

Považuji za svou milou povinnost poděkovat svému školiteli panu Doc. RNDr. Daliboru Šatínskému, Ph.D. za vstřícnost, trpělivost, cenné rady a připomínky při konzultacích v průběhu psaní této práce.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Doc. RNDr. Dalibora Šatínského, Ph.D. K získání informací o zpracovaném tématu jsem použila literatury a internetových zdrojů, které jsem uvedla v seznamu literatury.

Souhlasím, aby práce byla půjčována ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

Dne 11. 5. 2009 v Hradci Králové

.....  
podpis

# Obsah

<b>1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	6
<b>2. ÚVOD A CÍL PRÁCE</b> .....	7
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	8
<b>3. 1 Přírodní pigmenty</b> .....	8
<b>3. 2 Terpeny</b> .....	8
<b>3. 3 Karotenoidy</b> .....	9
<b>3. 4 Betakaroten</b> .....	10
3. 4. 1 Historie.....	10
3. 4. 2 Struktura .....	11
3. 4. 3 Biologické hledisko, funkce v organismu a výskyt .....	13
3. 4. 4 Potravinové zdroje karotenů .....	14
3. 4. 5 Metabolismus .....	15
3. 4. 6 Chemické a fyzikální vlastnosti .....	16
3. 4. 7 Betakaroten při fotosyntéze .....	18
3. 4. 8 Betakaroten jako přírodní pigment .....	18
3. 4. 9 Betakaroten jako umělé barvivo .....	18
3. 4. 10 Syntéza.....	18
<b>3. 5 Lutein</b> .....	19
3. 5. 1 Potravinové zdroje a výskyt.....	19
3. 5. 2 Chemické a fyzikální vlastnosti.....	19
3. 5. 3 Lutein jako barvivo.....	21
3. 5. 4 Role luteinu v lidském oku.....	21
3. 5. 5 Příjem.....	21
3. 5. 6 Komerční význam.....	22
<b>3. 6 Zeaxanthin</b> .....	22
3. 6. 1 Zdroje a biologická dostupnost .....	22
3. 6. 2 Využití.....	23
3. 6. 3 Chemické a fyzikální vlastnosti .....	23
3. 6. 4 Role zeaxanthinu ve vztahu s onemocněním oka .....	25

<b>4. ANALYTICKÉ MOŽNOSTI STANOVENÍ LUTEINU, BETAKAROTENU A ZEAXANTHINU METODOU HPLC.....</b>	<b>26</b>
<b>4. 1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....</b>	<b>26</b>
4. 1. 1 Rozdělení chromatografických metod.....	26
4. 1. 2 Princip HPLC.....	27
4. 1. 2. 1 Stacionární fáze na bázi silikagelu.....	28
4. 1. 2. 2 Monolitní stacionární fáze.....	29
4. 1. 2. 3 Další druhy stacionárních fází.....	29
4. 1. 3 Instrumentace HPLC.....	30
4. 1. 4 Charakteristiky HPLC procesu.....	30
<b>4. 2 Možnosti stanovení vybraných karotenoidů HPLC metodou.....</b>	<b>32</b>
4. 2. 1 HPLC metoda s kolonou Pinnacle II-C18 a s UV-Vis PDA detekcí (stanovení v meruňkách).....	32
4. 2. 2 HPLC metoda s C30 stacionární fází a s UV detekcí (stanovení v mangu).....	32
4. 2. 3 HPLC metoda s Bischoff C30 kolonou a s UV detekcí (stanovení v řasách, celeru a slézi).....	33
4. 2. 4 Stanovení karotenoidů HPLC metodou v Chlorella pyrenoidosa s C30 kolonou a s UV detekcí.....	34
4. 2. 5 HPLC metoda s Lichrospher RP C18 stacionární fází a s UV detekcí (stanovení v mrkvi).....	35
4. 2. 6 HPLC metoda s Inertsil ODS-3 RP stacionární fází a s UV detekcí (stanovení v sojových bobech).....	35
4. 2. 7 HPLC metoda s C18 RP stacionární fází a detekcí pomocí DAD detektoru (stanovení v papáje).....	36
4. 2. 8 HPLC metoda s použitím Nucleosil C18 kolony a s PDA detekcí (stanovení v tykvi).....	36
4. 2. 9 HPLC metoda s Ultrasphere ODS kolonou a detekcí pomocí DAD detektoru (stanovení v rajčatech).....	37
4. 2. 10 HPLC metoda s Microsorb C18 kolonou a PDA detekcí.....	38
4. 2. 11 HPLC metoda s použitím RP C18 stacionární fází a s UV-Vis detekcí (stanovení v séru či plazmě).....	39
4. 2. 12 HPLC metody s použitím C18 a C30 stacionárních fází a UV-Vis detektoru (stanovení v lidském séru).....	40

<b>5. ZÁVĚR.....</b>	<b>42</b>
<b>6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>44</b>

# 1. Seznam použitých zkratek

<b>ACN</b>	Acetonitril
<b>APCI</b>	Atmospherical pressure chemical ionization
<b>BHT</b>	Butylhydroxytoluen; 2,6-di-tert-butyl-4-methylfenol
<b>CRBP</b>	Cell-retinol-binding-protein; bílkovina přenášející retinol v buňce
<b>DAD</b>	Diode array detector
<b>Epidermis</b>	Vnější vrstva kůže
<b>HPLC</b>	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<b>IUPAC</b>	International union of pure and applied chemistry
<b>KOH</b>	Hydroxid draselný
<b>LC-MS</b>	Liquid chromatography–Mass spektrometry
<b>LLE</b>	Liquid-liquid extrakce; extrakce z kapaliny do kapaliny
<b>Makula</b>	Žlutá skvrna na sítnici
<b>MgCO<sub>3</sub></b>	Uhličitan hořečnatý
<b>MTBE</b>	Methyl-tert-butyl ether
<b>NADPH</b>	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaný)
<b>NaSO<sub>4</sub></b>	Síran sodný
<b>NH<sub>4</sub>Ac</b>	Amonium acetát
<b>ODS</b>	Oktadecylsilikagel
<b>Placebo</b>	Inertní lék či léčebná procedura, obvykle látka, která vypadá (event. chutná) jako studovaný lék, ale neobsahuje účinnou složku; v kontrolovaném pokusu bývá placebo podáváno kontrolní skupině osob; pacient však může pocítit úlevu, jestliže placebo věří (placebo efekt)
<b>RBP</b>	Retinol-binding-protein; protein přenášející retinol v krvi
<b>RP</b>	Reverse phase; reverzní fáze
<b>TEA</b>	Triethylamin
<b>THF</b>	Tetrahydrofuran
<b>UV</b>	Ultraviolet; ultrafialové spektrum
<b>VIS</b>	Visible; viditelné spektrum

## 2. Úvod a cíl práce

Karotenoidy jsou v přírodě se vyskytující lipofilní mikronutrienty. Patří do skupiny pigmentů, které jsou syntetizovány rostlinami a řadou mikroorganismů. Vyznačují se množstvím rozdílných biologických aktivit. Mezi analytickými metodami stanovení těchto látek se v posledních letech stále více prosazuje metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Cílem této rešeršní práce bylo shromáždit informace týkající se luteinu, betakarotenu a zeaxanthinu, a informace o současných metodách, které slouží ke stanovení těchto látek v potravinách.

V mé práci se budu zabývat analytickými metodami stanovení všech tří látek dohromady se zaměřením na metodu HPLC.

Zdrojem informací pro tuto práci byly internetové stránky [www.google.com](http://www.google.com), [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org), kde pro vyhledávání byla nejčastěji použita klíčová slova *Lutein*, *Betacarotene*, *Zeaxanthin* a *Determination of lutein*, *Determination of betacarotene* a *Determination of zeaxanthine*.

Jako zdroj byl také využíván především elektronický informační zdroj Web of Science a ScienceDirect. K vyhledání příslušných zdrojů byla využita slova *Carotenoids*, *Determination*, *Lutein*, *Betacarotene*, *Zeaxanthine*, *Column liquid chromatography*, *Determination of carotenoids by HPLC*, *Food analysis*, *Antioxidants* a např. *Apricot*, *Papaya fruits* a *Mango*.

Informace pro rešeršní práci byly také čerpány z literatury publikované v letech 1996-2007 v různých chemických časopisech.

# 3. Teoretická část

## 3.1 Přírodní pigmenty

Pigmenty lze rozdělit do dvou skupin - pigmenty přírodní včetně pigmentů přírodně identických a pigmenty syntetické. Přírodně identické pigmenty jsou po chemické stránce stejné jako přírodní pigmenty, jsou však vyráběny synteticky. Přírodní pigmenty jsou získávány z přírodních zdrojů: rostlinných, živočišných či nerostných [1]. Přírodní pigmenty jsou látky vyskytující se v živých organismech, mají barvu určenou selektivním pohlcením barevného spektra [2].

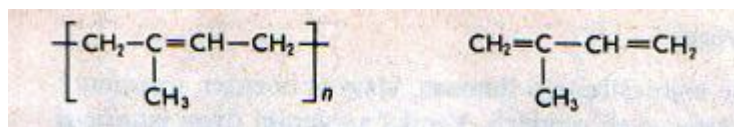
Mezi přírodní pigmenty patří i karotenoidy, mezi něž řadíme betakaroten ( $\beta$ -karoten), lutein i zeaxanthin.

## 3.2 Terpeny

Terpeny jsou obecným názvem pro skupinu pigmentů, které jsou rozpustné v tucích [3]. Jsou to organické sloučeniny převážně rostlinného původu [4]. Tyto pigmenty se nachází v zelené, žluté a listnaté zelenině a ve žlutém ovoci [3].

Terpeny jsou alifatické uhlovodíky, jejichž molekuly se skládají ze dvou nebo více isoprenových jednotek, a proto patří mezi isoprenoidy. Terpeny se dělí podle počtu isoprenových jednotek [5].

Obrázek č. 1: Isoprenová jednotka



isoprenová jednotka

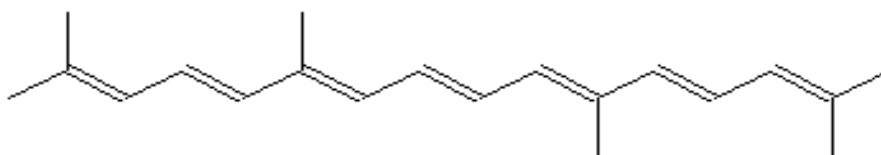
2-methylbuta-1,3-dien



### 3. 3 Karotenoidy

Karotenoidy jsou organická barviva, která patří do skupiny tetraterpenů (mají základní strukturu tvořenou pomocí isoprenových jednotek, obsahují osm isoprenoidních jednotek a tedy 40 uhlíkových atomů v molekule). Při biosyntéze tetraterpenů musí dojít ke kondenzaci dvou diterpenů – geranylgeranyldifosfátu a geranylallyldifosfátu, a to systémem „pata-pata“, čímž řetězec získává svoje centrum symetrie. Vzniká čtyřicetihlíkatá sloučenina, zvaná fytoen, který je všeobecným prekurzorem tetraterpenů. Fytoen obsahuje systém tří konjugovaných vazeb, který brání vzniku cyklických sloučenin. Další fází biosyntézy karotenoidů jsou úpravy uhlíkatého řetězce. Dochází k řadě dehydrogenačních reakcí, které vedou ke vzniku konjugovaného systému dvojných vazeb. Výsledná sloučenina má all-trans konfiguraci, na rozdíl od původního fytoenu, ve kterém byla jedna vazba cis [6]. Fytoen přejde po dehydrogenaci na lykopen. Cyklizací obou konců lykopenu získáme  $\beta$ -karoten [7].

Obrázek č. 2: Centrální část karotenoidů



Dvojně uhlíkové vazby vzájemně reagují v procesu konjugace, což umožňuje elektronům, aby se volně pohybovali uvnitř molekul. Jak roste počet dvojných vazeb, elektrony sdružené s konjugačním systémem mají více prostoru k pohybu a potřebují méně energie ke změně svého stavu. To vede k poklesu rozsahu energie světla absorbované molekulami. Konjugovaný řetězec umožňuje karotenoidům absorbovat ve viditelné oblasti spektra a díky tomu se jeví barevně. Karotenoidy absorbují modré světlo. Nejvíce frekvencí světla je absorbováno z malé části na konci oblasti viditelného spektra, látky získávají červenou barvu.

