

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

**Stanovení obsahu betakarotenu v odrůdách višňi
pomocí HPLC**

Rigorózní práce

Vedoucí rigorózní práce: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.
Hradec Králové, 2019
Mgr. Markéta Svobodová

„Prohlašuji, že tato rigorózní práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

datum

podpis

ABSTRAKT

Univerzita Karlova Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Mgr. Markéta Svobodová

Školitel: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Název rigorózní práce: Stanovení obsahu betakarotenu v odrůdách višňi pomocí HPLC

V této rigorózní práci jsme stanovovali přítomnost karotenoidů (*trans* betakarotenu, *cis* betakarotenu a luteinu) v 18 odrůdách višňi. Testované odrůdy: *Rannaja*, *Meteor*, *Krasnyj flag*, *Pandy 45*, *Muškatnaja pražskaja*, *Erdi jubileum*, *Griot Moskovskij*, *Valkova*, *Mesabich*, *Gorsetin*, *Inga mladi*, *Naumburger osheimer*, *Pandy 6039*, *Köröšská*, *Morellen fever*, *Wolyňská*, *Heimann's rubín a Višňa IV/155*. Optimalizovanou metodu jsme převzali z diplomové práce Štěpána Růžičky-Vývoj HPLC metody pro stanovení vybraných karotenoidů v ovoci (2017). Při chromatografické separaci jsme použili kolonu Supelco Analytical RP-Amide (100 x 4,6 mm, 5 µm) a stanovované karotenoidy byly detekovány při vlnové délce 450 nm. Měření proběhlo v režimu isokratické eluce mobilní fází acetonitril: hexan: dichlormethan (97,5 : 1,25 : 1,25) o průtokové rychlosti 1,8 ml/min při teplotě 30 °C. Vzorky, které jsme analyzovali byly extrahovány ultrazvukem do chloroformu, centrifugovány, přefiltrovány a nadávkovány do HPLC systému. Objem vzorku byl 5 µl. Původním cílem bylo stanovit pouze *trans* betakaroten a lutein, ale po průběžných výsledcích jsme narazili u některých odrůd na vysoký výskyt také *cis* formy betakarotenu. Proto jsme i tuto formu následně vyhodnotili.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Mgr. Markéta Svobodová

Supervisor: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Title of the rigorous thesis: Determination of beta-carotene content in sour cherries by HPLC

In this rigorous thesis, we determined the presence of carotenoids (*trans* betacarotene, *cis* beta-carotene and lutein) in 18 cultivars of sour cherries. Cultivars: *Rannaja*, *Meteor*, *Krasnyj flag*, *Pandy 45*, *Muskatnaja pražskaja*, *Erdi jubileum*, *Griot Moskovskij*, *Valkova*, *Mesabich*, *Gorsetin*, *Inga mladi*, *Naumburger osheimer*, *Pandy 6039*, *Körös*, *Morellen fever*, *Wolyňská*, *Heimann's rubín*, and *Višňa IV/155*. The optimized method was taken from the diploma thesis of Štěpán Růžička - HPLC method development for carotenoids determination in fruits (2017). In the chromatographic method, we used a Supelco Analytical RP-Amide column (100 x 4.6 mm, 5 µm) and carotenoids were detected at a wavelength of 450 nm. Measurements were carried out in the isocratic elution mode with a mobile phase of acetonitrile: hexane: dichloromethane (97.5 : 1.25 : 1.25) at a flow rate of 1.8 ml / min at 30 ° C. The analyzed samples were extracted by ultrasound into chloroform. After centrifugation, they were filtered and injected to the HPLC column. The sample volume was 5 µl. Originally, we wanted to determine only *trans* betacarotene and lutein, but after continuous results, we encountered a high incidence of *cis* form of betacarotene in some cultivars. Therefore, we have also evaluated this form.

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	Cíl a zadání rigorózní práce	9
3	TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1	Karotenoidy	10
3.1.1	Vlastnosti a funkce	10
3.1.2	Chemická struktura.....	10
3.1.3	Výskyt	12
3.1.4	Metabolismus	12
3.1.5	Izomery betakarotenu	14
3.2	Izomerie.....	17
3.3	Konstituce vs. konfigurace	17
3.3.1	Geometrická izomerie- konfigurace na dvojně vazbě.....	17
3.4	Višně a jejich potenciál pro společnost	18
3.5	Bioanalytické studie karotenoidů	19
3.6	Chromatografie.....	22
3.6.1	Základní principy a rozdělení chromatografických metod.....	22
3.6.2	Možnosti stanovení betakarotenu pomocí HPLC.....	26
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
4.1	Materiály a pomůcky	28
4.1.1	Chemikálie, standardy a vzorky	28
4.1.2	Přístroje a podmínky separace.....	29
4.1.3	Pomůcky	29
4.2	Příprava standardních roztoků.....	30
4.2.1	Příprava zásobního roztoku	30
4.2.2	Příprava roztoků pro kalibraci	30

4.2.3	Příprava vzorků pro stanovení obsahu betakarotenu a luteinu.....	31
5	Výsledky a diskuze	32
5.1	Vývoj metody	32
5.2	Validace metody.....	32
5.2.1	Linearita.....	32
5.3	Stanovení obsahu karotenoidů v odrůdách višňi.....	35
6	DISKUZE	47
7	ZÁVĚR	49
8	BIBLIOGRAFIE.....	50
9	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	55
10	SEZNAM TABULEK	56

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN- acetonitril

ATBC- studie prevence rakoviny α -tokoferolu betakarotenu (angl. The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention)

CARET- zkouška účinnosti betakarotenu a retinolu (angl. Carotene and Retinol Efficacy Trial)

CMOI – 15,15'-oxygenáza

CMOII - 9',10'-oxygenáza

CN - kyano radikál (nitril)

DAD HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí diodovým polem (angl. diode-array detector)

Faktor R - retenční faktor

HCOOH - kyselina mravenčí

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie (angl. high-performance liquid chromatography)

MeOH - methanol

MS - Hmotnostní spektrometrie (angl. Mass spectrometry)

MTBE - methyl terc-butyl ether

NADPH - Nikotinamidadeninukleotidfosfát

NH₂ - amino radikál

PHS - zdravotní studie lékařů (angl. Physicians' Health Study)

RAR - receptory kyseliny retinové

RXR - retinoidní X receptory

t_M - „mrtvý čas“

t_R - retenční čas

TEA - triethylamin

v_R - eluční objem

UV/VIS - Ultrafialovo-viditelná spektroskopie

1 ÚVOD

Karotenoidy je obecné označení pro skupinu přírodních látek, které jsou obsaženy v rostlinných i živočišných tkáních. Nejznámější výskyt je v plodech různého ovoce, zeleniny, ale také třeba v plazmě živočichů. Funkce zastávají různorodé - především jsou to barviva a silné antioxidanty. Pro tyto vlastnosti jsou nejčastěji zpracovány do doplňků stravy.

Barevnost karotenoidů je zapříčiněna obsahem velkého množství konjugovaných dvojných vazeb. Látky mají díky dlouhému uhlíkatému řetězci převážně lipofilní charakter.

Pro kvantitativní i kvalitativní analýzu vzorků s obsahem karotenoidů a dalších příbuzných látek je vhodná metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), která je snadno automatizovatelná, dokáže separovat jednotlivé analyzované látky, není časově náročná a k analýze dostačuje poměrně malé množství vzorku.

V této práci jsme stanovovali obsah karotenoidů v 18 odrůdách višňi (*Rannaja, Meteor, Krasnyj flag, Pandy 45, Muškatnaja pražskaja, Erdi jubileum, Griot Moskovskij, Valkova, Mesabich, Gorsetin, Inga mladi, Naumburger osheimer, Pandy 6039, Kőröšská, Morellen fever, Wolyňská, Heimann's rubín a Višňa IV/155*). Konkrétně byla práce zaměřena na *trans* betakaroten, *cis* betakaroten a lutein. Výsledky práce mohou být eventuelně dále využity jako zdroj informací o obsahu karotenoidů a zhodnocení nutriční kvality jednotlivých odrůd višňi.

2 Cíl a zadání rigorózní práce

Cílem práce bylo pokračovat v analýze karotenoidů (betakarotenu a luteinu) v různých odrůdách višňi (*Rannaja, Meteor, Krasnyj flag, Pandy 45, Muškatnaja pražskaja, Erdi jubileum, Griot Moskovskij, Valkova, Mesabich, Gorsetin, Inga mladi, Naumburger osheimer, Pandy 6039, Köröšská, Morellen fever, Wolyňská, Heimann's rubín a Višňa IV/155*). Tato rigorózní práce navazuje na spolupráci s Výzkumným ústavem ovocnářským a šlechtitelským v Holovousech, v analýzách antioxidantů v různých druzích drobného ovoce. Převzatá metoda chromatografické separace, která byla využita v této rigorózní práci, byla již v předešlé diplomové práci Štěpána Růžičky optimalizována a validována pro stanovení obsahu betakaroten v odrůdách třešňi. Cílem této práce bylo vyvinutou metodu aplikovat pro stanovení betakarotenu v dostupných odrůdách višňi.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Karotenoidy

Karotenoidy patří do skupiny pigmentů žluté, oranžové nebo červené barvy. Tyto pigmenty se vyskytují hojně v rostlinách. V menší míře u zvířat a lidí, kde zajišťují mnoho důležitých funkcí (1).

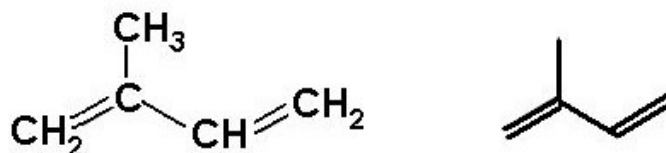
3.1.1 Vlastnosti a funkce

Karotenoidy převádějí škodlivé ultrafialové záření na tepelnou energii. Díky této vlastnosti se řadí do skupiny “zhášečů”, “lapačů” nebo také “zametačů” (anglicky quencher, scavenger). Antioxidanty mají schopnost nalézt a zneutralizovat volné radikály a jsou taktéž nezbytné k funkci jiných molekul v organismu. Např. likvidací kyslíkových a peroxidových radikálů působí imunomodulačně (2) (3).

Chrání tělo před běžnými civilizačními nemocemi, jako je rakovina, kardiovaskulární onemocnění, obezita, diabetes 2. typu a další. Strava založená na pestrosti jídelníčku, obsahu zeleniny nebo ovoce, snižuje výrazně riziko těchto onemocnění. Nejsilnějšími antioxidanty se ukázaly plody šípku, višně, divoké borůvky, černého rybízu, divokých ostružin (4) (5).

3.1.2 Chemická struktura

Podle chemické struktury se jedná o terpeny neboli isoprenoidy. Podstata molekuly spočívá ve vzájemně vázaných pětiuhlíkových isoprenových jednotkách, převážně v *trans*-konfiguraci (Obrázek 1). Existují v menší míře v postavení *cis*-. Podle počtu jednotek se terpeny dělí na monoterpeny (C₁₀), seskviterpeny (C₁₅), diterpeny (C₂₀), sesterterpeny (C₂₅), triterpeny (C₃₀), tetraterpeny (C₄₀) a polyterpeny (C_{5n}).



Obrázek 1: Isoprenová jednotka (6)

Terpeny se rozdělují na tři důležité skupiny:

a) *Karoteny*

Skupina zahrnuje několik příbuzných sloučenin, které mají obecný vzorec $C_{40}H_{56}$. Jedná se o jednochuchý typ karotenoidu, který se vyskytuje v několika isomerických formách jako je alfa (α), beta (β), gamma (γ), delta (δ), epsilon (ϵ) a zeta (ζ). Alfa a beta karoteny jsou dvě hlavní formy. V lidském těle je betakaroten štěpen ve sliznici tenkého střeva pomocí betakaroten dioxygenázy do dvou retinových molekul, které se později redukují na vitamín A. Přirozeně se vyskytuje v *trans* formě. Méně v *cis* uspořádání. V pořadí *all-trans* > *9-cis* > *13-cis* > *15-cis*.

Převládá nepolární charakter molekul. Jsou to tedy lipofilní látky a rozpouštějí se v nepolárních rozpouštědlech (2).

b) *Lykopeny*

Lykopeny jsou acyklicé karotenoidy s otevřeným uhlovodíkem s přímým řetězcem sestaveným z 11 konjugovaných a dvou nekonjugovaných dvojných vazeb. Lykopen nemá aktivitu provitaminu A, protože neobsahuje beta ionický kruh, který je základ pro strukturu vitamínu A.

c) *Xantofyly*

Xantofyly jsou oxidované deriváty karotenů. Mají obecný chemický vzorec $C_{40}H_{56}O_2$. Obsahují hydroxylové skupiny a jsou více polární než karoteny (7).

Podle funkce v rostlinách je můžeme dozdělit na:

- Primární, které jsou spolu s chlorofylem obsaženy v chloroplastech a chrání rostlinu před škodlivým ultrafialovým zářením a podílejí se na fotosyntéze a fototropismu. Z toho vyplývá, že jsou nejvíce zastoupeny v metabolicky aktivních listech. Fototaxí zachycují světelnou energii ve spektru 450-750 nm. Tuto roli přebírají hlavně xantofyly lutein, neoxanthin, violaxanthin a méně β -karoten. Takové karotenoidy nejsou v listech moc viditelné a objevují se až po odbourávání chlorofylu během podzimu (2) (1).
- Sekundární, které primárně slouží rostlině k přilákání opylovačů a roznašečů semen. Ty musí pak být na rostlině vidět a zbarvují květy a plody.

Nejznámějšími karotenoidy jsou:

1. bezkyslíkaté karoteny, které jsou nejvýznamějšími provitaminy vitamínu A,
2. kyslíkaté xantofyly, hlavní zástupce lutein, violaxanthin, neoxanthin a kryptoxanthiny. Doprovázejí chlorofyl (např. v listové zelenině),
3. rozšířený lykopen, červeně zbarvený (rajčata-Solanum lycopersicum, šípky-Rosa canina, vodní meloun- Citrullus lanatus),
4. zeaxanthin, žlutý barvivo kukuřice (Zea mays),
5. kapsaicin, barvivo červených paprik (Capsicum annum) (7)

Dvojně vazby vytvářejí tzv. konjugovaný systém. Karotenoidy obsahující více než sedm konjugovaných dvojných vazeb se řadí mezi látky s větší antioxidační kapacitou. Jsou to tzv. chromofory, které absorbují světlenou energii. Oxidací karoteinody přecházejí na výše uvedené xantofyly (8) (7).

3.1.3 Výskyt

Doposud bylo izolováno více než 600 karotenoidů. Karotenoidy syntetizují rostliny a některé mikroorganismy, u většiny živočichů se již jen ukládají nebo chemicky přetváří. Přibližně 50 jich bylo nalezeno v lidské stravě a 20 bylo identifikováno přímo v plasmě a lidských tkáních.

Většina karotenoidů se vyskytuje v přírodě jako estery několika mastných kyselin, které vznikají při zrání plodů esterifikací. Tento efekt může ovlivňovat intenzitu barvy (8) (7).

Ve stravě jsou vázány v komplexu s bílkovinami nebo uspořádány do krystalické podoby. Zahřátím se nejspíš zlepšuje biologická dostupnost tím, že se tyto komplexy rozkládají, jak bylo pozorováno u lykopenu ve vařených a syrových rajčatech (8) (5).

3.1.4 Metabolismus

Do metabolismu retinoidů spadají všechny chemické přeměny, transport po organismu a působení na buňku.

Nejdůležitější funkce karotenoidů je jejich přeměna v těle na vitamín A neboli retinol (aktivní forma vitamínu A). Betakaroten je nejdůležitější provitamin A, hlavně kvůli jeho výskytu v rostlinných potravinách a jeho největší aktivitě (9).

