

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
(Katedra analytické chemie)

**HPLC stanovení luteinu, zeaxanthinu a  
betakarotenu v potravních doplňcích**  
Rigorózní práce

Vedoucí rigorózní práce: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, PhD.

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

2010

Mgr. Petra Dvořáková

Chtěla bych poděkovat Doc. RNDr. Daliborovi Šatínskému, PhD. za zadání zajímavého tématu, za vedení rigorózní práce, za jeho trpělivost, cenné rady a připomínky k danému tématu. Rovněž bych chtěla poděkovat celému kolektivu pracovníků katedry analytické chemie.

Prohlašuji, že tuto rigorózní práci jsem vypracovala samostatně a že všechny uvedené zdroje jsou citované.

## ABSTRAKT

Tato rigorózní práce se zabývá úpravou metody separace karotenoidů luteinu, betakarotenu a zeaxanthinu převzaté z diplomové práce (Optimalizace chromatografických podmínek pro HPLC stanovení vybraných karotenoidů, Petra Dvořáková, 2009). Základní metodou je HPLC s VIS detekcí. Úprava spočívala ve vyvinutí gradientové eluce pro zkrácení doby analýzy. Při optimalizaci postupu gradientové eluce byly testovány čtyři způsoby.

Druhým úkolem této rigorózní práce je shrnutí extrakčních způsobů pro vybrané karotenoidy, které byly publikovány v odborné literatuře a navržení způsobů extrakce vhodných pro izolaci karotenoidů z potravních doplňků.

Při hledání optimálního způsobu extrakce byla využívána extrakce organickými rozpouštědly.

Zkoušena byla jak prostá extrakce do organického rozpouštědla, tak extrakce s předchozí úpravou vzorku saponifikací nebo okyselením extrakčního prostředí.

Přes vyzkoušení celé řady postupů a organických rozpouštědel se nepodařilo nalézt optimální a univerzální způsob extrakce karotenoidů z lékových forem.

## ABSTRACT

This rigorous thesis deals with modification of method for separation carotenoids lutein, betacarotene and zeaxanthin borrowed from diploma thesis (Optimization of chromatographic conditions for HPLC determination of chosen carotenoids, Petra Dvořáková, 2009). HPLC with VIS detection is the basic method. This method was modified by gradient elution for compressed time of analysis. Four ways of gradient elution were tested during optimization of new procedure.

The second aim of this rigorous thesis is summary of extraction ways for carotenoids published in special literature and proposition of extraction procedures for carotenoids from dietary products.

Extraction with organic solvents was used during searching for optimal way for extraction. Simple extraction with organic solvent was tested as basic method, but extraction with previous modification of sample (saponification or acidification of extraction medium) was tested too.

In spite of testing of many various ways for extraction and many various organic solvents, there wasn't find optimal and universal extraction way.

## Použité zkratky

ACN	Acetonitril
ARMD	Věkem podmíněná makulární degenerace
BHT	Butylhydroxytoluen
ČL	Český lékopis
HDL	High density lipoproteins = lipoproteiny s vysokou hustotou
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IČ	Infračervená oblast spektra elektromagnetického záření
LLE	Extrakce organickými rozpouštědly
SFE	Superkritická fluidní extrakce
SPE	Extrakce na pevných fázích
SST	System suitability test = test vhodnosti chromatografického systému
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
THF	Tetrahydrofuran
UV	Ultrafialová část spektra elektromagnetického záření
VIS	Viditelná část spektra elektromagnetického záření

## Obsah

1	Úvod .....	8
2	Cíl práce.....	9
3	Teoretická část .....	10
3.1	Karotenoidy .....	10
3.1.1	Lutein .....	11
3.1.2	Zeaxanthin.....	11
3.1.3	Betakaroten .....	12
3.2	Metody extrakce karotenoidů .....	13
3.3	Extrakce.....	16
3.3.1	Extrakce organickými rozpouštědly .....	16
3.3.2	Extrakce na pevných fázích .....	18
3.3.3	Superkritická fluidní extrakce .....	19
4	Experimentální část .....	20
4.1	Materiál a pomůcky.....	20
4.2	Deklarovaný obsah karotenoidů v testovaných potravních doplňcích.....	21
4.3	Příprava roztoků standardů .....	21
4.3.1	Příprava zásobních roztoků.....	21
4.3.2	Příprava roztoků pro validaci .....	22
4.4	Optimalizace chromatografických podmínek .....	22
4.4.1	Optimalizace složení mobilní fáze .....	23
4.4.2	Souhrn optimálních chromatografických podmínek .....	27
4.5	Základní validace metody.....	27
4.5.1	Test vhodnosti chromatografického systému (System suitability test – SST).....	27
4.5.2	Opakovatelnost .....	29
4.5.3	Linearita .....	29
4.6	Optimalizace extrakčního postupu.....	32
4.6.1	Extrakční způsob č. 1.....	32
4.6.2	Extrakční způsob č. 2.....	32
4.6.3	Extrakční způsob č. 3.....	33
4.6.4	Extrakční způsob č. 4.....	33
4.6.5	Extrakční způsob č. 5.....	33

4.6.6	Extrakční způsob č. 6.....	33
4.6.7	Extrakční způsob č. 7.....	34
4.6.8	Extrakční způsob č. 8.....	34
4.6.9	Extrakční způsob č. 9.....	34
4.6.10	Extrakční způsob č. 10.....	34
4.6.11	Extrakční způsob č. 11.....	35
4.6.12	Extrakční způsob č. 12.....	35
4.6.13	Extrakční způsob č. 13.....	35
4.6.14	Extrakční způsob č. 14.....	35
4.6.15	Extrakční způsob č. 15.....	35
4.6.16	Extrakční způsob č. 16.....	35
5	Závěr.....	40
6	Seznam literatury.....	42

# 1 Úvod<sup>1</sup>

Lutein, betakaroten a zeaxanthin patří do skupiny karotenoidů. Tyto látky jsou charakteristické výrazným zbarvením od žluté až po červenou barvu, které je způsobeno velkým počtem konjugovaných dvojných vazeb v molekule. Tato vlastnost zapříčiňuje také jejich antioxidační aktivitu, kvůli které jsou karotenoidy využívány v prevenci onemocnění zrakového aparátu, kardiovaskulárních onemocnění a některých typů rakoviny.

Přírodně se tyto látky vyskytují v ovoci, zelenině a v mase. Příjem těchto látek potravou, který by byl dostatečný pro prevenci onemocnění např. zrakového aparátu, by vyžadoval konzumaci velkého množství ovoce a zeleniny, což je nereálné (denní příjem luteinu, který může oddálit nástup věkem podmíněné makulární degenerace – ARMD, je 6 mg, což odpovídá konzumaci např. 2 liber kukuřice, 2 salátových misek špenátu nebo jedné salátové misky kapusty).

Proto jsou tyto látky obsaženy v řadě potravních doplňků dostupných v lékárnách. Ve většině případů se však jedná pouze o potravní doplňky a ne o registrované léky. Nevýhodou tedy je, že deklarovaný obsah karotenoidů nemusí odpovídat skutečnému obsahu, protože není garantován žádnou autoritou (např. SÚKL).

Prodej přípravku, který neobsahuje to, co by měl obsahovat, považuji za naprosto nemorální, ovšem v současné době není zjistitelné, zda potravní doplňky obsahují to, co mají, protože nad nimi není stanoven žádný způsob kontroly.

---

<sup>1</sup> Kapitola byla vypracována ze zdroje 1



## 2 Cíl práce

Cílem této rigorózní práce bylo vyvinout, optimalizovat a validovat metodu pro extrakci a stanovení luteinu, betakarotenu a zeaxanthinu v potravních doplňcích dostupných na trhu v České republice. Řada těchto potravních doplňků dostupných v lékárnách totiž budí podezření jednak deklarovaným obsahem látek (který je poměrně vysoký) a jednak nízkou cenou. Proto jsem si dala za cíl ověřit, zda jsou tyto potravní doplňky skutečně důvěryhodné a obsahují to, co obsahovat mají.

Při volbě postupu pro extrakci karotenoidů z potravních doplňků jsem vycházela z článků publikovaných v odborné literatuře. Pro stanovení karotenoidů jsem využila a modifikovala metodu z diplomové práce (Optimalizace chromatografických podmínek pro HPLC stanovení vybraných karotenoidů, Petra Dvořáková, 2009). Základní metodou byla HPLC s VIS detekcí.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Karotenoidy<sup>23</sup>

Karotenoidy jsou rostlinná barviva, která patří do skupiny tetraterpenů. To jsou látky, které obsahují v molekule 40 atomů uhlíku a velký počet konjugovaných dvojných vazeb, které mají většinou *all-trans* konfiguraci. Velký počet konjugovaných dvojných vazeb způsobuje absorpci viditelného světla, a proto jsou tyto sloučeniny barevné.

Tvoří skupinu žlutých, oranžových, červených a fialových barviv, která doprovázejí v rostlinách chlorofyl, ale vyskytují se i v mikroorganismech a živočišných orgánech a jako zásobní látky jsou ukládány do tukové tkáně (např. vaječný žloutek, játra, pigment sítnice oka). Dělí se do dvou skupin:

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

**Xantofyly:** jedná se o kyslíkaté sloučeniny (*zeaxanthin*, *lutein*, *cryptoxanthin*, a další) odvozené od karotenů, které v molekule obsahují hydroxylové skupiny a jedná se o alkoholy nebo dioly. V rostlinných tkáních jsou přítomny buď volné, nebo vázané ve formě esterů s vyššími mastnými kyselinami, nebo ve formě glykosidů.

