

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Estery karotenoidů v potravinách
a potravinových doplňcích**

Bakalářská práce

Anna Michalčíková

Školitel: RNDr. Radek Litvín, PhD.

Konzultant: RNDr. David Bína, PhD.

České Budějovice 2022

Michalčíková A., 2022: Estery karotenoidů v potravinách a potravinových doplňcích. [Esters of carotenoids in food and food supplements. Bc. Thesis, in Czech] – 42 p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Carotenoids are lipophilic dyes; their production is very important for photosynthetic processes as well as for tissue protection in leaves and as attractants in fruits. They are also crucial in human/animal nutrition for their antioxidant effects. Carotenoids can be found in plant and animal tissues both in free and esterified forms.

The main goal of this bachelor thesis was to establish the method of saponification of carotenoid extracts from fruits, food supplements and subsequent analysis of the presence of carotenoid esters by HPLC. Saponification was tested with sodium and potassium hydroxides. Content of carotenoid esters was detected in food samples and in selected food supplements with presumed high carotenoid content. Findings are discussed in terms of carotenoid uptake in human digestive tract.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích 13.04.2022

.....
Anna Michalčíková

Klíčová slova

Karotenoidy, estery, estery karotenoidů, saponifikace, β -karoten, lykopen, potravinové doplňky

Key words

Carotenoids, Esters, Esters of carotenoids, Saponification, β -caroten, lycopene, food supplements

Poděkování

Děkuji mému školiteli RNDr. Radku Litvínovi, PhD. za odborné vedení, cenné rady a ochotu při vypracování bakalářské práce. Dále bych chtěla velmi poděkovat RNDr. Davidu Bínovi, PhD. za pomoc s výsledky, velkou ochotu, odhodlání ve chvíli nouze a přátelský přístup. Také velmi děkuji prof. RNDr. Františku Váchovi, PhD. za pomoc při úpravě psaného textu, ochotu a vřelý přístup. V neposlední řadě děkuji své milé rodině a příteli za nekonečnou lásku a podporu.

Cíle práce

- Vypracovat rešerši na dané literární téma
- Zvládnout metody extrakce a analýzy karotenoidů z potravin a potravinových doplňků
- Otestovat a optimalizovat metodu saponifikace karotenoidů
- Analyzovat zastoupení esterů karotenoidů ve vybraných potravinách a potravinových doplňcích

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Karotenoidy	2
1.2 Vliv a účinky karotenoidů na lidské tělo	5
1.3 Vstřebávání karotenoidů v lidském těle	6
1.4 Estery karotenoidů	8
1.5 Vstřebávání esterů karotenoidů v lidském těle	9
1.6 Potraviny obsahující estery karotenoidů	10
1.7 Doplnky stravy	11
1.8 Metoda HPLC	12
2. Materiál a metody	13
2.1 Materiály, použité chemikálie a specifikace přístrojů	13
2.2 Příprava vzorků	16
2.3 Saponifikace	17
2.4 Metoda HPLC	18
3. Výsledky	19
3.1 Standardy karotenoidů	19
3.1.1 Smetánka lékařská	19
3.1.2 Rajče	21
3.2 Vliv délky extrakce na množství a stabilitu karotenoidů v extraktu	22
3.3 Optimalizace metody saponifikace	24
3.4 Analýza zastoupení esterů v sušených plodech	27
3.4.1 Šípek	27
3.4.2 Mandarinka	29
3.4.3 Další využití potravin	31
3.4.4 Procentuální zastoupení esterů karotenoidů	31
3.5 Potravinové doplňky s obsahem karotenoidů	32
4. Diskuse	34
5. Závěr	36
6. Použitá literatura	37
7. Seznam symbolů a zkratk	40
8. Přílohy	41
8.1 Příloha A	41
8.2 Příloha B	42

1. Úvod

Karotenoidy jsou lipofilní barviva vyskytující se ve významném množství zejména v rostlinách, a to jak v listech, tak i ve žlutých, oranžových a červených plodech. Komerčně jsou významné v zemědělství, potravinářském průmyslu, kosmetickém průmyslu, v široké veřejnosti jsou známé jako doplněk stravy s antioxidantními účinky (Cuttriss & Pogson, 2004). Role karotenoidů v těle člověka je rozmanitá. Mezi nejvýznamnější funkce patří tvorba vitamínu A, kterého jsou prekurzory a s tím související funkce opsinu v očích.

V přírodě se karotenoidy hojně vyskytují v esterifikované formě, kdy je k molekule karotenoidu připojen nepolární uhlíkový řetěz. Tyto modifikace zvyšují rozpustnost karotenoidů v tucích (nepolárních rozpouštědel) a snižují tak jejich výskyt ve vodných roztocích. Chemicky se karotenoidy řadí mezi isoprenoidy, jejich barva souvisí se systémem konjugovaných dvojných vazeb (Cuttriss & Pogson, 2004).

V běžné analytické laboratorní praxi se obvykle estery karotenoidů nejprve převádějí na základní karotenoidy a až poté následuje analýza vzorku. Informací o zastoupení, vlastnostech a funkci esterů karotenoidů je v literatuře poměrně málo. Tato bakalářská práce se věnuje studiu esterů karotenoidů, jejich identifikaci, výskytu v potravinách a potravinových doplňcích a potenciálu pro využití esterů ve výživě člověka a v medicíně.

Cílem práce byla analýza a srovnání obsahu karotenoidů ve vybraných vzorcích potravin a dostupných potravinových doplňcích před/po saponifikaci. Tato bakalářská práce slouží jako pilotní zavedení a optimalizace metody extrakce a saponifikace karotenoidů. Tyto metody byly aplikovány na analýzu obsahu karotenoidů a jejich esterů v potravinách a potravinových doplňcích. Výstupy z práce by mohly být využity ke studiu vstřebatelnosti karotenoidů a esterů karotenoidů na tkáňových strukturách s využitím lipidových nosičů, a tak blíže popsat vstřebatelnost těchto látek do organismu.

1.1 Karotenoidy

Karotenoidy jsou pigmenty terpenového typu, které jsou dobře rozpustné v tucích. Tyto pigmenty jsou v přirozené formě zastoupeny v ovoci, zelenině, rostlinách, fotosyntetických bakteriích či v houbách. Obsahují 8 lineárních symetricky uspořádaných isoprenových jednotek (Cuttriss & Pogson, 2004). Řetězec obsahuje řadu konjugovaných dvojných vazeb, které jsou zodpovědné za absorpci ve viditelném spektru elektromagnetického záření s variabilní barvu karotenoidů od žluté až po červenou. Čím více dvojných vazeb karotenoid obsahuje, tím více se barva přibližuje k vlnové délce červeného spektra (Khoo, 2011).

Živočichové, kromě specifického druhu mšic (Moran & Jarvik, 2010), nejsou schopni biosyntézy karotenoidů, proto je musí přijímat z potravy (Maoka, 2020). Fotosyntetické organismy (rostliny) a některé nefotosyntetické organismy (houby, bakterie) biosyntézy schopny jsou (Ruiz-Sola et al., 2012).

Dva funkčně odlišné druhy karotenoidů v rostlinách lze klasifikovat jako primární a sekundární. Primární karotenoidy jsou jedním z klíčových komponent fotosyntetického aparátu a jsou důležité pro přežití (Fiore et al., 2012), neboť mutantní rostliny bez těchto karotenoidů nepřežijí na světle (McCarthy et al., 2004). Sekundární karotenoidy se na fotosyntéze nepodílejí (Guedes et al., 2011).

Podle chemického složení se karotenoidy rozdělují do dvou skupin. i) Karoteny (např. β -karoten nebo lykopen) se skládají pouze z uhlíku a vodíku, ii) Xantofyly (např. lutein, zeaxanthin nebo violaxanthin), které v molekulové struktuře uhlovodík obsahují navíc ještě kyslík. (Saini et al., 2015).

Karotenoidy mají vliv na lidské tělo, a to především v prevenci před rakovinou, kardiovaskulárními onemocněními, arteriosklerózou, svalovou dystrofií a některými neurologickými onemocněními. Významnou funkci mají také jako antioxidanty. Pro správnou fyziologickou funkci organismu je nezbytná rovnováha mezi přijímanými volnými radikály a antioxidanty. Pokud volné radikály přemohou schopnost těla je regulovat, nastává stav známý jako oxidační stres. Volné radikály tak nepříznivě mění lipidy i proteiny a spouští řadu lidských onemocnění, proto konzumace potravy bohaté o antioxidanty může pomoci při zvládnutí tohoto oxidačního stresu a předcházet tím různým onemocněním (Lobo et al., 2010).

1.1.1. Lykopen

Lykopen je rostlinný karotenoid zodpovědný za načervenalé či narůžovělé zbarvení plodů (např. rajčat, grapefruitu, vodního melounu, guavy atd.). Jedná se o karotenoid spadající do skupiny uhlovodíkových karotenoidů – karotenů, obsahuje tedy výhradně uhlík a vodík (Story et al., 2010). Lykopen nemá funkci provitaminu A (Imran et al., 2020).

1.1.2. β -karoten

β -karoten (stejně jako α -karoten) funguje jako provitamin A (Grune et al., 2010).

Jako provitamin A se musí nejprve přeměnit na retinoidy, které jsou přímo využity k produkci biologicky aktivních retinoidových derivátů, nebo skladovány v těle pro pozdější využití (von Lintig, 2012). β -karoten působí také jako ochrana kůže před UV částí slunečního záření (Johnson, 2002).

1.1.3. Lutein

Lutein je xantofyl, který je bohatě zastoupen v říši rostlin, hub, bakterií či řas. Napomáhá při prevenci s věkem se spojujícím onemocněním očí (např. makulární degeneraci – macular eye disease), které může vést až k oslepnutí. Jedná se o tetraterpenový pigment vytvořený z 8 isoprenových jednotek obsahující prodloužený systém dvojných vazeb zodpovědný za jeho barvu více do červena a také za silnou antioxidantní aktivitu (Becerra et al., 2020).

1.1.4. Fukoxanthin

Fukoxanthin je xantofyl, který je široce rozšířen v hnědých mořských řasách. Je zodpovědný za jejich hnědý či tmavě zelený odstín (Nakazawa et al., 2009). Fukoxanthin má jedinečnou chemickou strukturu, která mu propůjčuje jeho biologické účinky. Má silnou antioxidantní kapacitu tím, že vycytává singletový molekulární kyslík a volné radikály, má protizánětlivé účinky (Bae et al., 2020).

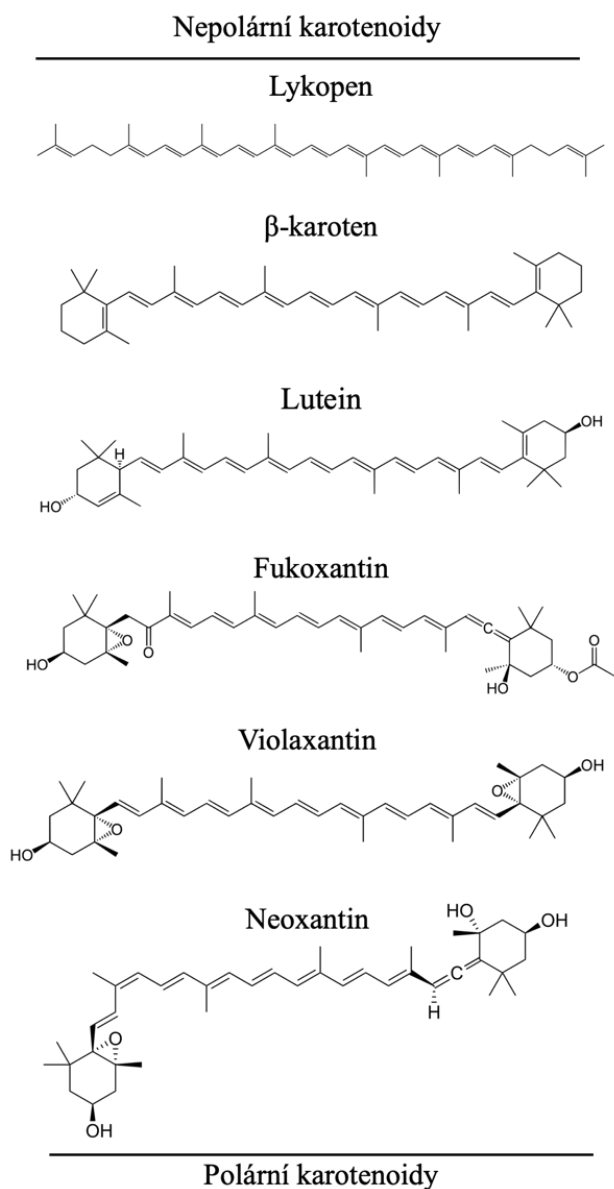
Studie prokázaly potenciální zdravotní přínosy fukoxanthinu při prevenci chronických onemocnění jako je diabetes mellitus, onemocnění jater či rakovina (Bae et al., 2020).

1.1.5. Violaxanthin

Violaxanthin je xantofyl, který je široce rozšířen v říši rostlin. Je specifický pro svůj oranžový odstín (Pugliese et al., 2014). Violaxanthin je v rostlinách zapojen do tzv. xantofylového cyklu, který chrání rostlinný fotosyntetický aparát při nadbytku světelného záření (Demmig-Adams, 1990).

1.1.6. Zeaxanthin

Zeaxanthin patřící do skupiny xantofylů je stejně jako violaxanthin zapojen do fotoprotektivního xantofylového cyklu rostlin (Demmig-Adams, 1990). Strukturně se jedná o izomer luteinu. Má příznivé účinky na lidské tělo, a to především díky jeho schopnosti blokovat volné radikály, antioxidačním účinkům či dokonce schopnosti snižovat v těle zánět. Zeaxanthin má pozitivní účinky na zdraví očí, kůže, jater a kardiovaskulárního systému (Murillo et al., 2019)



Obr.1 Karotenoidy rozdělené dle polarity (podle Saini et al., 2015).

1.2 Vliv a účinky karotenoidů na lidské tělo

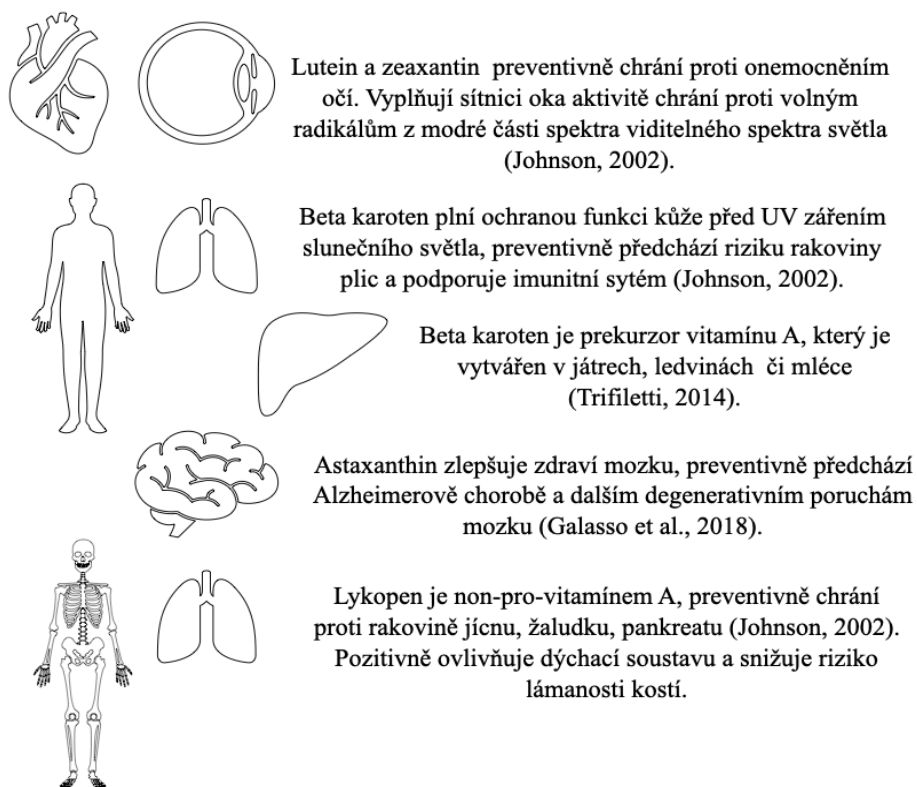
Pro lidské tělo je důležitá konzumace specifické diety obohacené o ovoce a zeleninu, která obsahuje specifické karotenoidy. Jednotlivé karotenoidy mají v lidském těle různé funkce a účinky (Bohn, 2018).

