

**VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ  
UNIVERZITA BRNO**

**Farmaceutická fakulta**

**Ústav přírodních léčiv**

# **Praktická cvičení z Fytochemie**

**Návody pro laboratorní cvičení**

**PharmDr. Markéta Gazdová, Ph.D.**

**PharmDr. Zuzana Hanáková, Ph.D.**

# **1. Izolace obsahových látek rostlin – extrakční metody, purifikace**

## **Obsahové látky v rostlinách:**

- Primární metabolity (cukry, AMK, puriny a pyrimidiny NK, tuky, MK, chlorofyl a ostatní rostlinná barviva)
- Sekundární metabolity (terpenoidy, dusíkaté látky, fenolické látky, acetáty)

## Dělení látek v rostlinách:

- Hlavní
- Vedlejší
- Balastní (chlorofyl, celulóza, lignin)

## Fixace účinných látek:

- Chemicky
- Fyzikálně

## **Metody získávání účinných látek:**

### **EXTRAKCE**

Metoda, při níž dochází k dělení mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, které mohou být v různých skupenstvích (pevná látka/kapalina; kapalina/kapalina)

## Typy extrakcí dle extrakčních médií:

- Kapalina
- Plyn
- Pevná látka

## Dělení extrakcí kapalinou:

- Totální
- Selektivní

## Typy extrakcí kapalinou podle průběhu:

- Periodické
  - Macerace
  - Digesce
    - Nálev
    - Odvar
- Semikontinuální
- Kontinuální

## **MIKROSUBLIMACE**

Metoda, jejímž principem je přeměna některých látek ze skupenství pevného do skupenství plynného s následnou desublimací na vhodném nosiči.

## **PURIFIKACE**

Vhodně zvolenou metodou extrakce lze získat co největší podíl látek žádoucích ku množství nečistot, které jsou oddělovány dalšími extrakčními či purifikačními postupy.

- Liquid-liquid extrakce
- Lyofilizace
- Precipitace
- Krystalizace

## Úloha č. 1:

### **Zpracování rostlinného materiálu pro fytochemickou analýzu, macerace**

Nejjednodušší extrakční metodou používanou ve fytochemické laboratoři pro získávání obsahových látek rostlin je macerace. Jejími hlavními výhodami jsou jednoduchost provedení, nenáročnost finanční i přístrojová, při vhodném nastavení také účinnost a selektivita.

Macerace se provádí v dobře uzavřených nádobách chráněných před světlem za normální teploty. Jednorázová vsádka materiálu se extrahuje daným množstvím extrakčního činidla po určité době (nejčastěji 24 h).

V rámci této úlohy budeme zpracovávat dřevo stromu *Cudrania tricuspidata* a připravovat z něj macerát, se kterým budeme dále pracovat na následujícím cvičení.

#### **Postup:**

Cca 100 g usušeného dřeva kudrání vložíme do připravené stojatky. Následně zalijeme 500-1000 ml ethanolu tak, aby bylo dřevo zcela ponořeno. Obsah promícháme pomocí skleněné tyčinky a nádobu uzavřeme a řádně označíme. Necháme macerovat do následujícího cvičení.

#### **Nákres:**

#### **Závěr:**

## Úloha č. 2:

### Izolace rostlinných barviv z *Urtica dioica*

*Urtica dioica* (Urticaceae), kopřiva dvoudomá, obsahuje v listech mj. vysoký podíl rostlinných barviv, především chlorofyl, karotenoidy, flavonoidy a xanthofyly. V acetonovém extraktu budeme tato barviva později identifikovat pomocí metody tenkovrstvé chromatografie (TLC) a izolovat sloupcovou chromatografií (CC).

#### **Postup:**

10 g čerstvých kopřivových listů se nastříhá a extrahuje se 300 ml acetonu v Soxhletově extraktoru po dobu 4 hodin. Extrakt se poté vysuší bezvodým síranem sodným, zfiltruje se a na vakuové odparce se následně odpaří na objem cca 10 ml.

#### **Schéma Soxhletova extraktoru:**

#### **Závěr:**

## Úloha č. 3:

### Izolace extraktivních látek ze *Species urologicae*

*Species urologicae* je rostlinná směs k přípravě čaje s diuretickými a antiseptickými účinky. Izolací methanolem získáme zejména fenolové glykosidy a flavonoidy.

