

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ

KATEDRA CHEMIE

Chemické vlastnosti antokyaninů využitelné k jejich důkazu a stanovení
v potravinách.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Karolína Sušanková

Učitelství pro střední školy (chemie – biologie)

Vedoucí práce: doc. Ing. Zdeněk Zloch, CSc.

Plzeň 2016

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně
s použitím uvedené literatury a zdrojů informací.

V Plzni dne

Bc. Karolína Sušanková

Touto cestou bych ráda poděkovala panu doc. Ing. Zdeňku Zlochovi, CSc. za odborné vedení, za pomoc a rady při zpracování mé diplomové práce.

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta pedagogická

Akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Karolína SUŠANKOVÁ
Osobní číslo: P14N0166P
Studijní program: N7504 Učitelství pro střední školy
Studijní obory: Učitelství biologie pro střední školy
Učitelství chemie pro střední školy
Název tématu: Chemické vlastnosti antokyaninů využitelné k jejich důkazu
a stanovení v potravinách
Zadávající katedra: Katedra chemie

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :


1. Extrahovat barviva z přírodních zdrojů (květy, ovoce).
2. Testovat chemické vlastnosti antokyaninů, využitelné při analytickém stanovení.
3. Porovnat chemické charakteristiky antokyaninů s vlastnostmi betalainů, event. karotenoidů a riboflavinu.
4. Ověřit možnosti aplikace sorpčních a chemických vlastností antokyaninů na jejich kvalitativní důkaz v potravinách.

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy: 40 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná
Seznam odborné literatury:


- DAVÍDEK J. Laboratorní příručka analýzy potravin. SNTL, Praha 1977.
ZANOTTI I. a kol.: Atheroprotective effects of (poly)phenols: a focus on cell cholesterol metabolism. Food Funct. 2015, vol. 6, issue 1, s. 13-31.
ABDENNACER B. a kol.: Determination of phytochemicals and antioxidant activity of methanol extracts obtained from the fruit and leaves of Tunisian *Lycium intricatum* Boiss. Food Chemistry. 2015, vol. 174, s. 577-584.
REQUE P. M. a kol.: Characterization of blueberry fruits (*Vaccinium* spp.) and derived products. Food Science and Technology (Campinas). 2014, vol. 34, issue 4, s. 773-779.
WANG Z., ZHANG M., WU Q. Effects of temperature, pH, and sunlight exposure on the color stability of strawberry juice during processing and storage. LWT - Food Science and Technology. 2015, vol. 60, issue 2, s. 1174-1178.

Vedoucí diplomové práce: Doc. Ing. Zdeněk Zloch, CSc.
Katedra chemie

Datum zadání diplomové práce: 15. března 2015
Termín odevzdání diplomové práce: 30. června 2016


Doc. PaedDr. Jana Coufalová, CSc.
děkanka




Doc. Mgr. Václav Richtř, CSc.
vedoucí katedry

V Plzni dne 15. března 2015

Obsah

1. ÚVOD.....	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	3
2. 1 Struktura antokyanů	3
2. 1. 1 Přehled a struktura významných antokyanidinů.....	4
2. 1. 2. Dělení antokyanů	6
2. 1. 3 Proantokyanidiny	6
2. 2 Chemické vlastnosti antokyanů	7
2. 2. 1 Vliv pH prostředí.....	7
2. 2. 2 Vliv struktury	9
2. 2. 3 Vliv teploty	9
2. 2. 4 Vliv enzymů	10
2. 2. 5 Vliv kyslíku a peroxidů	10
2. 2. 6 Vliv záření	10
2. 2. 7 Vliv oxidu siřičitého	10
2. 2. 8 Vliv cukrů a jejich rozkladných produktů	11
2. 2. 9 Reakce s jinými sloučeninami.....	11
2. 3 Výskyt antokyanů	11
2. 4 Barvení potravin	13
2. 4. 1 Přibarvování potravin	14
2. 5 Porovnání s jinými druhy barviv.....	15
2. 6 Význam antokyanů pro lidský organismus.....	16
2. 6. 1 Volné radikály.....	18
2. 6. 2 Oxidační stres	19
2. 6. 3 Antioxidanty	19
2. 7 Chromatografické metody	19
2. 7. 1 Sloupcová chromatografie (kolonová)	20
2. 7. 2 Papírová chromatografie.....	20
2. 7. 3 Chromatografie na tenké vrstvě.....	21
3. PRAKTICKÁ ČÁST	23
3. 1 Příprava tlumivých roztoků	23
3. 2 Extrakce antokyanů a příprava filtrátu.....	23
3. 3 Testování chemických vlastností antokyanů.....	24
3. 3. 1 Změna zbarvení v závislosti na pH prostředí.....	24

3. 3. 2 Změna zbarvení působením siřičitanu sodného	27
3. 3. 3 Změna zbarvení působením viditelného světla.....	28
3. 4. Červené zelí jako pH indikátor	29
3. 4. 1 Vytvoření vlastní barevné stupnice pH	29
3. 4. 2 Vytvoření vlastních pH indikátorů.....	29
3. 4. 3 Porovnání indikátoru z červeného zelí s univerzálním lakmusovým.....	32
3. 5 Dělení barviv.....	33
3. 5. 1 Chromatografie na školní křídě	33
3. 5. 2 Kruhová chromatografie na filtračním papíře.....	34
3. 5. 3 Nakapání výluhu na filtrační papír	36
3. 5. 4 Chromatografie na pruhu filtračního papíru.....	37
4. ZÁVĚR	39
5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	41
6. RESUMÉ.....	44

1. ÚVOD

Antokyany jsou velmi významná rostlinná barviva, která se vyskytují v buněčných vakuolách rostlin a šťávách z nich získaných a dávají charakteristické zbarvení listům, květům i plodům mnoha druhům rostlin. Tato barviva jsou významná především pro rostlinu samotnou, která díky pestrému zbarvení svých květů a plodů láká živočichy a to zajišťuje její reprodukci, ale tato barviva se stala významnými barvivy také pro člověka.

Protože barva potravin je velmi důležitou sensorickou vlastností a kromě chuti je důležitý i vzhled jídla, které konzumujeme, většina našich potravin se dodatečně dobarvuje, aby byly pro spotřebitele přitažlivější. Předpokládá se, že barva ovlivňuje přitažlivost výrobku skoro z poloviny. Zejména sladkosti, po kterých sahají nejčastěji děti, najdeme v obchodech v nejrůznějších barevných variacích. Syntetická barviva poskytují sice sytější zbarvení než ta přírodní, ale v současnosti jsou tendence nahrazovat umělá barviva právě barvivy z přírodních zdrojů. A právě antokyany jsou velmi často používány díky jejich velké barevné škále od červené po modrou. V potravinách je nalezneme také pod označením E163. Antokyanová barviva však snadno podléhají chemické degradaci (což může být problém při zpracování a skladování potravin s antokyanovými barvivy) a proto syntetická barviva z našich potravin ještě úplně nevymizela.

Antokyany jsou také v poslední době velmi zkoumané látky z hlediska jejich antioxidační aktivity. Odstraňují v těle volné radikály a působí v prevenci proti oxidačnímu stresu. Působí příznivě proti vzniku rakoviny, cukrovky a pomáhají v prevenci proti kardiovaskulárním a nervovým onemocněním.

Cílem této práce je extrakce antokyanových barviv z různých přírodních zdrojů a z různých částí rostlin (květy, plody, listy) a také testování jejich chemických vlastností a sledování změny zbarvení těchto látek v různých prostředích. Některé vlastnosti jsou porovnávány také se syntetickými barvivy a s vlastnostmi jiných přírodních barviv (betalainů) a je zde popsán jednoduchý laboratorní postup, kterým se dají antokyanová barviva odlišit od ostatních skupin přírodních barviv a od umělých barviv.

V praktické části své diplomové práce také navrhuji školní pokusy, které využívají převážně roztok antokyanů z červeného zelí, který se v testování ukázal jako nejnázornější. V práci je popsáno využití extraktu ze zelí jako pH indikátoru a použití

jednoduchých a ve škole dostupných chromatografických separačních metod. Hlavním záměrem bylo zvolit takové postupy, které jsou ve školní laboratoři dobře proveditelné a vyžadují co nejmenší množství chemikálií. Methanol doporučený u většiny laboratorních příruček pro extrakci antokyanů byl pro jeho velkou toxicitu nahrazen ethanolem nebo byly antokyanové louhovány v teplé vodě. Pro získání zásaditého roztoku byl použit roztok jedlé sody, pro vytvoření kyselého prostředí byla použita kyselina citronová, případně ocet.

2. TEORETICKÁ ČÁST

Antokyany (v literatuře je najdeme také pod názvem anthokyany, anthokyaniny nebo antokyaniny) jsou látky glykosidické povahy a početně velmi rozsáhlá skupina rostlinných barviv. Z různých rostlinných zdrojů bylo do dnešní doby izolováno přes 300 různých antokyanů. ¹ Antokyany jsou řazeny do skupiny flavonoidních látek. ³

Antokyany jsou velmi významná, ve vodě rozpustná, rostlinná barviva, která dávají charakteristické zbarvení mnoha druhům ovoce, zeleniny a květům rostlin. ²¹ Podle pH prostředí nabývají zbarvení od červené přes fialovou po modrou až modrozelenou. Protože toto zbarvení se těší velké spotřebitelské oblibě, bývají antokyany často používány k barvení potravin. ¹

Na obalech potravin jsou označovány pod názvem E163. Díky tomu, že antokyany neposkytují tak syté zbarvení, bývají někdy nahrazovány výraznějšími syntetickými barvivy.

Tato barviva mají však nejzásadnější vliv pro samotnou rostlinu. Pomáhají rostlině přežít a množit se, význam těchto barviv je tedy fyziologický i ekologický. Díky pestře zbarveným květům a plodům se rostlina stává atraktivní pro ostatní živočichy, kteří pomáhají rostlině s reprodukcí. V rostlině se antokyany nacházejí přímo v buněčné šťávě a zbarvují listy (např. červené zelí), květy i plody. ⁶

Svůj název získala tato skupina podle dvou řeckých slov „anthos“, což znamená květ a „cyaneos“ tedy modrý. ¹

2. 1 Struktura antokyanů

Antokyany, které se přirozeně vyskytují, jsou heteroglykosidy, které se skládají jak z cukerné složky, tak z aglykonu (necukerné složky)- antokyanidinu. ⁵

Cukernou složkou bývá pět hlavních sacharidů: D- glukóza, L- rhamnóza, D-galaktóza, D- xylóza a L- arabinóza. Jsou vždy glykosidovány v poloze C- 3. ¹ Další místo pro vytvoření glykosidické vazby je poloha C-5, o něco méně častější, je pak poloha C-7. Podle počtu navázaných cukrů na necukernou složku rozlišujeme monoglykosidy, diglykosidy a triglykosidy antokyanidinu. Pokud dojde ke ztrátě cukerné složky v poloze C-3, dojde k rozkladu aglykonu, což způsobí ztrátu zbarvení. ⁵

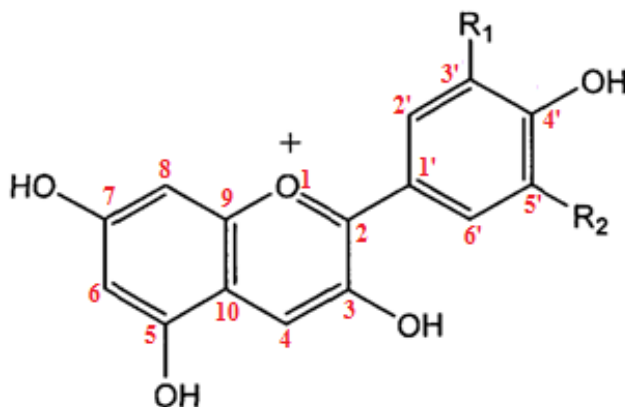
Vytvářejí interakce typu ion- ion s organickými kyselinami jako je kyselina malonová, citronová nebo jablečná. To je stabilizuje. ¹

Antokyanidiny jsou nestabilní a také mají menší rozpustnost ve vodě než antokyany. Pokud je tedy aglykon glykosidován, dochází ke zvyšování rozpustnosti molekuly antokyanového barviva.⁵

2. 1. 1 Přehled a struktura významných antokyanidinů

Antokyanidiny, tedy necukerné složky (aglykony) antokyanů, jsou po chemické stránce polyhydroxyderiváty a polymethoxyderiváty 2-fenylbenzopyryliového (nebo také flavyliového) kationtu (viz obr. 1).⁵

U všech antokyanidinů je v poloze C-4' substituovaná hydroxylová skupina. Substituenty v polohách C-3, C-5, C-6, C-7, C-3' a C-5' se liší.⁵ Výjimkou je šest hlavních a nejvýznamnějších antokyanidinů vyskytujících se v potravinách (tabulka 1), kde se substituenty liší pouze v poloze C-3' a C-5'.



