

# Stanovení $\beta$ -karotenu v rajčatech metodou HPLC

Bc. Petra Vojtíšková

---

Diplomová práce  
2008



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2007/2008

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Petra VOJTÍŠKOVÁ**

Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Stanovení beta-karotenu v rajčatech metodou HPLC**

Zásady pro vypracování:

1. Teoretické pojednání o karotenoidech.
2. Fyziologický popis rostliny rajčete.
3. Princip HPLC.
4. Experimentální část – izolace beta – karotenu z rajčat a jeho stanovení metodou HPLC s elektrochemickou detekcí.
5. Závěr

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

[1] VELÍŠEK, J. Chemie potravin 3. OSSIS, Tábor, 1999

[2] WILSON, K. , WALKER, J. Principles and Techniques of Practical Biochemistry. Fifth edition. Cambridge University Press 2000. ISBN 0521 65 87 3X (paperback)

[3] TAUNGBODHITHAM, A. K. a kol. Evaluation of extraction method for the analysis of carotenoids in fruits and vegetables. Food Chemistry, Volume 63, Issue 4, December 1998, dostupné z internetu: , str. 577-584

[4] <http://hplc.chem.shu.edu/HPLC/index.html>

[5] Lin, C.H., Chen, B.H. Stability of carotenoids in tomato juice during storage. Food Chemistry, Volume 90, Issue 4, May 2005, dostupné z internetu: , str. 837-846

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.**

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání diplomové práce:

**12. listopadu 2007**

Termín odevzdání diplomové práce:

**31. května 2008**

Ve Zlíně dne 2. května 2008

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.  
*děkan*



*v.z.*   
prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.  
*vedoucí katedry*

## **ABSTRAKT**

Cílem této diplomové práce je popis rajčete, karotenoidů, metody HPLC (High Performance Liquid Chromatography) a vytvoření metodiky na stanovení  $\beta$ -karotenu v rajčatech s praktickou aplikací na reálný vzorek. Ke stanovení byla použita metoda HPLC s elektrochemickou detekcí. K izolaci  $\beta$ -karotenu byla použita dvojnásobná extrakce směsí rozpouštědel aceton:hexan (50:50). Po filtraci extraktu byl filtrát odpařen do sucha na vakuové odparce a odparek byl rozpuštěn v ethanolu a aplikován na kolonu. Vhodnou mobilní fází byla směs rozpouštědel methanol:acetonitril:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5). Měření probíhala při parametrech detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV. Objem dávkovací smyčky byl 20  $\mu$ l, průtok mobilní fáze kolonou 1,1 ml.min<sup>-1</sup> a eluce probíhala izokraticky.

Klíčová slova:  $\beta$ -karoten, extrakce, HPLC, karotenoidy, mobilní fáze, rajče

## **ABSTRACT**

The aim of this diploma paper is to describe tomato, carotenoids, HPLC method and creating the suitable method for the determination of  $\beta$ -carotene in tomatoes, with practical application on tomato sample. For the determination the HPLC method with ECD (Electrochemical Detection) was used. For the isolation process a double extraction with the mixture of acetone:hexane (50:50) was used. After filtration of the extract, the filtrate was evaporated to dryness in a flask under vacuum. The residue was dissolved in ethanol and injected to the column. The mobile phase of methanol:acetonitrile:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) was used. Chromatographic conditions were follows: E1 = 500mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV. The injection volume was 20  $\mu$ l. The isocratic elution with the flow rate of 1,1 ml.min<sup>-1</sup> was used.

Keywords:  $\beta$ -carotene, carotenoids, extraction, HPLC, mobile phase, tomato

Ráda bych na tomto místě poděkovala především své vedoucí bakalářské práce Ing. Daniele Kramářové, Ph.D. za odbornou pomoc, podporu, rady a připomínky při tvorbě této práce. Dále bych chtěla poděkovat ostatním zaměstnancům Ústavu potravinářského inženýrství UTB ve Zlíně za poskytnutí zázemí a pomůcek potřebných k vypracování této práce.

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvolněno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně 15. 5. 2008

.....

podpis diplomanta

# OBSAH

|  |           |
|--|-----------|
| ÚVOD.....  | 8         |
| <b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>1 KAROTENOIDY .....</b>   | <b>10</b> |
| 1.1 STRUKTURA KAROTENOIDŮ .....  | 10        |
| 1.2 DĚLENÍ KAROTENOIDŮ .....   | 11        |
| 1.2.1 $\beta$ -karoten.....  | 12        |
| 1.2.2 Lykopen.....   | 13        |
| 1.3 VLASTNOSTI KAROTENOIDŮ .....                                       | 14        |
| 1.4 ZMĚNY KAROTENOIDŮ.....   | 14        |
| 1.4.1 Reakce s volnými radikály .....                                  | 15        |
| <b>2 RAJČE JEDLÉ (LYCOPERSICON ESCULENTUM).....</b>                    | <b>16</b> |
| 2.1 ODRŮDY RAJČAT .....  | 17        |
| 2.1.1 Vybrané odrůdy tyčkových rajčat.....                             | 18        |
| 2.1.2 Vybrané odrůdy keříčkových rajčat.....                           | 19        |
| <b>3 MOŽNOSTI STANOVENÍ KAROTENOIDŮ.....</b>                           | <b>20</b> |
| 3.1 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ $B$ -KAROTENU.....                   | 20        |
| 3.2 STANOVENÍ RETINOLU A $B$ -KAROTENU KAPALINOVOU CHROMATOGRÁFÍ ..... | 20        |
| <b>4 VYSOCEÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC) .....</b>           | <b>22</b> |
| 4.1 TECHNIKA SEPARACE LÁTEK .....                                      | 23        |
| 4.1.1 Frontální chromatografie.....                                    | 23        |
| 4.1.2 Vytěšňovací chromatografie.....                                  | 23        |
| 4.1.3 Eluční chromatografie .....                                      | 24        |
| 4.2 SOUČÁSTI KAPALINOVÉHO CHROMATOGRAFU .....                          | 24        |
| 4.2.1 Zásobník mobilních fází.....                                     | 24        |
| 4.2.2 Čerpadla (pumpy).....  | 25        |
| 4.2.3 Dávkovací zařízení.....  | 25        |
| 4.2.4 Kolona .....   | 25        |
| 4.2.5 Detektory .....  | 26        |
| <b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>   | <b>29</b> |
| <b>5 METODIKA .....</b>  | <b>30</b> |
| 5.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....                                  | 30        |
| 5.2 MATERIÁL .....   | 31        |
| 5.2.1 Vzorky rajčat .....  | 31        |
| 5.2.2 Obsah $\beta$ -karotenu v rajčatech .....                        | 31        |
| 5.2.3 Použité roztoky a chemikálie .....                               | 31        |
| 5.3 ANALÝZA JEDNOTLIVÝCH VZORKŮ.....                                   | 32        |
| 5.3.1 Extrakce karotenoidů z rajčat .....                              | 32        |
| 5.3.2 Optimalizace podmínek izolačního procesu .....                   | 33        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 5.4      | VYTVOŘENÍ METODIKY NA STANOVENÍ <i>B</i> -KAROTENU .....  | 35        |
| 5.4.1    | Kolona C8 Supelcosil 150 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m. ....  | 35        |
| 5.4.1.1  | Standard rozpuštěný v ethanolu .....  | 35        |
| 5.4.1.2  | Standard rozpuštěný v mobilní fázi .....  | 37        |
| 5.4.2    | Kolona C30 YMC Carotenoid S5 4,6 x 250 mm, 5 $\mu$ m.....   | 38        |
| 5.4.3    | Kolona C18 Supelcosil LC 18-DB 250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m .....  | 39        |
| 5.5      | SESTROJENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY PRO STANOVENÍ <i>B</i> -KAROTENU .....   | 39        |
| 5.6      | STANOVENÍ <i>B</i> -KAROTENU VE VZORKU RAJČETE .....  | 40        |
| 5.6.1    | Čerstvé rajče .....   | 40        |
| 5.6.2    | Rajče po třech týdnech skladování .....   | 40        |
| <b>6</b> | <b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>   | <b>42</b> |
| 6.1      | VÝSLEDKY EXTRAKCE <i>B</i> -KAROTENU Z RAJČETE .....  | 42        |
| 6.2      | VÝSLEDKY OPTIMALIZACE EXTRAKČNÍHO POSTUPU S NÁSLEDNOU<br>ANALÝZOU NA HPLC-ECD.....                          | 43        |
| 6.3      | VÝSLEDKY MĚŘENÍ OPTIMALIZAČNÍCH HPLC PODMÍNEK PRO STANDARD <i>B</i> -<br>KAROTENU.....                      | 45        |
| 6.4      | VÝSLEDKY MĚŘENÍ OPTIMALIZAČNÍCH HPLC PODMÍNEK PRO STANDARD <i>B</i> -<br>KAROTENU V MOBILNÍ FÁZI .....      | 57        |
| 6.5      | VÝSLEDKY OPTIMALIZACE HPLC PODMÍNEK PRO STANOVENÍ <i>B</i> -KAROTENU<br>NA KOLONĚ C30 YMC CAROTENOID .....  | 60        |
| 6.6      | VÝSLEDKY OPTIMALIZACE HPLC PODMÍNEK PRO STANOVENÍ <i>B</i> -KAROTENU<br>NA KOLONĚ C18 SUPELCOSIL LC-DB..... | 63        |
| 6.7      | VÝSLEDKY MĚŘENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY <i>B</i> -KAROTENU .....  | 67        |
| 6.8      | VÝSLEDKY MĚŘENÍ <i>B</i> -KAROTENU VE VZORKU ČERSTVÉHO RAJČETE.....   | 69        |
| 6.8.1    | Statistické zpracování výsledků měření $\beta$ -karotenu ve<br>vzorku čerstvého rajčete.....                | 70        |
| 6.9      | VÝSLEDKY MĚŘENÍ <i>B</i> -KAROTENU VE VZORKU RAJČETE PO TŘECH TÝDNECH<br>SKLADOVÁNÍ .....                   | 71        |
| <b>7</b> | <b>ZÁVĚR.....</b>   | <b>73</b> |
|          | <b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>   | <b>75</b> |
|          | <b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>   | <b>77</b> |
|          | <b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>   | <b>78</b> |
|          | <b>SEZNAM TABULEK.....</b>  | <b>83</b> |
|          | <b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>   | <b>84</b> |

## ÚVOD

Karotenoidy jsou látky, které se řadí mezi antioxidanty. Většina karotenoidních látek se řadí mezi tetraterpeny, tedy mezi terpenoidy formálně obsahující osm isoprenových jednotek.  $\beta$ -karoten v potravinách rostlinného původu je látka relativně stabilní v nepřítomnosti vzduchu. Za vyšších teplot a na světle (např. při konzervování potravin) však může isomerovat na tzv. neokaroteny, které vykazují aktivitu vitamínu A, pokud mají zachovaný alespoň jeden  $\beta$ -jononový cyklus, ale jsou méně intenzivně zbarvené.

Rajče je dvouděložná rostlina z čeledi lilkovitých (*Solanum lycopersicum*). Je to jednoletá rostlina, která může dorůst do výšky až čtyř metrů. Nezralé plody rajčat obsahují alkaloid solanin, který však při zrání z rajčat mizí. Rajče se pěstuje v mnoha odrůdách. Plodem jsou různě velké bobule, které se nazývají rajská jablka. Povrch mají hladký nebo žebnatý, pokožka a dužina jsou bělavě žluté, oranžové až temně červené. Pěstují se rajčata tyčková a keříčková (nízka). Tato zelenina má vysoký obsah minerálních látek a vitamínů, zejm. vitamínu C, B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub>, kyseliny askorbové a karotenů (provitaminů A).

Ke stanovení  $\beta$ -karotenu je zapotřebí jej nejprve vhodným způsobem izolovat, nejčastěji selektivní extrakcí. K vlastnímu stanovení se nejčastěji využívá různých chromatografických technik, např. dvourozměrné tenkovrstvé chromatografie, plynové chromatografie, nebo vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Přirozeně se vyskytující antioxidanty se stanovují metodou RP-HPLC (Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography) s UV-VIS (Ultraviolet-Visible) nebo ECD (Electrochemical Detection) detektorem. Kulometrická detekce poskytuje vysokou selektivitu a citlivost s detekcí v  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Tato diplomová práce se zabývá stanovením  $\beta$ -karotenu v rajčatech metodou HPLC s ECD detekcí. Hlavním úkolem této práce je vytvoření vhodné metodiky na stanovení  $\beta$ -karotenu a najít optimální metodu pro jeho izolaci. V rámci experimentu bylo zkoušeno několik druhů mobilních fází s různým poměrem chemikálií, různé typy chromatografických kolon a rozdílné parametry nastavené na detektoru. Následně byla provedena aplikace vytvořené metodiky na reálný vzorek rajčete.



## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

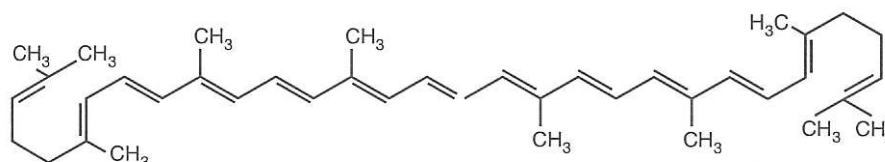
## 1 KAROTENOIDY

Karotenoidy jsou přírodní pigmenty, které jsou syntetizovány rostlinami a mikroorganismy. Struktura každého karotenoidu předurčuje jeho barvu i fotochemické vlastnosti jeho molekuly. <sup>(1)</sup>

### 1.1 Struktura karotenoidů

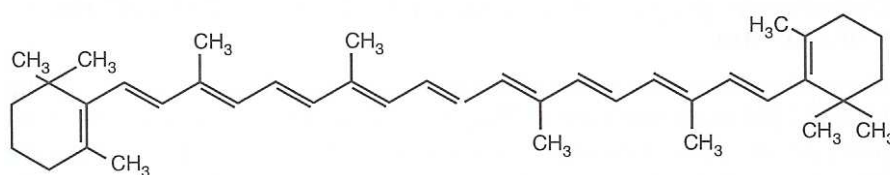
Většina karotenoidních látek se řadí mezi tetraterpeny, tedy mezi terpenoidy formálně obsahující osm isoprenových jednotek. Za svoji barevnost vděčí řetězci konjugovaných dvojných vazeb, které se vyskytují v několika základních strukturách a jejich kombinacích. <sup>(2)</sup>

Základní látkou karotenoidů je alifatický nenasycený tetraterpenický uhlovodík **lykopen**, podmiňující červenou barvu rajských jablíček. Jeho struktura je symetrická podle středové osy, má dvě izolované dvojně vazby a jedenáct konjugovaných, které jsou uspořádány vesměs v *trans*-konfiguraci („all-*trans*“). <sup>(3)</sup>



**Obr.1 Lykopen**

Biologický význam karotenoidů spočívá ve funkci provitaminů vitaminů skupiny A. Hydrolytickým štěpením dvojně vazby ležící v ose symetrie vzniká totiž z karotenoidů, které obsahují v molekule  $\beta$ -jononový kruh, vitamin A neboli retinol.  **$\beta$ -karoten** může poskytnout dvě molekuly vitaminu A,  $\alpha$ - a  $\gamma$ -karoten jen jednu, neboť druhá molekula se zbytkem  $\alpha$ -jononovým nebo pseudojononovým nevykazuje aktivitu vitaminu A. <sup>(3)</sup>

Obr.2  $\beta$ -karoten

Kvalitativní a kvantitativní složení karotenoidů závisí na mnoha faktorech jako je druh a odrůda rostliny, sezóna, stupeň zralosti, způsob zpracování apod. V mrkvi, rajčatech a paprikách se nachází stovky  $\text{mg.kg}^{-1}$  karotenoidů. V rajčatech je hlavním pigmentem lykopen, který běžně tvoří 90 % všech karotenoidů.  $\beta$ -karotenu je poměrně málo, asi do  $6 \text{ mg.kg}^{-1}$  a asi  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  představuje  $\gamma$ -karoten.<sup>(2)</sup>

## 1.2 Dělení karotenoidů

Karotenoidy se dělí na dvě hlavní skupiny:

- uhlovodíky nazývané karoteny,
- kyslíkaté sloučeniny odvozené od karotenů, které se nazývají xanthofyly.<sup>(2)</sup>

Xanthofyly primárně vznikají jako produkty biochemické oxidace karotenů. Například v rajčatech jsou jako minoritní pigmenty přítomny 1,2-epoxylykopen, 5,6-epoxylykopen, 1,2-epoxyfytoen aj. Nejběžnějšími látkami jsou monohydroxysubstituované deriváty alicyklických karotenů nazývané kryptoxanthiny, např.  $\beta$ -kryptoxanthin.<sup>(2)</sup>

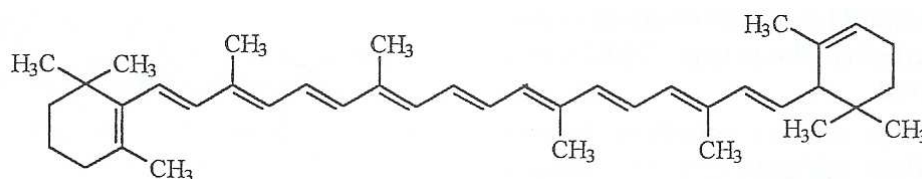
Nejjednodušším prototypem karotenů je acyklický uhlovodík lykopen. Běžně rozšířené jsou i hydroderiváty lykopenu jako je například dehydrolykopen. Další karoteny vznikají enzymově katalyzovanou cyklizací z alicyklických  $\psi$ -karotenů, kdy se tvoří  $\beta$ - nebo  $\alpha$ -jononové struktury. Struktura s  $\beta$ -jononovým cyklem se nazývá  $\beta$ -karoten, struktura s  $\alpha$ -jononovým cyklem je  $\epsilon$ -karoten.<sup>(2)</sup>

### 1.2.1 $\beta$ -karoten

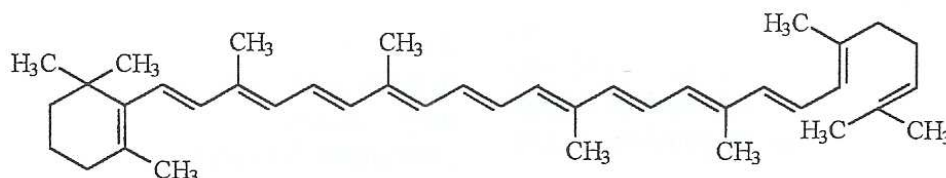
$\beta$ -karoten je v přírodě nejrozšířenějším provitaminem vitamínu A. V přírodním materiálu je obvykle doprovázen  $\alpha$ -karotenem a malým množstvím  $\gamma$ -karotenu. Molekula  $\beta$ -karotenu je tvořena dvěma  $\beta$ -jononovými kruhy spojenými čtyřmi isoprenovými jednotkami. Je hlavním dietním karotenoidem a v organismu plní dvě základní funkce:

1. Je prekurzorem vitamínu A (jeho molekula se v průběhu metabolických pochodů může rozštěpit na dvě molekuly vitamínu A),
2. a má významné antioxidační vlastnosti, které chrání organismus před oxidativním poškozením.

Molekula  $\beta$ -karotenu, stejně jako u ostatních karotenoidů, vzhledem ke své konfiguraci velmi snadno podléhá *cis*, *trans* isomerizaci, *all-trans* izomery jsou stáječší a v přirozených systémech se vyskytují nejčastěji.<sup>(1)</sup>



Obr.3  $\alpha$ -karoten



Obr.4  $\gamma$ -karoten

Dobrym zdrojem  $\beta$ -karotenu jsou především některé druhy ovoce a zeleniny, ale je obsažen i v živočišných produktech. Široká rozmezí obsahu karotenů u týchž rostlinných druhů je způsobena exogenními i endogenními vlivy, např. odrůdou, zralostí, vegetačním stadiem, složením půdy apod. Doporučená denní dávka pro  $\beta$ -karoten není stanovena, ale běžně se udává doporučení ve výši 2 až 4 mg za den. Tato dávka je nezbytná pro dosažení hodnoty snižující riziko ICHS (ischemické choroby srdeční). Stejně jako ostatní karotenoidy je  $\beta$ -karoten ze střevní sliznice přenášen prostřednictvím chylomikronů do krve, kde je transportován pomocí lipoproteinů.<sup>(1)</sup>

### 1.2.2 Lykopen

Lykopen je acyklický karotenoid, který je tvořen 8 isoprenovými jednotkami (jeho molekula má 40 atomů uhlíku a 11 lineárně sestavených konjugovaných dvojných vazeb). Nepůsobí jako provitamin vitamínu A, protože jeho molekula nemá  $\beta$ -jononový kruh. Lykopen je významným antioxidantem, kterému je věnována značná pozornost v souvislosti s prevencí civilizačních onemocnění.<sup>(1)</sup>

Lykopen se nachází v nemnoha potravinách. Ve většině potravin se vyskytuje v *all-trans* konfiguraci, což je jeho termodynamicky nejstabilnější forma. Více než 80 % lykopenu vstupujícího potravou do lidského organismu pochází z rajských jableček a produktů z nich vyrobených. Lykopen je poměrně stabilní během zpracování suroviny a při vaření, v tomatových produktech činí jeho podíl až 64 % všech karotenoidů, zatímco ostatní karoteny pouze 15 %.<sup>(1)</sup>

Byl zkoumán vliv mechanické homogenizace a tepelného zpracování se závěrem, že homogenizace a uvaření potravy před požitím zlepšuje vstřebatelnost a využitelnost karotenoidů včetně lykopenu (disociace vazeb na proteiny, disperze karotenoidních krystalických agregátů) a důležitou roli hraje i přítomnost lipidů.<sup>(1)</sup>

Lykopen, stejně jako ostatní karotenoidy, je po esterifikaci v enterocyту transportován v chylomikronech cestou *dictus thoracicus* (lymfatickou cestou) do krevního řečiště. Specifickým nosičem lykopenu i karotenoidů jsou lipoproteiny. *Cis*-isomery lykopenu jsou lépe rozpustné v lipofilních roztocích a mohou tedy být rychleji transportovány do buněk nebo mezi tkáněmi. Nejzávažnější biologický efekt z hlediska zlepšení a udržení zdraví je lykopenu a karotenoidům připisován v oblasti ochrany proti oxidativnímu poškození tkání.<sup>(1)</sup>

Zdrojem lykopenu, který významnou měrou posiluje obranný mechanismus lidského organismu proti negativnímu působení reaktivních forem kyslíku, je vyvážená strava s dostatečným zastoupením nosičů lykopenu.<sup>(1)</sup>

### 1.3 Vlastnosti karotenoidů

Karotenoidy mají žlutou, oranžovou až červenou barvu a za svůj název vděčí uhlovodíku karotenu ( $C_{40}H_{56}$ ) izolovanému poprvé z mrkve. Dnes je známo několik set různých karotenoidů podmiňujících typickou barvu nejen mrkve, ale např. rajských jablíček, pomerančů, meruněk, šípků, jeřabin, papriky, šafránu, kukuřice apod.<sup>(3)</sup>

Karotenoidy jsou převážně látky lipofilní, nerozpustné ve vodě, dobře rozpustné v nepolárních (organických) rozpouštědlech.<sup>(3)</sup>

S rostlinnou potravou se dostávají do živočišného organismu a podmiňují žluté zbarvení vaječného žloutku, másla i tkáňových tuků. Význam karotenoidů pro živočichy spočívá v tom, že jsou prekursory antixerofthalmických a antihemoraloptických faktorů-vitaminů A. Jsou tedy nepostradatelnými látkami podmiňujícími schopnost jak černobílého, tak barevného vidění.<sup>(3)</sup>

### 1.4 Změny karotenoidů

Stabilita karotenoidních barviv se v rostlinných pletivech během technologických operací liší podle typu přítomných karotenoidů. Ve většině případů se změny karotenoidních barviv posuzují z celkového poklesu obsahu barevných pigmentů sledováním změn absorpance při vlnové délce 450 nm.<sup>(4)</sup>

V kyselém prostředí podléhají karotenoidy isomeraci. V ovoci, které obsahuje většinou poly-*cis*-karotenoidy se tyto změny projevují intenzivním zbarvením. Při zahřátí kyselých roztoků vzniká mezi jednotlivými isomery rovnováha, daná typem karotenoidů, hodnotou pH, teplotou a dobou záhřevu.<sup>(4)</sup>

