

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

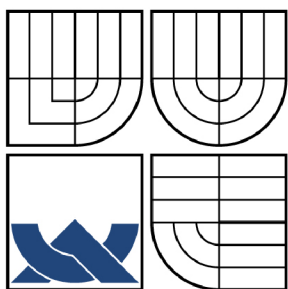
STANOVENÍ BETA-KAROTENU V JEČMENI METODOU HPLC

DIPLOMOVÁ PRÁCE
DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

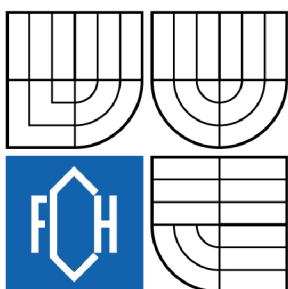
VOJTĚCH PUČ

BRNO 2007



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ BETA-KAROTENU V JEČMENI METODOU HPLC

DETERMINATION OF BETA-CAROTENE IN BARLEYCORN BY HPLC

DIPLOMOVÁ PRÁCE

DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

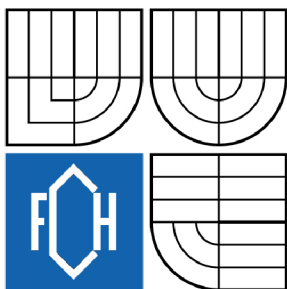
VOJTĚCH PUČ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. JAROSLAV PRÝMA

BRNO 2007



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce	FCH-DIP0068/2006	Akademický rok: 2007/2008
Ústav	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka)	Puč Vojtěch	
Studijní program	Chemie a technologie potravin (M2901)	
Studijní obor	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí diplomové práce	RNDr. Jaroslav Prýma	
Konzultanti diplomové práce	RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.	

Název diplomové práce:

Stanovení beta-karotenu v ječmeni metodou HPLC

Zadání diplomové práce:

Literární rešerše:

- Antioxidanty v obilovinách a jejich zdravotní význam
- Poznatky o karotenoidech v ječmeni a sladu
- Metody stanovení karotenoidů v ječmeni

Experimentální část:

- Optimalizace postupu stanovení beta-karotenu metodou HPLC
- Stanovení beta-karotenu ve vzorcích ječmene

Termín odevzdání diplomové práce: 18.5.2007

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Vojtěch Puč
student(ka)

RNDr. Jaroslav Prýma
Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2006

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

PUČ, V. *Stanovení beta-karotenu v ječmeni metodou HPLC*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 79 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Jaroslav Prýma.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis diplomanta

Poděkování:

Děkuji vedoucímu diplomové práce RNDr. Jaroslavu Prýmovi za vstřícnost a odbornou pomoc při realizaci diplomové práce. Dále děkuji konzultantce RNDr. Mileně Vespalcové, Ph.D., pracovníkům Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského a. s. a všem, kteří se jakýmkoli způsobem podíleli na vzniku této diplomové práce.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá problematikou přírodních antioxidantů obsažených v obilovinách a zvláště v ječmeni (*Hordeum vulgare*). Pozornost se zaměřuje především na karotenoidy.

Teoretická část shrnuje poznatky o obsahu antioxidantů v obilovinách a o jejich zdravotním významu. Byla vypracována také rešerše na téma metody stanovení karotenoidů.

V experimentální části byla optimalizována metoda stanovení β -karotenu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detektorem diodového pole a s hmotnostním detektorem (HPLC/DAD/APCI-MS). Tato metoda byla využita ke stanovení β -karotenu a luteinu ve vzorcích zrna ječmene, sladu a zeleného ječmene. Metoda zahrnuje zmýdelnění vzorků, extrakci diethyletherem, separaci na koloně ODS Hypersil 250x4,6 mm 5 μ za použití mobilní fáze MTBE/MeOH (20:80) a spektrofotometrickou detekci při 450 nm. Kvantitativní analýza byla realizována v systému HPLC/DAD. Hmotnostní detektor byl využit pro identifikaci analytů.

V této práci jsou uvedeny některé dosud nepublikované údaje o obsahu β -karotenu a luteinu v několika odrůdách sladovnického ječmene, sladu a v zeleném ječmeni. Nejvyšší hodnoty β -karotenu byly naměřeny ve vzorku zeleného ječmene odrůdy Malz, sklizeného v 1. fázi růstu (8,49 mg·kg⁻¹ sušiny). Obsah β -karotenu v zrně ječmene je relativně nízký (0,07-0,14 mg·kg⁻¹ sušiny). Ve sladu vyrobeném z tohoto ječmene je obsah β -karotenu několikrát vyšší (0,24-0,56 mg·kg⁻¹ sušiny).

Diplomová práce byla realizována ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském a. s. v Brně.

KLÍČOVÁ SLOVA

Antioxidanty, karotenoidy, beta-karoten, lutein, HPLC, HPLC/DAD/MS, ječmen, slad, zelený ječmen.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the natural antioxidants present in cereals, especially in barley (*Hordeum vulgare*). A close attention is paid to the study of carotenoids.

The theoretical part summarises the knowledge of the content of antioxidants in cereals and the health effects of antioxidants. In addition, a research on the methods of carotenoids determination was conducted.

In the experimental part, the method of β -carotene determination was optimized using high-performance liquid chromatography, diode array detector and mass detector (HPLC/DAD/APCI-MS). The method was used for the β -carotene and lutein determination in the samples of barleycorn, malt and green barley. This method involves the sample saponification, extraction by diethylether, followed by separation on ODS Hypersil 250x4,6 mm, 5 μ column, using MTBE/MeOH (20:80) as mobile phase and spectrophotometric detection (450 nm). Quantitative analysis was implemented in the HPLC/DAD system. The MS detector was used for identification of analytes.

A number of still unpublished data about the content of β -carotene and lutein in several varieties of malting barley, malt and green barley are stated in this thesis. The highest content of β -carotene was found in the green barley sample of variety Malz, harvested in first grow phase (8,49 mg·kg⁻¹ of the dry matter). The content of β -carotene in barleycorn is relatively low (0,07-0,14 mg·kg⁻¹ of the dry matter). The content of β -carotene is several times higher in the malt produced from barleycorn (0,24-0,56 mg·kg⁻¹ of the dry matter).

The diploma thesis was implemented in the Research Institute of Brewing and Malting, Plc. in Brno.

KEY WORDS

Antioxidants, carotenoids, beta-carotene, lutein, HPLC, HPLC/DAD/MS, barley, malt, green barley.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
2.1 Antioxidanty a volné radikály	9
2.1.1 Klasifikace	9
2.1.2 Mechanismus účinku antioxidantů	10
2.1.3 Oxidační stres	10
2.2 Ječmen	11
2.2.1 Systematika ječmene	11
2.2.2 Obilka ječmene	11
2.2.3 Chemické složení obilky	12
2.2.4 Antioxidanty v zrně ječmene	13
2.2.5 Mladý (zelený) ječmen	16
2.3 Karotenoidy	17
2.3.1 Struktura a klasifikace karotenoidů	17
2.3.2 Funkce karotenoidů	20
2.3.2.1 Oxidace karotenoidů	21
2.3.2.2 Antioxidační vlastnosti karotenoidů	22
2.3.2.3 Karotenoidy jako prekurzory vitamínu A	22
2.3.3 Preventivní význam karotenoidů ve výživě	25
2.3.3.1 Prevence rakoviny	25
2.3.3.2 Kardiovaskulární choroby	25
2.3.3.3 Karotenoidy a imunitní systém	25
2.3.3.4 Degenerativní oční změny	25
2.3.3.5 Ochrana kůže	26
2.3.3.6 Potřeba antioxidantů při kouření a nadměrném požívání alkoholu	26
2.4 Metody stanovení karotenoidů	27
2.4.1 Zacházení se vzorky	27
2.4.2 Extrakční metody	27
2.4.3 Separační metody	28
2.4.4 Detekce	28
2.4.5 Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC)	28
2.4.5.1 Charakteristické veličiny chromatografického systému	29
2.4.5.2 Instrumentace	30
2.4.5.3 Detektory používané v HPLC	31
2.4.5.4 Photodiode array detector (PDA)	32
2.4.6 Hmotnostní spektrometrie (MS)	34
2.4.6.1 Ionizace	34
2.4.6.2 Hmotnostní analyzátoři (separátory)	35
2.4.6.3 Detektory	36
2.4.6.4 Hmotnostní spektrometr finnigan LCQ Advantage MAX	37
2.5 Stanovení karotenoidů v rostlinných materiálech metodou HPLC	40

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	42
3.1 Přístrojové vybavení a chemikálie	42
3.1.1 Kapalinový chromatograf s detektorem diodového pole a hmotnostním spektrometrem.....	42
3.1.2 Ostatní vybavení.....	43
3.1.3 Použité chemikálie.....	43
3.1.4 Standardy	43
3.2 Optimalizace chromatografické metody	44
3.3 Validace metody	44
3.4 Stanovení β-karotenu v zrna ječmene a ve sladu	45
3.4.1 Kalibrace.....	45
3.4.2 Příprava vzorků.	45
3.4.3 Metoda extrakce	45
3.4.3.1 Metoda zmýdelnění a extrakce podle VÚPS.....	45
3.4.4 Výběr vzorků ječmene a sladu	45
3.5 Stanovení β-karotenu v zeleném ječmeni.....	46
3.5.1 Výběr vzorků zeleného ječmene	46
4. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	47
4.1 Optimalizace chromatografické metody	47
4.2 Validace metody	49
4.3 Kalibrační křivka	50
4.4 Stanovení β-karotenu v zrna ječmene a ve sladu	52
4.5 Stanovení β-karotenu v zeleném ječmeni.....	60
4.5.1 Zelený ječmen ze sklizně 2006	60
4.5.2 Zelený ječmen ze sklizně 2007	62
4.5.3 Zelený ječmen z modelového pokusu na VÚPS	64
5. ZÁVĚR.....	65
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	66
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	72
8. SEZNAM PŘÍLOH.....	73
9. PŘÍLOHY	74

1. ÚVOD

Cereálie mají vzhledem ke své spotřebě, snadné skladovatelnosti a finanční nenáročnosti výsadní postavení mezi zemědělskými produkty u nás i ve světě. Jsou rozhodujícími zdroji sacharidů (včetně vlákniny) a rostlinných proteinů. Jejich role ve výživě lidstva je nezastupitelná

V poslední době se cereálie dostávají do popředí zájmu nejen odborníků, ale i široké veřejnosti, a to zejména kvůli obsahu minoritních, avšak o to důležitějších látek. Jedná se o široké spektrum antioxidantů. S rozvojem poznání o mechanismu působení jednotlivých skupin látek v organismu jsou látkám s antioxidačními účinky připisovány významné pozitivní účinky na lidské zdraví. Díky této skutečnosti se obiloviny stávají předmětem výzkumů jako přírodní zdroj antioxidantů. Mezi látky s antioxidační aktivitou patří také přírodní žluté až oranžové pigmenty - karotenoidy. I když je jejich obsah v cereáliích relativně nízký, analýza jejich kvalitativního i kvantitativního zastoupení v těchto plodinách nabývá na významu.

Ukazuje se, že je užitečné znát obsah jednotlivých látek nejen v zrna obilovin, ale i v jiných částech rostliny. Ani distribuce nutričně a zdravotně významných látek v zrna není rovnoměrná. Vymletím zrna, případně odstraněním klíčků, jich velké množství ztratíme.

Ječmen má mezi ostatními cereáliemi zvláštní postavení. V minulosti byl téměř všechen využit k výrobě sladu nebo ke krmným účelům. V posledních desetiletích však rapidně roste i spotřeba potravinářského ječmene, který má vysoký potenciál k širokému využití (například k výrobě těstovin, pekařských výrobků, tzv. breakfast cereálií a pochutin). Z ječmene lze také získat cenné frakce vlákniny, které je možné využít k obohacení pekařských výrobků.

Výzkum antioxidantů v obilovinách není dosud zpracován tak detailně a komplexně, jak by se dalo vzhledem k rostoucímu významu těchto látek očekávat. Tato práce shrnuje dosavadní poznatky o obsahu β -karotenu a dalších karotenoidů v ječmeni. Přináší také některé dosud nepublikované údaje o obsahu těchto látek v několika odrůdách sladovnického ječmene, sladu a v zeleném ječmeni.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Antioxidanty a volné radikály

Antioxidanty jsou látky, které díky své struktuře mohou reagovat s volnými radikály autooxidačního řetězce, a tím eliminují jejich negativní účinky na lidský organismus. Proto se stávají předmětem stále většího zájmu nejen potravinářských a zdravotnických odborníků, ale i široké veřejnosti [1,2].

Volný radikál je reaktivní částice (jakýkoliv atom nebo skupina atomů), která obsahuje alespoň jeden nepárový elektron [3,4].

Volné radikály mohou vznikat různými způsoby. Jejich zdrojem může být vnější záření, včetně ultrafialového, rentgenového a gama záření. Vznik volných radikálů podporují také chemické otravy, kouření, úprava potravin a nadměrný přísun kyslíku při jeho vdechování v čistém stavu. Volné radikály se také objevují v průběhu nejrůznějších onemocnění. Na druhou stranu je tělo využívá při reakcích, které jsou nezbytnou součástí metabolismu a také při likvidaci mikroorganismů v buňkách imunitního systému [1].

2.1.1 Klasifikace

Antioxidanty tvoří různorodou skupinu látek a je velmi obtížné najít vhodné kritérium jejich třídění.

Nejvýznamnějším dělením antioxidantů je dělení podle jejich původu na přírodní a syntetické. Mezi přírodní antioxidanty řadíme například antioxidantní enzymy, jako je superoxiddismutáza, glutathionperoxidáza, kataláza; vitamín E (tokoferoly), vitamín C (kyselina askorbová), karotenoidy, polyfenolické látky, ubichinol (koenzym Q₁₀), glutathion, kyselinu močovou, melatonin, selen a další. Jako syntetické antioxidanty se používají například butylhydroxytoluen, dimethylsulfoxid, estery kyseliny gallové. Získání jiných vlastností přirozených antioxidantů lze docílit jejich modifikací. Například nahrazením terpenoidního řetězce vitamínu E karboxylovou skupinou se zvýší rozpustnost ve vodě. Tato látka se používá v analytické chemii pod označením Trolox. Naopak zabudováním hydrofobního vedlejšího řetězce do molekuly kyseliny askorbové vzniká lipofilní látka, která lépe proniká buněčnou stěnou.

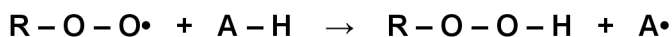
Podle ovlivnění tvorby volných radikálů můžeme rozlišit antioxidanty primární, sekundární a terciární. Primární antioxidanty zabraňují vzniku volných radikálů, sekundární likvidují již vzniklé volné radikály a terciární opravují či eliminují molekuly poškozené volnými radikály.

Dále můžeme antioxidanty rozdělit:

- podle způsobu vstupu do organismu na endogenní a exogenní
- podle rozpustnosti na hydrofilní, lipofilní a amfofilní
- podle lokalizace v buňce či mimo ni na extracelulární a intracelulární
- podle velikosti molekuly na nízkomolekulární a vysokomolekulární
- podle typu volného radikálu na který působí
- podle mechanismu účinku se dělí na: látky, které reagují s volnými radikály; látky, které váží do komplexů katalyticky působící kovy; a látky, které eliminují přítomný kyslík
- podle chemické struktury [17]

2.1.2 Mechanismus účinku antioxidantů

Mechanismus účinku antioxidantů spočívá přednostně v tom, že poskytují atomový vodík ke zneškodňování peroxidových nebo jiných radikálů, které vznikají jako meziprodukty řady oxidačních procesů. Odevzdáním vodíku se antioxidant stává sám radikálem:



Obrázek 1: Mechanismus účinku antioxidantů, kde R – O – O• je peroxylový radikál, A – H je antioxidant, R – O – O – H peroxid a A• radikál antioxidantu

Volný radikál antioxidantu je poměrně málo reaktivní a není schopen vyvolat další řetězovou reakci. Místo toho se deaktivuje. Buď spojením s dalším radikálem (A•, ROO• nebo RO•) nebo disproporcionací na původní antioxidant.

Antioxidanty se dále mohou uplatňovat jako redoxní systémy s nízkým redoxním potenciálem a regenerovat (redukovat) za dané situace nejnegativnější, a tedy nevratnou hydrogenací ohrožené, terminální články redoxních řetězců.

Další možností je nepřímý ochranný účinek inhibitorů oxidací např. tím, že vážou nebo jinak zneškodňují katalyzátory oxidací, tvoří s ochraňovanou složkou komplexy, které jsou stabilnější vůči oxidaci, ztěžují přístup kyslíku do ohrožené potraviny nebo kyslík přítomný v potravine redukuje [5].

2.1.3 Oxidační stres

Oxidační stres je definován jako disbalance mezi oxidanty a antioxidanty ve prospěch oxidantů, potenciálně vedoucí k poškození organismu. V průběhu oxidačního stresu vzniká velké množství ROS (reaktivní kyslíkové sloučeniny) [13].

ROS mohou z velké části vznikat během přirozeného buněčného aerobního metabolismu. Primárními oxidanty, které vznikají jako vedlejší produkty energetického metabolismu jsou superoxidový radikál, peroxid vodíku a hydroxylový radikál. Všechny tyto primární oxidační stresory mohou generovat sekundární kyslíkaté reaktanty, které také způsobují značné oxidační poškození buněčných organel i enzymů. Mnoho sekundárních radikálů vzniká jako produkt peroxidace lipidů a oxidace proteinů [7].

Přirozené antioxidantní mechanismy organismu jsou za normálních podmínek schopny negativní účinky ROS eliminovat. Za podmínek oxidačního stresu jsou však antioxidanty vyčerpány a tento stav může vést k rozvoji degenerativních onemocnění, zahrnujících kardiovaskulární choroby, rakovinu, neurodegenerativní poruchy a procesy stárnutí [13].

2.2 Ječmen

Ječmen je pro své mnohostranné hospodářské využití druhou nejrozšířenější zemědělskou plodinou u nás [57]. Je surovinou zejména pro výrobu sladu (ječmen sladovnický), dále ethanolu, whisky, škrobu, farmaceutických a kosmetických přípravků (ječmen průmyslový) a krmiv (ječmen krmný). V současnosti se největší podíl produkce ječmene využívá jako krmivo. V posledních letech ale kvůli obsahu zdravotně prospěšných látek rapidně vzrůstá i spotřeba potravinářského ječmene pro přípravu různých druhů pečiva, těstovin, müsli a pochutin.

Za oblast původu je považována oblast mezi Egyptem a Íránem, odkud se ječmen rozšířil po všech kontinentech (s výjimkou Antarktidy). První písemná zmínka o pěstování ječmene v našich zemích je z 11. stol. Zpočátku sloužil pouze na výrobu krup a chleba, ale v 17. století nahradil sladovnickou pšenici.

V českých zemích má sladovnictví dobrou tradici a sladovnický ječmen se pěstuje především na Hané a v Polabí [20,21].

2.2.1 Systematika ječmene

Ječmen (rod *Hordeum*) patří do říše rostlin (*Plantae*), oddělení semenných (*Spermatophyta*), pododdělení krytosemenných (*Angiospermae*), třídy jednoděložných (*Monocotyledonae*), čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Podle způsobu růstu se ječmeny dělí na divoce rostoucí plané ječmeny a ječmeny seté (*Hordeum sativum*). Podle uspořádání zrn v klasu se dělí na ječmeny dvouřadé a víceřadé, podle způsobu pěstování na jarní a zimní. Dvouřadé ječmeny se pak dělí do tří skupin: ječmeny nící, vzpřímené a paví. Hlavní skupinu sladovnických ječmenů tvoří ječmeny nící (*Hordeum distichum*, var. *nutans*). Podle novějšího taxonomického zařazení se pro dvouřadý nící ječmen používá pojmenování *Hordeum vulgare*, var. *nutans* [22]. Většina u nás pěstovaných odrůd jarního ječmene má sladovnický charakter [57].



Obrázek 2: *Hordeum vulgare*

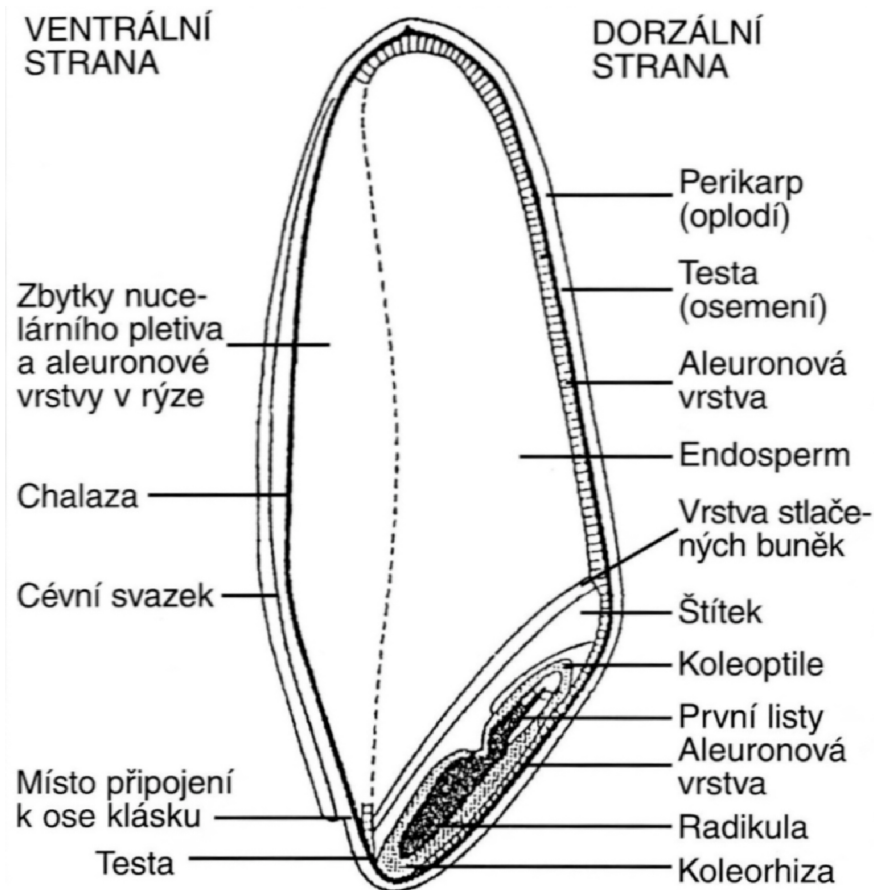
2.2.2 Obilka ječmene

Obilka ječmene je podlouhlého, vejčitého, na obou koncích zašpičatělého tvaru. Skládá se ze tří částí: z obalových vrstev, zárodku a endospermu.

Obalové vrstvy chrání obilku před vnějšími vlivy. Na hřbetní straně obilky je to plucha, na břišní straně pluška, dále oplodí a osemení. Vnější vrstvy jsou složeny převážně z nerozpustných polysacharidů typu celulózy s velkou mechanickou odolností.

Zárodek je latentní forma, ze které po hydrataci vyroste nová rostlina. Zárodek má velký technologický význam při výrobě sladu, kdy se máčením ječmene zahájí enzymatické reakce v zárodku a dochází ke klíčení zrna.

Endosperm představuje největší podíl obilky. Obsahuje zásobní látky pro klíčící rostlinu, z toho asi 75 % škrobu. Do endospermu bývá zvykem zahrnovat také jeho nejsvrchnější vrstvu, tzv. aleuronovou. Tato vrstva obsahuje bílkoviny, tuk a částečně i škrobová zrna. Při dosažení podmínek pro zahájení klíčení je aleuronová vrstva aktivována růstovými hormony. Živiny pro klíčení jsou uloženy ve vnitřním endospermu. Poměr obsahu škrobu k obsahu dusíkatých látek určuje povahu endospermu, tzv. moučnatost nebo sklovitost.



Obrázek 3: Podélný řez zralou obilkou

2.2.3 Chemické složení obilky

Obilka obsahuje 80 až 88 % sušiny a 12 až 20 % vody. Sušinu tvoří organické dusíkaté a bezdusíkaté sloučeniny a anorganické látky.

Největší podíl organických látek v zrně ječmene zaujímají polysacharidy. Vedle polysacharidů buněčné stěny (celulóza, β -glukany, lignin) je to především zásobní polysacharid škrob (60-65 % hmotnosti zrna). Ve zralém zrně je škrob zastoupen výlučně v endospermu ve formě škrobových granulí.

Lipidy jsou v zrně zastoupeny pouze z 2-3 %, a to převážně v aleuronové vrstvě.

Obsah dusíkatých látek je velmi variabilní (7-18 %) vlivem vnějších podmínek (závislost na odrůdě, složení půdy, hnojení, klimatických podmínkách). Bílkoviny jsou uloženy v aleuronové vrstvě jako lepkové bílkoviny a pod aleuronovou vrstvou jako bílkoviny rezervní. Tkáňové bílkoviny se nalézají v membránách buněk endospermu.

Polyfenoly se nachází zejména v obalových částech zrna a v aleuronové vrstvě.

Enzymy se v jednotlivých částech obilky ječmene vyskytují v různé míře. V zárodku a štítku jsou obsaženy všechny z šesti hlavních tříd enzymů (oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, lyázy, izomerázy, ligázy), ale především transferázy, oxidoreduktázy a hydrolázy. Z hydroláz zejména amylázy, peptidázy, lipázy a fosfatázy. Aleuronová vrstva obsahuje hydrolázy (exo- a endopeptidázy, lipázy, fytázu a α -amylázu), transferázy (transaminázy) a oxidoreduktázy. V subaluronové vrstvě se nachází především β -amyláza. V endospermu jsou přítomny β -amyláza, endopeptidáza a malé množství fytázy [22, 23, 24].

2.2.4 Antioxidanty v zrně ječmene

V zrně ječmene jsou obsaženy různé vitamíny, které se nachází především v zárodku a v aleuronové vrstvě. Jejich obsah závisí na odrůdě a půdně-klimatických podmínkách. Mnohé z nich tvoří součást aktivních skupin různých enzymů, a tím působí na enzymatickou aktivitu klíčícího zrna. Obsah vitamínů komplexu B v ječmeni je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1: Obsah vitamínů kopřmplexu B v ječmeni

vitamin	obsah v mg/100 g sušiny
B ₁ - thiamin	0,12-0,74
B ₂ - riboflavin	0,10-0,37
kyselina nikotinová	8-15
B ₆ - pyridoxin	0,30-0,40

Neméně důležitý je vitamin E, který se nachází v zárodečné části zrna. Ječmen obsahuje také vitamin C (kyselina L-askorbová), vitamin H (biotin), kyselinu panthotenovou, α -aminobenzoovou, listovou a karotenoidy. Přítomnost přírodních antioxidačních činidel v ječmeni a ve sladu je důležitá pro organoleptickou stabilitu piva [16].

Cereálie jsou po rostlinných olejích druhým nejvýznamnějším zdrojem vitamínu E. Vitamin E je reprezentován osmi přírodními sloučeninami. Jsou to α -, β -, φ -, a δ -tokoferol a α -, β -, φ -, a δ -tokotrienol. Dříve se za hlavní roli vitamínu E považovaly pozitivní účinky na reprodukční soustavu člověka, v současnosti se klade důraz na jeho antioxidační aktivitu, a to především na inhibici peroxidace lipidů biologických membrán. Za nejúčinnější je považován α -tokoferol, a proto se obsah vitamínu E většinou vyjadřuje v mg ekvivalentu α -tokoferolu (mg α -TE/kg). Průměrný obsah tohoto ekvivalentu udává tabulka 2 [60].

Tabulka 2: Průměrný obsah ekvivalentu α -tokoferolu v obilovinách

obilovina	mg α -TE/kg
ječmen	23,7
pšenice	15,6
oves	14,7
žito	17,1
tritikal	11,8

Účinnými antioxidanty s potenciální terapeutickou hodnotou jsou také fenolické sloučeniny, speciálně flavonoidy, které snižují riziko kardiovaskulárních chorob a rakoviny. Jiné skupiny, jako fenolové kyseliny a vysokomolekulární taniny mají nepříjemnou chuť a negativní vlastnosti při vstřebávání proteinů. Pro cereálie je charakteristický obsah derivátů apigeninu a luteolinu. Hlavní skupiny polyfenolů v ječmeni ukazuje tabulka 3. Silná antioxidační aktivita ječmene souvisí z obsahem tří hlavních fenolických skupin (flavanolů, hydroxycinnamových kyselin a flavonů) [58].

Tabulka 3: Polyfenoly v ječmeni

Flavony	Apigenin 7-O-rhamnoglukosid, isovitexin, vicenin-1,2, isoorientin, tricín, 2''-Oglykosylisovitexin, lutanarin, glukotricín, tricínin
Leukoantokyanidy	Prokyanidin, prodelfinidin
Katechiny	Gallokatechin, epikatechin
Kumariny	Umbelliferon, eskuletin, skopoletin, herniarin
Fenolkarboxylové kyseliny	Kávová, vanilková, m-hydroxybenzoová, p-hydroxybenzoová, syringová, o-kumarová, p-kumarová, veratrová, ferulová, salicylová, chlorogenová, o-hydroxycinnamová, gallová, m-galloylgallová, proptokatechuová

Polyfenoly mají široké spektrum příznivých účinků na lidské zdraví, zahrnujících účinky antioxidační, antikarcerogenní, antimikrobiální, imunomodulační a protizánětlivé. Dále se účastní procesů regulace tlaku krve a hladiny glukózy v krvi. Jestliže jsou antioxidační fenolické komponenty přijímány pravidelně, snižují trombotické jevy, a tím přispívají ke zlepšení aterosklerózy a snížení výskytu nemocí cévní soustavy [59].

Obsahem karotenoidů v obilovinách se zabývali Panfili, Fratiani a Irano [65]. Identifikovali tři píky příslušející luteinu, zeaxantinu a $\alpha+\beta$ -karotenu (nepodařilo se jim rozdělit α - a β -karoten). Jejich výsledky jsou uvedeny v tabulce 4. O významu karotenoidů a jejich funkci bude pojednáno v kapitole 2.3.

Tabulka 4: Obsah karotenoidů ve vybraných obilovinách

obilovina	$\alpha+\beta$ -karoten (mg/kg sušiny)	Lutein (mg/kg sušiny)	Zeaxantin (mg/kg sušiny)
ječmen	0,05 ± 0,01	0,86 ± 0,12	0,30 ± 0,15
oves	0,01	0,23	0,12
pšenice tvrdá	0,14 ± 0,04	2,65 ± 0,65	0,26 ± 0,04
pšenice semolina	0,1 ± 0,06	2,48 ± 0,48	0,11 ± 0,02
pšenice špalda	0,04 ± 0,01	1,46 ± 0,44	0,12 ± 0,05
pšenice dvouzrnka	0,05 ± 0,02	1,78 ± 0,37	0,19 ± 0,04
pšeničné klíčky	0,60 ± 0,07	2,60 ± 0,07	2,14 ± 0,01

Významné antioxidační vlastnosti použitelné v prevenci rakoviny mají také kyselina listová a inositolhexafosfát (IP-6), který je hlavní zásobárnou fosforu při klíčení luštěnin a obilí (včetně ječmene). Dr. Samsuddin v roce 1995 prokázal antinádorovou aktivitu IP-6. Uvedená látka je komerčně využitelná jako jedna z forem potravinových doplňků [62].

Jako nejzajímavější enzym s antioxidačními účinky bývá označována superoxid dismutáza (SOD). Funkce tohoto enzymu spočívá v přeměně superoxidových volných radikálů na méně reaktivní peroxid vodíku, zneškodňovaný dalšími enzymy na vodu a kyslík. Přítomnost superoxidového anionového radikálu v pivu může mít vliv na peroxidaci lipidů, degradaci polysacharidů a inaktivaci enzymů. V zrně ječmene a ve sladu zabraňuje SOD žluknutí během skladování [16].

