

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



Extrakce kapsaicinu a dihydrokapsaicinu

*z Capsicum Annuum*

RIGORÓZNÍ PRÁCE

2018

Vypracovala: Mgr. Sandra Benická

Obor: Analytická chemie

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora:	Sandra Benická
Název práce:	Extrakce kapsaicinu a dihydrokapsaicinu z <i>Capsicum Annuum</i>
Typ práce:	Rigorózní
Pracoviště:	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.
Rok odevzdání práce:	2018
Anotace:	<p>Teoretická část rigorózní práce byla zaměřena na charakteristiku kapsaicinoidů, na metody extrakce a možnosti separace těchto látek. Experimentální část se věnovala optimalizaci extrakce a následné aplikaci vyvinuté metody. Testováno bylo několik extrakčních postupů, dále byla porovnávána výtěžnost extrakce v methanolu a acetonitrilu, optimalizována byla rovněž teplota ultrazvukové lázně. Vyvinutá metoda byla nakonec aplikována na vzorky dvou odrůd paprik - Jatsubura Jopper a Ostryj Ukrajinskij 18. Metoda se jeví jako vhodná pro pravidelný screening vzorků paprik na obsah kapsaicinu a dihydrokapsaicinu.</p>
Klíčová slova:	Kapsaicin, dihydrokapsaicin, extrakce, kapalinová chromatografie
Počet stran:	43
Počet příloh:	0
Jazyk:	čeština

## **Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: Sandra Benická

Title: Extraction of capsaicin and dihydrocapsaicin from *Capsicum Annuum*

Type of thesis: Rigorous

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

The year of submission: 2018

Annotation: The theoretical part of the thesis was focused on characterization of capsaicinoids, methods of extraction and possibilities of separation of these substances. The experimental part deals with optimization of extraction and the application of developed method. Several extraction procedures were tested, the extraction in methanol and acetonitrile was compared and the temperature of the ultrasonic bath was optimized too. The developed method was finally applied to samples of two pepper varieties - Jatsubura Jopper and Ostryj Ukrajinsky 18. The method is suitable for regular determination of content of capsaicin and dihydrocapsaicin in samples of peppers.

Keywords: Capsaicin, dihydrocapsaicin, extraction, liquid chromatography

Number of pages: 43

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne .....

.....

Vlastnoruční podpis

Poděkování:

Touto cestou bych chtěla poděkovat svému vedoucímu doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D. a Výzkumnému ústavu rostlinné výroby v Olomouci.

## Obsah:

Seznam použitých zkratk	7
1. Úvod	8
2. Teoretická část	9
2.1. <i>Capsicum</i>	9
2.2. Vlastnosti kapsaicinoidů	9
2.3. Extrakce kapsaicinoidů	13
2.4. Analýza kapsaicinoidů	16
2.4.1 Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií	17
2.4.2 Kapalinová chromatografie a kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií	18
3. Experimentální část	23
3.1. Přístrojové vybavení a chemikálie	23
3.2. Příprava rostlinného materiálu	23
3.3. UHPLC metoda	24
4. Výsledky a diskuze	25
4.1. Porovnání extrakčních postupů při extrakci methanolem	25
4.2. Porovnání extrakčních postupů při extrakci acetonitrilem	27
4.3. Optimalizace teploty při extrakci vzorku	27
4.4. Testování výtěžnosti druhé a třetí extrakce	28
4.5. Analýza vybraných vzorků paprik	29
4.5.1. Metoda vnější standardizace	31
4.5.2. Vyhodnocení naměřených vzorků	33
5. Závěr	36
6. Seznam použité literatury	37

## Seznam použitých zkratek

APCI - Atmospheric pressure chemical ionization, chemická ionizace za atmosférického tlaku

CID - Collision-induced dissociation, kolizí indukovaná disociace

ED - Electrochemical detection, elektrochemická detekce

ESI - Electrospray ionization, ionizace elektrosprejem

GC - Gas chromatography, plynová chromatografie

HPLC - High-performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HS-SPME - Headspace-solid phase microextraction, headspace mikroextrakce na pevné fázi

LC - Liquid chromatography, kapalinová chromatografie

LOD - Limit of detection, limit detekce

MAE - Microwave-assisted extraction, mikrovlnná extrakce

MS - Mass spectrometry, hmotnostní spektrometrie

NIR - Near-infrared reflectance spectroscopy, infračervená reflektanční spektroskopie

PLE - Pressurized liquid extraction, extrakce kapalinou pod tlakem

RP-HPLC - Reverse phase - high-performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi

SIM - Selected ion monitoring mode, monitorování vybraného iontu

SPE - Solid-phase extraction, extrakce na pevné fázi

TLC - Thin layer chromatography, chromatografie na tenké vrstvě

TOF - Time-off-flight, průletový analyzátor

UHPLC - Ultra-high-performance liquid chromatography, ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie

USAE - Ultrasound-Assisted Extraction, ultrazvuková extrakce

## 1. Úvod

Paprika je plodina rozšířená po celém světě. Její pálivost, na základě které lze jednotlivé druhy paprik porovnávat, je dána kapsaicinoidy. Tyto látky lze analyzovat pomocí kapalinové chromatografie s UV detektorem. Důležitým krokem analýzy je samotná příprava vzorků a extrakční postup.

Cílem této práce bylo najít jednoduchý, spolehlivý, časově a finančně nenáročný postup, který by byl aplikovatelný na velké množství vzorků.

Experimentální část byla zaměřena na optimalizaci extrakčního postupu kapsaicinu a dihydrokapsaicinu ze vzorků paprik, výtěžnost extrakce a vyvinutí, aplikování a částečné optimalizování UHPLC metody s UV detekcí.



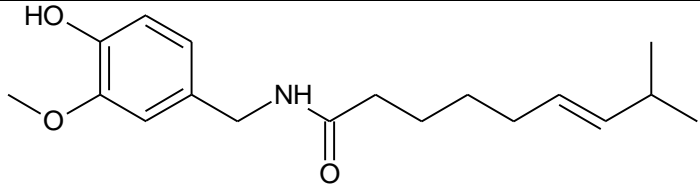
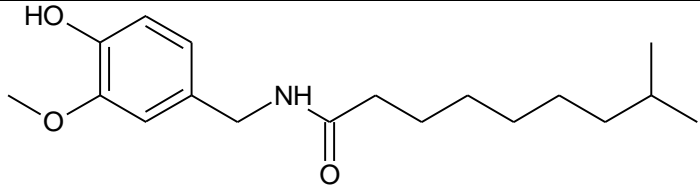
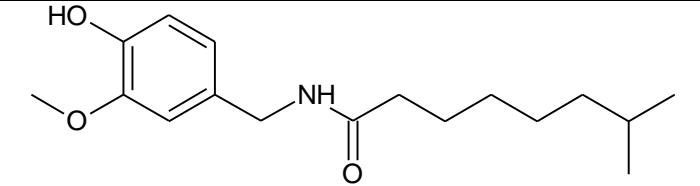
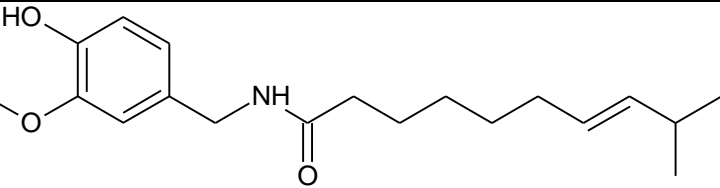
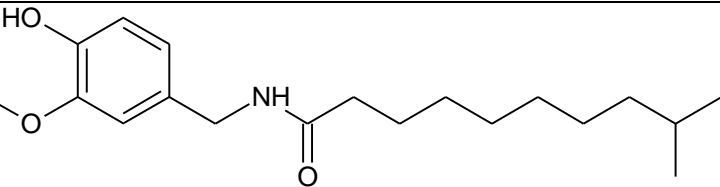
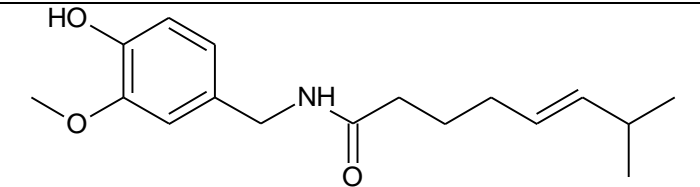
## 2. Teoretická část

### 2.1. *Capsicum*

Paprika (*Capsicum*) pochází z tropických a vlhkých oblastí střední a jižní Ameriky, patří do čeledi lilkovitých (Solanaceae). Pro svou chuť, barvu a aroma je celosvětově velmi populární a rozšířenou plodinou, která je důležitým zdrojem minerálů (vápník, fosfor, draslík, železo), proteinů, cukrů, lipidů, provitaminu A a vitaminů. Kromě vitaminů B a E je paprika velmi významným zdrojem vitaminu C (má pětkrát vyšší obsah vitaminu C než pomeranč) [1, 2]. První úspěšná izolace kyseliny askorbové (vitamin C) byla provedena právě z paprik. Roku 1937 byla za tento experiment udělena Nobelova cena maďarskému vědci Albertu Szent-Györgyiovi [3]. Paprika je nejen vyhledávanou zeleninou, ale rovněž přírodním potravinářským barvivem a více než 6000 let je používána jako koření. Existuje množství odrůd paprik, které se liší ve fyzickém, chemicko-mikrobiologickém a sensorickém hodnocení [4].

### 2.2. Vlastnosti kapsaicinoidů

Důležitým faktorem při porovnávání jednotlivých odrůd je ostrost/pálivost (organoleptický pocit tepla) paprik. Látky, které tyto vlastnosti způsobují, se nazývají kapsaicinoidy. Kapsaicinoidy jsou deriváty vanillylaminu a patří do skupiny přírodních netěkavých alkaloidů. Zahrnují více než dvě desítky sloučenin a mezi nejznámější a nejvíce zastoupené patří kapsaicin ((E)-N-[(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)methyl]-8-methylnon-6-enamid), dihydrokapsaicin (N-[(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)methyl]-8-methylnonanamid), nordihydrokapsaicin (N-[(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)methyl]-7-methyloktanamid), homokapsaicin ((E)-N-[(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)methyl]-9-methyldek-7-enamid), homodihydrokapsaicin (N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-9-methyldekanamid) a norkapsaicin ((E)-N-[(4-hydroxy-3-methoxyfenyl) methyl]-7-methylokt-5-enamid) (Tab. I.) [5, 6].

Triviální název:	Vzorec:	Molekulová hmotnost:
kapsaicin		305.41
dihydrokapsaicin		307.43
nordihydrokapsaicin		293.41
homokapsaicin		319.43
homodihydrokapsaicin		321.46
norkapsaicin		291.39

Tab. I.: Struktury některých kapsaicinoidů s jejich molekulovými hmotnostmi.

Bylo prokázáno, že vztah mezi ostrostití a celkovým množstvím kapsaicinoidů je lineární. Celková pálivost paprik je dána váženým součtem koncentrací kapsaicinoidů, přičemž u pálivých chilli paprik je pálivost asi ze 77 až 98 % dána pouze kapsaicinem a dihydrokapsaicinem [7-10]. Pálivost kapsaicinu a dihydrokapsaicinu je přibližně stejná a obě tyto látky vykazují pálivost 150-300 krát vyšší než pálivé složky pepře a zázvoru [11].

