

Stanovení anthokyanů v pšenicích s purpurově a modře zbarveným zrnem

*(Determination of Anthocyanins in Kernels
of Purple and Blue Coloured Wheat Cultivars)*

Bartl, P. ^a, Tremlová, B. ^a, Ošťádalová, M. ^a, Čáslavková, P. ^a, Eliášová, M. ^a, Žďárský, M. ^b

^a Ústav vegetabilních potravin, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

^b Ústav biochemie, chemie a biofyziky, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Souhrn: Práce se zabývá kvalitativní analýzou a stanovením anthokyanů v odrůdách pšenice s purpurově (Abyssinskaja arrasajta) a modře zbarveným zrnem (Skorpion). Pro extrakci obsahových látek byl použit ethanol s přídavkem kyseliny mravenčí, identifikace a stanovení obsahu anthokyanů byla provedena pomocí HPLC. Kvantitativním měřením bylo zjištěno, že pšenice s modrým zrnem obsahují 8,3 mg/kg anthokyanu, u pšenice s purpurovým zrnem bylo nalezeno 12,3 mg/kg. Bylo zjištěno, že pšenice s modrým zrnem obsahují zejména delphinidin 3–glukosid, delphinidin 3–rutinosid, kyanidin 3–glukosid, kyanidin 3–rutinosid a peonidin 3–rutinosid. V pšenicích s purpurovým zrnem se v největším množství vyskytuje hlavně kyanidin 3–glukosid, pelargonidin 3–glukosid, peonidin 3–glukosid a peonidin 3–rutinosid.

Klíčová slova: flavonoidy; obiloviny; stanovení; extrakce; chromatografie

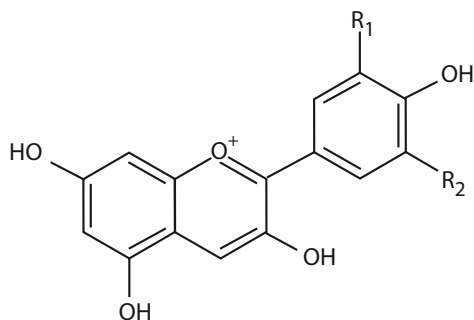
Abstract: This article describes qualitative analysis of anthocyanins and their quantitative determination in wheat with purple (Abyssinskaja arrasajta) and blue (Škorpion) coloured kernels. We used ethanol and formic acid for extraction of anthocyanins from wheat. Determination of anthocyanins was performed by using HPLC. There is 8.3 mg/kg of anthocyanins in blue wheat and 12.3 mg/kg of anthocyanins in purple wheat. We found out presence mainly delphinidin 3–glucoside, delphinidin 3–rutinoside, cyanidin 3–glucoside, cyanidin 3–rutinoside and peonidin 3–rutinoside in blue coloured wheat kernels. Purple wheat contains mostly cyanidin 3–glucoside, pelargonidin 3–glucoside, peonidin 3–glucoside and peonidin 3–rutinoside.

Key Words: flavonoids; cereals; determination; extraction; chromatography

Úvod

Anthokyany („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, zeleniny, květin ale také některých částí obilovin. Vyskytují se často v listech, stoncích, semenech a jiných rostlinných pletivech. V posledních letech bylo charakterizováno velké množství anthokyanů, v současné době je popsáno již více než 600 sloučenin této skupiny (Castaneda-Ovando a kol., 2009). Molekula anthokyanů se skládá z části necukerné (aglykonu), která se nazývá anthokyanidin, a jednoho nebo více glykosidicky vázaných cukerných zbytků. Chemická struktura nejčastějších anthokyanidinů je uvedena na obrázku 1 a v tabulce 1. V rostlinných buňkách se anthokyany nacházejí ve vakuolách a jsou zodpovědné za různé barevné odstíny, od oranžové po červenou, fialovou a modrou. Obecně platí, že pelargonidin barví červeně, kyanidin způsobuje purpurové až červené zbarvení a delphinidin modrou barvu. U hmyzoznubných rostlin pestře zbarvené květy přitahují hmyzí opylovače. Vzhledem k tomu, že některé barvy intenzivněji pohlcejí kratší vlnové délky slunečního spektra, mohou tyto sloučeniny přispívat k ochraně rostlin před poškozením ultrafialovým zářením.

Obrázek 1. Chemická struktura anthokyanidinu



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 kol., 2009).

