

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie



Rigorózní práce

**HPLC stanovení luteinu, vitamínu
E, vitamínu E acetátu,
betakarotenu v potravních
doplňcích**

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

Hradec Králové 2021

Mgr. Petra Hrdinová

Považuji za svou milou povinnost poděkovat svému vedoucímu rigorózní práce panu doc. RNDr. Daliboru Šatínskému, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky při konzultacích v průběhu psaní této práce a v neposlední řadě za jeho vstřícnost a trpělivost.

Prohlašuji, že tato práce je mým autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu literatury a v práci citovány. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. Souhlasím, aby práce byla půjčována ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

Dne 11.5.2021 v Hradci Králové

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Mgr. Petra Hrdinová

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

Název rigorózní práce: HPLC stanovení luteinu, vitamínu E, vitamínu E acetátu, betakarotenu v potravních doplňcích

Tato rigorózní práce se zabývá optimalizací podmínek pro stanovení obsahu luteinu, betakarotenu a vitamínu E a jeho acetátu v potravních doplňcích Ostrovidky, Ocutein forte, Walmark Lutein forte, Ocumax, Avilut, Ocuvite Lutein forte, Lutein pro oči, Walmark Betakaroten a Revital Super Betakaroten. Pro stanovení obsahu byla využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Testovány byly tři chromatografické kolony, nejlepších výsledků separace bylo dosaženo při použití kolony Ascentis Express C-18 o rozměrech 100 x 4,6 mm s velikostí částic 5 μm . Detekce byla provedena pomocí UV při 290 nm pro vitamín E a E acetát, a ve viditelné oblasti při 450 nm pro lutein a betakaroten. Separace probíhala za gradientové eluce s mobilní fází acetonitril + methylenchlorid:hexan (1:1). Průtoková rychlost analýzy byla 1 ml/min a teplota kolonového prostoru byla 30 °C. Dávkovaný objem vzorku 5 μl . Doba analýzy trvala 9 minut.

Výsledky stanovení obsahu luteinu, betakarotenu a vitamínu E v potravních doplňcích nebyly jednoznačné. Nepodařilo se vyvinout optimální metodu extrakce pro následné stanovení obsahu těchto látek.

Klíčová slova: Lutein, betakaroten, vitamín E, HPLC

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Mgr. Petra Hrdinová

Consultant. Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Rigorous thesis title: HPLC determination of lutein, vitamin E, vitamin E acetate, beta-carotene in food supplements

The rigorous thesis deals with optimization of conditions for determination of lutein, beta-carotene and vitamin E, and vitamin E acetate in food supplements Ostrovidky, Ocutein forte, Walmark Lutein forte, Ocumax, Avilut, Ocuvite lutein forte, Lutein for eyes, Walmark betacarotene and Revital Super Betacarotene. High performance liquid chromatography (HPLC) was used for determination. Three chromatographic columns were tested, the best results were obtained using an Ascentis Express C-18 column 100 x 4.6 mm with a particle size 5 microns. Detection was performed by UV/Vis at a wavelength of 290 nm for vitamin E and E acetate, and 450 for lutein and beta-carotene. Separation was carried out by gradient elution with mobile phase of acetonitrile + methylenchlorid:hexane (1:1). Flow rate of the analysis was 1 ml/min and column temperature was set at 30 °C. Volume of sample injection was 5 µl. The analysis time lasted 9 minutes.

The results of the determination of the content of lutein, beta-carotene and vitamin E in food supplements were not unambiguous. It has not been possible to develop an optimal extraction method for reliable determination of the content of analyzed substances.

Keywords: Lutein, betacarotene, vitamin E, HPLC.

Použité zkratky

ACN	Acetonitril
B-kar, β -kar	Betakaroten
CARET	The Caroten and Retinol Efficacy Trial = zkouška účinnosti karotenu a retinolu
ČL	Český lékopis
DAD	Diode array detektor
HDL	High density lipoproteins = lipoproteiny s vysokou hustotou
HPLC	High performance liquid chromatography = vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LDL	Low density lipoproteins = lipoproteiny s nízkou hustotou
Mr	Molekulová hmotnost
SST	System suitability test = test vhodnosti chromatografického systému
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
UV	Ultrafialová oblast spektra záření
VIS	Viditelná oblast spektra záření
Vit. E	Vitamín E
Vitamín E-ac	Vitamín E-acetát
VPMD	Věkem podmíněná makulární degenerace

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíl a zadání práce	9
3	Teoretická část	10
3.1	Karotenoidy.....	10
3.1.1	Lutein.....	11
3.1.2	Betakaroten	13
3.1.3	Věkem podmíněná makulární degenerace	16
3.2	Vitamíny	17
3.2.1	Vitamín E	18
3.2.2	Vitamín E acetát.....	21
3.3	Chromatografické metody	22
3.3.1	Základní princip a rozdělení chromatografických metod	22
3.3.2	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	23
3.4	Metody stanovení karotenoidů a vitamínu E	24
3.4.1	Metody stanovení betakarotenu a vitamínu E dle Českého lékopisu	25
3.4.2	Metody stanovení karotenoidů.....	25
4	Experimentální část.....	30
4.1	Materiál, přístroje a pomůcky	30
4.2	Deklarovaný obsah karotenoidů, vitamínu E a vitamínu E -acetátu ve zkoumaných potravních doplňcích	32
4.3	Příprava roztoků standardů.....	33
4.3.1	Příprava zásobních roztoků standardů	33
4.3.2	Příprava pracovních roztoků standardů	34

4.4	Příprava analyzovaných vzorků	34
4.5	Optimalizace chromatografických podmínek	34
4.5.1	Volba vlnové délky detektoru.....	35
4.5.2	Optimalizace složení mobilní fáze a výběr nejvhodnější kolony	36
4.5.3	Rychlost průtoku mobilní fáze, dávkovaného objemu a teploty při analýze.	37
4.6	Výsledky separací na jednotlivých kolonách	37
4.6.1	Ascentis Express C -18 (100 x 4,6 mm, 5 µm).....	37
4.6.2	Atlantis T3 (150 x 3 mm, 3 µm)	41
4.6.3	Ascentis Express RP-amide (100 x 4,6 mm; 5µm).....	43
4.7	Základní validace metody	48
4.7.1	Souhrn optimálních chromatografických podmínek.....	48
4.7.2	Test vhodnosti chromatografického systému (System suitability test – SST)	
	50	
4.7.2.1	Faktor asymetrie	51
4.7.2.2	Rozlišení	51
4.7.2.3	Píková kapacita	51
4.7.3	Opakovatelnost	51
4.7.4	Linearita	53
4.8	Extrakční postupy	58
4.8.1	Extrakční postup 1 (kapsle)	58
4.8.2	Extrakční postup 2 (tablety).....	59
4.8.3	Přesnost.....	60
4.8.4	Správnost	62
5	Závěr	68
6	Seznam literatury	70

1 Úvod

Lutein a betakaroten patří do skupiny karotenoidů. Tyto látky obsahují ve svých molekulách velký počet konjugovaných dvojných vazeb. To je příčinou jejich výrazného zbarvení od žluté až po červenou barvu a také jejich antioxidační aktivity. Díky svým antioxidačním vlastnostem jsou využívány v prevenci onemocnění kardiovaskulárního systému, zrakového ústrojí a některých typů rakoviny. Vitamín E, jinak nazývaný tokoferol, patří mezi vitamíny rozpustné v tucích. Právě proto snadno proniká do buněčných membrán. Má vysokou antioxidační aktivitu.

Tyto látky najdeme především v mase, ovoci, zelenině a oříšcích. Pokud bychom chtěli zajistit dostatečný příjem, který by působil jako prevence onemocnění, vyžadovalo by to konzumaci velkého množství ovoce, zeleniny, masa atd. Proto jsou tyto látky dostupné v řadě potravních doplňků, které můžeme zakoupit v lékárně. Bohužel většina z nich jsou pouze potravní doplňky nikoliv registrované léky. Nevýhodou těchto preparátů je skutečnost, že uváděné množství nemusí odpovídat skutečnému obsahu. Doplňky stravy nejsou kontrolovány žádnou autoritou (SÚKL).

V současné době není možné zjistit, jestli prodávané přípravky obsahují uvedená množství látek. Cena potravních doplňků je poměrně vysoká (zejména přípravky s luteinem). Prodej přípravků, které neobsahují uvedená množství, by neměl být povolen, jelikož se z hlediska legislativy jedná o klamání spotřebitele.

2 Cíl a zadání práce

Cílem této rigorózní práce bylo vyvinout, optimalizovat a validovat metodu pro extrakci a stanovení obsahu luteinu, betakarotenu, vitamínu E a vitamínu E acetátu v některých potravních doplňcích. Upřednostněny byly přípravky obsahující kombinace zkoumaných látek. Řada doplňků uvádí poměrně vysoký obsah za nízkou cenu. Některé přípravky obsahující lutein oproti tomu nutí zákazníka utrácet poměrně vysoké částky. Otázkou stále zůstává skutečný obsah těchto biologicky aktivních látek v potravních doplňcích. Tato práce má za cíl prověřit, zda vybrané potravní doplňky splňují požadovanou kvalitu a obsahují výrobcem deklarovaný obsah biologicky aktivních látek.

3 Teoretická část

3.1 Karotenoidy

Karotenoidy jsou barevné pigmenty. Najdeme je v rostlinách, houbách, bakteriích a řasách. Karotenoidy patří mezi tetraterpeny. To znamená, že jde o látky, které ve své molekule obsahují 40 atomů uhlíku a velký počet konjugovaných dvojných vazeb. Systém konjugovaných dvojných vazeb zapříčiňuje absorpci viditelného světla, a proto se tyto látky jeví jako barevné. Tvoří skupinu červených, oranžových, fialových a žlutých barviv. V rostlinách doprovázejí zelené barvivo chlorofyl. Vyskytují se také v mikroorganismech a živočišných orgánech. Jako zásobní látky se ukládají do tukové tkáně (např. pigment v oku, játra, vaječný žloutek). Dělíme je do dvou skupin:

Karoteny: jedná se o uhlovodíky (α -karoten, β -karoten, γ -karoten), které mají ve své molekule jeden nebo dva cyklohexanové kruhy spojené konjugovaným uhlovodíkovým řetězcem.

Xantofyly: jedná se o kyslíkaté sloučeniny (zeaxanthin, lutein, cryptoxanthin a další). Jsou odvozené od karotenů, které ve své molekule obsahují hydroxylové skupiny a jedná se tak o alkoholy nebo dioly. V rostlinných tkáních se vyskytují buď volné nebo vázané. Vázané jsou ve formě esterů s vyššími mastnými kyselinami nebo jako glykosidy.

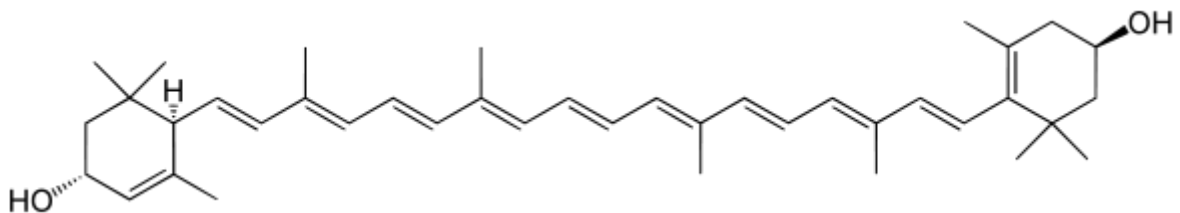
Karotenoidy jsou dobře rozpustné v tucích a některých organických rozpouštědlech (chloroform, hexan). Jsou nerozpustné ve vodě, omezeně se rozpouští v ethanolu. Řada látek ze skupiny karotenoidů má charakter provitaminu A, který je potřebný pro správnou funkci sliznic, kůže a sítnice oka. Důležitý je také pro růst a vývoj plodu. Nedostatek vitamínu A se projevuje suchostí kůže, sliznic, šeroslepostí apod. Kromě role provitaminu A jsou karotenoidy důležité pro řadu dalších procesů v organismu. Slouží jako významné antioxidanty, regulují buněčnou proliferaci a diferenciaci, jsou modulátory imunitních reakcí a metabolismu karcinogenů a jako filtry UV záření.

Dostatečný příjem karotenoidů snižuje riziko kardiovaskulárních onemocnění (ischemická choroba srdeční, srdeční selhání, diabetická kardiomyopatie, ateroskleróza, a další) a některých nádorových onemocnění (např. rakovina tlustého střeva) [1, 2].

V této práci jsem se podrobněji zabývala betakarotenem a luteinem. Vyskytují se zejména v potravních doplňcích určených pro prevenci rozvoje věkem podmíněné makulární degenerace. Samostatně najdeme betakaroten v doplňcích stravy podporující „zdravé“ opalování.

3.1.1 Lutein

Struktura:



Obrázek 1: Strukturální vzorec luteinu

Sumární vzorec: $C_{40}H_{56}O_2$

Mr: 568,88

Teplota tání: 190 °C

CAS: 127-40-2 [3]

Lutein (z latinského Luteus = žlutý) je žlutooranžový pigment patřící mezi karotenoidy [4].

Chemické a fyzikální vlastnosti: Lutein lze popsat jako dlouhý uhlíkatý řetězec se střídajícím se systémem jednoduchých a dvojných vazeb, na který jsou připojeny methylové skupiny. Na obou koncích uhlíkatého řetězce obsahuje molekula cyklickou hexenylovou strukturu s hydroxylovou skupinou. Od zeaxantinu se lutein liší polohou dvojných vazeb v hexenylovém kruhu. Jedná se o strukturální izomery, které se liší svými chemickými vlastnostmi. Charakteristická struktura s devíti dvojnými vazbami je zodpovědná za absorpci světla vedoucí k barevným vlastnostem těchto molekul. Z toho důvodu má lutein žlutou až oranžovou barvu v závislosti na jeho koncentraci. Lutein má řadu isomerů. Hlavní formou luteinu v rostlinách a zelenině je trans forma, avšak při zpracování může docházet ke změnám izomerů. V přírodní formě se lutein často vyskytuje

jako ester mastné kyseliny. Jeden nebo oba z hydroxylových zbytků mohou být vázány na mastnou kyselinu [5].

Lutein je lipofilní látka, která je nerozpustná ve vodě a obecně rozpustná v tucích a v organických rozpouštědlech. Jedná se o nestálou látku. Působením světla a tepla snadno podléhá oxidativním změnám [4].

Biodostupnost a metabolismus: Lutein z potravy je přijímán v gastrointestinálním traktu a metabolizován za pomoci enterocytů ve střevě. Rostlinný lutein je obvykle přítomný v esterifikované formě, lutein ve vaječném žloutku je volný ve formě alkoholu. Před absorpcí enterocyty jsou estery luteinu hydrolyzovány enzymy (např. cholesterol esteráza) gastrointestinálního traktu. Přítomnost tuků v potravě podporuje solubilizaci esterů luteinu a zároveň zvyšuje uvolňování a aktivitu esteráz a lipáz, které jsou při hydrolyze esterů luteinu nezbytné. Ukázalo se, že přítomnost tuků v potravě významně zvyšuje vstřebání a dostupnost luteinu. Z enterocytů je lutein transportován prostřednictvím lymfatického systému do hepatocytů. Následně je vázán na lipoproteiny a je přenášen krví do celého těla. Zvláště HDL lipoproteiny hrají v transportu luteinu významnou roli. V krvi je lutein přítomen pouze jako volná neesterifikovaná forma. V lidském těle představuje sítnice oka tkáň, kde dochází k nejvyšší absorpci a koncentraci luteinu [5].

Lutein v lidském oku: Lutein je koncentrován na sítnici v místě zvaném žlutá skvrna (*macula lutea*), kde je nejvyšší hustota čípků a místo nejostřejšího vidění. Barva lidské makuly je způsobena přítomností tří různých xantofylů – luteinu, zeaxantinu a meso-zeaxantinu. Primáti nedokáží syntetizovat první dva xantofyly a musí je přijímat v potravě. Různými studiemi byla prokázána přímá souvislost mezi koncentrací luteinu (zbarvení makuly) a snížením rizika onemocnění oka. Lutein díky své antioxidační aktivitě chrání oko a působí jako filtr modrého světla [5].

Zdroje a výskyt: Lutein je produkován výhradně rostlinami. Najdeme ho především v zelené listové zelenině. Značné množství luteinu lze nalézt ve žlutých květech rostlin rodu *Tropaeolum* (lichořeřišnice) a také v pampeliškách, vodnicích či měsíčku lékařském. Hlavním zdrojem luteinu v potravě jsou: špenát, kapusta, mangold, hrách, brokolice, cuketa, mrkev, kukuřice, pistáciové ořechy. Velký obsah luteinu najdeme také v řasách. Zdrojem vysoce biologicky využitelného luteinu je vaječný žloutek [4].

