

Stanovení β -karotenu v želatinových kapslích

Bc. Zuzana Kolajová

Diplomová práce
2008



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2007/2008

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Zuzana KOLAJOVÁ

Studijní program: N 2901 Chemie a technologie potravin

Studijní obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin

Téma práce: Stanovení β -karotenu v želatinových kapslích

Zásady pro vypracování:

- 1. Karotenoidy a fyziologický popis borůvek.**
- 2. Kapsle.**
- 3. Metodika HPLC.**
- 4. Experimentální část.**
- 5. Závěr.**

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. Velíšek, J.: **Chemie potravin 1, Osis Tábor, 1999.**
2. Straka, P.: **Obecná chemie, 1.vyd. Praha, Paseka, 1995.**
3. Chalabala, M.: **Liekové formy, Osveta, 1992.**
4. Hlúbik, P.: **Vitaminy, Grada Publishing, a.s., 2004.**

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání diplomové práce:

19. listopadu 2007

Termín odevzdání diplomové práce:

31. května 2008

Ve Zlíně dne 2. května 2008



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Cílem diplomové práce bylo najít a vypracovat vhodný postup izolace β -karotenu a současně zavést optimální chromatografickou metodu pro jeho stanovení v želatinových kapslích. Ke stanovení β -karotenu byla použita metoda HPLC s detekcí ECD. Byly vypracovány vhodné extrakční postupy a optimální chromatografické podmínky pro detekci β -karotenu v želatinových kapslích.

Klíčová slova: HPLC, β -karoten, želatinové kapsle, borůvky

ABSTRACT

The aim of this work was to develop and detect a suitable procedure for isolation of the β -carotene and installation optimal chromatographic conditions for its determination in gelatine capsules. To determine the amount of β -carotene the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method with ECD detector was used. Suitable procedure for extraction and installation of optimal chromatographic methods of β -carotene from gelatine capsules was to develop.

Keywords: HPLC, β -carotene, gellatin capsules, blueberries

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat vedoucí bakalářské práce Ing. Daniele Kramářové, Ph.D. a panu Ing. Pavlu Valáškoví CSc. za velmi cenné připomínky k tématu a za odborné vedení při vypracovávání diplomové práce. Ráda bych také poděkovala laborantce paní Jaroslavě Živocké za věnovaný čas a trpělivost. Dále bych chtěla moc poděkovat své rodině a přátelům za psychickou i finanční podporu během celého studia. Děkuji.

*„TAJEMSTVÍ ÚSPĚCHU V ŽIVOTĚ NENÍ DĚLAT TO CO SE NÁM LÍBÍ,
ALE NALÉZT ZALÍBENÍ V TOM, CO DĚLÁME“*

Thomas Alva Edison

Souhlasím s tím, že s výsledky mé práce může být naloženo podle uvážení vedoucí diplomové práce a ředitele ústavu. V případě publikace budu uvedena jako spoluautor.

Prohlašuji, že jsem na celé diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala.

Ve Zlíně,

podpis

OBSAH

OBSAH	6
ÚVOD	9
I. TEORETICKÁ ČÁST	10
1 FYZIOLOGICKÝ POPIS BORŮVEK A JEJICH VLIV NA LIDSKÉ ZDRAVÍ	11
2 BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY BORŮVEK	13
2.1 PŘIROZENÁ BARVIVA	13
2.1.1 KAROTENOIDY	13
2.1.2 FLAVONOIDY.....	17
2.1.3 ANTHOKYANY	19
2.2 VITAMÍNY	20
2.2.1 VITAMIN A	21
2.2.2 VITAMÍN E	22
2.2.3 VITAMÍN C	24
2.2.4 VITAMÍN B ₁	25
2.2.5 VITAMÍN B ₂	26
2.3 ORGANICKÉ KYSELINY	27
2.3.1 KYSELINA MLÉČNÁ	27
2.3.2 KYSELINA ŠŤAVELOVÁ.....	27
2.3.3 KYSELINA CITRONOVÁ	28
2.4 SACHARIDY	28
2.4.1 PEKTIKOVÉ LÁTKY	28
2.5 MINERÁLNÍ LÁTKY	29
3 KAPSLE	31
3.1 POMOCNÉ LÁTKY NA VÝROBU ŽELATINOVÝCH KAPSLÍ	31
3.2 VÝROBA ŽELATINOVÝCH KAPSLÍ	32
3.3 TVRDÉ ŽELATINOVÉ KAPSLE	32
3.4 MĚKKÉ ŽELATINOVÉ KAPSLE	36
3.5 ŽELATINOVÉ PERLY	36
3.6 HODNOCENÍ JAKOSTI ŽELATINOVÝCH KAPSLÍ A JEJICH POUŽITÍ	36
4 VYSOCEÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE (HPLC)	38
4.1 PŘÍSTROJE A POMOCNÁ ZAŘÍZENÍ	40
4.1.1 ZÁSOBNÍK	40
4.1.2 ČERPADLA.....	40
4.1.3 PŘEDKOLONA	41
4.1.4 DÁVKOVACÍ VENTIL	41
4.1.5 KOLONY	41
4.1.6 DETEKTORY	42
5 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ KVANTITATIVNÍCH	

ANALÝZ.....	45
II. PRAKTICKÁ ČÁST	47
6 METODIKA	48
6.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	48
6.2 MATERIÁL	48
6.2.1 CHEMIKÁLIE.....	48
6.2.2 VZOREK	49
6.3 EXTRAKCE BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK V SUCHÉM EXTRAKTU ŽELATINOVÝCH KAPSLÍ PRO PODPORU ZRAKU	49
EXTRAKCE 1. ČÁST.....	49
EXTRAKCE 2. ČÁST.....	50
EXTRAKCE 3. ČÁST.....	50
EXTRAKCE 4.ČÁST	50
EXTRAKCE 5.ČÁST	51
6.4 PILOTNÍ POKUSY	52
6.4.1 STANOVENÍ METODIKY PRO DETEKCI B-KAROTENU.....	52
6.5 URČENÍ HMOTNOSTI KAPSLE A JEJÍ NÁPLNĚ.....	52
6.6 KALIBRAČNÍ KŘIVKA PRO STANOVENÍ B-KAROTENU METODOU HPLC-ECD	53
6.7 VLASTNÍ STANOVENÍ B-KAROTENU V ŽELATINOVÝCH KAPSLÍCH.....	53
7 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	54
7.1 VÝSLEDKY EXTRAKCE NÁPLNĚ ŽELATINOVÉ KAPSLE.....	54
EXTRAKCE 1. ČÁST.....	54
EXTRAKCE 2. ČÁST.....	55
EXTRAKCE 3. ČÁST.....	57
EXTRAKCE 4.ČÁST	59
EXTRAKCE 5.ČÁST	60
7.2 KONEČNÝ EXTRAKČNÍ POSTUP	61
7.3 VÝSLEDKY PILOTNÍCH POKUSŮ DETEKCE B-KAROTENU.....	62
7.3.1 KOLONA C8 SUPELCOSIL 150 X 4,6 MM, 5MM.....	62
7.3.2 KOLONA C30 YMC CAROTENOID S5 4,6 X 250 MM, 5MM	73
7.3.3 KOLONA C18 SUPELCOSIL LC 18-DB.....	76
7.4 VÝSLEDKY URČENÍ HMOTNOSTI NÁPLNĚ KAPSLE	79
7.5 VÝSLEDKY MĚŘENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY B-KAROTENU.....	80
7.6 VÝSLEDKY A PŘESNOST VLASTNÍHO STANOVENÍ OBSAHU B- KAROTENU VE VZORCÍCH ŽELATINOVÝCH KAPSLÍ	82
ZÁVĚR	85
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	87
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	92
SEZNAM OBRÁZKŮ	93

SEZNAM TABULEK.....	97
SEZNAM PŘÍLOH.....	98

ÚVOD

Karotenoidy jsou důležitými antioxidanty, jejichž význam stále stoupá. Přestože až dosud bylo v potravě identifikováno přes 600 karotenoidových barviv, lidský organismus jich umí využít pouze šest. Fyziologické hladiny karotenoidů v krvi bývají udávány v rozmezí 0,2 - 0,6 mmol.l⁻¹. Nižší koncentrace mají kuřáci, vyšší koncentrace mají ženy. Pokud lidé jedí potravu obsahující dostatek zeleniny a ovoce, stoupá průměrná hladina karotenoidů v krvi na cca 0,6 - 1,5 mmol.l⁻¹. Karotenoidy jsou vysoce důležitou látkou v lidském organismu, snadno dochází k jejich nedostatku, který vede k řadě možných onemocnění (nádory, poruchy zraku, imunity) aj. Je proto nutné na nedostatek těchto látek myslet a vhodnými preparáty posílit jejich hladinu v těle.

β-karoten je prekursorem vitamínu A. Poznatky o příznivých účincích β-karotenu na správnou funkci zraku jsou dnes už dobře známy. Spojením přírodních látek z borůvkového extraktu a β-karotenu tak vzniká kombinace, kterou je možno považovat za vhodnou pomoc pro unavené oči.

Užívání přípravků pro podporu zraku je mimořádně vhodné jak při přecitlivělosti očí na světlo, tak i zlepšení jejich přizpůsobivosti ve tmě. Je to dáno příznivými účinky preparátu na regeneraci očního purpuru, rovněž na pevnost a odolnost očních cév. Blahodárné účinky ocení zejména řidiči před noční jízdou, operátoři u počítačů, osoby, jejichž činnost vyžaduje časté namáhání zraku. Významné je i zvláště příznivé působení přípravku při pobytu na ostrém slunci, což ocení jeho uživatelé po celý rok.

Diplomová práce je zaměřena na vypracování vhodného extrakčního postupu k izolaci β-karotenu a současně zavedení optimální chromatografické metody pro jeho stanovení v želatinových kapslích. Ke stanovení β-karotenu byla použita metoda HPLC-ECD.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 FYZIOLOGICKÝ POPIS BORŮVEK A JEJICH VLIV NA LIDSKÉ ZDRAVÍ

Brusnice borůvka (*Vaccinium corymbosum*) je známá pod názvem Borůvka chocholičnatá, zahradní, kanadská, vysoká nebo také jako americká.

V našich zemích se nejvíce sbírají plody borůvek z přirozených porostů, které však v současnosti nestačí pokrýt zvýšený zájem o toto atraktivní ovoce. Pěstovat lze pouze borůvky kanadské *Vaccinium corimbosum*, které tvoří keře s většími plody, světlou dužninou, ale také s vynikajícími léčivými účinky (1).

Nejvíce osvědčené a nejužívanější jsou **Brusnice borůvka** (*Vaccinium myrtillus*) - list, **Brusnice brusinka** (*Vaccinium vitisidaea*) – list.

Plody borůvek právem zařazujeme mezi nejzdravější ovoce. Zvyšují obranyschopnost, podporují růst u dětí, výborně působí proti mnohým onemocněním, slouží jako podpůrný prostředek při léčbě dny, revmatismu a cukrovky. Glukokininy totiž usnadňují uvolňování insulínu ze slinivky břišní a mírně zvyšují jeho tvorbu. Jejich chemická struktura připomíná například léčiva Amaryl, Diaprel, Glurenorm, Minidiab. Glukokininy jsou obsaženy hlavně v listech rostlin, ale někdy i v jejich podzemních částech, semenech či částech plodů. Odstraňují únavu očí a zlepšují ostrost zraku. Ulehčují průběh chorob způsobených stárnutím (2,3). Nejnovější výzkumy potvrdily významné protirakovinové účinky na lidský organismus a na kůži poškozenou při nadměrném opalování (4,5). Obecně se doporučuje dospělému jedinci zkonzumovat během léta alespoň 1,5 kg čerstvých plodů pro vyčištění organismu.

Plody lesních borůvek obsahují přes 7 % tříslovin, 20 až 30 % cukru, anthokyanová barviva, dále organické kyseliny citrónovou, jablečnou, jantarovou, mléčnou a šťavelovou, pektin, vitaminy B a C a látky snižující obsah cukru v krvi. Listy obsahují fenolické látky a kyselinu oleanovou a ursolovou. Obsah účinných látek v listech kolísá podle doby sběru a podmínek, kde borůvky rostou. Pozor však na obsah hydrochinonu, který při dlouhodobém užívání zvýšených dávek (především při cukrovce), může vést k chronické otravě (6).

Odvar z listů nebo sušených plodů se doporučuje používat jako náhražka pravého čaje. Mají svíravý účinek působící proti průjmům. Mnohem hodnotnější a účinnější než listy jsou plody. Sušené se užívají při průjmových stavech buď přímo, nebo namočené ve studené vodě. Šťáva z čerstvých borůvek byla i klinicky ověřena jako vynikající prostředek

k regeneraci sliznic při krčních onemocněních. Stejně účinky vykazují i borůvky zmrazené. Borůvkové barvivo proniká do nemocné sliznice a s její výstelkou vytvoří pevnou černo-modrou vrstvičku, pod kterou se vytvoří nová zdravá výstelka a vrchní vrstva se pozvolna odloupne a zmizí.

Je prokázáno příznivé působení borůvek i na žaludeční stěnu a další části zažívacího traktu, kde má význam především obsah pektinu, který omezuje nepříznivé působení nadměrného množství žaludečních šťáv. Čerstvá borůvková šťáva zředěná vodou má vynikající účinky jako kloktadlo. To je možné připravit i z borůvkového listí. U odvaru z plodů i čerstvého ovoce byl prokázán účinek proti škrkavkám a roupům. V plodech i listech byly nalezeny látky s antibakteriálními účinky, které jsou termostabilní. Jsou lépe rozpustné ve vodě než v alkoholu, proto jsou účinnější výluhy a odvary ve vodě, na rozdíl od alkoholických extraktů. Zpevňují cévní stěny a zlepšují vidění za šera (7).

Během posledních let se značně rozšířilo v řadě zemí EU pěstování borůvek, což platí zejména pro Polsko a některé další nové členské státy. V Německu rozšířili pěstitelskou plochu borůvek asi na 1 400 ha. 80 % této plochy se nachází v regionu Lüneburger Heide, spolkové zemi Dolní Sasko. Polsko bylo v roce 2004, 2005 a 2006 hlavním dodavatelem borůvek do Německa. Dobré odbytové podmínky na zahraničních trzích vedly polské pěstitele k rozšíření plantáží kultivovaných borůvek, které už by měly napřesrok dávat plnou úrodu. Ve Francii se borůvky pěstují hlavně pro export do Německa, kam bylo v roce 2006 dodáno celkem 580 tun. Velkou část borůvkových plantáží ve Francii ovládají němečtí obchodníci, protože potřebují většinu borůvek vypěstovaných ve Francii, podobně jako ve Španělsku, pro zajištění plynulých dodávek během delšího období (8).



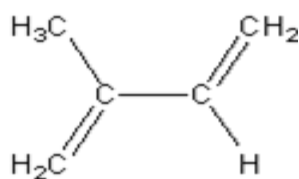
Obr.1. Borůvky

2 BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY BORŮVEK

2.1 Přírodní barviva

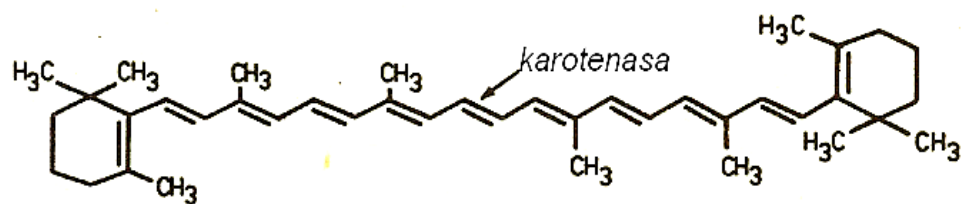
2.1.1 Karotenoidy

Z chemického hlediska patří karotenoidy do skupiny tetraterpenoidů. Mají buď ryze alifatický řetězec, nebo řetězec zakončený jedním či dvěma cykly (šestičlenným nebo pětičlenným). Dvojně vazby karotenoidů umožňují *cis*- i *trans*-isomerii, většinou mají konfiguraci *all-trans*, konfigurace *cis* se vyskytuje jen ve dvojných vazbách nesubstituovaných methyly. Karotenoidy se dělí na dvě základní skupiny: uhlovodíky nazývané karoteny a kyslíkaté sloučeniny odvozené od karotenů, které se nazývají xanthofyly. Jsou to nenasycená polyenová barviva složená z isoprenových jednotek (41,42,43). Karotenoidní barviva tvoří skupinu žlutých, oranžových, červených a fialových pigmentů, které doprovázejí chlorofyly v rostlinách, ale vyskytují se i v mikroorganismech a v živočišných organismech jako je například humr, nebo losos.

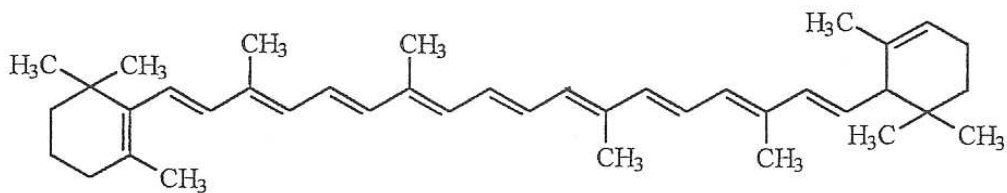
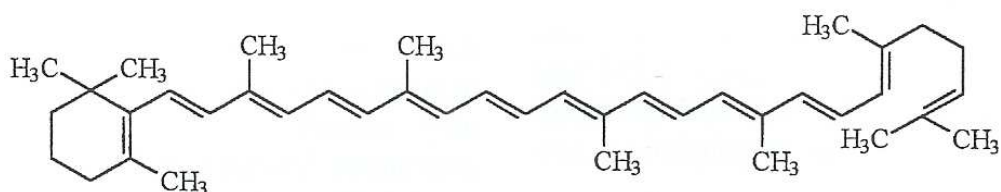
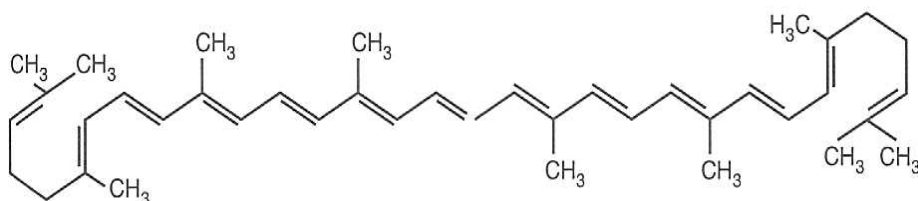


Isopren

Nejjednodušším karotenem je acyklický polynasycený uhlovodík lykopen, jehož isomerací a cyklizací lze odvodit postupně γ -, α - a β -karoten.



β -karoten

 α -karoten γ -karoten

lykopen

Nejdůležitějším provitaminem vitamínu A je β -karoten. Dalšími provitaminy vitamínu A jsou z karotenoidů α -karoten, γ -karoten a β -kryptoxanthin. *Cis*-isomery jsou méně aktivní než v přírodě se vyskytující *all-trans*. Biologická aktivita závisí na přítomnosti nehydroxylovaného β -ionového kruhu ve struktuře provitamínu A. Konverze provitamínu A na vitamín A vede přes štěpení, které může probíhat jako centrické nebo ekcentrické. Při centrickém štěpení dochází ke štěpení na dvojně vazbě 15,15' vedoucí ke dvěma molekulám retinolu na jednu molekulu β -karotenu. Při ekcentrickém štěpení dochází ke vzniku jedné molekuly retinolu (44).

Pouze 10 % v přírodě se vyskytujících karotenoidů spadá do kategorie provitamínu A tzn. že mohou být v těle přeměněny na vitamín A. Produkce vitamínu A z karotenoidů vyžaduje

je adekvátní hladinu hormonů štítné žlázy, proteiny, zinek a vitamín C. Za předpokladu, že tato přeměna probíhá efektivně, jsou karotenoidy dobrým zdrojem vitamínu A (retinolu) bez rizika jeho předávkování.

Jako zásobní látky jsou karotenoidy ukládány v tukových tkáních, ve žloutku ptačích vajec apod. Listy všech zelených rostlin obsahují též hlavní karotenoidy: β -karoten, α -karoten, lutein, violaxanthin a neoxanthin. Kryptoxanthin a zeaxanthin jsou minoritní složky tzv. xanthofylové frakce. Karotenoidní barviva jsou vázána v chloroplastech ve formě chromoproteinů a funkčně se účastní fotosyntézy. V kyselém prostředí podléhají karotenoidy isomeraci. Epoxykarotenoidy isomerují za tvorby příslušných furanových derivátů, kde dochází ke ztrátě zbarvení. Při zahřívání kyselých roztoků dochází mezi jednotlivými karotenoidy k ustavení rovnováhy, která je dána typem karotenoidu, hodnotou pH, teplotou a dobou působení vyšší teploty. Stabilita karotenoidních barviv v rostlinných pletivech se liší během technologických operací podle typu přítomných karotenoidů. Ve většině případů se změny karotenoidních barviv posuzují z celkového poklesu obsahu barevných pigmentů sledováním změn absorbance při vlnové délce 450 nm. Nepříznivý vliv na stabilitu karotenoidních barviv má světlo, jehož působením dochází k isomeraci i k tvorbě epoxyderivátů. Oxidace karotenoidů probíhá za přítomnosti kyslíku, za nepřístupu kyslíku jsou karotenoidy velmi stálé. Oxidace je urychlována ionty Cu^{2+} a při této reakci vzniká aceton, methylheptenon, kyselina levulová a glyoxal. Oxidací β -karotenu vzniká acetaldehyd, 2-methylpropanol, 1-butanol, biacetyl a 1-pentanol. Karotenoidy jsou výborně rozpustné v sirouhlíku, benzenu, chloroformu, hexanu méně rozpustné v etheru, petroletheru, olejích, acetonu a etanolu. Prakticky nerozpustné jsou ve vodě, kyselinách a solích (45).

2.1.1.1 Účinky Karotenoidů

Celá skupina karotenoidů má vysokou schopnost vylučovat volné kyslíkové radikály. Například β -karoten dokáže inhibovat oxidaci cholesterolu a tím redukovat riziko vzniku onemocnění srdce a cév a ochraňovat brzlík před poškozením volnými radikály. Karotenoidy lutein a zeaxanthin jsou silnými antioxidanty uvnitř oční tkáně a jejich vysoký příjem chrání oči před degenerací žluté skvrny (makulární degeneraci sítnice). Určité karotenoidy neutralizují toxické formy volného kyslíku, které se často vyskytují v cigaretovém kouři, znečištěném ovzduší, UV záření a ozonu. Ačkoliv β -karoten je dobrý neutralizátor těchto toxických molekul, studie prokázaly, že kapsanthin z papriky a červeného pepře, lykopen, γ -karoten a α -karoten jsou značně silnější než β -karoten (46).

Karotenoidy v potravě se nikdy nenacházejí jednotlivě, vždy je společně více karotenoidů a ochranných složek. Ochrana buněk, která byla prezentována těmito studii, byla dána synergickým efektem karotenoidů a dalších antioxidantů nalézajících se v potravě. Nicméně testy *in vitro* a na zvířatech prokázaly ochranný účinek jednotlivých karotenoidů. Několik málo *in vivo* studií na lidech, zahrnujících suplementaci syntetickým β -karotenem, neprokázalo ochranný efekt diety s vysokým obsahem karotenoidů na buňky. Bylo to díky tomu, že byl používán syntetický β -karoten.

Vysoký příjem karotenoidů je silně spojen se zmírněním rizika infekce. Například β -karoten ochraňuje největší žlázu imunitního systému - brzlík - před působením volných radikálů a jeho suplementace značně povzbuzuje aktivitu bílých krvinek (47).

Karotenoidy s provitamin A aktivitou:

- β -karoten – 100 % aktivity vitamínu A
- Cryptoxanthin - 50-60 % aktivity vitamínu A
- α -karoten - 50-54 % aktivity vitamínu A
- γ -karoten - 42-50 % aktivity vitamínu A

Karotenoidy, které nejsou provitaminem A: lykopen, zeaxanthin, lutein, capsanthin

Typické dávkování suplementů (12) :

- β -karoten: 5-15 mg.den⁻¹
- α -karoten: 500 μ g až 10 mg.den⁻¹
- lutein: 100 μ g až 5 mg.den⁻¹
- lykopen: 50 μ g až 15 mg.den⁻¹

2.1.1.2 Přírodní versus syntetický β -karoten

Doplňky stravy s β -karotenem obsahují většinou samotný β -karoten, zatímco přírodní potravinové doplňky a potravinové zdroje obsahují další přirozeně se vyskytující karotenoidy. Je nutno si uvědomit, že syntetický β -karoten blokuje vstřebávání ostatních karotenoidů. Přírodní β -karoten obsahuje 9-*cis* a *trans*-formy, kdežto syntetický pouze *trans*-formy. 9-*cis* isomer má větší biologickou dostupnost než všechny *trans*-formy

(přírodní β -karoten získaný z palmového oleje má 4-10x větší vstřebatelnost než syntetický β -karoten). Dále bylo vyzkoumáno, že 9-*cis* forma má mnohem větší antioxidační aktivitu než syntetický β -karoten. *Trans*-isomery samy o sobě jsou náchylné k poškození, což vede ke vzniku toxických látek. Ačkoliv je možné, že příjem dalších antioxidantů (vitamínu C a E) může pomoci chránit tělo proti takovému poškození, doporučuje se neužívat doplňky obsahující syntetický β -karoten, zejména pokud je člověk kuřák či silný konzument alkoholu (48,49).

2.1.1.3 Kontraindikace a vedlejší účinky

Není známa toxická hladina pro tyto suplementy. Syntetická forma β -karotenu by neměla být užívána těžkými kuřáky. Opakovaný příjem vysokých dávek β -karotenu, může vést k žlutooranžovému zbarvení kůže. Není to známka toxicity a pigmentace postupně mizí, pokud se sníží dávky nebo se karotenoidy přestanou užívat. Faktory, které snižují hladinu, zhoršují absorpci či inhibují aktivitu karotenoidů jsou látky zabraňující absorpci tuků, antacida, alkohol, vysoké dávky syntetického β -karotenu, který blokuje absorpci ostatních karotenoidů (14).

Možné známky nedostatku karotenoidů jsou suchá, drsná a předčasně stárnoucí kůže, kožní problémy, suché oči, suchá ústa, ztráta chuti k jídlu, zvýšená náchylnost k infekcím, poškození zraku, např. šeroslepost, ucpané vlasové folikuly, onemocnění srdce a cév, buněčné abnormality, poškození buněk aj. (50).

2.1.2 Flavonoidy

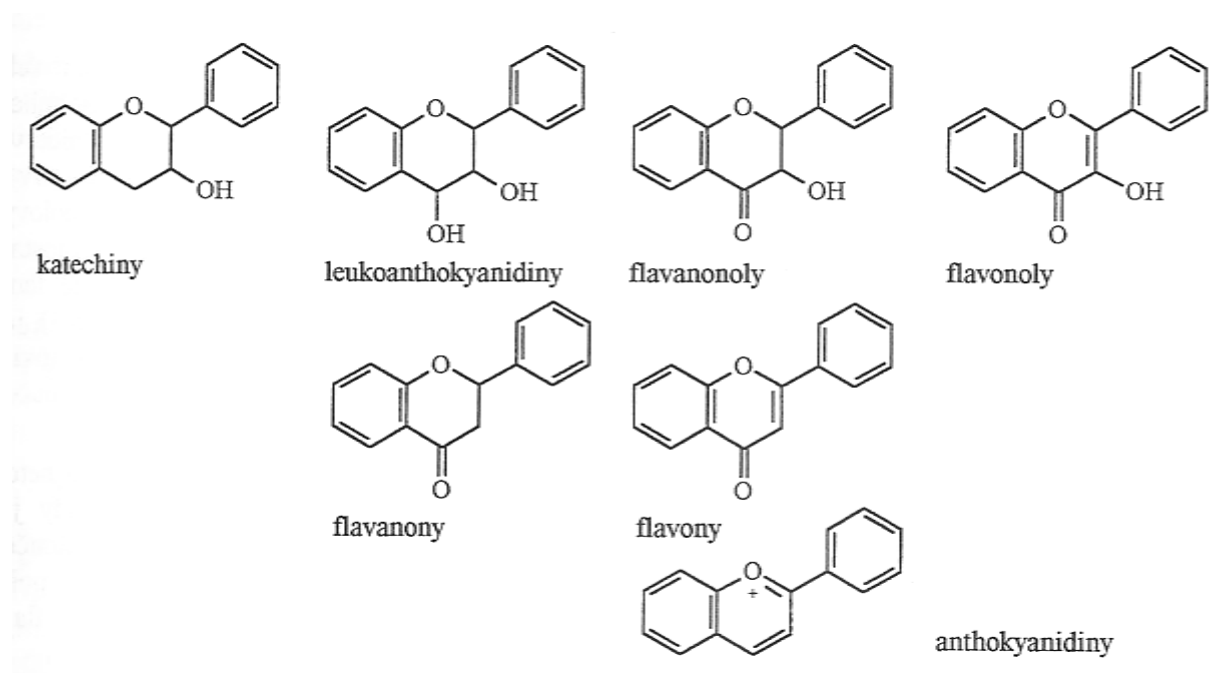
Flavonoidní látky neboli flavonoidy jsou velice rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů obsahujících v molekule dva benzenové kruhy spojené tříuhlíkatým řetězcem. Svými vlastnostmi se velmi liší od jiných fenolových pigmentů, a proto jsou uváděny jako samostatná skupina rostlinných barviv.