Konzumace na karotenoidy bohaté diety má značné benefity spojené s prevencí různých onemocnění, jako jsou kardiovaskulární a s nimi spojené srdeční choroby, rakovina, defekty nervové soustavy či šedý zákal a další onemocnění očí. Mezi bioaktivní složky potravy patří vedle karotenoidů řada dalších látek včetně vlákniny, která taktéž hraje významnou roli v prevenci různých onemocnění (Saini et al, 2015).

Člověk by si měl vybírat kvalitní potraviny z ověřených zdrojů, a to proto, že během doby zrání ovoce a zeleniny dochází postupně k přeměně chloroplastů na chromoplasty a postupnému úbytku volných karotenoidů (Mercadante et al., 2017).

Každý z karotenoidů má jiné účinky na tělo a jejich antioxidační potenciál je odlišný dle jejich biochemické struktury.

Z literatury je známo, že zelenina je na karotenoidy bohatší než ovoce, ale karotenoidy z ovoce jsou naproti tomu snadněji vstřebatelné, což souvisí s jejich biologickou dostupností (Saini et al., 2015).



Obr.2 Vliv a preventivní účinky jednotlivých karotenoidů na lidské tělo.

1.3 Vstřebávání karotenoidů v lidském těle

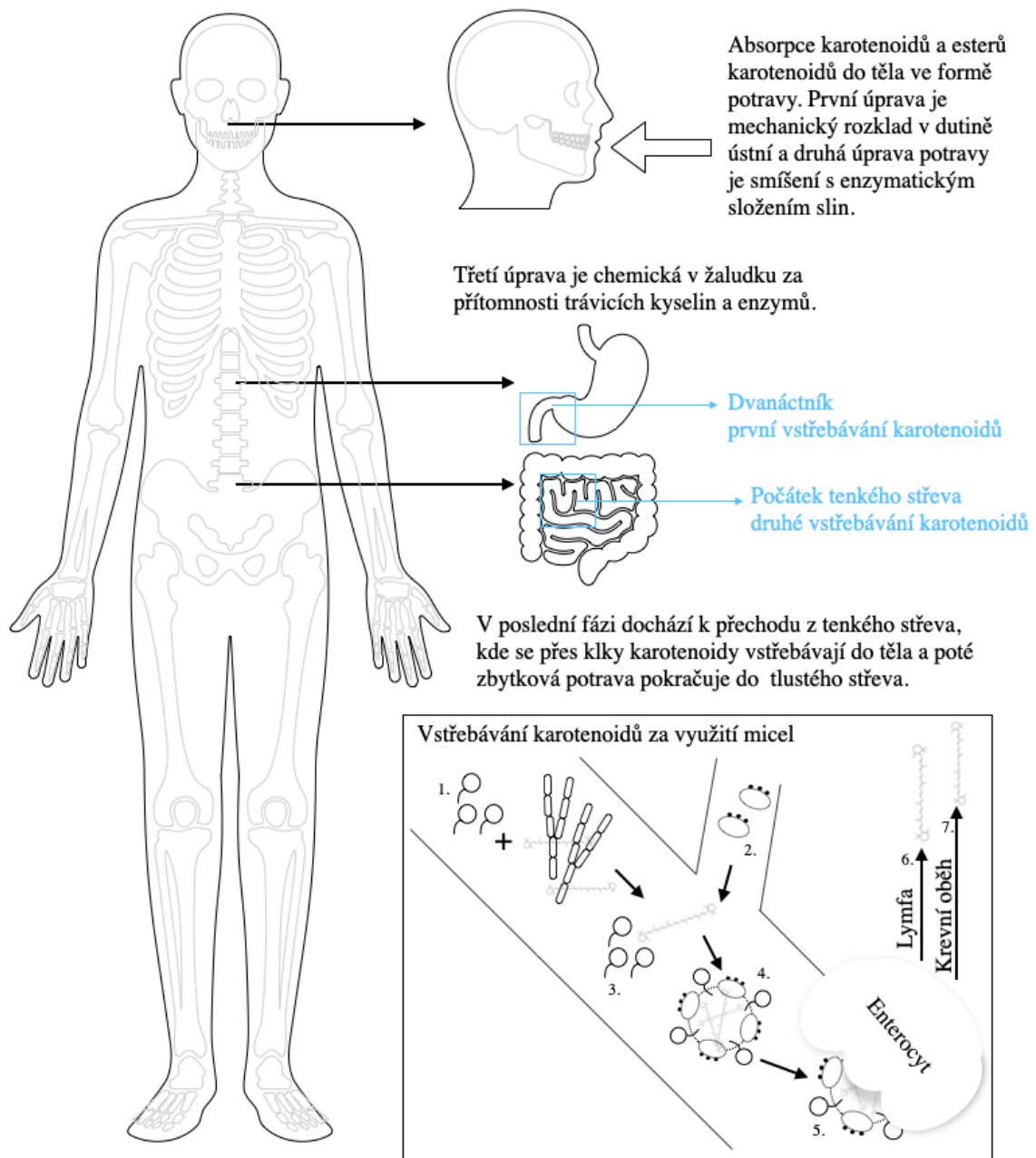
Karotenoidy jsou pigmenty rozpustné v tucích a díky nim také dobře vstřebatelné do těla. Karotenoidy se v lidském těle vyskytují volně, v esterifikovaných formách nebo v komplexech. Využívají transportní dráhy tuků k rozvodu po těle a také ke snazšímu vstřebání ve střevě, na což mají vliv části přijaté potravy a její složení. Při větším příjmu karotenoidů z potravy dochází ke snížení jejich vstřebávání, což funguje jako obranný mechanismus pro zachování rovnováhy v organismu, proto by měla být potrava vyvážená a pestrá. Tuky přijaté z potravy jsou rozkládány ve dvanáctníku a horní části tenkého střeva. Při aktivaci lipázy dochází k hydrolyzaci esterových vazeb tryacylglycerolů za vzniku mastných kyselin. Vznikají micely, jejichž části jsou následně vstřebávány do enterocytů (Meléndez-Martínez et al., 2019).

Příjem karotenoidů do organismu je popsán v Obr. 3, od absorpce až po samotné vstřebání karotenoidů do těla v tukových micelách. Ukazuje základní místa lidského těla fungujících v procesu mechanického i chemického zpracování potravy a procesu vstřebávání se všemi klíčovými složkami podílejícími se na zpracování karotenoidů a jejich vstřebání do těla.

Biologická dostupnost (bioavailability) závisí na množství karotenoidů přijímaných do těla, kde se využijí k fyziologickým funkcím organismu nebo jsou skladovány pro období nedostatku. Biologická přístupnost (bioaccessibility) závisí na poměrech přijatých karotenoidů, které jsou uvolněny z matrice jídla a začleněny do micel v gastrointestinálním traktu, a které jsou následně dostupné ke vstřebání ve střevě (Saini et al., 2015, Rodriguez-Amaya, 2015).

Účinnost vstřebávání karotenoidů z potravy se pohybuje mezi 5-50 %, na což mají vliv různé faktory jako je: dostupnost karotenoidů, tepelné zpracování, esterifikace některých složek stravy, přítomnost látek napomáhajících ke vstřebávání jako jsou lipidy, polysacharidy či minerály (Murillo et al., 2019).

Faktory ovlivňující vstřebatelnost karotenoidů souvisejí s biologickou dostupností a přístupností jsou: tepelné zásahy, strukturní bariéry (matrix a integrita buněčné stěny) a příjem lipidů z potravy, které jsou velmi podstatné pro vstřebávání v těle (Saini et al., 2015).



Obr.3 Místa úpravy potravy a vstřebávání karotenoidů za využití micel ve střevě (podle Saini et al. 2015)

1. Distribuce potravy, připojení karotenoidů na vlákninu ovlivňuje interakce karotenoidů s lipidy, 2. Uvolnění žlučových solí ze žlučového, 3. Narušení struktury potravy, 4. Příjem molekuly karotenoidů v kapénce lipidu a tvorba micel, 5. Vychytávání molekul karotenoidů do enterocytů, 6. a 7. Uvolnění molekuly karotenoidů do lymfy a krevního oběhu.

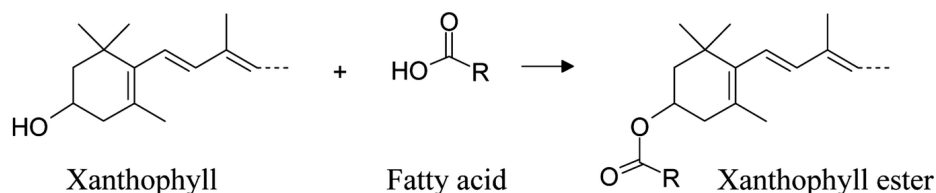
Karotenoidy a estery karotenoidů využívají k jejich snazšímu vstřebání do těla absorpčních drah lipidů, ve kterých jsou dobře rozpustné. Všechny mechanické i chemické způsoby rozkladu potravy pouze napomáhají k lepšímu rozdělení jednotlivých složek potravy, které jsou následně distribuovány po těle do místa jejich účinku.

1.4 Estery karotenoidů

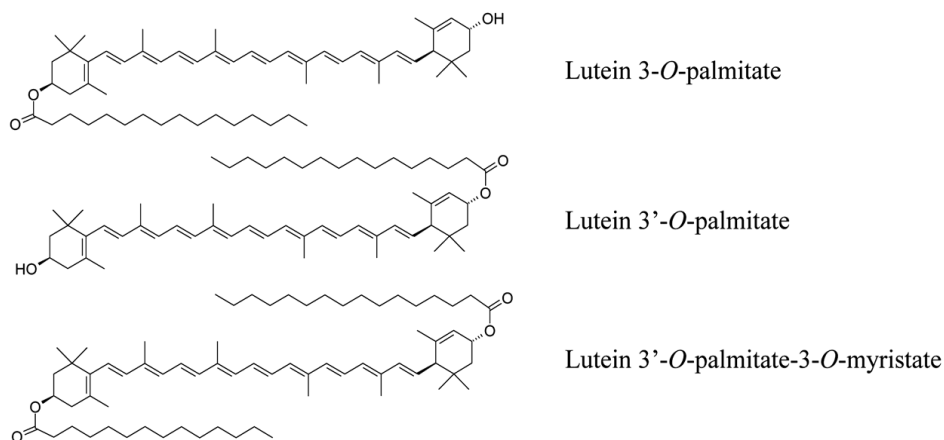
Jak již bylo zmíněno, karotenoidy se dělí na karoteny skládající se pouze z atomů uhlíku a vodíku, a na xantofyly, které kromě uhlíku a vodíku mají v molekule také kyslík jako součást funkční skupiny jako např.: hydroxyl, epoxid, karbonyl. Pro tvorbu esteru je důležitá hydroxylová skupina, esterová vazba se tvoří kondenzační reakcí hydroxyly karotenoidu s karboxylovou skupinou většinou mastné kyseliny. Karoteny a xantofyly bez hydroxylové skupiny tedy estery tvořit nemohou. Ovoce a zelenina obsahují xantofyly převážně v esterifikované formě (Mercadante et al., 2017).

Estery xantofylů se nachází v běžně konzumovaných potravinách, jako jsou jablka, meruňky, mandarinky, mango, papája, červené papriky, chilli papričky a brambory. Mezi další bohatší zdroje esterů karotenoidů se řadí kustovnice čínská (góji) či rakytník, které jsou v poslední době populární díky vysokému obsahu bioaktivních látek. Estery xantofylů si zachovávají antioxidantní kapacitu a mají lepší stabilitu v ovoci během skladování, a i při následném zpracování (Bunea et al., 2014).

Esterifikace (Obr. 4) probíhá přes hydroxylovou skupinu xantofylu, příklady xantofylových esterů jsou uvedeny na Obr. 5 (Meléndez-Martínez et al., 2019).



Obr. 4 Esterifikační reakce hydroxy skupinou v xantofylech s mastnou kyselinou (převzato z Meléndez-Martínez et al., 2019).



Obr. 5 Struktury esteru luteinu. Pokud má ester více hydroxylových skupin, dokáže navázat i více než jednu mastnou kyselinu (převzato z Meléndez-Martínez et al., 2019).

1.5 Vstřebávání esterů karotenoidů v lidském těle

Karotenoidy v lidském těle jsou získávány ve volné formě z potravy v kombinaci s dalšími látkami, jako jsou mastné kyseliny, cukry či proteiny. Xantofyly se v potravě běžně vyskytují ve formě esterů, především v ovoci. Tato modifikace ovlivňuje vlastnosti, jako je rozpustnost a náchylnost k oxidaci, což může mít vliv na hladinu jejich obsahu v potravinách a následně i v lidském těle a dále může ovlivňovat i jejich biosyntézu, depozici, stabilitu a biologickou dostupnost (Meléndez-Martínez et al., 2019).

Estery karotenoidů byly zaznamenány v plazmě, kůži a mlezivu, nicméně jejich hodnoty nebyly tak vysoké, jako u samotných karotenoidů (Meléndez-Martínez et al., 2019, Wingerath et al., 1998).

Karotenoidy lze v přírodě nalézt ve formě volné či konjugované s jinými molekulami za vzniku sulfátových esterů, glykosidů, glykosidových esterů, glykosilesterů a acylesterů. Nejrozšířenější formou konjugovaných karotenoidů obsažených v živých organismech jsou jednoznačně acylestery karotenoidů, tvořené středními (8-13 uhlíků) až dlouhými řetězci (14-20 uhlíků). Tyto estery se vyskytují v potravinách rostlinného i živočišného původu. Pro konkrétní xantofyl je diverzita odvozených esterů závislá i na počtu hydroxylových skupin (Meléndez-Martínez et al., 2019).

Esterifikace xantofylů činí estery lipofilnějšími a pozitivně tak ovlivňuje jejich vstřebávání a akumulaci, neboť zvýšená lipofilita může podporovat vylučování těchto látek z odumřelých pletiv chromoplastových struktur (van Wijk et al., 2017).

Hydrofobní vlastnosti xantofylových esterů napomáhají jejich vstřebávání a zvyšují tak celkovou dostupnost karotenoidů. Navíc jsou estery karotenoidů stabilnější než volné karotenoidy (Pérez-Gálvez et al., 2005).

Vstřebávání esterů karotenoidů probíhá identicky jako vstřebávání karotenoidů.

1.6 Potraviný obsahující estery karotenoidů

Většina zeleniny a ovoce obsahuje karotenoidy včetně esterifikovaných forem xantofylů. Během biosyntézy karotenoidů se xantofyly tvoří zavedením hydroxylových skupin do koncových kruhů karotenoidů v reakcích katalyzovaných hydroxylázami. Esterifikace xantofylů mastnými kyselinami je katalyzována esterázami (Mercadante et al., 2017, Schweiggert & Carle, 2017).

1.6.1 Žluté potraviny

Citrusové plody (pomeranče a mandarinky) obsahují volné, částečně esterifikované i plně esterifikované karotenoidy. Xantofylové estery se vyskytují i v citrusové šťávě (Mercadante et al., 2017, Giuffrida et al., 2010).

Jablka se vyskytují v různých odrůdách a zbarveních. Nachází se v nich především xantofylové diestery stejně jako volné karotenoidy β -karoten, lutein anebo violaxanthin v závislosti na barvě slupky (Mercadante et al., 2017, Delgado-Pelayo et al., 2014). V jablkách se žlutou slupkou se nachází jako hlavní karotenoid β -karoten. V jablkách s červenou a zelenou slupkou se jako hlavní karotenoid nachází izomer luteinu následovaný β -karotenem. (Mercadante et al., 2017, Delgado-Pelayo et al., 2014).

1.6.2 Oranžové potraviny

Papája se vyskytuje v různých barevných provedeních od červené po žlutou, 3 genotypy s různou dužinou vykazují malou kvalitativní diverzitu, hlavní odlišnosti jsou v obsahu lykopenu (Mercadante et al., 2017, Schweiggert et al., 2012). Spolu s karoteny se ve vzorku nachází i β -kryptoxanthin jak ve volné formě, tak hlavně jako ester s mastnou kyselinou (Mercadante et al., 2017, Schweiggert et al., 2012).

Mango má specifické složení xantofylových esterů s několika krátkými řetězci mastných kyselin (Mercadante et al., 2017, Pott et al., 2003). V mangu jsou obsaženy 3 hlavní karotenoidy: izomer violaxanthinu, violaxanthin a β -karoten (Pott et al., 2003).

Rakytník se vyskytuje v různých odrůdách. Ve vzorcích se nachází jako hlavní karotenoidy zeaxanthin, β -karoten a diestery zeaxanthinu a luteinu (Pop et al., 2014).

Maracuja obsahuje až 14 různých druhů karotenoidů. Nejhojnějšími jsou dva estery β -kryptoxanthinu a kryptokapsinu (Mercadante et al., 2017).

