

**Česká zemědělská univerzita v Praze**  
**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**  
**Katedra chemie**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Pšenice s barevným zrnem jako bohatý zdroj anthokyanů  
v lidské výživě**

**Bakalářská práce**

**Michal Brnka**

**Výživa a potraviny**

**Vedoucí práce: Ing. Barbora Burešová, Ph.D.**

© 2023 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Pšenice s barevným zrnem jako bohatý zdroj anthokyanů v lidské výživě" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 20.4.2023

---

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Barboře Burešové, Ph.D., za trpělivost, cenné rady a odborné vedení mé bakalářské práce.

# Pšenice s barevným zrnem jako bohatý zdroj anthokyanů v lidské výživě

## Souhrn

Pšenice setá je jednou z nejdůležitějších obilovin v lidské výživě, a to zejména díky svým pekařským vlastnostem a vysokému výnosovému potenciálu. Netradiční odrůdy pšenic s barevným zrnem jsou kromě základních živin bohatým zdrojem rostlinných pigmentů, ale také jiných biologicky aktivních látek. Jedním z nejdůležitějších typů rostlinných barviv jsou anthokyany, které způsobují zbarvení zrn purpurových a modrých linií pšenic. Anthokyany jsou fenolické sloučeniny, které jsou řazeny do skupiny flavonoidů. Jsou to glykosidy v jejichž struktuře je obsažen aglykon nazývaný anthokyanidin a cukerná složka. Tyto látky jsou používány jako přírodní barviva a jako součást lidské výživy mohou mít příznivé zdravotní účinky, které souvisí zejména s jejich antioxidačními vlastnostmi, díky kterým jsou schopny zmírňovat oxidační stres způsobený volnými radikály. Dále mají pozitivní účinky na zrak, napomáhají prevenci patologie kardiovaskulárních chorob, diabetu, působí proti obezitě a také vykazují antimikrobiální vlastnosti. Přestože mají pozitivní účinky na zdraví, jsou to nestabilní látky s nízkou biologickou dostupností, což může do značné míry limitovat jejich používání v potravinářském a farmaceutickém průmyslu.

K extrakci anthokyanů z rostlinné matrice je možné použít různé metody, které jsou obecně děleny na klasické, jako je Soxhletova extrakce či extrakce na pevnou fázi a metody moderní, mezi které jsou řazeny např. mikrovlnná extrakce nebo extrakce superkritickou tekutinou. Pro vlastní analytické stanovení těchto látek jsou nejčastěji využívány chromatografické metody, zejména kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole.

**Klíčová slova:** delfinidin, kyanidin, modrý aleuron, purpurový perikarp, rostlinné pigmenty

# **Color-grained wheats as a valuable source of anthocyanins in human nutrition**

## **Summary**

Common wheat is one of the most important cereals in human nutrition due to its baking properties and high yield potential. Unusual varieties of wheat with coloured grains are a rich source of plant pigments and other biologically active substances in addition to essential nutrients. One of the most important types of plant pigments are anthocyanins, which cause the colouration of the grains of purple and blue wheat lines. Anthocyanins are phenolic compounds that are classified as flavonoids. They are glycosides whose structure contains an aglycone called anthocyanidin and a sugar component. These substances are used as natural dyes and, as part of the human diet, may have beneficial health effects, which are mainly related to their antioxidant properties, which enable them to alleviate oxidative stress caused by free radicals. They also have positive effects on eyesight, help prevent the pathogenesis of cardiovascular disease, diabetes, act against obesity and also have antimicrobial properties. Although they have positive effects on health, they are unstable substances with low bioavailability, which may largely limit their use in the food and pharmaceutical industries.

Various methods can be used to extract anthocyanins from plant matrix, which are generally divided into classical methods such as Soxhlet extraction or solid-phase extraction and modern methods such as microwave-assisted extraction or supercritical fluid extraction. For the actual analytical determination of these substances, chromatographic methods in particular liquid chromatography with diode array detector are most commonly used.

**Keywords:** delphinidin, cyanidin, blue aleurone, purple pericarp, plant pigments

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce</b> .....	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1</b>	<b>Pšenice</b> .....	<b>9</b>
3.1.1	Historie pěstování .....	9
3.1.2	Anatomická stavba zrna.....	9
3.1.3	Chemická stavba zrna .....	11
3.1.3.1	Sacharidy .....	11
3.1.3.2	Bílkoviny .....	12
3.1.3.3	Lipidy .....	13
3.1.3.4	Minerální látky .....	14
3.1.3.5	Vitaminy .....	14
3.1.3.6	Biologicky aktivní sloučeniny.....	15
3.1.3.7	Anti-nutriční látky .....	16
<b>3.2</b>	<b>Pšenice s barevným zrnem</b> .....	<b>17</b>
3.2.1	Karotenoidy.....	18
3.2.2	Anthokyany .....	19
3.2.2.1	Biosyntéza .....	20
3.2.2.2	Zdroje v potravinách .....	22
3.2.2.3	Význam pro člověka .....	22
<b>3.3</b>	<b>Metody extrakce a analýzy anthokyanů</b> .....	<b>24</b>
3.3.1	Extrakce .....	24
3.3.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	26
3.3.3	Hmotnostní spektrometrie (MS) .....	28
3.3.4	Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie .....	28
3.3.5	Kapilární elektroforéza .....	29
<b>4</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>30</b>
<b>5</b>	<b>Literatura</b> .....	<b>31</b>

# 1 Úvod

Obiloviny jsou nedílnou součástí lidského stravování, a to již od doby neolitické revoluce, kdy se přešlo k usedlému způsobu života. Jsou jedním z nejdůležitějších zdrojů sacharidů a významně se podílejí na saturaci výživových potřeb světové populace. V této souvislosti zaujímá výsadní postavení pšenice, která je mimo lidskou stravu hojně využívána jako součást krmiv pro hospodářská zvířata.

Klasické odrůdy pšenice mají nejčastěji červenou nebo bílou barvu zrna, ovšem začínají se objevovat i nové odrůdy, jako jsou žluté, modré nebo purpurové, u kterých záleží na typu a uložení sloučenin v zrně. Netradiční zbarvení zrna těchto genotypů je dáno zvýšeným obsahem rostlinných pigmentů, které je u žlutých způsobeno karotenoidy, zatímco u modrých a purpurových je určeno přítomností anthokyanů. Barevné pšenice tak mohou kromě základních složek výživy představovat bohatý zdroj uvedených rostlinných barviv, ale i dalších biologicky aktivních látek, jako jsou fenolické sloučeniny nebo tokoly, které jsou známy svými antioxidačními schopnostmi. Látkám mající antioxidační efekt jsou připisovány účinky jako snížení rizika vzniku nádorových onemocnění a závažných chorob kardiovaskulární povahy, podpora imunitního systému, snižování obsahu volných radikálů v organismu a další.

Globální problém rozvoje tzv. civilizačních onemocnění, spojeného se špatným životním stylem, ke kterému dochází zejména ve vyspělých státech, je možné řešit změnou životního stylu, a především úpravou jídelníčku. Ve světě roste poptávka po potravinách, jejichž konzumace by spotřebitelům mohla přinášet řadu zdravotních benefitů. Z tohoto pohledu by využití pšenic s barevným zrnem v potravinářském průmyslu mohlo představovat vhodnou strategii, jak rozšířit trh o žádané funkční potraviny a tím podpořit zdraví světové populace.

## **2 Cíl práce**

Cílem bakalářské práce je shrnout základní poznatky o pšenici, popsat chemické složení zrna této plodiny se zaměřením na rostlinná barviva ze skupiny anthokyanů a uvést jejich význam pro lidské zdraví. Dále popsat princip extrakce a vlastní analytického stanovení těchto látek v obilné matici.



## 3 Literární rešerše

### 3.1 Pšenice

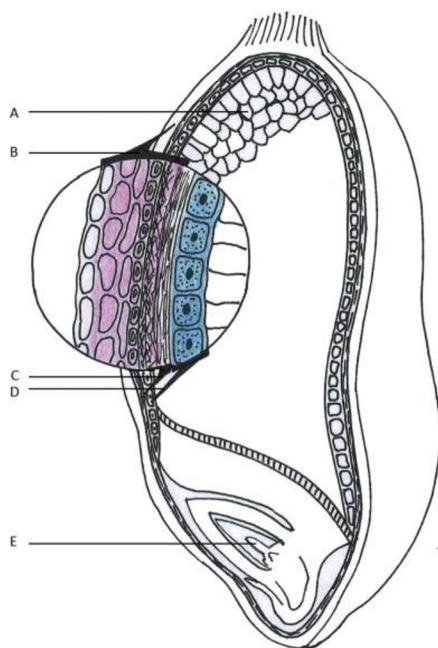
Obiloviny jsou jedny z nejvýznamnějších zemědělských plodin, které jsou používány jako krmiva pro hospodářská zvířata, nebo ve výživě člověka. Pšenice setá (*Triticum aestivum* L.) je z mnoha důvodů nejpěstovanější obilninou jak celosvětově, tak v České republice. Mezi hlavní důvody patří, že pšeničné zrno, které je využíváno pro lidskou výživu, je nejvýznamnější a nejvhodnější pro zpracování do potravinářských výrobků. Má skvělé pekařské vlastnosti kvůli obsahu specifických bílkovin, ze kterých při smíchání s vodou vzniká lepek, ale hojně je využívána i jako krmná surovina. Také je velmi dobře využitelná pro další průmyslové zpracování, jako je např. výroba lihu nebo škrobu. Dalšími kladnými vlastnostmi jsou její vysoký výnosový potenciál, variabilita odrůd, dobré skladovací vlastnosti zrna a zvládnutá pěstební technologie (Diviš et al. 2010). Produkce pšenice v České republice dosáhla v roce 2022 5,188 milionů tun (ČSÚ 2022). Z agronomického hlediska je tato plodina adaptovaná na pěstování v mírných oblastech s denními maximy kolem 15 °C a dobrou vlhkostí. Přesto může být pěstována v široké škále klimatických podmínek po celém světě, včetně horkých a suchých oblastí až po velmi chladné části světa, dokáže růst i ve výškách do 3000 m. n. m. a v oblastech s ročním úhrnem srážek 250-1800 mm (Uthayakumaran & Wrigley 2017).

#### 3.1.1 Historie pěstování

Pšenici lze považovat za nejstarší obilninu, která se zpočátku rozšířila na převážné části severní i jižní polokoule, a to především v oblasti přední Asie nebo severní Afriky. Nejstarší nálezy pšenice jsou dokládány z období okolo 15. tisíciletí př. n. l. Archeologické nálezy pěstování starobylé pšenice jednozrnky pocházejí z území Íránu, nejvíce z pohoří Zagros. V této oblasti byly zaznamenány nálezy systematického pěstování kolem roku 6000 př. n. l. Další archeologické záznamy ukazují na období 8.–9. tisíciletí př. n. l. taktéž na Předním východě, především v Anatolii a v Turecku. Na území České republiky se pšenice setá objevila v neolitu, tudíž okolo roku 5000 př. n. l. (Diviš et al. 2010).

#### 3.1.2 Anatomická stavba zrna

Obilka je složena ze tří hlavních částí, kterými jsou obalové vrstvy, endosperm a klíček (Obrázek 1) (Langton & Gutiérrez 2021).



**Obrázek 1. Podélně rozříznuté pšeničné zrno. A – endosperm, B – oplodí (perikarp), C – osemení (testa), D – aleuronová vrstva, E – embryo (klíček) (upraveno dle Trojan et al. 2014).**

Obalové vrstvy, které mají primární účel ochrany vůči vnějším vlivům, jsou nazývány otruby. Jejich hlavním úkolem je chránit zrno před mechanickým (poškození zrna při sklizni), mikrobiálním (plísně, houby, bakterie) nebo enviromentálním (sluneční záření, vlhkost, vyšší teploty) poškozením. Tento obal má vnější a podpovrchovou část. Vnější vrstvy neboli oplodí, (perikarp), se skládají především z nerozpustných sacharidů typu celulosy, které mají vysokou mechanickou pevnost. Tato část zrna může být využita jako zdroj vlákniny, čehož se využívá v úpravě výživových hodnot daného výrobku ke snížení energetického příjmu a zvýšení příjmu nestravitelných látek, ale v pekárenské technologii zhoršují kvalitu a schopnost zpracovat těsto, a také mohou mít neblahý vliv na konečný vzhled výrobku (Příhoda et al. 2003). Perikarp představuje zralou stěnu zrna, která je ve sklizňové době již mrtvá, protože většina pletiv je bez cytoplazmy, jsou tzv. lignifikované. Oplodí se skládá z vnější epidermis, hypodermis, parenchymu, intermediárních buněk, příčných buněk a trubicových buněk (Bechtel et al. 2009). Podpovrchové vrstvy neboli osemení (testa), jsou složeny zejména z polysacharidů typu arabinoxylanů a  $\beta$ -glukanů, díky kterým mají schopnost vázat vodu a v důsledku toho mohou bobtnat a ovlivňovat tak vaznost mouky nebo naopak zvýšit lepivost těsta (Příhoda et al. 2003).