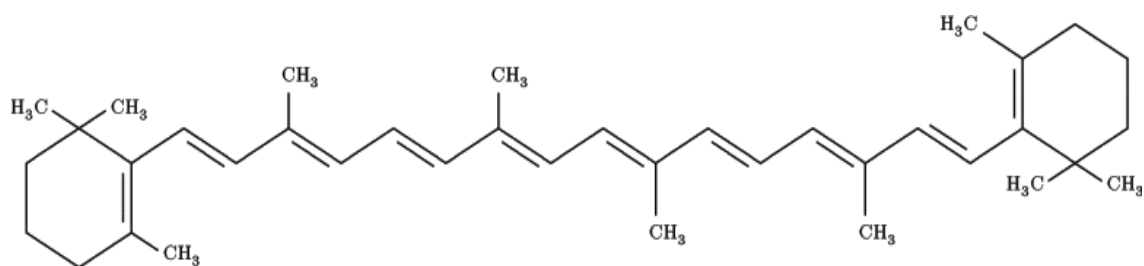
Lutein jako barvivo: Díky své žluto-oranžové barvě je tento xantofyl hojně využíván jako potravinářské barvivo. Nese označení E161b. Získává se z přírodních

zdrojů, nejčastěji z okvětních lístků měsíčku (bot. *Tagetes Erecta L.* = Aksamitník vzpřímený). Používá se ve zdravých nápojích, tyčinkách nebo pekařských výrobcích. Tradičně je lutein přidáván jako aditivum do krmiv pro drůbež [4].

Příjem: Pokud konzumujeme pestrou stravu včetně zeleniny a ovoce měli bychom mít zajištěný dostatečný příjem luteinu. U starších lidí bývá zhoršené vstřebávání ze zažívacího traktu a tím pádem nedostatečné vstřebávání živin z potravy. Lutein lze doplnit pomocí potravních doplňků. Pozitivní účinky luteinu by měly být znát při denním příjmu 6-10 mg. Negativním účinkem nadměrného příjmu luteinu je zbarvování kůže do bronzova (karotenodermie) [4].

3.1.2 Betakaroten

Struktura:



Obrázek 2: Strukturální vzorec β -karotenu

Sumární vzorec: $C_{40}H_{56}$

Mr: 536,88

Teplota tání: 183 °C

CAS: 7235-40-7 [6]

β -karoten patří do podskupiny karotenů. Jde o oranžové rostlinné barvivo. β -karoten má charakter provitaminu A.

Chemické a fyzikální vlastnosti: Molekula je tvořena dlouhým uhlíkatým řetězcem střídajících se jednoduchých a dvojných vazeb, na obou koncích zakončena cyklohexenovým kruhem. Ve své molekule neobsahuje žádnou hydroxylovou skupinu. Karoteny se vyskytují ve dvou základních formách - α -karoten, β -karoten. Liší se od sebe polohou dvojných vazeb na cyklickém zakončení, jde tedy o izomery. Existují i další

karoteny, které se také označují písmeny řecké abecedy (např. γ -karoten, cryptoxantin, echinenon). Aktivita provitaminu A je podmíněna přítomností alespoň jednoho cyklohexanového nebo 5,6-epoxycyklohexanového kruhu a přítomností polyenového řetězce, který délkou odpovídá vitamínu A. Díky konjugovanému řetězci dvojných vazeb absorbují karotenoidy ve viditelné části spektra a jeví se barevně. β -karoten nejvíce absorbuje při 400–500 nm, v modro-zelené části spektra. Modré světlo je pohlceno a delší vlnové délky žluté a červené nejsou absorbovány [7].

β -karoten je velmi lipofilní látka, která je rozpustná v lipofilních rozpouštědlech (např. chloroform). Je praktický nerozpustný ve vodě nebo etanolu [8].

Biodostupnost a metabolismus: β -karoten je provitamin vitamínu A. Vitamin A (retinol) je důležitý pro celou řadu funkcí v našem organismu (např. zrak, kůže). β -karoten je vstřebáván z rostlinné potravy v tenkém střevě v rozsahu asi 30–60 %. Jelikož se jedná o provitamin rozpustný v tucích, závisí vstřebané množství β -karotenu na tuku přijaté potravou. Ve střevě je část β -karotenu štěpena na retinal pomocí enzymu 15,15-karotendioxygenáza. Retinal je reverzibilně redukován pomocí retinal reduktázy na retinol a částečně nevratně oxidován na kyselinu retinovou. Část β -karotenu, která není metabolizována ve střevní sliznici je transportována pomocí lipoproteinů (zejména LDL), erytrocytů a leukocytů přímo do cílových orgánů, kde je následně přeměněna na retinol a kyselinu retinovou. Předpokládá se, že přibližně 15 % z přijatého β -karotenu je přeměněno na vitamin A. Přeměna β -karotenu na vitamin A klesá na základě množství absorbovaného β -karotenu a množství vitamínu A v organismu. Aktivita enzymu 15,15-karotendioxygenázy stoupá a klesá na základě potřeby vitamínu A. Z tohoto důvodu nemůže dojít k předávkování β -karotenem a představuje tak bezpečný zdroj vitamínu A. Naopak vyšší dávky vitamínu A mohou být pro organismus toxické a může docházet k předávkování. β -karoten, který není metabolizován na vitamin A může být v lidském těle beze změny resorbován. Nepřeměněný β -karoten má v lidském těle své biologické funkce. Je skladován v tukových tkáních, zejména v kůži a játrech [8, 9].

Funkce v organismu: β -karoten kromě toho, že slouží jako prekurzor vitamínu A, vykonává v organismu řadu dalších funkcí. Především působí jako antioxidant čili pomáhá neutralizovat volné radikály. V důsledku jeho schopnosti deaktivovat kyslíkové radikály má ochrannou funkci v buňkách. Proto má preventivní účinek v řadě onemocnění jako např.

- ochrana pokožky před slunečním zářením
- prevence různých typů rakoviny, zejména rakoviny plic
- prevence aterosklerózy
- posílení imunitního systému
- prevence některých onemocnění oka (katarakta, degenerace maculy) [9].

Zdroje a výskyt: β -karoten je sytě oranžový pigment. Téměř každému se při slově karoten vybaví mrkev, která tomuto pigmentu propůjčila své jméno. Ale karoteny obecně se nenacházejí zdaleka pouze v mrkvi. Karoteny se v přírodě vyskytují téměř všude. Mezi nejzřetelnější místa patří oranžová dužina ovoce a zeleniny – mrkev, mango, batáty, dýně. Ale jsou také důležitou složkou v zelených rostlinách. Během jara a léta jsou listy zaplaveny zeleným barvivem chlorofylem, ale s nástupem podzimu se chlorofyl rozpadá a odhalují oranžové a červené barvy karotenů. β -karoten je rozpustný v tucích, proto se doporučuje konzumace potravin bohatých na β -karoten společně s menším množstvím tuku (např. olivový olej, ořechy). Mezi významné přírodní zdroje β -karotenu patří: mrkev, batáty, špenát, brokolice, kapusta, mangold, dýně, mango, červená paprika, meruňky. Karotenoidy se vyskytují také v živočišných materiálech, např. dávají zabarvení vaječnému žloutku, máslu nebo masu lososa [7, 10, 11].

β -karoten jako barvivo: β -karoten je používán v potravinách jako přírodní nebo přírodně identické jasně žluté až oranžové barvivo. Tato barviva se dělí do dvou kategorií: E160a (i) – Směs karotenů a E160a (ii) – β -karoten. Pro barvení potravin se používá syntetická forma beta-karotenu. V hojném množství se používá v sýrech a margarínech. Dále se používá k barvení olejů, majonéz, zmrzlin, jogurtů, ovocných nápojů, limonád, dezertů, cukrovinek, pudinků [11].

Příjem: Doporučená denní dávka není přesně stanovena. Odborníci na výživu doporučují u dospělých 6-15 mg a u dětí 3-6 mg denně. Jako nejvhodnější se jeví konzumovat dostatek čerstvé zeleniny a ovoce, které nám zajistí dostatek β -karotenu v přirozené formě. Nadměrná konzumace β -karotenu vede podobně jako u luteinu k zažloutnutí kůže (karotenodermii). Tato změna je reverzibilní, odezní samovolně po vysazení stravy bohaté na karoteny. Klinické studie dosud nikdy neprokázaly pozitivní dopady suplementace β -karotenem u zdravých jedinců. Pozitivní účinky dlouhodobé suplementace vyššími dávkami β -karotenu tak zůstávají nepotvrzeny [11].

Kuřáci a β -karoten: Z dostupných studií byly nashromážděny důkazy o tom, že lidé konzumující více ovoce a zeleniny bohaté na β -karoten a retinol a lidé mající vyšší koncentrace β -karotenu v séru mají nižší výskyt rakoviny plic. Byla prováděna studie účinnosti β -karotenu a retinolu (studie CARET). Testovala kombinaci 30 mg β -karotenu a 25 000 IU retinylpalmitátu (vitamín A) užívaných denně oproti placebo. Studie se účastnilo 18 314 mužů a žen s vysokým rizikem vzniku rakoviny plic. Studie CARET byla zastavena o 21 měsíců dříve. Nebyla získána žádná data o přínosu látek v prevenci rakoviny plic, naopak byly získány podstatné důkazy o možném poškození. V aktivní skupině pacientů bylo o 28 % více rakoviny plic a o 17 % více úmrtí. Studie byla okamžitě po oznámení pozastavena (18.1.1996). Byla publikována předběžná zjištění z CARETu, která se týkala rakoviny, kardiovaskulárních onemocnění a celkové úmrtnosti. Účastníci CARETu, kteří dostávali kombinaci beta-karotenu a vitamínu A, neměli žádný chemopreventivní přínos a měli nadměrný výskyt a úmrtnost na rakovinu plic. Výsledky jsou vysoce konzistentní s výsledky zjištěnými pro β -karoten ve studii prevence rakoviny α -tokoferol β -karotenem u 29 133 kuřáků ve Finsku [12].

3.1.3 Věkem podmíněná makulární degenerace

Věkem podmíněná makulární degenerace sítnice – VPMD je nejčastější příčinou praktické slepoty ve vyspělých zemích a pravděpodobně hlavní příčinou nezvratné ztráty zraku u pacientů starších 65 let. VPMD je degenerativní onemocnění sítnice v oblasti žluté skvrny (makuly). Nemoc postihuje centrální vidění. Pacienti mají problém s rozeznáním obličejů, řízením vozidla nebo čtením. Periferní vidění zůstává zachováno, takže pacienti postižení tímto onemocněním jsou schopni orientace ve známém prostředí. Onemocnění probíhá v časných fázích asymptomaticky a rozvíjí se po řadu let. Vyskytuje se ve dvou formách, suché a vlhké formě. U většiny pacientů je přítomna pomalu se rozvíjející suchá atrofická forma VPMD. Přibližně v 10–20 % se vyvine rychle se rozvíjející vlhká forma. Onemocnění se projevuje příznaky postižení centrální krajiny sítnice. Přestože je postiženo pouze 5 % z celkové plochy sítnice, má tato nemoc zásadní vliv na centrální vidění. V případě vlhké formy se přidává pokřivení linií. Zvyšuje se citlivost k oslnění, snižuje se schopnost rozlišení barev. U většiny pacientů s vlhkou formou onemocnění zůstává periferní vidění zachováno, takže není způsobena celková slepota. V klinickém obrazu

suché formy VPMD rozeznáváme změny na úrovni membrány. Ty jsou charakterizovány přesuny a shlukováním pigmentu a ukládáním odpadních materiálů v sítnici. Tvoří se typické bělavo-žluté drúzy. Přejít ve vlhkou formu se projevuje krvácením pod sítnici oka, otokem sítnice a ukládáním tuku do sítnice. Příčina změn není stále zcela objasněna. Onemocnění má nejspíše multifaktoriální charakter. Rizikovými faktory jsou – věk, pohlaví (dle studie jsou ženy postiženy 2x častěji než muži), genetické předpoklady, rasa (bílá populace), kouření, dieta s nadbytkem tuků [13, 14].

Léčbu VPMD lze rozdělit na preventivní terapii, léčbu suché formy, preventivní léčbu zabraňující přechodu ve vlhkou formu a léčbu vlhké formy. V současné době je léčba VPMD stále omezená, onemocnění lze pouze zpomalit. Nejdůležitější je prevence onemocnění, která zahrnuje ovlivnění rizikových faktorů a zvýšený příjem vitamínů karotenů. Studie AREDS (Age-Related Eye Disease Study) hodnotila 3640 pacientů starších 55 let s pokročilou formou VPMD. Pacientům byly podávány antioxidanty v dávce 400 IU vitamínu E, 500 mg vitamínu C, 15 mg betakarotenu, 2 mg Cu a 80 mg Zn. Studie probíhala po dobu 6,3 let a bylo zjištěno snížení rizika těžké ztráty zraku o 25 %. Další studie LAST (Lutein Antioxidant Supplementation Trial) zjistila, že podáváním 10 mg luteinu denně po dobu jednoho roku se zlepšila atrofie, kontrastní citlivost, subjektivní vidění. Bylo pozorováno i zvýšení hustoty makulárního pigmentu. Profylaktickou farmakoterapii zahrnují zejména preparáty s luteinem, zeaxanthinem a omega 3 mastnými kyselinami [13, 14].

Mezi léčebné postupy patří laserová terapie, laserová fotokoagulace, fotodynamická terapie. U vlhké formy poté podávání inhibitorů vaskulárního endoteliálního růstového faktoru [14].

3.2 Vitamíny

Vitamíny jsou základní organické sloučeniny, které nejsou syntetizovány lidmi ani zvířaty nebo jsou tyto sloučeniny vytvářeny pouze v nedostatečném množství. Proto musí být vitamíny přijímány potravou jako takové nebo jako prekurzory – provitaminy. Typickým příkladem provitamínu je betakaroten, který je v organismu rozdělen na dvě

Vitamín E je souhrnný název osmi přírodních chemických látek derivátů 6-hydroxychromanu neboli tokolu. Odtud pochází označení tokoferoly. Dělí se na další dvě skupiny látek odvozené od tokolu nebo tokotrienolu. Existují čtyři izomery, které mají biologickou aktivitu – α , β , γ , δ -tokoferol. Liší se od sebe počtem methylových skupin. Nejvíce rozšířený je α -tokoferol, který má také největší antioxidační aktivitu. Antioxidační vlastnosti jsou způsobeny hydroxylovou skupinou na chromanovém jádře, která je dárce vodíkových atomů. α -tokoferol se nachází prakticky ve všech tkáních člověka a jeho biologická aktivita je nejvyšší [17].

Historie: Při studiu souvislostí mezi plodností a výživou objevili Evans a Bishop v roce 1922, že absence látky ve stravě samic potkanů vedla ke smrti plodu. Tato látka byla poprvé označena jako Faktor X a poté jako vitamín E (jde o pátý objevený vitamín). Ve 20. a 30. letech bylo dále zjištěno, že kromě poškození reprodukčního systému potkanů, strava, ve které je vitamín E oxidačně zničen způsoboval encefalomalacii u kuřat a ptáků a svalovou dystrofii u morčat a králíků. V roce 1936 Evans izoloval z oleje pšeničných klíčků alkohol, kterému dal jméno α -tokoferol (z řeckého tokos = porod a phero = přinést, přinášející porod). V roce 1938 Fernholz objasnil strukturu α -tokoferolu [17, 18].

Chemické a fyzikální vlastnosti: Chemické vlastnosti tokoferolů určuje volná fenolová hydroxyskupina, která může být esterifikována. Na vzduchu postupně oxiduje a zčervená. Jeho významné antioxidační vlastnosti jsou dány schopností uvolnit ze své molekuly atom vodíku. Vitamín E je světle nažloutlý viskózní olej, dobře rozpustný v lipofilních rozpouštědlech a v ethanolu. Ve vodě je prakticky nerozpustný. UV spektra tokoferolů a tokotrienolů mají maximum absorpce při 292–298 nm [17].

Metabolismus a důležitost v organismu: Vitamín E je nejdůležitější přírodní antioxidant rozpustný v tucích. Nachází se v buněčných membránách bohatých na mastné kyseliny. S volnými radikály reaguje rychleji než mastné kyseliny, proto je nezbytně důležitý pro stavbu a funkci buněčných membrán. Při peroxidaci lipidů přeměňuje alkylperoxylové radikály lipidů $\text{LOO}\cdot$ na hydroperoxydy LOOH , které jsou následně rozkládány působením enzymu glutathionperoxidázy. Tím je přerušena řetězec lipoperoxidace a alkylperoxylové radikály mastných kyselin nemohou napadat další molekuly mastných kyselin. Tokoferol se přitom mění na tokoferylový radikál, který je stabilnější a je díky vitaminu C zčásti redukován zpět na tokoferol. Vstřebává se v tenkém střevě, dále je pak transportován do plazmy vázaný na lipoproteiny (převážně LDL).

