

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Fakulta veterinární hygieny a ekologie



Stanovení anthokyanů ve vybraných druzích pšenic s netradičně zabarveným zrnem

Bakalářská práce

Autor práce:

Lenka Radoňová

Vedoucí práce:

Mgr. Pavel Bartl

Brno 2014

PROHLÁŠENÍ STUDENTA

Prohlašuji, že jsem předkládanou bakalářskou práci vypracovala zcela samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a veškeré podkladové materiály, z nichž jsem vycházela, uvádím v Seznamu literatury.

V Brně dne

.....

Podpis studenta

Poděkování

Děkuji Mgr. Pavlu Bartlovi, vedoucímu mé bakalářské práce, za cenné rady a věcné připomínky, trpělivost a čas, který mi v průběhu zpracování práce věnoval. Dále bych ráda poděkovala všem pracovníkům Ústavu vegetabilních potravin a rostlinné produkce za příjemné prostředí při práci v laboratoři.

Děkuji své rodině, známým a přátelům za podporu při studiu.

Obsah

1. Úvod	- 6 -
2. Literární přehled	- 7 -
2.1 Chemická struktura anthokyanů	- 7 -
2.2 Barva Anthokyanů	- 12 -
2.3 Použití anthokyanů	- 13 -
2.4 Stabilita anthokyanů	- 14 -
2.4.1 Vliv pH prostředí	- 14 -
2.4.2 Vliv teploty	- 15 -
2.4.3 Vliv struktury na vlastnosti a reaktivnost	- 17 -
2.4.4 Vliv enzymů	- 17 -
2.4.5 Účinky kyslíku a peroxidů	- 17 -
2.4.6 Záření	- 18 -
2.4.7 Účinky kyseliny L-askorbové	- 18 -
2.4.8 Působení oxidu siřičitého	- 18 -
2.5 Zastoupení anthokyanů v obilovinách	- 19 -
2.5.1 Obsah anthokyanů v kukuřici	- 19 -
2.5.2 Obsah anthokyanů v rýži	- 20 -
2.5.3 Obsah anthokyanů v pšenici	- 20 -
2.6 Vliv anthokyanů na organismus	- 22 -
2.7 Antioxidační kapacita anthokyanů	- 23 -
2.8 Chromatografie	- 24 -
2.8.1 Rozdělení chromatografických metod	- 25 -
2.8.2 Vysoce účinná kapalinová chromatografie	- 26 -
3. Cíle práce	- 27 -
4. Materiál a metodika	- 27 -
4.1 Materiál	- 27 -

4.1.1 Rostlinný materiál	- 27 -
4.1.2 Chemikálie a činidla.....	- 27 -
4.1.3 Standardy	- 27 -
4.1.4 Přístroje a zařízení.....	- 28 -
4.2 Metodika.....	- 28 -
4.2.1 Extrakce vzorků	- 28 -
4.2.2 Čištění vzorků	- 28 -
4.2.3 HPLC analýza	- 29 -
4.2.4 Statistika.....	- 29 -
5. Výsledky	- 30 -
6. Diskuse.....	- 33 -
7. Závěr.....	- 35 -
8. Použitá literatura	- 36 -
Abstrakt	- 40 -

1. Úvod

Anthokyany jsou přírodní barviva, která jsou rozpustná ve vodě. Patří do skupiny flavonoidů. Spolu s chlorofylem tvoří pravděpodobně nejdůležitější skupinu barviv, které způsobují zbarvení rostlin. Hojně se vyskytují v ovoci (červený rybíz, maliny, ostružiny, třešně), zelenině (červené zelí, červená cibule, ředkvičky, hlávkový salát) a dalších rostlinách (např.: modré odrůdy kukuřice, pšenice s modrým a purpurovým zbarvením zrn).

Existují dva významné důvody proč se anthokyany zabývat. Jelikož ovlivňují organoleptické vlastnosti potravin, tak mají významný vliv při technologickém zpracování. Druhým důvodem, který vzbuzuje zájem o anthokyany je jejich blahodárný vliv na zdraví (snížování výskytu kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny a dalších chronických onemocnění).

V dnešní době zájem o anthokyany rapidně narůstá. Důvodem k tomuto zájmu jsou právě zmiňované příznivé účinky na zdraví. Současným trendem výroby potravin je upřednostňování přírodních zdrojů barviv, jako jsou právě anthokyany, oproti syntetickým. Lidé si totiž začínají uvědomovat, co je pro jejich zdraví dobré a dávají přednost přírodním barvivům v potravinách, které si spojují s nulovým rizikem toxického zamořování organismu, před látkami uměle vytvořenými.

Cíle této práce jsou kvantifikace anthokyanů u pšenice s modře zbarveným zrnem a identifikace jednotlivých anthokyanů u vzorků získaných během pěti let jdoucích po sobě, dále doplnění potřebných informací k tomuto tématu.

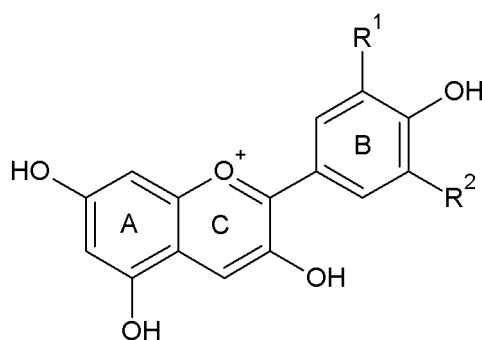
2. Literární přehled

Anthokyany odpovídají za červenou, fialovou, modrou a oranžovou barvu ve většině rostlin. Jejich název má původ v řeckém jazyce, kde „*anthos*“ znamená květ a „*cyanos*“ modrý (Escribano-Bailón a kol., 2004).

2.1 Chemická struktura anthokyanů

Anthokyany jsou tvořeny aglykonem (anthokyanidin) a cukernou složkou, což obvykle bývá jeden nebo několik cukerných zbytků. Anthokyanidiny jsou polyhydroxyderiváty a polymethoxyderiváty 2-fenylbenzopyryliového neboli flavyliového kationu (Balík, 2010), jehož struktura je znázorněna na obrázku č. 1.

Obrázek č. 1 - Základní struktura anthokyanidinu (Kay, 2006)



V přírodě se vyskytuje celkem 15 různých anthokyanidinů. Z toho je pouze šest nejvýznamnějších, které se vyskytují v potravinách (Tabulka č. 1). V sestupném pořadí, dle četnosti výskytu, se jedná o kyanidin (fialová barva, název získal odvozením od latinského názvu chrpy, *Cyanus* sp.), pelargonidin (červená barva, pelargonie, *Pelargonium* sp.), peonidin (fialová barva, pivoňka, *Paeonia* sp.), delfinidin (modrá barva, stračka, *Delphinium* sp.), petunidin (modrá barva, petunie, *Petunia* sp.) a malvidin, dříve nazývaný oenidin (purpurová barva, sléz, *Malva* sp.). Jejich struktura je znázorněna na obrázku č. 2 (Velíšek, 2002).

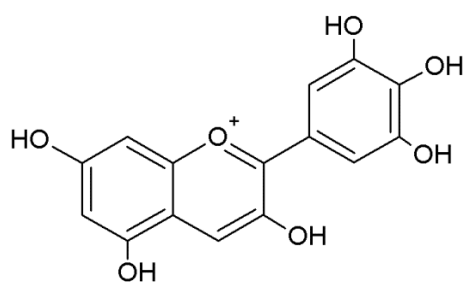
Volné aglykony se v rostlinách vyskytují velmi zřídka (např.: jako důsledek hydrolýzy anthokyanů), a to ve stopovém množství. Hlavními pigmenty u rostlin jsou jejich glykosidy neboli anthokyany (Velíšek, 2002).

Tabulka č. 1 - Anthokyanidiny a jejich substituenty (Andersen a Markham, 2006).

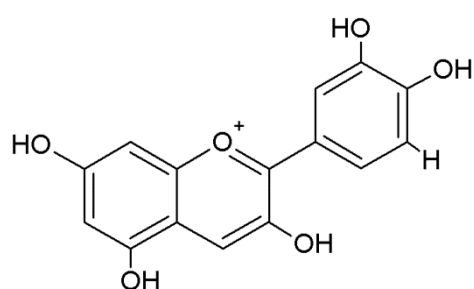
Anthokyanidin	Pozice substituentů ve flavyliovém kationu						
	3	5	6	7	3'	4'	5'
Nejběžněji se vyskytující							
Pelargonidin (Pg)	OH	OH	H	OH	H	OH	H
Kyanidin (Cy)	OH	OH	H	OH	H	OH	H
Definidin (Dp)	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH
Peonidin (Pn)	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	H
Petunidin (Pt)	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	OH
Malvidin (Mv)	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃
Methylované							
5-MethylCy	OH	OCH ₃	H	OH	OH	OH	H
7-MethylPn	OH	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	H
5-MethylDp	OH	OCH ₃	H	OH	OH	OH	OH
5-MethylPt	OH	OCH ₃	H	OH	OCH ₃	OH	OH
5-MethylMv	OH	OCH ₃	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃
7-MethylMv	OH	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃
6-hydroxylované							
6-hydroxyPg	OH	OH	OH	OH	H	OH	H
6-hydroxyCy	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H
6-hydroxyDp	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH
3-deoxyanthokyanidiny							
Apigeninidin (Ap)	H	OH	H	OH	H	OH	H
Luteolinidin (Lt)	H	OH	H	OH	OH	OH	H
Tricetinidin (Tr)	H	OH	H	OH	OH	OH	OH
7-MethylAp	H	OH	H	OCH ₃	H	OH	H
5-MethylLt	H	OCH ₃	H	OH	OH	OH	H
5-Methyl-6-hydroxyAp	H	OCH ₃	OH	OH	H	OH	H
5, 4'-Diethyl-6-hydroxyAp	H	OCH ₃	OH	OH	H	OCH ₃	H
5-Methyl-6-hydroxyLt	H	OCH ₃	OH	OH	OH	OH	H
5, 4'-Diethyl-6-hydroxyLt	OH	OCH ₃	OH	OH	OH	OCH ₃	H

Riccionidin A	OH	H	OH	OH	H	OH	H
Pyranoanthokyanidiny							
5-KarboxypyranoPg	OH	O-	H	OH	H	OH	H
5-KarboxypyranoCy	OH	O-	H	OH	OH	OH	H

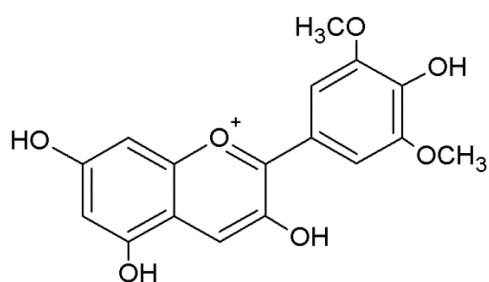
Obrázek č. 2 - (A) Delfinidin, (B) Kyanidin, (C) Malvidin, (D) Pelargonidin, (E) Peonidin, (F) Petunidin (Velíšek, 2002)



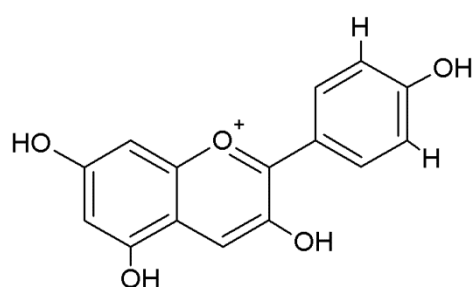
A



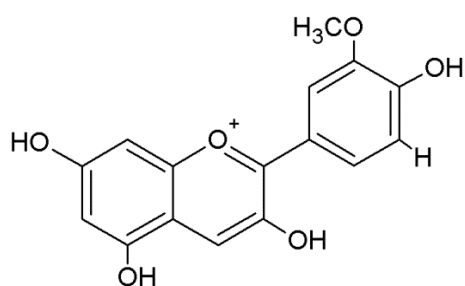
B



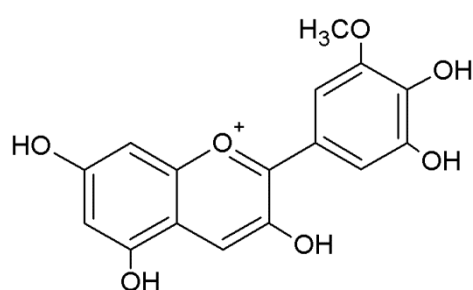
C



D

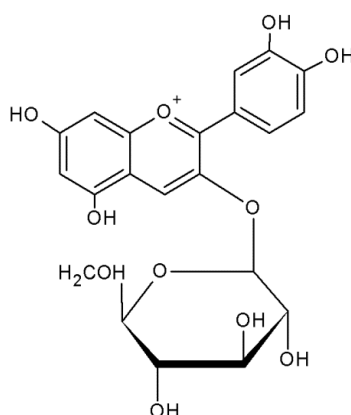


E



F

Obrázek č. 3 - kyanidin-3-O- β -D-glykosid (Velíšek, 2002)