Klíček neboli embryo, je samotným zárodkem rostliny a nese genetickou informaci. Při zpracovávání v mlýnských technologiích je separován od zbytku materiálu, protože je zdrojem látek na bázi tuků, které mají nízkou stabilitu a mohou lehce podléhat nežádoucím změnám, zejména žluknutí. Bez stabilizace proto není vhodné tuto část zrna dále pekárensky zpracovávat (Příhoda et al. 2003).

Endosperm, vnitřní obsah zrna, tvoří největší část celé obilky a z hlediska technologií je nejdůležitější částí. Zásobní látky pro klíčící rostlinu jsou obsaženy právě v endospermu. Téměř  $\frac{3}{4}$  obsahu tvoří škrob, ovšem pro pekárenské technologie jsou velmi podstatné bílkoviny, které tvoří přibližně 10 % celkového obsahu látek v endospermu, přičemž rozdílná kvalita

bílkovin v zrně určuje celkovou zpracovatelskou kvalitu mouky. K endospermu je dále řazena jeho vrchní vrstva, nacházející se pod vnějšími obaly, která je nazývána jako vrstva aleuronová. Tato část obsahuje větší procento bílkovin, ovšem s horšími lepkotvornými vlastnostmi než samotný endosperm, který je vzhledem ke své velikosti nejvýznamnějším zdrojem bílkovin obsažených v mouce (Příhoda et al. 2003).

### 3.1.3 Chemická stavba zrna

Díky vysokému obsahu sacharidů je pšenice skvělým zdrojem energie, ale obsahuje i proteiny, lipidy, a kromě těchto základních živin také vitaminy, minerální látky a řadu dalších biologicky aktivních rostlinných sloučenin (Moshawih et al. 2022).

#### 3.1.3.1 Sacharidy

Nejvíce zastoupenou složkou pšeničného zrna jsou sacharidy, z nichž se zde vyskytuje zejména škrob a vláknina ve formě celulosy a hemicelulosy, dále pentosany, jednodušší sacharidy jako oligosacharidy a monosacharidy, a také sacharidy ve formě komplexů s lipidy a proteiny – glykolipidy a glykoproteiny (Prugar 1977). Obilná zrna obsahují v průměru 66–76 % sacharidů, z toho tvoří největší podíl škrob (55–70 %), po něm následují v menším zastoupení arabinoxylany (1,5–8 %),  $\beta$ -glukany (0,5–7 %), cukry (okolo 3 %), celulóza (okolo 2,5 %) a glukofruktany (okolo 1 %) (Koehler & Wiesler 2013).

Škrob je tvořen dvěma polysacharidy, a těmi jsou amyloza, která má přímý řetězec glukosových jednotek spojených  $\alpha$ -glykosidickou vazbou (1→4) a amylopektin s rozvětveným řetězcem, který obsahuje až tisíce glukosových jednotek spojených  $\alpha$  (1→4) vazbou do linie a připojené větve pomocí  $\alpha$  (1→6) glykosidických vazeb. Díky větvení pomocí vazby  $\alpha$  (1→6) je amylopektin daleko odolnější vůči amylytickým enzymům než amyloza (Prugar 1977). Amyloza tvoří přibližně 25–28 % a amylopektin 72–75 % obilného škrobu (Koehler & Wiesler 2013).

Celulóza je polysacharid, který má podobnou stavbu jako škrob, na které se podílejí jako základní monomerní jednotky  $\beta$ -anomery glukosy, které jsou spojeny vazbou  $\beta$  (1→4). V rostlinách má především stavební funkci, neboť tvoří buněčné stěny a slouží ke stabilizaci rostlinných pletiv. V obilných zrnech se vyskytuje hlavně v obalových vrstvách a je součástí vlákniny, která z výživového hlediska slouží k prevenci vzniku cévních chorob nebo nádorových onemocnění (Příhoda et al. 2003).

Hemicelulosy jsou složeny z různých monosacharidů (pentosy a hexosy) a jejich derivátů (kyselina D-glukuronová a D-galakturonová) a spolu s celulosou jsou obsaženy v rostlinných tkáních. Hemicelulosy se dělí na hexosany zahrnující manany, glukany a fruktany a pentosany jako xylany a arabany. Pentosany jsou obsaženy v obilném zrně a napomáhají držet strukturu těsta u žitných výrobků. Jejich polymerní řetězec je tvořen D-xylany s vazbami  $\beta$  (1→4) a vedlejší řetězec je tvořen L-arabinosou, což dá za vznik arabinoxylanům (Hřivna 2014). Hlavním rozdílem od celulosy je v zastoupení sacharidových jednotek, přičemž hemicelulosy nejsou tvořeny pouze  $\beta$ -D-glukosou, ale vyskytují se v nich i sacharidy jako arabinosa, xyloza, manna nebo galaktosa. Uvedené složky nerozpustné vlákniny se od sebe dále liší ve struktuře, kdy celulóza je tvořena 7000 až 15 000 glukosovými jednotkami a není

větvená, zatímco hemicelulosa se skládá z 500 až 3000 monosacharidových jednotek a větvi se pomocí  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) vazeb (Kulkarni et al. 2012). Při zpracování zrna přechází část obsahu pentosanů do mouky, a díky svým hygroskopickým vlastnostem jsou schopné vázat velké množství vody (Prugar 1977). Bohatým zdrojem těchto látek jsou žitné mouky (4–7 %), ovšem pšeničné mouky jich obsahují méně (1–3 %) (Příhoda et al. 2003).

### 3.1.3.2 Bílkoviny

Bílkoviny jsou důležitou částí látek obsažených v zrně a jejich množství v sušině je přibližně v rozmezí 8–20 % (Prugar 1977; Belderok 2000). V každé části zrna je obsah těchto látek rozdílný. Poměrně nejvíce bílkovin se nachází v aleuronové vrstvě a klíčku v podobě metabolicky a geneticky důležitých látek, jako např. enzymů a nukleoproteinů. Enzymy jsou látky fungující jako katalyzátory biochemických dějů (Příhoda et al. 2003). Řadí se sem např. amylasy ( $\alpha$ -amylasa a  $\beta$ -amylasa), lipoxygenasy nebo lipasy (Belitz et al. 2009).

V endospermu se koncentrace bílkovin snižuje směrem ke středu. Bílkovinné látky přechází ve velké míře do mouky, a především lepkotvorné bílkoviny smíchané s vodou za vzniku lepku určují její technologické vlastnosti (Prugar 1977). Nejvyšší obsah bílkovin v pšeničném zrně je v aleuronové vrstvě a klíčku, kde dosahuje hodnot přes 30 %, následuje endosperm obsahující přibližně 13 % a obalové vrstvy, v nichž se nachází necelých 7 % (Belitz et al. 2009)

Složení aminokyselin v moukách z různých druhů obilovin je rozdílné, ale všechny jsou charakteristické vysokým obsahem glutamové kyseliny, hlavně ve formě glutaminu, kdy se jeho hodnoty pohybují mezi 15–31 %. U pšenice, ječmene a žita je poměrně vysoký obsah prolinu (12–14 %). Další dobře zastoupené aminokyseliny jsou leucin s obsahem 7–14 % a alanin s obsahem 4–11 %. Nutričně významné esenciální aminokyseliny jako tryptofan (0,2–1 %), methionin (1,3–2,9 %), histidin (1,8–2,2 %) a lysin (1,4–3,3 %) jsou zastoupeny pouze ve velice nízkých hodnotách. (Koehler & Wiesler 2013).

V roce 1907 T.D. Osborne vydal práci, podle které se rozdělují pšeničné bílkoviny do čtyř skupin dle rozpustnosti v různých rozpouštědlech, a to na albuminy, které jsou rozpustné ve vodě, globuliny rozpustné v solných roztocích, gliadiny neboli prolaminy rozpustné v 70% ethyl alkoholu a gluteniny, které jsou rozpustné ve zředěných roztocích kyselin nebo zásad (Belitz et al. 2009; Belderok et al. 2000).

Albuminy jsou z pšeničných bílkovin nejmenší a po nich následují globuliny. Ty se nalézají hlavně v obalových vrstvách, klíčku zrna a aleuronové vrstvě a celkově tvoří asi 25 % všech bílkovin v zrně. Gliadiny a gluteniny jsou vysokomolekulární bílkoviny, které se vyskytují především v endospermu (Belderok et al. 2000), také se jim říká zásobní bílkoviny (Belitz et al. 2009; Příhoda et al. 2003). Většina fyziologicky aktivních bílkovin (enzymů) je řazena do skupiny albuminů či globulinů, které tvoří asi 25 % celkového obsahu bílkovin. Zbývá část (75 %) je tvořena gliadiny a gluteniny, které si rostlina ukládá a využívá v procesu klíčení. Mají nulovou enzymatickou aktivitu, ale hrají důležitou roli při tvorbě těsta, neboť zadržují plyny a vytváří houbovitý charakter pekařského výrobku (Belderok et al. 2000). Při zadělávání těsta pojmu gliadiny a gluteniny určité množství vody, a za použití mechanické práce a vzdušného kyslíku se začne tvořit soudržná hmota, která je nazývána lepek (Belderok et al.

2000; Příhoda et al. 2003). Pokud je těsto vypráno pod vodou, odplaví se z něj všechny látky rozpustné ve vodě a škrob a zbylá část je pak pojmenována jako mokřý lepek (Příhoda et al. 2003). Lepek je složen přibližně z 90 % bílkovin, 8 % lipidů a 2 % sacharidů (Belitz et al. 2009).

V posledních desetiletích se celosvětově zvyšuje výskyt alergií a potravinových intolerancí. U lidí, kteří mají nevyrovnaný imunitní systém a střevní mikroflóru, je mohou vyvolávat různé živočišné a rostlinné bílkoviny obsažené v potravinách včetně obilovin. Problémovými proteiny u pšenice jsou lipidový transportní protein,  $\omega$ -5-gliadin,  $\alpha$ -amylasový/trypsinový inhibitor a všechny bílkoviny ze skupiny prolaminů. Intolerance na obiloviny se vyskytuje přibližně u 1–3 % populace. Bílkoviny, které ji vyvolávají, jsou gliadiny a gluteniny z pšenice, které po smíchání s vodou vytvoří lepek. Lepková intolerance neboli celiakie je autoimunitní onemocnění tenkého střeva a vyskytuje se u jedinců s genotypem lidského leukocytárního antigenu (HLA) DQ2 a/nebo DQ8. (Gilissen et al. 2014). Na vzniku celiakie se podílejí specifické fragmenty lepkových bílkovin, tzv. epitopy, což jsou peptidové sekvence devíti aminokyselin, které jsou odolné vůči žaludečnímu a pankreatickému trávení. Tyto peptidy se dostávají do vazivové tkáně tenkého střeva, kde se vejdou do receptoru antigenu HLA-DQ a mohou být rozpoznány specifickými T-lymfocyty, které se aktivují a začnou produkovat cytokiny, což může vést k rozvoji zánětu a atrofii klků v tenkém střevě, jenž může vyústit v problémy s příjmem potravy (Rodrigo 2006; Gilissen et al. 2014).

### 3.1.3.3 Lipidy

Lipidy jsou obecně řazeny mezi širokou a bohatou skupinu organických látek, které se vyskytují běžně v přírodě a zastávají důležité role v organismech. Jejich primárním znakem je nerozpustnost nebo omezená rozpustnost ve vodě. Oproti tomu v organických rozpouštědlech jako toluen, hexan, chloroform nebo aceton jsou rozpustné (Příhoda et al. 2003). Lipidy jsou obecně děleny na jednoduché, složené a odvozené. Jednoduché lipidy jsou tvořeny lipidovou částí čili estery alkoholů a mastných kyselin, kam jsou řazeny acylglyceroly (tuky) a vosky. Složené lipidy obsahují navíc oproti jednoduchým lipidům nelipidovou složku, kam patří fosfolipidy, glykolipidy a lipoproteiny. Do skupiny odvozených lipidů jsou řazeny isoprenoidní látky jako jsou steroidy nebo karotenoidy (Domínguez et al. 2022)

Tuky, které jsou řazeny mezi neutrální lipidy, patří mezi zásobní látky, které mohou být organismy využity k získání energie, přičemž jejich energetická hodnota je dvojnásobně větší než u sacharidů a bílkovin. Dle chemické struktury se jedná o estery glycerolu a vyšších mastných kyselin a nejčastěji se vyskytují jako triacylglyceroly. V organismech se vyskytují buď ve formě živočišných tuků (sádla, loje), které jsou tvořeny nasycenými mastnými kyselinami a jsou pevné při normální teplotě, nebo jako rostlinné oleje, které jsou kapalné a obsahují větší procento nenasycených mastných kyselin (Příhoda et al. 2003).

V pšenici a jiných obilovinách jsou lipidy řazeny mezi minoritní látky. Největší koncentrace se nachází v klíčku, přibližně 3–4 % z celkové váhy zrna, a protože je klíček při mlýnském zpracování ze zrna odstraňován, v mouce tvoří jen 1–2,5 %. Lipidy plní velmi důležitou roli při procesech jako pečení a hnětení, neboť společně s lepem vytváří komplex, který pomáhá ke stabilitě struktury plyných bublin v těstě, což ve výsledku značně ovlivňuje konečnou texturu a objem pečiva (Sabenca et al. 2021). Tuto stabilitu způsobují především

polární lipidy, např. N-acyl-fosfatidylethanolamin nebo monogalaktosyldiacylglyceroly (Pareyt et al. 2011), které se hromadí na přechodu plyn/kapalina, a tím zabraňují plynným bublinám v koalescenci neboli spojování (Belitz et al. 2009).