Existuje okolo 600 známých karotenoidů. Dělí se do dvou skupin, a to karotenů, bezkyslíkatých karotenoidů ( $\beta$ -karoten), které typicky obsahují jen uhlík a vodík, a xantofylů, karotenoidů obsahujících molekuly kyslíku (lutein a zeaxanthin).

Karotenoidy jsou převážně látky lipofilní, nerozpustné ve vodě, dobře rozpustné v nepolárních (organických) rozpouštědlech [8].

Barva karotenoidů, od bledě žluté přes světle oranžovou až po temně červenou, je spojená s jejich strukturou. Xantofyly jsou často žluté, od toho má také jejich skupina odvozené jméno [9].

Karotenoidy jsou jednou z nejdůležitějších skupin přírodních pigmentů. Jsou zodpovědné za žlutou a oranžovou barvu mnoha druhů ovoce a zeleniny. Ve fotosyntetických organismech, nejvíce pak u flóry, hrají karotenoidy důležitou roli při fotosyntetické reakci. Podílejí se buď na procesu přenosu energie, nebo chrání reakční centrum před autooxidací.

V organismech, které nejsou schopny fotosyntézy, jako je tomu např. u člověka, mají karotenoidy mnoho fyziologických funkcí. Jsou efektivním likvidátorem volných radikálů a dále podporují imunitní systém. Většina karotenoidů má antioxidační účinky. Některé karotenoidy jsou prekurzory vitamínu A (retinolu). Retinol je dietární vitamin, tzn. že ho živočichové musí přijímat z potravy ve formě různých prekurzorů jako jsou karotenoidy (rostlinný původ) nebo retinyl estery (živočišný původ) [52].

Karotenoidy jsou prekurzory retinoidů (strukturně jsou to mnohuhlíkové nenasycené uhlovodíky). Karotenoidy se vyskytují v rostlinách hlavně ve formě  $\beta$ -karotenu, popřípadě lykopenu. V živočišných tkáních jsou karotenoidy také, ale jsou rostlinného původu, protože si je živočichové nedokáží syntetizovat. Kromě karotenoidů, tkáň obsahuje i retinyl estery (a v této formě fungují retinoidy jako zásoba v organismu) [52].

Karotenoidy mají také vliv na vzhled daného organismu. Způsobují např. růžové zbarvení plameňáků či lososa, nebo červenou barvu raka [10].

### **3. 4 Betakaroten**

#### **3. 4. 1 Historie**

Zářivé barvy, které můžeme vidět v přírodě, a také molekuly, které tyto barvy způsobují, vždy fascinovaly přední světové vědce. Prvotní studie karotenoidů datujeme zpět na počátek 19. století.  $\beta$ -karoten byl poprvé samostatně izolován v roce 1831 díky Wackenrodovi. V průběhu 19. století bylo objeveno a pojmenováno mnoho dalších karotenoidů, přestože jejich stavba byla stále neznámá.

Až do roku 1907 byl známý pouze empirický vzorec  $\beta$ -karotenu  $C_{40}H_{56}$ , ustanovený Willstaterem a Miegem. Vlastní stavba byla objasněna až v letech 1930 – 1931 díky práci Karrera. Bylo to poprvé, kdy byla objasněna stavba nějakého vitamínu nebo provitaminu a Karrer za svou práci získal Nobelovu cenu.

V roce 1919 navrhl Steenbock hypotézu, že by mohl existovat vztah mezi  $\beta$ -karotenem a vitamínem A. Představa provitaminů jako molekul, které si tělo převede na vitamín, byla zcela nová a měla velký význam jak vědecký, tak komerční.

První úplné syntézy  $\beta$ -karotenu bylo dosaženo v roce 1950, a komerčně začal být vyráběn v roce 1954.

Různé studie provedené v průběhu 70. – 80. let 20. století prokázaly, že je  $\beta$ -karoten vhodný pro konzumaci v jídle a také zjistily jeho aktivitu v lidském těle.

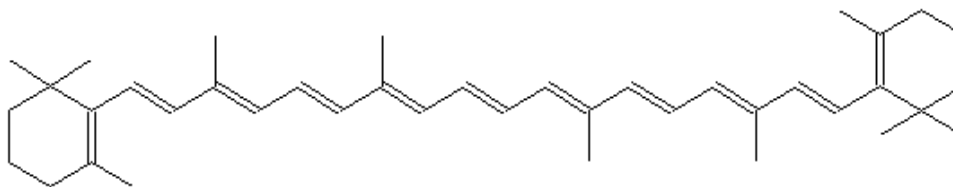
V 80. letech vědci navrhovali, aby byl  $\beta$ -karoten využit jako prevence onemocnění rakovinou. Dále bylo zjištěno, že působí jako antioxidant.

V poslední době byl  $\beta$ -karoten doporučen jako vhodný prostředek pro preventivní předcházení různým chorobám, a to např. cystické fibróze a artritidě. Je také nedílnou součástí úspěšného obchodu s vitamínovými doplňky [42].

### 3. 4. 2 Struktura

$\beta$ -karoten je organická sloučenina, z chemického pohledu patří karoteny mezi terpeny.  $\beta$ -karoten je tvořen osmi isoprenovými jednotkami, které jsou na každém konci cyklizovány. Chemická struktura vypadá následovně:

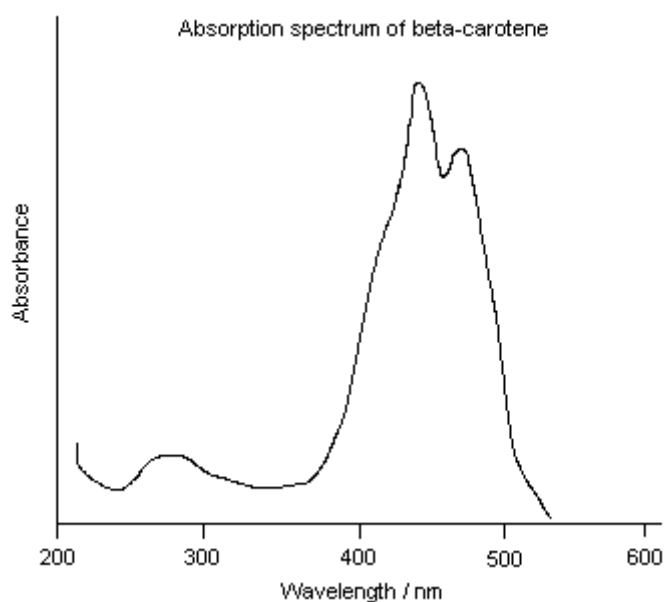
Obrázek č. 3



Dlouhý konjugovaný řetězec je zodpovědný za oranžovou barvu  $\beta$ -karotenu [11], [46].

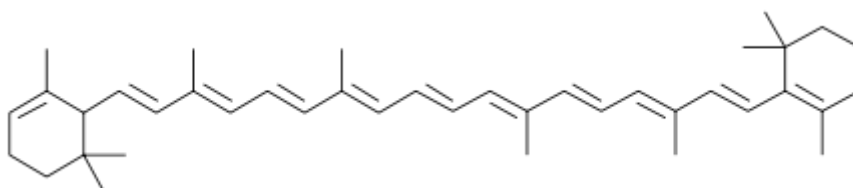
Konjugovaný řetězec umožňuje karotenoidům absorbovat ve viditelné oblasti spektra a díky tomu se jeví barevně. V grafu závislosti absorbance na vlnové délce pod tímto odstavcem můžeme pozorovat, že  $\beta$ -karoten nejvíce absorbuje v rozmezí 400-500 nm. Je to zeleno-modrá část spektra.  $\beta$ -karoten se jeví jako oranžový, protože se červená a žlutá barva odráží zpět k nám [47].

**Obrázek č. 4: Absorbční spektrum  $\beta$ -karotenu [47]**

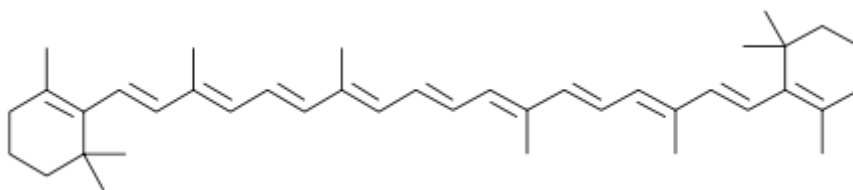


Karoteny se vyskytují ve dvou základních formách pojmenovaných písmeny řecké abecedy, alfa-karoten ( $\alpha$ -karoten) a  $\beta$ -karoten, které se liší v pozici dvojně vazby nacházející se na konci cyklické skupiny (jsou to izomery). Existují i další karoteny pojmenované podle dalších písmen.  $\beta$ -karoten je nejběžnější formou [44].

**Obrázek č. 5:  $\alpha$ -karoten**



Obrázek č. 6.:  $\beta$ -karoten



### 3. 4. 3 Biologické hledisko, funkce v organismu a výskyt

$\beta$ -karoten je prekurzorem vitamínu A. Je v těle přeměňován na retinol (vitamin A), který je nezbytný pro správnou funkci zraku. Přijímání nadměrného množství vitamínu A v potravě je toxické.  $\beta$ -karoten je bezpečnějším doplňkem stravy, nehrozí u něj předávkování jako u vitamínu A, protože tělo si z něho vytvoří jen potřebné množství vitamínu A. Přesto lidé, kteří přijímají nadměrné množství  $\beta$ -karotenu často trpí vedlejšími účinky. Projevuje se to žlutými skvrnami na kůži (karotenodermií) způsobenými ukládáním karotenoidů do nejsvrchnějších vrstev epidermis [51].

$\beta$ -karoten je červeno-oranžový pigment vyskytující se v rostlinách, ovoci a zelenině. Je důležitý při obraně organismu proti nádorům, infekčním chorobám (zvyšuje funkčnost našeho imunitního systému), dně a překyselení organismu. Chrání rostlinné a živočišné buňky (nejvíce sliznice a kůži) před destruktivními účinky UV záření. Jako antioxidant pomáhá deaktivovat pro naše tělo škodlivé volné radikály, nestabilní molekuly, které vznikají v důsledku „spalování“ kyslíku buňkami pro získání energie. Volné radikály mohou poškodit základní struktury buněk, mohou být jedním z faktorů přispívajících ke vzniku chronických onemocnění (nejčastěji rakovina a srdeční choroby) a urychlují proces stárnutí. Není stanovena doporučená denní dávka ani bezpečná nejvyšší dávka  $\beta$ -karotenu [11], [43], [48].

Některé výzkumy poukazují na to, že by  $\beta$ -karoten mohl snižovat riziko onemocnění rakovinou a dalšími chorobami. Pak se ale objevily dvě studie, které doložily, že  $\beta$ -karoten v potravinových doplňcích přes své nesporné kvality může způsobit také vážná poškození, především u kuřáků. Studie CARET (celý originální název zní Beta Carotene and Retinol Efficacy Trial) testovala vlivy konzumování  $\beta$ -karotenu a vitamínu A z potravinových doplňků na zdravotní stav lidí, kteří byli ve vysokém riziku onemocnění rakovinou plic – u kuřáků, lidí, kteří přestali kouřit a u lidí pracujících v azbestovém průmyslu. Studie byla pozastavena ve chvíli,

kdy se vědci přesvědčili, že ti, kdo konzumují  $\beta$ -karoten (ani nemuselo jít o velké dávky, pouze 30mg/den) mají skutečně větší úmrtnost a pravděpodobnost onemocnění rakovinou plic než ti, kdo berou placebo.

Nelze předpokládat, že  $\beta$ -karoten a další antioxidanty v potravinových doplňcích jsou prospěšné nebo dokonce neškodné. Nedoporučuje se brát  $\beta$ -karoten v kapslích, zvláště pokud byl člověk kuřák či dokonce stále kouří.  $\beta$ -karoten je obsažen v zelenině a ovoci a je prospěšný, pokud je přijímán v této potravě [48].

Pojem karoteny se používá pro mnoho látek, které mají společný sumární vzorec  $C_{40}H_{56}$  a jsou syntetizovány rostlinami, nikoliv však zvířaty. Karoten je oranžové fotosyntetické barvivo plnící důležitou funkci při fotosyntéze. Karoteny způsobují oranžovou barvu mrkve a dalšího ovoce a zeleniny (např. rajčat a ananasového melounu). Dále způsobují oranžovou barvu listů, které na podzim opadávají. Také propůjčují, pouze při malé koncentraci, žlutou barvu tuku v mléce, máslu a vaječnému žloutku.