Kataláza a peroxidáza, patřící mezi hydroperoxidázy, štěpí pro buňky škodlivý peroxid vodíku. Odbourávají stejný produkt, ale různým mechanismem. V zrně ječmene je kataláza obsažena v nepatrné koncentraci, během klíčení se její aktivita zvýší 40 až 70krát a roste s počtem dní klíčení. Hvozděním se inhibuje. Peroxidáza je v zrně ječmene také v nepatrném množství, ale během klíčení se její aktivita zvýší až 9krát. Během hvozdění sladu se aktivita naopak snižuje až na jednu třetinu [22].

Za zmínku stojí i obsah vlákniny a minerálů. Nemají sice antioxidační účinky, ale jsou také ze zdravotního hlediska velmi důležité. Vysoký obsah těchto látek a vitamínu E předurčuje cereálie jako surovinu k výrobě funkčních potravin se zdravotně pozitivními účinky. Obsah vlákniny ilustruje tabulka 5.

Tabulka 5: Obsah vlákniny a minerálů ve vybraných obilovinách

obilovina	Vláknina (%)
ječmen	14-17
bezpluchý ječmen	13-18
pšenice	14-16
oves	10-12
bezpluchý oves	10-12
žito	10-12
amarant	8-12

Vláknina je lokalizována hlavně v obalových vrstvách, které obsahují více než 38 % vlákniny. Oproti tomu bílá mouka obsahuje pouze 3,4 % vlákniny. Produkty s maximálním možným poměrem vnějších vrstev zrna nebo celozrnné produkty jsou k výrobě funkčních potravin ideální. Mezi fyziologické funkce vlákniny patří regulace funkce střev, prevence rakoviny, regulace hladiny cholesterolu, regulace hladiny cukru a tuku v krvi a redukce krevního tlaku [61]. Nakamura a kol. dokázali, že β -glukany, což jsou rozpustné vlákniny obsažené v cereáliích a především v ječmeni, hrají pozitivní roli v ochraně proti žaludečním vředům [63].

Mezi zdravotně pozitivní účinky minerálů obsažených v obilovinách (především Ca, Mg, K, Zn), můžeme zařadit především stimulaci růstu kostí a zubů, prevenci osteoporózy a kardiovaskulárních onemocnění. Při vstřebávání minerálních látek může hrát negativní roli kyselina listová [61].

2.2.5 Mladý (zelený) ječmen

Při zkoumání obsahu zdravotně významných látek v obilce a růstových fázích ječmene bylo zjištěno, že významným zdrojem žádaných přírodních antioxidantů je zelený ječmen. Zelený ječmen nachází v současné době uplatnění jako doplněk stravy. Další odstavce stručně nastíní obsah zdravotně významných látek v mladém ječmeni.

Předtím než projde obilná tráva reprodukčním procesem, který vede ke vzniku zrna, nachází se ve stádiu, kdy má podobné vlastnosti a obsah vitamínů a minerálů jako tmavá zelenolistá zelenina. Je-li tato tráva sklizena v mladém věku, svým složením se od svých dospělých protějšků výrazně liší. Ječmenná tráva je z nutričního hlediska považována ze všech zelených trav za nejhodnotnější. Listy mladého ječmene jsou sklizeny, když dosáhnou výšky 20-25 cm, kdy je obsah jejich významných složek nejvyšší.

V současnosti se mladý ječmen dodává na trh ve formě prášku, který lze smíchat s vodou či ovocným džusem. Existují dva komerčně využívané způsoby výroby. Prvním způsobem je vylisování ječmenné šťávy a vysušení sprejovou sušičkou na prášek. Tato forma obsahuje výrazně vyšší koncentrace nutričně a zdravotně zajímavých látek, ovšem kromě vlákniny. Té se zbavíme při lisování. Druhým způsobem je klasické vysušení ječmenné trávy a rozemletí na prášek.

Mladý ječmen se vyznačuje vysokou antioxidační aktivitou. Obsahuje velké množství karotenoidů, polyfenolů, chlorofylu, vitamínu C, E a skupiny B (B₁, B₂, B₃, B₅, B₆), dále obsahují biotin, kyselinu listovou, kyselinu nikotinovou, cholin a široké spektrum minerálů (Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, P, Zn).

Obsahuje také celou řadu enzymů. Těmi nejzajímavějšími z hlediska antioxidačních vlastností jsou superoxid dismutáza, kataláza a peroxidáza.

Nezanedbatelné je i množství vlákniny a rostlinných bílkovin o malé molekulové hmotnosti [66, 68, 69, 71].

Roku 1992 ohlásili Osawa a kol. [67] objev nového velice účinného antioxidantu izolovaného ze zeleného ječmene. Je to isoflavonoid 2''-O-glykosylisovitexin. V devadesátých letech byl v USA a Japonsku tento antioxidant v popředí zájmu o zelený ječmen. Markham a Mitchell [70] v roce 2003 uveřejnili článek, ve kterém píší, že v předchozích studiích došlo k chybné identifikaci, a 2''-O-glykosylisovitexin (považovaný za hlavní flavonoid v zeleném ječmeni) jsou ve skutečnosti flavon-C-glykosidy saponarin a lutonarin.

2.3 Karotenoidy

Karotenoidy představují jednu z nejrozšířenějších a nejpočetnějších tříd přirozených pigmentů s významnými biologickými účinky a řadou průmyslových aplikací (odhad jejich roční tvorby v biosféře činí 10^8 t). Jsou to žluté, oranžové, červené až hnědé pigmenty, které jsou produkovány fotosyntetizujícími organismy počínaje anaerobními fotosyntetickými bakteriemi, cyanobakteriemi, houbami až po rostliny, ale i nefotosyntetizujícími bakteriemi, kvasinkami a plísněmi. Karotenoidy jsou rozšířeny i v živočišné říši, jsou to ovšem karotenoidy mikrobiálního či rostlinného původu, protože živočichové je neumějí syntetizovat, pouze je přetváří na vlastní formy [6,7].

Všechny karotenoidy jsou lipofilní sloučeniny. Nejsou příliš stabilní, poměrně snadno dochází k izomeraci vlivem teploty, světla či kyselého prostředí [9].

2.3.1 Struktura a klasifikace karotenoidů

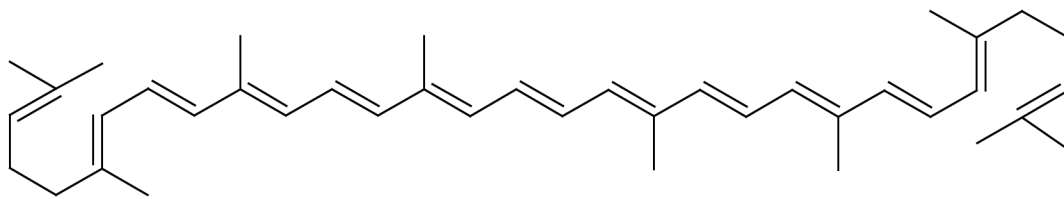
Ze strukturního hlediska jsou karotenoidy tetraterpeny, nenasycené alifatické a alicyklické uhlovodíky a jejich oxidační produkty.

Molekuly většiny karotenoidů jsou tvořeny 40 uhlíkovými atomy a sestávají obecně z nenasyceného řetězce o 22 atomech uhlíku s konjugovanými dvojnými vazbami a s methylovým větvením typickým pro isoprenoidy. Na oba konce řetězce je připojena devítičlenná jednotka, která může být cyklická (β -karoten) nebo acyklická (lycopen). Je-li koncová struktura cyklická, jako u β -karotenu, je to obvykle šestičlenný α - nebo β -jononový kruh. Polyenová struktura dává karotenoidům jejich barevnost.

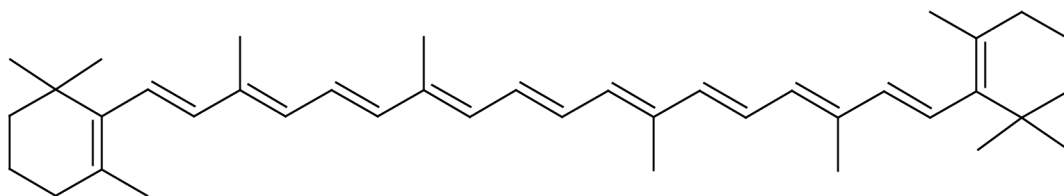
Karotenoidy rozdělujeme do dvou strukturních skupin. Ty, které mají čistě uhlovodíkovou strukturu, nazýváme **karoteny** (viz obrázek 4). Druhou skupinu tvoří oxidační produkty karotenů, které obsahují jednu, dvě nebo více hydroxylových, karboxylových, karbonylových nebo epoxidových skupin. Karotenoidy, patřící do této skupiny, nazýváme **xantofyly** (viz obrázek 5).

Konjugované dvojně vazby karotenoidů se obvykle vyskytují v all-trans konformaci. Cis izomery některých karotenoidů můžeme přesto nalézt v rostlinných tkáních a zejména buňkách řas [6,9].

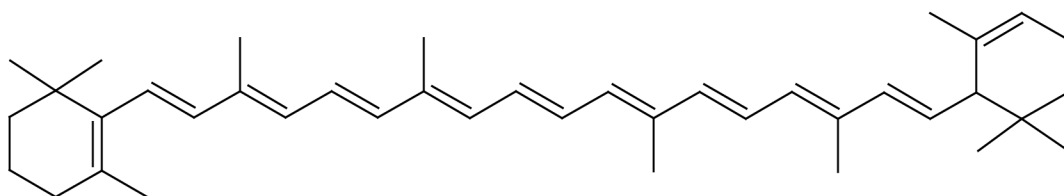
Více než 90 % rostlinných karotenoidů je lokalizováno v buňkách listů, obvykle jako směs 20-40 % karotenů (z toho víc jak 70 % β -karotenu) a 60-80 % xantofylů. β -karoten je často doprovázen i α - a γ -izomery (mrkev, meruňky, mirabelky, světlé třešně) [5].



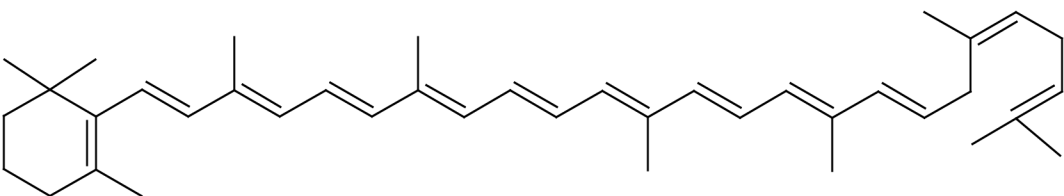
lykopen



β -karoten

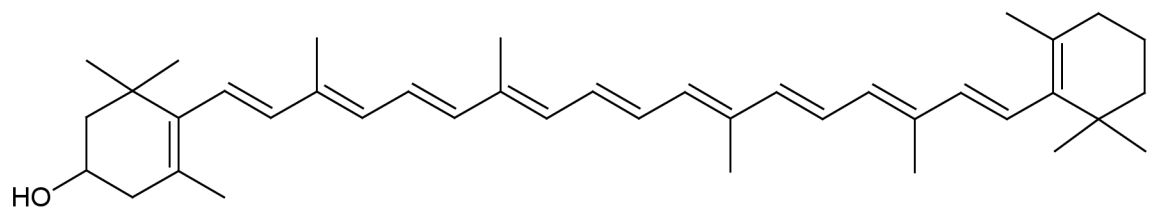


α -karoten

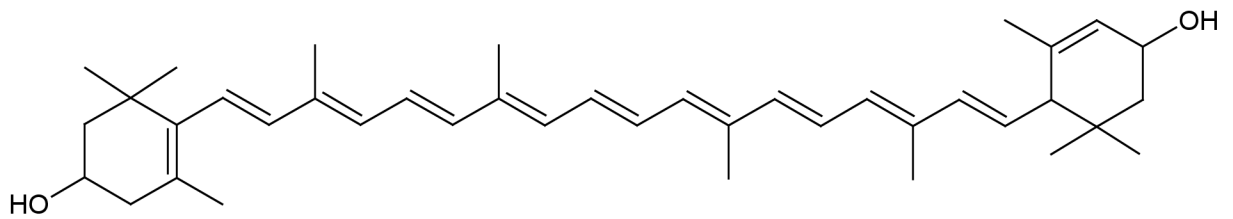


γ -karoten

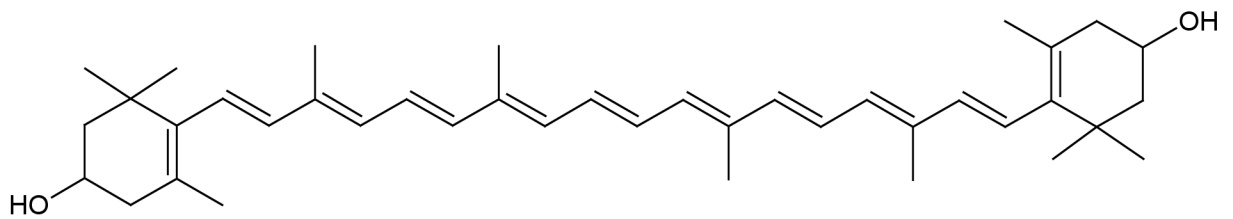
Obrázek 4: Chemická struktura vybraných karotenů



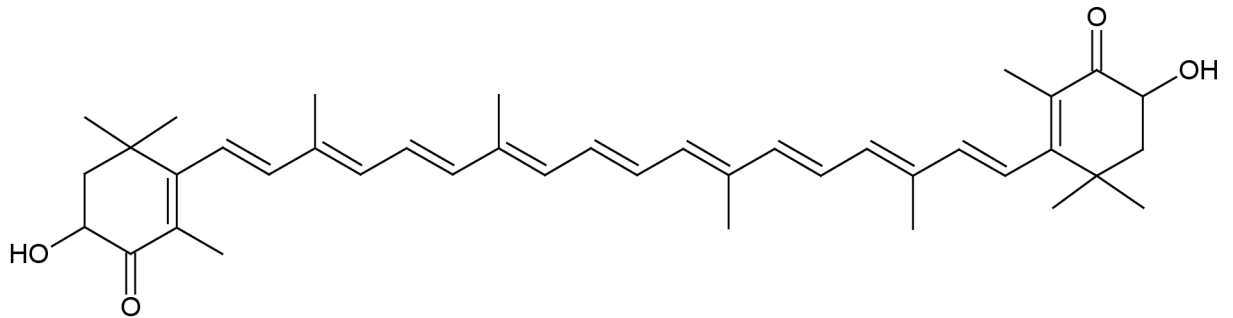
β-kryptoxantin



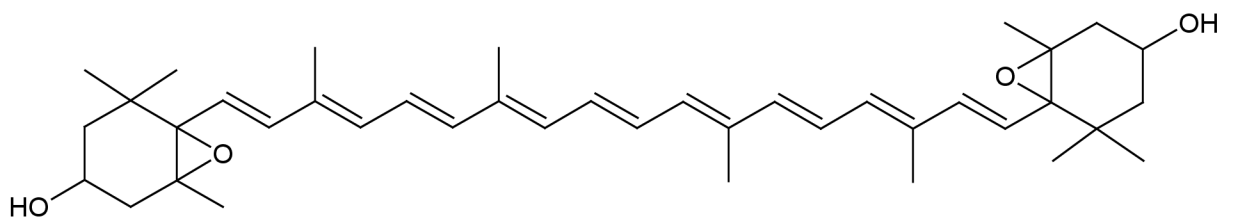
lutein



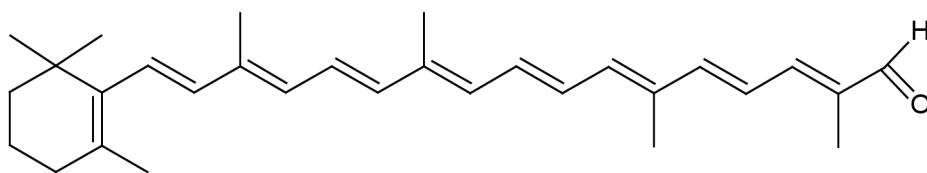
zeaxantin



asthaxantin



violaxantin

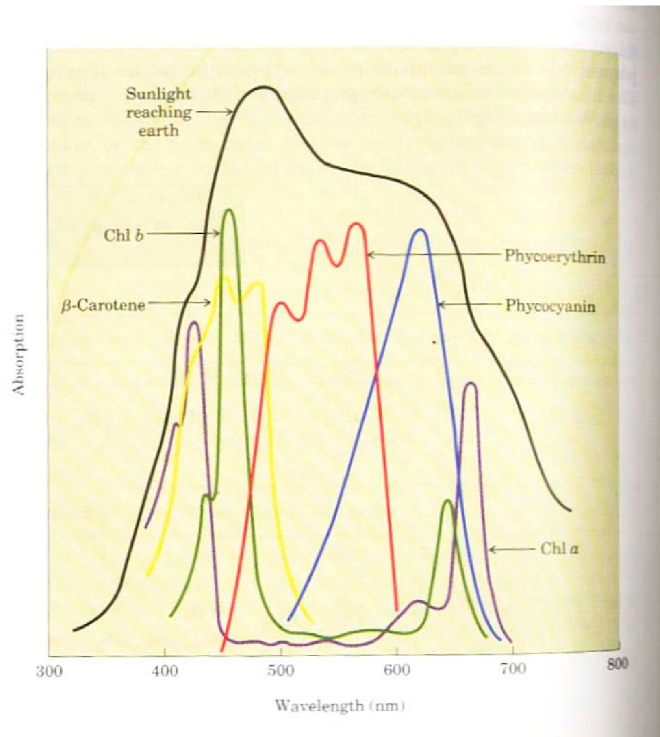


β-apo-8'-krotenal

Obrázek 5: Chemická struktura vybraných xantofylů

2.3.2 Funkce karotenoidů

Karotenoidy hrají významnou roli ve fotosyntéze jako pomocné pigmenty absorbující sluneční záření (viz obrázek 6). Jsou přítomny ve všech tkáních a buňkách obsahujících chlorofyl. U fotosyntetizujících organismů slouží také jako ochrana před fotooxidativním účinkem singletového kyslíku a radikálů vznikajících za světla v přítomnosti endogenních fotosenzitivních látek. Některé karotenoidy přítomné v kořenech a listech rostlin slouží jako prekurzory kyseliny abscisové (růstový hormon) [7,9].

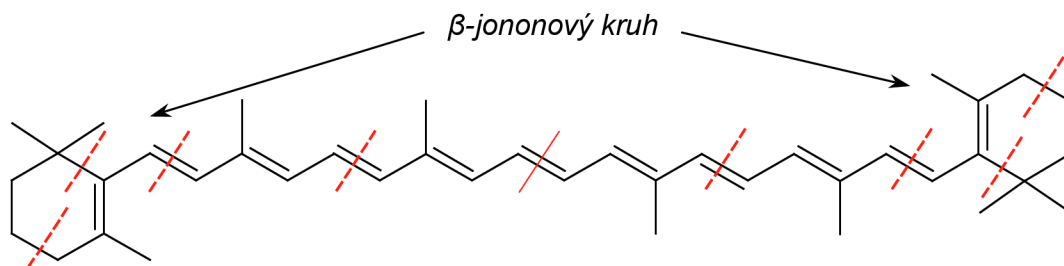


Obrázek 6: Absorbce slunečního záření fotosyntetickými barvivy

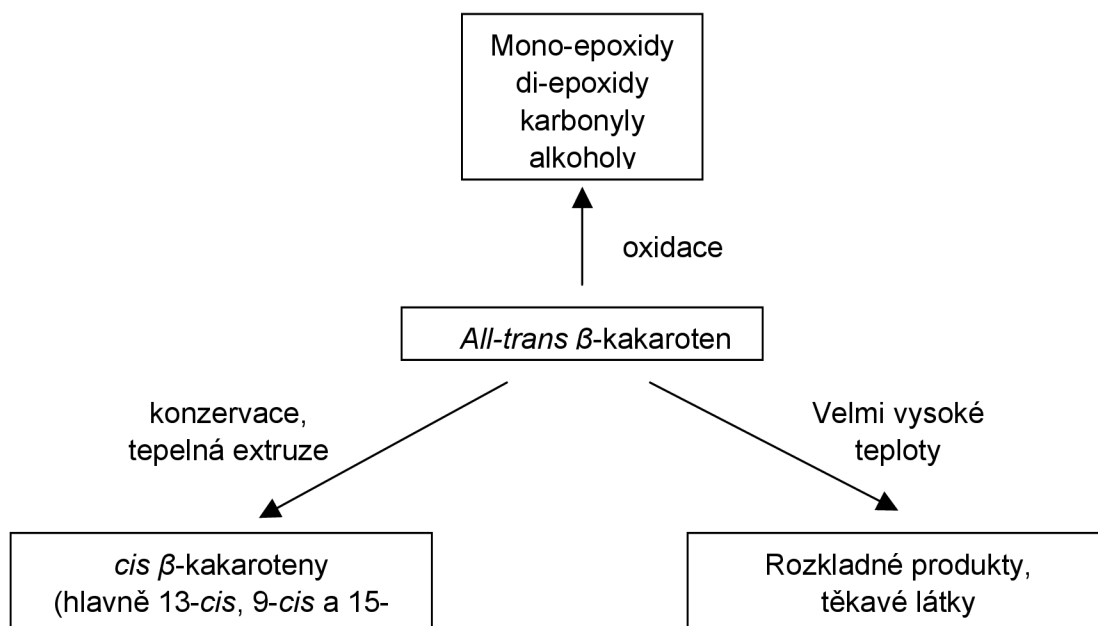
V lidské a savčí potravě mají karotenoidy řadu významných fyziologicky pozitivních účinků, založených hlavně na antioxidačním, antimutagenním a fotoprotektivním účinku. Dále ovlivňují imunitní systém, účastní se v procesu vidění a v neposlední řadě působí jako prekurzory vitamínu A [6,8].

2.3.2.1 Oxidace karotenoidů

Z důvodu vysokého počtu konjugovaných dvojných vazeb jsou karotenoidy snadno oxidovatelné. V průběhu oxidace se nejprve tvoří karbonylové a epoxidové sloučeniny, další oxidace má za následek vznik kratších řetězců mono- nebo dioxygenovaných, zahrnujících i sloučeniny s epoxy- β -jononovým kruhem. U karotenoidů s funkcí provitaminu A tím může být způsobena ztráta jejich aktivity. Oxidační rozklad β -karotenu je zesilován v přítomnosti sulfitu a iontů kovů. Degradaci karotenoidů nepřímou urychluje i enzym lysoxygenáza. Ten katalyzuje oxidaci mastných kyselin na peroxidy, které pak napadají karotenoidy.



Obrázek 7: Štěpení β -karotenu. Červeně jsou označeny možná místa štěpení.

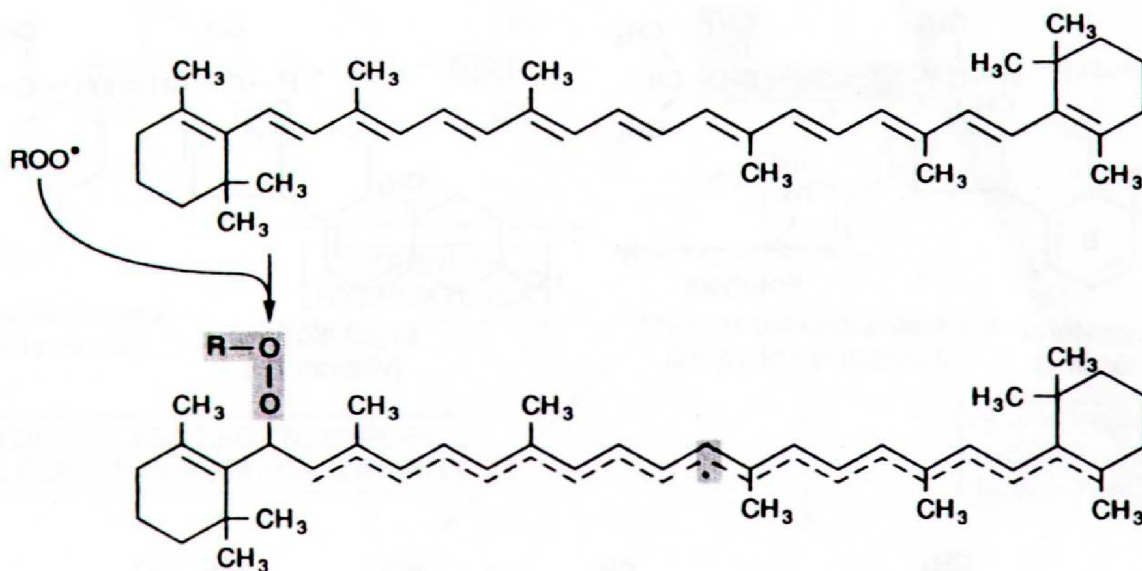


Obrázek 8: Degradace all-trans- β -karotenu.

2.3.2.2 Antioxidační vlastnosti karotenoidů

Karotenoidy mají z důvodu jejich snadné oxidace antioxidační účinky, a to především při nízkém parciálním tlaku kyslíku. Při vysokém parciálním tlaku kyslíku má β -kakaroten dokonce prooxidační účinky [9]. Doplnuje tak vitamín E, který má naopak největší aktivitu při vyšším parciálním tlaku [10].

Předpokládá se, že antioxidační účinky karotenoidů hrají roli v omezování rakoviny, šedého zákalu, arteriosklerózy a procesu stárnutí [9].



Obrázek 9: Vytvoření resonančně stabilizovaného radikálu β -karotenu.

2.3.2.3 Karotenoidy jako prekurzory vitamínu A

Vitamín A je nepostradatelný nejen pro vidění, ale i pro růst, vývoj kostry, normální reprodukční funkce a udržování diferenciací v tkáních [6]

Aby karotenoid vykazoval provitaminovou aktivitu, musí být jeho struktura srovnatelná se strukturou vitamínu A. Musí tedy obsahovat alespoň jeden β -jononový kruh.

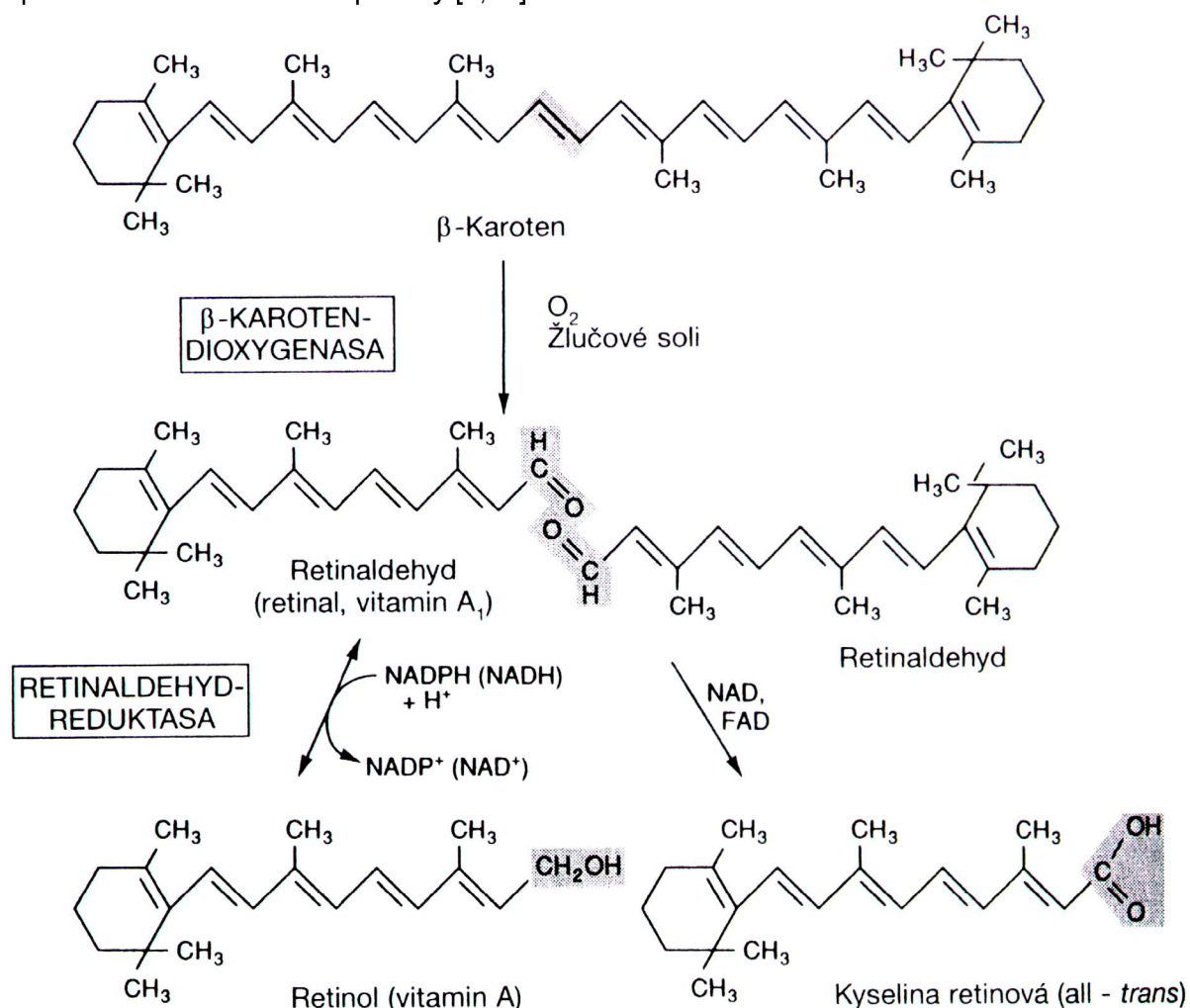
Tabulka 6: Příklady relativní aktivity karotenoidů vztažené na aktivitu vitamínu A (100 %)

karotenoid	relativní aktivita (%)
β -karoten	50
β -kryptoxantin	28
α -karoten	26
γ -karoten	21
β -apo-8'-krotenal	18-36
lykopen	0
zeaxantin	0

Tabulka 7: Relativní aktivita stereoizomerních forem β -karotenu, vztažené na all-trans- β -karoten [9].

stereoizomer	relativní aktivita (%)
All-trans- β -karoten	100
9-cis- β -karoten	38
12-cis- β -karoten	53

Oxidačním štěpením β -karotenu mohou vzniknout 2 molekuly retinalu, který se pak redukuje na retinol nebo oxiduje na kyselinu retinovou (obrázek 10). Retinol se esterifikuje mastnou kyselinou (především palmitovou) a vzniklý ester je transportován lymfou do jater, kde je skladován. V případě potřeby se retinol uvolňuje hydrolýzou a transportuje se z jater speciální bílkovinou krevní plazmy [6, 10].

