

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie



**CHARAKTERIZACE LIPOFILNÍCH ANTIOXIDANTŮ
V LUPINĚ (*Lupinus sp.*)**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Jitka Čamková

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. David Jirovský, Ph.D.

Olomouc 2014

SOUHRN

Tato práce se zabývá charakterizací lipofilních antioxidantů v lupině (*Lupinus sp.*). Analyzován byl olej získaný z bobů lupiny andské (*Lupinus mutabilis sweet*), která se vyznačuje vysokou výživnou hodnotou jedlých semen. V lupinovém oleji byly stanoveny karotenoidy (β -karoten, lutein, zeaxantin) a tokoferoly (α -tokoferol, γ -tokoferol, δ -tokoferol). Tyto látky jsou významnými antioxidanty poskytující buněčným strukturám ochranu proti volným radikálům a nežádoucím reakcím. Pro úpravu vzorku oleje byly testovány dvě extrakční metody, a to extrakce kapalina-kapalina a extrakce tuhou fází (SPE). Pro předběžnou identifikaci karotenoidů a tokoferolů v získaných extraktech byla použita tenkovrstvá kapalinová chromatografie (TLC). K separaci byla použita mobilní fáze o složení hexan : aceton : triethylamin; 10 : 4 : 1 (v/v/v). Skvrny po TLC separaci byly identifikovány pod UV lampou při vlnových délkách 366 nm (karotenoidy) a 254 nm (tokoferoly).

K analýze antioxidantů byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému reverzních fází (RP-LC), která umožňovala použití coulometrické detekce. Pro analýzu karotenoidů byla použita kolona Macherey-Nagel (3 μ m) 125 x 2 mm a mobilní fáze o složení 50 mmol/l dihydrogenfosforečnan sodný (pH 4,4) : acetonitril; 55 : 45 (v/v). Pro analýzu tokoferolů byla použita kolona Zorbax C8 (5 μ m) 150 x 4,6 mm a mobilní fáze o složení 20 mmol/l mravenčan amonný (pH 4,47) : metanol; 95 : 5 (v/v). K detekci byl použit elektrochemický detektor Coulochem III (ESA, Inc.), který se sestával z coulometrické cely (Model 5010, ESA Inc.) s dvěma průtočnými elektrodami z porézního grafitického uhlíku. Pracovní potenciály byly zvoleny +550 a +600 mV (vs. Pd/H₂) pro karotenoidy a +650 a +700 mV (vs. Pd/H₂) pro tokoferoly.

Mimo RP-LC byl pro analýzu studovaných látek použit také systém normálních fází (NP-LC). Pro separaci analytů byla použita kolona Tessek Separon (7 μ m) 250 x 4 mm, mobilní fáze o složení hexan : isopropylalkohol; 95 : 5 (v/v) pro karotenoidy, resp. hexan : isopropylalkohol; 97 : 3 (v/v) pro tokoferoly. Analyty byly detekovány pomocí UV-VIS detektoru (Shimadzu SPD 10-A VP) při vlnových délkách 450 nm pro karotenoidy a 200 nm pro tokoferoly. Tokoferoly byly také detekovány pomocí fluorescenčního detektoru (Agilent 1200 Series) při vlnových délkách 295 nm (excitační) a 330 nm (emisní).

Na základě získaných dat byly jednotlivé analyty identifikovány a kvantifikovány v lupinovém oleji.

SUMMARY

This diploma thesis is focused on the characterization of lipophilic antioxidants in lupine (*Lupinus sp.*). An analyzed oil was obtained from the seeds of Andean Lupine (*Lupinus mutabilis sweet*), which has been characterized by high nutritional value. In lupine oil were analyzed carotenoids (β -carotene, lutein, zeaxanthin) and tocopherols (α -tocopherol, γ -tocopherol, δ -tocopherol), that rank among the important antioxidants providing protection against free radicals and undesirable reaction.

The sample pretreatment was carried on by using two pre-concentration methods including liquid-liquid and solid phase extraction (SPE). Preliminary experiments were based on the using of the thin layer chromatography (TLC) working in normal phase system with mobile phase composed of hexane : acetone : triethylamine; 10 : 4 : 1 (v/v/v). Separated spots were detected under UV light at 366 nm for carotenoids and 254 nm for tocopherols.

Carotenoids and tocopherols were analyzed by using RP-LC with electrochemical detection. A Macherey-Nagel column (125 x 2 mm, 3 μ m), mobile phase consisting of monosodium phosphate (c=50 mmol/l, pH 4,4) : acetonitrile 55:45 (v/v) were used for separation of carotenoids. Zorbax C8 column (150 x 4,6 mm, 5 μ m) and mobile phase composed of ammonium formate (c=20 mmol/l, pH 4,47) : methanol; 95 : 5 (v/v) were used for separation of selected tocopherols. A Coulochem III electrochemical detector equipped with a coulometric cell (Model 5010, Esa Inc.) containing two flow-through electrodes made of porous carbon were used. The potential setting on channels were either + 500 mV and 650 mV (vs. Pd/H₂) for carotenoids or +650 mV and +700 mV (vs. Pd/H₂) for tocopherols detection.

The antioxidants were also separated in normal phase system, consisting of Tessek Separon column (250 x 4 mm, 7 μ m) and two mobile phases. Mobile phase composed of hexane : isopropyl alcohol; 95:5 (v/v) were used for carotenoids and mobile phase consisting of hexane : isopropyl alcohol; 97:3 (v/v) were used for tocopherols separation. The analytes were detected by using UV-VIS detector (Shimadzu SPD 10-A VP) at 450 nm for carotenoids and 200 nm for tocopherols, that were also detected by fluorescence detector (Agilent 1200 Series) at 295 nm excitation and 330 nm emission wavelength.

According to the obtained data, the particular analytes were identified and quantified in lupine oil.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne.....

.....
vlastnoruční podpis

Děkuji svému vedoucímu diplomové práce, doc. RNDr. Davidovi Jirovskému, Ph.D. za poskytnutí zajímavého námětu práce, odborné vedení, cenné rady, připomínky a čas, který mi věnoval při konzultacích. Poděkování patří také Mgr. Zdence Bartošové za cenné rady a čas, který mi věnovala při práci v laboratoři.

OBSAH

1. Úvod	1
2. Teoretická část	2
2.1 Lupina (Lupinus sp.)	2
2.1.1 Chemické složení lupiny a její účinky	3
2.1.2 Využití	4
2.2 Stanovované lipofilní antioxidanty	6
2.2.1 Karotenoidy	6
2.2.2 Vitamín E	14
2.3 Metody izolace lipofilních látek	16
2.3.1 Extrakce kapalina – kapalina	16
2.3.2 Extrakce tuhou fází (SPE)	16
2.4 Metody stanovení lipofilních látek	21
2.4.1 Kapalinová chromatografie	21
3. Experimentální část	34
3.1 Chemikále	34
3.2 Přístrojové vybavení	34
3.3 Vzorek	35
3.4 Pracovní postupy	35
3.4.1 Příprava standardů	35
3.4.2 Metody extrakce lupinového oleje	36
3.4.3 Metody stanovení	37
4. Výsledky a diskuze	40
4.1 Tenkovrstvá kapalinová chromatografie (TLC)	40
4.2 Separace v systému reverzních fází (RP-LC)	43
4.3 Separace v systému normálních fází (NP-LC)	46
4.3.1 NP-LC s UV-VIS detekcí	46
4.3.2 NP-LC s fluorescenční detekcí	51
4.4 Porovnání SPE extrakcí	53
5. Závěr	54
6. Seznam použitých zkratk	55
7. Literatura	56

1. Úvod

Lupina, patřící do čeledi bobovitých rostlin, se stala díky vysokému obsahu bílkovin a vlákniny důležitou součástí výživy nejen zvířat, ale i zdravé lidské stravy. Vzhledem k tomu, že je lupina nenáročná na pěstování a má vysokou výživovou hodnotu, mohla by v budoucnu hrát významnou roli při řešení problémů s nasycením obyvatelstva třetího světa^{1,2}.

Předkládaná práce se zabývá charakterizací hlavních lipofilních antioxidantů v lupině (*Lupinus sp.*). Analyzovanými lipofilními antioxidanty jsou karotenoidy (lutein, zeaxantin, β -karoten) a tokoferoly (α -tokoferol, γ -tokoferol, δ -tokoferol).

Experimentální část diplomové práce se zabývá identifikací a stanovením hlavních antioxidantů v lupinovém oleji. K tomuto účelu byla využita celá řada analytických přístupů a metod. Dílčím úkolem zadané práce byla volba vhodné extrakční techniky. Izolace analytů ze vzorku je totiž důležitou a nedílnou součástí téměř každé analýzy. Při řešení úkolu byly testovány extrakce typu kapalina-kapalina a extrakce tuhou fází (SPE), jenž se řadí mezi běžně užívané extrakční postupy.

Významná část diplomové práce se zabývá hledáním vhodných podmínek pro separaci analytů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s odlišnými typy detekčních technik. K výběru podmínek přispěla také tenkovrstvá kapalinová chromatografie (TLC), která sloužila k základní charakterizaci jednotlivých vzorků před samotnou HPLC analýzou. HPLC separace byla prováděna jednak v systému reverzních fází ve spojení s coulometrickou detekcí, a také v systému normálních fází za použití UV-VIS a fluorescenční detekce.

2. Teoretická část

2.1 Lupina (*Lupinus sp.*)

Lupina je rostlina z čeledi bobovitých (*Fabaceae*), dorůstající výšky 50 až 160 cm. Listy má dlanitě dělené do 9 až 18 četných úzkých lístků, které jsou na rubu chlupaté. Jejím květem je asi 40 cm dlouhý hrozen barvy tmavě modré, fialové, růžové, žluté nebo bílé. Plodem je lusk 2,5 cm dlouhý obsahující několik zploštělých semen. Semena jsou kruhově nepravidelná mající krémovou barvu. Lupinu lze členit na trvalky a jednoletky, kvetoucí v období od června do září^{1,2,3,4}.

Rod lupiny je velmi rozsáhlý, existuje asi čtyři sta druhů této byliny. Mezi nejznámější druhy patří: lupina úzkolistá (*Lupinus angustifolius*) Obr. 1, lupina žlutá (*Lupinus luteus*), lupina bílá (*Lupinus albus*) a lupina mnoholistá (*Lupinus polyphyllus*)^{5,6}.



Obr. 1 Lupina úzkolistá⁷

Lupina pochází z oblasti Středozemního moře, Ameriky a východní Afriky. Postupem času se z ní stala planá rostlina rostoucí téměř všude. Jelikož má lupina schopnost ve svých kořenech zadržovat vodu, může přežít i ve špatném životním prostředí, jako jsou např. neplodné půdy, hluboká písčítá prostředí a špatné klima. Roste převážně na okrajích lesů a cest, mýtinách, řídkých lesních porostech a v suchých polích. Preferuje půdy neutrální až kyselé, nevápňité a vyžaduje přímé světlo^{2,6}.

2.1.1 Chemické složení lupiny a její účinky

Lupina se vyznačuje vysokým obsahem bílkovin, přibližně 37 %, a touto hodnotou se vyrovnává sóji. Její semena obsahují pouze 10 % tuků, zatímco sója až dvojnásobek. Hmotnost lupiny je navíc z 13 % tvořena zdravou vlákninou, což je zdaleka nejvyšší množství ve srovnání s ostatními luštěninami². Semena lupiny obsahují vyšší množství rozpustných cukrů než jiné luštěniny. Je v nich také přítomno nepatrné množství škrobu a vyšší koncentrace nerozpustných neškrobových polysacharidů⁵.

Hlavními zásobními proteiny lupiny jsou globuliny a albuminy tvořící asi jednu čtvrtinu proteinu⁸. Semena také obsahují nezbytné aminokyseliny, zejména jsou považovány za dobrý zdroj lysinu a obecně jsou chudé na methionin, cystein a treonin. I když lupina patří k luštěninám, má ve svých semenech značné množství oleje. Vyznačuje se vyváženým složením mastných kyselin, kdy 10 % tvoří nasycené mastné kyseliny, a dalších 90 % je tvořeno nenasycenými mastnými kyselinami (olejová, linolová, linolenová). Lupina má v porovnání s ostatními luštěninami nižší úroveň přítomnosti nežádoucích složek, jako je kyselina fytová, oligosacharidy, inhibitory trypsinu, saponiny a lektiny⁵. Lupina je také bohatá na minerály (draslík, hořčík, fosfor, sodík, vápník, mangan) a vitamíny (thiamin, riboflavin, vitamín C)⁹. Semena lupiny obsahují i fytochemikálie s antioxidační aktivitou, jako jsou polyfenoly, především taniny a flavonoidy⁵. Dále obsahuje průměrné množství karotenoidů: lutein a zeaxantin, β -karoten, tokoferoly a jiné důležité bioaktivní složky významné pro člověka a zvířata⁹.

Lupina se vyznačuje obsahem chinolizidinových alkaloidů, které způsobují hořkost a toxicitu semen. Jsou to například: lupanin, lupinin, spartein, hydroxylupanin, monolupanin, arginin a další^{5,10}. Tyto alkaloidy mohou způsobovat akutní toxicitu nebo mohou mít teratogenní účinky na hospodářská zvířata. Silně poškozují játra, ledviny, nervový systém

i srdce. Příznakem otravy je slinění a nevolnost provázená zvracením. Dalšími příznaky jsou obtížné polykání, křeče, neklid a poruchy srdečního rytmu. Smrt při otravě nastává ochrnutím dýchacích svalů a udušení oběti za plného vědomí^{7,11,12}. Avšak některé odrůdy obsahují i velmi malá množství hořkých alkaloidů. Jsou známé jako sladké lupiny a patří mezi ně: lupina bílá, úzkolistá, žlutá a vyšlechtěná lupina andská (*Lupinus mutabilis*). Vzhledem k jejich nízkému obsahu hořkých a potenciálně toxických alkaloidů neexistuje riziko toxicity u zvířat a lidí^{2,6}.

2.1.2 Využití

Lupina je ekonomicky a zemědělsky cenná rostlina. Mnohdy je pěstována kvůli zlepšení kvality půdy, protože má schopnost ji obohacovat dusíkatými sloučeninami. Je schopna během jednoho pěstebního období dát do půdy přes 200 kg dusíku na hektar, řadí se tedy mezi významné zelené hnojivo^{1,7}. Absorbuje také velké množství pesticidů a dalších jedů obsažených v půdě^{2,5}.

Lupina je považována za cennou přísadu lidské stravy, hlavně kvůli vysokému obsahu bílkovin a nízkému obsahu oleje. Pro své nutriční a dietní vlastnosti může vyhovovat lidem snažícím se o zdravý životní styl. Má schopnost snižovat hladinu cholesterolu a požívání potravin obsahující lupinu je spojeno s prevencí diabetu, obezity a kardiovaskulárních onemocnění. Také se s lupinou počítá jako s bylinou, která může pomoci nasycit populaci zemí třetího světa^{2,9,13}.

Velkou výhodou lupiny je její schopnost odstraňovat nežádoucí toxiny, proto je široce používána v potravinářství¹. Některé druhy semen se praží a používají se jako mouka nebo náhražka kávy. Mouka je vhodná do pekařských směsí či k výrobě těstovin. Její další výhodou je, že neobsahuje lepek, tudíž se používá jako přísada do bezlepkových potravin. Z vlčího bobu se dále vyrábí náhražka kravského mléka, kojenecké výživy nebo bílkovinná náhražka masa – tofu^{2,5}.

Lupina se také přidává do živočišné výživy, kdy čtyřicet procent sklizně semen této byliny se používá jako přísada do krmiv pro hospodářská zvířata. Dále se lupiny využívá v kosmetickém průmyslu k výrobě pleťových masek pro oživení unavené pleti a na mastnou pleť^{1,5,6}.

V současnosti je největším světovým producentem a vývozcem semen lupiny Austrálie, která zajišťuje 80 až 85 % světové produkce. Mezi nejvýznamnější pěstitelské oblasti v Evropě patří Francie, Německo, Polsko, Španělsko, Rusko a Ukrajina⁹.

2.2 Stanovované lipofilní antioxidanty

Antioxidanty jsou látky, které si organismus může vytvářet sám (jejich aktivita a množství je dáno geneticky), avšak nejčastěji jsou získávány z potravin. Antioxidační kapacita je definována jako schopnost sloučenin řídit oxidační pochody v organismu, poskytovat buněčným strukturám ochranu proti volným radikálům (zejména kyslíku a dusíku) a zabraňovat nežádoucím reakcím. Antioxidanty převádějí aktivní kyslíkové radikály na nereaktivní nebo méně reaktivní formy^{14,15}.

Mezi antioxidační systémy patří antioxidační enzymy, tj. katalázy, glutathionperoxidázy, glutathion-S-transferázy, superoxiddismutázy a neenzymatické substráty (kyselina lipoová, koenzym Q, bilirubin, vitamín C, vitamín E, flavonoidy, karotenoidy,...). Úlohu v antioxidačním působení mají i některé prvky např. železo, měď, zinek a jiné¹⁵.

Antioxidanty dělíme na hydrofilní (vitamín C, selen, kyselina močová, bioflavonoidy,...) a lipofilní (vitamín E, ubiquinon Q₁₀,...). Mezi lipofilní antioxidanty se také řadí vitamín A, který se v přírodě vyskytuje ve dvou formách: retinol a β -karoten. Retinol lidský organismus získává z živočišné potravy (játra, tučné ryby, sýr, žloutek, máslo). Je nezbytný pro buněčný vývoj, růst, imunitní funkce a zrak¹⁶.

Jak již bylo zmíněno, lidské tělo získává antioxidanty potravou. Největší množství těchto látek je v čaji, vínu, mase, vejcích, ovoci, zelenině, celozrnných obilovinách a dalších komoditách. Antioxidační látky v potravinách hrají důležitou úlohu z hlediska ochrany zdraví. Snižují riziko chronických onemocnění, včetně rakoviny a srdečních onemocnění¹⁷. Funkci antioxidantů je nezbytné chápat jako celek. Konečný efekt je dán řadou interakcí jednotlivých složek, tedy pokud bude mít tělo dostatek například zinku, selenu či vitamínu E a nedostatečné množství vitamínu C, nebude antioxidační systém dostatečně funkční^{14,15}.

