

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Katedra analytické chemie

Simultánní elektrochemické stanovení lipofilních vitaminů

Bc. Klára Ptáčková

Diplomová práce

2018

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology
Department of Analytical Chemistry

Simultaneous electrochemical determination of lipophilic vitamins

Bc. Klára Ptáčková

Thesis

2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Klára Ptáčková**
Osobní číslo: **C16619**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Simultánní elektrochemické stanovení lipofilních vitaminů**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Z odborných publikací zpracujte literární rešerši na téma elektrochemického stanovení lipofilních vitaminů A, D, E a K na různých elektrodových materiálech.
2. Určete vhodné podmínky extrakce lipofilních vitaminů z vodně-organického prostředí do heterogenního materiálu uhlíkové pastové elektrody s ohledem na maximální velikost a dostatečné rozdělení oxidačních signálů analytů ve vodném detekčním roztoku. Zvolte vhodnou elektrochemickou techniku měření a optimalizujte její parametry. Proveďte kalibrace pro stanovení jednotlivých vitaminů a jejich směsí a diskutujte případné rozdíly.
3. Aplikujte navrženou elektrochemickou metodu simultánního stanovení lipofilních vitaminů pro analýzu ve vybraných praktických vzorcích.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Radovan Metelka, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce:

Ing. Milan Sýs, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Ostatní konzultanti:

Dariusz Guziejewski, PhD.

Department of Inorganic and Analytical Chemistry,
University of Lodz, Poland

Datum zadání diplomové práce: **20. února 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 9. 5. 2018

Bc. Klára Ptáčková

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce panu Ing. Radovanu Metelkovi, PhD., a konzultantovi panu Ing. Milanu Sýsovi, Ph.D., za odborné vedení a cenné rady, které byly nezbytné pro zhotovení této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za jejich trpělivost a podporu poskytovanou v průběhu celého studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se věnuje možnostem simultánního elektrochemického stanovení lipofilních vitaminů s využitím uhlíkové pastové elektrody. Teoretická část je zaměřena na obecný popis vitaminů rozpustných v tucích. Popisuje chemickou strukturu jednotlivých vitaminů, jejich fyziologické účinky, vlastnosti a výskyt v potravinách. Kromě elektrochemického stanovení jsou také uvedeny i další možnosti stanovení pomocí ostatních analytických metod. V experimentální části je studován vliv složení elektrodového materiálu, podmínek extrakce a parametrů voltametrických technik na rozlišení oxidačních signálů vitaminů a intenzitu jejich proudových odezev. Po optimalizaci metody byly určeny některé analytické parametry stanovení.

KLÍČOVÁ SLOVA

Lipofilní vitaminy, skelná uhlíková pastová elektroda, voltametrie, extrakce, potraviny.

ANOTATION

This diploma thesis deals with possibilities of simultaneous electrochemical determination of lipophilic vitamins. Theoretical part is focused on general characterization of fat-soluble vitamins. It describes chemical structure of particular vitamins, their physiological effects, properties and occurrence in food. Besides electrochemical analysis, other ways of determination using different analytical methods are described as well. In experimental part, the influence of electrode material composition, conditions of extraction, and parameters of voltammetric techniques on the resolution of oxidation signals of vitamins and intensity of their current responses were studied in detail. Some analytical parameters of the determination were ascertained after optimization of the method.

KEYWORDS

Lipophilic vitamins, glassy carbon paste electrode, voltammetry, extraction, food.

Obsah

Úvod.....	13
1 Teoretická část	14
1.1 Lipofilní vitaminy a jejich vlastnosti	14
1.1.1 Retinoidy.....	14
1.1.2 Kalciferoly	16
1.1.3 Tokoferoly	18
1.1.4 Naftochinony	20
1.2 Lipofilní vitaminy v potravinách	21
1.2.1 Vitamin A v potravinách.....	21
1.2.2 Vitamin D v potravinách.....	22
1.2.3 Vitamin E v potravinách	23
1.2.4 Vitamin K v potravinách.....	24
1.3 Voltametrické metody pro elektroanalýzu lipofilních vitamínů	24
1.3.1 Cyklická voltametrie	24
1.3.2 Square-wave voltametrie	25
1.3.3 Diferenční pulzní voltametrie	25
1.3.4 Anodická rozpouštěcí voltametrie	25
1.3.5 Katodická rozpouštěcí voltametrie	25
1.3.6 Adsorptivní rozpouštěcí voltametrie.....	26
1.3.7 Extraktivní rozpouštěcí voltametrie.....	27
1.3.8 Specificky modifikované elektrody	27
1.4 Další analytické metody stanovení lipofilních vitaminů.....	28
1.4.1 Plynová chromatografie	28
1.4.2 Kapalinová chromatografie.....	29
1.4.3 Tenkovrstvá chromatografie	30
1.4.4 Spektrální metody	30
2 Experimentální část.....	32
2.1 Použité chemikálie	32
2.2 Příprava standardních roztoků.....	32
2.3 Příprava zásobních elektrolytů	33
2.4 Příprava pastové elektrody ze skelného uhlíku	33
2.5 Přístrojové vybavení.....	34
2.6 Pracovní postupy	35

2.6.1	Extrakce	35
2.6.2	Voltametrické měření	35
3	Výsledky a diskuze	37
3.1	Optimalizace akumulace vitaminů.....	37
3.1.1	Výběr elektrodového pojiva.....	37
3.1.2	Množství pojiva v uhlíkové pastě	38
3.1.3	Složení roztoku pro extrakci vitaminů.....	39
3.1.4	Doba extrakce	40
3.2	Optimalizace elektrochemické detekce.....	42
3.2.1	Výběr pracovního elektrolytu a jeho pH.....	42
3.2.2	Parametry diferenční pulzní voltametrie.....	44
3.2.3	Kalibrační závislosti stanovení vitaminů.....	47
4	Závěr	53
5	Literatura.....	54

Seznam použitých ilustrací a tabulek

Obr. 1: Skupina vitaminů A: a) retinol, b) dehydroretinol, c) retinal, d) kyselina retinová	14
Obr. 2: Skupina vitaminů D: cholekalciferol (vlevo), ergokalciferol (vpravo)	16
Obr. 3: Chemické struktury tokoferolů a tokotrienolů	18
Obr. 4: Skupina vitaminů K: a) fyllochinon, b) menachinon, c) medadion.....	20
Obr. 5: Voltamogram adsorpční rozpouštěcí voltametrie simultánního stanovení lipofilních vitaminů ($100 \mu\text{mol l}^{-1}$) adsorbovaných z 25% acetonitrilu na povrch pevné GCE při rychlosti 400 rpm po dobu 10 minut. Detekce pomocí DPV v $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ acetátovém pufru (pH 4,5) při $E_{\text{dep}} = -0,6 \text{ V}$, $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$, $E_{\text{amp}} = 25 \text{ mV}$, $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$ (červená linie) a $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ (černá linie) [1].	26
Obr. 6: Voltamogram pro $5,33 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ α -TOH na GCE (křivka 2), na MWCNT-GCE (křivka 3) a samotný $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ acetonitril (křivka 1).....	28
Obr. 7: vlevo - elektrochemický analyzátor Autolab PGSTAT101, vpravo – měrný tříelektroodový systém s laboratorním stojanem a magnetickým míchadlem.....	34
Obr. 8: Porovnání průměrných hodnot proudu píku lipofilních vitaminů pro jednotlivé elektrody	37
Obr. 9: Vliv obsahu silikonového oleje v uhlíkové pastě na oxidační signály lipofilních vitaminů o $c = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ každého vitaminu; pracovní roztok $0,1 \text{ M KCl}$ a $0,01 \text{ M HCl}$ o hodnotě pH 2,07; GCPE.	38
Obr. 10: Závislost proudu píku lipofilních vitaminů na obsahu silikonového oleje v uhlíkové pastě. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku pro $n = 5$	39
Obr. 11: Závislost proudu píku na množství acetonitrilu ve vodném roztoku. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku pro $n = 5$	40
Obr. 12: Voltamogramy vitaminů o $c = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ každého vitaminu při různých časech extrakce, pracovní roztok $0,1 \text{ M KCl}$ a $0,01 \text{ M HCl}$ o hodnotě pH 2,07, GCPE.	41
Obr. 13: Závislost proudu píku lipofilních vitaminů na době extrakce. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku $n = 5$	41
Obr. 14: Voltamogramy vitaminů o $c = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ při různém pH detekčního roztoku; Brittonův-Robinsonův pufr; GCPE.	43
Obr. 15: Závislost proudu píku na pH detekčního roztoku, koncentrace vitaminu D, E a K $c = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku $n = 5$	43

Obr. 16: Voltamogramy vitaminů o koncentraci každého vitaminu $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ při různé amplitudě pulzu; acetátový pufr o hodnotě pH 5; GCPE.	44
Obr. 17: Závislost velikosti proudů píků vitaminů rozpustných v tucích na hodnotě amplitudy. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku $n = 5$	45
Obr. 18: Voltamogramy vitaminů o koncentraci každého vitaminu $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ při různé době mezi pulzy; acetátový pufr; GCPE.....	46
Obr. 19: Graf závislosti velikosti proudů píků vitaminů při různé době mezi pulzy. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku $n = 5$	46
Obr. 20: Kalibrační křivka, rozmezí koncentrace vitaminu K $c = 10-50 \mu\text{mol.l}^{-1}$, vitamin D $c = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$, vitamin E $c = \mu\text{mol.l}^{-1}$, acetátový pufr, pH 5, GCPE.	47
Obr. 21: Voltamogram vitaminu K pro koncentrace $10-50 \mu\text{mol.l}^{-1}$, vitamin E $c = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a vitaminu D $c = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$	48
Obr. 22: Graf závislost proudu na koncentraci jednotlivých vitaminu rozpustných v tucích. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku $n = 5$	48
Obr. 23: Kalibrační křivka pro rozmezí koncentrace vitaminu K $c = 10-50 \mu\text{mol.l}^{-1}$, vitamin E $c = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$, acetátový pufr, pH 5, GCPE (parafinový olej), DPV.....	49
Obr. 24: Kalibrační křivka pro rozmezí koncentrace vitaminu E $c = 5-25 \mu\text{mol.l}^{-1}$, vitamin K $c = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$, acetátový pufr, pH 5, GCPE (parafinový olej), DPV.....	50
Obr. 25: Kalibrační křivka simultánního stanovení vitaminu K $c = 10-50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a vitaminu E $c = 5-30 \mu\text{mol.l}^{-1}$, acetátový pufr, pH 5, GCPE (parafinový olej), DPV.....	50
Obr. 26: Kalibrační křivka pro koncentrační rozsah vitaminu K $c = 10-60 \mu\text{mol.l}^{-1}$, vitamin E $c = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$, acetátový pufr, pH o hodnotě 5, GCPE (parafinový olej), SWV.	51
Obr. 27: Voltamogram vitaminu K a E pro koncentraci $c = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$, acetátový pufr o hodnotě pH 5, GCPE (silikonový olej DC 200).	51
Obr. 28: Voltamogram vitaminu K a E pro rozsah koncentrací $c = 10-30 \mu\text{mol.l}^{-1}$, acetátový pufr o hodnotě pH 5, GCPE (směs silikonových olejů).	52
Tab. 1: Fyzikální vlastnosti vitaminu A.....	15
Tab. 2: Obsah retinolu a karotenoidů ve vybraných potravinách.	22
Tab. 3: Přehled kalciferolů ve vybraných potravinách.	23
Tab. 4: Obsah tokoferolů v potravinách.....	23
Tab. 5: Hodnoty obsahu vitaminu K v některých potravin.	24

Seznam použitých zkratek

α -TOH	α -tokoferol
ACN	acetonitril
DPV	diferenční pulzní voltametrie
GC	plynová chromatografie
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
GCPE	uhlíková pastová elektroda ze skelného uhlíku
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
MWCNT-GE	skelná uhlíková elektroda modifikovaná vícečetnými uhlíkovými nanotrubičkami
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadeninnukleotidfosfát
NP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s normálními fázemi
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi
SCE	nasyčená kalomelová elektroda
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TOQ	tokoferol chinon
UV	ultrafialové záření
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě

Úvod

Lipofilní vitaminy jsou nízkomolekulární esenciální látky nezbytné pro lidské zdraví. Tyto vitaminy nemohou být syntetizovány v lidském těle, a proto musí být dodávány v potravě. Lidské tělo potřebuje pouze malé množství těchto vitaminů. Při nedostatečném množství vitamínu v organismu dochází k chorobným změnám a k projevům hypovitaminózy. Naopak při nadbytečném množství dochází k předávkování, tedy hypervitaminóze. Analýza lipofilních vitaminů rozpustných v tucích je složitá a časově náročná. V současné době se lipofilní vitaminy stanovují pomocí chromatografických technik, zejména pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Lipofilní vitaminy se řadí se do čtyř hlavních skupin (vitamin A, D, E a K). V dostupných elektrochemických studiích je největší pozornost věnována stanovení vitamínu E. Voltametrickému simultánnímu stanovení lipofilních vitaminů na uhlíkových pastových či jiných elektrodách nebyla dosud věnována velká pozornost. Cílem této práce je určit, zda-li je možné navrhnout a prakticky použít voltametrickou metodu pro simultánní stanovení těchto lipofilních vitaminů na uhlíkové pastové elektrodě. Pro elektrochemickou detekci po extrakci vitaminů je použita diferenční pulzní voltametrie, která se velmi často používá při elektrochemické analýze organických látek. Takové elektrochemické stanovení by bylo oproti chromatografickým technikám rychlejší, méně pracnější a finančně nenáročné.

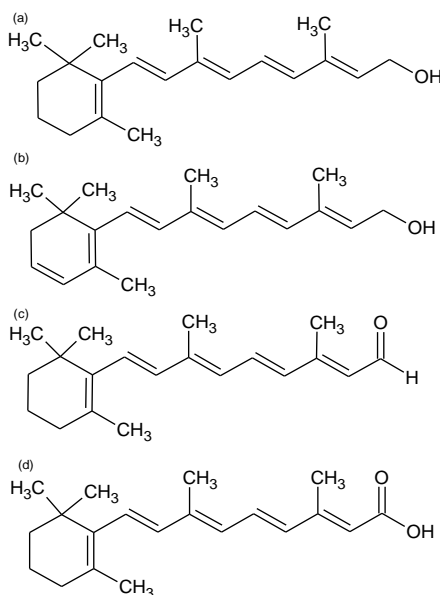
1 Teoretická část

1.1 Lipofilní vitaminy a jejich vlastnosti

Lipofilní vitaminy jsou nepolární organické sloučeniny, které jsou nezbytné pro správnou funkci lidského metabolismu. Samotné vitaminy nemohou být v potřebném množství v organismu syntetizovány, a proto musí být přijímány v potravě. Některé původní formy vitaminů musí projít chemickou změnou, aby byly biologicky aktivní. Existují čtyři hlavní skupiny vitaminů rozpustných v tucích: jsou to vitaminy skupiny A (*all-trans*-retinoidy), skupiny D (cholecalciferol a ergocalciferol), skupiny E (tokoferoly a tokotrienoly) a skupiny K (fylochinony). Tyto vitaminy jsou součástí fosfolipidových dvojvrstevných membrán, které tvoří stěny buněk. Zmíněné vitaminy se používají i v oborech, jako je farmacie, léčiva a kosmetika. [1, 2, 3].

1.1.1 Retinoidy

Vitamin A (retinol) je po chemické stránce alkohol s šestičlenným cyklem a s postranním řetězcem, který se skládá ze čtyř dvojných vazeb. Podle počtu dvojných vazeb rozeznáváme vitamin A₁ (retinol) a vitamin A₂ (dehydroretinol). Biologicky aktivní látkou této skupiny vitaminů je *all-trans*-retinol (vitamin A₁) a jeho dva deriváty - kyselina retinová a retinal. Chemické struktury retinoidů jsou prezentovány na obr. 1 [4, 5, 6].



Obr. 1: Skupina vitaminů A: a) retinol, b) dehydroretinol, c) retinal, d) kyselina retinová

1.1.1.1 Fyziologické účinky

Retinoidy se vstřebávají v tenkém střevě. Po resorpci z trávicího traktu dojde k esterifikaci retinolu a následuje transport lymfatickou cestou do jater. Vitamin A se podílí na tvorbě zrakového pigmentu, a je tedy nezbytný pro proces vidění. Dále se uplatňuje při diferenciaci a růstu epitelových buněk, při vývoji plodu, při zrání pohlavních buněk a ovlivňuje syntézu bílkovin, nukleových kyselin a lipoproteinů [4, 5].

Retinol spolu s kyselinou hyaluronovou má také příznivé účinky v estetické oblasti, napomáhá redukovat různé příznaky stárnutí, jako jsou pigmentové skvrny a vrásky [7].

Nedostatek vitaminů A má za následek zhoršení zraku, šeroslepost a poruchu nervového systému. Nadbytek vitaminu A je zvláště nebezpečný pro těhotné ženy, protože retinol může ve vyšších dávkách způsobovat vrozené vývojové vady. Projevem nadbytku může být zvracení, bolest hlavy, praskání a krvácení rtů [5, 8, 9, 10].

1.1.1.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Vitamin A vytváří bledě žluté jehlicovité krystalky. Vůči teple je retinol stálý a je citlivý ke světlu. V přítomnosti kyslíku a těžkých kovů (Fe, Cu) se oxiduje a rozkládá. Ke stabilizaci se používají různé antioxidanty, zejména tokoferoly a fosfolipidy, které nejsou fyziologicky účinné. Retinoidy jsou dobře rozpustné v tucích, chloroformu, ethanolu a etherech [11]. Teploty tání a absorpční maxima retinolu jsou uvedeny v tab. 1.

