

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra analytické chemie

**Vývoj a validace metody pro stanovení obsahu
antokyanů v kultivarech černého rybízu**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Barbora Šmídová

Hradec Králové 2016

Michaela Bobříková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu diplomové práce Doc. RNDr. Daliborovi Šatínskému, Ph.D. a Mgr. Barboře Šmídové za odborné vedení, připomínky, trpělivost a čas, který věnovali při vzniku této práce. Dále bych ráda poděkovala celé katedře analytické chemie za poskytnutí vhodných podmínek pro provedení experimentální části práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Michaela Bobříková

Školitel: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Barbora Šmídová

Název diplomové práce: **Vývoj a validace HPLC metody pro stanovení obsahu antokyanů v kultivarech černého rybízu.**

V této práci byla vyvinuta HPLC-DAD metoda pro současné stanovení delphinidin-3-glukosidu, delphinidin-3-rutinosidu, cyanidin-3-glukosidu a cyanidin-3-rutinosidu v kultivarech černého rybízu a v rybízových džusech. Analýza probíhala za podmínek gradientové eluce za použití methanolu a 2 % kyseliny mravenčí. Jako stacionární fáze byla použita kolona Supelco Analytical, Ascentis Express C18 2,7 μm , 15 cm x 4,6 mm. Analýza probíhala při teplotě 50°C a průtoku 0,8 ml/min. Pro detekci byla zvolena vlnová délka 520 nm.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical chemistry

Candidate: Michaela Bobříková

Supervisor: doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Consultant: Mgr. Barbora Šmídová

Title of diploma thesis: **HPLC method development and validation for analysis of anthocyanins content in black currant cultivars.**

A high performance liquid chromatography method with diode array detection was used and validated to determine delphinidin-3-glucoside, delphinidin-3-rutinoside, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside in black currant cultivars and black currant juices. The method used gradient elution with methanol and 2 % formic acid. Supelco Analytical, Ascentis Express C18 column with particle size 2.7 μm , 15 cm x 4.6 mm was used for separation. The analysis was performed using a temperature 50°C and a flow rate 0.8 ml/min. For detection, the wavelength of 520 nm was chosen.

OBSAH

1	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	7
2	CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE.....	9
3	ÚVOD.....	10
4	TEORETICKÁ ČÁST.....	11
4.1	Antokyany	11
4.1.1	Delphinidin-3-glukosid.....	13
4.1.2	Delphinidin-3-rutinosid	14
4.1.3	Cyanidin-3-glukosid	14
4.1.4	Cyanidin-3-rutinosid.....	15
4.1.5	Metody stanovení antokyanů.....	16
4.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	19
4.2.1	Popis HPLC aparatury	19
4.2.2	Charakteristika chromatografického procesu	20
4.2.3	Základní veličiny charakterizující chromatografický proces	21
4.2.4	Validace chromatografické metody.....	22
4.2.4.1	Validační parametry.....	22
4.2.4.2	Test vhodnosti chromatografického systému	23
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
5.1	Použité přístroje, chemikálie a pomůcky	24
5.1.1	Přístroje.....	24
5.1.2	Pomůcky	24
5.1.3	Chemikálie.....	24
5.2	Podmínky separace.....	25
5.3	Použitý materiál, jeho uchování	25
5.3.1	Standardy	25
5.3.2	Plody černého rybízu	26

5.3.3	Rybízové džusy	26
5.4	Příprava roztoků, úprava materiálu – validace metody.....	26
5.4.1	Příprava roztoků standardů.....	26
5.4.2	Příprava roztoků pro kalibraci	26
5.4.3	Přesnost.....	27
5.4.4	Správnost	28
5.5	Příprava roztoků, úprava materiálu – stanovení obsahu antokyanů.....	28
5.5.1	Plody černého rybízu	28
5.5.2	Rybízové džusy	29
6	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	30
6.1	Optimalizace metody	30
6.1.1	Volba vlnové délky.....	30
6.1.1.1	Absorpční spektrum delphinidin-3-glukosidu	31
6.1.1.2	Absorpční spektrum delphinidin-3-rutinosidu.....	31
6.1.1.3	Absorpční spektrum cyanidin-3-glukosidu.....	32
6.1.1.4	Absorpční spektrum cyanidin-3-rutinosidu	32
6.1.2	Volba kolony	33
6.1.3	Volba mobilní fáze a teploty	33
6.1.3.1	Mobilní fáze methanol – kyselina mravenčí 2%, 35°C	34
6.1.3.2	Mobilní fáze acetonitril – kyselina mravenčí 2%, 35°C.....	34
6.1.3.3	Mobilní fáze acetonitril – kyselina mravenčí 2%, 50°C.....	35
6.1.3.4	Mobilní fáze methanol – kyselina mravenčí 2%, 50°C	35
6.1.4	Identifikace jednotlivých antokyanů	36
6.1.5	Optimální podmínky pro HPLC analýzu antokyanů	37
6.1.6	Volba vnitřního standardu	38
6.2	Validace analytické metody	41
6.2.1	Test vhodnosti chromatografického systému	41

6.2.1.1	Rozlišení chromatografických píků	41
6.2.1.2	Asymetrie píků – Tailing F.....	41
6.2.1.3	Kapacitní faktor	42
6.2.2	Linearita.....	42
6.2.2.1	Kalibrační závislost pro delphinidin-3-glukosid	42
6.2.2.2	Kalibrační závislost pro delphinidin-3-rutinosid	43
6.2.2.3	Kalibrační závislost pro cyanidin-3-glukosid	44
6.2.2.4	Kalibrační závislost pro cyanidin-3-rutinosid	45
6.2.3	Opakovatelnost	46
6.2.4	Přesnost.....	48
6.2.5	Správnost	49
6.2.5.1	Výtěžnost analytické metody.....	49
6.3	Stanovení obsahu antokyanů.....	51
6.3.1	Stanovení obsahu antokyanů v plodech černého rybízu.....	51
6.3.1.1	'RUBEN'	51
6.3.1.2	'BEN LOMOND'	52
6.3.1.3	'BEN CONNAN'.....	53
6.3.1.4	'CERES'	53
6.3.1.5	'MORAVIA'	54
6.3.1.6	'OMETA'	55
6.3.1.7	'LOTA'	55
6.3.1.8	'TENAH'	56
6.3.1.9	'SEJANEC'	57
6.3.1.10	'FOKUS'	57
6.3.1.11	'CONSORT'	58
6.3.2	Stanovení obsahu antokyanů v rybízových džusech	59
6.3.2.1	HAPPY DAY.....	59

6.3.2.2	GRANINI	60
6.3.2.3	RIO	60
6.3.2.4	CAPPY	61
6.3.2.5	TESCO.....	62
6.3.2.6	HOLLINGER	62
7	ZÁVĚR.....	64
8	SEZNAM OBRÁZKŮ	66
9	SEZNAM TABULEK	68
10	LITERATURA	70

1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

cya-3-glu	–	cyanidin-3-glukosid
cya-3-rut	–	cyanidin-3-rutinosid
DAD	–	diode array detector
del-3-glu	–	delphinidin-3-glukosid
del-3-rut	–	delphinidin-3-rutinosid
ESI	–	ionizace elektrosprejem
GLP-1	–	glukagon-like peptid 1
HCl	–	kyselina chlorovodíková
HCOOH	–	kyselina mravenčí
HPLC	–	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
k'	–	kapacitní faktor
LDL	–	nízkodenzitní lipoprotein
MeOH	–	methanol
MF	–	mobilní fáze
min	–	minuta
MS	–	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	–	tandemová hmotnostní spektrometrie
OMe	–	methoxy skupina
R	–	rozlišení chromatografických píků
R _e	–	výtěžnost metody
RSD	–	relativní směrodatná odchylka
R _t	–	retenční čas
SD	–	směrodatná odchylka
St 1	–	Myrtillin chlorid (standard)
St 2	–	Delphinidin-3-rutinosid chlorid (standard)
St 3	–	Kuromanin chlorid (standard)

- St 4 – Keracyanin chlorid (standard)
- T – asymetrie chromatografických píků

2 CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo vyvinout, optimalizovat a validovat HPLC metodu pro stanovení delphinidin-3-glukosidu, delphinidin-3-rutinosidu, cyanidin-3-glukosidu a cyanidin-3-rutinosidu. Další cíl spočíval ve využití vyvinuté separační metody pro stanovení obsahu těchto čtyř látek v kultivarech černého rybízu. Cílem bylo také aplikovat tuto metodu při stanovení vybraných antokyanů v rybízových džusech.

3 ÚVOD

Antokyany jsou rostlinné pigmenty patřící do velké skupiny látek nazývaných flavonoidy nebo také bioflavonoidy. Tato početná skupina sekundárních metabolitů se tvoří v rostlinách a vyskytuje se proto v mnoha druzích ovoce i zeleniny, ale tyto metabolity lze také najít například v medu, obilovinách a nápojích, jako je např. červené víno. Ze všech flavonoidů se právě antokyany dají nejlépe vizuálně rozpoznat, patří mezi nejdůležitější rostlinné pigmenty. Tyto pigmenty jsou odpovědné za modré, fialové, červené, růžové nebo oranžové zbarvení plodů, květů či listů mnoha cévnatých rostlin. Antokyany díky své zdravotní nezávadnosti, mnoha pozitivním účinkům na lidský organismus a dobré rozpustnosti ve vodě tvoří velmi zajímavou skupinu ve vodě rozpustných přírodních pigmentů.

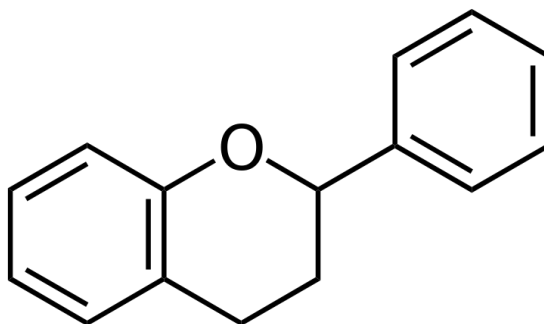
Vysokoučinná kapalinová chromatografie představuje v dnešní době nejčastěji používanou metodou ke stanovení antokyanů. V teoretické části práce jsou uvedeny metody stanovení antokyanů pomocí HPLC.

V této práci je popsána HPLC metoda, která byla vyvinuta pro současné stanovení delphinidin-3-glukosidu, delphinidin-3-rutinosidu, cyanidin-3-glukosidu a cyanidin-3-rutinosidu. Celý proces optimalizace a validace metody popisuje experimentální část práce. Vyvinutá metoda byla pak použita ke stanovení obsahu jednotlivých antokyanů v plodech černého rybízu u kultivarů: 'Ruben', 'Moravia', 'Ometa', 'Lota', 'Ceres', 'Consort', 'Ben Connan', 'Ben Lomond', 'Sejanec', 'Tenah', 'Fokus'. Daná metoda byla dále využita i ke stanovení obsahu těchto antokyanů v rybízových džusech dostupných na trhu v ČR.

4 TEORETICKÁ ČÁST

4.1 Antokyany

Antokyany jsou rostlinné pigmenty patřící do velké skupiny látek nazývaných flavonoidy nebo také bioflavonoidy. Chemicky se jedná o polyfenoly. Tato početná skupina sekundárních metabolitů se tvoří v rostlinách a vyskytuje se proto v mnoha druzích ovoce, zeleniny, ale tyto metabolity lze také najít například v medu, obilovinách a nápojích, jako je červené víno [2]. Flavonoidy jsou syntetizovány z phenylalaninu, tyrosinu a malonátu. Základní skelet všech flavonoidů se nazývá flavan (2-fenylchroman). Tato struktura je dle specifík konkrétního rostlinného organismu dále chemicky obměňována za vzniku antokyanů, flavanolů, flavanonů, isoflavonů a mnoha dalších skupin [3].

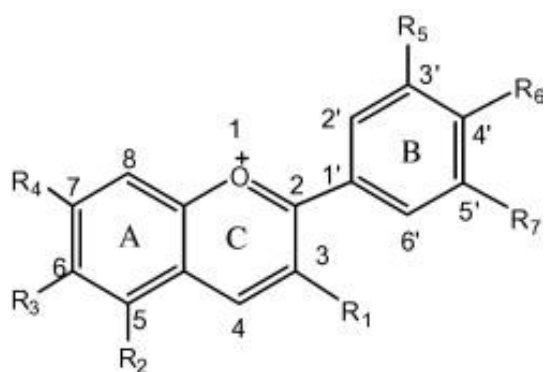


Obrázek 1 – Vzorec flavanu [9]

Tyto látky, syntetizované v rostlinách dle jejich specifického sekundárního metabolismu, mají různé biologické funkce. Jednak díky výraznému zbarvení či vůni mohou působit jako atraktanty pro některá zvířata, zejména hmyz, savce a ptactvo, což napomáhá procesu opylení. Dále poskytují rostlinám ochranu před škodlivými účinky UV-záření tím, že mají schopnost ho absorbovat [4]. Adstringentní účinky některých flavanolů zajišťují rostlinám ochranu před škodlivým hmyzem. Neméně důležitou vlastnost flavonoidů představuje jejich schopnost vychytávat reaktivní formy kyslíku a chránit tím rostlinné organismy před oxidativním stresem [3]. Některé flavonoidy mohou ovlivňovat symbiózu mezi rostlinami a bakteriemi se schopností diazotrofie (vazba vzdušného dusíku) [5]. Flavonoidy nemají význam jen pro rostliny, ale ovlivňují i lidský organismus. Proto je o ně stále větší zájem kvůli účinkům

protizánětlivým, antioxidačním, hepatoprotektivním a antikancerogenním. Dále se uvádí, že se tyto látky pozitivně uplatňují v prevenci kardiovaskulárních onemocnění. Některým zástupcům z této skupiny je připisován i účinek antivirotický [6].

Ze všech flavonoidů se dají právě antokyany vizuálně nejlépe rozpoznat, patří mezi nejdůležitější rostlinné pigmenty [2]. V dnešní době je známo více než 635 různých antokyanů [7]. Tyto pigmenty vytvářejí modré, fialové, červené, růžové nebo oranžové zbarvení plodů, květů či listů mnoha cévnatých rostlin. Základní strukturu antokyanů tvoří necukerné části nazývané aglykony neboli antokyanidiny. Po navázání cukerné části glykosidickou vazbou se už hovoří o antokyanech [1]. Aglykony ve své molekule obsahují chromofory skládající se z osmi dvojných vazeb, které při nižších hodnotách pH mají kladný náboj. Tato struktura pigmentům propůjčuje intenzivní zbarvení, čehož se s výhodou využívá při jejich detekci. Ve viditelné oblasti dosahují antokyany maxima absorpce mezi 465 a 550 nm. Dále se této jejich vlastnosti využívá v potravinářském průmyslu, protože antokyany jsou na rozdíl od umělých barviv bezpečné pro lidský organismus. V poslední době je kladen velký důraz právě na neškodnost používaných barviv, takže se od syntetických látek pomalu upouští a nahrazují se přírodními barvivy [7]. Antokyany tedy díky své zdravotní nezávadnosti, pozitivním účinkům na lidský organismus, antioxidačním vlastnostem a dobré rozpustnosti ve vodě tvoří velmi zajímavou skupinu ve vodě rozpustných přírodních pigmentů. Těchto přínosů by se dalo využít nejen v potravinářském, ale i farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Na druhou stranu je použití antokyanů limitováno jejich vysokou nestabilitou, jež závisí na mnoha faktorech, například na hodnotě pH (při hodnotách > 7 dochází k degradaci antokyanů), na intenzitě světla, chemické struktuře, teplotě uchovávání, přítomnosti kyslíku, přítomnosti enzymů, proteinů, kovů (tvorba komplexů), povaze použitého rozpouštědla [1].



Obrázek 2 – Obecný vzorec antokyanidinů [1]

$R^1=H, OH; R^2=H, OH, OMe; R^3=H, OH; R^4=OH, OMe; R^5=H, OH, OMe; R^6=OH$

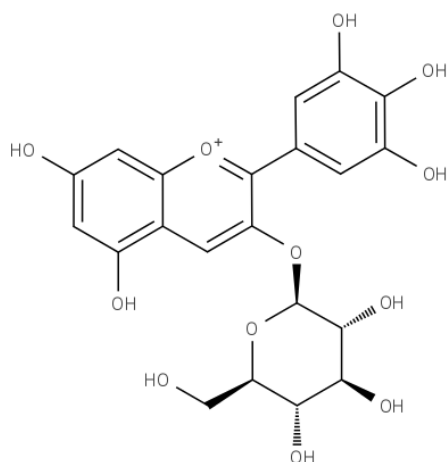
V plodech černého rybízu se nacházejí čtyři majoritní antokyany: delphinidin-3-glukosid, delphinidin-3-rutinosid, cyanidin-3-glukosid a cyanidin-3-rutinosid [30].

4.1.1 Delphinidin-3-glukosid

Sumární vzorec: $C_{21}H_{21}O_{12}^+$

Molární hmotnost: 465,38 g/mol [11]

Delphinidin-3-glukosid patří mezi nejznámější antokyany a v přírodě má široké zastoupení. Stejně jako další antokyany vykazuje mnoho pozitivních účinků na lidský organismus [1]. Nedávné studie například prokázaly snížení škodlivého účinku oxidované formy LDL na vaskulární endoteliální buňky díky potlačení oxidativního stresu, mitochondriální dysfunkce a apoptózy (in vitro studie) [39].



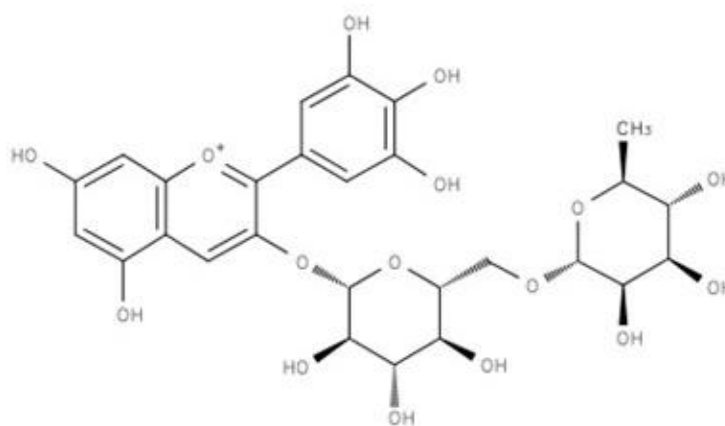
Obrázek 3 – Vzorec delphinidin-3-glukosidu [12]

4.1.2 Delphinidin-3-rutinosid

Sumární vzorec: $C_{27}H_{31}O_{16}^+$

Molární hmotnost: 611,53 g/mol [15]

Delphinidin-3-rutinosid je dalším významným bioflavonoidem. Tato látka má mimo jiné i antidiabetický potenciál. Bylo prokázáno, že delphinidin-3-rutinosid stimuluje sekreci GLP-1, a tak by mohl výrazně přispívat k prevenci a léčbě diabetu [42].



