

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO - TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2012

Vojtěch Paik

**Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko - technologická**

Nové trendy v analýze vitamínů

Vojtěch Paik

**Bakalářská práce
2012**

**University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology**

New trends in the analysis of vitamins

Vojtěch Paik

**Bachelor thesis
2012**

Prohlašuji:

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

Byl jsem seznámen 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 vynaložil, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 21.6.2012

Vojtěch Paik

Děkuji Ing. Tomášovi Hájkovi, Ph.D. za cenné rady při vypracování této bakalářské práce.

Souhrn

Bakalářská práce je zaměřená na nové trendy v analýze vitaminů rozpustných v tucích. V této práci jsou shrnuty informace o lipofilních vitamínech, jejich vlastnostech, standardních metodách stanovení a v neposlední řadě nové, moderní způsoby analýzy.

První část práce je zaměřena na teoretické informace, týkající se vlastností vitaminů rozpustných v tucích jako jsou: popis a jejich struktura, fyzikální a chemické vlastnosti, zdroje a zdravotní aspekty.

Druhá část práce popisuje standardní metody analýzy, mezi které patří plynová chromatografie (GC), kapalinová chromatografie (HPLC) a tenkovrstvá chromatografie (TLC).

Třetí část bakalářské práce popisuje nové analytické metody stanovení vitaminů rozpustných v tucích. Těmito metodami jsou simultánní stanovení pomocí HPLC chromatografie, ultra-vysoce účinné kapalinové chromatografie (UHPLC), kapilární kapalinové chromatografie (CLC), mikroemulzní elektrokinetické chromatografie (MEEKC), superkritické fluidní extrakce (SFE) a superkritické kapalinové chromatografie (SFC). Tyto metody lze použít pro kvalitativní i kvantitativní stanovení vitaminů rozpustných v tucích.

Klíčová slova:

Vitaminy rozpustné v tucích, HPLC, analýza potravin, vitamin A, D, E, K

Summary:

This Bachelor thesis deals with new trends of fat-soluble vitamins. This work summarizes the information about fat soluble vitamins, their characteristics and primarily classical and modern methods of determination.

The first part is focused on theoretical informations about fat-soluble vitamins as basic description, structure, physical and chemical properties, sources and effects on human health.

The second part describes commonly used analytical methods as gas chromatography (GC), high performance liquid chromatography (HPLC) and thin layer chromatography (TLC).

The third part deals with modern analytical methods of determination fat-soluble vitamins. These methods include simultaneous chromatography, ultra-high pressure liquid chromatography (UHPLC), microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC), supercritical fluid extraction (SFE) and supercritical fluid chromatography (SFC). These modern methods are useful in the qualitative and quantitative analysis of fat soluble vitamins.

Keywords:

Fat-soluble vitamins, HPLC, food analysis, vitamin A, D, E, K

SEZNAM ZKRATEK

CLC	Kapilární kapalinová chromatografie
ČR	Česká Republika
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ECD	Detektor elektronového záchytu
FID	Plamenový ionizační detektor
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie
HPLC-FI	Vysoce účinná kapalinová chromatografie spojená s fluorimetrickým detektorem
MEEKC	Elektrokinetická chromatografie
MFA	Mobilní fáze A
MFB	Mobilní fáze B
MS	Hmotnostní spektrometr
PC	Papírová chromatografie
PID	Fotoionizační detektor
RAE	Ekvivalent retinolové aktivity
SFC	Superkritická kapalinová chromatografie
SFE	Superkritická fluidní extrakce
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
UHPLC	Ultra-vysoce účinná kapalinová chromatografie

UME	Ultramikroelektroda
UV	Ultrafialová oblast spektra

Obsah:

1. Úvod.....	12
2. Vitaminy rozpustné v tucích	13
2.1 Vitamin A	13
2.1.1 Vlastnosti vitamínu A.....	13
2.1.1.1 Strukturální vzorec a popis molekuly	13
2.1.1.2 Chemické vlastnosti	14
2.1.1.3 Fyzikální vlastnosti.....	14
2.1.1.4 Zdroje vitamínu A.....	15
2.1.1.5 Zdravotní aspekty spojené s vitamínem A.....	16
2.2 Vitamin D.....	17
2.2.1 Vlastnosti vitamínu D.....	18
2.2.1.1 Strukturální vzorec a popis molekuly	18
2.2.1.2 Chemické vlastnosti	18
2.2.1.3 Fyzikální vlastnosti.....	19
2.2.1.4 Zdroje vitamínu D.....	19
2.2.1.5 Zdravotní aspekty spojené s vitamínem D.....	19
2.3 Vitamin E	20
2.3.1 Vlastnosti vitamínu E.....	20
2.3.1.1 Strukturální vzorec a popis molekuly	20
2.3.1.2 Chemické vlastnosti	21
2.3.1.3 Fyzikální vlastnosti.....	21
2.3.1.4 Zdroje vitamínu E.....	21
2.3.1.5 Zdravotní aspekty spojené s vitamínem E.....	22
2.4 Vitamin K.....	22
2.4.1 Vlastnosti vitamínu K	22
2.4.1.1 Strukturální vzorec a popis molekuly	22
2.4.1.2 Chemické vlastnosti	23
2.4.1.3 Fyzikální vlastnosti.....	23
2.4.1.4 Zdroje vitamínu K.....	24

2.4.1.5	<i>Zdravotní aspekty spojené s vitamínem K</i>	24
3.	Tradiční metody stanovení vitamínů rozpustných v tucích	26
3.1	Separáčn <i>í metody</i>	26
3.1.1	<i>Chromatografie</i>	26
3.1.1.1	<i>Tenkovrstvá chromatografie</i>	27
3.1.1.2	<i>Vysokoučinná kapalinová chromatografie</i>	28
3.1.1.3	<i>Plynová chromatografie</i>	30
3.2	Optické metody	32
3.2.1	<i>Spektrofotometrie</i>	32
3.3	Elektrochemické metody	33
3.3.1	<i>Diferenční pulsní voltametrie s ultramikroelektrodou (UME)</i>	33
4.	Nové trendy stanovení vitamínů rozpustných v tucích	34
4.1	<i>Simultánní stanovení pomocí HPLC chromatografie</i>	34
4.2	<i>Ultra-vysoce účinná kapalinová chromatografie</i>	35
4.3	<i>Kapilární kapalinová chromatografie</i>	37
4.4	<i>Mikroemulzní elektrokinetická chromatografie</i>	38
4.5	<i>Superkritická fluidní extrakce a chromatografie</i>	39
5.	Závěr	41
6.	Seznam použité literatury	42

1. Úvod

Tato práce je zaměřena na vitaminy rozpustné v tucích. Pojednává o jejich vlastnostech, standardních stanoveních a především se zabývá novými trendy v jejich analýze.

Vitaminy jsou nízkomolekulární organické látky, které společně s cukry, tuky a bílkovinami tvoří základ lidské potravy. Řadí se do skupiny esenciálních látek. Lidský organismus není, až na výjimky (vitamin D₃), schopen jejich vlastní syntézy. Existuje 13 základních typů vitaminů. V lidském těle mají nezastupitelnou funkci biokatalyzátorů. Podílejí se na metabolismu cukrů, tuků a bílkovin. Pravidelný příjem je nezbytný pro zachování fyziologických a metabolických funkcí lidského organismu. Hlavními zdroji vitaminů jsou rostlinné a živočišné tuky, ovoce a zelenina, maso, vejce, vnitřnosti, kvasnice, obilné klíčky a ryby [1].

Vitaminy se na základě rozpustnosti dělí do dvou skupin. Vitaminy rozpustné ve vodě jsou hydrofilní látky, podílející se na celé řadě biochemických procesů a to zejména při metabolické přeměně cukrů, tuků a bílkovin [1]. Některé vitaminy rozpustné ve vodě mají vliv na buněčné dýchání, syntézu DNA, krvetvorbu či růst a dělení buněk [2]. Další skupinou vitaminů jsou vitaminy rozpustné v tucích. Patří mezi ně vitamin A, vitamin D, vitamin E a vitamin K.

2. Vitaminy rozpustné v tucích

Druhou skupinou vitaminů představují vitaminy rozpustné v tucích. Mají lipofilní vlastnosti a jejich metabolismus je podobný s metabolismem tuků. Pro využití vitaminů rozpustných v tucích je nezbytná správná funkce gastrointestinálního traktu. Na rozdíl od vitaminů rozpustných ve vodě jsou nevyužité vitaminy v těle akumulovány. Hlavním orgánem bioakumulace a metabolismu vitaminů rozpustných v tucích jsou játra. Do skupiny lipofilních vitaminů patří: vitamin A (retinol), vitamin D (kalciferol), vitamin E (tokoferol) a vitamin K (fylochinon). Při hypervitaminózních stavech vzniká riziko poškození ledvin, žaludečních potíží či poruch vývoje plodu v těhotenství. Naopak deficiencie vitaminů rozpustných v tucích může způsobovat např. šeroslepost, odvápnování kostí, rachitidu či zvýšenou krvácivost do tělních dutin [3].

