

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Kateřina Hrubcová

Vývoj metody pro HPLC separaci astaxanthinu, β -karotenu a
luteinu

Development of HPLC separation of astaxanthin, β -carotene and
lutein

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Eliška Nováková, Ph.D.

Praha 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 10. srpna 2021.

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá vývojem metody separace karotenoidových barviv, především astaxanthinu, β -karotenu a luteinu, produkovaných mikroskopickou zelenou řasou *Tetracystis pulchra*. Práce porovnává publikované metody separace karotenoidových barviv a snaží se o optimalizaci metody vhodné pro analýzu extraktů barviv z buněk *Tetracystis pulchra*.

Optimalizované HPLC-DAD podmínky pro separaci karotenoidů byly následující: mobilní fáze A – ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0): 94/2/4, mobilní fáze B – MeOH/EtOAc: 68/32 za gradientové eluce, průtok 0,25 ml min⁻¹, teplota kolony 28 °C. Byla použita kolona Kinetex C18 (100 × 2,1 mm, 2,6 μ m), dávkovaný objem byl 20 μ l, detekce probíhala při vlnové délce 470 nm. Celková doba analýzy byla 23 minut.

Klíčová slova: HPLC, astaxanthin, β -karoten, lutein

Abstract

This bachelor's thesis deals with the development of a method for the separation of carotenoid pigments, especially astaxanthin, β -carotene and lutein, produced by the microscopic green alga *Tetracystis pulchra*. The work compares published methods for the separation of carotenoid pigments and attempts to optimize a method suitable for the analysis of pigment extracts from *Tetracystis pulchra* cells.

Optimized conditions for HPLC-DAD separation of carotenoid pigments were as follows: mobile phase A – ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl buffer (pH = 8,0): 94/2/4, mobile phase B – MeOH/EtOAc: 68/32 under gradient elution, flow rate 0,25 ml min⁻¹, column temperature 28 °C. The column used was Kinetex C18 (100 × 2,1 mm, 2,6 μ m), injection volume was 20 μ l and UV detection was performed at 470 nm. Total analysis time was 23 minutes.

Key words: HPLC, astaxanthin, β -carotene, lutein

Poděkování

Nejprve bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce RNDr. Elišce Novákové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícný a přátelský přístup, trpělivost, cenné rady a věnovaný čas.

Dále bych chtěla poděkovat Bc. Terezii Očadlíkové za poskytnutí vzorků řas a spolupráci.

Velké díky patří i celé mé rodině za jejich podporu během mého studia.

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Teoretická část	10
2.1	Karotenoidy	10
2.2	Chemická struktura a stabilita karotenoidů.....	10
2.3	Karotenogeneze	11
2.4	Význam karotenoidů pro člověka	12
2.5	Astaxanthin	12
2.5.1	Využití astaxanthinu.....	13
2.5.2	Chemické formy astaxanthinu.....	13
2.5.3	Astaxanthin jako silný antioxidant.....	15
2.5.4	Astaxanthin jako fotoprotektant.....	15
2.6	Canthaxanthin	16
2.7	Lutein a zeaxanthin	16
2.8	Violaxanthin, neoxanthin a echinenon.....	18
2.9	β -karoten	19
2.10	Stanovení karotenoidů metodou HPLC	20
2.10.1	Extrakce.....	21
2.10.2	Saponifikace	22
2.10.3	HPLC.....	23
2.10.4	Způsoby detekce.....	25
2.10.5	Přehled vybraných metod pro HPLC stanovení karotenoidů.....	26
3	Praktická část	30
3.1	Přístroje a pomůcky	30
3.2	Použité chemikálie	30
3.3	Použitý materiál	31
3.4	Příprava vzorků a činidel	31
3.4.1	Extrakce vzorků řas.....	31
3.4.2	Příprava vzorků pro HPLC separaci karotenoidů	32
3.4.3	Příprava kalibračních roztoků	32
3.5	Příprava pufry	33

3.6	Použité mobilní fáze	33
3.7	Podmínky separace v HPLC a mobilní fáze	33
3.8	Použité vzorce a výpočty	33
4	Výsledky a diskuse	35
4.1	Optimalizace složení mobilní fáze.....	36
4.2	Vliv teploty kolony na tvar signálů.....	43
4.3	Optimalizace průtokové rychlosti	43
4.4	Měření standardů a kalibrace	44
4.5	Určení limitu detekce a kvantifikace	55
5	Závěr	56
6	Použitá literatura	57

Seznam použitých zkratk

<i>a</i>	absorpční koeficient
ACN	acetonitril
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
BHA	butylhydroxyanisol
BHT	butylhydroxytoluen
C8	oktylová stacionární fáze
C18	oktadecylová stacionární fáze
C30	triakontylová stacionární fáze
DAD	detektor s diodovým polem
DMSO	dimethylsulfoxid
ESI	elektrosprejová ionizace
EtOAc	ethylacetát
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<i>k</i>	retenční faktor
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
M	jednotka molární koncentrace, mol dm ⁻³
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
MTBE	methyl <i>tert</i> -butyl ether
NMR	nukleární magnetická rezonance
NP-HPLC	kapalinová chromatografie s normálními fázemi
RP-HPLC	kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
<i>R</i>	rozlišení
SPE	extrakce tuhou fází
TBHQ	<i>tert</i> -butylhydrochinon
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TLS	termooptická spektrometrie
<i>t</i> _M	mrtvý čas
<i>t</i> _R	retenční čas
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast záření

1 Úvod

V poslední době se začalo objevovat mnoho studií zabývajících se karotenoidy a jejich antioxidačními vlastnostmi. Karotenoidy jsou lipofilní barviva, produkovaná všemi zelenými rostlinami a také širokým spektrem mikroorganismů. Jedním z takových mikroorganismů jsou mikrořasy, které představují hlavní zdroj pro komerční produkci karotenoidů.

Z mnoha karotenoidů vzrostl zájem především o přírodní formu astaxanthinu, zejména pro jeho využití v akvakultuře jako doplňku stravy pro správnou pigmentaci organismů. Pro své silné antioxidační vlastnosti má astaxanthin využití i v medicíně a kosmetice. Vykazuje protizánětlivé účinky a má potenciál v předcházení různým nemocem jako je diabetes, kardiovaskulární nemoci nebo i rakovina. Díky těmto četným zdravotním výhodám se v blízké době předpokládá velký nárůst zájmu o přírodní astaxanthin, jež kvalitou převyšuje dnes vyráběný syntetický astaxanthin. Alternativní zdroj astaxanthinu představuje například zelená řasa *Chromochloris zofingiensis*, která je schopná přizpůsobit se různým kultivačním podmínkám [1].

Pro účely studie produkce karotenoidů musí být k dispozici rychlá, spolehlivá, široce použitelná a levná metoda k charakterizaci karotenoidového profilu testovaného organismu. Taková metoda se skládá ze dvou částí, extrakce a chromatografické analýzy. Vývoj vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) výrazně zlepšil izolaci a kvantifikaci karotenoidů.

Přesná kvantifikace astaxanthinu ve formě esterů, ve které se často vyskytuje v buňkách řas, pomocí HPLC je složitá. Byly však vyvinuty různé metody pro analýzu volného astaxanthinu. Před samotnou analýzou je tedy často nutné estery astaxanthinu nejprve hydrolyzovat buď chemickou či enzymatickou cestou pro získání volného astaxanthinu.

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout a porovnat publikované metody separace karotenoidových barviv, se zaměřením na astaxanthin, β -karoten a lutein, a na tomto základě optimalizovat vhodnou metodu pro stanovení obsahu vybraných karotenoidů v extraktu směsi barviv získaných z kultur červenajících řas *Tetracystis pulchra* pěstovaných za různých podmínek.

2 Teoretická část

2.1 Karotenoidy

Karotenoidy jsou v tucích rozpustné pigmenty vyznačující se žlutou, oranžovou nebo červenou barvou. Celkem bylo identifikováno 500 až 600 konkrétních karotenoidů ve fotosyntetických i nefotosyntetických organismech: v rostlinách, řasách, houbách, bakteriích a také u živočichů. Přirozeně je syntetizují fotosyntetické bakterie, řasy, houby a rostliny. Karotenoidy těmto organismům slouží jako důležité složky tvořící fotosystémy a anténní komplexy pro sběr světla pro fotosyntézu a také jako ochrana před příliš intenzivním zářením. Kromě primárních karotenoidů podílejících se na fotosyntéze jsou rostliny a řasy schopné akumulovat také mnohem větší množství sekundárních karotenoidů, které se na rozdíl od primárních karotenoidů na fotosyntéze nepodílejí [2].

2.2 Chemická struktura a stabilita karotenoidů

Většinu karotenoidů tvoří uhlovodíkový řetězec ze 40 uhlíkových atomů zakončený jedním nebo dvěma cykly. Uhlovodíkový řetězec je tvořený konjugovanými dvojnými vazbami. Karotenoidy se dělí na dvě skupiny, karoteny a xantofyly. Karoteny jsou složeny pouze z uhlíku a vodíku, kdežto xantofyly jsou kyslíkové deriváty. U xantofylů může být kyslík přítomný v podobě hydroxylových (zeaxanthin) nebo ketonových (canthaxanthin) skupin, anebo mohou obsahovat kombinaci obou zmíněných skupin, jako je tomu u astaxanthinu [3].

Díky polyenovému řetězci mají karotenoidy svou specifickou strukturu, chemické vlastnosti a mohou pohlcovat světelnou energii. Každá dvojná vazba v polyenovém řetězci se může vyskytovat ve dvou konfiguracích jako geometrické izomery *cis* nebo *trans*. *Cis*-izomery jsou termodynamicky méně stabilní než *trans*-izomery. Většina karotenoidů se v přírodě vyskytuje jako *trans*-izomery [4].

Díky svému dlouhému řetězci jsou karotenoidy extrémně reaktivní a

nestabilní. Působení tepla, světla nebo kyslíku může vést ke snížení stability karotenoidů. Také vliv různých environmentálních faktorů může způsobovat změny ve struktuře a degradaci, což se projeví jak ztrátou barvy, tak i antioxidačních vlastností a funkcí (např. coby provitaminu A). Během izolace a chromatografie by mělo být dodrženo několik opatření, jako je ochrana před světlem a kyslíkem, provedení analýzy v co nejkratším čase za použití nízkých teplot a s přidavkem antioxidantů zabraňujících degradaci karotenoidů [3].

2.3 Karotenogeneze

Přesto, že lidské tělo neumí karotenoidy syntetizovat, jsou tyto sloučeniny známé pro svůj významný vliv na fyziologické funkce lidského organismu. Kromě toho, že jsou to antioxidanty, slouží také jako provitamin A. Karotenoidy se široce využívají jako přísady do jídla pro dosažení požadované barvy produktu [3].

Ačkoli jsou společné dráhy karotenogeneze u fotosyntetických organismů dobře prostudovány, další cesty specifické pro řasy jsou již prostudovány méně. Příkladem je skutečnost, že vyšší rostliny obecně neprodukují ketokarotenoidy. Některé zelené řasy jako *Haematococcus pluvialis* a *Chromochloris zofingiensis* jsou však schopny akumulovat vysoké množství ketokarotenoidů mimo plastidy za stresových podmínek [5].

Chromochloris zofingiensis je jednobuněčná zelená řasa považovaná za potenciálního producenta vysoce hodnotných karotenoidů a mastných kyselin. Pokud je tato řasa vystavena stresu, začne produkovat a akumulovat sekundární karotenoidy, jako je astaxanthin nebo canthaxanthin. Stres způsobují nepříznivé podmínky (přemíra záření, nedostatek živin, extrémní teploty, slanost prostředí nebo kombinace těchto vlivů) zpomalující růst a fotosyntézu. Nahromaděné sekundární karotenoidy pak chrání buňku před fotooxidačním poškozením, reaktivními formami kyslíku a slouží jako zásobárny produktů fotosyntézy, které nelze použít pro růst a dělení buňky za stresových podmínek [5].

2.4 Význam karotenoidů pro člověka

Karotenoidy jsou často spojovány s ochranou před kardiovaskulárními nemocemi, a dokonce některými druhy rakoviny. Antioxidační vlastnosti karotenoidů jsou dány jejich schopností zachytávat nejen lipidové peroxylové radikály, ale také singletový kyslík. Zásadní role karotenoidů jako zdroje vitamínu A je známa již mnoho let. Ačkoli všechny karotenoidy obsahují rozsáhlé konjugované dvojné vazby, jednotlivé karotenoidy se u lidí liší svým antioxidačním potenciálem. Mají také pozoruhodné účinky na imunitní odpověď a mezibuněčnou komunikaci [6].

Karotenoidy obsažené v ovoci, zelenině a zvířatech jsou obvykle rozpustné v tucích a jsou spojeny s lipidovými frakcemi. Mohou být také esterifikovány nebo v komplexu s proteinem. Během proteolytického štěpení se karotenoidy uvolňují z přidružených proteinů a agregují s jinými lipidy. U lidí bylo zjištěno, že se absorbuje 5-50 % karotenoidů. Účinnost absorpce karotenoidů ve střevech je ovlivněna přítomností nebo nepřítomností dalších složek ve stravě (tuky a bílkoviny) a žlučovými solemi. Jak se zvyšuje množství karotenoidů ve stravě, snižuje se jejich absorpce. Po absorpci se karotenoidy sloužící jako provitaminy A štěpí v buňkách sliznice za vzniku retinalu, který je poté redukován na retinol (vitamin A). Některé nepřeměněné karotenoidy jsou přímo absorbovány a přecházejí do krve. Ukládají se v játrech nebo jiných částech těla, například v tukových zásobách a různých orgánech [7, 6].

2.5 Astaxanthin

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β,β' -karoten-4,4'-dion) je pigment patřící do skupiny xantofylů, kyslíkatých derivátů karotenoidů, jejichž syntéza v rostlinách vychází z lykopenu. Je to tmavě červený pigment nacházející se především v mořském světě řas a vodních živočichů. Je přítomný v mnoha druzích mořských organismů, včetně lososů, pstruhů, pražmy, garnátů a humrů. Lze ho však najít i u ptáků, jako jsou plameňáci a křepelky. Astaxanthin byl také nalezen a identifikován v několika mikroorganismech, jako jsou mikrořasy *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella zofingiensis*, *Chlorococcum sp.*, červené kvasinky *Phaffia*

rhodozyma a mořské bakterie *Agrobacterium aurantiacum* [8].

2.5.1 Využití astaxanthinu

Astaxanthin je jedním z hlavních pigmentů nacházejících se u korýšů, lososovitých a v krmivu pro chovné ryby. Hlavním úkolem tohoto pigmentu v krmivu je zajistit červeno-oranžové zbarvení u organismů, které nemají přístup k přírodním zdrojům karotenoidů. Důvodem využití astaxanthinu v akvakultuře je fakt, že jde o důležitou nutriční složku zajišťující správný růst a reprodukci.

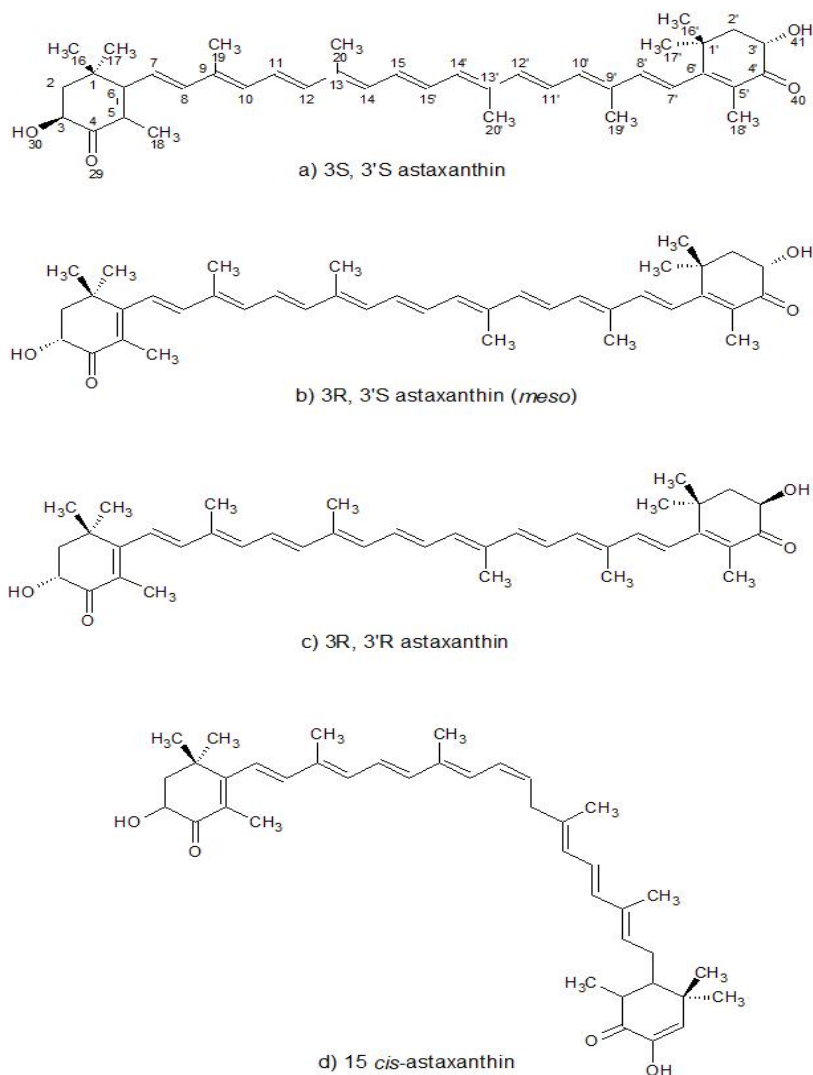
Jedním z nejdůležitějších aspektů astaxanthinu jsou jeho antioxidační vlastnosti, které překonají i ty u β -karotenu a dokonce α -tokoferolu (jinak známý jako vitamin E) [9]. Díky této význačné vlastnosti je astaxanthinu připisován potenciál v ochraně organismu proti širokému okruhu nemocí jako jsou kardiovaskulární problémy, různé typy rakoviny a některé nemoci imunologického systému. Toto vyvolalo velký zájem o astaxanthin a podnítilo množství studií zabírajících se možnými benefity pro zvířata i lidi. Mnoho studií se také soustředí na identifikaci, produkci a využití přírodních zdrojů astaxanthinu (řasy, kvasinky a vedlejší produkty korýšů) jako alternativu syntetického pigmentu, který tvoří většinu na světových trzích [10].