2.2.1 Karotenoidy

Karotenoidy jsou skupina přírodních barviv obsažených v rostlinách, kterým poskytují jejich charakteristické zbarvení: žluté až červené (α -karoten a β -karoten), oranžové (β -kryptoxantin), tmavě zelené (lutein) a tomatové (lykopen)^{18,19}. Avšak nejsou zodpovědné jen za barevnost rostlin, ovoce a zeleniny, ale také zbarvují například korýše, hmyz, ryby a

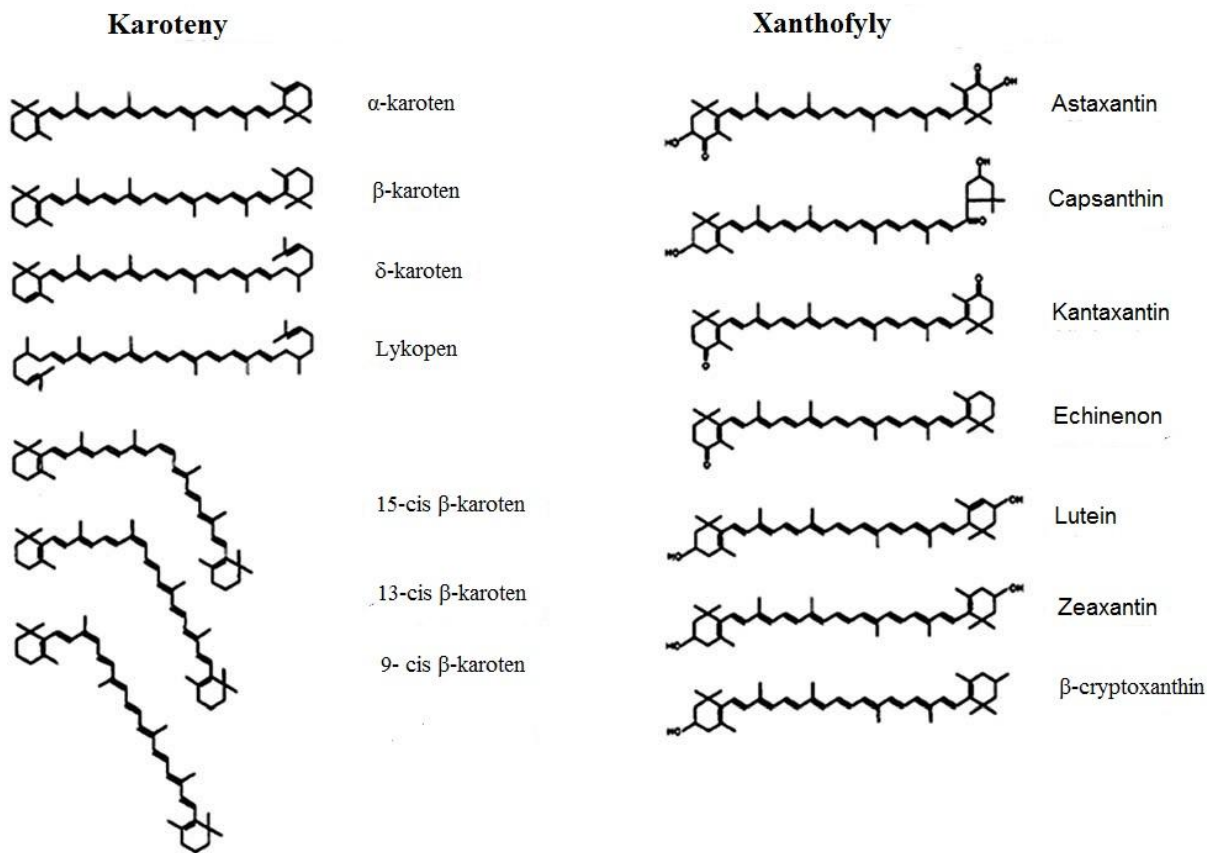
peří ptáků. V současné době je známo okolo 700 karotenoidů, nicméně pouze 40 z nich je přítomno v typické lidské stravě^{20,21}.

Karotenoidy jsou v tucích rozpustné sloučeniny, jejichž základem je acyklický isoprenoidní skelet lykopenu C₄₀, který je klasifikován jako tetraterpen^{18,21}. Odlišnost karotenoidů závisí na základní struktuře, která zahrnuje systém konjugovaných dvojných vazeb. Centrální řetězec může nést cyklické koncové skupiny, které mohou být substituované funkční skupinou obsahující kyslík. Struktura karotenoidů ovlivňuje jejich antioxidační aktivitu. Karotenoidy mají své charakteristické barvy díky schopnosti absorbovat světlo o určité vlnové délce. Dělíme je do dvou skupin a to na karoteny, které obsahují pouze atomy uhlíku a vodíku (α -karoten, β -karoten, δ -karoten, 15-*cis*- β -karoten, 13-*cis*- β -karoten, 9-*cis*- β -karoten, lykopen,...) a xanthofyly, mající ve své struktuře alespoň jeden atom kyslíku (lutein, zeaxantin a β -kryptoxantin, astaxanthin, kapsanthin, kantaxantin, echinenon,...) (Obr. 2). Karotenoidy α -karoten, β -karoten a β -kryptoxantin jsou prekurzory vitamínu A^{19,20,22}.

Karotenoidy mohou syntetizovat pouze bakterie, rostliny, řasy a houby²⁰. Hlavní úlohou karotenoidů v rostlinách je ochrana chlorofylu před jeho oxidací²¹. V rostlinách se vyskytují ve formě *trans*- geometrických izomerů, ale tepelné zpracování může vyvolat izomeraci *trans*-karotenoidů na *cis*-karotenoidy. U karotenoidů obsažených v potravinách může docházet vlivem pH, teploty a slunečního záření ke změnám, které vedou ke změně barvy potraviny, ale hlavně ke změně nutričních hodnot potraviny¹⁸.

Jelikož lidský organismus není schopen karotenoidy syntetizovat, je odkázán na jejich přísun pouze potravou. 90 % karotenoidů v potravě tvoří β -karoten, α -karoten, lykopen, lutein a kryptoxantin¹⁸. Vysoké koncentrace luteinu a zeaxantinu jsou obsažené i ve vaječném žloutku²². Antioxidační aktivita karotenoidů je v důsledku reaktivity se singletním kyslíkem a volnými kyslíkovými radikály schopna potlačit oxidativní stres u lidí, který je vyvolán právě reaktivními kyslíkovými radikály (ROS)¹⁸. Karotenoidy jsou zodpovědné za prospěšné vlastnosti ovoce a zeleniny v prevenci proti nemocem, jako jsou kardiovaskulární onemocnění (β -karoten, lykopen), různé druhy rakoviny (β -karoten, lykopen), poruchy vidění (lutein, zeaxantin) a ostatní chronická onemocnění^{19,20,21,23}.

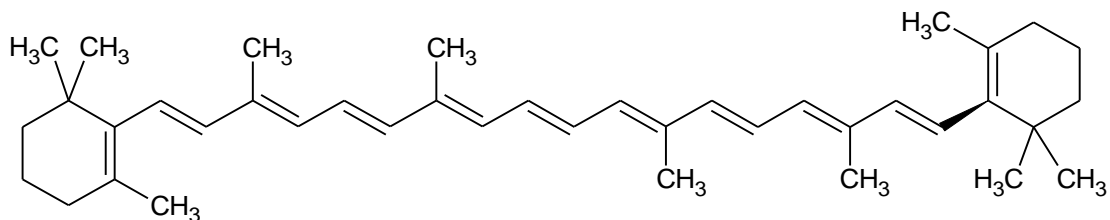
Karotenoidy



Obr. 2 Strukturní vzorce karotenoidů

2.2.1.1 β-karoten

β-karoten je rostlinný pigment a je jedním z nejvýznamnějších karotenoidů. Je významným antioxidantem a od ostatních karotenoidů se liší funkčně i strukturálně. Chemický vzorec β-karotenu je $C_{40}H_{56}$ se systematickým názvem β,β-karoten^{24,25} (Obr. 3).



Obr. 3 Strukturní vzorec β-karotenu

Molekulová hmotnost β -karotenu je 536,88 g/mol. Je to oranžově-červená látka, vyskytující se ve formě krystalů nebo ve formě krystalického prášku. Teplota tání tohoto karotenoidu je 178 – 179 °C a skladuje se při teplotě 4 °C. Rozpouští se v hexanu, benzenu, chloroformu, cyklohexanu, etheru a olejích. Naopak špatně rozpustný je ve vodě. Patří mezi nejznámější a technologicky nejdůležitější barvivo^{29,25,26}.

β -karoten se nachází v mnoha druzích ovoce (meruňky, mango, grapefruit, švestky...) a zeleniny (mrkev, špenát, brokolice, paprika, cibule...). V listových zeleninách je β -karotenu 10-20 % a vysoký obsah tohoto karotenoidu se nachází i v palmovém oleji, a to až 0,2 %²⁹. Avšak lépe využitelný je β -karoten z tepelně zpracovaného špenátu nebo mrkve, než ze syrové zeleniny^{6,27}.

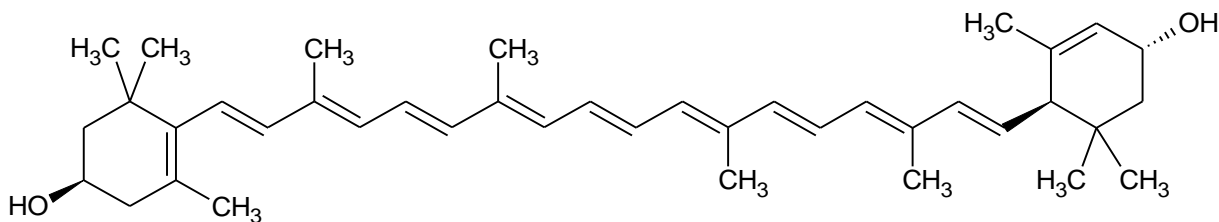
V biologických systémech převládá isomer *all-trans*- β -karoten, nicméně *cis*- isomery byly také nalezeny v živých organismech a ve vzorcích potravin. *All-trans*- β -karoten je prekurzorem pro vitamín A a je nejvýznamnějším provitaminem A. A to především díky jeho symetrické struktuře. Mezi přirozeně se vyskytujícím a syntetickým β -karotenem není žádný rozdíl^{29,24}.

β -karoten zabraňuje fotooxidativnímu poškození rostlin tím, že inhibuje tvorbu singletního kyslíku. Tento singletní kyslík hasí a vycytává reaktivní formy kyslíku. Tímto se β -karoten rozkládá a nelze ho regenerovat²⁴.

Lidské tělo získává β -karoten z potravin (ovoce, zelenina, doplňky stravy,...) a mění jej na vitamín A (retinol). Je hlavním karotenoidem chránícím lidskou kůži před intenzivním slunečním zářením a UV zářením, a také chrání před některými druhy rakoviny. Doporučená denní dávka je 1 – 6 mg²⁹. V nedávné době bylo zjištěno, že příliš velký přísun β -karotenu může na lidský organismus působit i negativně. Některé výzkumy tvrdí, že nadbytek β -karotenu může vést ke zvýšení rizika nádorových onemocnění nebo urychlování jejich rozvoje^{27,28}.

2.2.1.2 Lutein

Lutein je rostlinný pigment mající žlutou barvu a řadí se do skupiny karotenoidů, resp. xanthofylů. Je velmi důležitým antioxidantem. Jeho chemický vzorec je $C_{40}H_{56}O_2$ se systematickým názvem 3,3'-dihydroxy- α -karoten²⁹ (Obr. 4).

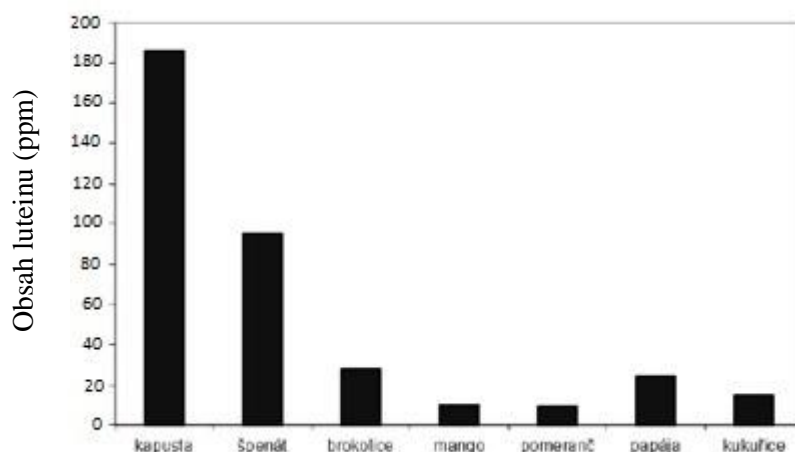


Obr. 4 Strukturní vzorec luteinu

Lutein má molární hmotnost 568,88 g/mol a teplotu tání 190 °C. V čisté formě je to červeno-oranžová krystalická látka, která je ve vodě nerozpustná. Naopak dobře se rozpouští v polárních organických rozpouštědlech a v tucích. Snadno se oxiduje na světle a vzduchu. Řadí se mezi potravinářská barviva s označením E161b^{23,29}.

Lutein je obsažen v několika druzích ovoce a zeleniny. Jeho největší zastoupení je hlavně v listové zelenině a vaječném žloutku. V poslední době je cenným zdrojem této látky i lupina³⁰. V rostlinných materiálech se vyskytuje ve dvou formách, a to jako volný lutein (kapusta, brokolice, špenát,...) nebo jako ester luteinu s mastnými kyselinami (papája, pomeranč, mango, žlutá kukuřice, paprika,...). Koncentrace luteinu závisí na odrůdě, druhu, části plodu, stupni zralosti, ale také na způsobu skladování, konzervace nebo na tepelné úpravě potravin²⁹. Obsah luteinu v čerstvém ovoci a zelenině znázorňuje Obr. 5.

Rostlinné materiály obsahují kromě *all-trans*-isomerů luteinu i *cis*-isomery, které vznikají působením tepla, světla a dalších faktorů v průběhu extrakce a analýzy vzorků. Zajímavostí je, že sladkovodní ryby dokážou lutein přeměnit na anhydrolutein, který se dále štěpí na příslušné aldehydy. Z nich redukcí vznikají *all-trans*-3,4-didehydroretinol, známý jako vitamín A₂ a *all-trans*-3-hydroxyretinol, ze kterého mohou dehydratací vzniknout další molekuly vitamínu A₂ (cit.²⁹).



Obr. 5. Obsah luteinu ve vybraném čerstvém ovoci a zelenině²⁹

Chemická syntéza luteinu je obtížná a časově náročná. Může vzniknout až osm stereoizomerů luteinu, protože jeho molekula obsahuje tři centra chiralit. Lidský organismus není schopen lutein syntetizovat, tudíž je jeho příjem zcela závislý na přírodních zdrojích, kterými jsou zelenina, ovoce nebo doplňky stravy. Lutein se v lidském těle nemění ve vitamín A, ale působí jako účinný antioxidant. Je důležitý pro zrak, protože snižuje riziko šedého zákalu a makulární degenerace²⁹. Hromadí se v oční čočce a v tzv. žluté skvrně na sítnici. Jeho specifickou vlastností je schopnost chránit oči před volnými radikály, které neutralizuje. Tyto radikály vznikají vlivem působení ultrafialových paprsků na oční sítnici. Je schopen také zastavit degenerativní změny na žluté skvrně, které bývají příčinou slepoty³⁰.

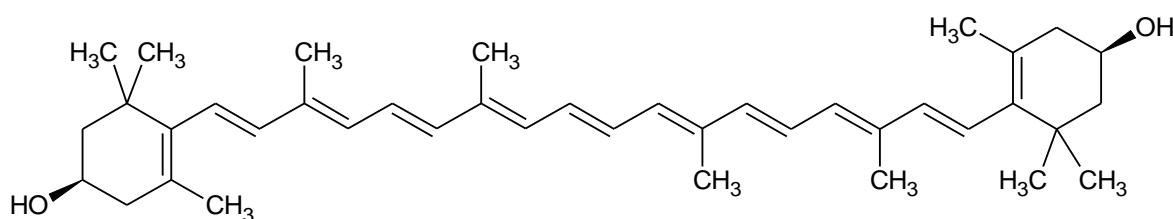
Lutein hraje významnou roli v percepčním jevu, označovaném Haidingerův snop. Tento jev umožňuje člověku spatření a určení roviny polarizovaného světla nebo určení směru rotace kruhově polarizovaného světla²⁹.

Lutein také chrání lidský organismus proti rakovině a nemocem srdce. Přenáší jej jedna z forem tzv. „cholesterolu“, tj. lipoprotein o nízké hustotě. Některé studie ukazují, že dokáže chránit vitamín E před oxidací, a také může přispět k funkčnosti imunitního systému²⁹.

Komise pro potravinářské přídatné látky (JECFA) určila, že denní přijatelný příjem luteinu je až 2 mg/kg tělesné hmotnosti člověka³⁰. Jak již bylo řečeno, lidský organismus lutein získává hlavně z potravin. Nejvíce se ho do organismu dostává z vaječného žloutku a o něco méně z listové zeleniny. Přísun luteinu je možný i z komerčních přípravků, jako jsou doplňky stravy podávané ve formě olejové, práškové nebo enkapsulované²⁹.

2.2.1.3 Zeaxantin

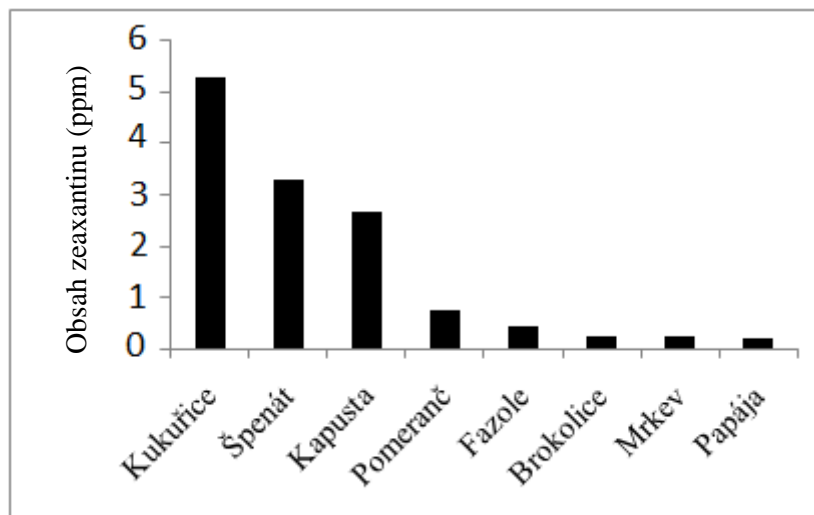
Zeaxantin je rostlinný pigment řadící se do skupiny karotenoidů, resp. xantofylů, které nemají provitamin A aktivitu. Jeho chemický vzorec je $C_{40}H_{56}O_2$ se systematickým názvem 3, 3'-dihydroxy- β -karoten (Obr. 6). Je isomerem luteinu, kdy dva karotenové alkoholy se od sebe liší posunem jedné dvojné vazby tak, že zeaxantin má všechny dvojné vazby konjugované^{31,32}.



Obr. 6 Strukturální vzorec zeaxantinu

Molekulová hmotnost zeaxantinu je 568,88 g/mol. Je to oranžově-červený krystalický prášek, rozpustný v chloroformu, etheru, sirouhlíku, pyridinu, kyselině sírové a ve vroucím metanolu. Naopak nerozpustný je ve vodě, hexanu a petroletheru. Zeaxantin má dvě chirální centra, a tudíž i čtyři stereoizomerní formy. Může se vyskytovat v *cis*- nebo *trans*-konformaci, ale obvyklejší je forma *trans*-, protože ukládá menší počet stérického omezení než *cis*- forma^{31,32}.

Přirozeně se zeaxantin nachází v kukuřici, vaječném žloutku, špenátu, medovici a také v ovoci a zelenině nesoucí žlutou barvu. Je také hlavním karotenoidem v za studena lisovaných ostružinách, malinách, borůvkách a rostlinných olejích. V následujícím obrázku jsou uvedeny obsahy zeaxantinu ve vybraném ovoci a zelenině³¹ (Obr. 7).



