Charakteristika lipofilních vitamínů a jejich stanovení chromatografickými technikami

Tereza Šenková

Bakalářská práce
2007

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav potravinářského inženýrství
akademický rok: 2006/2007

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Tereza ŠENKOVÁ**
Studijní program:	**B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Chemie a technologie potravin**
Téma práce:	**Charakteristika lipofilních vitaminů a jejich stanovení chromatografickými technikami**

Zásady pro vypracování:

Formou literární rešerže zpracujte téma o lipofilních vitaminech a jejich analytickém stanovení.

1. **Charakterizujte lipofilní vitaminy vyskytující se v potravinách.**
2. **Popište analytické metody, především chromatografické techniky, využívané pro stanovení těchto vitaminů.**

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Dle doporučení vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Soňa Škrovánková, Ph.D.**
Ústav potravinářského inženýrství a chemie

Datum zadání bakalářské práce: **8. ledna 2007**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. června 2007**

Ve Zlíně dne 2. května 2007

UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ
Fakulta technologická
L.S.

prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
děkan

prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Bakalářská práce je zaměřena na charakteristiku lipofilních vitaminů v potravinách a možnosti jejich stanovení pomocí různých instrumentálních metod. Mezi lipofilní vitaminy se řadí vitamin A (retinoidy), D (cholekalciferol, ergokalciferol), E (tokoferoly a tokotrienoly) a K (fylochinon, farnochinon). Tyto látky se spolupodílí na množství důležitých fyziologických pochodů.

Stanovení vitaminů v potravinách je náročné, protože jejich koncentrace jsou většinou velmi nízké a často jsou také citlivé k oxidaci. Pro stanovení lipofilních vitaminů je důležitá úprava (hydrolýza) vzorku a izolace vitamínu (extrakce organickými rozpouštědly), a následné stanovení pomocí spektrometrických, fluorimetrických metod, a zejména chromatografických technik (kapalinová chromatografie, plynová chromatografie) s využitím různé detekce (UV-VIS, MS, FID, ECD).

Klíčová slova: Vitamin A, D, E, K, potraviny, izolace, stanovení, GC, HPLC

ABSTRACT

The thesis deals with characterization of lipophilic vitamins in foods and possibilities of their determination by various instrumental methods. Vitamin A (retinoids), D (cholecalciferol, ergocalciferol), E (tocopherols and tokotrienols) and K (phylloquinone, farnoquinone) belong to lipophilic vitamins. These factors participate in many important physiological processes.

Determination of vitamins in foods is difficult because of their low concentrations and common sensitivity to oxidation. For lipophylic vitamins determination are important - sample preparation (hydrolysis) and vitamin isolation (extraction by organic solvents), and determination by spectrometric, fluorimetric methods and in particular chromatographic techniques (gas chromatography, liquid chromatography) with using various detectors (UV- VIS, MS, FID, ECD).

Keywords: Vitamin A, D, E, K, foods, isolation, determination, GC, HPLC

Tímto bych chtěla poděkovat Ing. Soni Škrovánkové, Ph.D, za řádné vedení mé bakalářské práce, za její cenné rady, doporučení a poskytnuté informace a literaturu.

OBSAH

ÚVOD **7**

I TEORETICKÁ ČÁST **8**

1 VITAMINY **9**

1.1 HISTORIE VITAMINŮ 10

1.2 DĚLENÍ VITAMÍNŮ 11

1.3 LIPOFILNÍ VITAMÍNY 12

1.3.1 Vitamín A 12
1.3.2 Vitamín D 15
1.3.3 Vitamin E 17
1.3.4 Vitamin K 20

2 STANOVENÍ LIPOFILNÍCH VITAMINŮ **22**

2.1 PŘÍPRAVA VZORKŮ 22

2.2 HYDROLÝZA VZORKŮ 23

2.3 EXTRAKCE VITAMINŮ 24

2.4 PŘEČIŠTĚNÍ ORGANICKÉHO EXTRAKTU 25

2.5 CHROMATOGRAFICKÉ METODY 25

2.5.1 Klasifikace chromatografických metod 26
2.5.2 Základní parametry separace v kolonové chromatografii 27
2.5.3 Kvalitativní a kvantitativní analýza v kolonové chromatografii 28
2.5.4 Plynová chromatografie 29
2.5.5 Kapalinová chromatografie 32
2.5.6 Planární chromatografie 35

2.6 STANOVENÍ JEDNOTLIVÝCH LIPOFILNÍCH VITAMINŮ 36

2.6.1 Stanovení vitaminu A 36
2.6.2 Stanovení karotenoidních látek 39
2.6.3 Stanovení vitaminů skupiny D 40
2.6.4 Stanovení vitaminu E 42
2.6.5 Stanovení vitaminů skupiny K 45
2.6.6 Společné stanovení vitaminů 46
V některých případech se pomocí HPLC metody může stanovit i několik vitaminů dohromady. 46

ZÁVĚR **48**

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY **50**

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK **55**

SEZNAM OBRÁZKŮ **56**

ÚVOD

Vitaminy jsou esenciální nízkomolekulární organické látky, které se spolupodílí na velkém množství důležitých fyziologických pochodů a funkcí. Většinou se do těla člověka dostávají z přijaté potravy, některé (nebo jejich podstatná část) se však tvoří přímo v těle, ať už za pomoci střevní mikroflóry nebo z prekurzorů. Potřeba většiny vitaminů je poměrně nízká, přesto při nedostatečném příjmu vitaminů z potravy, nebo při nedostatečné resorpci v trávícím traktu, dochází v organismu k chorobným změnám a k projevům hypovitaminózy a avitaminózy.

Vitaminy rozpustné v tucích jsou lipofilní vitaminy a patří mezi ně vitaminy A, D, E a K.

Vitamin A se účastní zrakového vjemu a biosyntézy bílkovin. V živočišných tkáních se vitamin A vyskytuje především jako all-*trans*-retinol (A_1), v rostlinných produktech ve formě prekurzorů - karotenů (α-, β-, γ-karoten a β-kryptoxantin). Vitaminy skupiny D (cholekalciferol, ergokalciferol) se spolupodílí především na zajištění homeostázy vápníku a fosforu v organismu. Tokoferoly a tokotrienoly (vitamin E) patří mezi významné antioxidanty, které napomáhají zpomalování stárnutí organismu a podílí se na prevenci vzniku kardiovaskulárních onemocnění. Vitaminy skupiny K (fylochinon a farnochinon) se účastní procesu srážení krve a fosforylačních pochodů fotosyntézy. Vitamin K vzniká také jako produkt biosyntézy mikroorganismů v trávicím traktu.

Stanovení vitaminů v potravinářském materiálu je opravdu důležitý, ale zároveň velmi složitý úkol, protože jejich obsah v potravinách je ve srovnání s ostatními složkami analyzovaného vzorku velmi nízký. Vitaminy jsou rovněž látky ve většině případů velmi citlivé k oxidaci, a někdy i na světelné záření. Před vlastním stanovením se provádí několik operací, které zahrnují hydrolýzu vzorku, extrakci vitaminů a přečištění vzorku. Pro vlastní stanovení se dříve používali především spektrofotometrické nebo fluorimetrické metody, v současné době jsou nejvíce využívány plynová a kapalinová chromatografie, především HPLC metoda.

K detekci složek vycházejících z chromatografické kolony se využívá různých fyzikálních a chemických vlastností, jako je např. hustota, tepelná vodivost, svítivost plamene apod. K měření těchto vlastností se využívá různě konstruovaných detektorů, které jsou přizpůsobeny daným chromatografickým metodám. V největší míře se využívají detektory - UV-VIS, ECD, MSD, FID, DAD a jiné.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VITAMINY

Vitaminy jsou esenciální nízkomolekulární organické látky, které jsou řazeny mezi biokatalyzátory a v organismu vykonávají předem dané řídící a regulační funkce. Vznikají-li přímo v živých objektech, pro něž jsou nezbytné, jde o ***endogenní*** biokatalyzátory. Mezi ně patří např. enzymy a hormony. Lidé si ale nedokáží veškeré biokatalyzátory syntetizovat (někdy jen v omezené míře) a musí je přijímat z vnějšího prostředí, obvykle potravou. Jedná se o biokatalyzátory ***exogenní.*** [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8]

Vitaminy nejsou pro organismus zdrojem energie, ani stavebními látkami tkání, ale vykonávají v organismu několik funkcí. Plní v živých organismech významnou úlohu ***prekurzorů kofaktorů*** různých enzymů (vitamíny skupiny B), jiné se uplatňují v oxidačně redukčních systémech (vitamín C, E), apod. [1, 2, 3, 4, 5, 7, 8]

Prekurzory vitamínů neboli ***provitamíny*** jsou organické sloučeniny bez vitaminózního účinku, které se však v živočišném těle mění působením UV záření nebo pomocí enzymů ve vitaminy. Jde např. o β-karoten, který je provitamínem vitamínu A nebo o 7-dehydrocholesterol, který je provitamin vitaminu D_3. [1, 3, 5, 6, 7, 8, 9,10]

V potravinách se vitaminy vyskytují zpravidla v množství od $\mu g.kg^{-1}$ po stovky až tisíce $mg.kg^{-1}$ podle druhu vitaminu, ročního období, druhu potraviny a způsobu zpracování potravin. Vyskytují se volné nebo vázané na jednotlivé složky potravy, nejčastěji na sacharidy a proteiny. [1, 3, 5, 10]

U potravin živočišného původu závisí obsah vitaminů na způsobu skladování a zpracování suroviny, u potravin rostlinného původu je významný i stupeň zralosti, klimatické podmínky během růstu, hnojení apod. Vitaminy patří mezi labilní složky potravin, proto slouží zároveň jako indikátory šetrnosti četných technologických a kulinárních úprav. [1, 3, 10]

Významnými zdroji vitaminů jsou především základní potraviny, jimiž se zpravidla dostatečně pokrývá potřeba vitaminů (maso a masné výrobky, mléko a mléčné výrobky, vejce - zvláště žloutek, chléb a jiné cereální výrobky, ovoce a zelenina). Některé potraviny mohou mít vysoký nebo extrémně vysoký obsah vitaminu, např. šípek obsahuje až 1600 mg vitaminu C na 100g vzorku, ale konzumují se nepravidelně nebo výjimečně, a jako zdroj vitaminů nemají pro většinu populace velký význam. Jiné vitaminy jsou omezeny pouze na

určitou skupinu potravin (např. vitamin B_{12} se vyskytuje téměř výhradně jen v potravinách živočišného původu). [3, 10]

Potřeba jednotlivých vitaminů pro organismus může být zásadně ovlivněna některou ze složek potravin, která brání plnému využití daného vitaminu nebo jej inhibují. Takovým látkám se říká ***antivitamíny***. Jedná se o látky inhibující určitým mechanizmem funkci daného vitaminu, což může vést až k projevům hypovitaminosy. Jsou to např. citran, který je antivitaminem vitaminu A nebo dikumarol, který potlačuje funkci vitaminu K. [1, 3, 5]

Nedostatek vitaminu se projevuje u živých organismů chorobnými příznaky, které v lehčích formách označujeme jako ***hypovitaminosa***, v těžších jako avitaminosa. Hypovitaminosa může být způsobena buď nedostatečným příjmem některého vitaminu potravou a nebo nedostatečnou resorpcí vitaminu v organismu, jejíž příčinou bývá většinou onemocnění zažívací soustavy, např. zánětlivá a průjmová onemocnění. Nedostatek vitaminů byl dříve jednou z hlavních příčin mnoha nemocí (kurděje – nedostatek vitaminu C, křivice – nedostatek vitaminu D). Přestože většina příznaků avitaminosy po dodání nedostatkového vitamínu rychle mizí, dlouhotrvající avitaminosa může vést až ke smrti organismu. Nadbytek některých vitamínů se označuje jako ***hypervitaminóza***. V našich klimatických podmínkách se téměř nevyskytuje, objevuje se většinou ve spojitosti s nadměrným přísunem aditivních preparátů. Nebezpečné jsou zejména zvýšené dávky lipofilních vitamínů A a D. [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12]

1.1 Historie vitaminů

Samotný název "*vitamin*" pochází z roku 1911 od polského chemika Kazimíra Funka. Vznikl spojením dvou slov - označením nezbytnosti těchto látek pro život (život = vita) s označením dusíkatých látek (amin). Funk zde vycházel z mylného předpokladu, že tyto pro život nezbytné sloučeniny jsou dusíkaté povahy. Tento fakt totiž obecně pro všechny vitaminy neplatí. Název vitamíny se ale ujal. [6, 7]

V minulosti se pro vitaminy používaly názvy související s onemocněním vyvolaném nedostatkem příslušného vitaminu (např. antixeroftalamický vitamin neboli vitamin proti šerosleposti – vitamin A). Později se používala velká písmena abecedy (vit. A, B, C atd.). Když se zjistilo, že stejné fyziologické účinky vykazuje více látek, začalo se používat u

písmen číselného indexu (např. B_1, B_2 atd.). V současné době se některá taková označení vitaminů ještě běžně používají, u dalších vitaminů se však dává přednost jednoduchým triviálním názvům (např. riboflavin – vitamin B_2). [3, 6, 7]

