

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Separace rostlinných pigmentů vysokoúčinnou
kapalinovou chromatografií

Mgr. Milada Roštejnská

Školitel: RNDr. Václav Martínek, Ph.D.

Praha 2007

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Václava Martínka, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

Místo a datum: *31. 8. 2007, Praha*

Podpis: *Milada Rottějnová*

Na tomto místě bych chtěla poděkovat školiteli RNDr. Václavu Martínkovi, Ph.D. za všestrannou pomoc, cenné rady a trpělivost při vedení této bakalářské práce.

Seznam použitých zkratek

GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
HPLC	vysokoučinná/vysokotlaká kapalinová chromatografie (high performance/pressure liquid chromatography)
TLC	tenkovrstevná chromatografie (thin layer chromatography)
λ	vlnová délka
u	průtoková rychlost mobilní fáze
T	teplota
t_R	retenční čas
V_R	retenční objem
M_f	mobilní fáze
UV-vis	ultrafialová a viditelná oblast (ultraviolet-visible)
THF	tetrahydrofuran

Obsah

1	ÚVOD	7
1.1	ROSTLINNÉ PIGMENTY	7
1.1.1	<i>Chlorofyly</i>	7
1.1.2	<i>Karotenoidy</i>	8
1.2	IDENTIFIKACE KAROTENOIDŮ A CHLOROFYLŮ POMOCÍ UV-VIS SPEKTROFOTOMETRU	12
1.2.1	<i>Identifikace chlorofylů</i>	13
1.2.2	<i>Identifikace karotenoidů</i>	15
1.3	CHROMATOGRAFICKÉ METODY	19
1.3.1	<i>Chromatografie obecně</i>	19
1.3.2	<i>Chromatogram</i>	20
1.4	VYSOKOÚČINNÁ/VYSOKOTLAKÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC).....	22
1.5	VÝHODY A NEVÝHODY HPLC	25
1.6	TENKOVRSTEVNÁ CHROMATOGRAFIE (TLC)	25
1.7	LYOFILIZACE	26
2	CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	27
3	MATERIÁL A METODY	28
3.1	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A SOFTWARE VYBAVENÍ	28
3.1.1	<i>HPLC a chromatografický software</i>	28
3.1.2	<i>Centrifuga Eppendorf MiniSpin</i>	31
3.1.3	<i>UV-vis spektrofotometr Helios γ a software VISIONLITE</i>	32
3.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	33
3.3	METODY A PRACOVNÍ POSTUPY	33
3.3.1	<i>Lyofilizace</i>	34
3.3.2	<i>Příprava extraktu</i>	34
3.3.3	<i>Parametry chromatografu</i>	36
3.3.4	<i>Identifikace pigmentů pomocí UV-vis spektrofotometru</i>	37
3.3.5	<i>Pracovní postup pro rozdělení směsi barviv pomocí chromatografie na tenké vrstvě</i>	38
4	VÝSLEDKY	39

4.1.1	Vzorek č. 1 (žlutý list buku, M_f = methanol)	39
4.1.2	Vzorek č. 2 (zelený list buku, M_f = methanol)	42
4.1.3	Vzorek č. 3 (zelený list břechťanu, M_f = methanol)	44
4.1.4	Vzorek č. 4 (červené rajče, M_f = aceton)	47
4.1.5	Vzorek č. 5 (červené rajče, M_f = 95% aceton)	48
4.1.6	Vzorek č. 6 (červené rajče, M_f = aceton/methanol)	49
4.1.7	Vzorek č. 7 (červené rajče, M_f = methanol)	50
4.1.8	Vzorek č. 8 (červené rajče, M_f = acetonitril/methanol/dichlormethan/voda) 52	
4.1.9	Vzorek č. 9 (červené rajče, M_f = THF(10)/methanol)	54
4.1.10	Vzorek č. 10 (červené rajče, M_f = THF(5)/methanol)	56
4.1.11	Vzorek č. 11 (jahody, M_f = methanol)	58
4.1.12	Vzorek č. 12 (třešně, M_f = methanol)	60
4.1.13	Vzorek č. 13 (sušený červený šípek, M_f = methanol)	62
4.1.14	Vzorek č. 14 (vodní meloun, M_f = methanol)	64
4.1.15	Vzorek č. 15 (sušená červená paprika, M_f = methanol)	66
4.1.16	Vzorek č. 16 (červená paprika, M_f = methanol)	68
4.1.17	Vzorek č. 17 (zelená paprika, M_f = methanol)	69
4.1.18	Vzorek č. 18 (žlutá paprika, M_f = methanol)	72
4.2	ROZDĚLENÍ ROSTLINNÝCH PIGMENTŮ POMOCÍ TLC	74
4.3	KVANTITATIVNÍ A KVALITATIVNÍ POROVNÁNÍ OBSAHU ROSTLINNÝCH PIGMENTŮ	75
4.3.1	Rostlinné pigmenty ze žlutých a zelených listů	75
4.3.2	Pigmenty z potravin (rajčete, jahod, třešní, šípku a melounu)	78
4.3.3	Rostlinné pigmenty v jednotlivých odrůdách paprik	80
5	DISKUSE A SHRUTÍ	83
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A INTERNETOVÉ ODKAZY	85

1 Úvod

1.1 Rostlinné pigmenty

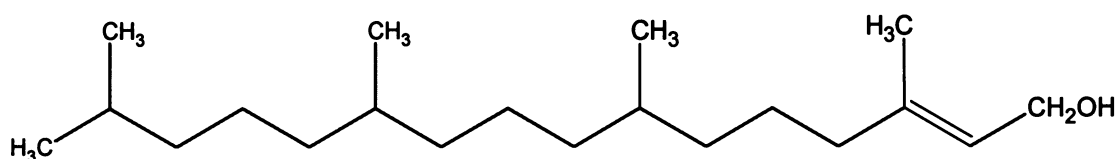
Rostliny i jejich plody obsahují množství látek, které mají schopnost absorbovat sluneční záření. Látky, které absorbují ve viditelné oblasti spektra, se člověku jeví jako barevné a většinou se charakterizují jako barviva neboli pigmenty. Společným znakem těchto látek je přítomnost většího počtu konjugovaných dvojných vazeb v molekule.¹

Přírodní barviva se dělí podle chemické struktury na polyenová (karotenoidy), chinonová, pyranová (flavonoidy), pyrrolová (chlorofyly), indolová barviva a pteriny.

Chlorofyly a karotenoidy jsou vázány v membránových proteinech chloroplastů, z nichž se snadno extrahují nepolárními organickými rozpouštědly.

Flavonoidy jsou v rostlinách vázány nejčastěji jako glykosidy. Jedná se především o polární barviva rostlinných květů a plodů.

1.1.1 Chlorofyly

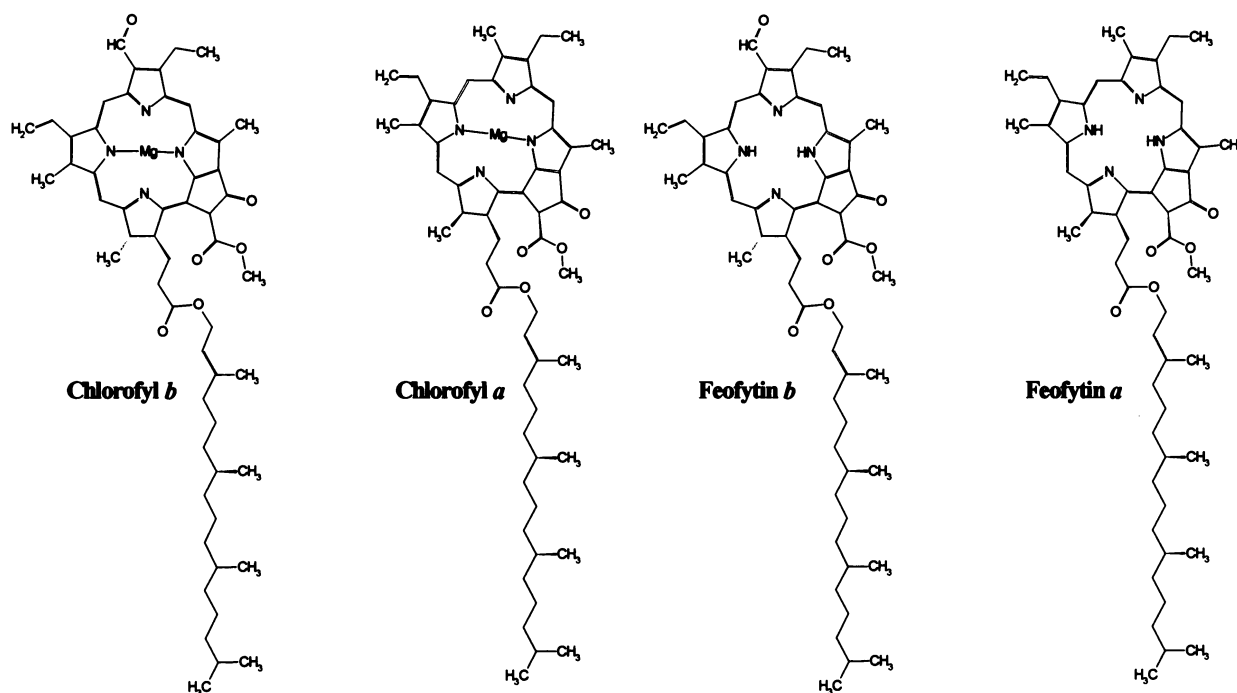


Obr. 1. Vzorec fytolu.

Chlorofyly lze řadit mezi cyklické tetrapyroly (porfyriny) s komplexně vázaným hořečnatým iontem. Na pyrrolové jádro je vázán zbytek alkoholu fytolu (C₂₀, viz obr. 1), který jim uděluje hydrofobní povahu. Chlorofyly jsou nejdůležitější fotosyntetické pigmenty, jsou vázány v membránových proteinech thylakoidů ve fotosystémech I i II. Hlavní funkcí chlorofylů je absorpce světelné energie a její využití při fotolýze vody. Absorbují fotony v modré (v oblasti vlnových délek 415 až 440 nm) a červené oblasti spektra (640 až 700 nm). Komplementární barvou červené je zelená, proto se lidskému oku jeví jako zelené. Nejvýznamnějšími chlorofyly jsou chlorofyl *a* a chlorofyl *b* (viz obr. 2, str. 8) vyskytující se u vyšších rostlin a zelených řas. Chlorofyl *a* se bezprostředně účastní primárního fotochemického děje (přeměny elektromagnetického záření v energii chemickou). Ostatní pigmenty mají v thylakoidech pouze pomocnou (světlosběrnou) funkci: zachycují záření a energii svého excitovaného stavu přenášejí na chlorofyl *a*.²

Dále existuje chlorofyl *c*, *d*, *e*, bakteriochlorofyly aj.

Feofytiny, tj. molekuly chlorofylů, z nichž byl odstraněn hořčík, mohou v thylakoidech absorbovat světelné záření a předávat chlorofylům excitační energii právě tak dobře, jako si ji předávají molekuly chlorofylu navzájem.¹



Obr. 2. Vzorce chlorofylů a feofytinů.

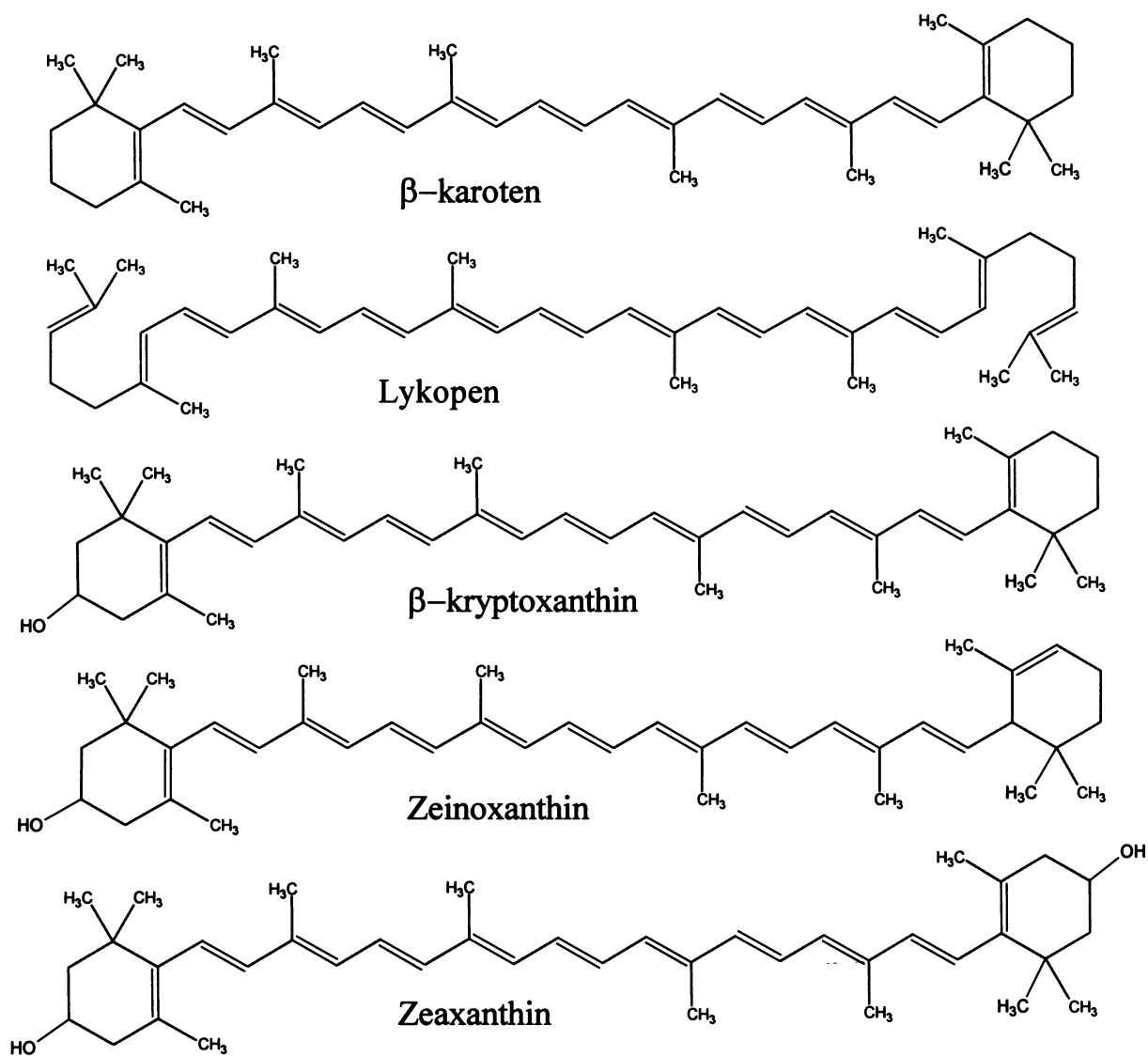
1.1.2 Karotenoidy

Karotenoidy (karoteny a xantofyly) jsou vázány v membránových proteinech thylakoidů ve fotosystému I i II.

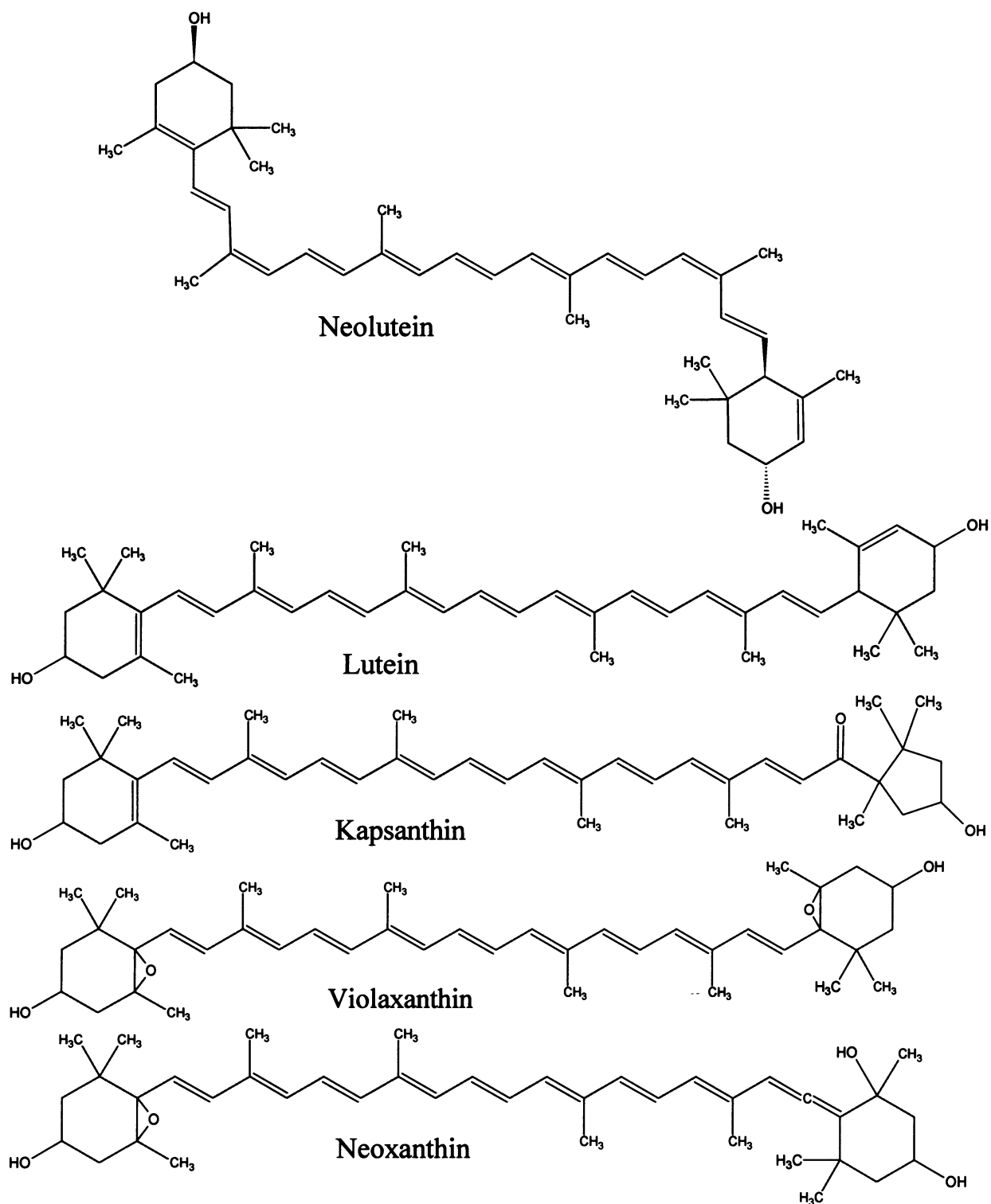
Z chemického hlediska se jedná o tetraterpeny (C₄₀) a všechny lze odvodit od lykopenu, hlavního pigmentu rajčat a šípků.³ Funkce karotenoidů spočívá nejen v absorpci energie pro fotosyntézu (doplňkové světlosběrné pigmenty) ale také v ochraně fotosyntetického aparátu před poškozením při vysokých ozářenostech.¹ Karotenoidy jsou schopny vázat tzv. aktivní formy kyslíku (singletový kyslík, superoxidový anionradikál), uplatňují se tedy rovněž jako antioxidantní činidla.³ Absorbují fotony ve fialové a modré oblasti světla (480 až 570 nm), proto se lidskému oku jeví jako žluté až oranžové. Za svou barevnost vděčí bohatému systému konjugovaných dvojných vazeb.

Xantofyly jsou deriváty β-karotenu obsahující v molekule kyslíkaté zbytky (hydroxylové, epoxidové, karbonylové, karboxylové nebo sacharidové zbytky, viz obr. 3,

str. 9-10). Zavedení takové funkční skupiny se projevuje posunem absorpčního spektra směrem k vyšším vlnovým délkám.³ V listech vyšších rostlin převažují tyto karotenoidy: β -karoten, violaxanthin, lutein, neoxanthin a zeaxanthin.²



Obr. 3. Vzorce karotenoidů (1. část)



Obr. 3. Vzorce karotenoidů (2. část)

β-karoten

β-karoten je nejrozšířenějším karotenoidem v přírodě. Patří mezi antioxidační činidla. V předchozích studiích se zjistilo, že chrání lipidy před radikálovou autooxidací způsobenou

reaktivními peroxidovými radikály.^{4,5,6} β -karoten má také schopnost vychytávat singletové formy kyslíku.^{7,8} Mezi další jeho schopnosti patří schopnost inhibice fotooxidace absorpcí světelných paprsků, čímž zabraňuje přenosu energie důležité pro vznik singletové formy kyslíku.⁹

Rostliny (např. mrkev) obsahují prakticky výhradně *all-trans*- β -karoten, ovšem působením světelných paprsků či zvýšené teploty (např. při vaření) může docházet k *cis-trans* isomerizaci a vzniku *cis* isomerů v různých pozicích.

Lykopen

Lykopen je karotenoid, který se vyskytuje převážně v rajčatech, ale i dalších plodech rostlin. Patří mezi silné antioxidační činidla, které přijímáme potravou. Jeho schopnost vychytávat singletové formy kyslíku je dvakrát silnější než u β -karotenu.¹⁰ Konzumací rajčat a pokrmů vyhotovených z rajčat snižujeme riziko vzniku chronických onemocnění jako je rakovina či kardiovaskulární onemocnění. Zjistilo se, že hladina lykopenu v séru a v tkáních nepřímo souvisí s výskytem některých typů rakoviny (např. rakovina prsu či prostaty).¹⁰ Předpokládá se, že potlačuje vznik rakoviny související s poškozením buněčné regulace (např. změna u regulačních proteinů p53 nebo Rb antionkogenů).¹¹

Lykopen ve své struktuře obsahuje 11 konjugovaných a 2 nekonjugované dvojné vazby. Působením světelných paprsků může podléhat *cis-trans* isomeraci.

Lutein

Lutein je karotenoid, obsahující dvě hydroxy skupiny ve své struktuře a je tudíž mnohem polárnější než β -karoten. Vychytává se v celé řadě rostlin a uděluje jim žlutou barvu. Není obsažen pouze v rostlinných produktech, ale i např. ve vaječném žloutku. Podobně jako ostatní živočichové také člověk si neumí lutein nasyntetizovat, takže veškerý lutein přijímá formou potravy. V současné době se zkoumají jeho příznivé účinky na lidské zdraví, převážně snižování rizika chronických onemocnění. Předpokládá se, že snižuje riziko vzniku zákalu a skvrnitého vidění převážně u starších lidí.¹² Dále snižuje riziko vzniku rakoviny díky schopnosti vychytávat peroxidové radikály.^{13,14} Díky studiím *in vitro* se zjistilo, že karotenoidy mají daleko větší antioxidační účinky, působí-li společně.¹⁵ Několik studií ukázalo, že karotenoidy (tedy i lutein) mohou mít ochrannou roli v souvislosti se vznikem kardiovaskulárního onemocnění díky jejich schopnosti vychytávat peroxonitrát (ONO_2^-).¹⁶

Oxidační stres

Oxidační stres indikují reaktivní formy kyslíku a je jedním z faktorů mající souvislost se vznikem kardiovaskulárních onemocnění a rakoviny. Reaktivní formy kyslíku vznikají v organismu v průběhu řady redoxních dějů. Jejich vznik je ovlivňován regulací metabolické aktivity, životním stylem a stravou. Způsobují oxidaci důležitých biomolekul, jako jsou lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. Předpokládá se, že hrají významnou roli v souvislosti s příčinami některých chronických onemocnění (např. rakovina či kardiovaskulární onemocnění).¹⁰

Kapsanthin

Hlavním pigmentem zralých červených paprik je karotenoid kapsanthin (zaujímá 45% ze všech karotenoidů obsažených v paprice). Kapsanthin ve své struktuře obsahuje dvě hydroxy skupiny a jednu keto skupinu, je tudíž mnohem polárnější než β -karoten, avšak méně polární než violaxanthin či neoxanthin.¹⁷

1.2 Identifikace karotenoidů a chlorofylů pomocí UV-vis spektrofotometru

K identifikaci jednotlivých karotenoidů a chlorofylů může vést porovnání hodnot absorpčních maxim s tabelovanými hodnotami poloh absorpčních pásů v příslušném rozpouštědle. Výhodou spektrofotometrického stanovení je rychlost, prakticky nevyžaduje žádnou přípravu vzorku (lze analyzovat rovnou frakce po HPLC), a také minimální spotřeba materiálu. Další výhodou je, že tato metoda je nedestruktivní.

Základem spektrofotometrických metod je měření absorbance záření při průchodu vzorkem. Spektrofotometrii lze v biochemii využít jak k získání kvalitativních údajů (charakterizace látek), tak také ke kvantitativnímu stanovení absorbujících složek.¹⁸

Závislost mezi absorbancí a koncentrací chromoforu (stanovované barevné látky) popisuje Lambert-Beerův zákon:

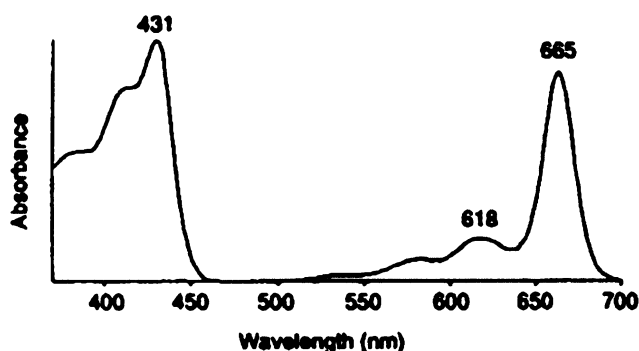
$$A = -\log T = \log I_0/I = \varepsilon \cdot c_M \cdot l,$$

kde A je absorbance, T je transmitance, I_0 je intenzita záření vstupující do vzorku, I je intenzita záření prošlého vzorkem, ε je molární absorpční koeficient, c_M je molární koncentrace a l je optická dráha vzorku (v cm).

1.2.1 Identifikace chlorofylů

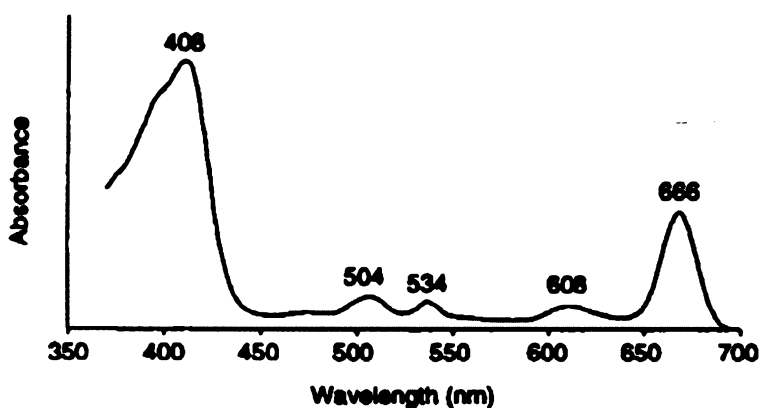
Obecný charakter spektra chlorofylů je dán dvěma absorpčními pásy. Absorpční pás v modré oblasti spektra viditelného záření ($\lambda = 400$ až 500 nm) odpovídá přechodu do druhého singletového stavu. Pás v červené oblasti zahrnuje fotony, jejichž energie přivádí molekuly do prvního singletového excitačního stavu. Poloha červeného absorpčního pásu chlorofylu se mění podle povahy rozpouštědla.^{2,19}

Hlavní absorpční pásy chlorofylu *a* v methanolu jsou: 417,6; 431,8; 618,2 a 665,2 nm (viz. obr. 4).^{19,20}



Obr. 4. Absorpční maxima chlorofylu *a* v methanolu.

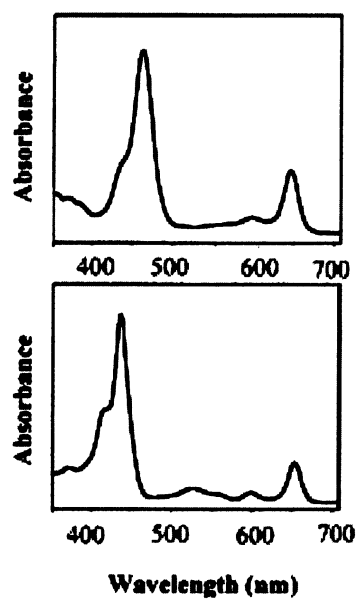
Hlavní absorpční maxima feofytinu *a* v methanolu jsou 408; 504; 534; 608 a 666 nm (viz. obr. 5).¹⁹



Obr. 5. Absorpční maxima feofytinu *a* v methanolu.

Chlorofyl *b* pohlcuje světlo o vlnové délce 470 a 650 nm.²¹

Hlavní absorpční maxima feofytinu *b* ve směsi methanol/ethyl-acetát (68:32) jsou: 432 a 651 nm (hlavní absorpční maxima v methanolu – viz obr. 6, str. 14).²²



Obr. 6. Absorpční maxima chlorofylu *b* (460 a 640 nm, nahoře) a feofytinu *b* (435 a 650 nm) v methanolu.²³

Tab. 1. shrnuje hlavní absorpční pásy chlorofylů v methanolu.