Sloučenina (<i>all-trans</i> -vitamin A ₁)	Teplota tání (°C)	Absorpční maxima (nm)
acetát	57-58	325-8
alkohol	64	325
methylester	34-35	327
palmitát	28-29	325-8

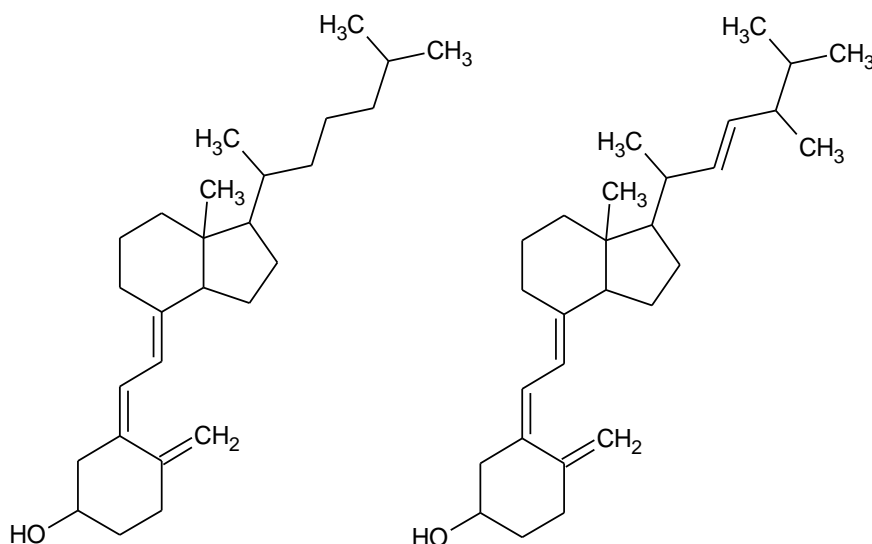
Tab. 1: Fyzikální vlastnosti vitaminu A

1.1.1.3 Elektrochemické chování

K oxidaci retinolu dochází na uhlíkové pastové elektrodě při potenciálu + 0,8 V vs. Ag/AgCl ve směsi methanol-voda. Také je možné retinol na uhlíkových pastových elektrodách oxidovat v tetrahydrofuranu (THF), jehož součástí je tetrabutylamonium chlorid, dále ve směsi acetonitril-voda s obsahem LiClO₄ nebo v methanolu obsahující acetátový pufr [12].

1.1.2 Kalciferoly

Vitamin D (kalciferol) je znám jako steroidní prekurzor, což znamená, že není bioaktivní, ale aktivuje se až v těle. Nejvýznamnější jsou vitamin D₃ (cholecalciferol) a vitamin D₂ (ergokalciferol). Vitaminy D vznikají z prekurzorů, které se označují provitaminy D. Vitamin D₃ (9,10-seko- δ -dehydrocholestatrien-3 β -ol) vzniká z provitaminu 7-dehydrocholesterolu, který je živočišného původu. Vitamin D₂ (9,10-seko- δ -ergostatetraen-3 β -ol) vzniká z prekurzoru ergosterolu, který se nachází v rostlinách. Ve struktuře provitaminů D jsou cyklopentaperhydrofenanthreny, které obsahují methylenové skupiny, hydroxylovou skupinu a systém konjugovaných dvojných vazeb lišící se v rozdílném uspořádání a v délce bočního řetězce. Chemické struktury vitaminu D jsou zobrazeny na obr. 2 [5, 6, 13].



Obr. 2: Skupina vitaminů D: cholecalciferol (vlevo), ergokalciferol (vpravo)

1.1.2.1 Fyziologické účinky

Cholekalciferol a ergokalciferol jsou hydroxylovány v játrech v endoplazmatickém retikulu za vzniku 25-hydroxykalciferolu (kalcidiolu). Dále jsou v ledvinách metabolizovány působením 1- α -hydroxylázou na 1,25-dihydroxykalciferol (kalcitriol). Kalcitriol působí na receptory regulující metabolismus vápníku, ale také se podílí na absorpci vápníku ve střevě a zajišťuje homeostázu vápníku a fosforu v organismu [5].

Nedostatek vitaminů D má zásadní vliv na metabolismus vápníku. Především se absence vitaminu projevuje osteoporózou. Toto onemocnění způsobuje křehkost kostí, hnutí páteře a zvýšené riziko zlomeniny. U malých dětí se nedostatek může projevit rachitidou (deformace kostí). Nadbytek vitaminu D je vzácný. Projevem vyšší dávky vitaminu může být bolest hlavy, nauzea, diarea a zmatenost [5, 8].

1.1.2.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Kalciferoly jsou bezbarvé krystalické látky, které kvůli přítomnosti dvojných vazeb silně absorbují ultrafialové záření. Vitaminy skupiny D jsou nerozpustné ve vodě, ale snadno rozpustné v olejích, ethanolu, acetonu, chloroformu a etheru. Cholekalciferol je za vysokých teplot stálý, ale při zahřívání nad teplotu 200 °C dochází k izomeraci na dva pyroderiváty – pyrokalciferol a isopyrokalciferol. Ergokalciferol rozpuštěný v tucích nebo alkalickém prostředí je stálý i za zvýšených teplot, vlivem kyselin jeho stabilita klesá [11].

1.1.2.3 Elektrochemické chování

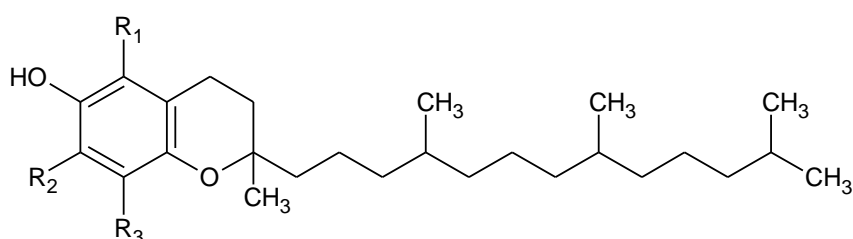
Vitaminy D₂ a D₃ jsou oxidovány na uhlíkové pastové elektrodě v ethanolu, který obsahuje LiClO₄ při potenciálu + 1,1 V vs. SCE. Při cyklické voltametii vitaminu D₂ a D₃, která probíhá ve směsi methanolu a acetátového pufru, je pozorován jeden nevratný píku [8].

Vitamíny D₂ a D₃ lze také elektrochemicky detekovat na skelné uhlíkové elektrodě modifikované nanokrystaly AuPd. Při cyklické voltametii vitaminu D₂ a D₃, která probíhala ve směsi dichlormethan-voda, acetonitril-voda a ethanol-voda, byly pozorovány oxidační píky vitaminu D₂ při potenciálu + 0,67 V v ethanolu, +1,0 V v acetonitrilu a 1,36 V v dichlormethanu. Nejlépe definované píky byly ve směsi

ethanol- voda (40%:60%). Vitamín D₃ vykazoval podobné oxidační potenciály jako vitamín D₂ [14].

1.1.3 Tokoferoly

Vitamin E jsou látky, které jsou odvozeny od tokolu (2-methyl-2-(4',8',12'-trimethyltrideca)-chroman-6-ol) a tokotrienolu (2-methyl-2-(4',8',12'-trimethyldeca-3',7',11'-trienyl(-chroman-6-ol), které obsahují chromanový cyklus s bočním řetězcem lišící se biologickou aktivitou, polohou a počtem methylových skupin. Na obrázku 3 jsou znázorněny chemické struktury tokoferolů a tokotrienolů [5, 6].

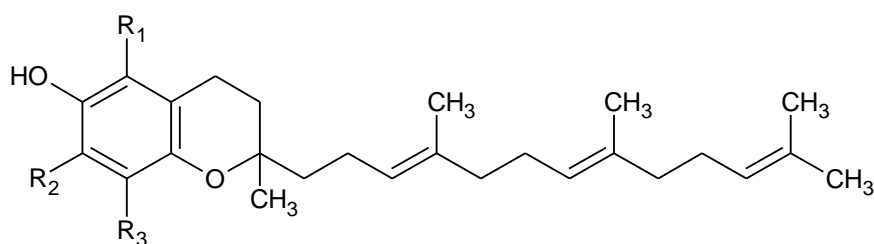


$R_1, R_2, R_3 = -CH_3$ α -tokoferol

$R_2 = -H, R_1, R_3 = -CH_3$ β -tokoferol

$R_1 = -H, R_2, R_3 = -CH_3$ γ -tokoferol

$R_1, R_2 = -H, R_3 = -CH_3$ δ -tokoferol



$R_1, R_2, R_3 = -CH_3$ α -tokotrienol

$R_2 = -H, R_1, R_3 = -CH_3$ β -tokotrienol

$R_1 = -H, R_2, R_3 = -CH_3$ γ -tokotrienol

$R_1, R_2 = -H, R_3 = -CH_3$ δ -tokotrienol

Obr. 3: Chemické struktury tokoferolů a tokotrienolů

1.1.3.1 Fyziologické účinky

Vitamin E je spolu s tuky vstřebáván v tenkém střevě, kde nejdříve pronikne do chylomikronů. Odtud je transportován do tkání, které obsahují lipoproteinlipasy. Dále přechází do jater, z jater je roznášen VLDL částicemi a ukládá se v tukové tkáni [5].

Vitamin E se uplatňuje při prevenci kardiovaskulárních onemocnění a zabraňuje vzniku rakoviny. Tokoferol zlepšuje sexuální výkonnost, u mužů má pozitivní vliv na spermatogenezi a u žen má zase vliv na plodnost. V těhotenství je důležitý pro zdravý vývoj plodu [8].

Nedostatek vitamínu E se může projevit neurogenerativními onemocněními, jako je Parkinsonova a Alzheimerova choroba. Mezi další projevy patří porucha vstřebávání tuků, epilepsie a onemocnění jater a ledvin. Nadbytek vitamínu se vyskytuje velice vzácně, příznaky mohou být bolesti hlavy a diarea [5, 8].

1.1.3.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Tokoferoly jsou bezbarvé nebo lehce nažloutlé viskózní oleje, které jsou nerozpustné ve vodě, ale snadno rozpustné v tucích a nepolárních rozpouštědlech. Mají silné redukční účinky a velmi snadno podléhají oxidaci. V přítomnosti UV záření dochází k velmi rychlému rozkladu [11].

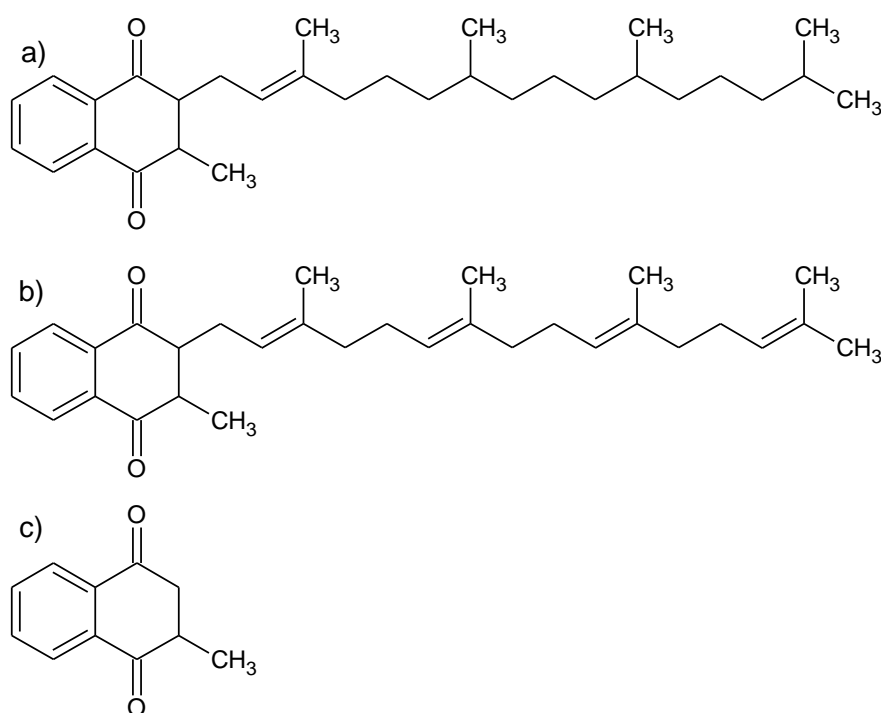
1.1.3.3 Elektrochemické chování

Voltametrické chování α -tokoferolu v aprotických organických rozpouštědlech (CH_3CN , CH_2Cl_2) prokázalo, že existuje řada oxidovaných forem vitamínu E. Přítomnost či nepřítomnost kyselin nebo bází má hlavní vliv na elektrochemické chování vitamínu. V nepřítomnosti kyseliny či báze dochází k oxidaci α -TOH jedním elektronem při + 0,5 V vs. Fc/Fc^+ a vznikne radikálový kationt α -TOH^{•+}. Ten se deprotonizuje a vytvoří neutrální radikál α -TO[•], který se ihned oxiduje na fenoxi kationt α -TO⁺. Další zásadní vliv na elektrochemické chování tokoferolu má přítomnost vody. Pokud je v rozpouštědle přítomna voda dochází k hydrolyze α -TO⁺ a vytváří se α -TOQ(OH), který dále reaguje na chinonovou formu (α -TOQ) [12, 15].

β -, γ -, δ -tokoferoly se chovají elektrochemicky stejně, jako α -tokoferol. Liší se pouze tím, že fenoxi kationty mají podstatně kratší životnost a rychleji podléhají hydrolyze [15].

1.1.4 Naftochinony

Naftochinony jsou vitaminy s navázaným postranním polyisoprenovým řetězcem. Mezi tyto vitaminy řadíme vitaminy K₁, K₂ a K₃ (viz. obr. 4). Vitamin K₁ neboli fyllochinon se nachází především v potravinách rostlinného původu a na třetím uhlíku se nachází ftylová skupina. Vitamin K₂ neboli menachinon je produkovaný střevní mikroflórou (zejména bakterií *Escherichia coli* a bakterií *Staphylococcus aureus*) a na třetím uhlíku je navázán polyisoprenový řetězec, který se skládá z 4 – 13 isoprenových jednotek. Vitamin K₃ neboli menadion je vyroben synteticky a jeho aktivita se v organismu projeví až po alkylnaci na menachinon [4, 5, 6].



Obr. 4: Skupina vitaminů K: a) fyllochinon, b) menachinon, c) medadion.

1.1.4.1 Fyziologické účinky

Naftochinony se resorbují v přítomnosti žlučových kyselin a pankreatických enzymů. V plazmě se pohybují především pomocí LDL částic. Naftochinony se ukládají v játrech. Vitamin K₃ je rozpustný ve vodě a resorbuje se i v nepřítomnosti žlučových kyselin [5].

Vitamin K má podíl při aktivaci protrombinu, který se přeměňuje na trombin a dále je nutný k syntéze dalších koagulačních faktorů krve (VII, IX a X). Také se účastní kostního metabolismu a vaskulární kalcifikace [5, 16].

Nedostatek vitamínu K může způsobit poruchu srážení krve, a to proto, že tělo netvoří protrombin. Nejčastěji nedostatkem trpí novorozenci a kojenci, kteří jsou krmeni pouze mateřským mlékem, které má malý obsah vitamínu K. Nadbytek se může projevit nadměrným pocením, horečkami nebo návaly horka a zimy. Přebytek se vyskytuje pouze ojediněle [5, 8].

1.1.4.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Vitamin K₁ je olejovitá žlutá látka, která se při prudkém ochlazení stane látkou krystalickou. Vitamíny K₂ a K₃ jsou žlutě zbarvené látky ve tvaru jehlic. Všechny tyto vitamíny jsou citlivé vůči světlu, kyselinám a alkalického prostředí. Jsou dobře rozpustné v tučných, organických rozpouštědlech a ethanolu, naopak jsou nerozpustné ve vodě [11].

1.1.4.3 Elektrochemické chování

Vitamin K, jako chinoidní sloučenina v aprotických organických rozpouštědlech ve dvou po sobě jdoucích krocích ztrácí dva elektrony. V CH₃CN nejdříve ztrácí jeden elektron při - 1,2 V vs. Fc/Fc⁺ za vzniku radikálového aniontu, a ten je dále redukován při - 1,7 V vs. Fc/Fc⁺ za vzniku dianiontu. Oba tyto elektrochemické kroky elektronového přenosu jsou reverzibilní [15].

1.2 Lipofilní vitamíny v potravinách

1.2.1 Vitamin A v potravinách

Vitamin A se vyskytuje pouze v potravinách živočišného původu. V potravinách rostlinného původu se nevyskytuje, ale je přítomen ve formě karotenů a xanthofylů. Zdrojem retinolu jsou převážně mléčné výrobky s vyšším obsahem tuků (mléko, sýry, máslo, jogurty), vejce, vnitřnosti (játra, ledviny, srdce), rybí maso a tuk (olej z rybích jater). Karotenoidy jsou obsaženy v ovoci a zelenině (špenát, petržel, meruňky, zelí, mango, mrkev). Obsah retinolu a karotenoidů ve vybraných potravinách je uveden v tab. 2 [5, 6, 17].

Potravina	Obsah (mg kg ⁻¹)	Potravina	Obsah (mg kg ⁻¹)
Játra	30-400	Špenát	50-480
Olej z rybích jater	265	Meruňky	6-20
Máslo	5-10	Mango	20
Vejce	0,5-1,5	Petržel	30-260
Sýry	1,6-3,2	Mrkev	20-95
Mléko	0,4-9,5	Zelí	3-74

Tab. 2: Obsah retinolu a karotenoidů ve vybraných potravinách.

U dospělých je doporučená denní dávka 0,8-1,0 mg a u dětí 0,4 až 0,6 mg za den. Tato potřeba je u vitamínu pokryta asi z 50 % z prekurzorů potravin rostlinného původu. Další 40 % potřeby zajišťují retinoidy zeleniny, 20 % retinoidy masa, 15 % retinol spolu s retinoidy mléka a 8 % retinoidy ovoce a tuků [6].

