

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
Katedra analytické chemie

Diplomová práce

**Vývoj a validace HPLC metody pro stanovení  
antokyanů v kanadských borůvkách**

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

Konzultant: Mgr. Barbora Šmídová

Hradec Králové 2016

Kateřina Dostálová

Děkuji panu Doc. RNDr. Daliborovi Šatínskému, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a také Mgr. Barboře Šmídové za pomoc při vypracování diplomové práce.

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Literatura a zdroje, z nichž jsem při zpracování práce čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím, aby práce byla půjčována ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

V Hradci Králové dne 9. 5. 2016

Podpis:

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutické fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Kateřina Dostálová

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

Název diplomové práce: Vývoj a validace HPLC metody pro stanovení antokyanů v kanadských borůvkách

V této diplomové práci byla vyvinuta a optimalizována HPLC metoda pro současné stanovení antokyanů: delfinidin-3-O-galaktosidu, delfinidin-3-O-glukosidu, kyanidin-3-O-galaktosidu, kyanidin-3-O-glukosidu, kyanidin-3-O-arabinosidu, peonidin-3-O-glukosidu a malvidin-3-O-galaktosidu ve 21 odrůdách kanadských borůvek ('Spartan', 'Sunrise', 'Toro', 'Bluegold', 'Croatan', 'Northland', 'Duke', 'Gila', 'Jersey', 'Bluecrop', 'Herbert', 'Berkeley', 'Patriot', 'Darrow', 'Bluetta', 'Collins', 'Brigitta', 'November', 'Iranka', 'Bluejay' a 'Rancocas').

K analýze byla využita kolona Kinetex PFP, 150 x 4,6 mm (velikost částic 2,6  $\mu\text{m}$ ). Detekce byla provedena DAD detektorem při vlnové délce 520 nm, teplotě kolony 50°C s využitím gradientové eluce s mobilní fází acetonitril/ 2 % kyselina mravenčí s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min. Celková doba analýzy jednoho vzorku trvala 21 minut.

Klíčová slova: HPLC, borůvky, antokyan, polyfenoly, antioxidanty, delfinidin-3-O-galaktosid, delfinidin-3-O-glukosid, kyanidin-3-O-galaktosid, kyanidin-3-O-glukosid, kyanidin-3-O-arabinosid, peonidin-3-O-glukosid, malvidin-3-O-galaktosid

## Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Kateřina Dostálová

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

Title of Diploma Thesis: HPLC method development and validation for analysis of anthocyanins in highbush blueberries

HPLC method for simultaneous determination of anthocyanins: delphinidin-3-O-galactoside, delphinidin-3-O-glucoside, cyanidin-3-O-galactoside, cyanidin-3-O-glucoside, cyanidin-3-O-arabinoside, peonidin-3-O-glucoside and malvidin-3-O-galactoside in 21 varieties of blueberries ('Spartan', 'Sunrise', 'Toro', 'Bluegold', 'Croatan', 'Northland', 'Duke', 'Gila', 'Jersey', 'Bluecrop', 'Herbert', 'Berkeley', 'Patriot', 'Darrow', 'Bluetta', 'Collins', 'Brigitta', 'November', 'Iranka', 'Bluejay' and 'Rancocas') was developed and optimized in this thesis.

Kinetex PFP column, 150 x 4.6 mm (particle size 2.6  $\mu\text{m}$ ) was used for the analysis. The detection was performed by DAD detector at 520 nm, column temperature of 50°C using gradient elution with a mobile phase of acetonitrile/ 2 % formic acid at a flow rate of 1.0 ml/min. The total time of the analysis of one sample took 21 minutes.

Keywords: HPLC, blueberries, anthocyanins, polyphenols, antioxidants, delphinidin-3-O-galactoside, delphinidin-3-O-glucoside, cyanidin-3-O-galactoside, cyanidin-3-O-glucoside, cyanidin-3-O-arabinoside, peonidin-3-O-glucoside, malvidin-3-O-galactoside

## Obsah

1	Seznam použitých zkratk	8
2	Úvod	9
3	Cíl a zadání práce	10
4	Teoretická část	11
4.1	Antokyany	11
4.1.1	Antokyany jako antioxidanty	12
4.1.2	Antokyany a metabolický syndrom	13
4.1.3	Biokinetika antokyanů	15
4.1.4	HPLC metody zabývající se stanovením antokyanů	16
4.2	Chromatografie	23
4.2.1	HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	24
5	Experimentální část	32
5.1	Materiál, přístroje a pomůcky	32
5.1.1	Přístroje, podmínky separace	32
5.1.2	Pomůcky	32
5.1.3	Chemikálie	33
5.1.4	Testované nápoje	33
5.2	Příprava roztoků	33
5.2.1	Příprava zásobního roztoku standardů pro optimalizaci a validaci metody	33
5.2.2	Příprava zásobního roztoku pro kalibraci	34
5.2.3	Příprava pracovních roztoků pro kalibraci	34
5.2.4	Příprava pracovního roztoku standardu pro optimalizaci metody a identifikaci látek	34
5.2.5	Příprava pracovních roztoků pro test opakovatelnosti	34
5.2.6	Příprava pracovních roztoků pro přesnost	35

5.2.7	Příprava zásobního roztoku standardu pro výtěžnost .....	35
5.2.8	Příprava pracovních roztoků a vzorků pro výtěžnost .....	35
5.2.9	Příprava pracovních roztoků testovaných nápojů .....	35
6	Výsledky a diskuze .....	36
6.1	Optimalizace metody .....	36
6.1.1	Volba vlnové délky detektoru .....	36
6.1.2	Volba a optimalizace gradientové eluce .....	40
6.1.3	Výběr optimálního gradientu a kolony .....	53
6.1.4	Souhrn optimálních podmínek pro HPLC analýzu .....	58
6.2	Validace analytické metody .....	58
6.2.1	Test vhodnosti chromatografického systému .....	58
6.2.2	Linearita .....	60
6.2.3	Opakovatelnost .....	68
6.2.4	Přesnost .....	69
6.2.5	Výtěžnost .....	73
6.3	Stanovení obsahu antokyanů v odrůdách borůvek .....	77
6.3.1	Zastoupení jednotlivých antokyanů v odrůdách borůvek .....	88
6.3.2	Chromatogramy odrůd s nejvyšším počtem antokyanů .....	89
6.4	Stanovení obsahu antokyanů v džusech .....	90
7	Závěr .....	91
8	Seznam grafů, obrázků a tabulek .....	93
8.1	Grafy .....	93
8.2	Obrázky .....	93
8.3	Tabulky .....	95
9	Použitá literatura .....	98

## 1 Seznam použitých zkratek

ACN	acetonitril
A <sub>s</sub>	faktor symetrie chromatografického píku
BMI	body mass index
DAD	diode array detektor
cya-3-ara	kyanidin-3-O-arabinosid
cya-3-gal	kyanidin-3-O-galaktosid
cya-3-glu	kyanidin-3-O-glukosid
delp-3-gal	delfinidin-3-O-galaktosid
delp-3-glu	delfinidin-3-O-glukosid
HCOOH	kyselina mravenčí
HLS	hormon senzitivní lipázy
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
mal-3-gal	malvidin-3-O-galaktosid
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
NO	oxid dusnatý
peo-3-glu	peonidin-3-O-glukosid
R <sub>s</sub>	rozlišení chromatografických píků
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
RSD	relativní směrodatná odchylka
SD	směrodatná odchylka
t <sub>r</sub>	retenční čas
UV	ultrafialová oblast spektra světla
VIS	viditelná oblast spektra světla
VMK	vyšší mastné kyseliny
TAG	triacylglyceroly



## 2 Úvod

Borůvky jsou plody kvetoucích rostlin z rodu *Vaccinium*, u kterých byly nalezeny četné polyfenolové sloučeniny, mezi které patří i antokyany. Právě díky antokyanům, které jim poskytují charakteristickou barvu a antioxidační aktivitu, jsou borůvky považovány za zdraví prospěšné. Antokyany se přirozeně vyskytující ve formě glykosidů. Cukernou složkou antokyanů jsou převážně galaktosidy, glukosidy a arabinosidy a z antokyanidinů (aglykolovaná forma antokyanů) se jedná především o delfinidin, kyanidin, petunidin, peonidin a malvidin. Laboratorní studie ukázaly, že antokyany inhibují šíření nádorových buněk, zlepšují krevní tlak a působí preventivně proti mrtvici.

Pro stanovení antokyanů je upřednostňována kapalinová chromatografie. V této práci byla vyvinuta vhodná chromatografická metoda pro současné stanovení delfinidin-3-O-galaktosidu, delfinidin-3-O-glukosidu, kyanidin-3-O-galaktosidu, kyanidin-3-O-glukosidu, kyanidin-3-O-arabinosidu, peonidin-3-O-glukosidu a malvidin-3-O-galaktosidu v různých odrůdách borůvek. Tato metoda byla dále aplikována na stanovení obsahu antokyanů v borůvkových džusech.

### **3 Cíl a zadání práce**

Cílem experimentální části diplomové práce bylo stanovení obsahu antokyanů pomocí HPLC, proto byla experimentální část diplomové práce zaměřena na vývoj a validaci HPLC metody pro analýzu antokyanů obsažených v odrůdách kanadských borůvek (*Vaccinium corymbosum L.*) dodaných Výzkumným šlechtitelským ústavem ovocnářským v Holovousích.

V teoretické části práce je uvedena základní charakteristika antokyanů a parametry jejich stanovení pomocí HPLC.

## 4 Teoretická část

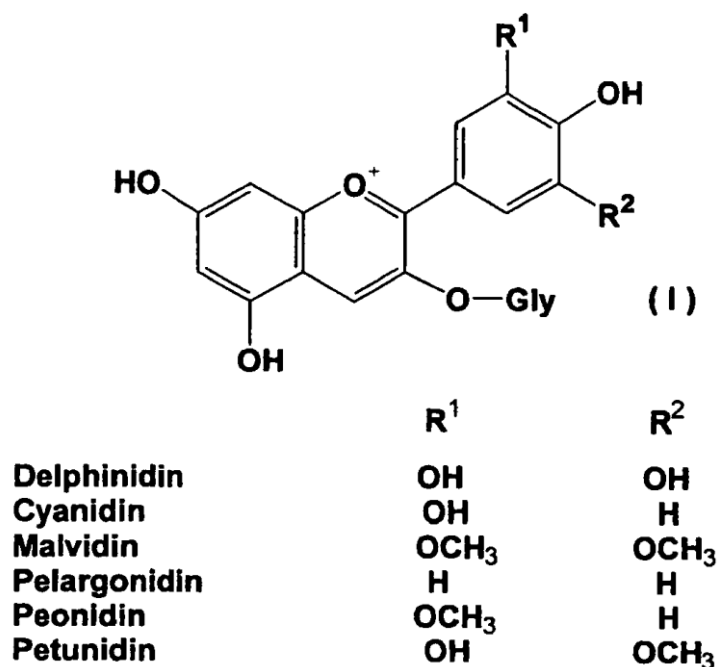
### 4.1 Antokyany

Antokyany (v řečtině anthos = květ; kyanos = modrá) jsou unikátní skupinou polyfenolových sekundárních metabolitů nalezených v rostlinných tkáních. Jedná se o jednu z mnoha sloučenin, které spadají do skupiny flavonoidů. Borůvky (plody kvetoucích rostlin z rodu *Vaccinium*) jsou považovány za zdraví prospěšné právě díky obsahu antokyanů, které jim poskytují charakteristickou barvu a antioxidační aktivitu. Slupka kanadských borůvek obsahuje ve srovnání s dužinou a semeny významně vyšší hladiny antokyanů i celkových polyfenolických látek. Jejich koncentrace se také značně liší mezi genotypy.

Antokyany jsou ve vodě rozpustné glykosidy odpovědné za zbarvení mnoha druhů ovoce a zeleniny, květin a bobulí (borůvky, ostružiny, černý bez). Cukerné substituenty v antokyanech jsou obvykle hexózy (galaktózy a glukózy) a pentózy (arabinóza). Tyto glykosidy mohou být také acylované (menší část antokyanů). Antokyanidin neboli necukerná složka (aglykolovaná forma antokyanů) je nejčastěji kyanidin (50 %), pelargonidin (12 %), peonidin (12 %), delphinidin (12 %), petunidin (7 %), a malvidin (7 %). V přírodě se vyskytuje běžně jen těchto 6 antokyanidinů. V borůvkách se pak jedná nejčastěji o malvidin-3-O-galaktosid, delphinidin-3-O-galaktosid, malvidin-3-O-arabinosid, kyanidin-3-O-arabinosid a delphinidin-3-O-arabinosid. Antokyanidiny se od sebe liší stupněm hydroxylace a methoxylace, proto se i jejich klasifikace provádí v závislosti na počtu a poloze hydroxylových a methoxylových skupin na flavonovém jádře. V borůvkách můžeme najít acylované i jednoduché antokyany, které se liší nejen barvou, ale i antioxidačním účinkem. Například pelargonidin a malvidin neobsahují v pozici R1 ani R2 hydroxylovou skupinu, mají tedy nižší schopnost absorbovat radikály kyslíku. Antokyany se liší od zbytku flavonoidů kladným nábojem nacházejícím se na atomu kyslíku pyranového jádra.

Vzhledem k rozdílům v chemické struktuře mění antokyany při různém pH svoji barvu. Zároveň záleží i na přítomnosti kopigmentů. Když je hodnota pH roztoku nižší než 2,5, antokyan je ve stavu kationu, pozorujeme červené zbarvení. V slabě kyselých roztocích, kde je hodnota pH mezi 4 a 6, je zbarvení fialové.

Obsah antokyanů je ovlivněn odlišnými odrůdami borůvek, klimatickými vlivy, technologií pěstování, posklizňovou úpravou, skladovacími podmínkami a dobou konzumace [1, 2, 3, 4, 5].



Obrázek 1 Struktura antokyanů

[dostupné z: <http://www.google.com/patents/EP1683805A1?cl=en>]

#### 4.1.1 Antokyaniny jako antioxidanty

V posledních dvou desetiletích si zájem získaly biologicky aktivní látky pocházející z rostlin známé jako fytochemikálie. Fytochemikálie mají ochranné a preventivní vlastnosti. Rostliny produkují tyto chemické látky, aby se chránily. Vědci zkoumají, zda tyto látky mohou podobně chránit i člověka.

Borůvky mají velmi účinné fytochemikálie, jimiž jsou antokyaniny. Tyto antioxidanty, mohou zlepšit stav mnoha nemocí způsobených reaktivními formami. Antioxidační kapacita je z 84 % přisuzována antokyaninům a nikoli vitamínu C, který je přítomen v nižší koncentraci. Antioxidanty chrání před oxidačním poškozením reaktivními radikály různými mechanismy, které mohou v konečném důsledku vést k neutralizaci volných radikálů. Díky kladnému náboji na antokyanovém jádře a aromatickým hydroxylovým skupinám mohou tyto sloučeniny snadno darovat proton volným radikálům, což chrání buňky před oxidačním poškozením, které vede ke stárnutí a různým nemocem.

Dále epidemiologické studie odhalily, že antioxidační aktivita redukuje počet kardiovaskulárních onemocnění, inhibuje karcinogenezi, způsobuje protizánětlivou aktivitu v mozku a prevenci mrtvice [3, 5].

#### **4.1.2 Antokyany a metabolický syndrom**

Metabolický syndrom je soubor poruch, jako je zhoršení glukózové tolerance, inzulínová rezistence, hyperinzulinémie, abdominální obezita, dyslipidemie a vysoký krevní tlak. Tyto poruchy zvyšují riziko kardiovaskulárních onemocnění a diabetu [3].

##### **4.1.2.1 Ovlivnění funkce inzulínu antokyany**

Funkce inzulínu je důležitá pro udržení normálních hladin glukózy v krvi a to, buď potlačením výdeje glukózy z jater, nebo stimulací vychytávání glukózy buňkami z krve a jejího metabolismu. Nedostatečné uvolňování inzulínu nebo ztráta účinku inzulínu na cílové tkáně vede ke zvýšení hladiny glukózy v krvi (charakteristické pro diabetes). Pokud inzulín nedostatečně stimuluje transport glukózy do kosterního svalstva a tukové tkáně a zároveň neúplně potlačuje produkci glukózy v játrech, dochází k poruše zvané inzulínová rezistence. Některé studie uvádějí, že konzumace ovoce a zeleniny bohaté na fenolové sloučeniny spolu s dietou s nízkým obsahem tuků, může snížit riziko inzulínové rezistence a výskyt diabetu typu-2.

Byly provedeny studie u obézních a inzulín rezistentních jedinců. Těmito studiemi bylo zjištěno zvýšení účinku inzulínu při zvýšení denní spotřeby borůvek. Vzhledem k tomu, že výsledky ukazují zvýšení citlivosti na inzulín bez změny tělesné hmotnosti, autoři tvrdí, že antokyany mají přímý vliv na zvýšení účinku inzulínu. K objasnění mechanismu, při kterém dochází k zlepšení citlivosti na inzulín konzumací borůvek, je zapotřebí dalších studií.

Hypoglykemická aktivita antokyanů byla popsána v několika studiích. Mechanismus hypoglykemického účinku však nebyl dobře pochopen. Mezi nejúčinnější antokyany patří delphinidin-3-O-glukosid, kyanidin-3-O-glukosid a pelargonidin-3-O-galaktosid. To znamená, že počet hydroxylových skupin hraje důležitou roli v jejich účinnosti [3].

#### 4.1.2.2 Antokyany a ochrana pankreatu

Vzhledem k tomu, že mají antokyany antioxidační aktivitu mohou poskytovat ochranu B buňkám pankreatu, u kterých může být vlivem glukózy vyvolán oxidační stres. Oxidační stres je definován obecně jako nadbytečné množství a nedostatečné odstranění vysoce reaktivních molekul, jako jsou reaktivní formy kyslíku (ROS) a reaktivní formy dusíku (RNS). Některá chronická zánětlivá onemocnění jsou spojena s oxidem dusnatým (NO) a antokyany mají silné inhibiční účinky na produkci NO. Zlepšení oxidačního stresu prostřednictvím léčby antioxidanty by mohlo být účinnou strategií pro snížení některých metabolických poruch [3].

#### 4.1.2.3 Vliv antokyanů na funkce tukové tkáně

Akumulace nadměrné tukové tkáně má metabolické důsledky, mezi které patří dysfunkce buněk tukové tkáně, spojené s rozvojem obezity a cukrovky. Strava bohatá na antokyany výrazně normalizuje hypertrofii adipocytů (buňky tukové tkáně), což vede k zmírnění hyperglykémie. Adipocyty tvoří množství peptidových hormonů neboli adipokinů. Nejvýznamnější z nich jsou leptin a adiponektin. Antokyany zvyšují sekreci adiponektinu a leptinu.

Leptin je proteinový hormon, jehož produkované množství koreluje s obsahem bílé tukové tkáně v těle. V malé míře se tvoří i v jiných tkáních (př. hnědá tuková tkáň, žaludek, kosterní svaly). Leptin reguluje výdej a příjem energie, umožňuje mozku zpětnou vazbu o stavu energetických zásob, tlumí chuť k jídlu a zvyšuje energetický výdej. Periferně ovlivňuje citlivost k inzulinu. Vzhledem k tomu, že je leptin tvořen úměrně množstvím tuku v těle, nemají obézní lidé leptinu nedostatek, ale naopak nadbytek, vedoucí až k rezistenci k leptinu. Terapeutické podání leptinu je výhodné jen u obézních, kde je obezita způsobená genetickým defektem leptinu nebo jeho receptoru.

Adiponektin je také proteinový hormon produkovaný adipocyty. Jeho koncentrace v krvi je vyšší než koncentrace leptinu. Na rozdíl od leptinu mají obézní pacienti koncentraci adiponektinu v plazmě nižší než pacienti s normálním BMI. Adiponektin zvyšuje transport a utilizaci glukózy a VMK ve svalových, jaterních a tukových buňkách, tlumí glukoneogenezi v játrech a zvyšuje citlivost tkání k inzulinu. Adiponektin působí proti rozvoji aterosklerózy, dále brzdí transformaci makrofágů na pěnivé buňky a snižuje expresi jejich povrchových adhesivních receptorů.

Antokyany ovlivňují také lipolytickou aktivitu, a to díky zvýšení genové exprese hormon senzitivní lipázy. HSL, která je aktivována katecholaminy a glukagonem, štěpí TAG na glycerol a volné mastné kyselinu. VMK jsou vázány na albumin a takto transportované plazmou až do cílových tkání, kde jsou využity v procesu betaoxidace k tvorbě energie.

Aktivita antokyanů je spojená s aktivací PPAR (receptory aktivované proliferátory peroxizomů). PPAR jsou jaderné receptory s řadou významných metabolických účinků. Výzkumy posledních let ukazují, že aktivace PPAR má i významné protizánětlivé a protinádorové účinky [3, 6, 7].

#### **4.1.3 Biokinetika antokyanů**

Pro vyhodnocení biologické dostupnosti a možných zdravotních účinků antokyanů je nezbytné posoudit jejich absorpci, metabolismus, distribuci v tkáních, vylučování a interakce těchto sloučenin s dalšími živinami.

Míru absorpce antokyanů ovlivňuje jejich chemická struktura, přijatá dávka, způsob podání, kvalita jejich zdroje a současně užívané látky. Absorpce se liší také podle sledovaného orgánu. Dostupnost antokyanů je odlišná podle glykosidu obsaženého v molekule. Studie ukazují, že antokyany jsou vstřebávány jako glykosidy i aglykony. S tím rozdílem, že aglykony jsou vstřebávány rychleji. Antokyany ve formě glykosidů jsou metabolicky odolnější před absorpcí v důsledku bakteriálního štěpení v gastrointestinálním systému. Glykosidy antokyanů jsou dobře vstřebávány z žaludku, který představuje příznivé prostředí pro jejich stabilitu. Vyšší absorpční účinnost byla zjištěna u antokyanů, které obsahují více volných hydroxylových skupin a méně OCH<sub>3</sub> skupin, které snižují biologickou dostupnost (snížení střevní absorpce) antokyanu.

Míra absorpce antokyanů u lidí i zvířat byla, dle výsledků několika studií, odhadnuta na extrémně nízkou, ale i tyto nízké hladiny mohou být biologicky dostupné a dobře zachovány v tkáních.

Zdroje bohaté na fenolové sloučeniny mají schopnost modulovat střevní absorpci organických kationtů, jako jsou například vitamíny, živiny (nehemové železo v potravě) a xenobiotika [3].

#### 4.1.4 HPLC metody zabývající se stanovením antokyanů

Cílem mnoha studií je získání optimální metody jak extrahovat, izolovat a identifikovat antokyaniny z přírodních produktů. Extrakce antokyanů je příznivější než syntéza kvůli nestabilní povaze sloučenin. Antokyaniny jsou reaktivní sloučeniny citlivé na změny pH a vysoké teploty. Vysoká teplota může snadno degradovat glykosidickou vazbu v molekule. Extrakční rozpouštědlo se obvykle skládá z polárního organického rozpouštědla, vody a kyseliny. Organické rozpouštědlo je nejčastěji methanol, z dalších rozpouštědel se používají aceton, ethanol nebo acetonitril. Obsah organického rozpouštědla se pohybuje od 50 % do 100 % směsi, zatímco obsah kyseliny je obvykle menší než 7 %. Používají se silné kyseliny (kyselina trifluoroctová, kyselina chlorovodíková), nebo slabší kyseliny (kyselina mravenčí, kyselina octová). Podrobná studie pro optimalizaci extrakce antokyanů z borůvek chybí, i přes velký počet publikací na toto téma.

Kvalitativní a kvantitativní analýza antokyanů v borůvkách byla rozsáhle studována, ale stále ji brzdí omezení komerčně dostupných kalibračních standardů a jejich vysoká cena. Většina standardů antokyanů není komerčně dostupná a syntetizovaná vůbec.

Klasické chromatografické metody, jako je například planární chromatografie (papírová chromatografie, tenkovrstvá chromatografie) a sloupcová chromatografie stále hrají roli v analýze antokyanů. Nyní je však standardně využívanou separační metodou HPLC. Běžně se používá HPLC ve spojení s UV-VIS detektorem (detektory s diodovým polem) nebo hmotnostně spektrometrické detektory.

Pro objasnění dalších struktur velkých a složitých antokyanových sloučenin je účinným nástrojem nukleární magnetické rezonance (NMR), je však omezena tím, že je třeba izolovat miligram čistého materiálu.

Níže je uvedena základní charakteristika publikovaných chromatografických metod pro stanovení antokyanů v různém ovoci a potravinách.

##### 4.1.4.1 Příklad stanovení antokyanů 1 [21]

VZOREK: borůvky (odrůdy: 'Duke', 'Bluecrop', 'Northland', 'Northblue', 'Spartan', 'St. Cloud')

DETEKCE: DAD, 520 nm

KOLONA: Zorbax Eclipse XBD C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm)



MOBILNÍ FÁZE: roztok A- voda: kyselina mravenčí: acetonitril (v poměru: 87:10:3),  
roztok B- voda: kyselina mravenčí: acetonitril (40:10:5)

TYP ELUCE: gradientová eluce:

	A	B
0. -40. min.	90-86 %	10-14 %
40. -44. min.	86-80 %	14-20 %
44. -50. min.	79-70 %	21-30 %
50. -60. min.	69-60 %	31-40 %

Tabulka 1 Příklad gradientové eluce pro stanovení antokyanů

Obsah antokyanů (15 druhů) u šesti stanovovaných odrůd se pohyboval od 108 to 300 mg/100 g (koncentrace všech antokyanů byla vyjádřena v mg/100 g kyanidin-3-O-glukosidu). Největší celkový obsah antokyanů byl nalezen u odrůdy 'Northblue'. Naopak nejnižší obsah byl u odrůdy 'Bluecrop'. Rozdíly koncentrací antokyanů ve stejných odrůdách různého původu byly malé. Tato studie poskytuje podrobné informace o obsahu antokyanů v borůvkách, které mohou pomoci výzkumným pracovníkům lépe pochopit jejich nutriční kvalitu.