Historie objevení vitaminů sahá o několik tisíciletí zpět, ovšem skutečné vědecké studium započalo až s rozvojem chemie v 19. a na začátku 20. století a vyvrcholilo poznáním jednotlivých vitaminů, které byly pojmenovány podle abecedy v pořadí, v jakém byly objeveny. [6, 9]

Projevy nedostatku těchto látek byly ovšem známy mnohem dříve. Šeroslepost, porucha vidění za šera, způsobovaná nedostatkem, v té době neznámého, vitamínu A, byla popsána už ve starém Egyptě v roce 1600 př.n.l., ale zkušenosti s ní měli i staří Číňané, kteří ji léčili podáváním jater zvířat, popř. inhalováním par z vařících se jater. [2]

1.2 Dělení vitamínů

Mezi jednotlivými vitaminy neexistují po stránce chemické žádné strukturní vztahy, podle nichž by mohly být klasifikovány. Důležitým znakem je jejich rozpustnost. Vitaminy rozpustné v tucích se označují jako **lipofilní vitaminy.** Ve vodě rozpustné vitaminy nazýváme **hydrofilní**. [1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 12]

Funkce hydrofilních vitaminů spočívá v jejich katalytickém účinku, protože se uplatňují zejména jako kofaktory různých enzymů a to v metabolismu nukleových kyselin, proteinů, sacharidů, lipidů aj. Hydrofilní vitaminy nebývají zpravidla v organismu vůbec skladovány a jejich přebytek je vylučován močí, naopak lipofilní vitaminy jsou skladovány v játrech. [1, 3, 4, 5, 12]

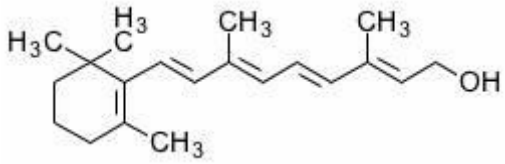
Vitaminy rozpustné ve vodě zahrnují tzv. vitaminy skupiny B neboli vitaminy B-komplexu, kyselinu askorbovou a dehydroaskorbovou (vitamin C). Vitaminy skupiny B jsou thiamin (B_1), riboflavin (B_2), niacin (vit. PP, B_3 a kyselina nikotinová), pantotenová kyselina (B_5), pyridoxin (B_6), folacin (B_9, kyselina listová) a kobalaminy (B_{12}). Vitaminy rozpustné v tucích jsou vitamin A, D, E, K. [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8]

1.3 Lipofilní vitamíny

Vitaminy rozpustné v tucích jsou nepolární hydrofobní deriváty isoprenu. V organismu nemohou být syntetizovány v potřebném množství, a proto musí být doplňovány z potravy. Vstřebány mohou být pouze při nenarušeném vstřebávání tuků v organismu. Vstřebané vitaminy jsou v krvi transportovány v lipoproteinech nebo vázané na specifické bílkoviny. Jedná se o vitaminy skupiny A (all-*trans*-retinoidy), skupiny D (cholekalciferol a ergokalciferol), skupiny E (tokoferoly a tokotrienoly) a skupiny K (hlavně fylochinon a farnochinon). [1, 2, 3, 6, 7]

1.3.1 Vitamín A

Vitamin A (all-*trans*-retinoidy) je prvním ze skupiny lipofilních vitaminů. Po chemické stránce je to alkohol s β-jononovým cyklem a s bočním řetězcem složeným ze dvou isoprenoidních jednotek. Podle počtu dvojných vazeb rozeznáváme vitamin A_1 (all-*trans*-retinol - *Obr. 1*) a A_2 (3-dehydroretinol). Postranní řetězec retinolu obsahuje čtyři dvojné vazby, které mohou vytvářet příslušné *cis* a *trans* izomery. Biologicky aktivní je však pouze retinol, který má všechny vazby v poloze *trans* a tzv. neoretinol, v němž je dvojná vazba na 13 uhlíku v *cis* konfiguraci. [3, 4, 6, 7, 10, 11]



Obr. 1 All-trans-retinol (vitamin A_1)

V potravinách je vitamin A doprovázen řadou analogů a metabolitů lišících se strukturou jononového cyklu nebo postranního řetězce. Aktivitu vitaminu A vykazuje asi 50 dalších přirozeně se vyskytujících sloučenin ze skupiny karotenoidů, které se nazývají provitaminy A. Nejvýznamnější je β-karoten, který je v potravinách často doprovázen α-karotenem, γ-karotenem, β-kryptoxantinem, echinenonem a dalšími provitaminy A. [2, 7]

Řada dalších látek s aktivitou vitaminu A (asi 2500) byla syntetizována. Pro přirozeně se vyskytující či syntetické látky vykazující aktivitu vitaminu A se vžil souhrnný název **retinoidy**. [1, 3]

Retinol zasahuje v živočišných organismech do látkové přeměny na několika různých místech. Uplatňuje se především v biochemii zrakového vjemu a při biosyntéze bílkovin. All-*trans*-retinol se významně podílí na fotorecepci v oční sítnici, a proto je nezbytný pro proces vidění. Aktivní formou vitaminu A je i oxidací vznikající aldehyd *11-cis*-retinal. Ten je součástí fotorecepčního pigmentu tyčinek oční sítnice – rhodopsinu. Bílkovinnou část tohoto chromoproteinu tvoří proteiny nazývané opsiny (např. skotopsin). Pokud rhodopsin absorbuje světelnou energii, jeho retinalová složka podlehne fotoizomerizaci a vytvoří se stabilnější *trans*-retinal. Tato konfirmační změna excituje nervové buňky v tyčinkách a dochází k vidění. *Trans*-retinal je pak *retinalisomerazou* přeměněn zpět na *11-cis*-retinal, který se váže v rhodopsinu. [1, 3, 4, 7, 11, 12]

Trans-retinal může být také redukován pomocí NADH a *alkoholdehydrogenasy* v oční sítnici na retinol, ten se izomeruje na *11-cis*-retinol, který oxidací pomocí NAD^+ a *alkoholdehydrogenasy* je přeměněn na *11-cis*-retinal. Tento cyklus, který umožňuje převod světelných impulsů na nervové vzruchy bývá označován jako Waldův cyklus. [1, 3, 4]

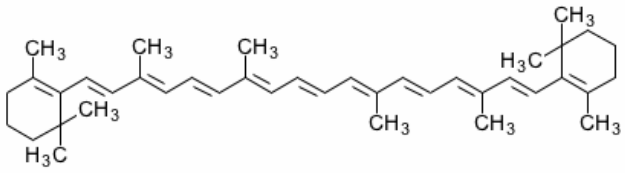
Vitamín A se podílí na prevenci proti vzniku rakoviny plic a je důležitý pro zdravý vzhled pokožky, tkání a slizničních epitelů. Je velmi důležitý pro činnost pohlavních žláz. Dále je nezbytný pro buněčné dělení, růst a udržování sliznic dýchacího, zažívacího a močového traktu. Esenciálním kofaktorem enzymů regulujících metabolismus vitaminu A je zinek. [1, 3, 4, 6, 11]

Vitamín A je stálý pouze v inertní atmosféře. Za vyšších teplot nebo za přístupu světla se snadno oxiduje vzdušným kyslíkem. Jeho oxidaci urychluje přítomnost kovů (Fe) nebo organických peroxidů. Pro stabilizaci vitaminu A jsou důležité antioxidanty, a to buď syntetické, které se využívají v technologii tuků (BHA), nebo v přírodní formě (tokoferoly). [1, 3, 4, 11]

Provitaminy vitaminu A jsou označovány jako **karotenoidy**. Na vitamin A jsou jednotlivé karoteny přeměňovány oxidativním štěpením, které u většiny savců probíhá ve střevech nebo Kupferových buňkách jater za katalytického působení enzymu *karotenasy*. Jednotlivé nejvýznamnější karoteny (α-, β-, γ-karoteny, β-kryptoxantin) neposkytují při štěpení stejná

množství vitaminu A, protože biologická funkce vitaminu závisí na přítomnosti β-jononového kruhu. Pouze β-karoten poskytuje dvě molekuly vitaminu A, ostatní izomery pouze jednu. Za silně oxidačních podmínek a při vysokých dávkách β-karotenu může docházet i ke štěpení asymetrickému, které poskytuje apokarotenaly, u nichž bylo prokázáno toxické působení. Karoteny jsou důležité biologické sloučeniny, které mohou inaktivovat např. singletový molekulární kyslík nebo peroxidové radikály. Tento proces se nazývá zhášení. [1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 12]

Nejrozšířenějším provitaminem vitaminu A v přírodě je β-karoten (*Obr. 2*), který je obvykle doprovázen α-karotenem a malým množstvím γ-karotenu. Má významné antioxidační vlastnosti. Karoteny jsou žlutá až červenofialová barviva, která jsou ve vodě nerozpustná nebo omezeně rozpustná. Při skladování a zpracování potravin dochází k jejich izomeraci a degradaci účinkem světla, tepla, kyslíku a dalších faktorů, jako jsou hydroxylové ionty apod. [1, 4, 10]



Obr. 2 β-karoten

Doporučená denní dávka retinolu u dětí je 0,4-0,6 mg, u dospělých 0,8-1,0 mg (u těhotných žen 1,0 -1,2 mg a u kojících žen 1,2-2,0 mg). Nejvyšší tolerovatelná hranice příjmu retinolu činí 3 mg na den, u dětí je tato hranice 0,6 mg. Potřeba vitaminu je kryta asi z 50% provitamíny z potravin rostlinného původu (zelenina), 20% zajišťují retinol a retinoidy masa, 15% retinol s retinoidy mléka. Retinol a karotenoidy se vstřebávají v tenkém střevě, ale karotenoidy se vstřebávají jen z části. [1, 2, 3, 7, 11]

V potravinách rostlinného původu a také v mnoha mikroorganismech a vyšších houbách se vitamin A nevyskytuje, ale jsou přítomny karoteny nebo xantofyly. Zvláště bohatým zdrojem vitaminu jsou játra (30 – 400 $mg.kg^{-1}$) a rybí tuk a maso (olej z rybích jater 265 $mg.kg^{-}$

[1]). Dále v másle (5 - 10 $mg.kg^{-1}$) a sýrech (1,6 – 3,2 $mg.kg^{-1}$). V tkáních vyšších živočichů nacházíme vitamin A_1, v rybích tucích vitamin A_2. [1, 2, 3, 6, 7, 9, 14]

Karotenoidy se nacházejí ve všech zelených částech rostlin, hlavně ve špenátu (50 – 480 $mg.kg^{-1}$), petrželi (30 – 260 $mg.kg^{-1}$), mrkvi (20 - 95 $mg.kg^{-1}$), zelí (3 - 74 $mg.kg^{-1}$) nebo v meruňkách (6 - 20 $mg.kg^{-1}$), v mangu (20 $mg.kg^{-1}$) apod. V živočišných produktech (např. v mléce) je obsah karotenů ovlivněn krmením, způsobem chovu, ročním obdobím nebo plemenem. Absorpce jednotlivých provitaminů závisí na složení a způsobu přípravy pokrmů, zejména na obsahu tuků, ve kterých jsou rozpustné. [1, 2, 3, 6, 10]

Při nedostatku vitaminu A poklesne nejprve jeho hladina v krvi, a teprve po vyčerpání zásob karotenu se snižuje i hladina vlastního vitaminu a začínají se vyvíjet příznaky avitaminosy. Významným symptomem je šeroslepost, způsobená sníženým obsahem fotorecepčních pigmentů v oční sítnici. Při těžších formách avitaminosy dochází k tzv. xeroftalmii (vysychání a rohovatění spojivek) a mohou být zasaženy i rohovky (keratomalacie). Podobné změny se vyvíjejí i na sliznicích dýchacích cest, které pak mohou být snáze napadány mikroorganismy. Dále může docházet k inhibici růstu, deformaci kostí a reprodukčních orgánů. [1, 2, 3, 4, 7, 11, 12]

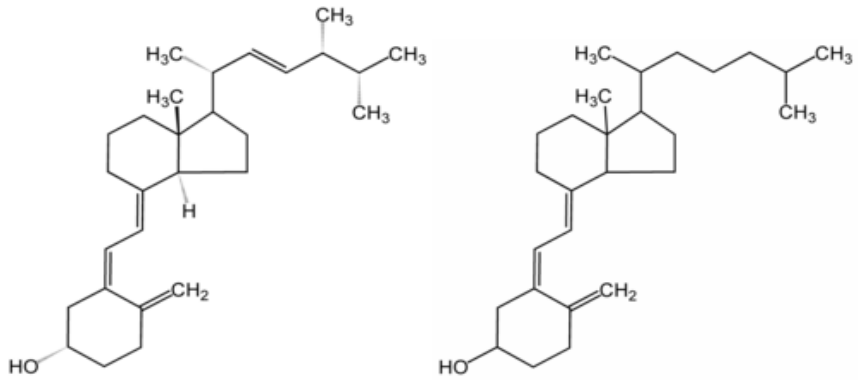
U vitaminu A se projevuje i hypervitaminosa. Příznakem je zvýšená únava, apatie, zvracení, vypadávání vlasů, změny ve vývoji kostí, bolestivost kloubů a také může dojít k samovolným potratům u gravidních žen. [1, 7]