Karotenoidy jsou látky rozpustné v tucích a některých organických rozpouštědlech (chloroform, hexan, petrolether). Nerozpouští se ve vodě, omezeně v ethanolu.

Řada látek z této skupiny má charakter provitaminu A, který je nezbytný pro správnou funkci kůže, sliznic a sítnice. Důležitý je pro růst a nitroděložní vývoj. Jeho nedostatek se projevuje suchou kůží, šeroslepostí apod.

Kromě role provitaminu A se karotenoidy účastní dalších procesů v organismu jako antioxidanty, regulátory buněčné proliferace a diferenciaci, modulátory imunitních reakcí a metabolismu karcinogenů, stimulanty komunikace mezi buňkami a jako filtry UV záření.

Příjem karotenoidů snižuje riziko kardiovaskulárních onemocnění (ischemická choroba srdeční, městnavé srdeční selhání, ateroskleróza, diabetická kardiomyopatie,...), některých nádorových onemocnění (rakovina tlustého střeva).

---

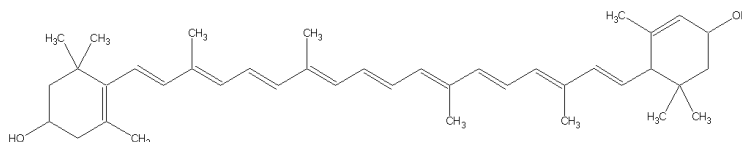
<sup>2</sup> Kapitola byla převzata ze zdroje 2

<sup>3</sup> Kapitola byla vypracována ze zdrojů 3, 4, 5, 6

V této práci jsem se zabývala třemi látkami – *betakarotenem*, *luteinem* a *zeaxanthinem*, které jsou využívány především v potravních doplncích určených k předcházení rozvoje věkem podmíněné makulární degenerace.

### 3.1.1 Lutein<sup>4</sup>

Struktura:



Obrázek 1: Strukturální vzorec luteinu

Sumární vzorec:  $C_{40}H_{56}O_2$

Mr: 568,88

Teplota tání: 190 °C

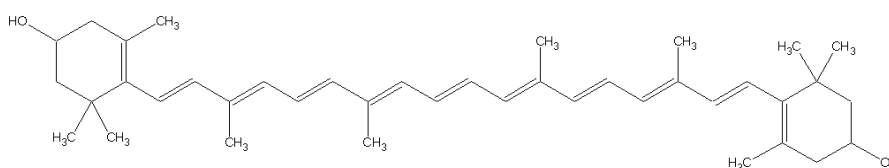
CAS: 127-40-2

Tento karotenoid patří do skupiny xantofylů. Má žlutou barvu a nemá aktivitu provitaminu A. Největší obsah luteinu je v ovoci, zelenině, obilí a vejcích. Vysoký obsah je také v řasách. Z vyšších rostlin je lutein zastoupen v květech měsíčku lékařského, v řepce olejce, pomerančích, meruňkách, špenátu atd., z řas lze jmenovat Chlorellu.

V živočišných organismech je transportován HDL lipoproteiny a to díky své relativně vysoké polaritě. Skladován je v játrech a krvi a v těle působí jako antioxidant.

### 3.1.2 Zeaxanthin<sup>5</sup>

Struktura:



Obrázek 2: Strukturální vzorec zeaxanthinu

Sumární vzorec:  $C_{40}H_{56}O_2$

Mr: 568,88

Teplota tání: 215,5 °C

<sup>4</sup> Odstavec byl vypracován ze zdrojů 4, 7, 8

<sup>5</sup> Odstavec byl vypracován ze zdrojů 4, 6

CAS: 144-68-4

Stejně jako lutein patří do skupiny xantofylů a je v podstatě jeho polohovým izomerem. Má výrazně žlutou barvu a vyskytuje se v ovoci a zelenině, většinou spolu s luteinem. Vysoký obsah je v zrnech kukuřice.

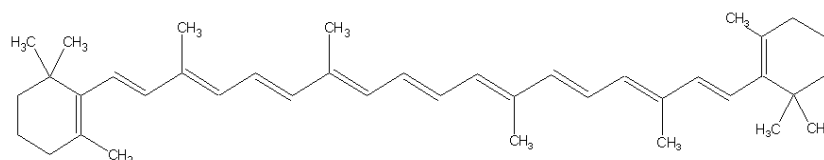
Zeaxanthin má s luteinem podobnou nejen strukturu a zdroje, ale také vlastnosti.

Během přípravy roztoků standardů těchto látek byla však zjištěna rozdílná rozpustnost luteinu a zeaxanthinu v chloroformu. Zeaxanthin se v chloroformu lépe rozpouštěl a tyto roztoky poskytovaly píky lepších tvarů (symetričtější) a se silnější odezvou.

Lutein se naproti tomu dobře rozpouštěl i v ethanolu.

### 3.1.3 Betakaroten<sup>6</sup>

Struktura:



Obrázek 3: Strukturní vzorec betakarotenu

Sumární vzorec: C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>

Mr: 536,88

Teplota tání: 183 °C

CAS: 7235-40-7

Betakaroten patří do podskupiny karotenů. Jedná se o rostlinné barvivo oranžové barvy a s aktivitou provitaminu A. Vyskytuje se v ovoci a zelenině, vysoké množství je v meruňkách, mrkvi, paprikách, apod.

Ve své molekule neobsahuje žádnou hydroxylovou skupinu, je to tedy lipofilní látka rozpustná v lipofilních rozpouštědlech (např. chloroform), prakticky nerozpustná ve vodě a ethanolu.

---

<sup>6</sup> Odstavec byl vypracován ze zdrojů 4, 9

### 3.2 Metody extrakce karotenoidů<sup>7</sup>

Navržené extrakční způsoby vycházely jednak z vlastností stanovovaných karotenoidů a jednak z článků publikovaných v odborné literatuře.

Většina způsobů využívá extrakci do organických rozpouštědel buď samostatnou, nebo v kombinaci s působením ultrazvuku, nebo saponifikace.

Metody shrnuté v následující tabulce se vždy netýkají přímo/pouze luteinu, betakarotenu a zeaxanthinu, ale vzhledem k tomu, že všechny karotenoidy mají podobné vlastnosti, bylo možné z nich vycházet. Většina metod rovněž nevyužívá jako zdroj karotenoidů kapsle nebo tablety, ale přírodní zdroje (ovoce, zelenina, játra,...), které jsou odlišné a složitější než lékové formy, proto byly uvedené extrakční způsoby různě modifikovány a to i vzhledem k vybavení laboratoře.

---

<sup>7</sup> Kapitola byla vypracována ze zdrojů 7, 8, 10, 1, 11

Zdroj karotenoidů	Stanovované látky	Typ extrakce	Rozpouštědla a další chemikálie	Zdroj	Poznámka
Kuřecí játra	Lutein	Extrakce rozpouštědlem	Extrakční rozpouštědlo - hexan  Saponifikační roztok - 10 g Na OH, 1 g BHT, 50 ml ethanol, 50 ml voda	7	Porovnání výtěžků různých extrakčních postupů
		Extrakce rozpouštědlem + saponifikace			
		Extrakce rozpouštědlem + ultrazvuk			
		Extrakce rozpouštědlem + saponifikace + ultrazvuk			
Řasa Chlorella vulgaris	Lutein	Extrakce rozpouštědlem + saponifikace	Extrakční rozpouštědlo - dichlormethan  Saponifikační roztok - 10 M KOH s 2,5 % kyseliny askorbové	8	

pokračování z předchozí strany					
Zdroj karotenoidů	Stanovované látky	Typ extrakce	Rozpouštědla a další chemikálie	Zdroj	Poznámka
Vaječný žloutek	Lutein	Extrakce rozpouštědlem + saponifikace	Extrakční rozpouštědlo - hexan Saponifikační roztok - 10% NaOH (vodný)	10	Antioxidant při saponifikaci - roztok kys. askorbové (0,1 g/ml)
Kukuřice	Lutein	Extrakce rozpouštědlem + saponifikace	Extrakční rozpouštědlo I - aceton Extrakční rozpouštědlo II - směs etheru a hexanu (1:1) Saponifikační roztok - 10% KOH (methanolický)	1	
Mrkvový protlak Džus Potravní doplňky (tablety, kapsle)	$\alpha$ -karoten, $\beta$ -karoten, lutein, zeaxanthin, cryptoxanthin, trans-retinol	Extrakce rozpouštědlem v kyselém prostředí	Okyselující roztok - 0,5 ml BHT, 10 ml 0,1 M HCl  Extrakční rozpouštědlo - chloroform	11	Kvantifikace karotenoidů z různých zdrojů

Tabulka 1: Přehled extrakčních způsobů používaných pro extrakci karotenoidů publikovaných v odborné literatuře

### 3.3 Extrakce<sup>8</sup>

Při HPLC analýze karotenoidů je nutná jejich předchozí extrakce. V řadě článků publikovaných v odborné literatuře byl jako zdroj karotenoidů využíván biologický materiál. V této práci byly jako zdroj karotenoidů využívány lékové formy různých potravních doplňků. Jednalo se o tablety, tvrdé a měkké želatinové tobolky.