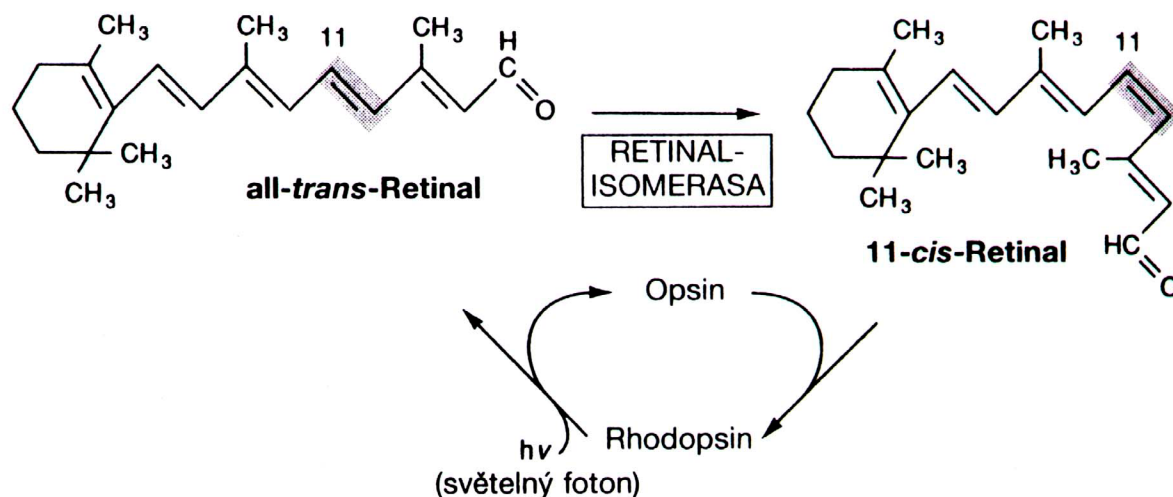


Obrázek 10: β -karoten a jeho štěpení na retinal (vitamin A_1)

Yeum a kol. v roce 2000 potvrdil, že retinal je jediným produktem štěpení β -karotenu v případě přítomnosti α -tokoferolu, a že vznik apo-karotenoidů nastává pouze v případě absence antioxidantů jako je α -tokoferol.

Ve stejném roce Barua a Olson zjistili, že klíčovým enzymem, který štěpí β -karoten na dvě molekuly retinalu je enzym β, β -karoten-15,15'-dioxxygenáza, lokalizován ve dvanáctníku a v játrech. [11]

Retinal je součástí zrakového pigmentu rhodopsinu. Rhodopsin se vyskytuje v receptorových buňkách, které jsou zodpovědné za vidění ve slabém světle. Jestliže je rhodopsin vystaven světlu, štěpí se a vzniká opsin a all-trans-retinal. Reakce je spojena s konformačními změnami ve stěně těchto buňek, které otevřou kanály pro vápenaté ionty. Rychlý průnik vápenatých iontů dovnitř spustí nervové impulzy umožňující vnímání světla mozkem (obr. 9) [6,10].



Obrázek 11: Mechanismus vizuálního podnětu

Nedostatek vitamínu A je celosvětovým zdravotním problémem. Častým příznakem nedostatku vitamínu A u lidí je šeroslepost, způsobená nedostatečnou regenerací retinalu. Stálý nedostatek vede k poruchám očního a kožního epitelu a výstelky dýchacího a zažívacího traktu [6].

Nadměrný příjem vitamínu A se projevuje hypervitaminózou (bolesti hlavy, průjem, únava, suchá pokožka, vypadávání vlasů, nechutenství). U těhotných žen může způsobit poškození plodu. Předávkování β -karotenem se naproti tomu neprojevuje hypervitaminózou, ale žlutým zabarvením moči a pokožky.

Doporučená denní dávka retinolu se vyjadřuje buď v mezinárodních jednotkách (IU-International Units) nebo v ekvivalentech hmotnosti retinolu v mg. Mezinárodní jednotka IU představuje 0,3 μ g retinolu [12].

Tabulka 8: Doporučená denní dávka vitamínu A

Děti do 1 roku	0,45 mg
Děti 1-6 roků	0,40 mg
Děti do 7-18 roků	0,75 mg
Dospělí	0,8-1,0 mg
Těhotné ženy	1,0-1,2 mg
Kojící ženy	1,2-2,0 mg

Vitamin A byl dříve izolován z rybích olejů, od roku 1950 je však prakticky veškerý komerční vitamin A získáván syntézou, vycházející z monoterpenů citralu [6].

2.3.3 Preventivní význam karotenoidů ve výživě

2.3.3.1 *Prevence rakoviny*

Řada epidemiologických studií opětovně potvrdila, že bohatý přísun karotenoidů potravou a jejich vysoká koncentrace v krevním séru nepřímo korelují s celkovou úmrtností a výskytem nádorových onemocnění. To platí zejména pro rakovinu plic a žaludku, ale i pro rakovinu tlustého střeva, močového měchýře, hrtanu, jícnu, děložního hrdla a jiné. Při podrobnější analýze se však mnohé studie ukazují jako přinejmenším problematické a jednotlivé poznatky si často odporují. Výsledky ovlivňují různé koncentrace různých karotenoidů a také další antioxidační a antikancerogenní látky přítomné ve sledovaných potravinách. Existuje tedy korelace mezi příjmem potravin bohatých na karotenoidy, ale ještě nebyly objasněny mechanismy kancerogenních účinků karotenoidů. Důkazy pro antikancerogenní účinek β -karotenu také chybí. Jako zvláště problematická se ukázala i otázka správného dávkování a suplementace.

2.3.3.2 *Kardiovaskulární choroby*

Z výsledků epidemiologických studií vyplývá nepřímá korelace mezi přísunem karotenoidů z potravy a kardiovaskulárními chorobami, a to i v kombinaci s přísunem vitamínu E a C. Dvě studie (evropská EURAMIC a americká LCR-CPPT) došly ke stejnému závěru, že konzum stravy bohaté na karotenoidy snižuje riziko srdečního infarktu a koronární choroby srdeční. Vysoká hladina β -karotenu a s tím spojené snížení morbidity však už nemohlo být následnou suplementací dále pozitivně ovlivněno.

Mechanismus preventivního účinku spočívá v zabraňování oxidace LDL (low density lipoprotein) cholesterolu, který hraje v patogenezi arteriosklerózy důležitou roli. Tento účinek byl potvrzen u vitamínu E, u β -karotenu však jednoznačně potvrzen nebyl.

2.3.3.3 *Karotenoidy a imunitní systém*

Výsledky farmakologických studií ukázaly jasný pozitivní vliv karotenoidů na imunitní systém. Výsledky epidemiologických studií jsou však nejednotné a neuspokojivé. Například studia suplementace β -karotenem vedly jak k pozitivním tak k negativním závěrům na imunologické parametry. Naproti tomu pozitivních výsledků se suplementací β -karotenem a lykopenem bylo dosaženo v doprovodné léčbě AIDS. Pozitivní vliv karotenoidů na imunitní systém byl potvrzen i u starých lidí, kuřáků a osob vystavených UV-záření.

2.3.3.4 *Degenerativní oční změny*

Degenerace žlutého tělíska oční sítnice je jednou z nejčastějších příčin oslepnutí ve stáří. Žluté tělísko obsahuje vysoké koncentrace luteinu a zeaxantinu, které způsobují charakteristické zbarvení tělíska. U osob často konzumujících tmavozelenou listovou zeleninu, jež obsahuje významný podíl právě těchto karotenoidů, se snížilo riziko stařecké degenerace žlutého tělíska.

Riziko šedého zákalu také snižuje výživa bohatá na antioxidanty včetně karotenoidů a na stopové prvky. Zdá se být jednoznačné, že karotenoidy jsou schopny ochraňovat proteázy v oční čočce, které jsou zodpovědné za eliminaci poškozených bílkovin čočky, a tím za její optimální funkci.

2.3.3.5 Ochrana kůže

Intenzivní sluneční záření může vést k poškození kůže různého stupně, které při opakované expozici způsobuje předčasné stárnutí kůže, ztrátu elasticity, často i rakovinu kůže. Pokusy za kontrolovaných podmínek ukázaly, že suplementace β -karotenem ochraňuje kůži před UV-zářením. Zarudnutí kůže bylo po expozici méně výrazné a rovněž koncentrace β -karotenu v kůži byla vyšší než u kontrolní skupiny [14].

2.3.3.6 Potřeba antioxidantů při kouření a nadměrném požívání alkoholu

Kuřáctví a nadměrné užívání alkoholu představují mnohostranné ohrožení zdraví v důsledku oxidativního stresu. Ten je způsoben přítomností reaktivních oxidantů v cigaretovém kouři a endogenní tvorbou reaktivních forem kyslíku a dusíku odvozených od metabolických drah etanolu. Proto je žádoucí přiměřené doplňování stravy zejména vitamínem C, E, A, folacinem, karotenoidy, fenolickými látkami aj. I když pivo a víno může působit jako dodatečný zdroj antioxidantů, nemůže v dostatečné míře zastoupit jiné zdroje antioxidantů [15].

2.4 Metody stanovení karotenoidů

2.4.1 Zacházení se vzorky

Charakteristická struktura karotenoidů se systémem konjugovaných dvojných vazeb souvisí s problémy, které se objevují při práci a manipulaci se vzorky. Největším problémem je citlivost karotenoidů na světlo, teplotu a přítomnost kyslíku. Také kyselé nebo zásadité prostředí může být příčinou jejich nestability. Tyto faktory mohou vést k degradaci nebo transformaci karotenoidů, a tím ke změnám jejich zastoupení ve vzorcích. Z tohoto důvodu je nezbytné řídit se opatřeními, které těmto nežádoucím změnám zabrání. Mezi taková opatření popsaná v literatuře patří například přidavek antioxidantů, využití rotační vakuové odparky nebo odpařování pod proudem dusíku, skladování v temnu, pod dusíkem či argonem, při teplotě okolo -20 °C. Použití antioxidantů je jednou z nejčastějších strategií prevence oxidace v průběhu extrakce, zvláště pokud jsou vzorky saponifikovány za účelem získání volných karotenoidů [25]. Obvykle se používá butylhydroxytoluen (BHT), kyselina askorbová nebo pyrogallol [37]

2.4.2 Extrakční metody

Pro stanovení karotenoidů se nepoužívá jediná standardní metoda extrakce, protože spektrum karotenoidů a vzorků obsahujících karotenoidy je velice široké [25].

Extrakční metody použitelné pro rostlinné vzorky jsou většinou založeny na extrakci methanolem [32] nebo směsí methanolu s jinými rozpouštědly. Používají se například směsi methanol (MeOH) a tetrahydrofuran (THF) (1:1, v/v) [28,29], MeOH a chloroform [30], MeOH a hexan [31], MeOH, aceton, ethanol (50:25:25, v/v/v) [32], MeOH, ethylacetát, benzín [34]. Další možností je extrakce směsí hexan:aceton (1:1, v/v) [33], hexan:aceton:ethanol (50:25:25, v/v/v) [35] nebo hexan:ethanol (1:1, v/v) [36].

Česká technická norma uvádí jako vhodná rozpouštědla diethylether (prostý peroxidů), *di*-isopropylether, petrolether (bod varu 40 °C - 60 °C), *n*-hexan, dichlormethan, tetrahydrofuran, toluen nebo jejich vhodnou směs [19].

Extrakční postupy živočišných vzorků, séra a plazmy jsou více jednotné. Prvním krokem je obvykle srážení proteinů ethanolem a druhým krokem extrakce hexanem nebo směsí butanol:ethylacetát (1:1, v/v).

V literatuře je popsána také metoda superkritické fluidní extrakce (SFE), která je rychlá, selektivní a s možností snadné automatizace.

Karotenoidy jsou ve vzorcích obsažené převážně ve formě esterů mastných kyselin, a proto bývá dalším krokem saponifikace methanolickým, ethanolickým nebo vodným roztokem hydroxidu draselného (10-60 % w/v). Podmínky, za kterých saponifikace probíhá, jsou voleny s ohledem na nízkou stabilitu karotenoidů [25].

2.4.3 Separační metody

První techniky separace karotenoidů z rostlinných materiálů v 60. letech 20. století využívaly chromatografii na tenké vrstvě (TLC). V 70. a 80. letech byla často využívána kolonová chromatografie (open-column chromatography) a v několika studiích byla použita i plynová chromatografie (GC) a gelová permeační chromatografie (GPC). TLC a kolonová chromatografie se dnes používají k přečišťování a koncentrování extraktů. Od konce 70. let se nejpoužívanější metodou separace karotenoidů z různých materiálů stává vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC), která je nejpoužívanější dodnes [26,27].

Další v současnosti používané techniky jsou protiproudá (counter-current) chromatografie [33], superkritická fluidní chromatografie [31,38] a kapilární elektroforéza [18].

2.4.4 Detekce

V literatuře se můžeme setkat s různými metodami detekce karotenoidů. Mezi nejpoužívanější metody patří UV-VIS spektroskopie, většinou s detektorem diodového pole (DAD), a hmotnostní spektrometrie (MS). Pro zjišťování struktury karotenoidů je vhodná nukleární magnetická rezonance (NMR), případně IR spektroskopie [27]. Byla popsána i aplikace termooptické spektrometrie (TLS) [39] a coulometrická elektrochemická detekce [40].

2.4.5 Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Kapalinová chromatografie se využívá především k separaci směsí látek, které jsou netěkavé nebo špatně těkavé a termicky labilní.

Metoda kapalinové chromatografie je známá už od počátku 20. století. K prudkému rozvoji vysoceúčinné kapalinové chromatografie dochází teprve od konce 60. let. Rozvoj umožnily, vedle technického pokroku, také poznatky z plynové chromatografie, které objasnily podstatu pochodů v koloně a jejich souvislost s účinností chromatografického procesu. Vysoké účinnosti a rychlosti analýzy se dosahuje použitím kolon plněných náplněmi s částicemi o velikosti 3-10 μm a relativně velkým průtokem mobilní fáze. To vyžaduje použití vysokotlakých čerpadel a konstrukce celého systému tak, aby odolal tlakům do 30-60 MPa. K automatizaci analýzy přispěly průtokové detektory umožňující citlivou kontinuální detekci, automatické dávkovače a počítačové systémy.

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Na rozdíl od plynové chromatografie rozhodují o separaci složek vzorku nejen jejich interakce se stacionární fází, ale také použitá mobilní fáze. Během separace se analyt rozděluje mezi stacionární a mobilní fází. Čas, který stráví v jedné nebo druhé fází, závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Jsou využitelné všechny možné mechanismy separace. Adsorpce, rozdělování, iontová výměna, molekulově síťový efekt nebo specifické interakce v afinitní chromatografii.

2.4.5.1 Charakteristické veličiny chromatografického systému

Distribuční konstanta

Během separace se v koloně neustále vytváří a porušuje fázová rovnováha mezi mobilní a stacionární fází. Složka má při ustavení rovnováhy ve stacionární fázi koncentraci c_S a v mobilní fázi c_M . Poměr mezi těmito koncentracemi je v ideálním případě konstantní a nazývá se distribuční konstanta K_D .

$$K_D = \frac{c_S}{c_M}$$

Čím je hodnota K_D vyšší, tím je složka více vázána stacionární fází a déle zdržována v koloně.

Retenční čas

Zadržování rozpuštěné látky stacionární fází způsobuje, že kolonou migruje menší rychlostí než je průměrná rychlost mobilní fáze. Čas, který molekula složky stráví v koloně, se nazývá retenční čas t_R . Tato doba se dělí na čas, po který molekula setrvává v mobilní fázi (mrtvý retenční čas t_M) a čas strávený ve stacionární fázi (redukovaný retenční čas t'_R).

$$t_R = t_M + t'_R$$

Retenční objem

Retenční objem V_R je objem mobilní fáze potřebný k eluci složky:

$$V_R = t_R \cdot F_M,$$

kde F_M je objemový průtok mobilní fáze.

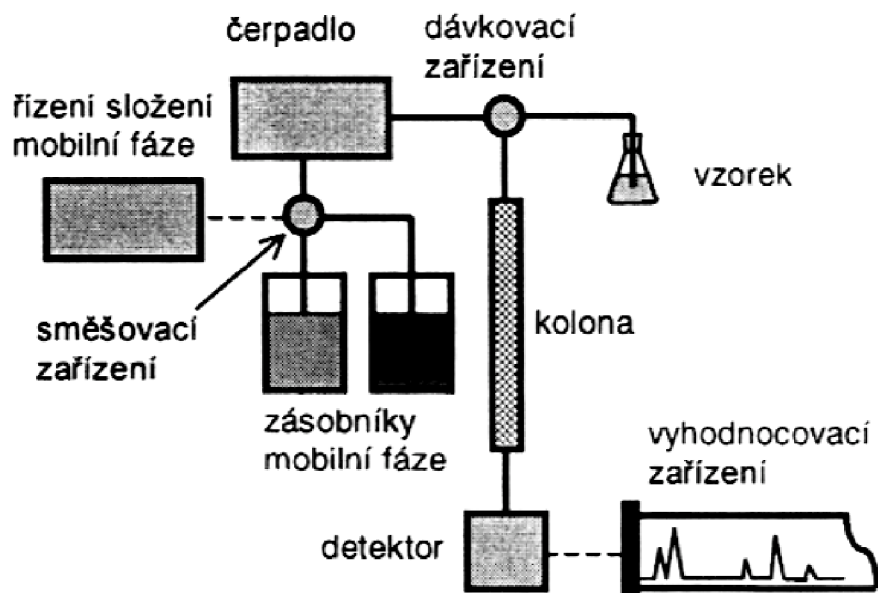
Účinnost kolony

Účinností kolony charakterizujeme její schopnost separovat složky směsi. Roste s počtem teoretických pater n . Teoretické patro je pomyslná část kolony, ve které dochází k ustavení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází. Počet teoretických pater n lze určit z chromatogramu, z šířky píku Y .

$$n = 16 \left(\frac{t_R}{Y} \right)^2$$

2.4.5.2 Instrumentace

HPLC systémy obsahují zásobníky mobilní fáze, čerpadlo mobilní fáze, zařízení pro odplynění mobilní fáze (degazér), dávkovací zařízení, kolonu se stacionární fází, termostat kolony, detektor s průtočnou celou a vyhodnocovací zařízení. Základní uspořádání HPLC systému ilustruje obrázek 12.



Obrázek 12: Základní uspořádání HPLC systému

Nároky na **čerpadlo** mobilní fáze jsou především: konstantnost toku, možnost regulace průtoku v dostatečně velkém rozsahu (0,1-10 ml/min), pracovní tlak minimálně 10 MPa. Podle technického řešení se rozlišují tři skupiny čerpadel: pneumatické, bezpulsní (tzv. lineární dávkovače) a pulsni neboli reciproční čerpadla (membránová nebo pístová). Pulsní tok recipročních čerpadel je možné vyrovnat použitím dvou nebo více čerpacích jednotek s fázově posunutou funkcí, kombinací hydraulického odporu a kapacity nebo elektrickou regulací rychlosti pohybu pístu podle změny tlaku v chromatografickém systému. V současné době se téměř výhradně používají pístová čerpadla s malým objemem pístní komory. Jsou většinou vybaveny 2-3 komorami, které pracují se vzájemným fázovým posunem. Hlavní výhoda těchto čerpadel spočívá v tom, že relativně malý vnitřní objem čerpadla umožňuje snadnou a rychlou výměnu mobilní fáze a gradientovou eluci.

Gradientová eluce se používá k dělení směsí, jejichž složky se značně liší retenčními časy při isokratické eluci (s konstantním složením mobilní fáze).

U čerpadel s malými vnitřními objemy je velmi důležité **odplynění mobilní fáze** před vstupem do čerpadla, aby nedocházelo k uvolňování bublinek rozpuštěných plynů v koloně nebo v detektoru. To by mělo za následek snížení a kolísání průtoku mobilní fáze a narušilo by separační proces. Rozpuštěné plyny lze z mobilní fáze odstranit například předem v ultrazvukové lázni nebo probubláváním vysoce čistým héliem. Dokonalejší je ale kontinuální odplynění v průtočných odplyňovačích (membránové filtry).

Dávkovací zařízení používající techniky nástřiku injekční stříkačkou byla už prakticky opuštěna a používají se buď manuální smyčkové dávkovače na principu přepínacích ventilů nebo automatické dávkovače.

Kolony pro většinu rutinních analýz jsou zhotoveny z nerezové oceli. Kolony pro analytické využití jsou dlouhé zpravidla 5-30 cm, s vnitřním průměrem 3-5 mm. Běžný průtok eluentu je 1-2 ml za minutu. Náplňový materiál má průměr 3-10 μm . V moderní HPLC převažuje aplikace v systémech s obrácenými fázemi, zvláště na oktadecylsilikagelu (C18) a oktysililicagelu (C8). Používají se však i jiné nepolární chemicky vázané fáze s alkyly o jiných délkách (C2-C40). Nevýhodou těchto fází je omezený rozsah pH (jen do pH 8,5). V systémech s normální fází je nejčastěji používaným polárním sorbentem silikagel, méně často i oxid hlinitý.

2.4.5.3 Detektory používané v HPLC

Požadovanými vlastnostmi detektorů pro kapalinovou chromatografii jsou okamžitá a lineární koncentrační odezva, vysoká citlivost, nízký šum, minimální vliv změny teploty, tlaku, průtoku mobilní fáze a možnost použití gradientové eluce. Současné systémy pro kapalinovou chromatografii jsou většinou vybaveny optickými nebo elektrochemickými detektory s průtočnou celou.

Fotometrické a spektrofotometrické detektory jsou nejpoužívanější detektory v kapalinové chromatografii. Pracují v ultrafialové a viditelné oblasti spektra. Měrnou veličinou je absorbance, jejíž závislost na koncentraci analytu je v oblasti nízkých koncentrací lineární. Popisuje ji Bouguer-Lambert-Beerův zákon:

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c$$

kde A je absorbance, ε_{λ} je molární absorpční koeficient [$\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$], l je délka absorbující vrstvy [cm] a c koncentrace analytu [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]. Jednoduché detektory pracují s jednou vlnovou délkou nebo lze volit vlnové délky pomocí vyměnitelných interferenčních filtrů. Detektory, umožňující volit libovolnou vlnovou délku, jsou vybaveny polychromatickým zdrojem záření, nejčastěji deuteriovou výbojkou, a monochromátorem. Moderní spektrofotometrické detektory (DAD, resp. PDA) jsou založeny na současném měření signálu velkého počtu miniaturních plošných fotodiód. Tímto typem detektoru se budu podrobněji zabývat v další kapitole.

Fluorimetrické a fosforimetrické detektory jsou vysoce selektivní a citlivé. Princip detekce je založen na tom, že látky obsahující ve své struktuře určité funkční skupiny absorbují budící ultrafialové záření, které se zčásti vyzáří ve formě luminiscenčního (fluorescenčního nebo fosforescenčního) záření o nižší energii (větší vlnové délce).

Elektrochemické detektory slouží k detekci látek schopných elektrochemické reakce. Amperometrické (polarografické) detektory měří proud vyvolaný průchodem redukovatelné či oxidovatelné látky průtokovou celou, v níž jsou umístěny elektrody s vloženým pracovním napětím nezbytným k uskutečnění elektrochemické reakce. Coulometrické detektory měří náboj potřebný k oxidaci či redukci celkového množství látky při jejím průtoku celou, což umožňuje dosáhnout vyšší citlivosti než u amperometrické detekce.

Refraktometrické detektory jsou nespecifické. Poskytují odezvu úměrnou rozdílu indexu lomu mobilní fáze a eluentem vycházejícím z kolony. Hlavním požadavkem na přesnou detekci je zajištění konstantní teploty.

Vodivostní detektory měří elektrickou vodivost eluátu v průtokové cele mezi dvěma elektrodami, na něž je vloženo střídavé napětí, aby se zabránilo jejich polarizaci.

Hmotnostní detektor má v kapalinové chromatografii specifické postavení jako detektor umožňující nejen detekci separovaných látek s vysokou citlivostí, ale především jako dominantní způsob identifikace jednotlivých složek.

Z dalších méně často používaných detektorů lze uvést detektory typu **spray impact**, **plamenově ionizační detektory**, detektor pracující na principu **tepelné čočky**, **detektory elektronového zachytu**, **permitivitní detektor**. Komerčně dostupné jsou i detektory schopné měřit v jedné průtokové cele několik veličin současně.

Kapalinovou chromatografii lze také přímo kombinovat s jinými technikami. Například s MS, NMR, IČ a UV-VIS spektroskopii, s jinými chromatografickými technikami (GC) nebo s chemickými reakcemi (předkolonová derivatizace, reakční detektory).

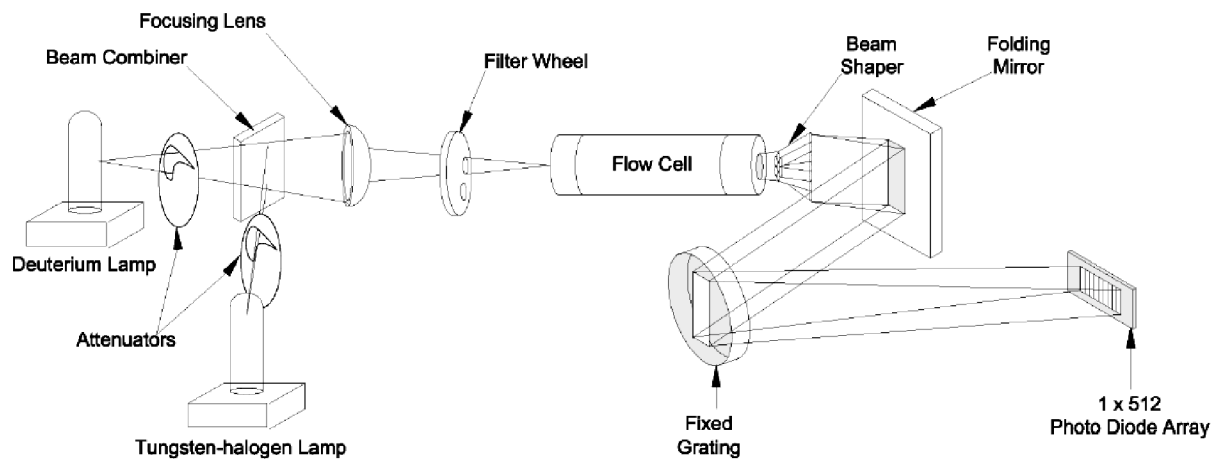
[41, 42, 45, 64]

2.4.5.4 Photodiode array detector (PDA)

Detektory diodového pole monitorují všechny vlnové délky spektra současně. Samotným detektorem je zde série lineárně uspořádaných křemíkových fotodiod, které měří absorpenci v celém vlnovém rozsahu přístroje. Výhodou tohoto uspořádání spektrofotometrického detektoru je především rychlost a jednoduchost analýzy a objem získaných dat. Standardní PDA detektory pracují v ultrafialové a viditelné oblasti spektra.

Finnigan Surveyor PDA plus detektor pracuje v oblasti od 190 nm do 800 nm. Detektor se skládá ze dvou světelných zdrojů, optických zařízení, fotodiodového pole a několika desek s plošnými spoji (PCB). Na obrázku 13 je znázorněn optický systém tohoto detektoru. Jako zdroj záření zde slouží deuteriová lampa (deuterium lamp) pro detekci v UV oblasti (190-360 nm) a wolfram-halogenová lampa (tungsten-halogen lamp) pro viditelnou oblast spektra (360-800 nm). V oblasti 300-500 nm se tyto dvě lampy překrývají. Tlumiče (attenuators) slouží k regulaci intenzity záření. Směšovač paprsků (beam combiner) odráží záření přicházející z wolfram-halogenové lampy tak, aby bylo souběžné a fázově shodné se zářením z deuteriové lampy. Kombinované záření je pak pomocí čočky (focusing lens) zaostřeno přes filtr (filter wheel) na vstupní otvor do průtočné kyvety (flow cell). Filtr má dvě pracovní pozice. První (otevřená) pozice slouží k normálnímu měření, na druhé pozici je zatavená křemenná kyveta naplněná roztokem oxidu holmia v kyselině chloristé, která slouží pouze při kalibraci a ověření přesnosti přístroje. Záření, které bylo zaostřeno na vstupní otvor průtočné kyvety prochází kyvetou a je částečně absorbováno vzorkem protékajícím kyvetou. Záření, které nebylo absorbováno, pokračuje do tvarovače paprsků (beam shaper). Toto zařízení je vlastně svazek optických vláken. Je konstruován tak, že jeho kruhový vstupní otvor sbírá všechno záření prošlé kyvetou. Na druhém konci je svazek uspořádán lineárně, takže produkuje úzký svazek záření. Tímto technickým řešením se dosahuje vyšší propustnosti záření než u mechanických štěrbin, které se používají v konvenčních PDA detektorech. Sklopné zrcadlo (folding mirror) slouží pouze k redukci délky optických zařízení a tedy k redukci velikosti celého detektoru. Záření dopadající na fixní mřížku (fixed grating) je dispergováno a namířeno na fotodiodové pole o rozměrech 1 krát 512 fotodiod. Každé

vlnové délce odpovídá jiný úhel difrakce. Každá fotodioda funguje jako kondenzátor. Dopadem záření se fotodiody vybíjí. Stupeň vybití fotodiody je úměrný množství záření, které na ni dopadne. Principem detekce je tedy měření proudu potřebného ke znovunabití fotodiody. Protože spektrum vlnových délek dopadající na fotodiody je široké 611 nm (od 190 do 800 včetně) a dvě diody nejsou využity, rozlišení vlnové délky je $611/510 = 1,2$ nm. Diodové pole je snímáno s frekvencí až 20 Hz. Tím, že je snímáno současně celé spektrum, je umožněno zobrazení 3D chromatogramu (závislost absorbance na čase a na vlnové délce) [72,73].



Obrázek 13: Schema Finnigan Surveyor PDA plus detektoru

2.4.6 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie je všestranná, rychlá a citlivá analytická separační metoda, která převádí vzorek na ionizovanou plynnou fázi a vzniklé ionty separuje podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje m/z [41].

Základními součástmi hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj, hmotnostní analyzátor (separátor), detektor, vakuový systém a vyhodnocovací zařízení.

Do iontového zdroje se vzorek přivádí buď v plynném stavu, nebo se vypařuje až v iontovém zdroji. To platí především pro málo těkavé látky. V iontovém zdroji vznikají z molekul vzorku ionty nevratným odštěpením valenčních elektronů. Před vstupem do analyzátorové sekce jsou ionty pomocí iontové optiky, tj. systémem elektrod nebo jiným způsobem, urychleny a iontový svazek je fokusován s co nejmenší divergencí. Po průletu separátorem jsou ionty detekovány a pomocí počítače zaznamenány. V oblasti od analyzátoru po detektor je nutné udržovat tlak na nízkých hodnotách, aby analyzované ionty neměnily svou energii zejména nechtěnými srážkami. K tomu slouží turbomolekulární nebo difuzní pumpa [42,43].

2.4.6.1 Ionizace

Ionizační techniky se dělí na tzv. tvrdé a měkké. Nejběžnějším způsobem tvrdé ionizace je **ionizace nárazem elektronů** (EI). Interakcí proudu elektronů s cílenou molekulou dochází k vyražení elektronu (případně více elektronů) z této molekuly. Vznikají tak jednou nebo vícenásobně nabitě molekulové ionty. Při interakci však dochází k přenosu větší energie než je energie ionisační, což způsobuje fragmentaci molekulového iontu. Vzhledem k tomu, že některé typy analytů nejde tímto způsobem ionizovat, byly vyvinuty techniky ionizace elektrickým polem, jiskrou, výbojem, v plazmě nebo laserem. V případě málo stabilních analytů, kdy by při tvrdé ionizaci vznikaly výhradně fragmentované ionty, a neměli bychom tedy k dispozici údaj o skutečné velikosti, se používají tzv. měkké ionizační techniky.

Příklady měkkých ionizačních technik:

Chemická ionizace - podstatou je přenos energie srážkami analytu s jinými nabitými částicemi, produkovanými z reakčního plynu proudem elektronů (CI), ze složek mobilní fáze chromatografických nebo elektromigračních technik za atmosferického tlaku koronovým výbojem (APCI) nebo z vhodné termicky snadno ionizované látky (TS).

Elektrosprejová ionizace (ESI) - podstatou této metody je fakt, že po průchodu roztoku silně polarizovanou kapilárou dochází ke vzniku mikrokapiček, nesoucích na svém povrchu náboj. Při postupném zmenšování kapiček v důsledku odpařování rozpouštědel dojde ke zvýšení povrchové hustoty náboje nad kritickou mez. V tomto okamžiku způsobí elektrostatické odpuzování dezintegraci kapky na množství menších a tento proces se opakuje až do vzniku samotných iontů analytu.