Všežravé zvířecí druhy, které mají slabou schopnost přetvářet barevné karotenoidy na bezbarvé retinoidy, mají žlutý podkožní tuk, a to v důsledku uchování karotenoidů. Typické žluté zbarvení tuku lidí je také výsledkem skladování karotenů přijímaných z potravy [44].

### **3. 4. 4 Potravinové zdroje karotenů**

- Mrkev
- Ananasový meloun
- Meruňky
- Špenát
- Mango
- Papája
- Kapusta
- Mangold
- Řeřicha potoční
- Tymián
- Brokolice
- Petržel

- Hlávkový salát
- Dýně
- Tykev

Absorpce z těchto potravin se zvyšuje, pokud jsou konzumovány společně s tuky, protože karoteny jsou rozpustné v tucích a pokud jsou tyto potraviny vařeny pouze pár minut a nestihne dojít k porušení buněčné stěny [45], [50].

### 3. 4. 5 Metabolismus

Metabolismus retinoidů zahrnuje všechny jejich chemické přeměny, transport po organismu a působení na buňku.

Vstřebané karotenoidy jsou oxidativně štěpeny  $\beta$ -karoten-15,15'-monooxygenasou. Vznikají dvě molekuly retinalu (aldehydu). Ve střevní sliznici je redukován retinaldehydreduktásou a NADPH na retinol, který je esterifikován. Estery retinolu jsou ze střeva transportovány v chylomikronech přes lymfatický systém do krevního oběhu. Zde se z nich stávají chylomikronremnanty, které jsou i s retinolem v nich obsaženém vychytávány játry. V játrech je vitamin A ukládán do zásoby jako ester v lipocytech (perisinusoidálních hvězdicovitých buňkách) pravděpodobně jako lipoglykoproteinový komplex.

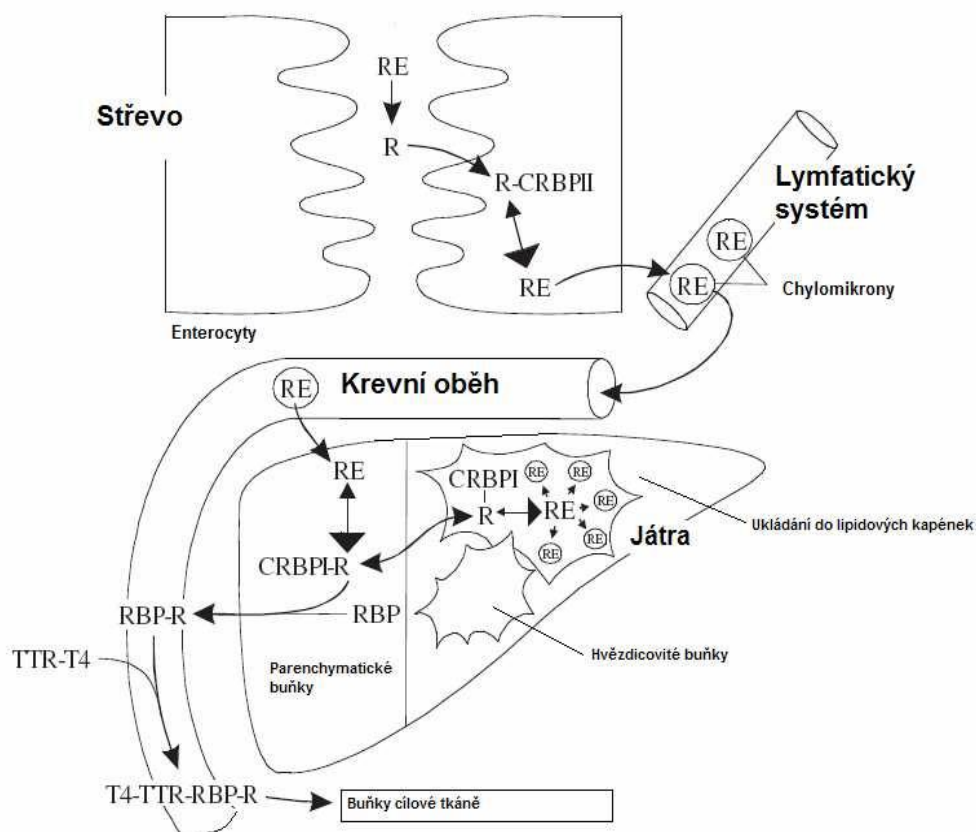
Retinol může být mobilizován a transportován z jater ve formě konjugátu s bílkovinou retinol-binding-protein (RBP). Kyselina retinová je transportována v plazmě navázaná na albumin. Mimo játra je retinol v buňkách vázán na bílkovinu přenášející retinol v buňce (CRBP).

Toxicita vitamínu A se projeví po vyčerpání kapacity vazebných bílkovin, buňky jsou vystaveny působení nenasázaného retinolu [22], [44].

Zvířecí druhy se nejvíce liší v jejich schopnosti převádět karoten na retinal. Masožravci mají obecně slabou schopnost převádět karotenoidy přijímané ze stravy a některé druhy, jako např. fretky či kočky, postrádají  $\beta$ -karoten-15,15'-monooxygenasu úplně a nedokážou převést karotenoidy na retinal vůbec (je to dáno tím, že pro tyto druhy nejsou karoteny prekurzorem vitamínu A) [44].

**Obr. č. 7: Schéma metabolických drah retinoidů [53]**

(RE = Retinyl estery, R = Retinol, RBP = Retinol-binding-protein, CRBP II = Cell-retinol-binding-protein II, CRBP I = Cell-retinol-binding-protein I, TTR-T4 = Komplex transportního proteinu transthyretinu a thyroïdního hormonu T4)



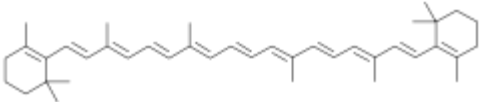
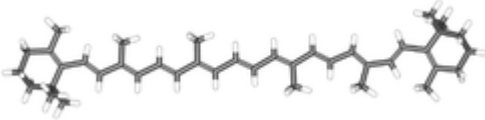
### 3. 4. 6 Chemické a fyzikální vlastnosti

Jako uhlovodíky, které neobsahují žádný kyslík, jsou karoteny rozpustné v tucích a nerozpustné ve vodě, jsou to lipofilní molekuly (v kontrastu s ostatními karotenoidy jako např. xantofyly, které jsou o něco méně hydrofobní) [11], [45].

$\beta$ -karoten je biosyntetizován z geranylgeranylpyrofosfátu [11].



**Tabulka č. 1: Charakterizace betakarotenu [11], [12]**

<b>Betakaroten</b>	
	
	
Název (IUPAC)	β,β-karoten
<b>Identifikace</b>	
CAS číslo	7235-40-7
PubChem	5280489
<b>Vlastnosti</b>	
Molekulový vzorec	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub>
Molární hmotnost	536.87 g mol <sup>-1</sup>
Rozsah barev ve volné formě	Světle žlutý až světle oranžový
Hustota	0.941 ± 0.06 g/cm <sup>3</sup>
Bod tání	180-182 °C
Rozpustnost	Nerozpustný ve studené i teplé vodě; rozpustný v diethyleteru, acetonu, benzenu, chloroformu; nepárně rozpustný v metanolu; rozpustný v tucích.
Platí pro standardní podmínky (25 °C, 100 kPa)	

### **3. 4. 8 Betakaroten při fotosyntéze**

Karoteny se při fotosyntéze podílejí na přenosu světelné energie, kterou absorbují z chlorofylu. Také chrání rostlinné tkáně, protože pomáhají absorbovat energii ze singletového kyslíku, excitované formy molekuly kyslíku, která vzniká v průběhu fotosyntézy [44].

### **3. 4. 8 Betakaroten jako přírodní pigment**

$\beta$ -karoten zodpovídá za žlutou a oranžovou barvu mnohého ovoce a zeleniny, nejvíce ho samozřejmě nalezneme v mrkvi.

Temně zelená zelenina (např. špenát nebo brokolice) je dalším zdrojem  $\beta$ -karotenu. U těchto potravin je barva karotenoidů maskována zelenou barvou chlorofylu. Podobně je tomu i u listů různých stromů, chlorofyl v nich ale na podzim podléhá rozkladu, barva stabilnějších karotenoidů se projeví výrazněji a způsobí oranžovo-žluté zbarvení listů [47].

### **3. 4. 9 Betakaroten jako umělé barvivo**

Přírodní výtažky obsahující karotenoidy, např. výtažky z mrkve nebo výtažky z červeného palmového oleje, se používají k barvení potravy již po staletí.

Syntetický  $\beta$ -karoten, sloužící k obarvení nejrůznějších potravin, začal prodávat Roche již v roce 1954. Dnes se nejčastěji používá k obarvení margarínu a másla. Jeho aktivita související s vitamínem A je v tomto případě pouze vedlejším účinkem.

Další možnosti užití zahrnují barvení zmrzliny, ovocných džusů nebo potahovaných tablet.  $\beta$ -karoten má oproti jiným barvivům (např. azobarviva) velkou výhodu a to takovou, že se běžně vyskytuje v potravě a lze ho tedy považovat za bezpečný [47].

### **3. 4. 10 Syntéza**

První syntéza  $\beta$ -karotenu byla provedena Inhoffenem Karrerem a Milesem Eugsterem v roce 1950. V současné době je známo již mnoho metod syntézy a  $\beta$ -karoten je vyráběn ve velkém průmyslově.

$\beta$ -karoten obsahuje 40 atomů uhlíku, je  $C_{40}$  karotenoidem. Existuje mnoho metod spojení dvou nebo tří menších molekul, kterými se získá požadovaná uhlíková kostra. Můžeme je klasifikovat jako symetrické a asymetrické [49].

Příklad symetrické syntézy:  $C_{16} + C_8 + C_{16} = C_{40}$

Příklad asymetrické syntézy:  $C_{25} + C_{15} = C_{40}$ .

## **3. 5 Lutein**

### **3. 5. 1 Potravinové zdroje a výskyt**

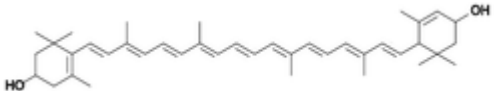
Lutein je jedním z více jak 600 známých, v přírodě se vyskytujících karotenoidů. Najdeme ho v zelenolisté zelenině, jako je špenát či kapusta, kořenové zelenině, brokolici, obilí či zeleném hrášku. Lutein se také nachází ve vaječném žloutku, zvířecím tuku a corpus luteum [13], [14].

### **3. 5. 2 Chemické a fyzikální vlastnosti**

Hlavním přírodním stereoisomerem luteinu je (3R,3'R,6'R)-beta,epsilon-caroten-3,3'-diol. Lutein se vyskytuje v rostlinách jako ester mastných kyselin, u kterého se mastná kyselina váže jednou či dvěma vazbami se dvěma hydroxy skupinami. Saponifikací luteinových esterů získáme lutein přibližně v molárním poměru 1:2. Lutein je lipofilní molekula a je obecně nerozpustný ve vodě. Působením světla nebo tepla podléhá polyenový řetězec oxidativní degradaci a je v kyselinách chemicky nestálý.

Přítomnost dlouhých chromoforů konjugovaných dvojných vazeb poskytuje výraznou vlastnost absorbce světla. Lutein absorbuje modré světlo a proto se jeví žlutě při nízké koncentraci a oranžovo-červeně při vysoké koncentraci [13].

**Tabulka č. 2: Charakterizace luteinu [13], [15]**

<b>Lutein</b>	
	
Název (IUPAC)	$\beta,\epsilon$ -karoten-3,3'-diol
Další názvy	Lutein; <i>trans</i> -lutein; 4-[18-(4-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexenyl) -3,7,12,16-tetramethyloctadeka-1,3,5,7,9,11,13,15,17-nonaenyl]-3,5,5-trimethyl-cyclohex-2-en-1-ol
<b>Identifikace</b>	
CAS číslo	127-40-2
PubChem	5368396
<b>Vlastnosti</b>	
Molekulový vzorec	$C_{40}H_{56}O_2$
Molární hmotnost	568.87 g/mol
Rozsah barev ve volné formě	Citrónově žlutý
Rozpustnost ve vodě	Nerozpustný
Rozpustnost v tucích	Rozpustný
Platí pro standardní podmínky (25 °C, 100 kPa)	

### 3. 5. 3 Lutein jako barvivo

Tento xantofyl je pro svou oranžovo-červenou barvu primárně používán jako přírodní barvivo. Lutein byl pro dosažení žlutého zabarvení brojlerů tradičně přidáván do krmiva pro tuto drůbež. Při použití luteinu jako aditiva do jídla má lutein označení E 161b a je extrahovaný z okvětních lístků měsíčku (bot. *Tagetes Erecta L.* = Aksamitník vzpřímený).