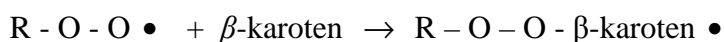
Nepříznivý vliv na stabilitu karotenoidních barviv má světlo, jehož působením dochází k isomeraci i k tvorbě epoxyderivátů. Karotenoidní barviva mohou být během technologických operací rovněž enzymově degradována *oxidasami* a *peroxidasami*.<sup>(4)</sup>

Přirozené retinoidy jako je  $\beta$ -karoten v potravinách rostlinného původu i estery retinolu v potravinách živočišného původu jsou látky relativně stabilní v nepřítomnosti vzduchu. Za vyšších teplot a na světle (např. při konzervování potravin) však mohou

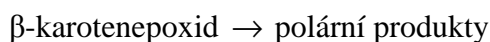
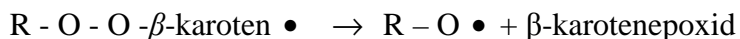
isomerovat na tzv. neokaroteny, které vykazují aktivitu vitamínu A, pokud mají zachovaný alespoň jeden  $\beta$ -jononový cyklus, ale jsou méně intenzivně zbarvené.<sup>(5)</sup>

#### 1.4.1 Reakce s volnými radikály

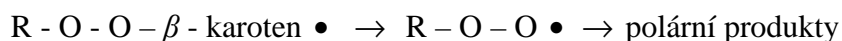
Předpokládá se, že hydroperoxidový radikál vznikající při autooxidaci lipidů není redukován na hydroperoxid, ale je zachycen konjugovaným polyenovým systémem a vznikají tak relativně stabilní radikály  $\beta$ -karotenů stabilizované rezonancí:



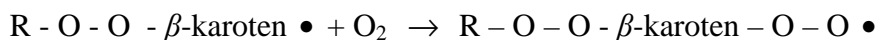
Tyto radikály se rozkládají za odštěpení alkoxylového radikálu a stabilizují se za vzniku epoxidů, karbonylových sloučenin a dalších produktů, např.:



Za anaerobních podmínek, resp. v přítomnosti malého množství kyslíku, kdy karoteny vykazují vyšší antioxidační účinky, reaguje  $\beta$ -karoten s dalším hydroperoxylovým radikálem na finální polární produkty:



Při vyšším parciálním tlaku kyslíku, např. při skladování tuku za přístupu vzduchu, může vznikat nestálý peroxylový radikál:



Alternativně vznikají stabilní polární produkty:



V reakcích s  $\beta$ -karotenem, kde vystupuje hydroperoxylový radikál  $R - O - O \bullet$  se může uplatnit také alkoxylový radikál  $R - O \bullet$ .<sup>(4)</sup>

Degradací  $\beta$ -karotenu a jiných karotenoidů vzniká také řada nízkomolekulárních produktů jako jsou uhlovodíky a kyslíkaté sloučeniny (epoxidy, ketony, aj.), které jsou významnou složkou aroma mnoha potravin.<sup>(5)</sup>

## 2 RAJČE JEDLÉ (LYCOPERSICON ESCULENTUM)

čeleď : Lilkovité (*Solanaceae*)

Rajčata se řadí k nejhodnotnějším druhům zeleniny. Z botanického hlediska je rajče ovoce, přesněji řečeno měkká bobule. Nezralé bobule rajčat obsahují alkaloid solanin, který po nadměrném požití dráždí centrální systém a způsobuje rozpad červených krvinek nebo obrnu dechového centra.<sup>(7)</sup>

Rajče je jednoletá rostlina. Má bylinný stonek, rozvětvený, vytvářející rozkladité keře. Listy jsou sečné, květenství je vijan. Rajčata jsou samosprašná. Plodem je bobule s různým počtem semenných komor. Plody jsou většinou zcela hladké. Zbarvení plodů může být červené, růžové, žluté nebo oranžové. Semena rajčete jsou drobná, šedavá, pokrytá chloupky.<sup>(6)</sup>

Předpokládá se, že divoce rostoucí druh rajčat pochází ze severní a střední části Jižní Ameriky, odkud se rozšířil do Střední a Severní Ameriky společně s kukuřicí, v průběhu lidských migrací před zhruba dvěma sty lety. Když se s nimi evropští dobyvatelé poprvé setkali v Mexiku, pěstovali už je tamní obyvatelé po celá staletí pod jmény tomati, tomatl, tumatle a tomatas. Když bylo rajče okolo roku 1523 poprvé dovezeno do Evropy, považovali je lidé kvůli výrazné vůni a jasně bílému, červenému nebo žlutému zbarvení za jedovaté, a proto se pěstovalo pouze pro okrasu.<sup>(8)</sup>



*Obr. 5. Rostlina rajčete*



*Obr.6. Květ rajčete*



Rajčata obsahují mnoho esenciálních živin, hlavně vitaminy A, C, E, foláty a různé biogenní prvky. Jsou také dobrým zdrojem karotenoidů.<sup>(9)</sup>

Během zrání mění rajčata barvu ze zelené přes oranžovou do jasně červené. Rajčata a výrobky z rajčat obsahují lykopen a  $\beta$ -karoten.  $\beta$ -karoten je karotenoid, který je schopen se přeměňovat na retinol lépe než jiné karotenoidy.  $\beta$ -karoten a lykopen jsou esenciální složky. Lykopen je hlavní karotenoid vyskytující se v rajčatech a výrobcích z rajčat, zabraňuje oxidaci LDL cholesterolu a snižuje riziko rozvoje aterosklerózy a kardiovaskulárních onemocnění. Lykopen je dvakrát účinnější antioxidant než  $\beta$ -karoten a desetkrát účinnější než vitamin E.<sup>(9)</sup>

## 2.1 Odrůdy rajčat

Odrůdy dělíme podle typu růstu, velikosti a tvaru.

**Keříčková (determinantní)** – růst výhonu je ukončen květenstvím, v dalším růstu pokračují boční výhony. Jsou to hlavně tzv. průmyslová rajčata určená pro velkovýrobu, sklízená kombajny a zpracovávána na džusy, kečupy, pyré. Vyznačují se pevnou dužninou plodu a vyšší sušinou. Plody bývají válcovité, ale i kulaté a vždy pevnější. Keříčkové odrůdy nejsou mezi pěstiteli příliš oblíbené. Patří sem např. DIANA, MINIGOLD, ORANŽE<sup>(10)</sup> (PŘÍLOHA I).

**Tyčková (indeterminantní)** – vyznačují se stále pokračujícím růstem hlavního výhonu. Pěstují se na opoře a vyžadují vylamování bočních výhonů, vyrůstajících v úžlabí listů. Patří sem např. PARTO F1, TIPO F1, TORINO F1, TORNÁDO F1<sup>(10)</sup> (PŘÍLOHA II).

**Třešňová rajčata** – plody velikosti třešní jsou výjimečně hutné, např. MINIGOLD.<sup>(10)</sup>

**Koktejllová rajčata** – plody mají hmotnost 20-40 g a průměr 2-4 cm, např. BEJBINO F1.<sup>(10)</sup>

**Beefsteaková (vícekomorová) rajčata** – plody mají většinou větší máslovou dužninu, např. BEEFMASTER VFN F1.<sup>(10)</sup>

### 2.1.1 Vybrané odrůdy tyčkových rajčat

#### **Albertovské žluté**

Polopozdní odrůda určená pro polní pěstování. Plod středně velký (v průměru 90 g), ploše kulovitý, u stopky velmi slabě žebernatý, v botanické zralosti sytě žlutý.<sup>(12)</sup>

*Obr.7. Albertovské žluté* (PŘÍLOHA III)

#### **Dagmar**

Raný až poloraný hybrid vhodný pro rychlení, v teplejších oblastech i pro polní pěstování. Plody jsou pevné s dobrou odolností proti praskání a přezrávání.<sup>(12)</sup>

*Obr.8. Dagmar* (PŘÍLOHA III)

#### **Goldkrone**

Velmi raná indeterminantní odrůda třešňového rajčete se žlutými plody, určená pro rychlení i polní pěstování. Rostlina je středně vzrůstná. Květenství převážně složené s vysokým počtem plodů. Plody jsou kulaté, malé, o hmotnosti 15-20 g.<sup>(13)</sup>

*Obr.9. Goldkrone* (PŘÍLOHA IV)

#### **CherrolaF1**

Vysoce výnosná, raná, indeterminantní hybridní odrůda třešňového rajčete, určená pro rychlení a polní pěstování. Rostlina je vzrůstná, středně tolerantní k plísni bramborové. Plody jsou kulaté, červené, malé, o hmotnosti 20 - 30 g. Na jednom vijanu dozrává průměrně okolo 20 plodů.<sup>(14)</sup>

*Obr.10. Cherrola F1* (PŘÍLOHA IV)

#### **Stupické polní rané**

Velmi raná odrůda s plody vynikající chuti. Poloindeterminantní odrůda vhodná především do okrajových oblastí. Doporučuje se vést 2 až 3 výhony s ukončením hlavního výhonu nad 4. - 6. výhonem. Lze jej také pěstovat jako keříčkové rajče bez vyvazování. Zaléváme větší dávkou vody v dlouhých intervalech.<sup>(15)</sup>

*Obr.11. Stupické polní rané* (PŘÍLOHA V)

### 2.1.2 Vybrané odrůdy keříčkových rajčat

#### **Denár**

Výrazně výnosná pozdnější odrůda. Vytváří hranaté až hruškovité plody větší velikosti se špičkou a vysokou výtěžností šťávy. Je vhodná pro ruční i mechanizovanou sklizeň zejména do lehčích půd s nedostatkem vody, kam ji předurčuje mohutnější vzrůst keře. Plody před sklizní neopadávají. Zdravotní stav porostu je dobrý.<sup>(16)</sup>

*Obr.12. Denár* (PŘÍLOHA VI)

#### **Minigold**

Třešňová odrůda s bohatými hrozny drobných žlutých plodů příjemné, lahodné chuti. Raná odrůda nenáročná na půdu.<sup>(16)</sup>

*Obr.13. Minigold* (PŘÍLOHA VI)

#### **Oranže**

Nová odrůda netradiční oranžové barvy plodu s vysokým obsahem vitamínů. Zbarvením i dietetickými vlastnostmi je přitažlivá a vhodná především pro děti. V zralosti je raná až středně raná, na půdu nenáročná. Plody jsou ploše kulovité, střední, oranžové.<sup>(16)</sup>

*Obr.14. Oranže* (PŘÍLOHA VII)

#### **Šejk**

Plastická raná odrůda polorozkladitého vzrůstu, pěstitelsky nenáročná obdobně jako Semarol. Plody jsou oválně hranaté s geneticky fixovaným vysokým obsahem červeného barviva v dužnině. Proto i barva protlaků a kečupů z nich vyrobených je intenzivně červená.<sup>(16)</sup>

*Obr.15. Šejk* (PŘÍLOHA VII)

### 3 MOŽNOSTI STANOVENÍ KAROTENOIDŮ

Pro stanovení karotenoidů se využívá jejich barevnosti, po chromatografickém rozdělení se stanoví spektrofotomericky. Pokud se nesledují fyziologicky významné deriváty, lze je stanovit pouze měřením absorpance při vlnové délce 450 nm.<sup>(4)</sup>

K izolaci karotenoidních barviv z rostlinných zelených materiálů slouží buď přímá extrakce acetonem, nebo extrakce diethyletherem po zmýdelnění alkalickým hydroxidem. Tímto způsobem se ze vzorku odstraní přítomné tuky, které by ve většině případů měly při stanovení karotenoidů, resp. jejich bližší identifikaci, rušivý vliv. Pokud jde o stanovení jednotlivých karotenoidních barviv je nutné směs karotenoidů po extrakci rozdělit některou z vhodných dělicích technik. Pro praktické účely našla uplatnění především kapalinová chromatografie na oxidu hlinitém a hořečnatém. K identifikaci lze rovněž použít  $R_F$  (retenční faktor) po rozdělení na papíře s obrácenými fázemi nebo na tenké vrstvě a po eluci rozdělených látek a spektrofotometrické charakterizaci.<sup>(4)</sup>

Pro analýzu se karotenoidy z různých materiálů získávají extrakční metodou. Nejvhodnějšími extrakčními činidly jsou ethanol a hexan.<sup>(17)</sup>

#### 3.1 Spektrofotometrické stanovení $\beta$ -karotenu

Žlutavě zbarvený petroletherový extrakt vzorku se čistí chromatograficky na sloupci oxidu hlinitého; karoteny se po eluci stanoví spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm. U materiálů s vyšším obsahem tuků se karoteny extrahují až po zmýdelnění. Metodu lze použít pro všechny druhy potravinářských surovin i potravin. Pouze způsoby čištění mohou být v jednotlivých případech rozdílné.<sup>(18)</sup>

#### 3.2 Stanovení retinolu a $\beta$ -karotenu kapalinovou chromatografií

Retinol a  $\beta$ -karoten se izolují ze vzorku nejčastěji po zmýdelnění extraktu n-hexanem, dělí se na sloupci oxidu hlinitého s obsahem 5 % vody a stanoví se spektrofotometricky. Taktéž lze použít extrakci retinolu a  $\beta$ -karotenu pomocí n-hexanu a methanolu. Rozpuštěné vzorky v methanolu lze aplikovat na kolonu za použití methanolu

jako imobilní fáze. Pokud se použije UV/VIS (Ultraviolet/Visible) detektor, pak tyto látky mají absorpční při 450 nm. Metoda je vhodná pro všechny druhy potravin obsahující vyšší množství retinolu a  $\beta$ -karotenu. Ve srovnání s klasickými metodami je značně rychlá. Dělení lze provádět automaticky za použití vhodného zařízení pro kapalinovou chromatografii.<sup>(18)</sup>

## 4 VYSOCEÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC)

Chromatografie je separační proces, při kterém se látky rozdělují mezi dvě nemísitelné fáze, jednu pohyblivou (mobilní) a druhou nepohyblivou (stacionární), na základě fyzikálně-chemických interakcí jako jsou adsorpce, iontová výměna apod.<sup>(19)</sup>

Při průchodu kolonou každá molekula vzorku přejde mnohokrát z proudu mobilní fáze na povrch sorbentu a zpět. V každém okamžiku musí být systém blízko rovnováhy, kdy počet sorbovaných molekul se přibližně rovná počtu molekul desorbovaných. Chromatografická kolona je však dynamický systém, který nikdy nemůže dosáhnout skutečné rovnováhy. Doba, kterou průměrná molekula určité složky setrvává na povrchu sorbentu, závisí na velikosti interakce mezi složkou a sorbentem a určuje pořadí, v jakém složka vychází z kolony. Čím větší je interakce, tím později složka vychází - tím má větší retenční čas.<sup>(19)</sup>

Kapalinová chromatografie se využívá především k separaci směsí látek, které jsou netěkavé nebo špatně těkavé a termicky labilní (až 85 % všech sloučenin). K separaci využívá různé systémy pevné nebo kapalně stacionární fáze a kapalně mobilní fáze. O separaci složek vzorku rozhodují nejen jejich interakce se stacionární fází, ale rovněž velmi výrazně použitá mobilní fáze. Podle uspořádání stacionární fáze rozlišujeme kolonovou a tenkovrstvou, či papírovou chromatografii.<sup>(20)</sup>

V kapalinové chromatografii se využívají čtyři systémy podle převažujícího mechanismu separace:

- kapalinová adsorpční chromatografie (LSC, Liquid-Solid Chromatography),
- kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC, Liquid-Liquid Chromatography),
- gelová permeační chromatografie (GPC, Gel Permeation Chromatography),
- iontově výměnná chromatografie (IEC, Ion Exclusion Chromatography).<sup>(20)</sup>

Vysoceúčinná kapalinová chromatografie je separační metoda, která se využívá k rozdělování směsí a následnému stanovování jednotlivých složek směsi vhodnou metodou. Tato metoda má velmi široké použití, vyznačuje se rychlostí a vysokou citlivostí. HPLC se řadí do sloupcové chromatografie. Sloupec obsahuje stacionární část, která

je spojena s vhodnou matricí a je umístěna do kovové kolony, a pohyblivou část, která prochází kolonou. Průchod mobilní fáze není samovolný, je nutno použít čerpadla. <sup>(21)</sup>

## 4.1 Technika separace látek

Chromatografickou separaci látek v koloně lze provést třemi rozdílnými technikami:

1. Frontální
2. Vytěšňovací
3. Eluční

### 4.1.1 Frontální chromatografie

V případě frontální chromatografie je vzorek přímo rozpuštěn v mobilní fázi nebo slouží jako mobilní fáze. Při průtoku ložem stacionární fáze jsou zadržovány složky s velkým rozdělovacím koeficientem až k nasycení stacionární fáze všemi složkami přiváděné směsi. Poté je z kolony vymývána nejméně zadržovaná složka, po ní směs první složky a silněji sorbované složky atd., až nakonec je z kolony vymývána směs téhož složení, jako je vzorek v mobilní fázi. Výměnou mobilní fáze se vzorkem za čistou mobilní fázi se dosáhne resorpce složek směsi mezi stacionární fázi v opačném pořadí. Nejprve se eluována směs všech složek, poté postupně jednotlivé směsi zmenšené vždy o předchozí nejméně sorbovanou složku, až nakonec samotná nejvíce sorbovaná složka a za ní samostatná mobilní fáze. Výsledkem je separace pouze nejméně a nejvíce sorbované složky ze vzorku. <sup>(20)</sup>

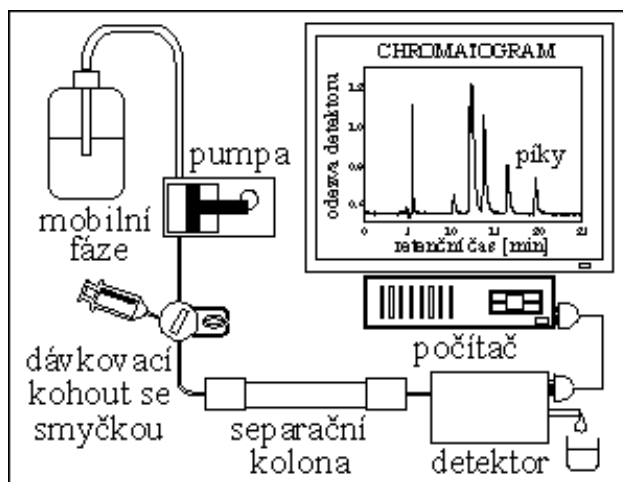
### 4.1.2 Vytěšňovací chromatografie

Chromatogram složek směsi se vyvíjí proudem silně se sorbující kapaliny nebo plynu. Mobilní fáze sorbuje silněji než kterákoliv složka vzorku a působí jako vytěšňovací činidlo, přičemž tlačí vzorek před sebou. Výsledkem jsou zóny, které nejsou odděleny mobilní fází a chromatogram ve formě stupňů. <sup>(20)</sup>

### 4.1.3 Eluční chromatografie

Při eluční chromatografii je analyzovaná směs jednorázově vnášena do přerušného nebo nepřetržitého proudu mobilní fáze. Podmínkou úspěšné separace je, aby složka vzorku byla stacionární fází zadržována silněji, než složky mobilní fáze. Jednotlivé složky jsou eluovány v pořadí rostoucí velikosti interakce se stacionární fází a jsou odděleny čistou mobilní fází. <sup>(20)</sup>

## 4.2 Součásti kapalinového chromatografu



Obr.16. Součásti kapalinového chromatografu <sup>(22)</sup>

Systém HPLC se skládá ze zásobníku mobilních fází, čerpadla (pumpy), dávkovacího zařízení, rozdělovací kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení. <sup>(23)</sup>

### 4.2.1 Zásobník mobilních fází

Kapalinový chromatograf může obsahovat zásobníky na více kapalin a je možné naprogramovat zařízení pro řízení změn ve složení výsledné mobilní fáze. Zůstává-li složení mobilní fáze stálé, hovoříme o isokratické eluci. Pokud lze složení mobilní fáze měnit v průběhu analýzy, hovoříme o eluci gradientové. <sup>(21)</sup>



Všechna rozpuštědla pro použití v HPLC systému musí být přečištěná, protože stopy přítomných nečistot mohou ovlivnit kolonu a zasahovat do detekčního systému.<sup>(21)</sup>

#### 4.2.2 Čerpadla (pumpy)

Kapalina se do kolony čerpá pístovými nebo membránovými čerpadly. Obvykle pracují dvě čerpadla tak, aby na sebe navazovaly fáze výtlačku a fáze sání.<sup>(21)</sup> Při každém pohybu pístu nebo membrány vpřed dochází k vytlačení malého objemu mobilní fáze do chromatografického systému a při pohybu zpět se komora naplní. Množství dodávané mobilní fáze se řídí výškou zdvihu pístu nebo membrány. Čerpadla musí zajišťovat konstantní průtok mobilní fáze. Všechny části čerpadla, které jsou ve styku s mobilní fází, musí být zhotoveny z takových materiálů, aby nedocházelo ke kontaminaci mobilní fáze nebo ke korozi těchto částí.<sup>(19)</sup>

#### 4.2.3 Dávkovací zařízení

Vzorek se dávkuje do kolony buď přímým nástřikem injekční stříkačkou, nebo předřazenou dávkovací smyčkou. Injekční stříkačka je opatřena dlouhou jehlou, aby bylo možno vnést vzorek až na začátek náplně, a to do středu průřezu kolony. Nástřikovací hlava musí mít malý objem a celý prostor musí být dokonale vyplachován mobilní fází. Druhý způsob dávkování používá šesticečný kohout s dávkovací smyčkou. Při dávkování se nejprve naplní smyčka vzorkem a potom se kohout přepne do druhé polohy, kdy eluent protéká smyčkou a unáší vzorek do kolony. Dávkovací smyčky umožňují dávkovat i větší množství vzorku až do tlaku 40 MPa.<sup>(19)</sup>

#### 4.2.4 Kolona

Kolony používáme pouze náplňové. Jsou ze silného borosilikátového skla pro nižší tlaky nebo z nerezavějící oceli pro tlaky vysoké (kolem 50 MPa). Pro analytické účely se používají kolony o délce 5 až 30 cm.<sup>(21)</sup>

Charakter stacionární fáze závisí na chromatografickém systému. V HPLC se často vyskytují pojmy "normální fáze" a "reverzní fáze". U normálních fází je stacionární fáze polární a mobilní fáze je nepolární. Nejčastěji se, jako stacionární fáze, používá alkylamin vázaný na silikagel. Mobilní fází je obvykle organické rozpouštědlo, např. hexan, heptan, dichlormethan nebo ethylacetát. Pořadí vymývání analytů je takové, že nejméně polární látka je eluována jako první a nejvíce polární látka jako poslední. U chromatografie s obrácenými fází RP-HPLC (Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography) je stacionární fáze nepolární a mobilní fáze polární. Stacionární fáze musí být inertní a s analyty se vytvářejí pouze hydrofobní vazby. Mobilní fází je obvykle voda nebo vodné roztoky pufrů, methanol, acetonitril, tetrahydrofuran nebo jejich směsi. Polární látky jsou eluovány jako první, nepolární látky jako poslední. <sup>(21)</sup>

#### 4.2.5 Detektory

V současné době jsou v podstatě všechny typy používaných detektorů koncentrační a lze je rozdělit do dvou skupin a to na:

1. Selektivní, jejichž signál je úměrný pouze koncentraci detekované komponenty v eluentu,
2. a univerzální, jejichž signál je úměrný celkové vlastnosti eluentu jako celku, tj. mobilní fázi a detekované komponenty. <sup>(22)</sup>

Na detektor jsou kladeny určité ideální požadavky:

- možnost detekce všech přítomných komponent (univerzálnost),
- odezva detektoru by měla být okamžitá a lineární v co nejširším koncentračním rozmezí (široký lineárně dynamický rozsah),
- vysoká citlivost a nízkou úroveň šumu,
- robustní vůči změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty,
- mimokolonový příspěvek k rozšiřování elučních zón co nejmenší,
- umožnit gradientovou eluci. <sup>(22)</sup>

V praxi jsou nejčastěji používané tyto detektory:

### 1. Fotometrický detektor (UV/VIS)

Většina organických látek absorbuje v oblasti UV záření, některé i ve viditelné oblasti světla. Detektory pracují buď s fixní vlnovou délkou (nejčastěji 254 nm), s možností výběru několika vlnových délek, nebo jsou opatřeny monochromátorem a pracují na principu spektrofotometru v rozsahu 190-400 nm. Světlo zdroje prochází průtokovou celou, intenzita prošlého paprsku je měřena fotonásobičem, kontinuálně se snímá signál eluovaných složek. <sup>(20)</sup>

### 2. Detektor diodového pole DAD (Diode Array Detector)

Umožňuje získat spektrální data látek v průběhu celé analýzy. Průtokovou celou prochází polychromatické světlo, transmitované záření je spektrálně rozkládáno holografickou mřížkou, takže na každou z miniaturních fotodiod umístěných na destičce o délce cca 1 cm dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v průtokové cele detektoru. Použití DAD je podmíněno softwarovým zázemím, které umožňuje např. průběžné hodnocení tzv. "čistoty píků", identifikaci neznámých složek pomocí spektrální knihovny, rychlé stanovení absorpčního maxima látky, kvantifikaci píků s odlišnými spektrálními vlastnostmi. <sup>(20)</sup>

### 3. Elektrochemický detektor

Umožňuje stanovit velmi nízké koncentrace látek v eluentu v případě, že tyto látky jsou elektrochemicky aktivní (redukovatelné nebo oxidovatelné). Měří se proud protékající mezi polarizovatelnou pracovní elektrodou a pomocnou elektrodou v závislosti na vloženém napětí. Detektor pracuje buď jako polarografický se rtuťovou kapkovou elektrodou, nebo s tuhou elektrodou zhotovenou např. z grafitu. Obecně se tento detektor nehodí pro detekci gradientové eluce. <sup>(20)</sup>

Používají se dva typy detektorů, a to amperometrické nebo kulometrické. Elektrochemický detektor se nejčastěji používá pro analyzování katecholaminů, vitaminů a antioxidantů. <sup>(21)</sup>

#### 4. Hmotnostní detektor LC/MS (Liquid Chromatography with Mass Spectroscopy Detection)

Snímání hmotnostního spektra během eluce látek je velmi výhodné pro strukturní analýzu a identifikaci látek ve složitých směsích. Technicky výhodné pro přímé napojení je používání mikrokolon a kapilárních kolon.<sup>(20)</sup>

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 METODIKA

### 5.1 Použité přístroje a pomůcky

- Standardní laboratorní vybavení:

- předvážky (Kern, Germany)
- analytické váhy (Adam, AFA 210 LC, Schoeller instruments)
- lednice (Whirlpool)
- temperovaná vodní lázeň s třepačkou (Memmert)
- digestoř (MERCY s.r.o.)
- vakuová odparka (INGOS, RVO 400 A)
- hliníková fólie
- filtrační aparatura
- filtrační papír (FILTRAK No.390,  $\varnothing$  12,5 cm)
- běžné laboratorní sklo a pomůcky

- Speciální zařízení:

Aparatura pro HPLC:

- pumpa (ESA, USA)
- detektor (Coulchem III, ESA, USA)
- dávkovací ventil analytický smyčkový (dávkovací smyčka o objemu 20  $\mu$ l, Rheodyne, USA)
- kolony (C8 Supelcosil 150 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m; C30 YMC Carotenoid S5 4,6 x 250 mm, 5 $\mu$ m ; C18 Supelcosil LC18-DB, 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m)
- termostat kolony
- Guard cela 5020
- Analytická cela 5010A

- PC s vyhodnocovacím programem Clarity

Dávkovací stříkačka (objem 50  $\mu$ l, Hamilton, Reno, Nevada)

Mikrofiltry 0,45  $\mu$ m (Cronus filter, Nylon 13 mm x 0,45  $\mu$ m, UK)

Aparatura na filtraci mobilní fáze (SUPELCO)

Filtry 0,2  $\mu$ m (SUPELCO, USA)

Injekční stříkačka (Chirana, SR)

## 5.2 Materiál

### 5.2.1 Vzorky rajčat

Vzorky rajčat byly zakoupeny v obchodní síti Interspar. Jednalo se o rajčata, která byla dovezena ze Španělska.