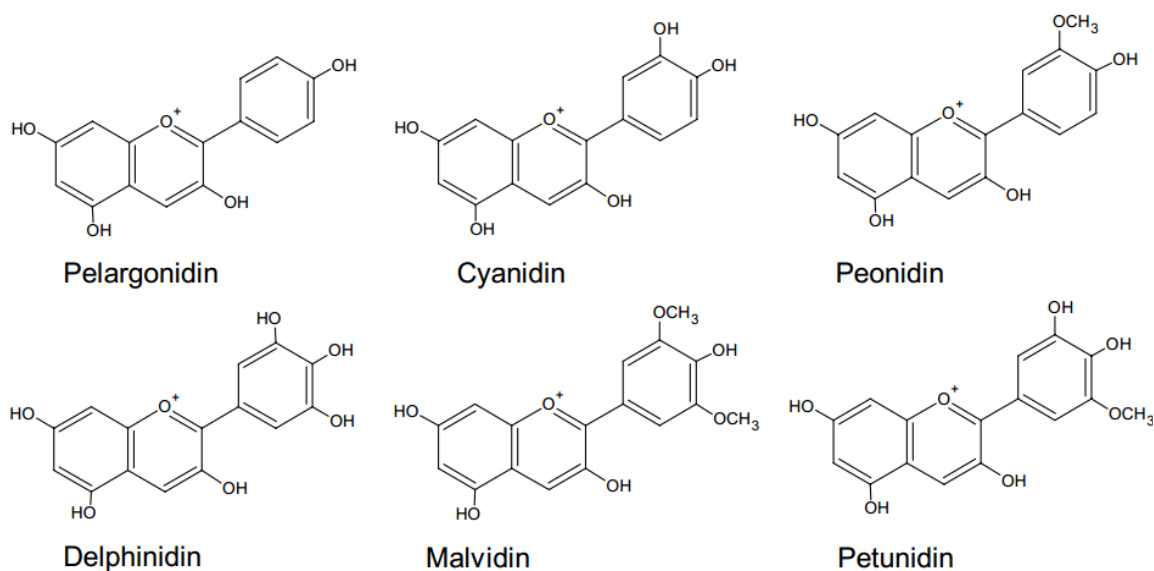
Obr. 1 Obecná struktura antokyanidinů⁹

Jak již bylo zmíněno, v potravinách má význam šest hlavních antokyanidinů. Jsou to kyanidin (název dle latinského názvu chrpy, *Cyanus sp.*), pelargonidin (pleargonie, *Pelargonium sp.*), peonidin (pivoňka, *Paeonie sp.*), delfinidin (stračka, *Delphinium sp.*), petunidin (petunie, *Petunia sp.*) a malvidin (sléz, *Malva sp.*).⁵

Tyto významné antokyanidiny se také odlišují svým zbarvením. Pelargonidin je šarlatový, kyanidin a peonidin mají fialové zbarvení, delfinidin a petunidin poskytují purpurově modré zbarvení a malvidin je purpurový.¹

Tabulka 1 Poloha substituentů u významných antokyanidinů ¹

	skupina navázána v poloze:					
	C-3	C-5	C-6	C-7	C-3'	C-5'
pelargonidin	OH	OH	H	OH	H	H
kyanidin	OH	OH	H	OH	OH	H
peonidin	OH	OH	H	OH	OCH ₃	H
delfinidin	OH	OH	H	OH	OH	OH
petunidin	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH
malvidin	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OCH ₃



Obr. 2 Struktura nejvýznamnějších antokyanidinů. ¹⁴

Z velké části ovlivňuje barva aglykonů barvu materiálu, které je obsahují. V rostlinách se volné antokyanidiny objevují zřídka (jen jako produkty hydrolýzy antokyanů), spíše jsou v rostlinách hlavními pigmenty antokyanů. ¹

Někdy se v rostlinách objevují antokyaniny odvozené jen od jednoho antokyanidinu, někdy se také vyskytují antokyaniny odvozené z několika různých antokyanidinů. ¹

2. 1. 2. Dělení antokyanů

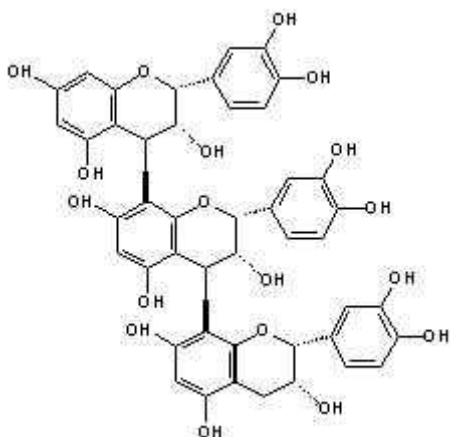
Podle toho, kolik molekul cukru antokyaniny obsahují, je dělíme do 18 skupin. Nejvýznamnějšími skupinami jsou ¹:

- 3- monosidy: monosidy s monosacharidy (glukóza, rhamnóza, galaktóza či arabinóza) vázanými v poloze C- 3 ¹
- 3-biosidy: biosidy s disacharidy (rutinóza, sambubióza, soforóza, neohesperidóza, genciobióza, robinobióza, laminaribióza) vázanými v C- 3 poloze ¹
- 3 triosidy: triosidy obsahující trisacharidy (lineární nebo rozvětvené) navázané v poloze C- 3 ¹
- 3, 5- diglykosidy s monosacharidy vázanými v poloze C- 3 a C- 5 ¹
- 3, 7- diglykosidy s monosacharidy vázanými v poloze C- 3 a C- 7 ¹
- 3- biosidy- 5- monosidy mají v polohách C- 3 navázán disacharid a monosacharid v poloze C- 5 ¹

Nejčastěji se vyskytující je kyanidin- 3- glykosid. Více než druh cukru, má na barvu vliv právě poloha, na které je cukr navázán. ¹

2. 1. 3 Proantokyanidiny

Antokyanidiny, což jsou právě barevné složky antokyanů, se v přírodě nachází také v oligomerní (tedy di-, tri-, tetra-, ...) formě jako takzvané proantokyanidiny. ²⁸ Hořkou chuť udávají také některým ovocným šťávám nebo například čaji. ¹ Na rozdíl od antokyanidinů, které se z proantokyanidinů tvoří, jsou to látky bezbarvé. Naleznout je můžeme například v zrníčkách hroznového vína nebo v kakau. ²⁸



Obr. 3 Struktura trimerního proantokyanidinu. ²⁹

Proantokyanidiny mají velký počet fenolických hydroxylových skupin, mají trpkou, svíravou chuť a řadíme je mezi třísloviny. Velké uplatnění mají v lékařství pro svoje antioxidační účinky a jejich pozitivní vliv na kardiovaskulární systém člověka.²⁸

2. 2 Chemické vlastnosti antokyanů

To, co nás z technologického hlediska na antokyanech nejvíce zajímá, je právě jejich barva a také stabilita jejich barvy, která je však poměrně nízká.¹ Absorpční spektra antokyanů jsou charakteristicky ve dvou oblastech vlnového spektra, ve viditelném spektru mezi 465 a 550 nm a v ultrafialovém spektru mezi 270 a 280 nm.²⁰ Barvu a stabilitu zbarvení ovlivňuje celkem velké množství faktorů.¹

Hlavní vliv má¹:

- struktura jejich molekuly
- pH prostředí
- přítomnost různých enzymů
- teplota
- působení záření
- přítomnost kyslíku
- reakce s jinými sloučeninami
- přítomnost malého množství kovu (Cu, Fe, Mn, Zn, Al, ...)

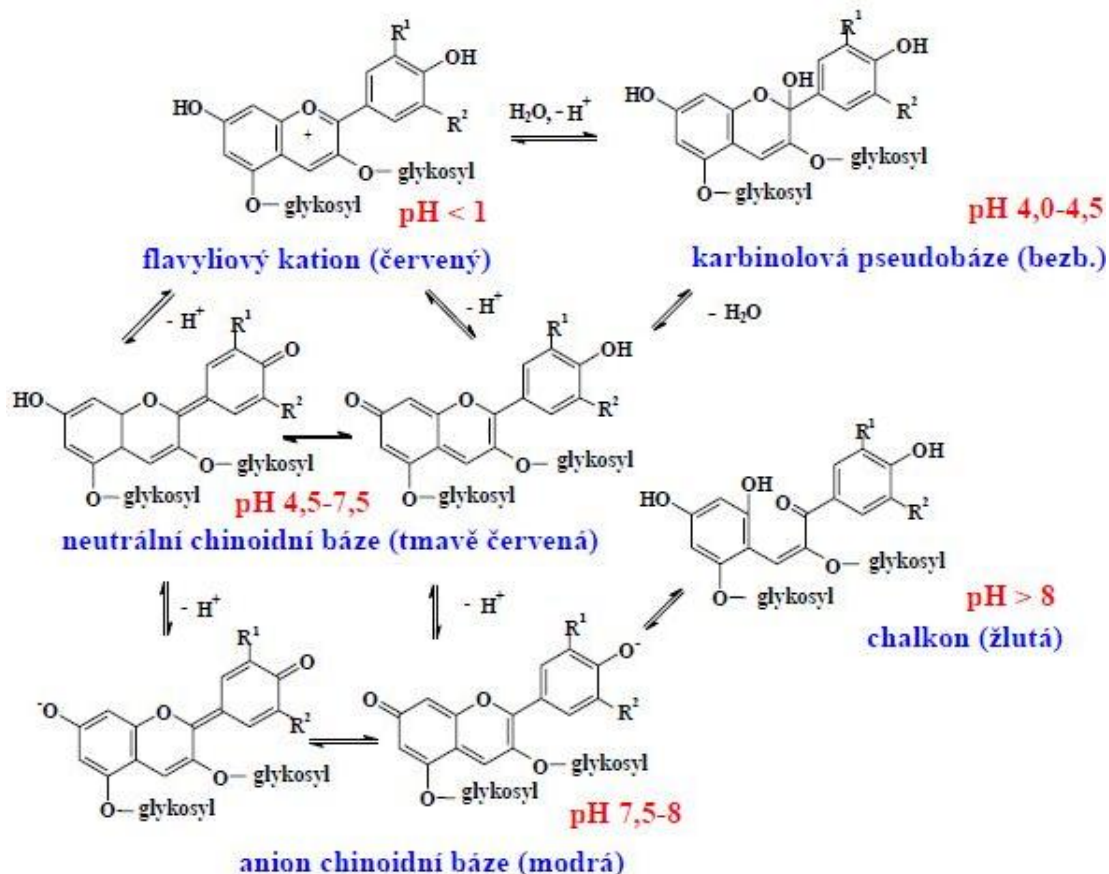
2. 2. 1 Vliv pH prostředí

Existuje rovnováha mezi pěti strukturami aglykonů v závislosti na pH prostředí. Jsou to¹:

- červený flavyliový kationt
- bezbarvá karbinolová pseudobáze
- purpurově červená neutrální chinoidní báze
- modrá chinoidní báze
- žlutý chalkon

V prostředí, které má pH 1 a nižší se vyskytují antokyaniny jen jako flavyliové soli červeného zbarvení. Pokud se pH o něco zvýší, začne se více uplatňovat bezbarvá karbinolová pseudobáze a dochází ke slábnutí červeného zbarvení roztoku. Při dalším zvyšování pH se začíná tvořit neutrální chinoidní báze, která vyvolá purpurově červené zbarvení. Aby mohla tato báze vzniknout, je nutné, aby byla přítomna volná hydroxylová skupina na jednom uhlíku v poloze C-5, C-7 nebo C-4'. Kolem pH 8 se

v roztoku začíná tvořit modře zbarvený aniont chinoidní báze. Pokud pH nadále roste, modré zbarvení začíná slábnout a začne docházet k vytváření chalkonu, který dává roztoku žluté zbarvení. Ze žlutého chalkonu se po okyselení zpátky na pH 1 můžeme dostat na červenou formu- flavyliový kationt. Tato změna je však pomalejší.¹



Obr. 4 Přeměna antokyanů v závislosti na změně pH prostředí.¹⁰

Jiná situace je u zpracovaného ovoce a zeleniny. Zatímco v rostlinách se vyskytují antokyany ve formě neutrální chinoidní báze v prostředí o pH 2,5 – 7,5, u zpracovaných potravin se mohou vyskytovat v prostředí s jiným pH než je přirozené. Jsou však stabilizovány interakcí s jinými flavonoidy (interkopigmentace), vyskytují se jako acylované formy (intrakopigmentace) nebo jsou v interakci s jinými složkami potravin.¹

Pokud se nějaký výrobek déle skladuje, dochází ke vzniku oligomeru, který má podobnou barvu původnímu antokyanu, ale tyto původní antokyany nemusejí být přítomny.¹

Vliv pH na zbarvení antokyanů můžeme také pozorovat během vývoje květu rostlin. Příčinou změny zbarvení v různém vývoji je změna kyselosti buněčné šťávy.