#### Postup:

1 g čajové směsi se 15 minut vaří s 10 ml vody a 10 ml methanolu pod zpětným chladičem na vodní lázni. Směs se poté ještě za horka zfiltruje přes vatou, k filtrátu se po ochlazení přidá 5 ml roztoku octanu olovnatého (vysrážení tříslovin) a opět se zfiltruje. Filtrát se zahustí a uschová se do lékovky pro chromatografické stanovení.

#### Nákres aparatury:

#### Závěr:

## Úloha č. 4:

### Mikrosublimate kofeinu

Při opatrném zahřívání kávy sublimuje při 140–150 °C kofein ve formě drobných jehličkovitých krystalů, které pozorujeme pod mikroskopem.

#### Postup:

Asi 0,1 g zkoušené práškové drogy umístíte do středu hodinového skla o průměru asi 7 cm. Sklo se pokryje plochou skleněnou destičkou, jejíž okraje přesahují asi o 1 cm hodinové sklo (lze také nahradit druhým hodinovým sklíčkem menšího průměru). Na horní destičku umístíme kádinku se studenou vodou, aby docházelo ke kondenzaci par. V případě horního hodinového sklíčka na něj umístíme vatu namočenou ve studené vodě. Droga se opatrně zahřívá minimálně 15 minut na azbestové síťce malým plamenem (nejméně 10–12 cm pod síťkou). Po skončení sublimace z horní destičky nebo sklíčka odpaříme vodu, po ochlazení pozorujeme pod mikroskopem a krystalky zakreslíme do protokolu.

#### Nákres mikrosublimateční aparatury:

#### Nákres jehličkovitých krystalků kofeinu:

#### Závěr:

## Úloha č. 5:

### **Purifikace extraktu *Cudrania tricuspidata* liquid-liquid extrakcí**

Rozdělování mezi nemísitelná rozpouštědla (liquid-liquid extrakce) neboli vytřepávání je metodou, pro jejíž provedení využíváme omezenou mísitelnost rozpouštědel, nacházejících se na opačných koncích eluotropní řady. Vzorek rozpuštěný v jedné fázi se vloží do dělicí nálevky a přidá se druhé, nemísící se rozpouštědlo (nejčastěji v poměru 1:1). Při vytřepávání dochází k difuzi extrahovaných látek a ustanovení koncentrační rovnováhy podle rozpustnosti látek v rozpouštědlech. Po separaci jsou jednotlivé fáze odděleny a odpařeny na rotační vakuové odparce.

V rámci cvičení budeme provádět vytřepávání ethanolickeho extraktu, který jsme získali macerací dřeva kudráníe na předchozím cvičení a následným vysušením na rotační vakuové odparce.

#### **Postup:**

Suchý ethanolickeý extrakt rozpustíme ve 200 ml 80 % methanolu, přidáme 100 ml hexanu a přelijeme do dělicí nálevky, kde pozorujeme dvě zřetelně ohraničené vrstvy. Dělicí nálevku vyjmeme ze stojanu a **opatrně** protřepáváme za současného průběžného odpouštění par pomocí kohoutu. Vložíme zpět do stojanu, necháme ustálit a následně oddělíme obě získané vrstvy do připravených kádinek, kvantitativně je přeneseme do varných baněk a odpaříme na rotační vakuové odparce do sucha. Methanolickeý podíl poté rozpustíme ve stejných objemových dílech (200 ml) chloroformu a vody a opět pozorujeme oddělování dvou nemísitelných kapalin. Provedeme vytřepání za současného odpouštění par, necháme ustálit, a jakmile jsou kapaliny viditelně odděleny, odpustíme chloroformovou vrstvu do připravené kádinky. Chloroformový podíl odpaříme na rotační vakuové odparce do sucha, k vodnému zbytku přidáme stejný objemový díl (200 ml) ethylacetátu. Po protřepání a oddělení obou vrstev je postupně odpustíme do připravených kádinek. Ethylacetátový podíl odpaříme na rotační vakuové odparce do sucha, z vodného podílu je zbytková voda vhodně odstraněna technikou lyofilizace. Získané 4 podíly budou použity pro chromatografickou separaci v následujících cvičeních.