Pšeničné lipidy jsou rozdělovány na polární a nepolární. Polární lipidy, kam jsou řazeny glykolipidy a fosfolipidy (Sabenca et al. 2021), se nachází v endospermu, kde jsou součástí dvojitéch buněčných membrán, které jsou nejspíše pozůstatkem po amyloplastech a tvoří 70–75 % celkových lipidů. Hlavními fosfolipidy v zrně jsou fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin a fosfatidylinositol. Z glykolipidů jsou v obilkách pšenice zastoupeny zejména mono- a digalaktosyldiglyceridy. Nepolární lipidy se vyskytují v klíčku a aleuronové vrstvě, a to zejména ve formě volných mastných kyselin, mono-, di- a triacylglycerolů nebo sterolových esterů (Belitz et al. 2009; Pareyt et al. 2011). V pšeničném zrně jsou jako součást acylglycerolů nejčastěji zastoupeny kyseliny palmitová (16:0), stearová (18:0), olejová (18:1) a linolová (18:2) (Pareyt et al. 2011), dále palmitoolejová (16:1) nebo  $\alpha$ -linolenová (18:3) (Belitz et al. 2009).

Pšeničné lipidy mohou být děleny také na zmýdelnitelné, kam patří mastné kyseliny, acylglyceroly, glykolipidy a fosfolipidy a nezmýdelnitelné, mezi které jsou řazeny zejména isoprenoidy, např. tokoferoly a karotenoidy (Uthayakumaran & Wrigley 2017).

#### 3.1.3.4 Minerální látky

Minerální látky jsou důležitou součástí lidské výživy (Koehler & Wiesler 2013). Jsou potřebné ke stimulaci a správný průběh řady funkcí organismu, jako je tvorba energie, růst, hojení, krvetvorba a vývoj kostí, udržování zdravého nervového systému, regulace svalů, včetně srdečních, a také jsou součástí spousty enzymů. Nedostatky různých minerálních látek způsobené špatnými stravovacími návyky nebo podvýživou mohou vést k rozvoji chronických nemocí (Karayigit et al. 2020). Minerální látky se nachází nejvíce v otrubách, kde jsou ovšem často silně vázány v buněčných stěnách. Některé minerální látky se mohou vyskytovat ve formě fytátů, tudíž mají nízkou biologickou dostupnost. Fosfor v pšenici je převážně uložen ve formě fytátů v aleuronové vrstvě, které obsahují 84 % celkového fosforu. Fytátové soli jsou zásobárnou dalších minerálních látek, jako železo, vápník a zinek. Proces, který by mohl být slibnou předúpravou obilovin je perlení, kdy se odstraňují vnější vrstvy zrn abrazií na požadovanou úroveň před mletím na mouku. Perlení poškozují buněčné stěny a způsobuje, že minerální látky zachycené v otrubách jsou biologicky dostupnější. Tento proces navíc může do jisté míry odstranit stopové toxické prvky, jako je kadmium a olovo, protože jejich koncentrace je v otrubách nebo celých zrnech až třikrát vyšší než v mouce (Brier et al. 2015).

#### 3.1.3.5 Vitaminy

Mezi hlavní mikroživiny pšeničného zrna patří skupina vitaminů B a vitamin E. Tyto látky jsou nerovnoměrně rozloženy v zrně a nacházejí se především v pšeničných klíčcích a otrubách, proto rafinovaná mouka obsahuje malé množství vitaminů. Pšenice je bohatým zdrojem některých vitaminů skupiny B, a to zejména thiaminu (B1), niacinu (B3), pyridoxinu (B6) a folátu (B9) (Uthayakumaran & Wrigley 2017). Kromě hydrofilních vitaminů je v pšenici obsaženo významné množství vitaminu E, což je souhrnné označení pro skupinu čtyř tokoferolů

a čtyř tokotrienolů. Jsou to v tucích rozpustné sloučeniny, které mají vynikající antioxidační vlastnosti a jsou syntetizovány pouze fotosyntetizujícími organismy. Obiloviny jsou považovány za průměrný zdroj vitamínu E. Tokoferoly, hlavně  $\alpha$ -tokoferol a  $\beta$ -tokoferol, jsou nejvíce koncentrovány v klíčku obilky, zatímco tokotrienoly bývají soustředěny hlavně v perikarpu, testu a aleuronové vrstvě (Uthayakumaran & Wrigley 2017; Gamna & Spriano 2021; Lachman et al. 2013)

### 3.1.3.6 Biologicky aktivní sloučeniny

Tyto látky, které se obecně v potravinách vyskytují v malých množstvích, jsou velmi prospěšné pro lidské zdraví, ale neřadí se mezi látky esenciální jako např. vitamíny. Většina těchto sloučenin je přítomna v obalových vrstvách a klíčku obilného zrna. Pokud se při mlýnském zpracování neodebírají klíček a obalové vrstvy, řada biologických aktivních látek v nich obsažená může mít vliv na snížení rizika vzniku chronických nemocí. Mezi nejvýznamnější biologicky aktivní látky, které jsou obsažené v pšeničném zrně, jsou řazeny fenolické sloučeniny a karotenoidy (Gani et al. 2012).

Fenolické sloučeniny jsou charakteristické přítomností jednoho nebo více aromatických kruhů, na kterých je navázána alespoň jedna hydroxylová skupina. Podle struktury se tyto látky rozřazují do mnoha různých skupin, jako jsou např. fenolické kyseliny, flavonoidy, stilbeny, kumariny nebo třísloviny. Jsou to produkty sekundárního metabolismu organismů rostlin zajišťující nezbytnou funkci při jejich rozmnožování a růstu, také působí jako obranné mechanismy proti patogenům, škůdcům a parazitům a podílejí se na barvě rostlin (Gani et al. 2012). Nejrozsáhlejší skupinou fenolických látek jsou flavonoidy skládající se ze dvou fenylových kruhů a jednoho heterocyklického kruhu. Rozdělují se do šesti podskupin, a to na anthokyanidiny, flavan-3-oly, flavony, flavonoly, isoflavony a flavanony (Cahyana & Adiyanti 2021; Lachman et al. 2017). Někdy místo anthokyanidinů jsou řazeny do skupiny flavonoidů anthokyany (Pojer et al. 2013). Některé sloučeniny náležící do skupiny flavonoidů určují zbarvení plodů a květů, díky čemuž působí jako atraktanty pro opylovače. U rostlin mají flavonoidy řadu dalších funkcí, např. fungují jako jedinečné filtry škodlivého UV záření, signální molekuly, detoxikační látky nebo se účastní klíčení semen (Samanta et al. 2011). V lidském organismu vykazují příznivé zdravotní účinky, jako je prevence proti kardiovaskulárním onemocněním, cukrovce, obezitě a vzniku nádorových onemocnění (Cahyana & Adiyanti 2021).

Pro lidskou populaci mají flavonoly přínosný účinek svým anti-alergickým efektem, tudíž je lze použít proti alergii. Mohou být také používány ke snížení krevního tlaku u lidí s hypertensí a zlepšují funkci střevních buněk. Flavan-3-oly neboli flavanoly mohou mít v lidském těle redukční efekt na hladinu krevního cukru (Cahyana & Adiyanti 2021). Některé flavonoidy mohou mít ochranný účinek proti rozvoji závažných chorob jako je Alzheimerova choroba. Tato choroba, jedna z možných forem demence, je neurodegenerativní onemocnění charakterizováno nedostatkem neuropřenašeče acetylcholinu. Je to jeden z hlavních zdravotních problémů u starších lidí, hlavně v průmyslových zemích. Acetylcholinesterasa (AChE) je důležitý enzym v centrálním nervovém systému, který ovšem způsobuje rozpad acetylcholinu, proto jsou vyvíjeny léky, které by rušily její funkci a zároveň neměly vedlejší účinky. Několik flavonoidů bylo použito pro výzkum (kvercetin, rutin,

kaempferol-3-O- $\beta$ -D-galaktosid a makluraxanthon), zda by dokázaly vyrušit účinek AChE. Bylo zjištěno, že jako účinnými inhibitory mohou být kvercetin a makluraxanthon s 50% inhibiční koncentrací  $IC_{50} = 353,86 \mu M$  a  $IC_{50} = 8,47 \mu M$ , které byly porovnány s klasickým AChE inhibitorem Galanthaminem, který měl  $IC_{50} = 0,75$ , takže se dá usoudit, že tyto látky mají určitý potenciál, zejména makluraxanthon, k dalšímu výzkumu jako možný lék proti Alzheimerově chorobě (Khan et al. 2009).

Některé sloučeniny tohoto typu mohou mít také negativní vliv, a tím jsou taniny neboli třísloviny. Jsou považovány za nežádoucí látky, protože srážejí bílkoviny, inhibují trávicí enzymy a ovlivňují využití minerálních látek a vitaminů. Rozdělují se do dvou skupin, a to na hydrolyzovatelné a kondenzovatelné. Hydrolyzovatelné třísloviny se skládají z centrální glukosové molekuly spojené s molekulami gallové kyseliny (galotaniny) nebo s hexahydroxydifenovou kyselinou (ellagitaniny). Nejběžnějším zástupcem galotaninů je kyselina tříslová, která je tvořena pentagalloylglukosou s estericky navázanými pěti molekulami gallové kyseliny. Přestože jsou některé třísloviny považovány za nevhodné nutriční látky, malé množství v potravinách může mít naopak pozitivní účinek. *In vitro* vykazují antioxidační aktivitu a zdá se, že mohou ovlivnit růst bakterií nepřímým mechanismem, kdy jsou schopny inhibovat mikrobiální enzymy a odebrat substráty potřebné pro růst bakterií (Ram et al. 2020; Sieniawska & Baj 2017).

### 3.1.3.7 Anti-nutriční látky

Pšenice může obsahovat velké množství nutričně prospěšných látek pro zdraví, přesto se v ní vyskytují látky, které jsou neprospěšné a mohou dokonce uškodit, např. kyselina fytová, taniny, inhibitory proteas a alkaloidy (Ram et al. 2020).

Kyselina fytová, jinak nazývaná inositol-hexafosfát nebo fytát, je u obilnin primární zásobní forma fosforu v rostlinných pletivech. Fosfor ve formě fytátu není pro člověka a monogastriční zvířata biologicky dostupný, protože postrádají enzym fytasu, která je nepostradatelná pro odštěpování atomů fosforu z molekuly kyseliny fytové. Dalším problémem u této látky je schopnost silně vázat kovové kationty (draslík, mangan, hořčík, vápník, železo a zinek) za vzniku molekul smíšených solí (fytinů), které redukuje biologickou dostupnost vázaných mikroživin. Nestrávená kyselina fytová, jež je hospodářskými zvířaty (prasata, drůbež) vyloučena exkrementy se dostává do půdy a vody a tím je znečištěná. Krokem vpřed může být šlechtění a využívání plodin s nízkým obsahem této látky, čímž by se zvýšila dostupnost fosforu v krmivech a snížilo znečištění prostředí. U lidí by se jednalo o zvýšení dostupnosti mikronutrientů, především železa a zinku. Možným postupem by mohla být identifikace genotypů s nízkým obsahem fytátu a vyšším obsahem fytázy v zrně (Ram et al. 2020).

Jako inhibitory proteas fungují specifické malé molekuly, které inhibují aktivitu enzymů katalyzujících hydrolytické štěpení peptidických vazeb různých proteinů. Obiloviny jsou známým zdrojem inhibitorů trypsinu a chymotrypsinu, které jsou uloženy zejména v klíčku obilky a částečně v endospermu. Tyto látky jsou díky své termostabilitě odolné působení vysokých teplot, kdy při vystavení  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu třiceti minut, respektive jedné hodiny, dochází ke ztrátě jen 10 %, respektive 50 % jejich aktivity. V důsledku účinku trypsinového inhibitoru dochází k četným poruchám trávení, jako je žaludeční nevolnost nebo hypertrofie a hyperplazie pankreatu, které byly pozorovány u kuřat, potkanů nebo myši. Snižují svými



účinky schopnost trávit bílkoviny, což vede k omezení jejich využitelnosti v organismu a zvýšenému vylučování (Ram et al. 2020).

Alkaloidy jsou sekundární metabolity, které byly původně popsány jako farmakologicky aktivní sloučeniny a základem jejich struktury jsou dusíkaté heterocykly. V rostlinách se vyskytují jako soli organických kyselin (mléčná kyselina, octová kyselina, jablečná kyselina a další). Některé alkaloidy se mohou vyskytovat volně v systému (nikotin), menší část existuje ve formě glykosidů (solanin), jako amidy (piperin) nebo jako estery organických kyselin (atropin, kokain). U obilovin je možný obsah alkaloidů způsoben přítomností houby *Claviceps purpurea* (paličkovice nachová), která parazituje na obilkách pšenice, žita, ječmene, ovsa a prosa, kde vytváří tzv. sklerocium. Tvorba sklerocií ovlivňuje kvalitu a výnosnost plodin, protože tyto útvary jsou zásobárnami alkaloidů, které mají negativní účinek na zdraví lidí a zvířat, kdy při požití způsobují ergotismus (Ram et al. 2020).