U většiny flavonoidů je C_3 řetězec součástí heterocyklického pyranového kruhu. Flavonový skelet se skládá ze dvou benzenových kruhů (A a B) a kruhu odvozeného od 2H-pyranu (C). Kruh B je spojen s pyranovým kruhem (C) v poloze C_2 . Běžně bývají všechny tři kruhy substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami a jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace. Vyskytují se jako volné látky nebo častěji vázané v glykosidech (11,51).

Podle stupně oxidace C₃ řetězce se rozeznávají následující základní struktury flavonoidů:

- **Katechiny** (3-flavanoly)
- **Leukoanthokyanidy** (3,4-flavandioly)
- **Flavanony**
- **Flavanonoly**
- **Flavony**
- **Flavonoly**
- **Anthokyanidy**

Základní struktura těchto flavonoidních látek je uvedena na obrázku 2. V řádcích zleva doprava roste oxidační stupeň sloučenin a současně také intenzita jejich barvy. Sloučeniny uvedené ve sloupcích pod sebou mají stejný stupeň oxidace.



Obr.2. Flavonoidní látky

Ze strukturně příbuzných sloučenin (vesměs produktů biosyntézy a katabolismu flavonoidů), u kterých jsou kruhy A a B spojeny alifatickým C₃ řetězcem, nebo řetězcem, který je částečně součástí furanového cyklu, se dále rozeznávají:

- **Chalkony a dihydrochalkony**
- **Aurony**

Méně běžné sloučeniny s kruhem B spojeným s pyranovým kruhem C v poloze C-3 se nazývají **isoflavonoidy**, pokud je toto spojení v poloze C-4 nazývají se příslušné sloučeniny **neoflavonoidy**. Potravinářsky významnými jsou pouze **isoflavony** (13).

Pouze některé flavonoidy jsou však důležité jako přírodní rostlinná barviva, jiné jsou významné pro svoji chuť (látky trpké a hořké) nebo mají významné biologické účinky.

Z bezbarvých leukoanthokyanů mohou při zpracování ovoce a zeleniny vznikat v kyselém prostředí příslušné barevné anthokyanidy. Oligomery těchto sloučenin s trpkou chutí se řadí mezi kondenzované třísloviny čili tanniny. Některé tanniny jsou světle žluté pigmenty (15).

Flavanony a flavanonoly jsou bezbarvé nebo světle žluté sloučeniny a jako barviva nemají velký význam. Některé flavanony jsou však důležitými hořkými látkami grapefruitů a borůvek. Z flavonoidních barviv jsou nejvýznamnější žlutě zbarvené flavony a flavonoly a zejména anthokyany, převážně červené (také žluté či oranžové), fialové a modré pigmenty.

Flavonoidy jsou hojně rozšířenou skupinou přírodních polyfenolů. Řada z nich vykazuje silné antioxidační účinky. Je známa též jejich antivirová, antibakteriální, antimutagenní a protizánětlivá aktivita. V současné době se flavonoidním látkám připisuje prominentní role

v prevenci nádorových onemocnění. Velice diskutovanou látkou je hlavně *trans*-resveratrol. Jde o trihydroxystilben patřící mezi rostlinné fytoalexiny. Vyskytuje se ve vysoké koncentraci v oplodí hroznů révy vinné (*Vitis vinifera*), v borůvkách (*Vaccinium myrtillus*), v řadě druhů zeleniny a ořechách. Vykazuje silné antioxidační a antimutagenní účinky, působí protizánětlivě, zamezuje agregaci trombocytů. Antikarcinogenní účinek spočívá v inhibici celé řady markerů účastnících se procesu karcinogeneze. Vzhledem k tomu, že v dnešní době existuje velké riziko vzniku nádorových onemocnění, rozvíjí se snaha o nalezení nových bezpečných látek s chemopreventivní aktivitou.

2.1.3 Anthokyaniny

Anthokyaniny, též nazývané **anthokyaniny**, jsou nejrozšířenější a početně velice rozsáhlou skupinou rostlinných barviv. Dosud bylo v přírodních zdrojích identifikováno asi 300 různých anthokyanů. Mnoho druhů ovoce, zeleniny a květin vděčí za svoji oranžovou, červe-

nou, fialovou a modrou barvu, která zvyšuje jejich spotřebitelskou oblibu, právě této skupině ve vodě rozpustných barviv. Vysoké množství anthokyaninových barviv obsahují právě borůvky (11,12).

Anthokyaniny izolované z přírodních zdrojů se jako potravinářská barviva používají více než 100 let ve formě koncentrátů šťáv různých plodů. Nevýhodou však je, že intenzivní barvu mají v prostředí o pH menší jak 3,5, takže jsou vhodné jen pro kyselé potraviny. Jejich význam jako potravinářských barviv roste v souvislosti se stoupajícím zájmem spotřebitelů o přírodní látky. Potencionální zdroje těchto barviv jsou omezeny dostupností rostlinného materiálu a celkovými ekonomickými podmínkami jejich výroby, takže pouze několik rostlinných druhů je průmyslově využíváno. Velmi málo je dosud známo o biologických vlastnostech antokyanů (17). Byla zkoumána jejich toxicita a mutagenita v souvislosti s použitím anthokyaninových barviv jako potravinářských aditiv. Toxicita a mutagenita buď nebyla prokázána, nebo byla velice nízká, takže anthokyaninová barviva jsou povolena k barvení potravin a ve většině zemí není stanoven ani limit pro jejich použití. Velmi nízká toxicita byla zjištěna dokonce i u některých jejich kovových komplexů (hlavně hlinitých a cínatých) (18).

Z technologického hlediska je nejdůležitější vlastností anthokyanů barva a její stabilita, ale ta bývá zpravidla poměrně nízká. Hlavními faktory ovlivňujícími barvu a stabilitu anthokyanů jsou struktura molekuly, přítomnost některých enzymů, pH prostředí, teplota, přítomnost kyslíku a působení záření. Z anthokyanů mohou vznikat také jinak barevné nebo bezbarvé produkty reakcemi s jinými složkami potravin, např. s kyselinou askorbovou, oxidem siřičitým, jinými fenoly, kovovými ionty aj. (11).

2.2 Vitamíny

Vitamíny jsou neenergetické nízkomolekulární organické látky, které lidský organismus v minimálním množství bezpodmínečně potřebuje. Některé vitamíny neumí sám syntetizovat nebo jen nedostatečně, a proto musí být přijímány v potravě.

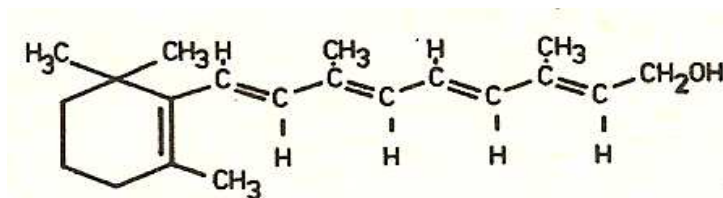
Absence vitamínů v potravě, nebo jejich dlouhodobý nedostatek, vede od latentní karence, projevující se nespecifickými příznaky hypovitaminosy, až k charakteristickým známkám nedostatku, které mohou v těžkých případech avitaminosy končit smrtelně. Nadbytek vitamínů hypervitaminosa přiváděných v potravě je obvykle z těla vyloučen, ale v určitých

případech může mít i toxické důsledky (např. vitamín A, D) (20). Lipofilní vitamíny mohou být v těle ukládány delší dobu, na rozdíl od vitamínů rozpustných ve vodě hydrofilních. Z tohoto důvodu lze jimi organismus předzásobit. Vitamíny rozpustné ve vodě nejsou v organismu ukládány, a proto musí být jejich přívod potravou plynulý. Slouží jako koenzymy buněčných enzymatických reakcí (s výjimkou vitamínu C, který představuje aktivátor celkového metabolismu). Vitamíny komplexu B se ponejvíce vyskytují pohromadě a jejich účinky jsou podobné.

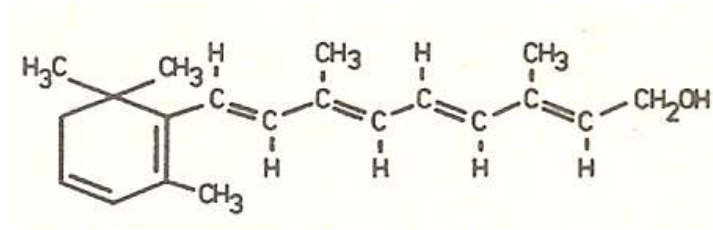
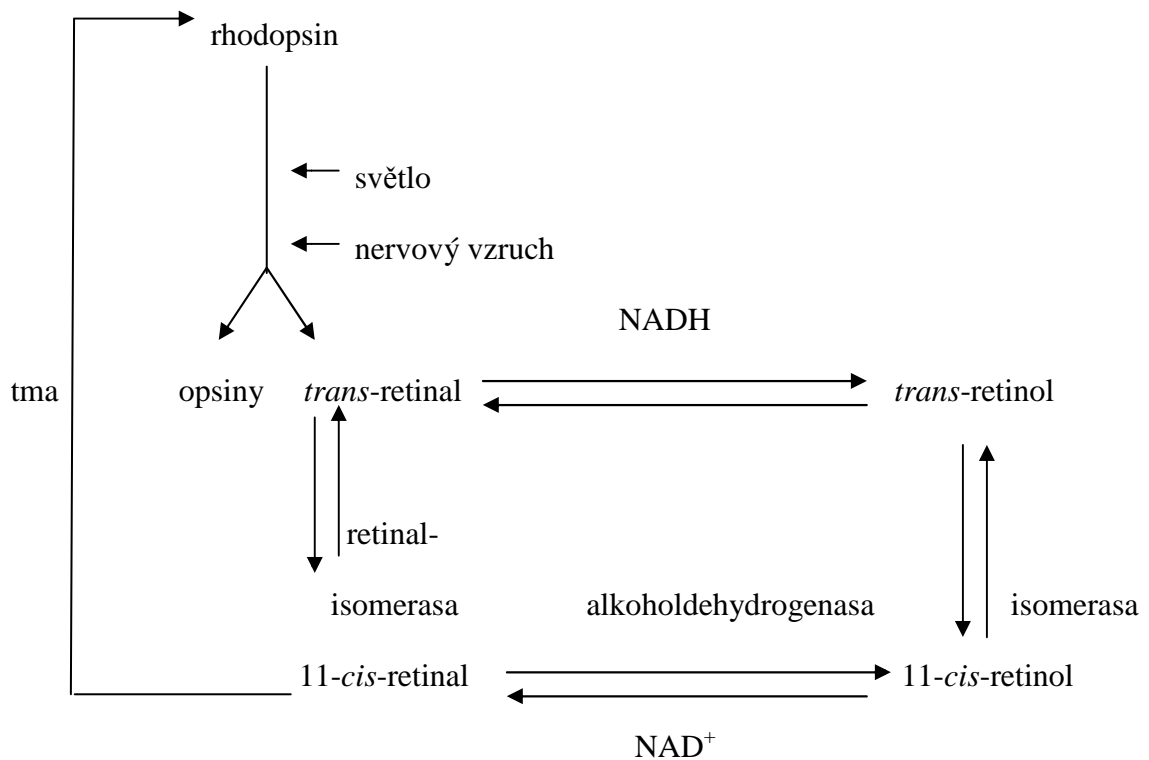
2.2.1 Vitamin A

Pro svoji úlohu v procesu vidění, konkrétně pro správnou funkci oční sítnice, se tento vitamín nazývá retinol. Vitamin A je po chemické stránce terpenový alkohol s β -jónonovým kruhem. Je velmi citlivý vůči oxidačním činidlům, světlu, zvláště jeho UV složce (21).

Nedostatek vitamínu A může způsobit problémy se zrakem v podobě noční slepoty, snížení ochrany proti opotřebení a vysoušení rohovky. Ve vážných případech se mohou tvořit i vřídky vedoucí k oslepnutí. Nedostatek vitamínu A oslabuje imunitní systém, což způsobuje větší náchylnost k bronchiální infekci a působí ztrátu chuti a vznik suché, drsné pokožky. Nedostatek vitamínu A může také způsobit deficitní růst a vývoj dětí. Prvními varovnými signály hypovitaminosy vitamínu A jsou lomivé, pomalu rostoucí nehty, suché, lomivé vlasy, suchá kůže, vypadávání vlasů, nechutenství, časté infekce, šeroslepost, poruchy vidění, poruchy růstu, neplodnost (22).



Vitamín A₁

Vitamín A₂

Obr.3. Waldův cyklus

2.2.2 Vitamín E

Je známo 8 tokoferolů a tokotrienolů vykazujících aktivitu vitamínu E. Nejúčinnější je α -tokoferol. Vitamín E je jedním z nejdůležitějších antioxidantů, je rozpustný v tucích a téměř nerozpustný ve vodě. Rozpustnost v tucích je vlastnost, která je důležitá při ochraně organismu před volnými radikály, neboť tyto nejvíce poškozují buněčné membrány a lipoproteiny o nižší hustotě, které ve své molekule obsahují tuky. Při ochraně před radi-

kály je sám přeměňován na radikál a je rychle regenerován v průběhu biochemického procesu, kterého se účastní vitamín C a glutation. Vitamín E může posílit obranyschopnost těla proti kardiovaskulárním nemocem a proti rakovině, neboť panuje podezření, že volné radikály jsou částečně odpovědné za vyvinutí podmínek ke vzniku těchto nemocí. Jako antioxidační činidlo chrání vitamín E především polynenasycené mastné kyseliny proti oxidaci volnými radikály (tedy proces nazývaný peroxidace lipidů) (23).

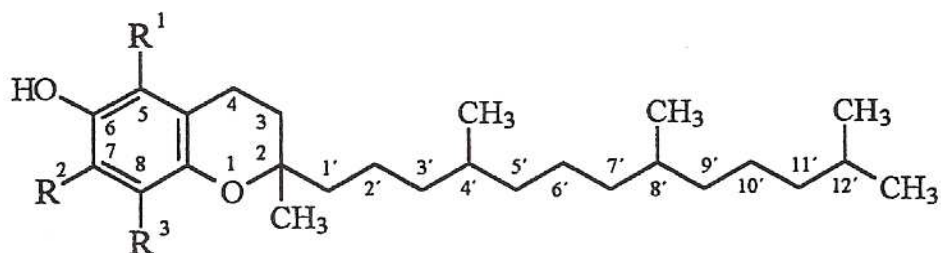
Vitamín E může pomáhat předcházet arterioskleróze (zesílení stěn artérií vzhledem k nánosům tuků a minerálů). Krev obsahuje nosiče pro látky typu cholesterolu a mastných kyselin, kterým říkáme lipoproteiny. LDL (Low Density Lipoprotein, lipoprotein s nízkou hustotou) zvyšuje riziko arteriosklerózy, pokud je oxidován volnými radikály (24). Vitamín E pravděpodobně snižuje riziko kardiovaskulárních nemocí především vzhledem k tomu, že chrání LDL proti oxidaci, tím že se na ně váže.

Zdrojem vitamínu E jsou rostlinné oleje, olej z rostlinných klíčků, suché fazole, arašídý, celozrnné výrobky, listová zelenina a v neposlední řadě i borůvky.

Nedostatkem vitamínu E může dojít k anémii (snížení množství hemoglobinu v krvi), poruchám metabolismu nervů a svalů a poruchám kapilární permeability. Prvními varovnými signály nedostatku vitamínu E jsou poruchy zraku, ochablá suchá kůže, únava, pokles výkonnosti, záněty v zažívacím traktu, neplodnost, onemocnění srdce, stařecké skvrny, nervová dráždivost, oslabení koncentrační schopnosti, špatné hojení ran.

Pro děti do 14 let je doporučen denní příjem od 6 do 12 μg podle věku, pro dospělé 12 μg , pro těhotné ženy a ženy v klimakteriu až 16 $\mu\text{g}\cdot\text{den}^{-1}$. Nové poznatky však upozorňují na to, že toto množství pro ochranu před volnými radikály nepostačuje.

V porovnání s jinými vitamíny rozpustnými v tucích není vitamín E toxický. Většina dospělých jedinců snáší vysoké dávky mnoha set mikrogramů bez potíží, ačkoli někteří lidé mohou trpět bolestmi hlavy, nevolností, nebo průjmem.



tokoferoly

2.2.3 Vitamín C

Čistá kyselina askorbová tvoří bezbarvé, ve vodě rozpustné krystalky. Je to látka dosti nestálá, rychle se rozkládá a ztrácí účinnost. Rozklad urychluje teplo, světlo, vzdušný kyslík, styk s některými kovy, zejména s Cu a Fe.

Jednou z nejdůležitějších funkcí vitamínu C je katalýza tvorby kolagenu. Kolagen tvoří velkou část našich vazivových tkání, kostí, chrupavek a zubů. Vitamín C se dále výrazně podílí na tvorbě žlučových kyselin, parathyreoidních hormonů a dvou klíčově důležitých přenašečů v nervové soustavě, noradrenalinu a serotoninu (16).

Vitamín C je životně důležitý pro imunitní systém organismu a funkci bílých krvinek, které napadají nebezpečné mikroorganismy. Přítomnost vitamínu C zvyšuje resorpci železa a tento vitamín je také životně důležitý pro naši schopnost využívat vitamíny B komplexu.

Ovoce a zelenina - zelené a červené papriky, borůvky, brokolice, špenát, pomeranče a ostatní citrusové plody, brambory a jahody obsahují velké množství vitamínu C. Malé množství naopak poskytuje maso, ryby, drůbež, vejce a mléčné výrobky. Téměř žádný vitamín C není obsažen v celozrnných výrobcích.

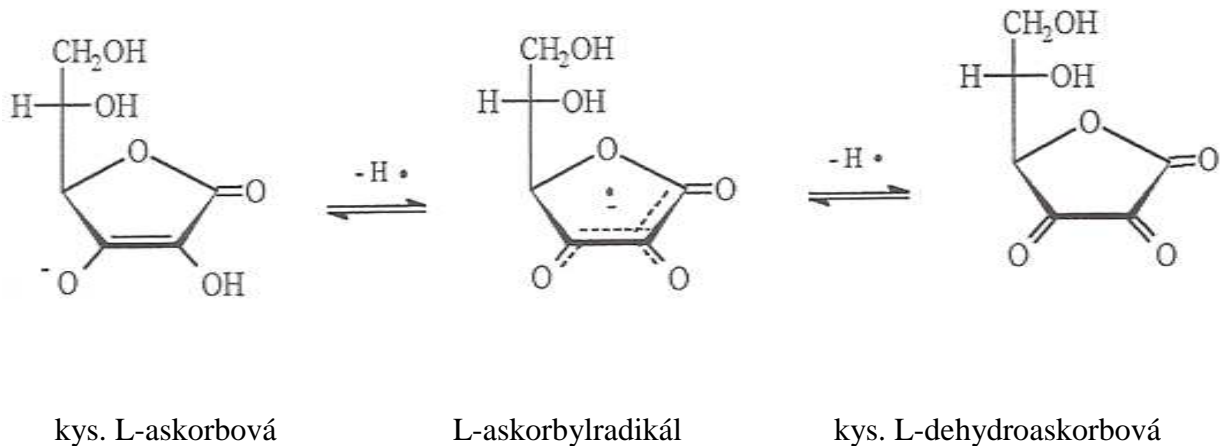
Vitamín C je důležité antioxidační činidlo, tedy ochranná látka, která zpomaluje škodlivé účinky volných radikálů. Jako antioxidační činidlo chrání vitamín C i jiné vitamíny, polynenasycené mastné kyseliny, LDL-cholesterol a enzymy před poškozením volnými radikály.

Kouření spotřebovává vitamín C v organismu a tím se může zvýšit nebezpečí vzniku jak rakoviny, tak kardiovaskulárních nemocí. Z některých studií vyplynulo, že vitamín C v naší stravě nebo podávaný jako doplněk, snižuje riziko koronární trombózy (krevní sraženiny v srdci). Požadavek se zvyšuje při extrémní tělesné zátěži, trvalém psychickém stresu, alkoholismu apod. Pro doporučený denní příjem vitamínu C pro muže i ženy v produktivním věku v ČR zatím platí hodnota $75 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$ (27).

Avitaminosa vede ke skorbutu – kurdějím. Typickými příznaky jsou zhoubovatělé dásně, při stisku krvácející. Zuby se uvolní a vypadávají. Klouby na ruce a nohy zduří a ve svalech, kloubech a vazech pod kůží se objevuje hemoragie, tedy krvácení.

Mnoho lidí užívá velké dávky vitamínu C, aby bojovali s rýmou, nebo jako antioxidačního činidla, aby se bránili nemocem. Většina lidí je schopna snášet dávky vysoké až do 1g bez

obtíží, zatímco jiní mohou trpět průjmami a bolestmi žaludku. Pravděpodobně je pro žaludek nejnadhnější, pokud tablety vitamínu C přijímáme spolu s jídlem. Velké dávky mohou povzbudit příjem železa a to může vést, i když poměrně vzácně, k ledvinovým kamenům.



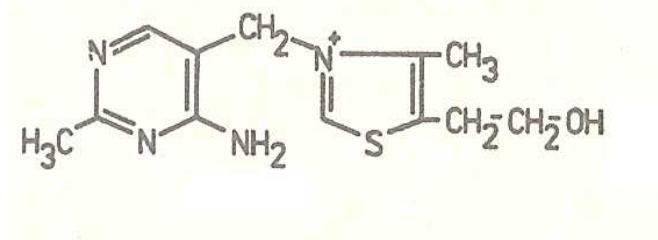
Obr.4. Vitamín C – kyselina L-askorbová

2.2.4 Vitamín B₁

Chemicky se jedná o derivát pirimidinu a tiazolu. Je rozpustný ve vodě, ničí se konzervováním, průmyslovým zpracováním jídel, zmrazováním, zvláště při rozmrazení a opětovném zmrazení. Jeho největším nepřítelem je uhličitan sodný. Dobře se vstřebává ze zažívacího traktu, objevuje se v mateřském mléku, rozsáhle se distribuuje do většiny tkání. Hladina tiaminu se v těle snižuje při dlouhodobé dialýze, parenterální výživě a při chronických infekcích.

Nalézají se ve většině potravin živočišného původu a v mnoha potravinách původu rostlinného. Libové vepřové, droby, borůvky, hrášek a fazole jsou rovněž dobrými zdroji tohoto vitamínu.

Klasický příznak nedostatku je nemoc beri-beri. Je rozšířená mezi lidmi žijícími v Asii, jejichž strava se skládá téměř výhradně z loupané rýže. Příznaky hypovitaminosy jsou snížená chuť k jídlu, poruchy soustředění a podrážděnost, provázené ztrátou hmotnosti, zácpami, sníženou silou svalů a mravenčením v prstech rukou i nohou.

vitamín B₁, thiamin

2.2.5 Vitamín B₂

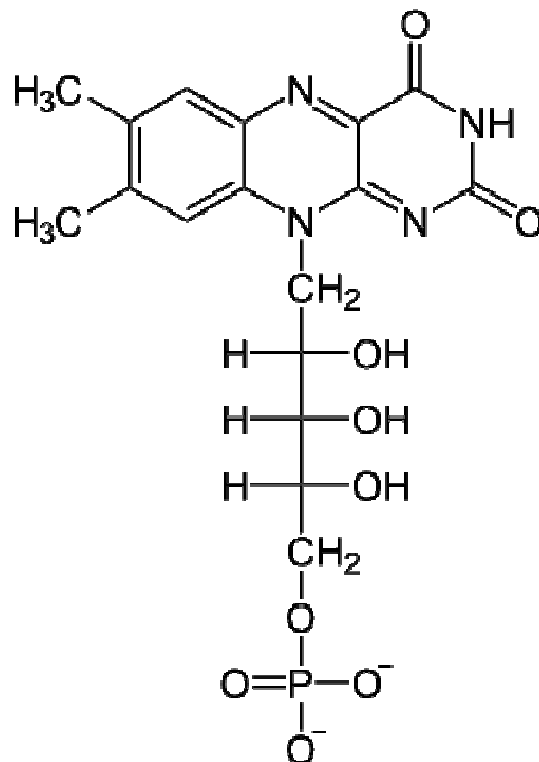
Chemicky se jedná o methylderivát isoalloxazinu a ribitolu. Je poměrně stálý v kyselém prostředí, je fotolabilní a termostabilní, je odolný vůči oxidaci.

Hraje životně důležitou roli při tvorbě energie ze sacharidů (cukrů), bílkovin a lipidů v rámci látkové přeměny. Vitamín B₂ (riboflavin) je složkou dvou koenzymů (flavinadenindinukleotidu - FAD a flavinmononukleotidu - FMN), které se účastní ve většině chemických reakcí v rámci látkové přeměny, během níž vzniká energie (26).

Vitamín B₂ se nalézá ve většině potravin živočišného a rostlinného původu. Nejlepšími zdroji jsou mléko, sýry a maso. Obilné výrobky, které jej obsahují poměrně málo, jsou tímto vitamínem fortifikovány a pokrývají většinu našich potřeb. Dalším hodnotným zdrojem je rovněž několik druhů zeleniny, např. brokolice, chřest, špenát a samozřejmě borůvky.

Ženy potřebují denně asi 1,2 mg vitamínu B₂. Když jsou vystaveny silnému stresu, potřebují až 1,7 mg za den, v těhotenství a v době kojení 2 mg nebo i více. Muži potřebují v závislosti na energetickém výdeji mezi 1,4 a 1,7 mg riboflavínu (19).

Snižuje riziko zákalu čočky u osob, které před tím nepřijímaly mnoho tohoto vitamínu ze stravy tak, jak se to prokázalo v rámci rozsáhlého výzkumu prováděného v Číně.

Vitamín B₂, riboflavin

2.3 Organické kyseliny

2.3.1 Kyselina mléčná

Lehce rozpustná kyselá chutnající kyselina tvoří ve vodě bezbarvé krystaly. Vzniká mléčným kvašením cukrů, např. v mléce, sýrech a kyselém zelí. Je používána v pekařství, pivovarnictví, k přípravě limonád apod. Nachází se v borůvkách.



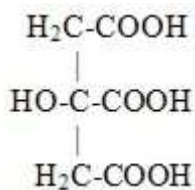
2.3.2 Kyselina šťavelová

Jedná se o organickou karboxylovou kyselinu, která je nazývána jako kyselina oxalová. Ve větším množství je obsažena ve šťavelu, šťovíku a také borůvkách. Čistá forma kyseliny šťavelové je jedovatá a má leptavé účinky. Soli kyseliny šťavelové se nazývají šťavelany nebo oxaláty.



