

KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ ANTHOKYANŮ V KULTIVARECH PŠENICE S MODRÝM A PURPUROVÝM ZRNEM QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF ANTHOCYANINS IN KERNELS OF PURPLE AND BLUE COLOURED WHEAT CULTIVARS

Pavel Bartl, Bohuslava Tremlová, Martina Ošřádalová, Jana Pokorná, Michal Žďárský

Abstract: The aim of this work was determination and identification of anthocyanins in blue and purple wheat. We used ethanol and formic acid for extraction of anthocyanins from wheat. Determination of anthocyanins was performed by using HPLC. Blue wheat contained 8.3 mg.kg^{-1} and purple wheat 12.3 mg.kg^{-1} of anthocyanins. We identified mainly delphinidin 3-glucoside, delphinidin 3-rutinoside, cyanidin 3-glucoside, cyanidin 3-rutinoside and peonidin 3-rutinoside in blue wheat. Purple wheat contained mostly cyanidin 3-glucoside, pelargonidin 3-glucoside, peonidin 3-glucoside and peonidin 3-rutinoside.

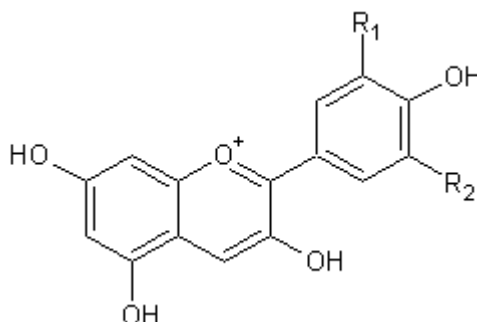
Keywords: flavonoids; cereals; determination; extraction; chromatography

ÚVOD

Anthokyaniny („*anthos*“ v řečtině květ a „*kyanos*“ modrý) představují nejširší a zřejmě i nejdůležitější skupinu ve vodě rozpustných přírodních pigmentů. Jedná se o fenolické látky zodpovědné za zbarvení mnoha druhů ovoce a zeleniny, ale také některých částí obilovin. Vyskytují se často v listech, stoncích, semenech a jiných rostlinných pletivech. V posledních letech dochází k identifikaci mnoha dalších anthokyanů, nyní je popsáno již více než 600 látek této skupiny (**Castaneda-Ovando a i., 2009**).

Z chemického hlediska se molekula anthokyanů skládá z části necukerné (aglykonu), která se nazývá anthokyanidin a jednoho nebo více cukerných zbytků. Jejich chemická struktura je uvedena na obrázku 1 a v tabulce 1. V buňkách se anthokyaniny nacházejí ve vakuolách a způsobují různé odstíny od oranžové po červenou, fialovou a modrou.

Anthokyaniny patří do velké skupiny chemických látek, která se nazývá flavonoidy. Fenolické sloučeniny a zejména anthokyaniny jsou v obilovinách obsaženy ve volné a konjugované formě. V zrně pšenice mohou dosahovat nejvyšší koncentrace v aleuronové vrstvě, nižší množství bývá v embryu a osemeni zrn (**Naczka a Shahidi, 2006**).



Obrázek 1 Chemická struktura anthokyanidinu

Tabulka 1 Nejčastější anthokyanidiny

Aglykon	R ₁	R ₂	Barva
Kyanidin	OH	H	červená
Peonidin	OCH ₃	H	fialová
Pelargonidin	H	H	červená
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃	červená
Delfinidin	OH	OH	modrá
Petunidin	OCH ₃	OH	fialová

Anthokyanidiny se samostatně v přírodě prakticky nevyskytují, vyskytují se pouze v jejich glykosylované formě, která se nazývá anthokyany. Tyto sloučeniny jsou mnohem rozpustnější a stabilnější ve vodě než anthokyanidiny, což je důsledek jejich glykosylace. Jejich klasifikace se provádí podle počtu sacharidových jednotek, které obsahují (**Andersen a Markham, 2006, Castaneda-Ovando a i., 2009**).

Cílem této práce je kvalitativní a kvantitativní stanovení anthokyanů v pšenici s modrým a purpurovým zabarvením zrna.

MATERIÁL A METODY

Pro náš experiment byl vybrán vzorek pšenice s purpurovým zrnem, který je v genové bance v Praze uveden pod názvem Abyssinskaja arrasajta a vzorek Skorpion s modrým zrnem.

