UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2022 Barbora Kvášová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Betalainy, přírodní barviva obsažená v červené řepě

Bakalářská práce

2022 Barbora Kvášová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Barbora Kvášová**
Osobní číslo:	**C19119**
Studijní program:	**B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce:	**Betalainy, přírodní barviva obsažená v červené řepě**
Zadávající katedra:	**Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na využití přírodních barviv obsažených v červené řepě. Zaměřte se rovněž na účinky betalainů na lidské zdraví a v neposlední řadě se věnujte jejich analytickému stanovení.

2. Výsledky prezentované v literatuře porovnejte a kriticky zhodnoťte.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **7. února 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 21. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Betalainy, přírodní barviva obsažená v červené řepě jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 20. 6. 2022

Barbora Kvášová v. r.

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí práce doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za poskytnuté rady a prospěšné připomínky, které mi pomohly s vypracováním bakalářské práce. Chtěla bych poděkovat rodičům za neomezenou podporu během studia a kamarádce Pavlíně Hřebíčkové za možnost sdílení radostí a starostí během psaní této práce.

ANOTACE

Bakalářská práce pojednává o přírodních barvivech ze skupiny betalainů, která se vyskytují v červené řepě. V práci je popsáno složení červené řepy, její využití jako zdroj potravinářského barviva a přiblížena problematika přírodních a syntetických potravinářských barviv. Dále jsou specifikovány účinky červené řepy na lidské zdraví. V neposlední řadě jsou v práci popsány metody používané pro stanovení betalainů v červené řepě, mezi které patří spektrofotometrie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

KLÍČOVÁ SLOVA

betalainy, potravinářská barviva, červená řepa, betanin, spektrofotometrie, HPLC

TITLE

Betalains, natural dyes contained in beets.

ANNOTATION

The bachelor thesis deals with natural dyes from the group of betalains, which occur in beetroot. The composition of beetroot and its use as a source of food dye is described in this work. The issue of natural and synthetic food dyes is also mentioned. Further, the effects of beetroot on human health are specified. Last but not least, the analytical methods used for the determination of betalains, including spectrophotometry and high-performance liquid chromatography, are described.

KEYWORDS

betalains, food dyes, beetroot, betanin, spectrophotometry, HPLC

OBSAH

ÚVOD 10
1 Červená řepa 11
1.1 Pěstování 12
1.2 Složení 12
2 Betalainy 14
2.1 Sekundární metabolity 14
2.2 Rostlinná barviva 14
2.3 Betalainy vs. anthokyany 14
2.4 Rozdělení betalainů 15
2.4.1 Betaxanthiny 16
2.4.2 Betakyany 18
2.5 Funkce betalainů 19
2.6 Výskyt a zdroje betalainů 20
2.6.1 Biosyntéza betalainů 20
3 Přídatné látky v potravinách 22
3.1 Barviva v potravinách 22
3.1.1 Přírodní vs. syntetická barviva 23
3.2 Přírodní barviva 25
3.2.1 Anthokyany 25
3.2.2 Karotenoidy 25
3.2.3 Karmín 26
3.3 Betanin v potravinářství 26
3.3.1 Získávání potravinářského betaninu 27
4 Fyziologické účinky betalainů na zdraví 28
4.1 Antioxidační vlastnosti 28
4.2 Protizánětlivé vlastnosti 29
4.3 Protinádorové působení 29
4.4 Kardioprotektivní vlastnosti a vliv na složení krve 29
5 Analytické stanovení betalainů v červené řepě 31
5.1 Příprava vzorku k analýze 31
5.2 Spektrofotometrie 32
5.2.1 Spektrofotometrické stanovení betalainů 32
5.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie 34

5.3.1 Stanovení betalainů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií 36
5.4 Betalainy stanovené v červené řepě 37
ZÁVĚR 41
Bibliografie 42

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obr. 1: Červená řepa 11
Obr. 2: Mangold 11
Obr. 3: Kyselina betalamová 16
Obr. 4: Vznik betaxanthinů 16
Obr. 5: Indicaxanthin 17
Obr. 6: Obecná struktura betakyanů (betanidin: R_1=R_2=H) 18
Obr. 7: Zástupci betakyanů 19
Obr. 8: Biosyntéza betaninu 21
Obr. 9: Práškový extrakt z červené řepy 27
Obr. 10: Absorpční spektrum vodného extraktu červené řepy 33

Tabulka 1: Betalainy identifikované v červené řepě 38

SEZNAM ZKRATEK

ADHD	Porucha pozornosti s hyperaktivitou
ADI	Akceptovatelný denní příjem
BK	Betakyany
BX	Betaxanthiny
CAS	Chemical Abstracts Service
DAD	Detektor s diodovým polem
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
ESI	Ionizace elektrosprejem
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
L-DOPA	3,4-dihydroxyfenylalanin
NMR	Nukleární magnetická rezonance
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SPE	Extrakce na pevné fázi
Synon.	Synonymum
UHPLC-HR-MS	Spojení ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením
UV	Ultrafialová oblast
Var.	Varieta
VIS	Oblast viditelného světla

ÚVOD

Červená řepa je kulturní plodina, jejíž pěstování má na území ČR dlouholetou tradici. Svůj význam má tato kořenová zelenina nejen v kuchyni jako nutričně bohatá potravina, ale i jako průmyslová surovina pro získávání červeného potravinářského barviva. Červená řepa obsahuje betalainy, skupinu přírodních barviv se specifickým rozšířením v rostlinné říši. Betalainy zahrnují dvě rozmanité skupiny látek, žluté betaxanthiny a červené betakyany. Betanin či betalainová červeň má označení E162. Přírodní barviva se těší vzrůstajícímu zájmu, z důvodu toxicity řady syntetických barviv, avšak jejich použití má i své nevýhody.

V rostlinách plní betalainy podobnou funkci jako anthokyany, jejichž zastoupení napříč rostlinnými druhy je mnohem dominantnější. Otázkou zůstává, proč se u řádu hvozdíkotvarých rozhodla příroda pro betalainy a proč vůbec evoluce dospěla ke vzniku obou de facto rovnocenných skupin barviv. Betalainy jsou obsaženy dále u některých stopkovýtrusných hub.

Betalainy jsou bioaktivní látky, které mají pozitivní účinek na lidské zdraví. Červená řepa se díky velkému obsahu těchto látek řadí mezi deset druhů zeleniny s nejlepšími antioxidačními vlastnostmi. Pravidelná konzumace červené řepy pomáhá organismus chránit před vznikem rakoviny, potlačuje rozvoj zánětů a má pozitivní účinky na oběhovou soustavu.

Betalainy jsou ve vodě rozpustné sloučeniny. K jejich stanovení v červené řepě se používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Identifikaci jednotlivých betalainů umožňuje také její spojení s hmotnostní spektrometrií. Pro určení celkového obsahu betalainů je vhodnou metodou spektrofotometrie v UV/VIS oblasti.

1 Červená řepa

Červená řepa (*Beta vulgaris* var. *vulgaris*) se díky příznivým účinkům na zdraví pěstuje pro konzumaci v domácnostech či stravovacích zařízeních (Obr. 1). Slouží k přípravě salátů, ovocno-zeleninových smoothie a tradičních pokrmů, jako je boršč. Nakládaná řepa je chutnou přílohou k masovým pokrmům. Svůj význam má červená řepa i v potravinářském průmyslu, kde se využívá její nejvýznamněji zastoupené červené barvivo betanin, s označením E162 [1].

Obr. 1: Červená řepa [2]

Červená řepa je hojně pěstovaná kulturní plodina, která patří mezi rostliny čeledi laskavcovitých (*Amaranthaceae*) [3]. Zemědělsky využívané jsou podřazené taxony planě rostoucí řepy obecné (*Beta vulgaris*). Pro Českou republiku je tradiční produkce řepy červené neboli salátové (*Beta vulgaris Vulgaris Group*), řepy cukrovky (*Beta vulgaris Altissima Group*) a řepy krmné (*Beta vulgaris Rapacea Group*). K hospodářským odrůdám patří dále u nás téměř zapomenutý mangold (*Beta vulgaris Cicla Group*) (Obr. 2), který není na rozdíl od ostatních druhů pěstován pro kořen, ale jako listová zelenina.

Obr. 2: Mangold [4]

1.1 Pěstování

Jen během několika málo let lze sledovat jednoznačné zvýšení rozlohy osevní plochy červené řepy. Zatímco v roce 2018 byla v zemědělském sektoru oseta plocha 158 ha, v roce 2021 se vyšplhala na 261 ha, čímž překonala tři roky starou hodnotu o 65 % [5]. Na jeden hektar půdy se výnosy pohybují v rozmezí 50–60 tun, přičemž obsah betaninu je 0,5 g na kg surové červené řepy [6]. Při pěstování nemá speciální požadavky na druh půdy, prosperuje jak v těžkých jílovitých, tak lehkých písčitých půdách. Proto se často pěstuje i na soukromých zahrádkách pro osobní potřebu pěstitelů. Optimální hodnota pH půdy je 6,5–7,5 [7]. V případě hnojení kyselými hnojivy (NPK) je vhodné půdu pro udržení pH zároveň vápnit [8].

Vyšlechtěno je mnoho odrůd lišících se tvarem, velikostí a barvou, přičemž zahrádkáři vybírají především podle tvaru bulvy mezi kulatou a válcovitou. Výsev se provádí na jaře do řádků s rozestupy 30–45 cm. Semena se vysévají v 10cm rozestupech nebo se později hustota rostlin upravuje protrháním. Přesazování rostlin se zpravidla neprovádí, protože je úspěšné pouze u velmi mladých rostlin a později jej rostliny špatně snáší. Listy na salát se mohou sklízet kdykoliv během růstu, avšak zároveň musí být ponechán dostatek zelených listů potřebných pro růst. Zatímco první sklizeň nedorostlých bulv, které se konzervují nekrájené jako „Baby řepa“, nastává již po 40 dnech, bulvy v plné velikosti se sklízí až po dvou měsících od výsevu. Protože s přibývajícím časem bulva tvrdne až dřevnatí, neměla by v zemi po ukončení růstu zůstávat o mnoho déle [9; 10].

1.2 Složení

Červená řepa je z převládající části tvořena vodou, obsah sušiny je okolo 13 %. Nejvíce zastoupenou skupinou organických látek jsou sacharidy [11; 12]. Dominantním disacharidem je sacharóza, kterou doprovází její stavební jednotky, monosacharidy glukóza a fruktóza [12] a z polysacharidů zde můžeme najít škrob. Vedle sacharidů se v bulvě řepy nachází vláknina, proteiny, volné aminokyseliny a mastné kyseliny, jak nasycené, tak nenasycené (i polynenasycené) [13].

Z vitamínů jsou v bulvě obsaženy vitamín A, vitamíny skupiny B (thiamin, riboflavin, niacin, kyselina pantothenová a pyridoxin) a vitamín C [12]. Vitamín A se společně s vitamínem K nachází v listech, které se u mladých rostlin využívají na salát [13]. Červená řepa je rovněž významným zdrojem minerálních látek, jmenovitě sodíku, vápníku, železa, fosforu, draslíku, hořčíku a zinku [11–13].

Kromě vitamínů a minerálů obsahuje rostlina řadu bioaktivních látek. Vedle bohatě zastoupených betalainů představují druhou velkou a rozmanitou skupinu fenolické látky, které se dělí na flavonoidy a saponiny. Obě skupiny jsou četně zastoupeny v bulvě i v listech. Tím výčet fytochemikálií nekončí. Vedle fenolických látek jsou v červené řepě prokázány karotenoidy, alkaloidy, kumariny a další [13].

Betalainy jsou skupinou barviv, které se dále rozdělují na červené betakyany a žluté betaxanthiny, přičemž větší podíl na celkovém množství betalainů obsažených v červené řepě mají betakyany. Obsah betalainů se pohybuje v rozmezí 10–17 mg/g sušiny a velkou měrou závisí na konkrétní odrůdě, avšak nejvyšší koncentrace byla stanovena ve slupce řepy [14–16]. Hlavním betakyanem je betanin, který se vyskytuje společně se svým izomerem isobetaninem a jejich dalšími deriváty. Celkový počet jednotlivých betalainů identifikovaných v červené řepě je však proměnný [14].

2 Betalainy

2.1 Sekundární metabolity

Sekundární metabolity jsou látky vznikající v těle rostlin, které ale nejsou nezbytné pro jejich život, protože nejsou zdrojem energie. Zastávají řadu rozmanitých funkcí a poskytují rostlině dodatečné výhody a ochranu. Dráhy sekundárního metabolismu jsou rozmanité a specifické pro jednotlivé rostlinné druhy. Přeměnou toxických látek na sekundární metabolity se rostliny vyhýbají jejich škodlivým účinkům. Jiné zas chrání povrch listů před nadbytečným vypařováním vody, další před poškozením pletiv parazity. Mezi sekundární metabolity patří také barviva a vonné látky, díky kterým jsou květy pro opylovače dostatečně atraktivní [17].

2.2 Rostlinná barviva

Barviva se vyskytují ve vegetativních i generativních orgánech. Lipofilní chlorofyly, nepostradatelná fotosyntetická barviva, a karotenoidy, chránící rostlinu před poškozením fotooxidací, se nachází v chloroplastech [18; 19]. V ovoci a zelenině jsou karotenoidy obsaženy v chromoplastech, avšak samostatně bez přítomnosti chlorofylu [19]. Ve vakuolách jsou obsaženy ve vodě rozpustné anthokyany a betalainy [18].

Zatímco anthokyany vytváří červená, fialová a modrá zabarvení [20], betalainy jsou zejména červené nebo žluté [21]. Barevné květy spolu s vůní vábí opylovače a jsou tak důležité pro reprodukci hmyzosnubných rostlin. Zbarvené plody pomáhají zvířatům určit jedlou část rostliny a podle barvy je možné rozhodnout o zralosti plodu [18].

Kromě květů a plodů se barviva vyskytují i v dalších rostlinných orgánech a mají spoustu důležitých funkcí pro růst rostliny. Anthokyany chrání chloroplasty před přílišným světlem a ke stáří nahrazují funkci chlorofylu, který je na podzim degradován. Pomáhají rostlinám vyrovnat se s chladem a suchem, navíc jsou tkáně obsahující anthokyany odolnější proti napadení hub [18].