Meruňka obsahuje jako hlavní karotenoid β -karoten a další formy monoesterů i diesterů xantofylů, kdy jejich množství je poměrně nízké a proměnné (Kurz et al., 2008).

1.6.3 Červené potraviny

Jahody obsahují xantofyly převážně v esterifikované formě. Stupeň esterifikace se zvyšuje se zráním plodu a s tím jsou spojené i změny barvy ze zelené na červenou, a to z 88 % až na 95 % obsahu esterifikovaných xantofylů z celkového množství karotenoidů. Hlavními pigmenty obsaženými v jahodách jsou izomer violaxanthinu a violaxanthin (Mercadante et al., 2017, Delgado-Pelayo et al., 2016).

Malina na začátku zrání obsahuje nejvíce β -karotenu a volného luteinu, jehož množství se během dozrávání snižuje, zatímco dochází ke zvyšování obsahu esterů luteinu a fytoenu (Carvalho et al., 2013).

Šípek se vyskytuje v mnoha odrůdách. V plodech se nachází karoteny lykopen a β -karoten a estery řady xantofylů (Zhong et al., 2016). Mezi nejčastější patří rubixanthin, violaxanthin, lutein a zeaxanthin, avšak všechny jsou přítomné v relativně malém množství (Mercadante et al., 2017, Zhong et al., 2016).

1.7 Doplnky stravy

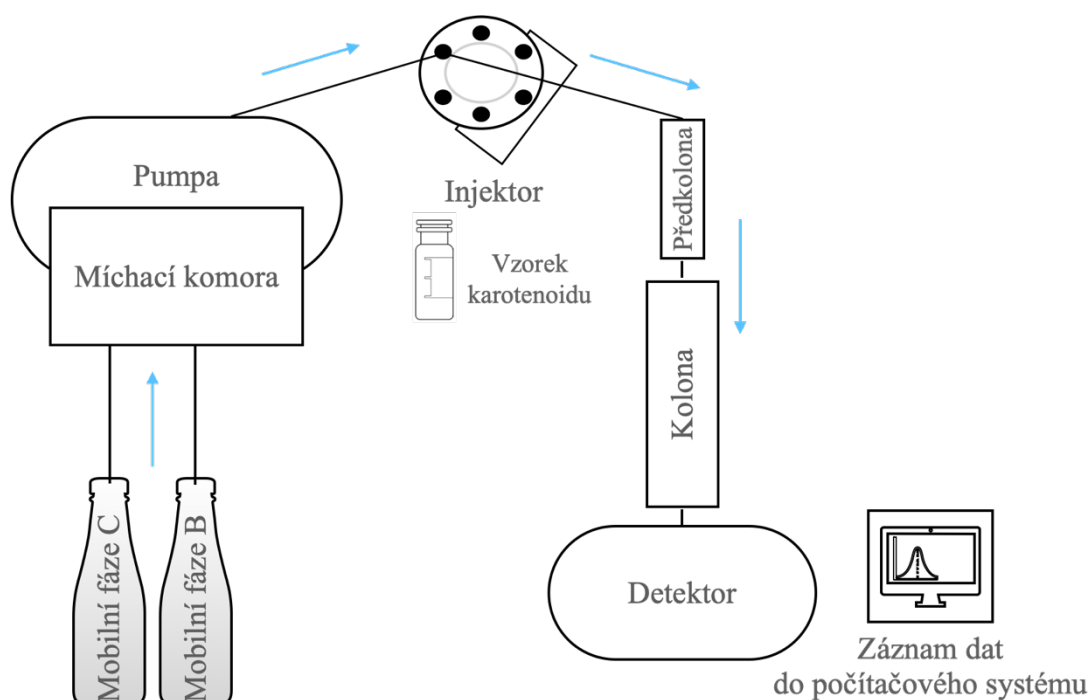
V současné době roste zájem o potravinové doplňky ve světě. Tyto doplňky stravy jsou důležité při nedostatečném příjmu určitých druhů potravin či pro doplnění chybějících látek při jejich nadměrné spotřebě nebo nedostatku v závislosti na fyziologickém stavu organismu. Doplnky stravy obsahují buď chemicky syntetizované látky nebo extrakty z ovoce či zeleniny (Mortensen, 2009). Lidské tělo nedokáže karotenoidy syntetizovat, proto je důležité je přijímat z potravy či potravinových doplňků (Eggersdorfer et al., 2018). Potravinové doplňky jsou snadnější a rychlejší na konzumaci, a proto jsou na trhu velmi rozšířené. Specifická dieta postavená tak, aby obsahovala vyvážené množství karotenoidů, vitamínů, proteinů, lipidů a cukrů, je však hlavní možností, jak přijímat dostatek živin a dalších esenciálních látek.

Vitamínové doplňky stravy jsou na trhu zastoupeny již desítky let, ale doplňky stravy neesenciálních látek (karoteny a xantofyly) se stávají žádanějšími až v posledních letech (Mortensen, 2009).

1.8 Metoda HPLC

HPLC neboli vysokoúčinná kapalinová chromatografie je jednou z analytických separačních metod využívaných v analytické chemii, která se běžně využívá k separaci různých molekul (Bélanger, 1997). Princip HPLC je separace vzorků rozpuštěných v mobilní fázi na koloně (stacionární fáze). Mobilní fáze unáší rozpuštěný vzorek skrz kolonu, kde se vzorek separuje na základě jeho interakcí se stacionární fází, která je ukotvena na tuhém nosiči. Jednotlivé frakce vzorku opouští kolonu v různých časech (Nováková, 2021). Doba, po které vzorek opouští kolonu, se nazývá eluční (retenční) čas.

Před samotnou analýzou dochází k injekci vzorku v automatickém injektoru. Mobilní fáze (rozpuštědla) jsou z rezervoárů přivedeny na kolonu pomocí soustavy vysokotlakých pump nebo směšovače, který umožňuje programované změny složení mobilní fáze – gradient. Důležitou částí každého HPLC je detektor, který je umístěn za kolonou. Detektor analyzuje vzorky eluované z kolony. Data získaná z detektoru jsou posílána do počítačového systému, který data registruje a zobrazuje ve formě chromatogramu (Bélanger, 1997). Schéma jednotlivých částí HPLC je na Obr. 6.



Obr.6 Hlavní komponenty HPLC (podle Bélanger, 1997).

2. Materiál a metody

2.1 Materiály, použité chemikálie a specifikace přístrojů

Potraviny a další přírodní zdroje biologicky aktivních látek analyzované v této práci lze rozdělit na lyofilizované (mrazem sušené), sušené a čerstvé. Lyofilizované potraviny jsou zastoupeny malinou, mandarinkou, mangem a melounem. Ze sušených potravin byl analyzován šípek. Čerstvé potraviny byly zastoupeny slupkou z rajčete (vysušená pouze ve vakuu po dobu 3 dnů), mochyňi peruánskou (physalis), ginkgem bilobou a listem ze smetánky lékařské. Vedle toho byly analyzovány některé doplňky stravy, jako jsou kapsle β -karotenu, Herba-C, Grepofit, Ocutein, Spirulina a Chlorella.

Tab. I.: Přehled materiálu analyzovaného v této práci.

<i>Název</i>	<i>Typ</i>	<i>Výrobce/zdroj</i>
Šípek	Plod celý sušený	Grešík Valdemar, Natura s.r.o.
Mandarinka	Plod mrazem sušený (lyofilizovaný)	Natural Jihlava, JK s.r.o.
Malina	Plod mrazem sušený (lyofilizovaný)	Bezva müsli, Bezva zdraví s.r.o.
Vodní meloun	Plod mrazem sušený (lyofilizovaný)	Natural Jihlava, JK s.r.o.
Mango	Plod mrazem sušený (lyofilizovaný)	Natural Jihlava, JK s.r.o.
Physalis	Čerstvý plod sušený ve vakuu	Bez informace o výrobci
Rajče	Slupka čerstvého plodu sušená ve vakuu	Bez informace o výrobci
List Ginkgo biloba	Čerstvý list	Sebráno autorkou v červnu 2021 pod stromem před budovou fakulty
List smetánky lékařské	Čerstvý list, nevysušený	Sebráno autorkou v červnu 2021 v zahradě před budovou fakulty
β -karoten	Kapsle ze želatiny se sójovým olejem	Dr. Max a.s.
Herba-C	Spékané tablety	Walmark a.s.
GREPOFIT	Kapsle ze želatiny s mastnými kyselinami	Energy Czech Republic a.s.
Ocutein	Kapsle ze želatiny s rybím olejem	Dr.Max a.s.
Spirulina	Lisované tablety	Topnatur s.r.o.
Chlorella	Lisované tablety	Topnatur s.r.o.

Tab. II.: Specifikace HPLC zařízení, které bylo využito k analýzám v této práci.

<i>Specifikace zařízení</i>			
Separáční modul a řídící jednotka	HPLC Waters E2695	Separation module	
Detektor	Waters 2998 PDA		
Předkolona	Nova-Pak® C18 4µm Waters (USA) 3.9x20 mm		
Kolona	Nova-Pak® C18 4µm Waters (USA) 3.9x300 mm		
<i>Využit spotřební materiál pro HPLC</i>			
Vialky	řr sklo, 2 mL	Agilent Technologies	Part No.: 5190-9100
Inserty	Skleněn, 250 µL s polymerovou nohou	Agilent (USA)	Part No.: 5181-1270
Víčka	PTFE, 9 mm	Agilent Technologies	Part No.: 5190-9067
Software pro analýzu dat	Empower® 3	Waters Corporation	
<i>Spotřební materiál</i>			
Mikrozkumavky	Safe-Lock Tubes 1,5 mL, PCR clean, polypropylen	Eppendorf	Part No.: 0030 123.328
Filtry	PTFE filtry o porozitě 0,2 µm, 4 mm Ø	Syringe Filters, OlimPeak, Teknokroma	TR-200640
Špičky na pipetu	1000 µL Tips, Graduated	Vertex, SSIbio, USA	4330N00

Tab. III.: Přehled chemikálií použitých v této práci.

<i>Chemikálie</i>	<i>Chemické vzorce</i>	<i>Kvalita</i>	<i>Výrobce/Dodavatel</i>
Acetonitril	C_2H_3N	p.a.	SIGMA-ALDRICH
Dichlormethan	CH_2Cl_2	p.a.	SIGMA-ALDRICH
Diethylether	$C_4H_{10}O$	bezvodý, 99,8 %	SIGMA-ALDRICH
Deionizovaná voda	H_2O		Smart2Pure 6, Thermo Scientific
Ethylacetát	$C_4H_8O_2$	HPLC	VWR Chemicals BDH
Hydroxid draselný (šupiny)	KOH	p.a.	Lach-Ner s.r.o.
Hydroxid sodný (perly)	NaOH	p.a.	Lach-Ner s.r.o.
Chlorid sodný	NaCl	p.a.	Lach-Ner s.r.o.
Methanol	CH_3OH	HPLC gradient grade	Fisher Scientific
Pyrogallol	$C_6H_6O_3$	ACS reagent	SIGMA-ALDRICH

2.2 Příprava vzorků

Přehled zkoumaných vzorků byl zapsán do tabulky (Tab. I.). HPLC aparatura a použitý spotřební materiál byly zapsány v tabulce (Tab. II.). Použité chemikálie byly specifikované v tabulce (Tab. III.). Příprava vzorků pro extrakci byla odlišná u lyofilizovaných vzorků a u čerstvých vzorků listů.

Lyofilizované vzorky byly homogenizovány v třecí misce, až byl vytvořen jemný prášek. Karotenoidy byly extrahovány ze získaných homogenátů s pomocí dichlormethanu (DCM). K 0,2 g homogenátu bylo přidáno 0,5 ml DCM inkubováno po dobu 60 minut, ve tmě při pokojové teplotě. Po extrakci byla směs centrifugována 2 minuty při 14100×g. Před nástřikem do HPLC systému byly všechny vzorky filtrovány PTFE filtrem o porozitě 0,2 μm. U sušených vzorků byla vyzkoušena i extrakce při nižší teplotě. Do plastové mikrozkušavky bylo přidáno 0,2 g drceného vzorku bylo z třecí misky, k němu bylo přidáno 0,5 ml DCM. Směs byla protřepána a inkubována při ~ 5 °C, ve tmě. Po centrifugaci a vysušení proudem plynného dusíku 4.0 bylo získáno 0,6 mg pigmentu. Před nástřikem bylo k tomuto množství přidáno 0,3 ml kombinace rozpouštědel odpovídající mobilní fázi C (methanol a ethylacetát v poměru 68:32 (V/V)).

Čerstvý vzorek byl homogenizován v třecí misce při objemu 0,2 g s přidáním 1 ml rozpouštědla DCM a brusného prášku (Carborundum, Augusta labor, středně hrubý, AL 171/50). Směs byla důkladně homogenizována v šeru po dobu 10-15 minut. Homogenát byl centrifugován po dobu 2 min při 14100×g, přefiltrován PTFE filtrem o porozitě 0,2 μm a následně vysušen proudem plynného dusíku 4.0 (čistota ≥ 99,99 %). Do vysušeného vzorku bylo přidáno 0,3 ml kombinace rozpouštědel odpovídající mobilní fázi C (methanol a ethylacetát v poměru 68:32 (V/V)). Následně byl vzorek analyzován na HPLC.

2.3 Saponifikace

Vysušený vzorek směsi extrahovaných karotenoidů byl rozpuštěn v mikrozkušné vialce v 0,5 ml etheru a do směsi bylo přidáno 0,5 ml saponifikačního činidla. Vzorek byl důkladně promíchán a inkubován ve tmě po různou dobu.

Saponifikace byla provedena s různými hydroxidy a jejich koncentracemi (KOH 5 %, 10 %, 40 % a NaOH 10 %) a s různou dobou inkubace, a to 15 min, 1 hodina a týden. Na začátku inkubace byl vzorek intenzivně protřepán.

Při testování vlivu přítomnosti antioxidantu bylo 126 mg pyrogallolu nejprve rozpuštěno v 0,5 ml etheru (výsledná koncentrace pyrogallolu byla 0,2 mM) (Toomey et al., 2007) a následně byl tento roztok převeden pomocí pipety do nádoby s vysušeným extraktem karotenoidů. Po rozpuštění karotenoidů byl do tohoto roztoku následně přidán hydroxid a vzorek byl ponechán 15 minut ve tmě při pokojové teplotě.

Po uplynutí zvoleného času saponifikace byl vzorek centrifugován po dobu 2 min při 14100×g, přenesen do dělicí nálevky a ke směsi bylo přidáno 4-5 ml roztoku 10 % NaCl. Po oddělení fází byla spodní fáze odstraněna a vzorek v dělicí nálevce byl opakovaně omýván 4-5 ml deionizované vody. Hodnoty pH spodních vodných fází z omývání byly měřeny pomocí univerzálních indikátorových papírků (Lach-Ner s.r.o., pro hodnoty pH 0-12). Po posledním omytí byla etherová frakce s pigmenty vysušena proudem plynného dusíku 4.0. Vysušený vzorek byl následně převeden do 0,3 ml kombinace rozpouštědel odpovídající mobilní fázi C (methanol a ethylacetát v poměru 68:32 (V/V)).

Použitá metoda saponifikace je blíže popsána v příloze 8.1. Příloha A, Saponifikace vzorků s obsahem esterů karotenoidů (převzato z knihy *Plant Pigments and their Manipulation* (Oyvind et al., 2004)).

2.4 Metoda HPLC

Pigmentové složení vzorků bylo analyzováno na HPLC sestavě Alliance od firmy Waters, která se skládala z modulu Waters e2695 a PDA detektoru Waters 2998 s použitím kolony s reverzní fází (Nova-Pak C18 Column, 60Å, 4 µm, 3.9 mm × 300 mm). K eluci byl použitý gradient mobilních fází B a C o složení: B – acetonitril, methanolu, voda v poměru 72:8:3 (V/V/V) a C – methanol, ethylacetát v poměru 68:32 (V/V). Průtok byl nastaven na 1 ml/min. Nastavení gradientu je znázorněné v Tabulce IV. Metoda je založena na metodě publikované pro analýzu pigmentů z mořských řas (Jeffrey et al., 2005), nicméně pro separaci silně nepolárních esterů karotenoidů bylo nutné prodloužit dobu eluce až na 40 minut.

Tabulka (Tab. IV.): Použitý gradient HPLC, průtok byl 1 ml za minutu. Složení mobilních fází je uvedeno v textu.