#### 4.1.4.2 Příklad stanovení antokyanů 2 [22]

VZOREK: džusy, ovoce, zelenina

DETEKCE: DAD, 520 nm

KOLONA: Inertsil ODS-3 C18 (150 mm x 4,6 mm, 3 μm)

MOBILNÍ FÁZE: roztok A: voda: acetonitril: kyselina mravenčí (85: 10: 5), roztok B  
voda: acetonitril: kyselina mravenčí (35: 10: 55), pH bylo upraveno na 2,0 pomocí  
kyseliny chlorovodíkové u roztoku A i B

TYP ELUCE: gradientová eluce:

	A	B
0. -15. min.	94 %	6 %
15. -30. min.	70 %	30 %
30. -35. min.	50 %	50 %
35. -41. min.	40 %	60 %
41. -46. min.	94 %	6 %

Tabulka 2 Příklad gradientové eluce pro stanovení antokyanů

Tato studie byla zaměřena na vývoj nové metody, mezi její tři přednosti patřila - rychlá příprava vzorku (rychlost a úspora času a rozpouštědel), použití kyanidinu jako vnitřního standardu (zvýšení přesnosti a reprodukovatelnosti) a snadná aplikace metody v praxi.

#### 4.1.4.3 Příklad stanovení antokyanů 3 [23]

VZOREK: jahody (Sao Paolo, Brazílie)

DETEKCE: DAD, 522 nm

KOLONA: C18, Phenomenex, Torrance (250 mm x 4,6 mm, 4 µm)

MOBILNÍ FÁZE: roztok A - deionizovaná voda, roztok B – methanol, pH bylo upraveno pomocí 0,0037 % HCl

TYP ELUCE: gradientová eluce:

	A	B
0. -30. min.	75-45 %	25-55 %
30. -35. min	45-75 %	55-25 %

Tabulka 3 Příklad gradientové eluce pro stanovení antokyanů

V této práci byla validována jednoduchá, spolehlivá HPLC-DAD metoda pro stanovení osmi antokyanů v jahodách. Práce se dále zabývala stabilitou antokyanů během skladování a při vysoké teplotě - byly stanoveny kinetické parametry degradace. Antioxidační aktivita antokyanů byla měřena on-line.

#### 4.1.4.4 Příklad stanovení antokyanů 4 [24]

VZOREK: borůvky (*Vaccinium uliginosum L.*)

DETEKCE: DAD, 530 nm

KOLONA: Zorbax Eclipse XDB C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)

MOBILNÍ FÁZE: roztok A- 100 % methanol, roztok B- 3 % kyselina mravenčí ve vodě

TYP ELUCE: gradientová eluce:

	A	B
0. -5. min.	15 %	85 %
5. -10. min.	15-20 %	85-80 %
10. -25. min.	20-25 %	80-75 %
25. -30. min.	25 %	75 %
30. -36. min.	25-70 %	75-30 %
36. -42. min	70 %	30 %
42. – 47. min	70-15 %	30-85 %
47. – 53. min	15 %	85 %

Tabulka 4 Příklad gradientové eluce pro stanovení antokyanů

V této práci bylo stanoveno 14 antokyanů, které se skládaly z 5 typů antokyanidinů (delfinidin, kyanidin, petunidin, peonidin a malvidin) a 4 typů glykosidů (galaktóza, glukóza, arabinóza a xylóza). Nejvíce zastoupeným antokyanem se stal malvidin-3-O-glukosid. Dále byly poprvé identifikovány 2 antokyany (antokyanidin-3-O-xylosid) nacházející se v čínských divokých borůvkách. Důležitým rysem tohoto druhu borůvek je, že všechny nalezené antokyany jsou v monoglykosylované formě. Tato forma vykazuje účinnější biologickou aktivitu než diglykosylovaná nebo acylovaná forma.

#### 4.1.4.5 Příklad stanovení antokyanů 5 [25]

VZOREK: borůvky (odrůdy: 'Reka', 'Puru', 'Bluecrop', 'Berkeley')

DETEKCE: DAD, 520 nm

KOLONA: Fluofix 120E (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)

MOBILNÍ FÁZE: roztok A- voda: kyselina mravenčí: ACN (94.5: 0.5: 5), roztok B- ACN

TYP ELUCE: gradientová eluce:

	A	B
0. -4. min.	100-96 %	0-4 %
4. -5. min.	96-98 %	4-2 %
5. -10. min.	98-96 %	2-4 %
10. -25. min.	96-92 %	4-8 %
25. -40. min.	92-78 %	8-22 %
40. -45. min.	78-72 %	22-28 %
45. -50. min.	72 %	28 %
50. -55. min.	72-55 %	28-45 %
55. -60. min.	55 %	45 %
60. -61. min.	55-100 %	45-0 %

Tabulka 5 Příklad gradientové eluce pro stanovení antokyanů

Tato práce se zabývala vývojem fenolických sloučenin a jejich antioxidační aktivitou během zrání (5 stupňů) u 4 odrůd borůvek. Obsah antokyanidinů roste během zrání, naopak obsah hydroxyskořicové kyseliny a flavonolů klesá. Bylo zjištěno, že antioxidační aktivita borůvek klesá během zrání spolu s obsahem fenolových sloučenin.

#### 4.1.4.6 Příklad stanovení antokyanů 6 [26]

VZOREK: borůvky (10 odrůd)

DETEKCE: DAD, 525 nm

KOLONA: SuperPac Pep-S (250 mm x 4,0 mm, 5 μm)

MOBILNÍ FÁZE: roztok A- 5 % kyselina mravenčí ve vodě, roztok B- 100 % methanol

TYP ELUCE: gradientová eluce:

	A	B
0. -4. min.	88 %	12 %
4. -10. min.	88-85 %	12-15 %
10. -20. min.	85-80 %	15-20 %
20. -23. min.	80 %	20 %
23. -32. min.	80-70 %	20-30 %
32. -40. min.	70-65 %	30-35 %
40. -48. min.	65-63 %	35-37 %
48. -50. min.	63-30 %	37-70 %
50. -53. min.	30 %	70 %
53. -55. min.	30-90 %	70-10 %

Tabulka 6 Příklad gradientové eluce pro stanovení antokyanů

Antokyanidiny stanovené v této práci byly delfinidin, kyanidin, petunidin, peonidin a malvidin a z cukerné složky se jednalo o galaktózu, glukózu a arabinózu. Žádná z deseti odrůd neobsahovala acylovanou formu glykosidu. Každý z antokyanidinů se nacházel i v acylované formě v různém zastoupení lišící se podle odrůdy. Celkový obsah antokyanů se pohyboval v rozmezí 110-260 mg na 100 g čerstvých borůvek. Kyselina chlorogenová (kopigment antokyanů) byla hlavní bezbarvá fenolická sloučenina nacházející se v borůvkách v rozmezí 50-100 mg na 100 g čerstvých borůvek.

#### 4.1.4.7 Příklad stanovení antokyanů 7 [4]

VZOREK: čistý borůvkový džus (100 % Bremner), borůvkový prášek v kapslích (Webber Naturals, WN, WellQuest, WQ)

DETEKCE: DAD, 210-600 nm

KOLONA: C18, Phenomonex Gemini (150 mm x 2 mm, 3 μm)

MOBILNÍ FÁZE: roztok A- 1 % kyselina mravenčí, roztok B- 100 % methanol

TYP ELUCE: gradientová eluce:

	A	B
0. -1. min.	90 %	10 %
1. -15. min.	60 %	50 %
15. -17,5. min.	20 %	80 %

Tabulka 7 Příklad gradientové eluce pro stanovení antokyanů

V této studii byl porovnáván čistý borůvkový džus (100 % Bremner) a borůvkový prášek v kapslích (Webber Naturals, WN, WellQuest, WQ). Ve dvou typech kapslí ( $1.38 \pm 0.02$  mg/g pro WN, and  $0.64 \pm 0.03$  mg/g pro WQ) byl zjištěn vyšší obsah antokyanů než v džusu ( $300 \pm 2$   $\mu$ g/mL). Celkem bylo stanoveno 23 antokyanů, z nichž 4 byly nově objeveny.

#### 4.1.4.8 Příklad stanovení antokyanů 8 [2]

VZOREK: borůvky odrůdy 'Crunchie', 'Star' a 'Sharpe' (*Vaccinium corymbosum* L.) a 'Climax', 'Powderblue' a 'Brightwell' (*Vaccinium ashei*)

DETEKCE: DAD, 520 nm

KOLONA: XTerra MS C18 (100 mm x 2,1 mm, 3,5  $\mu$ m)

MOBILNÍ FÁZE: roztok A- 100 % methanol, roztok B- 3 % kyselina mravenčí

TYP ELUCE: gradientová eluce:

	A	B
0. -5. min.	15-20 %	85-80 %
5. -10. min.	20 %	80 %
10. -25. min.	25 %	75 %
25. -30. min	25 %	75 %
30. -46. min	70 %	30 %
46. -52. min	70 %	30 %
52. - 55. min	15 %	85 %

Tabulka 8 Příklad gradientové eluce pro stanovení antokyanů

Složení antokyanů bylo ve všech odrůdách podobné, odrůdy se lišily hlavně poměrem jednotlivých antokyanů. Nejvíce obsažené antokyanidiny byly delphinidin, peonidin a malvidin. Největší obsah antokyanů měla odrůda 'Climax' ( $13,7 \pm 1,4$  g – ekvivalentní ke kyanidinu-3-O-glukosidu v  $\text{kg}^{-1}$  sušiny), zároveň byla u této odrůdy zjištěna i nejvyšší antioxidační aktivita ze všech testovaných kultivarů. Rod *Vaccinium ashei* měl významně vyšší celkový obsah antokyanů než *Vaccinium corymbosum* L.

#### 4.1.4.9 Příklad stanovení antokyanů 9 [28]

VZOREK: borůvky (*Vaccinium virgatum*)

DETEKCE: SPD-20AV UV VIS detektor, Shimadzu 2010EV hmotnostní spektrometr.  
380 nm a 510 nm

KOLONA: XTerra MS C18 (150 mm x 3,0 mm, 5 µm)

MOBILNÍ FÁZE: roztok A- 5 % kyselina mravenčí, roztok B- 100 % methanol

TYP ELUCE: gradientová eluce:

	A	B
0. -2. min.	93 %	7 %
2. -32. min.	93-78 %	7-22 %
32. -38. min.	78 %	22 %
38. -38,1. min.	78-93 %	22-7 %
38,1. -45. min.	93 %	7 %

Tabulka 9 Příklad gradientové eluce pro stanovení antokyanů

V této studii bylo stanoveno 13 antokyanů a 7 fenolických sloučenin. Hlavním cílem práce bylo definovat rozdíly mezi fytochemikáliemi, obsaženými v organicky rostoucích borůvkách a borůvkách rostoucích konvenčním způsobem (ne všechny organicky pěstované borůvky mají lepší antioxidační aktivitu).

## 4.2 Chromatografie

Chromatografie je analytická separační metoda, které využívá dělení analyzovaných látek mezi dvě nemísitelné fáze. Jedna je nepohyblivá – stacionární, druhá pohyblivá – mobilní. Během chromatografického procesu dochází k mnohonásobnému vytváření rovnovážného stavu mezi těmito fázemi. Mezi analyzovanou látkou a fázemi dochází k vzájemným interakcím. K separaci dochází díky rozdílné afinitě rozdělovaných látek ke stacionární a mobilní fázi. Složka analyzované látky, jejíž interakce se stacionární fází jsou nejsilnější, bude separována jako poslední, neboť je díky interakcím zadržována v systému nejdéle. Existuje velké množství chromatografických metod, které lze dělit podle různých hledisek:

Dělení podle principu separačního procesu:

- adsorpční chromatografie
- rozdělovací
- iontově výměnná

- gelová
- afinitní

#### Dělení podle charakteru mobilní fáze:

- plynová (GC) – mobilní fáze je inertní plyn
- kapalinová (LC) – mobilní fáze je kapalina

#### Dělení podle uložení stacionární fáze:

- kolonová chromatografie
- plošná chromatografie
  - papírová chromatografie
  - chromatografie na tenké vrstvě [9, 11]

Při vypracování této diplomové práce byla využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

#### **4.2.1 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)**

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie patří mezi nejčastěji používané separační metody. Nachází využití v různých oblastech, např. v analýze léčiv a potravin, monitorování lékových hladin a kontrole léčiv. Mezi hlavní výhody HPLC patří kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi, citlivost a rychlost stanovení, minimální množství vzorku a výhodná možnost automatizace. Naopak mezi negativa patří vyšší náklady, složité ovládání softwaru a úprava vzorku před vlastní analýzou. Grafický záznam analýzy je označován jako chromatogram. Principem HPLC je separace analytů na základě jejich rozdělení mezi stacionární a mobilní fázi. Mobilní fáze je vždy kapalná a v koloně je fáze stacionární. HPLC můžeme rozdělit:

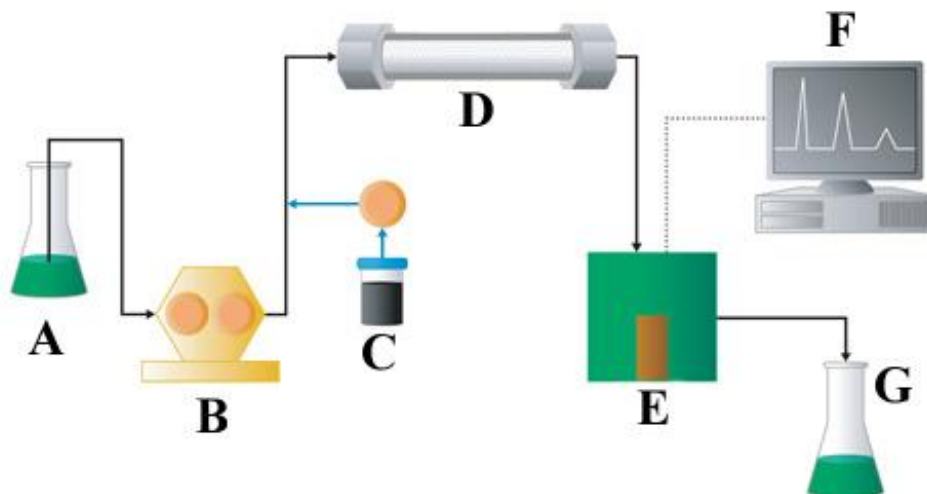
##### podle polarity fází:

- chromatografii na normálních fázích – jako stacionární fáze se využívá polární silikagel a jako mobilní fáze se používají nepolární rozpouštědla
- chromatografii na reverzních fázích – využívají se nepolární stacionární fáze, které jsou chemicky vázané na inertní nosič. Mobilní fáze bývá směs polárních rozpouštědel.

##### podle složení mobilní fáze:



- konstantního složení mobilní fáze v průběhu celé analýzy (isokratická eluce)
- programově se měnící složení mobilní fáze (gradientová eluce) [13].



Obrázek 2 Schéma kapalinového chromatografu

[dostupné z: <http://chemicalinstrumentation.weebly.com/hplc.html>]

zásobník mobilní fáze (A), vysokotlaké čerpadlo (B), vzorek a dávkovací zařízení (C), kolona (D), detektor (E), počítač (F), sběrač frakcí (G)

V této diplomové práci byla využívána chromatografie na reverzní fázi, gradientová eluce a DAD detektor.

#### 4.2.1.1 Stacionární fáze pro reverzní chromatografii

Při reverzní chromatografii má stacionární fáze nepolární charakter, je většinou tvořena silikagelem s modifikovaným povrchem (hydrofobní skupiny – C18, C8). Dále jsou k dispozici např. sorbenty s fluorovaným alkylovým řetězcem a fenylovou skupinou, které mají odlišnou selektivitu ve srovnání s C18 modifikovanými stacionárními fázemi. Kyano a amino modifikované stacionární fáze, které se díky vyšší polaritě využívají v normální chromatografii, nalézají své použití i v chromatografii reverzní.

Mobilní fáze je polárnější směs organické a vodné složky. Nejvíce využívanými organickými složkami jsou acetonitril, methanol nebo jejich směsi. Obě rozpouštědla mají přijatelnou viskozitu a poměrně malou absorbanci při nízkých vlnových délkách, což je výhodné zejména při použití UV detekce. Důležitým praktickým aspektem je vzájemná

mísitelnost všech složek mobilní fáze. Eluční síla mobilní fáze roste s klesající polaritou organického rozpouštědla, tedy eluční síla acetonitrilu je větší než eluční síla vody.

Hlavním mechanismem retence jsou hydrofóbní interakce, které jsou zprostředkovány především van der Waalsovými silami. Pořadí retence analytů je obrácené v porovnání s chromatografií na normální fázi. Méně polární analyty jsou víc zadržovány na stacionární fázi, mají tedy vyšší retenční čas. Retenční čas je charakteristika umožňující identifikaci látky, kdežto plocha píku je parametr kvantitativní, který nám určí výslednou koncentraci hledaného analytu. Změny ve složení stacionární a mobilní fáze (hlavně typ organického rozpouštědla, síla pufry, pH) má obvykle výrazný vliv na selektivitu, a tím umožňuje dosáhnout separace širokého spektra látek.

Pro navázání nepolárních skupin na povrch silikagelu se používají silanizační reakce. Silikagel má na svém povrchu silanolové skupiny, přičemž při silanizačních reakcích je možné modifikovat maximálně 50 % těchto skupin. Důvodem je sterické bránění už navázané objemné hydrofóbní skupiny, která brání modifikaci okolních silanolových skupin. Nezreagované zbytkové silanoly mohou negativně ovlivňovat separaci. Analyt reaguje s navázanou skupinou, ale i s nezreagovanými silanolovými skupinami (např. zhoršení tvaru píků u bazických látek) které jsou prakticky stále ionizované a způsobují tak zhoršený tvar píků, zejména při separaci bazických analytů. Řešením tohoto problému je tzv. endcapping neboli krytí těchto zbytkových silanolových skupin pomocí malých silanů (např. trimethylchlorsilan, dimethylchlorsilan). Endcapping snižuje koncentraci volných silanolů o dalších 20-30 %, avšak malá část zůstává přítomna na povrchu sorbentu stále.

Dalším problémem u kovalentně modifikovaného silikagelu je tendence navázaných zbytků k hydrolyze při nízkém pH (<2) a jejich následné uvolnění. Jedním z řešení tohoto problému je sterické chránění, u kterého je vazba Si-O stericky stíněna pomocí objemnější skupiny (např. *i*-propyl, *i*-butyl).

K částečné redukci problému došlo až použitím silikagelu typu B. Zatímco silikagel typu A je odvozen od anorganických silikátů, silikagel typu B vzniká hydrolyzou vysoce čistých organických silanů.

Chromatografie na obrácené fázi je dnes mnohem častěji aplikována, než chromatografie na normální fázi. Důvodem jsou menší problémy (vyšší teploty varu a menší hořlavost rozpouštědel) a zejména nižší toxicita generovaných odpadů [16, 20].

#### 4.2.1.2 Gradientová eluce

Použitím gradientové eluce se dosahuje optimálního rozlišení a přijatelné doby analýzy. Složení mobilní fáze se mění s časem, čím dochází ke zvyšování eluční síly. Nejčastější případ gradientové eluce je eluce binární, kdy jedná fáze má výrazně nižší eluční sílu než druhá. Časová změna koncentrace v průběhu separace se označuje jako profil gradientu. U gradientové eluce je potřeba patřičně upravit časy jednotlivých segmentů, při kterých dochází ke změně složení mobilní fáze. Díky gradientové eluci je možné detekovat látky při nižších koncentracích.

Při gradientové eluci mísí směšovač kapaliny přiváděné ze dvou nebo více zásobníků, dále následuje odplynění mobilních fází, dávkování na kolonu a detekce. Signál je z detektoru veden buď do integrátoru a zapisovače nebo dnes výhradně do datové stanice. Na výstupu z kolony mohou být také umístěny sběrače jednotlivých frakcí (preparativní chromatografie) [17, 18].

#### 4.2.1.3 Spektrofotometrické detektory (UV/VIS)

Spektrofotometrické detektory jsou při HPLC analýze používány nejčastěji zejména kvůli jejich poměrně nízké ceně a univerzálnosti. UV/VIS detekce je založena na schopnosti látek absorbovat záření (190-800 nm). Roztok v kyvetě je ozařován monochromatickým světlem a část tohoto záření je roztokem absorbována. Zdrojem záření pro UV oblast (190-400 nm) bývá obvykle deuteriová lampa, pro viditelnou oblast (400-800 nm) bývá využíváno lampy wolframové. Pro získání monochromatického záření vhodné vlnové délky pak slouží monochromátor. Tyto detektory porovnávají intenzitu vysílaného záření s intenzitou záření dopadajícího na detektor.

Velikost odezvy se hodnotí pomocí Lambert-Beerova zákona, kde je odezva detektoru přímo závislá na délce cely a koncentraci analytu v mobilní fázi. Množství absorbovaného záření je přímo úměrné koncentraci látky ve zkoumaném roztoku.

$A = \epsilon \cdot l \cdot c$  ( $\epsilon$  – molární absorpční koeficient;  $A$  – absorbance;  $l$  – tloušťka absorbující vrstvy;  $c$ -koncentrace analytu) [9, 14].

#### 4.2.1.4 Detektory s diodovým polem (Diode Array Detectors – DAD)

DAD je konstrukčně složitější typ spektrofotometrického detektoru. Záření ze zdroje procházející vzorkem, je rozloženo pomocí optické mřížky na jednotlivé vlnové délky a dopadá na pole fotodiod. Diodové pole je přitom umístěno tak, že na každou fotodiodu dopadá určitý rozsah vlnových délek. Každá fotodioda je spojena s kondenzátorem, který je nabitý na určitou hodnotu. Fotoelektrický proud, který dopadá na diodu, vybije kondenzátor. V další fázi je kondenzátor opět dobit. Proud, který je potřebné dobít, je úměrný intenzitě dopadajícího záření. Tyto sekvence vybíjení a dobíjení kondenzátorů se velice rychle opakují. Postupně jsou zaznamenávány údaje o absorbanci při každé vlnové délce v každém okamžiku.

Detektor ve spolupráci s počítačem umožňuje detekci látky při jakékoliv zvolené vlnové délce, umožňuje porovnávat snímaná spektra s knihovnou spekter, a také vypočítat čistotu píku (peak purity) a tím odhalit případnou koeluci s jinou látkou. Ve většině případů bývá výhodné (pro získání vysoké citlivosti odezvy) provádět měření v maximu absorpance látky. Nicméně, v úvahu je potřeba vzít také vlastní absorbanci ostatních složek vzorku (např. balastů z matrice) a mobilní fáze.

Mezi hlavní výhody UV/VIS detektorů patří snadná obsluha (nevyžaduje prakticky žádnou údržbu), přesnost, robustnost, nízká citlivost odezvy na změny složení mobilní fáze a teploty, možnost využití při gradientových analýzách a poměrně vysoká citlivost pro analyty obsahující chromofor. [14, 19, 20].

#### 4.2.1.5 Validace metod

Cílem validace chromatografické metody je prokázat, že daná metoda je přesná, spolehlivá a vhodná k účelu, pro který byla vyvinuta. Validace obsahuje řadu parametrů, které se hodnotí a které musí daná metoda splňovat. U nových metod nebo u stávajících metod, které byly nějakým způsobem změněny, je nutné provést validaci. Konkrétní zkušební metoda by měla být použitelná a stejně spolehlivá při opakovaném použití v jedné či vícero laboratořích [8, 9].

Mezi sledované parametry patří:

- výtěžnost
- přesnost (součástí přesnosti je opakovatelnost)
- linearita

- test způsobilosti
- detekční limit
- kvantitativní limit
- robustnost
- rozsah
- selektivita

### Výtěžnost (recovery)

Správnost vyjadřuje shodu mezi získaným výsledkem měření a reálnou hodnotou dané veličiny. Zjistit reálnou hodnotu může být problém. Hodnotu můžeme získat například nezávisle ověřenou metodou nebo analýzou modelového vzorku. Modelový vzorek obsahuje všechny složky přípravku přesně přidaný standard. Nemáme-li k dispozici všechny složky přípravku, analyzujeme vzorek se známým přídavkem standardu. Výtěžnost zjišťujeme analýzou nejméně šesti vzorků a vyjadřujeme jako:

$$\text{výtěžnost} = 100 \times \text{nalezená hodnota} / \text{správná hodnota} [8, 9].$$

### Přesnost (precision)

Přesnost je definována mírou shody mezi výsledky získanými opakovaným měřením jednoho homogenního vzorku. Jeden vzorek se šestkrát analyzuje stejným postupem, včetně přípravy vzorku. Míra přesnosti se vyjadřuje jako směrodatná odchylka výsledků zkoušek. Podle podmínek analýzy se rozlišují tři úrovně přesnosti:

- opakovatelnost (repeability) je opakováním měření metody jedním pracovníkem na stejném přístroji, se stejným roztokem, činidly a v krátkém časovém intervalu
- mezilehlá přesnosti (intermediate precision), při níž se analýza provádí různými pracovníky na různých přístrojích, různými činidly, v jiném časovém rámci, ale se stejným vzorkem a ve stejné laboratoři
- reprodukovatelnost (reproducibility), u které je provedení stejné jako u mezilehlé přesnosti, ale probíhá v různých laboratořích [8, 9]

### Linearita (linearity)

Linearita je schopnost metody dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky ve vzorku. Stanovuje se alespoň pět různých koncentrací (v rozsahu

50-150 %) deklarovaného obsahu. Linearitou je myšlena přímková závislost mezi odezvou instrumentace a koncentrací analytu, která je charakterizována metodou lineární regrese. Po proměření se sestaví kalibrační křivka a určí se její směrnice. K hodnocení linearit se v současné době používá korelační koeficient, který popisuje těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných. Čím více se jeho hodnoty blíží jedné, tím je závislost těsnější [8, 9, 10].