V poupěti je kyselá, při rozvoji květu neutrální a při plně vyvinutém květu slabě alkalická. To můžeme pozorovat například u plicníku tmavého (*Pulmonaria obscura*). Poupata jsou červená, při rozvíjení modrofialová a nakonec jsou květy modré.¹¹



Obr. 5 Změna zbarvení u květu plicníku tmavého během jeho vývoje.¹¹

2. 2. 2 Vliv struktury

Také struktura má vliv na zbarvení antokyanů. V kyselém prostředí závisí barva na počtu a druhu navázaných antokyanidinů. Čím větší počet hydroxylových skupin je v antokyanidinu navázáno, tím víc modrý odstín antokyanů získávají. Pokud jsou navázány spíše methoxyskupiny, nabývá antokyan červeného zbarvení.¹

Méně stabilní jsou deriváty, které obsahují větší počet hydroxylových skupin. Naopak deriváty s větším počtem methoxylových skupin, jsou stabilnější. Glykosidy, tedy antokyanů, jsou stabilnější než aglykony (antokyanidiny). Diglykosidy jsou více odolné při skladování, při vystavení slunečnímu světlu a při tepelném zpracování než monoglykosidy. Vliv na barevnou stabilitu má také druh cukru, který je navázaný.¹

2. 2. 3 Vliv teploty

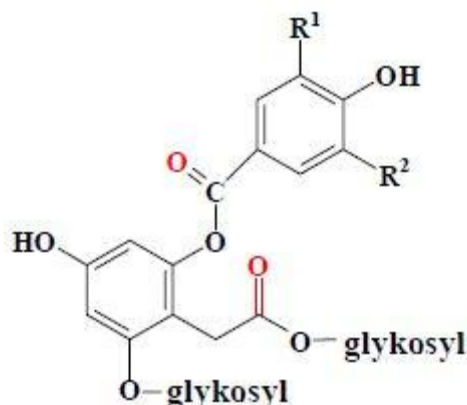
Změna teploty je dalším faktorem, který ovlivňuje stabilitu a rychlost degradace antokyanů. Vliv teploty navíc závisí také na struktuře, pH prostředí, vlivu kyslíku nebo na interakci s jinými složkami látek. Většina antokyanů při vyšších teplotách získává větší stabilitu. Tento proces se využívá například při zpracování ovoce a zeleniny. Při zvýšení teploty dochází ke vzniku stabilnějších oligomerních pigmentů a jsou hlavními nositeli barvy. Toho se využívá při výrobě červených vín nebo ovocných šťáv.¹

2. 2. 4 Vliv enzymů

Barvu mohou antokyany ztrácet také díky enzymovým reakcím. Tyto reakce mohou být katalyzovány glykosidasami nebo polyfenoloxidasami. Glykosidasy hydrolyzují glykosidické vazby, které antokyany obsahují a dávají vzniknout příslušnému cukru a aglykonu. Taková kombinace je nestabilní a přechází na bezbarvé produkty. Polyfenoloxidasas nachází svoje uplatnění hlavně při reakcích enzymového hnědnutí.¹

2. 2. 5 Vliv kyslíku a peroxidů

Vzdušným kyslíkem se antokyany oxidují na bezbarvé formy nebo na hnědé produkty a to buď přímo, nebo nepřímo prostřednictvím jiných nestabilních sloučenin. Prostředníkem těchto reakcí může být například kyselina askorbová, která se oxiduje za vzniku peroxidu vodíku, který vyvolá destrukci antokyanů.¹



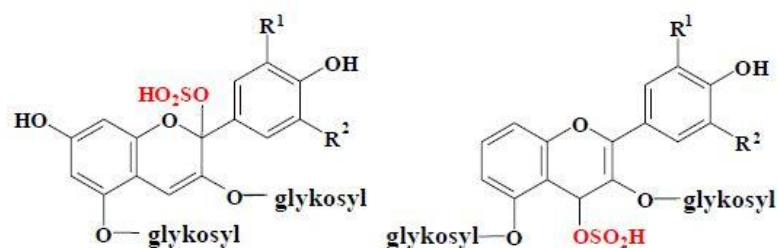
Obr. 6 Vliv peroxidu vodíku na antokyan a vznik bezbarvého produktu.¹³

2. 2. 6 Vliv záření

Pokud antokyany vystavíme působení viditelného světla, ultrafialového nebo ionizujícího záření, projeví se u nich jejich nestabilita. Rozklad probíhá hlavně formou fotooxidace. Stabilnější jsou antokyany, které jsou v poloze C-5 nesubstituovány. Antokyany, které mají v poloze C-5 navázanou hydroxylovou skupinu a fluoreskují, jsou vůči fotochemickému rozkladu mnohem citlivější.¹

2. 2. 7 Vliv oxidu siřičitého

Bezbarvé formy antokyanů vznikají i díky působení oxidu siřičitého. Tyto reakce jsou však vratné (reverzibilní) a pokud dojde k jejich zahřátí a okyselení, můžeme z velké části získat původní antokyany.¹



Obr. 7 Navázání oxidu siřičitého na antokyan za vzniku bezbarvých sulfonových kyselin.¹²

2. 2. 8 Vliv cukrů a jejich rozkladných produktů

Pokud je ve výrobku větší koncentrace cukrů (vyšší než 20%), tomu je například v ovocných džemech, pak se výrazně sníží aktivita vody a to má za následek stabilizaci barvy antokyanů. Degradční produkty cukrů poskytují hnědé zbarvení a urychlují degradaci antokyanů. Jedním z těchto degradačních produktů je furan-2-karbaldehyd a tím druhým je 5-hydroxymethylfuran-2-karbaldehyd.¹

2. 2. 9 Reakce s jinými sloučeninami

Antokyanany také reagují s jinými různými sloučeninami a tvoří s nimi komplexy. Významné produkty získáme při interakci s jinými flavonoidy, bílkovinami nebo polysacharidy. Takové interakci říkáme intermolekulární kopigmentace. Většina látek, se kterými antokyanany reagují, jsou bezbarvé látky, ale po vzniku komplexu se díky nim zvyšuje stabilita zbarvení antokyanů. Dojde k zabránění nukleofilní reakce s vodou, díky čemuž nedojde ke vzniku karbinolové pseudobáze a ztrátě barvy.¹

Komplexy antokyanů s kovy (hliník, draslík, železo, měď, vápník, cín, ...) mohou barvu částečně stabilizovat, nebo mohou naopak způsobit nežádoucí změnu zbarvení potravin. Tomu je pro příklad u cínu v konzervách, který mění přirozenou červenou barvu plodů. Tuto změnu můžeme pozorovat například u konzervovaných jahod, které ztrácí v konzervě svoje atraktivní červené zbarvení.¹

2. 3 Výskyt antokyanů

Antokyanany najdeme ve velkém počtu druhů rostlin. Konkrétně se vyskytují ve vakuolách buněk. Tato barviva najdeme nejen v květech a plodech, ale také v listech některých rostlin.¹

Hlavní zdroje antokyanů, které využíváme jako potraviny, jsou plody rostlin z různých čeledí¹:

- Révovité (*Vitaceae*) kam patří významné ovoce s antokyanovými barvivy- hrozny vinné révy. ¹
- Růžovité (*Rosaceae*) kam řadíme višně, třešně, maliny, jahody, ostružiny, švestky, jablka nebo také hrušky. ¹
- Lilkovité (*Solanaceae*) s významným zástupcem s antokyanovými barvivy lilkem vejcoplodým s charakteristickou tmavě fialovou slupkou, ale také sem řadíme červené odrůdy brambor. ¹
- Srstkovité (*Grossulariaceae*) je čeleď významná hlavně díky zástupci červenému rybízu, ale významné jsou i červené formy rybízu nebo angreštu. ¹
- Vřesovcovité (*Ericaceae*) díky borůvce a ostružině. ¹
- Olivovité (*Oleaceae*) s černými olivami. ¹
- Brukvovité (*Brassicaceae*)- jejich červené varianty obsahují také velké množství anthokyanů. Patří sem hlavně červené zelí nebo ředkvička. ¹

Tabulka 2 **Přehled výskytu antokyanidinů ve vybraném ovoci a zelenině.** ¹

Materiál	Antokyanidin
Ovoce:	
Borůvka	kyanidin, petunidin
Hruška (slupka)	kyanidin
Jablko (slupka)	kyanidin
Jahoda	pelargonidin, kyanidin
Malina	kyanidin, pelargonidin
Oliva	kyanidin
Ostružina	kyanidin, pelargonidin, malvidin, delfinidin
Černý rybíz	kyanidin, delfinidin
Červený rybíz	kyanidin
Švestka	kyanidin, peonidin
Třešeň	kyanidin, peonidin
Vinné hrozny	malvidin, kyanidin, peonidin, delfinidin, petunidin
Zelenina:	
Červená cibule	kyanidin, peonidin

Lilek (slupka)	delfinidin
Ředkvička (slupka)	pelargonidin, kyanidin
Červené zelí (listy)	kyanidin
Červené brambory	pelargonidin, kyanidin, peonidin, delfinidin, petunidin, malvidin
Květ rostliny:	
Ibišek	delfinidin, kyanidin

Je známo 500 různých antokyanů a 28 antokyanidinů, ze kterých pouze šest je nejvíce zastoupeno v cévnatých rostlinách (kyanidin, delfinidin, pelargonidin, peonidin, petunidin a malvidin). Z těchto šesti se vyskytuje největším podílem kyanidin, pelargonidin a delfinidin. Jsou z 80% v listech, z 69% v ovoci a z 50% v květech. Podíl v ovoci a zelenině je ¹⁵:

- kyanidin: 50%
- delfinidin: 12%
- pelargonidin 12%
- peonidin: 12%
- petunidin: 7%
- malvidin: 7%

Hlavní potravinový zdroj antokyanů jsou bobule, které obsahují až 5000 mg/kg (nejvíce borůvky, ostružiny a černý rybíz) a červené hrozny, kde je jejich obsah dokonce větší než 7500 mg/kg. V červeném víně se jejich množství pohybuje kolem 350 mg/l. ²¹ Na množství antokyanů ve vzorku má také vliv rostlinný druh a odrůda, množství slunečního záření, teplota a také podmínky posklizňového dozrávání. ²⁰

2. 4 Barvení potravin

Antokyanany mají sice obrovský potenciál pro použití v potravinářském, farmaceutickém a také kosmetickém průmyslu, ale jejich využití bylo velmi omezeno kvůli jejich relativní nestabilitě. V současné době je však zájem o nahrazování syntetických barviv, která mohou mít nepříznivý až toxický účinek na lidský organismus, a proto se opět začínají studovat různá přírodní barviva a je snaha zaměřovat se na problémy, které doprovází použití antokyanů jako barevných pigmentů v potravinách. ¹⁵