### 5.2.2 Obsah $\beta$ -karotenu v rajčatech

Z dostupné literatury byly čerpány informace o přibližném obsahu  $\beta$ -karotenu v rajčatech. Hiemer uvádí, že ve zkoumaných vzorcích rajčat bylo stanoveno 0,543 mg  $\beta$ -karotenu ve 100 g čerstvé hmoty. K tomuto stanovení bylo použito 10 g rostlinné tkáně a byla použita metoda RP-HPLC s programovatelnou změnou vlnové délky.<sup>(24)</sup>

### 5.2.3 Použité roztoky a chemikálie

- standard  $\beta$ -karotenu (Fluka)
- redestilovaná voda
- ethanol pro HPLC (LiChrosolv, Merck KgaA, Germany)
- methanol pro HPLC (LiChrosolv, Merck KgaA, Germany)
- acetonitril pro HPLC (LiChrosolv, Merck KgaA, Germany)

- $\text{H}_3\text{PO}_4$  (LACHEMA Brno, závod Neratovice)
- aceton (PENTA, Ing. Petr Švec, Chrudim)
- n-hexan (PENTA, Ing. Petr Švec, Chrudim)
- chloroform (PENTA, Ing. Petr Švec, Chrudim)

### 5.3 Analýza jednotlivých vzorků

#### 5.3.1 Extrakce karotenoidů z rajčat

Pokrájená čerstvá rajčata byla rozmixována ponorným mixérem a ze získané hmoty byly prováděny navážky na jednotlivé extrakce. Navážka na jednu extrakci byla 5 g vzorku. Navážka byla provedena s přesností na 0,0001 g.

- a) K jednotlivým navážkám vzorku v zábrusových baňkách byla přidávána různá extrakční činidla.

Použitá rozpouštědla: ethanol, aceton, hexan, chloroform – přidaný objem činil 10 ml.

Směsi: ethanol:aceton (50:50), ethanol:hexan (50:50), aceton:hexan (50:50) – přidaný objem činil 20 ml, od každého rozpouštědla bylo použito 10 ml.

Po přidání rozpouštědel byly vzorky třepány v třepačce a zároveň extrahovány po dobu 20 minut při laboratorní teplotě. Zábrusové baňky byly obaleny Al-fólií. Paralelně druhá část vzorků byla extrahována v třepací vodní lázni vyhřáté na 35°C. Extrakce pomocí chloroformu byla provedena pouze při laboratorní teplotě. Po skončení extrakce byly jednotlivé baňky vyhodnoceny.

- b) Podle výsledků předchozího experimentu byl proveden následující experiment. Byla provedena extrakce vzorku rajčat při laboratorní teplotě. Byly použity směsi rozpouštědel ethanol:hexan (50:50) a aceton:hexan (50:50).



Do 4 zábrusových baněk bylo naváženo 10 g připraveného vzorku rajčat s přesností na 0,0001 g. K navážce vzorku byly přidány směsi rozpouštědel v celkovém množství 20 ml. Do dvou baněk se vzorkem byla přidána směs ethanol:hexan (50:50) a do zbylých dvou směs aceton:hexan (50:50). Následovala extrakce v třepačce po dobu 20 minut. Po extrakci byla provedena optimalizace oddělení vyextrahovaného podílu vzorku s karotenoidy a zbylé části vzorku. Obsahy baněk, každé s jinou směsí rozpouštědel, byly přefiltrovány přes filtrační papír, filtrát byl jímán do čisté a suché kádinky za nepřístupu světla. Obsahy zbylých dvou baněk byly kvantitativně převedeny do dělicích nálevek. Poněvadž nebylo možné v dělicí nálevce směs rozpouštědel a vzorku kvantitativně oddělit, byla další část experimentu provedena pouze se získanými filtráty. Tyto získané filtráty byly převedeny do varných baněk a odpařeny na vakuové odparce při teplotě vodní lázně do 40°C. Doba odpařování byla 3-5 minut. Získané odparky byly následně rozpuštěny. Jeden odparek byl rozpuštěn v 5 ml ethanolu a druhý odparek v 5 ml methanolu.

### 5.3.2 Optimalizace podmínek izolačního procesu

Pokrájené rajče bylo rozmixováno a ze vzniklé hmoty bylo odváženo do dvou zábrusových baněk po 10 g vzorku s přesností na 0,0001 g. Do jedné baňky byla přidána směs rozpouštědel ethanol:hexan (50:50) a do druhé aceton:hexan (50:50). Baňky se vzorkem a rozpouštědly byly uzavřeny, obaleny Al-fólií a vloženy do třepačky, kde byly třepány po dobu 20 minut při teplotě 35°C. Po ukončení extrakce byla odebrána čirá vrstva extraktu a byla opět přidána směs rozpouštědel. Následovala druhá extrakce po dobu 20 minut za stejných podmínek. Po ukončení extrakce byly oba filtráty slity dohromady a přefiltrovány přes filtrační papír. Filtráty byly kvantitativně převedeny do varných baněk a rozpouštědla byla odpařena na vakuové odparce při teplotě lázně do 40°C. Doba odpařování byla 3-5 minut.

a) Odparek získaný odpařením směsi aceton:hexan byl rozpuštěn ve 20 ml ethanolu. Vzniklý roztok byl přefiltrován přes nylonový filtr s velikostí pórů 0,45 $\mu$ m. Následovala zkouška, zda se roztok nebude srážet s mobilní fází používanou při HPLC. Mobilní fáze byla složena z přefiltrované směsi methanol:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:redestilovaná H<sub>2</sub>O (99:0,5:0,5). Vzorek

se s mobilní fází nesrážel a mohl být aplikován na kolonu. Po nastavení parametrů na detektoru byl na kolonu nastříknut vzorek. Objem dávkovací smyčky byl 20 $\mu$ l.

První měření probíhalo s parametry detektoru: E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 650 mV. Průtok mobilní fáze byl 1 ml.min<sup>-1</sup>, eluce probíhala izokraticky a byla použita kolona C8 Supelcosil 150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m.

Pro druhé měření byly parametry detektoru změněny: E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV. Průtok mobilní fáze byl 1 ml.min<sup>-1</sup>, eluce probíhala izokraticky a byla použita kolona C8 Supelcosil 150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m.

b) Odparek získaný odpařením směsi ethanol:hexan byl také rozpuštěn ve 20 ml ethanolu. Vzniklý roztok byl přefiltrován přes nylonový filtr s velikostí pórů 0,45 $\mu$ m. Následovala zkouška, zda se roztok nebude srážet s mobilní fází používanou při HPLC. Mobilní fáze byla složena z přefiltrované směsi methanol:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>:redistilovaná H<sub>2</sub>O (99:0,5:0,5). Vzorek se s mobilní fází nesrážel a mohl být aplikován na kolonu. Po nastavení parametrů na detektoru byl na kolonu nastříknut vzorek. Objem dávkovací smyčky byl 20 $\mu$ l.

První měření probíhalo s parametry detektoru: E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 650 mV. Průtok mobilní fáze byl 1 ml.min<sup>-1</sup>, eluce probíhala izokraticky a byla použita kolona C8 Supelcosil 150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m.

Pro druhé měření byly parametry detektoru změněny: E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV. Průtok mobilní fáze byl 1 ml.min<sup>-1</sup>, eluce probíhala izokraticky a byla použita kolona C8 Supelcosil 150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m.

## 5.4 Vytvoření metodiky na stanovení $\beta$ -karotenu

### 5.4.1 Kolona C8 Supelcosil 150 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m.

#### 5.4.1.1 Standard rozpuštěný v ethanolu

Byla zkoušena metodika na stanovení  $\beta$ -karotenu. Byl používán standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu a různé typy mobilní fáze o různém složení s různými poměry jednotlivých komponent. Průtok mobilní fáze kolonou byl zvýšen na 1,1 ml.min<sup>-1</sup> a eluce probíhala izokraticky. Objem dávkovací smyčky byl 20  $\mu$ l.

#### Typy mobilních fází:

##### a) ACN (acetonitril):rH<sub>2</sub>O (redestilovaná voda):H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (99:0,5:0,5)

První měření probíhalo při parametrech detektoru: E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.

Druhé měření probíhalo s parametry detektoru: E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.

##### b) ACN:rH<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (80:19,5:0,5)

První měření probíhalo při parametrech detektoru: E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.

Druhé měření probíhalo s parametry detektoru: E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.

##### c) ACN:rH<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5)

První měření probíhalo při parametrech detektoru: E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.

Druhé měření probíhalo s parametry detektoru: E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.

**d) ACN:rH<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (50:49,5:0,5)**

První měření probíhalo při parametrech detektoru: E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.

Druhé měření probíhalo s parametry detektoru: E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.

**e) MetOH (methanol):ACN: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5)**

První měření probíhalo při parametrech detektoru: E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.

Druhé měření probíhalo s parametry detektoru: E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.

**f) MetOH:ACN: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5)**

První měření probíhalo při parametrech detektoru: E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.

Druhé měření probíhalo s parametry detektoru: E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.

**g) MetOH:ACN: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (50:49,5:0,5)**

První měření probíhalo při parametrech detektoru: E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.

Druhé měření probíhalo s parametry detektoru: E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.

**h) MetOH:ACN: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (30:69,5:0,5)**

První měření probíhalo při parametrech detektoru: E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.

Druhé měření probíhalo s parametry detektoru: E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.

**ch) MetOH:ACN: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (10:89,5:0,5)**

První měření probíhalo při parametrech detektoru: E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.

Druhé měření probíhalo s parametry detektoru: E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.

**5.4.1.2 Standard rozpuštěný v mobilní fázi**

V rámci optimalizace metodiky bylo také odzkoušeno, zda by vzorek mohl být rozpuštěný v mobilní fázi. Byly použity mobilní fáze o složení MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5) a MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5). Průtok mobilní fáze kolonou byl 1,1 ml.min<sup>-1</sup> a eluce probíhala izokraticky. Objem dávkovací smyčky byl 20 µl. Pro měření byl použit standard β-karotenu rozpuštěný v příslušné mobilní fázi. Byla použita kolona C8 Supelcosil 150 x 4,6 mm, 5 µm.

**a) Mobilní fáze MetOH:ACN: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5)**

První měření probíhalo při parametrech detektoru: E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.

Druhé měření probíhalo s parametry detektoru: E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.

**b) Mobilní fáze MetOH:ACN: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5)**

První měření probíhalo při parametrech detektoru: E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.

Druhé měření probíhalo s parametry detektoru: E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.

**5.4.2 Kolona C30 YMC Carotenoid S5 4,6 x 250 mm, 5μm**

Pro zjištění, zda by nebylo možné použít kolonu jiného typu byl zkoušen další druh kolony. Byla použita a vyzkoušena kolona C30 YMC Carotenoid S5 4,6 x 250 mm, 5μm. Pro měření byly použity mobilní fáze o složení MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5) a MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5), nastříkávaný vzorek byl rozpuštěný v ethanolu. Průtok mobilní fáze kolonou byl 1,0 ml.min<sup>-1</sup> a eluce probíhala izokraticky. Objem dávkovací smyčky byl 20 μl.

**a) Mobilní fáze MetOH:ACN: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5)**

První měření probíhalo při parametrech detektoru: E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.

Druhé měření probíhalo s parametry detektoru: E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.

**b) Mobilní fáze MetOH:ACN: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5)**

První měření probíhalo při parametrech detektoru: E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.

Druhé měření probíhalo s parametry detektoru: E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.

### 5.4.3 Kolona C18 Supelcosil LC 18-DB 250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m

Dále byla použita kolona C18 Supelcosil LC18-DB 250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m. Pro měření byly použity mobilní fáze o složení MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5) a MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5), nastříkávaný vzorek byl rozpuštěný v ethanolu. Průtok mobilní fáze kolonou byl 1,1 ml.min<sup>-1</sup> a eluce probíhala izokraticky. Objem dávkovací smyčky byl 20  $\mu$ l.

#### a) Mobilní fáze MetOH:ACN: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5)

První měření probíhalo při parametrech detektoru: E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.

Druhé měření probíhalo s parametry detektoru: E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.

#### b) Mobilní fáze MetOH:ACN: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5)

První měření probíhalo při parametrech detektoru: E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.

Druhé měření probíhalo s parametry detektoru: E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.

## 5.5 Sestrojení kalibrační křivky pro stanovení $\beta$ -karotenu

Na základě vyzkoušených druhů kolon a mobilních fází byla kalibrační křivka naměřena na koloně C18 Supelcosil LC18-DB 250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m, s použitím mobilní fáze o složení MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) při nastavených parametrech detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.

Jako standard  $\beta$ -karotenu byl použit standard od firmy Fluka. 0,05 g standardu  $\beta$ -karotenu bylo rozpuštěno v ethanolu ve 100 ml odměrné baňce a doplněno ethanolom po rysku. Výchozí koncentrace roztoku byla 500  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>. Ze zásobního roztoku byly připraveny dalším ředěním ethanolom kalibrační roztoky o koncentraci 25, 50, 100, 200,

300 a 400  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Kalibrační křivka byla sestavena jako závislost plochy píku ( $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ) na koncentraci roztoku  $\beta$ -karotenu ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

## 5.6 Stanovení $\beta$ -karotenu ve vzorku rajčete

### 5.6.1 Čerstvé rajče

Izolace  $\beta$ -karotenu z rajčete byla provedena dle postupu uvedeného v kapitole 5.3.2. Odparek byl rozpuštěn v 5 ml ethanolu, přefiltrován přes nylonový filtr s velikostí pórů 0,45  $\mu\text{m}$  a aplikován na kolonu. Použitá mobilní fáze měla složení MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5). Průtok mobilní fáze kolonou byl 1,1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , objem dávkovací smyčky 20  $\mu\text{l}$  a eluce probíhala izokraticky.

Měření probíhalo při nastavených parametrech detektoru: E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV, na koloně C18 Supelcosil LC18-DB 250 x 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ , při teplotě 30°C. Každý vzorek byl měřen pětkrát. Z naměřených hodnot bylo podle rovnice z kalibrační křivky vypočteno  $x$  (koncentrace  $\beta$ -karotenu obsaženého ve vzorku rajčete).

$$y = 0,3026x + 10,353$$

$$x = \frac{y - 10,353}{0,3026} \cdot \frac{\text{ethanol}(ml)}{\text{navážka}(g)} \cdot \frac{100}{1000} \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1} \text{ čerstvé hmoty}$$

### 5.6.2 Rajče po třech týdnech skladování

Izolace  $\beta$ -karotenu z rajčete byla provedena dle postupu uvedeného v kapitole 5.3.2. Odparek byl rozpuštěn v 5 ml ethanolu, přefiltrován přes nylonový filtr s velikostí pórů 0,45  $\mu\text{m}$  a aplikován na kolonu. Použitá mobilní fáze měla složení MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5). Průtok mobilní fáze kolonou byl 1,1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , objem dávkovací smyčky 20  $\mu\text{l}$  a eluce probíhala izokraticky.



Měření probíhalo při nastavených parametrech detektoru:  $E1 = 500 \text{ mV}$ ,  $E2 = 600 \text{ mV}$ ,  $G = 750 \text{ mV}$ , na koloně C18 Supelcosil LC18-DB 250 x 4,6 mm,  $5\mu\text{m}$ , při teplotě  $30^\circ\text{C}$ . Každý vzorek byl měřen pětkrát.

Podmínky skladování: v ledničce při teplotě  $4^\circ\text{C}$  a v laboratoři při teplotě  $23^\circ\text{C}$ .

## 6 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 6.1 Výsledky extrakce $\beta$ -karotenu z rajčete

a) Extrakce  $\beta$ -karotenu byla provedena dle postupu uvedeného v kapitole 5.3.1. Ke vzorku byly přidány směsi rozpouštědel v množství 10 ml od každého rozpouštědla. Extrakce probíhala v třepací vodní lázni vyhřáté na teplotu 35°C po dobu 20 minut.

*Tab.3: Extrakce karotenoidů při laboratorní teplotě*

| rozpouštědlo | ethanol | aceton | hexan | chloroform | ethanol<br>aceton | ethanol<br>hexan | aceton<br>hexan |
|--------------|---------|--------|-------|------------|-------------------|------------------|-----------------|
| extrakce     | -       | -      | -     | -          | -                 | +                | +               |

*Tab.4: Extrakce karotenoidů při teplotě vodní lázně 35°C*

| rozpouštědlo | ethanol | aceton | hexan | ethanol:aceton | ethanol:hexan | aceton:hexan |
|--------------|---------|--------|-------|----------------|---------------|--------------|
| extrakce     | -       | -      | -     | -              | +             | +            |

+ pozitivní reakce

- negativní reakce

Dle výsledků experimentu lze usoudit, že pro extrakci karotenoidů ze vzorku rajčete nejsou vhodnými rozpouštědly ethanol, aceton, hexan, chloroform a směs ethanol:aceton (50:50). Vhodnými rozpouštědly pro extrakci se ukázaly být směsi ethanol:hexan (50:50) a aceton:hexan (50:50).

b) Extrakce  $\beta$ -karotenu byla provedena dle postupu uvedeného v kapitole 5.3.1. Ke stanovení byly použity směsi rozpouštědel ethanol:hexan (50:50) a aceton:hexan (50:50). K oddělení směsi rozpouštědel od zbytku vzorku rajčete byly použity různé postupy. Z výsledků provedeného experimentu vyplynulo, že nejvhodnějším způsobem na oddělení směsi rozpouštědel od zbytku vzorku rajčete je metoda filtrační, za použití modrého papírového filtru, typ FILTRAK No.390,  $\varnothing$  12,5 cm. Při dělení pomocí dělicí

nálevky došlo k ucpání vytékacího otvoru zbytkem vzorku. Po odpaření směsi rozpouštědel použitých k extrakci, na vakuové odparce, byl získán odparek. Získaný odparek byl kvantitativně rozpuštěn v ethanolu. Při rozpouštění v methanolu došlo ke vzniku sraženiny a zákalu.

## 6.2 Výsledky optimalizace extrakčního postupu s následnou analýzou na HPLC-ECD

a) Extrakce  $\beta$ -karotenu byla provedena dle postupu uvedeného v kapitole 5.3.2. Po přípravě vzorku byla provedena jeho analýza na HPLC-ECD s podmínkami uvedenými v kapitole 5.3.2. Pro analýzu byla použita mobilní fáze MetOH:rH<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (99:0,5:0,5).

***Obr.17. Chromatogram. Extrakce karotenoidů směsí aceton:hexan (50:50) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 650 mV. (PŘÍLOHA VIII)***

Na chromatogramu (*obr.17*) se objevila řada píků, ale žádný z nich nemá retenční čas, který by odpovídal retenčnímu času  $\beta$ -karotenu.

***Obr.18. Chromatogram: Extrakce karotenoidů směsí aceton:hexan (50:50) při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV. (PŘÍLOHA VIII)***

Na chromatogramu (*obr.18*) se objevila řada píků. Pík  $\beta$ -karotenu by mohl být pík v retenčním čase 3,80 min.

b) Extrakce  $\beta$ -karotenu byla provedena dle postupu uvedeného v kapitole 5.3.2. Po přípravě vzorku byla provedena jeho analýza na HPLC-ECD s podmínkami uvedenými v kapitole 5.3.2.

***Obr.19. Chromatogram: Extrakce karotenoidů směsí ethanol:hexan (50:50) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 650 mV. (PŘÍLOHA IX)***

Na chromatogramu (*obr.19*) se objevila řada píků. Pík  $\beta$ -karotenu by mohl být pík v retenčním čase 4,12 min. Tento retenční čas je ale oproti retenčnímu času  $\beta$ -karotenu mírně posunutý.

**Obr.20. Chromatogram: Extrakce karotenoidů směsí ethanol:hexan (50:50) při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 500 \text{ mV}$ ,  $E2 = 600 \text{ mV}$ ,  $G = 750 \text{ mV}$ . (PŘÍLOHA IX)**

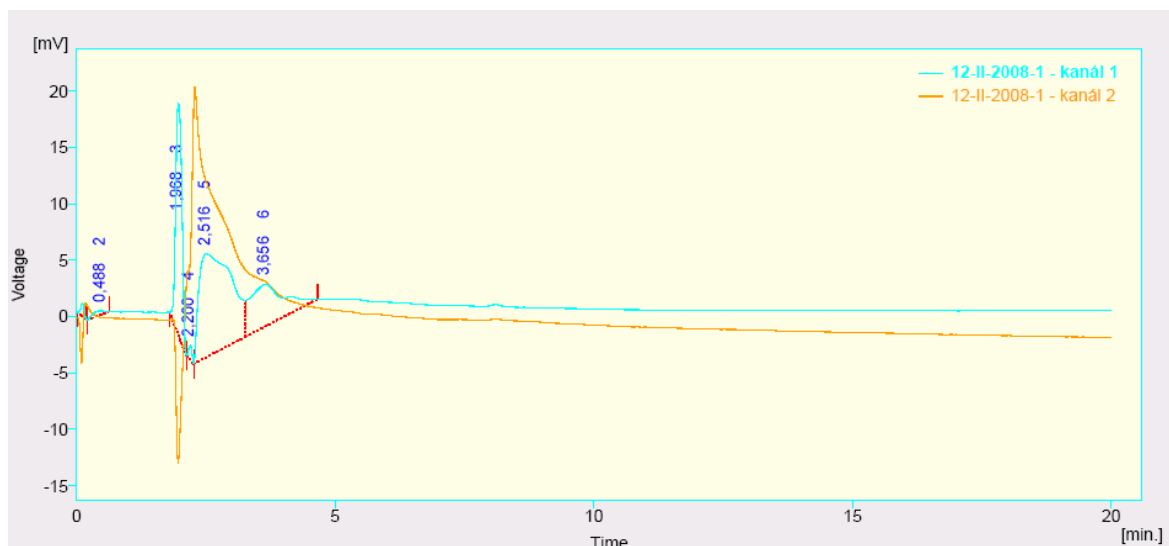
Na chromatogramu (obr.20) se objevila řada píků. Pík  $\beta$ -karotenu by mohl být pík v retenčním čase 4,13 min. Tento retenční čas je ale oproti retenčnímu času  $\beta$ -karotenu mírně posunutý.