2.1 Vitamin A

Vitamin A zasahuje do řady fyziologických procesů v lidském těle. Hlavní funkcí je tvorba zrkového pigmentu rodopsinu. Podílí se na růstu a diferenciaci epitelových buněk (sliznice, pokožky, pohlavních buněk). Dále se podílí na syntéze steroidů, nukleových kyselin a glykoproteinů. V neposlední řadě svými antioxidačními účinky zabráňuje vzniku rakovinných nádorů [4].

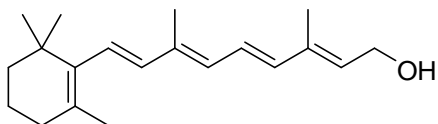
2.1.1 Vlastnosti vitaminu A

2.1.1.1 Strukturní vzorec a popis molekuly

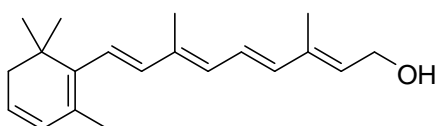
Systematický název retinolu je (2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyklohex-1-enyl)nona-2,4,6,8-tetraen-1-ol [5].

Vitamin A, neboli retinol, je alkohol obsahující ve své molekule šestičlenný kruh s postranním řetězcem, který je složen ze dvou isoprenoidních jednotek. Podle počtu dvojných vazeb na šestičlenném kruhu rozlišujeme vitamin A₁ (Obrázek 1) a vitamin A₂ (Obrázek 2). Postranní řetězec obsahuje čtyři dvojně vazby, které mohou vytvářet cis- či trans-izomery

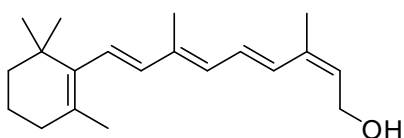
(celkem 16). Fyziologicky účinné izomery retinolu jsou pouze dvě: retinol (*all-trans*-izomer) a neoretinol (Δ^{13} cis izomer) (Obrázek 3) [6].



Obrázek 1 Chemická struktura vitamínu A₁



Obrázek 2 Chemická struktura vitamínu A₂



Obrázek 3 Chemická struktura neoretinolu

2.1.1.2 Chemické vlastnosti

Vitamin A (retinol) je látka patřící do skupiny vitaminů rozpustných v tucích. Lipofilní vlastnosti jsou dány přítomností dvou isoprenoidních jednotek v postranním řetězci [6].

Retinol je stabilní pouze v inertním prostředí. Za přítomnosti kyslíku a světla se rychle oxiduje na produkty, které již nejsou fyziologicky účinné. Oxidaci retinolu urychluje přítomnost těžkých kovů (Fe, Cu) nebo organických peroxidů. Pro stabilizaci retinolu jsou proto důležité antioxidanty, zejména tokoferoly a fosfolipidy [7].

2.1.1.3 Fyzikální vlastnosti

Retinol vytváří žluté krystaly jehlicovitého tvaru. Je dobře rozpustný v tucích, ethanolu, methanolu, chloroformu a etheru. Nerozpustný ve vodě a glycerolu. Retinol je stabilní i při zvýšené teplotě. Bod tání a spektrální vlastnosti jsou uvedeny v tabulce 1 [3, 8].

Tabulka 1 Fyzikální vlastnosti retinolu

Sloučenina	Bod tání (°C)	Absorpční maximum ($\lambda_{\max.}$, nm)	Absorbance v maximu 1% A 10mm	Extinkční koeficient ($1 \text{ mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)
All-trans- vitamin A ₁ alkohol	64	325	1830	52 800

2.1.1.4 Zdroje vitamínu A

Vitamin A se obecně vyskytuje v živočišných i rostlinných produktech. Samotný retinol se nachází pouze v živočišných produktech a to zejména v játrech ryb a jatečných zvířat. V ostatních živočišných zdrojích je obsah retinolu nižší a proměnlivý. Obsah retinolu v jednotlivých příkladech je uveden v tabulce 2 [8].

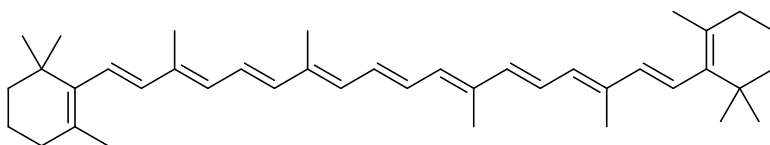
Tabulka 2 Obsah retinolu v živočišných produktech

Potravina	Obsah retinolu ($\mu\text{g}/100 \text{ g}$)
Mléko	40 - 950
Máslo	600 - 4500
Sýr	45 - 2400
Vejce	180 - 680
Játra hovězí	8400 - 41000
Ledviny vepřové	39 - 80
Rybí olej	19000 - 160000

Ačkoliv se samostatný retinol v rostlinné formě nevyskytuje, jsou zde bohatě zastoupeny jeho prekurzory – tzv. retinoidy. Tyto provitaminy svou podobnou strukturou umožňují vznik retinolu a neoretinolu. Mezi hlavní zástupce retinoidů patří β -karoten (Obrázek 4), α -karoten, γ -karoten a kryptoxanthin. Obsah karotenů ve vybraných rostlinných materiálech je znázorněn v tabulce 3 [8].

Tabulka 3 Obsah karotenů ve vybraných rostlinných materiálech

Materiál	Obsah karotenů ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)
Mrkev	2000 - 9600
Petržel kadeřavá	3200 - 26000
Zelená paprika	380 - 2350
Špenát	5000 - 48200
Zelí	12 - 7400
Rajčata	300 - 3500
Meruňky	1670 - 10000



Obrázek 4 Strukturní vzorec β - karotenu

2.1.1.5 Zdravotní aspekty spojené s vitamínem A

Doporučenou denní potřebu vitamínu A definujeme jako ekvivalent retinolové aktivity (RAE), kdy 1 μg RAE odpovídá 1 μg *all-trans*-retinolu, 12 μg *all-trans*- β -karotenu a 24 μg ostatních retinoidů. Doporučené hodnoty denních dávek jsou uvedeny v tabulce 4 [1].

Tabulka 4 Doporučené denní dávky RAE vitamínu A

Pohlaví a věk	Doporučené denní dávky RAE (µg/den)
Muži starší 19 let	900
Ženy starší 19 let	700
Těhotné a kojící ženy	1300
Děti do 3 let	300
Děti do 8 let	400
Děti do 13 let	600

Při nedodržení uvedených dávek může nastat jeho deficit či nadbytek v organismu, který se projeví specifickými klinickými projevy. Nedostatek vitamínu A či jeho úplný deficit má za následek šeroslepost, která může vést až k úplné slepotě. Dalšími projevy avitaminózy je keratinizace epitelálních buněk, poruchy hojení, záněty a zvýšená náchylnost k infekčním onemocněním [9].

Hypervitaminóza je v dnešní době velmi vzácná. Vysoké dávky vitamínu jsou toxické pro pacienty s hyperlipidemií či s těžce poškozenými játry. Mezi projevy intoxikace patří nevolnost, bolesti hlavy, poruchy vidění a závratě [10].

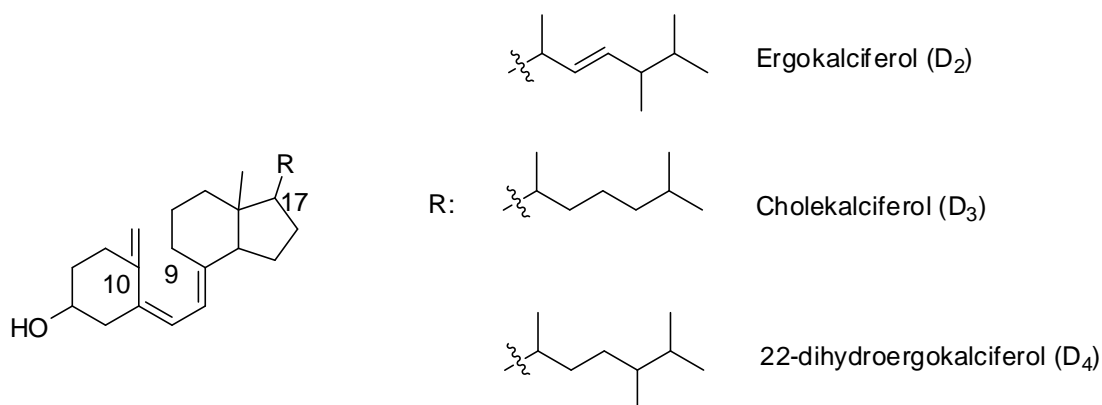
2.2 Vitamin D

Vitamin D zastává důležitou roli v metabolismu vápníku a fosforu. Reguluje vstřebávání vápníku v tenkém střevě a ovlivňuje činnost parathyreoidálního hormonu. Následkem je pak udržení homeostázy těchto prvků a mineralizace kostí. Vitaminy skupiny D vznikají ze svých provitaminů působením ultrafialového záření. Vitamin D₂ (ergokalciferol) vzniká z ergosterolu za vzniku vedlejších meziproductů jako je např. lumisterol, precalciferol a tachysterol. Vitamin D₃ (cholecalciferol) vzniká přeměnou 7-dehydrocholesterolu, který je obsažen v povrchových vrstvách pokožky živočichů. Některé zdroje uvádějí, že má také protizánětlivé a imunomodulační účinky [11].