Metody extrakce lze rozdělit na:

- Extrakce organickými rozpouštědly – LLE (liquid-liquid extraction)
- Extrakce na pevných fázích – SPE (solid phase extraction)
- Superkritická fluidní extrakce – SFE (extrakce kapalinou v nadkritickém stavu)

#### 3.3.1 Extrakce organickými rozpouštědly

Tento způsob extrakce je nejpoužívanější a instrumentálně nejméně náročný. V nejjednodušším provedení se jedná o vytřepávání 2 vzájemně nemísitelných kapalin (opačné polarity), v nichž extrahovaná látka vykazuje rozdílnou rozpustnost.

Extrakce organickými rozpouštědly probíhá podle rozdělovacího koeficientu  $K$ :

$$K = \text{koncentrace látky v organické fázi} / \text{koncentrace látky ve vodné fázi}$$

Extrakce rozpouštědly je ovlivňována řadou faktorů, ke kterým patří:

- Fyzikálně chemické vlastnosti rozpouštědla
  - pH vodné fáze
  - Vzájemný poměr fází
  - Způsob a doba trvání extrakce
  - Způsob předchozího zpracování vzorku
- Fyzikálně chemické vlastnosti rozpouštědla: Rozpouštědlo volíme podle vlastností extrahované látky. K základním požadavkům patří, aby rozpouštědlo bylo nemísitelné s vodnou fází a nereagovalo s extrahovanou látkou. K dalším požadavkům lze přiřadit nehořlavost a přijatelnou toxicitu s ohledem na životní prostředí a bezpečnou manipulaci. Nejčastěji používanými rozpouštědly jsou chloroform, ether, aceton, ethylacetát.
- pH vodné fáze: tento faktor se uplatňuje při extrakci látek charakteru slabých kyselin a zásad. Platí totiž, že přes fázové rozhraní přechází pouze neionizované molekuly.

---

<sup>8</sup> Kapitola byla vypracována ze zdrojů 12, 13, 14, 15



Z toho vyplývá, že slabé baze se budou lépe extrahovat v bazickém prostředí, protože v kyselém prostředí ionizují a nebudou tedy přecházet přes rozhraní kapalina – kapalina. Opačně to platí pro látky slabě kyselé.

- Způsob a doba trvání extrakce: z tohoto hlediska lze extrakci rozdělit na jednostupňovou a vícestupňovou. Při vícestupňové extrakci celkový objem rozpouštědla rozdělíme na několik částí a s těmi pak provádíme extrakci a získané extrakty spojíme. Protože extrakce mezi 2 fázemi probíhá po koncentračním gradientu, tak má tento způsob provedení extrakce vyšší výtěžnost. Doba extrakce nesmí být neúměrně dlouhá a nesmí při ní docházet k tvorbě emulzí či rozkladu extrahovaných látek.

Dalším způsobem provedení extrakce je použití ultrazvuku v průběhu extrakce. V případě extrakce z biologického materiálu dochází k rozrušení biologických membrán a tak ke zvýšení výtěžnosti. Při extrakci z lékových forem dochází k jejich rychlejšímu rozpadu.

Výtěžnost extrakce je také zvýšena protřepáváním, protože se tak zvětší plocha mezi dvěma fázemi, tedy rozhraní, přes které přechází extrahované látky. Protřepávání však musí být opatrné, aby nedocházelo ke vzniku emulzí.

- Způsob předchozího zpracování vzorku: předchozí zpracování vzorku ovlivňuje výtěžnost extrakce. V případě biologického materiálu se může jednat o rozdrobnění vzorku při kterém dochází k rozrušení biologických membrán a látka pak může lépe přecházet do rozpouštědla nebo o předvlhčení, při kterém buněčné membrány nabobtnají. V případě lékových forem extrakci usnadňuje rozdrcení tablet či otevření želatinových tobolek.

Mezi jeden ze způsobů zpracování vzorků před extrakcí karotenoidů patří i saponifikace.

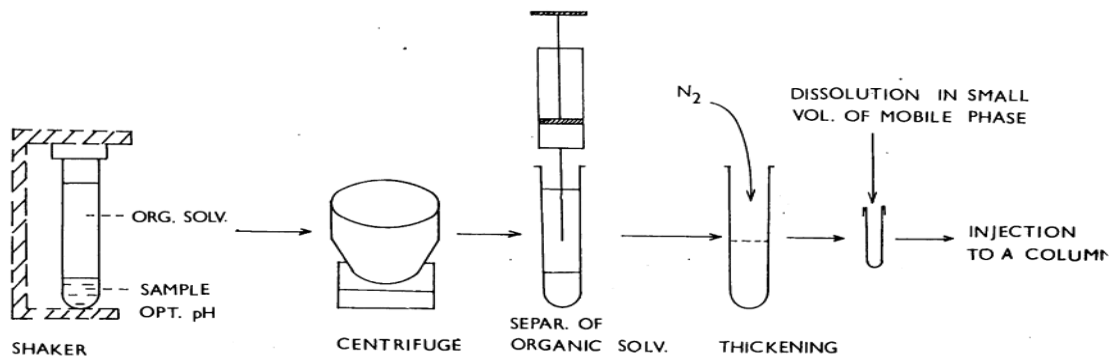
Jedná se o zmýdelnění zbytků vyšších mastných kyselin (mýdla jsou sodné nebo draselné soli vyšších mastných kyselin), které mohou být v biologickém materiálu vázány na hydroxylové skupiny xantofylů (např. lutein nebo zeaxanthin).

Při saponifikaci dochází k alkalické hydrolýze esterů vyšších mastných kyselin s karotenoidy za vzniku volných karotenoidů a mýdel. Saponifikace tak zvyšuje výtěžnost extrakce. Vlivem alkalického prostředí však může docházet k rozkladu karotenoidů, proto je nutné používat antioxidační přísady (například BHT nebo kyselinu askorbovou).

Mezi nejčastěji používaná rozpouštědla patří ethylacetát, dichlormethan a další.

K výhodám extrakce organickými rozpouštědly patří její univerzálnost a dobrá výtěžnost (lze zvýšit zakoncentrováním vzorku odpařením rozpouštědla). Mezi nevýhody

patří zejména zdlouhavost pracovního postupu a spotřeba organických rozpouštědel a tedy nešetrnost k životnímu prostředí.



Obrázek 4: Schema extrakce organickými rozpouštědly

### 3.3.2 Extrakce na pevných fázích

Tento způsob využívá extrakčních kolonek, které jsou naplněné pevným sorbentem. Sorbenty používané při extrakci jsou stejné jako sorbenty využívané v HPLC kolonách, ale kolonky jsou plněné většími částicemi a mají větší průměr.

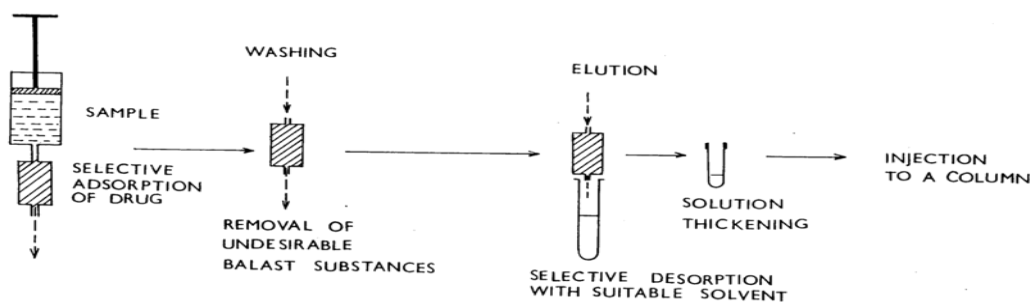
Při extrakci na pevných fázích jsou využívány dva rozdílné postupy.

- Látky, které chceme izolovat pro další analýzu mohou být zachycovány (adsorbovány) na kolonce a po odmytí balastních látek je z kolonky extrahujeme vhodným rozpouštědlem.
- Látky, které chceme izolovat prochází kolonkou nezadrženy a sorbují se na ní balastní látky.

Průtok kolonkou je zajištěn buď působením přtlaku, nebo naopak podtlakem.

Výhodou extrakce na pevných fázích je možnost automatizace a možnost spojení s HPLC. Další výhodou je, že sorbovaný analyt nemusí být z kolonky eluován ihned, ale může být s kolonkou např. zamrazen a uchován pro pozdější analýzu.

Nevýhodou je vysoká cena extrakčních kolonek.



Obrázek 5: Schéma extrakce na pevných fázích

### 3.3.3 Superkritická fluidní extrakce<sup>9</sup>

Superkritická fluidní extrakce využívá vlastností superkritických kapalin. Jako kapalina v superkritickém (nadkritickém) stavu je nejčastěji využíván CO<sub>2</sub>. V nadkritickém stavu se nachází při 31 ° C a 7,3 Mpa.

Superkritické kapaliny mají některé vlastnosti jako plyny (viskozita) a některé vlastnosti jako kapaliny (hustota a rozpouštěcí schopnost).

