Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Ing. Miroslav Šivel

LUTEIN V DOPLŇCÍCH STRAVY

LUTEIN IN DIETARY SUPPLEMENTS

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Program: P2901 Chemie a technologie potravin
Obor: 2901V013 Technologie potravin

Autor: Ing. Miroslav Šivel
Školitel: prof. Ing. Stanislav Kráčmar, DrSc.
Konzultant: prof. RNDr. Bořivoj Klejdus, Ph.D.

Zlín, 2012

Oponenti:

prof. Ing. Jozef Golian, Dr.

doc. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D

doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.

Motto:

„Největším bohatstvím je zdraví.“

Ralph Waldo Emerson

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli prof. Ing. Stanislavu Kráčmarovi, DrSc. a svému konzultantovi prof. RNDr. Bořivoji Klejdusovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky k danému tématu, odborné vedení a trvalý zájem při vypracování dizertační práce.
Rád bych zároveň chtěl poděkovat své rodině, mým blízkým a přátelům, kteří mi důvěřovali a po celou dobu studia mi vyjadřovali svoji morální podporu.

ABSTRAKT

Dizertační práce řeší problematiku obsahu významného karotenoidu luteinu v extraktech z aksamitníku vzpřímeného (*Tagetes erecta* L.) používaných pro komerční účely. Cílem dizertační práce bylo nalezení spolehlivé a přesné metody stanovení obsahu luteinu v doplňcích stravy dostupných na trhu v České republice. Základní metodou je RP-HPLC s UV-VIS detekcí. HPLC je všeobecně přijímána jako moderní metoda k oddělení, identifikaci a stanovení množství karotenoidů. V této dizertační práci bylo analyzováno 34 vzorků surovin (extraktů), které jsou komerčně dostupné na trhu ve dvou formách, z toho 16 vzorků enkapsulované formy a 18 vzorků práškové formy. Výrobci extraktů z Číny, Indie, Izraele a Mexika deklarovali obsah luteinu v rozmezí od 5 do 80 %. Pouze u 10 vzorků surovin odpovídal skutečný obsah luteinu deklarovanému obsahu luteinu výrobcem extraktu. Byla také porovnána kvalita obou forem surovin obsahujících lutein. Enkapsulovaná forma suroviny je odolnější vůči oxidaci luteinu než prášková forma.

Dále bylo analyzováno 48 vzorků doplňků stravy ve třech aplikačních formách, z toho 22 vzorků tablet, 18 vzorků měkkých tobolek a 8 vzorků tvrdých tobolek. Výrobci doplňků stravy z 12 zemí původu deklarovali obsah luteinu od 0,25 do 25 mg v jedné tabletě nebo tobolce. Pouze u 7 vzorků doplňků stravy odpovídal skutečný obsah luteinu deklarovanému obsahu luteinu, který byl uveden výrobcem doplňku stravy na obalu (etiketě) výrobku. Byla také porovnána kvalita doplňků stravy ve třech aplikačních formách. Doplňky stravy obsahující lutein v aplikační formě měkkých tobolek jsou nejodolnější vůči oxidaci luteinu, následuje tableta a nejhorší aplikační forma je tvrdá tobolka. Tato práce také shrnuje význam luteinu ve výživě člověka.

Klíčová slova:

Lutein, karotenoidy, RP-HPLC, aksamitník vzpřímený, doplňky stravy

ABSTRACT

This Doctoral Thesis deals with questions relating to the content of the significant carotenoid – lutein, in Marigold (*Tagetes erecta* L.) flower extracts, used for commercial purposes. A reliable and accurate determination method of lutein in dietary supplements which are available on the market in the Czech Republic was established. The basic method is High-performance Liquid Chromatography (further only RP-HPLC) with UV-VIS detection. RP-HPLC is generally accepted as a modern method for separating, identifying and quantifying carotenoids. 34 samples of Marigold flower extracts which are commercially available in two forms – 16 samples of the encapsulated form ("beadlets") and 18 samples of the powered form were analysed in this Doctoral thesis. The lutein content was in the 5 – 80 % range and the extracts originated from China, India, Israel and Mexico. Only 10 samples of the extracts were evaluated as complying with the declared content of lutein by the extract producers. The quality of lutein in the two forms of these extracts – encapsulated and powered; were compared. The encapsulated form of the extracts is more resistant to the oxidation of lutein than the powered form of extracts.

Then, 48 samples of dietary supplements in three dosage forms: 22 samples of tablets, 18 samples of soft capsules, and 8 samples of hard capsules; were analysed. The dietary supplement manufactures, from 12 countries, declared the lutein content as from 0.25 to 25 mg per tablet or capsule. Only 7 dietary supplement samples were evaluated as complying with the declared lutein content by dietary supplement manufactures. The quality of lutein in the three dietary supplement dosage forms, i.e. tablets, and soft and hard capsules, were compared. The soft capsule dosage form is the most resistant to lutein oxidation, followed by the tablet form, and the worst dosage form is hard capsule. The importance of lutein in human nutrition is included in this work.

Key words:

Lutein, Carotenoids, RP-HPLC, Marigold flower, dietary supplements

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ **7**

SEZNAM TABULEK **9**

1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY **10**

1. 1. PŘEHLED KAROTENOIDŮ 11
1. 1. 1. Karoteny *12*
1. 1. 2. Xanthofyly *13*
1. 1. 3. Apokarotenoidy *15*
1. 1. 4. Výskyt karotenoidů *16*
1. 1. 5. Použití karotenoidů *18*
1. 1. 6. Antioxidační aktivita karotenoidů *20*
1. 1. 7. Význam karotenoidů ve výživě člověka *21*
1. 2. LUTEIN 24
1. 2. 1. Syntéza luteinu a jeho isomerické formy *25*
1. 2. 2. Přírodní zdroje luteinu *27*
1. 2. 3. Komerční zdroje luteinu *28*
1. 2. 4. Lutein ve výživě člověka *31*
1. 2. 5. Zeaxanthin *33*
1. 3. DOPLŇKY STRAVY 35
1. 3. 1. Doplňky stravy v potravinářské legislativě *35*
1. 3. 2. Doplňky stravy s luteinem *35*
1. 4. STANOVENÍ LUTEINU METODOU HPLC 36
1. 4. 1. Extrakce luteinu *37*
1. 4. 2. Výběr chromatografické kolony *37*

2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE **38**

3. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ **39**

3. 1. VÝBĚR VZORKŮ 39
3. 1. 1. Výběr vzorků surovin *39*
3. 1. 2. Výběr vzorků doplňků stravy *40*
3. 2. STANDARD LUTEINU 43
3. 3. PŘÍPRAVA VZORKŮ 44
3. 4. STANOVENÍ LUTEINU METODOU HPLC 44

4. HLAVNÍ VÝSLEDKY PRÁCE **46**

4. 1. OBSAH LUTEINU V EXTRAKTECH Z AKSAMITNÍKU VZPŘÍMENÉHO 46
4. 2. KVALITA EXTRAKTŮ Z AKSAMITNÍKU VZPŘÍMENÉHO 50
4. 3. OBSAH LUTEINU V DOPLŇCÍCH STRAVY 51
4. 4. KVALITA APLIKAČNÍCH FOREM DOPLŇKŮ STRAVY S OBSAHEM LUTEINU 57
4. 5. KVALITA DOPLŇKŮ STRAVY S OBSAHEM LUTEINU 59

5. PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI **61**

6. ZÁVĚR **62**

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY **64**

SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA **75**

CURRICULUM VITAE **76**

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obr. 1 Biosyntéza lykopenu z geranylgeranyl-difosfátu ……..……13

Obr. 2 Schéma biosyntézy xanthofylů ……...……...……14

Obr. 3 Vznik apokarotenoidů z α-karotenu a z luteinu ……....……19

Obr. 4 Strukturní vzorec luteinu ……...……...……..24

Obr. 5 Vznik vitaminu A_2 z luteinu ……...……...…….25

Obr. 6 Biosyntéza luteinu ……...……...……26

Obr. 7 Chemická struktura isomerů luteinu ……...……..….27

Obr. 8 Obsah luteinu ve vybrané čerstvé zelenině a ovoci ……..…….....28

Obr. 9 Aksamitník vzpřímený (*Tagetes erecta* L.) ……...……29

Obr. 10 Složení karotenoidů v sušených květech aksamitníku vzpřímeného …….....29

Obr. 11 Složení nepolárního extraktu z aksamitníku vzpřímeného …….....30

Obr. 12 Komerční formy luteinu …….……30

Obr. 13 Strukturní vzorec zeaxanthinu …….……...…33

Obr. 14 Biosyntéza luteinu a zeaxanthinu …….…….…….....34

Obr. 15 Kalibrační přímka luteinu …….……...……...43

Obr. 16 Chromatogram standardu luteinu …….……..……43

Obr. 17 Chromatogram suroviny …….……..……..…45

Obr. 18 Chromatogram doplňku stravy …….……..……45

Obr. 19 Poměr skutečné a deklarované hodnoty obsahu luteinu vyjádřený v % (enkapsulovaná forma) ……..…….47

Obr. 20 Poměr skutečné a deklarované hodnoty obsahu luteinu vyjádřený v % (prášková forma) ……..……..49

Obr. 21 Vyhodnocení vzorků extraktů z aksamitníku vzpřímeného ……...50

Obr. 22 Vyhodnocení vzorků surovin podle země původu ……...…….51

Obr. 23 Poměr skutečné a deklarované hodnoty obsahu luteinu vyjádřený v % (tablety) ……...……...……53

Obr. 24 Poměr skutečné a deklarované hodnoty obsahu luteinu vyjádřený v % (měkké tobolky) …..…….55
Obr. 25 Poměr skutečné a deklarované hodnoty obsahu luteinu výjádřený v % (tvrdé tobolky) ……...56
Obr. 26 Vyhodnocení vzorků doplňků stravy z České republiky ……....…..58
Obr. 27 Vyhodnocení vzorků doplňků stravy ze zahraničí …….....58
Obr. 28 Srovnání doplňků stravy vyrobených v České republice a v zahraničí …….59
Obr. 29 Srovnání kvality doplňků stravy z jednotlivých států ……...60
Obr. 30 Vyhodnocení kvality doplňků stravy s obsahem luteinu ……...60

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Enkapsulovaná forma extraktů z aksamitníku vzpřímeného ….……39

Tab. 2 Prášková forma extraktů z aksamitníku vzpřímeného ……...40

Tab. 3 Analyzované doplňky stravy v aplikační formě tablet …….……..41

Tab. 4 Analyzované doplňky stravy v aplikační formě měkkých tobolek …42

Tab. 5 Analyzované doplňky stravy v aplikační formě tvrdých tobolek …..42

Tab. 6 Obsah luteinu v extraktech (enkapsulovaná forma) z aksamitníku vzpřímeného ……..……46

Tab. 7 Obsah luteinu v extraktech (prášková forma) z aksamitníku vzpřímeného ……..……48

Tab. 8 Obsah luteinu v doplňcích stravy (tablety) ……52

Tab. 9 Obsah luteinu v doplňcích stravy (měkké tobolky) …….……..54

Tab. 10 Obsah luteinu v doplňcích stravy (tvrdé tobolky) ……..56

1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Příroda kolem nás nabízí velmi širokou paletu oslňujících barev. Od listů, květů a plodů jako barev rostlin až k ptákům a rybám, všude tam kde se jen podíváme. Jsme doslova ohromeni sytými a pronikavými barvami přírody. Tyto barvy získané historickým vývojem flóry a fauny z každodenní zkušenosti přírody jsou rovněž významné i pro člověka. Výzkumy z posledních let ukazují, že v přírodních barvách spočívají nám doposud nepoznané a skryté možnosti jejich využití pro lidské zdraví.

Karotenoidy jsou přírodní barviva, které jsou syntetizovány rostlinami a mikroorganismy. Struktura každého karotenoidu určuje jeho barvu i fotochemické vlastnosti jeho molekuly. Z této struktury dále vyplývá i chemická reaktivita karotenoidů vzhledem k oxidačním agens nebo volným radikálům, která v organismu živočichů konzumujících karotenoidy v potravě hraje významnou roli [1].

Molekuly většiny karotenoidů jsou tvořeny 40 uhlíkovými atomy a sestávají obecně z nenasyceného řetězce o 22 atomech uhlíku s methylovým větvením, typickým pro isoprenoidy. Na oba konce řetězce je připojena devítičlenná jednotka, která může být cyklická nebo acyklická. Polyenová struktura karotenoidů jim dodává barevnost. Většinou mají konfiguraci „*all-trans*“, to znamená, že všechny dvojné vazby mají konfiguraci *trans*. Karotenoidy jsou jedny z nejdůležitějších přírodních barviv, velmi rozšířených v rostlinách i v živočišné říši.

O rozšířenosti karotenoidů svědčí odhad jejich roční tvorby v biosféře 10^8 tun, přesto, že jejich koncentrace v přírodním materiálu bývá řádově 0,02 až 0,1 % sušiny. Pro praktická použití se karotenoidy získávají extrakcí a chromatografií z rostlinného materiálu, v průmyslovém měřítku se provádí jejich částečná i totální syntéza. Karotenoidy se používají jako potravinářská barviva a ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu [2].

1. 1. Přehled karotenoidů

Karotenoidy jsou značně rozšířené žluté a oranžové, výjimečně také žlutozelené a červené, převážně lipofilní barviva rostlin, hub, řas, mikroorganismů a *de novo* také barviva živočichů (korýšů, ryb, ptáků, savců).

V rostlinách jsou karotenoidy principiálně asociovány s chlorofyly v chromoplastech, resp. v chloroplastech. Dnes je známo asi 700 přirozeně se vyskytujících karotenoidních látek. Z tohoto množství vykazuje asi 50 sloučenin aktivitu vitaminu A, které je nazývají provitaminy A.

Většina karotenoidních látek se řadí mezi tetraterpeny, tedy mezi terpenoidy formálně obsahující osm isoprenoidních jednotek. Za svoji barevnost vděčí řetězci konjugovaných dvojných vazeb, který se vyskytuje v několika základních strukturách a jejich kombinacích.

Karotenoidy se dělí na dvě hlavní skupiny:

1) uhlovodíky nazývané **karoteny**
2) kyslíkaté sloučeniny (alkoholy, aldehydy, ketony, epoxidy a jiné) odvozené od karotenů, které se nazývají **xanthofyly** [3-6].

Podle uhlovodíkové struktury molekuly můžeme karotenoidy rozdělit na:

a) karotenoidy s acyklickou strukturou (např. lykopen)
b) karotenoidy s monocyklickou strukturou (např. γ-karoten, δ-karoten)
c) karotenoidy s bicyklickou strukturou (např. α-karoten, β-karoten, lutein, zeaxanthin) [6].

Biosyntéza karotenoidů v přírodě vychází z aktivní formy kyseliny octové, tzv. acetylkoenzymu A. Postupně vzniká acetoacetylkoenzym A, kyselina mevalonová a isopentenyl-difosfát, který představuje tzv. „aktivní isoprenoidní jednotku“. Ze dvou isoprenoidních jednotek spojených způsobem „hlava-pata“ vzniká geranyl-difosfát. Ten kondenzuje s další molekulou isopentenyl-difosfátu za vzniku farnesyl-difosfátu. Prodloužením molekuly farnesyl-difosfátu

kondenzací s další molekulou isopentenyl-difosfátu vzniká geranylgeranyl-difosfát s 20 atomy uhlíku v molekule. Redukční kondenzací dvou molekul geranylgeranyl-difosfátu způsobem „pata-pata“ vzniká nejjednodušší karotenoid, resp. karoten, fytoen, který jako prekurzor tetraterpenů (karotenoidů) podléhá postupně dehydrogenaci za vzniku „all-trans“ konfigurace karotenoidů [2,5-8].

Lidský organismus není schopen biosyntézy karotenoidů, a proto je odkázán na jejich příjem potravou, zejména v zelenině a ovoci, popř. v doplňcích stravy [9].

1. 1. 1. Karoteny

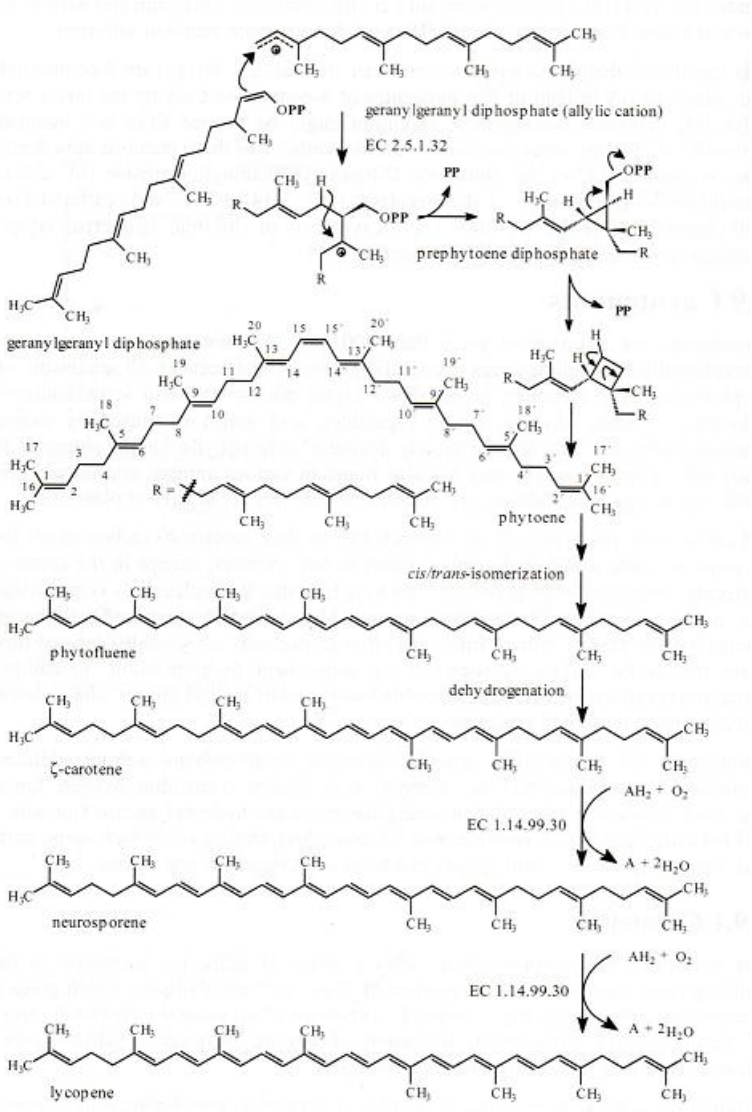
Nejjednodušším prototypem karotenů je acyklický polynenasycený uhlovodík fytoen, který je syntetizován ze dvou molekul geranylgeranyl-difosfátu. Isomerací fytoenu vzniká *trans*-isomer fytofluen, jeho oxidací postupně ζ-karoten, neurosporen a lykopen, systematickým názvem ψ,ψ-karoten, jako finální produkt biosyntézy (Obr. 1).

Alicyklické karoteny vznikají enzymově katalyzovanou cyklizací na jednom nebo na obou koncích acyklických ψ-karotenů, kdy se tvoří β-jononové struktury v β-karotenech nebo α-jononové struktury v ε-karotenech.

Příkladem karotenu s β-jononovým cyklem pouze na jednom konci molekuly je γ-karoten, systematickým názvem β,ψ-karoten a karotenu s α-jononovým cyklem pouze na jednom konci molekuly je δ-karoten, systematickým názvem ε,ψ-karoten.

Cyklizací na obou koncích molekuly vznikají struktury přítomné například v β-karotenu, v α-karotenu nebo v ε-karotenu. Sloučenina β-karoten se dvěma β-jononovými cykly se tedy systematicky nazývá β,β-karoten, α-karoten je potom β,ε-karoten, neboť má jeden β-jononový cyklus a jeden α-jononový cyklus. Karoten se dvěma α-jononovými cykly je ε-karoten neboli ε,ε-karoten.

Karoteny s β-jononovým cyklem, jako je α-karoten, β-karoten a γ-karoten, jsou prekurzory retinolu. Řadí se proto mezi provitaminy A [3-5].



Obr. 1 Biosyntéza lykopenu z geranylgeranyl-difosfátu [5]

1. 1. 2. Xanthofyly

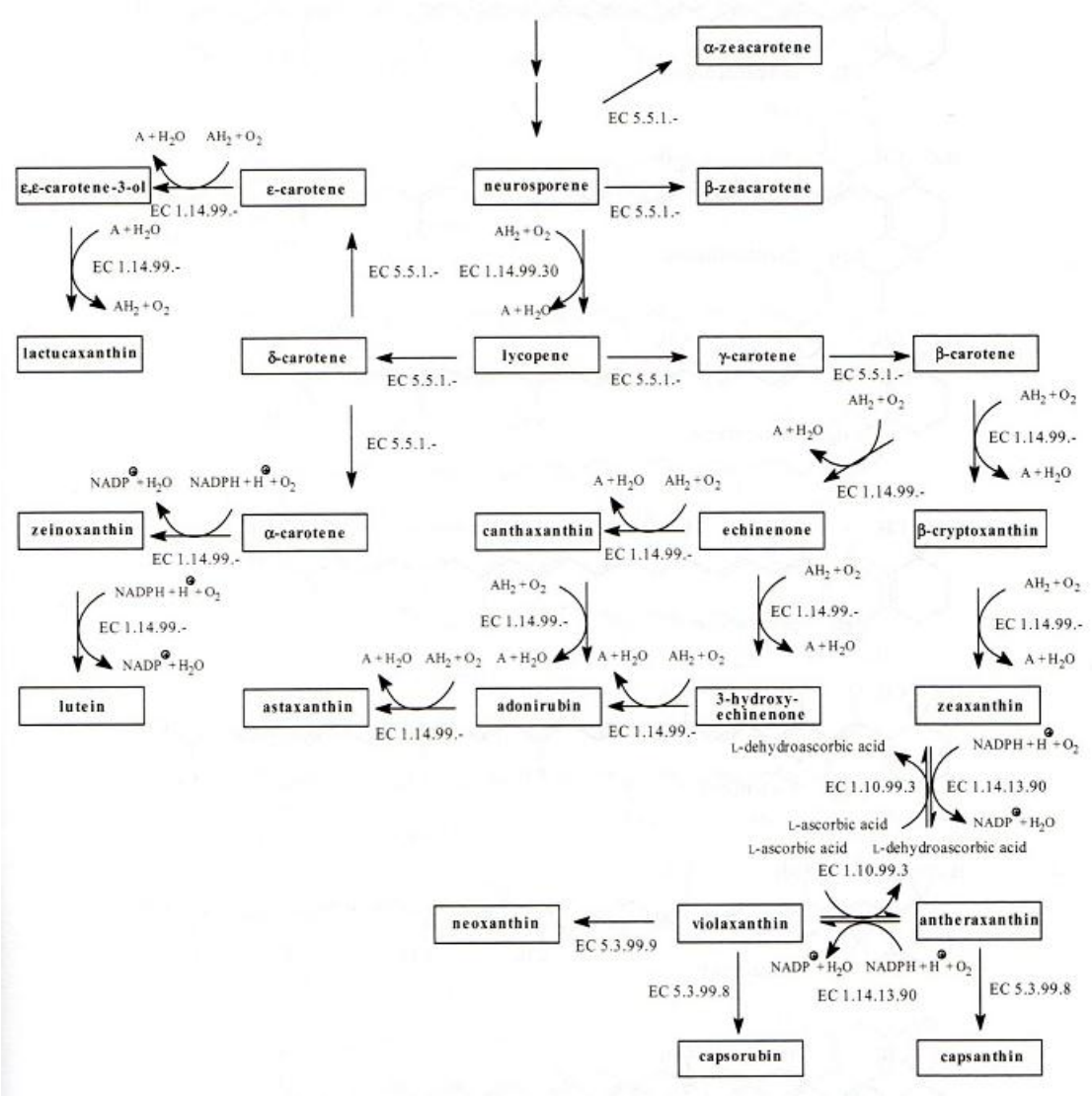
Xanthofyly jsou hlavními karotenoidy rostlin. Primárně vznikají jako produkty biochemické oxidace (hydroxylace, epoxidace) karotenů.