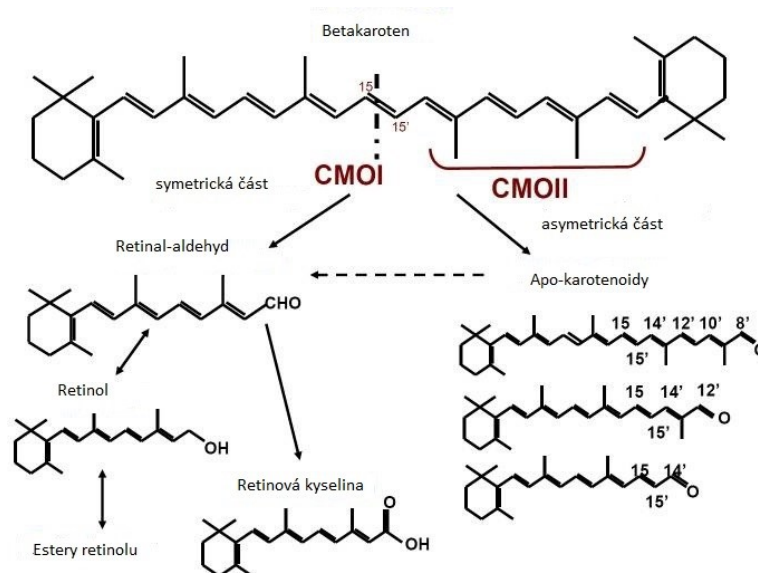
Metabolismus karotenoidů začíná po vstřebání do systému. Molekula betakarotenu se rozštěpí buď symetricky:

působením enzymu *15,15-oxygenázy* (CMOI), vytvoří se dvě molekuly retinal (aldehydu, náš hlavní pigment zraku). Retinal se poté může oxidovat za vzniku kyseliny retinové (esenciální metabolit) nebo může být redukován *retinaldehydreduktázou* a NADPH na retinol, který se dále převádí na ester retinolu. Estery retinolu jsou ze střeva transportovány v chylomikronech přes lymfatický systém do krevního oběhu. Tam se z nich stávají chylomikronremnanty, které jsou i s retinolem vychytávány játry. V játrech je ukládán do zásoby jako ester v lipocytech pravděpodobně jako lipoglykoproteinový complex. V případě potřeby může být zaktivován a transportován ve formě konjugátu s bílkovinou. In vivo 95% retinoidů pocházející z betakarotenu vzniká touto cestou.

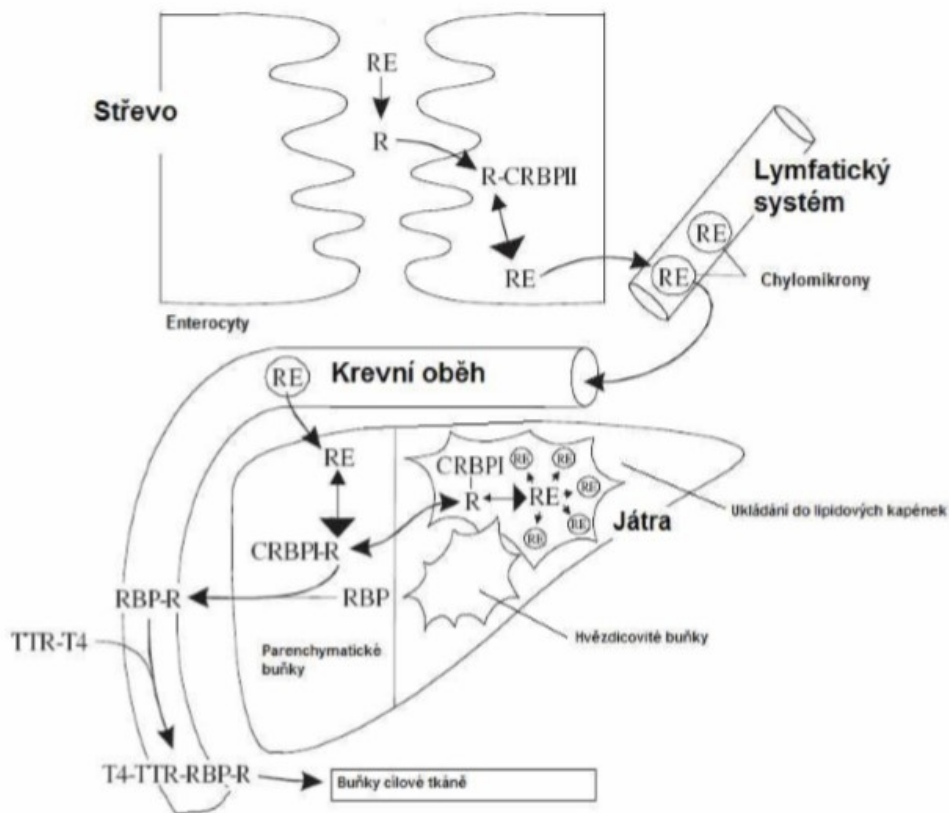
Nicméně betakaroten se může také štěpit asymetricky:

působením enzymu *9', 10'-oxygenázou* (CMOII) na apokarotenoidy, které mohou být metabolizovány na retinal zkrácením řetězce. Tímto způsobem vznikne z jedné molekuly betakarotenu jedna molekula retinal-aldehydu.

Nejdůležitějšími produkty metabolismu jsou retinal a kyselina retinová. Existuje ve dvou izomerních formách. Podílí se na regulaci diferenciaci imunitního systému a energetického metabolismu. Taktéž funguje jako antioxidant poskytující ochranu proti degenerativním nemocím včetně kardiovaskulárních onemocnění a rakoviny (7) (10) (9) (11) .



Obrázek 2: Metabolismus betakarotenu (11)

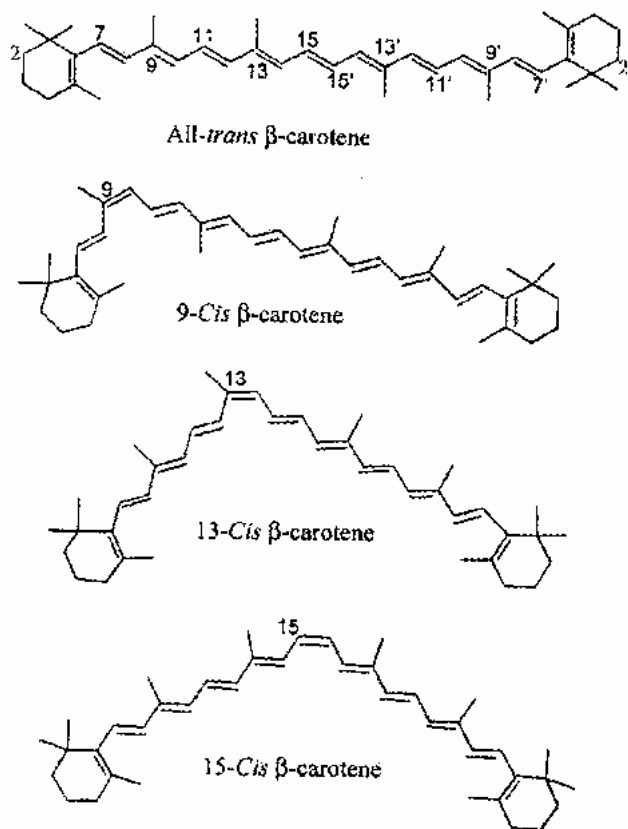


Obrázek 3: Betakaroten v těle (12)

3.1.5 Izomery betakarotenu

Většina karotenů je v přírodě v *trans* formě, což je molekulárně identické k synteticky vytvářenému *all-trans* betakarotenu. *All-trans* betakaroten může izomerizovat pokud je vystavený zahřívání (jakmile jsou teploty dostatečně vysoké k indukci rozpouštění krystalických struktur betakarotenu), sušení, kyselinám, enzymům a světlu, jak je popisováno v mnoha studiích (13) (14) (7) (15) (16) (17).

Izomerů betakarotenu je celá řada. Každá dvojná vazba v uhlíkovém řetězci existuje ve formě *cis* (*7-cis*, *9-cis*, *11-cis*, *13-cis*, *15-cis*, *di-cis* formy) nebo *trans*. *Cis* konfigurace patří mezi méně stabilní než *trans*. *Cis* izomery jsou více polární a mají menší schopnost krystalizovat. Isomery *all-trans*, *9-cis* *13-cis* a *15-cis* byly identifikovány v různých koncentracích jak v potravinách tak v lidské plazmě. Naopak čerstvé mrkve, rajčata a sladké brambory neobsahují žádný z *cis* izomerů. 98 % betakarotenu, který je obsažený v mrkvi představuje *trans* forma (7).



Obrázek 4: Nejčastější formy betakarotenu (18)

3.1.5.1 Vlastnosti izomerů

Přesmyknutím na jiný isomer se může měnit antioxidační aktivita, absorpce a s tím související aktivita provitaminu A. Např. *all-trans* betakaroten je silnější antioxidant než 13-*cis* betakaroten. 9-*cis* karoteinody jsou hůře absorbovány nebo jsou absorbovány prostřednictvím různých mechanismů (8) (19) (7) (20).

3.1.5.2 Vznik izomerů podle podmínek

Množství *cis* formy v potravinách se zvyšuje při zpracování a zahřívání. Převládající produkty isomerizace jsou 13-*cis* betakaroten a 9-*cis* betakaroten. Konkrétně 13-*cis* betakaroten je hlavním produktem geometrické izomerizace. 13-*cis* alfa a betakaroten se vytváří během skladování, zatímco 9-*cis* betakaroten vzniká při vystavení světelnému záření (7).

Zajímavostí je, že tepelným zpracováním červeně nebo oranžově zbarvených potravin se vytváří více 13-*cis* betakarotenu. Naproti tomu osvětlováním vzniká převážně 9-*cis* betakaroten. Jinak je tomu za situace, kdy se pracuje se zeleně zbarvenou zeleninou nebo ovocem. Tam v obou případech je hlavním produktem 9-*cis* betakaroten. Po vystavení světlu

čisté karotenoidy vykazovaly mnohem lepší světelnou stabilitu než v přítomnosti chlorofylu. Je zřejmé, že pigmenty jako jsou chlorofyly, působí senzibilizačně na rozklad a izomerizaci. Podobně kyselina chlorogenová zvyšuje rychlost izomerizace *trans* betakarotenu (21).

Také není podmínka, že se *cis* forma musí přetvářet na *trans*. Opačný proces se odehrává v lidském střevě, kde se forma *cis* přetváří na *trans*. Takto vzniklá izomerizace je nejběžnějším problémem artefaktů v analýze karotenoidů (8) (22) (23).

3.1.5.3 Syntetická vs přírodní forma betakarotenu

Epidemiologické průzkumy a intenzivní výzkumné studie ukázaly, že *betakaroten* z řasy mikroalga *Dunaliella* se liší od syntetického betakarotenu v jeho složení izomerů a biologických účincích. Například syntetický betakaroten může být ve vysokých dávkách promotor rakoviny, zatímco přírodně se vyskytující betakaroten je uznáván jako ochranná látka proti rakovině, psoriáze, kardiovaskulárním retinálním a jiným degenerativním onemocněním (24) (25) (26) (27) (28).

Neustálé debaty ohledně rozdílů mezi syntetickými nebo přírodně získanými karotenoidy rozhoduje fakt týkající se metabolismu *cis* izomerů. Syntetický betakaroten neobsahuje *cis* formu. Narozdíl od přírodních betakarotenů z ovoce a zeleniny, kde obsahují kromě *trans* formy i *cis*, (*9-cis* betakaroten a *13-cis* betakaroten). Konkrétně *9-cis* forma hraje ovšem klíčovou roli v metabolismu (2) (29).

Retinová kyselina je hlavní molekula řídící signální dráhu, která reguluje širokou škálu biologických procesů. Retinová kyselina je ligand dvou tříd nukleárních receptorů. Receptorů kyseliny retinové (RAR) a retinoidních X receptorů (RXR). *All-trans* betakaroten je prekurzor *all-trans* retinové kyseliny, která se přednostně váže na RAR receptory, zatímco *9-cis* betakaroten je prekurzorem *9-cis* retinové kyseliny, který preferuje vazbu na RXR receptory (30) (31).

Absorpce betakarotenu a jiných karotenoidů ze zeleniny je většinou 5-30 % absorpce vůči syntetickému betakaroten. Je to díky potravinové matici obklopující betakaroten. Tato matrice vytvořená z vlákniny nebo proteinů musí být nejdříve narušena žvýkáním a trávicími enzymy (8).

Podrobnosti budou uvedeny později v kapitole 3.5.

3.2 Izomerie

Izomerie je nedílnou součástí organické chemie. Je obecně známo, že existují molekuly, které mají stejné složení, stejný sumární vzorec. Sumární vzorec udává pouze druh a počet atomů obsažených v molekule. Molekuly o stejném sumárním vzorci, jejichž atomy se liší posloupností nebo prostorovým uspořádáním se nazývají izomery a svými fyzikálními i chemickými vlastnostmi jsou rozdílné.

Rozdělujeme izomery na:

- Strukturní
- Prostorové - stereoizomery

3.3 Konstituce vs. konfigurace

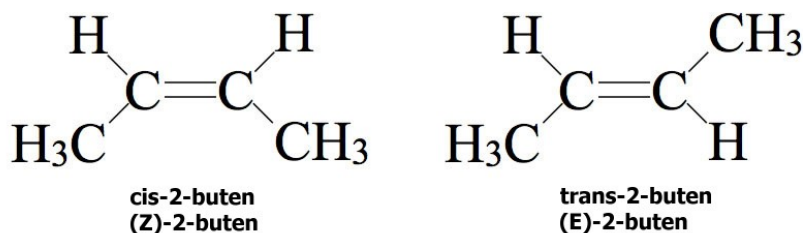
Charakterizace molekul pomocí atomů spojených vazbami s konkretizací charakteru vazeb vyjadřuje konstituci molekul. Pokud je vystiženo i prostorové uspořádání s odhlédnutím od prostorových změn způsobených volnou otáčivostí kolem jednoduchých vazeb, mluvíme o konfiguraci.

Rozdělujeme:

- Geometrická izomerie
- Optická izomerie

3.3.1 Geometrická izomerie- konfigurace na dvojně vazbě

Atomy dvou uhlíků vázaných dvojnou vazbou leží v jedné rovině, svírají úhel 120° a nejsou volně pohyblivé, např. ethylen. Takovému uspořádání se říká geometrická prostorová izomerie. Prostorové izomery na dvojně vazbě mezi atomy uhlíku se označují *cis*, pokud substituenty na obou sousedních atomech uhlíku vytvářejících dvojnou vazbu směřují na její stejnou stranu. Pokud je tomu opačně a jejich orientace je protilehlá, tak mají označení *trans*. Novější způsob označení je systém Z/E z německého jazyka. Z označení odpovídá staršímu *cis* (zusammen) a E odpovídá staršímu *trans* (endgegen) (32) (33).



Obrázek 5: Izomerie na dvojně vazbě

Jak bylo výše zmíněno, stereoizomery mají rozdílné fyzikální a chemické vlastnosti. To můžeme pozorovat na účinnosti některých léčiv. Geometrické izomery např. vitamínu A (retinolu) mají konfiguraci všech vazeb v *trans* uspořádání. U jiných izomerů, které se liší v jedné nebo ve dvou možných polohách, jsou molekuly méně účinné (32).