CO<sub>2</sub> jako nadkritická kapalina je vhodný zejména pro extrakci nepochárních látek. Jeho výhodou je nehořlavost, není toxický, je levný a je kompatibilní s IČ i spektrofotometrickými detektory. Nevýhodou je, že je nepolární a není tedy vhodný pro extrakci polárních látek.

---

<sup>9</sup> Odstavec byl vypracován ze zdroje 14

## 4 Experimentální část

### 4.1 Materiál a pomůcky

**Standardy karotenoidů:** Lutein, Applichem

Zeaxanthin, Applichem

Betakaroten, Fluka

**Chemikálie:** Methanol chromasolv, Sigma Aldrich

Acetonitril chromasolv, Sigma Aldrich

Tetrahydrofuran chromasolv, Sigma Aldrich

Hexan chromasolv, Sigma Aldrich

Methylenchlorid, Sigma Aldrich

Aceton, Sigma Aldrich

Chloroform, Sigma Aldrich

Isopropanol, Sigma Aldrich

Isobutanol, Sigma Aldrich

Dimethylsulfoxid, 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

**Kolona:** Zorbax SB C18 (50 x 4,6 mm, 1,7 µm), Agilent Technologies

**Testované potravní doplňky:** Centrum Silver

Lutein lux

Ocutein

Super beta-karoten

## 4.2 Deklarovaný obsah karotenoidů v testovaných potravních doplňcích<sup>10</sup>

Přípravek	Obsah látky (mg/1 dávku)		
	Betakaroten	Lutein	Zeaxanthin
Centrum Silver	0,4	1	—
Lutein lux	3	6	0,35
Ocutein	1	3	0,5
Super beta-karoten	6	5,5	1,1

Tabulka 2: Deklarovaný obsah karotenoidů ve vybraných potravních doplňcích

## 4.3 Příprava roztoků standardů

Standardy karotenoidů byly rozpouštěny, na základě předchozích zkušeností, v chloroformu. Navážky standardů byly rozpuštěny přímo ve vialkách z tmavého skla, ultrazvukovány po dobu 5 minut a následně uchovávány v chladničce, aby se předešlo oxidačním změnám látek. Z těchto zásobních roztoků byly pak připraveny směsi standardů pro validaci HPLC metody.

### 4.3.1 Příprava zásobních roztoků:

	Navážka (mg)	Chloroform (µl)	Koncentrace (mg/l)
Betakaroten	0,777	800	971,25
Lutein	0,515	800	643,75
Zeaxanthin	0,468	800	585

Tabulka 3: Koncentrace zásobních roztoků standardů karotenoidů

<sup>10</sup> Odstavec byl vypracován ze zdrojů 16, 17, 18

#### 4.3.2 Příprava roztoků pro validaci:

Roztok 0 pro validaci byl připraven smísením 300 µl každého zásobního roztoku. Další roztoky byly pak připravovány ředěním předchozího roztoku pro validaci chloroformem v poměru 1:1. Roztoky byly připravovány přímo ve vialkách. Koncentrace karotenoidů v roztocích pro validaci jsou uvedeny v následující tabulce.

	Koncentrace (mg/l)		
	Betakaroten	Lutein	Zeaxanthin
Roztok 0	323,75	214,58	195,00
Roztok 1	161,88	107,29	97,50
Roztok 2	80,94	53,65	48,75
Roztok 3	40,47	26,83	24,38
Roztok 4	20,24	13,42	12,19
Roztok 5	10,12	6,71	6,10
Roztok 6	5,06	3,35	3,05

Tabulka 4: Koncentrace karotenoidů pro validaci

#### 4.4 Optimalizace chromatografických podmínek

Jako základní byla převzata metoda z diplomové práce (Optimalizace chromatografických podmínek pro HPLC stanovení vybraných karotenoidů, Petra Dvořáková, 2009), která byla upravena. Aby bylo dosaženo zkrácení doby analýzy, byla vyvinuta a validována gradientová eluce.

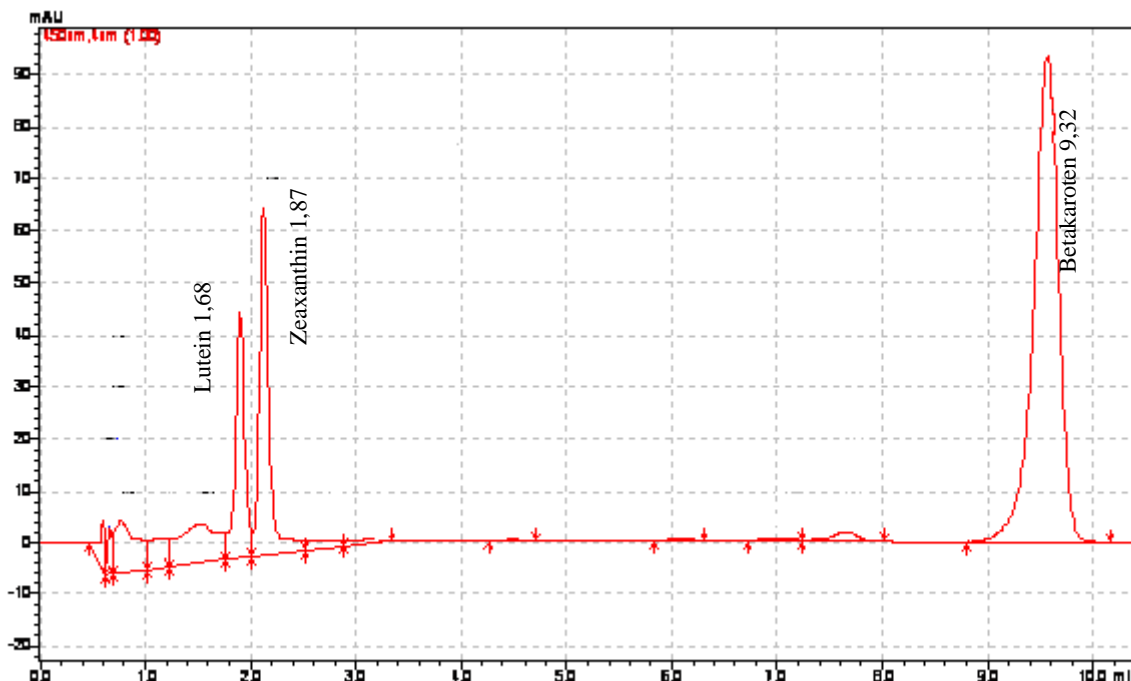
Původní metoda zahrnovala tyto podmínky:

- Kolona – Zorbax SB C18, 50 x 4,6 mm, velikost částic 1,7 µm.
- Detekce – VIS 450 nm
- Složení mobilní fáze – methylenchlorid : hexan : acetonitril o poměru 2,5 : 2,5 : 95
- Dávkovaný objem vzorku – 1 µl
- Rychlost průtoku mobilní fáze – 1 ml/min
- Teplota – 30 °C
- Isokratický režim

Při těchto podmínkách trvala analýza 10 minut, přičemž mezi píky zeaxanthinu a betakarotenu byla prodleva 7,5 minuty viz. obrázek 3 a tabulka 5.

Retenční čas (min)	
Betakaroten	9,32
Lutein	1,68
Zeaxanthin	1,87

*Tabulka 5: Retenční časy karotenoidů při použití původní metodiky HPLC*



*Obrázek 6: Chromatogram získaný při použití původní metodiky HPLC*

#### 4.4.1 Optimalizace složení mobilní fáze

Aby byl zkrácen retenční čas betakarotenu a současně zůstala zachována dostatečná separace píků luteinu a zeaxanthinu, byl vyvíjen gradient. Vycházelo se z lipo-hydrofilních vlastností karotenoidů. Eluce betakarotenu, který je oproti luteinu a zeaxanthinu lipofilnější, byla urychlována organickým rozpouštědly, proto byl v průběhu eluce měněn poměr mobilní fáze.

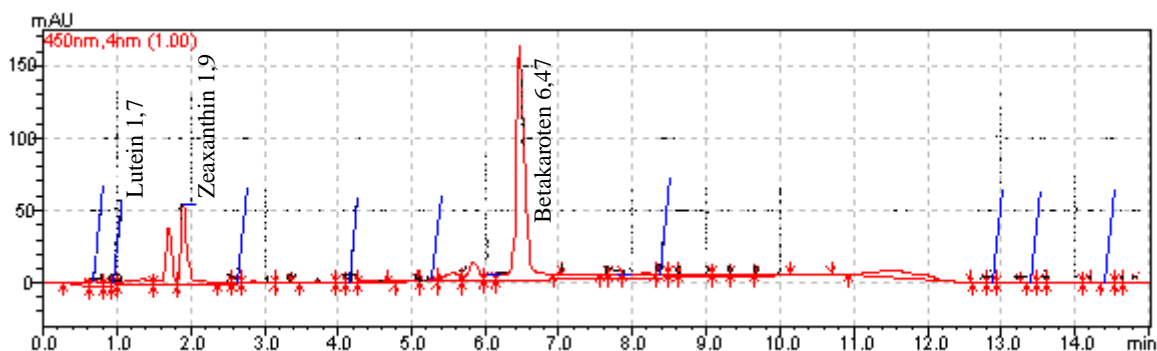
▪ Gradient č. 1

Čas (min)	Složení mobilní fáze (%)		
	Methylenchlorid	Hexan	Acetonitril
Do 3.	2,5	2,5	95
3. - 5.	přechod na 10	přechod na 10	přechod na 80
5. - 10.	10	10	80
10. - 11.	přechod na 2,5	přechod na 2,5	přechod na 95
11. - 15.	2,5	2,5	95

