

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

Diplomová práce

**Vývoj HPLC metody
pro stanovení betakarotenu
v potravních doplňcích**

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

Hradec Králové 2011

Bc. Markéta Hlaváčková

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

Prohlašuji, že tato práce je mým autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracovávání čerpala, jsou uvedeny v seznamu literatury a v práci citovány. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

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

Dne 6. 5. 2011 v Hradci Králové

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Markéta Hlaváčková

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

Název diplomové práce: Vývoj HPLC metody pro stanovení betakarotenu v potravních doplňcích

Byla optimalizována a vyvinuta HPLC metoda pro stanovení obsahu betakarotenu v potravních doplňcích Betakaroten Farmax, GS Betakaroten FORTE (GreenSwan pharmaceuticals), Walmark Betakaroten, Bioaktivní karoten (Pharma Nord Denmark), Beta karoten Max, BETAVID + LUTEIN (Naturvita), Karovit (Vitabalans Oy), SELZINK PLUS (PRO.MED.CS), Pupalkový olej (Aromatica). Metoda je založena na využití kolony Ascentis Express C18 (30 x 4,6 mm; 2,7 μ m) a UV detekce při 450 nm. Byla využita izokratická eluce mobilní fází 100% methanolem, průtoková rychlost mobilní fáze byla 1,5 ml/min. Měření probíhalo při teplotě 60 °C. Retenční čas betakarotenu byl za podmínek optimalizované a validované metody 2,185 min.

Klíčová slova: betakaroten, HPLC, Betakaroten Farmax, GS Betakaroten FORTE (GreenSwan pharmaceuticals), Walmark Betakaroten, Bioaktivní karoten (Pharma Nord Denmark), Beta karoten Max, BETAVID + LUTEIN (Naturvita), Karovit (Vitabalans Oy), SELZINK PLUS (PRO.MED.CS), Pupalkový olej (Aromatica)

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Markéta Hlaváčková

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

Diploma Thesis Title: Development of HPLC Method for the Determination of Betacarotene in Nutritional Supplements

A new HPLC method was optimized and developed for the determination of betacarotene contents in nutritional supplements Betakaroten Farmax, GS Betakaroten FORTE (GreenSwan pharmaceuticals), Walmark Betakaroten, Bioaktivní karoten (Pharma Nord Denmark), Beta karoten Max, BETAVID + LUTEIN (Naturvita), Karovit (Vitabalans Oy), SELZINK PLUS (PRO.MED.CS), Pupalkový olej (Aromatica). The method is based on using Ascentis Express C18 column (30 x 4.6 mm; 2.7 μm) and UV detection at 450 nm. There was used isocratic elution of the mobile phase 100% methanol at a flow-rate of 1.5 ml/min. Column oven temperature was set at 60 °C during the measurement. The retention time of betacarotene under the optimized and validated conditions was 2.185 min.

Keywords: betacarotene, HPLC, Betakaroten Farmax, GS Betakaroten FORTE (GreenSwan pharmaceuticals), Walmark Betakaroten, Bioaktivní karoten (Pharma Nord Denmark), Beta karoten Max, BETAVID + LUTEIN (Naturvita), Karovit (Vitabalans Oy), SELZINK PLUS (PRO.MED.CS), Pupalkový olej (Aromatica)

Obsah

OBSAH	5
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
1 ÚVOD	9
2 CÍL PRÁCE ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE	10
3 TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1 Karotenoidy	11
3.2 Betakaroten	12
3.2.1 Struktura, chemické a fyzikální vlastnosti.....	12
3.2.2 Biologické hledisko, funkce v organismu.....	14
3.2.3 Metabolismus.....	15
3.3 Chromatografie	17
3.3.1 Rozdělení chromatografických metod.....	17
3.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	17
3.3.2.1 Princip HPLC.....	18
3.3.2.2 Instrumentace HPLC.....	19
3.3.2.3 Charakteristiky HPLC procesu.....	19
3.4 Zacházení se vzorky	21
3.5 Validace analytické metody	21
3.5.1 Test vhodnosti chromatografického systému.....	21
3.5.1.1 Účinnost chromatografického systému – zdánlivý počet teoretických pater.....	22
3.5.1.2 Faktor symetrie chromatografických píků.....	22
3.5.2 Linearita.....	23
3.5.3 Správnost.....	23
3.5.4 Přesnost.....	24
3.5.5 Opakovatelnost.....	25
3.5.6 Robustnost.....	25

3.5.7 Stabilita.....	26
3.6 Možnosti stanovení β-karotenu pomocí HPLC.....	27
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	30
4.1 Materiál, přístroje a pomůcky.....	30
4.1.1 Standardy.....	30
4.1.2 Testované potravní doplňky.....	30
4.1.3 Chemikálie.....	30
4.1.4 Přístroje, podmínky separace.....	31
4.1.5 Pomůcky.....	32
4.2 Příprava standardních roztoků β-karotenu.....	32
4.2.1 Příprava zásobního a pracovního roztoku pro optimalizaci metody.....	32
4.2.2 Příprava zásobního a pracovních roztoků pro validaci metody.....	33
4.2.3 Příprava pracovních roztoků pro hodnocení obsahu β -karotenu v potravních doplňcích.....	33
4.3 Příprava vzorků.....	34
4.3.1 Příprava vzorků přípravků Betakaroten Farmax, Walmark Betakaroten, Bioaktivní karoten a Beta karoten Max.....	34
4.3.2 Příprava vzorků přípravků GS Betakaroten FORTE.....	34
4.3.3 Příprava vzorků přípravků SELZINK PLUS, Karovit.....	34
4.3.4 Příprava vzorků přípravku BETAVID + LUTEIN.....	35
4.3.5 Příprava vzorků přípravku Pupalkový olej.....	35
4.4 Stanovení β-karotenu v potravních doplňcích.....	36
5 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	37
5.1 Optimalizace chromatografických podmínek.....	37
5.1.1 Optimalizace složení a průtoku mobilní fáze, optimalizace teploty a výběr vhodné kolony.....	37
5.1.2 Souhrn optimálních podmínek HPLC analýzy.....	47
5.2 Validace analytické metody.....	48
5.2.1 Test vhodnosti chromatografického systému.....	48

5.2.1.1 Účinnost chromatografického systém – zdánlivý počet teoretických pater.....	48
5.2.1.2 Faktor symetrie chromatografických píkú.....	48
5.2.2 Linearita.....	49
5.2.3 Opakovatelnost.....	51
5.2.4 Přesnost.....	53
5.2.5 Správnost.....	54
5.2.6 Robustnost.....	56
5.2.6.1 Vliv teploty.....	56
5.2.6.2 Vliv průtoku mobilní fáze.....	58
5.2.7 Stabilita.....	60
5.3 Stanovení obsahu β-karotenu v potravních doplňcích.....	63
5.3.1 Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku GS Betakaroten FORTE.....	64
5.3.2 Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku Bioaktivní karoten.....	65
5.3.3 Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku Max Beta karoten.....	66
5.3.4 Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku Walmark Betakaroten.....	67
5.3.5 Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku Betakaroten Farmax...	68
5.3.6 Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku BETAVID + LUTEIN.....	69
5.3.7 Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku Karovit.....	70
5.3.8 Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku SELZINK PLUS.....	71
5.3.9 Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku Pupalkový olej.....	72
6 ZÁVĚR.....	75
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	77
8 PŘÍLOHA (Komerční balení analyzovaných potravních doplňků).....	81

Seznam použitých zkratek

ACN	Acetonitril
ATBC nápoje	Nápoje s přidanými vitaminy
β-karoten	Betakaroten
BHT	Butylhydroxytoluen
CRBP	Cell-retinol-binding-protein; bílkovina přenášející retinol v buňce
DAD	Diode array detektor
EtOH	Ethanol
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MF	Mobilní fáze
MTBE	Methyl-tert-butyl ether
NaOH	Hydroxid sodný
RBP	Retinol-binding-protein; protein přenášející retinol v krvi
RP	Reverse phase; reverzní fáze
SPE	Solid phase extraction; extrakce na pevných fázích
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
TLS	Thermal lens spectrometric detection; termooptická spektrometrie
UV/VIS	Ultrafialová/viditelná oblast spektra světla

1 Úvod

Betakaroten patří do skupiny karotenoidů. Velký počet konjugovaných dvojných vazeb v molekule betakarotenu umožňuje absorbovat světlo ve viditelné oblasti spektra, což způsobuje jeho charakteristické výrazné oranžové zbarvení. Tato vlastnost zapříčiňuje také mnoho jeho biologických aktivit. Betakaroten podporuje správnou funkci sítnice, imunitní systém a chrání živočišné buňky, zejména sliznice a kůže, před destruktivními účinky UV záření. Jeho antioxidační účinky jsou využívány v prevenci onemocnění zraňovacího aparátu, kardiovaskulárních onemocnění a některých typů rakoviny.

Betakaroten se přirozeně vyskytuje v ovoci, zelenině a rostlinách. Pro podporu organismu a dostatečnou prevenci výše zmíněných onemocnění by však příjem betakarotenu potravou vyžadoval konzumaci velkého množství ovoce a zeleniny. Proto je betakaroten obsažen v řadě potravních doplňků dostupných v lékárnách. Protože však karotenoidy nejsou součástí registrovaných léčivých přípravků, není nad těmito potravními doplňky stanoven žádný způsob kontroly, a proto výrobcem deklarovaný obsah betakarotenu není garantován žádnou autoritou, např. SÚKL, a nemusí odpovídat skutečnému obsahu.

Mezi analytickými metodami stanovení karotenoidů se v posledních letech stále více prosazuje metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Důvodem jsou současné kvalitativní a kvantitativní hodnocení, minimální potřeba vzorku, rychlost analýzy a možnost automatizace [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7].

2 Cíl a zadání diplomové práce

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout, optimalizovat a validovat HPLC metodu pro stanovení betakarotenu v potravních doplňcích dostupných v České republice. Bylo nutné vyzkoušet několik chromatografických kolon, různá složení mobilní fáze a několik průtokových rychlostí. Při hledání optimálních podmínek byl důraz kladen na retenční čas betakarotenu, šířku a symetrii jeho píku na chromatogramu.

Cílem a zadáním diplomové práce bylo pomocí vyvinuté a validované HPLC metody ověřit důvěryhodnost vybraných potravních doplňků, tedy zda výrobcem deklarované množství betakarotenu odpovídá jeho skutečnému obsahu v přípravcích.

3 Teoretická část

3.1 Karotenoidy

Karotenoidy jsou rostlinná barviva, která patří do skupiny tetraterpenů. Jejich základní struktura je tvořena pomocí izoprenových jednotek (Obrázek 1), obsahují osm izoprenových jednotek a tedy 40 uhlíkových atomů v molekule. Mají společný sumární vzorec $C_{40}H_{56}$ a jsou syntetizovány rostlinami, nikoliv však živočichy. Tyto látky mají konjugovaný systém dvojných vazeb, většinou v *all-trans* konfiguraci. Konjugovaný řetězec umožňuje karotenoidům absorbovat světlo ve viditelné oblasti spektra, a proto jsou tyto sloučeniny barevné.

Tvoří skupinu žlutých, oranžových a červených barviv, které ve fotosyntetických organismech, nejvíce pak u flóry, hrají důležitou roli při fotosyntetické reakci. Podílejí se na přenosu energie, kterou absorbují z chlorofylu a chrání rostlinné tkáně, protože pomáhají absorbovat energii ze singletového kyslíku, excitované formy molekuly kyslíku, která vzniká v průběhu fotosyntézy.

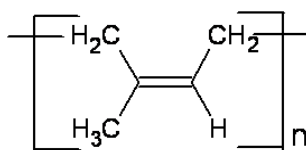
Živočišné tkáně obsahují karotenoidy také, ale ty jsou přijímány výhradně rostlinnou potravou (živočišné organismy nejsou schopny jejich syntézy) a jako zásobní látky ukládány do tukové tkáně, např. vaječný žloutek, játra, pigment sítnice oka.

V organismech, které nejsou schopné fotosyntézy, mají karotenoidy mnoho fyziologických funkcí. Některé jsou prekurzory vitamínu A, který je nezbytný pro správnou funkci sítnice, kůže a sliznic. Jeho nedostatek se projevuje šeroslepostí, suchou kůží apod. Karotenoidy podporují imunitní systém, mají antioxidační účinky (zamezují v organismu řetězovým oxidačním pochodům, které vedou ke vzniku různých chorob, stárnutí atd.), slouží jako filtry UV záření, účastní se procesů v organismu jako modulátory metabolismu karcinogenů, regulátory buněčné proliferace a diferenciaci a stimulátory komunikace mezi buňkami. Příjem karotenoidů snižuje riziko kardiovaskulárních onemocnění a některých nádorových onemocnění, např. rakoviny tlustého střeva.

Existuje okolo 600 známých karotenoidů. Dělí se do dvou skupin, a to **karotenů**, bezkyslíkatých sloučenin, které v molekule mají jeden nebo dva cyklohexanové kruhy spojené konjugovaným uhlovodíkovým řetězcem, a **xantofylů**, kyslíkatých sloučenin, které v molekule obsahují hydroxylové skupiny a jedná se o alkoholy nebo dioly.

Karotenoidy jsou převážně látky lipofilní, rozpustné v některých organických rozpouštědlech (chloroform, hexan, petrolether), nerozpustné ve vodě a omezeně v etanolu [1, 3, 8, 10].

Obrázek 1: Izoprenová jednotka

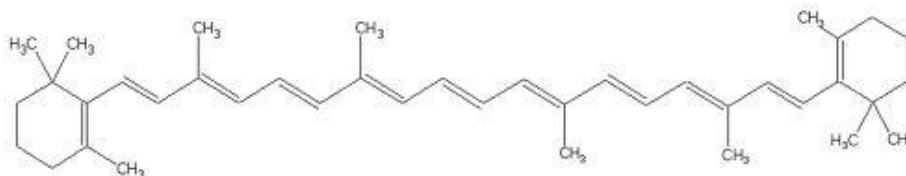


3.2 Betakaroten

3.2.1 Struktura, chemické a fyzikální vlastnosti

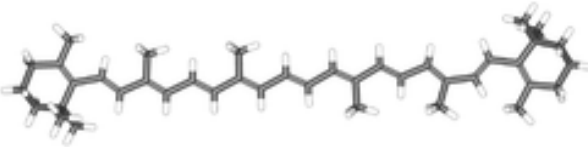
Karotenoid β-karoten patří do skupiny karotenů. Je tvořen osmi izoprenovými jednotkami, které jsou na každém konci cyklizovány. Chemická struktura vypadá následovně:

Obrázek 2: Strukturní vzorec β-karotenu



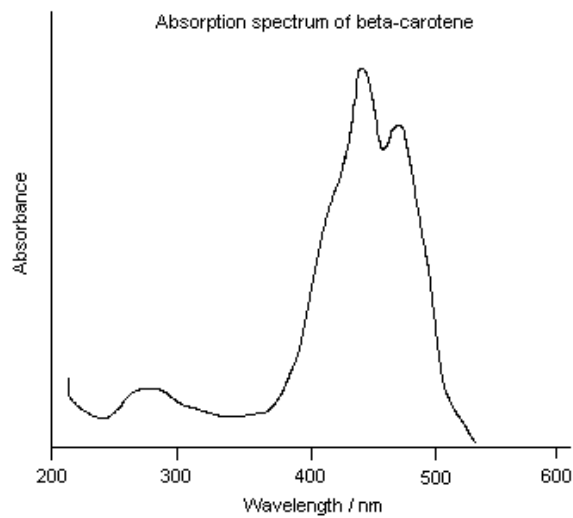
Jako uhlovodík, který neobsahuje žádný kyslík, je β-karoten rozpustný v tucích, některých organických rozpouštědlech a nerozpustný ve vodě. Jeho molekula je lipofilní (v kontrastu s ostatními karotenoidy, např. xantofyly, které jsou o něco méně hydrofobní) [1].

Tabulka 1: Charakterizace betakarotenu [1]

Betakaroten	
	
Identifikace	
CAS číslo	7235-40-7
PubChem	5280489
Vlastnosti	
Molekulový vzorec	$C_{40}H_{56}$
Molární hmotnost	$536.87 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Rozsah barev ve volné formě	Světle žlutý až světle oranžový
Hustota	$0.941 \pm 0.06 \text{ g/cm}^3$
Bod tání	$180\text{-}182 \text{ }^\circ\text{C}$
Rozpustnost	Nerzpustný ve studené i teplé vodě; rozpustný v diethylétheru, acetonu, benzenu, chloroformu; neparně rozpustný v metanolu; rozpustný v tucích
Platí pro standardní podmínky ($25 \text{ }^\circ\text{C}$, 100 kPa)	

Konjugovaný řetězec umožňuje karotenoidům absorbovat světlo ve viditelné oblasti spektra, což způsobuje jejich zbarvení. V grafu závislosti absorpance na vlnové délce pod tímto odstavcem můžeme pozorovat, že β -karoten nejvíce absorbuje v rozmezí vlnových délek 400-500 nm, což je zeleno-modrá část spektra. β -karoten se jeví jako oranžový, protože se červená a žlutá barva odráží zpět k nám [1, 5].