Tato rostlinná barviva dávají charakteristické červené zbarvení mnoha druhům našich potravin. Někdy bývá tato barva označována jako „radostná červen“ a můžeme ji pozorovat u ovocných kompotů, ovocných šťáv nebo sirupů. Následkem chemické degradace antokyanů však dochází ke změně, zhoršení či vyblednutí barvy a to se stává velkým problémem při zpracovávání těchto potravin nebo při jejich dlouhodobém skladování.⁷ Jahody jsou populární ovoce, které je často používáno pro výrobu džusů a jiných nápojů díky jejich atraktivní barvě, vynikající chuti, příjemnému aroma a jejich nutriční funkci. Světle červená barva je dána antokyanidinem pelargonidinem, který je v jahodách majoritní a tmavě červená barva je dána aglykonem kyanidinem, který je minoritní složkou. Tato přirozená barva jahod a výrobků z nich snadno bledne nebo se narušuje během zpracování a skladování. Teplota, pH a světlo jsou nejvýznamnějšími faktory, které stabilitu barvy ovlivňují. Skladování těchto potravin, které obsahují antokyaniny, je tedy velkým problémem, protože atraktivní červená barva bývá po pár týdnech či dokonce dnech skladování nahrazena neatraktivním nahnědlým zbarvením. Díky tomu se některé nápoje uměle dobarvují, aby byl vizuální vzhled potraviny zachován.¹⁸

Na obalech potravin najdeme antokyaniny také pod označením E163. Nejsou u nich známé žádné nežádoucí účinky a tvoří přirozenou součást naší potravy. V České republice i celé Evropské unii je použití tohoto barviva povoleno s výjimkou dětské stravy. V USA je jeho užití povoleno úplně.¹⁷

2. 4. 1 Přibarvování potravin

V České republice se nejčastěji zpracovává ovoce jako jablka, hrušky, meruňky, broskve, višně, třešně nebo jahody a dělají se z něj šťávy, koncentráty, povidla, džemy a dětská výživa. Ostatní ovoce jako jsou borůvky, brusinky, ostružiny nebo maliny se nakupují ze zahraničí již zpracované. Výrobky z ovoce se mohou lišit od čerstvého zejména vlivem technologického zpracování, použitím aditivních látek, balením nebo skladováním.²⁰ U antokyanů nás zajímá převážně změna zbarvení během těchto procesů.

Nejen problém se změnou vlastností nás nutí potraviny dobarvovat, ale také stále rostoucí cena čerstvého ovoce. Z tohoto důvodu se snižuje ovocný podíl dražšího ovoce a nahrazuje se ovocem levnějším (například jablky). Změnou složení, však výrobky ztratí svoji barevnost a zpětného intenzivního zbarvení je možné dosáhnout přibarvováním. U výrobků z červeného a modrého ovoce se využívají pro přibarvení

takzvané barvicí potraviny. Jedná se o koncentráty, extrakty nebo šťávy z intenzivně barevných plodů- bezinka, červená řepa, hroznové víno a jiné.²⁰

Přibarvovat nelze tehdy, pokud by došlo k matení spotřebitele (například pro skrytí použití nevhodných surovin). Lze dobarvit potravinu pro zlepšení organoleptických vlastností, pro obnovení původního vzhledu potraviny, které se ztratily během zpracování, skladování nebo balení nebo pro obarvení bezbarvých potravin.²⁰

Tabulka 3 **Povolená barviva ve výrobcích z červeného a modrého ovoce.**²⁰

Druh výrobku	Povolená přidaná barviva	Barviva použitelná s omezením	Další možnosti přibarvování
100% ovocné šťávy	žádná	žádná	-
Extra džemy a rosoly	žádná	žádná	červené ovocné šťávy
Dětská výživa	žádná	žádná	-
Džemy, pomazánky, zmrzliny, ochucené nápoje	E160 a, E160c, E162, E163 , E120, E122, E124, E129	E120, E122, E124, E129	červené ovocné šťávy, šťáva z červené řepy

(E160a- karoteny, E160c- paprikový extrakt, E162- betalain, E163- anthokyany, E120- košenila, E122- azorubin, E124- ponceau 4R, E129- allura red)

U nás na trhu můžeme najít různé falšované potraviny (šťávy, džemy, dětské příkrmy), které obsahují méně ovoce, než výrobci uvádějí na obalu. Také se objevují v potravinách druhy ovoce, které se v původním výrobku vyskytovat nemají. Nejčastěji se nahrazují výrobky, které mají velkou cenu- maliny, jahody, borůvky, černý rybíz a nahrazují se levnějšími například jablky.²⁰

2. 5 Porovnání s jinými druhy barviv

Výhody antokyanů spočívají v tom, že pokud je uchováváme v chemicky nezměněném prostředí, dodávají potravinou atraktivní jasnou červenou barvu a zejména ovocným výrobkům dávají přirozený vzhled. Nebyly u nich objeveny žádné pro zdraví škodlivé aspekty, ale naopak se mluví o jejich příznivých fyziologických účincích (zejména antioxidačních).⁷

V porovnání s ostatními barvivy však mají i svoje nevýhody. Sem patří zejména jejich nízká stabilita barvy a od toho se odvíjející problémy se skladováním a průmyslovým zpracováváním. Získání čistých preparátů je také velmi nákladné a většinou se používají odpadní suroviny, jako jsou slupky nebo výlisky z ovoce.⁷

Dalšími velmi používanými potravinovými barvivy jsou betalainy získávané zejména z červené řepy- E162. Je to barvivo o něco stabilnější než jsou antokyanové pigmenty a stejně jako u antokyanů je tato látka v potravinách povolena s výjimkou dětské výživy. Je také zdravotně nezávadné, jen u malých dětí může být problém s velkým množstvím dusičnanů, které se vyskytují v červené řepě.¹⁷

Ne však každé přírodní barvivo je zdravotně nezávadné. Další hojně využívaný červený pigment najdeme pod označením E120 a nese název Košenila (tu je potřeba konzervovat benzoanem sodným a takto upravené barvivo pak označujeme Karmín). Je to barvivo živočišného původu- získává se z vysušených těl samiček hmyzu *Dactylopius Coccus*. Vzhledem k jeho nežádoucím účinkům je snaha od tohoto barviva upouštět a nahrazovat ho jiným. Košenila je alergen a může způsobit anafylaxi, astma, kopřivku, sennou rýmu a bývá označována za příčinu dětské hyperaktivity.¹⁷

Syntetická barviva mají oproti těm přírodním velikou výhodu v tom, že jsou stabilní a poskytují velmi syté zbarvení. Od dobarvování potravin syntetickými barvivy se v současné době snaží mnoho výrobců upouštět, protože byly dokázány jejich nežádoucí účinky na lidské tělo. Z těch červených bych jako příklad uvedla barvivo E122- Azorubin, které je také zmiňováno v experimentální části této práce. Azorubin patří do skupiny azobarviv a vyrábí se z kamenouhelného dehtu. Může vyvolávat alergické kožní reakce a u dětí může podobně jako Košenila způsobovat hyperaktivitu. Tato informace se také uvádí na obalech, které azorubin obsahují. Před vstupem České republiky do Evropské unie bylo toto barvivo u nás zakázané. Nyní je jeho užití opět povoleno.¹⁷

2. 6 Význam antokyanů pro lidský organismus

O antokyanech se v poslední době mluví hlavně díky jejich vysoké antioxidační aktivitě. Celá řada studií ukazuje, že pravidelná konzumace ovoce a zeleniny snižuje riziko onemocnění rakovinou, zabraňuje vzniku neurologických poruch a pomáhá v prevenci proti kardiovaskulárním onemocněním.²² Je stále rostoucí zájem o stravu pestrou, nutriční a funkční. Tento zájem se zvýšil díky studiím jídel, které mohou být prospěšné našemu zdraví. Byly provedeny studie na ovoci, bylinách i semenech a

zkoumala se především jejich antioxidační aktivita. Ztráta volných radikálů a protistárnoucí aktivity mají zásadní význam, protože tyto vlastnosti jsou pevně spojeny s prevencí proti chronickým onemocněním, jako jsou různá kardiovaskulární onemocnění nebo rakovina.¹⁹

V poslední době je zájem využít květiny jako velmi zdravý zdroj potravy. Tento přístup se však setkává s velkou neofobií- tedy strachu lidí zkoušet nové věci. Nová potravinová vytváří často vrozenou nedůvěru zejména u dětí a je třeba lidi vzdělávat v oblasti výživy a navrhnout jim častěji květiny jako zdroj potravy. Květiny byly používány jako potrava už ve Starověkém Řecku a Římě a právě o to se opírají nově vznikající nutriční výzkumy, které se zaměřují na nové agronomické a ekonomické směry. Bohatý pigment rostlin se původně vyvinul k tomu, aby rostlina byla atraktivní a lákala opylovače. Vyznačuje se ale také vysokou antioxidační aktivitou, která je velmi důležitou a zajímavou vlastností také pro lidský organismus a výživu lidí. Právě množství antokyanů činí z květů významný zdroj, který by mohl být využit. U jedlých květů bylo také prokázáno, že jsou účinné v boji proti nádorům, zánětům a mutagenním vlivům. Antokyanové pigmenty jsou velmi důležité fytochemikálie v rostlinných potravinách vzhledem k jejich silným antioxidačním účinkům a dalším fyzikálně-chemickým a biologickým vlastnostem. I když se použití květin jeví jako velmi slibný zdroj potravy a jejich zdraví prospěšné účinky by neměly být opomíjeny, je třeba při výběru květin ke konzumaci postupovat opatrně, protože některé druhy obsahují i látky, které nejsou pro náš organismus zcela vhodné, v některých případech mohou být i zdraví škodlivé.¹⁹

Vysoce pigmentované ovoce, zejména malé bobule jako jsou borůvky, ostružiny, třešně, maliny a jahody byly velmi studovány kvůli jejich obsahu antokyanů. Zájem o tyto plodiny v posledních letech významně vzrostl díky důkazu, že obsahují fytochemikálie, které hrají klíčovou roli v boji proti oxidačnímu stresu, který je spojen se vznikem chronických onemocnění.¹⁹

Studie ukázaly, že antokyaniny však mají velmi malou biologickou dostupnost. Z celkového příjmu je výtěžek antokyanů pouze 1%. Absorpce probíhá typicky v horní části gastrointestinálního traktu.²¹ Pokud se nachází ve střevě, působí příznivě proti vzniku rakoviny, cukrovce a pomáhají v prevenci proti kardiovaskulárním a nervovým onemocněním.¹⁶

2. 6. 1 Volné radikály

Volné radikály jsou takové atomy, molekula nebo ion, které mají v elektronovém obalu jeden nepárový elektron a jsou schopné samostatné existence. Mají snahu získat další elektron, kterým si doplní elektronový pár a dostanou se tak do stabilní konfigurace. Z toho také vychází jejich vysoká reaktivita a tedy krátká doba jejich existence.²⁴

Volné radikály reagují buď s jinými volnými radikály a také s inaktivními molekulami. Touto reakcí vznikne další volný radikál a tento děj má tendenci dále pokračovat řetězovou reakcí. Volné radikály mohou napadat lipidy v membránách buněk, sacharidy, nukleové kyseliny, ale také bílkoviny včetně enzymů a to může vést k rozsáhlému poškození tkání i orgánů.²⁴

Aerobní způsob života a získávání energie vede k tomu, že se lidské tělo muselo naučit s volnými radikály vypořádat. Volné radikály tělo využívá ve svůj prospěch při ničení mikroorganismů, při oplodnění vajíčka, ale také volné radikály mohou naše tělo významně poškozovat. Můžou způsobit nemoci jako je ateroskleróza, cukrovka, nádory nebo záněty. V boji proti těmto nepříznivým vlivům volných radikálů pomáhá takzvaná antioxidační ochrana těla.²⁴ Antokyany jsou právě jedněmi z látek, které antioxidační účinky mají, podporují antioxidační ochranu těla a zabraňují vzniku radikálových řetězových reakcí.