Tabulka 6: Složení a změny mobilní fáze při použití gradientu č. 1

Retenční čas (min)	
Betakaroten	6,47
Lutein	1,7
Zeaxanthin	1,9

Tabulka 7: Retenční časy karotenoidů při použití gradientu č. 1



Obrázek 7: Chromatogram získaný použitím gradientu č. 1

▪ Gradient č. 2

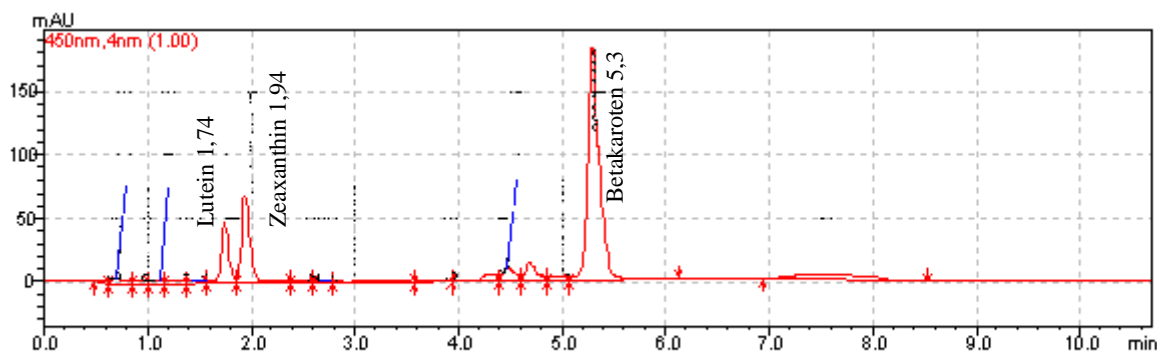
Čas (min)	Složení mobilní fáze (%)		
	Methylenchlorid	Hexan	Acetonitril
Do 2.	2,5	2,5	95
2. - 3.	přechod na 10	přechod na 10	přechod na 80
3. - 6.	10	10	80
6. - 7.	přechod na 2,5	přechod na 2,5	přechod na 95
7. - 9.	2,5	2,5	95

Tabulka 8: Složení a změny mobilní fáze při použití gradientu č. 2



Retenční čas (min)	
Betakaroten	5,3
Lutein	1,74
Zeaxanthin	1,94

Tabulka 9: Retenční časy karotenoidů při použití gradientu č. 2



Obrázek 8: Chromatogram získaný použitím gradientu č. 2

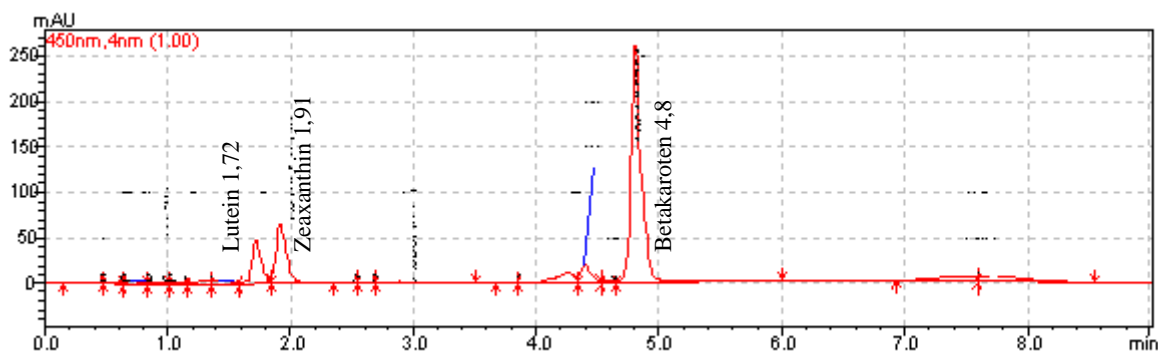
▪ Gradient č. 3

Čas (min)	Složení mobilní fáze (%)		
	Methylenchlorid	Hexan	Acetonitril
Do 2.	2,5	2,5	95
2. - 3.	přechod na 12,5	přechod na 12,5	přechod na 75
3. - 6.	12,5	12,5	75
6. - 7.	přechod na 2,5	přechod na 2,5	přechod na 95
7. - 9.	2,5	2,5	95

Tabulka 10: Složení a změny mobilní fáze při použití gradientu č.3

Retenční čas (min)	
Betakaroten	4,8
Lutein	1,72
Zeaxanthin	1,91

Tabulka 11: Retenční časy karotenoidů při použití gradientu č.3



Obrázek 9: Chromatogram získaný použitím gradientu č.3

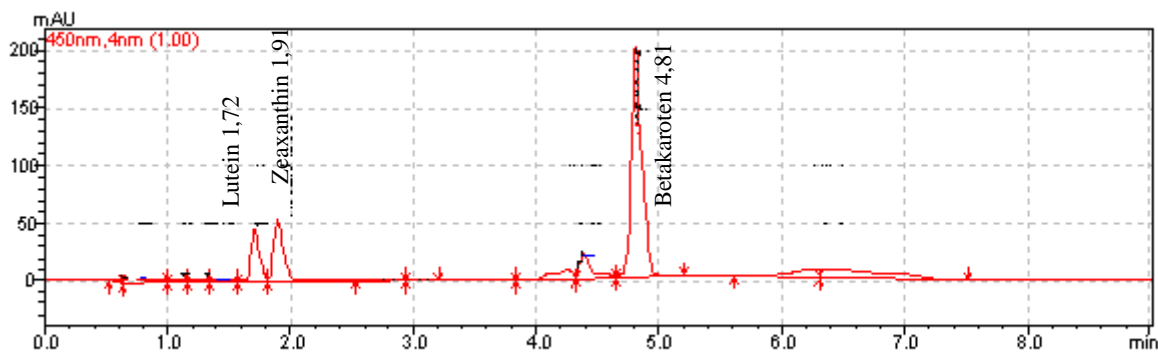
▪ Gradient č. 4

Čas (min)	Složení mobilní fáze (%)		
	Methylenchlorid	Hexan	Acetonitril
Do 2.	2,5	2,5	95
2. - 3.	přechod na 12,5	přechod na 12,5	přechod na 75
3. - 5.	12,5	12,5	75
5. - 6.	přechod na 2,5	přechod na 2,5	přechod na 95
6. - 9.	2,5	2,5	95

Tabulka 12: Složení a změny mobilní fáze při použití gradientu č.4

Retenční čas (min)	
Betakaroten	4,81
Lutein	1,72
Zeaxanthin	1,91

Tabulka 13: Retenční časy karotenoidů při použití gradientu č.4



Obrázek 10: Chromatogram získaný použitím gradientu č. 4

Jako nejvhodnější byl zvolen gradient č. 4. Při použití této eluce byl čas analýzy zkrácen na 5,5 minuty a prodleva mezi píkem zeaxanthinu a betakarotenu byla pouze 3 minuty.

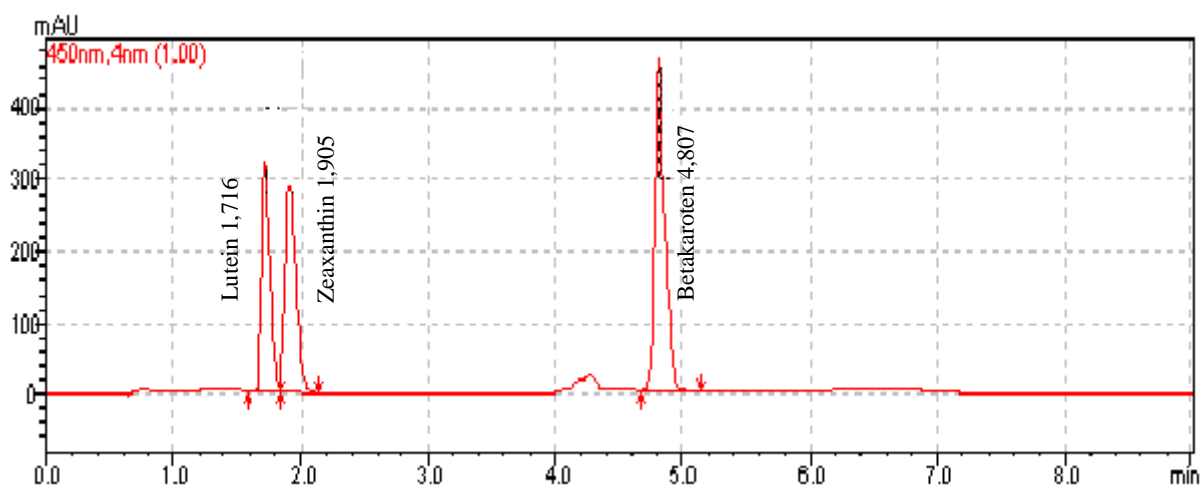
Metoda byla validována pro tento způsob gradientové eluce. Ostatní podmínky HPLC analýzy zůstaly stejné.