Xanthofyly odvozené od acyklických karotenů se v potravinách vyskytují v malém množství.

Mnohem běžnější jsou monohydroxysubstituované deriváty alicyklických karotenů nazývané **kryptoxanthiny**. Většina rostlinných pletiv obsahuje malá množství α-kryptoxanthinu (odvozen je od α-karotenu) a β-kryptoxanthinu

(odvozen je od β-karotenu), které jsou prekurzory xanthofylů obsahujících dvě hydroxylové skupiny v molekule. Xanthofyl β-kryptoxanthin se řadí mezi provitaminy A.

Příkladem dihydroxysubstituovaných karotenů je lutein (jeho prekurzorem je α-karoten, resp. α-kryptoxanthin), zeaxanthin (prekurzorem je β-karoten, resp. β-kryptoxanthin) a laktukaxanthin (prekurzorem je ε-karoten), Obr. 2.



Obr. 2 Schéma biosyntézy xanthofylů [5]

Oxidací těchto sloučenin vznikají následně 5,6-epoxidy, jakými jsou například antheraxanthin odvozený od β-karotenu a taraxanthin neboli

luteinepoxid odvozený od α-karotenu. Oxidací na obou koncích molekuly vznikají 5,6,5´,6´-diepoxidy, jako je violaxanthin [3-5].

Korunní lístky měsíčku lékařského (*Calendula officinalis* L.) obsahují karotenoidní barvivo 5,6-epoxylutein zvaný flavoxanthin [3,4].

Neoxanthin, který se vyskytuje ve vyšších rostlinách, a také karotenoidní barvivo řas fukoxanthin jsou příkladem v přírodě vzácně se vyskytujících sloučenin nazývaných **alleny** (dieny s kumulovanými dvojnými vazbami).

Isomerací 5,6-epoxidů vznikají oba isomery příslušných 5,8-epoxidů. Jejich příkladem je mutatochrom (odvozený od β-kryptoxanthinu) a mutatoxanthin (odvozený od zeaxanthinu). Luteoxanthin a auroxanthin jsou současně 5,6- a 5,8-diepoxidy.

Přesmykem 5,6-epoxidů vzniká další skupina xanthofylů, které se nazývají **cyklopentylketony** nebo také **κ-karoteny**. Nejvýznamnějšími κ-karoteny jsou kapsanthin a kapsorubin. V menším množství se vyskytují kryptokapsin, kapsanthon, kapsochrom, kapsolutein a epoxidy kapsanthinu [3,4].

1. 1. 3. Apokarotenoidy

Poměrně malou, avšak velmi významnou, skupinou xanthofylů jsou sloučeniny obsahující v molekule méně než 40 atomů uhlíku. Tyto sloučeniny vzniklé štěpením molekuly karotenoidů se nazývají **degradované karotenoidy** nebo **apokarotenoidy**. Apokarotenoidy vykazují různé biologické funkce. Základním a nejvýznamnějším biologicky aktivním apokarotenoidem živočišných tkání je vitamin A_1 (*all-trans*-retinol) [3,4,8].

Mezi významné produkty katabolismu karotenoidů se dále řadí dosti rozšířený β-citraurin (30 atomů uhlíku), bixin neboli *cis*-bixin ze semen annatto (22 atomů uhlíku) a krocetin vyskytující se v šafránu (20 atomů uhlíku) [3-5].

Hlavní přirozenou barevnou složkou extraktu z vnějších částí semen zvaných annatto, z keře oreláník barvířský (*Bixa orellana* L.) rostoucího v tropech (v zemích Střední a Jižní Ameriky) je apokarotenoid bixin neboli 9´-*cis*-bixin,

který vzniká jako produkt katabolismu luteinu. Sušené blizny šafránu setého (*Crocus sativus* L.) obsahují apokarotenoid krocetin neboli α-krocetin vzniklý štěpením zeaxanthinu [3,4].

1. 1. 4. Výskyt karotenoidů

V zrníčkových útvarech cytoplazmy mnoha rostlinných buněk jsou obsaženy ve vodě rozpustné komplexy karotenoidů s bílkovinami. V potravinách, kde jsou již původní buněčné struktury rozrušeny, nalézáme však odštěpené karotenoidy jako látky ve vodě nerozpustné, ale dobře rozpustné v tucích a nepolárních nebo málo polárních rozpouštědlech. Více než 90 % rostlinných karotenoidů je obsaženo v buňkách listů, obvykle jako směs 20 – 40 % karotenů (více než 70 % z nich tvoří β-karoten) a 60 – 80 % jejich oxidačních produktů [2].

Karotenoidy jsou významnými a nejrozšířenějšími lipofilními barvivy mnoha druhů ovoce a zeleniny. Vyskytují se ve všech fotosyntetizujících rostlinných pletivech, kde jsou přítomny jako fotochemicky aktivní složky plastidů (rostlinných organel) nazývaných chromoplasty. Často je doprovázejí další barviva, u broskví a meruněk např. anthokyany. Přítomnost karotenoidů v zelených částech rostlin bývá maskována chlorofylem.

Kvalitativní a kvantitativní složení karotenoidů závisí na mnoha faktorech, jako je druh a odrůda rostliny, sezóna, stupeň zralosti, způsob zpracování apod. V některých druzích ovoce a také v bramborách se karotenoidy vyskytují v jednotkých $mg.kg^{-1}$, ve většině druhů ovoce a zeleniny jsou přítomny v desítkách $mg.kg^{-1}$, v mrkvi, rajčatech a paprikách se nacházejí stovky $mg.kg^{-1}$ karotenoidů.

Určitá část karotenoidů vytváří vazbu s bílkovinami, podobně jako je tomu u chlorofylů. Tyto konjugáty se obecně nazývají **karotenoproteiny**. Xanthofyly se navíc vyskytují jako volné látky a také jako estery s mastnými kyselinami (hlavním barvivem květů slunečnice roční, *Helianthus annuus* L., je diester luteinu s palmitovou kyselinou) nebo jako glykosidy [3,4].

All-trans-isomery karotenoidů jsou v čerstvých i tepelně zpracovaných materiálech doprovázeny malým množstvím *cis*-isomerů, které se nazývají **neokarotenoidy**. β-Karoten doprovází hlavně geometrické isomery 9-*cis*-, 13-*cis*- a 15,15´-*cis*-β-karotenu. Lutein doprovází hlavně 9-*cis*- a 9´-*cis*-, 13-*cis*- a 13´-*cis*- isomery a méně 15-*cis*- a 15´-*cis*-isomerů.

V ovoci jednoho druhu se běžně nalézá větší počet karotenoidů. Vzácněji (např. v meruňkách a mangu) se jako hlavní barvivo vyskytuje β-karoten. Dalšími barvivy meruněk jsou různé jiné karoteny, xanthofyly jsou přítomny ve velmi malém množství. V broskvích je ve srovnání s meruňkami přítomno větší množství xanthofylů, část se vyskytuje ve formě monoesterů a diesterů mastných kyselin (převážně myristové a palmitové). Pomeranče obsahují značně proměnná množství kryptoxanthinu, luteinu, antheraxanthinu a violaxanthinu jako hlavní barviva a řadu dalších xanthofylů, avšak poměrně malé množství karotenů.

V listové zelenině tvoří zpravidla 10 – 20 % přítomných karotenoidů β-karoten. Ve velkém množství bývají přítomny lutein, violaxanthin a neoxanthin. Hlávkový salát obsahuje větší množství laktukaxanthinu. Zeaxanthin je hlavní karotenoid kukuřice. V mrkvi je převládajícím barvivem β-karoten. V rajčatech je převážně barvivo lykopen (běžně 85 % všech karotenoidů). V zelených paprikách jsou kromě chlorofylů hlavními barvivy karotenoidní barviva lutein, violaxanthin, neoxanthin a β-karoten. Větší část barviv zralých paprik je plně nebo částečně esterifikována mastnými kyselinami (asi z 80 %). Ve žlutých xanthofylech je vázána mastná kyselina linolová, myristová a palmitová, v červených xanthofylech je vázána především laurová, myristová a palmitová kyselina. Relativně vysoký obsah karotenoidů (až 0,2 %) má palmový olej, jeho převládajícími složkami jsou α-karoten a β-karoten [3,4].

U živočichů jsou karotenoidy přítomné hlavně v povrchových tkáních (kůže, krovky, šupiny, peří, zobáky), ale také ve žloutku ptačích vajec a jako zrakové barviva (pigmenty) [2]. Karotenoidy živočišných tkání jsou ale rostlinného

původu, protože živočichové nejsou schopni syntetizovat karotenoidy *de novo*, pouze přeměňují potravou získané rostlinné barviva na látky odlišné struktury nebo je skladují jako takové [3,4].

Hlavními barvivy depotních tuků ptáků (drůbeže) a savců jsou xanthofyly lutein a zeaxanthin, přítomno je také malé množství β-karotenu a dalších barviv. Ve vaječném žloutku jsou hlavními barvivy stejné xanthofyly a karoteny jako v depotním tuku slepic. Červeným barvivem lososovitých ryb a také mnoha korýšů (krevet, krabů, raků) je xanthofyl astaxanthin. U korýšů je astaxanthin vázán na bílkoviny v tmavých modročervených a zelenočervených karotenoproteinech. Červený kanthaxanthin je barvivem některých druhů brouků [3,4].

1. 1. 5. Použití karotenoidů

Některé karotenoidní barviva se jako čerstvé nebo sušené části rostlin nebo extrakty používají k barvení potravin od nepaměti (např. mrkev, slupky pomerančů, rajčat, šafrán, annatto, paprika). Ke stejnému účelu se používá také palmový olej obsahující karotenoidní látky.

Syntetické karotenoidy nalezly použití jako lipofilní i hydrofilní potravinářská barviva a také jako antioxidanty poměrně nedávno.

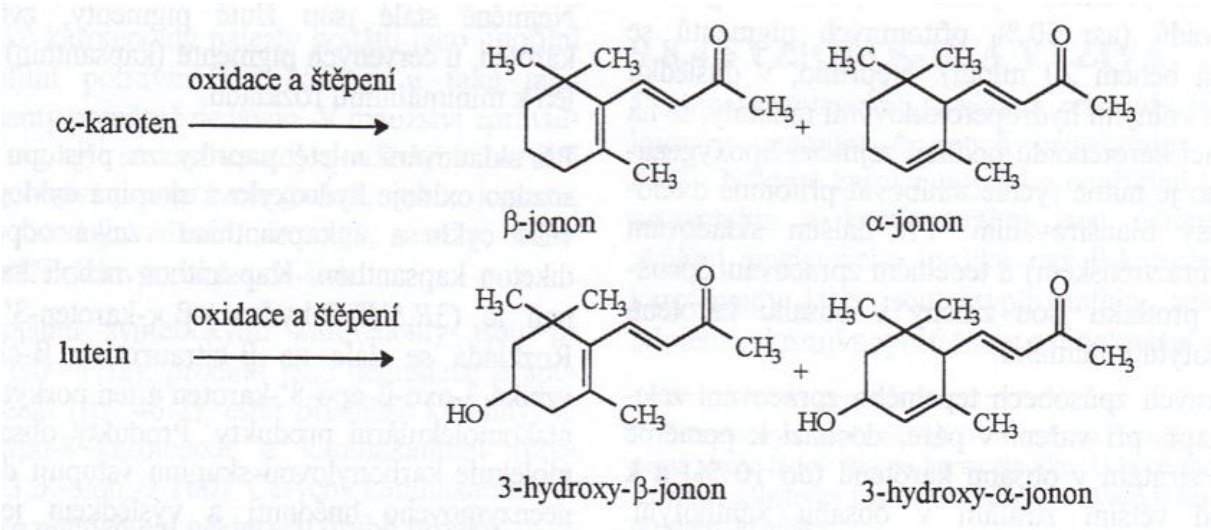
V množství zpravidla 1-10 $mg.kg^{-1}$ se karotenoidy používají k barvení mnoha potravin, např. margarínů, sýrů, jogurtů, zmrzlin, ovocných džusů, dresingů, mouky, těstovin, cukrářských výrobků a dalších [3,4].

Nejznámějším a technologicky nejdůležitějším barvivem karotenoidů je β-karoten (E160a) [2]. Dalšími karotenoidy, které se používají jako barviva v potravinářském průmyslu, jsou annatto (E160b), paprikový extrakt (E160c), lykopen (E160d), lutein (E161b) a kanthaxanthin (E161g) [3,4].

Karotenoidy se rovněž přidávají do krmiva dojnic a drůbeže pro zajištění žádoucí pigmentace mléka, mléčných výrobků, vajec a masa [3,4].

Karotenoidy jsou prekurzory mnoha důležitých sloučenin, které vznikají jako produkty jejich katabolismu nebo oxidace, např. při zrání ovoce nebo jeho zpracování. Degradační produkty karotenoidů zodpovědné za vůni a chuť potravin (hlavně ovoce a zeleniny) a vůni mnoha květin jsou především C_{13}, C_{11}, C_{10} a C_9 sloučeniny. Nejvýznamnějšími apokarotenoidy jsou C_{13} sloučeniny [4].

Štěpení molekuly karotenoidů *in vivo* při zrání a také během některých způsobů zpracování rostlinných materiálů probíhá za katalýzy regioselektivních dioxygenasových enzymů ze skupiny oxidoreduktas. Některé z těchto primárních degradačních produktů karotenoidů jsou již samy důležitými vonnými látkami, např. α-jonon a β-jonon vznikají z α-karotenu a 3-hydroxy-α-jonon a 3-hydroxy-β-jonon vznikají z luteinu (Obr. 3). Vyskytují se jako složky vonných látek malin, borůvek, ostružin, meruněk, manga, banánů, višní, švestek, rajčat, papriky, mrkve, petržele a mnoha jiných druhů ovoce a zeleniny, ale také zeleného a černého čaje a tabáku [3,4].



Obr. 3 Vznik apokarotenoidů z α-karotenu a z luteinu [3]

Kombinovaným účinkem enzymů ze skupiny oxidoreduktas, světla, tepla, kyslíku, hydroniových iontů a dalších faktorů může docházet k isomeraci, oxidaci a degradaci karotenů a xanthofylů. Karotenoidy přítomné ve formě

karotenoproteinů jsou stabilnější než volné látky. Náchylnější vůči změnám podmínek zpracování potravin jsou xanthofyly [4].

Vůči vnějším běžným vlivům, např. změně pH nebo působení redukčních činidel (SO_2), jsou karotenoidy poměrně odolné, ale jsou citlivé na oxidaci [2].

1. 1. 6. Antioxidační aktivita karotenoidů

Hlavní příznivý účinek karotenoidů spočívá v jejich antioxidačních schopnostech. Karotenoidy jsou přírodní antioxidanty, které pomáhají člověku v boji s některými nemocemi. Ačkoli se karotenoidy vzájemně podobají, každý z nich účinkuje specificky na určitou tkáň [10].

Karotenoidy reagují s reaktivními formami kyslíku a proto působí jako antioxidanty. Mechanismus antioxidačního působení karotenoidů se liší od mechanismu působení vitaminu E nebo syntetických fenolových antioxidantů. V heterogenních systémech, jako jsou emulze, nejsou výrazné rozdíly mezi jednotlivými karotenoidy. V homogenních systémech, např. v bezvodých tucích a olejích, se však jednotlivé látky svými antioxidačními vlastnostmi poněkud liší. Za anaerobních podmínek, resp. v přítomnosti malého množství kyslíku, vykazují karotenoidy vyšší antioxidační účinky [8,11].

Karotenoidy jako antioxidanty jsou účinné při nízkých koncentracích kyslíku, a tím doplňují antioxidační působení vitaminu E, který je účinný při vyšších koncentracích kyslíku [12].

Běžný atmosferický kyslík O_2 existuje ve stavu tripletovém ($^3O_2$). Excitací tripletového kyslíku vzniká reaktivní singletový kyslík ($^1O_2$), který může reagovat s dvojnou vazbou nenasycených lipidů (minimálně 1450-krát rychleji než tripletový kyslík) a dalších nenasycených sloučenin. Ze složek potravin jsou to hlavně karotenoidy, které jsou schopny zhášet singletový kyslík [8,13,14]. Karotenoidy vykazovaly o tři řády vyšší schopnost inaktivovat singletový kyslík ve srovnání s flavonoidy [15]. Určité karotenoidy, jako například lykopen,

astaxanthin a kanthaxanthin, jsou účinnější při zhášení singletového kyslíku než β-karoten [4].

Za nejvýznamnější faktor způsobující rozpory mezi antioxidační aktivitou *in vitro* a účinkem antioxidantů v lidské organismu se přitom považuje jejich biologická dostupnost, zahrnující tři základní fáze, a to uvolnění daných látek z potravinové matrice, jejich vstřebání v trávicím ústrojí a přestup do buněk [15].

Dokonce ani po více než 25 letech intenzivních studií ještě není zřejmé, jestli karotenoidy mají důležité místo v hierarchii přírodních antioxidantů *in vivo*. Jednou z nejvíce obecně diskutovanou vlastností karotenoidů je jejich schopnost reagovat jako antioxidant nebo prooxidant v závislosti na reakčních podmínkách daného biologického systému [9].

Hlavní význam karotenoidů spočívá v jejich příspěvku k přenosu energie ve fotosyntéze (fungují jako doplňkové fotoaktivní barviva) a v ochraně prokaryot proti zhoubným účinkům světla. Vedle molekul chlorofylů obsahují chloroplasty i některé jiné barviva (pigmenty), např. karotenoidy, které se podílejí na absorpci světla v zelené oblasti a zvyšují tak účinnost jeho zachycování. Jinak však jejich funkce ve fotosyntéze není jasná [2].

1. 1. 7. Význam karotenoidů ve výživě člověka

K nejdůležitějším karotenoidům vedle β-karotenu a lykopenu patří α-karoten, γ-karoten, β-kryptoxanthin, lutein, zeaxanthin, astaxanthin, neoxanthin, violaxanthin, kanthaxanthin a citranaxanthin, které působí jako provitaminy a antioxidanty. Údaje o jejich koncentracích v potravinách jsou dosud značně omezené, ale díky rozvíjející se analytické technice jsou stále upřesňovány [1].

V lidské organismu je podíl na celkové koncentraci cirkulujících karotenoidů následující: lykopen 20-40 %, β-karoten 15-30 % a lutein 10-20 %. Lykopen a β-karoten převládají v krevním séru a lutein v erytrocytech. Průměrná koncentrace luteinu v krevním séru člověka je 0,36 $\mu mol.l^{-1}$ [1].

Vstřebatelnost uvolněných karotenoidů (přirozeně vázaných v chloroplastech nebo chromoplastech) z potravinové matrice je v trávicím ústrojí člověka obecně nízká. Míra a rychlost vstřebávání karotenoidů může být ovlivněna (obvykle zvýšena) předchozím kulinárním zpracováním potravin. Například lykopen je lépe využitelný z rajčatových výrobků než ze syrových rajčat a β-karoten z tepelně opracované mrkve či špenátu než ze syrové zeleniny [15].

Isomerické formy (*cis/trans*) karotenoidů mohou být důležitým faktorem v biologické aktivitě karotenoidů, především ve vztahu k jejich biologické dostupnosti, přenosu a ukládání v tekutinách a tkáních lidského těla [9].

Za antioxidačně vysoce účinný **karotenoidový mix**, jehož složky se ve svých účincích vzájemně podporují (tzv. synergismus) se považuje: β-karoten, α-karoten, γ-karoten, lutein, zeaxanthin a lykopen [16].

Doporučené denní dávky karotenoidů jsou následující:

- β-karoten 1-6 mg,
- lutein 1-5 mg,
- zeaxanthin 1 mg,
- karotenoidy (celkově) 6-10 mg [17].

Vyšší denní dávky karotenoidů než doporučené, získané ať už z potravy nebo z doplňků stravy, mohou oranžově zbarvit kůži, zvláště na dlaních a chodidlech. Tento příznak je neškodný a postupně vymizí, snížíme-li denní dávky karotenoidů [10].

Pro antioxidační vlastnosti se karotenoidy uplatňují v prevenci degenerativních procesů a jako antikarcinogenní látky [3,4]. V případě β-karotenu se pozitivní účinek na lidský organismus zvyšuje jen do určité dávky. Vysoké dávky β-karotenu mohou totiž působit negativně, tj. zvyšovat riziko nádorových onemocnění a/nebo urychlovat jejich rozvoj, což za těchto podmínek souvisí s jeho možnou konverzí na prooxidant [15].

Karotenoidy (především β-karoten) chrání lidskou kůži před vysokou intenzitou slunečního záření a UV zářením, které může vést k poškození kůže,

popř. být příčinou rakoviny kůže. Karotenoidy mají také pozitivní vliv na imunitní systém člověka [9].

Karotenoidy jsou nejdůležitějším zdrojem provitaminů A pro lidskou populaci. Aktivitu vitaminu A (antixeroftalmický vitamin, vitamin proti xeroftalmii, šeroslepotě) vykazuje asi 50 přirozeně se vyskytujících sloučenin ze skupiny karotenoidů, které se nazývají provitaminy A. Nejznámějším a nejvýznamnějším provitaminem A je β-karoten. V potravinách je často doprovázen α-karotenem, γ-karotenem a xanthofyly (β-kryptoxanthinem, echinenonem) a dalšími provitaminy A. Další karotenoidy, jako jsou α-kryptoxanthin, lutein a zeaxanthin, vykazují naproti tomu asi poloviční aktivitu jako provitaminy A [4,8,9].

U živočichů, ale i u ptáků a ryb, jsou provitaminy A (karotenoidy obsahující alespoň jeden β-jononový cyklus) transformovány na *all-trans*-retinal neboli retinaldehyd. Z β-karotenu (symetrickým štěpením molekuly β-karoten 15,15´-dioxygenasou) vznikají dvě molekuly retinalu, ostatní provitaminy A poskytují pouze jednu molekulu retinalu. Retinal je reversibilně redukován retinoldehydrogenasou na *all-trans*-retinol (axeroftol či vitamin A_1), který je nejvýznamnějším biologicky aktivním apokarotenoidem živočišných tkání [8]. Retinol je významný především v biochemii zrakového vjemu. Biochemie vidění je složitý proces. V tomto procesu isomeruje *all-trans*-retinol na 11-*cis*-retinol a ten je enzymově oxidován na příslušný aldehyd, 11-*cis*-retinal, který se specificky váže na zrakový protein opsin, čímž dojde k vytvoření rhodopsinu. Vzniklý komplex je vizuálním pigmentem (fotoreceptorem), který zahajuje kaskádu, jež světlo (fotony) dopadající na sítnici oka převádí na elektrický impuls čili nervový signál. Pohlcením fotonu ze světla se rhodopsin štěpí na opsin a *all-trans*-retinal, který je nezbytný pro udržování této cyklické reakce. Celkový průběh fotorecepce vyjadřuje tzv. Waldův cyklus [7,8,11,12,14,18].

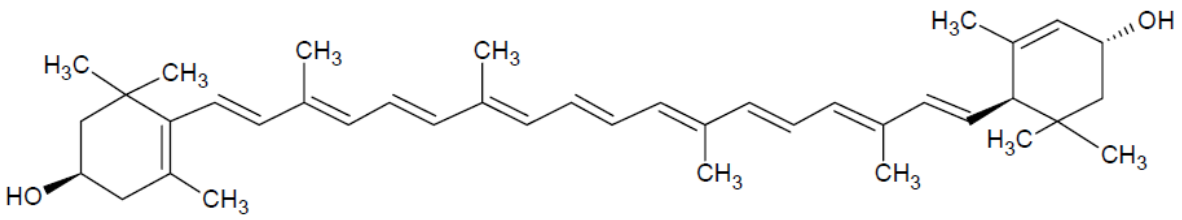
Přestože až dosud bylo v potravě identifikováno přes šest set karotenoidových barviv, lidský organismus jich umí využít pouze šest. Sem patří kromě β-

karotenu, který je z nich nejznámější, také α-karoten, lutein, lykopen, kryptoxanthin a zeaxanthin [10].