2.5.2 Chemické formy astaxanthinu

Astaxanthin má unikátní chemické vlastnosti založené na své molekulární struktuře. Má dvě karbonylové a dvě karboxylové skupiny a jedenáct konjugovaných ethylenových dvojných vazeb. Přítomnost hydroxylových a ketonových skupin na každém iononovém kruhu vysvětluje některé z charakteristických vlastností astaxanthinu, jako je schopnost esterifikace, vyšší antioxidační aktivita a vyšší polarita než u jiných karotenoidů. Astaxanthin může vystupovat jako silný antioxidant tím, že jako donor elektronů reaguje s volnými radikály a přeměňuje je na stabilnější produkty. Ve svém přirozeném stavu je astaxanthin obvykle spojován s jinými molekulami. Volný astaxanthin je zvlášť citlivý na oxidaci. Proto se astaxanthin v přírodě vyskytuje buď jako konjugovaný s proteiny nebo ve formě esteru s jednou či dvěma mastnými kyselinami a tvoří

tak mono- a di-estery [8, 11].

Atomy obsažené v molekule astaxanthinu, ať už je volný nebo vázaný, mohou být různě orientovány a tvořit tak izomery. Díky přítomnosti dvou chirálních center na 3C a 3'C může astaxanthin kromě geometrických izomerů (*cis* a *trans*) vytvářet i tři konfigurační izomery, a to dva enantiomery (3R, 3' R a 3S, 3' S) a mesoizomer (3R, 3' S) (obr. 1). Ze všech těchto izomerů se v přírodě nejhojněji vyskytuje izomer 3S, 3' S [12].



Obr. 1: Konfigurační izomery astaxanthinu (a-c) a geometrický *cis* izomer (d), vytvořeno v programu ChemSketch

Syntetický astaxanthin je po molekulární stránce stejný jako ten produkovaný v živých organismech a skládá se ze směsi izomerů 3S, 3' S: 3R,

3' S: 3R, 3' R) v poměru 1:2:1. Je to hlavní karotenoid používaný celosvětově v akvakultuře. Nicméně narůstající požadavky na přírodní zdroje potravin a vysoká cena syntetických barviv podnítilo hledání přírodních zdrojů astaxanthinu s potenciálem pro industrializaci. Zatím pouze pár zdrojů mikrobiálního původu může ekonomicky soutěžit se syntetickým astaxanthinem. Patří k nim zelená mikrořasa *Haematococcus pluvialis* a červená kvasinka *Phaffia rhodozyma* [8].

2.5.3 Astaxanthin jako silný antioxidant

Jak už bylo řečeno, astaxanthin má díky hydroxylovým a ketonovým skupinám na každém iononovém kruhu silné antioxidační vlastnosti. Bylo zjištěno, že astaxanthin má až desetkrát vyšší antioxidační aktivitu než jiné karotenoidy (zeaxanthin, lutein, canthaxanthin nebo β -karoten) a dokonce až stokrát silnější antioxidační aktivitu než α -tokoferol. Proto získal astaxanthin označení „super vitamin E“ [9]. Astaxanthin zachycuje radikály nejen na konjugovaném polyenovém řetězci, ale také na skupinách v cyklu na konci řetězce. Zatímco nenasycený polyenový řetězec zachytává radikály pouze v membráně, cyklus na konci řetězce astaxanthinu může vychytávat radikály z vnějšího i vnitřního prostředí fosfolipidové membrány [13].

Jedinečné vlastnosti astaxanthinu jsou také spojovány s jeho antiperoxidační aktivitou. Bylo zjištěno, že astaxanthin může inhibovat peroxidaci lipidů a zlepšuje působení antioxidačních enzymů v endotelových buňkách vystavených glykovaným proteinům/chelátům železa potlačením tvorby reaktivních forem kyslíku. Předpokládá se, že antioxidační vlastnosti astaxanthinu hrají klíčovou roli v několika dalších aspektech, jako je ochrana před fotooxidací UV zářením, záněty, rakovinou, vředovou infekcí *Helicobacter pylorii*, stárnutím a nemocemi souvisejícími s věkem. Dále je pak astaxanthin spojován s podporou imunitní odpovědi, funkce jater a zdravý srdce, očí, kloubů a prostaty [14].

2.5.4 Astaxanthin jako fotoprotektant

Vystavení lipidů a tkání světlu, zejména UV záření, může vést k produkci singletových kyslíkových forem a následně volných radikálů a fotooxidačnímu

poškození těchto lipidů a tkání. Karotenoidy mají důležitou roli v přírodě při ochraně tkání před fotooxidací zprostředkovanou UV zářením a často se vyskytují v tkáních vystavených slunečnímu záření. Astaxanthin může být při prevenci fotooxidace lipidů UV světlem významně účinnější než β -karoten a lutein. Poškození očí a pokožky UV zářením je široce zdokumentováno, a proto by mohli být vlastnosti astaxanthinu velmi důležité pro zdraví očí a pokožky [15].

2.6 Canthaxanthin

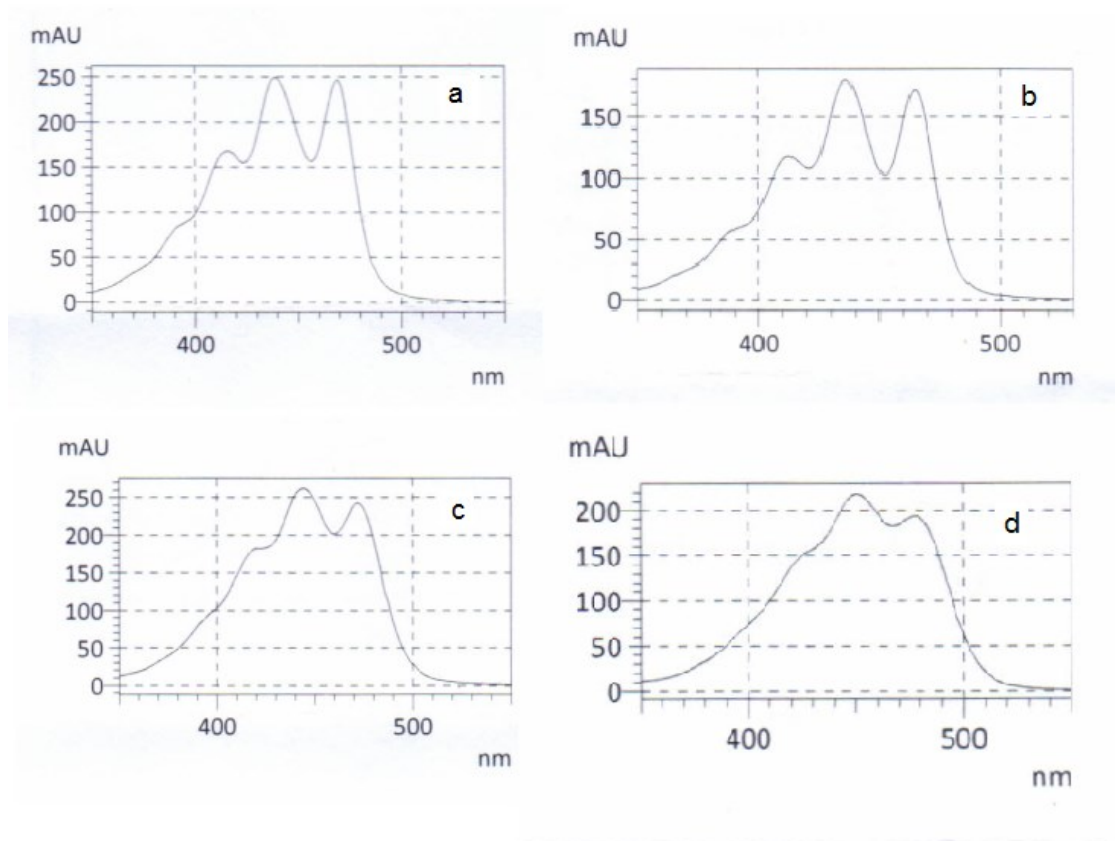
Canthaxanthin (β,β -karoten-4,4'-dion) je ketokarotenoid s devíti konjugovanými dvojnými vazbami, které jsou zodpovědné za jeho červeno-oranžovou barvu. Poprvé byl izolován z houby *Cantharellus cinnabarinus*. Dalšími potenciálními zdroji jsou mimo jiné zelená řasa *Haematococcus pluvialis* a mikrořasy *Chlorella zofingiensis* a *Dactylococcus dissociatus* MT. Canthaxanthin se stejně jako astaxanthin používá jako potravinová přídatná látka a dodává tak potravinám živočišného původu charakteristický červenooranžový odstín. Na rozdíl od jiných karotenoidů se canthaxanthin nepoužívá jako nutraceutikum, přestože kromě jeho funkcí jako pigmentu byly také popsány potenciální přínosy pro zdraví, včetně antioxidačních vlastností [47].

2.7 Lutein a zeaxanthin

Lutein a zeaxanthin patří mezi xantofyly. Čistý lutein se obvykle jeví jako žluto-oranžová krystalická lipofilní pevná látka s chemickým názvem β,ϵ -karoten-3,3'-diol. Nachází se v mnoha organismech od bakterií po řasy, kvasinky a rostliny. Díky své intenzivní žluté barvě je lutein široce využíván jako přírodní potravinářské barvivo. Biologický význam tohoto pigmentu vychází z jeho antioxidačního potenciálu, který hraje významnou roli v prevenci makulární degenerace související s věkem a dalších nemocí jako je rakovina. V současnosti se komerčně získává z okvětních lístků měsíčku lékařského. Extrakce luteinu z měsíčku lékařského je však omezena náročností procesu a extrémně nízkým obsahem luteinu v rostlinách (pouhých 0,03 % v suchém květu). V posledních letech se začalo uvažovat o mikrořasách jako o slibném zdroji luteinu pro jeho

vysoký obsah (až 7 mg/g). V přírodě se lutein vyskytuje společně se svým stereoizomerem zeaxanthinem. Dvojně vazby izoprenového řetězce luteinu mohou být v *all-trans* nebo *cis* konfiguracích, nazývajících se také E/Z konfigurace. V přírodě je nejběžnějším geometrickým izomerem luteinu *all-trans*, který je termodynamicky stabilnější než *cis* [16, 17].

Zeaxanthin (β,β -karoten-3,3-diol) je kyslíkový karotenoidový derivát, který byl poprvé identifikován v kukuřici. Je široce produkován rostlinami, řasami a mikroorganismy. Vždy se vyskytuje společně s luteinem, β -karotenem a kryptoxanthinem. Čistý zeaxanthin je oranžový krystalický prášek s malým nebo žádným zápachem. Je rozpustný v etheru, lipidech a jiných organických rozpouštědlech a nerozpustný ve vodě. Zeaxanthin obsahuje devět konjugovaných dvojných vazeb a má tři možné stereoizomery: (3S,3'S)-zeaxanthin, *meso*-zeaxanthin a (3R,3'R)-zeaxanthin. Stejně jako lutein hraje zásadní roli v prevenci očních chorob souvisejících s věkem jako je makulární degenerace a katarakta. Používá se v potravinářství, farmaceutickém a nutraceutickém průmyslu kvůli svým silným antioxidačním a protirakovinným vlastnostem [18]. Na obrázku 2 je kromě spektra zeaxanthinu zobrazeno i spektrum violaxanthinu, 9-*cis*-neoxanthinu a luteinu.



Obr. 2: Spektra xantofylových pigmentů violaxanthinu (a), 9-*cis*-neoxanthinu (b), luteinu (c) a zeaxanthinu (d), všechna spektra byla změřena ve 100% ethanolu, převzato z doprovodného certifikátu výrobce standardů pigmentů (DHI Group, Dánsko).

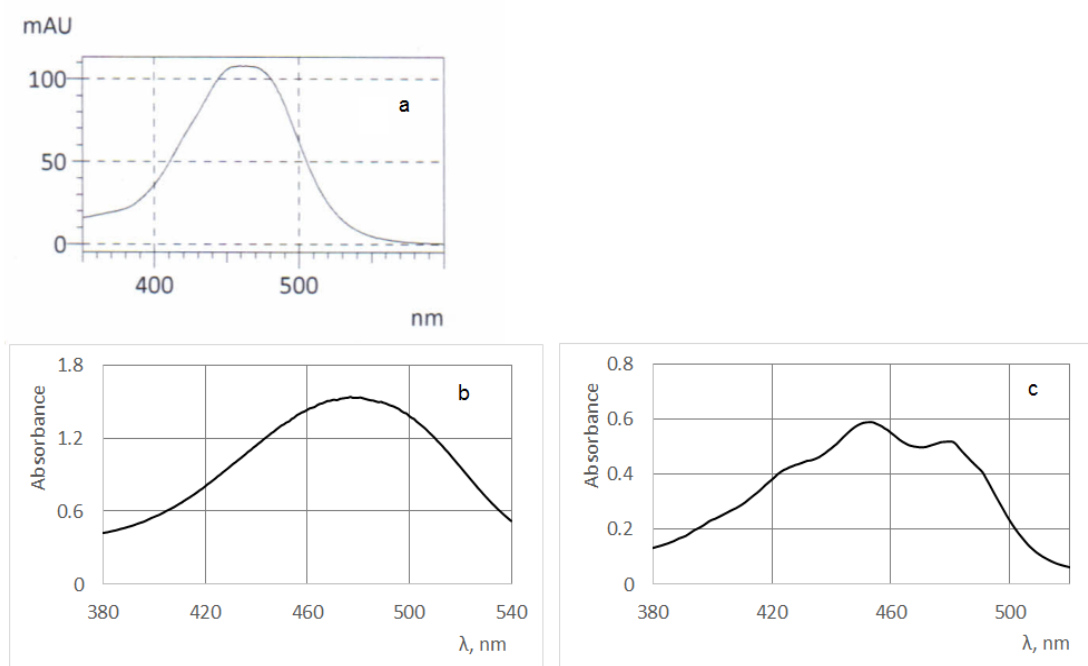
2.8 Violaxanthin, neoxanthin a echinenon

Ze zeaxanthinu je epoxidací syntetizován violaxanthin. Tento přírodní xantofylový pigment s oranžovou barvou se nachází v různých rostlinách včetně macešek. Používá se jako přísada do potravin a jako potravinářské barvivo. Violaxanthin může podléhat zpětné de-epoxidaci a měnit se tak zpět na zeaxanthin. Tento proces je známý jako xantofylový cyklus, který pomáhá zachytávat přebytečné elektrony generované během fotosyntézy, když se světelné a teplotní podmínky stanou stresujícími [19].

Dalším xantofylem je neoxanthin, který je prekurzorem rostlinného hormonu kyseliny abscisové. Je považován za poslední produkt syntézy karotenoidů v zelených rostlinách. Na rozdíl od ostatních xantofylů se neoxanthin

přirozeně vyskytuje především jako 9'-*cis*-izomer, který je považován za jeden z hlavních fotosyntetických xantofylů jak u zelených řas, tak u vyšších rostlin [20].