1.3.2 Vitamín D

Vitamín D je společný název pro skupinu blízce příbuzných lipofilních steroidů, z nichž nejvýznamnější jsou vitamin D_3 neboli cholekalciferol a vitamin D_2 neboli ergokalciferol *(Obr. 3).* [1, 2, 3, 6, 7, 11, 12, 14]

Vitaminy D vznikají z prekurzorů, které se nazývají provitaminy D. Provitaminem D_3 je 7-dehydrocholesterol a provitaminem D_2 je ergosterol. Působením UV záření o vlnové délce 280-320 nm vzniká v buňkách pokožky z provitaminu D_3 jako meziprodukt nejprve tzv. previtamin D_3 (vykazující asi 35% aktivity cholekalciferolu), který spontánně isomerizuje na cholekalciferol. Při dlouhodobém ozařování však mohou vznikat ještě suprasteroly a toxisteroly, které jsou ale zdravotně závadné. Cholekalciferol se dále váže na specifický

globulin krevní plasmy DBP (vitamin D-Binding Protein) a je transportován do jater. V játrech je skladován a podle potřeby oxidován na 25-hydroxycholekalciferol, který je hlavním cirkulujícím metabolitem tohoto vitaminu. Jeho koncentrace v plasmě závisí na řadě faktorů, jako je doba expozice slunečního záření, roční období atd. Dále je tato látka v ledvinách metabolizována na řadu derivátů vitaminu D_3, z nichž nejdůležitější je 1,25-dihydroxycholekalciferol. Jeho biologická účinnost je asi desetkrát větší než u samotného cholekalciferolu. 1,25-dihydroxycholekalciferol působí na receptory v orgánech regulujících metabolismus vápníku (střevo, kosti, ledviny, příštítná tělíska), ale také v imunitním systému, β-buňkách pankreatu a buňkách kůže. Spolupodílí se na zajištění homeostázy vápníku i fosforu v organismu. [1, 2, 3, 4, 6, 11, 12]



Obr. 3 Vitamin D - ergokalciferol a cholekalciferol

Denní potřeba vitaminu D: 2,5 – 10 μg je kryta především vitaminem D_3 získávaným biosyntézou provitaminu 7-dehydrocholesterolu a současně v různé míře vitamínem D_3 nebo D_2 obsaženým v potravě. [2, 3, 6, 7, 11]

Významné množství vitaminu D obsahuje olej z rybích jater (u makrel až 15 $mg.kg^{-1}$), maso tučných mořských ryb (50 - 450 $\mu g.kg^{-1}$), menší množství obsahují fortifikované margariny, máslo (10 – 20 $\mu g.kg^{-1}$) a vaječný žloutek (30 – 50 $\mu g.kg^{-1}$), játra (2 – 11 $\mu g.kg^{-1}$). Obsah cholekalciferolu v mléce v zimním období bývá asi 4x nižší než obsah v mléce v létě. Ergosterol je hlavním sterolem většiny plísní, a proto je přirozeně přítomen také v plísňových sýrech. Při skladování a tepelné úpravě se obsah vitamínů D významně nemění. [1, 2, 3, 4, 6, 7, 11]

Z rostlin je dobrým zdrojem vitaminu kokosové máslo a houby. Přítomnost ergosterolu v semenech olejnin, v obilovinách a cereálních výrobcích je ale indikátorem mikrobiální kontaminace. [1, 3]

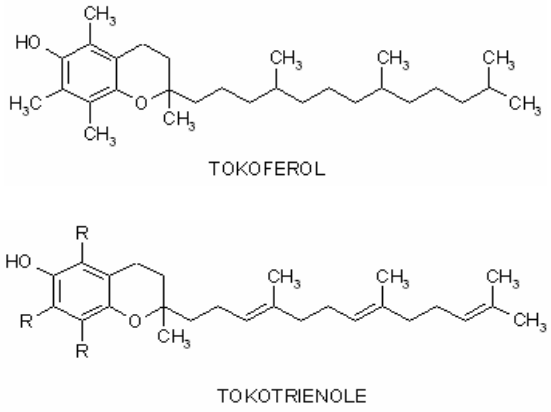
Vitamin D má mezi vitaminy zvláštní postavení, protože může být v těle syntetizován a není nutné jej vždy dodávat potravou. Při dostatečné expozici slunečního záření není perorální příjem téměř zapotřebí, protože v kůži dospělého jedince může být potřebné množství syntetizováno. Přesto se však např. při nedostatečné syntéze vitaminu D v těle může projevit hypovitaminoza.[1, 3, 7]

Příznaky hypovitaminozy se popisují u dětí jako křivice, u dospělých jako osteomalacie. Obě tato onemocnění jsou charakterizována celkovou poruchou minerálního metabolismu. U dětí se opožďuje kalcifikace chrupavek, nedostatečně kalcifikované kosti se pod rostoucí tíhou ohýbají (hlavně dolní končetiny) a v tomto tvaru zůstanou i po skončení vývoje kostní tkáně. Rovněž vývoj zubů je opožděný a chrup bývá obvykle nekvalitní se sklonem ke kazivosti. U dospělých se avitaminóza projevuje vyplavováním vápníku z kostí a jejich měknutím a křehnutím. [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12]

Hypervitaminóza vitamínem D většinou nastává pouze po předávkování farmaceutickými vitamínovými preparáty. Dlouhodobý nadměrný příjem může způsobit hyperkalcinemii. U dospělých dochází k retenci vápníku, z kostí je vyplavován a současně ukládán v různých orgánech (srdci, plicích apod.). [3, 4, 7, 11]

1.3.3 Vitamin E

Aktivitu vitaminu E vykazuje osm základních strukturně příbuzných derivátů chromanu. Čtyři formy vitaminu E s nasyceným terpenoidním postraním řetězcem odvozeným od tokolu se nazývají tokoferoly, čtyři formy s nenasyceným postraním řetězcem odvozené od tokotrienolu se nazývají tokotrienoly *(Obr. 4)*. Jednotlivé tokoferoly a tokotrienoly se liší polohou a počtem methylových skupin v chromanovém cyklu a biologickou aktivitou. Díky přítomnosti tří chirálních center může každý tokoferol existovat v osmi diastereoizomerních formách. V přírodě se vyskytují jen all-*trans*-geometrické izomery. [1, 3, 6, 7, 9, 10, 12, 13]



Obr. 4 α-tokoferol a tokotrienol

Na chromanovém kruhu je připojena jedna hydroxylová skupina, která je dárcem vodíkových atomů a podmiňuje antioxidační účinek vitaminu E. Nejvíce rozšířen je D-α-tokoferol, který má nejvyšší antioxidační aktivitu. [5]

Tokoferoly tedy patří mezi významné antioxidanty, které zabraňují destruktivnímu neenzymovému působení molekulárního kyslíku na dvojné vazby nenasycených mastných kyselin vázaných v tkáňových lipidech. Vitamin E také ochraňuje citlivý mitochondriální systém před jeho nevratnou inhibicí peroxidy mastných kyselin z lipidů. Tuto funkci plní společně se sirnými aminokyselinami a selenem. Uplatňuje se také při ochraně lipoproteinů přítomných v plasmě. [1, 2, 4, 7, 11, 12, 13]

Vitamín E ovlivňuje buňky hladké svaloviny cévní stěny. Je považován za faktor zpomalující stárnutí organismu a uplatňující se v menší míře v prevenci kardiovaskulárních chorob (zpomaluje aterosklerózu koronárních artérií) a prevenci vzniku rakoviny (onkogeneze). [1, 3, 7, 13]

Absorpce vitaminu E probíhá v tenkém střevě a účinnost vstřebávání závisí na povaze tuku, který je současně s ním vstřebáván. Nasycené mastné kyseliny absorpci podporují, zatímco polyenové nikoli, dokonce ji mohou inhibovat. Většina vstřebaného vitaminu E je transportována do lymfy, zbytek (asi 10 %) do krve. [1, 4, 7]

Potřeba vitaminu E pro člověka je závislá na příjmu nenasycených mastných kyselin potravou. Obecně pro osoby s průměrným denním příjmem do 20g polyenových mastných kyselin se doporučuje 15mg vitaminu E. Dalších 0,5mg vitaminu E se doporučuje na každý 1g přijatých polyenových mastných kyselin. Hodnoty doporučených dávek se v jednotlivých

zemích liší. Pro obyvatele ČR bylo stanoveno 12mg přírodního α-tokoferolu.den^{-1}, (resp. 24mg syntetického α-tokoferolu.den^{-1}). V organismu se vitamin E skladuje po dobu 6-12 měsíců, nejvíce je ho uloženo v tukových tkáních. [1, 4, 7, 13]

Vitamin E se vyskytuje především v potravinách rostlinného, v menším množství v potravinách živočišného původu. Tokoferoly jsou v přírodě rozšířeny zejména v rostlinných olejích, obzvláště bohatý na vitamin E je olej z obilných klíčků (olej z pšeničných klíčků obsahuje 1650 – 3000 mg.kg^{-1}), slunečnicový a řepkový olej (rafinovaný slunečnicový olej obsahuje 270 – 900 mg.kg^{-1}, řepkový 140 – 850 mg.kg^{-1}). Dále se vitamin E vyskytuje v ořechách (vlašské ořechy 200 mg.kg^{-1}), hrášku (30 mg.kg^{-1}), ovesné mouce (19 – 38 mg.kg^{-1}), z živočišných produktů jsou to vejce (5 – 30 mg.kg^{-1}), maso (2,5 – 7,7 mg.kg^{-1}), játra (4 – 14 mg.kg^{-1}) atd. [1, 2, 3, 4, 6, 7]

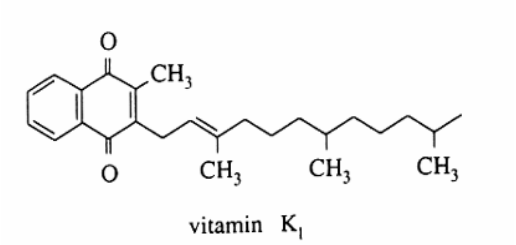
Deficience je poměrně vzácná. Projevem jsou hlavně degenerativní nervové a svalové změny, změna v reprodukčním systému, cévní soustavě, a u dětí byla pozorována změna krvetvorby – anémie. Jen ve výjimečných případech může docházet k nadměrnému příjmu tokoferolů. [1, 3, 4, 7, 12]

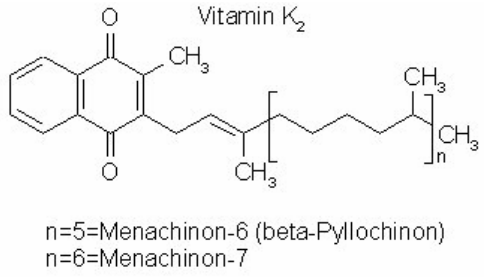
Během skladování a zpracování dochází ke značným ztrátám tohoto vitaminu. Např. při rafinaci olejů dochází ke snížení obsahu vitaminu na 10-50 % původního obsahu. V nepřítomnosti kyslíku a oxidovaných lipidů je vitamin E poměrně stálý při běžných způsobech kulinárního a průmyslového zpracování potravin. K největším ztrátám dochází při smažení a pečení. Obsah vitaminu E také postupně klesá v potravinách skladovaných při mrazírenských teplotách. [3, 4]

Vitamin E se běžně přidává jako antioxidant do olejů, margarinů a dalších potravin, které obsahují tuky. Vitamin E tyto tukové složky chrání před oxidací (žluknutím). V kombinaci s vitaminem C redukuje tvorbu nitrosaminů. Vitamin E tvoří také důležitou součást mnoha kosmetických produktů. Přidává se např. do opalovacích krémů a do přípravků, kterými se pleť ošetřuje po opalování, protože napomáhá zklidňovat a hydratovat pleť poškozenou a vysušenou sluncem a větrem. [13]

1.3.4 Vitamin K

Skupinu vitaminů K tvoří dvě hlavní formy, a to vitamin K_1 (fylochinon), vyskytující se v potravinách rostlinného původu, a vitamin K_2 (farnochinon), který je produkovaný střevní mikroflórou *(Obr. 5).* Jsou známy i některé syntetické látky s účinky vitaminu K, jako například vitamin K_3 (menadion). Produkty redukce menadionu a jeho odvozených sloučenin jsou nazývány jako vitamin K_4. Vitaminy K jsou látky odvozené od 2-metyl-1,4-naftochinonu s isoprenoidními postranními řetězci různé délky. [1, 3, 4, 6, 7, 11, 12]





Obr. 5 Fyllochinon a farnochinon

Jsou známy dva procesy, při nichž je přítomnost vitaminu K nezbytná. Jedná se o přeměnu neaktivního prothrombinu na aktivní proteolytický enzym thrombin v procesu srážení krve a fosforylační pochody fotosyntézy. Vitamin K působí spolu s vitaminem D v kostních strukturách při syntéze proteinu osteokalcinu, který usnadňuje vazbu vápníku v kostech a aktivně ovlivňuje vývoj, zrání a kvalitu kostní tkáně. [1, 2, 3, 5, 6, 7, 11]