Tab. 1. Hlavní absorpční maxima chlorofylů v methanolu

	Hlavní absorpční maxima v nm						zdroj
chlorofyl <i>a</i>	417,6	431,8			618,2	665,2	¹⁹
feofytin <i>a</i>	408		504	534	608	666	¹⁹
chlorofyl <i>b</i>		460				640	²³
feofytin <i>b</i>		435				650	²³

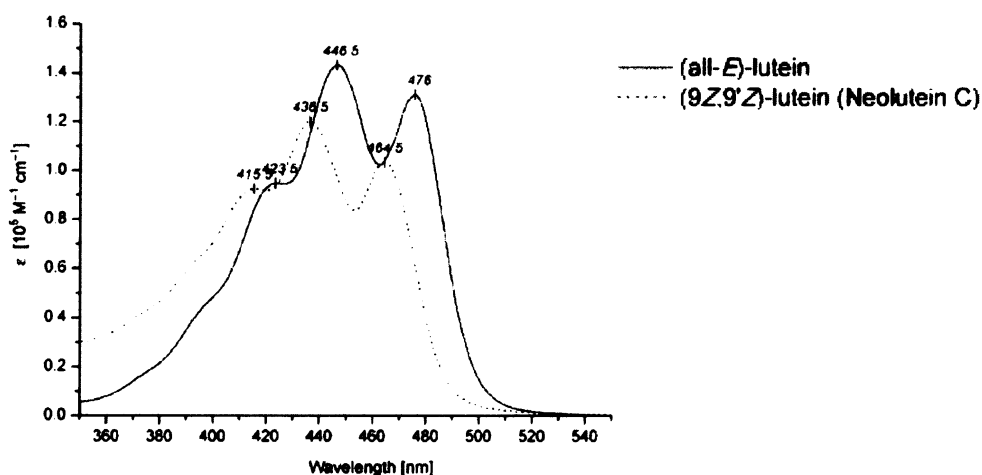
1.2.2 Identifikace karotenoidů

K identifikaci jednotlivých karotenoidů může vést porovnání hodnot absorpčních maxim v příslušném rozpouštědle ve srovnání s tabelovanými hodnotami poloh absorpčních pásů.

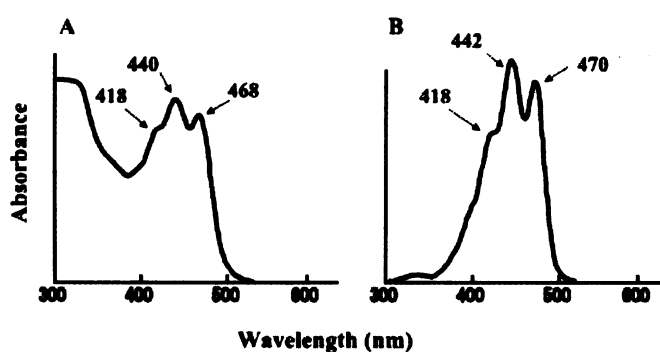
Hlavní absorpční maxima luteinu v ethanolu jsou: 423,5; 446,5 a 476 nm (viz. obr. 7).²⁴

Hlavní absorpční maxima luteinu v methanolu jsou: 418; 442 a 470 nm (viz. obr. 8).²⁵

Hlavní absorpční maxima neoluteinu v ethanolu jsou 415,5; 436,5 a 464,5 nm (viz. obr. 7).²⁴

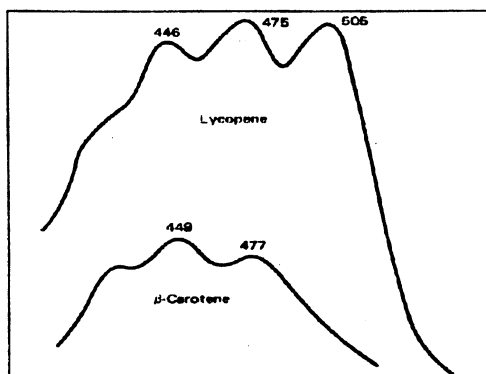


Obr. 7. Absorpční maxima luteinu a neoluteinu v ethanolu.²⁴



Obr. 8. Absorpční maxima luteinu v methanolu.²⁵

Hlavní absorpční maxima lykopenu v hexanu jsou: 446-448 nm, 474-475 nm a 505-506 nm (viz. obr. 9, str. 16).²⁶



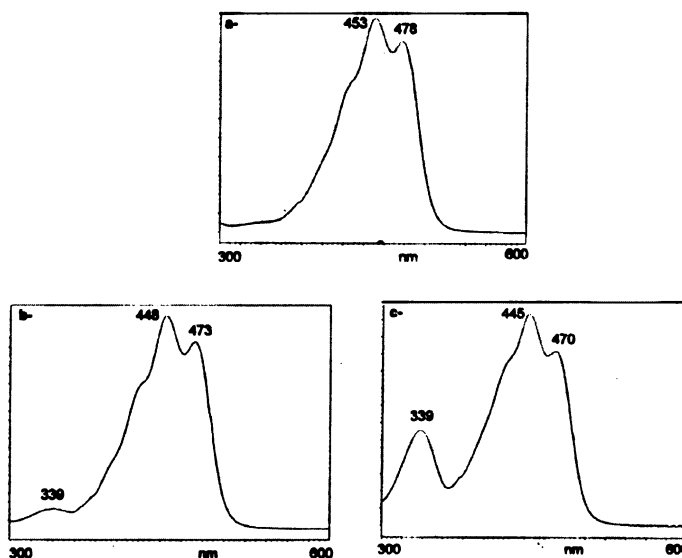
Obr. 9. Absorpční maxima lykopenu a β -karotenu.²⁷

Hlavní absorpční maxima *trans*- β -karotenu v 98% methanolu jsou: 453 a 478 nm.²⁸

Hlavní absorpční maxima 9-*cis*- β -karotenu v 98% methanolu jsou: 339; 448 a 473 nm.²⁸

Hlavní absorpční maxima 13-*cis*- β -karotenu v 98% methanolu jsou: 339; 445 a 470 nm.²⁸

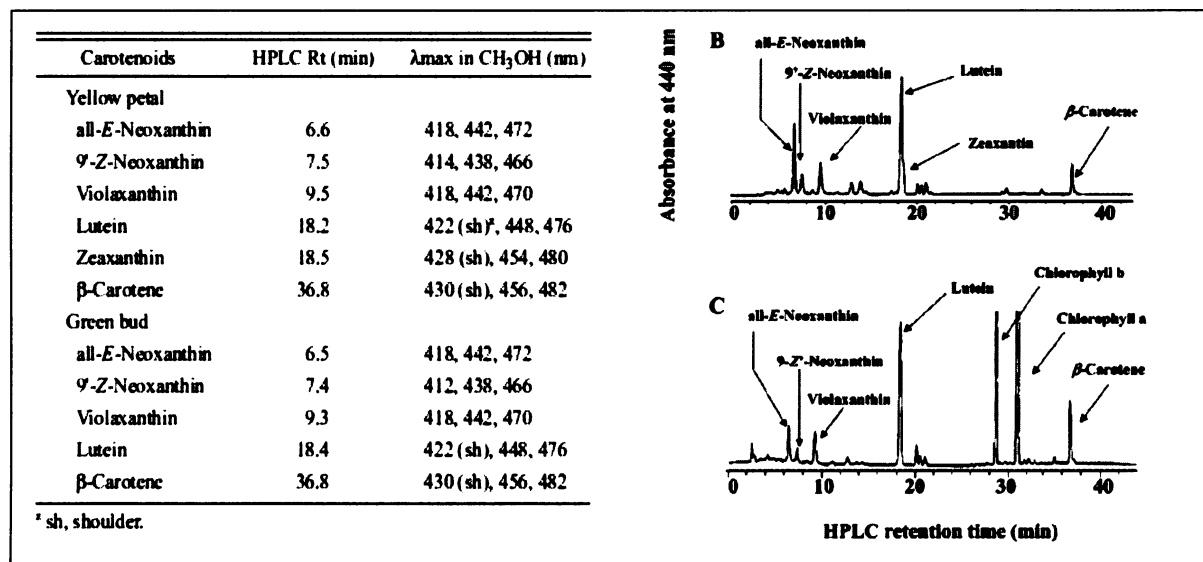
Hlavní absorpční maxima isomerů β -karotenu viz obr. 10.



Obr. 10. Absorpční maxima isomerů β -karotenu ve směsi methanol/voda (98:2).²⁸

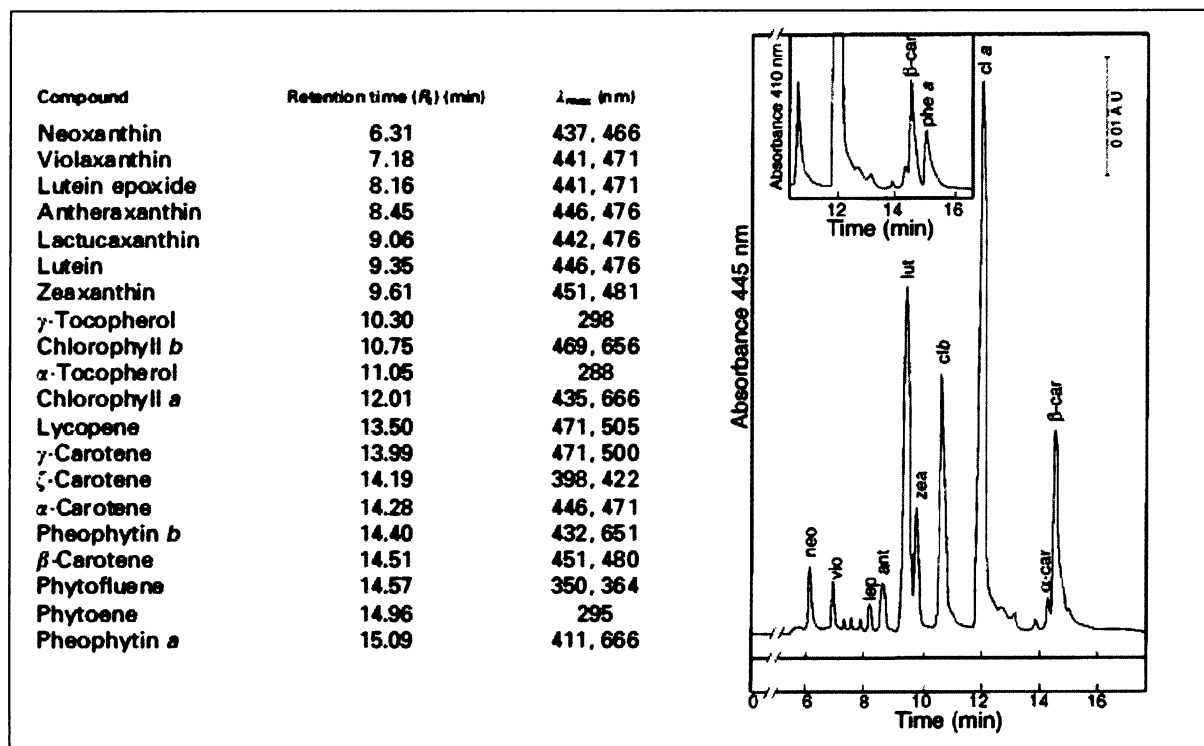
Hlavní absorpční maxima karotenoidů v methanolu udává obr. 11 (vlevo). Karotenoidy byly identifikovány ze žlutých okvětních plátků (yellow petal) a ze zelených poupátek (green bud) hvozdíku karafiátu. Na obr. 11 (vpravo) je znázorněn průběh chromatografie, B – yellow petal, C – green bud.²⁵

K identifikaci karotenoidů (resp. chlorofylů) může vést kromě porovnání hodnot absorpčních maxim také porovnání hodnot retenčních objemů v příslušném rozpouštědle taktéž ve srovnání s tabelovanými hodnotami těchto retenčních objemů (viz. obr. 11 a 12, str. 17-18).



Obr. 11. Retenční časy a absorpční maxima karotenoidů v methanolu (vlevo), průběh HPLC (vpravo).²⁵

Hlavní absorpční maxima a retenční časy při separaci z HPLC chlorofylů a karotenoidů ve směsi: A- acetonitril/methanol/voda (84:9:7) a B- methanol/ethyl-acetát (68:32) udává obr. 12 na str. 18. Barviva byly identifikovány z dubu cesmínového.²²



Obr. 12. Retenční časy a absorpční maxima karotenoidů a chlorofylů (vlevo), průběh HPLC (vpravo).²²

Tab. 2. shrnuje hlavní absorpční maxima karotenoidů.

Tab. 2. Hlavní absorpční maxima karotenoidů v methanolu (není-li uvedeno jinak)

	Hlavní absorpční maxima v nm					zdroj
lutein		418	442	470		25
neolutein		415,5	436,5	464,5		24
lykopen v hexanu			446-448	474-475	505-506	26
lykopen v methanolu			445	471	502	Roštejnská
all- <i>trans</i> - β -karoten			453	478		28
9- <i>cis</i> - β -karoten	339		448	473		28
13- <i>cis</i> - β -karoten	339		445	470		28

1.3 Chromatografické metody

1.3.1 Chromatografie obecně

Chromatografie je separační (dělicí) a současně i analytická metoda.

Princip chromatografie objevil v r. 1903 ruský botanik Michail Semjonovič Cvět.¹⁸

Při chromatografii se využívá mnohokrát opakované ustanovení rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými fázemi. Jedna fáze je přitom vždy pohyblivá (plyn nebo kapalina) a nazývá se mobilní. Druhá je nepohyblivá (pevná látka nebo kapalina) a označuje se jako stacionární.

Existuje široké spektrum chromatografických metod, které je možné rozdělit podle různých hledisek jako jsou např.:

1. Povaha (skupenství) mobilní fáze

Chromatografii dělíme na plynovou chromatografii (GC – gas chromatography), kde mobilní fází je plyn a kapalinovou chromatografii (LC – liquid chromatography), kde mobilní fází je kapalina.

2. Podle způsobu provedení a uspořádání fází¹⁸

Podle tvaru lože stacionární fáze dělíme chromatografii na chromatografii na tenké vrstvě (na tenké vrstvě gelu či papírová chromatografie) a na chromatografii na sloupcích (kolonách, viz obr. 13, str. 20). Podle směru postupu mobilní fáze rozlišujeme chromatografii vzestupnou a sestupnou.

3. Princip separace (podle povahy sil, které zodpovídají za separaci)

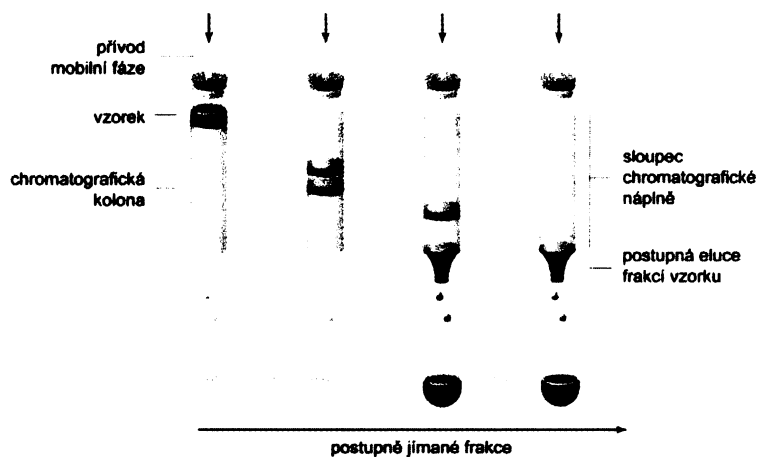
Chromatografii dělíme na adsorpční, ionexovou, gelovou, afinitní...

4. Pracovní způsob

Chromatografii dělíme na eluční, frontální a vytěšňovací.

5. Provedení chromatografie

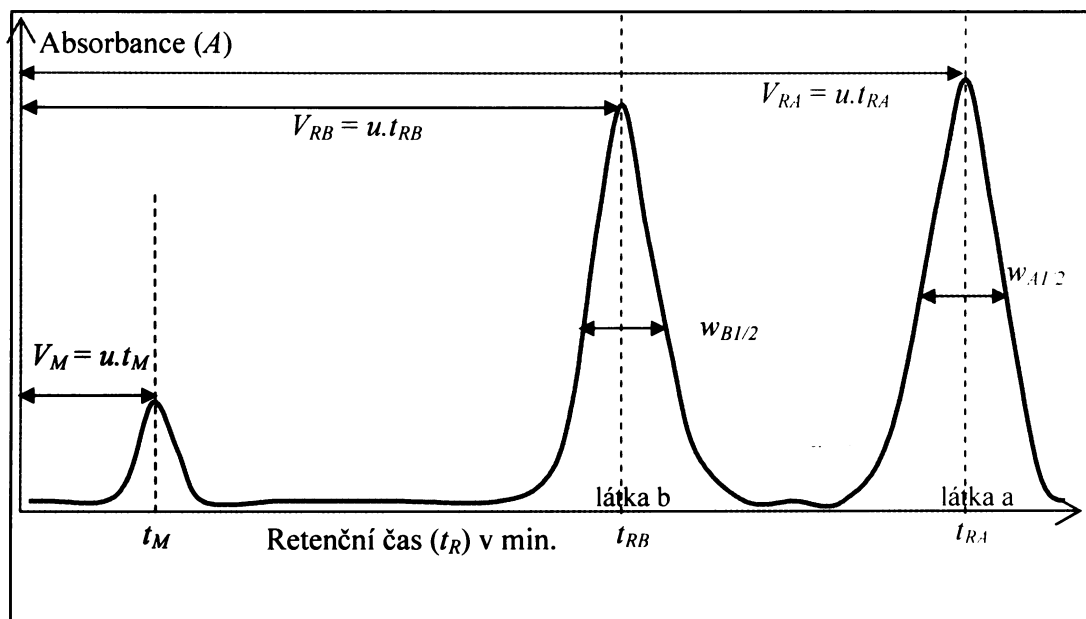
Je možné izokratické provedení (eluční podmínky se nemění) či gradientové provedení (některý z parametrů mobilní fáze se během eluce mění).



Obr. 13. Chromatografie na koloně.

1.3.2 Chromatogram

Chromatogram znázorňuje závislost odezvy detektoru (např. absorbance) na retenčním čase (resp. retenčním objemu).



Obr. 14. Chromatogram pro látku a a látku b.

Z chromatogramu (viz obr. 14) můžeme odečíst následující hodnoty:

- V_M mrtvý objem kolony;
- V_{RA} (V_{RB}) retenční objem látky a (látky b);
- $w_{A1/2}$ ($w_{B1/2}$) šířka píku v polovině jeho výšky (pološířka) látky a (látky b);

t_M	mrtvý čas kolony;
t_{RA} (t_{RB})	retenční čas látky a (látky b);
u	průtoková rychlost mobilní fáze.

Z odečtených hodnot se vypočítávají následující parametry chromatografie:

k_A (k_B)	kapacitní poměr pro látku a (látku b);
r_{BA} (r_{AB})	retenční poměr pro látku a (látku b);
N_A (N_B)	počet teoretických pater pro látku a (látku b);
R_{BA} (R_{AB})	rozlišení píků pro látku a (látku b);
H_A (H_B)	výškový ekvivalent teoretického patra pro látku a (látku b);
h_A (h_B)	redukovaný výškový ekvivalent teoret. patra pro látku a (látku b).

Vztahy mezi veličinami – viz. tab. 3.

Tab. 3. Vztahy mezi veličinami.¹⁸

Vztahy pro látku a:	Vztahy pro látku b:
$k_A = (V_{RA} - V_M) / V_M$	$k_B = (V_{RB} - V_M) / V_M$
$r_{BA} = k_A / k_B$	$r_{AB} = k_B / k_A$
$N_A = 5,545 \cdot (V_{RA} / w_{A1/2})^2$	$N_B = 5,545 \cdot (V_{RB} / w_{B1/2})^2$
$R_{BA} = [(r_{BA} - 1) / r_{BA}] \cdot [k_A / (k_A + 1)] \cdot [(\sqrt{N_A}) / 4]$	$R_{AB} = [(r_{AB} - 1) / r_{AB}] \cdot [k_B / (k_B + 1)] \cdot [(\sqrt{N_B}) / 4]$
$H_A = L / N_A$	$H_B = L / N_B$
$h_A = H_A / d_p$	$h_B = H_B / d_p$
kde L je délka kolony (0,15 m); d_p je průměr částic sorbentu.	

Mrtvý objem kolony V_M je objem eluentu, který musí projít kolonou, aby se nezadržovaný analyt dostal od počátku ke konci separační kolony.

Retenční objem V_R je objem mobilní fáze, který musí projít kolonou, aby se příslušný analyt dostal od počátku ke konci kolony.

Mrtvý čas kolony t_M je retenční čas analytu, který není v koloně zadržován, tj. analytu, který se pohybuje kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze.

Retenční čas t_R je celkový čas analytu, který není v koloně zadržován.

Kapacitní poměr k udává kolikanásobku mrtvého času (objemu) je třeba k eluci příslušné látky.²⁹ Kapacitní poměr umožňuje odhadnout, do jaké míry lze eluovat látky z kolony v přijatelném čase a koncentračním profilu. Je-li k malé (1-10), jsou eluční objem a doba trvání analýzy krátké, je-li k velké (20-1000), dochází k rozšiřování píků a analýza se neúměrně protahuje.¹⁸

Retenční poměr r charakterizuje selektivitu, tj. jak moc se analyty na koloně zadržují a zpožďují. Čím větší hodnota r , tím je systém selektivnější.²⁹

Počet teoretických pater dané kolony N a výškový ekvivalent teoretického patra H jsou mírou účinnosti chromatografické kolony. Účinnost kolony charakterizuje, jak moc se zóny separovaných látek na koloně rozšiřují. Účinnost separace je tím větší, čím je šířka píku pro daný eluční čas (objem) menší.²⁹

Při volbě podmínek analýzy nejde o dosažení co největšího rozlišení, ale o dosažení co největšího rozlišení v přijatelné době. Postačuje tedy hodnota $R_{BA} = 1$.¹⁸

1.4 Vysokoučinná/vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoučinná/vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC – high performance /pressure liquid chromatography) je v současné době jedna z velmi významných chromatografických metod. Jedná se o kolonovou chromatografii využívající vysokých tlaků mobilní fáze.

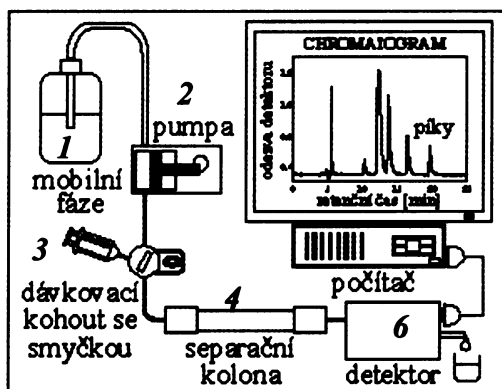
Princip separace:

Separace (dělení) probíhá v separační koloně, která obsahuje stacionární fázi (sorbent) a mobilní fázi (eluent).

Dělené látky (analyty) mají rozdílnou afinitu ke stacionární fázi, dále podléhají různé distribuci mezi mobilní a stacionární fázi. Výsledkem je, že rozdílné analyty jsou rozdílně zadržovány a tím i rozdílně zpožďovány (retardovány).

Mobilní fázi bývá nejčastěji voda či organická rozpouštědla, stacionární fázi je náplň kolony, což bývá nejčastěji modifikovaný silikagel (např. oktadecylovými řetězci, C-18 kolony).

Základní součásti chromatografu pro HPLC (viz obr. 15):



Obr. 15. Schéma kapalinového chromatografu pro HPLC.

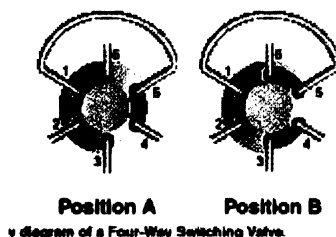
1. Rezervoár mobilní fáze

2. Vysokotlaká pumpa

Pumpa dávkuje mobilní fázi na kolonu. Důležité je zachovat konstantní předem nastavenou průtokovou rychlost mobilní fáze. Pumpy se používají jak jednopístové tak i dvoupístové. Tlumiče pulsů pomáhají vyrovnávat poklesy tlaku v momentě, kdy se píst pohybuje nahoru.

3. Dávkovací zařízení

Dávkovací zařízení dávkuje vzorek na kolonu (do proudu mobilní fáze). Důležité je, aby nedocházelo k poklesu tlaku, nebo aby se do kolony při nástřiku nedostal také vzduch, proto se používají speciální čtyřcestné ventily (např. ventil typu Rheodyne – viz obr. 16).



Obr. 16. Pozice ventilu Rheodyne.

4. Kolona

Kolony (viz obr. 17) musí odolávat vysokému tlaku, proto se vyrábějí silnostěnné s kovovým obalem. Na koloně není tlak konstantní, ale prudce klesá.

Jako náplň kolony se používají mikrozrnné gely s definovanou velikostí částic (5 až 20 μm), jsou nestlačitelné, s dobrými průtokovými vlastnostmi.



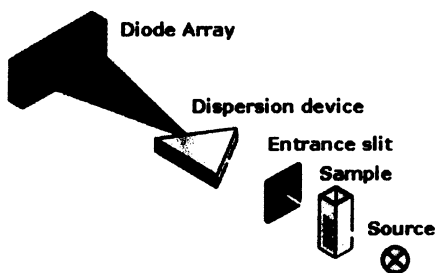
Obr. 17. Různé druhy kolon pro HPLC.

5. Termostat

Stabilní teplota kolony nejenom zlepšuje reprodukovatelnost HPLC analýz či preparací, ale výrazně pozitivní vliv má také na rozlišení.

6. Detekční zařízení

Detektory pracují na rozličných principech. Pro HPLC se používají např. UV-vis absorpční detektory (např. diode array detektor – viz obr. 18.), fluorescenční detektory, vodivostní detektory či refraktometrické detektory (měří index lomu).



Obr. 18. Diode array detektor – schéma.

1.5 Výhody a nevýhody HPLC

Mezi nejvýznamnější výhody HPLC patří její rychlost. Pro srovnání uvádím v jakých řádech se pohybuje celková doba u různých typů chromatografie: LPC (nízkotlaká kapalinová chromatografie) hodiny, FPLC (střednětlaká kapalinová chromatografie) desítky minut a HPLC minuty. Dalšími výhodami je její vysoká účinnost a automatizovatelnost.

Nevýhodou je vysoká cena přístrojového vybavení a nemožnost analyzovat více než jeden vzorek najednou.

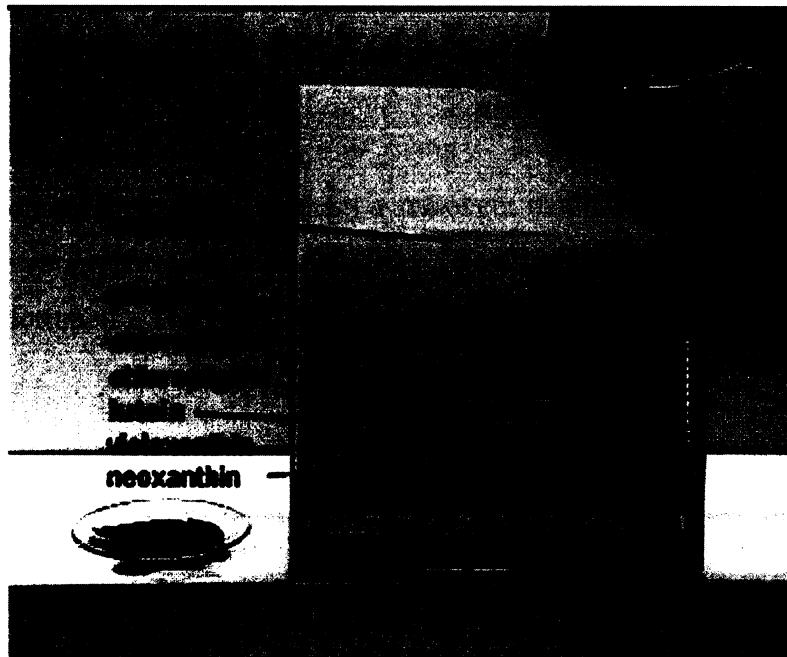
1.6 Tenkovrstevná chromatografie (TLC)

K separaci rostlinných pigmentů je možné použít chromatografii na tenké vrstvě (TLC – thin layer chromatography). Jedná se o rozdělovací adsorpční metodu. Jako stacionární fáze se nejčastěji používá deska Silufol (komerčně dodávaná hliníková deska se silikagelem o různých rozměrech).

Směs barviv se nanese na startovní čáru. Barviva vzlínají společně s rozpouštědlem, přičemž dochází díky jejich rozdílné hydrofilnosti (resp. hydrofobnosti) k jejich rozdělení. Chromatografii je třeba ukončit dříve, než čelo rozpouštědla dosáhne horního okraje desky. Po skončení chromatografie se změří vzdálenost čela (l_R) a vzdálenost skvrn (l_S) od startovní čáry. Jejich poměr se nazývá retenční faktor (R_F) a je pro danou látku, mobilní a stacionární fázi charakteristický.

$$R_F = l_S/l_R$$

Na obr. 19 na str. 26 je znázorněna chromatografie na silufolové destičce, během níž došlo k separaci rostlinných pigmentů z čerstvých zelených listů. Mobilní fází byla směs petrolether/acetone/voda (100ml:11ml:5kapek).



Obr. 19. TLC rostlinných barviv z čerstvých zelených listů; mobilní fáze = petrolether/acetone/voda (100ml:11ml:5kapek).

1.7 Lyofilizace

Lyofilizaci vynalezli francouzští fyzikové d'Arsonval a Bordas. Postup využívá odstranění vody v pevném (zmrzlém) stavu. Jednotlivé etapy lyofilizace:

1. Zmrazení potravin, aby se voda, kterou obsahují, přeměnila na led.
2. Sublimace ledu ve vakuu.
3. Kondenzace vody na chlazené části přístroje.