Obr. 7 Obsah zeaxantinu v zelenině a ovoci³¹

Průmyslová výroba čistého zeaxantinu využívá kvašení bakteriálních buněk z kmene *Flavobacterium multivorum*. Tento kmen může syntetizovat jako jediný karotenoid zeaxantin se zanedbatelným množstvím ostatních karotenoidů v rámci řádných podmínek fermentace. Výrobu zeaxantinu zahrnuje několik reakcí podle výrobního postupu, ve kterém je posledním krokem dvojitá Wittingova kondenzace symetrického dialdehydu, jako centrálního stavebního bloku se dvěma ekvivalenty vhodné fosfoniové soli^{31,32}.

Jelikož je zeaxantin velmi fotocitlivý, uchovává se ve tmě pod argonem po dobu jednoho měsíce při teplotě -40 °C. Pokud jej uchováváme déle, je nutné udržovat teplotu v rozmezí -3 až 5 °C³¹.

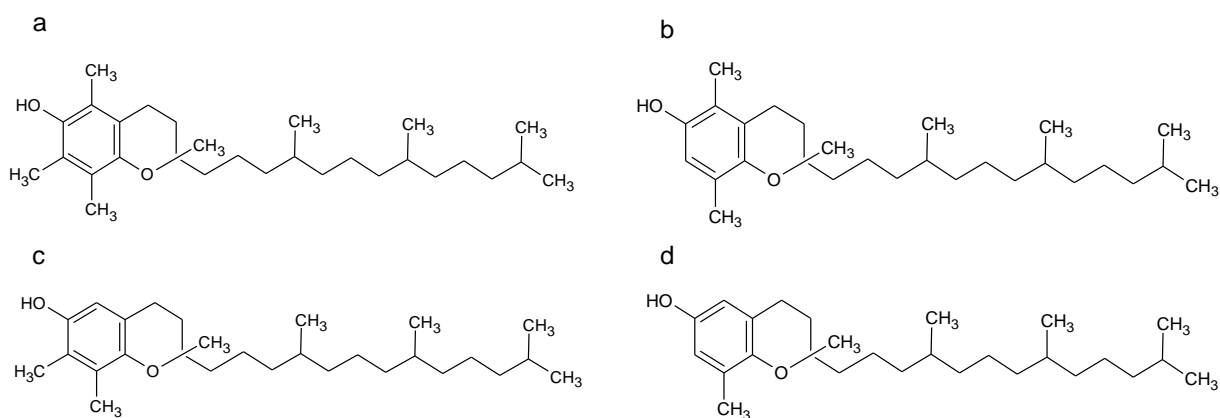
Zeaxantin poskytuje ochranu rostlinám proti fotooxidaci, kdy chrání membránu přímo proti peroxidaci lipidů reaktivními radikály, které byly vytvořeny jako toxické vedlejší produkty při fotosyntetických reakcí³¹.

Lidský organismus získává zeaxantin potravou, jednak z přírodních zdrojů nebo může být přidáván do potravin. Zeaxantin se v lidském těle nachází v makule sítnice a společně s luteinem má důležitou roli v prevenci věkem podmíněné makulární degenerace. Zatímco lutein je distribuován po celé sítnici, zeaxantin je soustředěn hlavně v makule. Také stejně jako lutein chrání proti rakovině. Komise pro potravinářské přídatné látky (JECFA) určila, že denní přijatelný příjem zeaxantinu je až 2 mg/kg tělesné hmotnosti člověka³¹.

Zeaxantin se v potravinářském průmyslu používá jako barvivo a nutriční doplněk v široké škále potravin (nápoje, cereálie, žvýkačky, vaječné výrobky, tuky, oleje, cukroví, kojenecké potraviny, mléčné výrobky, polévky,...). Zeaxantin se používá jako doplněk stravy pro ryby, prasata, ptáky. Přidává se do krmiva slepic, aby bylo dosaženo sytého žlutého zbarvení vaječného žloutku. Má také využití v kosmetické oblasti, kdy se přidává do přípravků na opalování^{31,32}.

2.2.2 Vitamín E

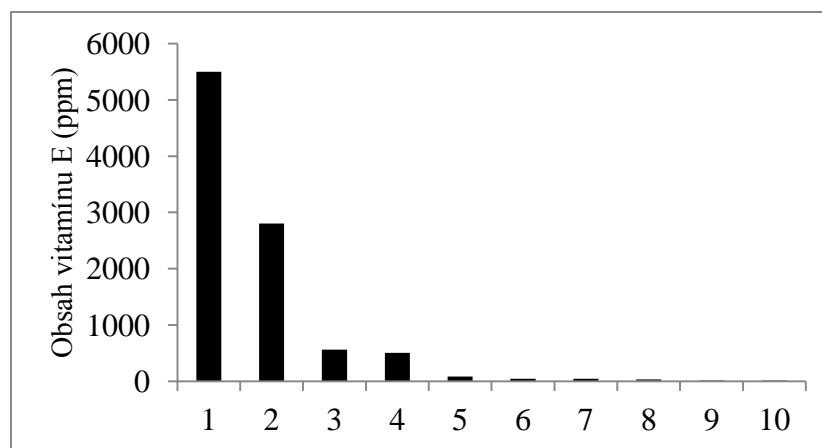
Strukturálním základem vitamínu E jsou tokotrienol (2-methyl-2-(4,8,12-trimethyltrideka-3,7,11-trien-1-ylchroman-6-ol) a tokol (2-methyl-2-(4,8,12-trimethyltridecylchroman-6-ol), které obsahují chromanový kruh buď s nenasyceným (tokotrienoly) nebo s nasyceným (tokoferoly) isoprenoidním postraním řetězcem. Tokotrienoly a tokoferoly se od sebe liší počtem a polohou methylových skupin v chromanovém kruhu. Dále se také liší svou biologickou účinností. Existují čtyři isomery tokotrienolů a čtyři isomery tokoferolů. Největší význam mají α -, β -, γ -, δ -tokoferoly^{33,34,35} (Obr. 8).



Obr. 8 Struktury tokoferolů (a) α -tokoferol, b) β -tokoferol, c) γ -tokoferol, d) δ -tokoferol)

Vitamín E je slabě nažloutlý nebo bezbarvý viskózní olej. Je velmi dobře rozpustný v tucích. V kyselém prostředí je stálý i při 100 °C, naopak v zásaditém prostředí se při vyšších teplotách rozkládá^{33,36}.

V přírodě se nacházejí jen (+)-tokoferoly a synteticky vyrobené jsou vždy racemické (\pm). Vitamín E je obsažen hlavně v potravinách rostlinného původu a v menší míře v živočišných tucích. Následující obrázek prezentuje průměrný obsah vitamínu E v některých potravinách^{33,35,36} (Obr. 9).



Obr. 9 Průměrný obsah vitamínu E ve vybraných potravinách³⁶

1 – olej z obilných klíčků, 2 – sojový olej, 3 – řepkový olej, 4 – hlávkový salát, 5 – olivový olej, 6 – hovězí maso, 7 – vejce, 8 – máslo, 9 – ryby, 10 – mléko

Pro lidský organismus je nejvýznamnější a nejdůležitější α -tokoferol. Denní potřeba vitamínu E pro člověka je dostatečně pokryta příjmem pestré stravy. Je významným antioxidantem. Lipidy buněčných membrán chrání před volnými radikály a s velkou pravděpodobností se na struktuře membrán podílí. Jeho největší množství se nachází v membránách buněk, které jsou vystaveny kyslíku (v membránách červených krvinek, plasmě a v dýchacím systému). Preventivně působí proti vzniku rakoviny a kardiovaskulárních chorob. Vhodnou formou vitamínu E přidávanou domácím a hospodářským zvířatům do krmiv je zejména acetát α -tokoferolu^{33,34,35}.

2.3 Metody izolace lipofilních látek

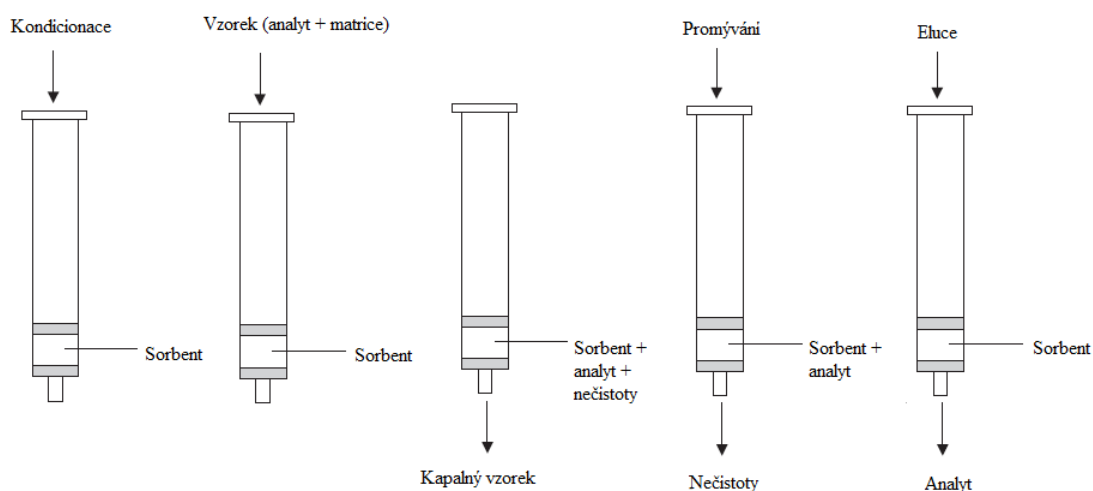
2.3.1 Extrakce kapalina – kapalina

U této extrakce se uplatňuje rozdělovací rovnováha. Jedna z fází je organická (rozpouštědlo nemísitelné s vodou) a druhá je vodná. Do organické fáze přecházejí pouze elektroneutrální složky. Povaha sil, jež způsobuje distribuci složky (skutečnost, že se složka v jedné fázi rozpustí více než ve fázi druhé), je různá, závisící na typu distribuující složky. Uplatňují se disperzní síly (tvorba vodíkových vazeb, vzájemné působení dipólů,...). Při rovnosti chemických potenciálů složky v organické i vodné fázi dosáhne tato soustava rovnováhy. Z této podmínky se odvozuje tzv. Nernstův rozdělovací zákon, který říká³⁷: „*Při konstantní teplotě je poměr aktivit složky v obou fázích konstantní za předpokladu, že rozdělovací se složka je přítomna v obou fázích v téže formě.*“ poměr aktivit se nazývá *rozdělovací konstanta* K_D . V obou fázích v téže formě je rozdělovací složka přítomna jen tehdy, když se v roztoku nezúčastní žádné interakce s molekulami rozpouštědla nebo s jinými složkami v roztoku³⁷.

Praktické aplikace extrakce kapalina-kapalina karotenoidů a tokoferolů z různých matric jsou dále uvedeny v kapitolách literární rešerše 2.4.1.2.1 a 2.4.1.2.2.

2.3.2 Extrakce tuhou fází (SPE)

Extrakce tuhou fází je v současné době velmi rozšířená metoda rychlé a selektivní přípravy vzorku umožňující jeho čištění, odsolování, prekoncentraci, frakcionaci a derivatizaci. Princip SPE je podobný jako u extrakce kapalina-kapalina, avšak namísto dvou nemísitelných kapalných fází SPE zahrnuje rozdělení mezi kapalnou (vzorek matrice nebo rozpouštědla s analyty) a pevnou fází (sorbentem). Extrakce je dosaženo prostřednictvím interakce tří složek: sorbentu, analytu a rozpouštědla, z nichž analyt musí být přitahován sorbentem silněji než matrice. Obecný postup pro SPE spočívá v kondicionaci sorbentu, nanesení vzorku, odstranění nežádoucích složek a v následné eluci prekoncentrovaných analytů elučním rozpouštědlem do zkumavky (Obr. 10). Úprava vzorku touto technikou umožňuje koncentrovat a čistit analyty z roztoků sorpcí na pevný sorbent a čištění extraktu³⁸.



Obr. 10 SPE extrakční postup³⁸

Při použití extrakce tuhou fází se musí dbát na vhodný výběr extrakčního SPE sorbentu. Výběr závisí na mechanismu interakce mezi sorbentem a analytem, a také na hydrofobních, polárních a ionogenních vlastnostech rozpuštěné látky a sorbentu. Retenční mechanismy SPE jsou založeny na vodíkových vazbách, van der Waalových silách (nepolární interakce), dipól-dipólových silách (polární interakce) a kation-aniontových interakcích (iontové interakce). V následující tabulce jsou uvedeny nejčastěji používané separační módy³⁸ (Tab I).

Tab. I Sorbenty a separační mechanismy pro SPE³⁸

Fáze	Sorbent	Typ analytu	Kondicionace SPE sorbentu	Eluční rozpouštědlo
Reverzní	Oktadecyl (C ₁₈) Oktyl (C ₈) Ethyl (C ₂) Cyklohexyl Fenyl	Nepolární	Metanol/voda Acetonitril/voda	Hexan Chloroform
Normální (vázané)	Kyano (CN) Amino (NH ₂) Diol (COHCOH)	Mírně až silně polární	Hexan Chloroform	Metanol
Normální (adsorpční)	Křemelina Silikagel Florisil Al ₂ O ₃	Mírně až silně polární	Hexan Chloroform	Metanol (v závislosti na typu analytu)
Iontoměničová	Amín Kvartérní amín	Anex - Iontová kyselina	Voda, pufr (pH=pKa +2)	Pufr (pH=pKa +2), rozpouštědlo s vysokou iontovou silou
	Karboxylová kys. Sulfonová kys.	Katex - Iontová báze	Voda, pufr (pH=pKa -2)	Pufr (pH=pKa -2), rozpouštědlo s vysokou iontovou silou

Extrakce tuhou fází je alternativou k extrakci kapalina – kapalina. Je to metoda jednoduchá, snadno automatizovatelná a minimálně finančně náročná. SPE technika má v porovnání s tradičnějšími technikami mnoho výhod: vysoká výtěžnost analytu, zakoncentrování analytu, vysoce čisté extrakty, schopnost současně extrahovat analyty v širokém rozsahu polarit, snadná automatizace a kompatibilita s instrumentálními technikami³⁸.

SPE patří mezi nejvhodnější a nejčastěji používané metody pro extrakci lipofilních antioxidantů. Touto extrakcí je možné zpracovat jakoukoli matici, ať už mléko, lidské sérum

nebo právě olejové matrice. V následujícím textu je uveden literární přehled SPE extrakcí karotenoidů a tokoferolů z různých matric.

Shen a kolektiv porovnávali vhodnost použití SPE kolonek naplněných různými sorbenty (CLEAN-UP-C₃₀, Prep Sep C₁₈, Envi-C₁₈ CLEAN-UP-Diol a ProElut™Silica) pro prekoncentraci luteinu a β-karotenu z lidského séra a mateřského mléka³⁹. Kolonky byly kondicionovány 3 ml acetonu a 3 ml směšného rozpouštědla (isopropylalkohol : ethylacetát : voda; 1:1:1(v/v/v)). Po nanesení vzorku byly kolonky propláchnuty 5 ml směšného rozpouštědla a karotenoidy byly eluovány 1 ml acetonu, obsah β-karotenu a luteinu byl stanoven pomocí HPLC-DAD. Z uvedených výsledků vyplývá, že pro současnou prekoncentraci karotenoidů jsou vhodné kolonky naplněné C₃₀ a C₁₈ sorbentem a lutein vykazuje dobrou retenci i na diolové a silikagelové kolonce. Výtěžnost luteinu byla v rozmezí 91,3 – 96,8 % v lidském séru a 92,1 – 93,8 % v mateřském mléce, výtěžnost β-karotenu byla v rozmezí 92,9 – 98,1 % v lidském séru a 90,7 – 95,7 % v mateřském mléce na C₁₈ a C₃₀ sorbentech.

Irakli a kolektiv testovali vhodnost tří SPE kolonek (Oasis HLB, Absolut Nexus a Lichrolut C₁₈) a tří elučních činidel (dichlormethan, etanol, hexan) pro extrakci tokoferolů, tokotrienolů a karotenoidů⁴⁰. Jako nejhodnější prekoncentrační systém byla vybrána Oasis HLB kolonka a eluce dichlormethanem, kolonka Nexus poskytovala nižší výtěžky extrakce a kolonka Lichrolut C₁₈ se ukázala jako méně vhodná pro izolaci karotenoidů, přičemž pro tokoferoly a tokotrienoly poskytovala vysoké výtěžky.

Pro prekoncentraci karotenoidů a chlorofylů ze slunečnicového oleje Mateos a kolektiv využili SPE extrakci s kolonkou naplněnou diol-vázaným sorbentem⁴¹. Kolonka byla kondicionována 6 ml metanolu a 6 ml hexanu, po nanesení vzorku byla kolonka propláchnuta hexanem, ve kterém byl zadržen β-karoten, a následně byly analyty eluovány 3 ml acetonu. Aplikovaná metoda byla porovnáována s klasickou kapalina-kapalina extrakcí a s SPE extrakcí s kolonkou naplněnou C₁₈ sorbentem. Při použití extrakce kapalina-kapalina byl výtěžek pigmentů 96,4 %, zatímco u C₁₈-SPE byl výtěžek jen 51,3 % obsahu pigmentů vzhledem k provedené diol-SPE extrakci.

Ke stanovení luteinu a zeaxantinu v hovězí sítnici Dachtler a kolektiv použili on-line spojení SPE extrakce s HPLC s UV-VIS detekcí⁴². Předem připravený extrakt luteinu a zeaxantinu v hexanu byl nanesen na PLRP-S kolonku, která byla součástí dávkovacího systému HPLC, po nanesení vzorku byla kolonka propláchnuta 500 μ l vody a karotenoidy byly následně eluovány mobilní fází složenou z acetonu a vody (85:15 (v/v)).

2.4 Metody stanovení lipofilních látek

2.4.1 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie byla objevena ruským botanikem M. S. Cvětem již v roce 1903. Tato metodika se vyvíjela řadu let, až dospěla do podoby dnešní, metody často používané ve vědě a výzkumu s názvem vysokoúčinná kapalinová chromatografie neboli HPLC (High performance liquid chromatography)⁴³.

Kapalinová chromatografie je založena na dělení látek mezi dvě a více fází, kdy dochází k opakovanému vytváření rovnovážných stavů. Mobilní fází je kapalina nesoucí přes stacionární fázi separované látky. Stacionární fáze může být umístěna v koloně nebo v ploché vrstvě. Mezi plošně uspořádané metody patří papírová a tenkovrstvá chromatografie. U sloupcové a vysokoúčinné kapalinové chromatografie je sorbentem naplněna kolona⁴⁴.

Pomocí kapalinové chromatografie lze analyzovat až 80 % převážně organických sloučenin. Umožňuje analyzovat látky jak s nízkou molekulovou hmotností, tak i látky mající molekulovou hmotnost několik set tisíc^{44,45}.

2.4.1.1 Tenkovrstvá kapalinová chromatografie (TLC)

Principem tenkovrstvé chromatografie je vzlínání mobilní fáze vrstvou stacionární fáze, kdy dochází k separaci látek. TLC vyvíjení může být prováděno ve vzestupném nebo v kruhovém (radiálním) uspořádání^{44,46}.