Ionizace laserem (LDI, MALDI) - zdrojem ionizační energie je laser pracující v infračervené nebo viditelné oblasti spektra a nachází uplatnění v analýze biopolymerů.

Ionizace elektrickým polem (FI) - k ionizaci dochází působením nehomogenního elektrického pole vytvořeného mezi hrotem pracovní elektrody a výstupní šterbinou iontového zdroje. Pokud je analyzovaná látka nanášena přímo na pracovní elektrodu, jedná se o metodu desorpce polem (FD), kterou lze využít při ionizaci netěkavých látek.

Ionizace rychlými atomy (FAB) - v této metodě se k ionizaci využívají urychlené atomy vzácných plynů.

Ionizace rychlými ionty (SIMS) - technika obdobná jako FAB, nejčastěji pracuje s Cs^+ ionty. FAB i SIMS mají v současnosti výsadní postavení při analýze teplotně nestálých netěkavých látek.

Většina ionizačních technik produkuje především nebo výhradně ionty nabitě kladně. Významnou výjimku tvoří elektrosprejová ionizace a chemická ionizace. Protože dostatečně stabilní záporně nabitě ionty tvoří jen omezený okruh analytů, lze toho snadno využít pro identifikaci látek při nižších detekčních limitech v důsledku vysoké selektivity.

2.4.6.2 Hmotnostní analyzátory (separátory)

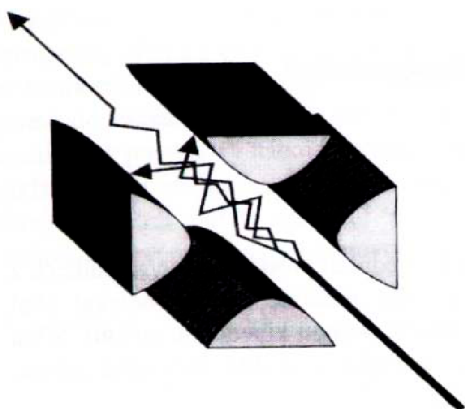
Slouží k disperzi nebo filtraci iontů produkovaných v iontovém zdroji podle poměru hmotnosti a náboje, popřípadě podle kinetické energie.

Obecně mohou pracovat ve dvojitým módu. První mód, tzv. full scan, snímá hmotnostní spektrum a je používán především k identifikaci analytů. Druhý mód selektivně sleduje intenzitu jednoho (SIM) nebo několika (MID) vhodně zvolených iontových druhů. Využívá se tedy při sledování změn relativního zastoupení složek s nižšími mezemi detekce a stanovitelnosti v důsledku vyšší selektivity.

Magnetický analyzátor (B) pracuje na principu zakřivení dráhy nabitě částice v magnetickém poli. Poloměr zakřivení výsledné dráhy je přímo úměrný hmotnosti částice a její rychlosti a nepřímoúměrný intenzitě magnetického pole. Magnetický analyzátor tedy zaostřuje podle poměru hybnosti částice k jejímu náboji. Požadované zaostření podle m/z lze dosáhnout pouze za předpokladu stejné kinetické energie analyzovaného svazku iontů..

Elektrický analyzátor (E) umožňuje energeticky sjednotit proud iontů nezávisle na jejich hodnotách m/z . Ionty vystupující z iontového zdroje nemají stejnou kinetickou energii. Dráha iontu v homogenním magnetickém poli je zakřívována a poloměr dráhy iontu je funkcí jeho kinetické energie a intenzity pole. Tímto zařízením tedy projdou pouze ionty o určité kinetické energii.

Kvadrupólový analyzátor (Q) bývá součástí hmotnostních spektrometrů vhodných pro

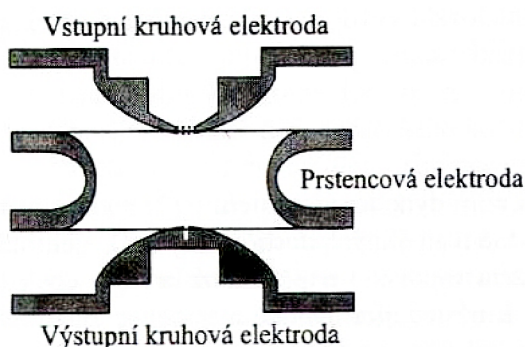


Obrázek 13: Schema kvadrupólu

spojení s plynovou nebo kapalinovou chromatografií. Je schopen dělit ionty podle m/z bez ohledu na jejich počáteční energii. Konstrukčně se jedná o čtyři tyčové elektrody kruhového nebo hyperbolického průřezu uspořádané v podélné ose do čtverce. Vždy na dvě protilehlé úhlopříčné tyče je vkládán stejný potenciál, složený ze stejnosměrné a vysokofrekvenční střídavé složky. Ionty při průchodu tímto polem vykonávají složité kmity. Při vhodně zvolené hodnotě napětí a poměru stejnosměrné a střídavé složky projdou kvadrupólem pouze ionty o určité hodnotě m/z . Nevýhodou kvadrupólu je jeho malá propustnost a

tzv. hmotnostní diskriminace se zvyšující se hmotností iontů.

Iontová past (QIT) uzavírá ionty v ohraničeném prostoru pomocí elektrického pole. Jedná



Obrázek 13: Schema iontové pasti

se vlastně o kvadrupól, který je tvořen hyperboloidním prstencem místo jedné dvojice tyčí a dvěma hyperboloidními „víčky“ místo dvojice druhé. Ionty ve vnitřním prostoru iontové pasti jsou nuceny se pohybovat po uzavřených kruhových drahách. Zvyšováním vysokofrekvenčního napětí se jednotlivé iontové druhy podle m/z dostávají na nestabilní trajektorie a opouští iontovou past směrem do detektoru.

Průletový analyzátor (TOF) je nejjednodušším analyzátozem. Ionty s odlišným m/z mají při stejné kinetické energii rozdílnou rychlost. K časovému rozdělení iontů podle m/z dochází na základě jejich odlišné doby letu z iontového zdroje do detektoru.

Iontová cyklotronová rezonance (ICR) pracuje s vysokým rozlišením, ale kvůli své náročnosti na prostor a finance je jeho použití omezeno pouze na špičková pracoviště. V homogenním magnetickém poli se iont pohybuje po šroubovici, jejímž průmětem do roviny kolmé na směr pole je kružnice o určitém poloměru. Působí-li kolmo na směr magnetické indukce ještě vysokofrekvenční pole, pak při určité frekvenci, která se označuje jako cyklotronová rezonanční frekvence, nastane rezonance. Ionty jsou tímto rezonančním polem urychlovány a nabývají rostoucí energie. Vysokofrekvenční oscilátor je konstruován tak, že absorpce energie a změna impedance se projeví výraznou změnou vysokofrekvenčního signálu. Spojitou změnou magnetického pole při konstantní frekvenci lze zaznamenávat přítomnost jednotlivých iontů. Iontový zdroj je v tomto případě upraven tak, že na vznikající ionty působí navzájem kolmé magnetické a elektrické pole, takže ionty jsou ze zdroje vytlačovány po cykloidálních drahách.

Sektorové analyzátozem s dvojitou fokusací (HRMS) jsou do série zapojené magnetické a elektrické analyzátozem v geometrii E-B nebo B-E. E zaostří ionty podle jejich kinetické energie a B podle poměru hmotnosti a náboje (viz výše). Při použití HRMS v SIM módu lze dosahovat několikanásobného snížení mezí detekce současně s mimořádně vysokou selektivitou.

2.4.6.3 Detektory

Detektory převádí proud dopadajících iontů na proud elektronů. Typy používaných detektorů souvisí s celkovou konstrukcí zařízení.

Faradayova cela (Faraday cup) je nejčastěji používaný detektor. Je tvořen konverzní elektrodou (dynodou) miskovitého tvaru, jejíž povrch je pokryt BeO nebo GaP. Dopad iontu způsobí vyrazení elektronu z povrchu. Elektron dopadá na anodu a vzniklý elektrický proud je zesílen zesilovačem. Šum zesilovače omezuje citlivost detektoru.

Elektronové násobiče zesilují elektronový proud $10^4 - 10^8$ krát. Většina elektronových násobičů se konstruuje jako zužující se trubice, do jejíž širší části dopadají ionty. Potenciál tohoto konce je negativní (-3kV) a postupně klesá k nule směrem k úzkému konci, který je uzemněn. Ion vyrazí elektron, který dopadá na místo s méně negativním potenciálem a vyrazí další elektrony. Dalšími nárazy elektronů se signál zvětšuje a je veden do zesilovače.

Detektor z konverzní dynodou a fotonásobičem mění v konverzní elektrodě náraz iontu na vyražený elektron. Ten dopadá na fosforescenční stínítko a vyráží foton, který je zachycen fotonásobičem.

U TOF jsou využívány **magnetické násobiče**, u ICR je přítomnost iontů detekována změnou elektrických vlastností systému v rezonanci [41,42,44].

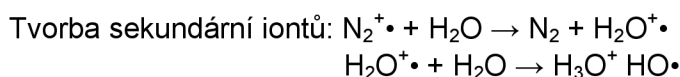
2.4.6.4 Hmotnostní spektrometr finnigan LCQ Advantage MAX

Iontový zdroj Ion Max API umožňuje výměnu sondy (Probe), a může tak pracovat v módu APCI nebo ESI. Může generovat kladné nebo záporné ionty.

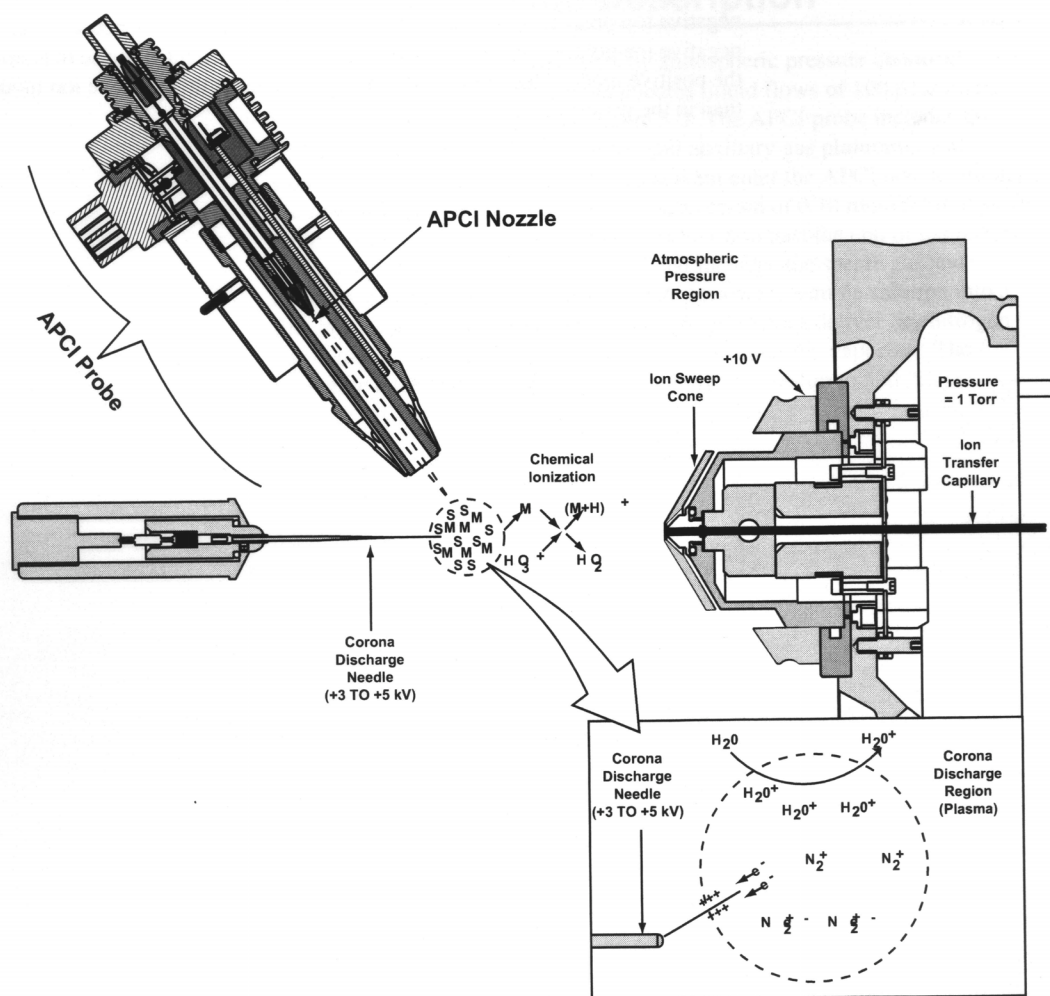
ESI je tzv. měkká ionizační technika a je velice užitečná při analýze polárních molekul s molekulovou hmotností větší než 100 000. Používá se převážně na analýzu biologických polymerů (např. proteiny, peptidy, nukleotidy, glykoproteiny), léčiv a jejich metabolitů a průmyslových polymerů. (Proces elektroprayové ionizace byl popsán v kapitole 2.4.6.1).

APCI je také měkká ionizační technika i když ne tak měkká jako ESI. Je použitelná k analýze méně polárních látek s molekulovou hmotností do 1 500. Mechanismus tohoto způsobu ionizace ilustruje obrázek 16. Při průchodu tryskou (APCI Nozzle) se roztok vzorku za pomoci proudu dusíku rozprašuje do vaporizéru, kde se odpařuje rozpouštědlo. Na jehlu (Corona discharge needle) je vložen vysoký potenciál. Vytváří se koronový výboj, který prostřednictvím série chemických reakcí s rozpouštědlem a dusíkem formuje ionty analytu.

Typické příklady reakcí v pozitivním módu jsou:



Ionty jsou nasávány do vyhřívané kapiláry (Ion transfer capillary), která je transportuje do iontové optiky.



Obrázek 16: Mechanismus chemické ionizace za atmosferického tlaku (APCI) v pozitivním módu [46]

Iontová optika se skládá ze dvou oktapólů, které usměrňují a zaostřují tok iontů přicházejících z iontového zdroje. Působí také jako přechod z oblasti s atmosferickým tlakem do oblasti vysokého vakua.

Hmotnostním analyzátozem je zde iontová past a **detektorem** Faradayova cela.

Takovéto uspořádání umožňuje dva **módy měření**:

MS scan zahrnuje měření pouze tzv. rodičovských iontů, tedy bez použití fragmentace. Zahrnuje tyto typy snímání: single-stage full scan a selected ion monitoring a zoom scan.

MSⁿ scan probíhá ve dvou nebo více fázích, při kterých jsou rodičovské ionty fragmentovány.

Typy snímání:

Full scan zahrnuje dvě různé techniky: Single-stage full scan a Two-Stage full scan.

Single-stage full scan má jen jednu fázi hmotnostní analýzy. Ionty produkované iontovým zdrojem jsou analyzovány a poskytují plné hmotnostní spektrum. Tohoto typu se využívá především k identifikaci neznámých sloučenin nebo k identifikaci známé sloučeniny ve směsi neznámých.

Two-Stage full scan pracuje v MS² módu, má tedy dvě fáze analýzy. V první fázi jsou v analyzátoru zadrženy jen vybrané ionty. Tyto ionty jsou excitovány kolizí s plynem, což způsobí fragmentaci iontů. V druhé fázi se analyzuje plné spektrum produktů fragmentace. Tato technika je vhodná pro zjištění specifických produktů fragmentace analytu před použitím SRM (viz níže).

Selected ion monitoring umožňuje vybrat pouze jednu nebo několik m/z. Používá se při měření známého analytu a může poskytovat nižší detekční limity než Full scan.

Selected reaction monitoring (SRM) je velice podobná technika jako Two stage full scan s tím rozdílem, že ve druhé fázi jsou analyzovány pouze vybrané produkty fragmentace. SRM je vhodná pro rutinní rychlou analýzu stopového množství analytů ve směsích.

Data-dependent neutral loss MSⁿ dovoluje výběr a fragmentaci jen těch iontů, které projevily námi specifikovanou ztrátu hmotnosti. Tento experiment může být například využit ke zjišťování, které aminokyseliny v polypeptidu byly fosforylovány. V první fázi je vyselektován iont polypeptidu. Ve druhé fázi dochází k fragmentaci peptidových iontů vedoucí k odštěpení fosfátových skupin. Detektor identifikuje ionty produktů, které představují úbytek hmotnosti o jeden nebo více fosfátových skupin a vyselektuje je. V třetí fázi jsou tyto ionty fragmentovány a poskytnou zbytky aminokyselin. Ty jsou analyzovány pomocí full scan. To umožní identifikaci defosforilovaných aminokyselin.

Zoom scan umožňuje snímání s vysokým rozlišením, které dovoluje určit náboj a hmotnost iontu. Dá se využít v případě, kdy určení hmotnosti z hodnoty m/z je obtížné, protože náboj může být neznámý [47].

2.5 Stanovení karotenoidů v rostlinných materiálech metodou HPLC

V dalších odstavcích je uveden souhrn publikovaných údajů, týkajících se stanovení karotenoidů v rostlinných materiálech metodami HPLC/UV-VIS a HPLC/MS se zaměřením na β -karoten a lutein.

Autoři Panfili, Fratiani a Irano [65] stanovovali obsah karotenoidů v různých obilovinách včetně ječmene. Vzorky byly zmýdelněny za použití hydroxidu draselného, s přidavkem pyrogallolu jako antioxidantu. Autoři zkoumali různé způsoby extrakce. Používali směsi n-hexan/ethylacetát (9:1), n-butylalkohol, petroleum ether a methanol/chloroform (1:1). Poté odpařili rozpouštědlo z organické fáze a vysušený vzorek rozpustili ve směsi isopropylalkohol/n-hexan (10:90). Pro stanovení HPLC byla jako mobilní fáze použita směs isopropylalkohol/n-hexan (5:95), kolona Kromasil Phenomenex, s náplní silikagel, 5 μ m. Největší podíl karotenoidů tvořil lutein a zeaxantin. Tyto dva majoritní karotenoidy následovala směs α + β karotenu. Protože autoři k separaci použili normální fázi, α a β -karoten se jim nepodařilo rozdělit.

Obsahem antioxidantů a antioxidační aktivitou ječmenného a sladového extraktu se zabývali Goupy a kol. [50]. Stanovovali především obsah fenolických látek, ale také tokoferolů a karotenoidů. Pro extrakci karotenoidů použili petrolether. Separaci karotenoidů provedli na dvou sériově zapojených kolonách Alltima 5 μ (C18) s mobilní fází methanol/acetonitril/dichlormethan a s gradientovou elucí, detekci detektorem diodového pole při 450 nm. Autoři v extraktu identifikovali lutein a zeaxantin, přičemž lutein byl dominantní složkou a představoval okolo 90% celkových karotenoidů.

Juhler a Cox [56] optimalizovali metodu separace luteinu a zeaxantinu z listů špenátu a ječmene. K separaci autoři využili kolonu C18, gradientovou eluci a mobilní fázi THF/voda. Autoři zvolili spektrofotometrickou detekci při 450 nm.

Olives a kol. [35] optimalizovali HPLC metodu na stanovení lykopenu a β -karotenu ve vybraných vzorcích zeleniny. Extrakci provedli směsí hexan/acetone/ethanol (50:25:25) a po odpaření rozpouštědla vzorek převedli do směsi THF/acetonitril/methanol (15:30:55). K HPLC analýze použili kolonu C18 a, mobilní fázi methanol/acetonitril (90:10) a spektrofotometrický detektor s vlnovou délkou detekce 475 nm.

Craft, Wise a Soares [55] optimalizovali metodu stanovení karotenoidů na koloně C18 s mobilní fází methanol/THF (95:5) a s detekční vlnovou délkou 445 nm.

Optimalizací metody HPLC/MS/MS pro stanovení β -karotenu, β -kryptoxantinu, luteinu a zeaxantinu v rostlinných materiálech se zabývali Hao a kol. [32]. K extrakci použili podle typu rostlinného vzorku hexan nebo směs methanolu a THF (1:1). Využili gradientové eluce s mobilní fází hexanu a 1 % isopropanolu v ethylacetátu.

Higeaki Takagi [48] se zabýval stanovením karotenoidů v zelených listech 14 různých rostlin. Zjistil, že největší podíl karotenoidů ve všech zkoumaných rostlinách zaujímá lutein a β -karoten. Takagi použil metodu HPLC-UV/VIS.

Karotenoidy v listové zelenině zkoumali také Lakshminarayana a kol. [54]. Metodou HPLC/DAD s použitím kolony C18 a směsi acetonitril/methanol dichlormethan (60:20:20) stanovili množství luteinu, β -karotenu, violaxantinu, neoxantinu a zeaxantinu. Nejvyšší podíl karotenoidů v této zelenině zaujímal lutein (7,7-9,2 mg kg⁻¹ sušiny) a β -karoten (3,6-4,4 mg kg⁻¹ sušiny).

Zastoupením karotenoidů v listech kopřivy dvoudomé v různých růstových fázích se zabývali Guerrero, Fuentes a Isasa [49]. Použili saponifikaci hydroxidem sodným a extrakci směsí acetonu, dietheru a vody. Jako mobilní fázi použili MTBE/methanol (50:50) a kolonu C30, která umožnila rozlišit i izomery jednotlivých karotenoidů. Analýzu provedli metodou HPLC-MS. Zjistili, že dominantní zastoupení ve všech růstových fázích mají izomery luteinu a β -karotenu.

Karotenoidy v listech huseníčku rolního metodou HPLC/MS stanovoval Taylor a kol. [51]. K extrakci autoři použili chloroform, k separaci karotenoidů autoři využili kolonu C30 a gradientový program mobilní fáze MTBE/methanol a k detekci hmotnostní detektor s chemickou ionizací za atmosferického tlaku (APCI) v negativním módu.

Liu a kol. [52] stanovili karotenoidy v listech tabáku za pomoci extrakce acetonem a gradientové eluce methanol/isopropylalkohol (1:1) na koloně C18. Identifikovali lutein, β -karoten, neoxantin a violaxantin.

Frenich a kol. [53] použili ke stanovení karotenoidů v ovoci a zelenině metodu HPLC/APCI/MS. Extrakce byla provedena směsí methanol/THF (1:1), separace s použitím systému dvou kolon C18 s mobilní fází methanol/THF/acetonitril (60:30:10).

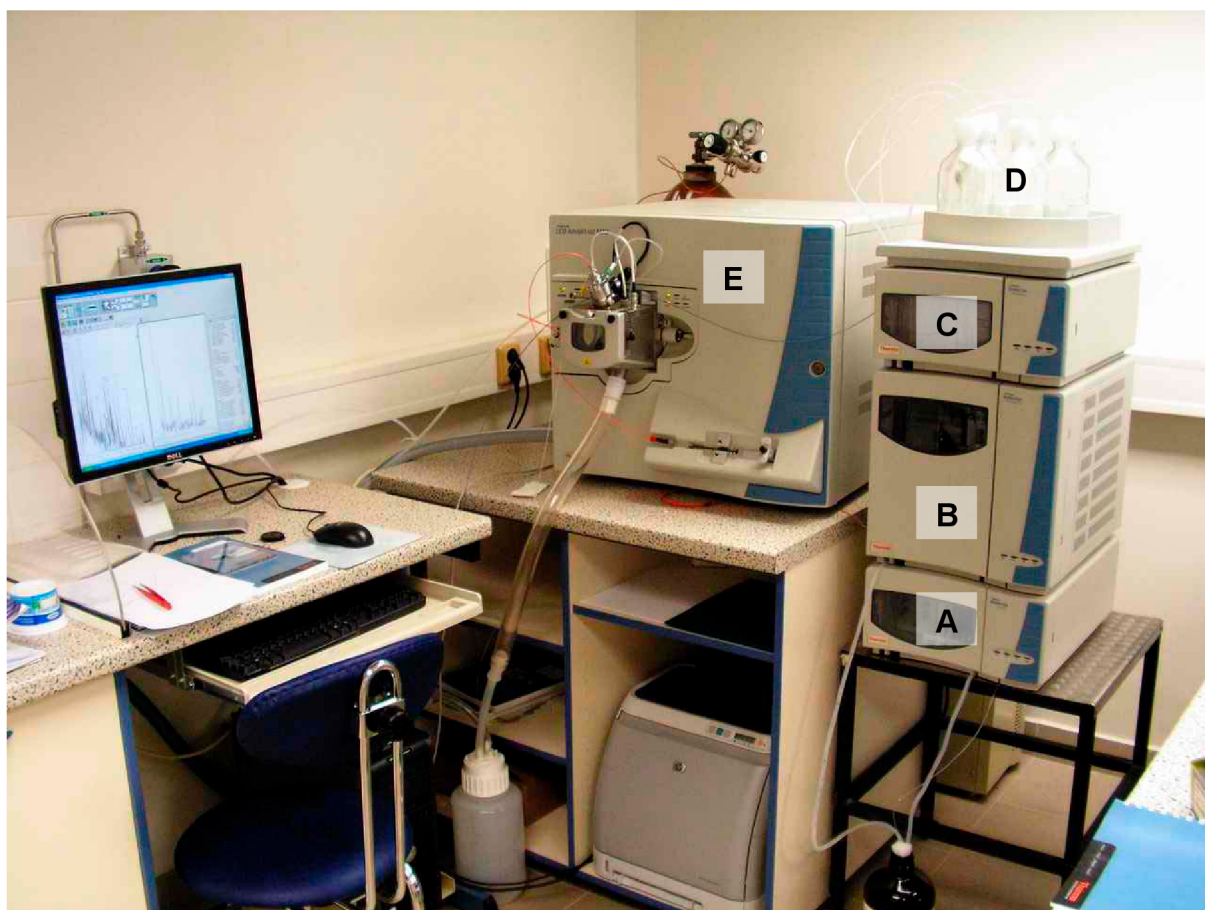
Metodu HPLC/APCI/MS použili také Lacker, Strohschein a Albert ke stanovení astaxantinu, canthaxantinu, zeaxantinu, echinenonu a β -karotenu. Separaci provedli na koloně C30 s mobilní fází methanol/MTBE.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístrojové vybavení a chemikálie

3.1.1 Kapalinový chromatograf s detektorem diodového pole a hmotnostním spektrometrem

- gradientová pístová pumpa s degazérem Finnigan Surveyor LC Pump Plus, Thermo electron corporation (San Jose, USA)
- autosampler s kolonovou skříní a termostatem Finnigan Surveyor Autosampler Plus, Thermo electron corporation (San Jose, USA)
- detektor diodového pole Finnigan Surveyor PDA Plus Detector, Thermo electron corporation (San Jose, USA)
- zásobní lahve 1 l
- hmotnostní spektrometr Finnigan LCQ Advantage MAX s turbomolekulární pumpou, Thermo electron corporation (San Jose, USA)
- sběrnice dat AT-FS705L, Allied Telesyn®
- počítač DELL
- software Xcalibur 1.3



Obrázek 17: Fotografie chromatografického systému

A - gradientová pumpa s degazérem, B - autosampler s kolonovou skříní, C - detektor diodového pole, D - zásobní lahve, E - hmotnostní spektrometr

3.1.2 Ostatní vybavení

- Analytické váhy PG503-S DeltaRange[®], Mettler Toledo
- Sušárna VENTICELL, Brněnská medicínská technika a.s.
- Vakuová odparka BÜCHI Rotavapor R-114
- Mlýnek Moulinex
- Mikropipety FINNPIPETTE[®], Thermo electron corporation
- Lednice s mrazákem
- Ultrazvuk, Tesla
- Běžné laboratorní sklo

3.1.3 Použité chemikálie

- methanol, for HPLC, chromapur GG, Chromservis s.r.o. , Praha
- tert.-Buthyl methyl ether CHROMASOLV[®], for HPLC, Německo
- acetonitril CHROMASOLV[®], for HPLC, gradient grade, USA
- tetrahydrofuran for HPLC, chromapur G, Chromservis s.r.o. , Praha
- diethylether čistý, nestabilizovaný, Chromservis s.r.o. , Praha
- ethanol
- hydroxid draselný
- bezvodý síran sodný, J.T. BAKER, Holandsko
- kyselina askorbová, vitar s.r.o. Zlín
- destilovaná voda, VÚPS
- dusík

3.1.4 Standardy

- β -karoten, Sigma-Aldrich
- směs α -karotenu a β -karotenu, Sigma-Aldrich
- Lutein, Sigma-Aldrich
- Lycopene, Sigma-Aldrich
- Astaxantin, Sigma-Aldrich

3.2 Optimalizace chromatografické metody

Jedním z úkolů praktické části této práce bylo ověření literárních údajů o podmínkách metody HPLC a stanovení optimálního postupu měření obsahu β -karotenu v zrně ječmene.

Pro dělení směsi látek byla zvolena kolona ODS Hypersil 250x4,6 mm (C18) 5 μ . Z literatury pak byly vybrány vhodné roztoky, sloužící jako mobilní fáze. Účinnost dělení směsi karotenoidů byla vyzkoušena za různých podmínek měření. Jako mobilní fáze byly použity směsi acetonitril/methanol, THF/methanol, MTBE/methanol, acetonitril/THF/methanol a acetonitril/MTBE/methanol. Podmínky měření, kdy byl měněn poměr složek ve fázi, průtok a teplota kolony, shrnuje tabulka 9.

Tabulka 9: Přehled prováděných zkoušek mobilních fází

Mobilní fáze	Poměr složek	Průtok (ml·m ⁻¹)			Teplota (°C)						
		1	1,5	2	25	30	35	40	45	50	60
CH ₃ CN/MeOH	85:15	1	1,5	2	25	30	35	40	45	50	60
THF/MeOH	5:95	1	1,5	2	25	30	35	40	45	50	60
	10:90	1		2	25				35		
	15:85		2		25				35		
	20:80	1		2	25				35		
MTBE/MeOH	10:90	1	1,5	2	25				35		
	20:80	1	1,5	2	25				35		
	30:70		2		25				35		
CH ₃ CN/MeOH/THF	80:10:10		1,5		25						
CH ₃ CN/MeOH/THF	80:10:10		1,5		25						

3.3 Validace metody

Byla provedena validace metody v rozsahu stanovení validačních parametrů opakovatelnost, rozšířená nejistota měření, mez detekce a mez stanovitelnosti. K výpočtu validačních parametrů byl použit program Effvalidation.

3.4 Stanovení β -karotenu v zrně ječmene a ve sladu

3.4.1 Kalibrace

Kalibrace byla provedena metodou vnějšího standardu.

Směs standardních roztoků β -karotenu a luteinu byla připravena rozpuštěním jednotlivých standardů v mobilní fázi (za pomoci ultrazvuku) a naředěním na zvolené koncentrace. Koncentrace byly voleny s ohledem na obsah stanovovaných látek ve vzorcích.

Pro β -karoten byly zvoleny koncentrace $0,08 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $0,16 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $0,4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $0,8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $1,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a $16 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Pro lutein to byly koncentrace $0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $0,02 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $0,05 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost plochy příslušných píků na koncentraci jednotlivých standardů.

3.4.2 Příprava vzorků.

Vzorky byly zmrazeny tekutým dusíkem a rozemlety v mlýnku. Zmražením získaly křehkost a také bylo zabráněno přehřátí vzorku při mletí, což by mohlo způsobit oxidaci karotenoidů.

U všech vzorků byla stanovena také sušina gravimetrickou metodou. Sušení vzorků probíhalo při teplotě $105 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.4.3 Metoda extrakce

Bylo testováno několik způsobů extrakce tetrahydrofuranem a diethyletherem. Jako nejlépe vyhovující se projevila extrakce diethyletherem s předcházejícím zmýdlením podle metody, vyvinuté na pracovišti VÚPS.