2.3 Betalainy vs. anthokyany

Při pohledu na rozšíření betalainů a anthokyanů napříč kontinenty lze dospět k závěru, že ve většině rostlin jsou přítomné anthokyany, jež jsou pouze u řádu hvozdíkotvaré (*Caryophyllales*) nahrazeny betalainy [21; 22]. Hvozdíkotvaré čítají 34 čeledí, z čehož právě polovina čeledí produkuje betalainy [23]. Aby to nebylo tak jednoznačné, mají zbarvení u čeledí *Caryophyllaceae* (hvozdíkovité) a *Molluginaceae* na svědomí opět anthokyany [22]. S betalainy se lze setkat i mimo rostlinnou říši, u zástupců rodů stopkovýtrusných hub *Amanita*

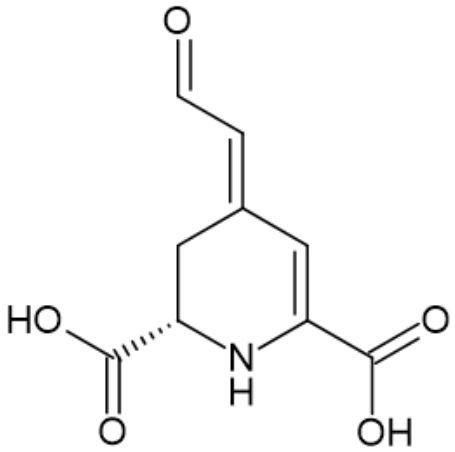
(muchomůrka), *Hygrocybe* (voskovka) a *Hygrophorus* (šťavnatka) [14]. Proč v říši rostlin během biologické evoluce došlo k vzniku obou skupin barviv, které se ve svých funkcích zastupují, není zcela objasněno [21].

Betalainy byly pro svůj obsah dusíku nejprve nesprávně nazývány dusíkatými anthokyany, aby byl zdůrazněn rozdíl od anthokyanů, které patří mezi fenolické látky. Současné pojmenování přiřadili betalainům roku 1968 Mabry a Dreiding, kteří jej odvodili od kyseliny betalamové, jejíž derivát (betanin) byl již dříve izolován z červené řepy [21].

Oba typy barviv jsou morfologicky odlišné a k jejich syntéze v rostlinách dochází jinými metabolickými drahami. U hvozdíkotvarých nedochází k expresi genů kódujících enzymy pro výrobu anthokyanů, proto se v jedné rostlině nikdy nenachází oba druhy zároveň [22]. Pro pochopení souvislostí mezi rostlinami syntetizujícími betalainy nebo anthokyany byly provedeny experimenty, které demonstrovaly, že pomyslnou bariéru fungující u rostlin v přirozeném prostředí je možné za uměle upravených podmínek překonat. Bylo zjištěno, že rostlina, jež v přírodě produkuje anthokyany, má geneticky kódovaný enzym vedoucí ke vzniku betalainů. Je-li tedy do její tkáně uměle dodán meziprodukt betalainové syntézy, tento enzym se aktivuje a dochází k produkci betalainu. Tato provázanost byla pozorována i u rostlin produkujících betalainy, neboť jejich enzym 6-O-glukosyltransferáza může glykosylovat i anthokyany [21].

2.4 Rozdělení betalainů

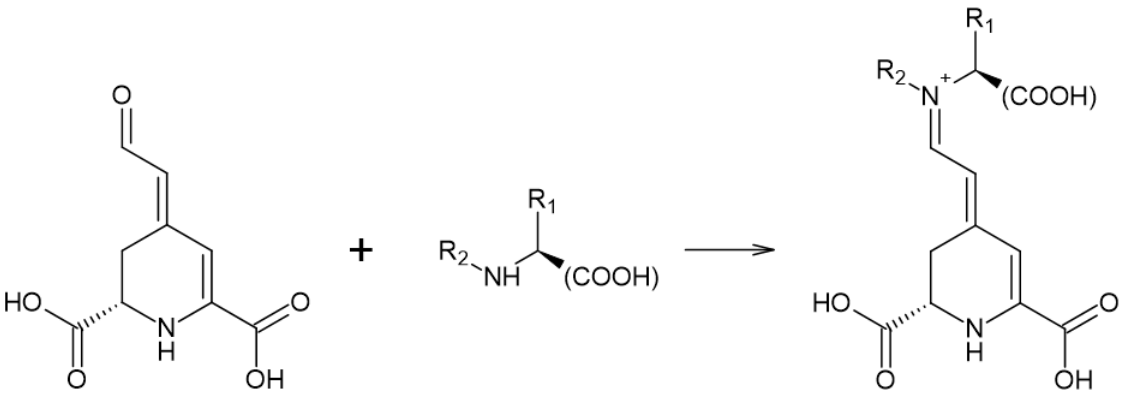
Obecně jsou betalainy dusíkaté alkaloidy odvozené od tyrosinu [21; 22] a podle struktury se dělí na betaxanthiny a betakyany. Jejich společným stavebním kamenem je kyselina betalamová, systematickým názvem 4-(2-oxoethyliden)-1,2,3,4-tetrahydropyridin-2,6--dikarboxylová kyselina (Obr. 3) [23]. Dosud bylo jednoznačně identifikováno 75 sloučenin s různou strukturou, jejichž společným chromoforem je kyselina betalamová [23; 24]. Struktura betalainů ovlivňuje interakci se světlem, a tedy jejich barevnost. Zatímco betaxanthiny jsou žluté pigmenty, betakyany se zbarvují do červena až fialova [14; 24; 25].



Obr. 3: Kyselina betalamová

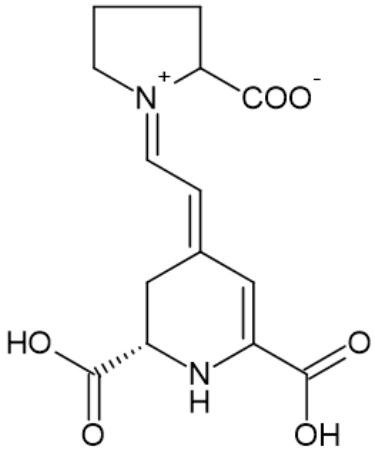
2.4.1 Betaxanthiny

Betaxanthiny vznikají v rostlině spontánní kondenzační reakcí aldehydové skupiny kyseliny betalamové s aminovou skupinou dostupných aminů nebo aminokyselin (Obr. 4) [22].



Obr. 4: Vznik betaxanthinů

Absorbance betaxanthinů je nejvyšší při vlnové délce přibližně 480 nm [22; 25], přičemž její hodnota závisí na navázané aminokyselině a použitém rozpouštědle [24]. V přírodě se betaxanthiny nachází vedle betakyanů v červené řepě, avšak jejich výskyt je významný hlavně v plodech pitayy a opuncie. Názvy jednotlivých betaxanthinů se vytváří systematicky doplněním názvu příslušné aminokyseliny, nicméně u těch častějších jsou oblíbené triviální názvy, např. vulgaxanthin I (betaxanthin glutaminu), který je nejvýznamnějším betaxanthinem vyskytujícím se v červené řepě [14] nebo indicaxanthin (betaxanthin prolinu, Obr. 5), který byl poprvé izolován z pitayy [23].



Obr. 5: Indicaxanthin

2.4.1.1 Fluorescence betaxanthinů

O fluorescenci betaxanthinů se dlouho nevědělo a k jejímu objevu došlo až náhodou v roce 2005, když při snaze zakoncentrovat zředěný roztok barviva vymrazováním došlo k zesílení fluorescence, která pak byla snadno pozorovatelná pouhým okem [26]. Nejvyšší intenzity fluorescence se u betaxanthinů dosahuje při 550 nm.

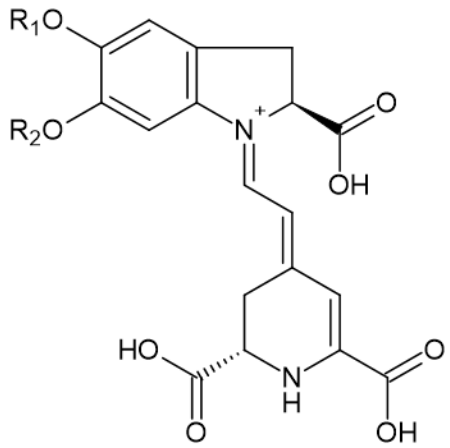
Betaxanthiny fluoreskují za fyziologických podmínek i v přírodě, kdy fluorescence může sloužit jako doplňkový signál pro opylovače, pokud ji ovšem vnímají. V případě netopýrů, kteří opylují kaktusy, je právě tato fluorescence důležitá, neboť jejich oči jsou citlivé na vlnové délky emitované betaxanthiny [26].

Tento jev byl využit při stanovení betaxanthinů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), neboť s fluorescenční detekcí byla úspěšně snížena mez jejich detekce [26]. Dále lze fluorescenci betaxanthinů využít ve fluorescenční mikroskopii [26], kdy je možné pozorovat fluoreskující vakuoly, v nichž se nacházejí ve vodě rozpustná barviva včetně betaxanthinů, a umístění nefluoreskujících jader v rostlinných buňkách. Pozorovány mohou být také lidské buňky, ve kterých není výskyt betaxanthinů původní. Z betaninu syntetizovaný betaxanthin je vhodným nástrojem pro velmi rychlou identifikaci malárie z krevního vzorku, proto může být úspěšná diagnostika provedena ještě dříve, než propukne onemocnění v plné síle [26]. Těží se ze schopnosti barviva procházet stěnou červených krvinek, a tam se navázat na parazitujícího prvoka (zimničku).

Reakce kyseliny betalamové s aminokyselinami za vzniku fluoreskujících betaxanthinů lze využít i při stanovení aminokyselin a proteinů pomocí gelové elektroforézy [26]. Pro snížení nákladů na stanovení lze standard kyseliny betalamové nahradit šťávou z červené řepy, ze které je kyselina betalamová uvolněna degradací přímo v gelu.

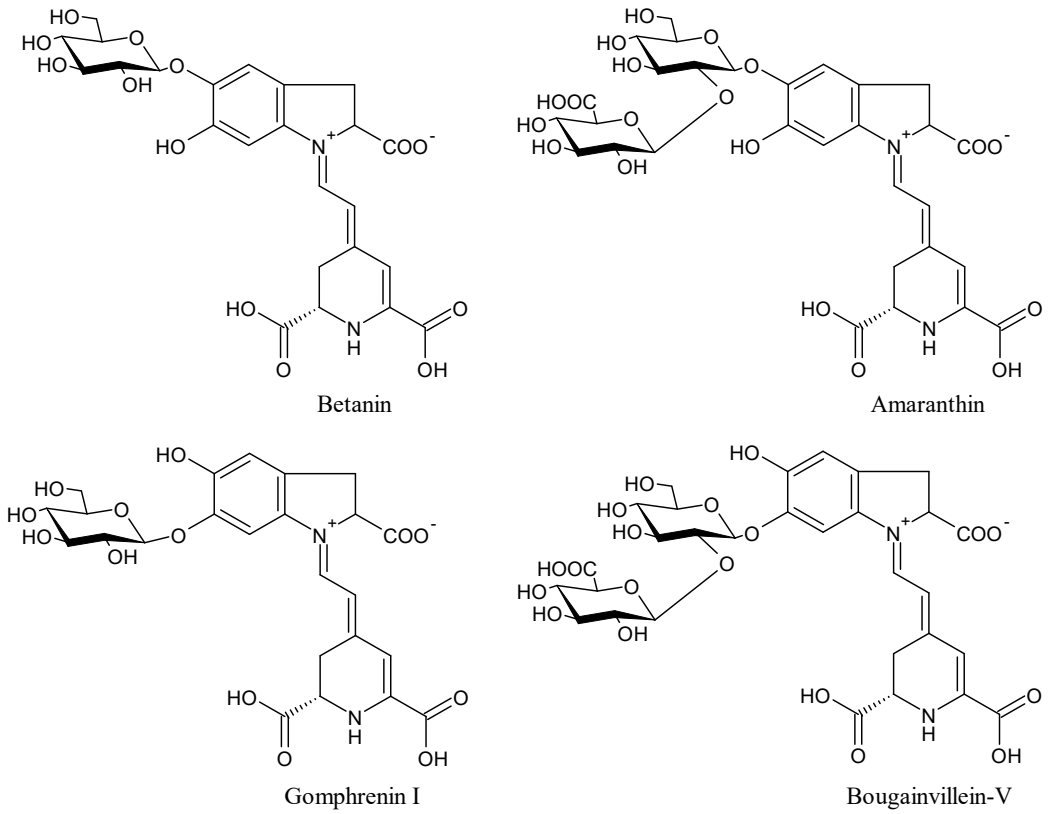
2.4.2 Betakyany

Druhou velkou skupinou betalainových barviv jsou červenofialové betakyany [14; 25], jejichž absorpční maximum je při vlnových délkách okolo 536 nm [21; 22]. Jejich schopnost fluoreskovat je daleko nižší než u betaxanthinů a nemá praktické využití [26]. Společným stavebním kamenem betakyanů je opět kyselina betalamová, která je navázaná na *cyklo*-3,4--dihydroxyfenylalanin (*cyclo*-DOPA) [14; 23]. V případě, že na tomto základním skeletu není navázaná žádná další skupina, jedná se o základní betakyanin a tím je betanidin (Obr. 6) [23].



Obr. 6: Obecná struktura betakyanů (betanidin: R_1=R_2=H)

Podle polohy a charakteru funkčních skupin (Obr. 6) lze betakyany rozdělit do čtyř skupin. Ukázka zástupců těchto skupin je uvedena na (Obr. 7). U skupiny betaninu je R_1 glukóza nebo její derivát a R_2 je vodík. Amaranthinová skupina má v základní podobě na místě R_1 glukózu, na kterou je navázaná kyselina glukuronová a R_2 je opět vodík. Gomphreninová skupina je podobná betaninové, pouze poloha substituentů R_1 a R_2 je obrácená, tzn. R_1 je vodík a R_2 je glukóza nebo její derivát. Poslední skupina jsou bougainvilleiny, které se dále dělí na dva typy sloučenin: bougainvilleiny-r, které mají glukózu s navázanou kyselinou glukuronovou připojenou na místě R_1 a bougainvilleiny-v, které mají tento substituent na místě R_2 [23; 24].