U TLC je stacionární fáze umístěná v ploše ve vrstvách různé tloušťky na tuhé podložce, kterou může být hliníková fólie nebo skleněná deska. Nejčastěji používanými stacionárními fázemi jsou: oxid hlinitý, křemelina, práškový polyamid, celit, škrob, silikagel a další. Mobilní fází volíme podle typu stacionární fáze, nejčastěji používané jsou: cyklohexan, toluen, dichlormetan, chloroform, etanol, kyselina octová, metanol, amoniak, aceton a jejich směsi^{44,46}.

Tenkovrstvá kapalinová chromatografie je výhodnou metodou pro velkosériové kvantitativní nebo orientační analýzy. Má velké využití při organických syntézách. Dále se používá k čištění a identifikaci látek, k analýze nečistot v surovinách, výrobcích a v jiných materiálech⁴⁴.

Detekce u TLC

Detekce (vizualizace) rozdělených látek na chromatogramu se provádí následujícími způsoby⁴⁴:

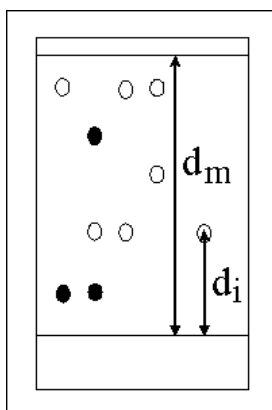
Fyzikální detekce - využívá záření (infračervené, ultrafialové a viditelné).

Chemická detekce – využívá vhodná detekční činidla, která po nanesení na chromatogram vyvolají barevnou reakci se separovanými látkami. U TLC se používají jednak univerzální detekční činidla s agresivními vlastnostmi (kyselina sírová, dusičná, roztok manganistanu draselného aj.), ale i selektivní činidla, které detekují jen určitou skupinu látek (Ehrlichovo činidlo, acidobazické indikátory aj.).

Vyhodnocování kvality u TLC

Látky v tenkovrstvé chromatografii se vyhodnocují pomocí hodnot retardačního faktoru (R_F) a jejich porovnání se standardy. R_F je definovaný jako poměr vzdálenosti středu skvrny od startu (d_i) ku vzdálenosti čela mobilní fáze od startu (d_m)^{46,47}:

$$R_F = \frac{d_i}{d_m} \quad (1)$$



Obr. 11 Výpočet R_F ⁴⁶

Vyhodnocování kvantity u TLC

Vyhodnocení TLC chromatogramu se provádí přímými metodami (denzitometrie, radiochemická metoda, měření plochy skvrny). Také jedním z postupů vyhodnocení kvantity je vyškrábnutí skvrny ze stacionární fáze, následná extrakce vhodným rozpouštědlem a stanovení koncentrace analytu v extraktu vhodnou metodou⁴⁷.

V následující tabulce (Tab. II) jsou shrnuty nejčastěji používané podmínky pro TLC separace vybraných karotenoidů a tokoferolů s příslušnými odkazy na literaturu.

Tab. II TLC vybraných karotenoidů a tokoferolů

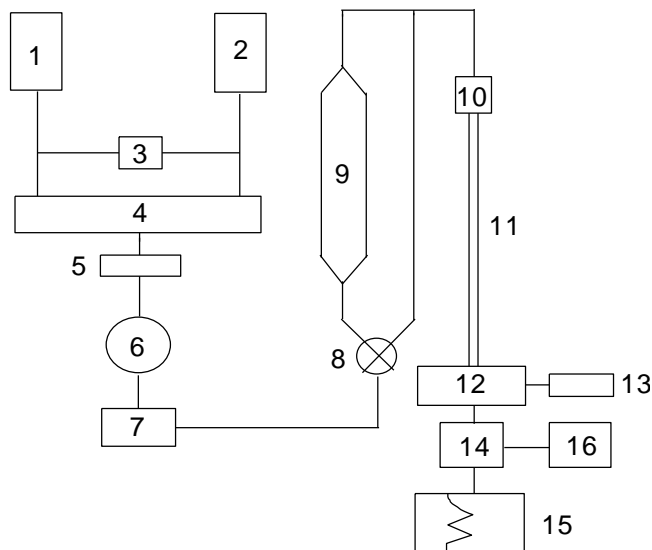
Sorbent	Analyt	Mobilní fáze	Ref.
Silikagel GF ₂₅₄	β -karoten, lutein, violaxantin, neoxantin	petrol-ether : aceton : diethylamin; 10:4:1 (v/v/v)	48,49
Silikagel G60	β -karoten, lutein, violaxantin, neoxantin	hexan : ethylacetát : aceton : metanol; 27:4:2:2 (v/v/v/v)	50
Silikagel 60F ₂₅₄	α -tokoferol	cyklohexan : diethylether; 4:1 (v/v)	51,52
Silikagel	α -tokoferol, ergokalciferol	oktan-diethylether; 7:1 (v/v) tetrachlormethan : diethylether; 4:1 (v/v)	53
Silikagel	α -tokoferol	trichlormethan	54
Silikagel F ₂₅₄	β -karoten, lykopen	benzen : petrolether; 10:90 (v/v)	55
Silikagel F ₂₅₄	β -karoten, lykopen, lutein, retinol, astaxantin, zeaxantin, α -, γ -, δ -tokoferol	metanol : benzen : ethylacetát; 5:75:20 (v/v/v)	55
Silikagel F ₂₅₄	β -karoten, lykopen, α -, γ -, δ -tokoferol	benzen : petrolether; 90:10 (v/v)	55
Silikagel	β -karoten, kryptoxantin, zeaxantin, violaxantin, kapsantin, kapsorubin, neoxantin	aceton : petrol-ether; 1:1 (v/v)	56
Silikagel	β -karoten, lutein	petrolether : diethylether : kys. octová; 80:20:1 (v/v/v)	57

2.4.1.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se běžně používá pro přesnou kvantitativní analýzu a pro výzkumné účely. Výhodou této metody je její automatizovatelnost i s vyhodnocením výsledků⁴⁴.

HPLC systém pracuje tak, že vysokotlaké čerpadlo čerpá mobilní fázi ze zásobníku. U složitějších směsí je možné mobilní fázi čerpat ze dvou nebo více zásobníků, proto je mobilní fáze vedena přes směšovač, ve kterém dochází podle nastaveného programu k jejímu smíchání. Směšovač je zařazen buď před, nebo za vysokotlaké čerpadlo. Tlumič tlakových rázů je do toku mobilní fáze zařazen v závislosti na použitém čerpadle. Poté je mobilní fáze vedena přes dávkovací zařízení do kolony. Kolona je propojena s detektorem, jehož signál je

veden přes zesilovač do počítače. Blokové schéma kapalinového chromatografu je znázorněno na Obr. 12. Součástí kapalinového chromatografu mohou být i doplňková zařízení, jako jsou ochranné filtry, ventily, předklonky a odplyňovač mobilní fáze. Často se k detekci využívá zapojení dvou i více detektorů za sebou⁴⁴.



Obr. 12 Schéma kapalinového chromatografu⁴⁴

1, 2 – zásobníky mobilní fáze, 3 – programování gradientu, 4 – směšovač, 5 – odplyňovač, 6 – vysokotlaké čerpadlo, 7 – tlumič tlakových pulzů, 8 – dávkovací zařízení, 9 – kolona, 10 – detektor, 11 – jímač frakcí, 12 – zesilovač, 13 – zapisovač, 14 – počítač

Mobilní fáze

Při nastavování parametrů separace je nejdůležitějším rozhodnutím výběr mobilní fáze. Složení mobilní fáze se může během analýzy měnit, pak mluvíme o gradientové eluci. Nebo její složení může v průběhu analýzy být neměnné, potom se jedná o izokratickou eluci. Složení mobilní fáze se volí podle toho, zda se pracuje v systému normálních nebo reverzních fází⁴³.

Normální fáze

Stacionární fázi tvoří polární sorbent (oxid hlinitý, silikagel) a mobilní fáze je složena z nepolárního rozpouštědla, do kterého je přidána polární složka. V tomto systému dochází k sorpci polárních látek a nepolární mobilní fáze tuto sorpci podporuje. O aktivní místa na

povrchu sorbentu soutěží analyt s mobilní fází a retence látek je dána výsledkem jejich rozdílné polarit⁴⁴.

Reverzní fáze

V reverzních fázích se používá nepolární stacionární fáze, kterou je např. chemicky vázaná nepolární fáze (C₈H₁₇, C₁₈H₃₇) na silikagelu jako nosiči nebo méně často na uhlíku či organickém polymeru. Mobilní fáze se sestává ze směsi vody a organického rozpouštědla. Čím je délka nepolární části molekuly větší, tím se zvyšuje retence látek. Avšak mechanismus retence látek v tomto systému není ještě jednoznačně vyřešen, je zde předpoklad o uplatnění solvofobního efektu⁴⁴.

Detektory

Detektory slouží k detekci látek vycházejících z chromatografické kolony. Detektor je vybaven snímačem, který sleduje danou vlastnost eluátu a poskytuje signál, který se následně převádí do počítače. Počítač ukáže záznam separace v závislosti intenzity signálu na čas⁴⁴.

Ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii se používají hmotnostní nebo koncentrační detektory. Koncentrační detektory mohou být univerzální (nespecifické) nebo selektivní a poskytují signál úměrný koncentraci látky v analytu. Mezi nejčastěji používané detektory pro stanovení lipofilních antioxidantů patří⁴⁴:

1. Spektrofotometrické detektory

Selektivní detektory schopny detekovat látky, které jsou schopné absorbovat záření o určité vlnové délce použité k detekci. Spektrofotometrické detektory se dělí na dva typy, podle počtu nastavených vlnových délek použitých k měření: detektor diodového pole a spektrofotometrický detektor s monochromátorem⁴⁴.

2. Fluorometrický detektor

Velmi citlivý a selektivní detektor, schopný detekovat pouze látky vykazující fluorescenci. Detekovaná látka absorbuje ultrafialové excitační záření v cele detektoru. Část pohlcené energie se vyzáří ve formě fluorescenčního záření, které má nižší energii než záření excitační. Následně dopadne emitované záření na fotoelektrický násobič, který poskytne proud úměrný koncentraci látky a toku emitovaného záření v cele detektoru. Pro dobrou

funkci detektoru je nutné oddělit emitované záření od budícího. Z toho důvodu je fotoelektrický násobič umístěn kolmo na směr průchodu budícího záření celou a také se to systému řadí vhodné filtry⁴⁴.

3. Elektrochemický detektor

Elektrochemické detektory detekují látky schopné elektrochemické reakce, které probíhají na fázovém rozhraní roztok (mobilní fáze) – elektroda. Elektrochemické detektory měří danou elektrickou veličinu (kapacita, proud, elektrodový potenciál), která je vyvolána při průchodu analytu průtokovou celou detektoru. V cele jsou uloženy elektrody, na něž je vkládáno pracovní napětí nezbytné k průběhu elektrochemické reakce v tříelektrodovém nebo dvouelektrodovém systému zapojení⁵⁸.

Amperometrický detektor

Amperometrický detektor měří proud vyvolaný průchodem oxidované nebo redukované látky průtokovou celou detektoru. Jako měrné elektrody se používají tuhé elektrody vyrobené z grafitových vláken, uhlíku, platiny, zlata, aj. Amperometrické cely se podle umístění pracovní elektrody a konstrukce dělí na: tubulární, wall – jet a tenkovrstvou celu. Jako srovnávací elektroda se většinou používá kalomelová nebo argentochloridová elektroda⁵⁸.

Coulometrický detektor

Coulometrický detektor měří náboj, který je potřebný k redukci či oxidaci celkového množství látky při průtoku měrnou celou detektoru. Citlivost detekce tohoto detektoru je vyšší než u amperometrických detektorů. Při použití tzv. elektrody fritového typu (porézní grafitová pracovní elektroda, kterou protéká mobilní fáze), je možné zvýšit účinnost elektrochemické reakce. Tato coulometrická elektroda má výhodu ve vysoké účinnosti, selektivitě a stabilitě (snižuje poměr signálu k šumu). Má daleko větší povrch než klasické elektrody a oxidačně redukčním reakcím na povrchu elektrody podléhá přes 90 % přítomného analytu⁵⁸.

Výhodou coulometrické elektrody je možnost zapojení dvou a více elektrod za sebou, na nichž je vloženo rozdílné napětí. Tímto dochází i ke zvýšení selektivity. Jelikož je analyt na coulometrické elektrodě 100 % elektrolyzován, efluent neobsahuje žádnou elektroaktivní komponentu, která může podléhat elektrochemické reakci při vloženém napětí. Zapojením až

šestnácti coulometrických elektrod můžeme získat detektor, který je obdobou detektoru diodového pole tzv. CoulArray. Z mobilní fáze se nečistoty odstraňují použitím porézní grafitové elektrody, na kterou je vloženo dané napětí, tzv. guard cela. Odstraňuje elektroaktivní nečistoty z mobilní fáze před vstupem do injektoru, kolony a cely⁵⁸.

2.4.1.2.1 Metody stanovení lipofilních antioxidantů metodou HPLC s UV-VIS a fluorescenční detekcí

Pro simultánní a selektivní stanovení karotenů (β -karoten), tokoferolů (α -, β -, γ -, δ -tokoferol) a retinolu (*cis*-retin-13-ol, *trans*-retinol) v italských sýrech Panfili a kolektiv použili metodu HPLC s následnou UV-VIS a fluorescenční detekcí⁵⁹. Příprava vzorků spočívala v homogenizaci, alkalickém zmýdelnění s přidavkem antioxidantu a následné extrakci směsí hexan : diethylether (9:1). Vzniklý extrakt byl odpařen do sucha a rekonstituován ve 2 ml mobilní fáze. Analyty byly děleny v systému normálních fází s gradientovou elucí, mobilní fáze A: 0,1 % propan-2-ol v hexanu, mobilní fáze B: hexan. Karotenoidy byly detekovány UV-VIS detektorem při 450 nm, tokoferoly a retinol fluorescenčním detektorem s nastavenými vlnovými délkami při měření 280 a 325 nm (excitační), 335 a 475 nm (emisní).

Lietz a kolektiv publikovali v roce 1997 stanovení karotenoidů v červeném palmovém oleji po předchozí enzymatické hydrolýze s využitím *Candida cylindracea* lipázy²⁸. Následně byla reakční směs extrahována třikrát 20 ml směsí diethylether : petrolether (2:1, v/v) s obsahem 0,1 % butylovaného hydroxytoluenu. Směsný extrakt byl promyt 50 ml 10 % roztoku NaCl, sušen přidavkem bezvodého síranu sodného a nakonec bylo organické rozpouštědlo odpařeno pomocí rotační odparky. Odparek byl rozpuštěn v 5 ml acetonu, přefiltrován a 10 μ l vzorku bylo přímo dávkováno do HPLC. Antioxidanty byly separovány podle metody publikované Hartem a Scottem⁶⁰ a rozseparované karotenoidy (α -karoten, *cis*- α -karoten, β -karoten, *cis*- β -karoten) byly detekovány UV-VIS detektorem při 450 nm a tokoferoly (α -, γ -, δ -tokoferol) byly detekovány fluorescenčním detektorem s excitační (298 nm) a emisní (328 nm) zvolenou vlnovou délkou.

Pro analýzu karotenoidů a vitamínu E ve slunečnicovém a řepkovém oleji využili Franke a kolektiv metodu HPLC s UV-VIS a fluorescenční detekcí⁶¹. Vzorky oleje byly spolu s přidavkem interních standardů a MgO dvakrát extrahovány 35 ml směsí metanol : tetrahydrofuran (1:1, v/v) s přidavkem 0,1 % butylhydroxytoluenem. Sloučené

extrakty byly odpařeny v rotační odparce a rekonstituovány v 5 ml směsi *n*-hexan : isopropylalkohol (95:5, v/v) pro analýzu karotenoidů a pro analýzu vitamínu E bylo 500 μ l této směsi odpařeno a rekonstituováno ve 2 ml *n*-hexan : metyl-*terc*-butylether (98:2, v/v). Tokoferoly (α -, β -, γ -, δ -) byly děleny v systému normálních fází (kolona Eurospher 100 DIOL) s izokratickou elucí, mobilní fáze se sestávala z *n*-hexan : metyl-*terc*-butylether (98:2, v/v), lutein a zeaxantin byly také separovány v systému normálních fází (kolona Luna silica) s izokratickou elucí (mobilní fáze *n*-hexan : isopropylalkohol (95:5, v/v)) a nakonec α - a β -karoten byl separován na obrácených fázích (kolona TRENTEC C₃₀) s využitím gradientové eluce (mobilní fáze metanol a metyl-*terc*-butyl-ether). Tokoferoly byly detekovány fluorescenčním detektorem s použitou excitační a emisní vlnovou délkou 292 a 330 nm a karotenoidy pomocí UV-VIS detektoru s diodovým polem.

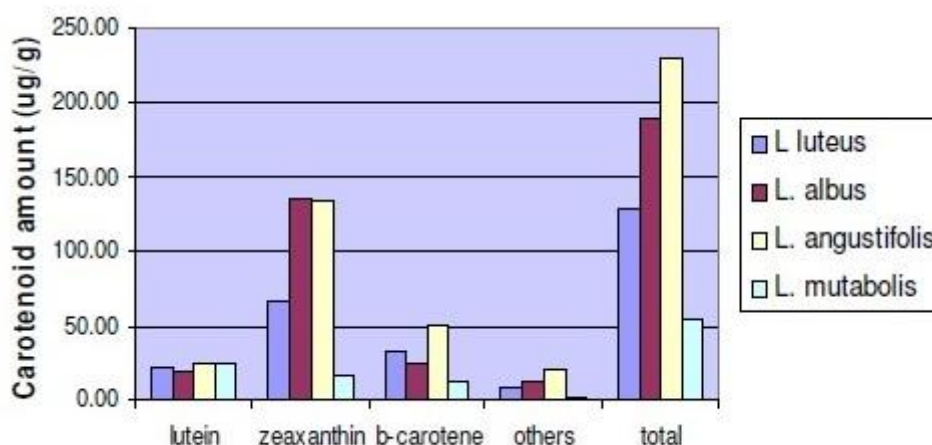
Panfili a kolektiv v roce 2004 publikovali postup pro stanovení karotenoidů (β -karoten, zeaxantin, lutein) v cereáliích založenou na NP-LC s UV-VIS detekcí⁶². Předúprava vzorku spočívala v alkalickém zmýdelnění etanolickým roztokem KOH s přídavkem pyrogalolu jako antioxidantu a následné extrakci karotenoidů extrakční směsí složené z hexanu a ethylacetátu v poměru (9:1). Vzniklý extrakt byl odpařen do sucha a rekonstituován ve 2 ml 10 % isopropylalkoholu v hexanu. Separace probíhala v systému normálních fází (kolona Kromasil Phenomenex Si column) s izokratickou elucí (mobilní fáze isopropylalkohol : hexan (5:95, (v/v))). Karotenoidy byly detekovány UV-VIS detektorem s diodovým polem v intervalu vlnových délek 350 – 500 nm (absorpční maximum při 450 nm).

