

# SHODA OBSAHU ANTIOXIDANTU STANOVOVANÉHO DVĚMA METODAMI

Blanka Beňová a Milan Meloun

*Katedra analytické chemie, Univerzita Pardubice, nám. Čs. legií 565, 532 10 Pardubice,  
blanka\_b@email.cz, milan.meloun@upce.cz*

## **Souhrn:**

V této úloze je testována použitelnost nové detekční techniky při stanovení antioxidantu resveratrolu v rostlině Křídlatce metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Výsledky obsahu resveratrolu naměřené oběma detekčními technikami byly podrobeny exploratorní analýze. Možnost použití nové metody byla prověřena párovým testem a rovněž byla provedena validace.

## **Úvod:**

V naší laboratoři je sledován obsah známého přírodního antioxidantu resveratrolu v rostlině Křídlatce (*Polygonum cuspidatum*). Obsah této látky je stanovován metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) se spektrofotometrickou detekcí.

Vzorky oddenků Křídlatky jsou dodávány Botanickým ústavem Akademie věd České republiky. Vzhledem k tomu, že Křídlatka je zařazena do kategorie karanténních plevelů a měla by být likvidována, je pro účely výzkumu Botanického ústavu pěstována jen na polích soukromých zemědělců, kde jsou učiněna opatření, aby se nekontrolovaně nešířila dále do okolí. Naším úkolem bylo zjistit, zda jsou rostliny na jednom z polí homogenní, tzn., zda je homogenní obsah resveratrolu. Testování bylo provedeno na 15 reprezentativně odebraných vzorcích.

Dalším úkolem v naší laboratoři bylo prověřit možnost použití elektrochemického detektoru po separaci látek kapalinovou chromatografií. Resveratrol je totiž v křídlatce obsažen ve stopových koncentracích, takže vznikla potřeba nalézt a aplikovat srovnávací metodu. Pro toto testování bylo připraveno 15 extraktů, které byly měřeny paralelně na dvou kapalinových chromatografech, jeden byl vybaven UV-VIS detektorem a druhý elektrochemickým CoulArray detektorem. V tabulce jsou uvedeny obsahy resveratrolu v mg/g vzorku, které byly získány dvěma metodami.

Tab. 1. Obsah resveratrolu (mg/g)

Vzorek	UV-VIS detekce	CoulArray detekce
1	0,135	0,126
2	0,182	0,198
3	0,491	0,457
4	0,123	0,127
5	0,182	0,171
6	0,387	0,371
7	0,234	0,224
8	0,196	0,199
9	0,481	0,496
10	0,173	0,195
11	0,095	0,106
12	0,126	0,109
13	0,322	0,341
14	0,252	0,268
15	0,204	0,195

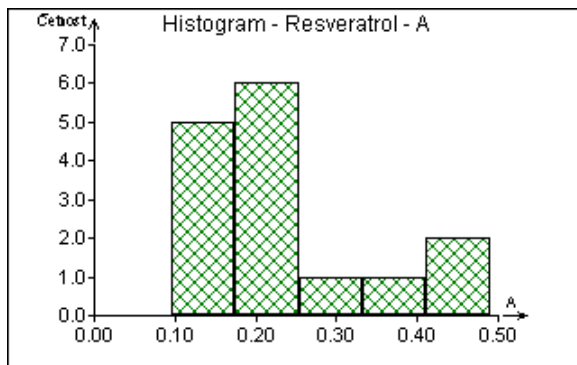
### Řešení:

Bylo provedeno testování v programu ADSTAT a QC Expert, byla použita jednorozměrná základní statistika. Testování na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

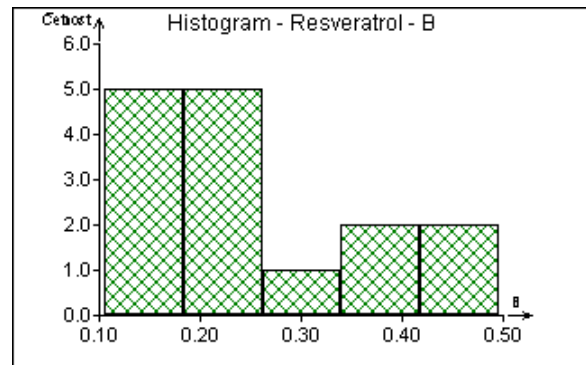
### Výsledky:

<i>Výběr A</i>		<i>Výběr B</i>	
Aritmetický průměr	0,239	Aritmetický průměr	0,239
Spodní mez	0,169	Spodní mez	0,170
Horní mez	0,309	Horní mez	0,307
Směrodatná odchylka	0,126	Směrodatná odchylka	0,124
Rozptyl	0,016	Rozptyl	0,015
Medián	0,196	Medián	0,198
Šikmost	0,964	Šikmost	0,891
Špičatost	2,702	Špičatost	2,616
Retrans. průměr	0,203	Retrans. průměr	0,203

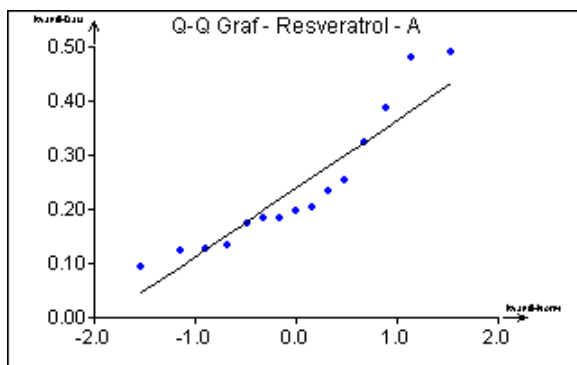
## Grafy:



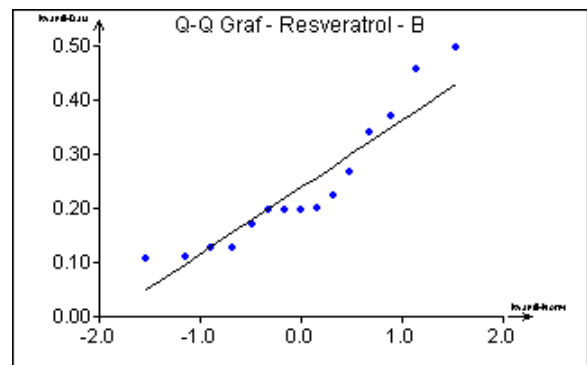
Obr. 1. Histogram výběru A



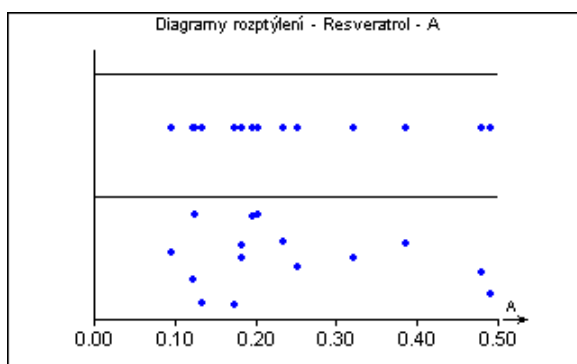
Obr. 2. Histogram výběru B



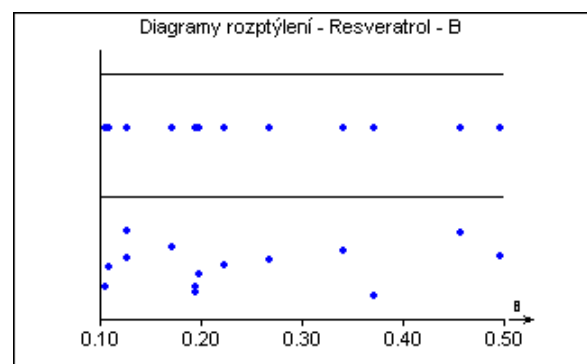
Obr. 3. Q-Q graf výběru A



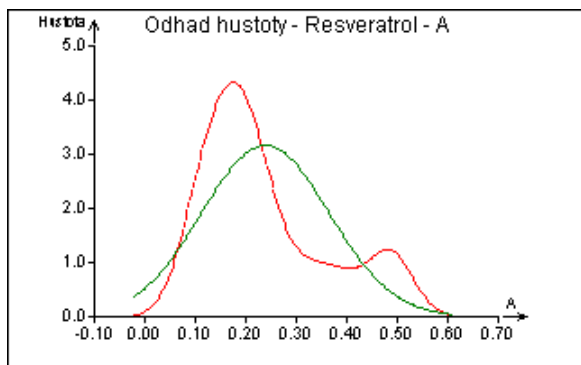
Obr. 4. Q-Q graf výběru B



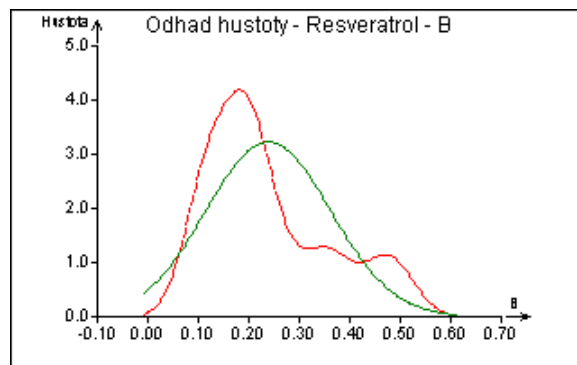
Obr. 5. Diagram rozptýlení výběru A



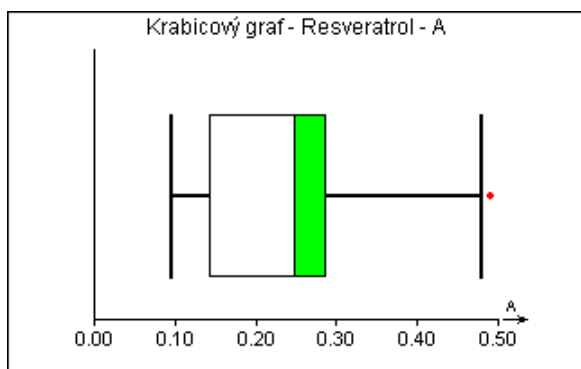
Obr. 6. Diagram rozptýlení výběru B



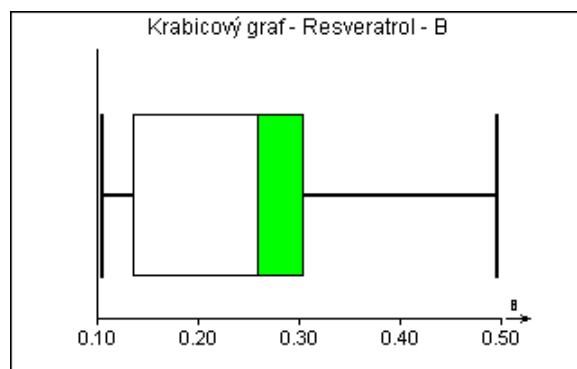
Obr. 7. Odhad hustoty výběru A



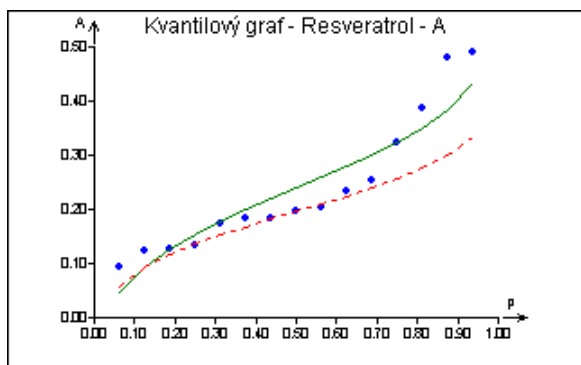