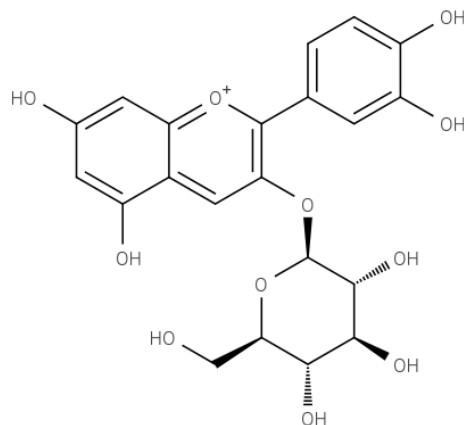
Obrázek 4 – Vzorec delphinidin-3-rutinosidu [15]

4.1.3 Cyanidin-3-glukosid

Sumární vzorec: $C_{21}H_{21}O_{11}^+$

Molární hmotnost: 449,38 [13]

Cyanidin-3-glukosid také patří mezi hojně rozšířené antokyany, lze ho nalézt například v jahodách nebo černém rybízu. Tato látka je zajímavá například tím, že napomáhá regeneraci rhodopsinu. Stejný účinek byl prokázán i u cyanidin-3-rutinosidu. U 3-O-glykosyl derivátů delphinidinu tento účinek prokázán nebyl [41].



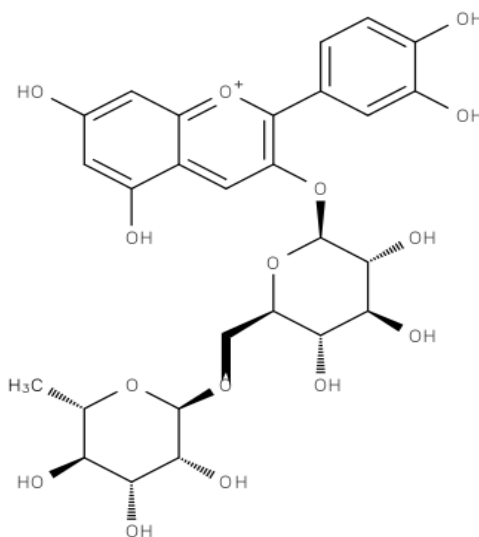
Obrázek 5 – Vzorec cyanidin-3-glukosidu [13]

4.1.4 Cyanidin-3-rutinosid

Sumární vzorec: $C_{27}H_{31}O_{15}^+$

Molární hmotnost: 595,53 g/mol [14]

Cyanidin-3-rutinosid je díky svým vlastnostem a biologickým účinkům také často zkoumanou látkou. Bylo například prokázáno, že tento v přírodě se vyskytující antioxidant má destrukční účinky na leukemické buňky bez toho, aby poškozoval buňky zdravé [40].



Obrázek 6 – Vzorec cyanidin-3-rutinosidu [14]

4.1.5 Metody stanovení antokyanů

V této části práce je uveden přehled některých doposud provedených stanovení antokyanů.

A) HPLC-DAD

testovaný materiál: plody černého rybízu

kolona: Hypersil ODS 60 mm x 4.6 mm, 3 μm, výrobce: Agilent

MF: roztok 1: 5% HCOOH ve vodě, roztok 2: acetonitril

hodnocené antokyany: cya-3-glu, cya-3-rut, del-3-glu, del-3-rut [33]

B) HPLC-DAD

testovaný materiál: více druhů ovoce a zeleniny, zpracované plody (nápoje, džemy)

kolona: LiChroCART Purospher RP-18e 125 x 3 mm, 5 μm, výrobce: Merck; 4 × 4 mm HP 1100 series HPLC, výrobce: Waldbronn

MF: roztok 1: 8.5% HCOOH ve vodě, roztok 2: acetonitril:MeOH (85:15), 2 programy gradientové eluce

hodnocené látky: deriváty pelargonidinu, peonidinu, cyanidinu, delphinidinu, malvidinu, petunidinu [35]

C) HPLC-DAD

testovaný materiál: více druhů zeleniny, ovoce, komerčně zpracované plody (džusy, víno)

kolona: Inertsil ODS-3 C18 150 x 4,6mm, 3 μm, GL Sciences

MF: roztok 1: voda:acetonitril:HCOOH (85:10:5), roztok 2: voda:acetonitril:HCOOH (35:10:55); pH obou roztoků bylo upraveno pomocí HCl na hodnotu 2

hodnocené látky: pelargonidin-3-glukosid, cya-3-glu, peonidin-3-glukosid, del-3-glu, petunidin-3-glukosid, malvinidin-3-glukosid [36].

D) HPLC-DAD-ESI-MS/MS

testovaný materiál: zelenina, ořechy, obilniny

kolona: Zorbax Stablebond Analytical SB-C18 column 250 x 4,6mm, 5 μm, výrobce: Agilent

MF: roztok 1: 5% HCOOH ve vodě, roztok 2: MeOH

Byla analyzována široká škála sloučenin, včetně antokyanů, aromatických kyselin, monosacharidů, disacharidů apod. [34.]

E) HPLC-DAD

testovaný materiál: jahody

kolona: C18 250 x 4.6 mm, 4.0 μm, výrobce: Phenomenex

MF: roztok 1: voda, roztok 2: methanol; obě složky okyselené (0,0037 % HCl)

Testované látky: cya-3,5-diglukosid, cya-3-glu, malvinidin-3-glu, pelargonidin-3-glukosid, delphinidin, cyanidin, pelargonidin, malvinidin [37].

F) HPLC-MS

testovaný materiál: plody červeného vína

kolona: Nova-Pak C18 250 x 4.6 mm, 5 μm, Nova-Pak C18 20 x 3.9 mm, výrobce: Waters

MF: roztok 1: voda:acetonitril (95:5), roztok 2: voda:acetonitril (50:50), obě složky mobilní fáze upraveny pomocí kyseliny trifluoroctové na pH 1.3

Celkem bylo hodnoceno 14 antokyanů [31]

G) HPLC-DAD

testovaný materiál: jahody, černý rybíz

kolona 1 : Zorbax Eclipse XDB-C18 250 mm x 4,6 mm, 5 μm; XDB-C18 12,5 mm x 4,6 mm

MF 1: roztok 1: 2% kyselina octová ve vodě, roztok 2: 2% trifluoroctová kyselina v methanolu

kolona 2: Alltech Allsphere ODS-1 250 mm x 4,6 mm, 5 μm; Alltech, Allsphere ODS-1 7,5 mm x 4,6 mm

MF 2: roztok 1: 1% kyselina fosforečná s 10% kyselinou octovou ve vodě, roztok 2: acetonitril

Každá kolona byla testována s oběma mobilními fázemi

testované antokyaniny: čtyři majoritně obsažené v černém rybízu, v jahodách pak: cya-3-glu, pelargonidin-3-glukosid, deriváty pelargonidinu [30].

H) HPLC-UV-MS

testovaný materiál: borůvky

kolona: XTerra MS C18 150 x 3 mm, 5 μm

MF: roztok 1: 5% HCOOH ve vodě, roztok 2: MeOH

Celkem bylo stanoveno 13 antokyanů a 7 volných fenolických látek [32].

CH) HPLC-DAD

testovaný materiál: plody černého rybízu

kolona: Alltech Allosphere ODS-1 250 x 4.6 mm, 5 μm, Alltech Allsphere ODS-1 7,5 mm × 4,6 mm, výrobce: Alltech

MF: roztok 1: 2.5% acetonitril a 5% HCOOH ve vodě, roztok 2: acetonitril

hodnocené antokyany: cya-3-glu, cya-3-rut, del-3-glu, del-3-rut [38].

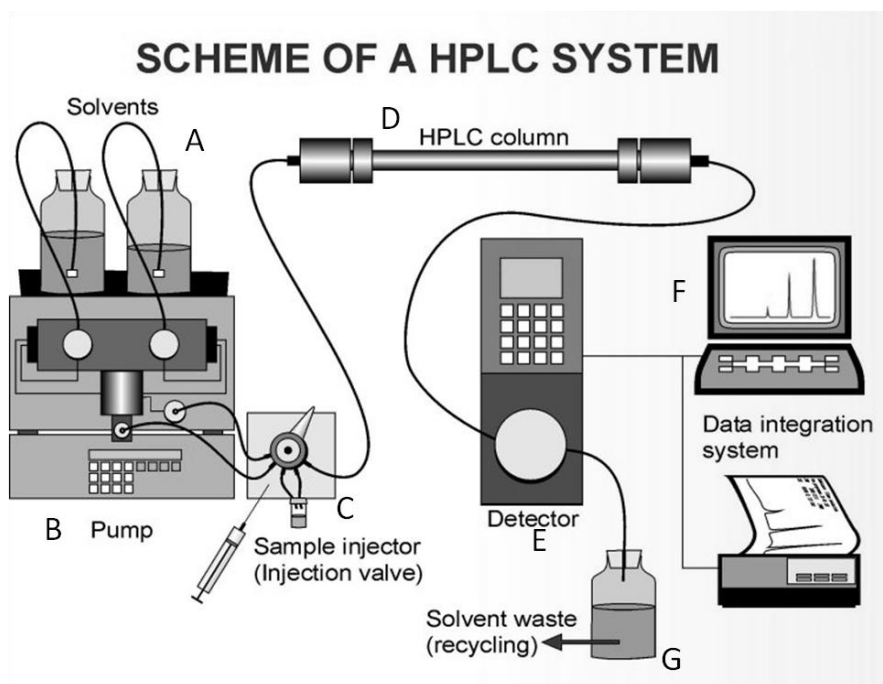
4.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie neboli HPLC (High Performance Liquid Chromatography) je široce využívaná analytická metoda, která slouží k separaci jednotlivých komponent směsi s možností stanovení jejich množství nebo jen k určení přítomnosti analytu ve vzorku. Jedná se tedy o metodu kvantitativní i kvalitativní. Oproti ostatním separačním metodám má HPLC mnoho výhod: dostatečná přesnost metody (používané detektory mají vysokou citlivost), velký rozsah použitelnosti (lze aplikovat na široké spektrum různých látek). Díky neustále vzrůstajícímu počtu používaných materiálů a dostupnosti přístrojového vybavení je dnes vysokoúčinná kapalinová chromatografie nejvíce používanou separační metodou [16]. Značné výhody představují minimální spotřeba vzorku, rychlost a automatizace analýzy. Na rozdíl od sloupcové kapalinové chromatografie se u HPLC používají kolony s velmi malými částicemi, jež kladou procházející mobilní fázi velký odpor, proto je nutné analýzu provádět za vysokého tlaku. Tím je zajištěna účinná a rychlá separace jednotlivých složek směsi [8] [17].

V chromatografii s normálními fázemi se používají méně polární rozpouštědla a stacionární fáze jsou polární více, například oxid křemičitý. K většině HPLC analýz se ale využívá chromatografie s obrácenými fázemi, v níž se uplatňují různé druhy chemicky modifikovaných stacionárních fází (například modifikované fáze s C-18 řetězci). Mobilní fází v tomto případě bývá polárnější rozpouštědlo [10].

4.2.1 Popis HPLC aparatury

Chromatograf se skládá z několika na sebe navazujících částí, které jsou popsány na obrázku 7. Mobilní fáze je po odvodušnění [18] čerpána ze zásobníku do čerpadla. Pokud se jedná o gradientovou eluci, aparatura obsahuje zásobníky s více kapalinami a tzv. směšovací zařízení, jež určuje výsledné složení mobilní fáze. Z čerpadla protéká mobilní fáze do dávkovacího zařízení umístěného před vstupem do kolony. Je ovládáno buď ručně, nebo automaticky. Preferuje se použití autosamplerů, a to zejména díky menší náročnosti, vyšší přesnosti a automatizaci metody. Po výstupu z kolony jsou jednotlivé separované složky vzorku přiváděny do detektoru [8]. V dnešní době se používá velké množství detektorů, například detektory fluorescenční, refraktometrické, spektrofotometrické, hmotnostní, chemiluminiscenční, elektrochemické apod. [16]. Informace získané detektorem jsou přiváděny do vyhodnocovacího zařízení a to je zpracuje (například počítač) [19].



Obrázek 7 – Schéma HPLC systému [20]

A – zásobníky mobilní fáze, B – vysokotlaké čerpadlo, C – dávkovací zařízení,

D – kolona, E – detektor, F – vyhodnocovací zařízení, G – odpad

4.2.2 Charakteristika chromatografického procesu

Chromatografický proces je založen na rozdílné distribuci dělených látek ve směsi mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze: nepohyblivou (stacionární) a pohyblivou (mobilní) fází. V HPLC představuje mobilní fázi kapalina, která je přiváděna do chromatografického systému pomocí čerpadla za vysokého tlaku. Stacionární fází bývá tuhá látka, případně kapalina ukotvena na tuhém nosiči. Při dělení jednotlivých komponent směsi dochází k opakovanému ustalování rovnováhy dělených látek mezi stacionární a mobilní fází. Distribuci složek mezi tyto dvě fáze lze popsat distribuční konstantou [43].

Pokud je eluce provedena mobilní fází o neměnném složení, jedná se o eluci isokratickou. Při eluci gradientové se složení mobilní fáze programově mění ve prospěch silnější eluční složky. Tento typ eluce je vhodný pro separaci složek směsi, které mají odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti a isokratická eluce by byla nevhodná z hlediska velké časové náročnosti [43].

4.2.3 Základní veličiny charakterizující chromatografický proces

A) Retenční čas

Eluční (retenční) čas t_R je doba, která uplyne od nástřiku vzorku na kolonu do dosažení maxima chromatografického píku [21]. Jedná se tedy o kvalitativní vyhodnocení nejčastěji sloužící k důkazu totožnosti látek [19].

B) Retenční objem

Eluční (retenční) objem V_R je objem mobilní fáze, jenž proteče kolonou od nástřiku vzorku na kolonu do dosažení maxima chromatografického píku [21].

C) Kapacitní faktor

Kapacitní faktor (též kapacitní poměr) udává poměr látkového množství rozpuštěné látky ve stacionární fázi k jejímu látkovému množství v mobilní fázi. Kapacitní faktor určuje míru zadržování solutu v koloně. Se zvyšujícím se kapacitním faktorem tedy stoupá i afinita látky ke stacionární fázi [22].

$$k' = \frac{(nA) s}{(nA) m}$$

Obrázek 8 – Vzorec pro kapacitní faktor [22]

k' – kapacitní faktor, $(nA) s$ – látkové množství rozpuštěné látky ve fázi stacionární,
 $(nA) m$ – látkové množství rozpuštěné látky ve fázi mobilní

Při gradientové eluci je měněno složení mobilní fáze a eluční síla v průběhu separace roste. Výše uvedený vzorec pro výpočet není v tomto případě vhodný, protože retenční faktor pro všechny složky směsi postupně s časem klesá [43]. Pro výpočet kapacitního faktoru při gradientové eluci platí:

$$k' = \frac{1}{2,3 b}$$

Obrázek 9 – Vzorec pro kapacitní faktor při eluci gradientové [43]

k' – kapacitní poměr, b – strmota gradientu

D) Distribuční konstanta

Distribuční (rozdělovací) konstanta K_D udává poměr rovnovážných koncentrací solutu ve fázi stacionární a fázi mobilní. Při separačním procesu dochází k neustálému vytváření rovnovážných stavů separovaných látek mezi dvěma fázemi [23].

$$K_D = \frac{[A]_s}{[A]_m} = \frac{(n_A)_s}{(n_A)_m} \times \frac{V_m}{V_s}$$

Obrázek 10 – Vzorec pro distribuční konstantu [23]

K_D – distribuční konstanta, $(n_A)_s$ – látkové množství složky A ve fázi stacionární,

$(n_A)_m$ – látkové množství složky A ve fázi mobilní, V_s – objem fáze stacionární,

V_m – objem fáze mobilní [23]

4.2.4 Validace chromatografické metody

Validace dané metody je proces, který má prokázat, zda je vypracovaná metoda vhodná pro požadovanou analýzu. Při tomto procesu se zjišťují základní charakteristiky metody. Hlavním záměrem validace je stanovit přesné podmínky, za nichž je analýza proveditelná, a zajistit stejnou spolehlivost metody při jejím opakovaném použití [19].

4.2.4.1 *Validační parametry*

A) Přesnost (precision)

Přesnost analytické metody udává míru těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky zkoušek za předem určených podmínek. Přesnost se vyjadřuje jako směrodatná odchylka či relativní směrodatná odchylka získaných výsledků [24].

B) Správnost (accuracy)

Správnost analytické metody udává těsnost shody získané hodnoty s přijatou referenční hodnotou [25]. Správnost se vyjadřuje obvykle jako výtěžnost (recovery) [19].

$$\text{Výtěžnost [\%]} = \frac{\text{nalezená hodnota}}{\text{správná hodnota}} \times 100$$

Obrázek 11 – Vzorec výtěžnosti [19]

C) Opakovatelnost (repeatability)

Opakovatelnost analytické metody udává těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek opakovaně získaných měření s jedním homogenním vzorkem [26] [19].

D) Linearita (linearity)

Linearita vyjadřuje přímkovou závislost mezi odezvou přístroje a koncentrací hodnoceného analytu. Těsnost této lineární závislosti stanoví korelační koeficient [27].

4.2.4.2 *Test vhodnosti chromatografického systému*

Test vhodnosti chromatografického systému určuje požadavky, jež musí být splněny. Provádějí se za účelem zajištění přiměřené účinnosti analytické metody [19].

A) Rozlišení chromatografických píků

Rozlišení (resolution) R udává míru kvality separace dvou sousedních, po sobě eluovaných, látek. Se vzrůstající hodnotou R se kvalita separace dvou sousedních eluátů zvyšuje [28]. Při volbě vhodných separačních podmínek jde o dosažení právě potřebného rozlišení, většinou $R > 1,5$, kdy dochází k 0,1 % překryvu dvou separujících se píků [43].

B) Asymetrie chromatografických píků

Asymetrii chromatografického píku lze vyjádřit jako T (tailing faktor) nebo jako faktor asymetrie A_S . Asymetrie je nežádoucí a souvisí s účinností kolony [29]. Pokud se A_S rovná 1, pak je pík symetrický. Čelní asymetrii píku („frontování“) lze pozorovat, když $A_S < 1,0$. Pokud je tato hodnota naopak větší než 1, dochází ke chvostování píku [10].

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité přístroje, chemikálie a pomůcky

5.1.1 Přístroje

Kolona: Supelco Analytical, Ascentis Express C18 2,7 μm , 15 cm x 4,6 mm

Chromatografická sestava: Shimadzu LC – 10

Pumpy: LC – 10 AC VP

Degasser: DGU – 14 A

Autosampler: SIL – HTA

Termostat: CTO – 10 AC VP

Detektor: DAD, SPD – M10A VP

Chromatografický software: LC Solution

Ultrazvuková lázeň: Tescon 1, Tesla, ČR

Analytické váhy: Sartorius Genius, SRN

5.1.2 Pomůcky

Kuchyňský tyčový mixér

PTFE filtry, velikost pórů: 0,45 μm

Pipety automatické: Brand

Plastové uzavíratelné zkumavky o objemu 15 a 50 ml

Základní laboratorní sklo

5.1.3 Chemikálie

Methanol (čistota Gradient grade) – Sigma-Aldrich

Kyselina mravenčí bezvodá R – Sigma-Aldrich

Ultračistá voda

5.2 Podmínky separace

Nástřik: 10 μ l

Teplota: 50°C

Detekce: VIS při 520 nm

Mobilní fáze: 2% kyselina mravenčí (vodná fáze) a methanol (organická fáze)

Režim: gradientová eluce

Pumpa A: organická fáze – methanol

Pumpa B: vodná fáze – 2% HCOOH

Průtok: 0,8 ml/min

Tabulka 1 – Podmínky gradientové eluce

čas [min.]		koncentrace vodné fáze [%]
0,01	spínač	start
4,00	pumpa B	80
8,00	pumpa B	75
10,00	pumpa B	10
10,15	pumpa B	10
10,30	pumpa B	95
13,00	spínač	stop

5.3 Použitý materiál, jeho uchovávání

5.3.1 Standardy

Všechny standardy antokyanů pocházejí z francouzské firmy Extrasynthese a byly uchovávány v mrazicím boxu při -18°C.