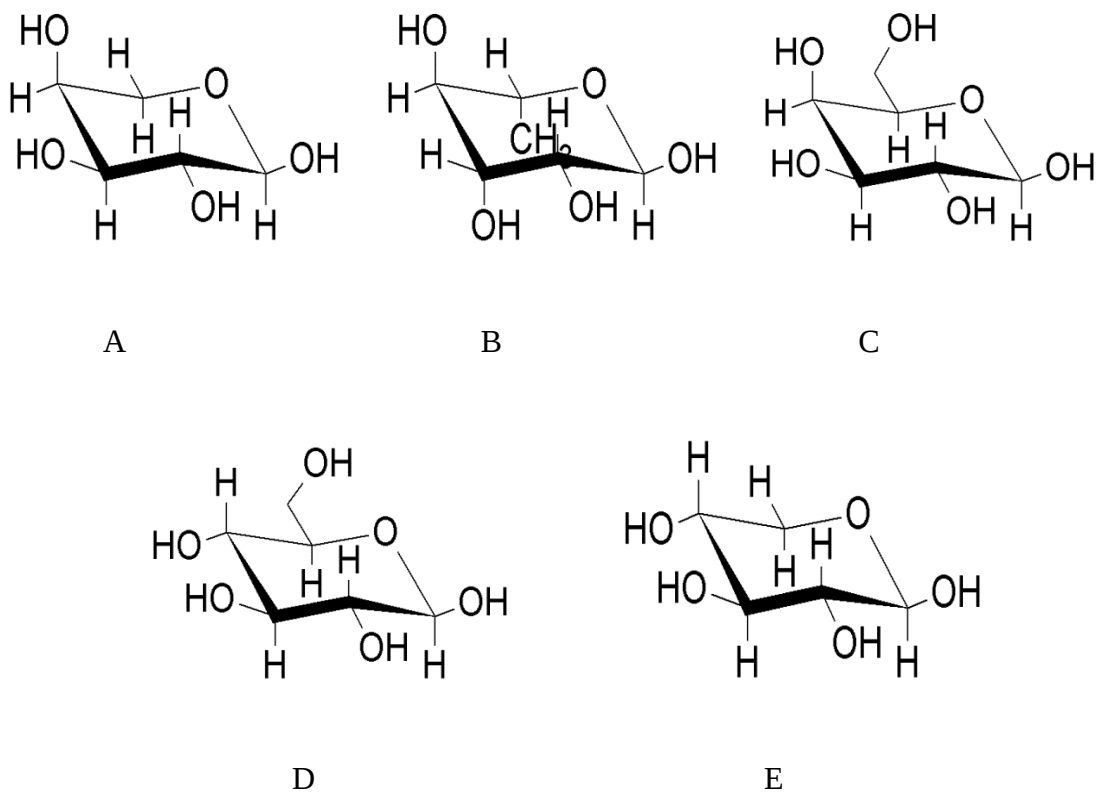
Nejčastější cukerné substituenty jsou monosacharidy D-glukosa, L-rhamnosa, D-galaktoza, D-xylosa a L-arabiosa. Strukturní znázornění těchto cukrů je na obrázku č. 4. Pokud jsou na molekulu anthokyanidinu navázány di- nebo trisacharidy, nejčastěji se jedná o rutinosa, sambubiosu, soforosu, laminaribosu a genciobiosu (Obrázek č. 5). Vazná poloha cukrů je vždy na pozici C-3. Ve výjimečných případech se mohou cukry, jako mono-, di-, trisacharidy, navazovat v polohách C-7, C-3', C-5' a C-4' (Velíšek, 2002). Rozlišujeme monoglykosidy, diglykosidy a triglykosidy anthokyanidinu, a to podle počtu glykosidicky navázaných cukrů na aglykon. Cukry bývají často acylovány kyselinou octovou, malonovou a fenolovými kyselinami (např.: kys. kávovou, kys. ferulovou - obrázek č. 6) (Balík, 2010).

Na základě místa připojení, množství a charakteru cukrů se anthokyaniny třídí do 18 skupin (Balík, 2010). Z nich je těchto 6 nejvýznamnějších:

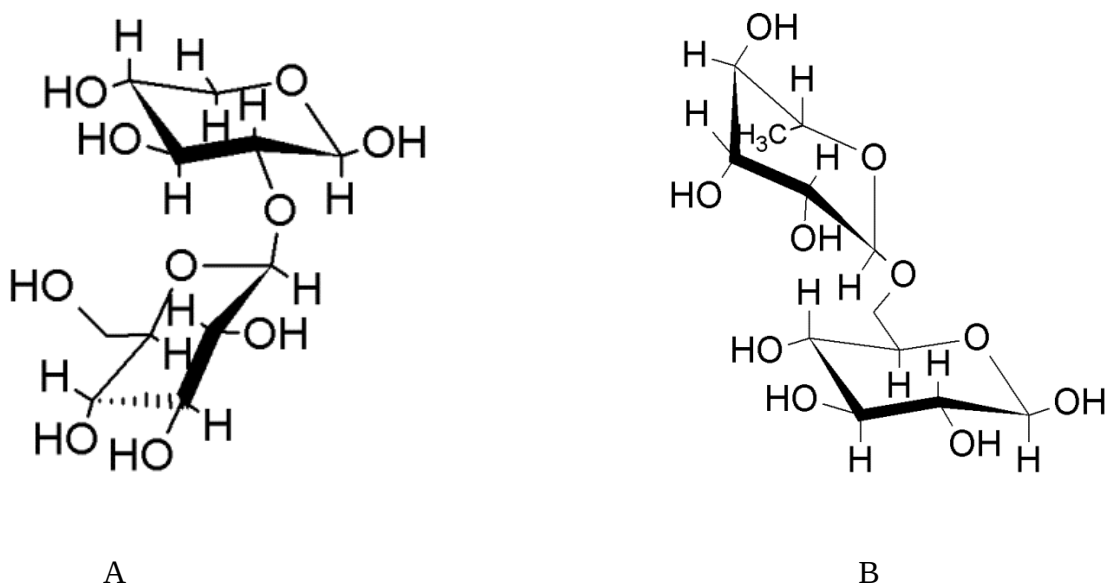
- Monosidy s glukosou, galaktosou, rhamnosou nebo arabinosou v poloze C-3 (3-monosidy),
- biosidy s disacharidy (rutinosa, sambubiosa, soforosa, genciobiosa aj.) vázanými v poloze C-3 (3-biosidy),
- triosidy s lineárními nebo rozvětvenými trisacharidy vázanými v poloze C-3 (3-triosidy),
- 3,5-diglykosidy s monosacharidy v poloze C-3 a C-5,
- 3,7-diglykosidy s monosacharidy v poloze C-3 a C-7,
- 3-biosidy-5-monosidy, u kterých je v poloze C-3 vázán disacharid a v poloze C-5 monosacharid.

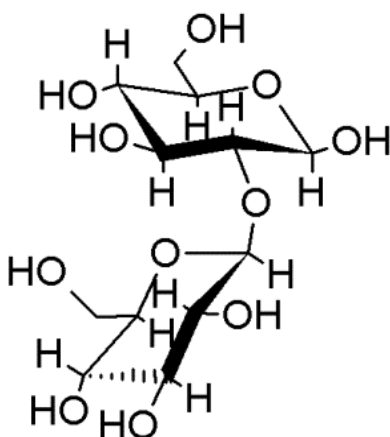
Nejčastěji se vyskytujícími anthokyanovými pigmenty jsou kyanidin-3-glykosidy (Obrázek č. 3) (Velíšek, 2002).

Obrázek č. 4 - nejčastěji substituované monosacharidy - (A) α -L-arabinoza, (B) α -L-rhamnoza, (C) β -D-galaktoza, (D) β -D-glukoza, (E) β -D-xyloza



Obrázek č. 5 - substituované disacharidy - (A) Sambubiosa, (B) Rutinosa, (C) Soforosa





C

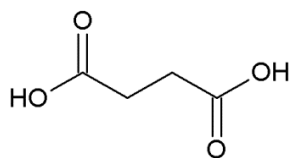
2.2 Barva Anthokyanů

Zabarvení anthokyanů je dáno především strukturou jejich molekuly - počet a kombinace hydroxylových a methoxylových skupin. Čím více hydroxylových skupin se v molekule nachází, tím více převládá modrý odstín barviva a naopak s nárůstem počtu methoxylových skupin barva přechází do červených odstínů (Delgado-Vargas a Paredes-Lopez, 2003; Velíšek, 2002).

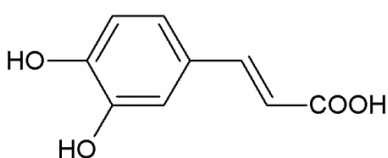
Je zjištěno, že čím více cukerných zbytků anthokyan obsahuje, tím více je náchylnější k Maillardovým reakcím, což také může do značné míry ovlivňovat barvu anthokyanů.

Barevnost je dále ovlivňována vnějšími a vnitřními faktory. Mezi nejdůležitější patří vliv pH, teploty, záření, kyslíku, oxidu siřičitého, kovů, kopigmentů, kyseliny askorbové a v neposlední řadě vliv enzymů nebo peroxidů. Ke změnám barvy anthokyanů v důsledku změn hodnot pH dochází spíše u izolovaných anthokyanů, nežli u těch, které jsou přítomny v rostlinách. Na anthokyan v rostlinných materiálech totiž působí kopigmenty, které stabilizují jejich barvu (Delgado-Vargas a Paredes-Lopez, 2003; Velíšek, 2002).

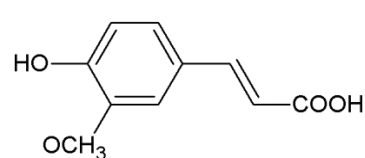
Obrázek č. 6 - (A) kys. sukcinová, (B) kys. kávová, (C) kys. ferulová, (D) kys. malonová, (E) kys. octová, (F) kys. šťavelová, (G) kys. vinná, (H) kys. kumarová, (I) kys. galová



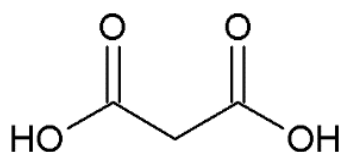
A



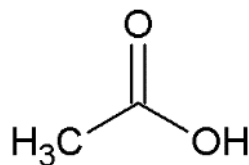
B



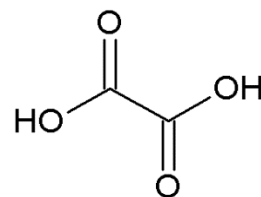
C



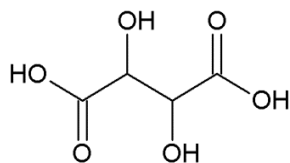
D



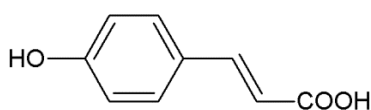
E



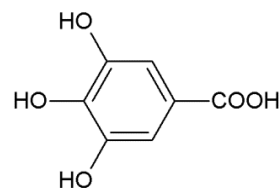
F



G



H



I

Kopigmentace může být intermolekulární nebo intramolekulární. Kopigmentace intermolekulární je uskutečňována pomocí látek, které jsou přítomny v blízkosti anthokyanů. Intramolekulární kopigmenty jsou látky, které jsou navázány na molekulu anthokyanu a tím zvyšují stabilitu jeho barvy. Jako intramolekulární kopigmenty fungují flavony, aurony, flavanoly, alkaloidy, aminokyseliny, organické kyseliny a další. Kopigmenty stabilizují barvu tak, že ochraňují flavyliový kation před degradací (Delgado-Vargas a Paredes-Lopez, 2003; Velíšek, 2002).

2.3 Použití anthokyanů

Anthokyaniny se nejčastěji používají jako přírodní rostlinné barvivo v potravinářství. Používají se izolované anthokyaniny, a to už přes 100 let. Další možností je použití ve formě koncentrátů šťáv různých plodů, což je známo a používáno mnohem déle. Nevýhodou použití anthokyanů, jakožto potravinářských barviv, je to, že mají intenzivní zbarvení pouze v kyselém prostředí ($\text{pH} < 3,5$), takže se hodí pouze pro kyselé potraviny (Velíšek, 2002).

Význam a zájem o používání těchto barviv v poslední době vzrůstá v souvislosti se zájmem spotřebitelů o přírodní látky v potravinách (Velíšek, 2002).