#### Test způsobilosti (systém suitability test)

Test způsobilosti je nedílnou součástí validace analytické metody. V praxi ale není možné definovat všechny podmínky nezbytné pro spolehlivost metody. Při novém použití metody se nemusí opakovat celá validace, předpokládá se, že pokud jsou splněny určité parametry, je validace platná. Tyto parametry se nazývají test způsobilosti chromatografického systému a patří sem:

- retenční čas ( $t_r$ ) je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky
- rozlišení chromatografických píků ( $R_s$ ) je vzdálenost mezi píky dvou složek analyzované směsi. Doporučený limit rozlišení je větší než 1,5 a odpovídá rozdělení píků téměř až na základní linii. Čím vyšší je hodnota  $R_s$ , tím lepší separace složek je dosaženo.
- kapacitní faktor ( $k$ ) vyjadřuje kapacitu kolony a je mírou sorpce analytu na koloně.
- faktor symetrie chromatografických píků ( $A_s$ ) vyjadřuje míru souměrnosti chromatografického píku. Téměř každý chromatografický pík vykazuje jistý stupeň chvostování nebo frontování. Akceptovatelné hodnoty faktoru symetrie leží v rozmezí 0,9 (nepatrné frontování) až 1,5 (mírné chvostování) [8, 9].

#### Detekční limit (limit of detection)

Detekční limit určuje citlivost metody. Je to nejnižší detekovatelná koncentrace látky nestanovovaná kvantitativně a z větší míry závisí na typu použitého detektoru [8, 9].

#### Kvantitativní limit (limit of quantitation)

Kvantitativní limit je také parametr citlivosti metody. Vyjadřuje nejnižší koncentraci látky, která je stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Za limitující

RSD se považuje 10 %, proto se dá kvantitativní limit vyjádřit jako koncentrace, jejíž stanovení nepřesahuje tuto odchylku. Kvantitativní limit bývá obvykle trojnásobkem limitu detekčního [8, 9], a bývá také vyjádřen jako hodnota, při jejímž stanovení je odezva rovna desetinásobku šumu nulové linie chromatogramu.

#### Robustnost (robustness)

Robustnost vyjadřuje míru vlivu proměnných podmínek na výsledky analýzy. Sbíráním poznatků z vývoje metody se snažíme upozornit na podmínky, které mohou ovlivnit výsledky. U HPLC se zjišťuje vliv složení mobilní fáze, teplota na koloně, rychlost průtoku, pH vodné složky mobilní fáze, stabilita vzorků, rozdíly mezi kolonami od různých výrobců a podobně [8, 9].

#### Rozsah (range)

Rozsah se odvozuje od linearit a udává hranice koncentrací, v nichž může být metoda používána. Jako dolní hranice slouží například výše zmiňovaný kvantitativní limit, jako horní hranice může být použita maximální odezva detektoru, po jejímž překročení přístroj nepracuje již přesně [8, 9].

#### Selektivita (specificity)

Selektivita metody je schopnost přesného a správného určení analytu i v přítomnosti jiných látek jako jsou například další účinné látky v kombinovaných přípravcích, pomocné látky, vedlejší produkty, nečistoty, neznámé látky, zbytková rozpouštědla, a případně další interferující látky přítomné v matrici měřeného vzorku [8, 9].

## 5 Experimentální část

### 5.1 Materiál, přístroje a pomůcky

#### 5.1.1 Přístroje, podmínky separace

Analýza byla provedena pomocí chromatografického systému Shimadzu LC-10, sestava systému viz. Tabulka 10.

<b>Chromatografická sestava</b>	Shimadzu LC-10
<b>Pumpy</b>	LC – 10 AD VP
<b>Degasser</b>	DGU – 14 A
<b>Autosampler</b>	SIL-HTA
<b>Termostat kolony</b>	CTO – 10 AC VP
<b>Detektor</b>	DAD detektor SPD – M10A VP
<b>Vyhodnocení</b>	Chromatografický software LC solution
<b>Kolona I.</b>	Kinetex PFP (150 x 4,6 mm, 2,6 µm)
<b>Kolona II.</b>	Ascentis® Express F5 (150 x 4,6 mm, 5 µm)
<b>Předkolona</b>	Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 µm)
<b>Dávkování</b>	5 µl
<b>Detekce</b>	520 nm
<b>Mobilní fáze</b>	Acetonitril/2 % kyselina mravenčí, průtok 1,0 ml/min
<b>Gradientový režim</b>	Testovány různé podmínky gradientové eluce
<b>Teplota</b>	50°C

Tabulka 10 Chromatografický systém

#### 5.1.2 Pomůcky

Ultrazvuková lázeň (Banderin Sonotex RK52,SRN)

Analytické váhy (Sartorius 2004 MP, SRN)

PTFE filtry o velikosti pórů 0,45µm

Pipety (BRAND)

Běžné laboratorní sklo a pomůcky

Standardy

Delphinidin-3-galactoside, Extrasynthese, Genay, Francie, ≥95 %

Delphinidin-3-glucoside, Extrasynthese, Genay, Francie, ≥95 %

Cyanidin-3-araboside, Extrasynthese, Genay, Francie, ≥97 %



Cyanidin-3-galactoside, Extrasynthese, Genay, Francie,  $\geq 97$  %

Cyanidin-3-glucoside, Extrasynthese, Genay, Francie,  $\geq 96$  %

Malvidin-3-galactoside, Extrasynthese, Genay, Francie,  $\geq 95$  %

Peonidin-3-glucoside, Extrasynthese, Genay, Francie,  $\geq 95$  %

Plody borůvek: Výzkumný šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.. Každá odrůda je pěstována ve třech keřích, ze kterých byly odebrány průměrně velké plody v plné zralosti. Plody byly sklizeny v měsících červenec a srpen 2014, poté ihned zamrazeny a až do doby analýzy uchovávány při  $-18$  °C.

### **5.1.3 Chemikálie**

Acetonitril (HPLC Gradient Grade), Sigma Aldrich

Methanol (HPLC Gradient Grade), Sigma Aldrich

Kyselina mravenčí, Sigma Aldrich

Ultračistá voda, čištěná systémem Milli-Q (Millipore, Berford)

### **5.1.4 Testované nápoje**

Pfanner borůvka 25 %, ovocný nápoj s borůvkovou šťávou z koncentrátu

složení: pitná voda, šťáva z několika druhů ovoce vyrobená z koncentrátu (borůvky [10 % hm.], jablka, bezinky), cukr, kyselina citrónová, vitamin C, aroma

země původu: Rakousko

Fructal borůvka, nektar z borůvek bez přídavku cukrů a konzervačních činidel  
země původu: Slovinsko.

## **5.2 Příprava roztoků**

Veškeré vzorky, standardy a roztoky standardů byly uchovávány v mrazáku při teplotě  $-18$ °C.

### **5.2.1 Příprava zásobního roztoku standardů pro optimalizaci a validaci metody**

Zásobní roztoky standardů (delfinidin-3-O-galaktosid, delfinidin-3-O-glukosid, kyanidin-3-O-galaktosid, kyanidin-3-O-glukosid, kyanidin-3-O-arabinosid, peonidin-3-O-

glukosid, malvidin-3-O-galaktosid) o koncentraci 1000 mg/l byly připraveny rozpuštěním 0,5 mg určitého standardu v 500  $\mu$ l MeOH.

### **5.2.2 Příprava zásobního roztoku pro kalibraci**

Zásobní roztok pro kalibraci byl připraven smísením 50  $\mu$ l každého ze sedmi zásobních roztoků standardů a poté bylo přidáno 150  $\mu$ l MeOH. Takto byl získán zásobní roztok standardu o koncentraci všech látek 100 mg/l.

### **5.2.3 Příprava pracovních roztoků pro kalibraci**

Pracovní roztoky pro kalibraci byly připraveny smísením zásobního roztoku pro kalibraci a MeOH v poměrech uvedených v Tabulce 11.

<b>Koncentrace (mg/l)</b>	<b>Objem zásobního roztoku (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Objem MeOH (<math>\mu</math>l)</b>
100	100	0
75	75	25
50	50	50
20	20	80
10	10	90
7	7	93
5	5	95
2	2	98
1	2	194

Tabulka 11 Příprava pracovních roztoků pro kalibraci

### **5.2.4 Příprava pracovního roztoku standardu pro optimalizaci metody a identifikaci látek**

Každý ze sedmi pracovních roztoků pro optimalizaci separace a identifikaci píků byl připraven samostatně z 50  $\mu$ l určitého zásobního roztoku standardu (o koncentraci 1000 mg/l) a přidavku 450  $\mu$ l MeOH.

### **5.2.5 Příprava pracovních roztoků pro test opakovatelnosti**

Pro test opakovatelnosti byly použity vzorky pracovních roztoků pro kalibraci.

Koncentrace (mg/l)	Objem zásobního roztoku (μl)	Objem MeOH (μl)
100	100	0
20	20	80
5	5	95

Tabulka 12 Příprava pracovních roztoků pro test opakovatelnosti

### **5.2.6 Příprava pracovních roztoků pro přesnost**

Pro měření přesnosti bylo připraveno 8 roztoků obsahujících přibližně 5 gramů vzorku (odrůda borůvek 'Bluehaven' – borůvky byly předem rozmixovány tyčovým mixérem), 25 ml MeOH a 320 μl koncentrované HCOOH. Roztoky byly protřepány a následně byl vzorek umístěn do ultrazvukové lázně na 20 minut (s protřepáním po 10 minutách). Po uplynutí 20 minut byly roztoky přefiltrovány přes PTFE membránový filtr Millipore 0,45 μm.

### **5.2.7 Příprava zásobního roztoku standardu pro výtěžnost**

Pro měření výtěžnosti byl použit zásobní roztok standardu, který byl složen z 200 μl z každého ze sedmi standardů, 320 μl koncentrované HCOOH a doplněn do 25 ml baňky MeOH po rysku.

### **5.2.8 Příprava pracovních roztoků a vzorků pro výtěžnost**

Pro měření výtěžnosti bylo celkově připraveno 9 navážek roztoků. První tři navážky byly o složení přibližně 0,4 g vzorku (odrůda borůvek 'Bluehaven') a 2,5 ml roztoku o složení (320 μl koncentrované HCOOH + 25 ml MeOH). Tyto tři roztoky vzorků borůvek sloužily jako roztoky srovnávací k vyhodnocení ploch antokyanů nativně přítomných v borůvkách. Dalších šest navážek bylo o složení přibližně 0,4 g vzorku a 2,5 ml zásobního roztoku standardu pro výtěžnost (5.2.7). Z těchto roztoků vzorků borůvek s přídavkem standardů byla hodnocena výtěžnost extrakčního postupu.

### **5.2.9 Příprava pracovních roztoků testovaných nápojů**

Pro přípravu pracovních roztoků testovaných nápojů byl odebrán vzorek džusu a přefiltrován přes filtr Millipore 0,45 μm do kádinky. Následně bylo odměřeno 2,5 ml džusu a přidáno 32 μl HCOOH.

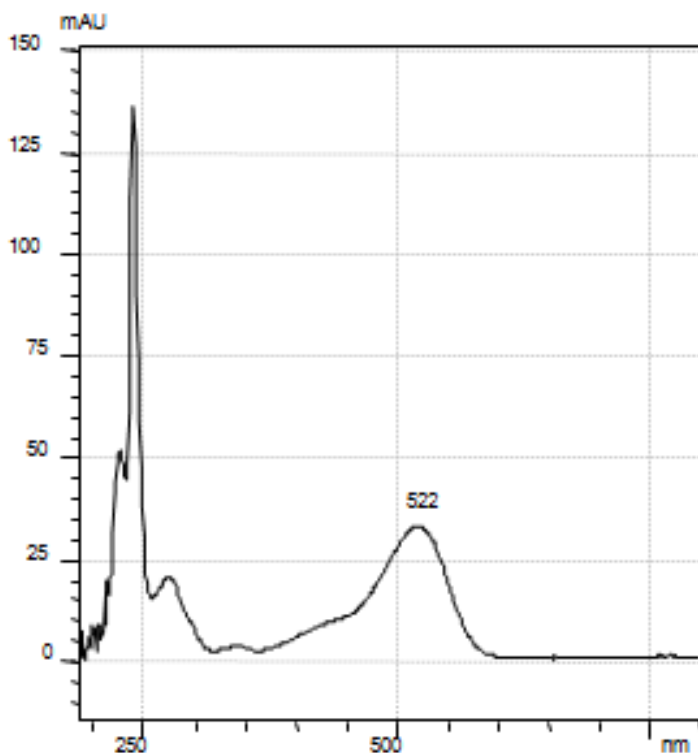
## 6 Výsledky a diskuze

### 6.1 Optimalizace metody

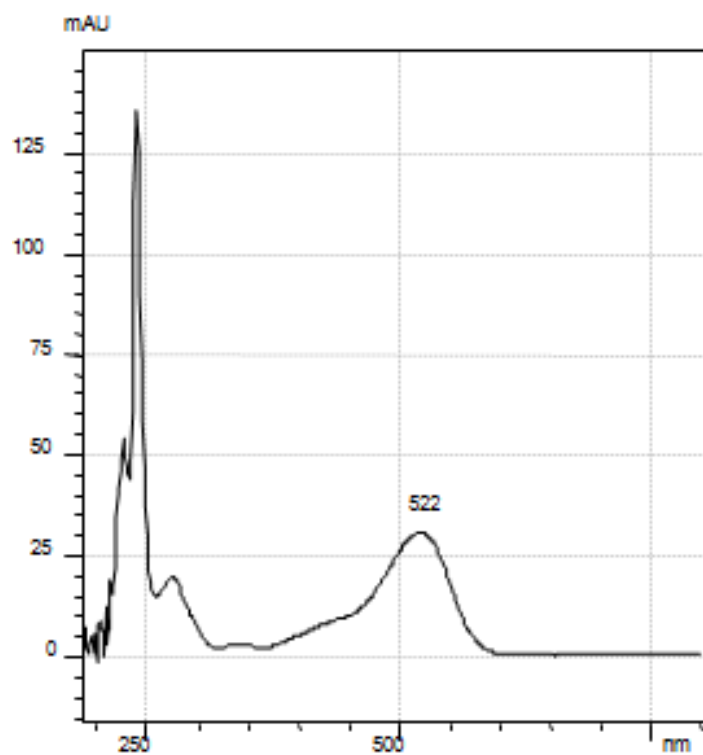
Pro optimalizaci metody byl použit roztok připravený podle 5.2.4.

#### 6.1.1 Volba vlnové délky detektoru

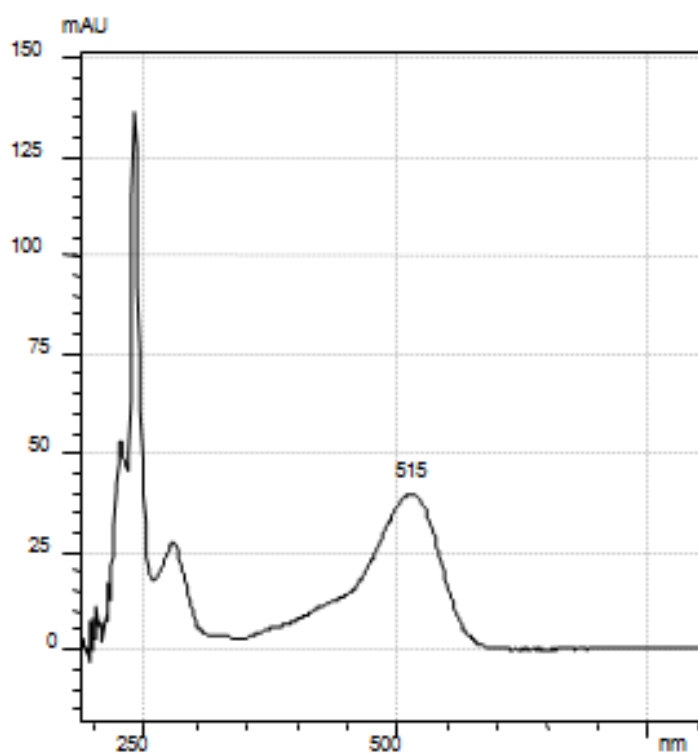
Pro analýzu byl použit DAD detektor při vlnové délce 520 nm. Tato vlnová délka umožňovala stanovení všech analytů v jejich absorpčním maximu spektra.



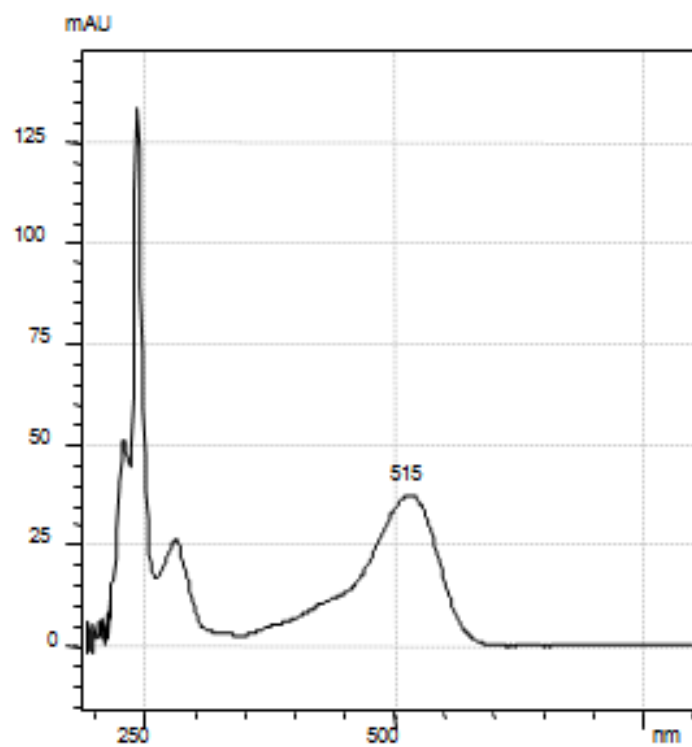
Obrázek 3 Absorpční spektrum pro delfinidin-3-O-galaktosid



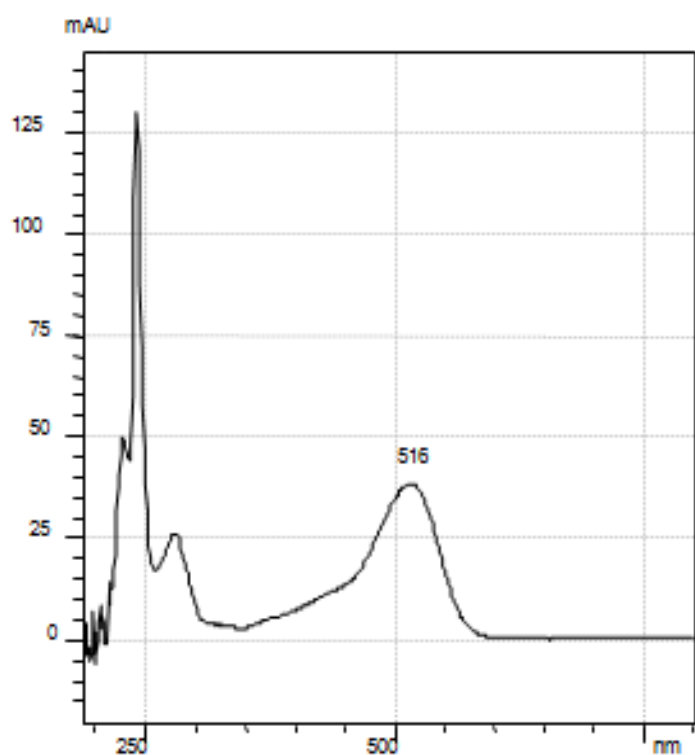
Obrázek 4 Absorpční spektrum pro delphinidin-3-O-glukosid



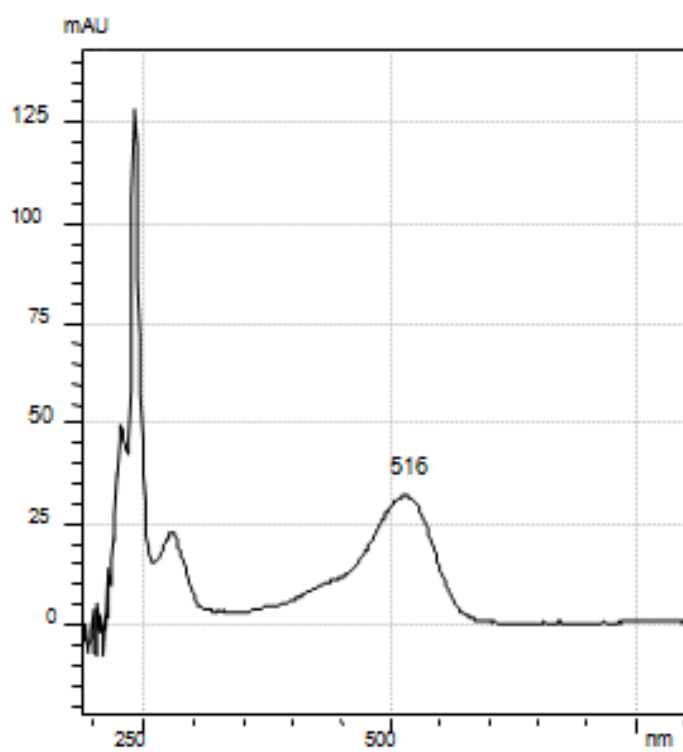
Obrázek 5 Absorpční spektrum pro kyanidin-3-O-galaktosid



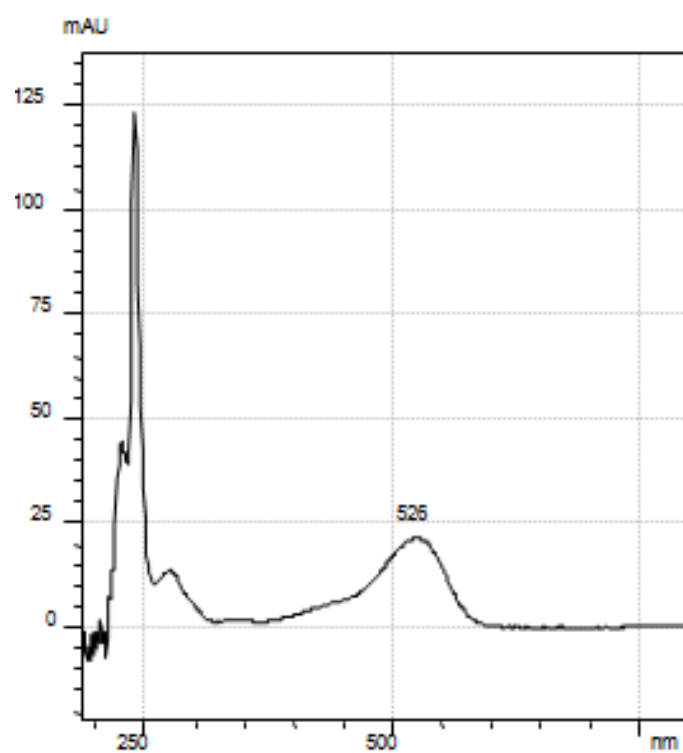
Obrázek 6 Absorpční spektrum pro kyanidin-3-O-glukosid



Obrázek 7 Absorpční spektrum pro kyanidin-3-O-arabinosid



Obrázek 8 Absorpční spektrum pro peonidin-3-O-glukosid



Obrázek 9 Absorpční spektrum pro malvidin-3-O-galaktosid

### **6.1.2 Volba a optimalizace gradientové eluce**

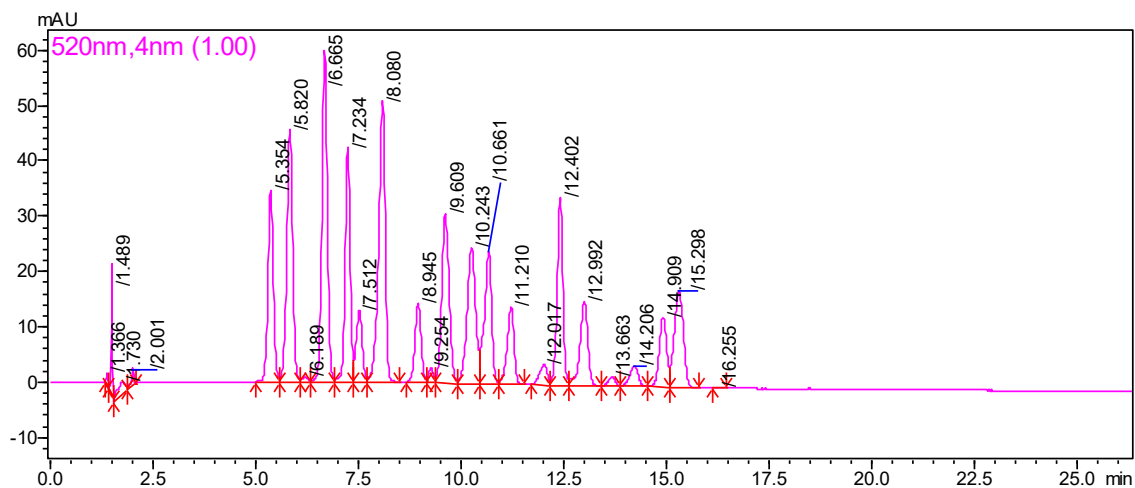
Z předchozích studií provedených na katedře analytické chemie bylo zjištěno, že pentafluorofenylová stacionární fáze (F5 anebo PFP) vykazuje vyšší účinnost separace antokyanů než standardně používané C-18 reverzní fáze. Dále bylo zjištěno, že tato fáze umožňuje značně urychlit separaci většího počtu antokyanů, než dosud běžně publikované metody používající C-18 kolony. Proto byly při optimalizaci testovány dvě kolony a jedna předkolona. Použity byly kolony Kinetex PFP (150 x 4.6 mm, 2,6 μm) a Ascentis® Express F5 (150 x 4,6 mm, 5 μm). K oběma kolonám byla použita předklonka Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm). Během optimalizace byl průtok nastaven na 1 ml/min a teplota 50°C. Obě kolony byly testovány při různých gradientech. Při volbě gradientu bylo vyzkoušeno 12 gradientů, se snahou najít vhodné podmínky gradientové eluce pro separaci co největšího počtu antokyanů. Z důvodů velkého počtu antokyanů přítomných v borůvkách a nedostatku komerčních standardů byly jednotlivé gradienty testovány na reálném vzorku s cílem separovat maximální možný počet antokyanů (hodnotícím kritériem byl počet separovaných píků a čas). Teprve poté probíhala identifikace píků pomocí 7 komerčně dostupných standardů a porovnání s reálnými vzorky. Při optimálních podmínkách by mělo dojít k dostatečné separaci analyzovaných látek a jejich píky by měly mít optimální symetrii, při zachování přiměřeného času analýzy. Některé z látek mají velmi podobné retenční časy a koeluce strukturně velmi podobných antokyanů nebyla zcela odstraněna. Gradienty 04 a 09 se ukázaly pro separaci jako nejvhodnější. Vzhledem k volbě kolony Kinetex PFP byl jako optimální zvolen gradient 09, zobrazený na Obrázek 18. Jednotlivé gradienty a separace antokyanů přítomných v borůvkách jsou zdokumentovány v následujících tabulkách:



## Gradient 01

Mobilní fáze Čas (min)	ACN	2 % HCOOH
	(%)	(%)
0.01	Start analýzy	
0.01	5	95
14.00	20	80
20.00	25	75
30.00	35	65
35.00	75	25
40.00	5	95
45.00	Kondicionace kolony	

Tabulka 13 Podmínky gradientu 01



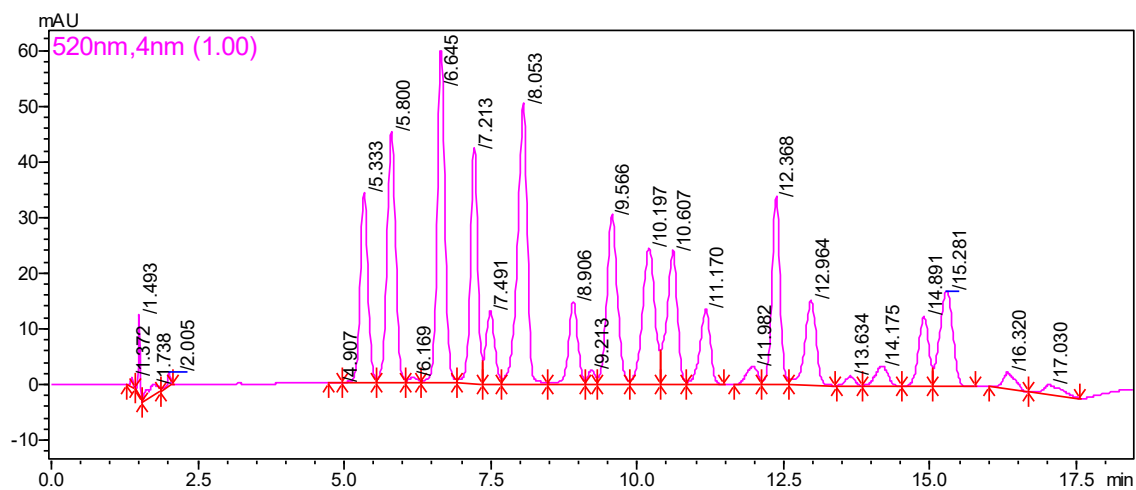
Obrázek 10 Chromatogram separace antokyanů pro gradient 01 - Ascentis® Express F5 (150 x 4,6 mm, 5 μm) s předkolonkou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm)

Separace píků proběhla v pořádku, bylo separováno celkem 18 látek. Pro příliš dlouhý čas analýzy a kondicionace kolony byly zkušeny rychlejší gradienty. Dále bylo postupně měněno složení mobilní fáze.

## Gradient 02

Čas (min)	Mobilní fáze	
	ACN (%)	2 % HCOOH (%)
0.01	Start analýzy	
0.01	5	95
14.00	20	80
15.00	95	5
15.30	5	95
17.00	5	95
17.01	Kondicionace kolony	

Tabulka 14 Podmínky gradientu 02



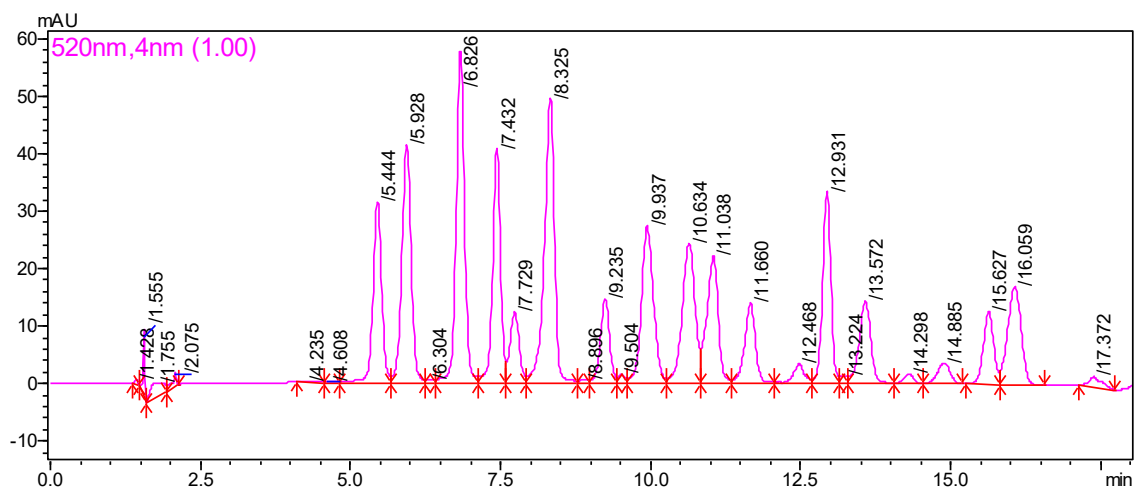
Obrázek 11 Chromatogram separace antokyanů pro gradient 02 - Ascentis® Express F5 (150 x 4,6 mm, 5 μm) s předkolonkou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm)

Za těchto podmínek bylo separováno 18-19 látek v prakticky stejném čase, avšak s kratší kondicionací kolony.

## Gradient 03

Čas (min)	Mobilní fáze	
	ACN (%)	2 % HCOOH (%)
0.01	Start analýzy	
0.01	5	95
15.00	20	80
16.00	95	5
16.30	5	95
18.00	5	95
18.01	Kondicionace kolony	

Tabulka 15 Podmínky gradientu 03



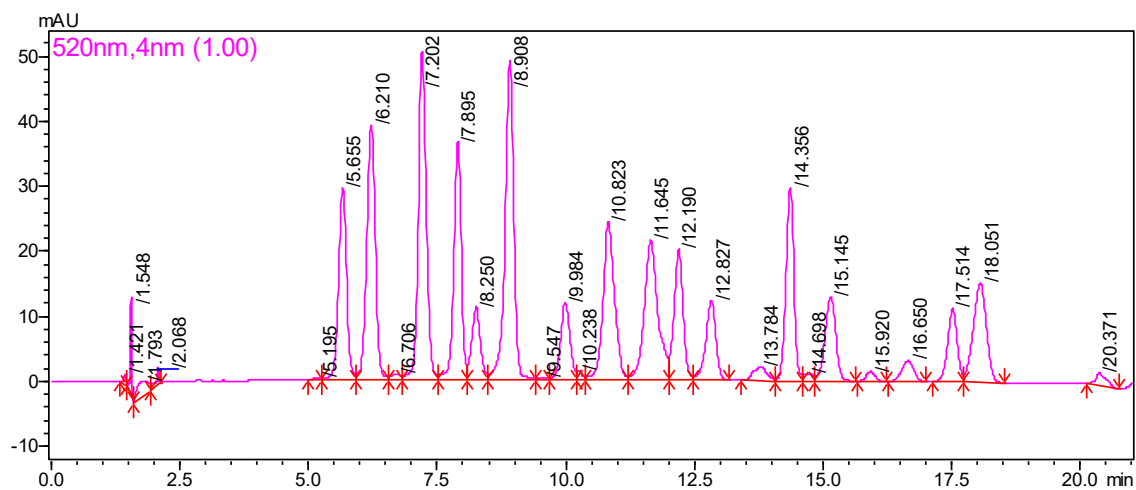
Obrázek 12 Chromatogram separace antokyanů pro gradient 03 - Ascentis® Express F5 (150 x 4,6 mm, 5 μm) s předkolonkou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm)

Za těchto podmínek bylo separováno 18-19 látek v prakticky stejném čase. K lepšímu rozlišení píků v čase kolem 11. minuty však nedocházelo.

## Gradient 04

Čas (min)	Mobilní fáze	
	ACN (%)	2 % HCOOH (%)
0.01	Start analýzy	
0.01	5	95
18.00	20	80
19.00	95	5
19.30	5	95
21.00	5	95
21.01	Kondicionace kolony	

Tabulka 16 Podmínky gradientu 04



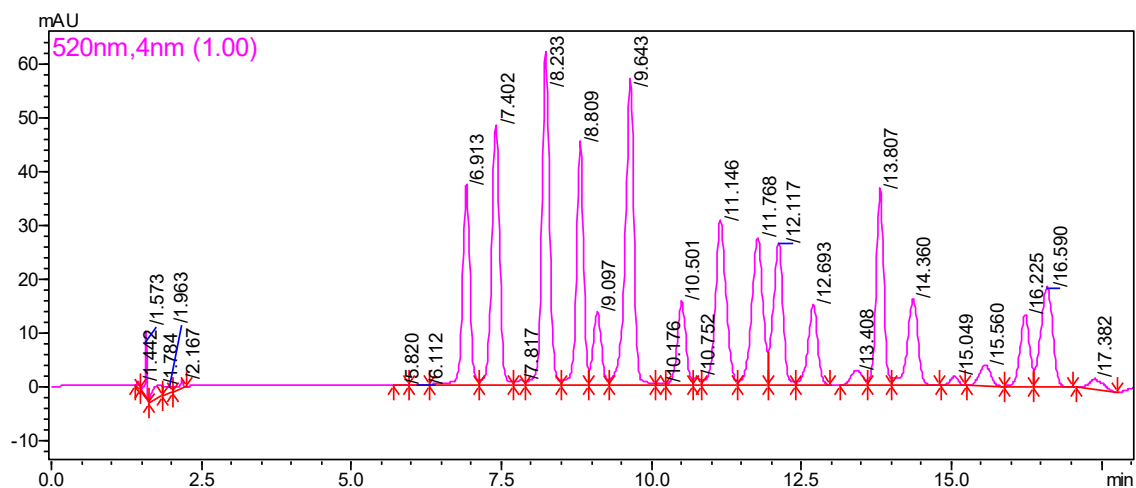
Obrázek 13 Chromatogram separace antokyanů pro gradient 04 - Ascentis® Express F5 (150 x 4,6 mm, 5 μm) s předkolonkou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm)

U tohoto gradientu byl testován pozvolnější lineární nárůst organické fáze. Za těchto podmínek bylo opět separováno 18-19 látek v delším čase. K lepšímu rozlišení píků v čase kolem 12. minuty však nedocházelo. Je pravděpodobné, že s píkem v čase 11,645 dochází ke koeluci dalšího antokyanu.

## Gradient 05

Čas (min)	Mobilní fáze	
	ACN (%)	2 % HCOOH (%)
0.01	Start analýzy	
0.01	3	97
15.00	20	80
16.00	95	5
16.30	5	95
18.00	5	95
18.01	Kondicionace kolony	

Tabulka 17 Podmínky gradientu 05



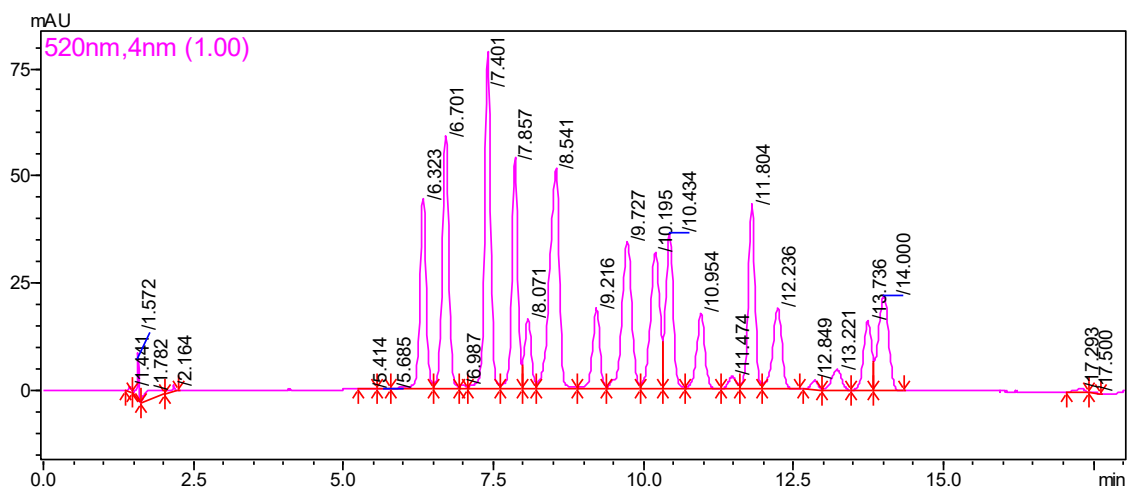
Obrázek 14 Chromatogram separace antokyanů pro gradient 05 - Ascentis® Express F5 (150 x 4,6 mm, 5 μm) s předkolonkou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm)

U tohoto gradientu byl testován nárůst organické fáze z nižší koncentrace (3 % vs. 5 % u předchozích gradientů). Za těchto podmínek bylo opět separováno 18-19 látek. K lepšímu rozlišení píků v čase kolem 12. minuty opět nedocházelo.

## Gradient 06

Mobilní fáze Čas (min)	ACN	2 % HCOOH
	(%)	(%)
0.01	Start analýzy	
0.01	3	97
15.00	25	75
16.00	95	5
16.30	5	95
18.00	5	95
18.01	Kondicionace kolony	

Tabulka 18 Podmínky gradientu 06



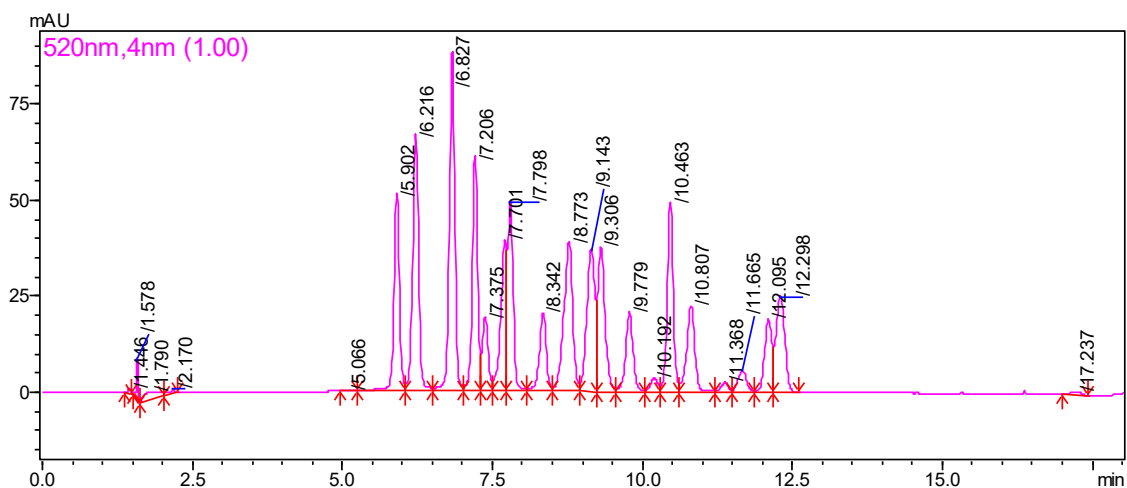
Obrázek 15 Chromatogram separace antokyanů pro gradient 06 - Ascentis® Express F5 (150 x 4,6 mm, 5 μm) s předkolumnou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm)

U tohoto gradientu byl testován lineární nárůst organické fáze do vyšší koncentrace acetonitrilu (25 % vs. 20 % předchozí). Za těchto podmínek docházelo ke zhoršení a urychlení separace.

## Gradient 07

Mobilní fáze Čas (min)	ACN	2 % HCOOH
	(%)	(%)
0.01	Start analýzy	
0.01	3	97
15.00	30	70
16.00	95	5
16.30	5	95
18.00	5	95
18.01	Kondicionace kolony	

Tabulka 19 Podmínky gradientu 07



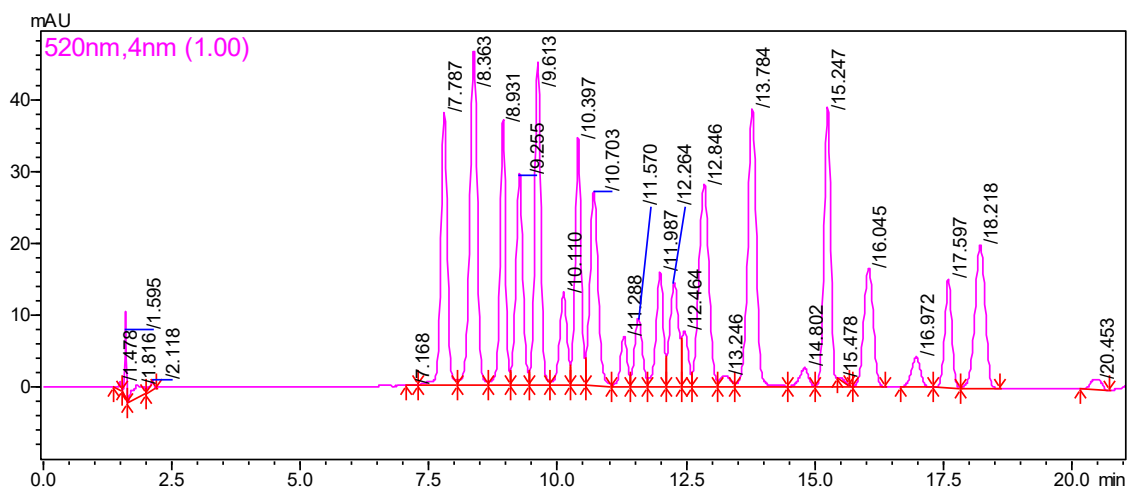
Obrázek 16 Chromatogram separace antokyanů pro gradient 07 - Ascentis® Express F5 (150 x 4,6 mm, 5 μm) s předkolonkou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm)

U tohoto gradientu bylo pouze potvrzeno, že lineární nárůst organické fáze do vyšší koncentrace acetonitrilu (25-30 %) je nevyhovující. Za těchto podmínek docházelo ke zhoršení, avšak značnému urychlení separace. Paradoxně však bylo zjištěno, že pík v čase 7,7 (na předchozích chromatogramech v pořadí vždy šestý) je pravděpodobně pík dvou koelujících látek.

## Gradient 08

Mobilní fáze Čas (min)	ACN	2 % HCOOH
	(%)	(%)
0.01	Start analýzy	
0.01	3	97
18.00	20	80
19.00	95	5
19.30	5	95
21.00	5	95
21.01	Kondicionace kolony	

Tabulka 20 Podmínky gradientu 08



Obrázek 17 Chromatogram separace antokyanů pro gradient 08 - Kinetex PFP

(150 x 4,6 mm, 2,6 μm) s předkolumnou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm)

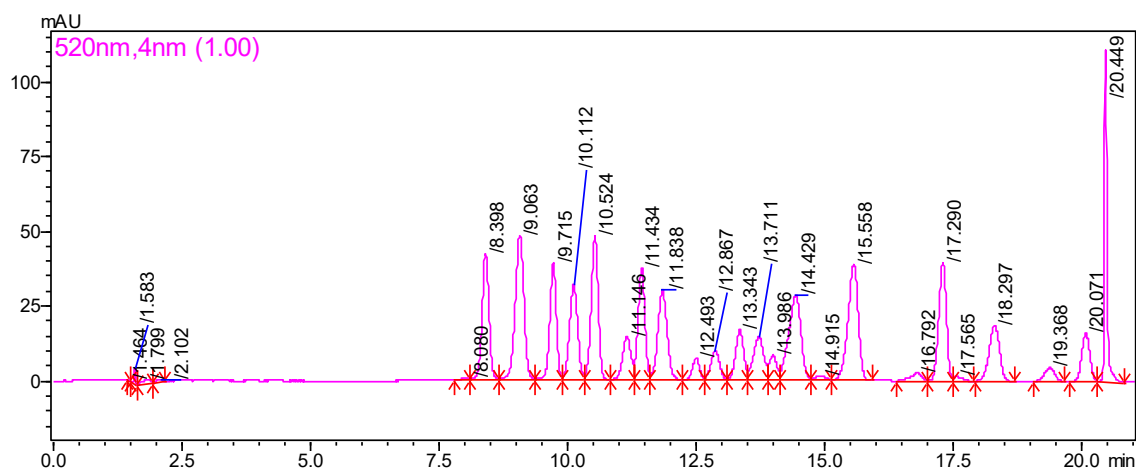
U této separace byla původní kolona Ascentis® Express F5 zaměněna za kolonu Kinetex PFP. Změnou kolony a velikosti částic byla dosažena podstatně lepší separace než na předchozí koloně a to v prakticky stejném čase. Byla zjištěna přítomnost 23-24 píků a potvrzena koeluce dvou píků u šestého píku na původní koloně. Také byly zaznamenány další koeluce zejména u píků kolem 12. minuty.



## Gradient 09

Čas (min)	Mobilní fáze	
	ACN (%)	2 % HCOOH (%)
0.01	Start analýzy	
0.01	3	97
18.00	17	83
19.00	95	5
19.30	3	97
21.00	3	97
21.31	Kondicionace kolony	

Tabulka 21 Podmínky gradientu 09



Obrázek 18 Chromatogram separace antokyanů pro gradient 09 - Kinetex PFP

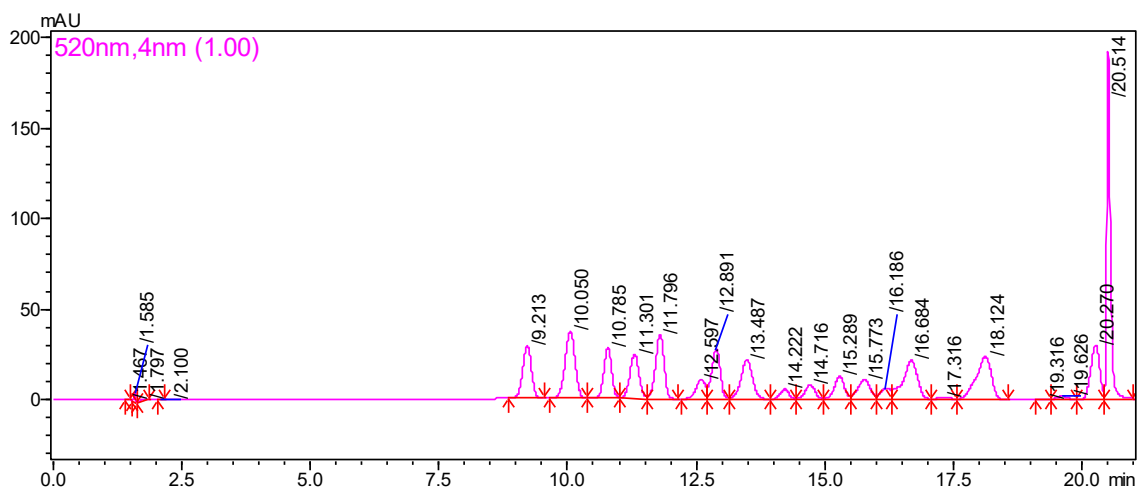
(150 x 4,6 mm, 2,6  $\mu$ m) s předkolonkou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m)

U tohoto gradientu byl testován lineární nárůst organické fáze do nižší koncentrace acetonitrilu (17 % vs. 20 % předchozí). Bylo opět separováno 23 píků. Za těchto podmínek docházelo k částečnému zlepšení rozlišení píků v čase 13,71-13,98 (předchozí 11,98-12,46) a také k mírnému zpomalení separace. Došlo také ke značnému zúžení posledního píku, což souvisí s vysokou koncentrací acetonitrilu, který v tomto čase začíná protékat kolonou. 24 pík již nebyl zaznamenán, protože se s největší pravděpodobností jednalo o systémový pík související s prudkou změnou fází na konci gradientu. Případně mohlo dojít ke koeluci.