Myrtillin chlorid (=delphinidin-3-glukosid chlorid), čistota $\geq 95\%$

Delphinidin-3-rutinosid chlorid, čistota $\geq 95\%$

Kuromanin chlorid (=cyanidin-3-glukosid chlorid), čistota $\geq 96\%$

Keracyanin chlorid (=cyanidin-3-rutinosid chlorid), čistota $\geq 96\%$

5.3.2 Plody černého rybízu

Všechny plody černého rybízu poskytl Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o. Rok sběru plodů byl 2014.

Pro optimalizaci a validaci metody se použila směs plodů získána více sběry, plody byly odebrány v plné zralosti ze tří keřů od každé níže jmenované odrůdy.

Stanovení obsahu se provedlo u odrůd: 'Ruben', 'Moravia', 'Ometa', 'Lota', 'Ceres', 'Consort', 'Ben Connan', 'Ben Lomond', 'Sejanec', 'Tenah', 'Fokus'.

Plody byly uchovávány v mrazicím boxu při -18°C.

5.3.3 Rybízové džusy

Obsah antokyanů se stanovil v rybízových džusech od šesti různých výrobců:

Happy Day – Černý rybíz, 2l, Rauch s.r.o.

Granini černý rybíz, Nektar z černého rybízu, 1l – Karlovarské minerální vody a.s.

Rio – černý rybíz, šípek, 1l, McCarter, a.s.

Cappy – Černý rybíz, nektar z černého rybízu, 1l – The Coca-Cola Company

Nektar z černého rybízu 1l – Tesco Stores ČR, a.s.

BIO nektar černý rybíz – Hollinger

5.4 Příprava roztoků, úprava materiálu – validace metody

5.4.1 Příprava roztoků standardů

Roztoky jednotlivých standardů o koncentraci 1 mg/ml byly připraveny samostatně. Pokaždé se navážil 1 mg standardu (delphinidin-3-glukosid chloridu, delphinidin-3-rutinosid chloridu, cyanidin-3-glukosid chloridu, cyanidin-3-rutinosid chloridu) a poté rozpustil v 1 ml methanolu. Takto připravené roztoky byly uchovávány v mrazicím boxu při -18°C.

5.4.2 Příprava roztoků pro kalibraci

Zásobní roztok o objemu 500 µl vznikl smísením všech čtyř zmíněných roztoků standardů. Z každého roztoku standardu se odebralo 125 µl a převedlo do jedné vialky. Z tohoto zásobního roztoku byly dále ředěním methanolem připraveny kalibrační roztoky podle tabulky 2.

Tabulka 2 – Příprava kalibračních roztoků v koncentračním rozmezí 10 – 250 mg/l

číslo vialky	koncentrace standardů [mg/l]	objem zásobního roztoku standardů [μl]	objem methanolu [μl]
1	250	125	0
2	200	80	20
3	150	60	40
4	100	40	60
5	75	30	70
6	50	20	80
7	20	8	92
8	10	4	96

Do dalších dvou vialek byly smíseny pouze dva a dva roztoky standardů ve stejném poměru dle následující tabulky pro dosažení nejvyšší koncentrace 500 mg/l:

Tabulka 3 – Příprava kalibračních roztoků o koncentraci standardů 500 mg/l

číslo vialky	koncentrace standardů	objemy použitých roztoků standardů
9	500 [mg/l]	50 μl St 1 50 μl St 2
10	500 [mg/l]	50 μl St 3 50 μl St 4

5.4.3 Přesnost

Plody černého rybízu (cca 80 – 100 g) byly v kádince o objemu 250 ml rozmělněny skleněnou tyčinkou a následně zhomogenizovány kuchyňským mixérem. Do 8 zkumavek bylo odváženo po 5 g této směsi a bylo přidáno vždy 25 ml methanolu a 400 μl HCOOH. Zkumavky se následně protřepaly a vložily do ultrazvuku. Po 10 min byly opět protřepány a vloženy do ultrazvuku na dalších 10 min. Z každé zkumavky se dále 10 ml extraktu přefiltrovalo přímo do vialky přes 0,45 μm PTFE filtr.

5.4.4 Správnost

Plody černého rybízu byly v kádince o objemu 250 ml rozmělněny skleněnou tyčinkou a následně zhomogenizovány kuchyňským mixérem. Tato směs se protlačila přes kuchyňské síto, kvůli odstranění pevných zrníček. Do 2 zkumavek bylo naváženo po 0,1 g homogenizátu a byly přidány 3 ml roztoku tvořeného 320 μ l HCOOH ve 25 ml methanolu. Do dalších 6 zkumavek bylo odváženo také 0,1 g vzorku, a dále byl přidán roztok tvořený smísením 0,1 mg každého standardu, 320 μ l kyseliny mravenčí a doplněný methanolem do 25 ml. Následoval proces s ultrazvukem popsáný výše. Z každé zkumavky se dále 10 ml extraktu přefiltrovalo do vialky.

Tabulka 4 – Správnost metody – příprava pracovních roztoků

číslo vialky	navážka vzorku [g]	roztok MeOH a HCOOH [ml]	množství jednotlivých standardů obsažených v roztoku HCOOH a MeOH [mg]			
			St 1	St 2	St 3	St 4
1	0,1	3	x	x	x	x
2	0,1	3	x	x	x	x
3	0,1	3	0,1	0,1	0,1	0,1
4	0,1	3	0,1	0,1	0,1	0,1
5	0,1	3	0,1	0,1	0,1	0,1
6	0,1	3	0,1	0,1	0,1	0,1
7	0,1	3	0,1	0,1	0,1	0,1
8	0,1	3	0,1	0,1	0,1	0,1

Tabulka popisuje množství jednotlivých komponent obsažených ve zkumavkách včetně uvedených množství přidávaných standardů v roztoku methanolu a kyseliny mravenčí

5.5 Příprava roztoků, úprava materiálu – stanovení obsahu antokyanů

5.5.1 Plody černého rybízu

Všechny testované odrůdy rybízu prošly stejnou úpravou. Plody zmrzlého černého rybízu se po vyndání z mrazicího boxu nechaly stát při pokojové teplotě cca 15 minut. Každá odrůda zvlášť se převedla do kádinky o objemu 250 ml

a rozmělnila se skleněnou tyčinkou. Kvůli lepší homogenizaci materiálu byla rybízová hmota dále rozmixována kuchyňským mixérem.

Z každé odrůdy rybízu byly připraveny tři navážky. Do zkumavky bylo odváženo vždy po 2 g homogenizátu z jedné odrůdy a přidáno 10 ml MeOH a 160 μ l HCOOH. Zkumavky se následně uzavřely, protřepaly a vložily do ultrazvuku. Po 10 min byly opět protřepány a vloženy do ultrazvuku na dalších 10 min. Z každé zkumavky se dále injekční stříkačkou odměřilo 10 ml extraktu a přefiltrovalo do vialky.

5.5.2 Rybízové džusy

Z každého originálního balení se odebralo 500 μ l džusu a promíchalo s 500 μ l roztoku tvořeného 320 μ l HCOOH ve 25 ml methanolu. Vzniklý roztok byl přefiltrován do vialky.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Optimalizace metody

Cíl optimalizace chromatografické metody spočíval v nalezení nejvhodnějších podmínek pro stanovení čtyř majoritně se vyskytujících antokyanů v plodech černého rybízu: delphinidin-3-glukosidu, delphinidin-3-rutinosidu, cyanidin-3-glukosidu a cyanidin-3-rutinosidu. Tato metoda byla poté použita i pro stanovení těchto čtyř antokyanů v rybízových džusech. Mezi požadavky analýzy patřila nejen dostatečná separace analyzovaných látek a s ní dostatečné rozlišení chromatografických píků, ale také co nejkratší čas celého procesu.

6.1.1 Volba vlnové délky

Dle dostupné literatury byla zvolena vlnová délka 520 nm, která měla být vhodná pro detekci všech čtyř látek současně. Pomocí detektoru se získala absorpční spektra analyzovaných látek:

Delphinidin-3-glukosid dosahoval absorpčního maxima ve 242, 276 a 524 nm.

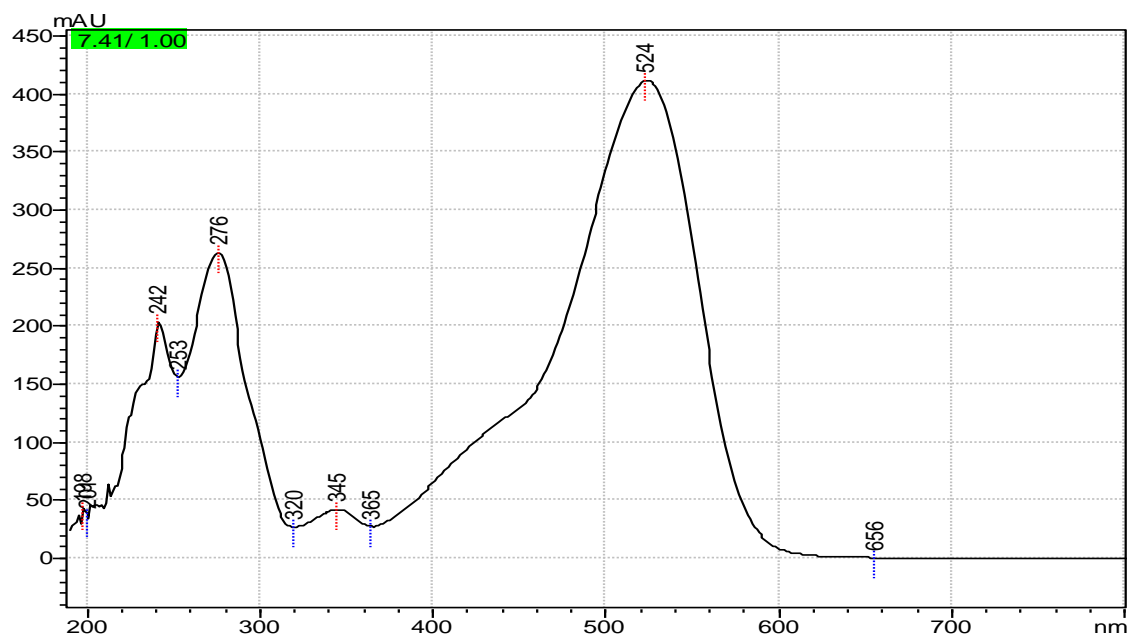
Delphinidin-3-rutinosid dosahoval absorpčního maxima při 242, 276 a 526 nm.

Cyanidin-3-glukosid dosahoval absorpčního maxima při 242, 279 a 516 nm.

Cyanidin-3-rutinosid dosahoval absorpčního maxima při 242, 280 a 519 nm.

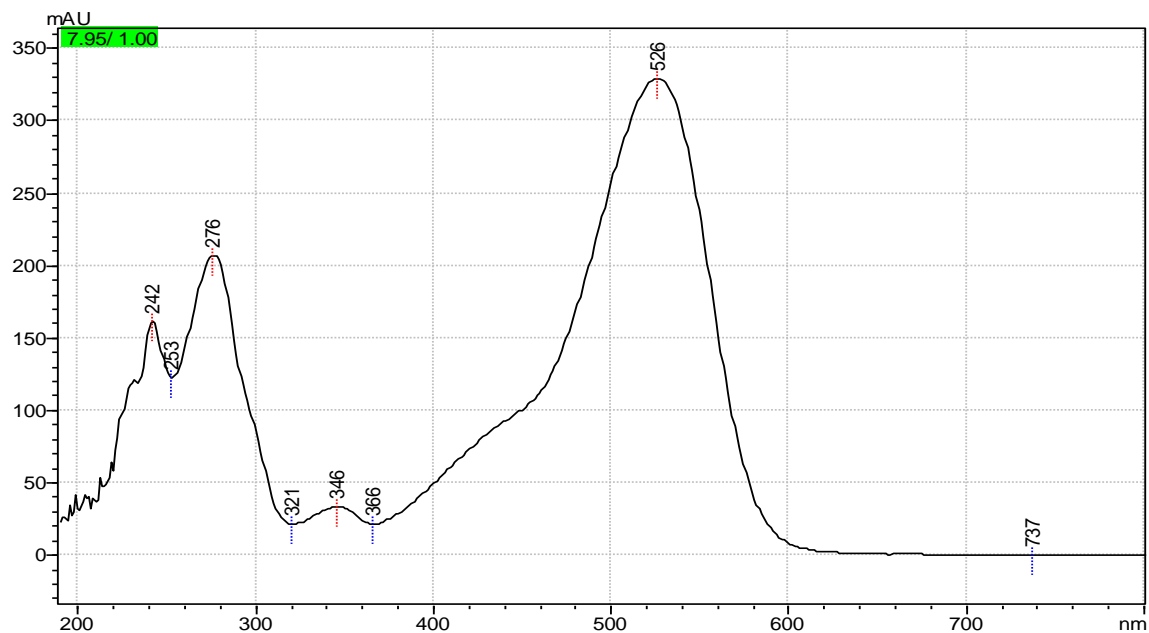
Zvolená vlnová délka 520 nm se tedy ukázala jako vhodná pro současnou analýzu všech čtyř látek.

6.1.1.1 Absorpční spektrum delphinidin-3-glukosidu



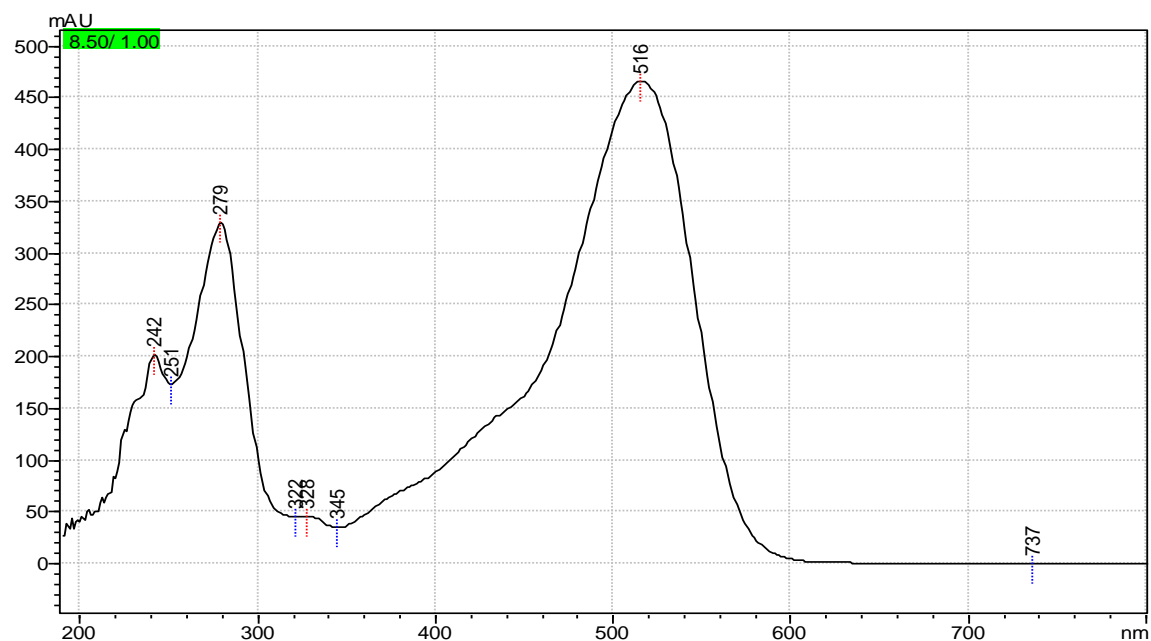
Obrázek 12 – Absorpční spektrum delphinidin-3-glukosidu

6.1.1.2 Absorpční spektrum delphinidin-3-rutinosidu



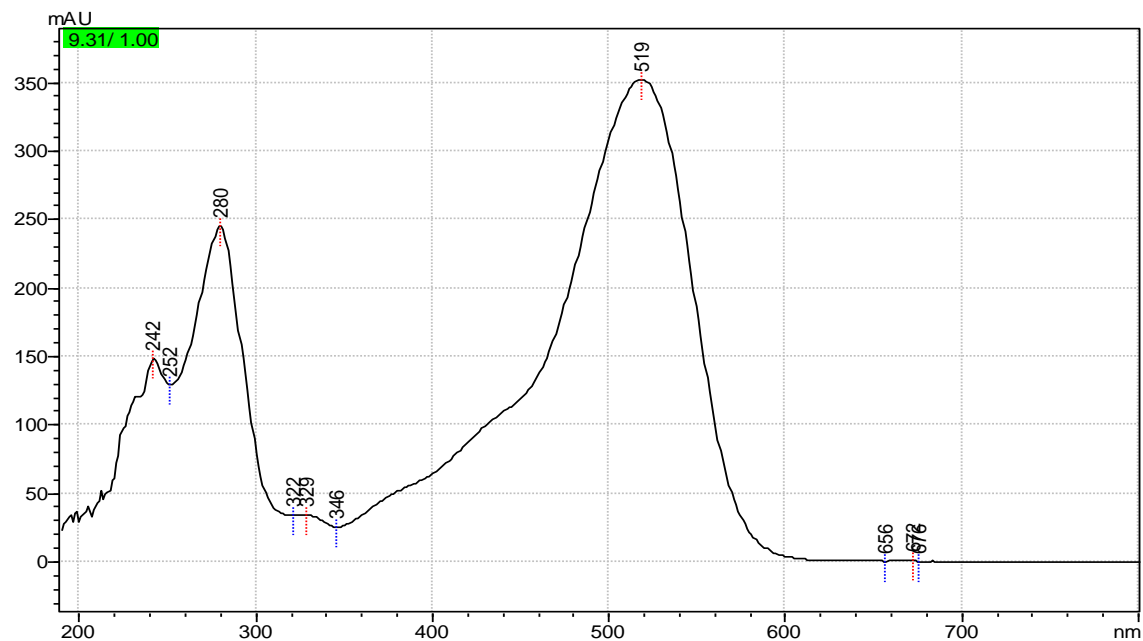
Obrázek 13 – Absorpční spektrum delphinidin-3-rutinosidu

6.1.1.3 Absorpční spektrum cyanidin-3-glukosidu



Obrázek 14 – Absorpční spektrum cyanidin-3-glukosidu

6.1.1.4 Absorpční spektrum cyanidin-3-rutinosidu



Obrázek 15 – Absorpční spektrum cyanidin-3-rutinosidu

6.1.2 Volba kolony

K detekci antokyanů se často využívají klasické kolony s reverzní fází (kapitola 4.1.5), nejčastěji však chemicky modifikované fáze s C-18 řetězcí. Z těchto důvodů byla zvolena kolona Supelco Analytical, Ascentis Express C18 2,7 μm, 15 cm x 4,6 mm.

