

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra analytické chemie

Vývoj HPLC metody pro stanovení vybraných karotenoidů v ovoci

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Hradec Králové 2017

Štěpán Růžička

Tímto bych rád poděkoval vedoucímu diplomové práce Doc. RNDr. Daliboru Šatínskému, Ph.D. za všechnu trpělivost a čas, které do komunikace se mnou vložil. Bez jeho odborných rad a připomínek by tato práce nemohla vzniknout. Díky patří i celému kolektivu z katedry analytické chemie za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Dne 12. 5. 2017 v Hradci Králové

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Štěpán Růžička

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

Název diplomové práce: Vývoj HPLC metody pro stanovení vybraných karotenoidů v ovoci

V této diplomové práci byla optimalizována a vyvinuta HPLC metoda pro stanovení karotenoidů betakarotenu, luteinu a zeaxanthinu ve vybraných odrůdách třešní. Tato metoda využívá kolonu Supelco Analytical RP-Amide (100 x 4,6 mm; 5 µm) a UV detekci při vlnové délce 450 nm. Měření probíhalo v režimu isokratické eluce mobilní fází acetonitril:hexan:dichlormethan (96,6:1,7:1,7) o průtokové rychlosti 1,409 ml/min při teplotě 30 °C. Analyzované vzorky třešní byly extrahovány s pomocí ultrazvuku do chloroformu, centrifugovány a po přefiltrování dávkovány do HPLC systému. Dávkovaný objem vzorku byl 5 µl. Kvůli nízké koncentraci karotenoidů byl betakaroten kvantifikován pouze v několika vybraných odrůdách třešní.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Štěpán Růžička

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

Title of the diploma thesis: HPLC method development for carotenoids determination in fruits

In this thesis was optimized and developed a new HPLC method for the determination of specific carotenoids (betacarotene, lutein and zeaxanthin) content in selected species of sweet cherries. The method used Supelco Analytical RP-Amide (100 x 4.6 mm; 5 µm) column for separation and UV detection at a wavelength of 450 nm. There was used isocratic elution of the mobile phase acetonitrile:hexan:methylene chloride (96.6:1.7:1.7) at a flow rate of 1.409 ml/min during the measurement. The cherry samples were extracted to chloroform in ultrasound bath, centrifuged, and after filtration injected into HPLC system. The temperature was set at 30 °C and injected volume was 5 µl. The amount of betacarotene was quantified in a few cherry samples because of too low concentration of carotenoids.

OBSAH

OBSAH	5
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
1 ÚVOD.....	9
2 CÍLE A ZADÁNÍ PRÁCE	10
3 TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1 Karotenoidy	11
3.1.1 Betakaroten	12
3.1.2 Lutein.....	13
3.1.3 Zeaxanthin.....	14
3.2 Chromatografie	15
3.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	15
3.2.1.1 Princip HPLC.....	16
3.2.1.2 HPLC aparatura	16
3.2.1.3 Charakteristika HPLC procesu	17
3.3 Validace analytické metody.....	18
3.3.1 Test vhodnosti chromatografického systému.....	18
3.3.1.1 Faktor symetrie chromatografických píků.....	18
3.3.1.2 Rozlišení chromatografických píků.....	19
3.3.1.3 Počet teoretických pater.....	19
3.3.1.4 Kapacitní faktor	19
3.3.2 Opakovatelnost.....	19
3.3.3 Linearita.....	20
3.3.4 Přesnost	20
3.3.5 Správnost	21
3.3.6 Metody stanovení karotenoidů pomocí HPLC	22
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	24
4.1 Použité přístroje a pomůcky	24

4.1.1	Přístroje	24
4.1.2	Pomůcky	24
4.2	Podmínky separace	25
4.3	Použité chemikálie	25
4.4	Použitý materiál	26
4.4.1	Standardy	26
4.4.2	Vzorky třešní	26
4.5	Příprava roztoků a vzorků	26
4.5.1	Příprava zásobních roztoků standardů	26
4.5.2	Příprava roztoků pro kalibraci	27
4.5.3	Příprava roztoků a vzorků pro validaci metody	27
4.5.4	Příprava materiálu a vzorků pro stanovení obsahu	29
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	30
5.1	Vývoj metody	30
5.1.1	Optimalizace chromatografických podmínek	30
5.1.1.1	Volba vlnové délky detektoru	30
5.1.1.2	Volba nejvhodnější kolony a optimalizace složení mobilní fáze	32
5.1.1.3	Volba objemu nástřiku vzorku a rychlosti průtoku mobilní fáze	40
5.1.1.4	Volba extrakčního činidla	41
5.2	Validace vyvinuté metody	44
5.2.1	Test vhodnosti chromatografického systému	45
5.2.1.1	Asymetrie chromatografických píků	46
5.2.1.2	Rozlišení chromatografických píků	46
5.2.1.3	Počet teoretických pater	47
5.2.1.4	Kapacitní faktor	47
5.2.2	Opakovatelnost	47
5.2.3	Linearita	49
5.2.4	Přesnost	53
5.2.5	Správnost	54
5.3	Stanovení obsahu karotenoidů v odrůdách třešní	55
5.3.1	Gloria	56
5.3.2	Rum	57
5.3.3	Jubileu Sl	58

5.3.4	NY 13688.....	59
5.3.5	Švestičková	60
5.4	Diskuze	61
6	ZÁVĚR.....	62
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	63

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN	acetonitril
β-kar	betakaroten
DAD	diode array detector
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IPA	isopropylalkohol
Lut	lutein
MeOH	methanol
MF	mobilitní fáze
min	minuta
MTBE	methyl-terc-butyl ether
RP	reverzní fáze
RSD	relativní směrodatná odchylka
SD	směrodatná odchylka
UV/VIS	ultrafialová/viditelná oblast spektra světla
Zea	zeaxanthin

1 ÚVOD

Karotenoidy patří do skupiny přírodních barviv, které vykazují převážně lipofilní charakter. Díky tomu, že ve své molekule obsahují množství konjugovaných dvojných vazeb, jsou vnímány jako barevné. Tyto látky se přirozeně vyskytují v rostlinných i živočišných tkáních, jako jsou například různé druhy ovoce, zeleniny nebo třeba vejce. Jsou známé především pro svou antioxidační aktivitu a jsou často používány jako doplňky stravy.

Pro separaci karotenoidů je vhodné použít vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), protože tato metoda poskytne během jedné analýzy informace o kvantitě, kvalitě i čistotě stanovovaných látek. Zároveň není analýza zbytečně časově náročná. Z uvedených důvodů byla právě tato metoda v práci použita.

V této práci byla vyvinuta a popsána HPLC metoda pro současné stanovení betakarotenu, luteinu a zeaxanthinu. Vzniklá metoda byla optimalizována, validována a následně použita ke stanovení obsahu zmíněných karotenoidů v plodech třešní těchto vybraných odrůd: 'Gloria', 'Rum', 'Jubileu SI', 'NY 13688', 'Švestičková'.

2 CÍLE A ZADÁNÍ PRÁCE

Prvním cílem diplomové práce bylo vyvinout, optimalizovat a validovat vhodnou HPLC metodu pro stanovení tří konkrétních karotenoidů: betakarotenu, luteinu a zeaxanthinu.

Druhý cíl byl použít nově vyvinutou metodu separace pro stanovení obsahu těchto tří látek v dodaných odrůdách třešní. Cíle práce navazují na spolupráci s Výzkumným ústavem ovocnářským a šlechtitelským v Holovousech a na jejich požadavek na vývoj metody pro analýzu beta-karotenu v odrůdách třešní. Cíle práce vyplývají také z toho, že analýza karotenoidů ve třešních je zatím v odborné literatuře prakticky nepopsána a plánovaná studie bude v budoucnu pokrývat větší počet odrůd třešní a zejména višňi.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Karotenoidy

Karotenoidy lze definovat jako rostlinná barviva, patřící do chemické skupiny tetraterpenů, což jsou sloučeniny, které ve své molekule obsahují řetězec, tvořený čtyřiceti uhlíkovými atomy, které jsou propojeny větším počtem konjugovaných dvojných vazeb (povětšinou v all-trans konfiguraci). Toto uspořádání dvojných vazeb umožňuje sloučeninám absorbovat záření v oblasti viditelného světla, a proto jsou barevné. Karotenoidy jsou červená, oranžová, žlutá a fialová barviva, která se v rostlinách vyskytují vedle chlorofylu, ale dají se najít i v živočišných tkáních (játra, vaječný žloutek) nebo mikroorganismech. Dělí se na dvě skupiny:

Karoteny jsou uhlovodíky, které mají ve struktuře jeden nebo dva cyklohexenové kruhy, spojené řetězcem s konjugovanými dvojnými vazbami. Do této podskupiny mimo jiné patří třeba betakaroten, α -karoten a lykopen.

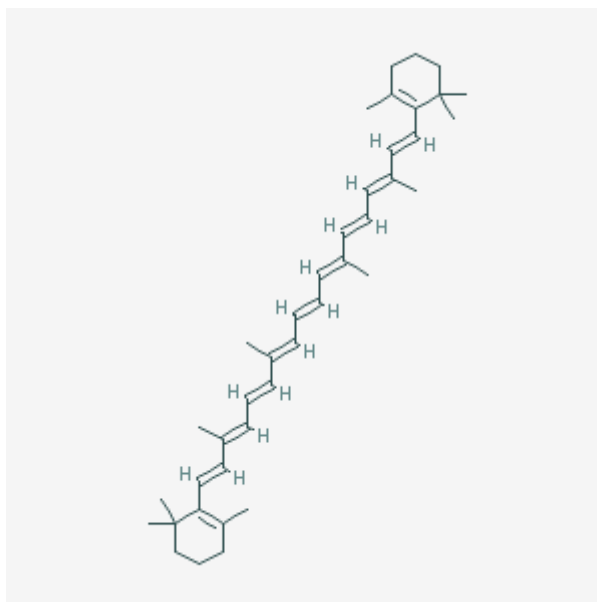
Xantofyly jsou odvozené od karotenů, ale ve své molekule obsahují hydroxylové skupiny. Jedná se tedy o kyslíkaté sloučeniny, především alkoholy a dioly. V přírodě se vyskytují buď volně, ve formě esterů s vyššími mastnými kyselinami nebo jako glykosidy. Podskupina xantofylů zahrnuje například cryptoxanthin, lutein, zeaxanthin, violaxanthin, a další.

Karotenoidy jako skupina látek jsou poměrně dobře rozpustné v tucích a některých organických rozpouštědlech (např. hexan, chloroform). V ethanolu se rozpouští omezeně a ve vodě prakticky vůbec. Hodně látek ze skupiny karotenoidů má vlastnosti provitaminu A, který je důležitý pro správný vývoj a funkci sítnice, kůže a sliznic. Kromě této důležité role se karotenoidy účastní různých metabolických procesů jako antioxidanty (imunomodulační funkce, vylučování vzniklých radikálů v organismu, regulace buněčné proliferace a diferenciací).

V této diplomové práci byla věnována pozornost konkrétně třem látkám: betakarotenu, luteinu a zeaxanthinu. Tyto látky se často používají v doplňcích stravy k prevenci různých obtíží a nemocí. Tato práce se ale zabývá analýzou

určených karotenoidů z přírodních materiálů (konkrétně plodů třešně) a jejich kvantitativním stanovením [1, 2, 3, 4].

3.1.1 Betakaroten



Obrázek 1: strukturní vzorec betakarotenu

Sumární vzorec: $C_{40}H_{56}$

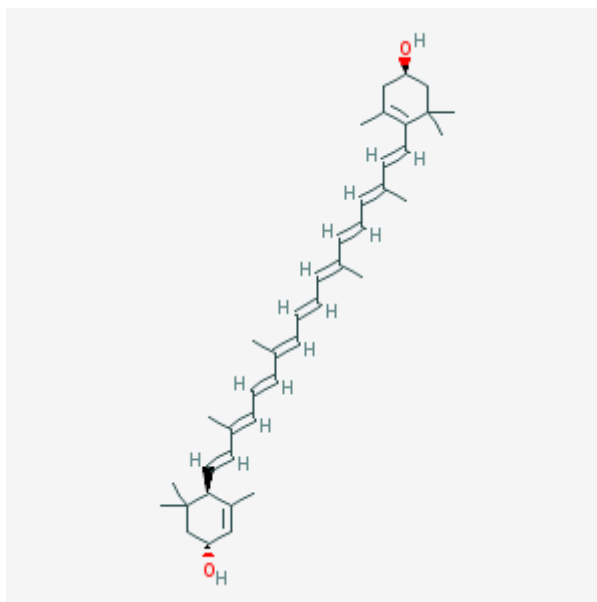
M_r : 536,89 g/mol

Teplota tání: 183 °C

CAS: 7235-40-7

Betakaroten je jedním z důležitých představitelů podskupiny karotenů. Je to oranžové rostlinné barvivo, které v organismu funguje jako prekurzor vitamínu A. Přírodním zdrojem betakarotenu je převážně ovoce a zelenina. Ve vyšším množství se vyskytuje v mrkvi, dýni, paprikách a podobně. Neobsahuje ani jednu hydroxylovou skupinu, a proto je to silně lipofilní látka rozpustná v lipofilních rozpouštědlech a nerozpustná ve vodě a ethanolu [5].

3.1.2 Lutein



Obrázek 2: strukturní vzorec luteinu

Sumární vzorec: $C_{40}H_{56}O_2$

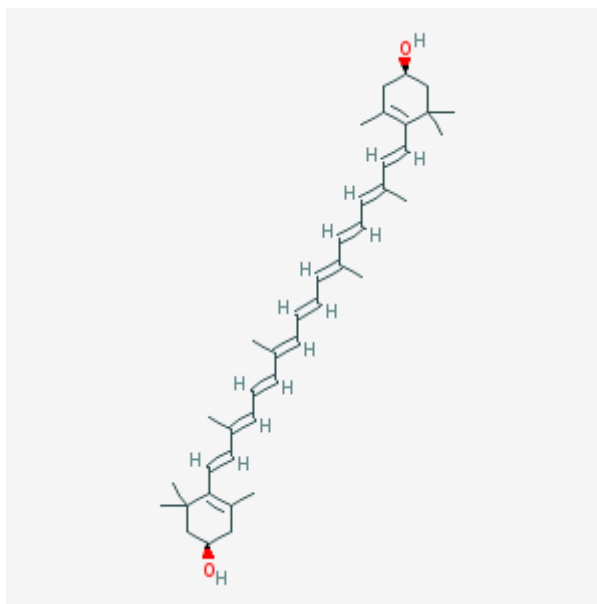
M_r : 568,89 g/mol

Teplota tání: 196 °C

CAS: 127-40-2

Karotenoid náležící do skupiny xantofylů. Barvivo se žlutou barvou, které postrádá schopnost provitaminu A. Lutein je obsažen v různém ovoci a zelenině, vejcích, obilí a dokonce i v rostlinných řasách (Chlorella). V poměrně vysokém množství ho můžeme najít třeba v brukvi řepce, špenátu nebo v květech měsíčku lékařského. Kvůli relativně vyšší polaritě je lutein v živočišném organismu transportován lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL). Působí jako antioxidant a jeho funkce je důležitá z hlediska prevence poškození oční sítnice [6].