Tmavší vaječný žloutek je také výsledkem činnosti luteinu.

Lutein funguje v organismu jako antioxidant [13].

### 3. 5. 4 Role luteinu v lidském oku

Bylo zjištěno, že lutein je koncentrován v makule, malé oblasti na sítnici, která je zodpovědná za správnou funkci zraku. Lutein pomáhá chránit organismus proti oxidativnímu stresu a světlu s velkou energií. Různé výzkumné studie ukázaly, že existuje vztah mezi příjmem luteinu a zbarvením oka. Jiné studie objevily, že zintenzivnění zabarvení makuly vede ke snížení rizika onemocnění oka [13].

### 3. 5. 5 Příjem

Lutein je přirozenou součástí lidské stravy v případě, že člověk konzumuje ovoce a zeleninu. V individuálních případech je k dispozici potrava obohacená o lutein a starším lidem s nedostatečným vstřebáváním ze zažívacího traktu se nabízí možnost užívat sprej, který se vstříkuje pod jazyk. Lutein je součástí potravinových doplňků od roku 1996. Pozitivní účinky by měly být znatelné při příjmu 6 mg luteinu/den.

Jediným negativním účinkem nadměrného příjmu luteinu je zbarvování kůže do bronzova (karotenodermie).

Několik vědců z Mezinárodního očního institutu v Marylandu zjistilo, že velký příjem luteinu a zeaxanthinu snižuje riziko slepoty (hodnoty vycházejí v časopisu *Archiv očního lékařství*). Zda je tato závislost kauzální a zda lutein a zeaxanthin skutečně snižují riziko slepoty je stále zkoumáno.

Rozdíly ve funkcích volné formy luteinu a esterů luteinu nejsou zcela známy. Jako možnost se nabízí tvrzení, že biologická dostupnost esterů luteinu je nižší než jeho volné formy. Nicméně debaty na toto téma stále pokračují [13].

### **3. 5. 6 Komerční význam**

Poptávka po luteinu je rozčleněna do několika skupin a týká se následujících odvětví: farmacie, výživa, strava, krmivo pro zvířata, krmivo pro domácí zvířata a krmivo pro akvarijní rybičky.

Mimo tyto trhy se přichází na užití nových aplikací v kosmetice, péči o kůži a jako antioxidantů.

Existuje několik dodavatelů esterů luteinu, ale jen pár dodavatelů čistého luteinu, kteří si náležitě patentovali metodu získávání čistého (volné formy) luteinu z přírodních zdrojů – měsíčku (viz. výše). Společnosti jako Indus Biotech Pvt. Ltd, Zhejiang Medicine Company (ZMC), OmniActive Health Technologies and Kemin Industries vlastní tyto patenty [13].

## **3. 6 Zeaxanthin**

### **3. 6. 1 Zdroje a biologická dostupnost**

Zeaxanthin je karotenoid, který má zlatě žlutou barvu a je dominantním pigmentem ve žluté indické pšenici [16].

Lze ho najít v některých druzích zeleniny, konkrétně v listové zelenině s tmavozelenými listy, jako je např. špenát a brokolice [14]. Dále je obsažen v oranžově zbarvených potravinách: pšenici, mangu a pomerančích [20].

Lutein i zeaxanthin se hojně nacházejí též ve vaječném žloutku. Právě z tohoto zdroje byla sledována jejich biologická dostupnost v lidské stravě. Dieta založená na hovězím loji doplněná vaječným žloutkem vedla ke zvýšení obsahu luteinu v krevní plazmě o 28 % a zeaxanthinu o 142 %, dieta založená na kukuřičném oleji doplněná vaječným žloutkem zvýšila obsah plazmového luteinu o 50 % a zeaxanthinu o 114 %. Z těchto zjištění vyplývá, že biologická dostupnost karotenoidů z vaječného žloutku je velmi dobrá. Lipidová matrix vaječného žloutku je velmi účinným vehikulem pro absorpci potravního luteinu a zeaxanthinu [14].

Zeaxanthin není v lidské potravě tak častý. Meso-zeaxanthin se v lidské stravě nenachází vůbec a je získáván z luteinu. Specifický příjem makulárních karotenoidů je zprostředkován specifickými vázajícími proteiny, které je dostanou do tkáně a tam je stabilizují [21].

### 3. 6. 2 Využití

Zeaxanthin se používá jako potravní aditivum, potravinové barvivo s označením E 161h [16].

Většina karotenoidů obsažených ve žloutku jsou hydroxysloučeniny – xantofyly.

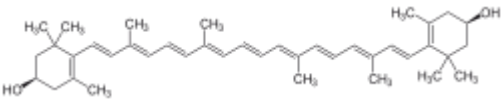
Lutein a zeaxanthin se nacházejí ve vysokém množství v pigmentovaných součástech krmiv jako je žlutá kukuřice, moučka ze sušené vojtěšky, moučka ze sušených řas či moučka z okvědí měsíčku zahradního a jsou z nich biologicky dobře dostupné. Oba karotenoidy lutein i zeaxanthin se z těchto rozličných krmivových přísad, jsou-li zkrmovány nosnicemi, účinně přenášejí do vaječného žloutku. Průmysl zpracování vajec produkuje vysoce pigmentované žloutky rutinně pro použití v pekařských výrobcích, při výrobě těstovin či majonézy. Na trhu se za tyto tmavší žloutky požadují vyšší ceny. Obecně však spotřebitelé dávají přednost spíše žloutkům světlejším. V každém případě však vejce od nosnic krmených xantofyly budou obsahovat vyšší množství karotenoidů, které se uplatní při snižování rizika stařecké degenerace oční sítnice [14].

### 3. 6. 3 Chemické a fyzikální vlastnosti

Lutein a zeaxanthin mají shodný chemický vzorec a jsou to isomery, nikoliv však stereoisomery. Hlavní rozdíl mezi nimi je v pozici dvojně vazby na jednom konci řetězců. Tato rozdílnost dává luteinu tři chirální centra, zatímco zeaxanthin má pouze dvě [16]. Díky symetrii jsou stereoisomery zeaxanthinu (3R,3'S) a (3S,3'R) identické. Nicméně zeaxanthin má pouze tři stereoisomerické formy. Isomer (3R,3'S) se nazývá meso-zeaxanthin. Hlavní přírodní formou zeaxanthinu je (3R,3'R)-zeaxanthin. Makula obsahuje hlavně (3R,3'R)- a meso-zeaxanthin, ale zároveň obsahuje i menší množství zmíněné třetí (3S,3'S) formy [17].

Lutein může být v těle převeden na zeaxanthin. Rozdílné tkáně mají různí schopnosti této přeměny. Na rozdíl od vitamínu A nejsou při nadměrných dávkách známy toxické účinky [18].

**Tabulka č. 3: Charakterizace zeaxanthinu [17], [19]**

<b>Zeaxanthin</b>	
	
Název (IUPAC)	4-[18-(4-hydroxy-2,6,6-trimetyl-1-cyclohexenyl)-3,7,12,16-tetrametyl-oktadeka-1,3,5,7,9,11,13,15,17-nonaenyl]-3,5,5-trimetyl-cyclohex-3-en-1-ol
Další názvy	$\beta,\beta$ -karoten-3,3'-diol
<b>Identifikace</b>	
CAS číslo	144-68-3
<b>Vlastnosti</b>	
Molekulový vzorec	$C_{40}H_{56}O_2$
Molární hmotnost	568.88 g/mol
Rozsah barev ve volné formě	Zlatě žlutý
Bod tání	215.5 °C, 489 K, 420 °F
Rozpustnost ve vodě	Nerozpustný
<b>Příbuzné látky</b>	
Příbuzné látky	Lutein, Xantofyl
Platí pro standardní podmínky (25 °C, 100 kPa)	



### **3. 6. 4 Role zeaxanthinu ve vztahu s onemocněním oka**

Zeaxanthin je jedním ze dvou karotenoidů vyskytujících se uvnitř sítnice oka [16]. Zeaxanthin je zde obsažen ve velmi vysoké koncentraci [20].

Uvnitř centrální makuly je dominantní látkou zeaxanthin, zatímco na sítnici převažuje lutein [16]. Studie ukázaly, že konzumace potravin bohatých na lutein a zeaxanthin, nebo potravinových doplňků těchto karotenoidů, může obnovit hustotu makulárního barviva, která klesá s věkem [21].

Zajímavým zjištěním bylo, že osoby, které konzumují hodně zeaxanthinu ze své stravy, jsou chráněny proti oběma zákalům a makulární degeneraci, dvěma nejběžnějším poruchám oka, které jsou spojeny se stárnutím. Zatímco zákal se dají poměrně snadno léčit a zrak může být obnoven, makulární degenerace může vést k úplné ztrátě zraku. [20] Jedna studie pacientů s pokročilou makulární degenerací však ukázala, že po vysokém příjmu doplňků luteinu a zeaxanthinu (4 mg a více na den) se stav pacientů dostal do „normálu“ již po několika měsících.

Studie vedená univerzitou v Harvardu ukázala, že osoba, která požívá stravu bohatou na lutein a zeaxanthin pravidelně pět dní v týdnu má osmkrát menší šanci, že se u ní objeví makulární degenerace než osoba, která konzumuje to samé jídlo pouze jednou do měsíce [21].

Karotka sice obsahuje vysoké množství  $\beta$ -karotenu, ale ten je však při ovlivňování degenerativních procesů sítnice neúčinný. Je to zajímavé zjištění, neboť v minulosti se vždy tvrdilo, že na zlepšení zraku je nejlepší mrkev [14].

# 4. Analytické možnosti stanovení luteinu, betakarotenu a zeaxanthinu metodou HPLC

Pro stanovení karotenoidů se v současnosti užívá různých modifikací separačních postupů s využitím instrumentace vysokoúčinné kapalinové chromatografie po předchozí extrakci ze vzorku. V literatuře již bylo popsáno mnoho metod, které jsou vhodné pro rutinní analýzy, a které byly i vhodně validovány. K detekci se často užívají univerzální UV detektory [23].

V této části bude pojednáno o základních informacích týkajících se HPLC. Dále zde budou uvedeny nalezené možnosti stanovení vybraných karotenoidů pomocí HPLC metody, se zaměřením na stanovení všech tří látek v jedné analýze.

## 4. 1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Kapalinová chromatografie jako separační metoda je jedna z dominantních separačních technik rutinně využívaných ve všech typech analytických laboratoří.

Hlavními výhodami HPLC jsou její schopnost separovat, identifikovat (využití standardu či vhodného detektoru) a kvantifikovat látky různého koncentračního rozmezí, polarity i těkavosti během jedné analýzy s vysokou citlivostí a možností automatizace [22].

### 4. 1. 1 Rozdělení chromatografických metod

Chromatografické metody lze dělit dle několika hledisek:

- 1. princip separace** - adsorpční
  - rozdělovací
  - iontovýměnná
  - gelová
  - afinitní
  - chirální

## 2. způsob vyvíjení - eluční

- frontální
- vytěšňovací

## 3.skupenství mobilní a stacionární fáze - kapalina-pevná látka

- plyn-kapalina
- plyn-pevná látka

## 4.technika - sloupcová (kolonová)

- papírová
- na tenké vrstvě

V adsorpční kapalinové chromatografii se dále používá rozdělení podle polarity fází.

Při chromatografii na normálních fázích je stacionární fáze silně polární (např. silikagel) a mobilní fáze je nepolární (hexan, chloroform). Polární látky jsou takto zadržovány na polárním povrchu stacionární fáze déle než látky nepolární.

Naopak chromatografie na reverzních fázích používá nepolární stacionární fázi (hydrofobní modifikace např. silikagelu jako je C18 nebo C8) a mobilní fází je polární kapalina (např. směsi vody, acetonitrilu nebo/a methanolu). V tomto uspořádání kapalinové chromatografie dochází k silné retenci nepolárních látek [22].