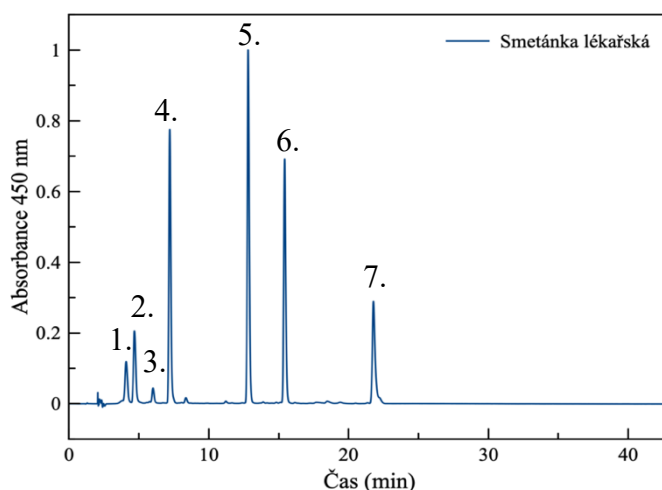
<i>Čas</i>	<i>Průtok</i>	<i>% B</i>	<i>% C</i>
0 minuta	1.00	100 %	0 %
1 minuta	1.00	96 %	4 %
13 minuta	1.00	30 %	70 %
20 minuta	1.00	0 %	100 %
40 minuta	1.00	0 %	100 %

3. Výsledky

3.1 Standardy karotenoidů

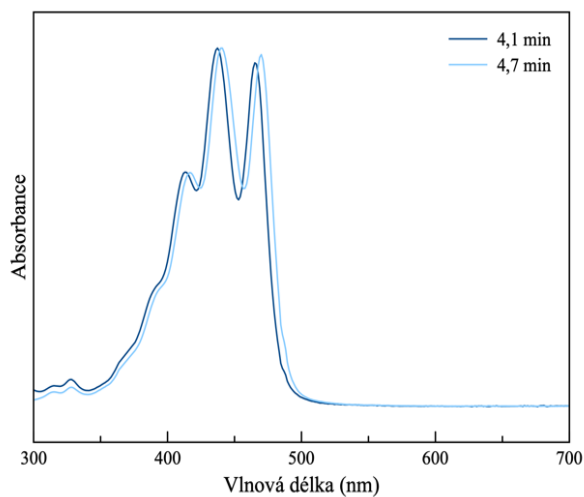
3.1.1 Smetánka lékařská

Extrakt z listu smetánky lékařské byl využit jako standard pro fotosyntetické karotenoidy violaxanthin, neoxanthin, anteraxanthin, lutein a β -karoten. HPLC chromatogram extraktu pigmentů z listu smetánky lékařské je na Obr. 7 a spektra jednotlivých karotenoidů obsažených ve vzorku jsou na Obr.8-11. Hlavní pigmenty byly identifikovány v extraktu podle retenčních časů a absorpčních spekter srovnáním s literaturou (Havaux & Kloppstech, 2001, Bungard et al., 1999). Retenční časy a maxima absorbance jsou obsaženy v Tab. V. Na chromatogramu je vidět 7 hlavních píků mezi 4,1 min až 21,7 min, ze kterých jsou 2 chlorofyly (píky u 12,8 min a 15,4 min) a 5 karotenoidů. Poslední karotenoid je detekován β -karoten při 21,7 minutě.

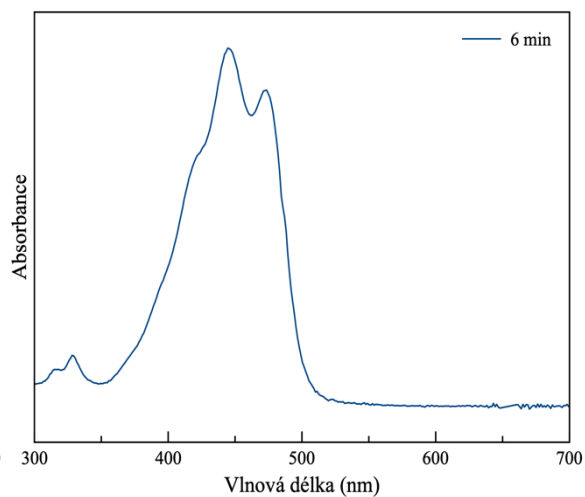


Obr. 7: HPLC chromatogram pigmentů extrahovaných z listu smetánky lékařské.

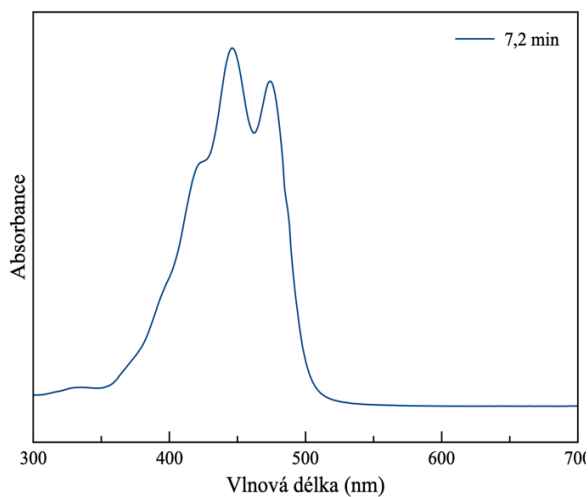
1. Neoxanthin
2. Violaxanthin
3. Anteraxanthin
4. Lutein
5. Chlorofyl b
6. Chlorofyl a
7. β -karoten



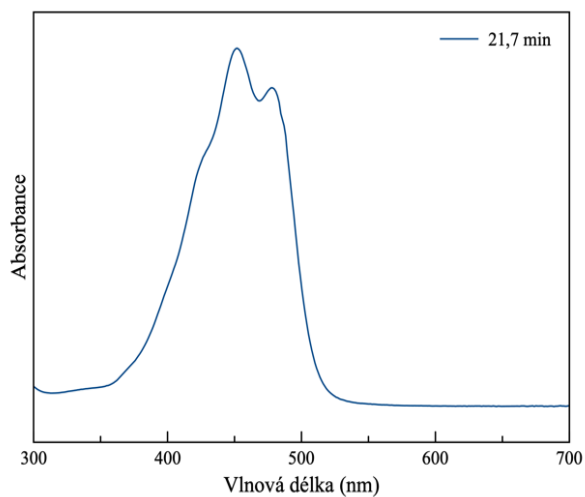
Obr. 8: Spektrum violaxanthinu 4,1 min a neoxanthinu 4,7 min.



Obr. 9: Spektrum anteraxanthinu 6,0 min.



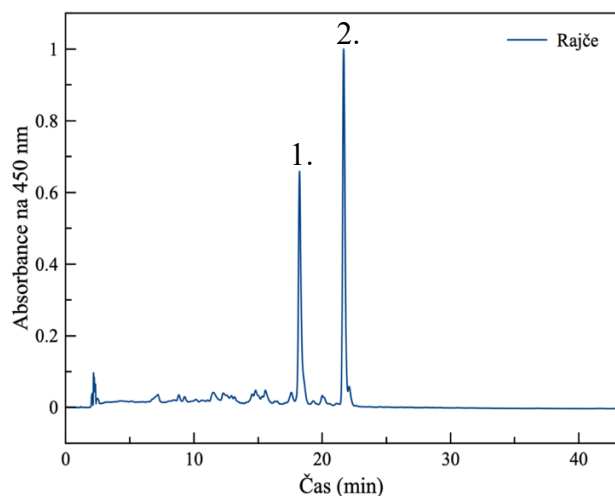
Obr. 10: Spektrum luteinu 7,2 min.



Obr. 11: Spektrum β -karotenu 21,7 min.

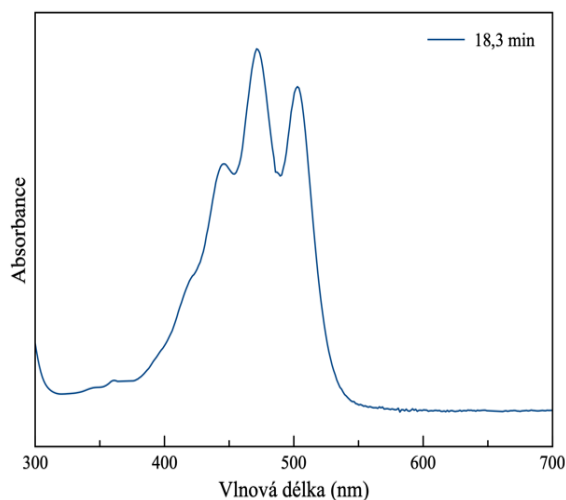
3.1.2 Rajče

Extrakt ze slupky plodu rajčete byl využit jako standard pro lykopen, který tvoří hlavní složku karotenoidů rajčete spolu s β -karotenem (Agarwal et al., 2000, Merlene et al., 2012). HPLC chromatogram extraktu pigmentů ze slupky rajčete je na Obr. 12 a spektrum pro nás důležitého karotenoidu lykopenu obsaženého ve vzorku rajčete použitého pro další identifikaci karotenoidu u jiných vzorků je na Obr. 13. V chromatogramu jsou přítomny dva hlavní píky, které byly identifikovány podle retenčních časů a absorpčních spekter jako lykopen (18,3 min) a β -karoten (Daood et al., 2014). Retenční časy a maxima absorbance jsou obsaženy v Tab. V.



Obr. 12: HPLC chromatogram extraktu pigmentů ze slupky plodu rajčete.

1. Lykopen
2. β -karoten



Obr. 13: Spektrum lykopenu z analýzy slupky rajčete.

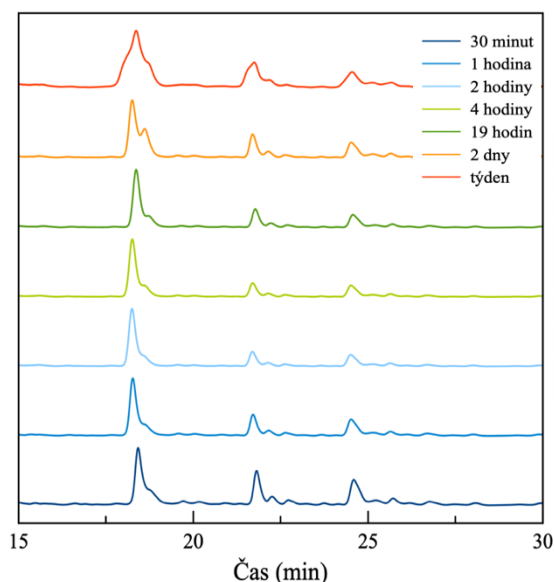
Tabulka (Tab. V.): Referenční karotenoidy ze vzorku listu smetánky lékařské a slupky plodu rajčete s retenčními časy a maximy absorbance.

<i>Referenční karotenoidy</i>	<i>Retenční čas</i>	<i>Maxima absorbance</i>
Neoxanthin	4,1 min	437.3, 465.2
Violaxanthin	4,7 min	439.7, 470
Anteraxanthin	6,0 min	444.5, 473.6
Lutein	7,2 min	445.8, 473.6
Lykopen	18,3 min	472.4, 502.8
β -karoten	21,7 min	451.8, 477.3

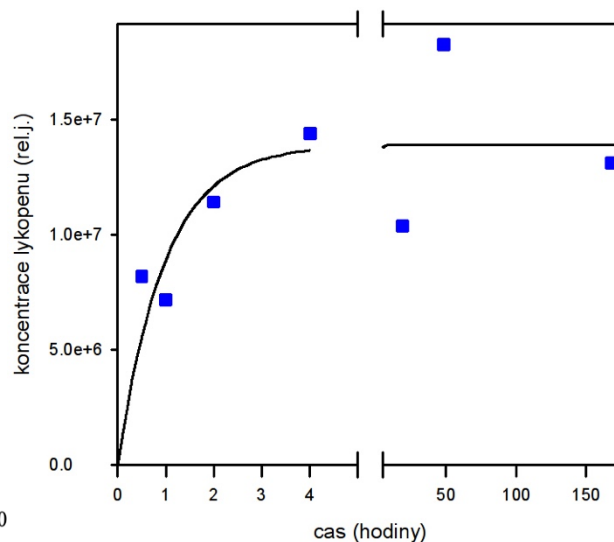
3.2 Vliv délky extrakce na množství a stabilitu karotenoidů v extraktu

Délka extrakce byla vyzkoušena u vzorku šípku, který byl extrahován po dobu 30 minut, 1 hodiny, 2 hodin, 4 hodin, 19 hodin, 2 dnů a 1 týden. Chromatogramy extraktů jsou na Obr. 14. Extrakt pigmentů z šípku obsahuje tři hlavní píky, které jsme identifikovali jako lykopen v 18,6 minutě, β -karoten v 21,8 minutě a ester rubixanthinu ve 24,5 minutě. Jak ukazuje Obr. 15, doba extrakce 2 hodiny dostačovala na extrahování zhruba 90 %. Obsah karotenoidů se s přibývajícím časem zvyšoval, ale docházelo ke tvorbě cis forem karotenoidů, lykopen ve srovnání s cis lykopenem je ukázán na Obr. 16. Cis konformace karotenoidu se vyznačuje absorpčním maximem přibližně 340 nm (Zhong et al., 2016), má jiný eluční čas. All-trans konformace karotenoidů je častější než cis konformace.

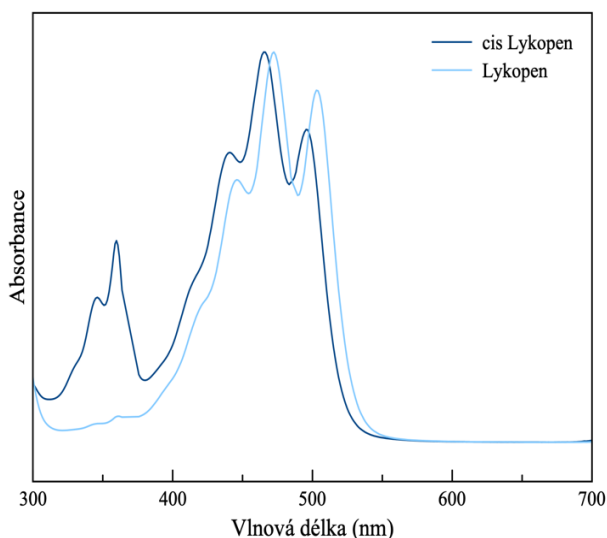
S časem přibývá množství cis formy karotenoidů, což je ukázané na Obr. 17. Světle modrý chromatogram ukazuje extrakci trvající 2 dny a tmavě modrý chromatogram ukazuje extrakci trvající 60 minut. Oba chromatogramy ukazují 3 píky v 18,6 minutě lykopen, ve 21,8 minutě β -karoten a ve 24,5 minutě ester rubixanthinu. Při srovnání obou chromatogramů extraktů (60 min a 2 dny) je zřetelné, že u píku v 18,6 minutě lykopenu dochází k růstu bočního píku, což by mohlo znamenat, že dochází k izomerizaci.



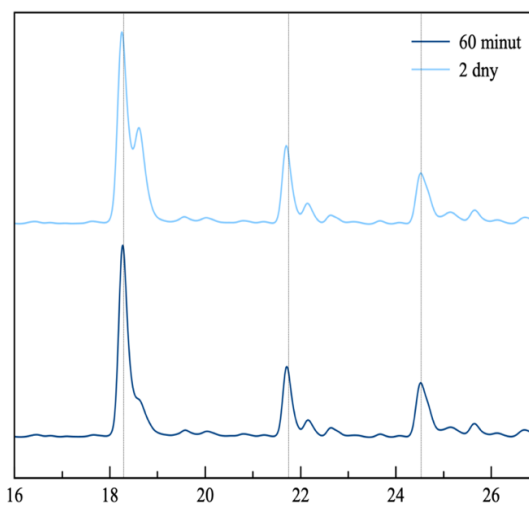
Obr. 14: HPLC chromatogram sedmi extraktů ze vzorku šípku v různých délkách extrakce.



Obr. 15: Graf zobrazující průběh extrakce lykopenu (první pík 18,6 min) v čase (body). Data byla proložena exponenciální funkcí (čára).