Během lyofilizace obsah vody z čerstvé zeleniny přechází z 90% až na 1%.

2 Cíle bakalářské práce

1. Najít vhodnou metodu pro separaci a stanovení rostlinných pigmentů ze zelených a žlutých listů z vybraných rostlin pomocí HPLC. Rostlinné pigmenty identifikovat pomocí UV-vis spektrofotometru. Porovnat rozdíly v množství a zastoupení pigmentů u zelených a žlutých listů.

2. Najít vhodnou metodu pro separaci a stanovení karotenoidů v potravinách pomocí HPLC. Rostlinné pigmenty z potravin identifikovat pomocí UV-vis spektrofotometru a porovnat rozdíly v množství a zastoupení pigmentů u vybraných potravin.

3. Porovnat rozdíly v množství a zastoupení pigmentů v různě zbarvených paprikách.

3 Materiál a metody

3.1 Použité přístroje a softwarové vybavení

Sestava pro HPLC, výrobce: ECOM spol. s r. o

Centrifuga Eppendorf MiniSpin, výrobce: Eppendorf

UV-vis spektrofotometr Helios Gamma, výrobce: Thermo Spectronic

TLC desky Alugram SIL G/UV₂₅₄, výrobce: Macherey-Nagel

Lyofilizátor, výrobce: FINN-AQUA

Centrifugační evaporátor – SpeedVac DNA 110, výrobce: Savant

3.1.1 HPLC a chromatografický software

3.1.1.1 HPLC (<http://www.ecomsro.cz/cz/>)

Složení sestavy pro HPLC viz tab. 4. Fotografie sestavy viz obr. 20 na str. 30.

Tab. 4. Součásti HPLC.

Rezervoár mobilní fáze	Zásobník mobilní fáze LCT 02
Vysokotlaká pumpa	Gradientní čerpadlo BETA 10
Degaser	Vakuový Degaser DG 3014, on-line, čtyřcestný
Dávkovací zařízení	Ventil D dávkovací analytický smyčkový
Smyčka	Smyčka vnější 20 ul resp. 100 ul nerez
Kolona	Kromasil 100, C18, zrnitost 5 resp. 7 µm, 250 mm x 4,6 mm
Termostat	Termostat Kolon LCO 102 SINGLE
Detekční zařízení	SAFÍR UV-VIS Detektor s plynule nastavitelnou vlnovou délkou
	Filtr mobilní fáze kov. 2µm, 1/8"
	705NR 50ul Mikrostříkačka
	ECOMAC Chromatografický software
	CLARITY Chromatografický software

Zásobník mobilní fáze LCT 02

Víčko a šroubení je z polypropylénu.

Gradientní čerpadlo BETA 10

Čerpadlo zajišťuje konstantní průtok kapaliny s možností práce v gradientním režimu.

Vakuový Degaser DG 3014

Vakuový degaser DG 3014 je průtočný modul odstraňující plyny rozpuštěné v mobilní fázi používané v HPLC. Odplyňovací proces spočívá v difuzi plynů přes membránu z fluoropolymeru. Pomocí jednoho přístroje mohou být současně odplyňovány až čtyři mobilní fáze najednou.

Ventil D dávkovací analytický smyčkový

Dávkované množství vzorku je dáno použitou výměnnou smyčkou (3 ul až 1 ml).

Termostat Kolon LCO 102 SINGLE

Termostat je určen pro stabilizaci teploty kolony při chromatografické analýze. Stabilní teplotou kolony se vyloučí vlivy změn okolní teploty a tím se zlepší reprodukovatelnost retenčních časů. Zvýšenou teplotou se zkrátí doba analýzy, zlepší separační účinnost a sníží pracovní tlak.

UV-vis detektor Sapphire 80

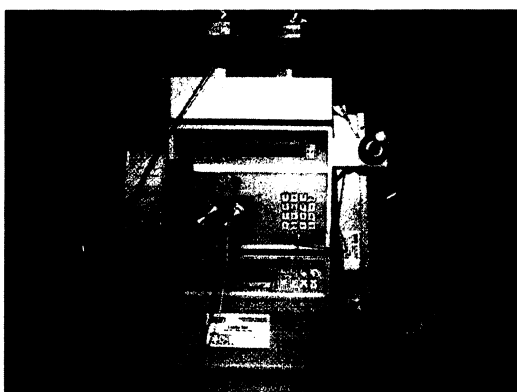
Přístroj měří změny absorpance světla v kapalinách protékajících kyvetou při zvolené vlnové délce, v rozsahu 190 až 800 nm. jako zdroj světla je použita deuteriová výbojka kombinovaná s wolframovou žárovkou.

3.1.1.2 Nastavení kapalinového chromatografu

Nejprve bylo třeba aparaturu promýt mobilní fází, k tomu sloužila funkce PURGE a následné stisknutí tlačítka PUMP. Pro ukončení promývání bylo třeba zmáčknout tlačítko STOP. Při promývání je nutné mít otevřený ventil, aby nedošlo k vniknutí vzduchových bublin do kolony.

Před každým měřením je třeba zkontrolovat, zda je absorpance vynulovaná na používanou mobilní fázi. K jejímu vynulování sloužila funkce AUTOZERO.

Po nastavení všech potřebných parametrů (průtoková rychlost, minimální a maximální tlak, složení mobilní fáze) bylo zapotřebí nechat po určitý čas promývat kolonu mobilní fází, aby se systém equilibroval (tlačítkem PUMP).



Obr. 20. Chromatograf ze předu.



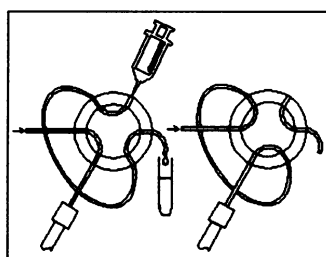
Obr. 21. Nástřik na kolonu.

3.1.1.3 Provádění nástřiku extraktu do kolony

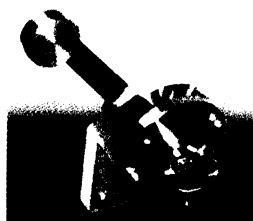
Nástřik se provádí, je-li páka dávkovače v poloze LOAD.

Do mikroštrikačky (bez jehly), kterou jsem obalila alobalem (ochrana před světlem), jsem nasála extrakt. Mikroštrikačku jsem kolmo vsunula do hlavy kolony (viz obr. 21). Extrakt jsem potom opatrně vstříkla do dávkovací smyčky (viz. obr. 22). Byla-li smyčka plná, zbytek extraktu vytekl ze smyčky ven do připravené buničiny. Před aplikací extraktu do kolony jsem zkontrolovala, zda všechny parametry jsou správně nastavené (vynulovaná absorbance, průtoková rychlost, teplota, příslušná vlnová délka – viz dále).

Aplikace extraktu se provádí otočením páky dávkovače (viz obr. 23) do polohy INJECT. Vzorek je aplikován na kolonu, aniž by se změnil tlak.



Obr. 22. Dávkovací smyčka.



Obr. 23. Dávkovač.

3.1.1.4 Chromatografický software ECOMAC

Software ECOMAC slouží pro řízení přístrojů a sběr dat. Na monitoru můžeme sledovat parametry všech přístrojů jako například absorbanci detektoru, tlak čerpadla a teplotu v termostatu. Všechna tato data je možné zaznamenávat, tisknout a exportovat.

V programu ECOMAC bylo nutné si nejprve nastavit metodu, používanou při konkrétním měření. Vhodnou metodu si nastavím pomocí příkazu NEW METHOD, kde si určím příslušnou vlnovou délku, koncentraci mobilní směsi a průtokovou rychlost. Mám-li již takovou metodu uloženou, např. z dřívějších měření, stačí použít příkaz LOAD METHOD.

Po kliknutí na odkaz INIT DEVICE(S) je již celý proces ovládaný počítačem.

Po nástřiku vzorku na kolonu se automaticky v počítači vykresluje křivka chromatogramu.

3.1.1.5 Chromatografický software CLARITY

Chromatografický software Clarity je účinným nástrojem pro sběr, zpracování a vyhodnocení dat z kapalinového chromatografu. Oproti softwaru ECOMAC umožňuje integrovat plochy píku.

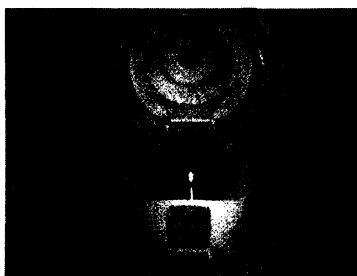
3.1.2 Centrifuga Eppendorf MiniSpin

Během vypracování bakalářské práce jsem používala centrifugu Eppendorf MiniSpin (viz obr. 24). Jedná se o miniaturní centrifugu s hliníkovým rotorem a ocelovým víkem.

Parametry centrifugy viz tab. 5.

Tab. 5. Parametry centrifugy Eppendorf MiniSpin.

RPM – max. otáček (ot./min.)	13 400
RTF – relativní odstředivá síla	12 100 x g



Obr. 24. Centrifuga na eppendorfsky.

3.1.3 UV-vis spektrofotometr Helios γ a software VISIONLITE

3.1.3.1 UV-vis spektrofotometr Helios Gamma

Nasbírané frakce methanolového extraktu jsem proměřovala na jednopaprskovém UV-vis spektrofotometru UNICAM Helios Gamma (viz obr. 25) pracujícím v ultrafialové a viditelné oblasti spektra, vybaveným monochromátorem se 2 nm šterbinou. Základní parametry UV-vis spektrofotometru UNICAM Helios Gamma shrnuje tab. 6.

Tab. 6. Parametry UV-vis spektrofotometru Helios Gamma.

Rozsah vlnových délek (nm)	190 - 1100
Šířka pásma (nm)	2

Na spektrofotometru bylo nejprve třeba nastavit několik parametrů: v nabídce MENU přejdu na příkaz SCAN, kde již mohu navolit minimální a maximální vlnovou délku a pomocí příkazu ZERO BASE se změřila absorbance pozadí (measuring baseline).



Obr. 25. UV-vis spektrofotometr HELIOS γ .

3.1.3.2 Software VisionLite

K dispozici jsem měla programové vybavení VisionLite umožňující ovládání z PC, měření spekter, automatickou konstrukci kalibračních křivek a měření koncentrace.

V programu VisionLite se nastavovali základní parametry měření: START – začátek měření (200 nm); END – konec měření (700 nm); INTERVAL – interval měření (0,5 nm); MEASUREMENT MODE – jaká fyzikální veličina se měří (absorbance); SCAN SPEED – rychlost měření (600 nm/min); OVERLAY – povolení překrytí (více grafů); TRESHOLD – práh pro zaznamenávání maxim na grafu.

Všechny vzorky musely být proměřeny proti pozadí (kyvetě obsahující roztok rozpouštědla používaného pro rozpuštění vzorků). K proměření pozadí sloužila funkce BASELINE.

3.2 Použité chemikálie

LAB SCAN, Irsko: methanol pro HPLC,

Lach-Ner, s r. o., ČR: aceton p.a., ethylester kyseliny octové p.a., propan-2-ol p. a.

Lachema, ČR: uhličitan vápenatý p.a., hexan čistý, butanol, diethylether, dichlorethan, acetonitril, dichlormethan, THF

PENTA, ČR: benzin lékařský

Zkoumané vzorky:

Listy: zelené listy buku, žluté listy buku, zelené listy břečťanu;

Potraviny: červené rajče, sušený šípek, vodní meloun, jahody, třešně, sušená sladká červená paprika, červená paprika, zelená paprika, žlutá paprika.

3.3 Metody a pracovní postupy

Ve své bakalářské práci jsem se snažila najít vhodnou metodu pro stanovení rostlinných pigmentů ze zelených a žlutých listů buku obecného (*Fagus silvatica*, viz obr. 26) a břečťanu popínavého (*Hedera helix*, viz obr. 27). Jako nejvhodnější mobilní fáze se osvědčil methanol (s čistotou pro HPLC). Měření jsem prováděla při těchto vlnových délkách: 210 nm, 280 nm a 438 nm. Vlnová délka 438 nm se ukázala jako nejvhodnější.



Obr. 26. Listy buku obecného.



Obr. 27. Listy břečťanu popínavého.

Ve své bakalářské práci jsem se taktéž snažila najít vhodnou metodu pro separaci pigmentů z plodu červeného rajčete (*Lycopersicon esculentum*). Následně tuto zvolenou metodu aplikovat na vybrané potraviny: plody šípku (*Cyanosbati fructus*), jahody – plody jahodníku zahradního (*Fragaria magna*), třešně – plody třešně (*Prunus sp.*), plod vodního melounu (*Cucumis melo*), červenou, žlutou a zelenou paprika (*Capsicum sp.*).

Při nalézání vhodné separační metody jsem využívala postupů, které jsem nacházela v odborné literatuře a na internetu^{30, 31, 32}. Podle informací z literatury jsem použila řadu

mobilních fází (viz tab. č. 7). Měření jsem prováděla při těchto vlnových délkách: 450 a 475 nm.

Hexanový (resp. methanolový) extrakt rostlinných pigmentů z listů i z vybraných potravin se dělí izokraticky na koloně obsahující silikagel s navázanými 18-ti uhlíkatými řetězci (Silasorb C-18, zrnění 7 μm). Ze zaznamenané chromatografické křivky jsem odečetla údaje pro stanovení množství rostlinných pigmentů ve vzorku, které jsem zpracovala pomocí chromatografického softwaru Clarity. U nasbíraných frakcí jsem proměřila UV-vis spektra.

3.3.1 Lyofilizace

Rajčata, meloun a podobné potraviny nebylo tak jednoduché vysušit způsobem jakým se dají např. vysušit listy (sušením v sušičce, na topení apod.). Pro přípravu vhodného dehydratovaného vzorku jsem tyto potraviny lyofilizovala.

3.3.2 Příprava extraktu

Žluté a zelené listy (konečný extrakt – viz obr. 28, str. 36)

Nejprve jsem na automatických vahách navázila 2 g sušených zelených a žlutých listů buku a zelených listů břečťanu. Odvážené sušené listy s přídavkem křišťálového prachu jsem tloučkem rozměnila v třecí misce. Do rozmělněné směsi jsem přidala 1 ml acetonu (pro narušení biologických membrán) a poté jsem přidala 5 ml methanolu pro HPLC (methanol by měl být pokud možno co nejvíce koncentrovaný, tj. s minimálním obsahem vody). Vzniklý extrakt jsem přefiltrovala do eppendorfky přes skládaný filtrační papír. Filtrát jsem zcentrifugovala a aplikovala na kolonu.

Červené rajče (konečný extrakt – viz obr. 29, str. 36)

100 g nakrájených čerstvých červených rajčat jsem dala přes noc lyofilizovat. Pro přípravu extraktu jsem vždy vycházela z jednoho gramu lyofilizovaných rajčat. K odváženým lyofilizovaným rajčatům jsem přidala malé množství uhličitanu vápenatého (neutralizační činidlo, abrazivo), poté jsem směs tloučkem rozměnila v třecí misce. Do rozmělněné směsi jsem přidala 2 ml (resp. 4 ml – viz tab. 7) hexanu, který se ukázal jako vhodné rozpouštědlo pigmentů z rajčete. Kromě hexanu byly otestovány: dichlorethan, aceton, butanol, ethylester kyseliny octové a diethylether.

Vzniklý extrakt jsem přefiltrovala do eppendorfky přes skládaný filtrační papír. Filtrát jsem zcentrifugovala a aplikovala na kolonu.

Jahody (konečný extrakt – viz obr. 30, str. 36)

60 g čerstvých nasbíraných jahod jsem dala přes noc lyofilizovat (lyofilizovaný vzorek vážil 10,5 g). Druhý den jsem si navázila 3 g (1 g se ukázal jako nedostačující), v třecí misce jsem přidala 1 ml acetonu, dále 5 ml methanolu a posléze ještě 5 ml methanolu. Vzniklý extrakt jsem přelila do kádinky a nechala odpařit na výsledný objem 1 ml.

Třešně

100 g čerstvých nasbíraných odpeckovaných třešní jsem dala přes noc lyofilizovat (lyofilizovaný vzorek vážil 10,5 g). Pro přípravu extraktu jsem vycházela ze tří gramů lyofilizovaných třešní, které jsem tloučkem rozmělnila v třecí misce. Do rozmělněné směsi jsem přidala 1 ml acetonu a po chvíli 5 ml methanolu. Filtrát jsem zcentrifugovala a aplikovala na kolonu.

Šípek (konečný extrakt – viz obr. 30, str. 36)

Sušený plod šípku jsem zakoupila v lékárně. Výsledný vzorek jsem připravovala z dvou předchozích vzorků, které nebyly postačující kvůli nízké koncentraci pigmentů (jeden byl tvořen z 1 g, druhý ze 2 g sušiny). Nedostatečně koncentrované vzorky jsem připravovala z 1 g (resp. 2 g) sušeného šípku, v třecí misce jsem přidala 1 ml acetonu a posléze 5 ml methanolu. Oba vzorky jsem nechala odpařit na centrifugačním evaporátoru Speed Vac 110DNA a slila je v jeden.

Vodní meloun (konečný extrakt – viz obr. 31, str. 36)

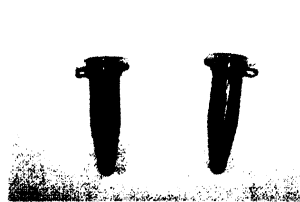
100 g odpeckovaného vodního melounu jsem dala přes noc lyofilizovat. Pro přípravu extraktu jsem vycházela ze čtyř gramů lyofilizovaného vodního melounu. Lyofilizovaný meloun jsem tloučkem rozmělnila v třecí misce a do rozmělněné směsi jsem přidala 1 ml acetonu a po chvíli 4 ml hexanu. Filtrát jsem zcentrifugovala a aplikovala na kolonu.

Sušená červená paprika (konečný extrakt – viz obr. 30, str. 36)

Na přípravu vzorku jsem použila 1 g sušené sladké červené papriky, v třecí misce jsem přidala 1 ml acetonu a posléze 5 ml methanolu. Vzniklý roztok jsem přefiltrovala a několikrát zcentrifugovala.

Paprika (konečné extrakty – viz obr. 32, str. 36)

50 g červené (resp. zelené a žluté) papriky jsem dala přes noc lyofilizovat. Pro přípravu extraktu jsem vycházela vždy ze dvou gramů lyofilizovaných paprik. Lyofilizované papriky jsem tloučkem rozmělnila v třecí misce a do rozmělněné směsi jsem přidala 1 ml acetonu a po chvíli 5 ml hexanu. Filtrát jsem zcentrifugovala a aplikovala na kolonu.



Obr. 28. Extrakt ze zeleného listu a ze žlutého listu buku.



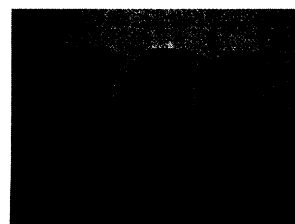
Obr. 29. Extrakt z červeného rajčete.



Obr. 30. Extrakt z jahod, šípku a sušené papriky.



Obr. 31. Extrakt z vodního melounu.



Obr. 32. Extrakt z červené, zelené a žluté papriky.

3.3.3 Parametry chromatografu

V tab. 7 jsou uvedeny parametry všech popsaných měření na HPLC.

Tab. 7. Parametry měření.

Číslo vzorku	Vzorek	Průtoková rychlost u [ml.min ⁻¹]	Mobilní směs	Vlnová délka λ [nm]	Teplota T [°C]	Objem smyčky [μ l]	Kolona-zrnitost [μ m]
1	2 g žlutého listu buku na 5 ml methanolu	1	Methanol pro HPLC	438	35	20	7
2	1 g zeleného listu buku na 5 ml methanolu	1	Methanol pro HPLC	438	35	20	7
3	2 g zeleného listu břečťanu na 5 ml methanolu	1	Methanol pro HPLC	438	35	20	7
4	1 g lyofil. rajčete na 2 ml hexanu	0,5	99,5% aceton	438	35	100	7
5	1 g lyofil. rajčete na 4 ml hexanu	1	95% aceton	475	35	100	7
6	1 g lyofil. rajčete na 2 ml hexanu	0,5	Aceton/methanol (50:50)	475	35	100	7
7	1 g lyofil. rajčete na 4 ml hexanu	1	Methanol pro HPLC	475	35	100	7

8	1 g lyofil. rajčete na 4 ml hexanu	1	Acetonitril/ methanol/ dichlormethan/ voda (70:15:10:5)	450	30	100	7
9	1 g lyofil. rajčete na 5 ml methanolu	1	THF/ methanol (10:90)	450	30	20	5
10	1 g lyofil. rajčete na 4 ml hexanu	1	THF/ methanol (5:95)	450	30	20	5
11	3 g lyofil. jahod na 5 ml methanolu	1	Methanol pro HPLC	475	35	100	7
12	3 g lyofil. třešní na 5 ml methanolu	1	Methanol pro HPLC	475	35	100	7
13	3 g sušeného šípku na 5 ml methanolu	1	Methanol pro HPLC	475	35	100	7
14	3 g lyofil. vodního melounu na 3 ml hexanu	1	Methanol pro HPLC	475	35	100	7
15	1 g sušené červené papriky na 5 ml methanolu	1	Methanol pro HPLC	475	35	100	7
16	2 g lyofil. červené papriky na 5 ml methanolu	1	Methanol pro HPLC	475	35	100	7
17	2 g lyofil. zelené papriky na 5 ml methanolu	1	Methanol pro HPLC	475	35	100	7
18	2 g lyofil. žluté papriky na 5 ml methanolu	1	Methanol pro HPLC	475	35	100	7

3.3.4 Identifikace pigmentů pomocí UV-vis spektrofotometru

Podle chromatogramu (resp. vzrůstajících píků) jsem zachytávala jednotlivé frakce separovaných barviv. Tyto frakce jsem ihned proměřila na UV-vis spektrofotometru (HELIOS γ , rozsah vlnových délek 200-700 nm) proti methanolu. Jednotlivá přírodní barviva jsem identifikovala podle charakteristických absorpčních pásů ve viditelné oblasti.

3.3.5 Pracovní postup pro rozdělení směsi barviv pomocí chromatografie na tenké vrstvě

Do chromatografické nádoby jsem nalila směs organických rozpouštědel benzín, propan-2-ol a voda v poměru 100:10:0,25 tak, aby hladina rozpouštědla byla asi 0,5 - 1 cm vysoko a nechala jsem ji uzavřenou stát, aby se vzduch uvnitř nasýtil parami rozpouštědla. Mezitím jsem si připravila chromatografickou desku (Silufol), na niž jsem asi 2 cm odzdola měkkou tužkou nakreslila startovní čáru. Na tuto čáru jsem pak pomocí kapiláry (kapátka) nanasla dostatečně koncentrovaný extrakt. Na jednu desku lze nanést několik skvrn, ty však musí být navzájem vzdálené alespoň 2 cm. Vysušení skvrn lze urychlit použitím fénu na vlasy či horkovzdušné pistole (teplota desky by neměla překročit 50 °C). V případě nižší koncentrace barviv lze extrakt na jedno místo nanést i opakovaně. Desku s nanesenými vzorky jsem pak opatrně vložila do chromatografické nádoby a sledovala jsem průběh dělení. Chromatografii je třeba ukončit dříve, než čelo rozpouštědla dosáhne horního okraje desky. Po vyjmutí desky jsem označila místo, kam až rozpouštědlo doputovalo a pak jsem desku vysušila.

4 Výsledky

Methanolové (resp. hexanové) extrakty rostlinných pigmentů ze zelených a žlutých listů a z vybraných potravin jsem rozdělila izokratickou vysokoúčinnou chromatografií. Ze zaznamenaných chromatografických křivek jsem odečetla údaje pro stanovení množství rostlinných pigmentů ve vzorku, které jsem zpracovala pomocí chromatografického softwaru Clarity.

Sesbírané frakce jsem následně proměřila na UV-vis spektrofotometru HELIOS γ . Z naměřených závislostí absorbance na vlnové délce neboli spekter jsem odečetla vlnové délky absorpčních maxim a jejich hodnoty porovnávala s údaji uvedenými v literatuře (viz kap. 1.2) jsem identifikovala pigmenty.

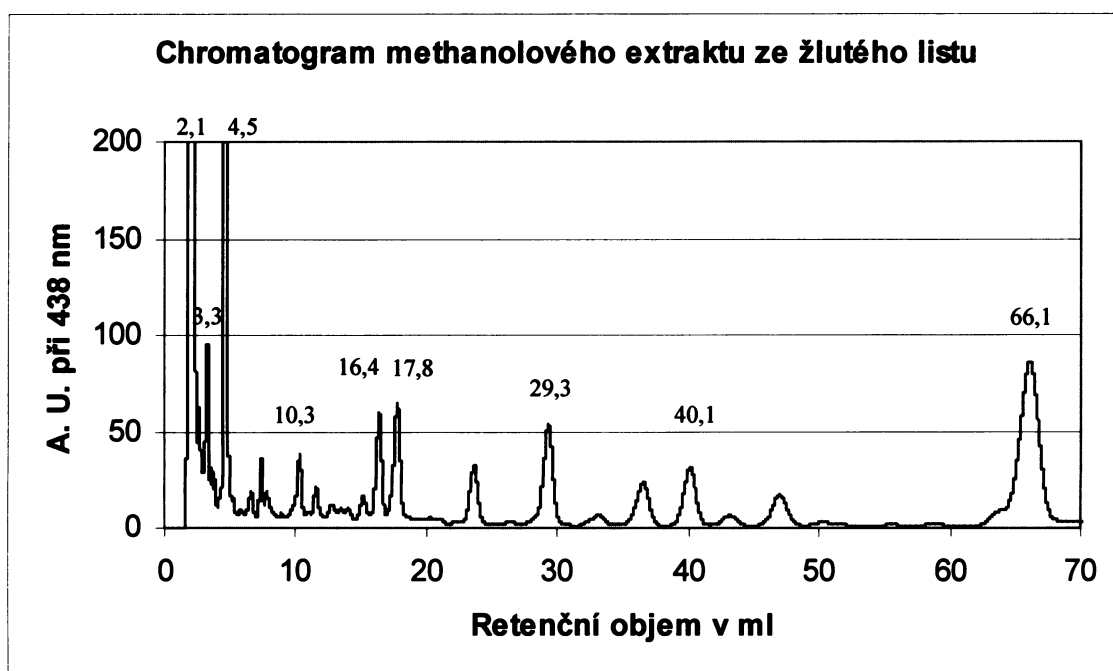
Na základě mobility látek na koloně s reverzní fází a přiřazením absorpčních maxim ve viditelné oblasti jsem pak jednotlivé pigmenty identifikovala.

Nebylo-li možné na základě těchto údajů látky jednoznačně identifikovat, pokusila jsem se je alespoň zařadit do příslušné skupiny (např. skupina karotenoidy).

4.1.1 Vzorek č. 1 (žlutý list buku, M_f = methanol)

Na obr. 33 na str. 40 je znázorněna chromatografická křivka methanolového extraktu ze žlutého listu buku. Jako mobilní fázi jsem použila methanol. Tab. 8 na str. 40 shrnuje absorpční maxima vybraných frakcí pomocí kterých jsem látky identifikovala. Spektra frakcí ze žlutého listu jsem znázorněny na obr. 34 na str. 41.

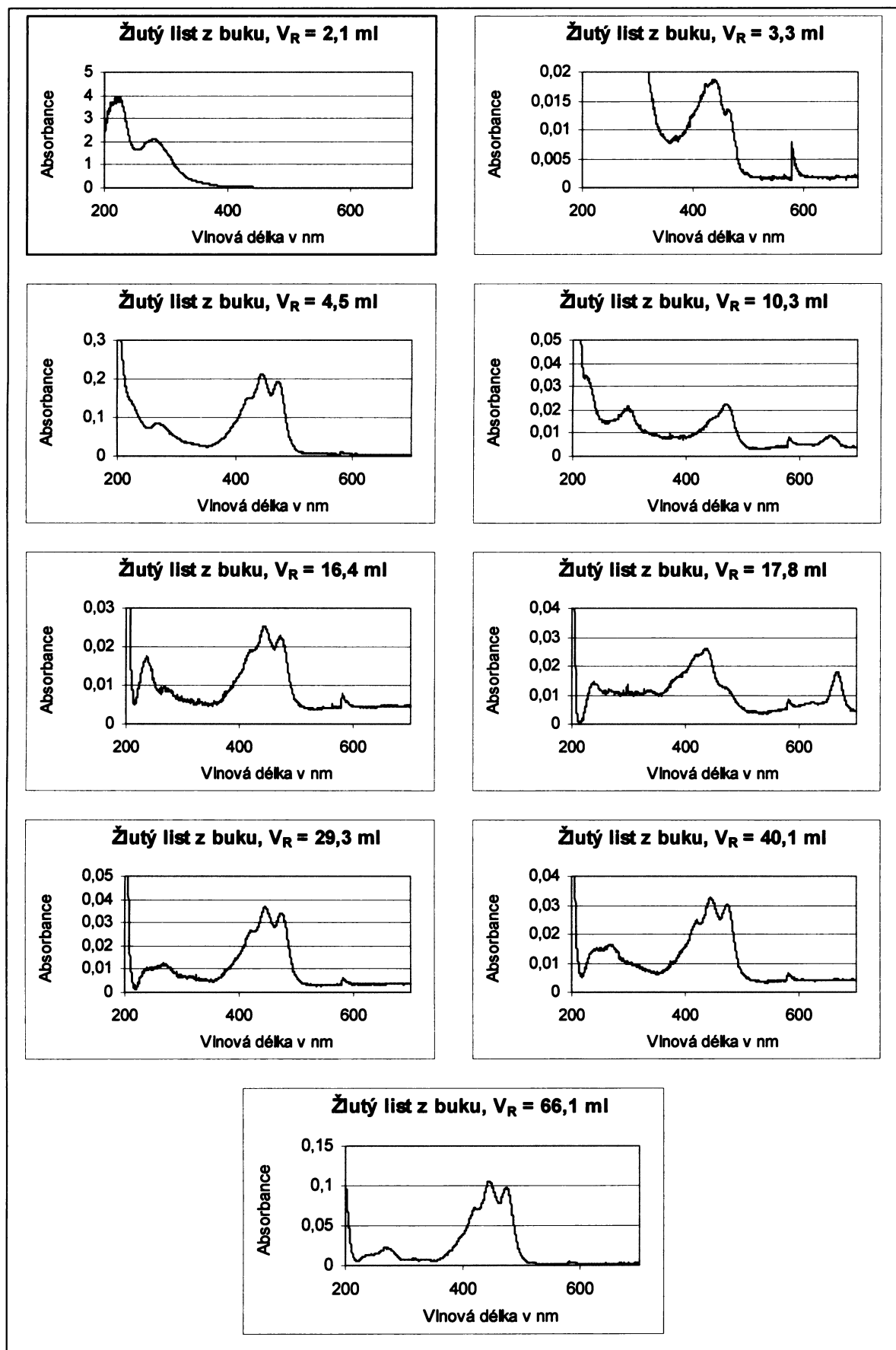
Ve žlutém listu jsem identifikovala následující barviva: xanthofyly (neoxanthin: $V_R = 3,3$ ml a lutein: $V_R = 4,5$ ml), chlorofyly (a : $V_R = 17,8$ ml, b : $V_R = 10,3$ ml) a β -karoten ($V_R = 66,1$ ml). Píky o $V_R = 16,4$ ml, $29,3$ ml a $40,1$ ml zřejmě odpovídají monosubstituovaným kyslíkatým derivátům karotenu (jako je např. kryptoxanthin či zeinoxanthin).