### 4. 1. 2 Princip HPLC

Chromatografický proces může být definován jako separační proces, při němž dochází k přenosu hmoty mezi stacionární a mobilní fází. Kapalinová chromatografie využívá k separaci složek směsi pevnou stacionární fázi (analytická kolona naplněná sorbentem) a kapalnou mobilní fází (směs rozpouštědel příslušné polarity).

Na chromatografické koloně dochází k dělení směsi na jednotlivé složky. Míra rozdělení závisí na rozsahu interakcí jednotlivých složek se stacionární fází. Stacionární fáze je definována jako nepohyblivý materiál naplněný do chromatografické kolony. Interakce analytu s mobilní a stacionární fází může být ovlivňována změnami ve složení jak mobilní fáze, tak použitím různých typů stacionárních fází.

Interakce, které se uplatňují při chromatografickém procesu:

- dipól-indukovaný dipól
- dipól-dipól
- hydrofobní interakce (van der Waalsovy síly)
- vodíková vazba
- elektrostatická interakce

Mobilní fáze je tvořena jedním nebo více rozpouštědly (jednosložková, vícesložková). Poměr a zastoupení mobilních fází můžeme během analýzy měnit podle toho, zda se jedná o eluci gradientovou či isokratickou. Gradientová eluce umožňuje zkrácení času analýzy, zlepšuje rozdělení složitějších směsí a zvyšuje citlivost analýzy [22], [24].

Stěžejním prvkem každé HPLC metody je kolona, která ovlivňuje její selektivitu a účinnost. HPLC kolony jsou konstruovány jako trubice (ocelové, skleněné, ze syntetických polymerů), které jsou naplněny mikročásticemi porézní látky, nejčastěji silikagelu.

Stacionární fáze je tvořena fixním materiálem uvnitř kolony. Pro účinné dělení je rozhodující kvalita sorbetu, jeho velikost a stejnoměrnost částic, ale i tvar, porozita a struktura [22].

#### **4. 1. 2. 1 Stacionární fáze na bázi silikagelu**

Vlastnosti silikagelu jsou předmětem studia už dlouhou dobu. Je to nejpoužívanější materiál pro přípravu stacionárních fází v kapalinové chromatografii.

Během vývoje chromatografie bylo využití normálních fází spíše potlačeno ve prospěch chromatografie na reverzních fázích, a to zejména kvůli širší využitelnosti a větší robustnosti reverzních fází.

Dnes jsou na trhu nejvíce zastoupeny stacionární fáze s postranním řetězcem C18 a C8. Technologie výroby analytických kolon se stále zlepšuje a vyvíjí, a tak jsou k dispozici sorbenty s fluorovaným alkylovým řetězcem, s fenylovou skupinou, které mají odlišnou selektivitu ve srovnání s C18 modifikovanými stacionárními fázemi. Kyano a amino modifikované stacionární fáze, které se využívají v normální chromatografii, nalézají své použití i v chromatografii reverzní [22].

#### **4. 1. 2. 2 Monolitní stacionární fáze**

Užití klasických HPLC kolon s 3 nebo 5  $\mu\text{m}$  částicemi je limitováno tlakem. Vysoký tlak může zničit kolonu i HPLC systém [22], [25]. Monolity jsou separační média, která lze přirovnat k jediné velké částici mající tvar i objem zcela zaplňující vnitřek separační kolony. Proti typickým kolonám plněným drobnými částicemi silikagelu, monolity neobsahují mezičásticové prostory, kterými se v klasických kolonách uskutečňuje valná část průtoku. Proto musí veškerá mobilní fáze protékat póry monolitu.

Kolona obsahuje dvojitou strukturu pórů, makropóry a mezopóry o velikosti 2  $\mu\text{m}$  a 13 nm. Tato dvojitá struktura pórů způsobuje, že stacionární fáze má porozitu větší než 80 %, což umožňuje provádět analýzu s mnohem menším zpětným tlakem než konvenční částicové kolony, které mají porozitu jen okolo 65 %. Průtok mobilní fáze až do 9 ml/min potom umožňuje dosažení mnohem rychlejší separace. Díky nízkým tlakovým nárokům lze několik monolitních kolon zapojit do série a zvýšit tím počet teoretických pater. Průtokový gradient umožňuje redukci reekvilibračního času kolony [22], [25], [26].

Vnitřní povrch sorbetu může být chemicky modifikován stejně jako konvenční materiály.

Objev monolitních kolon je pravděpodobně nejdůležitější inovací v historii kapalinové chromatografie. Příspěvek těchto kolon ke zlepšení efektivity a rychlosti chromatografické separace se zdá být srovnatelný s rozvojem kapilárních kolon v plynové chromatografii. Jejich používání má výrazně pozitivní vliv na fungování a ekonomiku provozu [22], [27].

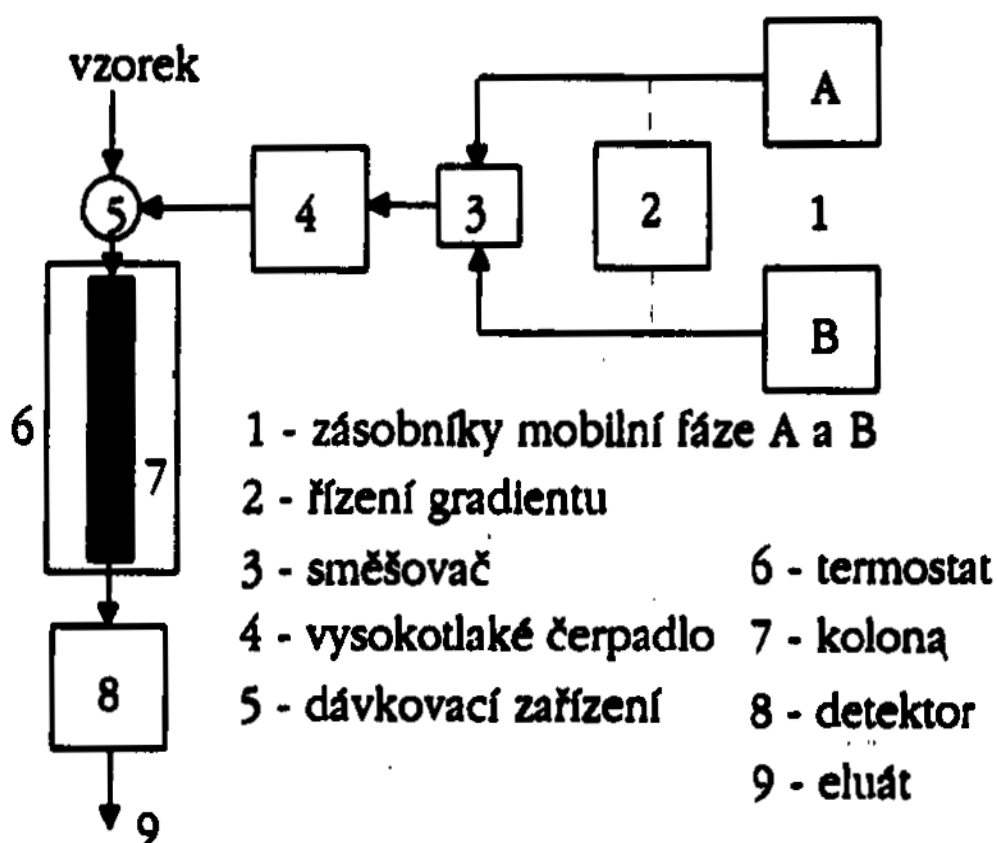
#### **4. 1. 2. 3 Další druhy stacionárních fází**

Dalšími druhy stacionárních fází je např. stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého, stacionární fáze na bázi oxidu hlinitého a titaničitého, stacionární fáze na bázi porézního grafitického karbonu [22].

### 4. 1. 3 Instrumentace HPLC

HPLC sestava pro chromatografickou analýzu se obecně skládá z rezervoáru mobilní fáze, odplyňovacího zařízení, injektoru, chromatografické kolony (popř. předkolony), detektoru a procesoru pro vyhodnocení dat [22].

Obrázek č. 8: Schéma kapalinového chromatografu [28]



### 4. 1. 4 Charakteristiky HPLC procesu

Při běžné chromatografii protéká mobilní fáze stálou rychlostí. Od vnesení určité látky na kolonu do okamžiku, kdy kolonu opustí a projeví se signálem detektoru, uplyne určitý čas závislý na sorbovatelnosti látky v daném chromatografickém systému a tedy na jejím druhu (kvalitě). Protože tento čas charakterizuje retenci, zadržování látky v koloně (a tím současně i snadnost její eluce z kolony), označuje se jako retenční nebo eluční čas  $t_R$ . K eluci látky je zapotřebí, aby kolonou protekl určitý objem mobilní fáze. Také ten může látku charakterizovat jako tzv. retenční nebo eluční objem  $V_R$ . Proto lze

eluci popisovat zcela rovnocenně jako časovou nebo objemovou závislost. Pokud detektorem protéká čistá mobilní fáze (eluent), registruje zapisovač základní linii rovnoběžnou s osou x. Průchod zóny eluované látky detektorem vyvolá narůst a opětný pokles signálu detektoru a tomu odpovídající maximum na chromatogramu, označované jako „pík“.

Pokud by látka nebyla vůbec sorbovaná na stacionární fázi a postupovala kolonou stejně rychle jako sama mobilní fáze, potom se její retenční čas označuje jako „mrtvý čas“  $t_M$ . Poměr mrtvého retenčního času a retenčního času látky A se označuje jako retenční faktor R (může mít hodnotu 0 až 1):  $t_M / t_R = R$ .

Pro chromatografickou separaci je účelné, aby R nevybočovalo z rozsahu asi 0,2 až 0,8.

Průběh píku představuje koncentrační profil zóny. Proto je plocha vymezená píkem nad základní linií („plocha píku“) úměrná množství látky v zóně a je základním údajem pro kvantitativní analýzu. Měření plochy píku na chromatogramu se provádí jako součin jeho výšky a šířky v poloviční výšce. U ostrých úzkých píků je měření šířky nepřesné. Proto se jejich plocha nahrazuje snadno změřitelnou výškou.

Na základě zjištěných ploch píků se obsah látky ve vzorku určuje vždy relativně, tedy s použitím standardu.

Při metodě vnějšího standardu je nezbytné dávkovat do kolony přesně definované množství vzorku. Plocha píku látky ve vzorku se srovnává s plochou píku standardu analyzovaného za zcela stejných podmínek. Pro sériová stanovení je účelné i pořízení kalibrační závislosti s použitím několika standardů. Výhodou metody je, že vzorek i standard jsou jedna a táž látka, nevýhodou je nezbytnost přesného dávkování, které může být dokonce hlavním zdrojem chyb.

Mezi hlavní výhody metody vnitřního standardu patří eliminace možné chyby při přípravě vzorku a jeho dávkování na kolonu. Jedná se o látku mající podobné fyzikální a chemické vlastnosti jako analyt, která se eluuje v jiném místě než analyty. Pokud je analyzován biologický materiál, neměl by se vnitřní standard před jeho přidáním v materiálu vyskytovat. Koncentrace vnitřního standardu by se měla pohybovat ve stejném rozmezí jako analyt [22], [29].

## **4. 2 Možnosti stanovení vybraných karotenoidů HPLC metodou**

V této kapitole budou rozepsány a komentovány různé metody stanovení vybraných karotenoidů v potravinách, popř. i v jiných materiálech. Kapitola nemá za cíl podat kompletní a vyčerpávající přehled možností stanovení vybraných karotenoidů různými metodami a technikami, ale pouze nastínit jaké možnosti současná analytická praxe nabízí.

### **4. 2. 1 HPLC metoda s kolonou Pinnacle II-C18 a s UV–Vis PDA detekcí (stanovení v meruňkách)**

V. Dragovic-Uzelac vyvinul tuto metodu pro stanovení polyfenolů a karotenoidů (kromě  $\alpha$ -karotenu a  $\gamma$ -karotenu byl stanoven i lutein, zeaxantin a  $\beta$ -karoten) v meruňkách.

Byla použita předkolona Pinnacle II-C18 (10 x 4,6 mm) a kolona Pinnacle II-C18 (250 x 4,6 mm, ID 5  $\mu$ m). Jako mobilní fáze byla použita směs rozpouštědel acetonitril (ACN)/methanol/1,2-dichlormethan v poměru 60:35:5, byl přidán také 0,1 % butylhydroxytoluen (BHT). Dávkovaný objem byl 20  $\mu$ l, průtok byl nastaven na 1 ml/min. Uplatnil se zde isokratický typ eluce. K detekci byl použit DAD detektor, látky byly detekovány při 450 nm [30].