3.1.3 Zeaxanthin



Obrázek 3: strukturní vzorec zeaxanthinu

Sumární vzorec: $C_{40}H_{56}O_2$

M_r : 568,89 g/mol

Teplota tání: 215,5 °C

CAS: 144-68-3

Další ze skupiny xantofylů je v podstatě polohový izomer luteinu. Liší se od sebe polohou dvojně vazby a jejich hlavní rozdíl tak spočívá v počtu chirálních center (lutein má tři, zatímco zeaxanthin pouze dvě). Zeaxanthin je jeden z nejběžnějších xantofylů, vyskytujících se v přírodě. Má sytě žlutou barvu a poskytuje typické zbarvení třeba kukuřici nebo šafránu. Často se vyskytuje spolu s luteinem. Díky strukturní podobnosti mají tyto dvě látky i podobné fyzikálně-chemické vlastnosti [7].

3.2 Chromatografie

Chromatografie je jedna z dominantních separačních metod, která je rutinně používaná ve všech typech analytických pracovišt. Její základní podstata tkví v rozdělování složek směsi vzorku mezi dvě fáze, a to fázi stacionární a mobilní, které se od sebe odlišují některou základní fyzikálně-chemickou vlastností, např. polaritou. Různé složky vzorku, unášené mobilní fází, interagují v různé míře s oběma fázemi a na základě podobnosti s jednou nebo druhou fází se jednotlivé složky vzorku separují [8].

3.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie neboli také HPLC (High Performance Liquid Chromatography) je hojně využívaná chromatografická metoda, která slouží k rozdělení jednotlivých komponent směsi a zároveň ke stanovení jejich množství nebo jen k prostému určení přítomnosti hledaného analytu. Je to tedy metoda kvantitativní i kvalitativní. HPLC má oproti ostatním separačním metodám mnoho výhod: relativně velká přesnost a citlivost metody (záleží na citlivosti použitého detektoru), široký záběr použitelnosti (lze měřit mnoho druhů různých látek). Dnes je HPLC nejvíce používanou separační metodou díky zvyšující se dostupnosti přístrojového vybavení i díky vzrůstajícímu počtu používaných materiálů. Další výhody představuje: rychlost analýzy, možnost její částečné automatizace nebo třeba malé nároky na spotřebu vzorku. Od sloupcové kapalinové chromatografie se HPLC liší tím, že se při měření používají kolony s velmi malými částicemi, což má za následek kladení velkého odporu MF, a proto je nutné analýzy provádět za zvýšeného tlaku. To zajišťuje rychlou a účinnou separaci jednotlivých komponent směsi [9, 10].

Může se uplatnit chromatografie s normálními fázemi, při které jsou používána méně polární rozpouštědla a polárnější stacionární fáze nebo chromatografie s reverzními fázemi, které se používají častěji. Při nich jsou uplatňovány vhodně chemicky modifikované stacionární fáze (například fáze s navázanými C-8 řetězci, fáze s C-18 řetězci) a naopak více polární rozpouštědla [11].

3.2.1.1 Princip HPLC

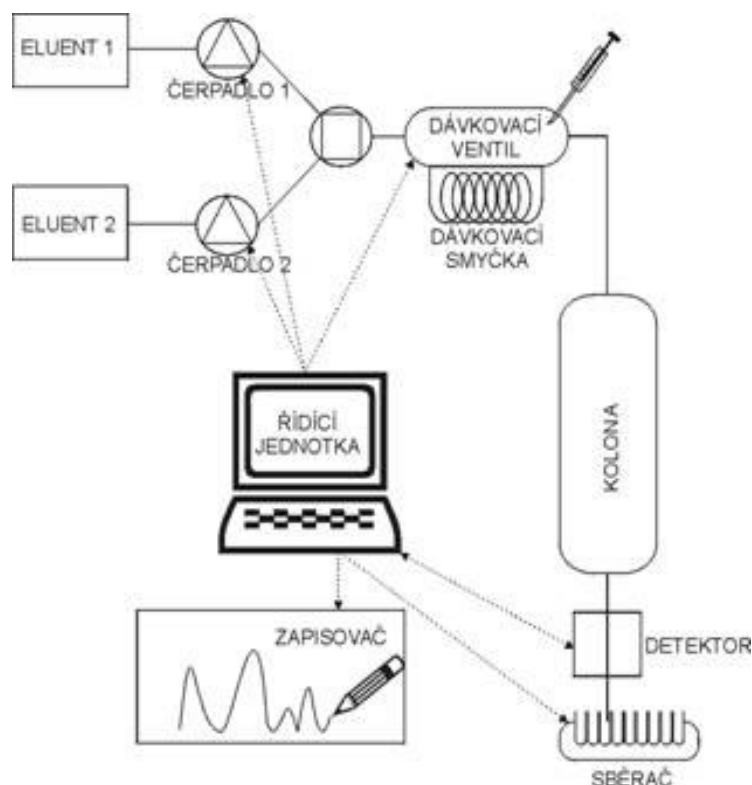
Proces chromatografie je založen na rozdílném rozdělení separovaných látek ve směsi mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze: pohyblivou (mobilní) a pevnou (stacionární). Ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii představuje mobilní fázi kapalina, která je vháněna čerpadlem do chromatografického systému za vysokého tlaku. Stacionární fází obvykle bývá tuhá látka, někdy kapalina ukotvena na pevném nosiči. Mezi mobilní a stacionární funkcí neustále dochází k ustavování rovnováhy při distribuci jednotlivých složek směsi. Rozdělení složek mezi tyto dvě fáze je možné popsat distribuční konstantou.

Podle způsobu průtoku mobilní fáze se může HPLC analýza dělit na dva režimy. Pokud chromatografem protéká mobilní fáze o konstantním složení v čase, jedná se o isokratickou eluci. Při gradientové eluci se poměr složek mobilní fáze mění ve prospěch jedné z elučních složek. Gradientová eluce je výhodná z pohledu zkrácení času analýzy, zlepšení rozdělení složitějších směsí a zvýšení citlivosti analýzy.

Základní součástí každé vyvíjené HPLC metody je kolona, od které se odvíjí její selektivita a účinnost navrhované separace. Kolony pro HPLC analýzy jsou většinou tenké trubice (z nerezové oceli nebo ze syntetických polymerů) o různých rozměrech. Uvnitř kolony je ukotvena stacionární fáze (nejčastěji tvořena silikagelem). Kvalita sorbetu je rozhodující pro účinné rozdělení látek, konkrétně jeho velikost a stejnoměrnost částic, ale i tvar, struktura a porozita [11].

3.2.1.2 HPLC aparatura

HPLC sestava pro chromatografickou analýzu obvykle sestává ze zásobních nádob mobilních fází, odplyňovače (degasser), vysokotlakého čerpadla, směšovacího zařízení, dávkovacího zařízení, chromatografické kolony, detektoru a zařízení na vyhodnocení signálu [12].



Obrázek 4: Jednoduché schéma kapalinového chromatografu [13]

3.2.1.3 Charakteristika HPLC procesu

Při běžné chromatografické analýze protéká MF stálou rychlostí. Od nástřiku určité látky na kolonu do chvíle, kdy z kolony odejde a projeví se signálem detektoru, uplyne určitý časový úsek závislý na retenci látky v konkrétním chromatografickém systému a tedy na jejích vlastnostech (kvalitě). Tento čas charakterizuje retenci látky v koloně (zároveň tedy i snadnost jejího průtoku kolonou), a proto je označován jako retenční čas (t_R). Objem MF, který je potřeba k eluci látky se nazývá eluční nebo retenční objem (V_R). Proto je možné eluci popisovat rovnocenně buď jako časovou nebo jako objemovou závislost.

Koncentrační profil zóny je představován průběhem píku. Proto je plocha ohraničená píkem nad nulovou linií (jednoduše, plocha píku) shodná s množstvím látky v zóně a jako taková je základním podkladem pro kvantitativní analýzu. Plochu píku na chromatogramu získáme z integrací křivky píku s využitím příslušného chromatografického softwaru. Na základě zjištěných

ploch píků se obsah látky v neznámém vzorku určuje vždy relativně, je tedy třeba použít standard o známé koncentraci.

Při použití metody vnějšího standardu je potřeba dávkovat do kolony přesně odměřené množství vzorku. Plochy píků látek ve vzorku se potom srovnávají s plochami píků standardů analyzovaných za stejných podmínek. Pro sériová stanovení je vhodné i proměření kalibrační závislosti s použitím několika standardů. Výhodou metody je, že vzorek i standard jsou shodné látky. Nevýhodou je ovšem nezbytnost přesného dávkování, které se může ukázat dokonce jako hlavní zdroj chyb měření [11, 12, 17].

3.3 Validace analytické metody

Validace je standardní proces, jehož cílem je dokázat a dokumentovat kvalitu použité metody ustanovením přesně definovaných podmínek a proměření hodnot stanovených kritérií. Validace slouží jako nástroj k prokázání spolehlivosti analytické metody a k ověření správnosti zvoleného metodického postupu [14].

3.3.1 Test vhodnosti chromatografického systému

Test způsobilosti systému představuje nedílnou součást vyvinuté metody a vede k zajištění vhodné účinnosti chromatografického systému [16].

3.3.1.1 Faktor symetrie chromatografických píků

Faktor symetrie píku (A_s) popisuje tendenci látky ulpívat na koloně a používá se pro výpočet plochy pod píkem.

Když se hodnota faktoru symetrie rovná 1,0, značí to ideální symetrii píku. Hodnoty větší než 1,0 znamenají chvostování píku a hodnoty menší než 1,0 zase frontování píku. Čím vyšší je asymetrie píku, tím větší je možnost chyby při výpočtu plochy píku [16].

3.3.1.2 Rozlišení chromatografických píků

Rozlišení (R) představuje kvalitu separace dvou po sobě eluovaných látek. Se vzrůstající hodnotou rozlišení chromatografických píků je kvalita rozdělení dvou sousedních eluátů vyšší. Volbou vhodných separačních podmínek se usiluje o dosažení potřebného rozlišení, většinou $R > 1,5$ [17].

3.3.1.3 Počet teoretických pater

Tento parametr udává účinnost chromatografické kolony. Zdánlivá účinnost kolony může být vypočítána jako zdánlivý počet teoretických pater (N).

Zdánlivý počet teoretických pater je rozdílný pro různé stanovované složky, kolony a retenční časy. Účinnost kolony je vyšší s rostoucím počtem teoretických pater N. Doporučený limit je $N > 2000$ [16, 18].

3.3.1.4 Kapacitní faktor

Kapacitní faktor vyjadřuje kapacitní možnosti kolony a je také mírou sorpce analytu na koloně. Ideálně by měl být kapacitní faktor větší než 2 [17].

3.3.2 Opakovatelnost

Definice opakovatelnosti metody je popsána jako těsnost shody výsledků získaných za podmínek použití shodné zkušební metody na shodném materiálu, na stejném pracovišti, stejným pracovníkem, za použití stejných zařízení a nástrojů, v průběhu krátkého časového úseku.

Opakovatelnost se dá vyjádřit jako relativní směrodatná odchylka (RSD), což je poměr mezi směrodatnou odchylkou a střední hodnotou dílčích měření udávaný v procentech:

$$RSD = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$$

y_i jsou jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plocha píku

\bar{y} je průměr jednotlivých hodnot

n je počet jednotlivých hodnot [19, 20]

3.3.3 Linearita

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, konkrétně odezvou instrumentace (výstupním signálem) a koncentrací analytu [21].

Je žádoucí, aby bylo během testu linearity proměřeno minimálně 5 nebo 6 koncentrací standardního roztoku. Přímková závislost dvou náhodných proměnných se určí pomocí metody lineární regrese. Čím více jsou hodnoty korelačního koeficientu blíže jedné, tím je vzájemná závislost proměnných veličin lineárnější [20].

3.3.4 Přesnost

Definice přesnosti metody je vyjádřena jako míra shody mezi vzájemně nezávislými výsledky, které byly získány opakovaným měřením stejného vzorku za předem stanovených podmínek. Počet opakování musí být dostatečný, aby umožňoval statistické vyhodnocení. Podle podmínek průběhu stanovení rozlišujeme:

Opakovatelnost - analýzy jsou prováděny všechny najednou, na stejném přístroji s touž obsluhou; může se použít i označení přesnost v sérii; tento analytický parametr charakterizuje metodu a preciznost jejího provedení v laboratoři;

Reprodukovatelnost - stanovení se provádí s časovým odstupem, například jednou denně, na stejném přístroji, případně i různými pracovníky; tímto

postupem se charakterizuje stabilita metody a jejího provádění během celého procesu měření; někdy se nazývá přesnost v čase;

Mezilaboratorní reprodukovatelnost - měření je prováděno na různých přístrojích, různými pracovníky, na různých pracovištích a zprostředkovává srovnání přesnosti metody v různých laboratořích.

Přesnost závisí na rozdělení náhodných chyb, které není možné zcela odstranit, a nemá vztah k pravé hodnotě. Neovlivitelné změny stability přístrojů, pomůcek, teplot atd. během analýzy vždy způsobují, že výsledky opakovaných měření jsou rovnoměrně rozmístěny kolem průměrné hodnoty. Mírou nepřesnosti, tedy rozptylu výsledků, je směrodatná odchylka (SD). Čím je nižší hodnota směrodatné odchylky, tím je metoda přesnější a naopak. Směrodatná odchylka má stejné jednotky jako veličina, která je měřena. Pro názornější demonstraci výsledků se obvykle počítá ještě relativní směrodatná odchylka (RSD) vyjadřovaná jednoduše v procentech [14, 15, 22].

3.3.5 Správnost

Správnost metody je definovaná jako těsnost shody získaných výsledků měření a reálné hodnoty měřené veličiny přijaté referenční hodnoty. Jedná se tedy o statisticky významný rozdíl mezi získanou a skutečnou hodnotou. Pro validní vyhodnocení správnosti musí být použit průměr z více stanovení, protože hodnota z jednoho stanovení může být zatížena náhodnou chybou. Dohodnutá referenční hodnota představuje reálnou hodnotu, která je ve skutečnosti vždy neznámá. Získává se, nejlépe ve větším počtu různých laboratoří, pomocí referenčních metod. Správnost je možné vyhodnotit použitím metody na referenční materiál se známou čistotou nebo srovnáním výsledků s jinou vhodně validovanou metodou. Správnost lze mimo jiné prokázat metodou standardního přídatku stanovované látky ke vzorku.

Správnost se vyjadřuje buď jako rozdíl hodnot, nebo jako výtěžnost (R_i), což je veličina, udávající poměr koncentrace stanovované látky získané danou analytickou metodou a přijaté referenční hodnoty v procentech:

$$R_i = 100 \cdot \frac{c_i}{c_0}$$

c_i je koncentrace stanovená pomocí HPLC metody

c_0 je koncentrace referenční látky [14, 15, 19, 20, 22]

3.3.6 Metody stanovení karotenoidů pomocí HPLC

V současné době se pro stanovení karotenoidů používá velké množství modifikací separačních postupů založených na metodě vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Důležitá je i předchozí extrakce látek ze stanovovaného materiálu. Již bylo provedeno a zaznamenáno mnoho metod, zabývajících se analýzou karotenoidů a zároveň byly i dostatečně validovány.