V tomto století se očekává plné využití pěti nejúčinnějších karotenoidů, a to α-karotenu, β-karotenu, lykopenu, luteinu a zeaxanthinu [19].

1. 2. Lutein

Lutein, systematickým názvem (3*R*,3´*R*,6´*R*)-β,ε-karoten-3,3´-diol nebo také 3,3´-dihydroxy-α-karoten, má chemický vzorec $C_{40}H_{56}O_2$, strukturní vzorec je na Obr. 4. Jako potravinářské barvivo má lutein označení E161b, molární hmotnost 568,87 g.mol^{-1}, teplota tání 190 °C a symbol CAS 127-40-2. V čisté formě je lutein červeno-oranžová krystalická látka, nerozpustná ve vodě, rozpustná v tucích a v organických rozpouštědlech [4,5,20].



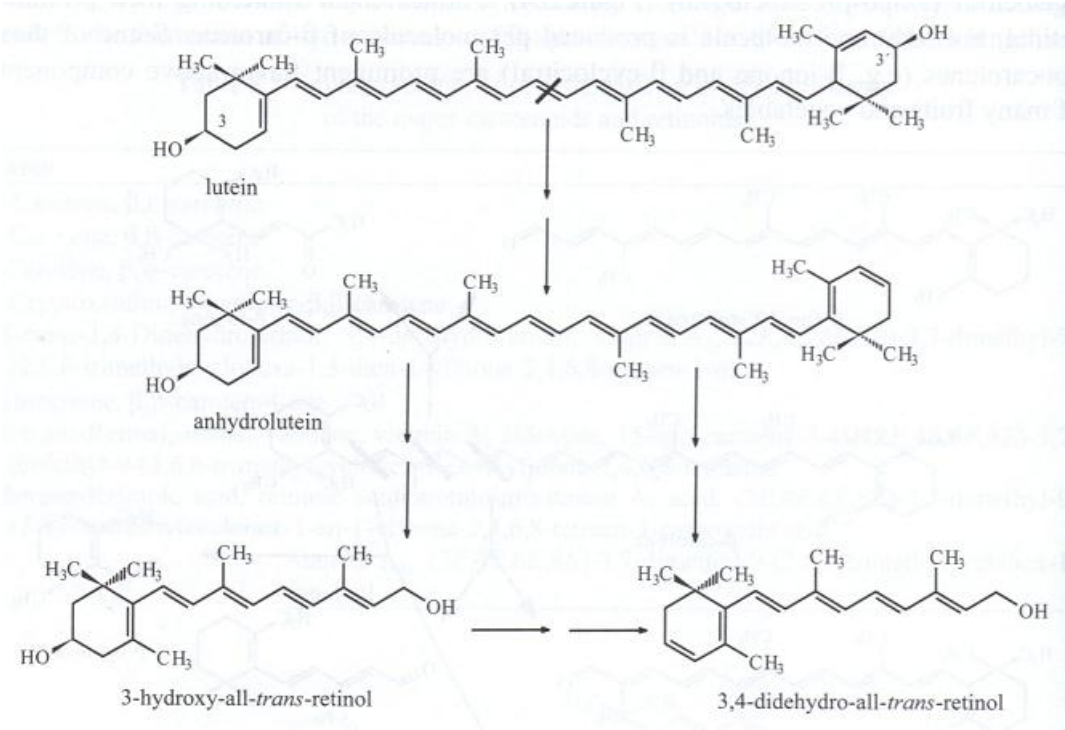
Obr. 4 Strukturní vzorec luteinu

Lutein (z lat. *luteus* znamená „žlutý“) je žluté rostlinné barvivo patřící do „chemické rodiny“ karotenoidů, resp. xanthofylů. Je přítomen v mnoha druzích ovoce a zeleniny, zejména v listové zelenině, ale také ve vaječném žloutku a v očních tkáních [21-25].

Lutein se v těle člověka nemění ve vitamin A, ale je účinným antioxidantem. Vyniká ochranou očí, protože neutralizuje volné radikály, které vznikají působením ultrafialových paprsků na oční sítnici. Zastavuje také degenerativní změny na žluté skvrně, jež bývá příčinou slepoty [19].

Člověk není schopen syntetizovat lutein a proto jeho příjem zcela závisí na přírodních zdrojích jako je ovoce a zelenina nebo na doplňcích stravy [21,24].

Sladkovodní ryby přeměňují lutein na anhydrolutein, který se štěpí na příslušné aldehydy. Z nich vznikají redukcí *all-trans*-3,4-didehydroretinol (vitamin A_2) a *all-trans*-3-hydroxyretinol, který se může dehydratovat za vzniku další molekuly vitaminu A_2 (Obr. 5). U mořských ryb, ptáků a savců se tento vitamin netvoří [5,8].

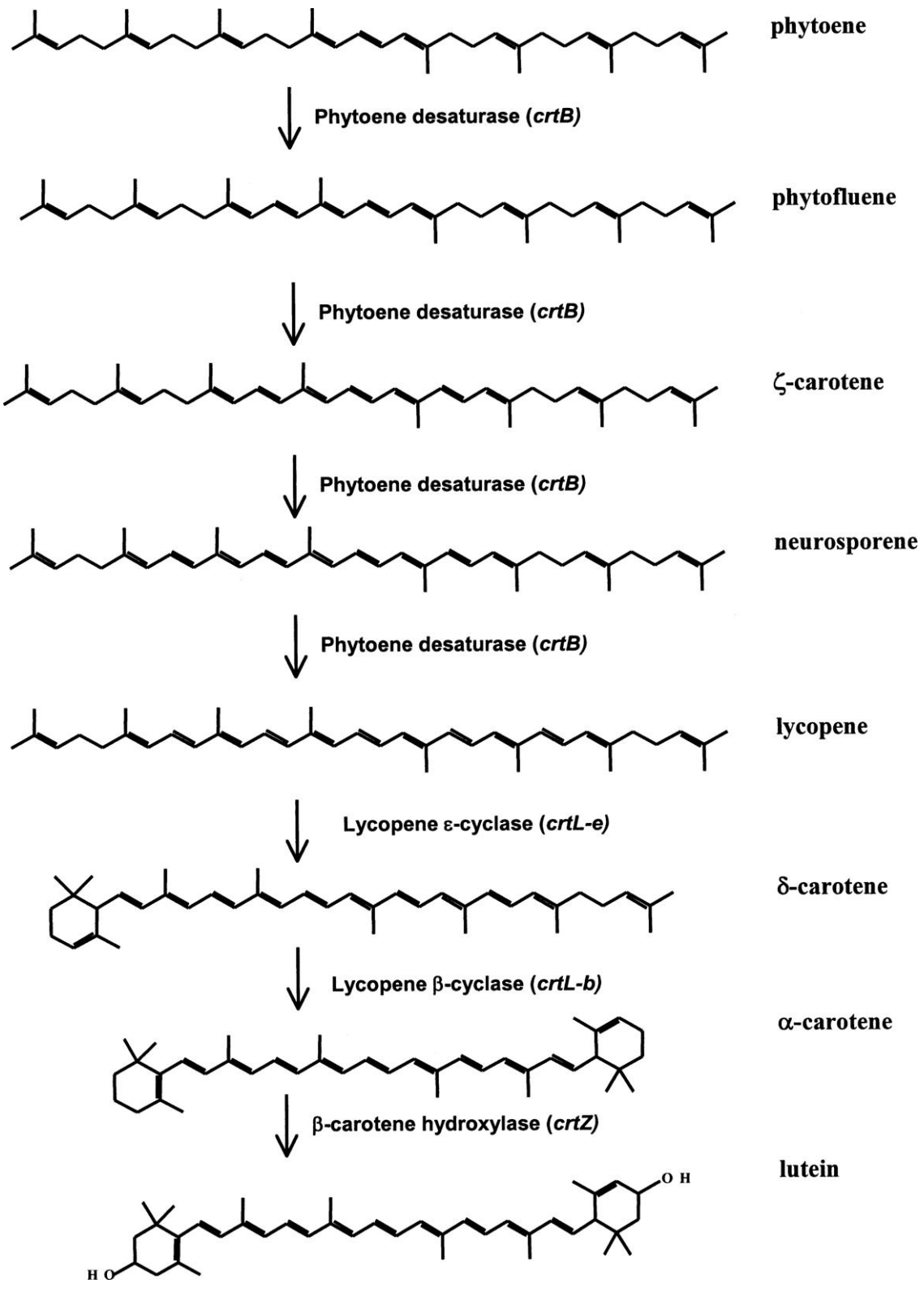


Obr. 5 Vznik vitaminu A_2 z luteinu [5]

1. 2. 1. Syntéza luteinu a jeho isomerické formy

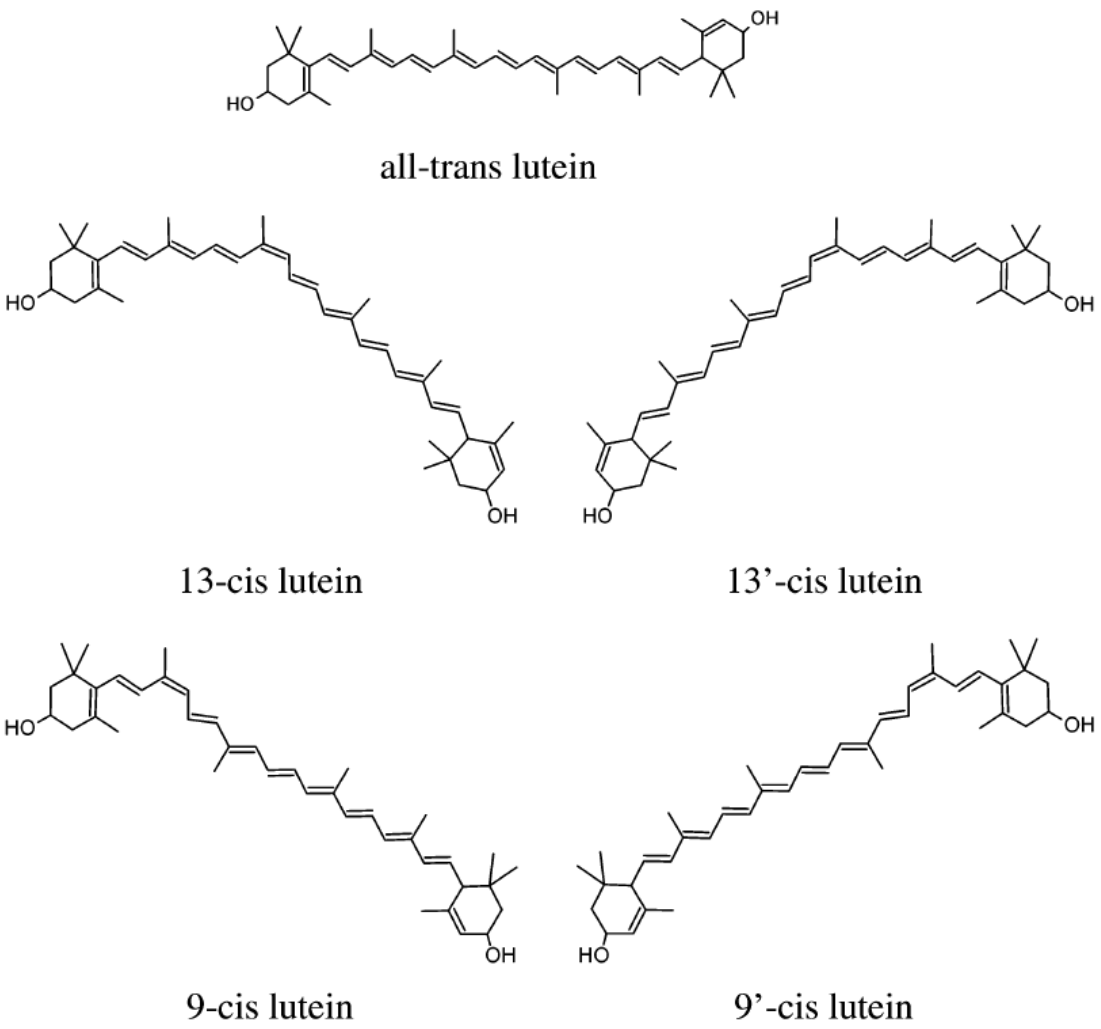
Biosyntéza *all-trans*-luteinu v rostlinách se stává středem zájmu výzkumníků z důvodu zvýšení produkce luteinu rostlinami pomocí genových manipulací rostlin [24]. Schéma biosyntézy luteinu je znázorněno na Obr. 6.

Chemická syntéza *all-trans*-luteinu neboli (3*R*,3´*R*,6´*R*)-luteinu je velmi obtížná a časově náročná. Molekula luteinu obsahuje tři centra chirality (C3, C3´a C6´) a proto může vzniknout osm stereoisomerů luteinu [26].



Obr. 6 Biosyntéza luteinu [24]

Rostlinné materiály obsahují *all-trans*-isomer luteinu, ale byly detekovány i *cis*-isomery luteinu znázorněné na Obr. 7, které vznikají i působením světla, teploty a dalších faktorů během extrakce a analýzy vzorků [24,27,28].



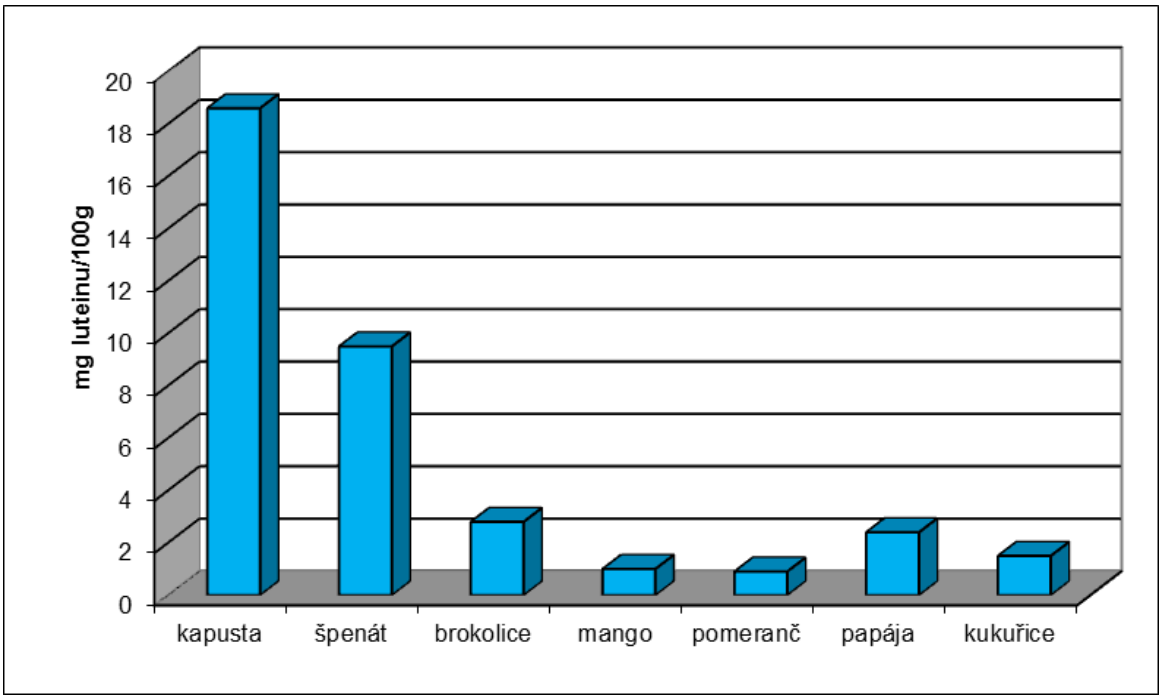
Obr. 7 Chemická struktura isomerů luteinu [28]

1. 2. 2. Přírodní zdroje luteinu

V rostlinných materiálech je lutein přítomen ve dvou formách:

a) ve formě volného luteinu – např. v listové zelenině (kapusta, špenát a brokolice),
b) ve formě esteru luteinu s mastnými kyselinami – např. v ovoci (mango, pomeranč, papája a jiné) a v zelenině (zelená a červená paprika, žlutá kukuřice a jiné) [24,29,30].

Koncentrace luteinu v poživatelných přírodních zdrojích, zejména v zelenině a ovoci, závisí na druhu, odrůdě, stupni zralosti, části plodu, ale také na jejich tepelné úpravě či způsobu konzervace nebo skladování [24]. Obsah luteinu v některých druzích čerstvé zeleniny a ovoce je znázorněn na Obr. 8.



Obr. 8 Obsah luteinu ve vybrané čerstvé zelenině a ovoci [24,30]

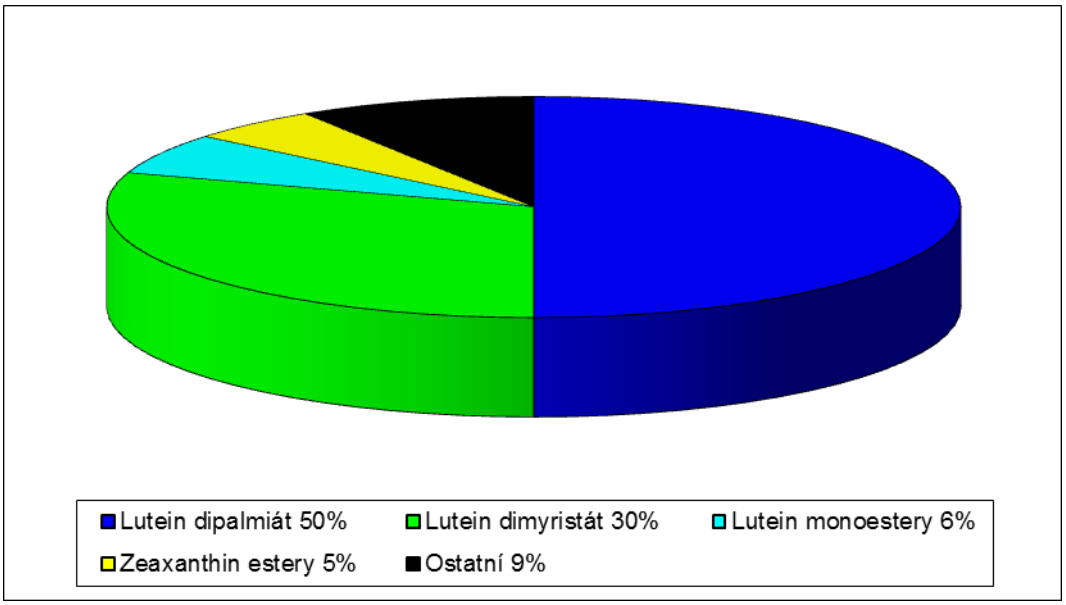
Biologická dostupnost a využitelnost luteinu z potravy závisí na jeho zdrojích a je velmi různorodá. Využitelnost luteinu z vaječného žloutku je vysoká, z ovoce nízká a z listové zeleniny velmi nízká [24,31-35]. Vhodná tepelná úprava potravin zvyšuje relativní využitelnost luteinu [36].

1. 2. 3. Komerční zdroje luteinu

Bohatým zdrojem luteinu je aksamitník vzpřímený (*Tagetes erecta* L., Obr. 9), který se pro komerční účely pěstuje v Mexiku, Peru, Ekvádoru, Španělsku, Indii a Číně [21,24,25,37].

Obr. 9 Aksamitník vzpřímený (*Tagetes erecta* L.) [38]

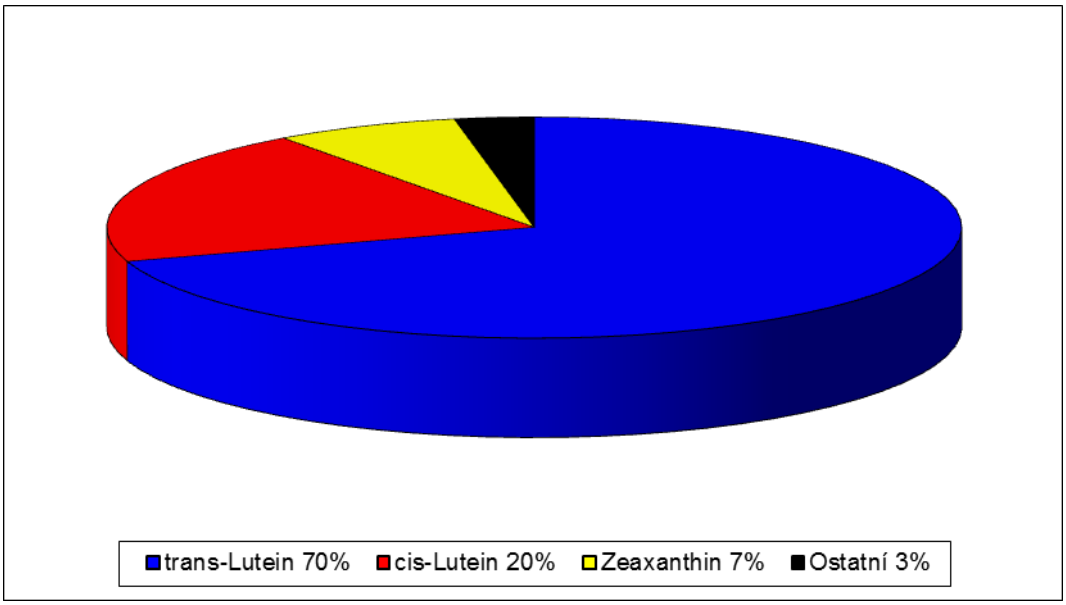
Sušené květy aksamitníku vzpřímeného obsahují 0,10 - 0,16 % karotenoidů, z toho 80 % tvoří diestery luteinu, jejichž složení je na Obr. 10 [21].



Obr. 10 Složení karotenoidů v sušených květech aksamitníku vzpřímeného [21]

Extrakcí sušených a rozemletých květů aksamitníku vzpřímeného se získává nepolární extrakt (z ang. oleoresin), který je důležitým komerčním zdrojem luteinu. Během technologického procesu se vlivem tepla, světla, vzdušného kyslíku a kyselin, katalyzuje isomerace *trans*-luteinu na *cis*-lutein. Složení nepolárního extraktu z aksamitníku vzpřímeného je na Obr. 11. Purifikací

nepolárního extraktu se získává lutein ester nebo jeho následnou saponifikací se získává volný lutein [21].



Obr. 11 Složení nepolárního extraktu z aksamitníku vzpřímeného [21]

Obě formy luteinu, jak lutein ester tak volný lutein, se komerčně používají jako suroviny pro výrobu doplňků stravy. Výrobci luteinu pro komerční účely nabízí lutein nebo lutein ester v práškové, v olejové nebo v enkapsulované formě (z ang. „beadlets“), Obr. 12 [21].

Obr. 12 Komerční formy luteinu [38]

I když je v současné době nejdůležitějším zdrojem luteinu, který se používá ke komerčním účelům, extrakt z květů aksamitníku vzpřímeného, objevují se stále častěji studie o alternativních přírodních zdrojích tohoto významného karotenoidu, resp. xanthofylu. Biotechnologická produkce luteinu pomocí řas či mikrořas (např. *Botryococcus braunii, Chlorella pyrenoidosa., Scenedesmus almeriensis, Coccomyxa acidophila*) začíná být považována za ekonomicky zajímavou alternativou pro komerční využití. Z 1 kg suché biomasy lze extrakcí získat 10 g luteinu [39-47].