Pro stanovení vzorku je potřeba provést několik přípravných procedur k jeho zpracování: homogenizaci vzorku, alkalickou hydrolýzu vzorku, extrakci vzorku organickými rozpouštědly, nejčastěji diethyletherem a *n*-hexanem. Alkalickou hydrolýzou se estery všech forem vitamínů přemění na alkoholy, tuky jsou hydrolyzovány na mastné kyseliny a glycerol, které mohou být od organických rozpouštědel separovány extrakcí [18].

1.2.2 Vitamin D v potravinách

Cholekalciferol se přirozeně vyskytuje v potravinách živočišného původu. Významné množství cholekalciferolu je obsaženo v jaterních tucích mořských ryb (halibut, makrela, treska), ale také v mase tučných ryb (sleď, sardinka, losos). V malých koncentracích je naopak obsažen v mase a vnitřnostech hospodářských zvířat a jejich živočišných produktech (mléko, mléčné výrobky, vejce). Obsah vitamínu v potravinách je určován mnoha faktory; například hladina cholekalciferolu v mléce je v zimě čtyřikrát nižší než v létě. Z potravin rostlinného původu je dobrým zdrojem kokosové máslo a houby, zejména hříby. Ergosterol se nachází ve velkém množství plísní, a proto je přítomen v plísňových sýrech. Doporučená denní dávka vitamínu D je 2,5-10 µg za den, ale u kojenců, dětí a těhotných žen je dávka vyšší [10]. Přehled vybraných potravin je uveden v tab. 3 [5, 6].

Potravina	Obsah ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Potravina	Obsah ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Maso	3	Hřiby	21
Játra	2-11	Žampiony	5,3-1,58
Mléko	1	Halibut v oleji	35000
Smetana	4	Sardinky	345
Máslo	10-20	Tuňák	50-80
Sýry	8	Rybí tuk	2500
Vejce	30-50	Losos sterilovaný	78,5
Kakaový prášek	750	Karotka	0,7

Tab. 3: Přehled kalciferolů ve vybraných potravinách.

1.2.3 Vitamin E v potravinách

Tokoferoly se tvoří pouze v rostlinách a jsou přítomny v lipidech rostlinného původu. Hlavním zdrojem jsou rostlinné oleje (slunečnicový, řepkový, sójový, olej z pšeničných klíčků), ve velkém množství jsou obsaženy v jádrech ořechů, hrášku, kukuřici a ovesné mouce. V potravinách živočišného původu se vyskytuje v malých koncentracích. Z živočišných produktů se vyskytuje ve vejcích, ve vepřovém a králičím mase, v játrech a vnitřnostech. Obsah tokoferolů v potravinách je shrnut v tab. 4 [5, 6].

Potravina	Obsah (mg kg^{-1})	Potravina	Obsah (mg kg^{-1})
Králík	10	Ovesné vločky	37
Margarín	7	Vlašské ořechy	200
Palmový olej	100	Jablka	5,9
Vejce	10	Rýže	10,2
Hrášek	30	Ryby	4-80
Maso	2,5-7,7	Sýry	3-3,5
Mrkev	20	Mléko	0,2-1,2

Tab. 4: Obsah tokoferolů v potravinách.

Doporučená denní dávka vitamínu E závisí na příjmu polyenových mastných kyselin z potravin. Pro jedince s příjmem mastných kyselin okolo 20 g za den je hodnota denního příjmu 12,5-15 mg. U těhotných žen je příjem o 2 mg vyšší a u kojících žen dokonce až o 5 mg vyšší [5, 6].

1.2.4 Vitamin K v potravinách

Vitamin K je rozšířen v potravinách rostlinného i živočišného původu. V potravinách rostlinného původu se hojně vyskytuje vitamin K₁. Nejčastějším zdrojem je špenát, zelí, květák, brokolice a rostlinné oleje (sójový, olivový). Živočišným zdrojem jsou především játra, vejce, maso a mléčné výrobky. Hodnoty obsahu některých potravin jsou prezentovány v tab. 5 [5, 6].

Potravina	Obsah (mg/kg)	Potravina	Obsah (mg/kg)
Brambory	0,2	Maso	0,03
Oves	0,75	Vejce	0,02
Sójový olej	1,93	Mléko	0,01-0,03
Zelí	2,5	Játra	1,1-4,0
Špenát	3,34	Jahody	0,01
Kukuřice	0,1	Olivový olej	0,55

Tab. 5: Hodnoty obsahu vitamínu K v některých potravin.

Doporučené výživové dávky zatím nebyly stanoveny ani u nás, ani v jiné zemi. Doporučené množství se odhaduje na 0,01-0,14 mg za den. U kojenců a dětí je potřeba vitamínu nižší (0,005-0,05 mg za den) [5, 6, 8].

1.3 Voltametrické metody pro elektroanalýzu lipofilních vitamínů

1.3.1 Cyklická voltametrie

Tuto techniku lze použít ke studii elektrochemických reakcí ve vodných nebo organických rozpouštědlech. Potenciál trojúhelníkového průběhu s rychlostí polarizace dE/dt je vkládán na stacionární elektrodu v nemíchaném roztoku. Výsledkem je polarizační křivka (závislost proudu na vloženém potenciálu), která má tvar píku. Výška píku je ovlivněna koncentrací analytu a rychlosti polarizace. Výhodou je sledování redukčních a oxidačních procesů. Cyklická voltametrie je ovlivněna elektrochemickým chováním lipofilních vitamínů, které ovlivňuje jejich další stanovení. Tuto metodu není vhodné používat pro analytickou aplikaci, protože podobnou odezvu může dávat mnoho látek. Dosavadní elektrochemické studie všech lipofilních vitamínů byly prováděny

cyklickou voltametrií na GCE elektrodě v organických rozpouštědlech nebo ve směsi voda-ethanol s povrchově aktivními látkami [12, 19, 20].

1.3.2 Square-wave voltametrie

Při square-wave voltametrii je na elektrodu vnášen lineárně měnící se potenciál modulovaný střídavými čtvercovými napěťovými pulzy o nízké amplitudě (asi 10 mV) a frekvenci přibližně 100 Hz. Proud se měří vždy před změnou potenciálu, tedy ke konci každého vloženého pulzu. Hodnoty proudu se vzájemně od sebe odečítají. Výhodou této metody je vysoká citlivost a schopnost potlačovat proudy pozadí [19, 21].

1.3.3 Diferenční pulzní voltametrie

Diferenční pulzní voltametrie je v současné době jednou z nejpoužívanějších elektroanalytických technik. Na lineárně měnící se potenciál je vkládán napěťový pulz o amplitudě 10-100 mV. Rozdíl proudů se zaznamenává před vložením pulzu a na jeho konci. Výsledný signál je následně získán odečtením proudu koncového pulzu od počátečního pulzu. Velikost amplitudy pulzu, rychlost skenování a doba trvání pulzu mají vliv na rychlost, citlivost a selektivitu analýzy. Poloha píku udává typ analytu a výška píku závisí na jeho koncentraci [19, 21].

1.3.4 Anodická rozpouštěcí voltametrie

Anodická rozpouštěcí voltametrie (ASV) je metoda vhodná pro stanovení nízkých koncentrací elektrochemicky aktivních látek. Analyt je nejprve nahromaděn na povrchu pracovní elektrody a jeho stanovení se provádí anodickou změnou potenciálu (elektrochemickou oxidací) směrem ke kladným hodnotám. Vhodnými voltametrickými technikami v detekčním kroku stanovení jsou DPV a SWV kvůli jejich dobré citlivosti. Oxidací lze stanovit vitaminy A, D a E [22, 23, 24, 25].

1.3.5 Katodická rozpouštěcí voltametrie

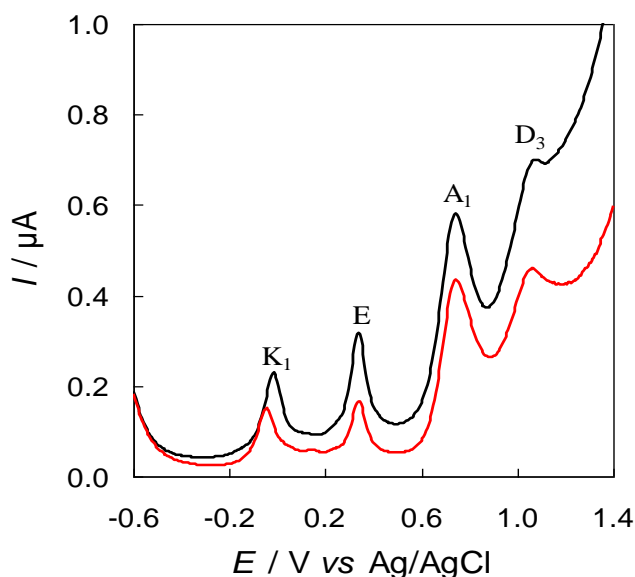
Katodická rozpouštěcí voltametrie (CSV) je obdobná jako ASV. Opět po nahromadění stanovované látky na povrchu elektrody se provádí detekce katodickým skenem potenciálu (elektrochemickou redukcí) směrem k záporným hodnotám. Detekce spočívá v redukcí samotného analytu nebo sloučenin vzniklých reakcí analytu a materiálu

elektrody. CSV může být stanoven vitamin K z důvodu přítomnosti chinonu v jeho struktuře [26].

1.3.6 Adsorptivní rozpouštěcí voltametrie

Při adsorptivní rozpouštěcí voltametii se při určitém potenciálu adsorbuje analyt na povrch elektrody a následně voltametrickým měřením dochází k jeho detekci a stanovení. Metoda je vhodná pro stanovení stopových koncentrací organických látek [19].

Adsorptivní rozpouštěcí voltametrie byla použita pro simultánní stanovení lipofilních vitaminů (retinol, cholekalciferol, α -tokoferol, fyllochinon) v margarínu. Elektrochemické měření bylo provedeno ve dvou krocích z důvodu lipofilního charakteru analytů. Nejdříve byla provedena akumulace na povrch skelné uhlíkové elektrody v 2.5 ml roztoku vzorku rozpuštěného v acetonitrilu a 7,5 ml vody po dobu 10 minut. Poté byla provedena diferenčně pulzní voltametrie nahromaděných vitaminů v acetátovém pufru. Bylo zjištěno, že tato metoda je vhodná pro kvalitativní stanovení lipofilních vitaminů. Voltamogram akumulovaných vitaminů v acetátovém pufru je znázorněn na obr. 5 [1].



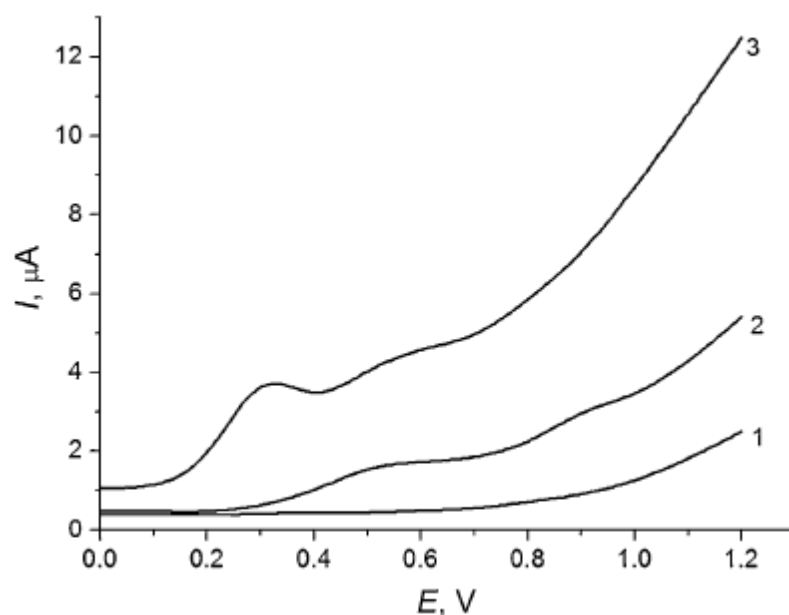
Obr. 5: Voltamogram adsorptivní rozpouštěcí voltametrie simultánního stanovení lipofilních vitaminů ($100 \mu\text{mol l}^{-1}$) adsorbovaných z 25% acetonitrilu na povrch pevné GCE při rychlosti 400 rpm po dobu 10 minut. Detekce pomocí DPV v $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ acetátovém pufru (pH 4,5) při $E_{\text{dep}} = -0,6 \text{ V}$, $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$, $E_{\text{amp}} = 25 \text{ mV}$, $\nu = 25 \text{ mV s}^{-1}$ (červená linie) a $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ (černá linie) [1].

1.3.7 Extraktivní rozpouštěcí voltametrie

Při extraktivní rozpouštěcí voltametii se analyt extrahuje do uhlíkové pasty a následně voltametrickým rozpouštěcím skenem dochází k detekci a stanovení analytu. Problémem této metody je reprodukovatelnost naměřených výsledků a optimalizace navržené metody. Měření se obvykle provádějí v čistých organických rozpouštědlech, popř. ve směsných vodně-organických prostředích. Detekce lipofilních vitaminů extrakcí do uhlíkové pasty se provádí ve dvou krocích. V prvním kroku se GCPE za stálého míchání a po určitou dobu vloží do vodně-organického roztoku, který obsahuje vitamin. Následně je GCPE s nahromaděným vitaminem omyta vodou a poté probíhá voltametrická detekce. Účinnost extrakce lipofilních vitaminů do pasty závisí na polaritě, množství použitého pojiva a velikosti částic uhlíkového prášku. Příliš vysoké množství pojiva v pastě může mít vliv na elektrochemické chování vitaminů [27, 28].

1.3.8 Specificky modifikované elektrody

Uhlíkové elektrody modifikované vícečlennými uhlíkovými nanotrubičkami (MWCNT-GE) byly použity pro stanovení α -tokoferolu a retinolu v léčivech. Povrch modifikované elektrody se vyznačoval zvýšenou drsností oproti nemodifikovaným elektrodám. Při porovnání s nemodifikovanou elektrodou byl pozorován významný pokles u potenciálu 0,2 V pro α -tokoferol (obr. 6). Obě látky byly měřeny v kyselině chloristé v acetonitrilu, jejich lineární koncentrační závislost byla v rozmezí 6,5 až $200 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ pro α -tokoferol a 5 až $150 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ pro retinol. Limity detekce byly pro α -tokoferol 5 mol l^{-1} a pro retinol 4 mol l^{-1} . Touto metodou byly rozšířeny analytické rozsahy a sníženy detekční limity stanovení pro α -tokoferol a retinol. O simultánním elektrochemickém stanovení lipofilních vitaminů s využitím MWCNT dosud není zmínka [29].



Obr. 6: Voltamogram pro $5,33 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ α -TOH na GCE (křivka 2), na MWCNT-GCE (křivka 3) a samotný $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ acetonitril (křivka 1).

1.4 Další analytické metody stanovení lipofilních vitaminů

1.4.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je typ separační techniky, kdy se od sebe oddělují složky analytu mezi dvě fáze, z nichž jedna je plynná a druhá pevná nebo kapalná. Mobilní fází je nosný plyn (He, N₂, H, Ar), který musí být inertní vůči fázi stacionární. Vzorek je dávkován do vyhřívaného prostoru, kde se vypaří a je unášen proudem plynu do kolony, která je umístěna v termostatu. Oddělené složky jsou unášeny nosným plynem až na detektor. Tato metoda není příliš vhodná pro všechny vitaminy rozpustné v tucích, protože některé jsou tepelně nestálé. Analyt lze separovat plynovou chromatografií pouze tehdy, pokud je provedena derivatizace, která se zakládá na převedení analytu na těkavější formu, například převedení retinolu na trimethylsilyl ether derivát. Plynová chromatografie je pro separaci lipofilních vitaminů náročná, jak na přípravu vzorku, tak na instrumentaci [30].

Stanovením obsahu retinolu a tokoferolu v drůbežích játrech pomocí plynové chromatografie se ve své studii zabýval Maraschiello a kolektiv. Vzorek drůbežích jater extrahovali v organickém rozpouštědle, zmýdelnili v KOH, čistili na pevné fázi a na závěr

analyzovali kapilární plynovou chromatografií s plamenově ionizačním detektorem. Průměrný obsah retinolu v drůbežích játrech byl 55,05 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a obsah tokoferolu byl 4,49 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ [18].

1.4.2 Kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je v současné době nejčastěji používanou metodou pro simultánní stanovení lipofilních vitaminů ve vzorcích potravin. Stejně jako v plynové chromatografii je separace látek založena na jejich distribuci mezi mobilní a stacionární fází a jejich vzájemném působení. HPLC je rozdělena dle polaritativy stacionární fáze na normální (NP-HPLC) a reverzní (RP-HPLC). U HPLC s reverzními fázemi má mobilní fáze polárnější charakter než fáze stacionární (C8, C18), u HPLC s normálními fázemi je tomu naopak.

Lipofilní vitaminy v mléce a v rybích produktech pomocí HPLC stanovovali Salo-Väänänen a kolektiv. Ve vzorcích byly stanovovány tokoferoly, *all-trans*-retinol, cholekalciferol a β -karoten. Vzorky byly homogenizovány, saponifikovány a rozpuštěny ve směsi *n*-hexan/ethylacetát, následně byla odpařena rozpouštědla, odparek byl rozpuštěn v hexanu a přefiltrován. U *all-trans*-retinolu a β -karotenu byla použita NP-HPLC s UV detektorem, u cholekalciferolu naopak RP-HPLC s detekcí UV-VIS. Tokoferoly byly detekovány fluorescenčním detektorem. Obsah α -tokoferolu v rybích produktech byl 6220 $\mu\text{g}\cdot 100^{-1}\text{ g}$, β -karotenu 107 $\mu\text{g}\cdot 100^{-1}\text{ g}$, cholekalciferolu 7 $\mu\text{g}\cdot 100^{-1}\text{ g}$ a *all-trans*-retinolu 8 $\mu\text{g}\cdot 100^{-1}\text{ g}$. V mléce byla hodnota α -tokoferolu 57 $\mu\text{g}\cdot 100^{-1}\text{ g}$, β -karotenu 13 $\mu\text{g}\cdot 100^{-1}\text{ g}$ a *all-trans*-retinolu 28 $\mu\text{g}\cdot 100^{-1}\text{ g}$. Tato technika se řadí mezi univerzální metody [31].