Ketokarotenoid echinenon (4-oxo- β -karoten) je syntetizován z β -karotenu. Byl identifikován u různých organismů jako jsou modro-zelené a zelené řasy, krevety, mořští ježci, plameňáci a další. Jako oranžový pigment je používán v potravinářství, dále jako antioxidant a provitamin A [21]. Na obrázku 3 je zobrazeno spektrum echinenonu, astaxanthinu a β -karotenu.



Obr. 3: Spektra karotenoidů echinenonu (a), astaxanthinu (b) a β -karotenu (c), spektra β -karotenu a astaxanthinu byla změřena ve 100% ethanolu, spektrum echinenonu (ve 100% ethanolu) bylo převzato z doprovodného certifikátu výrobce standardů pigmentů (DHI Group, Dánsko).

2.9 β -karoten

Zástupcem skupiny karotenů je β -karoten. Je prekurzorem vitamínu A (retinol) a zároveň nejdůležitější z provitaminů A. Štěpí se za vzniku dvou molekul retinalu, z nichž jedna je dále metabolizována na retinol a kyselinu retinovou. Existují tři izomery karotenu: alfa, beta a gama, přičemž beta izomer je

nejaktivnější. Beta karoten se může vyskytovat jako *all-trans*- β -karoten nebo 9-*cis*- β -karoten. Karoten se také používá jako látka k barvení produktů jako jsou džusy, koláče, dezerty, máslo a margarín. Avšak β -karoten má špatnou rozpustnost ve vodě, je citlivý na kyslík, světlo a teplotu, což značně omezuje použití β -karotenu v mnoha výrobcích jako jsou potraviny a nápoje.

Přesné kvantitativní stanovení β -karotenu je zvláště důležité při aplikacích ve výživě. Existuje mnoho způsobů kvantifikace β -karotenu, z nichž se často používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie a UV spektrometrie. Pro špatnou rozpustnost ve vodě je však obtížné přesně měřit množství β -karotenu [32].

2.10 Stanovení karotenoidů metodou HPLC

Vysoká variabilita chemické struktury a špatná stabilita karotenoidů významně přispívají k obtížnosti jejich analýzy. Nedostatek komerčně dostupných standardů, obvykle nízké koncentrace v biologických vzorcích, jako je lidské sérum a tkáň, a přítomnost interferujících sloučenin zvyšují obtížnost vývoje analytických metod pro identifikaci a měření karotenoidů ve skutečných vzorcích [22].

Chromatografická analýza je u stanovení karotenoidů velmi důležitý aspekt s ohledem na mnoho nesprávných identifikací karotenoidů v minulosti, založených hlavně na jejich UV-VIS absorpčních spektrech a separaci pigmentů na tenkovrstvé chromatografii (TLC). Příkladem mnoha z těchto nesprávných identifikací je pigment známého choroše sírového (*Laetiporus sulphureus*), o kterém se dlouho myslelo, že je kyselinou apokarotenovou, dokud úplné objasnění struktury neodhalilo, že sestává z celé rodiny nových polyenových pigmentů nekarotenoidního původu [23].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) za použití různých absorpčních spektrometrických detektorů se na základě chemických a fyzikálních vlastností karotenoidů stala nejčastější analytickou metodou pro kvalitativní a kvantitativní stanovení karotenoidů. Umožňuje jejich separaci, které musí předcházet extrakce z příslušného materiálu a často také saponifikace

karotenoidů.

2.10.1 Extrakce

Široká škála organismů a potravinářských výrobků obsahuje karotenoidy. Mohou však existovat rozdíly mezi různými částmi stejné potraviny nebo vzorku. Z toho důvodu neexistuje obecně přijímaná ani standardní metoda extrakce karotenoidů v laboratořích. Většina metod extrakce však zahrnuje uvolňování požadovaných složek z jejich matric narušením tkáně, následné odstranění nežádoucích složek a extrakci kapalina-kapalina nebo kapalina-pevná látka.

U karotenoidů je nejběžnějším postupem získání těchto sloučenin pro další analýzu jedнокroková aplikace organického rozpouštědla, které je extrahuje z matrice. Naproti tomu extrakce tuhou fází (SPE) se ve studiích s karotenoidy objevuje málokdy, a pokud ano, mezi typické sorbenty SPE patří -C30 a -C18, zatímco diolové a křemičité patrony mají dobrou retenci pouze pro lutein, více polární karotenoid [24].

Při analýze karotenoidů se používá mnoho různých organických rozpouštědel a výběr vhodného rozpouštědla není snadný. Důležitou roli hrají různé polariry karotenoidů a struktura analytické matrice a jejích složek. Nepochární rozpouštědla, jako je hexan, jsou obvykle dobrou volbou pro nepolární (karoteny) nebo esterifikované karotenoidy. Polární rozpouštědla, jako ethanol a aceton, jsou vhodnější pro polární karotenoidy (xantofyly). Pro extrakci karotenoidů se používá široká škála kombinací rozpouštědel. Kvůli velkým objemům, které se používají při těchto extrakcích, by měla být také zvažena toxicita vybraného rozpouštědla.

Při vývoji metody extrakce karotenoidů je také třeba vzít v úvahu náchylnost karotenoidů k oxidaci. Tyto molekuly jsou v matrici relativně stabilní, ale v roztoku mohou být karotenoidy velmi citlivé na vystavení světlu, teple, kyselinám nebo kyslíku. Do rozpouštědel se proto přidávají i různé antioxidanty pro ochranu karotenoidů před oxidací. Nejčastějším používaným antioxidantem je butylhydroxytoluen (BHT), dále pak pyrogallol, butylhydroxyanisol (BHA), kyselina askorbová a *tert*-butylhydrochinon (TBHQ). Také se doporučuje do

směsi extrakčního rozpouštědla se vzorkem přidat uhličitan vápenatý (uhličitan hořečnatý) pro neutralizaci organických kyselin, které se obvykle nacházejí v rostlinném materiálu [22].

Zajímavou možností zlepšení extrakce karotenoidů je použití mechanických sil (sonikace, autokláv a kuličkové homogenizátory), které způsobí větší narušení buněk a lepší promíchání. Rovnoměrnější distribuce rozpouštědla pak může vést k efektivnější extrakci a dá se předejít chemické rozkladné reakci způsobené alkalickými podmínkami při saponifikaci [25].

2.10.2 Saponifikace

Skupina xantofylů je nejsložitější skupinou karotenoidů z hlediska počtu sloučenin a variací v jejich struktuře. Tyto sloučeniny lze nalézt ve volné formě nebo ve stabilnější formě jako estery s mastnými kyselinami. Proto se často před samotnou analýzou používá saponifikace, což je extrakční krok zaměřený na odstranění chlorofylů a lipidů, které ztěžují chromatografickou separaci. Saponifikace současně slouží k hydrolyze esterifikovaných forem karotenoidů. V závislosti na povaze karotenoidu a typu potravin nebo organismu může však saponifikace vést až ke zničení nebo transformaci struktury karotenoidu [22].

Výtěžnost karotenoidů závisí na tom, zda se saponifikace provádí či nikoliv, dále na době saponifikace a koncentraci použité alkalické látky. S ohledem na nedostatek komerčně dostupných standardů derivátů karotenoidů může být jejich tvorba saponifikací velmi užitečná pro jejich analýzu ve vzorcích potravin a následně pro studie o jejich přínosu pro lidské zdraví [22].

Studie zabývající se saponifikací karotenoidů [26] zaznamenala nejlepší výsledky za použití 0,02M hydroxidu draselného v methanolu. Při vyšších koncentracích hydroxidu draselného byly pozorovány nižší výtěžky volných karotenoidů.

Jiná studie uvedla, že přidání 2,5% hydroxidu draselného jako saponifikačního činidla vedlo téměř k dvojnásobnému zvýšení obsahu extrahovaného luteinu ve srovnání s množstvím získaným pouze za použití deionizované vody. Zvýšení množství hydroxidu draselného z 2,5 % na 80 %

nemělo vliv na obsah luteinu, což naznačuje, že k převodu esterifikovaných forem luteinu na jejich volné formy postačuje nízké procento hydroxidu draselného [25].

V další studii bylo zjištěno, že po současné extrakci a saponifikaci vzorku ovoce kustovnice cizí (*Lycium barbarum*) je i po 12 hodinách stále přítomno velké množství esterů karotenoidů a taková metoda tedy není použitelná pro extrakci volných karotenoidů. Z toho důvodu by extrakce a saponifikace měly být prováděny odděleně. Obsah esterů karotenoidů postupně s časem saponifikace klesal a po 6 a 8 hodinách už nebyly detekovány žádné estery karotenoidů. Delší doba saponifikace (8 hodin) vedla k nižšímu výtěžku karotenoidů než kratší doba (6 hodin), pravděpodobně kvůli degradaci karotenoidů při prodloužené saponifikaci [27].

2.10.3 HPLC

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) je analytická metoda používaná k separaci sloučenin rozpuštěných v určitém rozpouštědle. V porovnání s jinými metodami stanovení karotenoidů (tenkovrstvá chromatografie, chromatografie v otevřené koloně) nabízí HPLC významné výhody, pokud jde o jednoduchost, rychlost, náklady (v závislosti na metodě detekce), citlivost, selektivitu, přesnost a uchování vzorku [6].

Přístroj HPLC je tvořen ze zásobníku mobilní fáze, odplyňovače, čerpadla, dávkovače, kolony a detektoru. Po nadávkování vzorku prochází různé složky směsi kolonou různými rychlostmi a jsou rozděleny na základě rozdílné afinity analytu pro použitou mobilní a stacionární fázi. Pokud látka silněji interaguje se stacionární fází v koloně, stráví více času zadržením na stacionární fázi kolony a bude mít tedy delší retenční čas [28].

V závislosti na polaritě rozpouštědla a stacionární fáze se HPLC dělí na chromatografii s normálními fázemi (NP-HPLC, *Normal Phase-HPLC*) a s obrácenými fázemi (RP-HPLC, *Reverse Phase-HPLC*). Pokud je stacionární fáze polárnější než mobilní fáze, jde o chromatografii s normálními fázemi. Jestliže je stacionární fáze méně polární než mobilní fáze, jde o chromatografii

s reverzními fázemi. V HPLC s reverzními fázemi se retenční čas sloučeniny zvyšuje se snižující se polaritou konkrétní látky. Důležité pro efektivní separaci je stanovení vhodného poměru mezi polárními a nepolárními složkami v mobilní fázi. Cílem je, aby se všechny sloučeniny vymývaly v co nejkratší době a přitom umožňovaly rozlišení jednotlivých signálů. Typické kolony pro separaci na normální fázi jsou naplněny oxidem hlinitým nebo oxidem křemičitým. Alkylové (-C8, -C18, -C30) nebo fenylové vázané fáze se obvykle používají pro separaci na reverzní fázi [28].

Pokud složení mobilní fáze zůstává konstantní po celou dobu HPLC separace, je tato separace prováděna za izokratické eluce. Způsobem, jak eluovat všechny sloučeniny ve vzorku v rozumném čase při zachování dobrého rozlišení, je změnit poměr polárních a nepolárních sloučenin v mobilní fázi během analýzy vzorku. Tato technika, známá jako gradientová eluce, je vhodná, pokud vzorek obsahuje složky širokého rozsahu polarit. Pro gradient s reverzní fází je rozpouštědlo nejprve relativně polární a jeho polarita pak pomalu klesá. Gradientová eluce umožňuje nejúplnější oddělení píků, aniž by separace trvala příliš dlouho. U gradientové eluce je však potřeba složitější a nákladnější zařízení a je obtížnější udržovat konstantní průtok, zatímco dochází ke stálým změnám ve složení mobilní fáze [28].

Výkon kolon závisí na několika parametrech (délka alkylové fáze, silanolová aktivita, hustota vazeb, průměr pórů substrátu atd.). Při separaci analytů je třeba vzít v úvahu kombinaci těchto vlastností. U reverzních fází se používají různé směsi rozpouštědel, včetně vody, methanolu, acetonitrilu, 2-propanolu, acetonu, ethylacetátu, tetrahydrofuranu, methyl-*tert*-butyletheru (MTBE), dichlormethanu a chloroformu [30].

Pro stanovení karotenoidů lze použít systémy HPLC s normální i reverzní fází v isokratickém nebo gradientovém elučním režimu (viz tabulka 1). Separace nejčastěji uváděné v literatuře zahrnují kolony s reverzní fází -C18 a -C30 s gradientovou elucí. Obecně -C30 kolony poskytují větší rozlišení a lepší separaci geometrických izomerů především u nepolárních látek. Jelikož je ale astaxanthin (popřípadě další xantofyly) polárnější látka, má na -C30 koloně rozlišení podobné jako na -C18 koloně. Jediným rozdílem jsou tedy mnohem delší

časy měření v případě -C30 kolon [29].

2.10.4 Způsoby detekce

Detektor HPLC, umístěný za kolonou, musí registrovat přítomnost různých složek vzorku, ale neměl by detekovat rozpouštědlo. Z tohoto důvodu neexistuje univerzální detektor, který by fungoval pro všechny separace [28].

V HPLC se k identifikaci karotenoidů nejčastěji používá detekce pomocí absorpčních detektorů v UV/VIS oblasti. Připojení detektoru s diodovým polem (DAD, *Diode Array Detector*) k HPLC umožňuje kontinuální sběr spekter během analýzy, což v některých případech značně napomáhá ke stanovení čistoty píku a identifikaci neznámých sloučenin [6].

Avšak vzhledem k tomu, že UV/VIS spektra mnoha karotenoidů jsou podobná a řada strukturně příbuzných molekul koeluuje, mnoho vědců doplňuje identifikaci karotenoidů jinými detekčními metodami. Jednou z takových metod je detekce pomocí hmotnostní spektrometrie (MS, *Mass Spectroscopy*), která má velké výhody pro analýzu těchto látek, včetně objasnění jejich struktury na základě molekulové hmotnosti a jejich fragmentačního vzoru. Další výhodou systémů HPLC-MS oproti UV detekci je skutečnost, že množství vzorku potřebné pro analýzu je velmi malé s limity detekce kolem 500 fmol pro jednotlivé karotenoidy. Velké úsilí bylo věnováno vývoji metod HPLC-MS převážně s chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI) nebo elektrosprejovou ionizací (ESI) [6].

K identifikaci a stanovení neznámých stereoizomerů karotenoidů z biologických vzorků se kromě HPLC-MS používá i HPLC ve spojení s nukleární magnetickou rezonancí (NMR). Metoda HPLC-NMR umožňuje jednoznačnou identifikaci každého stereoizomeru. Měření NMR spekter však vyžaduje velmi čistou sloučeninu ve vyšších koncentracích než jsou potřeba pro UV/VIS a MS detekci [31].

Další možnosti detekce karotenoidů představují elektrochemické HPLC detektory nebo termooptická spektrometrie. Použití elektrochemických HPLC detektorů (*Electrochemical Array Detector*) umožnilo významně zvýšit citlivost

pro karoteny i xantofyly. Termooptická spektrometrie (TLS, *Thermal Lens Spectrometry*) je jedna z metod laserové fototermální detekce. Byla úspěšně použita k detekci karotenoidů v plasmě a rybím oleji. Za stejných chromatografických podmínek bylo pomocí metody HPLC-TLS dosaženo vyšší citlivosti v porovnání s HPLC s UV/VIS detekcí [6, 32].

Rezonanční Ramanova spektroskopie umožnila studium karotenoidů v biologických systémech. Zapojení této metody přineslo nový přístup ke studiu komplexních systémů obsahujících karotenoidy a nabízí širokou škálu aplikací, od identifikace a zhodnocení konfigurace xantofylů v rekonstituovaných/izolovaných komplexech až po in vivo analýzu s cílem stanovit jejich roli ve fotoprotektivních mechanismech [33].

2.10.5 Přehled vybraných metod pro HPLC stanovení karotenoidů

V odborné literatuře je popsáno mnoho postupů HPLC separace karotenoidů v široké škále směsí a extraktů. Většinou jsou spojeny se spektrometrickou nebo hmotnostně spektrometrickou detekcí. Různé metody jsou obecně navrženy tak, aby splňovaly různé cíle. Některé poskytují rychlou metodu pro jeden analyt, zatímco jiné představují složitější postupy pro stanovení celého profilu přítomných karotenoidů včetně stereoizomerů.

Protože se tato práce zabývá HPLC separací karotenoidů pocházejících z řasy, byl tomu přizpůsoben i výběr metod – v tabulce 1 je uveden přehled metod přípravy vzorků k analýze a separace karotenoidů pro vzorky rostlinného původu. Kromě metod zaměřených na mikroskopické řasy tak jsou uvedeny i některé metody zabývající se HPLC separací karotenoidů pocházejících z různého ovoce. Co se týče analytu, pozornost byla zaměřena jak čistě na astaxanthin, tak i obecně na různé směsi karotenoidů.