Pro organismus jsou nejvýznamnější volné radikály kyslíku a dusíku. Jejich přeměnou pak mohou vznikat jiné reaktivní látky, které již nemají nepárový elektron. Tyto látky označujeme názvem reaktivní formy kyslíku (ROS, reactive oxygen species) nebo dusíku (RSN, reactive nitrogen species).²⁴

Tabulka 4 **Reaktivní formy kyslíku a dusíky a neradikálové formy.**²⁷

Reaktivní formy:		Neradikálové formy:	
Superoxid	O_2^-	peroxid vodíku	H_2O_2
Hydroxyl	$HO\cdot$	singletový kyslík	1O_2
Hydroperoxyl	$HOO\cdot$	ozon	O_3
Lipid	$L\cdot$	lipid hydroperoxid	$LOOH$
Lipid peroxy	$LOO\cdot$	kyselina chlorná	$HOCl$
Peroxy	$ROO\cdot$	peroxynitrit	$ONOO^-$
Lipid alkoxy	$LO\cdot$	oxid dusitý	N_2O_3

Oxid dusičitý	NO ₂	kyselina dusitá	HNO ₂
Oxid dusnatý	NO·	nitryl chlorid	NO ₂ Cl
Nitrosil	NO ⁺	nitroxyl	NO ⁻
Thiyl	RS·	kyselina peroxydusitá	ONOOH
Protein	P·	oxid dusný	N ₂ O

2. 6. 2 Oxidační stres

Oxidační stres nastává, pokud je v organismu převaha volných radikálů nad oxidační obranou, tedy vzniká více reaktivních forem kyslíku a dusíku než se stihne odstraňovat.²³ Reaktivní formy za normálních okolností nejsou pro naše tělo škodlivé. Škodí jen v případě, že se vymknou kontrole.²⁷

2. 6. 3 Antioxidanty

Antioxidantů existuje velké množství. Jsou to molekuly, jejichž přítomnost v malé koncentraci zabraňuje oxidační destrukci různých látek v organismu.²⁵ V porovnání s látkami, které mají chránit, jich je jen velmi málo. Antioxidanty (nebo také inhibitory oxidací) mají velmi velký význam při likvidaci volných radikálů a to hlavně kyslíku a dusíku.²⁷

Antioxidanty vytváří v našem těle přirozený obranný systém a chrání tak látky, které jsou pro naše tělo životně důležité, před nejrůznějšími změnami. Jsou však také prospěšné, pokud se nacházejí v potravinách. Zabraňují nejrůznějším projevům oxidace potravin a prodlužují jejich životnost.²⁷

2. 7 Chromatografické metody

Při chromatografii se opakovaně ustaluje rovnováha mezi dvěma nemísitelnými fázemi. Tato technika dokáže separovat směs na jednotlivé složky. Podstatou tohoto procesu je přechod složek směsi mezi dvěma různými fázemi. Jedna fáze je označena jako mobilní a druhá jako stacionární. Mobilní fází může být plyn nebo kapalina, stacionární fází se odvíjí od typu chromatografie. Může být ve formě tuhé fáze, tenké vrstvy, částicek a další.³¹

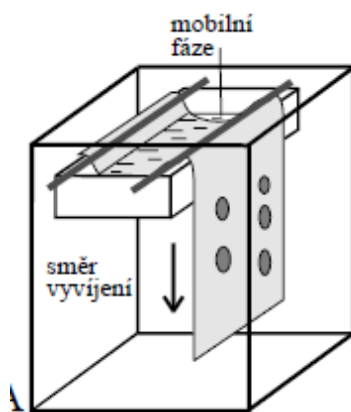
Nejčastějšími typy dělicích metod, které se užívají pro rozdělování flavonoidních barviv (tedy i antokyanů) jsou sloupcová chromatografie, chromatografie na papíře a chromatografie na tenké vrstvě.²

2. 7. 1 Sloupcová chromatografie (kolonová)

Při sloupcové chromatografii je stacionární fáze umístěna v trubici, tvoří sloupec.³¹ Podmínkou pro sloupcovou chromatografii je to, aby adsorbent nereagoval s mobilní fází nebo se složkami, které chceme dělit. Adsorbent se také nesmí v mobilní fázi rozpouštět a musí mít velkou adsorpční kapacitu. Dělení je založena na rozdílných distribučních konstantách jednotlivých složek ve směsi.³²

2. 7. 2 Papírová chromatografie

Při tomto typu chromatografie dochází k separaci na proužku papíru. U chromatografie na papíru volíme tzv. sestupné uspořádání. Pruh filtračního papíru má okraj smočený mobilní fází v nádobce a je volně zavěšen přes její okraj. Průtok mobilní fáze pak zajišťuje vztlínání a také gravitace. Aby se zabránilo vysychání mobilní fáze z papíru, provádíme chromatografii v uzavřené nádobce, která je nasycena parami mobilní fáze.³⁰



Obr. 8 Uspořádání papírové chromatografie.³⁰

Tabulka 5 Příklady hodnot retenčních faktorů (R_F) antokyanidinů u chromatografie na papíře u různých retenčních soustav.²

Antokyanidin	R_F - soustava:				
	1	2	3	4	5
pelargonidin	0,67	0,36	0,26	0,68	0,64
peonidin	0,64	0,29	0,20	0,50	0,64
malvidin	0,60	0,26	0,15	0,33	-
kyanidin	0,48	0,24	0,16	0,48	0,52
petunidin	0,45	0,20	0,12	0,33	0,60
delfinidin	0,35	0,14	0,09	-	0,46

Soustava:

1: kyselina octová, kyselina chlorovodíková a voda- 30: 3: 10

2: kyselina mravenčí, kyselina octová a voda- 5: 2: 3

3: kyselina propionová, kyselina chlorovodíková a voda- 3: 1: 8

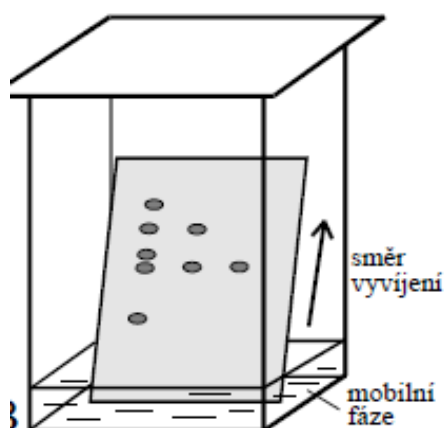
4: isopropanol a 5% kyselina chlorovodíková- 55: 45

5: n- butanol, kyselina octová a voda- 4: 1: 5

2. 7. 3 Chromatografie na tenké vrstvě

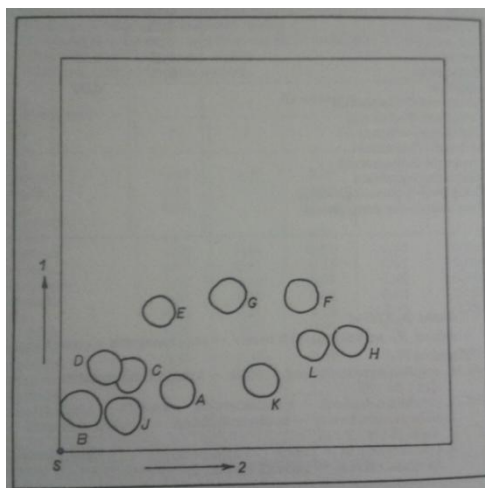
Jedná se o jednoduchou variantu kapalinové chromatografie. K separaci dochází na stacionární fázi tvořenou tenkou vrstvou sorbentu. U tohoto typu volíme tzv. vzestupné uspořádání, kdy spodní okraj stacionární fáze (tenké vrstvy) je smáčen mobilní fází, která protéká tenkou vrstvou vztlínáním. Pro zabránění vysychání mobilní fáze z tenké vrstvy ji uzavřeme do nádoby, která se nasytí parami mobilní fáze.³⁰

Jako tenké vrstvy se pro dělení flavonoidních barviv užívají vrstvy celulózy, polyamidu, silikagelu, polyvinylpyrrolidonu nebo oxidu hořečnatého.²



Obr. 9 Uspořádání chromatografie na tenké vrstvě.³⁰

Při dělení antokyanových barviv mají velké použití metody dvourozměrné chromatografie na celulóze (stacionární fáze).² Příklad takového dělení je znázorněn na obrázku č. 10. Jako mobilní fáze je použita v jednom směru směs n- butanolu, kyseliny chlorovodíkové a vody v poměru 5: 2: 1 a v druhém směru směs kyseliny mravenčí, kyseliny chlorovodíkové a vody v poměru 1: 4: 8.



Obr. 10 Příklad dělení antokyanů na tenké vrstvě celulózy. ²

(S- start; 1: *n*- butanol- kyselina chlorovodíková- voda (5: 2: 1); 2: kyselina mravenčí- kyselina chlorovodíková- voda (1: 4: 8); po detekci ultrafialovým světlem:

A: kyanidin- 3,5- diglukosid; B: delfinidin- 3- glukosid; C: delfinidin- 3- rutinosid;

D: kyanidin- 3- glukosid; E: kyanidin- 3- rutinosid; F: kyanidin- 3- soforosid;

G: kyanidin- 3- sambubiosid; H: kyanidin- 3- sambubiosid- 5- glukosid;

J: delfinidin- 3,5- glukosid; K- delfinidin- 3- rutinosid- 5- glukosid;

L- kyanidin- 3- rutinosid- 5- glukosid.) ²

Tabulka 6 Příklady hodnot retenčních faktorů tenkovrstevné chromatografie u vybraných antokyanových barviv v různých soustavách. ²

Antokyan	Retenční soustava:		
	1	2	3
kyanidin- 3- glukosid	0,30	0,34	-
kyanidin- 3- rutinosid	0,50	0,26	-
pelargonidin- 3- glukosid	0,43	0,52	-
delfinidin- 3,5- diglukosid	-	-	0,20
petunidin- 3,5- diglukosid	-	-	0,32
malvidin- 3,5- diglukosid	-	-	0,40

Soustava:

1- celulóza: kyselina octová, voda, kyselina chlorovodíková (15: 82: 3)

2- celulóza: *n*- butanol, kyselina octová, voda (4: 1: 5)

3- silikagel: ethylacetát, methylethylketon, kyselina mravenčí, voda (5: 3: 3: 1)

3. PRAKTICKÁ ČÁST

3. 1 Příprava tlumivých roztoků

Pro úpravu pH prostředí jsem zvolila univerzální pufr podle H. T. S. Brittona a R. A. Robinsona, který upravuje pH v rozmezí 1,81 – 11,98.

Ve dvou 250 ml odměrných baňkách byly připraveny 2 zásobní roztoky. Zásobní roztok 0,2M NaOH (roztok A) a zásobní roztok, který obsahoval 0,04M H_3PO_4 , 0,04M CH_3COOH a 0,04M H_3BO_3 (roztok B).

Pomocí těchto zásobních roztoků bylo připraveno 12 dílčích roztoků pro úpravu pH od přibližně 2 do 12. K 25 ml roztoku kyselin (B) bylo pipetováno různé množství roztoku hydroxidu sodného (A) podle tabulky uvedené níže:

Tabulka 7 Příprava pufru podle Brittona a Robinsona ⁴

pH:	x ml 0,2M NaOH
2	1,2 ml
3	4,4 ml
4	6,2 ml
5	8,7 ml
6	10,6 ml
7	13,1 ml
8	15 ml
9	16,9 ml
10	19,4 ml
11	21,2 ml
12	25 ml

3. 2 Extrakce antokyanů a příprava filtrátu

Ovoce, zeleninu nebo květy jsem před extrakcí nejdříve rozmělnila na menší části, poté zalila malým množstvím ethanolu a vše zhomogenizovala ve třecí misce. Poté jsem dala směs filtrovat a získala filtrát s antokyanem. Ovocné džusy a šťávy jsem pouze naředila destilovanou vodou a s tímto roztokem dále pracovala.

Jako extrakční činidlo pro získání antokyanů se v literatuře uvádí převážně methanol, který jsem však nahradila ethanolem kvůli lepší využitelnosti tohoto postupu ve školách a díky menší toxicitě a lepší dostupnosti této chemikálie. Antokyany jsou také látky dobře rozpustné ve vodě a lze je extrahovat pouze vodou a krátkým povařením.

3. 3 Testování chemických vlastností antokyanů

Z chemických vlastností antokyanů bylo testováno hlavně jejich chování v prostředí o různém pH a to zejména jejich změna zbarvení. Tato vlastnost je velmi hojně využívána zejména při použití ethanolového výluhu z červeného zelí jako acidobazického indikátoru.

Další sledovanou vlastností bylo jejich odbarvování po přidání roztoku siřičitanu sodného. Pokud výluh obsahoval pouze antokyanové pigmenty, došlo k okamžitému odbarvení.