Pilotní měření sloužila k získání prvotních chromatogramů pro optimalizaci podmínek izolačního procesu. Vzorek získaný odpařením směsi aceton:hexan byl hůře rozpustný v ethanolu, ale přesto vykazoval uspokojivé výsledky při chromatografickém stanovení (obr.17., obr.18.). Vzorek získaný odpařením směsi ethanol:hexan se lépe rozpouštěl v ethanolu, při stanovení vykazoval méně dobré výsledky (obr.19., obr.20.). Při použití směsi extrakčních rozpouštědel aceton:hexan bylo lepší měření při použití parametrů  $E 1 = 500 \text{ mV}$ ,  $E 2 = 600 \text{ mV}$ ,  $G = 750 \text{ mV}$  nastavených na detektoru. Pokud byla použita směs extrakčních rozpouštědel ethanol:hexan, bylo lepší měření při nastavení parametrů  $E 1 = 300 \text{ mV}$ ,  $E 2 = 400 \text{ mV}$ ,  $G = 750 \text{ mV}$  nastavených na detektoru. Nejlepší výsledky byly tedy získány při použití směsi extrakčních činidel aceton:hexan (50:50) a při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 500 \text{ mV}$ ,  $E2 = 600 \text{ mV}$ ,  $G = 750 \text{ mV}$ .

### 6.3 Výsledky měření optimalizačních HPLC podmínek pro standard $\beta$ -karotenu

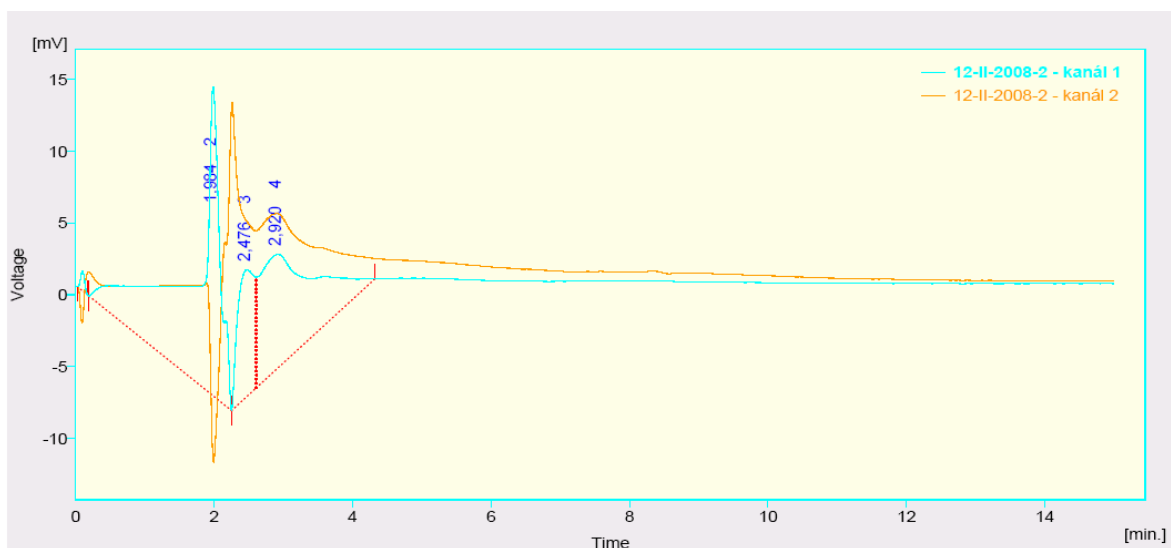
Pro měření byla použita kolona C8 Supelcosil 150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m.

a) Pro analýzu byla použita mobilní fáze o složení ACN:rH<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (99:0,5:0,5)



**Obr.21. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze ACN:rH<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (99:0,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 500$  mV,  $E2 = 600$  mV,  $G = 750$  mV.**

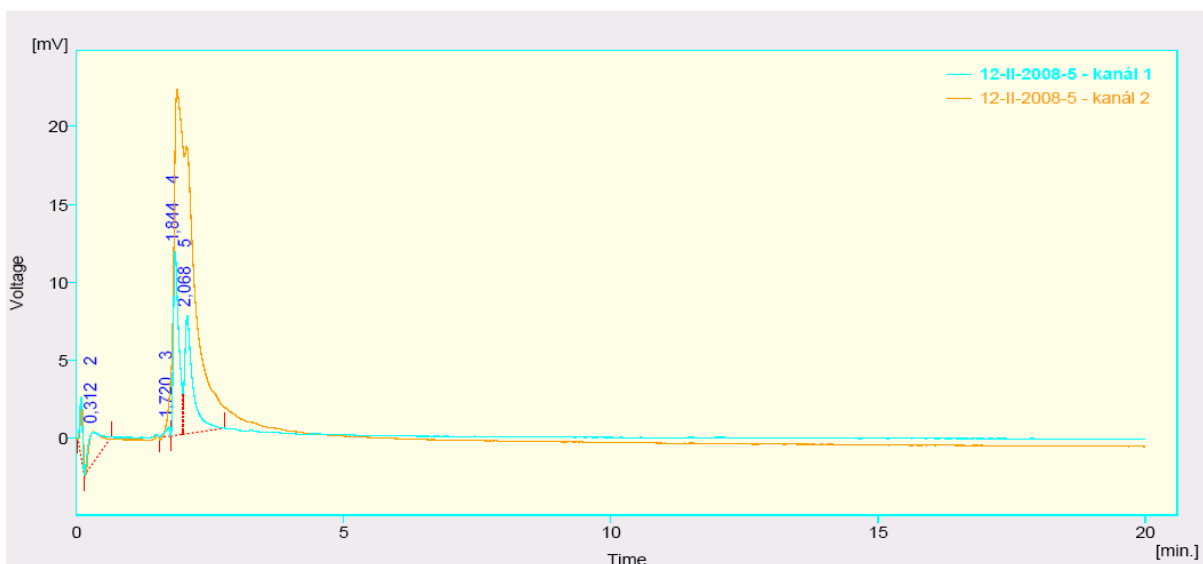
Na chromatogramu (obr.21) nebyl zjištěn zřetelný pík  $\beta$ -karotenu. Pík, který se objevil v retenčním čase 3,65 min., je příliš malý.



**Obr.22. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze ACN:rH<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (99:0,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 750 mV.**

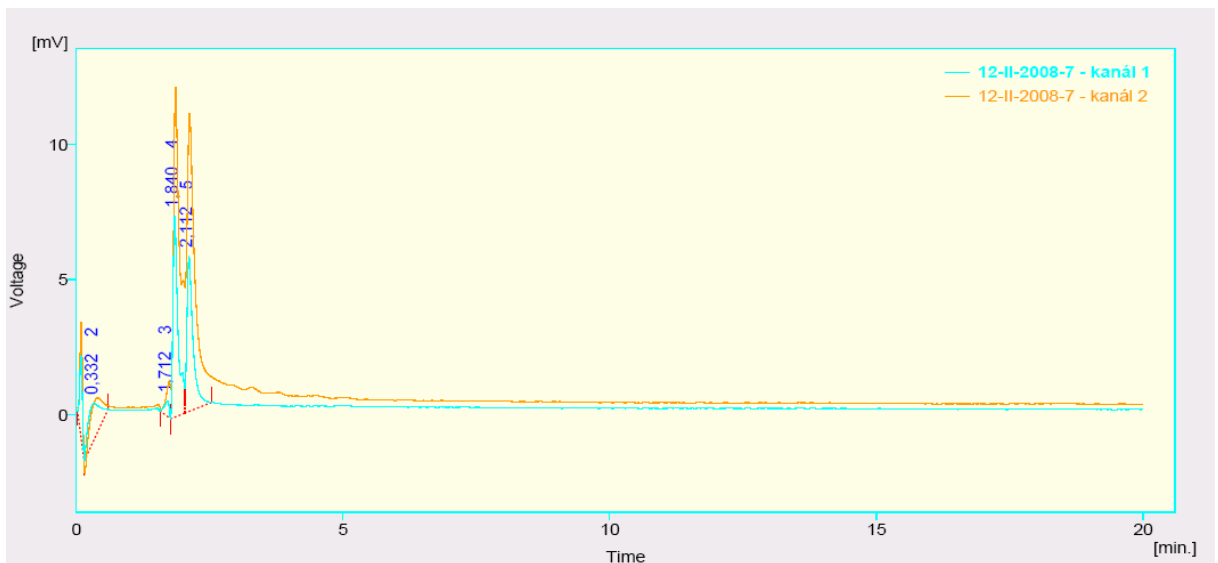
Na chromatogramu (obr.22) se objevil v retenčním čase 2,92 min. pík, který by mohl být píkem  $\beta$ -karotenu, ale je příliš malý a mírně rozmytý.

b) Pro analýzu byla použita mobilní fáze o složení ACN:rH<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (80:19,5:0,5)



**Obr.23. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze ACN:rH<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (80:19,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV.**

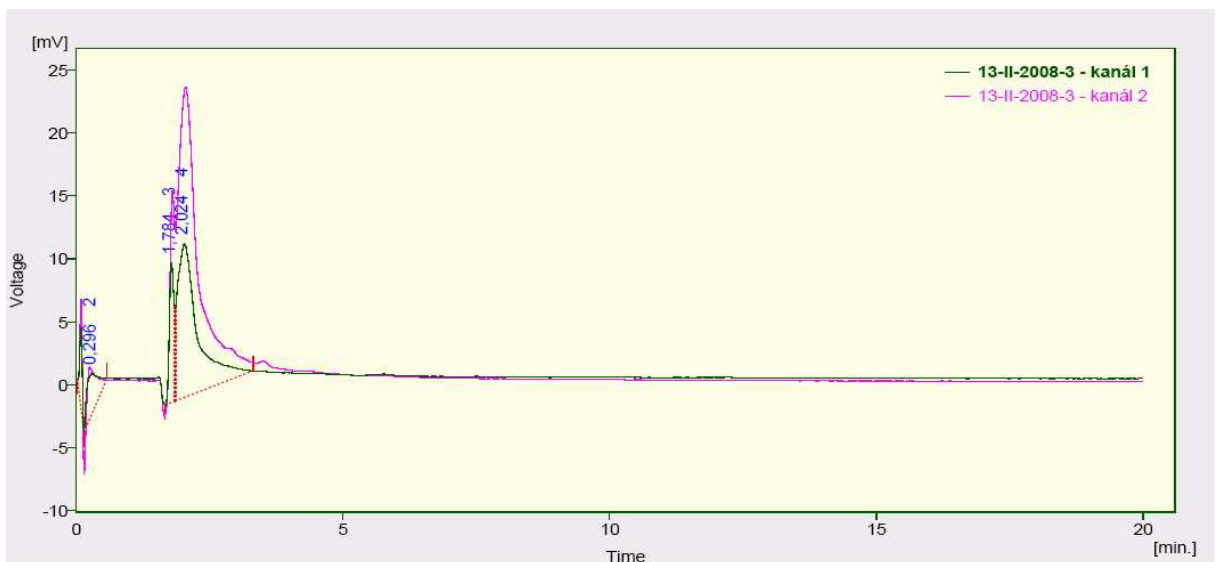
Na chromatogramu (obr.23) není zřetelný žádný pík, který by mohl být píkem  $\beta$ -karotenu.



**Obr.24. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze ACN:rH<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (80:19,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 750 mV.**

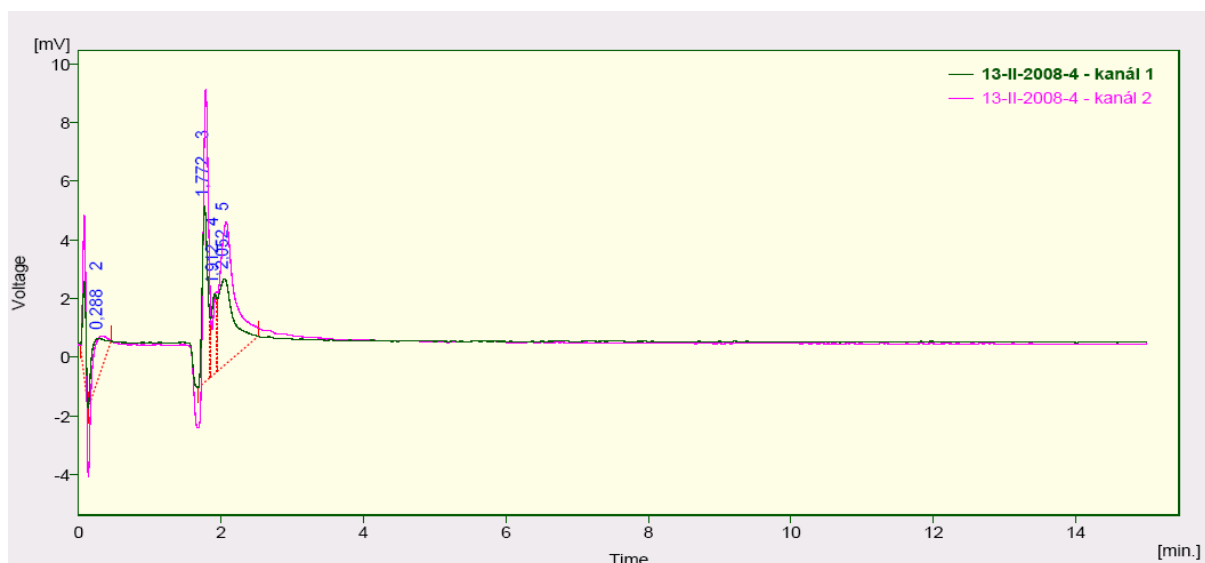
Na chromatogramu (obr.24) není zřetelný žádný pík, který by mohl být píkem  $\beta$ -karotenu.

c) Pro analýzu byla použita mobilní fáze o složení ACN:rH<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5)



**Obr.25. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze ACN:rH<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV.**

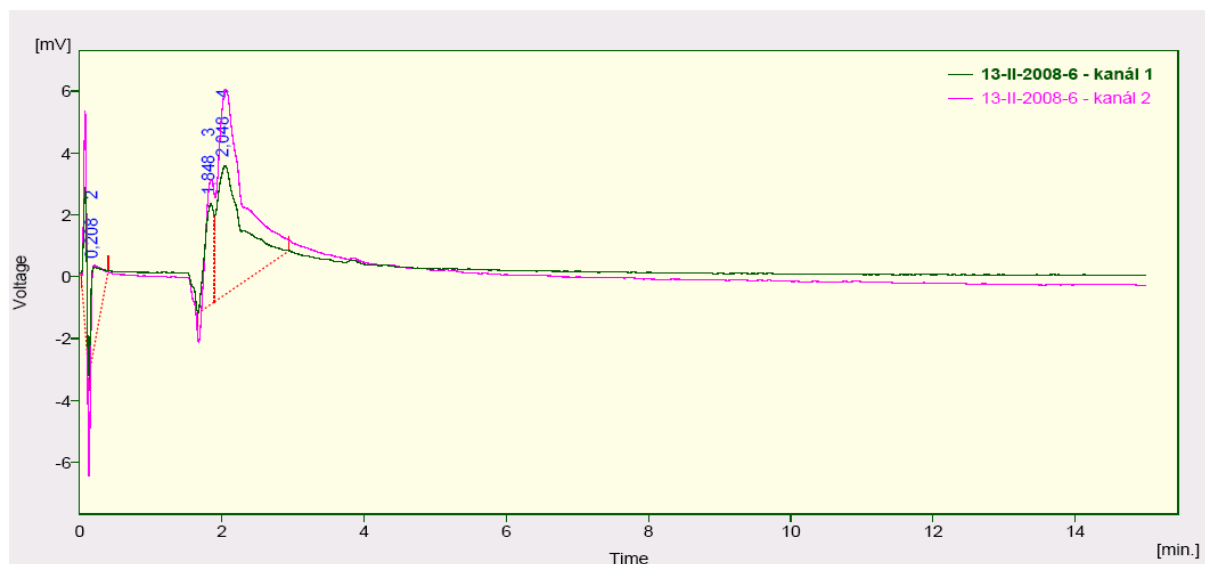
Na chromatogramu (obr.25) není zřetelný žádný pík, který by mohl být píkem  $\beta$ -karotenu.



**Obr.26. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze ACN:rH<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 750 mV.**

Na chromatogramu (obr.26) není zřetelný žádný pík, který by mohl být píkem  $\beta$ -karotenu.

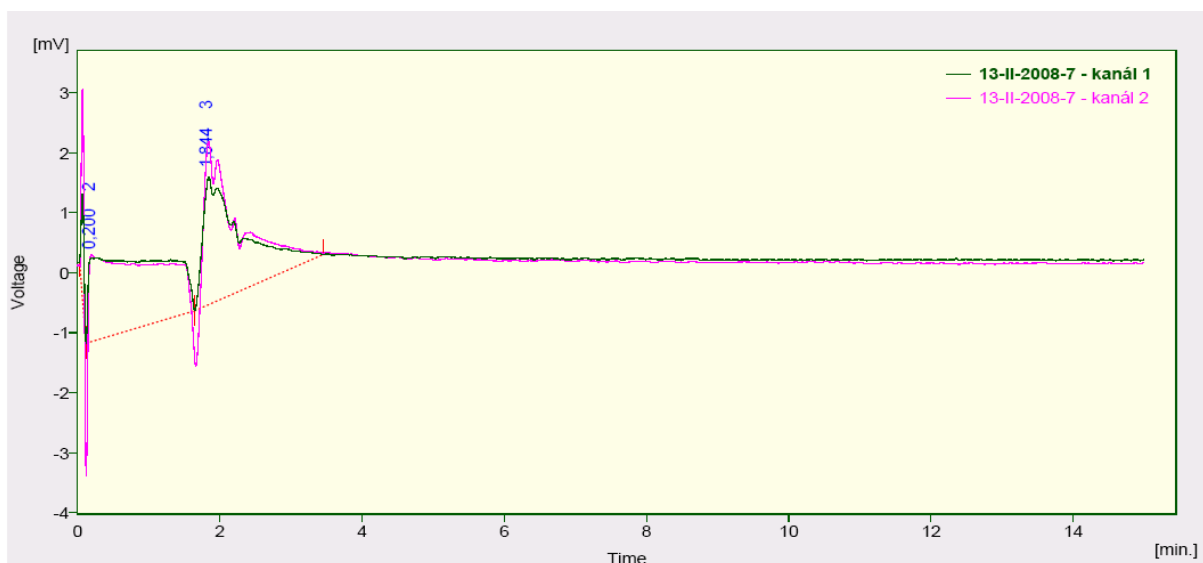
d) Pro analýzu byla použita mobilní fáze o složení ACN:rH<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (50:49,5:0,5)



**Obr.27. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze ACN:rH<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (50:49,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV.**

Na chromatogramu (obr.27) není zřetelný žádný pík, který by mohl být píkem  $\beta$ -karotenu.

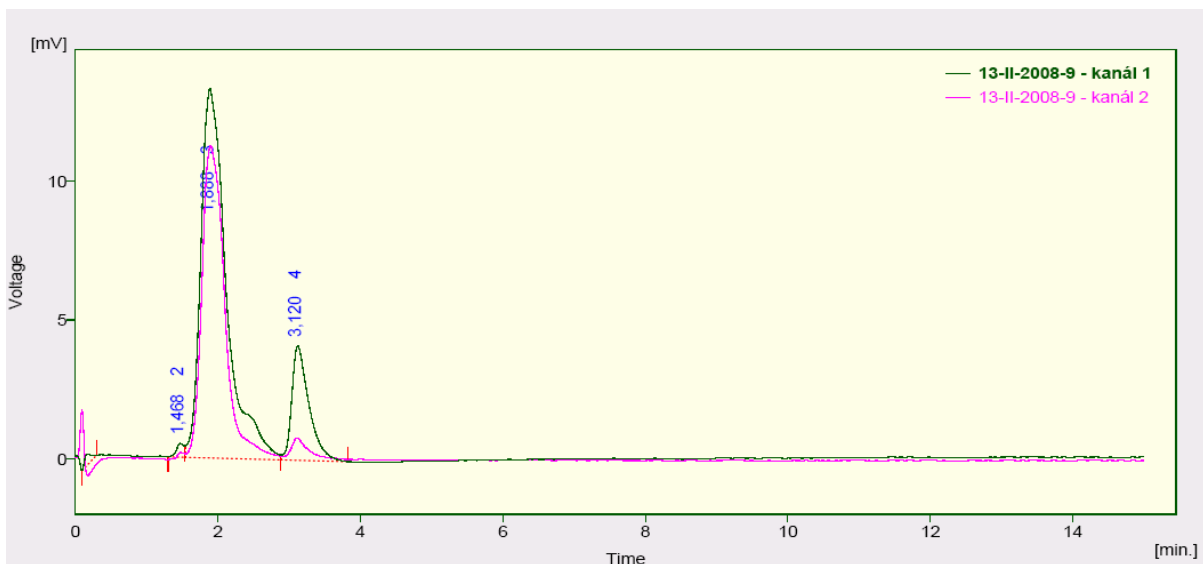




**Obr.28. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze ACN:rH<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (50:49,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 750 mV.**

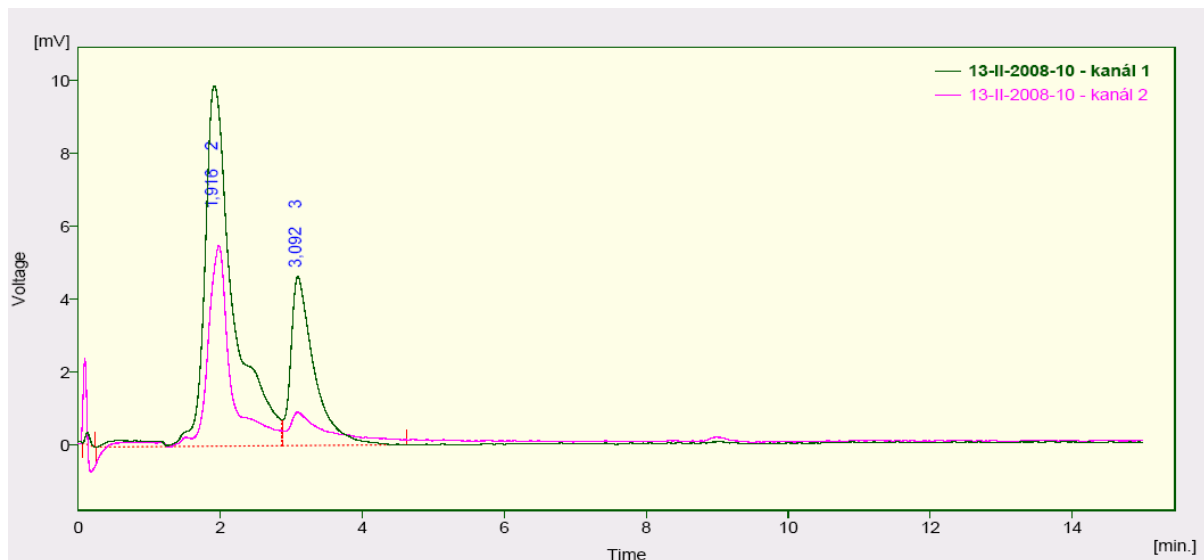
Na chromatogramu (obr.28) není zřetelný žádný pík, který by mohl být píkem  $\beta$ -karotenu.

e) Pro analýzu byla použita mobilní fáze o složení MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5)



**Obr.29. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV.**

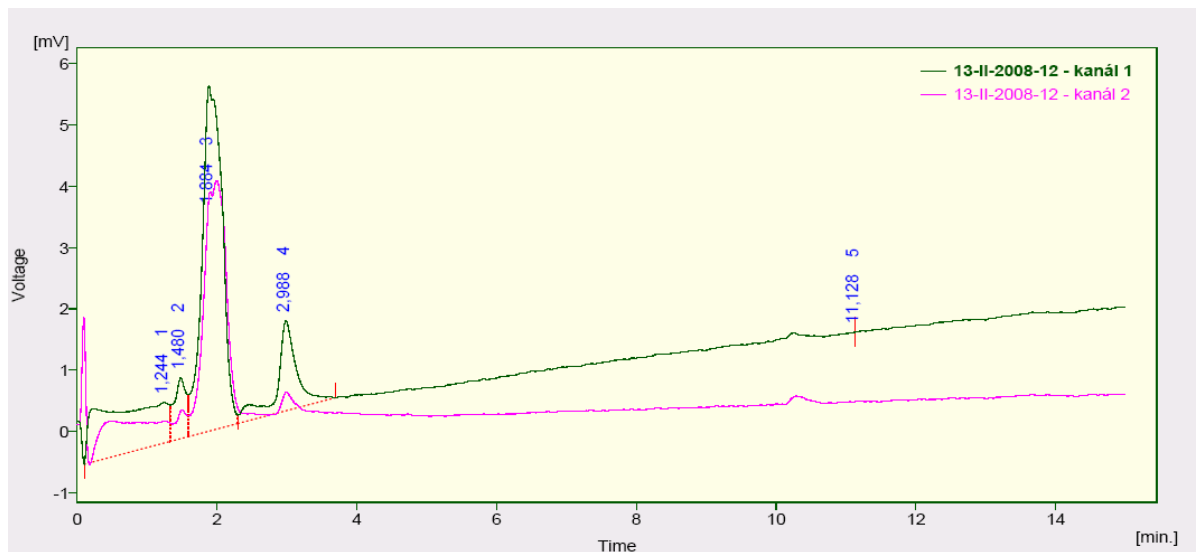
Na chromatogramu (obr.29) se v retenčním čase 3,12 min. objevil pík  $\beta$ -karotenu. Tento pík vypadá jako dobře měřitelný.