2.3.3 Kyselina citronová

Je jedním z klíčových buněčných metabolitů citrátového cyklu. S kationty některých kovů (Fe^{3+} , Ca^{2+}) tvoří komplexy; u živočichů usnadňuje využití vápníku z potravy. Protože váže Ca^{2+} , může tím zabránit srážení krve. Používá se zejména v potravinářském a farmaceutickém průmyslu a je obsažena taktéž v borůvkách (15).

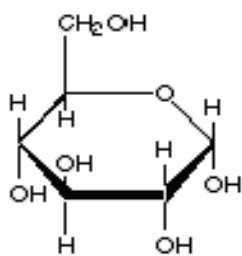


Kyselina citronová

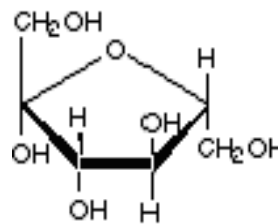
2.4 Sacharidy

Obsahují v molekule aldehydovou nebo ketonovou skupinu a jejich deriváty (aminocukry, deoxycukry, kyseliny aldonové, uronové a aldarové), jsou přítomny ve všech organismech, kde plní několik významných funkcí. Ze strukturních sacharidů obsažených v borůvkách je to celulóza, pektiny, hemicelulózy, hyaluronová kyselina.

Energetickou zásobu borůvek tvoří glukosa, fruktosa.



glukosa



fruktosa

2.4.1 Pektinové látky

Pektiny jsou polysacharidy obsahující jako monomerní jednotku kyselinu galaktouronovou, většinou esterifikovanou metanolem a na konci molekuly mají navázanou L-rhamnosu a D-glukosu. Jsou vázány na polysacharidy buněčných stěn rostlin a tvoří

tzv. buněčný tmel (střední lamelu) (24). Získávají se z řepných řízků, z jablek a citrusových plodů. Nachází se také v borůvkách. Díky přítomnosti silně hydrofilních karboxylových skupin mají pektiny velkou schopnost vázat vodu a za určitých podmínek (pH, koncentrace Ca^{2+}) vytvářejí gely. Toho se využívá v potravinářství (při výrobě marmelád), ve farmaceutickém průmyslu a v kosmetice.

2.5 Minerální látky

Vápník (Ca) je hlavním stavebním materiálem kostí, zubů a je také nezbytný při svalové činnosti. Při úbytku vápníku dochází k odebrání vápníku z kostí a může tak vznikat nemoc osteoporóza. Nedostatek se projevuje poruchami srdečního rytmu, křečemi a únavou. Zdrojem Ca^{2+} jsou mléčné výrobky, ovoce, borůvky, chléb, ořechy a ryby.(15)

Železo (Fe) je jeden ze zcela nezbytných prvků a bohužel dnes obecně v naší výživě nedostatečně obsažený. Nedostatek železa v těle má za následek nedostatek červených krvinek. Zdrojem železa jsou játra, pивní kvasinky, celozrnné výrobky, pažitka, borůvky, petržel, brokolice a růžičková kapusta.

Hořčík (Mg) má nezastupitelnou úlohu prakticky ve všech procesech probíhajících v organismu. Působí jako činitel antistresový, antitoxický, protialergický a protizánětlivý. Projevy nedostatku jsou především ranní únava, i po hodinách spánku, nespavost, noční pocení, bušení srdce, náhlé závratě, ztráta rovnováhy, třes víček, padání vlasů, lámavé nehty, křeče, rychlá únava, citlivost na změny počasí, časté bolení hlavy a potíže s koncentrací. Zdrojem Mg^{2+} jsou potraviny rostlinného původu - mák, fazole, sója, lískové ořechy, ovesné vločky, a dále borůvky. Z živočišných zdrojů sýry, ryby a drůbež.

Zinek (Zn) je nezbytný pro formování kostí, jako prevence před epilepsií a pro urychlování léčení ran, vředů, zranění a pooperačních ran a jizev. Zdrojem jsou semena dýní, pšeničné otruby a klíčky, většina hub, hovězí játra, ryby, ořechy, fazole, hrách, čočka, borůvky, kakao a další.

Draslík (K) je důležitý pro mezibuněčnou výměnu a funkci enzymů. Nedostatek se projevuje poruchou činnosti svalů, poruchou srdečního rytmu, trávení a nervového systému. Zdrojem jsou bílé fazole, hrách, vlašské ořechy, mandle, rozinky, brambory, špenát, rybíz, sušené švestky, borůvky a paprika.

Selen (Se) má význam pro ochranu buněk, svalovou funkci a srážení krve. Nedostatek se projevuje např. onemocněním srdce, poruchami jaterních funkcí a zvýšenou náchylností k infekčním chorobám. Zdrojem jsou maso, ryby, pивní kvasinky, celozrnné produkty, houby, ovoce, borůvky a zelenina.

Fosfor (P) podporuje látkovou výměnu a společně s vápníkem pečuje o tvorbu zubů a kostí. Nedostatek se projevuje poruchou funkce ledvin, křivicí a nedostatečným ukládáním minerálních látek v kostech. Zdrojem jsou mléko, maso, obilí, ryby, vejce a borůvky (16,17).

3 KAPSLE

Želatinové kapsle mají převážně funkci obalu. Možnosti využití želatinových kapslí jsou však širší. Neplní se jen tuhými práškovitými léčivými, ale i nevodnými roztoky a suspenzemi léčiv. Nemusí být určeny jen k perorální aplikaci, známe i želatinové kapsle rektální. Kapsle (*capsulae*) jsou dutá tělíška, zpravidla z želatiny různého tvaru, velikosti a konzistence, které slouží jako obal na plnění tuhých, nebo tekutých lipofilních léčiv, nebo roztoků a jsou to i léčivé přípravky, vyrobené naplněním léčiv do těchto obalů (24,25).

Rozlišují se tvrdé želatinové kapsle, želatinové kapsle s vrškem (*capsulae gelatinosae durae, operculatae*), pružné, měkké (*capsulae gelatinosae elasticae, moles*) a želatinové perly (*perlae gelatinosae*). Enterosolventní želatinové kapsle (*capsulae gelatinosae enterosolventes*) se nerozpouštějí v kyselé žaludeční šťávě. Mezinárodní lékopis definuje želatinové kapsle jako tuhé lékové formy s tvrdým, nebo měkkým obalem, vyrobené z vhodného typu želatiny. Liší se tvarem a objemem, obsahují zpravidla jedno léčivo a jsou určeny na perorální užití.

3.1 Pomocné látky na výrobu želatinových kapslí

Želatinové kapsle se vyrábí ze směsi želatiny, vody, glycerinu a barviv. Často obsahují také konzervační látky. Želatina je polymer, který tvoří stěnu kapslí, voda je rozpouštědlem, glycerol nebo sorbitol plní funkci změkčovadel. Želatina na výrobu kapslí se získává z kolagenu, který je hlavní součástí kůže a pojivových tkání. Kolagen je glykoprotein tvořený aminokyselinami spojenými do řetězců, jehož molekulu tvoří vždy tři řetězce peptidů. Jeho stavební jednotkou je trojšroubovice tropokolagenu. Průměrná relativní molekulová hmotnost je velmi vysoká, většinou okolo 360 000.

Z kolagenu se želatina získává termickou, nebo chemickou depolymerizací, rozložením molekul kolagenu. Produkt získaný odbouráním kolagenu má jiné fyzikální a chemické vlastnosti, je rozpustnější ve vodě má vysokou schopnost bobtnat. Cílem přípravy želatiny je depolymerizovat kolagen tak, aby byla získána želatina ve vodě rozpustná, ale neztratila pevnost.

Želatina se uplatňuje ve více lékových formách na zvýšení viskozity, jako emulgátor a stabilizátor. U gelů zabraňuje synerezi, tlumí pH, protože má amfolytický charakter. Výhodou

také je, že má neutrální chuť a je bez nepříjemného zápachu, fyziologicky je celkem neškodná, stravitelná, protože je to čistý protein přírodního původu.

Na výrobu želatinových kapslí musí splňovat náročné fyzikální, chemické a mikrobiologické požadavky (26). Z fyzikálních ukazatelů jsou nejdůležitější mechanické vlastnosti gelů

a viskozita slizů želatiny. Chemickými charakteristikami želatiny jsou pH, izoelektrický bod, obsah popela a nepřítomnost těžkých kovů, fosforečnanů a arzenů. U mikrobiologických zkoušek se sleduje nepřítomnost patogenních i nepatogenních zárodků, protože kapsle mají být sterilní, nebo alespoň mikrobiálně neškodné. Želatinová hmota je pro mikroorganismy vhodnou živnou půdou. Proto se do želatinové hmoty přidávají antibakteriální látky, nebo se kapsle sterilizují etylenoxidem.

3.2 Výroba želatinových kapslí

Tvrdé želatinové kapsle přichází do farmaceutických firem většinou od jiných výrobců. Ve farmaceutických firmách se většinou jen plní, zavírají a balí. Měkké želatinové kapsle a želatinové perly se ve farmaceutické výrobě současně formují a plní, až poté se balí.

3.3 Tvrdé želatinové kapsle

Tvrdé želatinové kapsle se skládají ze dvou válcovitých teleskopických, do sebe vsunutých tělísek, vršku a těla. Princip výroby kapslí se od roku 1833 prakticky nezměnil, dnes je přirozeně mechanizovaný a automatizovaný.

Při výrobě tvrdých želatinových kapslí se želatina rozpouští v kotlích z nerezavějící ocele při teplotě 65°C. Voda použitá jako rozpouštědlo musí být demineralizovaná a sterilizovaná. Do želatinové hmoty se přidávají rozpustná barviva, pokud mají být kapsle průsvitné, nebo barevné pigmenty, pokud mají kapsle chránit obsah před vlivem světla apod.

Při výrobě se namočí válcovité tyčinky, které plní funkci forem a zodpovídají tvarem a průměrem tělu a vršku kapsle, do roztopené želatinové hmoty. Potom se formy vytáhnou a otáčejí v proudu vzduchu, aby na nich vytvořený film ztuhl. Po usušení se tělo kapsle a jejich vršky z formy stáhnou, ořežou na požadovanou délku a spojí. Tak se vytvoří dvojdielná prázdná želatinová kapsle. Vyrobene kapsle mají obsahovat 12 až 15 % vody, aby nebyly velmi křehké. Obsah vody však nesmí být větší, protože kapsle by se lepily.

Želatinové kapsle se dodávají až v sedmi velikostech, jejich objem je 0,13 až 1,37 ml, v závislosti na hustotě prášku mohou obsahovat 78 až 1644 mg léčiva. Jejich velikost se označuje čísly 5 až 000, které jsou největší. Velikost 0 je nejpraktičtější na polknutí.

Charakteristickou vlastností želatinových kapslí je jejich barevnost. Barva kapslí není jen výhodným identifikačním znakem, barvy působí také na psychiku pacienta. Na základě psychologických poznatků se volí barva léků určitých farmakologických skupin. Žlutá, oranžová a levandulová působí psychostimulačně a jsou proto vhodná pro antidepresiva, pro které se nehodí tmavé barvy. Šedá, tmavomodrá a jasně zelená jsou indiferentní. Bílá je vhodná pro analgetika.

Původně vyráběné želatinové kapsle měly hladké stěny. Pokud se obě dvě části neslepily páskem želatiny, mohly se při manipulaci otevřít a jejich obsah se mohl vysypat. Proto se vyvinuly kapsle, jejichž obě dvě části do sebe zapadají, a proto se kapsle nemohou samovolně otevřít. Tyto kapsle označují výrobce *lok – caps* anebo *snap – fit* (anglicky to lock = zavírat, the snap = záchytky).



Obr. 5. Tvrdá želatinová kapsle se zámkem

Kapsle jsou opatřeny zámkem systému POSILOK, který je tvořen kroužkem na uzávěru tobolky. Zámek zajišťuje pevné uzavření tobolky po celou dobu spojení obou částí (tj. těla a víčka) kapsle. Prolisy na víčku (tzv. předzámek) zabraňuje nežádoucímu rozpojení prázdné kapsle a zajišťuje snadné spojení kapsle během plnění. Kanálek vytvářený na těle

tobolky, pak umožňuje odvod vzduchu a tím zároveň snadné plnění i při vysokých rychlostech.

Při vsouvání jedné části kapsle do druhé vznikají problémy s tolerancí jejich průměru. Rozdíl mezi průměrem těla a vršku je minimální, aby kapsle byly těsně zavřené. Při velké výrobní kapacitě strojů na plnění kapslí a při velké pracovní rychlosti může i velmi malá odchylka od stanovené tolerance rozměrů způsobit, že se okraj kapsle poškodí a kapsle se roztrhne. Aby se tyto nedostatky odstranily, upravili výrobce dolní část kapsle mírně kónického tvaru, čímž se ulehčí nasouvání vršku a zmenší se riziko, že se kapsle poškodí. Tyto kapsle s výhodnějším tvarem nazvali *coni – snap*. *Coni-snap-supro* jsou kapsle zaručující bezpečnost a spolehlivost terapie. Obyčejné želatinové kapsle se dají po naplnění otevřít a tak vzniká možnost záměny, nebo záměrného porušení jejich obsahu. *Coni-snap-supro* je kapsle, která se po naplnění a uzavření nemůže otevřít bez poškození. Na této kapsli horní díl velmi přesahuje ten spodní, ze kterého lze vidět jen zakulacené dno, které se nedá prsty ani kleštěmi bez zmáčknutí zachytit.

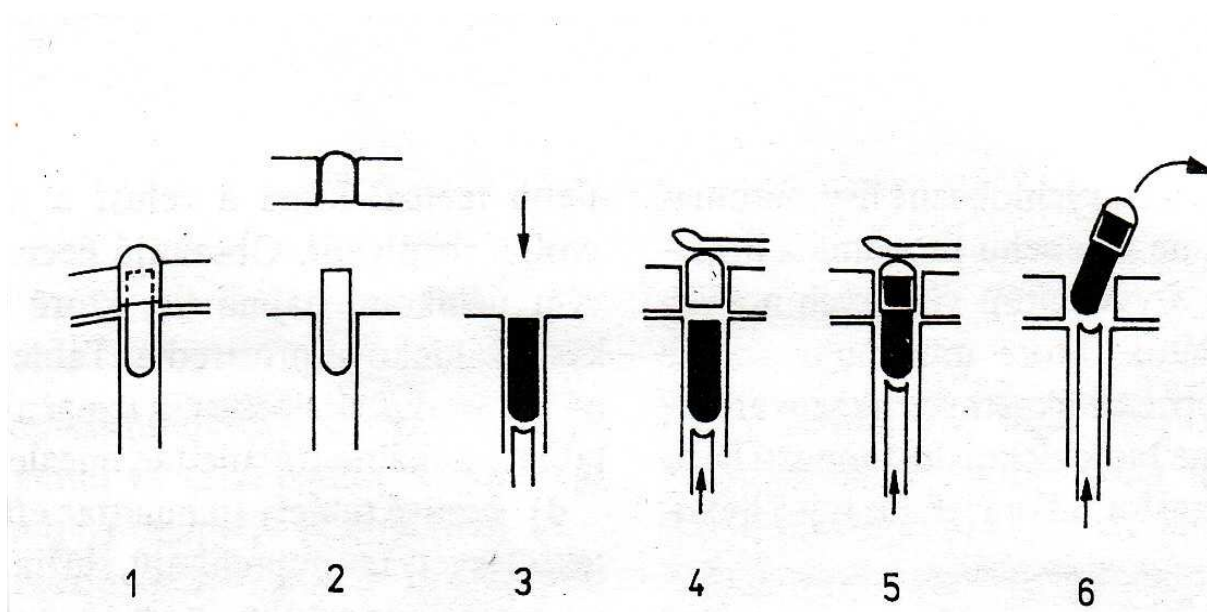
Přípravek, který se má plnit do želatinových kapslí musí splňovat dva požadavky. Musí být vhodný na zpracování na automatických plničkách, aby se dosáhla rovnoměrnost dávkování, a musí se z kapslí uvolňovat, aby se zabezpečila biologická dostupnost léčiva.

Materiál, který se má do želatinových kapslí plnit, není většinou bez úprav na plnění vhodný, protože plnicí automaty běží velkou rychlostí a přitom musí látku přesně dávkovat. Pokud má plnění probíhat bez problémů, musí se respektovat výrobcem plnicích zařízení určené nároky na tvar a velikost částic, na jednotnou velikost zrn tzv. granulometrickou rovnoměrnost, sypkost, která úzce souvisí s obsahem vlhkosti a na pojivovou neboli zhušťovací schopnost plněného prášku.

Do kapslí se nejčastěji plní prášek, nebo zrněný prášek. Na zlepšení tokových vlastností se k nim přidávají kluzké látky, zpravidla se vystačí s 0,1-0,3 % koloidního oxidu křemičitého, stearanu hořečnatého, nebo 0,5-1 % mastence. Plnit se však mohou i pelety, mikrokapsle, malé i větší tablety, nebo tablety potahované. Kulovité mikroformy, kterými jsou například pelety, nebo mikrokapsle jsou pro svoje dobré tokové vlastnosti jako obsah kapslí velmi výhodné. Náplň želatinových kapslí může být upravená i tak, že vznikne přípravek s řízeným uvolňováním léčiva.

Ve stroji se prázdná kapsle vyrovná tak, aby zaujímala svislou polohu a její vršek byl nahore. Po otevření se dolní část naplní a spojením obou částí se kapsle uzavře. Potom se

kapsle vysune a přichází do zásobníku. Plnění se přizpůsobuje materiálu, který se plní. Prášky anebo granuláty se plní do kapslí jako volně tekoucí anebo po zahuštění jako útvary definovaného tvaru. Plnění volně tekoucího prachu se dělá shrnováním navršeného materiálu do dolního dílu kapsle a jeho zarovnáním pravítkem. Tento způsob plnění je vhodný, pokud žádaná dávka vyplní dolní díl kapsle a pokud se plní jednosložkovým materiálem, při kterém nehrozí odmísení, jako při plnění směsi.



Obr.6. Plnění tvrdých želatinových kapslí

1 – prázdná kapsle, 2 – oddělení vršku od těla kapsle, 3 – plnění kapsle, 4,5 – uzavírání kapsle, 6 – vysunutí kapsle

Vzhledem k povaze želatiny nesmí kapalina, která se má plnit, obsahovat vodu. Vhodné jsou přípravky, které mají jako nosič olej. Mohou mít nízkou viskozitu, nebo být pastovité. Kapsle s kapalnou náplní, která se dávkuje s přesností $\pm 1\%$ se nazývají Licaps.

Naplněné tvrdé želatinové kapsle se mohou dále upravovat. K úpravám patří vyrážení, odstraňování prachu a leštění, zapečetování a páskování a vytvoření odolnosti proti žaludeční šťávě.

Zapečetění a páskování je opatřením, kterým se brání samovolnému, nebo úmyslnému otevření kapslí. Zapečetit se mohou nakapáním zředěného roztoku lihu na místa, kde se střetávají oba dva díly kapsle s následným vysušením, zahřátím, nebo působením ultrazvuku.

ku. Páskování je nanesení tenkého proužku roztopené želatinové hmoty na rotující kapsli tak, aby se vršek a tělo kapsle neoddělitelně spojili.

Odolnost želatinových kapslí proti žaludeční šťávě se může vytvořit dvojím způsobem. Acidorezistentní vlastnosti má náplň kapslí a druhým způsobem je, že kapsle se stane rezistentní enterosolventní denaturací, neboli síťováním želatiny, nebo nanesením vrstvy laku na kapsli. Denaturace želatiny kapalným, nebo plynným formaldehydem je vzhledem k obtížné kontrole tohoto postupu v současné době překonaná.

Zavedením laku jako je polyvinylacetalftalát, polyvinylpyrolidon, hydroxymetylpropylcelulóza, karboxyvinyllové polymerizáty, akrylové pryskyřice a vhodných způsobů jejich nanášení v drážkovacích kotlích, nebo fluidních přístrojích, se získal spolehlivý postup acidorezistentní úpravy želatinových kapslí. Z uvedených filmotvorných látek se nejvíc doporučují Eudragit®L a S.

3.4 Měkké želatinové kapsle

Měkké želatinové kapsle se na rozdíl od tvrdých želatinových kapslí v jedné operaci formují a zároveň plní. Výchozím produktem je želatinová hmota obsahující zpravidla 44 % želatiny, 24 % glycerinu a 32 % vody.

3.5 Želatinové perly

Želatinové perly se formují a plní v jedné operaci stejně jako měkké želatinové kapsle. Liší se tím, že na svém obvodě nemají šev. Želatinová hmota je složená z želatiny, glycerinu, čisté vody a konzervační přísady metylparabenu.

3.6 Hodnocení jakosti želatinových kapslí a jejich použití

Prázdné želatinové kapsle se hodnotí podle některých ukazatelů předepsaných pro želatinu. Těsnost uzavření, velikost, tvar a zbarvení se posuzuje organolepticky.

Průměrná hmotnost a hmotnostní proměnlivost obsahu se stanoví pro 20 kapslí. Pro individuálně připravované kapsle platí ustanovení o dělených prášcích. V hromadné výrobě se připouští odchylka průměrné hmotnosti $\pm 5\%$. Kolísání obsahu v jednotlivých kapslích je povoleno v rozmezí 7,5 - 20 % v závislosti na hmotnosti obsahu.

Zkouška na uvolnění obsahu se dělá stejně jako zkouška rozpadavosti tablet a předepsaný limit je 15 minut. Enterosolventní kapsle musí odolávat účinku umělé žaludeční šťávy 2 hodiny a uvolnit léčivo v umělé duodenální šťávě do 1 hodiny.

K výhodám želatinových kapslí je možné dále přiřadit eliminované problémy formulační, kde odpadají problémy lisovatelnosti práškových směsí, snížená spotřeba pomocných látek, přesné a rovnoměrné dávkování, možnost připravit enterosolventní kapsle s řízeným uvolňováním léčiva, depotní, racionální a hygienická výroba.

Pacienti želatinové kapsle rádi přijímají, protože mají neutrální chuť, lehce se polykají, dobře identifikují přípravek, vzbuzují důvěru. To vše se pozitivně projevuje v dodržování terapeutického režimu (48).

4 VYSOCEÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC)

Využití vysoceúčinné kapalinové chromatografie v analytických laboratořích, v základním výzkumu i v technické praxi je velmi rozsáhlé. Kapalinová chromatografie umožňuje analyzovat látky o relativních molekulových hmotnostech od několika desítek do několika set tisíc. Významnou výhodou metody HPLC je velká rychlost analýzy a možnost automatického vyhodnocení naměřených dat. Vysoceúčinná kapalinová chromatografie je metodou velice flexibilní, v současnosti jsou k dispozici různé druhy HPLC kolon vhodné pro nejrozmanitější účely. Moderní detekční systémy vynikají vysokou citlivostí a možností dosáhnout nízkých mezí detekce a mezí stanovitelnosti. Vedle tradičních analytických aplikací může být vysoceúčinná kapalinová chromatografie použita rovněž k čištění a preparaci složek ve směsích. Vysoceúčinná kapalinová chromatografie dosahuje vysoké účinnosti a rychlosti dělení látek použitím kolon plněných velmi jemnými sorbenty, při použití vysokotlakých čerpadel mobilních fází lze pracovat s velkými průtoky mobilních fází, průtokové detektory umožňují citlivou kontinuální detekci (32).

Chromatografie je separační proces, při kterém se látky rozdělují mezi dvě nemísitelné fáze, jednu pohyblivou (mobilní) a druhou nepohyblivou (stacionární), na základě fyzikálně-chemických interakcí, jako jsou adsorpce, rozpouštění, iontová výměna apod. (30,31).

Základní výhodou HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) je široký obor použitelnosti. Další předností je možnost účinně ovlivňovat separaci nejenom volbou stacionární fáze, ale rovněž změnami složení mobilní fáze, protože kapalná mobilní fáze není pouze interním nosičem vzorků, ale podílí se přímo na interakcích rozpuštěných látek se stacionární fází (30). Chromatografickou separaci látek v koloně lze provést třemi rozdílnými technikami:

1. Frontální
2. Vytěšňovací
3. Eluční

Současná praxe využívá výhradně eluční chromatografii. Její princip spočívá v tom, že chromatografickým systémem protéká konstantní rychlostí mobilní fáze o určitém složení a fyzikálních vlastnostech, jejíž složky neinteragují se stacionární fází v koloně (31).

Zadržování látek rozpuštěných v mobilní fázi – solutů – kolonou se nazývá retence, zatímco vymývání solutů z kolony se nazývá eluce. Mobilní fázi se říká eluční činidlo a její schopnost vymývat látky z kolony se posuzuje relativním parametrem eluční síly. Mobilní fáze o vyšší eluční síle vymývá látky z kolony rychleji, než mobilní fáze o nižší eluční síle. Rozpouštědla, seřazená podle stoupající eluční síly, tvoří tzv. eluotropní řadu. Látky lze eluovat třemi způsoby (30):

1. Izokratickou elucí
2. Elucí skokem
3. Gradientovou elucí

Gradientová eluce je nejúčinnější a nejpoužívanější technika programování podmínek v HPLC, kdy složení mobilní fáze se mění s časem. Nejčastěji se používá gradient lineární, někdy též gradient exponenciální či logaritmický. Při analýze na chemicky vázaných nepolárních fázích se zpravidla používá gradient metanolu nebo acetonitrilu ve vodě. Při tvorbě vysokotlakého gradientu mobilní fáze se využívá dvou nebo více čerpadel, jimiž se složky mobilní fáze dopravují do mísící komory a následně na HPLC kolonu. Průtokové rychlosti obou čerpadel jsou řízeny programovací jednotkou podle předem zvoleného programu (33).

Pokud se celá chromatografická separace provádí s použitím mobilní fáze o konstantním složení, tedy o konstantní eluční síle, jde o techniku izokratické eluce. Pokud se ovšem eluční síla mobilní fáze podle určitého programu zvyšuje v průběhu separace, pak jde o techniku gradientové eluce (30).

V současné době se používají jako náplně kolon pórovité částice silikagelu o průměru 1-5 μm . Umožňují separace s podstatně vyšší účinností, přičemž se dosahuje i vyšší kapacity kolony pro dávkované vzorky a zvyšuje se rychlost analýzy. Účinnost separace vzrůstá s klesajícím průměrem částic. Zavádí se kolony o velmi malém vnitřním průměru.

Nejběžnějším adsorbentem používaným v HPLC je silikagel. Silikagel je charakterizován průměrem pórů ($5 \cdot 10^{-6}$ až $25 \cdot 10^{-6}$ mm), specifickým povrchem (od 100 do $860 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) a specifickým objemem ($0,7$ až $1,2 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$). Na povrchu silikagelu jsou volné silanolové – Si-OH a siloxanové –Si-O-Si- skupiny. Koncentrace silanolových skupin je nejdůležitějším faktorem při separaci, naopak siloxanové jsou nežádoucí, neboť způsobují nespecifické interakce. V adsorpční chromatografii s polárními adsorbenty se používají nepolární rozpouštědla jako mobilní fáze. Postupem času převládají separace s fázemi méně polár-

ními než fáze mobilní. Zatímco adsorbční chromatografie se hodí pro separace směsi látek nízkomolekulárních, sloučenin lipofilního charakteru a geometrických izomerů, homologické řady látek se nejlépe dělí chromatografií s obrácenými fázemi. Reverzní fáze se nehodí pro separace silných kyselin a bází, neboť silikagel, který slouží jako nosič reverzní fáze, se rozkládá při extrémních hodnotách pH. Na povrchu silikagelu jsou už zmíněné volné hydroxylové (silanolové) skupiny $-\text{Si-OH}$ s aktivním vodíkovým atomem, který může být nahrazen různými organickými skupinami a tak mohou být připraveny stacionární fáze s různými vlastnostmi. V současné době je většina komerčně vyráběných stacionárních fází siloxanového typu Si-O-Si-R . Takto se vyrábějí např. fáze se skupinami $-\text{Si-C-Si-ethyl}$, $-\text{hexyl}$, $-\text{oktyl}$, $-\text{odktadecyl}$, $-\text{fenyl}$, $-\text{amino}$ a další. Vysoce účinné kolony naplněné částicemi o průměru menším než $5\ \mu\text{m}$ vyžadují k dosažení optimálních průtokových rychlostí vysokých tlaků (jednotky až desítky MPa) (34,35,36).