### 3.2 Pšenice s barevným zrnem

Nejčastěji konzumovanými odrůdami pšenice jsou ty s tzv. červeným a bílým zrnem, u kterých je přirozené okrové zbarvení obilky dáno přítomností různých derivátů katechinů a taninů. V posledních desetiletích se však stále více pěstují a využívají také pšenice se žlutým zbarvením zrna, které je určeno zvýšeným obsahem karotenoidů, zejména luteinu a zeaxanthinu (Lachman et al. 2017; Francavilla & Joye 2020). V ČR jsou registrovány dvě odrůdy se žlutým endospermem, a to Citrus a Luteus (Martínek & Vyhnánek 2014). Kromě toho existují i modré, fialové a černé odrůdy, jejichž barva zrna je dána přítomností anthokyanů (Lachman et al. 2017; Francavilla & Joye 2020). V purpurových zrnech jsou anthokyany uloženy v perikarpu a nejhorněji zde bývá zastoupen kyanidin-3-glukosid či kyanidin-3-rutinosid. V modrých zrnech se anthokyany, především delphinidin-3-glukosid a delphinidin-3-rutinosid, vyskytují v aleuronové vrstvě. Černé genotypy (někdy označované také jako tmavě purpurové), které vznikají kombinací modrých a purpurových linií, obsahují anthokyany jak v perikarpu, tak i v aleuronové vrstvě. Při srovnání těchto tří barevných typů je celkový obsah anthokyanů nejvyšší u černých pšenic, následně u modrých a nejnižší potom u genotypů purpurových (Abdel-Aal et al. 2006; Francavilla & Joye 2020).

Schopnost vytvářet anthokyany v perikarpu byla do purpurových linií přenesena z tetraploidních pšenic (*T. turgidum* L. subsp. *abbyssinicum* Vavilov) pocházejících z Etiopie, Jemenu a Somálska. Byly objeveny dva dominantní geny zodpovědné za zvýšenou biosyntézu anthokyanů. Jako geny zodpovědné za zvýšenou biosyntézu anthokyanů byly identifikovány *Pp1*, který je lokalizován na chromosomu 7B, *Pp2* na chromosomu 6A a *Pp3* na chromosomu 2A, kde je přítomen na dvou alelách, a to jako *Pp3a* *Pp3b* (Dobrovolskaya et al. 2006; Musilová et al. 2013). Odrůdou s purpurovými zrny je Konini, která byla vyšlechtěna na Novém Zélandu a registrována v roce 1981 (Martínek & Vyhnánek 2014), v ČR je pak registrována od roku 2018 AF Jumiko (ÚKZUZ 2018).

Zbarvení zrna modrých linií je řízeno geny *Ba*. Na chromosomu 4B se nachází gen *Ba1* a gen *Ba2* na chromosomu 4A, které byly přeneseny z rostliny *Thinopyrum ponticum* (*Ba1*) a *Triticum boeoticum* (*Ba2*) (Lachman et al. 2017; Musilová et al. 2013). V ČR byla registrována v roce 2019 odrůda s modrými zrny AF Oxana (ÚKZUZ 2019).

### 3.2.1 Karotenoidy

Karotenoidy jsou skupinou látek rozpustných v tucích, které určují červeno-oranžovo-žluté zbarvení řady rostlinných a živočišných struktur. Tyto látky jsou syntetizovány rostlinami a jinými fotosyntetizujícími organismy, zatímco většina živočišných organismů je syntetizovat neumí, a proto jsou odkázáni na jejich příjem potravou. Tuto velkou skupinu lze rozdělit na dvě základní podskupiny, karoteny, které jsou tvořeny pouze uhlíkem a vodíkem, a xanthofyly, jejichž struktura je na bázi kyslíku, vodíku a uhlíku. (Mortensen 2006) Je známo více než 600 druhů karotenoidů, přičemž v pšeničném zrně se nachází zejména lutein a zeaxanthin (Gani et al. 2012; Lachman et al. 2017). Obecná struktura karotenoidů vychází ze čtyřiceti uhlíkaté kostry tvořené isoprenovými jednotkami. Jeden nebo oba konce těchto sloučenin mohou být cyklizované, dále může mít jejich struktura různé stupně hydrogenace nebo, v případě xanthofylů může obsahovat funkční skupiny obsahující kyslík. Charakteristickým znakem jejich stavby je velký počet konjugovaných dvojných vazeb tvořící centrální část molekuly, což jim dává jejich tvar, chemickou reaktivitu a schopnost absorbovat světlo (Gani et al. 2012). Karotenoidy, které mají více než 40 uhlíků, jsou označovány jako vyšší karotenoidy, a ty které mají naopak méně než 40 uhlíků, se nazývají jako apokarotenoidy. Apokarotenoidy se přirozeně nacházejí v některých druzích rostlin a živočichů a jsou to produkty degradace čtyřiceti uhlíkatých karotenoidů (Maoka 2020).

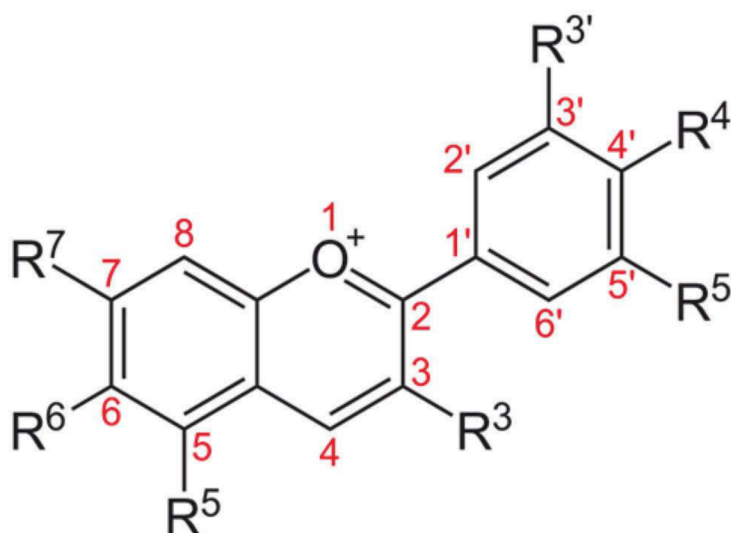
Biosyntéza karotenoidů v rostlinách začíná z isopentenylpyrofosfátu (IPP), který je syntetizován v plastidech, a také se v nich kumuluje. Kondenzací čtyř molekul IPP dochází k vzniku dvaceti uhlíkatého geranylgeranylpyrofosfátu (GGPP). Dvě molekuly GGPP se pomocí fytoensyntasy spojí ve čtyřiceti uhlíkatou sloučeninu, fytoen, který je následně přeměněn pomocí několika enzymů přes fytofluen,  $\zeta$ -karoten a neurosporen na lykopen (Tanaka et al. 2008). Syntéza karotenoidů s cyklickými koncovými skupinami, jako např.  $\alpha$ - a  $\beta$ -karoten, je řízena lykopencyklasou (Maoka 2020). Lutein a zeaxanthin jsou kyslíkatými deriváty  $\alpha$ -karotenu, respektive  $\beta$ -karotenu ze kterých jsou syntetizovány v několika krocích pomocí enzymů hydroxylas (Gupta et al. 2021).

Hlavním lidským zdrojem karotenoidů bývá ovoce a zelenina, může to ovšem být také z řas, z živočišných produktů, nebo z různých doplňků stravy obsahující tyto látky (Meléndez-Martínez 2019). Používají se jako potravinářská barviva, nebo jsou součástí kosmetických přípravků. Karotenoidy mají důležitou roli v lidské výživě a zdraví, protože některé z nich jsou prekurzory vitamínu A (provitaminy A) a také mají protirakovinné účinky. (Tanaka et al. 2008). Vitamin A je v organismu důležitý pro správnou funkci zraku, rozmnožování, udržování epitelálních povrchů, podporu imunitního systému a další (Tanumihardjo et al. 2016). Lutein a zeaxanthin se nacházejí v povrchu kůže, kde v esterifikované formě s mastnými kyselinami působí jako pohlcovače UV záření a vyskytují se i v sítnici, kde fungují jako makulární pigmenty, které filtrují modré světlo, tlumí škodlivé účinky chronického zánětu v makulární oblasti a chrání před věkem podmíněnou makulární degenerací (Loskutova et al. 2013; Maoka 2020).

### 3.2.2 Anthokyany

Jsou to rostlinné pigmenty, které se hojně vyskytují v ovoci a pletivech květin dodávající odstíny od růžové, oranžové až po červené v kyselém prostředí, a modré až fialové v zásaditém prostředí (Khoo et al. 2017; Cahyana & Adiyanti 2021).

Strukturně jsou anthokyany tvořeny dvěma částmi, anthokyanidiny jako aglykony (necukerná složka) (Obrázek 2), a navázanými cukernými zbytky na různých pozicích (Lachman et al. 2017), nejčastěji v pozici C-3 (Mortensen 2006). U pšeníc s barevným zrnem je typických šest anthokyanidinů, a to kyanidin, delfinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin a malvidin. (Delgado-Vargas et al. 2000; Lachman et al. 2017). Podle Delgada-Vargase et al. (2000) jsou anthokyany rozlišovány podle počtu molekul cukru v jejich struktuře (monosidy, biosidy, triosidy). Monosidy jsou anthokyany s navázanými monosacharidy, biosidy s disacharidy a triosidy s trisacharidy, a všechny tyto sacharidy jsou umístěny v poloze C-3 (Velíšek 2002). Strukturu anthokyanů lze měnit substitucí glykosidů (glukosa, galaktosa, rhamnosa, xylosa, arabinosa) na pozicích C-3 a C-5. Další variace anthokyanů jsou dány acylací cukerných skupin organickými kyselinami, mezi které patří např. octová, *p*-kumarová, kávová, malonová, sinapová, ferulová, šťavelová nebo jantarová kyselina (Lee et al. 2008).



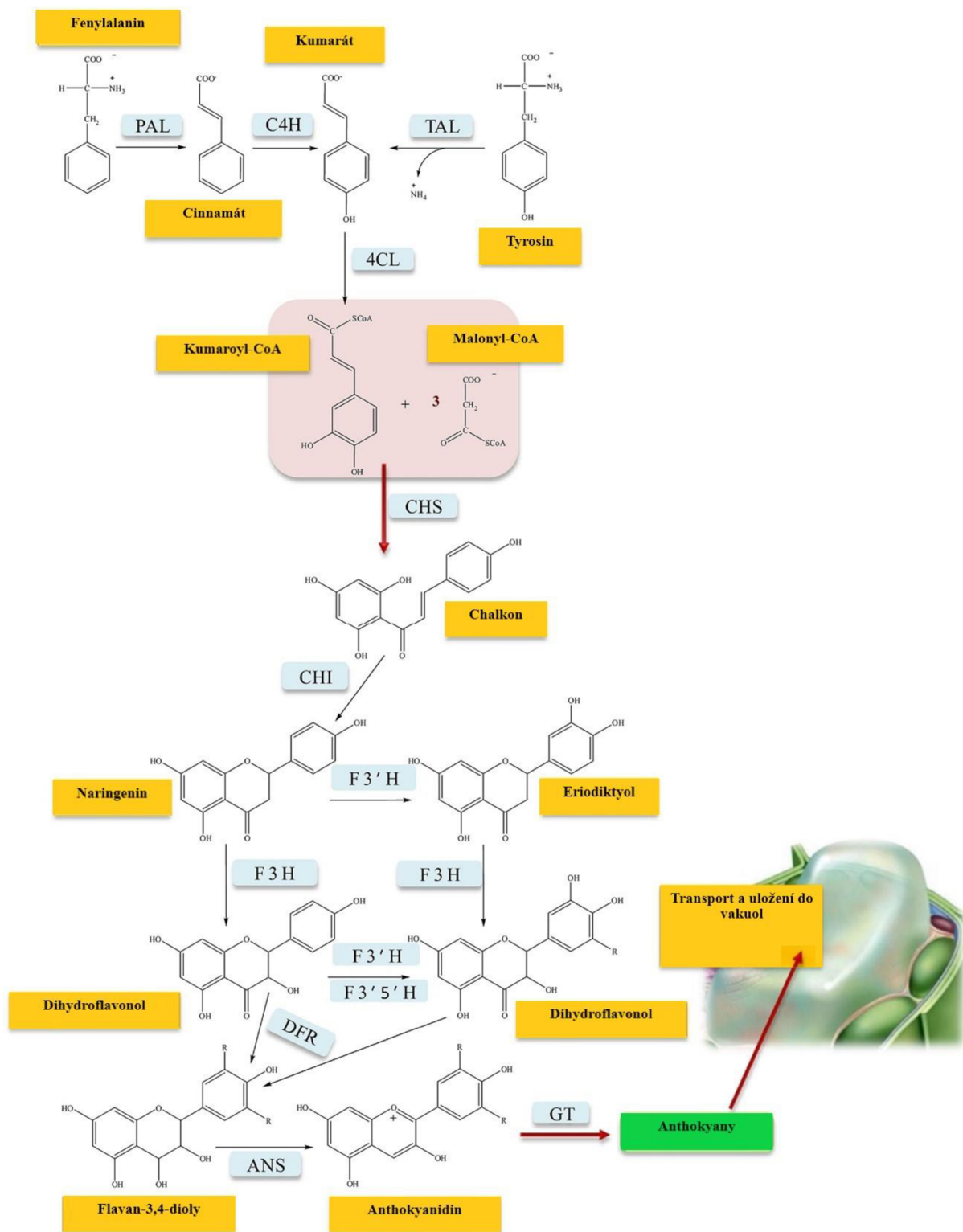
Obrázek 2. Základní struktura anthokyanidinů (Khoo et al. 2017)