1. 2. 4. Lutein ve výživě člověka

Lutein je velmi důležitý pro zrak. Hromadí se ve dvou oblastech očí – v tzv. žluté skvrně (lat. *macula lutea*) na sítnici a v oční čočce. Lidé s degenerací žluté skvrny mají často celotělový nedostatek luteinu a malé, neefektivní zásoby tohoto karotenoidu v oku. Vzhledem k roli žluté skvrny v „jemném“ i „centrálním“ vidění může její degenerace vést k vážnému zhoršení zraku a slepotě [10,48-50].

Lutein je životně důležitou součástí oční sítnice a chrání oči před poškozením ultrafialovým zářením a následnou ztrátou zraku. Luteinu funguje jako filtr modrého světla (v rozmezí vlnových délek od 400 do 460 nm), které způsobuje nevratné poškození oční sítnice. Tento významný karotenoid snižuje riziko makulární degenerace a šedého zákalu [24,50-56].

Věkem podmíněná makulární degenerace (z ang. Age-related Macular Degeneration – AMD nebo ARMD) je zdravotní stav, který vede ke ztrátě zraku ve středu zorného pole v důsledku poškození oční sítnice. V rozvinutých zemích je hlavní příčinou oslepnutí osob nad 55 let, u nás postihuje každého dvacátého seniora. Toto onemocnění poškozuje makulu, což je centrální část oční sítnice, která je důležitá pro jasné a ostré vidění. Jak nemoc postupuje, v centrálním poli vidění se postupně objevují slepé skvrny. Studie ukazují, že strava bohatá na lutein snižuje riziko vzniku makulární degenerace [51].

Studie potvrzují, že zvýšený příjem luteinu (v potravě nebo v doplňcích stravy) souvisí se zvýšením hodnoty optické hustoty makulárního pigmentu (z ang. Macular Pigment Optical Density – MPOD). Nízká hladina makulárního pigmentu má za následek poškození oční sítnice, a tím je vyšší riziko výskytu věkem podmíněné makulární degenerace [53,55,57-59].

Dočasné oslepnutí neboli fotofobie nastane po přímém ozáření světlem vysoké intenzity (např. světla protijedoucího auta), které má za následek nepříjemný pocit až bolest očí. Fotofobie se poměrně často vyskytuje u lidí s makulární degenerací. Vyšší hladina makulárního pigmentu zvyšuje viditelnost a snižuje nepříjemný pocit v přítomnosti oslnivého zdroje světla [55,59].

Hlavní příčinou zhoršeného zraku v rozvinutých zemích je šedý zákal (katarakta, z ang. cataract). S postupujícím věkem oční čočka ztrácí průhlednost a tím dochází ke zhoršení zraku (zastřené vidění a ztráta vnímání podrobností). Ačkoli se spojitost mezi luteinem a šedým zákalem ještě stále zkoumá, studie nasvědčují tomu, že tento karotenoid může působit jako vnitřní sluneční brýle filtrující škodlivé ultrafialové paprsky [24,51,55,60].

Lutein hraje důležitou roli v percepčním jevu, nazvaném Haidingerův snop, umožňující člověku spatřit a určit rovinu polarizovaného světla či směr rotace kruhově polarizovaného světla [9].

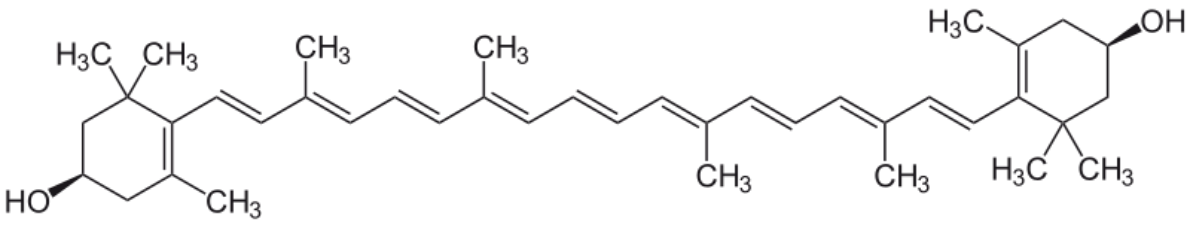
Nedávno dokončený výzkum naznačuje, že lutein rovněž chrání proti nemocem srdce a rakovině. Je rozpustný v tucích, a proto jej přenáší jedna z forem cholesterolu – lipoprotein o nízké hustotě. Lutein také pravděpodobně přispívá k funkčnosti imunitního systému [24,48].

Lutein je velice důležitým antioxidantem. Má silné antioxidační vlastnosti a preventivně chrání oči a pokožku před silným slunečním zářením, nečistotou v ovzduší, zplodinami kouření a UV zářením. Lutein zabraňuje peroxidaci tuků, která je značná jak v krevním séru, tak i v očích. Vysoké dávky luteinu snižují riziko vzniku rakoviny děložního hrdla [10,24,56].

Mnoho vědeckých studií se zabývalo antioxidační aktivitou luteinu v modelových systémech, ale většina z nich nemůže být použita k porovnání antioxidačního účinku luteinu získaného z přírodních zdrojů (z potravy) na lidské zdraví [24].

1. 2. 5. Zeaxanthin

Zeaxanthin, systematickým názvem (3*R*,3´*R*)-β,β-karoten-3,3´-diol nebo také 3,3´-dihydroxy-β-karoten, má chemický vzorec $C_{40}H_{56}O_2$, strukturní vzorec je na Obr. 13. Jako potravinové barvivo má zeaxanthin označení E161h, molární hmotnost 568,87 $g.mol^{-1}$, teplotu tání 215,5 °C a symbol CAS 144-68-3. V čisté formě je zeaxanthin červeno-oranžová krystalická látka, nerozpustná ve vodě, rozpustná v tucích a v organických rozpouštědlech [4,5,20].



Obr. 13 Strukturní vzorec zeaxanthinu

Zeaxanthin je žlutooranžové rostlinné barvivo, zvláště hojný v kukuřici, v tmavozelené zelenině, dýni a červených paprikách, je obsažen i ve vaječném žloutku [10].

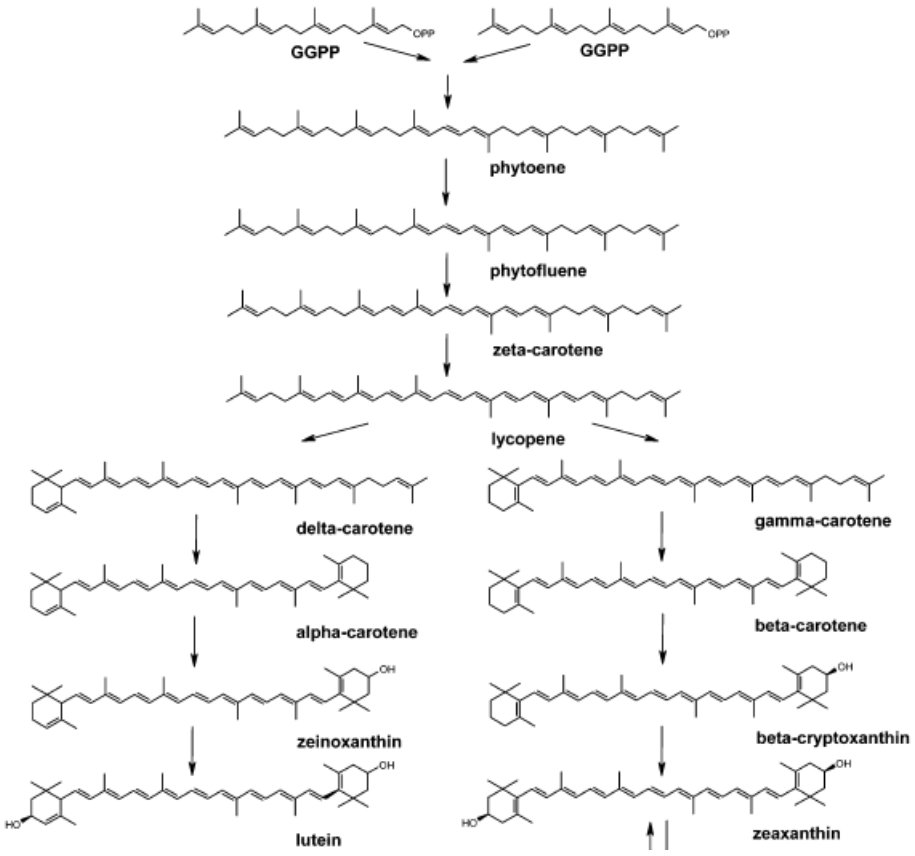
Lutein a zeaxanthin mají stejný chemický vzorec. Zeaxanthin je isomer luteinu, ale není jeho stereoisomerem. Přírodní forma *all-trans*-zeaxanthinu je (3*R*,3´*R*)-zeaxanthin. Zeaxanthin má dvě centra chirality (C3 a C3´), ale existuje jen ve třech různých stereoisomerech, protože molekula zeaxanthinu je symetrická a stereoisomery (3*R*,3´*S*)-zeaxanthin a (3*S*,3´*R*)-zeaxanthin jsou identické. Tyto stereoisomery se nazývají *meso*-zeaxanthin [61].

Zeaxanthin je obsažen v oční sítnici jako složka makulárního pigmentu a také v oční čočce. Poměr luteinu, zeaxathinu a *meso*-zeaxathinu ve žluté skvrně lidského oka je 1:1:1. V oční sítnici je poměr luteinu k zeaxanthinu 3:1 [49,55].

Lidské tělo není schopno syntézy zeaxanthinu, ale je za určitých okolností schopno přeměnit lutein v zeaxanthin, nikoliv však naopak [48,62]. Nedávná studie prokázala, že *meso*-zeaxanthin je metabolickým produktem luteinu [59].

Zeaxanthin chrání oči podobně jako lutein před ultrafialovým zářením, které může vyvolat degeneraci oční sítnice a postupné oslepnutí. Pomáhá tak snižovat riziko makulární degenerace a poruch zraku spojených s věkem, které jsou hlavní příčinou slepoty u starších lidí. Zeaxanthin pomáhá v boji proti srdečním nemocem a chrání také před některými druhy nádorů tím, že potlačuje růst nádorových buněk. Vysoké dávky zeaxanthinu snižují riziko vzniku rakoviny děložního hrdla [10,19,51,62].

Rozdíl mezi biosyntézou luteinu a zeaxanthinu je znázorněn na Obr. 14 [63].



Obr. 14 Biosyntéza luteinu a zeaxanthinu [63]

1. 3. Doplňky stravy

1. 3. 1. Doplňky stravy v potravinářské legislativě

Požadavky na potraviny a na provozovatele potravinářských podniků má každá země stanoveny ve svém národním právním systému. V České republice je základním předpisem Zákon o potravinách a tabákových výrobcích č. 110/1997 Sb. v platném znění (viz. Zákon č. 224/2008 Sb.). Zákonem jsou definovány i pojmy, které se v potravinářské legislativě používají:

- **Doplňky stravy** jsou potraviny, jejichž účelem je doplňovat nutriční hodnotu běžné stravy ve formě koncentrovaných zdrojů vitaminů a minerálních látek nebo dalších látek s nutričním nebo fyziologickým účinkem; jsou určené k přímé spotřebě v malých odměřených množstvích.

- **Potravní doplňky** jsou látky s významným biologickým účinkem (vitaminy, minerální látky, aminokyseliny, mastné kyseliny apod.), které se přidávají do potravin za účelem zvýšení nutriční hodnoty.

- **Výživové tvrzení** je údaj o zvláštních výživových vlastnostech (snížený nebo zvýšený obsah živin nebo energetické hodnoty).

- **Zdravotní tvrzení** je tvrzení, ze kterého vyplývá, že existuje souvislost mezi potravinou nebo některou její složkou a zdravím, např. snížení rizika vzniku určitého onemocnění; výživová a zdravotní tvrzení musí být založena na všeobecně uznávaných vědeckých poznatcích a každý, kdo taková tvrzení uvádí, musí být schopen je doložit [4].

1. 3. 2. Doplňky stravy s luteinem

Na celém světě vzrůstá zájem o zdravý životní styl a nikdo už nepochybuje o tom, že největší důraz je třeba klást na prevenci zdravotních potíží a nemocí.

Lutein je přírodní látka, kterou získáváme v omezené míře z potravin a/nebo z doplňků stravy, v nichž je obsah luteinu přesně definován [16].

Kvůli relativně nízké biologické využitelnosti luteinu z přírodních zdrojů je doporučována konzumace potravin obohacených o lutein nebo užívání doplňků stravy s obsahem luteinu [24].

Denní doporučená dávka luteinu je 6 až 10 mg. Některé studie dokonce doporučují denní dávku až 20 mg luteinu [22,23,42,50,54,56,59,97,135].

Zdroje [52,53] uvádí, že vztah mezi zvýšeným příjmem luteinu a sníženým rizikem výskytu makulární degenerace a šedého zákalu není dostatečně prokázána k zavedení zdravotního tvrzení a doporučuje další klinické studie.

1. 4. Stanovení luteinu metodou HPLC

Kapalinová chromatografie byla použita pro separaci biologicky aktivních lýtek před více než 100 lety. V původně navržené kapalinové chromatografii na normální fázi se používá polární stacionární fáze a nevodná mobilní fáze, jako je aceton, chloroform, benzen atd. Uvedené chromatografické uspořádání bylo postupně nahrazeno separacemi na reverzních fázích, u kterých je separační účinnost (při vhodně zvolených experimentálních podmínkách) výrazně vyšší, a to hlavně pro nepolární látky [64].

V odborné literatuře je jako zdroj luteinu, který je předmětem analýzy, používán rostlinný materiál (ovoce, zelenina, obilí, rýže atd.), živočišný materiál (vejce, mléko, krevní plazma a sérum, oční tkáně atd.), řasy či biomasa, ale také produkty potravinářského průmyslu (džus, víno, kečup, těstoviny, chleba atd.) a krmivářského průmyslu [24,27-37,39,41-43,45,47,49,54,57,58,63,65-124,131].

Vybrané práce [37,73,76,78,80,81,89,100,107,133] se zabývaly stanovením obsahu luteinu v květech (čerstvých nebo sušených) či v nepolárních extraktech získaných z aksamitníku vzpřímeného (*Tagetes erecta* L.), které se používají pro komerční účely k výrobě doplňků stravy.

Obsah luteinu v doplňcích stravy (tablety, tvrdé a měkké želatinové tobolky) byl stanoven pomocí HPLC [125-128].

1. 4. 1. Extrakce luteinu

Před HPLC analýzou luteinu je nutná jeho předchozí extrakce ze vzorku. Metoda extrakce organickými rozpuštědly (polárními, nepolárními a jejich kombinace) je nejpoužívanější a také nejméně instrumentálně náročnou metodou. V závislosti na charakteru analyzovaného vzorku je tento způsob extrakce používán buď samostatně nebo v kombinaci s předchozí saponifikací vzorku [24].

Rozpustnost a stabilita luteinu v organických rozpouštědlech používaných pro extrakci je velmi rozmanitá. Kombinace organických rozpouštědel může mít pozitivní, ale i negativní vliv na výsledek následující HPLC analýzy. Byla také prověřena možnost použití organických rozpouštědel s ohledem na životní prostředí a bezpečnou manipulaci [129-131].

Publikované výsledky využití superkritické fluidní extrakce tekutým CO_2 k extrakci luteinu nebyly pozitivní [44,46,132,134]. Zdroj [133] doporučuje využití tohoto způsobu extrakce k oddělení stereoisomerů luteinu.

1. 4. 2. Výběr chromatografické kolony

V odborné literatuře je většinou používána pro stanovení luteinu pomocí HPLC chromatografická kolona s náplní C_{18} [24,29,31-35,39,41-43,45,47,57,63,65-70,72,74,77,79,81,85,86,88-92,94,98-100,103,104,106,107, 112,113,116,118,122,128,130].

Pro přesnější HPLC analýzy byla použita kolona s náplní C_{30}, která je velmi vhodná i pro oddělení jednotlivých *trans*- a *cis*- isomerů luteinu [24,28,30,36,37, 73,75,76,78,80,82-84,93,95-97,101,102,105,108-111,114-117,119,120,123-128, 131,134].

Pro stanovení chemických látek se stejnou molekulovou hmotností, jako jsou lutein a zeaxanthin, je doporučováno použití kolony kyanopropylové (s náplní s koncovou skupinou – $(CH_2)_3$–CN) [24,27,49,68,70,71,77,81,88,133].

2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Doplňky stravy obsahující lutein se postupně stávají nedílnou součástí našeho běžného života.

Jejich dostupnost na českém trhu, ať už v lékárnách, supermarketech či v internetových obchodech, je velmi široká a neomezená. Řada těchto doplňků stravy budí podezření poměrně vysokým obsahem účinných látek na straně jedné a nízkou cenou na straně druhé.

Za naprosto nemorální vůči spotřebiteli považujeme to, když doplněk stravy neobsahuje deklarované množství účinné látky (potravního doplňku), který je uveden výrobcem na etiketě výrobku.

Cíle dizertační práce jsme rozdělili do pěti částí:

1. Stanovit obsah luteinu v extraktech z aksamitníku vzpřímeného, které se komerčně používají k výrobě doplňků stravy nebo k obohacení potravin a nápojů karotenoidy, pomocí metody HPLC.
2. Porovnat kvalitu dvou forem surovin obsahujících lutein, enkapsulovaná forma (z ang. „beadlets“) a prášková forma
3. Stanovit obsah luteinu v doplňcích stravy, které jsou dostupné na českém, slovenském, polském a maďarském trhu, pomocí metody HPLC.
4. Porovnat kvalitu tří aplikačních forem doplňků stravy (tableta, měkká a tvrdá tobolka) s obsahem luteinu
5. Porovnat kvalitu doplňků stravy s obsahem luteinu podle zemí původu výrobců

3. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ

3. 1. Výběr vzorků

3. 1. 1. Výběr vzorků surovin

Pro tuto dizertační práci byly vybrány extrakty z aksamitníku vzpřímeného, které se používají pro komerční účely, především jako vstupní suroviny k výrobě doplňků stravy. Obsah luteinu pro komerční označení v názvu surovin používaných výrobci ze zemí původu Čína, Indie, Izrael a Mexiko byl v rozmezí od 5 do 80 %. Vzorky surovin (extraktů) byly rozděleny podle formy suroviny na enkapsulovanou formu (z ang. „beadlets“) a na práškovou formu. Jejich charakteristiky jsou uvedeny v tabulce 1 a 2.

Tab. 1 Enkapsulovaná forma extraktů z aksamitníku vzpřímeného

Označení suroviny (extraktu)	Komerční označení výrobci (dle obsahu luteinu)	Země původu (výrobce)
L1	Lutein 5 %	Indie
L2	Lutein 5 %	Indie
L3	Lutein 5 %	Čína
L4	Lutein 5 %	Čína
L5	Lutein 5 %	Čína
L6	Lutein 5 %	Čína
L7	Lutein 5 %	Izrael
L8	Lutein 10 %	Indie
L9	Lutein 10 %	Čína
L10	Lutein 10 %	Čína
L11	Lutein 20 %	Indie
L12	Lutein 20 %	Indie
L13	Lutein 20 %	Čína
L14	Lutein 20 %	Izrael
L15	Lutein 25 %	Indie
L16	Lutein 25 %	Indie

Tab. 2 Prášková forma extraktů z aksamitníku vzpřímeného

Označení suroviny (extraktu)	Komerční označení výrobci (dle obsahu luteinu)	Země původu (výrobce)
L17	Lutein 5 %	Indie
L18	Lutein 5 %	Čína
L19	Lutein 5 %	Čína
L20	Lutein 5 %	Čína
L21	Lutein 5 %	Čína
L22	Lutein 5 %	Čína
L23	Lutein 5 %	Čína
L24	Lutein 20 %	Čína
L25	Lutein 20 %	Čína
L26	Lutein 20 %	Čína
L27	Lutein 20 %	Čína
L28	Lutein 25 %	Mexiko
L29	Lutein 70 %	Mexiko
L30	Lutein 70 %	Mexiko
L31	Lutein 75 %	Čína
L32	Lutein 75 %	Čína
L33	Lutein 80 %	Čína
L34	Lutein 80 %	Čína

3. 1. 2. Výběr vzorků doplňků stravy

Pro tuto dizertační práci byly vybrány doplňky stravy dostupné na českém, slovenském, polském a maďarském trhu. Deklarovaný obsah luteinu výrobci doplňků stravy ze zemí původu Česká republika, Dánsko, Finsko, Kanada, Maďarsko, Německo, Polsko, Rakousko, Slovensko, Švédsko, Švýcarsko a USA byl v rozmezí od 0,25 mg do 25 mg luteinu v jedné tabletě nebo tobolce.

Vzorky doplňků stravy byly rozděleny podle druhu aplikační formy na tablety, měkké tobolky (z ang. soft capsules) a tvrdé tobolky (z ang. hard

capsules). Jejich charakteristiky jsou uvedeny v tabulce 3 (tablety), v tabulce 4 (měkké tobolky) a v tabulce 5 (tvrdé tobolky).

Všechny vzorky doplňků stravy byly analyzovány před datem spotřeby (expirace) uvedeným výrobcem na etiketě výrobku.

Tab. 3 Analyzované doplňky stravy v aplikační formě tablet

Označení vzorku (doplňku stravy)	Země původu (dle výrobce)	Datum spotřeby (datum expirace)
D1	Česká republika	únor 2013
D2	Česká republika	listopad 2013
D3	Česká republika	listopad 2012
D4	Česká republika	leden 2013
D5	Česká republika	březen 2013
D6	Česká republika	květen 2013
D7	Česká republika	únor 2013
D8	Dánsko	březen 2013
D9	Finsko	duben 2014
D10	Finsko	srpen 2012
D11	Kanada	únor 2013
D12	Maďarsko	květen 2013
D13	Maďarsko	březen 2013
D14	Německo	listopad 2012
D15	Německo	březen 2013
D16	Německo	červen 2013
D17	Polsko	srpen 2013
D18	Rakousko	duben 2013
D19	Rakousko	únor 2013
D20	Slovensko	srpen 2012
D21	Švédsko	červenec 2012
D22	Švýcarsko	květen 2014

Tab. 4 Analyzované doplňky stravy v aplikační formě měkkých tobolek

Označení vzorku (doplňku stravy)	Země původu (dle výrobce)	Datum spotřeby (datum expirace)
D23	Česká republika	červen 2014
D24	Česká republika	březen 2013
D25	Česká republika	květen 2013
D26	Česká republika	červen 2012
D27	Česká republika	březen 2013
D28	Česká republika	srpen 2012
D29	Česká republika	červenec 2013
D30	Česká republika	březen 2013
D31	Česká republika	květen 2014
D32	Česká republika	červen 2012
D33	Maďarsko	září 2012
D34	Německo	listopad 2013
D35	Německo	leden 2014
D36	Polsko	listopad 2012
D37	Slovensko	květen 2014
D38	Švýcarsko	únor 2013
D39	Švýcarsko	září 2012
D40	USA	únor 2014

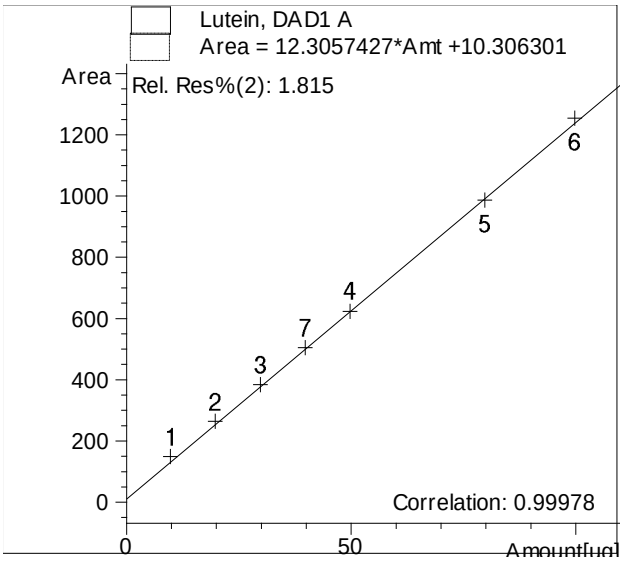
Tab. 5 Analyzované doplňky stravy v aplikační formě tvrdých tobolek

Označení vzorku (doplňku stravy)	Země původu (dle výrobce)	Datum spotřeby (datum expirace)
D41	Česká republika	březen 2014
D42	Česká republika	květen 2013
D43	Česká republika	duben 2014
D44	Česká republika	leden 2014
D45	Maďarsko	listopad 2012
D46	Maďarsko	říjen 2012
D47	Německo	duben 2013
D48	Polsko	březen 2013

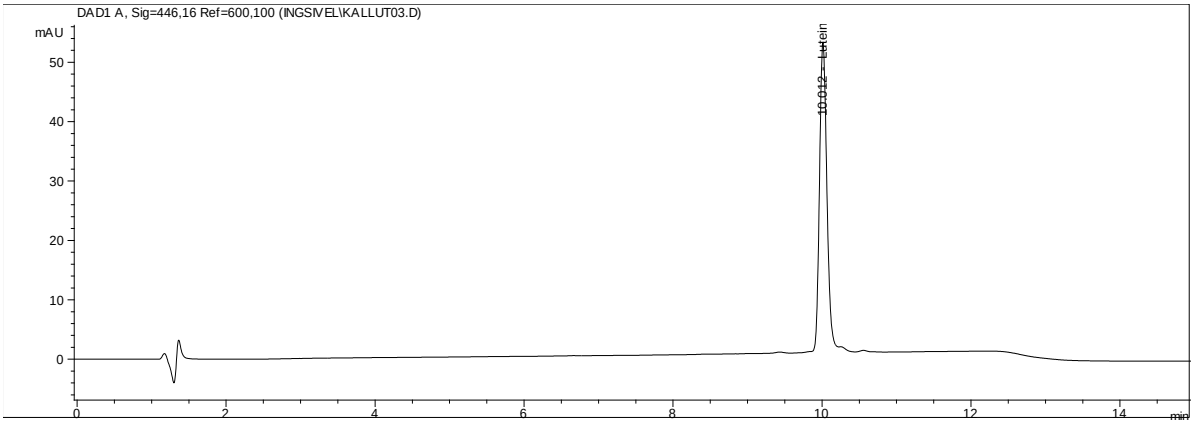
3. 2. Standard luteinu

Standard luteinu byl zakoupen u firmy Extrasynthese (Francie). Standardní roztok luteinu byl připraven navážením 0,50 mg standardu luteinu s přesností 0,01 mg (digitální váhy Mettler-Toledo XP105, Švýcarsko), který byl následně rozpuštěn ve směsi aceton-methanol (1:1 obj.) a pak doplněn na objem 50 ml.