*Obr. 33. Chromatogram methanolového extraktu ze zeleného listu buku.
(Čísla nad píky udávají retenční objem v ml).*

Tab. 8. Žlutý list: absorpční maxima v methanolu.

V_R (ml)	Maxima absorbance při vlnové délce γ (v nm):					Rostlinný pigment	Plocha píku (mV.s)	
2,1						směs polárních látek		
3,3		272		436,5	465,5	neoxanthin	1841	
4,5		267	422,5	444,5	473	lutein	15515	
10,3		298			470	654,5	chlorofyl <i>b</i>	1339
16,4	236	267	423	445,5	472,5		der. karotenu	2021
17,8	238,5		423	436,5		666,5	chlorofyl <i>a</i>	2730
29,3	267		420,5	444,5	472,5		der. karotenu	3178
40,1	267		423	444	473		der. karotenu	2222
66,1	267		421	444,5	472,5		β -karoten	10534

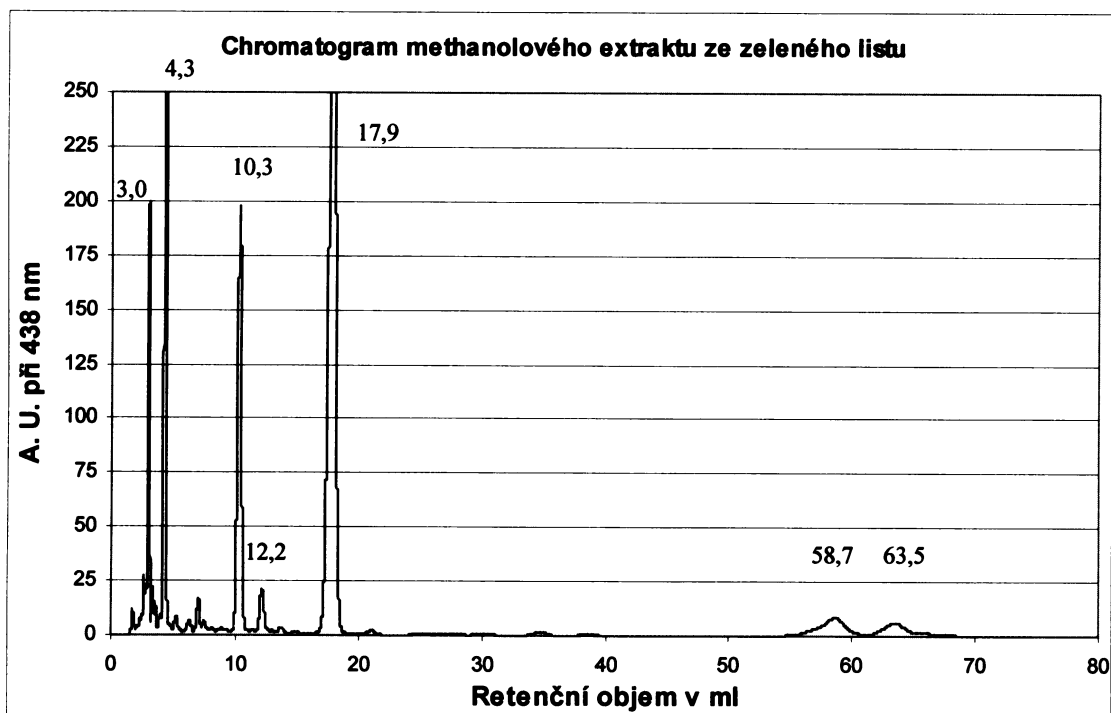


Obr. 34. Spektra frakcí ze žlutého listu.

4.1.2 Vzorek č. 2 (zelený list buku, M_f = methanol)

Na obr. 35 je znázorněna chromatografická křivka methanolového extraktu ze zeleného listu buku. Jako mobilní fázi jsem použila methanol. Tab. 9 shrnuje absorpční maxima vybraných frakcí, pomocí kterých jsem látky identifikovala. Spektra frakcí ze zeleného listu buku jsou znázorněny na obr. 36 na str. 43.

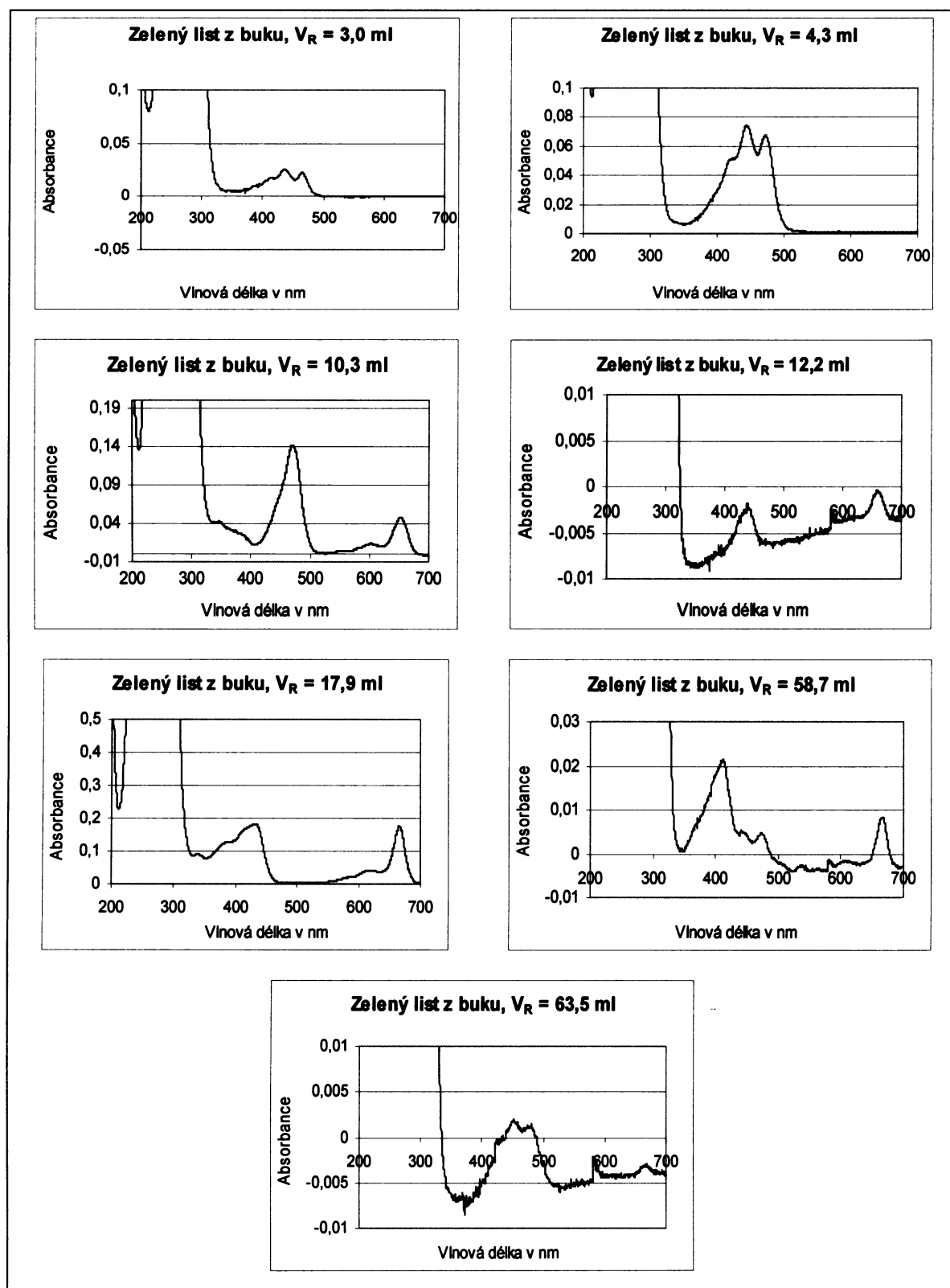
V zeleném listu buku jsem identifikovala následující barviva: xanthofyly (neoxanthin a lutein), chlorofyly (*a*, *b*), feofytin *a* a karoteny.



Obr. 35. Chromatogram methanolového extraktu ze zeleného listu buku.
(Čísla nad píky udávají retenční objem v ml).

Tab. 9. Zelený list buku: absorpční maxima v methanolu.

V_R (ml)	Maxima absorbance při vlnové délce γ (v nm):					Rostlinný pigment	Plocha píku (mV.s) násobeno dvěma	
3,0	270,5	414	437	465,5		neoxanthin	4205	
4,3	270,5		444,5	472,5		lutein	10496	
10,3	270,5			470	653	chlorofyl <i>b</i>	8813	
12,2	270,5		440,5		659,5	chlorofyl	1311	
17,9	269,5		432,5		666,5	chlorofyl <i>a</i>	30628	
58,7		412	441	474	610,5	668	feofytin <i>a</i>	2608
63,5			452	477?	(668)	β -karoten	1218	

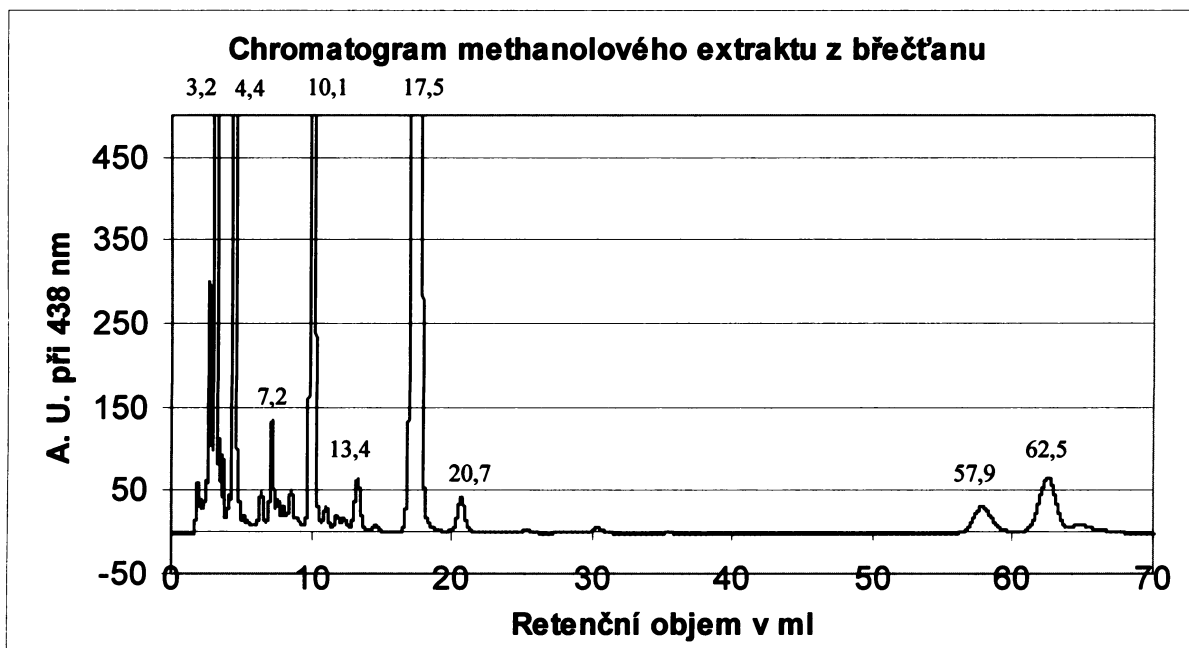


Obr. 36. Spektra frakcí ze zeleného listu buku.

4.1.3 Vzorek č. 3 (zelený list břečťanu, M_f = methanol)

Na obr. 37 je znázorněna chromatografická křivka methanolového extraktu ze zeleného listu břečťanu. Jako mobilní fázi jsem použila methanol. Tab. 10 shrnuje absorpční maxima vybraných frakcí, pomocí kterých jsem látky identifikovala. Spektra frakcí ze zeleného listu břečťanu jsou znázorněny na obr. 38 na str. 45 – 46.

V zeleném listu břečťanu jsem identifikovala následující barviva: xanthofyly (neoxanthin a lutein), chlorofyly (*a*, *b*), feofytin *a* a karoteny.

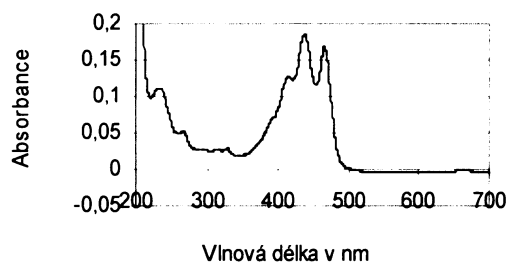


Obr. 37. Chromatogram methanolového extraktu ze zeleného listu břečťanu.
(Čísla nad píky udávají retenční objem v ml).

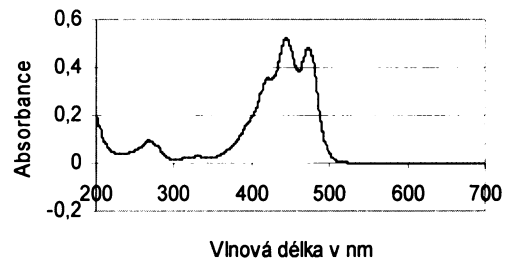
Tab. 10. Zelený list břečťanu: absorpční maxima v methanolu.

V_R (ml)	Maxima absorbance při vlnové délce γ (v nm):					Rostlinný pigment	Plocha píku (mV.s)
3,2	414,5	437	465,5			neoxanthin	14082
4,4	421	444,5	472,5			lutein	36362
7,2		444,5	469,5			xanthofyl	2498
10,1			470,5	603,5	652,5	chlorofyl <i>b</i>	25347
13,4		430			665	chlorofyl	2160
17,5		433,5		618	666,5	chlorofyl <i>a</i>	91542
20,7		430			668,5	chlorofyl	2152
57,9	409,5		474	537,5	610,5	feofytin <i>a</i>	3310
62,5		451,5	479,5			β -karoten	6222

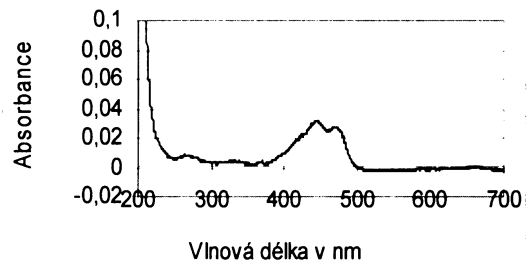
Břečťan, $V_R = 3,2$ ml



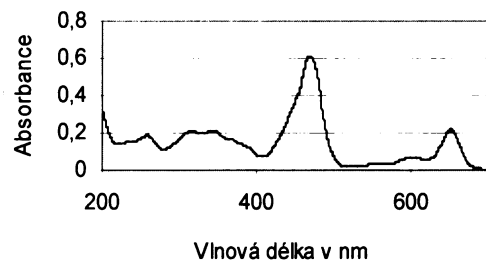
Břečťan, $V_R = 4,4$ ml



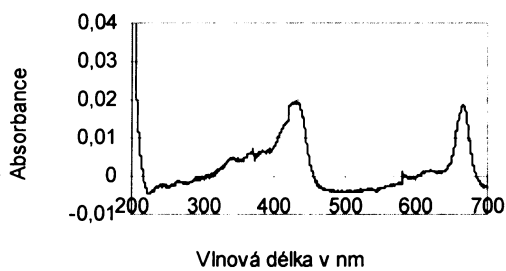
Břečťan, $V_R = 7,2$ ml



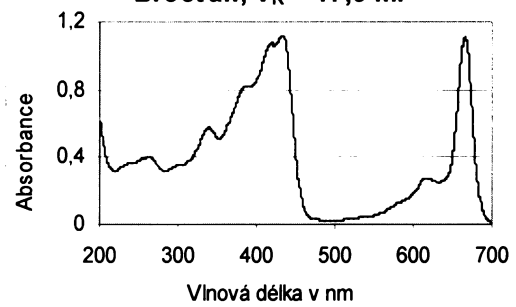
Břečťan, $V_R = 10,1$ ml



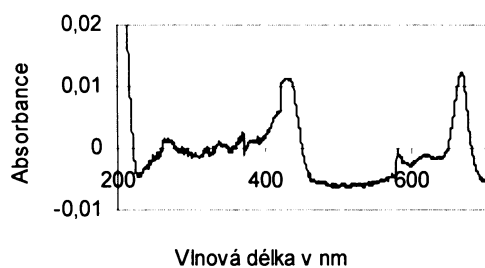
Břečťan, $V_R = 13,4$ ml



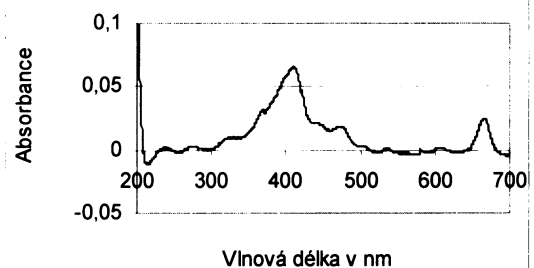
Břečťan, $V_R = 17,5$ ml

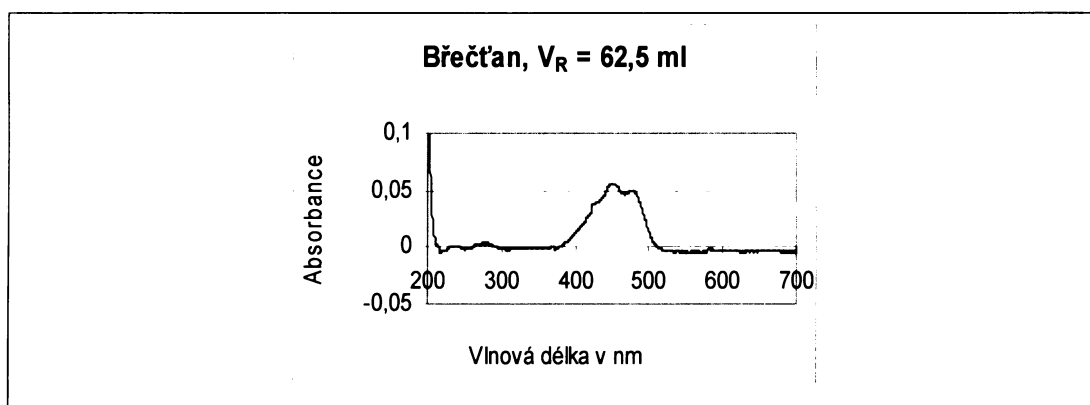


Břečťan, $V_R = 20,7$ ml



Břečťan, $V_R = 57,9$ ml

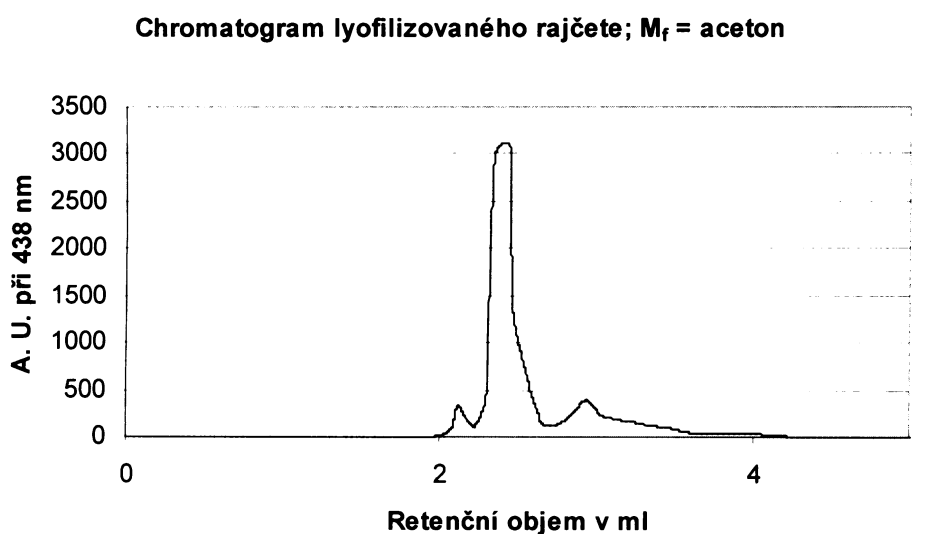




Obr. 38. Spektra frakcí ze zeleného listu břečťanu.

4.1.4 Vzorek č. 4 (červené rajče, M_f = aceton)

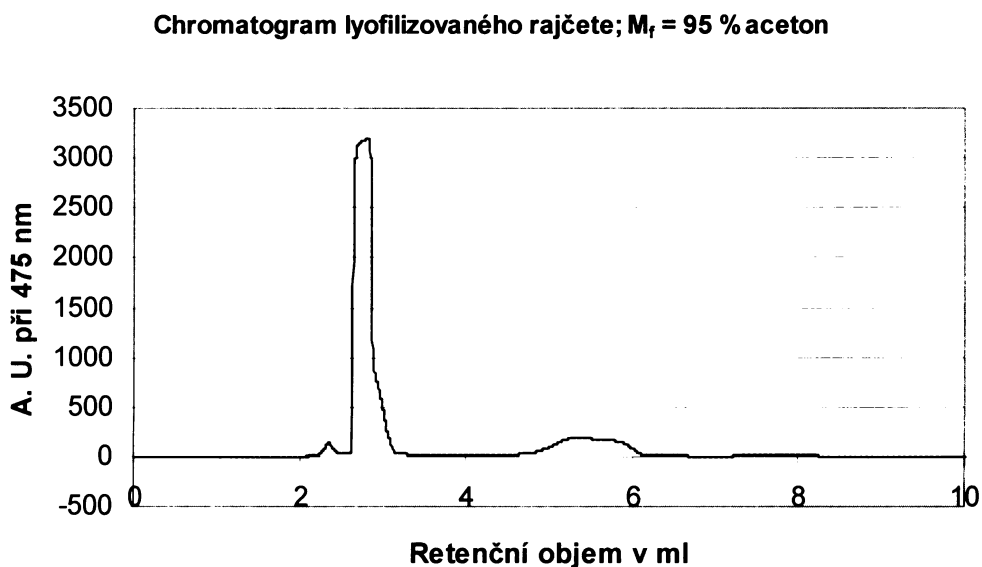
Na obr. 39 je znázorněna chromatografická křivka hexanového extraktu z lyofilizovaného červeného rajčete. Z chromatogramu vyplývá, že použitá mobilní fáze (aceton) není vhodná pro separaci rostlinných barviv obsažených v červených rajčatech, neboť na koloně nedošlo k jejich rozdělení a tudíž vytekly jako jeden pík blízko mrtvého objemu kolony.



Obr. 39. Chromatogram červeného rajčete; M_f : aceton.

4.1.5 Vzorek č. 5 (červené rajče, $M_f = 95\%$ aceton)

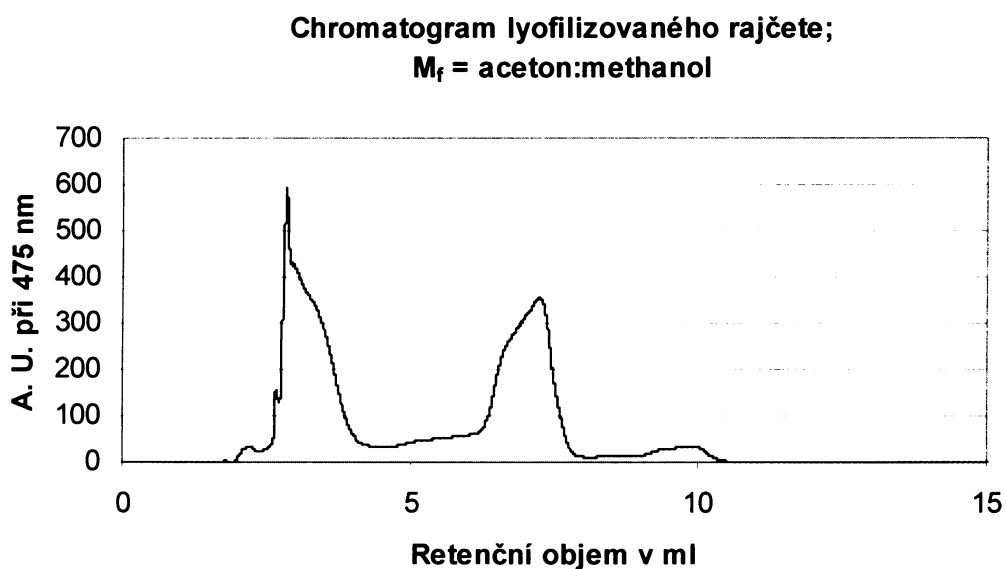
Na obr. 40 je znázorněna chromatografická křivka hexanového extraktu z lyofilizovaného červeného rajčete. Z chromatogramu vyplývá, že použitá mobilní fáze (95% aceton) opět není vhodná pro separaci rostlinných barviv obsažených v červených rajčatech. Na koloně nedošlo k dostatečnému rozdělení rostlinných barviv.



Obr. 40. Chromatogram červeného rajčete; M_f : 95% aceton.
(Čísla nad píky udávají retenční objem v ml).

4.1.6 Vzorek č. 6 (červené rajče, M_f = aceton/methanol)

Na obr. 41 je znázorněna chromatografická křivka hexanového extraktu z lyofilizovaného červeného rajčete. Použitím méně hydrofobní mobilní fáze (aceton/methanol = 50:50) došlo k zlepšení afinity části barviv ke koloně ($V_R = 7$ ml), nicméně asymetričnost obou píků naznačuje, že stále nedošlo k požadovanému rozdělení barviv.



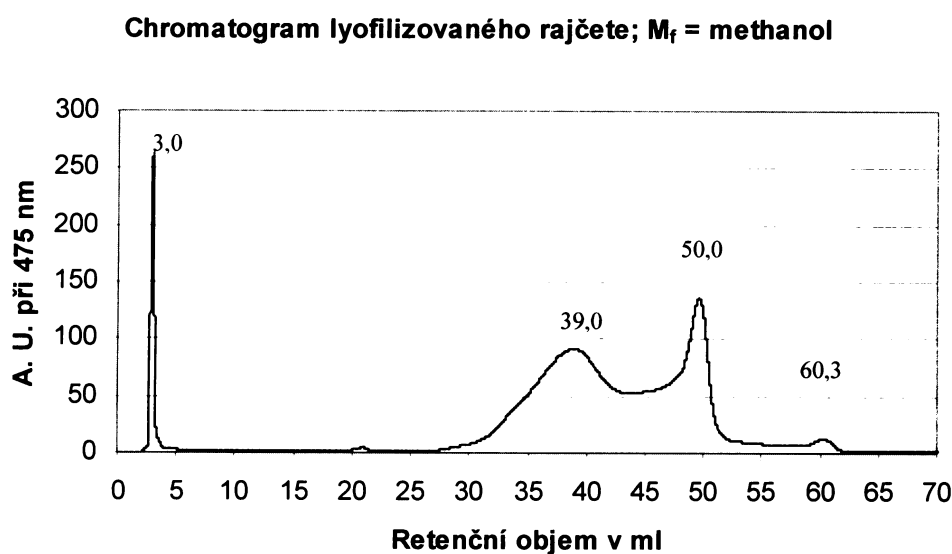
Obr. 41. Chromatogram červeného rajčete; M_f : aceton/methanol (50:50).
(Čísla nad píky udávají retenční objem v ml).