2.2.1 Vlastnosti vitamínu D

2.2.1.1 Strukturální vzorec a popis molekuly

Základním strukturálním rysem vitamínů D je struktura odvozená od cyklopentanperhydrofenantrenu, která je charakteristická pro látky steroidní povahy např. cholesterolu. Vitamin D má ale narozdíl od cholesterolu pouze tři intaktní kruhy. Kruh B je v polohách 9 a 10 rozpojen a na uhlíku číslo 10 je přítomna dvojná vazba. Tato dvojná vazba je součástí konjugace a tvoří trienový konjugovaný systém dvojných vazeb. Jednotlivé vitaminy z D řady se liší svým postranním řetězcem na uhlíku číslo 17. Strukturální název vitamínu D₂ je (9,10-*seco*-Δ^{10(19)5,7,22}-ergostatetraen-3-β-ol) a vitamínu D₃ (9,10-*seco*-Δ^{10(19)5,7}-dehydrocholestatrien-3-β-ol (Obrázek 5) [8].



Obrázek 5 Chemické struktury vitamínů D₂, D₃, D₄

2.2.1.2 Chemické vlastnosti

Vitaminy řady D jsou látky lipofilního charakteru. Jejich rozpustnost v tucích je daná jejich strukturou, která je odvozená od steroidního cyklu. Tyto vitaminy jsou stabilní v bezvodém prostředí organických rozpouštědel a většinou rostlinných olejů. Proto je ve většině případů skladování nutné použití inertních plynů např. argonu. Jsou termolabilní, fotolabilní a citlivé k nízkým hodnotám pH. Jsou také náchylné k oxidaci, a proto je nutné použití antioxidantů. Pokud nejsou dodrženy tyto podmínky, dochází snadno k izomeracím struktur [3].

2.2.1.3 Fyzikální vlastnosti

Vitaminy D₂ a D₃ jsou bílé až slabě žluté krystalické látky, které jsou nerozpustné ve vodě, rozpustné v ethanolu a olejích a snadno rozpustné v acetonu, chloroformu, benzenu, etheru a petroletheru. Kvůli přítomnosti konjugovaných dvojných vazeb oba vykazují silnou absorpci v UV oblasti. Teplota tání vitamínu D₂ je 1218 °C a vitamínu D₃ je stanovena na 848 - 858 °C [2, 3].

2.2.1.4 Zdroje vitamínu D

Hlavním zdrojem vitamínu D pro lidský organismus je jeho vlastní syntéza v povrchových vrstvách kůže za účasti slunečního záření [12].

Mezi exogenní zdroje vitamínu D₃ (cholecalciferol) patří rybí produkty. Zejména oleje a tuky z rybích jater (treska, halibut, makrela, sardinky). Vitamin D₂ (ergocalciferol) se vyskytuje v rostlinných surovinách jakou jsou např. kokosové máslo, avokádo, banány či houby [3].

2.2.1.5 Zdravotní aspekty spojené s vitamínem D

Doporučené denní dávky vitamínu D mají ve výživových tabulkách zvláštní význam, jelikož je organismus schopen si tento vitamin syntetizovat sám. Denní dávky záleží na klimatických a geografických faktorech. Doporučená denní dávka vitamínu D je v ČR v současné době stanovena na 5 µg, kterou stanovuje vyhláška 330/2009 Sb. [1, 13].

Nedostatek vitamínu D má za následek narušení metabolismu vápníku a fosforu. U kojenců a malých dětí vede k rachitidě, kdy dochází kvůli nedostatku vápníku k deformacím kostry. U dospělých dochází k demineralizaci kostí a vzniku osteomalacie. Hypervitaminóza vitamínu D může nastat pouze při nadměrné konzumaci látek bohatých na calciferoly. Při nadměrném vystavení UV záření se syntéza vitaminů sama zastaví. Mezi příznaky hypervitaminózy vitamínu D patří: nauzea, bolesti hlavy, zmatenost či psychické projevy. Při akutní otravě může docházet i ke kalcifikaci ledvin, plic a srdce [14].

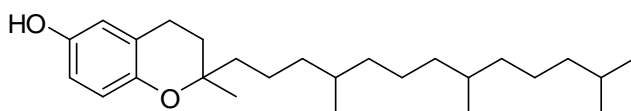
2.3 Vitamin E

Vitaminy E patří mezi nejsilnější přírodní antioxidanty. Zabraňují šíření volných radikálů a tvorbě oxidačního stresu. Pro jejich antioxidační aktivitu se předpokládá jejich preventivní působení proti ateroskleróze, rakovině a kardiovaskulárním onemocnění. Provedené klinické studie dokazují, že zvýšený příjem vitaminů E koreluje se sníženým rizikem těchto onemocnění. Tvoří se jen v rostlinách a jsou přítomny ve všech lipidech rostlinného původu [15].

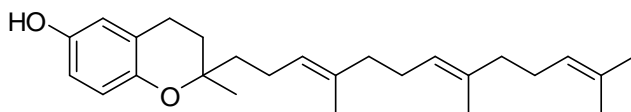
2.3.1 Vlastnosti vitaminu E

2.3.1.1 Strukturní vzorec a popis molekuly

Do skupiny vitaminů E řadíme látky, které mají základní strukturou odvozenou od tokolu (2-methyl-2-(4', 8',12'-trimethyltrideca)-chroman-6-olu (Obrázek 6) a tokotrienolu (2-methyl-2-(4', 8',12'-trimethyldeca-3',7',11-trienyl)-chroman-6-ol (Obrázek 7). Celkem rozlišujeme 8 vitamery. Vitamery odvozené od tokolu se nazývají tokoferoly a označují se α , β , γ a δ . Dále rozeznáváme α , β , γ a δ tokotrienoly. Tyto látky se od sebe liší počtem a polohou methylových skupin [16].



Obrázek 6 Strukturní vzorec tokolu



Obrázek 7 Strukturní vzorec tokotrienolu

2.3.1.2 Chemické vlastnosti

Všechny deriváty vitamínu E patří do skupiny látek rozpustných v tucích. Lipofilní vlastnosti jsou dány přítomností isoprenoidní jednotky v postranním řetězci. Velmi snadno se oxidují působením peroxidů, ozónu a manganistanu draselného. Oxidace je urychlována přítomností světla a těžkých kovů. Jsou stabilní v bazickém médiu a v bezvodém prostředí jsou velmi odolné vůči nízkému pH. Chráněním hydroxylové skupiny na uhlíku 6 lze dosáhnout zvýšené stability vůči vnějšímu působení vzduchu [3, 17].

2.3.1.3 Fyzikální vlastnosti

Tokoferoly jsou při pokojové teplotě světle nažloutlé oleje, které jsou nerozpustné ve vodě. Dobře rozpustné jsou prakticky ve všech nepolárních rozpouštědlech. Vzhledem k přítomnosti aromatického jádra absorbují UV záření v oblasti 280 - 300 nm [3].

2.3.1.4 Zdroje vitamínu E

Jak již bylo řečeno výše, tokoferoly se vyskytují pouze v rostlinách a lipidech rostlinného původu. Bohatým zdrojem vitamínu E jsou tedy rostlinné oleje, ve kterých se obsah liší. Množství některých vybraných potravin je uveden v tabulce 5 [1].

Tabulka 5 Množství vitamínu E ve vybraných potravinách

Potravina	Obsah vitamínu E (mg/100g)
Máslo	0,002
Palmový olej	10
Mrkev	2
Ořechy vlašské	20
Ovesné vločky	3,7
Játra hovězí	1
Kuře	0,21

2.3.1.5 Zdravotní aspekty spojené s vitamínem E

Denní dávka vitamínu E je pro lidský organismus závislá na příjmu polynenasycených mastných kyselin a proto je určení přesné dávky poměrně diskutabilní. Doporučené denní dávkování v ČR je však určeno vyhláškou 330/2009 Sb. na 12 mg [13].