Průmyslově je využíváno pouze několik rostlinných zdrojů anthokyanů, především kvůli dostupnosti a ekonomickým podmínkám jejich získávání. Nejčastěji se k barvení potravin využívají anthokyaniny získané z hroznů vinné révy, především z jejich slupek či sedimentů šťávy. Obsah anthokyanů v těchto částech hroznů je 0,3-7,5 g/kg. Dalším bohatým zdrojem jsou plody bezu černého, tzv. bezinky (2-10 g/kg) nebo plody aronie

černoplodé (*Aronia melanocarpa*, 10 g/kg), tyto dvě rostliny mají podobné zastoupení pigmentů. Vhodným zdrojem jsou i hlávky červeného zelí (0,7-0,9 g/kg), květy ibišku (15 g/kg v sušině), sladké brambory, červené pomeranče, listy a semena červených odrůd kukuřice a místně také další zdroje (Velíšek, 2002).

2.4 Stabilita anthokyanů

Stabilita anthokyanů vzrůstá s počtem methylových skupin navázaných na kruhu B a snižuje se s nárůstem počtu hydroxylových skupin. Nejstabilnější anthokyanidin je malvidin, následuje peonidin, petunidin, kyanidin a delfinidin. Obecně jsou anthokyany stabilnější v kyselém pH. Glykosylace a acylace cukrů také zvyšuje stabilitu anthokyanů (Escribano-Bailón a kol., 2004).

Velký vliv na stabilitu anthokyanů má okolní prostředí. Proto je důležité během analýzy kontrolovat teplotu a světlo (Escribano-Bailón a kol., 2004).

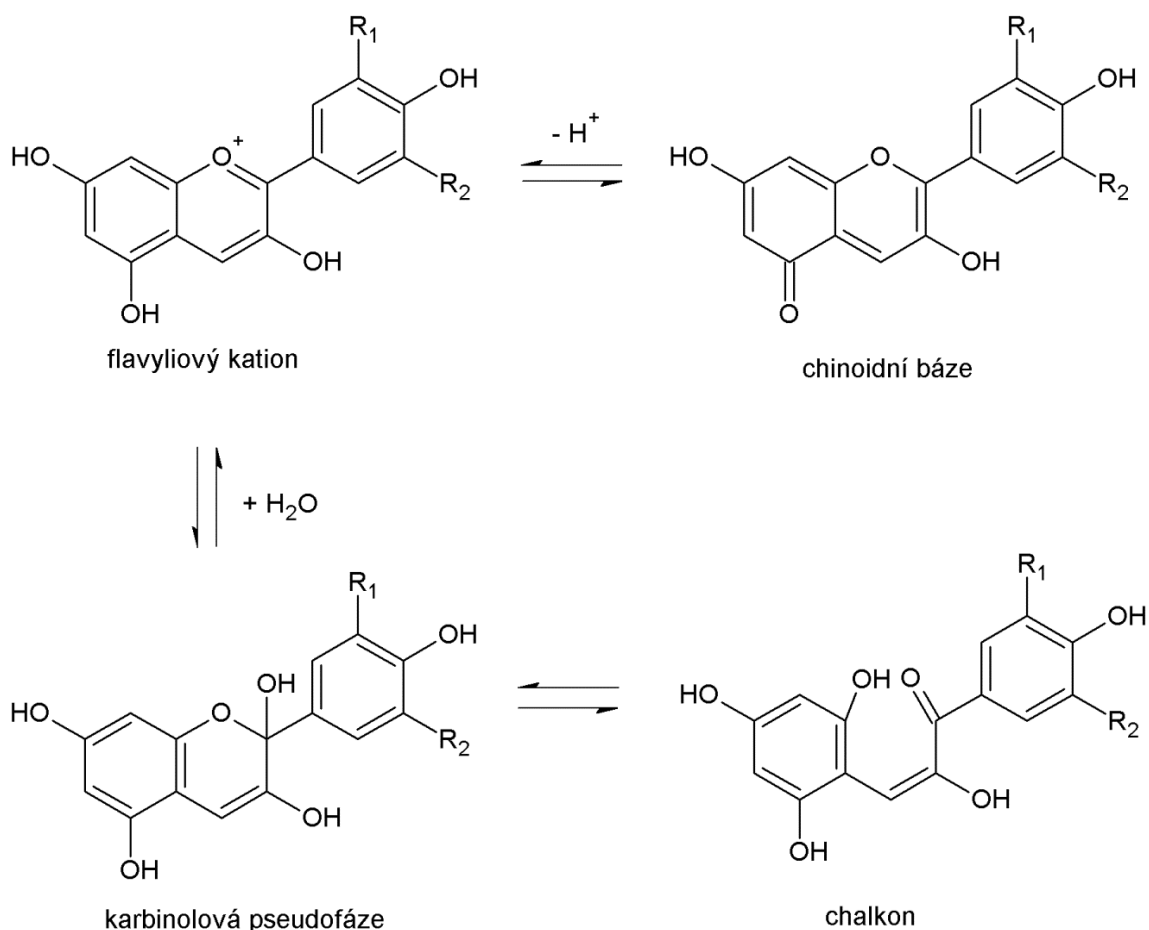
Anthokyany, které jsou přítomny v červeném víně, mohou podléhat chemickým přeměnám a tak mohou vznikat nové barevné deriváty odvozené od anthokyanů. Jedná se například o pyranoanthokyan, karbopyranoanthokyan a portisiny (vinylpyranoanthokyan-katechiny). Tyto sloučeniny jsou velmi stabilní díky svým strukturním vlastnostem. Vykazují značnou odolnost vůči odbarvujícímu účinky oxidu siřičitého a vynikají intenzivním zbarvením při vyšších hodnotách pH v porovnání s jejich anthokyanovými prekurzory (Azevedo a kol., 2010).

2.4.1 Vliv pH prostředí

Hodnota pH má výrazný vliv na barvu anthokyanových barviv. Výsledkem amfoterního charakteru anthokyanů je, že se podobají acidobazickým indikátorům. Roztoky anthokyanů pod hodnotou pH 3,0 dosahují nejintenzivnější červené barvy. Pokud se pH roztoků zvyšuje, červené zbarvení se pomalu vytrácí až do bodu, kdy se roztoky jeví jako bezbarvé (pH 4,0-5,0) (Balík, 2010). Při dalším zvyšování pH se barvy roztoků mění k purpurově červené. Tato změna barvy je dána vznikem neutrální chinoidní báze. Pro vznik této báze je nezbytná přítomnost volné hydroxyskupiny na jednom z uhlíků (C-5, C-7, C-4'). Zvyšování pH k hodnotám 7,5 - 8,0 vede ke změně barvy na modrou, a to díky vzniku modrého aniontu neutrální chinoidní báze. Tato modrá barva se vlivem doby skladování, pH a teploty postupně odbarvuje až do žlutého zbarvení - vznik žlutého chalkonu. Pokud roztok znovu okyselíme na pH 1,0, přemění se karbinová a chinoidní báze na flavyliový

kation (Velíšek, 2002). Zajímavostí je, že některé acylované anthokyany (např.: pentanin) jsou stabilní při pH hodnotě vyšší než 7,0, kdežto například kyanidin-3-glukosid ztrácí svoji stabilitu při pH vyšším než 5,0 (Cortés a kol., 2006).

Obrázek č. 7 - Vliv pH prostředí na strukturu anthokyanů (Balík, 2010).



2.4.2 Vliv teploty

Stejně jako většinu chemických reakcí ovlivňuje teplota okolního prostředí, ovlivňuje také rychlost degradace anthokyanů a jejich stabilitu. Velký vliv na degradaci má teplota prostředí v kombinaci s pH prostředí a strukturou látky, přítomností kyslíku a schopností vstoupit do reakce s jinými složkami systému (Velíšek, 2002).

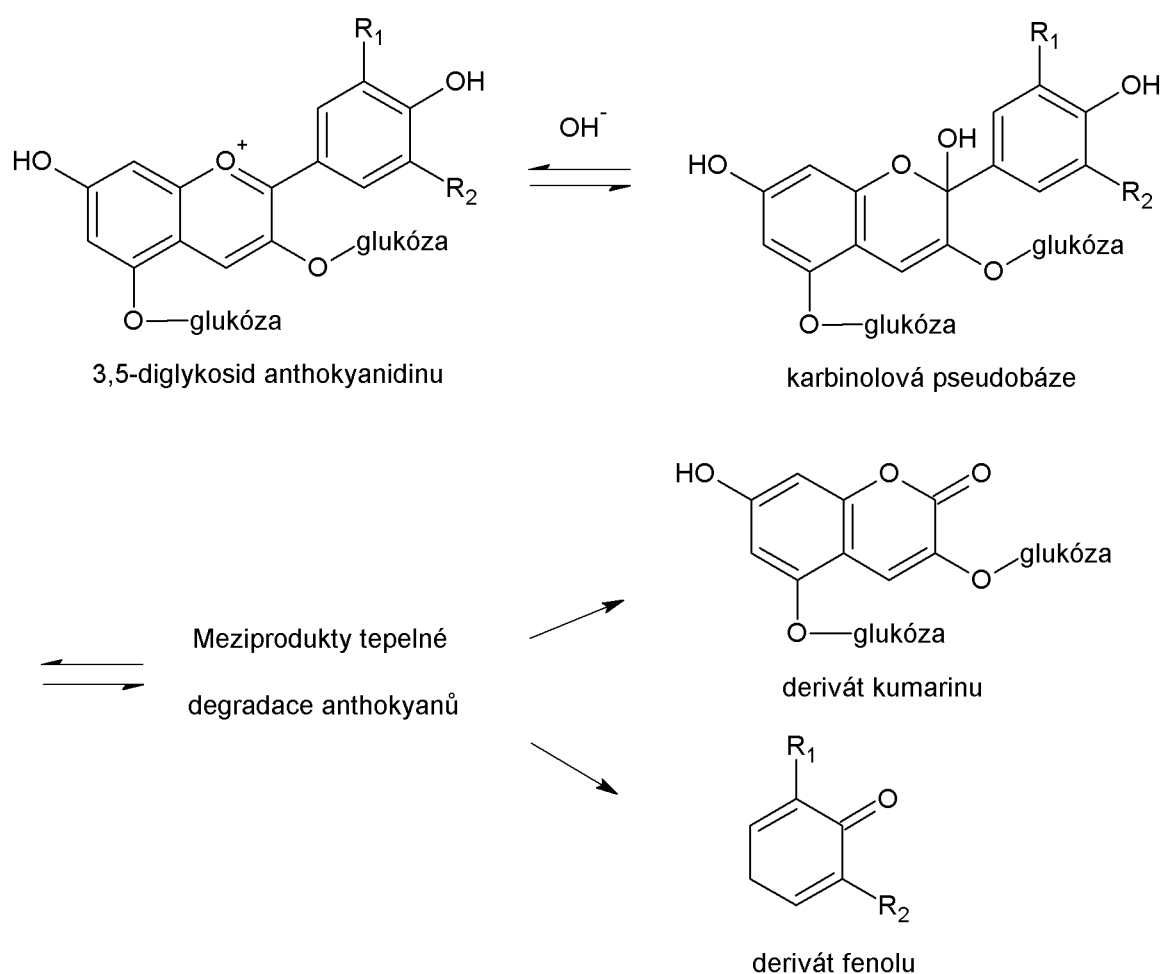
Většina běžných anthokyanů vykazuje vyšší stabilitu při vyšších teplotách, ke kterým dochází například při zpracování ovoce a zeleniny. Tento jev je vysvětlován ochranným efektem různých složek systému a kondenzací monomerů. Při těchto reakcích vznikají stabilnější oligomerní pigmenty, které jsou významnými nositeli barvy ovocných šťáv a červených vín. Množství těchto pigmentů se přímo úměrně zvyšuje s narůstající

teplotou a skladovací dobou. Významnými produkty mechanismu degradace anthokyanidinů jsou glykosidy odpovídajících chalconů (Velíšek, 2002).

Jsou popsány dva způsoby degradace anthokyanů. Jedná se o hydrolýzu glykosidové vazby, kdy vznikají z chalconů α -diketony, následně se předpokládá rozklad α -diketonu na fenolové deriváty. Druhý způsob degradace je bez hydrolýzy glykosidické vazby, kdy se otevře heterocyklický kruh karbonylové báze a vznikne bezbarvý chalcon (Balík, 2010). Následné reakce primárních degradačních produktů tvoří hnědě zabarvené polymerní produkty (Velíšek, 2002).

Experimentálně bylo zjištěno, že čas nutný k degradaci 50% anthokyanových barviv jahod byla 1 hodina při 100°C, 24 hodin při 38°C a 1300 hodin (cca 54 dní) při 20°C. Z tohoto pokusu vyplývá, že pro zpracování ovoce s ohledem k zachování jeho nepřirozenější barvy je vhodné používat působení vyšších teplot po kratší dobu (Balík, 2010).