4.1 Přístroje a pomocná zařízení

Mobilní fáze se přivádí ze zásobníku do vysokotlakého čerpadla, které ji přes dávkovací zařízení vzorku dopravuje do kolony. Na výstupu z kolony je připojen detektor, jehož signál se zpracovává na počítači.

4.1.1 Zásobník

Pro gradientovou eluci je zapotřebí dvou nebo více zásobníků pro složky mobilní fáze a zařízení pro jejich směšování. Mobilní fáze se před použitím filtrují, kvůli odstranění nečistot a odplyňují (např. s použitím ultrazvukové lázně). Do systému HPLC jsou čerpány nejčastěji ze skleněných lahví.

4.1.2 Čerpadla

Moderní instrumentace umožňuje pracovat s tlaky až 60 MPa. Důležitá je vysoká přesnost a reprodukovatelnost průtoků v celé škále pracovních tlaků. Čerpadla bývají dělena na pulzní a bezpulzní, používají se pístová, membránová nebo pístově membránová, konstrukční řešení v kombinaci s automatickým ovládním zpravidla uspokojivě řeší minimalizaci pulzů. Materiálem pro výrobu čerpadel v HPLC je nejčastěji nerezová ocel, safír, titan, nebo keramika. Nástřiková zařízení se musí vyrovnat s vysokými tlaky na koloně,

používají se především dávkovací vysokotlaké ventily se smyčkou. Dobře vybavená chromatografická zařízení mají k dispozici autosamplery se zásobníkem vzorků (nejlépe s teplotou). Někdy je nezbytné převádět složky vzorku na deriváty, takže systém může obsahovat reaktory pro derivatizaci (37,38).

4.1.3 Předkolona

Řada vzorků obsahuje balastní látky, proto se do systému zařazuje předkolona, ve které se tyto látky zachytí. Předkolony bývají nejčastěji umístěny mezi dávkovačem a chromatografickou kolonou. Jednotlivé části kapalinového chromatografu se nejčastěji spojují nerezo- vými kapilárami s minimálním mrtvým objemem. Termostatovat lze kolonu i detektor i celý okruh vedení mobilní fáze.

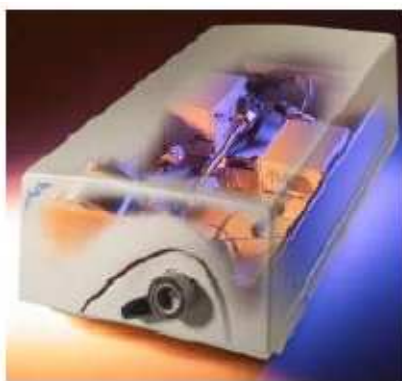
4.1.4 Dávkovací ventil

V současné době se používá dávkování vzorků pomocí dávkovacích ventilů, které umožňují podstatně přesnější dávkování a nevyžadují zastavení toku mobilní fáze. Dávkovací ventily jsou vícecestné ventily s vyměnitelnou dávkovací smyčkou. Smyčkové dávkovače umožňují dávkovat libovolný objem vzorku mikrostříkačkou do smyčky při atmosferickém tlaku. Po naplnění smyčky se její obsah vymyje pootočením ventilu mobilní fází do kolony (39).

4.1.5 Kolony

Kolony pro HPLC jsou z materiálu, který musí odolávat relativně vysokým pracovním tlakům a zároveň chemickému působení mobilních fází a separovaných složek. Materiálem chromatografických kolon je většinou antikorozivní ocel nebo speciálně tvrzené borosilikátové sklo, lze použít i kombinace obou materiálů. Pro analytické aplikace se převážně používají kolony plněné pórovitými náplněmi o průměru 3-5 μm o délce 5-25 cm a vnitřním průměrem 3-4,6 mm. Účinnost separace, doba analýzy a pracovní tlak se zvyšují s rostoucí délkou kolony a naopak klesají s rostoucím průměrem částic náplně. Materiály pro plnění kolon jsou většinou založeny na anorganické matici (silikagel, oxid hlinitý, pórovité sklo), na níž mohou být chemicky vázány nebo zakotveny různé stacionární fáze,

méně často se používá organických gelů různé struktury, které mohou být rovněž chemicky modifikovány. Charakter stacionární fáze závisí na chromatografickém systému. U normálních fází jsou funkční skupiny stacionární fáze polární, mobilní fází bývá nepolární rozpouštědlo (pentan, hexan). Chromatografie na tzv. systémech s obrácenými fázemi (RP, Reversed-Phase, asi v 80 % všech aplikací HPLC) používá chemicky vázanou nepolární stacionární fázi. Nejpoužívanější je typ C18, kde jsou molekuly octadecylsilanu vázány na částicích silikagelu. Mobilní fáze v systému RP je polární (40).



Obr.7. Kolonové uspořádání u zařízení ESA, Coulochem III.

4.1.6 Detektory

K detekci separovaných látek se zpravidla užívá obecných nebo specifických vlastností, kterými se tyto látky liší od mobilní fáze, na tomto základě se také rozlišují univerzální a selektivní detektory.

Fotometrické detektory (UV, VIS) - většina organických látek absorbuje v oblasti UV záření, některé i ve viditelné oblasti světla. Detektory pracují buď s fixní vlnovou délkou (nejčastěji 254 nm), s možností výběru několika vlnových délek (filtrové), nebo jsou opatřeny monochromátorem a pracují na principu spektrofotometru v rozsahu 190 - 400 nm.

Detektor diodového pole (DAD) - umožňuje získat spektrální data látek v průběhu celé analýzy. Průtokovou celou prochází polychromatické světlo, transmitované záření je spektrálně rozkládáno holografickou mřížkou, takže na každou z miniaturních fotodiod umístěných na destičce o délce cca 1 cm dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v průtokové cele detektoru.

Fluorimetrický detektor - je selektivní detektor s vysokou citlivostí. Při měření fluorescence se budící UV záření ze zdroje vede do průtokové cely, kde se absorbuje a vyzářené světelné kvantum o větší vlnové délce se měří fotonásobičem.

Elektrochemický detektor - umožňuje stanovit velmi nízké koncentrace látek v eluentu v případě, že tyto látky jsou elektrochemicky aktivní (redukovatelné nebo oxidovatelné). Měří se proud protékající mezi polarizovatelnou pracovní elektrodou a pomocnou elektrodou v závislosti na vloženém napětí. Detektor pracuje buď jako polarografický se rtuťovou kapkovou elektrodou, nebo s tuhou elektrodou zhotovenou např. z grafitu. Obecně se tento detektor nehodí pro detekci gradientové eluce (36).

Hmotnostní detekce (LC/MS) - snímání hmotnostního spektra během eluce látek je velmi výhodné pro strukturní analýzu a identifikaci látek ve složitých směsích. Technicky výhodné pro přímé napojení je používání mikrokolon a kapilárních kolon.



Obr.8. Coulochem III

V HPLC je nejdůležitější přesnost analýzy, neboť se v ní odráží důvěryhodnost výsledků získaných při dané analýze. Přesnost v HPLC závisí na kvalitě kontroly instrumentálních a separačních podmínek. Správnost metody je dána možnostmi kalibrovat systém standardy o známém složení (30).

Na analýzu řady vitaminových složek je dokonale využívána vysoceúčinná kapalinová chromatografie s použitím reverzní fáze C8 nebo C18. Jako eluční způsob se nejčastěji používá izokratická nebo gradientová eluce. Jako mobilní fáze bývá nejvíce používán metanol, etanol, acetonitril a voda v různých poměrech, případně v kombinaci s vhodnými pufrými (54).

5 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ KVANTITATIVNÍCH ANALÝZ

Analytická metoda je souhrn pokynů úplně definující algoritmus operací, kterými chemik-analytik získá výsledek.

Analytická chyba představuje rozdíl mezi nalezeným obsahem analytu (x) a jeho skutečným množstvím obsahem (μ) ve vzorku.

$$\Delta = \mu - \bar{x} \quad (1)$$

$$\% \Delta = \frac{\mu - \bar{x}}{\mu} \cdot 100 \quad (2)$$

Malé nepravidelné odchylky od skutečné hodnoty, jimiž jsou zatíženy všechny výsledky analýz, neboli naměřené výsledky se nazývají nahodilé chyby. Určují se statisticky ze souboru paralelních (opakovaných) analýz. Ovlivňují přesnost (reprodukovatelnost) či opakovatelnost stanovení. Aritmetický průměr (\bar{x}) všech výsledků se zpravidla nejvíce blíží skutečné hodnotě (51):

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{n} \quad (3)$$

Základní charakteristikou nahodilých chyb je odhad směrodatné odchylky:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \left(\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right)} \quad (4)$$

Ve skutečnosti máme k dispozici jen omezený počet výsledků, který je podstatně menší než $n \rightarrow \infty$ a tudíž je směrodatná odchylka závislá na počtu paralelních výsledků. Byl definován Studentův koeficient t , který charakterizuje Studentovo rozložení náhodných odchylek pro daný stupeň volnosti (daný počet výsledků analýz a použitou hladinu významnosti

1- α). Studentovým koeficientem pak násobíme hodnotu směrodatné odchylky. Nejlepším vyjádřením pro průměrný výsledek ze série paralelních stanovení je proto vztah:

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{\sqrt{s}}{t} \cdot n \quad (5)$$

Tabulka 1. Kvantily $t(n)$ Studentova rozdělení o n stupních volnosti (55)

t(n)	α		
	0,05	0,01	0,001
n			
1	12,71	63,66	636,58
2	4,30	9,93	31,60
3	3,18	5,84	12,92
4	2,78	4,60	8,60
5	2,57	4,03	6,87
6	2,45	3,71	5,96
7	2,37	3,50	5,41
8	2,31	3,36	5,04
9	2,26	3,25	4,78
10	2,23	3,14	4,59

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 METODIKA

6.1 Použité přístroje a pomůcky

Temperovaná vodní lázeň a třepačka (Memmert, SRN)

Předvážky (Kern, SRN)

Lednice (Samsung- Calex, CZ)

Odparka (RVO 400 A, Ingos)

Běžné laboratorní sklo a pomůcky

Analytické váhy

Dávkovací stříkačka (Hamilton, USA)

Mikrofiltry 0,45 μm , Nylon (Supelco, USA)

Mikrofiltry na mobilní fázi 0,2 μm (Supelco, USA)

- Speciální zřízení:

Aparatura pro HPLC – ECD (ESA - Coulochem III)

- analytická cela typ 5010 A

- guard cela typ 5020

- detektor Coulochem III

- dávkovací ventil analytický smyčkový (20 μl)

- kolona SUPELCOSIL – LC18 (15 cm x 4,6 mm; 5 μm , Supelco, USA)

- PC s vyhodnocovacím programem Chemstation - Instrument 1, (Agilent, USA)

6.2 Materiál

6.2.1 Chemikálie

Metanol 99,8 % - Merck KGa (Darmstadt, Germany)

Acetonitril 99,9 % - Merck KGa (Darmstadt, Germany)

kyselina fosforečná, 85% - Chemapol (Praha, Česká republika)

Destilovaná voda

Redestilovaná voda

Hexan, 99,9 % - Penta (Praha, Česká republika)

etanol - Chemapol (Praha, Česká republika)

Chloroform – Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, Česká republika

Kyselina chlorovodíková – Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, Česká republika

Standard β -karotenu (Sigma Aldrich, Riedel-del Haën, SRN)

Kapsle β -karotenu (Walmart, a.s.)

6.2.2 Vzorek

Zkoumaným vzorkem byla tvrdá želatinová kapsle nazvaná jako „Kapsle pro podporu zraku“ vyrobená na přístroj Automatic Capsule Arranging machine, fa. Topsonic International. Hlavními složkami této kapsle byl Borůvkový extrakt a β -karoten. Ostatní složení z důvodu ochrany receptury není záměrně uvedeno.

6.3 Extrakce biologicky aktivních látek v suchém extraktu želatinových kapslí pro podporu zraku

Extrakce 1. část

Vzorek suchého extraktu kapsle pro podporu zraku byl navážen na analytických vahách do zkumavek se zábrusem s přesností na 0,0001 g. Poté byla přidána rozpouštědla nebo směsi rozpouštědel o objemu 5 ml. Extrakce byla provedena na třepačce po dobu 20 minut při laboratorní teplotě 20°C a ve vodní lázni při teplotě 35°C po dobu 20 minut. Extrakční činidlo chloroform bylo použito pouze při laboratorní teplotě 20°C, taktéž po dobu 20 minut. Účinnost rozpouštědel je zaznamenána v tabulce 1, v kapitole 7.1.

Extrakce 2. část

0,05 g suchého extraktu z kapslí bylo naváženo do zkumavek se zábrusem. Vzorek byl navážen s přesností na 0,0001 g. Poté byla přidána rozpouštědla (tabulka 2) nebo směsi rozpouštědel o objemu 5 ml. U směsi rozpouštědel byl jejich vzájemný poměr 50:50. Extrakce byla provedena při teplotě 50°C ve vodní lázni po dobu 20 minut. Účinnost rozpouštědel je zaznamenána v tabulce uvedené v kapitole 7.1.

Extrakce 3. část

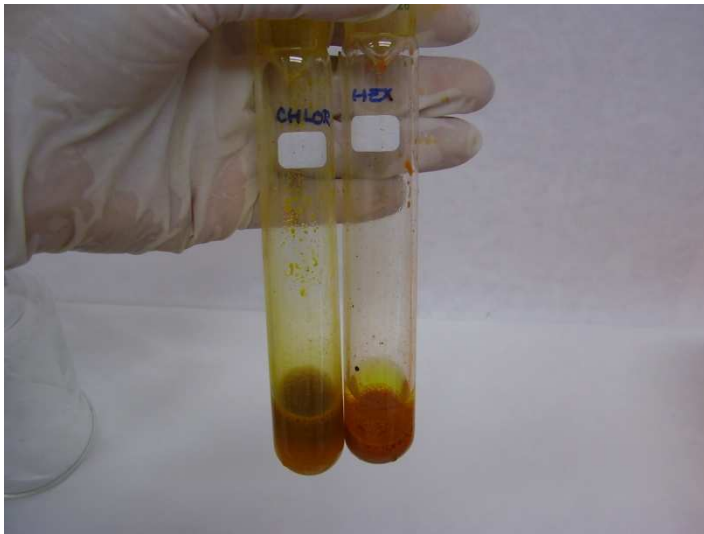
Vzorek suchého extraktu kapslí byl navážen na analytických vahách s přesností na 0,0001 g do zkumavek se zábrusem. Poté bylo přidáno rozpouštědlo (tabulka 3) o objemu 2,5 ml, u směsi rozpouštědel v poměru 50:50 a u kombinace rozpouštědel etanol + metanol v poměru 80:20. Extrakce byla provedena při laboratorní teplotě 20°C na třepačce po dobu 20 minut a ve vodní lázni při teplotě 35°C a 50°C po dobu 20 minut. Extrakční činidla metanol, etanol, aceton a směs rozpouštědel etanol + voda + hexan a aceton + voda bylo použito pouze při teplotě 50°C ve vodní lázni, taktéž po dobu 20 minut. Účinnost rozpouštědel je zaznamenána v tabulce 3, která je uvedena v kapitole 7.1.

Extrakce 4.část

Vzorek extraktu z želatinových kapslí byl navážen na analytických vahách s přesností na 0,0001 g do zkumavek se zábrusem. Poté byla přidána rozpouštědla o objemu 2,5 ml, u směsi rozpouštědel v poměru 50:50. Extrakce byla provedena při laboratorní teplotě 20°C na třepačce po dobu 20 minut a ve vodní lázni při teplotě 35°C a 50°C po dobu 20 minut. U směsi etanol + voda + hexan byla provedena druhá extrakce při použití vodní lázně 50°C a laboratorní teploty 20°C. Účinnost rozpouštědel je zaznamenána v tabulce 4 a na obrázcích 14-16 uvedených v kapitole 7.1.

Extrakce 5.část

Vzorek extraktu v želatinových kapslích byl navážen na analytických vahách s přesností na 0,0001 g do zkumavek se zábrusem. Poté bylo přidáno rozpouštědlo hexan o objemu 2,5 ml. Byla zvolena šestinásobná extrakce, která byla provedena při laboratorní teplotě 20°C na třepačce po dobu 20 minut, a poté ve vodní lázni při teplotě 35° C po dobu 20 minut. Výsledky extrakce jsou uvedeny v kapitole 7.1.



Obr.9. Několikanásobná extrakce



Obr. 10. Vyextrahované karotenoidy po přidavku okyselené vody

6.4 Pilotní pokusy

6.4.1 Stanovení metodiky pro detekci β -karotenu

Pro stanovení β -karotenu bylo nutné vytvořit metodiku, která zaručí správnost a rutinní stanovení β -karotenu v želatinových kapslích. Pro optimalizaci chromatografických podmínek byl použit standard β -karotenu, který byl rozpuštěn v etanolu. Bylo připraveno několik mobilních fází o různých poměrech obsažených chemikálií, které byly použity k testování. Každý vzorek byl měřen vždy pětkrát a to při dvou různých potenciálech. Měření probíhalo při parametrech vloženého napětí detektoru: $E_1 = 500 \text{ mV}$, $E_2 = 600 \text{ mV}$, $G = 750 \text{ mV}$ a druhé měření probíhalo s parametry detektoru: $E_1 = 300 \text{ mV}$, $E_2 = 400 \text{ mV}$, $G = 750 \text{ mV}$. Objem dávkovací smyčky byl $20 \mu\text{l}$.

Chromatografická separace byla testována na koloně Supelcosil C8, $5 \mu\text{m}$ ($15 \text{ cm} \times 4,6 \text{ mm}$), koloně Supelcosil LC18-DB, $5 \mu\text{m}$ ($25 \text{ cm} \times 4,6 \text{ mm}$) a speciální karotenové koloně YMC Carotenoids, Column ESA C30, $5 \mu\text{m}$ ($25 \text{ cm} \times 4,6 \text{ mm}$). Eluce probíhala izokraticky s příslušnou mobilní fází při 30°C a průtoku $1,1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Výsledky této metodiky jsou uvedeny v kapitole 7.3.

6.5 Určení hmotnosti kapsle a její náplně

Před samotnou analýzou vzorků při stanovení chromatografických podmínek bylo nutno zjistit, jaká je průměrná hodnota kapsle a její náplně.

Průměrná hmotnost a hmotnostní proměnlivost obsahu se stanoví pro 20 kapslí. Pro individuálně připravované kapsle platí ustanovení o dělených prášcích. V hromadné výrobě se připouští odchylka průměrné hmotnosti $\pm 5 \%$. Kolísání obsahu v jednotlivých kapslích je povoleno v rozmezí 7,5 - 20 %, v závislosti na hmotnosti obsahu.

Obsah účinné látky se hodnotí z průměrného vzorku vytvořeného 20 tabletami kritérii stejnými jako u tablet.

Výsledky jsou uvedeny v kapitole 7.4.

6.6 Kalibrační křivka pro stanovení β -karotenu metodou HPLC-ECD

Jako standard byl použit β -karoten o různých koncentracích. Jako první byl připraven zásobní roztok o koncentraci $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ tak, že bylo naváženo přesně $0,0500 \text{ g}$ β -karotenu do 100 ml odměrné baňky a ta byla doplněna etanolem po rysku. Z tohoto zásobního roztoku bylo postupně odebrán potřebný počet ml do odměrné baňky a byla postupně naředěna kalibrační křivka o koncentracích: 25 ; 50 ; 100 ; 200 a $300 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Chromatografická separace probíhala na koloně SUPELCO SIL LC18-DB, $5 \mu\text{m}$ ($25 \text{ cm} \times 4,6 \text{ mm}$). Eluce byla prováděna izokraticky s mobilní fází (MetOH : ACN : H_3PO_4 v poměru $70 : 29,5 : 0,5$) při teplotě 30°C a průtoku $1,1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Kalibrační křivka byla měřena při napětí $E_1 = 500 \text{ mV}$ a $E_2 = 600 \text{ mV}$. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost plochy píku [$\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$] na koncentraci β -karotenu [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]. Každý bod kalibrační křivky byl proměřen pětkrát.

Byly vypočteny průměrné hodnoty ploch píků, které jsou uvedeny v tabulce 11. Měření kalibrační křivky je zachyceno na chromatogramu obr. 44 v kapitole 7.5.

6.7 Vlastní stanovení β -karotenu v želatinových kapslích

Bylo připraveno 5 vzorků želatinových kapslí (Kapsle pro podporu zraku) extrakcí podle postupu uvedeného v kapitole 7.2 za použití rozpouštědla hexan. Vyextrahovaný podíl se vzorkem byl odpařen na odparce a poté byl rozpuštěn v 10 ml etanolu. Alikvotní část vzorku byla přefiltrována před vstřikem na kolonu přes nylonový mikrofiltr o velikosti pórů $0,45 \mu\text{m}$. Chromatografická separace probíhala na koloně SUPELCO SIL LC18-DB, $5 \mu\text{m}$ ($25 \text{ cm} \times 4,6 \text{ mm}$). Eluce byla prováděna izokraticky s mobilní fází (MetOH : ACN : H_3PO_4 v poměru $70 : 29,5 : 0,5$), při teplotě 30°C , při průtoku $1,1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a tlaku 61 bar . Detekce β -karotenu byla prováděna pomocí potenciálu vždy na dvou kanálech $E_1 = 500 \text{ mV}$ a $E_2 = 600 \text{ mV}$. Každý vzorek byl proměřen pětkrát při daném potenciálu. Z důvodu lepší odezvy signálu byl použit kanál $E_1 = 500 \text{ mV}$ pro přesnější stanovení. Poté byly odečteny plochy píku [$\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$]. Chromatografické podmínky jsou popsány v kapitole 6.4. Pomocí kalibrační křivky a obsahu plochy píku β -karotenu byla vypočtena výsledná koncentrace β -karotenu v náplni jedné kapsle. Výsledky jsou uvedeny v kapitole 7.6.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

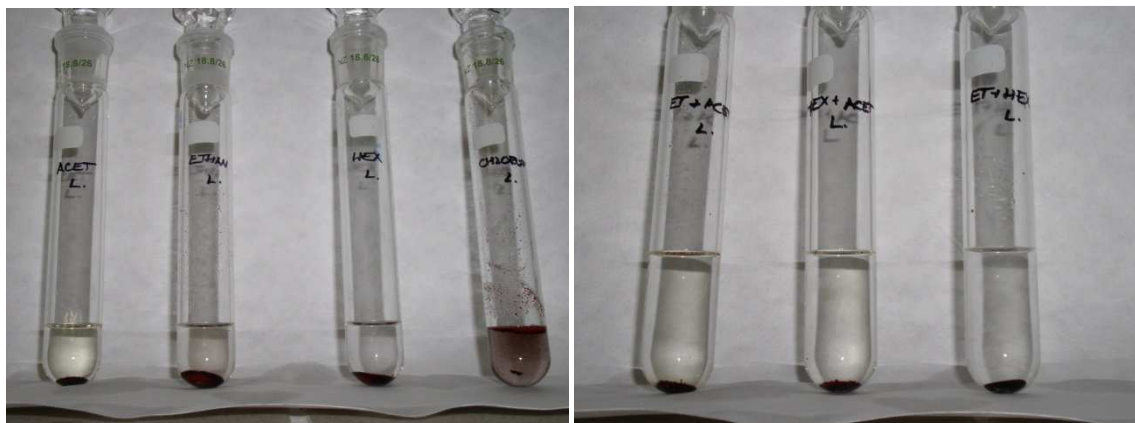
7.1 Výsledky extrakce náplně želatinové kapsle

Extrakce 1. část

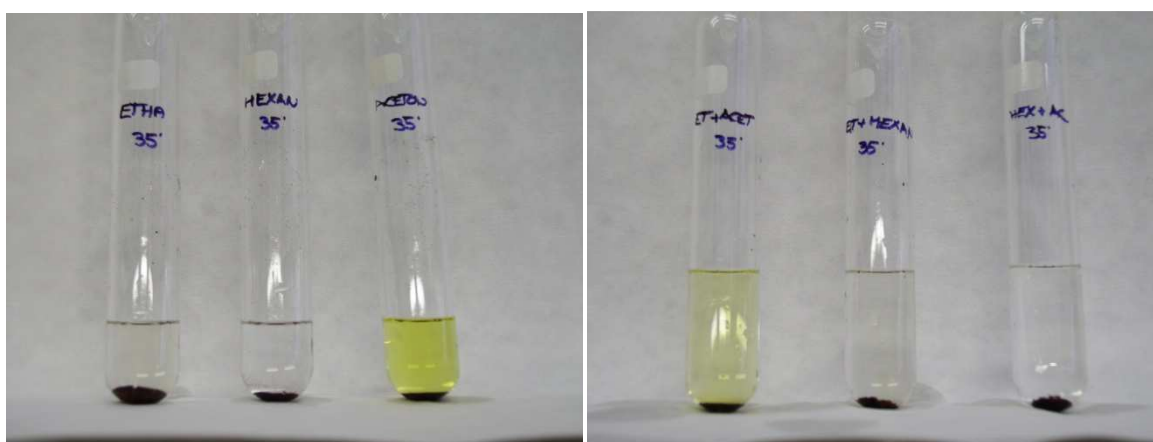
Tab. 2: Účinnost rozpouštědel na extrakci biologicky aktivních látek v kapslích:

Rozpouštědlo	Navážka (g)	Laboratorní teplota (20°C)	Navážka (g)	Vodní lázeň (35°C)
Hexan	0,0518	-	0,0443	-
Etanol	0,0499	-	0,0442	-
Chloroform	0,0640	-	0,0660	-
Etanol + Hexan 50:50	0,0439	-	0,0668	-
Etanol + Aceton 50:50	0,0702	-	0,0602	+
Hexan + Aceton 50:50	0,0465	-	0,0560	-

Z následujících obrázků 11 a 12 je patrné, že použití laboratorní teploty 20°C se jeví jako naprosto nevhodné. Při této teplotě se kvantitativně vyextrahovat aktivní látky ze suchého extraktu *Vaccinium myrtillus L.* v tvrdých kapslích nepodařilo. Nejhorší rozpustnost nastala při použití chloroformu, kde byla pozorována sraženina. Jako účinnější se jeví použití vodní lázně při teplotě 35°C, kdy po 20 minutách bylo pozorováno u kombinace aceton + etanol a samotného acetonu ve zkumavce jemně žluté zabarvení, což svědčí o extrakci, ale i přesto bylo stanoveno použití této metody a rozpouštědel, nebo kombinace rozpouštědel jako nedostatečné.