Vliv na barvu anthokyanů má několik faktorů, především pH. Při nízkém pH (okolo pH 3) mají nejsilnější odstín (fialový až červený). Okolo pH 5 jsou téměř bezbarvé a při neutrálním nebo zásaditém pH jejich barva přechází od modré až do zelené. Dalším činitelem je počet hydroxylových a methoxylových skupin substituovaných na strukturu, kdy methoxylové skupiny způsobují červenější zabarvení a hydroxylové skupiny modřejší zbarvení (Mortensen 2006). Dalším faktorem, který může ovlivnit barvu jsou enzymy, mezi které patří glykosidasy, které způsobují hydrolýzu anthokyanů a tím jejich rozpad na příslušný cukr a aglykon, který je nestabilní a mění se na bezbarvé deriváty a také polyfenoloxidas, které katalyzují reakce enzymového hnědnutí. Vzdušný kyslík má vliv na barvu anthokyanů tím, že je dokáže oxidovat na bezbarvé nebo nahnědlé produkty buď přímo, nebo přes sloučeniny, které jsou k oxidaci náchylnější, např. kyselina askorbová,

kdy při její oxidaci vzniká peroxid vodíku, který destruuje anthokyany (Velíšek 2002). Výslednou barvu anthokyanů může ovlivnit také jev nazývaný kopigmentace, která pomáhá stabilizovat barvu listů, květů a plodů rostlin obsahujících anthokyany. Kopigment je sloučenina, která bývá obvykle bezbarvá, ale po připojení k anthokyanům s nimi reagují v roztoku za vzniku hyperchromického efektu a bathochromního posunu v absorpci spektra (UV-Vis oblast). Vliv kopigmentace se mění v závislosti na struktuře anthokyanů a podle pH prostředí. Její účinek se zvyšuje s počtem methoxylových skupin a počtem glykosidických vazeb. Pelargonidin, peonidin a malvidin by v důsledku kopigmentace vytvářely intenzivnější odstíny než ostatní aglykony a diglykosidická forma by zvyšovala intenzitu oproti monoglykosidu (Welch et al. 2008; Castañeda-Ovando et al. 2009; Khoo et al. 2017).

### 3.2.2.1 Biosyntéza

Biosyntéza anthokyanů (Obrázek 3) začíná přes fenylalanin, produkt šikimátové cesty, který je přeměněn působením tří enzymů na kumaroyl-koenzym A. Ten následně kondenzuje se třemi molekulami malonyl-koenzymu A za vzniku tetrahydroxychalkonu (THC) pomocí chalkonsyntasy. Chalkonisomerasa mění THC na flavanon naringenin, který je hydroxylován pomocí flavonoid-3'-hydroxylasy na eriodiktyol. Obě látky (naringenin a eriodiktyol) jsou dále hydroxylovány pomocí flavonoid-3-hydroxylas na dihydroflavonoly, které jsou prekursorem pro produkci flavan-3,4-diolů (leukoanthokyanidinů) po reakci katalyzované dihydroflavonol-4-reduktasou. Syntéza je zakončena pomocí anthokyanidinsyntasy, nazývané také jako leukoanthokyanidin dioxygenasa. Aby vznikl anthokyan, je zapotřebí glykosyltransferasy, která katalyzuje přenos a navázání cukerného zbytku na strukturu anthokyanidinu (Delgado-Vargas et al. 2000; Smeriglio et al. 2016).



Obrázek 3. Schéma biosyntézy anthokyanů. 4CL 4-kumaroylkoenzym A ligasa, ANS anthokyanidinsynthasa, C4H cinnamát-4-hydroxylasa, DFR dihydroflavonol-4-reduktasa, F3H flavanon-3-hydroxylasa, F3'H flavonoid-3'-hydroxylasa, F3'5'H flavonoid-3',5'-hydroxylasa, GT glykosyltransferasa, CHI chalkonisomerasa, CHS chalkonsynthasa, PAL fenylalaninamoniak lyasa, TAL tyrosinamoniak lyasa, THC tetrahydrochalkon (upraveno dle Smeriglio et al. 2016)

### 3.2.2.2 Zdroje v potravinách

Hlavním zdrojem anthokyanů v lidské výživě je ovoce, např. třešně, švestky jahody, lesní plody, červené hrozny a černý rybíz (Cahyana & Adiyanti 2021). Významný zdroj mohou představovat také netradiční genotypy pšenice s barevným zrnem, kde se anthokyaniny nacházejí v perikarpu a dávají mu fialový odstín, nebo v aleuronové vrstvě s modrým zabarvením (Lachman et al. 2017; Praveen et al. 2021)

Biologická dostupnost je u těchto sloučenin nízká a tím je ovlivněn i jejich účinek, např. kyanidin-3-glukosid má dostupnost 1,7 % a celkový soubor anthokyanů průměrně 3,3 % (Marczylo et al. 2009). Vstřebatelnost anthokyanů je ovlivněna jejich chemickou strukturou, velikostí požití dávky a matricí dané potraviny. Chemická stavba aglykonu má dopad na vstřebání v trávicích cestách, kdy přítomnost methoxylovaných skupin snižuje absorpci. Negativní dopad na vstřebatelnost má také výskyt kovových iontů (např. nehemové železo), které tvoří s anthokyaniny komplexní sloučeniny, které nejsou rozpustné. Absorbované anthokyaniny se hromadí v různých částech těla, jako např. v játrech, ledvinách, mozku, a v malém množství se mohou vyskytovat v krvi a moči. Velká část anthokyanů se neúčastní metabolických přeměn a v plazmě zůstávají nezměněné, zatímco pokud se dostanou do kontaktu se střevní mikroflórou, může dojít k deglykosylaci a zbylé anthokyanidiny jsou nestabilní v zásaditém prostředí a přeměňují se na fenolické kyseliny a aldehydy (Pojer et al. 2013; Norberto et al. 2013).

Biologická dostupnost anthokyanů je zásadním faktorem pro udržení dobrého zdraví a prevenci proti nemocem. Obecně mají nízkou biologickou dostupnost, která způsobuje nízké vstřebávání těchto sloučenin do krevního oběhu a vysokou míru vylučování močí a stolicí, čímž se snižuje účinnost proti odstraňování volných radikálů z organismu. Pokud mají vysokou biologickou dostupnost, jsou schopny snížit peroxidaci buněčných lipidů a tím zmenšit riziko vzniku onemocnění (Khoo et al. 2017).

### 3.2.2.3 Význam pro člověka

Anthokyaniny byly nejprve používány jako potravinářská barviva, ale poté se začalo pohlížet na jejich zdravotní přínosy, které jsou spojovány s jejich antioxidačními vlastnostmi. V důsledku antioxidačního působení jsou anthokyaniny považovány za látky, které účinně působí proti rozvoji chronických zánětů, kardiovaskulárních onemocnění, dále napomáhají v prevenci proti vzniku rakoviny nebo regulaci metabolického syndromu (Valls et al. 2009). Vzhledem k uvedeným příznivým účinkům na lidské zdraví jsou anthokyaniny používány také jako bioaktivní složky nutraceutik. V případě potravinářských výrobků jsou anthokyaniny využívány jako aditivum, označované kódem E163, které se přidává do purpurově zbarvených džemů, cukrářských výrobků a nápojů. Používání anthokyanů jako jedno z potravinářských barviv má za cíl omezovat syntetická barviva jako tatrazin (E102), Ponceau 4R (E124) a další kvůli jejich negativním účinkům na lidské zdraví (ovlivňují neurologické funkce a chování) (Khoo et al. 2017). Použití anthokyanů jako barvicích látek má několik limitujících aspektů, prvním je, že se nedají použít u potravin, které nemají kyselé pH, nebo u potravin obsahujících siřičitany, přičemž je ovlivněna jejich výsledná barva. Dalším důvodem je, že jsou náchylné k tepelné degradaci, takže nejsou vhodné pro potraviny, které se zpracovávají při vyšších teplotách.

Klasické potravinářské produkty, kam se přidávají anthokyany, jsou nealkoholické nápoje, kyselé mléčné výrobky, džemy, cukrovinky. Acylované anthokyany, které jsou obsaženy v některých druzích zeleniny, jako jsou barevné brambory, mrkev, ředkev nebo červené zelí, mají obvykle vyšší světelnou a tepelnou stabilitu, proto by mohly být vhodné právě pro barvení potravin (Santos-Buelga & González-Paramás 2018). Jedním z možných řešení nestability anthokyanů, která omezuje jejich využití v potravinářském a farmaceutickém průmyslu by mohlo být použití zapouzdřování, protože tento způsob by působil jako ochranný prvek proti nepříznivým podmínkám jako je světlo, vlhkost a kyslík. Díky zapouzdřování se bioaktivní látky lépe zpracovávají a vykazují lepší stabilitu. Přímě pro anthokyany by se mohlo využít mikrozapouzdřování, které je vhodné pro ochranu citlivějších potravinových součástí, díky kterému může daná látka dosáhnout cílového orgánu. Látkami používanými na tuto ochranu bývají maltodextrin, arabská guma, dextrin nebo inulin (Yousuf et al. 2016).

Přímý antioxidační účinek anthokyanů spočívá ve schopnosti darovat vodík díky fenolickému charakteru molekuly, který se může vázat s reaktivními formami kyslíku (ROS) jako je superoxid ( $O_2^-$ ), singletový kyslík ( $O_2^\bullet$ ), peroxid ( $ROO^-$ ), peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) a hydroxidové radikály (OH). Zvýšená hladina ROS může způsobovat změny struktur a funkcí řady biomolekul, což může vést k poškození buňky a tkání, a to může vést k rozvoji a progresi kardiovaskulárních chorob, nádorových onemocnění, nebo jiných nemocí. Anthokyany mohou podporovat antioxidační obranný systém organismu také nepřímou cestou přes několik mechanismů. První způsob je obnovování nebo zvýšení aktivity antioxidačních enzymů jako superoxid-dismutasa a glutathionperoxidasa, což posléze zvyšuje obsah glutathionu, který funguje jako antioxidant, je kofaktorem pro antioxidační enzymy, je velmi důležitý pro funkci mitochondrií nebo dokáže transportovat rtuť z buněk a mozku. Druhý způsob spočívá ve snížení tvorby oxidačních adduktů v DNA, kdy dochází buď k inhibici NADPH oxidasy anebo ke změnám procesu mitochondriální respirace, a tím se sníží tvorba kyslíkových radikálů (Pojer et al. 2013; Pizzorno 2014). Antioxidační potenciál anthokyanů je dvakrát vyšší, než u jiných antioxidantů jako jsou katechiny, vitamin E nebo syntetické antioxidanty BHA (butylhydroxyanisol) a BHT (butylhydroxytoluen) (Martín et al. 2017).

K rozvoji kardiovaskulárních onemocnění dochází v důsledku agregace neboli shlukování krevních destiček, hypertenze, vysoké hladiny LDL (low-density lipoprotein) cholesterolu a dysfunkce cévního endotelu. Konzumace červeného vína může mít za účinek zvýšení ochrany kardiovaskulárního systému díky obsaženým anthokyanům a jejich metabolitům. Ochranný účinek anthokyanů spočívá zejména ve zvýšení sérové antioxidační kapacity, protizánětlivé a protisrážlivé aktivity nebo zlepšení postupu aterosklerózy (Pojer et al. 2013).

U anthokyanů byl zpozorován pozitivní účinek proti nádorovým onemocněním. Klíčový děj pro vývoj nádorových onemocnění je angiogeneze, při které dochází k přechodu nádorů z benigního do maligního stavu. V prevenci rakovinných onemocnění hraje roli tzv. antiangiogeneze, což je proces zabraňující tvorbě nových cév, které zásobují nádorové buňky kyslíkem a živinami. Výsledky studií, které se zabývaly potenciálními účinky anthokyanů v prevenci nádorových onemocnění potvrdily chemoprotektivní potenciál těchto látek, spočívající v antiangiogenezi a inhibici buněčné proliferace (Wang et al. 2009; Khoo et al. 2017)

Fenolické sloučeniny včetně anthokyanů mají obecně antimikrobiální účinky vůči širokému spektru mikroorganismů, hlavně v inhibici patogenů přítomných v potravinách. Anthokyany působí indukované poškození buněk destrukcí buněčné stěny a mezibuněčného matrixu. Extrakty z plodů bohatých na anthokyany, jako jsou borůvky, maliny, černý rybíz a jahody vykazují schopnost inhibice gramnegativních bakterií pravděpodobně tím, že vnější membrána těchto bakterií působí jako preventivní bariéra proti hydrofobním sloučeninám, nikoliv proti hydrofilním. Antimikrobiální aktivita extraktů obsahující anthokyany může být způsobena přítomností a účinky dalších sloučenin, jako jsou slabé organické kyseliny nebo fenolické kyseliny (Khoo et al. 2017).