Vitaminy A a D byly společně stanoveny v krvi u jedinců s potravinovou alergií, kde se pro oba vitaminy ukázala jako standardní cesta chromatografická separace spojená s hmotnostní detekcí [32].

Metoda HPLC s elektrochemickou detekcí byla úspěšně aplikována při analýze vitamínu A, D a E ve vzorcích jogurtů. Nejprve byl vzorek izolován ve směsi hexan-chloroform (2:1, v/v), následovala centrifugace vzorku a odpaření rozpouštědla. Dále byla provedena saponifikace alkoholickým KOH a vzorek byl extrahován methanolem. Mobilní fází byla směs methanol-voda (99:1, v/v). Obsah vitamínu E ve vzorcích jogurtů byl 0,073-0,087 $\mu\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$, obsah vitamínu A byl 23-31 $\mu\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ a vitamín D nebyl elektrochemickým detektorem zachycen [33]

Stanovením vitamin D₃ a jeho metabolitu 25-hydroxyvitaminu D₃ ve vařeném a syrovém vepřovém mase pomocí HPLC s UV detekcí se ve své studii zabýval Clausen a kolektiv. Vzorky masa byly zhomogenizovány, zmýdelněny a následně extrahovány ve směsi diethylether-petrolether (1:1, v/v). Jako mobilní fáze byla použita směs propanol-heptan. Ve vařeném mase byl obsah vitaminu D₃ 0,08-0,24 µg.100 g⁻¹ a metabolitu 0,06- 0,18 µg.100 g⁻¹. V syrovém mase byl obsah vitaminu D₃ 0,05 – 0,21 µg.100 g⁻¹ a obsah metabolitu 0,07-0,14 µg.100g⁻¹. Obsah v syrovém mase byl závislý na tučnosti masa, a proto bylo nejvíce vitamin D₃ obsaženo ve vepřové kůži a nejméně v libovém mase [34].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je univerzální metoda, která se používá v potravinářském průmyslu, ale také při analýze piva a při zpracování obilovin (cereálie) [35, 36, 37].

1.4.3 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) je jednoduchá separační metoda, kterou lze rovněž použít pro stanovení lipofilních vitamínů. Separace probíhá na stacionární fázi, kterou je nejčastěji hliníková podložka tvořena sorbentem (silikagel, celulóza, oxid hlinitý), elucí mobilní fázi, kterou jsou vhodná organická rozpouštědla, díky nimž dochází ke vzlínání analytu. Vzorek je nanášen na vyznačenou linii startu, je ponořen do vyvíjecí komory, ve které jsou vhodná organická rozpouštědla, a separace probíhá, dokud čelo mobilní fáze nedosáhne k okraji podložky. Touto metodou se ve své studii zabýval Hossu a kolektiv. Zjistili, že nejlepší výsledky pro stanovení vitamínů A, D a E je separace probíhající na stacionární fázi Silica Gel 60 F254 na plastové fólii s mobilní fází hexan/ether (9:1) nebo benzen/chloroform (1:1). Identifikace byla provedena pomocí denzitometrie při vlnové délce 254 nm. Nevýhodou TLC je, že hrozí riziko oxidace a degradace vitamínů, proto je doporučeno pracovat v proudu dusíku při 0 °C a ve tmě [38].

1.4.4 Spektrální metody

Spektrální metody patří mezi citlivé analytické metody, kdy látka je schopna absorbovat elektromagnetické záření v ultrafialové, viditelné nebo infračervené oblasti v rozmezí 200–1000 nm. Spektrofotometrie je oblíbená technika kvůli její jednoduchosti a specifičnosti a také je méně náročná na instrumentaci a má nižší provozní náklady než HPLC [39].

Metoda byla použita ke stanovení vitamínu A ve farmaceutických přípravcích. Způsob stanovení retinolu byl uváděn za použití rozpustné a imobilizované látky alkohol dehydrogenázy izolované z králičích jater. Reakce byla založena na oxidaci retinolu a současné redukci NAD^+ na NADH . Následující spektrofotometrická detekce byla provedena při 340 nm [40].

2 Experimentální část

2.1 Použité chemikálie

(+)- α -Tokoferol	SIGMA-ALDRICH, Rakousko
Acetonitril	SIGMA-ALDRICH
Chlorid draselný	LACHEMA, Neratovice, ČR
Cholekalciferol (Vitamin D ₃)	Merck, Německo
Kyselina boritá	Lachema n.p. Brno, ČR
Kyselina fosforečná, 84%	Penta, Chrudim, ČR
Kyselina chlorovodíková, 32%	SIGMA-ALDRICH, Německo
Kyselina octová, 99-100%	SIGMA-ALDRICH, Německo
Octan sodný	SIGMA-ALDRICH, Německo
Parafínový olej	Merck, Darmstadt, Německo
Parafínový vosk	SIGMA-ALDRICH, Německo
Polypropylen	Fluka, Německo
Silikonový olej DC 200	Fluka, Německo
Silikonový olej „LUKOOIL“ M 5000	Lučební závody Kolín, ČR
Silikonový olej „LUKOOIL“ MV 8000	Lučební závody Kolín, ČR
Silikonový olej „LUKOOIL“ M 12500	Lučební závody Kolín, ČR
Uhlíkový prášek „Sigradur G“	HTW Maintigen, Německo
Uhlíkový prášek „Sigradur K“	HTW Maintigen, Německo
Vazelína	SIGMA-ALDRICH, Německo
Vitamin K ₁	SIGMA-ALDRICH, Rakousko

2.2 Příprava standardních roztoků

Pro přípravu standardních roztoků byly použity lipofilní vitaminy, a to vitamin D, vitamin E a vitamin K, které byly uchovávány v lednici při teplotě 5 °C. Standardní roztoky vitaminu D, E a K o koncentraci 0,01 mol⁻¹ byly připraveny do 10 ml odměrných baněk. Navážky pro jednotlivé vitaminy 0,0385 g pro vitamin D, 0,0449 g pro vitamin E a 0,0459 g pro vitamin K byly doplněny po rysku odměrné baňky acetonitrem. Tyto roztoky bylo nutno uchovávat v lednici při teplotě cca 5 °C.

2.3 Příprava zásobních elektrolytů

Pro přípravu zásobních roztoků byl použit: chlorid draselný, kyselina chlorovodíková, kyselina fosforečná, kyselina octová, kyselina boritá, hydroxid sodný, a octan sodný.

Zásobní roztok základního elektrolytu HCl + KCl byl vypočítán tak, aby výsledné pH mělo hodnotu 2. Pro přípravu roztoku bylo pipetováno 0,98 ml 32% kyseliny chlorovodíkové a naváženo 7,456 g chloridu draselného. Směs byla doplněna destilovanou vodou po rysku 1000 ml odměrné baňky.

Dále byl připraven do 500 ml odměrné baňky zásobní roztok Brittonova–Robinsonova pufru. K přípravě 500 ml zásobního roztoku bylo naváženo 1,2909 g kyseliny borité, která byla rozpuštěna v destilované vodě. K této navážce bylo napipetováno 1,40 ml 84% kyseliny fosforečné a 1,25 ml 99-100% kyseliny octové. Roztok byl doplněn po rysku odměrné baňky destilovanou vodou. Připravený roztok měl hodnotu pH 1,56. Na úpravu pH byl do 500 ml odměrné baňky připraven zásobní roztok hydroxidu sodného o koncentraci $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$. Tento zásobní roztok obsahoval 4 g hydroxidu sodného rozpuštěného v destilované vodě a byl doplněn po rysku 500 ml odměrné baňky. Ze zásobních roztoků byla připravena řada o hodnotě pH 2-10. K dosažení vhodného pH bylo odpipetováno vhodné množství hydroxidu sodného do roztoku kyselin.

Jako další elektrolyt byl připraven octanový pufr. Příprava pufru byla vypočítána tak, aby výsledný roztok měl hodnotu pH 5. Na přípravu 1000 octanového pufru bylo naváženo 13,608 g octanu sodného, který byl rozpuštěn v destilované vodě. K navážce bylo pipetováno 2,86 ml 99-100% kyseliny octové. Takto připravený roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysu 1000 ml odměrné baňky.

40% roztok acetonitrilu byl připraven odměřením 40 ml acetonitrilu a doplněním destilovanou vodou na objem 100 ml.

2.4 Příprava pastové elektrody ze skelného uhlíku

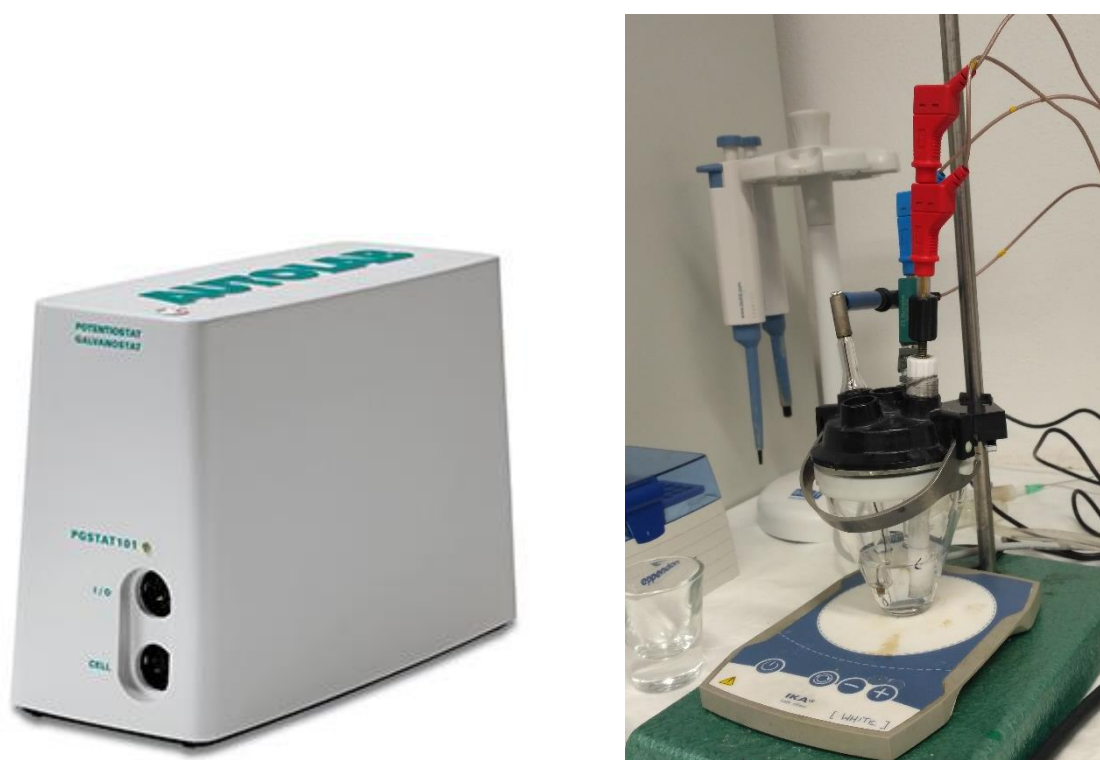
Uhlíková pasta byla připravena navážením vhodného množství skelného uhlíku (Sigradur G a Sigradur K) a pojiva (silikonový olej, parafínový olej, vazelína, polypropylen nebo parafínový vosk). Například pro přípravu uhlíkové pasty s obsahem 20 % pojiva bylo naváženo 0,9862 g uhlíkového prášku a 0,24655 g pojiva. Množství

uhlíkové pasty bylo voleno tak, aby pasta vydržela na celou sérii měření. Uhlíkový prášek a pojivo byly intenzivně míchány v porcelánové třecí misce po dobu 30 minut. Výsledná uhlíková pasta byla natlačena do teflonového držáku elektrody, jejíž průměr byl 3 mm. Součástí teflonového držáku je vodivý šroub, který slouží k vytlačení uhlíkové pasty. Malé množství pasty bylo vždy vloženo do pouzdra a důkladně stlačeno. Před každým měřením byl obnoven povrch elektrody vyleštěním a očištěním o vlhký filtrační papír.

2.5 Přístrojové vybavení

Voltametrická měření byla prováděna na elektrochemickém analyzátoru Autolab PGSTAT101 (Metrohm, Praha, ČR, obr. 7 - vlevo) s laboratorním stojanem pro elektrody, voltametrickou nádobkou a magnetickým míchadlem. Analyzátor byl s počítačem spojen pomocí USB rozhraní, přes které byl přístroj ovládán.

Pro elektrochemické měření byla použita pracovní elektroda GCPE (uhlíková pastová elektroda ze skelného uhlíku). Dále do tříelektrodového systému byly zapojeny pomocná elektroda z Pt plíšku a referentní chloridostříbrná elektroda $\text{Ag} | \text{AgCl} | 3\text{M KCl}$ (obr. 7 – vpravo).



Obr. 7: vlevo - elektrochemický analyzátor Autolab PGSTAT101, vpravo – měrný tříelektrodový systém s laboratorním stojanem a magnetickým míchadlem.

Měření pH hodnot připravených zásobních roztoků bylo prováděno na pH metru (typ inoLab® pH 720, WTW GmbH, Německo) s pH-elektrodou (SenTix 41, WTW GmbH, Německo). K navažování látek byly použity analytické váhy s přesností na čtyři desetinná místa značky KERN.

2.6 Pracovní postupy

2.6.1 Extrakce

Extrakce lipofilních vitaminů do uhlíkové pasty probíhala ve vodně-organickém roztoku o objemu 10 ml. Roztokem byl 40% (v/v) acetonitril s obsahem 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$ každého vitaminu (50 μl cholekalciferolu, 50 μl α -tokoferolu a 50 μl fyllochinonu o koncentraci 0,01 mol l^{-1}). Směs byla míchána magnetickým míchadlem rychlostí 400 otáček za minutu. Obnovená a vyleštěná uhlíková pastová elektroda byla obvykle za stálého míchání vložena do roztoku na dobu 10 minut. Následně byla elektroda s nahromaděnými vitaminy z roztoku vyjmuta a omyta destilovanou vodou.

2.6.2 Voltametrické měření

Vlastní voltametrické měření bylo prováděno v tříelektrodovém systému, jak již bylo uvedeno výše (obr. 7 – vpravo). Měření probíhalo v 20 ml acetátového pufru, Brittonově-Robinsonově pufru nebo ve směsi HCl + KCl. K zaznamenávání a vyhodnocování výsledků byl použit software NOVA 1.11. Po skončení měření byla pracovní elektroda opláchnuta destilovanou vodou a připravena k další extrakci vytlačení cca 5 mm pasty. Poté byl obnoven povrch elektrody očištěním a vyleštěním o vlhký filtrační papír.

Pro většinu měření byla použita diferenčně pulzní voltametrie, která zahrnovala výběr nejvhodnější elektrody, elektrolytu, a následnou optimalizaci elektrochemické detekce (např.: výběr pH, amplitudy). Experimenty byly prováděny v pufru, který je uváděn dále dle příslušného experimentu.

Přístrojové parametry byly tyto:

Počáteční potenciál: - 0,4 V

Koncový potenciál: 1,4 V

Rychlost skenu: 100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$

Amplituda pulzu: 0,025 V

Metoda square wave voltametrie a cyklická voltametrie byly použity pro srovnání citlivosti s metodou diferenčně pulzní voltametrie. Povrch elektrody byl očištěn a vyleštěn stejně jako u DPV.

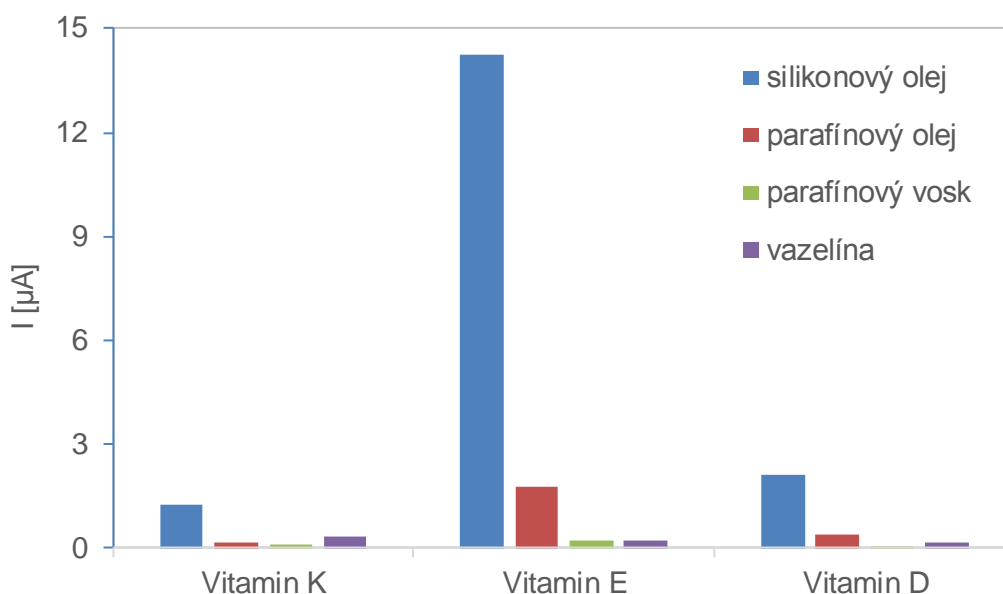
3 Výsledky a diskuze

3.1 Optimalizace akumulace vitaminů

3.1.1 Výběr elektrodového pojiva

Pro výběr vhodného elektrodového pojiva byly připraveny uhlíkové pasty s odlišnými pojivy (silikonový olej, parafínový olej, parafínový vosk, vazelína, polypropylen) s obsahem 20 %. Extrakce probíhala ponořením pracovní elektrody do vodného roztoku acetonitrilu (40% obsah acetonitrilu), s přidavkem $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ každého vitaminu po dobu 10 minut při rychlosti míchání 400 otáčkách za minutu. Voltametrické měření probíhalo v základním elektrolytu HCl + KCl o hodnotě pH 2,07.