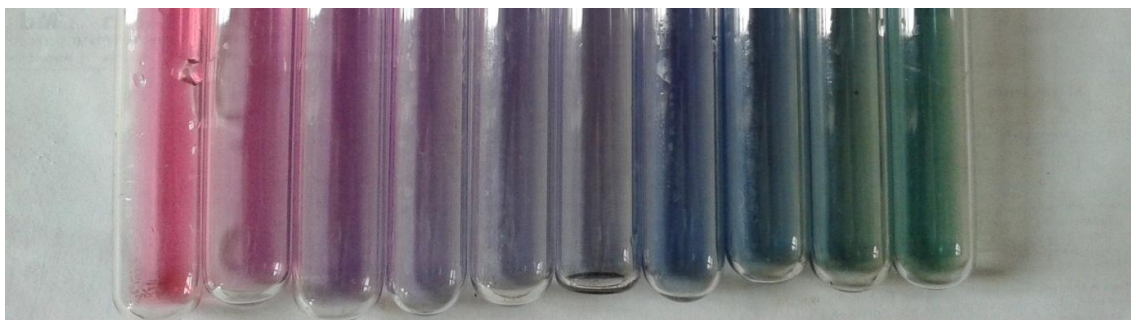
Poslední testovanou vlastností je jejich nestálost barvy na viditelném světle. Po několika dnech na světle začal roztok s antokyanem blednout a ztrácet svoje zbarvení.

Stejně postupy byly vyzkoušeny také na roztoku betalainů a u syntetického barviva azorubinu. Oproti antokyanům nedošlo k žádným viditelným reakcím, proto se dají tyto metody považovat za jednoduché a orientační laboratorní postupy, které odliší antokyany od ostatních stejně barevných pigmentů.

3. 3. 1 Změna zbarvení v závislosti na pH prostředí

Do každé z 11 zkumavek jsem pipetovala 3 ml filtrátu antokyanů. Následně jsem do každé zkumavky přidala jiný tlumivý roztok, abych vytvořila škálu pH od 2 do 12. Výslednou změnu zbarvení jsem zdokumentovala.

Jako první jsem použila extrakt z červeného zelí. Ten byl získán krátkým povařením listů červeného zelí ve vodě. V neutrálním prostředí byl tento extrakt fialový, v kyselém prostředí nabýval růžového až růžovofialového zbarvení a v zásaditém prostředí přecházel v modrou až modrozelenou.



Obr. 11 **Roztok anthokyanů z červeného zelí (pH 2 – 11).**

Anthokyaniny v červeném zelí: Cy- 3- soforosid- 5- glukosid acylovány.¹

Jako další roztok pro porovnání změny zbarvení v závislosti na pH prostředí jsem použila ethanolový extrakt ze slupky ředkvičky. Nejvýraznější zbarvení- červené se objevilo v prostředí o pH 2. Poté přecházelo v lehce narůžovělou, při neutrálním pH se objevilo opět fialové zbarvení, které se v zásaditě změnilo v modrou.



Obr. 12 **Roztok antokyanů ze slupky ředkvičky (pH 2 – 12).**

Anthokyaniny v ředkvičce: Pg a Cy- 3- soforosid- 5- glukosid¹

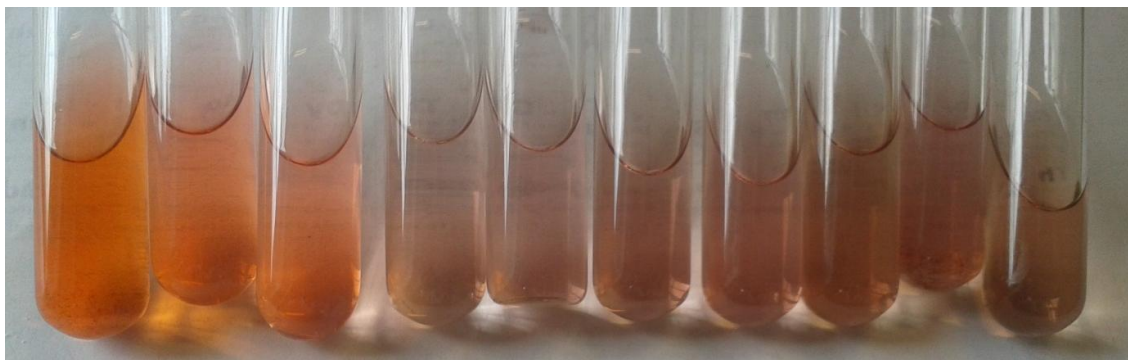
Extrakt ostružin se v různém prostředí, na rozdíl od předchozích dvou testovaných vzorků, tak výrazně barevně neodlišoval. Nejsytější zbarvení opět nabývá v kyselém prostředí při pH o hodnotě 2, 3 a 4. Při pH od 5 do 12 ztrácí svoji sytost, ale zachovává si růžový odstín.



Obr. 13 **Roztok antokyanů z ostružin (pH 2 – 12).**

Antokyanany v ostružinách: Cy- 3- glukosid, Cy- 3- rutinosid, Cy- 3- xylosid, Pg-3-glukosid, (glykosidy Dp, biosidy Cy, Mlv) ¹

U extraktu z jahod nastala podobná situace jako u extraktu z ostružin. Nejsytější zbarvení se objevuje v prostředí o pH 2. Antokyanany z jahod se zbarvují od oranžové (kyselé prostředí) přes lehce růžovou (neutrální) až k hnědé (zásadité).



Obr. 14 **Roztok antokyanů z jahod (pH 2 – 11).**

Antokyanany v jahodách: Pg a Cy- 3- glukosidy a 3,5- diglukosidy, triglykosidy Pg ¹

Stejný postup jsem provedla také u výluhu z červené řepy, který obsahuje jiný typ přírodních barviv- betaniny a také u roztoku s červeným syntetickým barvivem- azorubin. V obou případech byla barva roztoku stálá a změna pH neměla na barvu roztoku vliv. Tento postup můžeme použít jako jednoduché odlišení antokyanových barviv od ostatních přírodních barviv, které se používají k dobarvování potravin (betaninů) a také stejně barevných syntetických pigmentů. Změna zbarvení na základě změny pH prostředí je jednou z unikátních chemických vlastností, která se vyskytuje u antokyanů.

3. 3. 2 Změna zbarvení působením siřičitanu sodného

Pro lepší názornost a možnost porovnání jsem filtrát s antokyany nalila do dvou zkumavek. V jedné jsem nechala pouze tento roztok a do druhé jsem navíc přidala roztok siřičitanu sodného.

Tento roztok byl připraven smícháním 1 g siřičitanu sodného se 100 ml destilované vody a okyselený 1 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové.

K testování odbarvování roztoku siřičitanem sodným jsem zvolila některé druhy ovoce a zeleniny, květy rostlin a také potraviny jako ovocné džusy, šťávy a jiné nápoje, a některé sladkosti.

Pokud roztok obsahoval pouze antokyany, ihned se odbarvil po přidání okyseleného roztoku siřičitanu sodného. Stalo se tak u jahod, ostružin, ředkvičky, lentilek, sirupu z malin a sirupu lesní ovoce (Jupí).

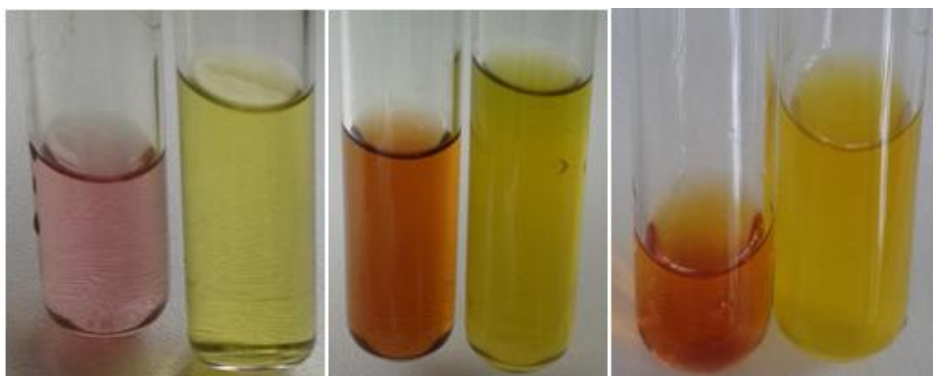


Obr. 15 Odbarvení extraktu antokyanů z jahod, ostružin a slupky z ředkvičky.



Obr. 16 Odbarvení extraktu antokyanů z malinového sirupu, sirupu Jupí lesní ovoce a růžových lentilek.

U červené cibule a většiny květin (listy nebo květy) došlo většinou jen k částečnému odbarvení na žlutý roztok. Změna se dá vysvětlit přítomností i jiných rostlinných barviv než jsou antokyany, které se siřičitanem sodným nereagují.



Obr. 17 Odbarvení extraktu z červené cibule, listu šťavelu purpurového a květu tulipánu zahradního.

Tento laboratorní postup byl opět testován na extraktu betaninů z červené řepy a na roztoku syntetického barviva azorubinu. V obou případech opět nedošlo ke změně barvy roztoku, ani k jeho odbarvení. Odbarvování siřičitanem sodným by tedy mohl být další jednoduchý postup, jakým lze odlišit antokyany od ostatních barviv.

3. 3. 3 Změna zbarvení působením viditelného světla

Pro otestování stability barvy antokyanů jsem zvolila výluh z červeného zelí. Nádobu s tímto roztokem jsem opatřila víčkem a nechala stát na přímém slunečním světle po dobu jednoho měsíce a pozorovala změnu zbarvení.

Po pár dnech začal roztok pomalu blednout. Po 14 dnech již bylo jasně vidět, jak extrakt z červeného zelí na přímém světle vybledl. Opět v porovnání s betaniny a syntetickými barvivy, mají antokyany velmi malou stabilitu barvy. Právě tato nízká stabilita barvy může způsobovat problémy při skladování ovocných kompotů a jiných ovocných pochutin, které časem ztrácejí svojí jasnou barvu.

Po více než 14 dnech se u roztoku začala objevovat hnědá barva a po měsíci byl tento výluh úplně hnědý, zakalený a dokonce tmavší než roztok původní.



Obr. 18 Čerstvý výluh z červeného zelí (vlevo), výluh z červeného zelí po 14 dnech na přímém světle (uprostřed), výluh z červeného zelí po měsíci na přímém světle (vpravo).

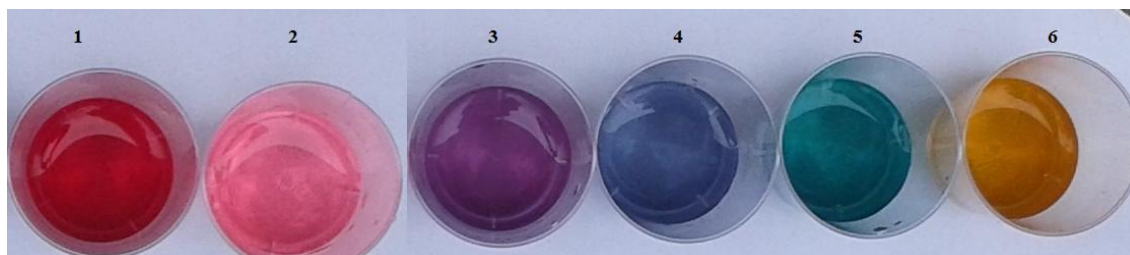
3. 4. Červené zelí jako pH indikátor

Extrakt z červeného zelí obsahuje velké množství antokyanů. Protože antokyany mají takové chemické vlastnosti, že dokážou měnit zbarvení podle kyselosti prostředí, dají se využít jako další druh pH indikátoru. Pro tento pokus byla vybrána červená varianta zelí, díky jeho dostupnosti, snadnému vyluhování i ve vodě a poskytnutí pestré a dobře názorné pH stupnice.

V první řadě si připravíme extrakt zelí. Listy na drobno nastříháme a necháme louhovat v ethanolu, případně je krátce povaříme ve vodě. Po vyluhování tuto směs přefiltrujeme, abychom získali čistý filtrát, se kterým budeme dále pracovat.