Obr. 8. Odhad hustoty výběru B



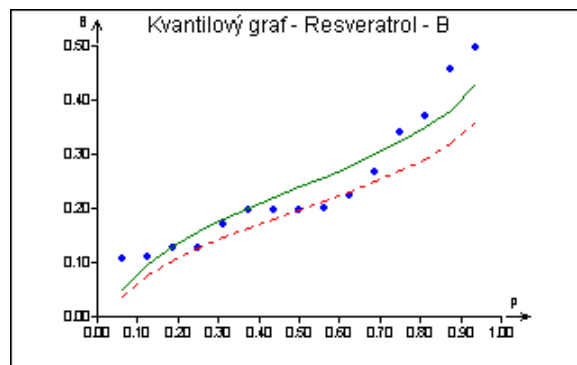
Obr. 9. Krabicový graf výběru A



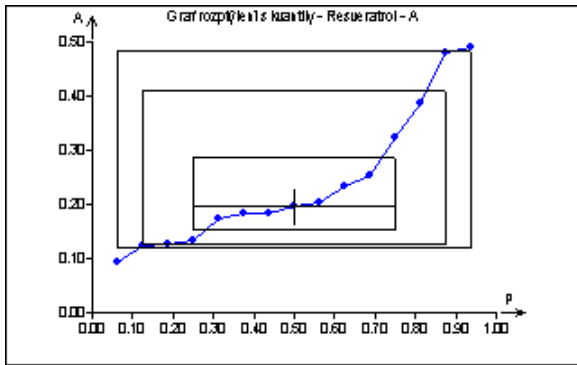
Obr. 10. Krabicový graf výběru B



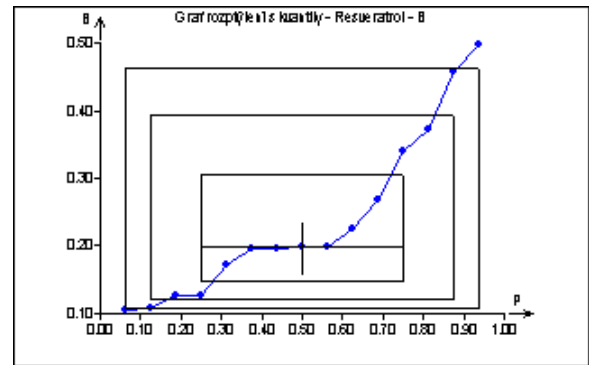
Obr. 11. Kvantilový graf výběru A



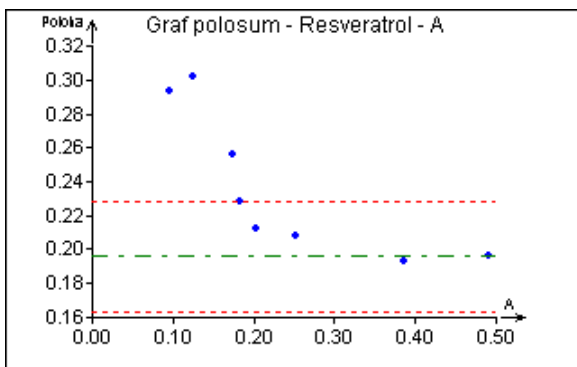
Obr. 12. Kvantilový graf výběru B



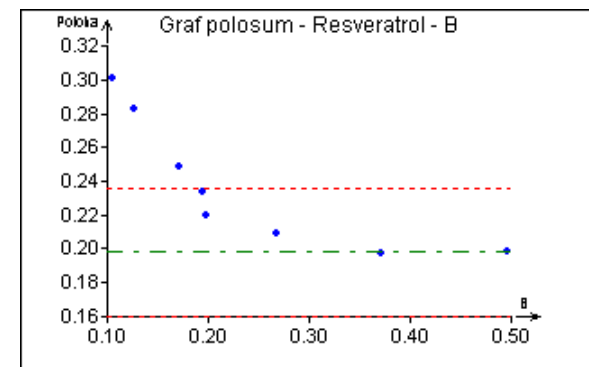
Obr. 13. Graf rozptýlení s kvantily- výběr A



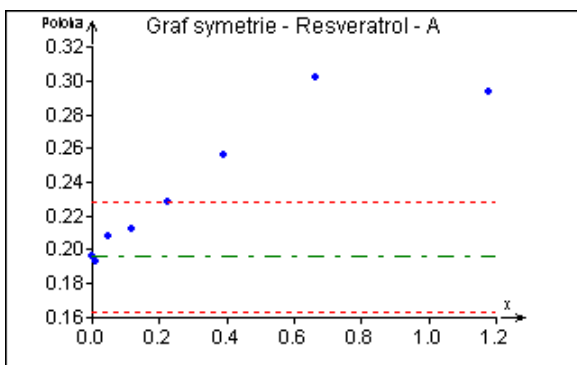
Obr. 14. Graf rozptýlení s kvantily- výběr B