V Tabulce 1 jsou shrnuty různé metody stanovení karotenoidů pomocí HPLC, vyhledané v článcích publikovaných v literatuře. Velká část metod, uvedených v dříve zmíněné tabulce, využívá jako zdroj betakarotenu různé druhy ovoce a zeleniny, ve kterých se karotenoidy přirozeně vyskytují. Karotenoidy se v přírodních zdrojích vyskytují většinou společně, a proto se metody uvedené v tabulce převážně týkají určování většího počtu látek než pouze betakarotenu, luteinu a zeaxanthinu. Vzhledem k podobným vlastnostem karotenoidů jako skupiny, bylo možno se o tyto zjištěné metody při optimalizaci podmínek opírat.

Tabulka 1: Přehled vybraných HPLC metod pro stanovení karotenoidů

Analyzovaný materiál	Stanovované látky	Kolona	Mobilní fáze	Průtok (ml/min)	Dávkovaný objem (μl)	Detekce	Zdroj
Šípky	Violaxanthin, lutein, zeaxanthin, rubixanthin, betakaroten	Phenomenex Luna 3 μ, 100 × 3 mm C18	A: ACN:MeOH:dichlormethan (16:3:1) B: ACN:MeOH:dichlormethan (6:4:10)	0,8	neuveđen	DAD 458 nm	[23]
Rajčata, kukuřičná mouka	Lykopen, betakaroten	Pathfinder AP-silica 100, C ₁₈ , 3,5 μm, RP, 4,6 × 150 mm	ACN:MeOH (1:1)	1,5	20	DAD 502 nm	[24]
Lidská a zvířecí plazma	Lutein, zeaxanthin, β-kryptoxanthin, α-karoten a betakaroten (celkem 26 látek)	YMC C ₃₀ , 3 μm, 4,6 × 150 mm	MeOH a MTBE	neuveđen	50	DAD 450 nm	[25]
Rajčata	Lykopen, betakaroten, zeaxanthin	Nucleodur ISIS, 1,8 μm, 5 cm × 4,6 mm a Nucleosil C18, 3 μm, 250 × 4,6 mm	A: voda B: aceton	0,7	neuveđen	DAD-MS	[26]
Kustovnice	Neoxanthin, all-trans-zeaxanthin, all-trans-betakaroten, β-cryptoxanthin, cis-zeaxanthin	C30	A: dichlormethan B: MeOH:ACN:voda (84:14:5)	1	20	DAD-MS 450 nm	[27]
Listová zelenina (špenát, brukev, sléz)	Betakaroten, 8-apokarotenal, lutein, chlorofyl, α-tokoferol	Agilent Zorbax Eclipse C18, 4,6 × 100 mm, 3,5 μm	A: methanol:voda (92:8) B: voda C: MTBE	1	10	DAD 450 nm	[28]
Rakytník	Neoxanthin, lutein, betakaroten, zeaxanthin, lykopen, α-karoten (celkem 22 látek)	YMC C30, 250 × 4,6 mm, 5 μm	A: MeOH: MTBE: voda (83:15:2) B: MeOH: MTBE: voda (8:90:2)	0,8	20	DAD-MS 450 nm	[29]
Borůvky, ostružiny, maliny, jahody, rybíz	Lutein, zeaxanthin, lykopen, β-kryptoxanthin, α-karoten, betakaroten	RP Prevail C ₁₈ , 50×4,6 mm, 5 μm	A: ACN:MeOH (95:5) B: ACN:MeOH:ethylacetát (60:20:20)	1	20	UV-VIS 450 nm	[30]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje a pomůcky

4.1.1 Přístroje

Chromatografická sestava: Shimadzu LC – 10

Pumpy: LC – 10 AC VP

Degasser: DGU – 14 A

Autosampler: SIL – HTA

Termostat: CTO – 10 AC VP

Detektor: DAD, SPD – M10A VP

Chromatografický software: LC Solution

Kolony: Supelco Analytical, RP-Amide; 100 mm x 4,6 mm; 5 μm

Agilent Technologies, Zorbax SB-C18; 50 mm x 4,6 mm; 1,8 μm

Phenomenex, Gemini C18 110A; 50 mm x 2,00 mm; 3 μm

Phenomenex, Gemini C18 110A; 30 mm x 2,00 mm; 3 μm

YMC, Triart C18; 50 mm x 3 mm; 1,9 μm

Ultrazvuková lázeň: Tescon 1, Tesla

Analytické váhy: Sartorius Genius

4.1.2 Pomůcky

PTFE filtry, o velikosti pórů 0,45 μm

Automatické pipety: Brand

Plastové uzavíratelné zkumavky o objemu 15 ml

Skleněné vialky o objemu 1,5 ml a inserty o objemu 150 μl

Základní laboratorní sklo a pomůcky

Tyčový mixér

4.2 Podmínky separace

Nástřik: 5 μ l

Teplota: 30°C

Detekce: 450 nm

Mobilní fáze: acetonitril a směs dichlormethanu s n-hexanem v poměru 1:1

Režim: isokratická eluce

Pumpa A: acetonitril (1,359 ml/min)

Pumpa B: dichlormethan:hexan (1:1); (0,05 ml/min)

Průtok: 1,409 ml/min

4.3 Použité chemikálie

Methanol chromasolv, Sigma Aldrich

Acetonitril chromasolv, Sigma Aldrich

Ethanol chromasolv, Sigma Aldrich

Hexan chromasolv, Sigma Aldrich

Methylenchlorid, Sigma Aldrich

Chloroform, Sigma Aldrich

Isopropanol, Sigma Aldrich

Demineralizovaná voda

4.4 Použitý materiál

Vzorky, standardy i pracovní roztoky byly skladovány v mrazicím boxu při teplotě -18 °C. Roztoky byly uskladněny v nádobách z tmavého skla. Tyto skladovací podmínky by měly zajistit potřebnou stabilitu karotenoidů a předejít jejich předčasné degradaci [31].

Z odborné literatury vzešel předpoklad, že obsah zeaxanthinu v našich vzorcích a za použitých podmínek by mohl být tak nízký, že nepůjde řádně kvantifikovat. Obsah betakarotenu a luteinu by měl dosahovat dostačujících množství [32, 33].

4.4.1 Standardy

Betakaroten (Sigma-Aldrich), čistota $\geq 97,0 \%$

Lutein (Applichem), čistota Pure

Zeaxanthin (Applichem), čistota Pure

4.4.2 Vzorky třešní

Použité plody třešní poskytl Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o. z rané sklizně roku 2016.

Pro optimalizaci a validaci měření byly použity stejné vzorky jako pro samotnou analýzu.

Stanovení obsahu se provedlo u následujících vybraných a dostupných odrůd: 'Gloria', 'Rum', 'Jubileu SI', 'NY 13688', 'Švestičková'

4.5 Příprava roztoků a vzorků

4.5.1 Příprava zásobních roztoků standardů

Pro každou látku byl připraven zásobní roztok zvlášť. Byl navážen 1 mg standardu betakarotenu a rozpuštěn v 1 ml chloroformu ($c = 1000 \text{ mg/l}$). Dále

byly naváženy standardy luteinu a zeaxanthinu každý po 0,5 mg a jejich navážky zvlášť rozpuštěny vždy v 1 ml chloroformu ($c = 500 \text{ mg/l}$). Vznikly tak tři zásobní roztoky, které byly uchovávány ve vialkách z tmavého skla a v mrazicím boxu při $-18 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.5.2 Příprava roztoků pro kalibraci

Pracovní roztok o objemu 500 μl byl připraven smísením 50 μl zásobního roztoku betakarotenu, 50 μl zásobního roztoku luteinu, 50 μl zásobního roztoku zeaxanthinu a 350 μl chloroformu.

Z tohoto pracovního roztoku byly připraveny příslušné kalibrační roztoky. Způsob ředění je uveden v Tabulce 2.

Tabulka 2: Příprava roztoků pro kalibraci

Koncentrace betakarotenu (mg/l)	Koncentrace luteinu a zeaxanthinu (mg/l)	Objem pracovního roztoku (μl)	Objem chloroformu (μl)
50	25	50	50
30	15	30	70
20	10	20	80
10	5	10	90
5	2,5	5	95
2	1	2	98
1	0,5	1	99
0,5	0,25	0,5	99,5

4.5.3 Příprava roztoků a vzorků pro validaci metody

Plody třešní byly nejprve vyndány z mrazicího boxu a 30 minut ponechány při pokojové teplotě. Dále byly třešně zbaveny pecek a v kádince zhomogenizovány tyčovým mixérem. Do osmi patnáctimililitrových plastových zkumavek bylo naváženo přibližně 9 g homogenizovaného vzorku třešní. Do tří

z těchto zkumavek byly přidány 2 ml samotného chloroformu. Do zbylých pěti bylo přidáno 1960 μ l chloroformu a 40 μ l pracovního roztoku, připraveného podle kapitoly 4.5.2. Do všech zkumavek byly ještě přidány 3 ml vody, které zajišťovaly lepší oddělení nemísitelných fází pro pohodlnější odběr organické fáze po proběhlé extrakci.

Takto připravené zkumavky byly intenzivně protřepávány po dobu 30 vteřin a následně vloženy na 15 minut do ultrazvukové lázně. Po ultrazvuku byla každá zkumavka 10 minut centrifugována při rychlosti 6000 ot/min a nakonec byla organická fáze vzorku pomocí injekční stříkačky přefiltrována do vialky přes PTFE filtr.

V dalších dvou vialkách bylo smíšeno 1960 μ l chloroformu a 40 μ l výše zmíněného porovnávacího roztoku, které při analýze sloužily jako samotné standardy. Přípravu roztoků pro validaci přehledně shrnuje Tabulka 3.

Tabulka 3: Složení jednotlivých roztoků pro validaci metody

Číslo zkumavky	Množství chloroformu (μ l)	Množství pracovního roztoku (μ l)	Množství vody (ml)
1	2000	x	3
2	2000	x	3
3	2000	x	3
4	1960	40	3
5	1960	40	3
6	1960	40	3
7	1960	40	3
8	1960	40	3
standard 1	1960	40	x
standard 2	1960	40	x

4.5.4 Příprava materiálu a vzorků pro stanovení obsahu

Všechny testované odrůdy prošly stejným postupem úpravy. Zmrzlé plody třešní byly nechány vždy 30 minut při pokojové teplotě, aby bylo možno je dále zpracovávat. Každá odrůda zvlášť byla zbavena pecek, převedena do kádinky a zhomogenizována tyčovým mixérem.

Dvě navážky byly připraveny z každé odrůdy (celkem 10 vzorků). Do plastové zkumavky bylo vždy odváženo přibližně 9 g homogenizátu a přidány 2 ml chloroformu a 3 ml demineralizované vody. Potom byly vzorky upraveny stejně jako v předchozí kapitole: 30 vteřin třepání, 15 minut ultrazvuková lázeň, 10 minut centrifugace a nakonec filtrace vzorku.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

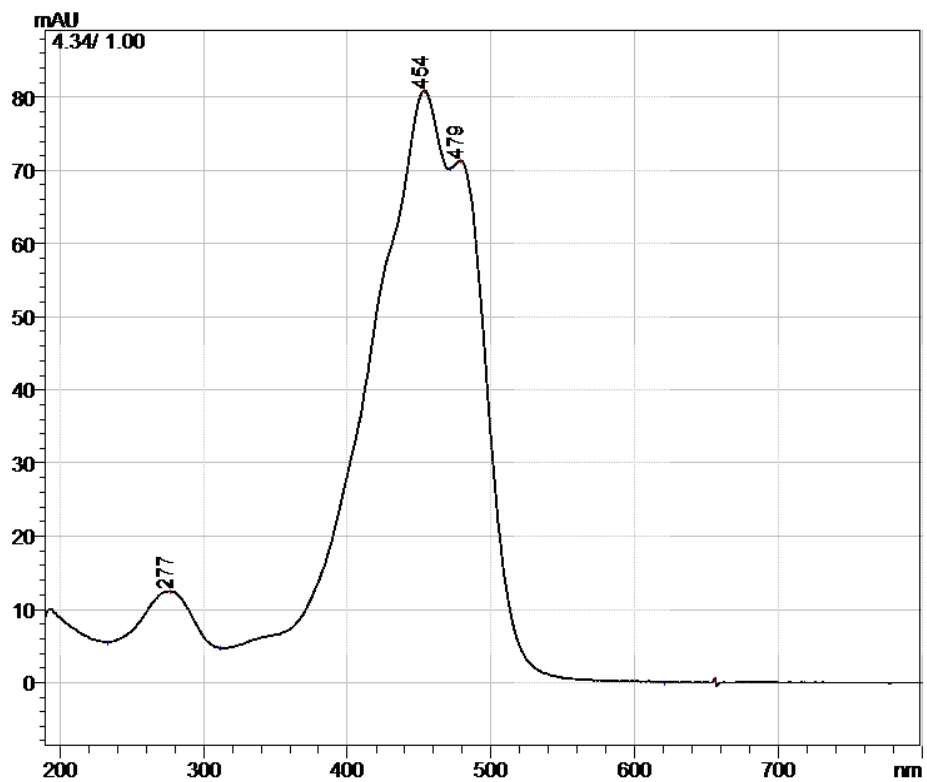
5.1 Vývoj metody

5.1.1 Optimalizace chromatografických podmínek

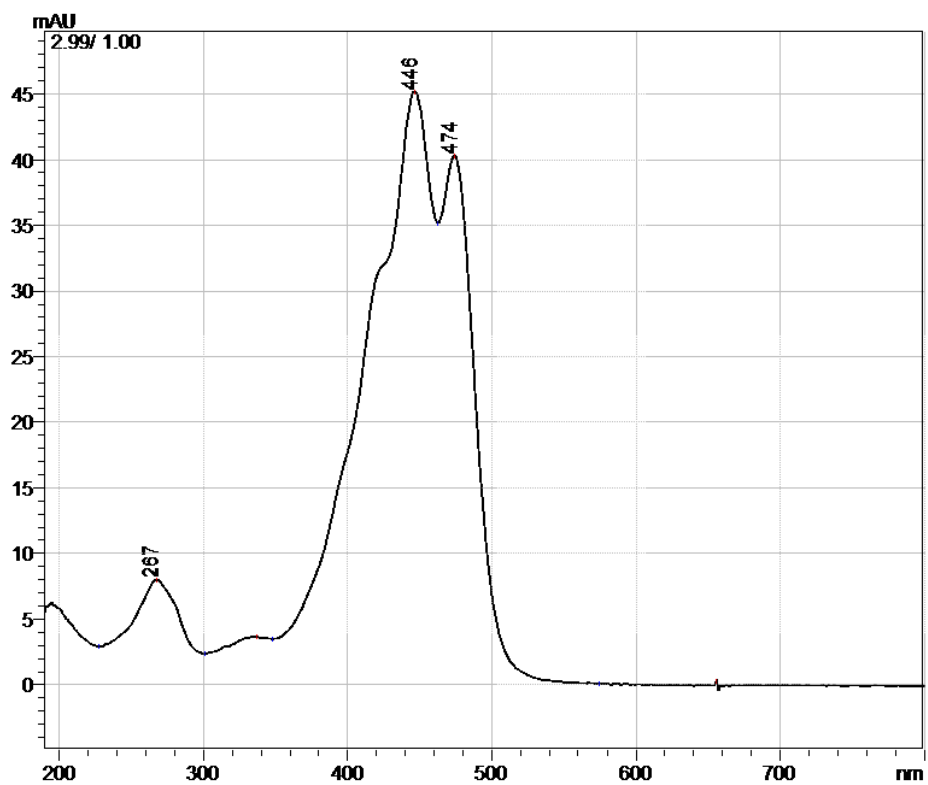
Optimalizace chromatografických podmínek je výběr takových podmínek analýzy, při kterých dojde v ideálním případě k co nejdokonalejší separaci složek směsi za co nejkratší čas. Týká se například volby složení mobilní fáze, výběru vhodné kolony, vlnové délky detektoru, objemu nástřiku a rychlosti průtoku MF.