3.4 Višně a jejich potenciál pro společnost

Chronické nepřenositelné nemoci jako kardiovaskulární onemocnění, rakovina, obezita a diabetes jsou nejčastější příčiny úmrtí moderní civilizace. Vyskytují se nejčastěji díky špatnému stravování. Zlepšením skladby jídla v podobě vyvážené stravy (pestrost - více ovoce a zeleniny ve stravě) je možné snížit četnost onemocnění (34).

Díky analytické a kontrolní studii byla potvrzena korelace mezi příjmem ovoce a zeleniny bohaté na karotenoidy a výskytem kardiovaskulárních onemocnění. Početné retrospektivní epidemiologické studie prokázaly inverzní vztah mezi hladinami karotenoidů ve stravě a výskytem specifických nádorů. Mnoho laboratorních studií a studií na zvířatech ukázaly také značnou schopnost karotenoidů potlačovat růst nádorových buněk a progresi karcinogeneze (8).

Na základě dosavadních studií byla prokázána závislost mezi konzumací ovoce v prevenci a léčbě obezity, diabetu a kardiovaskulárních onemocnění. Ovoce je charakteristické vysokým obsahem polyfenolů a vysokou antioxidační aktivitou. Navíc stimuluje inzulínovou sekreci, redukuje glykémii, snižuje krevní tlak, cholesterol v krvi a triglyceridy. Jako potenciální zástupce z pohledu zdravotní prospěšnosti vychází nejlépe plody višně (35) (36) (37).

Také višním podobné třešně nebo jejich zpracování v džusu, vede k významnému snížení systolického i diastolického krevního tlaku a srdeční frekvence u hypertenzních

subjektů, stejně jako ke snížení biomarkerů, které se u zdravých lidí vyskytují v průběhu zánětlivého onemocnění (38) (39) (40).

Právě výtažky z třešní vykazují antioxidační vlastnosti jak v testu bez buněk, tak v buňkách. In vitro působí antiproliferační aktivitě proti lidským rakovinným buňkám z tlustého střeva (HT-29 a CT-15) a žaludku (MKN45) (41) (42).

Višně i třešně patří obecně do čeledi Rosaceae (Růžovité) a rodu Prunus (Třešeň). Mezi nejčastější zástupce patří Třešeň ptačí (*Prunus avium*) a Višeň obecná (*Prunus cerasus*). Oba jsou ovocné stromy s plody obsahující pecku, které se běžně pěstují všude po světě. To je příznivé pro lepší dostupnost a další zpracování (35) (36) (3).

3.5 Bioanalytické studie karotenoidů

Aplikace metody

Studie Luterotti et al, 2002 popisuje jako první aplikaci metody HPLC-TLS v oblasti lidské výživy. Zároveň byly sledovány geometrické izomery betakarotenu v různých rostlinných olejích pomocí HPLC-TLS a zavedena spolehlivá a jednoduchá metoda pro jejich rutinní detekci (19).

Vliv teploty během skladování:

Imsic a další se zabývali vlivem změny teplot při skladování vzorků mrkve. Jak bylo uvedeno dříve, mrkev je přirozeným zdrojem velkého množství betakarotenu. Přirozeně se vyskytující ve formě *trans*. Množství *cis* formy (13-*cis* a 9-*cis*) je v syrových mrkvích velmi malé. Přibližně kolem 1,8% z celkového množství betakarotenu.

Při skladování se sledoval úbytek 9-*cis* betakarotenu při jakékoliv teplotě, zatímco 13-*cis* betakaroten se při skladování v teplotě 4°C zvýšil na 109% po 56 dnech. Vaření výrazně zvýšilo množství 13-*cis* a 9-*cis* formy a vedlo k produkci 15-*cis* betakarotenu, který nebyl přítomen v syrové mrkvi.

Zkoušelo se také skladování při teplotě 4 °C po dobu 15 dnů a více před vařením. Tento postup způsobil nižší citlivost *trans* betakarotenu ve vzorcích na tepelnou izomerizaci při následném vaření. To vedlo k nižšímu vzniku všech tří *cis* forem betakarotenu.

Zatímco skladování při teplotě 20 °C po dobu až 21 dní mělo za následek výrazně vyšší hladiny *trans* betakarotenu před a po vaření. Na produkci *cis* izomerů nebyl prokázán žádný

vliv během vaření. Proto pro dosažení největšího zdravotního přínosu může být čerstvá mrkev skladována po dobu až 21 dní při 20 °C nebo při 4 °C po dobu až 56 dní bez významného snížení *trans* betakarotenu. Mrkev by poté měla být spotřebována syrová nebo vařená méně než 15 minut k omezení tvorby izomerů *cis* betakarotenu (43) (44).

Vliv teploty během analýzy:

Ve studii Cserhádi testoval rozdílnou teplotu kolon od 0 do 30° a vliv teploty na zastoupení *trans* a *cis* formy ve vzorcích. Pigmenty se většinou extrahovaly acetonem a/nebo methanolem, aby se tak zabránilo nechtěné zvýšené teplotě, expozici světlu a kyselosti (5).

Tabulka 1: Vliv teploty kolony na zastoupení izomerů betakarotenu (5)

Teplota (°C)	Retenční čas				
	Lykopen	(<i>E</i>)-β Karoten	9(<i>Z</i>)-β Karoten	13(<i>Z</i>)-β Karoten	15(<i>Z</i>)-β Karoten
+30	12.77	16.00	17.43	18.43	18.43
+25	16.21	19.19	21.28	22.13	22.13
+20	26.64	26.64	30.71	30.71	30.71
+15	41.47	36.03	41.47	41.47	41.47
+10	80.14	55.45	65.72	60.74	60.74
+5	159.04	86.99	105.44	92.13	86.99
0	293.73	133.25	164.16	133.25	124.27

Studie zabývající se izomerizací způsobené vlivem zahřívání pod zpětným chladičem ukázala, že degradace nastává u *all-trans*-betakarotenu na produkt 13-*cis* betakaroten (7).

Na základě struktury *all-trans* betakarotenu mohou být dvojně vazby přemístěny během zahřívání a mohou tak tvořit několik izomerů (45).

Vliv interakcí karotenoidů během analýzy:

Khachik a další (1988) popisují interakce mezi molekulami karotenoidů, dávkovaným rozpouštědlem a mobilní fází. Tyto interakce znázorní na HPLC píky, které mohou být následně špatně identifikovány jako nečistota nebo *cis* forma. K rozdělení HPLC pík nastává při dávkování *trans* karotenoidů do dichlormethanu, ale ne do dimethylketonu ve směsi methanolu, acetonitrilu, dichlormethanu a hexanu jako mobilní fází. Dalšími dávkovanými rozpouštědly, které nevedly k artefaktům v HPLC byly acetonitril, methanol a hexan, přičemž vznikly artefakty, které byly vytvořeny z methylenchloridu, chloroformu, tetrahydrofuranu, benzenu a

toluenu. Zkreslení výsledků by mohlo být zabráněno aplikací koncentrovaných vzorků v malém objemu (23).

Zkouška přidání antioxidantů k betakarotenu

K zabránění izomerizace se zkoušely přidávat k betakarotenu různé antioxidanty. Např. α - tokoferol a L-askorbová kyselina ve studii Jiang Yi. Na pokus byl *all-trans* betakaroten enkapsulován v nanoemulzi (olej ve vodě) a vystaven teplotě od 25-50°C za přítomnosti antioxidantů. V další studii byly skladovány vzorky pomerančového džusu při teplotě 4°C přes 10 dní. Výsledky naznačily, že kombinací s antioxidanty by se mohla významně zvýšit chemická stabilita betakarotenu (43) (44).

Metabolismus betakarotenu

Naproti tomu tři velké studie betakarotenu: Zkouška účinnosti betakarotenu a retinolu (CARET), Studie prevence rakoviny α -tokoferolu betakarotenu (ATBC) a Zdravotní studie lékařů (PHS) ukázaly na nedostatek účinku syntetického betakarotenu na snížení kardiovaskulárních onemocnění nebo vzniku rakoviny u zdravě se stravující populace až po zvýšený výskyt a mortalitu rakoviny plic u kuřáků (38).

Tamai podal 38 mužským dobrovolníkům buď 60 mg syntetický *all-trans* betakarotenu (100%) nebo 60 mg betakarotenu z řas (poměr *trans*: *cis* 50:50) po dobu 44 týdnů. Jeho vědecká skupina došla k závěru, že dobrovolníci, kterým byl podán syntetický betakaroten měli dvojnásobné množství betakarotenu v plazmě oproti dobrovolníkům, kteří dostali přírodní formu karotenoidů. Překvapivě skupina, která dostávala syntetickou formu karotenoidů potvrdila významně vyšší množství 9-*cis*- betakarotenu v plazmě, ačkoliv v podávaný karoten *cis* formu neobsahoval. Autoři dospěli k závěru, že izomerizace z *all-trans* formy na 9-*cis* formu pravděpodobně probíhá v těle během nebo po absorpci, a že 9-*cis* forma se kumuluje ve tkáních.

Další studie vyšla po roce. Skupina z Cornellovy university podávala v jedné dávce 1 mg *cis* betakaroten, který byl radioaktivně označený (99% *cis* betakaroten), třem zdravým dospělým. 95% *cis* betakarotenu bylo izomerizováno do *trans* betakarotenu nebo přetvořeno na retinol přecházejícího do krevního oběhu. Pomocí výpočtů odhadli, že přibližně 14-52% *cis* betakarotenu se přetváří pomocí izomerizace na *trans* formu.

Pozorovali taktéž absorpci označeného *cis* betakarotenu tím, že dodávali jednotlivou dávku neoznačeného *cis* betakarotenu ještě 8 měsíců dále. Výsledkem srovnávacích údajů byly tři významné body.

Jednak to byl první konečný důkaz, že *cis* betakaroten je izomerizován ve střevní výstelce na *trans* izomer ještě před absorpcí. Také konkrétně 13-*cis* betakaroten může být produkován ze všech *trans* karotenoidů ve významných množstvích: až 10% z celkového příjmu karotenoidů.

Za druhé autoři naznačují, že po podání *cis* betakarotenu se absorbuje a sekretuje větší množství *trans* betakarotenu do chylomikronů než po ekvivalentní dávce *trans* betakarotenu. Přičemž se zmiňují o skutečnosti, že *cis* izomer může být skutečně lépe absorbován, což je v rozporu s ostatními výzkumnými poznatky.

Za třetí, většina radioaktivně označeného retinolu produkovaného studovanými subjekty byla vyrobena z označeného *trans* isomeru spíše vyrobeného přímo z označené *cis* isomerní formy betakarotenu. To poukazuje na účinnější mechanismus produkce retinolu transformací betakarotenu. Došli k závěru, že proces izomerizace může sloužit jako kontrolní mechanismus pro výrobu 9-*cis*-retinolu.

Ačkoli 9-*cis* betakaroten (společně s 13-*cis* a 15-*cis* izomery nalezenými v potravinách a přirozeně se vyskytujícími látkách) může sloužit k důležitým funkcím v lidské fyziologii, které nelze nahradit syntetickým betakarotenu, důsledky použití syntézy *all-trans* betakarotenu jsou v tomto okamžiku neznámé (8).

3.6 Chromatografie

Chromatografické metody patří k hojně využívaným analytickým separačním metodám, které umožňují kvantitativní i kvalitativní hodnocení jednotlivých složek směsí.

3.6.1 Základní principy a rozdělení chromatografických metod

Chromatografie využívá dělení analyzovaných látek mezi dvěma nemísitelnými fázemi. První fáze je nepohyblivá - *stacionární* (nachází se v koloně nebo v plošné vrstvě) a druhá pohyblivá - *mobilní* (prochází systémem a unáší separované látky). V průběhu chromatografického procesu dochází k postupnému vytváření rovnováhy dělených látek mezi

těmito fázemi. K separaci dochází tedy na základě afinity jednotlivých dělených látek ke stacionární a mobilní fázi.

Chromatografické metody lze rozdělit podle:

- Charakteru mobilní fáze
 - plynová: mobilní fáze je inertní plyn
 - kapalinová: mobilní fáze je kapalina
- Podstaty separačního procesu
 - adsorpční
 - afinitní
 - gelová
 - iontově výměnná
 - rozdělovací

V této práci byla využívána vysokoúčinná kapalinová chromatografie – High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (46).

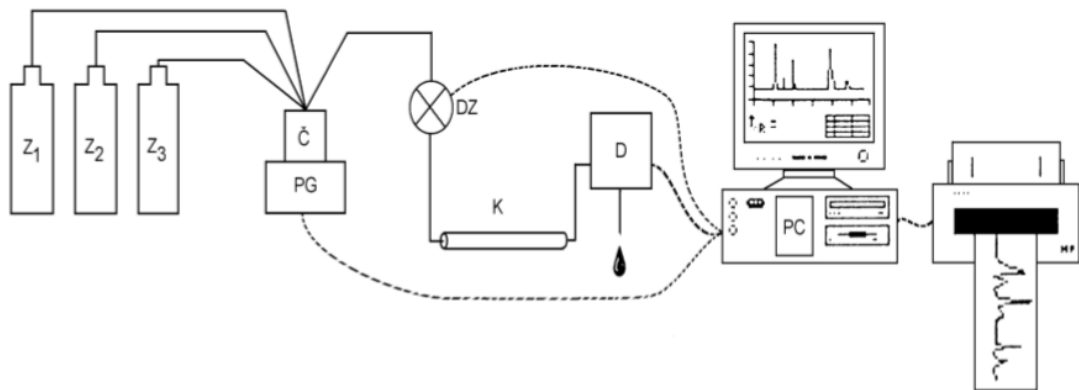
3.6.1.1 HPLC

HPLC je jedna z nejpoužívanějších analytických metod, která nachází využití v různých oblastech, např. v analýze léčiv, analýze potravin, v monitorování hladin, v kontrole léčiv atd.

Je vhodná jak ke kvalitativnímu, tak i kvantitativnímu hodnocení separovaných látek. Mezi její výhody patří hlavně rychlost a citlivost stanovení, minimální spotřeba vzorku a možnost automatizace.

HPLC lze rozdělit podle polarit mobilní a stacionární fáze na:

- Chromatografii na normálních fázích (NP) – jako stacionární fáze se využívá polární silikagel a jako mobilní fáze se používají nepolární rozpouštědla (heptan, hexan, atd.).
- Chromatografii na reverzních fázích (RP) – využívají se stacionární fáze, které jsou chemicky modifikované. Na inertní nosič (silikagel, oxid zirkoničitý, atd.) se chemickou vazbou nanese různé funkční skupiny (radikály). Podle typu radikálu jde buď o nepolární fáze (radikál obsahuje uhlíkaté řetězce – C8 až C18) nebo o středně polární fáze (radikál obsahuje tříuhlíkaté řetězce zakončené různými skupinami, které ovlivňují polaritu, např. -NH₂, -CN, atd.). HPLC je možno realizovat za konstantního složení mobilní fáze v průběhu celé analýzy, tzv. isokratická eluce. Pokud se během analýzy programově mění složení mobilní fáze, jedná se o gradientovou eluci.