Tabulka 1: Přehled vybraných metod pro stanovení karotenoidů

Analyt	Matrice	Extrakce	HPLC kolona	Mobilní fáze	Detekce	Zdroj
Astaxanthin	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Vortex, 100% aceton, saponifikace (0,05M NaOH v MeOH)	Zorbax SB-C8 (4,6 cm × 150 mm, 5 μm)	Gradient A: MeOH/1 N octan amonný (70:30) B: MeOH Průtok 1 ml min ⁻¹	DAD 440 nm	[34]
Astaxanthin	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Extrakce pomocí DMSO (4 °C) nebo HCl (70 °C), bez saponifikace	Supelco C18 (25 cm × 4,6 mm)	Gradient A: aceton B: MeOH/voda (9:1) Průtok 1,25 ml min ⁻¹	DAD 476 nm	[35]
Astaxanthin, celkový obsah forem astaxanthinu	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Extrakce HCl-aceton	Zorbax 300-SB C18, 40 °C	Gradient A: aceton B: MeOH/voda (9:1) Průtok 0,8 ml min ⁻¹	UV-VIS 460 nm	[36]
Astaxanthin	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Homogenizátor, 0,1M HCl, 15 min	NP-HPLC Lichrosorb (12,5 × 4,6 cm, 5 μm) pokrytá 1% H ₃ PO ₄ v MeOH (v/v), dávkováno 20 μl	Gradient A: <i>n</i> -hexan/aceton (86:14) B: <i>n</i> -hexan/aceton (1:1) Průtok 1,2 ml min ⁻¹	DAD 470, 476 nm	[37]
Karotenoidy	mango	Mixér, extrakce z acetonu do diethyl etheru/petroleum etheru, saponifikace 10% KOH v methanolu	Spherisorb nitrile, (150 × 4,6 i.d. mm, 5 μm)	Gradient A: <i>n</i> -hexan B: aceton Průtok 1 ml min ⁻¹	DAD, MS	[38]
Karotenoidy, steroly	Sójové boby	Vortex, saponifikace (KOH), extrakce hexanem	XTerra phenyl (150 mm × 3,9 mm × 3,5 μm), 30 °C	Izokratická eluce, ACN/MeOH/voda (48:22.5:29.5)	ELSD, UV-VIS 450 nm	[39]
Volný astaxanthin, estery astaxanthinu	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Mixér, extrakce – petroleum ether	YMC, C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm) 20 °C, dávkován 1 μl	Gradient A: aceton/voda (82:17) B: aceton/voda (98:2) Průtok 0,8 ml min ⁻¹	DAD 300-800 nm/APCI-MS	[40]

Analyt	Matrice	Extrakce	HPLC kolona	Mobilní fáze	Detekce	Zdroj
Karotenoidy (bez astaxanthinu)	Tropické ovoce	Mixér, extrakce aceton/petroleum ether, saponifikace 10% KOH v petroleum etheru	C18 Spherisorb ODS2 (4,6 i.d. × 150 mm, 3 μm), dávkováno 10 μl	Konkávnní gradient A: ACN (s 0,05% TMA)/ MeOH/EtOAc (95:5:0) B: ACN (s 0,05% TMA)/ MeOH/EtOAc (60:20:20) Průtok 0,5 ml min ⁻¹	DAD, MS	[41]
Karotenoidy	červené kvasnice (Basidiomycota)	Vortex, extrakce DMSO/aceton, bez saponifikace	LiChrospher 100 RP-18 (250 mm × 4 mm, 5 μm), dávkováno 10 μl	Gradient A: 70% aceton B: 100% aceton během 15 min při 40 °C Průtok 1 ml min ⁻¹	DAD 450 nm	[23]
20 karotenoidů	červená a žlutá paprika (<i>Capsicum annum</i> L.)	Homogenizace v mixéru, extrakce aceton/petroleum ether, saponifikace 10% KOH	C18 Spherisorb ODS2 (4,6 × 150 mm, 3 μm), dávkováno 10 μl	Konkávnní gradient z 95:5:0 do 60:20:20 (žlutá paprika) a z 99:1:0 do 60:20:20 (červená paprika) ACN (0.05% TEA)/ MeOH/EtOAc Průtok 0,5 ml min ⁻¹	DAD, MS	[42]
α- a β-karoteny, β-kryptoxanthin	Zelenina, ovoce	extrakce THF+Na ₂ SO ₄ +MgCO ₃	Partisil 5 ODS (25 cm × 4,6 mm, 5 μm, dávkováno 10-25 μl)	Izokratická eluce ACN/THF/H ₂ O (85:12,5:2,5) Průtok 2 ml min ⁻¹	UV 470 nm	[43]
Lutein, zeaxanthin, lykopen, β-Kryptoxanthin α-karoten, β-karoten	Borůvky, ostružiny, maliny, jahody, rybíz	Vortex, 0,1% BHT, MgCO ₃ , MeOH:THF (1:1 v/v), saponifikace 10% KOH v methanolu	RP Prevail C18 (150 × 4,6 mm i.d., 5 μm) 28 °C, dávkováno 20 μl	Lineární gradient A: ACN/MeOH (95:5) B: ACN/MeOH/EtOAc (60:20:20) Průtok 1 ml min ⁻¹	UV-VIS 450 nm	[44]
Astaxanthin, další karotenoidy	<i>Chlorella zofigiensis</i>	aceton	Spherisorb 5 μm ODS2 (4,6 × 250 mm)	gradient A: ACN/MeOH/ 0,1M Tris-HCl (pH 8.0) (84:2:14) B: MeOH/EtOAc (68:32) Průtok 1,2 ml min ⁻¹	UV-VIS	[45]

Analyt	Matrice	Extrakce	HPLC kolona	Mobilní fáze	Detekce	Zdroj
Astaxanthin, violaxanthin, lutein, echinenon, zeaxanthin a další karotenoidy	<i>Chlorella zoŕgiensis</i>	Mechanická disrupce, extrakce MeOH/chloroform	Aquity UPLC Shield C18 BEH (2,1×150 mm, 1,7 µm)	gradient A: 50% ACN B: ACN C: EtOAc (vše s 0,10% kyselinou mravenčí) Průtok 0,3 ml min ⁻¹	DAD 450 nm, MS	[46]

3 Praktická část

3.1 Přístroje a pomůcky

Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Pro separaci při gradientové eluci byl použit systém HPLC UltiMate 3000 (Thermo Fischer Scientific, USA). Systém byl složen z pumpy Dionex UltiMate 3000 RS Pump, dávkovače Dionex UltiMate 3000 RS autosampler, Dionex UltiMate 3000 RS Column Compartment a detektoru Dionex UltiMate 3000 Diode Array Detector. Data byla zpracována počítačovým programem Chromeleon Dionex Software verze 7.2 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Kolona

Kinetex C18 o rozměrech 100 × 2,1 mm, velikost částic 2,6 μm (Phenomenex, USA).

Další pomůcky

Analytické váhy Sartorius (Sartalex, s.r.o., ČR)

Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)

Centrifuga (Chirana, ČR)

Automatická pipeta Finnpiette F1 (Thermo Scientific, USA)

Stříkačkový filtr FP 30/0.2 PTFE-S (Whatman, Velká Británie)

pH metr Adwa AD1000 (Adwa, Maďarsko)

Magnetická míchačka (Fisher Scientific, USA)

3.2 Použité chemikálie

Deionizovaná voda připravená zařízením MilliporPLUS, minimální odpor 18,2 MΩcm.

Methanol Chromasolv® pro HPLC, čistota ≥ 99,9 % (Sigma-Aldrich, Německo)

Acetonitril HPLC Gradient Grade (Fisher Chemical, USA)

Acetone G.R., ISO REAGENT (Lach-Ner, s.r.o., Česká republika)

2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol, čistota $\geq 99,9$ % (GC) (Sigma-Aldrich, Německo)

Ethylacetát pro HPLC (Supelco, USA)

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan hydrochlorid, p.a. (Merck, Německo)

3.3 Použitý materiál

Vzorky, pracovní roztoky i standardy byly skladovány v mrazicím boxu při teplotě -18 °C. Se vzorky bylo pracováno za podmínek tlumeného světla (obalování roztoků pomocí hliníkové folie, zastínění v místnosti, zhasnuté umělé světlo) a chladu (uloženo na ledu), aby se předešlo degradaci a ztrátě karotenoidů.

Jako standardy karotenoidů byly použity β -karoten a *all-trans*-astaxanthin v práškové formě od Sigma-Aldrich. Dále pak echinenon, lutein, 9'-*cis*-neoxanthin, violaxanthin, zeaxanthin, každý o koncentraci přibližně 1 mg l^{-1} (přesné koncentrace jsou uvedeny v tabulce 2) ve 100% ethanolu od DHI LAB PRODUCTS (Hørsholm, Dánsko).

Reálným vzorkem pro analýzu karotenoidů byly lyofilizované vzorky řas *Tetracystis pulchra* poskytnuté katedrou botaniky PřF UK.

Tabulka 2: Přesné koncentrace použitých standardů

Standard	violaxanthin	9'- <i>cis</i> - neoxanthin	lutein	zeaxanthin	echinenon
c [mg l^{-1}]	1,118	0,820	1,031	0,925	0,947

3.4 Příprava vzorků a činidel

3.4.1 Extrakce vzorků řas

Metoda byla optimalizována s dodaným vzorkem nikoliv jen s vybranými standardy. Bylo tedy nutno nejprve vyextrahovat barviva z dodaného lyofilizovaného vzorku řasy. Při studiu literatury bylo zjištěno, že nejjednodušší vhodná extrakce astaxanthinu, jeho esterů i dalších karotenoidů je extrakce

acetone – viz tabulka 1 [23, 34, 38, 45]. Stabilita astaxanthinu v acetonu byla zároveň ověřena s využitím UV-VIS absorpční molekulové spektrometrie tak, že po dobu 18 hodin byla průběžně snímána spektra acetonového roztoku astaxanthinu a nebyla pozorována žádná změna spektra indikující jeho oxidaci.

Zvážené lyofilizované vzorky řas byly opakovaně extrahovány 2 ml acetonu s obsahem 0,1% BHT jako antioxidačního činidla. Vzorky byly míchány 2 minuty na vortexu se skleněnou kuličkou a centrifugovány 4 minuty při 900 rpm (40% výkon centrifugy). Extrakce byly opakovány do odbarvení supernatantu. Spojené supernatanty byly přefiltrovány přes stříkačkový filtr (PTFE, velikost pórů 0,2 μm) a byl odečten jejich celkový objem. Při vývoji metody byl přefiltrovaný vzorek ještě zakonzentrován odpařením acetonu pomocí probublávání argonem.

3.4.2 Příprava vzorků pro HPLC separaci karotenoidů

Vzorky pro HPLC separaci byly připraveny z extrahovaného vzorku a mobilní fáze A v různém poměru, nejčastěji v poměru 1:2 (extrahovaný vzorek/mobilní fáze A).

3.4.3 Příprava kalibračních roztoků

Jednotlivé kalibrační roztoky standardů astaxanthinu, zeaxanthinu, 9'-*cis*-neoxanthinu, luteinu, violaxanthinu, echinenonu a β -karotenu byly připraveny ředěním jejich zásobních roztoků o koncentraci přibližně 1 mg l^{-1} (přesné koncentrace standardů jsou uvedeny v tabulce 2) mobilní fází A na koncentraci 0,1 mg l^{-1} . Byl také připraven směsný vzorek obsahující zeaxanthin, lutein, 9'-*cis*-neoxanthin, violaxanthin, echinenon a β -karoten tak, aby koncentrace každého standardu v tomto směsném vzorku byla 0,1 mg l^{-1} .

Zásobní roztoky β -karotenu a astaxanthinu o koncentracích 1 mg l^{-1} byly připraveny navážením 1 mg daného standardu a rozpuštěním v 10 ml acetonu, čímž byl získán roztok o koncentraci 100 mg l^{-1} . Tento roztok byl dále ředěn mobilní fází A na koncentraci 1 mg l^{-1} a použit při přípravě kalibračních roztoků.

3.5 Příprava pufru

Příprava 0,05M roztoku Tris-HCl byla provedena navážením 1,5768 g Tris-HCl, který byl následně rozpuštěn v 200 ml deionizované vody. Přídavkem 0,5M NaOH a pomocí pH-metru bylo pH upraveno na hodnotu 8,0.

3.6 Použité mobilní fáze

Separční metoda je modifikovanou verzí metody dle Jin Liu [45] a bylo použito analogické označení mobilních fází. Jako mobilní fáze A je označována směs ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0) v různém poměru, jako mobilní fáze B směs MeOH/EtOAc v různém poměru. Byla testována gradientová eluce za různého objemového poměru jednotlivých složek mobilní fáze. Složky mobilních fází A a B byly míchány on-line za pomoci směšovače.

3.7 Podmínky separace v HPLC a mobilní fáze

Separace karotenoidů byla prováděna v reverzním modu vysokoúčinné kapalinové chromatografie. V termostatu byla nastavena teplota 28 °C a v autosampleru 16 °C, což jsou nejčastější podmínky nalezené v literární rešerši. Měření bylo prováděno za podmínek gradientové eluce. Průtok mobilní fáze byl zpočátku 0,3 ml min⁻¹, později byl optimalizován na 0,25 ml min⁻¹. Dávkovaný objem vzorků byl 20 µl. Vlnová délka pro detekci byla zvolena na základě absorpčních spekter karotenoidů a astaxanthinu jako 470 nm.

Při optimalizaci složení mobilní fáze pro separaci karotenoidů byly vyzkoušeny různé poměry acetonitrilu a methanolu v mobilní fázi A při zachování poměru pufru vůči organickým složkám, různé poměry methanolu a ethylacetátu v mobilní fázi B a také různé poměry organické a vodné složky.

3.8 Použité vzorce a výpočty

Hodnoty retenčního faktoru, rozlišení, počtu teoretických pater, limitu detekce (LOD) a limitu stanovitelnosti (LOQ) byly vypočítané podle následujících vztahů:

$$k_i = \frac{t_{R,i} - t_M}{t_M} \quad (1)$$

kde k_i je retenční faktor, $t_{R,i}$ [min] je retenční čas daného analytu, t_M [min] je mrtvý čas kolony. Retenční faktory byly vypočítány s použitím odezvy nástřiku jako indikátoru mrtvého času (hold-up time).

$$R_{i,j} = \frac{2 (t_{R,i} - t_{R,j})}{w_i + w_j} \quad (2)$$

kde $R_{i,j}$ je rozlišení dvou píků, $t_{R,i}$ [min] a $t_{R,j}$ [min] jsou retenční časy analytů a w_i [min] a w_j [min] jsou šířky píků při základně.

$$N = 16 \left(\frac{t_{R,j}}{w_j} \right)^2 \quad (3)$$

kde N je počet teoretických pater, $t_{R,j}$ [min] je retenční čas daného analytu a w_j [min] je šířka píku daného analytu při základně.

$$\text{LOD} = 3 \cdot \text{SD} \quad (4)$$

$$\text{LOQ} = 10 \cdot \text{SD} \quad (5)$$

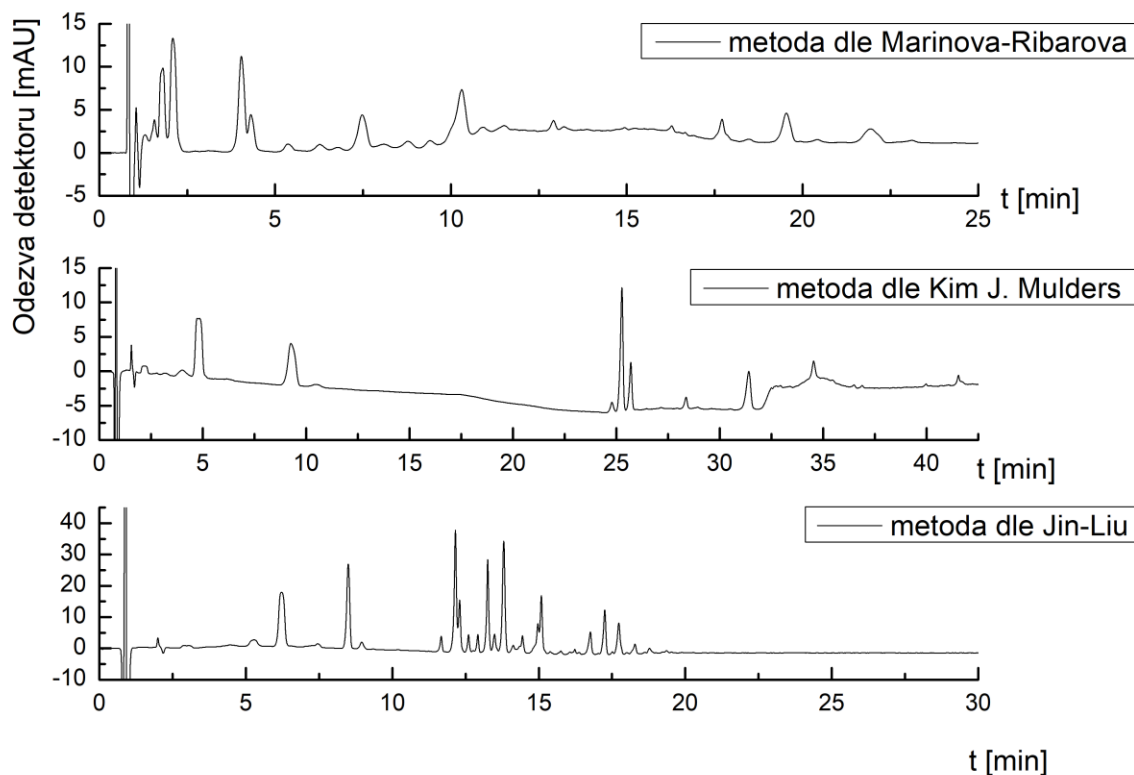
kde SD je směrodatná odchylka hmotnosti standardu analytu vypočtená pomocí kalibrační křivky pro osmkrát proměřený směsný roztok standardů o nejnižších měřitelných koncentracích standardů.