Obr. 11. Extrakce při teplotě 20°C



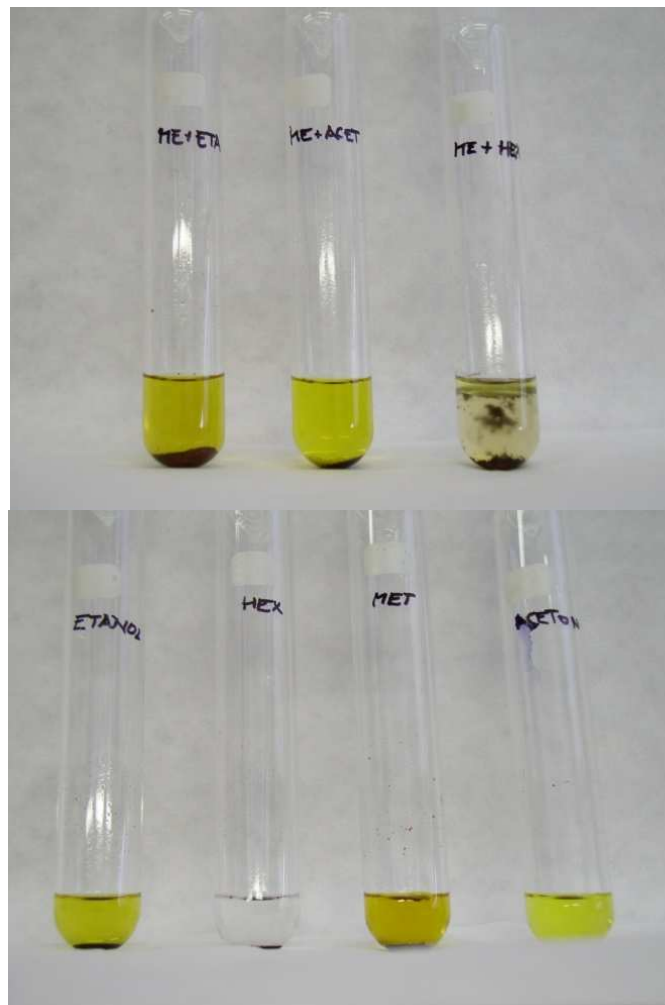
Obr. 12. Extrakce při použití vodní lázně 35°C

Extrakce 2. část

Tab. 3: Účinnost rozpouštědel na extrakci biologicky aktivních látek v suchém extraktu:

Rozpouštědlo	Navážka (g)	Laboratorní teplota (50° C)
Metanol	0,0423	+
Hexan	0,0467	-
Etanol	0,0451	+
Aceton	0,0523	-
Metanol + Hexan 50:50	0,0645	-
Metanol + Etanol 50:50	0,0535	+

V druhé části extrakce byla použita teplota vodní lázně 50° C a byla sledována extrakce biologicky aktivních látek do roztoku rozpouštědla, nebo směsi rozpouštědel. Zvýšení teploty se ukázalo jako účinná cesta k rozpuštění většího množství granulek suchého extraktu, ale i přesto se stále nepodařilo dosáhnout úplné extrakce. Nejhorší rozpustnost nastala při použití směsi rozpouštědel metanol + hexan, kdy byla pozorována ve zkumavce sraženina, což je patrné na obrázku 10. Také při použití hexanu se extrakce nezdařila. Při použití etanolu, metanolu a acetonu jako samostatných rozpouštědel byla rozpustnost dobrá, nicméně stále nedostatečná. Z tabulky 2 uvedené v kapitole 7.1 vyplývá, že biologicky aktivní látky byly nejlépe extrahovány při použití kombinace rozpouštědel metanol + etanol a metanol + aceton.



Obr. 13. Extrakce při použití vodní lázně 50°C

Extrakce 3. část*Tab. 4: Účinnost rozpouštědel na extrakci biologicky aktivních látek v suchém extraktu*

Rozpouštědlo	Laboratorní teplota (21°C)	Vodní lázeň (35°C)	Vodní lázeň (50°C)
Etanol + voda 50:50	+	+	+
Metanol + voda 50:50	+	+	+
Izopropanol	-	-	-
Etanol + Metanol 80:20	-	-	-
Metanol	x	x	-
Etanol	x	x	-
Aceton	x	x	-
Etanol+H ₂ O+hexan 50:50:50	+	x	+
Aceton + voda 50:50	+	x	+

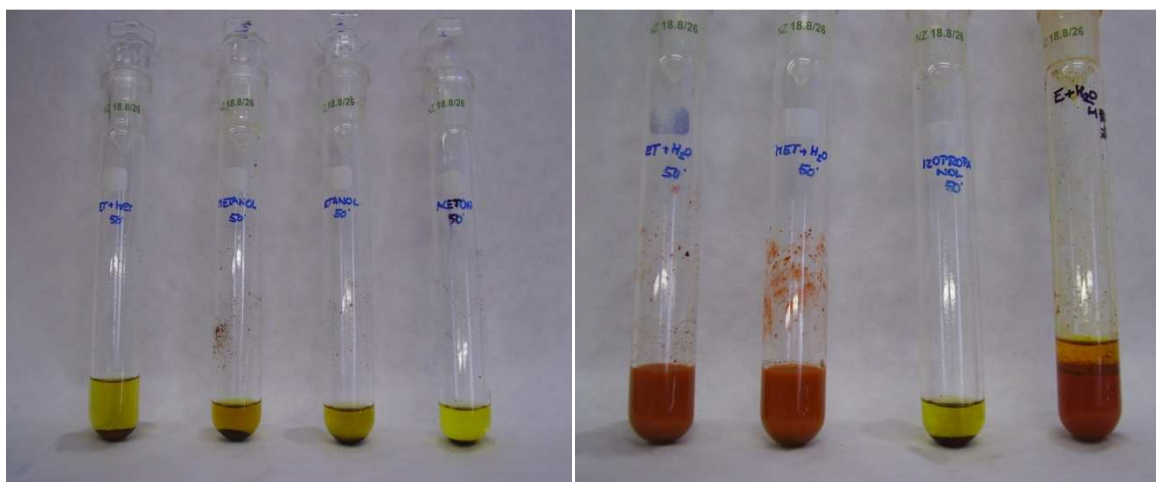
Ve třetí části extrakce byla použita laboratorní teplota 20°C, teplota vodní lázně 35°C a 50°C a bylo sledováno extrahování biologicky aktivních látek do roztoku rozpouštědla, nebo směsi rozpouštědel. V této části extrakce byla použita jiná rozpouštědla, nebo jejich kombinace než v předešlých dvou, ale i přesto se stále nepodařilo dosáhnout úplné extrakce karotenů do roztoku. Jako nejlepší se jevílo použití směsi rozpouštědel etanol + voda + hexan a to jak při laboratorní teplotě 20°C, tak při teplotě vodní lázně 50°C. Při teplotě 35°C se extrakce této směsi rozpouštědel nezdařila. Obrazová dokumentace je na obrázcích 14-16.



Obr. 14. Extrakce při použití laboratorní teploty 21°C



Obr. 15. Extrakce při použití vodní lázně 35° C



Obr. 16. Extrakce při použití vodní lázně 50° C

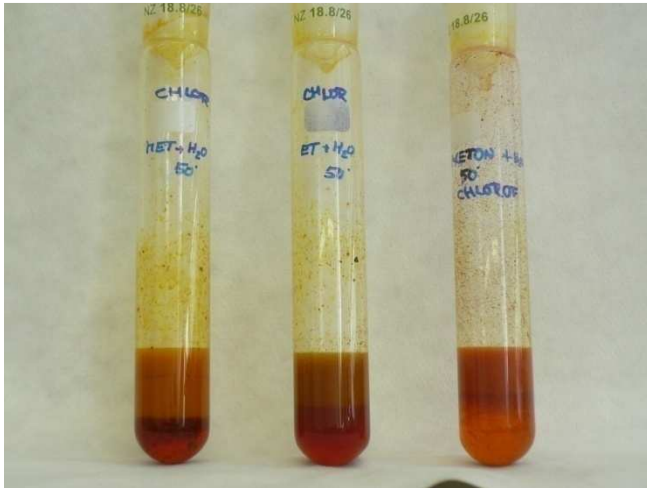
Extrakce 4.část

Tab. 5: Účinnost rozpouštědel na extrakci biologicky aktivních látek v suchém extraktu

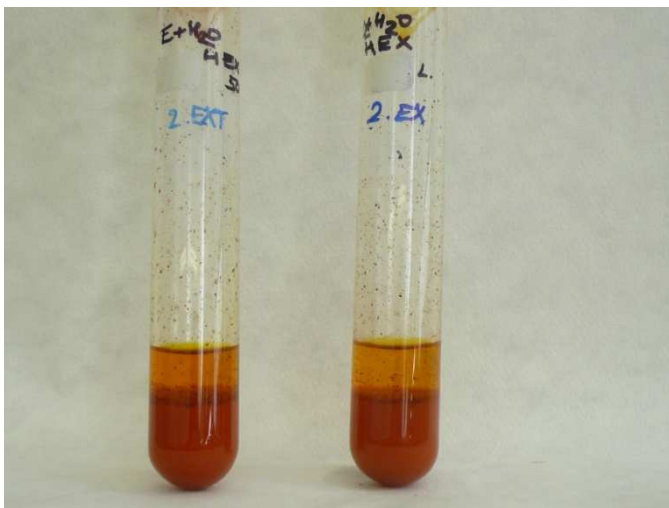
Rozpouštědlo	Laboratorní teplota (20° C)	Vodní lázeň (35° C)	Vodní lázeň (50° C)
H ₂ O + chloroform 50:50	x	+	x
H ₂ O + etanol 50:50	x	-	x
H ₂ O + hexan 50:50	x	+	x
H ₂ O + izopropanol 50:50	x	-	x
H ₂ O + metanol 50:50	x	-	x
H ₂ O + chloroform + Metanol	x	x	+
H ₂ O + chloroform + Etanol	x	x	+
H ₂ O + chloroform + Aceton	x	x	+
H ₂ O + etanol + hexan	x	x	+
H ₂ O + etanol + hexan	+	x	x



Obr. 17. Extrakce při použití vodní lázně 35° C (vzorek + voda + rozpouštědlo)



Obr. 18. Extrakce při použití vodní lázně 50°C (vzorek + voda + chloroform + rozpouštědlo metanol, etanol)



Obr. 19. Extrakce při použití vodní lázně 50°C a laboratorní teplotě 20°C

Extrakce 5.část

U použití vodní lázně při teplotě 35°C se velmi kladně projevilo užití směsi rozpouštědel voda + chloroform a voda + hexan. Došlo k přechodu biologicky aktivních látek, v tomto případě karotenů, do rozpouštědel chloroformu a hexanu. Použití chloroformu bylo posléze zhodnoceno jako nevhodné, protože chloroform je těžší než voda, tudíž vyextrahovaný vzorek by se ze zkumavky velmi těžce získával. Extrakce při použití vodní lázně 50°C

(vzorek + voda + chloroform + rozpouštědlo) bylo ve všech třech případech pozorované jako vhodné, ovšem posléze zhodnoceno jako nepoužitelné, ze stejného důvodu jako v předchozí extrakci. U směsi rozpouštědel voda + hexan při laboratorní teplotě 20°C a ve vodní lázni při teplotě 50°C byla provedena druhá extrakce, která byla vyhodnocena jako nedostatečná.

Při několikanásobné extrakci se jasně prokázalo, že užití hexanu jako rozpouštědla je nejvhodnějším způsobem jak vyextrahovat karotenoidy. Došlo k výraznému přechodu karotenoidů do rozpouštědla. Extrakce byla provedena šestkrát a jako kvantitativnější se projevílo použití vodní lázně při 35°C. Tato teplota byla zvolena v důsledku nestability karotenoidů při teplotách vyšších jak 40°C.

7.2 Konečný extrakční postup

Díky tomuto zjištění byl vytvořen postup extrakce karotenoidů z želatinových kapslí. Vzorek suchého extraktu z tvrdých kapslí byl navážen na analytických vahách s přesností na 0,0001 g do 50 ml kádinky. Voda o teplotě 35°C byla přidána do kádinky se vzorkem v množství 10 ml. Kapsle byly vymyty vodou ve stříkačce o stejné teplotě a množství 5 ml. Do této směsi bylo přidáno rozpouštědlo hexan v množství 10 ml. Extrakce probíhala po dobu 20 minut za nepřístupu světla. Extrakce byla provedena šestkrát vždy s oddělením rozpouštědla na děličce a přidáním nového množství rozpouštědla, pokaždé o objemu 10 ml. Po této několikanásobné extrakci byla do roztoku hexanu s obsahem karotenu přidána okyselená voda zředěnou kyselinou chlorovodíkovou o pH 5,5 v množství 4 ml potřebná k vysrážení maltodextrinů. Směs byla přefiltrována přes papírový filtr a filtrát byl odpařen do sucha na vakuové rotační odparce. Vzorek byl posléze rozpuštěn v 15 ml etanolu pro HPLC a znova přefiltrován přes nylonový filtr používaný pro chromatografii HPLC o velikosti pórů 0,45 μm. Takto získaný vzorek byl zpracováván za nepřístupu světla. Každý vzorek byl proměřen pětkrát. Měření byla provedena na kapalinovém chromatografu ESA s detektorem Coulochem III.

7.3 Výsledky pilotních pokusů detekce β -karotenu

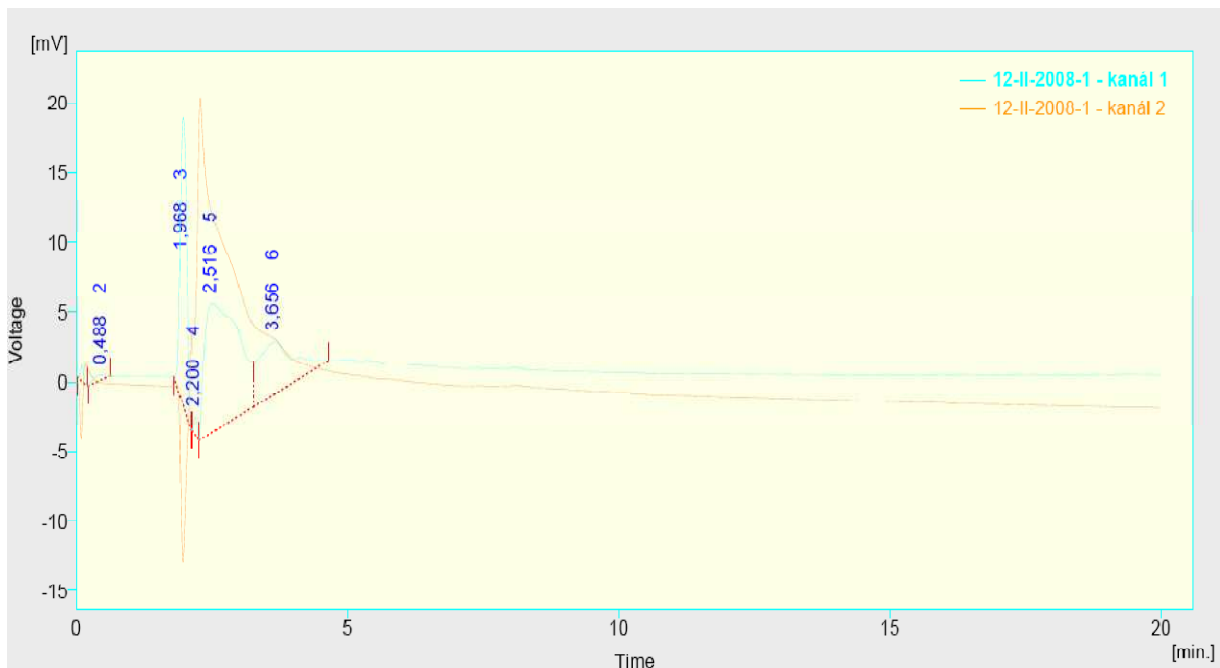
7.3.1 Kolona C8 Supelcosil 150 x 4,6 mm, 5 μ m

Analýza byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 6.4. Eluce probíhala izokraticky s danou mobilní fází při 30 °C a průtoku 1,1 ml.min⁻¹. Vzorek byl zkoušen na každý typ níže uvedené mobilní fáze (tabulka 6) a vždy měřen na potenciálech při parametrech detektoru: E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV; druhé měření probíhalo s parametry detektoru: E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV. Objem dávkovací smyčky byl 20 μ l.

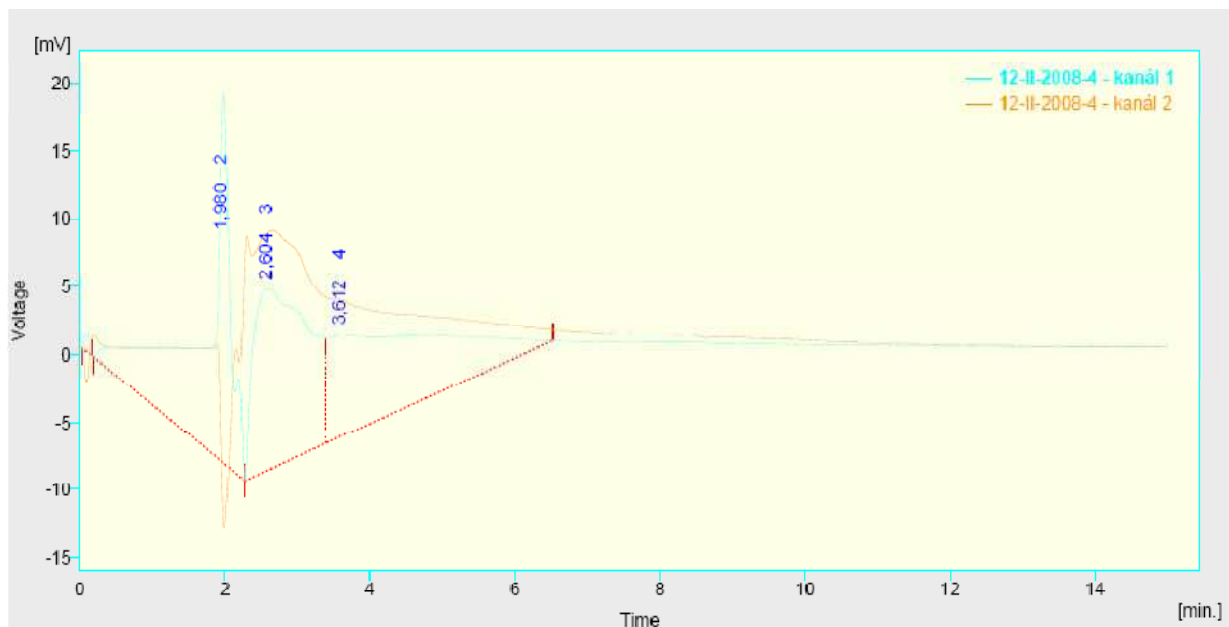
Tab.6: Testované mobilní fáze

Mobilní fáze	ACN	rH ₂ O	H ₃ PO ₄
1.	99	0,5	0,5
2.	80	19,5	0,5
3.	70	29,5	0,5
4.	50	49,5	0,5

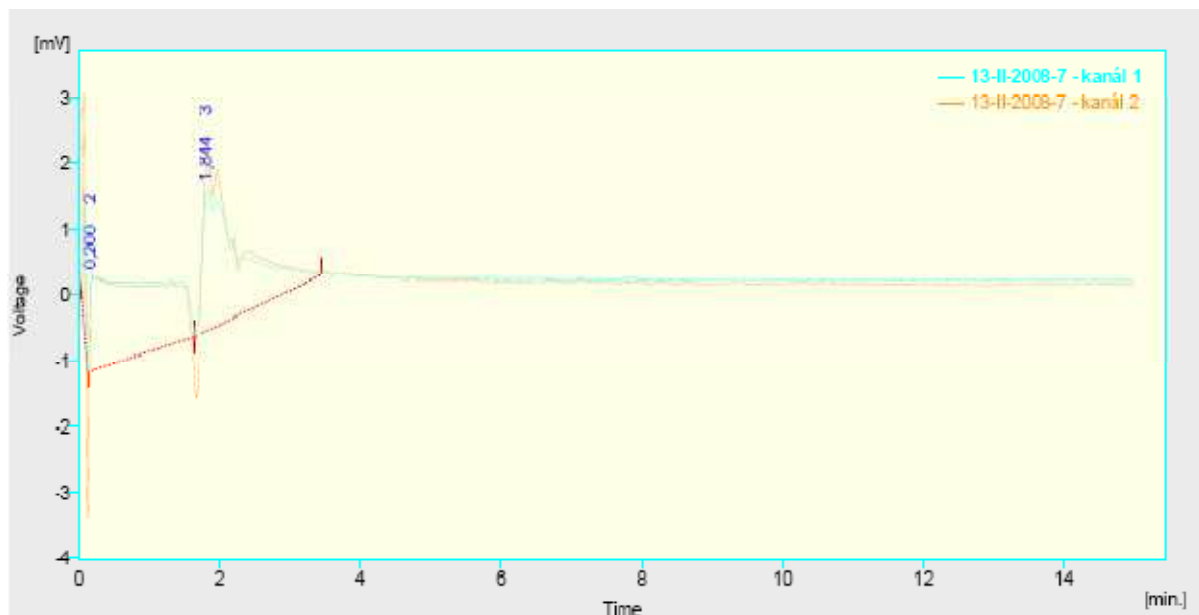
Výsledné chromatogramy jsou doloženy na obrázcích 20-27.



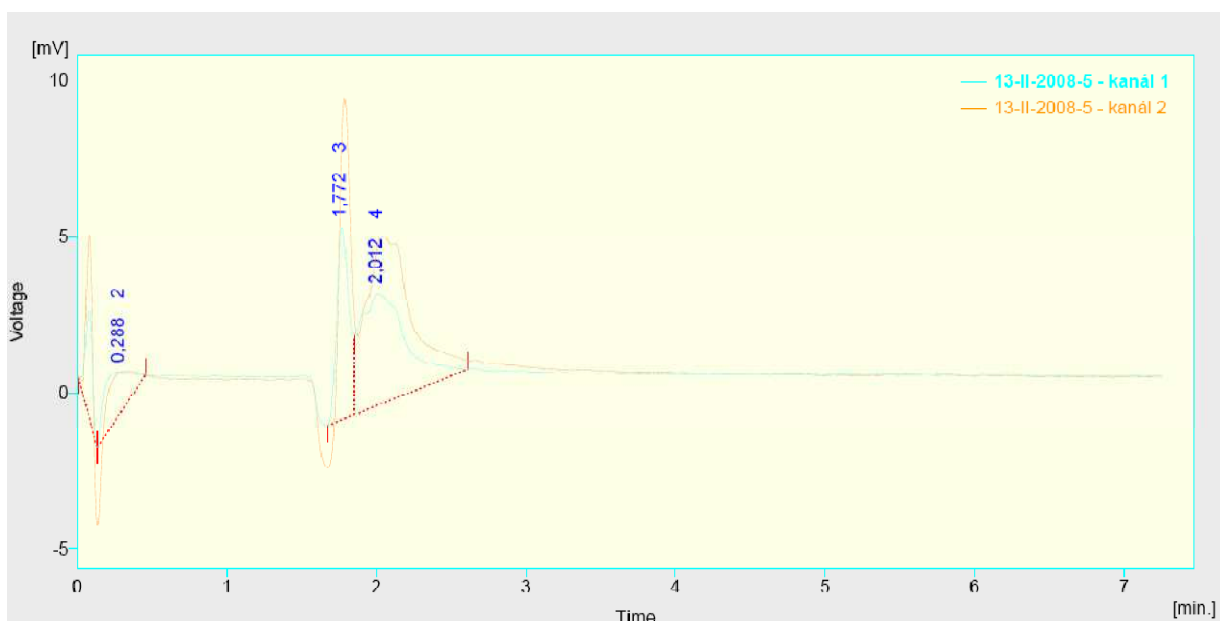
Obr. 20. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze ACN:rH₂O:H₃PO₄ (99:0,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.



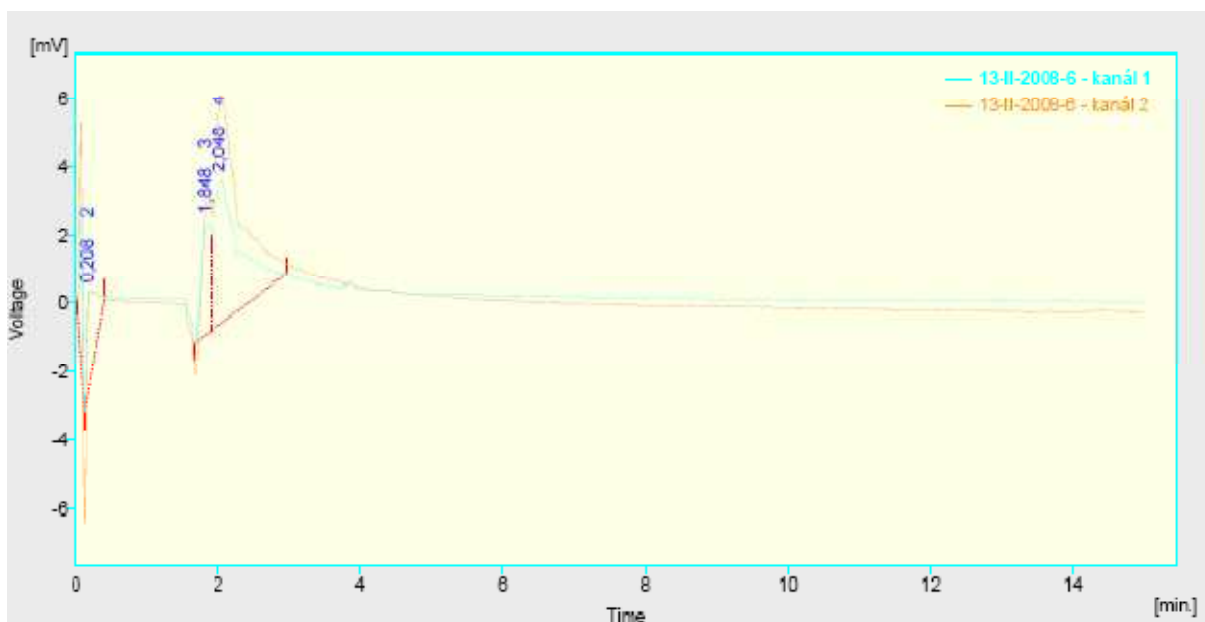
Obr. 21. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze ACN:rH₂O:H₃PO₄ (99:0,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.



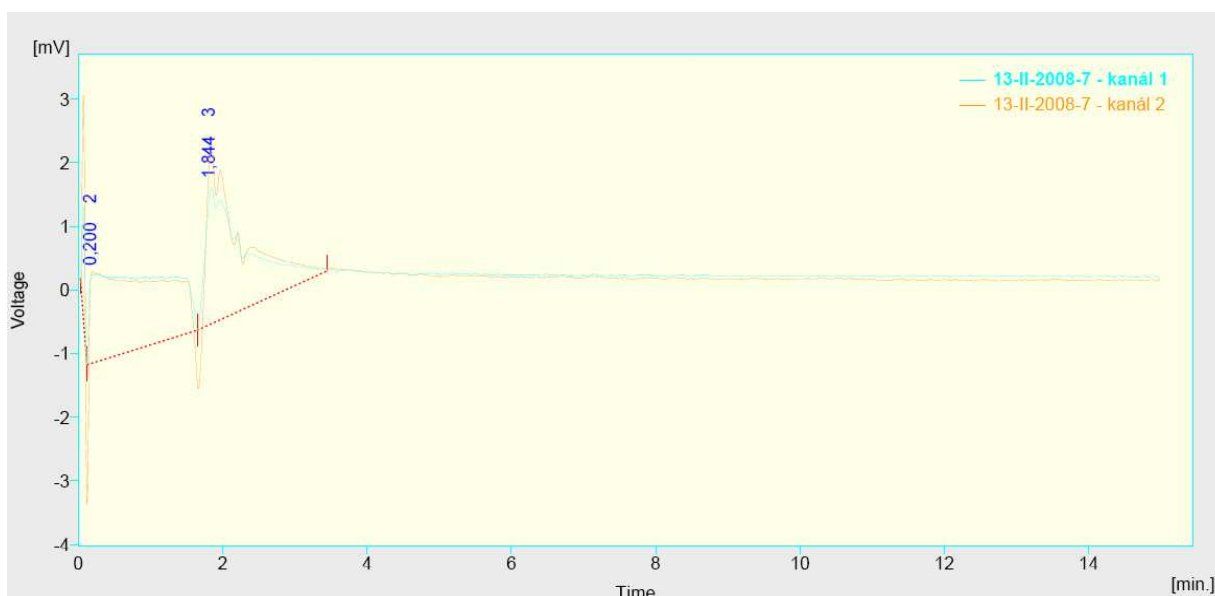
Obr. 24. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze ACN:rH₂O:H₃PO₄ (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.



Obr. 25. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze ACN:rH₂O:H₃PO₄ (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.



Obr. 26. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze ACN:rH₂O:H₃PO₄ (50:49,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.