Obrázek 3: Absorbční spektrum β -karotenu [5]



3.2.2 Biologické hledisko, funkce v organismu

β -karoten je prekurzorem vitamínu A. Je v těle přeměňován na retinol (vitamin A), který je nezbytný pro správnou funkci sítnice, kůže a sliznic. Přijímání nadměrného množství vitamínu A v potravě je toxické. β -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 β -karotenu často trpí vedlejšími účinky. Projevuje se to žlutými skvrnami na kůži (karotenodermií) způsobenými ukládáním karotenoidů do nejsvrchnějších vrstev epidermis.

β -karoten 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 β -karotenu.

Některé výzkumy poukazují na to, že by β -karoten mohl snižovat riziko onemocnění rakovinou a dalšími chorobami. Pak se ale objevily dvě studie, které doložily, že β -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 β -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 lidí pracujících v azbestovém průmyslu. Studie byla pozastavena ve chvíli, kdy se vědci přesvědčili, že ti, kdo konzumují β -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 β -karoten a další antioxidanty v potravinových doplňcích jsou prospěšné nebo dokonce neškodné. Nedoporučuje se brát β -karoten v kapslích, zvláště pokud byl člověk kuřák či dokonce stále kouří. β -karoten je obsažen v zelenině a ovoci a je prospěšný, pokud je přijímán v této potravě [1].

3.2.3 Metabolismus

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

Vstřebané karotenoidy jsou oxidativně štěpeny β -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

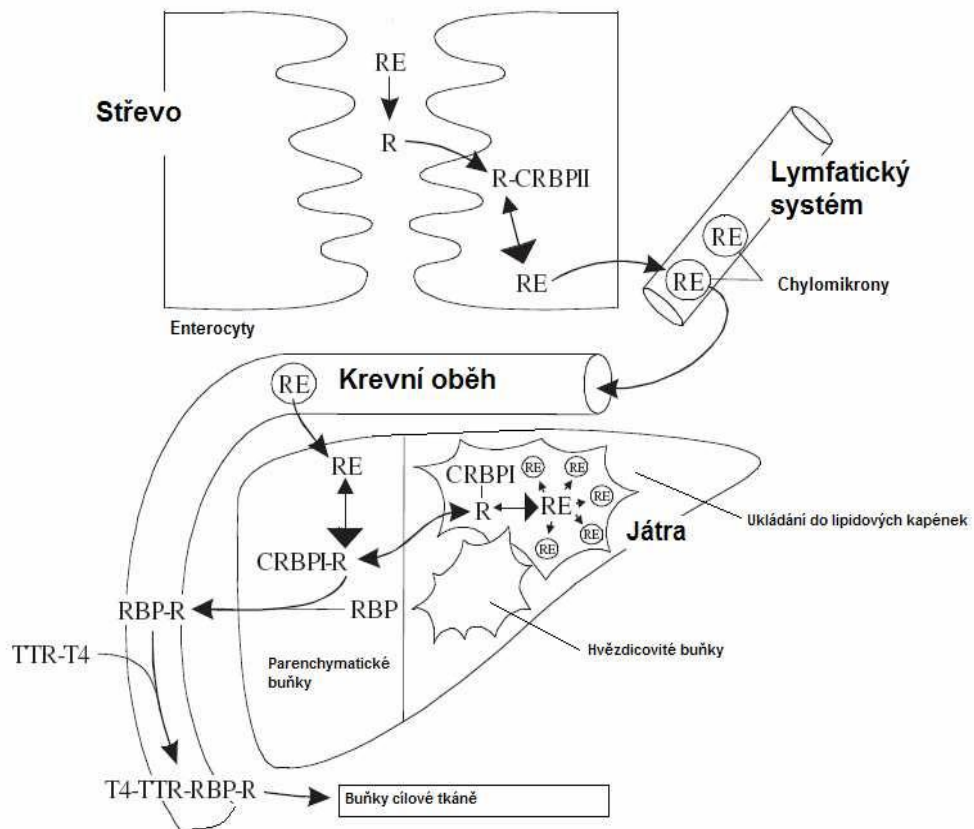
jako ester v lipocytech (perisinusoidálních hvězdovitých buňkách) pravděpodobně jako lipoglykoproteinový komplex.

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 nenavázaného retinolu [1].

Obrázek 4: Schéma metabolických drah retinoidů [1]

(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)



3.3 Chromatografie

Chromatografie jako separační metoda je jedna z dominantních separačních technik rutinně využívaných ve všech typech analytických laboratoří [1].

3.3.1 Rozdělení chromatografických metod

Chromatografické metody lze dělit dle několika hledisek:

- » **princip separace** (adsorpční, rozdělovací, iontovýměnná, gelová, afinitní, chirální);
- » **způsob vyvíjení** (eluční, frontální, vytěšňovací);
- » **skupenství mobilní a stacionární fáze** (kapalina-pevná látka, plyn-kapalina, plyn-pevná látka);
- » **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 fáze je polární kapalina (např. směs vody, acetonitrilu nebo/a methanolu). V tomto uspořádání kapalinové chromatografie dochází k silné retenci nepolárních látek [1].

3.3.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

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.

Pro stanovení karotenoidů se v současnosti užívá různých modifikací separačních postupů s využitím instrumentace HPLC 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 [1].

3.3.2.1 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 fází (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 izokratickou. Gradientová eluce umožňuje zkrácení času analýzy, zlepšuje rozdělení složitějších směsí a zvyšuje citlivost analýzy.

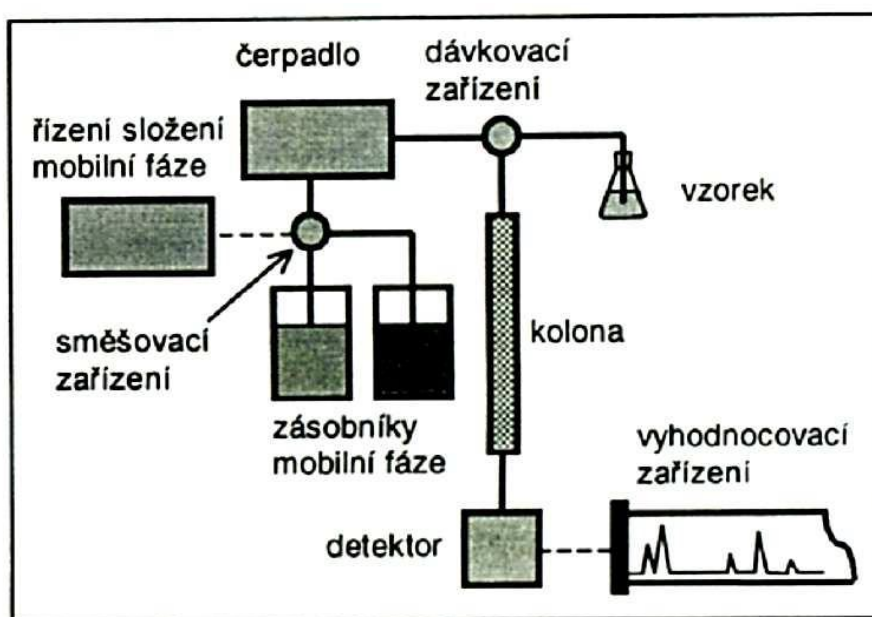
Stěžejním prvkem každé HPLC metody je kolona, která ovlivňuje její selektivitu a účinnost. HPLC kolony jsou konstruovány jako trubice (ocelové, skleněné, ze syntetických polymerů). Stacionární fáze je tvořena fixním materiálem

(nejčastěji silikagelem) uvnitř kolony. Pro účinné dělení je rozhodující kvalita sorbetu, jeho velikost a stejnoměrnost částic, ale i tvar, porozita a struktura [1].

3.3.2.2 Instrumentace HPLC

HPLC sestava pro chromatografickou analýzu se obecně skládá ze zásobníků mobilních fází, odplyňovacího zařízení, čerpadla, směšovacího zařízení, dávkovacího zařízení, chromatografické kolony (popř. předklony), detektoru a vyhodnocovacího zařízení [1, 9].

Obrázek 5: Schéma kapalinového chromatografu [9]



3.3.2.3 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 retenci 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 pak 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 [1].

3.4 Zacházení se vzorky

Charakteristická struktura karotenoidů se systémem konjugovaných dvojných vazeb souvisí s problémy, které se objevují při práci a manipulaci se vzorky. Největším problémem je citlivost karotenoidů na světlo, teplotu a přítomnost kyslíku. Také kyselé nebo zásadité prostředí může být příčinou jejich nestability. Tyto faktory mohou vést k degradaci nebo transformaci karotenoidů, a tím ke změnám jejich zastoupení ve vzorcích.

Z tohoto důvodu je nezbytné řídit se opatřeními, které těmto nežádoucím změnám zabrání. Mezi taková opatření popsaná v literatuře patří například přidavek antioxidantů, využití rotační vakuové odparky nebo odpařování pod proudem dusíku, skladování v temnu, pod dusíkem či argonem, při teplotě okolo -20 °C [25].

3.5 Validace analytické metody

Validace je procedura, jejímž cílem je demonstrovat a dokumentovat kvalitu analytické metody ustanovením definovaných kritérií a měřením hodnot těchto kritérií. Validace slouží k prokázání spolehlivosti analytické metody a k ověření platnosti zvoleného analytického postupu [36].

3.5.1 Test vhodnosti chromatografického systému

Test způsobilosti systému představuje nedílnou součást metody a slouží k zajištění přiměřené účinnosti chromatografického systému [17].

3.5.1.1 Účinnost chromatografického systému – zdánlivý počet teoretických pater

Účinnost kolony (zdánlivá) může být vypočtena jako zdánlivý počet teoretických pater N podle vzorce, v němž musí být vyjádřeny hodnoty t_R a w_h ve stejných jednotkách (času, objemu nebo vzdálenosti):

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2, \text{ kde:}$$

t_R je retenční čas (nebo objem);

$w_{1/2}$ je šířka píku v polovině jeho výšky.

Zdánlivý počet teoretických pater se mění se stanovovanou složkou, kolonou a retenčním časem. Účinnost kolony roste s počtem teoretických pater N [9, 17].

3.5.1.2 Faktor symetrie chromatografických píků

Faktor symetrie píku A_S (faktor chvostování píku) se vypočítá podle vzorce:

$$A_S = \frac{w_{0,05}}{2d}, \text{ kde:}$$

$w_{0,05}$ je šířka píku ve vzdálenosti 5 % výšky píku;

d je vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v 5 % jeho výšky.

Hodnota faktoru symetrie 1,0 značí úplnou (ideální) symetrii píku. Hodnoty faktoru symetrie větší než 1,0 znamenají „**tailing**“ (chvostování), hodnoty menší než 1,0 znamenají „**fronting**“ (frontování) píku. Zvyšováním asymetrie píku roste možnost chyby při výpočtu plochy píku [17].

3.5.2 Linearita

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. odezvou instrumentace (analytickým signálem) a koncentrací analytu [11].

Pro provedení testu linearity je doporučeno proměřit minimálně 5 – 6 různých koncentrací modelového vzorku. Linearita vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných se charakterizuje metodou lineární regrese (korelační koeficient, směrnice kalibrační křivky – regresní koeficient). Čím více se hodnoty korelačního koeficientu blíží jedné, tím je závislost obou proměnných lineárnější [16].

3.5.3 Správnost

Správnost metody je definována jako těsnost shody získaných výsledků měření a skutečné hodnoty měřené veličiny, přijaté referenční hodnoty. Jedná se tedy o statisticky významnou rozdílnost mezi získanou a skutečnou hodnotou. Pro hodnocení správnosti se musí brát průměr více stanovení, protože jednotlivá hodnota může být zatížena náhodnou chybou. Dohodnutá referenční hodnota zastupuje skutečnou hodnotu, která je ve skutečnosti vždy neznámá. Získává se pomocí referenčních metod, nejlépe ve velkém počtu různých laboratoří. Správnost lze vyhodnotit aplikací metody na referenční materiál o známé čistotě nebo srovnáním výsledků s jinou validovanou metodou. Správnost lze prokázat aplikací metody na placebo s přidavkem stanovované látky, resp. metodou standardního přidavku stanovované látky k přípravku.

Dnes se v klinických oborech místo termínu správnost používá spíše termín **pravdivost**. Správností se míní kombinace přesnosti a pravdivosti. Matematicky se správnost vyjadřuje celkovou chybou měření, která se rovná součtu náhodné a systematické chyby. Pravdivost metody je dána velikostí systematické chyby, která odchyluje výsledek vždy jedním směrem (pozitivní a negativní systematická chyba). Můžeme se setkat s konstantní složkou systematické chyby (výsledek je u různé koncentrace odchýlen vždy o stejnou hodnotu) a s proporcionální složkou (výsledek se od skutečné hodnoty liší vždy o stejný násobek).

Správnost se vyjadřuje jako rozdíl hodnot, nebo jako **výtěžnost** (Recovery; R_i), která udává poměr koncentrace analytu získané danou analytickou metodou a přijaté referenční hodnoty v procentech:

$$R_i = 100 \cdot \frac{c_i}{c_0}, \text{ kde:}$$

c_i je koncentrace stanovená pomocí HPLC;

c_0 je vložená koncentrace [12, 13, 14, 16].

3.5.4 Přesnost

Přesnost metody je definována jako míra shody mezi vzájemně nezávislými výsledky získanými opakovanou analýzou téhož vzorku za předem specifikovaných podmínek. Počet opakování musí být dostatečně velký, aby umožňoval statistické vyhodnocení. Podle podmínek, za kterých stanovení probíhá, rozlišujeme:

»**Opakovatelnost** (analýzy se provádějí všechny najednou, na témže zařízení s touž obsluhou; používá se proto označení přesnost v sérii; tato analytická vlastnost charakterizuje metodu a preciznost jejího provedení v laboratoři);

»**Reprodukovatelnost** (stanovení se provádí postupně, např. jednou denně, na témže zařízení, případně i různými pracovníky; tím je charakterizována stabilita metody a jejího provádění během celé doby používání hovoří se o přesnosti v čase);

»**Mezilaboratorní reprodukovatelnost** (měření se provádí na různých zařízeních, s různou obsluhou, na různých místech a zajišťuje srovnání úrovně přesnosti v různých laboratořích).

Přesnost závisí pouze na rozdělení náhodných chyb, které není možné zcela eliminovat, a nemá vztah k pravé hodnotě. Náhodné kolísání činnosti přístrojů, pomůcek, teplot atd. vždy způsobuje, že výsledky opakovaných analýz jsou rovnoměrně rozptýleny kolem průměrné hodnoty, přičemž četnost jednotlivých výsledků vykazuje normální rozložení (Gaussova křivka). Mírou rozptylu výsledků, tedy nepřesnosti, je **směrodatná odchylka** (SD). Nižší hodnota směrodatné odchylky (užší a vyšší Gaussova křivka) ukazuje na vyšší přesnost metody a naopak. Směrodatná odchylka je vyjadřovaná ve stejných jednotkách jako měřená veličina. Závisí na měřené

hodnotě, proto se obvykle počítá tzv. **relativní směrodatná odchylka (RSD)** vyjadřovaná většinou v procentech [12, 13].

3.5.5 Opakovatelnost

Opakovatelnost metody je definována jako těsnost shody výsledků získaných za podmínek použití téže zkušební metody na identickém materiálu, v téže laboratoři, týmž pracovníkem, za použití týchž nástrojů a zařízení, během krátkého časového rozmezí.

Kritériem opakovatelnosti je relativní směrodatná odchylka (RSD), tedy poměr mezi směrodatnou odchylkou a střední hodnotou souboru následných měření vyjádřený v procentech:

$$\text{RSD [\%]} = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}, \text{ kde:}$$

- y_i jsou jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plocha píku, výška píku nebo poměr ploch u metody vnitřního standardu;
- \bar{y} je průměr jednotlivých hodnot;
- n je počet jednotlivých hodnot [14, 16].

3.5.6 Robustnost

Robustnost analytické metody lze chápat dvojím způsobem:

- »jako toleranci metody k malým záměrným změnám parametrů;
- »jako stupeň reprodukovatelnosti výsledků analýz téhož vzorku při změně vnějších podmínek.

Změna podmínek může nastat pro případ mezilaboratorních zkoušek (jiná laboratoř, analytik, instrument, různé šarže reagentů = RUGGEDNESS) nebo změnou podmínek v jedné laboratoři (teplota, koncentrace, doba extrakce = ROBUSTNESS). Takto definovaná robustnost může být stanovena porovnáním analýz před a po změně vnějších podmínek v rámci validace přesnosti. Aby bylo možno metodu prohlásit za dostatečně robustní, nesmí střední hodnoty souborů analýz získaných v rámci

stanovení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti překročit předem daná kritéria, nastavená podle účelu použití metody [14, 15].