Z historických důvodů je obsah kapsaicinoidů velice často přepočítáván na SHU jednotky (Scoville Heat Units). Tento přepočet vychází z originálního organoleptického testu na pálivost paprik Wilbura Scovilleho z roku 1912. Test spočíval v extrakci definovaného množství chilli ethanolem, poté docházelo k opakovanému ředění vodou s cukrem až do doby, dokud nedošlo k vymizení pocitu pálivosti na jazyku. Počet zředění byl poté brán jako ostrost v jednotkách SHU [12]. Jelikož šlo o poměrně náročný a těžkopádný experiment, byl později přepočtový poměr na Scovilleho stupnici dán kombinací koncentrace (určené analytickými metodami) a prahové pálivosti jednotlivých kapsaicinoidů [13]. Výsledky se uvádějí v ppm kapsaicinu a mohou být převedeny na SHU (nebo jiné jednotky) podle následující stupnice: 1 ppm = 16 SHU = 0,0001% = 0,001 mg.g<sup>-1</sup>, přičemž čistý kapsaicin je roven 16000000 SHU [14]. V tabulce II jsou uvedeny pálivosti v SHU jednotkách pro některé látky a vybrané druhy paprik.

<b>Scovilleho jednotky pálivosti (SHU):</b>	<b>Látka/druh papriky:</b>
15 000 000 - 16 000 000	Čistý kapsaicin
9 100 000	Nordihydrokapsaicin
5 300 000 – 2 000 000	Standardní pepřový sprej
2 200 000	Carolina Reaper
2 009 231	Trinidad Scorpion Moruga
1 463 700	Trinidad Scorpion Butch T
350 000 – 577 000	Red Savina Habenero
2 500 – 8 000	Jalapeño
0	Sladká paprika

Tab. II.: Pálivost některých látek a vybraných druhů paprik v SHU jednotkách [15,16].

Celkový obsah kapsaicinoidů v paprikách je velmi proměnlivý a koncentrace kapsaicinoidů u jednotlivých druhů paprik se významně liší [17, 18, 19]. Méně pálivé odrůdy paprik mají koncentraci kapsaicinoidů v rozmezí od 0,003 do 0,01%. Koncentrace kapsaicinoidů v mírně pálivých odrůdách se pohybují v rozmezí od 0,01 do 0,3% a velmi pálivé odrůdy jsou charakterizovány obsahem kapsaicinoidů nad 0,3% a mohou dosáhnout až 1% [19]. Tyto sloučeniny se přirozeně syntetizují v placentě plodů paprik, kde se hromadí ve váčcích a podléhají enzymatické kondenzaci vanillylaminu se středně

dlouhými řetězci mastných kyselin [20]. Studie prokázaly, že se kapsaicinoidy začínají hromadit už v počátečních fázích vývoje plodu a nadále se akumulují až po dosažení maximální úrovně (toto maximum obecně nastává po 40 - 60 dnech zrání). V tomto bodě dochází k výraznému zvratu - dochází k významné degradaci kapsaicinoidů v důsledku přítomnosti peroxidázy, která je schopná degradovat kapsaicin a dihydrokapsaicin [21-23]. To bylo rovněž potvrzeno v experimentu. Peroxidázová aktivita se zvyšovala v době, kdy koncentrace kapsaicinoidů začala klesat [24]. K degradaci kapsaicinoidů dochází i během jejich uložení. Byl proveden experiment, který sledoval úbytek kapsaicinoidů v plodech *Capsicum annuum*. U zhomogenizovaných vzorků se obsah kapsaicinoidů během několika dnů snížil na úroveň pouhých 10% výchozí hodnoty. Tento pokles nebyl pozorován u plodů, které byly pečlivě rozřezány na poloviny. Mnohem nižší pokles byl pozorován při uložení mletých vzorků pod dusíkem, zatímco skladování pod kyslíkem mělo za následek značné ztráty kapsaicinoidů. To potvrzuje, že oxidační procesy jsou příčinou poklesu obsahu kapsaicinoidů [25].

Variabilita ostrosti je závislá nejen na genotypu papriky, ale zároveň na zeměpisném původu papriky (respektive na environmentálních rozdílech). Experimentálně bylo prokázáno, že životní prostředí mělo větší vliv na hladiny ostrosti než genotyp dané papriky. Důležitým faktorem je dostupnost vody, vývojová fáze, ve které se paprika nachází [26], minerální výživa [27] a infekce rostlin papriky [28]. Z hlediska genotypu platí, že čím je plod papriky menší, tím je hladina kapsaicinoidů v paprice vyšší - velké plody papriky seté (*C. annuum*) mají nižší obsah kapsaicinoidů než středně velké plody (např. *tabasco*), nejvyšší obsah kapsaicinoidů se nachází v malých plodech (např. *chilli*, *C. frutescens*) [11]. Při testování kapsaicinoidů bylo rovněž zjištěno, že lidé vnímají štiplavost každého kapsaicinoidu (při nízkých koncentracích) zcela odlišně. Kapsaicin, dihydrokapsaicin a homodihydrokapsaicin způsobovaly velmi nepříjemné pocity na rozdíl od nordihydrokapsaicinu, který působil podstatně méně dráždivě než výše uvedené látky [7]. Tyto významnější rozdíly ve vnímání kapsaicinoidů znamenají, že je důležité studovat každý kapsaicinoid samostatně. Kombinací různých kapsaicinoidů lze produkovat různé ostrosti, které jsou charakteristické pro jednotlivé odrůdy pálivých paprik. Proto přichází na řadu hraní si s myšlenkou o genetické manipulaci profilu kapsaicinoidů a jejich následnému specifickému uplatnění [29].

Kapsaicinoidy jsou zajímavé rovněž svými farmakologickými vlastnostmi – mají analgetické a antikarcinogenní účinky, ulevují od bolesti, potlačují záněty, mají antimykotické a antibakteriální vlastnosti, působí jako antioxidant, podporují energetický

metabolismus a ztrátu hmotnosti (tím, že zvyšují tělesnou teplotu), snižují chuť k jídlu a potlačují hromadění tuku [14, 30]. Díky tomu dochází k jejich hojnému používání i v medicíně ve formě krémů, náplastí a dalších přípravků na infekční onemocnění kůže a sliznic. Příkladem mohou být přípravky na léčbu jednoduchých oparů (*herpes simplex*). Důvodem je fakt, že pálivost kapsaicinu (obsaženého v těchto přípravcích) snižuje citlivost nervových buněk na bolest [11]. Kapsaicinoidy jsou rovněž používány při výrobě pepřových sprejů, které jsou vyráběny pro účely individuální sebeobrany a slouží rovněž jako donucovací prostředek u policie [17]. Expozici kapsaicinoidům je ale nutné regulovat, neboť se jedná o silné dráždidlo. Vyvolává řadu fyziologických reakcí, které zahrnují kašel a dávení, dezorientaci, zarudnutí, kožní zčervenání, nadměrné slzení, dokonce až dočasné oslepnutí a pocit intenzivního pálení [31]. Vzhledem k širokému spektru použití těchto látek neustále narůstá produkce pálivých paprik, ze kterých se kapsaicinoidy získávají. V roce 2011 se hodnota celosvětové produkce pálivých paprik vyšplhala na 14,4 miliard amerických dolarů, což je oproti roku 1980 čtyřicetkrát víc [32].

### 2.3. Extrakce kapsaicinoidů

Kapsaicinoidy jsou látky, které se za laboratorních podmínek špatně rozpouští ve vodě [33], naopak jsou dobře rozpustné v organických rozpouštědlech a tucích, jsou bez barvy a zápachu. Nejčastějším způsobem extrakce je extrakce různými rozpouštědly, použít lze rovněž extrakci kapalinou pod tlakem a superkritickou fluidní extrakci. Pro extrakci kapsaicinoidů lze použít i další techniky – macerace, extrakce na pevné fázi (solid-phase extraction, SPE), enzymem zprostředkovaná extrakce, macerace s magnetickým mícháním, mikrovlnná extrakce (microwave-assisted extraction, MAE), ultrazvuková extrakce (ultrasound-assisted extraction, USAE) a Soxhletova extrakce.

Jak bylo uvedeno výše, běžnějším způsobem extrakce kapsaicinoidů je extrakce různými organickými rozpouštědly – nejčastěji methanolem a acetonitrilem. Příkladem může být extrakce kapsaicinoidů, kde byla porovnávána extrakční výtěžnost acetonitrilu a methanolu s extrakcí na pevné fázi (SPE). Nejvyšší výtěžnost byla pozorována za použití extrakce methanolem a nejnižší hodnoty byly získány pomocí SPE [34]. Prováděna byla rovněž studie, která se zaměřila na efektivitu extrakce kapsaicinu a dihydrokapsaicinu ze vzorků paprik. Ta se může lišit v závislosti na paprice, jejich částech a způsobu zpracování před samotnou extrakcí. Extrahovány byly různé části papriky (části plodu, semena a celá paprika) a rovněž bylo testováno, zda je extrakce

účinnější, pokud jsou vzorky čerstvé, lyofilizované nebo sušené v sušárně. Testována byla celkem tři různá rozpouštědla - ethanol, acetonitril a aceton, a délka extrakce. Bylo zjištěno, že kombinace přípravy vzorku a rozpouštědla významně ovlivnila výtěžky obou kapsaicinoidů. Ethanol a acetonitril byla lepší rozpouštědla pro extrakci kapsaicinu z čerstvých vzorků, zatímco aceton byl lepší pro extrakci sušených částí paprik. Výtěžky dihydrokapsaicinu z čerstvých vzorků byly také typicky vyšší u acetonitrilu a ethanolu [35]. V dalším experimentu byla testována extrakce kapsaicinoidů různými rozpouštědly s různou polaritou (n-hexan, n-hexan/dichlormethan (1:1), dichlormethan, diethylether, ethylacetát, aceton, methanol) a byla porovnáována se superkritickou fluidní extrakcí (extrakční činidlo CO<sub>2</sub>). Výtěžky extrakce kapsaicinoidů získané pomocí SFE byly srovnatelné nebo mírně nižší než výtěžky získané po extrakci ethylacetátem, acetonem a dichlormethanem. Nejlepších výsledků bylo dosaženo extrakcí methanolem. Obecně bylo zjištěno, že se zvyšující se polaritou extrakčního rozpouštědla lze pozorovat nárůst signálů ve výsledných chromatogramech. Dále výsledky studie ukázaly, že SFE ve srovnání s extrakcí rozpouštědlem umožňuje kratší doby extrakce, kratší přípravu vzorku před HPLC analýzou, pracuje se v širokém koncentračním rozmezí a ve výsledném HPLC chromatogramu se nachází méně interferujících signálů [36].

Pro izolaci kapsaicinoidů přítomných ve španělských pálivých paprikách lze využít i extrakci kapalinou pod tlakem (pressurized liquid extraction, PLE). Vzorky paprik byly čerstvé, oloupané, zbavené semen a stopky. Takto připravené vzorky byly rozmixovány na homogenní pastu. Extrakční komora byla naplněna extrakčním rozpouštědlem, natlakovaná na 100 atm a zahřáta na teploty v rozmezí od 50 do 200 °C. Testováno bylo několik extrakčních proměnných: rozpouštědlo (methanol, ethanol a voda), různé procento vody v methanolu (0-20%) a v ethanolu (0-20%) a počet extrakčních cyklů. Z takto připravených vzorků se nakonec podařilo kvantifikovat celkem pět kapsaicinoidů: nordihydrokapsaicin, kapsaicin, dihydrokapsaicin, izomer dihydrokapsaicinu a homodihydrokapsaicinu [37].