Obr. 7: Zástupci betakyanů

Betakyany jsou často pojmenovány podle botanického druhu, ze kterého byly poprvé izolovány. Betanin je nejvýznamnějším betakyanem červené řepy (*Beta vulgaris*), amaranthin se získává z laskavce (*Amaranthus*), gomphreniny vybarvují květy pestrovky kulovité (*Gomphrena globosa*) a okrasnou dřevinou s růžovými květy je bugenvilea lysá (*Bougainvillea glabra*) [24].

2.5 Funkce betalainů

Přítomnost betalainů v květech a plodech rostlin napomáhá k reprodukci, protože zatraktivňují jejich generativní orgány pro okolí. Stejně tak se betalainy vyskytují i ve vegetativních orgánech včetně neosvětlených částí rostlin. Betalainy svojí interakcí se světlem chrání chloroplasty před poškozením, které je způsobeno dlouhodobým vystavením slunečnímu záření, a proto je jejich syntéza stimulována při expozici světla a UV záření [21; 24]. Další ochranná funkce spočívá v redukci reaktivních forem kyslíku (ROS, Reactive Oxygen Species), které vznikají během metabolické přeměny a při jejich nadbytku dochází k poškození buněčných struktur [21].

Rostliny z řádu hvozdíkotvarých často osidlují suché oblasti a nachází se mezi nimi i halofilní rostliny rostoucí na zasolených půdách. Tyto nepříznivé podmínky vyvolávají v rostlinách zvýšenou produkci betalainů [21; 24], díky které rostliny pravděpodobně lépe odolávají nedostatku srážek nebo nadbytku soli. Betalainy dále mohou fungovat jako prostředek v boji

s biotickými faktory, z nichž je pro rostliny ohrožující napadení bakteriemi, plísněmi, popřípadě viry [11; 24].

2.6 Výskyt a zdroje betalainů

Hvozdíkotvaré rostliny jsou celosvětově rozšířené, přičemž v našich podmínkách se nejčastěji vyskytují zástupci z čeledi laskavcovitých, mezi které patří hospodářsky významné plodiny jako řepa cukrovka a krmná řepa. Kulturními plodinami jsou dále červená řepa, mangold a špenát. Mnoho laskavcovitých rostlin (lebeda, laskavec, merlík či bříšť) patří naopak mezi plevely. Na zahradách má své místo pestrokvětý nevadlec nebo bytel, který je pěstován jako náhrada tújí [3].

Betalainy, určené k použití jako přírodní potravinářské barvivo, se získávají jen z několika málo druhů. Dominantní postavení na celosvětovém trhu mají betalainy extrahované z červené řepy, které tvoří 99,99 % produkce, která činí 96,8 Gt za rok [23]. Vzhledem k tomu, že z červené řepy je možné získat betalainy jen určitých barevných odstínů, hledají se i další přírodní zdroje betalainů. Významnou skupinu představují barviva získávaná z barevných plodů kaktusovitých rostlin, např. plody opuncie a pitayy, známé jako dračí ovoce [14; 23; 24]. Nevelkou měrou přispívá do celosvětové produkce laskavec, který obsahuje betalainy v celé rostlině a je možné je extrahovat ze semen, květenství, listů, stonků i kořene [23].

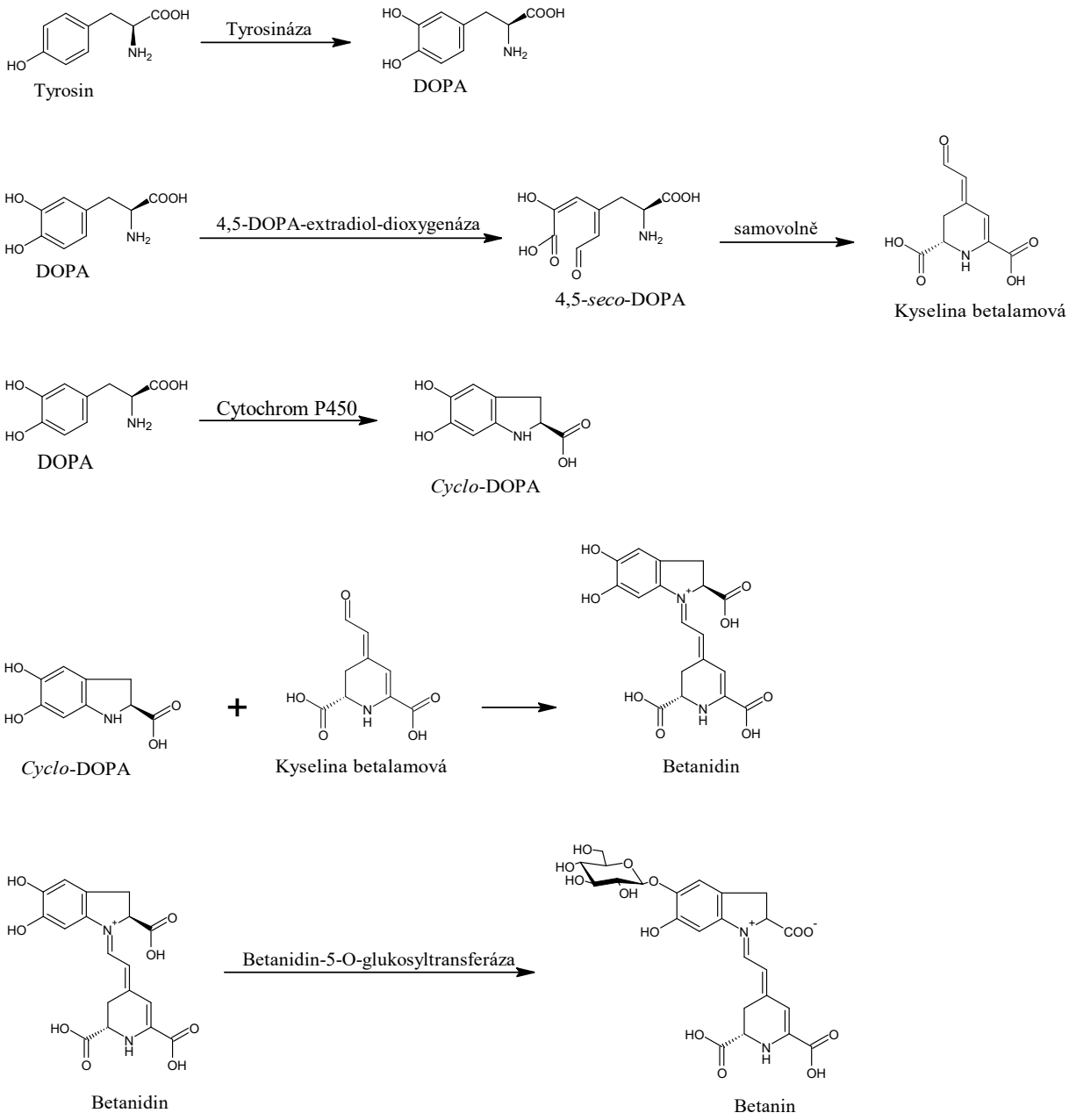
2.6.1 Biosyntéza betalainů

Biosyntéza betalainů zahrnuje několik kroků od formace stavebních jednotek až po závěrečnou glukosylaci. Schématické znázornění biosyntézy betaninu je uvedeno na Obr. 8. Na rozdíl od betaxanthinů, které se tvoří spontánní kondenzací kyseliny betalamové s aminem nebo aminokyselinou, u betakyanů je i poslední krok řízen enzymaticky [22; 24]. Reakce probíhají v cytoplazmě a v endoplazmatickém retikulu [24].

V prvním kroku syntézy betaninu (Obr. 8) se pomocí enzymu tyrosinázy hydroxyluje L-tyrosin na 3,4-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA). Tvorba L-DOPA je klíčová, neboť dalšími pochody z něj vzniká kyselina betalamová a *cyclo*-DOPA [22; 24]. Při tvorbě kyseliny betalamové dochází nejprve za pomoci enzymu 4,5-DOPA-extradiol-dioxygenázy k oxidaci L-DOPA na meziprodukt 4,5-*seco*-DOPA, jenž poté samovolně přechází na kyselinu betalamovou [22; 24]. Díky enzymu cytochrom P450 je L-DOPA přeměňován na *cyclo*-DOPA. Jeho následnou kondenzací s kyselinou betalamovou vzniká v červené řepě betanidin. [22; 24]. Ke vzniku betakyanů zbývá poslední krok, kterým je připojení molekuly glukózy na jeden z hydroxylovaných uhlíků betanidinu. Aby proběhla reakce na vybraném uhlíku, je zapotřebí

vysoce specifických enzymů. Cílovým místem pro vznik betaninu je uhlík C_5, enzym umožňující navázání na tuto polohu se nazývá betanidin-5-O-glukosyltransferáza. Výše popsaný mechanismus je jen jednou z možných cest biosyntézy betakyanů [22; 24].

Rozmanitost betakyanů napříč rostlinnými druhy je zajištěna navázanými glykosidy, jejich deriváty a dostupností příslušných glykosyltransferáz. Četné případy násobné glykosylace ještě rozšiřují okruh vznikajících sloučenin, příkladem je bugenvilea lysá, ve které bylo rozpoznáno na 140 různých betakyanů [24].



Obr. 8: Biosyntéza betaninu

3 Přídatné látky v potravinách

Používání přídatných látek není převratným objevem posledních desetiletí, tzv. aditiva se do potravin přidávala odjakživa. V dobách, kdy chladničky a mrazničky nebyly běžným vybavením domácností, zaručovaly trvanlivost potravinám konzervační přísady, příkladem může být solení masa nebo konzervování zeleniny pomocí kyseliny octové [1].

Oproti tomu výskyt „Éček“ v potravinách je relativně novodobou záležitostí. Značení aditiv písmenem E s trojmístným nebo čtyřmístným číselným kódem na obalech potravin bylo v České republice zavedeno a upraveno na začátku roku 2008 Vyhláškou č. 4/2008 Sb. [27]. Toto označení se používá v celé Evropě (proto „E“). Přesto, že se většina lidí Éček děsí, a výrobci raději do složení na etiketách výrobků vypisují celé slovní názvy, označení E přináší záruku bezpečnosti aditiva [28].

Použití jakýchkoliv aditiv se řídí předpisy a k jejich použití musí být důvod. Bezpečnost látek je posouzena Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA) [29]. Pokud jsou shledány jako vhodné do potravin, dostanou se na „E seznam“, toto postavení však není neměnné, jejich bezpečnost je stále přehodnocována [30]. Pro konkrétní aditivum jsou vždy stanovené vybrané druhy nebo skupiny potravin, ve kterých se mohou použít, a v nich maximální použitelné množství. Pokud není limit stanoven, použije se aditiva jen nezbytně nutné množství [1; 31].

Mezi aditiva nepatří pouze výše zmíněné konzervanty, ačkoli se společně s barvivy a antioxidanty s pojmem „Éčka“ nejběžněji asociují. Aditiva jsou různé látky, které mají mnoho funkcí, díky nimž jsou uspokojena očekávání zákazníků. Zajišťují hygienickou nezávadnost produktů, zvyšují dostupnost mimosezónních potravin a prodlužují dobu trvanlivosti. Výrobcům zaručují vyšší prodejnost zboží díky atraktivnější barvě, nadýchanější struktuře a výraznější chuti. Na etiketách jsou nejčastěji značená sladidla, kyseliny a regulátory kyselosti, protispékavé látky, lešticí látky, želírující látky či stabilizátory [1; 31]. Mezi aditiva patří také plyny, které se využívají při balení výrobků a jejich použití doprovází na obalu povinné sdělení: „Baleno v ochranné atmosféře“ [1].

3.1 Barviva v potravinách

Užívání konzervantů a antioxidantů v potravinářství má své opodstatnění, chrání potraviny před mikrobiální nebo oxidační zkázou. S barvivy je to však jiné, i bez jejich použití se potravina dostane zdravá a neporušená k zákazníkovi. Jak potom ale bude vypadat?

Zrakový vjem je totiž primárním faktorem výběru potraviny při nákupu, čich a zejména chuť se uplatní až při konzumaci. Pro výrobce je tedy přidání barviv do produktů mnohdy nezbytné. Jednak se kompenzují rozdíly v barvě surovin, která může záviset na sezónních vlivech a skladování nebo dochází k obnově barvy, která byla změněna během zpracování. Dále se barviva používají pro dodání vzhledu jinak nevýrazným výrobkům, vytváří veselé cukrovinky, například proměna želatiny v dětmi milované gumové medvídky. Často barva patří k zažité identitě výrobku, proto se u produktů s příměsí nebo příchutí ovoce očekává barva daného ovoce. Pokud ovocná složka nedodá výrobku (např. jogurtu) dostatečnou barvu, je povoleno barvivo přidat [1].

Pro některé kategorie potravin je však použití barviv zakázáno. Nesmí se dobarvovat med, potraviny určené pro výživu kojenců a malých dětí, neochucené mléko, máslo, maso, ryby, káva, čaj, koření, ovocné šťávy a další [1; 31].

3.1.1 Přírodní vs. syntetická barviva

Barviva se rozdělují na přírodní a syntetická. Přírodní barviva se nachází v tělech rostlin a živočichů, z nichž se pro potravinářské účely nejčastěji získávají extrakcí. Zástupcem barviva živočišného původu je karmín získávaný z těl samiček hmyzu nopálovce karmínového (*Dactylopius coccus*) [32]. Rostlinné karotenoidy však mohou být syntetizovány i bakteriemi, kvasinkami či plísněmi [19].

V současné době jsou pro svou zdravotní nezávadnost mezi spotřebiteli preferována přírodní barviva [1; 33; 34], u kterých není stanovena maximální dávka použití, i přesto se používají pouze v nezbytně nutném množství [1; 31]. Práce s přírodními barvivy však není jednoduchá, mnohdy bývají nestabilní a jejich odstín se může lišit v závislosti na podmínkách pěstování rostliny, ze které se získávají. Důsledkem může být nestejnorodost jednotlivých vyrobených šarží. Další nevýhodou je možnost ovlivnění chutě a vůně produktu přidávaným barvivem [1].

Oproti tomu syntetická barviva jsou zpravidla stabilní látky, které neovlivňují chuť a vůni produktu, jejich odstín je stálý a nové odstíny lze získat kombinací barviv. K výčtu jejich výhod je nutné zmínit příznivou cenu. Na druhé straně se u nich často vyskytuje zdravotní závadnost, a proto je nutné definovat jejich nejvyšší přípustné množství [1].