4.1.7 Vzorek č. 7 (červené rajče, M_f = methanol)

Podle již publikovaného postupu jsem pro další měření použila jako mobilní fázi methanol.³⁰ Z chromatogramu znázorněného na obr. 42 vyplývá, že použitá mobilní fáze je již vhodná pro separaci rostlinných barviv obsažených v červených rajčatech. Na koloně došlo k rozdělení barviv na xanthofyly ($V_R = 3,0$ ml), lykopeny ($V_R = 39,0$ a $50,0$ ml) a karoteny ($V_R = 60,3$ ml). Avšak nevýhodou této metody je dlouhá doba analýzy (poslední pík vytékal v 60. minutě).

Tab. 11 na str. 51 shrnuje absorpční maxima vybraných frakcí, pomocí kterých jsem látky identifikovala. Spektra frakcí z plodu červeného rajčete jsou znázorněny na obr. 43 na str. 51.

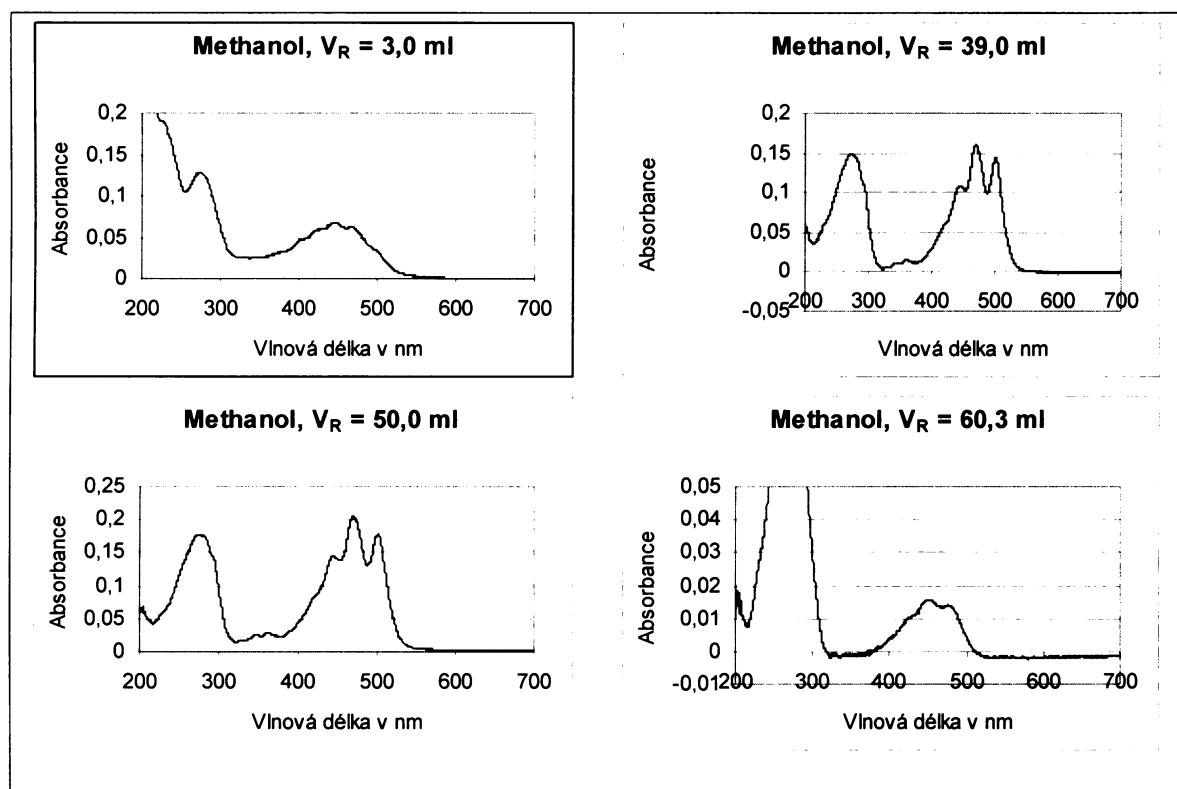
Převažujícím barvivem červeného rajčete je lykopen a jeho isomery. Ostrý pík vytékající při 50 ml by mohl náležet all-*trans*-lykopenu, zatímco široký pík kolem 40 ml je směsí jednotlivých *cis*-isomerů lykopenu.



Obr. 42. Chromatogram červeného rajčete; M_f : methanol.
(Čísla nad píky udávají retenční objem v ml).

Tab. 11. Červené rajče: absorpční maxima v methanolu.

V_R (ml)	Maxima absorbance při vlnové délce λ (v nm):							Rostlinný pigment	Plocha píku (mV.s)
3,0	275			426,5	446,5	468		xanthofyly	5778
39,0	273		360		445	470,5	502	<i>cis</i> -lykopeny	45131
50,0	274,5	348,5	361,5		445	471	502	all- <i>trans</i> -lykopen	35208
60,3	273			427	453,5	476,5		β -karoten	2138



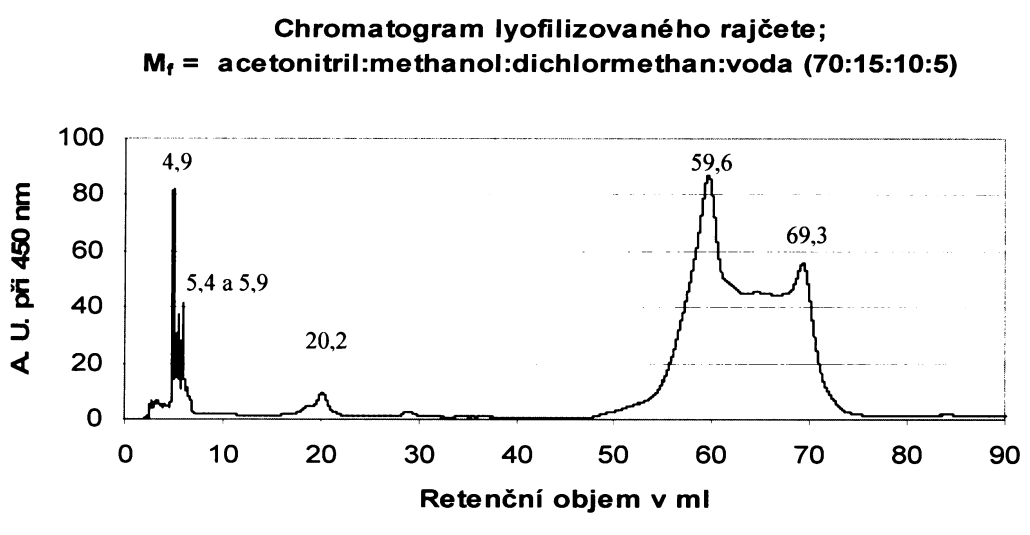
Obr. 43. Spektra frakcí z červeného rajčete.

M_f: methanol.

4.1.8 Vzorek č. 8 (červené rajče, M_f = acetonitril/methanol/dichlormethan/voda)

Zajímalo mě, zda je možné zlepšit rozlišení jednotlivých isomerů lykopenu a současně zkrátit dobu analýzy. Podle dříve publikovaného postupu jsem použila čtyřsložkovou mobilní fázi (acetonitril/methanol/dichlormethan/voda = 70:15:10:5).³¹ Z chromatogramu znázorněného na obr. 44 vyplývá, že použitá mobilní fáze je vhodná pro separaci rostlinných barviv (především lykopenu), avšak oproti očekávání se doba analýzy prodloužila (poslední pík vytékal v 70. minutě), taktéž nedošlo k lepšímu rozlišení píků ve srovnání s předchozím pokusem. Na koloně došlo k rozdělení na xanthofyly (V_R = do 10ti ml) a lykopeny (V_R = 20,2 ml, 59,6 ml a 69,3 ml).

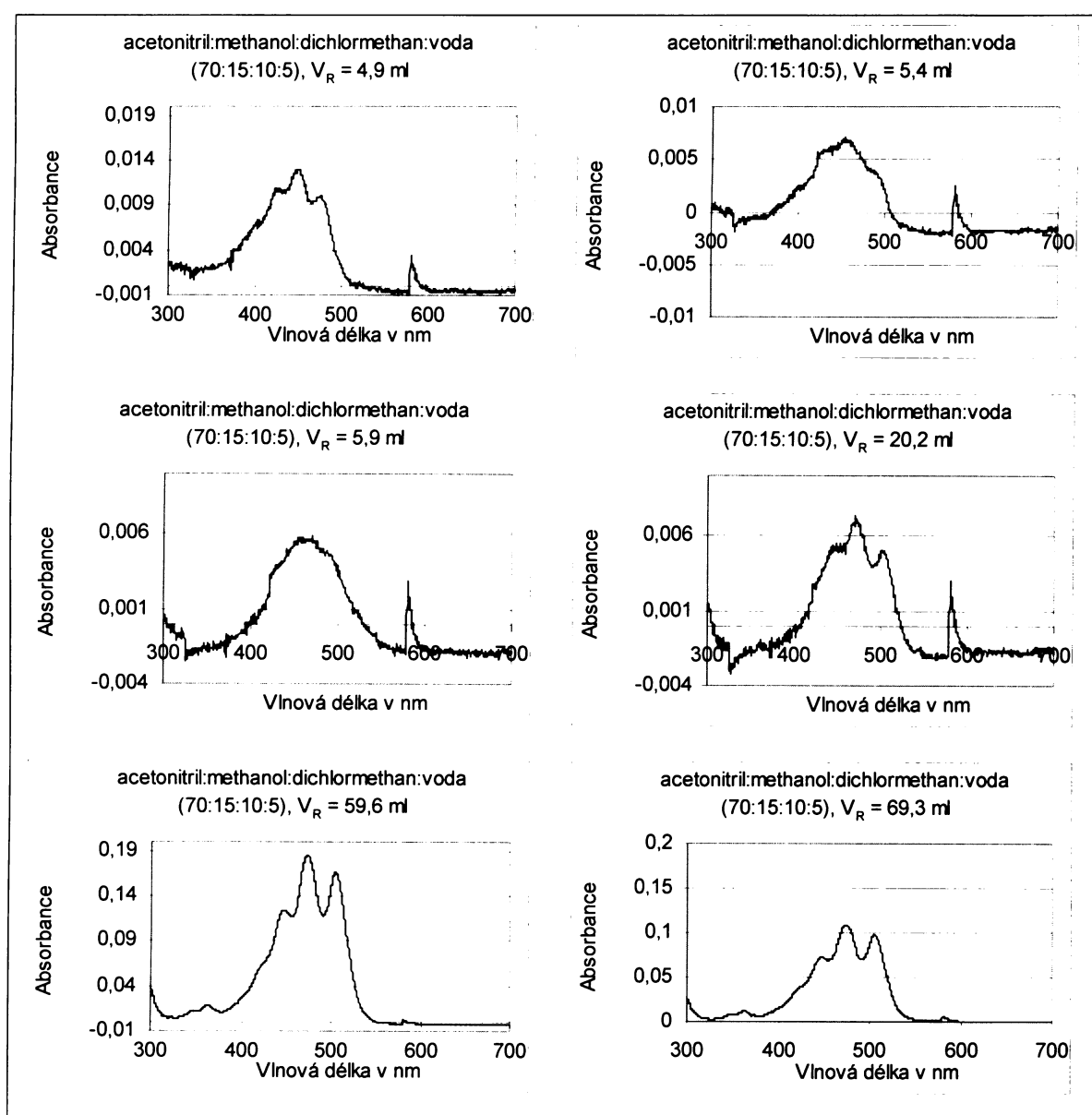
Tab. 12 na str. 53 shrnuje absorpční maxima vybraných frakcí pomocí kterých jsem látky identifikovala. Spektra frakcí z plodu červeného rajčete jsou znázorněny na obr. 45 na str. 53.



Obr. 44. Chromatogram červeného rajčete; M_f : acetonitril/methanol/dichlormethan/voda (70:15:10:5). (Čísla nad píky udávají retenční objem v ml).

Tab. 12. Červené rajče: absorpční maxima ve směsi
acetonitril/methanol/dichlormethan/voda (70:15:10:5).

V_R (ml)	Maxima absorbance při vlnové délce λ (v nm):						Rostlinné pigmenty
4,9	280		422,5	449	474		xanthofyly
5,4	282,5		430?	454?			xanthofyly
5,9	274		430?		470?		xanthofyly
20,2	280	361			470	504	lykopen (epoxid?)
59,6	296,5	363,5		447,5	474,5	506	lykopen
69,3	296	363		448,5	474,5	506	lykopen



Obr. 45. Spektra frakcí z červeného rajčete.

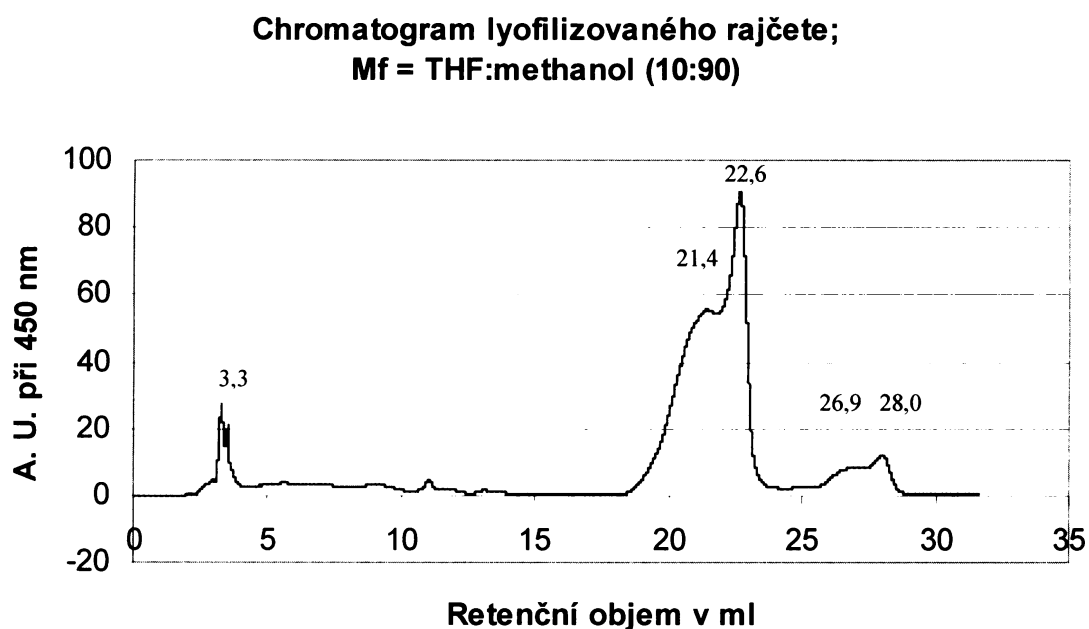
M_f : acetonitril/methanol/dichlormethan/voda (70:15:10:5).

4.1.9 Vzorek č. 9 (červené rajče, $M_f = \text{THF}(10)/\text{methanol}$)

Za účelem zkrácení doby analýzy jsem podle dříve publikovaného postupu použila dvousložkovou mobilní fázi (THF/methanol = 10:90).³⁰ Z chromatogramu znázorněného na obr. 46 vyplývá, že se výrazně zkrátila doba analýzy (poslední pík vytékal v 28. minutě), avšak nedošlo k požadovanému rozlišení isomerů lykopenu.

Na koloně došlo k rozdělení na xanthofyly ($V_R = 3,3$ ml), lykopeny ($V_R = 21,4$ ml, a 22,6 ml) a karoteny (26,9 ml a 28 ml).

Tab. 13 na str. 55 shrnuje absorpční maxima vybraných frakcí pomocí kterých jsem látky identifikovala. Spektra frakcí z plodu červeného rajčete jsou znázorněny na obr. 47 na str. 55.

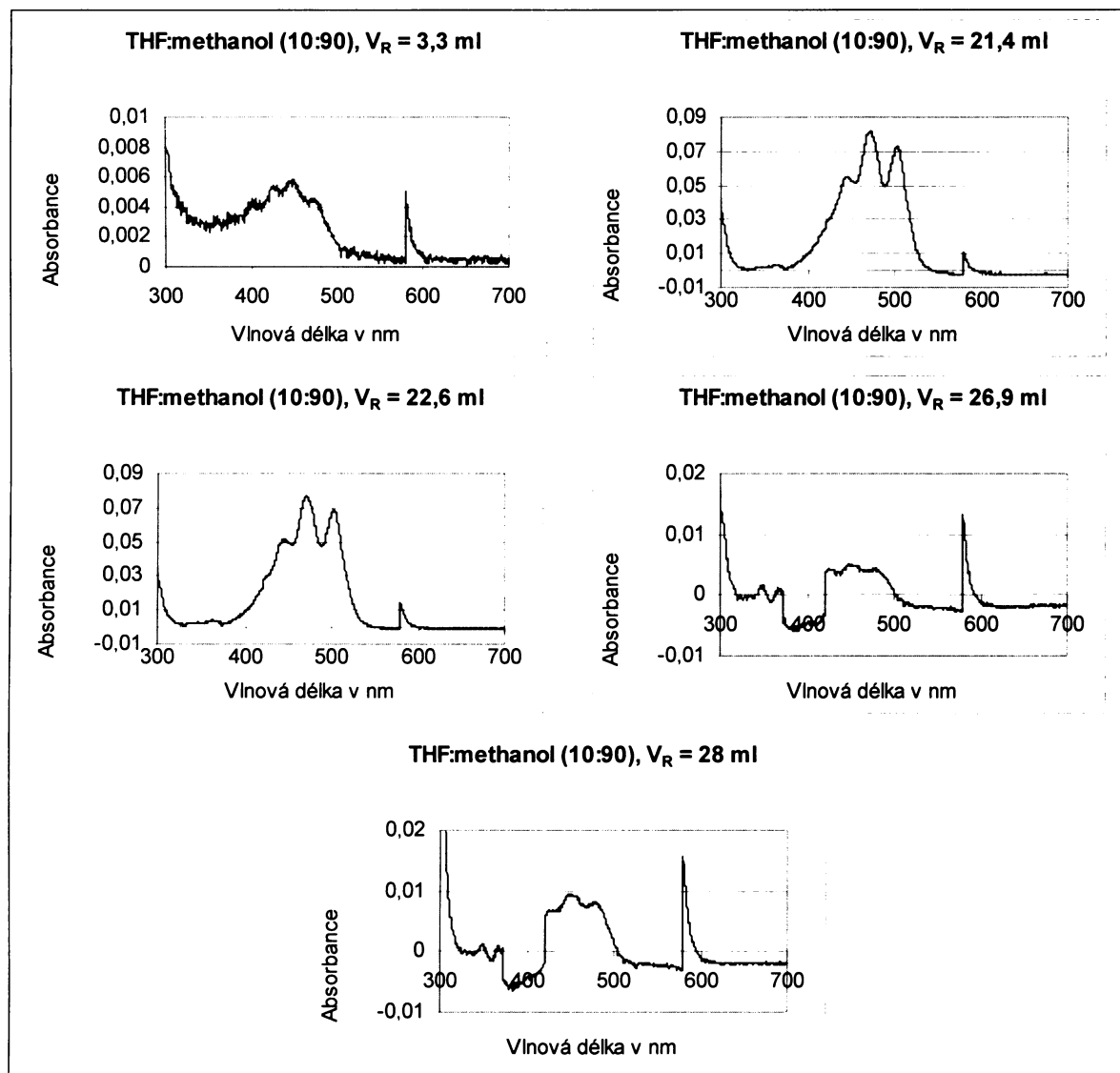


Obr. 46. Chromatogram červeného rajčete; M_f : THF/methanol (10:90).

(Čísla nad píky udávají retenční objem v ml).

Tab. 13. Červené rajče: absorpční maxima ve směsi methanol/THF (90:10).

V_R (ml)	Maxima absorpance při vlnové délce λ (v nm):						Rostlinné pigmenty	
3,3	278				449,5		xanthofyly	
21,4	270,5		362,5		446,5	471,5	503	lykopen
22,6	280,5		362,5		444,5	471	503	lykopen
26,9	270,5; 273,5	348,5	367	425	452,5	(480?)		karoteny
28,0	277	349,5	367,5	(430?)	451	(480?)		karoteny



Obr. 47. Spektra frakcí z červeného rajčete.

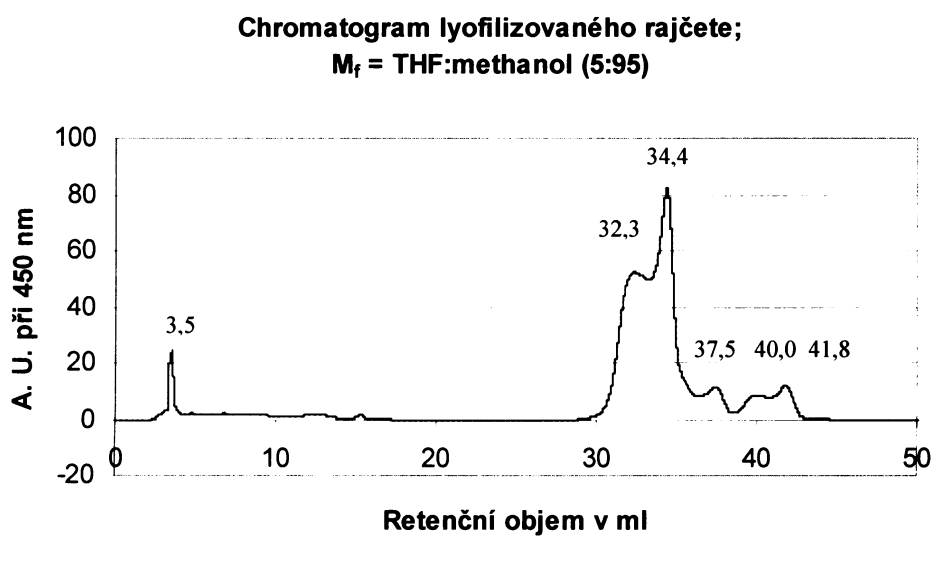
M_f : THF/methanol (10:90).

4.1.10 Vzorek č. 10 (červené rajče, $M_f = \text{THF}(5)/\text{methanol}$)

K lepšímu rozlišení isomerů lykopenu jsem chtěla dojít snížením koncentrace tetrahydrofuranu v mobilní fázi používané v předchozím pokusu, tj. z 10% jsem snížila koncentraci na 5%. Výsledkem byla očekávaná delší doba analýzy a bohužel opětne nedostačující rozlišení isomerů lykopenu. Oproti předchozímu pokusu se objevil nový pík vytékající při 37,5 ml (viz chromatografická křivka znázorněná na obr. 48).

Na koloně došlo k rozdělení na xanthofyly ($V_R = 3,5$ ml), lykopeny ($V_R = 32,3$ ml a $34,4$ ml) a karoteny ($37,5$ ml, $40,0$ ml a $41,8$ ml).

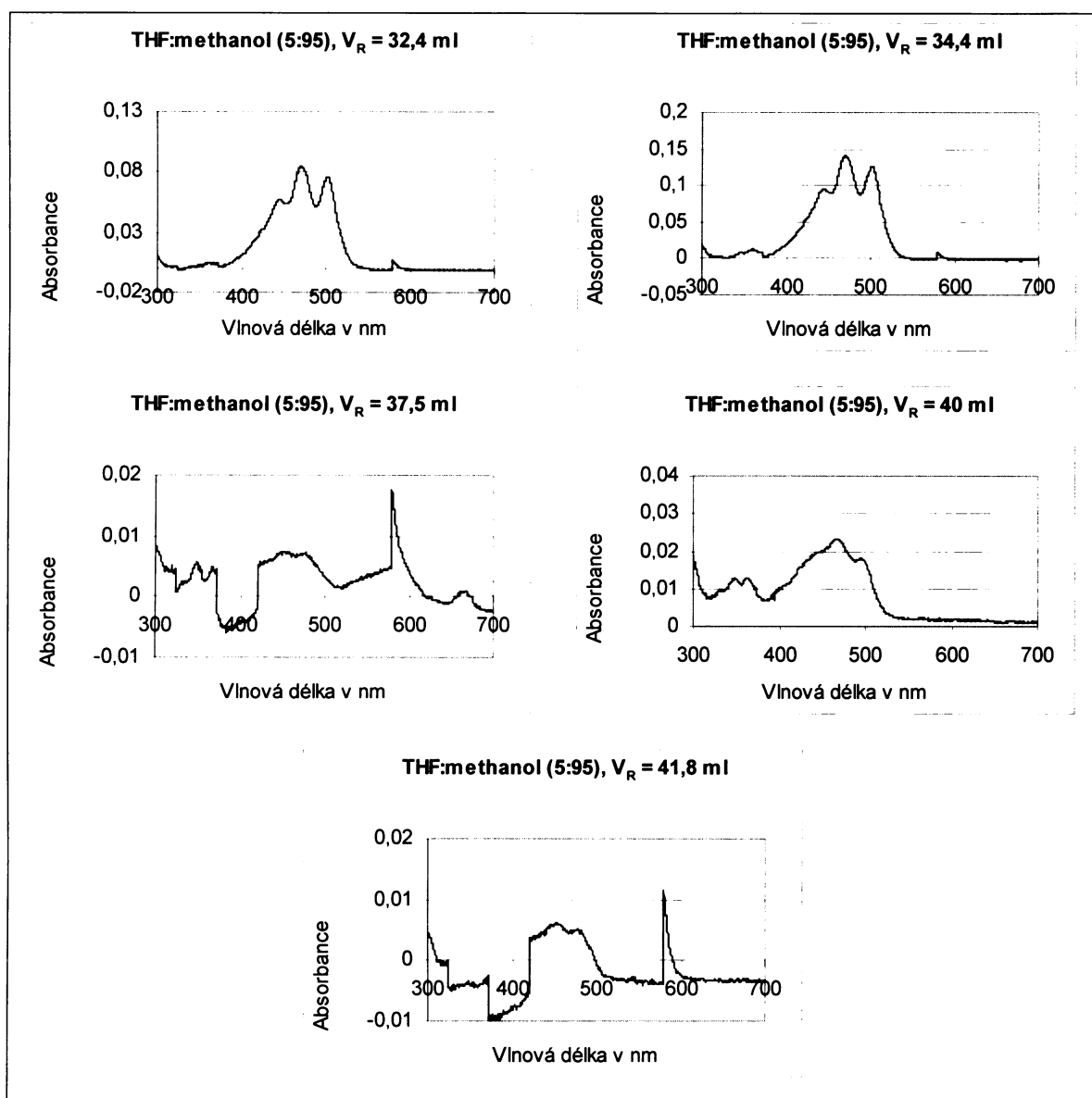
Tab. 14 na str. 57 shrnuje absorpční maxima vybraných frakcí pomocí kterých jsem látky identifikovala. Spektra frakcí z plodu červeného rajčete jsou znázorněny na obr. 49 na str. 57.



Obr. 48. Chromatogram červeného rajčete; M_f : THF/methanol (5:95).
(Čísla nad píky udávají retenční objem v ml).

Tab. 14. Červené rajče: absorpční maxima ve směsi THF/ methanol (5:95).

V_R (ml)	Maxima absorbance při vlnové délce λ (v nm):							Rostlinné pigmenty
3,5	Vylil se							
32,3	295,5				443,5	471,5	502,5	lykopen
34,4	294,5		(362,5)		443,5	470,5	502,5	lykopen
37,5	297			430?	451	476?		karoten
40,0	275,5; 285	348	362		444	468,5	495	karoten
41,8	294,5			430	452	478		karoten



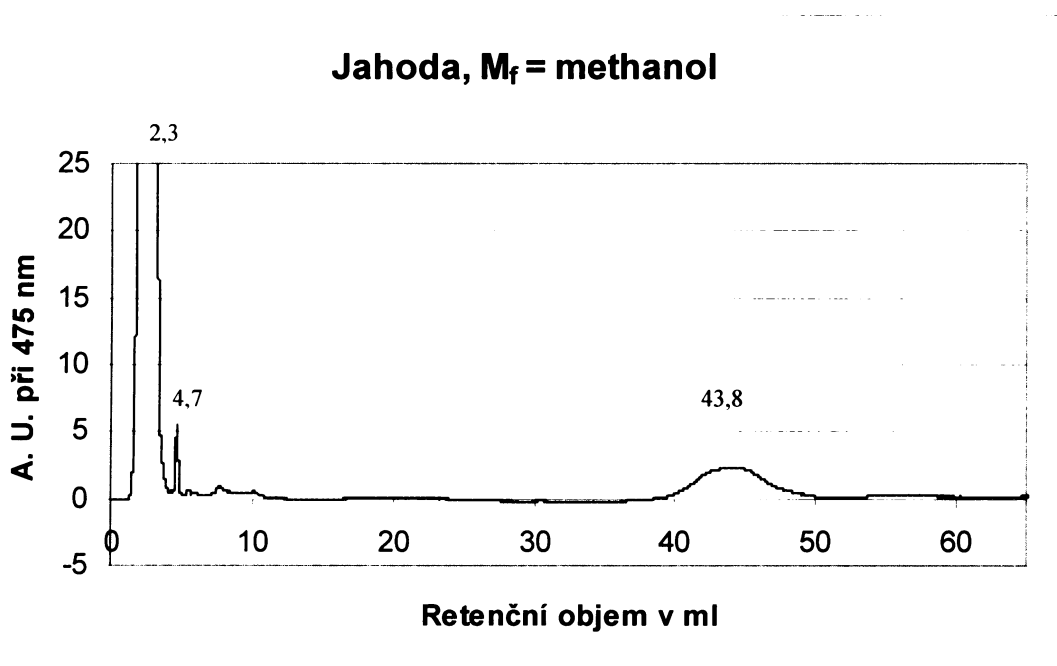
Obr. 49. Spektra frakcí z červeného rajčete.

M_f : THF/methanol (5:95).