Pro stanovení isomerů vitamínu E v zrně ječmene použili Benešová a kolektiv metodu UPLC s fluorescenční detekcí³⁵. Vzorky byly před vlastní extrakcí zmýdelněny, extrahovány dietytherem a odpařeny do sucha. Vzniklý odparek byl dále rekonstituován v metanolu a isomery vitamínu E (α -, β -, δ -, γ -) byly separovány pomocí UHPLC na reverzních fázích (kolona ACQUITY BEH C18) s izokratickou elucí směsí metanol : voda (98:2). K detekci byl využit fluorescenční detektor s použitou excitační a emisní vlnovou délkou 290 a 330 nm. Mez detekce isomerů vitamínu E byla stanovena jako rozmezí od 0,02 do 0,06 mg/kg.

Homosková s kolegy v roce 2007 použily metodu HPLC s fluorescenční detekcí pro stanovení isomerů vitamínu E v krmných surovinách, krmivech a potravinách³³. Isomery vitamínu E byly v homogenních mletých vzorcích po alkalickém zmýdelnění extrahovány hexanem, který byl pro separace v reverzním systému odpařen a odparek byl rekonstituován

v metanolu. Systém normálních fází využíval kolony Silica NovaPak a izokratické eluce směsí cyklohexan : tetrahydrofuran (99,6:0,4), reverzní systém aplikoval kolonu NovaPak C18 a mobilní fázi složenou z metanolu a vody v poměru 98:2. Isomery vitamínu E byly detekovány pomocí fluorescenčního detektoru s nastavenými vlnovými délkami při měření 292 nm (excitační) a 330 nm (emisní).

Wang s kolegy studovali zastoupení různých karotenoidů v semenech čtyř druhů lupiny pomocí HPLC s UV-VIS detekcí⁶. Jemně rozemletá semena byla extrahována pomocí směsi složené z dichlormetanu a metanolu (1:1), extrakt byl odpařen a rekonstituován v ethylacetátu, část ethylacetátového extraktu byla použita přímo k analýze a druhá část byla podrobena zmýdelnění a opětovné reextrakci ethylacetátem. K separaci karotenoidů byla využita technika HPLC s gradientovou elucí (kolona YMCTM Carotenoid S-5, mobilní fáze: A-metanol, B- 80 % metanol s obsahem 0,2 % octanu amonného, C- methyl-*terc*-butyl-ether) a následně detekovány v rozsahu 210 – 550 nm pomocí UV-VIS detektoru s diodovým polem. Porovnání obsahu karotenoidů v jednotlivých druzích lupiny je uvedeno na Obr. 13.



Obr. 13 Obsah karotenoidů v semenech lupiny (převzato z cit.⁶)

Pro simultánní stanovení fytosterolů, tokoferolů a luteinu v sojovém bobu použili Slavin a kolektiv metodu RP-LC s UV-VIS a ELSD detekcí⁶³. Po předchozím zmýdelnění byly analyty extrahovány hexanem a vzniklý extrakt byl po přečištění odpařen do sucha, odparek byl rekonstituován v propan-2-olu. Separace látek probíhala na fenylové koloně (XTerra fenyl column) s izokratickou elucí směsí složenou z acetonitrilu, metanolu a vody v poměru (48:22,5:29,5; v/v/v). Pro kvantitativní analýzu β -sitosterolu, stigmasterolu,

campesterolu, α -, β - a γ -tokoferolu byl použit odpařovací detektor rozptylu světla (ELSD) a lutein byl stanoven pomocí UV-VIS detektoru při vlnové délce 450 nm.

Habit s kolegy publikoval v roce 2013 porovnání 18 různých druhů olejů na obsah karotenoidů, vitamínů rozpustných v tucích a mastných kyselin⁶⁴. Pro analýzu karotenoidů byly vzorky olejů (0,5 g) smíchány se směsí 0,5 ml 95 % etanolu, 0,1 ml 0,2 % butylovaného hydroxytoluenu a 4 ml hexanu, takto připravená extrakční směs byla třepána, centrifugována a následně odpařena pod proudem dusíku. Vzniklý odparek byl rozpuštěn v 1 ml chloroformu a dávkován do HPLC. Separace byla prováděna v systému obrácených fází (kolona C18) s izokratickou elucí, mobilní fáze složená z acetonitrilu a chloroformu v poměru 80:20. Rozseparované karotenoidy (lutein, kryptoxantin, echinenon, lykopen, α -, β -, γ -karoten) byly detekovány pomocí UV-VIS detektoru při 450 nm. Isomery vitamínu E byly analyzovány po předchozím zmýdelnění, extrakci petroletherem, odpaření a rekonstituci v 2 ml pomocí RP-LC s UV-VIS detekcí. Separace probíhala v reverzním módu (ACQUITY UPLC BEH C₁₈) s izokratickou elucí (acetonitril s obsahem 0,1 % kyseliny mravenčí) a následná detekce isomerů vitamínu E (α -, γ -tokoferol a acetát α -tokoferolu) využívala dvoukanalového UV-VIS detektoru měřícího při 291 a 265 nm.

Mortensen použil pro stanovení karotenoidů v palmovém oleji metodu HPLC s UV-VIS detekcí⁶⁵. Analyzované vzorky oleje byly smíchány s metyl-*tert*-butyl-etherem (MTBE) a následně separovány pomocí RP-LC (kolona YMC (C30 column)) s lineární gradientovou elucí, mobilní fáze A- směs MTBE : metanol : voda (15:81:4) a mobilní fáze B- směs MTBE : metanol (10:1). Karotenoidy (α -, β -, γ -, ζ - karoten, fytoen, fytofluen, lykopen, β -zeakaroten) byly identifikovány pomocí UV-VIS detektoru při nastavené vlnové délce 456 nm.

Karotenoidy obsažené v mrkvi byly analyzovány pomocí HPLC s UV-VIS detekcí po předchozí superkritické fluidní extrakci modifikované přidavkem canolového oleje⁶⁶. Extrakt byl rozpuštěn ve směsi metanol : dichlormetan (1:1, v/v) a takto vzniklý vzorek byl separován pomocí RP-LC (kolona Supelcosil™ LC-18) s izokratickou elucí využívající mobilní fáze metanolu s 10 % acetonitrilu. Analyty (lutein, α -karoten a β -karoten) byly kvantifikovány při 450 nm.

Aruna se spolupracovníky publikovali metodu pro stanovení luteinu a zeaxantinu ve vybraných vzorcích zeleninových olejů s využitím HPLC s UV-VIS detekcí⁶⁷. Karotenoidy byly ze zmýdelněných vzorků oleje extrahovány směsí diethylether : hexan (50:50, v/v),

sušeny bezvodým síranem sodným a po odpaření rekonstituovány ve směsi diethylether : hexan (1:1, v/v). Lutein v extraktu byl separován TLC (silica gel, MF-heptan : aceton (70:30, v/v)) a zóny obsahující lutein byly oškrábnuty a extrahovány ve směsi aceton : hexan (50:50, v/v) a po odpaření rekonstituovány v 1 ml mobilní fáze složené z acetonitrilu, dichlormetanu a metanolu v poměru 6:2:2 (v/v/v). Karotenoidy byly separovány na koloně SGE C-18 (ODS) s využitím izokratické eluce mobilní fází složenou z acetonitrilu, dichlormetanu a metanolu v poměru 6:2:2 (v/v/v) a detekovány UV-VIS detektorem při 450 nm.

2.4.1.2.2 Metody stanovení lipofilních antioxidantů metodou HPLC s elektrochemickou detekcí

Ferruzzi a kolektiv publikovali metodu HPLC s elektrochemickou detekcí pro selektivní a citlivé stanovení karotenoidů v krevním séru a vzorcích tkání⁶⁸. Karotenoidy byly ze vzorků séra a zmýdelněných vzorků tkání extrahovány hexanem s přidavkem 0,02 % butylovaného hydroxytoluenu. Karotenoidy byly separovány v reverzním systému (kolona YMC (C30 kolona) s gradientovou elucí, mobilní fáze: A- metanol : MTBE : octan amonný (95:3:2), B- metanol : MTBE : octan amonný (25:73:2). Detekce rozseparovaných karotenoidů (α -karoten, β -karoten, lutein, zeaxantin, β -kryptoxantin) byla založena na použití coulometrického detektoru (ESA Model 5600 CoulArray) vybaveného 8 měřícími kanály. Detekce analytů probíhala simultánně při potenciálech od 100 do 520 mV po 60 mV intervalech.

Puspitasari-Nienaber a kolektiv použili v roce 2002 modifikovanou metodu HPLC-ECD publikovanou Ferruzzim a kolektivem pro stanovení karotenoidů, tokoferolů, chlorofylů v zeleninových olejích⁶⁹. Vzorky olejů (10-20 mg) byly před vlastní analýzou pomocí HPLC rozpuštěny v 6 ml směsi MTBE : metanol (1:1) a přefiltrovány. Podmínky HPLC byly modifikovány pro dosažení separace tokoferolů a tokotrienolů, tudíž analyty byly separovány v reverzním módu (kolona YMC (C30 kolona) s gradientovou elucí. Mobilní fáze: A- metanol : MTBE : octan amonný : voda (88:5:5:2), B- metanol : MTBE : octan amonný (20:78:2). Kladné potenciály nastavené pro detekci analytů byly v rozmezí 200 – 620 mV po 60 mV intervalech.

Guaratini a spolupracovníci v roce 2009 prezentovali porovnání HPLC s UV-VIS a HPLC s ECD detektorem pro stanovení karotenoidů obsažených v sinicích⁷⁰. Karotenoidy

byly extrahovány z kultivačního média směsí metanol : aceton (1:1) a následně separovány pomocí HPLC pracující v reverzním systému (Ultracarb C30 kolona) s gradientovou elucí, mobilní fáze: A- metanol : voda : octan amonný (90:8:2), B- metanol : MTBE : octan amonný (30:68:2). Karotenoidy byly detekovány pomocí UV-VIS detektoru s diodovým polem při 445 nm (UV-VIS spektra měřena v rozmezí 200 – 800 nm) a simultánně pomocí coulometrického detektoru s dvěma měrnými celami, potenciál měření +600 mV. Pro získání hydrodynamických voltamogramů byla data snímána v rozmezí potenciálů +100 až +900 mV po 50 mV přírůstcích.

Pro stanovení retinolu, α -tokoferolu a β -karotenu v séru použili MacCrehan a kolektiv metody HPLC s UV-VIS a HPLC s elektrochemickou detekcí⁷¹. Po předchozí denaturaci séra byly analyty extrahovány opakovaně do hexanu, extrakt byl odpařen a rekonstituován v etanolu s příměsí butylhydroxytoluenu. Analyty byly separovány pomocí HPLC pracující v reverzním módu na koloně Vydac C18 s využitím gradientové eluce (MF: A- voda : metanol : *n*-butanol (15:75:10), B- voda : metanol : *n*-butanol (2:88:10) součástí obou směsí byl octan amonný pH 3,5 o koncentraci 0,02 mol/l). Detekce byla založena na použití UV-VIS detektoru s diodovým polem (při 450 a 325 nm) a ampérometrického detektoru (thin-layer) s elektrodou ze skelného uhlíku (aplikovaný potenciál +900 mV).

Buratti a kolektiv využili spojení FIA s amperometrickým detektorem pro stanovení antioxidantů (lykopen, β -karoten, zeaxantin, α -karoten, β -kryptoxantin, lutein, α -tokoferol, kapsaicin, chlorofyl a, chlorofyl b, astaxantin, kantaxantin) v 5 zeleninových a 2 ovocných extraktech⁷². Antioxidanty byly extrahovány tetrahydrofuranem, reextrahovány do petroletheru a extrakt byl odpařen pod proudem dusíku do sucha. Antioxidanty byly dávkovány do proudu směsné kapaliny složené z metyl-*terc*-butyl-etheru, metanolu, dodecylsulfátu sodného a vody v poměru (50:45:1,5:3,5) a následně detekovány amperometrickým detektorem s elektrodou ze skelného uhlíku při +0,5 V (hydrodynamické voltamogramy měřeny v rozmezí 0,2 – 0,8 V (vs Ag/AgCl)).

Pro rychlé a přesné stanovení antioxidantů (koenzym Q₁₀, vitamín A, vitamín E, lutein, zeaxantin, β -kryptoxantin, lykopen, β -karoten) v lidském séru Lee a kolektiv použili metodu HPLC s elektrochemickým detektorem⁷³. Antioxidanty byly z denaturovaného séra extrahovány hexanem, extrakt byl odfoukán dusíkem do sucha a rekonstituován ve směsi složené z etanolu a *terc*-butanolu (4:1, v/v) obsahující 0,02 % butylhydroxytoluen. Analyty byly separovány v reverzním systému (kolony Zorbax SB-C₁₈ a Partisphere-5 C₁₈)

s gradientovou elucí, mobilní fáze: A- acetonitril, B- metanol, C- etanol : *terc*-butanol (8:2, v/v). Antioxidanty byly detekovány pomocí tří detektorů zapojených za sebou, a to UV-VIS, fluorimetrického a amperometrického detektoru s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku (nastavený potenciál +700 mV proti (Ag/AgCl)).

3. Experimentální část

3.1 Chemikále

Standardy analyzovaných látek

- lutein (p.a. > 95 %) Fluka (Buchs, Švýcarsko)
- β -karoten (p.a. > 97 %) Fluka (Buchs, Švýcarsko)
- α -tokoferol (p.a. > 98 %) Fluka (Buchs, Švýcarsko)
- γ -tokoferol (p.a. > 96 %) Fluka (Buchs, Švýcarsko)
- δ -tokoferol (p.a. > 90 %) Fluka (Buchs, Švýcarsko)

Ostatní použité chemikálie

- metanol (p.a. > gradient grade) Prolabo Chemicals (Fontenay-sous-Bois, Francie)
- acetonitril (p.a. > gradient grade) Sigma Aldrich (Steinheim, Německo)
- tetrahydrofuran (p.a. > HPLC grade) Sigma Aldrich (Steinheim, Německo)
- mravenčan amonný (p.a. > HPLC) Fluka (Buchs, Švýcarsko)
- triethylamin (p.a. > 99,5 %) Fluka (Buchs, Švýcarsko)
- dihydrogenfosforečnan sodný (p.a. > 99 %) Fluka (Buchs, Švýcarsko)
- n-heptan (p.a. > UV) Lachema (Neratovice, ČR)
- isopropylalkohol (p.a.) Lachema (Neratovice, ČR)
- octan ethylnatý (p.a.) Lachema (Neratovice, ČR)
- petrol-ether (p.a.) Lachema (Neratovice, ČR)
- hexan (p.a.) Lachema (Neratovice, ČR)
- aceton (p.a.) Penta (Praha, ČR)
- methyl-*tert*-butyl-ether (p.a. > HPLC grade) Lab-Scan (Český Brod, ČR)
- voda získaná reverzní osmózou (Millipore)

3.2 Přístrojové vybavení

Chromatografický systém pro HPLC separaci v systému reverzních fází se sestával z isokratické pumpy ESA s tlumičem pulsů (model 582) a coulometrického detektoru Coulochem III obsahující coulometrickou celu (model 5010) s dvěma průtočnými elektrodami

z porézního grafitického uhlíku. Všechna uvedená zařízení jsou zakoupena od firmy ESA Inc., MA Chelmsford, USA. K separaci byly použity dvě HPLC kolony, a to CN-kolona Macherey-Nagel (3 μm) 125 x 2 mm a kolona Zorbax C8 (5 μm) 4,6 x 150 mm. Vzorky byly do HPLC systému nastříkovány 25 μl skleněnou mikrostříkačkou (Hamilton, Reno, USA). Dávkování bylo prováděno pomocí manuálního dávkovacího ventilu s 10 μl smyčkou (Rheodyne, Cotati, USA).

Pro analýzu v systému normálních fází byla použita HPLC sestava Agilent 1100 Series (Santa Clara, Kalifornie, USA) vybavená autosamplerem a degaserem. K HPLC systému byl sériově připojen UV-VIS spektrofotometrický detektor Shimadzu SPD 10-A VP (Duisburg, Německo), který poskytoval záznam při vlnových délkách 200 a 450 nm. Druhým detektorem použitým k detekci byl fluorescenční detektor Agilent 1200 Series (Santa Clara, Kalifornie, USA), excitační a emisní vlnová délka byla nastavena na 295 a 330 nm. K separaci byla použita HPLC kolona Tessek Separon (7 μm) 250 x 4 mm.

Všechna použitá těsnění, spojky, ferulky a kapiláry byla vyrobena z polymerního materiálu PEEK. Záznamy z detektorů a vyhodnocování chromatografických dat bylo prováděno za pomoci softwaru Clarity (DataApex, Praha, ČR). Výsledky byly zpracovány za pomoci softwaru Microsoft Excel.

3.3 Vzorek

Vzorek oleje poskytnutý k analýze byl získán z lupiny andské (*Lupinus mutabilis sweet*) metodou superkritické extrakce pomocí CO_2 modifikovaného metanolem. Vzorek byl uchováván v chladu a temnu při 4 $^\circ\text{C}$.

3.4 Pracovní postupy

3.4.1 Příprava standardů

Jako zásobní standardní roztok byl použit β -karoten o koncentraci 10 mg/ml, lutein o koncentraci 0,25 mg/ml, α -tokoferol o koncentraci 5 mg/ml, γ -tokoferol o koncentraci 1 mg/ml a δ -tokoferol o koncentraci 7 mg/ml. Všechny standardní roztoky byly rozpuštěny v metanolu. Zásobní standardní roztoky byly dále ředěny mobilní fází dle potřeby. Standardní

roztoky α -, γ -, δ -tokoferolu byly uchovávány v chladu a temnu při 4 °C. Standardní roztoky β -karotenu a luteinu byly uchovávány v chladu a temnu při -20 °C.

3.4.2 Metody extrakce lupinového oleje

3.4.2.1 Extrakce kapalina-kapalina (L-L extrakce)

Lipofilní antioxidanty byly extrahovány z definovaného množství lupinového oleje. Olej byl extrahován metanolem pomocí tří různých extrakčních postupů:

A

Vzorek oleje (4 ml) byl extrahován do heptanu (4 ml). Po ustálení rovnováhy byla heptanová fáze odebrána. Zbývá olejová vrstva byla dále extrahována metanolem (8 ml). Po ustálení rovnováhy byla metanolická fáze odebrána. Extrakce byla opakována celkem třikrát. Spojené metanolické extrakty byly uchovávány v hlubokém mrazu (-77 °C). Po vymražení tuhé fáze byl vzorek centrifugován a k analýze byl použit čirý supernatant. Vzorek byl dále dle potřeby ředěn mobilní fází. Takto připravený vzorek byl použit k přímému nástřiku do HPLC systému.

B

Vzorek oleje (4 ml) byl extrahován do metanolu (4 ml). Po ustálení rovnováhy byla metanolická fáze odebrána a následně byla extrakce dvakrát opakována 8 ml metanolu. Spojené metanolické extrakty byly vloženy na 7 dní do mrazáku (-20 °C). Po vymražení byla provedena reextrakce do heptanu (4 ml). Po ustálení rovnováhy byla odebrána metanolická fáze. Po vymražení tuhé fáze byl vzorek centrifugován a k analýze byl použit čirý supernatant. Vzorek byl dále dle potřeby ředěn mobilní fází. Takto připravený vzorek byl použit k přímému nástřiku do HPLC systému.

C

Vzorek oleje (500 μ l) byl extrahován metanolem (500 μ l). Po ustálení rovnováhy mezi vrstvami byla odebrána metanolická fáze. Metanolická fáze byla dále ředěna mobilní fází dle potřeby. Takto připravený vzorek byl použit k přímému nástřiku do HPLC systému.