**Obr.30. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 750 mV.**

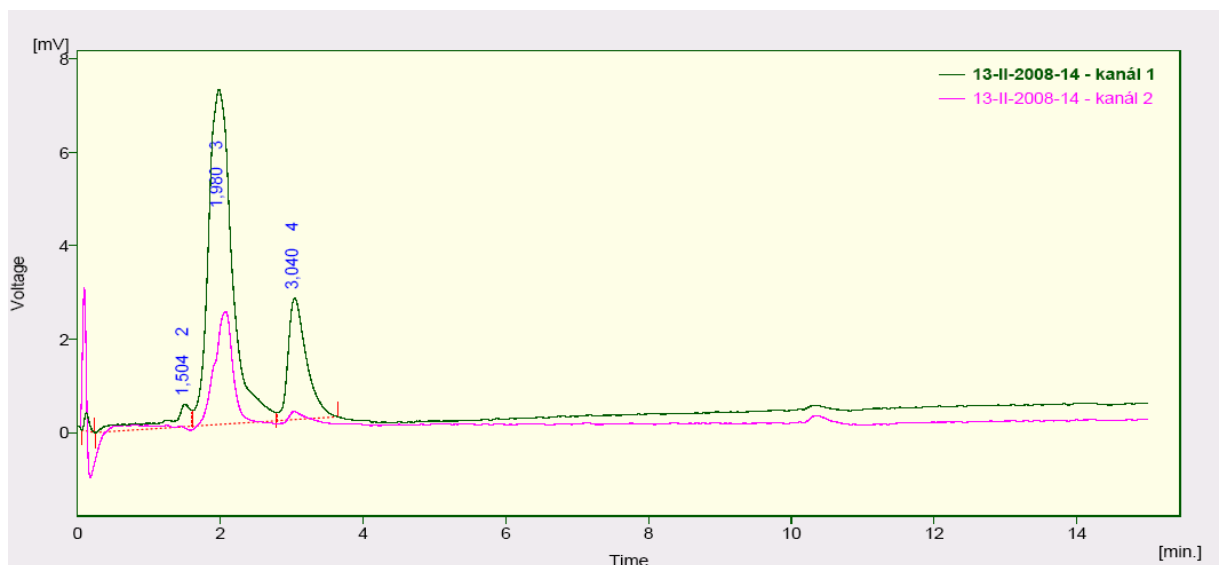
Na chromatogramu (obr.30) se v retenčním čase 3,09 min. objevil pík  $\beta$ -karotenu. Tento pík vypadá jako dobře měřitelný, pouze je ve spodní části mírně rozmytý.

f) Pro analýzu byla použita mobilní fáze o složení MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5)



**Obr.31. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 500 \text{ mV}$ ,  $E2 = 600 \text{ mV}$ ,  $G = 750 \text{ mV}$ .**

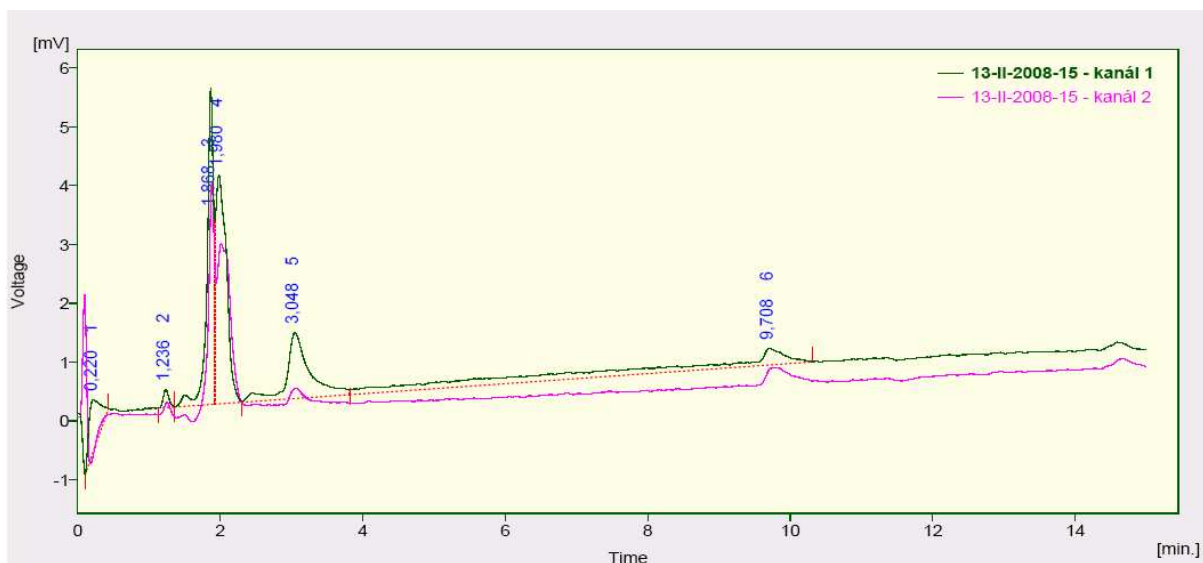
Na chromatogramu (obr.31) se v retenčním čase 2,98 min. objevil pík  $\beta$ -karotenu. Tento pík není příliš pravidelný a byl by hůře měřitelný.



**Obr.32. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 300 \text{ mV}$ ,  $E2 = 400 \text{ mV}$ ,  $G = 750 \text{ mV}$ .**

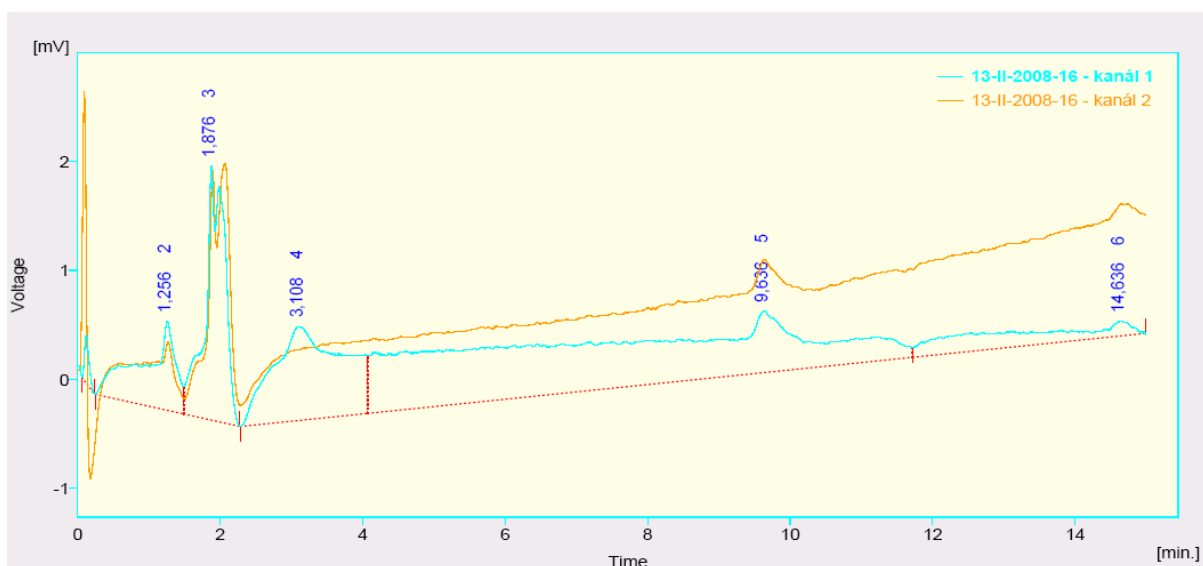
Na chromatogramu (obr.32) se v retenčním čase 3,04 min. objevil pík  $\beta$ -karotenu. Tento pík vypadá jako dobře měřitelný.

g) Pro analýzu byla použita mobilní fáze o složení MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (50:49,5:0,5)



**Obr.33. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (50:49,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV.**

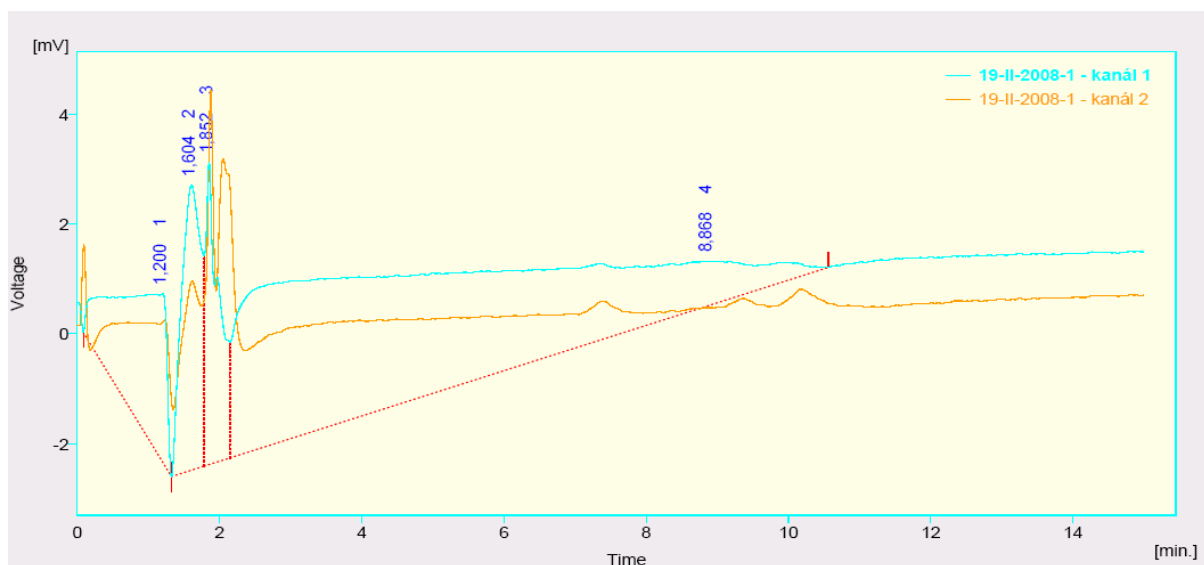
Na chromatogramu (obr.33) se v retenčním čase 3,04 min. objevil pík  $\beta$ -karotenu. Tento pík vypadá jako dobře měřitelný, ale je menší.



**Obr.34. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze  $\text{MeOH}:\text{ACN}:\text{H}_3\text{PO}_4$  (50:49,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 300$  mV,  $E2 = 400$  mV,  $G = 750$  mV.**

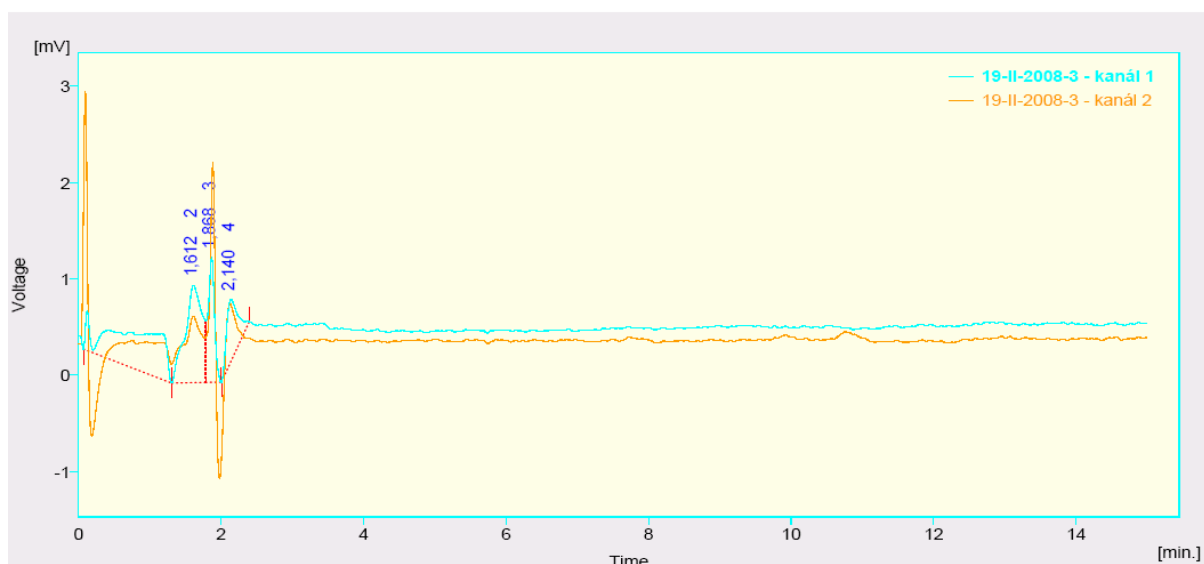
Na chromatogramu (obr.34) se v retenčním čase 3,10 min. objevil pík  $\beta$ -karotenu. Tento pík je velmi malý a z hlediska kvantity by nebylo možné provést měření reálného vzorku.

h) Pro analýzu byla použita mobilní fáze o složení MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (30:69,5:0,5)



**Obr.35. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (30:69,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV.**

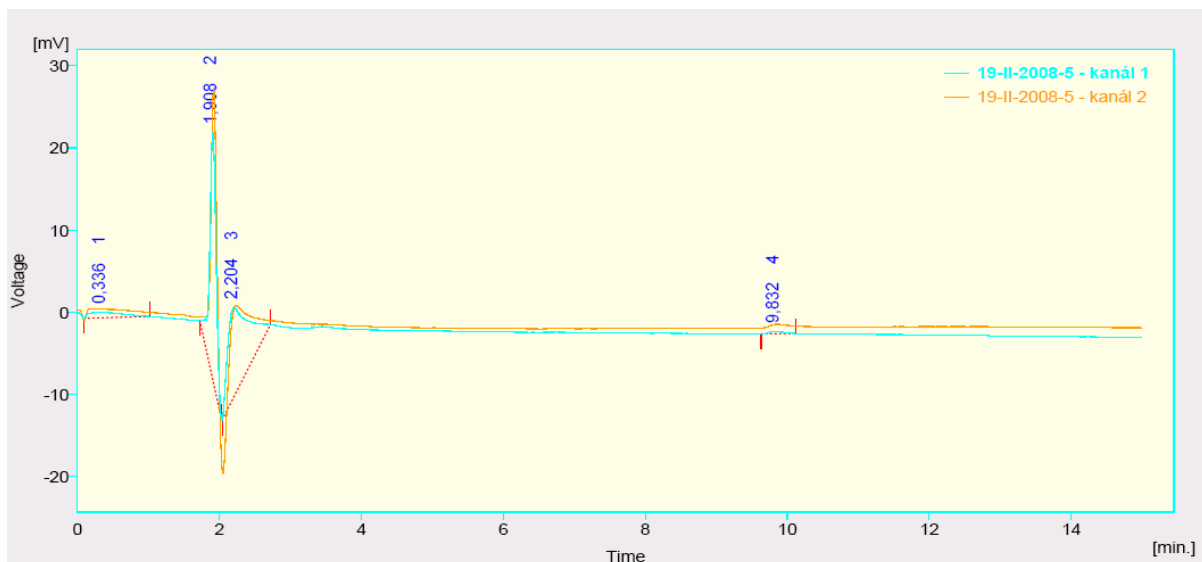
Na chromatogramu (obr.35) není zřetelný žádný pík, který by mohl být píkem  $\beta$ -karotenu.



**Obr.36. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (30:69,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 750 mV.**

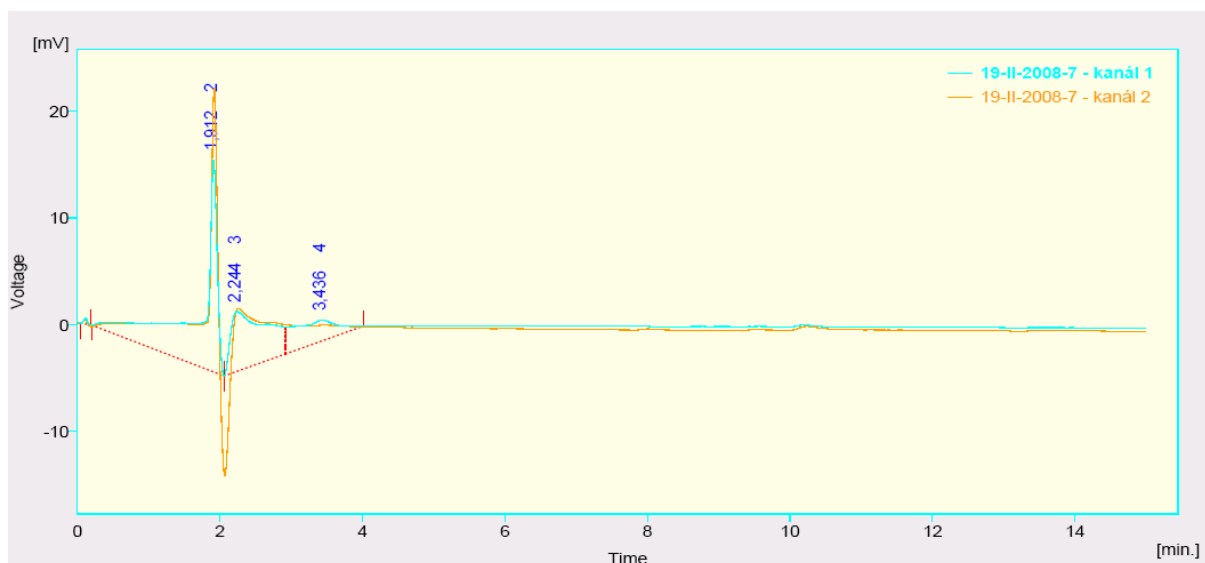
Na chromatogramu (*obr.36*) není zřetelný žádný pík, který by mohl být píkem  $\beta$ -karotenu.

ch) Pro analýzu byla použita mobilní fáze o složení MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (10:89,5:0,5)



**Obr.37. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (10:89,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 500 \text{ mV}$ ,  $E2 = 600 \text{ mV}$ ,  $G = 750 \text{ mV}$ .**

Na chromatogramu (*obr.37*) není zřetelný žádný pík, který by mohl být píkem  $\beta$ -karotenu.



**Obr.38. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (10:89,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 750 mV.**

Na chromatogramu (obr.38) není zřetelný žádný pík, který by mohl být píkem  $\beta$ -karotenu.

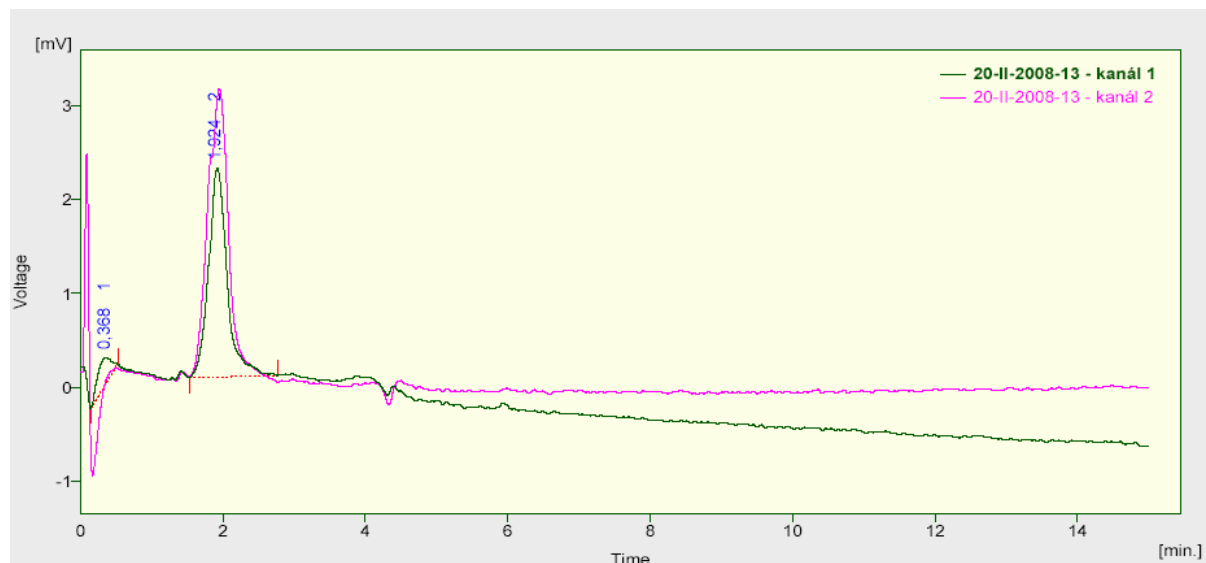
Při složení mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5) byla lepší odezva při parametrech detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV (obr.29). Pokud byla použita mobilní fáze o složení MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) byla lepší odezva při parametrech detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV (obr.32). Byla-li použita mobilní fáze o složení MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (50:49,5:0,5) objevil se na chromatogramu pík, ale podmínky z hlediska kvantity nebyly reálné (obr.33,34). Ostatní mobilní fáze nejsou vhodné pro stanovení  $\beta$ -karotenu (obr.21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 35, 36, 37, 38). Z výsledků získaných při sestavování metodiky vhodné pro stanovení  $\beta$ -karotenu lze odvodit, že nejvhodnější mobilní fáze bude mít složení MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5) a nastříkávaný vzorek bude rozpuštěný v ethanolu. Dále lze použít mobilní fázi o složení MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5).



## 6.4 Výsledky měření optimalizačních HPLC podmínek pro standard $\beta$ -karotenu v mobilní fázi

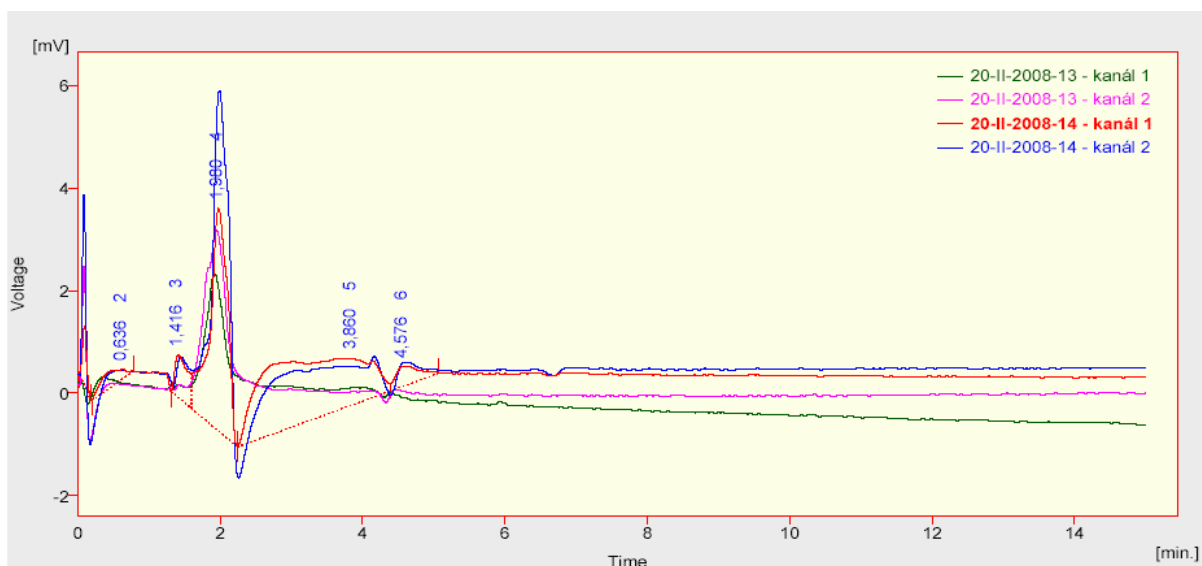
Pro měření byla použita kolona C8 Supelcosil 150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m.

a) Pro analýzu byla použita mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5) a vzorek byl rozpuštěn v použité mobilní fázi.