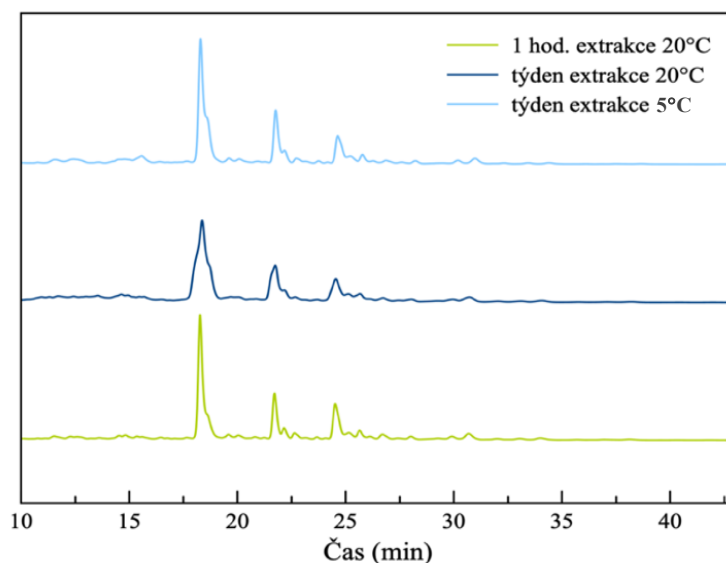


Obr. 16: Spektrum lykopenu při extrakci dlouhé 60 min., a spektrum cis lykopenu při extrakci dlouhé 2 dny z 18,6 minuty.



Obr. 17: HPLC chromatogram dvou extraktů ze šípku. Tmavě modrá ukazuje extrakci dlouhou 60 min., světle modrá ukazuje extrakci dlouhou 2 dny.

Protože s delší dobou extrakce docházelo k izomerizaci karotenoidů v extraktu, byla extrakce vyzkoušena za pokojové teploty a v chladu ($\sim 5\text{ }^{\circ}\text{C}$), chromatogramy extraktů jsou na Obr. 18. Při týdenní extrakci v pokojové teplotě došlo k ztelné izomerizaci zejména píku u 18,6 min (lykopen). Chromatogram vzorku extrahovaného v chladu je podobný chromatogramu extraktu po dobu 1 hodiny v pokojové teplotě. Za nižší teploty tedy týdenní vzorek netvořil izomery tak rychle, jako vzorek extrahovaný v pokojové teplotě. Pro další práci byly využity hodinové extrakty za pokojové teploty, kvůli plánování práce a návaznosti experimentů.



Obr. 18: HPLC chromatogram tří extrakcí vzorku šípku při pokojové teplotě a v chladu.

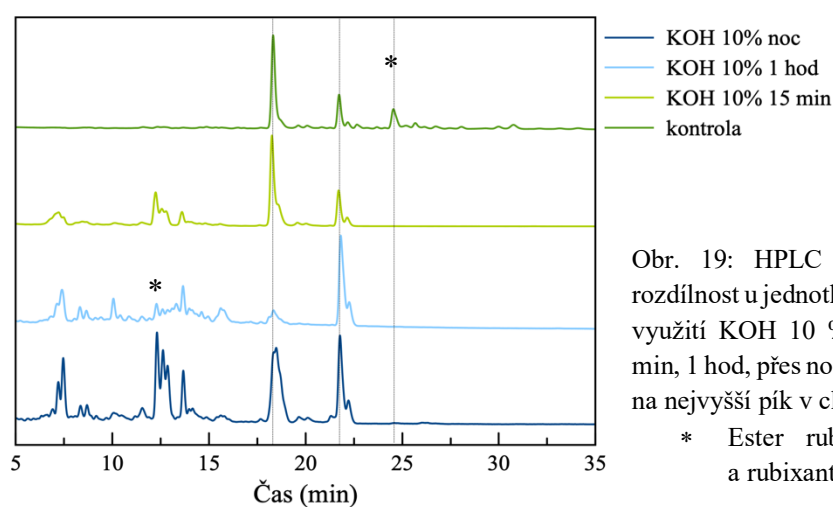
3.3 Optimalizace metody saponifikace

Byly vyzkoušeny různé metody saponifikace s hydroxidy o různých koncentracích (KOH 5 %, KOH 10 %, KOH 40 % a NaOH 10 %) a s různou délkou reakce (15 minut, 1 hodina a přes noc). Vzorek šípku obsahuje 2 karotenoidy a jeden ester karotenoidu. Karotenoidy by měly zůstat po saponifikaci v nezměněné formě, 18,6 minuta je lykopen a 21,8 minuta je β -karoten. V chromatogramu se úspěšná saponifikace projeví zmenšením pásu esteru rubixanthinu z 24,5 minuty a objeví se pík se stejným spektrem s kratším elučním časem.

Výsledky analýz saponifikovaných vzorků šípku jsou na Obr. 19, 21, 22. Na Obr. 19 můžeme vidět chromatogram, který ukazuje kontrolu (tmavě zelená), saponifikaci s hydroxidem KOH 10 % na 15 minut (světle zelená), na 1 hodinu (světle modrá) a po dobu 12 hodin (tmavě modrá). Vzorek ponechaný v KOH 10 % na 15 minut obsahuje 5 zřetelných píků. Vzorek ponechaný v KOH 10 % na 1 hodinu obsahuje 15 píků. Vzorek ponechaný v KOH 10 % na 12 hodin obsahuje 16 píků.

Tabulka (Tab. VI.): Přehled testovaných metod saponifikace

	15 minut	1 hodina	přes noc
KOH 5 %	×		
KOH 10 %	×	×	×
KOH 40 %		×	×
NaOH 10 %		×	×

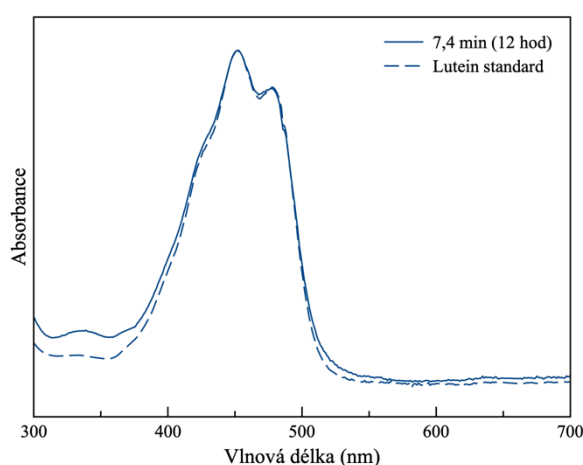


Obr. 19: HPLC chromatogramy ukazující rozdílnost u jednotlivých druhů saponifikací za využití KOH 10 % v rozdílných časech (15 min, 1 hod, přes noc). Píky jsou normalizované na nejvyšší pík v chromatogramu.

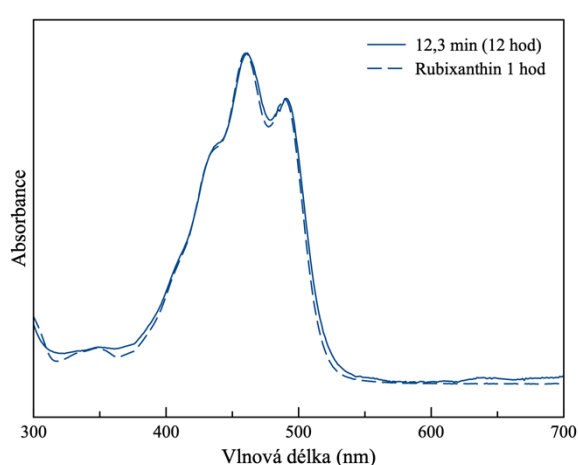
* Ester rubixanthinu v 24,5 minutě a rubixanthin v 12,3 minutě

Spektra z chromatogramu ukazující saponifikaci s KOH 10 % po dobu 12 hodin (tmavě modrá na Obr. 19). Obr. 20, 21, 22 ukazují 3 nové píky v časech 7,4 minuty (lutein), 12,3 minuty (rubixanthin) a 13,7 minuty. Pík z 7,4 minuty a 13,7 minuty jsou nové karotenoidy, které vznikly pravděpodobně zničením lykopenu. Pík lykopenu z 18,6 minuty se zmenšil v porovnání s β -karotenem, který byl v kontrole podstatně menší než lykopen.

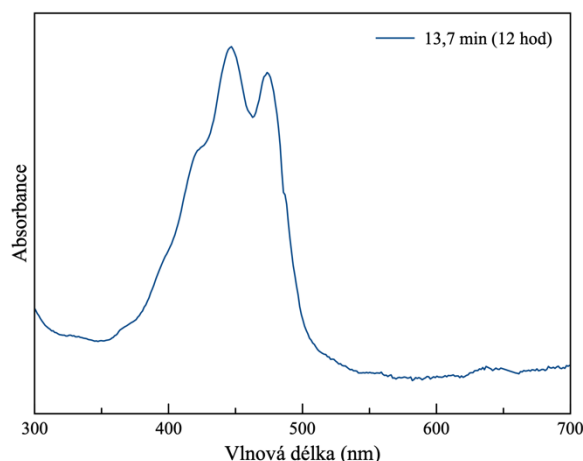
Očekávalo se, že 1 ester rubixanthinu dá vzniku 1 karotenoidu rubixanthinu v jiném retenčním čase metody po saponifikaci. Během saponifikace lykopen v 18,6 minutě degradoval a objevilo se velké množství píků v elučním rozmezí od 5-15 minut se spektry posunutými ke kratším vlnovým délkám (proti lykopenu), což naznačuje zkrácení systému konjugovaných vazeb, produkty lykopenu se mohly podílet na dalším vzniku karotenoidů.



Obr. 20: Spektrum luteinu z 7,4 minuty z 12 hod. extrakce šípku ve srovnání se standardem luteinu získaného ze smetánky lékařské.



Obr. 21: Spektrum rubixanthinu z 12,3 minuty z 12 hod. extrakce šípku ve srovnání s rubixanthinem získaným z 1 hod. extrakce.

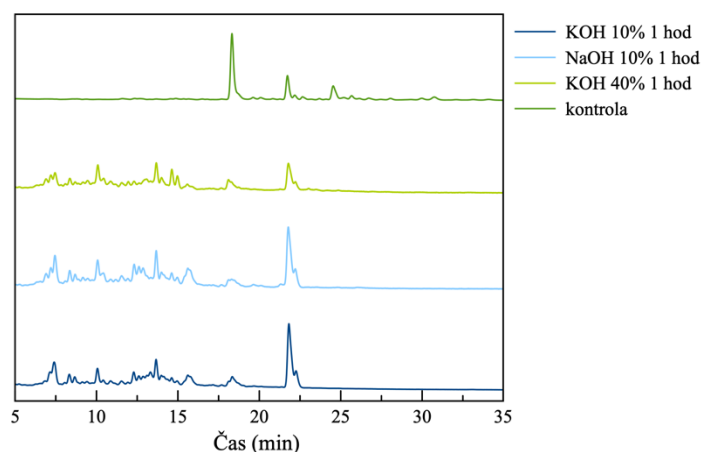


Obr. 22: Spektrum karotenoidu z 13,2 min z 12 hod. extrakce šípku.

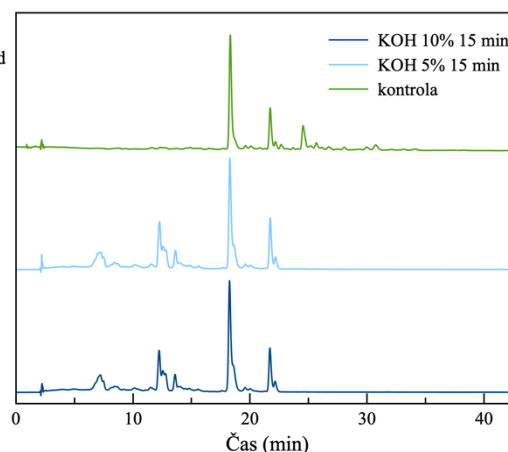
Z toho důvodu bylo rozhodnuto, vyzkoušet jiné časy saponifikace a také jiné koncentrace hydroxidu, aby nedocházelo ke ztrátě lykopenu ve vzorku.

Obr. 23 ukazuje chromatogram s účinkem různých hydroxidů (KOH 10 %, NaOH 10 % a KOH 40 %) v čase 1 hodiny. Všechny vzorky na grafu ukazují vznik velkého množství různých rozpadových produktů s elučními časy pod 17 minut, které jsou vidět opět proto, že lykopen v 18,6 minutě zmizel. Došlo opět ke zkrácení jeho konjugovaného systému. Chromatogram KOH 10 % na 1 hodinu (světle zelená) obsahuje 19 píků, jedná se o nepřehledný chromatogram. Chromatogram NaOH 10 % na 1 hodinu (světle modrá) obsahuje také 19 píků. Chromatogram KOH 40 % na 1 hodinu (tmavě modrá) obsahuje 18 píků, jedná se o nepřehledný chromatogram, kde většina píků obsahuje velmi nízké koncentrace.

Obr. 24 ukazuje chromatogramy kontroly (tmavě zelená), KOH 5 % na 15 minut (světle modrá), KOH 10 % na 15 minut (tmavě modrá). Účinek obou saponifikací byl srovnatelný.



Obr. 23: HPLC chromatogram ukazující všechny využitě hydroxidy pro saponifikaci (Oyvind et al., 2004, Toomey et al., 2007).



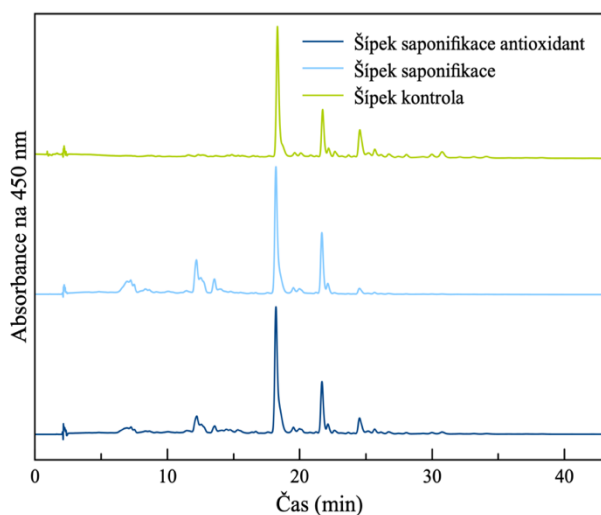
Obr. 24: HPLC chromatogram ukazující dostatečnou funkčnost saponifikace slabších koncentrací hydroxidu. Byl využit 5 % KOH a 10 % KOH na 15 min.

Nakonec byl pro další zpracování jednotlivých vzorků využit 5 % KOH na 15 minut, který nezpůsoboval ztrátu lykopenu a nedocházelo k jeho možné izomerizaci, ale saponifikoval ester rubixanthinu obsaženého ve vzorku.

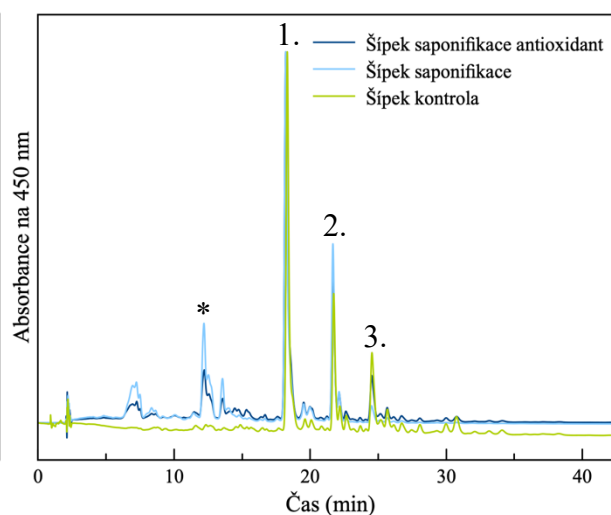
3.4 Analýza zastoupení esterů v sušených plodech

3.4.1 Šípek

Pro analýzu zastoupení esterů byl využit vzorek šípku, který byl saponifikovaný 5 % KOH po dobu 15 minut. V těchto experimentech jsme také testovali vliv přidání antioxidantu (pyrogallol) do reakční směsi pro omezení degradace karotenoidů (Toomey et al. 2007). Chromatogram všech analyzovaných vzorků s kontrolou je v Obr. 25 A, B. Světle zelená barva na chromatogramu ukazuje kontrolní vzorek, tento chromatogram obsahuje 3 píky, v 18,6 minutě byl nalezen lykopen, v 21,8 minutě byl nalezen β -karoten a v 24,5 minutě byl nalezen ester rubixanthinu. Pro rubixanthin jsme neměli standard, identifikaci jsme provedli na základě prací potvrzující jeho přítomnost šípku (Makino et al., 2008, Mercadante et al., 2017). Tento třetí pík se po saponifikaci zmenšil, z toho je patrné, že se jedná o ester karotenoidu. Pík se zmenšil, ale zcela nezmizel. Saponifikace neproběhla úplně, byla však dostačující k formaci píku v kratším elučním čase 12,5 minuty, jednalo se o karotenoid rubixanthin. Světle modrá barva na chromatogramu ukazuje vzorek po saponifikaci. V případě tmavě modrého chromatogramu s obsahem pyrogallolu je viditelné, že antioxidant má ochranné účinky na karotenoidy i na estery, tudíž ještě zpomalil proces saponifikace. Retenční časy s maximy absorbance jsou v Tab. VII.