3.4.2.2 Extrakce tuhou fází (SPE)

K extrakci tuhou fází byly použity SPE kolonky Spe-ed™ naplněné silikagelem o hmotnosti 1000 mg. Vzorek oleje byl odvážen do 10 ml odměrné baňky a rozpuštěn v n-heptanu. SPE kolonka byla kondicionována 30 ml heptanu, po nanesení 10 ml vzorku rozpuštěného v n-heptanu byla kolonka promyta dvakrát 1 ml n-heptanu. Po dvouminutovém vakuovém sušení byly analyty eluovány různými rozpouštědly: metanol (12 ml), tetrahydrofuran (3 ml), acetonitril (12 ml), isopropylalkohol (3 ml), aceton (3 ml), octan ethylnatý (3 ml), methyl-*terc*-butyl-ether (6 ml). Spolu se vzniklými extrakty byla uchována i heptanová fáze vzorku. Extrakty byly vloženy do mrazáku (-20 °C). Po vymražení byl vzniklý vysrážený tuk odfiltrován. Extrakty byly dále dle potřeby ředěny mobilní fází. A takto připravené vzorky byly přímo dávkovány do HPLC systému.

3.4.3 Metody stanovení

3.4.3.1 Tenkovrstvá kapalinová chromatografie (TLC)

K TLC separaci byl použit silikagelový sorbent ukotven na hliníkové destičce (TLC silikagel 60 F254, 20 x 20 cm, Merck spol. s.r.o.) a sada vybraných mobilních fází (MF):

- MF 1 (petrolether : aceton : triethylamin; 10 : 4 : 1 (v/v/v))
- MF 2 (hexan : ethylacetát : aceton : metanol; 27 : 4 : 2 : 2 (v/v/v/v))
- MF 3 (hexan : aceton : triethylamin; 10 : 4 : 1 (v/v/v))
- MF 4 (CHCl₃)

Standardy a extrakty byly nanášeny v rozmezí 1,5 cm na startovní linii, která byla ve vzdálenosti 1,5 cm od hrany TLC destičky. Poté byla TLC destička vložena do chromatografické komory předem nasycené parami mobilní fáze. Po ukončení separace bylo označeno čelo eluentu. Skvrny po TLC separaci byly identifikovány pod UV lampou při vlnových délkách 366 nm pro karotenoidy a 254 nm pro tokoferoly. Ze získaných chromatogramů byly vypočteny R_F hodnoty luteinu, β-karotenu, α-, γ-, δ-tokoferolu, které sloužily k identifikaci látek v extraktech.

3.4.3.2 RP-LC s coulometrickou detekcí

Pro analýzu lipofilních antioxidantů byly použity dva isokratické systémy, protože nebylo možné použít pro karotenoidy a tokoferoly stejné separační podmínky.

Analýza luteinu a zeaxantinu

K separaci karotenoidů byla použita CN-kolona (Macherey-Nagel (3 μm) 125 x 2 mm) a mobilní fáze o složení 50 mmol/l dihydrogenfosforečnan sodný (pH 4,4) : acetonitril; 55 : 45 (v/v). Pufr byl připraven rozpuštěním navážky v redestilované vodě a pH bylo upraveno titrací koncentrovanou kyselinou trihydrogenfosforečnou na hodnotu 4,4. Následně byl roztok přefiltrován vakuovou filtrací přes filtr o porozitě 0,2 μm . Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,4 ml/min. Na základě výsledků hydrodynamických voltamogramů byl měřicí potenciál nastaven na +550 a +600 mV (vs. Pd/H₂) a citlivost na 10 $\mu\text{A/V}$.

Analýza α -, γ -, δ -tokoferolu

K separaci tokoferolů byla použita kolona C8 (Zorbax C8 (5 μm) 150 x 4,6 mm) a mobilní fáze o složení 20 mmol/l mravenčan amonný (pH 4,47) : metanol; 95 : 5 (v/v). Pufr byl připraven rozpuštěním navážky v redestilované vodě. Následně byl roztok přefiltrován vakuovou filtrací přes filtr o porozitě 0,2 μm . Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,8 ml/min. Na základě výsledků hydrodynamických voltamogramů byl měřicí potenciál nastaven na +650 a +700 mV (vs. Pd/H₂) a citlivost na 1 $\mu\text{A/V}$.

3.4.3.3 NP-LC s UV-VIS a fluorescenční detekcí

UV-VIS detektor byl použit pro detekci karotenoidů (viditelná oblast spektra) i tokoferolů (UV oblast). Jelikož se tokoferoly vyznačují fluorescenčními vlastnostmi, byl pro jejich detekci ve vybraných extraktech použit také fluorescenční detektor.

Analýza β -karotenu, luteinu a zeaxantinu

K separaci karotenoidů byla použita silikagelová kolona (Tessek Separon (7 μ m) 250 x 4 mm) a mobilní fáze o složení hexan : isopropylalkohol; 95 : 5 (v/v). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml/min. Karotenoidy byly detekovány UV-VIS spektrofotometrickým detektorem při vlnové délce 450 nm.

Analýza α -, γ -, δ -tokoferolu

K separaci tokoferolů byla použita silikagelová kolona (Tessek Separon (7 μ m) 250 x 4 mm) a mobilní fáze o složení hexan : isopropylalkohol; 97 : 3 (v/v). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml/min. Tokoferoly byly detekovány UV-VIS spektrofotometrickým detektorem při vlnové délce 200 nm. A dále fluorescenčním detektorem s nastavenými vlnovými délkami 295 nm (excitační) a 330 nm (emisní).

4. Výsledky a diskuze

Experimentální část byla zaměřena na charakterizaci lipofilních antioxidantů v olejovém extraktu lupiny andské. Olejový extrakt byl dále upravován extrakcemi kapalina-kapalina a extrakcí tuhou fází (SPE). Mezi analyzované lipofilní antioxidanty patřily jednak karotenoidy, zejména β -karoten, lutein a zeaxantin, a také tokoferoly, mezi něž patřily α -tokoferol, γ -tokoferol a δ -tokoferol. Předběžná charakterizace vzorků byla provedena pomocí TLC a následná kvantifikace se prováděla metodami HPLC ve spojení s coulometrickou, UV-VIS a fluorescenční detekcí.

4.1 Tenkovrstvá kapalinová chromatografie (TLC)

Prvotní experimenty byly založeny na separaci a identifikaci karotenoidů a tokoferolů metodou tenkovrstvé kapalinové chromatografie. TLC separaci byly podrobeny standardy β -karotenu, luteinu, α -tokoferolu, γ -tokoferolu a δ -tokoferolu. Po nalezení vhodné mobilní fáze byly tenkovrstvou kapalinovou chromatografií separovány i SPE extrakty a lupinový olej.

TLC separace karotenoidů a tokoferolů byla prováděna za použití více mobilních fází. Z testovaných mobilních fází byla pro veškeré následné separace zvolena MF 3 o složení hexan : aceton : triethylamin; 10 : 4 : 1 (v/v/v). V tomto systému docházelo k dělení všech látek, kromě luteinu a zeaxantinu. K rozdělení těchto karotenoidů nedocházelo v žádné použité mobilní fázi. V následující tabulce jsou porovnány R_F hodnoty separovaných látek v závislosti na použité mobilní fázi (Tab. III). Na zobrazených dvou chromatogramech je uvedena separace standardů tokoferolů a karotenoidů (Obr. 14) a dále separace karotenoidů v SPE extraktech (Obr. 15).

Tab. III R_F hodnoty analyzovaných látek

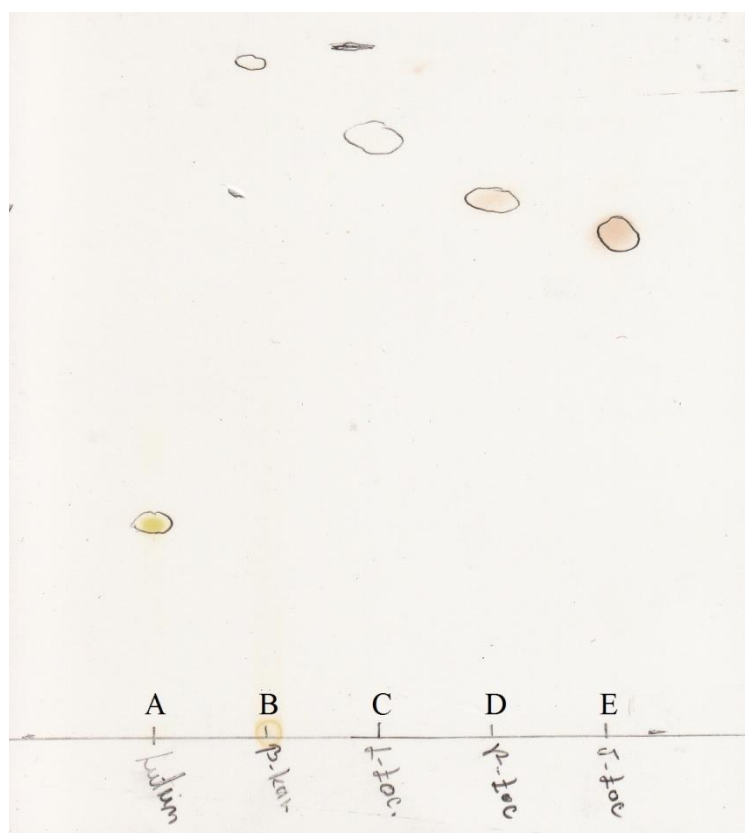
R _F	Lutein	β-karoten	α-tokoferol	γ-tokoferol	δ-tokoferol
MF 1	0,49	0,98	0,96	0,93	0,89
MF 2	0,26	0,98	0,86	0,81	0,78
MF 3	0,32	0,98	0,87	0,78	0,73
MF 4*	-	-	0,85	0,63	0,53

MF 1 (petrolether : aceton : triethylamin; 10 : 4 : 1 (v/v/v))

MF 2 (hexan : ethylacetát : aceton : metanol; 27 : 4 : 2 : 2 (v/v/v/v))

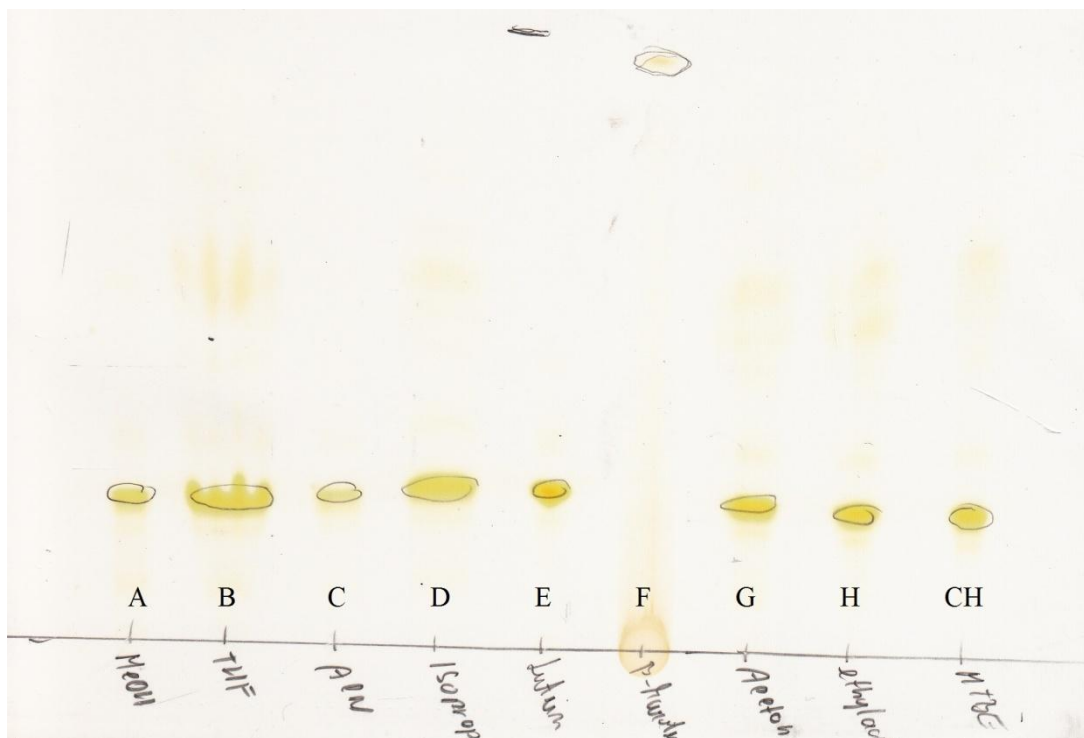
MF 3 (hexan : aceton : triethylamin; 10 : 4 : 1 (v/v/v))

MF 4* (CHCl₃), byla použita pouze k separaci tokoferolů



Obr. 14 TLC chromatogram standardů tokoferolů a karotenoidů vyvíjený v MF 3
A – lutein, B – β-karoten, C – α-tokoferol, D – γ-tokoferol, E – δ-tokoferol

Chromatogram demonstruje vhodnost použité mobilní fáze. Na chromatogramu je zřetelné, že docházelo k separaci jednotlivých látek, tudíž tato mobilní fáze mohla být použita pro separaci reálných vzorků.



Obr. 15 TLC chromatogram lupinového oleje po extrakci tuhou fází, zachycené látky se z SPE kolonek vymývaly sedmi různými rozpouštědly: A – metanol, B – tetrahydrofuran, C – acetonitril, D – isopropylalkohol, E – standard luteinu, F – standard β -karotenu, G – aceton, H – octan ethylnatý, CH – metyl-*tert*-butyl-ether

Uvedený chromatogram zobrazuje TLC separaci jednotlivých SPE extraktů. Ve všech extraktech byla prokázána přítomnost luteinu, naopak přítomnost β -karotenu prokázána nebyla.

Pomocí TLC separace byla dokázána přítomnost luteinu jak v oleji, tak v jednotlivých SPE extraktech. Přítomnost zeaxantinu nemohla být touto metodou potvrzena, protože nedocházelo k separaci od luteinu. Přítomnost β -karotenu, α -, γ -, δ -tokoferolu se rovněž nepodařilo touto metodou prokázat.

4.2 Separace v systému reverzních fází (RP-LC)

Před samotným stanovením analytů v reálných vzorcích byly naměřeny hydrodynamické voltamogramy, ze kterých byl na základě naměřených dat vybrán vhodný oxidační potenciál nastavený pro měření:

- lutein a zeaxantin +550 a +600 mV (vs. Pd/H₂)
- α -, γ -, δ -tokoferol +650 a +700 mV (vs. Pd/H₂)

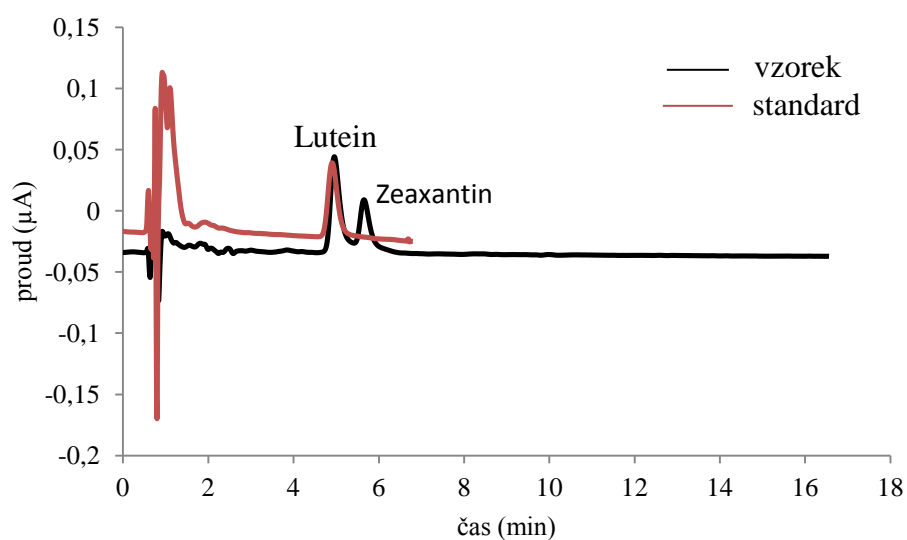
Analýze byly podrobeny vzorky získané extrakcí kapalina-kapalina (viz. kapitola 3.4.2.1), a to extrakt *A*, extrakt *B* a extrakt *C*. Pro tuto analýzu byly uvedené extrakty vybrány z důvodu kompatibility výsledných metanolických extraktů s použitou mobilní fází. K separaci luteinu a zeaxantinu byla použita CN-kolona (Macherey-Nagel (3 μ m) 125 x 2 mm) a vitamery tokoferolu byly separovány pomocí kolony C8 (Zorbax C8 (5 μ m) 150 x 4,6 mm).

Analyty v extraktech byly identifikovány porovnáním retenčních charakteristik se standardem a metodou standardního přídatku. Lutein a zeaxantin byl nalezen v extraktu *A* a *B*, γ -tokoferol a δ -tokoferol v extraktu *C*. Kvantifikace analytů byla provedena metodou standardního přídatku. Zeaxantin byl identifikován na základě shody retenčních charakteristik s literaturou^{67,68} a kvantifikace se prováděla porovnáním ploch se standardem luteinu za oprávněného předpokladu stejné odezvy detektoru pro obě analyzované látky. Retenční charakteristiky a obsahy analytů přepočtené na příslušnou navážku lupinového oleje (3,5544 g) jsou uvedeny v Tab. IV. Na Obr. 16 je chromatogram standardu luteinu ($c = 2,5 \mu\text{g/ml}$) a extraktu *A*, ve kterém je znázorněna separace luteinu a zeaxantinu. Obr. 17 znázorňuje separaci luteinu a tokoferolů v extraktu *C*.