3.4.3.1 Metoda zmýdlení a extrakce podle VÚPS

Ke 2 g vzorku a cca 1 mg kyseliny askorbové bylo přidáno 50 ml ethanolu a 10 ml 50% KOH. Směs byla ponechána v temnu a v dusíkové atmosféře cca 15 hodin.

Poté byl zmýdlený vzorek kvantitativně přelit do dělicí nálevky a bylo přidáno cca 100 ml destilované vody. Extrakce byla prováděna 3krát 50 ml diethyletheru. Spojené etherové fáze byly promyty vodou až do neutrální reakce. Promytá etherová fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným a rozpouštědlo odpařeno na vakuové odparce při teplotě $45 \text{ }^\circ\text{C}$. Suchý vzorek byl rozpuštěn v definovaném množství mobilní fáze.

Poté byly vzorky nastříknuty do chromatografického systému nebo umístěny do mrazícího boxu a v nejbližší možné době stanoveny.

3.4.4 Výběr vzorků ječmene a sladu

Obsah karotenoidů byl stanovován v několika odrůdově čistých vzorcích jarního ječmene ze sklizně 2006 (viz tabulka 10). Vzorky byly získány ze čtyř lokalit. Navíc každá z odrůd byla vypěstována dvěma různými způsoby. Na část vzorků byly během vegetace aplikovány pesticidy a minerální hnojiva (50 kg/ha N , $55 \text{ kg/ha P}_2\text{O}_5$ a $55 \text{ kg/ha K}_2\text{O}$) – v kapitole 4.4

jsou tyto vzorky označeny jako ošetřené. Vzorky označené jako neošetřené byly vypěstovány bez použití pesticidů a minerálních hnojiv. Vzorky sladu byly připraveny sladováním odpovídajících vzorků ječmene.

Tabulka 10: Přehled odrůd a lokalit použitých vzorků ječmene a sladu

lokality	odrůda	lokality	odrůda
Hrubčice	Bojos	Lednice	Bojos
	Jersey		Jersey
	Malz		Malz
	Prestige		Prestige
	Sebastian		Sebastian
	Tolar		Tolar
Branišovice	Bojos	Krásné Údolí	Bojos
	Jersey		Jersey
	Malz		Malz
	radegast		radegast
	Sebastian		Sebastian
	Tolar		Tolar

3.5 Stanovení β -karotenu v zeleném ječmeni

Příprava vzorků, metoda extrakce i kalibrace byly provedeny stejně jako u vzorků zrna ječmene a sladu.

3.5.1 Výběr vzorků zeleného ječmene

Pro stanovení obsahu karotenoidů v zeleném ječmeni byly použity vzorky zeleného ječmene ze sklizně 2006, které byly skladovány v zmrazeném stavu při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorky pocházely ze Školní farmy Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Žabčicích. K dispozici byly odrůdově čisté vzorky Malz, Sebastian a zkušební odrůda KM 1910. Všechny vzorky byly odebírány ve dvou fázích růstu, označené jako 1. odběr a 2. odběr. 1. odběr byl proveden v růstové fázi DC 29 (konec odnožování), 2. odběr v růstové fázi DC 31 (první kolénko na hlavním stéble je hmatatelné).

Dále byl stanoven obsah karotenoidů ve vzorcích zeleného ječmene ze sklizně 2007, pocházející ze Školní farmy Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Žabčicích a ze Zemědělského výzkumného ústavu Kroměříž. Byly to odrůdově čisté vzorky Malz, Sebastian a zkušební odrůda KM 1910, vždy 1. a 2. odběr. Odebírání vzorků proběhlo ve stejných fázích růstu jako u zeleného ječmene ze sklizně 2006.

Pro srovnání byl obsah karotenoidů stanoven také ve vzorcích zeleného ječmene, který byl získán z modelového pokusu na VÚPS. Naklíčený ječmen byl rovnoměrně rozprostřen na cca 5 cm silnou vrstvu zeminy pro pokojové rostliny, překryt další vrstvou zeminy (cca 1 cm) a jemně zdusán. Tímto způsobem zasetý ječmen byl umístěn na světlé místo. Růst probíhal při pokojové teplotě a s pravidelnou závlakou. Sklizeň proběhla ve fázi růstu DC 31 (první kolénko na hlavním stéble je hmatatelné). Pro tento pokus byly použity odrůdy Bojos, Jersey, Sebastian a Tolar.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Pro stanovení β -karotenu v ječmeni byla použita metoda HPLC/DAD/MS. Kvantitativní stanovení β -karotenu bylo provedeno v systému HPLC/DAD. Hmotnostní detektor byl využit pro identifikaci analytů.

Řízení analýz a vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu Xcalibur 1.3.

4.1 Optimalizace chromatografické metody

Jako účinná kolona ke stanovení β -karotenu byla zvolena kolona ODS Hypersil s velikostí částic 5 μ m. Stacionární fází je v tomto případě oktadecylsilikagel (C18). To znamená, že separace probíhala na reverzní fázi (stacionární fáze je nepolární, mobilní fáze polární). Nepolární látky (jako jsou β -karoten, α -karoten, lykopen) v koloně setrvávají delší dobu a dochází k jejich lepšímu rozdělení. Naopak polární xantofyly mají kratší retenční časy.

Vliv mobilní fáze na retenční čas β -karotenu při stejném průtoku a teplotě kolony ukazuje tabulka 11.

Tabulka 11: Vliv vybraných mobilních fází na retenční čas β -karotenu

mobilní fáze	retenční čas β -karotenu
CH ₃ CN/MeOH 85:15	25,4
THF/MeOH 5:95	12,9
MTBE/MeOH 20:80	10,2
CH ₃ CN/MeOH/THF 80:10:10	15,7
CH ₃ CN/MeOH/THF 80:10:10	16,0

Jako nejvíce vyhovující mobilní fáze z hlediska účinnosti separace i doby analýzy se jevila směs MTBE a methanolu, a proto se další zkoušky týkaly pouze této mobilní fáze.

Dalším zkoumaným parametrem byl poměr složek mobilní fáze. Tabulka 12 ukazuje, že největší odezvu měla mobilní fáze o složení MTBE/MeOH 20:80.

Tabulka 12: Závislost velikosti plochy píku na složení mobilní fáze MTBE/MeOH

složení mobilní fáze (MTBE/MeOH)	relativní plocha píku
10:90	90,1 %
20:80	100 %
30:70	94,5 %

Průtok mobilní fáze 1ml·min⁻¹ byl zvolen z důvodu nejvyšší odezvy (viz tabulka 13) a zároveň přijatelné doby analýzy. Nastavení průtoku 1ml·min⁻¹ bylo také vhodné pro současné použití obou detektorů.

Tabulka 13: Závislost velikosti plochy píku na průtoku mobilní fáze MTBE/MeOH 20:80

průtok mobilní fáze	relativní plocha píku
1 ml·min ⁻¹	100 %
1,5 ml·min ⁻¹	69,6 %
2 ml·min ⁻¹	55,5 %

Teplota kolony 25 °C byla zvolena s ohledem na nízkou tepelnou stabilitu karotenoidů.

Podle spektrálního profilu standardu β -karotenu byly optimalizovány také podmínky měření DAD detektoru. Kvantifikace naměřených dat probíhala při vlnové délce 450 nm, což je absorpční maximum β -karotenu. Byla také provedena kalibrace MS detektoru a ladění na β -karoten s APCI sondou iontového zdroje.

Tato jednoduchá metoda umožnila dostatečné rozlišení jednotlivých složek směsi v čase 15 minut.

V následujících tabulkách (tabulky 14 a 15) jsou shrnuty optimální podmínky chromatografické analýzy, které byly zvoleny na základě provedených zkoušek.

Tabulka 14: Chromatografická metoda

kolona	ODS Hypersil 250x4,6 mm 5 μ
mobilní fáze	MTBE:methanol, 20:80
průtok mobilní fáze	1 ml·min ⁻¹
nástřik vzorku	20 μ l
spektrofotometrická detekce	450 nm
teplota	25 °C
doba analýzy	15 min

Tabulka 15: Nastavení hmotnostního detektoru

iontový zdroj	APCI
mód iontů	pozitivní
typ skenování	single-stage full scan
doba analýzy	15 min

V pokusných vzorcích bylo identifikováno kromě β -karotenu také významné množství dalších karotenoidů. Vzhledem k omezenému množství dostupných standardů není jejich identifikace zcela jednoznačná. Přesto je jejich stanovení do práce zahrnuto, neboť poskytuje úplnější obraz o celkovém obsahu karotenoidů v ječmeni a může být základem pro další obdobné výzkumy.

Karotenoid s nejvyšším obsahem v ječmeni byl identifikován jako lutein. Identifikace je založena na retenčním čase a spektrální charakteristice standardu luteinu. Vzhledem ke stejné molekulové hmotnosti a podobnému UV-VIS spektru dalšího karotenoidu zeaxantinu, jehož standard nebyl k dispozici, nelze identifikaci považovat za jednoznačnou a není prokázáno, že příslušný pík vyjadřuje koncentraci luteinu bez dalších příměsí. Protože tato práce byla zaměřena na stanovení β -karotenu, nebyl kladen důraz na detailní separace dalších karotenoidů a příslušný pík je dále označován jako lutein. Ve vzorcích bylo také přítomno významné množství dalšího karotenoidu, který je dále označován jako neznámý karotenoid.

Rozdílné retenční časy umožnily rozlišit α -karoten a lykopen, jejichž molekulová hmotnost je stejná jako molekulová hmotnost β -karotenu a nemohly tak být rozlišeny hmotnostním detektorem. Dále byl zjištěn retenční čas asthaxantinu, jehož standard byl také k dispozici. Přehled retenčních časů a hodnot m/z vybraných karotenoidů je uveden v tabulce 16.

Tabulka 16: Retenční časy a m/z vybraných karotenoidů

karotenoid	retenční čas	m/z
β -karoten	10,2	537
α -karoten	9,7	537
lykopen	8,4	537
lutein	3,2	568
asthaxantin	3,5	596
neznámý karotenoid	3,0	583

UV-VIS spektra a hmotnostní spektra vybraných karotenoidů jsou uvedeny v kapitole 9.

4.2 Validace metody

V rámci validace metody byly ověřeny následující validační parametry - opakovatelnost, rozšířená nejistota měření, mez detekce a mez stanovitelnosti. Výsledky byly získány z 15 nezávislých měření identického vzorku a k výpočtu validačních parametrů byl použit program Effvalidation. Číselné vyjádření validačních parametrů je uvedeno v tabulce 17.

Opakovatelnost analytické metody je definována jako těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek. Tyto výsledky byly získány opakovaným měřením identického materiálu, použitím téže zkušební metody, týchž přístrojů a zařízení, v téže laboratoři, týmě pracovníkem, během tříměsíčního časového intervalu.

Nejistota výsledku měření představuje interval, ve kterém se nachází s deklarovanou mírou pravděpodobnosti skutečný výsledek měření. Číselná hodnota standardní nejistoty je vyjádřena jako směrodatná odchylka. Rozšířená standardní nejistota měření je součin standardní nejistoty a faktoru rozšíření (k). Obvykle se používá hodnota k=2, což odpovídá přibližně 95 % intervalu spolehlivosti pro normální rozdělení.

Mez detekce se obvykle definuje jako koncentrace látky, jejíž odezva je trojnásobná k velikosti šumu. Je to tedy koncentrace, kterou detektor prokazatelně zaznamená.

Mez stanovitelnosti se definuje jako koncentrace látky, jejíž odezva je desetinásobná k velikosti šumu.

Tabulka 17: Validací parametry

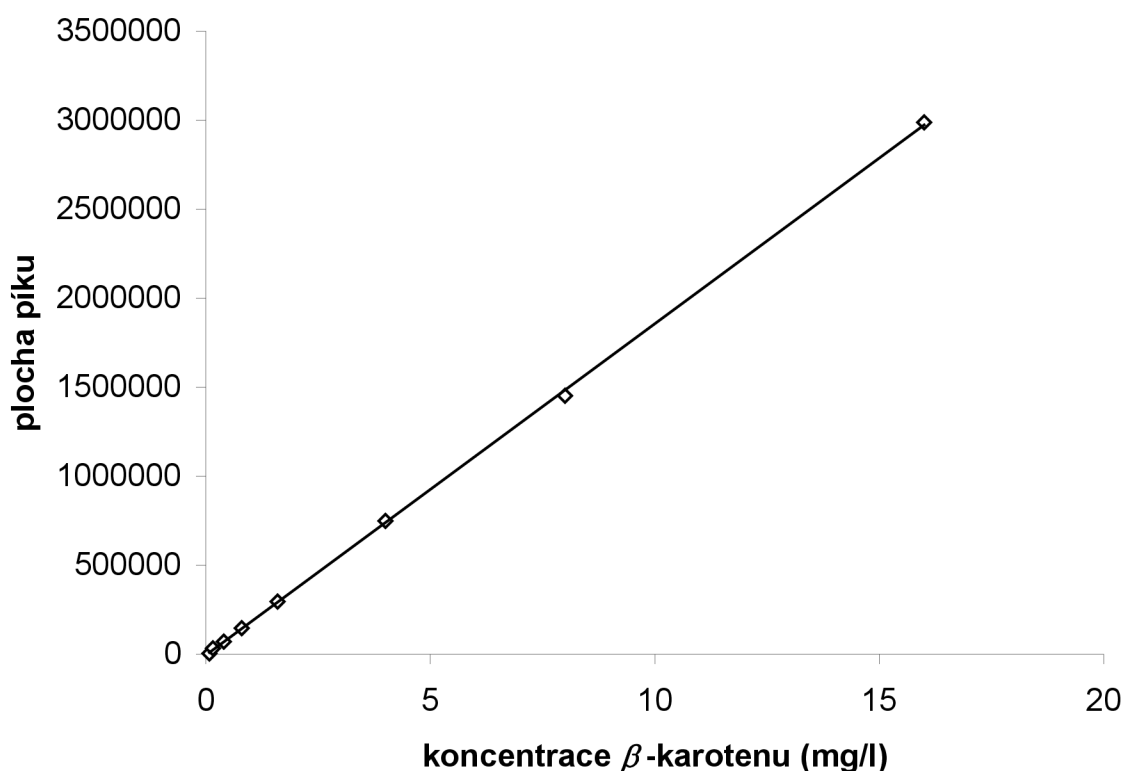
validační parametr	jednotka	β -karoten	lutein
počet měření		15	15
průměrná hodnota	mg·l ⁻¹	0,133	2,666
opakovatelnost	mg·l ⁻¹	0,010	0,099
relativní opakovatelnost	%	7,83	3,73
rozšířená standardní nejistota	mg·l ⁻¹	0,021	0,199
relativní rozšířená nejistota	%	15,66	7,47
mez detekce	mg·l ⁻¹	0,016	0,009
mez stanovitelnosti	mg·l ⁻¹	0,053	0,030

4.3 Kalibrační křivka

Koncentrace jednotlivých standardů β -karotenu a luteinu byly voleny tak, aby nedocházelo k výrazným rozdílům v odezvě na DAD detektoru při dané vlnové délce (450 nm) a s ohledem na obsah stanovovaných látek ve vzorcích.

Standardní roztoky byly vzhledem k nestabilitě karotenoidů připravovány vždy čerstvé pro každou sérii měření.

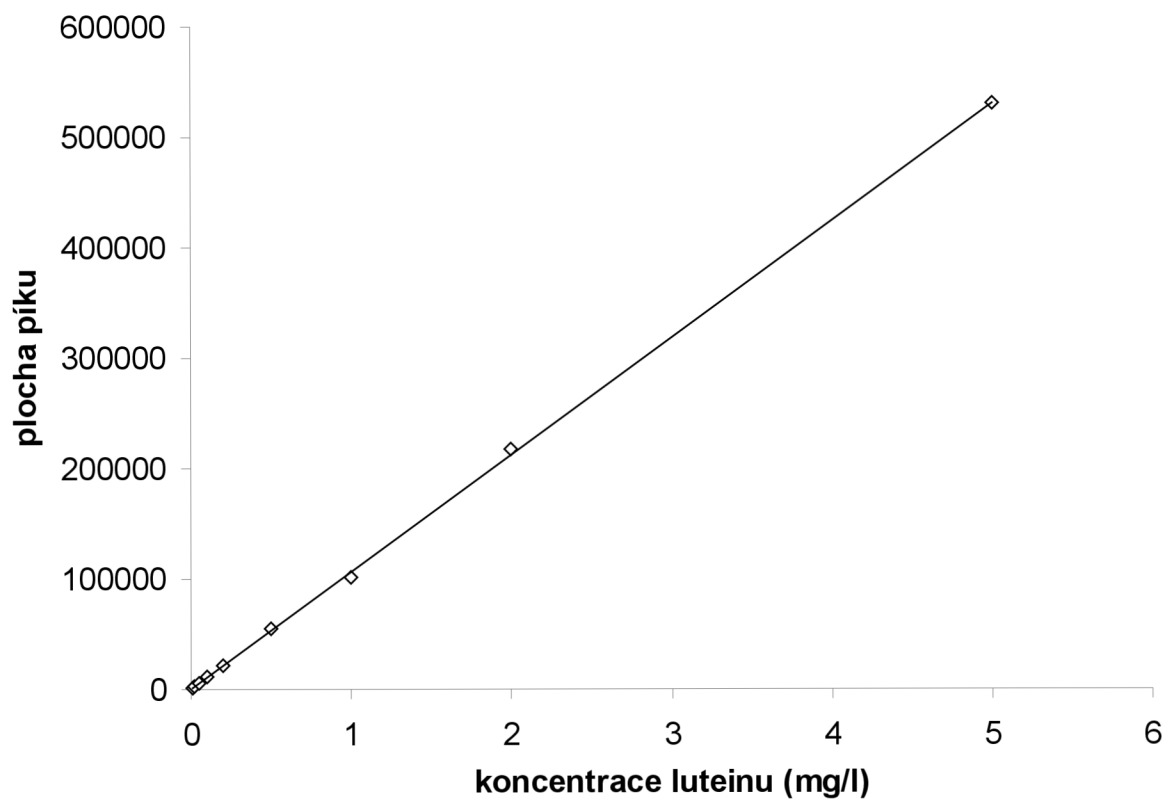
Všechny použité kalibrační křivky vykazovaly v daném rozmezí koncentrací lineární závislost plochy píku na koncentraci. Obrázky 18 a 19 ukazují příklad kalibrační křivky pro β -karoten a pro lutein.



Obrázek 18: Kalibrační křivka β -karotenu

Rovnice regrese: $y = 186\,222x - 5716,3$

Hodnota spolehlivosti R: $R^2 = 0,9998$



Obrázek 19: Kalibrační křivka luteinu

Rovnice regrese: $y = 106\,169x + 233,6$

Hodnota spolehlivosti R: $R^2 = 0,9997$

4.4 Stanovení β -karotenu v zrna ječmene a ve sladu

Do kvantitativního stanovení β -karotenu bylo zahrnuto sedm odrůd ze čtyř různých lokalit (viz kapitola 3.4.4.). V ječmeni byl identifikován β -karoten a lutein. Jak je již uvedeno v kapitole 4.1, lutein může obsahovat také příměs jiných, za podmínek analýzy těžko oddělitelných karotenoidů.

Obsah β -karotenu a luteinu z jednotlivých lokalit uvádí tabulky 18 až 21. Pro větší přehlednost jsou uspořádány do grafů (obrázky 20 až 28). Výsledky jsou uvedeny v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ sušiny. Obsah vody ve vzorcích ječmene se pohyboval v rozmezí 12 až 16 % a ve vzorcích sladu v rozmezí 4 až 6 %.

Tabulka 18: obsah β -karotenu a luteinu v ječmeni a sladu z lokality Hrubšice

Hrubšice	odrůda	β -karoten ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ suš.)			lutein ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ suš.)	
		ječmen	Slad		ječmen	slad
neošetřeno	Bojos	0,09	0,42	neošetřeno	4,75	8,09
	Jersey	0,13	0,44		5,92	8,90
	Malz	0,12	0,38		4,73	6,58
	Prestige	0,07	0,30		4,50	6,95
	Sebastian	0,11	0,41		5,57	7,54
	Tolar	0,08	0,33		5,64	7,50
ošetřeno	Bojos	0,13	0,46	ošetřeno	5,84	8,46
	Jersey	0,14	0,49		6,05	9,26
	Malz	0,12	0,38		5,04	6,72
	Prestige	0,08	0,32		4,37	7,20
	Sebastian	0,13	0,38		5,16	7,49
	Tolar	0,11	0,29		3,68	7,01

Tabulka 19: obsah β -karotenu a luteinu v ječmeni a sladu z lokality Lednice

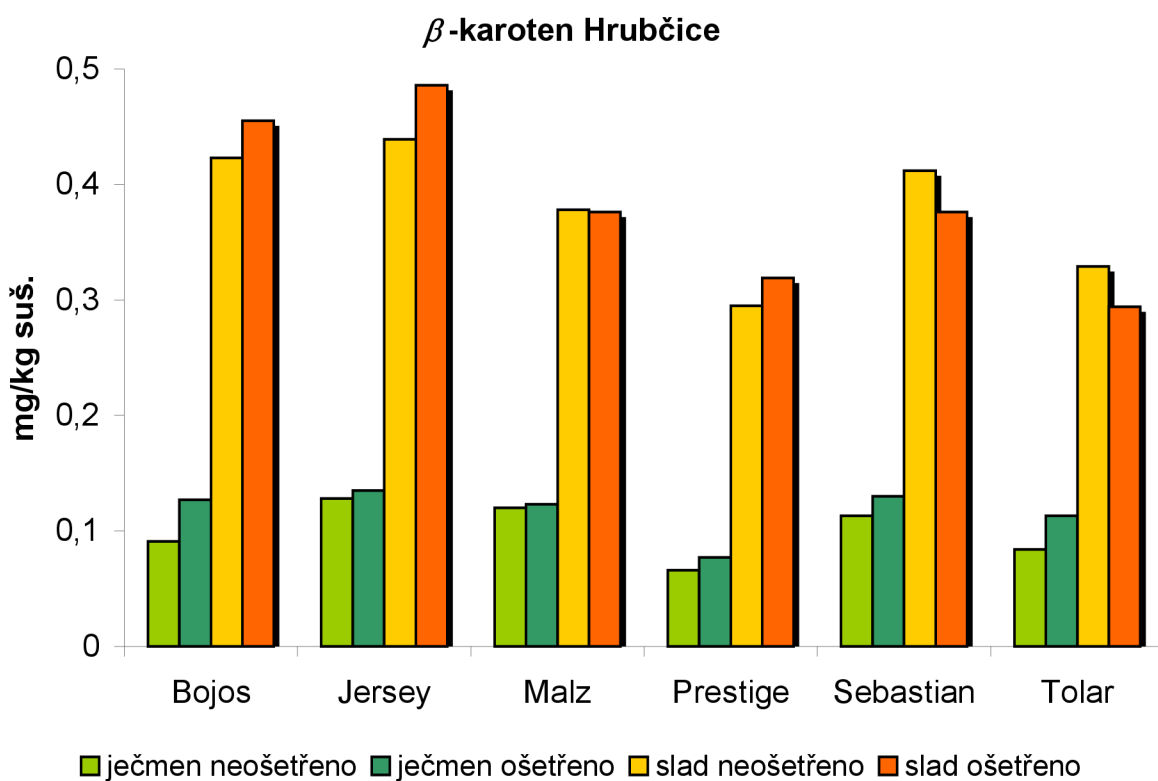
Lednice	odrůda	β -karoten ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ suš.)			lutein ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ suš.)	
		ječmen	Slad		ječmen	slad
neošetřeno	Bojos	0,12	0,34	neošetřeno	4,84	6,42
	Jersey	0,12	0,44		5,71	8,34
	Malz	0,12	0,30		4,66	7,07
	Prestige	0,07	0,43		4,83	6,99
	Sebastian	0,09	0,31		4,64	7,61
	Tolar	0,12	0,35		4,89	7,73
ošetřeno	Bojos	0,10	0,24	ošetřeno	4,42	6,62
	Jersey	0,12	0,35		5,29	7,51
	Malz	0,11	0,33		4,89	7,75
	Prestige	0,07	0,35		4,71	6,92
	Sebastian	0,13	0,24		5,38	6,88
	Tolar	0,09	0,25		4,73	6,58

Tabulka 20: obsah β -karotenu a luteinu v ječmeni a sladu z lokality Branišovice

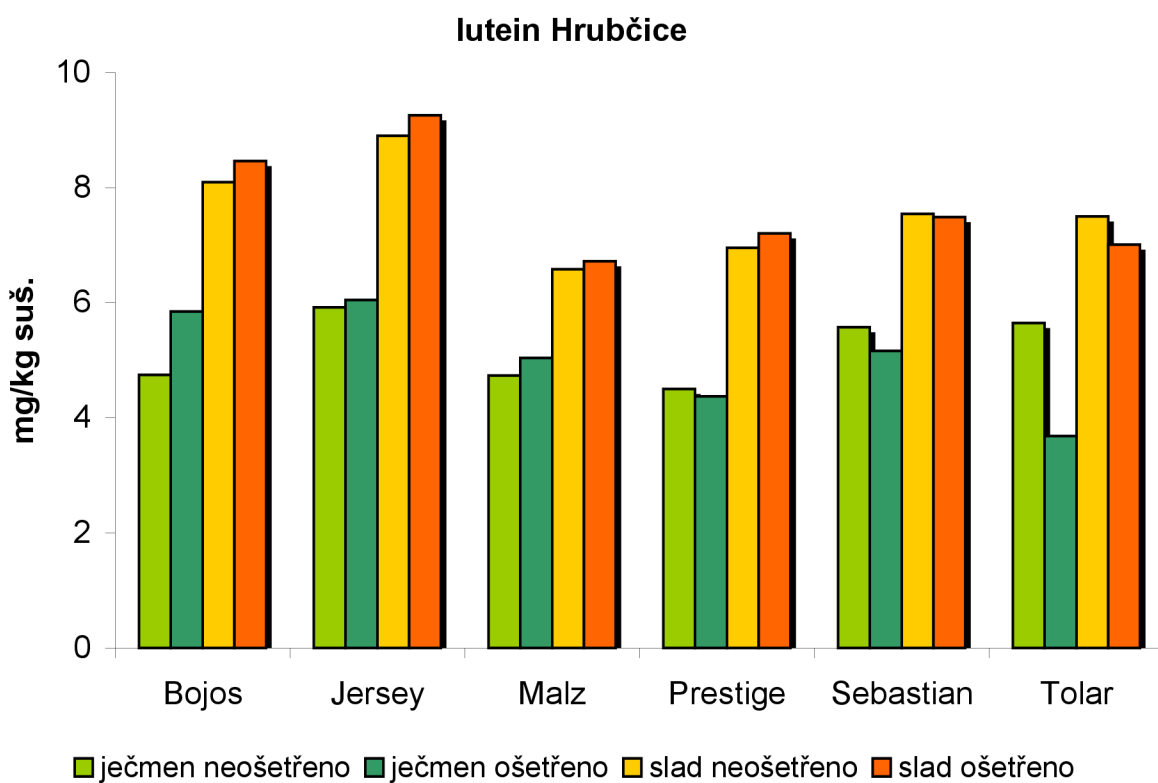
Branišovice	odrůda	β -karoten (mg·kg ⁻¹ suš.)			lutein (mg·kg ⁻¹ suš.)	
		ječmen	Slad		ječmen	slad
neošetřeno	Bojos	0,11	0,40	neošetřeno	4,04	6,81
	Jersey	0,12	0,53		4,42	8,12
	Malz	0,11	0,41		3,85	6,18
	radegast	0,10	0,34		3,73	5,95
	Sebastian	0,10	0,39		4,67	6,80
	Tolar	0,11	0,38		5,74	7,75
ošetřeno	Bojos	0,12	0,43	ošetřeno	3,86	7,23
	Jersey	0,12	0,56		4,34	7,73
	Malz	0,13	0,40		4,27	6,16
	radegast	0,08	0,33		3,76	5,94
	Sebastian	0,12	0,40		4,91	6,79
	Tolar	0,09	0,36		5,55	7,41

Tabulka 21: obsah β -karotenu a luteinu v ječmeni a sladu z lokality Krásné Údolí

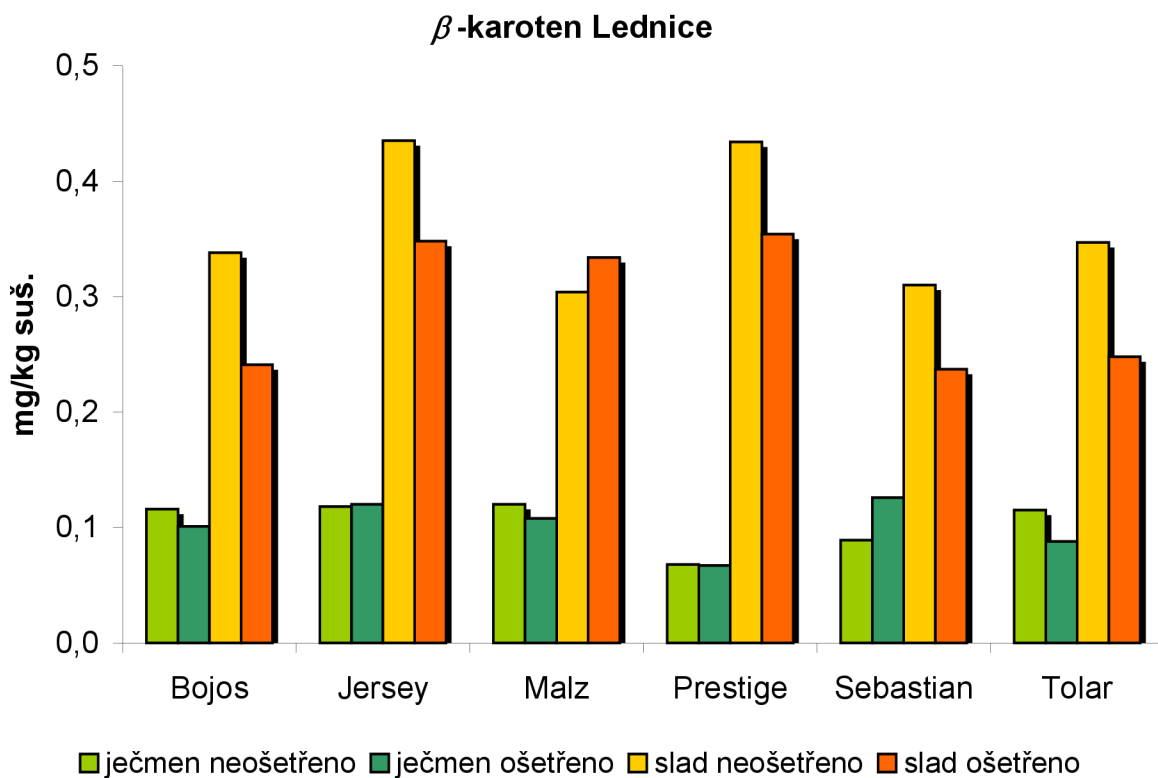
Krásné Údolí	odrůda	β -karoten (mg·kg ⁻¹ suš.)			lutein (mg·kg ⁻¹ suš.)	
		ječmen	Slad		ječmen	slad
neošetřeno	Bojos	0,11	0,44	neošetřeno	2,92	5,43
	Jersey	0,12	0,48		4,32	6,99
	Malz	0,11	0,49		3,22	5,49
	radegast	0,08	0,37		2,96	5,31
	Sebastian	0,09	0,37		3,79	6,30
	Tolar	0,07	0,31		4,23	6,36
ošetřeno	Bojos	0,07	0,38	ošetřeno	2,40	5,69
	Jersey	0,08	0,41		3,48	5,81
	Malz	0,11	0,38		3,66	6,22
	radegast	0,08	0,31		2,92	4,75
	Sebastian	0,08	0,37		3,29	6,08
	Tolar	0,08	0,30		5,26	6,96