4 Výsledky a diskuse

Na základě literární rešerše byly na extrahovaném vzorku vyzkoušeny a porovnány tři metody HPLC separace karotenoidů: metoda dle Marina-Ribarova [44], metoda dle Kim J. Mulders [46] a metoda dle Jin Liu [45]. Všechny uvedené metody byly vyzkoušeny s nám dostupnou kolonou Kinetex-C18. Porovnání těchto metod je vidět na obrázku 4. Jako nejvhodnější metoda pro další optimalizaci se jevila metoda dle Jin Liu [45] poskytující velké množství dobře separovaných signálů (23 signálů) včetně dvou sérií signálů, které by podle spektra a strukturní podobnosti mohly být považovány za mono- a diesterifikované formy astaxanthinu [48]. Kromě těchto dvou sérií signálů se úplně na začátku chromatogramu a také kolem 12. minuty vyskytovalo 3–5 látek se zřetelným karotenoidovým spektrem.

Během optimalizace metody byly jednotlivé píky rozlišovány podle jejich spektra. Sledovány byly píky s karotenoidovým a astaxanthinovým typem spektra. Astaxanthin a echinenon měly v polárním rozpouštědle absorpční pás s jediným maximem při 470 nm (astaxanthinový typ spektra). Violaxanthin, neoxanthin, lutein, zeaxanthin a β -karoten mají absorpční pásy vykazující tři až čtyři lokální maxima (karotenoidové spektrum) (obr. 2 a 3 v oddílech 2.7 a 2.8).

Nedostatkem metody dle Jin Liu [45] byly pouze signály při retenčních časech nižších než přibližně 8 min, které byly významně deformované. Tato deformace mohla souviset s poměrem organické a vodné fáze v mobilní fázi na počátku separace nebo se zbytkovým obsahem acetonu ve vzorku po extrakci a byla proto podnětem pro optimalizaci složení mobilní fáze.



Obr. 4: Porovnání tří zkoušených metod: metoda dle Marinova-Ribarova – lineární gradient z MF A: ACN/MeOH (95/5) do MF B: ACN/MeOH/EtOAc (60/20/20); metoda dle Kim J. Mulders – A: 50% ACN v deionizované vodě, B: 100% ACN, C: 100% EtOAc, gradient; metoda dle Jin Liu - A: ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl (84:2:14), B: MeOH/EtOAc (68:32), lineární gradient, dávkovaný objem vždy 20 μ l, teplota kolony 28 $^{\circ}$ C, detekce při $\lambda = 470$ nm

4.1 Optimalizace složení mobilní fáze

Nejprve byl optimalizován poměr acetonitrilu a methanolu v mobilní fázi při zachování koncentrace a poměru pufru vůči organickým složkám. Cílem bylo zjistit, jaký vliv na separaci má záměna ACN za méně polární MeOH. Testována byla následující složení počáteční mobilní fáze ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0): 76/10/14, 43/43/14 a 0/86/14. Zvyšující se obsah methanolu mírně měnil retenci některých analytů. Dokud ale nebyl použit přebytek methanolu, nebyl pozorován jednoznačný obecný trend vlivu měnícího se poměru ACN/MeOH na retenci. Při použití 86% MeOH došlo k nárůstu viskozity mobilní

fáze, zpomalení celé analýzy včetně mrtvého času a retence analytů klesla. Výrazný nárůst mrtvého času v posledním případě se nepodařilo vysvětlit. Rozlišení s rostoucí koncentrací MeOH mírně klesalo a deformované píky karotenoidů na počátku separace odstraněny nebyly. Pro porovnání retence (retenční čas, retenční faktor) a rozlišení byly vybrány tři intenzivní signály (píky 2, 3 a 6 v chromatogramu). Hodnoty jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Hodnoty retenčních časů (t_R), retenčních faktorů (k) a rozlišení (R) vybraných signálů při použití mobilní fáze A: ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0) v poměrech 76/10/14, 43/43/14 a 0/86/14

ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0)	t_M [min]	Pík	t_R [min]	k	R
76/10/14	0,825	2	6,14	7,12	8,90
		3	8,70	9,49	2,51
		6	13,17	14,9	1,19
43/43/14	0,830	2	7,00	7,44	8,37
		3	8,92	9,75	3,09
		6	13,09	14,8	1,06
0/86/14	1,235	2	8,69	6,01	6,51
		3	10,29	7,30	3,07
		6	14,13	10,4	-

Další pravděpodobnou příčinou deformace signálů na začátku separace se jevila i přítomnost vodného pufru. Nejprve bylo testováno, zda se projeví rozdíl mezi přítomností 0,05M Tris-HCl pufru (pH = 8,0) a přítomností deionizované vody. Byla-li použita pouze deionizovaná voda, tak retence analytů klesla o cca 20 %, navíc deformace signálů byla v obou mobilních fázích stejná. Následně tedy byl optimalizován poměr pufru a organické fáze.

Kromě poměru ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0): 84/2/14 byly vyzkoušeny poměry: 88/2/10, 93/2/5 a 98/2/0; byl tedy zachován obsah MeOH v mobilní fázi a byl postupně snižován obsah vodného pufru. K porovnání byly použity signály deformovaných píků s karotenoidovým a astaxanthinovým typem spektra (píky 1 až 5) a pík 8 (hodnoty pro složení mobilní fáze A 88/2/10 a

93/2/5 jsou uvedeny v tabulce 4). Na těchto dvou složeních je nejlépe možné ilustrovat vliv malé změny poměru vodné fáze na výslednou separaci analytů. Tyto chromatogramy byly změřeny s novým extrahovaným vzorkem, proto nešlo předpokládat zastoupení ani identitu analytů stejné jako v předchozích případech. Pík 8 by měl odpovídat píku 6 z předchozích chromatogramů.

Se snižujícím se obsahem pufru při stálém množství MeOH v mobilní fázi A docházelo k postupnému zkracování retenčních časů analytů. Rozlišení bylo nejlepší při 5% obsahu pufru, tedy při ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0): 93/2/5.

Složení mobilní fáze ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0): 98/2/0 je blízké složení mobilní fáze v metodě Marinova-Ribarova [44], která využívá jako počáteční mobilní fázi ACN/MeOH: 95/5. Podle metody Marinova-Ribarova [44] by měly karotenoidy eluovat až s nástupem méně polární mobilní fáze obsahující ethylacetát a MeOH. Při našich experimentech ale látky s karotenoidovým vzhledem spektra eluovaly v blízkosti mrtvého času. Z hlediska struktury by se tedy mělo jednat o polární látky interagující se stacionární fází až v přítomnosti velmi polární mobilní fáze. Tato charakteristika karotenoidům ovšem příliš neodpovídá. Zvážena byla také možnost koeluce izomerních sloučenin karotenoidů, tu ovšem bylo možné potvrdit nebo vyvrátit pouze s použitím standardů, které v této části experimentů zatím používány nebyly.

Tabulka 4: Hodnoty retenčních časů (t_R), retenčních faktorů (k) a rozlišení (R) vybraných signálů při použití mobilní fáze A: ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0) v poměrech 88/2/10 a 93/2/5

ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0)	t_M [min]	Pík	t_R [min]	k	R
88/2/10	0,837	1	1,77	1,11	-
		2	2,80	2,33	-
		3	3,60	3,29	-
		4	4,88	4,81	-
		5	6,15	6,32	0,96
		8	12,21	13,5	-

ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0)	t_M [min]	Pík	t_R [min]	k	R
93/2/5	0,827	1	1,57	0,89	1,26
		2	2,04	1,46	0,97
		3	2,49	2,00	1,98
		4	3,54	3,27	1,73
		5	4,50	4,42	8,37
		8	8,44	9,17	0,92

Nejlepších výsledků bylo dosaženo při 5,0% obsahu pufru v počáteční mobilní fázi, tedy při poměru ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0): 93/2/5. I v této mobilní fázi byly ovšem píky karotenoidů na počátku chromatogramu částečně deformované. Experiment byl tedy zopakován pro obsah pufru v rozmezí 1,0–5,0 % s cílem posoudit kromě tvaru počátečních píků a jejich retence a rozlišení také celkovou separaci všech analytů s cílem předejít případným koelucím. Podle níže uvedených dat (tabulka 5) by optimální bylo použít 4 % obsahu pufru nebo 2 % obsahu pufru. V prvním případě bylo dosaženo dobrého rozlišení a lepší retence než ve druhém případě, ovšem ale za cenu možné deformace signálů a nepřesnosti při kvantifikaci. Ve druhém případě měly píky lepší tvar, ale malá změna ve složení MF mohla vést k překryvu píků karotenoidů, respektive jednoho z analytů se signálem chlorofylu. Jako kompromis byla vybrána varianta ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0): 94/2/4.

Tabulka 5: Hodnoty retenčních časů (t_R), retenčních faktorů (k) a rozlišení (R) vybraných signálů při použití mobilní fáze A: ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0) v poměrech 93/2/5, 94/2/4, 95/2/3, 96/2/2, 97/2/1 a 98/2/0

ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0)	t_M [min]	Pík	t_R [min]	k	R
93/2/5	0,84	1	1,50	0,79	1,36
		2	2,03	1,42	1,09
		3	2,48	1,95	2,36
		4	3,56	3,24	1,94
		5	4,48	4,33	9,66
		6	7,87	8,34	1,19
94/2/4	0,83	1	1,45	0,75	1,30
		2	1,92	1,31	1,04
		3	2,32	1,80	2,12
		4	3,23	2,89	1,83
		5	4,01	3,83	6,19
		6	7,17	7,64	0,55
95/2/3	0,83	1	1,42	0,71	1,11
		2	1,82	1,19	1,03
		3	2,19	1,64	1,92
		4	2,91	2,51	1,65
		5	3,52	3,24	9,03
		6	6,44	6,76	1,08
96/2/2	0,82	1	1,38	0,68	1,16
		2	1,72	1,10	1,14
		3	2,07	1,52	1,60
		4	2,61	2,18	1,58
		5	3,12	2,80	8,40
		6	5,71	5,96	1,06

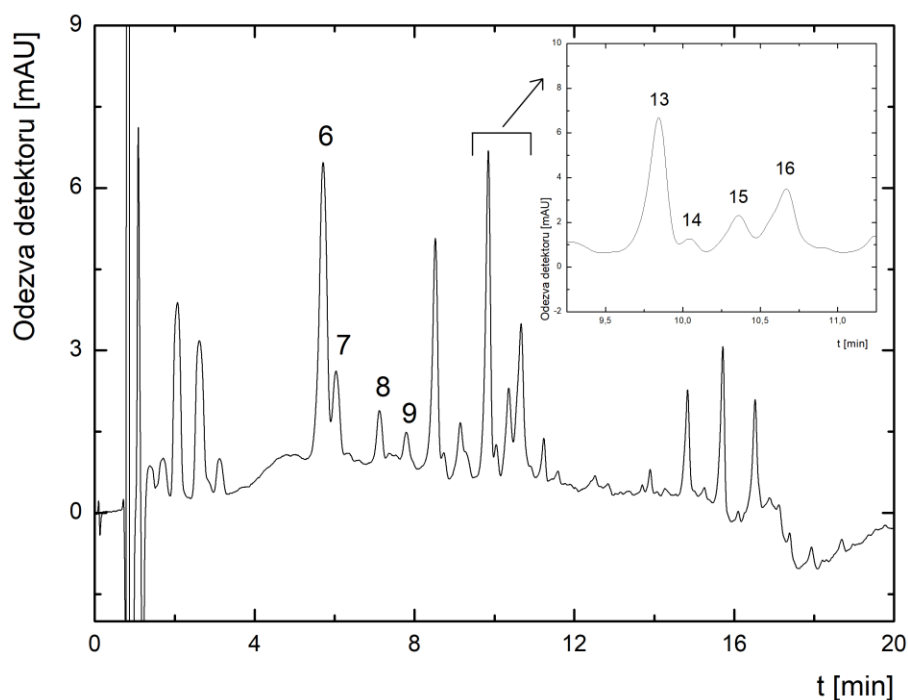
ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0)	t_M [min]	Pík	t_R [min]	k	R
97/2/1	0,82	1	1,37	0,67	0,90
		2	1,63	0,99	1,23
		3	1,99	1,43	1,39
		4	2,41	1,94	1,40
		5	2,82	2,44	7,69
		6	5,00	5,10	0,93
98/2/0	0,83	1	1,35	0,63	1,13
		2	1,66	1,00	0,95
		3	1,89	1,28	1,01
		4	2,19	1,64	1,17
		5	2,51	2,02	6,57
		6	4,25	4,12	1,02

Při použití ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0): 94/2/4 byly píky na začátku chromatogramu rozšířené, ale lepšího tvaru, méně výrazně hranaté. Při vyšší koncentraci analytů by se ovšem nežádoucí tvar stále mohl projevovat. Separace píků 6 a 7 (oba měly astaxanthinový typ spektra) byla nedostatečná. Chlorofyl eluující mezi píky 8 a 9 se s nimi nepřekrýval.

Při použití ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0): 95/2/3 byla separace píků 6 a 7 nedostatečná. Chlorofyl eluující mezi píky 8 a 9 se s nimi nepřekrýval. Docházelo k překryvu píků 13 a 14, z nichž alespoň jeden ale pravděpodobně oba byly dle spektra karotenoidy.

Při použití ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0): 96/2/2 byly píky 6 a 7 téměř rozděleny. Chlorofyl eluující mezi píky 8 a 9 se s nimi nepřekrýval. Karotenoidy představované zde píky 15 a 16 se nepřekrývaly (obr. 5).

Při použití ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0): 97/2/1 docházelo ke koeluci píku 9 s chlorofylem. Píky 6 a 7 nebyly rozseparovány. Píky 14, 15 a 16 nebyly rozseparovány až na základní linii, ale pro kvalitativní analýzu jejich rozlišení postačovalo.



Obr. 5: Chromatogram separace karotenoidů, mobilní fáze A – ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0): 96/2/2, mobilní fáze B – MeOH/EtOAc: 68/32, 0–15 min lineární gradient z A do B, 15–25 min izokraticky B, průtok $0,3 \text{ ml min}^{-1}$, teplota kolony $28 \text{ }^\circ\text{C}$, dávkováno $20 \text{ }\mu\text{l}$, detekce při $\lambda = 470 \text{ nm}$

Mobilní fáze používaná pro eluci předpokládaných mono- a diesterů astaxanthinu (mobilní fáze B) je směs methanolu a ethylacetátu. Byly vyzkoušeny různé poměry, ale ukázalo se, že poměr MeOH/EtOAc: 68/32 z metody Jin Liu plně vyhovuje potřebám naší analýzy. Celková doba analýzy byla zkrácena na 23 min, což plně postačovalo pro eluci všech složek. Výsledný optimalizovaný gradient je uveden v tabulce 6.