Obr. 25 A: HPLC chromatogram šípku. Světle zelená je kontrola obsahující 3 píky. Světle modrá je saponifikace obsahující 6 píků. Tmavě modrá je saponifikace s antioxidantem obsahující 8 píků.



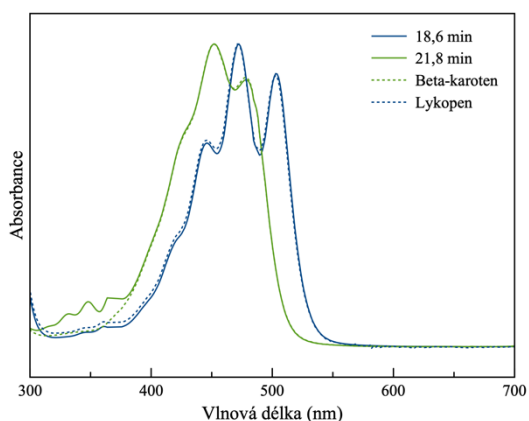
Obr. 25 B: HPLC chromatogram šípku. Srovnávací kontrolní vzorek (světle zelená), vzorek po saponifikaci (světle modrá) a vzorek po saponifikaci s antioxidantem (tmavě modrá).

1. Lykopen
2. β -karoten
3. Ester rubixanthinu
- * Rubixanthin

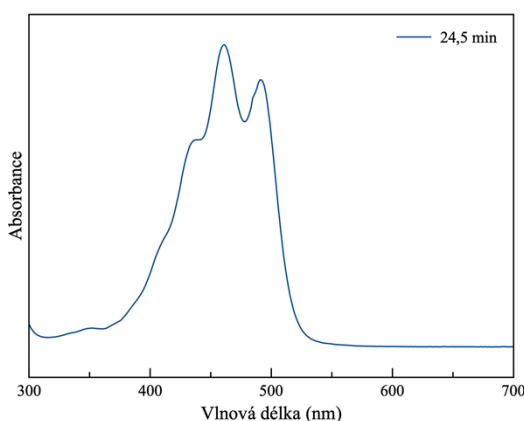
Tabulka (Tab. VII.): Referenční karotenoidy ze vzorku šípku s retenčními časy a maximy absorbance.

Potravina	Referenční karotenoidy	Retenční čas	Maxima absorbance
Šípek	Lykopen	18,6 min	445.8, 472.4, 502.8
	β -karoten	21,8 min	451.8, 478.5
	Ester rubixanthin	24,5 min	461.5, 491.9

Spektra karotenoidů (lykopen a β -karoten) a esterů karotenoidů (ester rubixanthinu) obsažená v kontrolním vzorku šípku jsou na Obr. 26, 27.

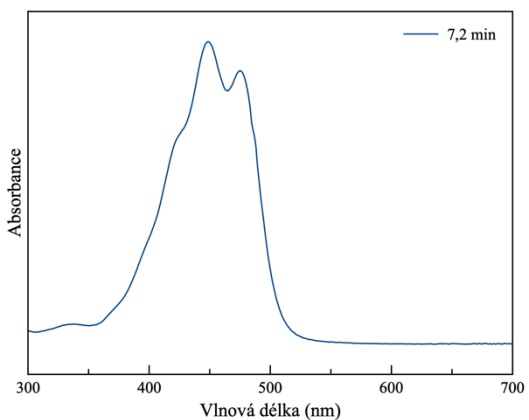


Obr. 26: Spektrum lykopenu z 18,6 minuty a spektrum β -karotenu z 21,8 minuty se standardy ze smetánky lékařské a rajčete.

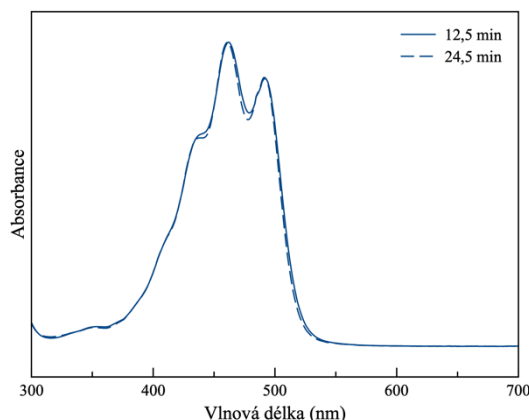


Obr. 27: Spektrum esteru rubixanthinu z 24,5 minuty.

Spektra píků vzniklých po saponifikaci ze vzorku šípku. Jedná se o lutein v 7,2 minutě a rubixanthin v 12,5 minutě, tato spektra jsou obsažena na Obr. 28, 29.



Obr. 28: Spektrum luteinu z 7,2 minuty.

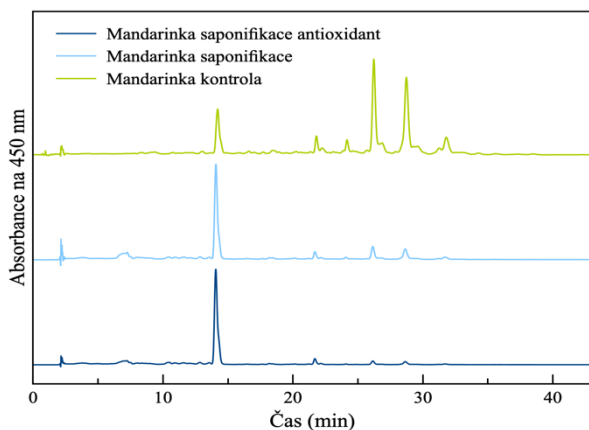


Obr. 29: Spektrum rubixanthinu z 12,5 min se srovnáním se spektrem esteru rubixanthinu z 24,5 min.

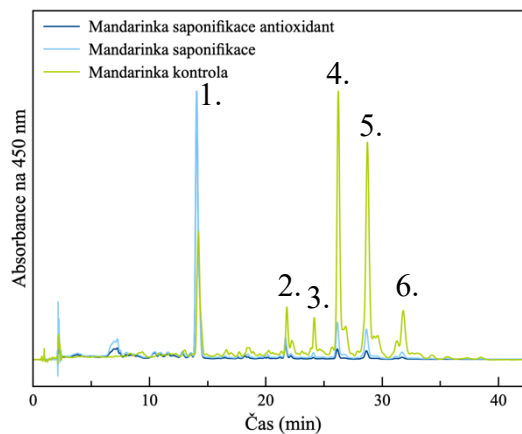
Spektra karotenoidů lykopenu a β -karotenu zůstala v nezměněné formě. Spektrum vzniklého karotenoidu rubixanthinu z 12,5 minuty je totožné s jeho esterifikovanou formou.

3.4.2 Mandarinka

Pro analýzu zastoupení esterů byl využit vzorek mandarinky, který byl saponifikovaný 5 % KOH po dobu 15 minut s antioxidantem i bez antioxidantu. Chromatogram všech analyzovaných vzorků s kontrolou je v Obr. 30 A, B. Kontrolní vzorek (světle zelená) obsahuje 6 píků, ve 14,2 minutě byl nalezen β -kryptoxanthin, ve 21,8 minutě byl nalezen β -karoten s neznámou kontaminací s absorpcí v UV, ve 24,2 minutě byl nalezen β -karoten, ve 26,2 minutě, 28,7 minutě a 31,8 minutě byly nalezeny estery luteinu. Pro β -kryptoxanthin jsme neměli standard, identifikaci jsme provedli na základě prací potvrzující jeho přítomnost v mandarince (Makino et al., 2008, Giuffrida et al., 2019, Mercadante et al., 2017). Píky v elučním čase po 25 minutě se po saponifikaci zmenšily, či zmizely. Je jasné, že se jedná o estery karotenoidů. Estery se transformovaly do prvního píku β -kryptoxanthinu do 14,2 minut. Retenční časy s maximy absorbance jsou v Tab. VIII. Saponifikovaný vzorek 5 % KOH (světle modrá) ukazuje zmenšení píků po 24,2 minutě. Saponifikovaný vzorek 5 % KOH s antioxidantem (tmavě modrá) ukazuje stejně jako světle modrý chromatogram zmenšení píků, v tomto případě antioxidant fungoval lépe a došlo k lepšímu výsledku saponifikace, estery karotenoidů skoro zmizely a transformovaly se do píku v 14,2 minutě β -kryptoxanthinu. Saponifikace neproběhla úplně, nedošlo k úplnému zmizení píků esterů xantofylu.



Obr. 30 A: HPLC chromatogram vzorku mandarinky. Světle zelená je kontrola, která obsahuje 6 píků. Světle modrá je saponifikace, která obsahuje 5 píků. Tmavě modrá je saponifikace s antioxidantem, která obsahuje také 5 píků.



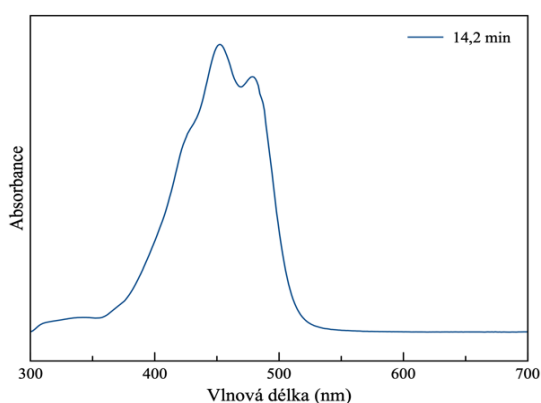
Obr. 30 B: HPLC chromatogram vzorku mandarinky srovnávající kontrolní vzorek (světle zelená), vzorek po saponifikaci (světle modrá) a vzorek po saponifikaci s antioxidantem (tmavě modrá).

1. β -kryptoxanthin
2. β -karoten s neznámou kontaminací
3. β -karoten
- 4.-6. Estery β -kryptoxanthinu

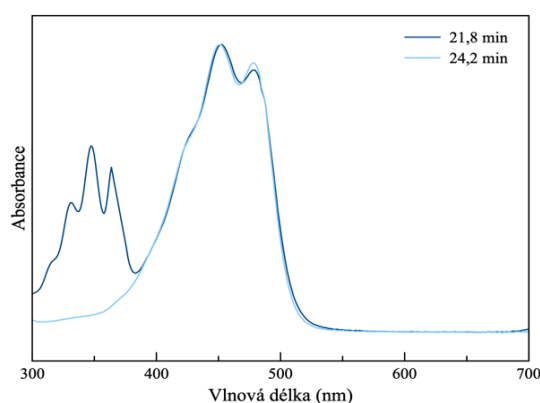
Tabulka (Tab. VIII.): Referenční karotenoidy ze vzorku mandarinky s retenčními časy a maximy absorbance.

<i>Potravina</i>	<i>Referenční karotenoidy</i>	<i>Retenční čas</i>	<i>Maxima absorbance</i>
<i>Mandarinka</i>	β -kryptoxanthin	14,2 min	451.8, 478.5
	β -karoten s neznámou kontaminací	21,8 min	347.2, 363.7, 451.8, 478.4
	β -karoten	24,2 min	450.6, 478.5
	Ester β -kryptoxanthinu	26,2 min	450.6, 477.3
	Ester β -kryptoxanthinu	28,7 min	451.8, 477.3
	Ester β -kryptoxanthinu	31,8 min	451.8, 478.5

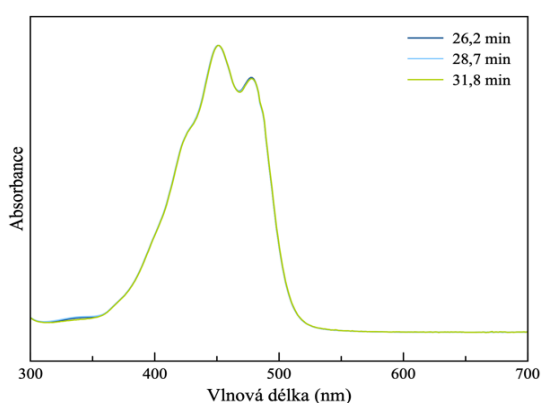
Spektra karotenoidů (β -karoten a β -kryptoxanthin) a esterů karotenoidů (ester β -kryptoxanthinu) obsažená v kontrolním vzorku mandarinky jsou na Obr. 31, 32, 33.



Obr. 31: Spektrum β -kryptoxanthinu v 14,2 min.



Obr. 32: Spektrum β -karotenu a neznámá kontaminace s absorpcí v UV v 21,8 min a β -karotenu v 24,2 min

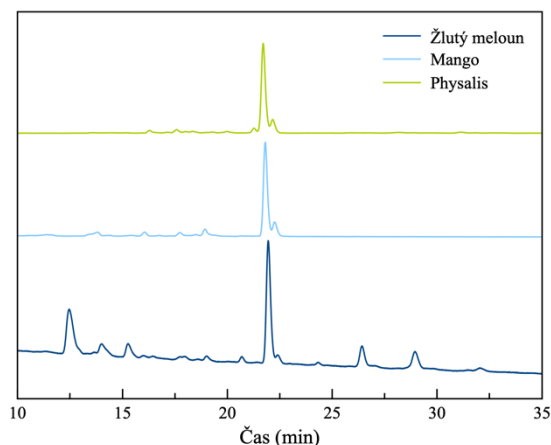


Obr. 33: Spektrum esterů β -kryptoxanthinu v 26,2 min, 28,7 min a 31,8 min.

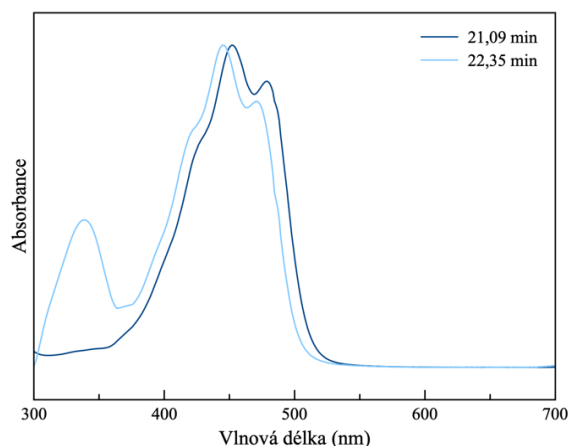
Pík β -kryptoxanthinu se po saponifikaci zvětšil, spektra β -karotenu a β -kryptoxanthinu zůstala v nezměněné formě. Estery β -kryptoxanthinu se transformovaly do píku v 14,2 minutě β -kryptoxanthinu.

3.4.3 Další využití potravin

Byly analyzovány další potraviny (Obr. 34): žlutý meloun, mango a mochyňě peruánská (physalis), které dle literatury obsahují estery karotenoidů (Mercadante et al., 2017). V běžně dostupných potravinách, které byly v této práci analyzovány se estery vyskytují pouze ve velmi malých procentuálních zastoupeních. Tyto tři potraviny pojí žlutá barva dužiny a také stejné zastoupení karotenoidů, ve vzorcích se vyskytoval β -karoten a cis β -karoten (Obr. 35).



Obr. 34: HPLC chromatogram ze žlutého melounu (světle zelený), manga (světle modrý) a physalis (tmavě modrý).



Obr. 35: Spektrum β -karotenu v 21,09 min. a cis β -karotenu 22,35 min z manga.

3.4.4 Procentuální zastoupení esterů karotenoidů

V jednotlivých vzorcích bylo zastoupeno množství karotenoidů a esterů karotenoidů, jejich plochy a procentuální zastoupení se před a po saponifikaci změnilo. Informace o karotenoidech ve zkratkách a informace o množství před saponifikací jsou ukázány v Tab. IX.

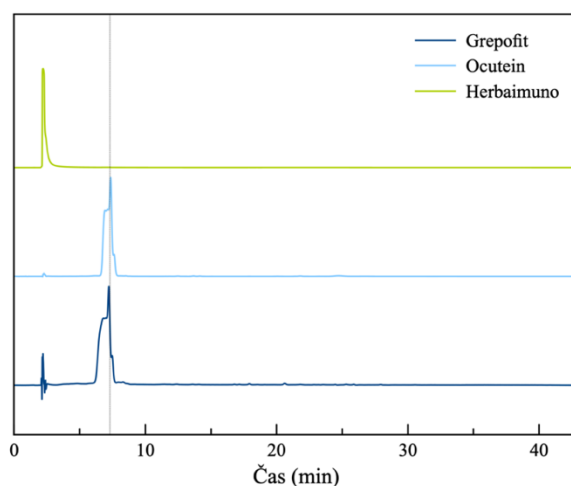
Tabulka (Tab. IX.): Obsahuje množství karotenoidů a esterů karotenoidů v potravinách.