Obrázek č. 8 - Rozklad 3,5-diglykosidů anthokyanidinu zvýšenou teplotou (Velíšek, 2002).



2.4.3 Vliv struktury na vlastnosti a reaktivnost

V kyselém prostředí je barva neacylovaných, ale také monoacylovaných anthokyanů závislá na počtu a druhu substituentů navázaných na aglykon. Aglykony s větším počtem hydroxylových skupin mají spíše modrý odstín barvy, deriváty s methoxyskupinami mají barvu do červena. Glykosidy a jejich acylderiváty mají všeobecně modré zbarvení (Velíšek, 2002).

Stabilita derivátů se zvyšuje s narůstajícím počtem methoxylových skupin, naopak nárůst počtu hydroxylových skupin jejich stabilitu snižuje. Obecně jsou anthokyany stabilnější než samotné aglykony. Vliv na stabilitu barviva má i druh navázaného cukru a přítomnost acylových skupin. Acylové skupiny ovlivňují reaktivnost s vodou, ve slabě kyselém nebo v neutrální prostředí, kdy se přednostně tvoří modrá chinoidní báze místo bezbarvé. Tyto pigmenty jsou méně citlivé na výkyvy hodnot pH, udrží si svoji barvu v neutrálním a také ve slabě kyselém prostředí (Velíšek, 2002).

2.4.4 Vliv enzymů

V rostlinných pletivech existují enzymy, které se podílejí na odbarvování anthokyanových barviv. Jedná se o dvě skupiny enzymů:

- Glykosidázy, které hydrolyzují glykosidické vazby anthokyanů za vzniku substituovaného cukru a aglykonu, který je nestabilní a zdegraduje na bezbarvé deriváty (Velíšek, 2002).
- Polyfenoloxidasy, které katalyzují oxidaci fenolických sloučenin obsahujících *o*-dihydroxyskupinu na *o*-chinony.

O-chinony mohou následně reagovat navzájem v hnědě zabarvené polymery s vyšší molekulovou hmotností nebo reagují s aminokyselinami či bílkovinami, kdy vzniká makromolekulární komplex, který má rovněž hnědou barvu (Balík, 2010).

2.4.5 Účinky kyslíku a peroxidů

Kyslík spolu s teplotou prostředí je považován za nejspecifičtější urychlovač destrukce anthokyanů (Balík, 2010). Oxidační účinky kyslíku na anthokyany jsou přímé nebo nepřímé. Nepřímo vzdušný kyslík působí přes jiné labilní sloučeniny, které jsou oxidovány přednostně (kyselina askorbová). K destrukci anthokyanů, která je vyvolána díky kyselině askorbové, dochází nepřímým účinkem působení peroxidu, který vzniká při její oxidaci. Těmito způsoby jsou anthokyany oxidovány na bezbarvé nebo hnědě zabarvené produkty (Velíšek, 2002).

Destrukce anthokyanů kyslíkem se zvyšuje za přítomnosti alkoholu a působením světla (Balík, 2010).

2.4.6 Záření

Rozklad anthokyanů v důsledku působení viditelného, ultrafialového nebo ionizujícího záření probíhá jako fotooxidace. Anthokyan, které jsou substituované v poloze C-5 hydroxylovou skupinou, jsou náchylnější k fotochemickému rozkladu, a to v porovnání s anthokyan, které v poloze C-5 substituované nejsou (Velíšek, 2002).

2.4.7 Účinky kyseliny L-askorbové

Vliv kyseliny L-askorbové na degradaci anthokyanů je podporován působením kyslíku, existuje zde synergický účinek. Experimentálně bylo zjištěno, že největší ztráty anthokyanových barviv jsou při současné oxidaci kyseliny L-askorbové. Při pokusech s dokonale odvzdušněnými anthokyanovými koncentráty, bez produktů Maillardovy reakce, byly pozorovány případy, kdy v průběhu několikahodinového zahřívání (60°C, pH 3) nebyla destrukce anthokyanových barviv urychlena vlivem kyseliny L-askorbové. Z těchto experimentů vyplývá, že zvýšená rychlost destrukce anthokyanových barviv, při zvýšené teplotě a přítomnosti kyseliny L-askorbové, je spíše přičítána produktům její vlastní oxidace, nežli jejímu přímému působení na barvivo (Balík, 2010).

Při těchto oxidačně-redukčních reakcích vznikají nestabilní produkty, které se dále rozkládají na bezbarvé a nestabilní látky. Tyto produkty ještě více urychlují degradaci anthokyanových barviv (Balík, 2010).

2.4.8 Působení oxidu siřičitého

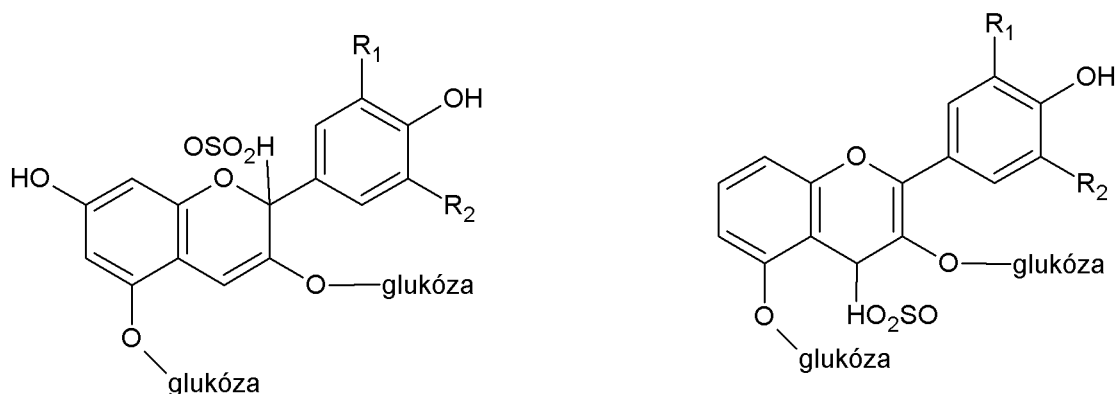
Změny pozorované působením oxidu siřičitého na anthokyan se projevují změnami v barevnosti. Anthokyan jsou v důsledku působení oxidu siřičitého odbarvovány. Tento jev je spojován s nukleofilní reakcí negativně nabitého bisulfátového iontu s flavyliovým kationem za tvorby chroman-4(nebo 2)-sulfonové kyseliny. Pokud flavyliová sůl obsahuje v poloze C-4 fenylovou skupinu, odbarvovací efekt vlivem oxidu siřičitého není pozorován (Balík, 2010).

Stačí nízké množství oxidu siřičitého, aby došlo k odbarvení významného množství anthokyanových barviv. Odbarvovací účinek se dá snížit či úplně eliminovat snížením pH na hodnotu 1. Kinetické studie prokázaly, že je anthokyan-bisulfitový komplex v oblasti

pH 3-4 stabilní a působí preventivně proti vzniku hnědých degradačních produktů (Balík, 2010).

Působením oxidu siřičitého také vznikají barevně velmi stabilní sloučeniny anthokyanů (Velíšek, 2002).

Obrázek č. 9 - Produkty reakce anthokyanů s SO₂ (Velíšek, 2002).



2.5 Zastoupení anthokyanů v obilovinách

Prekurzory pro primární vznik anthokyanů v rostlinách se tvoří při glykolýze a pentózofosfátovém cyklu. Při glykolýze se jedná o fosfoenolpyruát (PEP) a z pentózového cyklu jde o erythrozu-4-fosfát. Tyto sloučeniny vytváří základní stavební jednotky pro vznik kyseliny shikimové, která spolu s acetátem vytváří primární aromatické stavební kameny pro mnoho fenolických sloučenin včetně anthokyanů (Delgado-Vargas a Paredes-Lopez, 2003).

2.5.1 Obsah anthokyanů v kukuřici

Nejčastější výskyt anthokyanů u kukuřice je v purpurové, modré a červené odrůdě. Purpurová kukuřice je šlechtěna z kukuřice seté (*Zea Mays* L.) v latinské Americe, kde se z ní vyrábí tradiční nápoj, který příznivě ovlivňuje zdraví. Nejčastěji zastoupeným anthokyanem v purpurové kukuřici je kyanidin-3-glukosid (Escribano-Bailón a kol., 2004).

Modrá kukuřice obsahuje anthokyaniny odvozené od malvidinu a kyanidinu. Dále jsou v modré kukuřici zastoupeny 3-glukosidy pelargonidinu a peonidinu, přítomnost těchto anthokyanů zaznamenal Jackman a Smith (1996).

Celkový obsah anthokyanů a sytost zbarvení u kukuřičné mouky se snižuje v důsledku jejího speciálního zpracování - nixtamalizace (Cortés a kol., 2006). Nixtamilizace je proces

vaření kukuřice s vápnem, dojde k mineralizaci zrna a uvolnění výživových látek, které jsou jinak pro tělo nevstřebatelné (Veselý, 2012). Vyšší ztráty celkového množství anthokyanů u obilných výrobků jsou u vzorků, které mají anthokyany uloženy v oplodí. To se zpracováním obilovin nedostane do výsledného produktu (mouky). Anthokyany vyskytující se v červených zrnech kukuřice pochází z aglykonu pelargonidinu a také malvidinu a kyanidinu (Cortés a kol., 2006).

2.5.2 Obsah anthokyanů v rýži

Anthokyany vyskytující se v rýži jsou obsaženy v lusku červené a černé odrůdy rýže. Barevná rýže se běžně konzumuje v Asijských zemích, kde jsou navíc anthokyany používány jako přírodní barvivo ve výrobě alkoholických nápojů (Escribano-Bailón a kol., 2004).

Nejvíce zastoupeným anthokyanem obsaženým v rýži je kyanidin-3-glukosid. Jako druhý, ovšem v malém množství, se vyskytuje peonidin-3-glukosid. Dále byla zaznamenána přítomnost malého množství dalších derivátů kyanidinu, a sice kyanidin-3-gentiobiosid, kyanidin-3-rhamnosid, kyanidin-3,5-diglukosid a kyanidin-3-rhamnoglukosid (Escribano-Bailón a kol., 2004).

2.5.3 Obsah anthokyanů v pšenici

Zastoupení anthokyanů u pšenice s pigmentovanými zrny není zatím moc detailně objasněno. Doposud je známo pouze několik málo informací o hlavních látkách v ní zastoupených. Látky, které jsou známé, byly identifikovány pomocí srovnávání se standardy (Tabulka č. 3) (Escribano-Bailón a kol., 2004).

V barevné pšenici se vyskytují glykosidy a rutinosidy kyanidinu a peonidinu a jejich acylované deriváty. Dále byla zjištěna přítomnost kyanidinu-3-gentiobiosidu (Escribano-Bailón a kol., 2004).

Tabulka č. 2 - Celkový obsah anthokyanů v pšenici (mg/100g) (Escribano-Bailón a kol., 2004).

Pšeničný produkt	Druh pšenice		
	Modrá	Purpurová	Červená
Celé zrno	16	9	0,5
Mouka	2	0,7	0,2
Otruby	46	24	1

Obsah anthokyanů v pšenici je významně ovlivňován podmínkami pěstování, počasím a množstvím slunečního svitu přijímaného rostlinou. Faktory, jako například množství UV-B záření a změna projevu obranných růstových genů, způsobují zvýšení syntézy anthokyanů v rostlině a tím pádem způsobují značné rozdíly v koncentracích celkového obsahu anthokyanů stanovovaných ve vzorcích pšenic z různých sezonních sklizní (Escribano-Bailón a kol., 2004).

Působení vlivů životního prostředí na celkový obsah anthokyanových barviv byl zaznamenán ve větší míře u purpurové odrůdy pšenice nežli u modré. Tento fakt je dán různým uložením anthokyanů v pšeničném zrně. Zrna purpurové pšenice obsahují anthokyaniny v perikarpu (zevní vrstva), zatímco u modré pšenice jsou anthokyanová barviva uložena v aleuronové buněčné vrstvě (Escribano-Bailón a kol., 2004).

Tabulka č. 3 - Přehled identifikovaných anthokyanů v pšenici s barevnými zrny (Abdel-Aal a Hucl, 2003; Abdel-Aal a kol., 2006; Abdel-Aal a kol., 2008; Hosseinian a kol., 2008; Knievel a kol., 2009).