Tabulka 6: Výsledný gradient použitý pro separaci karotenoidů

Čas [min]	ACN (obj. %)	MeOH (obj. %)	0,05M Tris- HCl (obj. %)	EtOAc (obj. %)
0	94	2	4	0
15	0	68	0	32
23	0	68	0	32

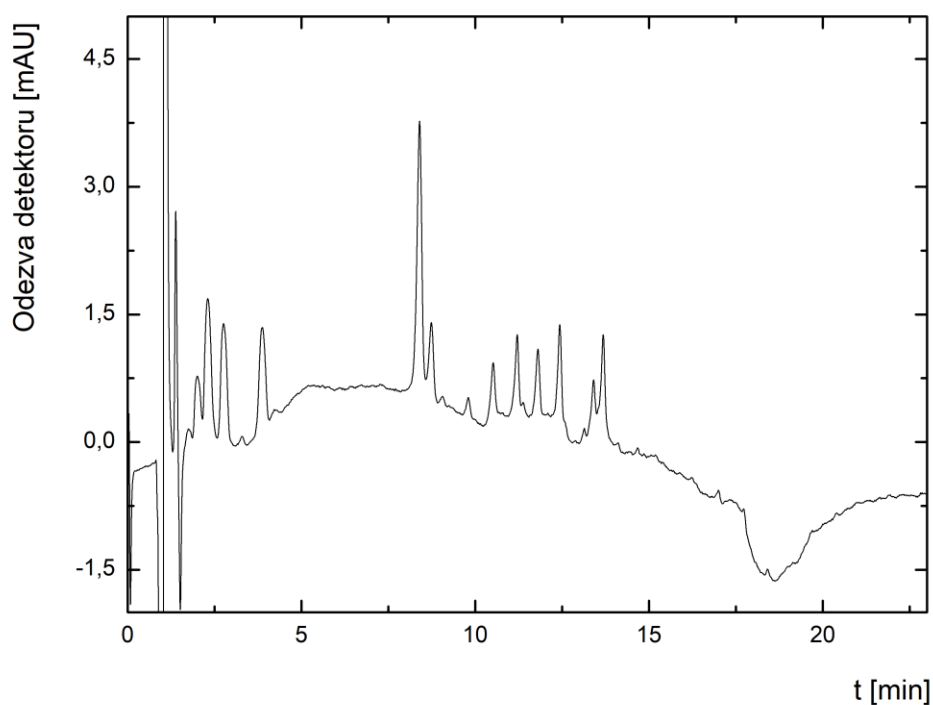
4.2 Vliv teploty kolony na tvar signálů

Bylo testováno, jaký vliv na tvar signálů má teplota, na kterou je vyhřívána kolona. Kromě obvykle používané teploty 28 °C byly otestovány také teploty 20 °C a 35 °C. Jediným efektem bylo celkové zpomalení separace vlivem snížení rychlosti difúze a zvýšení viskozity rozpouštědla v případě kolony vyhřívané na 20 °C a celkové zrychlení separace vlivem zvýšení rychlosti difúze a snížení viskozity rozpouštědla v případě kolony vyhřívané na 35 °C. Rozlišení nebylo ovlivněno.

4.3 Optimalizace průtokové rychlosti

Vliv průtokové rychlosti byl zkoumán v rozmezí 0,2–0,4 ml min⁻¹. Průtokové rychlosti doporučené výrobcem používané kolony jsou typicky 0,1 ml min⁻¹. Tato průtoková rychlost byla ale výrazně menší než průtoková rychlost 0,3 ml min⁻¹, pro kterou byl optimalizován gradient mobilní fáze. Ta byla dosud používána kvůli rychlosti analýzy. Tlakový limit kolony byl přibližně 580 bar, nejvyšší tlak dosahovaný v průběhu analýzy při průtokové rychlosti 0,3 ml min⁻¹ byl 140 bar. Průtokovou rychlost by tedy bylo možné i výrazně zvýšit, ale s ohledem na nízkou retenci některých látek by to nebylo relevantní.

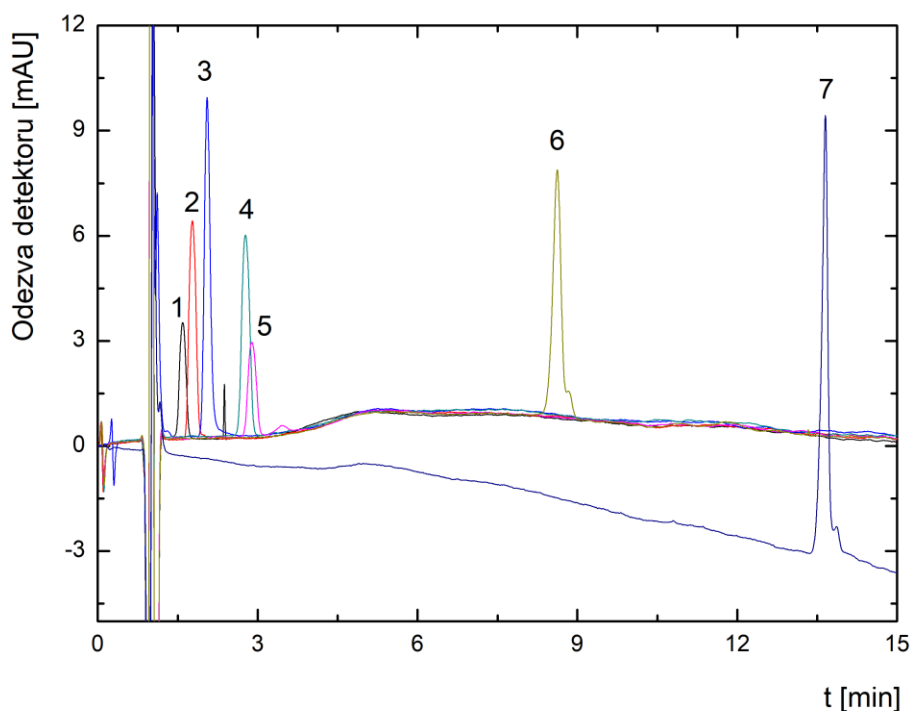
Vyhodnocována byla retence prvních píků, překryv některých signálů a doba analýzy. Jako kompromisní a nejlepší varianta byla zvolena průtoková rychlost 0,25 ml min⁻¹ (obr. 6).



Obr. 6: Chromatogram separace karotenoidů v reálném vzorku, kolona Kinetex C18, mobilní fáze A – ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0): 94/2/4, mobilní fáze B – MeOH/EtOAc: 68/32, 0–15 min lineární gradient z A do B, 15–23 min izokraticky B, průtok 0,25 ml min⁻¹, teplota kolony 28 °C, dávkováno 20 µl, detekce při $\lambda = 470$ nm

4.4 Měření standardů a kalibrace

Za optimalizovaných separačních podmínek byly zanalyzovány jednotlivé standardy (*all-trans*-astaxanthin, zeaxanthin, lutein, 9'-*cis*-neoxanthin, violaxanthin, echinenon a β -karoten), každý o koncentraci přibližně 0,1 mg l⁻¹ (obr. 7). Přesné koncentrace roztoků jednotlivých standardů byly 10× nižší ve srovnání s hodnotami v tabulce 2 (viz. oddíl 3.3). Cílem bylo identifikovat analyty v reálném vzorku extraktu řas na základě retenčních časů.

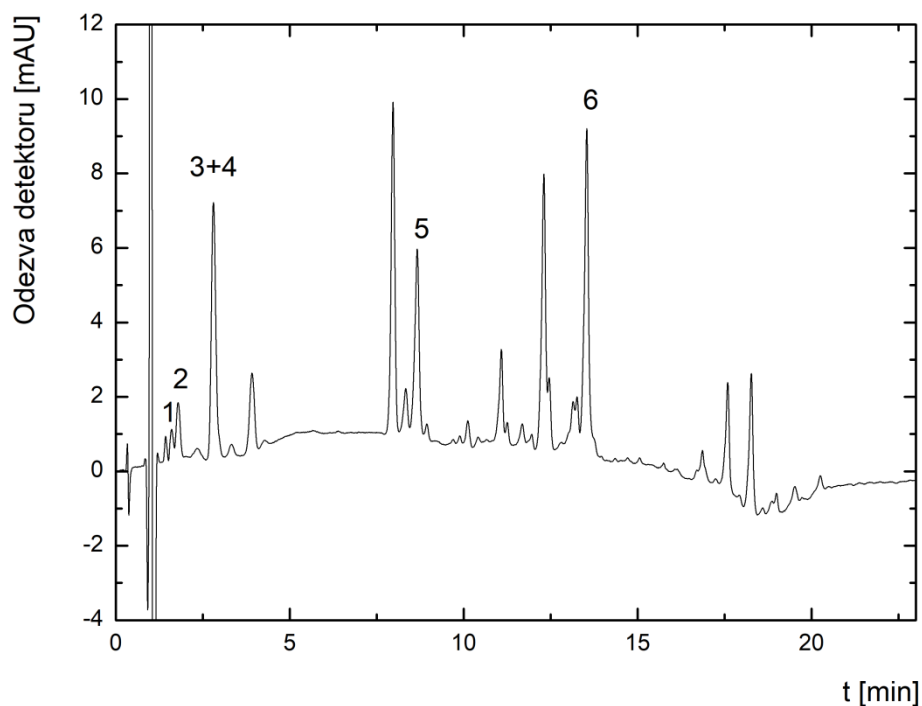


Obr. 7: Porovnání chromatogramů standardů 9'-*cis*-neoxanthinu (1), violaxanthinu (2), *all-trans*-astaxanthinu (3), luteinu (4), zeaxanthinu (5), echinenonu (6) a β -karotenu (7), každý o koncentraci $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ za použití MF A – ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0): 94/2/4, MF B – MeOH/EtOAc: 68/32, 0–15 min lineární gradient z A do B, 15–23 min izokraticky B, průtok $0,25 \text{ ml min}^{-1}$, dávkováno vždy $20 \mu\text{l}$, teplota kolony $28 \text{ }^\circ\text{C}$, detekce při $\lambda = 470 \text{ nm}$

Také byl analyzován směsný vzorek obsahující zeaxanthin, lutein, 9'-*cis*-neoxanthin, violaxanthin, echinenon a β -karoten (koncentrace každého standardu ve směsném vzorku byla přibližně $0,1 \text{ mg l}^{-1}$) v dávkovaných objemech 0, 1, 2, 5, 12 a $25 \mu\text{l}$ pro sestavení kalibračních křivek. Směsné standardy byly měřeny vždy v duplikátech.

Porovnáním retenčních časů standardů s retenčními časy píků v reálném vzorku byla identifikována klíčová barviva. Porovnáním s chromatogramem reálného vzorku bylo zjištěno, že volný *all-trans*-astaxanthin se ve vzorku nenachází, ostatní předpokládané pigmenty ano. Identifikovanými barvivy

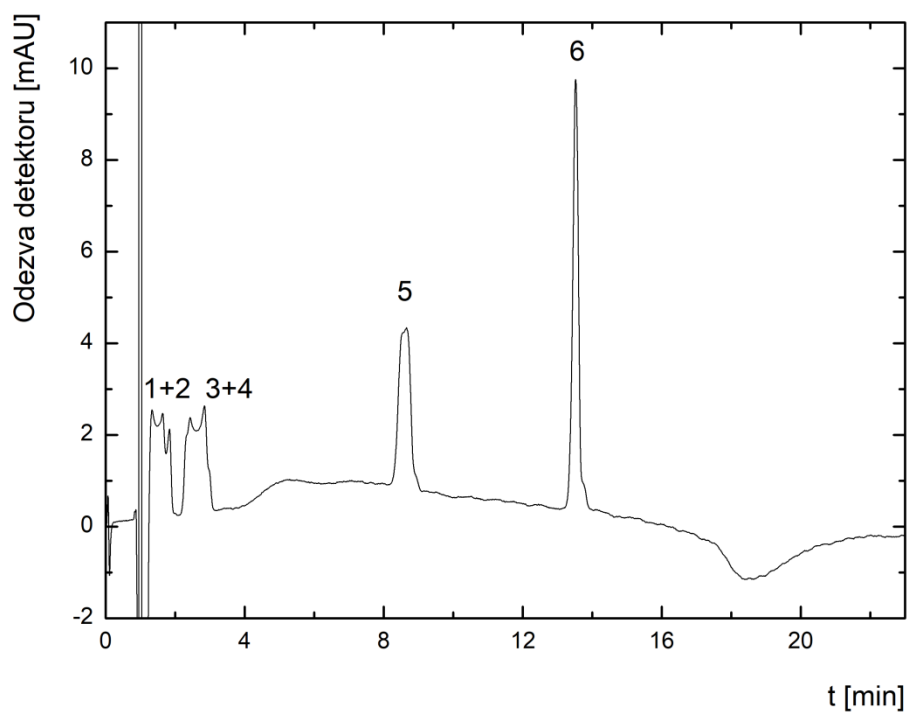
v reálném vzorku byly β -karoten, neoxanthin, violaxanthin, lutein, zeaxanthin a echinenon, které byly pracovníky katedry algologie ve vzorcích očekávány (obr.8).



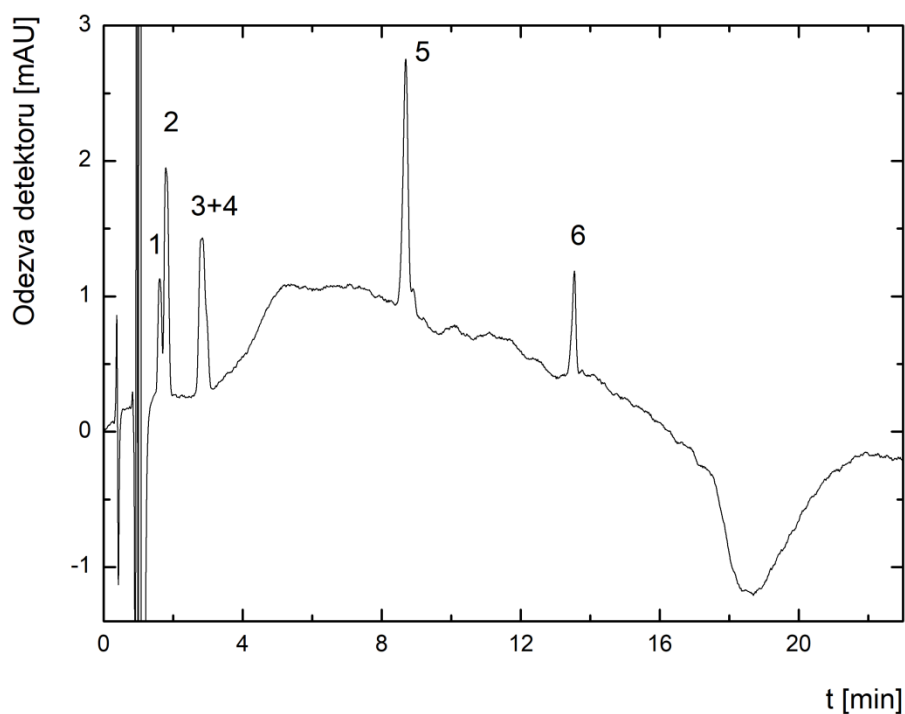
Obr. 8: Chromatogram separace a identifikace karotenoidů v reálném vzorku (označení vzorku N+3), mobilní fáze A – ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0): 94/2/4, mobilní fáze B – MeOH/EtOAc: 68/32, 0-15 min lineární gradient z A do B, 15-23 min izokraticky B, průtok $0,25 \text{ ml min}^{-1}$, teplota kolony $28 \text{ }^\circ\text{C}$, objem nástřiku vzorku $20 \text{ } \mu\text{l}$, detekce $\lambda = 470 \text{ nm}$, identifikované karotenoidy: 1 – neoxanthin, 2 – violaxanthin, 3+4 – lutein + zeaxanthin, 5 – echinenon, 6 – β -karoten

Ukázalo se, že deformované signály na začátku chromatogramu byly způsobeny částečnou koelucí vždy dvou izomerů karotenoidů. Retenční časy violaxanthinu s *9'-cis*-neoxanthinem a luteinu se zeaxanthinem se překrývaly. Důvodem těchto podobných retenčních časů dvojic standardů byl jejich stejný sumární vzorec (jednalo se o izomery se stejnou molekulární hmotností), a na stacionární fázi se tedy tyto dvojice zadržovaly podobně. Lutein a zeaxanthin se

nepovedlo zintegrovat jednotlivě, ale povedlo se je identifikovat z kvalitativního hlediska a kvantifikovány byly dohromady. Tento postup byl posouzen jako možný díky jejich shodným molekulovým hmotnostem a absorpčním koeficientům při vlnové délce maxima ($a_{Zea} = 254 \text{ l g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $a_{Lut} = 255 \text{ l g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ při 450 nm). Violaxanthin a 9'-*cis*-neoxanthin se povedlo jednotlivě zintegrovat, pokud jejich obsahy nebyly vysoké, samostatně. Tato podmínka se zdála být splněna pro většinu dodaných vzorků a kalibrační křivky violaxanthinu i 9'-*cis*-neoxanthinu tak byly vytvořeny pouze z hodnot získaných z dávkovaných objemů 0, 1, 2, a 5 μl směsného vzorku standardů. Při dávkovaných objemech 12 a 25 μl už 9'-*cis*-neoxanthin a violaxanthin eluovaly v jednom píku a nebylo možné je zintegrovat. Pro porovnání je uveden graf pro dávkovaný objem 20 μl směsného vzorku (obr. 9) a graf pro dávkovaný objem 5 μl směsného vzorku (obr. 10), ze kterých je zřejmé slítí píků 1 (neoxanthin) a 2 (violaxanthin) do jednoho signálu při vyšších obsazích obou analytů.