Kalibrační přímka byla naměřena ze standardního roztoku pro různé objemy nástřiku (1, 2, 3, 5, 8 a 10 µl) do HPLC kolony. Kalibrace byla prováděna vždy v den měření. Příklad kalibrační přímky luteinu a chromatogramu standardu luteinu je na Obr. 15 a 16.



Obr. 15 Kalibrační přímka luteinu



Obr. 16 Chromatogram standardu luteinu

3. 3. Příprava vzorků

Příprava extraktu ze suroviny

Vzorek suroviny (5,00 – 10,00 ± 0,01 mg) byl rozpuštěn v 50 ml směsi aceton-methanol (1:1 obj.). Po dobu 10 minut byl vzorek umístěn do ultrazvukové lázně (Kraintek K5, Česká republika) a následně do multifunkční odstředivky (MPW 350R, Polsko), kde byl po dobu 5 min odstřeďován při otáčkách 12000 min^{-1} (odstředivá síla 23000 x g).

Příprava extraktu z doplňku stravy

Vzorek doplňku stravy (tableta, tobolka) o průměrné hmotnosti 1 g byl rozpuštěn v 50 ml směsi aceton-methanol (1:1 obj.). Po dobu 10 minut byl vzorek umístěn do ultrazvukové lázně (Kraintek K5, Česká republika) a následně do multifunkční odstředivky (MPW 350R, Polsko), kde byl po dobu 5 min odstřeďován při otáčkách 12000 min^{-1} (odstředivá síla 23000 x g).

3. 4. Stanovení luteinu metodou HPLC

HPLC analýza byla provedena na sestavě Agilent Technologies series 1100 (USA) s detektorem DAD při teplotě 30 °C. Signál byl snímám při λ = 446 nm, šířka pásma 16 nm. Referenční signál byl při λ = 600 nm, šířka pásma 100 nm.

Typ kolony ZORBAX SB CN (75 mm x 4,6 mm, 3,5 μm).

HPLC s obrácenými (reverzními) fázemi při průtoku mobilní fáze kolonou 0,7 $ml.min^{-1}$ a s lineární gradientovou elucí probíhající následovně:

Při nástřiku (1 – 5 μl) analyzovaného vzorku v čase 0 min bylo složení mobilní fáze 30 % obj. složky A a 70 % obj. složky B, které se lineárně měnilo a v čase 10 min bylo složení mobilní fáze 0 % obj. složky A a 100 % obj. složky B. Od 10 min do 15 min se složení mobilní fáze lineárně měnilo a složení mobilní fáze v čase 15 min bylo 30 % obj. složky A a 70 % obj. složky B.

Složení jednotlivých složek mobilní fáze:

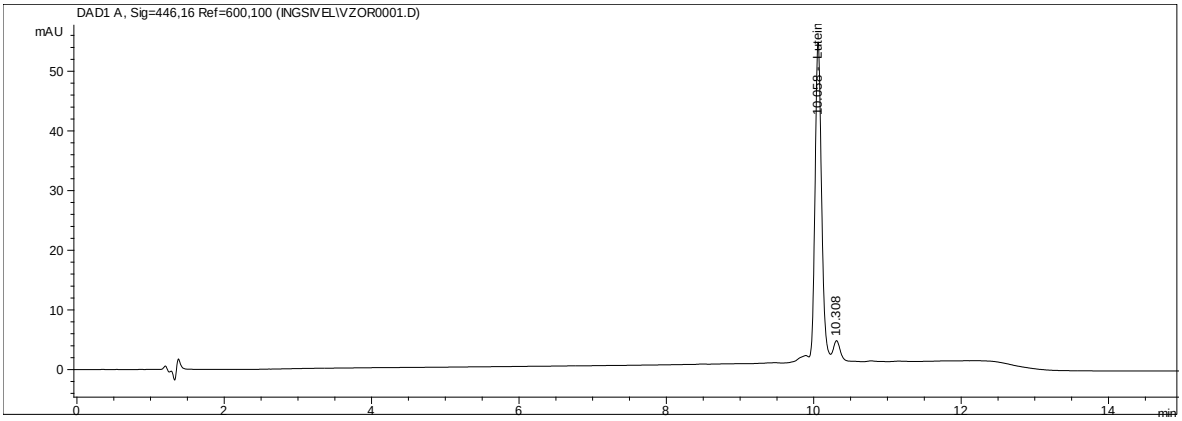
- složka A (3,153 $g.l^{-1}$ mravenčnanu amonného ve vodě)

- složka B (methanol).

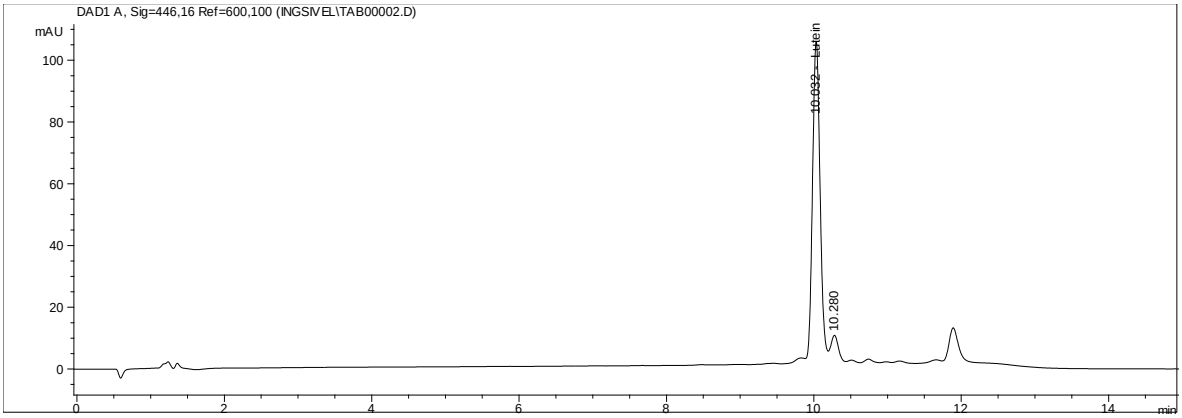
Počet opakování jednoho vzorku: 2

Počet stanovení jednoho vzorku: 3

Příklad chromarogramu analyzovaného vzorku suroviny a doplňku stravy je na Obr. 17 a 18.



Obr. 17 Chromatogram suroviny



Obr. 18 Chromatogram doplňku stravy

Stanovení luteinu metodou HPLC bylo provedeno ve spolupráci s Ústavem chemie a biochemie na Mendelově univerzitě v Brně.

Naměřené hodnoty byly vyhodnoceny variačně statisticky analýzou rozptylu (ANOVA) za použití statistického balíku Unistat, v. 5.1. a Office Excel®Microsoft [136].

4. HLAVNÍ VÝSLEDKY PRÁCE

4. 1. Obsah luteinu v extraktech z aksamitníku vzpřímeného

V této dizertační práci byly analyzovány extrakty z aksamitníku vzpřímeného, které se používají pro komerční účely. Celkem bylo analyzováno 34 vzorků extraktů s obsahem luteinu ve dvou formách, a to 16 vzorků v enkapsulované formě (L1 až L16) a 18 vzorků v práškové formě (L17 až L34). Deklarované obsahy luteinu (získané z certifikátů analýz jednotlivých výrobců) a skutečné (naměřené) obsahy luteinu v komerčních extraktech z aksamitníku vzpřímeného jsou uvedeny v tabulce 6 a 7.

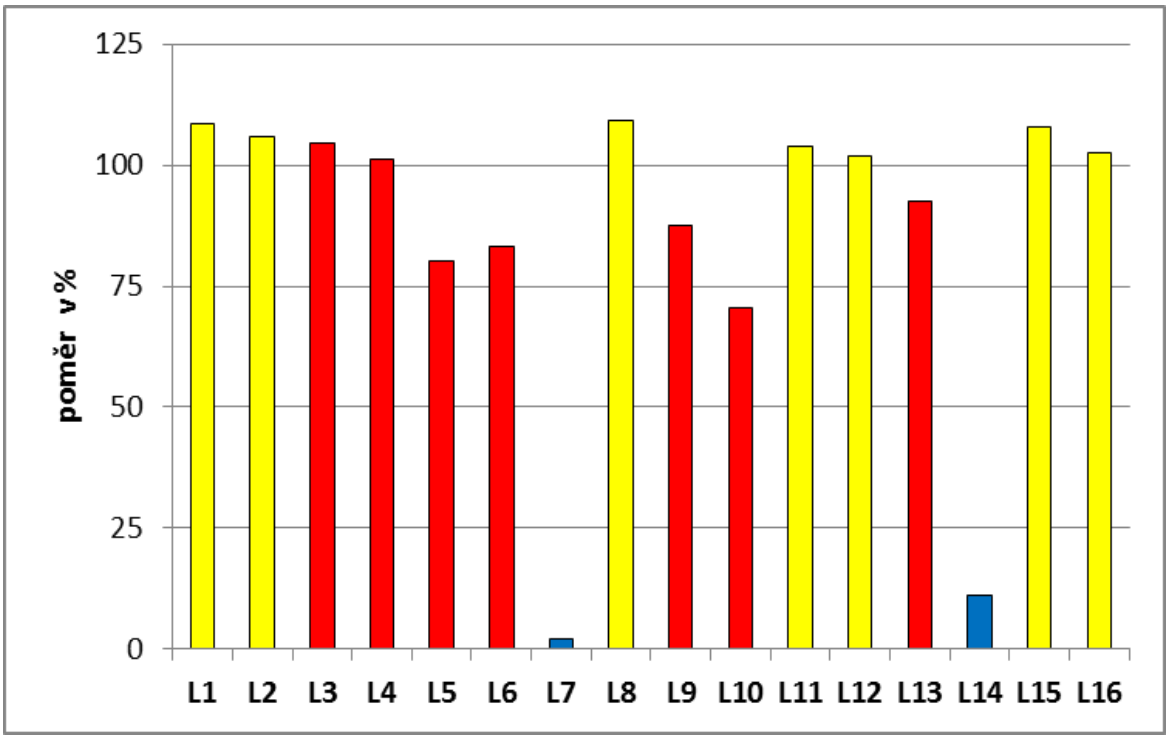
Tab. 6 Obsah luteinu v extraktech (enkapsulovaná forma) z aksamitníku vzpřímeného

Označení suroviny (extraktu)	Komerční označení Výrobci	Deklarovaný obsah luteinu ($mg.g^{-1}$)	Průměrný stanovený obsah luteinu $\bar{x}$ ± S.D. ($mg.g^{-1}$)
L1	Lutein 5 %	67,7	73,56 ± 0,547
L2	Lutein 5 %	65,0	68,74 ± 0,692
L3	Lutein 5 %	56,8	59,35 ± 0,747
L4	Lutein 5 %	54,5	55,09 ± 0,523
L5	Lutein 5 %	64,0	51,26 ± 0,475
L6	Lutein 5 %	50,0	41,64 ± 0,740
L7	Lutein 5 %	89,0	2,02 ± 0,066
L8	Lutein 10 %	116,4	127,13 ± 0,984
L9	Lutein 10 %	104,9	91,70 ± 1,025
L10	Lutein 10 %	114,0	80,48 ± 0,803
L11	Lutein 20 %	215,4	224,06 ± 2,390
L12	Lutein 20 %	235,0	239,40 ± 2,179
L13	Lutein 20 %	204,3	189,16 ± 2,624
L14	Lutein 20 %	215,0	23,83 ± 0,245
L15	Lutein 25 %	272,1	293,19 ± 2,469
L16	Lutein 25 %	265,0	271,44 ± 1,355

Poměry skutečných a deklarovaných hodnot obsahu luteinu pro jednotlivé vzorky extraktů z aksamitníku vzpřímeného v enkapsulované formě (Tab. 6) vyjádřené v procentech jsou graficky znázorněny na Obr. 19. Barevné označení podle země původu je následující: Indie (žlutá), Čína (červená) a Izrael (modrá).

U všech 7 vzorků ze země původu Indie (L1, L2, L8, L11, L12, L15 a L16) byl naměřen vyšší obsah luteinu než deklaroval výrobce těchto extraktů ve specifikaci. To svědčí o vysoké kvalitě suroviny a také o velmi dobře zvládnuté technologii výroby enkapsulované formy, která se používá pro komerční účely s obsahem luteinu v koncentracích 5, 10, 20 a 25 %.

Nejnižší obsahy luteinu byly naměřeny u vzorků L7 a L14, a to 2,02 $mg.g^{-1}$ a 23,83 $mg.g^{-1}$, i když výrobce ze země původu Izrael deklaroval obsah luteinu 89,0 $mg.g^{-1}$ a 215,0 $mg.g^{-1}$.

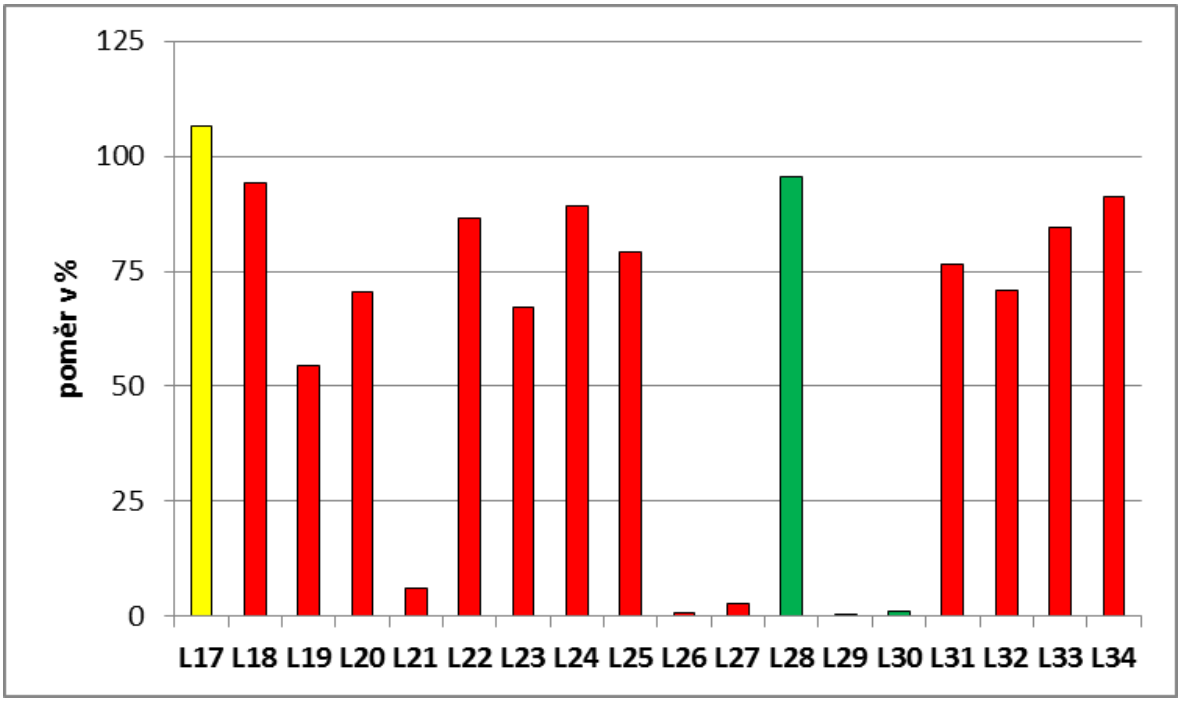


Obr. 19 Poměr skutečné a deklarované hodnoty obsahu luteinu vyjádřený v % (enkapsulovaná forma)

Tab. 7 Obsah luteinu v extraktech (prášková forma) z aksamitníku vzpřímeného

Označení suroviny (extraktu)	Komerční označení Výrobci	Deklarovaný obsah luteinu ($mg.g^{-1}$)	Průměrný stanovený obsah luteinu $\bar{x}$ ± S.D. ($mg.g^{-1}$)
L17	Lutein 5 %	55,0	58,65 ± 0,644
L18	Lutein 5 %	54,2	51,00 ± 0,942
L19	Lutein 5 %	55,2	30,12 ± 0,482
L20	Lutein 5 %	54,3	38,30 ± 0,570
L21	Lutein 5 %	50,0	3,04 ± 0,116
L22	Lutein 5 %	74,0	63,90 ± 0,558
L23	Lutein 5 %	68,9	46,17 ± 0,960
L24	Lutein 20 %	217,2	194,02 ± 2,735
L25	Lutein 20 %	203,0	160,80 ± 2,520
L26	Lutein 20 %	200,5	1,75 ± 0,055
L27	Lutein 20 %	200,0	5,33 ± 0,127
L28	Lutein 25 %	289,6	276,43 ± 1,933
L29	Lutein 70 %	720,2	2,21 ± 0,111
L30	Lutein 70 %	700,0	6,68 ± 0,180
L31	Lutein 75 %	750,0	573,25 ± 4,573
L32	Lutein 75 %	750,0	531,50 ± 4,170
L33	Lutein 80 %	802,3	677,16 ± 6,003
L34	Lutein 80 %	800,0	729,50 ± 6,058

Poměry skutečných a deklarovaných hodnot obsahu luteinu pro jednotlivé vzorky extraktů z aksamitníku vzpřímeného v práškové formě (Tab. 7) vyjádřené v procentech jsou graficky znázorněny na Obr. 20. Barevné označení podle země původu je následující: Indie (žlutá), Čína (červená) a Mexiko (zelená).



Obr. 20 Poměr skutečné a deklarované hodnoty obsahu luteinu vyjádřený v % (prášková forma)

Pouze u jednoho vzorku (L17), a to ze země původu Indie, byl naměřen vyšší obsah luteinu než deklaroval výrobce tohoto extraktu ve specifikaci.

Nejblíže deklarovaným hodnotám obsahu luteinu byly naměřeny skutečné hodnoty obsahu luteinu u vzorků L28 a L18, a to 276,43 $mg.g^{-1}$ a 51,00 $mg.g^{-1}$, i když výrobci ze země původu Mexiko a Čína deklarovali obsah luteinu 289,6 $mg.g^{-1}$ a 54,2 $mg.g^{-1}$.

U všech 14 vzorků (L18 až L27 a L31 až L34) ze země původu Čína byl skutečný obsah luteinu nižší než deklarovaný obsah luteinu výrobci těchto extraktů. Dokonce u poloviny z nich byl skutečný obsah luteinu pod 75 % deklarovaného obsahu luteinu.

Nejnižší obsahy luteinu byly naměřeny u vzorků L26 a L29, a to 1,75 $mg.g^{-1}$ a 2,21 $mg.g^{-1}$, i když výrobci ze země původu Čína a Mexiko deklarovali obsah luteinu 200,5 $mg.g^{-1}$ a 720,2 $mg.g^{-1}$.

4. 2. Kvalita extraktů z aksamitníku vzpřímeného

Ke kvalitativnímu porovnání vzorků enkapsulované formy (L1 až L16) a práškové formy (L17 až L34) extraktů z aksamitníku vzpřímeného bylo použito rozdělení podle poměru skutečného a deklarovaného obsahu luteinu vyjádřeného v % na tři skupiny, a to:

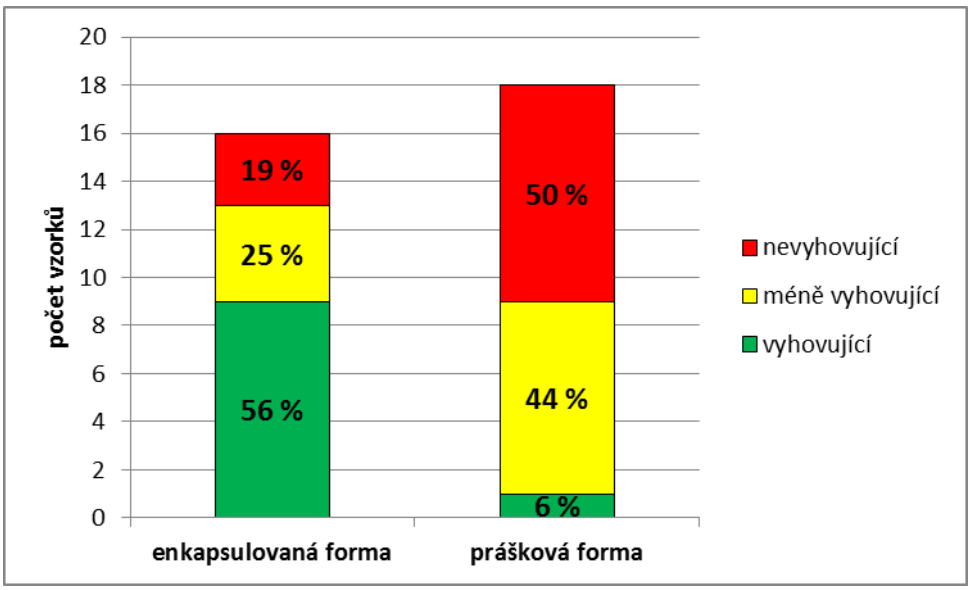
a) vyhovující (hodnota poměru nad 100 %),

b) méně vyhovující (hodnota poměru od 75 do 100 %),

c) nevyhovující (hodnota poměru pod 75 %).