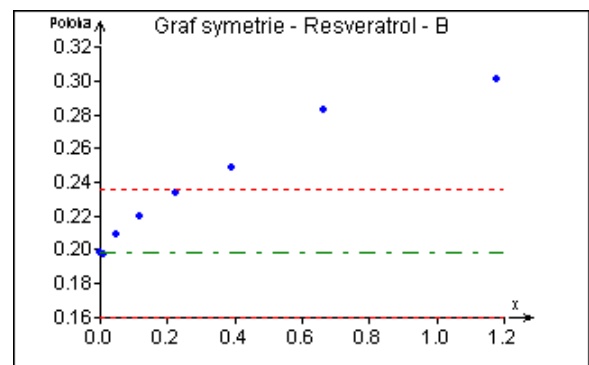
Obr. 15. Graf polosum výběru A



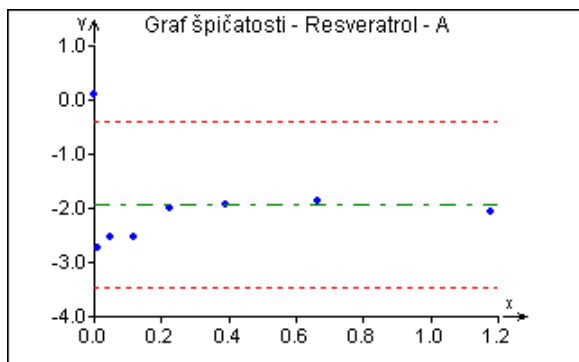
Obr. 16. Graf polosum výběru B



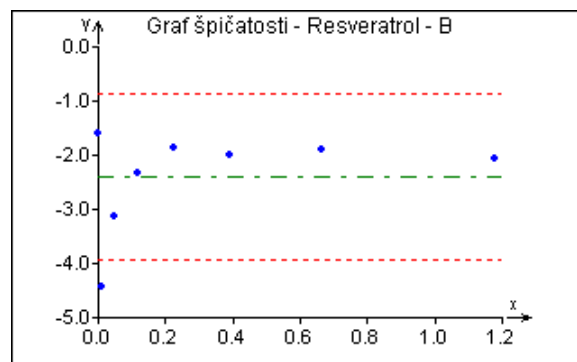
Obr. 17. Graf symetrie výběru A



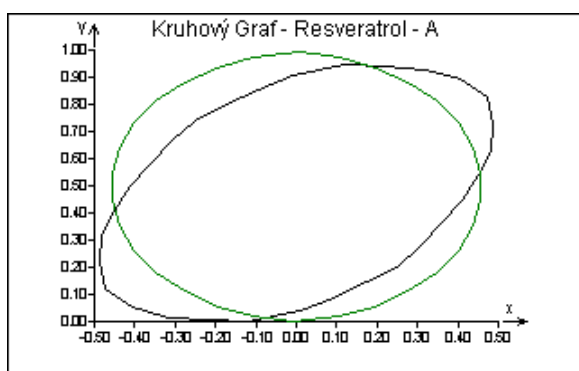
Obr. 18. Graf symetrie výběru B



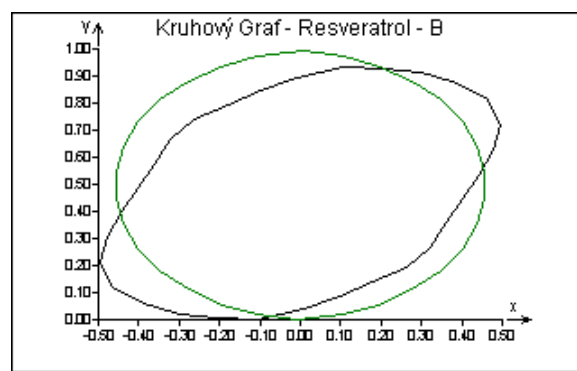
Obr. 19. Graf špičatosti výběru A



Obr. 20. Graf špičatosti výběru B



Obr. 21. Kruhový graf výběru A



Obr. 22. Kruhový graf výběru B

### Párové testování dvou detekčních technik:

Provedeno v programu ADSTAT.