Na obrázku 8 je srovnání průměrných naměřených hodnot ($n = 5$) proudu cholekalciferolu, α -tokoferolu a fyllochinonu, ze kterých vyplývá, že největší odezvu měla elektroda, která obsahovala uhlíkovou pastu tvořenou silikonovým olejem. Při použití uhlíkové pasty, kde byl jako pojivo použit polypropylen, nebyl detekován žádný pik. Uhlíková pastová elektroda s parafínovým olejem, pastová elektroda s parafínovým voskem i pastová elektroda s vazelínou poskytovaly signál, ale jejich odezva byla znatelně nižší než u pastové elektrody se silikonovým pojivem.

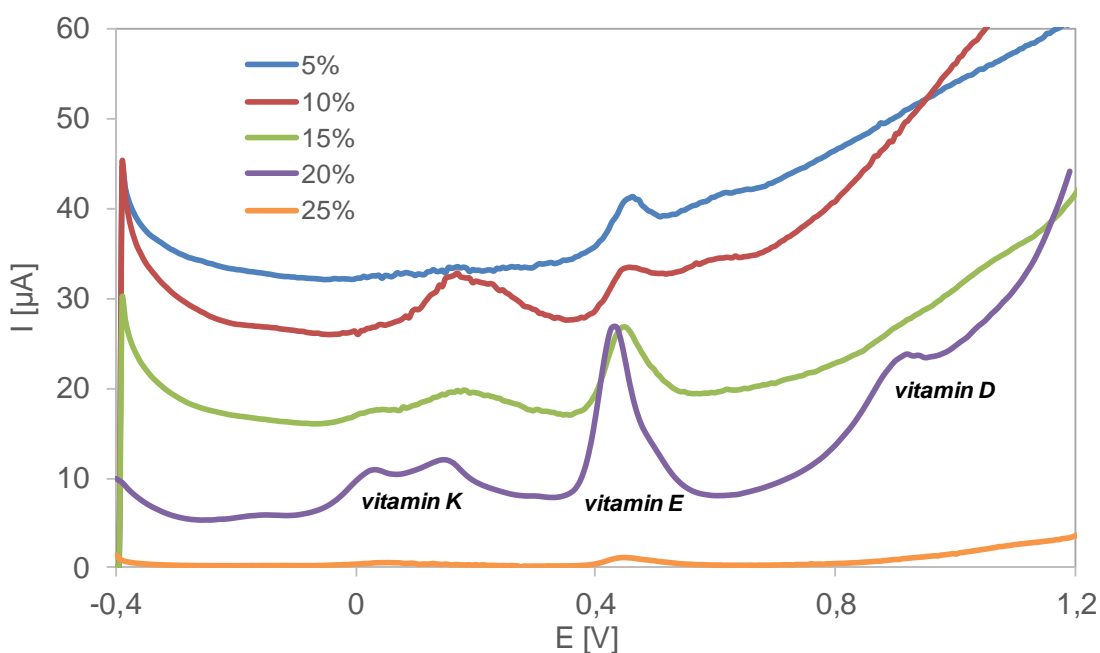


Obr. 8: Porovnání průměrných hodnot proudu piku lipofilních vitaminů pro jednotlivé elektrody

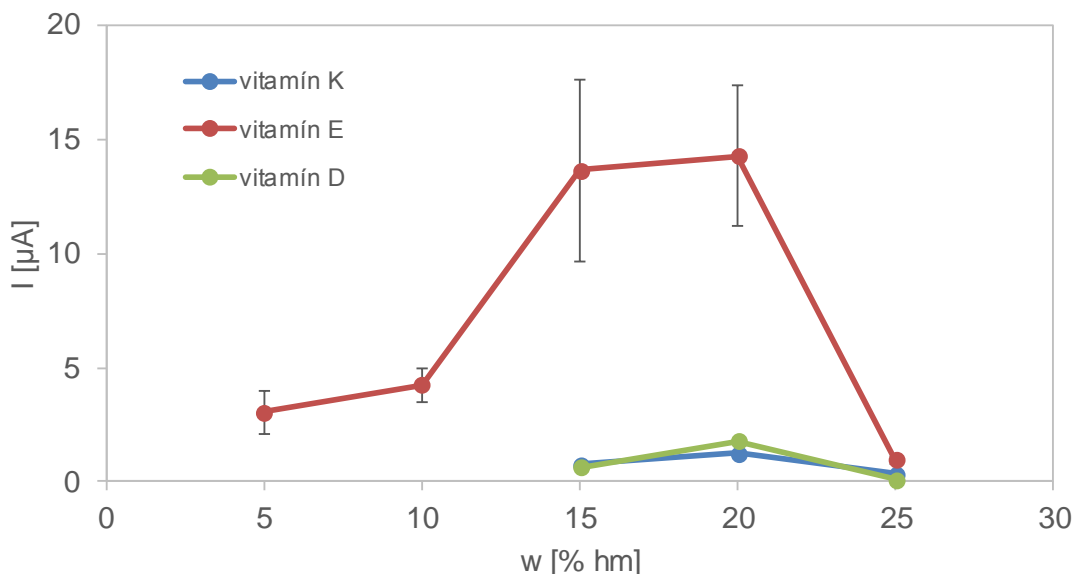
3.1.2 Množství pojiva v uhlíkové pastě

Byly připraveny uhlíkové pasty ze skelného uhlíku s odlišným množstvím silikonového oleje (5 – 25 %). Při extrakci a následném voltametrické měření bylo postupováno stejně, jako v předchozím případě.

Se zvyšujícím se obsahem silikonového oleje v pastě se zvyšují signály pro jednotlivé vitaminy (obr. 9, 10), ale pro elektrodu s obsahem silikonového oleje 25 % byly proudové odezvy téměř nulové. Hodnoty potenciálu píku pro jednotlivé vitaminy jsou následující: pro vitamin K 0,023 V, vitamin E 0,4 V a vitamin D 0,8 V. Pro elektrodu s 5 % silikonového oleje byl viditelný pík pouze pro α -tokoferol, oxidační signály všech vitaminů bylo možné zaznamenat až od obsahu pojiva 15 %. Pro další měření byla zvolena uhlíková pastová elektroda s obsahem silikonového oleje 20 %, protože píky u všech vitaminů byly dobře viditelné a daly se bez potíží snadno vyhodnocovat.



Obr. 9: Vliv obsahu silikonového oleje v uhlíkové pastě na oxidační signály lipofilních vitaminů o $c = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ každého vitaminu; pracovní roztok 0,1 M KCl a 0,01 M HCl o hodnotě pH 2,07; GCPE.

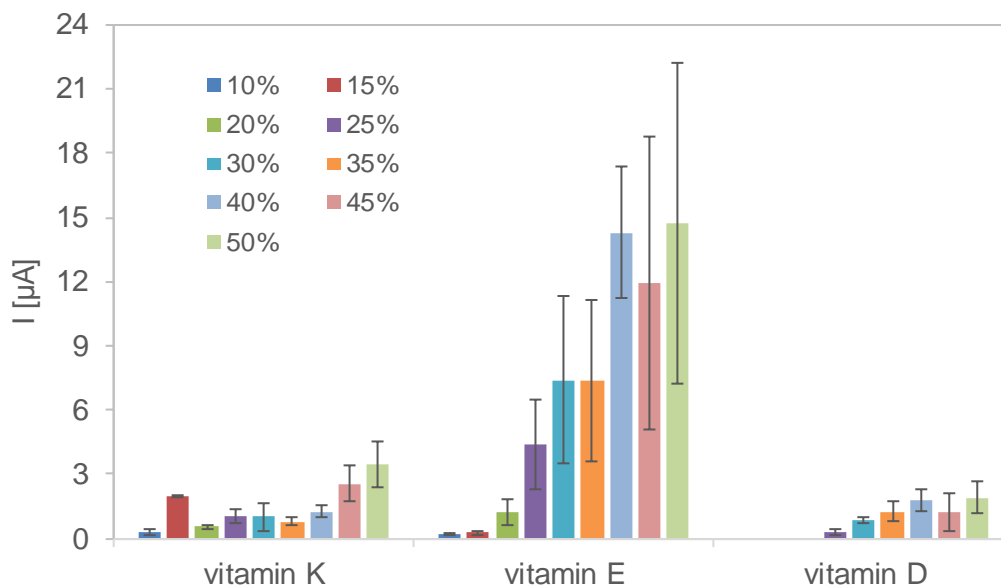


Obr. 10: Závislost proudu píku lipofilních vitaminů na obsahu silikonového oleje v uhlíkové pastě. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku pro $n = 5$.

3.1.3 Složení roztoku pro extrakci vitaminů

Extrakce probíhala ve vodně-organickém roztoku, který jako organickou složku obsahoval acetonitril. Toto organické rozpouštědlo je semipolární a dobře mísitelné s vodou. Byly připraveny roztoky s obsahem acetonitrilu 10-45 % (v/v). Při vyšším obsahu acetonitrilu se pojivo uhlíkové pasty rozpouštělo organickou složkou a elektrodový materiál se rozpadal. Samostatná extrakce probíhala ponořením elektrody do vodného roztoku acetonitrilu (obsah ACN 40%), který obsahoval $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ každého vitaminu. Doba extrakce byla 10 minut s rychlostí míchání 400 otáček za minutu. Základním elektrolytem pro voltametrické měření diferenční pulzní voltametrií byl roztok $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ HCl a $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ KCl o hodnotě pH 2,07.

Závislost proudů píků lipofilních vitaminů na množství organického rozpouštědla (acetonitrilu) ve vodné směsi je zaznamenána na obr. 11. Na sloupcovém grafu je vidět, že největší odezva byla pozorována pro acetonitril s obsahem 50 %, ale také je patrná příliš velká směrodatná odchylka, zřejmě v důsledku částečného narušování homogenity elektrodového materiálu. Proto není vhodné tento roztok s obsahem 50 % acetonitrilu používat pro další měření. Pro měření byl tedy zvolen vodný roztok s obsahem acetonitrilu 40 %, protože jeho odezva byla dostatečná pro následující měření.

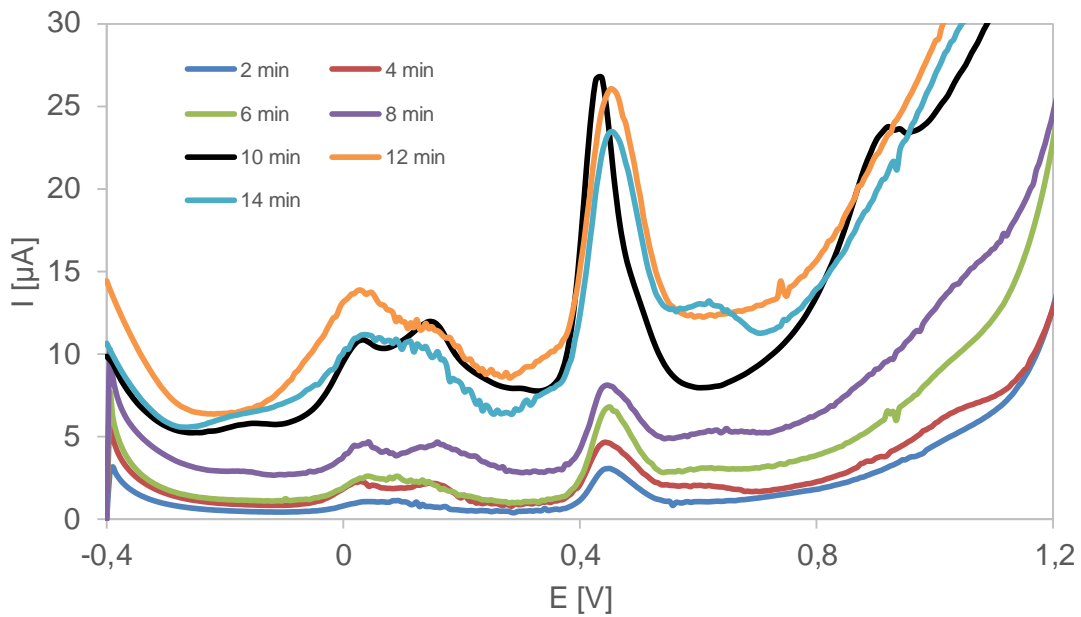


Obr. 11: Závislost proudu píku na množství acetonitrilu ve vodném roztoku. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku pro $n = 5$.

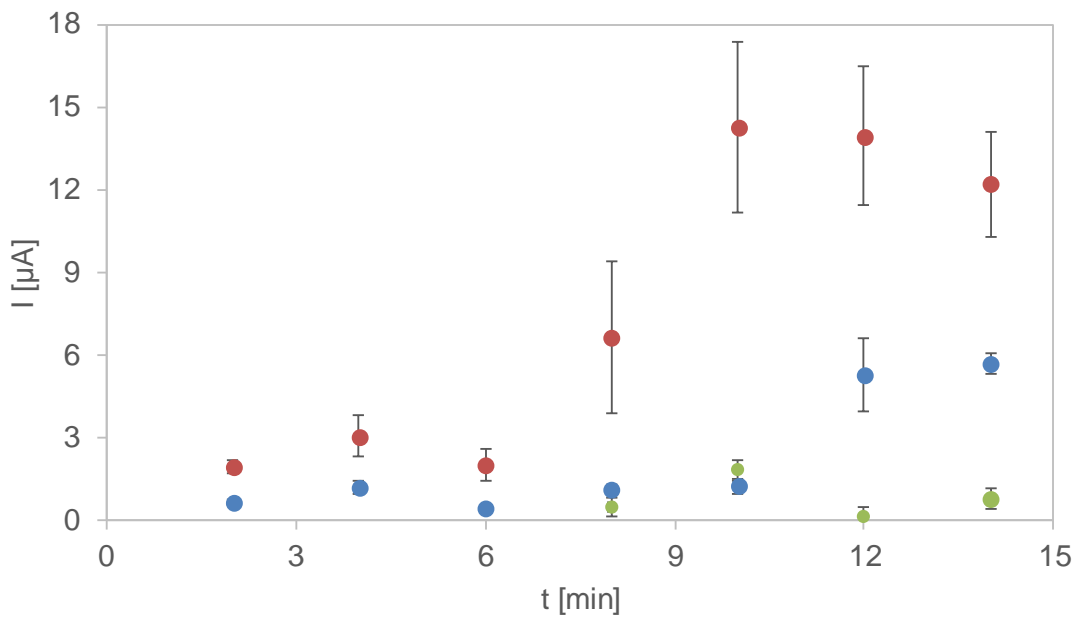
3.1.4 Doba extrakce

Extrakce probíhala z vodného roztoku acetonitrilu (obsah ACN 40 %) s koncentrací standardů každého vitamínu $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ do uhlíkové pasty s 20 % silikonového oleje při rychlosti míchání 400 otáček za minutu. Byl testován vliv doby extrakce na velikost proudových odezev vitaminů. Extrakce probíhala s různou dobou 2-14 minut. Detekční elektrolyt pro voltametrické měření pomocí DPV byl roztok $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ HCl a $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ KCl o hodnotě pH 2,07.

Závislost proudu píku vitaminů na době extrakce je specifikována na obrázku 12 a 13. Čím delší je doba extrakce, tím je zaznamenán větší pík, protože je poskytnut delší čas pro ustanovení rovnováhy distribuce vitaminů mezi vodným roztokem acetonitrilu a uhlíkovou pastou. Tento jev je nejvíce patrný v čase mezi 2 až 10 minutou, rozdíly proudu píku při vyšších časech byly nevýznamné. Pro elektrochemickou analýzu lipofilních vitaminů bylo vhodné najít optimální dobu pro extrakci. Bylo zjištěno, že nejvhodnější čas pro extrakci je 10 minut, protože byly registrovány vysoké hodnoty proudu píků.



Obr. 12: Voltamogramy vitaminů o $c = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ každého vitaminu při různých časech extrakce, pracovní roztok 0,1 M KCl a 0,01 M HCl o hodnotě pH 2,07, GCPE.



Obr. 13: Závislost proudu piku lipofilních vitaminů na době extrakce. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku $n = 5$.