## Gradient 10

Čas (min)	Mobilní fáze	
	ACN (%)	2 % HCOOH (%)
0.01	Start analýzy	
0.01	3	97
18.00	14	86
19.00	95	5
19.30	3	97
21.00	3	97
21.01	Kondicionace kolony	

Tabulka 22 Podmínky gradientu 10



Obrázek 19 Chromatogram separace antokyanů pro gradient 10 - Kinetex PFP

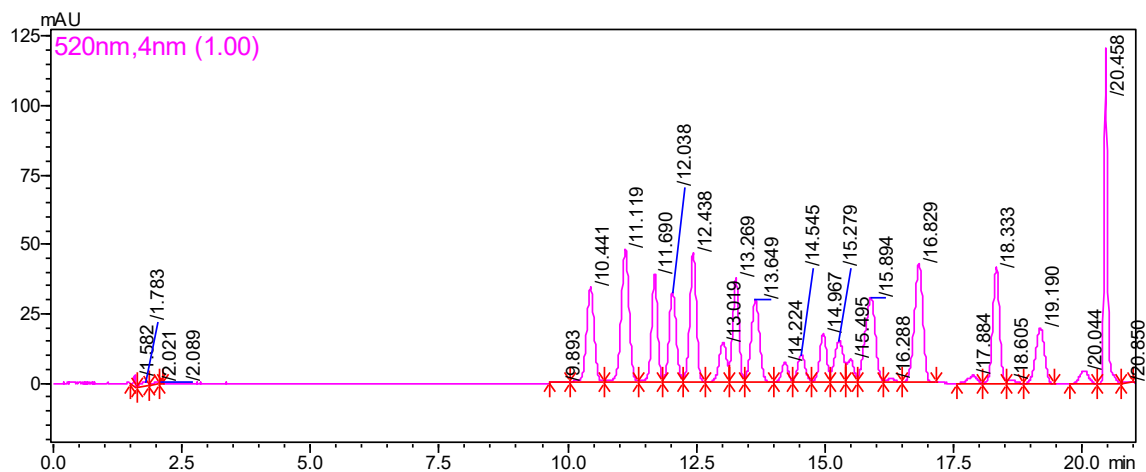
(150 x 4,6 mm, 2,6 μm) s předkolumnou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm)

U tohoto gradientu bylo testováno další snížení koncentrace acetonitrilu (14 % vs. 17 % předchozí) při lineárním nárůstu organické fáze. Docházelo však k výraznému rozmývání separovaných zón a bylo zaznamenáno pouze 19 piků. Další snížení organické fáze se tedy ukázalo jako nevhodné.

## Gradient 11

Mobilní fáze Čas (min)	ACN (%)	2 % HCOOH (%)
0.01	Start analýzy	
0.01	3	97
3.00	3	97
18.00	17	83
19.00	95	5
19.50	3	97
21.00	3	97
22.00	Kondicionace kolony	

Tabulka 23 Podmínky gradientu 11



Obrázek 20 Chromatogram separace antokyanů pro gradient 11 - Kinetex PFP

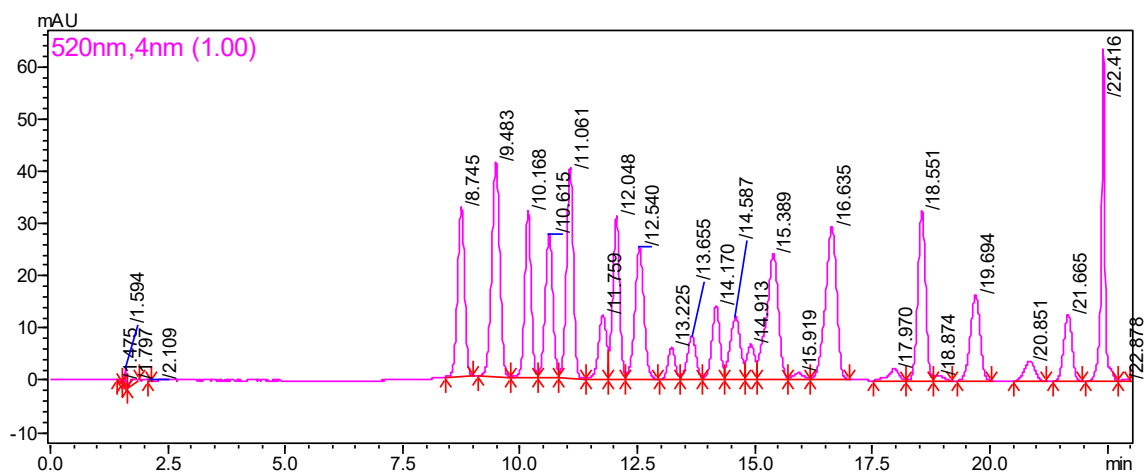
(150 x 4,6 mm, 2,6  $\mu$ m) s předkolumnou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m)

U tohoto gradientu bylo testováno zpoždění lineárního nárůstu organické fáze, kde vlastní lineární gradient začínal až ve třetí minutě po předchozí isokratické eluci 3 % acetonitrilu v mobilní fázi. Nebylo však zaznamenáno podstatné zlepšení separace, pouze docházelo k posunu retenčních časů píků na začátku chromatogramu.

## Gradient 12

Mobilní fáze Čas (min)	ACN	2 % HCOOH
	(%)	(%)
0.01	Start analýzy	
0.01	3	97
20.00	17	83
21.00	95	5
21.30	3	97
23.00	3	97
23.01	Kondicionace kolony	

Tabulka 24 Podmínky gradientu 12



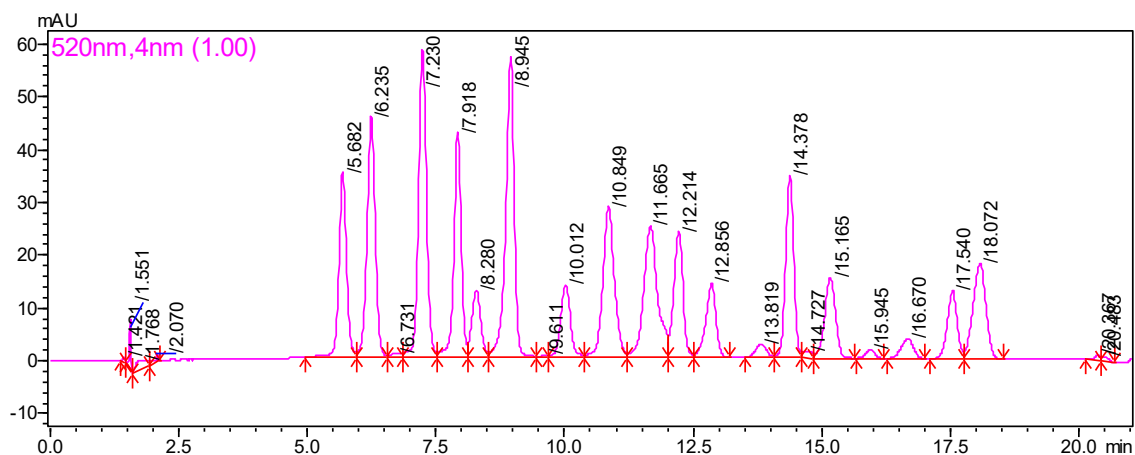
Obrázek 21 Chromatogram separace antokyanů pro gradient 12 - Kinetex PFP

(150 x 4,6 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ ) s předkolkou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )

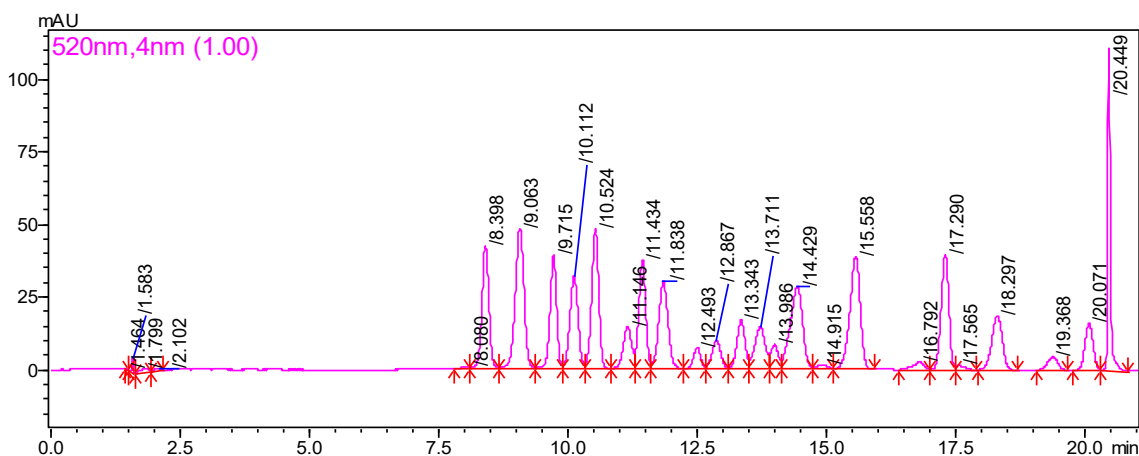
U tohoto gradientu bylo testováno prodloužení času lineárního nárůstu organické fáze (z 0. do 20. minuty vs. předchozí z 0. do 18. min.). V porovnání s gradientem č. 09 však nedocházelo k separaci více látek, ani k jejich lepšímu rozlišení a navíc se celkový čas analýzy prodloužil o dvě minuty

### 6.1.3 Výběr optimálního gradientu a kolony

Ze všech předchozích experimentů s gradientovou elucí na dvou dostupných kolonách byl pro srovnání učiněn stručný závěr. Dvě nejvhodnější možnosti pro danou kolonu a typ gradientu jsou pro srovnání uvedeny níže na dvou chromatogramech. Z důvodů lepší a rychlejší separace píků byla vybrána pro validaci metody kolona Kinetex PFP (150 x 4,6 mm, 2,6 µm)

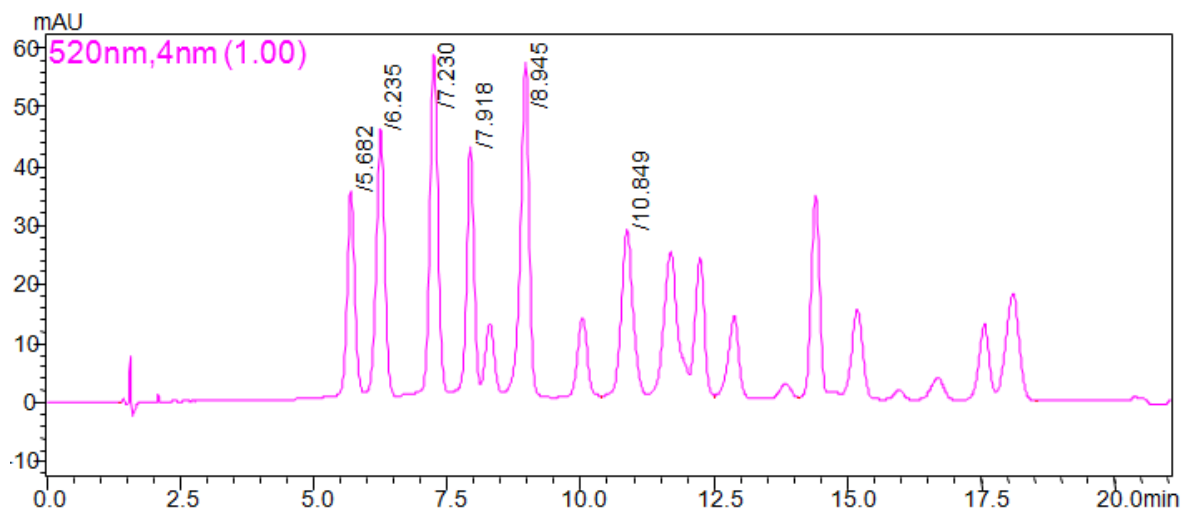


Obrázek 22 Podmínky separace: Ascentis® Express F5(150 x 4,6 mm, 5 µm)  
s předkolonkou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 µm), gradient 04



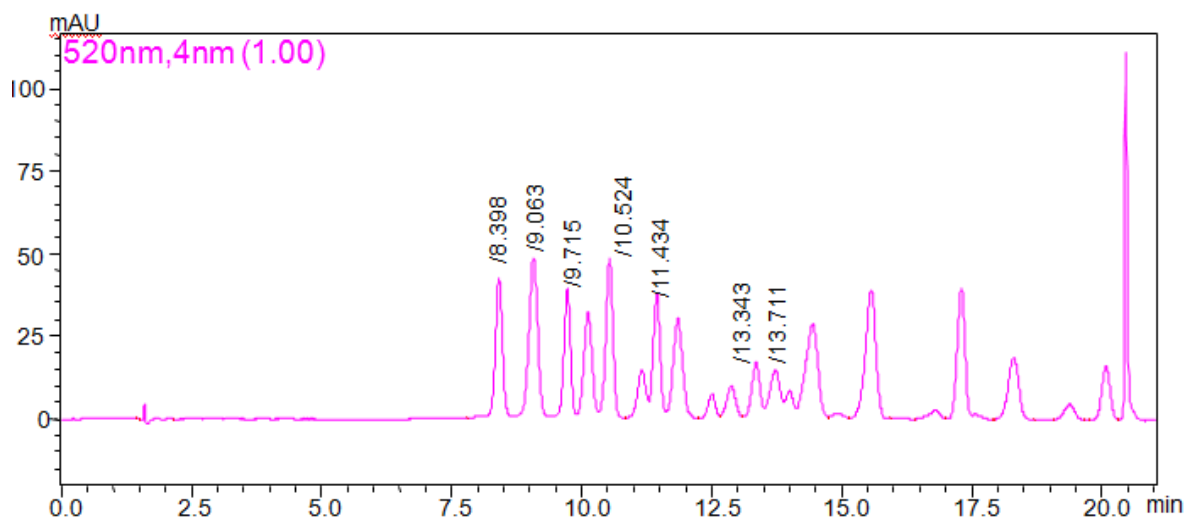
Obrázek 23 Podmínky separace: Kinetex PFP (150 x 4,6 mm, 2,6 µm) s předkolonkou  
Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 µm), gradient 09

Identifikace stanovovaných antokyanů na kolonách Ascentis a Kinetex:



Obrázek 24 Ascentis® Express F5(150 x 4,6 mm, 5 µm) s předkolonkou  
Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 µm), gradient 04

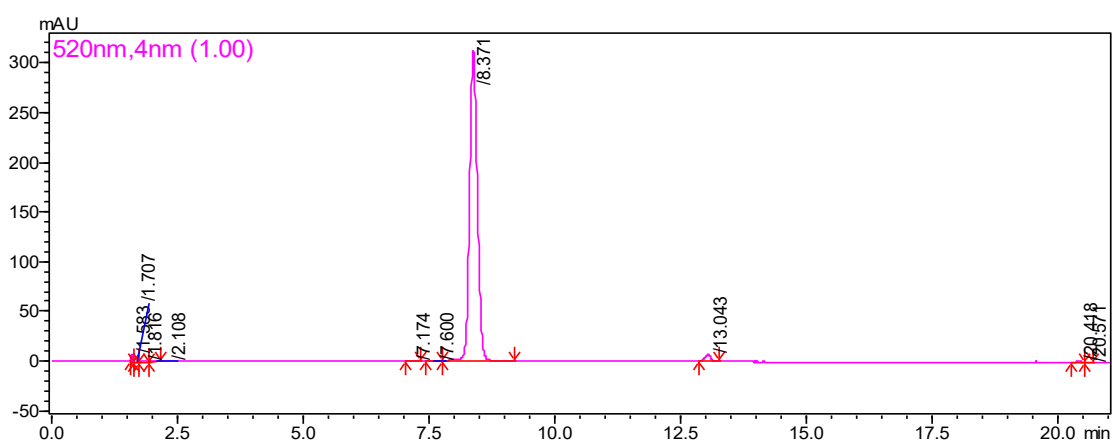
Retenční čas pro delfinidin-3-O-galaktosid byl 5,598 min., delfinidin-3-O-glukosid-6,187 min., kyanidin-3-O-galaktosid-7,157 min., kyanidin-3-O-glukosid-7,847 min., kyanidin-3-O-arabinosid-8,878 min., peonidin-3-O-glukosid-10,738 min. a malvidin-3-O-galaktosid-10,868 min. U kolony Ascentis byl problém s rozlišením 9. a 10. píku, tedy peonidin-3-glukosidu a malvidin-3-galaktosidu kvůli velmi blízkým retenčním časům.



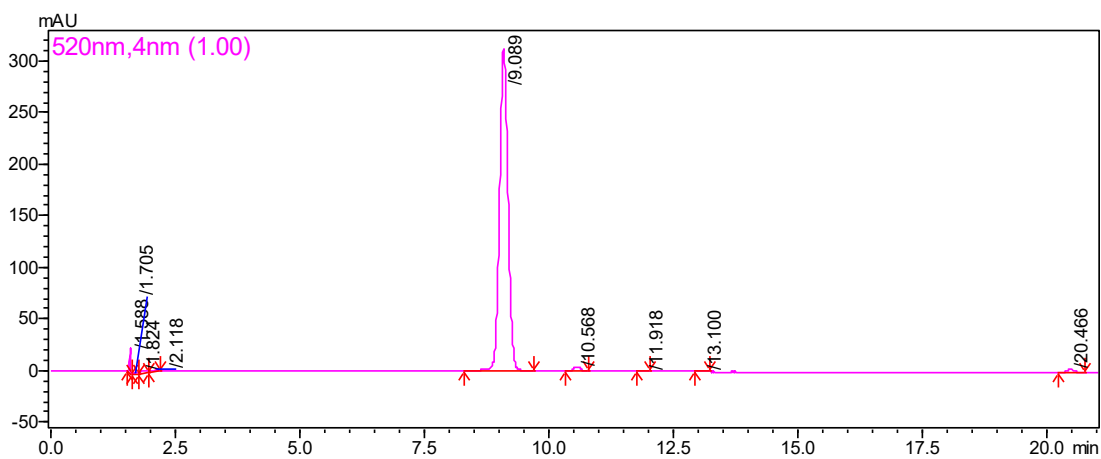
Obrázek 25: Kinetex PFP (150 x 4,6 mm, 2,6 µm) s předkolonkou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 µm), gradient 09

Retenční čas pro delfinidin-3-O-galaktosid byl 8,371 min., delfinidin-3-O-glukosid-9,089 min., kyanidin-3-O-galaktosid-9,630 min., kyanidin-3-O-glukosid-10,525 min., kyanidin-3-O-arabinosid-11,390 min., peonidin-3-O-glukosid-13,241 min. a malvidin-3-O-galaktosid-13,651 min.

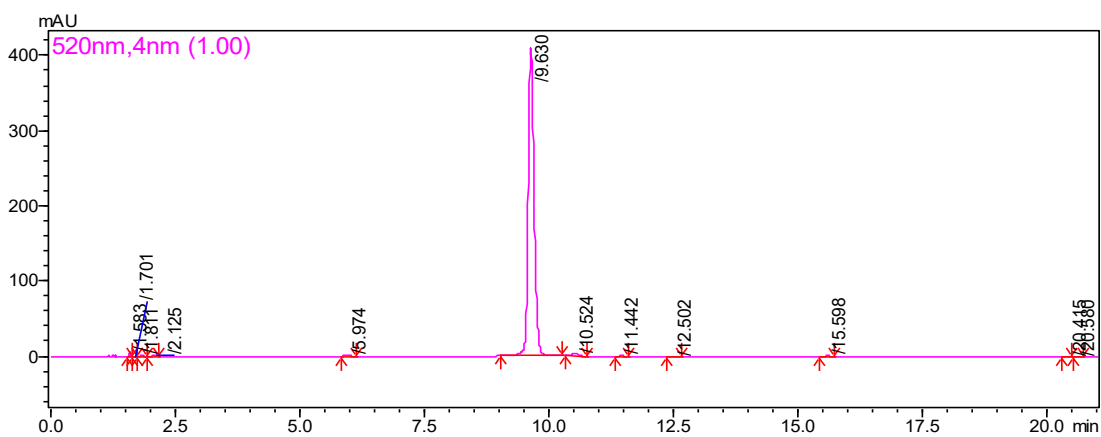
### 6.1.3.1 Chromatogramy stanovení jednotlivých standardů antokyanů na koloně Kinetex PFP, gradient 09



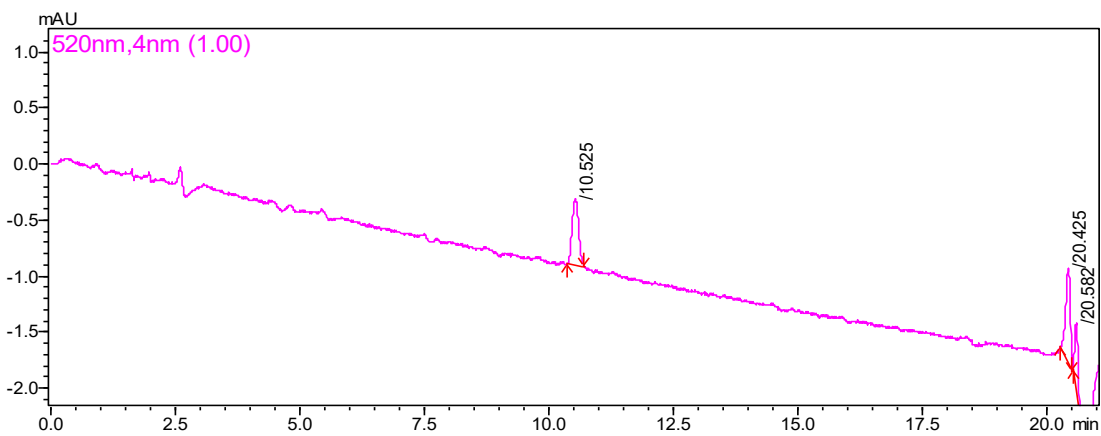
Obrázek 26 Stanovení delfinidin-3-O-galaktosidu – retenční čas- 8,371 min.



Obrázek 27 Stanovení delphinidin-3-O-glukosidu – retenční čas-9,089 min.

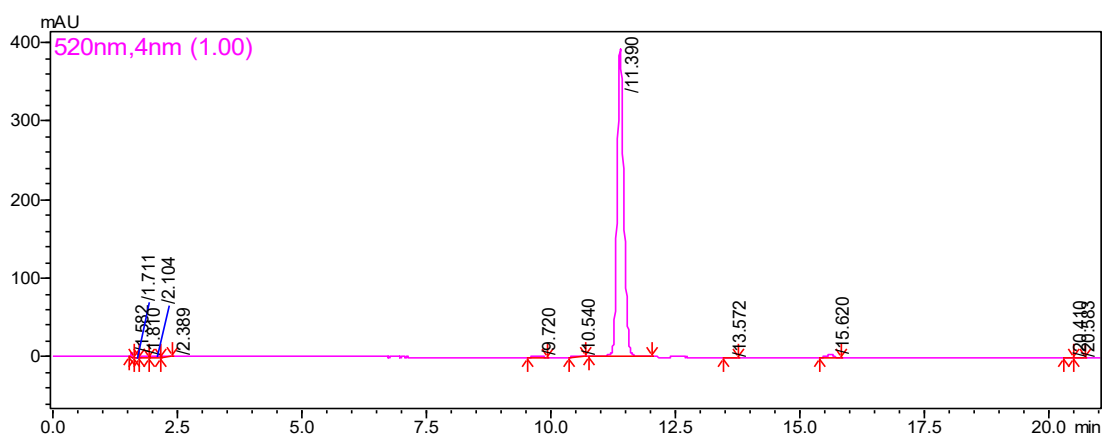


Obrázek 28 Stanovení kyanidinu-3-O-galaktosidu – retenční čas-9,630 min.

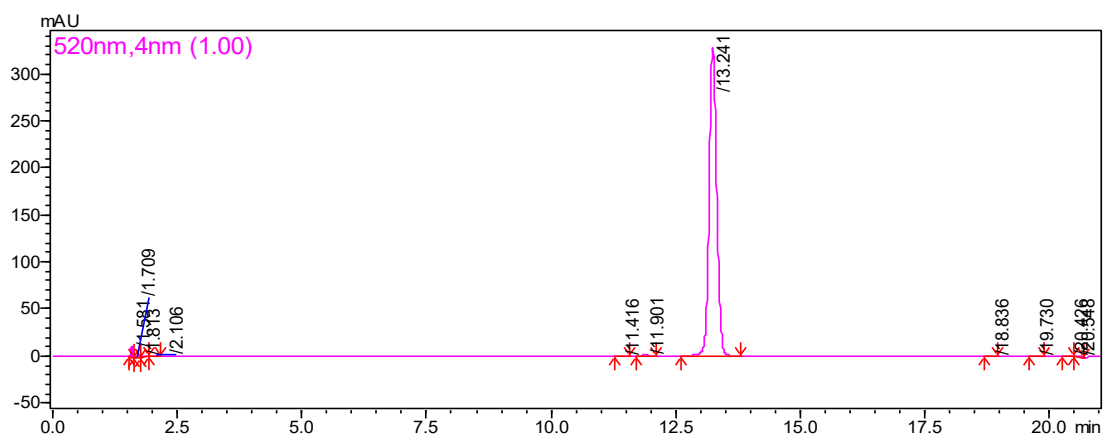


Obrázek 29 Stanovení pro kyanidinu-3-O-glukosidu – retenční čas 10,525 min.

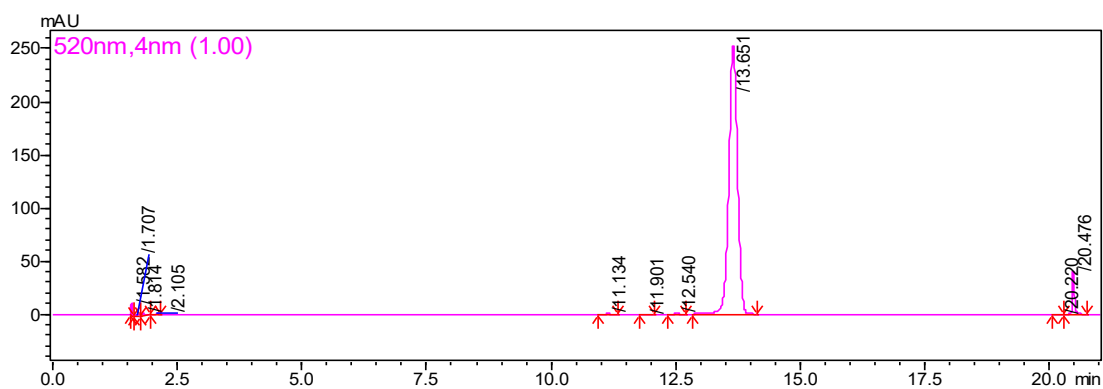




Obrázek 30 Stanovení kyanidinu-3-O-arabosidu – retenční čas-11,390 min.