### **4. 2. 2 HPLC metoda s C30 stacionární fází a s UV detekcí (stanovení v mangu)**

Tato HPLC metoda byla vyvinuta pro stanovení různých karotenoidů v tchajwanském mangu.

Nejprve byla odstraněna slupka spolu se semeny, dužnina byla nakrájena na malé kousky, usušena, rozdrobena na prášek, extrahována a podrobena HPLC analýze.

HPLC systém byl vybaven C30 stacionární fází. Byly použity dvě mobilní fáze – methanol/isopropanol v poměru 99:1 (A) a 100 % methylenchlorid (B) – s následnou gradientovou elucí: 100% A (0% B) na začátku analýzy po dobu 15 min, po této době došlo do 45. min ke snížení A na 70 % (30 % B), tento stav byl opět udržován po dobu



15 min a poté bylo znovu navýšeno na 100 % A (0 % B) a to do 65. min. Dávkovaný objem byl 20  $\mu$ l. Pro kvantifikování všech karotenoidů byl jako vnitřní standard použit  $\alpha$ -karoten. Během 53 minut bylo stanoveno 25 karotenoidů (lutein, zeaxantin,  $\beta$ -karoten, all-trans  $\alpha$ -karoten, violaxanthin, neoxanthin, neochrom, luteoxanthin, cis-neoxanthin, cis-violaxanthin a další) s použitím C30 kolony, s průtokem 1 ml/min a s detekcí při 450 nm.

All-trans- $\beta$ -karoten byl stanoven v největším množství, následovaly cis isomery  $\beta$ -karotenu, violaxanthin a jeho cis isomery, neochrom, luteoxanthin, neoxanthin a jeho cis isomery, zeaxanthin a 9- nebo 9'-cis-lutein [31].

#### **4. 2. 3 HPLC metoda s Bischoff C30 kolonou a s UV detekcí (stanovení v řasách, celeru a slézi)**

HPLC systém vybavený Bischoff C30 kolonou (3,0  $\mu$ m, 3,0 x 150 mm) a mobilní fází methanol/methyl-tert-butyl ether (MTBE)/voda byly použity k separaci luteinu, zeaxanthinu,  $\beta$ -karotenu a dalších látek vyskytujících se v rostlinách jako jsou řasy chlorella, spirulina a celer a sléz.

Prášek z řas (chlorella, spirulina) byl extrahován LLE následovně: 100 mg bylo smícháno s 10 ml methanolu a tato směs byla inkubována po dobu 3 hodin při 22 °C, poté byla extrahována s 10 ml tetrahydrofuranu (THF) celkem čtyřikrát. Výsledný objem vyextrahovaného vzorku s přidaným THF vzrostl na 50 ml. 1 ml extraktu ze spiruliny bylo smícháno se stejným množstvím extraktu z chlorelly a dále byl tento extrakt vypařován pod atmosférou dusíku při 50 °C. Následně byl zbytek rozpuštěn v 1 ml ethanolu.

Stejný postup zmíněný výše by se opakoval s 1 g čerstvého celeru či sléze.

Pro optimální separaci byly použity dvě mobilní fáze. Mobilní fáze A obsahovala směs rozpouštědel methanol/MTBE/voda v poměru 60:33:7 (byl přidán 1,5 % amonium acetát (NH<sub>4</sub>Ac)), mobilní fáze B obsahovala tu samou směs rozpouštědel v poměru 8:90:2 (byl přidán 1 % NH<sub>4</sub>Ac). Bylo využito gradientové eluce, která probíhala následovně: průtok 100 % mobilní fáze A po dobu 3 min, poté 15 min lineární gradient na 80 % A (20 % B), následoval 17 min lineární gradient na 55 % mobilní fáze B (45 % A), dále 15 min lineární gradient na 95 % B (5 % A) a nakonec 2 min gradient

zpět na 100 % A. Průtok byl 0,4 ml/min a dávkovaný objem 20 µl. Karotenoidy byly detekovány při 445 nm.

Pro další identifikaci, byly tyto látky charakterizovány LC-MS s APCI [32].

#### **4. 2. 4 Stanovení karotenoidů HPLC metodou v *Chlorella pyrenoidosa* s C30 stacionární fází a s UV detekcí**

Metoda byla vytvořena B. S. Inbarajem pro kvantitativní analýzu velkého počtu karotenoidů v řase *Chlorella pyrenoidosa*. Tato řasa je důležitým komerčním zdrojem karotenoidů po celém světě.

Prášek z řasy byl extrahován, saponifikován a podroben HPLC analýze.

HPLC systém byl vybaven C30 stacionární fází. Byly použity dvě mobilní fáze – mobilní fáze A methanol/ACN/voda v poměru 84:14:2 a mobilní fáze B 100 % methylenchlorid. Byl vyvinut následující eluční gradient: na začátku byl udržován po dobu 14 min průtok 100 % A (0 % B), do 25. min pokles na 95 % A (5 % B), do 30. min pokles na 75 % A (25 % B), do 35. min pokles na 74 % A (26 % B), do 50. min pokles na 45 % A (55 % B) a nakonec zpět na průtok 100 % A do 55. min.

Celkem bylo během 49 minut stanoveno 32 karotenoidů (auroxanthin, violaxanthin, neochrom, neoxanthin, lutein, β-karoten, α-karoten, β-cryptoxanthin a jejich různé izomery) s použitím C30 kolony, s průtokem 1 ml/min. Dávkovaný objem byl 20 µl. Karotenoidy byly detekovány při 450 nm. Ke stanovení všech karotenoidů byl použit jako vnitřní standard β-apo-8'-karotenal.

All-trans-lutein byl přítomen v největším množství, ve velkém množství, následovaly cis izomery luteinu, all-trans-α-karoten, zeaxanthin, cis izomery β-karotenu, all-trans-β-karoten a další [33].

#### **4. 2. 5 HPLC metoda s Lichrospher RP C18 stacionární fází a s použitím UV-Vis detekce (stanovení v mrkvi)**

H. M. Pinheiro San't Ana vyvinula tuto metodu pro sledování vlivů různých způsobů přípravy potravy na stabilitu  $\alpha$ -karotenu,  $\beta$ -karotenu a ostatních karotenoidů v mrkvi.

Kvantifikace byla provedena s použitím Lichrospher Merck RP C18 (25 cm x 4 mm, 5  $\mu$ m) stacionární fází. Jako mobilní fáze byla použita směs rozpouštědel methanol/ACN/ethylacetát v poměru 80:10:10. Dávkovaný objem nebyl uveden, průtok byl nastaven na 2 ml/min. Uplatnil se zde isokratický typ eluce. Karotenoidy byly kvantifikovány spektrofotometricky při 449 nm pomocí UV-Vis detektoru [34].

#### **4. 2. 6 HPLC metoda s Inertsil ODS-3 RP stacionární fází a s UV detekcí (stanovení v sojových bobech)**

Metoda byla vyvinuta K. Kanamaruem pro stanovení karotenoidů (luteinu,  $\beta$ -karotenu, chlorofylu A a chlorofylu B) v sojových bobech.

Přibližně 10 mg sojových bobů bylo nařezáno na malé kousky a vzorek byl smíchán s 0,4 ml směsi aceton/ethanol (v poměru 1:1). Byla provedena extrakce karotenoidů.

Jako stacionární fáze pro HPLC analýzu byla použita Inertsil ODS-3 RP kolona (4,6 x 250 mm), která byla temperována na 40 °C. Byl aplikován lineární gradientový systém s použitím dvou mobilních fází, mobilní fáze ACN (A) a mobilní fáze 75 % methanolu (B): na začátku analýzy byl udržován průtok 25 % A (75 % B), poté došlo do 22. min ke zvýšení na 100 % A. Od 22. min do 23. min následovalo postupné snížení na 25 % A (75 % B), tento stav 25 % A byl udržován po dobu 2 min. Dávkovaný objem byl 20  $\mu$ l, průtok byl nastaven na 1 ml/min. Byl použit vnitřní standard  $\beta$ -apo-8'-karotenal. K detekci byl použit UV-Vis detektor, karotenoidy byly detekovány při 447 nm [35].

#### **4. 2. 7 HPLC metoda s C18 RP stacionární fází a detekcí pomocí DAD detektoru (stanovení v papáje)**

Metoda byla vytvořena pro kvantitativní analýzu mnoha karotenoidů (mezi nimi luteinu, zeaxanthinu a  $\beta$ -karotenu) v papáje. Byl použit systém HPLC s reverzní fází a gradientovou elucí.

Ke 30 g nakrájeného ovoce byl přidán uhličitan hořečnatý ( $\text{MgCO}_3$ ), sulfid sodný ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) a 100 ml THF a vzorek byl homogenizován. Aby se zabránilo degradaci analytů a cis-trans přechodům, extrakce byla provedena za 0 °C, za úplného temna a pod atmosférou dusíku. Vzorky byly rozděleny a zakoncentrovány v LLE systému mezi dichlormethan a vodný roztok NaCl do organické vrstvy. Látky rozpuštěné ve vodě byly spolu s vrstvou vodné fáze odstraněny a vrstva organického rozpouštědla byla odpařena. Zbytek byl rozpuštěn v 0,3 ml dichlormethanu. Tento vzorek byl poté dávkován do HPLC systému.

K separaci byla použita série dvou Hypersil ODS RP C18 kolon (10 cm x 4,6 mm, velikost částic 5  $\mu\text{m}$ ). Bylo využito gradientové eluce. Byly použity dvě mobilní fáze – směs rozpouštědel methanol/voda v poměru 75:25 (eluent A) a ethylacetát (eluent B) – s následnou gradientovou elucí: od začátku analýzy do 10. min byl udržován průtok 75 % B (25 % A), do 20. min následoval nárůst na 100 % B. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml/min. Do systému bylo dávkováno 5  $\mu\text{l}$  vzorku. Karotenoidy byly detekovány při 450 nm s použitím DAD detektoru [36].

#### **4. 2. 8 HPLC metoda s použitím Nucleosil C18 kolony a s PDA detekcí (stanovení v tykvi)**

Metoda byla vyvinuta pro stanovení karotenoidů v tykvi. Bylo identifikováno celkem deset karotenoidů. Dva majoritní – lutein a  $\beta$ -karoten a osm minoritních – neoxanthin, violaxanthin, zeaxanthin,  $\alpha$ -karoten a další.

Ovoce bylo nakrájeno na malé kousky. 5 – 10 g vzorky byly extrahovány s použitím 50 ml methanolu, 0,1 g hydroxytoluenu s přídavkem 1 g uhličitanu vápenatého ( $\text{CaCO}_3$ ), který byl přidán, aby se zabránilo oxidaci a izomeraci v průběhu extrakčního procesu. Výsledná směs byla filtrována pod vakuem a pevný materiál byl třikrát reextrahován s 50 ml acetonu. Výsledný extrakt byl desetkrát promyt destilovanou vodou, zakoncentrován a rozpuštěn v 25 ml diethyléteru. Dále následovala

saponifikace. Bylo použito 25 ml roztoku 30 % hydroxidu draselného (KOH) v methanolu. Frakce nepodléhající saponifikaci byla následně extrahována s diethyléterem a promyta destilovanou vodou. Vodná vrstva byla reextrahována s malým množstvím diethyléteru. Organická vrstva byla také několikrát promyta destilovanou vodou a vypařena do sucha pod sníženým tlakem. Zbytek byl rozpuštěn v petroléteru a podroben LLE mezi hexanem a směsí vody s methanolem v poměru 85:15. Nakonec byly vrstvy odděleny, organická vrstva vysušena do sucha a zbytek rozpuštěn v 5 ml ethylacetátu. 20 µl množství bylo poté dávkováno do HPLC systému.

Separace byla provedena s použitím Nucleosil C18 kolony (250 x 4,6 mm, velikost částic 5 µm). Byly použity dvě mobilní fáze - směs rozpouštědel ACN/voda v poměru 90:10, eluent A a ethylacetát, eluent B. Karotenoidy byly separovány při pokojové teplotě, při průtoku 1 ml/min a za podmínek gradientové eluce: počáteční podmínky byly 90 % A (10 % B), poté do 20. min 30 % A (70 % B), nakonec do 40. min 90 % A (10 % B). Všechny karotenoidy byly stanoveny spektrofotometricky. Separace byly monitorovány při 450 nm [37].