5.1.1.1 Volba vlnové délky detektoru

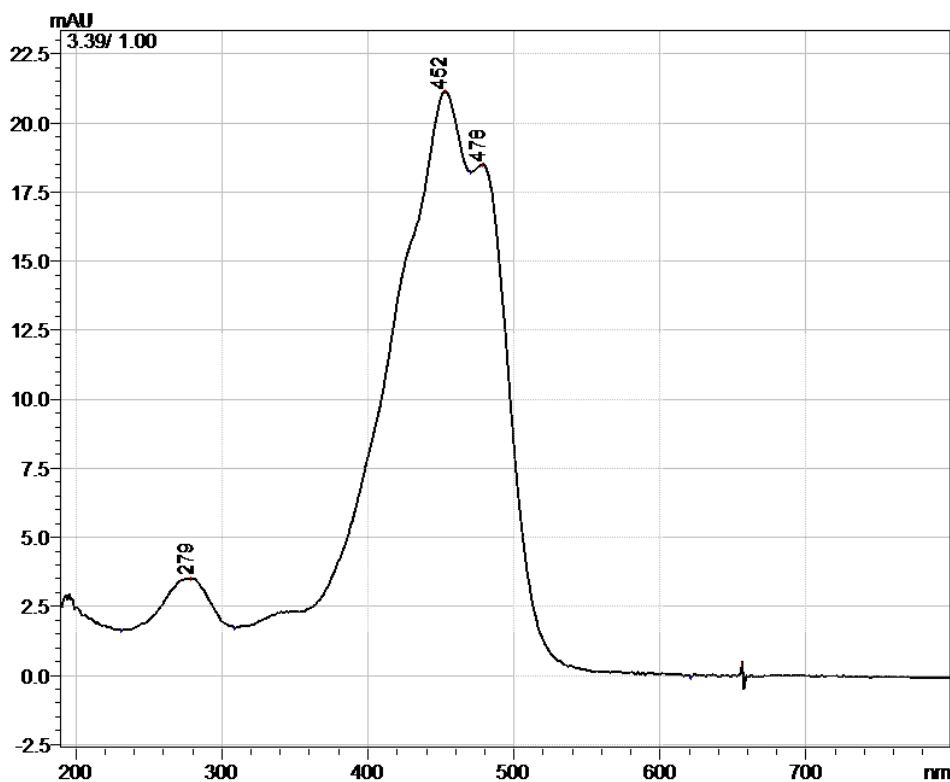
Karotenoidy ve své molekule obsahují velký počet konjugovaných dvojných vazeb, a proto absorbují záření ve viditelné oblasti, což je přibližně 400 – 760 nm. Proto byl pro jejich analýzu zvolen DAD detektor. Byla změřena absorpční spektra čistých standardů a podle nich zvolena vhodná vlnová délka pro analýzu.



Obrázek 5: Absorpční spektrum betakarotenu



Obrázek 6: Absorpční spektrum luteinu



Obrázek 7: Absorpční spektrum zeaxanthinu

Tabulka 4: Vlnové délky v maximu absorpce záření měřených karotenoidů

	λ_{\max} (nm)
Betakaroten	454
Lutein	446
Zeaxanthin	452

Pro detekci byla zvolena vlnová délka 450 nm. Tato vlnová délka je vhodná pro analýzu, jelikož při ní absorbují všechny tři zkoumané látky.

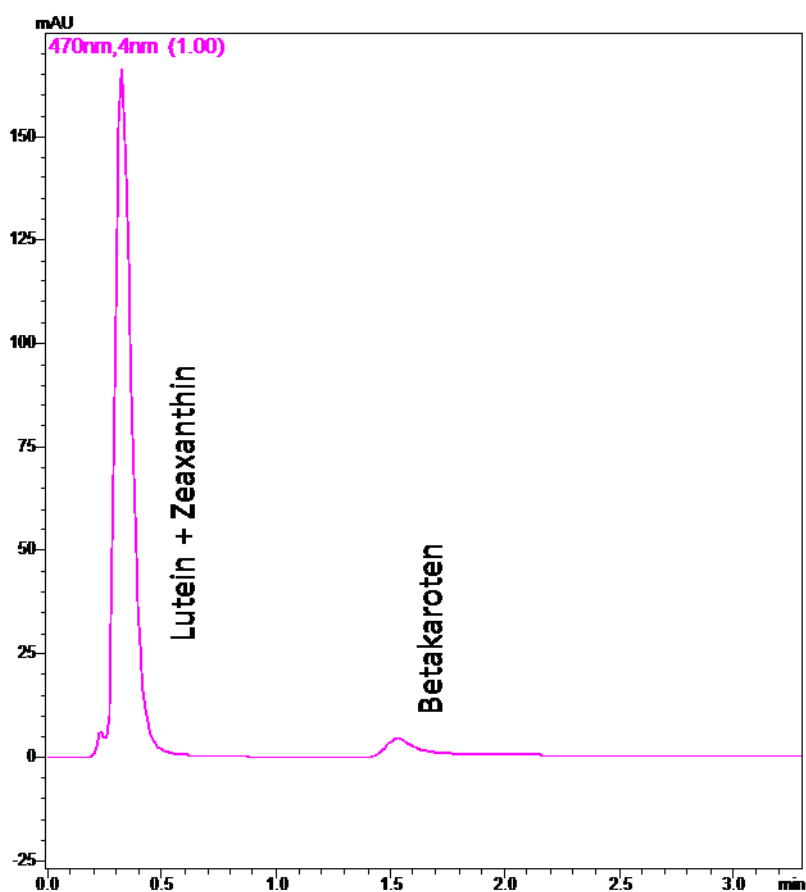
5.1.1.2 Volba nejvhodnější kolony a optimalizace složení mobilní fáze

Při výběru optimálního složení mobilní fáze se vycházelo z postupů uvedených v odborné literatuře.

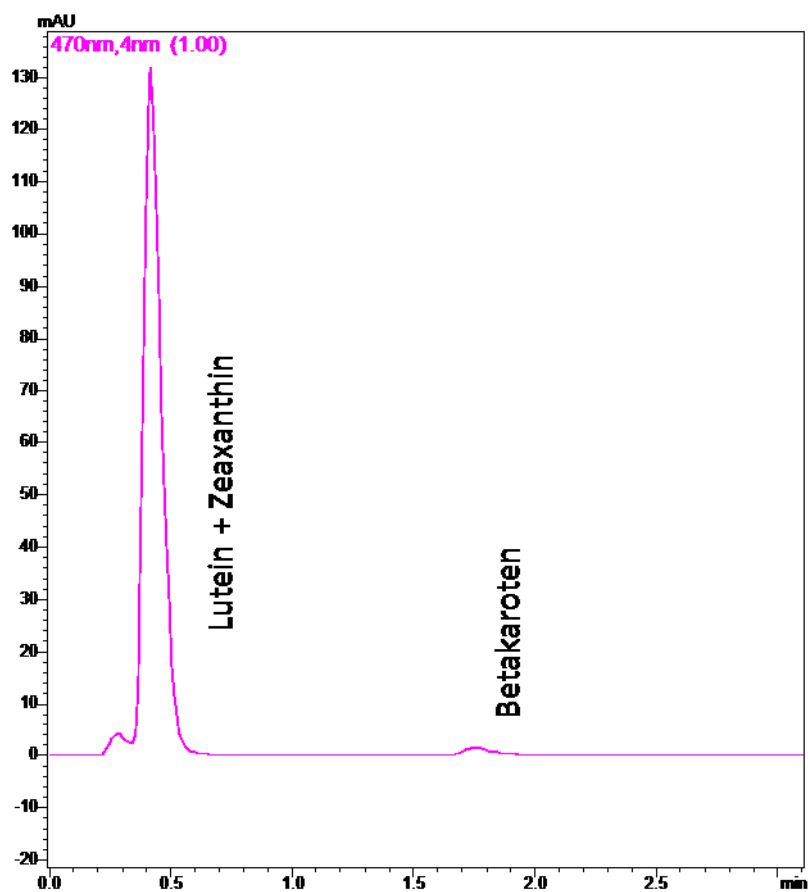
Byly testovány různé mobilní fáze a chromatografické kolony. Byly zkoušeny jak kolony využívající systém reverzních fází, tak i normálních fází. Kvůli tomu, že

lutein a zeaxanthin jsou polohové izomery, byl při testování řešen hlavní problém, a to jejich dostatečné oddělení na koloně. Dalším problémem byl fakt, že zkoumané látky nemají shodnou lipofilitu. Zatímco betakaroten je hydrofobní, zbývající dvě látky obsahují hydroxylové skupiny, které tyto látky hydrofilizují. Z toho důvodu musely být zvolené mobilní a stacionární fáze vybírány tak, aby se jednotlivé složky směsi jednoznačně separovaly a separace probíhala v přijatelném čase.

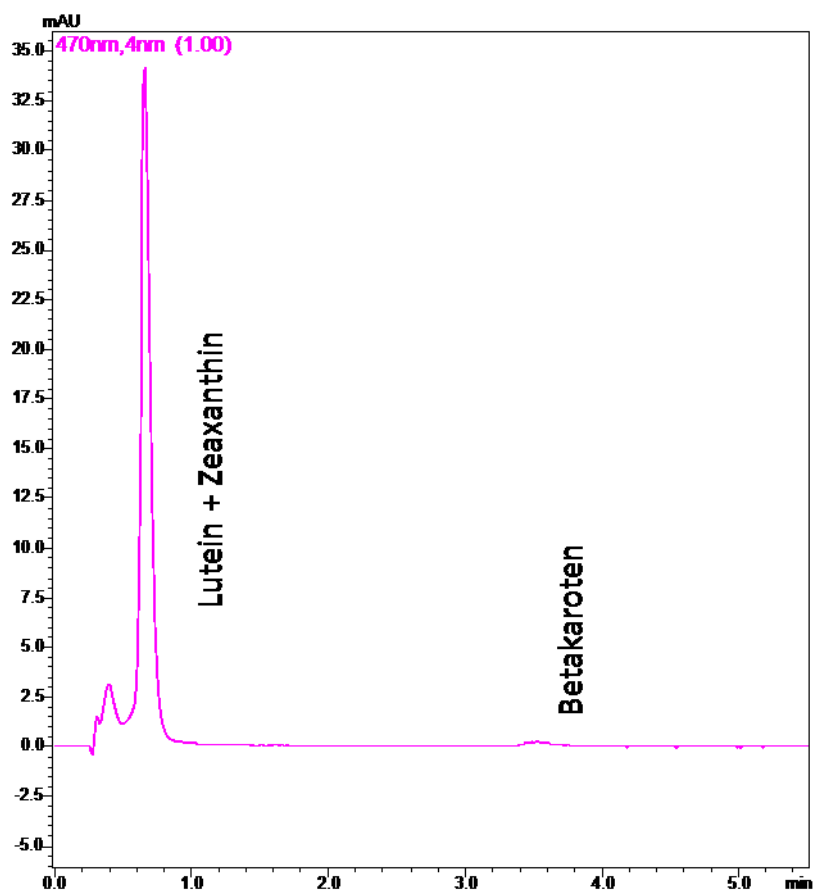
Na obrázcích 8 - 15 jsou uvedeny vybrané chromatografické záznamy získané při měřeních za různých podmínek (kolona, složení a průtok MF, teplota).



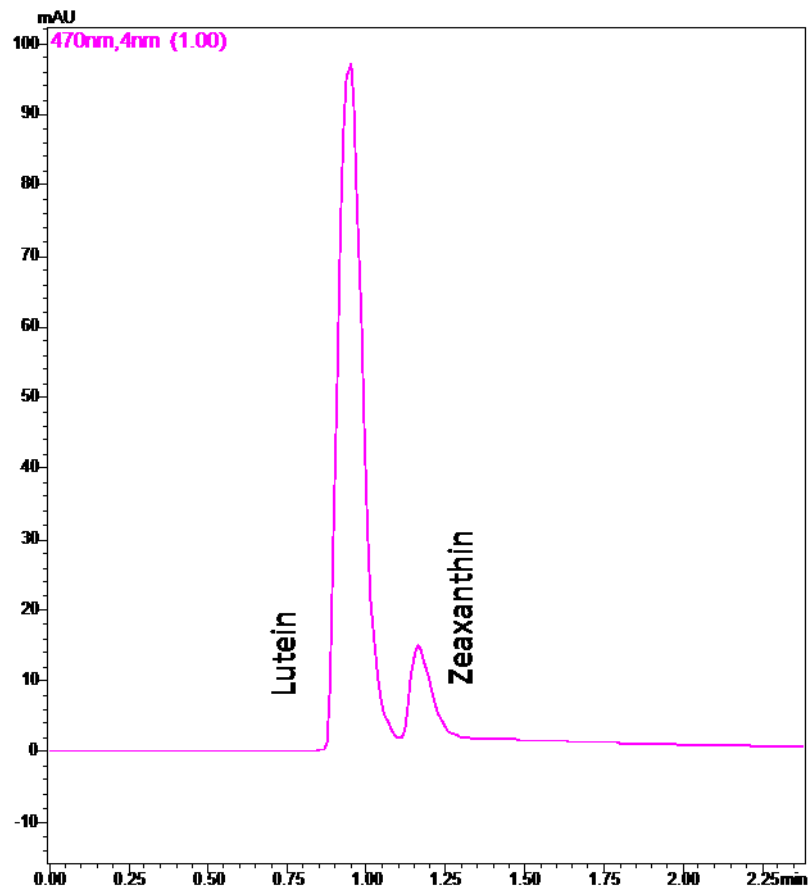
Obrázek 8: Chromatogram volby optimální kolony a MF – Phenomenex Gemini C18 (30 x 2,00 mm, 3 μ m), MeOH 100%, 0,7 ml/min, 30 °C