Výsledkem ověření robustnosti metody není závěr, že metoda je robustní nebo nerobustní, ale výsledkem ověření robustnosti je informace, jaké parametry metody jsou kritické a vyžadují pečlivou kontrolu.

Robustnost metody je taková vlastnost metody, kdy malou změnou jejích parametrů, poskytuje metoda pořád správné a přesné výsledky.

Robustnost poskytuje informaci o spolehlivosti analytického postupu během běžného používání. Typickými změnami parametrů kapalinové chromatografie jsou změna pH, změna kolony, změna složení a rychlosti průtoku mobilní fáze, změna teploty [15, 16].

3.5.7 Stabilita

Často je při analýze nezbytná dostatečná stabilita vzorků, standardů, reagensů a mobilní fáze, protože se počítá s analýzou přes noc s využitím autosampleru nebo s časovými ztrátami danými poruchou přístroje.

Vzorky a standardy by měly být znovu testovány po nejméně 24 hodinách (dle potřeby), a stanovený obsah složek by měl být srovnán s čerstvě připravenými standardy. Kritériem stability po 24 hodinách za definovaných skladovacích podmínek je maximálně 2% změna v odpovědi standardu nebo vzorku, vztažená k čerstvě připraveným standardům, vzorkům.

Pokud roztok není stabilní za pokojové teploty, pak snížení teploty na 2 – 8 °C může zlepšit stabilitu vzorků a standardů [16, 26].

3.6 Možnosti stanovení β -karotenu pomocí 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/Vis detektory [1].

V Tabulce 2 jsou uvedeny metody stanovení β -karotenu pomocí HPLC nalezené v článcích publikovaných v odborné literatuře. Většina metod shrnutých v následující tabulce nevyužívá jako zdroj β -karotenu tobolky nebo tablety, ale přírodní zdroje (ovoce, zelenina, lidská plazma či sérum, atd.). Uvedené metody se také vždy netýkají pouze β -karotenu, ale i ostatních karotenoidů, které se v přírodních zdrojích vyskytují většinou společně.

Širší problematikou týkající se možností stanovení β -karotenu HPLC metodou se zabývá bakalářská práce *Analytické možnosti stanovení luteinu, betakarotenu a zeaxanthinu v potravinách* ([1]).

Tabulka 2: HPLC metody pro stanovení β -karotenu - stručná rešerše

Chromatografická kolona	Mobilní fáze	Průtok [ml/min]	Detekce	Analyzovaný vzorek	Poznámka	Citace
YMC C30 RP (250 x 4,6 mm; 5 μ m)	gradient (A) MeOH/ACN/H ₂ O (84/14/2) (B) dichlormethan	1	UV/Vis 450 nm	kořenové hlízy Povijnice jedlé		[18]
Tracer Extrasil ODS-2 (150 x 4 mm; 5 μ m)	lineární gradient (A) MeOH (B) Milli-Q voda (C) butanol	2	UV/Vis (DAD)	olivový olej		[19]
Inertsil ODS 80A (150 x 4,6 mm; 5 μ m)	ACN/Et OH (70/30)	1,6	UV/Vis 450 nm	emulgované potravní doplňky	provedena SPE	[20]
VYDAC 218TP54 C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m)	MeOH/THF (90/10)	1	TLS	potravní doplňky s rybím olejem		[21]

Chromatografická kolona	Mobilní fáze	Průtok [ml/min]	Detekce	Analyzovaný vzorek	Poznámka	Citace
Diamonsil C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm)	ACN/dichlormethan (75/25)	1,5	UV/Vis 450 nm	plíseň Blakeslea trispora	vnitřní standard sudan I	[22]
Spherisorb ODS2 (150 x 4,6 mm; 3 µm)	ACN/MeOH/dichlormethan (71/22/7)					
Diamonsil C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm)	ACN/dichlormethan (75/25)					
Shim-pack CLC-C8 (150 x 4,6 mm; 5 µm)	ACN/MeOH/chloroform (47/47/6)					
Prevail C18 RP (150 x 4,6 mm; 5 µm)	gradient (A) ACN/MeOH (95/5) (B) ACN/MeOH/ethylacetát (60/20/20) + 0,1 % BHT, 0,05 % TEA	1	UV/Vis 450 nm	jahody, maliny, ostružiny, borůvky, černý rybíz, červený rybíz		[23]
YMC C30 RP (250 x 4,6 mm; 5 µm)	lineární gradient (A) MeOH/MTBE/H ₂ O (81/15/4) (B) MTBE/MeOH/H ₂ O (90/6/4)	1	UV/Vis 450 nm	ATBC nápoje		[24]

4 Experimentální část

4.1 Materiál, přístroje a pomůcky

4.1.1 Standardy

Betakaroten 97,0 % (Sigma Aldrich)

4.1.2 Testované potravinové doplňky

Betakaroten Farmax

GS Betakaroten FORTE (GreenSwan pharmaceuticals)

Walmark Betakaroten

Bioaktivní karoten (Pharma Nord Denmark)

Beta karoten Max

BETAVID + LUTEIN (Naturvita)

Karovit (Vitabalans Oy)

SELZINK PLUS (PRO.MED.CS)

Pupalkový olej (Aromatica)

4.1.3 Chemikálie

Methanol CHROMALSOLV for HPLC (Sigma Aldrich)

Tetrahydrofuran CHROMALSOLV for HPLC, gradient grade (Sigma Aldrich)

Acetonitril CHROMALSOLV for HPLC, gradient grade (Sigma Aldrich)

Chloroform p.a. stabilizovaný v 1% ethylalkoholu (PENTA)

Hydroxid draselný (Lachema)

Ultračistá voda

4.1.4 Přístroje, podmínky separace

Chromatografický systém:

<i>Chromatografická sestava:</i>	Shimadzu 20AD Prominence Liquid Chromatograph
<i>Detektor:</i>	SPD-M20A DAD
<i>Pumpy:</i>	3x pumpa LC-20AD
<i>Degasser:</i>	GU-20A5
<i>Autosampler:</i>	SIL-20AC
<i>Termostat:</i>	CTO-20AC
<i>Komunikační modul:</i>	CBM-20A
<i>Kolony:</i>	»Ascentis® Express C18; 3 cm x 4,6 mm; 2,7 µm (Supelco Analytical) »Ascentis® Express RP-Amide; 3 cm x 4,6 mm; 2,7 µm (Supelco Analytical) »Discovery® HS C18; 15 cm x 4,6 mm; 5 µm (Supelco Analytical) »Discovery® HS C18; 10 cm x 4,6 mm; 5 µm (Supelco Analytical) »Discovery® HS F5; 10 cm x 4 mm; 3 µm (Supelco Analytical) »Chromolith® Performance C18; 100 x 4,6 mm (Merck) »Chromolith® Performance RP-18e; 100 x 3 mm (Merck) »Luna 3u Phenyl Hexyl; 150 x 4,6 mm; 3 µm (Phenomenex®) »Zorbax® SB-C18 ; 4,6 x 50 mm; 1,8 µm (Agilent Technologies) »Zorbax® SB-PHENYL; Rapid resolution®; 4,6 cm x 75 mm; 3,5 µm (Agilent Technologies) »Zorbax® TMS; 4,6 mm x 250 mm; 5 µm (Agilent Technologies)

Dávkování:	3 μ l
Detekce:	450 nm
Mobilní fáze:	»methanol »methanol/tetrahydrofuran »methanol/voda »acetonitril »acetonitril/tetrahydrofuran »acetonitril/metanol
Průtoková rychlost:	1,0 – 2,0 ml/min
Vyhodnocení:	chromatografický software LC Solution

4.1.5 Pomůcky

PTFE filtry o velikost pórů 0,45 μ m
Analytické váhy (Sartorius analytic)
Ultrazvuková lázeň (BANDELIN SONOREX RK100)
Třepačka (Memmert)
Pipety (BRAND)
Byreta (50 ml)
Třecí miska s tloučkem
Běžné laboratorní sklo a pomůcky

4.2 Příprava standardních roztoků β -karotenu

4.2.1 Příprava zásobního a pracovního roztoku pro optimalizaci metody

Zásobní roztok ($c = 2000$ mg/l) byl připraven rozpuštěním navážky 50,00 mg β -karotenu v chloroformu a doplněním chloroformem na objem 25,00 ml v odměrné baňce. Tento roztok byl uchováván při -18 °C, aby se předešlo oxidačním změnám látky.

Pracovní roztok ($c = 100 \text{ mg/l}$) byl připraven naředěním 0,50 ml zásobního roztoku chloroformem na objem 10,00 ml v odměrné baňce. Tento pracovní roztok byl použit pro optimalizaci chromatografických podmínek a byl připravován každý den čerstvý.

4.2.2 Příprava zásobního a pracovních roztoků pro validaci metody

Zásobní roztok ($c = 2000 \text{ mg/l}$) byl připraven rozpuštěním navážky 50,00 mg β -karotenu v chloroformu a doplněním chloroformem na objem 25,00 ml v odměrné baňce.

Z tohoto roztoku byly připraveny příslušným naředěním jednotlivé **pracovní roztoky pro kalibraci** v rozmezí koncentrací 20 mg/l – 200 mg/l.

Tabulka 3: Příprava pracovních roztoků pro kalibraci

Pracovní roztok pro kalibraci	Koncentrace β -karotenu v pracovním roztoku pro kalibraci [mg/l]	Objem zásobního roztoku doplněný chloroformem na objem 10,00 ml v odměrné baňce [μ l]
1	20	100
2	50	250
3	100	500
4	125	625
5	150	750
6	175	875
7	200	1000

4.2.3 Příprava pracovních roztoků pro hodnocení obsahu β -karotenu v potravinových doplňcích

Pracovní roztok pro hodnocení obsahu β -karotenu v jednotlivých potravinových doplňcích byl připraven vždy čerstvý před vlastním měřením a to o přibližně přesné koncentraci 150 mg/l rozpuštěním přesné navážky β -karotenu v chloroformu v 50,00 ml odměrné baňce a doplněním chloroformem po rysku.

4.3 Příprava vzorků

Extrakční postup pro extrakci β -karotenu z jednotlivých potravních doplňků vycházel z rigorózní práce *HPLC stanovení luteinu, zeaxanthinu a betakarotenu v potravních doplňcích* ([3]) a byly pouze optimalizovány množství vzorku, objemy chloroformu a 1 M NaOH.

4.3.1 Příprava vzorků přípravků Betakaroten Farmax, Walmark Betakaroten, Bioaktivní karoten a Beta karoten Max

K jedné tobolce přípravku umístěné v centrifugační zkumavce bylo přidáno přibližně 20 ml přibližně 1 M NaOH. Směs byla ponořena na 20 minut do ultrazvukové lázně. Poté bylo přidáno 20,00 ml chloroformu a směs byla 30 minut protřepávána. Po ustálení rozmezí hladin dvou nemísitelných kapalin bylo odebráno 500 μ l spodní chloroformové vrstvy do vialky. Do vialky bylo přidáno dalších 500 μ l čistého chloroformu (ředění 1:1). Vzorek byl ve vialce promíchán a dávkován autosamplermem do HPLC systému.

4.3.2 Příprava vzorků přípravků GS Betakaroten FORTE

Postup je totožný s postupem v kapitole 4.3.1, s tím rozdílem, že v posledních krocích bylo odebráno pouze 250 μ l spodní chloroformové vrstvy a do vialky bylo přidáno 750 μ l čistého chloroformu (ředění 1:3). Tento vzorek byl po předchozím promíchání dávkován autosamplermem do HPLC systému.

4.3.3 Příprava vzorků přípravků SELZINK PLUS, Karovit

V třecí misce bylo rozdrobeno a homogenizováno 5 tablet přípravku. Z této směsi byla přibližně přesně navážena a jako vzorek použita průměrná hmotnost 1 tablety určená z navážek 10 tablet (průměrná hmotnost 1 tablety SELZINK PLUS byla 0,6725 g, Karovit byla 0,3542 g). K naváženému vzorku ve zkumavce bylo přidáno přibližně 20 ml přibližně 1 M NaOH. Směs byla ponořena na 20 minut do ultrazvukové lázně. Poté bylo přidáno 20,00 ml chloroformu a směs byla 30 minut protřepávána. Po ustálení rozmezí hladin dvou nemísitelných kapalin bylo odebráno 500 μ l spodní

chloroformové vrstvy do vialky. Do vialky bylo přidáno dalších 500 μ l čistého chloroformu (ředění 1:1). Vzorek byl přefiltrován přes filtr o velikosti pórů 0,45 μ m a dávkován autosamplerem do HPLC systému.

4.3.4 Příprava vzorků přípravku BETAVID + LUTEIN

V třecí misce bylo rozdrveno a homogenizováno 5 tablet přípravku. Z této směsi byla přibližně přesně navážena a jako vzorek použita průměrná hmotnost 1 tablety určená z navážek 10 tablet (průměrná hmotnost 1 tablety BETAVID + LUTEIN byla 0,3268 g). K naváženému vzorku ve zkumavce bylo přidáno přibližně 20 ml přibližně 1 M NaOH. Další postup je totožný s postupem v kapitole 4.3.3, s tím rozdílem, že v posledním kroku nebylo k odebrané chloroformové vrstvě ve vialce přidáno 500 μ l čistého chloroformu. Vzorek byl přefiltrován přes filtr o velikosti pórů 0,45 μ m a dávkován autosamplerem do HPLC systému.

4.3.5 Příprava vzorků přípravku Pupalkový olej

Do zkumavky bylo naváženo přibližně přesně 2,00 g přípravku. Ke vzorku bylo přidáno přibližně 20 ml přibližně 1 M NaOH. Směs byla ponořena na 20 minut do ultrazvukové lázně. Poté bylo přidáno 10,00 ml chloroformu a směs byla 30 minut protřepávána. Po ustálení rozmezí hladin dvou nemísitelných kapalin bylo odebráno 500 μ l spodní chloroformové vrstvy do vialky. V tomto případě nebylo znovu v posledním kroku k odebrané chloroformové vrstvě ve vialce přidáno 500 μ l čistého chloroformu. Vzorek byl ve vialce promíchán a dávkován autosamplerem do HPLC systému.

4.4 Stanovení β -karotenu v potravních doplňcích

Byla optimalizována metoda pro stanovení obsahu β -karotenu v testovaných potravních doplňcích. Podstatou optimalizace je volba vhodných podmínek pro analýzu β -karotenu tak, aby ve výsledném chromatogramu bylo dosaženo nejvhodnější šířky a symetrie píku a také dosaženo optimální retence β -karotenu (volba vhodné analytické kolony, mobilní fáze, teploty). Při optimalizaci byl používán pracovní roztok pro optimalizaci (kapitola 4.2.1).

Po získání optimálních podmínek byla metoda validována.

Následně byly proměřeny vzorky potravních doplňků Betakaroten Farmax, GS Betakarotén FORTE (GreenSwan pharmaceuticals), Walmark Betakaroten, Bioaktivní karoten (Pharma Nord Denmark), Beta karoten Max, BETAVID + LUTEIN (Naturvita), Karovit (Vitabalans Oy), SELZINK PLUS (PRO.MED.CS), Pupalkový olej (Aromatica). Obsah β -karotenu v mg v potravním doplňku byl vypočítán podle vzorce:

$$m_i = \frac{A_{b-kar(vz)} \cdot m_{b-kar(st)} \cdot m_{(tab,tob)} \cdot 0,97}{A_{b-kar(st)} \cdot m_{vz}} \cdot R, \text{ v němž značí:}$$

m_i	obsah β -karotenu ve vzorku v mg;
$A_{b-kar(vz)}$	plocha píku β -karotenu ve vzorku;
$A_{b-kar(st)}$	plocha píku β -karotenu ve standardu;
$m_{b-kar(st)}$	navážka standardu v mg;
$m_{(tab,tob)}$	průměrná hmotnost 1 tablety nebo tobolky v g;
m_{vz}	navážka vzorku (tablety, tobolky) v g;
0,97	korekční faktor na čistotu standardu β -karotenu;
R	korekce na rozdílnou koncentraci β -karotenu ve vzorku a ve standardu (ředění 40/50, 20/50 a 10/50 dle postupu zpracování jednotlivých přípravků).

5 Výsledky a diskuze

5.1 Optimalizace chromatografických podmínek

5.1.1 Optimalizace složení a průtoku mobilní fáze, optimalizace teploty a výběr vhodné kolony

Při optimalizaci podmínek byl používán každý den čerstvě připravený pracovní roztok β -karotenu, jehož příprava je popsána v kapitole 4.2.1. Na vybraných kolonách byly měřeny retenční časy β -karotenu v závislosti na změnách složení a průtoku mobilní fáze a změnách teploty.

Jako mobilní fáze byl používán čistý methanol, směs methanolu a tetrahydrofuranu, směs methanolu a vody, čistý acetonitril, směs acetonitrilu a methanolu, směs acetonitrilu a tetrahydrofuranu v různých poměrech. Na různých kolonách byly v kombinaci s různými složeními mobilní fáze testovány průtokové rychlosti 1 ml/min a 2 ml/min a teplota 30 °C až 60 °C. Byl zvolen nástřik 10 μ l. Odezva detektoru byla sledována při vlnové délce 450 nm.