#### **Nákres aparatury a schéma postupu:**

#### **Závěr:**



## **2. Chromatografická analýza a separace rostlinných extraktů**

Analytická separační metoda, při níž dochází k rozdělování molekul analyzovaného vzorku mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, přičemž látky mají různou afinitu k jednotlivým fázím.

- Fáze mobilní
- Fáze stacionární

Dělení dle různých kritérií:

- 1) Dle charakteru stacionární fáze (SF)
  - Uložena v ploše
  - Uložena v koloně
- 2) Dle charakteru mobilní fáze (MF)
  - Kapalina
  - Plyn
- 3) Dle povahy sil, které způsobují dělení mezi SF a MF
  - Adsorpční
  - Rozdělovací
  - Iontová výměna
  - Vylučovací
  - Afinitní
- 4) Dle požadovaného využití
  - Analytická
  - Preparativní

TLC: chromatografie na tenké vrstvě, hojně rozšířená metoda v analýze sekundárních metabolitů. Provádí se v plošném uspořádání, SF (nejčastěji silikagel) je v tenké vrstvě na inertním podkladu, kterým je kovová folie nebo sklo.

Chování látek separovaných pomocí TLC popisujeme pomocí tzv. retenčního faktoru ( $R_f$ ).

Retenční faktor:

Bezrozměrná veličina, pro každou látku je za přesně daných podmínek konstantní

**Výpočet:**

### Detekční metody pro TLC:

- Nedestruktivní
- Destruktivní
  - Nespecifické
  - Specifické

CC: typ chromatografie, kdy je SF uložena v skleněné koloně, kde probíhá dělení látek. K plnění kolony stacionární fází dochází přímo v laboratoři v čase potřeby. Látky opakovaně přechází mezi SF a MF a na základě svých fyzikálně-chemických vlastností jsou různě dlouho zadržovány stacionární fází. MF přechází přes SF nejčastěji pomocí gravitace, příp. mírným přetlakem nebo podtlakem.

HPLC: analytická metoda, při které dochází k dělení látek mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze (SF a MF), přičemž stacionární fáze s velmi malými částicemi o standardní velikosti homogenně vyplňuje kolonu (kolony pro HPLC jsou vyráběny komerčně a jsou kovové) a mobilní fáze protéká kolonou za zvýšeného tlaku. Zařízení pro HPLC jsou mnohem složitější než u klasické sloupcové chromatografie a jsou ovládána pomocí počítače.

## Úloha č. 6:

### TLC extraktu ze *Species urologicae* – důkaz arbutinu

**Zkoušený roztok:** Extrakt *Species urologicae* připravený na předchozím cvičení

**Porovnávací roztok:** Methanolický roztok arbutinu (2 mg/10 ml)

**Vyvíjecí směs:** Ethylacetát: methanol: voda (100:17:13)

**Detekční činidlo I:** Diazotovaná kyselina sulfanilová (připravit v čase potřeby – k 5 ml kyseliny sulfanilové přidejte dusitan sodný do světle žlutého zabarvení roztoku)

**Detekční činidlo II:** Ethanolový roztok KOH

#### Postup:

Na TLC destičku se nanese odděleně dvě skvrny zkoušeného a porovnávacího roztoku a vyvíjí se po dráze 10–12 cm (cca 1 cm pod horní okraj desky). Po vysušení fénem se postříká detekčním činidlem I a po 5 minutách činidlem II. Objeví se červené skvrny v místě, kde se nachází arbutin.

Spočítejte  $R_F$  standartu a skvrny ve vzorku.

**Výpočet  $R_F$  standartu a skvrny v zkoušeném vzorku:**

**Závěr:**

## Úloha č. 7:

### TLC extraktu *Urtica dioica* – identifikace rostlinných barviv

**Zkoušený roztok:** Extrakt *Urtica dioica* připravený na minulém cvičení

**Vyvíjecí směs:** Ether: petrolether (1:1)

#### Pracovní postup:

Na vrstvu se nanese zkoušený roztok. Nanáška musí být natolik vysoká, aby byla dostatečně dobře patrná již po nanesení na start. TLC destička se vyvíjí po dráze 10–12 cm. Po vysušení při pokojové teplotě pozorujeme oddělené skvrny jednotlivých barviv.