6.1.3 Volba mobilní fáze a teploty

Jako nezbytně nutné se jevilo zvolit vhodnou mobilní fázi, k dosažení dostatečné separace všech testovaných antokyanů, píky by měly být zároveň dostatečně symetrické. Dále byla volena vhodná teplota, aby analýza probíhala v přijatelném čase, ale zároveň nedocházelo k rozkladu látek či poškození stacionární fáze vlivem příliš vysoké teploty.

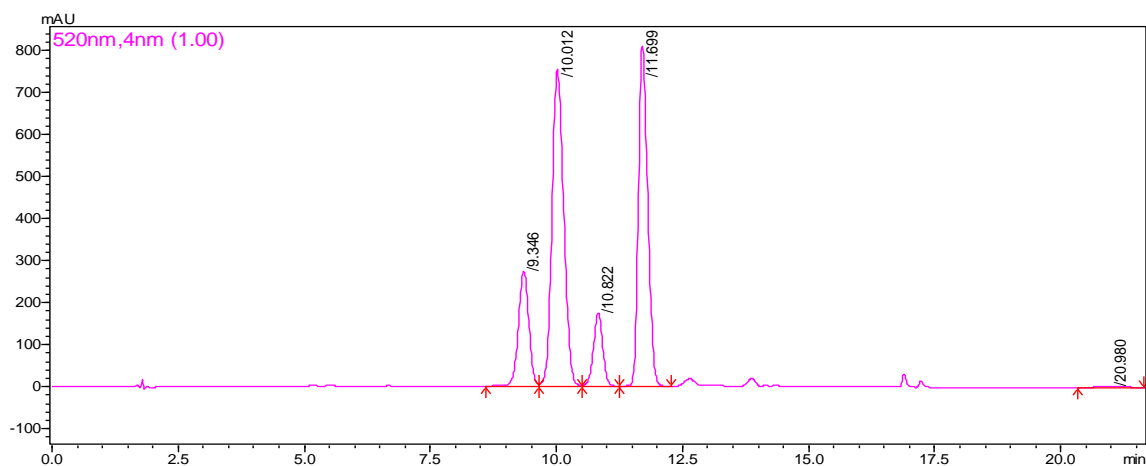
Volba mobilní fáze a teploty probíhala za gradientových podmínek uvedených v následující tabulce:

Tabulka 5 – Program gradientové eluce

čas [min.]		koncentrace vodné fáze [%]
0,01	spínač	start
4,00	pumpa B	80
8,00	pumpa B	75
10,00	pumpa B	10
10,15	pumpa B	10
10,30	pumpa B	95
13,00	spínač	stop

Pumpa B přiváděla do systému fázi vodnou (2% HCOOH); organická fáze pak byla tvořena MeOH nebo acetonitrilem, dle záznamů uvedených níže.

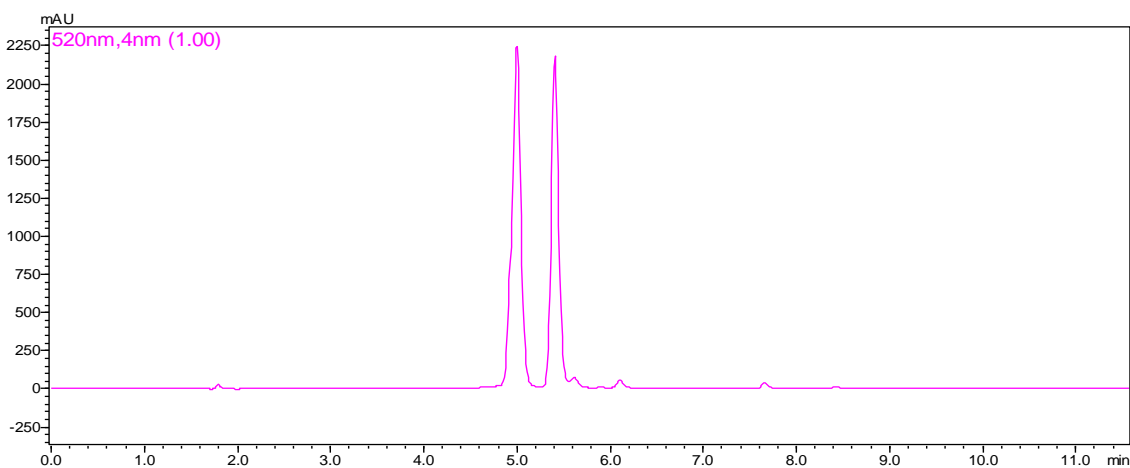
6.1.3.1 Mobilní fáze methanol – kyselina mravenčí 2%, 35°C



Obrázek 16 – Chromatogram za použití MF o složení: 2% HCOOH/MeOH, 35°C

Zde byly látky separovány dostatečně, poslední analyt se eluoval ve 12. minutě.

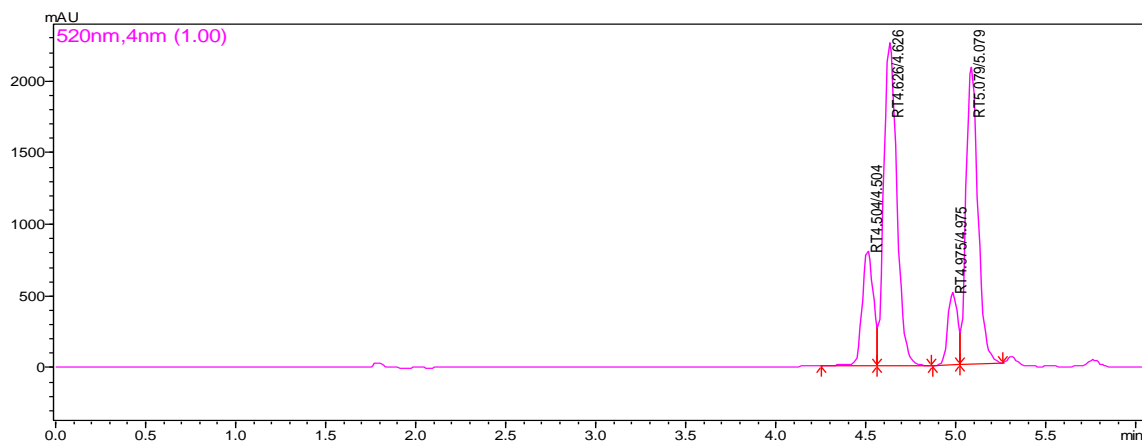
6.1.3.2 Mobilní fáze acetonitril – kyselina mravenčí 2%, 35°C



Obrázek 17 – Chromatogram za použití MF o složení: 2% HCOOH/acetonitril, 35°C

V tomto případě došlo k nedokonalé separaci látek, acetonitril při dané teplotě není vhodnou mobilní fází.

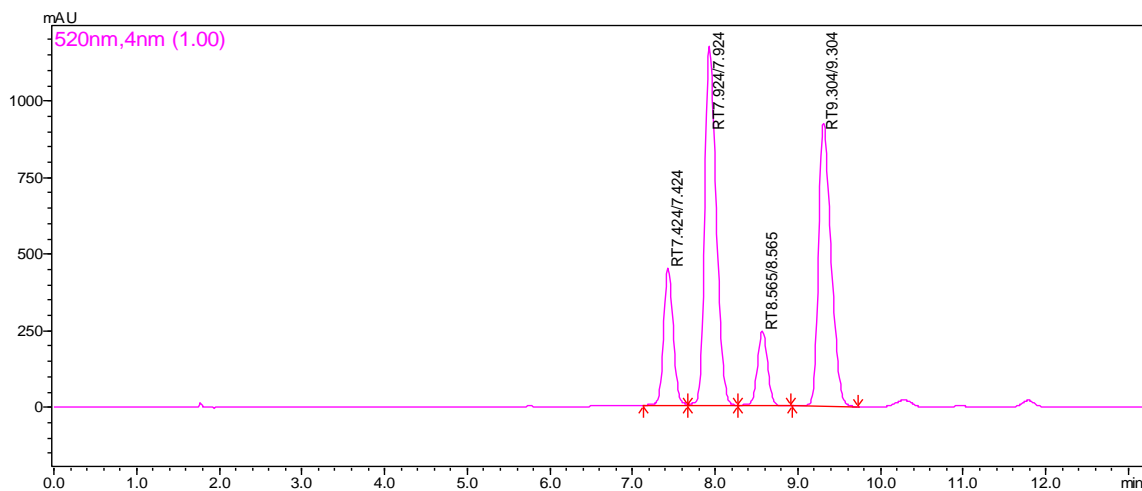
6.1.3.3 Mobilní fáze acetonitril – kyselina mravenčí 2%, 50°C



Obrázek 18 – Chromatogram za použití MF o složení: 2% HCOOH/acetonitril, 50°C

Při 50°C dojde k lepší separaci látek, než při nižší teplotě, ale stále není dostatečná. Vyšší teplota analýzy by už nebyla vhodná, výrobce kolony sice uvádí maximum použitelnosti do 60°C, ale při vyšších teplotách již dochází k rozkladu antokyanů.

6.1.3.4 Mobilní fáze methanol – kyselina mravenčí 2%, 50°C



Obrázek 19 – Chromatogram za použití MF o složení: 2% HCOOH/MeOH, 50°C

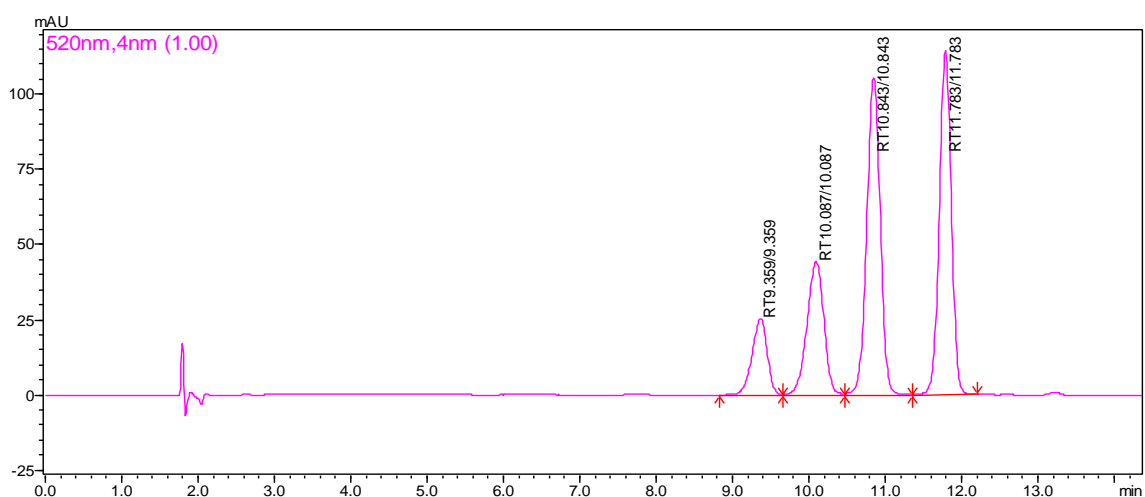
Při použití methanolu jako mobilní fáze probíhá separace všech čtyř analytů rychleji při 50°C, než při 30°C. Poslední látka se eluovala již po devíti minutách. Použití této mobilní fáze za teploty 50°C se jeví jako nejvhodnější.

Tabulka 6 – Retenční časy [min.] eluátů při teplotách 35°C a 50°C.

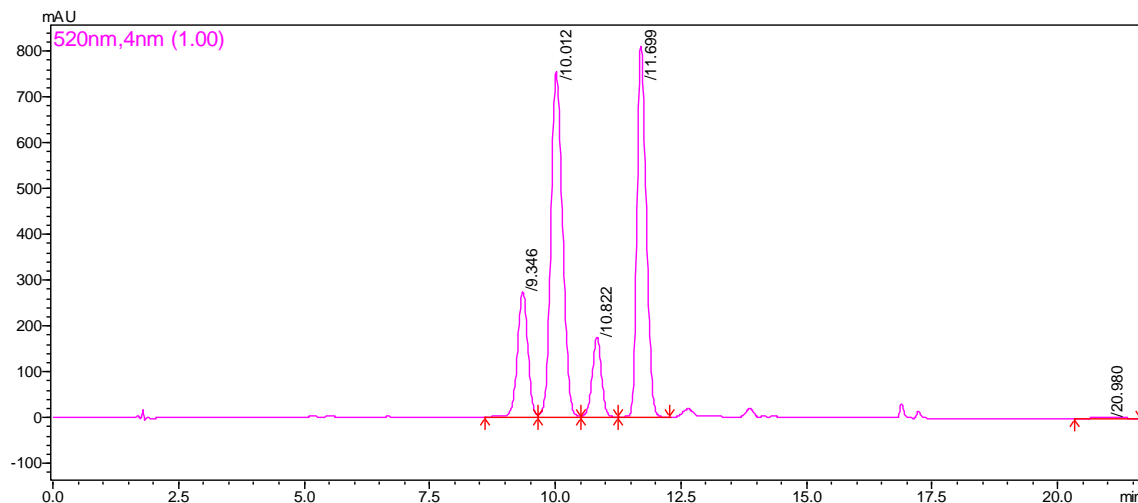
Název antokyanu	teplota 35°C	teplota 50°C
delphinidin-3-glukosid	9.346	7.424
delphinidin-3-rutinosid	10.012	7.924
cyanidin-3-glukosid	10.822	8.565
cyanidin-3-rutinosid	11.699	9.304

6.1.4 Identifikace jednotlivých antokyanů

Identifikace jednotlivých antokyanů byla provedena na základě porovnání retenčních časů eluátů vzorku černého rybízu a retenčních časů jednotlivých standardních látek. Separace probíhala za teploty 35 °C s použitím mobilní fáze tvořené 2 % HCOOH a MeOH a využitím gradientu uvedeného v tabulce 5.



Obrázek 20 – Chromatografický záznam směsi standardních látek



Obrázek 21 – Chromatografický záznam černého rybízu

6.1.5 Optimální podmínky pro HPLC analýzu antokyanů

Kolona: Supelco Analytical, Ascentis Express C18 2,7 μm , 15 cm x 4,6 mm

Chromatografická sestava: Shimadzu LC – 10

Detektor: DAD , SPD – M10A VP

Nástřik: 10 μl

Teplota: 50°C

Detekce: VIS při 520 nm

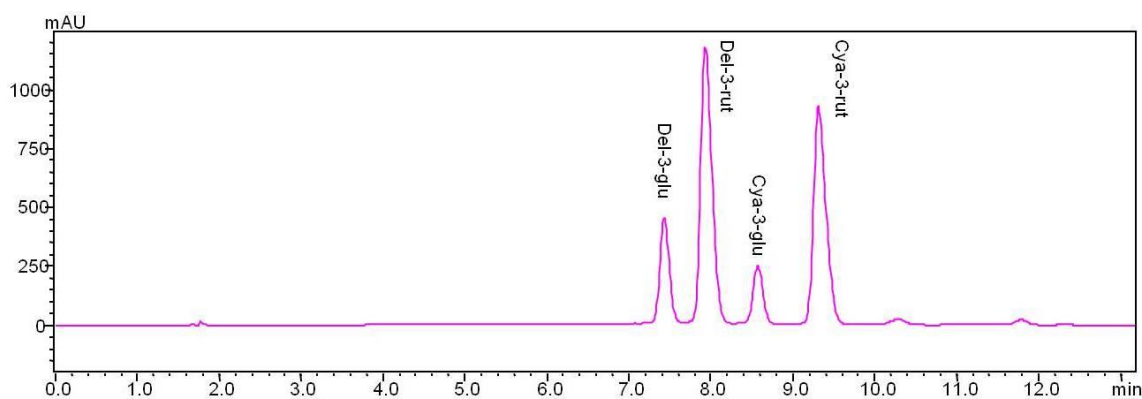
Průtok: 0,8 ml/min

Mobilní fáze: 2% kyselina mravenčí (vodná fáze) – methanol (organická fáze)

Režim: gradientová eluce

Tabulka 7 – Optimální podmínky gradientové eluce

čas [min.]		koncentrace vodné fáze [%]
0,01	spínač	start
4,00	pumpa B	80
8,00	pumpa B	75
10,00	pumpa B	10
10,15	pumpa B	10
10,30	pumpa B	95
13,00	spínač	stop



Obrázek 22 – Chromatogram za optimálních separačních podmínek

6.1.6 Volba vnitřního standardu

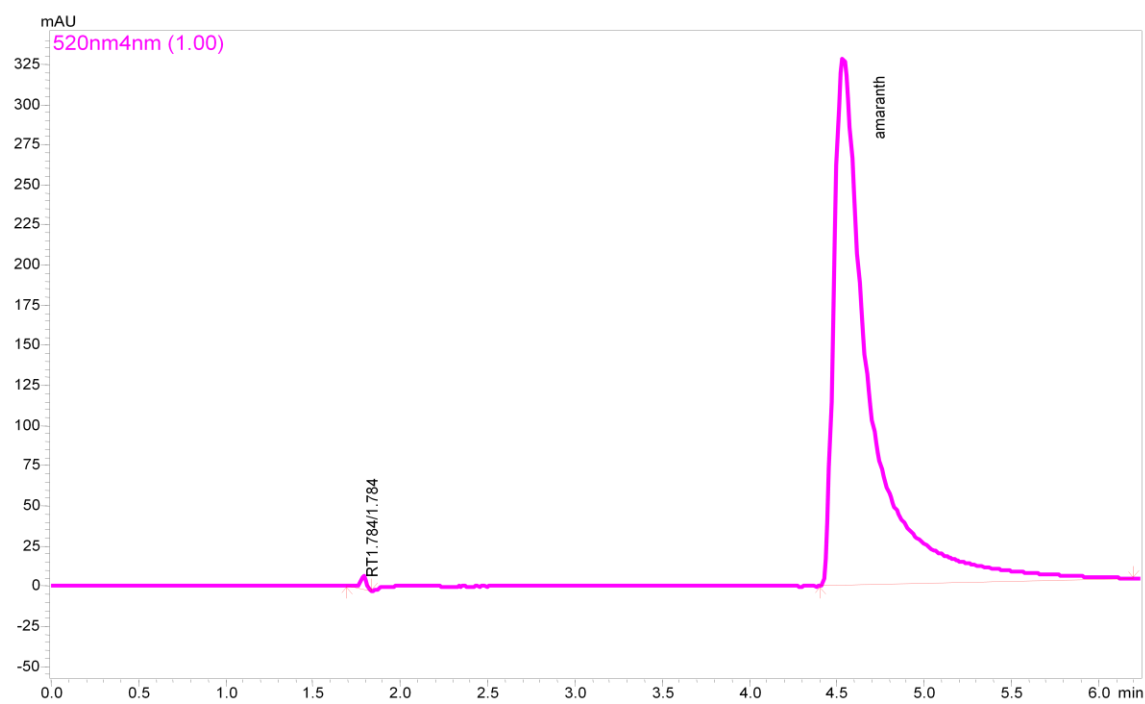
Cíl spočíval v nalezení látky, jež by se eluovala před všemi čtyřmi antokyany. Bylo testováno osm potravinářských barviv a pět indikátorů. Retenční časy většiny testovaných barviv a indikátorů vykazovaly značnou délku, u barviva PonX došlo k rozmytí látky na koloně a R_t nešel určit. Pouze Amaranth měl přijatelný retenční čas, avšak symetrie píku (3,67) se ukázala jako nedostatečná pro jeho přesnou kvantifikaci. Indigo Carmin se eluoval těsně přes píkem delphinidin-3-glukosidu a jeho symetrie (2,49) nebyla z hlediska případné koeluce s delphinidinem přijatelná.