Možností je i použití macerace. Ta byla využita například pro sledování poklesu obsahu kapsaicinoidů v zelených a červených paprikách. V tomto případě extrakce trvala 30 minut a jako rozpouštědlo byl použit methanol [25]. V některých případech je možné provádět extrakci na pevné fázi (SPE). Příkladem může být analýza, kde kapsaicin a dihydrokapsaicin byly extrahovány za použití akcelerované extrakce rozpouštědlem. Extrakčním rozpouštědlem byl methanol, doba extrakce byla 5 minut a proběhly 3 cykly. Methanolicke extrakty byly vyčištěny extrakcí na pevné fázi (SPE) na C18

kolonkách přičemž výtěžnost činila 90,2 až 98,0%. Optimalizovaná metoda extrakce byla použita pro stanovení dvou kapsaicinoidů v deseti variacích vzorků pálivých paprik. Celkový obsah kapsaicinoidů odpovídal Scovilleho jednotkám (SHU) v rozmezí 34 600 - 135 700. Většinou byl obsah kapsaicinu v reálných vzorcích vyšší než obsah dihydrokapsaicinu [38]. SPE byla rovněž prováděna při extrakci kapsaicinu a dihydrokapsaicinu ze vzorků chilli paprik. Nejprve byly vzorky extrahovány methanolem při neustálém míchání. Celkový obsah kapsaicinoidů odpovídal Scovilleho jednotkám (SHU) v rozmezí 26 400 až 106 000. Ve většině případů bylo opět průměrné množství kapsaicinu (62%) v reálných vzorcích vyšší než množství dihydrokapsaicinu (38%) [39].

K extrakci kapsaicinoidů lze rovněž použít enzymem zprostředkovanou extrakci. Ta byla použita v případě extrakce vzorků Chili Guajillo puya (*Capsicum annum* L.), kde byla studována selektivní extrakce kapsaicinoidů a karotenoidů. Výsledky ukázaly, že při použití ethanolu jako rozpouštědla bylo získáno 80% kapsaicinoidů a 73% karotenoidů, což představuje zajímavou alternativu pro náhradu hexanu v průmyslových procesech. Navíc v případě, že předem došlo k ošetření vzorků enzymy, které rozbíjely buněčnou stěnu, došlo ke zvýšení výtěžku extrakce – u karotenoidů o 11%, u kapsaicinoidů o 7% [24, 40].

Další možností je využití mikrovlnné extrakce (MAE). Příkladem může být extrakční metoda, která byla vyvinuta pro extrakci nordihydrokapsaicinu, kapsaicinu, dihydrokapsaicinu, homokapsaicinu a homodihydrokapsaicinu ze vzorků paprik. Pro extrakci byla použita mikrovlnná extrakce a mezi analyzované parametry patřilo extrakční rozpouštědlo (methanol, ethanol, aceton, ethylacetát a voda), dále teplota (50 až 200 °C), množství vzorku (0,1 až 1 g), objem rozpouštědla (15 až 50 ml) a doba extrakce (5-20 min). Nejlepších výsledků bylo dosaženo, když teplota extrakce byla 125 °C, použito bylo 25 ml rozpouštědla, navážka papriky činila 0,5 g (vzorek papriky byl čerstvě rozmělněný) a extrakce probíhala po dobu 5 minut za použití 100% ethanolu jako rozpouštědla. Tento extrakční způsob byl zároveň porovnáván s tradičním extrakčním způsobem – konkrétně macerací s magnetickým mícháním. Při této porovnávací metodě byly vzorky extrahovány různě dlouho (5, 10, 15, 20, 25 a 30 min). Použitým rozpouštědlem byl ethanol a teplota extrakce byla 25 °C (důvodem bylo zabránit odpařování ethanolu při vyšších teplotách). Bylo potvrzeno, že MAE je mnohem rychlejší metoda. Výsledky získané po 30 minutách magnetického míchání odpovídaly výsledkům po 5 minutách mikrovlnné extrakce [41]. Mezi tradiční extrakční metody lze zařadit i ultrazvukovou extrakci. Například analýza, která se zabývala extrakcí kapsaicinu

a dihydrokapsaicinu z paprik pocházejících z Mexika. Podmínky ultrazvukové extrakce byly optimalizovány tak, aby se maximalizovala výtěžnost extrakce analytu. Mezi optimalizované parametry patřilo rozpouštědlo (ethanol a voda), doba extrakce (5-25 min), extrakční teplota (25-50 °C), množství vzorku (0,25-0,5 g) a síla ultrazvuku (40-80%). Nejvýznamnějšími podmínkami pro extrakci kapsaicinoidů ultrazvukovou extrakcí byl typ rozpouštědla, doba extrakce a množství vzorku. Nejlepších výsledků při extrakci kapsaicinu a dihydrokapsaicinu bylo dosaženo při použití ethanolu jako rozpouštědla za relativně krátkou dobu (25 min) [42]. Výsledky byly srovnatelné s těmi, které byly získány Soxhletovou extrakční metodou [43]. Výhodou USAE je, že není potřeba velké množství vzorku a rozpouštědla a dochází k zásadnímu zkrácení doby extrakce (Soxhletova extrakce vyžadovala 5 hod 25 min) [42]. Obdobná extrakční technika byla testována rovněž na vzorcích pálivých chilli paprik. V tomto případě byla testována tři rozpouštědla – aceton, acetonitril a methanol. Nejvyšší výtěžek byl získán při extrakci acetonitrem. Optimalizace objemu rozpouštědla a času sonifikace byla proto prováděna právě pro acetonitril. Optimalizace objemu rozpouštědla byla prováděna na 0,3 g vzorku chilli, který byl 60 min sonifikován s 10, 15, 20, 30 a 40 ml acetonitrilu a čas sonifikace byl testován rovněž na 0,3 g vzorku chilli s 10 ml acetonitrilu po dobu 10, 30, 45, 60, 75 a 105 minut. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití 10 ml acetonitrilu a 60 min dlouhé sonifikaci [44]. Obecně platí, že MAE a PLE jsou podobné techniky a patří ke klasickým extrakčním metodám. Jedná se o uživatelsky nenáročné, relativně rychlé techniky, které vyžadují významně menší množství organického rozpouštědla. Jedinou nevýhodou je nutnost zvažování teploty, při které bude extrakce probíhat, aby nedocházelo k tepelné degradaci analytu [45].

Jak bylo uvedeno výše, pro extrakci kapsaicinoidů lze využít i Soxhletovu extrakci. Ta byla použita v několika extrakčních postupech [43, 46], ovšem jedná se o časově velmi náročnou metodu (extrakce trvá většinou kolem 5 hodin) a proto při velkém množství vzorků a při rutinní analýze není tato extrakční technika příliš využívána.

## 2.4. Analýza kapsaicinoidů

Existuje několik přístupů a metod, jak lze kapsaicinoidy zkoumat. První metodou, která tyto látky zkoumala, byl organoleptický test [12]. Mezi další metody, které v dnešní době nejsou příliš vyhledávané, patří kolorimetrické metody [27], přímá UV spektrometrie [47, 48] a infračervená reflektanční spektroskopie (near-infrared reflectance spectroscopy,



NIR) [49]. Dále chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography, TLC) [19, 50], elektrochemické metody [51, 52], elektrochemické senzory [53], kapilární elektroforéza [54], plynová chromatografie (gas chromatography, GC) [55], plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) a (ultra)vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (reverse phase – (ultra)high-performance liquid chromatography, RP-(U)HPLC) nebo HPLC ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS). HPLC metoda je zdaleka nejběžnější technika používaná pro identifikaci a kvantifikace těchto sloučenin. Důvodem je možnost optimalizace metody, která přináší úsporu nákladů a času.

### 2.4.1 Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Jednou z možností separace, detekce a kvantifikace kapsaicinoidů v paprikách je analýza plynovou chromatografií (GC) spojenou s hmotnostním spektrometrem (MS). Příkladem může být analýza, kdy předem lyofilizované vzorky byly extrahovány acetonitrilem, sonifikovány, centrifugovány a finálně přefiltrovány přes diskový mikrofiltr. Takto připravené vzorky byly analyzovány GC-MS s HP-5MS kolonou (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm). Identifikace a kvantifikace byly prováděny pomocí full scanu a monitorováním vybraného iontu (selected ion monitoring mode, SIM). Fragmentační spektra kapsaicinoidů se až na molekulární ionty příliš nelišila. Nejintenzivnějším iontem ve spektru byl ion  $m/z = 137$ , což odpovídá vanillylové části. Kvantifikace byla prováděna za použití molekulových iontů každé sloučeniny ( $m/z = 293, 293, 279, 305, 307$ , pro nordihydrokapsaicin, nonivamid, nornordihydrokapsaicin, kapsaicin, dihydrokapsaicinu). Metoda popsaná v této studii byla jednoduchá, rychlá, umožnila detekci řady sloučenin pomocí jednoduché extrakce následované přímou analýzou GC-MS a jeví se jako vhodná technika pro rychlý screening vzorků [56].

Další možností využití GC-MS při analýze paprik je aplikace headspace mikroextrakce na pevné fázi (headspace-solid phase microextraction, HS-SPME). SPME byla vyvinuta, aby usnadnila a urychlila přípravu vzorků pro analýzu těkavých a semitěkavých sloučenin. Metoda je rychlá, přesná a vyžaduje pouze malé množství vzorku. Mezi hlavní parametry, které ovlivňují proces SPME, patří výběr vlákna, teplota extrakce, extrakční časový profil, desorpční čas a pH. Na mikroextrakčních vláknech dochází k prekoncentraci vzorku. Mezi často používaná mikroextrakční vlákna patří

PDMS (Polydimethylsiloxan) a PDMS/DVB (Polydimethylsiloxan/Divinylbenzen) vlákna [43].

## 2.4.2 Kapalinová chromatografie a kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Nejčastěji aplikovanou technikou, která je vhodná na analýzu kapsaicinoidů, je (ultra)vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-(U)HPLC). Typické je použití kolon C18 nebo C8 a vodných methanolových nebo acetonitrilových mobilních fází. Je několik možností detekce analyzovaných látek - ultrafialovým, fluorescenčním, elektrochemickým detektorem nebo hmotnostní spektrometrií.

Příkladem analýzy kapsaicinoidů kapalinovou chromatografií s UV detekcí může být analýza vzorků po extrakci methanolem. Použita byla kolona Inertsil ODS-3V, eluce byla gradientová, mobilní fáze obsahovala: A: acetonitril, B: voda + 0.5% kyseliny mravenčí, detekce probíhala při vlnové délce 280 nm [57]. Kolona ACQUITY UPLC BEH C18 byla použita pro oddělení sedmnácti kapsaicinoidů (přírodních a syntetických). Eluce byla gradientová a mobilní fáze byla složena z A: voda (+0,1% kyselina octová), B: acetonitril (+0,1% kyselina octová). Detekce probíhala rovněž při 280 nm [58]. Příkladem izokratické eluce může být analýza na koloně C18, kde mobilní fáze obsahovala acetonitril a vodu (1:1, v/v). Detektor sledoval vlnové délky 202, 222 a 280 nm [47]. V jiném případě byla použita kolona C8, eluce byla izokratická a mobilní fáze měla složení 40% (v/v) acetonitril a 60% (v/v) kyselina ortofosforečná, detekce probíhala při 281 nm [59]. UHPLC analýza na reverzní fázi (C18) byla rovněž využita při identifikaci a kvantifikaci nordihydrokapsaicinu, kapsaicinu, dihydrokapsaicinu, homokapsaicinu a homodihydrokapsaicinu. Eluce byla gradientová a mobilní fáze obsahovala vodu (+0,1% kyselina octová) a methanol (+0,1% kyselina octová). Kvantifikace látek probíhala při 280 nm a metodika byla porovnávána s konvenční HPLC metodou. Výhodou UHPLC metody je malá spotřeba rozpouštědla a kratší délka analýzy [60].