Anthokyan	Přítomnost v pšenici s purpurovým zrnem	Přítomnost v pšenici s modrým zrnem	m/z
Kyanidin-3-arabinosid	+		419, 287
Kyanidin-3-galaktosid	+		449, 287
Kyanidin-3-glukosid	+	+	449, 287
Kyanidin-3-rutinosid	+	+	595, 449, 287
Kyanidin malonyl-glukosid	+		535, 449, 287
Kyanidin sukcinyl-glukosid	+		549, 287
Delfinidin-3-arabinosid	+		435, 303
Delfinidin-3-galaktosid	+		465, 303
Delfinidin-3-glukosid		+	465, 303
Delfinidin-3-rutinosid		+	611, 465, 303
Malvidin-3-glukosid	+		493, 331
Malvidin-3-rutinosid		+	639, 493, 331
Pelargonidin-3-arabinosid	+		403, 271
Pelargonidin-3-galaktosid	+		433, 271

Pelargonidin-3-glukosid	+		733, 271
Peonidin-3-arabinosid	+		449, 301
Peonidin-3-glukosid	+	+	463, 301
Peonidin-3-rutinosid		+	609, 463, 301
Peonidin malonyl-glukosid	+		549, 301
Petunidin-3-glukosid	+	+	479, 317
Petunidin-3-rutinosid		+	625, 479, 317

2.6 Vliv anthokyanů na organismus

Anthokyany mají silnou antioxidační schopnost, a proto je jejich vliv na organismus velmi příznivý. Hlavně díky antioxidačním schopnostem jsou anthokyany, a další flavonoidy, považovány za důležitý nutriční doplněk v lidské výživě. Přispívají k prevenci vzniku některých onemocnění spojených s oxidačním stresem (Andersen a Markham, 2006).

Ve Spojených Státech Amerických se denní konzumace anthokyanů pohybuje okolo 200 mg. Tato hodnota se zvyšuje u konzumentů červeného vína (Azevedo a kol., 2010).

V dnešní době se zájem o anthokyany, jakožto potencionální nutriční doplňky, velmi zvýšil. Důvodem je fakt, že pravidelná konzumace anthokyanů v ovoci, zelenině, marmeládách, konzervách a víně je spojována s redukcí rizik spojených s chronickými nemocemi, rakovinou, Alzheimerovou nemocí, kardiovaskulárními chorobami a virovými onemocněními (Andersen a Markham, 2006).

Studie biologické aktivity anthokyanů dokazují, že jsou schopny ochránit DNA, bílkoviny, tuky a další makromolekuly před oxidačním poškozením reaktivními druhy kyslíku. Předpokládá se, že působení anthokyanů je rozděleno na dvě úrovně, a to na účinek systémový a lokální. Systémově působí anthokyany po vstřebání do krevního oběhu, následné cirkulaci a prostupu cílovými tkáněmi v organismu. Lokální účinek se projevuje například ve střevech, pokud nejsou střevní sliznicí vstřebány do systémové cirkulace. Dále mohou lokálně působit v pokožce, kde ji ochraňují před UV zářením. V případě lokálního působení na střevo není zatím zcela jasné, zda se jedná o původní účinek anthokyanů nebo jejich metabolitů, které vznikají v důsledku působení střevní mikroflóry. Takto vzniklé metabolity mohou přispívat k prevenci vzniku rakoviny konečníku a tlustého střeva (Pascual-Teresa a Sanchez-Ballesta, 2008).

Příznivý vliv anthokyanů se také projevuje při onemocnění cukrovkou, kdy ovlivňují vstřebávání glukosy a chrání buňky pankreatu. Mají protizánětlivé a chemoterapeutické

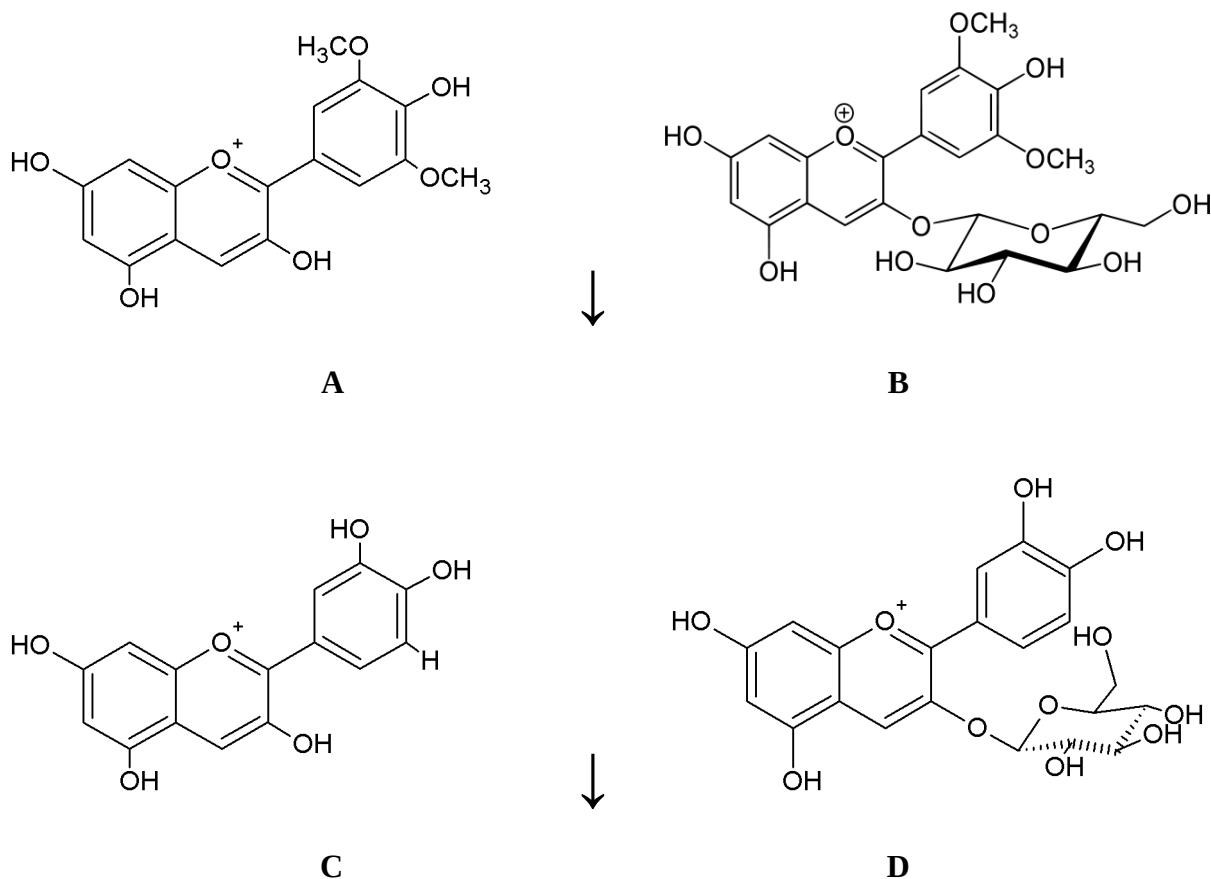
vlastnost. Ochraňují játra a kladně ovlivňují zrak, především příznivě působí na noční vidění (Pascual-Teresa a Sanchez-Ballesta, 2008).

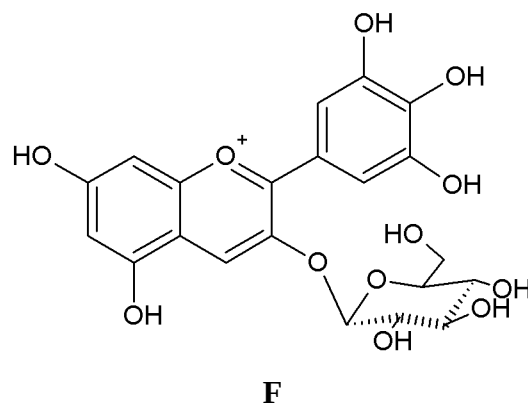
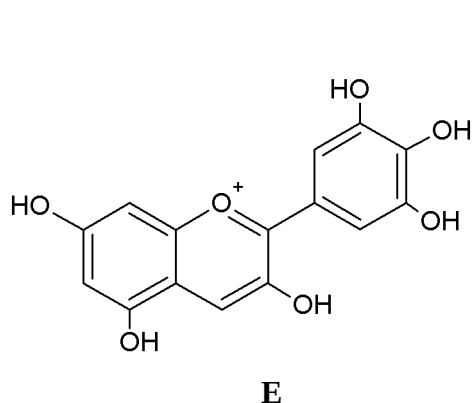
2.7 Antioxidační kapacita anthokyanů

Obecně antioxidační kapacita anthokyanů stoupá s nárůstem počtu navázaných hydroxylových skupin. Zkoumáním schopnosti anthokyanů vychytávat volné radikály bylo zjištěno, že největší antioxidační schopnost vykazuje anthokyanidin delfinidin (Azevedo a kol., 2010). Jako jediný totiž obsahuje hydroxyskupinu na pozici 3', 4' a 5' v B kruhu základní struktury (Pascual-Teresa a Sanchez-Ballesta, 2008).

Obrázek č. 10 znázorňuje postupně narůstající antioxidační kapacitu a schopnost vychytávat volné radikály jednotlivých anthokyanidinů a jejich glykosidů (Azevedo a kol., 2010).

Obrázek č. 10 - Vyrůstající antioxidační kapacita (A) Malvidin, (B) Malvidin-3-glukosid, (C) Kyanidin, (D) Kyanidin-3-glukosid, (E) Delfinidin, (F) Delfinidin-3-glukosid (Azevedo a kol., 2010).





Nejen antioxidační kapacita, ale také schopnost vázat na sebe těžké kovy (železo, zinek a měď) je důležitou předností anthokyanů. Dále jsou induktory antioxidačních enzymů jako je superoxid dismutáza a glutathion-S-transferáza. Anthokyaniny také podporují příznivé účinky jiných flavonoidů a působí jako synergisté vitamínu C (Hosseinian a kol., 2008).

Mezi obilovinami se antioxidační schopností vyznačují hlavně barevná rýže, pšenice, purpurová kukuřice a černý čirok (obrázek č. 11). U černého čiroku je schopnost vychytávat volné radikály připisována přítomnosti 3-deoxyanthokyanu. Některé studie popisují, že za antioxidační kapacitu otrub červené zimní pšenice, jsou zodpovědné karotenoidy spolu s kyselinou ferulovou a tokoferoly (Hu a kol. 2007).

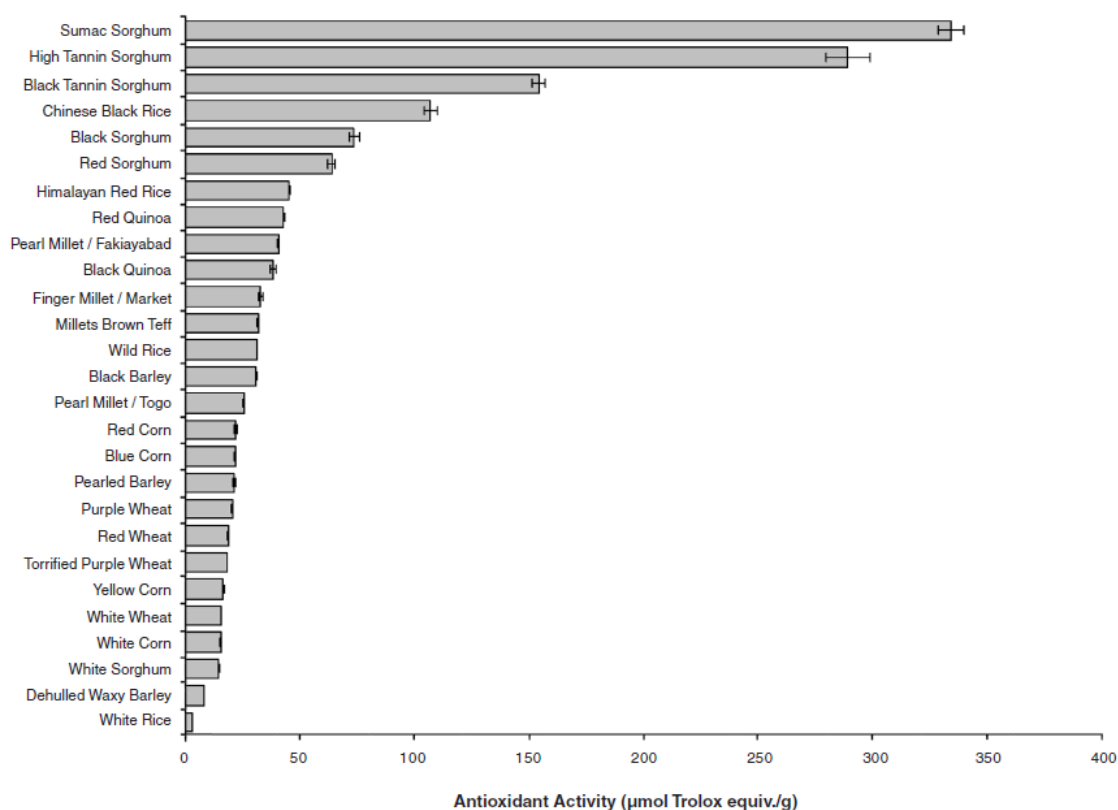
Nově získané údaje poukazují na možnost značného nedocení celkové antioxidační kapacity u obilovin, a to díky existenci neextrahovatelných fenolických komplexů (Hu a kol. 2007).