Tabulka 8 – Retenční časy testovaných indikátorů

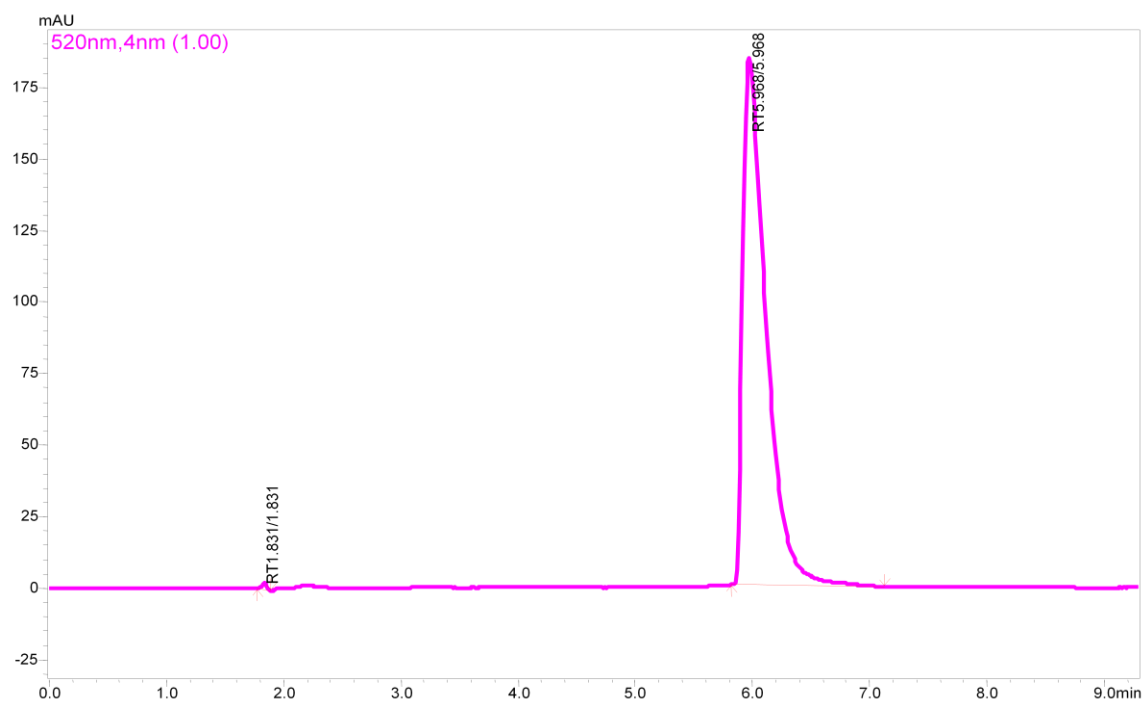
Testovaná látka	R_t [min.]
Červeně Kongo	16,56
Violet krystal	16,39
Methyl oranž	15,61
Červeně fenol	15,94
Červeně methyl	16.57

Tabulka 9 – Retenční časy testovaných potravinářských barviv

Testovaná látka	Rt [min.]
Amaranth	4.53
Ponc 4R	6.98
Red 2G	12.89
Alrac	12.24
PonX	nelze určit
Bunset Yellow	10.22
Indigo Carmin	5.97
Rhodamin B	16.43



Obrázek 23 – Chromatogram potravinářského barviva Amaranth



Obrázek 24 – Chromatogram potravinářského barviva Indigo Carmin

6.2 Validace analytické metody

6.2.1 Test vhodnosti chromatografického systému

Použité hodnoty byly získány z kalibrace při koncentraci roztoků 100 mg/l.

6.2.1.1 Rozlišení chromatografických píků

Tabulka 10 – Hodnoty rozlišení chromatografických píků

Hodnocené antokyany	R
del-3-glu – del-3-rut	2.089
del-3-rut – cya-3-glu	2.056
cya-3-glu – cya-3-rut	3.043

Rozlišení dvou sousedních píků vždy dosahovalo hodnoty > 1,5.

6.2.1.2 Asymetrie píků – Tailing *F*

Tabulka 11 – Hodnoty asymetrie píků

Hodnocená látka	F
del-3-glu	1.008
del-3-rut	1.037
cya-3-glu	1.126
cya-3-rut	1.119

Hodnoty asymetrie píků dosahovaly od 1.008 do 1.126.

6.2.1.3 Kapacitní faktor

Tabulka 12 – Hodnoty kapacitních faktorů jednotlivých analytů

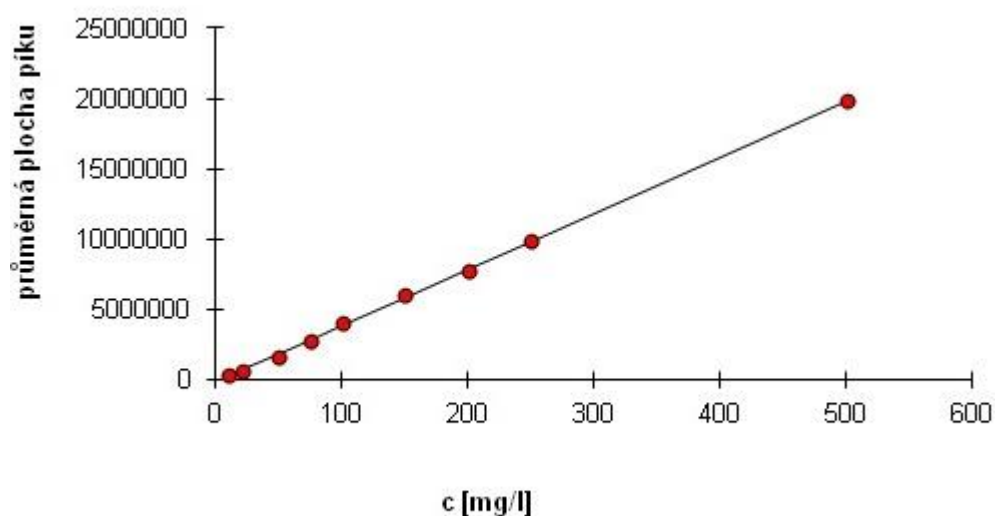
Hodnocená látka	k'
del-3-glu	3.182
del-3-rut	3.498
cya-3-glu	3.813
cya-3-rut	4.273

6.2.2 Linearita

Ke stanovení linearity byly použity kalibrační roztoky o těchto koncentracích: 10, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250 a 500 mg/l (viz kapitola) 5.4.2 Příprava roztoků pro kalibraci. U každého roztoku byly provedeny tři nástřiky na kolonu. Ze tří takto získaných ploch píku se vždy stanovila průměrná hodnota. Nakonec byla vyhodnocena závislost ploch píků na koncentraci látky metodou lineární regrese.

6.2.2.1 Kalibrační závislost pro delphinidin-3-glukosid

Pro určení kalibrační závislosti byly použity kalibrační roztoky o koncentraci delphinidin-3-glukosidu: 10 mg/l, 20 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l, 200 mg/l, 250 mg/l a 500 mg/l.



Obrázek 25 – Kalibrační závislost pro delphinidin-3-glukosid

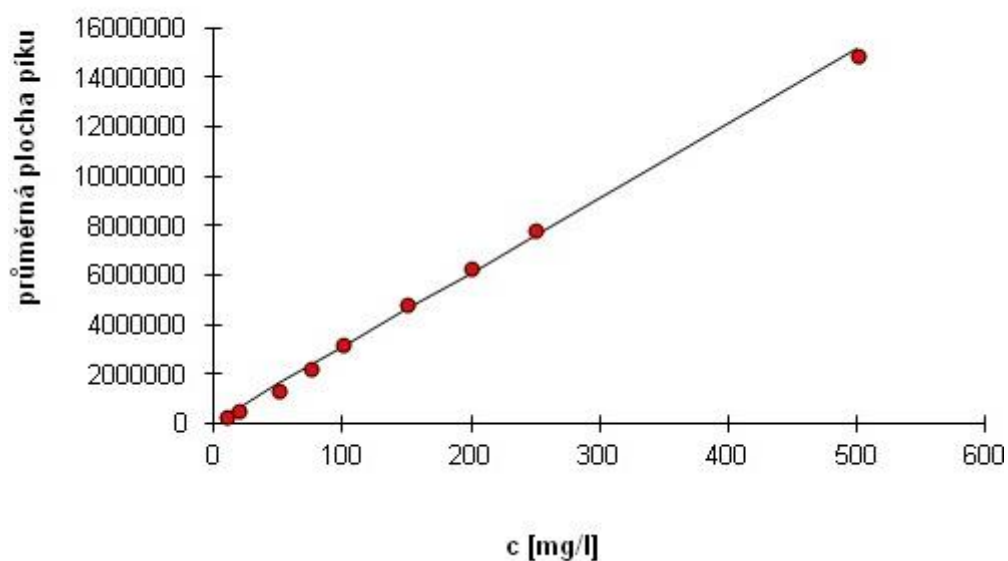
Tabulka 13 – Parametry pro lineární regresi delphinidin-3-glukosidu

Statistické parametry pro regresi: $y = k x + q$			
Počet bodů	$n = 9$	Odhad chyby	
Směrnice	$k = 39940$	\pm	300
Abs. člen	$q = -114379$	\pm	62849
Korelační koef.	$r = 0,9998$		
Reziduální odch.	$s = 130865$		

V koncentračním rozmezí od 10 do 500 mg/l dosahoval korelační koeficient hodnoty 0,9998.

6.2.2.2 Kalibrační závislost pro delphinidin-3-rutinosid

Pro určení kalibrační závislosti byly použity kalibrační roztoky o koncentraci delphinidin-3-rutinosidu: 10 mg/l, 20 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l, 200 mg/l, 250 mg/l a 500 mg/l.



Obrázek 26 – Kalibrační závislost pro delphinidin-3-rutinosid

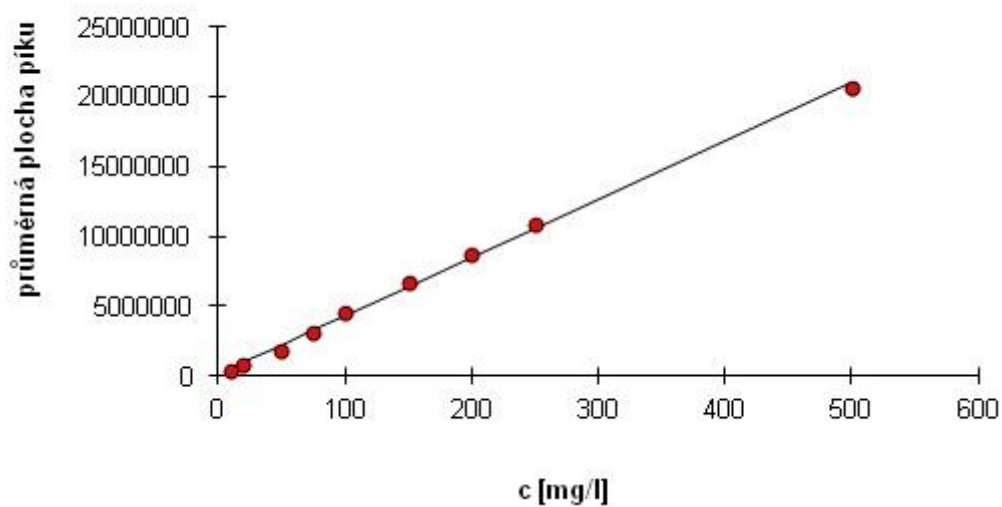
Tabulka 14 – Parametry pro lineární regresi delphinidin-3-rutinosidu

Statistické parametry pro regresi: $y = k x + q$			
Počet bodů	$n = 9$	Odhad chyby	
Směrnice	$k = 30169$	±	471
Abs. člen	$q = 59272$	±	98482
Korelační koef.	$r = 0,9991$		
Reziduální odch.	$s = 205061$		

V koncentračním rozmezí od 10 do 500 mg/l dosahoval korelační koeficient hodnoty 0,9991.

6.2.2.3 Kalibrační závislost pro cyanidin-3-glukosid

Pro určení kalibrační závislosti byly použity kalibrační roztoky o koncentraci cyanidin-3-glukosidu: 10 mg/l, 20 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l, 200 mg/l, 250 mg/l a 500 mg/l.



Obrázek 27 – Kalibrační závislost pro cyanidin-3-glukosid

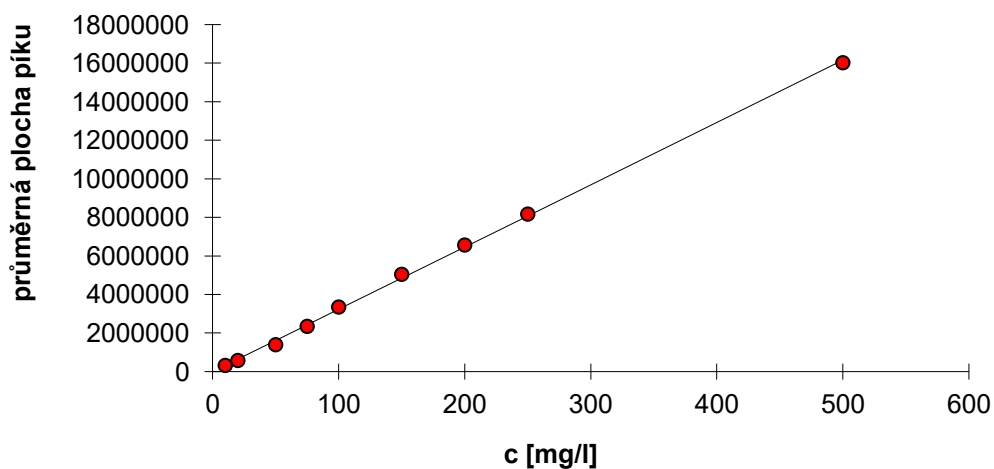
Tabulka 15 – Parametry pro lineární regresi cyanidin-3-glukosidu

Statistické parametry pro regresi: $y = k x + q$			
Počet bodů	$n = 9$	Odhad chyby	
Směrnice	$k = 41745$	±	716
Abs. člen	$q = 134283$	±	149765
Korelační koef.	$r = 0,9990$		
Reziduální odch.	$s = 311842$		

V koncentračním rozmezí od 10 do 500 mg/l dosahoval korelační koeficient hodnoty 0,9990.

6.2.2.4 Kalibrační závislost pro cyanidin-3-rutinosid

Pro určení kalibrační závislosti byly použity kalibrační roztoky o koncentraci cyanidin-3-rutinosidu: 10 mg/l, 20 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l, 200 mg/l, 250 mg/l a 500 mg/l.



Obrázek 28 – Kalibrační závislost pro cyanidin-3-rutinosid

Tabulka 16 – Parametry pro lineární regresi cyanidin-3-rutinosidu

Statistické parametry pro regresi: $y = k x + q$			
Počet bodů	$n = 9$	Odhad chyby	
Směrnice	$k = 32305$	±	337
Abs. člen	$q = 716$	±	70411
Korelační koef.	$r = 0,9996$		
Reziduální odch.	$s = 146611$		

V koncentračním rozmezí od 10 do 500 mg/l dosahoval korelační koeficient hodnoty 0,9996.

6.2.3 Opakovatelnost

Ke stanovení opakovatelnosti byly použity kalibrační roztoky o koncentracích 250, 100 a 20 mg/l. Přípravu těchto roztoků uvádí kapitola 5.4.2. U každého roztoku bylo provedeno sedm nástřiků na kolonu. Z ploch píků jednotlivých antokyanů byly vypočteny směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky.

Tabulka 17 – Opakovatelnost analýzy jednotlivých roztoků o koncentraci 20 mg/l

koncentrační úroveň 20 mg/l				
nástřik:	del-3-glu	del-3-rut	cya-3-glu	cya-3-rut
1.	723915	580474	831003	622039
2.	724049	581425	831236	622817
3.	724344	581877	830377	621696
4.	726424	581392	837281	627931
5.	735126	582474	842363	629540
6.	726754	581996	832970	625308
7.	728389	583342	836275	626375
průměr	727000	581854	834501	625101
SD	3950	906	4377	3043
RSD [%]	0,54	0,16	0,52	0,49

Relativní směrodatná odchylka pro koncentrační úroveň 20 mg/l dosahovala hodnot v rozmezí od 0,16 % do 0,54 %, čímž byl splněn požadavek, aby RSD dosahovala hodnoty < 1 %.

Tabulka 18 – Opakovatelnost analýzy jednotlivých roztoků o koncentraci 100 mg/l

koncentrační úroveň 100 mg/l				
nástřik:	del-3-glu	del-3-rut	cya-3-glu	cya-3-rut
1.	4106837	3275526	4651855	3477461
2.	4109313	3282374	4666342	3474641
3.	4171224	3291454	4665647	3503700
4.	4194980	3289908	4671303	3526628
5.	4116998	3290889	4666195	3484243
6.	4124397	3296647	4676807	3494612
7.	4134795	3306446	4696075	3512726
průměr	4136935	3290463	4670603	3496287
SD	33598	9863	13549	19221
RSD [%]	0,81	0,30	0,29	0,55

Relativní směrodatná odchylka pro koncentrační úroveň 100 mg/l dosahovala hodnot v rozmezí od 0,29 % do 0,81 %, čímž byl splněn požadavek, aby RSD dosahovala hodnoty < 1 %.

Tabulka 19 – Opakovatelnost analýzy jednotlivých roztoků o koncentraci 250 mg/l

koncentrační úroveň 250 mg/l				
nástřik:	del-3-glu	del-3-rut	cya-3-glu	cya-3-rut
1.	9302379	7462869	10521912	7867872
2.	9330068	7478826	10554838	7896480
3.	9376666	7565350	10557275	7904795
4.	9345197	7471411	10546716	7891939
5.	9284483	7468443	10511364	7890361
6.	9275161	7439372	10502900	7869477
7.	9217059	7393134	10505556	7823185
průměr	9304430	7468486	10528652	7877730
SD	52329	51729	23707	27646
RSD [%]	0,56	0,69	0,23	0,35

Relativní směrodatná odchylka pro koncentrační úroveň 250 mg/l dosahovala hodnot v rozmezí od 0,23 % do 0,69 %, čímž byl splněn požadavek, aby RSD dosahovala hodnoty < 1 %.