4.1.11 Vzorek č. 11 (jahody, M_f = methanol)

Na obr. 50 je znázorněna chromatografická křivka methanolového extraktu z lyofilizovaných jahod. Jako mobilní fázi jsem použila methanol. Většina barviv jahody se na použité koloně nedělí (vytékají blízko mrtvého objemu kolony), a to z toho důvodu, že jahoda obsahuje především polární barviva, která vychází ihned na začátku jako směs (hlavním barvivem jahod je polární látka z kategorie anthokyanů). Pík vytekající při 43,8 ml podle retenčního objemu spíše odpovídá lykopenu, avšak tomu neodpovídá naměřenými hodnotami absorpčních maxim (viz tab. 15, str. 59). Ve spektru je nicméně patrný trojitý pík kolem 460 nm typický pro karotenoidy. Ostatní píky nebyly identifikovatelné.

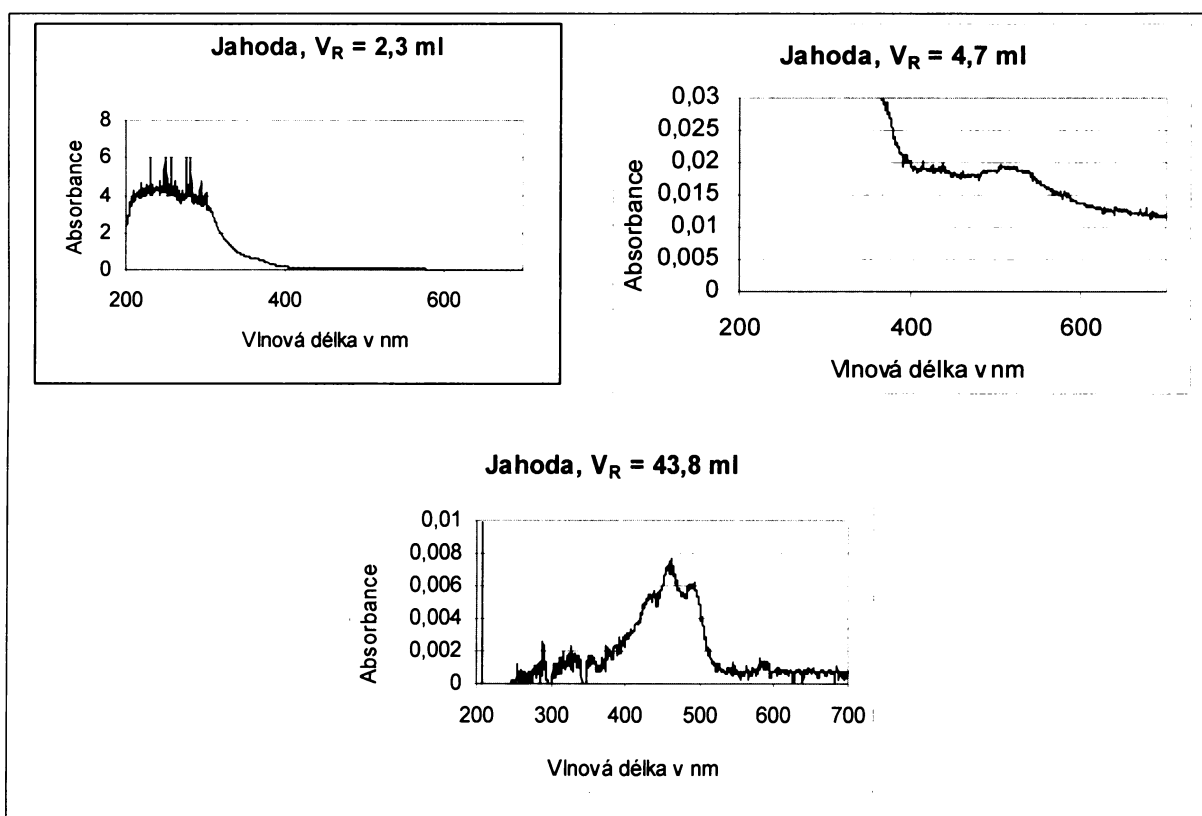
Spektra frakcí z jahody jsou znázorněny na obr. 51 na str. 59.



Obr. 50. Chromatogram jahod; M_f : methanol.
(Čísla nad píky udávají retenční objem v ml).

Tab. 15. Jahody: absorpční maxima v methanolu.

V_R (ml)	Maxima absorbance při vlnové délce λ (v nm):				Rostlinné pigmenty
2,3			508,5		Směs
4,7	414,5	433,5	505	544	neidentifikovatelné (příliš malá koncentrace)
43,8	439,5	460,5	492,5		blíže neurčený karotenoid



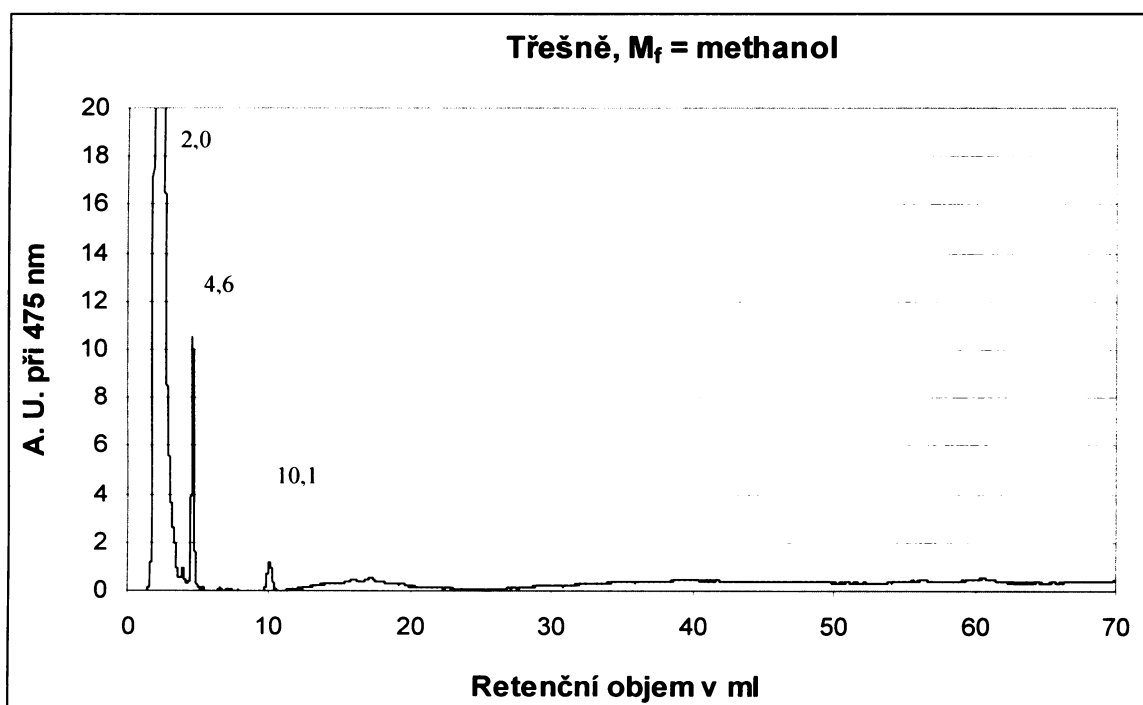
Obr. 51. Spektra frakcí z jahod.

M_f: methanol.

4.1.12 Vzorek č. 12 (třešně, M_f = methanol)

Na obr. 52 je znázorněna chromatografická křivka methanolového extraktu z lyofilizovaných třešní. Jako mobilní fázi jsem použila methanol. Na koloně nedošlo k potřebnému rozdělení pigmentů, a to z toho důvodu, že třešeň, stejně jako jahoda, obsahuje především polární barviva, která vychází ihned na začátku jako směs ($V_R = 2,0$ ml). Ostatní obsažené pigmenty vzhledem k nízké koncentraci nebyly identifikovatelné. Pík o $V_R = 4,6$ ml zřejmě odpovídá luteinu.

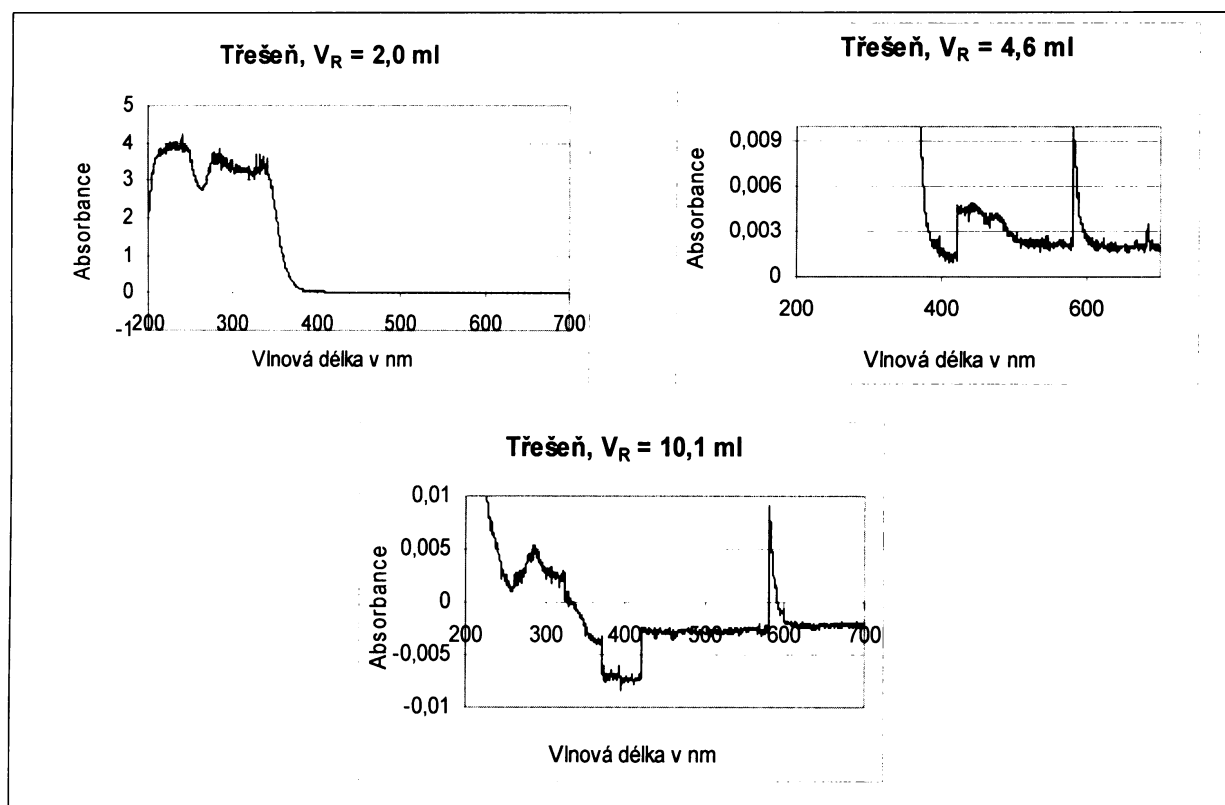
Tab. 16 na str. 61 shrnuje absorpční maxima vybraných frakcí pomocí kterých jsem látku identifikovala. Spektra frakcí z třešní jsou znázorněny na obr. 53 na str. 61.



Obr. 52. Chromatogram třešní; M_f : methanol.
(Čísla nad píky udávají retenční objem v ml).

Tab. 16. Třešně: absorpční maxima v methanolu.

V_R (ml)	Maxima absorbance při vlnové délce λ (v nm):			Rostlinné pigmenty
2,0				směs hydrofilních barviv
4,6	437,5	442,5	477	neidentifikovatelné (příliš malá koncentrace)
10,1				neidentifikovatelné (příliš malá koncentrace)



Obr. 53. Spektra frakcí z třešni.

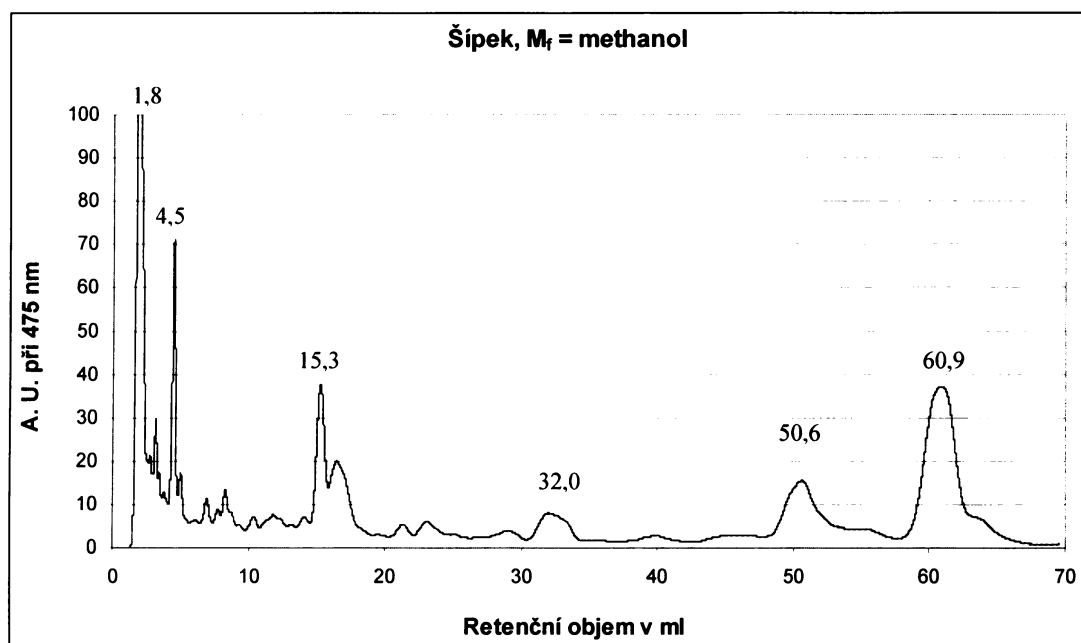
Mf: methanol.

4.1.13 Vzorek č. 13 (sušený červený šípek, M_f = methanol)

Na obr. č. 54 je znázorněna chromatografická křivka methanolového extraktu ze sušeného plodu červeného šípku. Jako mobilní fázi jsem použila methanol. Na koloně došlo k rozdělení na xanthofyly ($V_R = 1,8$ ml a 4,5 ml), lykopeny ($V_R = 50,6$ ml) a karoteny (60,9 ml). Píky vytékající při $V_R = 15,3$ ml a $V_R = 32$ ml by mohly být řazeny mezi monosubstituované kyslíkaté deriváty karotenů (nejspíše kryptoxanthin a zeinoxanthin).

Převažujícím barvivem šípku jsou tedy β -karoten, lykopeny a jejich blíže neidentifikovatelné barevné deriváty.

Tab. 17 na str. 63 shrnuje absorpční maxima vybraných frakcí pomocí kterých jsem látky identifikovala. Spektra frakcí z plodu sušeného červeného šípku jsou znázorněny na obr. 55 na str. 63.

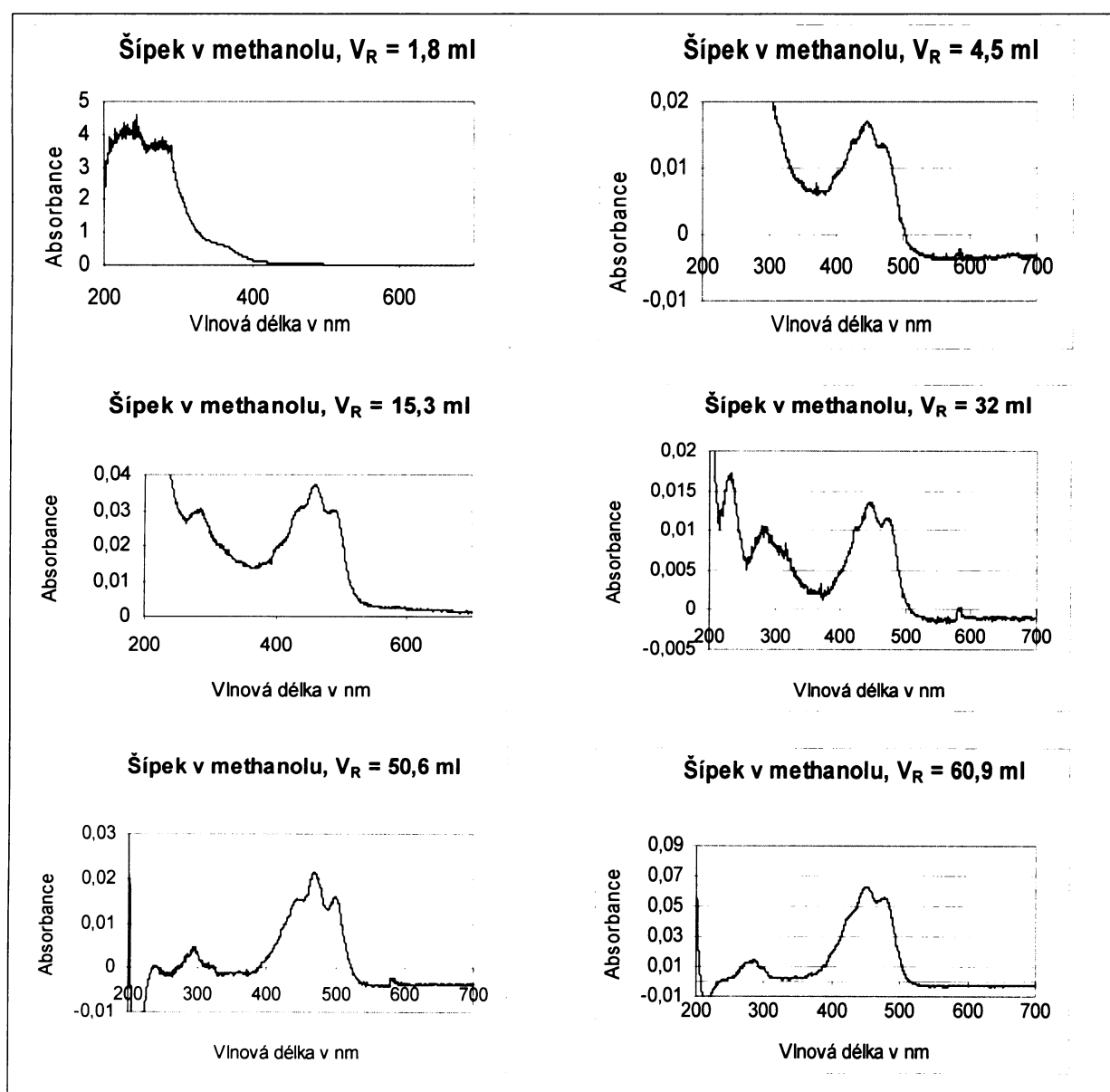


Obr. 54. Chromatogram sušeného červeného šípku; M_f : methanol.

(Čísla nad píky udávají retenční objem v ml).

Tab. 17. Sušený červený šípek: absorpční maxima v methanolu.

V_R (ml)	Maxima absorbance při vlnové délce λ (v nm):			Rostlinné pigmenty	Plocha píku (mV.s) děleno třemi	
1,8				směs hydrofilních barviv	1787	
4,5		446	470	lutein	454	
15,3	284,5	459,5	488	der. karotenu	583	
32,0		448	472	der. karotenu	457	
50,6			469	502	all-trans-lykopen	1159
60,9		451	477,5	β -karoten	2194	



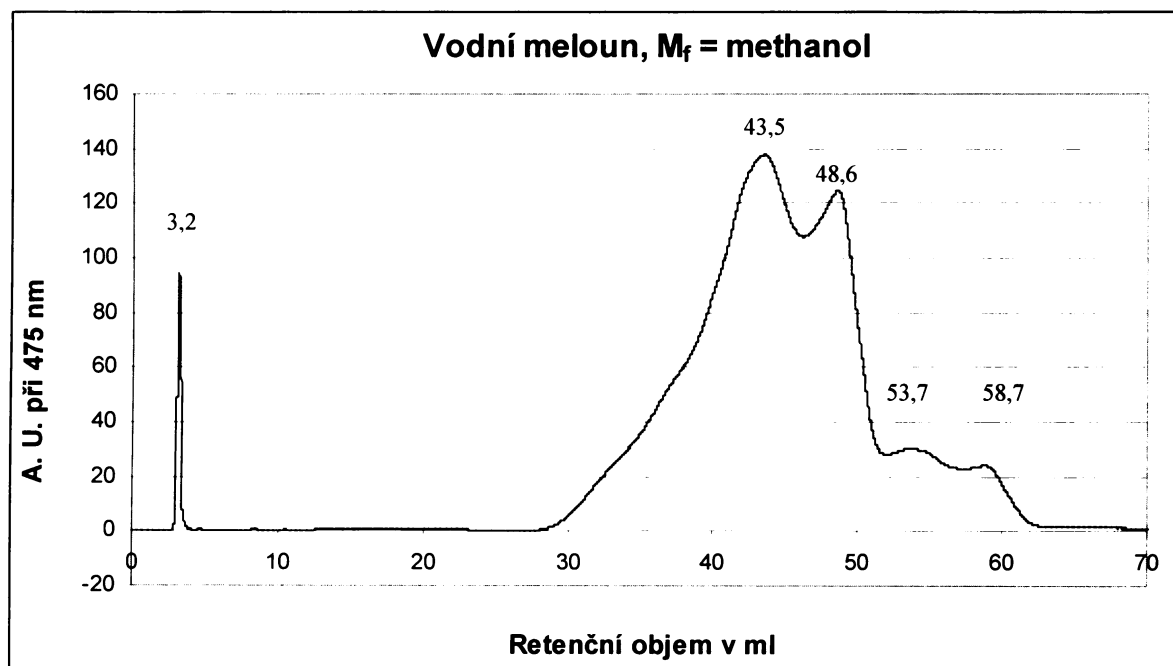
Obr. 55. Spektra frakcí ze sušeného červeného šípku. M_f: methanol.

4.1.14 Vzorek č. 14 (vodní meloun, M_f = methanol)

Na obr. 56 je znázorněna chromatografická křivka hexanového extraktu z lyofilizovaného plodu vodního melounu. Jako mobilní fázi jsem použila methanol. Na koloně došlo k rozdělení na xanthofyly ($V_R = 3,2$ ml), lykopeny ($V_R = 43,5$ ml a $48,6$ ml) a karoteny ($V_R = 53,7$ ml a $58,7$ ml).

Převažujícím barvivem způsobujícím červené zbarvení dužniny melounu je lykopen a jejich isomery.

Tab. 18 na str. 65 shrnuje absorpční maxima vybraných frakcí pomocí kterých jsem látky identifikovala. Spektra frakcí z plodu vodního melounu jsou znázorněny na obr. 57 na str. 65.

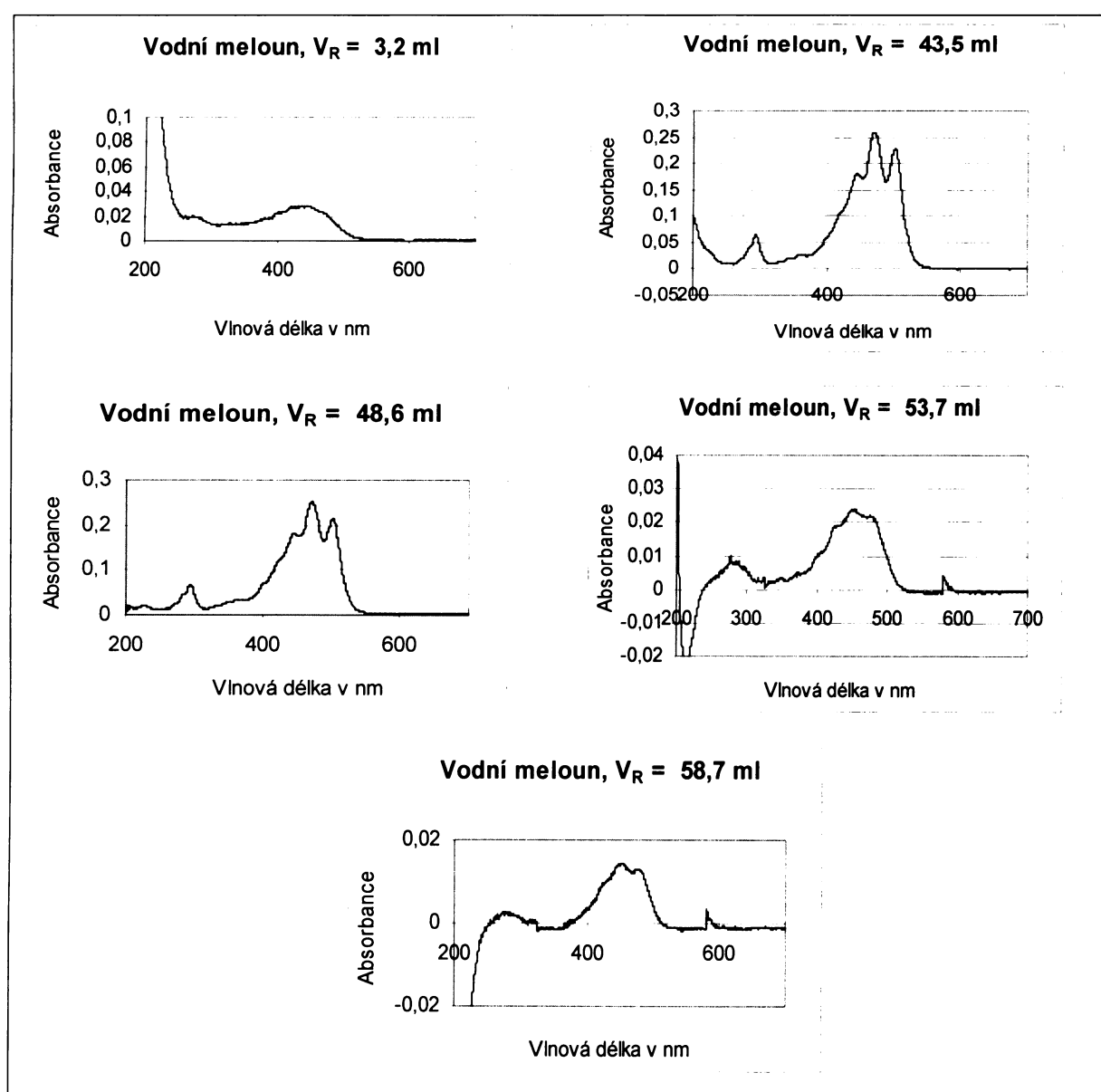


Obr. 56. Chromatogram vodního melounu; M_f : methanol.

(Čísla nad píky udávají retenční objem v ml).

Tab. 18. Vodní meloun: absorpční maxima v methanolu.

V_R (ml)	Maxima absorpce při vlnové délce λ (v nm):					Rostlinné pigmenty	Plocha píku (mV.s) děleno čtyřmi
3,2						směs hydrofilních barviv	446
43,5	294,5		444,5	470,5	502	<i>cis</i> -lykopeny	16874
48,6	295		445	470,5	502	<i>all-trans</i> -lykopen	7629
53,7		426	456,5	478		karoten	2071
58,7		428	453	476		β -karoten	1161

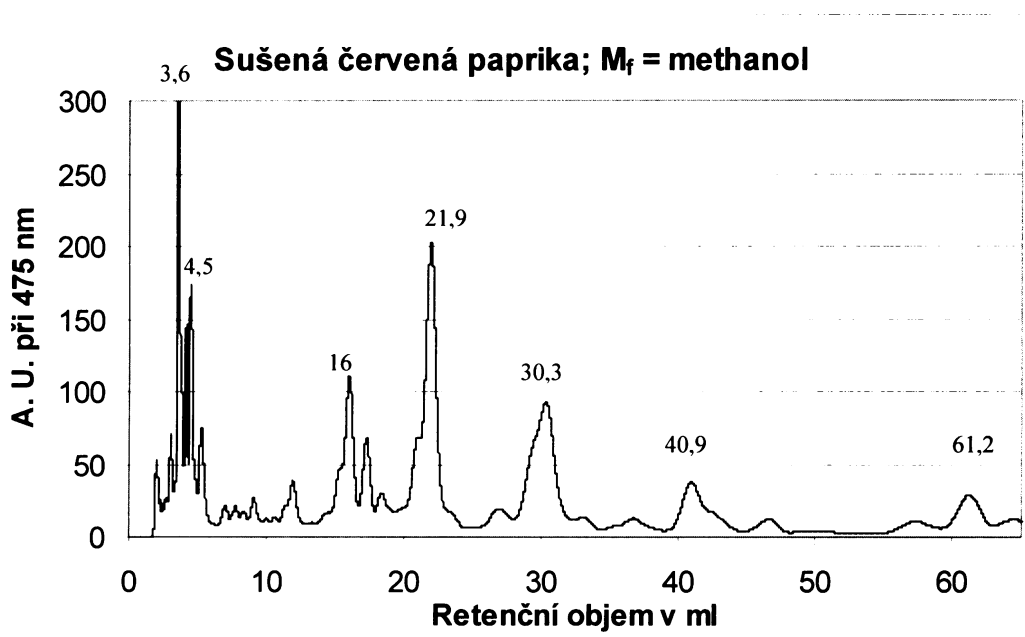


Obr. 57. Spektra frakcí z vodního melounu. Mj: methanol.