Obrázek 6: Schéma kapalinového chromatografu (46)

- Zásobníky (Z1, Z2, Z3) mobilní fáze jsou nádoby vyrobené ze skla, kovu nebo plastu. Může být jeden nebo jich může být více. Mobilní fáze musí být odplyněna, buď použitím vakua, nebo probuláním inertním plynem (např. heliem). Nové sestavy mají zabudované degassery.
- Vysokotlaké čerpadlo (Č) tlačí konstantní průtokovou rychlostí mobilní fázi nastaveného složení přes kolonu do detektoru. V HPLC se používají dva typy čerpadel. Jedná se buď o vysokotlaká čerpadla, u kterých se složky mobilní fáze mísí až za čerpadlem, nebo o nízkotlaká čerpadla, která pumpují už smísenou mobilní fázi. Oba typy čerpadel ale pracují za vysokého tlaku (až 40 MPa).
- Programovací jednotka (PG) nastavuje požadované složení mobilní fáze.
- Dávkovací zařízení (DZ) umožňuje nadávkovat roztok vzorku na kolonu. Nové HPLC sestavy mají zabudované automatické dávkovače, tzv. autosamplery, které automaticky a přesně dávkují i malá množství vzorku.
- Na koloně (K) dochází k rozdělení směsi na jednotlivé složky, které jsou unášeny mobilní fází do detektoru. U nových přístrojů je kolona umístěna v termostatovaném prostoru, což zajišťuje stálou a regulovatelnou teplotu analýzy a tím i stabilní retenční časy.
- Detektor (D) registruje průtok mobilní fáze a složek směsi, a tento průtok převádí na vhodný signál do počítače, kde je softwarem dále zpracováván. Na typu detektoru závisí citlivost a také selektivita analýzy (46).

3.6.1.2 Charakteristiky HPLC procesu

Při běžné chromatografii protéká mobilní fáze kolonou stálou rychlostí. Vnesení určité látky na kolonu a její opuštění z kolony se zaznamená jako signál detektoru. Uplynutý čas průchodu látky kolonou je závislý na retenci látky v daném chromatografickém systému a tedy na jejím druhu (fyzikálně chemických vlastnostech). Protože tento čas charakterizuje retenci, zadržování látky v koloně (a tím současně i snadnost její eluce z kolony), označuje se jako retenční nebo eluční čas t_R . K eluci látky je zapotřebí, aby kolonou protekl určitý objem mobilní fáze. Také ten může látku charakterizovat jako tzv. retenční nebo eluční objem V_R . Eluci lze popisovat zcela rovnocenně jako časovou nebo objemovou závislost (47).

Pokud detektorem protéká čistá mobilní fáze (eluent), registruje zapisovač základní linii rovnoběžnou s osou x. Průchod zóny eluované látky detektorem vyvolá narůst a opětný pokles signálu detektoru a tomu odpovídající maximum na chromatogramu, označované jako „pík“.

Pokud by látka nebyla vůbec afinitní k použité stacionární fázi a postupovala kolonou stejně rychle jako samotná mobilní fáze, potom se její retenční čas označuje jako „mrtvý čas“ t_M . Poměr mrtvého retenčního času a retenčního času látky A se označuje jako retenční faktor R (může mít hodnotu 0 až 1): $t_M / t_R = R$.

Pro chromatografickou separaci je účelné, aby R bylo v rozsahu 0,2 až 0,8. Průběh píku představuje koncentrační profil zóny. Proto je plocha vymezená píkem nad základní linií („plocha píku“) úměrná množství látky v zóně a je základním údajem pro kvantitativní analýzu.

Měření plochy píku na chromatogramu se provádí jako součin jeho výšky a šířky v poloviční výšce. V dnešní době je výpočet plochy získáván převážně pomocí integračního software. Na základě zjištěných ploch píků se obsah látky ve vzorku určuje vždy relativně, tedy s použitím standardu o přesně známé koncentraci (12).

Při metodě vnějšího standardu je nezbytné dávkovat do kolony přesně definované množství vzorku. Plocha píku látky ve vzorku se srovnává s plochou píku standardu analyzovaného při totožných podmínkách. Pro sériová stanovení je účelné i pořízení kalibrační závislosti s použitím koncentrační řady standardů. Výhodou metody je, že vzorek i standard jsou jedna a táž látka, nevýhodou je pak nezbytnost přesného dávkování, které může být dokonce hlavním zdrojem chyb (47).

Naopak použitím metody vnitřního standardu se eliminuje chyba při přípravě vzorku a jeho dávkování na kolonu. Používá se látka o podobných fyzikálních a chemických vlastnostech, která se eluuje v jiném čase než analyty. Pokud je analyzován biologický materiál,

neměl by se vnitřní standard před jeho přidáním v materiálu vyskytovat. Koncentrace vnitřního standardu by se měla pohybovat ve stejném rozmezí jako analyt (12).

3.6.2 Možnosti stanovení betakarotenu pomocí HPLC

V současné době se pro stanovení karotenoidů využívá převážně vysokoúčinná kapalinová chromatografie s řadou obměn v separačních postupech. Vychází se z předchozí extrakce látek ze vzorku. V mnoha studiích se můžeme dočíst o validovaných metodách, pomocí kterých se provádí rutinní analýzy. K detekci slouží často univerzální UV/VIS detektory, které jsou vhodné z hlediska spektrálních vlastností betakarotenu (48).

Tabulka 2: Přehled vybraných HPLC metod pro stanovení karotenoidů

Chromatografická kolona	Mobilní fáze	Průtok [ml/min]	Detekce	Analyzovaný vzorek	Analyzované látky	Citace
RP-Amide (C16) (250 x 4.6 mm, 5 μm)	MeOH/ACN/ 2-propanol (54/44/2)	1	UV/VIS (DAD)	řasa <i>Dunaliella salina</i>	α - karoten, all- <i>trans</i> - β - karoten, 9- <i>cis</i> - β karoten, 13- <i>cis</i> - β karoten a 15- <i>cis</i> - β karoten	(49)
YMC C30 (250 x 4.6 mm, 5 μm)	Terciální gradient MeOH/MTBE/H ₂ O	1	UV/VIS 450 nm	Syrová a vařená mrkev (<i>Daucus carota</i>)	(13Z)- betakaroten, (15Z) betakaroten, (9Z) betakaroten, (all-E) betakaroten	(13)
YMC C30 (150 x 4,6 mm, 3 μm)	MeOH/MTBE	1	UV/VIS 450 nm	Biologické vzorky (postprandiální plazma, plíce)	Fytoen, fytofluen, lutein, zeaxantin, β -kryptoxantin, lykopen a alfa a betakroten	(50)
HxSil C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm)	(A) H ₂ O/HCOOH (99/1) (B) ACN/HCOOH (99/1)	1	HPLC/MS	6 druhů italských třešní (<i>Prunus avium</i>)	Hydroxyskořicové kyseliny, antokyany a flavan-3-dioly	(40)
Prevail C18 RP (150 x 4,6 mm, 5 μm)	(A)ACN/MeOH (95/5) (B)ACN/MeOH/ethylacetát (60/20/20) + 0,1 % BHT, 0,05 % TEA	1	UV/VIS 450 nm	Ovocné plody (jahody, maliny, borůvky, černý rybíz)	Lutein, zeaxantin, lykopen, β - kryptoxantin, alfa a betakaroten	(51)
Tracer Extrasil ODS- 2 (150 x 4 mm; 5 μm)	(A) MeOH (B) Milli-Q voda (C) butanol	2	UV/VIS (DAD)	Olivový olej	α , β , γ , δ - tokoferol, α - tokoferyl acetát, all- <i>trans</i> alfakaroten, 9- <i>cis</i> a 13- <i>cis</i> betakaroten	(52)

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiály a pomůcky

4.1.1 Chemikálie, standardy a vzorky

Před samotnou analýzou byly vzorky, standardy i pracovní roztoky skladovány v mrazícím boxu při teplotě -18 °C. A roztoky uschovány v nádobách z tmavého skla.

Podmínky byly nastaveny záměrně, aby se předešlo nechtěnému rozpadu materiálu (viz kapitola 3.5)

- Chemikálie: Methanol CHROMALSOLV for HPLC (Sigma Aldrich)
Tetrahydrofuran CHROMALSOLV for HPLC, gradient grade (Sigma Aldrich)
Acetonitril CHROMALSOLV for HPLC, gradient grade (Sigma Aldrich)
Chloroform p.a. stabilizovaný v 1% ethylalkoholu (PENTA)
Hydroxid draselný (Lachema)
Ultračistá voda
Hexan (Sigma Aldrich)
Butylhydroxytoluen (Sigma Aldrich)
- Standardy: Betakaroten 97,0 % (Sigma Aldrich)
Lutein 95% (Sigma Aldrich)

- Testované vzorky: *Rannaja*
Meteor
Krasnyj flag
Pandy 45
Muškatnaja pražskaja
Erdi jubileum

Griot Moskovskij

Valkova

Mesabich

Gorsetin

Inga mladi

Naumburger osheimer

Pandy 6039

Köröšská

Morellen fever

Wolyňská

Heimann's rubín

Višňa IV/155

4.1.2 Přístroje a podmínky separace

Chromatografický systém

Chromatograf:	Shimadzu 20AD Prominence Liquid Chromatograph
Detektor:	Shimadzu M20A Diode Array Detector
Kolony:	Ascentis® Express RP-Amide, 100 x 4,6 mm, 5µ částice (Sigma Aldrich)
Dávkování:	5 µl
Detekce:	470 nm
Mobilní fáze:	Acetonitril/Dichlormethan/Hexan 97,5/1,25/1,25
Průtoková rychlost:	1,8 ml/min
Vyhodnocení:	Chromatografický software LC Solution

4.1.3 Pomůcky

PTFE filtry o velikost pórů 0,45 µm

Analytické váhy (Sartorius analytic)

Ultrazvuková lázeň (BANDELIN SONOREX RK100)

Třepačka (Memmert), Pipety (BRAND)

Běžné laboratorní sklo a pomůcky

4.2 Příprava standardních roztoků

4.2.1 Příprava zásobního roztoku

Pro každou látku byl připraven zvlášť zásobní roztok. Navážili jsme 1,02 mg standardu *trans* betakarotenu a následně ho rozpustili v 1 ml chloroform ($c=1020$ mg/l). Dále jsme navážili standard luteinu 0,26 mg a taktéž rozpustili v 1 ml chloroform ($c=520$ mg /l). Vzniklé zásobní roztoky jsme uschovávali v tmavých vialkách uložené v chladicím boxu při -18°C .

4.2.2 Příprava roztoků pro kalibraci

Pracovní roztok o objemu 500 μl jsme připravili smícháním 50 μl zásobního roztoku betakarotenu, 50 μl zásobního roztoku luteinu a 400 μl chloroformu.

Z tohoto pracovního roztoku byly vytvořeny kalibrační roztoky podle Tabulka 3.

Tabulka 3: Příprava roztoků ke kalibraci

Pracovní roztok pro kalibraci	Koncentrace <u>betakarotenu</u> v pracovním roztoku pro kalibraci (mg/l)	Koncentrace <u>luteinu</u> v pracovním roztoku pro kalibraci (mg/l)	Objem hlavního pracovního roztoku doplněný <u>chloroformem</u> na objem 100 ml v odměrné baňce (μl)
1	25	12,5	25
2	20	10	20
3	15	7,5	15
4	10	5	10
5	5	2,5	5
6	2	1	2
7	1	0,5	1
8	0,5	0,25	0,5
9	0,25	0,125	0,25

4.2.3 Příprava vzorků pro stanovení obsahu betakarotenu a luteinu

Nejprve jsme vzorky višní vyndali z mrazícího boxu a 30 min je nechali rozmraznout při pokojové teplotě. Dále jsme plody zbavili pecek a v kádince je zhomogenizovali pomocí tyčového mixéru. Od každé odrůdy jsme navážili přibližně 8-10 g zhomogenizovaného materiálu do patnáctimililitrových plastových zkumavek. Následně jsme ke vzorku napipetovali 2 ml chloroformu a 3 ml demineralizované vody pro lepší oddělení nemísitelných fází a pro snadnější odběr organické fáze po předchozí extrakci.

Tímto způsobem připravené zkumavky byly intenzivně 30 sekund protřepávány a dále ponořeny na 15 minut do ultrazvukové lázně. Po ultrazvuku byla každá zkumavka vložena na 10 minut do centrifugy (rychlost 6 000 otáček/min). Po ustálení rozmezí hladin dvou nemísitelných kapalin s usazeninou na dně, jsme odebrali pomocí injekční stříkačky 500 μ l spodní chloroformové vrstvy do vialky a přes PTFE filtr zároveň přefiltrovali. Vzorky byly dále dávkovány autosamplermem do HPLC systému.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Vývoj metody

Optimalizace chromatografických podmínek byla převzata z předešlé diplomové práce Štěpána Růžičky 2017-Vývoj HPLC metody pro stanovení vybraných karotenoidů v ovoci (47).

Vlnová délka: 450 nm

Detector: DAD

Kolona: Supelco Analytical, Ascentis Expres RP-Amide, 100 x 4,6 mm, 5 μ částice

Mobilní fáze: acetonitril: hexan: dichlormethan v poměru 96,6 : 1,7 : 1,7, průtok 1,409 ml/min

Objem nástřiku: 5 μ l

Extrakční činidlo: chloroform

Tyto separační podmínky byly mírně upraveny vzhledem k přenosu na novější HPLC systém na mobilní fázi Acetonitril/Dichlormethan/Hexan 97,5/1,25/1,25, průtok 1,8 ml/min. Za těchto podmínek bylo také dosaženo lepšího rozlišení *cis* a *trans* betakarotenu v reálných vzorcích višni, které nebylo v přechozí diplomové práci řešeno.

5.2 Validace metody

5.2.1 Linearita

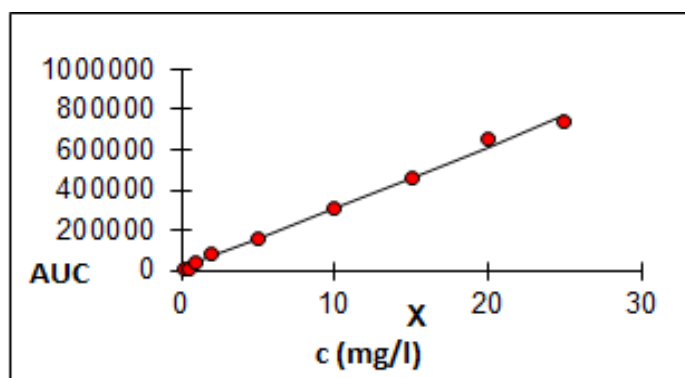
Linearitu použité analytické metody jsme zjišťovali u *trans* betakarotenu a luteinu. Vytvořili jsme si devět roztoků od každého standardu o různých koncentracích.

Byly provedeny 3 nástřiky od každé koncentrace. Průměry ploch pod píkem z jednotlivých nástřiků jsme použili pro pozdější výpočty. Vyhodnocení jsme provedli pomocí metody lineární regrese. Koncentrace a plochy píků jsou vyobrazeny v níže uvedených tabulkách (Tabulka 4, Tabulka 5).

Betakaroten:

Tabulka 4: Test linearity-betakaroten

Koncentrace (mg/l)	Plocha píku
0,25	4233
0,5	10867
1	38522
2	77965
5	158767
10	304188
15	458110
20	658220
25	737773



Obrázek 7: Graf lineární regrese-betakaroten

Regresní funkce: $y = kx + q$

Počet bodů $n = 9$

Směrnice $k = 30511,95 \pm 802,5556$

Absolutní člen $q = -5092,142 \pm 9938,998$

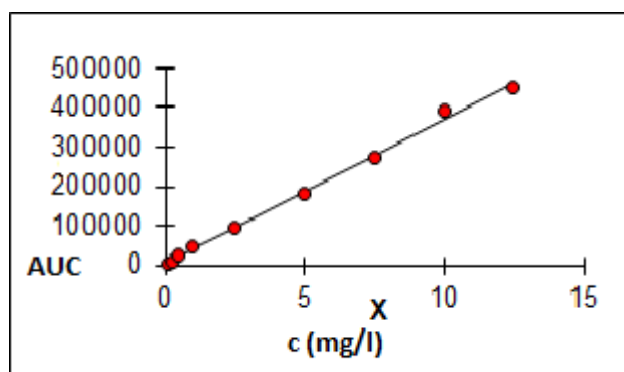
Korelační koeficient $R = 0,997587$

Reziduální odchylka $S_{rez} = 21100,5$

Lutein:

Tabulka 5: Test linearity-lutein

Koncentrace (mg/l)	Plocha píku
0,125	2198
0,25	6425
0,5	22658
1	45261
2,5	92267
5	180942
7,5	274179
10	393050
12,5	451136



Obrázek 8: Graf lineární regrese – lutein

Regresní funkce: $y = kx + q$

Počet bodů $n = 9$

Směrnice $k = 37016,31 \pm 799,5292$

Absolutní člen $q = -1177,622 \pm 4950,759$

Korelační koeficient $R = 0,998371$

Reziduální odchylka $S_{rez} = 10510,46$

5.3 Stanovení obsahu karotenoidů v odrůdách višní

Na základě výše popsané analytické metody jsme zjišťovali obsah betakarotenu (*cis* a *trans*) a luteinu v plodech 18 odrůd višní. Jelikož jsme neměli k dispozici standard zeaxantinu, nemohli jsme jeho obsah kvantitativně vyhodnotit jako tomu bylo u betakarotenu a luteinu. Stanovení obsahu bylo provedeno metodou vnějšího standardu.