2.8 Chromatografie

Chromatografie patří mezi separační metody analytické chemie. Svým určením jde o kvalitativní i kvantitativní analýzy vzorku (Klouda, 2003).

Principem chromatografie je vnášení vzorku mezi dvě navzájem nemísitelné fáze - stacionární a mobilní fázi. Vzorek je umístěn na začátek stacionární fáze. Pohybem fáze mobilní přes fázi stacionární je vzorek v této soustavě unášen a zachytáván na stacionární fázi. Takto dochází k postupné separaci částí vzorku. Některé části jsou stacionární fází poutány silněji, kdežto jiné části jsou méně zachytné. Dříve se na konec stacionární fáze dostávají složky, které jsou méně zadržované (Klouda, 2003).

Obrázek č. 11 - Antioxidační kapacita obilovin (Dykes a kol., 2007).



2.8.1 Rozdělení chromatografických metod

Chromatografické metody jsou velmi různorodé, z tohoto důvodu se dělí podle několika hledisek.

- Dělení dle skupenství mobilní fáze:
 - Kapalinová chromatografie (LC) - mobilní fáze je kapalina
 - Plynová chromatografie (GC) - mobilní fáze je plyn
- Dělení dle uspořádání stacionární fáze:
 - Kolonová chromatografie - stacionární fáze je umístěna v koloně
 - Plošné techniky
 - Papírová chromatografie (PC) - stacionární část je součástí chromatografického papíru
 - Tenkovrstvá chromatografie (TLC) - umístění stacionární fáze je na pevném plochém podkladu (skleněná deska, hliníková folie)
- Dělení podle povahy děje, který převládá při separaci (převládající fyzikálně-chemický jev):

- Rozdělovací chromatografie - separace je založena na různé rozpustnosti složek vzorku ve stacionární i mobilní fázi.
- Adsorpční chromatografie - separace probíhá díky různé schopnosti složek vzorku poutat se na povrch stacionární fáze.
- Ionově-výměnná chromatografie - o separaci látek rozhodují rozdíly ve velikosti elektrostatických přitažlivých sil mezi funkčními skupinami stacionární fáze a ionty vzorku.
- Gelová chromatografie - složky vzorku jsou separovány na základě své velikosti na pórovité stacionární fázi (gel), kdy se menší molekuly zdržují v pórech gelu déle.
- Afinitní chromatografie - ze vzorku jsou na stacionární fázi vázány pouze určité složky, ke kterým má stacionární fáze úzce selektivní vztah (Klouda, 2003).

2.8.2 Vysoce účinná kapalinová chromatografie

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) byla pro detekci flavonoidů poprvé použita v roce 1976. HPLC se používá pro kvantitativní i kvalitativní stanovení anthokyanových barviv. Samotnému chromatografickému měření předchází čištění a koncentrování vzorku. Nejvíce se uplatňuje zachytávání anthokyanů na práškový polyamid, polyvinylpyrrolidon nebo na ionexy v katexové podobě. V těchto případech se využívá tvorby pevných vodíkových můstků mezi adsorbentem a molekulou anthokynů. U katexu se reverzibilně navazují flavyliové kationy anthokyanů (Balík, 2010).

Kapalinový chromatograf je složen z pěti hlavních částí, jejichž funkce je transport mobilní fáze, který zajistí čerpadlo s čidlem pro měření tlaku a zásobník mobilní fáze. Dávkování vzorku je manuální nebo automatické injekčními stříkačkami z inertního materiálu. Separace látek probíhající v kolonách, které jsou vyrobeny z nerezové oceli. Pro detekci látek jsou používány detektory, které by měly být selektivní pro analyt a málo citlivé k mobilní fázi. Nejběžnějším detektorem je fotometrický detektor, který měří absorbanci eluátu vycházejícího z kolony. Registrace signálu s následným vyhodnocením chromatografického záznamu probíhá na počítači (Klouda, 2003; Forejtarová, 2010; Drdák, 1989).

3. Cíle práce

Cíle této bakalářské práce jsou identifikace jednotlivých anthokyanů a kvantifikace anthokyanů u pšenice s modře zbarveným zrnem, a to u vzorků získaných během pěti let jdoucích po sobě. Dále také doplnění stávajících informací k problematice anthokyanů u pšenice s modrým zrnem.

4. Materiál a metodika

4.1 Materiál

4.1.1 Rostlinný materiál

Pro analýzu byla použita zrna pšenice s modrým zrnem UR63046, druhu *Triticum aestivum* L., která byla vypěstována ve výzkumném ústavu v Kroměříži. Zrna byla získána ze sklizní během pěti let jdoucích po sobě, a sice roky 2008, 2009, 2010, 2011 a 2012.

4.1.2 Chemikálie a činidla

- Methanol, gradient grade pro HPLC LiChrosolv, Merck (Darmstadt, Německo)
- Methanol, pro analýzy EMPARTA, Merck (Darmstadt, Německo)
- Acetonitril, hypergrade pro LC-MS LiChrosolv, Merck (Darmstadt, Německo)
- Kyselina mravenčí, 98-100% Suprapur, Merck (Darmstadt, Německo)
- Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-karboxylová kyselina), 97%, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

4.1.3 Standardy

- Kyanidin-3-glukosid, čistota $\geq 96\%$, Extrasynthese (Genay, Francie)
- Kyanidin-3-rutinosid, čistota $\geq 96\%$, Extrasynthese (Genay, Francie)
- Peonidin-3-glukosid, čistota $\geq 95\%$, Extrasynthese (Genay, Francie)
- Peonidin-3-rutinosid, čistota $\geq 95\%$, Extrasynthese (Genay, Francie)
- Delfinidin-3-glukosid, čistota $\geq 95\%$, Extrasynthese (Genay, Francie)
- Delfinidin-3-rutinosid, čistota $\geq 95\%$, Extrasynthese (Genay, Francie)
- Pelargonidin-3-glukosid, čistota $\geq 95\%$, Extrasynthese (Genay, Francie)
- Pelargonidin-3-rutinosid, čistota $\geq 90\%$, Extrasynthese (Genay, Francie)

4.1.4 Přístroje a zařízení

- HPLC chromatograf Agilent 1100, Agilent Technologies (Palo Alto, USA)
 - binární pumpa (G1312A)
 - autosampler (G1330B)
 - vakuový odplyňovač (G1322A)
 - DAD detektor (G1315A)
- HPLC kolona Supelcosil LC-18-DB, 3 μm , 150 mm $\times$ 4,6 mm, Supelco (Bellefonte, USA)
- SPE kolona 1g C18 Sep-Pak cartridge, Waters Corporation (Milford, MA, USA)
- Destilovaná voda pro přípravu roztoků byla připravena pomocí přístroje Mili-Q water (Millipore, Bedford, USA)
- Laboratorní mlýnek typ 3100, Perten instruments (Hamburg, Německo)
- Laboratorní sklo

4.2 Metodika

4.2.1 Extrakce vzorků

Pro extrakci vzorků byla použita optimalizovaná metoda dle Mozetiče a kol. (2002) a Može a kol. (2011). Vzorek 10 g pomleté pšenice se extrahoval v 50 ml MeOH po dobu 3 hodin při laboratorní teplotě bez přístupu světla. Následovalo odstředění na odstředivce při 4000g čímž se oddělil supernatant od pelety. Následně byly vzorky opětovně reextrahovány po dobu 2 hodin v 25 ml MeOH a opět odstředěny. Extrakty se odpařovaly do sucha při 30°C na vakuové rotační odparce.

4.2.2 Čištění vzorků

Postup čištění vzorků byl proveden podle Može a kol. (2011). Vysušené extrakty pšenice byly rozpuštěny v 7 ml 3% kyseliny mravenčí. Před použitím byla SPE kolona aktivována pomocí 5 ml 3% kyseliny mravenčí a 5 ml MeOH. Následně se na kolonu nanese roztok 7 ml 3% kyseliny mravenčí s rozpuštěným extraktem ze vzorku pšenice. Poté se kolona s naneseným vzorkem promyla 6 ml 3% kyseliny mravenčí a vysušila se proudem vzduchu. V dalším kroku byla kolona promyta 5 ml MeOH, čímž došlo k rozpuštění a vymytí přítomných anthokyanů ze stacionární fáze kolony. Roztok MeOH s anthokyanem byl zachycen do odpařovací baňky a vysušen do sucha na vakuové rotační

odparce při 30°C. Před vlastním měřením byly extrakty rozpuštěny v mobilní fázi a přefiltrovány pomocí 0,45µm filtru. Takto vyčištěné extrakty byly přímo analyzovány na HPLC.

4.2.3 HPLC analýza

HPLC analýza pro stanovení anthokyanů byla založena na upravené metodě od Naczka a Shahidiho (2006) a Hosseiniana a kol. (2008). Vstříkovaný objem do kolony byl 20µl, teplota v koloně 40°C a doba ekvilibrace mezi jednotlivými cykly byla 5 minut. Gradient mobilní fáze A (4,5% kyselina mravenčí) a mobilní fáze B (MeOH/ACN, 90:10, v/v) byl 0 - 10 min, 10% B; 10 - 15 min, 10 - 32% B; 15 - 30 min, 32 - 50% B; 30 - 35 min, 50 - 100% B; 35 - 50 min, 100% B; 50 - 55 min, 100 - 10% B. Průtok mobilní fáze byl 0,8ml/min v intervalu 0 - 15 minut a od 15,5 minuty byl průtok 1ml/min. Měření anthokyanů probíhalo při vlnové délce 520nm.

4.2.4 Statistika

Všechna měření extraktů ze vzorků pšenice byla provedena třikrát. Získaná data byla analyzována pomocí softwaru Unistat (verze 6.0, Unistat Ltd., London, UK). Data byla popsána pomocí $\pm$ směrodatné odchylky (SD).

5. Výsledky

Získané hodnoty z chromatogramu, respektive velikost plochy peaků a retenční časy vzorků (graf č. 2) byly porovnávány s hodnotami roztoků standardních látek jednotlivých anthokyanů (graf č. 1).

Ke zjištění, které peaky chromatogramu odpovídají daným anthokyanům, bylo použito metody přídavku standardů (spikování). To znamená, že koncentrace anthokyanu, u kterého se provádí identifikace, ve vzorku přímo úměrně naroste s přidaným množstvím standardu do extraktu. Tento krok se projeví na výsledném chromatogramu v podobě zvětšení plochy peaku identifikované látky. Pokud odpovídá retenční čas peaku spikovaného vzorku retenčnímu času čistého standardu dá se s jistotou potvrdit přítomnost dané látky, která odpovídá požadovanému standardu (tabulka č. 5).

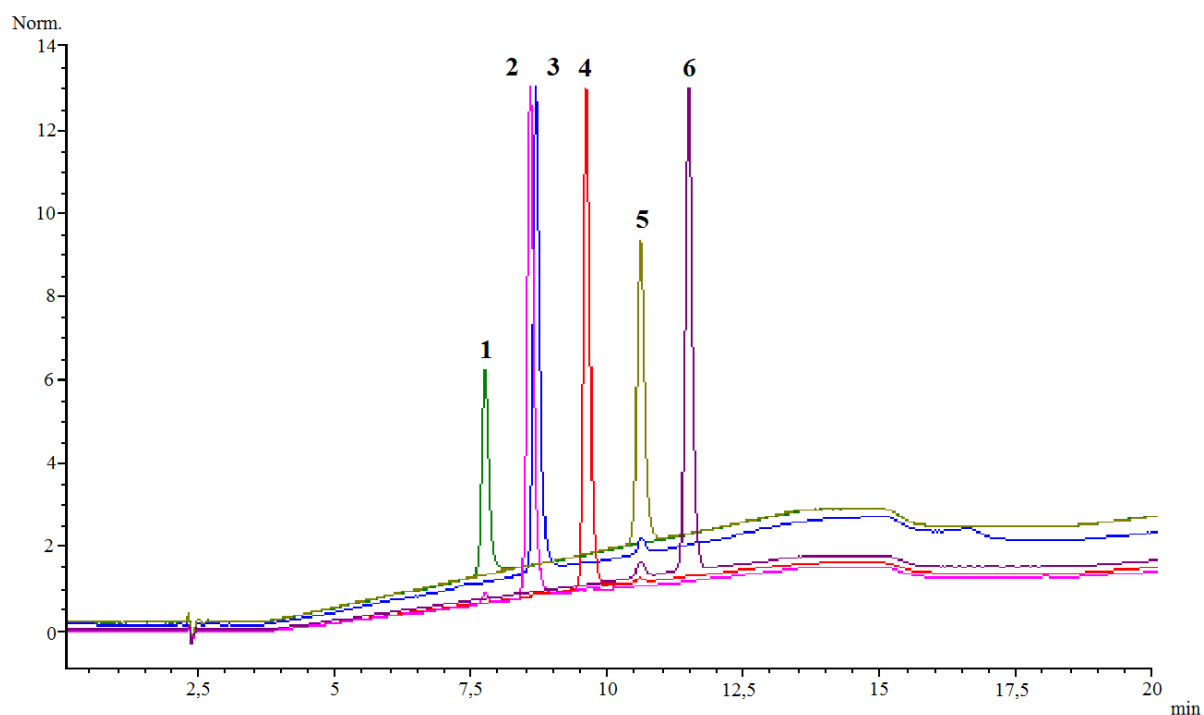
Ve vzorcích pšenice s modře zbarveným zrnem z let 2008, 2009, 2010, 2011 a 2012 byla tímto způsobem prokázána přítomnost těchto anthokyanů: delfinidin-3-glukosid, delfinidin-3-rutinosid, kyanidin-3-glukosid, kyanidin-3-rutinosid, peonidin-3-glukosid, peonidin-3-rutinosid (graf č. 2). Dále se prokázala přítomnost dvou neznámých anthokyanů, jejich identifikace není možná, protože retenční časy se neshodují s žádným z retenčních časů standardů.