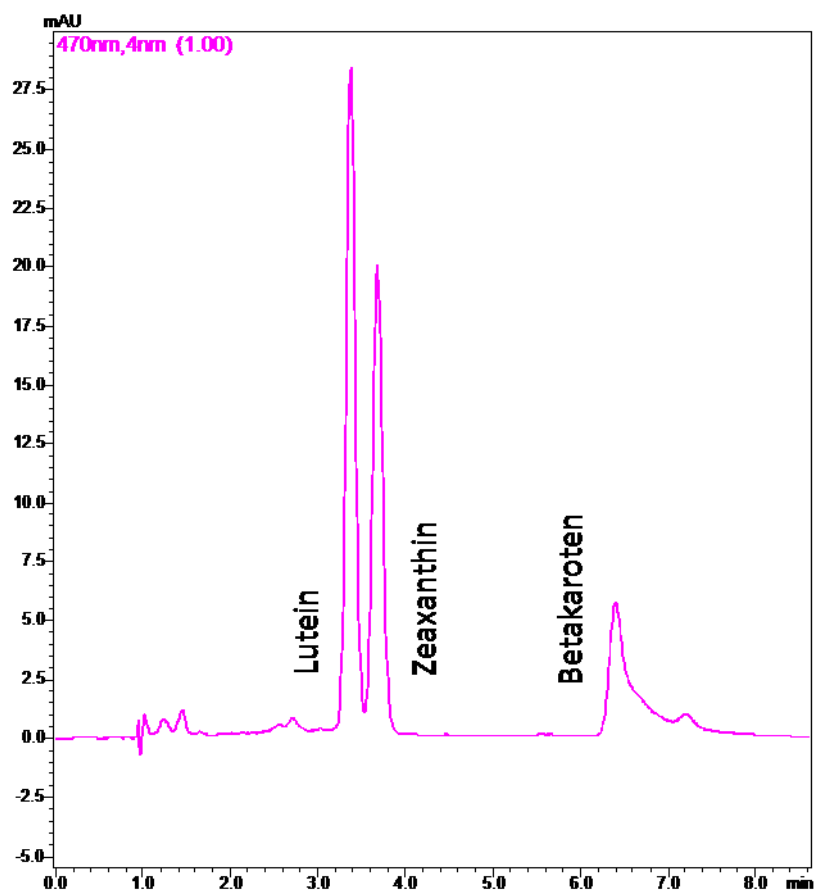
Obrázek 9: Chromatogram volby optimální kolony a MF – Phenomenex Gemini C18 (30 x 2,00 mm, 3 μ m), ACN 100%, 0,7 ml/min, 30 °C



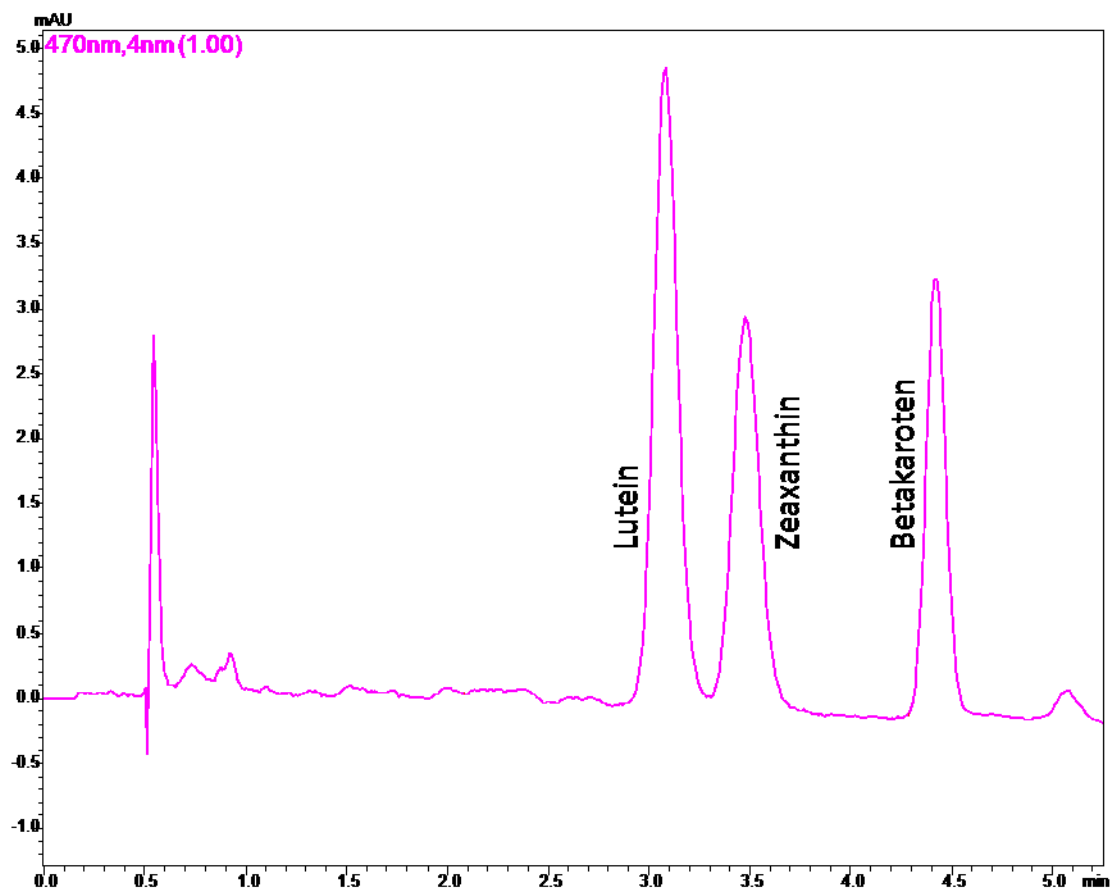
Obrázek 10: Chromatogram volby optimální kolony a MF – Phenomenex Gemini C18 (50 x 2,00 mm, 3 μ m), ACN 100%, 0,7 ml/min, 30 $^{\circ}$ C



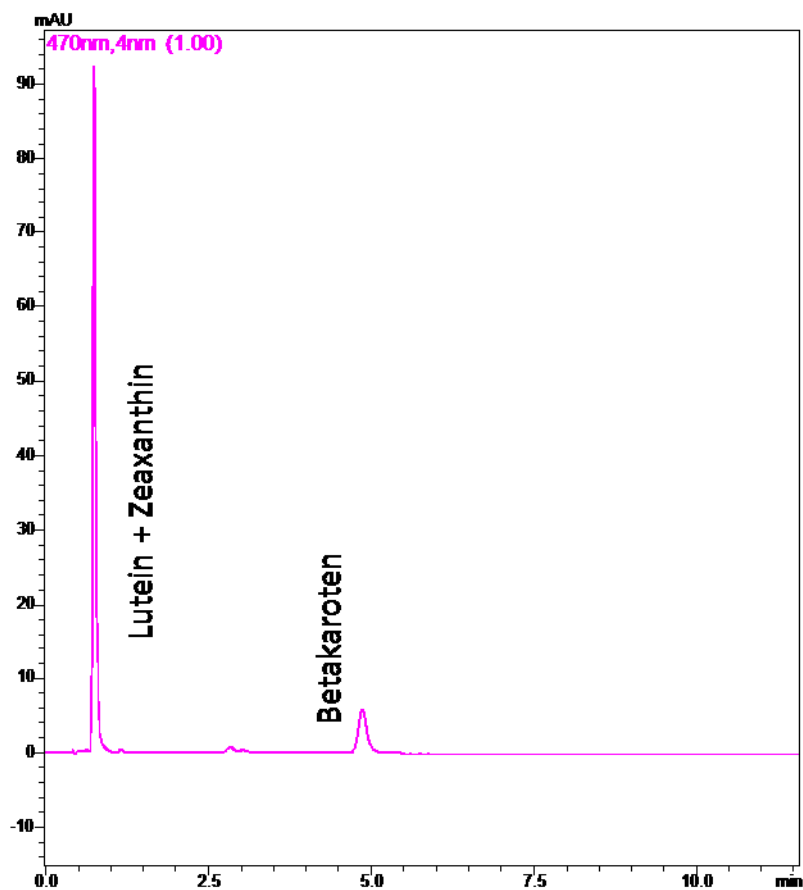
Obrázek 11: Chromatogram volby optimální kolony a MF – Supelco Analytical
RP-Amide (100 x 4,6 mm, 5 μ m), IPA 100%, 1 ml/min, 30 °C



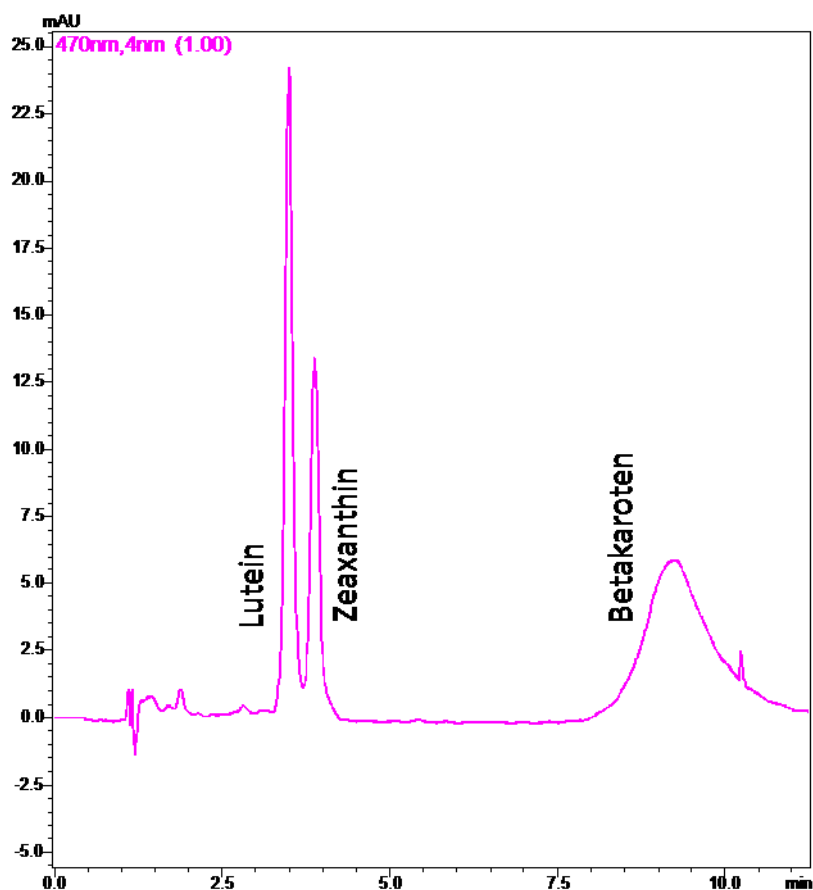
Obrázek 12: Chromatogram volby optimální kolony a MF – Supelco Analytical
RP-Amide (100 x 4,6 mm, 5 μ m), ACN:IPA (95:5), 1 ml/min, 30 °C



Obrázek 13: Chromatogram volby optimální kolony a MF – Supelco Analytical RP-Amide (100 x 4,6 mm, 5 μ m), acetonitril:dichlormethan:hexan (95:2,5:2,5), 2 ml/min, 30 °C



Obrázek 14: Chromatogram volby optimální kolony a MF – YMC Triart C18 (50 x 3,00 mm, 1,9 μ m), MeOH 100%, 1 ml/min, 30 °C



Obrázek 15: Chromatogram volby optimální kolony a MF – Agilent Technologies Zorbax SB-C18 (50 x 4,6 mm, 1,8 μ m), ACN:IPA (95:5), 1 ml/min, 30 °C

Z výsledků jednotlivých analýz byla nakonec pro tuto metodu vybrána kolona Supelco Analytical, RP-Amide; 10 cm x 4,6 mm; 5 μ m a mobilní fáze acetonitril:hexan:dichlormethan o poměru 96,6:1,7:1,7.

5.1.1.3 Volba objemu nástřiku vzorku a rychlosti průtoku mobilní fáze

Základní volba dávkovaného objemu vycházela z odborné literatury. Zpočátku zkoušení byl nástřikován objem 2 μ l, který se jevil jako dostatečný při dávkování standardů. Později bylo zjištěno, že tento objem není vhodný pro měření samotných vzorků, protože ty v dávkovaném objemu 2 μ l nedosahovaly stanovité koncentrace zjišťovaných látek. Dávkovaný objem byl tedy zvýšen na 10 μ l, což se projevilo mírným přetížením kolony, rozmytými výslednými píky

a zhoršenou separací. Nakonec byl objem nástřiku stanoven jako kompromis na objem 5 μ l. Tento objem byl maximální možný z hlediska přetížení kapacity kolony a téměř vhodný z pohledu koncentrace karotenoidů ve vzorku.

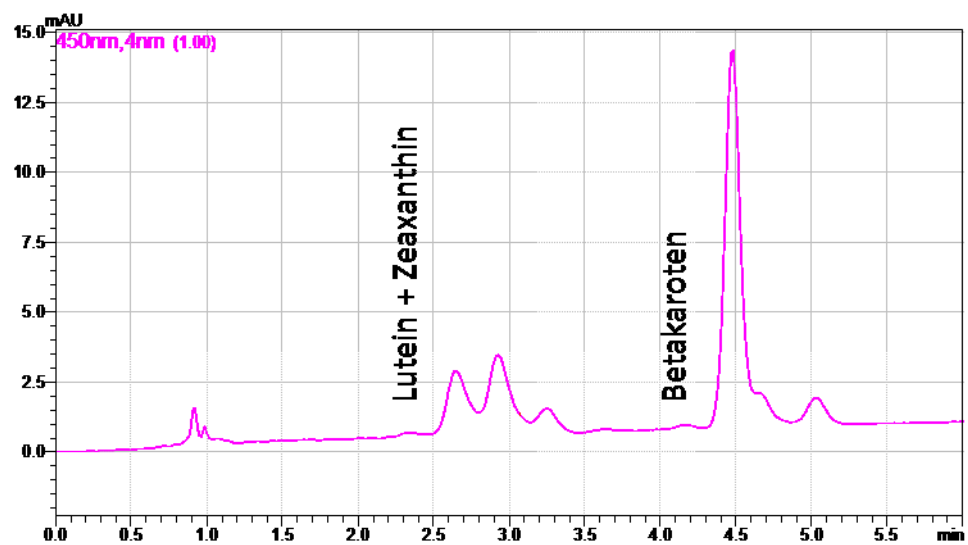
Během testování byly zkoušeny různé průtokové rychlosti a to za účelem zkrácení doby analýzy (příliš silná sorbce látek na koloně prodlouží retenční čas látek) nebo pro lepší rozdělení píků luteinu a zeaxanthinu na chromatogramu. Jako finální rychlost průtoku mobilní fáze byla zvolena rychlost 1,409 ml/min. Tato neobvyklá hodnota byla zvolena v důsledku netěsnosti ventilů jedné z pump, která byla zjištěna až v závěrečné fázi optimalizace. Po odstranění závady pak byla nově optimalizována průtoková rychlost tak, aby separace luteinu a zeaxanthinu proběhla v dostatečně krátkém čase. Tudíž byl průtok mobilních fází postupně měněn tak, aby byla dosažena stejná optimální separace jako před odstraněním závady.