Obrázek 31 Stanovení peonidinu-3-O-glukosidu – retenční čas-13,241 min.



Obrázek 32 Stanovení pro malvidin-3-O-galaktosidu – retenční čas-13,651 min.

#### 6.1.4 Souhrn optimálních podmínek pro HPLC analýzu

<b>Kolona</b>	Kinetex PFP (150 x 4,6 mm, 2,6 $\mu$ m)		
<b>Předkolona</b>	Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m)		
<b>Detekce</b>	520 nm		
<b>Rychlost průtoku mobilní fáze</b>	1 ml/min		
<b>Dávkovaný objem</b>	5 $\mu$ l		
<b>Mobilní fáze</b>	organická fáze: ACN, vodná fáze: 2 % HCOOH		
<b>Teplota</b>	50°C		
<b>Gradientová eluce:</b>	Gradient 09		
	mobilní fáze	ACN (%)	2 % HCOOH (%)
	čas (min)		
	0.01	Start analýzy	
	0.01	3	97
	18.00	17	83
	19.00	95	5
	19.30	3	97
	21.00	3	97
	21.31	Kondicionace kolony	

Tabulka 25 Shrnutí optimálních podmínek pro analýzu

## 6.2 Validace analytické metody

### 6.2.1 Test vhodnosti chromatografického systému

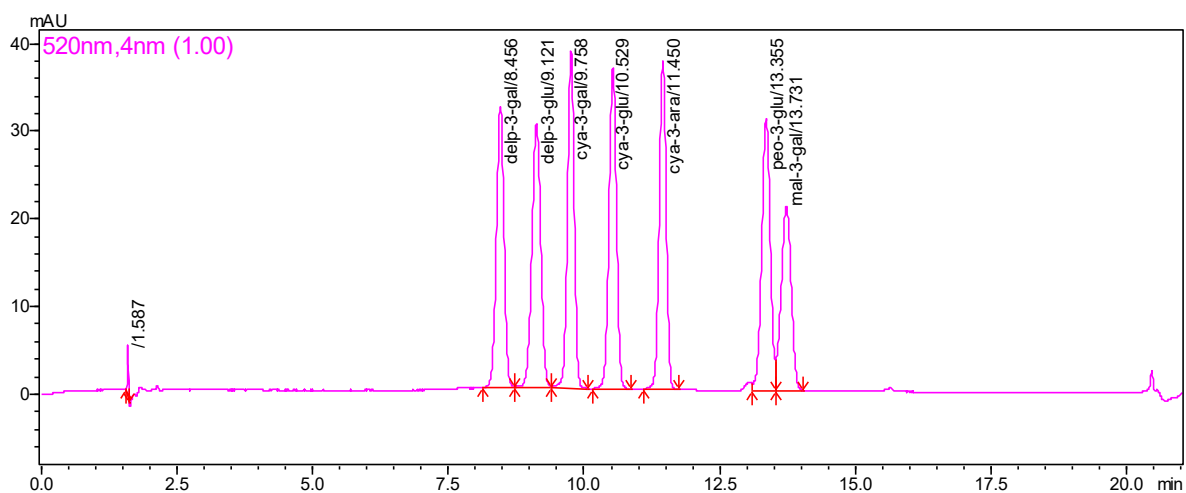
Ke stanovení vhodnosti chromatografického systému byl použit pracovní roztok pro kalibraci o koncentraci 10 mg/l, příprava viz 5.2.3.

Při testu vhodnosti chromatografického systému se hodnotil retenční čas ( $t_r$ ), rozlišení chromatografických píků ( $R_s$ ), kapacitní faktor ( $k$ ), faktor symetrie chromatografických píků ( $A_s$ ).

antokyan	$t_r$ (min)	$R_s$	$k$	$A_s$
delp-3-gal	8,456	44,939	4,328	0,973
delp-3-glu	9,121	2,350	4,747	0,970
cya-3-gal	9,758	2,372	5,149	0,978
cya-3-glu	10,529	3,147	5,634	0,994
cya-3-ara	11,450	3,686	6,214	0,999
peo-3-glu	13,355	7,164	7,415	--
mal-3-gal	13,731	1,166	7,651	--

Tabulka 26 Parametry testu vhodnosti chromatografického systému

Rozlišení chromatografických pík je, kromě malvidin-3-O-galaktosidu u ostatních zkoušených antokyanů větší než 1,5, tedy splňuje doporučený limit. Kapacitní faktor vyjadřuje míru sorpce analytu na koloně. Faktor symetrie chromatografických pík je v rozmezí hodnot 0,9 (nepatrné frontování) až 1,5 (mírné chvostování). Na Obrázek 33 je viditelné neúplné rozdělení peonidin-3-O-glukosidu a malvidin-3-O-galaktosidu, kvůli kterému nelze určit faktor symetrie těchto chromatografických pík.



Obrázek 33 Chromatogram směsi standardů při koncentraci 10 mg/l

### **6.2.2 Linearita**

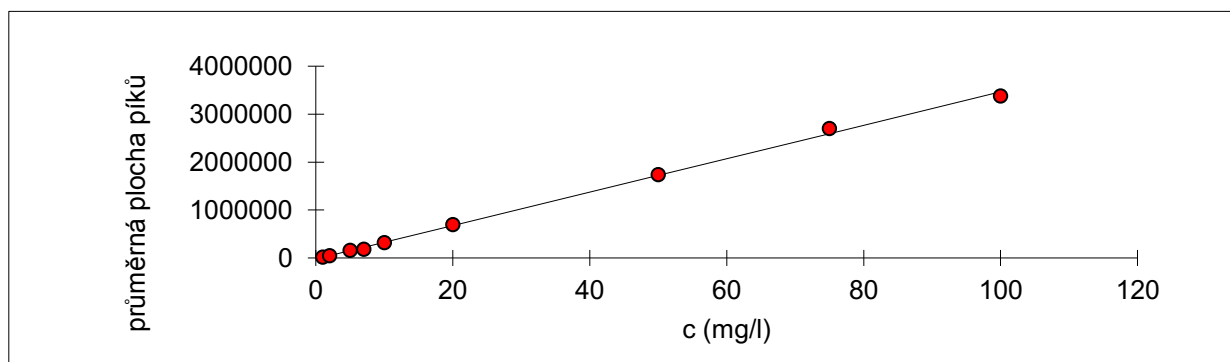
Pro stanovení linearity bylo použito 8 kalibračních roztoků o různých koncentracích (1-100 mg/l) Příprava těchto roztoků je popsána v kapitole 5.2.2 a 5.2.3. Z každého kalibračního roztoku byly provedeny 3 nástřiky na kolonu, z nichž byla stanovena průměrná hodnota plochy píku pro každou z koncentrací.

K vyhodnocení závislosti průměrných ploch píků kalibračních roztoků na jejich koncentraci byla použita metoda lineární regrese.

### 6.2.2.1 Kalibrační závislost pro delfinidin-3-O-galaktosid

Koncentrace (mg/l)	Plocha píku
1	15399
2	44913
5	156776
7	179272
10	317366
20	694105
50	1736377
75	2698993
100	3377379

Tabulka 27 Test linearity pro delfinidin-3-O-galaktosid



Graf 1 Kalibrační závislost pro delfinidin-3-O-galaktosid

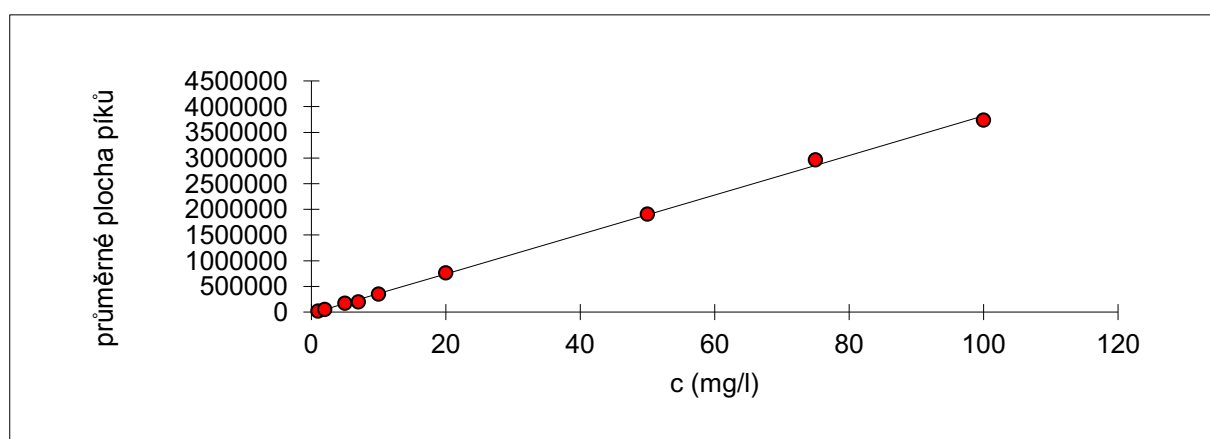
Statistické parametry pro regresi: $y = k x + q$				
Počet bodů	n =	9	Odhad chyby	
Směrnice	k =	34851	±	536
Abs. člen	q =	-21031	±	24465
Korelační koef.	r =	0,9992		
Reziduální odch.	s =	55265		

Tabulka 28 Parametry lineární regrese pro delfinidin-3-O-galaktosid

### 6.2.2.2 Kalibrační závislost pro delfinidin-3-O-glukosid

Koncentrace (mg/l)	Plocha píku
1	17069
2	49032
5	170055
7	195861
10	348204
20	761135
50	1905803
75	2962871
100	3737000

Tabulka 29 Test linearity pro delfinidin-3-O-glukosid



Graf 2 Kalibrační závislost pro delfinidin-3-O-glukosid

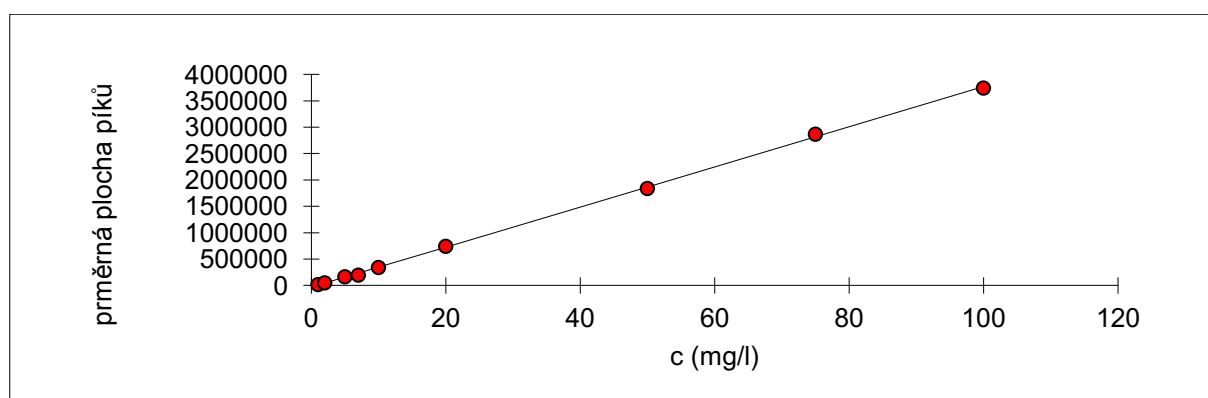
Statistické parametry pro regresi: $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	9	Odhad chyby
Směrnice	k =	38460	± 526
Abs. člen	q =	-26368	± 23998
Korelační koef.	r =	0,9993	
Reziduální odch.	s =	54208	

Tabulka 30 Parametry lineární regrese pro delfinidin-3-O-glukosid

### 6.2.2.3 Kalibrační závislost pro kyanidin-3-O-galaktosid

Koncentrace (mg/l)	Plocha píku
1	17992
2	50369
5	165791
7	197051
10	341668
20	743102
50	1839601
75	2868935
100	3743470

Tabulka 31 Test linearity pro kyanidin-3-O-galaktosid



Graf 3 Kalibrační závislost pro kyanidin-3-O-galaktosid

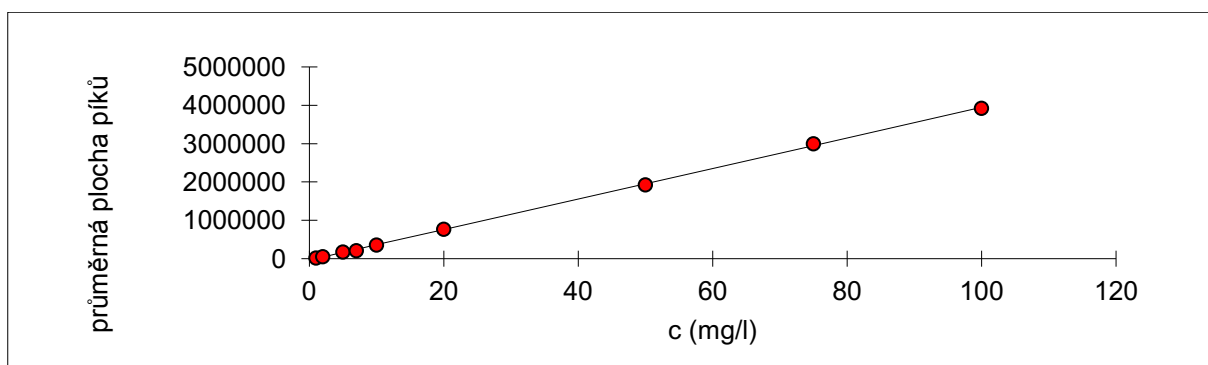
Statistické parametry pro regresi: $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	9	Odhad chyby
Směrnice	k =	38010	± 281
Abs. člen	q =	-32762	± 12828
Korelační koef.	r =	0,9998	
Reziduální odch.	s =	28978	

Tabulka 32 Parametry lineární regrese pro kyanidin-3-O-galaktosid

#### 6.2.2.4 Kalibrační závislost pro kyanidin-3-O-glukosid

Koncentrace (mg/l)	Plocha píku
1	18908
2	53213
5	175498
7	209396
10	357238
20	769051
50	1926758
75	2998408
100	3923867

Tabulka 33 Test linearity pro kyanidin-3-O-glukosid



Graf 4 Kalibrační závislost pro kyanidin-3-O-glukosid

Statistické parametry pro regresi: $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	9	Odhad chyby
Směrnice	k =	39801	± 266
Abs. člen	q =	-34902	± 12136
Korelační koef.	r =	0,9998	
Reziduální odch.	s =	27414	

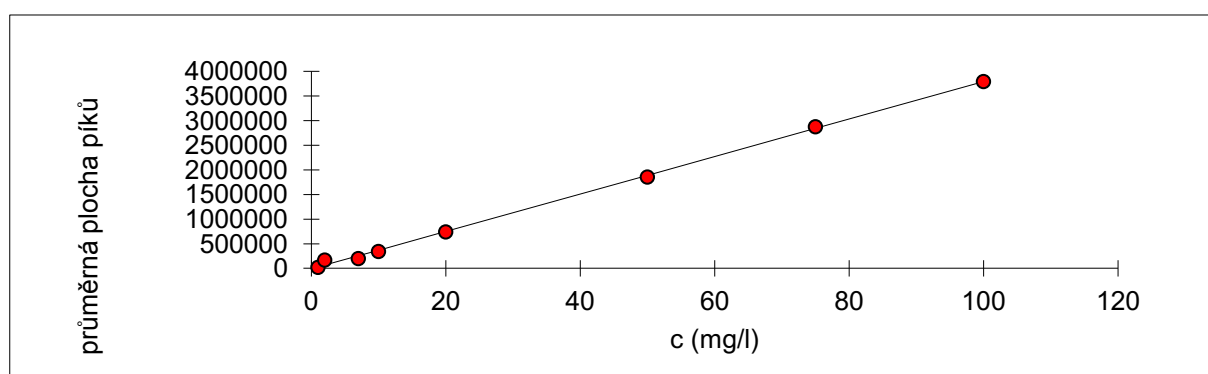
Tabulka 34 Parametry lineární regrese pro kyanidin-3-O-glukosid



### 6.2.2.5 Kalibrační závislost pro kyanidin-3-O-arabinosid

Koncentrace (mg/l)	Plocha píku
1	20352
2	50502
5	168455
7	198871
10	342546
20	739672
50	1853495
75	2874446
100	3792042

Tabulka 35 Test linearity pro kyanidin-3-O-arabinosid



Graf 5 Kalibrační závislost pro kyanidin-3-O-arabinosid

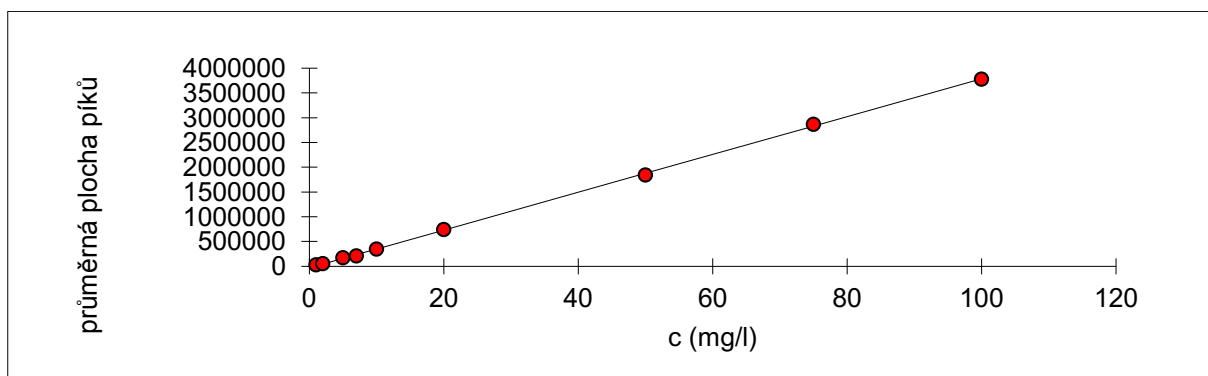
Statistické parametry pro regresi: $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby
Směrnice	k =	38028	± 538
Abs. člen	q =	-10960	± 25996
Korelační koef.	r =	0,9994	
Reziduální odch.	s =	53533	

Tabulka 36 Parametry lineární regrese pro kyanidin-3-O-arabinosid

### 6.2.2.6 Kalibrační závislost pro peonidin-3-O-glukosid

Koncentrace (mg/l)	Plocha píku
1	27056
2	51324
5	170285
7	207360
10	345204
20	739520
50	1840713
75	2863766
100	3775458

Tabulka 37 Test linearity pro peonidin-3-O-glukosid



Graf 6 Kalibrační závislost pro peonidin-3-O-glukosid

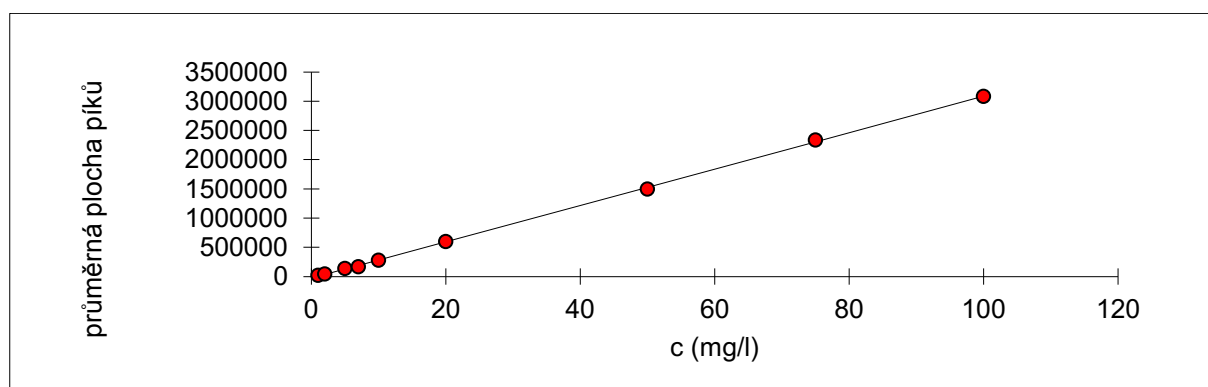
Statistické parametry pro regresi: $y = kx + q$			
Počet bodů	n =	9	Odhad chyby
Směrnice	k =	38138	± 230
Abs. člen	q =	-30739	± 10485
Korelační koef.	r =	0,9999	
Reziduální odch.	s =	23684	

Tabulka 38 Parametry lineární regrese pro peonidin-3-O-glukosid

### 6.2.2.7 Kalibrační závislost pro malvidin-3-O-galaktosid

Koncentrace (mg/l)	Plocha píku
1	19311
2	41971
5	136638
7	166007
10	277504
20	597121
50	1494755
75	2334133
100	3081178

Tabulka 39 Test linearit y pro malvidin-3-O-galaktosid



Graf 7 Kalibrační závislost pro malvidin-3-O-galaktosid

Statistické parametry pro regresi: $y = kx + q$			
Počet bodů	n =	9	Odhad chyby
Směrnice	k =	31131	± 198
Abs. člen	q =	-28555	± 9032
Korelační koef.	r =	0,9999	
Reziduální odch.	s =	20403	

Tabulka 40 Parametry lineární regrese pro malvidin-3-O-galaktosid

### 6.2.3 Opakovatelnost

Pro stanovení opakovatelnosti byly použity 3 roztoky o různých koncentracích. Příprava těchto roztoků je popsána v kapitole 5.2.5. Z každého kalibračního roztoku bylo provedeno 8 nástřiků na kolonu, z nichž byla stanovena průměrná hodnota plochy píku pro každou z koncentrací. Z těchto ploch byly následně spočítány směrodatné odchylky.

<b>100 mg/l</b>	<b>PRŮMĚR</b>	<b>SD</b>	<b>RSD (%)</b>
delp-3-gal	3288371	14402	0,44
delp-3-glu	3622104	20543	0,57
cya-3-gal	3516145	33099	0,94
cya-3-glu	3673029	26344	0,72
cya-3-ara	3518193	13599	0,39
peo-3-glu	3504425	16377	0,47
mal-3-gal	2852235	11301	0,40

Tabulka 41 Stanovení opakovatelnosti pro roztoky o koncentraci 100 mg/l

Relativní směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí 0,39-0,94 %. U žádného ze zkoušených roztoků nebyla RSD >1 %.

<b>20 mg/l</b>	<b>PRŮMĚR</b>	<b>SD</b>	<b>RSD (%)</b>
delp-3-gal	661335	1569	0,24
delp-3-glu	729450	4430	0,61
cya-3-gal	710403	1630	0,23
cya-3-glu	744105	5037	0,68
cya-3-ara	715114	3554	0,50
peo-3-glu	715050	1481	0,21
mal-3-gal	574355	1842	0,32

Tabulka 42 Stanovení opakovatelnosti pro roztoky o koncentraci 20 mg/l

Relativní směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí 0,21-0,68 %. U žádného ze zkoušených roztoků nebyla RSD >1 %.

<b>5 mg/l</b>	<b>PRŮMĚR</b>	<b>SD</b>	<b>RSD (%)</b>
delp-3-gal	163480	932	0,57
delp-3-glu	180365	1659	0,92
cya-3-gal	184893	1515	0,82
cya-3-glu	195491	1451	0,74
cya-3-ara	190465	1867	0,98
peo-3-glu	200590	1056	0,53
mal-3-gal	157519	442	0,28

Tabulka 43 Stanovení opakovatelnosti pro roztoky o koncentraci 5 mg/l

Relativní směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí 0,28-0,92 %. U žádného ze zkoušených roztoků nebyla RSD >1 %.

#### **6.2.4 Přesnost**

Pro stanovení přesnosti bylo použito 8 roztoků. Příprava těchto roztoků je popsána v kapitole 5.2.6. Z každého roztoku byly provedeny 3 nástřiky na kolonu, z kterých byla následně stanovena průměrná hodnota plochy píku pro každý z roztoků. Tato průměrná hodnota byla přepočtena na stejnou navážku 5,000 g borůvek. Z těchto ploch byly následně spočítány směrodatné odchylky. Přesnost byla stanovena jako hodnota RSD (%).