Nedostatek vitamínu E se u lidí vyskytuje zřídka. Nesouvisí s jeho nedostatečným příjmem v potravě, ale příčinou jsou genetické poruchy transportní bílkoviny pro α -tokoferol nebo malabsorbce tuků. Projevy jsou spinocerebrální ataxie a myopatie. Nadbytek vitamínu E je dobře snášen a vyskytuje se opět velmi zřídka. Klinickými projevy jsou gastrointestinální potíže a snížená hladina tyroxinu v krvi [15].

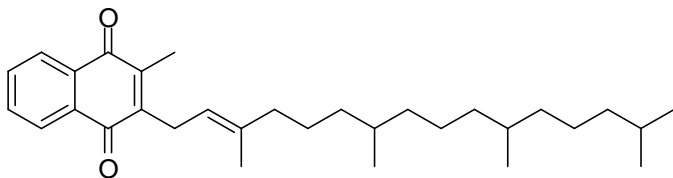
2.4 Vitamin K

Vitamin K_1 je nepostradatelným článkem v kaskádě krevního srážení. Katalyzuje syntézu protrombinu v játrech, který je jedním z hemokoagulačních faktorů. Vitamin K_2 je produktem biosyntézy přirozené střevní mikroflóry zejména bakterií druhu *Enterobacter* a *Eubacterium*. V rostlinných systémech se podílí na aerobní fosforylaci. Je lokalizován v zelených částech rostlin (chloroplastech), kde je součástí elektronového transportního řetězce [18].

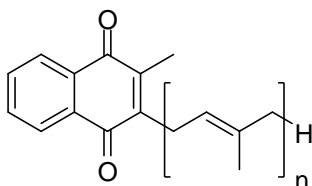
2.4.1 Vlastnosti vitamínu K

2.4.1.1 Strukturní vzorec a popis molekuly

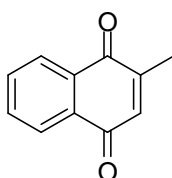
Mezi vitamíny řady K řadíme vitamin K_1 (fylochinon, 2-Methyl-3-fytyl-1,4-naftochinon) (Obrázek 8), K_2 (menachinon) a K_3 (menadion, 2-Methyl-1,4-naftochinon) (Obrázek 10). Vitamin K_2 má jako i předcházející vitamíny K základní strukturu odvozenou od 2-Methyl-1,4-naftochinonu. Od ostatních se liší tím, že má na uhlíku č. 3 navázaný polyisoprenový řetězec, který může mít 4 - 13 isoprenových jednotek (Obrázek 9).



Obrázek 8 Chemický vzorec vitamínu K₁



Obrázek 9 Chemický vzorec vitamínu K₂



Obrázek 10 Chemický vzorec vitamínu K₃

2.4.1.2 Chemické vlastnosti

Vitaminy řady K jsou nestabilní v kyselém i zásaditém prostředí. Jsou fotosenzitivní, ale relativně stálé při vyšších teplotách a odolné vůči mírným oxidačním činidlům. Produkty oxidačních pochodů jsou 2,3-epoxidy. Naftochinony, které jsou základní strukturální jednotkou vitamínu K, mohou být redukovány na odpovídající naftohydrochinony. Ty mohou zpět přecházet na naftochinony působením slabých oxidačních činidel [3].

2.4.1.3 Fyzikální vlastnosti

Při pokojové teplotě je vitamin K₁ žlutě zbarvená amorfní látka, která při prudkém ochlazení přechází na krystalickou formu. Ostatní vitaminy řady K jsou žluté krystalické látky tvaru jehlic. Tyto vitaminy jsou nerozpustné ve vodě. Naopak dobře rozpustné jsou v ethanolu, etheru, chloroformu a olejích. Vzhledem k přítomnosti nenasyceného jádra s konjugovanými vazbami absorbují světlo v UV oblasti mezi 240 až 270 nm [3].

2.4.1.4 Zdroje vitamínu K

Vitamíny K jsou přítomny v rostlinných i živočišných systémech. Vitamin K₁ je přítomný v zelených částech rostlin zejména rostlin z čeledi brukvovitých a také v řasách. Nejvyšší koncentrace lze najít v některých rostlinných olejích. Vitamin K je přítomný v malých koncentracích v mase jatečných zvířat a drůbeži. Naopak v játrech a drůbežích vejcích je jeho obsah několikanásobně vyšší. Hodnoty obsahu vitamínu K v některých potravinách jsou uvedeny v tabulce 6 [3].

Tabulka 6 Obsah vitamínu K v potravinách

Rostlinné zdroje	Obsah vitamínu K (µg/100 g)
Brokolice	154
Mrkev	13
Kapusta	275
Rajčata	48
Špenát	266
Olej řepkový	830
Olej sójový	200

Živočišné zdroje	Obsah vitamínu K (µg/100 g)
Maso hovězí	0,6
Maso kuřecí	0,01
Játra hovězí	104
Játra vepřová	88
Vaječný bílek	149
Kravné mléko	4
Vejce	50

2.4.1.5 Zdravotní aspekty spojené s vitamínem K

Doporučená denní dávka vitamínu K pro ČR je stanovena na 75 µg vyhláškou 330/2009 Sb. Denní příjem vitamínu K by měl být zvýšen při dlouhodobé antibiotické léčbě, laxativ, statinů a antikonvulziv [13].

Hypovitaminóza se vyskytuje velmi zřídka. Je přítomná u pacientů se sníženou funkcí jater, cystickou fibrózou či poruchou tvorby žluči. Projevy nedostatku jsou hemoragické stavy gastrointestinálního a urogenitálního systému. Nedostatek vitamínu K také ovlivňuje syntézu osteokalcinu a tak může potencovat vznik osteoporózy. U vitamínu K₁ a K₂ nebyly pozorovány žádné klinické projevy ani při mnohonásobně vyšších dávkách než je dávka

doporučená. V případě vysokých dávek vitamínu K₃ dohází k iniciaci hemolytické anémie hyperbilirubinémie [1].

3. Tradiční metody stanovení vitaminů rozpustných v tucích

Mezi tradiční analytické metody stanovující vitaminy rozpustné v tucích patří postupy více či méně náročné na provedení nebo instrumentální vybavení. Metody analýzy lze dělit dle několika kritérií. Z praktického hlediska je nejlepší volbou dělit metody dle fyzikálně - chemické podstaty [19, 20].

Z tohoto hlediska dělíme metody:

- Separační
- Optické
- Elektrochemické

3.1 Separační metody

Separační metody jsou obvykle založené na principu rozdělování složek směsi mezi dvě navzájem nemísitelné fáze. Jedná se tedy o rovnovážnou distribuci. Nejčastěji využívanou separační metodou je chromatografie [20].

3.1.1 Chromatografie

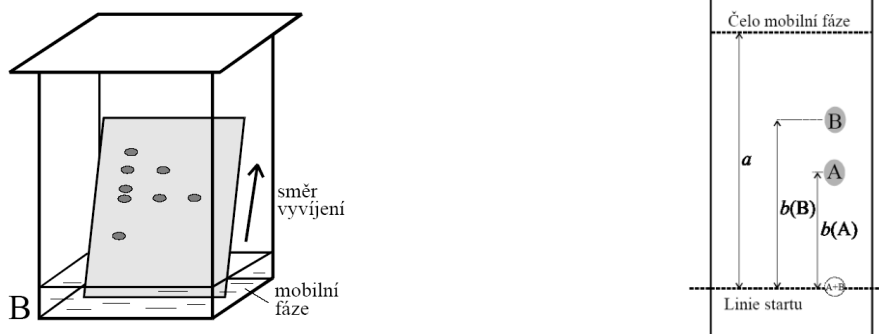
Chromatografie je separační metoda, která využívá dělení látek ze směsi mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Slouží ke kvalitativnímu a i kvantitativnímu stanovení. Principem metody je nanesení vzorku na začátek stacionární fáze (fáze nepohyblivá) a následném unášení látek mobilní fází. Při pohybu mobilní fáze dochází také k pohybu vzorku, který má ke stacionární fázi různou afinitu a je jí různě zadržován. Ty látky, které jsou stacionární fázi nejméně zadržovány, jsou unášeny nejrychleji. Na základě tohoto principu dojde ideálně k rozdělení směsi analytu. Podle uspořádání stacionární fáze lze metody dělit na papírovou (PC), tenkovrstvou (TLC) a sloupcovou chromatografii [21]. Podle povahy mobilní fáze se chromatografické metody rozdělují na chromatografii vysokoúčinnou kapalinovou (HPLC) a plynovou (GC) [20].