Je předpokládáno, že konzumace anthokyanů může mít pozitivní vliv na schopnost vidění. Anthokyany obsažené v bobulovinách prospívají zraku zvýšenou tvorbou sítnicových pigmentů, zvýšením cirkulace krve v kapilárách sítnice, dále snižují riziko vzniku makulární degenerace, glaukomu (zelený zákal) a kataraktu (šedý zákal) (Pojer et al. 2013).

### **3.3 Metody extrakce a analýzy anthokyanů**

Pro extrakci a vlastní stanovení anthokyanů obsažených v rostlinném materiálu lze využít řadu metod (Valls et al. 2009). Mezi nejčastěji používané metody analýzy anthokyanů patří UV-vis spektroskopie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, nukleární magnetická rezonanční spektroskopie nebo kapilární elektroforéza (Lee et al. 2008; Welch et al. 2008).

#### **3.3.1 Extrakce**

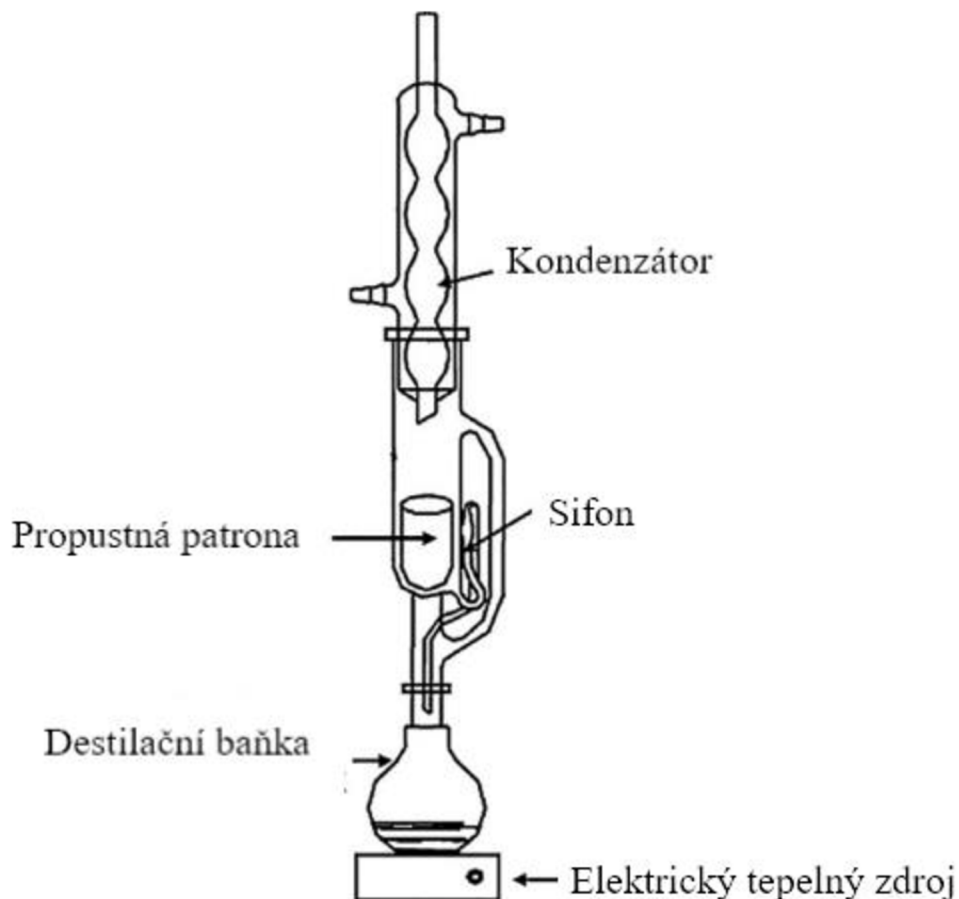
Extrakce rozpouštědlem představuje nejběžnější metodu pro extrakci různých sloučenin obsažených v plodech (ovoce, zelenina), ale i jiných přírodních nebo syntetických materiálech. Před vlastní extrakcí bývá matrice podrobena úpravám zahrnující sušení či lyofilizaci, mletí nebo namáčení (Castañeda-Ovando et al. 2009).

Pokud jde o extrakci rozpouštědly, klasické extrakce typu pevná látka-kapalina a kapalina-kapalina mají stále zásadní roli při získávání cílových analytů z matric, protože tyto metody jsou levné a jednoduše proveditelné. Mezi nejběžnější klasické metody extrakce patří Soxhletova extrakce a extrakce na pevnou fázi (SPE). Přesto se objevila řada moderních technik, které jsou méně náročné na čas a spotřebu rozpouštědel a zároveň je s jejich použitím dosaženo vysoké extrakční účinnosti. Mezi moderní metody jsou řazeny extrakce pomocí ultrazvuku (UAE), mikrovlnná extrakce (MAE), tlaková extrakce (PLE) a extrakce superkritickou kapalinou (SFE) (Lozano-Sánchez et al. 2018).

Soxhletovu extrakci vytvořil v roce 1879 Franz Ritter von Soxhlet. Tato technika je používána pro extrakci analytů z pevných vzorků. Aparatura se skládá z destilační baňky, expanzního adaptéru, kondenzátoru, přívodu a výstupu chladicí vody, zdroje tepla a náprstku (Obrázek 4). Vzorek ve formě prášku se umístí do náprstkového držáku ze silného filtračního papíru nebo celulosy, který se postupně plní kondenzovaným čerstvým extrahovadlem z destilační baňky. Jakmile kapalina dosáhne přepadové hladiny, sifon nasaje rozpuštěnou látku z držáku a vypustí ji do destilační baňky, čímž se extrahované analyty dostanou do objemové



kapaliny. Tato operace se opakuje, dokud není extrakce dokončena. Sestava funguje jako dávkový systém, protože extrahovadlo působí postupně (Luque de Castro & Priego-Capote 2010; Zygler et al. 2012; Gopalasatheeskumar 2019; López-Bascón & Luque de Castro 2020).



**Obrázek 4. Schéma konvenční Soxhletovy aparatury (upraveno dle López-Bascón & Luque de Castro 2020)**

Tato extrakce má několik výhod, zejména že vzorek je opakovaně přiváděn do kontaktu s čerstvými dávkami extrakčního činidla, teplota systému zůstává vysoká, protože teplo přiváděné do destilační baňky dosahuje extrakční teploty, po vyluhování není nutná filtrace a průchodnost vzorku lze zvýšit souběžnou paralelní extrakcí, protože základní vybavení je levné. Nevýhodou je dlouhá doba potřebná k extrakci a velké množství odpadu z extrakčního činidla, extrakce probíhá při teplotě varu, což ovlivňuje množství termolabilních sloučenin, kvůli velkému množství použitého rozpouštědla je po extrakci povinný krok odpaření a technika je omezena na selektivitu rozpouštědla a není jednoduše automatizovatelná (López-Bascón & Luque de Castro 2020).

Extrakce na pevnou fázi (SPE) je široce používaná technika přípravy vzorku pro izolaci vybraných analytů, obvykle z mobilní fáze. Tato extrakce je používaná pro čištění, extrakci nebo koncentraci pigmentů. Základní postup spočívá v nanesení roztoku na pevnou fázi, kdy jsou analyty přeneseny na pevnou fázi, kde jsou zadrženy po dobu trvání procesu vzorkování. Pevná fáze se pak od vzorku izoluje a analyty se získají zpět elucí pomocí kapaliny

nebo tekutiny, nebo tepelnou desorpcí do plynné fáze. Hlavními cíli SPE jsou stopové obohacení (koncentrace), zjednodušení matrice (vyčištění vzorku) a výměna média (převod z matrice vzorku do jiného rozpouštědla nebo do plynné fáze). Původní záměr použití SPE byl jako doplněk nebo náhrada extrakce kapalina-kapalina. Nyní je SPE běžnou technikou odběru vzorků v mnoha oblastech chemie včetně životního prostředí (Poole 2003; Andrade-Eiroa et al. 2016).

UAE je metoda extrakce typu pevná látka-kapalina založená na mechanickém rozkladu matricových struktur v důsledku ultrazvukového tlaku způsobující kavitační jevy, které rozbíjejí buněčnou stěnu pevných částic, což vede k rozptylu chemických složek uvnitř do rozpouštědla (Ongkowijoyo et al. 2018; Zahari et al. 2020). Při MAE dochází k zahřívání rozpouštědel v důsledku absorpce mikrovlnného záření za účelem rozdělení sloučenin, které jsou v zájmu analýzy extrahovány z matrice vzorku do rozpouštědla. Principem PLE je extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku a teploty, což vede ke zvýšení účinnosti extrakčního procesu. Při PLE jsou za účelem zlepšení získávání analytů z pevných materiálů používána běžná okyselená rozpouštědla (acetonitril, ethanol, methanol; okyselovače: mravenčí, fosforečná, citronová kyselina) při teplotě (30–200 °C) a tlaku (1500 psi). SFE je metoda, při které se používají rozpouštědla při jejich kritické teplotě a tlaku vykazující fyzikálně-chemické vlastnosti na pomezí kapaliny a plynu (Lozano-Sánchez et al. 2018). Jako vhodné rozpouštědlo pro selektivní extrakci rozpustných sloučenin z rostlinného materiálu je považován superkritický oxid uhličitý. Výhodou je, že je netoxický, nevybušný a snadno dostupný. Použití CO<sub>2</sub> má nevýhodu vůči látkám jako jsou anthokyany, protože je to nepolární rozpouštědlo, které má afinitu k jiným nepolárním rozpouštědlům, ale za použití polárních rozpouštědel se zlepšuje afinita superkritického oxidu uhličitého směrem k polárním látkám, např. anthokyanům (Ongkowijoyo et al. 2018).

Anthokyany jsou polární molekuly, proto se při extrakcích velmi často používají vodné směsi methanolu, acetonu a ethanolu. Během přípravy vzorku může dojít k extrakci i jiných látek, např. cukrů, bílkovin, organických kyselin, které se následně musí vyčistit ze vzorku, např. extrakcí v pevné fázi. Nejčastěji se používají metody, při nichž se jako extrakční činidlo využívá acidifikovaný methanol nebo ethanol, jenž obsahuje malé množství kyseliny chlorovodíkové nebo mravenčí kyseliny, kde díky sníženému pH roztoku kyselinou se zabrání degradaci neacylovaných anthokyanových pigmentů, nicméně malá množství kyseliny mohou způsobit částečnou nebo úplnou hydrolýzu acylových částí acylovaných anthokyanů, které jsou přítomné v některých rostlinách (Da Costa et al. 2000). Z těchto uvedených metod je methanolová extrakce o 20 % efektivnější než pomocí ethanolu a o 73 % efektivnější než pouze vodou, přesto se v rámci potravinářského průmyslu preferuje ethanol z důvodu toxicity methanolu (Castañeda-Ovando et al. 2009). Aceton je pro extrakci anthokyanů v porovnání s okyseleným methanolem účinnějším rozpouštědlem, protože zajišťuje reprodukovatelnější extrakci vzorku (Da Costa et al. 2000).

### 3.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC je separační technika, při níž jsou zkoumané složky rozdělovány mezi dvě fáze, z nichž jedna je stacionární (pevná), a druhá je mobilní (kapalná), která se pohybuje v určitém

směru. Složky vzorku jsou pomocí mobilní fáze transportovány přes stacionární fázi. Analyty mají obvykle rozdílné interakce s mobilní a stacionární fází. Pokud některá část rozpuštěných látek má silnou interakci se stacionární fází, pak mají tyto látky tendenci se pohybovat pomaleji než ty, které mají slabší nebo žádné interakce. Vzájemné působení těchto dvou fází určuje dobu, po kterou analyty procházejí kolonou. V důsledku toho se sloučeniny eluují z kolony a dostávají se do detektoru v různých časech, které detektor sleduje během měřicího cyklu. Výsledky jsou po zpracování dat zobrazovány v chromatogramech (Lozano-Sánchez et al. 2018).

Moderní HPLC se skládá ze systému dodávání rozpouštědel, vstřikovače vzorku, kolony, detekčního systému a počítačové datové stanice. Součástí systému dodávání rozpouštědel jsou zásobníky rozpouštědel, vysokotlaká čerpadla, zpětné ventily, regulátory průtoku, snímače tlaku, tlumiče pulzů a směšovací komory. Rozpouštědla mohou obsahovat nežádoucí částice (prach, rozpuštěné plyny), které by mohly narušit průběh analýzy, proto tento systém obsahuje úpravnu rozpouštědel, kde se odstraňují tyto špatné částice pomocí filtrace a odplyňovačů, aby bylo dosaženo lepší výkonnosti a delší životnosti všech částí (Lozano-Sánchez et al. 2018).