3.2 Optimalizace elektrochemické detekce

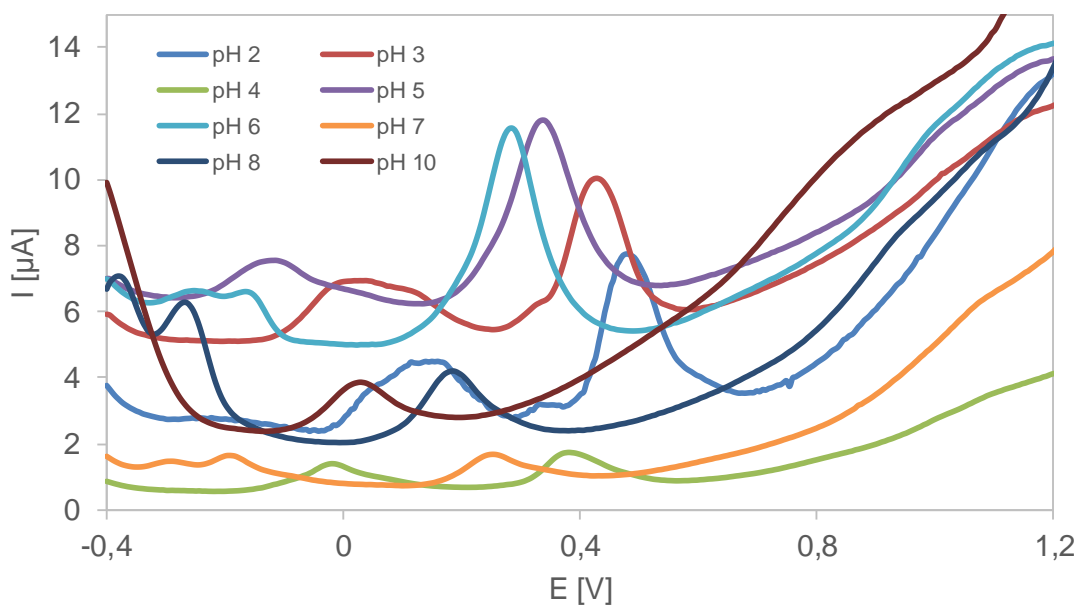
3.2.1 Výběr pracovního elektrolytu a jeho pH

Pro optimalizaci pH byl zvolen Brittonův-Robinsonův pufr, jenž umožňuje elektrochemickou analýzu při různých hodnotách pH v závislosti na poměru jednotlivých složek pufru. pH bylo měřeno v rozsahu 2-10, obvykle po jednotce, u vyšších hodnot po dvou jednotkách. Extrakce probíhala z vodně-organického roztoku 40 % acetonitrilu a standardu vitamínu D, E a K o koncentraci $c = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ každého vitamínu při rychlosti míchání 400 otáček za minutu po dobu 10 minut.

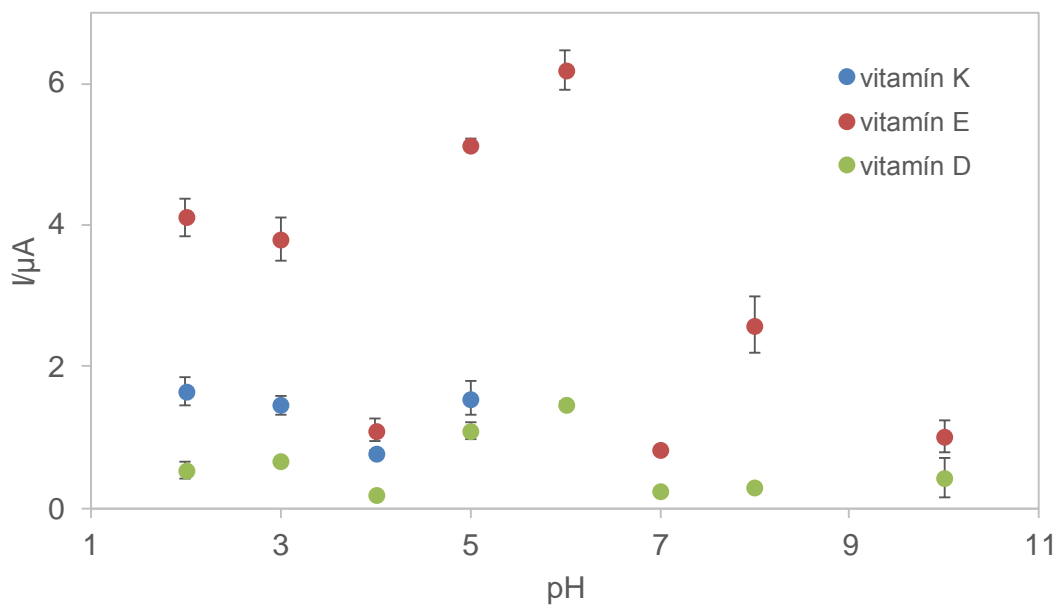
Z obrázku 14 je patrné, že vitaminy D a E poskytují oxidační signály v celém měřeném rozsahu hodnot pH. Vitamin K je elektroaktivní pouze v rozsahu pH 2-5. Potenciály píku jednotlivých vitaminů měly při pH 2 tyto hodnoty: pro vitamin K 0,14 V, pro vitamín E 0,48 V a pro vitamín D 1,14 V. Také je patrné, že s vyšší hodnotou pH dochází k posunu potenciálu píku směrem k negativním hodnotám: pro vitamíny E a D jsou potenciály píku 0,05 V pro vitamín E a 0,9 V pro vitamín D.

Na obrázku 15 je zřejmé, že nejvyšší hodnota proudu píku pro vitamin D a E byla při hodnotě pH 6. Pro následující měření však byla použita hodnota pH 5, protože pík byl lépe vyhodnotitelný pro všechny vitaminy (vitamin D, E a K) a hodnota proudu píku byla druhá nejvyšší. Obrázek 14 ukazuje posun potenciálu píku k negativním hodnotám.

Brittonův-Robinsonův pufr byl v dalších experimentech nahrazen octanovým pufrům o stejném pH (pH 5). Octanový pufr byl zvolen, protože vykazoval větší signály, byla možná lepší kontrola pH a hodnoty byly víceméně stejné jako hodnoty B-R pufru.



Obr. 14: Voltamogramy vitaminů o $c = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ při různém pH detekčního roztoku; Brittonův-Robinsonův pufr; GCPE.



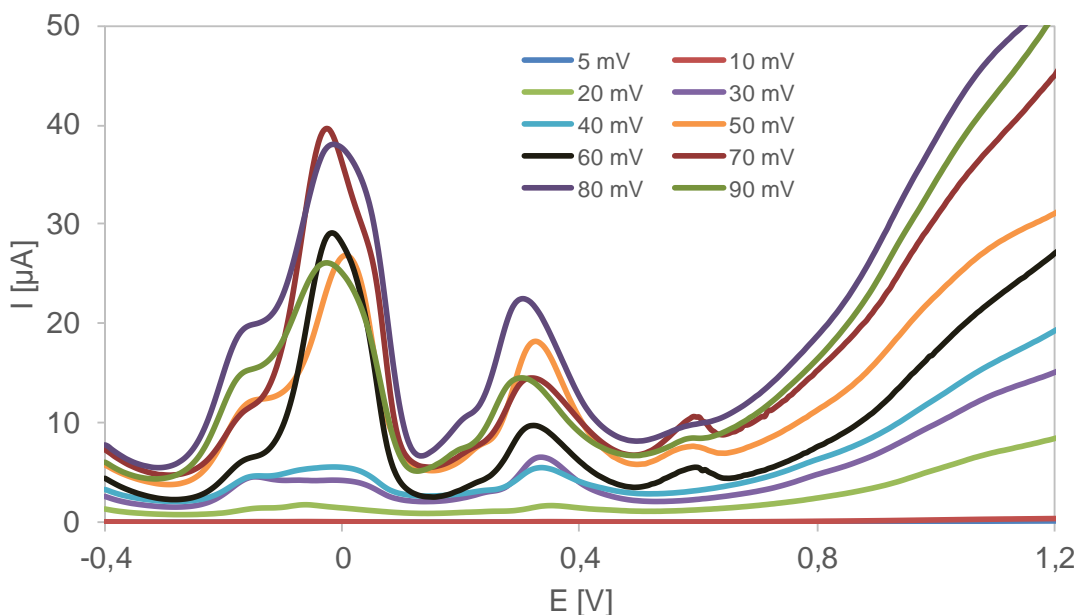
Obr. 15: Závislost proudu píku na pH detekčního roztoku, koncentrace vitaminu D, E a K $c = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku $n = 5$.

3.2.2 Parametry diferenční pulzní voltametrie

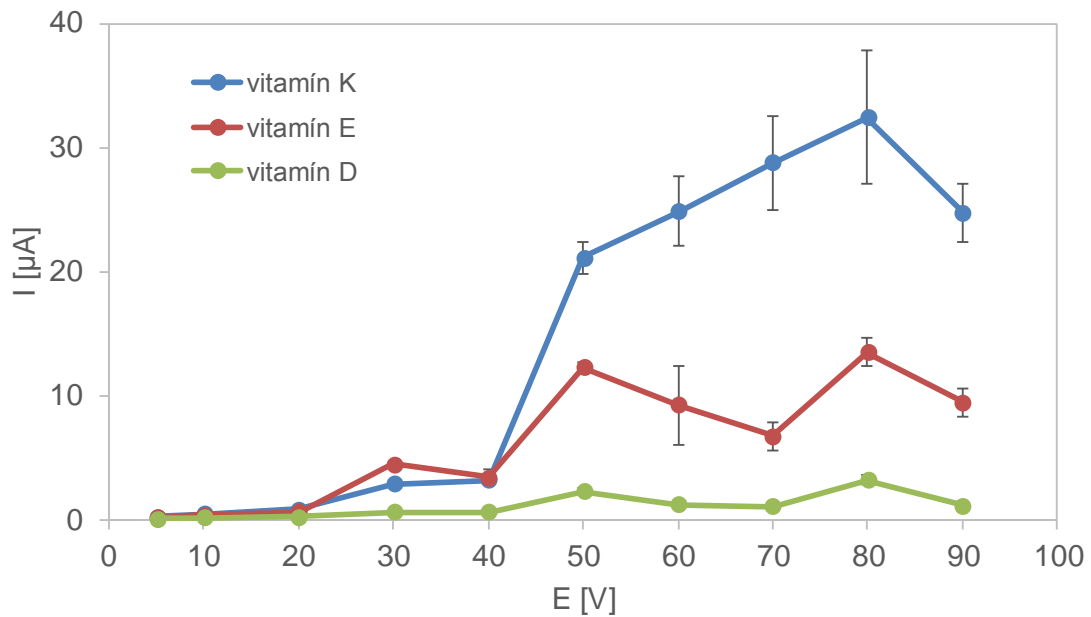
3.2.2.1 Amplituda pulzu

Při optimalizaci amplitudy při diferenčně pulzní voltametii v acetátovém pufru o hodnotě pH 5 probíhala extrakce vitaminů rozpustných v tucích o koncentraci $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ každého vitaminů z vodného roztoku acetonitrilu (ACN obsah 40%) při rychlosti míchání 400 otáček za minutu po dobu 10 minut do uhlíkové pasty s 20 % silikonového oleje. Volba amplitudy probíhala v rozsahu 5-90 mV.

Naměřené hodnoty vyplývající z obrázku 16, 17 ukazují, že nejvyšší proudová odezva byla pro hodnotu amplitudy 80 mV, a proto tedy byla tato hodnota používána i pro následující měření.



Obr. 16: Voltamogramy vitaminů o koncentraci každého vitaminu $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ při různé amplitudě pulzu; acetátový pufr o hodnotě pH 5; GCPE.



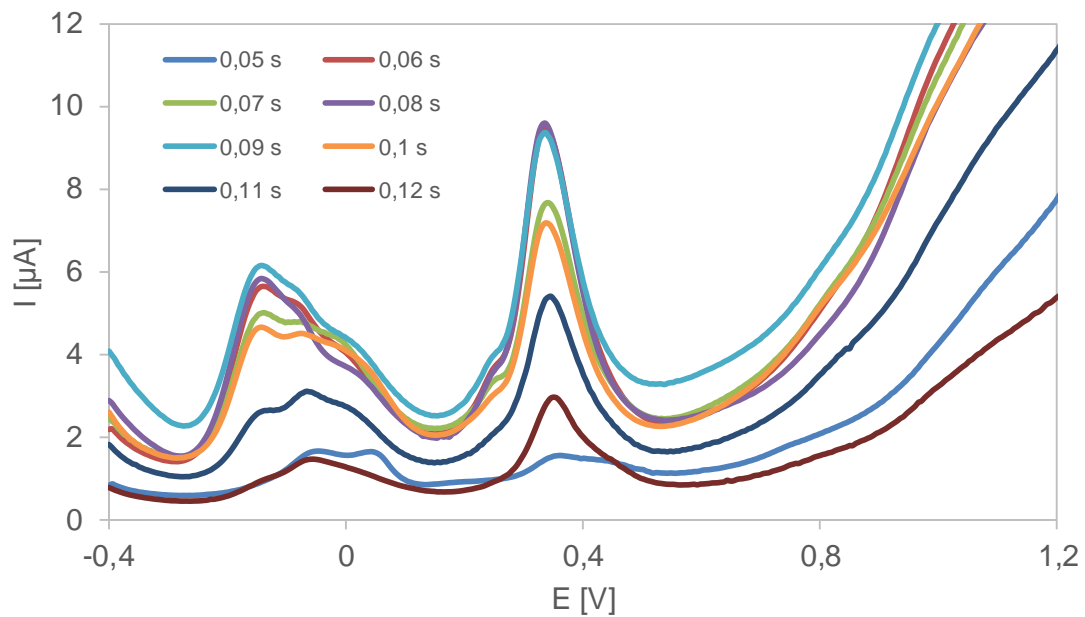
Obr. 17: Závislost velikosti proudů píků vitaminů rozpustných v tucích na hodnotě amplitudy.

Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku $n = 5$.

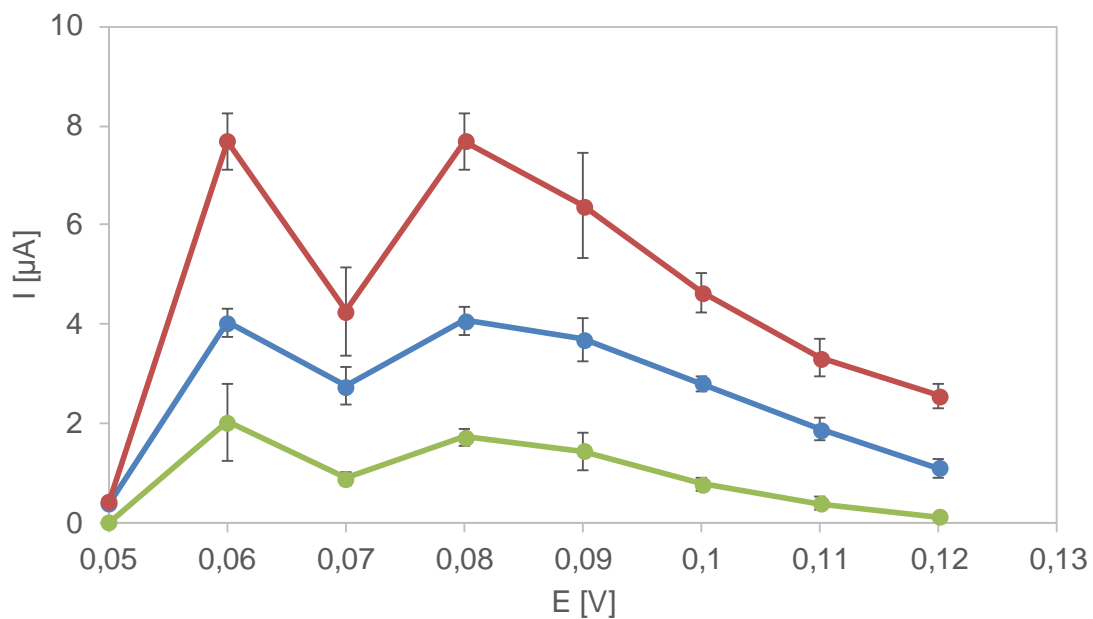
3.2.2.2 Doba mezi pulzy

Při proměňování vlivu vzdálenosti mezi pulzy, která souvisí s rychlostí skenu, byla použita diferenční pulzní voltametrie v acetátovém pufru o hodnotě pH 5. Pro měření vzdálenosti mezi pulzy byly použity hodnoty 0,05 až 0,12 s. Extrakce vitaminu D, E a K ($c = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$) probíhala z vodně-organického roztoku 40 % acetonitrilu při rychlosti míchání 400 otáček za minutu po dobu 10 minut do uhlíkové pasty, která obsahovala 20 % silikonového oleje.

Na obrázku 18, 19 jsou znázorněny jednotlivé voltamogramy pro různé vzdálenosti mezi pulzy. Z obrázku 18, 19 vyplývá, že nejvyšší odezva je při hodnotě 0,06 a 0,08 s, avšak pro následující měření byla použita hodnota 0,08 s.



Obr. 18: Voltamogramy vitaminů o koncentraci každého vitaminu $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ při různé době mezi pulzy; acetátový pufr; GCPE.



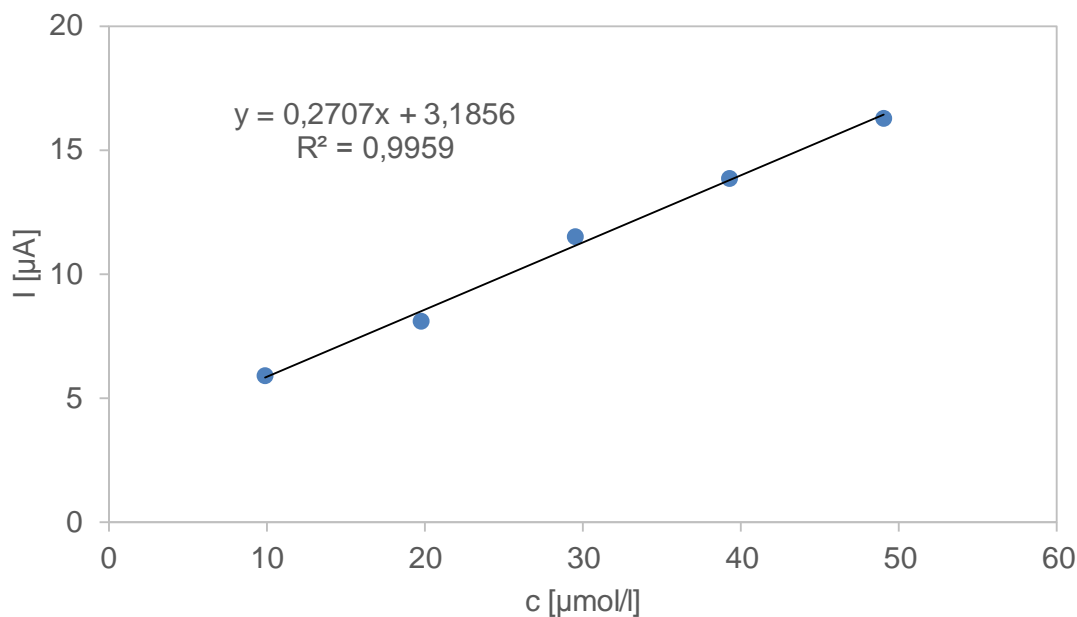
Obr. 19: Graf závislosti velikosti proudů pík vitaminů při různé době mezi pulzy. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku $n = 5$.