Je zřejmé, že v různých částech světa se pravidla pro používání aditiv a konkrétních barviv liší, většinou jsou však přísnější předpisy v zemích Evropské unie. Vyskytují se ale i některá barviva v EU povolená (Amarant E123), která jsou naopak zakázaná ve Spojených státech [33].

Povolené množství aditiv v potravinách je odvozeno od akceptovatelného denního příjmu (ADI, Acceptable Daily Intake), což je množství, kterému se lze denně po celý život vystavovat, aniž by mělo negativní vliv na naše zdraví [34]. ADI se vyjadřuje v jednotkách mg/kg tělesné váhy. Přestože jsou maximální povolené limity přídavku syntetických barviv dodržovány, může po konzumaci výrobků docházet k nežádoucím kožním reakcím jako je kopřivka, ekzém, či dermatitida. Vzácněji mohou syntetická barviva způsobovat alergické reakce, astma nebo hyperaktivitu [1; 33].

Prozatím není provedeno velké množství studií zaměřených na toxicitu a vedlejší účinky syntetických barviv přijímaných z potravy. Z toho důvodu vytvořila Evropská unie seznam nejpodezřelejších barviv, na kterém se nachází tartrazin (E102), karmoisin (E122), chinolinová žluť (E104), žluť SY (E110), ponceau 4R (synon. konšelinová červeň A, E124) a červeň allura AC (E129) [1]. Výrobky s obsahem některého z těchto barviv, musí mít na obalu upozornění: „Mohou nepříznivě ovlivňovat činnost a pozornost dětí“ [1; 35].

Prvním na tomto seznamu je citronově žlutý tartrazin (E102) [1], který se přidává nejen do potravin, ale i do produktů kosmetického a farmaceutického průmyslu. Jeho účinky na lidskou DNA byly studovány v práci Floriano a kol. [36]. Cytotoxicita ani mutagenita nebyla prokázána, avšak při koncentraci 70 μg/ml došlo ke znatelnému poškození DNA leukocytů. Další studie [37; 38] jeho bezpečnost potvrdily, a to i přes potencionální genotoxicitu azoskupiny v molekule tartrazinu. Tato skutečnost ovšem platí pouze pro tartrazin přijímaný z potravin, kde je jeho obsah vždy velmi nízký [37; 38].

Velmi diskutovaným tématem je vliv konzumace syntetických barviv na chování, zvláště u dětí. Bylo zjištěno, že konzumace tartrazinu nezpůsobuje přímo hyperaktivitu, ale u některých dětí vyvolává změny chování – podrážděnost, neklid a poruchy spánku [39]. S rostoucí dávkou tartrazinu se doba projevů prodlužuje. U dětí s diagnostikovanou poruchou pozornosti či s hyperaktivitou (ADHD, Attention Deficit Hyperactivity Dissorder) došlo po dietě, která spočívala v omezení příjmu syntetických barviv, ke zmírnění klinických projevů v 8 % případů [38]. Množství přijatých barviv u dětí regulují alespoň v předškolním věku především rodiče. Měla by být sledována přítomnost barviv v bonbonech, želé a dalších cukrovinkách, ale nemělo by se zapomínat ani na „dětská pitíčka“ a „džusíky“, protože nápoje pro děti jsou téměř vždy křiklavě žluté, oranžové nebo červené [33].

Dalším takto evidovaným syntetickým barvivem je karmoisin (E122), u nás častěji uváděný pod názvem azorubín [1; 35; 38]. Při sledování jeho vlivu na meristematické pletivo kořene

cibule kuchyňské, vykazoval dokonce silnější genotoxické účinky než metanilová žluť, která v zemích EU zakázaná je. Obě barviva jsou hojně používá v Indii a dalších rozvojových zemích [40]. Nicméně karmoisin, který je přítomný v potravinách v nízkých dávkách, nepředstavuje riziko, pouze vzácně může způsobit kožní a respirační obtíže [38].

3.2 Přírodní barviva

Přírodní barviva jsou většinou zdravotně nezávadná, ba dokonce zdraví prospěšná, kupříkladu pod označením E101 se ukrývá riboflavin neboli vitamín B2 [1]. Je potřeba rozlišovat přírodní barviva získávaná technologickými postupy z přírodních materiálů a barviva přírodním identická vyráběná synteticky [38]. Podle záznamů jsou zdravotně zcela bezproblémové extrakty z černé mrkve, červené řepy i slupek hroznového vína [33]. V potravinářství se z přírodních barviv nejvíce využívají anthokyany, karotenoidy, betalainy a chlorofyly [41].

3.2.1 Anthokyany

Anthokyany jsou rostlinné pigmenty modré nebo červené barvy v odstínech od růžové po fialovou [41]. Mají pozitivní účinky na zdraví, působí jako silné antioxidanty, zlepšují zrak a podporují mozkovou činnost [42]. Redukují aktivitu krevních destiček a srážení krve, čímž chrání před vznikem trombózy, která by mohla zapříčinit srdeční příhodu, mrtvici a tromboembolické stavy [20]. Proto je nanejvýše doporučená konzumace ředkviček, červeného zelí, černého a červeného rybízu, malin, ostružin, borůvek a dalšího ovoce [41]. Nejčastějším zdrojem barviva pro účely potravinářského průmyslu je černá nebo fialová mrkev. Obsah barviva může u některých odrůd fialové mrkve dosáhnout až 191 mg anthokyanů/ 100 g syrové mrkve [42]. Ve vinařských zemích jako zdroj anthokyanů dobře poslouží slupky hroznového vína nebo kaly z hroznové šťávy [43]. Po porovnávání přírodních a syntetických barviv stejných odstínů představovaly anthokyany nejudržitelnější zdroj barviva při zvážení nejrůznějších hledisek [44].

3.2.2 Karotenoidy

Karotenoidy jsou velkou skupinou přírodních barviv, které propůjčují svým nositelům žlutou, oranžovou nebo červenou barvu. Nachází se v mrkvi, pomeranči, melounu, paprice či papáji [41]. Karotenoidy působí v těle jako antioxidanty, zvláště lykopen, obsažený v rajčatech, je spojován s prevencí vzniku rakoviny. Karotenoidy dále chrání naši kůži před účinky UV záření a zajišťují dobrou kondici očí i ve vyšším věku [19].

3.2.3 Karmín

Ze sušených těl samiček nopálovce karmínového (*Dactylopius coccus*) se extrakčními technikami získává karmín (E120), který je z převážné části tvořen kyselinou karmínovou [32; 45]. Nejobvyklejší barva je červená, ale v závislosti na pH může přecházet do žluté [45]. Přidává se do alkoholického nápoje Campari [46], nealkoholických nápojů, jogurtů, nanuků, marmelád a cukrovinek [45], další uplatnění má v kosmetice a farmacii [32]. I přes svůj přírodní původ je však karmín zdravotně závadný [32; 45]. Po jeho požití byly zaznamenány případy vzniku alergií s rozmanitými projevy, od kopřivky, otoků, dýchacích a zažívacích potíží až po ztráty vědomí a anafylaktický šok [46]. Alergie může být vyvolaná také proteiny, které se do karmínu dostanou z těla nopálovce, nebo může být barvivo znečištěno ionty těžkých kovů [32]. Citlivost na karmín je častá u dětí s atopickým ekzémem [33], byla zjištěna i u pracovníků ve výrobně barviva, dokonce byly zaznamenány i případy profesního astmatu způsobeného inhalací karmínového prachu [47]. Díky jeho snadné rozpustnosti ve vodě, oxidační, tepelné a světelné stabilitě je však stále používán [45].

3.3 Betanin v potravinářství

Použití betaninu, stejně jako ostatních barviv, je řízeno legislativou, která rozděluje potraviny na dvě kategorie – potraviny, které lze dobarvovat, a potraviny, které nelze dobarvovat. Stejně tak určuje jednotlivé potraviny, do kterých je možné konkrétní barvivo přidat [1; 31].

Betanin je jediným zástupcem betalainů používaným v potravinářství [24]. Jeho stabilitu ovlivňuje hodnota pH prostředí, teplota během zpracování a skladování, či přítomnost kyslíku a světla [26]. Betalainy vykazují stabilitu v rozmezí pH 3–7 [24; 48], proto se v přírodě akumulují ve vakuolách, jejichž prostředí je kyselé [23; 26]. To jim dává výhodu před anthokyany, které jsou při změnách pH nestálé [24; 48; 49]. Betalainy se lépe rozpouštějí ve vodě a mají vyšší barvicí sílu, proto jich stačí přidat menší množství k dosažení stejně sytého odstínu [24]. Jedinou nevýhodou betaninu je jeho tepelná nestabilita, která limituje využití u tepelně upravovaných potravin [49].

Podle nařízení Komise EU č. 1129/2011 lze betanin použít výhradně do zavařenin z červeného ovoce, do konzervované nebo nakládané zeleniny (kromě oliv), do džemů, rosolů a marmelád a do snídaňových cereálií s ovocnou příchutí. Dále lze přidávat betanin do uzenin z tepelně opracovaného i tepelně neopracovaného masa, do paštik a terin, do past z ryb a korýšů a do předvařených korýšů [50].

V žádné z těchto kategorií není stanoveno maximální množství barviva, opatření je nahrazeno pravidlem „quantum satis“, tedy použít jen množství potřebné k dosažení požadovaného efektu. U většiny aplikací nelze betanin kombinovat s dalším barvivem, výjimkou je případ dobarvování snídaňových cereálií, u kterých je možné barviva E162 (betanin), E163 (anthokyany) a E120 (karmíny) použít jednotlivě, ale i v kombinaci [50].

3.3.1 Získávání potravinářského betaninu

Barvivo E162 (betanin) původem z červené řepy je komerčně dodáváno v několika podobách, kterými jsou nejčastěji práškový extrakt z červené řepy, lyofilizovaná červená řepa, sušená šťáva z červené řepy zředěná dextrinem, případně čerstvá šťáva z červené řepy [51; 52]. Práškový extrakt z červené řepy zachycuje Obr. 9.

Obr. 9: Práškový extrakt z červené řepy [53]

Betanin se v průmyslovém měřítku tradičně získává macerací bulvy červené řepy vodou za pokojové teploty. Extrakt s možným přídavkem kyseliny citronové je nejprve hrubě filtrován, poté je kapalná fáze zakoncentrována ultrafiltrací a výsledný produkt je pasterizován. Tento extrakt obsahuje 0,5–1 % betaninu, spolu s malým množstvím vulgaxanthinu, cukru a dalších ve vodě rozpustných látek. Při použití moderní mikrovlnné extrakce nebo extrakce vysokotlakým oxidem uhličitým je však dosaženo mnohem uspokojivějších výtěžků. V případě vodných extraktů lze koncentraci zvýšit s využitím preparativní chromatografie [52].

4 Fyziologické účinky betalainů na zdraví

Fytochemické látky obsažené v rostlinách jsou důležité jednak pro rostlinu samotnou, pro její vývoj a ochranu, ale i pro ostatní živočichy, kteří ji konzumují. Mnoho rostlin má pozitivní účinky na lidské zdraví, a to od preventivních účinků, kdy se využívají pro podporu zdraví, až po účinky léčebné, kdy potlačují projevy již vzniklé nemoci.

V červené řepě se nachází celá řada fytochemikálií, betalainy jsou však z hlediska zastoupení i účinků nejvýznamnější. Obě skupiny betalainů, betaxanthiny a betakyany, jsou studované v extraktech, šťávě, sušených práškách nebo v bulvě řepy.

Po konzumaci červené řepy setrvává převážná část betalainů v trávicím traktu. Ke vstřebávání do krve dochází střevním epitelem, kdy jsou transportovány v nemetabolizované podobě, díky čemuž je zachována jejich aktivita [13]. Močí není vyloučeno více než jedno procento z přijatého betaninu [54; 55].

4.1 Antioxidační vlastnosti

K oxidačnímu stresu dochází v těle při nadbytku radikálů, které sice vznikají přirozeně během metabolických reakcí, avšak jejich počet je potřeba redukovat, neboť při nadbytku poškozují biomolekuly. K eliminaci vznikajících radikálů nám slouží antioxidanty, které jsou více či méně součástí běžné potravy. Bohatými zdroji antioxidantů jsou především ovoce a zelenina, bylinky, zelený čaj a mnoho dalších potravin. Mezi deset druhů zeleniny s nejlepšími antioxidačními vlastnostmi se díky vysokému obsahu betalainů řadí i červená řepa [14]. Antioxidační aktivita betaninu je za jistých podmínek dokonce téměř dvojnásobná než u anthokyanů [56]. Šťáva z červené řepy má vyšší antioxidační aktivitu než pomerančové džusy a jiné ovocné či zeleninové šťávy. Lepším antioxidantem než červená řepa je pouze granátové jablko [13].

Již v nízkých koncentracích dokáží betalainy chránit hem, barvivo červených krvinek, před rozkladem [25] a nízkodenzitní lipoproteiny před oxidačním poškozením [13]. Podle studií provedených na potkanech dokáže šťáva z červené řepy obnovit funkci antioxidačních enzymů v játrech, navíc dokáže chránit před xenobiotiky a jimi vyvolaným oxidačním stresem [57]. Vyšší mastné kyseliny mohou být v důsledku reakce s volnými radikály poškozeny. Při této reakci, tzv. lipoperoxidaci, vykazují betalainy opět své protektivní vlastnosti [25; 58]. Vliv betalainů na buňky trávicí soustavy je pozitivní, neboť potlačují poškozující účinek lipoperoxidáz [25].

4.2 Protizánětlivé vlastnosti

Tvorba zánětů je ve své podstatě obranným mechanismem organismu, ale při chronickém průběhu působí škodlivě. Na lidských buňkách imunitního systému bylo demonstrováno, že extrakt z červené řepy působí protizánětlivě a potlačuje nežádoucí aktivaci imunitního systému [54]. Protizánětlivé vlastnosti betalainů, obsažených v červené řepě jsou rovněž prezentovány v mnoha dalších studiích [13; 55; 57; 59; 60]. Ve výzkumu zaměřeném na problematiku neurodegenerativních onemocnění, jež mohou být způsobena zánětem nervových buněk, bylo dokázáno, že betanin z červené řepy měl inhibiční efekt na aktivované mikroglie, jež jsou imunitními buňkami centrální nervové soustavy a vyskytují se v nervové tkáni. Konkrétně byla u mikroglií utlumena produkce mikrogliálních radikálů, faktoru nádorové nekrózy a interleukinů [59].