Cílem testování bylo získat ve výsledném chromatogramu nejvhodnější šířku a symetrii píku a také dosáhnout optimální retence β -karotenu.

Následující tabulka (Tabulka 4) podává přehled o použitých kolonách, směsích mobilní fáze, průtokových rychlostech mobilní fáze, teplotách a tlacích, za kterých jednotlivá měření probíhala. Tabulka dále uvádí hodnoty získaných retenčních časů.

Tabulka 4: Hodnoty naměřené při optimalizaci chromatografických podmínek

Kolona	Složky mobilní fáze	Poměr složek mobilní fáze	Průtok [ml/min]	Tlak [MPa]	Teplota [°C]	t _R β-karotenu [min]	Poznámka
Supelco Analytical Ascentis Express C18, 30 x 4,6 mm, 2,7 μm	MeOH	-	1	4,8	30	-	zjištěn rozklad β-karotenu (použit nevhodný standard)
	MeOH/H ₂ O	98/02	1	5,9	30	-	
	MeOH/H ₂ O	95/05	1	6,1	30	-	
	MeOH/H ₂ O	90/10	1	7,0	30	-	
	MeOH/ACN	50/50	1	3,6	30	-	
	ACN/MeOH	80/20	1	3,5	30	-	
	ACN	-	1	3,1	30	-	
	MeOH	-	2	7,6	30	3,522	
	MeOH/THF	90/10	2	7,1	30	1,225	
	ACN/THF	90/10	2	6,9	30	1,907	
	ACN	-	2	6,2	30	5,923	

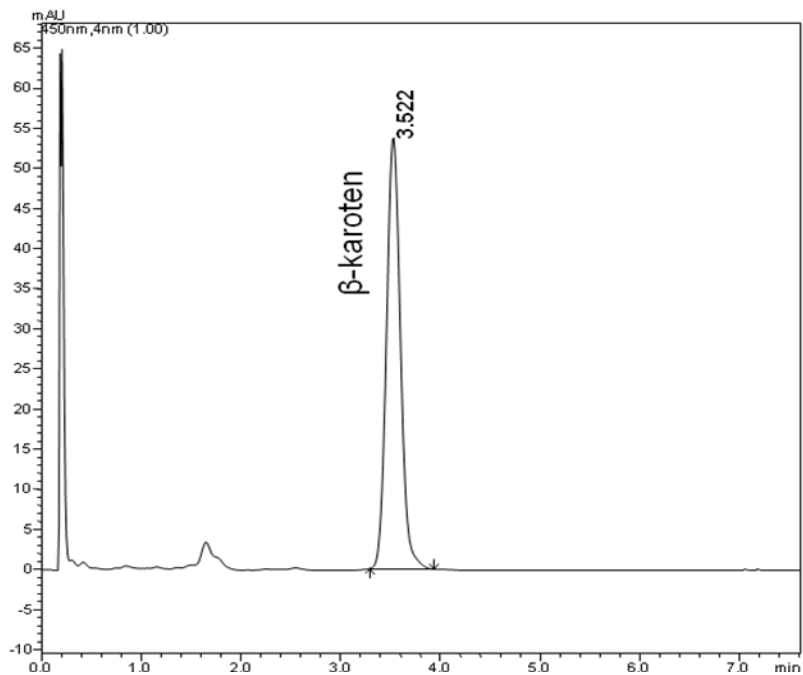
Kolona	Složky mobilní fáze	Poměr složek mobilní fáze	Průtok [ml/min]	Tlak [MPa]	Teplota [°C]	T _R β-karotenu [min]	Poznámka
Supelco Analytical Ascentis Express RP-Amide, 30 x 4,6 mm, 2,7 μm	MeOH	-	1	3,9	30	1,631	nástřik 2μl
	MeOH/ACN	80/20	1	2,4	30	2,213	nástřik 2μl
	MeOH/ACN	50/50	1	2,7	30	2,542	
	ACN	-	1	2,5	30	3,001	nástřik 2μl
Supelco Analytical Discovery C18, 150 x 4,6 mm, 5 μm	MeOH/THF	90/10	1	6,5	30	15,191	dlouhá analýza
	MeOH/THF	90/10	2	8,2	30	7,641	
	MeOH/THF	80/20	2	8,6	30	3,548	
	MeOH/THF	90/10	2	7,9	60	3,965	
Supelco Analytical Discovery C18, 100 x 4,6 mm, 5 μm	MeOH	-	2	7,3	30	13,227	nástřik 2μl dlouhá analýza
	MeOH/THF	90/10	2	7,0	30	5,187	nástřik 2μl
	ACN	-	2	4,7	30	19,554	nástřik 2μl dlouhá analýza

Kolona	Složky mobilní fáze	Poměr složek mobilní fáze	Průtok [ml/min]	Tlak [MPa]	Teplota [°C]	t _R β-karotenu [min]	Poznámka
Chromolith Performance (monolit) C18, 100 x 4,6 mm	MeOH/THF	90/10	2	6,3	30	2,999	
	MeOH/THF	95/05	2	6,5	30	4,251	
Supelco Analytical Discovery F5, 100 x 4 mm, 3 μm	MeOH	-	1	13,7	30	1,712	nástřik 2μl
	MeOH/THF	90/10	1	14,1	30	1,360	nástřik 2μl
	ACN	-	1	9,9	30	1,274	nástřik 2μl
Chromolith Performance RP-18e, 100 x 3 mm	MeOH	-	2	6,2	30	2,723	nástřik 2μl
	MeOH/THF	90/10	2	6,0	30	1,219	nástřik 2μl
	ACN	-	2	4,9	30	3,820	nástřik 2μl
Luna 3u Phenyl Hexyl, 15 x 4,6 mm, 3 μm	MeOH	-	2	19,1	30	3,550	
	MeOH/THF	90/10	2	18,7	30	2,125	
	ACN	-	2	12,5	30	2,120	

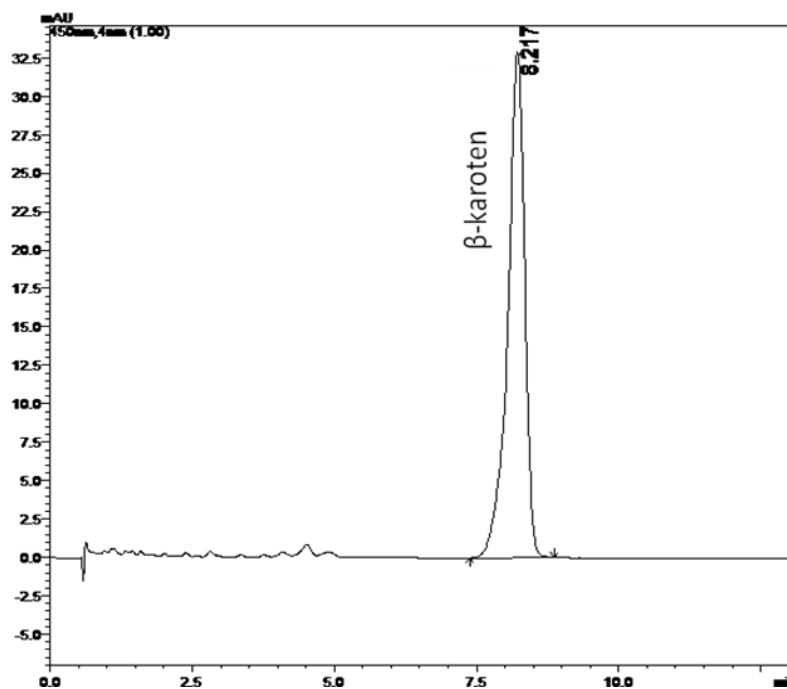
Kolona	Složky mobilní fáze	Poměr složek mobilní fáze	Průtok [ml/min]	Tlak [MPa]	Teplota [°C]	t _R β-karotenu [min]	Poznámka
Agilent Zorbax SB-C18, 50 x 4,6 mm, 1,8 μm	MeOH	-	1	9,8	30	8,217	nástřik 2μl
	MeOH/THF	90/10	1	9,5	30	3,707	nástřik 2μl
	ACN	-	1	6,4	30	13,824	nástřik 2μl dlouhá analýza
Agilent Zorbax SB-Phenyl, 75 x 4,6 mm, 3,5 μm	MeOH	-	1	14,6	30	2,043	nástřik 2μl
	MeOH/THF	90/10	1	14,5	30	1,485	nástřik 2μl
	ACN	-	1	9,7	30	1,461	nástřik 2μl
Agilent Zorbax TMS, 250 x 4,6 mm, 5 μm	MeOH	-	2	9,5	30	1,338	nástřik 2μl
	MeOH/THF	90/10	2	9,2	30	1,338	nástřik 2μl
	MeOH/H ₂ O	90/10	2	13,7	30	1,458	
	MeOH/H ₂ O	80/20	2	17,4	30	1,460	
	ACN	-	2	6,1	30	1,329	nástřik 2μl

Na následujících obrázcích (Obrázek 6, 7, 8, 9, 10, 11) jsou uvedeny chromatografické záznamy získané měřeními za podmínek (kolona, složení a průtok mobilní fáze, teplota), které se jeví jako potenciálně vhodné pro stanovení β -karotenu. V Tabulce 4 jsou tyto podmínky vyznačeny zeleně.

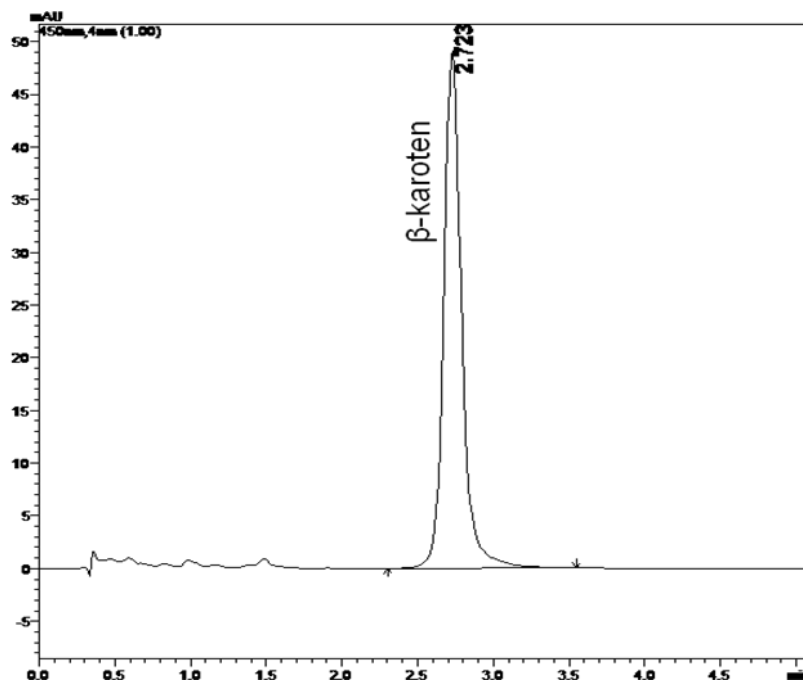
Obrázek 6: Chromatografický záznam – kolona Supelco Analytical Ascentis Express C18 (30 x 4,6 mm, 2,7 μ m), MF MeOH, průtok 2 ml/min, teplota 30 °C



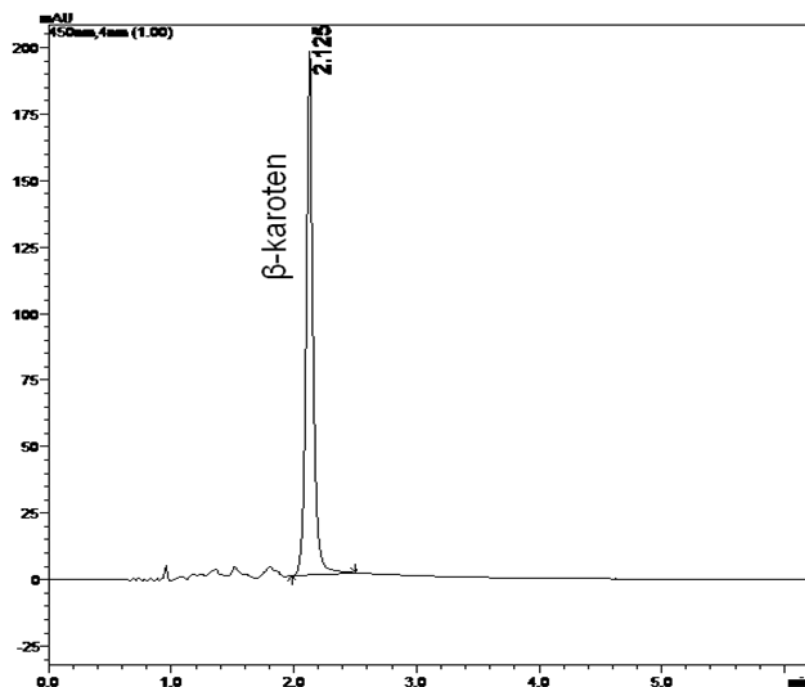
Obrázek 7: Chromatografický záznam – kolona Agilent Technologies Zorbax SB-C18 (4,6 x 50 mm; 1,8 μm), MF MeOH, průtok 1 ml/min, teplota 30 °C



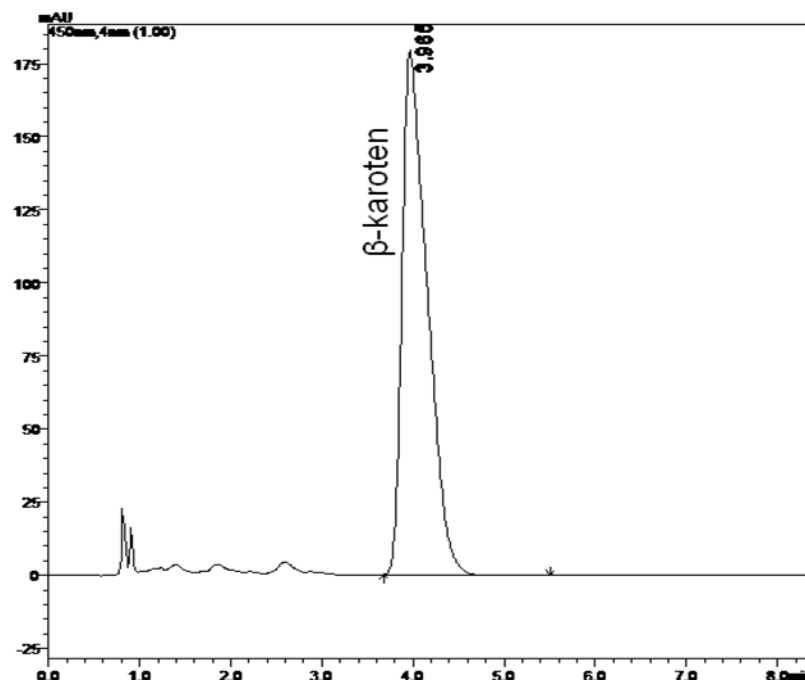
Obrázek 8: Chromatografický záznam – kolona Chromolith Performance RP-18e (100 x 3 mm), MF MeOH, průtok 2 ml/min, teplota 30 °C



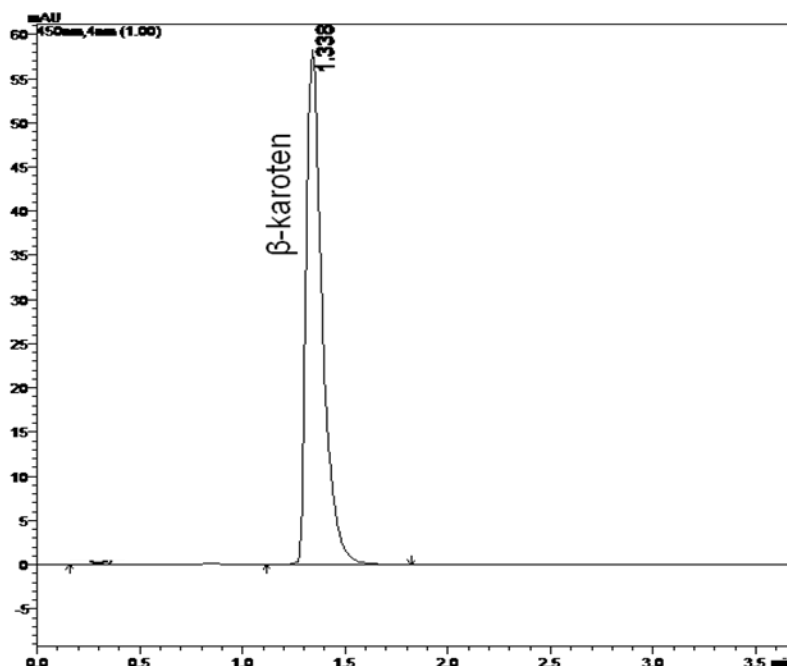
Obrázek 9: Chromatografický záznam – kolona Luna 3u Phenyl Hexyl (15 x 4,6 mm, 3 μm), MF MeOH/THF (90/10), průtok 2 ml/min, teplota 30 °C



Obrázek 10: Chromatografický záznam – kolona Supelco Analytical Discovery C18 (150 x 4,6 mm, 5 μm), MF MeOH/THF (90/10), průtok 2 ml/min, teplota 60 °C



Obrázek 11: Chromatografický záznam – kolona Agilent Zorbax TMS (250 x 4,6 mm, 5 µm), MF MeOH, průtok 2 ml/min, teplota 30 °C



Po posouzení chromatografického chování a retence β -karotenu na použitých kolonách se pro další práci a pro validaci metody jevily jako nejvhodnější tyto 2 kolony:

- »Chromolith Performance RP-18e, 100 x 3 mm;
- »Ascentis Express C18, 30 x 4,6 mm, 2,7 µm.