Význam funkcí vitamínu E v lidském organismu je mnohostranný. Vysoké dávky vitamínu E snižují riziko aterosklerózy a ischemické choroby srdeční. Významnou roli hraje také v profylaxi stárnutí buněk, oxidačního stresu – vychytávání volných radikálů, rakoviny, důležitý je rovněž pro činnost pohlavních orgánů. Stimuluje buněčnou a humorální imunitu. Dobré výsledky byly zaznamenány i v terapii Alzheimerovy nebo Parkinsonovy choroby. Vitamín E se uplatňuje i při léčbě kožních potíží [17, 19].

Zdroje a výskyt: Na vitamín E jsou bohaté především rostlinné oleje lisované za studena, kde tento vitamín působí jako antioxidant zabraňující žluknutí (slunečnicový olej, olej z obilných klíčků). Vitamín E obsahují obilné klíčky, semena, ořechy (např. mandle), ale i avokádo, vejce, máslo, játra, tuk z lososa nebo tuňáka, listová zelenina. Vitamín E se ničí během kuchyňské úpravy a při zpracování potravin, a to včetně mrazení [17, 19].

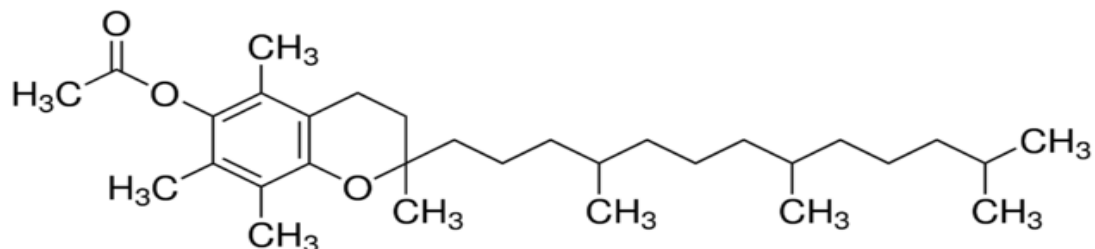
Nedostatek vitamínu E: Jelikož se vitamín E vstřebává v tenkém střevě je jeho nedostatek často spojen s poruchou vstřebávání tuků nebo může postihovat pacienty po resekci střeva. Vyskytuje se také u pacientů s cystickou fibrózou. Nedostatek se může projevit neurologickými potížemi, sníženou obranyschopností či nedostatečnou funkcí pohlavního systému. U novorozenců může nedostatek vitamínu E vyvolat anémii [17, 19].

Toxicita: Předávkování vitamínem E je poměrně vzácné. Na rozdíl od ostatních vitamínů rozpustných v tucích je relativně málo toxický. Vitamin E se má užívat opatrně v kontrolovaných dávkách u těch, kdo trpí zvýšenou funkcí štítné žlázy, diabetem, vysokým krevním tlakem nebo revmatickou srdeční vadou. Jeho dlouhodobé užívání vysokých dávek zhoršuje vstřebávání vitamínu K [19].

Příjem: Doporučená denní dávka vitamínu E je v průměru 10 mg denně (muži 12 mg a ženy 8 mg). Při léčebné terapii by denní dávky neměly překročit 800 mg. Vstřebatelnost přírodní formy vitamínu E je vyšší než syntetické formy vitamínu E. Vitamín C a selen podporují činnost tokoferolu v organismu. Vysoké dávky železa, mědi a hořčíku mohou snížit množství vitamínu E v organismu. Sloučeniny anorganického železa, které se podávají při chudokrevnosti, ničí vitamin E, nelze je proto užívat současně. Časová prodleva mezi jejich příjmem by měla být minimálně osm hodin. Organické sloučeniny železa, jako je glukonát, citrát nebo fumarát, vitamin E neničí [18, 19].

3.2.2 Vitamín E acetát

Struktura:



Obrázek 4: Strukturální vzorec vitamínu E acetátu

Sumární vzorec: $C_{31}H_{52}O_3$

Mr: 472,75

CAS: 58-95-7 [20]

Vitamín E acetát je suchá, prášková forma vitamínu E. Jedná se o ester kyseliny octové a α -tokoferolu. Dokud není acetát vitamínu E absorbován a přeměněn ve střevě, nemá tato forma sama o sobě antioxidační vlastnosti. Je mnohem stabilnější vůči slunečnímu záření a kyslíku než samotný vitamín E. Životnost esteru je větší než u neesterifikované formy tokoferolu. Běžně dostupný zdroj stabilního vitamínu E je syntetický DL- α -tokoferyl acetát.

Z důvodu lepší stability je běžnější využití vitamínu E acetátu v potravních doplňcích. Vitamín E acetát funguje v podstatě jako provitamín vitamínu E, kdy hydrolýzou esterové vazby dojde k uvolnění vitamínu E a jeho antioxidačních vlastností [21].

3.3 Chromatografické metody

Chromatografie je významná a široce používaná analytická metoda. Chromatografické metody slouží k separaci složek směsí. Pomocí chromatografie lze oddělit jednotlivé látky ze směsi a můžeme dále určit jejich kvantitativní, a i kvalitativní charakteristiky [22].

3.3.1 Základní princip a rozdělení chromatografických metod

Princip chromatografie spočívá v dělení směsi látek mezi dvěma fázemi. Jedna fáze je přitom vždy stacionární (nepohyblivá) a na ní dochází k zadržování dělených látek. Druhá fáze je mobilní (pohyblivá) a touto fází jsou dělené látky unášeny. Stacionární fází může být tuhá látka nebo kapalina (ukotvená na tuhém nosiči), mobilní fází může být plyn nebo kapalina. Stacionární fáze je umístěna v chromatografické koloně jako tzv. sorbent. Mobilní fáze protéká sorbentem. Mechanismus chromatografického dělení využívá retence směsi látek stacionární fází a postupné a opakované vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi stacionární a mobilní fází. Mobilní a stacionární fáze jsou vzájemně nemísitelné. K ustavování rovnováhy a k separaci složek směsi dochází na základě afinity látek směsi k jednotlivým fázím [22, 23].

Podle vlastností stacionární a mobilní fáze se dělí i chromatografické metody. Rozdělení je možné dle:

- mechanismu interakcí (adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou, gelovou, afinitní)
- skupenství mobilní fáze (kapalinová, plynová)
- uspořádání stacionární fáze (kolonová, plošná, tenkovrstevná) [23].

V této práci byla používána vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography – HPLC).

3.3.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC je analytickou separační metodou, jež je široce používána v mnoha odvětvích. Uplatnění nachází v monitorování lékových hladin, v analýze potravin, v monitoringu životního prostředí či diagnostice nemocí. Velké uplatnění nachází ve farmacii, zejména při výzkumu a kontrole léčiv. HPLC je předepsanou metodou při určení totožnosti a zkoušek na čistotu v monografiích Českého lékopisu [22].

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je separační metoda, která podává informace o kvalitě i o kvantitě zkoumaných analytů. Velkou výhodou je její citlivost a rychlost. HPLC poskytuje díky moderním přístrojům, které jsou vybavené autosamplery i možnost automatizace a dávkování malých objemů vzorků (1 μ l). Z toho vyplývá nízká spotřeba vzorků a rozpouštědel. Při HPLC je mobilní fáze přiváděna do systému pomocí čerpadla za vysokého tlaku. K rozdělení látek dochází na koloně působením mobilní fáze, která eluuje analyty sorbované na fázi stacionární [22].

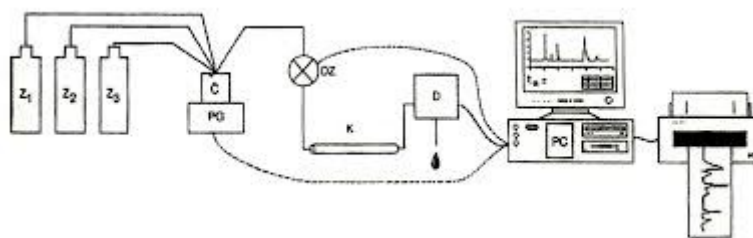
HPLC dělíme na chromatografii na normálních fázích a na chromatografii na reverzních fázích podle polaritý stacionární a mobilní fáze. V současné době je používanější chromatografie na reverzních fázích.

- **chromatografie na normálních fázích** používá silně polární adsorbent (silikagel, oxid hlinitý) a nepolární nebo slabě polární mobilní fázi (hexan, heptan, metylenchlorid apod.). Vzhledem k horším vlastnostem nepolárních rozpouštědel (hořlavost, negativní působení na lidské zdraví a také na životní prostředí) je upřednostňována chromatografie na reverzních fázích.
- **chromatografie na reverzních fázích** využívá sníženou polaritu stacionární fáze a polární mobilní fázi. Stacionární fáze je chemicky modifikovaná. Na inertní nosič (silikagel, oxid zirkoničitý nebo různé polymerní materiály) jsou chemickou vazbou navázány různé radikály. Dle typu radikálu je dělíme na nepolární fáze (radikál obsahuje uhlíkové řetězce, nejčastěji C8 až C18) nebo středně polární fáze (radikál obsahuje tříuhlíkaté řetězce zakončené různými skupinami, které ovlivňují polaritu, např. $-\text{NH}_2$, $-\text{CN}$ [23]).

Separace a eluce jednotlivých složek směsi je ovlivněna povahou stacionární i mobilní fáze. Dle povahy mobilní fáze rozlišujeme gradientovou nebo isokratickou eluci.

- **gradientová eluce** – složení mobilní fáze se mění s časem. Nejčastěji se používá gradient lineární (může být i exponenciální nebo logaritmický). Uplatňuje se tam, kde mají složky směsi odlišné fyzikálně–chemické vlastnosti, a kde by isokratická eluce byla časově velmi náročná. Gradientová eluce je více používanou technikou.
- **isokratická eluce** – složení mobilní fáze je konstantní během celé analýzy. Výhodou může být vyšší stupeň separace analyzovaných složek, avšak velkou nevýhodou je délka analýzy a také nejistota, zda došlo k vymytí všech složek analytu z kolony. Isokratická eluce je vhodná u látek s podobnými fyzikálně–chemickými vlastnostmi [23, 24].

Separované analyty, které vycházejí z kolony jsou zaznamenávány při průchodu detektorem. Jejich signál je převeden do podoby chromatografického záznamu, takzvaného chromatogramu. Chromatogram je charakterizován typickými křivkami, které nazýváme píky (eluční křivky) [24].



Obrázek 5: Schéma kapalinového chromatografu [22]

Z_1 , Z_2 , Z_3 – zásobníky mobilní fáze; \check{C} – vysokotlaké čerpadlo; PG – programovací zařízení; K – chromatografická kolona; D – diferenciální detektor; PC – počítač

3.4 Metody stanovení karotenoidů a vitamínu E

Ze stanovovaných látek je lékopisnou látkou betakaroten, vitamín E a vitamín E acetát. Lutein lékopisnou látkou není. Vzhledem ke skutečnosti, že potravní doplňky obsahují většinou směs luteinu a vitamínu E či betakarotenu (nebo obojí) nebylo možné použít ke stanovení obsahu předepsané lékopisné metody. Proto byla použita

separační metoda, stanovení pomocí HPLC analýzy. Vycházelo se z metod, které byly publikované v odborné literatuře. Většina publikovaných metod byla aplikována především v analýze zeleniny a ovoce, proto byly uvedené způsoby extrakce, úpravy vzorku a separace v naší práci upraveny pro analýzu potravních doplňků. Níže je uveden stručný přehled lékopisných a jiných publikovaných metod analýzy látek našeho zájmu.

3.4.1 Metody stanovení betakarotenu, vitamínu E a vitamínu E acetátu dle Českého lékopisu

- **Betakaroten** – ČL předepisuje spektrofotometrické stanovení. Zkoušená látka se rozpustí v chloroformu, zředí cyklohexanem a měří se absorbance roztoku při 455 nm. Roztok cyklohexanu slouží jako kontrolní vzorek [6].
- **Vitamín E** – ČL předepisuje stanovení obsahu pomocí plynové chromatografie za použití dotriakontanu R jako vnitřního standardu [16].
- **Vitamín E acetát** – ČL předepisuje stanovení obsahu pomocí plynové chromatografie za použití dotriakontanu R jako vnitřního standardu [20].

3.4.2 Metody stanovení karotenoidů

Vzhledem k lipofilním vlastnostem karotenoidů je výhodné použití organických rozpouštědel při extrakci ze zkoumaného vzorku. Nejběžněji používaná jsou například aceton, petrolether, hexan, diethylether, případně ethanol a methanol. Použití polárních alkoholů v nepolárních rozpouštědlech se také ukázalo jako účinné při extrakci karotenoidů. Jako nejvhodnější možností se ukázalo použití hexanu, acetonu a ethanolu. Z dostupných chromatografických metod je při stanovení karotenoidů nejběžnější použití metody HPLC. Byly zkoušeny různé metody, nicméně nejlepších výsledků dle článků publikovaných v odborné literatuře vykazuje použití chromatografie na reverzních fázích za použití kolony C18 nebo C30. Chemické vlastnosti stacionární fáze ovlivňují výsledky stanovení karotenoidů. Obecně lze říci, že stacionární fáze C30 poskytují lepší výsledky analýz. Pro stanovení geometrických izomerů betakarotenu, luteinu, zeaxanthinu je výhodnější použít stacionární fázi C18. Mobilní fázi může tvořit celá řada látek v různých poměrech, například voda, methanol, acetonitril, 2-propanol, aceton, ethyl acetát,

tetrahydrofuran, t-butyl methyl ether, dichlormethan, chloroform, methylenchlorid. Je však potřeba zachovat podmínku dokonalé mísitelnosti použitých rozpouštědel. Z hlediska typu eluce bylo dosaženo lepších výsledků při použití gradientové eluce. Detekce je nejčastěji za pomoci UV/VIS spektrofotometrického detektoru v barevné oblasti spektra [25–28].

Výsledky stručné rešerše z odborných článků jsou shrnuty v následující tabulce.

