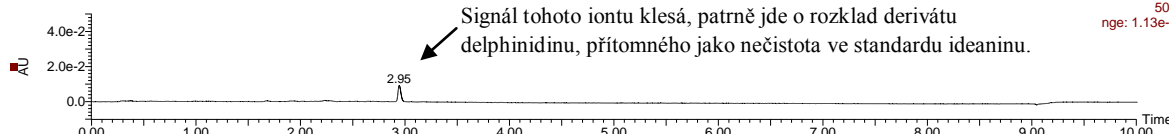
cy-3-gal-s-H2O2-02-06-2010-po60min

5: Diode Array
500
Range: 1.277e-1



cy-3-gal-s-H2O2-02-06-2010-po190

5: Diode Array
500
nge: 1.13e-2

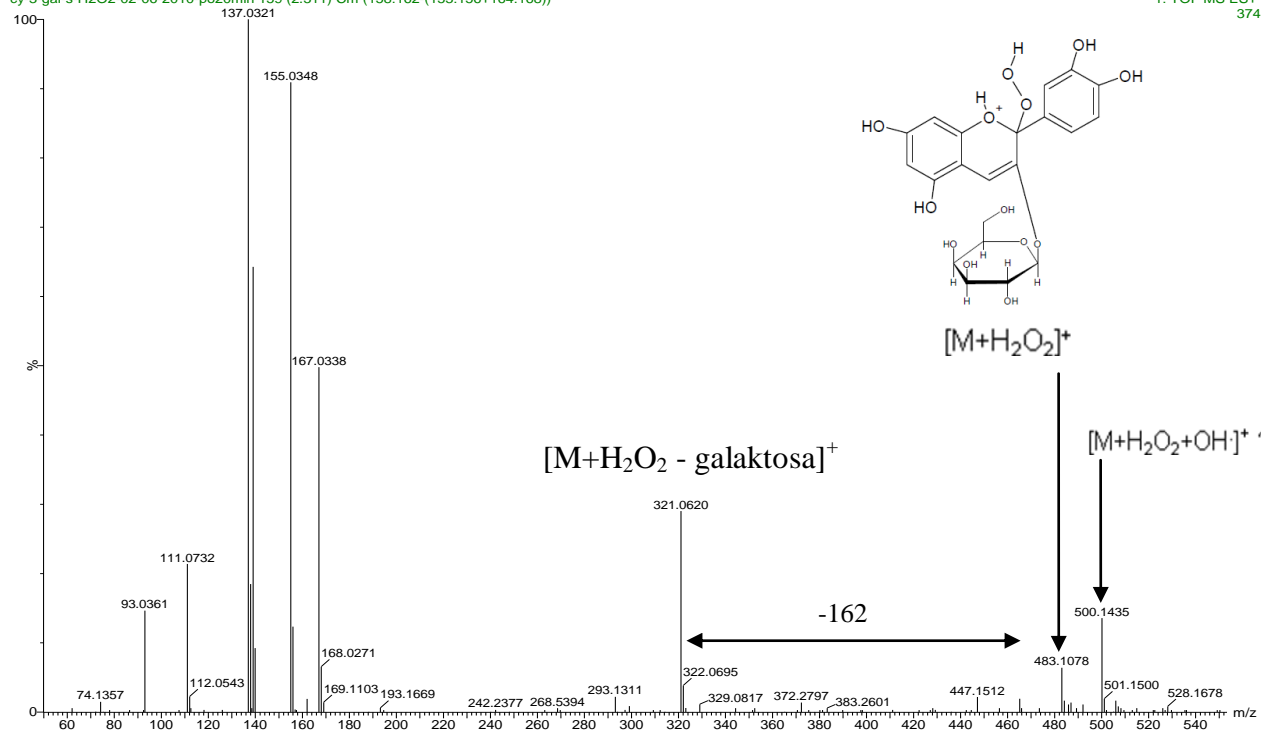


Obr. 25 Chromatogramy s UV-Vis detekcí při vlnové délce 500 nm

cyanidin-3-gal-5-full lopp-s-H2O2-3proc-antho-0-5mg-ml-po20min

cy-3-gal-s-H2O2-02-06-2010-po20min 159 (2.311) Cm (158:162-(153:156+164:168))