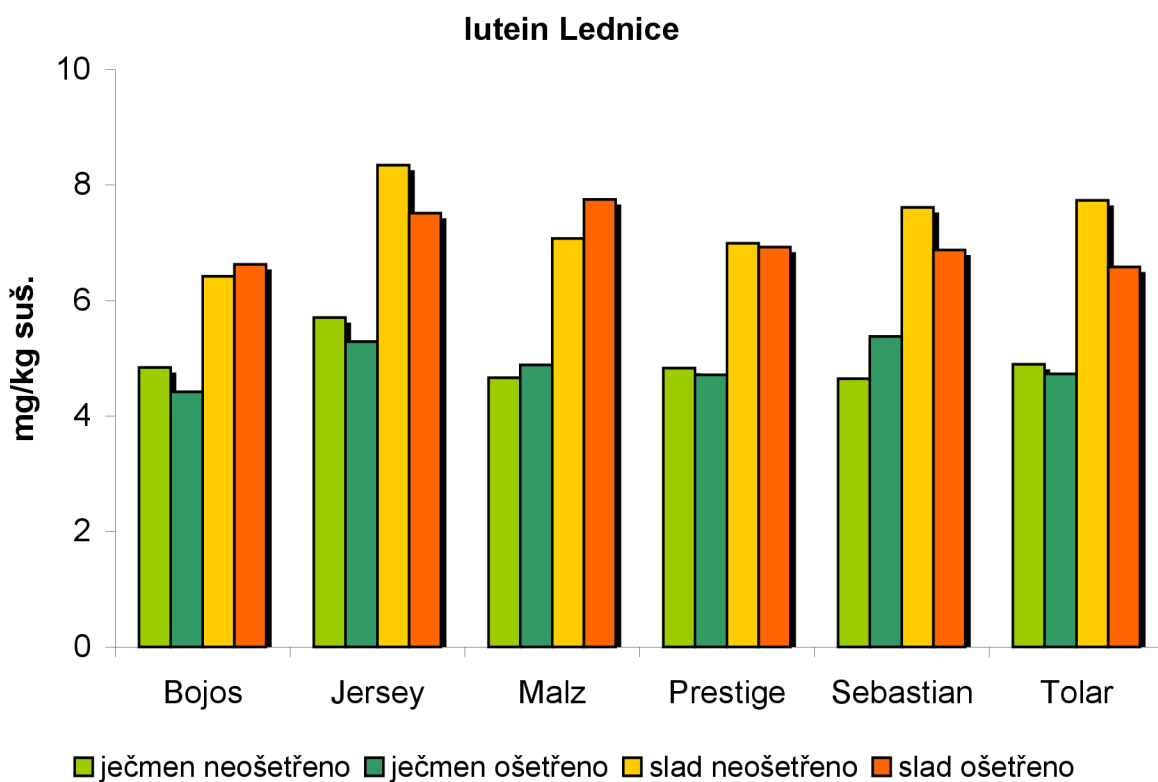
Obrázek 20: Obsah β -karotenu ve vybraných odrůdách ječmene z lokality Hrubčice a v odpovídajících vzorcích sladu



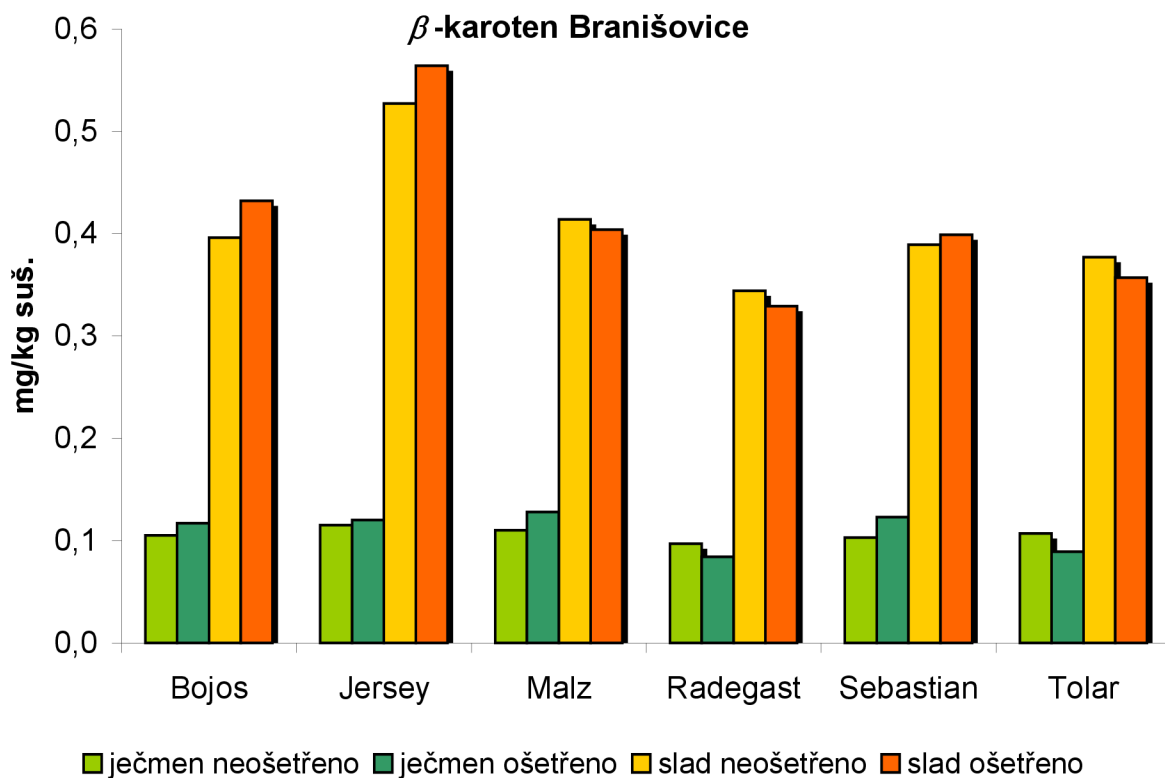
Obrázek 21: Obsah luteinu ve vybraných odrůdách ječmene z lokality Hrubčice a v odpovídajících vzorcích sladu



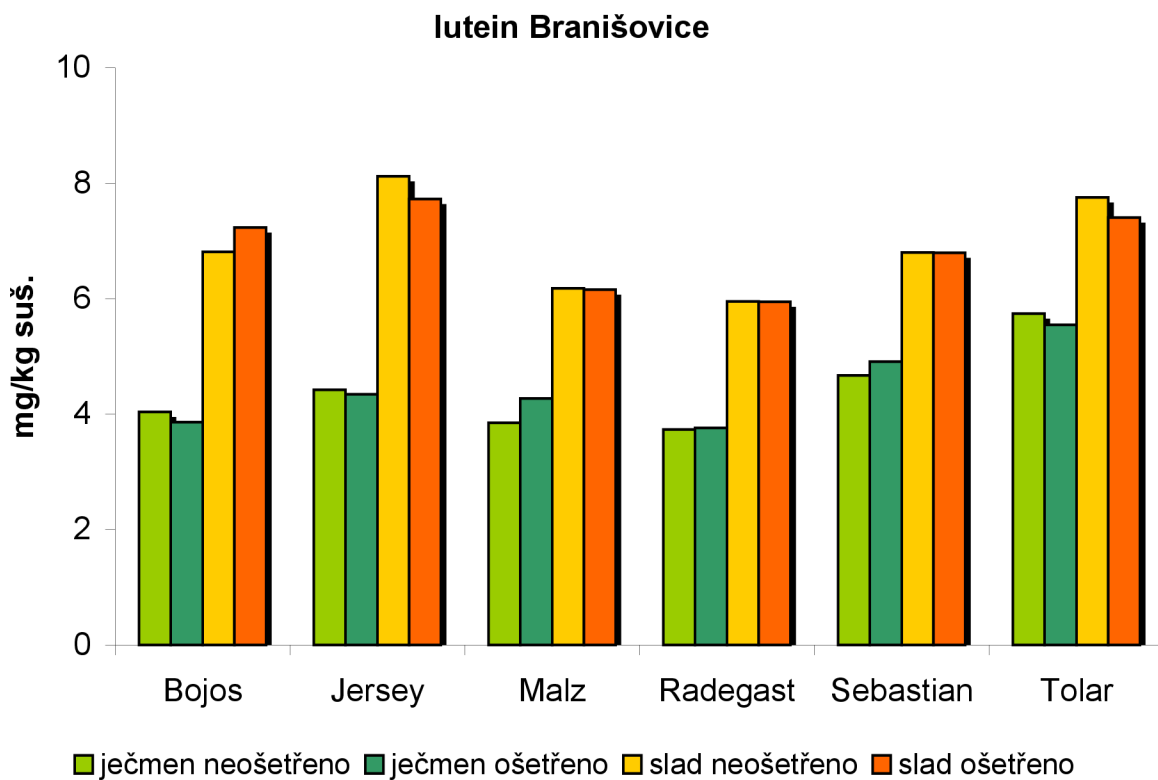
Obrázek 22: Obsah β -karotenu ve vybraných odrůdách ječmene z lokality Lednice a v odpovídajících vzorcích sladu



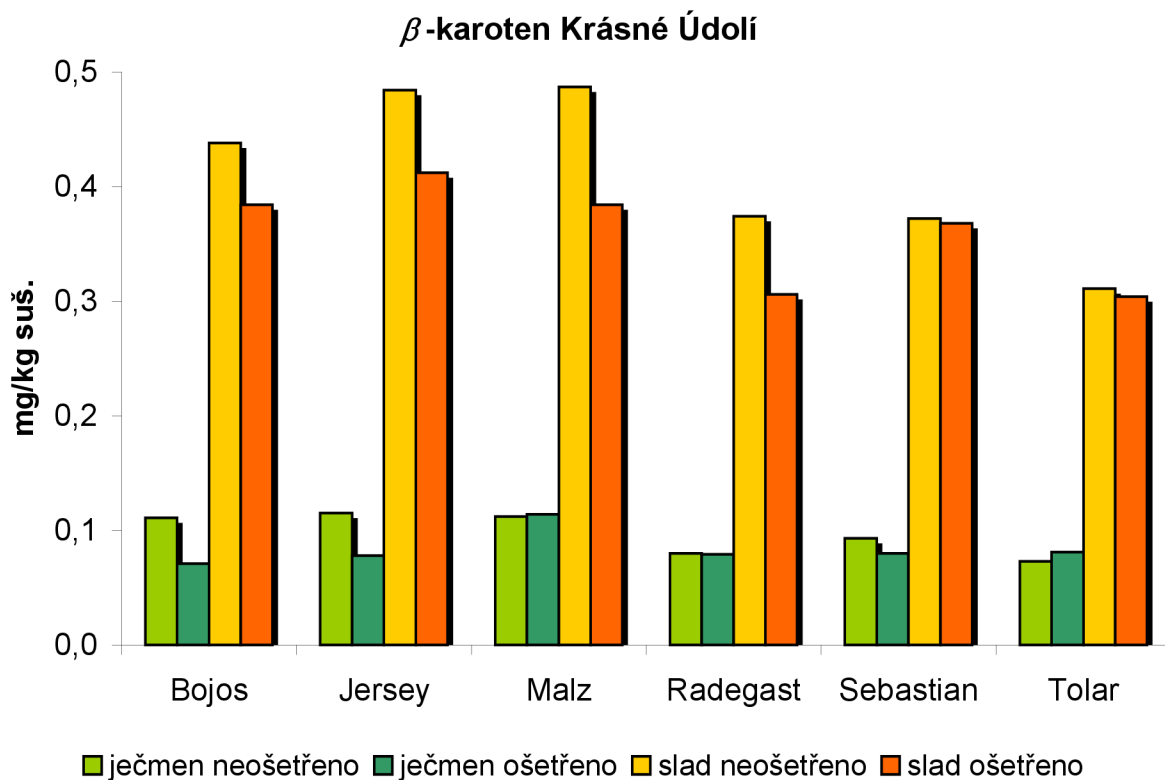
Obrázek 23: Obsah luteinu ve vybraných odrůdách ječmene z lokality Lednice a v odpovídajících vzorcích sladu



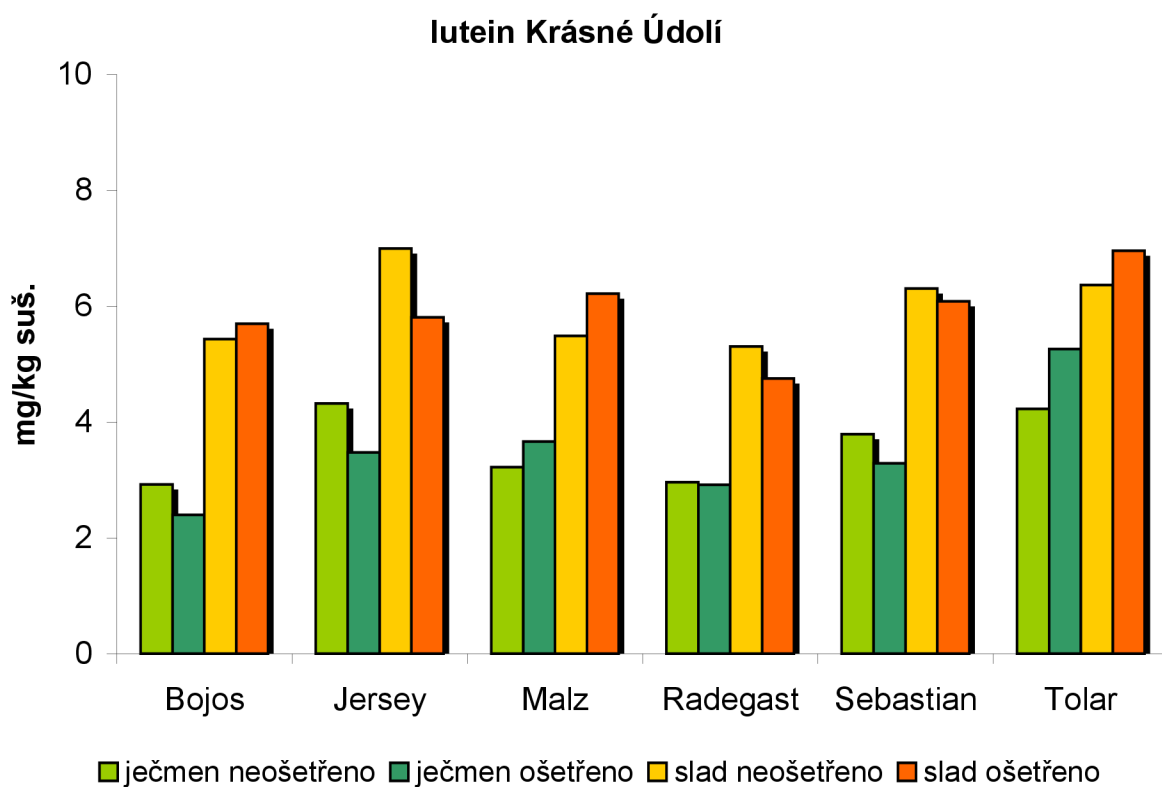
Obrázek 24: Obsah β -karotenu ve vybraných odrůdách ječmene z lokality Branišovice a v odpovídajících vzorcích sladu



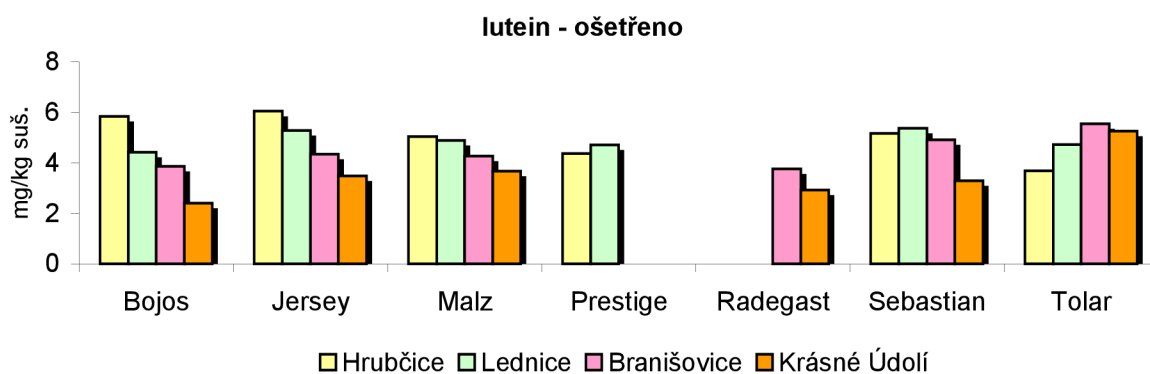
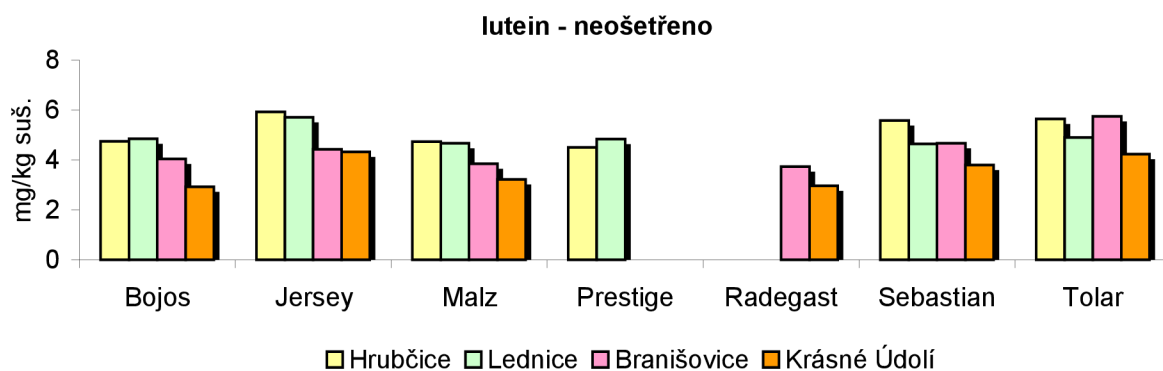
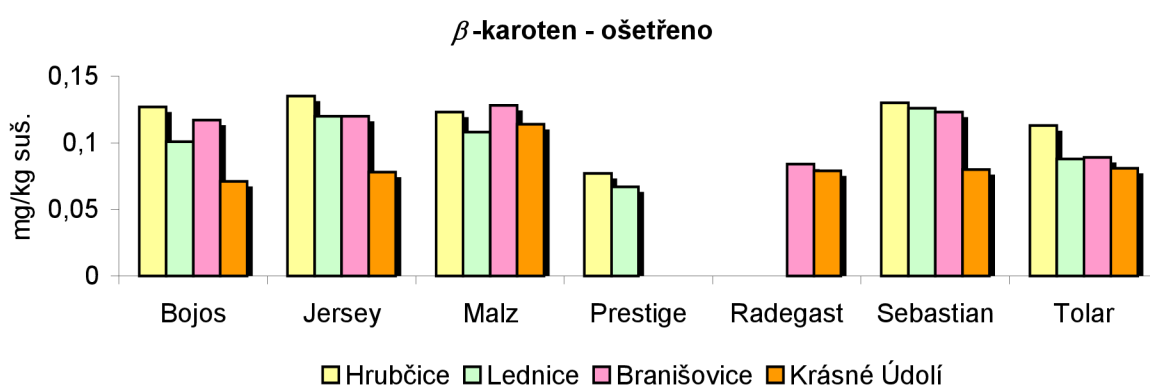
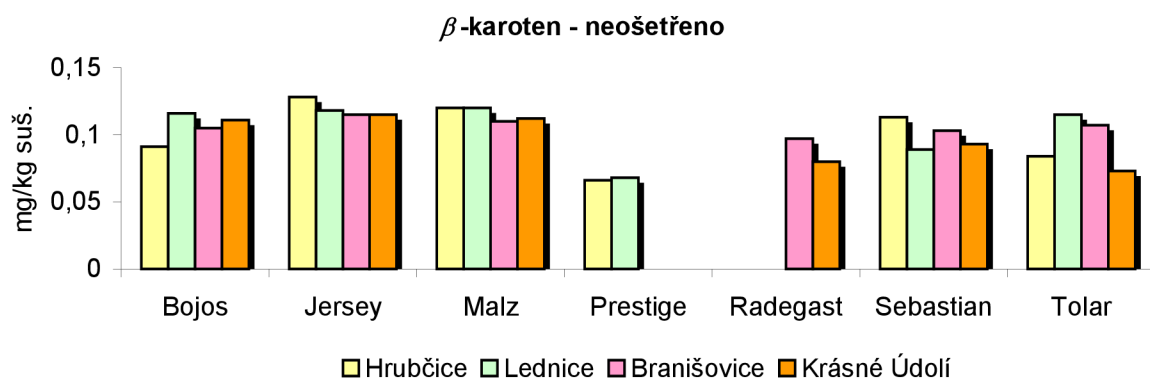
Obrázek 25: Obsah luteinu ve vybraných odrůdách ječmene z lokality Branišovice a v odpovídajících vzorcích sladu



Obrázek 26: Obsah β -karotenu ve vybraných odrůdách ječmene z lokality Krásné Údolí a v odpovídajících vzorcích sladu



Obrázek 27: Obsah luteinu ve vybraných odrůdách ječmene z lokality Krásné Údolí a v odpovídajících vzorcích sladu



Obrázek 28: Závislost obsahu β -karotenu a luteinu v ječmeni na lokalitě

Bylo prokázáno, že v zrně ječmene je β -karoten obsažen. Jeho obsah je však relativně nízký, pohybuje se těsně nad mezí stanovitelnosti. Obsah luteinu je řádově vyšší. Vlivem sladování se obsah β -karotenu zvýší až 5krát a obsah luteinu se zvýší až dvojnásobně.

Z výsledků jsou také patrné odrůdové závislosti. Ve většině případů byl obsah β -karotenu nejvyšší u odrůdy Jersey (v ječmeni i ve sladu). Nižší hodnoty naopak vykazovaly odrůdy Prestige a Radegast. Obsah luteinu vykazuje podobné závislosti na odrůdě jako obsah β -karotenu.

Rozdíly v obsahu karotenoidů v ječmeni z různých lokalit nejsou příliš vysoké. Přesto se dá říci, že nejnižší obsah β -karotenu i luteinu ve většině případů vykazují vzorky z lokality Krásné Údolí. Naopak nejvyšší obsah těchto látek je ve většině případů u odrůd ječmene pocházejícího z lokality Hrubčice. Souvislost mezi obsahem β -karotenu v ošetřených a neošetřených vzorcích zrna ječmene a z něho vyrobeného sladu nebyla prokázána.

V odborné literatuře nejsou podrobné informace o obsahu β -karotenu a luteinu v ječmeni téměř uváděny (s výjimkou práce autorů Panfilio, Fratianiho a Irana [65]). Naměřené výsledky jsou vzhledem k různým pěstebním podmínkám a odlišnosti vzorků srovnatelné s výsledky těchto autorů.

K podrobnějším závěrům by bylo možno dospět vyhodnocením většího množství analytických dat a zejména opakovaním rozborů v rozmezí několika let. To však převyšuje rozsah této diplomové práce.

4.5 Stanovení β -karotenu v zeleném ječmeni

Ke stanovení β -karotenu resp. luteinu ve vzorcích zeleného ječmene byla použita stejná metoda jako pro stanovení těchto karotenoidů ve vzorcích zrna ječmene a sladu. Na chromatogramu zeleného ječmene lze také identifikovat stejné píky jako na chromatogramu zrna ječmene nebo sladu (viz obrázky 43 až 45 v kapitole 9).

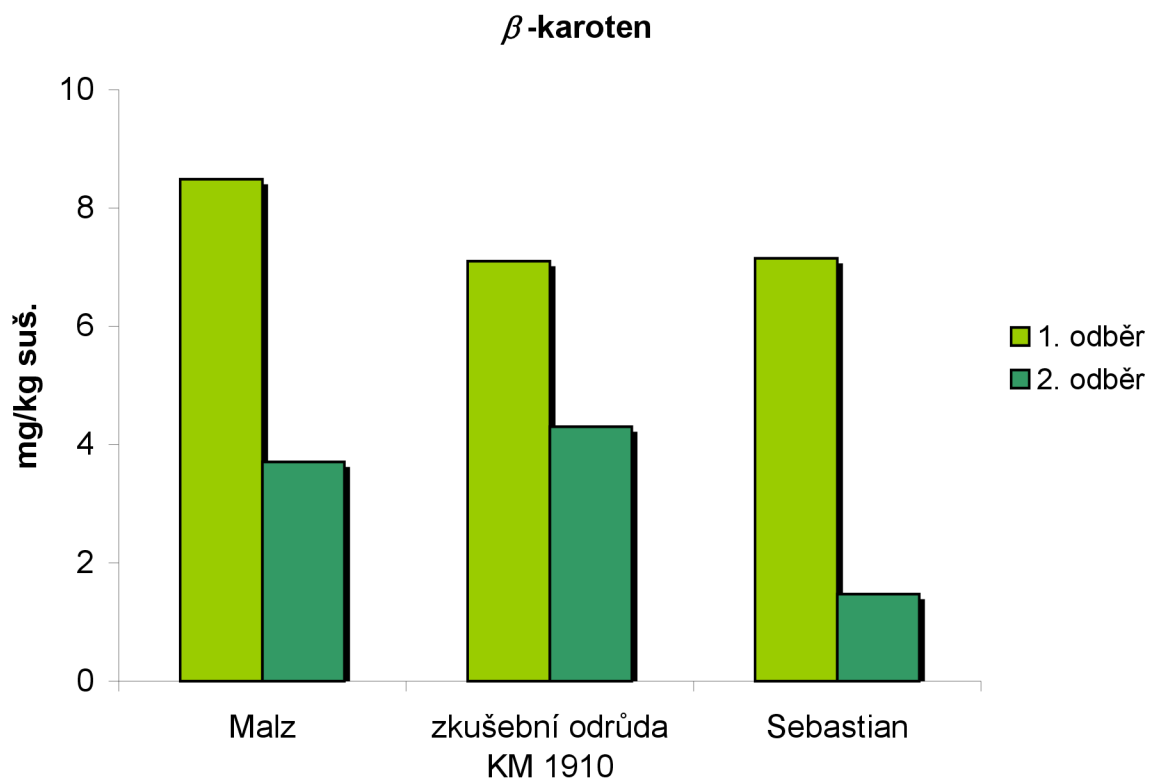
Obsah β -karotenu i luteinu v zeleném ječmeni je několikanásobně vyšší než v zru ječmene. Relativně velké rozdíly v obsahu analytů mezi jednotlivými odrůdově čistými vzorky zeleného ječmene vyplývají z rozdílných půdních a klimatických podmínek jednotlivých pěstebních lokalit a ročníků sklizně. Obsah karotenoidů v zeleném ječmeni také významně ovlivňuje růstová fáze, při které se zelený ječmen sklízí.

4.5.1 Zelený ječmen ze sklizně 2006

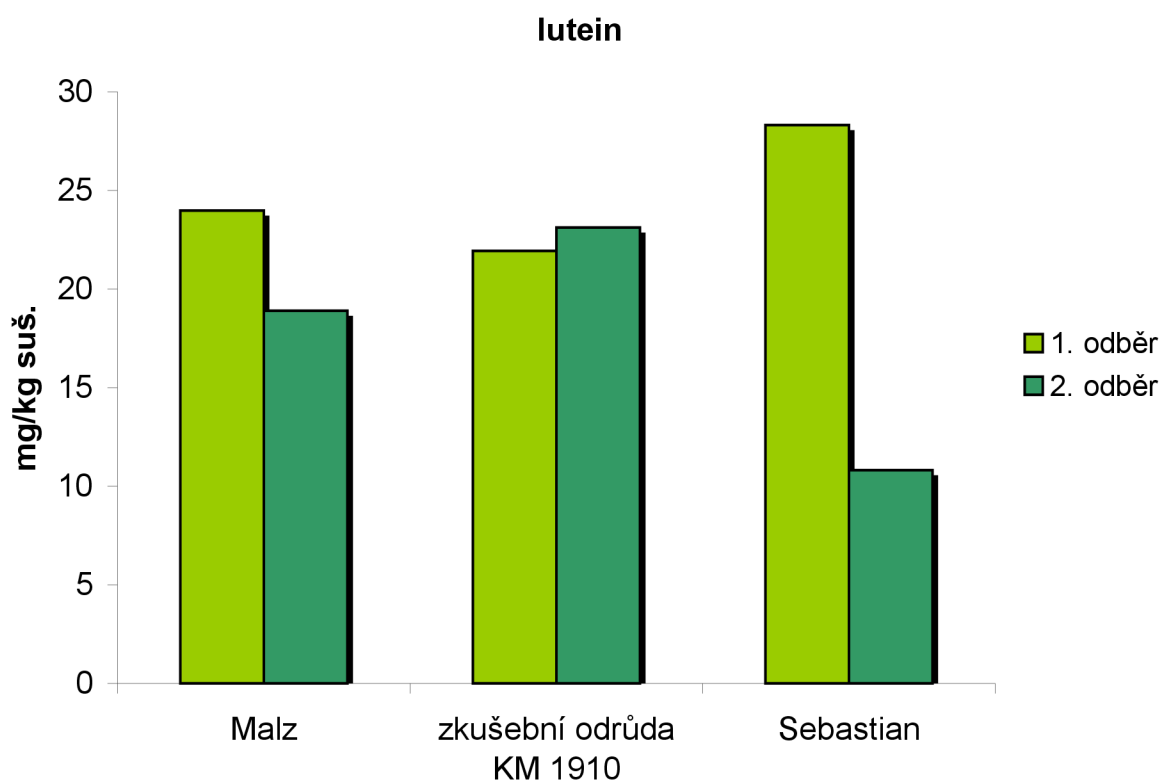
Obsah β -karotenu a luteinu ve třech odrůdově čistých vzorcích zeleného ječmene, pocházejících z lokality Žabčice, uvádí tabulka 22 a obrázky 29 a 30. Z výsledků je patrný velký rozdíl mezi obsahem β -karotenu (i luteinu) z 1. a z 2. odběru. Až na jednu výjimku (obsah luteinu u zkušební odrůdy KM 1910) je obsah měřených karotenoidů vyšší v 1. odběru. Vzorky zeleného ječmene obsahovaly 86-88 % vody.