3.1.1.1 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie je ekonomicky přístupnou a snadno proveditelnou separační metodou. Umožňuje separaci, izolaci, identifikaci a subjektivní kvantifikaci látek ve směsi. Samotná separace probíhá na stacionární fázi, která je tvořena silikagelem, křemelinou, celulózou nebo oxidem hlinitým naneseným na desce hliníku nebo skla. Vhodnou volbou mobilní fáze dochází ke vztlínání vzorku analytu. Vzorek analytu se nanáší na vyznačenou linii startu a chromatografie je ukončena ve chvíli, kdy mobilní fáze dosáhne čela mobilní fáze (Obrázek 11) [22]. Vyhodnocení TLC se provádí vypočítáním retenčního faktoru R_F , který se vypočítá pomocí rovnice 1:

$$R_F = \frac{b}{a} \quad (1)$$

Kde b je vzdálenost středu skvrny od linie startu a kde a je vzdálenost mezi linií startu a čelem mobilní fáze.



Obrázek 11 Provedení TLC ve vyvíjecí komoře a vyhodnocení TLC chromatogramu

Pro detekci látek na chromatogramu se využívají selektivní reakce pro přítomné funkční skupiny nebo neselektivní reakce postřikem vhodným reagentem. Látky s konjugovanými dvojnými vazbami, které poskytují barvy lze detekovat přímo. Pro nebarevné látky se využívá UV detekce při vlnových délkách 254 nm a 366 nm [23]. Pomocí této metody se analyzují vitaminy A, D, E a K [21]. Jako příklad lze uvést stanovení vitamínu A. Varma a kolektiv [24] využili tuto metodu pro stanovení vitamínu A a jeho

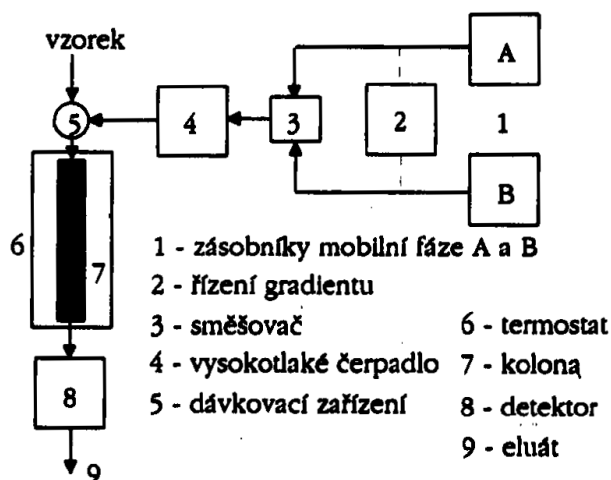
chemických derivátů. Komerčně dostupný krystalický vitamin A převedli na jeho acetát, aldehyd, epoxid a volnou kyselinu. Jako stacionární fázi použili oxid hlinitý nanesený na skleněné desce. V této práci byly použity různé směsi organických rozpouštědel. Detekce byla provedena pomocí UV lampy. Z polohy skvrn pak stanovili R_F . Vypočítané hodnoty a použité mobilní fáze jsou v tabulce 7.

Tabulka 7 Deriváty vitaminu A a vypočítané hodnoty retenčních faktorů pro různé mobilní fáze (MF), kde 1. Cyklohexan; 2. Benzen/Cyklohexan (5 :95); 3. Methanol/cyklohexan (0,25 : 99,75); 4. Methanol/cyklohexan (3 : 97); 5. Ethanol/cyklohexan (3: 97); 6. Ethanol/cyklohexan (8: 92)

Derivát Vitaminu A	Mobilní fáze (MF) a R_F					
	1	2	3	4	5	6
Vitamin A acetát	0,19	0,88	-	-	-	-
Vitamin A aldehyd	-	0	0,66	-	-	-
Vitamin A epoxid	-	-	0,03	-	0,32	-
Vitamin A kyselina	-	-	-	-	0	0,05

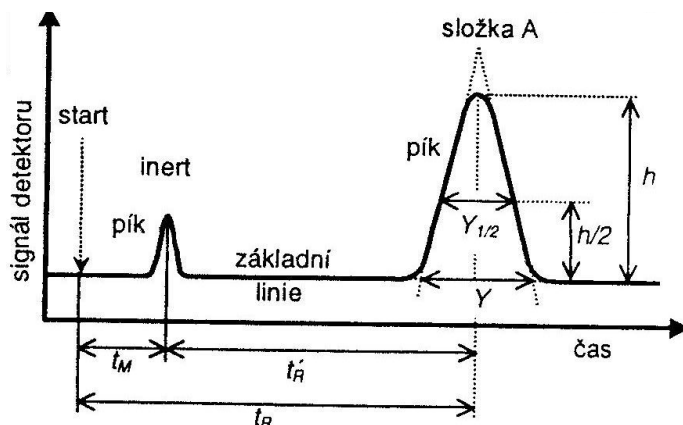
3.1.1.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

HPLC je pro stanovování vitaminu rozpustných v tucích nejčastější metodou. Využívá, jako v ostatních chromatografických metodách, separace jednotlivých složek vzorku mezi stacionární a mobilní fází. HPLC je narozdíl od plynové chromatografie využitelná i pro látky, které jsou tepelně nestálé a jsou netěkavé. Využívá se pro kvantitativní i kvalitativní analýzu. HPLC je náročnější na instrumentální vybavení a využívá kolonového uspořádání. Vysoká účinnost této metody je zajišťována vysokým tlakem v systému, který může dosahovat hodnot až 50 MPa. Přístroj pro HPLC se skládá ze zásobníků mobilních fází, směšovače, vysokotlakého čerpadla, autosampleru, termostatu, vlastní kolony a detektoru (Obrázek 12) [25].



Obrázek 12 Schéma HPLC zařízení

Zařízení HPLC může obsahovat několik zásobníků mobilních fází a pomocí gradientového zařízení je možné měnit procentuální zastoupení jednotlivých rozpouštědel v mobilní fázi. Pokud zůstává složení mobilní fáze po celou dobu eluce stejné, nazývá se tato eluce izokratická. V případě, že se poměry rozpouštědel v mobilní fázi mění, jedná se o gradientovou eluci. Vysoké tlaky v systému kolon zabezpečuje přítomnost vysokotlakého čerpadla, které může být pístové nebo membránové. Výhodou membránového čerpadla je schopnost vytvářet stálý tlak po celou dobu eluce. Zařízení, na kterém probíhá vlastní separace, se nazývá kolona. Kolony pro HPLC se používají výhradně náplňové vyrobené z nerezavějící oceli, které se liší velikostí, délkou a stacionární náplní dle konkrétních aplikací. Metoda HPLC může být plně automatizovaná pomocí autosampleru. Pro spolehlivou detekci eluátu se v praxi využívá několik druhů detektorů. Mezi nejpoužívanější detektory patří detektor fotometrický, refraktometrický, fluorimetrický a hmotnostní spektrometr [20, 21, 24]. Detektor je spojen s řídicím a vyhodnocovacím zařízením, které sleduje závislost intenzity signálů v čase. Výsledný grafický záznam této závislosti se nazývá chromatogram, který je znázorněn na obrázku 13 [20].



Obrázek 13 Grafický záznam chromatogramu

Kde h je výška píku, Y je šířka píku v základně, $Y_{1/2}$ je šířka píku v polovině výšky píku, A je plocha píku a t_R je retenční čas. Hodnoty A a h souvisejí s kvantitativním hodnocením chromatogramu, zatímco Y a $Y_{1/2}$ se separační účinností [20].

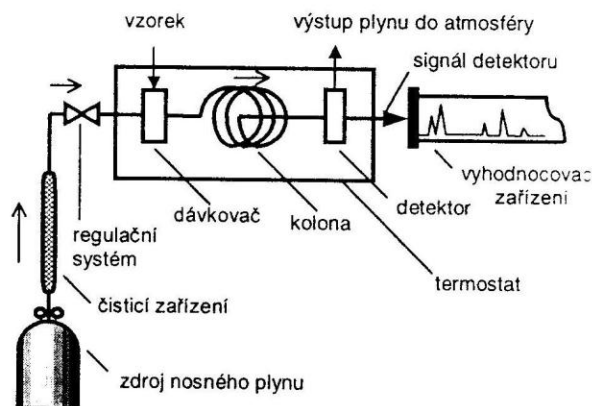
Příprava vzorků jednotlivých vitaminů pro nástřik na kolonu vyžaduje odlišné postupy. První fází přípravy bývá homogenizace rostlinného či živočišného materiálu a následná extrakce organickými rozpouštědly. Organickou vrstvu je nutné vysušit pomocí bezvodých solí anorganických kyselin a následně ji přechistit od nežádoucích organických nečistot. Posledním krokem přípravy vzorku je jeho zakoncentrování destilací za sníženého tlaku nebo působením proudu inertních plynů [19]. Jelikož se chemicko-fyzikální vlastnosti jednotlivých vitaminů liší, není možné použít univerzální postup pro jejich stanovení. HPLC analýzy se proto liší ve volbě podmínek pro stanovení a použití mobilních a stacionárních fází

HPLC je všestranná metoda, která je hojně využívána v potravinářském průmyslu. Je běžně používanou metodou v pivovarnictví při analýze piva a pivovarských surovin [26], mlékárenském a tukovém průmyslu při analýze mléka a sýrů [27, 28] masném průmyslu [29] či při zpracování obilovin a výrobě pečiva [30].