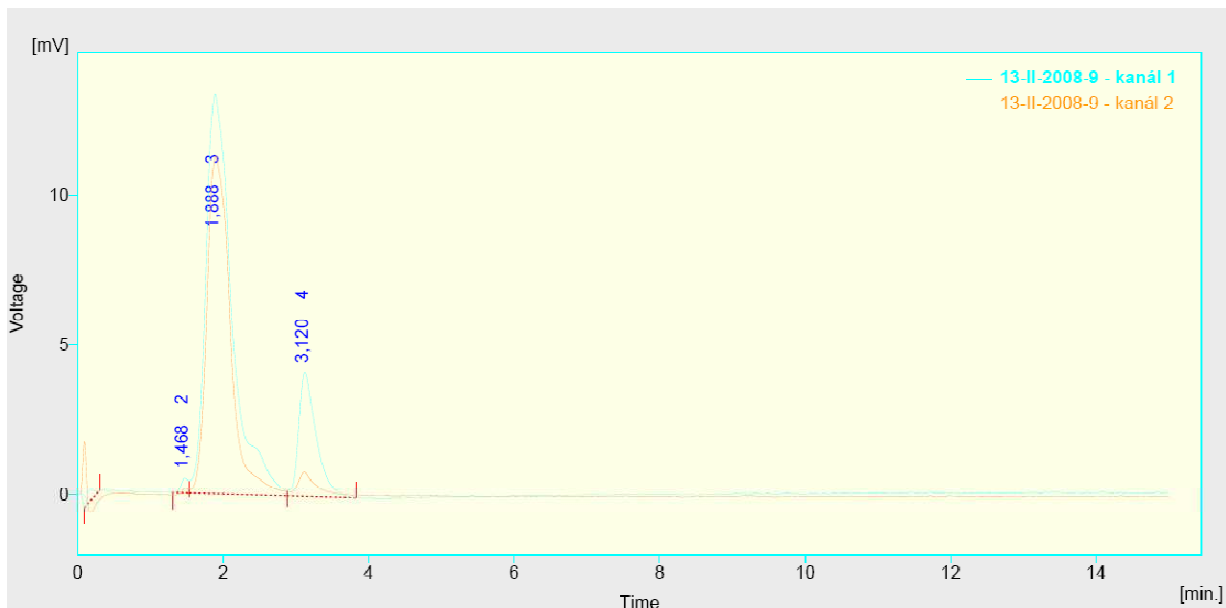


Obr. 27. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze ACN:rH₂O:H₃PO₄ (99:0,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.

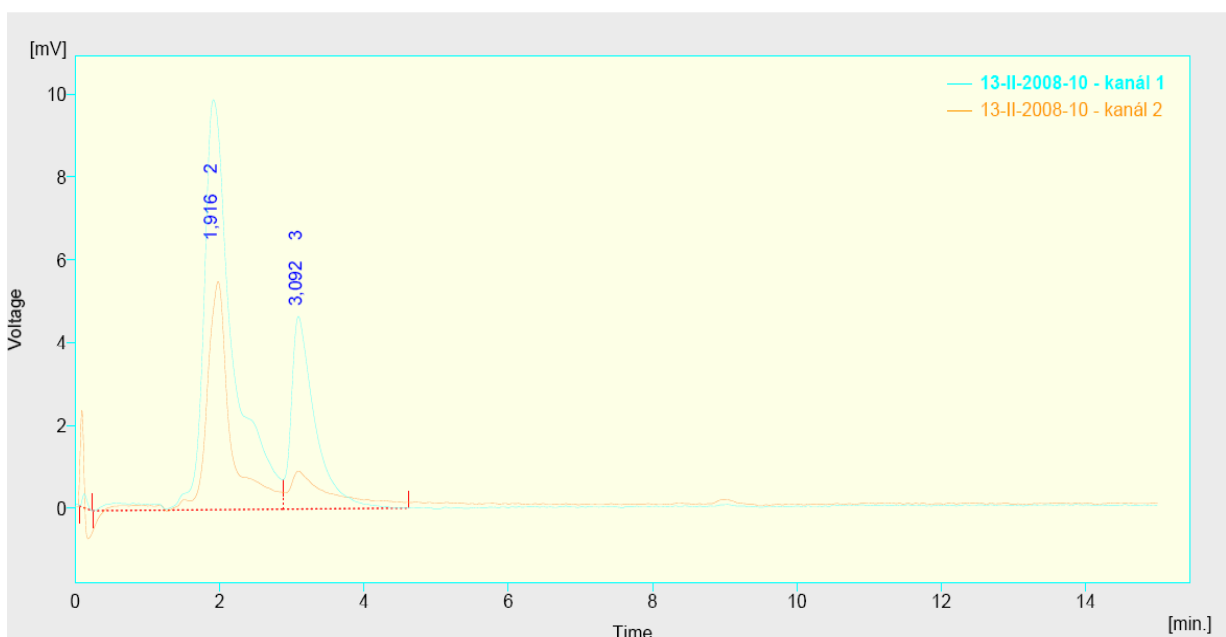
Z uvedených grafů jasně vyplývá, že mobilní fáze není vhodná pro stanovení standardu karotenu a potažmo ani karotenů obsažených v želatinové kapsli. Retenční čas β -karotenu se pohyboval mezi třetí až čtvrtou minutou. V této oblasti se objevují pouze rozmyté, nebo nekvantitativně vyhodnotitelné píky. Ani jedna zvolená mobilní fáze o různých poměrech činidel nevyhovovala chromatografickým podmínkám a koloně Supelcosil C8 a proto byly připraveny jiné mobilní fáze: metanol : acetonitril : kyselina fosforečná. Jejich složení je uvedeno v tabulce 7. Chromatografické podmínky byly stejné, jako je uvedeno v kapitole 6.4. Výsledky měření jsou zachyceny na obrázcích 28-37.

Tab.7: Typy mobilních fází

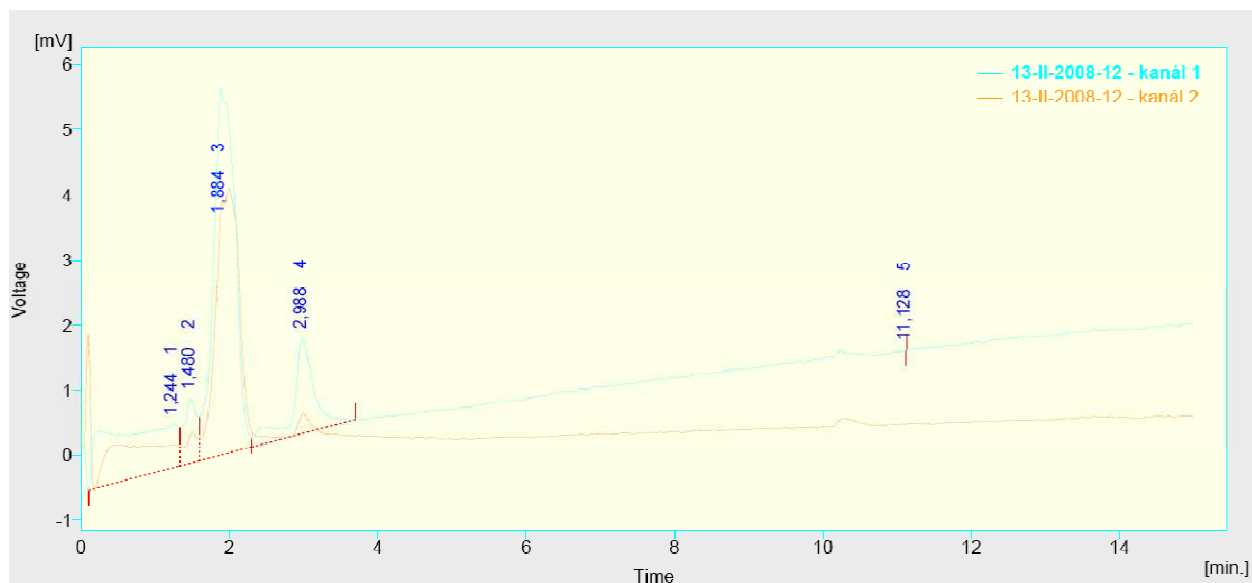
Mobilní fáze	MetOH	ACN	H ₃ PO ₄
1.	90	9,5	0,5
2.	70	29,5	0,5
3.	50	49,5	0,5
4.	30	69,5	0,5
5.	10	89,5	0,5



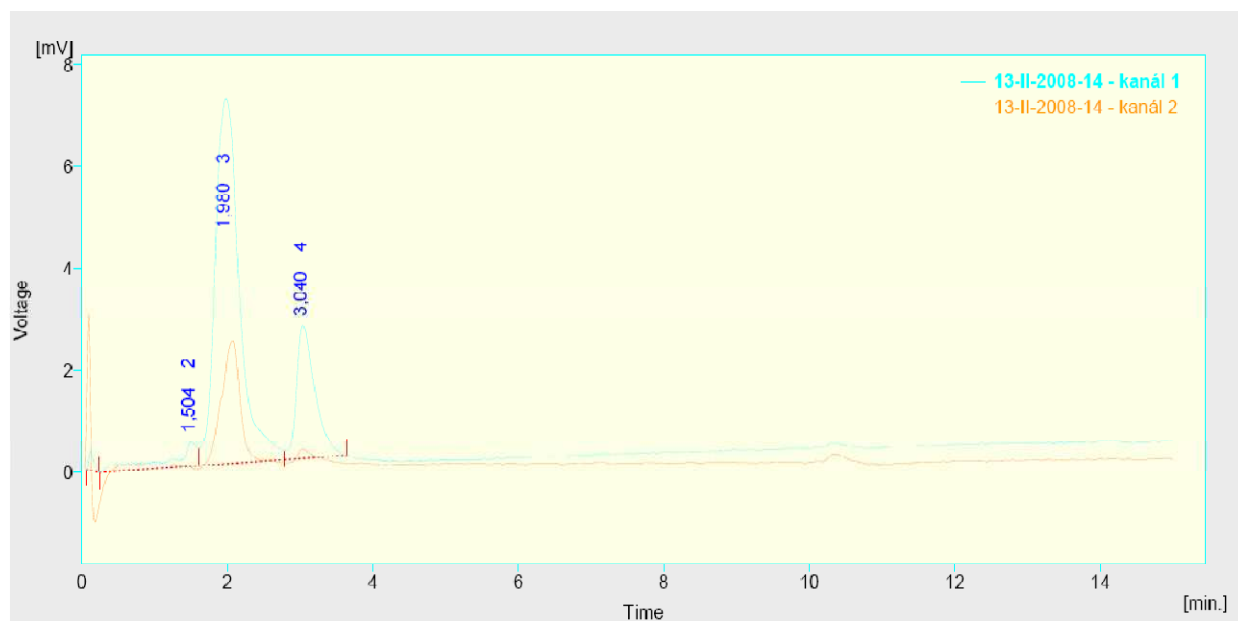
Obr. 28. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.



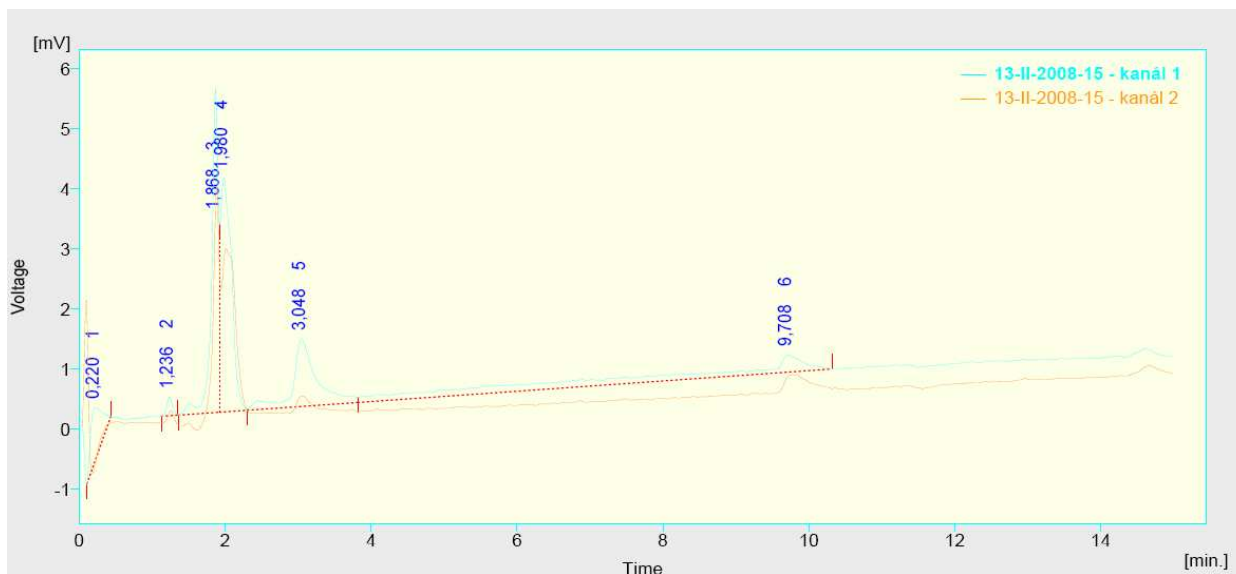
Obr. 29. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.



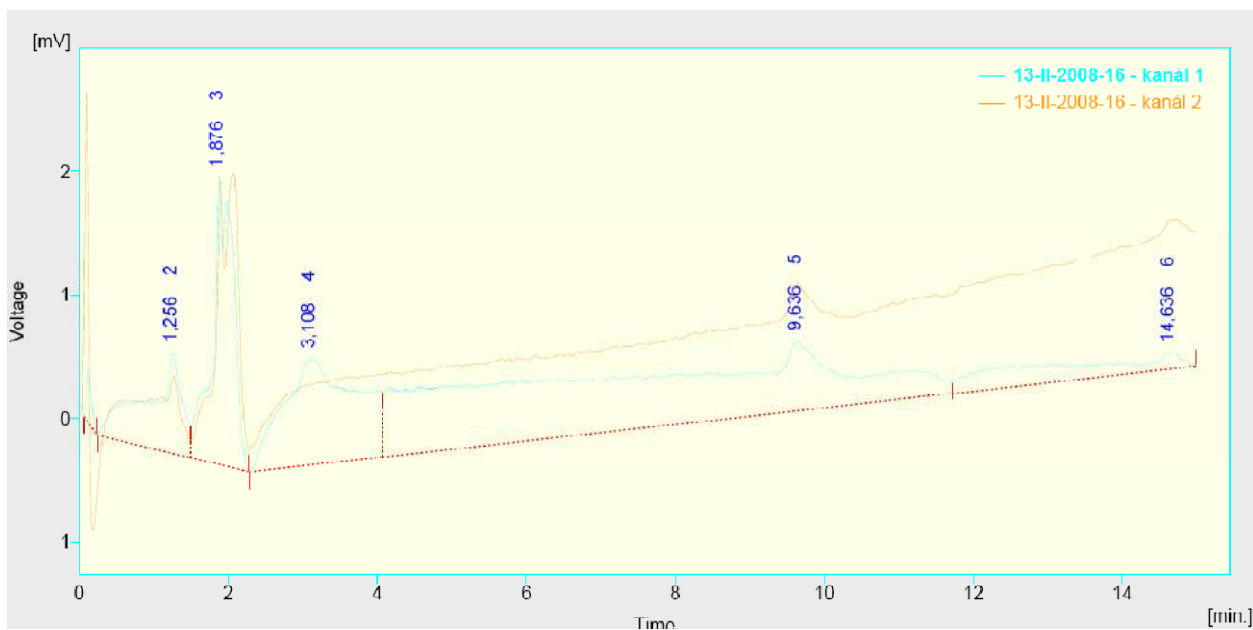
Obr. 28. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.



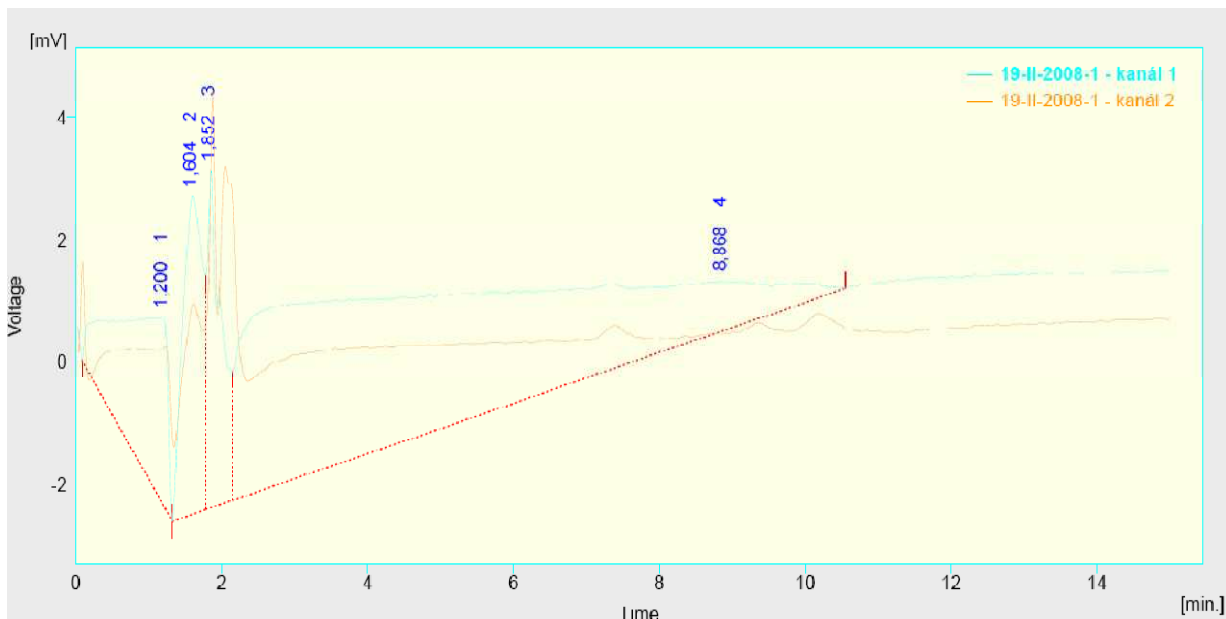
Obr. 29. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.



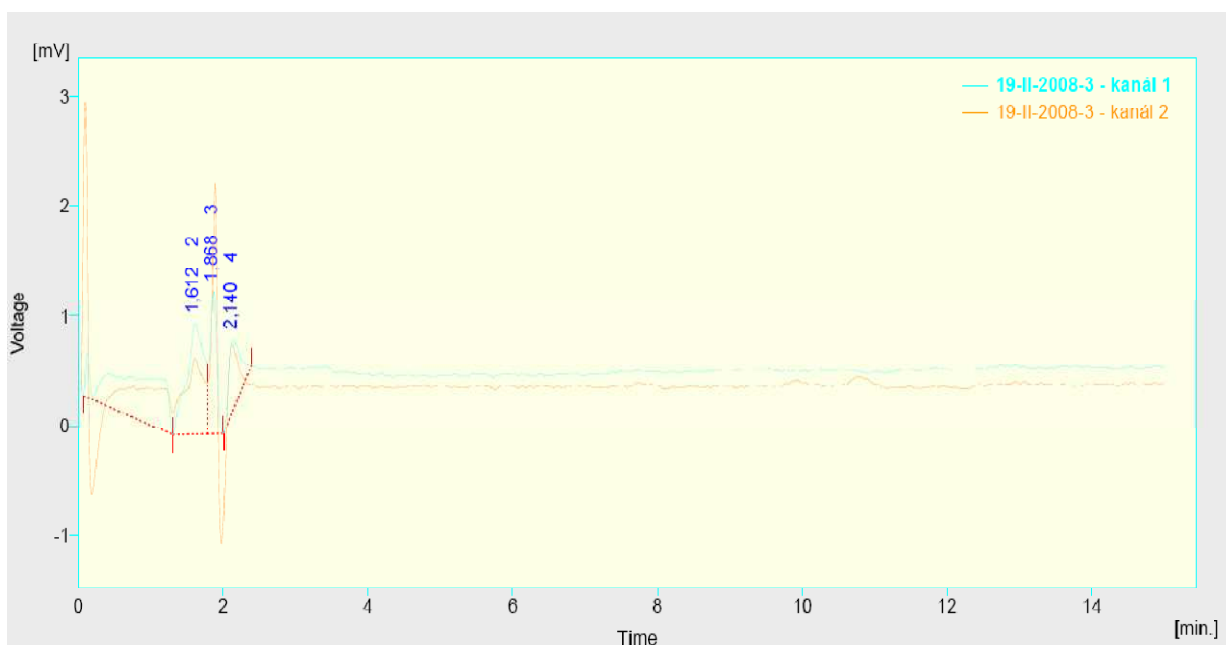
Obr. 30. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (50:49,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.



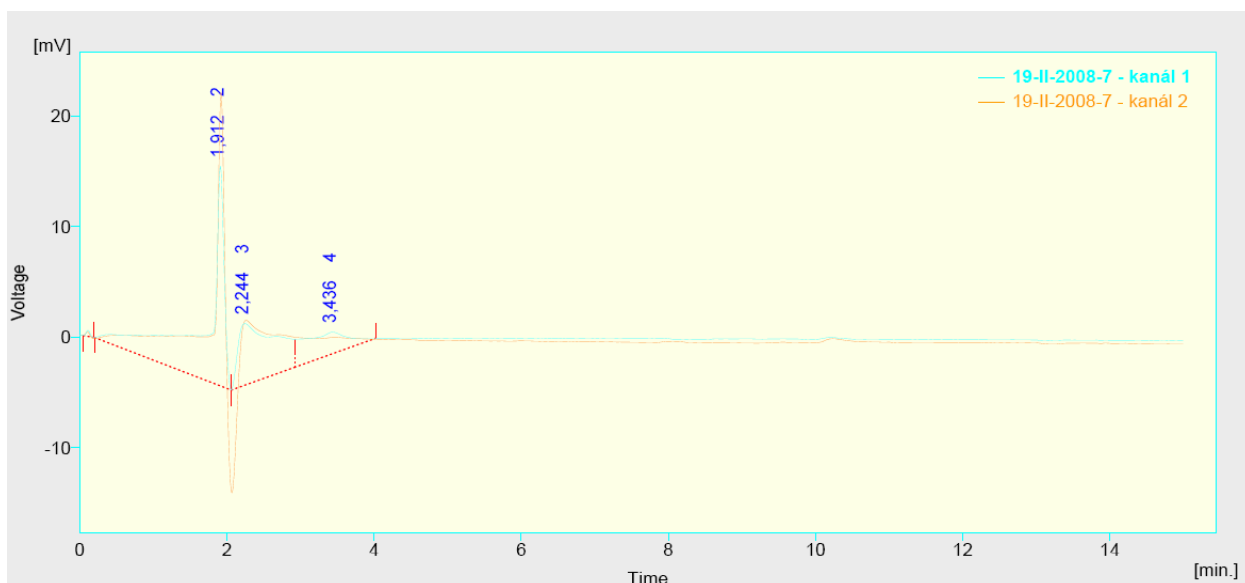
Obr. 31. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (50:49,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.



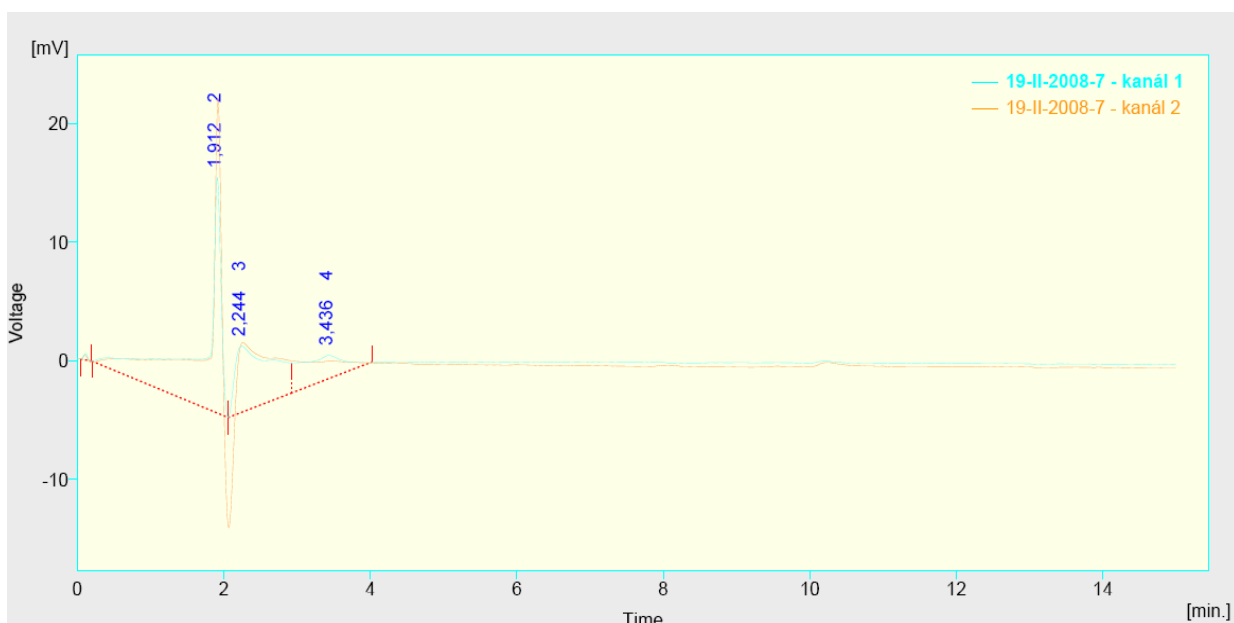
Obr. 32. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (30:69,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.



Obr. 33. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (30:69,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.



Obr. 34. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (10:89,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.



Obr. 35. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (10:89,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.

Při složení mobilní fáze, ve které bylo obsaženo 90% MetOH, 9,5% ACN a 0,5% H₃PO₄ byla lepší odezva při parametrech detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV. Při použití mobilní fáze o složení 70% MetOH, 29,5% ACN a 0,5% H₃PO₄ byla lepší odezva při parametrech detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV. Retenční čas β -karotenu se pohyboval mezi třetí až čtvrtou minutou.

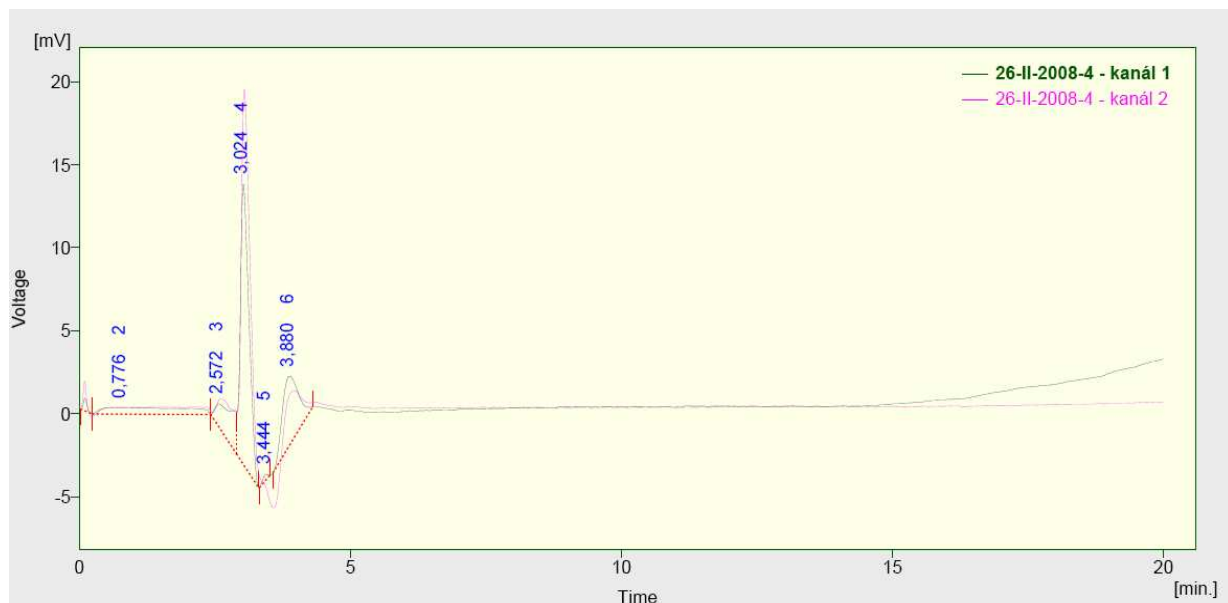
U mobilní fáze o složení 50% MetOH, 49,5% ACN a 0,5% H₃PO₄ se na chromatogramu pík objevil, ale podmínky z hlediska kvantity nebyly reálné. Ostatní mobilní fáze byly vyhodnoceny jako nevhodné pro stanovení β -karotenu. Z uvedených výsledků získaných při sestavování metodiky vhodné pro stanovení β -karotenu lze konstatovat, že nejvhodnější mobilní fáze by byla ta o složení 90% MetOH, 9,5% ACN a 0,5% H₃PO₄ při užití kolony Supelcosil C8. Dále lze použít mobilní fázi o složení 70% MetOH, 29,5% ACN a 0,5% H₃PO₄. Vzhledem k tomu, že odezva byla stále ještě nedostačující, byla dále testována kolona C30 YMC Carotenoid S5.