Tabulka 1: Vybrané chromatografické metody stanovení karotenoidů

Zdroj karotenoidů	Stanovované látky	Kolona	Mobilní fáze	Průtok	Nástrík	Detekce	Typ eluce	Literatura
Mikrořasy	Neoxanthin, lutein, fucoxanthin, peridinin, violaxanthin, zeaxanthin, vaucherixanthin, diatoxanthin, diadinoxanthin, giroxanthin exter, dinoxanthin, betakaroten	LiChrospher 100 RP-18, 5µm, (4,6 x 150 mm)	A: voda:methanol 1:4 B: aceton:methanol 1:1	1 ml/min	20 µl	UV 440, 450, 475 nm	Gradientová: 0-8 min 25 % B, 8-18 min 75 % B, 18-23 min 90 % B, 25-27 min 100 % B, 27-32 min 25 % B	[25]
Kiwi, špenát, lidská plazma, lidská tuková tkáň	Retinol, ubiquinol, tocopherol, astaxanthin, lutein, zeaxanthin, betakaroten, lycopen,	C30	A: methanol B: methyl tert-butyl ether C: voda	1 ml/min	neuveden	UV 450, 290, 325 a 272 nm	Gradientová: 0-27 min 96:2:2, 27-31 min 18:80:2, 31-35 min 96:2:2	[26]
Doplňky stravy	Lutein	C18, 4,6 x 250 mm	A: voda B: acetonitril C: ethyl acetát	neuveden	neuveden	DAD	Gradientová: 0-9 min: A (9-5 %), B (81-45 %), C (10-50 %); od 9.1 do 15 min: A (5-1 %), B (45-9 %) C (50-90 %); od 15.1 do 18 min: A (1-9 %), B (9-81 %), C (90-10 %)	[27]

Tabulka 1: Vybrané chromatografické metody stanovení karotenoidů

Zdroj karotenoidů	Stanovované látky	Kolona	Mobilní fáze	Průtok	Nástřik	Detekce	Typ eluce	Literatura
Standardy	Lutein, zeaxanthin, alfakaroten, betakaroten, lycopon	Polymerní C18	Xantophyly: methanol Karoteny: A: methanol B: ethylacetát	1,5 ml/min	neuveđen	UV	Isokratická	[28]
Brazilské tropické ovoce	Vitamíny B, C, karotenoidy (celkem 13 látek)	C30 250 x 4,6 mm	A: methanol B: methyl tert-butyl ether	0,9 ml/min	neuveđen	UV 450 nm	Gradientová: lineární gradient z 95 % A na 70 % A za 30 min, 50 % A za 20 min	[29]
Měsíček	Lutein, estery luteinu	C18 Radial Pak A	Hexan:aceton 80:20	1,5 ml/6 min	neuveđen	UV 450 a 480 nm	Isokratická	[30]
Mrkev	alfakaroten, betakaroten, lycopon, lutein, zeaxanthin, violaxanthin (celkem 15 látek)	YMC C-30, 2,0 x 250 mm	A: methanol + 0,1% butylhydroxytoulen B: methyl tert-butyl ether + 0,1% butylhydroxytoulen C: voda	150μl/min	1,25 μl	PDA 190-800 nm	Gradientová: 0 min 90:5:5, 12 min 95:5:0, 25 min 89:11:0, 45 min 75:25:0, 60 min 50:50:0, 78 min 25:75:0, 80 min 90:5:5, 100 min 90:5:5	[31]

Tabulka 1: Vybrané chromatografické metody stanovení karotenoidů

Zdroj karotenoidů	Stanovované látky	Kolona	Mobilní fáze	Průtok	Nástřik	Detekce	Typ eluce	Literatura
Sójové boby	Lutein, α , δ , γ -tokoferol, β -sitosterol, stigmasterol, campesterol	Fenylová kolona Xterra, 150 x 3,9 mm, 3,5 μ m	Acetonitril:methanol:voda 48:22,5:29,5	neuveden	neuveden	Lutein UV 450 nm, ostatní ELSD	Isokratická po 40 min, poté lineární gradient 4 min 100 % A, udržení 7 min, 4 min návrat k iniciálním podmínkám a udržení 6 min.	[32]
Mango	Lutein, zeaxanthin, betakaroten, violaxanthin, neoxanthin (celkem 10 látek)	C30	A: methanol:isopropanol (99:1) B: methylenchlorid 100%	1 ml/min	20 μ l	UV 450 nm	Gradientová: 100 % A, po 15 min. snížení na 70 % A do 45. min., udrženo 15 min., zvýšeno na 100 % A do 65 min.	[33]
Rajče	Lutein, lycopene, betakaroten	C-30, 4,6 x 250 mm, 3 μ m (YMC)	A: methanol B: tert-butyl methyl ether	0,8 ml/min	10 μ l	UV 450-470 nm	Gradientová: lineární gradient 60 min od 90 % do 40 % A, vyvážení na 90 % A a udržení 15 min.	[34]

4 Experimentální část

4.1 Materiál, přístroje a pomůcky

Standardy karotenoidů:	Lutein 90%, Applichem Betakaroten 97%, Sigma Aldrich Vitamin E 96%, Sigma Aldrich Vitamin E-acetát 96%, Sigma Aldrich
Chemikálie:	Methanol chromasolv, Sigma Aldrich Acetonitril chromasolv, Sigma Aldrich Hexan chromasolv, Sigma Aldrich Metylenchlorid, Sigma Aldrich Aceton, Sigma Aldrich Chloroform, Sigma Aldrich Kyselina octová, Fluka Kyselina askorbová, Sigma Aldrich Hydroxid draselný, Lachema Kyselina chlorovodíková, Lachema Destilovaná voda, Millipore
Přístroje a pomůcky:	Chromatografická sestava Shimadzu Pumpy LC-10 AD VP Degasser DGU-14 A Autosampler SIL-HTA Termostat kolony CTO-10 AC VP DAD detektor SPD-M10A VP Fluorescenční detektor RF-10A XL Ultrazvuková lázeň, Bandelin Sonorex Digitec Analytické váhy, Sartorius Třepačka, Memmert Centrifuga, Schiller Instruments

Kolony: Ascentis Express C-18 100 x 4,6 mm, velikost částic 5 µm (Sigma Aldrich)
Atlantis T3, 150 x 3 mm, velikost částic 3 µm (Waters)
Ascentis Express RP-Amide 100 x 4,6 mm, velikost částic 5 µm (Sigma Aldrich)

Zkoumané potravní doplňky: Ostrovidky (Noventis s.r.o.)
Ocutein forte (Simply You Pharmaceuticals a.s.)
Walmark Lutein forte (Walmark)
Ocumax (SVUS PHARMA a.s, Hradec Králové)
Avilut (Herbacos – Recordati s.r.o.)
Ocuvite (Dr. Gerhard Mann, Chem.-Pharm. fabrik GMBH)
Lutein pro oči (Uniospharma)
Walmark Betakaroten (Walmark)
Revital Super Betakaroten (Vitar)

4.2 Deklarovaný obsah karotenoidů, vitamínu E a vitamínu E-acetátu ve zkoumaných potravních doplňcích

Tabulka 2: Obsah karotenoidů, vitamínu E, vitamínu E-acetátu, betakarotenu v potravních doplňcích

Přípravek	Obsah látky (mg/1 tbl/1 cps.)			
	Lutein	Vitamín E	Vitamín E-ac.	Betakaroten
Ostrovidky	3 mg			6,7 mg
Ocutein forte	15 mg	30 mg		2 mg
Walmark Lutein forte	20 mg	36 mg		
Ocumax	12 mg			
Avilut	12 mg			
Walmark Betakaroten				6 mg
Ocuvite	6 mg	8,8 mg		
Lutein pro oči	6 mg	7,5 mg		
Revital Super Betakaroten		3 mg		6 mg

4.3 Příprava roztoků standardů

Standardy luteinu, betakarotenu, vitamínu E a vitamínu E-acetátu byly rozpouštěny v 1-20 ml chloroformu. Protože se jedná o velmi lipofilní látky byl na základě poznatků z odborných článků použit jako rozpouštědlo chloroform. Navážky standardů byly rozpouštěny ve vialkách z tmavého skla. Následně byly ultrazvukovány 5 minut a dále uchovávány v chladničce. Zejména lutein je velmi citlivý k oxidačním změnám a uchováním vzorků v chladu se předešlo jejich znehodnocení. Byl také navažován vzhledem k ceně v nejmenším množství.

4.3.1 Příprava zásobních roztoků standardů

Tabulka 3: Koncentrace zásobních roztoků standardů luteinu, betakarotenu, vitamínu E a vit. E-acetátu

	Navážka (mg)	Chloroform (ml)	Koncentrace (mg/l)
Lutein	1,03	1	1030
Betakaroten	50,15	20	25007
Vitamín E	101,00	20	5050
Vitamín E-acetát	100,70	20	5035

4.3.2 Příprava pracovních roztoků standardů

Pracovní roztoky byly připraveny smísením 2 ml roztoků standardu a 10 ml chloroformu. Toto ředění bylo provedeno pětkrát. Koncentrace pracovních roztoků standardů byla následující:

Lutein	206 mg/l
Vitamín E	1010 mg/l
Vitamín E-ac.	1007 mg/l
Betakaroten	501,5 mg/l

4.4 Příprava analyzovaných vzorků

Příprava kapslí: Obal kapsle se mechanicky narušil nůžkami, kapsle byla rozpuštěna ve 20 ml chloroformu. Zkumavka s kapslí a chloroformem se protřepala a dala se 5 minut ultrazvukovat. Roztok byl přefiltrován přes 0,45 μm filtr. Tímto byl získán základní extrakt, který bylo třeba dále vhodně naředit.

Příprava tablet: Bylo zváženo 10 tablet a spočítána průměrná hmotnost jedné tablety. Tablety byly rozdrceny a byla odvážena hmotnost jedné tablety. Tabletovina byla rozpuštěna v 10 ml vody, poté bylo přidáno 0,5 ml kyseliny askorbové ($c = 0,5 \text{ g/l}$). Následně bylo přidáno 15 ml 1 M hydroxidu sodného v methanolu. Roztok se 15 minut ultrazvukoval. Poté se roztok okyselil 5 ml 37% kyselinou chlorovodíkovou. Následovalo přidání 20 ml chloroformu a 20 minut centrifugace. Došlo k oddělení vodné a organické vrstvy. Chloroformová vrstva se odebrala, zfiltrovala a byla použita pro analýzu.

4.5 Optimalizace chromatografických podmínek

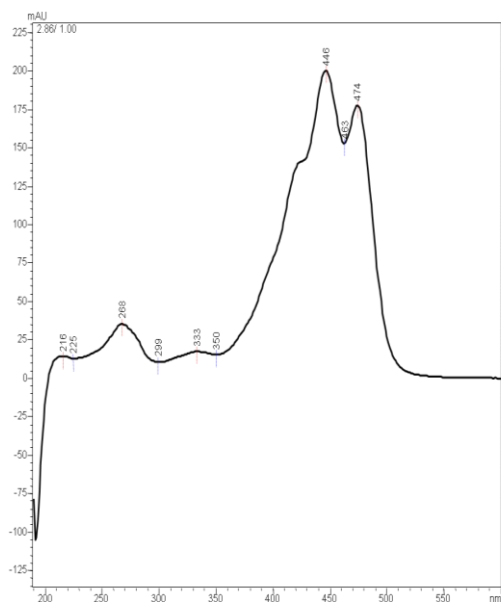
Cílem optimalizace je výběr takových chromatografických podmínek, při kterých je dosažena dostatečná separace jednotlivých složek směsi v co nejkratším čase. Mezi podmínky optimalizace řadíme volbu kolony, složení mobilní fáze, vlnovou délku detektoru, rychlost průtoku mobilní fáze kolonou, teplotu na kolně a objem dávkované směsi.

4.5.1 Volba vlnové délky detektoru

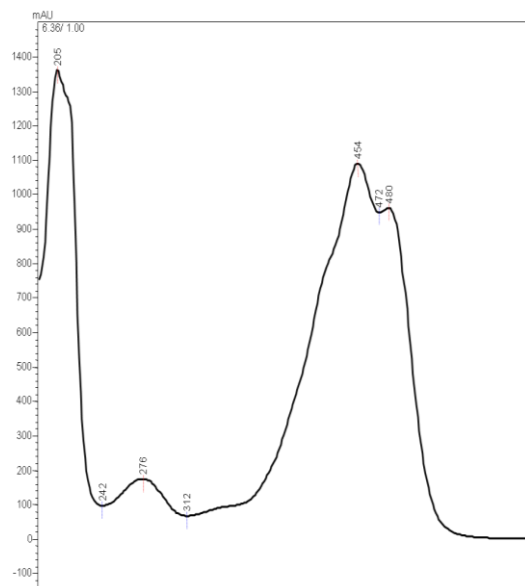
Karotenoidy mají ve své molekule velký počet konjugovaných dvojných vazeb, absorbují záření ve viditelné oblasti spektra (400–760 nm). Vitamin E a vitamin E-acetát absorbují záření v ultrafialové oblasti spektra (10–400 nm). Pro analýzu karotenoidů a vitaminů byl využit DAD detektor který byl součástí HPLC systému a umožnil výběr různých vlnových délek pro detekci jednotlivých analytů.

Tabulka 4: Vlnové délky absorpčního maxima záření pro jednotlivé látky

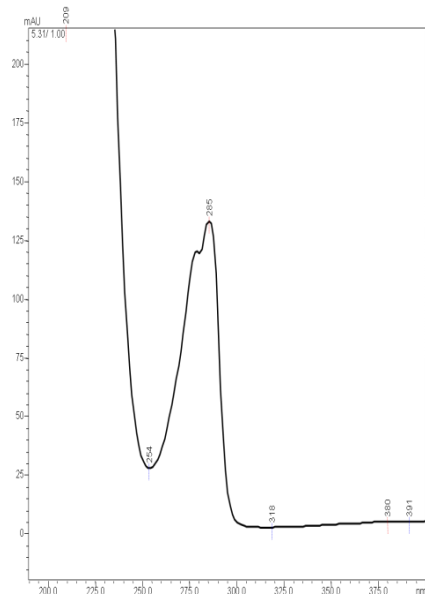
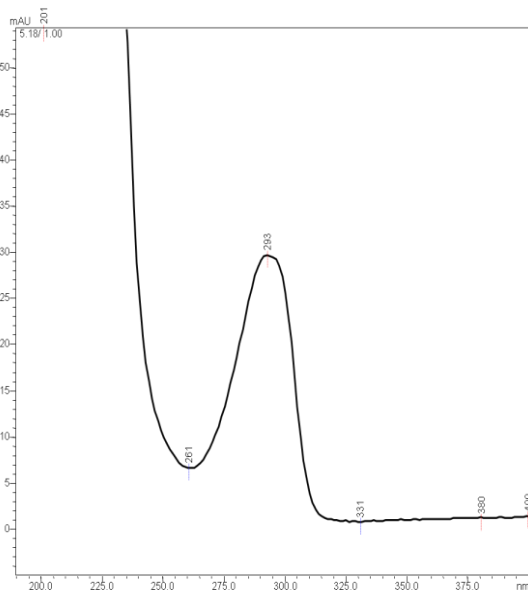
Analyt	λ (nm)
Lutein	445
Betakaroten	455
Vitamin E	290
Vitamin E-ac.	290



Obrázek 6: Absorpční spektrum luteinu



Obrázek 7: Absorpční spektrum betakarotenu



Obrázek 8: Absorpční spektrum vitamínu E Obrázek 9: Absorpční spektrum vit. E-ac

Detekce byla prováděna při dvou vlnových délkách 290 a 450 nm. Vitamíny byly detekovány pouze při vlnové délce 290 nm. Karotenoidy jsou detekovatelné při obou vlnových délkách, ale při 450 nm vykazují vyšší odezvu a lepší symetrii píků. Při těchto vlnových délkách neabsorbují rozpouštědla a případné nečistoty a neprojevují se tak na záznamu.

4.5.2 Optimalizace složení mobilní fáze a výběr nejvhodnější kolony

Při výběru nejvhodnější mobilní fáze se vycházelo z postupů publikovaných v odborné literatuře. Bylo testováno několik chromatografických kolon a řada mobilních fází v různých poměrech. Měření probíhalo v módu separace na reverzních fázích. Při výběru mobilních fází se vycházelo z vlastností látek. Vitamíny E a betakaroten jsou velmi lipofilní látky. Lutein obsahuje ve své molekule hydroxylové skupiny, které snižují jeho lipofilitu. Díky těmto vlastnostem zkoumaných látek byly zvolené mobilní fáze vybírány tak, aby se jednotlivé složky směsi dostatečně separovaly a tato separace probíhala

v optimálním (co nejkratším) čase. Pro urychlení času analýzy a z důvodů rozdílné lipofility analyzovaných látek byla použita gradientová eluce.

4.5.3 Rychlost průtoku mobilní fáze, dávkovaného objemu a teploty při analýze

Při volbě těchto parametrů bylo vycházeno z odborných poznatků. Jako nejvhodnější rychlost průtoku mobilní fáze byla zvolena rychlost 1ml/min. Dávkovaný objem byl 5 μ l, tedy standardní používané množství pro HPLC analýzu. Teplota kolonového termostatu při analýzách byla nastavena na 30 °C.

4.6 Výsledky separací na jednotlivých kolonách

4.6.1 Ascentis Express C-18 (100 x 4,6 mm, 5 μ m)

Jedná se o standardní C18 kolonu, která se často používá při HPLC analýze. Sorbent s C18 skupinami využívala i řada odborných prací při analýze karotenoidů a vitamínů.

Nejllepších výsledků bylo dosaženo při použití gradientu 1 a složení mobilní fáze acetonitril a methylenchlorid:hexan (1:1), dále bylo zkoušeno složení mobilní fáze methanol:acetonitril (2:8) a methylenchlorid:hexan (1:1).