6.2.4.1 Stanovení přesnosti pro delfinidin-3-O-galaktosid

<b>PŘESNOST</b>		<b>delfinidin-3-O-galaktosid</b>
<b>Průměry ploch píků</b>	1	264326
	2	258075
	3	257646
	4	252769
	5	251936
	6	254711
	7	251545
	8	244939
<b>Průměr</b>		254493
<b>SD</b>		5719
<b>RSD (%)</b>		<b>2,25</b>

Tabulka 44 Stanovení přesnosti pro delfinidin-3-O-galaktosid

6.2.4.2 Stanovení přesnosti pro delfinidin-3-O-glukosid

<b>PŘESNOST</b>		<b>delfinidin-3-O-glukosid</b>
<b>Průměry ploch píků</b>	1	363010
	2	351249
	3	352668
	4	347441
	5	346703
	6	349361
	7	344092
	8	339012
<b>Průměr</b>		349192
<b>SD</b>		7032
<b>RSD (%)</b>		<b>2,01</b>

Tabulka 45 Stanovení přesnosti pro delfinidin-3-O-glukosid

6.2.4.3 Stanovení přesnosti pro kyanidin-3-O-galaktosid

<b>PŘESNOST</b>		<b>kyanidin-3-O-galaktosid</b>
<b>Průměry ploch píků</b>	1	224761
	2	218731
	3	219410
	4	213705
	5	215288
	6	217164
	7	214788
	8	212693
<b>Průměr</b>		217067
<b>SD</b>		3896
<b>RSD (%)</b>		<b>1,79</b>

Tabulka 46 Stanovení přesnosti pro kyanidin-3-O-galaktosid

6.2.4.4 Stanovení přesnosti pro kyanidin-3-O-glukosid

<b>PŘESNOST</b>		<b>kyanidin-3-O-glukosid</b>
<b>Průměry ploch píků</b>	1	277092
	2	270772
	3	270549
	4	266172
	5	267780
	6	268426
	7	267577
	8	264703
<b>Průměr</b>		269134
<b>SD</b>		3802
<b>RSD (%)</b>		<b>1,41</b>

Tabulka 47 Stanovení přesnosti pro kyanidin-3-O-glukosid

6.2.4.5 Stanovení přesnosti pro kyanidin-3-O-arabinosid

<b>PŘESNOST</b>		<b>kyanidin-3-O-arabinosid</b>
<b>Průměry ploch píků</b>	1	223860
	2	224094
	3	222487
	4	224936
	5	220061
	6	218933
	7	222450
	8	215007
<b>Průměr</b>		221478
<b>SD</b>		3312
<b>RSD (%)</b>		<b>1,50</b>

Tabulka 48 Stanovení přesnosti pro kyanidin-3-O-arabinosid

6.2.4.6 Stanovení přesnosti pro peonidin-3-O-glukosid

<b>PŘESNOST</b>		<b>peonidin-3-O-glukosid</b>
<b>Průměry ploch píků</b>	1	110774
	2	112512
	3	118072
	4	116633
	5	114597
	6	113818
	7	113475
	8	111990
<b>Průměr</b>		113984
<b>SD</b>		2416
<b>RSD (%)</b>		<b>2,12</b>

Tabulka 49 Stanovení přesnosti pro peonidin-3-O-glukosid



#### 6.2.4.7 Stanovení přesnosti pro malvidin-3-O-galaktosid

PŘESNOST		malvidin-3-O-galaktosid
Průměry ploch píků	1	123352
	2	123591
	3	128821
	4	126192
	5	124660
	6	123776
	7	123866
	8	122701
Průměr		124620
SD		1991
RSD (%)		1,60

Tabulka 50 Stanovení přesnosti pro malvidin-3-O-galaktosid

Výsledky přesnosti jsou vyhovující, hodnota RSD je u všech standardů <5 %.

#### 6.2.5 Výtěžnost

Pro vyhodnocení výtěžnosti byla použita metoda standardního přídávku. Výtěžnost byla získána z připravených roztoků pro výtěžnost, jejichž postup přípravy je popsán v kapitolách 5.2.7 a 5.2.8. U každého z 9 roztoků pro výtěžnost (obsahujících buď vzorek, nebo vzorek i standard) byly provedeny 2 nástřiky na kolonu, z nichž byla poté stanovena průměrná hodnota plochy píku. Tato průměrná hodnota byla přepočtena na navážku 0,400 g vzorku borůvek. Následně byly provedeny 2 nástřiky na kolonu z dvou roztoků standardů pro výtěžnost, z nichž byla poté stanovena průměrná hodnota velikosti plochy píku jednotlivých antokyanů.

Pro výpočet výtěžnosti, která je uvedena v % byl použit následovný vzorec:

$$\text{výtěžnost (\%)} = \frac{A_{vz+st} - A_{vz}}{A_{st}} * 100$$

$A_{vz+st}$  je průměrná plocha píků roztoků vzorku s přídávkem standardu (6 navážek),  $A_{vz}$  je průměrná plocha píků roztoků vzorku (první 3 navážky),  $A_{st}$  je průměrná plocha píků roztoku standardu.

6.2.5.1 Stanovení výtěžnosti pro delfinidin-3-O-galaktosid

<b>VÝTĚŽNOST</b>		<b>delfinidin-3-O-galaktosid</b>
<b>Hodnoty výtěžnosti (%)</b>	1	94,40
	2	98,63
	3	104,83
	4	99,59
	5	101,12
	6	97,68
<b>Průměr (%)</b>		<b>99,37</b>
<b>SD</b>		3,49
<b>RSD (%)</b>		3,52

Tabulka 51 Stanovení výtěžnosti pro delfinidin-3-O-galaktosid

6.2.5.2 Stanovení výtěžnosti pro delfinidin-3-O-glukosid

<b>VÝTĚŽNOST</b>		<b>delfinidin-3-O-glukosid</b>
<b>Hodnoty výtěžnosti (%)</b>	1	95,14
	2	100,39
	3	110,19
	4	101,74
	5	105,35
	6	98,96
<b>Průměr (%)</b>		<b>101,96</b>
<b>SD</b>		5,24
<b>RSD (%)</b>		5,14

Tabulka 52 Stanovení výtěžnosti pro delfinidin-3-O-glukosid

6.2.5.3 Stanovení výtěžnosti pro kyanidin-3-O-galaktosid

<b>VÝTĚŽNOST</b>		<b>kyanidin-3-O-galaktosid</b>
<b>Hodnoty výtěžnosti (%)</b>	1	96,22
	2	97,64
	3	102,14
	4	98,83
	5	100,18
	6	95,96
<b>Průměr (%)</b>		<b>98,50</b>
<b>SD</b>		2,39
<b>RSD (%)</b>		2,43

Tabulka 53 Stanovení výtěžnosti pro kyanidin-3-O-galaktosid

6.2.5.4 Stanovení výtěžnosti pro kyanidin-3-O-glukosid

<b>VÝTĚŽNOST</b>		<b>kyanidin-3-O-glukosid</b>
<b>Hodnoty výtěžnosti (%)</b>	1	94,86
	2	98,65
	3	104,64
	4	97,66
	5	99,61
	6	94,71
<b>Průměr (%)</b>		<b>98,35</b>
<b>SD</b>		3,66
<b>RSD (%)</b>		3,72

Tabulka 54 Stanovení výtěžnosti pro kyanidin-3-O-glukosid

6.2.5.5 Stanovení výtěžnosti pro kyanidin-3-O-arabinosid

<b>VÝTĚŽNOST</b>		<b>kyanidin-3-O-arabinosid</b>
<b>Hodnoty výtěžnosti (%)</b>	1	94,96
	2	98,26
	3	101,24
	4	97,09
	5	97,80
	6	93,78
<b>Průměr (%)</b>		<b>97,19</b>
<b>SD</b>		2,63
<b>RSD (%)</b>		2,70

Tabulka 55 Stanovení výtěžnosti pro kyanidin-3-O-arabinosid

6.2.5.6 Stanovení výtěžnosti pro peonidin-3-O-glukosid

<b>VÝTĚŽNOST</b>		<b>peonidin-3-O-glukosid</b>
<b>Hodnoty výtěžnosti (%)</b>	1	93,97
	2	95,00
	3	96,35
	4	93,05
	5	94,75
	6	90,08
<b>Průměr (%)</b>		<b>93,87</b>
<b>SD</b>		2,15
<b>RSD (%)</b>		2,30

Tabulka 56 Stanovení výtěžnosti pro peonidin-3-O-glukosid

#### 6.2.5.7 Stanovení výtěžnosti pro malvidin-3-O-galaktosid

VÝTĚŽNOST		malvidin-3-O-galaktosid
Hodnoty výtěžnosti (%)	1	98,02
	2	98,54
	3	101,85
	4	98,08
	5	99,43
	6	95,56
Průměr (%)		<b>98,58</b>
SD		2,06
RSD (%)		2,09

Tabulka 57 Stanovení výtěžnosti pro malvidin-3-O-galaktosid

Výtěžnost je v rozmezí 93,87-101,96 % a RSD je v rozmezí 2,09-5,14 %.

### 6.3 Stanovení obsahu antokyanů v odrůdách borůvek

K analýze bylo použito celkem 21 odrůd borůvek. Příprava těchto roztoků byla stejná jako u roztoků pro stanovení přesnosti viz. kapitola 5.2.6. Z každé odrůdy borůvek byly připraveny 3 navážky přibližně 5 g. Z každé navážky byly provedeny 2 nástřiky na kolonu, ze kterých byla následně stanovena průměrná hodnota plochy píku pro každou navážku jedné odrůdy. Tato průměrná hodnota byla přepočtena na 5,000 g. Následně byla stanovena průměrná hodnota plochy píku jednotlivých antokyanů pro celou odrůdu (průměr 3 navážek). Z těchto hodnot byla vypočtena z kalibrační křivky koncentrace jednotlivých antokyanů.

Pro přepočet obsahu antokyanů z koncentrace v mg/l na  $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$  ovoce byl použit vzorec, u kterého byla využita příprava pracovních roztoků pro přesnost viz. 5.2.6. V první části přepočtu byl zjištěn obsah antokyanu v miligramech v daném objemu vzorku tedy v 25,32 ml (25 ml MeOH a 320  $\mu\text{l}$  koncentrované HCOOH). Následně byl výsledek vydělen 5 (kvůli navážce vzorku 5 g) a vynásoben 100 ( $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) pro přepočet na 100 g ovoce.

U výpočtu celkového obsahu antokyanů byly použity hodnoty součtu ploch píků všech antokyanů po integraci a přepočítány na koncentraci (mg/l) s využitím lineární regrese pro kyanidin-3-O-glukosid. Dále se postupovalo stejným způsobem jako

u přepočtu obsahu antokyanů na  $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ . Výsledná koncentrace je vyjádřena v mg jako ekvivalent kyanidin-3-O-glukosidu na 100 g ovoce. Tento postup je relevantní předchozím publikovaným pracím a běžně se takto při stanovení antokyanů v odborné literatuře používá.

Získané hodnoty a výsledky pro jednotlivé odrůdy jsou uvedeny v následujících tabulkách.

<b>SPARTAN</b>	<b>Průměrná plocha píků</b>	<b>Koncentrace (mg/l)</b>	<b>Koncentrace (<math>\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}</math>)</b>
delp-3-gal	831403	24,46	12,39
delp-3-glu	404410	11,20	5,67
cya-3-gal	127017	4,20	2,13
cya-3-glu	69138	2,61	1,32
cya-3-ara	98567	2,88	1,46
peo-3-glu	45010	1,99	1,01
mal-3-gal	484363	16,48	8,35

Tabulka 58 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Spartan'

Celková zjištěná suma všech antokyanů v odrůdě 'Spartan' byla 57,49 mg na 100 g plodů.

<b>SUNRISE</b>	<b>Průměrná plocha píků</b>	<b>Koncentrace (mg/l)</b>	<b>Koncentrace (<math>\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}</math>)</b>
delp-3-gal	2193890	63,55	32,18
delp-3-glu	21133	1,24	0,63
cya-3-gal	776747	21,30	10,79
cya-3-glu	13252	1,21	0,61
cya-3-ara	368991	9,99	5,06
peo-3-glu	466411	13,04	6,60
mal-3-gal	974016	32,20	16,31

Tabulka 59 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Sunrise'

Celková zjištěná suma všech antokyanů v odrůdě 'Sunrise' byla 93,15 mg na 100 g plodů.

<b>TORO</b>	<b>Průměrná plocha píků</b>	<b>Koncentrace (mg/l)</b>	<b>Koncentrace (mg.100g<sup>-1</sup>)</b>
delp-3-gal	839907	24,70	12,51
delp-3-glu	10583	0,96	0,49
cya-3-gal	221880	6,70	3,39
cya-3-glu	5342	1,01	0,51
cya-3-ara	123807	3,54	1,79
peo-3-glu	255202	7,50	3,80
mal-3-gal	581708	19,60	9,93

Tabulka 60 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Toro'

Celková zjištěná suma všech antokyanů v odrůdě 'Toro' byla 46,78 mg na 100 g plodů.

<b>BLUEGOLD</b>	<b>Průměrná plocha píků</b>	<b>Koncentrace (mg/l)</b>	<b>Koncentrace (mg.100g<sup>-1</sup>)</b>
delp-3-gal	1680428	48,82	24,72
delp-3-glu	544555	14,84	7,51
cya-3-gal	289814	8,49	4,30
cya-3-glu	95011	3,26	1,65
cya-3-ara	234134	6,45	3,27
peo-3-glu	57432	2,31	1,17
mal-3-gal	742022	24,75	12,53

Tabulka 61 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Bluegold'

Celková zjištěná suma všech antokyanů v odrůdě 'Bluegold' byla 120,34 mg na 100 g plodů.

<b>CROATAN</b>	<b>Průměrná plocha píků</b>	<b>Koncentrace (mg/l)</b>	<b>Koncentrace (mg.100g<sup>-1</sup>)</b>
delp-3-gal	812367	23,91	12,11
delp-3-glu	10233	0,95	0,48
cya-3-gal	355074	10,20	5,17
cya-3-glu	7276	1,06	0,54
cya-3-ara	218848	6,04	3,06
peo-3-glu	306034	8,83	4,47
mal-3-gal	660629	22,14	11,21

Tabulka 62 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Croatan'

Celková zjištěná suma všech antokyanů v odrůdě 'Croatan' byla 54,39 mg na 100 g plodů.

<b>NORTHLAND</b>	<b>Průměrná plocha píků</b>	<b>Koncentrace (mg/l)</b>	<b>Koncentrace (mg.100g<sup>-1</sup>)</b>
delp-3-gal	1978343	57,37	29,05
delp-3-glu	1073583	28,60	14,48
cya-3-gal	411734	11,69	5,92
cya-3-glu	205952	6,05	3,06
cya-3-ara	250531	6,88	3,48
peo-3-glu	75004	2,77	1,40
mal-3-gal	454074	15,50	7,85

Tabulka 63 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Northland'

Celková zjištěná suma všech antokyanů v odrůdě 'Northland' byla 114,81 mg na 100 g plodů.



<b>DUKE</b>	<b>Průměrná plocha píků</b>	<b>Koncentrace (mg/l)</b>	<b>Koncentrace (mg.100g<sup>-1</sup>)</b>
delp-3-gal	1566502	45,55	23,07
delp-3-glu	19820	1,20	0,61
cya-3-gal	490205	13,76	6,97
cya-3-glu	9811	1,12	0,57
cya-3-ara	241032	6,63	3,36
peo-3-glu	409124	11,53	5,84
mal-3-gal	1315764	43,18	21,87

Tabulka 64 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Duke'

Celková zjištěná suma všech antokyanů v odrůdě 'Duke' byla 83,93 mg na 100 g plodů.

<b>GILA</b>	<b>Průměrná plocha píků</b>	<b>Koncentrace (mg/l)</b>	<b>Koncentrace (mg.100g<sup>-1</sup>)</b>
delp-3-gal	1626784	47,28	23,94
delp-3-glu	1061416	28,28	14,32
cya-3-gal	364482	10,45	5,29
cya-3-glu	220258	6,41	3,25
cya-3-ara	269968	7,39	3,74
peo-3-glu	100088	3,43	1,74
mal-3-gal	750017	25,01	12,67

Tabulka 65 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Gila'

Celková zjištěná suma všech antokyanů v odrůdě 'Gila' byla 113,86 mg na 100 g plodů.

<b>JERSEY</b>	<b>Průměrná plocha píků</b>	<b>Koncentrace (mg/l)</b>	<b>Koncentrace (mg.100g<sup>-1</sup>)</b>
delp-3-gal	702310	20,76	10,51
delp-3-glu	342356	9,59	4,86
cya-3-gal	153497	4,90	2,48
cya-3-glu	75477	2,77	1,40
cya-3-ara	96802	2,83	1,43
peo-3-glu	63527	2,47	1,25
mal-3-gal	600820	20,22	10,24

Tabulka 66 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Jersey'

Celková zjištěná suma všech antokyanů v odrůdě 'Jersey' byla 59,26 mg na 100 g plodů.

<b>BLUECROP</b>	<b>Průměrná plocha píků</b>	<b>Koncentrace (mg/l)</b>	<b>Koncentrace (mg.100g<sup>-1</sup>)</b>
delp-3-gal	345841	10,53	5,33
delp-3-glu	171670	5,15	2,61
cya-3-gal	99077	3,47	1,76
cya-3-glu	45985	2,03	1,03
cya-3-ara	81184	2,42	1,23
peo-3-glu	42888	1,93	0,98
mal-3-gal	455004	15,53	7,86

Tabulka 67 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Bluecrop'

Celková zjištěná suma všech antokyanů v odrůdě 'Bluecrop' byla 40,01 mg na 100 g plodů.

<b>HERBERT</b>	<b>Průměrná plocha píků</b>	<b>Koncentrace (mg/l)</b>	<b>Koncentrace (mg.100g<sup>-1</sup>)</b>
delp-3-gal	448141	13,46	6,82
delp-3-glu	158081	4,80	2,43
cya-3-gal	70977	2,73	1,38
cya-3-glu	35466	1,77	0,90
cya-3-ara	48623	1,57	0,80
peo-3-glu	40399	1,87	0,95
mal-3-gal	583893	19,67	9,96

Tabulka 68 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Herbert'

Celková zjištěná suma všech antokyanů v odrůdě 'Herbert' byla 41,89 mg na 100 g plodů.

<b>BERKELEY</b>	<b>Průměrná plocha píků</b>	<b>Koncentrace (mg/l)</b>	<b>Koncentrace (mg.100g<sup>-1</sup>)</b>
delp-3-gal	818146	24,08	12,19
delp-3-glu	12558	1,01	0,51
cya-3-gal	168059	5,28	2,67
cya-3-glu	9375	1,11	0,56
cya-3-ara	98397	2,88	1,46
peo-3-glu	278876	8,12	4,11
mal-3-gal	823679	27,38	13,87

Tabulka 69 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Berkeley'

Celková zjištěná suma všech antokyanů v odrůdě 'Berkeley' byla 47,91 mg na 100 g plodů.

<b>PATRIOT</b>	<b>Průměrná plocha píků</b>	<b>Koncentrace (mg/l)</b>	<b>Koncentrace (mg.100g<sup>-1</sup>)</b>
delp-3-gal	289265	8,90	4,51
delp-3-glu	400187	11,09	5,62
cya-3-gal	231639	6,96	3,52
cya-3-glu	301435	8,45	4,28
cya-3-ara	228743	6,30	3,19
peo-3-glu	129755	4,21	2,13
mal-3-gal	163274	6,16	3,12

Tabulka 70 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Patriot'

Celková zjištěná suma všech antokyanů v odrůdě 'Patriot' byla 50,06 mg na 100 g plodů.

<b>DARROW</b>	<b>Průměrná plocha píků</b>	<b>Koncentrace (mg/l)</b>	<b>Koncentrace (mg.100g<sup>-1</sup>)</b>
delp-3-gal	327572	10,00	5,06
delp-3-glu	160596	4,86	2,46
cya-3-gal	111071	3,78	1,91
cya-3-glu	50094	2,14	1,08
cya-3-ara	99278	2,90	1,47
peo-3-glu	45376	2,00	1,01
mal-3-gal	444622	15,20	7,70

Tabulka 71 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Darrow'

Celková zjištěná suma všech antokyanů v odrůdě 'Darrow' byla 38,99 mg na 100 g plodů.

<b>BLUETTA</b>	<b>Průměrná plocha píků</b>	<b>Koncentrace (mg/l)</b>	<b>Koncentrace (mg.100g<sup>-1</sup>)</b>
delp-3-gal	556062	16,56	8,39
delp-3-glu	271266	7,74	3,92
cya-3-gal	126541	4,19	2,12
cya-3-glu	57754	2,33	1,18
cya-3-ara	98510	2,88	1,46
peo-3-glu	52442	2,18	1,10
mal-3-gal	410449	14,10	7,14

Tabulka 72 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Bluetta'

Celková zjištěná suma všech antokyanů v odrůdě 'Bluetta' byla 44,45 mg na 100 g plodů.

<b>COLLINS</b>	<b>Průměrná plocha píků</b>	<b>Koncentrace (mg/l)</b>	<b>Koncentrace (mg.100g<sup>-1</sup>)</b>
delp-3-gal	874491	25,70	13,01
delp-3-glu	317901	8,95	4,53
cya-3-gal	120464	4,03	2,04
cya-3-glu	52159	2,19	1,11
cya-3-ara	82246	2,45	1,24
peo-3-glu	59916	2,38	1,21
mal-3-gal	1024993	33,84	17,14

Tabulka 73 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Collins'

Celková zjištěná suma všech antokyanů v odrůdě 'Collins' byla 74,10 mg na 100 g plodů.

<b>BRIGITTA</b>	<b>Průměrná plocha píků</b>	<b>Koncentrace (mg/l)</b>	<b>Koncentrace (mg.100g<sup>-1</sup>)</b>
delp-3-gal	600102	17,82	9,02
delp-3-glu	216424	6,31	3,20
cya-3-gal	73662	2,80	1,42
cya-3-glu	23313	1,46	0,74
cya-3-ara	58841	1,84	0,93
peo-3-glu	22474	1,40	0,71
mal-3-gal	355525	12,34	6,25

Tabulka 74 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Brigitta'

Celková zjištěná suma všech antokyanů v odrůdě 'Brigitta' byla 42,95 mg na 100 g plodů.

<b>NOVEMBER</b>	<b>Průměrná plocha píků</b>	<b>Koncentrace (mg/l)</b>	<b>Koncentrace (mg.100g<sup>-1</sup>)</b>
delp-3-gal	1984506	57,55	29,14
delp-3-glu	600936	16,31	8,26
cya-3-gal	1104681	29,92	15,15
cya-3-glu	303203	8,50	4,30
cya-3-ara	655354	17,52	8,87
peo-3-glu	158429	4,96	2,51
mal-3-gal	562003	18,97	9,61

Tabulka 75 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'November'

Celková zjištěná suma všech antokyanů v odrůdě 'November' byla 113,76 mg na 100 g plodů.

<b>IRANKA</b>	<b>Průměrná plocha píků</b>	<b>Koncentrace (mg/l)</b>	<b>Koncentrace (mg.100g<sup>-1</sup>)</b>
delp-3-gal	1080718	31,61	16,01
delp-3-glu	17391	1,14	0,58
cya-3-gal	419116	11,89	6,02
cya-3-glu	12668	1,20	0,61
cya-3-ara	233381	6,43	3,26
peo-3-glu	369741	10,50	5,32
mal-3-gal	1101597	36,30	18,38

Tabulka 76 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Iranka'

Celková zjištěná suma všech antokyanů v odrůdě 'Iranka' byla 70,36 mg na 100 g plodů.

<b>BLUEJAY</b>	<b>Průměrná plocha píků</b>	<b>Koncentrace (mg/l)</b>	<b>Koncentrace (mg.100g<sup>-1</sup>)</b>
delp-3-gal	1250316	36,48	18,47
delp-3-glu	22748	1,28	0,65
cya-3-gal	169210	5,31	2,69
cya-3-glu	12809	1,20	0,61
cya-3-ara	94966	2,79	1,41
peo-3-glu	445743	12,49	6,32
mal-3-gal	1476322	48,34	24,48

Tabulka 77 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Bluejay'

Celková zjištěná suma všech antokyanů v odrůdě 'Bluejay' byla 76,60 mg na 100 g plodů.

<b>RANCOCAS</b>	<b>Průměrná plocha píků</b>	<b>Koncentrace (mg/l)</b>	<b>Koncentrace (mg.100g<sup>-1</sup>)</b>
delp-3-gal	1334081	38,88	19,69
delp-3-glu	595256	16,16	8,18
cya-3-gal	558091	15,54	7,87
cya-3-glu	297000	8,34	4,22
cya-3-ara	324935	8,83	4,47
peo-3-glu	164678	5,12	2,59
mal-3-gal	902488	29,91	15,15

Tabulka 78 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Rancocas'

Celková zjištěná suma všech antokyanů v odrůdě 'Rancocas' byla 98,67 mg na 100 g plodů.

### 6.3.1 Zastoupení jednotlivých antokyanů v odrůdách borůvek

<b>Průměr všech odrůd</b>	<b>Koncentrace (mg.100g<sup>-1</sup>)</b>
delp-3-gal	15,62
delp-3-glu	4,38
cya-3-gal	4,52
cya-3-glu	1,59
cya-3-ara	2,68
peo-3-glu	2,67
mal-3-gal	11,98

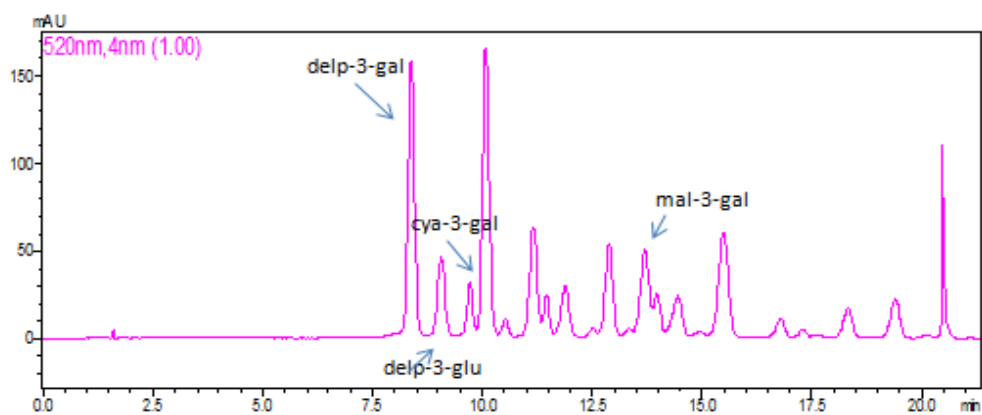
Tabulka 79 Zastoupení jednotlivých antokyanů

Nejvíce zastoupené antokyanany v průměru všech odrůd byly delfinidin-3-O-galaktosid, malvidin-3-O-galaktosid a kyanidin-3-O-galaktosid.