$R_F = 1,0$	Karotenoidy	žlutá
$R_F = 0,48$	Feofytin	zelenohnědá
$R_F = 0,35$	Chlorofyl A	zelenomodrá
$R_F = 0,20$	Chlorofyl B	zelenožlutá
$R_F = 0,11-0$	Xanthofyly	světle zelená, žlutá

Spočítejte  $R_F$  hodnoty jednotlivých barviv na TLC destičce a zaznamenejte je do protokolu.

#### Výpočet $R_F$ hodnot jednotlivých barviv:

#### Závěr:

## Úloha č. 8:

### Preparativní TLC extraktu *Paulownia tomentosa* – izolace látek flavonoidní povahy

Chromatografické destičky lze využít jak pro analytické, tak pro preparativní účely. V případě analytického TLC zjišťujeme, zdali je analyzovaná látka totožná s referenčním standardem, případně v jakém množství je zastoupena v analyzované frakci. Cílem preparativní TLC je po vyvinutí destičky izolace látky ze směsi.

V této úloze budeme provádět preparativní TLC frakce získané pomocí sloupcové chromatografie methanolového podílu extraktu paulovnie, s cílem izolovat látky flavonoidní povahy, které budeme následně analyzovat pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC).

**Zkoušený roztok:** 10 mg frakce ze sloupcové chromatografie rozpuštěné v 0,5 ml methanolu

**Vyvíjecí směs:** Chloroform: ethylacetát (9:1)

**Postup:** Na start chromatografické desky nanese pomocí pipety vzorek. Na rozdíl od analytického TLC budeme pro preparativní účely nanášet vzorek v pruzích po celé délce startu a následně na krátkou dobu vložíme do kádinky s methanolem pro „vyrovnání“ pruhu na startu. TLC destičku vysušíme a necháme vyvíjet v mobilní fázi po dráze 10 cm. Po vysušení při pokojové teplotě detekujeme chromatogram pod UV lampou a zaznačíme polohu pásů pomocí tužky. Následně pomocí kopistky seškrábneme jednotlivé pásy a získaný silikagel přeneseme do připravené eppendorfky s 0,5 ml methanolu. Po centrifugaci přeneseme získaný supernatant do skleněného insertu ve vialce a vzorek dále analyzujeme pomocí HPLC.

**Závěr:**

## Úloha č. 9:

### Sloupcová chromatografie (CC), izolace karotenoidních barviv z *Urticae folium*

Extrakt z kopřivových listů obsahuje chlorofyl, který je směsí dvou látek: modrozeleného chlorofylu A a světlezeleného chlorofylu B. Kromě toho obsahuje žlutá barviva xanthofyly a karoteny. Jednotlivá barviva lze od sebe úspěšně oddělit metodou sloupcové chromatografie na silikagelu.

Cílem tohoto cvičení je izolace žlutých karotenoidních barviv pomocí sloupcové chromatografie. Získaná barviva budou použita na dalším cvičení pro stanovení obsahu pomocí spektrofotometrických metod.

**Zkoušený vzorek:** Extrakt *Urticae folium* připravený na předchozím cvičení

**Stacionární fáze:** silikagel

**Mobilní fáze:** Ether : petrolether (1:1)

**Pracovní postup:**

**Příprava kolony:**

Zúžený konec těsně nad kohoutem ucpěte kouskem vaty, kohout kolony uzavřete, do kolony nalijte přibližně 10 ml mobilní fáze a přesvědčte se, že kohout neprotéká a vata nevyplave. Pomocí dlouhé skleněné tyčinky opatrně vytlačte z vaty všechny vzduch. Do kádinky na 100 ml nasypete přibližně 30 ml silikagelu a přilévejte (za současného míchání suspenze skleněnou tyčinkou) přibližně 60 ml mobilní fáze tak, aby hmota nebyla příliš tuhá a mohla téci do kolony. Jakmile se už ze silikagelu neuvolňují vzduchové bubliny (není slyšet syčení), nalijte suspenzi po částech nálevkou do kolony, otevřete kohout a nechte silikagel usadit. Jakmile povrch stacionární fáze dále neklesá a hladina mobilní fáze dosáhla 1 cm nad úroveň stacionární fáze, kohout uzavřete. Na povrch silikagelu nyní opatrně spusťte připravené kolečko filtračního papíru s rozměry přesně stejnými, jaký je průměr kolony.