3.2.3 Kalibrační závislosti stanovení vitaminů

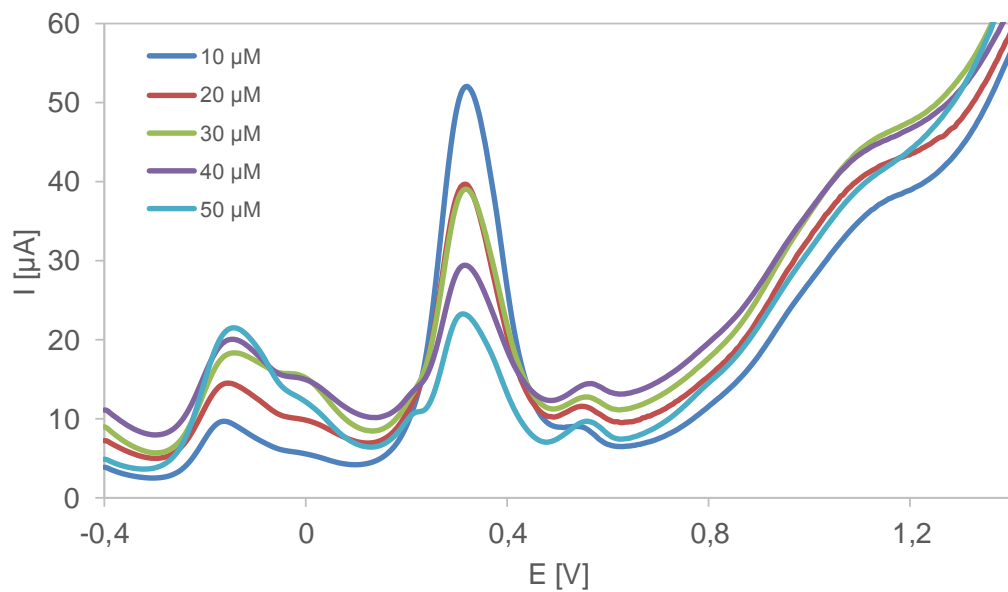
Měření kalibrační křivky byla použita diferenční pulzní voltametrie. Nejdříve byla proměřena křivka v širším rozmezí koncentrací pro zjištění oblasti linearity a poté byl proměřen vybraný rozsah znovu. Kalibrační závislosti jednotlivých vitaminů byly proměřeny za konstantní koncentrace zbývajících dvou vitaminů k určení, jestli ve směsi dochází k ovlivňování signálů jednotlivými složkami.

Extrakce probíhala z vodně-organického roztoku s obsahem 40 % acetonitrilu při rychlosti 400 otáček za minutu po dobu 10 minut do uhlíkové pastové elektrody s 20 % silikonového oleje. Pracovním elektrolytem pro vlastní voltametrické měření (DPV) byl acetátový pufr o hodnotě pH 5.

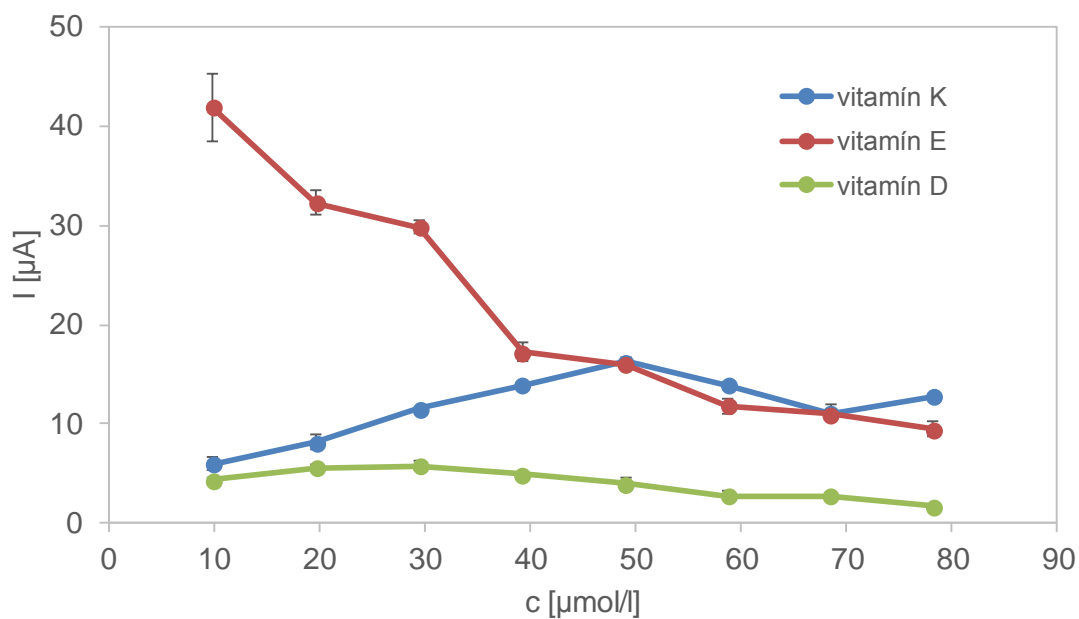
Na obrázku 20 je uvedena kalibrační křivka vitaminu K proměřená v koncentračním rozsahu 10-50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ spolu s vitaminy D a E o stejné koncentraci 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Na obrázku 21 jsou uvedeny voltamogramy pro jednotlivé koncentrace a je zde vidět, že vitaminy K a E se vzájemně ovlivňují. S nižší koncentrací vitaminu K se hodnoty píku vitaminu E zvětšují a naopak (obr. 22).



Obr. 20: Kalibrační křivka, rozmezí koncentrace vitaminu K $c = 10\text{-}50 \mu\text{mol.l}^{-1}$, vitamin D $c = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$, vitamin E $c = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$, acetátový pufr, pH 5, GCPE.



Obr. 21: Voltamogram vitaminu K pro koncentrace 10-50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, vitamin E $c = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a vitaminu D $c = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$.

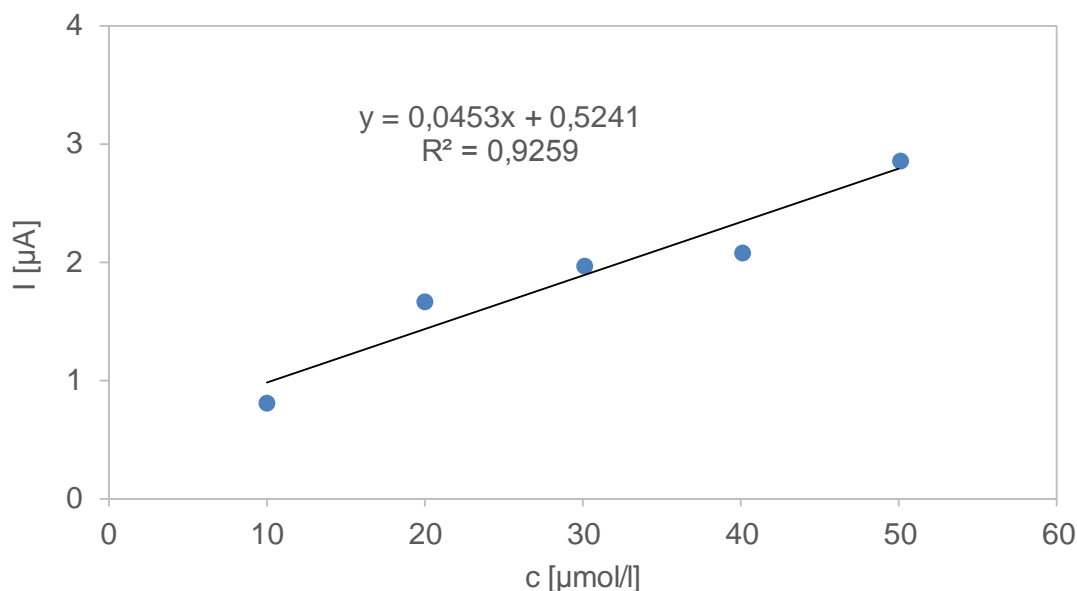


Obr. 22: Graf závislost proudu na koncentraci jednotlivých vitaminu rozpustných v tucích. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku $n = 5$.

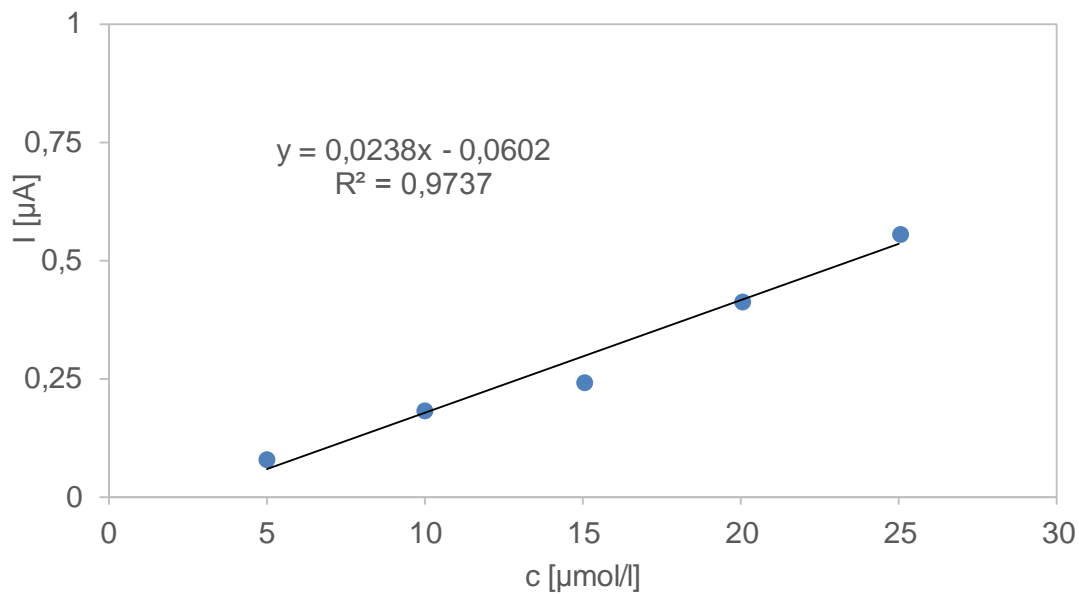
Bohužel v samém závěru experimentálních prací by spotřebován silikonový olej MV 8000, který byl do té doby používán jako pojivo do uhlíkové pasty. Bylo tedy hledáno pojivo, které by nahradilo výše zmíněný silikonový olej, aby mohly být doměřeny kalibrační křivky vitaminů D a E a zjištěny analytické parametry stanovení. Jak se však v dalších experimentech vzápětí ukázalo, nepovedlo se najít vhodnou náhradu dosud používaného pojiva.

První testovanou náhradou byl parafinový olej. Byla připravena uhlíková pasta s 20 % parafinového oleje. Extrakce probíhala ve vodně-organickém roztoku 40% acetonitrilu při rychlosti 400 otáček za minutu po dobu 10 minut. Pracovním roztokem pro voltametrické měření byl octanový pufr o hodnotě pH 5. Na uhlíkové pastě s parafinovým olejem nebyl pozorován oxidační signál pro vitamin D při vyšších hodnotách potenciálů, proto bylo dále pokračováno v detekci pouze s vitaminy K a E. Kromě diferenční pulzní voltametrie byla v detekčním kroku zkoušena i square-wave voltametrie (SWV) ke zvýšení citlivosti měření.

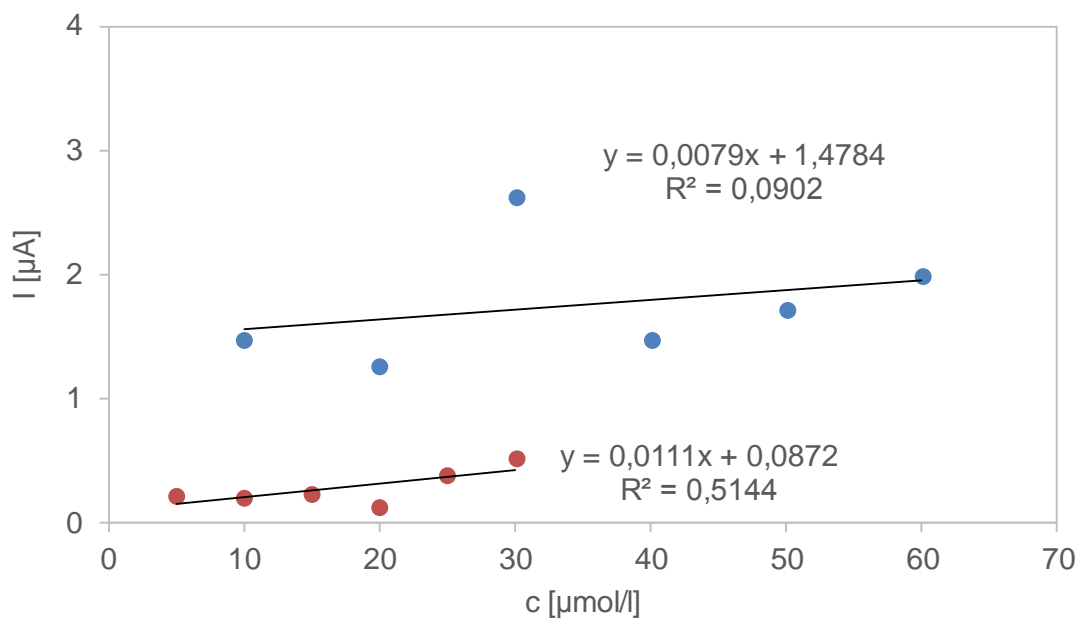
Z obrázku 23, 24, 25 a 26 je patrné, že výběr pojiva má zásadní vliv na celé měření. Kalibrační křivky proměřené metodami SWV i DPV nevykazují lineární závislost, proto bylo používání tohoto pojiva nevhodné.



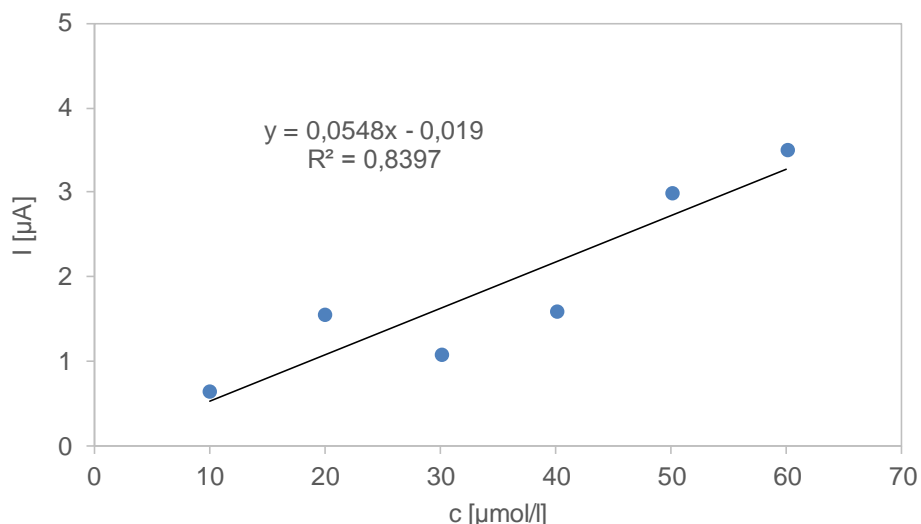
Obr. 23: Kalibrační křivka pro rozmezí koncentrace vitaminu K $c = 10-50 \mu\text{mol.l}^{-1}$, vitamin E $c = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$, acetátový pufr, pH 5, GCPE (parafinový olej), DPV.



Obr. 24: Kalibrační křivka pro rozmezí koncentrace vitamínu E $c = 5\text{-}25 \mu\text{mol.l}^{-1}$, vitamín K $c = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$, acetátový pufr, pH 5, GCPE (parafinový olej), DPV.



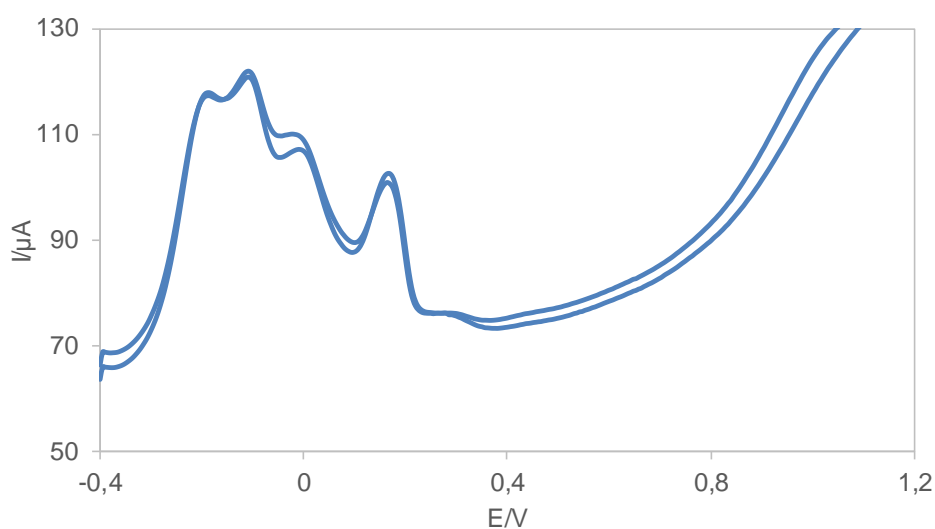
Obr. 25: Kalibrační křivka simultánního stanovení vitamínu K $c = 10\text{-}50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a vitamínu E $c = 5\text{-}30 \mu\text{mol.l}^{-1}$, acetátový pufr, pH 5, GCPE (parafinový olej), DPV.