Výsledný obsah karotenoidů v odrůdách višní byl vždy založen na vytvoření dvou navážek od každé odrůdy (podle kapitoly 4.2.3). Z chromatogramu byly získány plochy elučních křivek a následně vypočítány průměrné plochy píků od každého karotenoidu zvlášť. Poté jsme vypočítali množství stanovovaných karotenoidů v mg/l podle vzorce:

$$\frac{C_{Vz}}{C_{St}} = \frac{A_{Vz}}{A_{St}}$$

c_{Vz} je koncentrace stanovované látky

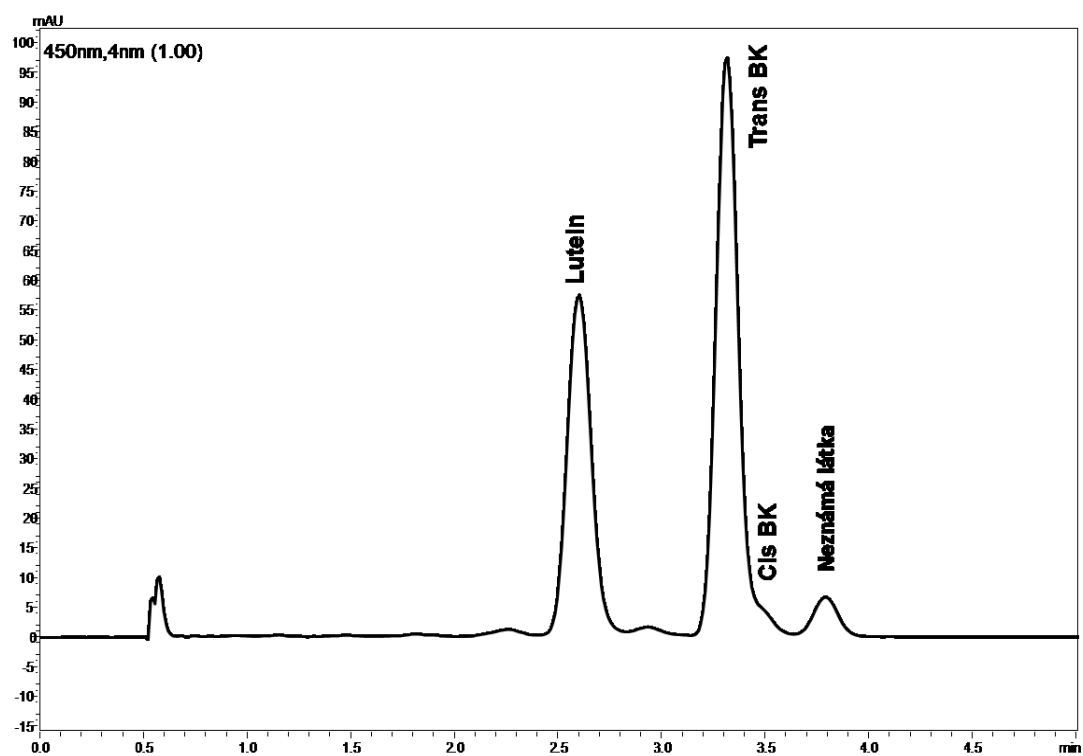
c_{St} je přesná koncentrace standardu podle přesné navážky a po korekci na čistotu standardu (karoten 97%, lutein 95%)

A_{Vz} je průměrná plocha píku stanovované látky přepočítaná na navážku

A_{St} je průměrná plocha píku standardu

Podle následujícího výpočtu jsme vyjádřili zastoupení jednotlivých druhů karotenoidů v $\mu\text{g}/100$ g plodů: Ze začátku jsme vypočítali obsah sledovaných karotenoidů v koncentračních jednotkách (mg/l) vztažených ke koncentraci připraveného standardu. Ten byl následně převeden na mg vydělením 500 (vzorek jsme extrahovali do 2 ml chloroformu). Výsledná hodnota byla dále vynásobena 100/ navážka, čímž jsme získali množství karotenoidů v mg/100 g. Závěrem, z důvodu nízkých koncentrací karotenoidů, jsme výsledek vynásobili 1000 a tím jsme hodnotu převedli na jednotky $\mu\text{g}/100$ g (μg karotenoidu/100 g ovoce). Obsahy *cis* a *trans* betakarotenu jsou vztaženy proporcionálně k ploše píku standardu celkového beta-karotenu. Níže jsou uvedeny příklady chromatografických záznamů jednotlivých měřených odrůd višní společně s vypočítanými obsahy:

5.3.1.1 Standard

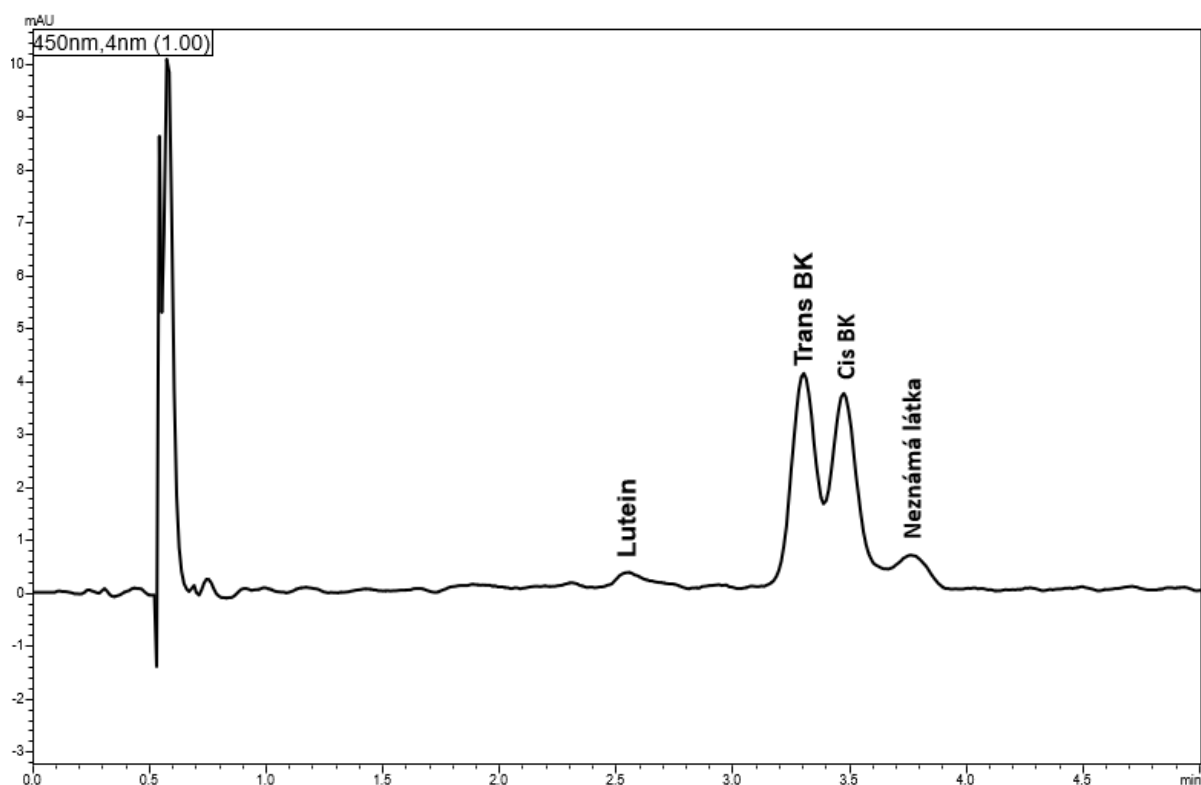


Obrázek 9: Chromatogram separace standardů za podmínek validované metody (kap. 5.1) (*trans* betakaroten+lutein)

Tabulka 6: Plochy karotenoidů v roztoku standardu odpovídající uvedeným koncentracím

Standard	A_{st}	C_{st} (mg/l)
<i>Trans</i> betakaroten	18118	0,9894
Lutein	1107	0,494

5.3.1.2 Rannaja



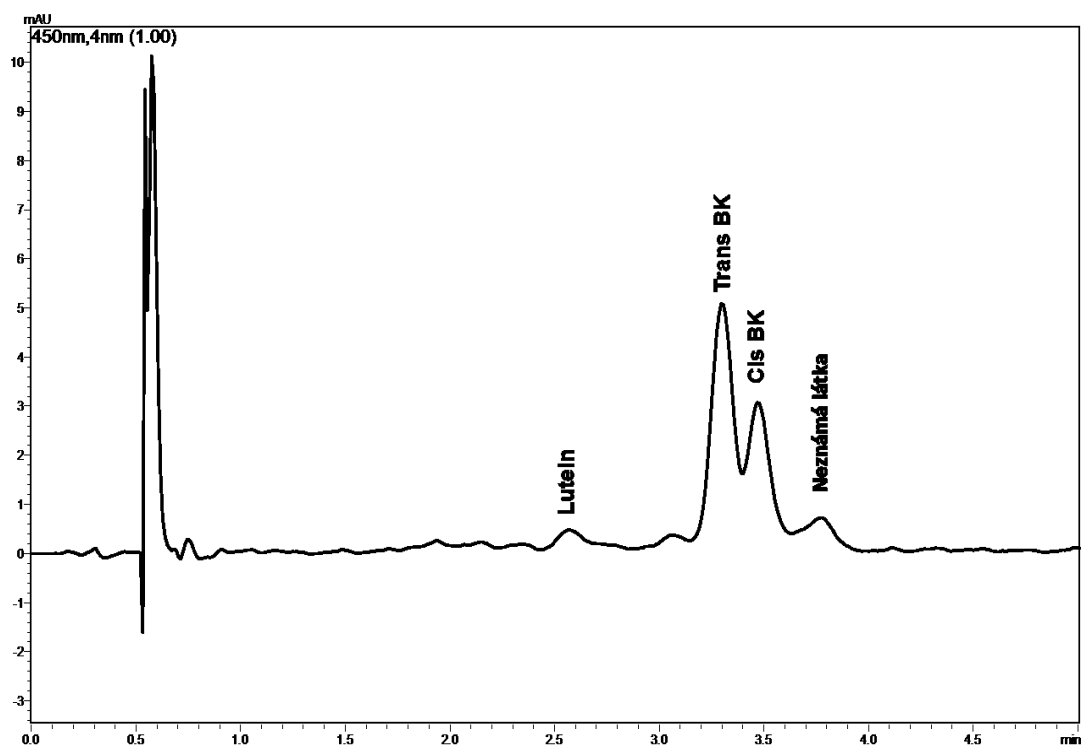
Obrázek 10: Chromatogram stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě *Rannaja*

Tabulka 7: Obsah karotenoidů v odrůdě *Rannaja*

<i>Rannaja</i>	A_{st}	c_{st} (mg/l)	A_{vz}	C_{vz} (mg/l)	($\mu\text{g}/100 \text{ g}$)
<i>Trans</i> betakaroten	18118	0,9894	29668	1,62	19,68
<i>Cis</i> betakaroten	18119	0,9894	29598	1,61	19,63
Lutein	11076	0,494	2828	0,13	1,53

V odrůdě višňi “*Rannaja*” bylo stanoveno *trans* betakarotenu 19,68 μg , *cis* betakarotenu 19,63 μg a luteinu 1,53 μg na 100 g plodů.

5.3.1.3 Meteor



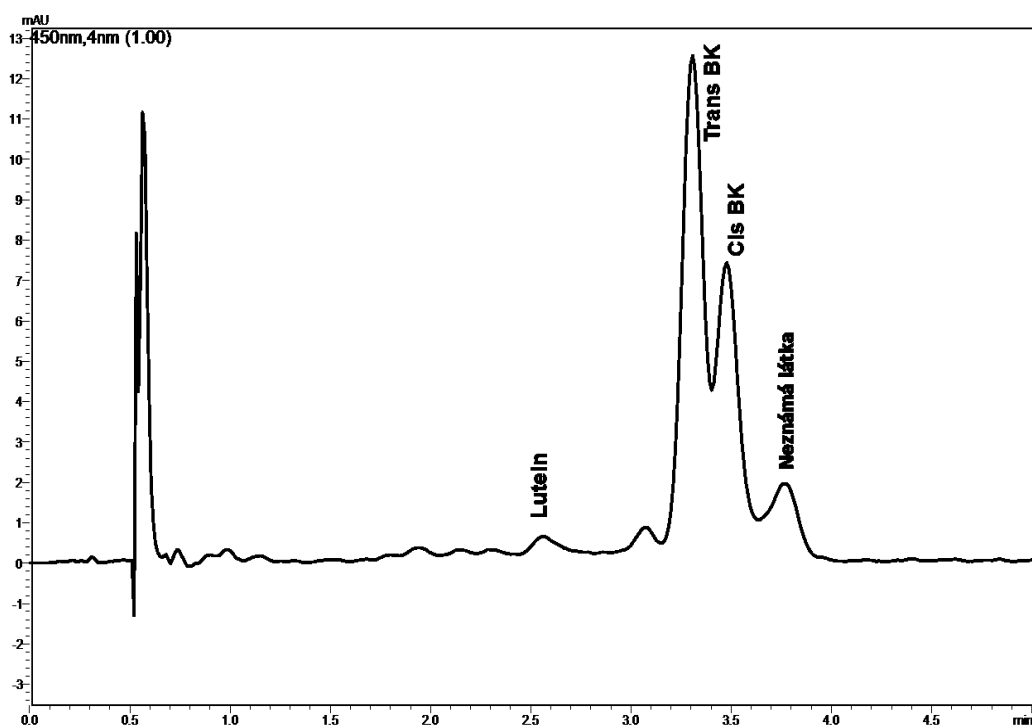
Obrázek 11: Chromatogram stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě *Meteor*

Tabulka 8: Obsah karotenoidů v odrůdě *Meteor*

<i>Meteor</i>	A_{st}	c_{st} (mg/l)	A_{vz}	C_{vz} (mg/l)	($\mu\text{g}/100\text{ g}$)
<i>Trans</i> betakaroten	18119	0,9894	34945	1,91	22,77
<i>Cis</i> betakaroten	18119	0,9894	21640	1,18	14,10
Lutein	11076	0,494	3665	0,17	1,95

V odrůdě višni “*Meteor*” bylo stanoveno *trans* betakarotenu 22,77 μg , *cis* betakarotenu 14,10 μg a luteinu 1,95 μg na 100 g plodů.