Pro HPLC stanovení fenolických látek jsou voleny separační systémy na tzv. reverzních fázích, ve kterých se využívají stacionární fáze o nižší polaritě ve srovnání s fází mobilní. Mobilní fáze je složena ze směsi rozpouštědel, která obsahuje určitý podíl vody a organické složky (např. methanol nebo acetonitril). Rozpouštědla používaná jako mobilní fáze jsou obvykle okyselována přidáním mravenčí nebo octové kyseliny (Valls et al. 2009).

Pro analýzu anthokyanů pomocí HPLC neexistuje jeden standardní postup, místo toho se používá široký výběr kolon a parametrů, které se mohou měnit, i když se může jednat o stejný rostlinný zdroj, a tím je možné získat velkou škálu separačních postupů (Welch et al. 2008).

Identifikace anthokyanů ve vzorku je zajišťována pomocí různých detektorů. Ideální detektor by měl splňovat všechny požadované charakteristiky: mít vysokou citlivost, reagovat na všechny požadované látky, nebýt destruktivní pro danou látku, mít rychlou odezvu a další. Tím, že každý jeden detektor není schopen identifikovat veškeré sloučeniny, existuje velké množství těchto detekčních zařízení. Klasickým detektorem používaným u HPLC je UV-Vis detektor, který se používá na sloučeniny absorbující světlo v UV nebo viditelném spektru (od 190 do 600 nm). Existují tři druhy tohoto typu, a to detektory s pevnou vlnovou délkou, které se v současné době využívají jen zřídka, detektory s proměnlivou vlnovou délkou a s fotodiodovým polem. Detektory s proměnlivou vlnovou délkou lze nastavit, aby pracovaly při absorpčním maximu analytu, nebo aby měnily vlnové délky během chromatografického cyklu a kompenzovaly odezvu jiných analytů. Světlo v těchto detektorech je ze širokospektrální lampy (pro UV je to deuteriová, pro viditelné záření wolframová) vedeno štěrbinou do difrakční mřížky, která paprsek rozkládá na jednotlivé vlnové délky. Tato mřížka se otáčí a směřuje jednu vlnovou délku přes detekční buňku na fotodiodu. Detektory s fotodiodovým polem (DAD) jsou podobné, jako ty s proměnlivou vlnovou délkou, ale oproti nim dochází k tomu, že světlo před dopadem prochází průtokovou kvyetou, což umožňuje rozložit spektrum světla na pole fotodiod (Swartz 2010). Použití DAD má výhodu oproti detektoru s proměnlivou vlnovou délkou a to, že u DAD je vzorek vystaven světlu všech vlnových délek najednou, zatímco u druhého se musí přeprogramovat pokaždé vlnová délka (Sunil et al. 2018). Stanovení obsahu anthokyanů spektrofotometrickými metodami je založeno na skutečnosti, že anthokyany absorbují energii,

když jsou vystaveny světlu. Vzorek obvykle obsahuje směs anthokyanů s neznámou molární absorpční schopností, a tedy by měla být použita molární absorptivita převládajícího anthokyanu. Jejich absorpční maximum je při vlnové délce 510-550 nm, což je daleko od rozsahu absorpce ostatních fenolických sloučenin, a to umožňuje jejich identifikaci pomocí měření jejich absorbance při jediné vlnové délce (Mazza et al. 2004). Spektrum může poskytnout užitečné informace o strukturním složení anthokyanů, ale pro potvrzení struktury je potřeba použít další doplňkové spektroskopické techniky. Přestože se častěji využívá hmotnostní spektrometr pro objasnění jejich struktury, údaje z UV-vis jsou stále užitečné pro charakterizaci nenasycených a funkčních skupin v různých komponentech struktury anthokyanů (Saha et al. 2020).

HPLC na reverzních fázích spojená s DAD detekcí je nejpoužívanějším nástrojem pro analýzu anthokyanů, neboť mají jedinečné absorpční maximum při vlnové délce 510–550 nm, což je odlišuje od ostatních látek flavonoidního charakteru (Welch et al. 2008). Jednotlivé anthokyanu lze oddělit podle jejich polaritu, která způsobuje že eluují v různých časech (Lee et al. 2008). HPLC se rovněž používá k identifikaci různých přírodních sloučenin v rostlinných matricích pomocí spojení dvou technik jako je HPLC s hmotnostně spektrometrickou detekcí (LC-MS) nebo s detekcí nukleární magnetickou rezonancí (LC-NMR) (Welch et al. 2008).

### 3.3.3 Hmotnostní spektrometrie (MS)

MS je analytická metoda, která odděluje ionizované částice, jako jsou atomy, molekuly a klastry, pomocí rozdílů v poměru jejich nábojů a příslušných hmotností ( $m/z$ ) a může být použita k určení molekulové hmotnosti částic. Přístroje pro MS se skládají z několika částí: iontový zdroj, který rozděljuje molekuly vzorku na ionty; hmotnostní analyzátor, který třídí ionty podle jejich hmotnosti pomocí elektromagnetického pole; detektor, který měří hodnotu indikátorové veličiny a poskytuje údaje pro výpočet množství každého přítomného iontu; a počítač, který reguluje hmotnostní analyzátor a spravuje údaje získané z detektoru (Murayama et al. 2009).

V iontovém zdroji jsou molekuly vzorku ionizovány jednou z možných dostupných technik. Pokud ionizace probíhá ve vakuu, tak se často používá elektronová a chemická ionizace; pokud probíhá při normálních atmosférických podmínkách, volbou bývá elektrosprejová nebo chemická ionizace za atmosférického tlaku. Fragmentované ionty vzniklé ionizací jsou urychleny a soustředěny do hmotnostního analyzátoru, kde jsou separovány podle poměru hmotnost/náboj ( $m/z$ ). Jako u iontových zdrojů existuje řada různých hmotnostních analyzátorů, které se liší ve způsobu, jakým jsou ionty separovány a jak jsou přenášeny. Propustnost analyzátoru je vyjádřena jako poměr prošlých iontů k detektoru ku počtu iontů, které projdou analyzátozem (Smith 2013).

### 3.3.4 Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie

Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie (NMR) je metoda, při které se aplikuje magnetické pole na jádro atomu a radiofrekvenční pulzy k charakterizaci rezonanční frekvence tohoto jádra v závislosti na jeho chemickém nebo enviromentálním okolí. Protože každé jádro

je ve vzorku rozrušeno ze svého původního rovnovážného stavu, bude toto jádro vykazovat charakteristický rozpadový signál zpět do rovnováhy a tento signál je jako zakódovaná mapa chemické struktury molekul a polymerů. Elektrony atomu obíhají ve směru aplikovaného magnetického pole, a to způsobuje vznik malého opačného magnetického pole v jádře. Elektronová hustota kolem jádra se v molekule liší podle typů jádra a vazeb, které obsahuje, takže se statické a protilehlé magnetické pole liší. Tento jev se nazývá “chemický posun“ [ppm nebo Hz] a je to stěžejní informace používaná k charakterizaci struktury molekuly nebo polymeru (Stark et al. 2016).

NMR představuje nedestruktivní, selektivní metodu simultánní detekce velkého počtu složek s nízkou molekulovou hmotností ve složitých směsích. Kapalinová chromatografie (LC) a kapilární elektroforéza jsou sice citlivější metody než NMR s vysokým rozlišením, avšak vyžadují více času na přípravu vzorku před měřením (Košíř & Kidrič 2002).

### **3.3.5 Kapilární elektroforéza**

Kapilární elektroforéza funguje na principu oddělování sloučenin na základě rozdílů v jejich elektroforetické pohyblivosti a vyznačuje se vynikající hmotnostní citlivostí, vysokým rozlišením, nízkou spotřebou vzorku a minimálním odpadem rozpouštědel. Přístroj pro analýzu se skládá ze dvou zásobníků a kapilární trubice z taveného oxidu křemičitého, která obsahuje nosný elektrolyt a zdroj vysokého napětí. Vzorek je zaveden do kapilární trubice na anodu a prostřednictvím elektrolytu jsou některé složky vzorku posunuty směrem ke katodě, zatímco jiné jsou zadrženy na anodě (Welch et al. 2008).

Jednou z běžných metod stanovení anthokyanů je kapilární zónová elektroforéza (CZE), kde závisí migrace určité sloučeniny na poměru jejího náboje k její velikosti. To znamená, že celková doba migrace kladně nabitých menších molekul je delší než u molekul s menším nábojem nebo větší velikostí. K separaci sloučenin se používá základní médium složené z pufru tetraboritanu sodného o  $\text{pH} = 8,4$  a 15% methanol. Rozdělování probíhá v režimu kladné polarizace a kladného elektroosmotického toku s putováním sloučenin od anody ke katodě. Jejich detekce se provádí pomocí UV-Vis detektoru při vlnové délce 599 nm. Použití CZE s bazickým médiem je omezeno nestabilitou anthokyanů v zásaditém prostředí, proto je pro separaci anthokyanů z rostlinných extraktů používáno kyselé médium a systém se přenastaví tak, aby částice putovaly od katody k anodě. Kyselé médium zajistí stabilitu anthokyanů v protonované formě (Welch et al. 2008).

## 4 Závěr

Obiloviny jsou z hlediska naplnění výživových potřeb světové populace jednou z nejdůležitějších složek lidské výživy, a to především kvůli vysokému obsahu sacharidů. Nejpěstovanější obilninou v České republice je pšenice setá, která se používá k výrobě mouk bohatých na lepkové bílkoviny, které jsou vhodné pro zpracování a výrobu různých pekařských výrobků. Kromě základních živin obsahují pšeničná zrna i zdravotně prospěšné látky jako jsou vitaminy a minerální látky. V potravinářském a krmivářském průmyslu jsou nejčastěji využívány standardní odrůdy pšenice s bílým nebo červeným zrnem, ale kromě nich existují také odrůdy netradiční, jako jsou pšenice žluté, modré nebo purpurové. Zbarvení zrna těchto netradičních genotypů je dáno zvýšeným obsahem rostlinných pigmentů z řady karotenoidů v případě žlutých pšenic a anthokyanů v případě pšenic modrých a purpurových.

Anthokyaniny jsou rostlinné pigmenty patřící do skupiny flavonoidů, které zodpovídají za zbarvení různých rostlinných struktur v odstínech od červené, až po purpurové a modré. U obilovin jsou ukládány do různých částí zrna a tvoří atypické zbarvení. Konzumace anthokyanů má potenciál poskytnout příznivé zdravotní účinky, které souvisí zejména s jejich antioxidačními vlastnostmi. Anthokyaniny mohou napomáhat prevenci patogeneze řady lidských onemocnění, včetně nádorových. Dále mají určitou antimikrobiální schopnost, kdy dokáží indukovat rozpad buněčné membrány u gramnegativních bakterií. Kvůli nestabilitě anthokyanů je nutné kontrolovat pH a teplotu při zpracování potravin s těmito látkami. Anthokyaniny jsou potenciální skupinou látek pro větší použití ve výživě člověka, ale do budoucna by bylo potřeba vyřešit jejich stabilitu a rozšířit tak možnosti jejich použití v potravinách.

Vzhledem k vysoké spotřebě pšenice a cereálních výrobků by netradiční genotypy pšenice s purpurovým a modrým zbarvením zrna mohly představovat významný zdroj anthokyanů v lidské výživě, jejichž konzumace by mohla výrazně podpořit zdraví světové populace.

## 5 Literatura

- Abdel-Aal ESM, Young JC, Rabalski I. 2006. Anthocyanin Composition in Black, Blue, Pink, Purple and Red Cereal Grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:2696-4704.
- Andrade-Eiroa A, Canle M, Leroy-Cancellieri V, Cerdà V. 2016. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **80**:641-654.
- Bechtel DB, Abecassis J, Shewry PR, Evers AD. 2009. Development, Structure and Mechanical Properties of the Wheat Grain. Pages 51-95 in Khan K, Shewry PR, editors. *Wheat: Chemistry and Technology*. Woodhead Publishing and AACC International Press. St. Paul.
- Belderok B, Mesdag J, Donner DA. 2000. Bread-making quality of wheat. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. 2009. Cereals and cereal products In: *Food Chemistry*. Springer US.
- Brier ND, Gomand SV, Donner E, Paterson D, Delcour JA, Lombi E, Smolders E. 2015. Distribution of Minerals in Wheat Grains (*Triticum aestivum* L.) and in Roller Milling Fractions Affected by Pearling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**:1276-1285.
- Cahyana Y, Adiyanti T. 2021. Flavonoids as Antidiabetic Agents. *Indonesian Journal of Chemistry* **21**:512-526.
- Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* **113**:859-871.
- ČSÚ. 2022. Veřejná databáze ČSÚ – Vývoj ploch, hektarových výnosů a sklizní zemědělských plodin. ČSÚ. Praha. Available from [https://vdb.czso.cz/vdbvo2/faces/cs/index.jsf?page=vystup-objekt&z=T&f=TABULKA&skupId=386&katalog=30840&pvo=ZEM02G&pvo=ZEM02G&evo=v1442 !\\_ZEM02G-sklizen\\_1](https://vdb.czso.cz/vdbvo2/faces/cs/index.jsf?page=vystup-objekt&z=T&f=TABULKA&skupId=386&katalog=30840&pvo=ZEM02G&pvo=ZEM02G&evo=v1442 !_ZEM02G-sklizen_1) (accessed April 2023).
- Da Costa CT, Horton D, Margolis SA. 2000. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, lipid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **881**:403-410.
- Delgado-Vargas F, Jiménez AR, Paredes-López O. 2000. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins and Betalains – Characteristics, Biosynthesis, Processing and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **40**:173-289.
- Diviš J, Jůza J, Moudrý J, Vondrys J, Bárta J, Štěrbá Z. 2010. Pěstování rostlin. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.