3.1.1.3 Plynová chromatografie

GC je další možnou analytickou a separační metodou. Narozdíl od HPLC využívá plynnou mobilní fázi, která unáší vzorek kolonou. Proto se mobilní fáze nazývá nosný plyn. Tato metoda je vhodná pro analýzu těkavých látek, nedisociovatelných kapalin,

organokovových sloučenin, plynů a látek s relativní molekulovou hmotností menší než 1000. Na obrázku 14 je schematicky znázorněno zařízení pro plynovou chromatografii, které se skládá ze zdroje nosného plynu, čistícího zařízení, regulačního systému, dávkovače, kolony, termostatu a detektoru.



Obrázek 14 Schematický popis zařízení pro plynovou chromatografii

Zdrojem nosného plynu je zpravidla tlaková lahev s mobilní fází, která obsahuje vodík, helium, argon nebo dusík. Před vstupem nosného plynu do vyhřívané kolony je zbaven nečistot a vlhkosti pomocí čistícího zařízení. Dávkoč jednorázově zavede vzorek do kolony. Pro plynovou chromatografii se používají kolony náplňové i kapilární. Volba stacionární fáze záleží na konkrétním případě. Analyzované látky po průchodu kolonou jsou postupně detekovány detektorem. Nejpoužívanějším je plamenový ionizační detektor (FID). Dalším je detektor elektronového záchytu (ECD) a fotoionizační detektor (PID). Nezastupitelné postavení má spojení GC s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) tam, kde je potřeba analýzy neznámých směsí látek. Detektor je opět i v tomto případě spojen s vyhodnocovacím zařízením. Grafický záznam je obdobný s chromatogramem HPLC, který je demonstrován na obrázku 13.

Plynová chromatografie není vhodná pro všechny vitaminy rozpustné v tucích. Některé z nich jsou tepelně nestálé, a proto není možné je touto metodou analyzovat. Vhodnou derivatizací vzorku je ale možné tyto vlastnosti měnit. Například v případě vitamínu A, kdy je převeden na jeho trimethylsilyl ether derivát, a tím ztrácí svou termolabilní povahu. Po této

úpravě vzorku je možné GC použít. Pro analýzu všech vitamínů je výhodné spojení GC-MS [21].

3.2 Optické metody

3.2.1 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie patří mezi optické neinvazivní metody. Principem metody je schopnost látky absorbovat elektromagnetické záření v ultrafialové UV (200 - 400 nm), viditelné VIS (400 - 750 nm) či infračervené IR (750 - 1000 nm) oblasti. Schopnost molekuly absorbovat záření je daná její strukturou. U organických sloučenin a tedy i vitamínů je tato vlastnost podmíněna přítomností dvou a více konjugovaných dvojných vazeb.

Sobotka a kolektiv stanovili vitamin A pomocí UV spektrofotometrie [31]. Vzorek vitamínu A získali z oleje z jater halibuta. Vzorek byl rozpuštěn v bezvodém ethanolu a následně byly změřeny jeho absorpční spektra. Absorpční maxima byly pozorována v rozmezí 328-329, 345 a 363-364 nm.

3.3 Elektrochemické metody

Elektrochemické či elektroanalytické metody lze také použít ke stanovení vitaminů rozpustných v tucích. Elektroanalytické metody jsou založeny na principu závislosti elektrochemického chování roztoků na jejich složení a koncentraci. Základem těchto metod je elektrochemický článek, který je tvořen analyzovaným roztokem a elektrodami. Elektrody jsou dále spojeny s měřicím zařízením. Tímto způsobem lze měřit veličiny jako je elektrický proud I , potenciál E , vodivost G a kapacitu C .

3.3.1 Diferenční pulsní voltametrie s ultramikroelektrodou (UME)

Marie Coatanea a kolektiv [32] se zabývali stanovením vitaminu E obsaženém v rostlinných olejích a tucích pomocí UME. Použití pracovní platinové UME s průměrem od 14 mm – 50 mm snížilo podíl rozpouštědla v roztoku. Jako málo toxické rozpouštědlo byl zvolen *N*-methyl-pyrrolidon. K zabránění tvorby dvoufázových emulzí byly použity kvartérní amoniové soli o koncentracích menších než 0,01 M. Stanovení obsahu vitaminu E probíhala pro několik druhů rostlinných olejů a vepřového sádla. Výsledky analýzy byly porovnány s výsledky HPLC analýzy. Z tabulky 8 je zřejmé, že tato metoda poskytuje podobné výsledky jako častěji užívaná HPLC.

Tabulka 8 Srovnání metody HPLC s diferenční pulsní voltametří s UME

Metoda	Rostlinný olej A Koncentrace vitaminu E ($\times 10^3$ M)	Rostlinný olej B Koncentrace vitaminu E ($\times 10^3$ M)	Rostlinný olej C Koncentrace vitaminu E ($\times 10^3$ M)
HPLC metoda	1,79	0,98	1,41
Diferenční pulsní voltametrie s UME	1,6	0,98	1,41

4. Nové trendy stanovení vitaminů rozpustných v tucích

Ve světě je mnoho výzkumných skupin a center, které se zabývají zdokonalováním již zavedených analytických metod či zaváděním inovativních postupů. V analýze vitaminů rozpustných v tucích je na prvním místě separační metoda HPLC. V této metodě lze pozorovat největší rozmach pokroků a invencí jako je simultánní stanovení pomocí HPLC a ultra-vysoce účinná chromatografie UHPLC. Mezi další nově zaváděné metody patří například mikroemulzní elektrokinetická chromatografie, kapilární kapalinová chromatografie či superkritická fluidní chromatografie.

4.1 Simultánní stanovení pomocí HPLC chromatografie

Tim Plozza a kolektiv [33] vyvinuli metodu pro stanovení několika vitaminů rozpustných v tucích. Jejich cílem bylo současně stanovit *all* trans-retinol, α -tokoferol a β -karoten, které jsou obsaženy v kravském mléce. Výhodou této metody je časová úspora oproti jednotlivým stanovením, stejně tak snížení nákladů na energie a organická rozpouštědla.

K simultánní analýze byla použita metoda HPLC s iontovou pastí, která patří mezi detektory hmotnostní spektrometrie. V dnešní době jsou iontové pasti MS využívány pro vysokou rychlost a citlivost. Jednotlivé vitaminy byly detekovány pomocí tří konkurenčních metod: HPLC-MS², HPLC–UV/Vis a HPLC–Fl.

Těmito metodami bylo pro analýzu *all* trans-retinolu, α -tokoferolu a β -karotenu jako základ použito čerstvé kravské mléko, které bylo jeden den skladováno při teplotě 4°C, poté zmrazeno a skladováno o teplotě -70 °C. Před analýzou bylo mléko rozmrazeno a důkladně zhomogenizováno. 10 ml takto upraveného mléka bylo smícháno společně s 0.5 g kyseliny askorbové, 40 ml ethanolu a 10 ml hydroxidu draselného s vodou (1:1). Poté byla směs 30 minut zahřívána. Následně byla směs ochlazena v ledové lázni a kvantitativně převedena do dělicí nálevky společně s 50 ml vody, 10 ml ethanolu a 50 ml hexanu. Po dvou minutách třepání došlo k rozdělení fází. Vodná fáze byla oddělena a dvakrát extrahována 20 ml hexanu. Všechny organické fáze byly ještě třikrát promyty 100 ml vody a poté převedeny do objemu

100 ml. 10 ml roztoku organické fáze bylo převedeno do skleněné trubice, kde při laboratorní teplotě v proudu dusíku došlo k odpaření. Odparek byl smíchán s 1 ml methanolu a zfiltrován přes teflonový filtr. Filtrát byl použit ke třem souběžným analytickým metodám: HPLC-MS², HPLC-UV/Vis a HPLC-Fl. Podmínky stanovení jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9 Podmínky stanovení all-trans-retinolu a tokoferolu

Typ detekce	Chromatografická kolona	Mobilní fáze	Průtok	Teplota
HPLC-MS ²	Polaris C ₁₈ 2,1 × 150 mm (5 μm)	Voda : methanol (5 : 95 - 0 : 100)	0,2 - 0,4 ml / 1 min.	30 °C
HPLC- Fl	Bondclone C ₁₈ 3,9 × 300 mm (10 μm)	Voda : methanol (5 : 95)	1 ml /1 min.	30 °C
HPLC-UV/Vis	Bondclone C ₁₈ 3,9 × 300 mm (10 μm)	Voda : methanol (5 : 95)	1 ml /1 min.	30 °C

HPLC-MS² metoda se stala na základě stabilních výsledků a snadné opakovatelnosti vhodnou novou analytickou metodou pro současně probíhající stanovení vitaminů rozpustných v tucích. Níže jsou uvedeny minimální rozdíly stanovení v různých v koncentracích analyzovaných vitaminů. Vitamin A 45 μg/100 ml, HPLC-MS² ± 8%, HPLC-UV ± 9 %, Vitamin E 150 μg/100 ml, HPLC-MS² ± 11%, HPLC-Fl ± 9%, β-karoten 12 μg/100 ml, HPLC-MS² ± 18%, HPLC-Vis ± 21% .