Kromě UV detekce lze při analýze kapsaicinoidů využít i fluorescenčního detektoru. Například separace na monolitické koloně Chromolith TH Performance RP-18e a následná detekce při 278 nm (excitace) a 310 nm (emise). Při analýze byla použita gradientová eluce a mobilní fáze se skládala z vody (+0,1% kyselina octová) a methanolu (+0,1% kyselina octová) [41]. Fluorescenční detektor byl využit i pro analýzu kapsaicinu a dihydrokapsaicinu při studiu biotransformace kapsaicinoidů v tenkém střevě potkanů.

Separace probíhala na koloně ZORBAX Eclipse (R) XDB-C8, eluce byla izokratická a mobilní fáze obsahovala 0.05 M roztok kyseliny ortofosforečné a acetonitril (60:40, v/v; pH 3.0). Fluorescenční detektor sledoval excitaci a emisi při vlnových délkách 230 a 323 nm [61]. Dalším příkladem může být HPLC analýza, kde byla použita kolona Hypersil ODS C18, mobilní fáze obsahovala směs methanol:voda (50-70% v/v), excitace byla monitorována při 278 nm a emise při 310 nm [38]. UHPLC analýza kapsaicinoidů v gochujang (pikantní a ostré fermentované korejské koření) byla provedena na koloně LaChromUltra C18. Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a 1% kyseliny mravenčí ve vodě (60:40, v/v), fluorescenční detektor byl nastaven na 280 nm pro excitaci a 325 nm pro získání emisních spekter [62]. Dalším zajímavým experimentem byla analýza nových hybridů pálivých paprik. Separace kapsaicinoidů probíhala na koloně Nucleodur C18, Cross-Linked, eluce byla izokratická, mobilní fáze byla složena z vody a acetonitrilu (1:1, v/v) a detektor monitoroval 280 nm (excitace) a 320 nm (emise). V analyzovaných vzorcích se podařilo oddělit a stanovit sedm kapsaicinoidů - hlavními sloučeninami byly nordihydrokapsaicin, kapsaicin a dihydrokapsaicin, zatímco deriváty homokapsaicinu a homodihydrokapsaicinu byly detekovány jako vedlejší složky [63].

K detekci kapsaicinoidů je rovněž možné použít hmotnostní spektrometr. Spojení (U)HPLC-MS je ovšem cenově i přístrojově náročné a ne každá laboratoř si může tuto techniku dovolit. Velkou výhodou této techniky je vysoká selektivita a citlivost metody. Existuje více způsobů ionizace, které umožňují propojení kapalinové chromatografie a hmotnostního spektrometru - chemická ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) a ionizace elektrosprejem (electrospray ionization, ESI) za použití iontové pastě [64] nebo kvadrupólového hmotnostního spektrometru. Využít lze rovněž i průletového analyzátoru (time-off-flight, TOF) [65].

Příkladem použití ionizace elektrosprejem, může být experiment, kde k separaci kapsaicinoidů a piperinů metodou LC-MS byla použita kolona Zorbax Eclipse XDB-C18, eluce byla gradientová a mobilní fázi tvořil acetonitril a voda (+0,5% kyseliny mravenčí). Sledovány byly následující protonované molekuly: nordihydrokapsaicin ( $m/z = 294$ ), kapsaicin ( $m/z = 306$ ), dihydrokapsaicin ( $m/z = 308$ ), dva isomery homokapsaicinu (homokapsaicin I a II) ( $m/z = 320$ ), dva isomery homodihydrokapsaicinu (homodihydrokapsaicin I a II) ( $m/z = 322$ ), nonivamid ( $m/z = 293.9$ ), piperin ( $m/z = 286.2$ ) a piperin isomer ( $m/z = 286.2$ ). Izomerní kapsaicinoidy homokapsaicin I a homokapsaicin II ( $m/z = 308$ ) a homodihydrokapsaicin I a homodihydrokapsaicin II ( $m/z = 320$ ) jsou látky, které se liší v pozici koncových  $\text{CH}_3$  skupin, ale ne v molekulové hmotnosti.

Na základě MS spekter nelze jednoznačně určit, který chromatografický pík odpovídá danému izomeru (nelze jednoznačně objasnit polohu dvojně vazby nebo polohu methylové skupiny). Po provedení MS-MS bylo zjištěno, že isomery se navzájem liší ve fragmentačních spektrech [57, 66]. V jiné studii bylo použito LC-ESI-MS-MS na analýzu kapsaicinoidů z plazmy potkana. Důvodem použití tandemové hmotnostní spektrometrie byl předpoklad poměrně nízké plazmatické koncentrace kapsaicinu a dihydrokapsaicinu ve vzorku, což vyžaduje značnou citlivost metody. Separace kapsaicinu a dihydrokapsaicinu probíhala na koloně Zorbax SB-C18, mobilní fáze obsahovala acetonitril a vodu (55:45, v/v) s přidavkem 0,1% kyseliny mravenčí (v/v). Jak bylo uvedeno výše, ionizace byla prováděna elektrosprejem. Bylo zjištěno, že intenzita signálu v pozitivním módu byla mnohem vyšší než intenzita signálu v negativním módu. V pozitivním módu byly sledovány protonované molekulární ionty -  $m/z = 306$  pro kapsaicin a  $m/z = 308$  pro dihydrokapsaicin. Po fragmentaci protonovaných molekulárních iontů  $[M+H]^+$  se v produktových spektrech obou látek objevil intenzivní ion  $m/z = 137$  (odpovídá benzenovému jádru s -OH a -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> skupinou) [67]. LC-ESI-MS a LC-ESI-MS-MS byly rovněž použity pro analýzu kapsaicinu, dihydrokapsaicinu a nonivamidu v pepřovém spreji. Chromatografického oddělení kapsaicinoidních analogů bylo dosaženo za použití kolony s reverzní fází a postupným gradientem methanolu a destilované vody (+0,1% kyselina mravenčí) (v/v). Identifikace a kvantifikace kapsaicinoidů bylo dosaženo jak jednostupňovou hmotnostní spektrometrií, která sledovala protonované molekuly kapsaicinu ( $m/z = 306$ ), dihydrokapsaicinu ( $m/z = 308$ ) a nonivamidu ( $m/z = 294$ ), tak tandemovou hmotnostní spektrometrií, která monitoruje příslušné iontové přechody prekurzor-produkt. Analýza vybraných pepřových sprejů ukázala, že koncentrace kapsaicinoidů ve výrobcích byla v rozmezí od 0,7 do 40,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  [68]. ESI bylo využito i při spojení kapalinové chromatografie s průletovým analyzátozem (TOF), což je technika, která umožňuje stanovení přesné hmotnosti a je schopna izotopického rozlišení v celém hmotnostním rozsahu bez ohrožení citlivosti. Chromatografické separace kapsaicinu a dihydrokapsaicinu bylo dosaženo na koloně Waters Symmetry C18 column za použití gradientu methanolu a vody. Metoda se jeví jako vhodná technika k provádění rutinních analýz v šlechtitelských programech (přesto jsou podobné analýzy prováděné především na kvadrupólových analyzátozech nebo na iontových pastech). TOF poskytuje také informace o izotopové distribuci, což umožňuje jeho použití v metabolických studiích se stabilními izotopy [65].

Pro ionizaci lze rovněž použít chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI). Studie, která porovnávala ESI a APCI ovšem potvrdila, že lepší citlivost má ionizace elektrosprejem v pozitivním módu [69]. Příkladem použití APCI může být analýza, kde pomocí HPLC-APCI-MS techniky byly sledovány kapsaicinoidy z plodů paprik - 12 minoritních a 3 majoritní. Použita byla kolona Phenomenex C18 Synergi-Hydro-RP, eluce byla gradientová a mobilní fáze obsahovala A: voda (+0.5% kyselina octová):acetonitril (90:10 v/v), B: acetonitril (+0.5% kyselina octová):voda (90:10 v/v). Všechny kapsaicinoidy byly monitorovány při 280 nm a navíc byla zaznamenávána UV-VIS spektra v rozmezí 200-600 nm. Vysokouúčinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií byla mimořádně užitečná při identifikaci píků a další charakterizaci jednotlivých látek. Nicméně diferenciaci několika kapsaicinoidních izomerů, které se lišily v konfiguraci (E-, Z-izomery), poloze dvojných vazby a poloze methylové skupiny podél acylového řetězce, výhradně pomocí LC-MS nemohlo být dosaženo. Technika APCI poskytla informace o molekulové hmotnosti  $[M+H]^+$  iontů a fragmentační spektra získaná pomocí CID (kolizí indukovaná disociace) poskytla cenné informace pro další charakterizaci kapsaicinoidů, které se liší stupněm nasycení a počtem atomů uhlíku v acylovém řetězci. Společně s naměřenými UV spektry bylo možno identifikovat jednotlivé sloučeniny [64]. Obdobný experiment za použití UHPLC-DAD-MS-MS s ionizací za atmosférického tlaku byl prováděn na plodech *Capsicum chinense*, kde byl kvantifikován kapsaicin a dihydrokapsaicin. Separace kapsaicinoidů byla prováděna na koloně Hypersil Gold C18, eluce byla izokratická a mobilní fáze se skládala z vody a acetonitrilu (40:60, v/v), UV spektra byla měřena při 280 nm, MS spektra byla sbírána v pozitivním ionizačním módu. Metoda se jeví jako vhodná technika k rychlé rutinní analýze a může být použita k určení koncentrací jiných malých kapsaicinoidů [70]. Chemické ionizace za atmosférického tlaku bylo využito i při dalších analýzách [69, 71]. Přesto je rozšířenější aplikace ionizace elektrosprejem.

Testována byla rovněž kapalinová chromatografie ve spojení s elektrochemickým detektorem (HPLC-ED). Příkladem může být analýza, kde byl identifikován a kvantifikován kapsaicin v různých částech plodů paprik (vrchní část plodu, kde přisedá zbytek květní stopky, spodní část papriky, semena a semeník). Nejvhodnější podmínky pro stanovení kapsaicinu byly následující: potenciál pracovní elektrody byl nastaven na 750 mV, mobilní fáze obsahovala acetátový pufr (pH 4) a methanol v poměru 40:60 (v/v). Za těchto podmínek byly změřeny i vzorky s velmi nízkou koncentrací kapsaicinu. Běžně se tato metoda příliš nepoužívá. Převažuje spíše spojení s jinými detektory [72].