7.3.2 Kolona C30 YMC Carotenoid S5 4,6 x 250 mm, 5 μ m

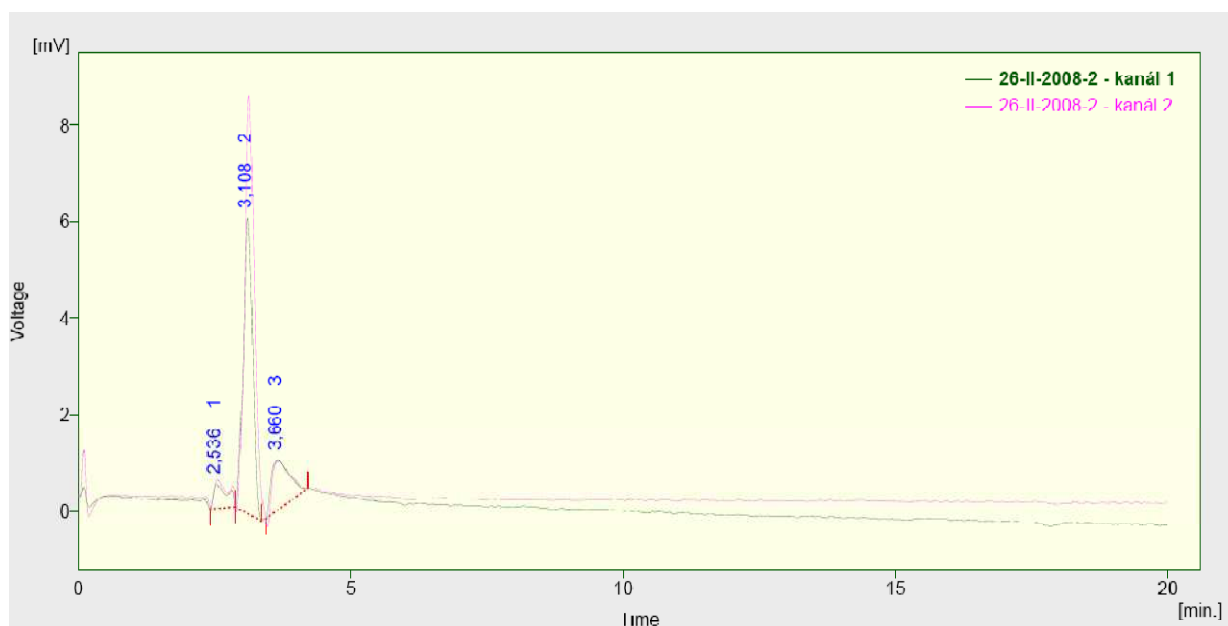
Po této sérii měření byla kolona Supelcosil C8, 5 μ m (15 cm x 4,6 mm) přeměněna na speciální karotenovou kolonu YMC Carotenoid S5, 5 μ m (25 cm x 4,6 mm). Také bylo testováno, zda by vzorek mohl být rozpuštěn přímo v mobilní fázi. Byly použity mobilní fáze uvedené v tabulce 8. Průtok mobilní fáze kolonou byl 1,1 ml.min⁻¹ a eluce probíhala izokraticky. Objem dávkovací smyčky byl 20 μ l. Pro měření byl použit standard β -karotenu rozpuštěný v příslušné mobilní fázi. Detekční a separační podmínky byly stejné, jako je uvedeno v kapitole 6.4.

Tab.8: Typy mobilních fází

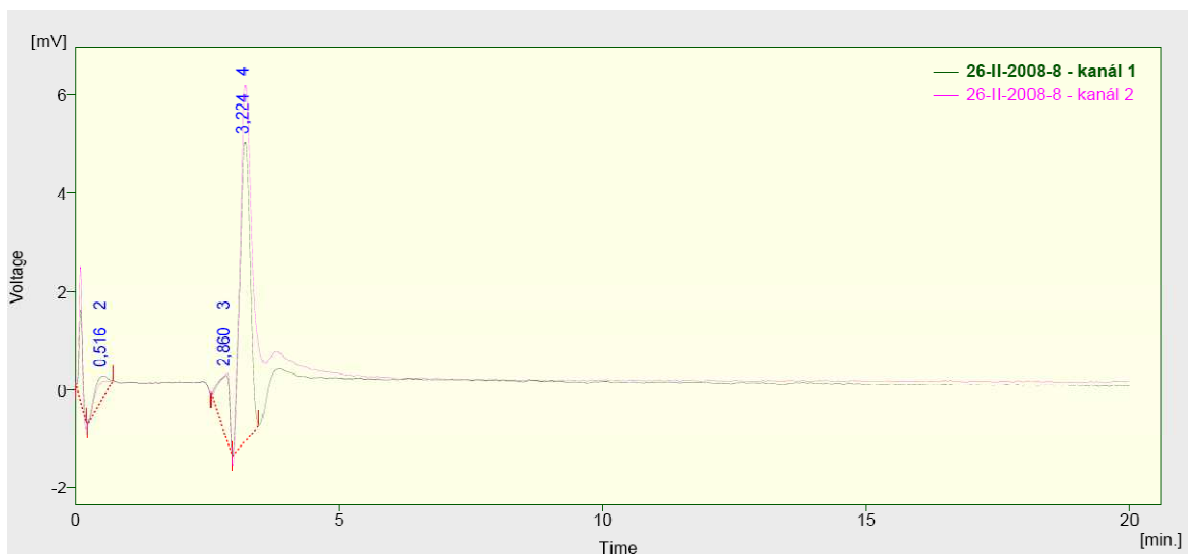
Mobilní fáze	MetOH	ACN	H ₃ PO ₄
1.	90	9,5	0,5
2.	70	29,5	0,5



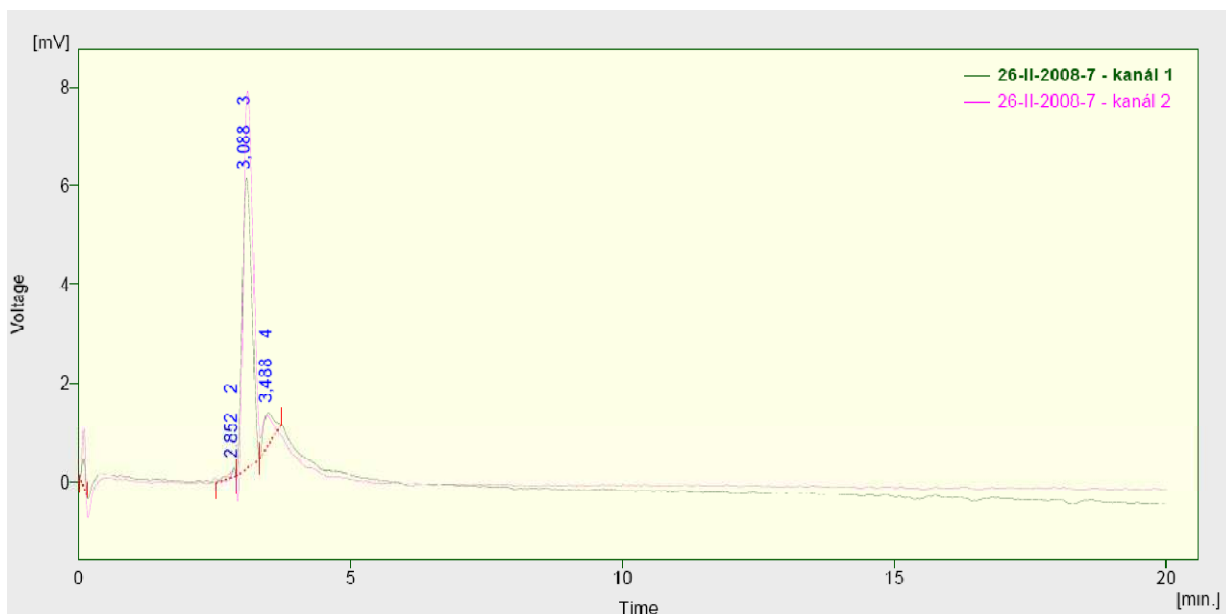
Obr. 36. Standard β -karotenu rozpuštěný v mobilní fázi při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.



Obr. 37. Standard β -karotenu rozpuštěný v mobilní fázi při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.



Obr. 38. Standard β -karotenu rozpuštěný v mobilní fázi při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.



Obr. 39. Standard β -karotenu rozpuštěný v mobilní fázi při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.

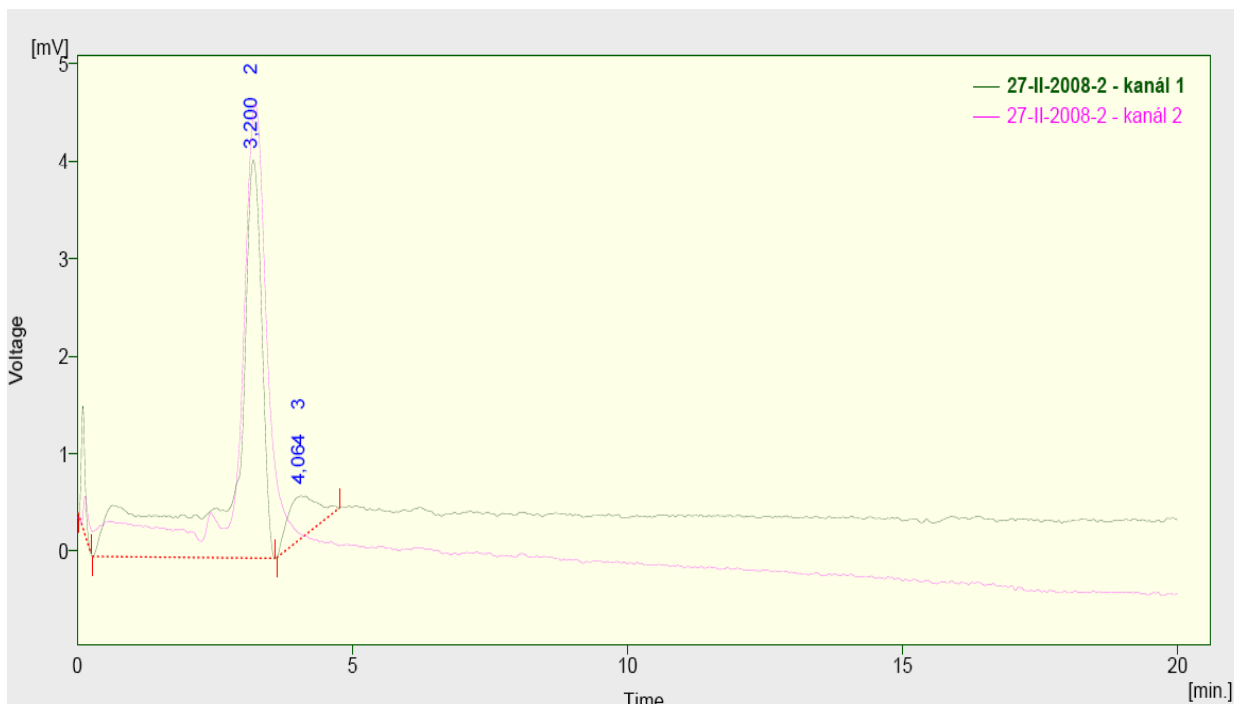
Získané výsledky při použití kolony C30 YMC Carotenoid S5 (4,6 x 250 mm, 5 μ m) nebyly příliš dobré. Tato kolona, je určena přímo pro měření karotenoidů, ale v našem případě se neosvědčila jako nejvhodnější. Patrně jí nevyhovují podmínky detekce na ECD.

7.3.3 Kolona C18 Supelcosil LC 18-DB

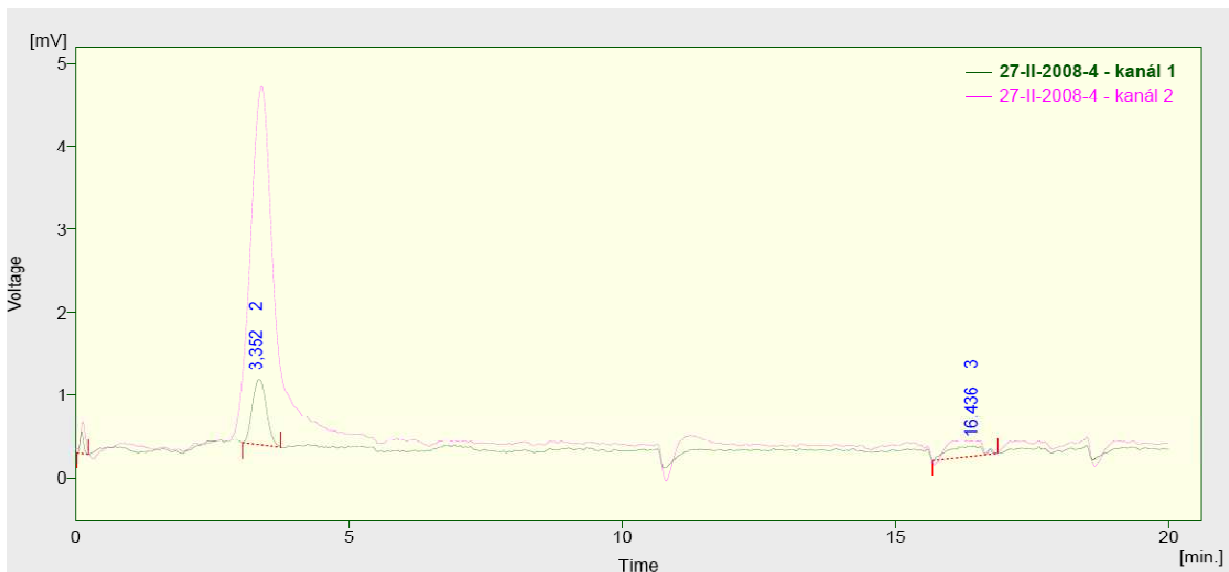
Dále byla použita kolona C18 Supelcosil LC18-DB, 5 μ m (25 cm x 4,6 mm. Pro měření byly použity mobilní fáze uvedené v tabulce 9. Vzorek standardu β -karotenu byl rozpuštěný v etanolu. Průtok mobilní fáze kolonou byl 1,1 ml.min⁻¹ a eluce probíhala izokraticky. Objem dávkovací smyčky byl 20 μ l. Chromatografické podmínky byly stejné jako je uvedeno v kapitole 6.4.

Tab.9: Typy mobilních fází

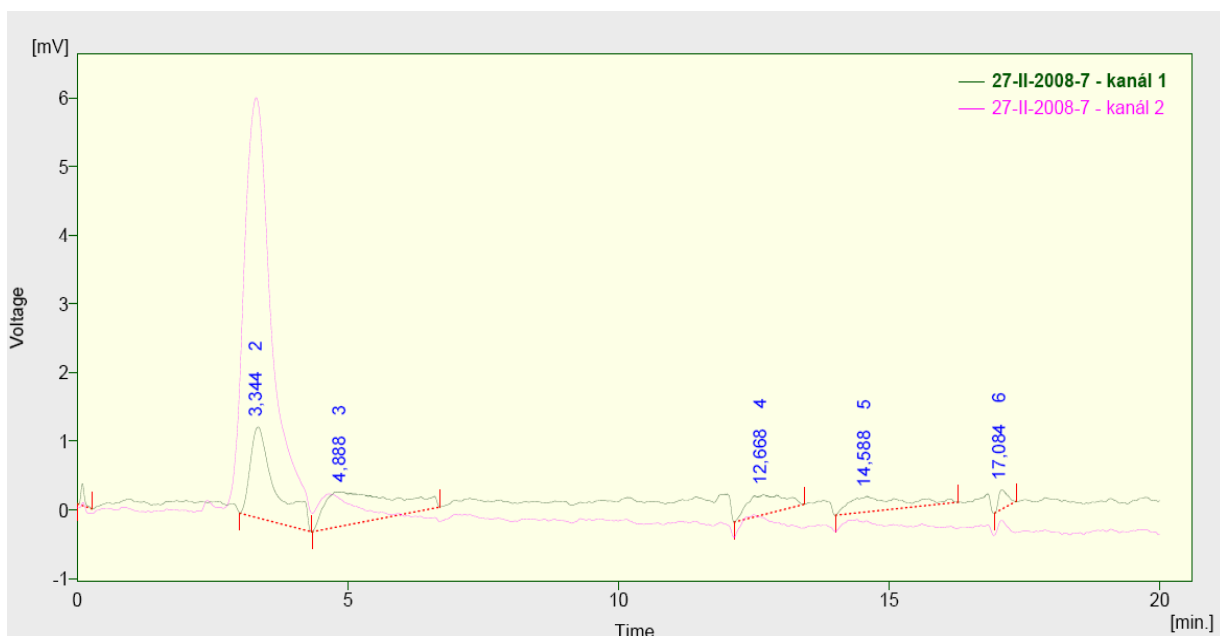
Mobilní fáze	MetOH	ACN	H ₃ PO ₄
1.	90	9,5	0,5
2.	70	29,5	0,5



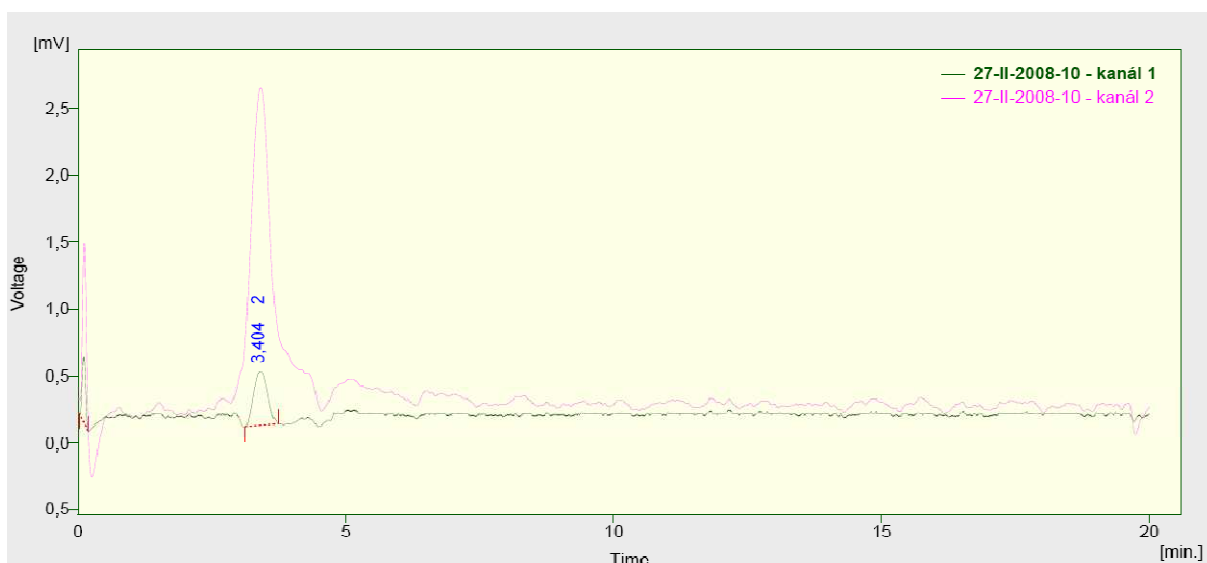
Obr. 40. Standard β -karotenu rozpuštěný v mobilní fázi při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.



Obr. 41. Standard β -karotenu rozpuštěný v mobilní fázi při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.



Obr. 42. Standard β -karotenu rozpuštěný v mobilní fázi při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.



Obr. 43. Standard β -karotenu rozpuštěný v mobilní fázi při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.

Použití kolony C18 Supelcosil LC18-DB (250 x 4,6 mm, 5 μ m), se projevilo jako velmi vhodné. Bylo možné použít pro stanovení β -karotenu mobilní fázi o složení 70% MetOH, 29,5% ACN a 0,5% H₃PO₄, při nastavených parametrech detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.

7.4 Výsledky určení hmotnosti náplně kapsle

Tab.10: Tabulka hmotnosti 20 tablet

Kapsle č.	Hmotnost kapsle (g)	Hmotnost obalu (g)	Hmotnost náplně (g)
1.	0,3103	0,0741	0,2362
2.	0,3218	0,0742	0,2476
3.	0,3227	0,0731	0,2496
4.	0,3097	0,0754	0,2343
5.	0,3107	0,0745	0,2362
6.	0,3097	0,0733	0,2364
7.	0,3100	0,0753	0,2347
8.	0,3134	0,0733	0,2401
9.	0,3114	0,0733	0,2381
10.	0,3082	0,0731	0,2351
11.	0,3104	0,0736	0,2368
12.	0,3140	0,0725	0,2415
13.	0,3137	0,0754	0,2383
14.	0,3148	0,0741	0,2407
15.	0,3088	0,0755	0,2333
16.	0,3145	0,0743	0,2402
17.	0,3065	0,0731	0,2334
18.	0,3046	0,0730	0,2316
19.	0,3078	0,0746	0,2332
20.	0,3077	0,0767	0,2350
			$\Sigma = 4,7523$
			$\bar{x} = 0,2376$

Náplň kapsle byla zjišťována postupem uvedeným v kapitole 6.5.

Vypočtená průměrná hmotnost obsahu jedné tablety je 0,2376 g.

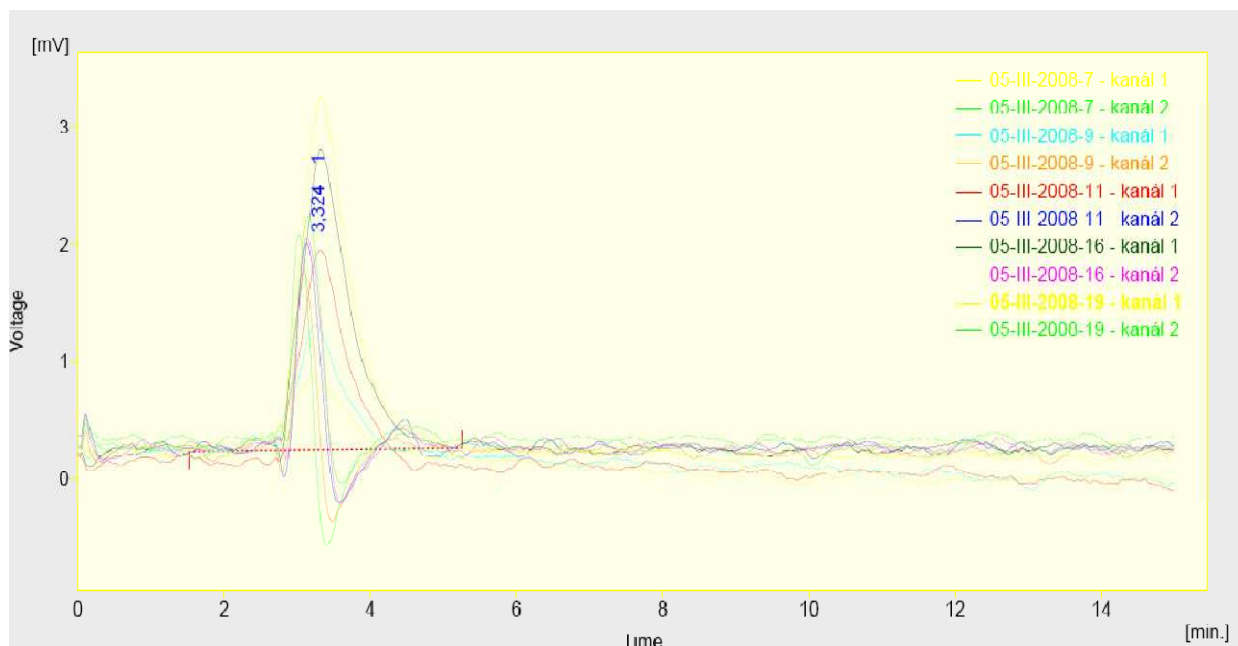
7.5 Výsledky měření kalibrační křivky β -karotenu

Kalibrační křivka byla sestrojena a naměřena podle postupu uvedeného v kapitole 6.6.

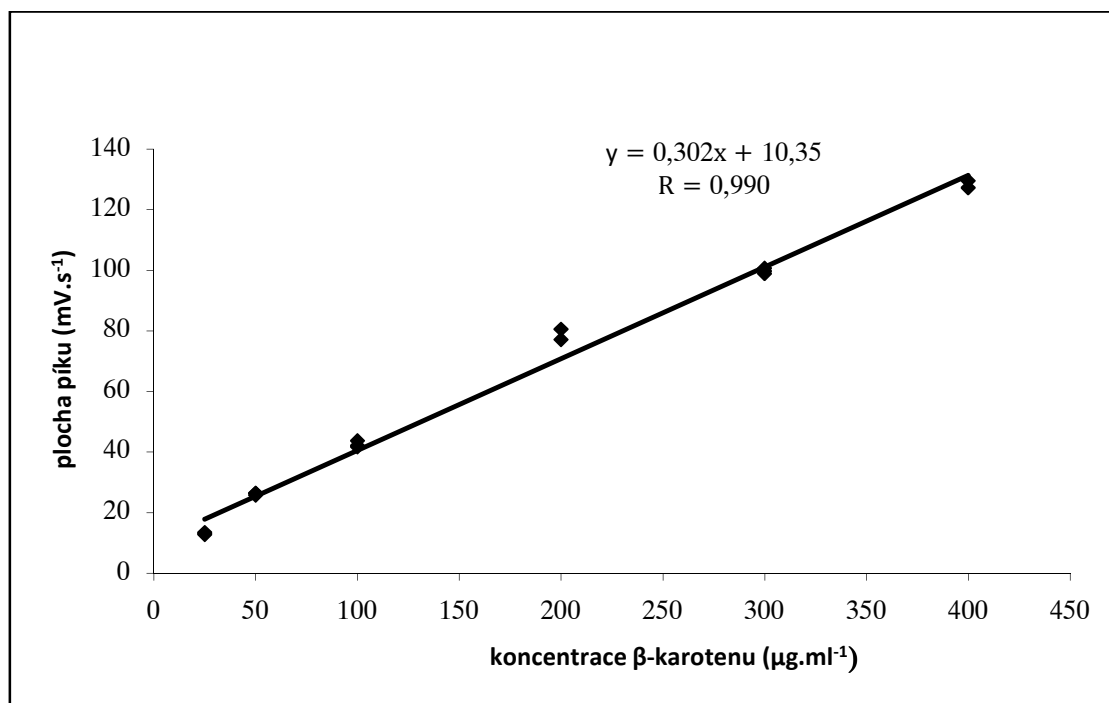
Tab.11: Kalibrace β -karotenu metodou HPLC-ECD

Koncentrace β -karotenu [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Průměrná plocha píku [$\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$]	Směrodatná odchylka [$\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$]
25	13,1	0,101
50	26,2	0,082
100	42,8	0,130
200	78,9	0,193
300	99,8	0,260
400	128,5	0,308

Výsledné plochy píků pro danou koncentraci standardu β -karotenu zachycuje tabulka 11. Obrázek 44 dokumentuje vlastní měření. V grafu č. 1 je uvedena výsledná kalibrační křivka s reversní rovnicí, která je nezbytná pro výpočet koncentrace β -karotenu v želatinových kapslích. Retenční čas standardu β -karotenu se pohyboval v rozmezí 3,15 – 3,3 min.