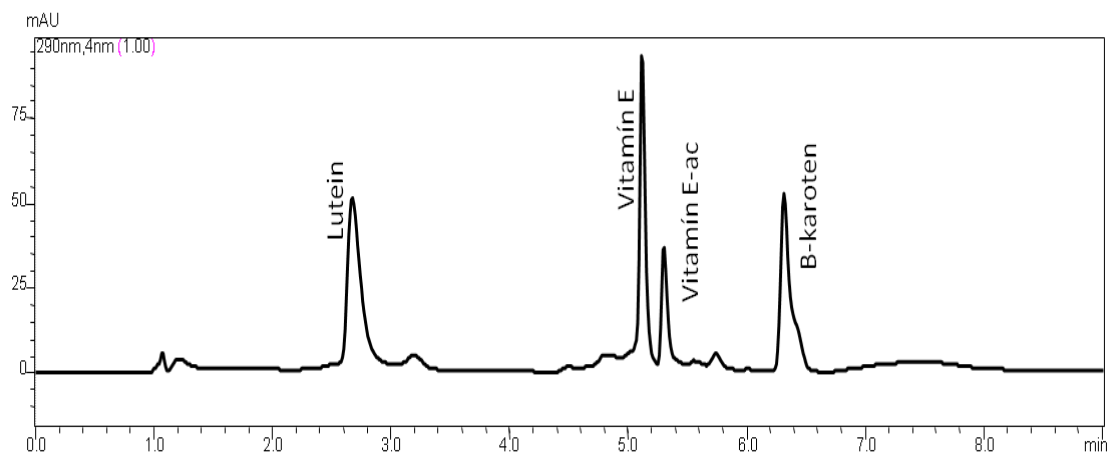
Gradient č. 1: mobilní fáze acetonitril + methylenchlorid:hexan (1:1)

Tabulka 5: Složení a poměr mobilní fáze při použití gradientu č. 1

Složení mobilní fáze (%)		
čas	Acetonitril	Methylenchlorid:hexan (50:50)
do 2.	100	0
3.-5.	75	25
5.-6.	75	25
6.-9.	100	0

Tabulka 6: Retenční časy vzorků při použití gradientu č. 1

Retenční čas (min)	
Lutein	2,6
Vit.E	5,1
Vit.E -ac	5,2
Betakaroten	6,4



Obrázek 10: Chromatogram získaný při použití gradientu č. 1

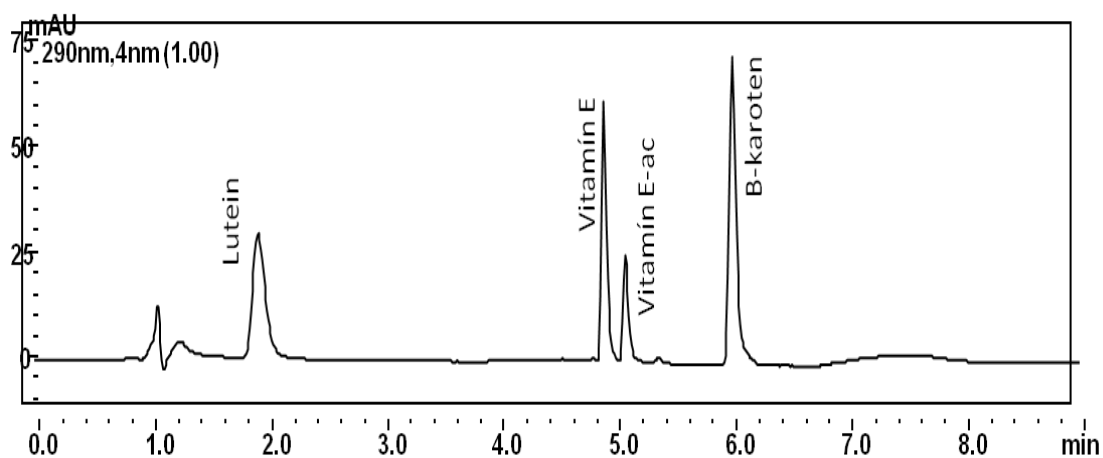
Gradient č. 1: mobilní fáze methanol:acetonitril (2:8) + methylenchlorid:hexan (1:1)

Tabulka 7: Složení a poměr mobilní fáze při použití gradientu č. 1

Čas (min)	Složení mobilní fáze (%)	
	Methanol:Acetonitril	Methylenchlorid:hexan
Do 2.	100	0
3.-5.	75	25
5.-6.	75	25
6.-9.	100	0

Tabulka 8: Retenční časy vzorků při použití gradientu č. 1

Retenční čas (min)	
Lutein	2,0
Vit.E	4,9
Vit.E-ac	5,1
Betakaroten	6,0



Obrázek 11: Chromatogram získaný při použití gradientu č. 1

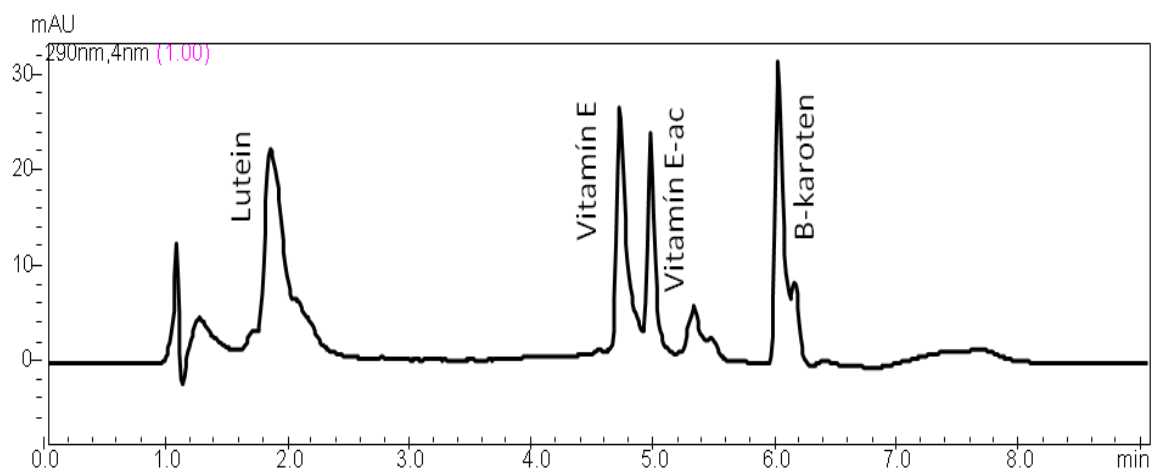
Gradient č. 2: mobilní fáze acetonitril + methylenchlorid:hexan (1:1)

Tabulka 9: Složení a poměr mobilní fáze při použití gradientu č. 2

Čas (min)	Složení mobilní fáze (%)	
	Acetonitril	Methylenchlorid:hexan 50:50
Do 2.	95	5
3.-5.	75	25
5.-6.	75	25
6.-9.	95	5

Tabulka 10: Retenční časy vzorků při použití gradientu č. 2

Retenční čas (min)	
Lutein	1,9
Vit.E	4,75
Vit.E-ac	4,98
Betakaroten	6,0



Obrázek 12: Chromatogram získaný při použití gradientu č. 2

4.6.2 Atlantis T3 (150 x 3 mm, 3 µm)

Na této koloně byly použity mobilní fáze ve složení acetonitril a methylenchlorid:hexan (1:1). Opět byl vyvíjen gradient dle metody gradient 1 a gradient 2. Při použití gradientu 1 docházelo ke špatné separaci píků luteinu a betakarotenu. Naopak vitamíny se separovaly velmi dobře. Metodou gradient 2 se dosáhlo lepší separace luteinu a betakarotenu. U obou použitých metod byl delší retenční čas luteinu a betakarotenu.

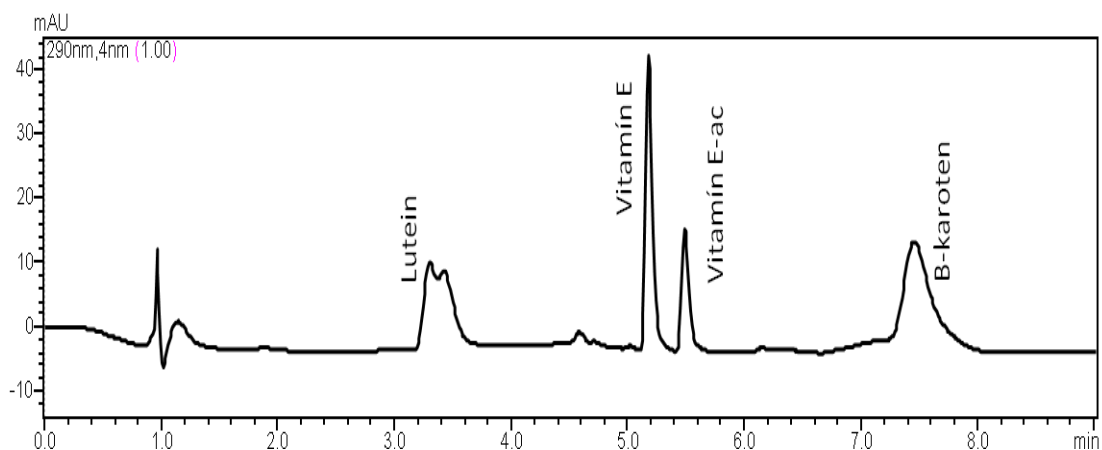
Gradient č. 1: mobilní fáze acetonitril + methylenchlorid:hexan (1:1)

Tabulka 11: Složení a poměr mobilní fáze při použití gradientu č. 1

Čas (min)	Složení mobilní fáze (%)	
	Acetonitril	Methylenchlorid:hexan 50:50
Do 2.	100	0
3.-5.	75	25
5.-6.	75	25
6.-9.	100	0

Tabulka 12: Retenční časy vzorků při použití gradientu č. 1

Retenční čas (min)	
Lutein	3,45
Vit.E	5,1
Vit.E-ac	5,25
Betakaroten	7,5



Obrázek 13: Chromatogram získaný při použití gradientu č. 1

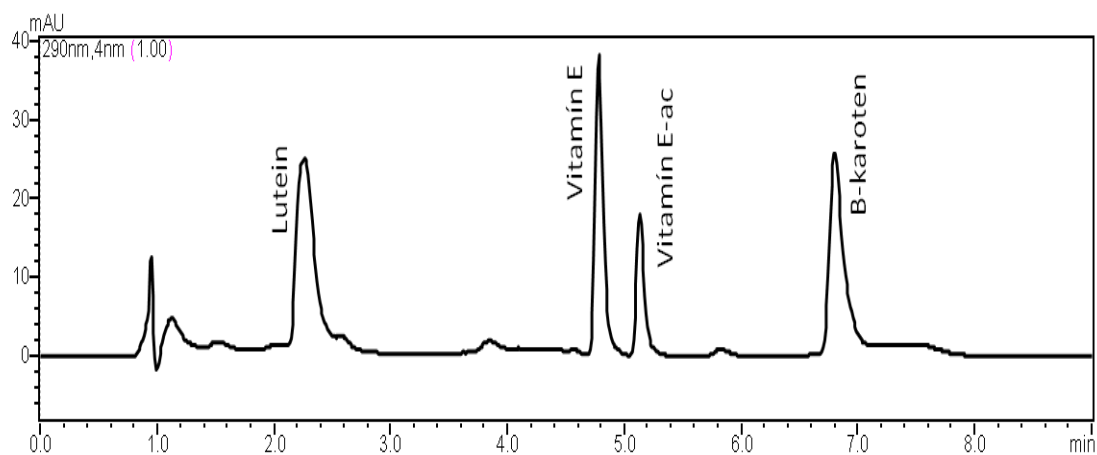
Gradient č. 2: mobilní fáze acetonitril + methylenchlorid:hexan (1:1)

Tabulka 13: Složení a poměr mobilní fáze při použití gradientu č. 2

Čas (min)	Složení mobilní fáze (%)	
	Acetonitril	Methylenchlorid:hexan 50:50
Do 2.	95	5
3.-5.	75	25
5.-6.	75	25
6.-9.	95	5

Tabulka 14: Retenční časy vzorků při použití gradientu č. 2

Retenční čas (min)	
Lutein	2,25
Vit.E	4,9
Vit.E-ac	5,1
Betakaroten	6,91



Obrázek 14: Chromatogram získaný při použití gradientu č. 2

4.6.3 Ascentis Express RP-amide (100 x 4,6 mm; 5 µm)

Díky přítomnosti amidové skupiny dochází k odlišné retenci hydrofilních a hydrofobních látek. Oproti předchozím použitým kolonám je více hydrofilní. Na této koloně byly zkoušeny tři rozdílné gradienty. Složení mobilní fáze bylo stejné jako u předchozích kolon. Acetonitril methylenchlorid:hexan (1:1). U gradientu č. 3 byl zkoušen i čistý acetonitril. Při použití všech typů gradientů docházelo k pozdní separaci luteinu. Všechny píky se od sebe nedostatečně separovaly. K separaci vitamínu E a vitamínu E-acetátu nedošlo vůbec. Pík betakarotenu neměl dostatečnou odezvu. Na této koloně byla také testována i separace polohového izomeru luteinu, tedy zeaxanthinu, který se v potravních doplňcích může také v nižších koncentracích vyskytovat. Nebyl však dále kvůli nedostatku standardu hodnocen.

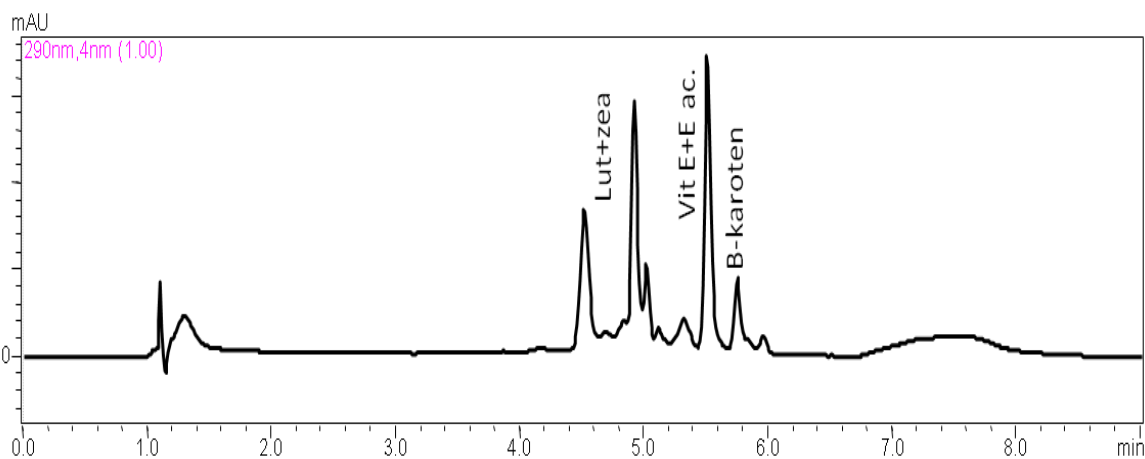
Gradient č. 1: mobilní fáze acetonitril + methylenchlorid:hexan (1:1)

Tabulka 15: Složení a poměr mobilní fáze při použití gradientu č.1

Čas (min)	Složení mobilní fáze (%)	
	Acetonitril	Methylenchlorid:hexan 50:50
Do 2.	100	0
3.-5.	75	25
5.-6.	75	25
6.-9.	100	0

Tabulka 16: Retenční časy vzorků při použití gradientu č.1

Retenční čas (min)	
Lutein	4,9
Vit.E	5,45
Vit.E-ac	5,45
Betakaroten	5,75



Obrázek 15: Chromatogram získaný při použití gradientu č. 1

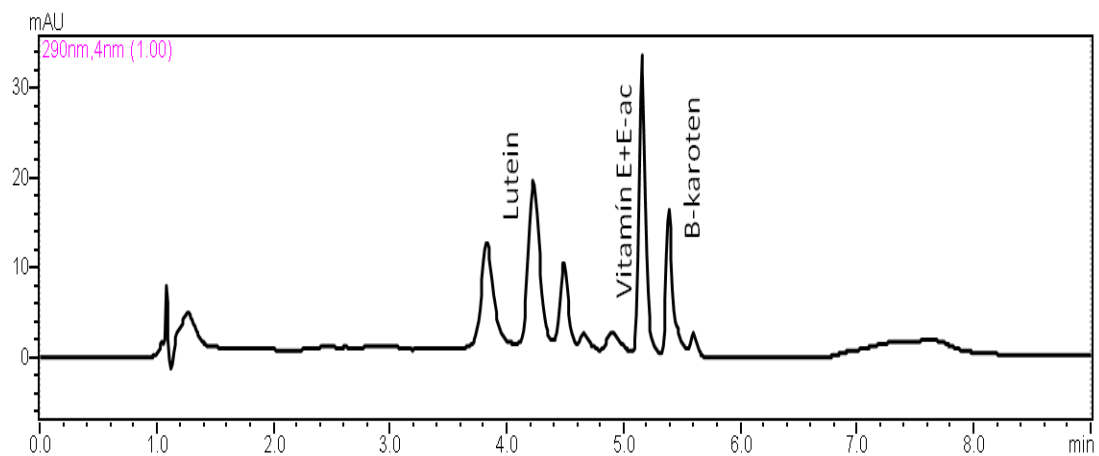
Gradient č. 2: mobilní fáze acetonitril + metylenchlorid:hexan (1:1)

Tabulka 17: Složení a poměr mobilní fáze při použití gradientu č.2

Čas (min)	Složení mobilní fáze (%)	
	Acetonitril	Metylenchlorid:hexan 50:50
Do 2.	95	5
3.-5.	75	25
5.-6.	75	25
6.-9.	95	5