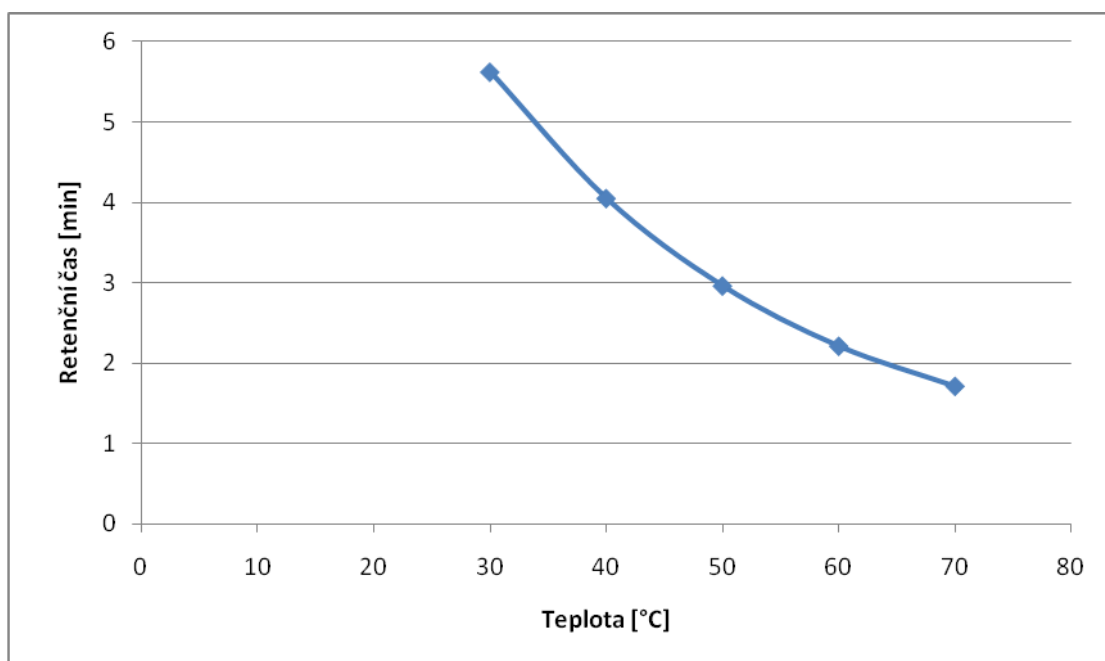
Vybrána byla **kolona Ascentis Express C18, 30 x 4,6 mm, 2,7 µm**. Šířka a symetrie píku byly nejvhodnější. Ostatní kolony za testovaných podmínek vykazovaly příliš nízkou, či naopak vysokou retenci β -karotenu, nebo nevhodnou symetrii píku.

U vybrané kolony byl navíc vyzkoušen vliv teploty na retenční časy β -karotenu a vyzkoušena byla i průtoková rychlost 1,5 ml/min (Tabulka 5 a Obrázek 12). Další měření a validace metody probíhala při průtokové rychlosti 1,5 ml/min a při teplotě 60 °C z důvodu požadavku na rychlost analýzy a vhodnost symetrie píku β -karotenu. Při průtokové rychlosti 1,5 ml/min a teplotě 60 °C byl retenční čas β -karotenu 2,185 min.

Tabulka 5: Vliv teploty na retenční časy β -karotenu u kolony Ascentis Express C18 (30 x 4,6 mm, 2,7 μ m) při složení MF MeOH, průtoku 1,5 ml/min, izokraticky

Teplota [°C]	t_R β -karotenu [min]
30	5,625
40	4,052
50	2,963
60	2,185
70	1,713

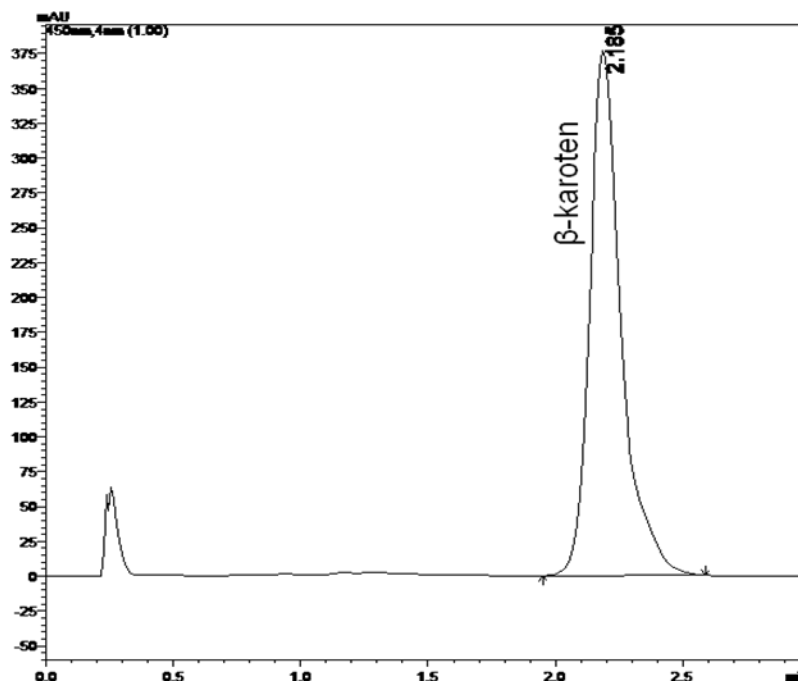
Obrázek 12: Závislost retenčního času β -karotenu na teplotě pro kolonu Ascentis Express C18 (30 x 4,6 mm, 2,7 μ m) (MF MeOH, průtok 1,5 ml/min, izokratická eluce)



5.1.2 Souhrn optimálních podmínek HPLC analýzy

<i>Chromatografická sestava:</i>	Shimadzu 20AD Prominence Liquid Chromatograph
<i>Detektor:</i>	SPD-M20A DAD
<i>Kolona:</i>	Ascentis Express C18, 30 x 4,6 mm, 2,7 μm (Supelco Analytical)
<i>Dávkování:</i>	3 μl
<i>Detekce:</i>	450 nm
<i>Mobilní fáze:</i>	100% MeOH
<i>Typ eluce:</i>	izokratický
<i>Průtoková rychlost:</i>	1,5 ml/min
<i>Teplota</i>	60 °C
<i>Čas analýzy:</i>	3 min
<i>Vyhodnocení:</i>	chromatografický software LC Solution

Obrázek 13: Chromatografický záznam – podmínky dle validace



5.2 Validace analytické metody

5.2.1 Test vhodnosti chromatografického systému

5.2.1.1 Účinnost chromatografického systému – zdánlivý počet teoretických pater

Účinnost kolony byla ověřena proměřením pracovního roztoku pro kalibraci o koncentraci $c = 125 \text{ mg/l}$ (příprava je popsána v kapitole 4.2.2) v testu na opakovatelnost a výpočet byl proveden z průměrů 3 měření podle vzorce:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2, \text{ kde:}$$

t_R je retenční čas [min];

$w_{1/2}$ je šířka píku v polovině jeho výšky [min].

Tabulka 6: Účinnost chromatografického systému

Analyzovaná látka	t_R [min]	$w_{1/2}$ [min]	N
B-karoten	2,185	0,123	1523

Zdánlivý počet teoretických pater přesahoval hodnotu 1500.

5.2.1.2 Faktor symetrie chromatografických píků

Hodnoty pro ověření symetrie chromatografického píku byly získány z analýz pracovního roztoku pro kalibraci o koncentraci $c = 125 \text{ mg/l}$ (příprava je popsána v kapitole 4.2.2) v testu na opakovatelnost. Výpočet faktoru symetrie byl proveden z průměrů 3 měření podle vzorce:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}, \text{ kde:}$$

$w_{0,05}$ je šířka píku ve vzdálenosti 5 % výšky píku;

d je vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v 5 % jeho výšky.

Tabulka 7: Symetrie chromatografických píků

Analyzovaná látka	$W_{0,05}$ [min]	d [min]	As
B-karoten	0,299	0,117	1,279

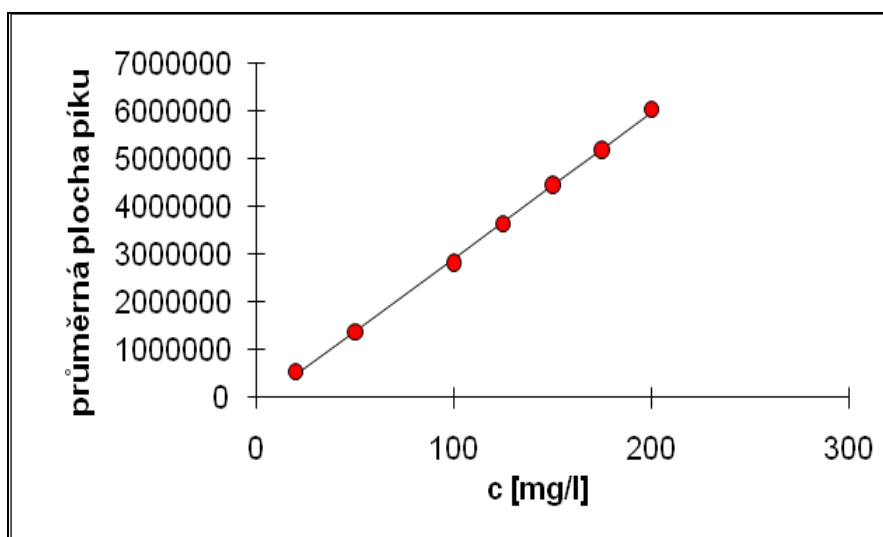
Faktor symetrie píku má být v rozmezí 0,8 a 1,5. Pro β -karoten požadavek vyhovuje.

5.2.2 Linearita

Byla použita metoda absolutní kalibrace. Bylo připraveno 7 pracovních roztoků β -karotenu pro kalibraci, jejichž příprava je popsána v kapitole 4.2.2 (koncentrace jsou uvedené v tabulce na Obrázku 14). U každého pracovního roztoku pro kalibraci byly provedeny 3 nástřiky. Plocha píku pro každou koncentraci je průměrem ze 3 měření a pro další výpočty byl brán průměr z těchto 3 hodnot. Závislost průměrných ploch píků pracovních roztoků pro kalibraci na jejich koncentraci byla vyhodnocena metodou lineární regrese. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 14.

Obrázek 14: Testování linearity - β -karoten

Koncentrace β -karotenu [mg/l]	Průměrná plocha píku β -karotenu
20	553284
50	1377118
100	2829744
125	3644825
150	4457825
175	5193295
200	6029914



Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	7	Odhad chyby ± 387,1846
Směrnice	k =	30495,96	
Absolutní člen	q =	-131526,2	± 51041,69
Korelační koeficient	r =	0,999597	
Reziduální odchylka	$s_{rez} =$	61940,89	

Požadavek na linearitu ($r > 0,999000$) byl splněn.

5.2.3 Opakovatelnost

3 μ l pracovních roztoků pro kalibraci o koncentracích $c = 20, 125, 200$ mg/l, jejichž příprava je popsána v kapitole 4.2.2, bylo šestkrát nadávkováno na kolonu. Z ploch píků β -karotenu byly vypočítány relativní směrodatné odchylky (RSD). Byly získány výsledky uvedené v Tabulkách 8, 9, 10.

Tabulka 8: Opakovatelnost analýzy pracovního roztoku pro kalibraci ($c = 20$ mg/l)

Koncentrace β -karotenu 20 mg/l	
Číslo pokusu	Plocha píku β -karotenu
1	556525
2	554436
3	548893
4	546940
5	546075
6	544354
n	6
\bar{y}	549537
SD	4875
RSD [%]	0,89

Požadavek – RSD < 1 % byla vyhovující.

Tabulka 9: Opakovatelnost analýzy pracovního roztoku pro kalibraci (c = 125 mg/l)

Koncentrace β -karotenu 125 mg/l	
Číslo pokusu	Plocha píku β -karotenu
1	3634314
2	3651169
3	3648991
4	3651429
5	3653028
6	3663812
n	6
\bar{y}	3650457
SD	9478
RSD [%]	0,26

Požadavek – RSD <1 % byla vyhovující.

Tabulka 10: Opakovatelnost analýzy pracovního roztoku pro kalibraci (c = 200 mg/l)

Koncentrace β -karotenu 200 mg/l	
Číslo pokusu	Plocha píku β -karotenu
1	6027903
2	6021564
3	6040275
4	6036879
5	6036784
6	6026830
n	6
\bar{y}	6031706
SD	7309
RSD [%]	0,12

Požadavek – RSD <1 % byla vyhovující.

5.2.4 Přesnost

Bylo naváženo 10 kapslí Walmark, jejich hmotnost byla 2,2465 g. Postupně bylo připraveno a analyzováno 6 pracovních roztoků pro přesnost, jejichž příprava je totožná s postupem v kapitole 4.3.1. U každého roztoku byly provedeny 3 nástřiky na kolonu. Z hodnot ploch píků β -karotenu těchto 3 nástřiků byla pro každý roztok vypočítána průměrná plocha píku, která byla dále přepočtena na navážku 0,20 g. Byla vypočítána relativní směrodatná odchylka (RSD) stanovení 6 roztoků. Výsledky jsou uspořádány v Tabulce 11.

Tabulka 11: Přesnost metody – β -karoten

Vzorek	Navážka kapsle Walmark [g]	Průměrná plocha píku	Plocha píku přepočtená na 0,2000 g
1	0,2279	4667144	4095782
2	0,2215	4644469	4193651
3	0,2238	4721275	4219191
4	0,2208	4712792	4268833
5	0,2310	4684164	4055553
6	0,2242	4699245	4192012

n	6
\bar{y}	4170837
SD	79792
RSD [%]	1,91

Požadavek – RSD < 5 % byl splněn.

5.2.5 Správnost

Pro hodnocení správnosti byla použita metoda standardního přídávku.

Bylo naváženo 10 kapslí Walmark, jejich hmotnost byla 2,2211 g. Postupně bylo připraveno 6 pracovních roztoků pro správnost. Tyto roztoky byly připraveny přidáním přibližně 20 ml přibližně 1 M NaOH k jedné kapsli Walmark umístěné ve zkumavce. Směs byla ponořena na 20 minut do ultrazvukové lázně. Poté byly přidány 2,00 ml standardního roztoku β -karotenu ($c = 100 \text{ mg/l}$), jehož příprava je popsána v kapitole 4.2.2, 18,00 ml chloroformu a směs byla 30 minut protřepávána. Další postup je totožný s postupem v kapitole 4.3.1.

Bylo tedy změřeno 6 pracovních roztoků pro správnost (s přídávkem standardního roztoku β -karotenu ($c = 100 \text{ mg/l}$)). U každého roztoku byly provedeny 3 nástřiky na kolonu. Z hodnot ploch píků β -karotenu každých 3 nástřiků byla pro každý roztok vypočítána průměrná plocha píku, která byla dále přepočtena na navážku 0,20 g.

Pro výpočet výtěžností byla použita průměrná plocha píku každého pracovního roztoku pro správnost a hodnota \bar{y} získaná při měření 6 pracovních roztoků pro přesnost, která je uvedena v kapitole 5.2.4 (bez přídávku standardního roztoku β -karotenu ($c = 100 \text{ mg/l}$)). Rozdílem těchto dvou hodnot je plocha píku přidaného β -karotenu zjištěná HPLC metodou (A_i).

Výtěžnost (R_i) v % byla vypočtena podle vzorce:

$$R_i = 100 \cdot \frac{A_i}{A_0}, \text{ kde:}$$

A_i je plocha píku přidaného β -karotenu zjištěná metodou HPLC;

A_0 je plocha odpovídající známé koncentraci přidaného β -karotenu.

Byly získány výsledky uvedené v Tabulce 12.

Tabulka 12: Správnost metody – β -karoten

Vzorek	A_0	A_i	R_i [%]
1	2518527	2689833	106,8
2		2632384	104,5
3		2476744	98,3
4		2540316	100,9
5		2501495	99,3
6		2629785	104,4

n

6

\bar{y}

102,4

SD

3,00

RSD [%]

2,92

Požadavek - R_i v intervalu 100 ± 5 % vyhovuje, RSD < 5 % vyhovuje.