5.3.1.4 Muškatonaja pražskaja



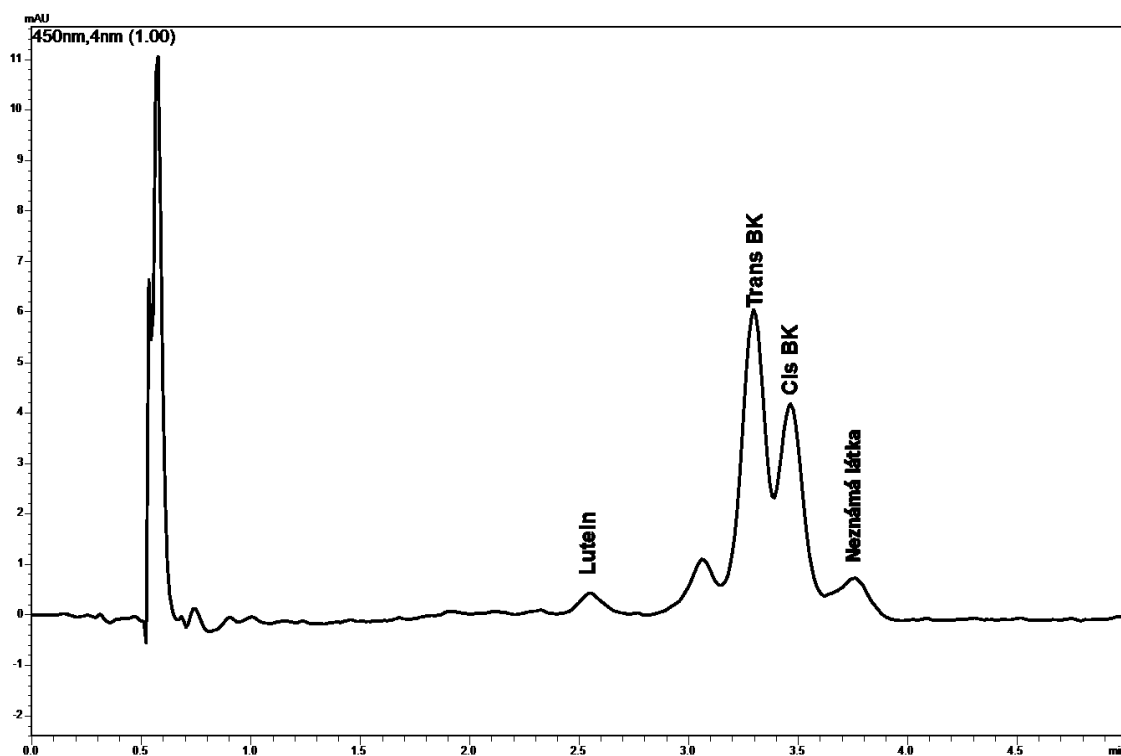
Obrázek 12: Chromatogram stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě *Muškatnaja Pražskaja*

Tabulka 9: Obsah karotenoidů v odrůdě *Muškatnaja Pražskaja*

<i>Muškatnaja Pražskaja</i>	A_{st}	c_{st} (mg/l)	A_{vz}	C_{vz} (mg/l)	($\mu\text{g}/100 \text{ g}$)
<i>Trans</i> betakaroten	26328	0,9894	15185	0,57	6,05
<i>Cis</i> betakaroten	26328	0,9894	8749	0,33	3,48
Lutein	15546	0,494	1262	0,04	0,42

V odrůdě višni “*Muškatnaja Pražskaja*” bylo stanoveno *trans* betakarotenu 6,05 μg , *cis* betakarotenu 3,48 μg a luteinu 0,42 μg na 100 g plodů.

5.3.1.5 Griot Moskovskij



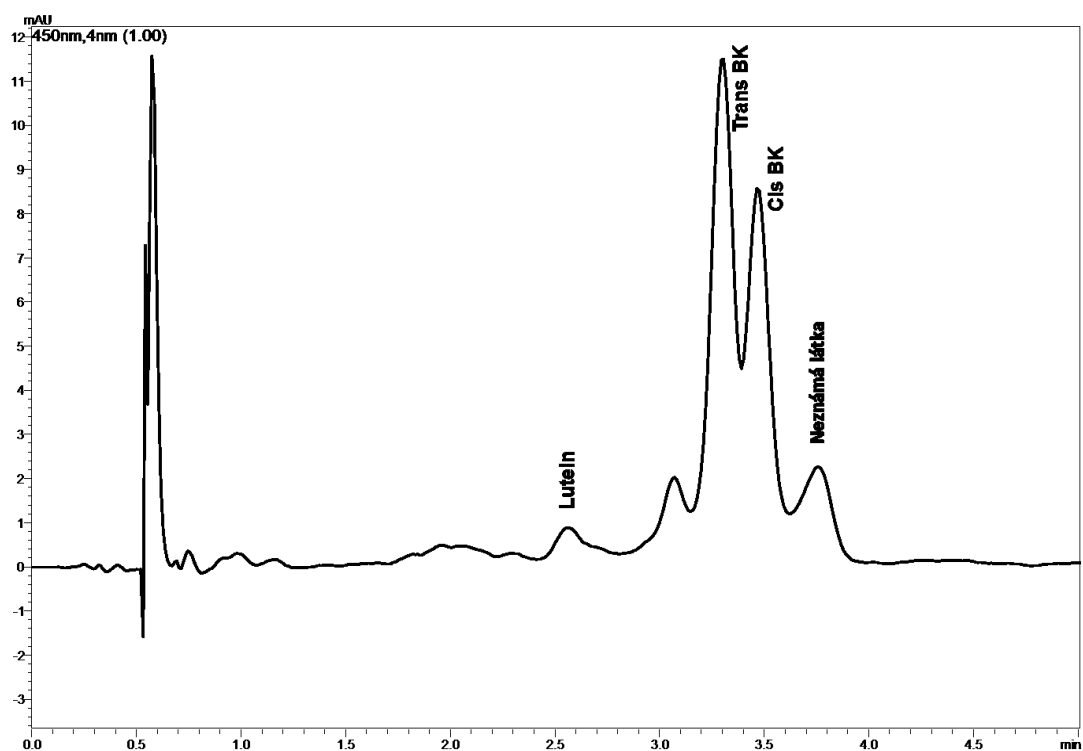
Obrázek 13: Chromatogram stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě *Griot Moskovskij*

Tabulka 10: Obsah karotenoidů v odrůdě *Griot Moskovskij*

<i>Griot Moskovskij</i>	A_{st}	c_{st} (mg/l)	A_{vz}	C_{vz} (mg/l)	($\mu\text{g}/100 \text{ g}$)
<i>Trans</i> betakaroten	26328	0,9894	35282	1,33	14,29
<i>Cis</i> betakaroten	26328	0,9894	24016	0,93	9,73
Lutein	15546	0,494	2973	0,10	1,02

V odrůdě višni “*Griot Moskovskij*” bylo stanoveno *trans* betakarotenu 14,29 μg , *cis* betakarotenu 9,73 μg a luteinu 1,02 μg na 100 g plodů.

5.3.1.6 Naumburger ostheimer



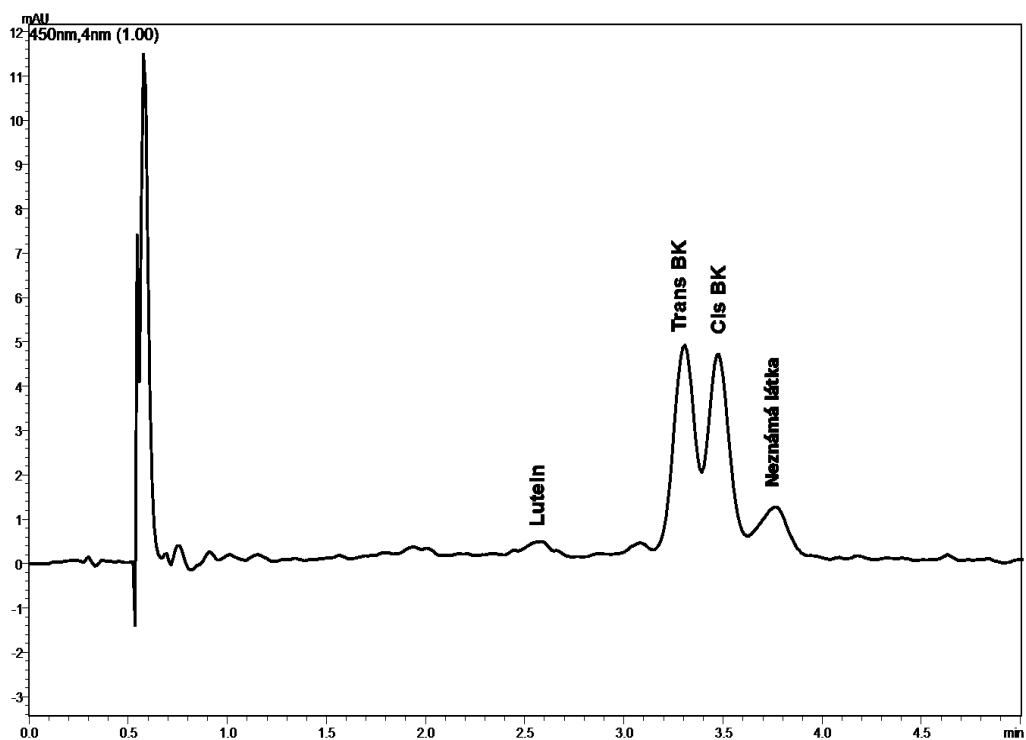
Obrázek 14: Chromatogram stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě *Naumburger ostheimer*

Tabulka 11: Obsah karotenoidů v odrůdě *Naumburger ostheimer*

<i>Naumburger ostheimer</i>	A_{st}	c_{st} (mg/l)	A_{vz}	C_{vz} (mg/l)	($\mu\text{g}/100 \text{ g}$)
<i>Trans</i> betakaroten	25976	0,9894	84058	3,38	38,34
<i>Cis</i> betakaroten	25976	0,9894	64179	2,41	28,90
Lutein	16556	0,494	8373	0,25	3,00

V odrůdě višni “*Naumburger ostheimer*” bylo stanoveno *trans* betakarotenu 38,34 μg , *cis* betakarotenu 28,90 μg a luteinu 3,00 μg na 100 g plodů.

5.3.1.7 Morellen fever SE 603



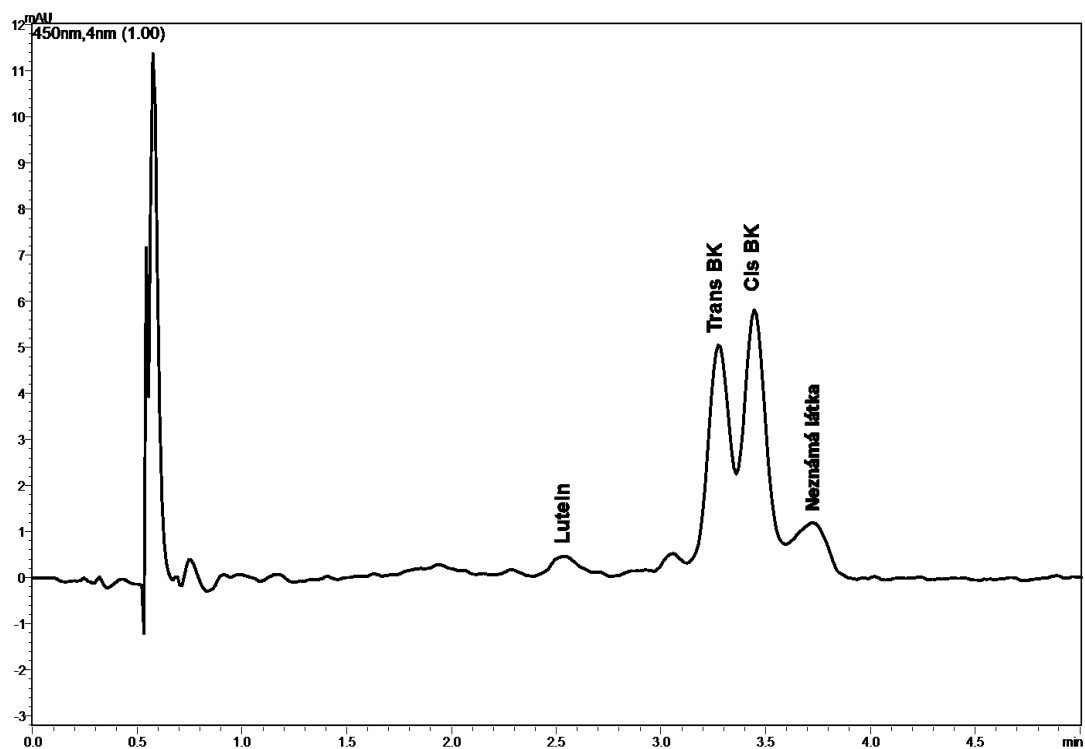
Obrázek 15: Chromatogram stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě *Morellen fever SE 603*

Tabulka 12: Obsah karotenoidů v odrůdě *Morellen fever SE 603*

<i>Morellen fever SE 603</i>	A_{st}	c_{st} (mg/l)	A_{vz}	C_{vz} (mg/l)	($\mu\text{g}/100 \text{ g}$)
<i>Trans</i> betakaroten	25976	0,9894	42237	1,61	18,12
<i>Cis</i> betakaroten	25976	0,9894	39666	1,50	16,79
Lutein	16556	0,494	2860	0,09	0,96

V odrůdě višni “*Morellen fever SE 603*” bylo stanoveno *trans* betakarotenu 18,12 μg , *cis* betakarotenu 16,79 μg a luteinu 0,96 μg na 100 g plodů.

5.3.1.8 Višňa IV/155 bez BHT



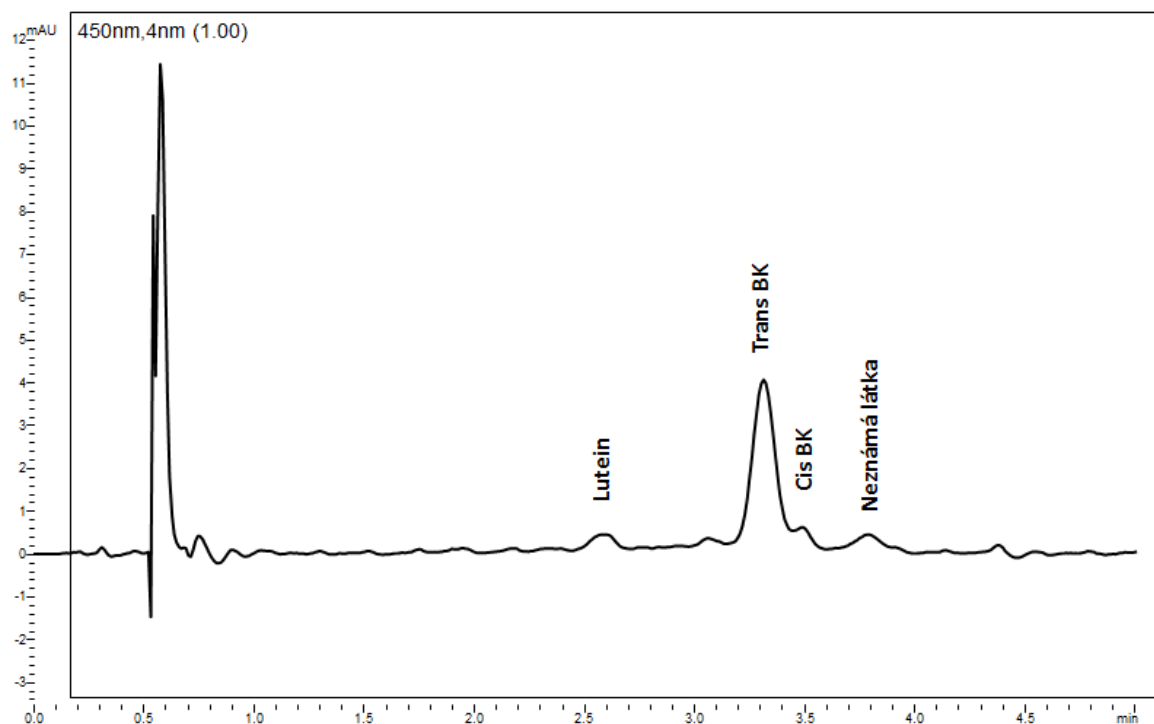
Obrázek 16: Chromatogram stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě *Višňa IV/155*

Tabulka 13: Obsah karotenoidů v odrůdě *Višňa IV/155*

<i>Višňa IV/155</i> <i>s BHT</i>	A_{st}	c_{st} (mg/l)	A_{vz}	C_{vz} (mg/l)	($\mu\text{g}/100\text{ g}$)
<i>Trans</i> betakaroten	25976	0,9894	45860	2,24	26,61
<i>Cis</i> betakaroten	25976	0,9894	51512	2,37	28,23
Lutein	16556	0,494	3566	0,12	1,47

V odrůdě višni “*Višňa IV/155*” bylo stanoveno *trans* betakarotenu 26,61 μg , *cis* betakarotenu 28,23 μg a luteinu 1,47 μg na 100 g plodů.