**Obr.39. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v mobilní fázi při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV.**

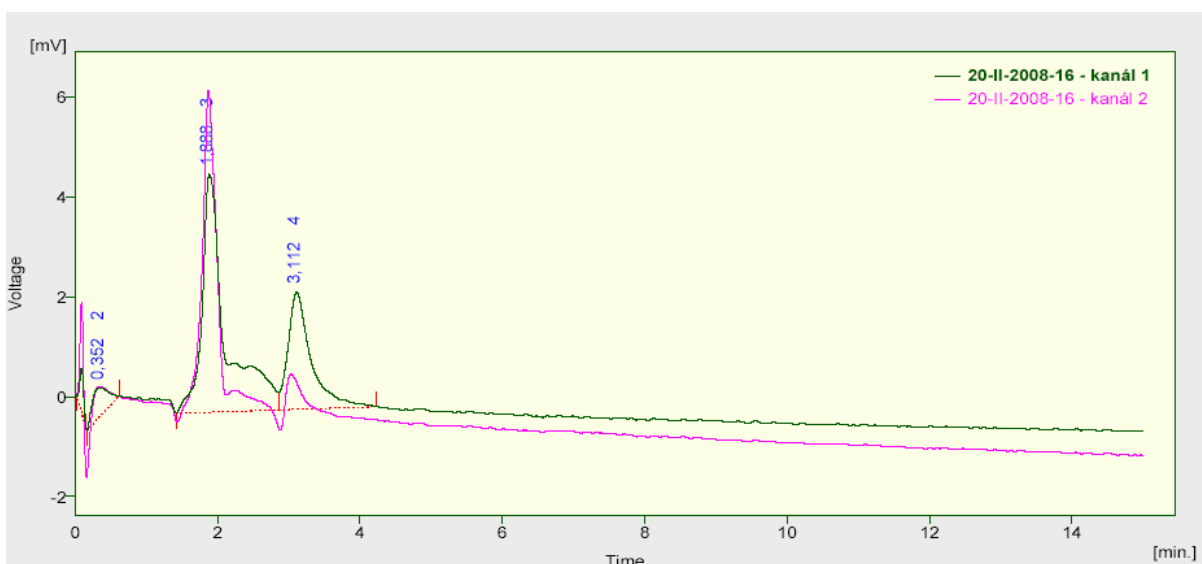
Na chromatogramu (obr.39) se pík  $\beta$ -karotenu vůbec neobjevil.



**Obr.40. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v mobilní fázi při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 300 \text{ mV}$ ,  $E2 = 400 \text{ mV}$ ,  $G = 750 \text{ mV}$ .**

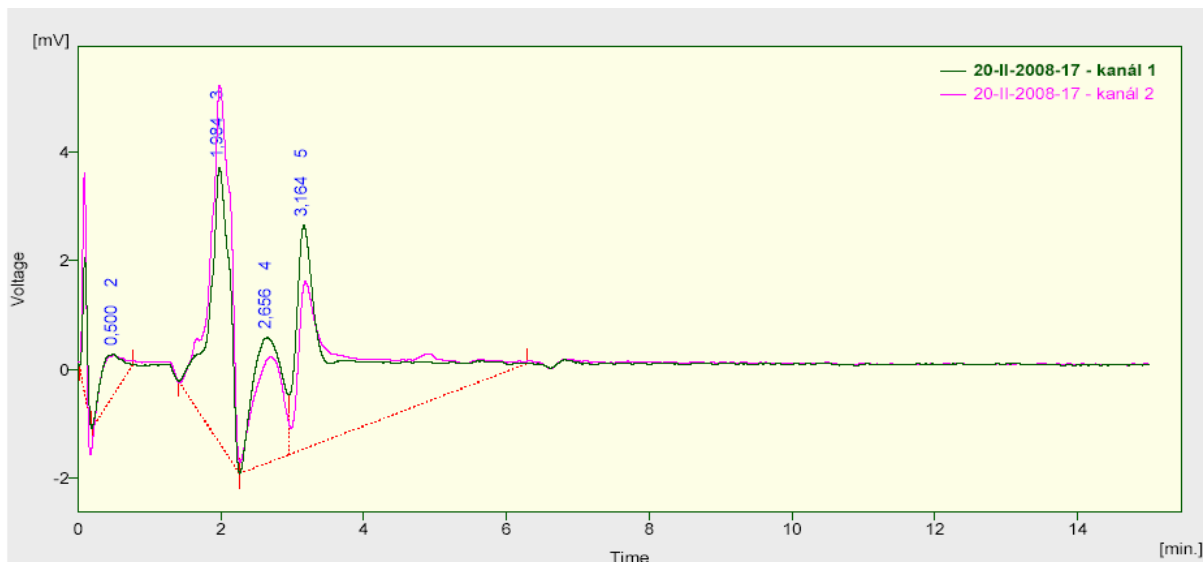
Na chromatogramu (obr.40) se pík  $\beta$ -karotenu vůbec neobjevil.

b) Pro analýzu byla použita mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) a vzorek byl rozpuštěn v použité mobilní fázi.



**Obr.41. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v mobilní fázi při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 500 \text{ mV}$ ,  $E2 = 600 \text{ mV}$ ,  $G = 750 \text{ mV}$ .**

Na chromatogramu (*obr.41*) se pík  $\beta$ -karotenu objevil v retenčním čase 3,11 min. Tento pík je mírně rozmytý, ale pro měření je vhodný.



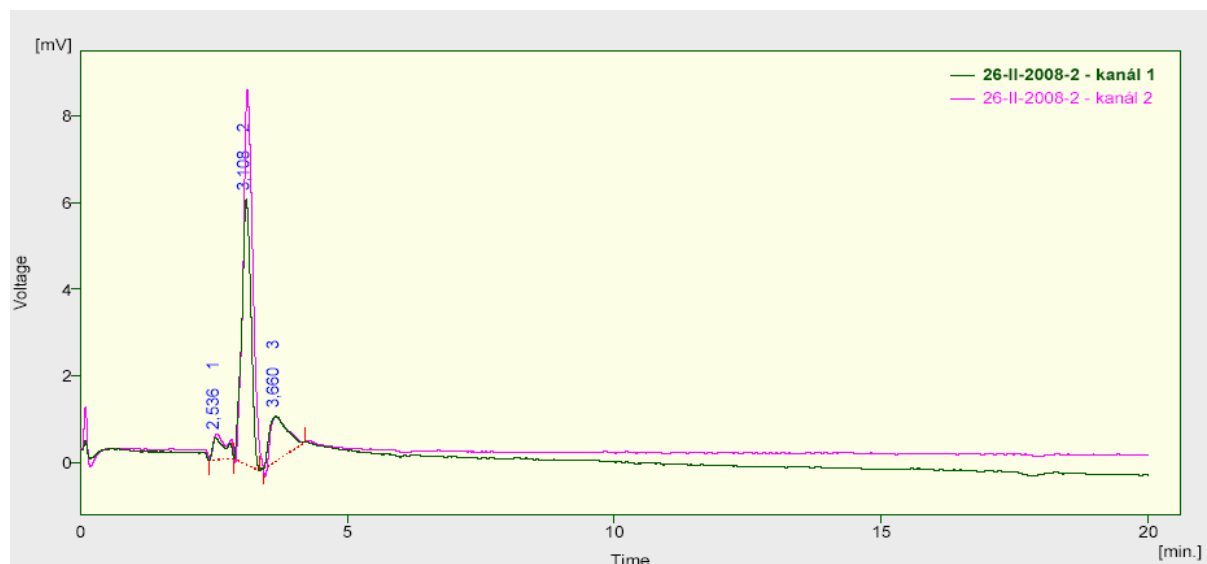
**Obr.42. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v mobilní při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 750 mV.**

Na chromatogramu (*obr.42*) se pík  $\beta$ -karotenu objevil v retenčním čase 3,16 min., ale tento pík nelze změřit, protože začíná v záporné oblasti napětí.

Jak vyplývá z výše uvedených chromatogramů, bylo by možné použít vzorek rozpuštěný v příslušné mobilní fázi, a to při použití mobilní fáze o složení MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) při nastavených parametrech detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV (*obr.41*), nebo E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV (*obr.42*).

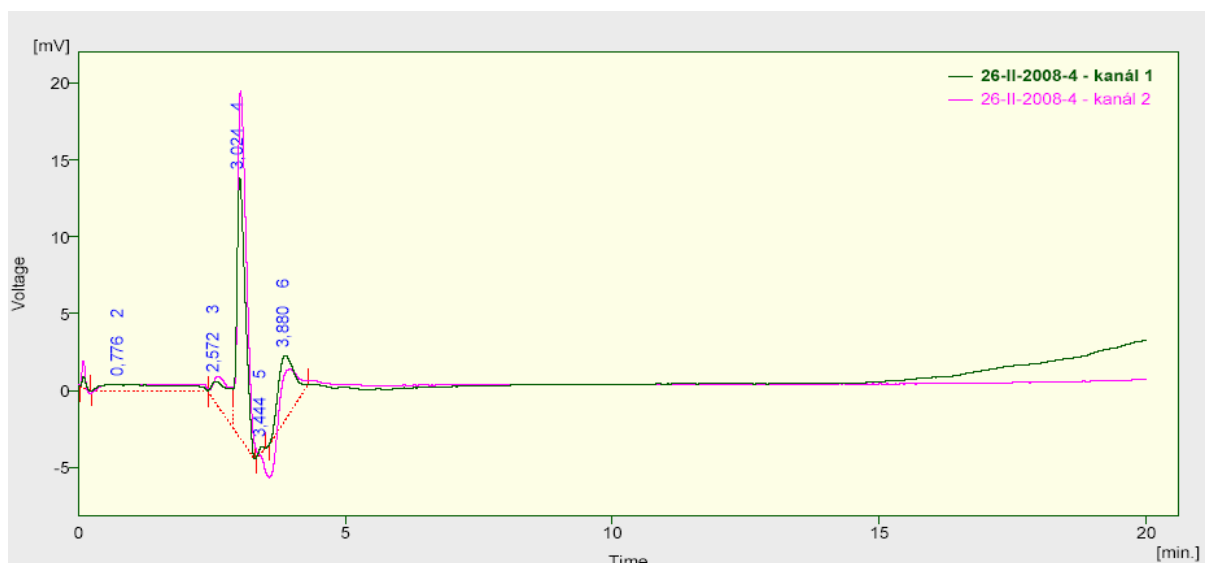
## 6.5 Výsledky optimalizace HPLC podmínek pro stanovení $\beta$ -karotenu na koloně C30 YMC Carotenoid

a) Pro analýzu byla použita mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5) a vzorek byl rozpuštěn ethanolu.



**Obr.43. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV.**

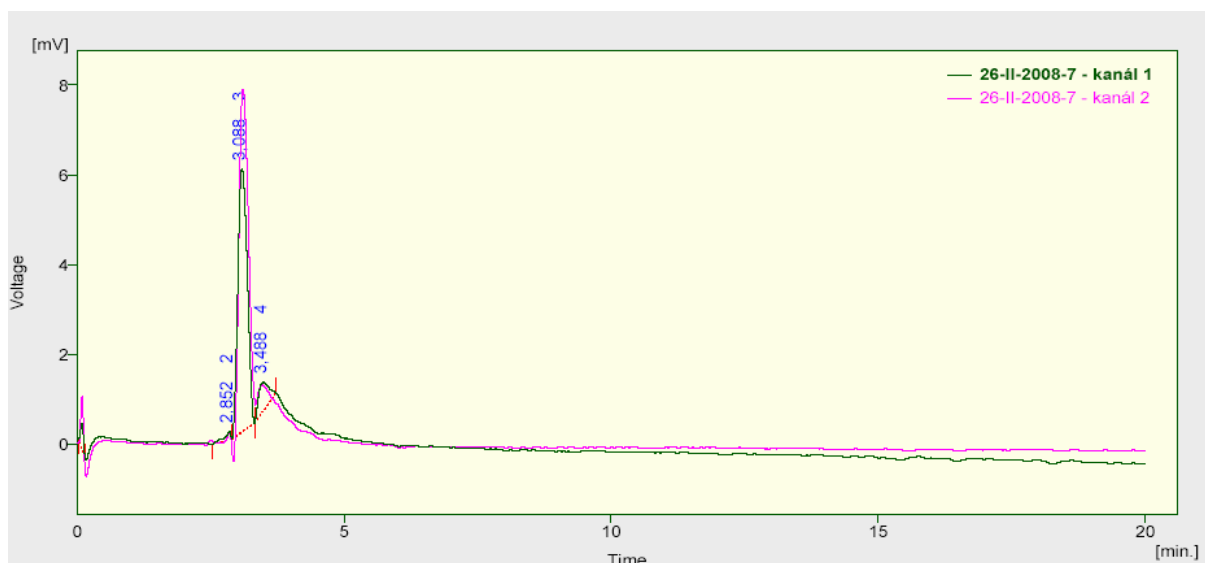
Na chromatogramu (obr.43) se pík  $\beta$ -karotenu objevil v retenčním čase 3,66 min., ale tento pík nelze změřit, protože je příliš malý.



**Obr.44. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze  $\text{MetOH}:\text{ACN}:\text{H}_3\text{PO}_4$  (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 300 \text{ mV}$ ,  $E2 = 400 \text{ mV}$ ,  $G = 750 \text{ mV}$ .**

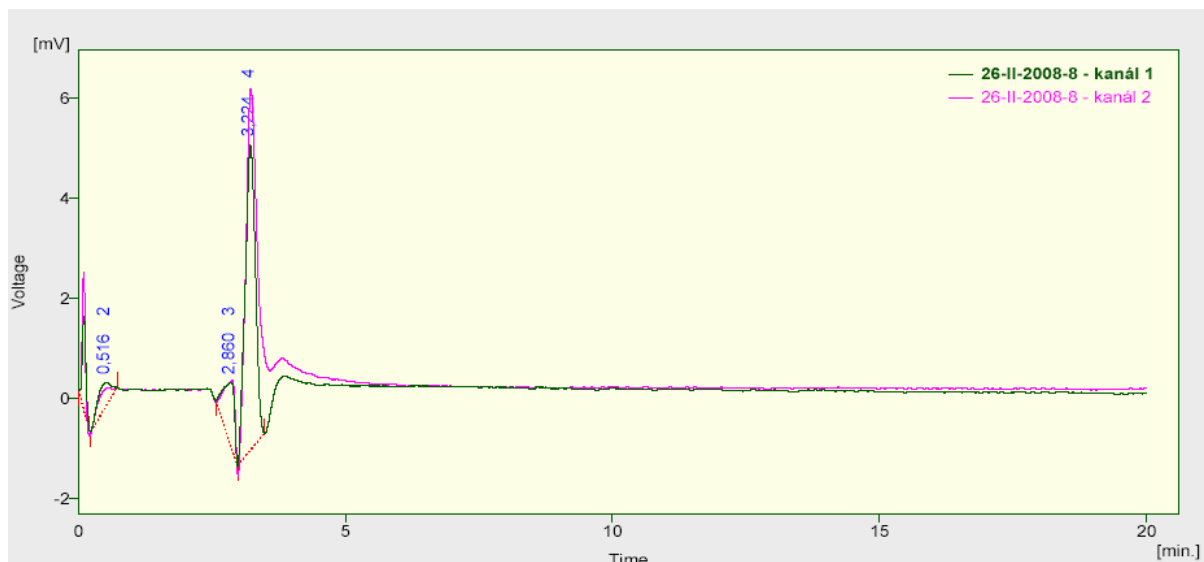
Na chromatogramu (obr.44) se pík  $\beta$ -karotenu objevil v retenčním čase 3,88 min., ale tento pík nelze změřit, protože začíná v záporné oblasti napětí.

b) Pro analýzu byla použita mobilní fáze  $\text{MetOH}:\text{ACN}:\text{H}_3\text{PO}_4$  (70:29,5:0,5) a vzorek byl rozpuštěn ethanolu.



**Obr.45. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze  $\text{MetOH}:\text{ACN}:\text{H}_3\text{PO}_4$  (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 500 \text{ mV}$ ,  $E2 = 600 \text{ mV}$ ,  $G = 750 \text{ mV}$ .**

Na chromatogramu (*obr.45*) se pík  $\beta$ -karotenu objevil v retenčním čase 3,48 min., ale tento pík nelze změřit, protože je příliš blízko u píku, který je před ním.



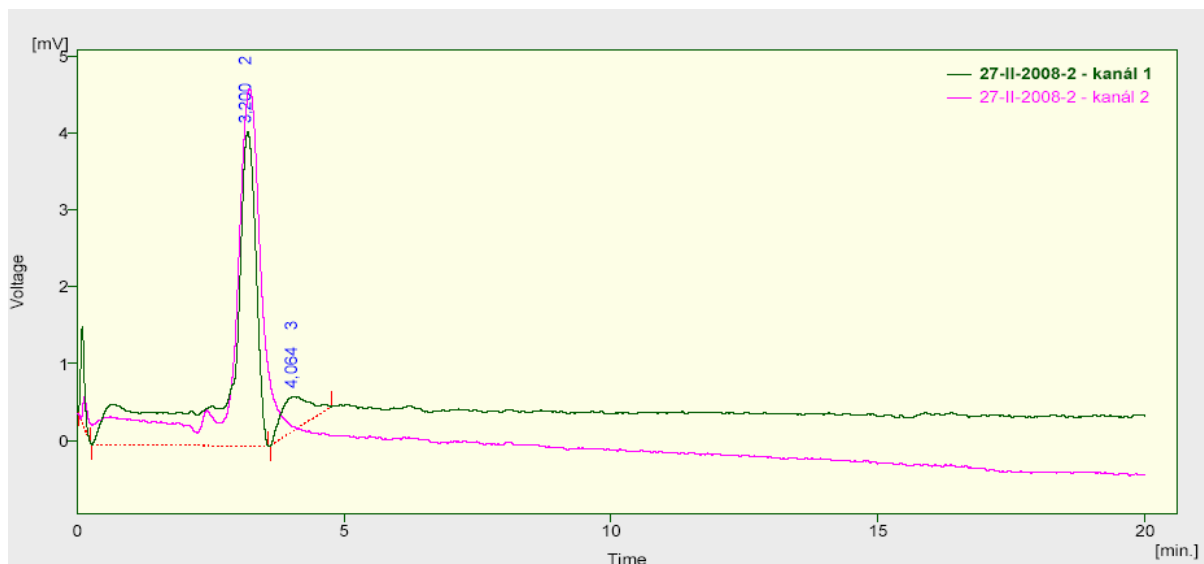
**Obr.46. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 750 mV.**

Na chromatogramu (*obr.46*) se pík  $\beta$ -karotenu neobjevil.

Při použití kolony C30 YMC Carotenoid S5 4,6 x 250 mm, 5 $\mu$ m nebyly získány příliš dobré výsledky. Tato kolona, i když je určena pro karotenoidy, by v našem případě nebyla vhodná (*obr. 43, 44, 45, 46*).

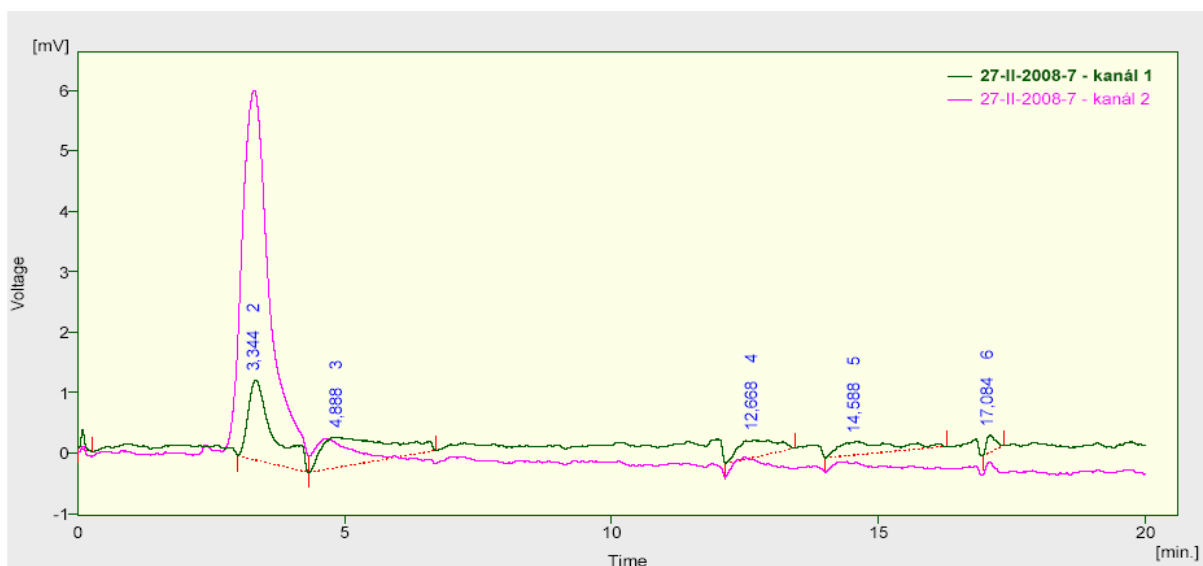
## 6.6 Výsledky optimalizace HPLC podmínek pro stanovení $\beta$ -karotenu na koloně C18 Supelcosil LC-DB

a) Pro analýzu byla použita mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5) a vzorek byl rozpuštěn v ethanolu.



**Obr.47. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV.**

Na chromatogramu (obr.47) by se o pík  $\beta$ -karotenu mohlo jednat v případě píku získaného v retenčním čase 3,20 min. Tento pík však zasahuje do záporné oblasti napětí a tudíž by nebylo možné jej změřit.

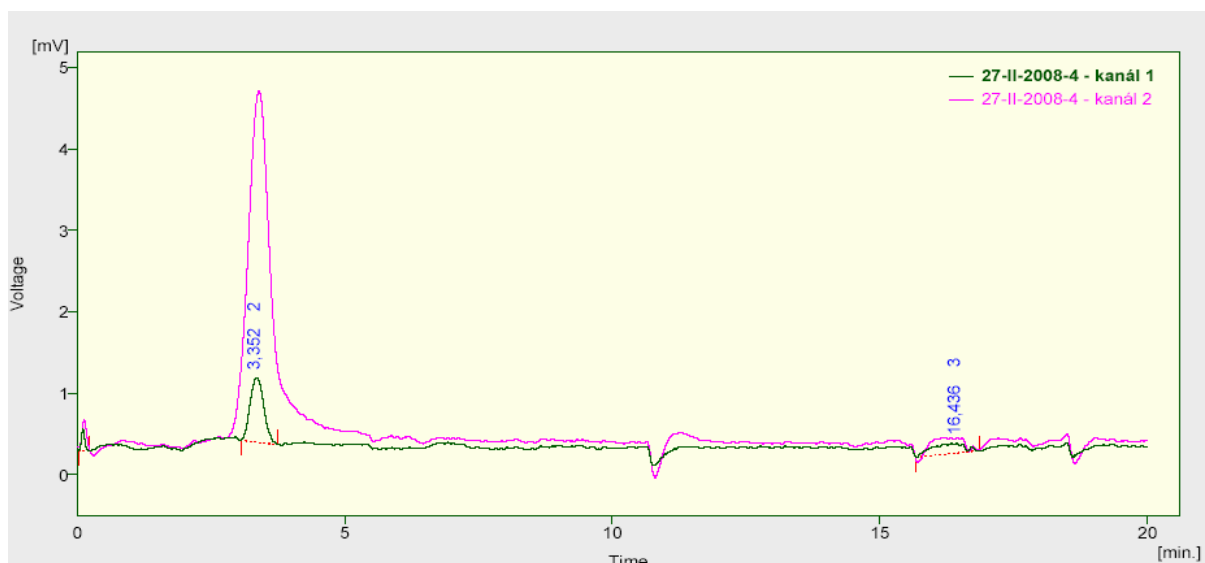


**Obr.48. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 750 mV.**

Na chromatogramu (obr.48) by se o pík  $\beta$ -karotenu mohlo jednat v případě píku získaného v retenčním čase 3,34 min. Tento pík je mírně rozmytý a zasahuje do záporné oblasti napětí, tudíž by nebylo možné jej změřit.