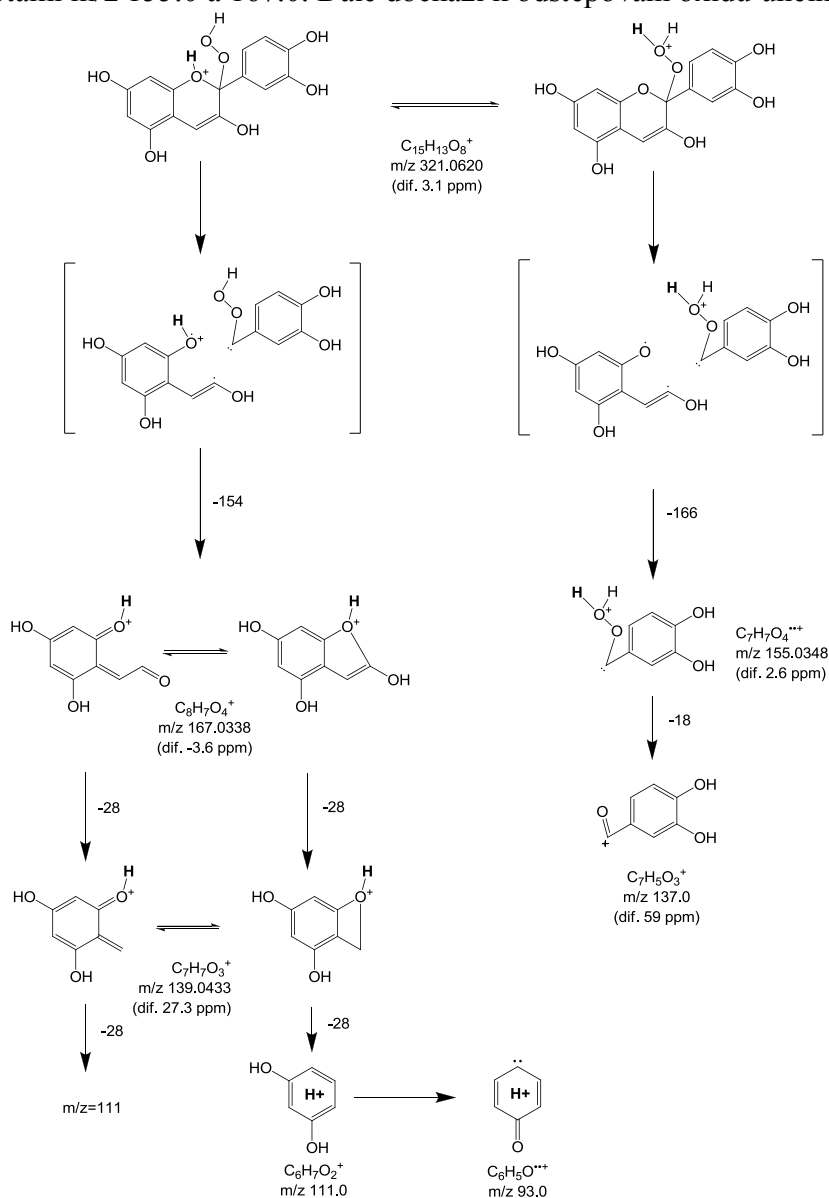
1: TOF MS ES+
374



Obr. 26 Spektrum rekonstruované pro pik elující s retenčním časem 2.29 (resp 2.32 s použitím MS detektoru).

Porovnáním odezvy píku s retenčním časem $t_R=2,95$ min v průběhu oxidace bylo zjištěno, že dochází k úbytku této látky. V jejím spektru byl potvrzen ion s m/z 303 a jde tedy patrně o derivát delphinidinu, přítomný jako nečistota ve standardu, který v přítomnosti H_2O_2 rovněž oxiduje. Analýza kontrolního vzorku (bez přítomnosti H_2O_2) prokázala rovněž přítomnost této látky.

Obr. 26 ukazuje MS spektrum již zmíněného oxidačního produktu s retenčním časem $t_R= 2,3$ min. Prokazuje přítomnost iontu s hodnotou m/z 483,1 a postup jeho štěpení. Nejprve dochází k odštěpení cukerného zbytku (vzniká iont s m/z 321.1) a následuje fragmentace navržená na obr. 27. Dochází k rozštěpení C-kruhu anthokyanidinového skeletu a vzniku iontů s hodnotami m/z 155.0 a 167.0. Dále dochází k odštěpování oxidu uhelnatého a vody.



Obr. 27 Navržené schéma dekompozice iontu m/z 321.

Navržená struktura fragmentů s hodnotou m/z 321.1; 167.0; 155.0 byla potvrzena také měření přesné a správné hmoty. Chyba (odchylka od vypočtených hodnot) nepřesahuje 3.7 ppm. Izolací iontu s m/z 321.1 a jeho fragmentací v kolizní cele vznikají ionty s m/z 155.0 a 137.0 a ačkoli je jejich signál slabý, potvrzují navrhovanou fragmentační cestu. Izolací iontu s m/z 155.0 a jeho fragmentací vzniká ion 137.0, který rovněž potvrzuje navrhované procesy. Všechny rekonstruované chromatogramy pro výše diskutované hodnoty m/z poskytují pík ve stejném retenčním čase $t_R=2.3$ min.