5.2.6 Robustnost

Testování míry vlivu proměnných experimentálních podmínek na stanovení analytu bylo provedeno u pracovního roztoku pro kalibraci o koncentraci $c = 125 \text{ mg/l}$.

5.2.6.1 Vliv teploty

Vliv teploty byl testován při $50 \text{ }^\circ\text{C}$ a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ pro srovnání s původní teplotou $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Každá teplota byla proměřena třikrát za podmínek složení mobilní fáze MeOH a průtoku mobilní fáze $1,5 \text{ ml/min}$.

a) Vliv na plochu chromatografických píků

$$A_R = 100 \cdot \frac{A_i}{A_{60^\circ\text{C}}}, \text{ kde:}$$

A_i je plocha píku za testovaných podmínek;

$A_{60^\circ\text{C}}$ je plocha píku za standardních podmínek.

Byly získány výsledky uvedené v Tabulce 13. Relativní plocha píku vztažená na plochu píku při optimální teplotě se pohybovala v rozmezí $102,0 \%$ a $107,9 \%$.

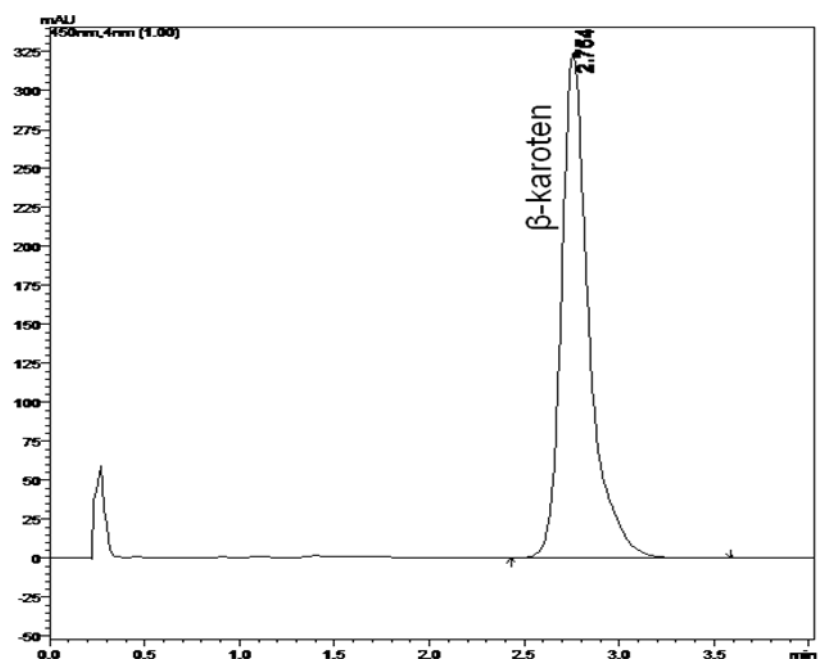
Tabulka 13: Vliv teploty na plochu píku β -karotenu

Teplota [$^\circ\text{C}$]	β -karoten	
	A_i	A_R [%]
50	3293639	102,0
60	3230130	100,0
70	3484967	107,9

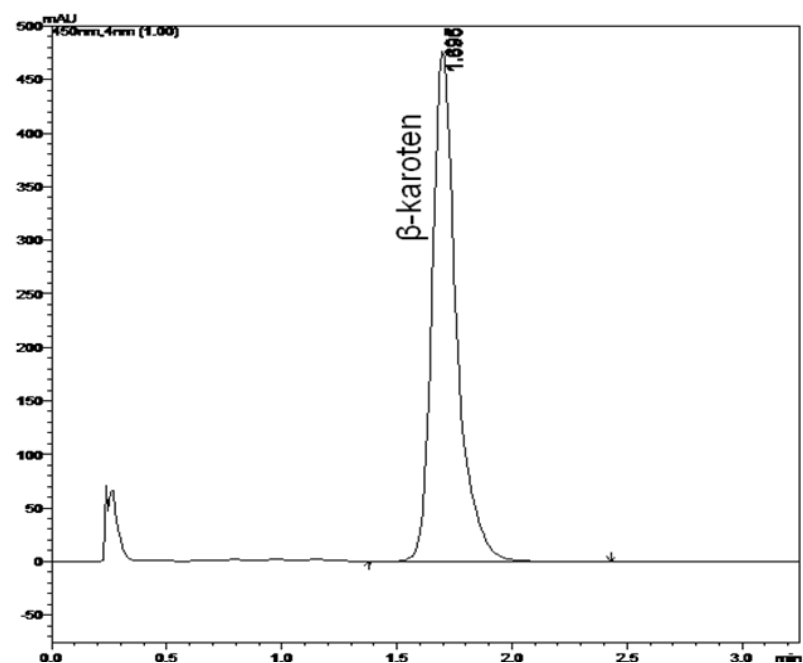
b) Vliv na retenční čas

Jak můžeme vidět v Tabulce 5 v kapitole 5.1.1, teplota ovlivňuje dobu trvání analýzy. Z tohoto hlediska je doporučeno použití teploty $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Bylo zjištěno, že s klesající teplotou se významně prodlužuje retenční čas β -karotenu.

**Obrázek 15: Chromatografický záznam – Robustnost: vliv teploty 50 °C
(MF MeOH, průtok 1,5 ml/min)**



**Obrázek 16: Chromatografický záznam – Robustnost: vliv teploty 70 °C
(MF MeOH, průtok 1,5 ml/min)**



5.2.6.2 Vliv průtoku mobilní fáze

Vliv průtoku mobilní fáze byl testován při průtoku 1 ml/min a 2 ml/min pro srovnání s původním průtokem 1,5 ml/min. Každý průtok byl proměřen třikrát za podmínek složení mobilní fáze MeOH a teploty 60 °C.

a) Vliv na plochu chromatografických píků

$$b) A_R = 100 \cdot \frac{A_i}{A_{1,5 \text{ ml/min}}}, \text{ kde:}$$

A_i je průtok mobilní fáze za testovaných podmínek;

$A_{1,5 \text{ ml/min}}$ je průtok mobilní fáze za standardních podmínek.

Byly získány výsledky uvedené v Tabulce 14. Relativní plocha píku vztažená na plochu píku při optimálním průtoku mobilní fáze se pohybovala v rozmezí 76,5 % až 151,6 %.

Tabulka 14: Vliv průtoku mobilní fáze na plochu píku β -karotenu

Průtok mobilní fáze [ml/min]	β -karoten	
	A_i	A_R [%]
1,0	4897695	151,6
1,5	3230130	100,0
2,0	2471102	76,5

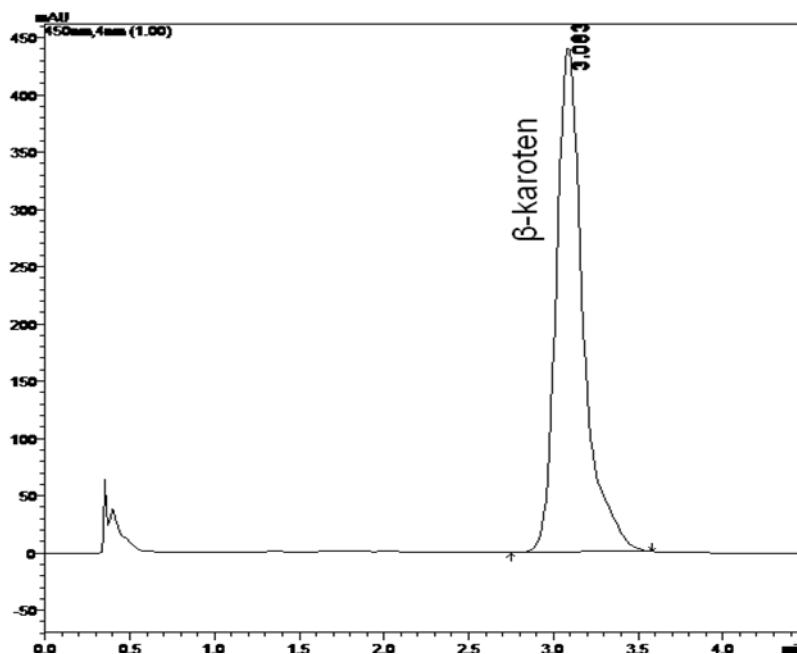
b) Vliv na retenční čas

Jak můžeme vidět v Tabulce 15, různý průtok mobilní fáze ovlivňuje dobu trvání analýzy. Z tohoto hlediska je doporučeno použití průtoku 1,5 ml/min. Bylo zjištěno, že s měnícím se průtokem mobilní fáze se mění retenční čas β -karotenu.

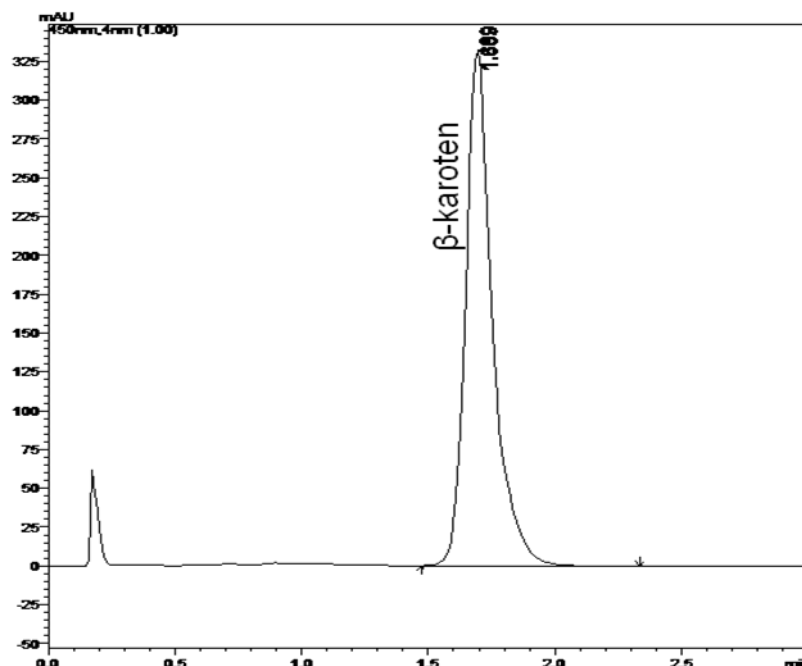
Tabulka 15: Vliv průtoku mobilní fáze na retenční čas β -karotenu

Průtok mobilní fáze [ml/min]	t_R β -karotenu [min]
1,0	3,083
1,5	2,185
2,0	1,689

Obrázek 17: Chromatografický záznam – Robustnost: vliv průtoku MF 1 ml/min (MF MeOH, teplota 60 °C)



Obrázek 18: Chromatografický záznam – Robustnost: vliv průtoku MF 2 ml/min (MF MeOH, teplota 60 °C)



5.2.7 Stabilita

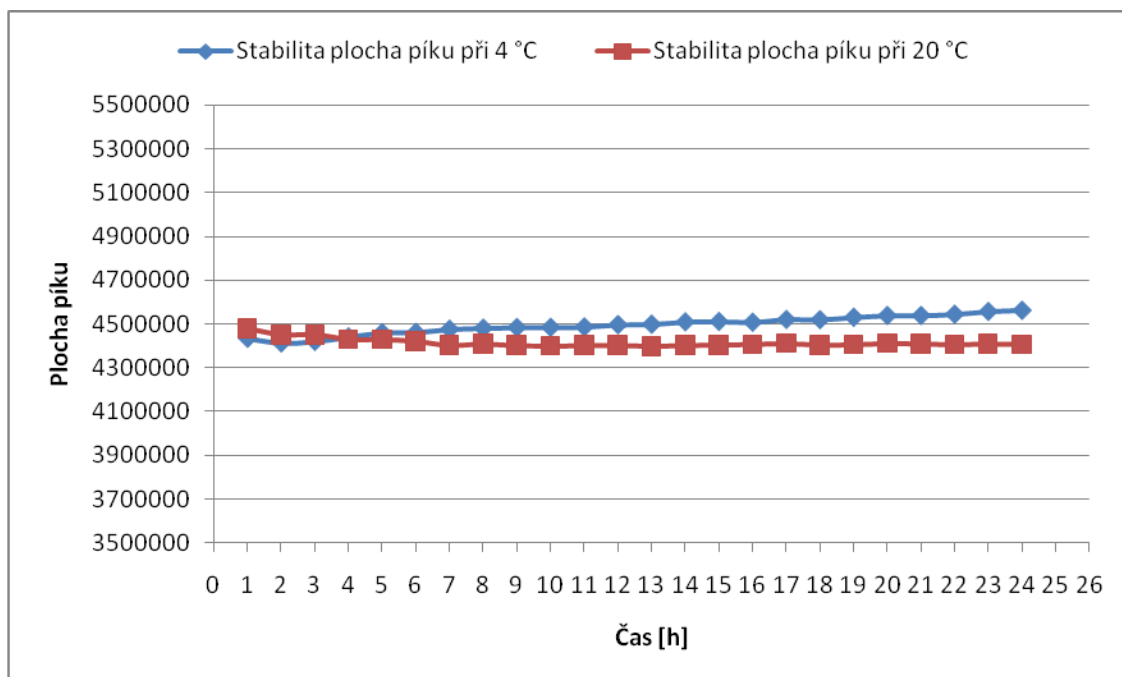
Jak je uvedeno v kapitole 3.4, charakteristická struktura karotenoidů zapříčiňuje jejich nestabilitu za určitých podmínek. Protože byla předpokládána nízká stabilita β -karotenu ve standardních roztocích a vzorcích, byla stabilita testována u pracovního roztoku standardu β -karotenu za teploty 20 °C a 4 °C po dobu 24 hod bez přístupu světla. Výsledky jsou uspořádány v Tabulce 16.

Pracovní roztok standardu byl připraven rozpuštěním 7,73 mg β -karotenu v chloroformu v 50,00 ml odměrné baňce a doplněním chloroformem po rysku ($c = 154,6$ mg/l).

Tabulka 16: Stabilita β -karotenu mezi 1. a 24. hodinou

Měření v čase [h]	Plocha píku (4 °C)	Plocha píku (20 °C)
1	4435165	4478876
2	4414269	4450918
3	4421033	4451740
4	4441798	4430172
5	4461055	4429652
6	4462483	4421346
7	4476789	4403141
8	4481427	4409363
9	4484877	4401846
10	4485369	4399695
11	4487201	4402017
12	4497685	4403270
13	4499494	4399169
14	4510502	4402872
15	4512347	4404633
16	4509042	4407374
17	4521510	4411358
18	4520447	4404496
19	4531368	4406084
20	4539592	4411321
21	4539886	4409744
22	4545161	4406300
23	4558123	4409421
24	4563331	4407077

Obrázek 19: Stabilita β -karotenu v roztoku v závislosti na době a způsobu uchování



Předpokládaná nestabilita β -karotenu v roztoku za testovaných podmínek nebyla prokázána. Rozdíly v hodnotách ploch píků mezi 1. a 24. hodinou se pohybují v intervalu blízkému 2%, což odpovídá spíše chybě měření v rámci dlouhého časového úseku než potvrzenému rozkladu β -karotenu.

5.3 Stanovení obsahu β -karotenu v potravních

doplňcích

Byly připraveny pracovní standardní roztok pro hodnocení obsahu β -karotenu v jednotlivých potravinových doplňcích a čtyři roztoky vzorku pro každý testovaný přípravek. Pracovní standardní roztok byl připraven čerstvý rozpuštěním 8,18 mg β -karotenu v chloroformu v 50,00 ml odměrné baňce a doplněním chloroformem po rysku (viz. kapitola 4.2.3). U každého roztoku byly provedeny tři HPLC analýzy. Podle vzorce uvedeného v kapitole 4.4 byl z průměrů naměřených hodnot vypočítán obsah β -karotenu v mg. Z průměrného obsahu β -karotenu v jedné tobolce/tabletě každého přípravku bylo vypočítáno, kolik procent z deklarovaného množství tobolka/tableta opravdu obsahuje. Deklarovaný obsah β -karotenu v testovaných potravních doplňcích je uveden v Tabulce 17.