Potraviny	Počet karotenoidů	Počet esterů	% esterů	Hlavní karotenoidy	Saponifikované složky
Šípek	3	1	14,7 %	Lyk, β -kar, cis β -kar	Ester rubixanthinu
Mandarinka	2	4	80,26 %	β -krypt	Ester β -kryptoxanthinu

Procentuální data zastoupení esterů ve vzorcích byla vypočítána v závislosti na plochách ostatních píků obsažených v HPLC chromatogramu. Nejčastěji se ve vzorcích vyskytovaly estery rubixanthinu a β -kryptoxanthinu. Proběhla úspěšná či skoro úspěšná saponifikace, kde došlo ke zmenšení pásu esterů xantofylu.

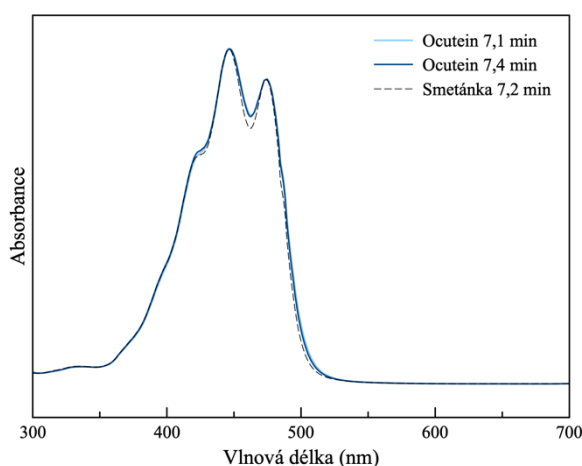
3.5 Potravinové doplňky s obsahem karotenoidů

Potravinové doplňky použité pro analýzu na HPLC byly vybírány na základě obsahu a popisu výrobce. Byli vybráni tři zástupci z řady běžně dostupných doplňků stravy na maloobchodním trhu či na webových stránkách. Chromatogramy extraktů jsou na Obr. 36. Analýzy Ocuteinu a Grepofitu ukazují jasně zřetelný pík v rozmezí 6,7 – 7,6 minuty. Jedná se o složený pík ze dvou karotenoidů, a to luteinu na Obr. 37, 38 v elučním čase 6,7 – 7,4 minuty a zeaxanthinu na Obr. 40, 41 v elučním čase 7,4 – 7,6 minuty.

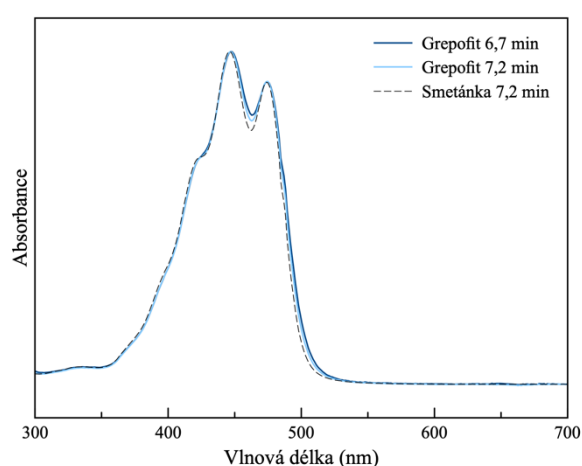


Obr. 36: HPLC chromatogram všech potravinových doplňků využitých pro analýzu. Světle zelená je HerbaImuno. Světle modrá je Ocutein. Tmavě modrá je Grepofit.

Spektra píků ve vzorku Grepofitu a Ocuteinu jsou zobrazeny v Obr. 36,37. Spektra odpovídají luteinu, při srovnání se standardem z 7,2 minuty luteinu ze smetánky lékařské.

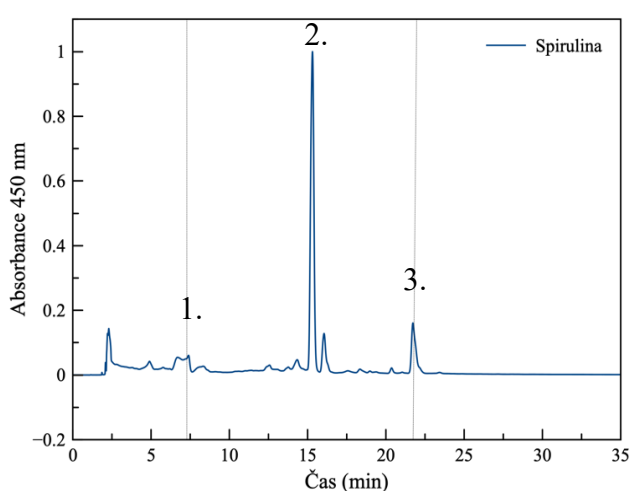


Obr. 37: Spektrum luteinu z 7,1 min, 7,4 min ze vzorku Ocuteinu ve srovnání se standardem luteinem získaným ze smetánky lékařské z 7,2 min.



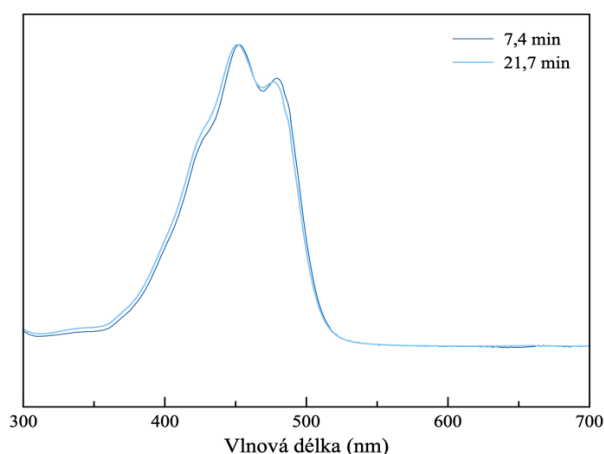
Obr. 38: Spektrum luteinu z 6,7 min, 7,2 min ze vzorku Grepofit ve srovnání se standardem získaným ze smetánky lékařské z 7,2 min.

Potravinové doplňky měly píky v rozmezí času 7,4 – 7,6 minuty, hodnoty spektra odpovídají β -karotenu, tvar píků také, ale β -karoten se běžně objevuje ve 21,8 minutě. Podle času se jedná o karotenoid obsažený hned za luteinem, kterému by odpovídal zeaxanthin. Když byla porovnána naše absorpční maxima s literaturou, jedná se opravdu o zeaxanthin (Havaux & Kloppstech, 2001). Zeaxanthin se povedlo najít ve vzorku jiného potravinového doplňku, a to Spiruliny na Obr. 39., která je vyráběna ze sinic. Spektrum zeaxanthinu bylo srovnáno s β -karotem (světle modrá a tmavě modrá) na Obr. 40. Na Obr. 41 je ukázáno spektrum z Grepofitu (červeně) a Ocuteinu (oranžově) ve srovnání se zeaxanthinem ze vzorku Spiruliny (modrá), tato spektra se shodují, proto víme, že se jedná o zeaxanthin.

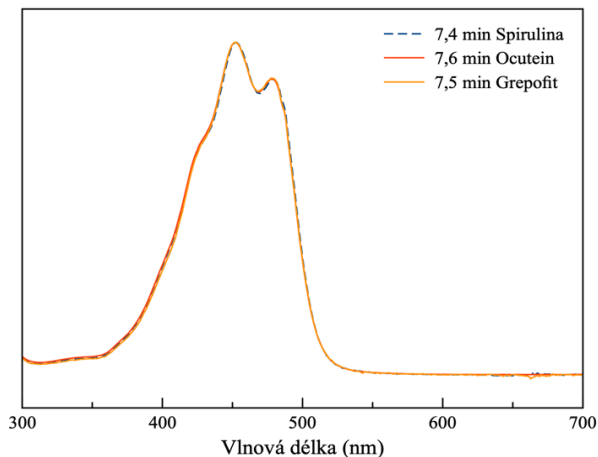


Obr. 39.: HPLC chromatogram vzorku spiruliny.

1. Zeaxanthin
2. Chlorofyl a
3. β -karoten



Obr. 40.: Spektrum Zeaxanthinu z 7,4 minuty a β -karotenu z 21,8 minuty. Spektra jsou stejná, ale každý z karotenoidů se ukazuje na HPLC metodě v jiný čas.



Obr. 41.: Spektrum Zeaxanthinu z 7,4 minuty, 7,6 minuty z Ocuteinu a 7,5 minuty z Grepofitu. Spektra z Ocuteinu a Grepofitu odpovídají spektru zeaxanthinu ze Spiruliny.

4. Diskuse

Saponifikace je běžná procedura používaná při analýzách složení karotenoidů v přírodních vzorcích. Podle dostupné literatury se k saponifikaci využívají dva odlišné hydroxidy KOH a NaOH v různých koncentracích a po různě dlouhou dobu. Dle Oyvind et al., (2004) dobře fungují KOH 10 % a NaOH 10 %, které mohou být využity na saponifikaci dlouhou až 6 hodin. Toomey et al., (2007) porovnal 3 rozdílné metody saponifikace. První metoda je založena na využití 0,1 % KOH (0,02 M) nebo NaOH, inkubace po dobu 6ti hodin ve tmě při pokojové teplotě (~ 22 °C). Druhá metoda popisuje saponifikaci s KOH 0,3 % (0,06 M) v methanolu po dobu 1 hodiny za pokojové teploty. Třetí metoda popisuje účinky antioxidantu (pyrogallolu 0,07 M), který byl v jejich pokusech využit při saponifikacích s 6,6 % KOH (1,32 M) po dobu 15ti minut.

Z důvodu neexistence ustálené standardní metody v literatuře a neúspěchu našich pilotních experimentů jsme nejprve vyzkoušeli širší spektrum koncentrací hydroxidů. U vyšších koncentrací hydroxidů jsme pozorovali významný nárůst počtu píků karotenoidů v saponifikovaných vzorcích (Obr.19, 23, 24). Pravděpodobně v našich podmínkách docházelo k izomeraci a možná i nežádoucím chemickým změnám karotenoidů ve směsích. Jako nejvhodnější se nakonec ukázala metoda saponifikace s 5 % KOH po dobu 15 minut. Metoda je téměř stejná jako ta použitá v práci (Granado et al., 2001). V jejich práci popisují metodu s využitím 5 % KOH po dobu 30 minut. Z našich výsledků (např. mandarinka, Obr. 30 A, B) je zjevné, že v některých případech při použití těchto postupů nedošlo k úplné hydrolyze pozorovaných esterů karotenoidů a do budoucna bude nutné metodu optimalizovat pro každý konkrétní vzorek. To je pravděpodobně i důvod, proč se v literatuře vyskytují různé metody saponifikace.

Pro zvýšení stability karotenoidů v podmínkách saponifikace jsme otestovali vliv přítomnosti antioxidantu (Toomey et al., 2007). Saponifikace s využitím antioxidantu byly méně účinné než bez něj (např. šípek, Obr. 25 A, B), nicméně v přítomnosti antioxidantu nedochází k tak výrazné nespecifické degradaci karotenoidů, což se projevuje množstvím píků v oblasti retenčních časů do 20 min.

Vzorek šípku analyzovaný v této práci obsahoval 2 karotenoidy lykopen a β -karoten a 1 ester rubixanthinu. Literatura udává pro šípek 28-54 % esterů (Mercadante et al., 2017, Zhong et al., 2016) a karotenoidové složení lykopen, β -karoten a ester rubixanthinu (Mariutti et al., 2018). V našem případě jsme nedetekovali ester luteinu, jak je popsáno v práci (Zhong et al., 2016), který udává bohaté zastoupení karotenoidů v šípku. Popsané rozdíly závisí na

analyzovaných druhích a kultivarech, obsah karotenoidů na základě jejich výsledků byl: 21 karotenoidů, z toho 11 xantofylů, 10 karotenů, které detekovali v saponifikovaném vzorku a 23 esterů xantofylu ve vzorku, který nebyl saponifikován (Mercadante et al., 2017).

Vzorek mandarinky v naší práci obsahoval 2 karotenoidy, a to β -kryptoxanthin a β -karoten a 3 hlavní estery β -kryptoxanthinu. Literatura udává pro mandarinku až 93 % esterů β -kryptoxanthinu (Peréz-Gálvez et al., 2005). Podle literatury (Mercadante et al., 2017, Mariutti et al., 2018) obsahují šťáva i plody mandarinky ester β -kryptoxanthinu v all-trans izomerizaci a karotenoidové složení je β -kryptoxanthin a β -karoten. V našem vzorku jsme pozorovali neznámý karotenoid s absorpcí v UV s retenčním časem shodným ve 21,8 minutě shodným s β -karotenem, jedná se pravděpodobně o phytofluen (Gupta et al., 2015), který je charakteristický svým elučním časem blízkým β -karotenu.

Podle (Mercadante et al., 2017) mango obsahuje estery karotenoidů na rozdíl od žlutého melounu (Mariutti et al., 2018). V našem případě jsme detekovali píky v časech delších než β -karoten, tedy v oblasti esterů karotenoidů, nicméně se nám již nepodařilo jejich přítomnost potvrdit saponifikací. V případě manga jsme žádné estery karotenoidů nedetekovali. To může být způsobeno odlišnou odrůdou manga využitou pro analýzu nebo podmínkami pěstování či stářím plodů, protože obsah esterů v plodech se při zrání mění (Mercadante et al., 2017). Naše výsledky ukazují, že hlavním karotenoidem žlutých plodů je β -karoten.

Potravinové doplňky zkoumané v této práci estery karotenoidů neobsahovaly. Hlavní karotenoidy obsažené v potravinových doplncích byly lutein a zeaxanthin. Spektra luteinu byla srovnána se standardem smetánky lékařské a spektra zeaxanthinu byla srovnána s literaturou (Havaux & Kloppstech, 2001) a se spektrem ze Spiruliny, která obsahuje jako hlavní xantofyl zeaxantin (Yu et al., 2012).

5. Závěr

V první fázi práce byla extrahována směs karotenoidů z různých vzorků plodů, listů a potravinových doplňků. Jako nejvhodnější rozpouštědlo byl zvolen dichlormethan (DCM). Složení karotenoidů v extraktech bylo analyzováno s pomocí HPLC, původní metoda byla z důvodu přítomnosti silně nepolárních esterů karotenoidů modifikována a doba analýzy prodloužena až na 40 minut.

Bylo otestováno několik metod saponifikace extraktů karotenoidů. Z použitých různých koncentrací hydroxidu draselného a sodného se jako nejvhodnější saponifikační činidlo jeví 5 % KOH v methanolu. Optimální doba saponifikace byla stanovena na 15 minut. Saponifikace nijak nezměnila složení a strukturu jednotlivých karotenoidů. Produkty esterifikace mají identická absorpční spektra jako volné karotenoidy.

Byl analyzován obsah esterů karotenoidů v dostupných vzorcích. Nejvyšší obsah esterů byl detekován v šípku, který obsahuje zejména estery rubixanthinu. Značné množství esterifikovaných karotenoidů se vyskytuje také v mandarince, která obsahuje zejména estery β -kryptoxanthinu.

V práci je diskutován význam esterifikace karotenoidů na jejich vstřebávání do lidského organismu a na jejich funkci v organismu. Stejně tak biologická dostupnost jednotlivých karotenoidů v lidském těle.