4.3 Protinádorové působení

K dalším benefitům červené řepy patří její aktivita proti tvorbě nádorových onemocnění [13; 56; 57; 60]. Při výzkumu prováděném na potkanech s indukcí rakoviny kůže a jater bylo po jejich krmení betaninem prokázáno snížení výskytu nádorů [13]. Podobné účinky byly potvrzeny i u lidí, kdy podávání samotného betaninu vyvolalo apoptózu lidských nádorových buněk plic [13]. Protirakovinné účinky se netýkají pouze izolovaného betaninu, nýbrž i samotného extraktu z červené řepy. Při eliminaci lidských nádorových buněčných linií slinivky, prostaty a prsu podpořila jeho přítomnost účinek chemoterapeutik [57]. Nejen tyto výzkumy ukázaly, že betanin potlačuje účinek karcinogenů a tím redukuje vznik a rozvoj nádorových onemocnění [56–58].

4.4 Kardioprotektivní vlastnosti a vliv na složení krve

Onemocnění srdce a cév neboli kardiovaskulární choroby vznikají nejčastěji vytvořením trombózy, která posléze vede k infarktu myokardu, mozkové mrtvici nebo žilní trombóze. K rizikovým faktorům patří zvýšená hladina cholesterolu v krvi, zvýšená srážlivost krve, záněty, oxidační stres, obezita a nedostatečná fyzická aktivita. Betalainy mají kardioprotektivní efekt, počínaje protizánětlivými a antioxidačními vlastnostmi. Podle studií *in vitro* přínos betalainů spočívá i ve schopnosti snižovat aktivitu krevních destiček a potlačení shlukování trombocytů [20]. Konzumace červené řepy vede k efektivnímu snížení systolického a diastolického krevního tlaku, které je ovšem způsobeno spíše vysokým obsahem dusičnanů [13; 54; 56].

Červená řepa má pozitivní vliv na složení krve, neboť snižuje hladinu krevního cukru [11; 13; 58], a zlepšuje lipidový profil krve [11; 54; 58]. V případě konzumace šťávy z červené řepy společně s glukózou byla zjištěna zvýšená citlivost inzulinu ke glukóze, která bývá při obezitě a cukrovce utlumena [13]. Souhrnem těchto vlastností společně s již zmíněnými protizánětlivými a antioxidačními vlastnostmi by červená řepa měla pomáhat v boji proti obezitě, která je dalším rizikovým faktorem vzniku kardiovaskulárních chorob [13].

5 Analytické stanovení betalainů v červené řepě

Kvalitativní a kvantitativní stanovení betalainů se provádí jak ve vzorcích syrové červené řepy, tak blanšírované či konzervované řepy [61]. Pro analýzu se většinou využívá celá bulva červené řepy [16; 59; 62–66], ale v některých studiích byla pozornost věnována pouze její části, např. centrální části [15] nebo koncentrickým vrstvám bulvy [14] nebo byly analyzovány pouze slupky [67].

5.1 Příprava vzorku k analýze

Vzorky červené řepy je potřeba před vlastní analýzou nejprve upravit. Zpravidla dochází v prvé řadě k omytí bulvy červené řepy, aby se zbavila povrchových nečistot [62; 63; 68]. Poté se bulva oškrábe [62; 68], nicméně hojně využívanou variantou je použití červené řepy i se slupkou [16; 63; 65; 66; 67]. Následuje rozmělnění na menší části, ručně například pomocí třecí misky a tloučku [62], častěji přístrojově, pomocí mixéru [61; 63; 64] nebo odšťavňovače [69]. Moderním přístupem ke zpracování vzorku červené řepy a šťávy z červené řepy je sušení vymrazováním. Vzorky červené řepy jsou po nasekání na malé kousky hluboce zmrazeny v plastových sáčcích a lyofilizovány v proudu kapalného dusíku [15; 65]. Vysušené lyofilizované vzorky jsou rozemlety na jemný prášek [14; 15; 65].

Z takto upravených vzorků červené řepy jsou betalainy extrahovány rozpouštědlem, kterým je nejběžněji vodný roztok ethanolu nebo methanolu [59; 62; 67]. Rozpouštědla lze pro větší účinnost slabě okyselit kyselinou citronovou, mravenčí či askorbovou [14; 59; 62; 65; 67]. Pro zvýšení účinnosti se extrakce provádí pomocí orbitální třepačky či v ultrazvukové lázni. Poté následuje centrifugace a odebrání supernatantu [14; 63–65; 67]. Pro dosažení optimální extrakční účinnosti se často provádí vícenásobná extrakce [14–16; 63–65].

Pro oddělení pevných částeček se místo centrifugace může využít i filtrace. Při starším postupu přípravy vzorku byla k filtraci mixované červené řepy využívána křemelina [61]. Pokud je vzorek červené řepy připraven na odšťavňovači, bývá šťáva centrifugována a filtrována přes filtrační papír [51; 69]. Pro roztoky vzniklé rozpuštěním lyofilizované červené řepy či prášku betaninu ve vodě je používán PTFE filtr s velikostí pórů 0,45 μm [51].

Upravené vzorky červené řepy se až do analýzy zpravidla skladují při 4–8 °C [68]. Lyofilizované vzorky jsou obvykle skladovány v temnu ve vzduchotěsném obalu při pokojové teplotě [67], ale někdy jsou uchovávány při teplotách −20 °C a nižších [14; 15; 69].

Zmrazen může být také supernatant získaný centrifugací a filtrací, použitelný pro pozdější analýzu [51; 69].

5.2 Spektrofotometrie

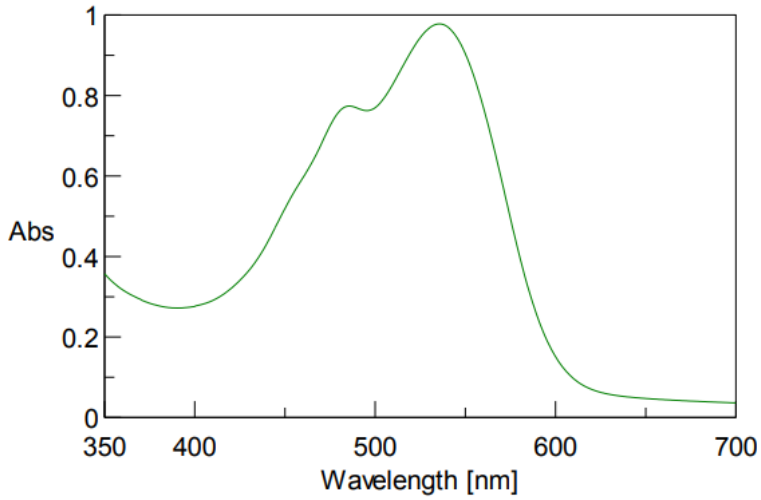
Při molekulové absorpční spektrometrii se ke stanovení látek využívá jejich interakce s elektromagnetickým zářením. Spektroskopie v blízké ultrafialové (UV) a viditelné (VIS) oblasti využívá záření vlnových délek 200–400 nm (UV) a 400–750 nm (VIS). Závislost absorbance monochromatického záření na koncentraci absorbujících částic popisuje Lambert-Beerův zákon a ke kvantitativnímu stanovení se zpravidla využívá metoda vnějšího standardu s kalibrační křivkou [70; 71].

Kvantitativní spektrofotometrická analýza je možná pouze u organických látek, které obsahují volné π elektrony. Barevnost zvyšují chromofory, tj. substituenty s volnými elektronovými páry (–OH, $–NH_2$) nebo elektrofilními skupinami ($–NO_2$, =CO, =C=NH). Látky vidíme barevně právě podle doplňkové barvy k té, která je absorbována, např. žlutý roztok vulgaxanthinu I absorbuje barvu modrou [70; 71].

5.2.1 Spektrofotometrické stanovení betalainů

Nejjednodušší a nejpoužívanější metodou pro stanovení betalainů je spektrofotometrie. Významnou předností stanovení je, že roztoky není nutné před analýzou přečistit [15; 62; 67; 68; 72; 73]. Nutným krokem spektrofotometrické analýzy je naředění vzorků, aby se hodnota absorbance betalainů pohybovala v rozmezí 0,4–0,5 [51]. Metoda ke společnému stanovení betakyanů a betaxanthinů ve šťávě z červené řepy bez předchozího přečištění byla v roce 1970 navržena Nilssonem [61] a pro stanovení betalainů v červené řepě se používá dodnes. Toto stanovení však není vhodné pro plody kaktusů, ve kterých jsou ve větší míře zastoupeny betaxanthiny [51].

Absorbance měřených roztoků se proměřuje při vlnové délce absorpčního maxima, která je pro betakyany nejčastěji 536 nm [51; 68; 69] a pro betaxanthiny 486 nm [68; 73]. Měření obvykle probíhá při pokojové teplotě [51; 68]. Příklad absorpčního spektra vodného extraktu červené řepy zobrazuje Obr. 10.



Obr. 10: Absorpční spektrum vodného extraktu červené řepy [73]

Obsah betalainů se udává na jednotku hmotnosti čerstvé červené řepy nebo sušiny červené řepy, případně vysušeného (lyofilizovaného) vzorku.

Pro výpočet platí vztah:

$$m_{BK/BX} = \frac{A \cdot F_{zř} \cdot M_{BK/BX} \cdot V_{vz}}{\varepsilon_{BK/BX} \cdot l \cdot m_{vz}} \quad (1)$$

kde $m_{BK/BX}$ je hmotnost betakyanů (BK) nebo betaxanthinů (BX) ve vzorku [mg/g], A je naměřená absorbance, $F_{zř}$ je faktor zředění, $M_{BK/BX}$ je průměrná molární hmotnost betakyanů nebo betaxanthinů [g/mol], V_{vz} je objem připraveného roztoku [l], $\varepsilon_{BK/BX}$ je molární absorpční koeficient betakyanů nebo betaxanthinů [l·mol^{-1}·cm^{-1}], l je délka kyvety [cm] a m_{vz} je hmotnost vzorku [g] [15; 62; 67; 68; 73].

Druhou možností je vyjádření výsledků v mg betalainů v jednotce objemu roztoku připraveného extrakcí práškového vzorku nebo roztoku ze šťávy červené řepy. Obsah betalainů se vypočítá pomocí vzorce:

$$m_{BK/BX} = \frac{A \cdot F_{zř} \cdot M_{BK/BX} \cdot 1000}{\varepsilon_{BK/BX} \cdot l} \quad (2)$$

kde $m_{BK/BX}$ je hmotnost betakyanů nebo betaxanthinů ve vzorku [mg/l], ostatní veličiny a jednotky se shodují s předchozím vzorcem (1) [15; 72].

Pomocí daných vztahů se spočítá zvlášť obsah betakyanů i betaxanthinů a následně je určen celkový obsah betalainů, pouhým součtem obou hodnot. Při výpočtu obsahu betakyanů se za molární absorpční koeficient ε_{BK} dosazuje hodnota 60 000 $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ a za M_{BK} se dosazuje molární hmotnost betaninu (550 g/mol), množství betakyanů je tedy vyjádřeno jako ekvivalent betaninu [15; 62; 67; 68; 72; 73]. Pro výpočet množství betaxanthinů se dosazuje hodnota molárního absorpčního koeficientu ε_{BX} 48 000 $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ a za M_{BX} molární hmotnost indicaxathinu (308 g/mol) [68; 73] nebo vulgaxanthinu I (339 g/mol) [15; 72]. Zatímco v hodnotách molárních absorpčních koeficientů se literatura shoduje, hodnoty vlnové délky absorpčního maxima jsou v závislosti na použitém literárním pramenu odlišné.

5.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Chromatografie je nejrozšířenější analytickou separační technikou. Za zakladatele chromatografie je považován ruský biolog Michail S. Cvět, který aplikoval chromatografii k separaci rostlinných barviv. Kolonová chromatografie se dočkala velkého rozvoje a rozšíření v 60. letech minulého století a od té doby se stále vyvíjí [74].

HPLC je separační technika s širokým rozsahem použití. Látky nadávkované na kolonu jsou unášené mobilní fází, přičemž rychlost pohybu záleží na jejich afinitě ke stacionární a mobilní fázi [75]. V průběhu analýzy je možné měnit podmínky separace, kdy se nejčastěji mění složení mobilní fáze, potom mluvíme o tzv. gradientové eluci. Při izokratické eluci je složení mobilní fáze konstantní. Na konci kolony se nachází detektor registrující látky procházející kolonou. Informace z detektoru jsou zpracovávány softwarem a prezentovány v podobě chromatogramu. Podle signálu, který detektory zaznamenávají, rozlišujeme detektory spektrofotometrické, refraktometrické, elektrochemické či fluorescenční. V posledních letech je velmi oblíbené spojení HPLC s hmotnostním spektrometrem [75; 76].

V průběhu posledních let dochází v chromatografii k miniaturizaci. Zpravidla se zmenšuje velikost částic tvořících náplň kolony, spolu s průměrem a délkou kolon, což vede ke zkrácení doby analýzy a snížení spotřeby mobilní fáze, a tedy k menší zátěži jak ekonomické, tak ekologické. Pro náplňové kolony s porézními sorbenty je typickým nosičem silikagel, jehož částice mají nejčastěji průměr 3 a 5 μm. Neporézní a povrchově porézní sorbenty mají na rozdíl od porézních sorbentů nepropustné jádro s vrstvou stacionární fáze na povrchu [77].

V systémech s obrácenými fázemi se používají nepolární stacionární fáze, nejčastěji chemicky vázaný oktadecyl silikagel (C18) nebo oktyl silikagel (C8). Kromě toho jsou na trhu dostupné různě modifikované stacionární fáze s navázanými alkyly či aryly. Pro separaci různých skupin

látek lze využít různou stacionární fázi, např. pro separaci velmi nepolárních látek, jako jsou karotenoidy, se využívají stacionární fáze s uhlovodíkovým řetězcem C30 a pro separaci polohových izomerů jsou s úspěchem využívány pentafluorfenylové fáze [77].

Pro úspěšnou separaci je nutné zvolit vhodné podmínky. Často je pro optimální separaci nutné upravit pH mobilní fáze, jenž musí být v rozmezí, při kterém je stacionární fáze stabilní. Teplota nehraje v HPLC tak významnou roli jako u plynové chromatografie, ale může přispět k vyššímu rozlišení separovaných látek. Zvýšením teploty dochází zpravidla ke snížení viskozity mobilní fáze a je dosaženo rychlejší separace při nižším pracovním tlaku [77].