ZÁVĚR

V teoretické části byly popsány základní vlastnosti anthokyaninů, antioxidační vlastnosti, jejich chování ve fyziologickém prostředí a jejich vliv na zdraví člověka. Byla popsána jejich antioxidační kapacita a schopnost vylučovat volné radikály. Dále byla diskutována retence anthokyaninů v organismu a byl popsán jejich metabolismus. Konec teoretické části se věnoval chemickým přeměnám anthokyaninů a byla nastíněna problematika jejich analýzy.

V experimentální části byla sledována oxidace cyanidin-3-galaktosidu peroxidem vodíku. Během analýzy byl prokázán úbytek původního anthokyaninu a nárůst množství degradačních produktů. LC/MS analýzou byl nalezen produkt adice cyanidin-3-galaktosidu s peroxidem vodíku ($m/z = 483,1078$). Detailně bylo popsáno štěpení tohoto aduktu. Při fragmentaci dochází k odštěpení cukru a dále k rozštěpení C kruhu anthokyanidinového skeletu.

Vedle tohoto aduktu vznikají ještě další minoritní produkty oxidace. Vzhledem k jejich slabé intenzitě nebyla jejich struktura doposud objasněna a tyto produkty jsou předmětem dalšího studia.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. D.W. Lee, K.S. Gould, Why leaves turn red, *Am. Sci.* 90 (2002) 524.
2. M. G. Hertog, P. C. Hollman, M. B. Katan, D. Kromhout, Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands, *Nutr. Cancer* 20 (1993) 21-29.
3. M. L. Ovaskainen, R. Törrönen, J. M. Koponen, H. Sinkko, J. Hellström, H. Reinivuo, P. Mattila, Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults, *J. of Nutr.* 138 (2008) 562-566.
4. M. P. Kähkönen, M. Heinonen, Antioxidant Activity of Anthocyanins and Their Aglycons, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 628-633.
5. T. Borkowski, H. Szymusiak, A. Gliszczyńska-Świgło, I.M. C. M. Rietjens, B. Tyrakowska, Radical Scavenging Capacity of Wine Anthocyanins Is Strongly pH-Dependent, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 5526-5534.
6. H.Wang, G. Cao, R. L. Prior, Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 304.
7. Y. Noda, T. Kaneyuki, A. Mori, L. Packer, Antioxidant Activities of Pomegranate Fruit Extract and Its Anthocyanidins: Delphinidin, Cyanidin, and Pelargonidin, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 166-171.
8. A. Gliszczyńska-Świgło, Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assai, *Food Chem.* 96 (2006) 131-136.
9. G. Cao, H. M. Alessio and R. G. Cutler, Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants, *Free Rad. Biol. Med.* 14 (1993) 303-311.
10. K. Yagi, Lipid peroxides, free radicals, and diseases. In: *Active oxygens, Lipid peroxides, and Antioxidants*, Japan Science Society Press, Tokyo (1993) 39-56.
11. T. Tsuda, K. Shiga, K. Ohshima, S. Kawakishi, T. Osawa, Inhibition of Lipid Peroxidation and the Active Oxygen Radical Scavenging Effect of Anthocyanin Pigments Isolated from *Phaseolus vulgaris L.*, *Biochem. Pharmacol.* 52 (1996) 1033-1039.
12. T. Tsuda, Y. Kato, T. Osawa, Mechanism for the peroxynitrite scavenging activity by anthocyanins, *FEBS Lett.* 484 (2000) 207-210.