5.3.1.9 *Erdi jubileum*



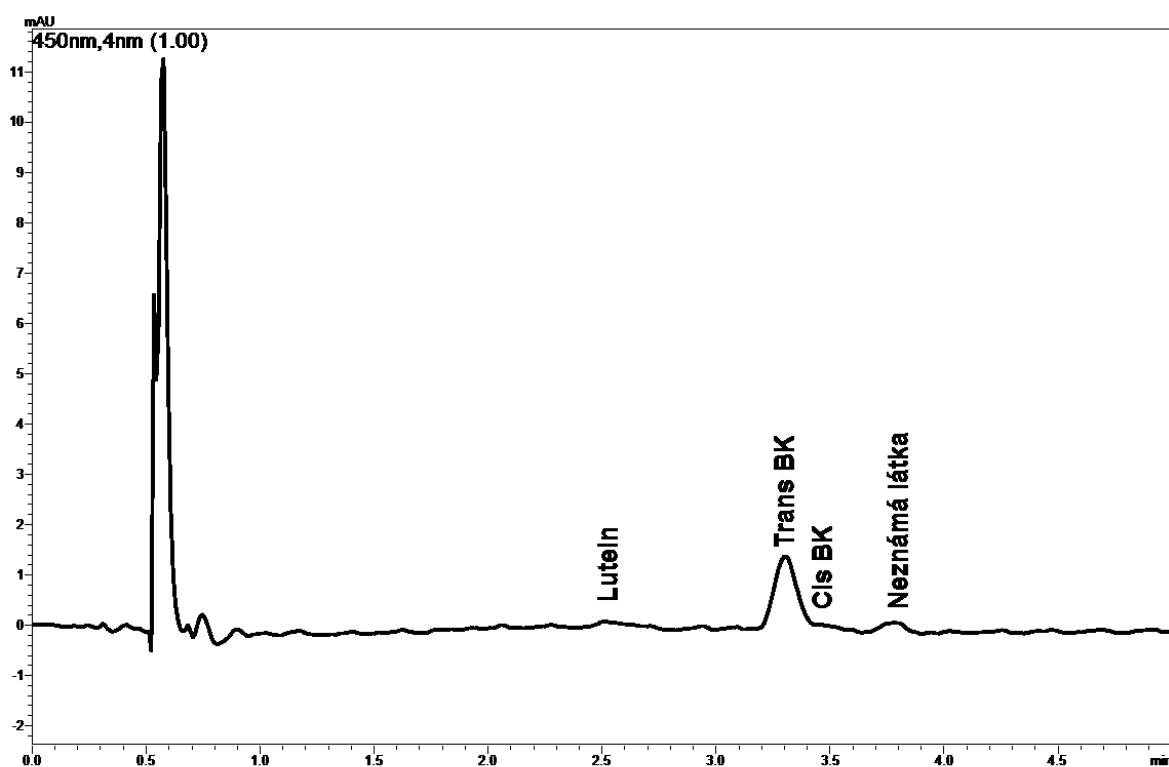
Obrázek 17: Chromatogram stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě *Erdi jubileum*

Tabulka 14: Obsah karotenoidů v odrůdě *Erdi jubileum*

<i>Erdi jubileum</i>	A_{st}	c_{st} (mg/l)	A_{vz}	C_{vz} (mg/l)	($\mu\text{g}/100\text{ g}$)
<i>Trans</i> betakaroten	26328	0,9894	18986	0,71	7,42
<i>Cis</i> betakaroten	26328	0,9894	1418	0,05	0,55
Lutein	15546	0,494	1434	0,05	0,47

V odrůdě višňi “*Erdi jubileum*” bylo stanoveno *trans* betakarotenu 7,42 μg , *cis* betakarotenu 0,55 μg a luteinu 0,47 μg na 100 g plodů.

5.3.1.10 Pandy 6039



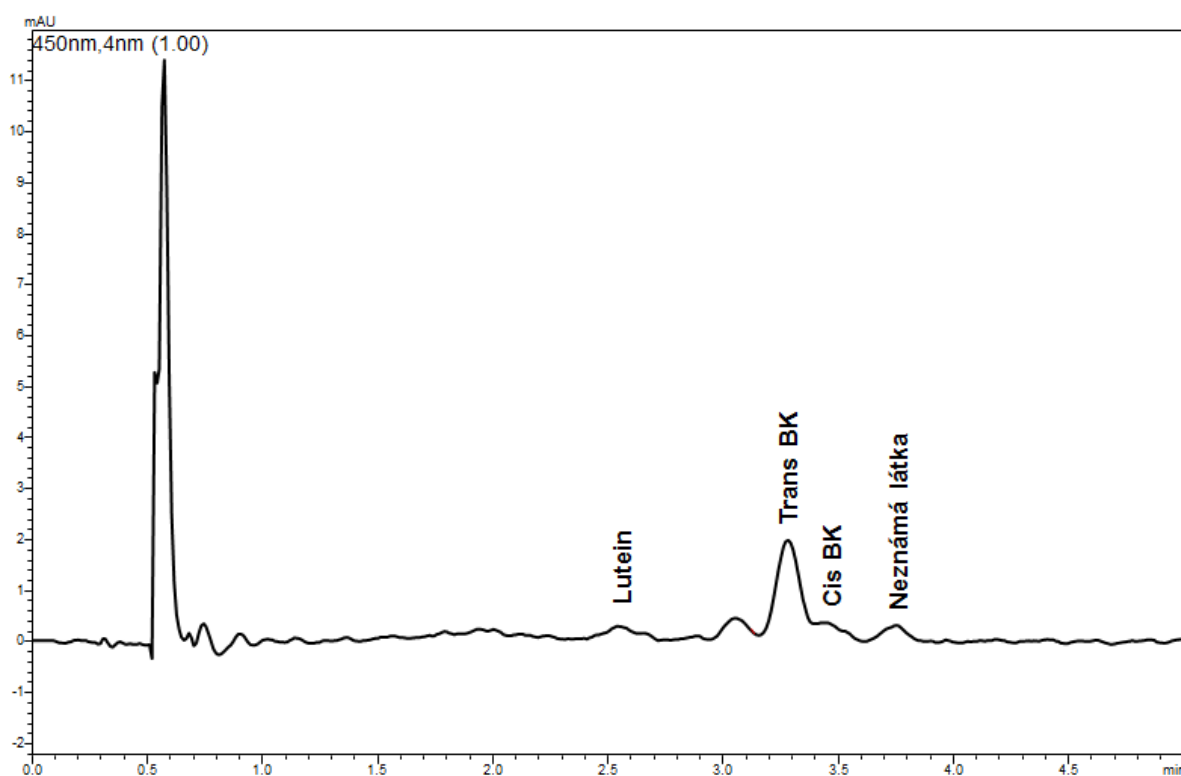
Obrázek 18: Chromatogram stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě *Pandy 6039*

Tabulka 15: Obsah karotenoidů v odrůdě *Pandy 6039*

<i>Pandy 6039</i>	A_{st}	c_{st} (mg/l)	A_{vz}	C_{vz} (mg/l)	($\mu\text{g}/100$ g)
<i>Trans</i> betakaroten	25976	0,9894	9342	0,36	3,74
<i>Cis</i> betakaroten	25976	0,9894	1291	0,05	0,51
Lutein	16556	0,494	1075	0,03	0,34

V odrůdě višni “*Pandy 6039*” bylo stanoveno *trans* betakarotenu 3,74 μg , *cis* betakarotenu 0,51 μg a luteinu 0,34 μg na 100 g plodů.

5.3.1.11 Heimann's rubín



Obrázek 19: Chromatogram stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě *Heimann's rubín*

Tabulka 16: Obsah karotenoidů v odrůdě *Heimann's rubín*

<i>Heimann's rubín</i>	A_{st}	c_{st} (mg/l)	A_{vz}	C_{vz} (mg/l)	$\mu\text{g}/100 \text{ g}$
<i>Trans</i> betakaroten	25976	0,9894	14216	0,54	5,74
<i>Cis</i> betakaroten	25976	0,9894	2064	0,08	0,99
Lutein	16556	0,494	2277	0,07	0,72

V odrůdě višně "*Heimann's rubín*" bylo stanoveno *trans* betakarotenu 5,74 μg , *cis* betakarotenu 0,99 μg a luteinu 0,72 μg na 100 g plodů.

6 DISKUZE

Hodnocení obsahu karotenoidů proběhlo vůči standardu o přímo definované koncentraci. Jak se ukázalo, tak nejvyšší hodnoty *trans* betakarotenu byly zjištěny u odrůdy *Gorsetin*, *Mesabich*, *Naumburger ostheimer*, *Meteor* a *Rannaja*. *Cis* betakarotenu u odrůdy *Gorsetin*, *Naumburger ostheimer*, *Višňa IV* a *Mesabich*. Lutein byl ve vzorcích detekován v poměrně menších koncentracích téměř na hranici limitu kvantifikace. Nejvyšší hodnoty dosahovaly koncentrace luteinu v odrůdě *Naumburger ostheimer*, *Meteor* a *Gorsetin*.

Můžeme říct, že nejvíce karotenoidů z celkových 18 testovaných odrůd bylo v *Gorsetin* a *Naumburger ostheimer* (viz Tabulka 17).

Tabulka 17: Výsledný přehled obsahu karotenoidů v jednotlivých odrůdách v µg na 100g plodů

Odrůda	Lutein	<i>cis</i> BK	<i>trans</i> BK	Množství celkových karotenoidů
<i>Gorsetin</i>	1,82	40,75	51,53	94,10
<i>Naumburger osheimer</i>	3,00	28,90	38,34	70,24
<i>Mesabich</i>	1,40	24,53	40,04	65,97
<i>Višňa IV/155 bez BHT</i>	1,47	28,23	26,61	56,31
<i>Višňa IV/155 s BHT</i>	1,18	21,32	19,23	41,73
<i>Rannaja</i>	1,53	19,63	19,68	40,84
<i>Meteor</i>	1,95	14,10	22,77	38,82
<i>Morellen fever</i>	0,96	16,79	18,12	35,87
<i>Griot Moskovskij</i>	1,02	9,73	14,29	25,04
<i>Krasnyj flag</i>	0,92	5,89	11,07	17,88
<i>Köröšská</i>	0,26	7,37	4,07	11,70
<i>Wolyňská</i>	0,70	4,77	6,59	12,06
<i>Muškatnaja pražskaja</i>	0,42	3,48	6,05	9,95
<i>Erdi jubileum</i>	0,47	0,55	7,42	8,44
<i>Pandy 45</i>	0,35	1,06	6,65	8,06
<i>Heimann's rubín</i>	0,72	0,99	5,74	7,45
<i>Pandy 6039</i>	0,34	0,51	3,74	4,59
<i>Valkova</i>	0,18	0,38	0,50	1,06
<i>Inga mladi</i>	0,44	0,22	0,16	0,82

Tyto odrůdy mohou být do budoucna doporučovány jako zdroj karotenoidů pro průmyslově zpracované ovoce.

Na základě dosavadních studií, které se zabývaly prospěšností *cis* betakarotenu pro organismus, je výhoda, že kromě *trans* betakarotenu obsahují višně i větší podíl méně vyskytujícího *cis* betakarotenu (34) (8).

Můžeme se pouze domnívat, zda obsažený *cis* betakaroten mohl být ve višních už za čerstvého stavu a nebo vznikl izomerizací až po delší době při skladování vzorku v mrazícím boxu.

Taktéž je možné, že vzorky z počátku obsahovaly *cis* betakarotenu více a v průběhu analýzy byla koncentrace snížena vlivem teploty kolony (5).

Na analýzu byla zvolena mobilní fáze acetonitrilu a směs dichlormethanu s n-hexanem v poměru 97,5/1,25/1,25. V předešlé literatuře je popisována interakce dichlormethanu s *trans* karotenoidem, což může na HPLC znázornit píky, které mohou být následně identifikovány jako nečistota nebo *cis* forma (24).

Na základě starších studií, kde se porovnávala stabilita betakarotenu samostatného a s přidáním α -tokoferolu a L-askorbové kyseliny jako antioxidantů, jsme se i my pokusili o porovnání. Jako antioxidant jsme zvolili butylhydroxytoluen. Antioxidant jsme smísili se vzorkem těsně před HPLC analýzou. Bohužel, výsledný poměr *trans* a *cis* betakarotenu byl srovnatelný. Z toho pravděpodobně vyplývá, že izomerizace neproběhla během analýzy, ale nejspíš v průběhu skladování.

Do budoucna by bylo zajímavé porovnat obsah karotenoidů u čerstvých plodů a skladovaných po delší době v závislosti na teplotě a času. Dále porovnání obsahu karotenoidů za přítomnosti antioxidantu už během skladování.

7 ZÁVĚR

V této rigorózní práci byl stanoven obsah jednotlivých karotenoidů u vybraných kultivarů višňi.

Hodnocení obsahu karotenoidů proběhlo vůči standardu o přímo definované koncentraci.

Jak se ukázalo, tak nejvyšší obsah karotenoidů z celkově 18 testovaných odrůd byl obsažen v odrůdách *Gorsetin* 94,10 µg, *Naumburger ostheimer* 70,24 µg a *Mesabich* 65,97 µg karotenoidů na 100 g vzorku. Oproti tomu nejméně karotenoidů bylo v odrůdách *Inga mladi* 0,82 µg, *Valkova* 1,06 µg a *Pandy 6039* 4,59 µg na 100 g vzorku.

Nejvíce *cis* betakarotenu bylo v odrůdách *Gorsetin* 40,75 µg, *Naumburger ostheimer* 28,90 µg a *Višňa IV/155 bez BHT* 28,23 µg na 100 g vzorku. Nejméně *cis* betakarotenu u *Inga mladi* 0,22 µg, *Valkova* 0,38 µg a *Pandy 6039* 0,51 µg na 100 g vzorku.

Nejvíce *trans* betakarotenu v odrůdách *Gorsetin* 51,53 µg, *Mesabich* 40,04 µg, *Naumburger ostheimer* 38,34 µg na 100 g vzorku. Nejméně *trans* betakarotenu u odrůd *Inga mladi* 0,16 µg, *Valkova* 0,50 µg a *Pandy 6039* 3,74 µg na 100 g vzorku.