6.2.4 Přesnost

K určení parametru přesnosti bylo použito celkem osm roztoků, jejichž příprava je popsána v kapitole: 5.4.3 Přesnost. U každého roztoku byly provedeny dva nástřiky na kolonu. Z těchto dvou nástřiků byl získán průměr a byl přepočten na navážku 5 g (viz vzorec). Nakonec se z takto získaných průměrů určily relativní směrodatné odchylky stanovení jednotlivých antokyanů ve vzorku rybízu.

$$x = A \frac{5}{m}$$

Obrázek 29 – Výpočet použitý k přepočtu na navážku

A – průměrná plocha píků jedné látky, *m* – hmotnost naváženého vzorku

Tabulka 20 – Hodnoty pro výpočet přesnosti analytické metody

název látky	del-3-glu	del-3-rut	cya-3-glu	cya-3-rut
hodnoty ploch píků (X)	1965873	9819480	482355	4686676
	2030924	9954066	491901	4759443
	1988996	9751165	485393	4677071
	2057416	10120229	496072	4850926
	1992982	9823720	482541	4701183
	1984671	9712900	481783	4672192
	1938418	9633286	478202	4575000
	1942427	9563756	475773	4583997
průměr	1987713	9797325	484252	4688311
SD	40922	177581	6768	89266
RSD [%]	2,06	1,81	1,40	1,90

U každé látky dosahovala relativní směrodatná odchylka hodnoty < 2,1 %.

6.2.5 Správnost

Správnost byla vyjádřena jako výtěžnost.

6.2.5.1 Výtěžnost analytické metody

K určení výtěžnosti byly použity roztoky, jejichž přípravu popisuje kapitola 5.4.4 Správnost. U každého roztoku byly provedeny dva nástřiky na kolonu a vypočtena průměrná plocha píků, která byla následně přepočtena na navážku 0,1 g.

$$y = A \frac{0,1}{m}$$

Obrázek 30 – Výpočet použitý k přepočtu na navážku

A – průměrná plocha píků jedné látky, m – hmotnost naváženého vzorku

Výtěžnost byla vypočítána jako rozdíl průměru ploch píků s přidavkem standardních látek a průměru ploch bez standardů ku průměru ploch píků samotných standardů.

$$R_{\epsilon} = \frac{A_{St} V_z - A V_z}{A_{St}}$$

Obrázek 30 – Výpočet pro výtěžnost

Byla provedena korekce získaných hodnot výtěžnosti na objem navážky vzorku. Každá hodnota se vynásobila 3,1 a tento násobek vydělil 3 (viz příprava roztoků).

Tabulka 21 – Výtěžnost analytické metody

název látky	del-3-glu	del-3-rut	cya-3-glu	cya-3-rut
výtěžnost [%]	91,92	89,05	91,82	91,07
	95,35	94,34	92,63	94,45
	92,46	87,23	90,98	87,67
	94,03	92,69	91,79	93,71
	95,23	94,64	90,86	94,00
	86,81	82,62	88,35	84,35
průměr	92,63	90,10	91,07	90,88
SD	3,17	4,70	1,48	4,08
RSD [%]	3,43	5,22	1,63	4,50

Průměrné hodnoty výtěžnosti stanovovaných látek se pohybovaly od 90,10 do 92,63. Hodnoty relativní směrodatné odchylky se pohybovaly v rozmezí 1,63 až 5,22 %.

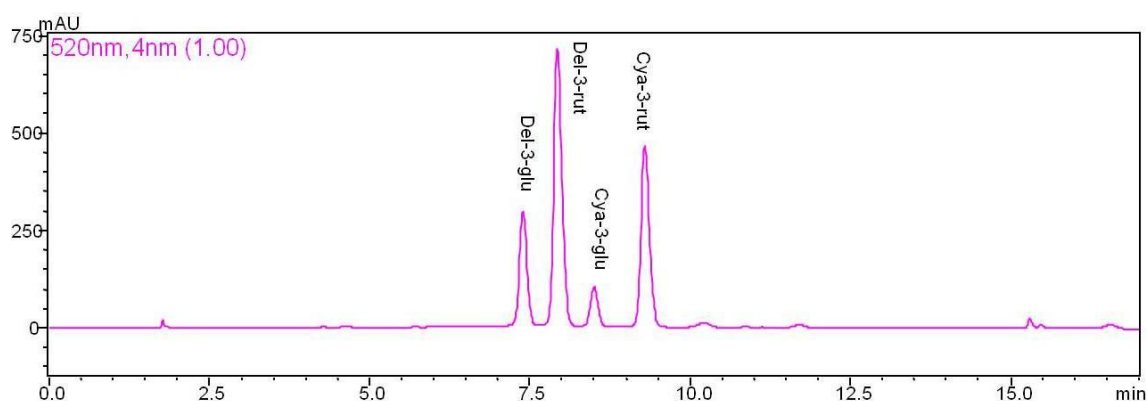
6.3 Stanovení obsahu antokyanů

Popsaná analytická metoda byla použita pro současné stanovení obsahu delphinidin-3-glukosidu, delphinidin-3-rutinosidu, cyanidin-3-glukosidu a cyanidin-3-rutinosidu v rybízových džusech a v plodech kultivarů černého rybízu. Stanovení obsahu se provedlo metodou kalibrační křivky.

6.3.1 Stanovení obsahu antokyanů v plodech černého rybízu

Ke stanovení obsahu antokyanů v plodech černého rybízu bylo použito celkem třiatřicet roztoků (tři navážky od každé odrůdy), jejichž příprava je popsána v kapitole: 5.5.1. Z každého roztoku se uskutečnily dva nástřiky na kolonu a stanovil se průměr ze získaných ploch elučních křivek. Poté byla spočtena průměrná plocha píku jednotlivých antokyanů ze tří navážek (pro každou odrůdu). Z takto získaných hodnot bylo metodou kalibrační křivky určeno množství jednotlivých antokyanů v mg/l. Množství antokyanů se nakonec určilo v mg/100 g plodů následovně: Nejprve byl spočten obsah jednotlivých antokyanů v objemu vzorku 10,160 ml (10 ml MeOH + 160 μ l HCOOH, viz kapitola 5.5.1). Tato hodnota byla poté vydělena 2 (navážka byla 2 g), tím se spočetlo množství antokyanů v 1 g. Výsledek se nakonec vynásobil 100 pro získání množství jednotlivých antokyanů ve 100 g ovoce.

6.3.1.1 'RUBEN'



Obrázek 31 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v kultivaru

'Ruben'

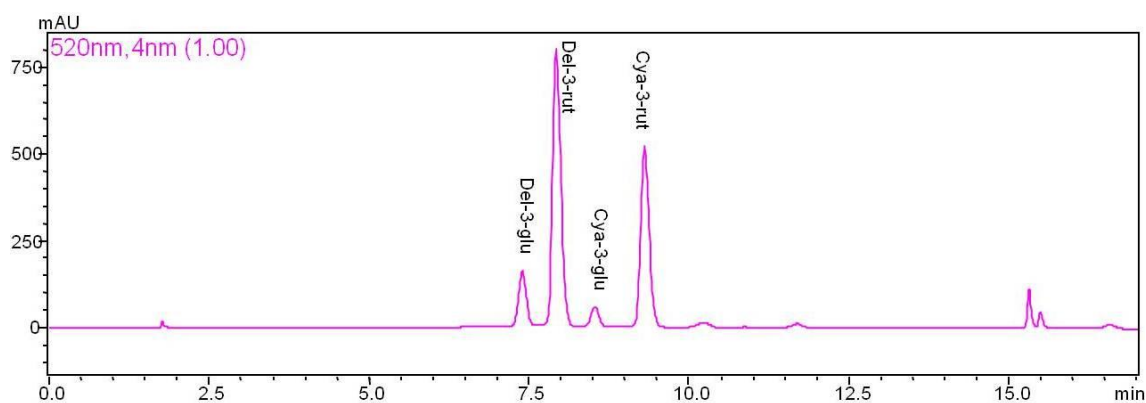
Tabulka 22 – Stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Ruben'

RUBEN	A	[mg/l]	[mg/100g]
del-3-glu	2375196	62,33	31,17
del-3-rut	6231774	204,60	102,30
cya-3-glu	800727	15,97	7,98
cya-3-rut	4108316	127,15	63,58

A – průměrná plocha piků po přepočtu na navážku

Celkové množství hodnocených antokyanů v odrůdě 'Ruben' dosahovalo 205,02 mg na 100 g plodů.

6.3.1.2 'BEN LOMOND'



Obrázek 32 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Ben Lomond'

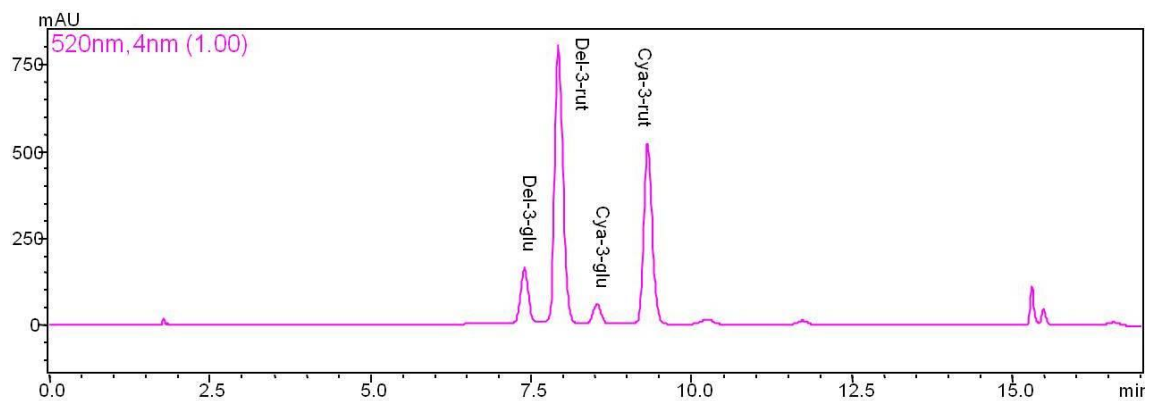
Tabulka 23 – Stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Ben Lomond'

BEN LOMOND	A	c [mg/l]	[mg/100g]
del-3-glu	1375859	37,31	18,66
del-3-rut	7204986	236,86	118,43
cya-3-glu	497674	8,71	4,35
cya-3-rut	4686004	145,03	72,52

A – průměrná plocha piků po přepočtu na navážku

Celkové množství hodnocených antokyanů v odrůdě 'Ben Lomond' bylo 213,95 mg na 100 g plodů.

6.3.1.3 'BEN CONNAN'



Obrázek 33 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Ben Connan'

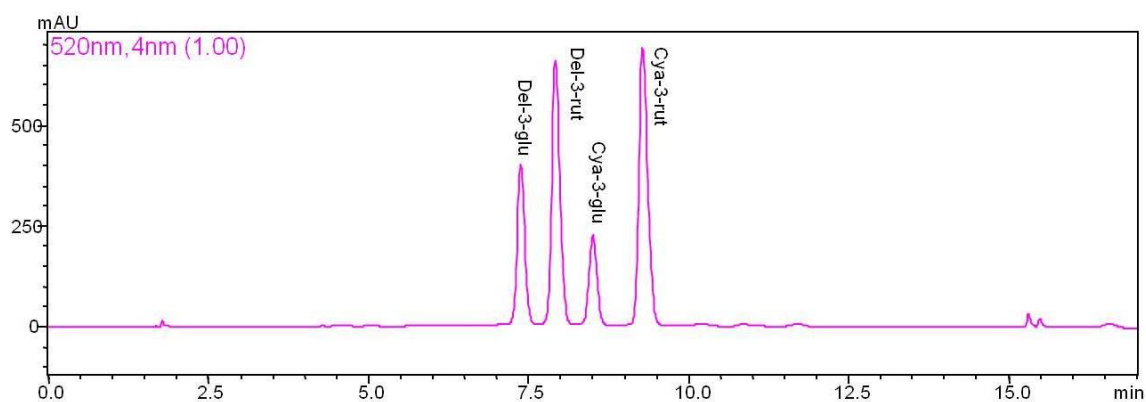
Tabulka 24 – Stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Ben Connan'

BEN CONAN	A	c [mg/l]	[mg/100g]
del-3-glu	816520	23,31	11,65
del-3-rut	2445069	79,08	39,54
cya-3-glu	268117	3,21	1,60
cya-3-rut	1639613	50,73	25,37

A – průměrná plocha piků po přepočtu na navážku

Celkové množství hodnocených antokyanů v odrůdě 'Ben Connan' bylo 78,16 mg na 100 g plodů

6.3.1.4 'CERES'



Obrázek 34 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Ceres'

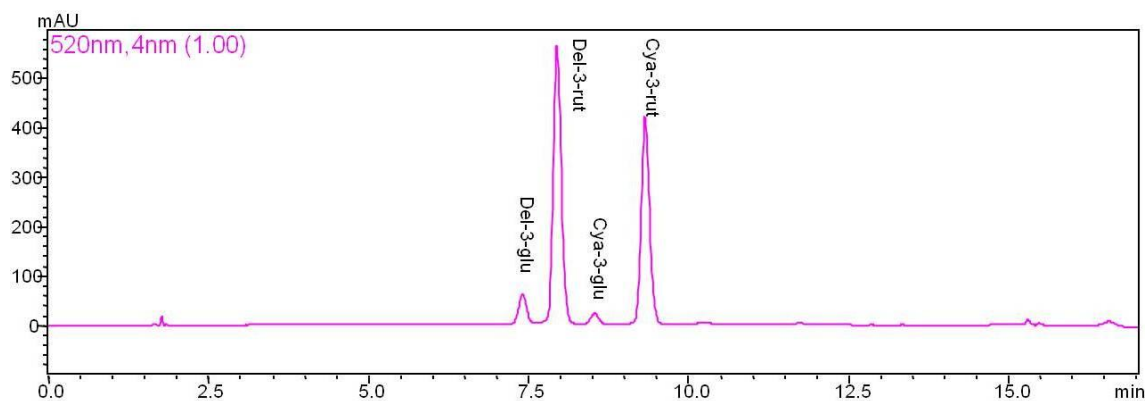
Tabulka 25 – Stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Ceres'

CERES	A	c [mg/l]	[mg/100g]
del-3-glu	3204993	83,11	41,55
del-3-rut	5824561	191,10	95,55
cya-3-glu	1844976	40,98	20,49
cya-3-rut	6468506	200,21	100,11

A – průměrná plocha piků po přepočtu na navážku

Celkové množství hodnocených antokyanů v odrůdě 'Ceres' bylo 257,70 mg na 100 g plodů.

6.3.1.5 'MORAVIA'



Obrázek 35 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Moravia'

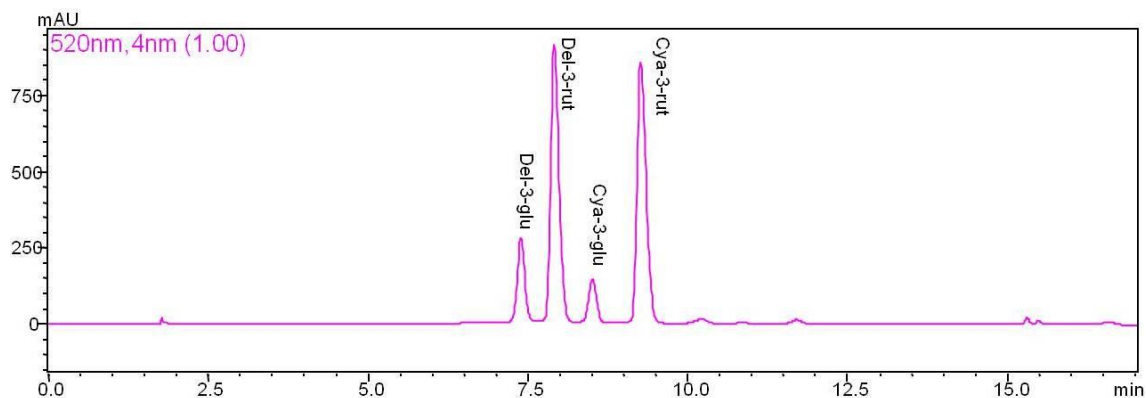
Tabulka 26 – Stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Moravia'

MORAVIA	A	c [mg/l]	[mg/100g]
del-3-glu	499184	15,36	7,68
del-3-rut	4471610	146,26	73,13
cya-3-glu	181771	1,14	0,57
cya-3-rut	3377381	104,53	52,26

A – průměrná plocha piků po přepočtu na navážku

Celkové množství hodnocených antokyanů v odrůdě 'Moravia' bylo 133,64 mg na 100 g plodů.

6.3.1.6 'OMETA'



Obrázek 36 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Omota'

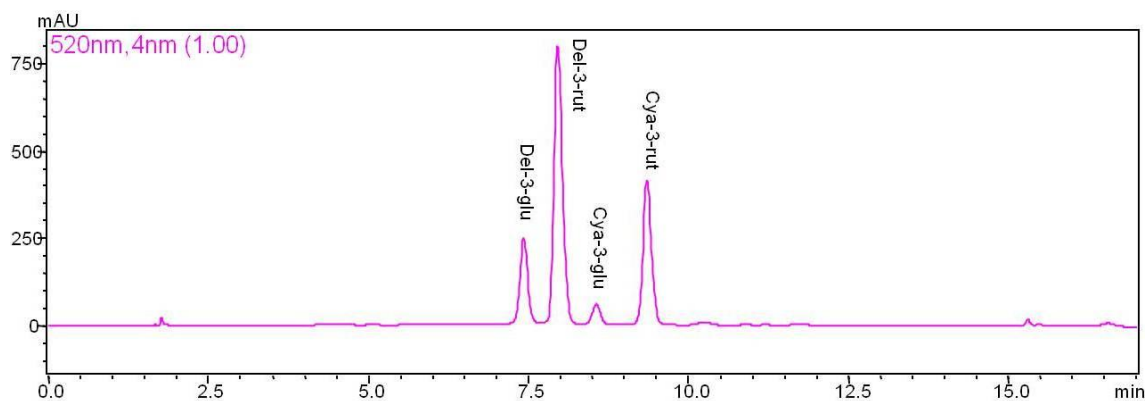
Tabulka 27 – Stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Omota'

OMETA	A	c [mg/l]	[mg/100g]
del-3-glu	2175294	57,33	28,66
del-3-rut	7755299	255,10	127,55
cya-3-glu	1165222	24,70	12,35
cya-3-rut	7735441	239,43	119,71

A – průměrná plocha piků po přepočtu na navážku

Celkové množství hodnocených antokyanů v odrůdě 'Omota' bylo 288,28 mg na 100 g plodů.