#### *Párový t-test*

Prům. rozdíl	$9,934 \cdot 10^{-10}$
Rozptyl	$7,159 \cdot 10^{-2}$
Tab. kvantil	2,1448
t-statistika	$5,3739 \cdot 10^{-8}$
Hladina významnosti	1,000

Závěr: Průměry se považují za shodné, hypotéza  $H_0$  je přijata.

## Validace metody:

Byl navržen regresní model přímky  $y = \beta_0 + \beta_1 x$ , u kterého budeme testovat nulovou hypotézu  $H_0: \beta_0 = 0, \beta_1 = 1$ .

Program ADSTAT, modul lineární regrese, regresní diagnostika.

Byl nalezen vhodný regresní model s následujícími charakteristikami.

Parametr	Odhad	Směrodatná Odchylka	Test $H_0: \beta_j = 0$ vs. t-kritérium	$H_A: \beta_j \neq 0$ hypotéza $H_0$ je	Spočtená hladina významnosti
$\beta_0$	$1,731 \cdot 10^{-3}$	$8,865 \cdot 10^{-3}$	0,1953	přijata	0,848
$\beta_1$	0,9847	0,05712	19,417	zamítnuta	0,000

### Statistické charakteristiky regrese

Vícenásobný korelační koeficient, R	0,9832
Koeficient determinace, $R^2$	0,9667
Predikovaný korelační koeficient, $R^2_p$	0,9754
Střední kvadratická chyba predikce, MEP	$2,4555 \cdot 10^{-4}$
Akaikeho informační kritérium, AIC	-126,45

### Zhodnocení kvality modelu

#### Test úseku

Intervalový odhad parametrů úseku  $\beta_0$ :

$$b_0 - t_{1-\alpha/2} \cdot \sqrt{D(b_0)} \leq \beta_0 \leq b_0 + t_{1-\alpha/2} \cdot \sqrt{D(b_0)}$$

$$\mathbf{-0,0174 \leq \beta_0 \leq 0,0208}$$

Tento interval spolehlivosti úseku obsahuje nulu, proto lze úsek  $\beta_0$  považovat za nulový.

#### Test směrnice

Intervalový odhad parametrů směrnice  $\beta_1$ :

$$b_1 - t_{1-\alpha/2} \cdot \sqrt{D(b_1)} \leq \beta_1 \leq b_1 + t_{1-\alpha/2} \cdot \sqrt{D(b_1)}$$

$$\mathbf{0,8613 \leq \beta_1 \leq 1,1081}$$

Tento interval spolehlivosti směrnice obsahuje jedničku, proto lze směrnici  $\beta_1$  považovat za rovnou jedné.

**Závěr:**

V první části úlohy bylo dokázáno, že obsah resveratrolu v rostlinách na zkoumaném poli je homogenní, z toho lze usoudit, že i rostliny by měly být homogenní.

V druhé části úlohy bylo provedeno párové testování dvou typů detektorů používaných v kapalinové chromatografii. Testování bylo provedeno na 15 extraktech připravených z rostliny Křídlatky. Naším testem bylo prokázáno, že rozdíly při analýze resveratrolu jsou nevýznamné, tudíž lze použít elektrochemickou CoulArray detekci jako srovnávací metodu k detekci spektrofotometrické. Po navržení vhodného regresního modelu a jeho zhodnocení lze uzavřít, že výsledky nové metody (elektrochemická detekce) se statisticky významně neliší od původní, spektrofotometrické metody.

**Poděkování:**

Práce vznikla za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy. MSMT0021627502.

**Doporučená literatura:**

1. Meloun M., Militký J., *Statistické zpracování experimentálních dat*, Academia Praha 2004.
2. Meloun M., Militký J., *Kompendium statistického zpracování experimentálních dat*, Academia Praha 2006.