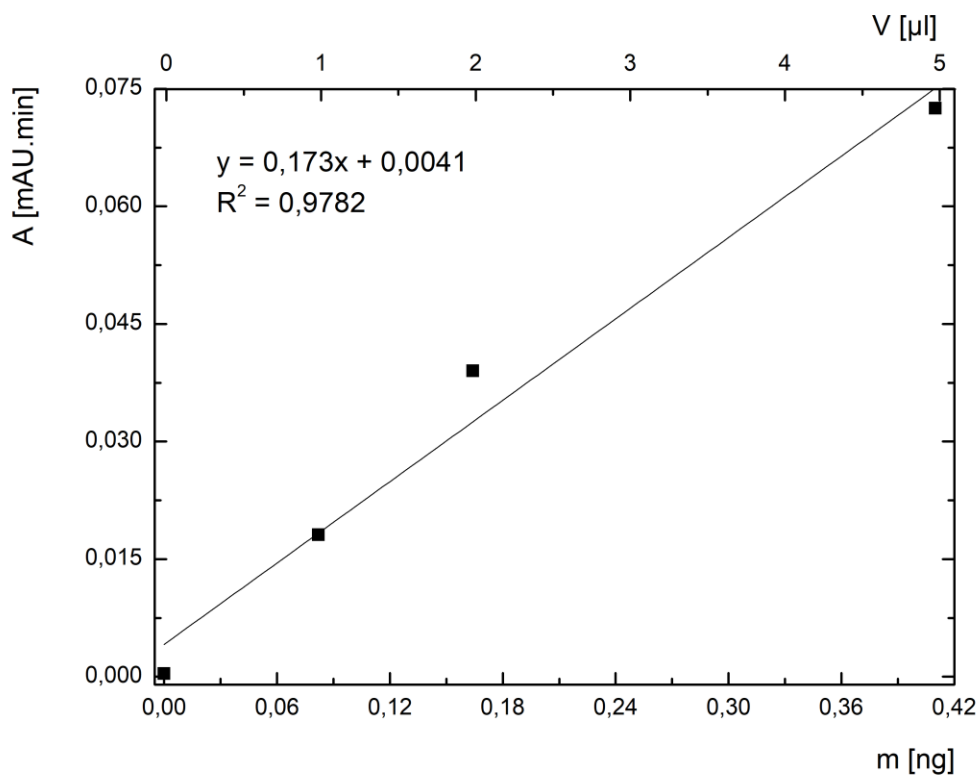
Obr. 9: Chromatogram separace směsi standardů karotenoidů (1 + 2 – 9'-*cis*-neoxanthin a violaxanthin, 3 + 4 – lutein a zeaxanthin, 5 – echinenon, 6 – β -karoten) při použití MF A – ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0): 94/2/4, MF B – MeOH/EtOAc: 68/32, 0–15 min lineární gradient z A do B, 15–23 min izokraticky B, průtok 0,25 ml min⁻¹, teplota kolony 28 °C, dávkováno 20 μ l, detekce při λ = 470 nm



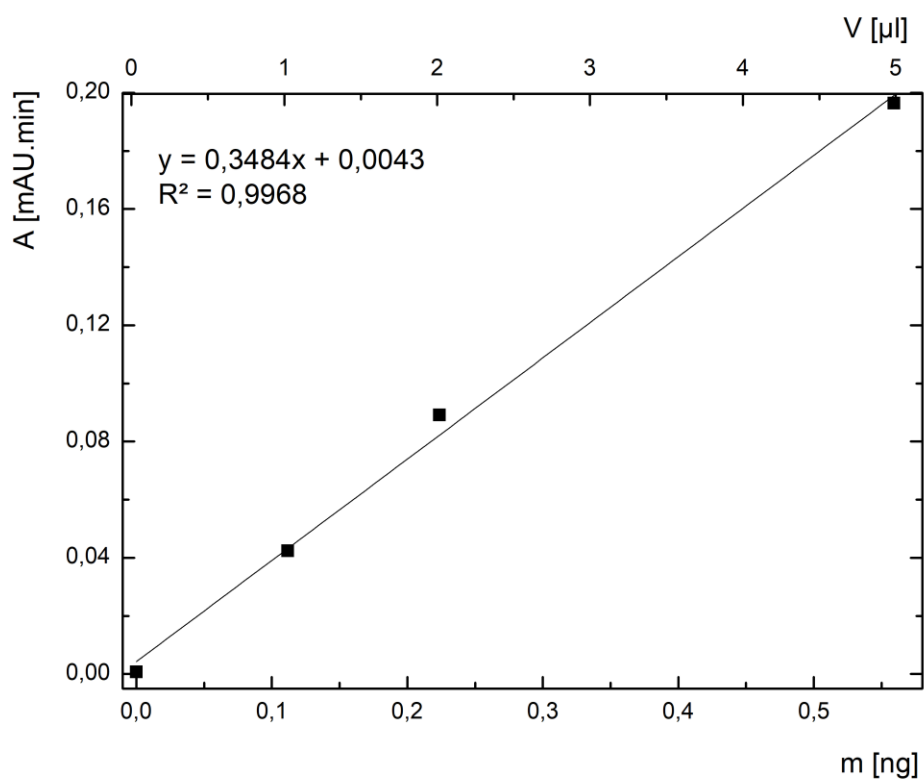
Obr. 10: Chromatogram separace směsi standardů karotenoidů (1 – 9'-cis-neoxanthin 2 – violaxanthin, 3 + 4 – lutein a zeaxanthin, 5 – echinenon, 6 – β-karoten) při použití MF A – ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0): 94/2/4, MF B – MeOH/EtOAc: 68/32, 0–15 min lineární gradient z A do B, 15–23 min izokraticky B, průtok 0,25 ml min⁻¹, teplota kolony 28 °C, dávkováno 5 μl, detekce při λ = 470 nm

Volný *all-trans*-astaxanthin ve vzorcích nalezen nebyl. Z toho důvodu nebyl standard astaxanthinu použit při přípravě směsného vzorku použitého při validaci metody. Z průměrných hodnot ploch píků a vypočtených hmotností standardů (vypočteno ze známého dávkovaného objemu a známé koncentrace) v měřeném vzorku byly poté sestrojeny kalibrační křivky pro jednotlivé standardy (obr. 11–15). V dávkovaném objemu 1 μl byl směsný vzorek proměřen celkem osmkrát pro výpočet LOD a LOQ. Tabulka 7 uvádí hodnoty charakterizující jednotlivé standardy (hodnoty *k*, *R* a *N* byly vypočteny pomocí uvedených vzorců 1, 2, 3 v oddílu 3.8). Kalibrační rozmezí pro jednotlivé standardy byla zvolena na základě dosavadních zkušeností tak, aby obsáhla očekávané koncentrace

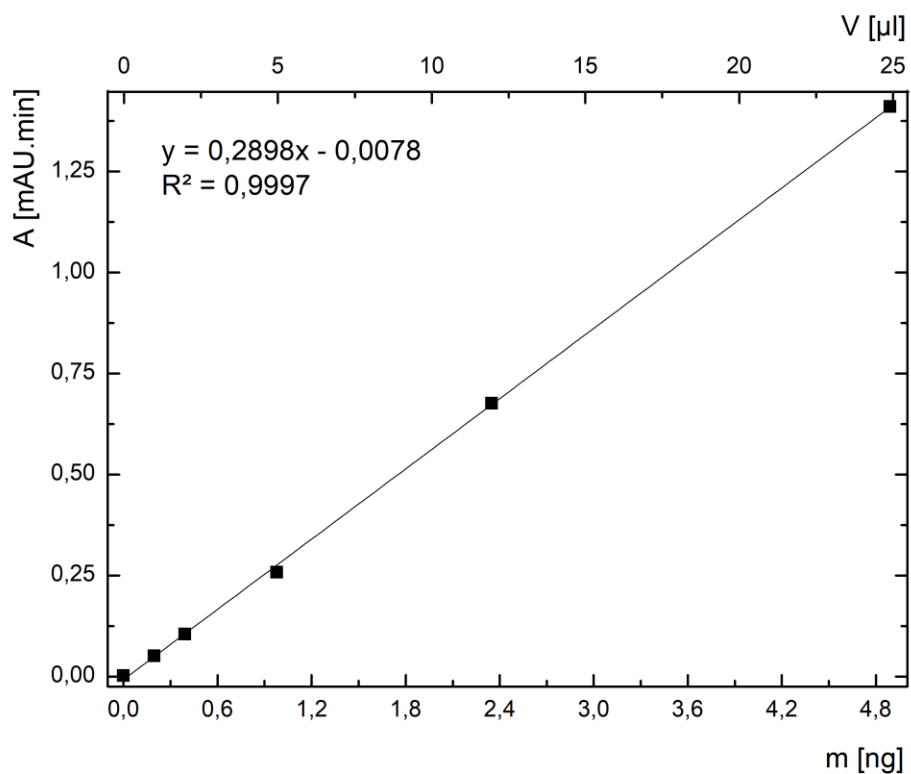
jednotlivých pigmentů v dodaných vzorcích.



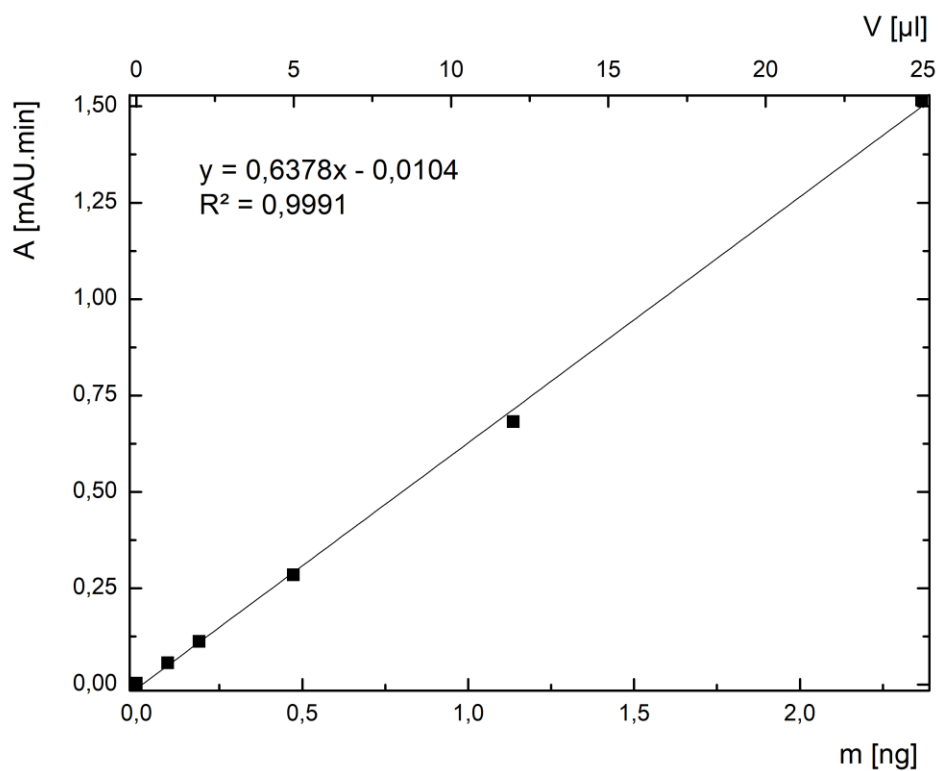
Obr. 11: Kalibrační závislost plochy píku na hmotnosti 9'-cis-neoxanthinu a na dávkovaném objemu vzorku při použití MF A – ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0): 94/2/4, MF B – MeOH/EtOAc: 68/32, 0–15 min lineární gradient z A do B, 15–23 min izokraticky B, průtok 0,25 ml min⁻¹, teplota kolony 28 °C, detekce při $\lambda = 470$ nm



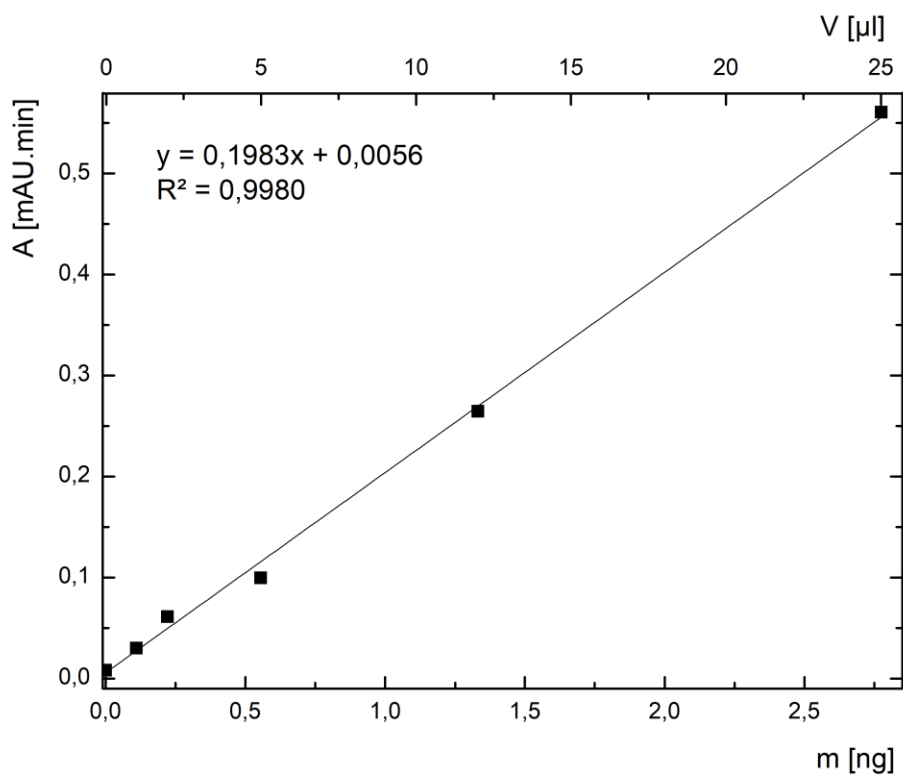
Obr. 12: Kalibrační závislost plochy píku na hmotnosti violaxanthinu a na dávkovaném objemu vzorku při použití MF A – ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0): 94/2/4, MF B – MeOH/EtOAc: 68/32, 0–15 min lineární gradient z A do B, 15–23 min izokraticky B, průtok 0,25 ml min⁻¹, teplota kolony 28 °C, detekce při $\lambda = 470$ nm



Obr. 13: Kalibrační závislost plochy píku na hmotnosti luteinu, respektive zeaxanthinu a na dávkovaném objemu vzorku při použití MF A – ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0): 94/2/4, MF B – MeOH/EtOAc: 68/32, 0–15 min lineární gradient z A do B, 15–23 min izokraticky B, průtok 0,25 ml min⁻¹, teplota kolony 28 °C, detekce při $\lambda = 470$ nm



Obr. 14: Kalibrační závislost plochy píku na hmotnosti echinenonu a na dávkovaném objemu vzorku při použití MF A – ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0): 94/2/4, MF B – MeOH/EtOAc: 68/32, 0–15 min lineární gradient z A do B, 15–23 min izokraticky B, průtok 0,25 ml min⁻¹, teplota kolony 28 °C, detekce při $\lambda = 470$ nm



Obr. 15: Kalibrační závislost plochy píku na hmotnosti β -karotenu a na dávkovaném objemu vzorku při použití MF A – ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0): 94/2/4, MF B – MeOH/EtOAc: 68/32, 0–15 min lineární gradient z A do B, 15–23 min izokraticky B, průtok $0,25 \text{ ml min}^{-1}$, teplota kolony $28 \text{ }^\circ\text{C}$, detekce při $\lambda = 470 \text{ nm}$

Tabulka 7: Charakterizace standardů látek vyskytujících se v reálném vzorku řas při složení mobilní fáze MF A – ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0): 94/2/4, MF B – MeOH/EtOAc: 68/32, průtok 0,25 ml min⁻¹

Standard	t_R [min]	k	R	N	Lineární dynamický rozsah (LDR) [ng]	Směrnice [mAU.min/ng]	LOD [ng]	LOQ [ng]
9'-cis-neoxanthin	1,593	0,562	0,882	852	0,10 - 0,41	0,173	0,03	0,10
violaxanthin	1,773	0,747	3,424	952	0,06 - 0,56	0,348	0,02	0,06
lutein	2,770	1,716	18,321	1800	0,20 - 4,89	0,290	0,06	0,20
zeaxanthin	2,890	1,850	18,321	1910	0,20 - 4,89	0,290	0,06	0,20
echinenon	8,623	7,454	21,101	14672	0,05 - 2,37	0,638	0,01	0,05
β-karoten	13,653	12,003	-	75090	0,56 - 2,78	0,198	0,17	0,56

4.5 Určení limitu detekce a kvantifikace

Limity detekce (LOD) a limity kvantifikace (LOQ) jednotlivých standardů karotenoidů byly stanoveny pomocí vzorců 4 a 5 uvedených v praktické části (oddíl 3.8). Směsný vzorek standardů o koncentraci každého přibližně 0,1 mg l⁻¹ byl proměřen osmkrát v dávkovaném objemu 1 μl. Z kalibračních přímek jednotlivých standardů bylo vypočteno osm hmotností pro každý standard. Z těchto hmotností byla vypočtena směrodatná odchylka a dosazena do vzorce pro výpočet LOD a LOQ. Vypočtené hodnoty LOD a LOQ jsou uvedeny v tabulce 7.