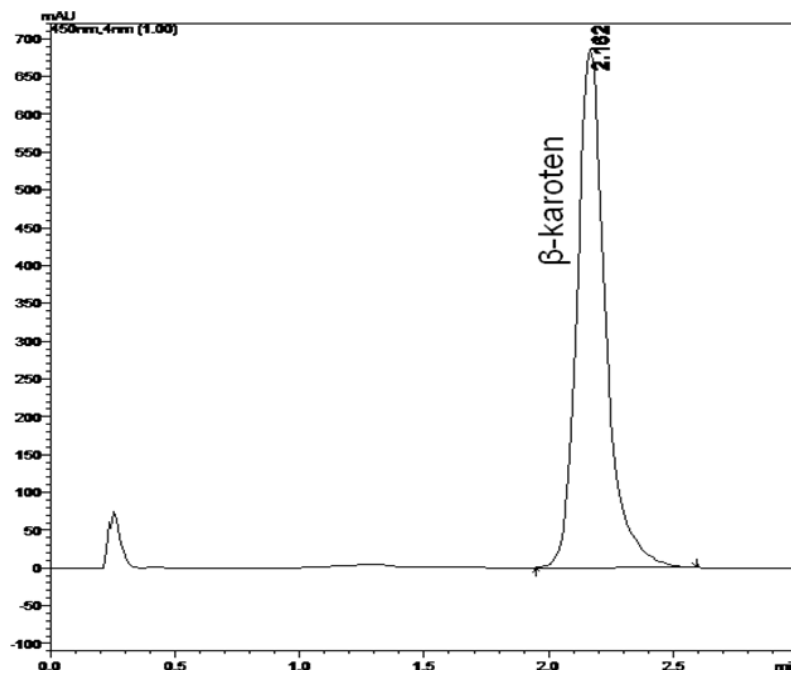
Tabulka č. 17: Deklarovaný obsah β -karotenu v testovaných potravních doplňcích

Přípravek	Uváděný obsah β -karotenu
Betakaroten Farmax	6 mg/1 tobolku
GS Betakaroten FORTE	15 mg/1 tobolku
Walmark Betakaroten	6 mg/1 tobolku
Bioaktivní karoten	9 mg/1 tobolku
Beta karoten Max	6 mg/1 tobolku
BETAVID + LUTEIN	3 mg/1 tabletu
Karovit	6 mg/1 tabletu
SELZINK PLUS	6 mg/1 tabletu
Pupalkový olej	30 mg/100 g oleje

5.3.1 Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku GS Betakaroten FORTE

Na obalu přípravku deklaruje výrobce 15 mg β -karotenu v jedné kapsli přípravku. Průměrný obsah β -karotenu v přípravku stanovený danou metodou byl 15,01 mg, což odpovídá 100,07 % deklarovaného množství β -karotenu.

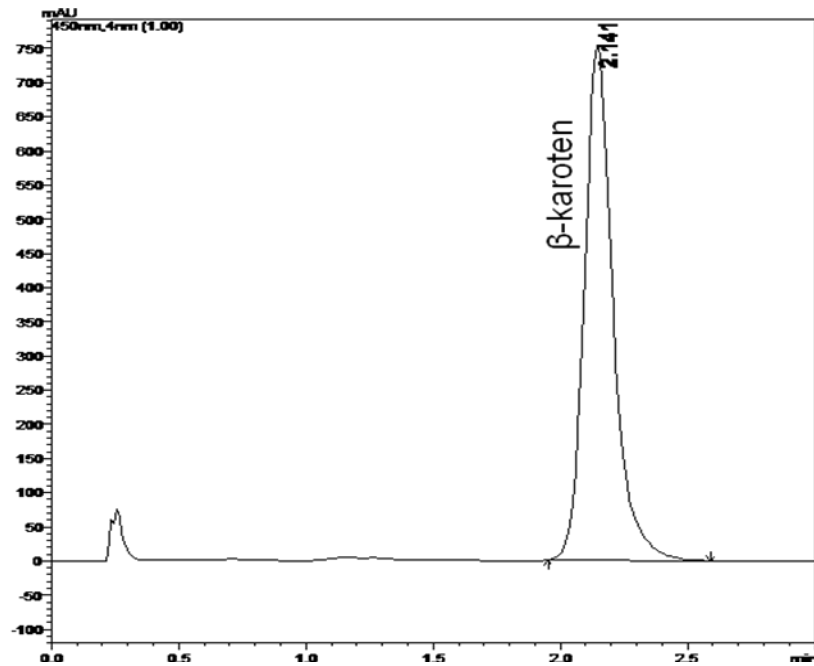
Obrázek 20: Chromatografický záznam - Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku GS Betakaroten FORTE



5.3.2 Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku Bioaktivní karoten

Na obalu přípravku deklaruje výrobce 9 mg β -karotenu v jedné kapsli přípravku. Průměrný obsah β -karotenu v přípravku stanovený danou metodou byl 8,73 mg, což odpovídá 97,00 % deklarovaného množství β -karotenu.

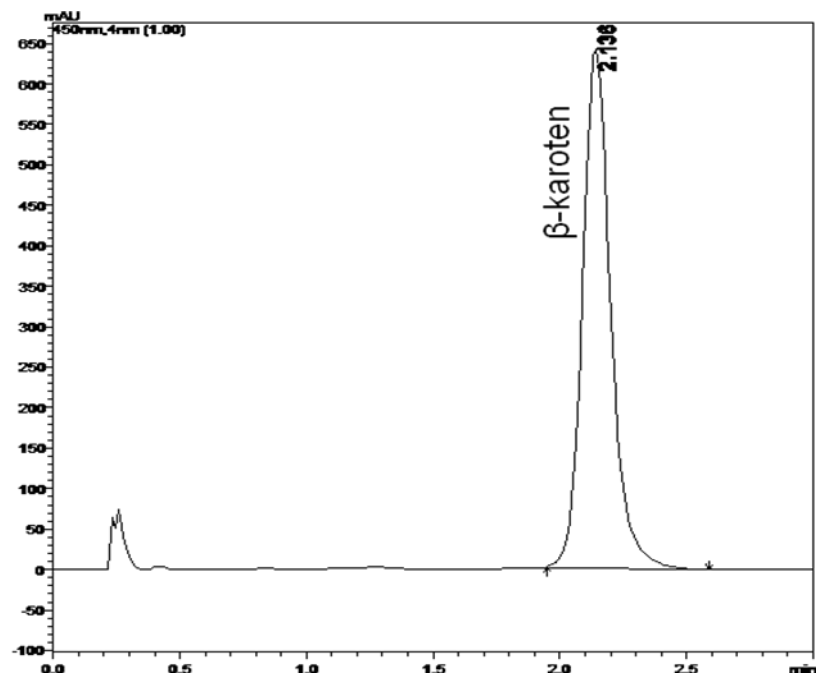
Obrázek 21: Chromatografický záznam - Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku Bioaktivní karoten



5.3.3 Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku Max Beta karoten

Na obalu přípravku deklaruje výrobce 6 mg β -karotenu v jedné tobolce přípravku. Průměrný obsah β -karotenu v přípravku stanovený danou metodou byl 6,70 mg, což odpovídá 111,67 % deklarovaného množství β -karotenu.

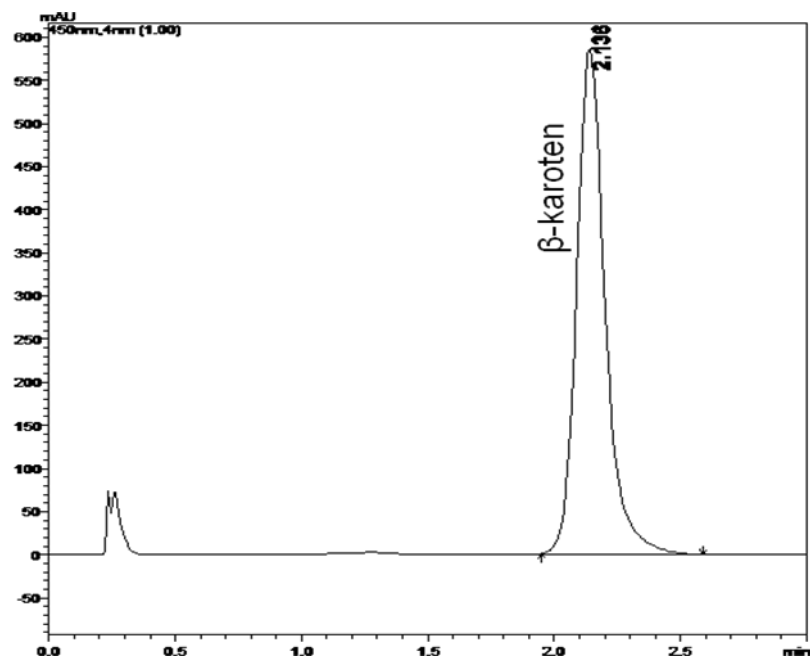
Obrázek 22: Chromatografický záznam - Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku Max Beta karoten



5.3.4 Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku Walmark Betakaroten

Na obalu přípravku deklaruje výrobce 6 mg β -karotenu v jedné tobolce přípravku. Průměrný obsah β -karotenu v přípravku stanovený danou metodou byl 6,45 mg, což odpovídá 107,50 % deklarovaného množství β -karotenu.

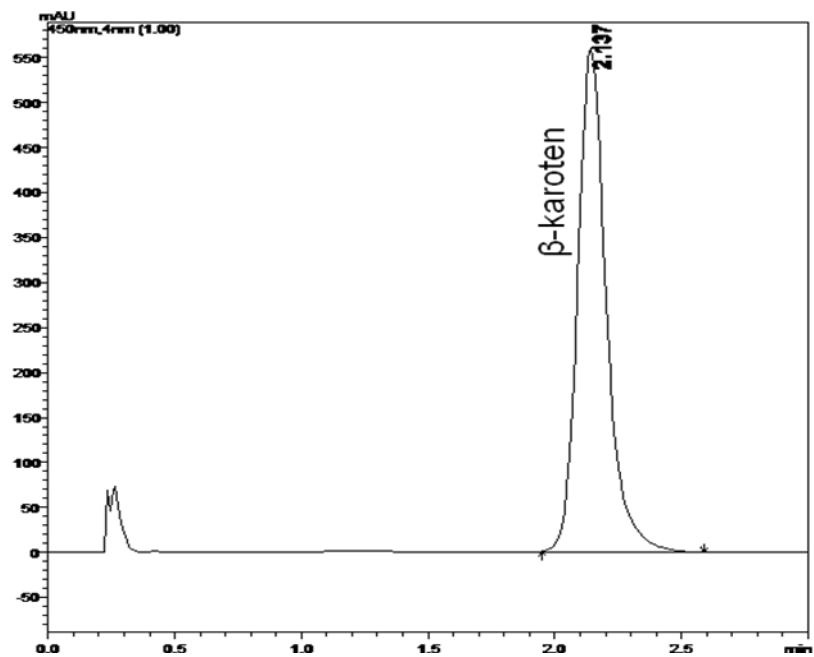
Obrázek 23: Chromatografický záznam - Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku Walmark Betakaroten



5.3.5 Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku Betakaroten Farmax

Na obalu přípravku deklaruje výrobce 6 mg β -karotenu v jedné tobolce přípravku. Průměrný obsah β -karotenu v přípravku stanovený danou metodou byl 6,44 mg, což odpovídá 107,34 % deklarovaného množství β -karotenu.

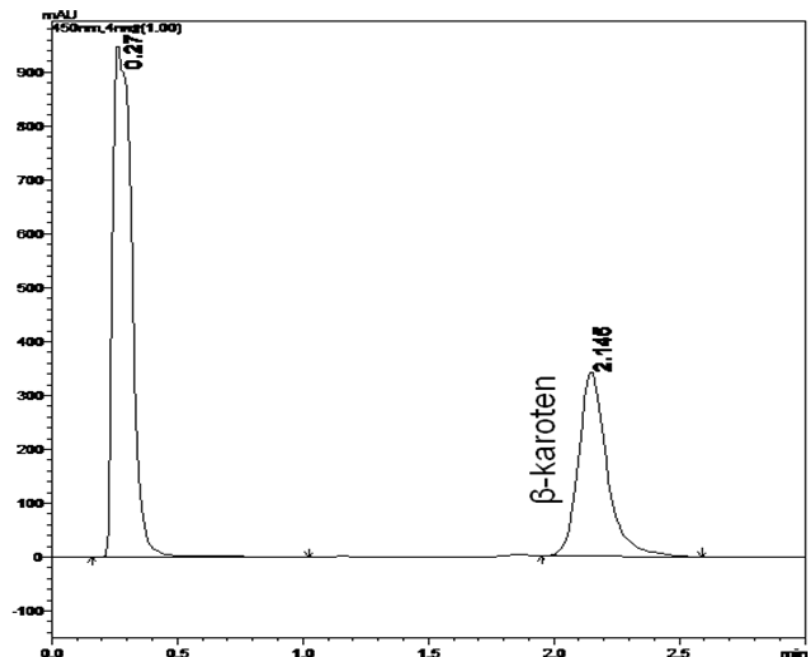
Obrázek 24: Chromatografický záznam - Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku Betakaroten Farmax



5.3.6 Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku BETAVID + LUTEIN

Na obalu přípravku deklaruje výrobce 3 mg β -karotenu v jedné tabletě přípravku. Průměrný obsah β -karotenu v přípravku stanovený danou metodou byl 1,73 mg, což odpovídá 72,08 % deklarovaného množství β -karotenu.

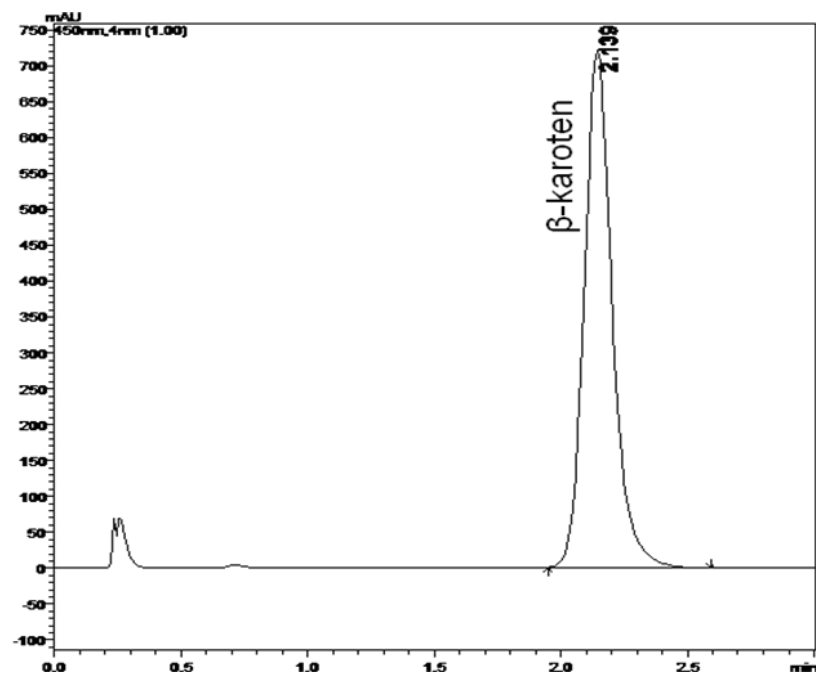
Obrázek 25: Chromatografický záznam - Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku BETAVID + LUTEIN



5.3.7 Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku Karovit

Na obalu přípravku deklaruje výrobce 6 mg β -karotenu v jedné tabletě přípravku. Průměrný obsah β -karotenu v přípravku stanovený danou metodou byl 7,63 mg, což odpovídá 127,17 % deklarovaného množství β -karotenu.

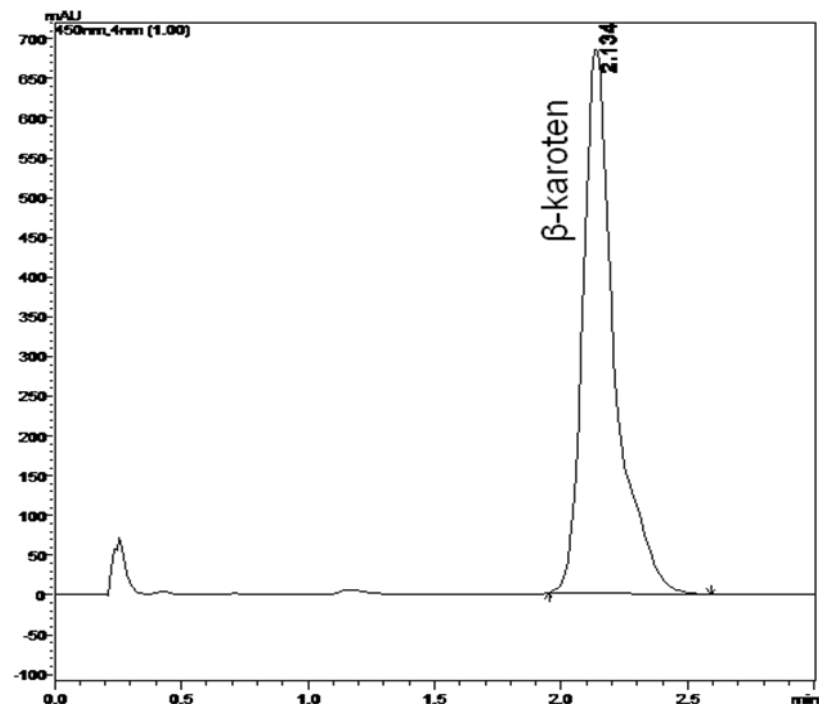
Obrázek 26: Chromatografický záznam - Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku Karovit



5.3.8 Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku SELZINK PLUS

Na obalu přípravku deklaruje výrobce 6 mg β -karotenu v jedné tabletě přípravku. Průměrný obsah β -karotenu v přípravku stanovený danou metodou byl 7,73 mg, což odpovídá 128,83 % deklarovaného množství β -karotenu.