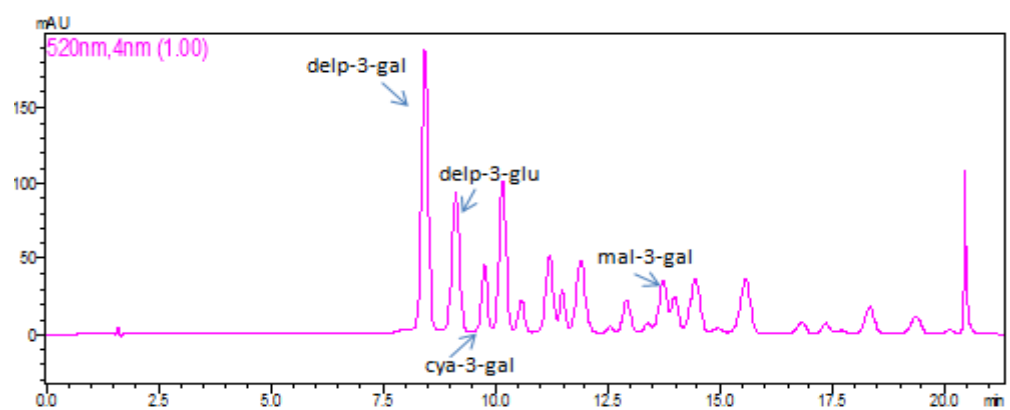
### 6.3.2 Chromatogramy odrůd s nejvyšším počtem antokyanů

#### 'Bluegold'



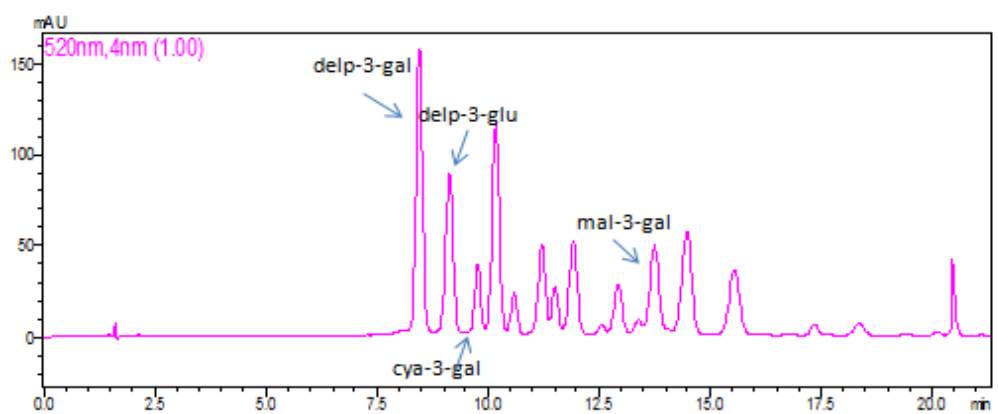
Obrázek 34 Chromatogram zastoupení antokyanů u odrůdy 'Bluegold'

#### 'Northland'



Obrázek 35 Chromatogram zastoupení antokyanů u odrůdy 'Northland'

#### 'Gila'



Obrázek 36 Chromatogram zastoupení antokyanů u odrůdy 'Gila'

#### 6.4 Stanovení obsahu antokyanů v džusech

K analýze byly použity dva druhy džusů. Příprava těchto roztoků je popsána v kapitole 5.2.9. Z každého džusu byly připraveny 2 roztoky a z každého roztoku 2 nástřiky na kolonu, z kterých byla následně stanovena průměrná hodnota plochy píku. Z těchto hodnot byla vypočtena z kalibrační křivky koncentrace jednotlivých antokyanů vyjádřená jako obsah anthokyanů v mg na litr nápoje.

<b>PFANNER</b>	<b>Průměrná plocha píků</b>	<b>Koncentrace (mg/l)</b>
delp-3-gal	44222	1,87
delp-3-glu	92427	3,09
cya-3-gal	28818	1,62
cya-3-glu	450245	12,19
cya-3-ara	41549	1,38
peo-3-glu	60890	2,40
mal-3-gal	83433	3,60

Tabulka 80 Stanovení obsahu antokyanů pro borůvkový džus Pfanner

<b>FRUCTAL</b>	<b>Průměrná plocha píků</b>	<b>Koncentrace (mg/l)</b>
delp-3-gal	48888	2,01
delp-3-glu	73433	2,60
cya-3-gal	308031	8,97
cya-3-glu	116173	3,80
cya-3-ara	116340	3,35
peo-3-glu	81302	2,94
mal-3-gal	61730	2,90

Tabulka 81 Stanovení obsahu antokyanů pro borůvkový džus Fructal

## 7 Závěr

V této diplomové práci byla vyvinuta a validována metoda HPLC pro stanovení antokyanů v borůvkách. Experimentálně byly nalezeny optimální chromatografické podmínky HPLC stanovení:

Podmínky analýzy:

Kolona: Kinetex PFP (150 x 4,6 mm, 2,6  $\mu$ m)

Předkolona: Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m)

Mobilní fáze: organická fáze: ACN, vodná fáze: 2 % HCOOH

Rychlost průtoku mobilní fáze: 1 ml/min

Gradientová eluce: Gradient 09 (viz. 6.1.4)

Detekce UV: 520 nm

Dávkovaný objem vzorku: 5  $\mu$ l

Teplota: 50°C

K detekci byl použit UV-VIS detektor (DAD detektor).

Po optimalizaci separace byla metoda validována. Vhodná chromatografická separace byla prokázána vyhovující symetrií píků a jejich rozlišením. Pro přesnost metody byla kritériem směrodatné odchylna, která byla u všech antokyanů menší než 5 %. Opakovatelnost byla měřena při třech koncentracích (5 mg/l, 20 mg/l a 100 mg/l). Směrodatná odchylna nevykazovala u žádného ze zkoušených roztoků hodnotu větší než 1 %. Hodnoty výtěžností se pohybovaly v rozmezí 93,87-101,96 %. Tyto hodnoty extrakční výtěžnosti jsou běžně publikované i v odborné literatuře. Dále byla ověřena linearita (v koncentračním rozmezí 1 mg/l-100 mg/l), výsledkem byla přímka lineární regrese, z které byl následně vypočítán korelační koeficient. Korelační koeficient se pohyboval v intervalu hodnot od 0,9992 do 0,9999.

U 21 odrůd borůvek byly zjištěny významné rozdíly v zastoupení jednotlivých antokyanů. Rozdíl v počtu separovaných antokyanů u jednotlivých odrůd je způsoben skutečností, že u některých z nich je přítomen vyšší obsah acylovaných antokyanů. Koncentrace celkových antokyanů byla spočítána s využitím lineární regrese kyanidin-3-O-glukosidu metodou součtu ploch píků všech separovaných antokyanů. Výsledná koncentrace je vyjádřena v mg jako ekvivalent kyanidin-3-O-glukosidu na 100 g ovoce.

Největší obsah antokyanů byl zjištěn u odrůdy 'Bluegold' (120,34 mg na 100 gramů plodů), 'Northland' (114,81 mg na 100 gramů plodů) a 'Gila' (113,86 mg na 100 gramů plodů). Obsah antokyanů u ostatních odrůd se pohyboval v rozmezí 38,99-113,76 mg.100g<sup>-1</sup>. Nejvíce zastoupené antokyany byly delphinidin-3-O-galaktosid, malvidin-3-O-galaktosid a kyanidin-3-O-galaktosid.

Konzumace borůvek je doporučena zvláště v čerstvém stavu z důvodu poklesu antokyanů procesem mražení. Obsah antokyanů je ovlivněn odlišnými odrůdami borůvek, klimatickými vlivy, technologií pěstování, posklizňovou úpravou, skladovacími podmínkami a dobou konzumace.

Vyvinutou metodu pro stanovení antokyanů je dále možné využít i pro stanovení obsahu antokyanů v borůvkových džusech.

## 8 Seznam grafů, obrázků a tabulek

### 8.1 Grafy

Graf 1 Kalibrační závislost pro delfinidin-3-O-galaktosid .....	61
Graf 2 Kalibrační závislost pro delfinidin-3-O-glukosid.....	62
Graf 3 Kalibrační závislost pro kyanidin-3-O-galaktosid.....	63
Graf 4 Kalibrační závislost pro kyanidin-3-O-glukosid .....	64
Graf 5 Kalibrační závislost pro kyanidin-3-O-arabinosid .....	65
Graf 6 Kalibrační závislost pro peonidin-3-O-glukosid .....	66
Graf 7 Kalibrační závislost pro malvidin-3-O-galaktosid .....	67

### 8.2 Obrázky

Obrázek 1 Struktura antokyanů .....	12
Obrázek 2 Schéma kapalinového chromatografu .....	25
Obrázek 3 Absorpční spektrum pro delfinidin-3-O-galaktosid .....	36
Obrázek 4 Absorpční spektrum pro delfinidin-3-O-glukosid.....	37
Obrázek 5 Absorpční spektrum pro kyanidin-3-O-galaktosid.....	37
Obrázek 6 Absorpční spektrum pro kyanidin-3-O-glukosid .....	38
Obrázek 7 Absorpční spektrum pro kyanidin-3-O-arabinosid .....	38
Obrázek 8 Absorpční spektrum pro peonidin-3-O-glukosid .....	39
Obrázek 9 Absorpční spektrum pro malvidin-3-O-galaktosid .....	39
Obrázek 10 Chromatogram separace antokyanů pro gradient 01 - Ascentis® Express F5(150 x 4,6 mm, 5 μm) s předkolumnou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm) .....	41
Obrázek 11 Chromatogram separace antokyanů pro gradient 02 - Ascentis® Express F5(150 x 4,6 mm, 5 μm) s předkolumnou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm) .....	42
Obrázek 12 Chromatogram separace antokyanů pro gradient 03 - Ascentis® Express F5(150 x 4,6 mm, 5 μm) s předkolumnou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm) .....	43
Obrázek 13 Chromatogram separace antokyanů pro gradient 04 - Ascentis® Express F5(150 x 4,6 mm, 5 μm) s předkolumnou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm) .....	44
Obrázek 14 Chromatogram separace antokyanů pro gradient 05 - Ascentis® Express F5(150 x 4,6 mm, 5 μm) s předkolumnou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm) .....	45
Obrázek 15 Chromatogram separace antokyanů pro gradient 06 - Ascentis® Express F5(150 x 4,6 mm, 5 μm) s předkolumnou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm) .....	46

Obrázek 16 Chromatogram separace antokyanů pro gradient 07 - Ascentis® Express F5(150 x 4,6 mm, 5 μm) s předkolumnou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm) .....	47
Obrázek 17 Chromatogram separace antokyanů pro gradient 08 - Kinetex PFP (150 x 4.6mm, 2,6 μm) s předkolumnou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm).....	48
Obrázek 18 Chromatogram separace antokyanů pro gradient 09 - Kinetex PFP (150 x 4.6mm, 2,6 μm) s předkolumnou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm).....	49
Obrázek 19 Chromatogram separace antokyanů pro gradient 10 - Kinetex PFP (150 x 4.6mm, 2,6 μm) s předkolumnou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm).....	50
Obrázek 20 Chromatogram separace antokyanů pro gradient 11 - Kinetex PFP (150 x 4.6mm, 2,6 μm) s předkolumnou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm).....	51
Obrázek 21 Chromatogram separace antokyanů pro gradient 12 - Kinetex PFP (150 x 4.6mm, 2,6 μm) s předkolumnou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm).....	52
Obrázek 22 Podmínky separace: Ascentis® Express F5(150 x 4,6 mm, 5 μm) s předkolumnou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm), gradient 04 .....	53
Obrázek 23 Podmínky separace: Kinetex PFP (150 x 4.6mm, 2,6 μm) s předkolumnou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm), gradient 09 .....	53
Obrázek 24 Ascentis® Express F5(150 x 4,6 mm, 5 μm) s předkolumnou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm), gradient 04 .....	54
Obrázek 25: Kinetex PFP (150 x 4.6mm, 2,6 μm) s předkolumnou Ascentis® Express F5 (5 x 4,6 mm, 5 μm), gradient 09.....	55
Obrázek 26 Stanovení delfinidin-3-O-galaktosidu – retenční čas- 8,371 min. ....	55
Obrázek 27 Stanovení delfinidin-3-O-glukosidu – retenční čas-9,089 min. ....	56
Obrázek 28 Stanovení kyanidin-3-O-galaktosidu – retenční čas-9,630 min.....	56
Obrázek 29 Stanovení pro kyanidin-3-O-glukosidu – retenční čas 10,525 min.....	56
Obrázek 30 Stanovení kyanidin-3-O-arabinosidu – retenční čas-11,390 min.....	57
Obrázek 31 Stanovení peonidin-3-O-glukosidu – retenční čas-13,241 min.....	57
Obrázek 32 Stanovení pro malvidin-3-O-galaktosidu – retenční čas-13,651 min .....	57
Obrázek 33 Chromatogram směsi standardů při koncentraci 10 mg/l.....	59
Obrázek 34 Chromatogram zastoupení antokyanů u odrůdy 'Bluegold' .....	89
Obrázek 35 Chromatogram zastoupení antokyanů u odrůdy 'Northland' .....	89
Obrázek 36 Chromatogram zastoupení antokyanů u odrůdy 'Gila' .....	89

### 8.3 Tabulky

Tabulka 1 Příklad gradientové eluce pro stanovení antokyanů .....	17
Tabulka 2 Příklad gradientové eluce pro stanovení antokyanů .....	18
Tabulka 3 Příklad gradientové eluce pro stanovení antokyanů .....	18
Tabulka 4 Příklad gradientové eluce pro stanovení antokyanů .....	19
Tabulka 5 Příklad gradientové eluce pro stanovení antokyanů .....	20
Tabulka 6 Příklad gradientové eluce pro stanovení antokyanů .....	21
Tabulka 7 Příklad gradientové eluce pro stanovení antokyanů .....	21
Tabulka 8 Příklad gradientové eluce pro stanovení antokyanů .....	22
Tabulka 9 Příklad gradientové eluce pro stanovení antokyanů .....	23
Tabulka 10 – Chromatografický systém.....	32
Tabulka 11 – Příprava pracovních roztoků pro kalibraci .....	34
Tabulka 12 – Příprava pracovních roztoků pro test opakovatelnosti.....	35
Tabulka 13 Podmínky gradientu 01 .....	41
Tabulka 14 Podmínky gradientu 02.....	42
Tabulka 15 Podmínky gradientu 03.....	43
Tabulka 16 Podmínky gradientu 04.....	44
Tabulka 17 Podmínky gradientu 05.....	45
Tabulka 18 Podmínky gradientu 06.....	46
Tabulka 19 Podmínky gradientu 07.....	47
Tabulka 20 Podmínky gradientu 08.....	48
Tabulka 21 Podmínky gradientu 09.....	49
Tabulka 22 Podmínky gradientu 10.....	50
Tabulka 23 Podmínky gradientu 11 .....	51
Tabulka 24 Podmínky gradientu 12.....	52
Tabulka 25 Shrnutí optimálních podmínek pro analýzu.....	58
Tabulka 26 Parametry testu vhodnosti chromatografického systému .....	59
Tabulka 27 Test linearity pro delfinidin-3-O-galaktosid.....	61
Tabulka 28 Parametry lineární regrese pro delfinidin-3-O-galaktosid.....	61
Tabulka 29 Test linearity pro delfinidin-3-O-glukosid.....	62
Tabulka 30 Parametry lineární regrese pro delfinidin-3-O-glukosid.....	62

Tabulka 31 Test linearity pro kyanidin-3-O-galaktosid .....	63
Tabulka 32 Parametry lineární regrese pro kyanidin-3-O-galaktosid .....	63
Tabulka 33 Test linearity pro kyanidin-3-O-glukosid .....	64
Tabulka 34 Parametry lineární regrese pro kyanidin-3-O-glukosid .....	64
Tabulka 35 Test linearity pro kyanidin-3-O-arabinosid .....	65
Tabulka 36 Parametry lineární regrese pro kyanidin-3-O-arabinosid .....	65
Tabulka 37 Test linearity pro peonidin-3-O-glukosid .....	66
Tabulka 38 Parametry lineární regrese pro peonidin-3-O-glukosid .....	66
Tabulka 39 Test linearity pro malvidin-3-O-galaktosid .....	67
Tabulka 40 Parametry lineární regrese pro malvidin-3-O-galaktosid .....	67
Tabulka 41 Stanovení opakovatelnosti pro roztoky o koncentraci 100 mg/l .....	68
Tabulka 42 Stanovení opakovatelnosti pro roztoky o koncentraci 20 mg/l .....	68
Tabulka 43 Stanovení opakovatelnosti pro roztoky o koncentraci 5 mg/l .....	69
Tabulka 44 Stanovení přesnosti pro delfinidin-3-O-galaktosid.....	70
Tabulka 45 Stanovení přesnosti pro delfinidin-3-O-glukosid .....	70
Tabulka 46 Stanovení přesnosti pro kyanidin-3-O-galaktosid .....	71
Tabulka 47 Stanovení přesnosti pro kyanidin-3-O-glukosid .....	71
Tabulka 48 Stanovení přesnosti pro kyanidin-3-O-arabinosid .....	72
Tabulka 49 Stanovení přesnosti pro peonidin-3-O-glukosid.....	72
Tabulka 50 Stanovení přesnosti pro malvidin-3-O-galaktosid.....	73
Tabulka 51 Stanovení výtěžnosti pro delfinidin-3-O-galaktosid.....	74
Tabulka 52 Stanovení výtěžnosti pro delfinidin-3-O-glukosid .....	74
Tabulka 53 Stanovení výtěžnosti pro kyanidin-3-O-galaktosid .....	75
Tabulka 54 Stanovení výtěžnosti pro kyanidin-3-O-glukosid.....	75
Tabulka 55 Stanovení výtěžnosti pro kyanidin-3-O-arabinosid.....	76
Tabulka 56 Stanovení výtěžnosti pro peonidin-3-O-glukosid.....	76
Tabulka 57 Stanovení výtěžnosti pro malvidin-3-O-galaktosid.....	77
Tabulka 58 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Spartan' .....	78
Tabulka 59 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Sunrise' .....	78
Tabulka 60 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Toro' .....	79
Tabulka 61 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Bluegold' .....	79
Tabulka 62 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Croatan' .....	80



Tabulka 63 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Northland' .....	80
Tabulka 64 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Duke' .....	81
Tabulka 65 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Gila' .....	81
Tabulka 66 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Jersey' .....	82
Tabulka 67 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Bluecrop' .....	82
Tabulka 68 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Herbert' .....	83
Tabulka 69 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Berkeley' .....	83
Tabulka 70 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Patriot' .....	84
Tabulka 71 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Darrow' .....	84
Tabulka 72 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Bluetta' .....	85
Tabulka 73 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Collins' .....	85
Tabulka 74 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Brigitta' .....	86
Tabulka 75 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'November' .....	86
Tabulka 76 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Iranka' .....	87
Tabulka 77 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Bluejay' .....	87
Tabulka 78 Stanovení obsahu antokyanů pro odrůdu 'Rancocas' .....	88
Tabulka 79 Zastoupení jednotlivých antokyanů .....	88
Tabulka 80 Stanovení obsahu antokyanů pro borůvkový džus Pfanner .....	90
Tabulka 81 Stanovení obsahu antokyanů pro borůvkový džus Fructal .....	90

## 9 Použitá literatura

1. **Scalzo J., Stevenson D., Hedderley D.:** Blueberry estimated harvest from seven new cultivars: Fruit and anthocyanins, *Food Chemistry*, 2013, vol. 139: 44-50
2. **Lohachoompol V., Mulholland M., Srzednicki G., Craske J.:** Determination of anthocyanins in various cultivars of highbush and rabbiteye blueberries, *Food Chemistry*, 2008, vol. 111: 249–254
3. **Norberto S., Silva S., Meireles M., Faria A., Pintado M., Calhau C.:** Blueberry anthocyanins in health promotion: A metabolic overview, *Journal of Functional Foods*, 2013, vol. 5: 1518-1528
4. **Li P. CH., Wong M. CK., Adomat H., Guns E. S. T.:** Blueberry anthocyanins analyzed by absorption spectroscopy and HPLC-UV-MS, *Canadian Journal of Pure and Applied Sciences*, 2009, vol. 3: 765-772
5. **Barnes J. S., Nguyen H. P., Shen S., Schug K. A.:** General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography–electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2009, vol. 1216: 4728-4735
6. **Lavříková P., Fontana J.:** Hormony tukové tkáně. Dostupné na: <http://fbt.cz/skripta/xi-regulacni-mechanismy-1-endokrinni-regulace/8-hormony-tukove-tkane/> [Citace: 10. 1. 2016]
7. **Haluzík M., Svačina Š.:** Budou jaderné receptory PPAR klíčem k léčbě metabolického syndromu? Dostupné na: <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/budou-jaderne-receptory-ppar-klicem-k-lecbe-metabolickeho-syndro-272169> [Citace: 5. 1. 2016]
8. **Kovaříková P., Stariat J.:** Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze-validace chromatografických metod, dostupné z: [http://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/243291/mod\\_resource/content/5/Lekce\\_%2011\\_Validace%20HPLC%20metody.pdf](http://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/243291/mod_resource/content/5/Lekce_%2011_Validace%20HPLC%20metody.pdf) [Citace: 7. 1. 2016]
9. **Klimeš J. a kol.:** Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami, *Nukleus HK*, 2011: 29 – 30, 36 – 40, 251 – 254, ISBN: 978-80-87009-29-1
10. **Hplc.cz,** Validační program pro statistické zpracování analytických dat, dostupné z: [http://www.hplc.cz/Validace/program\\_validace.htm](http://www.hplc.cz/Validace/program_validace.htm) [Citace: 7. 1. 2016]
11. **Karlíček R.:** Analytická chemie pro farmaceuty, *Karolinum*, 2007: 276 – 281, ISBN: 978-80-246-1453-3

- 12. Chocholouš P.**, disertační práce: Sekvenční injekční chromatografie, FAF UK, Hradec Králové (2006)
- 13. Labmet.zshk.cz**, Laboratorní metody, HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie), dostupné z: <http://labmet.zshk.cz/vyuka/hplc.aspx> [Citace: 23. 1. 2016]
- 14. Kovaříková P., Stariat J.:** HPLC-Detektory, dostupné z: [http://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/219169/mod\\_resource/content/4/HPLC\\_kurz/Lekce\\_PDF/Lekce %203 \\_Detektory.pdf](http://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/219169/mod_resource/content/4/HPLC_kurz/Lekce_PDF/Lekce%203_Detektory.pdf) [Citace: 23. 1. 2016]
- 15. Kovaříková P., Stariat J.:** HPLC-Popis základního hardwaru, dostupné z: [http://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/215460/mod\\_resource/content/4/HPLC\\_kurz/Lekce\\_PDF/Lekce %202 \\_HPLC %20instrumentace.pdf](http://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/215460/mod_resource/content/4/HPLC_kurz/Lekce_PDF/Lekce%202_HPLC%20instrumentace.pdf) [Citace: 23. 1. 2016]
- 16. Kovaříková P., Stariat J.:** HPLC – Stacionární fáze a separační módy, dostupné z: [http://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/221432/mod\\_resource/content/4/HPLC\\_kurz/Lekce\\_PDF/Lekce %204 \\_Stac %20faze %20a %20separacni %20mody.pdf](http://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/221432/mod_resource/content/4/HPLC_kurz/Lekce_PDF/Lekce%204_Stac%20faze%20a%20separacni%20mody.pdf) [Citace: 23. 1. 2016]
- 17. Kovaříková P., Stariat J.:** Rychlá chromatografie, ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie, dostupné z: [http://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/223394/mod\\_resource/content/4/HPLC\\_kurz/Lekce\\_PDF/Lekce %205 \\_UHPLC.pdf](http://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/223394/mod_resource/content/4/HPLC_kurz/Lekce_PDF/Lekce%205_UHPLC.pdf) [Citace: 23. 1. 2016]
- 18. Hplc.cz**, Gradientová eluce, dostupné z: <http://www.hplc.cz/Teorie/gradient.html> [Citace: 23. 1. 2016]
- 19. Vejražka M.:** Optické metody používané v biochemii, dostupné z: <https://dec53.lf1.cuni.cz/download.php?fid=217> [Citace: 13. 2. 2016]
- 20. Nováková L, Douša M a kol.:** Moderní HPLC separace v teorii a praxi I., Europrint a.s., 2013: 63-64, 135, ISBN: 978-80-260-4243-3
- 21. Li D., Meng X., Li B.,** Profiling of anthocyanins from blueberries produced in China using HPLC-DAD-MS and exploratory analysis by principal component analysis, Journal of Food Composition and Analysis, 2013, vol. 47: 1–7
- 22. Can N. O, Arli G, Atkosar Z.:** Rapid determination of free anthocyanins in foodstuffs using high performance liquid chromatography, Food Chemistry, 2012, vol. 130: 1082–1089
- 23. Canuto G.A.B, Oliveira D.R., Conceicao L.S.M., Farah J.P.S, Tavares M.F.M.:** Development and validation of a liquid chromatography method for anthocyanins

in strawberry (*Fragaria spp.*) and complementary studies on stability, kinetics and antioxidant power, Food Chemistry, 2012, vol. 130: 566–574

**24. Wang E., Yin Y., Xu C., Liu J.:** Isolation of high-purity anthocyanin mixtures and monomers from blueberries using combined chromatographic techniques, Journal of Chromatography A, 2014, vol. 1327: 39–48

**25. Castrejo'n A. D. R., Eichholz I., Rohn S., Kroh L. W., Keil S.H.:** Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening, Food Chemistry, 2008, vol. 109: 564–572

**26. Gao L., Mazza G.:** Quantitation and distribution of simple and acylated anthocyanins and other phenolics in blueberries, Journal of food science, 1994, vol. 59: 1059

**28. You Q., Wang B., Chen F., Huang Z., Wang X., Luo P. G.:** Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars, Food Chemistry, 2011, vol. 125: 201-208