Degradace anthokyanů probíhá za vysoké teploty, světla, přítomnosti kyslíku, rozpouštědel a některých enzymů. Jejich barevnost ovlivňuje pH nebo přítomnost kovů. Studie z poslední doby se zaměřují především na způsoby jejich stabilizace. Jedná se totiž o látky potenciálně využitelné v potravinářském průmyslu, neboť vykazují pozitivní účinky na lidské zdraví. Proto se uvažuje

o jejich širším využití namísto umělých barviv (Castaneda-Ovando a kol., 2009). U obilných potravinářských surovin by vysoké množství anthokyanů v zrnu mohlo mít při pravidelné konzumaci ve formě základních potravin (jako například chléb) značný význam pro zlepšení zdraví člověka a k tomuto účelu je vhodné vyšlechtit příslušné odrůdy obilovin. Anthokyany a fenolické látky jsou zastoupeny nejvíce v perikarpu nebo v aleuronové vrstvě zrna, nižší množství je v endospermu (Naczka a Shahidi, 2006).

Cílem práce bylo po kvalitativní a kvantitativní stránce předběžně charakterizovat zastoupení anthokyanů v nově vyšlechtěných odrůdách pšenice s barevným zrnem.

Materiál a metody

Pro experiment byla vybrána odrůda pšenice s purpurovým zrnem, která je v genové bance v Praze vedena pod názvem Abyssinskaja arrasajta, a odrůda pšenice Škorpion s modrým zrnem. Tyto vzorky byly vypěstovány v roce 2009 a pro účely našeho experimentu nám byly poskytnuty firmou Agrotest fito, s.r.o. Kroměříž.

Vzorek 10 g rozemletého zrna byl extrahován v 50 ml extrakčního roztoku ethanolu s přídavkem 12,5 % kyseliny mravenčí. Směs obilného šrotu a extrakčního činidla byla míchána na třepačce po dobu 3 hodin a poté odstředěna. Vzorek byl znovu extrahován stejným extrakčním roztokem o objemu 20 ml po dobu 2 hodin a opět odstředěn. Supernatant byl následně odpařen do sucha na vakuové rotační odparce při laboratorní teplotě (Hu a kol., 2007).

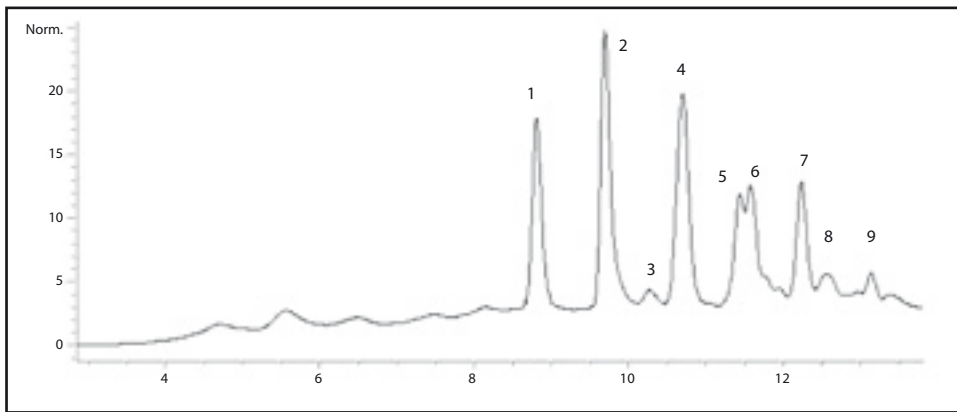
Identifikace a stanovení anthokyanů bylo provedeno za použití kapalinové chromatografie s detektorem s diodovým polem. Měření probíhala při vlnové délce 520 nm. Pro tuto analýzu byla použita kolona Supelcosil C18. Mobilní fáze byla složena z kyseliny mravenčí a methanolu. Použitá metoda pro kvantitativní analýzu byla převzata od Abdel-Aal a kol. (2006) a optimalizována na naše podmínky. Odchylka stanovení je cca $\pm 0,2$ mg anthokyanů na 1 kg pšenice. Nejprve byla za použití HPLC instrumentace provedena kvalitativní analýza získaných extraktů. Většina významných anthokyanů byla eluována mezi 8. a 14. minutou HPLC analýzy. Detekce byla provedena při vlnové délce 520 nm, která je blízko absorpčního maxima sloučenin ze skupiny anthokyanů.

Výsledky a diskuse

Obrázek 2 zobrazuje chromatogram extraktu pšenice s purpurovým zrnem. Z tohoto chromatogramu vyplývá, že extrakt kromě cca 6 majoritních signálů obsahuje celou řadu neintenzivních signálů, které dle charakteru svých UV spekter s velkou pravděpodobností přísluší mezi anthokyany. Majoritní signály byly identifikovány na základě porovnání UV-VIS spekter a retenčních časů mezi studovanými extrakty a komerčně zakoupenými standardy anthokyanů. Jedná se o kyanidin 3-glukosid, pelargonidin 3-glukosid, peonidin 3-glukosid a peonidin 3-rutinosid. Dva majoritní signály se nepodařilo

Tabulka 1: Nejčastější anthokyanidiny a jejich absorpční maximum

Aglykon	R1	R2	Barva	λ_{\max} [nm]
Kyanidin	OH	H	červená	535
Peonidin	OCH3	H	fialová	532
Pelargonidin	H	H	červená	520
Malvidin	OCH3	OCH3	červená	542
Delphinidin	OH	OH	modrá	546
Petunidin	OCH3	OH	fialová	543



na základě srovnání s komerčně dostupnými anthokyany identifikovat.