6.3.1.7 'LOTA'



Obrázek 37 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Lota'

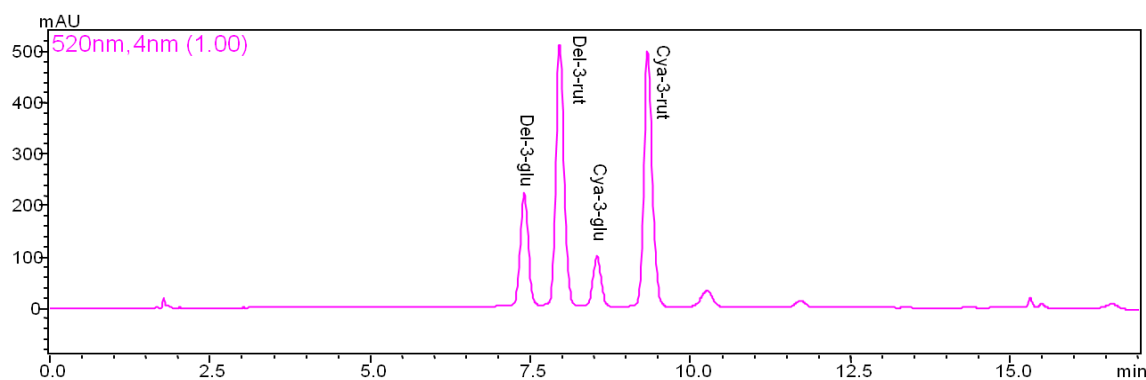
Tabulka 28 – Stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Lota'

LOTA	A	c [mg/l]	[mg/100g]
del-3-glu	2134593	56,31	28,15
del-3-rut	7537226	247,87	123,94
cya-3-glu	520198	9,25	4,62
cya-3-rut	3862551	119,54	59,77

A – průměrná plocha piků po přepočtu na navážku

Celkové množství hodnocených antokyanů v odrůdě 'Lota' bylo 216,48 mg na 100 g plodů

6.3.1.8 'TENAH'



Obrázek 38 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v odrůdě 'Tenah'

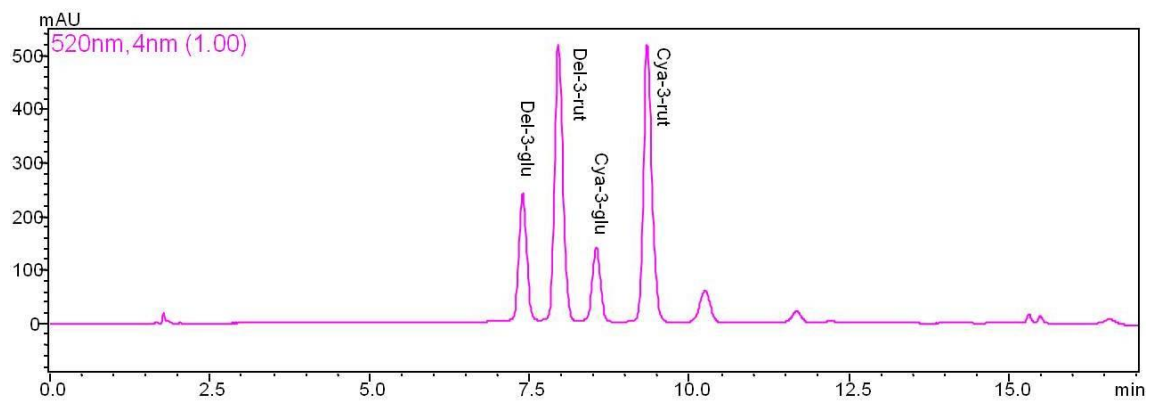
Tabulka 29 – Stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Tenah'

TENAH	A	c [mg/l]	[mg/100g]
del-3-glu	1951717	51,73	25,86
del-3-rut	4589952	150,18	75,09
cya-3-glu	848143	17,10	8,55
cya-3-rut	4529342	140,18	70,09

A – průměrná plocha piků po přepočtu na navážku

Celkové množství hodnocených antokyanů v odrůdě 'Tenah' bylo 179,60 mg na 100 g plodů.

6.3.1.9 'SEJANEC'



Obrázek 39 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Sejanec'

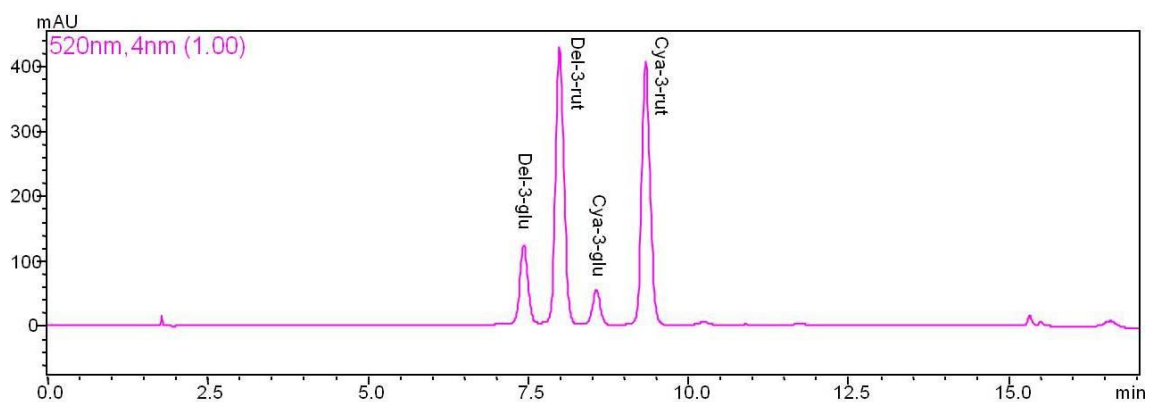
Tabulka 30 – Stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Sejanec'

SEJANEC	A	c [mg/l]	[mg/100g]
del-3-glu	2086656	55,11	27,55
del-3-rut	4790421	156,82	78,41
cya-3-glu	1247976	26,68	13,34
cya-3-rut	4897584	151,58	75,79

A – průměrná plocha piků po přepočtu na navážku

Celkové množství hodnocených antokyanů v odrůdě 'Sejanec' bylo 195,10 mg na 100 g plodů.

6.3.1.10 'FOKUS'



Obrázek 40 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Fokus'

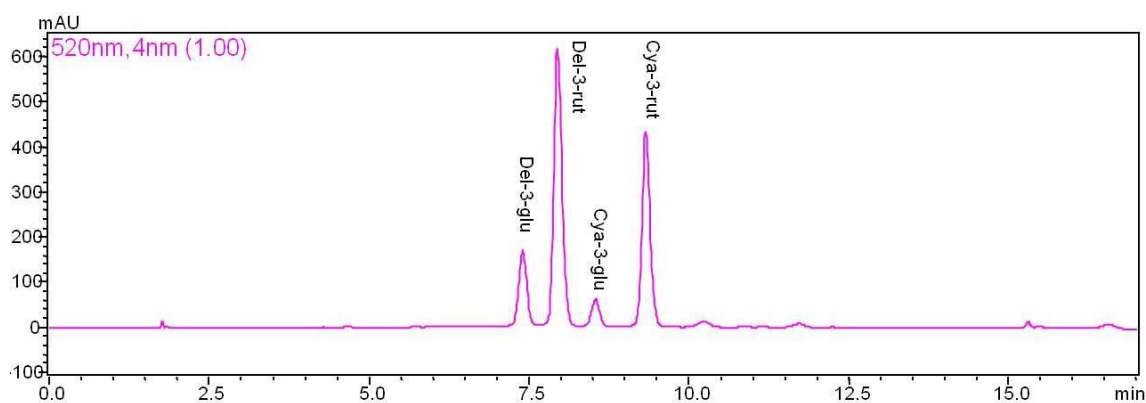
Tabulka 31 – Stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Fokus'

FOKUS	A	c [mg/l]	[mg/100g]
del-3-glu	1118562	30,87	15,43
del-3-rut	3864880	126,14	63,07
cya-3-glu	474978	8,16	4,08
cya-3-rut	3658055	113,21	56,61

A – průměrná plocha píků po přepočtu na navážku

Celkové množství hodnocených antokyanů v odrůdě 'Fokus' bylo 139,19mg na 100 g plodů.

6.3.1.11 'CONSORT'



Obrázek 40 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Consort'

Tabulka 32 – Stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Consort'

CONSORT	A	c [mg/l]	[mg/100g]
del-3-glu	1363726	37,01	18,50
del-3-rut	5017950	164,36	82,18
cya-3-glu	490935	8,54	4,27
cya-3-rut	3467094	107,30	53,65

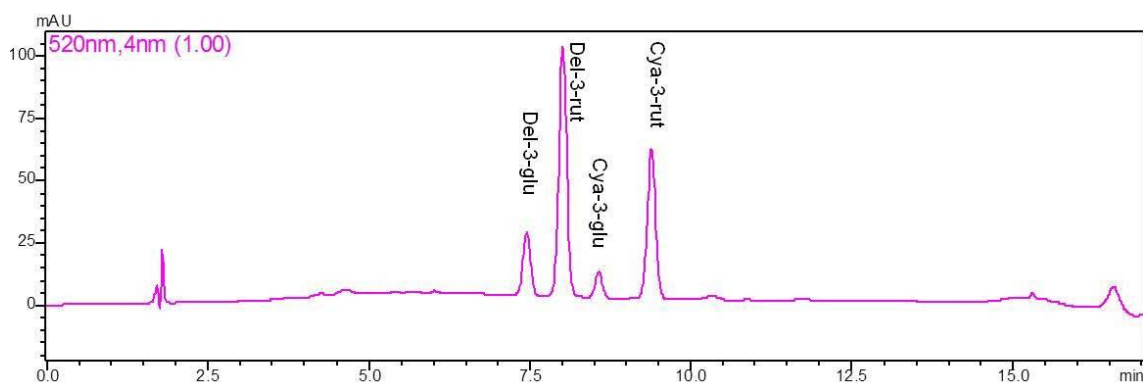
A – průměrná plocha píků po přepočtu na navážku

Celkové množství hodnocených antokyanů v odrůdě 'Consort' bylo 158,61 mg na 100 g plodů.

6.3.2 Stanovení obsahu antokyanů v rybízových džusech

Ke stanovení obsahu antokyanů v rybízových džusech se použily roztoky, jejichž přípravu popisuje kapitola 5.5.2. Z každého roztoku (dva od každého druhu džusu) byly provedeny dva nástřiky na kolonu. Každá získaná plocha eluční křivky se násobila dvěma, kvůli postupu při přípravě roztoku džusů (500 μ l džusu + 500 μ l roztoku MeOH s HCOOH). Nakonec byl spočten průměr ploch každého antokyanu a metodou kalibrační křivky se zjistil obsah jednotlivých antokyanů v mg/l.

6.3.2.1 HAPPY DAY



Obrázek 41 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v rybízovém džusu Happy Day

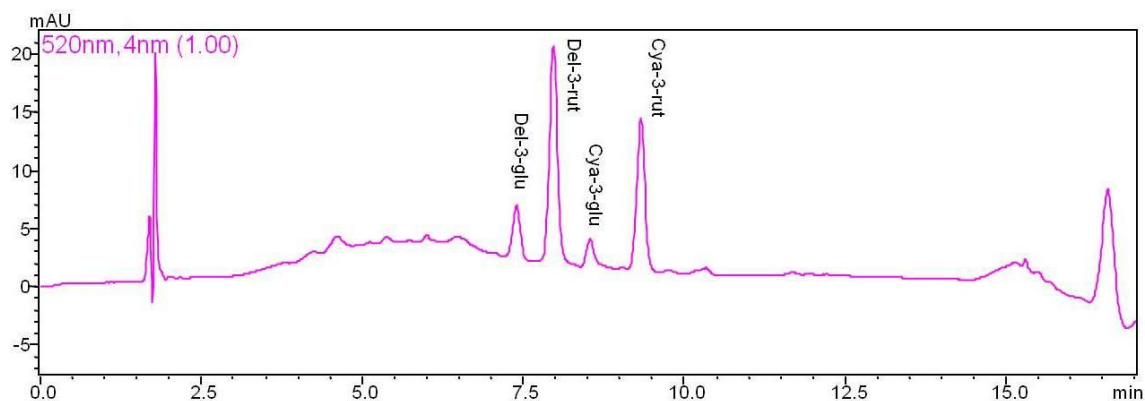
Tabulka 33 – Stanovené množství antokyanů v rybízovém džusu Happy Day

název antokyanu	A	c [mg/l]
del-3-glu	424346	13,49
del-3-rut	1707106	54,62
cya-3-glu	168966	3,96
cya-3-rut	1101660	34,08

A – plochy jednotlivých antokyanů vynásobené dvěma

Celkové zjištěné množství hodnocených antokyanů v rybízovém džusu Happy Day dosahovalo 106,15 mg/l.

6.3.2.2 GRANINI



Obrázek 42 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v rybízovém džusu Granini

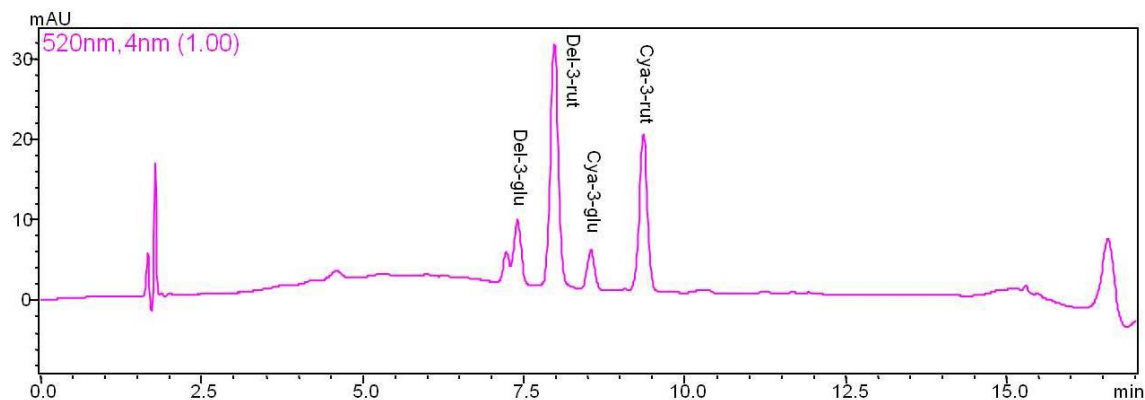
Tabulka 34 – Stanovené množství antokyanů v rybízovém džusu Granini

název antokyanu	A	c [mg/l]
del-3-glu	72145	4,67
del-3-rut	322293	8,72
cya-3-glu	38015	0,89
cya-3-rut	226018	6,97

A – plochy jednotlivých antokyanů vynásobené dvěma

Celkové zjištěné množství hodnocených antokyanů v rybízovém džusu Granini dosahovalo 21,25 mg/l.

6.3.2.3 RIO



Obrázek 43 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v rybízovém džusu Rio

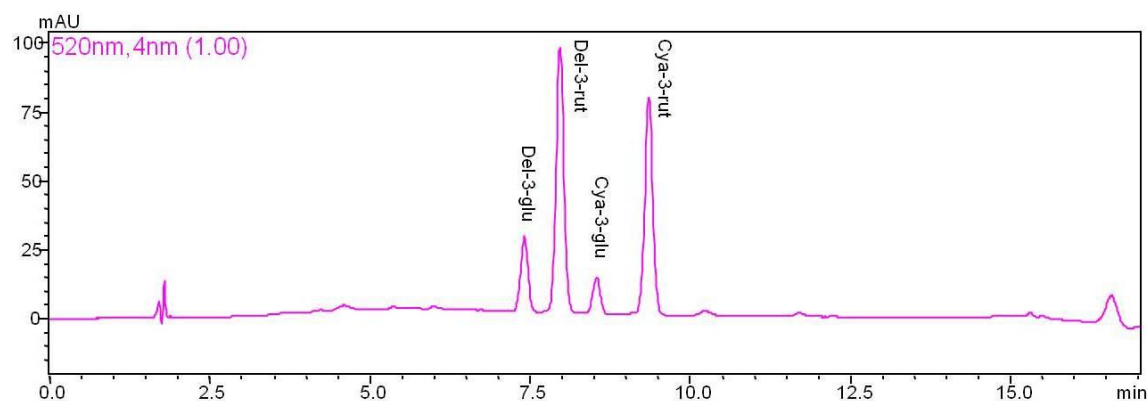
Tabulka 35 – Stanovené množství antokyanů v rybízovém džusu Rio

název antokyanu	A	c [mg/l]
del-3-glu	151734	6,66
del-3-rut	536212	15,81
cya-3-glu	76209	1,79
cya-3-rut	347742	10,74

A – plochy jednotlivých antokyanů vynásobené dvěma

Celkové zjištěné množství hodnocených čtyř antokyanů v džusu Rio bylo 35,00 mg/l

6.3.2.4 CAPPY



Obrázek 44 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v rybízovém džusu Cappy

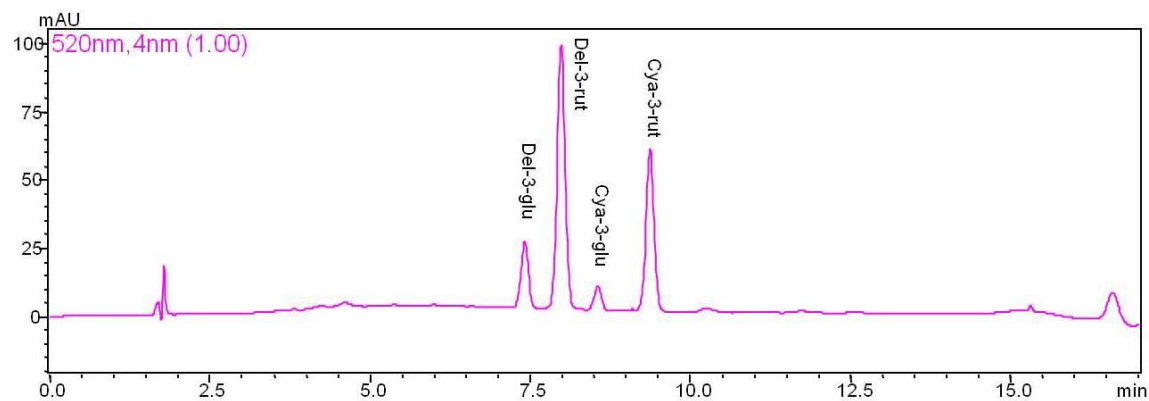
Tabulka 36 – Stanovené množství antokyanů v rybízovém džusu Cappy

název antokyanu	A	c [mg/l]
del-3-glu	436725	13,80
del-3-rut	1638291	52,34
cya-3-glu	206698	4,84
cya-3-rut	1386277	42,89

A – plochy jednotlivých antokyanů vynásobené dvěma

Celkové zjištěné množství hodnocených čtyř antokyanů v džusu Cappy bylo 113,87 mg/l.

6.3.2.5 *TESCO*



Obrázek 45 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v rybízovém džusu Tesco

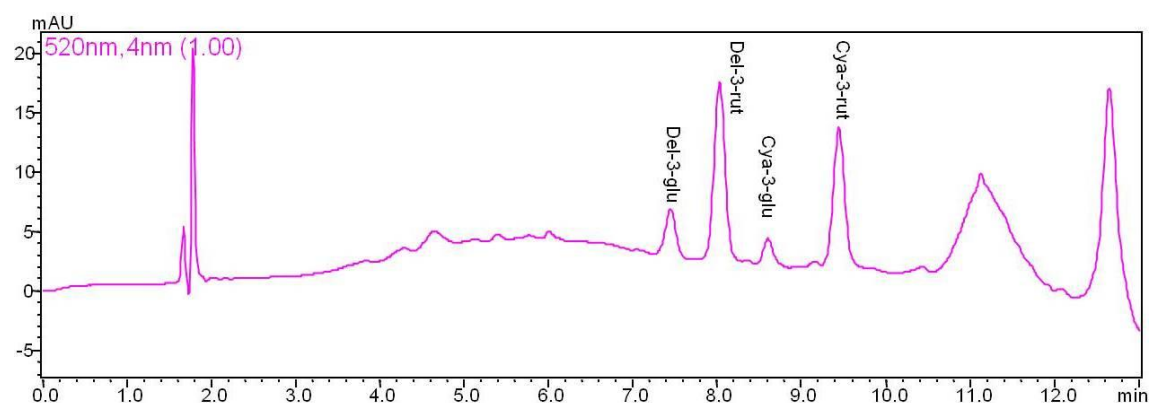
Tabulka 37 – Stanovené množství antokyanů v rybízovém džusu Tesco

název antokyanu	A	c [mg/l]
del-3-glu	412379	13,19
del-3-rut	1736470	55,59
cya-3-glu	141360	3,31
cya-3-rut	1076072	33,29

A – plochy jednotlivých antokyanů vynásobené dvěma

Celkové zjištěné množství hodnocených čtyř antokyanů v džusu Tesco bylo 105,38 mg/l.