Cílem běžné laboratoře je nalézt jednoduchou, finančně nenáročnou, spolehlivou a robustní metodu, která by byla použitelná i pro různé materiály a byla metodou univerzální. Teoretická část rigorózní práce popisovala vlastnosti a využití kapsaicinoidů. Zaměřena byla především na metody extrakce a separační techniky, které se při identifikaci a kvantifikaci těchto látek používají. Praktická část byla vypracována na základě teoretické části a týkala se testování výtěžnosti různých extrakčních postupů pro kapsaicin a dihydrokapsaicin ze vzorků paprik. Cílem bylo najít vhodné podmínky pro extrakci vzorků a vyvinout a optimalizovat UHPLC metodu s UV detekcí.

### 3. Experimentální část

#### 3.1. Přístrojové vybavení a chemikálie

K vlastnímu měření vzorků byl použit přístroj UHPLC UltiMate 3000 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) s UV detektorem. K přípravě vzorků byly použity analytické váhy (Kern), kulový mlýnek (Mixer Mill MM 400), ultrazvuková lázeň (SONOREX DIGITEC, BANDOLIN), centrifuga (HERMLE Z 300, BioTech a.s.), lyofilizátor (CHRIST BETA 1-8 LD Plus) a diskové mikrofiltry (Nylon, 0,22  $\mu\text{m}$ ) (Chromservis s.r.o.).

Použité chemikálie: acetonitril (LC-MS grade, Sigma Aldrich, Praha, ČR), methanol (LC-MS grade, Sigma Aldrich, Praha, ČR), destilovaná voda pro HPLC (LC-MS grade, Sigma Aldrich, Praha, ČR) a kyselina mravenčí (98-100%, for analysis, Merck, Německo). Ke kvantifikaci byly použity standardy kapsaicinu a dihydrokapsaicinu (oba Sigma Aldrich, Praha, ČR).

#### 3.2. Příprava rostlinného materiálu

Reálné vzorky pocházely z Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Olomouci z kolekce paprik Ing. Heleny Stavělkové Ph.D. a vzorky byly zpracovány a analyzovány rovněž ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Olomouci.

Vzorky byly vypěstovány podle standardního postupu. Semena paprik byla zavrtána do malých květináčů s perlitem. Ty byly umístěny do Jacobsenova aparátu na klíčení po dobu deseti dnů (s 12 hodinovým cyklem střídání světla a tmy), přičemž po dobu tří dnů byla teplota udržována při 35 °C a po 7 dnů při 25 °C. Po 10 dnech byly sazenice přemístěny do plastových květináčů s růstovým médiem. Šest týdnů byly ve skleníku. Poté byly paprikové výsadby zasazeny do izolačních klecí. Sledování zdravotního stavu bylo prováděno v průběhu celého vegetačního období. Ve stádiu zralosti byly sklizeny plody pro chemickou analýzu. Dopředu byly organoleptickou analýzou vybrány ty druhy paprik, které vykazovaly nenulovou hladinu pálivosti (sladké papriky byly z analýzy na kapsaicinoidy vyloučeny). Vybrané vzorky byly dále zpracovány.

Kapsaicinoidy jsou v plodu papriky zastoupeny nerovnoměrně. Aby se předešlo zkreslení výsledků, byly plody paprik rozkrájeny na podélné proužky. Poté byly vzorky umístěny do lyofilizátoru CHRIST BETA 1-8 LD Plus. Po lyofilizaci následovalo pomletí vzorků na kulovém mlýnku Mixer Mill MM 400, aby byla zajištěna co nejlepší homogenita vzorků. Takto připravené vzorky byly nachystané k navážení

a následné extrakci. Extrakce byla prováděna několika extrakčními postupy (viz kapitola 4. Výsledky a diskuze).

### 3.3. UHPLC metoda

Extrahované vzorky paprik byly analyzovány na UHPLC přístroji UltiMate 3000 s UV detekcí při vlnové délce 222 nm (referenční vlnová délka byla 500 nm). Použita byla kolona C18 (EC 100/2 NUCLEODUR C18 Gravity, 1,8  $\mu\text{m}$  s předkolonkou EC 4/2 NUCLEODUR C18 Gravity, 1,8  $\mu\text{m}$ ). Teplota kolony byla nastavena na 25 °C, teplota v autosampleru byla nastavena na 10 °C. Analýza probíhala při izokratické eluci a nástřik byl 5  $\mu\text{l}$ . Mobilní fáze obsahovala 40% acetonitrilu a 60% vody s 0,1% přídavkem kyseliny mravenčí. Průtok byl nastaven na 0,150 ml/min. Kvantifikace byla prováděna metodou vnější standardizace na standardy kapsaicinu a dihydrokapsaicinu.



## 4. Výsledky a diskuze

### 4.1. Porovnání extrakčních postupů při extrakci methanolem

Bylo testováno několik extrakčních postupů při extrakci methanolem. Extrakce byla prováděna na vzorku odrůdy Kocu (silně pálivá). Do 50 ml centrifugačních zkumavek bylo naváženo 650 mg vzorku. K naváženému vzorku se přidalo 25 ml methanolu. Po důkladném zvortexování bylo provedeno šest extrakčních postupů (viz Tab. III.). Extrakce probíhala v ultrazvukové lázni o teplotě 35 °C. Teplota ultrazvukové lázně byla udržována termostatem. Po ukončení extrakce byl vzorek přenesen do centrifugy HERMLE Z 300, kde byl odstředován 15 minut při 4500 ot/min. Po vyjmutí z centrifugy byl vzorek dekantován do zásobní vialky. Vzorky se uchovávají v lednici při + 5 °C. Před chromatografickou analýzou je potřeba vzorek přefiltrovat přes diskový mikrofiltr (PP, 0,22 µm) do vialky. Chromatografická analýza probíhala za podmínek popsaných v kapitole 3.3.

	Extrakční postupy při extrakci methanolem:
1	30 min macerace
2	30 min macerace + 15 min extrakce v ultrazvukové lázni
3	3 hod macerace
4	3 hod macerace + 15 min extrakce v ultrazvukové lázni
5	3 hod macerace + 30 min extrakce v ultrazvukové lázni
6	3 hod macerace + 60 min extrakce v ultrazvukové lázni

Tab. III.: Extrakční postupy při extrakci methanolem.

Extrakční postup:	Plocha kapsaicinu/dihydrokapsaicinu:
1	267682/168404
2	297075/179087
3	264658/165879
4	293074/178192
5	291052/174560
6	297009/178816

Tab. IV.: Extrakční výtěžnost v methanolu.

Na základě výsledků získaných při analýze vzorků, které byly extrahovány methanolem, bylo zjištěno, že optimálním extrakčním postupem je 30 min macerace a 15 min extrakce v ultrazvukové lázni (viz tab. IV.).

Vzhledem k vysoké odezvě stanovovaných látek, byla testována nižší navážka. Navážka tedy byla změněna na 100 mg vzorku, dále byl snížen objem rozpouštědla na 4 ml. Extrakční postup zůstal stejný – 30 minut macerace a následně 15 min extrakce v ultrazvukové lázni při 35 °C. Plochy píků kapsaicinu a dihydrokapsaicinu, získané chromatografickou analýzou, jsou zaznamenány v tabulce V.

	Plocha kapsaicinu/dihydrokapsaicinu:
Vzorek 1	50100/28665
Vzorek 2	45631/30070
Vzorek 3	49844/30157
Průměr:	48525/29631

Tab. V.: Extrakční výtěžnost 100 mg vzorku ve 4 ml methanolu.

Po této analýze byl zopakován stejný extrakční postup, ovšem jako rozpouštědlo byl použit acetonitril (viz kap. 4.2.).

## 4.2. Porovnání extrakčních postupů při extrakci acetonitrilem

Do centrifugačních zkumavek bylo naváženo 100 mg vzorku (jednalo se o stejný vzorek jako v kap. 4.1.). K naváženému vzorku byly přidány 4 ml acetonitrilu. Následně byla provedena 30 min macerace a 15 min extrakce v ultrazvukové lázni při 35 °C (stejně jako při extrakci methanolem). Po ukončení extrakce byl vzorek přenesen do centrifugy, kde byl odstředován 15 minut při 4500 ot/min. Po vyjmutí z centrifugy byl vzorek dekantován do zásobní vialky. Před chromatografickou analýzou byl vzorek přefiltrován přes diskový mikrofiltr (PP, 0,22 µm) do vialky.

	Plocha kapsaicinu/dihydrokapsaicinu:
Vzorek 1	54143/25513
Vzorek 2	56802/28338
Vzorek 3	53969/25923
Průměr:	54971/26591

Tab. VI.: Extrakční výtěžnost 100 mg vzorku ve 4 ml acetonitrilu.

Ze získaných výsledků (viz tab. V. a VI.) bylo zjištěno, že výtěžnost při extrakci acetonitrilem je vyšší než při extrakci methanolem. Z toho důvodu byl v následujících experimentech jako rozpouštědlo použit acetonitril.

## 4.3. Optimalizace teploty při extrakci vzorku

Dalším experimentem byla optimalizace teploty při 15 min extrakci na ultrazvukové lázni, která následovala po 30 min maceraci. Testováno bylo 15 min na ultrazvukové lázni při teplotě 35 °C, 45 °C, 55 °C a 65 °C. 100 mg vzorku papriky (odrůda Ozdobná) bylo extrahováno 4 ml acetonitrilu, sledovány byly hodnoty kapsaicinu a dihydrokapsaicinu. Průměrné plochy píků kapsaicinu a dihydrokapsaicinu ze tří analýz jsou zaznamenány v Tab. VII.

Teplota ultrazvukové lázně:	Průměrná plocha kapsaicinu/dihydrokapsaicinu:
35 °C	15511/8482
45 °C	24779/12915
55 °C	177970/66698
65 °C	69242/26586

Tab. VII.: Extrakční výtěžnost acetonitrilu při 35 °C, 45 °C, 55 °C a 65 °C.

Při optimalizaci teploty ultrazvukové lázně, kde probíhala extrakce vzorků, bylo zjištěno, že extrakční výtěžnost byla nejvyšší při 55 °C. Na základě těchto výsledků byla teplota ultrazvukové lázně v dalších experimentech nastavena na 55 °C.

I přes snížení navážky na 100 mg byla výtěžnost extrakce vysoká, proto v následujících analýzách byla navážka snížena na 50 mg vzorku.

#### 4.4. Testování výtěžnosti druhé a třetí extrakce

Dalším experimentem bylo testování druhé a třetí extrakce. K 50 mg vzorku se přidalo 10 ml acetonitrilu. Vzorek byl 30 min macerován a následně 15 min probíhala extrakce v ultrazvukové lázni při 55 °C. Po ukončení extrakce byl vzorek 15 min centrifugován při 4500 rpm. Extrakt byl dekantován do zásobní vialky (1. extrakt) a zbytek z předchozí extrakce byl reextrahován acetonitrem. Přidáno bylo 5 ml acetonitrilu, následovala 30 min macerace a 15 min extrakce v ultrazvukové lázni. Po ukončení extrakce byl vzorek centrifugován a extrakt byl dekantován do zásobní vialky (2. extrakt) a zbytek z předchozí extrakce byl opět reextrahován acetonitrem. Bylo přidáno 5 ml acetonitrilu, následovala 30 min macerace, 15 min extrakce v ultrazvukové lázni. Po ukončení extrakce byl vzorek 15 min centrifugován a dekantován do zásobní vialky (3. extrakt). Před UHPLC analýzou byly vzorky přefiltrovány přes diskový mikrofiltr (PP, 0,22 µm), následovala chromatografická analýza a výtěžnost první, druhé a třetí extrakce je uvedena v tab. VIII.