Celkové množství anthokyanů bylo zjištěno přepočtem s použitím velikosti plochy peaků vzorků na standard kyanidin-3-glukosid. Zjištěné celkové množství anthokyanů u vzorků pšenice je uvedeno v tabulce č. 4. Získané hodnoty se pohybují v rozmezí od 47,5 mg/kg do 126,5 mg/kg. Průměrné celkové množství anthokyanů ve vzorcích ze všech sklizní je 67,9 mg/kg.

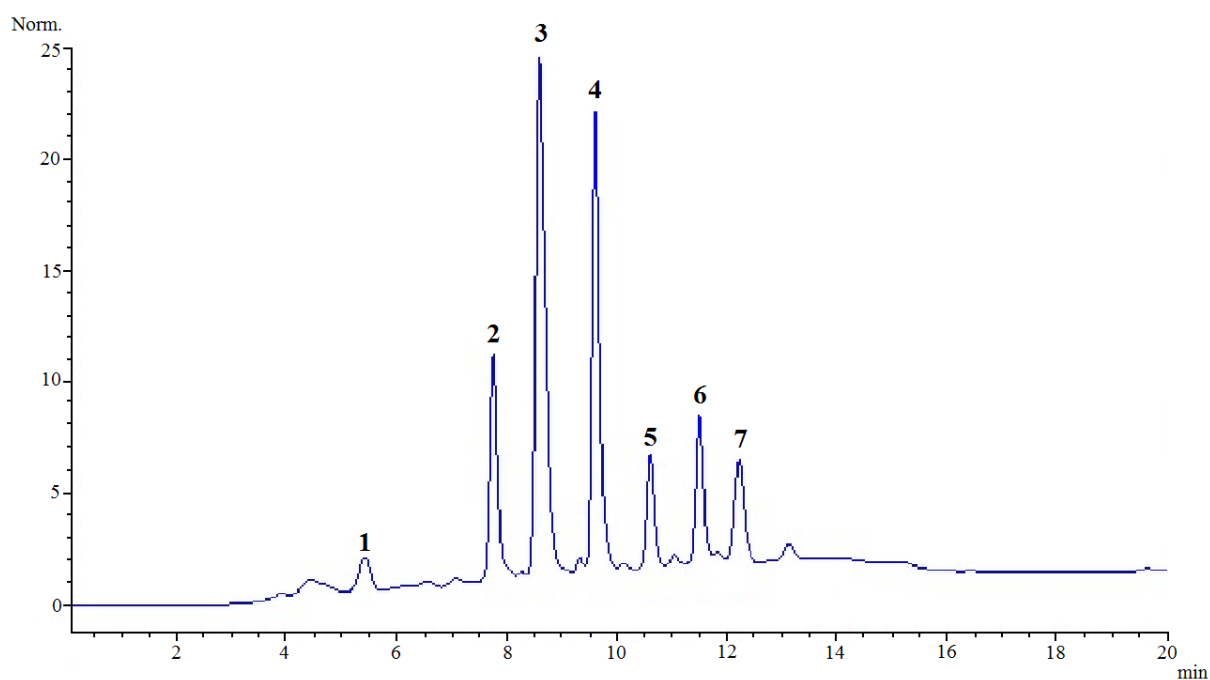
Tabulka č. 4 - Celkové množství anthokyanů ve vzorcích modré pšenice.

Rok sklizně vzorku	Celkové množství anthokyanů v mg/kg
2008	47,5±1,2
2009	64,7±1,4
2010	47,9±1,1
2011	52,8±1,1
2012	126,5±2,6
Průměr	67,9

Graf č. 1 - Chromatogram standardů (1 Delfinidin-3-glukosid; 2 Delfinidin-3-rutinosid; 3 Kyanidin-3-glukosid; 4 Kyanidin-3-rutinosid; 5 Peonidin-3-glukosid; 6 Peonidin-3-rutinosid).



Graf č. 2 - Chromatogram vzorku (1 Neznámý anthokyan; 2 Delfinidin-3-glukosid; 3 Delfinidin-3-rutinosid + Kyanidin-3-glukosid; 4 Kyanidin-3-rutinosid; 5 Peonidin-3glukosid; 6 Peonidin-3-rutinosid; 7 Neznámý anthokyan).



Tabulka č. 5 - Zaznamenané retenční časy standardních roztoků a zjištěných anthokyanů.

Číslo peaku	Identifikovaný anthokyan	Retenční čas vzorku	Retenční čas standardu
1	Neznámý anthokyan	5,400	-
2	Delfinidin-3-glukosid	7,750	7,760
3	Delfinidin-3-rutinosid	8,577	8,583
	Kyanidin-3-glukosid		8,691
4	Kyanidin-3-rutinosid	9,600	9,618
5	Peonidin-3-glukosid	10,593	10,608
6	Peonidin-3-rutinosid	11,487	11,482
7	Neznámý anthokyan	12,200	-

Poznámka: Peak číslo 3 je směsí delfinidin-3-rutinosidu a kyanidin-3-glukosidu.

6. Diskuse

Studie od Abdel-Aala a kol. (2006) prezentuje velmi široké rozmezí množství anthokyanů, které jsou obsaženy v zrnech různých druhů obilnin (rýže, kukuřice, pšenice, ječmen). Podle jejich zjištění se toto množství pohybuje od 7 do 3276 mg/kg pšenice. Ve vzorcích použitých pro tuto práci se hodnoty celkového množství anthokyanů pohybují od 48 do 127 mg/kg pšenice. Zjištěné hodnoty celkového obsahu anthokyanů ve vzorcích pšenice se od sebe významně liší. V zrnech pšenice je obsah anthokyanů nestabilní a proměnlivý v širokém rozmezí, které je závislé na mnoha faktorech (např.: počasí a teplotní podmínky při růstu pšenice, rozsah zavlažování, množství UV-B záření a vlhkost při sklizni pšenice) (Sharma a kol., 1998; Cavalcanti a kol., 2011). Z tohoto důvodu je možné, že obiloviny mají dvojnásobně až trojnásobně zvýšené nebo snížené množství anthokyanů v průběhu několika let (Abdel-Aal a Hucl, 2003). Tuto skutečnost potvrzují výsledky našich analýz vzorků z let 2009 a 2012, které se kvantitou anthokyanů znatelně odlišují od vzorků, které byly vypěstovány v letech 2008, 2010 a 2011.

Abdel-Aal a kol. (2006) ve své studii zaznamenali celkový obsah anthokyanů u pšenice s modrým zrnem 212 mg/kg. Tato hodnota se odlišuje od jejich předchozí studie, kde byl celkový obsah anthokyanů stanoven 139 - 164 mg/kg (vzorky z let 1996, 1997, 1998), což je více, než bylo zjištěno u našich vzorků (Abdel-Aal a Hucl, 2003).

Celkový obsah anthokyanů se také odlišuje podle analyzované části zrna (např.: otruby, mouka, šrot). Nejvyšší koncentrace anthokyanů je v otrubách a nejnižší v mouce, kde se pravděpodobně jedná o kontaminaci z otrub pšenice, která vzniká při mletí (Abdel-Aal a Hucl, 2003). Abdel-Aal a Hucl (2003) ve své studii uvádí průměrný obsah anthokyanů v otrubách pšenice s modře zbarveným zrnem 453 mg/kg.

Výsledky studie Siebenhandlové a kol. (2007) udávají nejvyšší celkový obsah anthokyanů (74 mg/kg) právě u pšenice s modrým zrnem. Zároveň poukazují na stanovený nižší obsah anthokyanů, než zaznamenali Abdel-Aal a kol. (2006) a Abdel-Aal a Hucl (2003), což dokazuje ovlivňování celkového obsahu anthokyanů genotypy pšenice a vlivy životního prostředí (Siebrnhandl a kol., 2007).

V porovnání s obsahem anthokyanů u pšenice s purpurovým zrnem jsou výsledky celkového obsahu anthokyanů u pšenice s modrým zrnem vyšší (Abdel-Aal a Hucl, 2003). To může být důsledek uložení anthokyanů v pšeničném zrně. U pšenice s modrým zrnem jsou anthokyaniny lokalizovány v aleuronové vrstvě, zatím co u pšenice s purpurovým zrnem anthokyaniny najdeme v perikarpu. Anthokyaniny uložené v perikarpu pšenice s purpurovým

zrnem jsou náchylnější na vlivy vnějšího prostředí a snadněji podléhají degradačním procesům (Abdel-Aal a Hucl, 2003). Celkový obsah anthokyanů je např. u pšenice s červeným zrnem relativně stabilní i po několik sklizní, ovšem koncentrace anthokyanů jsou velmi nízké (Abdel-Aal a Hucl, 2003).

Kvalitativním zastoupením anthokyanů u pšenice s modrým zrnem se zabývá studie od Hu a kol. (2007), kde svými výsledky analýz dokazují přítomnost 4 majoritních anthokyanů, a sice kyanidin-3-glukosidu, pelargonidin-3-glukosidu, kyanidin-3-galaktosidu, a peonidin-3-glukosidu. Hu a kol. (2007) dále prokázali přítomnost 2 neznámých látek, které by mohly na základě UV-viditelného spektra být anthokyany. Tato úvaha je podložena retenčními časy a vlnovou délkou, což dokazují, že by se teoreticky mohlo jednat o glykosidy delfinidinu (Escribano-Bailón a kol., 2004; Hu a kol., 2007).

Abdel-Aal a kol. (2006) uvádí, kromě již zmíněných majoritních anthokyanů, také přítomnost delfinidin-3-glukosidu a delfinidin-3-rutinosidu jako hlavních anthokyanů pšenice s modrým zrnem. Výsledky dřívější studie Abdel-Aala a Hucla (2003) poukazují na významné zastoupení kyanidin-3-glukosidu a peonidin-3-glukosidu. V nízkém množství byly detekovány i další anthokyany. Bohužel mnoho hlavních anthokyanů nemohlo být identifikováno kvůli omezené dostupnosti standardů (Abdel-Aal a Hucl, 2003; Knievel a kol., 2009). Výsledky analýzy našich vzorků pšenice prokazují přítomnost delfinidin-3-glukosidu, delfinidin-3-rutinosidu, kyanidin-3-glukosidu a kyanidin-3-rutinosidu ve významných koncentracích. Výsledky studie od Knievela a kol. (2009) potvrzují námi získané hodnoty. Jako nejvíce zastoupené anthokyany u pšenice s modrým zrnem identifikovali delfinidin-3-rutinosid (hodnoty od 30 mg/kg do 44 mg/kg) a delfinidin-3-glukosid (od 22 mg/kg do 29 mg/kg). Dále potvrdili přítomnost kyanidin-3-glukosidu a kyanidin-3-rutinosidu. Výsledky našich analýz také dokazují přítomnost peonidin-3-glukosidu a peonidin-3-rutinosidu. Neprokázalo se zastoupení pelargonidin-3-glukosidu a kyanidin-3-galaktosidu.