#### 4.4.2 Souhrn optimálních chromatografických podmínek

- Kolona – Zorbax SB C18, 50 x 4,6 mm, velikost částic 1,7 µm.
- Detekce – VIS 450 nm
- Dávkovaný objem vzorku – 1 µl
- Rychlost průtoku mobilní fáze – 1 ml/min
- Teplota – 30 °C
- Gradientová eluce: Do 2. minuty – methylenchlorid:hexan:acetonitril 2,5:2,5:95, 2. – 3. minuta změna na methylenchlorid:hexan:acetonitril 12,5:12,5:75, tento poměr udržen do 5. minuty. 5. – 6. minuta změna zpět na methylenchlorid:hexan:acetonitril 2,5:2,5:95, ekvilibrace kolony do 9. minuty.

### 4.5 Základní validace metody

#### 4.5.1 Test vhodnosti chromatografického systému (System suitability test – SST)<sup>11</sup>



Obrázek 11: Chromatogram získaný při SST

<sup>11</sup> Kapitola byla vypracována ze zdroje 19

	Retenční čas	Faktor symetrie	Rozlišení	Počet teoret. pater
Lutein	1,716	1,498		2431,8
Zeaxanthin	1,905	1,596	1,258 (L-Z)	2239,4
Betakaroten	4,807	1,475	17,319 (Z-B)	12192,5

Tabulka 14: Hodnoty parametrů získaných při SST

#### 4.5.1.1 Faktor symetrie

Tento parametr se vypočítává podle vzorce:

$$A_s = W_{0,05} / 2d$$

Kde :  $W_{0,05}$  = šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky

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

Hodnoty pro faktor symetrie, které požaduje ČL 2005 jsou 0,8 – 1,5

Tento požadavek je splněn pouze pro píky luteinu a betakarotenu.

#### 4.5.1.2 Rozlišení

Vypočítá se podle vzorce:

$$R_s = 1,18 \cdot (t_{R1} - t_{R2}) / W_{h1} + W_{h2}$$

Kde:  $t_R$  = retenční čas

$W_h$  = šířka píku v polovině jeho výšky

Rozlišení, které požaduje ČL 2005 je minimálně 1,5.

Tento požadavek je splněn pouze pro píky zeaxanthinu a betakarotenu.

#### 4.5.1.3 Počet teoretických pater

Počet teoretických pater vyjadřuje účinnost kolony a vypočítá se podle vzorce:

$$N = 5,54 (t_R / W_h)^2$$

Kde:  $t_R$  = retenční čas

$W_h$  = šířka píku v polovině jeho výšky

ČL 2005 požaduje počet teoretických pater minimálně 2000. Tento požadavek je splněn pro všechny tři látky.

#### 4.5.2 Opakovatelnost

Při testování opakovatelnosti byla provedena analýza šesti nástřiků pro jednu koncentraci od každé látky (validační roztok 3). Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

Koncentrace (mg/l)	Plocha pod píkem	Průměr	Směrodatná odchylka	RSD
Betakaroten Roztok 3 40,47	374662	373583	4888	1,31%
	369028			
	382070			
	374578			
	368781			
	372378			
Lutein Roztok 3 26,83	212939	210026	1814	0,86%
	208722			
	209760			
	210957			
	207717			
	210062			
Zeaxanthin Roztok 3 24,38	202033	199596	1818	0,91%
	199731			
	200782			
	200026			
	197813			
	197190			

Tabulka 15: Výsledky testu na opakovatelnost

Při testu na opakovatelnost byl splněn požadavek na relativní směrodatnou odchylku < 1% u luteinu a zeaxanthinu. Betakartoten tento požadavek nesplňuje.

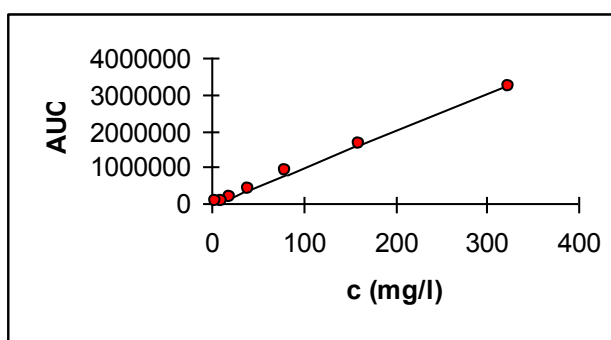
#### 4.5.3 Linearita

Linearita byla testována na sedmi koncentracích každé látky (validační roztoky 0 – 6). Pro každou koncentraci bylo provedeno šest nástřiků, pro výpočet byly použity průměrné hodnoty ploch pod píkem. Pro vyhodnocení byla použita metoda lineární regrese. Výsledky jsou shrnuty v následujících tabulkách.

## Betakaroten

Koncentrace (mg/l)	Průměrná plocha pod píkem
323,75	3223569
161,88	1630261
80,94	926641
40,47	375253
20,24	157119
10,12	68561
5,06	29499

Tabulka 16: Výsledky testu linearitu pro betakaroten



Obrázek 12: Graf lineární regrese betakarotenu

Regresní funkce:  $y = kx + q$

Počet bodů  $n = 7$

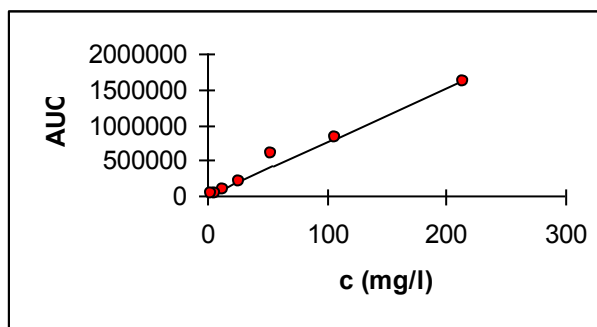
Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek:

- Směrnice  $k = 10068,66 \pm 211,6385$
- Absolutní člen  $q = 8258,044 \pm 29903,04$
- Koeficient korelace  $R = 0,998897$
- Reziduální odchylka  $S_{rez} = 60151,9$

## Lutein

Koncentrace (mg/l)	Průměrná plocha pod píkem
214,58	1600550
107,29	820124
53,65	593928
26,83	210473
13,42	87757
6,71	37435
3,35	15532

Tabulka 17: Výsledky testu linearitu pro lutein



Obrázek 13: Graf lineární regrese luteinu

Regresní funkce:  $y = kx + q$

Počet bodů  $n = 7$

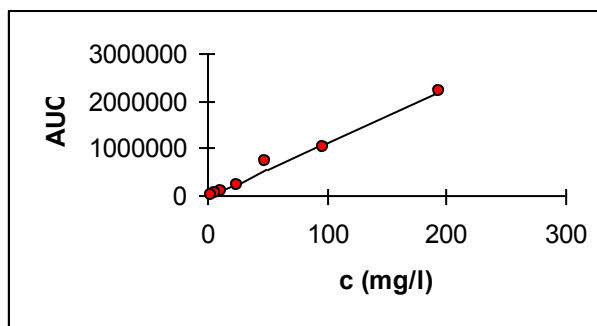
Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek:

- Směrnice  $k = 7486,889 \pm 433,1071$
- Absolutní člen  $q = 25379,99 \pm 40559,81$
- Koeficient korelace  $R = 0,991737$
- Reziduální odchylka  $S_{rez} = 81587,29$

Zeaxanthin

Koncentrace (mg/l)	Průměrná plocha pod píkem
195,00	2210700
97,50	1022460
48,75	735654
24,38	200848
12,19	80838
6,10	32839
3,05	13009

Tabulka 18: Výsledky testu linearity pro zeaxanthin



Obrázek 14: Graf lineární regrese zeaxatnhinu

Regresní funkce:  $y = kx + q$

Počet bodů  $n = 7$

Parametry regresní přímky a odhady jejich směrodatných odchylek:

- Směrnice  $k = 11440,12 \pm 582,0837$
- Absolutní člen  $q = 18662,03 \pm 49536,9$
- Koeficient korelace  $R = 0,99359$
- Reziduální odchylka  $S_{rez} = 99645,26$

## 4.6 Optimalizace extrakčního postupu

Při extrakci karotenoidů z potravních doplňků se vycházelo jednak z lipo-hydrofilních vlastností těchto látek a jednak z článků publikovaných v odborné literatuře. Byla testována řada různých rozpouštědel a rozdílných vlastností extrakčního prostředí. Podrobněji jsou testované způsoby popsány v následujícím přehledu. Účinnost extrakce a výpočet obsahu karotenoidů v přípravcích byl proveden pomocí srovnání ploch píků s roztokem standardů.

### 4.6.1 Extrakční způsob č. 1

Kapsle nebo tableta byla rozpuštěna v 50 ml chloroformu a ultrazvukována po dobu 15 – 30 minut. Roztok byl nakonec zfiltrován přes 0,45  $\mu\text{m}$  filtr. Rozdílná délka působení ultrazvuku byla testována z důvodu různé rozpadavosti lékových forem jednotlivých potravních doplňků. Některé přípravky bylo dokonce nutno mechanicky rozrušit.

Chloroform byl zvolen jako rozpouštědlo, protože se v něm rozpouštěly standardy látek a pro extrakci byl používán i v řadě prací publikovaných v odborné literatuře.