5 Závěr

Ze tří metod převzatých z literatury (Marinova-Ribarova [44], metoda Kim J. Mulders [46] a metoda Jin Liu [45]) byla pro HPLC separaci karotenoidů ze vzorku extrahovaného z řasy *Tetracystis pulchra* pro další optimalizaci vybrána metoda Jin Liu [45] na reverzní fázi za podmínek gradientové eluce s detekcí UV-VIS. Na koloně Kinetex C18 bylo nejprve optimalizováno složení mobilní fáze. U mobilní fáze A byly vyzkoušeny různé poměry acetonitrilu a methanolu při zachování poměru pufru vůči organickým složkám a také různé poměry organické a vodné složky. U mobilní fáze B byly vyzkoušeny různé poměry methanolu a ethylacetátu. Jako vhodná byla vybrána varianta ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0): 94/2/4 jako mobilní fáze A a MeOH/EtOAc: 68/32 jako mobilní fáze B.

Dále byl testován vliv teploty kolony na tvar signálu a optimalizována průtoková rychlost. Jako optimální se ukázala teplota kolony 28 °C.

Průtoková rychlost byla zkoumána v rozmezí 0,2–0,4 ml min⁻¹. Po vyhodnocení retence prvních píků, překryvu některých signálů a celkové době analýzy byla jako nejlepší varianta zvolena průtoková rychlost 0,25 ml min⁻¹. Celková doba analýzy optimalizovanou metodou byla 23 min.

Jako standardy byly použity 9'-*cis*-neoxanthin, violaxanthin, astaxanthin, lutein, zeaxanthin, echinenon a β-karoten. Retenční časy violaxanthinu s 9'-*cis*-neoxanthinem a luteinu se zeaxanthinem se překrývaly. Při nižších dávkovaných objemech se violaxanthin a 9'-*cis*-neoxanthin podařilo jednotlivě zintegrovat a kvantifikovat každý zvlášť. Lutein a zeaxanthin se nepodařilo zintegrovat jednotlivě, ale povedlo se je identifikovat z kvalitativního hlediska a kvantifikovány byly dohromady. V reálném vzorku řas byly identifikovány všechny standardy kromě volného *all-trans*-astaxanthinu. Byl-li astaxanthin ve vzorcích obsažen, pak v jiné formě. Pro karotenoidy vyskytující se ve vzorcích řas byly vytvořeny kalibrační přímky a vypočteny hodnoty LOD a LOQ. Vyvinutá metoda je vhodná pro stanovení, jak se mění zastoupení různých karotenoidů ve vzorcích řas *Tetracystis pulchra* pěstovaných za různých podmínek, které je obsahem diplomové práce další studentky Bc. Terezie Očadlíkové [49]. Cíle této bakalářské práce tedy byly splněny.

6 Použitá literatura

- [1] M. Lu, Y. Zhang, C. Zhao, P. Zhou, and L. Yu, “Analysis and identification of astaxanthin and its carotenoid precursors from *Xanthophyllomyces dendrorhous* by high-performance liquid chromatography,” *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.*, vol. 65 C, no. 7–8, pp. 489–494, 2010, doi: 10.1515/znc-2010-7-812.
- [2] Y. Ye and J. C. Huang, “Defining the biosynthesis of ketocarotenoids in *Chromochloris zofingiensis*,” *Plant Divers.*, vol. 42, no. 1, pp. 61–66, 2020, doi: 10.1016/j.pld.2019.11.001.
- [3] Melton L., Shahidi F., Varelis P.: *Encyclopedia of Food Chemistry*. Amsterdam; Kidlington, Oxford; Cambridge MA: Elsevier 2019
- [4] G. Britton, “Structure and properties of carotenoids in relation to function.,” *FASEB J.*, vol. 9, no. 15, pp. 1551–1558, 1995, doi: 10.1096/fasebj.9.15.8529834.
- [5] A. E. Solovchenko, “Recent breakthroughs in the biology of astaxanthin accumulation by microalgal cell,” *Photosynth. Res.*, vol. 125, no. 3, pp. 437–449, 2015, doi: 10.1007/s11120-015-0156-3.
- [6] Q. Su, K. G. Rowley, and N. D. H. Balazs, “Carotenoids: Separation methods applicable to biological samples,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 781, no. 1–2, pp. 393–418, 2002, doi: 10.1016/S1570-0232(02)00502-0.
- [7] K. L. Simpson, “Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A,” *Proc. Nutr. Soc.*, vol. 42, no. 1, pp. 7–17, 1983, doi: 10.1079/pns19830003.
- [8] J. Dhankhar, S. S. Kadian, and A. Sharma, “Astaxanthin: a Potential Carotenoid,” *Ijpsr*, vol. 3, no. 5, p. 5, 2012.
- [9] W. Miki, “Biological functions and activities of animal carotenoids,” *Pure Appl. Chem.*, vol. 63, no. 1, pp. 141–146, 1991, doi: 10.1351/pac199163010141.
- [10] I. Higuera-Ciapara, L. Félix-Valenzuela and F. M. Goycoolea, “Astaxanthin: A review of its chemistry and applications,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 46, no. 2, pp. 185–196, 2006, doi: 10.1080/10408690590957188.
- [11] J. Peng, W. Z. Xiang, Q. M. Tang, N. Sun, F. Chen, and J. Yuan, “Comparative analysis of astaxanthin and its esters in the mutant E1 of *Haematococcus pluvialis* and other green algae by HPLC with a C30 column,” *Sci. China, Ser. C Life Sci.*,

- vol. 51, no. 12, pp. 1108–1115, 2008, doi: 10.1007/s11427-008-0146-1.
- [12] S. A. Turujman, W. G. Wamer, R. R. Wei, and R. H. Albert, “Rapid liquid chromatographic method to distinguish wild salmon from aquacultured salmon fed synthetic astaxanthin,” *J. AOAC Int.*, vol. 80, no. 3, p. 622–632, 1997.
- [13] S. Goto *et al.*, “Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1512, no. 2, pp. 251–258, 2001, doi: 10.1016/S0005-2736(01)00326-1.
- [14] M. H. Jang, X. L. Piao, J. M. Kim, S. W. Kwon, and J. H. Park, “Cytoprotective Role of Astaxanthin against Glycated Protein/Iron Chelate-induced Toxicity in Human Umbilical Vein Endothelial Cells,” *Phyther. Res.*, vol. 22, no. 24, pp. 54–59, 2010, doi: 10.1002/ptr.2867.
- [15] I. O’Connor and N. O’Brien, “Modulation of UVA light-induced oxidative stress by β -carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts,” *J. Dermatol. Sci.*, vol. 16, no. 3, pp. 226–230, 1998, doi: 10.1016/S0923-1811(97)00058-3.
- [16] M. Ochoa Becerra, L. Mojica Contreras, M. Hsieh Lo, J. Mateos Díaz, and G. Castillo Herrera, “Lutein as a functional food ingredient: Stability and bioavailability,” *J. Funct. Foods*, vol. 66, no. 103771, 2020, doi: 10.1016/j.jff.2019.103771.
- [17] J. H. Chen, C. Y. Chen, and J. S. Chang, “Lutein production with wild-type and mutant strains of *Chlorella sorokiniana* MB-1 under mixotrophic growth,” *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, vol. 79, pp. 66–73, 2017, doi: 10.1016/j.jtice.2017.04.022.
- [18] Y. Zhang, Z. Liu, J. Sun, C. Xue, and X. Mao, “Biotechnological production of zeaxanthin by microorganisms,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 71, pp. 225–234, 2018, doi: 10.1016/j.tifs.2017.11.006.
- [19] A. Pugliese *et al.*, “In vitro investigation of the bioaccessibility of carotenoids from raw, frozen and boiled red chili peppers (*Capsicum annuum*),” *Eur. J. Nutr.*, vol. 53, no. 2, pp. 501–510, 2014, doi: 10.1007/s00394-013-0555-1.
- [20] F. Bouvier, A. D’Harlingue, R. A. Backhaus, M. H. Kumagai, and B. Camara,

- “Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, no. 21, pp. 6346–6352, 2000, doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01722.x.
- [21] E. H. Schwartzel and J. J. Cooney, “Isolation and identification of echinenone from *Micrococcus roseus*,” *J. Bacteriol.*, vol. 104, no. 1, pp. 272–274, 1970, doi: 10.1128/jb.104.1.272-274.1970.
- [22] K. T. Amorim-Carrilho, A. Cepeda, C. Fente, and P. Regal, “Review of methods for analysis of carotenoids,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 56, pp. 49–73, 2014, doi: 10.1016/j.trac.2013.12.011.
- [23] R. W. S. Weber, H. Anke, and P. Davoli, “Simple method for the extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of carotenoid pigments from red yeasts (Basidiomycota, Fungi),” *J. Chromatogr. A*, vol. 1145, no. 1–2, pp. 118–122, 2007, doi: 10.1016/j.chroma.2007.01.052.
- [24] S. Rivera and R. Canela, “Influence of sample processing on the analysis of carotenoids in Maize,” *Molecules*, vol. 17, no. 9, pp. 11255–11268, 2012, doi: 10.3390/molecules170911255.
- [25] M. C. Chan, S. H. Ho, D. J. Lee, C. Y. Chen, C. C. Huang, and J. S. Chang, “Characterization, extraction and purification of lutein produced by an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 78, pp. 24–31, 2013, doi: 10.1016/j.bej.2012.11.017.
- [26] E. García-de Blas, R. Mateo, J. Viñuela, and C. Alonso-Álvarez, “Identification of carotenoid pigments and their fatty acid esters in an avian integument combining HPLC-DAD and LC-MS analyses,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 879, no. 5–6, pp. 341–348, 2011, doi: 10.1016/j.jchromb.2010.12.019.
- [27] B. S. Inbaraj, H. Lu, C. F. Hung, W. B. Wu, C. L. Lin, and B. H. Chen, “Determination of carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-APCI-MS,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 47, no. 4–5, pp. 812–818, 2008, doi: 10.1016/j.jpba.2008.04.001.
- [28] Y. H. Hui; Frank Sherkat: *High performance liquid chromatography*. CRC Press, 2005.

- [29] P. Gupta, Y. Sreelakshmi, and R. Sharma, "A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography," *Plant Methods*, vol. 11, no. 1, pp. 1–12, 2015, doi: 10.1186/s13007-015-0051-0.
- [30] S. M. Rivera and R. Canela-Garayoa, "Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials," *J. Chromatogr. A*, vol. 1224, pp. 1–10, 2012, doi: 10.1016/j.chroma.2011.12.025.
- [31] T. Glaser, A. Lienau, D. Zeeb, M. Krucker, M. Dachtler, and K. Albert, "Qualitative and quantitative determination of carotenoid stereoisomers in a variety of spinach samples by use of MSPD before HPLC-UV, HPLC-APCI-MS, and HPLC-NMR on-line coupling," *Chromatographia*, vol. 57, SUPPL., pp. 19–25, 2003, doi: 10.1007/BF02492079.
- [32] M. Franko, P. Van De Bovenkamp, and D. Bicanic, "Determination of trans- β -carotene and other carotenoids in blood plasma using high-performance liquid chromatography and thermal lens detection," *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, vol. 718, no. 1, pp. 47–54, 1998, doi: 10.1016/S0378-4347(98)00347-8.
- [33] A. V. Ruban, A. A. Pascal, B. Robert, and P. Horton, "Configuration and dynamics of xanthophylls in light-harvesting antennae of higher plants: Spectroscopic analysis of isolated light-harvesting complex of photosystem II and thylakoid membranes," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 27, pp. 24862–24870, 2001, doi: 10.1074/jbc.M103263200.
- [34] J. I. Galarza, B. O. Arredondo Vega, J. Villón, and V. Henríquez, "Deesterification of astaxanthin and intermediate esters from *Haematococcus pluvialis* subjected to stress," *Biotechnol. Reports*, vol. 23, 2019, doi: 10.1016/j.btre.2019.e00351.
- [35] R. Sarada, R. Vidhyavathi, D. Usha, and G. A. Ravishankar, "An efficient method for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, no. 20, pp. 7585–7588, 2006, doi: 10.1021/jf060737t.
- [36] S. Dong, Y. Huang, R. Zhang, S. Wang, and Y. Liu, "Four Different Methods Comparison for Extraction of Astaxanthin from Green Alga *Haematococcus*

- pluvialis,” *Sci. World J.*, vol. 2014, 7 pages, 2014, doi: 10.1155/2014/694305.
- [37] M. M. Mendes-Pinto, M. F. J. Raposo, J. Bowen, A. J. Young, and R. Morais, “Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 13, pp. 19–24, 2001, doi: 10.1023/A:1008183429747.
- [38] A. Z. Mercadante, D. B. Rodriguez-Amaya, and G. Britton, “HPLC and Mass Spectrometric Analysis of Carotenoids from Mango,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 45, no. 1, pp. 120–123, 1997, doi: 10.1021/jf960276j.
- [39] M. Slavin and L. Yu, “A single extraction and HPLC procedure for simultaneous analysis of phytosterols, tocopherols and lutein in soybeans,” *Food Chem.*, vol. 135, no. 4, pp. 2789–2795, 2012, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.06.043.
- [40] F. Miao, D. Lu, Y. Li, and M. Zeng, “Characterization of astaxanthin esters in *Haematococcus pluvialis* by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry,” *Anal. Biochem.*, vol. 352, no. 2, pp. 176–181, 2006, doi: 10.1016/j.ab.2006.03.006.
- [41] C. H. Azevedo-Meleiro and D. B. Rodriguez-Amaya, “Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS,” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 17, no. 3–4, pp. 385–396, 2004, doi: 10.1016/j.jfca.2004.02.004.
- [42] C. H. De Azevedo-Meleiro and D. B. Rodriguez-Amaya, “Qualitative and quantitative differences in the carotenoid composition of yellow and red peppers determined by HPLC-DAD-MS,” *J. Sep. Sci.*, vol. 32, no. 21, pp. 3652–3658, 2009, doi: 10.1002/jssc.200900311.
- [43] J. L. BUREAU and R. J. BUSHWAY, “HPLC Determination of Carotenoids in Fruits and Vegetables in the United States,” *J. Food Sci.*, vol. 51, no. 1, pp. 128–130, 1986, doi: 10.1111/j.1365-2621.1986.tb10851.x.
- [44] D. Marinova and F. Ribarova, “HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries,” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 20, no. 5, pp. 370–374, 2007, doi:

10.1016/j.jfca.2006.09.007.

- [45] J. Liu, Y. Zhong, Z. Sun, J. Huang, G. Sandmann, and F. Chen, “One amino acid substitution in phytoene desaturase makes *Chlorella zofingiensis* resistant to norflurazon and enhances the biosynthesis of astaxanthin,” *Planta*, vol. 232, no. 1, pp. 61–67, 2010, doi: 10.1007/s00425-010-1132-y.
- [46] K. J. M. Mulders *et al.*, “Nitrogen-depleted *Chlorella zofingiensis* produces astaxanthin, ketolutein and their fatty acid esters: a carotenoid metabolism study,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 27, no. 1, pp. 125–140, 2015, doi: 10.1007/s10811-014-0333-3.
- [47] T. Esatbeyoglu and G. Rimbach, “Canthaxanthin: From molecule to function,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 61, no. 6, pp. 1–17, 2017, doi: 10.1002/mnfr.201600469.
- [48] K. Holtin, M. Kuehnle, J. Rehbein, P. Schuler, G. Nicholson, and K. Albert, “Determination of astaxanthin and astaxanthin esters in the microalgae *Haematococcus pluvialis* by LC-(APCI)MS and characterization of predominant carotenoid isomers by NMR spectroscopy,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 395, no. 6, pp. 1613–1622, 2009, doi: 10.1007/s00216-009-2837-2.
- [49] T. Očadlíková: *Vliv stresových faktorů na tvorbu karotenoidů v izolovaných kmenech půdních řas*, Univerzita Karlova 2021.