Doporučené výživové dávky vitaminu K nejsou přesně stanoveny. Doporučuje se přijímat 1 μg/kg tělesné hmotnosti. Denní příjem vitaminu K se odhaduje na 0,5mg, ale jen 30 – 70% vitaminu přijatého potravou je absorbováno ve střevech. Podle některých údajů je asi 40 – 50% denní potřeby vitaminu kryto z potravy a zbytek produkuje střevní mikroflóra. [1, 2, 3, 6, 7]

Vitamin K je hojně rozšířen v potravě, zejména v sytě zelené zelenině (brokolice obsahuje 1,5 -1,8 $mg.kg^{-1}$, špenát 2 – 14,4 $mg.kg^{-1}$), dále v květáku (0,8 $mg.kg^{-1}$) a hrachu (0,4 $mg.kg^{-1}$). V živočišných produktech se vyskytuje málo. [1, 2, 3, 4, 7]

Fyllochinon je syntetizován v rostlinách, zatímco farnochinon vzniká jako produkt biosyntézy mikroorganismů (zejména bakteriemi *Escherichia coli* a bakteriemi rodu *Bacillus*). Vitamin K je dostatečně rezistentní vůči kyslíku a teplu, jeho ztráty při úpravě stravy jsou minimální. Světlem je rychle ireverzibilně inaktivován. [1, 2, 3, 4, 6]

Hypovitaminóza se může vyvinout při dlouhodobé léčbě některými antibiotiky a jinými léky, kdy je potlačena střevní mikroflóra, nebo při poruchách resorpce tuku, při průjmech nebo onemocněních žlučníku. Deficience vitaminu K se častěji vyskytuje u novorozenců a kojenců, kteří jsou krmeni pouze mateřským mlékem, které obsahuje málo vitaminu K. [1, 4, 7]

2 STANOVENÍ LIPOFILNÍCH VITAMINŮ

Stanovení vitaminů v potravinářském materiálu je velmi složitý úkol, neboť jejich koncentrace jsou ve srovnání s ostatními složkami analyzovaného vzorku velmi nízké. Vitaminy jsou látky, ve většině případů, velmi citlivé k oxidaci a někdy i na světelné záření. Skupina vitaminů je chemicky tak heterogenní, že nelze použít žádné univerzální metody ke stanovení celé skupiny vitaminů, i když v poslední době jsou využívány v potravinářské analýze chromatografické metody, které umožňují stanovení velkého počtu vitaminů dohromady. Obecně lze říci, že stanovení vitaminů v potravinářských materiálech vyžaduje značné analytické zkušenosti. Přitom je nezbytné přesné dodržování pracovních předpisů, čistota chemikálií a rozpouštědel, snížený přístup kyslíku, omezení světelného záření, dodržování teplot a pH. [14, 15]

Metody pro stanovení vitaminů jsou založeny na fyzikálních a chemických vlastnostech vitaminů a na jejich biologické účinnosti. Podle toho se dělí i metody pro stanovení vitaminů na fyzikální a chemické. Biologické metody např. zahrnují pokusy na zvířatech, mikrobiologické a enzymatické metody. [10]

Stanovení lipofilních vitaminů v potravinách zahrnuje několik následných kroků - přípravu vzorku, alkalickou hydrolýzu vzorku, extrakci vitaminů z hydrolyzátu, přečištění extraktu a vlastní analytickou koncovku. Lipofilní vitaminy nejsou chemicky stabilní, může docházet ke ztrátě jejich biologické aktivity, která je iniciována nebo katalyzována přítomností hydroperoxidů, vzduchem, světlem, vlhkostí, přítomností minerálních kyselin, těžkých kovů a dalšími oxidanty. [8, 14, 15]

2.1 Příprava vzorků

Vzorky potravin obsahující lipofilní vitaminy se musí chránit před přímým slunečním světlem, nadměrně vysokým teplotám a vlhkostí během transportu, skladování a přípravě vzorků v laboratoři. Proto se musí věnovat přípravě laboratorního vzorku velká pozornost. U velmi nehomogenních vzorků a vzorků o nestejné velikosti částic se musí vzorky homogenizovat. U vzorků potravin obsahujících vysoký podíl tuku dochází při úpravě vzorku

mletím nebo drcením k rychlému úbytku lipofilních vitaminů. Tato úprava, pokud je nezbytná, by měla být provedena bezprostředně před vlastní analýzou. [8]

2.2 Hydrolýza vzorků

Při analýze lipofilních vitamínů se k hydrolýze (zmýdelnění) vzorku využívá alkalická hydrolýza. [8, 15]

U vitaminu A a vitaminu E dochází k přeměně esterů všech jejich forem na alkoholickou formu příslušného vitaminu a tuky (glyceridy a fosfolipidy) jsou hydrolyzovány na volné mastné kyseliny a glycerol. Tyto látky pak mohou být odděleny od vitaminů extrakcí organickými rozpouštědly. Během alkalické hydrolýzy dochází k isomeraci vitaminu A. [8]

U vitaminu D je nutný přechod vitaminu D na příslušný previtamin vlivem isomerace. Isomerace vitaminu D na jeho previtamin je katalyzována zejména zvýšenou teplotou při alkalické hydrolýze. Proto se tento problém řeší studenou alkalickou hydrolýzou po dobu 12 až 16 hodin za laboratorní teploty. Vlastní hydrolýza vzorku se provádí ethanolickým roztokem hydroxidu draselného za přítomnosti antioxidantů pod zpětným chladičem po dobu nejméně 30 minut ve speciální zmýdelňovací aparatuře *(Obr. 6).* Po celou dobu hydrolýzy by se aparatura měla probublávat mírným proudem dusíku, který saturuje dané prostředí a preventivně chrání přítomné vitaminy před vzdušnou oxidací. [8, 14, 15]

Důležité je rychlé ochlazení hydrolyzátu po ukončení vlastní hydrolýzy. Množství KOH použitého k hydrolýze je závislé na množství tuku ve vzorku. Uvádí se, že na každý 1g tuku je nutné použít 5 ml 60 % roztoku hydroxidu draselného a 15 ml etanolu. Jako další antioxidační činidla se používají např. samotný vitamin E, pyrogallol, sodná sůl kyseliny askrobové, butylhydroxytoluen - BHT. Nevýhodou některých antioxidačních činidel (pyrogallol, BHT) je, že při extrakci lipofilních vitaminů ze zmýdelněné matrice rovněž přechází do organické fáze a můžou způsobovat problémy při vlastním stanovení vitaminů. [15]

Obr. 6 Zmýdelňovací aparatura [15]

2.3 Extrakce vitaminů

Lipofilní vitaminy (A,D, E, K) jsou extrahovány ze zmýdelněných vzorků potravin různými rozpouštědly. Samotná extrakce vitaminů je jeden z nejdražších a nejpracnějších kroků a bývá zdrojem největších chyb při analýzách lipofilních vitaminů. Jako organická rozpouštědla se používají diethyleter, petroleter, hexan, směs diisopropyleteru a petroleteru nebo 10% etylacetát v hexanu. [8, 14, 15]

Získané extrakty se pak vysuší a stopové zbytky vody se odstraňují filtrací extraktu přes vrstvu bezvodého síranu sodného. Pro zakoncentrování extraktu se používá destilace za sníženého tlaku. Teplota při destilaci by neměla přesáhnout 40 až 50 ^{o}C. Odparek by měl být vystaven působení vzduchu co nejkratší dobu a poté by se měl ihned rozpustit v definovaných rozpouštědlech. [8]

Pro extrakci vitaminu D se může využít i přímá extrakce. Jako extrakční činidlo se používá dichlormetan obsahující fosforečnan sodný a BHT nebo směs 2-propanolu a dichlormetan obsahující síran hořečnatý jako vysoušedlo a BHT. Při použití jednoduchých srceeningových metod stanovení vitaminu D v odstředěném mléce se mléko naředí vodou, etanolem, přidá se vodný roztok amoniaku a vitamin D se extrahuje 4 hodiny směsí etheru a hexanu.

Vitamin D se v organické fázi po odpaření převede do příslušného rozpouštědla. Výhodou tohoto postupu je, že se vzorek nemusí podrobit alkalické hydrolýze. [8]

2.4 Přečištění organického extraktu

Přečištění extraktu zavádí do pracovního postupu krok navíc, proto se, pokud není nezbytně nutné, dnes nepoužívá. Z možných postupů přečištění extraktu se používá např. sloupcová chromatografie, tenkovrstvá chromatografie a extrakce kapalina-kapalina. Nejrozšířenějším čistícím krokem je použití sloupcové chromatografie, která má široké možnosti použití sorbentů - oxid hlinitý, silikagel a oxid hořečnatý a používá se většinou při spektrofotometrickém stanovení vitaminu A. [8, 15, 14]

Pro stanovení obsahu lipofilních vitaminů ve vzorcích potravin se nejčastěji využívají chromatografické metody (plynová chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie), dále pak spektrofotometrické nebo fluorimetrické metody.

2.5 Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou separační a současně analytické fyzikálně - chemické metody pro separaci a analýzu směsí látek, jejímž základním principem je rozdělování složek směsi mezi mobilní a stacionární fází. [16, 17]

Podstatou dělícího procesu složek vzorku pomocí chromatografie je několikanásobné ustavování rovnováhy mezi dvěma fázemi vzorku. Jde o mobilní fázi, která nese vzorek postupně sestupující separačním prostorem, a stacionární fázi, která tvoří nepohybující se obsah separačního prostoru. Při postupu vzorku separačním prostorem dochází k interakcím se stacionární fází. Jednotlivé frakce vzorku jsou díky těmto interakcím brzděny a to různou silou v závislosti na druhu frakce. Pohyb, neboli distribuci frakce (složky)

vzorku X mezi mobilní a stacionární fází X_m a X_s je možné vyjádřit distribučním poměrem D, příp. distribuční konstantou K_D:

$$K_D = \frac{[X]_s}{[X]_m},$$

kde $[X]_s$ a $[X]_m$ jsou odpovídající molární hmotnosti frakce X ve stacionární a mobilní fázi. [17, 18]

Zkoumaná látka obsahuje frakce o různých distribučních konstantách K_D a tyto frakce se pohybují separačním prostorem jinou rychlostí, což vede k jejich vzájemnému oddělení, frakce se shodnými distribučními konstantami K_D nebudou odděleny. S rostoucí hodnotou K_D je látka více zadržována stacionární fází, bude se pomaleji pohybovat separačním prostorem a později tento prostor opustí. Hodnoty K_D nezávisí jen na povaze zkoumané látky, ale také na vlastnostech mobilní a stacionární fáze. Daná látka může být charakterizována různými hodnotami K_D v závislosti na použité mobilní a stacionární fázi. [17, 18]

2.5.1 Klasifikace chromatografických metod

Chromatografické metody je možno roztřídit podle několika hledisek. Základním kritériem je skupenství použité mobilní fáze. Pokud se tato fáze nachází ve skupenství plynném, hovoříme o **plynové chromatografii** (GC – Gas chromatography), pokud je ve skupenství kapalném, jedná se **kapalinovou chromatografii** (LC – Liquid chromatography, HPLC – High performance liquid chromatography). [14, 15, 16, 17, 18, 20, 21]

Další způsob třídění technik je podle tvaru separačního prostoru. Nejjednodušší příklad je kolonová (sloupcová) chromatografie, kdy stacionární fáze je uzavřena v prostoru vymezeném skleněnou, křemennou či kovovou trubicí. Při použití kolon velmi malých vnitřních průměrů řádově stovek μm, jde o kapilární chromatografii. Z hlediska instrumentálního je nejjednodušší planární (plošná) chromatografie (papírová – PC, tenkovrstvá – TLC), kdy separace probíhá v tenké vrstvě stacionární fáze. [15, 17, 18, 21, 22]

Rozdělení nejdůležitějších chromatografických metod je shrnuto v tabulce č. 1 *(Tab. 1).* [16, 17, 18, 21, 22]

Dalším typem může být eluční chromatografie. U techniky eluční chromatografie je vzorek dávkován ve formě úzce ohraničené zóny do proudu mobilní fáze. Tato technika v praxi úplně vytlačila techniku frontální chromatografie, kdy je vzorek kontinuálně přiváděn do separačního prostoru po celou dobu analýzy, a vytěsňovací chromatografie, kdy je vzorek předem sorbován na stacionární fázi a během analýzy je mobilní fází vytěsňován. [17, 18]

Tab. 1 Rozdělení chromatografických metod [18]

Mobilní fáze	Typ stacionární fáze	Separační mechanizmus	Metoda	Používaná zkratka
Plyn	Pevná fáze	Adsorpce	Plynová adsorpční chromatografie	GSC
	Kapalná fáze	Rozdělování	Plynová Rozdělovací chromatografie	GLC
	Mikroporézní fáze	Sítový efekt	Plynová chrom. na molekulových sítech	GSC
Kapalina	Pevná fáze	Adsorpce	Kapalinová adsorpční chromatografie	LSC
	Kapalná fáze	Rozdělování	Kapalinová rozdělovací chromatografie	LLC
	Iontoměnič	Iontová výměna	Iontově výměnná chromatografie	IEC
	Mikroporézní fáze	Sítový efekt	Gelová permeační chromatografie	GPC (SEC)
	Strukturně selektivní fáze	Specifická interakce	Afinitní chromatografie	

2.5.2 Základní parametry separace v kolonové chromatografii

Vyhodnocení dat získaných experimentálně některou z chromatografických metod závisí na typu použitého vybavení. U kolonové chromatografie s detektorem je výsledkem hodnocení záznam odezvy detektoru na čase – chromatogram. V chromatografii se používají detektory zaznamenávající odezvu úměrnou koncentraci a zóny oddělovaných látek procházejících detektorem jsou zaznamenány jako tzv. chromatografické píky *(Obr. 7).* [15, 16, 17, 18, 20, 21]

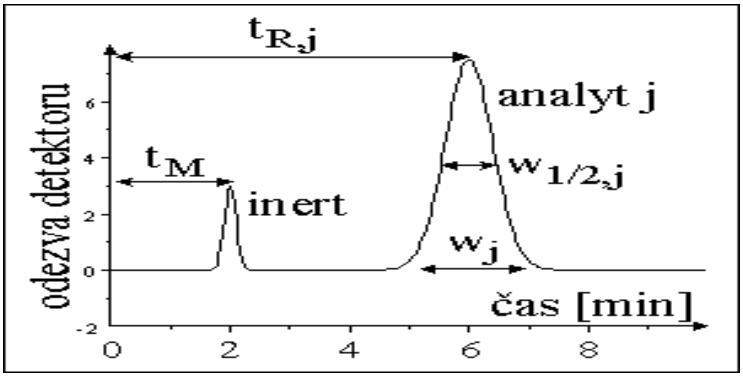
Z chromatogramu je možné určit:

- retenční čas vzorku t_R – celkový čas, který příslušný analyt ztráví v separační koloně, udává se v minutách nebo vteřinách

- mrtvý čas kolony t_M – je retenční čas analytu, který není v koloně zadržován, tj. analytu, který se pohybuje kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze

- šířka chromatografického píku w – běžně se udává v jednotkách času

- výška a plocha chromatografického píku – udává se v příslušných délkových a plošných jednotkách.