Z níže uvedeného grafu na Obr. 21 vyplývá, že ochrana luteinu před oxidací vzdušným kyslíkem v enkapsulované formě je výrazně vyšší než v práškové formě, protože bylo vyhodnoceno 56 % vzorků luteinu v enkapsulované formě jako vyhovující oproti 6 % vzorků luteinu v práškové formě.

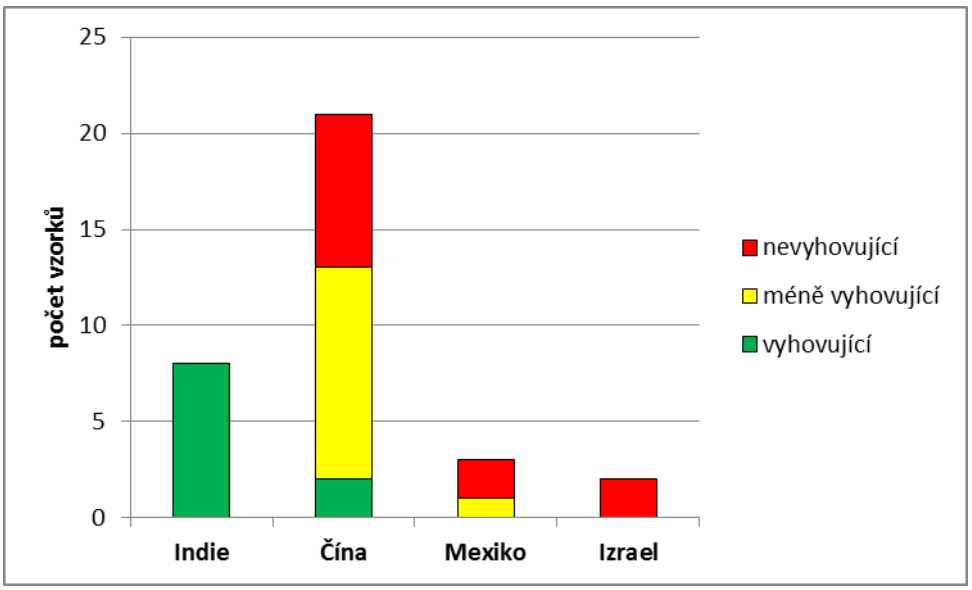
Pouze 19 % vzorků luteinu v enkapsulované formě bylo vyhodnoceno jako nevyhovující oproti 50 % vzorků luteinu v práškové formě.



Obr. 21 Vyhodnocení vzorků extraktů z aksamitníku vzpřímeného

Závěrem můžeme konstatovat, že ze 34 vzorků luteinu obou forem bylo vyhodnoceno jako vyhovující 10 vzorků, z toho 8 vzorků bylo ze země původu Indie a 2 vzorky ze země původu Čína. Dále bylo vyhodnoceno 12 vzorků luteinu jako méně vyhovující a 12 vzorků luteinu jako nevyhovující.

Vyhodnocení vzorků extraktů z aksamitníku vzpřímeného podle země původu je znázorněno na Obr. 22.



Obr. 22 Vyhodnocení vzorků surovin podle země původu

4. 3. Obsah luteinu v doplňcích stravy

V této dizertační práci bylo analyzováno celkem 48 vzorků doplňků stravy s obsahem luteinu ve třech aplikačních formách, a to 22 vzorků ve formě tablet (D1 až D22), 18 vzorků ve formě měkkých tobolek (D23 až D40) a 8 vzorků ve formě tvrdých tobolek (D41 až D48). Deklarované a skutečné (naměřené) obsahy luteinu v doplňcích stravy jsou uvedeny v tabulce 8 (tablety), v tabulce 9 (měkké tobolky) a v tabulce 10 (tvrdé tobolky).

Tab. 8 Obsah luteinu v doplňcích stravy (tablety)

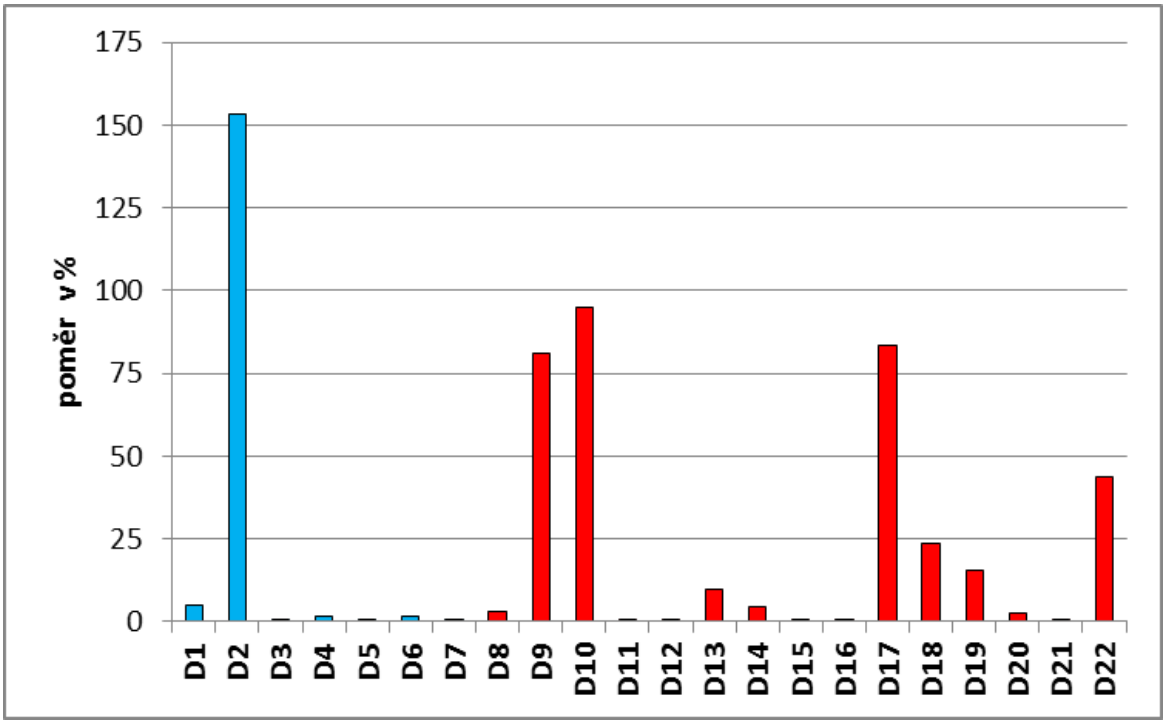
Označení vzorku	Země původu výrobce	Deklarovaný obsah luteinu (mg.tableta^{-1})	Průměrný stanovený obsah luteinu $\bar{x}$ ± S.D. (mg.tableta^{-1})
D1	Česká rep.	0,25	0,01 ± 0,001
D2	Česká rep.	2,00	3,07 ± 0,027
D3	Česká rep.	3,75	0,02 ± 0,002
D4	Česká rep.	5,00	0,08 ± 0,008
D5	Česká rep.	5,00	0,04 ± 0,003
D6	Česká rep.	5,50	0,08 ± 0,002
D7	Česká rep.	15,00	0,04 ± 0,004
D8	Dánsko	3,00	0,09 ± 0,004
D9	Finsko	3,00	2,44 ± 0,070
D10	Finsko	6,00	5,71 ± 0,088
D11	Kanada	6,00	0,02 ± 0,002
D12	Maďarsko	10,00	0,02 ± 0,002
D13	Maďarsko	12,00	1,19 ± 0,068
D14	Německo	0,30	0,01 ± 0,002
D15	Německo	6,00	0,05 ± 0,006
D16	Německo	6,00	0,04 ± 0,002
D17	Polsko	12,00	10,04 ± 0,112
D18	Rakousko	0,50	0,12 ± 0,011
D19	Rakousko	1,00	0,16 ± 0,009
D20	Slovensko	6,00	0,16 ± 0,009
D21	Švédsko	3,00	0,02 ± 0,002
D22	Švýcarsko	0,25	0,11 ± 0,007

Poměry skutečných a deklarovaných hodnot obsahu luteinu pro jednotlivé vzorky doplňků stravy v aplikační formě tablet (Tab. 8) vyjádřené v procentech jsou graficky znázorněny na Obr. 23. Barevné označení podle země původu je následující: Česká republika (modrá) a ostatní státy (červená).

Ze 7 vzorků tablet vyrobených českými výrobci doplňků stravy byl skutečný obsah luteinu vyšší než deklarovaný obsah luteinu výrobci jen u jednoho vzorku (D2). U tohoto vzorku byl naměřen obsah luteinu 3,07 mg.tableta^{-1}, i když český

výrobce deklaroval na obalu výrobku obsah luteinu 2,00 mg.tableta^{-1}. U ostatních vzorků (D1, D3 až D7) tablet vyrobených v České republice byl naměřený obsah luteinu pod 10 % deklarované hodnoty výrobci (Obr. 23).

Z 15 vzorků tablet (D8 až D22) vyrobených zahraničními výrobci doplňků stravy ani jeden vzorek neobsahoval deklarovaný obsah luteinu. Skutečný obsah luteinu byl nejblíže deklarovaným hodnotám naměřen u dvou vzorků vyrobených ve Finsku (D9 a D10) a u jednoho vzorku vyrobeného v Polsku (D17). U ostatních vzorků tablet vyrobených v zahraničí byl naměřený obsah luteinu pod 50 % deklarované hodnoty výrobci (obr. 23).



Obr. 23 Poměr skutečné a deklarované hodnoty obsahu luteinu vyjádřený v % (tablety)

Ze struktury tablet u čtyř vzorků doplňků stravy (D2, D9, D10 a D17), u kterých byl naměřen skutečných obsah luteinu nad 80 % deklarované hodnoty, lze usoudit, že tito výrobci používají k výrobě enkapsulovanou formu luteinu.

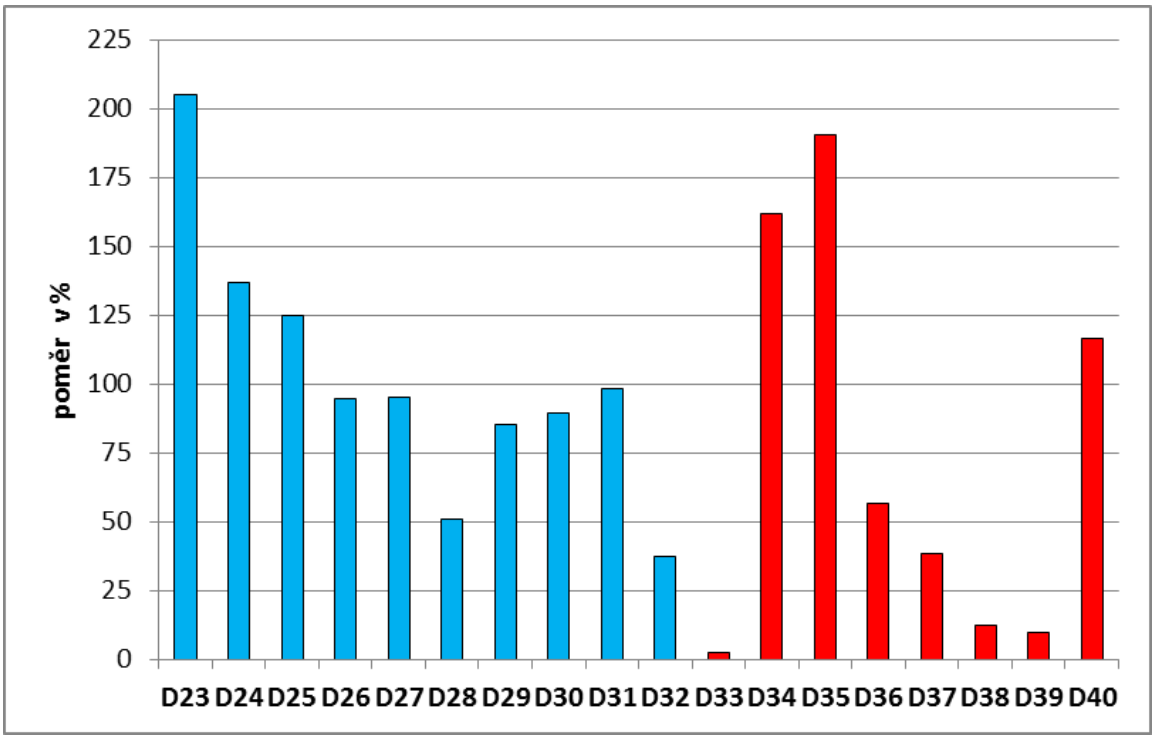
Tab. 9 Obsah luteinu v doplňcích stravy (měkké tobolky)

Označení vzorku	Země původu výrobce	Deklarovaný obsah luteinu (mg.tobolka^{-1})	Průměrný stanovený obsah luteinu $\bar{x}$ ± S.D. (mg.tobolka^{-1})
D23	Česká rep.	3,00	6,14 ± 0,077
D24	Česká rep.	3,00	4,10 ± 0,098
D25	Česká rep.	10,00	12,48 ± 0,086
D26	Česká rep.	10,00	9,45 ± 0,051
D27	Česká rep.	12,00	11,40 ± 0,115
D28	Česká rep.	12,00	6,13 ± 0,072
D29	Česká rep.	12,00	10,24 ± 0,107
D30	Česká rep.	15,00	13,38 ± 0,135
D31	Česká rep.	15,00	14,76 ± 0,142
D32	Česká rep.	15,00	5,58 ± 0,203
D33	Maďarsko	6,00	0,13 ± 0,008
D34	Německo	4,00	6,46 ± 0,092
D35	Německo	4,00	7,62 ± 0,106
D36	Polsko	8,00	4,54 ± 0,092
D37	Slovensko	6,00	2,29 ± 0,069
D38	Švýcarsko	10,00	1,22 ± 0,040
D39	Švýcarsko	10,00	0,99 ± 0,060
D40	USA	20,00	23,32 ± 0,176

Poměry skutečných a deklarovaných hodnot obsahu luteinu pro jednotlivé vzorky doplňků stravy v aplikační formě měkkých tobolek (Tab. 9) vyjádřené v procentech jsou graficky znázorněny na obr. 24. Barevné označení podle země původu je následující: Česká republika (modrá) a ostatní státy (červená).

Z 10 vzorků měkkých tobolek vyrobených českými výrobci doplňků stravy byl skutečný obsah luteinu vyšší než deklarovaný obsah luteinu výrobci u tří vzorků (D23 až D25), ale u dalších pěti vzorků (D26, D27, D29 až D31) byl naměřený obsah luteinu nad 85 % deklarované hodnoty luteinu výrobci (Obr. 24).

Z 8 vzorků měkkých tobolek vyrobených zahraničními výrobci doplňků stravy byl skutečný obsah luteinu vyšší než deklarovaný obsah luteinu výrobci u dvou vzorků vyrobených v Německu (D34 a D35) a u jednoho vzorku vyrobeného v USA (D40).



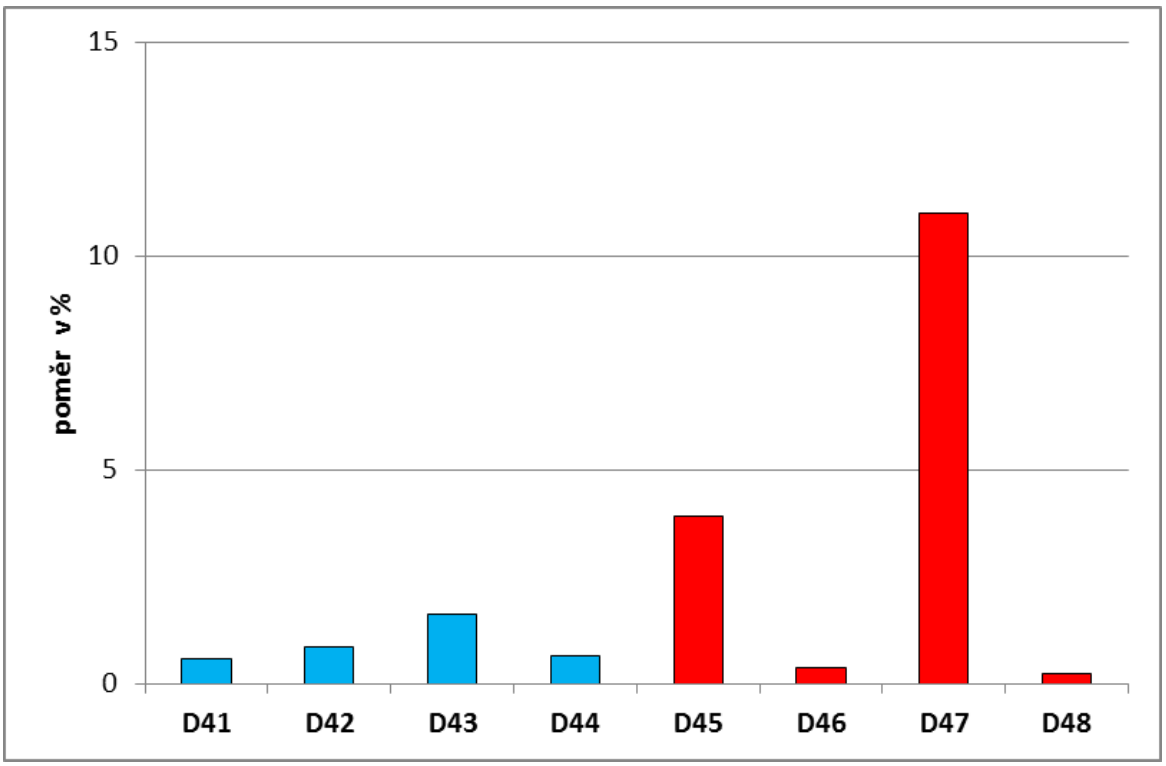
Obr. 24 Poměr skutečné a deklarované hodnoty obsahu luteinu vyjádřený v % (měkké tobolky)

U vzorku (D23) český výrobce deklaroval na obalu výrobku obsah luteinu 3,00 mg.tobolka^{-1}, ale byl naměřen obsah luteinu 6,14 mg.tobolka^{-1}, což odpovídá téměř 205 % deklarovaného obsahu.

Tab. 10 Obsah luteinu v doplňcích stravy (tvrdé tobolky)

Označení vzorku	Země původu výrobce	Deklarovaný obsah luteinu (mg.tobolka^{-1})	Průměrný stanovený obsah luteinu $\bar{x}$ ± S.D. (mg.tobolka^{-1})
D41	Česká rep.	3,00	0,02 ± 0,001
D42	Česká rep.	6,00	0,05 ± 0,001
D43	Česká rep.	6,00	0,10 ± 0,005
D44	Česká rep.	11,00	0,07 ± 0,003
D45	Maďarsko	5,00	0,20 ± 0,005
D46	Maďarsko	25,00	0,09 ± 0,007
D47	Německo	0,80	0,09 ± 0,003
D48	Polsko	20,00	0,05 ± 0,003

Poměry skutečných a deklarovaných hodnot obsahu luteinu pro jednotlivé vzorky doplňků stravy v aplikační formě tvrdých tobolek (Tab. 10) vyjádřené v procentech jsou graficky znázorněny na Obr. 25. Barevné označení podle země původu je následující: Česká republika (modrá) a ostatní státy (červená).



Obr. 25 Poměr skutečné a deklarované hodnoty obsahu luteinu výjádřený v % (tvrdé tobolky)

U 4 vzorků (D41 až D44) tvrdých tobolek vyrobených českými výrobci doplňků stravy byl naměřený obsah luteinu pod 2 %, ve třech vzorcích dokonce pod 1 % deklarované hodnoty obsahu luteinu výrobci.

U 4 vzorků (D45 až D48) tvrdých tobolek vyrobených zahraničními výrobci doplňků stravy byl naměřený obsah luteinu pod 12 %, ve dvou vzorcích dokonce pod 1 % deklarované hodnoty obsahu luteinu výrobci.

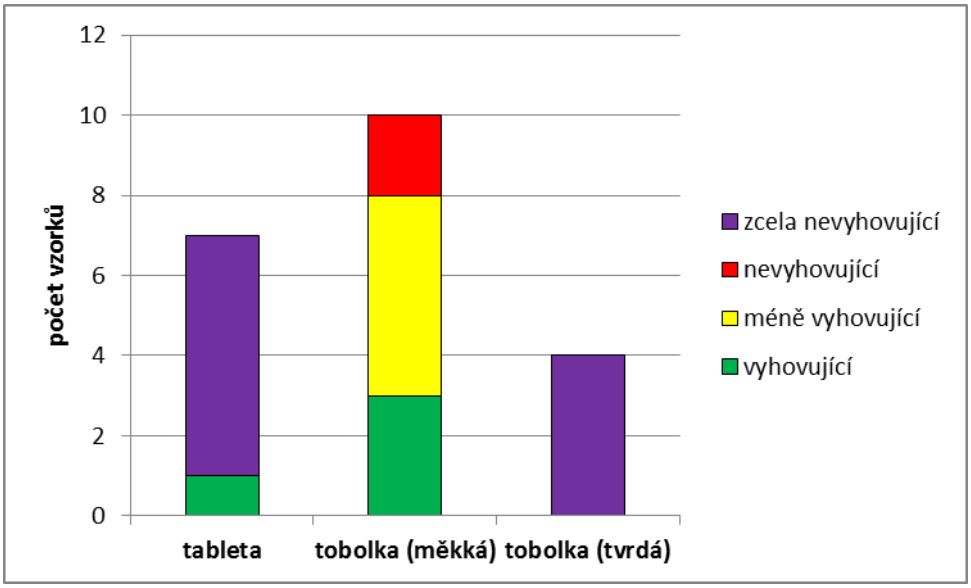
4. 4. Kvalita aplikačních forem doplňků stravy s obsahem luteinu

Ke kvalitativnímu porovnání vzorků doplňků stravy ve třech aplikačních formách (tableta, měkká a tvrdá tobolka) bylo použito rozdělení podle poměru skutečného a deklarovaného obsahu luteinu vyjádřeného v % na čtyři kategorie, a to:

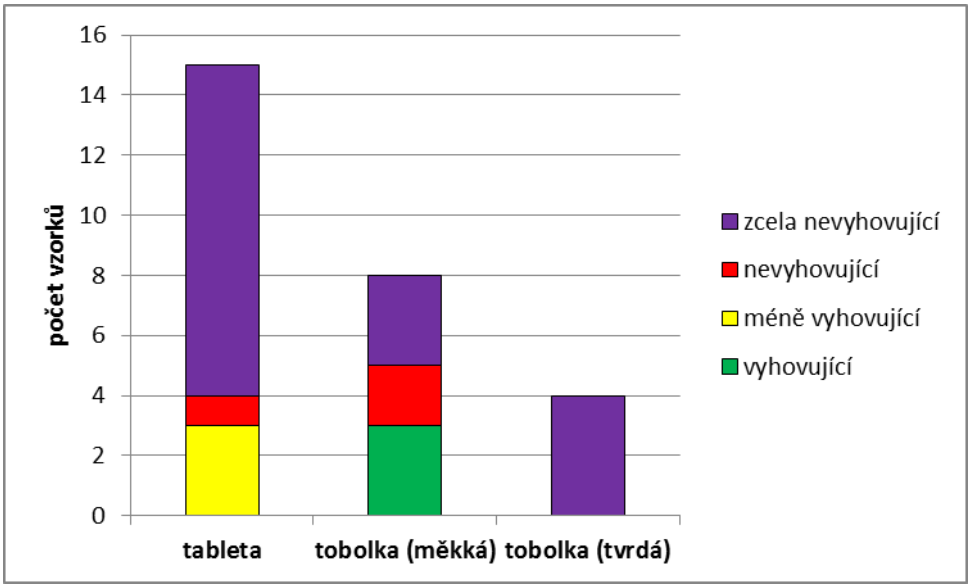
a) vyhovující (hodnota poměru nad 100 %),
b) méně vyhovující (hodnota poměru od 75 do 100 %),
c) nevyhovující (hodnota poměru od 25 do 75 %).
d) zcela nevyhovující (hodnota poměru pod 25 %).