4.2 Ultra-vysoce účinná kapalinová chromatografie

Paliakov, Crow a kolektiv [34] se zabývali kvantitativním stanovením vitaminů rozpustných v tucích a koenzymu Q-10 v lidském séru pomocí metody ultra- vysoce účinné chromatografie (UHPLC) s UV detekcí.

Všechny přípravy vzorků probíhaly za omezeného přístupu denního světla, aby se minimalizovala možnost fotodegradace analytu. Vzorek byl rozpuštěn ve směsi butylovaného hydroxytoluenu a tetrahydrofuranu kvůli precipitaci proteinů a chránění analyzovaných vitaminů před radikálovou oxidací. Do vzorku byl dále přidán ethanol a 4% roztok NaCl. Poté byl do roztoku přidán hexan a vzorek byl jím extrahován centrifugací. Po dokončení centrifugace byla organická vrstva oddělena a převedena do skleněné trubice. Ta byla následně odpařena proudem dusíku při 38°C. Získaný odparek byl promyt 2-propanolem a převeden do vialky. Následně byl dávkován do UHPLC systému. Pro separaci byla použita gradientová eluce mobilní fáze A (MFA): Acetonitril : voda (90 : 10) a mobilní fáze B (MFB): Methanol : 2-propanol (70 : 30). Od 0 minut do 0,4 minut byl poměr mezi MFA a MFB (90 : 10), od 0,4 minut do 1 minut se poměr mezi mobilními fázemi měnil až na MFA a MFB (20 : 80). Tento poměr byl udržován po dalších 0,4 minut. Po další 0,6 minut se poměr MFA : MFB vracel k původnímu poměru (90 : 10). Podmínky stanovení jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka 10 Podmínky stanovení pomocí UHPLC

Vitamin	Mobilní fáze	Stacionární fáze	Průtok	Teplota
Vitamin A	Gradientová eluce MFA : MFB	BEH kolona 2,1 mm × 50 mm (1,7 μm)	1,25 ml/min.	40 °C
α-, β- a γ- tokoferoly				
β- karoten				
Vitamin K ₁				

Mezi hlavní výhody této metody patří její rychlost provedení, linearita, přesnost a stabilita. V tabulce 11 jsou uvedeny vlastnosti analýzy. Celkový čas analýzy trvající 2 minuty je dvakrát až třikrát rychlejší než běžně dostupné validované metody HPLC pro analýzu těchto vitaminů [34].

Tabulka 11 Hodnoty meze stanovitelnosti, linearity a meze detekce při stanovení vybraných vitaminů

Vitamin	Mez stanovitelnosti mg/l	Mez detekce (mg/l)	linearita
Vitamin A	0,024	0,007	> 0,999
β- a γ-tokoferol	0,060	0,018	
α-tokoferol	0,261	0,078	
β - karoten	0,012	0,004	

4.3 Kapilární kapalinová chromatografie

Stanovením vitaminů rozpustných v tucích a β -karotenu se zabývali autoři Hui Xu, Li Jia [35]. Kapilární kapalinovou chromatografii (CLC) s UV/Vis detekcí spojili s mikroextrakcí pevnou fází (SPME). Jako extrakční medium byla použita křemíková C18 (ODS) kolona. Ke zvýšení citlivosti detekce v UV/Vis oblasti byla použita průtoková cela s optickými vlákny. Spojení kapilární kapalinové chromatografie s SPME má za následek snížení množství analyzovaných vzorků a organických rozpouštědel.

Příprava vzorku probíhala následovně: Analyzovaný vzorek, který byl připraven homogenizací kukuřice (120 mg) byl vložen do 15 ml plastové trubice. Dále byl přidán methanol (4 ml) ochlazený na teplotu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Směs byla 30 sekund protřepávána a poté umístěna na 30 minut do chladicího zařízení o teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Roztok byl odstředován 30 minut při 4°C a rychlosti 5000 otáček za minutu. Vrchní vrstva byla zfiltrována. Filtrát byl při 30°C odpařen pomocí mikrocentrifugálního vakuového koncentrátoru. Před přímou analýzou byl odparek rozpuštěn v 0,5 ml 50% methanolu. Podmínky pro stanovení touto metodou jsou uvedeny v tabulce 12.

Tabulka 12 Podmínky stanovení vitaminu E, K₁, A a β -karotenu

Vitamin	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Vlnové délky při detekci (nm)	Průtok
Vitamin E	ODS kolona 27 cm \times 100 μm	Methanol	290	1 $\mu\text{l}/\text{min}$
Vitamin K ₁			250	
Vitamin A			325	
β - karoten			452	

Touto skupinou byla vytvořena CLC metoda v kombinaci s mikroextrakcí s pevnou fází s UV/Vis detektorem pro stanovení vitaminů rozpustných v tucích. Hodnoty meze detekce jsou uvedené v tabulce 13 [35].

Tabulka 13 Mez detekce u metody kapilární kapalinové chromatografie

Vitamin	Mez detekce (ng/ml)
Vitamin E	173
Vitamin K ₁	16,4
Vitamin A	3,6
β - karoten	1,9

4.4 Mikroemulzní elektrokinetická chromatografie

Sánchez a kolektiv [36] se zabývali mikroemulzní elektrokinetickou analýzou pro analýzu vitaminů rozpustných v tucích. Mikroemulzní elektrokinetická chromatografie (MEEKC) patří do skupiny elektroforetických metod. Je založena na principu mikroemulgace polární a nepolární složky pomocí surfaktantů a ko-surfaktantů. Využili butanolu ke stabilizaci emulze oktanolu a pufovaného vodného média. Cílem metody je zvýšit selektivitu v separaci nepolárních roztoků analytů. Hlavní nevýhodou této metody je relativně dlouhý čas potřebný k separaci lipofilních molekul.

Vzorky vitaminů rozpustných v tucích byly připraveny rozpuštěním v butanolu. Ty byly skladovány při teplotě 0 °C. Mikroemulze byla připravena smícháním příslušného objemu roztoku vzorku v butanolu s kyselinou boritou a boritanem sodným na přesný objem. Tato směs byla ponořena do ultrazvukové lázně po dobu 30 minut, dokud nebyl surfaktant plně rozpuštěn. Takto byla připravena stálá a čirá mikroemulze, která je stabilní po dobu několika měsíců. Podmínky stanovení, při kterých byly analýzy prováděny, jsou uvedeny v tabulce 14.

Tabulka 14 Podmínky stanovení vitaminů provedené Sánchézem a kol.

Vitamin	Zařízení	Napětí	Teplota	UV detekce
Vitamin A	Waters Capillary Analyzer plněný nemoifikovanou kolonou se silikagelem 63 cm (75 μm)	15 kV	25 °C	254 nm
Vitamin E				
Vitamin K ₃				
Vitamin D ₃				

Sánchez a kolektiv [36] vyvinuli novou metodu stanovení pomocí elektrokinetické chromatografie. Zjistili, že přidání jednoho či dvou surfaktantů je možné vytvořit mikroemulzi, a pomocí níž úplně oddělit analyzovanou směs lipofilních vitaminů, které pak mají různé migrační časy. Kromě butanolu jako surfaktantu do směsi přidali 15% propanol a díky tomu došlo k rozdělení stanovovaných vitaminů. MEEKC patří mezi nejefektivnější techniky separace vitaminů. Pomocí vytvoření mikroemulze dochází ke zlepšení rozpustnosti, stability i separační účinnosti vitaminů. Lipofilní sloučeniny jsou kompletně solubilizovány a kvůli tomu nedochází k precipitaci vzorku během elektroforetické analýzy [36].