Vzorek 10 g rozemletého zrna byl extrahován v 50 ml extrakčního roztoku ethanolu a kyseliny mravenčí. Směs obilného šrotu a extrakčního činidla byla míchána na třepačce po dobu 3 hodin a poté odstředěna. Následně byl vzorek reextrahován stejným extrakčním roztokem o objemu 20 ml po dobu 2 hodin a opět odstředěn. Vzniklý supernatant byl následně odpařen do sucha na vakuové rotační odparce při laboratorní teplotě (**Hu i., 2007**).

Kvalitativní i kvantitativní stanovení anthokyanů bylo provedeno za použití kapalinové chromatografie s detektorem s diodovým polem. Měření probíhala při vlnové délce 520 nm. Pro tuto analýzu byla použita kolona Supelcosil C18. Mobilní fáze byla složena z kyseliny mravenčí a methanolu. Použitá metoda byla převzata od **Abdel-Aal a i. (2006)** a optimalizována na naše podmínky. Každé měření bylo opakováno třikrát. Výsledná odchylka měření koncentrace anthokyanů byla $\pm 0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ pšenice.

VÝSLEDKY A DISKUZE

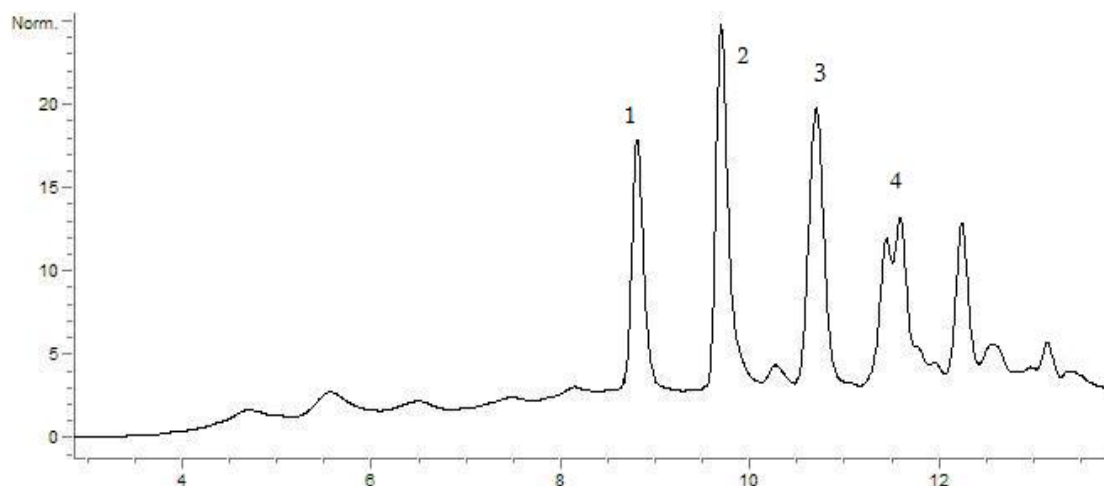
Celkové množství anthokyanů bylo u pšenice s modrým zrnem $8,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ a u pšenice s purpurovým zrnem $12,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ (tabulka 2). Tyto hodnoty jsou velmi nízké v porovnání s hodnotami, které byly dříve zjištěny v příbuzných kultivarech pšenice se stejně zabarveným zrnem. **Abdel-Aal a Hucl (2003)** analyzovali anthokyany v pšenicích s purpurovým zrnem kultivaru Konini a modrým zrnem kultivaru Purendo ve třech po sobě jdoucích letech. Množství anthokyanů se v jejich výsledcích meziročně pohybovalo u pšenice s modrým zrnem od $139,3$ do $143,9 \text{ mg.kg}^{-1}$ a u pšenice s purpurovým zrnem od $61,3$ do $153,3 \text{ mg.kg}^{-1}$. Tyto vysoké meziroční výkyvy jsou způsobeny více faktory, které zároveň vysvětlují odlišnost jejich výsledků od našich. Jedním z nich je lokalizace anthokyanů v zrně pšenice. U pšenice s purpurovým zrnem se anthokyany nacházejí v perikarpu, zatímco u pšenice s modrým zrnem jsou lokalizovány v aleuronové vrstvě. Důležitou roli hrají i klimatické

podmínky, které působí na porost během vegetace a tak mohou do značné míry ovlivnit celkové množství anthokyanů v obilkách.