6.3.2.6 *HOLLINGER*



Obrázek 46 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v rybízovém džusu Hollinger

Tabulka 38 – Stanovené množství antokyanů v rybízovém džusu Hollinger

název antokyanu	A	c [mg/l]
del-3-glu	71754	4,66
del-3-rut	265745	6,84
cya-3-glu	31349	0,73
cya-3-rut	216697	6,69

A – plochy jednotlivých antokyanů vynásobené dvěma

Celkové zjištěné množství hodnocených čtyř antokyanů v džusu Hollinger bylo 18,92mg/l.

7 ZÁVĚR

V této diplomové práci je popsána HPLC metoda pro současné stanovení delphinidin-3-glukosidu, delphinidin-3-rutinosidu, cyanidin-3-glukosidu a cyanidin-3-rutinosidu. Pro danou metodu byly stanoveny následující optimální podmínky. Byla zvolena kolona Supelco Analytical, Ascentis Express C18 2,7 μm , 15 cm x 4,6 mm. Jako mobilní fáze byl použit roztok methanolu a 2% kyselina mravenčí, analýza probíhala za podmínek gradientové eluce, které jsou uvedeny v kapitole 5.2 Podmínky separace. Byl zvolen průtok 0,8 ml/min a teplota 50°C. Dle dostupné literatury a hodnot absorpčních maxim jednotlivých antokyanů se pro detekci s využitím DAD detektoru zvolila vlnová délka 520 nm.

Retenční čas delphinidin-3-glukosidu byl 7.424 minut, delphinidin-3-rutinosidu 7.924, cyanidin-3-glukosidu 8.565 a cyanidin-3-rutinosidu 9.304.

Při volbě vnitřního standardu nebyla nalezena vhodná látka. Zjištěním linearitu v daném koncentračním rozmezí 10–500 mg/l byly dosaženy tyto hodnoty korelačních koeficientů. Pro delphinidin-3-glukosid 0,99980, pro delphinidin-3-rutinosid 0,99915, pro cyanidin-3-glukosid 0,99897 a pro cyanidin-3-rutinosid 0,99962. Opakovatelnost zjištěna na koncentračních hladinách 250, 100 a 20 mg/l byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka. Hodnoty RSD jednotlivých analytů při všech daných koncentracích nabývaly hodnot $< 1 \%$. Přesnost metody vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka dosahovala pro každou analyzovanou látku hodnoty $< 2,1 \%$. Správnost byla vyjádřena jako výtěžnost. Průměrné hodnoty výtěžnosti stanovovaných látek se pohybovaly od 90,09 do 92,63 % a hodnoty relativní směrodatné odchylky pro každý analyt se pohybovaly v rozmezí 1,63 až 5,22 %. Rozlišení mezi dvěma sousedními píky vždy dosahovalo hodnoty $> 1,5$. Hodnoty faktoru asymetrie píků nabývaly hodnot od 1.008 do 1.126.

Zjištěný obsah celkového množství hodnocených antokyanů černého rybízu dosahoval hodnot 205,02 mg/100 g pro odrůdu 'Ruben', 78,16 mg/100 pro odrůdu 'Ben Connan', 133,64 mg/100 g pro odrůdu 'Moravia', 179,60 mg/100 g pro odrůdu 'Tenah', 195,10 mg/100 g pro odrůdu 'Sejanec', 139,19 mg/100 g pro odrůdu Fokus, 158,61 mg/100 g pro odrůdu 'Consort', 213,95 mg/100 g pro odrůdu 'Ben Lomond'. Nejvyšší celkové zastoupení antokyanů bylo zjištěno v těchto třech kultivarech: 288,28 mg/100 g

pro odrůdu 'Ometa', 257,70 mg/100 g pro odrůdu 'Ceres', a 216,48 mg/100 g pro odrůdu 'Lota'.

Zjištěný celkový obsah antokyanů v rybízových džusech je uveden v mg/l: Happy Day 106,15; Granini 21,25; Cappy 113,8; Tesco 105,38; Hollinger 18,92 a Rio 35,00.

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Vzorec flavanu [9].....	11
Obrázek 2 – Obecný vzorec antokyanidinů [1]	13
Obrázek 3 – Vzorec delphinidin-3-glukosidu [12].....	13
Obrázek 4 – Vzorec delphinidin-3-rutinosidu [15].....	14
Obrázek 5 – Vzorec cyanidin-3-glukosidu [13]	15
Obrázek 6 – Vzorec cyanidin-3-rutinosidu [14]	15
Obrázek 7 – Schéma HPLC systému [20]	20
Obrázek 8 – Vzorec pro kapacitní faktor [22]	21
Obrázek 9 – Vzorec pro kapacitní faktor při eluci gradientové [43]	21
Obrázek 10 – Vzorec pro distribuční konstantu [23].....	22
Obrázek 11 – Vzorec výtěžnosti [19]	22
Obrázek 12 – Absorpční spektrum delphinidin-3-glukosidu.....	31
Obrázek 13 – Absorpční spektrum delphinidin-3-rutinosidu	31
Obrázek 14 – Absorpční spektrum cyanidin-3-glukosidu	32
Obrázek 15 – Absorpční spektrum cyanidin-3-rutinosidu.....	32
Obrázek 16 – Chromatogram za použití MF o složení: 2% HCOOH/MeOH, 35°C.....	34
Obrázek 17 – Chromatogram za použití MF o složení: 2% HCOOH/acetonitril, 35°C.	34
Obrázek 18 – Chromatogram za použití MF o složení: 2% HCOOH/acetonitril, 50°C.	35
Obrázek 19 – Chromatogram za použití MF o složení: 2% HCOOH/MeOH, 50°C.....	35
Obrázek 20 – Chromatografický záznam směsi standardních látek	36
Obrázek 21 – Chromatografický záznam černého rybízu	37
Obrázek 22 – Chromatogram za optimálních separačních podmínek	38
Obrázek 23 – Chromatogram potravinářského barviva Amaranth.....	39
Obrázek 24 – Chromatogram potravinářského barviva Indigo Carmin	40
Obrázek 25 – Kalibrační závislost pro delphinidin-3-glukosid	42
Obrázek 26 – Kalibrační závislost pro delphinidin-3-rutinosid.....	43
Obrázek 27 – Kalibrační závislost pro cyanidin-3-glukosid	44
Obrázek 28 – Kalibrační závislost pro cyanidin-3-rutinosid	45
Obrázek 29 – Výpočet použitý k přepočtu na navážku	48
Obrázek 30 – Výpočet použitý k přepočtu na navážku	49
Obrázek 31 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Ruben'	51

Obrázek 32 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Ben Lomond'	52
Obrázek 33 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Ben Connan'	53
Obrázek 34 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Ceres'	53
Obrázek 35 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Moravia'	54
Obrázek 36 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Ometa'	55
Obrázek 37 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Lota'	55
Obrázek 38 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v odrůdě 'Tenah'	56
Obrázek 39 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Sejanec'	57
Obrázek 40 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Consort'	58
Obrázek 41 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v rybízovém džusu Happy Day.....	59
Obrázek 42 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v rybízovém džusu Granini.....	60
Obrázek 43 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v rybízovém džusu Rio	60
Obrázek 44 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v rybízovém džusu Cappy.....	61
Obrázek 45 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v rybízovém džusu Tesco.....	62
Obrázek 46 – Chromatografický záznam stanovení obsahu antokyanů v rybízovém džusu Hollinger.....	62

9 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Podmínky gradientové eluce.....	25
Tabulka 2 – Příprava kalibračních roztoků v koncentračním rozmezí 10 – 250 mg/l....	27
Tabulka 3 – Příprava kalibračních roztoků o koncentraci standardů 500 mg/l	27
Tabulka 4 – Správnost metody – příprava pracovních roztoků	28
Tabulka 5 – Program gradientové eluce	33
Tabulka 6 – Retenční časy [min.] eluátů při teplotách 35°C a 50°C.....	36
Tabulka 7 – Optimální podmínky gradientové eluce.....	37
Tabulka 8 – Retenční časy testovaných indikátorů	38
Tabulka 9 – Retenční časy testovaných potravinářských barviv	39
Tabulka 10 – Hodnoty rozlišení chromatografických píků	41
Tabulka 11 – Hodnoty asymetrie píků.....	41
Tabulka 12 – Hodnoty kapacitních faktorů jednotlivých analytů.....	42
Tabulka 13 – Parametry pro lineární regresi delphinidin-3-glukosidu.....	43
Tabulka 14 – Parametry pro lineární regresi delphinidin-3-rutinosidu	44
Tabulka 15 – Parametry pro lineární regresi cyanidin-3-o-glukosidu	45
Tabulka 16 – Parametry pro lineární regresi cyanidin-3-rutinosidu.....	46
Tabulka 17 – Opakovatelnost analýzy jednotlivých roztoků o koncentraci 20 mg/l.....	46
Tabulka 18 – Opakovatelnost analýzy jednotlivých roztoků o koncentraci 100 mg/l....	47
Tabulka 19 – Opakovatelnost analýzy jednotlivých roztoků o koncentraci 250 mg/l....	47
Tabulka 20 – Hodnoty pro výpočet přesnosti analytické metody	48
Tabulka 21 – Výťažnost analytické metody.....	50
Tabulka 22 – Stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Ruben'	52
Tabulka 23 – Stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Ben Lomond'	52
Tabulka 24 – Stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Ben Connan'	53
Tabulka 25 – Stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Ceres'	54
Tabulka 26 – Stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Moravia'	54
Tabulka 27 – Stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Ometa'	55
Tabulka 28 – Stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Lota'	56
Tabulka 29 – Stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Tenah'	56
Tabulka 30 – Stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Sejanec'	57
Tabulka 31 – Stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Fokus'	58
Tabulka 32 – Stanovení obsahu antokyanů v kultivaru 'Consort'	58

Tabulka 33 – Stanovené množství antokyanů v rybízovém džusu Happy Day.....	59
Tabulka 34 – Stanovené množství antokyanů v rybízovém džusu Granini.....	60
Tabulka 35 – Stanovené množství antokyanů v rybízovém džusu Rio	61
Tabulka 36 – Stanovené množství antokyanů v rybízovém džusu Cappy	61
Tabulka 37 – Stanovené množství antokyanů v rybízovém džusu Tesco	62
Tabulka 38 – Stanovené množství antokyanů v rybízovém džusu Hollinger.....	63

10 LITERATURA

- [1] A. Castañeda-Ovando, M. L. Pacheco-Hernández, M. E. Pàes-Hernández, J. A. Rodríguez, C. A. Galán-Vidal. Chemical studies of anthocyanins: A review, *Food Chemistry*, 2009, 113, s. 859–871
- [2] H. J. Roy, S. Lundy, C. Eriksen, B. Kalicki. Anthocyanins, Pennington Nutrition Series No 1, 2009
- [3] P-G. Pietta. Flavonoids as Antioxidants, *J. Nat. Prod.*, 2000, 63 (7), s. 1035–1042,
- [4] R. Koes, W. Verweij, F. Quattrocchio. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways, *Trends in Plant Science*, 2005, 10 (5), s. 236–42
- [5] J. Mierziak, K. Kostyn, A. Kulma. Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment, *Molecules* 2014, 19, s. 16240–16265
- [6] S. Kumar, A. K. Pandey. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview, *The Scientific World Journal* , 2013, vol. 2013
- [7] J. He, M. M. Giusti. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties, *Annual Review of Food Science and Technology*, 2010, vol 1, s. 163–187
- [8] P. Klouda, *Moderní analytické metody*, 2. vydání, Klouda Pavel, Ostrava, 2003, s. 9–26, ISBN 80-86369-07-2,
- [9] Wikimedia, flavan structure, dostupné na adrese: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Flavan_acsv.svg
(citováno 28. 2. 2016)
- [10] Český lékopis 2009 – doplněk 2013, Grada, Praha, 2013, s. 92–122, ISBN 978-80-247-4679-1
- [11] Pubchem, Delphinidin 3-glucoside compound summary, dostupné na adrese: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/443650#section=Top>
(citováno 22 3. 2016)
- [12] ChEBI, Delphinidin 3-O-β-D-glucoside, dostupné z adresy: <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:31463>
(citováno 22. 3. 2016)

- [13] ChEBI, Cyanidin 3-O- β -D-glucoside, dostupné na adrese: <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:28426>
(citováno 22. 3. 2016)
- [14] ChEBI, Cyanidin 3-O-rutinoside, dostupné z adresy: <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:28064>
(citováno 22. 3. 2016)
- [15] CheBI, Tulipanin, dostupné z adresy: <http://www.ebi.ac.uk/chebi>
(citováno 22. 3. 2016)
- [16] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. W. Dolan. Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3rd edition, John Wiley & Sons, 2011, ISBN 978-0-470-16754-0
- [17] Laboratory info, High Performance Liquid Chromatography: Principle, Types, Instrumentation and Applications, dostupné na adrese: <http://laboratoryinfo.com/hplc/> (citováno 1. 4. 2016)
- [18] Hplc.cz, Tipy a triky, Odvzdušnění (degassing) mobilní fáze, dostupné na adrese: <http://www.hplc.cz/> (citováno 1. 4. 2016)
- [19] J. Klimeš a kol. Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami, Hradec Králové, Nucleus HK, 2011, ISBN 978-80-87009-29-1
- [20] Uft.uni-bremen.de, Scheme of a HPLC system, dostupné na adrese: <http://chem.uft.uni-bremen.de/Chromatography/chrom065.htm>
(citováno 24. 3. 2016)
- [21] Hplc.cz, Základní charakteristiky chromatografického procesu: retenční čas, dostupné na adrese: <http://www.hplc.cz/> (citováno 24. 3. 2016)
- [22] Hplc.cz, Základní charakteristiky chromatografického procesu: kapacitní poměr, dostupné na adrese: <http://www.hplc.cz/> (citováno 24. 3. 2016)
- [23] Hplc.cz, Základní charakteristiky chromatografického procesu: distribuční konstanta, dostupné na adrese: <http://www.hplc.cz/> (citováno 24. 3. 2016)
- [24] Hplc.cz, Validace analytických metod, Validační parametry: přesnost metody, dostupné na adrese: <http://www.hplc.cz/> (citováno 24. 3. 2016)
- [25] Hplc.cz, Validace analytických metod, Validační parametry: správnost metody, dostupné na adrese: <http://www.hplc.cz/> (citováno 24. 3. 2016)

- [26] Hplc.cz, Validace analytických metod, Validační parametry: opakovatelnost metody, dostupné na adrese: <http://www.hplc.cz/> (citováno 24. 3. 2016)
- [27] Hplc.cz, Validace analytických metod, Validační parametry: linearita, dostupné na adrese: <http://www.hplc.cz/> (citováno 24. 3. 2016)
- [28] Hplc.cz, Teorie HPLC, Separace na chromatografické koloně: rozlišení, dostupné na adrese: <http://www.hplc.cz/> (citováno 24. 3. 2016)
- [29] Hplc.cz, Tipy a triky: faktor asymetrie, dostupné na adrese: <http://www.hplc.cz/> (citováno 24. 3. 2016)
- [30] J. G. Bordonaba, P. Crespo, L. A. Terry. A new acetonitrile-free mobile phase for HPLC-DAD determination of individual anthocyanins in blackcurrant and strawberry fruits: A comparison and validation study, *Food Chemistry*, 2011, 129, s. 1265–1273
- [31] E. García-Beneytez, F. Cabello, E. Revilla. Analysis of Grape and Wine Anthocyanins by HPLC-MS, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 19, s. 5622–5629
- [32] Q. You, B. Wang, F. Chen, Z. Huang, X. Wang, P. G. Luo. Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars, *Food Chemistry*, 2011, 125, s. 201–208
- [33] M. J. Anttonen, R. O. Karjalainen. High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Black Currant (*Ribes nigrum* L.) Fruit Phenolics Grown either Conventionally or Organically, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54 (20), s. 7530–7538
- [34] X. Wu, R. L. Prior. Identification and Characterization of Anthocyanins by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry in Common Foods in the United States: Vegetables, Nuts, and Grains, *J. Agric. Food Chem.*, 2005 J., 53 (8), s. 3101–3113
- [35] J. M. Koponen, A. M. Happonen, P. H. Mattila, A. R. Törrönen. Contents of Anthocyanins and Ellagitannins in Selected Foods Consumed in Finland, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55 (4), s. 1612–1619
- [36] N. O. Can, G. Arli, Z. Atkosar. Rapid determination of free anthocyanins in foodstuffs using high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 2012, 130, s. 1082–1089

- [37] G. A. B. Canuto, D. R. Oliveira, L. S. M. da Conceicao, J. P. S. Farah, M. F. M. Tavares. Development and validation of a liquid chromatography method for anthocyanins in strawberry (*Fragaria* spp.) and complementary studies on stability, kinetics and antioxidant power. *Food Chemistry*, 2016, 192, s. 566-574
- [38] J. G. Bordonaba, L. A. Terry. Biochemical Profiling and Chemometric Analysis of Seventeen UK-Grown Black Currant Cultivars, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56 (16), s. 7422–7430
- [39] X. Xie, R. Zhao, G. X. Shen. Influence of Delphinidin-3-glucoside on Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in Cultured Endothelial Cells, *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60 (7), s 1850–1856
- [40] R. Feng, H-M. Ni, S. Y. Wang, I. L. Tourkova, M. R. Shurin, H. Harada, X-M. Yin. Cyanidin-3-rutinoside, a Natural Polyphenol Antioxidant, Selectively Kills Leukemic Cells by Induction of Oxidative Stress, *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282, s. 13468–13476.
- [41] H. Matsumoto, Y. Nakamura, S. Tachibanaki, S. Kawamura, M. Hirayama. Stimulatory Effect of Cyanidin 3-Glycosides on the Regeneration of Rhodopsin, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51 (12), s. 3560–3563
- [42] M. Kato, T. Tani, N. Terahara, T. Tsuda. The Anthocyanin Delphinidin 3-Rutinoside Stimulates Glucagon-Like Peptide-1 Secretion in Murine GLUTag Cell Line via the Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Kinase II Pathway, *PLoS ONE*, 2015, 10 (5)
- [43] L. Nováková, M. Douša a kol. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*, Lucie Nováková (Hradec Králové), Michal Douša (Klatovy), 2013, ISBN 978-80-260-4243-3