Tabulka 18: Retenční časy vzorků při použití gradientu č.2

Retenční čas (min)	
Lutein	4,15
Vit.E	5,1
Vit.E-ac	5,1
Betakaroten	5,3



Obrázek 16: Chromatogram získaný při použití gradientu č.2

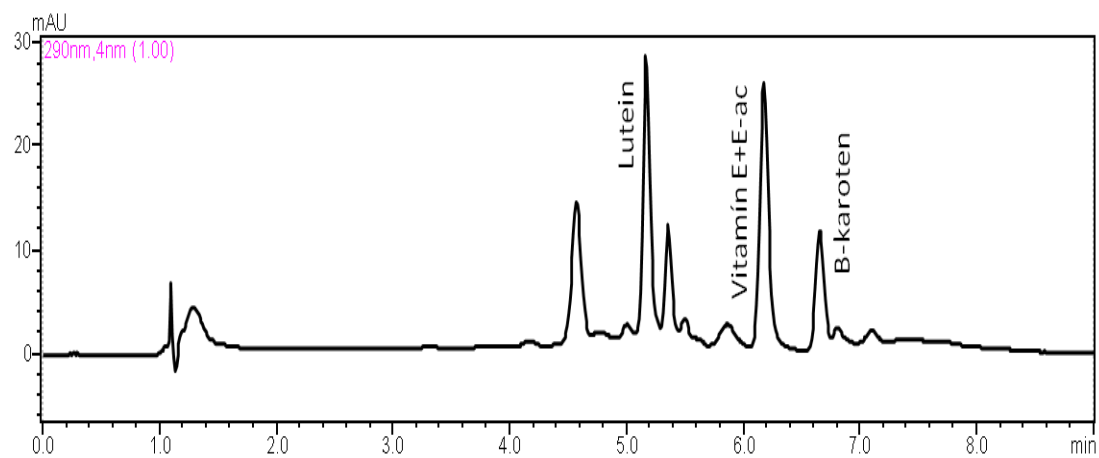
Gradient č. 3: mobilní fáze acetonitril + methylenchlorid:hexan (1:1)

Tabulka 19: Složení a poměr mobilní fáze při použití gradientu č.3

Čas (min)	Složení mobilní fáze (%)	
	Acetonitril	Methylenchlorid:hexan 50:50
Do 2.	100	0
3.-5.	85	15
5.-6.	85	15
6.-9.	100	0

Tabulka 20: Retenční časy vzorků při použití gradientu č.3

Retenční čas (min)	
Lutein	5,15
Vit.E	6,2
Vit.E-ac	6,2
Betakaroten	6,75



Obrázek 17: Chromatogram získaný při použití gradientu č.3

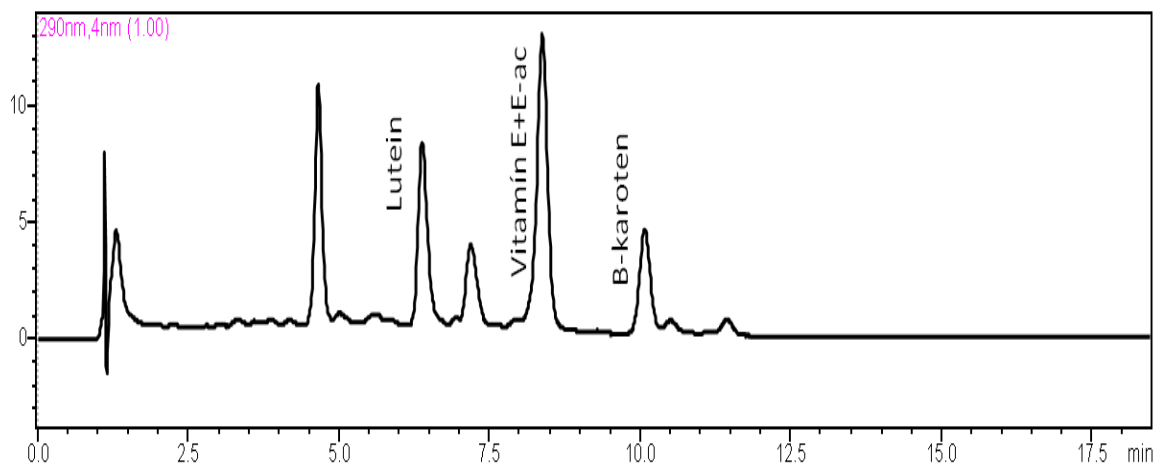
Gradient č. 3: mobilní fáze acetonitril

Tabulka 21: Složení a poměr mobilní fáze při použití gradientu č.3

	Složení mobilní fáze (%)
Čas (min)	Acetonitril
Do 2.	100
3.-5.	100
5.-6.	100
6.-9.	100

Tabulka 22: Retenční časy vzorků při použití gradientu č.3

Retenční čas (min)	
Lutein	6,0
Vit.E	8,0
Vit.E -ac	8,0
Betakaroten	10,0



Obrázek 18: Chromatogram získaný při použití gradientu č.3

4.7 Základní validace metody

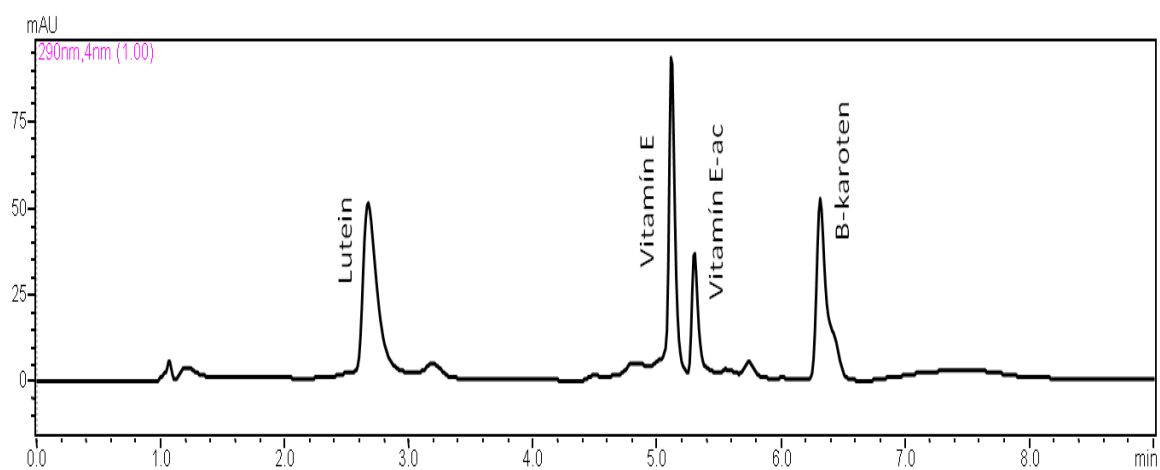
4.7.1 Souhrn optimálních chromatografických podmínek

Nejllepších výsledků bylo dosaženo při použití kolony Ascentis Express C–18, při použití gradientu 1 a složení mobilní fáze acetonitril, methylenchlorid:hexan (1:1). Za těchto podmínek trvala doba analýzy i ekvilibrací kolony 9 minut. Mezi píkem luteinu a betakarotenu byla prodleva necelé 4 minuty.

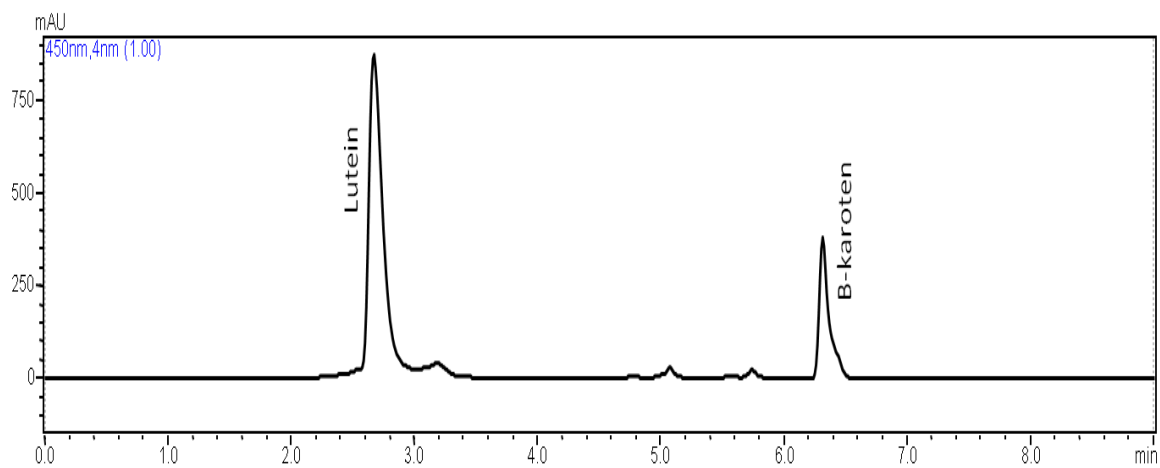
- Kolona – Ascentis Express C–18 (100 x 4,6 mm, velikost částic 5 µm)
- Detekce – UV/Vis 290 nm a 450 nm
- Dávkovaný objem vzorku – 5 µl
- Rychlost průtoku mobilní fáze – 1 ml/min
- Teplota – 30 °C
- Gradientová eluce

Tabulka 23: Složení a poměr mobilní fáze při použití gradientu č.1

Složení mobilní fáze (%)		
čas (min)	Acetonitril	Methylenchlorid:hexan (50:50)
do 2.	100	0
3.-5.	75	25
5.-6.	75	25
6.-9.	100	0

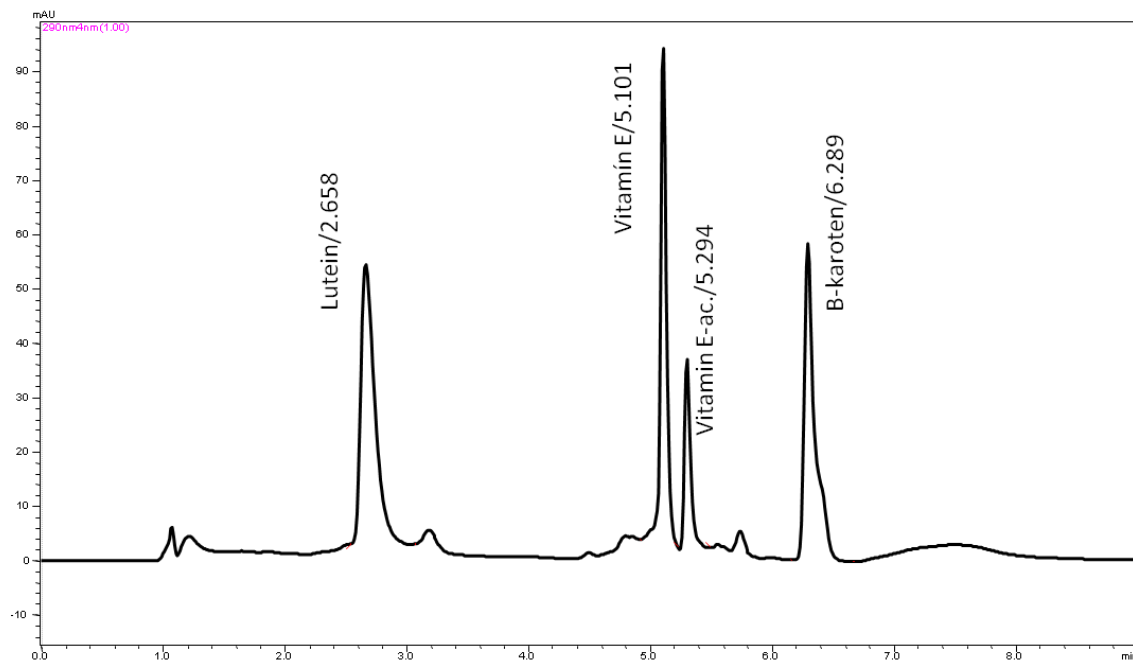


Obrázek 19: Chromatogram standardů za validovaných podmínek při vlnové délce 290 nm



Obrázek 20: Chromatogram standardů za validovaných podmínek při vlnové délce 450 nm

4.7.2 Test vhodnosti chromatografického systému (System suitability test – SST)



Obrázek 21: Chromatogram separace standardů získaný při SST

Tabulka 24: Hodnoty parametrů získaných při SST

	Retenční čas	Faktor symetrie	Rozlišení	Píková kapacita
Lutein	2,658	1,885	-	21,09
Vit.E	5,101	1,215	12,202	46,00
Vit.E-ac.	5,294	1,718	1,917	43,45
Betakaroten	6,289	2,116	7,859	32,25

4.7.2.1 Faktor asymetrie

Se vypočítá podle vzorce: $A_s = W_{0,05} / 2d$

$W_{0,05}$ – šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky

d – vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

4.7.2.2 Rozlišení

Tento parametr se vypočítá podle vzorce: $R_s = 1,18 (t_{R1} - t_{R2}) / (W_{h1} + W_{h2})$

t_R – retenční čas

W_h – šířka píku v polovině jeho výšky

4.7.2.3 Píková kapacita

Tento parametr se vypočítává podle vzorce: $n_p = 1 + (t_g/4 \times W_h)$

t_g – čas gradientu

W_h – šířka píku v polovině jeho výšky

4.7.3 Opakovatelnost

Při testu opakovatelnosti byla provedena analýza šesti nástřiků od každé látky pro jednu koncentraci. Pro analýzu byly použity pracovní roztoky standardů o koncentracích uvedených v tabulce 25. Výsledky jsou zaznamenány v následující tabulce.

Tabulka 25: Výsledky testu opakovatelnosti

Koncentrace (mg/l)	Plocha pod píkem	Průměr	Směrodatná odchylka	RSD (%)
Lutein 100	3828847	3777469	35865	0,95
	3792160			
	3775222			
	3761801			
	3734261			
	3753984			
Vit. E 82,5	634926	608312	13162	2,16
	602625			
	600850			
	602245			
	602931			
	606295			
Vit.E-ac. 495	232576	228153	3302	1,45
	228222			
	225880			
	225719			
	224809			
	231713			
Betakaroten 150	7068695	6954434	65002	0,93
	6959890			
	6924056			
	6941237			
	6961335			
	6871390			

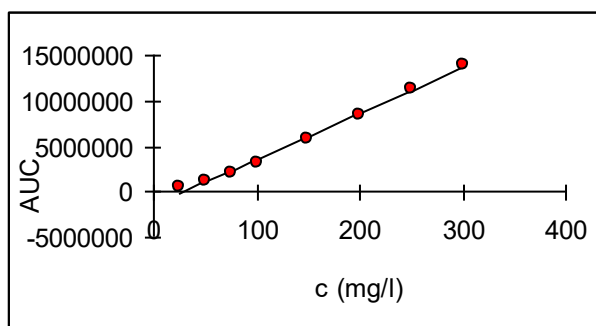
4.7.4 Linearita

Linearita byla testována na osmi nebo devíti koncentracích každé látky. Bylo provedeno šest nástřiků pro každou koncentraci. Pro výpočet byly použity průměrné hodnoty ploch pod píkem. Výsledky byly hodnoceny metodou lineární regrese a jsou shrnuty v následujících tabulkách.