5.1.1.4 Volba extrakčního činidla

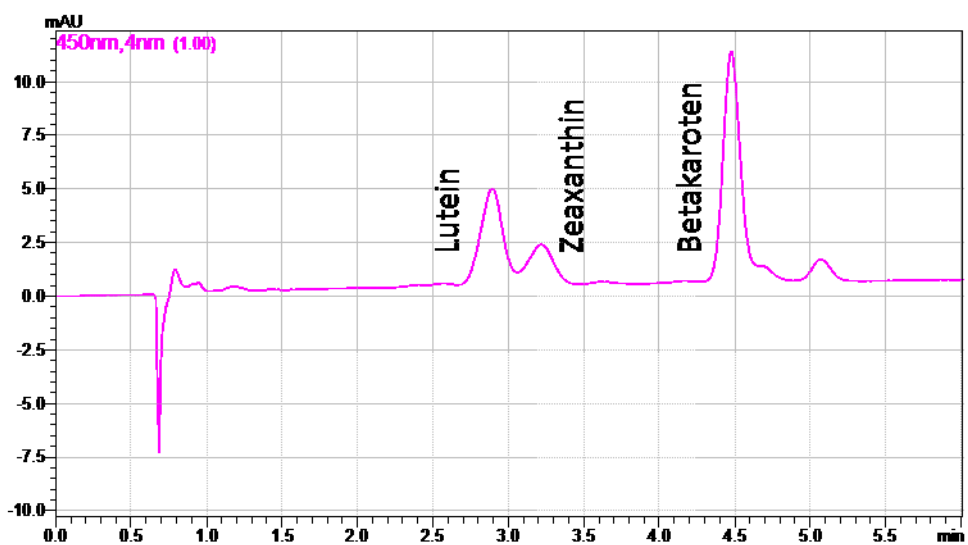
Při přípravě vzorků a při volbě extrakčního činidla bylo postupováno takto: do plastové zkumavky bylo přidáno 6 g homogenizované směsi třešní a vždy 3 ml zkoušeného extrakčního činidla. Tato směs byla potom 30 vteřin intenzivně protřepávána a vložena na 15 minut do ultrazvukové lázně. Následně byl každý vzorek 3 minuty centrifugován (3000 ot/min) a nakonec byla organická fáze vzorku přefiltrována do vialky.

Nejprve byly zkoušeny kombinace acetonu a hexanu v různých poměrech. Tato kombinace se ale rychle ukázala jako nepoužitelná kvůli rychlému těkání extrakčního činidla a nedostatečnému rozdělení obou vrstev u měřených vzorků. Nebyly měřeny opakovatelné výsledky.

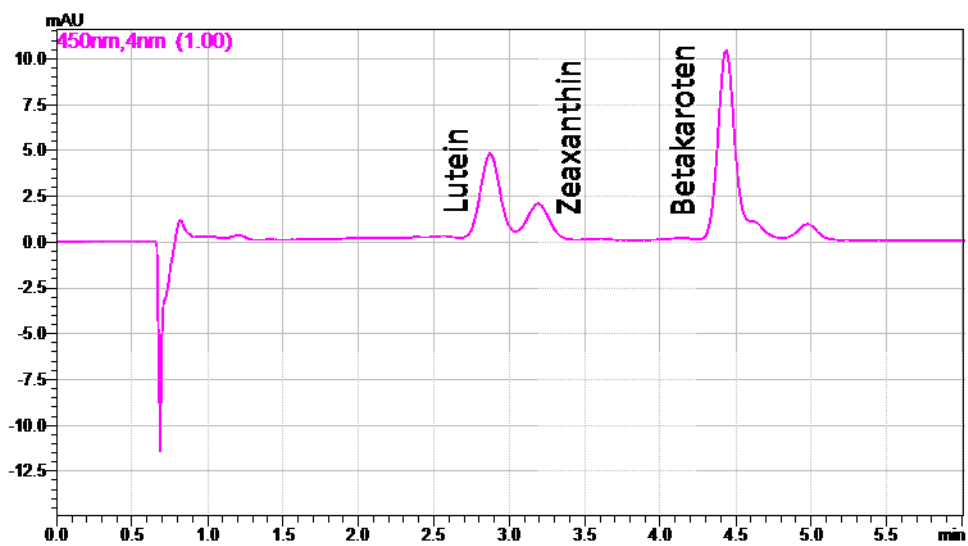
Hexan a chloroform se jevily jako stabilnější a vhodná činidla pro extrakci, a proto byly testovány kombinace, které jsou uvedeny na obrázcích 16 - 19.



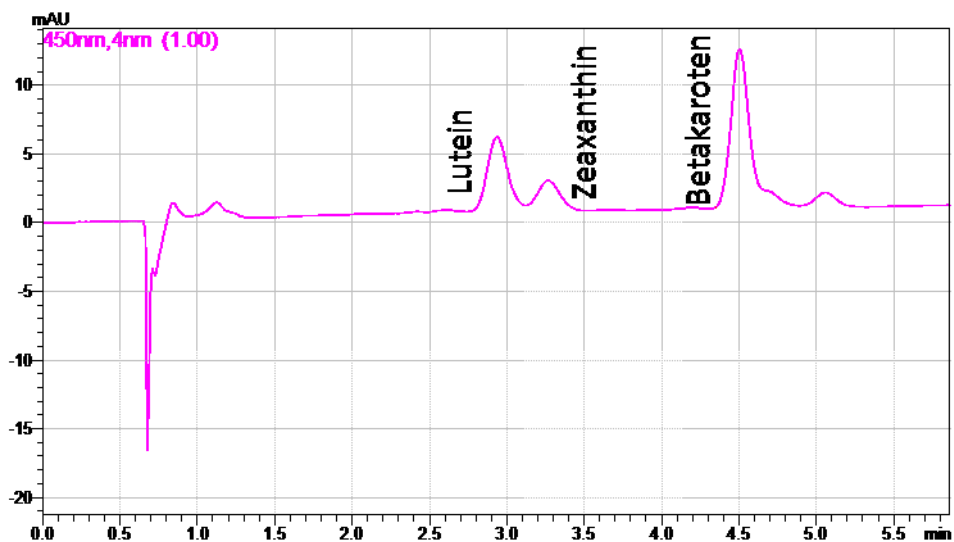
Obrázek 16: Chromatogram získaný při extrakci do Hexanu



Obrázek 17: Chromatogram získaný při extrakci do směsi
Hexan:Chloroform 1:1



Obrázek 18: Chromatogram získaný při extrakci do směsi Hexan:Chloroform 1:3



Obrázek 19: Chromatogram získaný při extrakci do chloroformu

Podle výsledků zkoušek byl jako nejvhodnější extrakční činidlo vybrán čistý chloroform, který vykazoval dobrou extrakční účinnost, bezproblémové oddělení obou vrstev a dostatečně rozdělené a symetrické píky. Jedinou nevýhodou

tohoto extrakčního činidla byla komplikace se získáním spodní vrstvy organické fáze. K tomu byla využita injekční jehla, kterou byla po částečné dekantaci odebrána vrstva chloroformu ze dna plastové zkumavky do plastové stříkačky a poté filtrována přes filtr.

5.2 Validace vyvinuté metody

Validace metody byla provedena za těchto optimalizovaných podmínek separace:

Kolona: Supelco Analytical, RP-Amide; 100 x 4,6 mm; 5 µm

Nástřik: 5 µl

Teplota: 30°C

Detekce: 450 nm

Mobilní fáze: acetonitril a směs dichlormethanu s n-hexanem v poměru 1:1

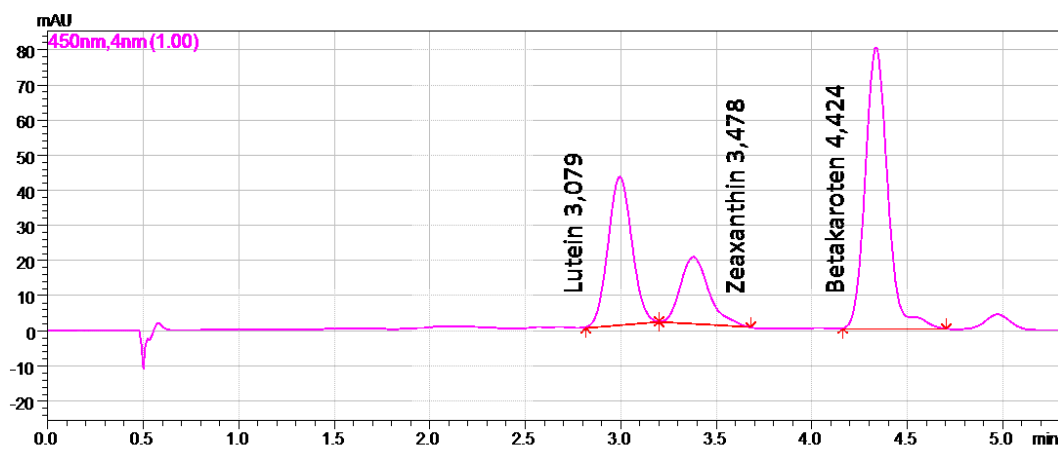
Režim: isokratická eluce

Pumpa A: acetonitril (1,359 ml/min)

Pumpa B: dichlormethan:hexan (1:1); (0,05 ml/min)

Průtok: 1,409 ml/min

5.2.1 Test vhodnosti chromatografického systému



Obrázek 20: Chromatogram získaný při testu vhodnosti chromatografického systému

Tabulka 5: Hodnoty veličin získaných při testu vhodnosti chromatografického systému

	Retenční čas	Faktor symetrie	Rozlišení	Počet teoretických pater	Kapacitní faktor
Lutein	3,079	1,091	15,14	2396	4,15
Zeaxanthin	3,478	1,396	1,48	2402	4,81
Betakaroten	4,424	1,160	3,84	6069	6,46

Všechny parametry uvedené v Tabulce 5 byly vypočítány z výsledků standardních roztoků při měření testu na opakovatelnost.

5.2.1.1 Asymetrie chromatografických píkú

Faktor symetrie byl vypočítán dle vzorce:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

$w_{0,05}$ je šířka píku ve dvacetině jeho výšky

d je vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku
a vzestupnou částí píku ve dvacetině jeho výšky

5.2.1.2 Rozlišení chromatografických píkú

Rozlišení píkú bylo zjištěno výpočtem podle vzorce:

$$R_s = 2 \left[\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1 + w_2} \right]$$

t_R je retenční čas

w je šířka píku na úrovni nulové linie

Minimální požadavek na dostatečné rozlišení píkú $> 1,5$ je splněn pouze pro dvojici píkú zeaxanthinu a betakarotenu. Dvojice lutein - zeaxanthin se v chromatogramu částečně překrývá, její rozlišení dosahuje hodnoty 1,48. Příčinou tohoto relativně nízkého rozlišení je podobnost v chemické struktuře těchto látek.

5.2.1.3 Počet teoretických pater

Počet teoretických pater N byl získán podle vzorce:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2$$

t_R je retenční čas

W_h je šířka píku v polovině jeho výšky

5.2.1.4 Kapacitní faktor

Kapacitní faktor byl vypočítán podle vzorce:

$$D_m = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

t_R je retenční čas

t_M je mrtvý retenční čas

5.2.2 Opakovatelnost

Na kolonu bylo šestkrát nadávkováno 5 μ l pracovního roztoku pro kalibraci o koncentracích betakarotenu 0,5; 5; 10 μ g/l (pro lutein a zeaxanthin tedy 0,25; 2,5; 5 μ g/l - příprava těchto roztoků je popsána v kapitole 4.5.2). Následně byly z ploch výsledných píků betakarotenu, luteinu a zeaxanthinu vypočítány směrodatné odchylky (RSD). Výsledky shrnují Tabulky 6, 7 a 8.

Tabulka 6: Opakovatelnost měření prac. roztoku pro kalibraci ($c = 0,5 \mu\text{g/l}$)

Koncentrace karotenoidů 0,5 mg/l			
Číslo pokusu	Plocha píku β -kar	Plocha píku Lut	Plocha píku Zea
1	5444	3350	1415
2	5490	3318	1418
3	5235	3319	1379
4	5587	3329	1444
5	5334	3324	1398
6	5236	3353	1321
průměr	5388	3332	1396
SD	143	16	43
RSD (%)	2,66	0,47	3,05

Tabulka 7: Opakovatelnost měření pracovního roztoku pro kalibraci ($c = 5 \mu\text{g/l}$)

Koncentrace karotenoidů 5 mg/l			
Číslo pokusu	Plocha píku β -kar	Plocha píku Lut	Plocha píku Zea
1	62684	48788	18954
2	67248	48433	20215
3	69232	51248	20714
4	71404	49472	21271
5	70626	51751	20871
6	72064	51563	21315
průměr	68876	50209	20557
SD	3485	1484	883
RSD (%)	5,06	2,96	4,29

Tabulka 8: Opakovatelnost měření pracovního roztoku pro kalibraci ($c = 10 \mu\text{g/l}$)

Koncentrace karotenoidů 10 mg/l			
Číslo pokusu	Plocha píku β -kar	Plocha píku Lut	Plocha píku Zea
1	152440	100011	44664
2	153015	101737	44678
3	156171	101066	46113
4	158677	102899	45463
5	158907	103998	45954
6	161765	104295	46503
průměr	156829	102334	45563
SD	3643	1691	767
RSD (%)	2,32	1,65	1,68

5.2.3 Linearita

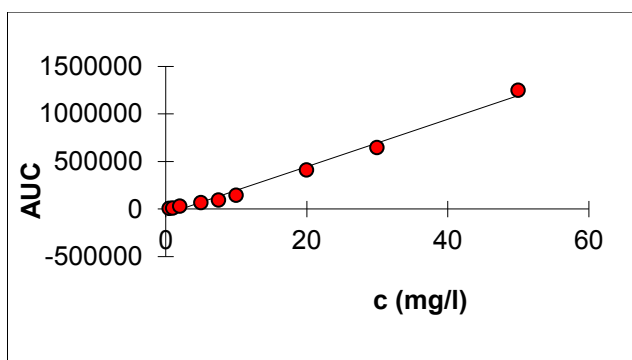
Linearita použité analytické metody byla zjišťována u všech tří látek na devíti roztocích standardů o různých koncentracích.

Koncentrace a plochy píků jsou shrnuty v níže uvedených tabulkách. Byly provedeny 3 nástřiky od každé koncentrace. Pro výpočty byly použity průměry ploch pod píkem z dílčích nástřiků. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí metody lineární regrese.