Tento postup byl však pro extrakci nevhodný a získané extrakty neposkytovaly při HPLC analýze žádné odezvy.

### 4.6.2 Extrakční způsob č. 2

Kapsle nebo tableta byla rozpuštěna v 50 ml methanolu a ultrazvukována po dobu 15 minut. Získaný roztok byl zfiltrován přes 0,45  $\mu\text{m}$  filtr a provedena analýza.

Methanol byl testován z důvodu jeho vyšší hydrofility, bylo totiž předpokládáno, že se jeho použitím zlepší rozpadavost lékových forem, což se sice potvrdilo, ale získané extrakty neposkytovaly při analýze žádné odezvy. Tento postup byl tedy nevhodný.



#### **4.6.3 Extrakční způsob č. 3**

Kapsle nebo tableta byla rozpuštěna v 50 ml THF a ultrazvukována po dobu 15 minut. Získaný extrakt byl zfiltrován přes 0,45 µm a provedena analýza.

THF byl jako extrakční rozpouštědlo zkoušen protože se u něj předpokládala lepší rozpustnost extrahovaných látek se zachovanou dobrou rozpadavostí lékových forem, což se nepotvrdilo a tento postup byl proto pro extrakci nevhodný.

#### **4.6.4 Extrakční způsob č. 4**

Kapsle nebo tableta byla rozpuštěna v 50 ml acetonu a ultrazvukována po dobu 15 minut, tento extrakt byl zfiltrován přes 0,45 µm filtr a provedena analýza.

Aceton byl testován jako další rozpouštědlo pro jednoduchý způsob extrakce na základě odborné literatury, ale ani tento postup nebyl vhodný.

#### **4.6.5 Extrakční způsob č. 5**

Ke kapsli nebo tabletě bylo přidáno 0,5 ml roztoku kyseliny askorbové (c10,0 g/l) a 20 ml 0,1 M kyseliny chlorovodíkové. Směs byla protřepávána 30 minut při 60 °C. Pak bylo přidáno 20 ml chloroformu a protřepáváno dalších 5 minut. Pak byla směs odstředěna (6000 ot/min) po dobu 5 minut a chloroformová vrstva byla oddělena. K vodné vrstvě bylo přidáno dalších 20 ml chloroformu a extrakce zopakována. Spojené chloroformové vrstvy byly přefiltrovány přes 0,45 µm filtr a provedena analýza.

Tento extrakční postup se snaží napodobit kyselé prostředí žaludku, kam se přípravky při používání pacientem dostanou a tedy musí uvolnit účinné látky. Roztok kyseliny askorbové byl přidán jako antioxidant, aby se předešlo oxidačním změnám.

Při použití tohoto postupu extrakty vykazovali na chromatogramu odezvy stanovovaných látek.

#### **4.6.6 Extrakční způsob č. 6**

Ke kapsli nebo tabletě bylo přidáno 20 ml 20% vodného roztoku hydroxidu draselného a směs byla protřepávána 30 minut při 60 °C. Pak bylo přidáno 30 ml chloroformu a protřepáváno dalších 10 minut. Pak byla směs odstředěna (6000 ot/min) po dobu 5 minut. Oddělená chloroformová vrstva byla zfiltrována přes 0,45 µm filtr a provedena analýza.

Roztok hydroxidu draselného byl použit jako saponifikační roztok. Lutein a zeaxanthin jsou látky ze skupiny xantofylů, mají tedy v molekule hydroxylové skupiny,

kteřé mohou být blokovány vazbou s mastnými kyselinami. Saponifikací dochází k uvolnění látky z vazby s mastnou kyselinou a látka může být extrahována.

Při použití tohoto postupu extrakty vykazovali na chromatogramu píky stanovovaných látek.

#### **4.6.7 Extrakční způsob č. 7**

Ke kapsli nebo tabletě bylo přidáno 20 ml 20% methanolického roztoku hydroxidu draselného a směs byla protřepávána 20 minut při 60 °C. Pak bylo přidáno 5 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové k neutralizaci, přidáno 20 ml chloroformu. Po protřepání byla chloroformová vrstva oddělena, zfiltrována přes 0,45 µm filtr a provedena analýza.

#### **4.6.8 Extrakční způsob č. 8**

Ke kapsli nebo tabletě bylo přidáno 0,5 ml roztoku kyseliny askorbové (c10,0 g/l) a 20 ml 1M kyseliny chlorovodíkové a směs byla 30 minut protřepávána při 60 °C. Pak bylo přidáno 20 ml chloroformu a protřepáváno dalších 5 minut a odstředěno (6000 ot/min). Chloroformová vrstva byla oddělena a extrakce zopakována s dalšími 20 ml chloroformu. Spojené extrakty byly zfiltrovány přes 0,45 µm filtr a provedena analýza.

#### **4.6.9 Extrakční způsob č. 9**

Ke kapsli nebo tabletě bylo přidáno 20 ml 0,1 M vodného roztoku hydroxidu draselného a směs byla protřepávána při 60 °C 30 minut. Pak bylo přidáno 30 ml chloroformu, dalších 10 minut protřepáváno, provedena centrifugace (6000 ot/min), oddělená chloroformová vrstva byla zfiltrována přes 0,45 µm filtr a provedena analýza.

#### **4.6.10 Extrakční způsob č. 10**

Ke kapsli nebo tabletě bylo přidáno 20 ml hexanu a směs byla ultrazvukována 20 minut. Pak byla provedena filtrace přes 0,45 µm filtr a provedena analýza.

Další jednoduchý způsob extrakce využíval jako extrakční rozpouštědlo hexan, který byl používán i v některých pracích publikovaných v odborné literatuře. Extrakty získané tímto postupem sice vykazovaly na chromatogramech odezvy, ale výtěžnost byla nízká.

#### **4.6.11 Extrakční způsob č. 11**

Ke kapsli nebo tabletě bylo přidáno 20 ml 20% vodného roztoku hydroxidu draselného jako saponifikačního roztoku. Směs byla protřepávána 30 minut při 60 °C. Pak bylo přidáno 30 ml hexanu a protřepáváno dalších 10 minut. Hexanová vrstva byla oddělena, zfiltrována přes 0,45 µm filtr a provedena analýza.

Saponifikace mírně zvýšila výtěžek oproti samotné extrakci hexanem.

#### **4.6.12 Extrakční způsob č. 12**

Ke kapsli nebo tabletě bylo přidáno 20 ml dimethylsulfoxidu a směs byla ultrazvukována 20 minut. Extrakt byl zfiltrován přes 0,45 µm filtr a provedena analýza.

#### **4.6.13 Extrakční způsob č. 13**

Ke kapsli nebo tabletě bylo přidáno 40 ml 0,1 M kyseliny octové v methanolu. Směs byla zfiltrována přes 0,45 µm filtr a provedena analýza.

#### **4.6.14 Extrakční způsob č. 14**

Ke kapsli nebo tabletě bylo přidáno 40 ml 0,1 M kyseliny octové v isopropanolu a přefiltrováno přes 0,45 µm filtr a provedena analýza.

#### **4.6.15 Extrakční způsob č. 15**

Ke kapsli nebo tabletě bylo přidáno 40 ml 0,1 M kyseliny octové v isobutanolu. Směs byla zfiltrována přes 0,45 µm filtr a provedena analýza.

#### **4.6.16 Extrakční způsob č. 16**

Ke kapsli nebo tabletě bylo přidáno 40 ml 1 M kyseliny octové v methanolu. Směs byla zfiltrována přes 0,45 µm filtr a provedena analýza.

Univerzální způsob extrakce nebyl nalezen. Pro každý přípravek byl vhodný jiný způsob extrakce. Výsledky jednotlivých přípravků pro jednotlivé extrakční postupy jsou shrnuty v následující tabulce.

Přípravek	Způsob extrakce	Lutein			Zeaxanthin			Betakaroten		
		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 (%)
Ocutein	5	75	0	0	12,5	11,92	95,42	25	7,9	31,63
Lutein lux		15	0	0	8,75	0	0	75	0	0
Centrum silver		25	43,56	174	—	—	—	10	17,19	172
Super beta-karoten		137,5	10,51	7,65	27,5	0	0	150	44,16	29,44
Ocutein	6	100	0	0	16,67	9,36	56,2	33,33	18,82	56,47
Lutein lux		199,98	0	0	11,67	0	0	100	0	0
Centrum silver		33,33	35,88	108	—	—	—	13,33	15,6	117,1
Super beta-karoten		183,3	8,86	4,83	36,66	0	0	199,98	17,27	8,64
Ocutein	7	75	20,18	26,92	12,5	11,72	93,83	25	7,26	29,06
Lutein lux		150	0	0	8,75	0	0	75	3,63	4,84
Centrum silver		25	0	0	—	—	—	10	0	0
Super beta-karoten		137,5	0	0	27,5	0	0	150	86,45	57,64
Ocutein	8	75	0	0	12,5	10,2	81,62	25	5,76	23,07
Lutein lux		15	0	0	8,75	0	0	75	0	0
Centrum silver		25	30,94	123,77	—	—	—	10	12,17	121,78
Super beta-karoten		137,5	0	0	27,5	0	0	150	47,09	31,4