Lutein

Tabulka 26: Výsledky testu linearity luteinu

Koncentrace (mg/l)	Průměrná plocha pod píkem
25	438477
50	1130283
75	2083706
100	3229850
150	5679116
200	8499497
250	11315246
300	13819537



Obrázek 22: Graf lineární regrese luteinu

Regresní funkce: $y = kx + q$

Počet bodů $n = 8$

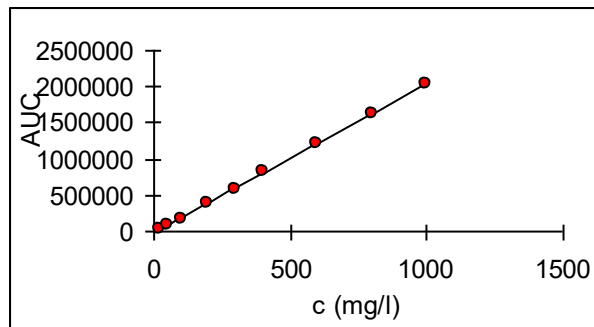
Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek:

- Směrnice $k = 50155 \pm 1425$
- Absolutní člen $q = -1435448 \pm 243592$
- Korelační koeficient $R = 0,9975$
- Reziduální odchylka $S = 372803$

Vitamín E

Tabulka 27: Výsledky testu linearitity vitamínu E

Koncentrace (mg/l)	Průměrná plocha pod píkem
25	30166
50	79424
100	172953
200	374643
300	578007
400	832912
600	1205313
800	1628374
1000	2036072



Obrázek 23: Graf lineární regrese vitamínu E

Regresní funkce: $y = kx + q$

Počet bodů $n = 9$

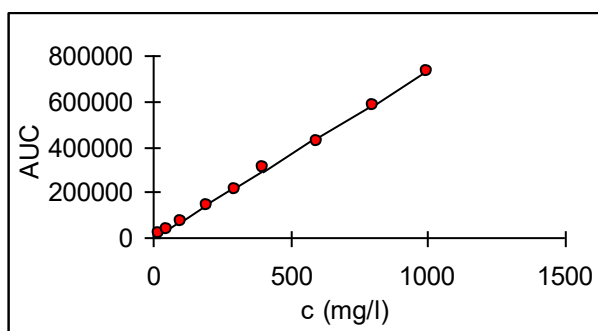
Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek:

- Směrnice $k = 2066,5 \pm 15,6$
- Absolutní člen $q = -27016 \pm 7867$
- Korelační koeficient $R = 0,999802$
- Reziduální odchylka $S = 15248,8$

Vitamín E-acetát

Tabulka 28: Výsledky testu linearitu vitamínu E-acetátu

Koncentrace (mg/l)	Průměrná plocha pod píkem
25	18268
50	39112
100	73814
200	143964
300	215109
400	310201
600	424702
800	581605
1000	732090



Obrázek 24: Graf lineární regrese vitamínu E – acetátu

Regresní funkce $y = kx + q$

Počet bodů $n = 9$

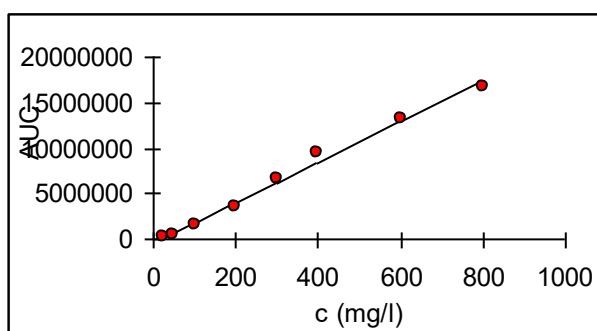
Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek:

- Směrnice $k = 727,2 \pm 8,9$
- Absolutní člen $q = 1320,6 \pm 4518,4$
- Korelační koeficient $R = 0,999472$
- Reziduální odchylka $S = 8757,7$

Betakaroten

Tabulka 29: Výsledky testu linearitý betakarotenu

Koncentrace (mg/l)	Průměrná plocha pod píkem
25	154585
50	500739
100	1431174
200	3536647
300	6518630
400	9429688
600	13091393
800	16719506



Obrázek 25: Graf lineární regrese betakarotenu

Regresní funkce: $y = kx + q$

Počet bodů $n = 8$

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek:

- Směrnice $k = 22218,7 \pm 755,4$
- Absolutní člen $q = -451126,3 \pm 304886$
- Korelační koeficient $R = 0,99655$
- Reziduální odchylka $S = 553792,6$

4.8 Extrakční postupy

Při extrakci karotenoidů z doplňků stravy se vycházelo z článků publikovaných v odborné literatuře, z jejich lipo-hydrofilních vlastností, a také z poznatků z dřívějších prací na toto téma na katedře analytické chemie. V práci byly použity extrakční postupy s využitím chloroformu, u kterých se předpokládalo zajištění dobrých výsledků pro konkrétní testované látky. Detailnější popis jednotlivých extrakčních způsobů je popsán v následujícím textu. Pro hodnocení účinnosti extrakce a výpočtu obsahu karotenoidů v jednotlivých přípravcích bylo použito srovnání ploch píků testovaných látek s píky standardů.

4.8.1 Extrakční postup 1 (kapsle)

Obal kapsle se mechanicky narušil nůžkami, kapsle byla rozpuštěna ve 20 ml chloroformu. Zkumavka s kapslí a chloroformem se protřepala a dala se 5 minut ultrazvukovat. Roztok byl přefiltrován přes 0,45 μm filtr. Tímto byl získán základní extrakt, který bylo třeba dále vhodně naředit. Jako nejvhodnější rozpouštědlo pro ředění

byl zvolen na základě předchozích zkušeností acetonitril. Podle typu přípravku, respektive podle očekávaného obsahu látek bylo použito různé ředění.

A: 100 μ l extraktu + 900 μ l ACN

B: 200 μ l extraktu + 800 μ l ACN

Touto metodou ředění vykazovaly extrakty dobré dostatečné odezvy detektoru.

4.8.2 Extrakční postup 2 (tablety)

Bylo zváženo 10 tablet a spočítána průměrná hmotnost jedné tablety. Tablety byly rozdrceny a byla odvážena hmotnost jedné tablety. Tabletovina byla rozpuštěna v 10 ml vody, poté bylo přidáno 0,5 ml kyseliny askorbové ($c = 0,5 \text{ g/l}$). Následně bylo přidáno 15 ml 1 M hydroxidu sodného v methanolu. Roztok se 15 minut ultrazvukoval. Poté se roztok okyselil 5 ml 37% kyselinou chlorovodíkovou. Následovalo přidání 20 ml chloroformu, protřepání a 20 minut centrifugace. Došlo k oddělení vodné a organické vrstvy. Chloroformová vrstva se odebrala, zfiltrovala a byla použita pro analýzu. Metoda vykazovala na chromatogramech odezvy, ale zejména pro lutein byly velmi nízké.

Univerzální způsob extrakce, který by zajišťoval optimální odezvy pro všechny testované látky bohužel nebyl nalezen ani potvrzen. Potvrdily se již předchozí zkušenosti, že pro každý přípravek by byl vhodný jiný způsob extrakce. V této práci byly vzorky zpracovány extrakčními postupy výše uvedenými. Byly vybrány na základě předchozích zkušeností, protože s jejich pomocí bylo dosaženo relativně dobrých výsledků u více vzorků.

4.8.3 Přesnost

K určení parametru přesnosti byly analyzovány roztoky vzorku Ocutein forte, Walmark Lutein forte a Ostrovidky, které byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 4.7.1. Byly provedeny tři nástřiky každého roztoku na kolonu a určena průměrná plocha píku vztahující se na průměrnou navážku 450 mg. Směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka byla stanovena pro 6 roztoků. V případě přípravku Ostrovidky byly měřeny pouze 3 roztoky.

Tabulka 30: Přesnost analytické metody – přípravek Ocutein forte

Název	Lutein	Vitamín E
Průměrné hodnoty ploch píků	10578207	164433,3
	10631063	161807,3
	10692118	162445
	10147664	165249
	10634413	162232,7
	10542948	164481
Průměr	10537735	163441,4
SD	197844,2	1446,108
RSD (%)	1,88	0,88

Tabulka 31: Přesnost analytické metody – přípravek Walmark lutein forte

Název	Lutein	Vitamín E
Průměrné hodnoty ploch píků	5951278	212784,3
	5711835	205128,7
	6130517	213164,3
	6320777	220141,3
	6063285	210021,7
	6103712	210689,7
Průměr	6046901	211988,3
SD	203424,8	4921,328
RSD (%)	3,36	2,32

Tabulka 32: Přesnost analytické metody – přípravek Ostrovidky

Název	β -karoten
Průměrné hodnoty ploch píků	8714432
	8484284
	8649043
Průměr	8615920
SD	118595,3
RSD (%)	1,38

4.8.4 Správnost

Správnost byla vyjádřena výtěžností. Výtěžnost byla měřena u vzorku Revital Super Betakaroten, Ocutein forte. Ke zjištění výtěžnosti bylo připraveno šest roztoků podle kapitoly 4.7.1. U zkoumaných roztoků byly provedeny dva nástřiky na kolonu. Ze získaných hodnot byla vypočítána průměrná plocha píků. Získané hodnoty byly přepočteny na jednotnou navážku 0,5 g dle vzorce uvedeného níže.

$$y = A \frac{0,5}{m}$$

A – průměrná plocha píku jedné látky

m – hmotnost naváženého vzorku

Výtěžnost byla vypočítána jako rozdíl průměru ploch píků s přidavkem standardních látek ke vzorku a průměru ploch vzorku bez standardů v poměru k průměru ploch píků samotných standardů.

$$R_e = \frac{(A_{st+vz} - A_{vz})}{A_{st}} \times 100$$

A_{st+vz} – je průměr ploch píků s přidavkem standardu

A_{vz} – je průměr ploch píků bez standardu

A_{st} – je průměr ploch píků samotných standardů

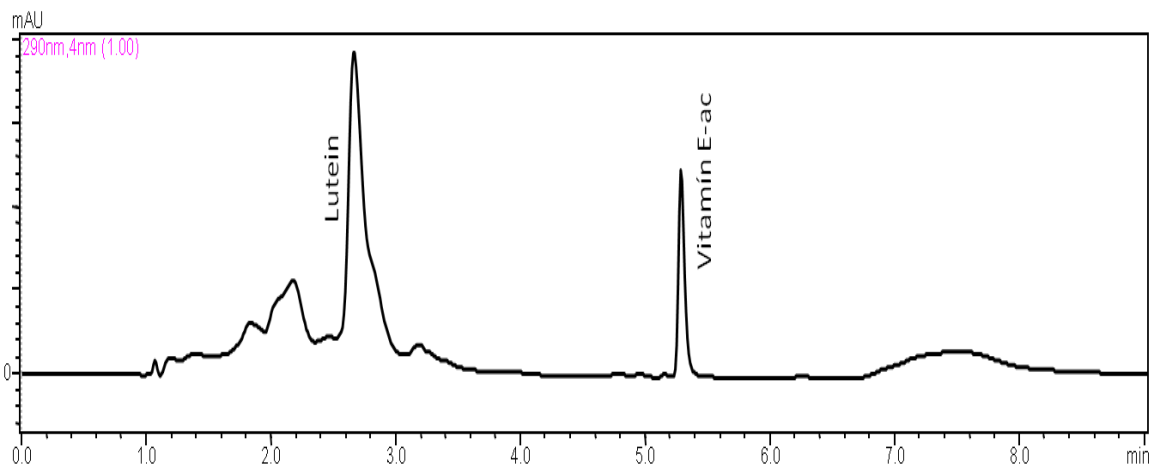
Tabulka 33: Výtěžnost analytické metody – přípravek Super betakaroten

Název	β -karoten
Výtěžnost (%)	100,54
	100,39
	92,79
	109,98
	100,62
	102,35
Průměr	101,11
SD	5,49
RSD (%)	5,42

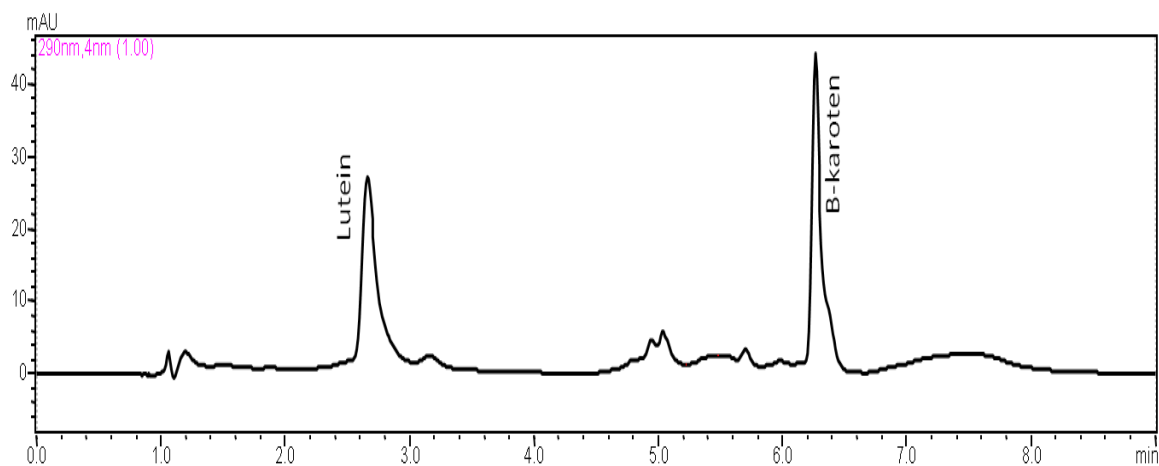
Tabulka 34: Výtěžnost analytické metody – přípravek Ocutein forte

Název	Lutein	Vitamín E	β -karoten
Výtěžnost (%)	110,5	98,84	138,17
	108,23	111,21	154,62
	105,81	104,57	159,25
	111,29	107,21	171,19
	108,2	104,59	151,53
	110,8	103,41	157,13
Průměr	109,14	104,97	155,32
SD	2,1	4,1	10,8
RSD (%)	1,9	3,9	7

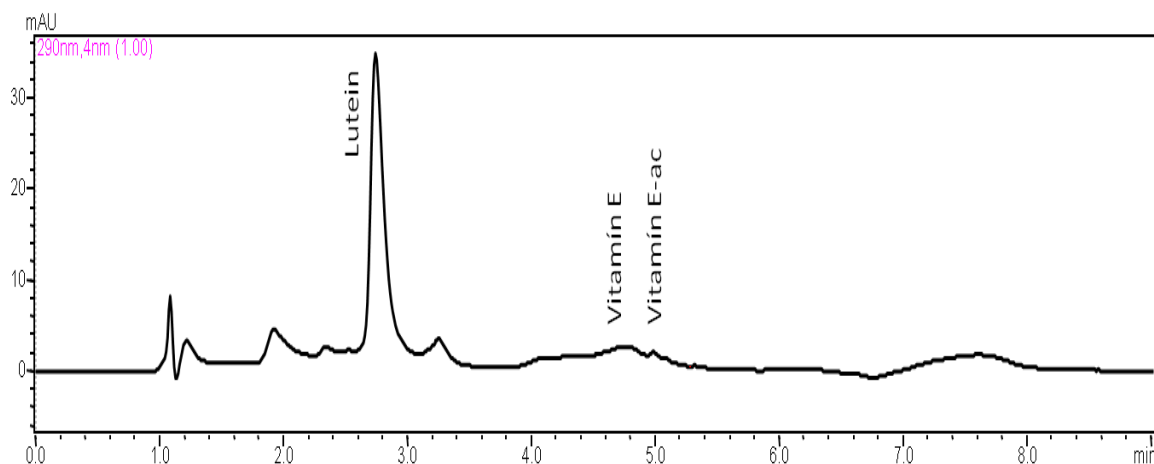
Chromatografické záznamy analýzy vybraných potravních doplňků



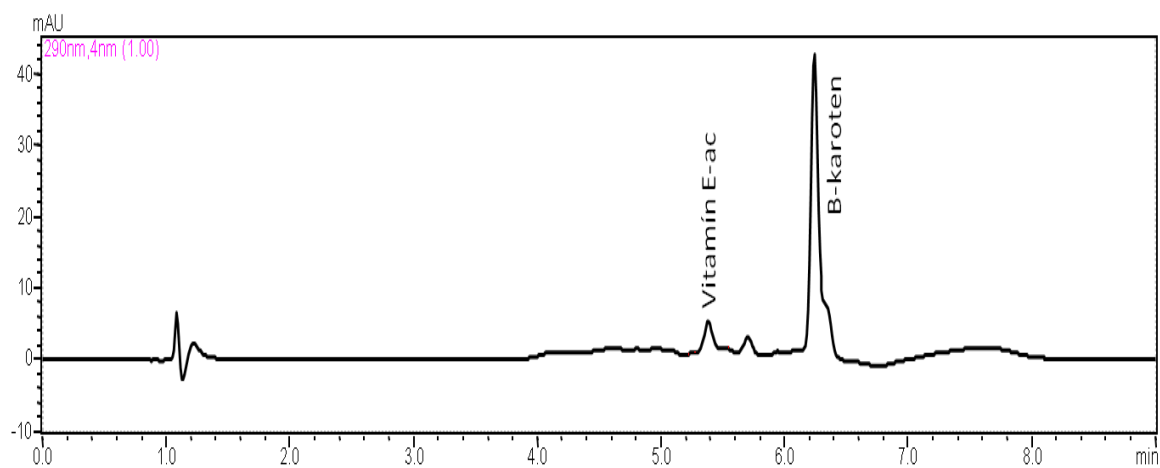
Obrázek 26: Chromatogram získaný při analýze vzorku přípravku Walmark Lutein forte