Betakaroten:

Tabulka 9: Test linearity – betakaroten

Koncentrace (mg/l)	Plocha píku
0,5	4800
1	8401
2	29472
5	67914
7,5	95294
10	144211
20	408811
30	644789
50	1248490



Obrázek 21: Graf lineární regrese – betakaroten

Regresní funkce: $y = kx + q$

Počet bodů $n = 9$

Směrnice $k = 24917,88 \pm 999,58$

Absolutní člen $q = -54163,33 \pm 21037,45$

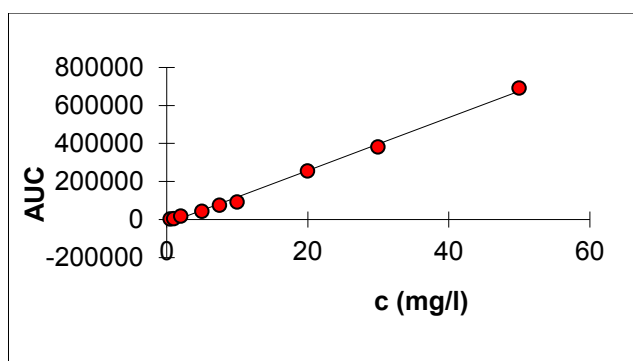
Korelační koeficient $R = 0,994415$

Reziduální odchylka $S_{\text{rez}} = 47123,71$

Lutein:

Tabulka 10: Test linearity – lutein

Koncentrace (mg/l)	Plocha píku
0,25	2784
0,5	4886
1	18130
2,5	43199
3,75	74833
5	92278
10	255503
15	382062
25	690911



Obrázek 22: Graf lineární regrese – lutein

Regresní funkce: $y = kx + q$

Počet bodů $n = 9$

Směrnice $k = 13928,38 \pm 339,7871$

Absolutní člen $q = -21154,18 \pm 7151,243$

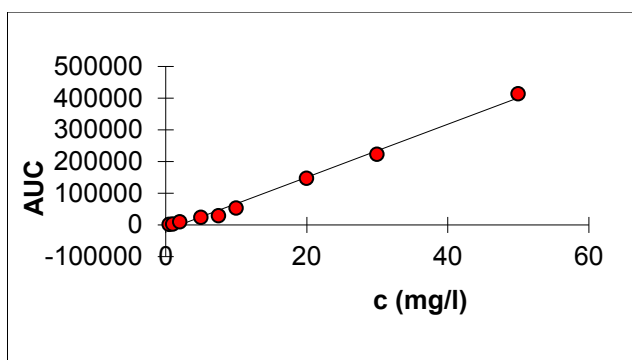
Korelační koeficient $R = 0,997924$

Reziduální odchylka $S_{\text{rez}} = 16018,72$

Zeaxanthin:

Tabulka 11: Test linearity – zeaxanthin

Koncentrace (mg/l)	Plocha píku
0,25	1313
0,5	2535
1	9907
2,5	24109
3,75	28982
5	53162
10	147134
15	222097
25	413408



Obrázek 23: Graf lineární regrese – Zeaxanthin

Regresní funkce: $y = kx + q$

Počet bodů $n = 9$

Směrnice $k = 8338,108 \pm 276,2933$

Absolutní člen $q = -16439,43 \pm 5814,937$

Korelační koeficient $R = 0,996179$

Reziduální odchylka $S_{\text{rez}} = 13025,41$

5.2.4 Přesnost

K určení parametru přesnosti bylo použito celkem pět roztoků, jejichž příprava je popsána v kapitole 4.5.3. U každého roztoku byly provedeny dva nástřiky na kolonu. Z těchto dvou nástřiků byl získán průměr, který byl přepočten na navážku 9 g, dle vzorce:

$$x = A \cdot \frac{9}{m}$$

A je průměrná plocha píku jedné látky

m je hmotnost konkrétního vzorku

Nakonec byly z takto získaných průměrů určeny relativní směrodatné odchylky stanovení jednotlivých karotenoidů ve vzorcích třešní.

Tabulka 12: Hodnoty přesnosti analytické metody

	Betakaroten	Lutein	Zeaxanthin
Průměrné hodnoty ploch píků přepočítané na navážku	44660	17259	7530
	47323	18749	8287
	44625	17449	7745
	47879	18255	7782
	53343	20833	9015
Průměr	47567	18510	8072
SD	3558	1433	596
RSD (%)	7,48	7,74	7,38

5.2.5 Správnost

Správnost byla vyjádřena výtěžností.

Ke zjištění výtěžnosti byly použity roztoky, které byly připraveny podle kapitoly 4.5.3. U každého roztoku byly provedeny dva nástřiky na kolonu. Ze získaných hodnot byla vypočtena průměrná plocha píků a následně byla přepočtena na navážku 9 g dle vzorce uvedeného v kapitole 5.2.4.

Samotná výtěžnost byla spočítána podle vzorce:

$$R_i = \frac{(A_{StVz} - A_{Vz})}{A_{St}} \cdot 100$$

A_{StVz} je průměr ploch píků s přidavkem standardu

A_{Vz} je průměr ploch píků bez standardu

A_{St} je průměr ploch píků samotných standardů

Tabulka 13: Výtěžnost analytické metody

	Betakaroten	Lutein
Výtěžnost (%)	99,90	101,42
	107,26	110,89
	99,81	102,63
	108,79	107,75
	123,89	124,14
Průměr	107,93	109,37
SD	9,83	9,11
RSD (%)	9,11	8,33

Průměrné hodnoty výtěžnosti stanovovaných látek byly 107,93 a 109,37 %. Hodnoty relativní směrodatné odchylky se pohybovaly v rozmezí 8,33 až 9,11 %. Zeaxanthin ve vzorcích bez přidavku standardu neposkytoval dostatečně hodnotitelné píky, a proto nebyla vyhodnocena ani jeho výtěžnost.

5.3 Stanovení obsahu karotenoidů v odrůdách třešní

Výše popsaná analytická metoda byla použita pro zjištění obsahu betakarotenu a luteinu v plodech pěti odrůd třešní. Obsah zeaxanthinu nebylo možno kvantitativně stanovit z důvodu jeho příliš nízké koncentrace ve vzorcích. Stanovení obsahu bylo provedeno metodou vnějšího standardu.

Obsah karotenoidů v třešních byl stanoven vždy ze dvou navážek od každé odrůdy (celkem deset roztoků, připravených podle kapitoly 4.5.4). Z výsledných ploch elučních křivek byly vypočítány průměrné plochy píků jednotlivých karotenoidů ze dvou navážek pro každou odrůdu. Potom bylo spočítáno množství stanovovaných karotenoidů v mg/l podle vzorce:

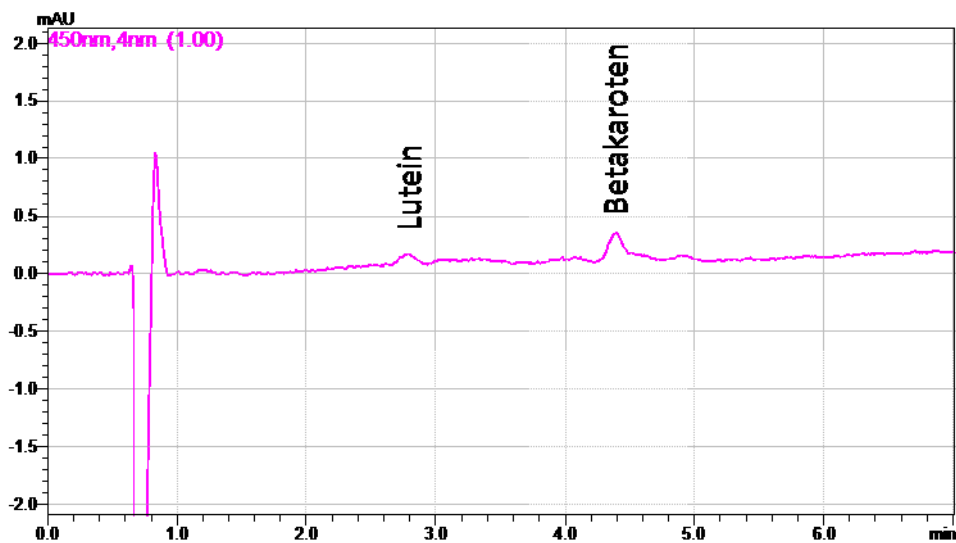
$$\frac{C_{Vz}}{C_{St}} = \frac{A_{Vz}}{A_{St}}$$

C_{Vz}	je koncentrace stanovované látky
C_{St}	je koncentrace standardu
A_{Vz}	je průměrná plocha píku stanovované látky přepočítaná na navážku
A_{St}	je průměrná plocha píku standardu

Množství jednotlivých karotenoidů bylo nakonec vyjádřeno v $\mu\text{g}/100\text{g}$ plodů podle tohoto postupu: Nejprve byl spočtený obsah (mg/l) převeden na mg vydělením pěti sty (vzorek byl extrahován do 2 ml chloroformu). Výsledek byl dále vynásoben hodnotou 100/navážka, čímž bylo získáno množství karotenoidů v mg/100g. Konečný výsledek byl násoben tisícem, a tím převeden na jednotky $\mu\text{g}/100\text{g}$ (μg karotenoidu/100g ovoce).

Níže jsou uvedeny chromatografické záznamy jednotlivých měřených odrůd.

5.3.1 Gloria



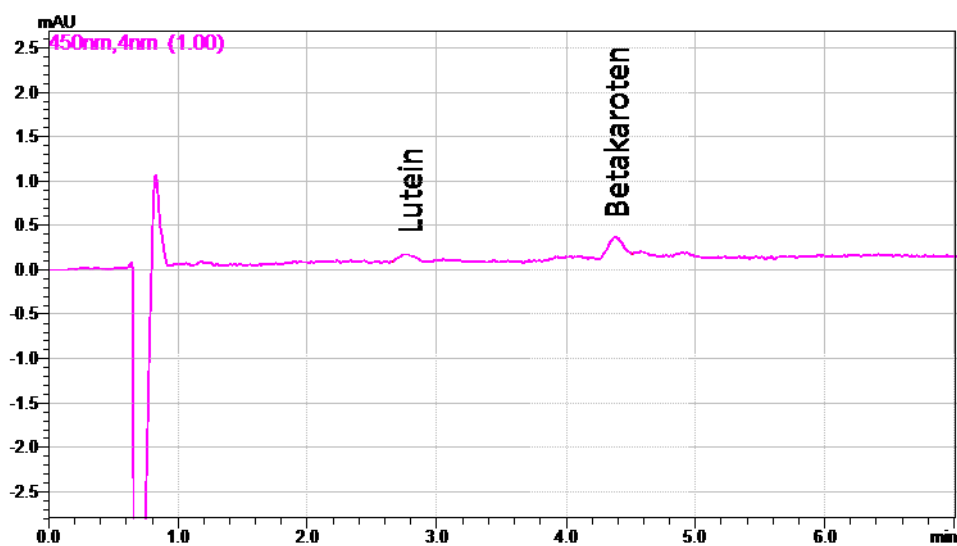
Obrázek 24: Chromatogram stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě 'Gloria'

Tabulka 14: Stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě 'Gloria'

GLORIA	A_{st}	c_{st} (mg/l)	A_{vz}	c_{vz} (mg/l)	($\mu\text{g}/100\text{g}$)
Betakaroten	54062	2	1828	0,068	1,52
Lutein	28793	1	638	0,022	0,50

V odrůdě třešňi 'Gloria' bylo stanoveno 1,52 μg betakarotenu a 0,5 μg luteinu na 100 g plodů.

5.3.2 Rum



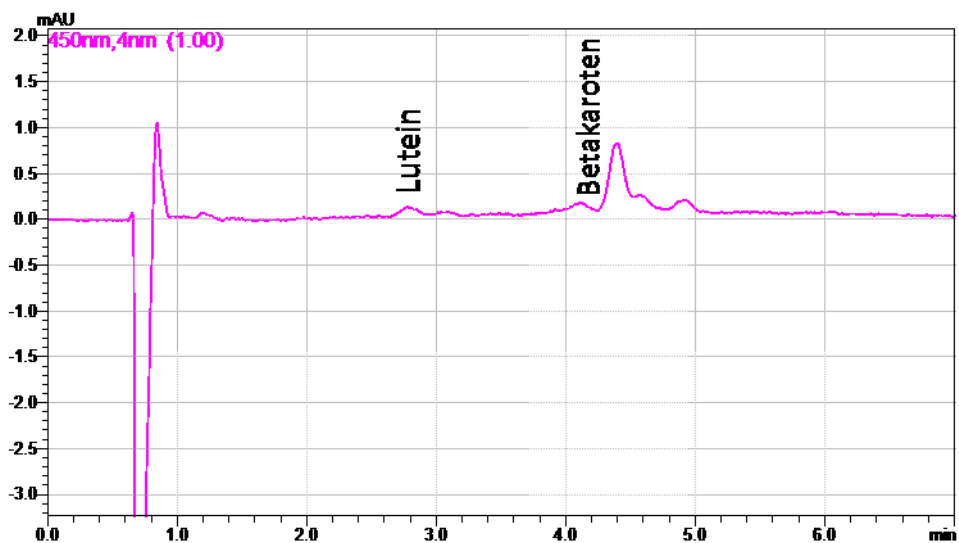
Obrázek 25: Chromatogram stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě 'Rum'

Tabulka 15: Stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě 'Rum'

RUM	A_{st}	c_{st} (mg/l)	A_{vz}	c_{vz} (mg/l)	($\mu\text{g}/100\text{g}$)
Betakaroten	54062	2	1454	0,054	1,21
Lutein	28793	1	805	0,028	0,63

V odrůdě třešňí 'Rum' bylo stanoveno 1,21 μg betakarotenu a 0,63 μg luteinu na 100 g plodů.

5.3.3 Jubileu SI



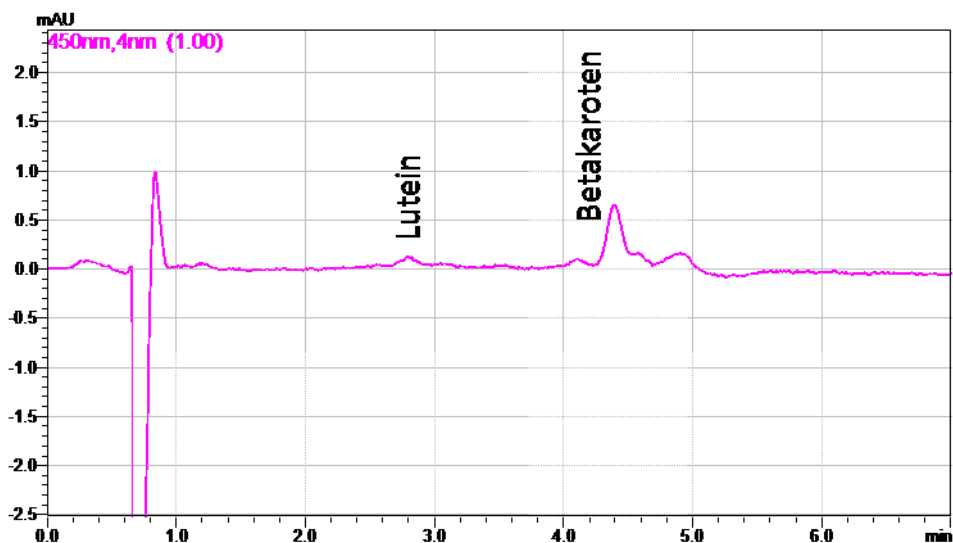
Obrázek 26: Chromatogram stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě 'Jubileu SI'

Tabulka 16: Stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě 'Jubileu SI'

JUBILEU SI	A_{st}	c_{st} (mg/l)	A_{vz}	c_{vz} (mg/l)	($\mu\text{g}/100\text{g}$)
Betakaroten	54062	2	5942	0,220	4,99
Lutein	28793	1	779	0,027	0,62

V odrůdě třešní 'Jubileu SI' bylo stanoveno 4,99 μg betakarotenu a 0,62 μg luteinu na 100 g plodů.