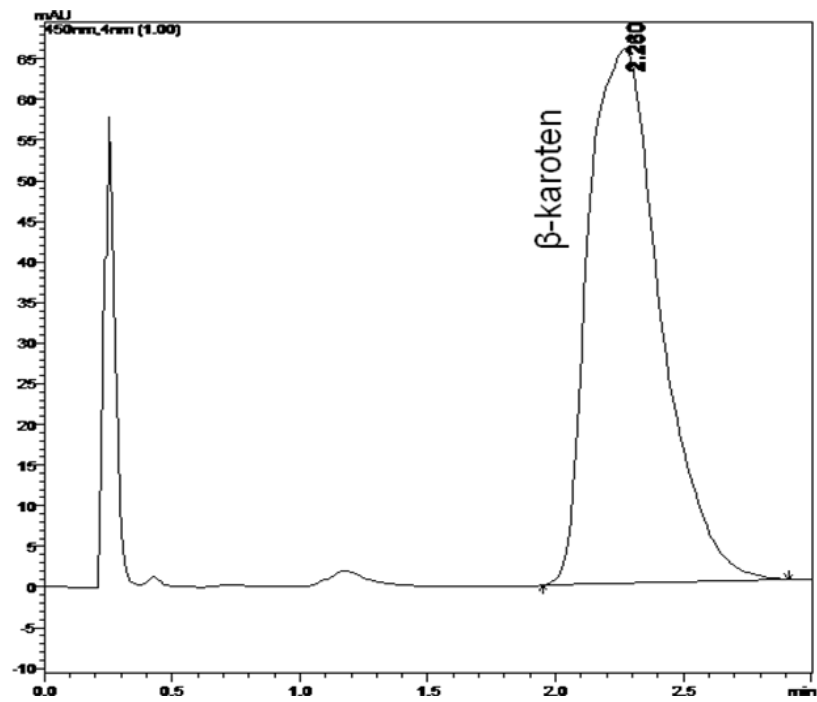
Obrázek 27: Chromatografický záznam - Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku SELZINK PLUS



5.3.9 Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku Pupalkový olej

Na obalu přípravku deklaruje výrobce 30 mg β -karotenu/100 g přípravku. Průměrný obsah β -karotenu v přípravku stanovený danou metodou byl 21,96 mg, což odpovídá 73,20 % deklarovaného množství β -karotenu.

Obrázek 28: Chromatografický záznam - Stanovení obsahu β -karotenu v přípravku Pupalkový olej



Tabulka 18: Přehled analýz všech vzorků všech testovaných přípravků

Potravní doplněk	Průměrná hmotnost 1 kapsle/tobolky [g]	Navážka vzorku [g]	Průměrná plocha píku β-karotenu	Obsah β-karotenu ve vzorku [mg]	% β-karotenu z deklarovaného množství
GS Betakaroten FORTE					
vzorek 1	0,2618	0,2653	5392714	15,0596	100,07
vzorek 2		0,2636	5257975	14,7782	
vzorek 3		0,2669	5372609	14,9136	
vzorek 4		0,2642	5446645	15,2736	
Bioaktivní karoten					
vzorek 1	0,4066	0,4010	5950226	8,6049	97,00
vzorek 2		0,4034	6093601	8,69	
vzorek 3		0,4049	6125775	8,7035	
vzorek 4		0,4085	6383102	8,9891	
Max Beta karoten					
vzorek 1	0,2191	0,2209	4948621	6,9477	111,67
vzorek 2		0,2206	4678081	6,5768	
vzorek 3		0,2231	4645768	6,4582	
vzorek 4		0,2016	4420143	6,7999	
Walmark Beta karoten					
vzorek 1	0,2235	0,2237	4567718	6,4569	107,50
vzorek 2		0,2252	4570139	6,4173	
vzorek 3		0,2258	4565375	6,3936	
vzorek 4		0,224	4634912	6,5431	

Potravní doplněk	Průměrná hmotnost 1 kapsle/tobolky [g]	Navážka vzorku [g]	Průměrná plocha píku β-karotenu	Obsah β-karotenu ve vzorku [mg]	% β-karotenu z deklarovaného množství
Betakaroten Farmax					
vzorek 1	0,2401	0,2342	4389204	6,3666	107,34
vzorek 2		0,2397	4576164	6,4854	
vzorek 3		0,2448	4669725	6,4802	
vzorek 4		0,2425	4577255	6,4121	
BETAVID+LUTEIN					
vzorek 1	0,3268	0,3272	2707847	1,8589	72,08
vzorek 2		0,3272	2513551	1,7255	
vzorek 3		0,3269	2306985	1,5852	
vzorek 4		0,3267	2549002	1,7525	
Karovit					
vzorek 1	0,3542	0,3537	5544116	7,6320	127,17
vzorek 2		0,3548	5723059	7,8539	
vzorek 3		0,3549	5604440	7,6889	
vzorek 4		0,3543	5351291	7,3541	
SELZINK PLUS					
vzorek 1	0,6725	0,6734	5974030	8,2012	128,83
vzorek 2		0,6723	5529516	7,6034	
vzorek 3		0,6726	5621536	7,7265	
vzorek 4		0,6728	5385008	7,3992	
Pupalkový olej					
vzorek 1	2,0000	2,0034	1262760	21,6613	73,20
vzorek 2		2,0736	1345522	22,2996	
vzorek 3		2,0216	1291907	21,9618	
vzorek 4		2,0208	1288631	21,9148	

6 Závěr

Byla optimalizována a validována HPLC metoda určená pro stanovení β -karotenu v potravních doplňcích Betakaroten Farmax, GS Betakarotén FORTE (GreenSwan pharmaceuticals), Walmark Betakaroten, Bioaktivní karoten (Pharma Nord Denmark), Beta karoten Max, BETAVID + LUTEIN (Naturvita), Karovit (Vitabalans Oy), SELZINK PLUS (PRO.MED.CS), Pupalkový olej (Aromatica).

Byly nalezeny tyto optimální chromatografické podmínky HPLC metody s Vis detekcí pro stanovení β -karotenu:

<i>Kolona:</i>	Ascentis Express C18, 30 x 4,6 mm, 2,7 μ m (Supelco Analytical);
<i>Dávkování:</i>	3 μ l;
<i>Detekce:</i>	450 nm;
<i>Mobilní fáze:</i>	MeOH;
<i>Typ eluce:</i>	izokratický;
<i>Průtoková rychlost:</i>	1,5 ml/min;
<i>Teplota:</i>	60 °C;
<i>Čas analýzy:</i>	3 min.

U testování parametru linearity bylo vyhověno požadavku na hodnotu korelačního koeficientu $r > 0,9990$ pro β -karoten ($r = 0,999597$).

Opakovatelnost vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka RSD byla pro β -karoten u pracovního roztoku pro kalibraci o koncentraci 20 mg/l 0,89 %, u pracovního roztoku pro kalibraci o koncentraci 125 mg/l 0,26 %, u pracovního roztoku pro kalibraci o koncentraci 200 mg/l 0,12 %.

Byla hodnocena přesnost metody a požadavek na relativní směrodatnou odchylku RSD < 5 % byl splněn (RSD pro β -karoten 1,91 %).

Správnost stanovení je vyjádřena veličinou výtěžnosti R_i . Požadavek, aby se hodnota výtěžnosti R_i pohybovala v rozmezí $100 \pm 5 \%$ byl splněn. Výtěžnost dosahovala hodnot 98,3 % až 106,8 %.

Testování robustnosti prokázalo vhodnost teploty (60 °C) a průtoku mobilní fáze (1,5 ml/min). Teplota ovlivňuje dobu trvání analýzy. S klesající teplotou se významně prodlužuje retenční čas β -karotenu. Různý průtok mobilní fáze ovlivňuje velikost plochy píku β -karotenu i dobu trvání analýzy.

Stabilita byla testována po dobu 24 hodin a za daných podmínek nebyl s jistotou prokázán rozklad β -karotenu.

Metoda byla použita pro stanovení β -karotenu v testovaných potravních doplňcích. V případě přípravku GS Betakarotén FORTE odpovídají naměřené hodnoty 100,07 % množství β -karotenu, které deklaruje výrobce na obalu. V případě přípravku Bioaktivní karoten odpovídají naměřené hodnoty 97,00 % deklarovaného množství β -karotenu. Naměřené hodnoty v případě přípravku Max Beta karoten odpovídají 111,67 % deklarovaného množství, přípravku Walmark Betakaroten odpovídají 107,50 % deklarovaného množství, přípravku Betakaroten Farmax odpovídají 107,34 % deklarovaného množství, přípravku BETAVID + LUTEIN odpovídají 72,08 % deklarovaného množství, přípravku Karovit odpovídají 127,17 % deklarovaného množství, přípravku SELZINK PLUS odpovídají 128,83 % deklarovaného množství a v případě přípravku Pupalkový olej odpovídají 73,20 % deklarovaného množství.

7 Seznam použité literatury

- [1]Hlaváčková, M. *Analytické možnosti stanovení luteinu, betakarotenu a zeaxanthinu v potravinách*. Bakalářská práce. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Hradec Králové, 2009.
- [2]*The vitamin section* [online]. 17. 5. 2008, [cit. 31. 3. 2011]. Dostupný z WWW: <<http://www.vitaminstuff.com/betacarotene.html>>.
- [3]Dvořáková, P. *HPLC stanovení luteinu, zeaxanthinu a betakarotenu v potravních doplňcích*. Rigorózní práce. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Hradec Králové, 2010.
- [4]*Beta-Carotene* [online]. 10. 4. 2011, [cit. 11. 4. 2011]. Dostupný z WWW: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Betacarotene>>.
- [5]*Beta-carotene colourings* [online]. 19.6.2001, [cit. 31. 3. 2011]. Dostupn z WWW: <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/carotene/beta-carotene_colourings.html>.
- [6]*Wellness Guide to Dietary Supplements* [online]. 24. 4. 2011, [cit. 24. 4. 2011]. Dostupný z WWW:<<http://www.wellnessletter.com/html/ds/dsBetaCarotene.php>>.
- [7]*It: Beta Carotene* [online]. 1. 12. 2006, [cit. 31. 3. 2011]. Dostupný z WWW: <https://wiki.ch.ic.ac.uk/wiki/index.php?title=It:Beta_Carotene>.
- [8]Vodrážka, Z. *Biochemie*. 2. opravené vydání. Praha: Academia, 2002. 506 s. ISBN 80-200-0600-1.

- [9] Klouda, P. *Moderní analytické metody*. 2. Vydání. Ostrava, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [10] Šulová, R. *Zavedení metody stanovení betakarotenu ve vybraných odrůdách pšenice* [online]. 28. 2. 2011, aktualizováno 3. 3. 2011, [cit. 4. 4. 2011]. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř. Dostupný z WWW: <<http://www.ukzuz.cz/Uploads/169646-7-Bulletin+NRL+12011pdf.aspx>>.
- [11] *Hodnocení linearity* [online]. 14. 12. 2010, [cit. 4. 4. 2011]. Dostupný z WWW: <<http://www.hplc.cz/Validace/linearita.html>>.
- [12] *Validační program pro statistické zpracování analytických dat* [online]. 26. 1. 2011, [cit. 5. 4. 2011]. Dostupný z WWW: <http://www.hplc.cz/Validace/program_validace.htm>.
- [13] Racek, J. *Klinická biochemie*. 2. přepracované vydání. Galén, 2006. 329 s. ISBN 80-7262-324-9.
- [14] Fričová, M. *Stanovení chloridů ve farmaceutických substancích*. Chemická fakulta Vysokého učení technického v Brně, Brno, 2008.
- [15] *Robustnost metody* [online]. 26. 1. 2011, [cit. 5. 4. 2011]. Dostupný z WWW: <<http://www.hplc.cz/Validace/robustnost.html>>.
- [16] Švesková, P. *Vývoj HPLC metody pro stanovení vitamin E v přípravku Geladrink*. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, 2009.
- [17] *Český lékopis 2009*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2009. ISBN 978-80-247-2994-7.

- [18]Shih-Chuan L., Jau-Tien L., Deng-Jye Y. *Determination of cis- and trans- α - and β - carotenoids in Taiwanese sweet potatoes (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) harvested at various times.* Food Chemistry, 2009, vol. 116, s. 605-610.
- [19]Gimeno E., Calero E., Castellote A. I., Lamuela-Raventós R. M., de la Torre M. C., López-Sabater M. C. *Simultaneous determination of α -tocopherol and β -carotene in olive oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography.* Journal of Chromatography A, 2000, vol. 881, s. 255-259.
- [20]Hiroshi I. *Simultaneous sample preparation for high-performance liquid chromatographic determination of Vitamin A and β -carotene in emulsified nutritional supplements after solid-phase extraction.* Analytica Chimica Acta, 2002, vol. 463, s. 21-29.
- [21]Luterotti S., Franko M., Bicanic D. *Ultrasensitive determination of β -carotene in fish oil-based supplementary drugs by HPLC-TLS.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1999, vol. 21, s. 901-909.
- [22]Xu F., Yuan Q. P., Dong H. R. *Determination of lycopene and β -carotene by high-performance liquid chromatography using sudan I as internal standard.* Journal of Chromatography B, 2006, vol. 838, s. 44-49.
- [23]Marinova D., Ribarova F. *HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries.* Journal of Food Composition and Analysis, 2007, vol. 20, s. 370-374.
- [24]Schieber A., Marx M., Carle R. *Simultaneous determination of carotenes and tocopherols in ATBC drinks by high-performance liquid chromatography.* Food Chemistry, 2002, vol. 76, s. 357-362.
- [25]Oliver J., Palou A. *Chromatographic determination of carotenoids in food.* Journal of Chromatography A, 2000, vol. 881, s. 543-555.

- [26]Shabir G. A. *Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization.* Journal of Chromatography A, 2003, vol. 987, s. 57-66.
- [27]*Betakatoten Farmax tob. 90* [online]. 30. 4. 2011, [cit. 30. 4. 2011].
Dostupný z WWW: <<http://vitaminy-a-minerally.heureka.sk/betakaroten-farmax-tob-90/galerie/>>.
- [28]*GS Betakaroten Forte – 90 tbl.* [online]. 30. 4. 2011, [cit. 30. 4. 2011].
Dostupný z WWW: <<http://www.lekynainternetu.cz/p/gs-betakaroten-forte-90-tbl/>>.
- [29]*Walmark Beta Karoten tbl. 60* [online]. 30. 4. 2011, [cit. 30. 4. 2011].
Dostupný z WWW: <<http://www.eod.cz/lekarna/vitaminy-a-minerally/vitaminy-a-multivitaminy/vitamin-a-a-beta-karoten/samotny/walmark-beta-karoten-tbl.60>>.
- [30]*Bioaktivní Karoten rodinné balení cps. 90* [online]. 30. 4. 2011, [cit. 30. 4. 2011].
Dostupný z WWW: <<http://pharma-nord.heureka.sk/vitaminy-a-minerally/?f=2>>.
- [31]*DR.MAX Betakaroten 100x6mg* [online]. 30. 4. 2011, [cit. 30. 4. 2011].
Dostupný z WWW: <<http://vitaminy-a-minerally.heureka.cz/dr-max-betakaroten-100x6mg/galerie/>>.
- [32]*Naturvita Betavid 60 tablet* [online]. 30. 4. 2011, [cit. 30. 4. 2011].
Dostupný z WWW: <<http://vitaminy-a-minerally.heureka.cz/naturvita-betavid-60-tablet/poradna/>>.
- [33]*Karovit tbl. 140 Vitabalans* [online]. 30. 4. 2011, [cit. 30. 4. 2011].
Dostupný z WWW: <<http://www.lekarna.cz/karovit-tbl-140-vitabalans/>>.

- [34] *PRO.MED.CS Praha a.s., Selzink Plus[®]* [online]. 30. 4. 2011, [cit. 30. 4. 2011].
Dostupný z WWW: <<http://www.planetazdravi.cz/produkty/6-ostatni-vitaminy-mineraly-a-prirodni-produkty/38-selzink-plus-sup-sup.html>>.
- [35] *AROMATICA Pupalkový olej s beta-karotenem a vitamínem E 50 ml* [online].
30. 4. 2011, [cit. 30. 4. 2011].
Dostupný z WWW: <<http://www.drmax-lekarna.cz/aromatica-pupalkovy-olej-s-beta-karotenem-a-vitaminem-e-50-ml.html>>.
- [36] *Validační program pro statistické zpracování analytických dat* [online].
26. 1. 2011, [cit. 4. 4. 2011]. Dostupný z WWW:
<http://www.hplc.cz/Validace/program_validace.htm>.

8 Příloha

Komerční balení analyzovaných potravních doplňků [27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35].