4.1.15 Vzorek č. 15 (sušená červená paprika, M_f = methanol)

Na obr. 58 je znázorněna chromatografická křivka methanolového extraktu ze sušené červené papriky. Jako mobilní fázi jsem použila methanol. Na koloně došlo k rozdělení na xanthofyly ($V_R = 3,6$ ml a 4,5 ml) a β -karoten ($V_R = 61,2$ ml). Pík o $V_R = 3,6$ ml nejspíš odpovídá karotenoidu kapsanthinu – hlavnímu pigmentu zralých červených paprik (viz str. 12). Červená paprika obsahuje řadu dalších hydrofobních barviv ($V_R = 16$ ml, 21,9 ml, 30,3 ml a 40,9 ml). Podle chromatografických a spektrálních vlastností je lze řadit mezi částečně polární karotenoidy. Mohlo by se jednat o monosubstituované deriváty karotenu (např. kryptoxanthin, zeinoxanthin a pod).

Tab. 19 shrnuje absorpční maxima vybraných frakcí pomocí kterých jsem látky identifikovala. Spektra frakcí ze sušené červené papriky jsou znázorněny na obr. 59 (str. 67).

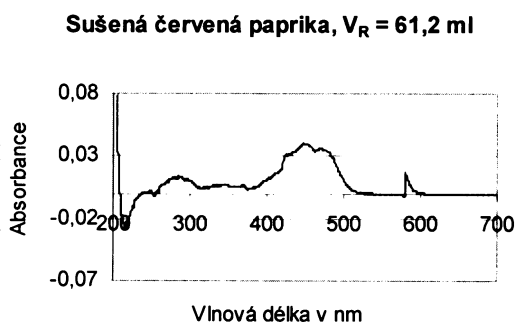
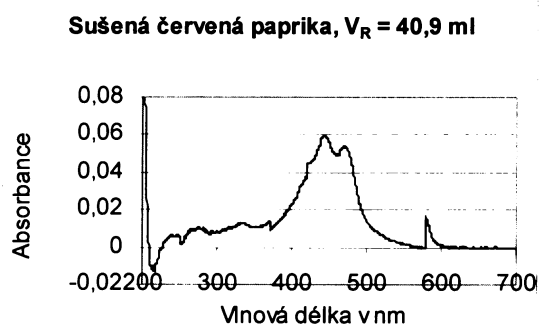
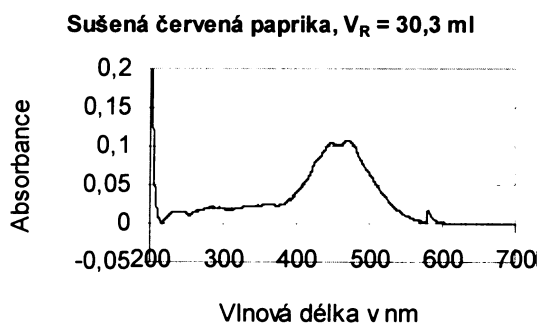
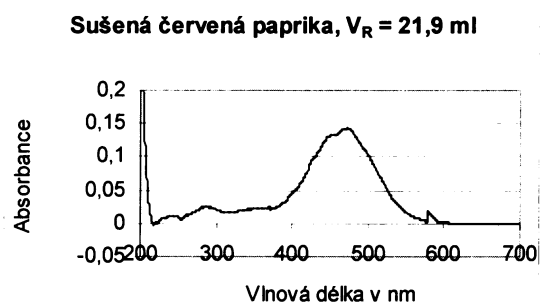
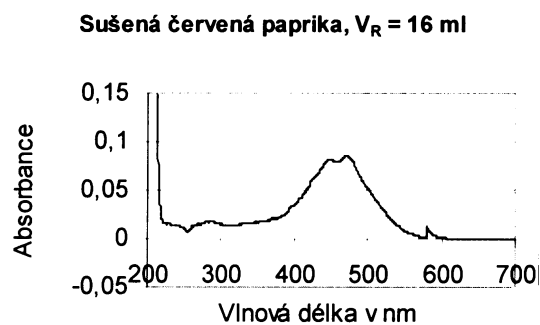
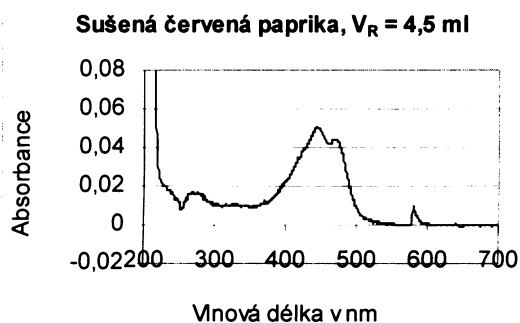
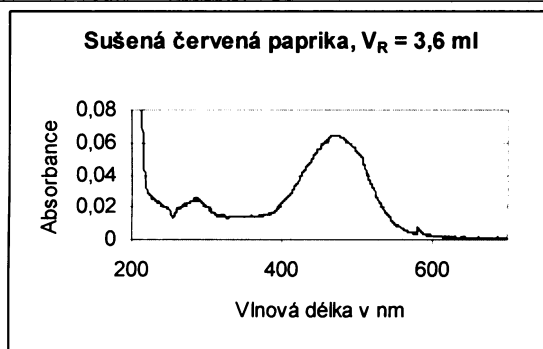


Obr. 58. Chromatogram sušené červené papriky; M_f : methanol.
(Čísla nad píky udávají V_R v ml).

Tab. 19. Sušená červená paprika: absorpční maxima v methanolu.

V_R (ml)	Maxima absorpce při vlnové délce λ (v nm):			Rostlinné pigmenty	Plocha píku (mV.s)
3,6	285		471,5	xanthofyly (kapsanthin)	11656

4,5		444,5	469		lutein	7206
16		448,5	471,5		der. karotenu	13180
21,9	371		473,5	580	der. karotenu	33102
30,3		448,5	469,5		der. karotenu	23482
40,9		444,5	471,5		der. karotenu	10838
61,2		443	470		β -karoten	7186

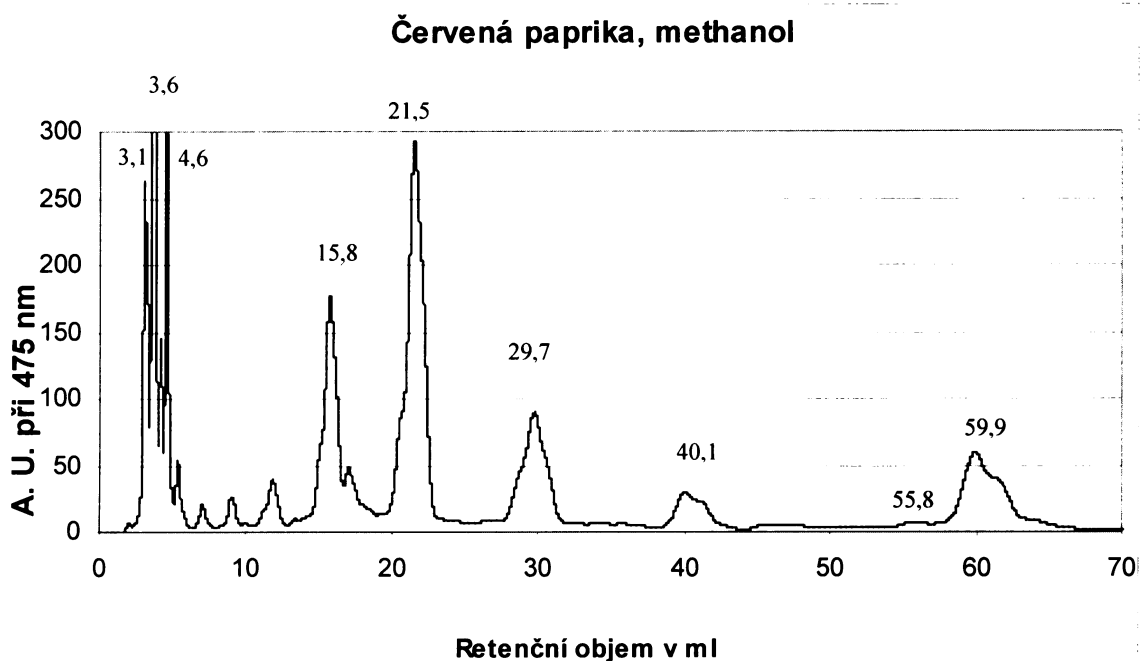


Obr. 59. Spektra frakcí ze sušené červené papriky. M_f : methanol.

4.1.16 Vzorek č. 16 (červená paprika, M_f = methanol)

Na obr. 60 je znázorněna chromatografická křivka methanového extraktu z lyofilizované červené papriky. Jako mobilní fázi jsem použila methanol. Na koloně došlo k rozdělení na xanthofyly ($V_R = 3,1$ ml, $3,6$ ml a $4,6$ ml), částečně polární karotenoidy - monosubstituované deriváty karotenu ($V_R = 15,8$ ml, $21,5$ ml, $29,7$ ml a $40,1$ ml) a karoteny ($V_R = 55,8$ ml a $59,9$ ml). Pík o $V_R = 3,6$ ml nejspíš odpovídá karotenoidu kapsanthinu – hlavnímu pigmentu zralých červených paprik (viz str. 12).

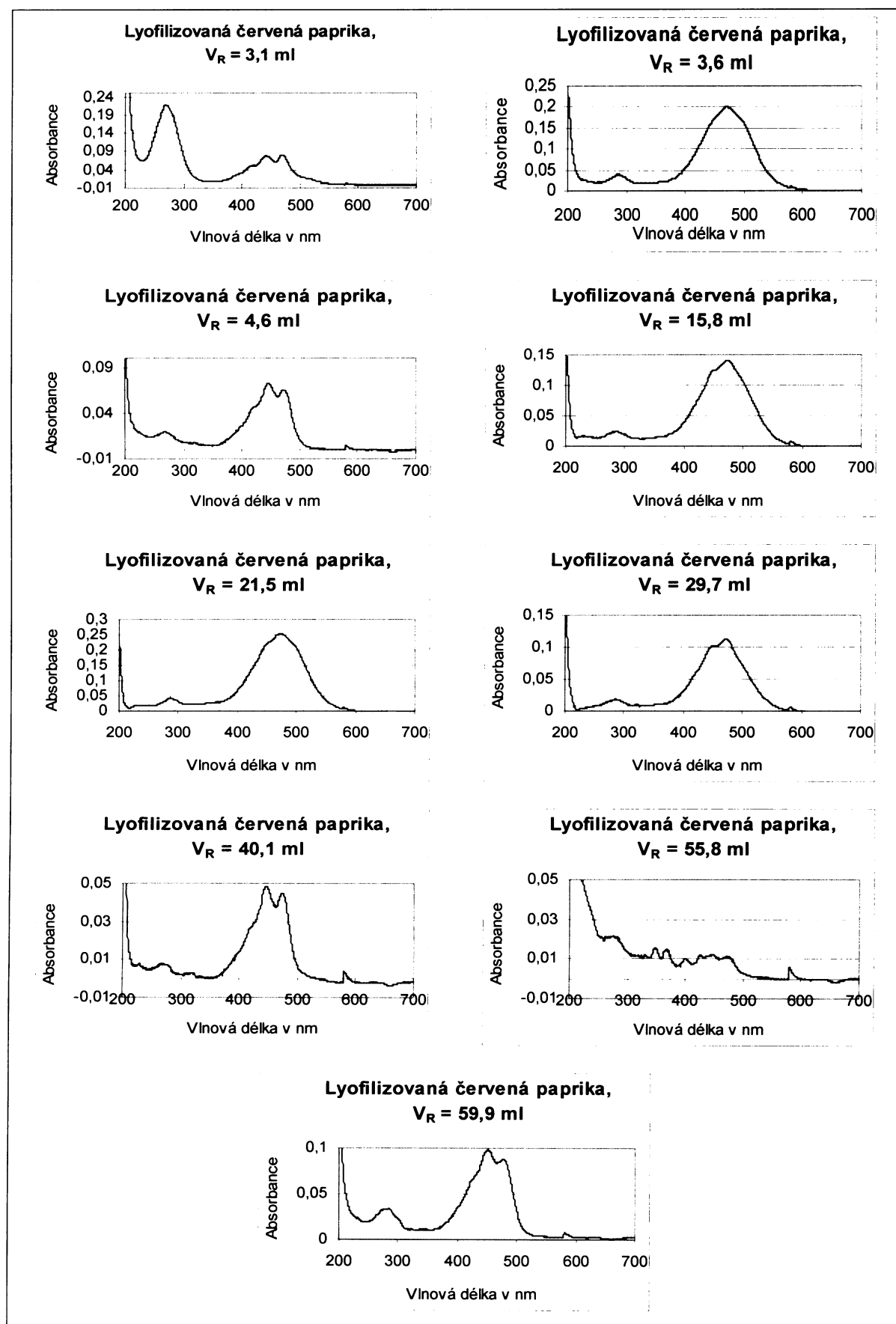
Tab. 20 shrnuje absorpční maxima vybraných frakcí pomocí kterých jsem látky identifikovala. Spektra frakcí z lyof. červené papriky jsou znázorněny na obr. 61 (str. 69).



Obr. 60. Chromatogram červené papriky; M_f : methanol. (Čísla nad píky udávají V_R v ml).

Tab. 20. Červená paprika: absorpční maxima v methanolu.

V_R (ml)	Maxima absorbance při vlnové délce λ (v nm):						Rostlinné pigmenty	Plocha píku (mV.s)
3,1				421	441,5	470,5	xanthofyly	5938
3,6	286					470,5	xanthofyly (kapsanthin)	17245
4,6					444,5	471,5	lutein	5273
15,8	286,5					474	der. karotenu	12086
21,5	286					473,5	der. karotenu	25375
29,7	284					471,5	der. karotenu	11460
40,1					444,5	473	der. karotenu	4374
55,8	348,5	368	399	425,5	449	474,5	karoten	869
59,9					451	477,5	β -karoten	11416

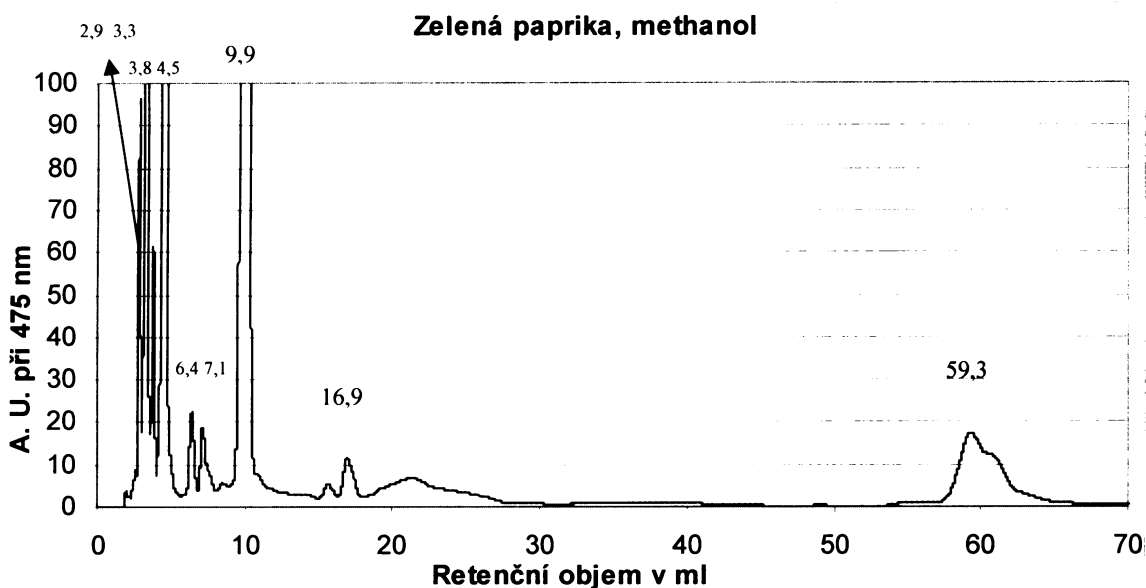


Obr. 61. Spektra frakcí z červené papriky. M: methanol.

4.1.17 Vzorek č. 17 (zelená paprika, M_f = methanol)

Na obr. 62 je znázorněna chromatografická křivka methanového extraktu z lyofilizované zelené papriky. Jako mobilní fázi jsem použila methanol. Na koloně došlo k rozdělení na xanthofyly ($V_R = 2,9$ ml, 3,3 ml, 3,8 ml, 4,5 ml, 6,4 ml a 7,1 ml), chlorofyly ($V_R = 9,9$ ml a 16,9 ml) a karoteny ($V_R = 59,3$ ml).

Tab. 21 shrnuje absorpční maxima vybraných frakcí pomocí kterých jsem látky identifikovala. Spektra frakcí z lyofilizované zelené papriky jsou znázorněny na obr. 63 na str. 71.

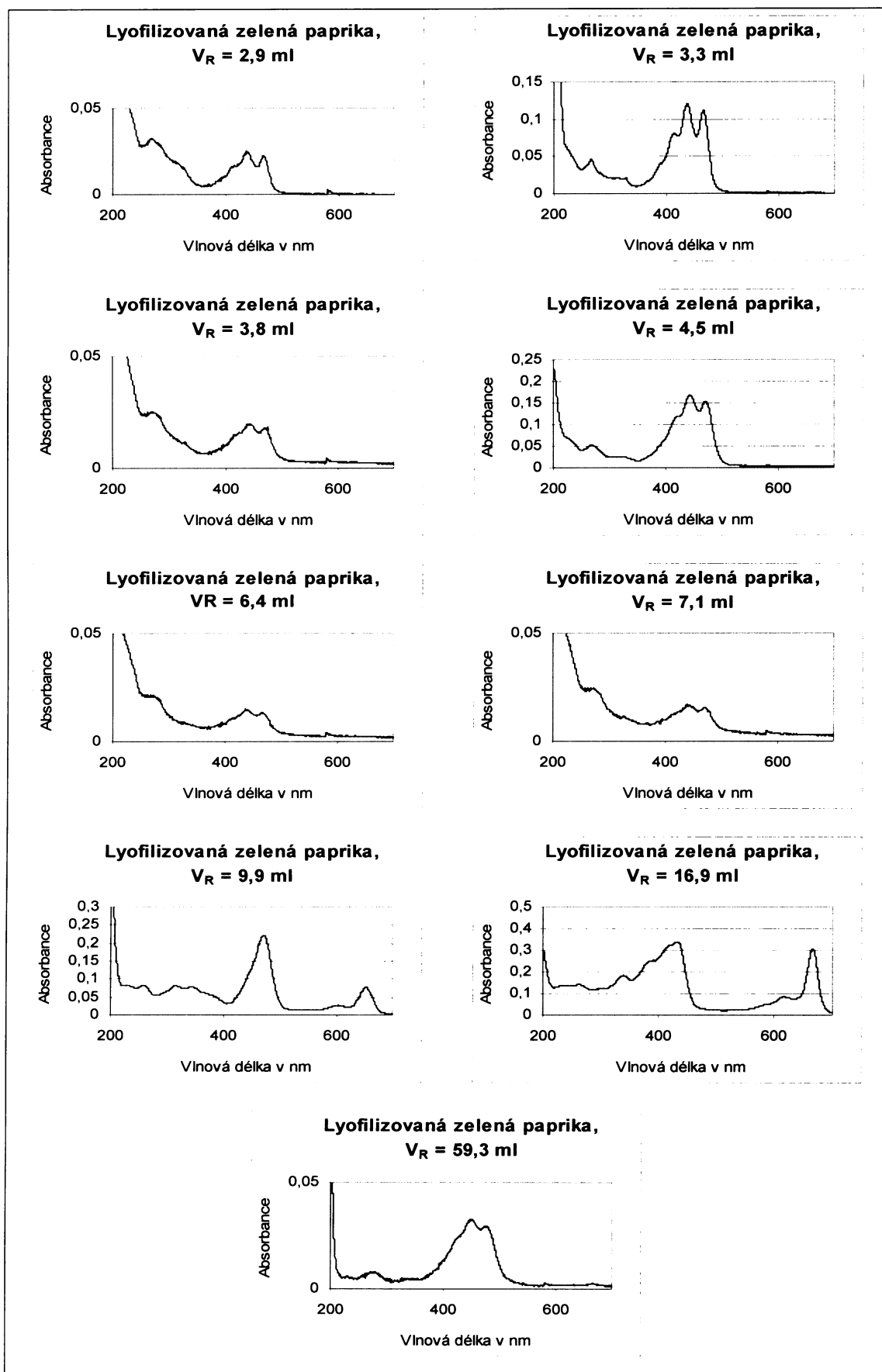


Obr. 62. Chromatogram zelené papriky; M_f : methanol.

(Čísla nad píky udávají retenční objem v ml).

Tab. 21. Zelená paprika: absorpční maxima v methanolu.

V_R (ml)	Maxima absorbance při vlnové délce λ (v nm):						Rostlinné pigmenty	Plocha píku (mV.s)
2,9		415,5	437,5	467,5			all- <i>trans</i> -neoxanthin	1144
3,3		415,5	438,5	466,5			neoxanthin	5194
3,8			443	470			violaxanthin	817
4,5			443	471,5			lutein	11099
6,4			437	467			neolutein	537
7,1			439,5	469,5			neolutein	590
9,9				470,5	603,5	652,5	chlorofyl <i>b</i>	18714
16,9	338,5	421	431,5		617	666,5	chlorofyl <i>a</i>	454
59,3			451,5	478			β -karoten	3503

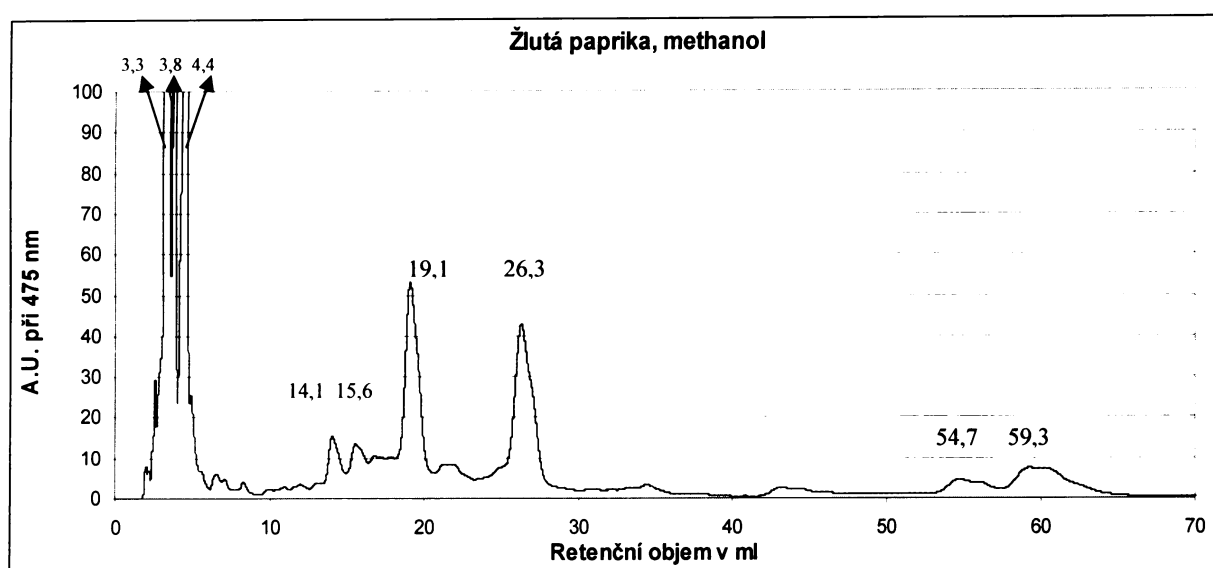


Obr. 63. Spektra frakcí ze zelené papriky. Mj: methanol.

4.1.18 Vzorek č. 18 (žlutá paprika, M_f = methanol)

Na obr. 64 je znázorněna chromatografická křivka methanolového extraktu z lyofilizované žluté papriky. Jako mobilní fázi jsem použila methanol. Na koloně došlo k rozdělení na xanthofyly (V_R = 3,3 ml, 3,8 ml a 4,4 ml), částečně polární karotenoidy - monosubstituované deriváty karotenu (V_R = 14,1 ml, 15,6 ml, 19,1 ml a 26,3 ml) a karoteny (V_R = 54,7 ml a 59,3 ml).

Tab. 22 shrnuje absorpční maxima vybraných frakcí pomocí kterých jsem látky identifikovala. Spektra frakcí z lyofilizované žluté papriky jsou znázorněny na obr. 65 na str. 73.

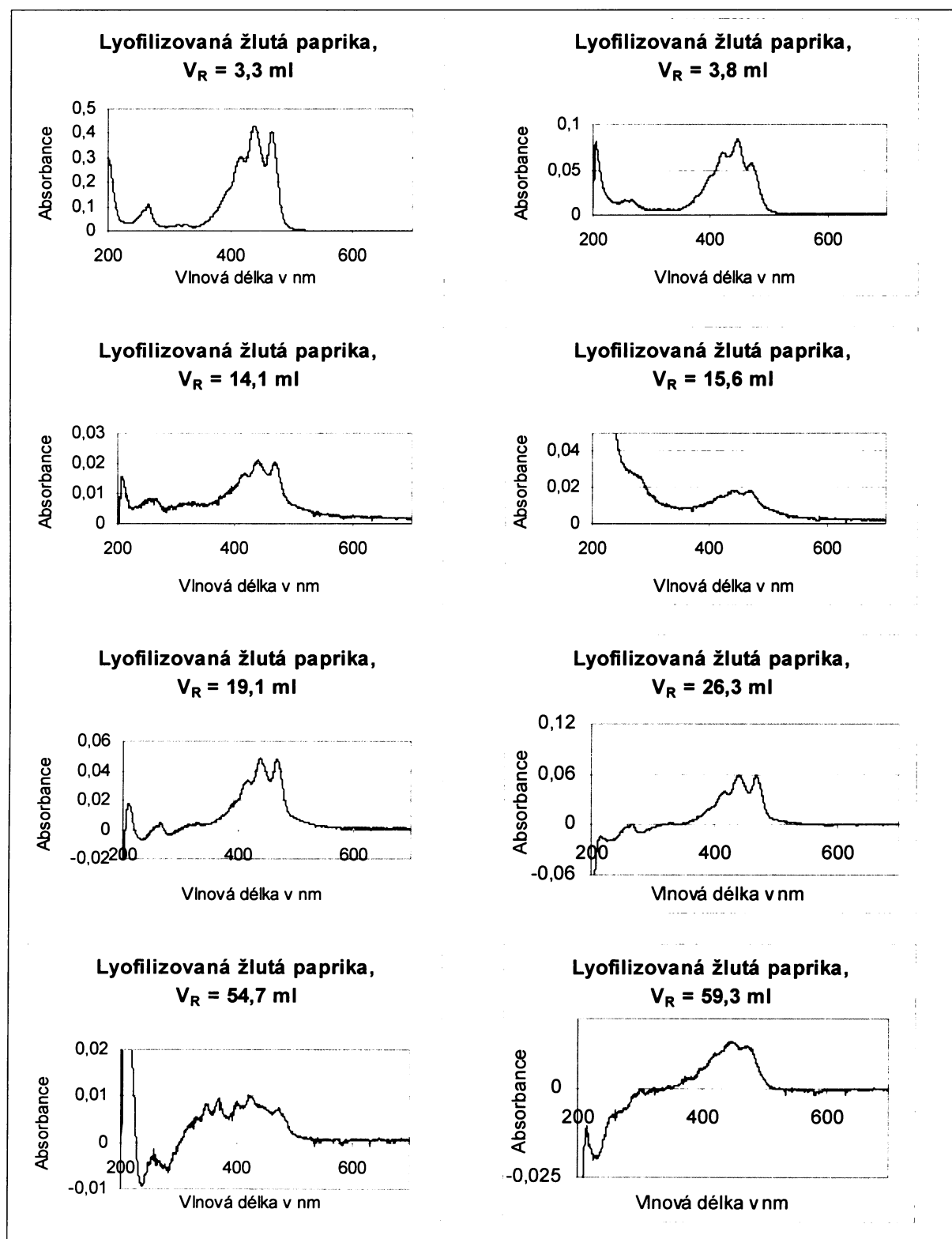


Obr. 64. Chromatogram žluté papriky; M_f : methanol.

(Čísla nad píky udávají retenční objem v ml).

Tab. 22. Žlutá paprika: absorpční maxima v methanolu.

V_R (ml)	Maxima absorbance při vlnové délce λ (v nm):			Rostlinné pigmenty	Plocha píku (mV.s)
3,3	418	439	468,5	neoxanthin	19245
3,8	421	446,5	470,5	violaxanthin	3130
4,4		444,5	469	lutein	8513
14,1	418	438,5	468,5	der. karotenu	886
15,6		439	468,5	der. karotenu	927
19,1	418	439,5	468,5	der. karotenu	3664
26,3	415,5	439	468,5	der. karotenu	4657
54,7	421		473	karoten	1083
59,3		444,5	474	β -karoten	1876

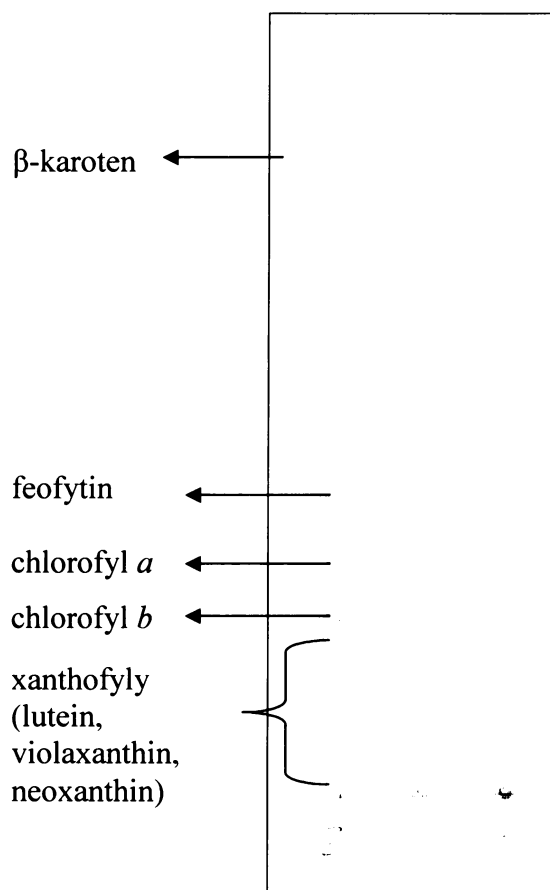


Obr. 65. Spektra frakcí ze žluté papriky.