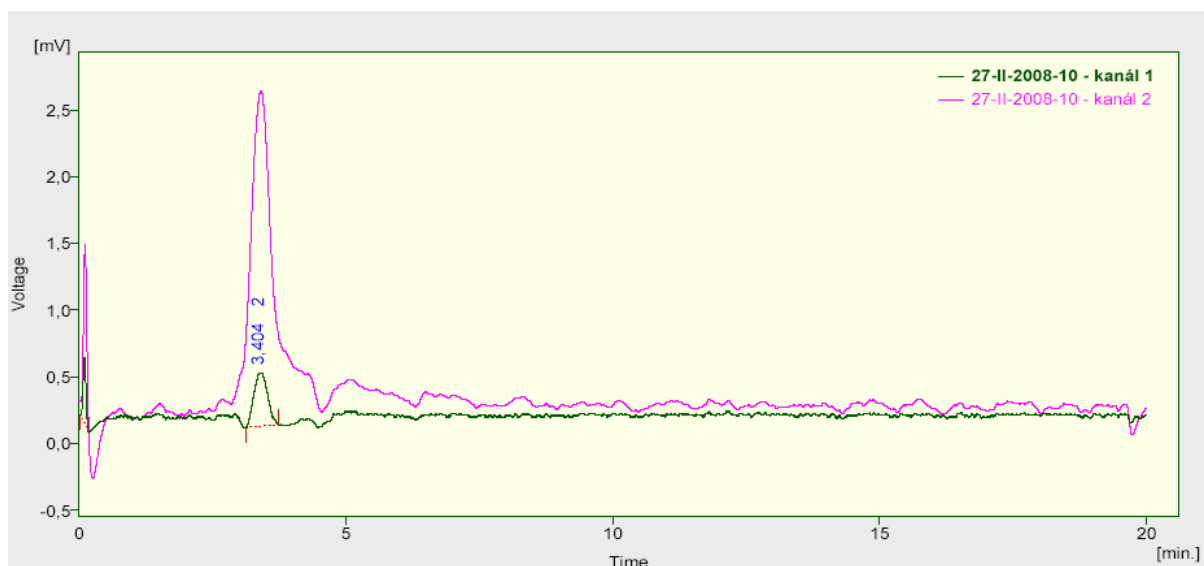


b) Pro analýzu byla použita mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) a vzorek byl rozpuštěn ethanolu.



**Obr.49. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 500 \text{ mV}$ ,  $E2 = 600 \text{ mV}$ ,  $G = 750 \text{ mV}$ .**

Na chromatogramu (obr.49) se v retenčním čase 3,35 min. objevil pík  $\beta$ -karotenu. Tento pík je mírně rozmytý, ale bylo by možné jej změřit.



**Obr.50. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 750 mV.**

Na chromatogramu (obr.50) by se o pík  $\beta$ -karotenu mohlo jednat v případě píku získaného v retenčním čase 3,40 min. Tento pík však není rovnoměrný a tudíž by nebylo možné jej změřit.

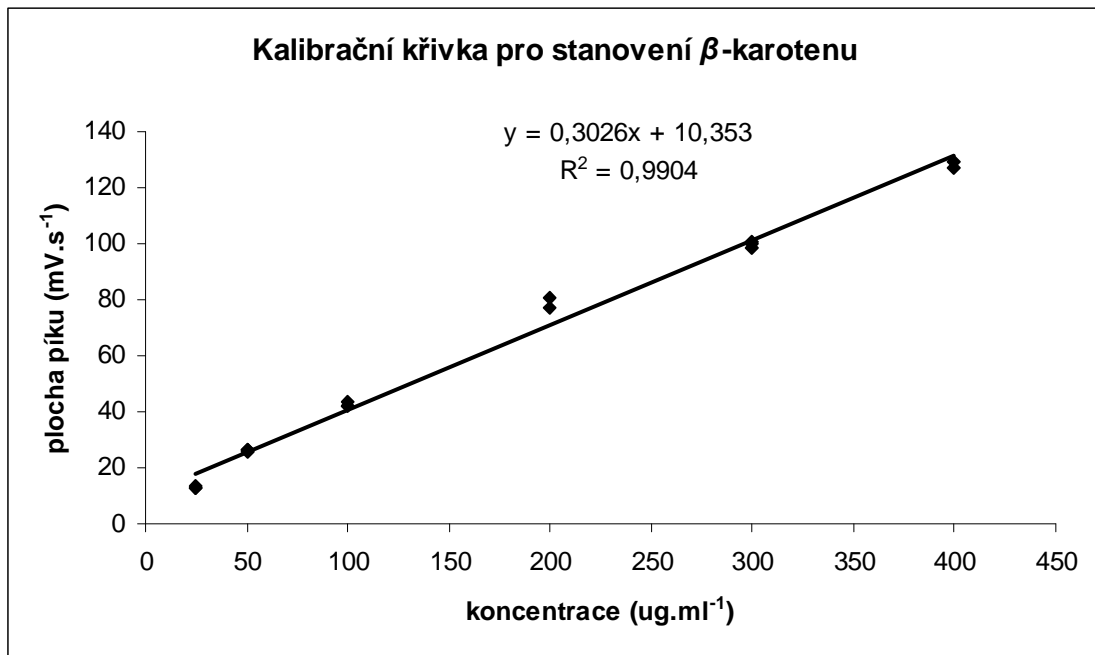
Pokud by byla použita kolona C18 Supelcosil LC18-DB 250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m, bylo by možno pro stanovení  $\beta$ -karotenu použít mobilní fázi o složení MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) při nastavených parametrech detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV. Jelikož získaný pík byl mírně rozmytý, bylo by možno mírně zvýšit průtok mobilní fáze kolonou, abychom získali symetrický pík.

## 6.7 Výsledky měření kalibrační křivky $\beta$ -karotenu

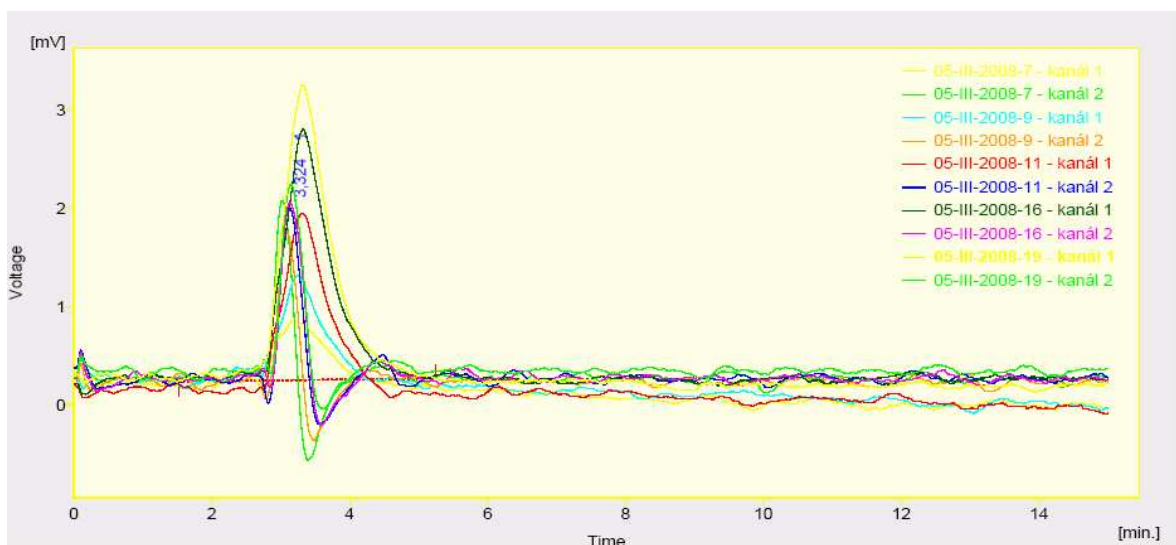
Výsledky byly naměřeny dle metodiky popsané v kapitole 5.5. Byl použit standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu.

*Tab.5: Naměřené hodnoty pro stanovení kalibrační křivky*

| Koncentrace<br>( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) | Plocha píku<br>( $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ) | Koncentrace<br>( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) | Plocha píku<br>( $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ) |
|---|--|---|--|
| 25  | 13,1   | 100   | 42,2   |
| 25  | 13,5   | 200   | 77,2   |
| 25  | 12,8   | 200   | 80,6   |
| 50  | 26,4   | 300   | 99,8   |
| 50  | 26,5   | 300   | 98,9   |
| 50  | 25,8   | 300   | 100,7  |
| 100   | 43,8   | 400   | 129,6  |
| 100   | 41,8   | 400   | 127,3  |



Obr.51. Kalibrační křivka s regresní rovnicí pro stanovení  $\beta$ -karotenu metodou HPLC

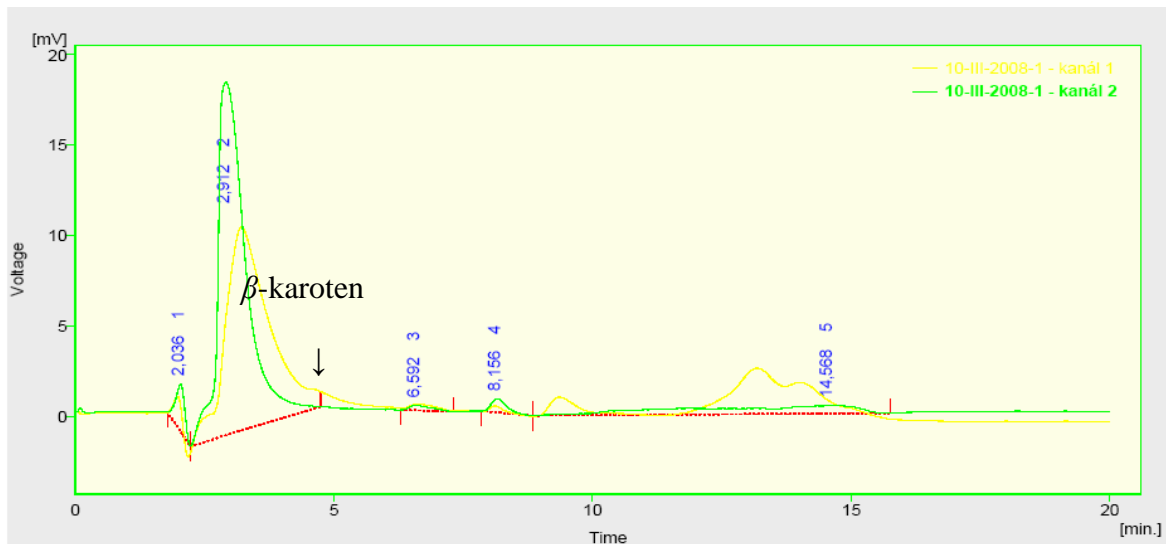


Obr.52. Chromatogram: Měření kalibrační křivky  $\beta$ -karotenu

Na chromatogramu (obr.52) lze sledovat postupné zvětšování píků v závislosti na rostoucí koncentraci měřených kalibračních roztoků.

## 6.8 Výsledky měření $\beta$ -karotenu ve vzorku čerstvého rajčete

Izolace  $\beta$ -karotenu z rajčete byla provedena dle postupu uvedeného v kapitole 5.3.2. K analýze byla použita mobilní fáze o složení MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) a kolona C18 Supelcosil LC18-DB 250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m.



**Obr.53. Chromatogram: Stanovení  $\beta$ -karotenu v čerstvém rajčeti**

Na chromatogramu (obr.53) označuje šipka pík  $\beta$ -karotenu.

**Tab.6: Naměřené hodnoty v čerstvém rajčeti**

| Navážka vzor-<br>ku (g) | Množství<br>ethanolu na<br>rozpuštění<br>odparku (ml) | Plocha píku<br>(mV.s <sup>-1</sup> ) | Obsah<br>$\beta$ -karotenu<br>(mg.100g <sup>-1</sup><br>čerstvé hmoty) |
|-------------------------|---|--------------------------------------|--|
| 10,0707                 | 10  | 14,0                                 | 1,197  |
| 10,0709                 | 10  | 14,0                                 | 1,197  |
| 10,0711                 | 10  | 13,7                                 | 1,098  |
| 10,0718                 | 10  | 13,2                                 | 0,934  |
| 10,0701                 | 10  | 11,3                                 | 0,311  |

### 6.8.1 Statistické zpracování výsledků měření $\beta$ -karotenu ve vzorku čerstvého rajčete

Ke statistickému zpracování byly použity následující vzorce:

Aritmetický průměr:  $\bar{x} = \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{n}$ , který se nejvíc blíží skutečné hodnotě. (1)

Směrodatná odchylka:  $s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \left( \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right)}$  pro odhad nahodilých chyb. (2)

Studentovo rozdělení:  $\mu = \bar{x} \pm \frac{\sqrt{s}}{t} \cdot n$  pro průměrný výsledek ze série paralelních stanovení.

(3)

**Tab.7. Statistické zpracování výsledků měření obsahu  $\beta$ -karotenu v čerstvém rajčeti**

| Obsah $\beta$ -karotenu<br>(mg.100g <sup>-1</sup> čerstvé hmoty) | $(x_i - \bar{x})$ | $(x_i - \bar{x})^2$ |
|--|-------------------|---------------------|
| 1,197  | 0,250             | 0,06250             |
| 1,197  | 0,250             | 0,06250             |
| 1,098  | 0,151             | 0,02280             |
| 0,934  | -0,013            | 0,00017             |
| 0,311  | -0,636            | 0,40450             |
| $\bar{x} = 0,947$  |                   | $\Sigma = 0,55247$  |

Průměrný obsah  $\beta$ -karotenu v čerstvém rajčeti byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky podle vzorce (2). Následoval výpočet skutečného obsahu

$\beta$ -karotenu v čerstvém rajčeti podle vzorce (3). Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ( $\alpha = 0,05$ ) a při čtyřech stupních volnosti 2,78.

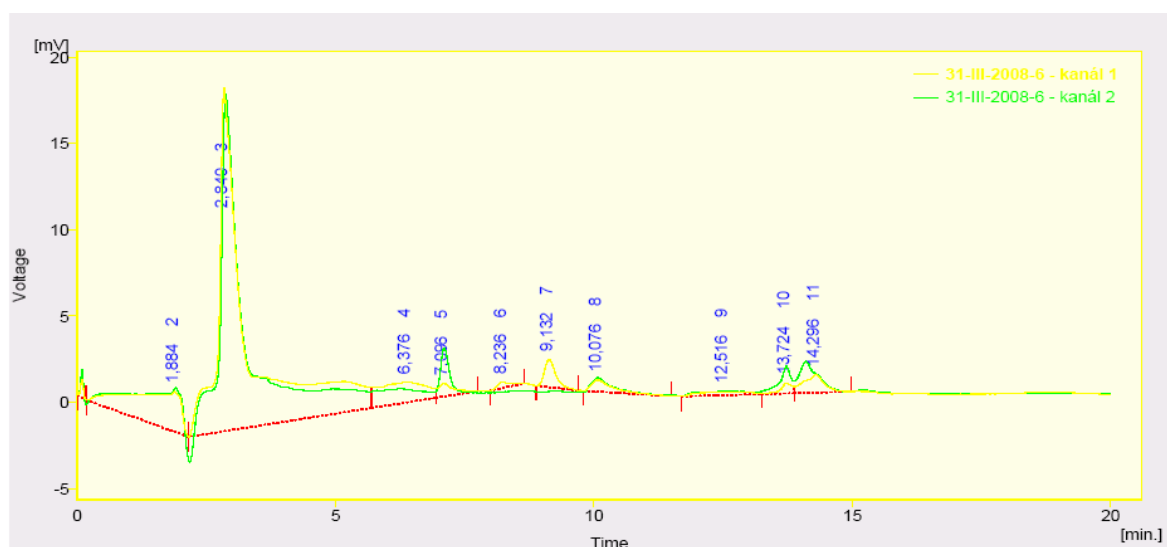
|  |
|--|
| Směrodatná odchylka : $s = 0,3716 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ |
|--|

Skutečný obsah  $\beta$ -karotenu v čerstvém rajčeti:

$$\mu = 0,947 \pm 2,043 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

## 6.9 Výsledky měření $\beta$ -karotenu ve vzorku rajčete po třech týdnech skladování

Izolace  $\beta$ -karotenu z rajčete byla provedena dle postupu uvedeného v kapitole 5.3.2. K analýze byla použita mobilní fáze o složení MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) a kolona C18 Supelcosil LC18-DB 250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m.



Obr. 54. Chromatogram. Stanovení  $\beta$ -karotenu v rajčeti po třech týdnech skladování v lednici při teplotě 4 °C

Na chromatogramu (obr.54) se pík  $\beta$ -karotenu téměř neobjevil. Obsah  $\beta$ -karotenu ve skladovaném rajčeti byl tak nízký, že nebylo možné použít výpočet. Množství přítomného  $\beta$ -karotenu leželo pod hranicí detekovatelnosti.

Tab.8: Naměřené hodnoty v rajčeti po třech týdnech skladování

| Navážka vzorku (g) | Množství ethanolu na rozpuštění odparku (ml) | Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> ) | Obsah $\beta$ -karotenu (mg.100 g <sup>-1</sup> čerstvé hmoty) |
|--------------------|--|-----------------------------------|--|
| 10,1062            | 5  | 1,62                              | -  |
| 10,1068            | 5  | 2,2                               | -  |
| 10,1066            | 5  | 2,2                               | -  |
| 10,1060            | 5  | 2,3                               | -  |
| 10,1060            | 5  | 2,3                               | -  |

Ve vzorku rajčete skladovaného po dobu tří týdnů nebylo možno stanovit obsah  $\beta$ -karotenu, protože byl tak nízký, že je pod hranicí detekovatelnosti. Nebylo tedy možné provést statistické zhodnocení měření. Lze tedy říci, že skladováním se obsah  $\beta$ -karotenu v rajčatech snižuje, až klesne na téměř nulovou hodnotu.

Naměřené hodnoty  $\beta$ -karotenu ve vzorcích rajčat jsou odlišné od hodnot udávaných v literatuře. Hiemer zde uvádí, že obsah  $\beta$ -karotenu zjištěný v 10 g rostlinné tkáně rajčete byl 0,543 mg.100g<sup>-1</sup> čerstvé hmoty.



## 7 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo vytvoření vhodné metodiky na stanovení  $\beta$ -karotenu v rajčatech. Pro měření byla používána metoda HPLC s elektrochemickou detekcí.

Byla zkoušena vhodnost tří druhů chromatografických kolon, kolona C8 Supelcosil 150 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m, kolona C30 YMC Carotenoid S5 4,6 x 250 mm, 5 $\mu$ m a kolona C18 Supelcosil LC 18-DB 250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m. Také byly zkoušeny různé druhy mobilních fází s různým poměrem chemikálií. Jako nejvhodnější kolona se jevila kolona C18 Supelcosil LC 18-DB 250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m s použitím mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) a parametry detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV. S těmito charakteristikami byla poté proměřena kalibrační křivka s použitím standardu  $\beta$ -karotenu.

Tato vytvořená metodika byla aplikována na reálný vzorek rajčete. Nejprve byla provedena izolace  $\beta$ -karotenu a to dvojnásobnou extrakcí s použitím rozpouštědel aceton:hexan (50:50), ve vodní lázni o teplotě 35°C, za současného třepání, po dobu 20 minut. Získaný extrakt byl přefiltrován přes papírový filtr FILTRAK No.390,  $\phi$ 12,5 cm a 25 ml filtrátu bylo odpařeno do sucha na vakuové odparce. Získaný odparek byl rozpuštěn v ethanolu, přefiltrován přes nylonový filtr s velikostí pórů 0,45  $\mu$ m do vialky a následně aplikován na kolonu. Objem dávkovací smyčky byl 20  $\mu$ l, průtok mobilní fáze kolonou 1,1 ml.min<sup>-1</sup> a eluce probíhala izokraticky. Na detektoru byly nastavené parametry E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV a byla používána mobilní fáze o složení MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5). Vyhodnocení probíhalo při kanálu E 1 = 500 mV.

Toto stanovení bylo provedeno u čerstvého rajčete a poté u rajčete po třech týdnech skladování. U čerstvého rajčete byl zjištěn skutečný obsah  $\beta$ -karotenu 0,947  $\pm$  2,043 mg.100g<sup>-1</sup> čerstvé hmoty, u rajčete, které bylo skladováno tři týdny skladováno, ať v ledničce či při laboratorní teplotě, nebylo možno stanovit obsah  $\beta$ -karotenu, protože byl tak nízký, že byl pod hranicí detekovatelnosti. Z toho lze tedy odvodit, že skladováním se obsah  $\beta$ -karotenu v rajčatech snižuje, až klesne na téměř nulovou hodnotu.

Naměřené hodnoty  $\beta$ -karotenu ve vzorcích rajčat jsou odlišné od hodnot udávaných v literatuře. Záleží také na odrůdě rajčete, podmínkách pěstování, sezóně. Obsah  $\beta$ -karotenu závisí také na skladovacích podmínkách a délce skladování.

U reálného vzorku byly naměřené hodnoty ovlivněny přítomností dalších látek přítomných v rajčeti, např. obsahem organických kyselin. Pro tvorbu metodiky a následné stanovení  $\beta$ -karotenu v rajčeti byla použita metoda HPLC s elektrochemickou detekcí, u níž nelze provést eluci gradientově, ale pouze izokraticky.