Tabulka 2 Kvantitativní a kvalitativní zastoupení majoritních anthokyanů ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) ve vzorcích pšenice

Anthokyan	Množství	
	Pšenice s modrým zrnem	Pšenice s purpurovým zrnem
delfinidin 3–glukosid	0,5	-
delfinidin 3–rutinosid	1,5	-
kyanidin 3–glukosid	1,0	1,6
kyanidin 3-rutinosid	2,7	-
peonidin 3–rutinosid	0,4	0,6
pelargonidin 3–glukosid	-	2,0
peonidin 3-glukosid	-	1,7
Celkem	8,3	12,3

Kvalitativní zastoupení jednotlivých druhů anthokyanů je v pšenicích s purpurovým a modrým zrnem vzájemně odlišné. Pšenice s modrým zrnem obsahují zejména delfinidin 3-glukosid a delfinidin 3-rutinosid, které se v pšenicích s purpurovým zrnem nevyskytují. Mezi majoritní anthokyanů v pšenici s purpurovým zrnem (obrázek 2) patří zejména kyanidin 3-glukosid, pelargonidin 3-glukosid, peonidin 3-glukosid a peonidin 3-rutinosid. Kyanidin 3-glukosid a peonidin 3-rutinosid byly detekovány i ve vzorku pšenice s modrým zrnem.



Obrázek 2: Chromatogram vzorku pšenice s purpurovým perikarpem (č. 1 kyanidin 3-glukosid, č. 2 pelargonidin 3-glukosid, č. 3 peonidin 3-glukosid, č. 4 peonidin 3-rutinosid)

Shoda v kvalitativním složení anthokyanů mezi stejně zabarvenými kultivary pšenice je mezi našimi výsledky a těmi publikovanými v dalších vědeckých pracích vysoká. **Abdel-Aal a Hucl (2003)** a **Knieval a i. (2009)** dospěli prakticky ke stejnému kvalitativnímu zastoupení anthokyanů v zrna pšenice, ke kterému jsme dospěli i my.

ZÁVĚR

Cílem práce bylo kvalitativní a kvantitativní stanovení anthokyanů v pšenicích se zabarveným zrnem. Ve vzorcích pšenic byly detekovány majoritní anthokyany, jejichž identita se ve většině případů shodovala s těmi, které byly již dříve publikovány ve vědecké literatuře. Množství anthokyanů v našich vzorcích bylo velmi nízké (až 15x nižší) v porovnání s výsledky z dalších vědeckých prací. Tyto rozdíly jsou zřejmě způsobeny charakteristikou pěstovaného kultivaru pšenice a také klimatickými podmínkami stanoviště, kde byly vzorky vypěstovány.

LITERATURA

- ABDEL-AAL, E., S. M., HUCL, P. 2003. Composition and Stability of Anthocyanins in Blue-Grained Wheat. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, p. 2174-2180.
- ABDEL-AAL, E., S., M., YOUNG, J., CH., RABALSKI, I. 2006. Anthocyanin Composition in Black, Blue, Pink, Purple, and Red Cereal Grains. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, p. 4696-4704.
- ANDERSEN, O., M., MARKHARM, K., R. 2006. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. 1. vyd., Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis, 1197 s.
- CASTANEDA-OVANDO, A., PACHECO-HERNÁNDEZ, M., L., PÁEZ-HERNÁNDEZ, M., E., RODRIGUEZ, J., A., GALÁN-VIDAL, C., A. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. In *Food Chemistry*, vol. 113, p. 859-871.
- HU, C., CAI, Y., Z., LI, W., D., CORKE, H., KITTS, D., D. 2007. Anthocyanin characterization and bioactivity assessment of a dark blue grained wheat (*Triticum aestivum L.* cv. Hedong Wumai) extract. In *Food Chemistry*, vol. 104, p. 955-961.
- KNIEVEL, D. C., ABDEL-AAL, E., S. M., RABALSKI, I., NAKAMURA, T., HUCL, P. 2009. Grain color development and the inheritance of high anthocyanin blue aleurone and purple pericarp in spring wheat (*Triticum aestivum L.*). In *Journal of Cereal Science*, vol. 50, p. 113-120.
- NACZK, M., SHAHIDI, F. 2006. Phenolics in Cereals, Fruits and Vegetables: Occurrence, Extraction and Analysis. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 41, p. 1523-1542.

Poděkování: Tato práce byla podpořena grantem IGA 91/2011/FVHE.

Kontaktní adresa: Mgr. Pavel Bartl, Ústav vegetabilních potravin, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, e-mail: bartlp@vfu.cz