Mf. methanol.

4.2 Rozdělení rostlinných pigmentů pomocí TLC

Na tenké vrstvě silikagelu (normální fáze) došlo k rozdělení rostlinných pigmentů dle rozdílné hydrofobnosti (resp. hydrofilnosti). Nejrychleji se v tomto případě pohybuje nejvíce hydrofobní barvivo (karoten) nejpomaleji hydrofilní barvivo (luteiny) – viz obr. 66.



Obr. 66. TLC: Z značí methanolový extrakt ze zeleného listu, Ž methanolový extrakt ze žlutého listu a S jejich směs; mobilní fází je směs benzín/propan-2-ol/voda v poměru 100:10:0,25.

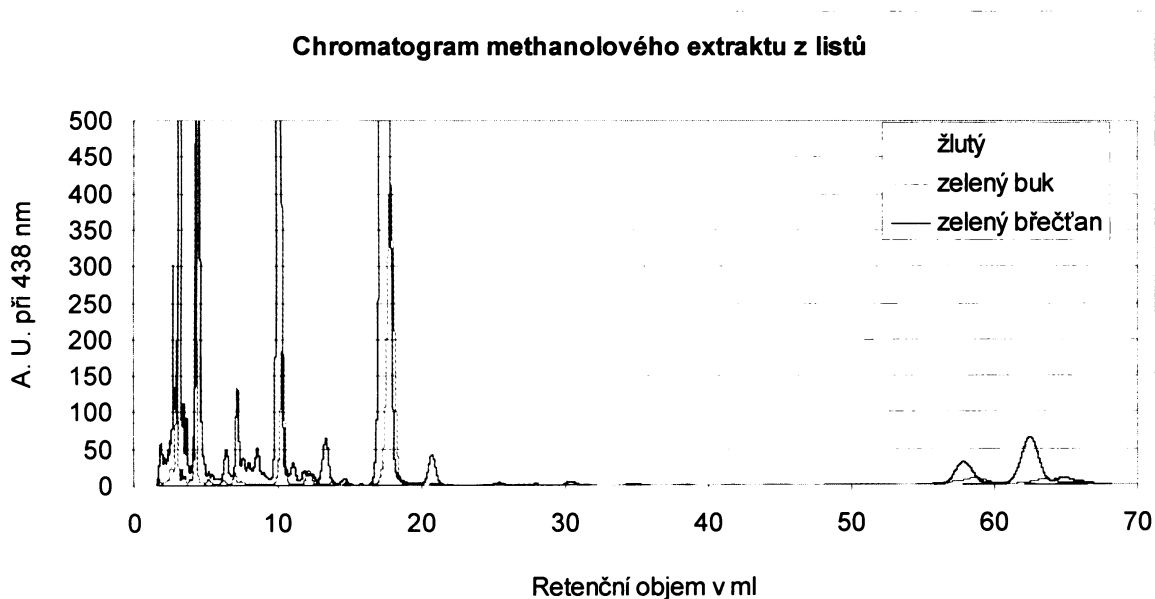
4.3 Kvantitativní a kvalitativní porovnání obsahu rostlinných pigmentů

4.3.1 Rostlinné pigmenty ze žlutých a zelených listů

4.3.1.1 Kvalitativní hodnocení

Retenční objemy barviv ze zkoumaných listů jsou uvedeny v tab. 23 na str. 77. Z tabulky taktéž vyplývá srovnání zastoupení jednotlivých pigmentů v různých typech listů. Všechny tři typy zkoumaných listů (žluté a zelené listy buku, zelené listy břechťanu) ve svých strukturách obsahovaly tyto pigmenty: xanthofyly (neoxanthin, violaxanthin a lutein), chlorofyly (*a* a *b*), karoteny. Oba dva typy zelených listů navíc obsahovaly feofytiny (*a*), který je prvním degradačním produktem chlorofylů, může však vzniknout až dodatečně během izolace.

Na obr. 67 je znázorněno srovnání chromatografických křivek žlutých listů buku a zelených listů buku a břechťanu.



Obr. 67. Srovnání chromatogramu ze žlutých listů buku a zelených listů buku a břechťanu;

M_f: methanol.

4.3.1.2 Kvantitativní hodnocení

Vzhledem k tomu, že nebyly k dispozici standardy stanovovaných barviv, určila jsem pouze jejich relativní zastoupení v jednotlivých vzorcích, které byly analyzovány. Extrakce i analýza byla prováděna vždy stejným způsobem (stejná mobilní fáze, vlnová délka, teplota apod.).

Výpočty poměrů stejných rostlinných barviv v různých typech listů byly počítány pomocí obsahu pigmentů v zeleném břečťanu. Obsahy rostlinných pigmentů v břečťanu byly, vzhledem k jejich největšímu množství, zvoleny jako 100%.

Relativní obsah jednotlivých barviv v listech – viz tab. 23 na str. 77.

List stínomilného břečťanu popínavého obsahuje největší množství všech detekovaných barviv, což ukazuje na zvýšení počtu chloroplastů v listech této rostliny související s jejím obvyklým stanovištěm.

Na listech buku byl sledován proces žloutnutí listu. Došlo k úbytku chlorofylů *a* a *b*, ale také k podstatnému nárůstu obsahu i počtu zastoupených karotenoidů. Obsah luteinu se zvýšil o 50% a β -karotenu dokonce o 760%.

Tab. 23. Srovnání rostlinných pigmentů v listech buku a břechťanu (přepočítáno na 2 g suchého materiálu).

V_R (ml)	Plocha píku (mV.s)	<u>Žlutý list</u> <u>buku</u>	Obsah v % (porovnáváno s obsahem barviv v břechťanu)	V_R (ml)	Plocha píku (mV.s)	<u>zelený list buku</u>	Obsah v % (porovnáváno s obsahem barviv v břechťanu)	V_R (ml)	Plocha píku (mV.s)	<u>zelený list</u> <u>břechťanu</u>	Obsah v % (zvoleno jako 100%)
3,3	1841	neoxanthin	13,1	3,0	4205	neoxanthin	29,9	3,2	14082	neoxanthin	100
4,5	15515	lutein	42,7	4,3	10496	lutein	28,9	4,4	36362	lutein	100
10,3	1339	chlorofyl <i>b</i>	5,3	10,3	8813	chlorofyl <i>b</i>	34,8	7,2	2498	xanthofyl	
				12,2	1311	chlorofyl		10,1	25347	chlorofyl <i>b</i>	100
16,4	2021	der. karotenu						13,4	2160	chlorofyl	
17,8	2730	chlorofyl <i>a</i>	3,0	17,9	30628	chlorofyl <i>a</i>	33,5	17,5	91542	chlorofyl <i>a</i>	100
29,3	3178	der. karotenu						20,7	2152	chlorofyl	
40,1	2222	der. karotenu									
66,1	10534	β-karoten	169,3	58,7	2608	feofytin <i>a</i>	78,8	57,9	3310	feofytin <i>a</i>	100
				63,5	1218	β-karoten	19,6	62,5	6222	β-karoten	100

4.3.2 Pigmenty z potravin (rajčete, jahod, třešní, šípku a melounu)

4.3.2.1 Kvalitativní hodnocení

Ve zralých plodech rajčete jsem detekovala následující rostlinné pigmenty: xanthofyly (neoxanthin, violaxanthin a lutein), lykopen a karoteny.

Pro separaci rostlinných barviv z červených rajčat a z ostatních plodů rostlin se jako nejvíce vhodná mobilní fáze osvědčil methanol, dále dvousložková směs THF/methanol (5:95) a THF/methanol (10:90). Již méně vhodná byla čtyřsložková směs acetonitril/methanol/dichlormethan/voda (70:15:10:5).

Ostatní testované mobilní fáze neposkytly dostatečně kvalitní separaci.

Retenční objemy jednotlivých barviv jsou uvedeny v tab. 24 na str. 79. Tabulka také uvádí relativní zastoupení detekovaných látek v jednotlivých vzorcích. Všechny typy zkoumaných potravin obsahovaly xanthofyly a karoteny; rajče, vodní meloun a šípek navíc lykopen.

4.3.2.2 Kvantitativní hodnocení

Obsah lykopenu: v jahodách a třešních nebyl nalezen pík odpovídající lykopenu. Lykopen byl identifikován v plodech červených rajčat (zvoleno jako 100%), v sušených plodech červeného šípku (1,4%) a v poměrně vysokém množství také v dužnině vodního melounu (30,5%) – viz tab. 24 (str. 79).

Tab. 24. Srovnání rostlinných pigmentů v potravinách (přepočítáno na 1 g suchého materiálu).

V_R (ml)	Plocha píku (mV.s)	<u>červené rajče</u>	Obsah v % (zvoleno jako 100%)	V_R (ml)	Plocha píku (mV.s)	<u>šípek</u>	Obsah (%)	V_R (ml)	Plocha píku (mV.s)	<u>vodní meloun</u>	Obsah (%)
				1,8	1787	směs hydrofilních barviv					
3,0	5778	xanthofyly						3,2	446	směs hydrofilních barviv	
				4,5	454	lutein					
				15,3	583	der. karotenu					
				32	457	der. karotenu					
39,0	45131	<i>cis</i> -lykopeny						43,5	16874	<i>cis</i> -lykopeny	
50,0	35208	all- <i>trans</i> - lykopen		50,6	1159	all- <i>trans</i> -lykopen		48,6	7629	all- <i>trans</i> -lykopen	
lykopen celkem	80339		100		1159		1,4		24503		30,5
								53,7	2071	karoten	
60,3	2138	β -karoten	100	60,9	2194	β -karoten	102,6	58,7	1161	β -karoten	54,3

4.3.3 Rostlinné pigmenty v jednotlivých odrůdách paprik

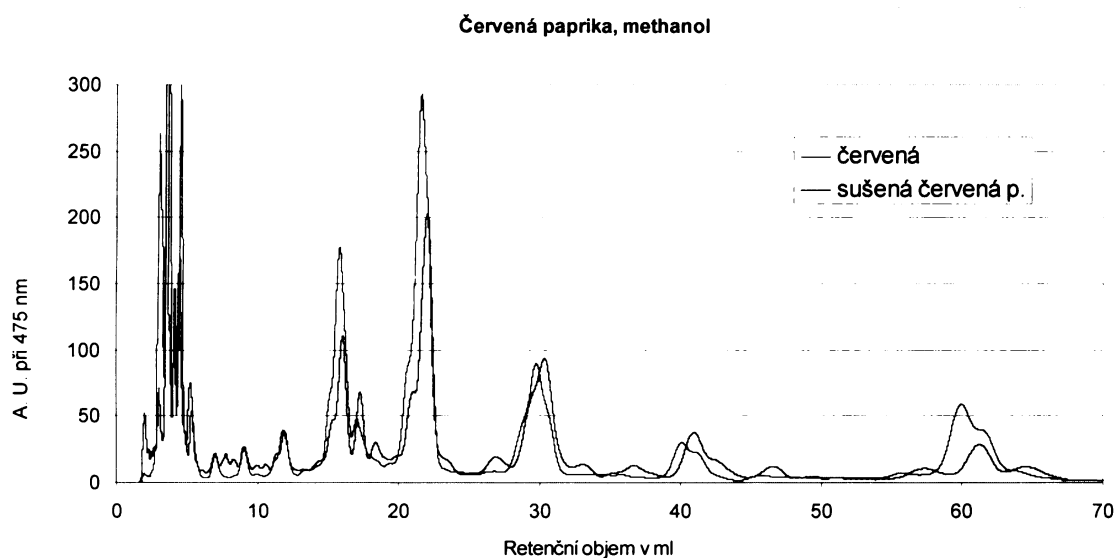
4.3.3.1 Kvalitativní hodnocení

Retenční objemy jsou uvedeny v tab. 25 (str. 82). Z tabulky taktéž vyplývá srovnání v zastoupení jednotlivých pigmentů v různých odrůdách paprik. Všechny čtyři druhy zkoumaných paprik (sušená červená, lyofilizovaná červená, žlutá a zelená) ve svých strukturách obsahovaly tyto pigmenty: xanthofyly (neoxanthin, violaxanthin a lutein) a karoteny. V zelené paprice jsem navíc identifikovala neolutein a chlorofyl (*a*, *b*).

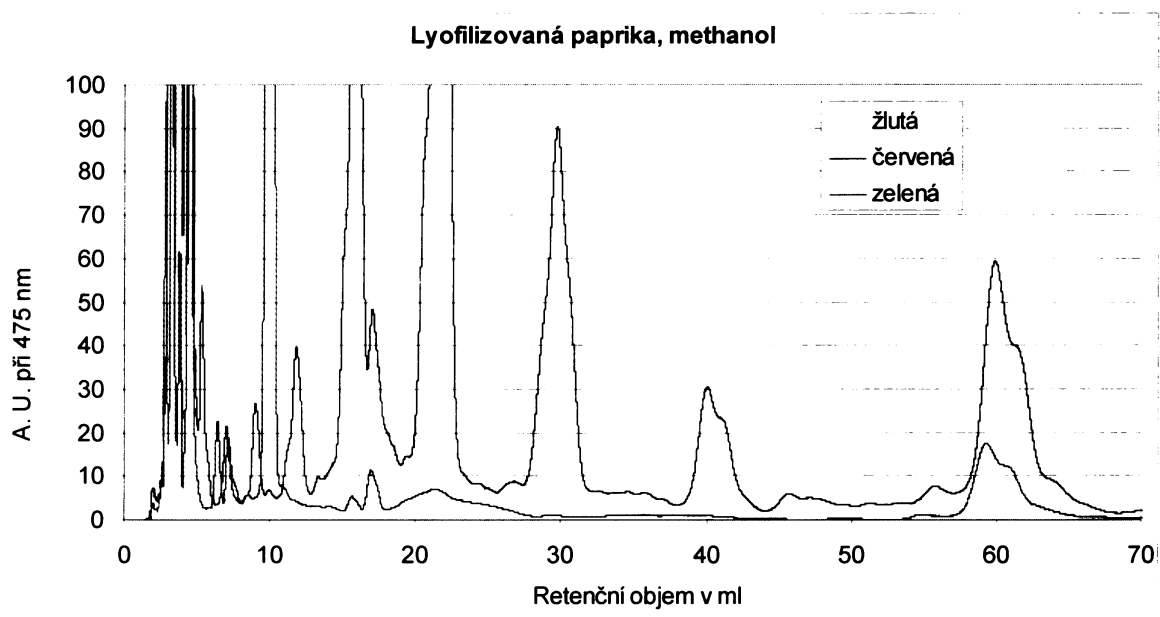
Pík o $V_R = 3,6$ ml v červené (sušené i lyofilizované) paprice nejspíš odpovídá karotenoidu kapsanthinu – hlavnímu pigmentu zralých červených paprik (viz str. 12).

O dobré stabilitě barviv přítomných v paprice svědčí srovnatelné zastoupení v čerstvé (lyofilizované) i sušené (komerční) červené paprice. Významnější úbytek byl zaznamenán u sušené komerční papriky zejména u β -karotenu pravděpodobně jeho spontánní oxidací při delším skladování na vzduchu – viz obr. 68, kde je znázorněno srovnání chromatografických křivek lyofilizované a sušené červené papriky.

Na obr. 69 na str. 81 je znázorněno srovnání chromatografických křivek červené, žluté a zelené lyofilizované papriky.



Obr. 68. Srovnání chromatogramu sušené a lyofilizované červené papriky; M_f : methanol.



Obr. 69. Srovnání chromatogramu červené, žluté a zelené lyofilizované papriky; M_f : methanol.

4.3.3.2 Kvantitativní hodnocení

Relativní zastoupení rostlinných pigmentů v různých odrůdách papriky– viz tab. 25 (str. 82).

Výpočty poměrů pigmentu luteinu (resp. β -karotenu) v různých odrůdách papriky byly počítány tak, že obsah luteinu (resp. β -karotenu), který byl nejvíce zastoupen, byl zvolen jako 100%.

Obsah luteinu:

65% v sušené červené paprice, 47,5% v lyofilizované červené paprice, 100% v zelené paprice a 76,7% ve žluté paprice.

Obsah β -karotenu:

62,9% v sušené červené paprice, 100% v lyofilizované červené paprice, 30,7% v zelené paprice a 16,4% ve žluté paprice.

Tab. 25. Srovnání rostlinných pigmentů v červené, zelené a žluté paprice (přepočítáno na 2 g suchého materiálu).

V_R (ml)	Plocha píku násobeno dvěma	Obsah (%)	V_R (ml)	Plocha píku (mV.s)	červená paprika	Obsah (%)	V_R (ml)	Plocha píku (mV.s)	zelená paprika	Obsah (%)	V_R (ml)	Plocha píku (mV.s)	žlutá paprika	Obsah (%)
							2,9	1144	all- <i>trans</i> -neoxanthin					
			3,1	5938	xanthofyly	30,9	3,3	5194	neoxanthin	27	3,3	19245	neoxanthin	100
3,6	11656	67,6	3,6	17245	xanthofyly (kapsanthin)	100	3,8	817	violaxanthin	4,7	3,8	3130	violaxanthin	18,2
4,5	7206	65	4,6	5273	lutein	47,5	4,5	11099	lutein	100	4,4	8513	lutein	76,7
							6,4	537	neolutein					
							7,1	590	neolutein					
							9,9	18714	chlorofyl <i>b</i>					
16	13180	100	15,8	12086	der. karotenu	91,7					14,1	886	der. karotenu	
							16,9	454	chlorofyl <i>a</i>		15,6	927	der. karotenu	7,7
21,9	33102	100	21,5	25375	der. karotenu	76,7					19,1	3664	der. karotenu	
30,3	23482	100	29,7	11460	der. karotenu	48,8					26,3	4657	der. karotenu	
40,9	10838	100	40,1	4374	der. karotenu	40,4								
			55,8	869	karoten	80,24					54,7	1083	karoten	100
61,2	7186	62,9	59,9	11416	β-karoten	100	59,3	3503	β-karoten	30,7	59,3	1876	β-karoten	16,4

5 Diskuse a shrnutí

Na koloně s reverzní fází dochází k separaci rostlinných barviv především na základě jejich rozdílné hydrofobicity. Velmi polární látky a barviva s kolonou prakticky neinteragují, takže se nedělí a vytékají jako směs látek v elučním objemu blízko mrtvého objemu kolony. Méně polární barviva (např. mající ve své struktuře jednu či více hydroxy skupin) vytékají v elučním objemu do 10ti ml (luteiny). Po nich následují slabě polární chlorofyly (*b* a *a*) a nakonec nepolární terpeny (lykopeny a karoteny) – viz tab. 26. Vzorce jednotlivých pigmentů – viz. obr. 2 a 3 na str. 8 – 10.

Tab. 26. Srovnání rostlinných pigmentů dle pohyblivosti v mobilní fázi (methanol).

polární karotenoidy	neoxanthin
	violaxanthin
	lutein
	neolutein
	zeaxanthin
chlorofyly	chlorofyl <i>b</i>
	chlorofyl <i>a</i>
nepolární karotenoidy	lykopen
	feofytin <i>a</i>
	karoteny

Byly nalezeny a zoptimalizovány podmínky pro extrakci barviv z přírodního materiálu:

Pro separaci rostlinných pigmentů ze zelených a žlutých listů se jako mobilní fáze osvědčil methanol. Vlnová délka 438 nm použitá pro detekci pak zaručuje vysokou citlivost detekce chlorofylů i karotenoidů.

U zkoumaných žlutých listů jsem detekovala tyto látky: neoxanthin, violaxanthin, lutein, chlorofyly (*a* a *b*) a β -karoten. U všech zkoumaných zelených listů jsem detekovala kromě výše zmíněných barviv ještě feofytin (*a*).

Pro separaci rostlinných barviv z červených rajčat a z ostatních plodů rostlin se jako nejvíce vhodná mobilní fáze osvědčil methanol, dále dvousložková směs THF/methanol

(5:95) a THF/methanol (10:90). Již méně vhodná byla čtyřsložková směs acetonitril/methanol/dichlormethan/voda (70:15:10:5). V methanolu dochází také k částečné separaci jednotlivých *cis-trans* isomerů lykopenu. Proto se pík na chromatogramu na obr. 45 odpovídající lykopenu jevil jako složený ze dvou popř. více chromatograficky podobných látek.

Ostatní testované mobilní fáze neposkytly dostatečně kvalitní separaci.

Vlnová délka 475 nm se ukázala jako optimální pro detekci karotenoidů.

U sledovaných potravin jsem hodnotila relativní obsah lykopenu na stejné množství sušiny. Největší množství lykopenu bylo obsaženo v plodech červeného rajčete, překvapivě vysoký, i když asi třikrát nižší obsah, je v dužninách vodního melounu, malé množství lykopenu bylo identifikováno i v sušených plodech červeného šípku. V ostatních zkoumaných potravinách nebyl lykopen identifikován.

Všechny čtyři druhy zkoumaných paprik ve svých strukturách obsahovaly tyto pigmenty: xanthofyly (neoxanthin, violaxanthin a lutein) a karoteny. V zelené paprice jsem navíc identifikovala neolutein a chlorofyly (*a*, *b*).

Byly také identifikovány *převažující barviva* zkoumaných přírodních materiálů:

Převažujícími barvivy žlutého listu jsou polární xanthofyly (lutein) a β -karoten.

Převažujícími barvivy zeleného listu jsou samozřejmě chlorofyly, z nichž nejvíce zastoupený je chlorofyl *a*.

Převažujícím barvivem rajčete je lykopen a jeho isomery.

Převažujícími barvivy šípku jsou β -karoten, lykopeny a jejich blíže neidentifikované polární deriváty.

Převažujícím barvivem melounu je lykopen a jeho isomery.

Převažujícím barvivem červené papriky je blíže neidentifikovaný částečně polární derivát karotenu a v menší míře pak polární xanthofyly (kapsanthin).

Převažujícími barvivy zelené papriky jsou chlorofyly *a* a *b* a lutein.

Převažujícím barvivem žluté papriky je především neoxanthin a v menší míře pak violaxanthin a další polární xanthofyly.

6 Seznam použité literatury a internetové odkazy

Použitá literatura:

1. Pavlová, L.: Fyziologie rostlin. skriptum PŘF UK Praha. (2005)
2. Leblková, S., Sofrová, D.: Biochemie fotosynthesy, skriptum PŘF UK Praha. (1982)
3. Kolektiv: Biochemie – Základní kurz, skriptum PŘF UK Praha. (1999)
4. Burton, G. W., Ingold, K. U.: *Science* 244, 569-573 (1984)
5. Palozza, P., Krinsky, N. I.: *Free radical Biol. Med.* 11, 407-414 (1991)
6. Britton, G. W.: *FASEB J.* 9: 1551-1558 (1995)
7. Foote, C. S., Denny, R. W.: *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 90, 6233 (1968)
8. Matsushita, S., Terao, J.: Singlet oxygen-initiated photooxidation of unsaturated fatty acid esters and inhibitory effects of tocopherols and β -carotene. In *Autoxidation in Food and Biological Systems*. M. G. Simic and M. Karel (Ed.), p. 27-44. Plenum Press, N.Y. (1980)
9. Fakourelis, N., Lee, E. C., Min, D. B.: *J. Food. Sci.* 52, 234-235 (1987)
10. Agarwal, S., Rao, A. V.: *Can. Med. Assoc. J.* 163, 739-744 (2000)
11. Matsushima, N.R., Shidoji, Y., Nishiwaki, S., Yamada, T., Moriwaki, H., Muto, Y.: *Lipids* 30, 1029-1034 (1995)
12. Mares-Perlman, J. A., Millen, A. E., Ficek, T. L., Hankinson, S. E.: *J. Nutr.* 132, 518S-524S (2002)
13. Iannone, A., Rota, C., Bergamini, S., Tomasi, A., Canfield, L. M.: *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 12, 299-304 (1998)
14. Sujak, A., Gabrielska, J., Grudzinski, W., Borc, R., Mazurek, P., Gruszecki, W. I.: *Arch. Biochem. Biophys.* 371, 301-307 (1999)
15. Stahl, W., Junghans, A., De Boer, B., Driomina, E. S., Briviba, K., Sies, H.: *FEBS lett.* 427, 305-308 (1998)
16. Panasenko, O. M., Sharov, V. S., Briviba, K., Sies, H.: *Arch. Biochem. Biophys.* 373, 302-305 (2000)
17. Deli, J., Tóth, G.: *Lebensm Unters Forsch A.* 205, 288-391 (1997)

18. Kolektiv: Biochemické metody – Návod k pokročilým praktickým cvičením, skriptum PřF UK Praha. (1991)
19. Dijkmans, H., Aghion, J.: Eur. J. Biochem. 32, 237-241 (1973)
20. Lichtenthaler H. K.: Methods in Enzymology. 148, 350-382 (1987)
21. Satoh, S., Ikeuchi, M., Mimuro, M., Tanaka, A.: The Journal of Biological Chemistry. 276, 4293-4297 (2001)
22. García-Plazaola, J. I., Becerril, J. M.: Phytochem. Anal. 10, 307-313 (1999)
23. Xu, H., Vavilin, D., Vermaas, W.: PNAS. 98, 14168-14173 (2001)
24. Molnár, P., Ósz, E., Tóth, G., Zsila, F., Deli, J.: Helvetica Chimica Acta. 89, 667-674 (2006)
25. Nakayama, M., Miyasaka, M., Maoka, T., Yagi, M., Fukuta, N.: J. Japan. Soc. Hort. Sci. 75(2), 161-165 (2006)
26. Liaaen-Jensen, S.: Phytochemistry. 4, 925-931 (1965)
27. Deschênes, S., Blais, K. D., Gagnon, C., Pelletier, I.: Étude de la coloration alimentaire et les impacts de celle-ci sur l'homme [online]. [cit. 8. 6. 2007]. Dostupné z: <<http://profweb.qc.ca/mpaquette/travaux/act2001/colorant/colorant.htm>>
28. Mercadante, A. Z., Rodriguez-Amaya, D.: Ciênc. Technol. Aliment., Campinas. 21(2), 216-222 (2001)
29. Pacáková, V., Štulík, K.: Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, skriptum PřF UK Praha. (1986)
30. Olives Barba, A. I., Cámara Hurtado, M., Sánchez Mata, M. C., Fernández Ruiz, V., López Sáenz de Tejada, M.: Food Chemistry. 95(2), 328-336 (2006)
31. Tyssandier, V., Cardinault, N., Caris-Veyrat, C., Amiot, M.J., Grolier, P., Bouteloup, C., Azais-Braesco, V., Borel, P.: Am. J. Clin. Nutr. 75, 526-34 (2002)
32. Lin, C.H., Chen, B.H.: Eur. Food. Res. Technol. 221, 274-280 (2005)

Internetové stránky (převzaté obrázky):

1. Obr. 13: Chromatografie na koloně: Kodíček, M.: Biochemické pojmy – výkladový slovník [online]. [cit. 11. 6. 2007]. Dostupné z:
<http://www.vscht.cz/eds/knihy/uid_es-002/hesla/chromatografie.html>
2. Obr. 15: Schéma kapalinového chromatografu pro HPLC: Coufal, P.: High Performance Liquid Chromatography, HPLC [online]. poslední revize 28.7.2004 [cit. 11. 6. 2007]. Dostupné z: <<http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>>
3. Obr. 16: Pozice ventilu Rheodyne: Rheodyne [online]. [cit. 11. 6. 2007]. Dostupné z: <<http://www.techlab.de/produkte/img/rh-schema-stator-positionen.jpg>>
4. Obr. 17: Různé druhy kolon pro HPLC: Inertsil [online]. [cit. 11. 6. 2007]. Dostupné z: <<http://www.inertsil.com/>>
5. Obr. 18: Diode array detektor – schéma: Laboratorní zpravodaj [online]. poslední revize 14.8.2006 [cit. 11. 6. 2007]. Dostupné z: <http://www.gmi-inc.com/Genlab/spec_fig2%20diode%20array.gif>
6. Obr. 19: TLC rostlinných barviv z čerstvých listů: Keusch, P. Separation of Plant Pigments by Thin Layer Chromatography (TLC) [online]. poslední revize 7.5.2003 [cit. 11. 6. 2007]. Dostupné z: <http://www.uni-regensburg.de/Fakultaeten/nat_Fak_IV/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/D-TLC-e.htm>
7. Obr. 22: Dávkovací smyčka: Peptide synthetics [online]. poslední revize 2006 [cit. 11. 6. 2007]. Dostupné z: <<http://www.peptidesynthetics.co.uk/tools/>>
8. Obr. 23: Dávkovač: Labio, a. s. [online]. [cit. 11. 6. 2007]. Dostupné z:
<[http://www.labio.com/cze/Catalogue.asp?Cat=72&SubCat=4&CatName=Injektor y,%20sb%C4%9Bra%C4%8De,%20termostaty%20... >](http://www.labio.com/cze/Catalogue.asp?Cat=72&SubCat=4&CatName=Injektor%20sb%C4%9Bra%C4%8De,%20termostaty%20...)