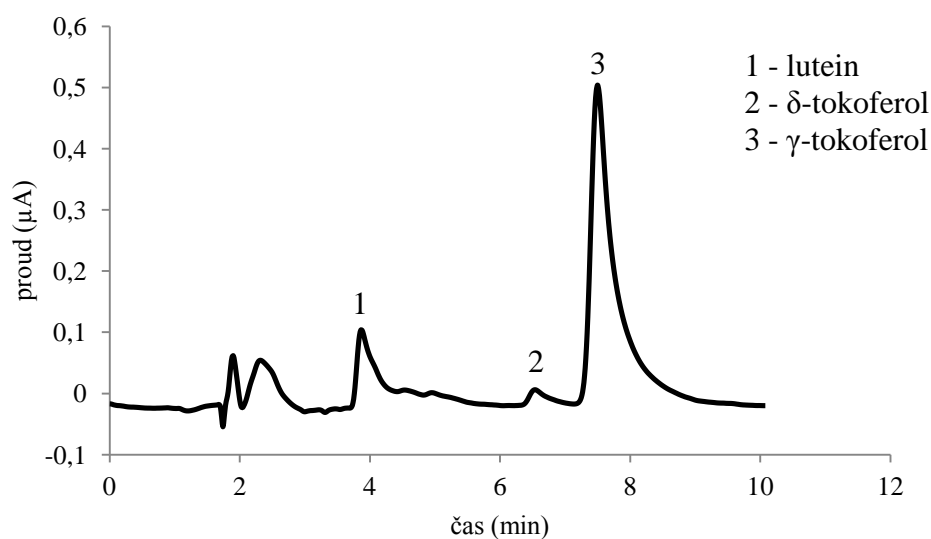
Tab. IV Retenční charakteristiky a obsahy jednotlivých analytů v extraktech

Analyt	Retenční čas (min)	Extrakt A		Extrakt B		Extrakt C	
		Hmotnost (μg)	Obsah (ppm)	Hmotnost (μg)	Obsah (ppm)	Hmotnost (μg)	Obsah (ppm)
Lutein	4,92	307,2	86,4	67,2	18,9	-	-
Zeaxantin	5,02	140,2	39,4	2,7	0,8	-	-
γ-tokoferol	7,57	-	-	-	-	710,0	199,8
δ-tokoferol	6,56	-	-	-	-	36,7	10,3

- nehodnoceno



Obr. 16 Chromatogram vzorku (8x zředěný extrakt A) a standardu luteinu ($c = 2,5 \mu\text{g/ml}$), podmínky měření: CN-kolona (Macherey-Nagel ($3 \mu\text{m}$) $125 \times 2 \text{ mm}$), mobilní fáze o složení 50 mmol/l dihydrogenfosforečnan sodný (pH 4,4) : acetonitril; 55 : 45 (v/v), potenciál +550 mV (vs. Pd/H₂)



Obr. 17 Chromatogram extraktu oleje *C* (20x zředěný), podmínky měření: kolona C8 (Zorbax C8 (5 µm) 150 x 4,6 mm), mobilní fáze o složení 20 mmol/l mravenčan amonný (pH 4,47) : metanol; 95 : 5 (v/v), potenciál +650mV (vs. Pd/H₂)

Na základě výše uvedených dat byla v lupinovém oleji prokázána přítomnost elektroaktivních lipofilních antioxidantů (lutein, zeaxantin, γ -tokoferol, δ -tokoferol) po předchozí L-L extrakci. Z hlediska výtěžnosti luteinu a zeaxantinu je vhodnější extrakce typu *A*, jejíž výtěžek je téměř pětikrát vyšší než u extrakce typu *B*. V extraktu *C* byla navíc potvrzena přítomnost tokoferolů. Lze se domnívat, že u extraktu *A* a *B* byly tokoferoly vyextrahovány do heptanové fáze.

4.3 Separace v systému normálních fází (NP-LC)

V systému normálních fází je dominantním separačním mechanismem adsorpce na polárním sorbentu. Jako mobilní fáze se používají organická rozpouštědla nemísitelná s vodou, NP-LC tudíž není kompatibilní s elektrochemickou detekcí. Hlavní uplatnění systému NP-LC nachází při analýze lipofilních matric.

4.3.1 NP-LC s UV-VIS detekcí

Studované karotenoidy jsou barevné látky, tudíž pro jejich detekci byla použita viditelná oblast spektra. K detekci byly vybrány tyto vlnové délky: 450 nm pro karotenoidy (β -karoten, lutein, zeaxantin) a 200 nm pro tokoferoly (α -tokoferol, γ -tokoferol, δ -tokoferol). Při těchto vlnových délkách látky vykazovaly absorpční maximum.

Karotenoidy a tokoferoly byly analyzovány v SPE extraktech (kap. 3.4.2.2) a v lupinovém oleji (referenční hodnota). K separaci byla použita silikagelová kolona (Tessek Separon (7 μ m) 250 x 4 mm).

Analyty byly identifikovány jednak na základě porovnání retenčního času se standardem, a také metodou standardního přídatku. Kvantitativní stanovení látek bylo provedeno metodou kalibrační křivky. Zeaxantin byl identifikován na základě shody retenčních charakteristik s literaturou⁶² a kvantifikace se prováděla porovnáním ploch se standardem luteinu za oprávněného předpokladu stejné odezvy detektoru pro obě analyzované látky. Retenční charakteristiky a obsah látek nalezený v 1,2 až 2,0 g lupinového oleje byl přepočten na navážku (3,5544 g) vzorku a výsledky jsou shrnuty v Tab. V a Tab. VI.

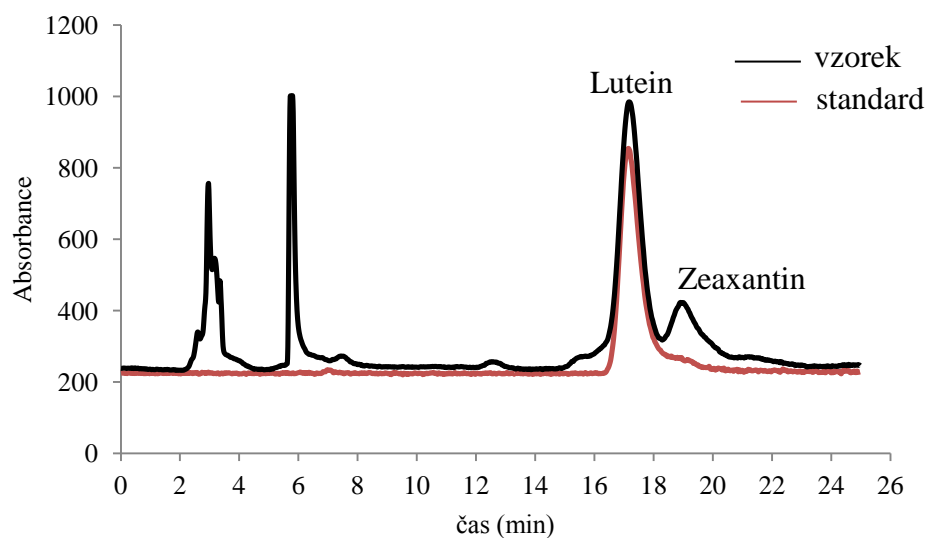
Obr. 18 ilustruje separaci tetrahydrofuranového SPE extraktu. Obr. 19 dokazuje přítomnost β -karotenu v heptanové fázi po SPE extrakci. Na Obr. 20 je znázorněn chromatogram separace naředěného oleje v hexanu, který potvrzuje přítomnost β -karotenu, luteinu a zeaxantinu. Chromatogram na Obr. 21 demonstruje separaci standardů α -, γ -, δ -tokoferolu ($c = 30 \mu\text{g/ml}$) a Obr. 22 znázorňuje chromatogram methyl-*terc*-butyl-etherového SPE extraktu, ve kterém je prokázána přítomnost γ -tokoferolu a δ -tokoferolu.

Tab. V Retenční charakteristiky a obsahy karotenoidů v SPE extraktech

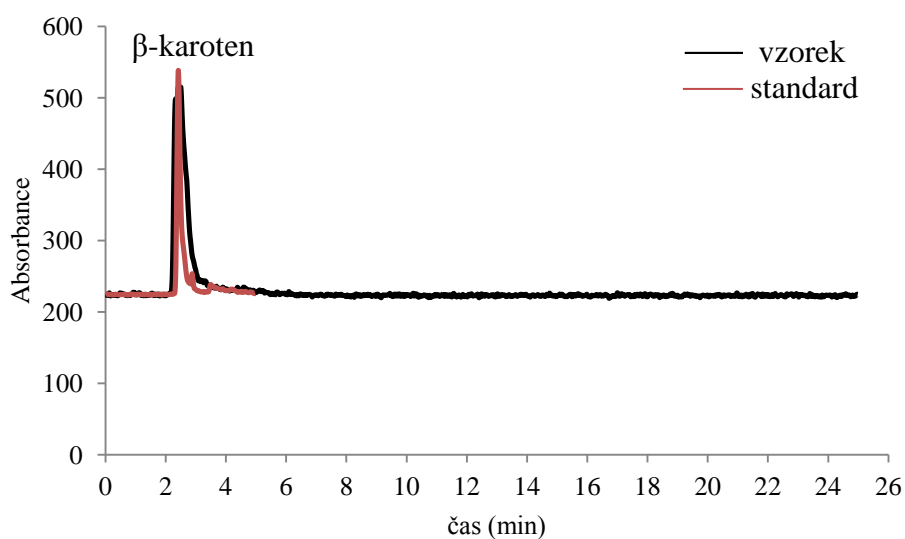
Extrakt	Lutein ($t_R=17,12$ min)		Zeaxantin ($t_R=18,44$ min)		β -karoten ($t_R=2,44$ min)	
	Hmotnost (μg)	Obsah (ppm)	Hmotnost (μg)	Obsah (ppm)	Hmotnost (μg)	Obsah (ppm)
MTBE	236,2	66,5	51,0	14,3	-	-
Acetonitril	103,0	29,0	24,4	6,9	-	-
Isopropylalkohol	28,7	8,1	detekováno	-	-	-
Octan ethylnatý	153,3	43,1	33,8	9,5	-	-
Tetrahydrofuran	140,2	39,4	30,1	8,5	-	-
Aceton	106,2	29,9	20,5	5,8	-	-
Heptanová fáze	-	-	-	-	5 458,3	1 535,6
Olej v hexanu	292,9	82,4	64,5	18,1	10 525,4	2 961,2

MTBE – methyl-*terc*-butyl-ether

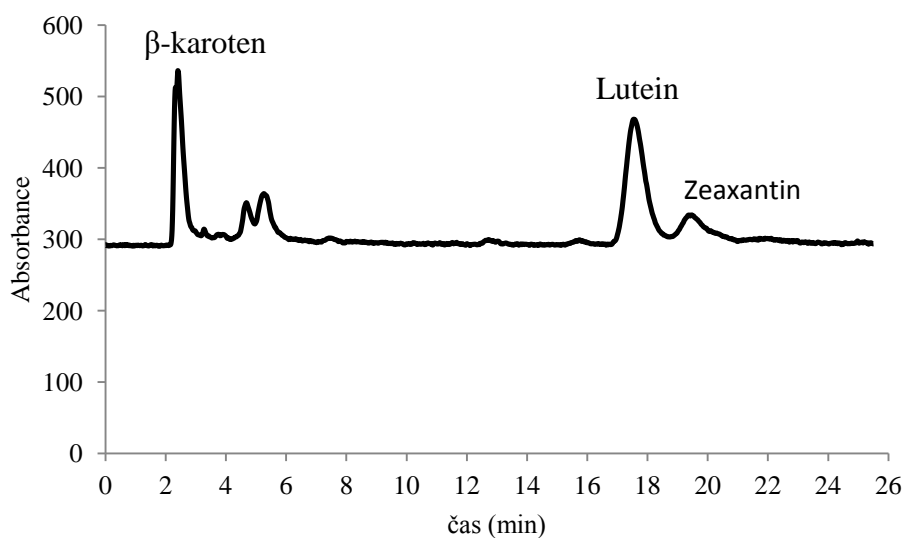
- neanalyzáváno



Obr. 18 Chromatogram vzorku (SPE extrakt tetrahydrofuranu) a standardu luteinu ($c = 40 \mu\text{g/ml}$), podmínky měření: silikagelová kolona (Tessek Separon ($7 \mu\text{m}$) 250×4 mm), mobilní fáze o složení hexan : isopropylalkohol; 95 : 5 (v/v), vlnová délka 450 nm



Obr. 19 Chromatogram vzorku (heptanová fáze po SPE extrakci) a standardu β -karotenu ($c = 0,5 \text{ mg/ml}$), podmínky měření: silikagelová kolona (Tessek Separon ($7 \mu\text{m}$) $250 \times 4 \text{ mm}$), mobilní fáze o složení hexan : isopropylalkohol; 95 : 5 (v/v), vlnová délka 450 nm



Obr. 20 Chromatogram lupinového oleje (5x ředěný), podmínky měření: silikagelová kolona (Tessek Separon ($7 \mu\text{m}$) $250 \times 4 \text{ mm}$), mobilní fáze o složení hexan : isopropylalkohol; 95 : 5 (v/v), vlnová délka 450 nm

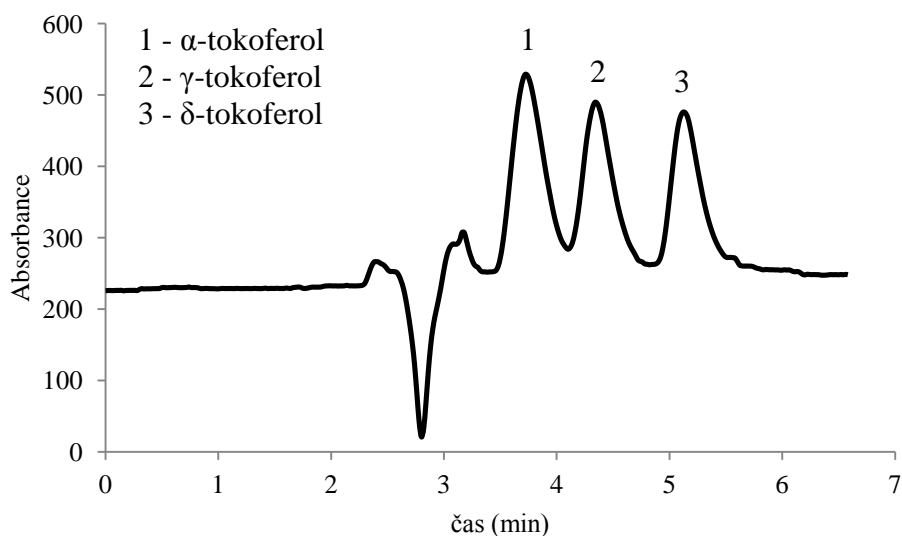
Z hlediska výtěžnosti extrakce byl nejvhodnějším elučním činidlem methyl-*terc*-butyl-ether, naopak isopropylalkohol se pro extrakci těchto látek neosvědčil (viz. Tab.V). Z důvodu velice nízké retence β -karotenu na silikagelu bylo podle očekávání významné množství této látky nalezeno v heptanové fázi po SPE extrakci.

Srovnáme-li obsah luteinu nalezený v lupinovém oleji s hodnotami uvedenými na Obr. 5, je zřejmé, že obsah luteinu je srovnatelný se špenátem. Obsah zeaxantinu v lupinovém oleji v porovnání s Obr. 7 je vyšší než ve všech uvedených potravinách. I kukuřice, která je uváděna jako jeden z hlavních zdrojů zeaxantinu má obsah třikrát menší než lupinový olej. Z uvedeného je zřejmé, že lupinový olej je bohatým zdrojem těchto významných antioxidantů.

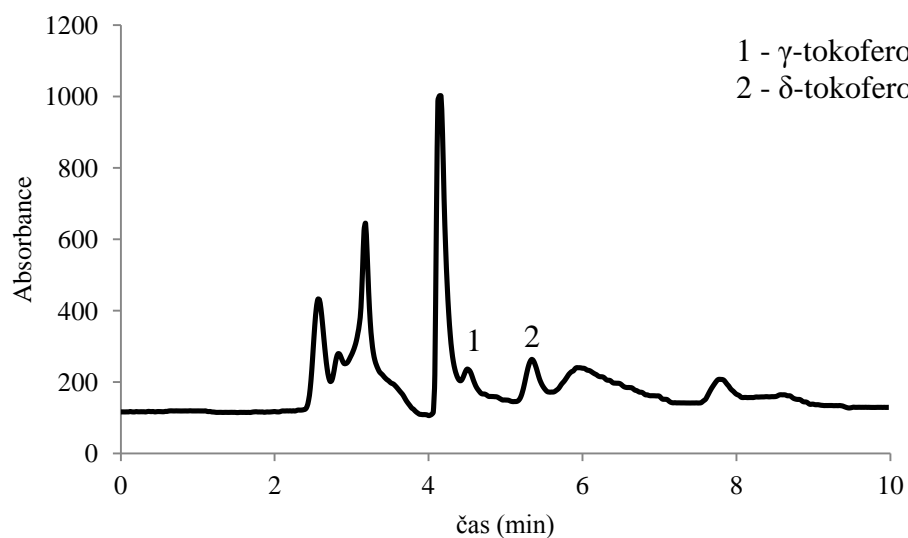
Tab. VI Retenční charakteristiky a obsahy tokoferolů v SPE extraktech

Extrakt	γ-tokoferol ($t_R=4,57$ min)		δ-tokoferol ($t_R=5,31$ min)	
	Hmotnost (μg)	Obsah (ppm)	Hmotnost (μg)	Obsah (ppm)
MTBE	2 478,2	697,2	2 883,6	811,2
Acetonitril	324,1	91,2	1 106,0	311,2
Isopropylalkohol	607,8	171,0	1 881,0	529,2
Octan ethylnatý	1 202,1	338,2	2 007,7	564,8
Tetrahydrofuran	170,3	47,9	1 115,6	313,9
Aceton	42,5	12,0	1 159,3	326,2
Olej v hexanu	3 615,9	1 017,3	4 337,2	1 220,2

MTBE – methyl-*terc*-butyl-ether



Obr. 21 Chromatogram separace standardů α -, γ -, δ -tokoferolu ($c = 30 \mu\text{g/ml}$), podmínky měření: silikagelová kolona (Tessek Separon ($7 \mu\text{m}$) $250 \times 4 \text{ mm}$), mobilní fáze o složení hexan : isopropylalkohol; 97 : 3 (v/v), vlnová délka 200 nm



Obr. 22 Chromatogram methyl-*tert*-butyl-ether SPE extraktu (25x zředěný), podmínky měření: silikagelová kolona (Tessek Separon ($7 \mu\text{m}$) $250 \times 4 \text{ mm}$), mobilní fáze o složení hexan : isopropylalkohol; 97 : 3 (v/v), vlnová délka 200 nm

Z hlediska výtěžnosti extrakce byl pro tokoferoly nejvhodnějším elučním činidlem octan ethylnatý a methyl-*tert*-butyl-ether (viz. Tab VI). V SPE extraktech a ani v oleji opět nebyla potvrzena přítomnost α -tokoferolu.

4.3.2 NP-LC s fluorescenční detekcí

Tokoferoly (α -, γ -, δ -tokoferol) se vyznačují fluorescenčními vlastnostmi, které lze využít pro jejich selektivní a citlivou detekci. Měření probíhalo při vlnových délkách 295 nm (excitační) a 330 nm (emisní). Použité vlnové délky byly vybrány z článků z rešerše⁶¹.

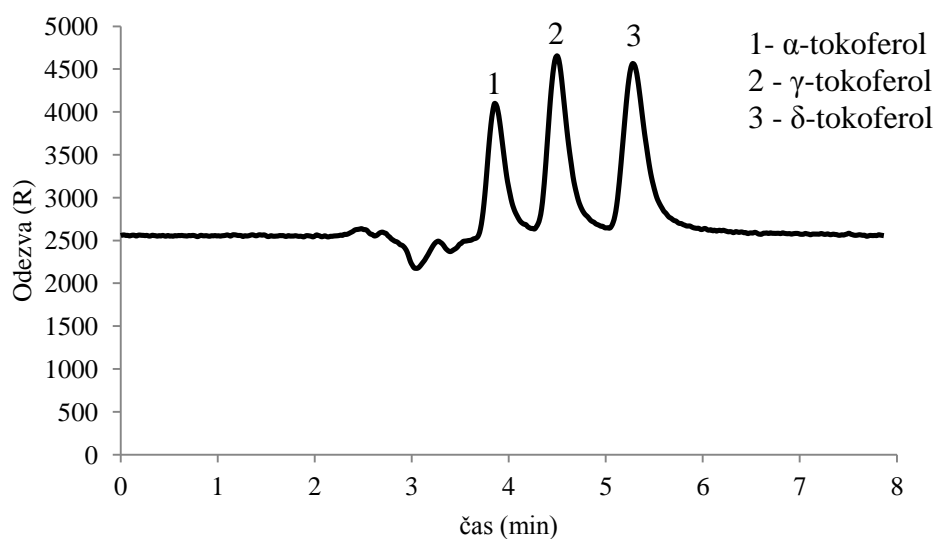
Tokoferoly byly analyzovány v oleji (referenční hodnota) a methyl-*terc*-butyl-ether SPE extraktu. K analýze byl vybrán tento extrakt na základě výsledku měření na UV-VIS detektoru (nejvyšší výtěžek extrakce). K separaci byla použita silikagelová kolona (Tessek Separon (7 μ m) 250 x 4 mm). Analyty byly identifikovány na základě porovnání retenčního času se standardem. Kvantitativní stanovení bylo provedeno metodou kalibrační křivky. Retenční charakteristiky a obsah látek nalezený v 1,6989 g lupinového oleje, byl přepočten na navážku (3,5544 g) vzorku a výsledky obsahu jsou uvedeny v Tab. VII. Na Obr. 23 je znázorněn chromatogram standardů α -, γ -, δ -tokoferolu ($c = 10 \mu\text{g/ml}$) a Obr. 24 ilustruje separaci oleje, který potvrzuje přítomnost γ -tokoferolu a δ -tokoferolu.