Z hlediska tzv. green chromatografie je snaha o již zmíněnou miniaturizaci v HPLC, která vede ke snížení množství použitých organických rozpouštědel, které zatěžují životní prostředí. Především se jedná o acetonitril, jehož výroba i likvidace jsou velmi nákladné. Ekologicky přijatelnější je substituce acetonitrilu za jiná rozpouštědla, která však nemusí být tak univerzálně použitelná, např. aceton je nevhodný při spektrofotometrické detekci [78].

V současné době jsou k detekci látek ve spojení s kapalinovou chromatografií stále více využívány hmotnostní spektrometry. Látky opouštějící kolonu jsou zpravidla detekovány nejprve spektrofotometrickým detektorem a poté je eluát veden do hmotnostního spektrometru. Na základě informací získaných z hmotnostních spekter je možné stanovenou látku identifikovat a poté i kvantifikovat. Hmotnostní spektrometry lze také využít pro určení struktury látek. Podle relativních intenzit iontových fragmentů lze posoudit izotopové složení prvku [70; 79].

Vzorek při průchodu hmotnostním spektrometrem prochází postupně třemi hlavními částmi přístroje. Nejprve dochází k ionizaci látky pomocí některé z ionizačních technik a vzniklé ionizované fragmenty jsou separovány v analyzátoru podle poměru hmotnosti a náboje, *m/z*. Nakonec rozdělené fragmenty dopadají na detektor, jehož podstatou je elektronový násobič, na kterém dochází k zesílení elektrického signálu. Výstupem je hmotnostní spektrum, ze kterého lze zjistit molární hmotnost analyzovaných látek a také relativní intenzitu jejich protonovaných či deprotonovaných molekul [70; 79].

Pro stanovení betalainů je pro ionizaci výhradně používána ionizace elektrosprejem (ESI, Electrospray Ionization), která patří mezi měkké ionizační techniky [79]. Tento způsob ionizace pracuje s kapalným vzorkem a vede také ke vzniku vícenásobně nabitých iontů, což jej činí výjimečným. Vzorek vstupuje tenkou kovovou kapilárou, na kterou je vloženo napětí. Mezi kapilárou a druhou elektrodou, jež se nazývá protielektroda, je vytvářeno elektrické pole

o obvyklé intenzitě 106 až 107 V/m. Zatímco anionty jsou přitahovány ke kovové kapiláře, na níž dochází k jejich oxidaci, přebytek kladného náboje je přitahován k protielekrodě. Vlivem povrchového napětí kapaliny se vytvoří Taylorův kužel, na jehož konci už síla elektrického pole převáží povrchové napětí a odtrhující se kladně nabité kapičky putují od kapiláry směrem k protielektrodě. Kapičky jsou po odtržení vlivem přebytečného náboje nestabilní. Rozpadají se na menší, tím se zvětšuje plocha a náboj je lépe rozprostřen. K protielektrodě doputuje vzorek ve formě elektrospreje. Probíhající redukce na protielektrodě pak uzavírá elektrický obvod. Ionizace elektrosprejem tak připomíná elektrolytický systém [80].

Z analyzátorů je velmi často používaný kvadrupól, který se skládá ze čtyř hyperbolických tyčí s dokonale vodivým povrchem, na něž je vloženo střídavé napětí a zároveň na protilehlé dvojice tyčí je vloženo stejnosměrné napětí různé polarity. Analyzátorem projdou pouze ionty, které se při dané kombinaci stejnosměrného a střídavého napětí budou pohybovat po stabilní trajektorii [70].

Dalším využívaným analyzátorem je analyzátor doby letu. Principem je záznam rychlosti pohybu iontů v evakuované letové trubici po dodání určité kinetické energie. Nejrychleji trubicí putují nejlehčí ionty, nejpomaleji nejtěžší ionty [70].

5.3.1 Stanovení betalainů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

HPLC analýza betalainů je zpravidla prováděna v systémech s obrácenými fázemi na kolonách plněných C18 stacionární fází [14–16; 51; 59; 63–66; 69; 81]. Mobilní fáze vhodné polarity a eluční síly je tvořena kombinací dvou rozpouštědel. Jedním z rozpouštědel je acetonitril [15; 16; 59; 66; 81] nebo jeho vodný roztok [14; 51; 63; 64; 69]. Druhým rozpouštědlem je voda s přídavkem kyseliny mravenčí, případně fosforečné nebo trifluoroctové. V některých případech jsou okyseleny obě složky mobilní fáze. Pro separaci betalainů se zpravidla používá gradientová eluce, kdy je postupně zvyšována koncentrace organického rozpouštědla (acetonitrilu) v mobilní fázi [14–16; 51; 59; 63–66; 69; 81]. Pro snížení spotřeby rozpouštědel se kromě klasických analytických kolon mohou využít mikrokolony [14; 64].

Eluát z kolony je veden do detektoru, kterým tradičně bývá spektrofotometrický detektor pracující v UV/VIS oblasti. Při stanovení betalainů se většinou zaznamenává absorbance při vlnové délce okolo 538 nm [59; 81]. V případě využití spektrofotometrického detektoru s diodovým polem (DAD) je možné zaznamenat libovolné množství vlnových délek, protože se v době eluce píku snímá celé spektrum. Zpravidla nás zajímají vlnové délky blízké absorpčnímu maximu betaninu a betaxanthinů, 535 a 470 nm [65]. Pro identifikaci různých

derivátů betaninu se využívá spojení s hmotnostním spektrometrem s ionizací elektrosprejem a zpravidla při snímání kladných iontů [14; 15; 63; 65; 66; 69; 81].

Koncentrace betalainů ve vzorcích se většinou stanovuje metodou kalibrační křivky s vnějším standardem [14; 51; 63–65], přičemž jedním ze způsobů přípravy standardního roztoku betaninu je přečištění červené řepy pomocí flash chromatografie. Struktura betaninu a jeho čistota byly poté potvrzeny pomocí HPLC a ultraúčinné kapalinové chromatografie s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií (UPLC-HR-MS) [63]. Dále je možné vyjádřit obsah betaninu, isobetaninu, vulgaxanthinu a dalších betalainů relativně v procentech plochy píku sloučeniny k celkové ploše všech píků [15].

Protože hmotností spektrometr nedokáže rozlišit izomery se stejnou molární hmotností, není možné s hmotnostně spektrometrickou detekcí rozlišit isobetanin od betaninu a další izomery betalainů [66]. Proto je k jejich kompletní analýze nutná kvalitní chromatografická separace, která umožňuje separaci jednotlivých izomerních forem betaninu [14; 15; 63; 65; 66; 81]. V systémech s obrácenými fázemi je zpravidla eluován nejprve polárnější betanin či jeho deriváty a poté teprve isobetanin a jeho deriváty [14; 15; 51; 63; 65; 66; 81]. Některé izomery betakyanů mají stejné retenční vlastnosti a nelze je od sebe odlišit ani chromatograficky [14; 15; 63; 65; 81].

Pomocí HPLC-MS bylo možné v červené řepě identifikovat celou řadu betalainů, které jsou pro přehlednost uvedené v Tabulce 1. Identifikace nových sloučenin bývá provedena na základě informací získaných z hmotnostního spektra, tandemového hmotnostního spektra, dále na základě retenčního chování a absorpčního spektra [14–16; 63; 65; 81].

5.4 Betalainy stanovené v červené řepě

Pomocí spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektroskopií bylo v rámci různých studií [14; 15; 63; 65; 81] identifikováno celkem 30 betakyanů a jejich derivátů a 30 betaxanthinů (Tabulka 1). V nejnovějších studiích byly identifikovány nové sloučeniny a zároveň některé betakyany a betaxanthiny identifikované v předchozích studií již nebyly detekovány. Bylo zjištěno, že během purifikace vzorků může docházet ke změně složení, a proto je nejvhodnější podrobit vzorky analýze neprodleně po přípravě [81].

Tabulka 1: Betalainy identifikované v červené řepě

	Identifikované betakyany a jejich deriváty	Literární zdroje
1	Betanin	[14; 15; 63; 65; 81]
2	Isobetanin	[14; 15; 63; 65; 81]
3	6′-O-feruloyl-betanin/isobetanin	[14; 15; 63; 65; 81]
4	17-dekarboxy-neobetanin	[14; 15; 63; 65; 81]
5	2-dekarboxy-neobetanin	[14; 15; 63; 65; 81]
6	Betanidin	[14; 15; 63; 65; 81]
7	Neobetanin	[14; 15; 63; 65; 81]
8	Isoprebetanin	[14; 15; 65; 81]
9	2,17-bidekarboxy-neobetanin	[14; 15; 65; 81]
10	2-dekarboxy-2,3-dehydro-neobetanin	[15; 63; 65; 81]
11	17-dekarboxy-betanidin	[14; 63; 65; 81]
12	17-dekarboxy-isobetanidin	[14; 63; 65; 81]
13	Prebetanin	[14; 63; 65; 81]
14	17-dekarboxy-betanin	[14; 63; 65; 81]
15	2′-O-glukosyl-betanin	[15; 63; 81]
16	2,17-bidekarboxy-2,3-dehydro-neobetanin	[15; 63; 81]
17	6′-O-feruloyl-2′-O-glukosyl-betanin	[15; 65; 81]
18	6′-O-feruloyl-2′-O-glukosyl-isobetanin	[15; 65; 81]
19	17-dekarboxy-isobetanin	[14; 65; 81]
20	2-dekarboxy-isobetanin	[14; 65; 81]
21	2-dekarboxy-betanin	[14; 65; 81]
22	15-dekarboxy-betanidin	[14; 65; 81]
23	2′-O-glukosyl-isobetanin	[15; 81]
24	2-dekarboxy-betanidin/isobetanidin	[65; 81]
25	2,17-bidekarboxy-betanin/isobetanin	[14; 65]
26	15-dekarboxy-betanin	[81]
27	2,17-bidekarboxy-betanidin/isobetanidin	[81]
28	Isobetanidin	[81]
29	2,15,17-tridekarboxy-2,3-dehydro-neobetanin	[81]
30	15-dekarboxy-isobetanidin	[14]
	Identifikované betaxanthiny	Literární zdroje
1	Vulgaxanthin I (betaxanthin glutaminu)	[14; 15; 63; 65; 81]
2	Betaxanthin kyseliny γ-aminomáselné	[14; 63; 65; 81]
3	Vulgaxanthin IV (betaxanthin leucinu)	[14; 63; 65; 81]
4	Isoindicaxanthin (isobetaxanthin prolinu)	[15; 63; 81]

5	Indicaxanthin (betaxanthin prolinu)	[15; 65; 81]
6	Betaxanthin isoleucinu/ isobetaxanthin leucinu	[15; 65; 81]
7	Isobetaxanthin valinu	[14; 15; 81]
8	Isobetaxanthin fenylalaninu	[14; 15; 81]
9	Vulgaxanthin II (betaxanthin kyseliny glutamové)	[63; 65; 81]
10	Betaxanthin valinu	[63; 65; 81]
11	Betaxanthin fenylalaninu	[14; 65; 81]
12	Betaxanthin tryptofanu	[14; 65; 81]
13	Isobetaxanthin isoleucinu	[15; 81]
14	Miraxanthin V (betaxanthin dopaminu)	[65; 81]
15	Portulacaxanthin II (betaxanthin tyrosinu)	[65; 81]
16	Vulgaxanthin III (betaxanthin asparaginu)	[14; 65]
17	Miraxanthin II (betaxanthin kyseliny asparagové)	[14; 65]
18	Betaxanthin threoninu	[14; 65]
19	Miraxanthin III (betaxanthin tyraminu)	[14; 65]
20	Betaxanthin 3-methoxy-tyraminu	[14; 65]
21	Isobetaxanthin glutaminu	[63]
22	Isoportulacaxanthin II (isobetaxanthin tyrosinu)	[81]
23	Musca-aurin VII (betaxanthin histidinu)	[65]
24	Betaxanthin serinu	[65]
25	Betaxanthin argininu	[65]
26	Betaxanthin ethanolaminu	[65]
27	Portulacaxanthin III (betaxanthin glycinu)	[65]
28	Isoportulacaxanthin III (betaxanthin isoglycinu)	[65]
29	Betaxanthin alaninu	[65]
30	Betaxanthin methioninu	[65]

Obsah betalainů v červené řepě se v jednotlivých studií liší, pravděpodobně z důvodu použití různých odrůd červené řepy, což má významný vliv na obsah barviva. Dále mají na obsah betalainů vliv podmínky během růstu rostliny, které jsou v různých zemích jiné a liší se i v rámci různých let. Publikované výsledky se dále liší i formou vyjadřování výsledků, nicméně pro orientační přepočet mezi obsahem vztaženým na čerstvou váhu nebo na sušinu vzorku lze využít poznatku, že čerstvá červená řepa je z přibližně 87 % tvořena vodou [11; 12].

Obsah celkového množství betalainů stanovených v červené řepě se pohybuje v rozmezí 4,62–17,15 mg/g sušiny [14; 73], čemuž odpovídají výsledky dalších studií, které udávají celkový obsah betalainů 0,32–2,70 mg/g čerstvé váhy [14; 51; 64].

V jedné z polských studií [14] byla za nejlepší odrůdu s nejvyšším obsahem betalainů (17,15 mg/g sušiny) označena odrůda Crosby, zatímco v Rakousku to byla odrůda Mona Lisa s obsahem 1 309 mg betalainů v litru šťávy [72]. Vliv podmínek pěstování na obsah betalainů byl studován Bucurovou a kol. [73], kdy byl pozorován výrazný rozdíl mezi obsahem betalainů u jarní a podzimní sklizně stejné odrůdy červené řepy. Zatímco pro jarní sklizeň byl obsah 8,38 mg/g sušiny, při podzimní sklizni to bylo pouhých 4,62 mg/g sušiny.

Ačkoli celkový obsah betalainů napříč odrůdami je proměnlivý, vzájemný poměr betakyanů a betaxanthinů zůstává zachován [72]. Betakyany tvoří zpravidla okolo 60 % z celkového obsahu betalainů [65; 68; 72; 73]. Jako konkrétní příklad lze uvést další polskou studii provedenou Kusznierewiczem a kol. [65], kteří se zabývali stanovením fytochemikálií v červené řepě a její antioxidační aktivitou. V 1 gramu sušiny červené řepy bylo stanoveno 10,28 mg betalainů, se zastoupením 6,49 mg betakyanů a 3,79 mg betaxanthinů.