5.3.4 NY 13688



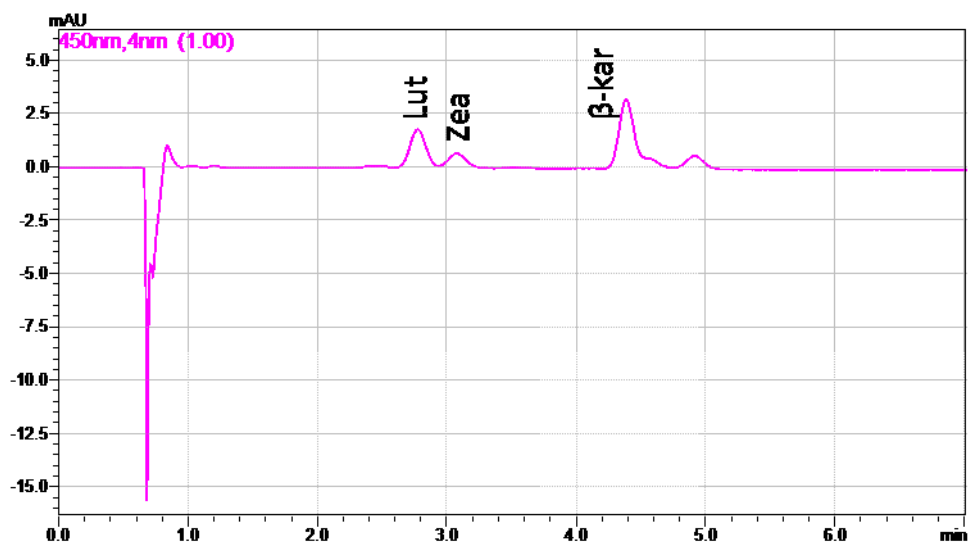
Obrázek 27: Chromatogram stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě 'NY 13688'

Tabulka 17: Stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě 'NY 13688'

NY 13688	A_{st}	c_{st} (mg/l)	A_{vz}	c_{vz} (mg/l)	($\mu\text{g}/100\text{g}$)
Betakaroten	54062	2	4700	0,174	3,76
Lutein	28793	1	615	0,021	0,46

V odrůdě třešní 'NY 13688' bylo stanoveno 3,76 μg betakarotenu a 0,46 μg luteinu na 100 g plodů.

5.3.5 Švestičková



Obrázek 28: Chromatogram stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě 'Švestičková'

Tabulka 18: Stanovení obsahu karotenoidů v odrůdě 'Švestičková'

ŠVESTIČKOVÁ	A_{st}	c_{st} (mg/l)	A_{vz}	c_{vz} (mg/l)	($\mu\text{g}/100\text{g}$)
Betakaroten	54062	2	23230	0,859	18,13
Lutein	28793	1	14545	0,505	10,66

V odrůdě třešní 'Švestičková' bylo stanoveno 18,13 μg betakarotenu a 10,66 μg luteinu na 100 g plodů.

5.4 Diskuze

U většiny testovaných odrůd, kromě odrůdy 'Švestičková', bylo zjištěno, že obsah karotenoidů je příliš nízký pro vyhodnocení pomocí kalibrační křivky. Proto bylo hodnocení provedeno jako výsledek přímého srovnání vůči standardu o definované koncentraci. Získané hodnoty jsou však pouze orientační, a to zejména u luteinu, kde se hodnoty pohybovaly na hranici detekovatelnosti a byly pod validovaným rozmezím linearity.

Jelikož výzkum na téma stanovení karotenoidů v třešních a višních bude na pracovišti i po této diplomové práci dále pokračovat, zejména analýzou višní, kde se očekává vyšší koncentrace karotenoidů a je již potvrzená předběžnými výsledky [34], bude potřeba vyvinutou metodu dále upravit a to zejména z ohledu zvýšení citlivosti stanovení.

Jelikož není možné pro tento účel použít vyšší dávkovaný objem vzorku kvůli přetížení kapacity kolony, nabízí se prakticky pouze dvě možná řešení. Rozšíření kalibrační křivky a ověření linearity k nižším koncentracím nabízí pouze omezený rozsah řešení problému. Proto druhou a účinnější variantou bude testování zvýšení navážky a snížení objemu extrakčního činidla se současným odpařením extrakčního činidla a zakoncentrováním do menšího objemu. Tato možnost nabízí 5 - 10 násobné zakoncentrování karotenoidů, což by mělo být pro analýzu zejména betakarotenu dostačující.

6 ZÁVĚR

V této diplomové práci byla popsána HPLC metoda pro stanovení betakarotenu, luteinu a zeaxanthinu. U dané metody byly zjištěny následující optimální podmínky. Měření bylo provedeno na koloně RP-Amide; 100 x 4,6 mm; 5 µm od firmy Supelco Analytical. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu a roztoku, vzniklého smísením dichlormethanu s n-hexanem v poměru 1:1. Celá analýza probíhala v režimu isokratické eluce. Průtok mobilní fáze byl zvolen 1,409 ml/min a teplota 30°C. Pro detekci stanovovaných karotenoidů byla, pomocí proměření hodnot absorpčních maxim, určena vlnová délka 450 nm.

Retenční čas pro betakaroten byl 4,424 minut, lutein 3,079 minut a zeaxanthin 3,478 minut. Proměření linearit v koncentračním rozmezí 0,5; (0,25) – 50 mg/l byly získány následující hodnoty korelačních koeficientů. Pro betakaroten 0,99441, pro lutein 0,99792 a pro zeaxanthin 0,99618. Opakovatelnost, která byla zjišťována pro koncentrace 0,5; 5 a 10 mg/l, pro jednotlivé látky dosahovala hodnot směrodatných odchylek v rozmezí 0,47 – 5,06 %. Přesnost byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka, která dosahovala hodnoty 7,48 % pro betakaroten, 7,74 % pro lutein a 7,38 % pro zeaxanthin. Správnost byla určena pomocí výtěžnosti a kvůli nedostatečné koncentraci zeaxanthinu ve vzorcích byla stanovena pouze pro betakaroten a lutein. Průměrné hodnoty výtěžnosti zkoumaných látek byly 107,93 a 109,37 % a hodnoty jejich relativní směrodatné odchylky 8,33 a 9,11 %.

Výsledky validace metody v této práci často nedosahují ideálních hodnot. Bylo to pravděpodobně zapříčiněno charakterem měřeného rostlinného materiálu a nižší spolehlivostí měřící sestavy během validace metody. I přes zmíněné nedostatky má tato práce určitou hodnotu především jako podklad pro další zkoumání karotenoidů z rostlinných zdrojů.

Orientačně stanovený obsah hodnocených karotenoidů v třešních dosahoval hodnot 1,52 µg/100g betakarotenu a 0,50 µg/100g luteinu pro odrůdu 'Gloria', 1,21 µg/100g β-kar a 0,63 µg/100g Lut pro odrůdu 'Rum', 4,99 µg/100g β-kar a 0,62 µg/100g Lut pro odrůdu 'Jubileu SI', 3,76 µg/100g β-kar a 0,46 µg/100g Lut pro odrůdu 'NY 13688', 18,13 µg/100g β-kar a 10,66 µg/100g Lut pro odrůdu 'Švestičková'.

Nejvyšší obsah karotenoidů byl zjištěn v odrůdě 'Švestičková'.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] F. KHACHIK, Ch. J. SPANGLER, J. C. SMITH: Analytical Chemistry 69, (1997) 1873-1881
- [2] L. LI, J. QIN, Shi-an YIN, G. TANG: Chromatographia 65, (2007) 91-94
- [3] Extrakce a metody stanovení karotenoidů (citováno 20. 4. 2017). Dostupné z: <http://sweb.cz/HPLC1/index.html>
- [4] K. WAISSER: Bioorganická chemie, Praha, Karolinum (1998), s. 89-90
- [5] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=5280489 (citováno 21. 4. 2017). Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280489>
- [6] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=5281243 (citováno 21. 4. 2017). Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281243>
- [7] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=5280899 (citováno 21. 4. 2017). Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280899>
- [8] Chromatografie. WikiSkripta [online], 2008 (citováno 22. 4. 2017) ISSN 18046517. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Chromatografie&oldid=283463>
- [9] P. KLOUDA, Moderní analytické metody, 2. vydání, Ostrava, 2003, s. 9–26, ISBN 80-86369-07-2
- [10] Laboratory info, High Performance Liquid Chromatography: Principle, Types, Instrumentation and Applications (citováno 22. 4. 2017). Dostupné z: <http://laboratoryinfo.com/hplc/>
- [11] L. NOVÁKOVÁ, M. DOUŠA a kol. Moderní HPLC separace v teorii a praxi I, 2013, ISBN 978-80-260-4243-3
- [12] Kapalinová chromatografie (citováno 23. 4. 2017). Dostupné z: https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52970

- [13] Schéma kapalinového chromatografu (citováno 16. 3. 2017). Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-002_v1/hesla/chromatografie_kapalinova_vysoceucinna.html
- [14] Validační program pro statistické zpracování analytických dat. 26. 1. 2011, (citováno 23. 4. 2017). Dostupné z: http://www.hplc.cz/Validace/program_validace.htm
- [15] J. KLIMEŠ a kol., Kontrola chemických léčiv II, Praha, Karolinum, 2004, s. 79 – 82
- [16] Český lékopis 2009. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2009. ISBN 978-80-247-2994-7
- [17] Hplc.cz, Teorie HPLC (citováno 23. 4. 2017). Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
- [18] P. KLOUDA, Moderní analytické metody, 2. vydání, Ostrava, 2003, s. 132, ISBN 80-86369-07-2
- [19] M. FRIČOVÁ, Stanovení chloridů ve farmaceutických substancích. Chemická fakulta Vysokého učení technického v Brně, Brno, 2008
- [20] P. ŠVESKOVÁ, Vývoj HPLC metody pro stanovení vitamínu E v přípravku Geladrink. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, 2009
- [21] Hodnocení linearity, 14. 12. 2010 (citováno 24. 4. 2017). Dostupné z: <http://www.hplc.cz/Validace/linearita.html>
- [22] J. RACEK, Klinická biochemie. 2. přepracované vydání. Galén, 2006, s. 329 ISBN 80-7262-324-9.
- [23] ZHONG, Lijie, Karl-Erik GUSTAVSSON, Stina OREDSSON, Bartosz GŁĄB, Jenny Lindberg YILMAZ a Marie E. OLSSON. Analytical Methods: Determination of free and esterified carotenoid composition in rose hip fruit by HPLC-DAD-APCI+-MS. Food Chemistry [online]. 2016, 210, 541-550 (citováno 8. 4. 2017). DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.05.002. ISSN 03088146.

- [24] LUTEROTTI, Svjetlana, Ksenija MARKOVIĆ, Mladen FRANKO, Dane BICANIC, Azamela MADŽGALJ a Kristina KLJAK. Analytical Methods: Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determination of carotenoids in foods. *Food Chemistry* [online]. 2013, 140(1-2), 390-397 (citováno 8. 4. 2017). DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.02.003. ISSN 03088146.
- [25] MELENDEZ-MARTINEZ, Antonio J., Carla M. STINCO, Chun LIU a Xiang-Dong WANG. Analytical Methods: A simple HPLC method for the comprehensive analysis of cis/trans (Z/E) geometrical isomers of carotenoids for nutritional studies. *Food Chemistry* [online]. 2013, 138(2-3), 1341-1350 (citováno 8. 4. 2017). DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.10.067. ISSN 03088146.
- [26] Hussein G. DAOOD, Gyula BENCZE, Gábor PALOTÁS, Zoltán PÉK, Akmal SIDIKOV, Lajos HELYES; HPLC Analysis of Carotenoids from Tomatoes Using Cross-Linked C18 Column and MS Detection. *J Chromatogr Sci* [online] 2014; 52 (9): 985-991 (citováno 8. 4. 2017). DOI: 10.1093/chromsci/bmt139
- [27] INBARAJ BS, LU H, HUNG CF, WU WB, LIN CL a CHEN BH. Determination of carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-APCI-MS. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis* [online]. 2008, 47(4-5), 812-8 (citováno 8. 4. 2017). DOI: 10.1016/j.jpba.2008.04.001. ISSN 07317085.
- [28] ZEB, A. A simple, sensitive HPLC-DAD method for simultaneous determination of carotenoids, chlorophylls and α -tocopherol in leafy vegetables. *Journal of Food Measurement and Characterization* [online]. 2017, 1 - 8 (citováno 8. 4. 2017). DOI: 10.1007/s11694-017-9472-y. ISSN 21934134.
- [29] GIUFFRIDA, D., A. PINTEA, R.M. POP, P. DUGO, G. TORRE a L. MONDELLO. Determination of carotenoids and their esters in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) by HPLC-DAD-APCI-MS. *Phytochemical Analysis* [online]. 2012, 23(3), 267 - 273 (citováno 8. 4. 2017). DOI: 10.1002/pca.1353. ISSN 09580344.
- [30] MARINOVA, D. a F. RIBAROVA. Original Article: HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. *Journal of Food Composition and Analysis*

[online]. 2007, 20(5), 370-374 (citováno 8. 4. 2017). DOI: 10.1016/j.jfca.2006.09.007. ISSN 08891575.

[31] DIAS, M. Graça, M. Filomena G.F.C. CAMÕES a Luísa OLIVEIRA. Carotenoid stability in fruits, vegetables and working standards – Effect of storage temperature and time. Food Chemistry [online]. 2014, 156, 37-41 (citováno 8. 4. 2017). DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.01.050. ISSN 03088146.

[32] DIAS, M. Graça, M. Filomena G.F.C. CAMÕES a Luísa OLIVEIRA. Carotenoids in traditional Portuguese fruits and vegetables. Food Chemistry [online]. 2009, 113(3), 808-815 (citováno 8. 4. 2017). DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.08.002. ISSN 03088146.

[33] SELF nutrition data, Cherries, sour, red, raw Nutrition Facts & Calories (citováno 24. 3. 2017). Dostupné z: <http://nutritiondata.self.com/facts/fruits-and-fruit-juices/1861/2>

[34] SVOBODOVÁ, M. HPLC stanovení vybraných karotenoidů v odrůdách višňi. *Rigorózní práce – Farmaceutická fakulta Hradec Králové – nepublikované výsledky*