Extrakce:	Plocha kapsaicinu/dihydrokapsaicinu:
1.	19235/16557 19880/17243 18560/17151
2.	623/508 627/557 691/549
3.	- - -

Tab. VIII.: Výtěžnost první, druhé a třetí extrakce.

Z naměřených dat je patrné, že 96,63% kapsaicinu a 96,83% dihydrokapsaicinu je vyextrahováno při první extrakci. Výtěžnost druhé extrakce byla 3,37% pro kapsaicin a 3,17% dihydrokapsaicin. Při třetí extrakci nebyla naměřena žádná hodnota, koncentrace kapsaicinu a dihydrokapsaicinu byla pod limitem detekce (LOD). Třetí extrakci tedy není nutné provádět. V případě rozboru paprik ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Olomouci není nezbytné provádět druhou extrakci. Důvodem je velké množství vzorků, které je nutné zpracovat a nízká chyba, kterou je měření zatíženo. V dalších experimentech byla prováděna pouze extrakce první.

#### 4.5. Analýza vybraných vzorků paprik

Metoda byla testována na dvou odrůdách paprik, které vykazovaly nenulovou hladinu pálivosti – konkrétně se jednalo o odrůdy Jatsubura Jopper (pálivá) a Ostryj Ukrajinckij 18 (silně pálivá). Od každé odrůdy bylo vysazeno 10 rostlin. Papriky byly pěstovány dle postupu v kapitole 3.2. Z každé rostliny bylo ve stádiu zralosti odebráno několik plodů (minimálně 3), které byly dále zpracovány, zlyofilizovány a zhomogenizovány (viz kap. 3.2.). Do 25 ml centrifugačních zkumavek bylo naváženo přesně asi 50 mg vzorku (viz tab. IX a X).

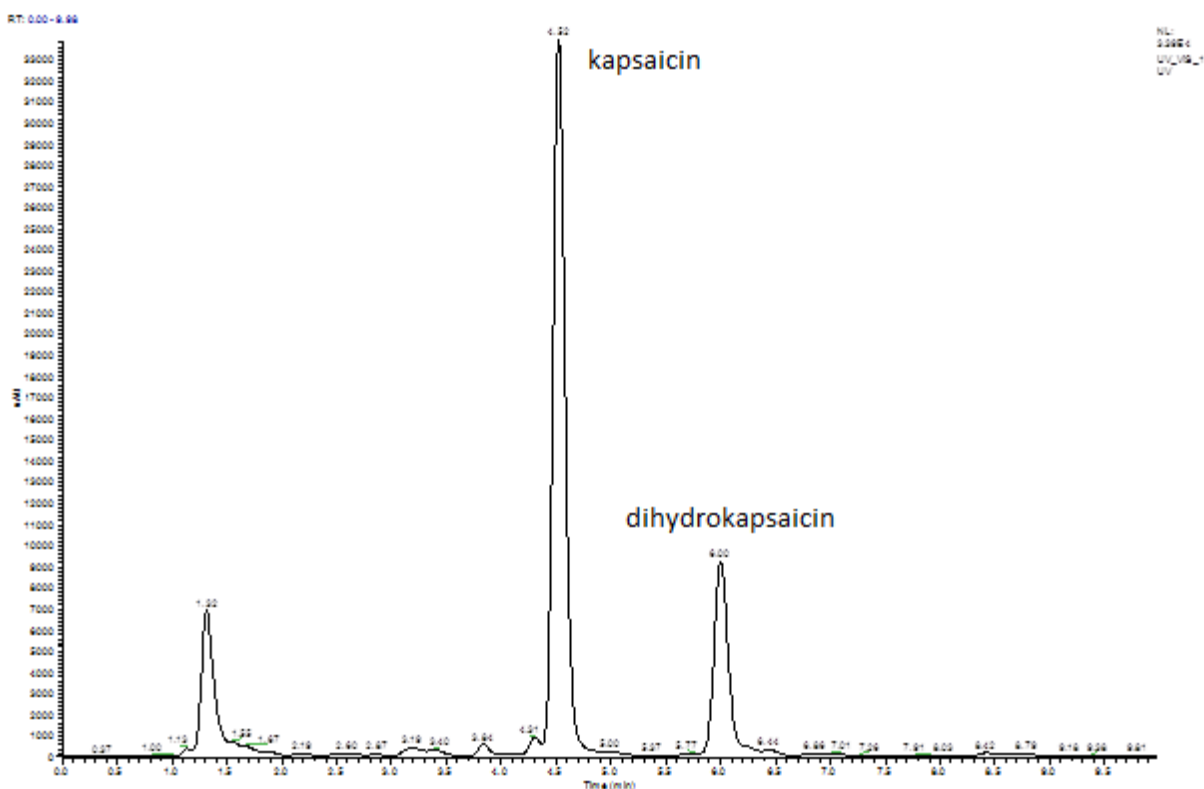
Navážky			
Odrůda: Jatsubura Jopper			
	a	b	c
1	49,58	49,45	50,05
2	50,20	50,20	50,20
3	49,87	50,03	49,77
4	49,84	49,98	49,98
5	49,67	49,86	49,88
6	49,62	49,49	49,62
7	49,33	49,25	49,90
8	50,10	50,70	50,40
9	49,45	49,48	49,86
10	49,90	49,74	50,07

Tab. IX.: Navážky vzorků – odrůda Jatsubura Jopper.

Navážky			
Odrůda: Ostryj Ukrajinskij 18			
	a	b	c
1	50,00	50,10	50,30
2	50,30	50,30	50,40
3	50,14	49,57	50,09
4	50,30	50,10	50,10
5	50,50	50,30	50,10
6	49,60	49,80	49,96
7	50,50	50,60	50,10
8	50,30	50,30	50,50
9	50,30	50,30	50,40
10	50,30	50,10	50,10

Tab. X.: Navážky vzorků – odrůda Ostryj Ukrajinskij 18.

Každý vzorek byl navážen v triplikátu. K naváženému vzorku bylo napipetováno 10 ml acetonitrilu. Vzorek byl poté 30 minut macerován a následně byla zkumavka na 15 min vložena do ultrazvukové lázně vyhřáté na 55 °C (viz kap. 4.1.). Po ukončení extrakce byl vzorek vložen do centrifugy po dobu 15 minut při 4500 ot/min. Po vyjmutí z centrifugy byl vzorek přefiltrován přes diskový mikrofiltr (0,22 µm) do vialky a podroben chromatografické analýze. Všechny vzorky a standardní roztoky byly analyzovány dle metody uvedené v kapitole 3.3. Příklad chromatografického záznamu separace kapsaicinu a dihydrokapsaicinu na reálném vzorku pálivé papriky je zobrazen na obrázku I, přičemž kapsaicin eluuje v čase 4,53 min, dihydrokapsaicin eluuje v 6. minutě.



Obr. I.: Příklad chromatografického záznamu z analýzy vzorku pálivé papriky. Pík v čase 4,53 min odpovídá kapsaicinu, pík v 6. minutě odpovídá dihydrokapsaicinu.

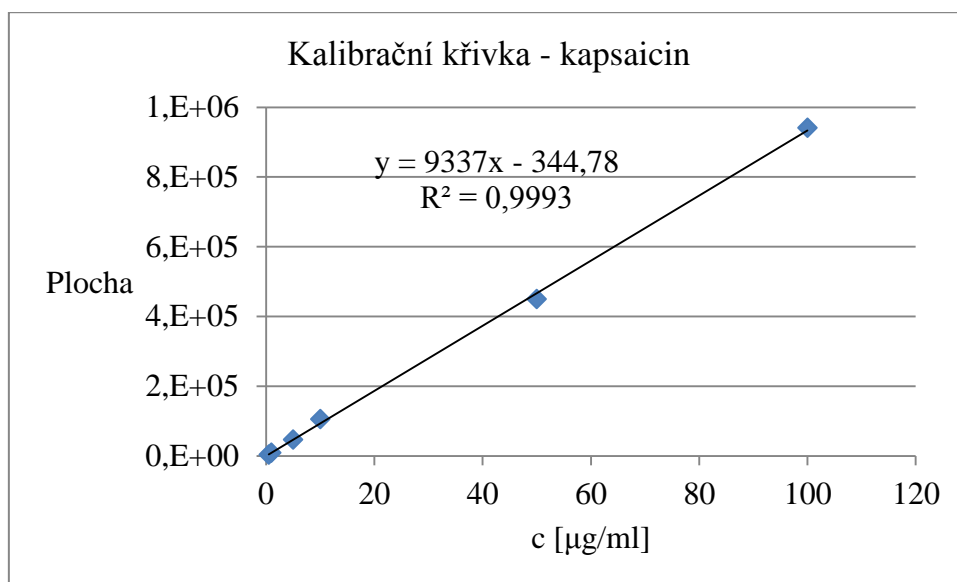
#### 4.5.1. Metoda vnější standardizace

Kvantifikace byla prováděna metodou vnější standardizace na standardy kapsaicinu a dihydrokapsaicinu. Kalibrační řada kapsaicinu a dihydrokapsaicinu zahrnovala koncentrace 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 50 µg/ml a 100 µg/ml. Roztoky byly

připraveny v acetonitrilu a to postupným ředěním. Každý kalibrační bod byl 3krát proměřen. Kalibrační body a odpovídající průměrná plocha píku standardu kapsaicinu a dihydrokapsaicinu jsou zobrazeny v tabulce XI. Kalibrační křivku (průměrná plocha píků v závislosti na koncentraci) kapsaicinu a dihydrokapsaicinu znázorňuje graf I a II.

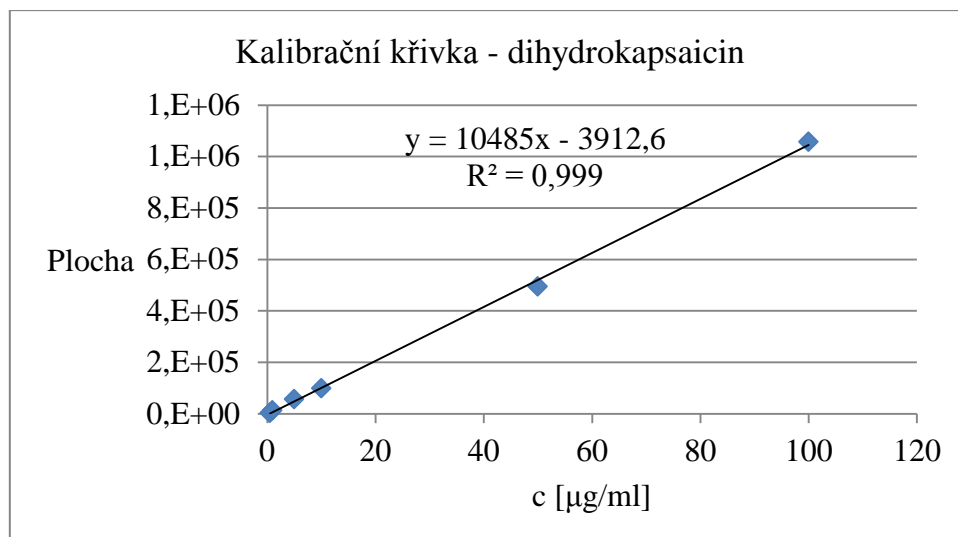
	<b>Kapsaicin</b>	<b>Dihydrokapsaicin</b>
c		
[ $\mu\text{g/ml}$ ]	Průměrná plocha	Průměrná plocha
0,5	3218,83	2515,67
1	8745,00	13046,80
5	45664,50	56700,83
10	104786,67	97990,50
50	449310,33	494927,83
100	940824,00	1057143,17

Tab. XI.: Kalibrační body a odpovídající průměrná plocha píku standardu kapsaicinu a dihydrokapsaicinu.