Jelikož je zastoupení δ -tokoferolu v analyzované matici nízké, nebylo možné u této látky provést kvantifikaci. Ve srovnání s předchozími použitými detektory, fluorescenční detektor poskytoval podobné výsledky jako coulometrický detektor.

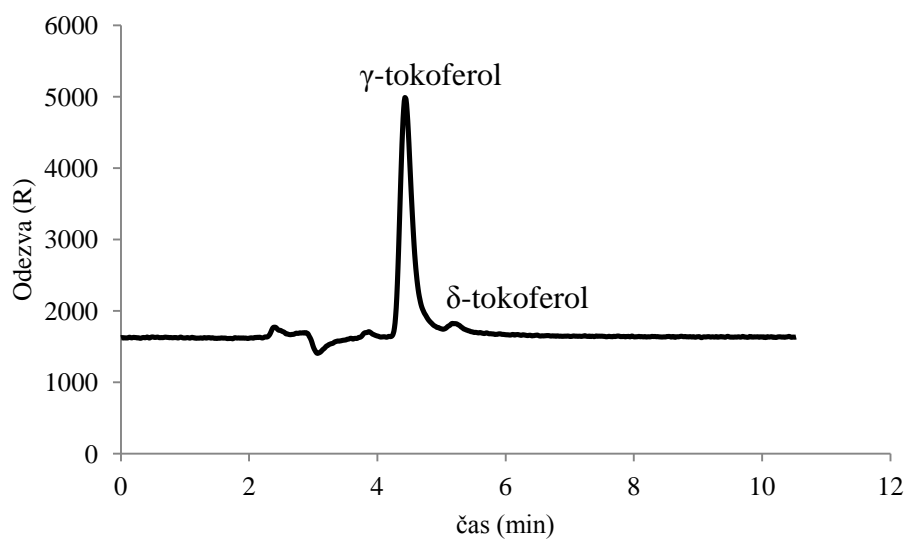
Tab. VII Retenční charakteristiky a obsahy tokoferolů v methyl-*terc*-butyl-ether SPE extraktu

Extrakt	γ -tokoferol ($t_R=4,61$ min)		δ -tokoferol ($t_R=5,31$ min)	
	Hmotnost (μg)	Obsah (ppm)	Hmotnost (μg)	Obsah (ppm)
MTBE	2 143,9	603,2	detekováno	
Olej v hexanu	4 808,0	1 352,7	detekováno	

MTBE – methyl-*terc*-butyl-ether



Obr. 23 Chromatogram separace standardů α -, γ -, δ -tokoferolu ($c = 10 \mu\text{g/ml}$), podmínky měření: silikagelová kolona (Tessek Separon ($7 \mu\text{m}$) $250 \times 4 \text{ mm}$), mobilní fáze o složení hexan : isopropylalkohol; 97 : 3 (v/v), vlnové délky 290 nm (excitační) a 330 nm (emisní)



Obr. 24 Chromatogram oleje (50x zředěný), podmínky měření: silikagelová kolona (Tessek Separon ($7 \mu\text{m}$) $250 \times 4 \text{ mm}$), mobilní fáze o složení hexan : isopropylalkohol; 97 : 3 (v/v), vlnové délky 290 nm (excitační) a 330 nm (emisní)

Z Obr. 9 plyne, že vysokým obsahem vitamínu E se vyznačuje olej z obilných klíčků a sojový olej. V lupinovém oleji je obsah vitamínu E zhruba o 1 000 jednotek ppm vyšší než v již zmíněném sojovém oleji.

4.4 Porovnání SPE extrakcí

V této kapitole je uvedeno porovnání jednotlivých SPE extraktů, v následující tabulce (Tab. VIII) jsou shrnuty výtěžnosti extrakcí pro jednotlivé analyty. Jako referenční hodnoty byly použity množství analytů odpovídající navážce (3,5544 g) lupinového oleje. Výtěžnost byla vypočítána podle následujícího vzorce:

$$R = \frac{m_{\text{naměřená}}}{m_{\text{referenční}}} * 100 \quad (2)$$

Tab. VIII Výtěžnosti SPE extrakcí

Extrakt	Lutein R (%)	Zeaxantin R (%)	β-karoten R (%)	γ-tokoferol R (%)	δ-tokoferol R (%)
MTBE	80,6	79,1	-	68,5	66,5
Acetonitril	35,2	37,8	-	9,0	25,5
Isopropylalkohol	9,8	-	-	16,8	43,4
Octan ethylnatý	52,3	52,4	-	33,2	46,3
Tetrahydrofuran	47,9	46,7	-	4,7	25,7
Aceton	36,3	31,8	-	1,2	26,7
Heptanová fáze	-	-	51,9	-	-

MTBE – methyl-*terc*-butyl-ether

- nepočteno (nebylo kvantifikováno)

Z uvedených výsledků výtěžností plyne, že nejvhodnější eluční činidlo pro SPE extrakci všech analyzovaných látek je methyl-*terc*-butyl-ether, jehož výtěžnost pro karotenoidy dosahuje 80 % a pro tokoferoly necelých 70 %. Nejméně vhodným elučním činidlem pro SPE extrakci karotenoidů je isopropylalkohol, jehož výtěžnost dosahuje pouze 9,8 %. Pro γ-tokoferol a δ-tokoferol jsou nejméně vhodnými elučními činidly tetrahydrofuran, aceton a acetonitril, jejichž výtěžnost je v porovnání s ostatními činidly dosahuje nejnižších hodnot.

5. Závěr

Cílem diplomové práce byla charakterizace lipofilní antioxidantů v lupině (*Lupinus sp.*). V teoretické části byly podrobněji popsány rostliny rodu lupiny a vybrané antioxidanty, kterými byly karotenoidy (β -karoten, lutein, zeaxantin) a tokoferoly (α -tokoferol, γ -tokoferol, δ -tokoferol). Následně byly popsány používané techniky pro extrakci lipofilních látek, a také princip a instrumentace kapalinové chromatografie, zejména TLC a HPLC. Dále byly diskutovány možnosti prekoncentrace (L-L, SPE extrakce) a možnosti analýzy antioxidantů v různých matricích (olej, sérum, cereálie,...) pomocí spojení HPLC s UV-VIS, fluorescenční a elektrochemickou detekcí.

V rámci řešení praktické části byly prováděny extrakce typu kapalina-kapalina a SPE extrakce lipofilních antioxidantů z oleje získaného z lupiny andské (*Lupinus mutabilis sweet*). Přítomnost antioxidantů v získaných extraktech byla prokázána pomocí TLC separace v systému normálních fází (silikagel a mobilní fáze o složení hexan : aceton : triethylamin; 10 : 4 : 1 (v/v/v)). Dále byly pro stanovení antioxidantů vyvinuty metody založené na spojení RP-LC s coulometrickou detekcí potažmo NP-LC s UV-VIS a fluorescenční detekcí. Při coulometrické detekci bylo využito elektrochemické aktivity antioxidantů. Detekce probíhala při potenciálech +550 a +600 mV (vs. Pd/H₂) pro karotenoidy, +650 a +700 mV (vs. Pd/H₂) pro tokoferoly. Spektrofotometrická detekce probíhala při vlnových délkách 450 nm pro karotenoidy a 200 nm pro tokoferoly. Tokoferoly byly také analyzovány pomocí fluorescenčního detektoru při vlnových délkách 295 nm (excitační) a 330 nm (emisní) v methyl-*terc*-butyl-etherovém SPE extraktu a v oleji.

Na závěr lze říci, že vyvinuté metody lze použít pro stanovení lipofilních antioxidantů zahrnující zejména β -karoten, lutein, zeaxantin, α -tokoferol, γ -tokoferol, δ -tokoferol v lupinovém oleji ale i v jiných matricích. Analýza antioxidantů v systému normálních fází s UV-VIS a potažmo fluorescenční detekcí je vhodná zejména pro analýzu olejových matric, které lze analyzovat přímo bez nutnosti předchozí L-L nebo SPE extrakce.

6. Seznam použitých zkratk

DAD	detektor s diodovým polem
ECD	elektrochemický detektor
ELSD	odpařovací detektor rozptylu světla
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
JECFA	komise pro potravinářské přídatné látky
L-L	extrakce kapalina-kapalina
MF	mobilní fáze
MTBE	methyl- <i>terc</i> -butyl-ether
NP-LC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému normálních fází
ROS	reaktivní formy kyslíku
RP-LC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému obrácených fází
SPE	extrakce tuhou fází
TLC	tenkovrstvá kapalinová chromatografie
UHPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie za ultravysokého tlaku
UPLC	extrémně účinná kapalinová chromatografie
UV-VIS	spektrofotometrický detektor

7. Literatura

1. Bremnessová L.: *Užitkové rostliny*. Ikar, Praha 2005.
2. <http://www.dia-potraviny.cz/lupina.html> (staženo 29.1.2014).
3. <http://www.library.illinois.edu/vex/toxic/lupine/lupine.htm> (staženo 11.12.2013).
4. <http://www.ceskestavby.cz/rostliny/vlci-bob-lupinus/> (staženo 29.1.2014).
5. Kohajdová Z., Karovičová J., Schmidt Š.: *Czech J. Food Sci.*, **29**, 203-211 (2011).
6. Wang S., Errington S., How Yap H.: Studies on carotenoids from lupin seeds. In lupins for health and wealth proceedings of the 12 th international lupin conference, Ed. Palta J.A. and Berger J.B. - international lupin association, Fremantle 2008.
7. Spohnová M., Golte-Bechtleová M.: *Květena střední Evropy*. Euromedia Group, Praha 2010.
8. Salmanowicz B. P.: *J. Chromatogr. A*, **894**, 297-310 (2000).
9. <http://czech-universities.com/clanek/4128-lupin-herb-which-according-to-scientists-the-potential-to-become-an-important-part-of-animal-nutrition-but-also-part-of-a-healthy-human-diet> (staženo 20.8.2013).
10. <http://www.nakobylce12.org/Index/ukaz.cfm?pg=Botanicka/lupina> (staženo 29.1.2014).
11. Ruiz M. A., Sotelo A.: *J. Agr. Food Chem.*, **49**, 5336-5339 (2001).
12. Cook D., Lee S. T., Pfister J. A., Stonecipher C. A., Welch K. D., Green B. T., Panter K. E.: *Phytochem. Anal.*, **23**, 278-284 (2012).
13. Jappe U., Vieths S.: *Mol. Nutr. Food Res.*, **54**, 113-126 (2010).
14. <http://www.zdravinadevse.cz/antioxidacniaktivita.html> (staženo 10. 2. 2014).
15. <http://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2011/07/ANTIOXIDA%C4%8CN%C3%8D-KAPACITA-POTRAVIN.pdf> (staženo 10. 2. 2014).
16. http://www.chembiolupol.cz/data/xinha/9__antioxidanty_v_potravinarstvi.pdf (staženo 2.4. 2014).
17. http://www.medlabs.com/downloads/antiox_acti_.pdf (staženo 10. 2. 2014).
18. Rao A. V., Rao L. G.: *Pharmacol. Res.*, **55**, 207-216 (2007).
19. Yeum K-J., Russell R. M.: *Annu. Rev. Nutr.*, **22**, 483-504 (2002).
20. Stahl W., Sies H.: *Mol. Aspects Med.*, **24**, 345-351 (2003).
21. Arvayo-Enríquez H., Mondaca-Fernández I., Gortáñez-Moroyoqui P., López-Cervantes J., Rodríguez-Ramírez R.: *Anal. Methods*, **5**, 2916-2924 (2013).
22. Edge R., McGarvey T. G., Truscott T. G.: *J. Photoch. Photobio. B*, **41**, 189-200 (1997).

-
23. Yuea Y., Lianga Q., Liaoa Y., Guoa Y., Shaoa S.: *J. Electroanal. chem.*, **682**, 90-94 (2012).
 24. Grune T., Lietz G., Palou A., Ross C. A., Stahl W., Tang G., Thurnham D., Yin S., Biesalski H. K.: *J. Nutr.*, **140**, 2268-2285 (2010).
 25. <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/monograph4/additive-112-m4.pdf> (staženo 11. 2. 2014).
 26. <http://www.scbt.com/datasheet-202485-b-carotene.html> (staženo 11. 2. 2014).
 27. <http://www.medicalnewstoday.com/articles/252758.php> (staženo 11. 2. 2014).
 28. Lietz G., Henry J. K.: *Food chem.*, **60**, 107-117 (1997).
 29. Šivel M., Klejdus B., Kráčmar B., Kubáň V.: *Chem. Listy*, **107**, 456-463 (2013).
 30. Fryirs C., Eisenhaur B., Duckworth S.: Luteins in lupins-An eye for health. In lupins for health and wealth proceedings of the 12 th international lupin conference, Ed. Palta J.A. and Berger J.B. - international lupin association, Fremantle 2008.
 31. Sajilata M. G., Singhal R. S., Kamat M. Y.: *Compr. Rev. Food. Sci. F.*, **7**, 29-49 (2008).
 32. <http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/cta/63/Zeaxanthin.pdf> (staženo 10. 2. 2014)
 33. Hosmanová R., Douša M.: *Chem. Listy*, **101**, 578-583 (2007).
 34. Sies H., Stahl W.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **62**, 1315-1321 (1995).
 35. Benešová K., Pluháčková H., Běláková S., Vaculová K., Mikulíková R., Ehrenbergerová J., Belcredi Březinová N.: *Chem. Listy*, **106**, 672-676 (2012).
 36. <http://galenus.cz/clanky/vyziva/vitaminy-vitamin-E> (staženo 11. 2. 2014).
 37. Zýka J.: *Analytická příručka Díl I.*. SNTL, Praha 1979.
 38. Zwir-Ferenc A., Biziuk M.: *Polish J. of Environ. Stud.*, **15**, 677-690 (2006).
 39. Shen Y., Hu Y., Huang K., Yin S., Chen B., Yao S.: *J. Chromatogr. A*, **1216**, 5763-5768 (2009).
 40. Irakli M. N., Samanidou V. F., Papadoyannis I. N.: *J. Sep. Sci.*, **34**, 1375-1382 (2011).
 41. Mateos R., García-Mesa J. A.: *Anal. Bioanal. Chem.*, **385**, 1247-1254 (2006).
 42. Dachtler M., Kohler K., Albert K.: *J. Chromatogr. B*, **720**, 211-216 (1998).
 43. Yost R. W., Ettre L. S., Conlon R. D.: *Practical liquid chromatography*. PERKIN-ELMER, USA 1980.
 44. Churáček J. a kol.: *Analytická separace látek*. SNTL, Praha 1990.

-
45. Churáček J., Jandera P.: *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie*. SNTL, Praha 1985.
46. <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/tlcpc.html> (staženo 26.3.2014).
47. Štulík K. a kol.: *Analytické separační metody*. Karolinum, Praha 2004.
48. Minguez-Mosquera M. I., Gandul-Rojas B., Gallardo-Guerrero M. L.: *J. Agr. Food Chem.*,**40**, 60-63 (1992).
49. Mercadante A. Z., Britton G., Rodriguez-Amaya D. B.: *J. Agr. Food Chem.*,**46**,4102-4106 (1998).
50. Ren D., Zhang S.: *Food Chem.*,**106**, 410-414 (2008).
51. Kivcak B., Akay S.: *Fitoterapia*,**76**, 62-66 (2005).
52. Mino M., Nishino H., Yamaguchi T., Hayashi M.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, **23**, 63-69 (1977).
53. Borodina E. V., Kitaeva T. A., Safonova E. F. Selemenev V. F. Nazarova A. A.: *J. Anal. Chem.*,**62**, 1064-1068 (2007).
54. Rybakova O. V., Safonova E. F., Slikvin A. I.: *Pharm. Chem. J.*,**42**, 31-34 (2008).
55. Briciu R. D., Casoni D., Bischin C.: *Studia Universitatis Babes-Bolyai*, **4**, 11 (2008).
56. Perucka I., Oleszek W.: *Food Chem.***71**,287-291 (2000).
57. Fried B., Beers K., Sherma J.: *Parasitol J.*,**79**,13-114 (1993).
58. <http://www.hplc.cz/> (staženo 3. 2. 2014)
59. Panfili G., Manzi P., Pizzoferrato L.: *Analyst*,**119**,1161-1165 (1994).
60. Hart D. J., Scott K. J.: *Food Chem.*,**54**, 101-111 (1995).
61. Franke S., Fröhlich K., Werner S., Böhm V., Schöne F.: *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*,**112**,1122-1129 (2010).
62. Panfili G., Fratianni A., Irano M.: *J. Agr. Food. Chem.*,**52**,6373-6377 (2004).
63. Slavin M., Yu L.: *Food Chem.*, **135**, 2789-2795 (2012).
64. Habib H. M., Kamal H., Ibrahim W. H., Al Dhaheri A. S.: *Ind. Crop. and Prod.*, **42**, 567-572 (2013).
65. Mortensen A.: *Food Res. Int.*, **38**, 847-853 (2005).
66. Sun M., Temelli F.: *J. Supercrit. Fluids*,**37**, 397-408 (2006).
67. Aruna G.,Mamatha B. S., Baskaran V.: *J. Food Comps. and Anal.*, **22**, 632-636 (2009).
68. Ferruzzi M. G., Sander L. C., Rock Ch. L., Schwartz S. J.: *Anal. Biochem.*,**256**, 74-78 (1998).

-
69. Puspitasari-Nienaber N. L., Ferruzzi M. G., Schwartz S. J.: *Department of Food Science and Technology*, **79**, 633-640 (2002).
70. Guaratini T., Cardozo K. H. M., Pinto E., Colepicolo P.: *J. Braz. Chem. Soc.*, **20**, 1609-1616 (2009).
71. MacCrehan W. A., Schönberger E.: *Clin. Chem.*, **33**, 1585-1592 (1987).
72. Buratti S., Pellengrini N., Brenna O. V., Mannino S.: *J. Agr. Food Chem.*, **49**, 5136-5141 (2001).
73. Lee B. L., Ong C. N.: *J. Chromatogr. A*, **1216**, 3131-3137 (2009).