6. Použitá literatura

- **Agarwal S., Rao A.V.** Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Cmaj*. 2000;163:739–744
- **Bae M, Kim MB, Park YK, Lee JY.** Health benefits of fucoxanthin in the prevention of chronic diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2020;1865(11):158618
- **Becerra MO et al.,** Lutein as a functional food ingredient: Stability and bioavailability. *Journal of Functional Foods*. 2020;66:103771
- **Bélanger JMR, Paré JRJ, Sigouin M.** High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles and Applications. In: **Paré JRJ, Bélanger JMR.** Instrumental Methods in Food Analysis. Elsevier Science B.V., 1997;37-56
- **Bohn T.** Carotenoids, Chronic Diseases Prevention and Dietary Recommendations. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 2018;87(3-4):1-10
- **Bunea A, Socaciu C, Pinteana A.** Xanthophyll Esters in Fruits and Vegetables. *Academic Pres, Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, Not Bot Horti Agrobo*, 2014;42(2):310-324
- **Bungard RA, Ruban AV, Hibberd JM, Press MC, Horton P, Scholes JD.** Unusual carotenoid composition and a new type of xanthophyll cycle in plants. *Plant Biology*, 1999; 96:1135-139
- **Carvalho E, Fraser PD, Martens S.** Carotenoids and tocopherols in yellow and red raspberries. *Food Chemistry*, 2013;139:774-752
- **Cuttriss A, Pogson B.** Carotenoids. In: **Davies KM.** Plant Pigments and their Manipulation. *Crop & Food Research, Palmerston North, New Zealand*, 2004;57-82
- **Daood HG, Bencze G, Palotás G, Pék Z, Sidakov A, Helyes L.** HPLC Analysis of Carotenoids from Tomatoes Using Cross-Linked C18 Column and MS Detection. *Journal of Chromatographic Science*, 2014;52:985-991
- **Delgado-Pelayo R, Gallardo-Guerrero L, Hornero-Méndez D.** Carotenoid composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Food Chemistry*, 2016;199:165-206
- **Delgado-Pelayo R, Gallardo-Guerrero L, Hornero-Méndez D.** Chlorophyll and carotenoid pigments in the peel and flesh of commercial apple fruit varieties. *Food Research International*, 2014;65:272-281
- **Demmig-Adams B.** Carotenoids and photoprotection: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim Biophys Acta*, 1990;1020:1–24
- **Eggersdorfer M, Wyss A.** Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2018;652:18-26
- **Fiore, A., Dall'Osto, L., Cazzaniga, S. et al.** A quadruple mutant of Arabidopsis reveals a β -carotene hydroxylation activity for LUT1/CYP97C1 and a regulatory role of xanthophylls on determination of the PSI/PSII ratio. *BMC Plant Biol*, 2012;12:50
- **Galasso C, Orefice I, Pellone P, Cirino P, Miele R, Ianora A, Brunet C, Sansone C.** On the Neuroprotective Role of Astaxanthin: New Perspective? *Mar Drugs*, 2018;16(8):247
- **Giuffrida D, Cacciola F, Mapelli-Brahm P, Stinco CM Dugo P, Oteri M, Mondello L, Meléndez-Matínez AJ.** Free carotenoids and carotenoids esters composition in Spanish orange and mandarin juices from diverse varieties. *Food Chemistry*, 2019;300:125139
- **Giuffrida D, Dugo P, Salvo A, Saitta M, Dugo G.** Free carotenoid ester composition in native orange juices of different varieties. *Fruits*, 2010;65, 277-284
- **Granado F, Olmedilla B, Gil-Martinez E, Blanco I.** A Fast, Reliable and Low cost Saponification Protocol for Analysis of Carotenoids in Vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2001;14(5):479-489
- **Grune T, Lietz G, Palou A, Ross AC, Stahl W, Tang G, Thurnham D, Yin S, Biesalski HK.** β -Carotene is an important vitamin A source for humans. *J Nutr*. 2010;140(12):2268S–2285S

- **Guedes AC, Amaro HM, Malcata FX.** Microalgae as sources of carotenoids. *Mar Drugs*, 2011;9(4):625–644
- **Gupta P, Sreelakshmi Y, Sharma R.** A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography. *Plant Methods*, 2015;11:5
- **Havaux, M., Kloppstech, K.** The Protective Functions of Carotenoid and Flavonoid Pigments Against Excess Visible Radiation at Chilling Temperature Investigated in Arabidopsis npq and tt mutants. *Planta*, 2001;213(1): 953-966
- **Imran M, Ghorat F, Ul-Haq I, Ur-Rehman H, Aslam F, Heydari M, Shariati MA, Okuskhanova E, Yessimbekov Z, Thiruvengadam M, et al.** Lycopene as a Natural Antioxidant Used to Prevent Human Health Disorders. *Antioxidants*, 2020;9:706
- **Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C, Wright, S.W.** Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods Monographs on oceanographic methodology (2nded.). *UNESCO Publishing Paris*; 2005
- **Johnson EJ.** The Role of Carotenoids in Human Health. *Nutrition in Clinical Care*, 2002;5(2):56-65
- **Khoo H-E, Prasad KN, Kong K-W, Jiang Y, Ismail A.** Carotenoids and their isomers: color pigments in fruits and vegetables. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2011;16(2):1710–1738
- **Kurz C, Carle R, Schieber A.** HPLC-DAD-MS(n) characterisation of carotenoids from apricots and pumpkins for the evaluation of fruit product authenticity. *Food Chemistry*, 2008;110:522-530
- **Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N.** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.*, 2010;4(8):118-126
- **Makino T, Harada H, Ikenaga H, Matsuda S et al.** Characterization of Cyanobacterial Carotenoid Ketolase CrtW and Hydrxylase CrtR by Complementation Analysis in Escherichia coli. *Plant and Cell Physiology*, 2008;49(12):1867-78
- **Maoka T.** Carotenoids as natural functional pigments. *J Nat Med*, 2020;74:1-16
- **Mariutti LRB, Mercadante AZ.** Carotenoid esters analysis and occurrence: What do we know so far?. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2018;648:36-43
- **McCarthy SS, Kobayashi MC, Niyogi KK.** White Mutants of Chlamydomonas reinhardtii Are Defective in Phytoene Synthase. *Genetics*, 2004;168(3):1249-1257
- **Meléndez-Marínez AJ, Mapelli-Brahm P, Honero-Méndez D, Vicarion IM.** Chemical and Biological Properties, Structures, Nomenclature and General Chemistry of Carotenoids and Their Esters. In: **Mercadante AZ.** Carotenoid Esters in Foods: Physical, Chemical and Biological Properties. The Royal Society of Chemistry, UK, 2019;3-50
- **Mercadante AZ, Rodrigues DB, Petry FC, Mariutti LRB.** Carotenoid esters in food – A review and practical directions on analysis and occurrence. *Food Research International*, 2017;99(2):830-850
- **Merlene AB, Kaushal S, Karthikeyan S, Babu S, Gothandam KM.** Determination of health beneficial phytochemicals in commonly consumed variety of different fruits in Tamil Nadu, India. *JK Welfare & Pharmascope Foundation, International Journal of Research in Phytochemistry & Pharmacology*, 2012;2(2):119-124
- **Moran NA, Jarvik T.** Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids. *Science*. 2010;328(5978):624-7
- **Mortensen A.** Supplements In: **Britton G, Pfander H, Liaen-Jensen S.** Carotenoids, vol 5., *Birkhäuser Basel*, 2009;67-82
- **Murillo AG, Hu S, Fernandez ML.** Zeaxanthin: Metabolism, Properties, and Antioxidant Protection of Eyes, Heart, Liver, and Skin. *Antioxidants (Basel)*, 2019;8(9):390
- **Nakazawa Y, Sashima T, Hosokawa M, Miyashita K.** Comparative evaluation of growth inhibitory effect of stereoisomers of fucoxanthin in human cancer cell lines. *Journal of Functional Foods*, 2009;1(1):88-97

- **Nováková L, Douša M, Česla P et al.** Moderní HPLC separace v teorii a praxi I: Kapitola 2, Základní pojmy chromatografické separace. (2nd ed.). Brno, *Česká chromatografická škola, zapsaný spolek*; 2021;24-33
- **Oyvind M, Francis A, Francis GW.** Saponification. In: **Davies KM.** Plant Pigments and their Manipulation, in Carotenoids. *Crop & Food Research, Palmerston North, New Zealand, 2004*;320
- **Pérez-Gálvez A, Mínguez-Mosquera MI.** Esterification of xanthophylls and its effect on chemical behavior and bioavailability of carotenoids in the human. *Nutrition Research, 2005*;25:631-640
- **Pop RM, Weesepeel Y, Socaciu C, Pinteá A, Vicken JP, Gruppen H.** Carotenoid composition of berries and leaves from six Romanian Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) varieties. *Food Chemistry, 2014*;147:1-9
- **Pott I, Breithaupt DE, Carle R.** Detection of unusual carotenoid esters in fresh mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Kent'). *Phytochemistry, 2003*;64(4):835-829
- **Pugliese A, et al.** In vitro investigation of the bioaccessibility of carotenoids from raw, frozen and boiled red chili peppers (*Capsicum annuum*), *Eur. J. Nutr., 2014*;53(2):501–510
- **Rodriguez-Amaya DB.** Status of carotenoid analytical methods and in vitro assays for the assessment of food quality and health effects. *Current Opinion in Food Science, 2015*;1:56-63
- **Ruiz-Sola MA, Rodriguez-Concepcion M.** Carotenoid biosynthesis in Arabidopsis: A colorful pathway. *Arab. Book. 2012*;10:e0158
- **Saini RK, Nile SH, Park SW.** Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Research International, 2015*;76:735–750
- **Schweiggert RM, Carle R.** Carotenoid deposition in plant and animal food and its impact on bioavailability. *Crit Rev Food Sci Nutr. 2017*;57(9):1807–1830
- **Schweiggert RM, Steingass CB, Esquivel P, Carle R.** Chemical and morphological characterization of costa rican papaya (*Carica papaya* L.) hybrids and lines with particular focus on their genuine carotenoid profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012*;60:2577-2585
- **Story E.N., Kopec R.E., Schwartz S.J., Harris G.K.** An update on the health effects of tomato lycopene. *Annu. Rev. Food Sci. Technol. 2010*;1:189–210
- **Toomey MB, McGraw KJ.** Modified Saponification and HPLC Methods for Analyzing Carotenoids from Retina of Quail: Implications for Its Use as a Nonprimate Model Species. *Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2007*;48(9):3976-3982
- **Trifiletti RR.** Vitamin A. In: **Minoff MJ, Daroff RB.** Encyclopedie of the Neurological Sciences. (2nd ed.). *Academic Press; 2014*;717-718
- **Van Wijk KJ, Kessler F.** Plastoglobuli: Plastid Microcompartments with Integrated Functions in Metabolism, Plastid Developmental Transitions, and Enviromental Adaptation. *Annual Review of Plant Biology, 2017*;68:253-289
- **Von Lintig J.** Provitamin A metabolism and functions in mammalian biology. *Am. J. Clin. Nutr., 2012*;96:1234s–1244s
- **Wingerath T, Sies H, Stahl W.** Xanthophyll Esters in Human Skin. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 1998*;355:271-274
- **Yu B, Wang J, Suter PM, Russell RM, Grusak MA, Wang Y, Wang Z, Yin S, Tang G.** Spirulina is an effective dietary source of zeaxanthin to humans. *British Journal of Nutrition 2012*;108:611-619
- **Zhong L, Gustavsson KE, Oredsson S, Glab B, Yilmaz JL, Olsson ME.** Determination of free and esterified carotenoid composition in rose hip fruit by HPLC-DAD-APCI⁺-MS. *Food Chemistry, 2016*;210, 541-550

7. Seznam symbolů a zkratek

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
DCM	dichlormethan
PTFE	polytetrafluoroethylen (povrchová úprava, teflonování)
Lyk	Lykopen
β -kar	β -karoten
cis β -kar	cis β -karoten
β -krypt	β -kryptoxanthin

8. Přílohy

8.1 Příloha A

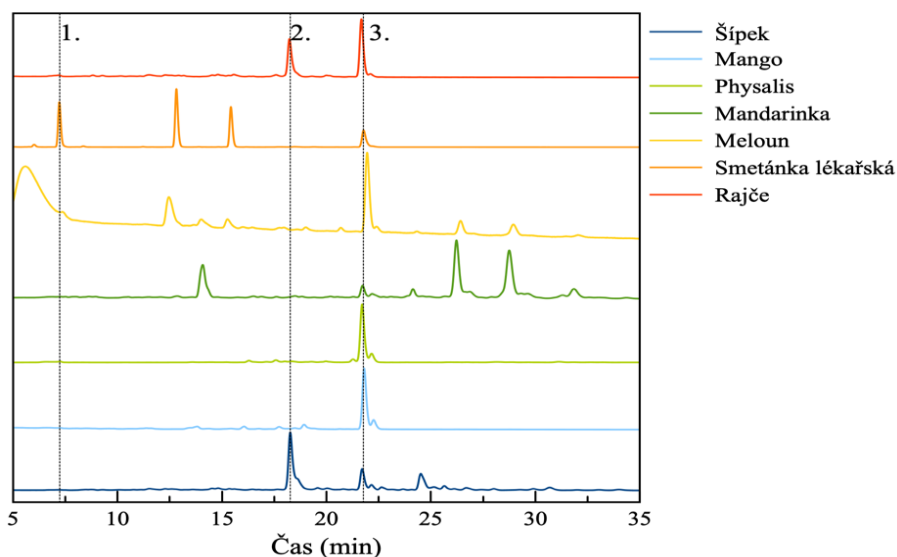
Saponifikace vzorků s obsahem karotenoidů a esterů karotenoidů (Upraveno podle knihy *Plant Pigments and their Manipulation* (Oyvind et al., 2004).)

1. Bylo odváženo 0,2g homogenizovaného vzorku, který byl 1 hodinu extrahován v 0,5 ml DCM ve tmě.
2. Vzorek před filtrací byl centrifugován při 14100×g na 2 minuty.
3. Byla provedena filtrace za pomoci filtru o porozitě 0,2 μm, 4 mm Ø (Syringe Filters, OlimPeak, Teknokroma).
4. Tento filtrát měl výrazně žlutou či oranžovou barvu a byl následně vysušen dusíkem.
5. Do tohoto vzorku bylo přidáno 0,5 ml etheru a 0,5 ml 5 % KOH v methanol. Pokud probíhala saponifikace za využití antioxidantu, bylo do čistého etheru přidáno ještě 0,0126 g pyrogallolu, který byl do vzorku přidán první. Vzorek s etherem a pyrogallem byl několikrát protřepán a následně byl přidán roztok hydroxidu. Vzorek s roztokem hydroxidu byl ponechán 15 minut ve tmě.
6. Po uplynutí času inkubace se ke vzorku přidalo 4-5 ml 10 % NaCl, směs byla protřepána v dělicí nálevce. Spodní frakce se vypustila a znovu se přidala zpět do dělicí nálevky a protřepala. Toto se opakovalo 3x, následně se spodní fáze vypustila a do dělicí nálevky se přidal čistý 10 % NaCl. Směs se protřepala, spodní frakce byla odstraněna a etherová frakce v dělicí nálevce se ještě jednou promyla 10 % NaCl.
7. Vzorek byl následně v dělicí nálevce ještě 3x omyt redestilovanou vodou.
8. Vzorek z horní etherové fáze byl z dělicí nálevky převeden do mikrozkuhavky a znovu vysušen dusíkem.
9. Po vysušení do vzorku bylo přidáno 0,3 ml methanolu a ethylacetátu, které byly namíchány ve stejném poměru jako mobilní fáze C pro HPLC.
10. Tento vzorek byl následně analyzován na HPLC.

8.2 Příloha B

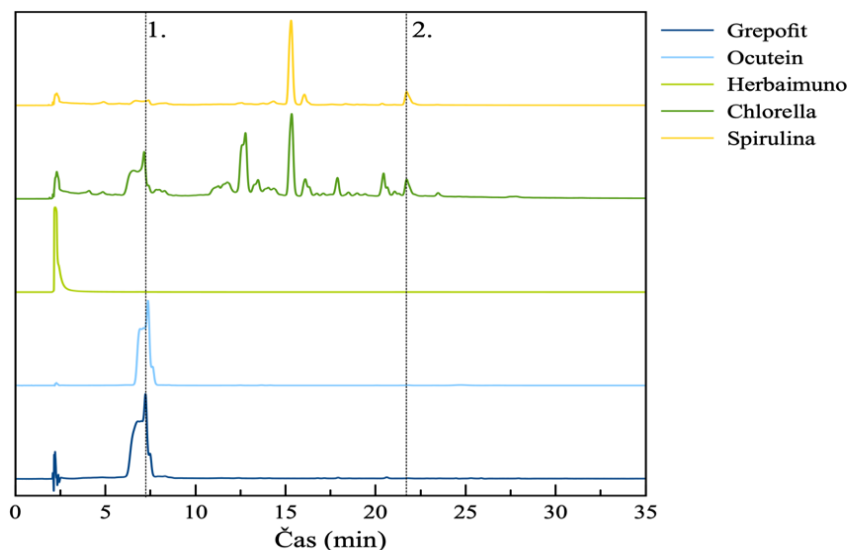
Chromatografická analýza HPLC metodou upravenou podle (Jeffrey et al., 2005) s prodlouženou dobou eluce

Obr. 42, 43 obsahují data potravin a potravinových doplňků využitých v této bakalářské práci, popisující nejčastěji zastoupené karotenoidy.



Obr. 42: Obsahuje HPLC chromatogramy všech zpracovaných potravin (ovoce a zeleniny). Svislé čáry očíslované 1.-3. popisují nejčastěji přítomné karotenoidy.

1. Lutein v 7,2 minutě
2. Lykopen v 18,6 minutě
3. β -karoten v 21,8 minutě



Obr. 43: Obsahuje HPLC chromatogramy všech zpracovaných potravinových doplňků. Svislé čáry 1.-2. označují nejčastěji přítomné karotenoidy.

1. Lutein/Zeaxanthin v 7,2-7,4 minutě
2. β -karoten v 21,8 minutě