4.5 Superkritická fluidní extrakce a chromatografie

Touto metodou se zabýval Turner a kolektiv [37]. Superkritická fluidní extrakce (SFE) a superkritická kapalinová chromatografie (SFC) jsou analytické metody, které využívají superkritické médium, což je taková látka, která se vyskytuje při teplotě a tlaku nad svým kritickým bodem. Při tomto stavu se ztrácí rozdíl mezi kapalnou a plynnou fází. Zahříváním kapaliny v uzavřeném prostředí dochází k zvyšování teploty. Hustota, povrchové napětí a viskozita kapaliny se snižuje. Zatímco současně narůstá hustota a tlak plynné fáze. V okamžiku, kdy se hodnoty hustot kapaliny a plynu rovnají, vymizí mezi nimi fázové rozhraní. V superkritickém stavu má kapalina solvatační vlastnosti, ale zároveň i vlastnosti podobné plynům. Následnou regulací teploty a tlaku lze měnit solvatační vlastnosti superkritické tekutiny. Výhodou těchto metod je, že je lze provádět za mnohem mírnějších podmínek než u standardních analytických metod založených na bázi rozpouštědel. Extrakce a chromatografická separace vitaminů rozpustných v tucích je složitý úkol vzhledem k citlivosti těchto sloučeniny vůči světlu, kyslíku, teplu a pH. Navíc superkritické metody spotřebují mnohem menší množství organických rozpouštědel, tepla a zabraňují nežádoucím oxidacím kyslíkem.

Během přípravy vzorku k analýze je důležitá důkladná homogenizace. Velikost částic by měla být co nejmenší. K zabránění degradace vitaminů lze přidat antioxidanty a omezit působení světelného záření. Voda ve vzorku může usnadnit extrakci, ale také může vést k hydrolýze a degradaci analytu. Absorpce CO₂ ze vzduchu může vést ke snižování pH

roztoku. Proto vzorky obsahující velké množství vody je vhodné lyofilizovat.

Shen a kolektiv [38] separoval pomocí SFC vitaminy A, D₂, D₃, E (α -tokoferol), K₁ a K₂ z komečně dostupných zdrojů. Jako stacionární fáze byla použita kapilární kolona o rozměrech 40 cm \times 250 μ m naplněná tekutými krystaly polysiloxanu nanešených na silikagelu. Tvary výsledných píků a retenční charakteristiky byly zpracovány pro neupravený, potažený a deaktivovaný potažený silikagel. Nejlepší separační vlastnosti a nejkratší separační časy vykazoval deaktivovaný potažený silikagel. Teplota kolony byla 70 °C. Kompletní separace trvala 40 minut a byly rozděleny vitaminy A, E (α -tokoferol), K₁ a K₂.

5. Závěr

Dnešní nároky na kvalitu a bezpečnost potravin a léčiv stále rostou. S tímto požadavkem zároveň roste význam jejich analýzy. Proto je neustálou snahou analytické metody zlepšovat. Hlavními cíly moderní analýzy je snadná proveditelnost, reprodukovatelnost a v neposlední řadě snaha o redukci ekonomické a časové náročnosti. Tento fakt bezpochybně platí i pro analýzu vitaminů rozpustných v tucích.

V této práci je pojednáno o lipofilních vitamínech, jejich vlastnostech, standardních metodách analýzy a především o nových metodách jejich stanovení. Vitaminy rozpustné v tucích jsou nejběžněji stanovovány pomocí HPLC. Tato práce se proto zabývá zejména pokroky ve vývoji a modifikacemi HPLC. Mezi nejvýznamější modifikace HPLC lze považovat UHPLC, která pracuje s tlaky až 100 MPa a velikosti porézních částic menších než 2 μm . Tato metoda přináší až devítinásobné zkrácení času analýzy a až dvakrát větší mez detekce oproti HPLC. Další výhodou je také možnost detekovat organické molekuly různých velikostí. Společným rysem moderních metod je také trend snižování spotřeby organických rozpouštědel, což umožňuje např. kapilární kapalinová chromatografie s SPME či superkritická fluidní chromatografie.

6. Seznam použité literatury

1. Hlúbik, P.; Opltová, L.: *Vitaminy*. 1. vyd., Praha: Grada Publishing, a.s., 2004, 232 s.
2. Zempleni, J.; Rucker, R. B.; McCormick, D. B.; Suttie, J. W.: *Handbook of Vitamins*. 4. vyd. New York: CRC Press, 2007, 593 s.
3. Combs JR., G. F.: *The Vitamins: Fundamental aspects in nutrition and health*. 3. vyd. New York: Academic Press, 2007, 608 s.
4. Navarra, T.: *The Encyclopedia of Vitamins, Minerals and Supplements Facts on File Library of Health and Living*. 2. vyd. New York: Facts On File Inc., 2004, 368 s.
5. Waisser, K.: *Bioorganická chemie*. Praha: Karolinum - UK, 1998, 263 s.
6. Šicho, V.; Vodrážka, Z.: *Potravinářská biochemie*. 2. vyd. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1981, 360 s.
7. Vávrová, J.: *Vitaminy a stopové prvky 2007*. Pardubice: SEKK, 2007, 155 s.
8. Davídek, J.; Janíček, G.; Pokorný, J.: *Chemie potravin*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1983, 632 s.
9. Frühauf, P., a kol.: *Fyziologie a patologie dětské výživy*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2003, 63 s.
10. Bendich, A; Langseth, L.: *Am. J. Clin. Nutr.*, 1989, 49, 358-371.
11. Kulie, T.; Groff, A.; Redmer, J.; Hounshell, J.; Schrage, S.: *J. Am. Board Fam. Med.*, 2009, 22, 698-706.
12. Holick, M. F.: *N. Engl. J. Med.*, 2007, 357, 266-281.
13. Dostupné z *Vyhláška 330/2009 Sb.* [online]. 2009 [cit. 2012-06-07]. Dostupné z: <http://portal.gov.cz/app/zakony/zakonPar.jsp?page=0&idBiblio=69313&fulltext=450~2F2004&nr=&part=&name=&rpp=15#local-content> Staženo 7.6.2012.
14. Griffith, H. W.: *Vitamins, Herbs, Minerals, & Supplements: The Complete Guide*. Arizona: Da Capo Press, 2000, 512 s.
15. Brigelius-Flohé, R.; Traber, M. G.: *Faseb J.*, 1999, 10, 1145-1155.
16. Aggarwal, B. B.; Sundaram, C.; Prasad, S.; Kannappan, R.: *Biochem. Pharmacol.* 2010, 80, 1613–1631.
17. Schneider, C.: *Mol. Nutr. Food Res.* 2005, 49, 7-30.

18. Vermeer, C.: *Food & Nutrition Research*. 2012, 56, 5329.
19. Klimeš, J. a kol.: *Kontrola léčiv I*. Praha: Karolinum, 2009, 150 s.
20. Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Pavel Klouda, 2003, 132 s.
21. Deleenheer, A. P.; Lambert, W. E.; Van Bocxlaer; J. F.: *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*. 3rd. New York: Marcel Dekker, 2000, 616 s.
22. Dostupné z http://chemie.ocikvideni.cz/ZS/11_chromatografie.pdf staženo 7.6.2012.
23. Fried, B.: *Thin-Layer Chromatography*. 4th. New York: Marcel Dekker, 1999, 499 s.
24. Varma, T. N. R., Panalaks, T.; Murray, T. K.: *Anal. Chem.* 1964, 36, 1864–1865.
25. Dostupné z http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/hplc/HPLC.pdf Staženo 7.6.2012.
26. Olšovská, J.; Jurková, M.: *Kvasny. prum.* 2012, 58, 30-35.
27. Stancher, B.; Zonta, F.: *J. Chromatogr. A.*, 1982, 238, 217-225.
28. De Vries, E. J.; Borsje, B.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1982, 65, 1228-1234.
29. Qingping, L.; Kristine, K.; Schaefer, D. M.: *Journal of Anim. Sci.* 1996, 74, 2406-2410.
30. Gianfranco Panfili, G.; Fratianni, A.; Irano, M.: *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 3940–3944.
31. Sobotka, H.; Kann, S.; Winternitz, W.; Brand, B.: *J. Am. Chem. Soc.* 1944, 66, 1162–1164.
32. Coatanea, M.; Darchen, A; Hauchard D.: *Senzor Actuat B*. 2001, 76, 539–544.
33. Plozza, T.; Trenerry, V. C.; Caridi, D.: *Food Chem.* 2012, 134, 559–563.
34. Paliakov, E. M; Crow, B. S.; Bishop, M. J.; Norton, D.; George, J.; Bralley, J. A.: *J. Chromatogr. B*. 2009, 877, 89–94.
35. Xu, H.; Jia, L.: *J. Chromatogr. B*. 2009, 877, 13–16.
36. Sánchez, J. M; Salvadó, V.: *J. Chromatogr. A*. 2002, 950, 241–247.
37. Turner, Ch.; King, J. W.; Mathiasson, L.: *J. Chromatogr. A*. 2001, 936, 215–237.
38. Shen, Y.; Bradshaw, J. S.; Lee, M. L.: *Chromatographia*. 1996. 43, 665 – 670.