Výsledek vyhodnocení vzorků tří aplikačních forem z České republiky je graficky znázorněny na Obr. 26. Jako vyhovující byly vyhodnoceny 3 vzorky měkkých tobolek a 1 vzorek tablet. Jako méně vyhovující bylo vyhodnoceno 5 vzorků měkkých tobolek. Jako zcela nevyhovující bylo vyhodnoceno 6 vzorků tablet a 4 vzorky tvrdých tobolek (Obr. 26).

Výsledek vyhodnocení vzorků tří aplikačních forem ze zahraničí je graficky znázorněny na Obr. 27. Jako vyhovující byly vyhodnoceny 3 vzorky měkkých tobolek. Jako méně vyhovující byly vyhodnoceny 3 vzorky tablet. Jako zcela nevyhovující bylo vyhodnoceno 11 vzorků tablet, 3 vzorky měkkých tobolek a 4 vzorky tvrdých tobolek (Obr. 27).



Obr. 26 Vyhodnocení vzorků doplňků stravy z České republiky



Obr. 27 Vyhodnocení vzorků doplňků stravy ze zahraničí

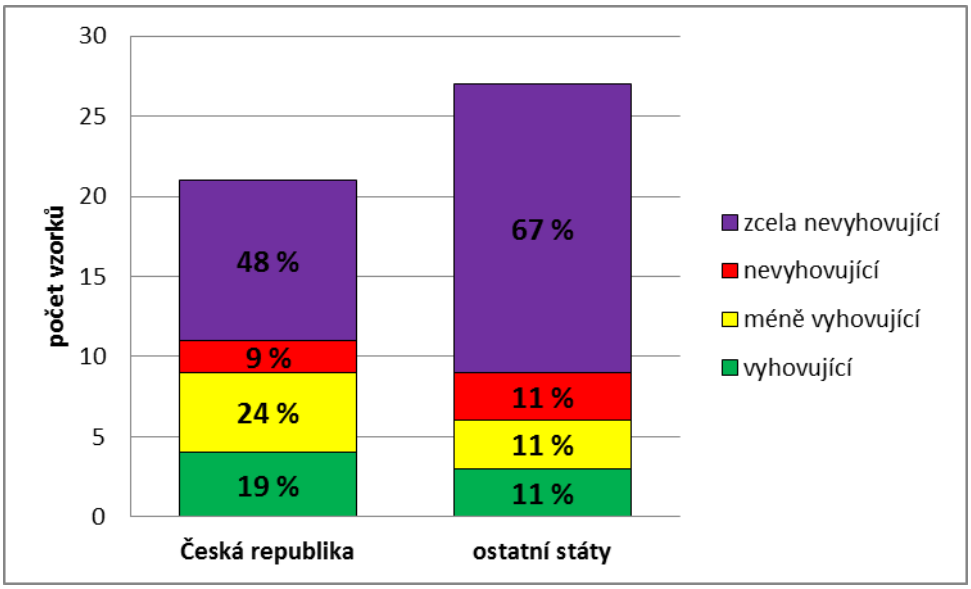
Srovnáním tří aplikačních forem doplňků stravy (tableta, měkká a tvrdá tobolka) vyrobených v České republice a v zahraničí z hlediska odolnosti luteinu vůči oxidaci vzdušným kyslíkem můžeme konstatovat, že měkká tobolka je nejodolnější aplikační formou, následovaná tabletou a nejméně odolnou formou je tvrdá tobolka.

4. 5. Kvalita doplňků stravy s obsahem luteinu

Z celkem 21 vzorků z České republiky byly 4 vzorky vyhodnoceny jako vyhovující, 5 vzorků jako méně vyhovujících, 2 vzorky jako nevyhovující a 10 vzorků jako zcela nevyhovujících.

Z celkem 27 vzorků ze zahraničí byly vyhodnoceny 3 vzorky vyhodnoceny jako vyhovující, 3 vzorky jako méně vyhovující, 3 vzorky jako nevyhovující a 18 vzorků jako zcela nevyhovujících.

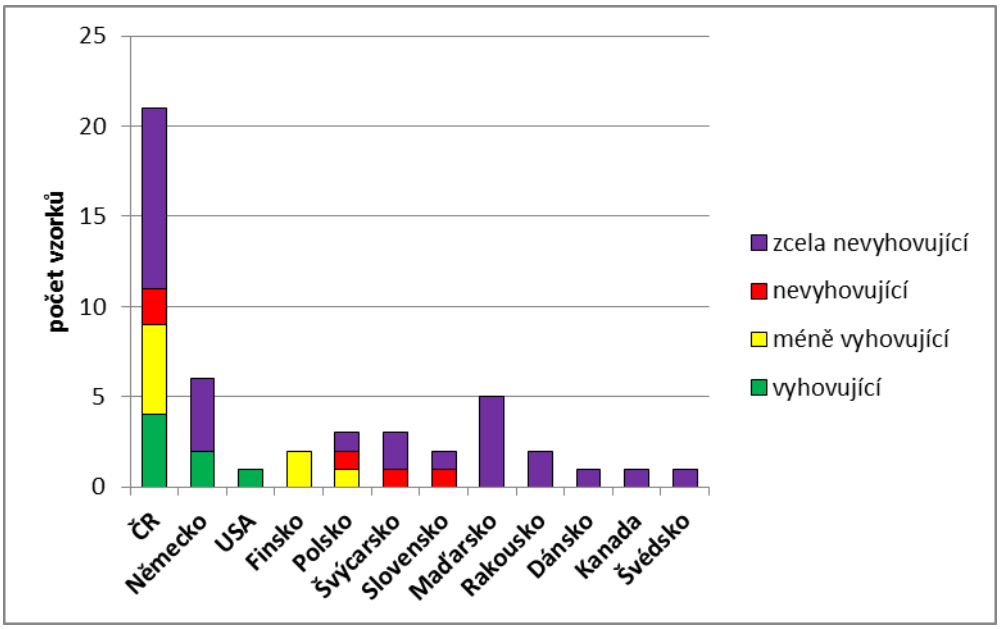
Při srovnání kvality doplňků stravy vyrobených v České republice a v zahraničí, dopadli výrobci z České republiky relativně lépe (Obr. 28), 19 % vzorků bylo vyhovujících oproti 11 % vzorkům ze zahraničí. Na druhé straně 48 % vzorků z České republiky bylo zcela nevyhovujících oproti 67 % vzorkům ze zahraničí.



Obr. 28 Srovnání doplňků stravy vyrobených v České republice a v zahraničí

Při srovnání kvality doplňků stravy z jednotlivých států byly vyhodnoceny jako vyhovující 4 vzorky z České republiky, 2 vzorky z Německa a 1 vzorek z USA (Obr. 29). Jako méně vyhovující bylo vyhodnoceno 5 vzorků v České republiky, 2 vzorky z Finska a 1 vzorek z Polska.

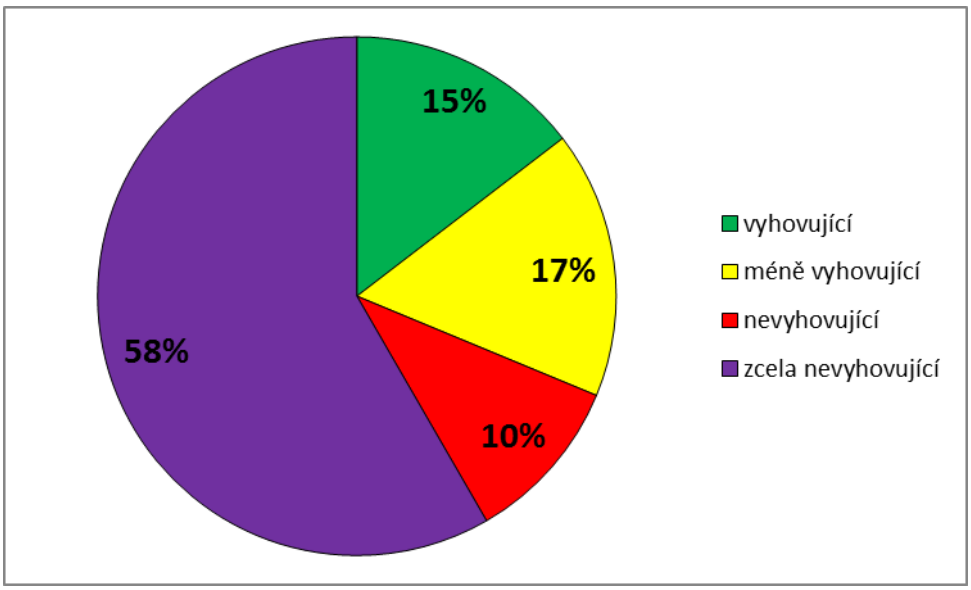
Všechny vzorky doplňků stravy z Maďarska, Rakouska, Dánska, Kanady a Švédska byly vyhodnoceny jako zcela nevyhovující.



Obr. 29 Srovnání kvality doplňků stravy z jednotlivých států

Z celkem 48 vzorků doplňků stravy bylo 15 % vyhovujících, 17 % méně vyhovujících, 10 % nevyhovujících a 58 % zcela nevyhovujících (Obr. 30).

Závěrem můžeme konstatovat, že pouze každý šestý analyzovaný vzorek doplňku stravy obsahoval deklarované množství luteinu.



Obr. 30 Vyhodnocení kvality doplňků stravy s obsahem luteinu

5. PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI

Přínos pro vědu:

- Byla modifikována a ověřena přesná, spolehlivá a reprodukovatelná metoda stanovení luteinu pomocí HPLC s UV-VIS detekcí.
- Byl stanoven obsah luteinu v komerčně používaných extraktech z aksamitníku vzpřímeného a v doplňcích stravy dostupných na českém, slovenském, polském a maďarském trhu.
- Pro další srovnávací analýzy extraktů z aksamitníku vzpřímeného a sledování obsahu luteinu v doplňcích stravy bude pokračovat spolupráce s Ústavem chemie a biochemie na Mendelově univerzitě v Brně, jehož výzkum je zaměřen na HPLC analýzu přírodních látek.
- Výsledky budou publikovány v odborném tisku, vědeckých časopisech a prezentovány na tuzemských i zahraničních konferencích.

Přínos pro praxi:

- Získané výsledky obsahu luteinu by měly přispět k lepší informovanosti českých spotřebitelů o skutečném obsahu luteinu v doplňcích stravy.
- Využití HPLC metody pro stanovení luteinu v doplňcích stravy pro běžnou laboratorní praxi.
- Enkapsulovaná forma extraktu z aksamitníku vzpřímeného, zajišťuje ochranu velmi citlivé molekuly luteinu před oxidací vzdušným kyslíkem, a tím zaručuje deklarovaný obsah tohoto karotenoidu v této surovině po dlouhou dobu.
- Získané výsledky by mohli sloužit jako podklad k legislativě České republiky

6. ZÁVĚR

Na základě získaných poznatků a výsledků analýz jsme dospěli k závěrům, že výrobci doplňků stravy s obsahem luteinu musí pečlivě vybírat suroviny pro jejich výrobu. Prvním a možná nejdůležitějším předpokladem výroby kvalitních doplňků stravy je spolehlivý a důvěryhodný obchodní partner, který dbá nejen na kvalitu nabízené suroviny, ale také na spolehlivou metodu analýzy této suroviny. Tím je zaručen deklarovaný obsah účinné látky, v našem případě luteinu v daném extraktu z aksamitníku vzpřímeného.

Povinnost výrobců provádět vstupní analýzu používaných surovin a výstupní analýzu jimi vyráběných doplňků stravy by měla být samozřejmostí. Výrobci doplňků stravy by také měli zvážit případné negativní následky při používání levných surovin (extraktů) obsahujících lutein, kterých se na trhu mnoho.

Celosvětový trend výrobců doplňků stravy je vyrábět doplňky stravy s obsahem 5 – 15 mg luteinu v jedné tabletě či tobolce, což odpovídá doporučené denní dávce luteinu.

Závěrem můžeme doporučit české výrobce měkkých želatinových tobolek s deklarovaným obsahem luteinu 3 – 15 mg luteinu v jedné tobolce.

Z výsledků analýz surovin a doplňků stravy s obsahem luteinu můžeme vyvodit následující závěry:

- ze 16 vzorků surovin v enkapsulované formě bylo vyhodnoceno jako vyhovujících 9 vzorků, z toho 7 vzorků ze země původu Indie a 2 vzorky ze země původu Čína
- z 18 vzorků surovin v práškové formě byl vyhodnocen jako vyhovující pouze 1 vzorek, a to ze země původu Indie
- enkapsulovaná forma suroviny obsahující lutein je výrazně odolnější vůči oxidaci vzdušným kyslíkem v porovnání s práškovou formou
- z 22 vzorků doplňků stravy v aplikační formě tablet byl vyhodnocen jako vyhovující pouze 1 vzorek, a to od českého výrobce

- z 18 vzorků doplňků stravy v aplikační formě měkkých tobolek bylo vyhodnoceno jako vyhovujících 6 vzorků, z toho 3 vzorky od českých výrobců a 3 vzorky od zahraničních výrobců

- z 8 vzorků doplňků stravy v aplikační formě tvrdých tobolek nebyl vyhodnocen jako vyhovující ani jeden vzorek

- doplňky stravy obsahující lutein v aplikační formě měkkých tobolek jsou nejodolnější vůči oxidaci luteinu, následuje tableta a nejhorší aplikační forma je tvrdá tobolka

- z 21 vzorků doplňků stravy z České republiky byly vyhodnoceny jako vyhovující pouze 4 vzorky, z toho 3 vzorky měkkých tobolek a 1 vzorek tablet

- z 27 vzorků doplňků stravy ze zahraničí byly vyhodnoceny jako vyhovující pouze 3 vzorky, a to všechny v aplikační formě měkkých tobolek

- z celkem 48 vzorků doplňků stravy bylo vyhodnoceno jako vyhovujících 7 vzorků, méně vyhovujících 8 vzorků, nevyhovujících 5 vzorků a zcela nevyhovujících 28 vzorků

- pouze každý šestý analyzovaný vzorek doplňku stravy obsahoval deklarované množství luteinu

- téměř 60 % analyzovaných vzorků doplňků stravy s obsahem luteinu bylo zcela nevyhovujících

Žádný ze zdrojů [37,73,76,78,80,81,89,100,107,133], ve kterých se autoři zabývali stanovením luteinu a jiných karotenoidů v extraktech z aksamitníku vzpřímeného, nebyly podrobeny HPLC analýze vzorky práškové nebo enkapsulované formy surovin (extraktů), které se používají pro komerční účely k výrobě doplňků stravy.

Ve zdrojích [125-128] autoři provedli HPLC analýzy u celkem 20 vzorků doplňků stravy s obsahem luteinu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] HLÚBIK P., OPLTOVÁ L.: *Vitaminy*, Grada Publishing, Praha 2004, s. 232, ISBN 80-247-0373-4
[2] VODRÁŽKA Z.: *Biochemie (1., 2. a 3. díl)*, Academia, Praha 1999, s. 506, ISBN 80-200-0600-1
[3] VELÍŠEK J.: *Chemie potravin 3.*, OSSIS, Tábor 1999, s. 342, ISBN 80-902391-5-3
[4] VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J.: *Chemie potravin II.*, OSSIS, Tábor 2009, s. 623, ISBN 978-80-86659-16-9
[5] VELÍŠEK J., CEJPEK K.: *Biosynthesis of Food Components*, OSSIS, Tábor 2008, s. 497, ISBN 978-80-86659-12-1
[6] MASÁK J., PELECHOVÁ J., PLACHÝ J.: *Speciální mikrobní technologie*, VŠCHT, Praha 1992, s. 301, ISBN 80-7080-142-5
[7] ŠÍCHO V.: *Potravinářská biochemie*, SNTL, Praha 1969, s. 424, ISBN 04-801-69
[8] VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J.: *Chemie potravin I.*, OSSIS, Tábor 2009, s. 580, ISBN 978-80-86659-15-2
[9] Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H.: *Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health*, Birkhäuser Verlag, Basel 2009, s. 431, ISBN 978-3-7643-7500-3
[10] JORDÁN V., HEMZALOVÁ M.: *Antioxidanty zázračné zbraně*, JOTA, Brno 2001, s. 160, ISBN 80-7217-156-9
[11] VELÍŠEK J.: *Chemie potravin 2.*, OSSIS, Tábor 1999, s. 304, ISBN 80-902391-4-5
[12] MURRAY R. K., GRANNER D. K., MAYES P. A., RODWELL V. W.: *Harperova Biochemie*, H&H, Praha 1998, s. 872, ISBN 80-85787-38-5
[13] VELÍŠEK J.: *Chemie potravin 1.*, OSSIS, Tábor 1999, s. 328, ISBN 80-902391-3-7
[14] EASTWOOD M.: *Principles of Human Nutrition*, Blackwell Publishing, Edinburgh 2003, p. 680, ISBN 0-632-05811-0
[15] RÉBLOVÁ Z.: Vliv vnějších faktorů na aktivitu antioxidantů. *Chem. Listy*, 2011, 105, s. 667-673
[16] MACH I.: *Doplňky stravy*, Svoboda Servis, Praha 2004, s. 157, ISBN 80-86320-34-0
[17] MACH I.: *Doplňky stravy na našem trhu*, Svoboda Servis, Praha 2006, s. 118, ISBN 80-86320-46-4
[18] HOŘEJŠÍ J., PRAHL R.: *Lidské tělo*, CESTY, Praha 1996, s. 336, ISBN 80-7181-093-2
[19] MÁČEK M.: *Vitaminová bible pro 21. století*, Knižní klub, Praha 2000, s. 304, ISBN 80-242-0406-1
[20] Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H.: *Carotenoids Handbook*, Birkhäuser Verlag, Basel 2004, s. 660, ISBN 3-7643-6180-8

[21] ANTONY J. I. X., SHANKARANARAYANA M. L.: Lutein – A Natural Colourant and a Phytonutrient for Eye Health Protection. *The World of Food Ingredients*, 2001, p. 64-67
[22] Lutein Awareness Grows, *Food & Drink Technology*, July/August 2007, p. 28
[23] All Eyes on Lutein, *Food & Drink Technology*, November 2007, p. 15
[24] CALVO M. M.: Lutein: A Valuable Ingredient of Fruit and Vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2005, 45, p. 671-696, ISSN 1040-8398
[25] ČOPÍKOVÁ J., UHER M., LAPČÍK O., MORAVCOVÁ J., DRAŠAR P.: Přírodní barevné látky. *Chem. Listy*, 2005, 99, s. 802-816
[26] KHACHIK F., CHANG A.: Total Synthesis of (3R,3´R,6´R)-Lutein and Its Stereoisomers. *J. Org. Chem.*, 2009, 74, p. 3875-3885
[27] HUMPHRIES J. M., KHACHIK F.: Distribution of Lutein, Zeaxanthin, and Related Geometrical Isomers in Fruit, Vegetables, Wheat, and Pasta Products. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, p. 1322-1327
[28] UPDIKE A. A, SCHWARTZ S. J.: Thermal Processing of Vegetables Increasing Cis Isomers of Lutein and Zeaxanthin. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, p. 6184-6190
[29] KHACHIK F., BEECHER G. R., WHITTAKER N. F.: Separation, Identification, and Quantification of the Major Carotenoid and Chlorophyll Constituents in Extracts of Several Green Vegetables by Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 1986, 34, p. 603-616
[30] BREITHAUPT D. E., BAMEDI A.: Carotenoid Esters in Vegetables and Fruits: A Screening with Emphasis on β-Cryptoxanthin Esters. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, p. 2064-2070
[31] BOWEN P. E., HERBST-ESPINOSA S. M., HUSSAIN E. A., STACEWICZ-SAPUNTZAKIS M.: Esterification Does Not Impair Lutein Bioavailability in Humans. *J. Nutr.*, 2002, 132, p. 3668-3673
[32] HANDELMAN G. J., NIGHTINGALE Z. D., LICHTENSTEIN A. H., SCHAEFER E. J., BLUMBERG J. B.: Lutein and Zeaxanthin Concentrations in Plasma after Dietary Supplementation with Egg Yolk. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1999, 70, p. 247-251
[33] SERRANO J., GONI I., SAURA-CALIXTO F.: Determination of β-Carotene and Lutein Available from Green Leafy Vegetables by an in Vitro Digestion and Colonic Fermentation Method. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, p. 2936-2940
[34] GONI I., SERRANO J., SAURA-CALIXTO F.: Bioaccessibility of β-Carotene, Lutein, and Lycopene from Fruits and Vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, p. 5382-5387
[35] GRANADO-LORENCIO F., OLMEDILLA-ALONSO B., HERRERO-BARBUDO C., PERÉZ-SACRISTÁN B., BLANCO-NAVARRO I., BLÁZQUEZ-GARCÍA S.: Comparative in Vitro Bioaccessibility of Carotenoids

from Relevant Contributors to Carotenoid Intake. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, p. 6387-6394
[36] KEAN E. G., HAMAKER B. R., FERRUZZI M. G.: Carotenoid Bioaccessibility from Whole Grain and Degermed Maize Meal Products. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, p. 9918-9926
[37] BREITHAUPT D. E., WIRT U., BAMEDI A.: Differentiation between Lutein Monoester Regioisomers and Detection of Lutein Diesters from Marigold Flowers (*Tagetes erecta* L.) and Several Fruits by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, p. 66-70
[38] OmniActive Health Technologies: Marketing materials, 2008
[39] RAO A. R., SARADA R., BASKARAN V., RAVISHANKAR G. A.: Antioxidant Activity of *Botryococcus braunii* Extract Elucidated in Vitro Models. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, p. 4593-4599
[40] DEL CAMPO J. A., GARCÍA-GONZÁLEZ M.: Outdoor Cultivation of Microalgae for Carotenoid Production: Current State and Perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 74, p. 1163-1174
[41] WU Z.-Y., SHI C.-L., SHI X.-M.: Modeling of Lutein Production by Heterotrophic *Chlorella* in Batch and Fed-batch Cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 23, p. 1233-1238
[42] CERÓN-GARCÍA M. C., CAMPOS-PÉREZ I., MACÍAS-SÁNCHEZ M. D., BERMEJO-ROMÁN R., FERNÁNDEZ-SEVILLA J. M., MOLINA-GRIMA E.: Stability of Carotenoids in *Scenedesmus almeriensis* Biomass and Extracts under Various Storage Conditions. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58, p. 6944-6950
[43] RAO A. R., REDDY R. L. R., BASKARAN V., SARADA R., RAVISHANKAR G. A.: Characterization of Microalgal Carotenoids by Mass Spectrometry and Their Bioavailability and Antioxidant Properties Elucidated in Rat Model. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58, p. 8553-8559
[44] FERNÁNDEZ-SEVILLA J. M., FERNÁNDEZ F. G. A., GRIMA E. M.: Biotechnological Production of Lutein and its Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 86, p.27-40
[45] CASAL C., CUARESMA M., VEGA J. M., VILCHEZ C.: Enhanced Productivity of a Lutein-Enriched Novel Acidophile Microalga Grown on Urea. *Mar. Drugs*, 2011, 9, p. 29-42
[46] GUEDES A. C., AMARO H. M., MALCATA F. X.: Microalgae as Sources of Carotenoinds. *Mar. Drugs*, 2011, 9, p. 625-644
[47] CERÓN M., CAMPOS I., SÁNCHEZ J. F., ACIÉN F. G., MOLINA E., FERNÁNDEZ-SEVILLA J. M.: Recovery of Lutein from Microalgae Biomass: Development of a Process for *Scenedesmus almeriensis* Biomass. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, p. 11761-11766
[48] PASSWATER R. A.: *O antioxidantech (All about antioxidants)*, Pragma, Praha 2002, s. 94, ISBN 80-7205-897-5