Obr. 7 Příklad chromatogramu [18, 16]

2.5.3 Kvalitativní a kvantitativní analýza v kolonové chromatografii

Kvalitativní vyhodnocení chromatografických křivek je založeno na porovnání retenčního času nebo objemu neznámé složky s retenčním časem nebo objemem standardu při stejných podmínkách chromatografického dělení. Souhlasí-li retenční data některé složky analyzované směsi s daty standardu, lze předpokládat, že látka je totožná se standardní látkou. [14, 15, 17, 18, 22]

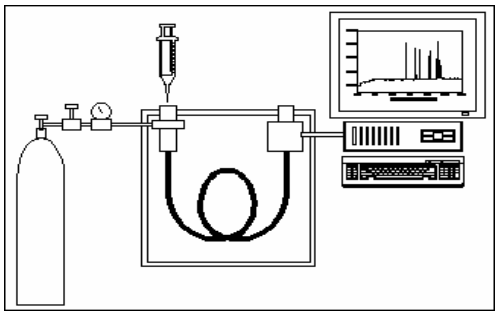
Kvantitativní vyhodnocení chromatografických křivek vychází z toho, že plocha pod eluční křivkou je úměrná koncentraci separované složky. Z tohoto důvodu je nutné zjistit pokud možno co nejpřesněji příslušnou plochu. [14, 15, 17, 18, 20, 21, 22]

Účinnost separačního procesu v kolonové chromatografii závisí na chromatografické koloně, která klesá s rostoucí rychlostí rozmývání zón separovaných látek. Kinetiku procesu rozmývání zón se snažila objasnit řada teorií, mezi nejznámější patří teorie chromatografického patra, která vychází z předpokladu, že chromatografickou kolonu je možno rozdělit na sled elementárních jednotek – pater. V rámci jednoho patra se uskuteční kompletní elementární separační krok, např. sorpce vzorku na povrchu stacionární fáze a jeho následná desorpce do fáze mobilní. V praxi se ujalo vyjadřování účinnosti chromatografických kolon počtem teoretických pater, popř. výškou teoretického patra. [17, 18]

2.5.4 Plynová chromatografie

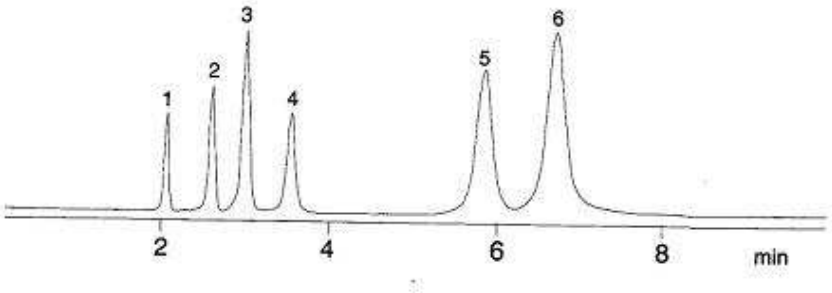
Metoda plynové chromatografie je vhodná pro analýzu těkavých látek, jež je možno převést do plynného stavu. [14, 18]

Popis GLC analýzy. Separační kolona uvnitř termostatu je ohřátá na určitou teplotu, vhodnou pro danou analýzu, kterou udržuje nebo programovatelně mění termostat. Do kolony vchází nosný plyn (nejčastěji N_2, H_2, He) o konstantní průtokové rychlosti. Výstup z kolony je zaveden do příslušného detektoru. Do proudu nosného plynu je přes nástřikový port, který je vyhříván pro rychlejší odpaření vzorku, nastříknut vzorek analyzované směsi (kapalný, plynný). Nosný plyn unáší plynnou směs analyzované látky a nosného plynu skrze kolonu, kde nastává její dělení na jednotlivé složky *(Obr. 8).* [15, 16, 20, 21, 22]
Principem dělení směsi na složky je v případě GLC rozdílná rozpustnost těchto složek ve stacionární fázi (ve filmu zakotvené kapaliny). Čím je daná složka směsi rozpustnější ve stacionární fázi, tím více je kolonou její průchod zpomalován. Během chromatografické separace se neustále opakuje proces „rozpouštění“ a „odpařování“ složek směsi, takže na výstupu se objeví prakticky všechen analyt, který byl do kolony nastříknut. Jednotlivé složky směsi pak vchází do příslušného detektoru, jehož signál je zaznamenáván v počítači v podobě chromatogramu. Hlavními parametry, které ovlivňují kvalitu separace a dobu GLC analýzy jsou teplota kolony a průtoková rychlost nosného plynu. [15, 16, 20, 21, 22]



Obr. 8 Části plynového chromatografu [16]

Chromatogram. V případě GLC chromatografie je chromatogram tvořen soustavou píků, které mají různou plochu a výšku a mají od sebe různou vzdálenost. Pokud je zkoumaná směs dobře rozdělena, pak každý pík na chromatogramu odpovídá jedné ze složek směsi. Poloha píku na ose x uváděná pomocí retenčního času (určeno podle polohy vrcholu píku) určuje o jakou látku se jedná (kvalitativní analýza), plocha píku (nebo jeho výška) určuje koncentraci látky ve směsi (kvantitativní analýza). Identifikace píků (látek) se provede tak, že se na stejné separační koloně za stejných experimentálních podmínek provede analýza předem připravené směsi o známém kvalitativním složení, tzv. standardní směs. Pokud se retenční časy píků na chromatogramu neznámé směsi shodují s retenčními časy píků směsi o známém složení, pak se jedná o stejné látky. Koncentrace látek ve směsi se určuje z ploch nebo výšek píků metodou kalibrace, pro kterou existuje více způsobů provedení *(Obr. 9).* [18, 16, 17, 19]



Obr. 9 Ukázka GLC chromatogramu [16]

V GC se požívají náplňové nebo kapilární separační **kolony**. *Kolony náplňové* jsou tvořeny do spirály stočenou kovovou nebo skleněnou trubicí o vnitřním průměru 2 – 4 mm a délce 2 – 6 m, naplněnou částicemi stacionární fáze o průměru 30 – 350 μm. *Kapilární kolony* jsou nejčastěji vyrobeny z křemenné kapiláry o vnitřním průměru 50 – 350 μm, pro zvýšení mechanické odolnosti potažené vrstvou polymeru (polyamidu). Na vnitřní stěně kapiláry je zakotvena netěkavá kapalina sloužící jako vlastní stacionární fáze. [15, 16, 17, 18, 20, 21]

Volba detektoru závisí na cíli analýzy. Jednotlivé typy detektorů se liší principem funkce, konstrukcí, selektivitou, citlivostí a mezí detekce (což je nejmenší možné množství látky, které je na pozadí šumu detektoru možné detekovat). K detekci složek vycházejících z chromatografické kolony se využívá různých fyzikálních a chemických vlastností, jako je např. hustota, tepelná vodivost, svítivost plamene apod. [16, 18, 19]

Detektory v plynové chromatografii je možno rozdělit na univerzální a selektivní. Nejstarším používaným univerzálním detektorem je *tepelně vodivostní detektor* (TCD – Thermal Conduktivity Detector). Tento detektor obsahuje zahřívané odporové vlákno, které se ochlazuje protékajícím plynem, čímž se mění jeho elektrický odpor. Jestliže detektorem prochází eluovaná látka, dojde ke změně teploty vlákna a ke změně elektrického odporu. [16, 17, 18, 22, 23]

Mezi univerzální detektory řadíme, v současné době nejpoužívanější, *plamenově ionizační detektor* (FID – Flame Ionization Detector). Je tvořen miniaturním hořákem, ve kterém je spalována směs vodíku a vzduchu a do něhož je přiveden i výstup z chromatografické kolony. Velikost signálu detektoru závisí na typu a koncentraci detekované látky. Detektor poskytuje odezvu na většinu organických sloučenin, anorganické látky včetně vody signál neposkytují. Je podstatně citlivější než TCD detektor. [15, 16, 18, 19]

Zástupcem selektivního detektoru je *detektor elektronového záchytu* (ECD - Electron Capture Detector), který je citlivý na elektronegativní atomy, zejména na halogeny. Nejmenší detekované množství zjišťované látky je o několik řádů nižší než u FID. [16, 17, 18, 22, 23]

V současnosti se stále častěji používají spektrometrické detektory, umožňující získat přímou informaci o struktuře separovaných látek, především *hmotnostní detektor* (MSD - Mass Spektrometry Detector), který patří mezi univerzální a velmi citlivé detektory. Detektor rozděluje organické molekuly na ionty. K dispozici jsou tři typy hmotnostních detektorů

- klasický kvadrupol, trojitý kvadrupol (triplequad) a tzv. TOF (Time Of Flight), které umožňují na principu hmotnostní spektrometrie přesnou a spolehlivou detekci a identifikaci. [16, 18, 23]

Pro analýzu málo těkavých látek plynovou chromatografií je nutno převést tyto složky před nadávkováním na těkavé produkty. Tento postup se nazývá derivatizace, činidlo reagující se vzorkem pak derivatizační činidlo. Vhodné derivatizační činidlo musí splňovat několik požadavků: reakce s analytem musí probíhat rychle, kvantitativně a s definovanou stechiometrií; reakční produkt musí být dostatečně stabilní i při zvýšené teplotě; pokud při derivatizační reakci vznikají kromě těkavého derivátu další produkty, je důležité, aby nerušily vlastní stanovení; je vhodné aby derivatizační činidlo reagovalo specificky pouze s vybranou skupinou látek. Derivatizace také přispívá ke snížení meze detekce a snížení polarity analytu blokováním polárních funkčních skupin (-OH, -NH_2, -COOH). Velmi častým derivatizačním postupem v plynové chromatografii je *silylace*, kdy účinkem trimetylchlorsilanu dojde k převedení vzorku na těkavé trimetylsilylderiváty. Dalším postupem derivatizace může být převedení vzorků na těkavé etyletery, estery, hydrazony. [16, 18]

Metody plynové chromatografie se využívají především při stanovení tokoferolů (vitamin E) a vitaminu D (cholekaciferol, ergokalciferol). Ostatní lipofilní vitaminy lze touto metodou stanovit jen v jednoduchých směsích. [15]

2.5.5 Kapalinová chromatografie

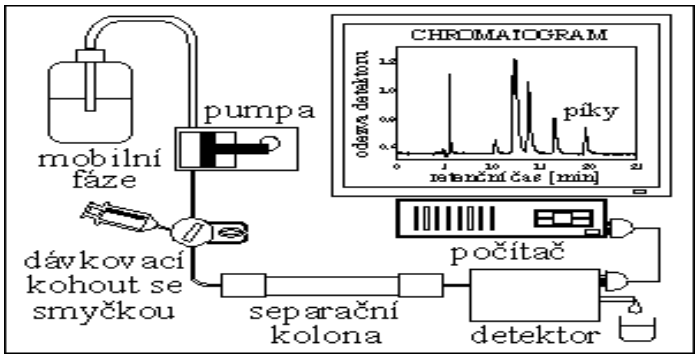
V průběhu několika posledních desetiletí dosáhla kapalinová chromatografie značného rozvoje. V současnosti je nejpoužívanější *vysokoúčinná kapalinová chromatografie* (HPLC – High performance liquid chromatography). [8, 18, 22]

HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je nyní nejvíce se rozvíjející se technikou pro stanovení organických látek. Patří mezi pokročilé a instrumentálně náročné techniky kapalinové chromatografie. Velkou výhodou této metody je možnost detekce látky řádově až 10^{-10}g ve vzorku. Tím se stává velice citlivou. HPLC analýza je také ve srovnání s GC analýzou mnohem méně citlivá na teplotu kolony a průtokovou rychlost mobilní fáze. Je však

citlivá na složení a pH mobilní fáze. Výhodou HPLC je schopnost analyzovat termolabilní látky (např. vitamíny a jiné), které by při použití plynové chromatografie degradovaly a byly by tak neanalyzovatelné. [16, 18, 19]

Popis HPLC analýzy. Aparaturou HPLC protéká mobilní fáze, která je vedena přes vysokotlakou pumpu do kolony a z ní do detektoru. Dávkovačem je do proudu mobilní fáze nadávkován vzorek (řádově několik μl). Vzorek je unášen mobilní fází do kolony, kde dochází k separaci jednotlivých složek. Výstup z kolony vede do detektoru, kde jsou jednotlivé složky detekovány *(Obr. 10)*. Signál z detektoru je zaznamenáván v podobě chromatogramu, který je vizuálně podobný jako chromatogram pořízený pomocí GC. [16, 18, 19]



Obr. 10 Části kapalinového chromatografu

Mobilní fází v HPLC může být např. voda, methanol, acetonitril a jejich směsi v různých vzájemných poměrech, pufry atd. Mobilní fáze může být jednosložková nebo vícesložková – izokratická nebo gradientová eluce. Při gradientové eluci je možné měnit během analýzy poměr složek mobilní fáze, tím dochází ke zkrácení doby analýzy a zlepšení rozdělění složitějších látek. Volba složení mobilní fáze je pro HPLC velmi významná. Eluční pořadí je určeno vzájemným vztahem polarity separovaných látek a polarity mobilní a stacionární fáze. Voda má charakter výrazně polární, běžné alkoholy a acetonitril jsou látky středně polární, alkany a cykloalkany jsou nepolární. Při použití polární stacionární fáze jsou kolonou nejméně zadržovány nepolární složky vzorku. [18, 16, 24]

Metoda HPLC existuje jako tzv. „klasické“ a „reversní“. Při klasické HPLC je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní. Při reversní HPLC (RP HPLC - reverse phase HPLC). je naopak stacionární fáze méně polární než fáze mobilní. [16]

Moderní kapalinové chromatografy umožňují práci s tlaky v rozmezí 1-60 MPa. To umožňuje dosáhnout poměrně velký **průtok** mobilní fáze (1-20 ml/min). Tok mobilní fáze je zajišťován vysokotlakým čerpadlem (pumpa). [16, 18, 19, 22]

Separační kolony používané v HPLC musí odolat vysokému tlaku mobilní fáze. Většinou se vyrábí z nerezové oceli nebo z tlustostěnné skleněné trubice o vnitřním průměru 2-5 mm a délce 30-300 mm. Nejlepší kolony jsou zhotovené z kovu, jehož vnitřní povrch je potažen slabou vrstvou skla. Délka kolony se volí podle druhu použitého adsorbentu. Čím je velikost zrn sorbentu menší, tím kratší kolona se použije. Kolony jsou naplněny vhodnou stacionární fází (např. oxid křemičitý vhodné zrnitosti). [15, 16, 18, 19, 20, 21]

Jako stacionární fáze může být použit i granulovaný iontoměnič, potom se tato metoda nazývá *iontově výměnná chromatografie* (IEC – Ion exchange chromatography). Dále je možné jako stacionární fázi použít mikroporézní sorbenty, kdy dochází k separaci složek vzorku podle velikosti molekul. Tato technika se nazývá *vylučovací* nebo *gelová permeační chromatografie*. [15, 16, 18, 19, 20, 21]

K detekci se využívá mnoha instrumentálních metod s tím, že vlastní detekční cela je konstrukčně přizpůsobena k tomu, aby byla použitelná k detekci v HPLC. Objem detekční cely musí být dostatečně malý, aby v detektoru nedocházelo k rozmývání zón látek separovaných v koloně. K detekci separovaných látek se využívá jejich obecných nebo specifických vlastností, jimiž se tyto látky liší od mobilní fáze. [18, 19]

Fotometrický detektor (UV-VIS) je v současné době nejpoužívanější. Většina organických látek absorbuje záření v oblasti UV, některé i ve viditelné oblasti světla. Detektory pracují buď s fixní vlnovou délkou (nejčastěji 254 nm), s možností výběru několika vlnových délek (filtrové), nebo jsou opatřeny monochromátorem a pracují na principu spektrofotometru v rozsahu 190 - 400 nm. Tento detektor umožňuje sledovat absorbanci látek vystupujících z chromatografické kolony. Fotometrický detektor pracující v ultrafialové oblasti je pro organické látky prakticky univerzální. [15, 16, 17, 18, 24]

Dalším často používaným detektorem je *detektor s diodovým polem (DAD - detektor)*, jehož výhodou je možnost okamžitého záznamu celého spektra ve zvolené oblasti vlnových délek. [15, 16, 18, 22, 24]

Pro organické látky vykazující fluorescenci je možno použít *fluorimetrický detektor*. Jako zdroj záření se používá nejčastěji miniaturní vysokotlaká xenonová výbojka a nebo laser.

Zařízení je doplněno dvěma monochromátory, umožňujícími vybrat jak vlnovou délku budícího, tak i fluorescenčního zařízení. Fluorescenční detektor umožňuje dosáhnout velmi nízkých mezí detekce. [16, 18, 24]

Elektrochemický detektor umožňuje stanovit velmi nízké koncentrace látek v eluentu v případě, že tyto látky jsou elektrochemicky aktivní (redukovatelné nebo oxidovatelné). Měří se proud protékající mezi polarizovatelnou pracovní elektrodou a pomocnou elektrodou v závislosti na vloženém napětí. [17, 22, 24, 25]

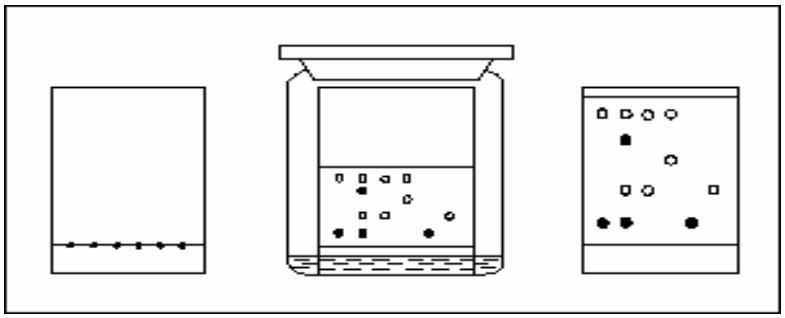
Hmotnostní detektor se používá v HPLC stále častěji. Umožňuje přímou identifikaci a následně kvantifikaci jednotlivých separovaných látek vycházejících z kolony na základě získaných hmotnostních spekter. [18, 24]

2.5.6 Planární chromatografie

Planární (plošná) chromatografie patří mezi instrumentálně nejjednodušší variantu kapalinové chromatografie a využívá se stále i přes obrovský rozvoj kolonové chromatografie. Planární chromatografie se dělí podle typu použité stacionární fáze na papírovou chromatografii (PC – Paper chromatography), kde k separaci dochází na proužku papíru, a na tenkovrstvou chromatografii (TLC – Thin layer chromatography), kdy je stacionární fáze tvořena tenkou vrstvou sorbentu. V současné době se více využívá TLC, např. pro orientační analýzu neznámých vzorků a při vyhledávání vhodných separačních podmínek pro kolonovou chromatografii. [15, 16, 18, 19, 20, 22]

Při chromatografii v plošném uspořádání vzlíná mobilní fáze po chromatogramu nahoru a unáší dělené látky ze vzorku, které se více či méně zpožďují (rozpouštění nebo adsorpce) se stacionární fází, a tím se vzájemně dělí *(Obr. 11)*. Poté putují látky ve formě skvrn a detekují se vhodnou fyzikální nebo chemickou metodou. Skvrny barevných látek jsou přímo viditelné, u nebarevných látek se používá postřik desky nebo papíru vhodným reagentem (např. jodem). Pokud skvrny absorbují záření v ultrafialové oblasti, je možné osvícení tenké vrstvy nebo papíru rtuťovou lampou a poté pozorování tmavých skvrn na světlém pozadí. K lokalizaci fluoreskujících složek se používá ultrafialová lampa. Pro každou sloučeninu je charakteristická poloha její skvrny na chromatogramu a její chování při detekci. Velikost a intenzita zbarvení je v souladu s množstvím látky. K identifikaci látek se pou-

žívají hodnoty Rf (retardační faktor), což je vlastně poměr vzdálenosti středu (těžiště) skvrny od místa startu ke vzdálenosti čela rozpouštědla (mobilní fáze) od místa startu. [16, 18, 19, 24]



Obr. 11 Vyvíjení chromatogramu při PC a TLC [18, 24]

Pro PC s používá celulózový filtrační papír, pro TLC je nejvhodnější tzv. Silufol, což je deska ze silikagelu s přídavkem škrobu jako pojidla na podložce z hliníkové folie. Jako mobilní fáze se používají organická rozpouštědla nebo jejich směsi s jinými látkami (cyklohexan, toluen, chloroform, dichlormetan, aceton, etanol, metanol, voda, amoniak, kyselina octová). [17, 19, 22, 24]

2.6 Stanovení jednotlivých lipofilních vitaminů

2.6.1 Stanovení vitaminu A

Při analýze vitaminu A jsou nejvíce využívány metody HPLC a spektrofotometrické metody, u některých vzorků (mléko a mléčné výrobky) lze vitamin A stanovit fluorimetricky nebo pomocí plynové chromagrafie.

Spektrofotometrické stanovení

Tato metoda je vhodná pro veškerý potravinářský materiál, v některých případech je však nutné upravit chromatografické způsoby čištění extraktu podle druhu potraviny. Při spektrofotmetrickém stanovení vitaminu A z živočišných tkání bývá zpravidla prvním krokem zmýdelnění vzorku KOH ve zmýdelňovací aparatuře pod proudem dusíku za přítomnosti antioxidantů. Poté se vitamin A extrahuje petroleterem a po chromatografickém čištění na sloupci nebo tenké vrstvě se proměří vzniklé modré zbarvení po reakci s chloridem antimonitým na spektrofotometru při 620 nm. [8, 10, 15, 26]

Fluorimetrické stanovení

Při stanovení vitaminu A v mléce a mléčných výrobcích se může použít fluorimetrická metoda. Vzorek se zmýdelní pomocí KOH za přídavku pyrogalolu. Vzorek mléka se extrahuje pomocí petroleteru, vzorky másla nebo sýrů pomocí n-hexanu. Fluorescence se proměří při 330 a 480 nm.[10, 15]

GC

Maraschiello a kol. stanovovali obsah retinolu v drůbežích játrech. Homogenizovaný vzorek se izoloval směsí hexanu a isopropanolu (3:2, v/v) s přídavkem BHT pod proudem dudíku, provedlo se odstředění a odpaření rozpouštědel. Odparek se poté rozpustil v 100% etanolu, pomocí KOH se provedlo zmýdelnění a vzorek se následně rozpustil v hexanu. Vlastní stanovení se provádělo kapilární plynovou chromatografií. Nosným plynem bylo helium, byl použit FID detektor a analýza se prováděla při 220 – 310 °C. Průměrný obsah retinolu v drůbežích játrech byl 54,3 $\mu g.g^{-1}$. [27]

HPLC

Další často využívanou metodou pro stanovení vitaminu A, ale i karotenoidů, je HPLC metoda. Po zmýdelnění vzorku pomocí KOH se vitamin A extrahuje do organického rozpouštědla (hexanu). Extrakt se odpaří na rotační vakuové odparce a odparek se rozpustí v metanolu. Obsah vitaminu A se stanoví HPLC metodou s UV detekcí při vlnové délce

325 nm nebo fluorescenční detekcí při excitační vlnové délce 325 nm a emisní vlnové délce 480 nm. [8]

Při spektrofotometrické detekci se mez detekce pohybuje kolem 2 ng. Při použití Fluorescenčního detektoru je detekční limit je 0,5 ng. Kromě těchto detektorů se k detekci vitaminu A může použít i elektrochemický detektor. Elektrochemická amperometrická detekce retinolu je méně selektivní než detekce spektrofotometrická, přičemž detekční limity jsou srovnatelné. Separační podmínky (průtok mobilní fáze a eluční síla mobilní fáze) se nastaví takové, aby nedocházelo k dělení cis a trans isomerů vitaminu A. [8]

Majchrzak a kol. stanovovali obsah vitaminu A ve vepřových, hovězích, telecích, kuřecích a krůtích játrech. Pro separaci různých forem vitaminu A (all-trans retinolu a jeho čtyř esterů: retinyl palmitátu, oleátu, stearátu a linolátu) byla použita technika HPLC. Pro stanovení byly použity vždy tři vzorky od šesti různých dodavatelů. Z homogenizátu byla izolována lipidová fáze podle Folche s následnou extrakcí směsí chloroformu a metanolu. Pro separaci jednotlivých složek byla použita jako mobilní fáze směs acetonitrilu a metanolu (85:15 v/v). Odezvy píků byly měřeny při 320 nm za použití DAD detektoru. Rakouští vědci zjistili, že obsah tohoto vitaminu ve vzorcích se pohyboval v rozmezí 6,5 – 18,9 mg.100g^{-1} ve vepřových játrech, 1,1 - 6,7 mg.100 g^{-1} v hovězích játrech, 1,6 - 16,6 mg.100 g^{-1} v kuřecích játrech a 2,7 - 21,5 mg.100 g^{-1} v krůtích játrech. Různé hodnoty obsahu vitaminu A u vzorků téhož druhu byly způsobeny rozdílným plemenem, věkem a různým krmícím režimem. [28]