#### **4. 2. 9 HPLC metoda s Ultrasphere ODS kolonou a detekcí pomocí DAD detektoru (stanovení v rajčatech)**

Metoda byla vyvinuta pro stanovení obsahu luteinu a β-karotenu v rajčatech. Metoda byla použita k porovnání množství karotenoidů obsažených v rajčatech čerstvých a vařených třemi různými způsoby. Bylo zjištěno, že koncentrace karotenoidů v rajčatech čerstvých byla vyšší než v rajčatech vařených.

Surový nebo zpracovaný materiál byl rozmělněn a smíchán s 0,1 g CaCO<sub>3</sub>, 2 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,2 g písku. Poté proběhla extrakce ve 120 ml směsi petroléter/acetone (poměr 1:1). Extrakt byl vysušen do sucha na vodní lázni. Zbytek byl rozpuštěn ve 2 ml THF a tento roztok byl dávkován do chromatografického systému.

Separace byly provedeny při 30 °C s použitím Ultrasphere ODS (240 x 4,6 mm, velikost částic 5 µm) kolony při průtoku 1 ml/min s 60 minutovým lineárním gradientem. Byly použity dvě mobilní fáze – voda (A) a směs rozpouštědel ACN/THF (B) v poměru 85:15. Gradientová eluce začala s 25 % A (75 % B). Eluáty byly monitorovány při 355 nm pomocí DAD detektoru. Dávkovaný objem byl 40 µl [38].

#### 4. 2. 10 HPLC metoda s Microsorb C18 kolonou a PDA detekcí

Tato metoda byla vytvořena pro stanovení karotenoidů v běžném ovoci a zelenině. F. Khackik zjišťoval distribuci karotenoidů v běžně konzumovaném ovoci a zelenině a vyvinul HPLC podmínky, které umožňují separaci a kvantifikaci různých karotenoidů v tomto druhu potravin. Tyto potraviny obsahují různé koncentrace různých karotenoidů. V tabulce č. 4, 5 a 6 je uveden přehled potravin, ve kterých je obsažen lutein,  $\beta$ -karoten a zeaxanthin.

HPLC separace byla provedena na Microsorb RP C18 koloně (25 x 4,6 mm, velikost částic 5  $\mu$ m). Isokratická směs methanol (10 %), ACN (85 %) a dichlormethan/hexan (v poměru 1:1) (5 %) byla následována elucí lineární gradientovou, která začala v 10. min a byla ukončena ve 40. min. Konečné složení gradientové směsi v čase 40. min bylo methanol (10 %), ACN (45 %) a dichlormethan/hexan (v poměru 1:1) (45 %). Průtok byl nastaven na 0,7 ml/min. Jednotlivé karotenoidy byly identifikovány pomocí jejich UV-Vis a hmotnostních spekter a porovnáním jejich HPLC retenčních časů, UV-Vis absorpčních spekter s karotenoidy syntetickými. Karotenoidy byly stanoveny PDA detekcí [39].

Tabulka č. 4: Distribuce karotenoidů v zeleném ovoci a zelenině [39]

Ovoce nebo zelenina	Karotenoid
Fazole	Betakaroten, Lutein
Brokolice	Betakaroten, Lutein
Kapusta	Betakaroten, Lutein
Hlávkové zelí	Betakaroten, Lutein
Čínské zelí	Betakaroten, Lutein
Kiwi	Betakaroten, Lutein
Špenát	Betakaroten, Lutein
Hrášek	Betakaroten, Lutein

**Tabulka č. 5: Distribuce karotenoidů ve žlutém/červeném ovoci a zelenině obsahující hlavně uhlovodíkové karotenoidy [39]**

Ovoce nebo zelenina	Karotenoid
Meruňka	Betakaroten
Ananasový meloun	Betakaroten
Mrkev	Betakaroten
Grep	Betakaroten
Tykev	Betakaroten
Rajčata	Betakaroten

**Tabulka č. 6: Distribuce karotenoidů ve žlutém/oranžovém ovoci a zelenině obsahující hlavně acyl estery karotenolu [39]**

Ovoce nebo zelenina	Karotenoid
Mango	Betakaroten
Papája	Betakaroten
Broskev	Betakaroten, Zeaxanthin
Švestka	Betakaroten, Lutein
Pomeranč	Betakaroten, Lutein

#### **4. 2. 11 HPLC metoda s RP C18 stacionární fází a s UV-Vis detekcí (stanovení v séru či plazmě)**

Tato metoda byla vyvinuta pro měření karotenoidů a tokoferolů v lidském séru nebo plazmě.

K separaci byla použita kolona Suplex C18 (25 cm x 4,6 mm, velikost částic 5 µm). HPLC analýza probíhala za pokojové teploty. Byly použity dvě mobilní fáze – směs rozpouštědel methanol/ACN/2-propanol (A) v poměru 54:44:2 a methanol/ACN/voda/2-propanol (B) v poměru 46:37:15:2 – s následnou lineární gradientovou elucí: od začátku do 5. min 64 % A (36 % B), od 5. min do 27. min

100 % A, nakonec od 27. min do 32. min 64 % A (36 % B). Karotenoidy byly kvantifikovány pomocí UV-Vis detekce při 450 nm.

Stanovení lipofilních antioxidantů v lidském séru podává informaci o antioxidativním stavu jedince a může být použito i pro hodnocení nutričního stavu a výše rizika degenerativních onemocnění. Individuální antioxidantní charakteristiky mohou také pomoci identifikovat jejich nedostatky a díky tomu se může zahájit suplementární dieta jako prevence.

Charakteristiky lipofilních antioxidantů v plazmě získané od zdravých jedinců jsou mezi jednotlivými studii obvykle srovnatelné a umožňují vymezení koncentračního rozmezí, ve kterém mohou být hladiny karotenoidů a tokoferolů v plazmě shledány „normálními“. Toto rozmezí je uvedeno v tabulce č. 7 [40].

**Tabulka č. 7: Lipofilní antioxidanty v lidské plazmě [40]**

<b>Antioxidant</b>	<b>Plasmatická koncentrace (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>
$\alpha$ -Tokoferol	15-40
$\gamma$ -Tokoferol	3-5
$\alpha$ -Karoten	0,05-0,1
$\beta$ -Karoten	0,3-0,6
Lykopen	0,5-1
Lutein	0,1-0,3
Zeaxanthin	0,1-0,2

#### **4. 2. 12 HPLC metody s použitím C18 a C30 stacionárních fází a UV-Vis detektoru (stanovení v lidském séru)**

Tyto metody byly vyvinuty K. E. Sharplessovou pro srovnání výsledků měření provedených na různých C18 nebo C30 stacionárních fázích. C30 stacionární fáze byla specificky navržena pro separaci karotenoidů a měření používající tuto kolonu byla porovnána s těmi, které běžně používají kolonu C18.

Analyty byly extrahovány ze séra do hexanu.



Přidáním  $\text{NH}_4\text{Ac}$  a triethylaminu (TEA) do mobilních fází se zlepšila výtěžnost karotenoidů při HPLC analýze.

Při měření na C18 koloně se využilo gradientu rozpouštědel ACN, methanol a ethylacetát. Při měření na C30 koloně se využilo gradientu směsi voda, methanol a MTBE.

Metoda používající C18 kolonu (4,6 mm x 25 cm, velikost částic 5  $\mu\text{m}$ ) využila dvou lineárních gradientů a isokratických složek. Eluent A byl ACN, eluent B methanol smíchaný s 0,05 %  $\text{NH}_4\text{Ac}$  a eluent C ethylacetát. Každý eluent obsahoval 0,05 % TEA. První gradient začal s 98 % A, 2 % B, poté do 10. min pokračoval s 75 % A, 18 % B a 7 % C. Druhý lineární gradient se změnil z tohoto složení na 68 % A, 25 % B a 7 % C během 5 min. Tento stav byl udržován po dobu 10 min a poté během 5 min došlo k navrácení k původním poměrům 98 % A, 2 % B.

U metody s C30 kolonou byla jako mobilní fáze A použita směs voda/methanol v poměru 8:92, ke které byl přidán 0,05 %  $\text{NH}_4\text{Ac}$  a 0,05 % TEA. Jako mobilní fáze B byl použit MTBE. Metoda opět využila dvou lineárních gradientů: gradient začal s 83 % A, 17 % B a poté během 27 min došlo ke změně na 59 % A, 41 % B. Druhý lineární gradient se změnil z tohoto složení na 30 % A, 70 % B během 5 min. Tento stav byl udržován po dobu 4 min, poté se systém během 5 min navrátil k původním poměrům 83 % A, 17 % B.

Pro měření absorpance karotenoidů při 450 nm byl použit UV-Vis detektor.

Byly použity tři kalibrační standardy obsahující nízkou, střední a vysokou koncentraci luteinu a zeaxanthinu,  $\beta$ -cryptoxanthinu, trans- $\alpha$ - a trans- $\beta$ -karotenu připravené v ethanolu obsahujícím 30  $\mu\text{l/ml}$  BHT (působil jako antioxidant). Jako vnitřní standard byl přidán trans- $\beta$ -apo-10'-karotenal [41].

## 5. Závěr

V práci je pojednáno o základních charakteristikách, funkcích a zdrojích luteinu,  $\beta$ -karotenu a zeaxanthinu. Tyto informace jsou zařazeny v první části práce.

Druhá část práce je zaměřena na stanovení luteinu,  $\beta$ -karotenu a zeaxanthinu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) v nejrůznějších potravinách. Všechny tři látky jsou obsaženy v listové zelenině (např. špenátu či brokolici), ovoci (např. meruňkách a mangu), ve vaječném žloutku a některých druzích řas (např. chlorella či spirulina).

V současné době se pro stanovení karotenoidů využívá různých modifikací separačních postupů s využitím instrumentace vysokoúčinné kapalinové chromatografie po předchozí extrakci ze vzorku. Bylo již popsáno a validováno mnoho metod, které jsou vhodné pro rutinní analýzy.

HPLC metoda vyniká svou jednoduchostí a citlivostí. Lze jí snadno stanovit vybrané karotenoidy i v přítomnosti řady dalších látek (nedochází k interferenci). Z těchto důvodů se tyto metody uplatnily jak ve zdravotnickém, tak potravinářském průmyslu, ale i v řadě jiných odvětví.

Protože karotenoidy jsou látky lipofilní povahy, k jejich stanovení byl nejčastěji používán HPLC systém s RP C18 nebo C30 stacionární fází. Při analýzách se nejčastěji využíval gradientový typ eluce. Gradientová eluce umožňuje zkrácení času analýzy, zlepšuje rozdělení složitějších směsí a zvyšuje citlivost analýzy. Vybrané karotenoidy byly ve všech případech detekovány spektrofotometricky pomocí UV-Vis detektoru v rozmezí vlnových délek 355-450 nm. Největší uplatnění získal DAD detektor. V některých případech byly pro další charakterizaci látek zařazeny hyphenální (tandemové) detekční techniky (např. LC-MS s APCI).

Informace pro druhou část práce byly čerpány z literatury publikované v letech 1996-2007 v různých chemických časopisech.

Ve své práci jsem se chtěla zmínit i o farmakokinetických a farmakodynamických vlastnostech vybraných karotenoidů a proto jsem kontaktovala firmu Walmark vyrábějící parafarmaka a Státní zdravotní ústav (SZÚ) a to z toho důvodu, že karotenoidy nejsou součástí registrovaných léčivých přípravků a vzhledem k tomu jaké jsou podmínky schvalování a uvedení na trh ani nebudou existovat tyto validované

údaje. Domnívala jsem se, že firma Walmark bude mít nějaké bližší údaje (přinejmenším srovnávací studie) a že by mi je mohla případně poskytnout. SZÚ jsem kontaktovala protože parafarmaka schvaluje. Bohužel ani jedna instituce mi informace neposkytla. Firma Walmark s omluvou, že mi požadované informace nemůže poskytnout, jelikož látky, na které se ve své práci zaměřuji nakupují od dodavatelů v potřebné podobě pro výrobu tablet jejich potravinových doplňků. Tyto informace jsem tudíž nezískala.