[49] BHOSALE P., LI B., SHARIFZADEH M., GELLERMANN W., FREDERICK J. M., TSUCHIDA K., BERNSTEIN P. S.: Purification and Partial Characterization of a Lutein-Binding Protein from Human Retina. *Biochemistry*, 2009, 48, p. 4798-4807
[50] AMAR I., ASERIN A., GARTI N.: Solubilization Patterns of Lutein and Lutein Esters in Food Grade Nonionic Microemulsions. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, p. 4775-4781
[51] KADLEČEK J., MAYER J., KANTA J.: *Braňte se jídlem*, Reader´s Digest Výběr, Praha 2007, s. 352, ISBN 978-80-86880-55-6
[52] TRUMBO P. R., ELLWOOD K. C.: Lutein and Zeaxanthin Intakes and Risk Age-related Macular Degenetation and Cataracts: An Evaluation Using the Food and Drug Administration´s Evidence-based Review System for Health Claims. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2006, 84, p. 971-974
[53] CHO E., HANKINSON S. E., ROSNER B., WILLET W. C., COLDITZ G.: Prospective Study of Lutein/Zeaxanthin Intake and Risk of Age-related Macular Degeneration. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2008, 87, p. 1837-1843
[54] WANG W., CONNOR S. L., JOHNSON E. J., KLEIN M. L., HUGHES S., CONNOR W. E.: Effect of Dietary Lutein and Zeaxanthin on Plasma Carotenoids and Their Transport in Lipoproteins in Age-related Macular Degeneration. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2007, 85, p. 762-769
[55] STRINGHAM J. M., BOVIER E. R., WONG J. C., HAMMOND Jr. B. R.: The Influence of DietaryLutein and Zeaxanthin on Visual Performance. *J. of Food Sci.*, 2010, 75, p. 24-29
[56] EVANS J. A., JOHNSON E. J.: The Role of Phytonutrients in Skin Health. *Nutrients*, 2010, 2, p. 903-928
[57] KOPSELL D. A., LEFSRUD M. G.: Spinach Cultigen Variation for Tissue Carotenoid Concentrations Influences Human Serum Carotenoid Levels and Macular Pigment Optical Density Following a 12-Week Dietary Intervention. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, p. 7998-8005
[58] JOHNSON E. J., CHUNG H.-Y., CALDARELLA S. M., SNODDERLY D. M.: The Influence of Supplemental Lutein and Docosahexaenoic Acid on Serum, Lipoproteins, and Macular Pigmentation. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2008, 87, p. 1521-1529
[59] BERNSTEIN P. S., DELORI F. C., RICHER S., KUIJK F. J. M., WENZEL A. J.: The Value of Measurement of Macular Carotenoid Pigment Optical Densities and Distributions in Age-related Macular Degeneration and Other Retinal Disorders. *Vision Research*, 2010, 50, p. 716-728
[60] GAO S., QIN T., LIU Z., CACERES M. A., RONCHI C. F., CHEN C.-Y. O., YEUM K.-J., TAYLOR A., BLUMBERG J. B., LIU Y., SHANG F.: Lutein and Zeaxanthin Supplementation Reduces H_2O_2-induced Oxidative Damage in Human Lens Epithelial Cells. *Molecular Vision*, 2011, 17, p. 3180-3190

[61] SAJILATA M. G., SINGHAL R. S., KAMAT M. Y.: The Carotenoid Pigment Zeaxanthin – A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2008, 7, p. 29-49
[62] HAMEED A., ARUN A. B., HO H.-P., CHANG C.-M. J., REKHA P. D., LEE M.-R., SINGH S., YOUNG C.-C.: Supercritical Carbon Dioxide Micronization of Zeaxanthin from Moderately Thermophilic Bacteria *Muricauda lutaonensis* CC-HSB-11. *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59, p. 4119-4124
[63] LEFSRUD M. G., KOPSELL D. A., KOPSELL D. E., RANDLE W. M.: Kale Carotenoids are Unaffected by, whereas Biomass Production, Elemental Concentrations, and Selenium Accumulation Respond to, Changes in Selenium Fertility. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, p. 1764-1771
[64] VACEK J., ONOFREJOVÁ L., KLEJDUS B., KUBÁŇ V.: Využití kapalinové chromatografie založené na hydrofilních interakcích pro separaci polárních látek. *Chem. Listy*, 2009, 103, s. 381-385
[65] KHACHIK F., BEECHER G. R.: Separation and Identification of Carotenoids and Carotenol Fatty Acid Esters in Some Squash Products by Liquid Chromatography. 1. Quantification of Carotenoids and Related Esters by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, 1988, 36, p. 929-937
[66] KHACHIK F., BEECHER G. R., LUSBY W. R.: Separation and Identification of Carotenoids and Carotenol Fatty Acid Esters in Some Squash Products by Liquid Chromatography. 2. Isolation and Characterization of Carotenoids and Related Esters. *J. Agric. Food Chem.*, 1988, 36, p. 938-946
[67] KHACHIK F., BEECHER G. R., LUSBY W. R.: Separation, Identification, and Quantification of the Major Carotenoids in Extracts of Apricots, Peaches, Cantaloupe, and Pink Grapefruit by Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 1989, 37, p. 1465-1473
[68] KHACHIK F., BEECHER G. R., GOLI M. B.: Separation, Identification, and Quantification of Carotenoids in Fruits, Vegetables and Human Plasma by High Performance Liquid Chromatography. *Pure Appl. Chem.*, 1991, 63, p. 71-80
[69] KHACHIK F., GOLI M. B., BEECHER G. R., HOLDEN J., LUSBY W. R., TENORIO M. D., BARRERA M. R.: Effect of Food Preparation on Qualitative and Quantitative Distribution of Major Carotenoid Constituents of Tomatoes and Several Green Vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, 1992, 40, p. 390-398
[70] KHACHIK F., BEECHER G. R., GOLI M. B., LUSBY W. R., SMITH J. C. Jr.: Separatiom and Identification of Carotenoids and their Oxidation Products in the Extracts of Human Plasma. *Anal. Chem.*, 1992, 64, p. 2111-2122
[71] KHACHIK F., ENGLERT G., DAITCH C. E., BEECHER G. R., TONUCCI L. H., LUSBY W. R.: Isolation and Structural Elucidation of the Geometrical Isomers of Lutein and Zeaxanthin in the Extracts from Human Plasma. *J. Chromatography B: Biomedical Sci. Appl.*, 1992, 582, p. 153-166

[72] TONUCCI L. H., HOLDEN J. M., BEECHER G. R., KHACHIK F., DAVIS C. S., MULOKOZI G.: Carotenoid Content of Thermally Processed Tomato-Based Food Products. *J. Agric. Food Chem.*, 1995, 43, p. 579-586
[73] EMENHISER C., SIMUNOVIC N., SANDER L. C., SCHWARTZ S. J.: Separation of Geometrical Carotenoid Isomers in Biological Extracts Using a Polymeric C_{30} Column in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44, p. 3887-3893
[74] RAZUNGLES A. J., BABIC I., SAPIS J. C., BAYONOVE C. L.: Particular Behavior of Epoxy Xanthophylls during Veraison and Maturation of Grape. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44, p. 3821-3825
[75] ROUSEFF R., RALEY L., HOFSOMMER H. J.: Application of Diode Array Detection with a C-30 Reversed Phase Column for Separation and Identification of Saponified Orange Juice Carotenoids. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44, p. 2176-2181
[76] DELGADO-VARGAS F., PAREDES-LÓPEZ O.: Effects of Enzymatic Treatments of Marigold Flowers on Lutein Isomeric Profiles. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45, p. 1097-1102
[77] KHACHIK F., SPANGLER CH. J., SMITH Jr. J. C.: Identification, Quantification, and Relative Concentrations of Carotenoids and Their Metabolites in Human Milk and Serum. *Anal. Chem.*, 1997, 69, p. 1873-1881
[78] DELGADO-VARGAS F., PAREDES-LÓPEZ O., AVILA-GONZÁLES E.: Effects of Sunlight Illumination of Marigold Flower Meals on Egg Yolk Pigmentation. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46, p. 698-706
[79] CHEN B. H., TANG Y. C.: Processing and Stability of Carotenoid Powder from Carrot Pulp Waste. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46, p. 2312-2318
[80] HADDEN W. L., WATKINS R. H., LEVY L. W., REGALADO E., RIVADENEIRA D. M., BREEMEN R. B., SCHWARTZ S. J.: Carotenoid Composition of Marigold (*Tagetes erecta*) Flower Extract Used as Nutritional Supplement. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, p. 4189-4194
[81] KHACHIK F., STECK A., PFANDER H.: Isolation and Structural Elucidation of (13Z,13′Z,3R,3′R,6′R)-Lutein from Marigold Flowers, Kale, and Human Plasma. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, p. 455-461
[82] SANDER L. C., PURSCH M., MÄRKER B., WISE S. A.: Separation of Carotenoid Isomers by Capillary Electrochromatography with C_{30} Stacionary Phases. *Anal. Chem.*, 1999, 71, p. 3477-3483
[83] TAI C.-Y., CHEN B. H.: Analysis and Stability of Carotenoids in the Flowers of Daylily (*Hemerocallis disticha*) as Affected by Various Treatments. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, p. 5962-5968
[84] DACHTLER M., GLASER T., KOHLER K., KLAUS A.: Combined HPLC-MS and HPLC-NMR On-Line Coupling for the Separation and Determination of Lutein and Zeaxanthin Stereoisomers in Spinach and in Retina. *Anal. Chem.*, 2001, 73, p. 667-674

[85] PINHO P. G., FERREIRA A. C. S., PINTO M. M., BENITEZ J. G., HOGG T. A.: Determination of Carotenoid Profiles in Grapes, Musts, and Fortified Wines from Douro Varieties of *Vitis vinifera*. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, p. 5484-5488
[86] LI H. B., JIANG Y., CHEN F.: Isolation and Purification of Lutein from the Microalga *Chlorella vulgaris* by Extraction after Saponification. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, p. 1070-1072
[87] MOROS E. E., DARNOKO D., CHERYAN M., PERKINS E. G., JERRELL J.: Analysis of Xanthophylls in Corn by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, p. 5787-5790
[88] MENDES-PINTO M. M., FERREIRA A. C. S., OLIVEIRA M. B. P. P., PINHO P. G.: Evaluation of Some Carotenoids in Grapes by Reversed- and Normal-Phase Liquid Chromatography: A Qualitative Analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, p. 3182-3188
[89] NAVARRETE-BOLANOS J. L., JIMÉNEZ-ISLAS H., BOTELLO-ALVAREZ E., RIVO-MARTÍNEZ R., PAREDES-LÓPEZ O.: Improving Xanthophyll Extraction from Marigold Flower Using Cellulolytic Enzymes. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, p. 3394-3398
[90] LAKSHMINARAYANA R., RAJU M., KRISHNAKANTHA T. P., BASKARAN V.: Determination of Major Carotenoids in a Few Indian Leafy Vegetables by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, p. 2838-2842
[91] LARSEN E., CHRISTENSEN L. P.: Simple Saponification Method for the Quantitative Determination of Carotenoids in Green Vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, p. 6598-6602
[92] NISHIYAMA I., FUKUDA T., OOTA T.: Genotypic Differences in Chlorophyll, Lutein, and *β*-Carotene Contents in the Fruits of *Actinidia* Species. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, p. 6403-6407
[93] SCHLATTERER J., BREITHAUPT D. E.: Xanthophylls in Commercial Egg Yolks: Quantification and Identification by HPLC and LC-(APCI)MS Using a C30 Phase. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, p. 2267-2273
[94] AZEVEDO-MELEIRO C. H., RODRIGUEZ-AMAYA D. B.: Qualitative and Quantitative Differences in Carotenoid Composition among *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*, *Cucurbita pepo*. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, p. 4027-4033
[95] BHOSALE P., SERBAN B., ZHAO D. Y., BERNSTEIN P. S.: Identification and Metabolic Transformations of Carotenoids in Ocular Tissues of the Japanese Quail *Coturnix japonica*. *Biochemistry*, 2007, 46, p. 9050-9057
[96] BURKHARDT S., BŐHM V.: Development of a New Method for the Complete Extraction of Carotenoids from Cereals with Special Reference to Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.). *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, p. 8295-8301

[97] ABDEL-AAL E.-S. M., YOUNG J. C., RABALSKI I., HUCL P., FREGEAU-REID J.: Identification and Quantification of Seed Carotenoids in Selected Wheat Species. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, p. 787-794
[98] ELIZALDE-GONZÁLEZ M. P., HERNÁNDEZ-OGARCÍA S. G.: Effect of Cooking Processes on the Contents of Two Bioactive Carotenoids in *Solanum lycopersicum* Tomatoes and *Physalis ixocarpa* and *Physalis philadelphica* Tomatillos. *Molecules*, 2007, 12, p. 1829-1835, ISSN 1420-3049
[99] KEAN E. G., EJETA G., HAMAKER B. R., FERRUZZI M. G.: Characterization of Carotenoid Pigments in Mature and Developing Kernels of Selected Yellow-Endosperm Sorghum Varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, p. 2619-2626
[100] LI W., GAO Y., ZHAO J., WANG Q.: Phenolic, Flavonoid, and Lutein Ester Content and Antioxidant Activity of 11 Cultivars of Chinese Marigold. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, p. 8478-8484
[101] ZHOU C. H., XU C. J., SUN C. D., LI X., CHEN K. S.: Carotenoids in White- and Red-Fleshed Loquat Fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, p. 7822-7830
[102] MCCURDY J. D., MCELROY J. S., KOPSELL D. A., SAMS C. E., SOROCHAN J. C.: Effects of Mesotrione on Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.) Carotenoid Concentrations under Varying Enviromental Conditions. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, p. 9133-9139
[103] LAMBERTS L., DELCOUR J. A.: Carotenoids in Raw and Parboiled Brown and Milled Rice. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, p. 11914-11919
[104] WANG Y., KING J. M., XU Z., LOSSO J., PRUDENTE A.: Lutein from Ozone-Treated Corn Retains Antimutagenic Properties. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, p. 7942-7949
[105] AL-DUAIS M., HOHBEIN J., WERNER S., BŐHM V., JETSCHKE G.: Contents of Vitamin C, Carotenoids, Tocopherols, and Tocotrienols in the Subtropical Plant Species *Cyphostemma digitatum* as Affected by Processing. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, p. 5420-5427
[106] SÉRINO S., GOMEZ L., COSTAGLIOLA G., GAUTIER H.: HPLC Assay of Tomato Carotenoids: Validation of a Rapid Microextraction Technique. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, p. 8753-8760
[107] BHATTACHARYYA S., DATTA S., MALLICK B., DHAR P., GHOSH S.: Lutein Content and in Vitro Antioxidant Activity of Different Cultivars of Indian Marigold Flower (*Tagetes patula* L.) Extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58, p. 8259-8264
[108] KOPSELL D. A., ARMEL G. R., MUELLER T. C., SAMS C. E., DEYTON D. E., MCELROY J. S., KOPSELL D. E.: Increase in Nutritionally Important Sweet Corn Kernel Carotenoids following Mesotrione and Atrazine Applications. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, p. 6362-6368
[109] BURT A. J., GRAINGER C. M., YOUNG J. C., SHELP B. J., LEE E. A.: Impact of Postharvest Handling on Carotenoid Concentration and Composition

in High-Carotenoid Maize (*Zea mays* L.) Kernels. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58, p. 8286-8292
[110] KAMFFER Z., BINDON K. A., OBERHOLSTER A.: Optimization of a Method for the Extraction and Quantification of Carotenoids and Chlorophylls during Ripening in Grape Berries (*Vitis vinifera* cv. Merlot). *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58, p. 6578-6586
[111] ABDEL-AAL E.-S. M., YOUNG J. C., AKHTAR H., RABALSKI I.: Stability of Lutein in Wholegrain Bakery Products Naturally High in Lutein or Fortified with Free Lutein. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58, p. 11109-10117
[112] KWASNIEWSKI M. T., HEUVEL J. E. V., PAN B. S., SACKS G. L.: Timing of Cluster Light Environment Manipulation during Grape Development Affects C_{13} Norisoprenoid and Carotenoid Concentrations in Riesling. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58, p. 6841-6849
[113] STUETZ W., PRAPAMONTOL T., HONGSIBSONG S., BIESALSKI H.-K.: Polymethoxylated Flavones, Flavanone Glycosides, Carotenoids, and Antioxidants in Different Cultivation Types of Tangerines (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampueng) from Northern Thailand. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58, p. 6069-6074
[114] WENZEL M., SEUSS-BAUM I., SCHLICH E.: Influence of Pasteurization, Spray- and Freeze-Drying, and Storage on the Carotenoid Content in Egg Yolk. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58, p. 1726-1731
[115] XU J.-G., HU Q.-P., WANG X.-D., LUO J.-Y., LIU Y., TIAN C.-R.: Changes in the Main Nutrients, Phytochemicals, and Antioxidant Activity in Yellow Corn Grain during Maturation. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58, p. 5751-5756
[116] KHOO H.-E., PRASAD K. N., KONG K.-W., JIANG Y., ISMAIL A.: Carotenoids and Their Isomers: Color Pigments in Fruits and Vegetables. *Molecules*, 2011, 16, p. 1710-1738
[117] ZHOU C., ZHAO D., SHENG Y., TAO J., YANG Y.: Carotenoids in Fruits of Different Persimmon Cultivars. *Molecules*, 2011, 16, p. 624-636
[118] XIAO Z., LESTER G. E., LUO Y., WANG Q.: Assessment of Vitamin and Carotenoid Concentractions of Emerging Food Products: Edible Microgreens. *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60, p. 7644-7651
[119] VALLVERDÚ-QUERALT A., ARRANZ S., CASALS-RIBES I., LAMUELA-RAVENTÓS R. M.: Stability of the Phenolic and Carotenoid Profile of Gazpachos during Storage. *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60, p. 1981-1988
[120] REIF C., ARRIGONI E., NEUWEILER R., BAUMGARTNER D., NYSTRÖM L., HURRELL R. F.: Effect of Supfur and Nitrogen Fertilization on the Content of Nutritionally Relevant Carotenoids in Spinach (*Spinacia oleracea*). *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60, p. 5819-5824
[121] STINCO C. M., FERNÁNDEZ-VÁZQUEZ R., ESCUDERO-GILETE M. L., HEREDIA F. J., MELÉNDEZ-MARTÍNEZ A. J., VICARIO I. M.: Effect of

Orange Juice´s Processing on the Color, Particle Size, and Bioaccessibility of Carotenoids. *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60, p. 1447-1455
[122] GUZMAN I., YOUSEF G. G., BROWN A. F.: Simultaneous Extraction and Quantification of Carotenoids, Chlorophylls, and Tocopherols in *Brassica* Vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60, p. 7238-7244
[123] GARZÓN G. A., NARVÁEZ-CUENCA C.-E., KOPEC R. E., BARRY A. M., RIEDL K. M., SCHWARTZ S. J.: Determination of Carotenoids, Total Phenolic Content, and Antioxidant Activity of Arazá (*Eugenia stipitata* McVaugh), an Amazonian Fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60, p. 4709-4717
[124] CHISTÉ R. C., MERCADANTE A. Z.: Identification and Quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of Carotenoids and Phenolic Compounds from Amazonian Fruit *Caryocar villosum*. *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60, p. 5884-5892
[125] AMAN R., BAYHA S., CARLE R., SCHIEBER A.: Determination of Carotenoid Stereoisomers in Commercial Dietary Supplements by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, p. 6086-6090
[126] YOUNG J. C., ABDEL-AAL E.-S. M., RABALSKI I., BLACKWELL B. A.: Identification of Synthetic Regioisomeric Lutein Esters and Their Quantification in Commercial Lutein Supplement. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, p. 4965-4972
[127] KROLL H., FRIEDRICH J., MENZEL M., SCHREIER P.: Carbon and Hydrogen Stable Isotope Ratios of Carotenoids and *β*-Carotene-Based Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, p. 4198-4204
[128] SANDER L. C., SHARPLESS K. E., WISE S. A., NELSON B. C., PHINNEY K. W., PORTER B. J., RIMMER C. A., THOMAS J. B., WOOD L. J., YEN J. H., DUEWER D. L., ATKINSON R., CHEN P., GOLDSCHMIDT R., WOLF W. R., HO I.-P., BETZ J. M.: Certification of Vitamins and Carotenoids in SRM 3280 Multivitamin/Multielement Tablets. *Anal. Chem.*, 2011, 83, p. 99-18
[129] CRAFT N. E.: Relative Solubility, Stability, and Absorptivity of Lutein and β-Carotene in Organic Solvents. *J. Agric. Food Chem.*, 1992, 40, p. 431-434
[130] KHACHIK F., BEECHER G. R., VANDERSLICE J. T., FURROW G.: Liquid Chromatographic Artifacts and Peak Distortion: Sample-Solvent Interactions in the Separation of Carotenoids. *Anal. Chem.*, 1988, 60, p. 807-811
[131] ISHIDA B. K., CHAPMAN M. H.: Carotenoid Extraction from Plants Using a Novel, Enviromentally Friendly Solvent. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, p. 1051-1059
[132] NARANJO-MODAD S., LÓPEZ-MUNGUIA A., VILAREM G., GASET A., BÁRZANA E.: Solubility of Purified Lutein Diesters Obtained from *Tagetes erecta* in Supercritical CO_2 and the Effect of Solvent Modifiers. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, p. 5640-5642

[133] KHACHIK F.: An Efficient Conversion of (3R,3´R,6´R)-Lutein to (3R,3´S,6´R)-Lutein (3´-Epilutein) and (3R,3´R)-Zeaxanthin. *J. Nat. Prod.*, 2003, 66, p. 67-72
[134] HSU Y.-W., TSAI C.-F., CHEN W.-K., HO Y.-C., LU F.-J.: Determination of Lutein and Zeaxanthin and Antioxidant Capacity of Supercritical Carbon Dioxide Extract from Daylily (*Hemerocallis disticha*). *Food Biochemistry*, 2011, 129, p. 1813-1818
[135] LI B., VACHALI P., FREDERICK J. M., BERNSTEIN P. S.: Identification of StARD3 as a Lutein-Binding Protein in the Macula of Primate Retina. *Biochemistry*, 2011, 50, p. 2541-2549
[136] SNEDECOR G. W., COCHRAN W. G.: *Statistical Methods*. Iowa: 6th Edition Iowa State University Press, 1967, p. 534

SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

KUNCOVÁ G., ŠIVEL M.: Lipase Immobilized in Organic-Inorganic Matrices. *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 1997, 8, p. 667-671

ŠIVEL M., KRÁČMAR S., KLEJDUS B.: Lutein as Dietary Supplement. 9th International Conference Vitamins, Nutrition, Diagnostics, Brno, 2009, s. 105-106, ISBN 978-80-7318-809-2

ŠIVEL M.: The Content of Lutein in Marigold extract. 10th International Nutrition & Diagnostics Conference, Praha, 2010, s. 79, ISBN 978-80-7395-257-0

ŠIVEL M., KLEJDUS B., KRÁČMAR S., KUBÁŇ V.: Lutein – významný karotenoid ve výživě člověka. *Chem. Listy* (15.10.2012 přijato k tisku)

CURRICULUM VITAE

Osobní údaje

Jméno a příjmení:	Ing. Miroslav Šivel
E-mail:	Mirek.Sivel@seznam.cz
	sivel@ft.utb.cz

Vzdělání

2008 – dosud	Doktorský studijní program Chemie a technologie potravin, obor Technologie potravin, FT UTB Zlín Doktorská práce: „Stanovení luteinu v doplňcích stravy“
1988 – 1993	VŠ chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie
1984 – 1988	SPŠ potravinářské technologie v Bzenci

Praxe

2006 – dosud	ředitel, Atlantic Chemicals Trading Czech Republic
1999 – 2006	Produktový manager, DKSH Czech Republic
1998 – 1998	technolog výroby, OKL v Bzenci
1996 – 1998	samostatní pracovník, ABK ve Veselí nad Moravou
1993 – 1995	výzkumný pracovník, Ústav chemických procesů AVČR v Praze