Za stejných podmínek byla provedena analýza extraktu získaného z odrůdy pšenice Škorpion s modrým zrnem. Podobně jako extrakt z purpurové pšenice Abyssinskaja arrasajta, obsahuje i extrakt z pšenice s modrým zrnem několik dominantních anthokyanů, které byly následně identifikovány. Jedná se o delfinidin 3-glukosid, delfinidin 3-rutinosid, kyanidin 3-glukosid, pelargonidin 3-glukosid, peonidin 3-glukosid a peonidin 3-rutinosid. Kyanidin 3-glukosid a peonidin 3-rutinosid byly detekovány ve vzorcích obou dvou barevných odrůd pšenice. Shoda v kvalitativním složení anthokyanů je mezi našimi výsledky a těmi publikovanými v dalších vědeckých pracích vysoká. Abdel-Aal a Hucl (2003) a Knievel a kol. (2009), kteří prováděli srovnatelné analýzy u jinak zbarvených odrůd pšenice, dospěli k velmi podobnému kvalitativnímu zastoupení anthokyanů. Z těchto výsledků vyplývá, že se zastoupení majoritních druhů anthokyanů u stejně zbarvených odrůd pšenice významně neliší a lze tak předpokládat, že jejich variabilita není mezi stejně zbarvenými odrůdami velká.

Celkové množství anthokyanů nalezených u pšenice s modrým zrnem bylo 8,3 mg/kg a u pšenice s purpurovým zrnem bylo naměřeno 12,3 mg/kg (Tabulka 2). Tyto hodnoty leží na spodní hranici rozmezí běžného obsahu anthokyanů v obilninách, které Abdel - Aal a kol. (2006) uvádí 7–3276 mg/kg. Zjištěné hodnoty obsahu anthokyanů nelze brát jako zcela absolutní a neměnné hodnoty, obsah anthokyanů se v závislosti na podmínkách růstu a zrání obilovin mění i v případě použití stejné odrůdy až několikanásobně (Abdel-Aal a Hucl 2003).

Závěr

Ve vzorcích pšenice byly identifikovány nejvýznamnější anthokyany a potvrzena přítomnost celého spektra minoritních sloučenin anthokyanového typu. Identifikované anthokyany jsou odvozené od delfinidinu, kyanidinu, peonidinu a pelargonidinu. Kvantitativní zastoupení anthokyanů je ve srovnání s příbuznými odrůdami se stejně zbarveným zrnem poměrně nízké.

Poděkování

Tato práce byla podpořena grantem IGA 75/2010/FVHE.

Děkujeme Ing. Petru Martinkovi, CSc. z Agrotest fyto, s.r.o. Kroměříž za poskytnutí vzorků.

Literatura:

ABDEL-AAL, E.-S., M., HUCL, P. (2003): Composition and Stability of Anthocyanins in Blue-Grained Wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2174-2180.

ABDEL-AAL, E.-S., M., YOUNG, J., Ch., RABALSKI, I. (2006): Anthocyanin Composition in Black, Blue, Pink, Purple, and Red Cereal Grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 4696-4704.

ANDERSEN, O., M., MARKHAM, K., R. (2006): *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications.*, Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis, 1197 p.

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. *Food Chemistry* 113: 859-871.

HOHNOVÁ, B., ŠTAVÍKOVÁ, L., KARÁSEK, P. (2008): Determination of Anthocyanins in Red Grape Skin by Pressurised Fluid Extraction and HPLC. *Czech Journal of Food Science* 26: S39-S42.

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. *Food Chemistry* 104: 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.). *Journal of Cereal Science* 50: 113-120.

NACZK, M., SHAHIDI, F. (2006): Phenolics in Cereals, Fruits and Vegetables: Occurrence, Extraction and Analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41: 1523-1542.

SCALBERT, A., WILLIAMSON, G. (2000): Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition* 130: 2073S-2085S.

WANG, L., S., STONER, G., D. (2008): Anthocyanins and Their Role in Cancer Prevention. *Cancer Letters* 269: 281-290.

/recenzováno/

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

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-glukosid	-	1,7
peonidin 3-rutinosid	0,4	0,6
pelargonidin 3-glukosid	-	2,0
neidentifikované	2,2	6,4
Celkem	8,3	12,3