**Příprava vzorku:**

Vzorek byl získán na předchozím cvičení extrakcí kopřivových listů acetonem v Soxhletově extraktoru po dobu 4 hodin. Po extrakci byl vysušen bezvodým síranem sodným, zfiltrován a následně odpařen na objem cca 10 ml.

**Nanášení vzorku:**

Otevřete kohout kolony a nechte mobilní fázi dosáhnout těsně k povrchu silikagelu, kohout uzavřete. Do pipety naberte pomocí balonku 0,2 ml vzorku a opatrně naneste do středu filtračního papíru na začátku kolony tak, aby se povrch silikagelu neporušil a nechte vsáknout.

Opatrně převrstvěte 1 ml mobilní fáze a opět nechte vsáknout, zopakujte totéž ještě minimálně jednou do té doby, než se mobilní fáze přestane barvit. Při této činnosti je důležité, aby byl kohout střídavě otevřen a uzavřen, aby nedošlo k vyschnutí povrchu silikagelu. Opatrně doplňte kolonu mobilní fází. Otevřete kohout a nastavte rychlost jeho průtoku na přibližně 40 kapek/min.

### **Izolace karotenoidních barviv:**

Mobilní fázi jímáme do zkumavek či vialek po frakcích o objemu 10 ml. Vzhledem k tomu, že karotenoidní barviva jdou v tomto případě s čelem rozpouštědla, můžeme si dovolit jímat několik prvních frakcí dohromady do kádinky a použít je znova jako mobilní fázi. Jakmile se dostane žlutá zóna karotenoidních barviv 3 cm nad zúženou část kolony, začneme jímat do připravené lahvičky frakci karotenoidů.

Na koloně můžeme pozorovat několik barevných zón

$R_f = 1,0$	Karotenoidy	Žlutá
$R_f = 0,48$	Feofytin	Zelenohnědá
$R_f = 0,35$	Chlorofyl A	Zelenomodrá
$R_f = 0,20$	Chlorofyl B	Zelenožlutá
$R_f = 0,11-0$	Xantofyly	Světle zelená, žlutá

### **Nákres aparatury:**

### **Závěr:**

## Úloha č. 10:

### HPLC analýza extraktu *C. tricuspidata*

**Instrument:** HPLC systém Agilent 1100 series s DAD detektorem

**Zkoušený vzorek:** hexanový, chloroformový a ethylacetátový podíl EtOH extraktu *C. tricuspidata* získané liquid- liquid extrakcí na předcházejícím cvičení

**Mobilní fáze:** methanol (MeOH), 0,2% HCOOH, acetonitril (ACN); gradientová eluce

**Stacionární fáze:** kolona Ascentis® Express RP-amide 100 × 2,1 mm, velikost částic 2,7 μm

**Teplota:** 40 °C

**Tlak:** do 400 bar

**Průtok:** 0,3 ml/min

**Nástřik:** 1 μl

<b>Průběh metody:</b>	0. minuta	10 % ACN, 90 % 0,2% HCOOH
	36. minuta	100 % ACN
	36.– 40. minuta	100 % ACN

**Detekce:** DAD, pozorujeme při vlnových délkách 254 nm, 280 nm

**Pracovní postup:** Testované roztoky (každý o přibližné koncentraci 1mg/ml) připravíme rozpuštěním požadovaného množství suchého extraktu v 10 ml methanolu. Následně z každého připraveného roztoku odebereme 1 ml, který vložíme pomocí automatické pipety do označené vialky, kterou umístíme na požadované místo do stojanu v HPLC systému. Pomocí řídicí PC jednotky spustíme dle instrukcí vyučujícího jednotlivé části HPLC systému a vyplníme požadované parametry měření (název sekvence, pořadí a popis vialek, metoda). Jakmile jsou všechny části systému i analyzovaná sekvence připraveny, spustíme měření.



**Nákres HPLC aparatury:**

**Základní HPLC charakteristiky:**

**Závěr:**

### **3. Identifikace obsahových látek rostlin- spektroskopické metody** **(UV, IČ, NMR, CD)**

Určení struktury přírodní látky je úkolem nesmírně obtížným a jeho splnění vyžaduje znalosti z oblasti chemie, fyziky, studium literatury, ale také práci s různými typy přístrojů a spekter z nich získaných.