3. 4. 1 Vytvoření vlastní barevné stupnice pH

Zaznamenejme si nebo vyfotíme zbarvení původního roztoku (čistý výluh ze zelí). Postupně přikapáváme zředěný hydroxid sodný (méně než 2%) případně roztok jedlé sody, každou výraznější změnu zbarvení dokumentujeme nebo zapisujeme, čímž vytvoříme pH stupnici v zásadité oblasti. Kyselou oblast pH stupnice vytvoříme stejným stylem, jen přikapáváme zředěnou kyselinu chlorovodíkovou (méně než 10%), ocet nebo roztok kyseliny citronové.



Obr. 19 Indikátor z červeného zelí.

1- větší množství kyseliny citronové, 2- menší množství kyseliny citronové, 3- čistý výluh ze zelí, 4- menší množství jedlé sody, 5- větší množství jedlé sody, 6- silnější roztok hydroxidu sodného

Červené a růžové roztoky svědčí o kyselém prostředí. V zásaditém prostředí je barevná škála o něco pestřejší od modré po modrozelenou, zelenou až žlutou.

3. 4. 2 Vytvoření vlastních pH indikátorů

Filtrační papír rozstříháme na malé proužky a napustíme je výluhem ze zelí. Necháme je uschnout a poté je používáme jako klasické lakmusové papírky. U roztoků různých látek z kuchyně a domácnosti určujeme, zda se jedná o silnější kyselinu, slabší

kyselinu, slabší zásadu či silnější zásadu. K určování používáme námi připravenou barevnou stupnici.



Obr. 20 Vyrobené indikátorové papírky z výluhu z červeného zelí.

Nejprve byl připraven nasycený roztok kyseliny citronové, který byl změřen lakmusovým indikátorem i indikátorem z výluhu z červeného zelí. U obou papírků se objevilo zbarvení charakteristické pro pH 1. To samé bylo provedeno u nasyceného roztoku jedlé sody. Výsledné pH se podle lakmusového indikátoru pohybuje mezi 9 a 10 a podle antokyanového indikátoru kolem 10 a 11.



Obr. 21 Měření pH univerzálním lakmusovým papírkem a indikátorem z červeného zelí u roztoku kyseliny citronové (vlevo) a u roztoku jedlé sody (vpravo).

Dále bylo měřeno pH oblíbených nápojů- černého čaje a černé kávy. Opět byly pro srovnání použity oba indikátory. V obou případech se testované vzorky pohybovaly kolem pH 6.



Obr. 22 Měření pH univerzálním lakmusovým papírkem a indikátorem z červeného zelí u černého čaje (vlevo) a černé kávy (vpravo).

Velmi často používanou kyselinou v domácnosti je kyselina octová, tedy její 8% roztok známý pod názvem ocet. V hodně domácnostech se také nachází velmi silná zásada hydroxid sodný, pro testování zde byl použit čistič odpadů (obchodní název Krtek). Podle měření vyšel čistič odpadů jako zásada o pH mezi 12 a 13 a ocet jako kyselina kolem pH 4.



Obr. 23 Měření pH univerzálním lakmusovým papírkem a indikátorem z červeného zelí u octu (vlevo) a čističe odpadů- louhu (vpravo).

Další porovnávanou dvojicí je tuhé mýdlo a tekuté mýdlo. U mýdla tuhého vyšlo pH podle obou indikátorů zásaditější než u tekutého mýdla. Zatímco tekuté se pohybovalo kolem neutrálních hodnot pH 7, tuhé bylo v zásaditější oblasti kolem hodnot pH 8 – 9.



Obr. 24 Měření pH univerzálním lakmusovým papírkem a indikátorem z červeného zelí u tuhého mýdla (vlevo) a tekutého mýdla (vpravo).

Poslední testovanou dvojicí jsou dva velmi oblíbené alkoholické nápoje a to pivo a víno. Růžové víno vyšlo o něco kyselější, pohybovalo se kolem pH 4, zatímco pivo se blížilo k neutrálnímu pH s hodnotou kolem 5 – 6.



Obr. 25 Měření pH univerzálním lakmusovým papírkem a indikátorem z červeného zelí u piva (vlevo) a vína (vpravo).

3. 4. 3 Porovnání indikátoru z červeného zelí s univerzálním lakmusovým

Pokud budeme porovnávat stupnici indikátoru z červeného zelí a stupnici univerzálního lakmusového indikátoru, můžeme pozorovat velké rozdíly v barevnosti. Zatímco neutrální barva u klasických papírků je žlutá, u červeného zelí je tato barva fialová. V kyselém prostředí najdeme u lakmusu různé barvy od růžové, přes červenou až po oranžovou a oranžovožlutou. U červeného zelí najdeme spíše červenou a růžovou barvu. Velké změny jsou také v zásadité oblasti. Nejzásaditější látky dokážeme lakmusem modrým zbarvením a červeným zelím v odstínech od zelené po žlutou. Slabé zásady barví lakmusový papírek zelenomodře a červené zelí se zbarvuje fialovomodře.



Obr. 26 Barevná stupnice pH u indikátoru z červeného zelí.⁸



Obr. 27 Barevná stupnice pH u univerzálního lakmusového indikátoru.²⁶

3. 5 Dělení barviv

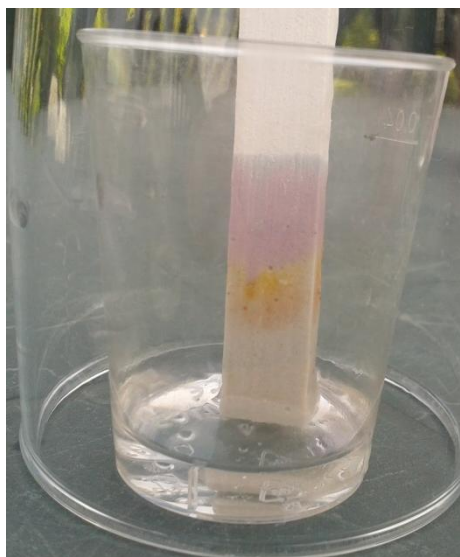
K dělení barviv je nejčastěji užívaná chromatografie. Principem chromatografie je dělení látek mezi stacionární (nepohyblivou) fází a mobilní (pohyblivou) fází.² Stacionární fází může zastupovat chromatografický papír nebo tenká vrstva, v našem případě školní křída a filtrační papír.

Při dělení látek se nejnižší na stacionární fází zachycují takové látky, které mají největší schopnost adsorpce. Nejvýše se pak dostávají takové látky, které jsou schopny adsorpce nejméně. Výsledkem chromatografie je pak chromatogram, ze kterého čteme výsledky.

Při volbě mobilních a stacionárních fází byla snaha o to, aby materiál byl dostupný a mohl s ním pracovat každý. Proto byly zvoleny jednoduché postupy, které rozdělí antokyany od ostatních barviv (chlorofyl, karotenoidy,...). Tento postup není sice úplně přesný, ale může žákům ukázat princip chromatografie a dát jim povědomí o tom, že se v rostlinách nevyskytuje pouze jeden typ barviv, ale i jiné, různě barevné.

3. 5. 1 Chromatografie na školní křídě

Ethanolové výluhy z různých rostlin přefiltrujeme a získaný čistý filtrát nanášíme skleněnou kapilárou na školní křidu (stacionární fáze) asi 1 cm od okraje. Jako mobilní fází použijeme ethanol. Malé množství ethanolu nalijeme do menší nádoby a postavíme sem bílou křidu s naneseným vzorkem a přikryjeme větší kádinkou. Necháme mobilní fází vzlihat, dokud se nedostane téměř k druhému konci křidy. Poté křidu vyjmeme a pozorujeme vzniklý chromatogram.



Obr. 28 Uspořádání chromatografie na školní křídě.

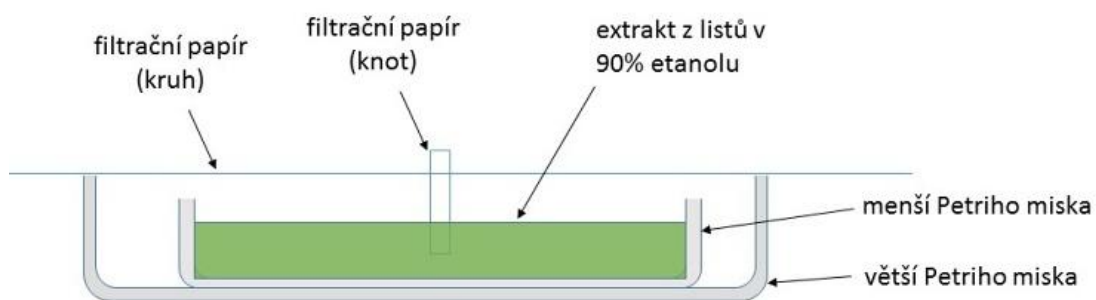


Obr. 29 Průběh chromatografie na bílé školní třídě z extraktu z kořene mrkve a listů červeného zelí.

Při chromatografii tohoto výluhu můžeme pozorovat rozdělení žlutých karotenoidů z mrkve od fialových a modrých antokyanů z červeného zelí.

3. 5. 2 Kruhová chromatografie na filtračním papíře

Opět připravíme výluh z částí rostlin, přefiltrujeme a tento filtrát nalijeme do menší Petriho misky. Tuto Petriho misku dáme do další větší proto, abychom na ni mohli položit kruh z filtračního papíru podle níže uvedeného schématu. Do filtračního papíru jsme si připravili malou díрку, do které jsme zasunuli ruličku z jiného kousku filtračního papíru jako knot, který bude nasávat námi připravený extrakt. Na filtračním papíru pozorujeme na chromatogramu, jak se nám dělí různá barviva.



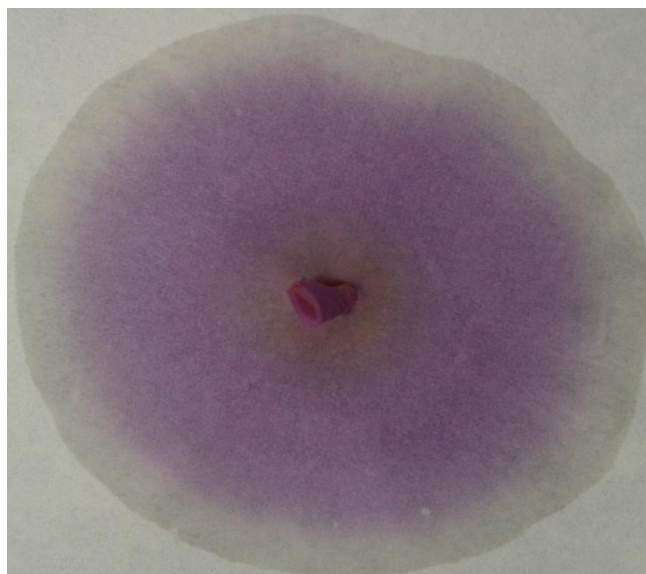
Obr. 30 Schéma kruhové chromatografie na filtračním papíře.¹¹



Obr. 31 Průběh kruhové chromatografie z extraktu směsi různých částí rostlin. (květ plaménku (*Clematis*), listy břečťanu popínavého a listy červeného zelí)

Na filtračním papíru můžeme pozorovat tmavší růžový pruh antokyanů z listů červeného zelí, jemně fialový pruh antokyanů z květu *Clematis* a slabě zelený nádech chlorofylu z listů břečťanu.

Podobného výsledku jsme docílili také u extraktu z mrkve a červeného zelí. Nejbližše knotu se oddělily oranžovo-žluté karotenoidy a za nimi silnější růžový proužek antokyanů.



Obr. 32 Průběh kruhové chromatografie z extraktu kořenu mrkve a listů červeného zelí.

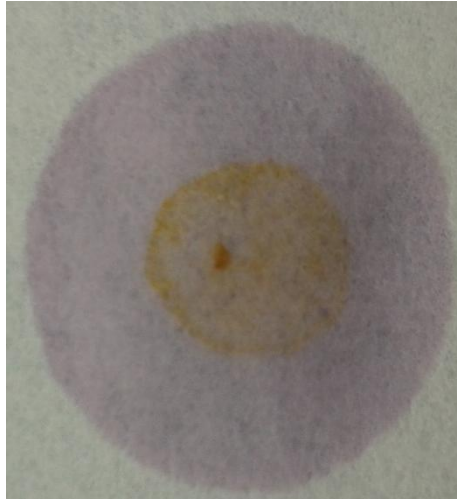
3. 5. 3 Nakapání výluhu na filtrační papír

Druhá varianta je pouhé nakapání tohoto výluhu na filtrační papír. I v tomto případě můžeme pozorovat, že se nám barvy rozložily. Objevilo se nám stejné rozložení jako v případě kruhové chromatografie, jen nebyly přechody tak výrazné.