Graf I.: Kalibrační závislost pro kapsaicin v rozsahu koncentrací 0,5 - 100  $\mu\text{g/ml}$ .





Graf II.: Kalibrační závislost pro dihydrokapsaicin v rozsahu koncentrací 0,5 - 100 µg/ml.

#### 4.5.2. Vyhodnocení naměřených vzorků

Z chromatogramů byly vyhodnoceny plochy píku kapsaicinu a dihydrokapsaicinu. Tyto hodnoty jsou zaznamenány v tabulce XII.

	Plocha kapsaicinu			Plocha dihydrokapsaicinu		
	a	b	c	a	b	c
<b>Jatsubura Jopper</b>						
1	59968	60680	61017	25251	26159	26272
2	91805	92642	90042	43641	40443	40284
3	79669	77788	74135	22096	20737	20928
4	31845	34026	35489	9675	9843	8930
5	49196	48454	51515	19028	18851	18987
6	41531	39928	43645	17270	14997	16922
7	60887	58939	61468	10526	11541	11928
8	47388	53159	52206	10060	12088	11432
9	63165	65600	66993	18437	19839	20604
10	40018	38918	39478	3597	3563	4226

Ostryj Ukrajinskij 18						
1	60656	65606	66815	42498	43444	43275
2	89191	90629	91903	48058	49460	50825
3	118078	125236	121751	62391	65854	63549
4	62827	58435	63431	27424	26373	28021
5	58119	56294	54522	19531	20951	18612
6	86808	91654	87353	45677	46511	49445
7	90783	79297	76078	37689	39588	38152
8	51607	51175	50157	30787	31312	30807
9	94048	85280	93083	46057	45404	44391
10	73076	72304	68763	33234	34898	32648

Tab. XII.: Plocha chromatografického píku kapsaicinu a dihydrokapsaicinu u analyzovaných vzorků.

Získané hodnoty byly dosazeny do rovnic kalibračních závislostí (graf I a II). Po přepočtu na aktuální navážku (tab. IX a X) byl vypočítán průměrný obsah kapsaicinu a dihydrokapsaicinu v jednotkách mg/kg v suchém stavu (viz tabulka XIII).

	Průměrný obsah kapsaicinu [mg/kg]	Průměrný obsah dihydrokapsaicinu [mg/kg]
Jatsubura Jopper		
1	1312,54	572,06
2	1959,41	861,95
3	1664,58	481,11
4	732,04	255,86
5	1076,65	437,93
6	908,29	390,68
7	1315,10	293,73
8	1089,12	285,79
9	1416,45	452,61
10	854,51	147,30

Ostryj Ukrajinskij 18		
1	1382,17	893,84
2	1934,59	1011,08
3	2617,82	1296,01
4	1321,67	592,88
5	1206,26	447,66
6	1913,48	979,28
7	1750,69	802,13
8	1091,40	660,52
9	1939,45	932,22
10	1531,23	713,06

Tab. XIII.: Vypočítaný obsah kapsaicinu a dihydrokapsaicinu pro jednotlivé vzorky paprik v mg/kg suché hmoty.

Obě odrůdy shodně vykazují velkou biologickou diverzitu. I přes stejné podmínky pěstování jsou rozdíly v obsahu kapsaicinu a dihydrokapsaicinu mezi deseti vzorky (získanými z deseti rostlin) velké. Statisticky není možné mezi sebou tyto vzorky průměrovat, protože by docházelo ke zkreslení výsledku.

Naměřené hodnoty kapsaicinu a dihydrokapsaicinu u odrůdy Jatsubura Jopper byly ve většině případů nižší než u odrůdy Ostryj Ukrajinskij 18. Nejvyšší hodnoty kapsaicinu a dihydrokapsaicinu u odrůdy Jatsubura Jopper byly naměřeny u vzorku z rostliny číslo 2. Naopak nejnižší hodnota kapsaicinu byla naměřena u vzorku z rostliny číslo 4 a nejnižší hodnota dihydrokapsaicinu se nacházela ve vzorku 10. U odrůdy Ostryj Ukrajinskij 18 byl nejvyšší obsah kapsaicinu a dihydrokapsaicinu naměřen ve vzorku z rostliny číslo 3. Nejnižší obsah kapsaicinu byl ve vzorku z rostliny číslo 8 a dihydrokapsaicin se v nejmenším množství nalézal ve vzorku z rostliny číslo 5. Výsledky potvrdily popisy kurátora kolekce a výsledky organoleptického testu, že odrůda Ostryj Ukrajinskij 18 je pálivější než odrůda Jatsubura Jopper.

## 5. Závěr

Řada příkladů z literatury odkazuje na použití kapalinové chromatografie při analýze kapsaicinoidů. Stejná technika byla použita při experimentech.

Experimentální část byla zaměřena na vývoj a aplikaci metody na kvalifikaci a kvantifikaci kapsaicinu a dihydrokapsaicinu ve vzorcích paprik. Zaměřeno bylo především na optimalizaci extrakce. Testováno bylo několik extrakčních postupů v methanolu, přičemž nejlepších výsledků bylo dosaženo při 30 min maceraci a 15 min extrakci v ultrazvukové lázni. Tento extrakční postup byl zopakován s acetonitrilem, přičemž bylo zjištěno, že výtěžnost extrakce s acetonitrilem je vyšší než při použití methanolu. Optimalizována byla rovněž teplota ultrazvukové lázně – nejvyšší výtěžnost byla při teplotě 55 °C. Následně bylo dokázáno, že při experimentu stačí provádět pouze 1. extrakci. Výtěžnost druhé extrakce byla pouze 3,37% pro kapsaicin a 3,17% pro dihydrokapsaicin. Při třetí extrakci byla koncentrace kapsaicinu a dihydrokapsaicinu pod limitem detekce. Vyvinutá metoda byla nakonec aplikována na vzorky dvou odrůd paprik - Jatsubura Jopper a Ostryj Ukrajinskij 18. Od každé odrůdy bylo vypěstováno 10 rostlin. Výsledkem bylo zjištění, že i přes stejné podmínky pěstování jsou rozdíly kapsaicinu a dihydrokapsaicinu u deseti rostlin stejné odrůdy velké – obě odrůdy vykazují velkou biologickou diverzitu.

Výsledky prokázaly, že metoda je vhodná pro pravidelný screening vzorků paprik na obsah kapsaicinu a dihydrokapsaicinu. Tato metoda našla své uplatnění při každoročním popisu genetického fondu paprik ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Olomouci.

## 6. Seznam použité literatury

1. Purseglove J. W., Brown E. G., Green C. L., Robins S. R. J., Spices, 1st edn, Longman Inc., New York, USA, pp. 331, (chillies/capsicum), 1981.
2. Govindarajan V. S., Capsicum-production, technology, chemistry, and quality, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 24 (1986) 245-355.
3. Govindarajan V. S., Capsicum – production, technology, chemistry and quality, Part II. Processed products, standards, world production, and trade. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 23 (1986) 207–288.
4. Pruthi J. S., Quality Assurance in Spices and Spice Products – Modern Methods of Analysis, 1st edn, Allied Publishers Ltd, New Delhi, 1999.
5. Kobata, K., T. Todo, S. Yazawa, K. Iwai & T. Watanabe, Novel capsaicinoid-like substances, capsiate and dihydrocapsiate, from the fruits of a nonpungent cultivar, CH-19 sweet, of pepper (*Capsicum annuum* L.), J. Agric. Food Chem. 46 (1998) 1695–1697.
6. Seungill K., Minkyu P., Seon-In Y., Yong-Min K., Je Min L., Hyun-Ah L., Eunyoung S., Jaeyoung Ch., Kyeongchae Ch., Ki-Tae K., Kyongyong J., Gir-Won L., Sang-Keun O., Chungyun B., Saet-Byul K., Hye-Young L., Shin-Young K., Myung-Shin K., Byoung-Cheorl K., Yeong Deuk J., Hee-Bum Y., Hee-Jin J., Won-Hee K., Jin-Kyung K., Chanseok S., et al., Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species, Nature Genetics 46 (2014) 270-278.
7. Krajewska A. M., Powers J. J., Sensory properties of naturally occurring capsaicinoids, J. Food Sci. 53 (1988) 902–905.
8. Govindarajan V. S., Rajalakshmi D., Chand N., Salzer U. J., Capsicum — Production, technology, chemistry, and quality, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 25 (1987) 185-282.
9. Kurian A. L., Starks A. N.: HPLC Analysis of Capsaicinoids Extracted from Whole Orange Habañero Chili Peppers, J. Food Sci. 67 (2002) 956 – 962.
10. Duelund L., Mouritsen O. G., Contents of capsaicinoids in chillies grown in Denmark, Food Chem. 221 (2017) 913–918.
11. Velíšek J., Hajšlová J., Chemie potravin 2, Rozš. a přeprac. 3. vyd., Tábor: OSSIS, 2009.
12. Scoville W. L., Note on capsicums, Journal of the American Pharmacists Association 1 (1912) 453–454.

13. Todd P. H., Bensinger M. G., Biftu T., Determination of pungency due to capsaicin by gas-liquid chromatography, *J. Food Sci.* 42 (1977) 660–665.
14. Peter K. V., *Handbook of Herbs and Spices 1*, CRC Press, Cornwall, England, 2001.
15. <http://www.chilipeppermadness.com/cooking-with-chili-peppers/the-scoville-scale>, staženo 13. června 2017.
16. <http://www.chilli-willy.com/measuring-chilli-heat/>, staženo 13. června 2017.
17. Reilly C. A., Crouch D. J., Yost G. S., Quantitative analysis of capsaicinoids in fresh peppers, oleoresin capsaicin and pepper spray products, *J. Forensic Sci.* 46 (2001) 502–509.
18. Thiele R., Mueller-Seitz E., Petz M., Chili pepper fruits: presumed precursors of fatty acids characteristic for capsaicinoids, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 4219–4224.
19. Perucka I., Oleszek W., Extraction and determination of capsaicinoids in fruit of hot pepper *Capsicum annuum* L. by spectrometry and high-performance liquid chromatography, *Food Chem.* 71 (2000) 287-291.
20. Stewart C. Jr., Mazourek M., Stellari G. M., O’Connell M., Jahn M., Genetic control of pungency in *C. chinense* via the *Pun1* locus, *J. Exp. Bot.* 58 (2007), 979-991.
21. Bernal M. A., Calderon A. A., Pedreno M. A., Munoz R., Barcelo A. R., de Caceres F. M., Capsaicin oxidation by peroxidase from *Capsicum annuum* (variety *Annuum*) fruits, *J. Agric. Food Chem.* 41 (1993), 1041–1044.
22. Bernal M. A., Calderon A. A., Pedreno M. A., Munoz R., Barcelo A. R., de Caceres F. M., Dihydrocapsaicin Oxidation by *Capsicum annuum* (var. *annuum*) Peroxidase, *J. Food Sci.* 58 (1993) 611- 613.
23. Barbero G. F., de Aguiarb A. C., Carrerac C., Olachea A., Ferreiro-González M., Martínez J., Palma M., Barroso C. G., Evolution of Capsaicinoids in Peter Pepper (*Capsicum annuum* var. *annuum*) During Fruit Ripening, *Chem. Biodiversity* 13 (2016), 1068 – 1075.
24. Contreras-Padilla M., Yahia E. M., Changes in Capsaicinoids during Development, Maturation, and Senescence of Chile Peppers and Relation with Peroxidase Activity, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 2075-2079.
25. Kirschbaum-Titze P., Hiepler C., Mueller-Seitz E., Petz M., Pungency in paprika (*Capsicum annuum*). 1. Decrease of capsaicinoid content following cellular disruption. *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 1260-1263.