## 6. Seznam použité literatury

- [1] <https://www.ordinace.cz/clanek/synteticka-barviva-v-potravinach/?increase=0>  
[cit. 2009-2-12].
- [2] [http://en.wikipedia.org/wiki/Biological\\_pigment](http://en.wikipedia.org/wiki/Biological_pigment) [cit. 2009-2-12].
- [3] <http://dietarysupplements.nlm.nih.gov/dietary/ingredDetail.jsp?contain=Carotenoids&id=1048> [cit. 2009-2-12].
- [4] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Terpen> [cit. 2009-2-12].
- [5] <http://www.gvi.cz/files/chemie/terpeny.pdf> [cit. 2009-2-12].
- [6] [http://cs.wikibooks.org/wiki/P%C5%99%C3%ADrodn%C3%AD\\_1%C3%A1tky/Chemie\\_p%C5%99%C3%ADrodn%C3%ADch\\_1%C3%A1tek/P%C5%99ehled\\_p%C5%99%C3%ADrodn%C3%ADch\\_1%C3%A1tek/Isoprenoidy](http://cs.wikibooks.org/wiki/P%C5%99%C3%ADrodn%C3%AD_1%C3%A1tky/Chemie_p%C5%99%C3%ADrodn%C3%ADch_1%C3%A1tek/P%C5%99ehled_p%C5%99%C3%ADrodn%C3%ADch_1%C3%A1tek/Isoprenoidy) [cit. 2009-2-13].
- [7] <http://209.85.129.132/search?q=cache:mLqaGej5C1UJ:biochemie.upol.cz/stranky/vyuka/bch/O-Modul-0403112008.ppt+geranylgeranyldifosf%C3%A1t&cd=5&hl=cs&ct=clnk&gl=cz&client=firefox-a> [cit. 2009-2-13].
- [8] [https://www.stag.utb.cz/apps/stag/dipfile/index.php?download\\_this\\_unauthorized=8078](https://www.stag.utb.cz/apps/stag/dipfile/index.php?download_this_unauthorized=8078) [cit. 2009-2-13].
- [9] <http://www.mfgouldianfinches.com/Breeding/Genetics.html> [cit. 2009-2-14].
- [10] <http://en.wikipedia.org/wiki/Carotenoid> [cit. 2009-2-13].
- [11] <http://en.wikipedia.org/wiki/Betacarotene> [cit. 2009-2-15].

- [12][http://209.85.129.132/search?q=cache:5t64ly3jg2UJ:old.mendelu.cz/~agro/af/222/pages/vyuka/vyziva/otazky\\_vypr/25\\_pigmenty\\_nesvadbova\\_d.doc+Mendelova+zem%C4%9Bd%C4%9Blsk%C3%A1+a+lesnick%C3%A1+univerzita+v+Brn%C4%9B+POU%C5%BDIT%C3%8D+PIGMENTA%C4%8CN%C3%8DCH+L%C3%81TEK&cd=1&hl=cs&ct=clnk&gl=cz&client=firefox-a](http://209.85.129.132/search?q=cache:5t64ly3jg2UJ:old.mendelu.cz/~agro/af/222/pages/vyuka/vyziva/otazky_vypr/25_pigmenty_nesvadbova_d.doc+Mendelova+zem%C4%9Bd%C4%9Blsk%C3%A1+a+lesnick%C3%A1+univerzita+v+Brn%C4%9B+POU%C5%BDIT%C3%8D+PIGMENTA%C4%8CN%C3%8DCH+L%C3%81TEK&cd=1&hl=cs&ct=clnk&gl=cz&client=firefox-a) [cit. 2009-2-16].
- [13]<http://en.wikipedia.org/wiki/Lutein> [cit. 2009-3-7].
- [14]<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=13&typ=1&val=484&ids=0>  
[cit. 2009-3-19].
- [15][http://209.85.129.132/search?q=cache:5t64ly3jg2UJ:old.mendelu.cz/~agro/af/222/pages/vyuka/vyziva/otazky\\_vypr/25\\_pigmenty\\_nesvadbova\\_d.doc+Mendelova+zem%C4%9Bd%C4%9Blsk%C3%A1+a+lesnick%C3%A1+univerzita+v+Brn%C4%9B+POU%C5%BDIT%C3%8D+PIGMENTA%C4%8CN%C3%8DCH+L%C3%81TEK&cd=1&hl=cs&ct=clnk&gl=cz&client=firefox-a](http://209.85.129.132/search?q=cache:5t64ly3jg2UJ:old.mendelu.cz/~agro/af/222/pages/vyuka/vyziva/otazky_vypr/25_pigmenty_nesvadbova_d.doc+Mendelova+zem%C4%9Bd%C4%9Blsk%C3%A1+a+lesnick%C3%A1+univerzita+v+Brn%C4%9B+POU%C5%BDIT%C3%8D+PIGMENTA%C4%8CN%C3%8DCH+L%C3%81TEK&cd=1&hl=cs&ct=clnk&gl=cz&client=firefox-a) [cit. 2009-3-9].
- [16]<http://doryoku.org/site/topic/10250465> [cit. 2009-3-19].
- [17]<http://en.wikipedia.org/wiki/Zeaxanthin> [cit. 2009-3-20].
- [18]<http://www.vitaminmanual.com/lutein.htm> [cit. 2009-3-20].
- [19][http://209.85.129.132/search?q=cache:5t64ly3jg2UJ:old.mendelu.cz/~agro/af/222/pages/vyuka/vyziva/otazky\\_vypr/25\\_pigmenty\\_nesvadbova\\_d.doc+Mendelova+zem%C4%9Bd%C4%9Blsk%C3%A1+a+lesnick%C3%A1+univerzita+v+Brn%C4%9B+POU%C5%BDIT%C3%8D+PIGMENTA%C4%8CN%C3%8DCH+L%C3%81TEK&cd=1&hl=cs&ct=clnk&gl=cz&client=firefox-a](http://209.85.129.132/search?q=cache:5t64ly3jg2UJ:old.mendelu.cz/~agro/af/222/pages/vyuka/vyziva/otazky_vypr/25_pigmenty_nesvadbova_d.doc+Mendelova+zem%C4%9Bd%C4%9Blsk%C3%A1+a+lesnick%C3%A1+univerzita+v+Brn%C4%9B+POU%C5%BDIT%C3%8D+PIGMENTA%C4%8CN%C3%8DCH+L%C3%81TEK&cd=1&hl=cs&ct=clnk&gl=cz&client=firefox-a) [cit. 2009-3-19]
- [20][http://www.healthandage.com/html/res/longevity\\_dialogues/content/page3.htm](http://www.healthandage.com/html/res/longevity_dialogues/content/page3.htm)  
[cit. 2009-3-19].
- [21]<http://www.greenskybio.com/en/productdis.asp?id=91> [cit. 2009-3-19].

- [22] Krčmová, L. *Vývoj a validace HPLC metody pro stanovení esterů retinolu v lidském séru s využitím monolitické kolony*. Diplomová práce, 2006.
- [23] Aust O., Sies H., Stahl W., Polidori M. C. Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids. *Journal of Chromatography A*, 2001, vol. 936, s. 83-93.
- [24] Karlíček, R. a kolektiv. *Analytická chemie pro farmaceuty*. 2. vydání. Praha: Karolinum, 2005. 281 s. ISBN 80-246-0348-9.
- [25] Miyabe K., Guichon G. Characterization of monolithic columns for HPLC. *Journal of Chromatography A*, 2004, vol. 27, s. 853-873.
- [26] Platonova G. A., Tennikova T. B. Affinity processes realized on high-flowtrough matacrylate-based macroporous monoliths. *Journal of Chromatography A*, 2005, vol. 1065, s. 19-28.
- [27] Švec F. Monolitické stacionární fáze pro HPLC. *Chemické listy*, 2004, roč. 98, s. 232-238.
- [28] [http://www.vscht.cz/ktk/www\\_324/lab/texty/hplc/HPLC.pdf](http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/hplc/HPLC.pdf) [cit. 2009-4-22].
- [29] <http://www.faf.cuni.cz/studium/Materialy/> [cit. 2009-4-21].
- [30] Dragovic-Uzelac V., Levaj B., Mrkic V., Bursac D., Boras M. The content of polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity and geographical region. *Food Chemistry*, 2007, vol. 102, s. 966-975.
- [31] 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.

- [32]Li L., Qin J., Shi-an Yin, Tang G. Effects of Mobile Phase Ratios on the Separation of Plant Carotenoids by HPLC with a C30 Column. *Chromatographia*, 2007, vol. 65, s. 91-94.
- [33]Inbaraj B. S., Chin J. T., Chen B. H. Improved high performance liquid chromatographic method for determination of carotenoids in the microalga *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Chromatography A*, 2006, vol. 1102, s. 193-199.
- [34]Pinheiro San't Ana H. M., Stringheta P. C., Cardoso Brandao S. C., Cordeiro de Azeredo R. M. Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service. *Food Chemistry*, 1998, vol. 61, s. 145-151.
- [35]Kanamaru K., Wang S., Abe J., Yamada T., Kitamura K. Genetic analysis and biochemical characterization of the high lutein trait of wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.). *Breeding Science*, 2008, vol. 58, s. 393-400.
- [36]Pilar Cano M., Begoña de Ancos, Lobo M. G., Montreal M. Carotenoid pigments and colour of hermaphrodite and female papaya fruits (*Carica-papaya*) cv sunrise during post-harvest ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1996, vol. 71, s. 351-358.
- [37]<http://www.ann.ugal.ro/tpa/Annals%2007%20papers/12%20Full%20paper%20Muntean.pdf> [cit. 2009-4-29]
- [38]Elizalde-González M. P., Hernández-Ogarcía S. G. Effect of cooking processes on the contents of two bioactive carotenoids in *Solanum lycopersicum* tomatoes and *Physalis ixocarpa* and *Physalis philadelphica* tomatillos. *Molecules*, 2007, vol. 12, s. 1829-1835.
- [39]Khachik F., Beecher G. R., Goli M. B. Separation, identification, and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography. *Pure and Applied Chemistry*, 1991, vol. 63, no. 1, s. 71-80.

- [40]Aust O., Sies H., Stahl W., Polidori C. Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids. *Journal of Chromatography A*, 2001, vol. 936, s. 83-93.
- [41]Sharpless K. E., Brown Thomas J., Sander L. C., Wise S. A. Liquid chromatographic determination of carotenoids in human serum using an engineered C<sub>30</sub> and a C<sub>18</sub> stationary phase. *Journal of Chromatography B*, 1996, vol. 678, s. 187-195.
- [42][http://www.chm.bris.ac.uk/motm/carotene/beta-carotene\\_history.html](http://www.chm.bris.ac.uk/motm/carotene/beta-carotene_history.html)  
[cit. 2009-5-8].
- [43]<http://zdravi.megapark.cz/beta-karoten/> [cit. 2009-5-8].
- [44]<http://uk.answers.yahoo.com/question/index?qid=20090301080648AA8oWCQ>  
[cit. 2009-5-8].
- [45]<http://en.wikipedia.org/wiki/Carotene> [cit. 2009-5-8].
- [46][http://www.chm.bris.ac.uk/motm/carotene/beta-carotene\\_structure.html](http://www.chm.bris.ac.uk/motm/carotene/beta-carotene_structure.html)  
[cit. 2009-5-8].
- [47][http://www.chm.bris.ac.uk/motm/carotene/beta-carotene\\_colourings.html](http://www.chm.bris.ac.uk/motm/carotene/beta-carotene_colourings.html)  
[cit. 2009-5-8].
- [48]<http://www.wellnessletter.com/html/ds/dsBetaCarotene.php> [cit. 2009-5-8].
- [49][http://www.chm.bris.ac.uk/motm/carotene/beta-carotene\\_synthesis.html](http://www.chm.bris.ac.uk/motm/carotene/beta-carotene_synthesis.html)  
[cit. 2009-5-8].
- [50]<http://www.whfoods.com/genpage.php?tname=nutrient&dbid=125> [cit. 2009-5-8].
- [51][http://www.ch.ic.ac.uk/wiki/index.php/It:Beta\\_Carotene](http://www.ch.ic.ac.uk/wiki/index.php/It:Beta_Carotene) [cit. 2009-5-8].



[52]Vodrážka, Z. *Biochemie*. 2., opr. vydání. Praha: Academia, 2002. 506 s.  
ISBN 80-200-0600-1.

[53]Simms W., Ross P. S. (2000). Vitamin A physiology and its application as a biomarker of contaminant-related toxicity in marine mammals: a review. *Toxicology and Industrial Health*, 2000, vol. 16, s. 291-302.