Tabulka 22: stanovené množství β -karotenu a luteinu ve vzorcích zeleného ječmene (sklizeň 2006)

odrůda	odběr	β -karoten (mg/kg sušiny)	lutein (mg/kg sušiny)
Malz	1.	8,49	23,98
	2.	3,70	18,99
zkušební odrůda KM 1910	1.	7,10	21,93
	2.	4,30	23,12
Sebastian	1.	7,15	28,32
	2.	1,47	10,81



Obrázek 29: Obsah β -karotenu ve vzorcích zeleného ječmene z lokality Žabčice



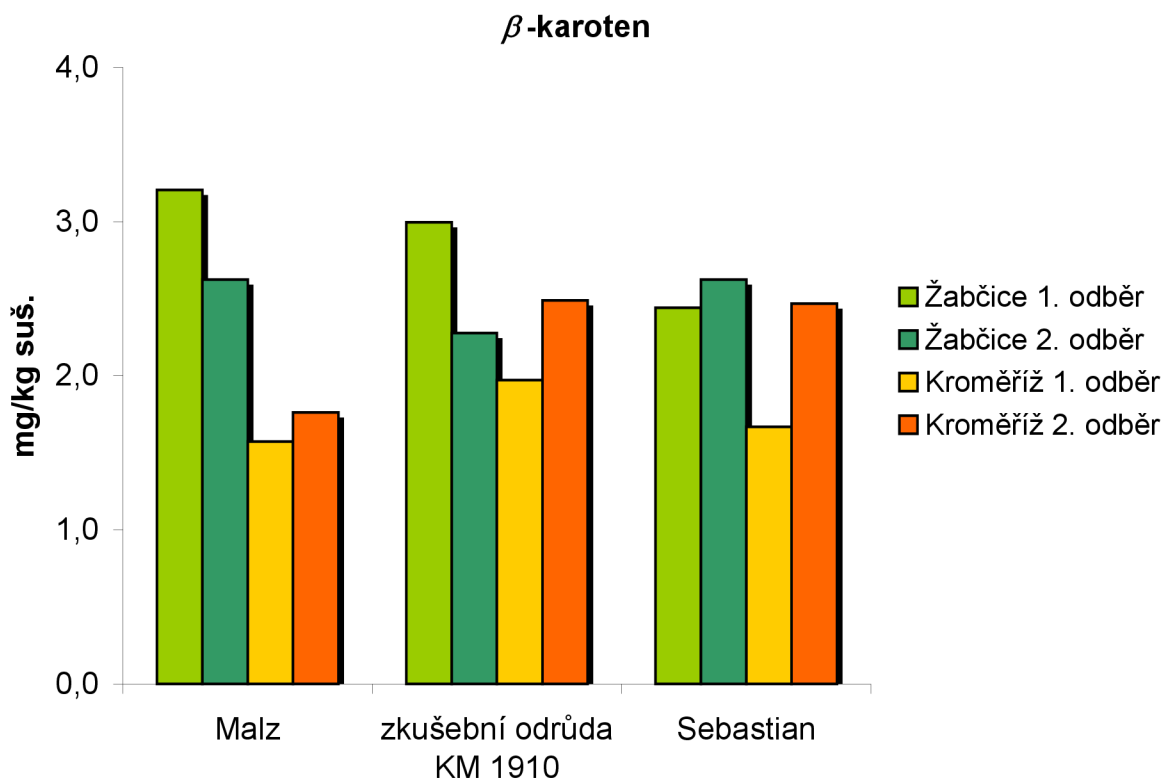
Obrázek 30: Obsah luteinu ve vzorcích zeleného ječmene z lokality Žabčice

4.5.2 Zelený ječmen ze sklizně 2007

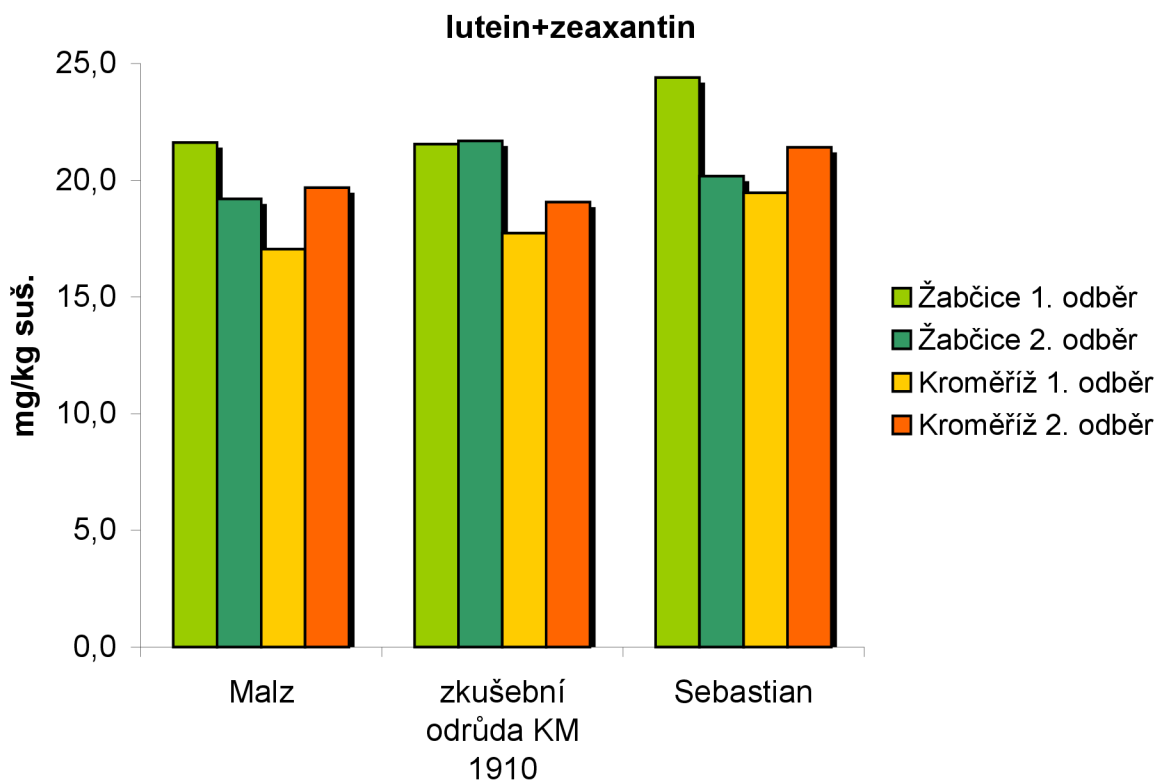
Na rozdíl od vzorků ze sklizně 2006 je rozdíl v obsahu karotenoidů mezi 1. a 2. odběrem méně patrný. Zatímco ve vzorcích z lokality Žabčice je ve většině případů větší obsah karotenoidů ve vzorcích z 1. odběru, ve vzorcích pocházejících z lokality Kroměříž je tomu naopak (viz tabulka 23 a obrázky 34 a 35). Obsah β -karotenu z 1. odběru je v porovnání se vzorky 1. odběru odpovídajících odrůd ze sklizně 2006 několikanásobně nižší. Vzorky zeleného ječmene ze sklizně 2007 obsahovaly 83-85% vlhkosti.

Tabulka 23: stanovené množství β -karotenu a luteinu ve vzorcích zeleného ječmene (sklizeň 2007)

odrůda	odběr	β -karoten (mg/kg sušiny)		lutein (mg/kg sušiny)	
		Žabčice	Kroměříž	Žabčice	Kroměříž
Malz	1.	3,21	1,57	21,62	17,05
	2.	2,62	1,76	19,20	19,67
zkušební odrůda KM 1910	1.	2,99	1,97	21,55	17,74
	2.	2,28	2,49	21,69	19,06
Sebastian	1.	2,44	1,67	24,40	19,46
	2.	2,62	2,47	20,17	21,41



Obrázek 31: Obsah β -karotenu ve vzorcích zeleného ječmene z lokality Žabčice a Kroměříž



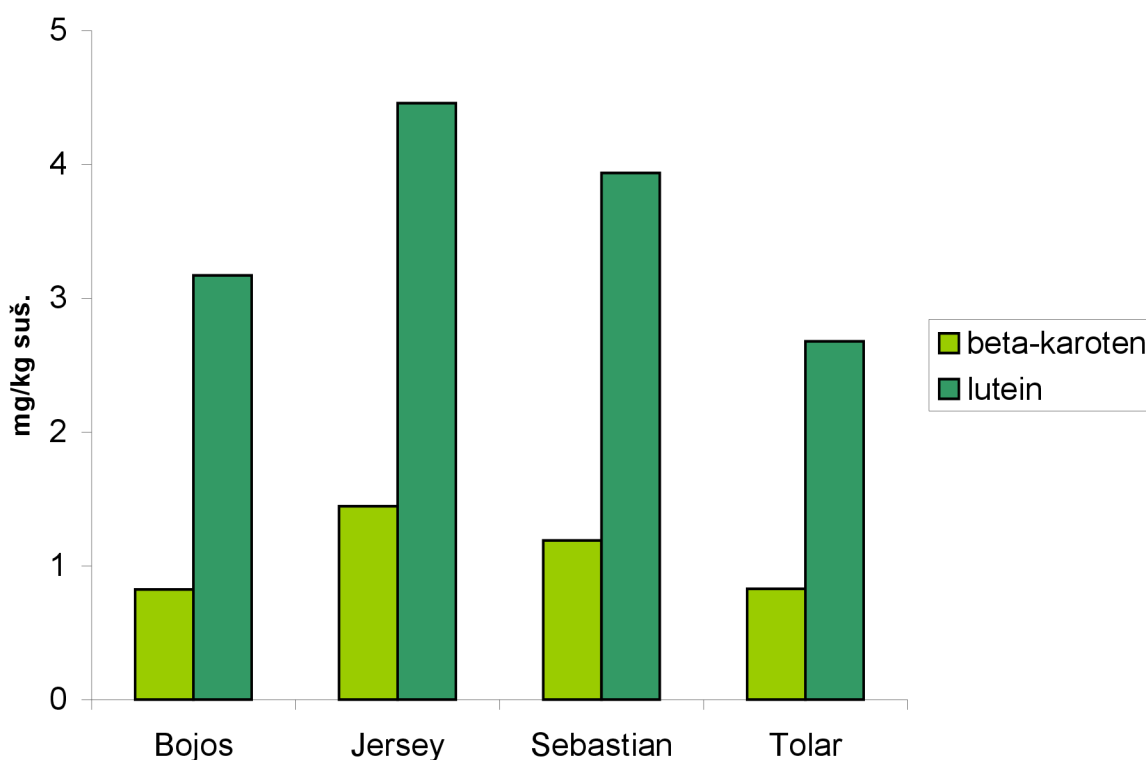
Obrázek 32: Obsah luteinu ve vzorcích zeleného ječmene z lokality Žabčice a Kroměříž

4.5.3 Zelený ječmen z modelového pokusu na VÚPS

Čtyři odrůdově čisté vzorky zeleného ječmene, které byly získány z modelového pokusu na pracovišti VÚPS, odpovídaly růstovou fází vzorkům z 2. odběru. Vykazovaly nejnižší hodnoty obsahu β -karotenu a luteinu ze všech sledovaných vzorků zeleného ječmene. Vysvětlením by mohlo být vypěstování tohoto ječmene na půdě pro pokojové rostliny a také fakt, že tento pokus byl proveden v zimním období, čili při nestandardních světelných podmínkách. Dalšími faktory, které mohly ovlivnit obsah analytů v listech ječmene bylo pěstování při pokojové teplotě a s pravidelnou zálivkou. V důsledku těchto faktorů byl urychlen růst ječmene. Vzorky obsahovaly 93-94 % vody.

Tabulka 24: stanovené množství β -karotenu a luteinu ve vzorcích zeleného ječmene vypěstovaného na pracovišti VÚPS (2007)

odrůda	β -karoten (mg/kg sušiny)	lutein (mg/kg sušiny)
Bojos	0,82	3,17
Jersey	1,44	4,46
Sebastian	1,19	3,94
Tolar	0,83	2,68



Obrázek 33: Obsah β -karotenu a luteinu ve vzorcích zeleného ječmene z modelového pokusu na VÚPS

5. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se věnovala přírodním antioxidantům, které jsou obsaženy v ječmeni. Největší pozornost se zaměřila na karotenoidy, z nichž některé jsou účinnými antioxidanty a provitaminy A.

Byla zpracována literární rešerže, shrnující poznatky o antioxidantech obsažených v obilovinách a o jejich zdravotním významu. Tato část diplomové práce se zaměřila na karotenoidy a zvláště na jeden z nejvíce známých karotenoidů - β -karoten. Dále byly shromážděny informace o metodách stanovení karotenoidů v rostlinných materiálech. Stručně byla popsána také metoda HPLC/DAD a MS.

Praktická část diplomové práce se zabývala stanovením β -karotenu v několika odrůdách ječmene, z něho vyrobeného sladu a v zeleném ječmeni metodou vysoceúčinné kapalinové chromatografie s photo diode array detektorem a s hmotnostním detektorem (APCI-MS). Ke kvantifikaci byla použita data z DAD (PDA) detektoru. Kromě β -karotenu byl v uvedených vzorcích stanoven i obsah luteinu.

Ke stanovení β -karotenu byla použita metoda založená na alkalickém zmýdelnění pomletého vzorku ječmene, extrakci diethyletherem a chromatografické analýze s použitím sestavy HPLC/DAD/MS. Separace proběhla na koloně ODS Hypersil 250x4,6 mm (C18) 5 μ a v průběhu práce byly pro stanovení β -karotenu optimalizovány následující chromatografické podmínky: mobilní fáze: MTBE/MeOH, 20:80; průtok: 1 ml·min⁻¹; teplota: 25 °C; objem nástřiku: 20 μ l; vlnová délka: 450 nm. Tato jednoduchá metoda umožnila provedení jedné analýzy v průběhu 15 minut. Navržené optimální podmínky je možno modifikovat vzhledem k požadavkům na selektivitu a na časové možnosti analýzy.

Naměřené hodnoty β -karotenu v zrně ječmene a ve sladu se pohybovaly v rozmezí 0,07-0,14 mg/kg sušiny pro zrno ječmene a 0,24-0,56 mg/kg sušiny pro slad. Hodnoty luteinu se pohybovaly v rozmezí 2,92-6,05 mg/kg sušiny pro zrno ječmene, 4,75-9,26 mg/kg sušiny pro slad. Výsledky vykazovaly odrůdovou závislost. Odrůda s nejvyšším obsahem analytů byla ve většině případů odrůda Jersey. Obsah β -karotenu byl ve všech vzorcích vyšší ve sladu než v zrně ječmene.

Výsledky získané z analýzy zeleného ječmene se pohybují ve větším rozmezí. Ve vzorcích ze sklizně 2006 se obsah β -karotenu pohybuje v rozmezí 1,47-8,49 mg·kg⁻¹ sušiny a obsah luteinu je 10,80-28,32 mg·kg⁻¹ sušiny. Ve vzorcích ze sklizně 2007 bylo nalezeno 1,57-3,21 mg·kg⁻¹ sušiny β -karotenu a 17,05-24,40 mg·kg⁻¹ sušiny luteinu. Zelený ječmen získaný z modelového pokusu na pracovišti VÚPS vykazoval tyto hodnoty obsahu analytů: 0,82-1,44 mg·kg⁻¹ sušiny pro β -karoten a 2,68-4,48 mg·kg⁻¹ sušiny pro lutein. Tyto relativně velké rozdíly v obsahu karotenoidů ve vzorcích pocházejících z různých zdrojů jsou způsobeny odlišnými půdně-klimatickými podmínkami, odběrem vzorků v různých fázích růstu a ročníkem sklizně.

Pomocí programu Effvalidation byly vyhodnoceny vybrané validační parametry chromatografické analýzy.

Pro další práci je možné se zaměřit na separaci a identifikaci dalších karotenoidů obsažených v ječmeni, jejichž výzkum nebyl součástí této diplomové práce a nebyla jim proto věnována dostatečná pozornost.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Youngson, R.: *Antioxidanty cesta ke zdraví*. 1. vyd. Brno: Jota, 1995. 18-96 s. ISBN 80-85617-56-0.
- [2] Havlová, P., Prýma, J., Šusta, J., Mikulíková, R., Ehrenbergerová, J., Němejč, R.: Zdravotně významné látky v ječmeni a pivu. *Kvasný průmysl*, 2000, vol. 46, no. 12, pp. 350-352. ISSN 0023-5830.
- [3] Honza, J., Mareček, A.: *Chemie 2. díl*. 2. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 1998. 115 s. ISBN 80-7182-056-3.
- [4] Mach, I.: *Doplňky stravy*. 1. vyd. Praha: Svoboda Servis, 2004. 64-65 s. ISBN 80-86320-34-0.
- [5] Vodrážka, Z.: *Biochemie 3*. 1. vyd. Praha: Academia, 1993. 71 s., 138 s. ISBN 80-200-0471-8.
- [6] Vodrážka, Z.: *Biochemie 2*. 1. vyd. Praha: Academia, 1992. 82-83 s. ISBN 80-200-0441-6.
- [7] Kočí, R.: Pojednání k disertační práci: Vliv stresových podmínek na metabolickou aktivitu kvasinek. Brno: VUT, FCH, 2003. 28 s.
- [8] Lehninger, A., Nelson, D., Cox, M.: *Principles of Biochemistry*. 2nd ed. New York: Worth publishers, 1993. 259-260, 576 s. ISBN 0-87901-500-4.
- [9] Fennema, O.: *Food chemistry*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, inc., 1996. 673-680 s. ISBN 0-8247-9691-8.
- [10] Murray, R., Granner, D., Mazes, P., Rodwell, V.: *Harperova biochemie*. 23. vyd., Jinočany: Nakladatelství H+H, 2002. 618-621 s. ISBN 80-7319-013-3.
- [11] Lakshman, MR.: Alpha and omega of carotenoid cleavage. *Journal of nutrition*, 2004, vol. 134, no. 1, pp. 241-245 ISSN 0022-3166.
- [12] Uhrová, R.: *Čo vieme o vitamínoch dnes*. 1. vyd. Malé centrum: Bratislava, 2002. 29-38 s. ISBN 80-968737-0-9.
- [13] Zámola, F., Bruinsma, M.: Antioxidants as components of food or supplements. Antioxidant constituents. In *Konference vitamíny 2001*. Pardubice, 5. - 6. září, 2001. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2001., L22 s. ISBN 80-7194-380-0.
- [14] Stránský, M.: Fyziologický a preventivní význam karotenoidů ve výživě. In *Konference vitamíny 2001*. Pardubice, 5. - 6. září, 2001. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2001. L7 s. ISBN 80-7194-380-0.

- [15] Zloch, Z.: Potřeba antioxidantů při kouření a abúzu alkoholu. In *Konference vitamíny 2001*. Pardubice, 5. - 6. září, 2001. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2001. L6 s. ISBN 80-7194-380-0.
- [16] Havlová, P., Mikulíková, R., Prýma, J., Ehrenbergerová, J., Němejc, R.: Přírodní antioxidanty v ječmeni a ve sladu. In *Konference vitamíny 2001*. Pardubice, 5. - 6. září, 2001. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2001., P8 s. ISBN 80-7194-380-0.
- [17] Racek, J.: *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění*. 1. vyd. Praha: Galén, 2003. 31-63 s. ISBN 80-7262-231-5.
- [18] Xiuhua, S., Xiurong, Y., Erkang, W.: Chromatographic and electrophoretic procedures for analyzing plant pigments of pharmacologically interests. *Analytica chimica acta*, 2005, vol. 547, no 2, pp 153-157. ISSN 0003-2670.
- [19] ČSN EN 12823-2: 2002. Potraviny - Stanovení vitamínu A metodou vysoceúčinné kapalinové chromatografie - Část 2: Stanovení β -karotenu. Praha: Český normalizační institut, 2002. 7 s.
- [20] Petr, J., Louda, F.: *Produkce potravinářských surovin*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1998. 79-84 s. ISBN 80-7080-332-0.
- [21] Příhoda, J., Skřivan, P., Hrušková, M.: *Cereální chemie a technologie I Cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2003. 22,23 s. ISBN 80-7080-530-7.
- [22] Kosař, K., Procházka, S. a kolektiv autorů: *Technologie výroby sladu a piva*. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sadařský, a. s., 2000. 31,76 s. ISBN 80-902658-6-3.
- [23] Pelikán, M., Dudáš, F., Míša, D.: *Technologie kvasného průmyslu*, 1. vyd. Brno: MZLU, 1996. 135 s. ISBN 80-7157-240-3.
- [24] Kadlec, P.: *Technologie sacharidů*, 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2000. 53s. ISBN 80-7080-400-9.
- [25] Oliver, J., Palou, A.: Chromatographic determination of carotenoids in food. *Journal of Chromatography A*, 2000, vol. 881, no 1-2, pp. 543-555. ISSN 0021-9673.
- [26] Tee, E., Lim, C.: The analysis of carotenoids and retinoids. *Food chemistry*, 1991, vol. 41, no 2, pp. 147-193. ISSN 0308-8146.
- [27] Schoefs, B.: Determinaton of pigments in vegetables. *Journal of Chromatography A*, 2004, vol. 1054, no 1-2, pp. 217-226. ISSN 0021-9673.
- [28] Hart, D., Scott, K.: Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food chemistry*, 1995, vol 54, no 1, pp. 101. ISSN 0308-8146.

- [29] Davey, M., Keulemans, J., Swennen, R.: methods for the efficient quantification of fruit provitamin A contents. *Journal of Chromatography*, 2006, vol. 1136, no 1, pp 176-184. ISSN 0021-9673.
- [30] Oliver, J., Palou, A., Pons, A.: Semi-quantification of carotenoids by high-performance liquid chromatography: saponification-induced losses in fatty foods. *Journal of Chromatography*, 1998, vol. 829, no 1-2, pp. 393-399. ISSN 0021-9673.
- [31] Schmitz, H., Artz, W., Poor, C., Dietz, J., Erdman, J.: High-performance liquid chromatography and capillary supercritical-fluid chromatography separation of vegetable carotenoids and carotenoid isomers. *Journal of Chromatography*, 1989, vol. 479, no 1, pp. 261-268. ISSN 0021-9673.
- [32] Hao, Z., Parker, B., Knapp, M., Yu, L.: Simultaneous quantification of α -tocopherol and four major carotenoids in botanical materials by normal phase liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2005, vol. 1094, no 1-2, pp. 83-90. ISSN 0021-9673.
- [33] Aman, R., Carle, R., Conrad, J., Beifuss, U., Schieber, A.: Isolation of carotenoids from plant materials and dietary supplements by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography*, 2005, vol. 1074, no 1-2, pp. 99-105. ISSN 0021-9673.
- [34] Breithaupt, D., Schwack, W.: Determination of free and bound carotenoids in paprika (*Capsicum annuum* L.) by LC/MS. *European Food Research and Technology*, 2000, vol. 211, no 1, pp. 52-55. ISSN 1438-2377.
- [35] Olives, A., Cámara, M., Sánchez, M., Fernández, V., López, M.: Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β -carotene in vegetables. *Food Chemistry*, 2006, vol. 95, no 2, pp. 328-336. ISSN 0308-8146.
- [36] Seo, J., Burri, B., Quan, Z., Neidlinger, T.: Extraction and chromatography of carotenoids from pumpkin. *Journal of Chromatography A*, 2005, vol 1073, no 1-2, pp. 371-375. ISSN 0021-9673.
- [37] Watson, D., Atsriku, C., Oliveira, E.: Review role of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of oxidation products and antioxidants in biological systems. *Analytica Chimica Acta*, 2003, vol. 492, no 1-2, pp. 43. ISSN 0003-2670.
- [38] Lesellier, E., Tchaplá, A.: Analysis of carotenoids by high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1993, vol 633, no1-2, pp. 9-23. ISSN 0021-9673.
- [39] Franko, M.: Recent applications of thermal lens spectrometry in food analysis and environmental research. *Talanta*, 2001, vol. 54, no 1, pp. 1-13. ISSN 0039-9140.
- [40] Finckh, B., Kontush, A., Commentz, J., Hubner, C., Burdelski, M., Kohlschutter, A.: High-performance liquid chromatography coulometric electrochemical detection of ubiquinol 10, ubiquinone 10, carotenoids, and tocopherols in neonatal plasma. *Oxidants and antioxidants, pt a methods in enzymology*, 1999, vol. 299, pp. 341-348. ISSN 0076-6879.

- [41] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 15-52 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [42] Sommer, L. a kol.: *Základy analytické chemie II*. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2000. 208-238 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [43] Volka, K. a kol.: *Analytická chemie II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1995. 212 s. ISBN 80-7080-227-8.
- [44] Němcová, I., Engst, P., Jelínek, I., Sejbal, J., Rychnovský, P.: *Spektrometrocké analytické metody II*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998. 42-47 s. ISBN 80-7184-586-8.
- [45] Churáček, J. a kol.: *Nové trendy a v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. 1. vyd. Praha: Academia, 1993. 223-254 s. ISBN 80-200-0010-0.
- [46] Thermo electron corporation: *Finnigan™ Ion API Source, Hardware Manual*. Revision A. San Jose: Technical publications, 2003. pp. 3.2-3.4.
- [47] Thermo electron corporation: *Finnigan™ LCQ™ Series, Hardware Manual*. Revision A. San Jose: Technical publications, 2003. pp. 1.3-1.4.
- [48] Takagi, S.: Determination of green leaf carotenoids by HPLC. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1985, vol. 49, no 4, pp. 1211-1213. ISSN 0002-1369.
- [49] Guerrero, J., Fuentes, M., Isasa, M.: Fatty acids and carotenoids from Stinging Nettle. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2003, vol. 16, pp. 111-119. ISSN 0889-1575.
- [50] Goupy, P., Hugues, M., Boivin, P., Amiot, M.: Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999, vol. 79, pp. 1625-1634. ISSN 0022-5142.
- [51] Taylor, K., Brackenridge, A., Vivien, M., Oberholster, A.: High-performance liquid chromatography profiling of the mayor carotenoids in *Arabidopsis thaliana* leaf tissue. *Journal of Chromatography A*, 2006, vol. 1121, no 1, pp. 83-91. ISSN 0021-9673.
- [52] Liu, G., Wei, F., Wang, F., Li, Y., Guo, Q., Huang, X.: Determination of carotenoids in flue-cured tobacco leaves during its growth by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Sepu*, 2006, vol. 24, no 2, pp. 161-163. ISSN 1000-8713.
- [53] Frenich, A., Torrez, M, Vega, A., Vidal, J., Bolanos, P.: Determination of ascorbic acid and carotenoids in food composition by liquid chromatography with mass spectrometry detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, vol. 53, no 19, pp. 7371-7376. ISSN 0021-8561.
- [54] Lakshiminarayana, R., Raju, M., Krishnakantha, T., Baskaran, V.: Determination of major carotenoids in a few Indian leafy vegetables by high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, vol. 53, no 8, pp. 2838-2842. ISSN 0021-8561.

- [55] Craft, N., Wise, S., Soares, J.: Optimization of an isocratic high-performance liquid chromatographic separation of carotenoids. *Journal of Chromatography A*, 1992, vol. 589, no 1-2, pp. 171-176. ISSN 0021-9673.
- [56] Juhler, K., Cox, R.: High-performance liquid-chromatographic determination of chloroplast pigments with optimized separation of lutein and zeaxanthin. *Journal of Chromatography A*, 1990, vol. 508, no 1-2, pp. 232-235. ISSN 0021-9673.
- [57] Polák, B., Váňová, M., Onderka, M.: *Základy pěstování a zpracování sladovnického ječmene*. 1. vyd. Praha: Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR, 1998. 4-6 s. ISBN 80-7105-166-7.
- [58] Lachman, J., Hosnedl, V., Pivec, V., Orsák, M.: Polyphenols in cereals and their positive and negative role in human and animal nutrition. In *Cereals for Human Health and Preventive Nutrition*. Brno, 7-11 July, 1998. Brno: MZLU, 1998. 118-124s. ISBN 80-902545-0-0.
- [59] Čepička, J., Karabín, M.: Polyfenolové látky piva-přirozené antioxidanty. *Chemické listy*, 2002, vol. 96, no. 2, pp 90-96. ISSN 0009-2770.
- [60] Holasová, M., Velišek, J., Davídek, J.: Cereal grains - the sources of tocopherols and tocotrienols. In *Cereals for Human Health and Preventive Nutrition*. Brno, 7-11 July, 1998. Brno: MZLU, 1998. 185-187s. ISBN 80-902545-0-0.
- [61] Vavreinová, S., Smrčinová, H., Fiedlerová, V.: Cereals in functional foods. In *Cereals for Human Health and Preventive Nutrition*. Brno, 7-11 July, 1998. Brno: MZLU, 1998. 103-105 s. ISBN 80-902545-0-0.
- [62] Newman, R., Newman, C.: Health benefits of barley: heart disease, diabetes and cancer. In *Cereals for Human Health and Preventive Nutrition*. Brno, 7-11 July, 1998. Brno: MZLU, 1998. 32-34 s. ISBN 80-902545-0-0.
- [63] Nakamura, H., Uesaka, F., Yokoayama, K., Yoshizawa, M.: Beta-(1→3)-glucan contents of Barley and protective effects of barley samples on gastric stress ulcer induced by water immersion in rats. In *Cereals for Human Health and Preventive Nutrition*. Brno, 7-11 July, 1998. Brno: MZLU, 1998. 36 s. ISBN 80-902545-0-0.
- [64] Churáček, J. a kol.: *Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1990. 202-203 s. ISBN 80-03-00569-8.
- [65] Panfili, G., Fratiani, A., Irano, M.: Improved Normal-phase high-performance liquid chromatography procedure for the determination of carotenoids in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, vol. 52, no 21, pp. 6373-6377. ISSN 0021-8561.
- [66] Ohtake, H., Yuasa, H., Komura, C., Miyauchi, T., Hagiwara, Y., Kubota, K.: Studies on a constituent of green juice from young barley leaves. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 1985, vol. 105, no 11, pp. 1046-1051.
- [67] Osawa, T., Katsuzaki, H., Hagiwara, Y., Hagiwara, H., Shibamoto, T.: A novel antioxidant isolated from young green barley leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, vol. 40, no 7, pp. 1135-1138. ISSN 0021-8561.

- [68] Hegedüs, A., Erdei, S, Horwáth, G.: Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Science*, 2001, vol. 160, no 6, pp. 1085-1093. ISSN 0168-9452.
- [69] Paulíčková, I., Ehrenbergerová, J, Fiedlerová, V., Gabrovská, G., Havlová, P., Holasová, M., Kopáček, J., Ouhřabková, J., Pinkrová, J., Rysová, J., Vaculová, K., Winterová, R.: Evaluation of barley grass as a potential source of some nutritional substances. *Czech Journal of Food Science*, 2001, vol. 25, no 2, pp.65-72. ISSN 1212-1800.
- [70] Markham, K., Mitchell, K.: The mis-identification of the major antioxidant flavonoids in young barley (*Hordeum vulgare*) leaves. *Journal of Biosciences*, 2003, vol. 58, no 1-2, pp. 53-56. ISSN 0939-5075.
- [71] Etoh, H., Murakami, K, Yogoh, T., Ishikawa, H, Fukuyama, Y, Tanaka, H.: Anti-oxidative compounds in barley tea. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2004, vol. 68, no 12, pp. 2616-2618. ISSN 0916-8451.
- [72] Thermo electron corporation: *Finnigan™ PDA detector, Hardware Manual*. Revision A. San Jose: Technical publications, 2001. pp. 1.2-1.3.
- [73] Waters corporation: *Acquity UPLC Photodiode Array Detector, getting started manual*. Revision A. USA, 2005. pp. 1.10-1.11.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AIDS – acquired immune deficiency syndrome
APCI – atmospheric pressure chemical ionization
B – magnetický analyzátor
B-E – magnetický-elektrický
BeO – oxid berylnatý
BHT – butylhydroxytoluen
CI – chemical ionization
DAD – diodearray detector
E – elektrický analyzátor
E-B – elektrický-magnetický
EI – electron impact nebo elektron ionization
ESI – electrospray ionization
EURAMIC – European community multicentre study on antioxidants, myocardial infarction, and cancer of the breast.
FAB – Fast atom bombardment
FD – field desorption
FI – field ionization
GaP – fosfid galia
GC – gas chromatography
GPC – gel permeation chromatography
HPLC – high performance liquid chromatography
HRMS – high resolution mass spectrometry
CH₃CN – acetonitril
ICR – ion cyclotron resonance
LDI – laser desorption ionization
LDL – low density lipoprotein
LRC-CPPT – lipid research clinics coronary primary prevention trial
MALDI – matrix-assisted laser desorption ionization
MeOH – methanol
MID – multiple ion detection
MS – mass spectrometry
PCB – printed circuit board
PD – plasma desorption
PDA – photodiode array
Q – quadrupole
QIT – quadrupole ion trap
ROS – reaktivní kyslíkové sloučeniny
SFE – supercritical fluid extraction
SIM – single ion monitoring
SIMS – secondary ion mass spektrometry
SOD – superoxiddismutáza
SRM – selected reaction monitoring
THF – tetrahydrofuran
TLC – thin layer chromatography
TLS – thermal lens spectrometry
TOF – time of flight
TS – thermospray
UV – ultraviolet
UV-VIS – ultraviolet-visible
VÚPS – Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s.