Větší zastoupení *cis* betakarotenu než *trans* betakarotenu bylo u odrůdy *Köröšská*, *Višňa IV/155* s BHT i bez BHT. Výsledky získané v rámci této rigorózní práce by bylo vhodné potvrdit další studií na totožných kultivarech a u čerstvě sbíraného ovoce, a vyloučit případný vliv chlorovaných rozpouštědel při extrakci a separaci na izomerizaci betakarotenu ve višních.

8 BIBLIOGRAFIE

1. Taylor K.L., Brackenridge A.E., Vivier M.A., Oberholster A., *High-performance liquid chromatography profiling of the major carotenoids in Arabidopsis thaliana leaf tissue*. 2006. J. Chromatogr. A, Volume 1121, Issue 1, 14 Jul, Pages 83-91.
2. Kalač P. *Organická chemie přírodních látek a kontaminantů*. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta. 2001. ISBN 80-7040-520-1.
3. Cásedas G., Les F., Gómez-Seeranillos M. P., Smith C., López V., *Bioactive and functional properties of sour cherry juice (Prunus cerasus)*. 2016. Food Funct., 7, 4675-4682.
4. Halvorsen B.L., Holte K., Myhrstad M.C., Barikmo I., Hvattum E., Remberg S.F., Wold A.B., Haffner K., Baugerod H., Andersen L.F., Moskaug J., Jacobs D.R. Jr., Blomhoff R., *A systematic screening of total antioxidants in dietary plants*. 2002. J. Nutr., Mar; 132(3):461-71.
5. Cserhádi E., Forgács T. *Liquid chromatographic separation of terpenoid pigments in food and food products*. 2001. J. Chromatogr. A., 936(1-2):119-137].
6. Biochemický ústav (E.T.) 2013 Eicosanoidy Isoprenoidy Steroidy. [Online] [Citace: 10.. srpen 2018.] <http://slideplayer.cz/slide/11178018/>.
7. Hock-Eng Khoo, Nagedra Prasad K., Kn-Weng Kong, Yueming Jiang, Amin Ismail. *Carotenoids and Their Isomers: Color Pigments in Fruit and Vegetables*. 2011. Molecules, 16(2), 1710-1738.
8. Patrick L. *Beta-Carotene: The controversy continues*. 2000. Alt. Med. Rev., Dec 5(6):530-45.
9. Sass-Kiss A., Kiss J., Milotay P., Kerek M. M., Toth-Markus M., *Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables*. 2005. Food Res. Int., 38, Issues 8–9, October–Nov , Pages 1023-1029.
10. Eroglu A., Harrison E.H., *Carotenoid metabolism in mammals, including man, formation, occurrence and function of apocarotenoids* 2013. J. Lipid Res., Jul;54(7):1719-30.
11. Spiegler E., Youn-Kyung K., Wassef L., Shete V., Quadro L., *Maternal-fetal transfer and metabolism of vitamin A and its precursor β -carotene in the developing tissues*. 2012. Biochim. Biophys. Acta, Jan; 1821(1): 88–98..
12. Hlaváčková M. *Diplomová práce: Vývoj HPLC metody pro stanovení betakarotenu v potravních doplňcích*. 2011.

13. Insic M., Winkler S., Tomkins B., Jones S., *Effect of storage and cooking on betacarotene isomers in carrots (Daucus carota L.cv. "Stefano")*. 2010. J. Agric. Food Chem., Apr 28;58(8):5109-13.
14. Yves Waché, Aurélie Bosser-Deratuld, Jean-Claude Lhuguenot, Jean-Marc Belin. *Effect of isomerism of β -Carotene on the rations of volatile compounds produced during oxidative degradation*. 2003. J. Agric. Food Chem., Mar 26;51(7):1984-7.
15. Gortner W.A., Singleton V.L., *Carotenoid pigments of pineapple fruit. II. Influence of fruit ripeness, handling and processing on isomerization*. 1961. J. Food Sci., 26:53-55.
16. Sweeney J.P., Marsh A. C., *Effect of processing on provitamin A in vegetables*. 1971. J. Amer. Dietet. Assoc., 59, 238-243.
17. Khachik F., Beecher G.R., Whittaker N. F., *Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography*. 1986. J. Agric. Food Chem., 34, 603616..
18. Rajendran V., Chen B. H., *Isomerization of β -carotene by titanium tetrachloride catalyst*. 2007. J. Chem. Sci., Vol. 119, No. 3, May, pp. 253–258..
19. Luterhotti S., Mladen Franko, Mateja Šikovec, Dane Bicanic. *Ultrasensitive assays of trans and cis-betacarotenes in vegetable oils by HPLC-thermal lens detection*. 2002. Anal. Chimica Acta 460(2):193-200.
20. Böhm V, Puspitasari-Nienaber NL, Ferruzzi MG, Schwartz SJ. *Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of alpha-carotene, beta-carotene, lycopene, and zeaxanthin*. 2002. J. Agric Food Chem., Jan 2;50(1):221-6.
21. Aman R., Schieber A., Carle R., *Effects of heating and illumination on trans-cis isomerization and degradation of β -carotene and lutein in isolated spinach chloroplasts, Journal of agricultural and food chemistry*. 2005. J. Agric. Food Chem., 53 (24), pp 9512–9518.
22. Liaaen-Jensen S. *Artifacts of natural carotenoids-unintended carotenoid synthesis, In Carotenoids chemistry and biology*. 1989. Carotenoids chemistry and biology, pp 149-165.
23. Helena T. Godoy, Delia B. Rodriguez-Amaya. *Occurrence of cis-Isomers of Provitamin A in Brazilian Fruits*. 1994. J. Agric. Food Chem., 42 (6), pp 1306–1313.
24. Pastorino U. *β -carotene and the risk of lung cancer*. 1997. J. Nat. Cancer inst., Volume 89, Issue 6, 19 March, Pages 456–457.

25. Harari A., Abecasis R., Relevi N., Levi Z., Ben-Amotz A., Kamari Y., Harats D., Shaish A., *Prevention of atherosclerosis, progression by 9-cis β -carotene rich alga Dunaliella in apoE-deficient mice*, 2013. Biomed. Res. Int.; 169517.
26. Roteinstreich Y, Harats D., Shaish a, Pras E, Belkin N. *Treatment of retinal dystrophy, fundus albupunctatus, with oral 9-cis-(beta)-carotene*, 2010. Br. J. Ophthalmol. 2010 May;94(5):616-21.
27. Roteinstreich Y., Belkin N., Sadetzki S., Chertit A., Ferman-Attar G., Sher I., Harari A., Shaish A., Harats D., *Treatment with 9-cis β -carotene-rich powder in patients with retinitis pigmentosa; a randomizes crossover trial*. 2013. JAMA Ophthalmol., Aug;131(8):985-92.
28. Zolberg Relavy N., Bechor S., Harari A., Ben-Amotz A., Kamari Y., Harats D., Shaish A., *The inhibition of macrophage foam cell formation by 9-cis- β -carotene is driven by BCMO1 activity*. 2015. PLoS One, Jan 28;10(1):e0115272. doi: 10.1371/journal.pone.0115272.
29. Davidi L, Pick U. *Novel 9-cis/all-trans β -carotene isomerases from plastidic oil bodies in Dunaliella bardawil catalyze the conversion of all-trans to 9-cis β -carotene*. 2017. Plant Cell Rep., Jun;36(6):807-814.
30. Boehm V., Mueller L. *Antioxidant activity of β -carotene compounds in different in vitro assays*. 2011. Molecules, 16(2), 1055-1069.
31. Plutzky J. *The PPAR-RXR transcriptional complex in vasculature;energy in the balance*. 2011. J. Chromatogr. A, Volume 1121, Issue 1, 14 July , Pages 83-91.
32. Čeladník M. *Organická chemie: Učebnice pro farmaceutické fakulty*. 1990. ISBN 8020100938.
33. Waisser K. *Organická chemie I. Praha: Univerzita Karlova v Praze*. 1999. ISBN 80-7184-874-3.
34. Chung MY., Oh DK., Lee KW., *Hypoglycemic health benefits of D-Psicose*. 2012. J. Agric Food Chem., Feb 1;60(4):863-9.
35. Damar E. *Antioxidant capacity and anthocyanin profile of sour cherry juice*. 2012. Food Chem., Dec 15;135(4):2910-4.
36. Nowicka P., Wojdylo A., *Bioactive compounds and sensory attributes of sour cherry puree sweetened with natural sweeteners*. 2015. Int. J. Food Sci. Technol. 50, 585-591.

37. Wojdylo A., Figiel A., Lech K., Nowicka P., Oszmianski J., *Effect of convective and vakuuum-microwave drying on the bioactive compounds, color and antioxidant capacity of sour cherries*. 2014. Food Bioproc. Technol., March, Volume 7, Issue 3, pp 829–841.
38. Kelley D.S., Adkins Y., Reddy A., Woodhouse L.R., Mackey B.E., Erickson K.L., *Sweet Bing cherries lower circulating concentrations of markers for chronic inflammatory diseases in healthy humans*, 2013. J. Nutr., Mar;143(3):340-4.
39. Kent K., Charlton K.E., Jenner A., Roodenrys S., *Acute reduction in blood pressure following consumption of anthocyanin-rich cherry juice may be dose-interval dependent, A pilot cross-over study*, 2016. Int. J. Food Sci. Nutr.; 67(1):47-52.
40. Martini S., Conte A., Tagliazucchi D., *Phenolic compounds profile and antioxidant properties of six sweet cherry (Prunus Avium) cultivars*. 2017. Food Res. Int., Jul; 97:15-26..
41. Bastos C., Barros L. Duenas M., Calhella R., C., Queiroz M. J.R.P., Santoa-Buelga, C., Ferreira I.C.f.r. *Chemical characterization and bioactive properties of Prunus avium l; The widely studied fruits and the unexplored stems*. 2015. Food Chem., Apr 15;173:1045-53.
42. Serra A.T., Duarte, R.O., Bronze, M.R, Duarte, C.M.M. *Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal*. 2011. Food Chem., Volume 125, Issue 2, 15 March, Pages 318-325.
43. Sanchez-Moreno, Lucia Plaza, Begoña de ancós, m. Pilar Cano. *Vitamin C, provitamin A carotenoids and other carotenoids in high-pressured orange juice during refrigerated storage*, 2003. J. Agric. Food Chem., 51 (3), pp 647–653.
44. Jiang Yi, Yuting Fan, Wallace Yokoyama, Yuzhu Zhang, Liqing Zhao, *Thermal degradation and isomerization of β -carotene in oil-in-water nanoemulsions supplemented with natural antioxidants*, *Journal of agricultural and food chemistry*. 2016. J. Agric Food Chem., 64 (9), pp 1970–1976.
45. Marx M., Stuparic M., Schieber A., Carl R., *Effects of thermal processing on trans-cis-isomerization of β -carotene in carrot juices and carotene-containing preparations*. 2003. Food Chem. 83, 609–617.
46. Šmidrkalová T. *Diplomová práce: Využití HPLC pro stanovení barviv ilegálně používaných v potravinách*. 2013.
47. Růžička Š. *Vývoj HPLC metody pro stanovení vybraných karotenoidů v ovoci*. 2017. Diplomová práce – Farmaceutická fakulta Hradec Králové.

48. Hlaváčková, M. *Analytické možnosti stanovení luteinu, betakarotenu a zeaxanthinu*. místo neznámé : Bakalářská práce. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 2009.
49. Bononi, M., Commissati, I., Lubian E. et al. *A simplified method for the HPLC resolution of α -carotene and β -carotene (trans and cis) isomers*. 2002. *Anal. Bioanal. Chem.*, Jan; 372(2):401-3.
50. Antonio J. Melendez-Martinez, Carla M. Stinco, Chun Liu, Xiang-Dong Wang. *A simple HPLC method for the comprehensive analysis of cis/trans (Z/E) geometrical isomers of carotenoids for nutritional studies*. 2013. *Food Chem.* 138(2-3):1341-50.
51. Marinova D., Ribarova F., *HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries*. 2007. *J. Food Compos. Anal.*, vol. 20, s. 370-374.
52. Gimeno E., Calero E., Castellote A. I., Lamuela-Raventós R. M., de la Torre M. C., López-Sabater M. C. *Simultaneous determination of α -tocopherol and β -carotene in olive oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography*. 2000. *J. Chromatogr. A.*, vol. 881, s. 255-259.
53. Steroidy, Biochemický ústav (E.T.) 2013 Eicosanoidy Isoprenoidy. 2019 SlidePlayer.cz Inc. *Eicosanoidy Isoprenoidy Steroidy*. [Online] Biochemický ústav (E.T.), 2013. [Citace: 13. únor 2019.] <http://slideplayer.cz/slide/11178018/>.

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Isoprenová jednotka (6)	10
Obrázek 2: Metabolismus betakarotenu (11)	13
Obrázek 3: Betakaroten v těle (12)	14
Obrázek 4: Nejčastější formy betakarotenu (18).....	15
Obrázek 5: Izomerie na dvojně vazbě	18
Obrázek 6: Schéma kapalinového chromatografu (46).....	24
Obrázek 7: Graf lineární regrese-betakaroten	33
Obrázek 8: Graf lineární regrese – lutein	34
Obrázek 9: Chromatogram separace standardů za podmínek validované metody (kap. 5.1) (<i>trans</i> betakaroten+lutein).....	36
Obrázek 10: Chromatogram stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě <i>Rannaja</i>	37
Obrázek 11: Chromatogram stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě <i>Meteor</i>	38
Obrázek 12: Chromatogram stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě <i>Muškatnaja Pražskaja</i>	39
Obrázek 13: Chromatogram stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě <i>Griot Moskovskij</i>	40
Obrázek 14: Chromatogram stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě <i>Naumburger ostheimer</i>	41
Obrázek 15: Chromatogram stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě <i>Morellen fever SE 603</i>	42
Obrázek 16: Chromatogram stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě <i>Višňa IV/155 bez BHT</i>	43
Obrázek 17:Chromatogram stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě <i>Erdi jubileum</i>	44
Obrázek 18:Chromatogram stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě <i>Pandy 6039</i>	45
Obrázek 19:Chromatogram stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě <i>Heimann's rubín</i>	46

10 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Vliv teploty kolony na zastoupení izomerů betakarotenu (5).....	20
Tabulka 2: Přehled vybraných HPLC metod pro stanovení karotenoidů	27
Tabulka 3: Příprava roztoků ke kalibraci	30
Tabulka 4: Test linearity-betakaroten	33
Tabulka 5: Test linearity-lutein.....	34
Tabulka 6: Plochy karotenoidů v roztoku standardu odpovídající uvedeným koncentracím	36
Tabulka 7: Obsah karotenoidů v odrůdě <i>Rannaja</i>	37
Tabulka 8: Obsah karotenoidů v odrůdě <i>Meteor</i>	38
Tabulka 9: Obsah karotenoidů v odrůdě <i>Muškatnaja Pražskaja</i>	39
Tabulka 10: Obsah karotenoidů v odrůdě <i>Griot Moskovskij</i>	40
Tabulka 11: Obsah karotenoidů v odrůdě <i>Naumburger ostheimer</i>	41
Tabulka 12: Obsah karotenoidů v odrůdě <i>Morellen fever SE 603</i>	42
Tabulka 13: Obsah karotenoidů v odrůdě <i>Višňa IV/155 bez BHT</i>	43
Tabulka 14: Obsah karotenoidů v odrůdě <i>Erdi jubileum</i>	44
Tabulka 15: Obsah karotenoidů v odrůdě <i>Pandy 6039</i>	45
Tabulka 16: Obsah karotenoidů v odrůdě <i>Heimann's rubín</i>	46
Tabulka 17: Výsledný přehled obsahu karotenoidů v jednotlivých odrůdách v µg na 100g plodů.....	47