Diplomová práce zahrnuje proces izolace  $\beta$ -karotenu z rajčat a postup vytváření metodiky a mohla by být dále využita jako výchozí bod pro tvorbu jiné metodiky na stanovení  $\beta$ -karotenu v rajčatech, kdy by mohly být případně odstraněny látky, které ruší stanovení v případě reálného vzorku.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] HLÚBIK, P., OPLTOVÁ, L. *Vitaminy*. Grada Publishing a. s., Praha, 2004. ISBN 80-247-0373-4
- [2] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. OSSIS, Tábor, 1999. Vydání první. ISBN 80-902391-5-3
- [3] DUCHOŇ, J. a kol. *Lékařská chemie a biochemie*, učebnice pro lékařské fakulty. AVICENUM, zdravotnické nakladatelství, n. p. , Praha, 1985
- [4] DAVÍDEK, J. , JANÍČEK, G. , POKORNÝ, J. *Chemie potravin*. SNTL, Praha, 1983
- [5] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*. OSSIS, Tábor, 1999. Vydání první. ISBN 80-902391-4-5
- [6] ŠAPIRO, D. K. a kol. *Ovoce a zelenina ve výživě člověka*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 1988. Vydání první.
- [7] [http://old.mendelu.cz/~agro/af/systematika/ucebni\\_text/system/krytosemenne/dvoudelozne/lilkovite/Solanum\\_lycopersicum.html](http://old.mendelu.cz/~agro/af/systematika/ucebni_text/system/krytosemenne/dvoudelozne/lilkovite/Solanum_lycopersicum.html)
- [8] BIGGS, M. *Zelenina, velká kniha zeleninových druhů*. VOLVOX GLOBATOR, Praha, 1997, ve spolupráci s londýnským nakladatelstvím Kyle Cathie Limited
- [9] SCHULZOVÁ, V. , HAJŠLOVÁ, J. , VRÁNOVÁ, M. *Changes of biologically active compounds during ripening and processing of tomatoes*. VITAMINS 2005. The Abstract Book. Pardubice, September, 14-15, 2002, str. 33
- [10] <http://www.ireceptar.cz/detail-clanku/desatero-pro-rajcata.html>
- [11] [http://www.ukzuz.cz/publikace/odrudy/zeleniny\\_vegetables.pdf](http://www.ukzuz.cz/publikace/odrudy/zeleniny_vegetables.pdf)
- [12] <http://www.osiva.cz>
- [13] <http://www.moravoseed.cz/CZE/zeleniny/rajce/goldkrone.html>
- [14] <http://www.moravoseed.cz/CZE/zeleniny/rajce/cherrola-f1.html>
- [15] <http://www.semo.cz/homegardencz/index.php?s=&druhId=195&Rajce-tyckove>

- [16] <http://www.semo.cz/homegardencz/index.php?s=&druh=36&Rajce-kerickove>
- [17] TAUNGBODHITHAM, A. K. a kol. *Evaluation of extraction method for the analysis of carotenoids in fruits and vegetables*. Food Chemistry, Volume 63, Issue 4, December 1998, [online], [citováno 24.4.2005] , dostupné z internetu: < [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com) >, str. 577-584
- [18] DAVÍDEK, J. a kol. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. SNTL, Praha, 1981
- [19] KOLEKTIV AUTORŮ. *Instrumentální analýza*. SNTL, Praha, 1986. Vydání první.
- [20] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Učebnice základů instrumentálních analytických metod. Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava. ISBN 80-902155-0-5
- [21] WILSON, K. , WALKER, J. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. Fifth edition. Cambridge University Press 2000. ISBN 0-521-65873-X (paperback)
- [22] <http://www.hplc.cz/Teorie/detectors.html>
- [23] <http://elchem.kaist.as.kr/vt/chem-ed/sep/lc/hplc.htm>
- [24] HIEMER, J. , MAROVÁ, I. , ILLEK, J. *Množství antioxidantů a antioxidační kapacita vybraných druhů potravin*. Výživa a potraviny. Recenzovaný odborný časopis. Vydavatel výživaservis s.r.o., Praha 2. ISSN 1211-846X, str. 150-151

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| <b>ACN</b>                         | Acetonitril   |
| <b>DAD</b>                         | Diode Array Detector, detektor diodového pole   |
| <b>ECD</b>                         | Electrochemical detection, elektrochemická detekce  |
| <b>GPC</b>                         | Gel Permeation Chromatography, gelová permeační chromatografie  |
| <b>HPLC</b>                        | High Performance Liquid Chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie  |
| <b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b> | Kyselina fosforečná   |
| <b>IEC</b>                         | Ion Exclusion Chromatography, iontově výměnná chromatografie  |
| <b>ICHS</b>                        | Ischemická choroba srdeční  |
| <b>LDL</b>                         | Low Density Lipoprotein, lipoprotein s nízkou hustotou  |
| <b>LC/MS</b>                       | Liquid Chromatography with Mass Spectroscopy detection, kapalinová chromatografie s hmotnostně spektroskopickou detekcí |
| <b>LLC</b>                         | Liquid-Liquid Chromatography, kapalinová rozdělovací chromatografie   |
| <b>LSC</b>                         | Liquid-Solid Chromatography, kapalinová adsorpční chromatografie  |
| <b>MetOH</b>                       | Methanol  |
| <b>R<sub>F</sub></b>               | Retenční faktor   |
| <b>rH<sub>2</sub>O</b>             | Redestilovaná voda  |
| <b>RP-HPLC</b>                     | Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenou fází          |
| <b>UV-VIS</b>                      | Ultraviolet-Visible, ultrafialová a viditelná oblast světla   |

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

|  |    |
|--|----|
| Obr.1. Lykopen .....   | 10 |
| Obr.2. $\beta$ -karoten .....  | 11 |
| Obr.3. $\alpha$ -karoten .....   | 12 |
| Obr.4. $\gamma$ -karoten .....   | 12 |
| Obr.5. Rostlina rajčete .....  | 16 |
| Obr.6. Květ rajčete .....  | 16 |
| Obr.16. Součásti kapalinového chromatografu .....  | 24 |
| Obr.21. Chromatogram: Standard $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze<br>ACN:rH <sub>2</sub> O:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (99:0,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV,<br>E2 = 600 mV, G = 750 mV.....  | 45 |
| Obr.22. Chromatogram: Standard $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze<br>ACN:rH <sub>2</sub> O:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (99:0,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV,<br>E2 = 400 mV, G = 750 mV.....  | 46 |
| Obr.23. Chromatogram: Standard $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze<br>ACN:rH <sub>2</sub> O:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (80:19,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV,<br>E2 = 600 mV, G = 750 mV..... | 46 |
| Obr.24. Chromatogram: Standard $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze<br>ACN:rH <sub>2</sub> O:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (80:19,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV,<br>E2 = 400 mV, G = 750 mV..... | 47 |
| Obr.25. Chromatogram: Standard $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze<br>ACN:rH <sub>2</sub> O:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV,<br>E2 = 600 mV, G = 750 mV..... | 47 |

- Obr.26. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze ACN:rH<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 750 mV.....48
- Obr.27. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze ACN:rH<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (50:49,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV.....48
- Obr.28. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze ACN:rH<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (50:49,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 750 mV.....49
- Obr.29. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV.....49
- Obr.30. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 750 mV.....50
- Obr.31. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV.....51
- Obr.32. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 750 mV.....51
- Obr.33. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (50:49,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV.....52

- Obr.34. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (50:49,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 750 mV.....53
- Obr.35. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (30:69,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV.....54
- Obr.36. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (30:69,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 750 mV.....54
- Obr.37. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (10:89,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV.....55
- Obr.38. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (10:89,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 750 mV.....56
- Obr.39. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v mobilní fázi při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV.....57
- Obr.40. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v mobilní fázi při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 750 mV.....58
- Obr.41. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v mobilní fázi při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV.....58



- Obr.42. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v mobilní při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 750 mV.....59
- Obr.43. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV.....60
- Obr.44. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 750 mV.....61
- Obr.45. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV.....61
- Obr.46. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 750 mV.....62
- Obr.47. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV.....63
- Obr.48. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 750 mV.....64
- Obr.49. Chromatogram: Standard  $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 500 mV, E2 = 600 mV, G = 750 mV.....65

---

|  |    |
|--|----|
| Obr.50. Chromatogram: Standard $\beta$ -karotenu rozpuštěný v ethanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E1 = 300 mV, E2 = 400 mV, G = 750 mV..... | 66 |
| Obr.51. Kalibrační křivka s regresní rovnicí pro stanovení $\beta$ -karotenu metodou HPLC ...  | 68 |
| Obr.52. Chromatogram: Měření kalibrační křivky $\beta$ -karotenu.....  | 68 |
| Obr.53. Chromatogram: Stanovení $\beta$ -karotenu v čerstvém rajčeti .....   | 69 |
| Obr.54. Chromatogram: Stanovení $\beta$ -karotenu v rajčeti po 3 týdnech skladování .....  | 71 |

**SEZNAM TABULEK**

|  |    |
|--|----|
| Tab.3. Extrakce karotenoidů při laboratorní teplotě .....                                      | 42 |
| Tab.4. Extrakce karotenoidů při teplotě vodní lázně 35 °C .....                                | 42 |
| Tab.5. Naměřené hodnoty pro stanovení kalibrační křivky .....                                  | 67 |
| Tab.6. Naměřené hodnoty v čerstvém rajčeti .....   | 69 |
| Tab.7. Statistické zpracování výsledků měření obsahu $\beta$ -karotenu v čerstvém rajčeti..... | 70 |
| Tab.8. Naměřené hodnoty v rajčeti po 3 týdnech skladování .....                                | 72 |

**SEZNAM PŘÍLOH**

- P I: Odrůdy keříčkových rajčat
- P II: Odrůdy tyčkových rajčat
- P III: Tyčkové odrůdy rajčat
- P IV: Tyčkové odrůdy rajčat
- P V: Tyčkové odrůdy rajčat
- P VI: Keříčkové odrůdy rajčat
- P VII: Keříčkové odrůdy rajčat
- P VIII: Optimalizace podmínek izolačního procesu
- P IX: Optimalizace podmínek izolačního procesu

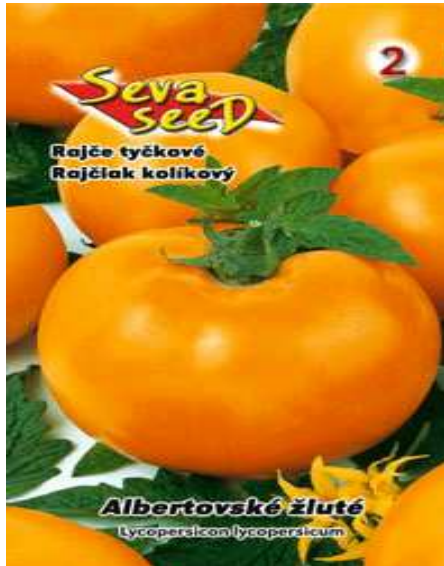
**PŘÍLOHA P I: ODRŮDY KEŘÍČKOVÝCH RAJČAT****Tab.1. Odrůdy keříčkových rajčat zapsaných ve Státní odrůdové knize <sup>(1)</sup>**

|             |          |
|-------------|----------|
| Campbell 33 | Oranže   |
| Darinka     | Orbit    |
| Denár       | Patria   |
| Diana       | Pavlína  |
| Dublet      | Proton   |
| Dulcia      | Salus    |
| Eskort      | Semalus  |
| Hana        | Semaprim |
| Homer       | Semarol  |
| Karla       | Šejk     |
| Kmicic      | Titan    |
| Marienka    | Topspin  |
| Minigold    | Tritonex |
| Odeon       | Vilma    |

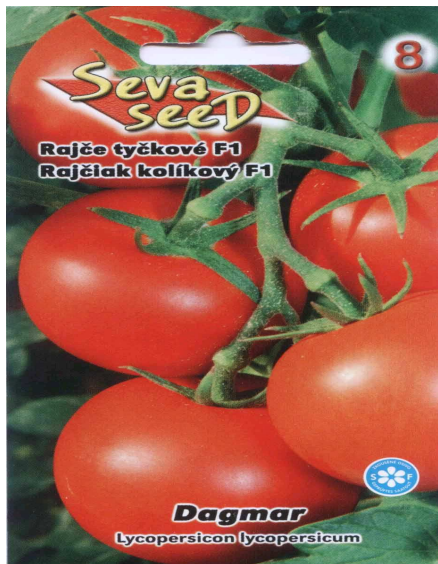
**PŘÍLOHA P II: ODRŮDY TYČKOVÝCH RAJČAT****Tab.2. Odrůdy tyčkových rajčat zapsaných ve Státní odrůdové knize <sup>(11)</sup>**

|                       |                     |
|-----------------------|---------------------|
| Albertovské žluté     | Pedro               |
| Bejbino               | Perun               |
| Boreal                | Princess            |
| Brick                 | Raïssa              |
| Canestrino            | Red pear            |
| Cindel                | Romus               |
| Dagmar                | S.Marzano Vesuvio 2 |
| Dalit N               | S.Pierre            |
| Furore                | Sláva Porýní        |
| Goldkrone             | Start S             |
| Cherrola              | Stupické polní rané |
| Lehečkovo pomerančové | Stupické skleníkové |
| Lusita                | Tajfun              |
| Marfa                 | Thomas              |
| Marilyn               | Tipo                |
| Marissa               | Tolstoi             |
| Megana                | Torino              |
| Orfea                 | Tornádo             |
| Orkado                | Toro                |
| Parto                 | Uragan              |

## PŘÍLOHA P III: TYČKOVÉ ODRŮDY RAJČAT



Obr.7. Albertovské žluté <sup>(12)</sup>



Obr.8. Dagmar <sup>(12)</sup>

## PŘÍLOHA P IV: TYČKOVÉ ODRŮDY RAJČAT



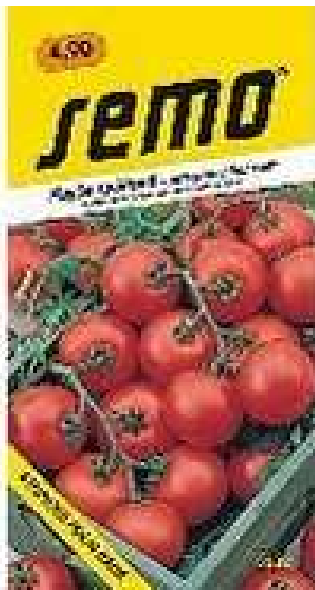
*Obr.9. Goldkrone* <sup>(13)</sup>



*Obr.10. Cherrola F1* <sup>(14)</sup>



## PŘÍLOHA P V: TYČKOVÉ ODRŮDY RAJČAT

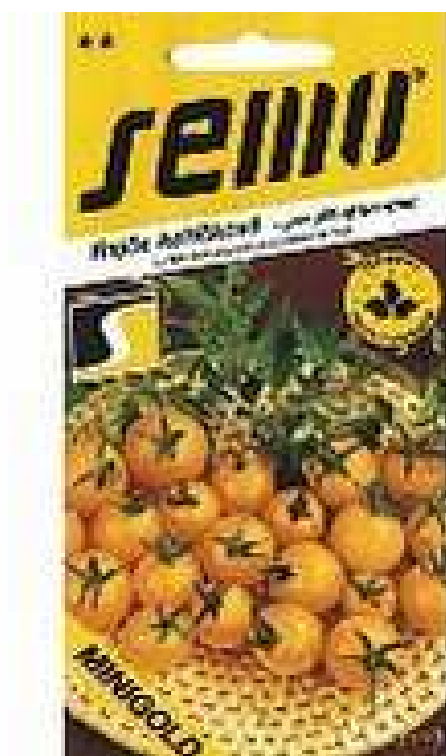


*Obr.11. Stupické polní rané* <sup>(15)</sup>

## PŘÍLOHA P VI: KEŘÍČKOVÉ ODRŮDY RAJČAT

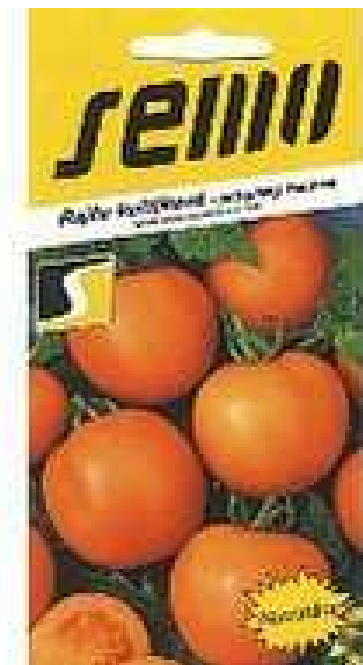


*Obr.12. Denar<sup>(16)</sup>*

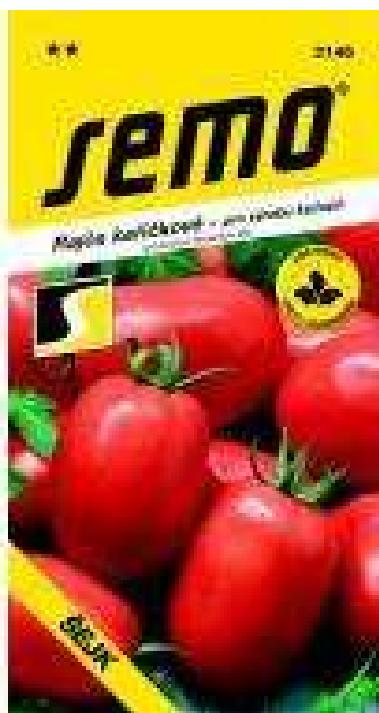


*Obr.13. Minigold<sup>(16)</sup>*

## PŘÍLOHA P VII: KEŘÍČKOVÉ ODRŮDY RAJČAT

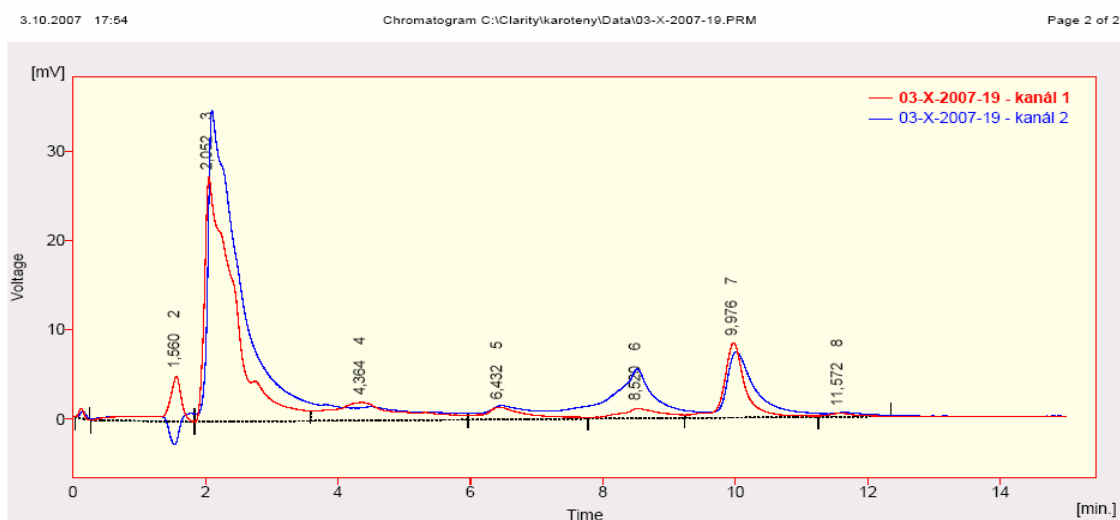


*Obr.14. Oranže* <sup>(16)</sup>

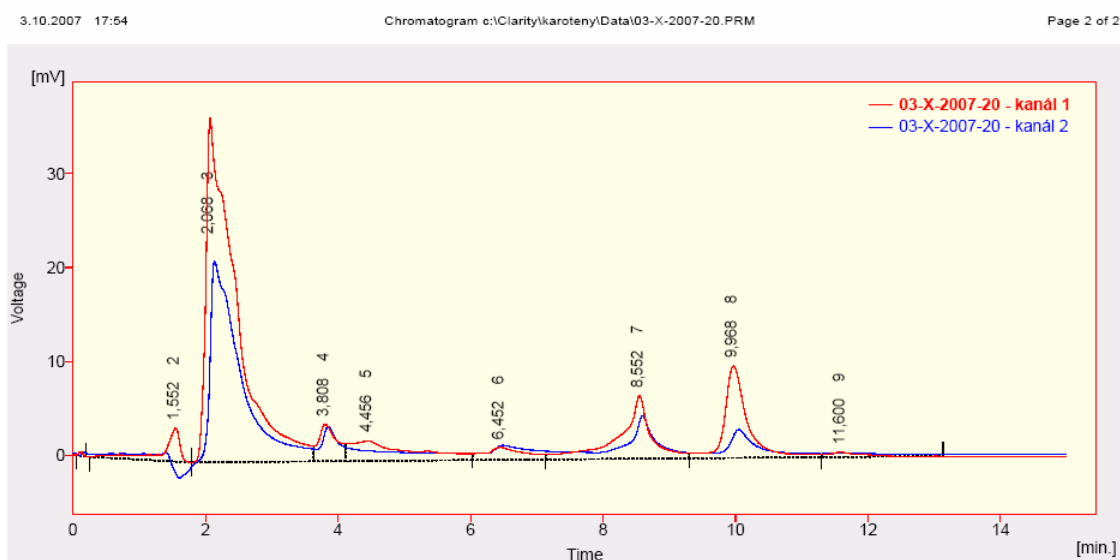


*Obr.15. Šejk* <sup>(16)</sup>

## PŘÍLOHA P VIII: OPTIMALIZACE PODMÍNEK IZOLAČNÍHO PROCESU

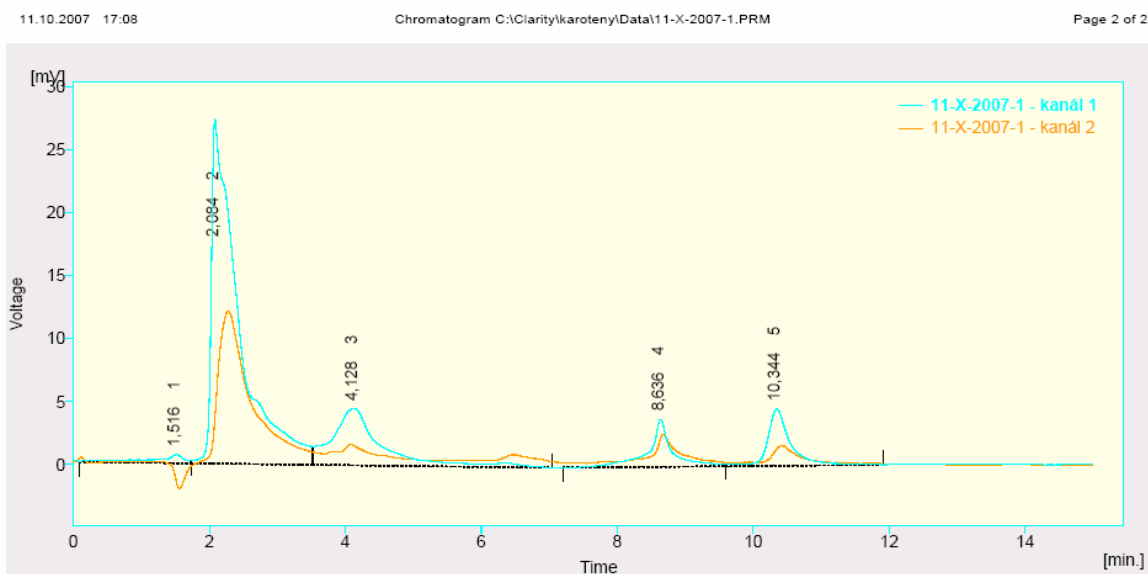


**Obr.17. Chromatogram. Extrakce karotenoidů směsí aceton:hexan (50:50) při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 300 \text{ mV}$ ,  $E2 = 400 \text{ mV}$ ,  $G = 650 \text{ mV}$ .**

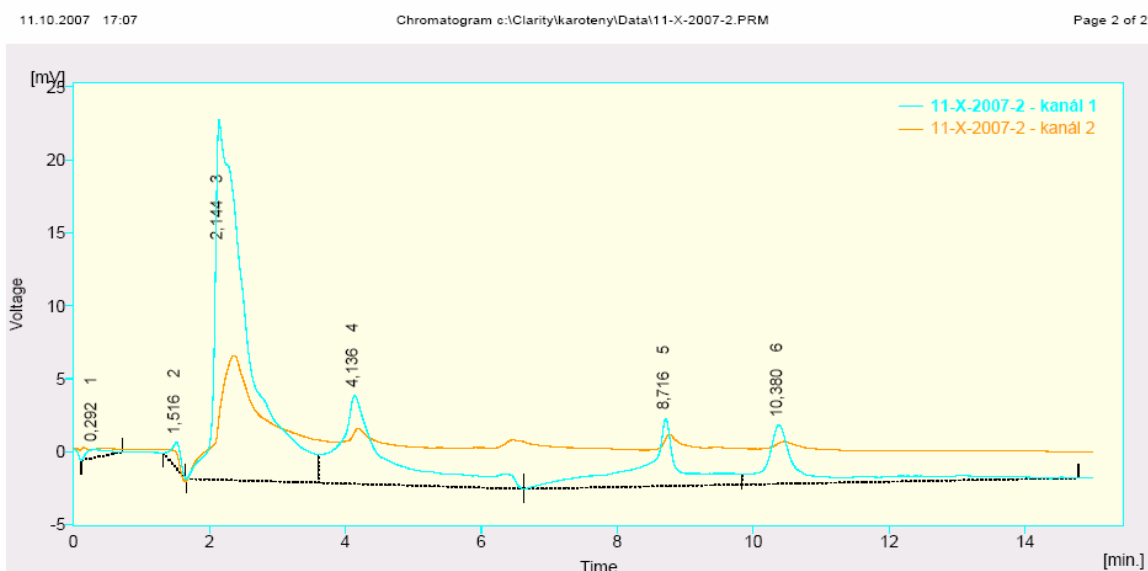


**Obr.18. Chromatogram: Extrakce karotenoidů směsí aceton:hexan (50:50) při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 500 \text{ mV}$ ,  $E2 = 600 \text{ mV}$ ,  $G = 750 \text{ mV}$ .**

## PŘÍLOHA P IX: OPTIMALIZACE PODMÍNEK IZOLAČNÍHO PROCESU



Obr.19. Chromatogram: Extrakce karotenoidů směsí ethanol:hexan (50:50) při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 300 \text{ mV}$ ,  $E2 = 400 \text{ mV}$ ,  $G = 650 \text{ mV}$ .



Obr.20. Chromatogram: Extrakce karotenoidů směsí ethanol:hexan (50:50) při nastavení parametrů detektoru  $E1 = 500 \text{ mV}$ ,  $E2 = 600 \text{ mV}$ ,  $G = 750 \text{ mV}$ .