Obr. 26: Kalibrační křivka pro koncentrační rozsah vitamínu K $c = 10\text{-}60 \mu\text{mol.l}^{-1}$, vitamin E $c = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$, acetátový pufr, pH o hodnotě 5, GCPE (parafínový olej), SWV.

Dále byla připravena uhlíková pasta s obsahem 10 % silikonového oleje DC 200. Extrakce probíhala ve vodném roztoku s obsahem acetonitrilu 40 % při rychlosti 400 otáček za minutu po dobu 10 minut. Pracovním roztokem pro voltametrické měření (DPV) byl octanový pufr o hodnotě pH 5.

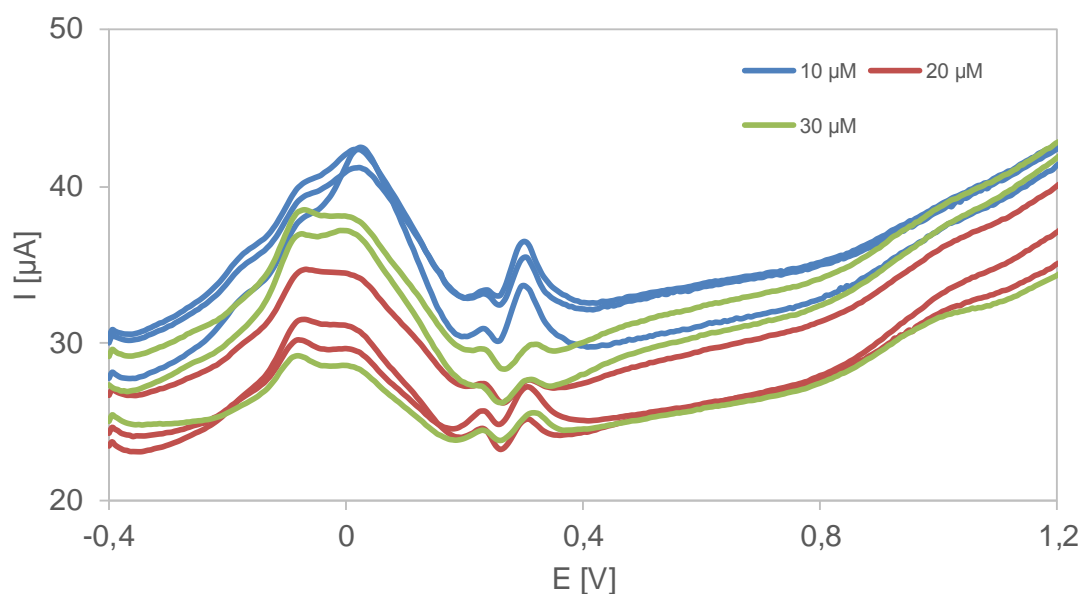
Na obrázku 27 jsou znázorněny voltamogramy vitamínu K a E o koncentraci $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ pro dvě opakování. Z obrázku je patrné, že tyto záznamy se zásadně liší od původního pojiva. Píky jsou nevyhodnotitelné a pozadí proudu je vysoké. Proto tento olej je nevhodný pro další detekci.



Obr. 27: Voltamogram vitamínu K a E pro koncentraci $c = 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$, acetátový pufr o hodnotě pH 5, GCPE (silikonový olej DC 200).

Těsně před odevzdáním diplomové práce se u výrobce původního silikonového oleje (Lučební závody, Kolín) podařily zajistit vzorky olejů stejného označení. Smícháním dvou silikonových olejů o viskozitě 5000 a 12 500 v daném poměru byl připraven silikonový olej o stejné viskozitě 8000 jako ten původní. Následně byla z tohoto oleje připravena uhlíková pasta s obsahem 20 % pojiva. Extrakce probíhala ve vodném roztoku acetonitrilu (obsah ACN 40 %) při rychlosti míchání 400 otáček za minutu po dobu 10 minut. Pracovním elektrolytem pro voltametrické stanovení byl octanový pufr o pH 5.

Na obrázku 28 jsou zaznamenány voltamogramy vitaminů K a E v koncentračním rozmezí 10-30 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ v trojím opakování pro danou koncentraci. Z obrázku je patrné, že v porovnání s původním pojivem se tyto záznamy velmi liší. Píky nejsou dobře vyhodnotitelné a proudy pozadí jsou příliš velké, proto ani tento olej není vhodný pro detekci. S tímto zjištěním nebyly další analytické parametry zjišťovány a experimenty byly ukončeny.



Obr. 28: Voltamogram vitaminu K a E pro rozsah koncentrací $c = 10\text{-}30 \mu\text{mol.l}^{-1}$, acetátový pufr o hodnotě pH 5, GCPE (směs silikonových olejů).

4 Závěr

Předložená diplomová práce je zaměřena na studium možností elektrochemického simultánního stanovení lipofilních vitaminů na uhlíkové pastové elektrodě technikou extraktivní rozpouštěcí voltametrie.

Tato práce se zabývala optimalizací detekce vitaminů rozpustných v tučích (vitamin D, E a K) extrakcí z vodně-organického roztoku do materiálu uhlíkové pastové elektrody a následnou detekcí pomocí diferenčně pulzní voltametrie. Nejvhodnějším elektrodovým materiálem byla uhlíková pasta ze skelného uhlíku s obsahem silikonového oleje 20 %, který odolával působení organické složky v roztoku. Optimální podmínky extrakce byly vodný roztok acetonitrilu (obsah acetonitrilu 40 %), rychlost míchání 400 otáček za minutu a doba extrakce 10 minut. Optimalizace dále zahrnovala pH studii, kde bylo zjištěno, že vitaminy D, E a K jsou nejstabilnější a mají největší odezvu při pH o hodnotě 5. Dále byly určovány vhodné parametry diferenční pulzní voltametrie a byly zjištěny tyto hodnoty: amplituda pulzu 80 mV a vzdálenost mezi pulzy 0,08 s.

Sestavená kalibrační křivka pro vitamin K měla lineární rozsah v oblasti koncentrací v rozsahu 10 až 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Z kalibrační závislosti bylo zřejmé, že vitaminy K a E se navzájem ovlivňují. S nižší koncentrací vitaminu K se signály píku vitaminu E zvyšovaly a naopak. Kalibrační závislost pro vitamin D a E sestavena a proměřena být nemohla z důvodu úplné spotřeby použitého silikonového oleje.

Jako náhrada byly zkoušeny i jiné oleje, například parafinový nebo silikonový o jiné viskozitě a od jiného výrobce. Žádné uhlíkové pastové elektrody připravené z těchto pojiv však nevykazovaly voltametrickou odezvu srovnatelnou s původním pojivem. Podařilo se zajistit silikonový olej od původního výrobce, avšak ani tento nový výrobek po namíchání na správnou viskozitu nevykazoval příznivé elektrochemické vlastnosti pro detekci lipofilních vitaminů po jejich extrakci do uhlíkové pasty. Experimenty tak bylo nutné předčasně ukončit. Dosažené výsledky nicméně naznačují, že bude zřejmě možné provést simultánní stanovení lipofilních vitaminů po jejich adsorpci na povrch pevné uhlíkové elektrody. Tyto experimenty budou náplní navazující diplomové práce.

5 Literatura

- [1] SÝS, Milan, Simona ŽABČÍKOVÁ, Libor ČERVENKA a Karel VYTRÁS. Adsorptive stripping voltammetry in lipophilic vitamins determination. *Potravinářstvo Slovak Journal of Food Sciences*. 2016, **10**(1), 1-5.
- [2] BEULENS, Joline W. J., Sarah L. BOOTH, Ellen G. H. M. VAN DEN HEUVEL, Elisabeth STOECKLIN, Athanasia BAKA a Cees VERMEER. The role of menaquinones (vitamin K2) in human health. *British Journal of Nutrition*. **110**(8), 1357-1368.
- [3] GONNET, M., L. LETHUAUT a F. BOURY. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release*. 2010, **146**(3), 276-290.
- [4] MURRAY, Robert K., Daryl K. GRANNER, Peter A. MAYES a Victor W. RODWELL. *Harperova biochemie*. Jinočany: H&H, 1998, 872 s. ISBN 80-7319-013-3.
- [5] HLÚBIK, Pavel a Libuše OPLTOVÁ. *Vitaminy*. Praha: Grada Publishing, 2004, 232 s. ISBN 80-247-0373-4.
- [6] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Tábor: OSSIS, 1999, 352 s. ISBN 80-902-3914-5.
- [7] ODDOS, Thierry, Romain ROURE, James LEYDEN, Valérie BRUÈRE a Christiane BERTIN. A Placebo-Controlled Study Demonstrates the Long-Lasting Anti-Aging Benefits of a Cream Containing Retinol, DihydroxyMethylChromone (DMC) and Hyaluronic Acid. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*. 2012, **2**(2), 51-59.
- [8] JORDÁN, Václav a Marie HEMZALOVÁ. *Antioxidanty: zázračné zbraně: vitaminy, minerály, stopové prvky, aminokyseliny a jejich využití pro zdravý život*. Brno: Jota, 2001. 153 s. ISBN 80-7217-156-9.
- [9] ROCCHI, E., G. CASALGRANDI, A. RONZONI, et al. Antioxidant liposoluble vitamins and carotenoids in chronic hepatitis. *European Journal of Internal Medicine*. 2001, **12**(2), 116-121.
- [10] EDEM, D.O. Vitamin A: A Review. *Asian Journal of Clinical Nutrition*. 2009, **1**(1), 65-82.
- [11] DAVÍDEK, Jiří, Gustav JANÍČEK a Jan POKORNÝ. *Chemie potravin: učebnice pro vys. školy chemickotechnologické*. Praha: SNTL, 1983, 629 s. ISBN 04-815-83.
- [12] WEBSTER, Richard D. Voltammetry of the liposoluble vitamins (A, D, E and K) in organic solvents. *The Chemical Records*. 2012, **12**(1), 188-200.
- [13] HEANEY, R. P. Vitamin D in Health and Disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2008, **3**(5), 1535-1541.
- [14] MEN, Kun. Electrochemical Detection of Vitamin D2 and D3 Based on a Au- Pd Modified Glassy Carbon Electrode. *International Journal of Electrochemical Science*. 2017, **12**, 9555-9564.

- [15] WEI YAO, Wei, Hong MEI PENG a Richard D. WEBSTER. Electrochemistry of α -Tocopherol (Vitamin E) and α -Tocopherol Quinone Films Deposited on Electrode Surfaces in the Presence and Absence of Lipid Multilayers. *The Journal of Physical Chemistry*. 2009, **113**(52), 21805-21814.
- [16] GREER, Frank R. Vitamin K the basics—What's new?. *Early Human Development*. 2010, **86**(1), 43-47.
- [17] RUCKER, Robert B., Janos ZEMPLENI, John W. SUTTIE a Donald B. MCCORMICK. *Handbook of Vitamins*. 3. Boca Raton (Florida): CRC Press, 2001, 600 s. ISBN 9781420029666.
- [18] MARASCHIELLO, C a J.A GARCÍA REGUEIRO. Procedure for the determination of retinol and α -tocopherol in poultry tissues using capillary gas chromatography with solvent venting injection. *Journa of Chromatography A*. 1998, **818**(1), 109-121.
- [19] BAREK, Jiří, František OPEKAR a Karel ŠTULÍK. *Elektroanalytická chemie*. 1. Praha: Karolinum, 2005, 188 s. ISBN 80-246-1146-5.
- [20] COMPTON, Richard G., Adrian C. FISHER, Mark H. LATHAM, Christopher M. A. BRETT a Ana Maria C. F. Oliveira BRETT. Wall-jet electrode linear sweep voltammetry. *The Journal of Physical Chemistry*. 1992, **96**(21), 8363-8367.
- [21] KIZEK, René. *Biotechnologie a nanotechnologie* [online]. 2011, 1-12 [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: http://www.umel.feec.vutbr.cz/nanoteam/data/soubory/%C5%A0kol%C3%ADc%C3%AD%20materi%C3%A1ly_Bioelektrochemie%20a%20nanotechnologie.doc
- [22] HART, John P., Michael D. NORMAN a Christopher J. LACEY. Voltammetric behaviour of vitamins D2 and D3 at a glassy carbon electrode and their determination in pharmaceutical products by using liquid chromatography with amperometric detection. *Analyst*. 1992, **117**(9), 1441-1445.
- [23] WRING, Stephen A., John P. HART a David W. KNIGHT. Voltammetric behaviour of all-trans-retinol (vitamin A1) at a glassy carbon electrode and its determination in human serum using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analyst*. 1988, **113**(12), 1785-1789.
- [24] CHAN, Ya Yun, Yanni YUE a Richard D. WEBSTER. Voltammetric Studies on Vitamins D2 and D3 in Organic Solvents. *Electrochimica Acta*. 2014, **138**, 400-409.
- [25] ACHTERBERG, Eric P. a Charlotte BRAUNGARDT. Stripping voltammetry for the determination of trace metal speciation and in-situ measurements of trace metal distributions in marine waters. *Analytica Chimica Acta*. 1999, **400**(1-3), 381-397.
- [26] WANG, L.Z., C.S. MA, X.L. ZHANG a Y. XU. Determination of Vitamin K3 by Cathodic Stripping Voltammetry. *Microchemical Journal*. 1994, 2000, **50**(1), 101-105.

- [27] RICE, Margaret E., Zbigniew GALUS a Ralph N. ADAMS. Graphite paste electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. 1983, **143**(1-2), 89-102.
- [28] ŠVANCARA, Ivan, Jiří KONVALINKA, Klements SCHACHL, Kurt KALCHER a Karel VYTRÁS. Stripping Voltammetric Determination of Iodide with Synergistic Accumulation at a Carbon Paste Electrode. *Electroanalysis*. 1998, **10**(6), 435-441.
- [29] ZIYATDINOVA, Guzel, Mikhail MOROZOV a Herman BUDNIKOV. MWNT-modified electrodes for voltammetric determination of lipophilic vitamins. *Journal of Solid State Electrochemistry*. 2012, **16**(7), 2441-2447.
- [30] DE LEENHEER, Andre P. a Willy LAMBERT. *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*. 3. New York: CRC Press, 2000, 632 s. ISBN 0-8247-0316-2.
- [31] SALO-VÄÄNÄNEN, P, V OLLILAINEN, P MATTILA, K LEHIKONEN, E SALMELA-MÖLSÄ a V PIIRONEN. Simultaneous HPLC analysis of fat-soluble vitamins in selected animal products after small-scale extraction. *Food Chemistry*. 2000, **71**(4), 535-543.
- [32] ZAKARIAEEABKOO, Rosita, Katrina J. ALLEN, Jennifer J. KOPLIN, Peter VUILLERMIN a Ronda F. GREAVES. Are vitamins A and D important in the development of food allergy and how are they best measured?. *Clinical Biochemistry*. 2014, **47**(9), 804-811.
- [33] DELGADOZAMARRENO, M, A SANCHEZPEREZ, M SANCHEZRODRIGUEZ, M GOMEZPEREZ a J HERNANDEZMENDEZ. Determination of fat-soluble vitamins in yogurt by HPLC with electrochemical detection. *Talanta*. 1996, **43**(9), 1555-1563.
- [34] CLAUSEN, Ina, Jette JAKOBSEN, Torben LETH a Lars OVESEN. Vitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 in raw and cooked pork cuts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2003, **16**(5), 575-585.
- [35] STANCHER, Bruno a Fabio ZONTA. High-performance liquid chromatographic determination of carotene and vitamin A and its geometric isomers in foods. *Journal of Chromatography A*. 1982, **238**(1), 217-225.
- [36] OLŠOVSKÁ, Jana a Marie JURKOVÁ. New trends in liquid chromatography and their utilization in analysis of beer and brewery raw materials. Part 1. Theoretical introduction. *Kvasný průmysl*. 2012, **58**(2), 30-35.
- [37] IRAKLI, Maria N., Victoria F. SAMANIDOU a Ioannis N. PAPADOYANNIS. *Development and validation of an HPLC method for the simultaneous determination of tocopherols, tocotrienols and carotenoids in cereals after solid-phase extraction*. 2011, **34**(12).
- [38] HOSSU, Ana-Maria, Cristiana RADULESCU, Mihaela-Flory MARIA, Mihaela ILIE a Vasile MAGEARU. TLC Applications on separation and quantification of fat-soluble vitamins. *Romanian Society of Biological Sciences*. 2009, **14**(5), 4615-4619.

[39] YILMAZ, Bilal, Murat ÖZTÜRK a Yücel (YAŞAR) KADIOĞLU. Comparison of two 1derivative spectrophotometric methods for the determination of α -tocopherol in pharmaceutical preparations. *II Farmaco*. 2004, **59**(9), 723-727.

[40] RISHI, Lubna, Mohammad ASGHER, Mohammad YAQOOB, Amir WASEEM a Abdul NABI. Enzymatic determination of vitamin A in pharmaceutical formulations with spectrophotometric detection. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2009, **72**(5), 989-993.