Sungpuank a kol. stanovovali obsah retinolu v játrech a slepičích vejcích metodou HPLC před a po různých kulinárních úpravách – syrová, vařená a grilovaná játra, syrové a vařené vejce na tvrdo, omeleta. Po zmýdelnění jednotlivých vzorků KOH se provedla extrakce diisopropyleterem, jako mobilní fáze se použil metanol a k detekci byl použit UV detektor při 450 nm. Nejvíce retinolu bylo obsaženo v syrových játrech (15514 μg.100 g^{-1}) a játrech vařených (9402 μg.100 g^{-1}). Syrové vejce obsahovalo 166 μg.100 g^{-1} retinolu a vařené natvrdo 120 μg.100 g^{-1}. Vařená játra ztratila během tepelné úpravy 5% retinolu, restovaná 8-16%. K největším ztrátám došlo při přípravě vaječné omelety (43 %), ve vařeném vejci činily ztráty retinolu 11%. [29]

2.6.2 Stanovení karotenoidních látek

Z rostlinných tkání se karotenoidní látky po homogenizaci a rozpuštění v acetonu izolují vhodným organickým rozpouštědlem a jednotlivé karoteny se rozdělí sloupcovou adsorpční chromatografií. Poté se provádí buď spektrofotometrické stanovení nebo pomocí HPLC. [15, 19, 21]

Způsob extrakce karotenoidů závisí na tom, zda vlastní extrakci předchází zmýdelnění či nikoli. Při přímé extrakci se k izolaci karotenoidů využívá např. tetrahydrofuran (THF), methanol, acetonitril nebo různé směsi, např. aceton – hexan, ethanol – hexan, ethylacetát – hexan, ethylacetát - petrolether nebo methanol – tetrahydrofuran. Ke vzorku je také nutné většinou přidat některý z antioxidantů (BHT, pyrogallol, kyselina askorbová) a zneutralizovat obsažené organické kyseliny pomocí uhličitanu vápenatého, hořečnatého nebo sodného. V případě použití alkalické hydrolýzy se provádí hydrolýza 10 % methanolickým roztokem KOH za studena po dobu 16 hodin. [8]

Jako sorbent se pro separaci karotenoidů využívá $Ca(OH)_2$. Mobilní fáze pro separaci α, β, γ- karotenů může být např. isooctan s přídavkem 0,5 % THF nebo se směs acetonitrilu, dichlormetanu a metanolu (70:20:10). Při HPLC stanovení se nejčastěji používá UV detektor v oblasti 400 – 500 nm v závislosti na stanovovaných karotenoidech. [8]

Spektrofotometrické stanovení

Při spektrofotometrickém stanovení se žlutě zabarvený petroleterový extrakt vzorku čistí chromatograficky na sloupci a karoteny se proměří při 450 nm na spektrofotometru. [15, 19, 21]

Choi a kol. stanovovali spektrofotometricky obsah provitaminů A v bílé rýži, neloupané rýži a v ječmeni. Zhomogenizované vzorky byly extrahovány pomocí metanolu, odstředěny a přefiltrovány. Poté byl extrakt smíchán s vodou a se směsí hexanu, acetonu a metanolu (50/25/25, v/v) a provedlo se odstředění. Absorbance byla proměřena při vlnové délce 450 nm. Obsah celkových karotenoidů (přepočteno na β-karoten) byl v ječmeni 15 $\mu g.100g^{-1}$ vzorku, v neloupané rýži 14 $\mu g.100\ g^{-1}$ a v bílé rýži 1 $\mu g.100g^{-1}$. [30]

HPLC

Raju a kol. stanovovali pomocí HPLC techniky obsah karotenoidních látek v 30 různých druzích zelené listové zeleniny, např. v cibuli, v mátě, v amarantu, v mrkvi, v tykvi, v lilku černém nebo v koriandru. Po homogenizaci a extrakci acetonem a petroletherem se vzorek vysušil a provedla se filtrace. Z fitrátu se odpařilo rozpouštědlo a zbytek se rozpustil v hexanu. Vzorek se připravoval při 4 °C pod matným žlutým osvětlením, aby se zamezilo isomerizaci, oxidaci a případným ztrátám karotenů. Vzorek se analyzoval pomocí metody HPLC, kde se jako mobilní fáze použila směs acetonitrilu, metanolu a dichlormetanu (60:20:20, v/v/v) s 0.1 % octanem amonným a detekce se provedla pomocí UV–VIS detektoru při 450 nm. Zjištěné množství β-karotenu: v cibuli 16, 9 $mg.100g^{-1}$ sušiny, v mátě 7,48 $mg.100g^{-1}$, v amarantu 18,67 $mg.100g^{-1}$, v mrkvi 12,9 $mg.100g^{-1}$, v tykvi 10,27 $mg.100g^{-1}$, v lilku 50,17 $mg.100g^{-1}$ a v koriandru 67,5 $mg.100g^{-1}$. Významné množství α-karotenu se nacházelo pouze v mrkvi (21,53 $mg.100g^{-1}$). [26, 31]

Pinheiro Sant'Ana a kol. se ve své práci zaměřili na zjišťování obsahu α-karotenu, β-karotenu a celkových karotenoidů v mrkvi po různých kulinárních úpravách. Obsah karotenů zjišťovali u čerstvé nastrouhané mrkve, mrkve vařené v páře, vařené ve vodě, v tlakovém hrnci a v grilované mrkvi. Pro analýzu byla použita reverzní HPLC technika. Jako mobilní fáze byla použita směs metanolu, acetonitrilu a etylacetátu (80:10:10) za použití UV – VIS detektoru při 449 nm. K největším ztrátám α- a β-karotenů docházelo při grilování a v nastrouhané mrkvi, jako nejšetrnější způsob úpravy se jeví vaření ve vodě a v páře. I přes značné ztráty karotenů zůstává mrkev i po kulinární úpravě dobrým zdrojem provitamínů A. [32]

2.6.3 Stanovení vitaminů skupiny D

Stanovení vitaminů s antirachitickým účinkem je v potravinách velmi složitý úkol, protože se ve vzorcích vyskytují v nízkém množství a také společně s jinými steroidními látkami jako jsou steroly nebo např. s karotenoidy. Proto se používají různé předseparační techniky jako srážení sterolů digitoninem nebo adsorpční kolonová chromatografie na Al_2O_3. Pro stanovení vitaminu D lze použít spektrofotometické metody, metodu plynové a kapalinové

chromatografie. U vzorků s vyšším obsahem vitaminu D lze použít i chromatografické stanovení na tenké vrstvě. [8, 14, 15]

Spektrofotometrické stanovení

Pro vzorky potravin obsahující větší množství vitaminu D (rybí tuky, rostlinné oleje aj.) lze použít spektrofotometrickou metodu, kdy se po zmýdelnění vzorku KOH z nezmýdelnitelných podílů extrahuje vitamin petroleterem. Poté se provede trojnásobné chromatografické přečištění na Celitu, Al_2O_3 a Florexu XXS a oddělený vitamin D se nechá zreagovat s chloridem antimonitým. Vzniklé lososovité zbarvení se proměří spektrofotometricky při 750 nm. [14, 15, 26]

GC

Při použití plynové chromatografie se vzorek zmýdelnění pomocí alkoholického KOH, izoluje dietyleterem a rušivé steroidní látky se vysráží digitoninem. Vysrážené steroly se odfiltrují a vzorek se opět extrahuje dietyleterem. Rozpouštědlo se odpaří, odparek se rozpustí v isooktanu a znovu se provede zmýdelnění a extrakce. K GC analýze vitaminu se používá jako nosný plyn dusík a plamenově ionizační detektor. [15]

HPLC

Při použití HPLC analýzy pro stanovení vitaminu D po studené alkalické hydrolýze a extrakci do hexanu je vzorek isomerizován na isotachysterol pomocí HCl v butanolu. Na semipreparativní koloně je sbírána frakce isotachysterolu vitaminu D a ta se následně separuje na HPLC koloně se silikagelem za použití UV detektoru při vlnové délce 301 nm. Alternativou k UV detekci je detekce elektrochemická, nebo amperometrická. Při elektrochemické detekci na uhlíkové elektrodě je detekční limit vitaminu D_3 7 ng. [8]

Perales a kol. stanovovali obsah vitaminu D_3 ve fortifikovaném mléce a v mléce, připraveném ze sušeného kojeneckého mléka pomocí HPLC při 20°C. Vzorky byly zmýdelněny pomocí alkoholického KOH za přídavky vitaminu C a extrakce byla provedena hexanem, který se následně odpařil. Vzorek byl poté rozpuštěn v metanolu. Jako mobilní fáze byla použita směs metanolu a vody (98:2, v/v). HPLC analýzu byla provedena isokratickou reverzní kapalinovou chromatografií za použití elektrochemického detektoru. Obsah vitami-

nu D ve fortifikovaném mléce byl 48 ng.100g^{-1} vzorku a v mléce ze sušeného kojeneckého mléka 156 ng.100g^{-1} vzorku. [33]

Clausen a kol. zjišťovali pomocí HPLC obsah vitaminu D_3 a jeho metabolitu 25-hydroxyvitamin D_3 v syrovém a ve vařeném vepřovém mase. Homogenizované vzorky byly zmýdelněny a extrahovány ve směsi dietyleteru a petroleteru (1:1). Při HPLC analýze byla jako mobilní fáze použita směs propanolu a heptanu a jako detektor byl použit DAD (220 - 320 nm) a UV detektor (265nm). V syrovém mase byl obsah vitamínů závislý na tučnosti masa. Zjištěný obsah vitaminu D_3 byl od 0,05 do 0,21 μg.100g^{-1} vzorku a obsah metabolitu byl 0,07 – 0,14 μg.100g^{-1}. Vařením došlo ke zvýšení obsahu vitaminu D_3 (0,08–0,24μg.100g^{-1}) i jeho metabolitu (0,06 – 0,18 μg.100g^{-1}). Nejvíce vitaminu D_3 i jeho metabolitu bylo ve vepřové kůži, méně v sádle, v mletém mase a nejméně v libovém mase. [34]

2.6.4 Stanovení vitaminu E

Ke stanovení tokoferolů je vypracováno nejvíce metod ze všech lipofilních vitaminů. Při analýze potravinářských materiálů se ve většině případů po zmýdelnění a izolaci nezmýdelnitelného podílu oddělí tokoferoly některou chromatografickou metodou. Izolované deriváty tokoferolů se stanoví spektrofotometricky, plynovou chromatografií nebo pomocí HPLC. [14, 15]

Spektrofotometrické stanovení

Při spektrofotometrickém nepřímém stanovení, které je vhodné pro všechny typy potravin, se homogenizovaný vzorek zmýdelní etanolovým roztokem KOH a poté se extrahuje dietyleterem. Po odpaření rozpouštědla se odparek rozpustí v petroleteru a tento roztok se použije k chromatografickému dělení na tenké vrstvě silikagelu. Poté se tokoferoly eluují etanolem. Po přídavku 2,2-dipyridylu se barevný roztok proměří proti etanolu na spektrofotometru při 520 nm. [10, 14, 15, 26]

GC

U plynové chromatografie se tokoferoly a tokotrienoly spolu s lipofilními látkami extrahují ze vzorku etanolem. Tuk se zmýdelní, nezmýdelnitelný podíl se extrahuje petroleterem, dělí na tenké vrstvě silikagelu ve směsi benzenu a metanolu. Jednotlivé tokoferoly se eluují dietyleterem, který se následné odpaří. K odparku se přidá směs hexametyldisilizanu, trimetylchlorsilanu a pyridinu a vzorek se převede na těkavé trimetylestery, které se dělí chromatograficky. Při této metodě se využívá helium jako nosný plyn a FID-detektor. Metoda je použitelná pro všechny potravinářské výrobky. [15]

Maraschiello a kol. stanovovali obsah α- tokoferolu v drůbežích játrech. Homogenizovaný vzorek se izoloval směsí hexanu a isopropanolu (3:2, v/v) s přídavkem BHT pod proudem dusíku, provedlo se odstředění a odpaření rozpouštědel. Odparek se poté rozpustil v 100% etanolu a pomocí KOH se provedlo zmýdelnění. Po přídavku hexanu se provedlo přečištění na tenké vrstvě silikagelu a skvrny se eluovaly směsí hexanu a dietyleteru (85:15, v/v). Poté byla provedena derivatizace směsí hexadimetylsilazanu a trimetylchlorsilanu v pyridinu. Jako mobilní fáze se použilo helium a vzniklý α-tokoferyl acetát byl detekován FID detektorem. Obsah α- tokoferolu ve vzorku byl v průměru 4,5 $\mu g.g^{-1}$. [27]