Obsah samotného betaninu v červené řepě se v rámci studií pohyboval v rozmezí 2,62–7,6 mg/g sušiny [14; 16]. Wang a kol. [63], který se věnoval rozdílům mezi konvenčně a organicky pěstovanou červenou řepou, shledal v organicky pěstované červené řepě třikrát vyšší obsah betaninu (0,756 mg/g čerstvé váhy) než v konvenčně pěstované řepě (0,26 mg/g). Tomuto výsledku se blíží Nouairi a kol. [62] s obsahem betaninu 0,342 mg/g čerstvé váhy, avšak Ahmadi a kol. [59] stanovili 5 mg/g čerstvé váhy, přičemž takto vysoký výtěžek betaninu vysvětluje jeho zvláště vysokým zastoupením ve vzorku červené řepy zakoupené v místním obchodě na jihu Íránu. Betanin je v nepatrném, jindy až významném množství doprovázen isobetaninem, jehož obsah je koncentrován především ve slupce. Kujala a kol. [16] zjistili, že právě ve slupce bylo obsaženo vysoké množství isobetaninu, a to v odrůdě Forono 3,1 mg/g sušiny, koncentrace betaninu byla stanovena na 7,6 mg/g sušiny. Obdobného výsledku obsahu isobetaninu dosáhl Sawicki a kol. [14], který stanovil ve slupce červené řepy 2,35 mg/g sušiny.

Kromě betaninu byl ve čtyřech odrůdách červené řepy stanoven vulgaxanthin I (betaxanthin glutaminu) společně s vulgaxanthinem II (betaxanthin kyseliny glutamové) [16]. Jejich koncentrace se pohybovaly v rozmezí 1,4 – 4,3 mg/g sušiny a dosahovaly tak poloviny množství přítomného betaninu. Vulgaxanthin I je sice nejvýznamnějším betaxanthinem, ale takto vysoký obsah byl spíše výjimkou. Sawicki a kol. [14] udává v 1 g sušiny slupky červené řepy 1,17 mg vulgaxanthinu I současně s 5,32 mg betaninu.

ZÁVĚR

Červená řepa je hlavním zdrojem komerčního betaninu, který se využívá jako potravinářské barvivo především v Evropě a v Americe. U nás slouží k dobarvování zavařenin z červeného ovoce, nakládané zeleniny, džemů a marmelád, dále se přidává do uzenin a paštik. Vzhledem k současnému upřednostňování přírodních barviv v potravinářství je zájem získávat betalainy kromě červené řepy i z dalších rostlinných zdrojů. U betalainů je však velmi omezený výběr, protože se vyskytují pouze u řádu hvozdíkotvarých.

Kromě betalainů obsahuje červená řepa řadu prospěšných minerálů, vitamínů a dalších fenolických látek, což z ní činí velmi oblíbený pokrm zvláště u příznivců zdravého stravování. Díky vysoké antioxidační aktivitě dokáže regulovat oxidační stres organismu, má protizánětlivé účinky a pomáhá v boji s rakovinou. Dále zlepšuje lipidový profil krve a snižuje riziko trombózy.

Tato bakalářská práce popisuje metody stanovení betalainů, jako hlavní skupiny barviv obsažených v červené řepě. Hlavními metodami využívanými pro jejich stanovení je spektrofotometrie v UV/VIS oblasti a vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Spektrofotometricky se zpravidla stanovuje celkový obsah betalainů, kapalinová chromatografie naproti tomu umožňuje jednotlivá barviva rozdělit a stanovit individuálně. Pro současnou identifikaci a kvantifikaci velkého množství sloučenin obsažených v červené řepě se v dnešní době používá spojení kapalinové chromatografie s hmotností spektrometrií. Pro stanovení se zpravidla využívá šťáva z červené řepy, lyofilizovaná červená řepa či vhodně upravený extrakt. Celkový obsah betalainů se pohybuje v rozmezí 4,62–17,15 mg/g sušiny červené řepy, přičemž betakyany tvoří okolo 60 % celkových betalainů.

Bibliografie

[1] BABIČKA, Luboš. *Přídatné látky v potravinách: publikace České technologické platformy pro potraviny*. 1. vyd. Praha: Potravinářská komora České republiky, Česká technologická platforma pro potraviny, 2012. ISBN 978-80-905096-3-4.

[2] In: *Tunsmll* [online]. Company Godshaop.Cf, 2019 [cit. 2022-03-29]. Dostupné z: http://www.tunsmll.cf/ProductDetail.aspx?iid=140260013&pr=58.88

[3] Amaranthaceae. In: *Pladias: Databáze české flóry a vegetace* [online]. Brno: Ústav botaniky a zoologie Přírodovědecká fakulta Masarykova univerzita, c2014–2022 [cit. 2022-01-31]. Dostupné z: https://pladias.cz/taxon/overview/Amaranthaceae

[4] In: *Osivá-Semená* [online]. c2010–2022 [cit. 2022-03-29]. Dostupné z: https://www.osiva-semena.sk/mangold/1106-mangold-stopkovy-ruzovy-beta-vulgaris-semena-50-ks.html

[5] Veřejná databáze. In: *Český statistický úřad* [online]. 2021 [cit. 2021-01-29]. Dostupné z: https://vdb.czso.cz/vdbvo2/faces/cs/index.jsf?page=vystup-objekt-vyhledavani&vyhltext=%C4%8Derven%C3%A1+%C5%99epa&bkvt=xI1lcnZlbsOhIMWZZXBh&katalog=all&skupId=346&pvo=ZEM02A

[6] STRACK, Dieter, Thomas VOGT a Willibald SCHLIEMANN. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* [online]. 2003, 62(3), 247–269 [cit. 2021-03-27]. ISSN 00319422. Dostupné z: doi:10.1016/S0031-9422(02)00564-2

[7] Řepa salátová. In: *Semo* [online]. c1993–2021 [cit. 2021-01-30]. Dostupné z: https://www.semo.cz/osivo-semena/hobby/zelenina/repa-salatova/

[8] KULOVANÁ, Eliška. Jak pohlížet na půdní reakci (pH půd). In: *Úroda* [online]. Profi Press, 2013 [cit. 2021-01-30]. Dostupné z: https://www.uroda.cz/jak-pohlizet-na-pudni-reakci-ph-pud/

[9] How to grow beets. In: *Harvest to Table* [online]. c2016–2020 [cit. 2021-01-30]. Dostupné z: https://harvesttotable.com/how_to_grow_beets/

[10] BOECKMANN, Catherine. Growing Beets: Planting, Growing and Harvesting Beets. In: *The Old Farmer's Almanac* [online]. Dublin: Yankee Publishing, 2021 [cit. 2021-01-30]. Dostupné z: https://www.almanac.com/plant/beets

[11] MIRMIRAN, Parvin, Zeinab HOUSHIALSADAT, Zahra GAEINI, Zahra BAHADORAN a Fereidoun AZIZI. Functional properties of beetroot (Beta vulgaris) in management of cardio-metabolic diseases. *Nutrition & Metabolism* [online]. 2020, 17(1) [cit. 2022-02-17]. ISSN 1743-7075. Dostupné z: doi:10.1186/s12986-019-0421-0

[12] SZÉKELY, Dóra, Diána FURULYÁS a Mónika STÉGER-MÁTÉ. Investigation of Mineral and Vitamin C Contents in Different Parts of Beetroots (Beta vulgaris L.).

Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca [online]. 2019, 47(3), 615–620 [cit. 2022-02-17]. ISSN 1842-4309. Dostupné z: doi:10.15835/nbha47311394

[13] HADIPOUR, Elham, Akram TALEGHANI, Nilufar TAYARANI-NAJARAN a Zahra TAYARANI-NAJARAN. Biological effects of red beetroot and betalains: A review. *Phytotherapy Research* [online]. 2020, 34(8), 1847-1867 [cit. 2022-02-17]. ISSN 0951-418X. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.6653

[14] SAWICKI, Tomasz, Natalia BąCZEK a Wieslaw WICZKOWSKI. Betalain profile, content and antioxidant capacity of red beetroot dependent on the genotype and root part. *Journal of Functional Foods* [online]. 2016, 27, 249–261 [cit. 2021-04-02]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jff.2016.09.004

[15] SLATNAR, Ana, Franci STAMPAR, Robert VEBERIC a Jerneja JAKOPIC. HPLC--MSn Identification of Betalain Profile of Different Beetroot (Beta vulgaris L. ssp. vulgaris) Parts and Cultivars. *Journal of Food Science* [online]. 2015, 80(9), 1952-1958 [cit. 2022-02-23]. ISSN 00221147. Dostupné z: doi:10.1111/1750-3841.12977

[16] KUJALA, Tytti, Maarit VIENOLA, Karel KLIKA, Jyrki LOPONEN a Kalevi PIHLAJA. Betalain and phenolic compositions of four beetroot (Beta vulgaris) cultivars. *European Food Research and Technology* [online]. 2002, 214(6), 505-510 [cit. 2022-03-01]. ISSN 1438-2377. Dostupné z: doi:10.1007/s00217-001-0478-6

[17] KRMEČNÍK, Pavel a Jiří KYSILKA. Toxikon: Sekundární metabolismus rostlin. In: *Biotox* [online]. 2001–2007 [cit. 2021-02-27]. Dostupné z: http://www.biotox.cz/toxikon/rostliny/sekmetab.php

[18] STINTZING, Florian a Reinhold CARLE. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2004, 15(1), 19–38 [cit. 2021-03-08]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2003.07.004

[19] STAHL, Wilhelm a Helmut SIES. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta* [online]. 2004, 1740, 101–107 [cit. 2021-02-23]. ISSN 0925-4439. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbadis.2004.12.006

[20] OLAS, Beata, Karina URBAńSKA a Magdalena BRYś. Selected food colourants with antiplatelet activity as promising compounds for the prophylaxis and treatment of thrombosis. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2020, 141, 111437 [cit. 2021-02-23]. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2020.111437

[21] JAIN, Gagandeep a Kevin GOULD. Are betalain pigments the functional homologues of anthocyanins in plants?. *Environmental and Experimental Botany* [online]. 2015, 119, 48–53 [cit. 2021-03-08]. ISSN 00988472. Dostupné z: doi:10.1016/j.envexpbot.2015.06.002

[22] GANDÍA-HERRERO, Fernando a Francisco GARCÍA-CARMONA. Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends in Plant Science* [online]. Elsevier, 2013, 18(6), 334–343 [cit. 2021-03-07]. Dostupné z: doi:10.1016/j.tplants.2013.01.003

[23] KHAN, Mohammad a P. GIRIDHAR. Plant betalains: Chemistry and biochemistry. *Phytochemistry* [online]. 2015, 117, 267–295 [cit. 2021-04-02]. Dostupné z: doi:10.1016/j.phytochem.2015.06.008

[24] POLTURAK, Guy a Asaph AHARONI. "La Vie en Rose": Biosynthesis, Sources, and Applications of Betalain Pigments. *Molecular Plant* [online]. 2018, 11(1), 7-22 [cit. 2021-03-08]. ISSN 16742052. Dostupné z: doi:10.1016/j.molp.2017.10.008

[25] GENGATHARAN, Ashwini, Gary DYKES a Wee CHOO. Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2015, 64(2), 645–649 [cit. 2021-04-02]. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2015.06.052

[26] GUERRERO-RUBIO, M., Josefa ESCRIBANO, Francisco GARCÍA-CARMONA a Fernando GANDÍA-HERRERO. Light Emission in Betalains: From Fluorescent Flowers to Biotechnological Applications. *Trends in Plant Science* [online]. 2020, 25(2), 159-175 [cit. 2021-03-07]. ISSN 13601385. Dostupné z: doi:10.1016/j.tplants.2019.11.001

[27] ČESKÁ REPUBLIKA. Vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin, ve znění pozdějších předpisů. In: *ASPI [právní informační systém]*. Wolters Kluwer ČR [cit. 2021-02-04]. Dostupné také z: https://www.aspi.cz/products/lawText/1/65967/1/2

[28] Hodnocení bezpečnosti a schvalování přídatných látek v potravinách v EU. In: *Státní zemědělská a potravinářská inspekce* [online]. 2021 [cit. 2021-02-06]. Dostupné z: https://www.szpi.gov.cz/clanek/hodnoceni-bezpecnosti-a-schvalovani-pridatnych-latek-v-eu.aspx

[29] Přídatné látky (aditiva). In: *Státní zemědělská a potravinářská inspekce* [online]. Brno: Státní zemědělská a potravinářská inspekce, 2021 [cit. 2021-02-04]. Dostupné z: https://www.szpi.gov.cz/clanek/pridatne-latky-aditiva.aspx

[30] Food additives. In: *Efsa: European Food Safety Authority* [online]. 2021 [cit. 2021-02-06]. Dostupné z: https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/food-additives

[31] MICHALOVÁ, Irena. *Značky a informace na potravinách*. První vydání. Praha: Sdružení českých spotřebitelů, 2006, str. 20–24. Průvodce spotřebitele. ISBN 80-239-6652-9.