Nejběžněji používanými technikami pro určení struktury přírodních látek jsou techniky spektroskopické a jejich vzájemná kombinace, neboť každá z těchto metod slouží pro určení jiné charakteristiky ve struktuře přírodních látek.

#### **UV/VIS spektrofotometrie:**

Metoda založená na absorpci záření v oblasti vlnových délek ultrafialového (200–400 nm) nebo viditelného (400–800 nm) světla a následném přechodu valenčních elektronů na vyšší energetické hladiny. Patří mezi základní metody ve fytochemické analýze, je jednoduchá a levná. Nejčastěji je metoda využívána ve spojení s HPLC nebo kapilární elektroforézou.

#### **Infračervená spektrofotometrie (IČ):**

Metoda založená na absorpci infračerveného záření testovanou látkou. Pro strukturní analýzu přírodních látek je používána střední oblast infračerveného spektra (30–2,5  $\mu\text{m}$ ), která odpovídá vlnočtu 4000–600  $\text{cm}^{-1}$ . Pro určení struktury analyzované látky má největší význam oblast charakteristických silných vibrací (4000–1300  $\text{cm}^{-1}$ ) s intenzivními absorpčními pásy, které je možno přiřadit různým funkčním skupinám. Oblast otisku prstu (1300–600  $\text{cm}^{-1}$ ) je zajímavá pro porovnání látek s knihovnamí spekter, případně látek mezi sebou.

#### **Nukleární magnetická rezonance (NMR):**

Základem nukleární magnetické rezonance je interakce radiofrekvenčního pole s jádry atomů umístěnými ve statickém magnetickém poli. Obvyklé je rozpuštění vzorku v deuterovaném rozpouštědle, podle povahy vzorku  $\text{CDCl}_3$ , MeOD nebo  $d_6$ -DMSO. Rozpouštědla obsahující vodík by při analýze NMR rušila měření. Používají se speciální kyvety z křemenného skla (trubice o průměru 2–5 mm, objem vzorku přibližně 0,7 ml). Jednodimenzionální  $^1\text{H}$  NMR poskytuje rychlé informace o struktuře a čistotě analyzované látky, informuje o povaze protonů a jejich bezprostředním okolí. Pro kompletní identifikaci látky se potom využívá dvoudimenzionálních spekter poskytujících např. informace o vazbách H-H nebo C-H.

#### **Cirkulární dichroismus (CD):**

Metoda používaná k zjištění relativní konfigurace chirálních molekul. Lze ji použít u molekul, jejichž chirální centra se nacházejí v chromoforu dané molekuly, tj. v části molekuly

zodpovědné za absorpci záření v UV oblasti. Taková opticky aktivní látka rozdílně absorbuje levotočivě a pravotočivě kruhově polarizované záření a deformuje jej do elipsy. Z charakteristik této deformace lze výpočtem odvodit tzv. Cottonův efekt, nabývající pozitivních nebo negativních hodnot v závislosti na vlnové délce. Porovnáním těchto hodnot s literaturou potom odvodíme relativní konfiguraci chirálních center.

## Úloha č. 10:

### Spektrofotometrické stanovení karotenoidních barviv v extraktu *Urticae folium*

Z extraktu *Urticae folium* byly izolována pomocí sloupcové chromatografie karotenoidní barviva (směs  $\alpha$ -karotenu a  $\beta$ -karotenu). Jejich obsah ve vzorku je možné stanovit spektrofotometricky v oblasti viditelného světla (VIS).

Dle Lambert-Beerova zákona ( $A = \epsilon \times b \times c$ ) je absorpce roztoku přímo úměrná koncentraci karotenoidů.

Cílem této úlohy je stanovení obsahu karotenoidů pomocí metody UV/VIS spektrofotometrie.

#### Pracovní postup:

Vzorek získaný na předchozím cvičení ze sloupcové chromatografie kvantitativně převedeme do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplníme po rysku směsí petrolether: ether (1:1). Roztok přelijeme do kyvety a měříme jeho absorbanci při vlnové délce  $\lambda=460$  nm oproti slepému vzorku (čisté rozpouštědlo). Obsah karotenoidů (v mg/100 ml) odečteme z kalibrační křivky a přepočítáme dle vzorce na obsah karotenoidů v droze. Výsledek vyjádříme v procentech (%).

#### Výpočet:

#### Závěr:

Zavislost absorbance na koncentraci karotenoidu při 460 nm