- Dobrovolskaya O, Arbuzova VS, Lohwasser U, Röder MS, Börner A. 2006. Microsatellite mapping of complementary genes for purple grain colour in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* **150**:355-364.
- Domínguez R, Pateiro M, Purriños L, Munekata PES, Echegaray N, Lorenzo JM. 2022. Introduction and classification of lipids. Pages 1-16 in Lorenzo JM, Munekata PES, Pateiro M, Barba FJ, Domínguez R, editors. *Food Lipids*, Academic Press.
- Ficco DBM, De Simone V, Colecchia SA, Pecorella I, Platani C, Nigro F, Finocchiaro F, Papa R, De Vita P. 2014. Genetic Variability in Anthocyanin Composition and Nutritional Properties of Blue, Purple and Red Bread (*Triticum aestivum* L.) and Durum (*Triticum turgidum* L. ssp. *Turgidum* convar. *durum*) Wheats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**:8686-8695.
- Francavilla A, Joye IJ. 2020. Anthocyanins in Whole Grain Cereals and Their Potential Effect on Health. *Nutrients* **12** (2922) DOI: 10.3390/nu12102922.
- Gamna F, Spriano S. 2021. Vitamin E: A Review of Its Application and Methods of Detection When Combined with Implant Biomaterials. *Materials* **14** (3691) DOI: 10.3390/ma14133691.
- Gani A, Wani SM, Masodi FA, Hameed G. 2012. Whole-Grain Cereal Bioactive Compounds and Their Health Benefits: A Review. *Food Processing & Technology* **3**:146-156.
- Gilissen LJWJ, Van der Meer IM, Smulders MJM. 2014. Reducing the incidence of allergy and intolerance to cereals. *Journal of Cereal Science* **59**:337-353.
- Gopalsatheeskumar K. 2019. Significant role of Soxhlet extraction process in phytochemical research. *Mintage Journal of Pharmaceutical & Medical Sciences* **7**:43-47.
- Gupta AK, Seth K, Maheshwari K, Baroliya PK, Meena M, Kumar A, Vinayak V, Harish. 2021. Biosynthesis and extraction of high-value carotenoid from algae. *Frontiers in Bioscience-Landmark* **26**:171-190.
- Hřivna L. 2014. Technologie sacharidů. Mendelova Univerzita. Brno.
- Karayigit B, Colak N, Ozogul F, Gundogdu A, Inceer H, Bilgiçli N, Ayaz FA. 2020. The biogenic amine and mineral contents of different milling fractions of bread and durum wheat (*Triticum* L.) cultivars. *Food Bioscience* **37** (100676) DOI: 10.1016/j.fbio.2020.100676.
- Khan MT, Orhan I, Senol FS, Kartal M, Sener B, Dvorská M, Smejkal K, Slapetová T. 2009. Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chemico-Biological Interactions* **181**:383-389
- Khoo HE, Azlan A, Tang ST, Lim SM. 2017. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research* **61** (1361779) DOI: 10.1080/16546628.2017.1361779.
- Koehler P, Wieser H. 2013. Chemistry of Cereal Grains. In Gobbetti M, Gänzle M, editors. *Handbook on sourdough biotechnology*. Springer. New York.



- Košir IJ, Kidrič J. 2002. Use of modern nuclear magnetic resonance spectroscopy in wine analysis: determination of minor compounds. *Analytica Chimica Acta* **458**:77-84.
- Kulkarni Vishaka S, Butte Kishor D, Rathod Sudha S. 2012. Natural polymers-A comprehensive review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* **3**:1597-1613.
- Lachman J, Hejtmánková K, Kotíková Z. 2013. Tocols and carotenoids of einkorn, emmer and spring wheat varieties: Selection for breeding and production. *Journal of Cereal Science* **57**:207-214.
- Lachman J, Martinek P, Kotíková Z, Orsák M, Šulc M. 2017. Genetics and chemistry of pigments in wheat grain – A review. *Journal of Cereal Science* **74**:145-157.
- Langton M, Gutiérrez JLV. 2021. The Structure of Cereal Grains and Their Products. Pages 1-20 in Landberg R, Scheers N, editors. *Whole Grains and Health*. Wiley.
- Lee J, Rennaker C, Wrolstad RE. 2008, Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry* **110**:782-786.
- López-Bascón MA, Luque de Castro MD. 2020. Soxhlet Extraction. Pages 327-354 in Poole CF, editor. *Liquid-Phase Extraction*. Elsevier.
- Loskutova E, Nolan J, Howard A, Beatty S. 2013. Macular Pigments and Its Contribution to Vision. *Nutrients* **5**:1962-1969.
- Lozano-Sánchez J, Borrás-Linares I, Sass-Kiss A, Segura-Carretero A. 2018. Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). Pages 459-526 in Sun DW, editor. *Modern Techniques for Food Authentication* Academic Press.
- Luque de Castro MD, Priego-Capote F. 2010. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A* **1217**:2383-2389
- Maoka T. 2020. Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines* **74**:1-16.
- Marczylo TH, Cooke D, Brown K, Steward WP, Gescher AJ. 2009. Pharmacokinetics and metabolism of the putative cancer chemopreventive agent cyanidin-3-glucoside in mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **64**:1261-1268.
- Martín J, Kuskoski EM, Navas MJ, Asuero AG. 2017. Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Pages 205-255 in Justino GC, editor. *Flavonoids – From Biosynthesis to Human Health*. InTech
- Martínek P, Vyhnánek T. 2014. Barevné zrno pšenice jako zdroj antioxidantů. *Úroda* **7**:68-70.
- Mazza G, Cacace JE, Kay CD. 2004. Methods of Analysis for Anthocyanins in Plants and Biological Fluids. *Journal of AOAC International* **87**:129-145.
- Meléndez-Martínez AJ. 2019. An Overview of Carotenoids, Apocarotenoids, and Vitamin A in Agro-Food, Nutrition, Health, and Disease. *Molecular Nutrition Food Research* **63** (1801045) DOI: 10.1002/mnfr.201801045.

- Mortensen A. 2006. Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure and Applied Chemistry* **78**:1477-1491.
- Moshawih S, et al. 2022. General Health Benefits and Pharmacological Activities of *Triticum aestivum* L. *Molecules* **27** (1948) DOI: 10.3390/molecules27061948.
- Murayama C, Kimura Y, Setou M. 2009. Imaging mass spectrometry: principle and application. *Biophysical reviews* **1**:131-139.
- Musilová M, Trojan V, Vyhnánek T, Havel L. 2013. Genetic variability for coloured caryopses in common wheat varieties determined by microsatellite markers. *Czech J. Genet. Plant Breed* **49**:116-122.
- Norberto S, Silva S, Meireles M, Faria A, Pintado M Calhau C. 2013. Blueberry anthocyanins in health promotion: A metabolic overview. *Journal of Functional Foods* **5**:1518-1528.
- Ongkowijoyo P, Luna-Vital DA, Gonzalez de Mejia E. 2018. Extraction techniques and analysis of anthocyanins from food sources by mass spectrometry: An update. *Food Chemistry* **250**:113-126.
- Pareyt B, Finnie SM, Putseys JA, Delcour JA. 2011. Lipids in bread making: Sources, interactions, and impact on bread quality. *Journal of Cereal Science* **54**:266-279.
- Pizzorno J. 2014. Gluthathione!. *Integrative Medicine* **13**:8-12.
- Pojer E, Mattivi F, Johnson D, Stockley CS. 2013. The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **12**:483-508
- Poole CF. 2003. New trends in solid-phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **22**:362-373.
- Praveen S, Kumar N, Kumar S, Mwaurah PW, Panghal A, Attkan AK, Singh VK, Garg MK, Singh V. 2021. Bioactive Compounds, nutritional benefits and food applications of colored wheat: a comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **61**:3197-3210.
- Prugar J. 1977. Kvalita rostlinných produktů. SZN, Praha.
- Příhoda J, Novotná D, Humpolíková P. 2003. Základy pekárenské technologie. Pekař a cukrář, Praha.
- Ram S, Narwal S, Gupta OP, Pandey V, Singh GP. 2020. Anti-nutritional factors and bioavailability: approaches, challenges, and opportunities. Pages 101-128 in Ram S, Narwal S, Gupta OP, Pandey V, Singh GP, editors. *Wheat and Barley Grain Biofortification*. Woodhead Publishing.
- Rodrigo L. 2006. Celiac disease. *World Journal of Gastroenterology* **12**:6585-6593.
- Saha S, Singh J, Paul A, Sarkar R, Khan Z, Banerjee K. 2020. Anthocyanin Profiling Using UV-Vis Spectroscopy and Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* **103**:23-39.

- Sáenz-López R, Fernández-Zurbano P, Tena MT. 2004. Analysis of aged red wine pigments by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1052**:191-197.
- Santos-Buelga C, González-Paramás AM. 2018. Anthocyanins. Pages: 10-21 in Melton L, Shahidi F, Varelis P, editors. *Encyclopedia of Food Chemistry*. Academic Press.
- Shewry PR. 2009. Wheat. *Journal of Experimental Botany* **60**:1537-1553.
- Sieniawska E, Baj T. 2017. Tannins. Pages 199-232 in Badal S, Delgoda R, editors. *Pharmacognosy*. Academic Press.
- Smeriglio A, Barreca D, Bellocco E, Trombetta D. 2016. Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins. *Phytotherapy Research* **30**:1265-1286.
- Smith RW. 2013. Mass Spectrometry. Pages: 603-608 in Siegel JA, Saukko PJ, Houck MM, editors. *Encyclopedia of Forensic Sciences*. Academic Press. Londýn.
- Stahl W, Sies H. 2005. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta* **1740**:101-107.
- Stark NM, Yelle DJ, Agarwal UP. 2016. Techniques for Characterizing Lignin. Pages 49-66 in Faruk O, Sain M, editors. *Lignin in Polymer Composites*. Elsevier. Amsterdam.
- Sunil A, Anju G, Rajat V. 2018. HPLC Detectors, Their Types and Use: A Review. *Organic and Medicinal Chemistry International Journal* **6** (555700) DOI: 10.19080/OMCIJ.2018.06.555700.
- Swartz M. 2010. HPLC DETECTORS: A BRIEF REVIEW. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **33**:1130-1150.
- Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* **54**:733-749.
- Tanumihardjo SA, Russell RM, Stephensen CB, Gannon BM, Craft NE, Haskell MJ, Raiten DJ. 2016. Biomarkers of Nutrition for Development (BOND) —Vitamin A Review. *The Journal of Nutrition* **146**:1816-1848.
- Trojan V, Musilová M, Vyhnánek T, Klejdus B, Hanáček P, Havel L. 2014. Chalcone synthase expression and pigments deposition in wheat with purple and blue colored caryopsis. *Journal of Cereal Science* **59**:48-55.
- Uthayakumaran S, Wrigley C. 2017. Wheat: Grain-Quality Characteristics and Management of Quality Requirements. Pages 91-134 in Wrigley C, Batey I, Miskelly D, editors. *Cereal Grains (Second Edition)*. Woodhead Publishing.
- ÚKZUZ. 2018. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. Nově registrované odrůdy 2018. Available from [http://eagri.cz/public/web/file/584088/PseniceO\\_2018.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/584088/PseniceO_2018.pdf) (accessed April 2023)
- ÚKZUZ. 2019. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. Nově registrované odrůdy 2019. Available from [http://eagri.cz/public/web/file/622781/PseniceO\\_2019.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/622781/PseniceO_2019.pdf) (accessed April 2023)

- Valls J, Millán S, Martí MP, Borràs E, Arola L. 2009. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of Chromatography A* **43**:7143-7172.
- Velíšek J. 2002. Chemie potravin. Osis. Tábor.
- Wang LS, Hecht SS, Carmella SG, Yu N, Larue B, Henry C, McIntyre C, Rocha C, Lechner JF, Stoner GD. 2009. Anthocyanins in black raspberries prevent esophageal tumors in rats. *Cancer prevention Research (Philadelphia)* **2**:84-93.
- Welch CR, Wu Q, Simon JE. 2008. Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization. *Current Analytical Chemistry* **4**:75-101.
- Yousuf B, Gul K, Wani AA, Singh P. 2016. Health Benefits of Anthocyanins and Their Encapsulation for Potential Use in Food Systems: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **56**:2223-2230.
- Zahari NAAR, Chong GH, Abdullah LC, Chua BL. 2020. Ultrasonic-Assisted Extraction (UAE) Process on Thymol Concentration from *Plectranthus Amboinicus* Leaves: Kinetic Modeling and Optimization. *Processes* **8** (322) DOI: 10.3390/pr8030322.
- Zyglis A, Słomińska M, Namieśnik J. 2012. Soxhlet Extraction and New Developments Such as Soxtec. Pages 65-82 in Pawliszyn J, editor. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*. Academic Press.