[32] BORGES, M.E., R.L. TEJERA, L. DÍAZ, P. ESPARZA a E. IBÁñEZ. Natural dyes extraction from cochineal (Dactylopius coccus). New extraction methods. *Food Chemistry* [online]. 2012, 132(4), 1855-1860 [cit. 2021-02-23]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2011.12.018

[33] FEKETEA, Gavriela a Sophia TSABOURI. Common food colorants and allergic reactions in children: Myth or reality?. *Food Chemistry* [online]. 2017, 230, 578–588 [cit. 2022-06-07]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2017.03.043

[34] KUBCOVÁ BERÁNKOVÁ, Jana. Akceptovatelný a tolerovatelný denní příjem chemické látky. In: *Informační centrum bezpečnosti potravin* [online]. Ministerstvo zemědělství, 2018 [cit. 2021-02-06]. Dostupné z: https://www.bezpecnostpotravin.cz/akceptovatelny-a-tolerovatelny-denni-prijem-chemicke-latky.aspx

[35] Potravinářská barviva. In: *Bezpečnost potravin* [online]. Ministerstvo zemědělství, 2018 [cit. 2021-02-08]. Dostupné z: https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76567.aspx

[36] FLORIANO, Jassana, Emanoeli ROSA, Queila DO AMARAL, Luísa ZURAVSKI, Pamella CHAVES, Michel MACHADO a Luís DE OLIVEIRA. Is tartrazine really safe? In silico and ex vivo toxicological studies in human leukocytes: a question of dose. *Toxicology Research* [online]. 2018, 7(6), 1128-1134 [cit. 2022-06-07]. ISSN 2045-452X. Dostupné z: doi:10.1039/C8TX00034D

[37] BASTAKI, Maria, Thomas FARRELL, Sachin BHUSARI, Kamala PANT a Rohan KULKARNI. Lack of genotoxicity in vivo for food color additive Tartrazine. *Food and Chemical Toxicology* [online]. Elsevier, 2017, 105, 278–284 [cit. 2021-02-18]. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2017.04.034

[38] AMCHOVA, Petra, Hana KOTOLOVA a Jana RUDA-KUCEROVA. Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* [online]. 2015, 73, 914–922 [cit. 2021-02-18]. Dostupné z: doi:10.1016/j.yrtph.2015.09.026

[39] ROWE, Katherine a Kenneth ROWE. Synthetic food coloring and behavior: A dose response effect in a double-blind, placebo-controlled, repeated-measures study. *The Journal of Pediatrics* [online]. 1994, 125(51), 691–698 [cit. 2022-06-07]. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-3476(06)80164-2

[40] KHAN, Ishfaq, Niamat ALI, Rabia HAMID a Showkat GANIE. Genotoxic effect of two commonly used food dyes metanil yellow and carmoisine using Allium cepa L. as indicator. *Toxicology Reports* [online]. 2020, 7, 370–375 [cit. 2021-02-05]. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxrep.2020.02.009

[41] RÓżYŁO, Renata. Recent trends in methods used to obtain natural food colorants by freezedrying. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2020, 102, 39–50 [cit. 2021-02-23]. ISSN 0924-2244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2020.06.005

[42] IORIZZO, Massimo, Julien CURABA, Marti POTTORFF, Mario G. FERRUZZI, Philipp SIMON a Pablo F. CAVAGNARO. Carrot Anthocyanins Genetics and Genomics: Status and Perspectives to Improve Its Application for the Food Colorant Industry. *Genes* [online]. 2020, 11(8), 906 [cit. 2021-02-22]. ISSN 2073-4425. Dostupné z: doi:10.3390/genes11080906

[43] FRANCIS, F. J. A new group of food colorants. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 1992, 3, 27–30 [cit. 2021-02-23]. Dostupné z: doi:10.1016/0924-2244(92)90112-A

[44] GEBHARDT, Beate, Regina SPERL, Reinhold CARLE a Judith MÜLLER-MAATSCH. Assessing the sustainability of natural and artificial food colorants. *Journal of Cleaner Production* [online]. 2020, 260, 120884 [cit. 2021-02-23]. ISSN 0959-6526. Dostupné z: doi:10.1016/j.jclepro.2020.120884

[45] GONZÁLEZ, Evangelina, Elisa GARCÍA a Mónica NAZARENO. Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of cochineal (Dactylopius coccus C.) extracts. *Food Chemistry* [online]. 2010, 119(1), 358-362 [cit. 2021-02-23]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2009.06.030

[46] DE GIER, Steffie a Kitty VERHOECKX. Insect (food) allergy and allergens. *Molecular Immunology* [online]. 2018, 100, 82-106 [cit. 2021-02-23]. ISSN 01615890. Dostupné z: doi:10.1016/j.molimm.2018.03.015

[47] TABAR-PURROY, Ana, María ALVAREZ-PUEBLA, Sara ACERO-SAINZ, Blanca GARCÍA-FIGUEROA, Susana ECHECHIPÍA-MADOZ, Jose OLAGUIBEL-RIVERA a Santiago QUIRCE-GANCEDO. Carmine (E-120)–induced occupational asthma revisited. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2003, 111(2), 415-419 [cit. 2021-02-23]. ISSN 00916749. Dostupné z: doi:10.1067/mai.2003.51

[48] CARDOSO-UGARTE, G.A., M.E. SOSA-MORALES, T. BALLARD, A. LICEAGA a M.F. SAN MARTÍN-GONZÁLEZ. Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (Beta vulgaris). *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2014, 59(1), 276-282 [cit. 2022-02-03]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2014.05.025

[49] Colours. COULTATE, T. *Food - The Chemistry of its Components* [online]. 5th Edition. Cambridge (UK): Royal Society of Chemistry, 2009, s. 214–263 [cit. 2022-02-03]. ISBN 978-0-85404-111-4.

[50] NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 1129/2011 ze dne 11. listopadu 2011, kterým se mění příloha II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 vytvořením seznamu potravinářských přídatných látek Unie. In: *Eur-lex [právní informační systém]*. Dostupné také z: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/cs/TXT/?uri=CELEX%3A32011R1129

[51] GONçALVES, Letícia, Marco TRASSI, Nathana LOPES, Felipe DÖRR, Monica SANTOS, Wilhelm BAADER, Vani OLIVEIRA a Erick BASTOS. A comparative study of the purification of betanin. *Food Chemistry* [online]. 2012, 131(1), 231-238 [cit. 2022-02-06]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2011.08.067

[52] CIRIMINNA, Rosaria, Alexandra FIDALGO, Carmelo DANZì, Giuseppe TIMPANARO, Laura ILHARCO a Mario PAGLIARO. Betanin: A Bioeconomy Insight into a Valued Betacyanin. *ACS Sustainable Chem. Eng* [online]. 2018, 6(3), 2860-2865 [cit. 2022-02-02]. ISSN 2168-0485. Dostupné z: doi:10.1021/acssuschemeng.7b04163

[53] In: *Tsfoodtech* [online]. © Guangdong Tiansheng Food Technology, 2022 [cit. 2022-03-29]. Dostupné z: https://www.tsfoodtech.com/showroom/red-beet-root-extract-betanin-red-color-.html

[54] SADOWSKA-BARTOSZ, Izabela a Grzegorz BARTOSZ. Biological Properties and Applications of Betalains. *Molecules* [online]. 2021, 26(9), 2520 [cit. 2022-02-17]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26092520

[55] CLIFFORD, Tom, Glyn HOWATSON, Daniel WEST a Emma STEVENSON. The Potential Benefits of Red Beetroot Supplementation in Health and Disease. *Nutrients* [online]. 2015, 7(4), 2801-2822 [cit. 2022-02-17]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu7042801

[56] CHEN, Liping, Yuankang ZHU, Zijing HU, Shengjie WU a Chengtao JIN. Beetroot as a functional food with huge health benefits: Antioxidant, antitumor, physical function, and chronic metabolomics activity. *Food Science & Nutrition* [online]. 2021, 9(11), 6406-6420 [cit. 2022-02-17]. ISSN 2048-7177. Dostupné z: doi:10.1002/fsn3.2577

[57] TAN, Mei a Shahrul HAMID. Beetroot as a Potential Functional Food for Cancer Chemoprevention, a Narrative Review. *Journal of Cancer Prevention* [online]. 2021, 26(1), 1-17 [cit. 2022-02-17]. ISSN 2288-3649. Dostupné z: doi:10.15430/JCP.2021.26.1.1

[58] CARREÓN-HIDALGO, Juan, Diana FRANCO-VÁSQUEZ, Darío GÓMEZ-LINTON a Laura PÉREZ-FLORES. Betalain plant sources, biosynthesis, extraction, stability enhancement methods, bioactivity, and applications. *Food Research International* [online]. 2022, 151, 110821 [cit. 2022-02-17]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2021.110821

[59] AHMADI, Hosein, Zahra NAYERI, Zarrin MINUCHEHR, Farzaneh SABOUNI, Mehdi MOHAMMADI a Gautam SETHI. Betanin purification from red beetroots and evaluation of its anti-oxidant and anti-inflammatory activity on LPS-activated microglial cells. *PLOS ONE* [online]. 2020, 15(5), 1–18 [cit. 2022-02-17]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0233088

[60] NINFALI, Paolino, Elena ANTONINI, Alessandra FRATI a Emanuele-Salvatore SCARPA. C-Glycosyl Flavonoids from Beta vulgaris Cicla and Betalains from Beta vulgaris rubra: Antioxidant, Anticancer and Antiinflammatory Activities-A Review. *Phytotherapy Research* [online]. 2017, 31(6), 871-884 [cit. 2022-01-31]. ISSN 0951418X. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.5819

[61] S. J., SCHWARTZ, HILDENBRAND B. E. a VON J. H. Comparison of Spectrophotometric and HPLC Methods to Quantify Betacyanins. *Journal of Food Science* [online]. 1981, 46, 296–297 [cit. 2022-02-23].

[62] NOUAIRI, Mohammed, Mohammed FREHA a Ali BELLIL. Study by absorption and emission spectrophotometry of the efficiency of the binary mixture (Ethanol-Water) on the extraction of betanin from red beetroot. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and*

Biomolecular Spectroscopy [online]. 2021, 260, 119939 [cit. 2022-02-23]. ISSN 13861425. Dostupné z: doi:10.1016/j.saa.2021.119939

[63] WANG, Junyi, Guddadarangavvanahally JAYAPRAKASHA a Bhimanagouda PATIL. UPLC-QTOF-MS fingerprinting combined with chemometrics to assess the solvent extraction efficiency, phytochemical variation, and antioxidant activities of Beta vulgaris L. *Journal of Food and Drug Analysis* [online]. 2020, 28(2), 217-230 [cit. 2022-02-23]. ISSN 2224-6614. Dostupné z: doi:10.38212/2224-6614.1056

[64] SAWICKI, Tomasz, Magdalena SURMA, Henryk ZIELIńSKI a Wiesław WICZKOWSKI. Development of a new analytical method for the determination of red beetroot betalains using dispersive solid-phase extraction. *Journal of Separation Science* [online]. 2016, 39(15), 2986-2994 [cit. 2022-03-01]. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201600196

[65] KUSZNIEREWICZ, Barbara, Marika MRÓZ, Izabela KOSS-MIKOŁAJCZYK a Jacek NAMIEśNIK. Comparative evaluation of different methods for determining phytochemicals and antioxidant activity in products containing betalains – Verification of beetroot samples. *Food Chemistry* [online]. 2021, 362, 130132 [cit. 2022-02-23]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2021.130132

[66] NESTORA, Sofia, Franck MERLIER, Elise PROST, Karsten HAUPT, Claire ROSSI a Bernadette TSE SUM BUI. Solid-phase extraction of betanin and isobetanin from beetroot extracts using a dipicolinic acid molecularly imprinted polymer. *Journal of Chromatography A* [online]. 2016, 1465, 47-54 [cit. 2022-02-02]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2016.08.069

[67] LAZăR (MISTRIANU), Silvia, Oana CONSTANTIN, Nicoleta STăNCIUC, Iuliana APRODU, Constantin CROITORU a Gabriela RâPEANU. Optimization of Betalain Pigments Extraction Using Beetroot by-Products as a Valuable Source. *Inventions* [online]. 2021, 6(50) [cit. 2022-02-23]. ISSN 2411-5134. Dostupné z: doi:10.3390/inventions6030050

[68] KAUR, Sehajveer, Navjot KAUR, Poonam AGGARWAL a Kiran GROVER. Bioactive compounds, antioxidant activity, and color retention of beetroot (Beta vulgaris L.) powder: Effect of steam blanching with refrigeration and storage. *Journal of Food Processing and Preservation* [online]. 2021, 45(3) [cit. 2022-02-23]. ISSN 0145-8892. Dostupné z: doi:10.1111/jfpp.15247

[69] ESTEVES, Larissa, Amanda PINHEIRO, Renan PIOLI, Tatiana PENNA, Wilhelm BAADER, Thiago CORRERA a Erick BASTOS. Revisiting the Mechanism of Hydrolysis of Betanin. *Photochemistry and Photobiology* [online]. 2018, 94(5), 853-864 [cit. 2022-02-23]. ISSN 00318655. Dostupné z: doi:10.1111/php.12897

[70] HOLZBECHER, Záviš a Jaroslav CHURÁČEK. *Analytická chemie*. Vydání první. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987.

[71] ZÝKA, Jaroslav. *Analytická příručka*. Druhé, doplněné a upravené vydání. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1972.

[72] WRUSS, Jürgen, Gundula WALDENBERGER, Stefan HUEMER, Pinar UYGUN, Peter LANZERSTORFER, Ulrike MÜLLER, Otmar HÖGLINGER a Julian WEGHUBER. Compositional characteristics of commercial beetroot products and beetroot juice prepared from seven beetroot varieties grown in Upper Austria. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2015, 42, 46-55 [cit. 2022-03-07]. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2015.03.005

[73] BUCUR, Laura, Gheorghe TARALUNGA a Verginica SCHRODER. The betalains content and antioxidant capacity of red beet (Beta vulgaris L. subsp. vulgaris) root. *Pharmacia* [online]. 2016, 64(2), 198–201 [cit. 2022-03-07].

[74] ŠVEC, František. Quo vadis kapalinová chromatografie?. *Chemické listy*. 2021, 115(4), 185–187.

[75] HPLC basics – Principles and parameters. In: *Knauer* [online]. KNAUER Wissenschaftliche Geräte, 2022 [cit. 2022-04-05]. Dostupné z: https://www.knauer.net/en/Systems-Solutions/Analytical-HPLC-UHPLC/HPLC-Basics---principles-and-parameters

[76] NEUE, Uwe D. *HPLC columns: theory, technology, and practice*. 1. New York: Wiley, 1997. ISBN 04-711-9037-3.

[77] SÝKORA, David, Eva TESAŘOVÁ, Magda VOSMANSKÁ a Monika ZVOLÁNKOVÁ. Moderní stacionární fáze pro HPLC. *Chemické listy*. 2007, 3(101), 190–199.

[78] ŠESTÁK, JOZEF a VLADISLAV KAHLE. Zelená kapalinová chromatografie pro jednoduché aplikace. *Chemické listy*. 2015, 109(6), 470–474.

[79] ZÝKA, Jaroslav. *Analytická příručka*. Díl II. Třetí, přepracované a rozšířené vydání. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1980.

[80] COLE, Richard B. Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. John Wiley & Sons, 2000, 35(7), 763–772 [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: doi:10.1002/1096-9888(200007)35:7<763::AID-JMS16>3.0.CO;2-%23

[81] NEMZER, Boris, Zbigniew PIETRZKOWSKI, Aneta SPÓRNA, Paweł STALICA, Wayne THRESHER, Tadeusz MICHAŁOWSKI a Sławomir WYBRANIEC. Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root (Beta vulgaris L.) dried extracts. *Food Chemistry* [online]. 2011, 127(1), 42-53 [cit. 2022-03-16]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2010.12.081