Obr. 33 Rozklad barev na filtračním papíru z extraktu směsi různých částí rostlin. (květ plaménku (Clematis), listy břechťanu popínavého a listy červeného zelí)

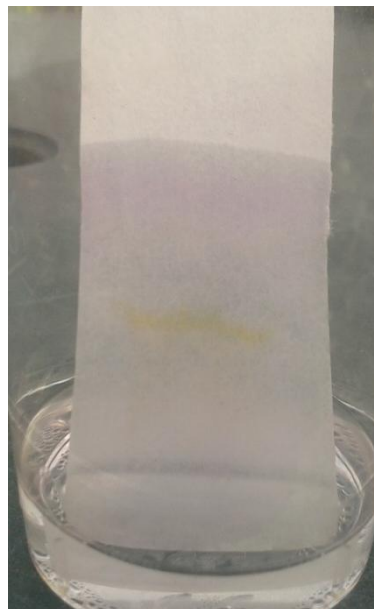
Stejný postup byl vyzkoušen také na výluhu z červeného zelí a mrkve. Při tomto typu rozkladu barev jsou karotenoidy o něco výraznější než u předchozí kruhové chromatografie.



Obr. 34 **Rozklad barev na filtračním papíru z extraktu z kořene mrkve a listů červeného zelí.**

3. 5. 4 Chromatografie na pruhu filtračního papíru

Další možnost je podobná jako u chromatografie na školní křídě, jen s použitím filtračního papíru. Na filtrační papír kápneme 1 centimetr od okraje přefiltrovaný výluh z rostlin, ponoříme filtrační papír do ethanolu, aby se nedotýkal stěn kádinky, kádinku s filtračním papírem uvnitř uzavřeme a necháme vzlínat. Po čase pozorujeme rozklad barev.



Obr. 35 **Průběh chromatografie na proužku filtračního papíru.**

Na chromatografii na pruhu filtračního papíru byl použit opět roztok z listů červeného zelí a kořenu mrkve. Oproti ostatním typům dělení barviv neposkytuje tento postup výrazné zbarvení. Oranžovožluté karotenoidy vytvořily úzký pruh kousek od startu, zatímco fialové antokyany pouze velmi světlý a téměř nevýrazný proužek blíže k čelu chromatografie.

4. ZÁVĚR

Hlavním cílem této diplomové práce bylo otestovat chemické vlastnosti antokyanů, porovnat tyto vlastnosti s vlastnostmi jiných přírodních barviv (betalainů) a s vlastnostmi syntetických barviv a navrhnout jednoduché laboratorní postupy pro rozlišení antokyanových barviv od ostatních.

V teoretické části popisují hlavně chemické vlastnosti antokyanů a vliv různých faktorů na změnu jejich zbarvení a faktory ovlivňující stabilitu zbarvení, což je také jedním z cílů této práce. Dále se zabývám strukturou antokyanů a antokyanidinů a přehledem rostlin, které antokyanová barviva obsahují. Protože jsou tyto látky i významná potravinářská barviva, která jim dodávají atraktivní zbarvení, je zde zařazena i kapitola o barvení potravin. Kvůli navrhnutí laboratorních postupů k odlišení antokyanů od ostatních barviv jsou v teoretické části popsány také syntetická barviva a betalainy- další významná barviva získaná z červené řepy. Jsou zhodnocena jejich pozitiva i negativa při využití těchto látek jako aditiva v potravinách. Je zde také zmíněno, jaký vliv mají tyto látky na lidský organismus a popsány hlavně jejich antioxidační účinky. Poslední kapitola je věnována chromatografickým metodám, kterými lze rozdělit různé druhy antokyanových barviv. Jsou zde popsány tři druhy chromatografických metod, kterými se antokyaniny rozlišují- chromatografie sloupcová, chromatografie na papíře a chromatografie na tenkých vrstvách.

V experimentální části jsou popsány a zdokumentovány výsledky testování chemických vlastností. Byla sledována hlavně změna zbarvení při změně pH prostředí, vliv siřičitanu sodného na barvu roztoku a také vliv přímého slunečního záření na roztok antokyanů. Stejně postupy byly vyzkoušeny také na roztocích betalainů získaných z červené řepy a na červeném syntetickém barvivu azorubinu. Chování těchto látek bylo zcela odlišné od chování antokyanů a lze tyto postupy považovat za jednoduché laboratorní metody k jejich rozlišení.

Pro praktickou část jsem se snažila vybrat takové metody, které jsou snadno proveditelné, využívají co nejméně chemikálií a dají se proto využít v každé škole. Pro extrakci antokyanů ze vzorku se v laboratorních příručkách využívá methanol. Ten jsem pro jeho velkou toxicitu a lepší využitelnost nahradila ethanolem, který je mnohem dostupnější. Vyzkoušela jsem také extrakci vodou, která v mnoha případech také poskytla extrakt, který se dal dále použít. I při výběru chromatografických metod jsem

se snažila vybrat takové metody, které jsou snadno dostupné- chromatografie na bílé křídě a kruhová chromatografie na filtračním papíru.

Pomocí červeného zelí, které je velmi dobrým zdrojem antokyanů, jsem navrhla jednoduchý školní pokus, který závisí právě na vlastnosti změny zbarvení v závislosti na pH prostředí. Tento postup opět není náročný na chemikálie a lze ho uskutečnit pomocí různých přípravků a potravin, které se běžně vyskytují v každé domácnosti.

5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- (1) VELÍŠEK J. a kol.: Chemie potravin 2. Osis, Tábor 1999.
- (2) DAVÍDEK J. a kol.: Laboratorní příručka analýzy potravin. SNTL, Praha 1981.
- (3) VELÍŠEK J., CEJPEK K.: Biosynthesis of food components. Osis, Tábor 2008.
- (4) ČÍHALÍK J., DVOŘÁK J., SUK V.: Příručka měření pH. Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1975.
- (5) BALÍK J.: Anthokyaninová barviva v hroznech a vínech: Anthocyanin pigments in grapes and wines. Mendelova univerzita v Brně, Brno 2010.
- (6) TICHÝ L., TICHÁ I.: Barvy z rostlin: povídání o přírodních barvivech a jejich využití, Rezekvítek, Brno 1997.
- (7) ZLOCH Z.: Určení přítomnosti antokyanů v potravinách. Závěrečná práce. Plzeň 1985.
- (8) Obrázek- stupnice pH indikátoru z červeného zelí,
http://www.enviroexperiment.cz/files/20_110_466_b.jpg, staženo 21. 5. 2016.
- (9) Obrázek- obecná struktura antokyanidinů,
http://phunuvasacdep.com/images/imgf000010_0001.png, staženo 20. 5. 2016
- (10) Obrázek- přeměna antokyanů v závislosti na změně pH prostředí,
<http://www.wikiskripta.eu/images/7/7e/Vliv-ph-na-antokyany.jpg>, staženo 4. 6. 2016
- (11) Změna barvy korunních lístků obsahující antokyany,
http://www.botanickafotogalerie.cz/novinky.php#curiosity_83, staženo 5. 6. 2016

- (12) Vliv oxidu siřičitého,
<http://www.wikiskripta.eu/images/8/8e/Anthok-siricity.jpg>, staženo 7. 6. 2016
- (13) Obrázek- vliv peroxidu kyslíku,
<http://www.wikiskripta.eu/images/3/3c/Anthok-peroxid.jpg>, staženo 7. 6. 2016
- (14) KABELKOVÁ P.: Stanovení aromaticky aktivních látek v netradičních typech drobného ovoce. Bakalářská práce. Brno 2013.
- (15) MARKOVÁ L.: Srovnání některých nových odrůd rybízu z hlediska vybraných obsahových látek. Diplomová práce. Brno 2013.
- (16) KURKA O.: Studium chemických přeměn anthokyanidinových barviv. Diplomová práce. Olomouc 2011.
- (17) Seznam „éček“ v potravinách,
<http://www.zdravapotravina.cz/seznam-ecek>, staženo 23. 5. 2016
- (18) WANG Z., ZHANG M., WU Q.: Effects of temperature, pH, and sunlight exposure on the color stability of strawberry juice during processing and storage. In: *LWT- Food Science and Technology*. **2015**, 60, s. 1174 - 1178.
- (19) BENVENUTI S., BRTOLOTTI E., MAGGINI R.: Antioxidant power, anthocyanin content and organoleptic performance of edible flowers. In: *Scientia Horticulturae*. **2016**, 199, s. 170 – 177.
- (20) NERADOVÁ E., RAJCH A., ČÍŽKOVÁ H.: Nedeklarované přibarvování výrobků z červeného a modrého ovoce: možnosti prokázání. In: *Chemické listy*. **2016**. 110, s. 4 – 10.
- (21) ZANOTTI I., DALL'ASTA M., MENA P., MELE L., BRUNI R., RAY S., DEL RIO D.: Atheroprotective effects of (poly)phenols: a focus on cell cholesterol metabolism. In: *Food and Function*. **2015**. 6, s. 13 – 31.

- (22) BOULILA A., MATTOUSSI K., M'RABET Y., ROKBENI N., DHOUIOUI M., BOUSSAID M.: Determination of phytochemicals and antioxidant activity of methanol extracts obtained from the fruit and leaves of Tunisian *Lycium intricatum* Boiss. In: *Food Chemistry*. **2015**. 174, s. 577 – 584.
- (23) HOLEČEK V.: Volné radikály, antioxidanty, jejich účinky a možnost jejich sledování metodami FORT a FORD. In: *Chemické listy*. **2004**. 98, s. 174 – 179.
- (24) HOLEČEK V., RACEK J.: Enzymy a volné radikály. *Chemické listy*. **1999**, 93.
- (25) PAULOVÁ H., BOCHOŘÁKOVÁ H., TÁBORSKÁ E.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*. **2004**, 98, s. 174 – 179.
- (26) Obrázek- stupnice pH u univerzálního lakmusového indikátoru,
http://www.enviroexperiment.cz/files/20_178_516.jpg, staženo 7. 6. 2016.
- (27) KŘENOVÁ A.: Antioxidační aktivita vybraných druhů drobného ovoce. Diplomová práce. Brno 2015.
- (28) ŠULCOVÁ R., BÖHMOVÁ H.: Pokusy z chemie i praktického života. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze 2007.
- (29) Obrázek- proantokyanidin,
<http://www.drycreeknutrition.com/AVsafe5.jpg>, staženo 7. 6. 2016.
- (30) OPEKAR F., JELÍNEK I., RYCHLOVSKÝ P., PLZÁK Z.: Základní analytická chemie. Praha 2002.
- (31) Chromatografie,
http://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM_07.pdf, staženo 8. 6. 2016.
- (32) Sloupcová chromatografie,
<http://www.ceskachemie.cz/svet-chemie/chemie-pro-skoly/stredni-skoly/analyticke-metody-chromatografie-i#.V2SwlqLpVPo>, staženo 8. 6. 2016

6. RESUMÉ

Tato diplomová práce se zabývá extrakcí antokyanových barviv z rostlinných materiálů a potravin a jejich důkazem v těchto materiálech. V práci je popsáno několik laboratorních postupů, kterými lze odlišit antokyany od ostatních přírodních barviv a od barviv syntetických, založených na jejich unikátních vlastnostech. Také navrhuji jednoduché pokusy využitelné ve škole, které nejsou náročné na chemikálie a které využívají právě jejich chemických vlastností. V teoretické části je popsána struktura antokyanů, výskyt a význam, vlivy, které mají vliv na jejich barevnost a také problematika dobarvování potravin a problémy s uchováváním potravin, které jsou barveny antokyany.

This diploma thesis deals with the extraction of anthocyanins pigments from plant materials and foodstuffs and their proof in these materials. I describe several laboratory experiments that distinguish anthocyanins from other natural pigments and synthetic pigments. These methods are based on their unique chemical characteristics. I also suggest simple experiments, which can be used in schools. These experiments require only minimum chemicals. The theoretical part describes the structure of anthocyanins, their occurrence and importance and also factors affecting their color. There is also mentioned the issue of food coloring and problems with storage of food which are colored with anthocyanins pigments.