Zastoupení jednotlivých anthokyanů je odlišné u pšenice s modrým a purpurovým zrnem. Nejčastější anthokyan pšenice s purpurovým zrnem je kyanidin-3-glukosid, který je u pšenice s modrým zrnem druhým nejčastěji se vyskytujícím anthokyanem (Hu a kol., 2007). U pšenice s purpurovým zrnem byla dále prokázána přítomnost acylovaného anthokyanu kyanidin-sukcinil-glukosidu (Knievel a kol., 2009).

7. Závěr

V této práci jsme se zabývali stanovením celkového obsahu anthokyanů modré pšenice a stanovením přítomnosti jednotlivých anthokyanů. Z informací získaných studiem dostupné literatury byla objasněna chemická struktura anthokyanů, vlivy vnějšího prostředí na jejich stabilitu, antioxidační kapacita těchto barviv a vliv na lidský organismus.

Měření bylo provedeno u 5 vzorků pšenice s modře zbarveným zrnem. Vzorky pochází z let 2008, 2009, 2010, 2011, 2012. Ve všech vzorcích byla prokázána přítomnost těchto anthokyanů: delfinidin-3-glukosid, delfinidin-3-rutinosid, kyanidin-3-glukosid, kyanidin-3-rutinosid, peonidin-3-glukosid, peonidin-3-rutinosid. Celkový obsah anthokyanů ve vzorku z roku 2008 byl stanoven 47,5 mg/kg, toto množství je nejnižší. Ve vzorku z roku 2009 byl naměřen celkový obsah anthokyanů 64,7 mg/kg, vzorek z roku 2011 obsahoval 52,8 mg/kg anthokyanů a ve vzorku z roku 2012 byl stanoven celkový obsah anthokyanů 126,5 mg/kg, tato hodnota byla nejvyšší.

Z těchto údajů vyplývá, že obsah anthokyanů v pšenici je proměnlivý, což je zřejmě způsobeno vlivy prostředí, které působí na pšenici během pěstování a tím pádem dochází k ovlivnění celkového obsahu anthokyanů.

Toto téma jsem zvolila, protože se zajímám o zdravou výživu, ráda získávám nové informace a chtěla bych svým výzkumem přispět k dodání potřebných informací o zastoupení jednotlivých anthokyanů v obilovinách, zejména tedy u pšenice, kde zatím není mnoho poznatků.

8. Použitá literatura

ABDEL-AAL, El-Sayed M. a Pierre **HUCL**. Composition and Stability of Anthocyanins in Blue-Grained Wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, vol. 51, issue 8. DOI: 10.1021/jf021043x.

Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf021043x>

ABDEL-AAL, El-Sayed M., Atef A. **ABOU-ARAB**, Tamer H. **GAMEL**, Pierre **HUCL**, J. Christopher **YOUNG** a Iwona **RABALSKI**. Fractionation of Blue Wheat Anthocyanin Compounds and Their Contribution to Antioxidant Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008-12-10, vol. 56, issue 23.

DOI: 10.1021/jf802168c.

Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf802168c>

ABDEL-AAL, El-Sayed M., J. Christopher **YOUNG** a Iwona **RABALSKI**. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *Journal of Agricultural and Food*. 2006, č. 54.

ANDERSEN, Øyvind M a Kenneth R **MARKHAM**. *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. Boca Raton, FL: CRC, Taylor, 2006, 1237 p. ISBN 08-493-2021-6.

AREA viva. **VESELÝ**, Vojtěch. *Tradiční příprava kukuřice, komunitní život a semenářství* [online]. 2012 [cit. 2014-03-06].

Dostupné z: <http://www.areaviva.cz/ZE-ZIVOTA/Tradicni-priprava-kukurice-komunitni-zivot-a-semenareni.html>

AZEVEDO, Joana, Iva **FERNANDES**, Ana **FARIA**, Joana **OLIVEIRA**, Ana **FERNANDES**, Victor de **FREITAS** a Nuno **MATEUS**. Antioxidant properties of anthocyanidins, anthocyanidin-3-glucosides and respective portisins. *Food Chemistry*. 2010-03-15, vol. 119, issue 2.

DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.06.050.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814609008607>

BALÍK, Josef. *Anthokyaninová barviva v hroznech a vínech: Anthocyanin pigments in grapes and wines*. Vyd. 1. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2010. Folia Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis. ISBN 978-80-7375-412-9.

CAVALCANTI, Rodrigo N., Diego T. **SANTOS** a Maria Angela A. **MEIRELES**. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems- An overview. *Food Research International*. 2011, vol. 44, issue 2. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.12.007.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996910004758>

CORTÉS, G.A., **M.Y. SALINAS**, E. San **MARTÍN-MARTINEZ** a F. **MARTÍNEZ-BUSTOS**. Stability of anthocyanins of blue maize (*Zea mays* L.) after nixtamalization of separated pericarp-germ tip cap and endosperm fractions. *Journal of Cereal Science*. 2006, vol. 43, issue 1.
DOI: 10.1016/j.jcs.2005.05.003.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521005000731>

DELGADO-VARGAS, Francisco a Octavio **PAREDES-LOPEZ**. *Natural colorants for food and nutraceutical uses*. Boca Raton: CRC Press, 2003. Food science and technology (CRC Press). ISBN 15-871-6076-5.

DRDÁK, Milan. *Technológia rastlinných neúdržných potravín*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1989. ISBN 80-050-0121-5.

DYKES, Chun, Yi-Zhong **CAI**, Wende LI, Harold **CORKE** a David D. **KITTS**. Phenolic Compounds in Cereal Grains and Their Health Benefits. *Cereal Foods World*. 2007, vol. 104, issue 3.
DOI: 10.1094/CFW-52-3-0105.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607000465>

ESCRIBANO-BAILÓN, Ma Teresa, Celestino **SANTOS-BUELGA** a Julián C. **RIVAS-GONZALO**. Anthocyanins in cereals. *Journal of Chromatography A*. 2004, vol. 1054. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.08.152.
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730401564X>

FOREJTAROVÁ, Darina. *Stanovení anthokyanových barviv ve vybraných druzích ovoce*. Brno, 2010. Diplomová práce. Vysoké učení technické.

HOSSEINIAN, Farah S., Wende **LI** a Trust **BETA**. Measurement of anthocyanins and other phytochemicals in purple wheat. *Food Chemistry*. 2008, vol. 109, issue 4. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.12.083.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608000964>

HU, Chun, Yi-Zhong **CAI**, Wende **LI**, Harold **CORKE** a David D. **KITTS**. Anthocyanin characterization and bioactivity assessment of a dark blue grained wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Hedong Wumai) extract. *Food Chemistry*. 2007, vol. 104, issue 3. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.12.064.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607000465>

KAY, Colin D. Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans. *Nutrition Research Reviews*. 2006, vol. 19, issue 01.

DOI: 10.1079/NRR2005116.

Dostupné z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0954422406000114

KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003.

ISBN 80-863-6907-2.

KNIEVEL, D.C., E.-S.M. **ABDEL-AAL**, I. **RABALSKI**, T. **NAKAMURA** a P. **HUCL**. Grain color development and the inheritance of high anthocyanin blue aleurone and purple pericarp in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science*. 2009, vol. 50, issue 1.

DOI: 10.1016/j.jcs.2009.03.007.

MOZETIČ, Branka, Polonca **TREBŠE** a Janez **HRIBAR**. Biotechnol. Determination and Quantitation of Anthocyanins and Hydroxycinnamic Acids in Different Cultivars of Sweet Cherries (*Prunus avium* L.) from Nova Gorica Region Slovenia. *Food Technol. Biotechnol.* 2002.

MOŽE, Špela, Tomaž **POLAK**, Lea **GAŠPERLIN**, Darinka **KORON**, Andreja **VANZO**, Nataša **POKLAR ULRIH** a Veronika **ABRAM**. Phenolics in Slovenian Bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) and Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011-07-13, vol. 59, issue 13.

DOI: /10.1021/jf200765n.

Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf200765n>

NACZK, Marian a Fereidoon **SHAHIDI**. Corrigendum to “Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis” [J. Pharm. Biomed. Anal. 41 (2006) 1523–1542]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007, vol. 43, issue 2. DOI: 10.1016/j.jpba.2006.09.034

PASCUAL-TERESA, Sonia a Maria Teresa **SANCHEZ-BALLESTA**. Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemistry Reviews*. 2008, vol. 7, issue 2.

DOI: 10.1007/s11101-007-9074-0.

Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11101-007-9074-0>

SHARMA, P.K., Preetah **ANAND**, Sangeeta **SANKHALKR** a Rajendra **SHEYE**. Photochemical and biochemical changes in wheat seedlings exposed to supplementary ultraviolet-B radiation. *Plant Science*. 1998, č. 132.

SIEBRNHANDL, Heinrich **GRAUSGRUBER**, Nicoletta **PELLEGRINI**, Daniele **DEL RIO**, Vincenzo **FOGLIANO**, Rita **PARENICE** a Emmerich **BERGHOFER**. Phytochemical Profile of Main Antioxidants in Different Fractions of Purple and Blue Wheat, and Black Barley. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2007, č. 21.

VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin* 3. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002.

ISBN 80-866-5903-8.

Stanovení anthokyanů ve vybraných druzích pšenice s netradičně zabarveným zrnem

Radoňová, L.

Abstrakt

Anthokyany jsou důležitými antioxidanty pro lidský organismus. Denně je přijímáme v ovoci a zelenině. Existují ale i jiné další zdroje, které jsou bohaté na obsah těchto cenných látek, jako například obilniny s barevným zrnem. Anthokyany mají velký význam také v potravinářském průmyslu, kde se uplatňují jako hodnotný zdroj přírodních barviv.

Cíle této práce byly kvantifikace anthokyanů u pšenice s modře zbarveným zrnem a identifikace jednotlivých anthokyanů u vzorků získaných během pěti let jdoucích po sobě, dále doplnění stávajících informací k problematice anthokyanů u pšenice s modrým zrnem.

Stanovení zastoupení jednotlivých anthokyanů bylo provedeno měřením extrahovaných vzorků na HPLC chromatografu. Celkový obsah anthokyanů byl získán přepočtem údajů získaných z chromatogramu na standard kyanidin-3-glukosid.

Získané hodnoty celkového obsahu anthokyanů se pohybují v rozmezí od 47,5 mg/kg do 126,5 mg/kg pšenice. V pšenici byla prokázána přítomnost delfinidin-3-glukosidu, delfinidin-3-rutinosidu, kyanidin-3-glukosidu, kyanidin-3-rutinosidu, peonidin-3-glukosidu a peonidin-3-rutinosidu.

Klíčová slova: flavonoidy; chromatografie; identifikace; kvantifikace; pigmenty

Content of anthocyanins in kernels of selected coloured wheat cultivars

Radoňová, L.

Abstract

Anthocyanins represent important antioxidants for a human organism. People consume them usually with fruit and vegetable. But there are other sources rich in content of these precious substances, such as coloured kernel cereals. Anthocyanins have also a significant role in the food industry as a valuable source of natural colorings.

The aim of this thesis was the quantification of anthocyanins in the blue kernel wheat, the identification of particular anthocyanins in the samples obtained during five subsequent years and completion of the current information basis for the problematics of anthocyanins in the blue kernel wheat.

The specification of representation of particular anthocyanins was realized by measuring extracted samples on a HPLC chromatograph. The total content of anthocyanins was acquired by the conversion of the chromatogram's data to standard cyanidin 3-glucoside.

Obtained data of the total content of anthocyanins range from 47,5 mg/kg to 126,5 mg/kg. There was proved the presence of delphinidin 3-glucoside, delphinidin 3-rutinoside, cyanidin 3-glucoside, cyanidin 3-rutinoside, peonidin 3-glucoside and peonidin 3-rutinoside in the wheat.

Keywords: flavonoids; chromatography; identification; quantification; pigments

PROHLÁŠENÍ AUTORA

Jsem si vědom, že

- odevzdáním závěrečné práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a to i bez ohledu na výsledek její obhajoby
- moje závěrečná práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitní databázi a bude veřejně přístupná k nahlédnutí
- na moji závěrečnou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, především ustanovení § 35 odst. 3 tohoto zákona, tj. o užití tohoto díla.

Jméno a příjmení autora: Lenka Radoňová

Název práce: Stanovení anthokyanů ve vybraných druzích pšenic s netradičně zabarveným zrnem

V Brně dne:

.....

Podpis autora

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

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

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

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

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

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

3) zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, ustanovení § 60:

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

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

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

POTVRZENÍ AUTORA

Svým podpisem potvrzuji, že písemná verze mé bakalářské práce je shodná se souborem v pdf formě uloženým pod stejným názvem v Informačním systému STAG, příp. na předaném nosiči (CD, DVD).

Jméno a příjmení autora: Lenka Radoňová

Název práce: Stanovení anthokyanů ve vybraných druzích pšenice s netradičně zabarveným zrnem

V Brně dne:

.....

Podpis autora