Obr. 44. Měření kalibrační křivky β -karotenu

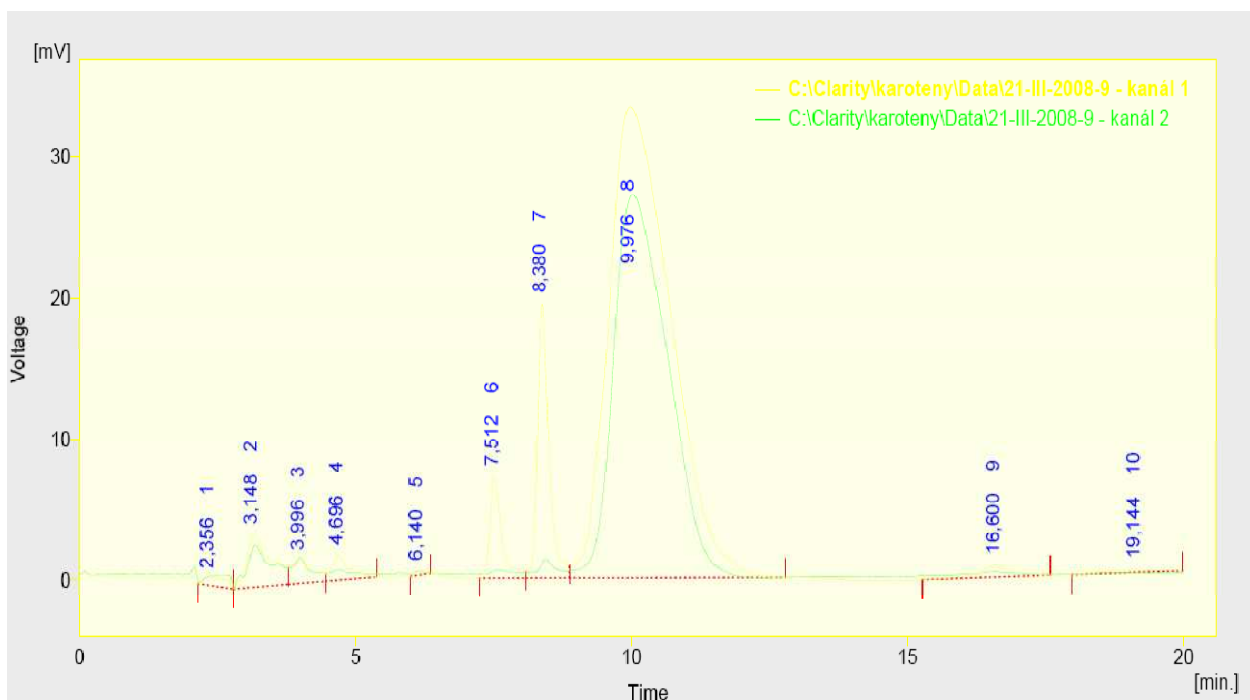
Graf 1: Kalibrační křivka s regresní rovnicí pro stanovení β -karotenu metodou HPLC-ECD na kanálu E 1 = 500 mV



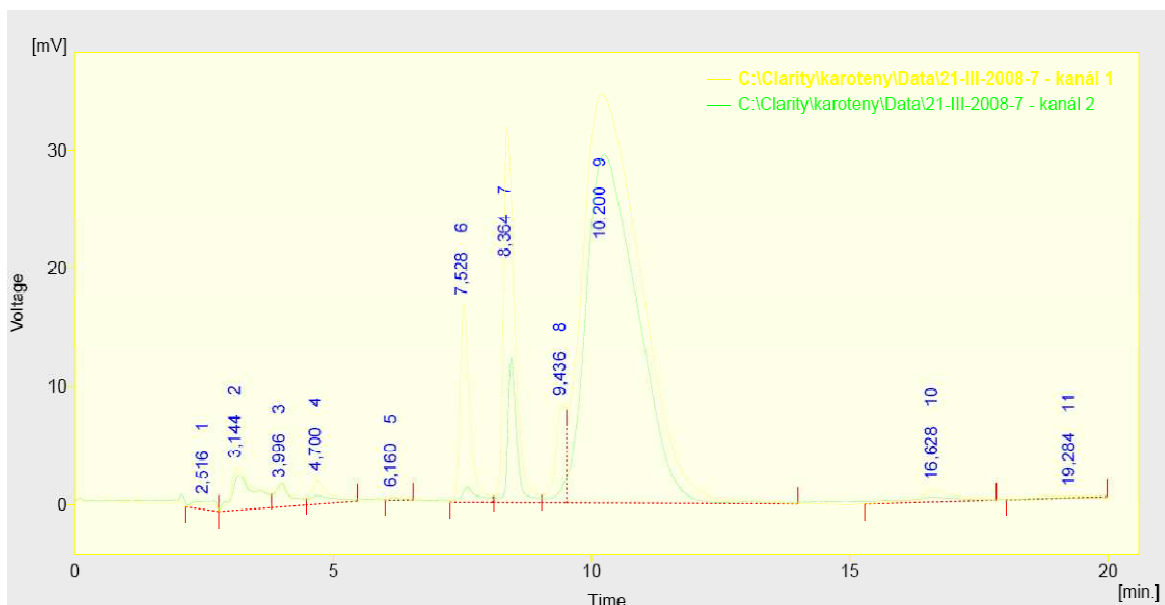
Z kalibrační křivky byla stanovena rovnice regresní přímky s korelačním koeficientem 0,990.

7.6 Výsledky a přesnost vlastního stanovení obsahu β -karotenu ve vzorcích želatinových kapslí

Postup stanovení byl proveden podle metody uvedené v kapitole 6.7. Retenční čas β -karotenu byl v 3,15 minutě a v tomto retenčním čase byly také odečteny plochy píků. Průběh analýzy vzorku zachycují chromatogramy na obrázcích 45 a 46. Každá kapsle byla proměřena pětkrát.



Obr. 45. Vzorek želatinových kapslí rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.



Obr. 46. Vzorek obsahu náplně želatinových kapslí rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.

Tab. 12: Přesnost stanovení β -karotenu metodou HPLC-ECD

Kapsle	Plocha píku [mV.s ⁻¹]	Obsah β -karotenu [mg]	$/ x_i - \bar{x} /$	$/ x_i - \bar{x} /^2$
1.	52,00	5,804	-0,0672	0,00451
2.	51,25	5,700	-0,1712	0,02931
3.	53,30	5,986	0,1148	0,01318
4.	52,45	5,867	-0,0042	0,00001
5.	53,40	5,999	0,1278	0,01633
		$\bar{x} = 5,871$		$\Sigma = 0,06335$

Průměrný obsah β -karotenu v želatinových kapslích byl deklarován výrobcem na etiketě výrobku a činil 6 mg. Odhad směrodatné odchylky byl vypočten podle vzorce (4). Skutečný obsah β -karotenu stanovovaný metodou HPLC byl vypočten podle vzorce (5), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 5. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha = 0,05$) a při čtyřech stupních volnosti 2,78. (55)

Směrodatná odchylka $s = 0,0158$

Průměrný obsah β -karotenu v želatinových kapslích

$\mu = 5,871 \pm 0,2264 \text{ mg } (\alpha = 0,05)$

Plochy píku byly dosazeny do regresní rovnice kalibrační křivky a byly vypočteny koncentrace β -karotenu v jednotlivých vzorcích. Průměrná hodnota β -karotenu v želatinových kapslích byla stanovena na $5,871 \pm 0,2264 \text{ mg}$. Výrobce „Kapslí pro podporu zraku“ uvádí hodnotu 6 mg, což přibližně odpovídá naměřené hodnotě. Nižší námi naměřené množství mohlo být způsobeno tím, že kapsle byly již staré přibližně 2 roky až 1,5 roku, což určitě vede k degradaci β -karotenu v kapslích. Nutno také zdůraznit, že kapsle byly skladovány v láhvi ze světlého skla, tudíž nebyly chráněny před světlem. β -karoten je citlivý na světlo a na kyslík, izomerie se a tím degraduje. Další možnost je, že výrobce nesplnil deklarovaný obsah z důvodu nedostatečného technologického postupu při plnění a balení. Lze tedy výrobcovi navrhnout využití jiné kluzné látky, která by umožnila lepší kvalitativní smíchání všech komponent tablety a poté její kvantitativní plnění.

Zároveň je nutno připomenout, že byl testován i samotný extrakt z borůvek, který byl negativní na přítomnost β -karotenu, nebo jeho množství bylo tak malé, že bylo pod hladinou detekovatelnosti.

Metodika byla ověřena metodou standardního přídatku.

ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na vypracování vhodného postupu k izolaci β -karotenu a současně zavedení optimální chromatografické metody pro jeho stanovení v želatinových kapslích. Ke stanovení β -karotenu byla použita metoda HPLC s detekcí ECD. V rámci této práce byly testovány optimální extrakční postupy vhodné ke kvantitativní izolaci β -karotenu z želatinových kapslí a různé typy mobilních fází a kolon.

V teoretické části jsou popsány obecně fyziologické účinky rostlin borůvek, zařazení do rostlinného systému, její výskyt a produkce v různých státech světa. Následuje část věnující se fyziologickému popisu aktivních látek obsažených v borůvkách, jako jsou karotenoidy a flavonoidy.

Dále jsou v práci popsány organické kyseliny, sacharidy, pektiny a minerální látky. V neposlední řadě jsou zmíněny kapsle, jejich praktické využití a metoda HPLC (Vysoce účinné kapalinové chromatografie). Jde o metodu která se běžně používá ke stanovování karotenoidů.

V konečné fázi bylo připraveno 5 vzorků želatinových kapslí (Kapsle pro podporu zraku) extrakcí podle postupu uvedeného v kapitole 6.4. za použití rozpouštědla hexanu. Extrakty vzorků byly odpařeny na vakuové rotační odparce a poté byl odparek rozpuštěn v 10 ml etanolu. Alikvotní část vzorku byla přefiltrována před vstříkem na kolonu přes nylonový mikrofiltr o velikosti póru 0,45 μm . Chromatografická separace probíhala na koloně SUPELCOSIL LC18-DB, 5 μm (25 cm x 4,6 mm). Eluce byla prováděna izokraticky s mobilní fází (MetOH : ACN : H_3PO_4 v poměru 70 : 29,5 : 0,5), při teplotě 30°C, při průtoku 1,1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a tlaku 61 bar. Detekce β -karotenu byla prováděna pomocí potenciálu vždy na dvou kanálech $E_1 = 500 \text{ mV}$ a $E_2 = 600 \text{ mV}$. Každý vzorek byl proměřen pětikrát při daném potenciálu. Z důvodu lepší odezvy signálu byl použit kanál $E_1 = 500 \text{ mV}$ pro přesnější vyhodnocení. Poté byly odečteny plochy píku [$\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$].

Výsledky analýzy byly zpracovány pomocí standardních statistických parametrů za využití Studentova rozdělení náhodných odchylek pro daný stupeň volnosti. Výsledky byly testovány na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (95 %).

Průměrná hodnota β -karotenu v želatinových kapslích byla stanovena na $5,871 \pm 0,2264 \text{ mg}$. Výrobce Kapslí pro podporu zraku uvádí hodnotu 6 mg, což přibližně odpovídá naměřené hodnotě. Nižší námi naměřené množství mohlo být způsobeno tím, že kapsle

byly již staré přibližně 2 roky až 1,5 roku, což určitě vede k degradaci β -karotenu v kapslích. Nutno také zdůraznit, že kapsle byly skladovány v láhvi ze světlého skla, tudíž nebyly chráněny před světlem. β -karoten je citlivý na světlo a na kyslík, izomerie se a tím degraduje. Další možnost je, že výrobce nesplnil deklarovaný obsah z důvodu nedostatečného technologického postupu při plnění a balení. Lze tedy výrobcí navrhnout využití jiné kluzné látky, která by umožnila lepší kvalitativní smíchání všech komponent tablety a poté její kvantitativní plnění.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. DUŠKOVÁ, L., KOPŘIVA, J. *Pěstujeme maliny, ostružiny a borůvky*, 1. vyd., Grada, 90s, 2002
2. STEINMETZ, K.A, POTTER, J.D. *Vegetables, fruits, and cancer. II. Mechanisms.* Cancer Causes Control 1991; 2 : p.428-434
3. POSPÍŠIL, J. *Antioxidanty*, 1.vyd., Academia Praha 1968
4. STEINMETZ, K.A, POTTER, J.D. *Vegetables, fruits and cancer. I. Epidemiology.* Cancer Causes Control 1991; 2 : p.312-333
5. AUSTOKER, J. *Cancer prevention in primary care. Diet and cancer.* BMJ 1994; 308 : p.16111-16112
6. WALKER, A.R.P. *Vegetable and fruit consumption: Some past, present and future practices.* J R Soc Health 1995; 115 : p.211-6
7. *V Evropě a Americe se rozšiřuje pěstování a export borůvek*, Agra Europe, 2006, č.2117, s.M/6.
8. DOSTÁL, J., KAPLAN, P. a kol. *Lékařská chemie II.*, Masarykova univerzita v Brně, 2003.
9. GREENBERG, E.R, SPORN, M.B. *Antioxidant vitamins, cancer, and cardiovascular disease.* N Engl J Med 1996; 334 : p.1189-90.
10. KEYS, A. *Seven countries: a multivariate analysis of death and coronary heart disease.* Cambridge, Mass: Harvard University Press, 1980.
11. VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*, VŠCHT Praha, OSSIS-Tábor, 1999.
12. CANFIELD, L.M., Forage, J.W. *Carotenoids as cellural antioxidants*, University of Arizona, Society for experimental biology and medicine, p.250-255, 1992.
13. SCHMIDT, F. *Biochemistry I.*, IDG Books Worldwide, Inc., USA, 2000.
14. GAZIANO, J.M, MANSON, J.E, BRANCH, L.G, COLDITZ, G.A, WILLETT, W.C, BURING, J.B. *A prospective study of consumption of carotenoids in fruits and vegetables and decreased cardiovascular mortality in the elderly.* Ann Epidemiol 1995; 5 : p.255-60.
15. VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*, Osis Tábor, 1999
16. MURRAY, R.K., GRANNER, D.K., MAYES, P.A. *Harperova biochemie*, Nakladatelství H+H, Jinočany, 2002.

17. SCHMIDT, F. *Biochemistry II.*, IDG Books Worldwide, Inc., USA, 2000.
18. WILLETT, W., TRICHOPOULOS, D. *Nutrition and cancer: a summary of the evidence.* *Cancer Causes Control* 1996; 7: p.178-80.
19. HLÚBIK, P., OPLTOVÁ, L. *Vitaminy*, Grada Publishing, a.s., 2004
20. KALÁČ, P.: *Také příjem antioxidantů má své horní meze.* *Výživa a potraviny*, 58, 2003, s.66-67.
21. HOLEČEK, V., RACEK, J. *Ochrana před volnými radikály pomocí antioxidantů, stopových prvků a léků*, *Klinická biochemie a metabolismus* 3, s.137-141, 1994.
22. PROVAZNÍK, K. a kol. *Manuál prevence v lékařské praxi II.* *Výživa*, 1.vyd., Praha: SZÚ, 1995, 104 str.
23. KODÍČEK, M. *Biochemické pojmy*, VŠCHT Praha, 2004.
24. VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 1*, Osis Tábor, 1999.
25. HAMPL, F., PALEČEK, J. *Farmakochemie*, VŠCHT Praha, 2002.
26. STRAKA, P. *Obecná chemie*, 1.vyd. Praha, Paseka, 1995, 142 s.
27. DOSTÁLOVÁ, J. *Výživová doporučení Společnosti pro výživu pro obyvatelstvo České republiky*, *Potravinářská revue*, 2005, 1, s. 17-18.
28. DUCHOŇ A KOL. *Lékařská chemie a biochemie*, Zdravotnické nakladatelství Avicenum, 1991.
29. Dostupné na: www.midwife.org/legislative.cfm
30. PACÁKOVÁ, K., ŠTULÍK, K. *Vysokoučinná kapalinová chromatografie*, UK Praha, SPN Praha 1986.
31. FERENČÍK, M., ŠKÁRKA, B., a kol. *Biochemické laboratorní metody*, Alfa, Praha 1981
32. KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*, 1.vyd., Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava, 1996.
33. DAVÍDEK a kol. *Laboratorní příručka analýzy potravin*, Nakladatelství technické literatury, Praha, 1977.
34. FERRUZI, M.G., SANDER, L.C. *Carotenoid determination in biological micro-samples using liquid chromatography with coulometric array detector.* *Anal Biochem*, 256., p.74-81, 1998.

35. GAMACHE, P.H., FREETO, S.M., AND ACWORTH, I.N. *Coulometric array HPLC analysis of lipid-soluble vitamins and antioxidants*. Amer. Clin. Lab., 18, p.18-19., 1999.
36. ROY, S., VENOJARVI, M., KHANNA,S., AND SEN,C.K. *Simultaneous detection of tocopherols and tocotrienols in biological samples using HPLC-coulometric electrode array*, Meth. Enzymol., 352, p.326-332, 2002
37. NG, L. T., LEONG, W.H., HO, D. *The pharmacological properties of palm tocotrienols*. Chinese Pharmaceu. J. 54, p.63-75, 2002.
38. PACKER, L. *Molecular aspects of alpha tocotrienol antioxidant action and cell signaling*. J. Nutr., 131, p.369-373, 2001.
39. GERALD, F., COMBS, JR. *“The vitamins” fundamental aspects in nutrition and health*, (1999), p.23-24
40. MARIKO, M., SHOSUKE, K. *Oxidative DNA damage by vitamin A and its derivative via superoxide generation*, Journal of Biological Chemistry 275, 13, 2000, p. 2003-2008
41. NICHLOAS, H. DE KLERK ET AL. *Vitamin A and cancer prevention II: Comparison of the effects of retinol and β -carotene*. International Journal of Cancer, 175, Issue 3, 1998, p.362-367
42. AMANDA, J CROSS ET AL. *Iron and colorectal cancer risk in the α -tocopherol, β - carotene cancer prevention study*. International Journal of Cancer, 1118, Issue 12, 2006, p.3147-3152
43. HIROSHI IWASE. *Simultaneous sample preparation for high-performance liquid chromatographic determination of Vitamin A and β -carotene in emulsified nutritional supplements after solid-phase extraction*. Journal of Analytica Chemica Acta 463, 2002, p.21-29
44. OLIVES BARBA, A.I, et all. *Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β -carotene in vegetables*. Journal of Food chemistry 95, 2006, p.328-336
45. FERRUZZI, M, MARIO G. *Carotenoid determination in biological microsamples using liquid chromatography with a coulometric electrochemical array detector*. Jurnal of Analytical Biochemistry 256(1), 1998, p.74-81

46. MANTOURA RFC, REPEATA DJ. *Calibration methods for HPLC*. In Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW (eds), *Phytoplankton pigments in oceanography: Guideline to modern methods*. UNESCO Publishing, Paris, 1997, p. 407-428
47. SZYLKA DEVRIES. AOAC Official Method 2005.07 β - Carotene in Supplements and Raw Materials – Reversed-Phase High Pressure Liquid Chromatographic Method . *First Action 2005*. Journal of AOAC international Vol.88, No.5, 2005
48. CHALABALA, M., MANDÁK, M. *Liekové formy*, Osveta 1985, 1992.
49. DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J., *Chemie potravin*, 1.vyd., Nakladatelství technické literatury, Praha 1983
50. WILSON, K., WALKER, J., *Principles and Techniques of practical biochemistry*, fifth edition, University Cambridge 2000,
51. HÁBOVÁ, M., *Stanovení vitamínu B₂ v produktech živočišného původu*, diplomová práce, UTB ve Zlíně, 2006
52. SQUADRITO, GL. at all. *HPLC-ECD analysis of water-soluble antioxidants in biological symplex*, Free radical biology and medicine 39, p. 112, 2005
53. KADOŠ, E., BEREK, D., *Základy kvapalinovej chromatografie*, Alfa, Bratislava , 1978
54. KOLAJOVÁ, Z. *Stanovení biologicky aktivních látek v borůvkách*, Bakalářská práce, UTB ve Zlíně, 2006
55. SOMMER, L. *Teoretické základy analytické chemie III*, Chemická fakulta Vysokého učení technického v Brně, 1995
56. WINTERHALTER, P. *Carotenoid-derived aroma compounds*, ACS Symposium Series 802, p.1-17. American Chemical Society: Washington, DC, 2002.
57. CROTEAU, R., KUTCHAN, T., LEWIS, N. Natural products (secondary metabolites). *In Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plants Physiologists, Rockville, MD, p.1250-1318., 2000
58. CARIS-VEYRAT, C., SCHMIDT, A., CARAIL, M., BOHM, V. *Cleavage products of lycopene produced in vitro oxidants: Characterization and mechanisms of formativ*. J. Agric Food Chem., 52, p.7318-7325. 2003

59. RONEN, G. *An alternative pathway to Beta karotene formativ in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta (B) an old – gold (og) color mutations in tomato.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, p.11102-11107, 2000.
60. SCHWARTZ, S. *Characterization of a novel karotenoid cleavage dioxygenase from plants.* J. Biol. Chem. 276, p.25208 – 25211, 2001.
61. ZORN, H. *β -carotene in flavor compounds.* Biol. Chem., 384, p.5478-5490. 2003
62. KIMURA, M. *Carotenoid composition of hydroponic leafy vegetables.* J Agric. Food. Chem., 51, p.2603-2607, 2003.
63. RAJU, M. *β -carotene absorption and conversion into vitamin A in rats.* J. Nutr. Sci. Vitaminol. 2005
64. BURNS, J.: FRASER, P. D. *Identification and qantification of carotenoids, toco-pherol and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables.* Phytochemistry, 62., p.939-945. 2003
65. LEWINSOHN, E., YRON, S. *Carotenoid Pigmentation Affects the Volatile Composition of fruits, As Revealed by Comparative Genetic Analyses,* J. Agric. Food Chem. 53, p.3142-3145. 2005

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

I.U.	Mezinárodní jednotky
LDL	Lipoprotein s nízkou hustotou
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinadeninmononukleotid
ATP	Adenosin trifosfát
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
HPLC	Vysoceúčinná kapalinová chromatografie
RP-HPLC	Vysoceúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází
ECD	Elektrochemický detektor

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr.1. Borůvky.....	12
Obr.2. Flavonoidní látky.....	18
Obr.3. Waldův cyklus.....	22
Obr.4. Vitamín C – kyselina L-askorbová.....	25
Obr. 5. Tvrdá želatinová kapsle se zámkem	33
Obr.6. Plnění tvrdých želatinových kapslí.....	35
Obr.7. Kolonové uspořádání u zařízení ESA, Coulochem III.....	42
Obr.8. Coulochem III.....	43
Obr.9. Několikanásobná extrakce.....	51
Obr. 10. Vyextrahované karotenoidy po přidavku okyselené vody.....	51
Obr. 11. Extrakce při teplotě 20°C.....	55
Obr. 12. Extrakce při použití vodní lázně 35°C.....	55
Obr. 13. Extrakce při použití vodní lázně 50°C.....	56
Obr. 14. Extrakce při použití laboratorní teploty 21°C.....	58
Obr. 15. Extrakce při použití vodní lázně 35°C.....	58
Obr. 16. Extrakce při použití vodní lázně 50°C.....	58
Obr. 17. Extrakce při použití vodní lázně 35°C (vzorek + voda + rozpouštědlo).....	59
Obr. 18. Extrakce při použití vodní lázně 50°C (vzorek + voda + chloroform + rozpouštědlo metanol, etanol).....	60
Obr. 19. Extrakce při použití vodní lázně 50°C a laboratorní teplotě 20°C.....	60
Obr. 20. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze ACN:rH ₂ O:H ₃ PO ₄ (99:0,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.....	63
Obr. 21. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze ACN:rH ₂ O:H ₃ PO ₄ (99:0,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.....	63

- Obr. 22. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze ACN:rH₂O:H₃PO₄ (80:19,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.....64
- Obr. 23. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze ACN:rH₂O:H₃PO₄ (80:19,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.....64
- Obr. 24. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze ACN:rH₂O:H₃PO₄ (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.....65
- Obr. 25. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze ACN:rH₂O:H₃PO₄ (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.....65
- Obr. 26. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze ACN:rH₂O:H₃PO₄ (50:49,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.....66
- Obr. 27. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze ACN:rH₂O:H₃PO₄ (99:0,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.....66
- Obr. 28. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.....68
- Obr. 29. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.....68
- Obr. 30. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (50:49,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.....70
- Obr. 31. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (50:49,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.....70

- Obr. 32. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (30:69,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.....71
- Obr. 33. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (30:69,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.....71
- Obr. 34. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (10:89,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.....72
- Obr. 35. Standard β -karotenu rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (10:89,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.....72
- Obr. 36. Standard β -karotenu rozpuštěný v mobilní fázi při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.....74
- Obr. 37. Standard β -karotenu rozpuštěný v mobilní fázi při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.....74
- Obr. 38. Standard β -karotenu rozpuštěný v mobilní fázi při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.....75
- Obr. 39. Standard β -karotenu rozpuštěný v mobilní fázi při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.....75
- Obr. 40. Standard β -karotenu rozpuštěný v mobilní fázi při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.....76
- Obr. 41. Standard β -karotenu rozpuštěný v mobilní fázi při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (90:9,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.....77

- Obr. 42. Standard β -karotenu rozpuštěný v mobilní fázi při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.....77
- Obr. 43. Standard β -karotenu rozpuštěný v mobilní fázi při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 300 mV, E 2 = 400 mV, G = 750 mV.....78
- Obr. 44. Měření kalibrační křivky β -karotenu.....81
- Obr. 45. Vzorek želatinových kapslí rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.....82
- Obr. 46. Vzorek obsahu náplně želatinových kapslí rozpuštěný v etanolu při použití mobilní fáze MetOH:ACN:H₃PO₄ (70:29,5:0,5) při nastavení parametrů detektoru E 1 = 500 mV, E 2 = 600 mV, G = 750 mV.....83

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Kvantily $t (n)$ Studentova rozdělení o n stupních volnosti.....	46
Tab. 2: Účinnost rozpouštědel na extrakci biologicky aktivních látek v kapslích	54
Tab. 3: Účinnost rozpouštědel na extrakci biologicky aktivních látek v suchém extraktu..	55
Tab. 4: Účinnost rozpouštědel na extrakci biologicky aktivních látek v suchém extraktu .	57
Tab. 5: Účinnost rozpouštědel na extrakci biologicky aktivních látek v suchém extraktu .	59
Tab.6: Testované mobilní fáze.....	62
Tab.7: Typy mobilních fází.....	67
Tab.8: Typy mobilních fází.....	73
Tab.9: Typy mobilních fází.....	76
Tab.10: Tabulka hmotnosti 20 tablet.....	79
Tab.11: Kalibrace β -karotenu metodou HPLC-ECD	80
Tab. 12: Přesnost stanovení β -karotenu metodou HPLC-ECD.....	83

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: DENNÍ DOPORUČENÁ DÁVKA VITAMINU A

PŘÍLOHA P II: MNOŽSTVÍ VITAMINU C VE 100 G POTRAVINY

PŘÍLOHA P III: SCHÉMA PŘÍPRAVY SUCHÉHO BORŮVKOVÉHO
EXTRAKTU

PŘÍLOHA P I: DENNÍ DOPORUČENÁ DÁVKA VITAMINU A

Denní potřeba	Mezinárodní jednotky (I.U.)
kojenci	2000
děti od 1 do 3 let	2300
děti od 4 do 6 let	2500
děti od 7 do 10 let	3200
ženy	4000
muži	5000
těhotné ženy	8000

I.U - (International Units, Mezinárodní jednotky)

PŘÍLOHA P II: MNOŽSTVÍ VITAMINU C VE 100 G POTRAVINY

Potravina	Množství (mg . 100 g⁻¹)
borůvky	37,1
kiwi	36,7
pomeranč	35,4
citron s dužinou	34,0
špenát, brokolice	26,1

I.U - (International Units, Mezinárodní jednotky)

PŘÍLOHA P III: SCHÉMA PŘÍPRAVY SUCHÉHO BORŮVKOVÉHO EXTRAKTU