13. T. Tsuda, F. Horio, J. Kitoh, T. Osawa, Protective Effects of Dietary Cyanidin 3-O- β -D-Glucoside on Liver Ischemia-Reperfusion Injury in Rats, *Arch. Biochem. Biophys.* 368 (1999) 361-366.
14. A. D. Sarma, Y. Sreelakshmi, R. Sharma, Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation, *Phytochemistry* 45 (1997) 671-674.
15. C. R. Welch, Q. Wu, J. E. Simon, Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization, *Curr. Anal. Chem.* 4 (2008) 75-101.
16. T. Ichiyanagi, Y. Hatano, S. Matsuo, T. Konishi, Simultaneous Comparison of Relative Reactivities of Twelve Major Anthocyanins in Bilberry towards Reactive Nitrogen Species, *Chem. Pharm. Bull.* 52 (2004) 1312-1315.
17. M. López-Serrano, A. Ros Barceló, H₂O₂-Mediated Pigment Decay in Strawberry as a Model System for Studying Color Alternations in Processed Plant Foods, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 824-827.
18. N. Ruenroengklin, B. Yang, H. Lin, F. Chen, Y. Jiang, Degradation of anthocyanin from litchi pericarp by H₂O₂ and hydroxyl radical, *Food Chem.* 116 (2009) 995-998.
19. F. Kader, M. Irmouli, J. P. Nicolas, M. Metche, Proposed mechanism for the degradation of pelargonidin 3-glucoside by caffeic acid o-quinone, *Food Chem.* 75 (2001) 139-144.
20. J. Fleschhut, F. Kratzer, G. Rechkemmer, S. E. Kulling, Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro, *Eur. J. Nutr.* 45 (2006) 7-18.
21. T. Tsuda, F. Horio, T. Osawa, Absorption and metabolism of cyanidin 3-O- β -D-glucoside in rats, *FEBS Lett.* 449 (1999) 179-182.
22. M. V. Selma, J. C. Espín, F. A. Tomás-Barberán, Interaction between Phenolics and Gut Microbiota: Role in Human Health, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 6485-6501.
23. F. Kader, J. P. Haluk, J. P. Nicolas, M. Metche, Degradation of Cyanidin 3-Glucoside by Blueberry Polyphenol Oxidase: Kinetic Studies and Mechanism, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 3060-3065.
24. Q. Tian, M. M. Giusti, G. D. Stoner, S. J. Schwartz, Urinary Excretion of Black Raspberry (*Rubus occidentalis*) Anthocyanins and Their Metabolites, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 1467-1472.

25. A. D. Sarma, R. Sharma, Anthocyanin-DNA copigmentation complex: mutual protection against oxidative damage, *Phytochemistry* 52 (1999) 1313-1318.
26. Y. Zhang, S. K. Vareed, M. G. Nair, Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables, *Life Sci.* 76 (2005) 1465-1472.
27. L. Wang, G. D. Stoner, Anthocyanins and their role in cancer prevention, *Cancer Lett.* 269 (2008) 281-290.
28. F. Hakimuddin, G. Paliyath, K. Meckling, Selective cytotoxicity of a red grape wine flavonoid fraction against MCF-7 cells, *Breast Cancer Res. Treat.* 85 (2004) 65-79.
29. F. Galvano, L. La Fauci, G. Lazzarino, V. Fogliano, A. Ritieni, S. Ciappellano, N. C. Battistini, B. Tavazzi, G. Galvano, Cyanidins: metabolism and biological properties, *J. Nutr. Biochem.* 15 (2004) 2-11.
30. D. Cooke, W. P. Steward, A. J. Gescher, T. Marczylo, Anthocyanins from fruits and vegetables-does bright colour signal cancer chemopreventive activity? *Eur. J. Cancer* 41 (2005) 1931-1940.
31. H. Fulcrand, P. J. Cameira dos Santos, P. Sarni-Manchado, V. Cheynier, J. Favre-Bonvin, Structure of new anthocyanin-derived wine pigments, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (1996) 735-739.
32. M. Schwarz, T. C. Wabnitz, P. Winterhalter, Pathway Leading to the Formation of Anthocyanin-Vinylphenol Adducts and Related Pigments in Red Wine, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 3682-3687.
33. N.-E. Es-Safi, V. Cheynier, M. Moutounet, Role of Aldehydic Derivates in the Condensation of Phenolic Coumpounds with Emphasis on the Sensorial Properties of Fruit-Derived Foods, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 5571-5585.
34. C. T. da Costa, D. Horton, S. A. Margolis, Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 403-410.
35. J. B. Harborne, Spectral methods of characterizing anthocyanins, *Biochem. J.* 70 (1958) 22-28.
36. P. Montoro, C. I. G. Tuberoso, A. Perrone, S. Piacente, P. Cabras, C. Pizza, Characterisation by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of anthocyanins in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur, *J. Chromatogr. A*, 1112 (2006) 232-240.

37. A. Baldi, A. Romani, N. Mulinacci, F. F. Vincieri, B. Casetta, HPLC/MS Application to Anthocyanins of *Vitis vinifera*, J. Agric. Food Chem. 43 (1995) 2104-2109.
38. M. Saltmarsh, G. Williamson, C. Santos-Buelga, Methods In Polyphenol Analysis, Royal Society of Chemistry, Cambridge (2003) 348.