8. SEZNAM PŘÍLOH

Obrázek 34: UV-VIS spektrum β -karotenu

Obrázek 35: UV-VIS spektrum luteinu

Obrázek 36: UV-VIS spektrum lykopenu

Obrázek 37: UV-VIS spektrum α -karotenu,

Obrázek 38: UV-VIS spektrum astaxantinu

Obrázek 39: Hmotnostní spektrum β -karotenu

Obrázek 40: Hmotnostní spektrum luteinu

Obrázek 41: Hmotnostní spektrum lykopenu

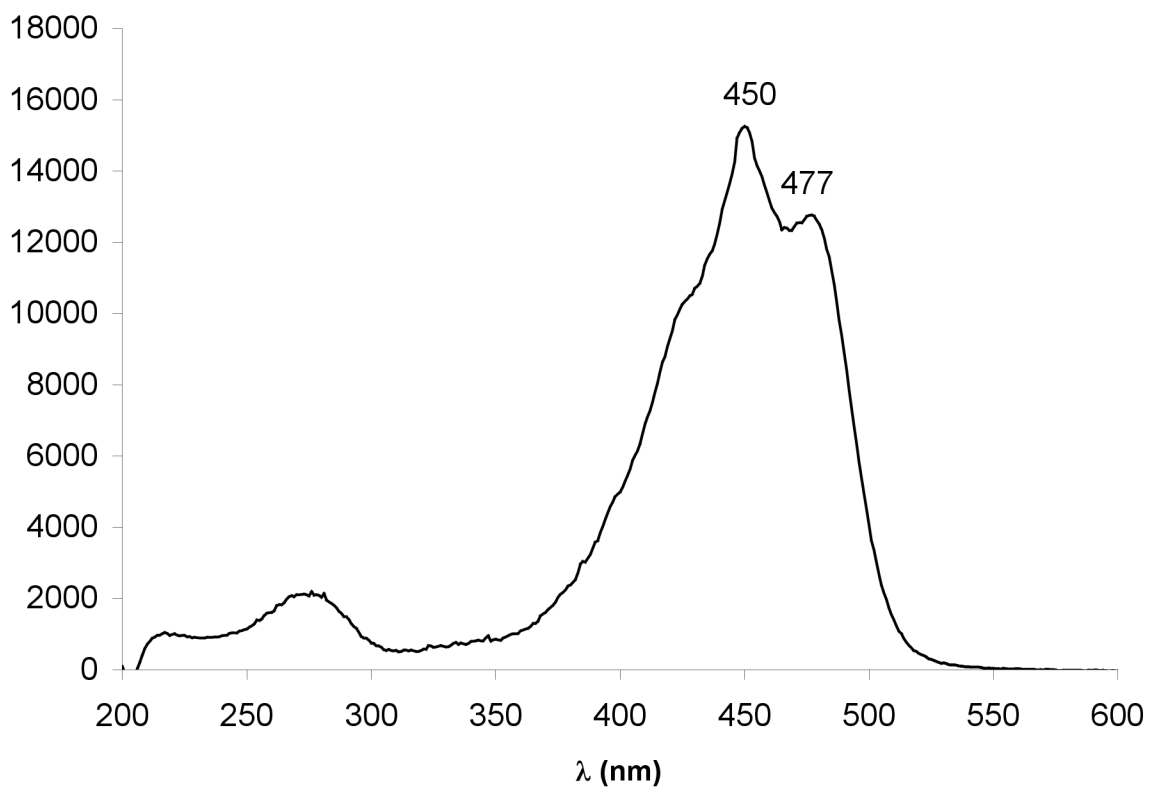
Obrázek 42: Hmotnostní spektrum astaxantinu

Obrázek 43: Příklad chromatogramu zeleného ječmene

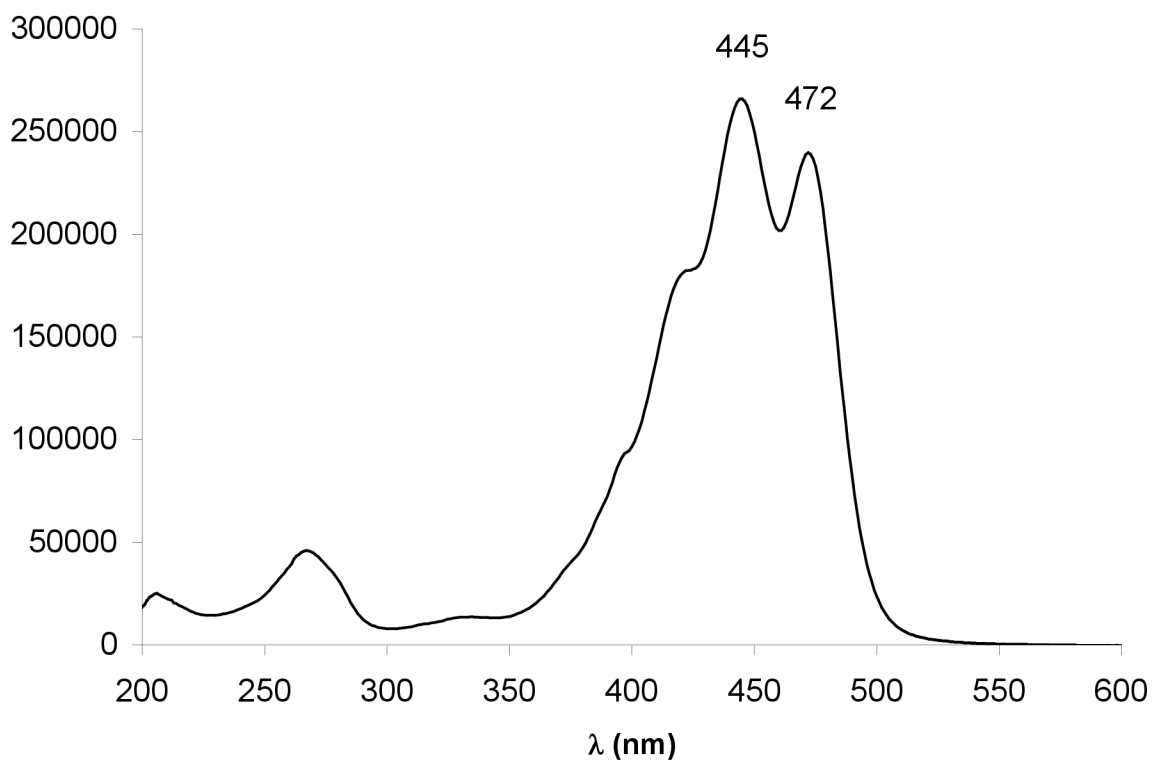
Obrázek 44: Příklad chromatogramu sladu

Obrázek 45: Příklad chromatogramu ječmene

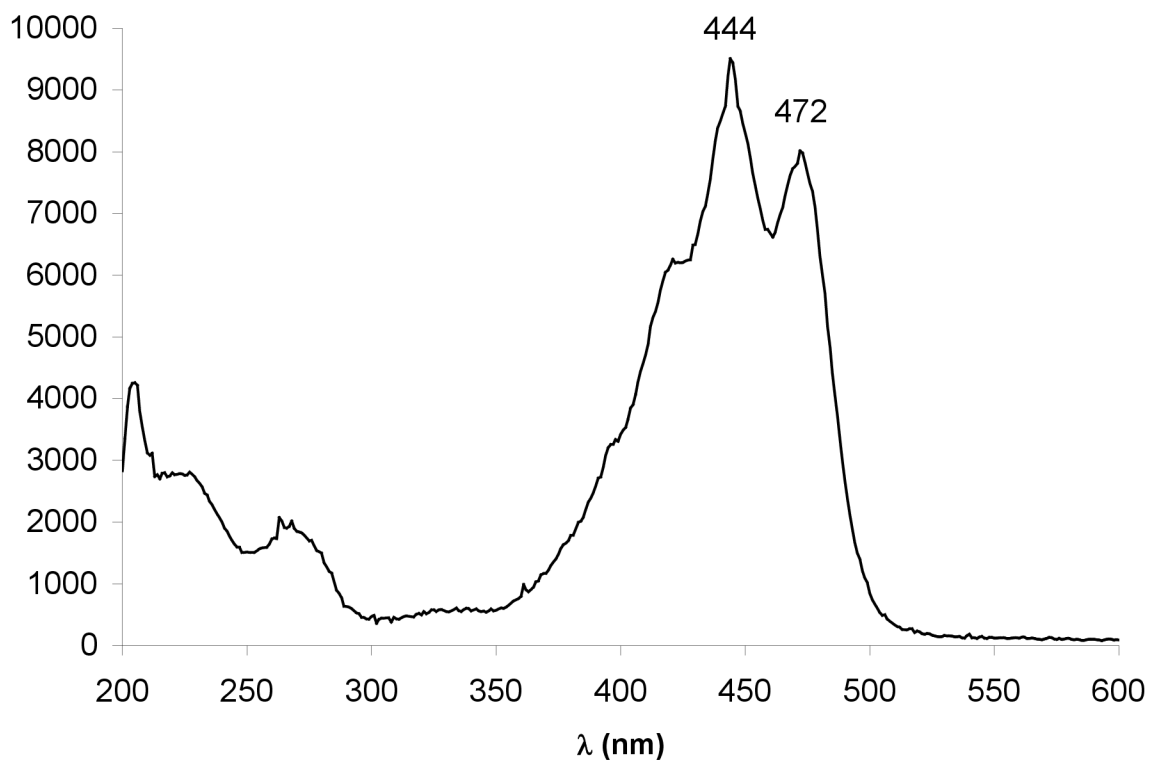
9. PŘÍLOHY



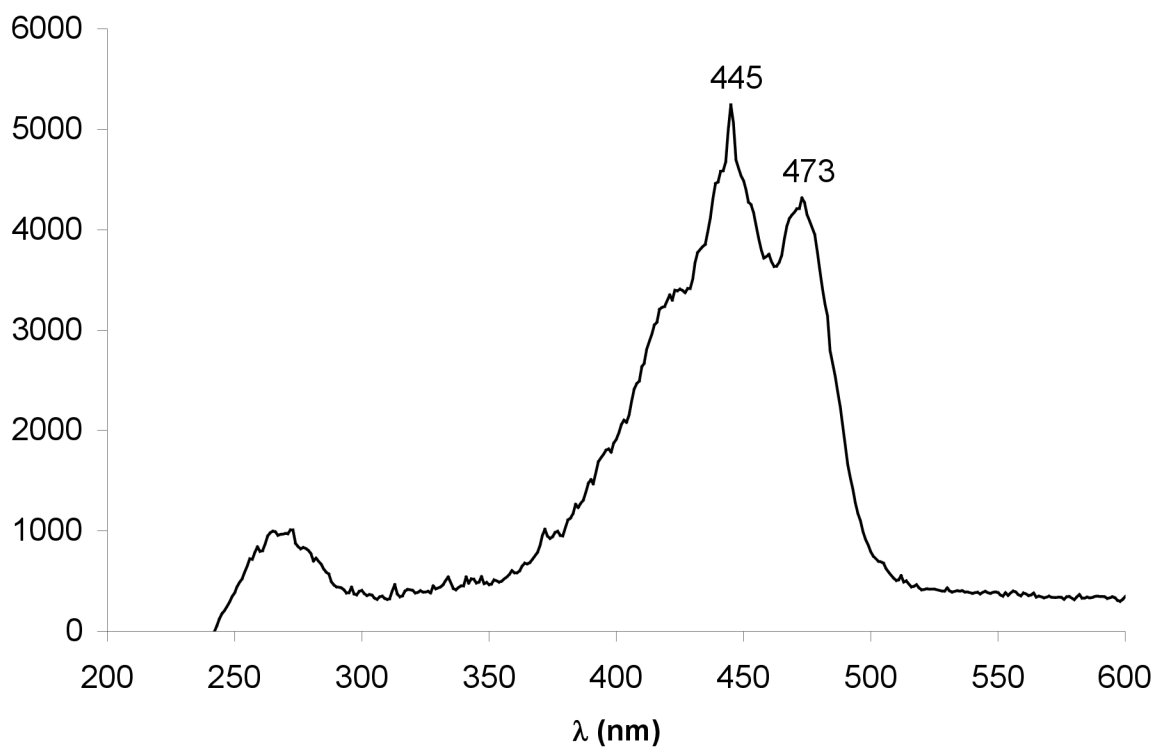
Obrázek 34: UV-VIS spektrum β -karotenu



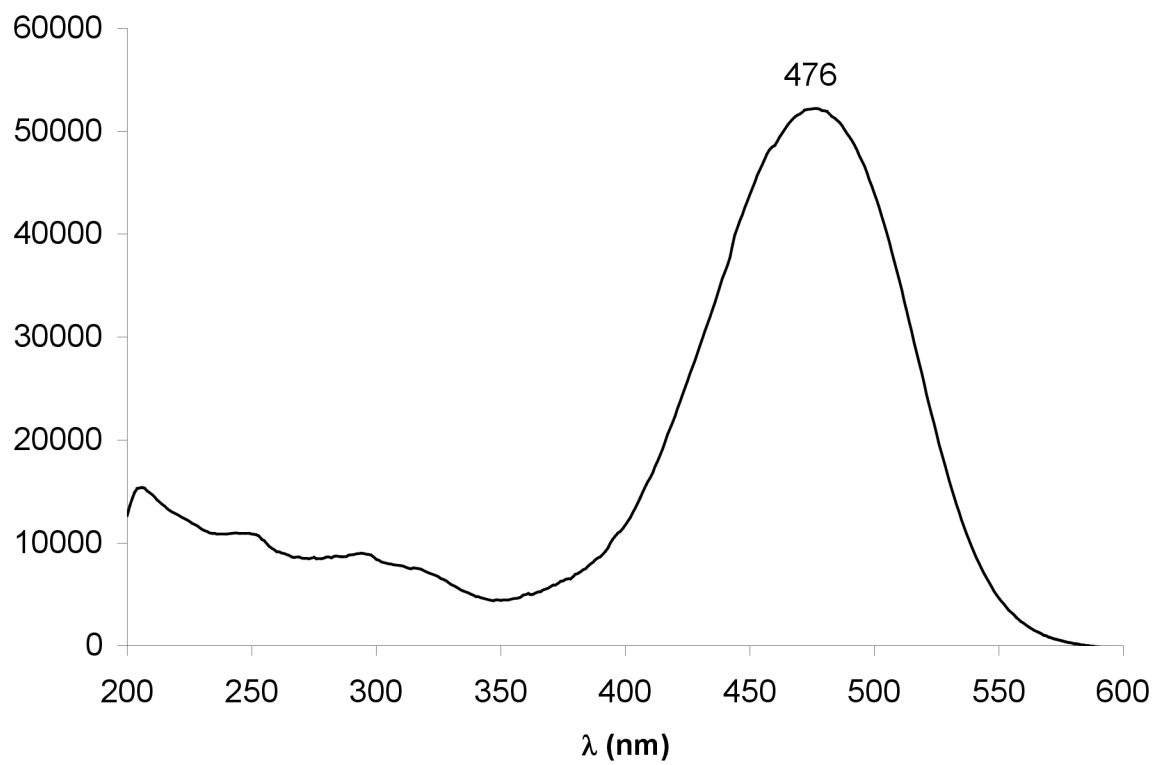
Obrázek 35: UV-VIS spektrum luteinu



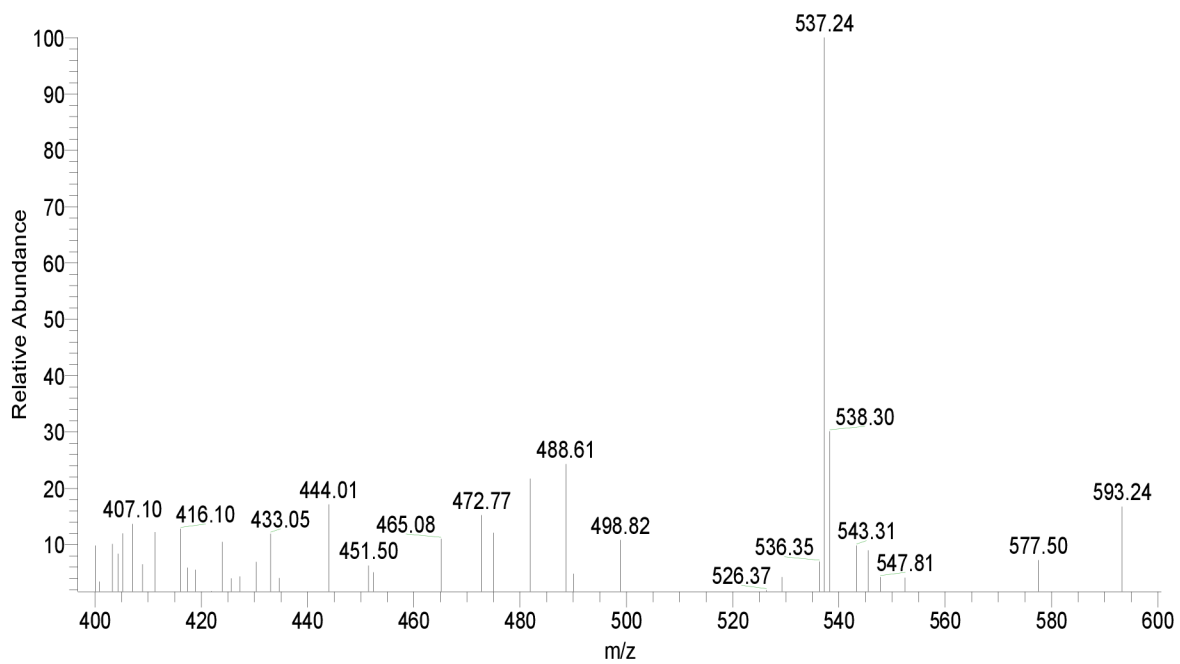
Obrázek 36: UV-VIS spektrum lycopenu



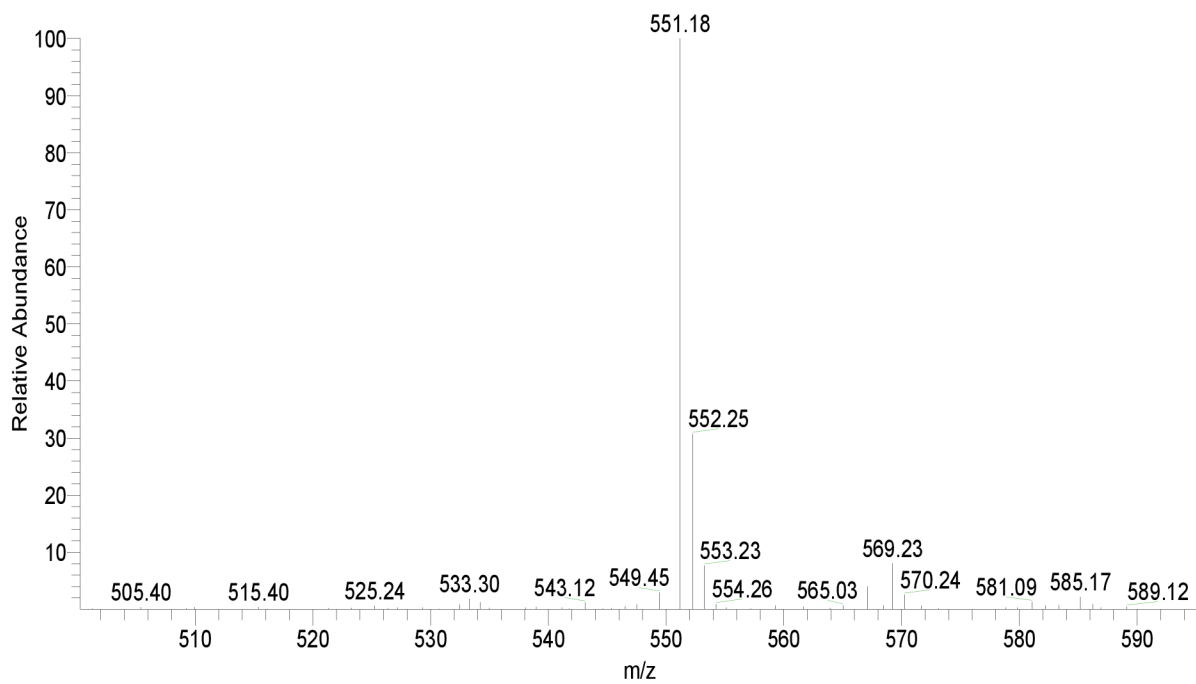
Obrázek 37: UV-VIS spektrum α -karotenu



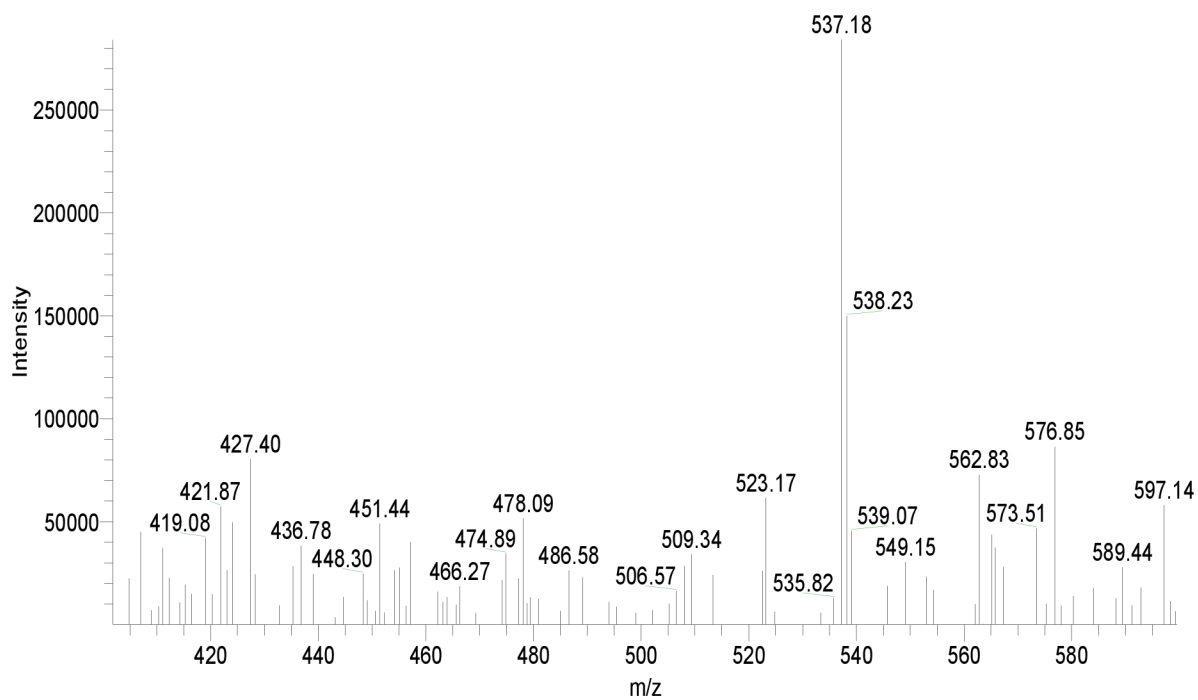
Obrázek 38: UV-VIS spektrum astaxantinu



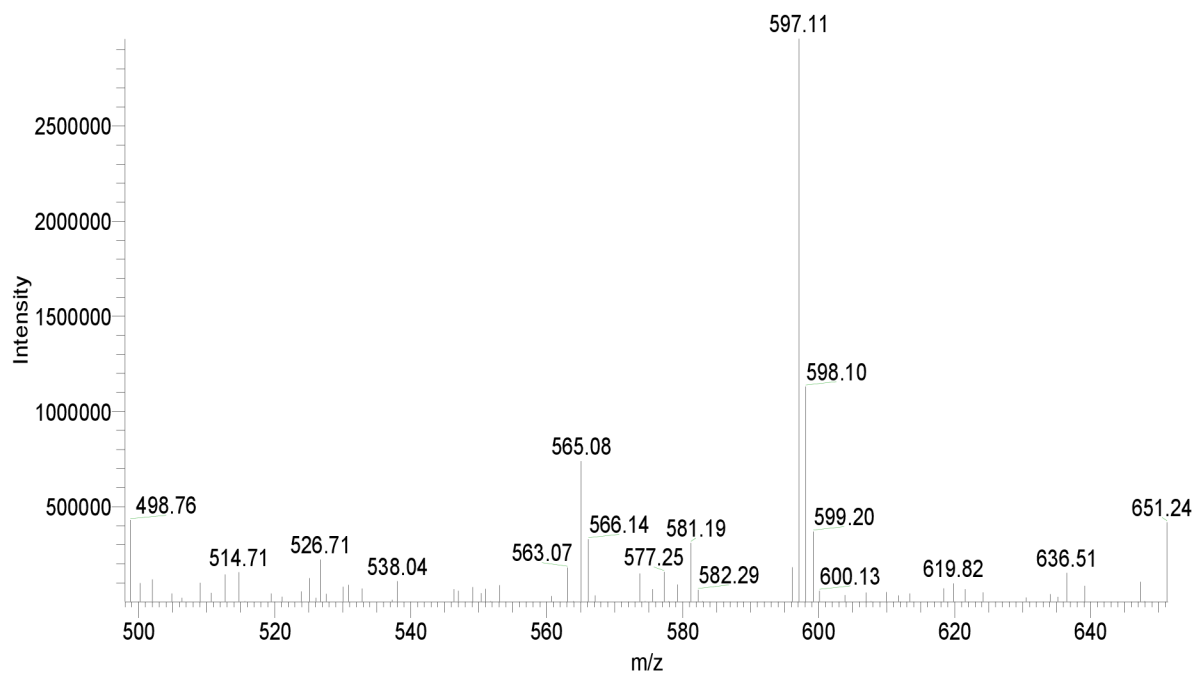
Obrázek 39: Hmotnostní spektrum β -karotenu



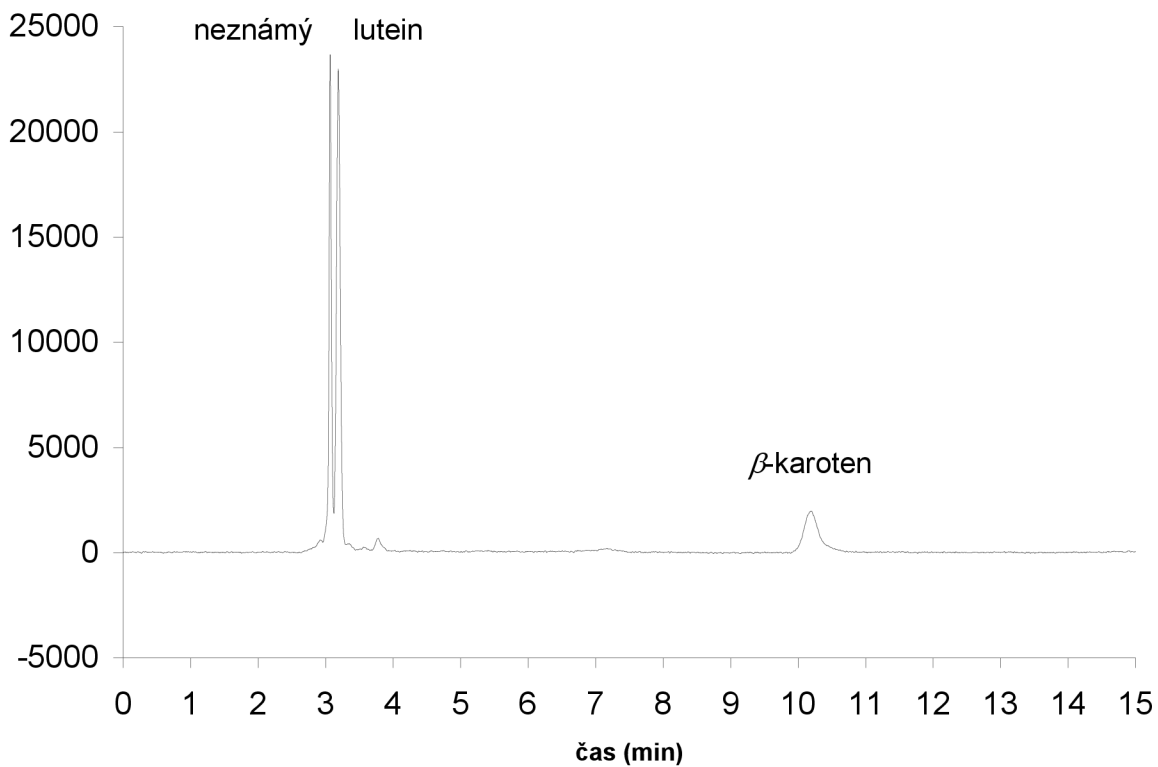
Obrázek 40: Hmotnostní spektrum luteinu



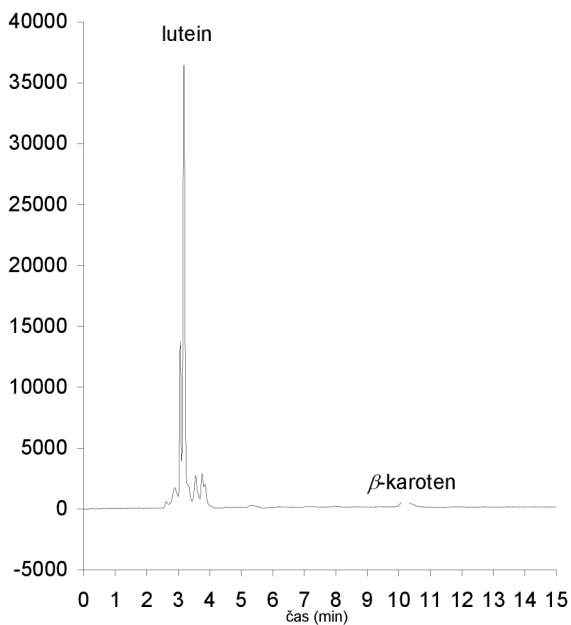
Obrázek 41: Hmotnostní spektrum lykopenu



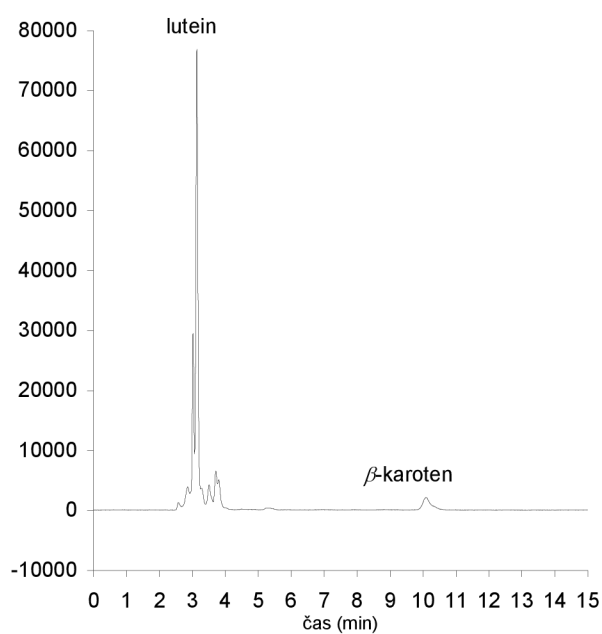
Obrázek 42: Hmotnostní spektrum astaxantinu



Obrázek 43: Příklad chromatogramu zeleného ječmene



Obrázek 44: Příklad chromatogramu sladu



Obrázek 45: Příklad chromatogramu ječmene