26. Zewdie, Y., Bosland, P. W., Evaluation of genotype, environment, and genotype-by-environment interaction for capsaicinoids in *Capsicum annum* L., *Euphytica*, 111 (2000) 185-190.
27. Gibbs H. A. A., O'Garro L. W., Capsaicin content of west Indies hot pepper cultivars using colorimetric and chromatographic techniques, *HortScience* 39 (2004) 132-135.
28. Tahboub M. B., Sanogo S., Bosland P. W., Murray L., Heat level in chile pepper in relation to root and fruit infection by *Phytophthora capsici*, *HortScience* 43 (2008) 1846-1851.
29. Bosland P. W., Breeding for quality in *Capsicum*, *Capsicum and Eggplant Nswl.* 12 (1993) 25–31.
30. Tremblay A., Arguin H., Panahi S., Capsaicinoids: a spicy solution to the management of obesity?, *Int. J. Obes.* 40 (2016), 1198-1204.
31. Hyder K., Is CS the wrong solution?, *New Sci.* 149 (1996) 12-13.
32. FAO, Food Agriculture Organization of the United Nations, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, staženo 17. února 2017.
33. Barbero G. F., Liazid A., Palma M., Barroso C. G., Fast determination of capsaicinoids from peppers by high-performance liquid chromatography using a reversed phase monolithic column, *Food Chem.* 107 (2008) 1276-1282.
34. Jeon G., Lee J., Comparison of Extraction Procedures for the Determination of Capsaicinoids in Peppers, *Food Sci. Biotechnol.* 18 (2009) 1515-1518.
35. Chinn M. S., Sharma-Shivappa R. R., Cotter J. L., Solvent extraction and quantification of capsaicinoids from *Capsicum chinense*. *Food Bioprod. Process.* 89 (2011) 340-345.
36. Peusch M., Müller-Seitz E., Petz M., Müller A., Anklam E., Extraction of capsaicinoids from chillies (*Capsicum frutescens* L.) and paprika (*Capsicum annum* L.) using supercritical fluids and organic solvents, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 204 (1997) 351-355.
37. Barbero G. F., Palma M., Barroso C. G., Pressurized liquid extraction of capsaicinoids from peppers, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 3231-3236.
38. Chanthai S., Juangsamoot J., Ruangviriyachai C, Techawongstien S., Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in Some Chilli Varieties using Accelerated Solvent Extraction Associated with Solid-Phase Extraction Methods and RP-HPLC-Fluorescence. *E.-J. Chem.* 9 (2012) 1550-1561.

39. Juangsamoot J., Ruangviriyachai C., Techawongstien S., Chanthai S., Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in some hot chilli varieties by RP-HPLC-PDA after magnetic stirring extraction and clean up with C18cartridge, *Journal of International Food Research* 19 (2012) 1217-1226.
40. Santamaría R. I., Reyes-Duarte M. D., Bárzana E., Fernando D., Gama F. M., Mota M., López-Munguía A., Selective Enzyme-Mediated Extraction of Capsaicinoids and Carotenoids from Chili Guajillo Puya (*Capsicum annum* L.) Using Ethanol as Solvent, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000), 3063-3067.
41. Barbero G. F., Palma M., Barroso C. G., Determination of capsaicinoids in peppers by microwave-assisted extraction–high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Anal. Chim. Acta* 578 (2006) 227–233.
42. Peña-Alvarez A., Alvarado L. A., Vera-Avila, L. E., Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in hot peppers by ultrasound assisted extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry, *Instrum. Sci. Technol.* 40 (2012) 429-440.
43. Peña-Alvarez A., Ramírez-Maya E., Alvarado-Suárez L. A., Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in peppers and pepper sauces by solid phase microextraction–gas chromatography–mass spektrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2843–2847.
44. Karnka R., Rayanakorn M., Watanesk S., Vaneesorn, Y., Optimization of high-performance liquid chromatographic parameters for the determination of capsaicinoid compounds using the simplex method. *Anal. Sci.* 18 (2002) 661-665.
45. Huie C. W.: A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 23-30.
46. Korel F, Bagdatlioglu N., Balaban M. O., Hişil Y., Ground red peppers: capsaicinoids content, Scoville scores, and discrimination by an electronic nose. *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 3257-3261.
47. Gonzalez-Zamora A., Sierra-Campos E., Perez-Morales R., Vazquez-Vazquez C., Gallegos-Robles M. A., Lopez-Martinez J. D., Garcia-Hernandez J. L., Measurement of Capsaicinoids in Chiltepin Hot Pepper: A Comparison Study between Spectrophotometric Method and High Performance Liquid Chromatography Analysis, *Journal of Chemistry* 2015 (2015), Article ID 709150.
48. Marana O. M., Garcia T. D. B., Diaz T. G., Characterization of Spanish Paprika by Multivariate Analysis of Absorption and Fluorescence Spectra, *Anal. Lett.* 49 (2016) 1184-1197.



49. Samson C. S., Tung-Liang H., Berke T.: Use of near infra-red reflectance to measure capsaicinoids in pepper (*Capsicum* spp.), *Capsicum Eggplant Newsl.* 16 (1997) 156–159.
50. Suzuki T., Kawada T., Iwai K., Effective separation of capsaicin and its analogues by reverse-phase high performance thin layer chromatography, *J. Chromatogr. A* 198 (1980) 217-223.
51. Manaia M. A. N., Diculescu V. C., de Souza Gil E., Oliveira-Brett A. M., Guaiolic spices curcumin and capsaicin electrochemical oxidation behaviour at a glassy carbon electrode, *J. Electroanal. Chem.* 682 (2012) 83–89.
52. Randviir E. P., Metters J. P., Stainton J., Banks C. E., Electrochemical impedance spectroscopy versus cyclic voltammetry for the electroanalytical sensing of capsaicin utilizing screen printed carbon nanotube electrodes, *Analyst* 138 (2013) 2970–2981.
53. Xue Z., Hu C., Rao H., Wang X., Zhou X., Liu X., Lu X., A novel electrochemical sensor for capsaicin based on mesoporous cellular foams, *Anal. Methods*, 7 (2015) 1167–1174.
54. Liu L., Cheng X., Liu J., Deng X., Duan W., Tan S., Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum annuum* and related products by capillary electrophoresis with a mixed surfactant system, *Food Chem.* 119 (2010) 1228–1232.
55. Thomas B. V., Schreiber A. A., Weisskopf C. P., Simple Method for Quantitation of Capsaicinoids in Peppers Using Capillary Gas Chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 2655–2663.
56. Saha S., Walia S., Kundu A., Charanjit Kaur Ch., Sisodia R., Capsaicinoids, Tocopherol, and Sterols Content in Chili (*Capsicum* sp.) by Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Determination, *Int. J. Food Prop.* 18 (2015) 1535-1545.
57. Choi S.-H., Suh B.-S., Kozukue E., Kozukue N., Levin C. E., Friedman M., Analysis of the contents of pungent compounds in fresh Korean red peppers and in pepper-containing foods, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9024–9031.
58. Coutinho J. P., Barbero G. F., Godoy H. T., Palma M., Barroso C. G., Multivariate optimization by statistical methods of ultra high performance liquid chromatography conditions for the separation of 17 capsaicinoids, *Anal. Methods* 8 (2016) 1659-1666.
59. Kuzma M., Fodor K., Boros B., Perjesi P., Development and Validation of an HPLC-DAD Analysis for Pharmacopoeial Qualification of Industrial Capsicum Extracts, *J. Chromatogr. Sci.* 53 (2015) 16-23.

60. Barbero G. F., Liazid A., Ferreiro-Gonzalez M., Palma M., Barroso C. G., Fast Separation of Capsaicinoids from Peppers by Reversed Phase Ultra-Performance Liquid Chromatography: Comparison with Traditional High-Performance Liquid Chromatography Methods, *Int. J. Food Prop.* 19 (2016) 984-992.
61. Kuzma M., Fodor K., Maasz G., Avar P., Mozsik G., Past T., Fischer E., Perjesi P., A validated HPLC-FLD method for analysis of intestinal absorption and metabolism of capsaicin and dihydrocapsaicin in the rat, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 103 (2015) 59-66.
62. Ha J., Seo H. Y., Shim Y. S., Seo D. W., Seog H., Ito M., Nakagawa H., Determination of Capsaicinoids in Foods Using Ultra High Performance Liquid Chromatography, *Food Sci. Biotechnol.* 19 (2010) 1005-1009.
63. Nagy Z., Daood H., Ambrozy Z., Helyes L., Determination of Polyphenols, Capsaicinoids, and Vitamin C in New Hybrids of Chili Peppers: *J. Anal. Methods Chem.* (2015), Article ID: 102125.
64. Schweiggert U., Carle R., Schieber, A. Characterization of major and minor capsaicinoids and related compounds in chili pods (*Capsicum frutescens* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 557 (2006) 236–244.
65. Garcés-Claver A., Arnedo-Andrés M. S., Abadía J., Gil-Ortega R., Álvarez-Fernández A., Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in *Capsicum* Fruits by Liquid Chromatography–Electrospray/Time-of-Flight Mass Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9303–9311.
66. Kozukue N., Han J. S., Kozukue E., Lee S. J., Kim J. A., Lee K. R., Levin C. E., Friedman M., Analysis of eight capsaicinoids in peppers and pepper-containing foods by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 9172-9181.
67. Zhang Q., Hu J., Li Sheng L., Li Y., Simultaneous quantification of capsaicin and dihydrocapsaicin in rat plasma using HPLC coupled with tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* (2010) 2292–2297.
68. Reilly C. A., Crouch D. J., Yost G. S., Fatah A. A., Determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, and nonivamide in self-defense weapons by liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 912 (2001) 259 – 267.

69. Thompson R. Q., Phinney K. W., Welch M. J., White V E., Quantitative determination of capsaicinoids by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 1441–1451.
70. Sganzerla M., Coutinho J. P., de Melo A. M. T., Godoy H. T., Fast method for capsaicinoids analysis from *Capsicum chinense* fruits, *Food Res. Int.* 64 (2014) 718–725.
71. de Wasch K., de Brabander H. F., Impens S., Okerman L., Kamel C. H.: Detection of the major components of *capsicum* oleoresin and zigerone by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, v knize: Pfannhauser W., Fenwick G. R., Khokhar S. (Eds.), *Biologically-Active Phytochemicals in Food – Analysis, Metabolism, Bioavailability and Function*, Royal Society of Chemistry, Cambridge 2001, str.: 134–139.
72. Supalkova V., Stavelikova H., Krizkova S., Adam V., Horna A., Havel L., Ryant P., Babula P., Kizek R., Study of Capsaicin Content in Various Parts of Pepper Fruit by Liquid Chromatography with Electrochemical Detection, *Acta. Chim. Slov.* 54 (2007) 55-59.