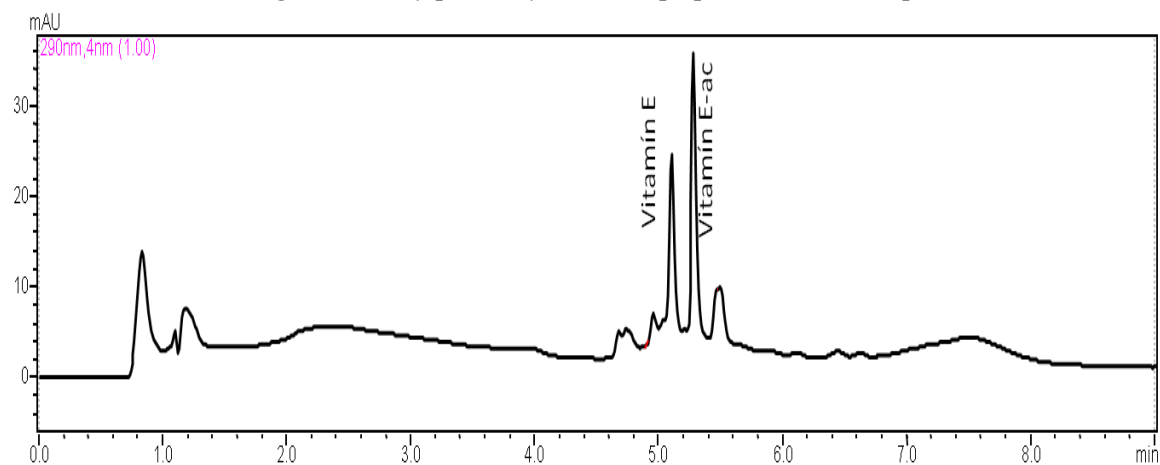
Obrázek 27: Chromatogram získaný při analýze vzorku přípravku Ostrovidky



Obrázek 28: Chromatogram získaný při analýze vzorku přípravku Ocutein forte



Obrázek 29: Chromatogram získaný při analýze vzorku přípravku Revital Super Betakaroten



Obrázek 30: Chromatogram získaný při analýze vzorku přípravku Ocuvite

Souhrn výsledků stanovení vybraných potravních doplňků

Tabulka 35: Naměřené množství analyzovaných látek ve zkoumaných přípravcích

Přípravek	Lutein			Beta-karoten			Vit.E			Vit.E-ac.		
	c vypočítaná (mg/ml)	c naměřená (mg/ml)	Nalezené množství deklarovaného obsahu (%)	c vypočítaná (mg/ml)	c naměřená (mg/ml)	Nalezené množství deklarovaného obsahu (%)	c vypočítaná (mg/ml)	c naměřená (mg/ml)	Nalezené množství deklarovaného obsahu (%)	c vypočítaná (mg/ml)	c naměřená (mg/ml)	Nalezené množství deklarovaného obsahu (%)
Ostrovidky	30	64,42	215	67	68,52	101	-	-	-	-	-	-
Ocutein forte	75	98,41	130	-	-	-	-	-	-	150	40,44	27,45
Walmart Lutein forte	100	110,41	110	-	-	-	-	-	-	180	94,32	52,4
Ocumax	120	102,42	85,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Avilut	120	140	116,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Walmart Beta karoten	-	-	-	60	38,12	63	-	-	-	-	-	-
Ocuvite	150		0	-	-	-	220	133,64	60,74	-	-	-
Lutein pro oči	150		0	125	107,33	85,8	187,5	111,5	59,47	-	-	-
Revital Super Beta karoten	-	-	-	150	253,15	168,7	-	-	-	75	96,22	128,3

Komentář k získaným výsledkům

Obecně bylo dosaženo dobrých výsledků při testování obsahu betakarotenu, vitamínu E a vitamínu E-acetátu. U přípravků Ocuvite a Lutein pro oči byl ve složení uveden vitamín E, ale při analýze byl ve skutečnosti naměřen vitamín E-acetát. Z testovaných přípravků vykazoval nízký obsah vitamínu E-acetátu Ocutein forte (pouze 27 % uvedeného množství).

Výsledky obsahu luteinu v očních přípravcích byly nejednotné. Přípravky, kde je lutein v želatinové olejové tobolce – Ostrovidky, Ocutein forte, Walmark Lutein forte, Ocumax a Avilut vykazovaly velmi dobré výsledky. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo u přípravku Avilut (116,6 %). Daleko vyšší hodnoty byly naměřeny u přípravku Ostrovidky (215 %). Hodnoty luteinu byly 2x vyšší, než bylo uvedeno výrobcem. To může být způsobeno tím, že lutein pochází z rostlinných zdrojů a může mít různou čistotu.

Přípravky, které byly ve formě tablet vykazovaly pouze minimální stopy luteinu. Při přepočtu pak obsah luteinu vyšel nulový. Deklarovaný obsah tedy vůbec neodpovídá naměřeným hodnotám. Velmi špatné výsledky měření mohly být způsobeny nedostatečně účinným extrakčním postupem nebo špatně zvolenou lékovou formou. Jelikož lutein snadno podléhá oxidaci, vyvstává otázka, zda je vůbec možné, aby zůstal v tabletě stabilní. Při jeho silně lipofilní povaze je jistě mnohem stálejší ve formě olejové tobolky, což bylo dokázáno i naměřenými výsledky.

5 Závěr

Tato práce byla zaměřena na zjištění obsahu karotenoidů a vitamínů v potravních doplňcích. Při stanovení vhodného postupu separace jednotlivých látek se vycházelo z již prověřených postupů z diplomové a rigorózní práce (Optimalizace chromatografických podmínek pro HPLC stanovení vybraných karotenoidů, Petra Dvořáková, 2009 a HPLC stanovení luteinu, zeaxanthinu a betakarotenu v potravních doplňcích, Mgr. Petra Dvořáková, 2010) [35, 36]. Byla vyvinuta gradientová eluce pro separaci luteinu, vitamínu E, vitamínu E-acetátu a betakarotenu. Eluce všech čtyř látek probíhala do 9 minut. Následně byla provedena validace této metody.

Faktor symetrie T, vyjadřující asymetrii jednotlivých píků, byl v rozmezí 1,885 – 2,116. Parametr rozlišení byl v rozmezí 1,917 – 12,202. Hodnoty pro píkovou kapacitu byly od 21,09 – 46. Opakovatelnost při testu vhodnosti chromatografického systému byla vyjádřena relativní směrodatnou odchylkou. Hodnota relativní směrodatné odchylky byla 0,95 – 2,16 %.

Při testování parametru linearit bylo dosaženo hodnoty korelačního koeficientu 0,999 pro všechny čtyři látky. Jelikož byly testovány doplňky stravy, nebyly naměřené výsledky hodnoceny dle parametrů, které požaduje ČL.

Při stanovení extrakčního postupu se vycházelo z poznatků publikovaných v odborné literatuře. Použitý extrakční postup pro želatinové tobolky přinesl dobré výsledky. Přípravky ve formě tablet se nedařilo extrahovat stejně dobře jako tobolky. V případě tablet mohly být extrakce málo účinné anebo testované potravní doplňky neobsahovaly uváděné množství látek. Ani v této práci nebyl bohužel nalezen ani potvrzen obecný způsob extrakce karotenoidů, který by byl platný pro většinu potravních doplňků.

V této práci bylo testováno 9 potravních doplňků na obsah luteinu, betakarotenu, vitamínu E a vitamínu E-acetátu. Z výsledků práce lze obecně říci, že obsah betakarotenu splňuje množství uváděná výrobcem. Vitamin E a vitamin E-acetát se ve zkoumaných přípravcích nacházely v menším množství, než bylo uvedeno výrobcem (nejvyšší obsah kolem 60 %). Co se týče obsahu luteinu byly výsledky nejednotné. Přípravky, které jsou v želatinových tobolkách (Ostrovidky, Ocutein, Walmark Lutein forte, Ocumax, Avilut) vykazovaly obsah luteinu uváděný výrobcem, nejméně 85 % Ocumax. Tablety (Ocuvite, Lutein pro oči) neobsahovaly žádný lutein. Je stále otázkou, zda jsou tyto výsledky způsobeny neúčinností extrakčního postupu nebo zkoušené přípravky skutečně lutein

neobsahují. Ostatní zkoumané látky byly i v tabletových přípravcích naměřeny. Jak zde bylo již několikrát zmíněno, lutein je látka silně lipofilní a velice snadno podléhá oxidaci. Podle všech zjištěných skutečností je tabletová forma doplňku naprosto nevhodná. Bylo by žádoucí navrhnout nový způsob extrakce pro tablety s obsahem luteinu, aby byly výsledky získané v této práci potvrzeny nebo vyvráceny. Jestliže přípravky lutein neobsahují nebo je v krátkém čase oxidován a stává se neúčinným, pak by toto zjištění bylo alarmující.

6 Seznam literatury

- [1] MILANI, A., BASIRNEJAD, M., SHAHBAZI, S., BOLHASSANI, A. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. *British Journal of Pharmacology*, 2017, vol. 174, s. 1290-1324. [Doi: 10.1111/bph.13625](https://doi.org/10.1111/bph.13625)
- [2] KHACHIK, F., SPANGLER, CH. J., SMITH, J. C.: *Analytical Chemistry*, 1997, vol. 69, s. 1873-1881.
- [3] *Wikipedie: Otevřená encyklopedie: Lutein* [online]. c2021 [cit. 1.3.2021]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Lutein&oldid=19609445>
- [4] *Bezpečnost potravin A–Z: Lutein* [online] [cit. 4.3.2021]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92522.aspx>
- [5] KIJLSTRA, A., TIAN, Y., KELLY, E. R., BERENDSCHOT, T. T. Lutein: more than just a filter for blue light. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2012, vol. 31, s. 303-315. [Doi: 10.1016/j.preteyeres.2012.03.002](https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2012.03.002)
- [6] Český lékopis 2017, Grada Publishing a.s., Praha 2017, s. 1316. ISBN 978-80-271-1757-4
- [7] BROADWITH, P. Beta carotene. In: *Chemistry World.com* [online] 10.10.2012 [cit. 10.3.2021]. Dostupné z: <https://www.chemistryworld.com/podcasts/beta-carotene/3005712.article>
- [8] HLAVÁČKOVÁ, M. *Analytické možnosti stanovení luteinu, betakarotenu a zeaxanthinu v potravinách*. Bakalářská práce. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Hradec Králové, 2009.
- [9] *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2005, kap. Vitamins, s. 25–26. [Doi: 10.1002/14356007.a27_443](https://doi.org/10.1002/14356007.a27_443)

- [10] WHITBREAD, D. Top 10 Foods Highest in Beta Carotene. In: Myfooddata.com [online] 22.1.2021 [cit. 13.3.2021]. Dostupné z: <https://www.myfooddata.com/articles/natural-food-sources-of-beta-carotene.php>
- [11] *Bezpečnost potravin A–Z: Beta Karoten* [online] [cit. 10.3.2021]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92515.aspx>
- [12] OMENN, G. S., GOODMAN, G. E., THORNQUIST, M. D., et al. Risk Factors for Lung Cancer and for Intervention Effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 1996, vol. 88 (21), s. 1150–1559. [Doi.org/10.1093/jnci/88.21.1550](https://doi.org/10.1093/jnci/88.21.1550)
- [13] KORDA, V., SPÍŠEK, J.: Věkem podmíněná makulární degenerace sítnice (VPMD), *Medicína pro praxi*, 2010, vol. 7 (11), s. 432–436.
- [14] STUDNÍČKA, J: Věkem podmíněná makulární degenerace, *Interní medicína*, 2008, vol. 10 (5), s. 240–244.
- [15] Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2005, kap. Vitamins, s. 4–5. [Doi . 10.1002/14356007.a27_443](https://doi.org/10.1002/14356007.a27_443)
- [16] Český lékopis 2017, Grada Publishing a.s ., Praha 2017, s. 3464. ISBN 978-80-271-1757-4
- [17] Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2005, kap. Vitamins, s. 37–42. [Doi. 10.1002/14356007.a27_443](https://doi.org/10.1002/14356007.a27_443)
- [18] *Bezpečnost potravin A –Z: Vitamin E* [online] [cit. 13.3.2021]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92153.aspx>
- [19] *Vitaminy bez cenzury: Vitamin E – tokoferol* [online] [cit. 13.3.2021]. Dostupné z: <https://www.vitaminybezczury.cz/vitamin-e>
- [20] Český lékopis 2017, Grada Publishing a.s ., Praha 2017, s. 3454 - 3455. ISBN 978-80-271-1757-4

- [21] SCOTT, A. E., ALCOCK, J., CARLILE, M. J. Metabolism of vitamin E acetate by reconstituted human gingival and buccal epithelium, *International Dental Journal*, 2007, vol. 57, s. 135 – 139. [Doi. 10.1111/j.1875-595X.2007.tb00155.x](https://doi.org/10.1111/j.1875-595X.2007.tb00155.x)
- [22] KLIMEŠ, J. a kol. *Kontrolně – analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*, Hradec Králové, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy 2015, s. 29–40. ISBN 978-80-260-8175-3
- [23] MOTYKA, K., HLAVÁČ, J. *Stručný přehled separačních metod*, Olomouc, Univerzita Palackého v Olomouci 2009, s. 17–33. ISBN 978-80-244-2304-3
- [24] NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M. a kol. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*, Praha 2013, s. 11–12. ISBN 978-80-260-4243-3
- [25] CÉRÓN-GARCÍA, M. C., GONZÁLEZ-LOPÉZ, C. V., CAMACHO-RODRÍGUEZ, J., et al. Maximizing carotenoid extraction from microalgae used as food additives and determined by liquid chromatography (HPLC), *Food Chemistry*, 2018, vol. 257, s. 316–324. [Doi. 10.1016/j.foodchem.2018.02.154](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.154)
- [26] GLEIZE, B., STEIB, M., ANDRÉ, M., REBOUL, E. Simple and fast HPLC method for simultaneous determination of retinol, tocopherols, coenzyme Q10 and carotenoids in complex samples, *Food Chemistry*, 2012, vol. 134, s. 2560–2564. [Doi. 10.1016/j.foodchem.2012.04.043](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.043)
- [27] ANSELMO, C. DE S., MENDES, T. DE C., HONORIO, T. DA S. et al. Development and validation of a dissolution test for lutein tablets and evaluation of intestinal permeability, *Food Chemistry*, 2016, vol. 210, s. 63–69. [Doi. 10.1016/j.foodchem.2016.04.081](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.081)
- [28] RIVERA, S. M., CANELA-GARAYOA, R. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials, *Journal of Chromatography A*, 2012, vol. 1224, s. 1–10. [Doi. 10.1016/j.chroma.2011.12.025](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.025)

- [29] DE ASSIS, R. C., DE LIMA GOMES SOARES, R., SIQUEIRA, A. C. P. et al. Determination of water-soluble vitamins and carotenoids in Brazilian tropical fruits by High Performance Liquid Chromatography, *Heliyon*, 2020, vol. 6, s. 1–10. [Doi. 10.1016/j.heliyon.2020.e05307](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05307)
- [30] TYCZKOWSKI, J. K., HAMILTON, P. B. Preparation of Purified Lutein and Its Diesters from Extracts of Marigold (*Tagetes erecta*), *Poultry science*, 1991, vol. 70, s. 651-654. [Doi. 10.3382/ps.0700651](https://doi.org/10.3382/ps.0700651)
- [31] BIJTTEBIER, S., D'HONDTA, E., NOTENA, B., et al. Ultra high performance liquid chromatography versus high performance liquid chromatography: Stationary phase selectivity for generic carotenoid screening, *Journal of Chromatography A*, 2014, vol. 1332, s. 46–56. [Doi. 10.1016/j.chroma.2014.01.042](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.042)
- [32] SLAVIN, M., YU, L. A single extraction and HPLC procedure for simultaneous analysis of phytosterols, tocopherols and lutein in soybeans, *Food Chemistry*, 2012, vol. 135, s. 2789–2795. [Doi. 10.1016/j.foodchem.2012.06.043](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.043)
- [33] CHEN, J. P., TAI, C. Y., CHEN, B. H. Improved liquid chromatographic method for determination of carotenoids in Taiwanese mango (*Mangifera indica* L.), *Journal of Chromatography A*, 2004, vol. 1054, s. 261–268. [Doi. 10.1016/j.chroma.2004.08.100](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.100)
- [34] CAMPESTRINI, L. H., MELO, P. S., PERES, L. E. P., et al. A new variety of purple tomato as a rich source of bioactive carotenoids and its potential health benefits, *Heliyon*, 2019, vol. 5, s. 1–8. [Doi. 10.1016/j.heliyon.2019.e02831](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02831)
- [35] DVOŘÁKOVÁ, P. *Optimalizace chromatografických podmínek pro HPLC stanovení vybraných karotenoidů*. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Hradec Králové, 2009.

[36] DVOŘÁKOVÁ, P. *HPLC stanovení luteinu, zeaxanthinu a betakarotenu v potravních doplňcích*. Rigorózní práce. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Hradec Králové 2012.