pokračování z předchozí strany

Přípravek	Způsob extrakce	Lutein			Zeaxanthin			Betakaroten		
		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 (%)
Ocutein	9	100	0	0	16,67	10,31	61,85	33,33	7,51	22,55
Lutein lux		199,98	0	0	11,67	0	0	100	0	0
Centrum silver		33,33	39,93	119,8	—	—	—	13,33	14,1	105,84
Super beta-karoten		183,3	0	0	36,66	0	0	199,98	4,68	2,34
Ocutein	10	150	0	0	25	8,28	33,12	50	13,42	26,84
Lutein lux		300	0	0	17,5	0	0	150	0	0
Centrum silver		X	X	X	X	X	X	X	X	X
Super beta-karoten		275	12,24	4,45	55	0	0	300	3,32	1,12
Ocutein	11	100	0	0	16,7	7,83	46,89	33,33	9,25	27,75
Lutein lux		199,98	0	0	11,67	0	0	100	0	0
Centrum silver		X	X	X	X	X	X	X	X	X
Super beta-karoten		183,32	9,1	4,96	36,66	0	0	199,98	21,9	10,95
Ocutein	12	150	0	0	25	17,8	71,2	50	4,66	9,32
Lutein lux		300	0	0	17,5	0	0	150	0	0
Centrum silver		X	X	X	X	X	X	X	X	X
Super beta-karoten		275	15,82	5,75	55	0	0	300	15,37	5,12

pokračování z předchozí strany										
Přípravek	Způsob extrakce	Lutein			Zeaxanthin			Betakaroten		
		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 (%)
Ocutein	13	75	0	0	12,5	9,66	77,28	25	0	0
Lutein lux		150	0	0	8,75	0	0	75	0	0
Centrum silver		25	13,87	55,5	—	—	—	10	0	0
Super beta-karoten		137,5	12,22	8,89	27,5	0	0	150	5	3,33
Ocutein	14	75	0	0	12,5	10,7	85,6	25	4,82	19,28
Lutein lux		150	0	0	8,75	0	0	75	0	0
Centrum silver		25	0	0	—	—	—	10	0	0
Super beta-karoten		137,5	10,05	7,31	27,5	0	0	150	0	0
Ocutein	15	75	0	0	12,5	9,53	76,24	25	3,96	15,84
Lutein lux		150	0	0	8,75	0	0	75	0	0
Centrum silver		25	0	0	—	—	—	10	0	0
Super beta-karoten		137,5	0	0	27,5	0	0	150	0	0
Ocutein	16	75	0	0	12,5	9,4	75,2	25	3,42	13,68
Lutein lux		150	0	0	8,75	0	0	75	0	0
Centrum silver		25	11,3	45,2	—	—	—	10	0	0
Super beta-karoten		137,5	11,37	8,27	27,5	0	0	150	4,3	2,87

Tabulka 19: Výsledky jednotlivých přípravků při použití navržených extrakčních postupů

Vysvětlivky: X Přípravek nebyl tímto extrakčním postupem testován

— Složka není v přípravku deklarována

Z testovaných přípravků dosahoval uspokojivých výsledků pouze Centrum Silver a to při použití extrakčního postupu číslo 6.

U ostatních přípravků byl extrakční postup málo účinný nebo deklarovaný obsah karotenoidů neodpovídal skutečnému obsahu.

## 5 Závěr

V této práci byla upravena metoda pro separaci vybraných karotenoidů z diplomové práce (Optimalizace chromatografických podmínek pro HPLC stanovení vybraných karotenoidů, Petra Dvořáková, 2009). Byla vyvinuta gradientová eluce pro separaci luteinu, zeaxanthinu a betakarotenu. Podmínky byly nastaveny tak, aby eluce všech tří látek probíhala do 5,5 minut. Byla provedena částečná validace této metody.

Při testování vhodnosti chromatografického systému byla vyjádřena opakovatelnost jako relativní směrodatná odchylka. Požadavek na hodnotu relativní směrodatné odchylky  $< 1\%$  byl splněn pouze pro lutein a zeaxanthin. Betakaroten tomuto požadavku nevyhovoval. Účinnost kolony vyjádřená jako počet teoretických pater  $N$  byla splněna pro všechny tři látky ( $N > 2000$ ). Asymetrie chromatografických pík vyjádřená faktorem  $T$  byla v rozmezí  $0,8 - 1,5$  požadovaném ČL 2005 splněna pouze pro píky luteinu a betakarotenu. Pík zeaxanthinu tomuto požadavku nevyhovoval. Rozlišení  $> 1,5$  bylo splněno pouze pro píky zeaxanthinu a betakarotenu. U pík luteinu a zeaxanthinu nebylo tak vysokého rozlišení dosaženo.

Při testování parametru linearit nebylo dosaženo hodnoty korelačního koeficientu  $0,999$  ani pro jednu z látek.

Byly shrnuty způsoby extrakce vybraných karotenoidů publikované v odborné literatuře. Čerpáno bylo i ze zdrojů, které se přímo netýkaly tří vybraných látek. Ale pro podobné vlastnosti všech karotenoidů lze závěry prací částečně zobecnit.

Byla navržena a testována řada extrakčních postupů pro extrakci vybraných karotenoidů z potravních doplňků. Při navrhování extrakčních postupů se vycházelo ze způsobů extrakce publikovaných v odborné literatuře a z vlastností karotenoidů.

Přes veškeré snahy nebyl nalezen ideální způsob extrakce, který by byl použitelný u většiny potravních doplňků.

Testované extrakční způsoby byly buď málo účinné, nebo zkoušené potravní doplňky neobsahovaly deklarované množství karotenoidů.

Přesto, že nebylo dosaženo předpokládaných výsledků, má tato rigorózní práce určitý význam. Nepodařilo se potvrdit, ale ani vyvrátit, že potravní doplňky dostupné na trhu v ČR fakticky obsahují deklarované množství karotenoidů. Pokud tato skutečnost byla způsobena neúčinností zkoušených extrakčních postupů, pak by bylo žádoucí navrhnout nový extrakční postup některou metodou, která dosud testována nebyla.



Pokud však tato skutečnost byla způsobena tím, že látky v přípravcích nebyly v množství dostatečném pro analýzu, pak by se jednalo o alarmující zjištění, které by vyžadovalo další zkoumání a případné vyvození patřičných důsledků.

Upravená metoda pro separaci tří vybraných karotenoidů zahrnuje následující podmínky:

- Kolona Zorbax SB C18, 50 x 4,6 mm, velikost částic 1,7  $\mu\text{m}$ .
- Detekce – VIS 450 nm
- Dávkovaný objem vzorku – 1  $\mu\text{l}$
- Rychlost průtoku mobilní fáze – 1 ml/min
- Teplota – 30 °C
- Gradientová eluce: Do 2. minuty – methylenchlorid:hexan:acetonitril 2,5:2,5:95, 2. – 3. minuta změna na methylenchlorid:hexan:acetonitril 12,5:12,5:75, tento poměr udržen do 5. minuty. 5. – 6. minuta změna zpět na methylenchlorid:hexan:acetonitril 2,5:2,5:95, ekvilibrace kolony do 9. minuty.

## 6 Seznam literatury

1. S. T. Jones K. J. Aryana, J. N. Losso: *Journal of Dairy Science*, 88 (2005), 1661 – 1670
2. P. Dvořáková: Diplomová práce , Faf UK, Hradec Králové (2009)
3. F. Khachik, Ch. J. Spangler, J. C. Smith: *Analytical Chemistry* 69, (1997) 1873-1881
4. <http://sweb.cz/HPLC1/index.html> (cit. 2008-2-19)
5. K. Waisser: *Bioorganická chemie*, Praha, Karolinum (1998), 89-90
6. L. Li, J. Qin, Shi-an Yin, G. Tang: *Chromatographia* 65, (2007) 91-94
7. Ting Sun, Zhimin Xu, J. Samuel Goodber: *Journal of Chromatography B*, 830 (2006), 158 – 160
8. Hua-Bin Li, Yue Jinag, Feng Chen: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (2002), 1070 – 1072
9. Český lékopis 2002, Grada Publishing a. s. (2002), *Chromatografické separační metody* (2.2.46), 181
10. Xiaohua Yue, Zhimin Xu, Witoon Prinyawiwatkul, Joan M. King: *Journal of Food Science*, 71 (2006), 239 – 241
11. M. H. Akhtar, M. Bryan: *Food Chemistry*, 111 (2008), 255 – 261
12. L. Nováková: Disertační práce, Faf UK, Hradec Králové (2005)
13. J. Babjuk, F. Perlík, Z. Šídlo: *Bioanalytika léků*, 52 – 64, Avicenum (1991)
14. <http://www.natur.cuni.cz/~suchan/extrakce.pdf> (cit. 2009-10-25)
15. P. Kastner – Přednáška z kontroly chemických léčiv – Analýza léčiv v biologickém materiálu, říjen 2007
16. <http://www.davinciacademia.cz/ocutein/> (cit. leden 2010)
17. <http://www.vitar.cz/produkty1/polykaci-tablety-a-kapsle-revital/revital-super-beta-karoten> (cit. leden 2010)
18. <http://www.virde.cz/sortiment-oci.php> (cit. leden 2010)
19. Český lékopis 2005, Grada Publishing a. s. (2005), 235 - 243