HPLC

Nejčastěji používanou metodou pro stanovení tokoferolů je HPLC metoda. U vzorku se provede zmýdelnění pomocí KOH a poté se provede extrakce hexanem. Extrakt se odpaří na vakuové odparce a rozpustí v metanolu. Obsah vitaminu E se stanoví HPLC metodou s UV detekcí při vlnové délce 292 nm nebo fluorescenční detekcí, která je daleko citlivější, při vlnové délce 295 a 330 nm. Fluorescenční detekce je ve srovnání se spektrofotometrickou detekcí citlivější a detekční limity jsou o jeden řád nižší. [8]

Při stanovení vitaminu E v margarinu a tucích přímou extrakcí metodou HPLC se tokoferoly extrahují rozpuštěním tuku v hexanu na ultrazvuku. Po rozpuštění tuku se přidá bezvodý síran hořečnatý a nechá se stát 2 hodiny. Po filtraci se tokoferoly separují za použití mobilní fáze isopropanolu v hexanu na normální fázi (silikagel) s fluorescenční detekcí. [8]

Delgado-Zamarreño a kol. při HPLC stanovení tokoferolů ze vzorků semen a ořechů použili extrakci pomocí acetonitrilu za zvýšeného tlaku. Tímto způsobem byly získány velmi čisté extrakty, které byly použity přímo pro analýzu. Jako mobilní fáze byla použita směs metanolu a vody (99,9:0,1 v/v) a detekce byla provedena pomocí ECD detektoru. Získané

výsledky byly porovnány s výsledky při HPLC analýze za použití alkalické hydrolýzy a byly téměř totožné. Tato metoda je rychlá a jednoduchá a tím vhodná pro stanovení tokoferolů v mandlích, slunečnicových semenech, lískových a vlašských ořeších. [35]

Cho a kol. využili HPLC analýzu při stanovení acetátu tokoferolu v panenském olivovém oleji. Extrakce vzorku byla provedena směsí hexanu a etylacetátu (4:1, v/v). K detekci byl použit DAD - detektor, jehož výsledky byly navíc potvrzeny MS detektorem. Obsah acetátu tokoferolu v olivovém oleji byl 32,6 ± 1,1 $\mu g.ml^{-1}$. [36]

Gliszczyńska-Świgło a Sikorska stanovovali obsah tokoferolů (α-, β-, γ-, a δ-tokoferolů) v jedlých rostlinných olejích (olivový, řepkový, arašídový, slunečnicový, sojový, kukuřičný olej) pomocí HPLC techniky. Vitamin E z olejů byl extrahován 2-propanolem a poté byly vzorky přímo nastříknuty do kolony. Jako mobilní fáze byla použita směs metanolu a acetonitrilu (1:1) a jednotlivé tokoferoly byly detekovány pomocí fluorescenčního detektoru při 295 nm a 325nm. Pomocí tohoto detektoru je možné detekovat množství γ- a δ-tokoferolu od 8 $ng.ml^{-1}$ vzorku a množství α-tokoferolu od 28 $ng.ml^{-1}$ vzorku. Nejvíce α-tokoferolu bylo obsaženo ve slunečnicovém oleji (561 $mg.kg^{-1}$), největší množství β- a γ-tokoferolu bylo obsaženo v kukuřičném a sojovém oleji (582 $mg.kg^{-1}$ a 504 $mg.kg^{-1}$) a nejvíce δ-tokoferolu bylo v sojovém oleji (188 $mg.kg^{-1}$). Celkový obsah tokoferolů byl největší v sojovém a v kukuřičném oleji (845 $mg.kg^{-1}$, 815 $mg.kg^{-1}$), slunečnicový olej obsahoval 625 $mg.kg^{-1}$, řepkový 505 $mg.kg^{-1}$, arašídový 224 $mg.kg^{-1}$ a olivový 174 $mg.kg^{-1}$ tokoferolů.[37]

Další způsob analýzy rostlinných olejů je pomocí reverzní HPLC. Gimeno a kol. stanovovali obsah vitaminů E v olivovém oleji, panenském olivovém oleji, slunečnicovém, kukuřičném a sojovém oleji. U tohoto způsobu se neprovádí extrakce, vzorek se pouze naředí směsí hexanu a etanolu, která navíc obsahuje jako vnitřní standard acetát α-tokoferolu. Jako mobilní fáze byla použita směs metanolu a vody a k detekci byl použit UV – detektor. Tokoferoly byly detekovány po 5 minutách od nástřiku při vlnové délce 292 nm. Průměrný obsah α-tokoferolu byl 213,3 $mg.kg^{-1}$ a β-tokoferolu 8,68 $mg.kg^{-1}$. Tato metoda patří mezi velmi rychlé a přesné metody. [38]

Choi a kol. stanovovali obsah vitaminu E v bílé rýži, neloupané rýži a v ječmeni pomocí HPLC. Při stanovení obsahu vitaminu E se metanolový extrakt odpařil pod proudem dusíku, rozpustil v *n*-hexanu, přefiltroval a poté se provedla HPLC analýza. Jako mobilní fáze se použila směs hexanu a isopropanolu (98,7:1,3 v/v) a detekce se provedla pomocí fluo-

rescenčního detektoru při vlnové délce 290 a 330 nm. Obsah α-tokoferolu v neloupané rýži byl 0,42mg.100g^{-1} vzorku, v ječmeni 0,23mg.100g^{-1} a v bílé rýži 0,07mg.100g^{-1}. [30]

2.6.5 Stanovení vitaminů skupiny K

Ke stanovení vitaminů skupiny K bylo popsáno poměrně málo metod, protože tato stanovení se neprovádí příliš často. Přísun tohoto vitaminu potravou a jeho tvorba střevní mikroflórou jsou totiž ve většině případů dostatečné. Pro stanovení vitaminu K v potravinách byly dříve používány různé biologické, chemické a chromatografické metody, ale v současné době se za spolehlivou považuje pouze HPLC metoda. V některých případech se může použít i spektrofotometrická metoda. Při zjišťování obsahu vitaminu K pomocí HPLC techniky se nejčastěji používají elektrochemické, UV detektory nebo fluorescenční detektory za použití různých mobilních fází a kolon. [10, 14, 15]

Spektrofotometrické stanovení

Při spektrofotometrickém stanovení se vitamin K_1 po zmýdelnění extrahuje ze vzorku acetonem, poté se provede chromatografické čištění na Al_2O_3 a floridinu. Po reakci s 5-imino-3-tion-1,2,4-ditiazolidinem se provede spektrofotometrické měření při 520 nm. [10, 14, 15]

HPLC

Othles a kol. stanovovali obsah fyllochinonu v olivovém oleji. Vzorek olivového oleje se extrahoval pomocí n-hexanu a poté se provedla filtrace a přečištění. Při vlastní HPLC analýze se použila mobilní fáze směsi acetonitrilu, dichlorometanu a metanolu (60:20:20, v/v/v) při 20°C. Vitamin K_1 byl detekován pomocí UV-VIS detektoru při vlnové délce 248 nm. Obsah fyllochinonu v olivovém oleji se pohyboval mezi 12,7 - 18,9 μg.100g^{-1} vzorku. [39]

Damon a kol. stanovovali obsah fyllochinonu v různých druzích zeleniny za použití HPLC techniky s fluorescenčním detektorem. V zelené listové a košťálové zelenině (brokolice, špenát) byl obsah vitaminu nad 100μg.100g^{-1}. Naopak kořenová zelenina obsahovala méně

než 10μg.100g^{-1} fyllochinonu. Ledový salát, který bývá uváděn jako významný zdroj tohoto vitaminu obsahoval v porovnání se špenátem nebo brokolicí pouze 24,1μg.100g^{-1}. [40]

Pérez-Ruiz a kol. stanovovali obsah jednotlivých vitaminů K v syrových listech špenátu a v růžičkové kapustě. Homogenizované vzorky zeleniny byly extrahovány na ultrazvukové lázni hexanem. Poté se provedla filtrace a odpaření rozpouštědla. Po přídavku dalších rozpouštědel se provedlo zachycení obsažených vitaminů K do patrony se silikagelem a tento zbytek se rozpustil v metanolu. Pro HLPC analýzu byl použit UV detektor. Obsah vitaminu K_1 ve špenátu byl 4,2mg.100g^{-1} a růžičková kapusta obsahovala 2,5mg.100g^{-1} vitaminu K_1. [41]

2.6.6 Společné stanovení vitaminů

V některých případech se pomocí HPLC metody může stanovit i několik vitaminů dohromady.

Pomocí reverzní HPLC se mohou vedle sebe stanovovat antioxidanty jako provitamin A (β-karoten) a α-tokoferol ve vzorku brokolice. Zjištěný obsah β-karotenu byl 0,81 mg.100g^{-1}, a *α*-tokoferolu 0,47 mg.100 g^{-1}. [42]

Salo-Väänänen a kol. stanovovali pomocí HPLC obsah lipofilních vitaminů v mléce a ve vzorcích rybích produktů (filet baltského sledě obalovaný v žitné mouce a v trojobalu a smažený v řepkovém oleji). V mléce byly stanovovány tokoferoly, β-karoten, all-*trans*-retinol a v rybích produktech navíc i cholekalciferol. Vzorky byly zmýdelněny a rozpuštěny ve směsi *n*-hexanu a etylacetátu, poté se rozpouštědla odpařila, odparek se rozpustil v hexanu a přefiltroval se. Pro β-karoten a all-*trans*-retinol byla použita jako mobilní fáze směs diisopropyleteru a *n*-hexanu a UV detektor (486 nm) a pro detekci tokoferolů byl použit fluorescenční detektor (470 nm). Pro stanovení obsahu cholekalciferolu byla použita HPLC technika s UV – VIS detektorem (265 nm) po předchozím přečištění a jako mobilní fáze byla použita směs hexanu, THF a propanolu (98:1:1). Obsah α-tokoferolu v mléce byl 57 μg.100g^{-1}, β-karotenu 13 μg.100g^{-1}, all-*trans*-retinolu 28 μg.100g^{-1}. V rybích produktech byl vysoký obsah α-tokoferolu a γ-tokoferolu (6220 μg.100g^{-1}, 2830), obsah ostatních tokoferolů nebyl významný. μg.100g^{-1}. Obsah all-*trans*-retinolu byl 8 μg.100g^{-1}, β-karotenu 107 μg.100g^{-1} a vitaminu D_3 7 μg.100g^{-1}. Tato metoda patří mezi univerzální metody. [43]

Delgado a kol. stanovovali obsah vitaminů A, D_3 a E ve vzorcích jogurtů pomocí HPLC. Nejdříve se provedla izolace vzorků pomocí směsi hexanu a chloroformu (2:1, v/v), odstředění vzorku a odpaření rozpouštědla. Poté následovala studená hydrolýza alkoholickým KOH za přídavku vitaminu C a vzorek se extrahoval metanolem. Jako mobilní fáze byla použita směs metanolu a vody (99:1, v/v). Detekce se provedla pomocí elektrochemického detektoru, přičemž výsledky byly téměř totožné s UV detekcí při 280 nm. Obsah vitaminu A ve vzorcích jogurtů byl 23–31 $\mu g.100g^{-1}$, obsah vitaminu E se pohyboval mezi 57–87 $\mu g.100g^{-1}$ a vitamin D_3 nebyl danými detektory zachycen. [44]

ZÁVĚR

Vitaminy jsou esenciální nízkomolekulární organické látky. Jsou řazeny mezi biokatalyzátory a v organismu se spolupodílí na velkém množství fyziologických pochodů a funkcí.

Lipofilní vitaminy skupiny A a D se vyskytují především v potravinách živočišného původu (játra, rybí tuk a maso atd.), provitaminy vitaminu A karotenoidy se vyskytují ve všech zelených částech rostlin nebo v ovoci (špenát, meruňky apod.). Vitaminy skupiny E se vyskytují především v potravinách rostlinného původu, např. v rostlinných olejích nebo v ořechách. Vitaminy skupiny K se hojně vyskytují v sytě zelené zelenině (brokolice, špenát), a vznikají i jako produkt biosyntézy mikroorganismů v trávicím traktu.

Stanovení lipofilních vitaminů v potravinářském materiálu je relativně složitý úkol, protože se v potravinách vyskytují pouze v malém množství. Některé lipofilní vitaminy patří mezi látky, které za přístupu vzdušného kyslíku, slunečního záření nebo vyšších teplot podléhají degradaci nebo izomeraci na neúčinné formy. Proto se při jejich stanovení musí podmínky v laboratoři přizpůsobit analýze (probublávání hydrolyzační aparatury mírným proudem dusíku, přídavek antioxidantů, umělé osvětlení). Vlastnímu stanovení většinou předchází příprava vzorku (homogenizace), jeho hydrolýza (pomocí KOH), extrakce (organickými rozpouštědly) a případné přečištění. Poté následuje vlastní analýza pomocí různých chromatografických kolon a směsí mobilních fází.

Dříve se pro stanovení těchto vitaminů používaly různé spektrofotometrické metody, ale s dalším rozvojem analytických metod, zejména chromatografických, se využívají nové, přesnější, a často i jednodušší metody pro stanovení – plynová a kapalinová chromatografie. V současné době se pro stanovení lipofilních vitamínů využívá především HPLC. Pro jednotlivé skupiny vitaminů a druhy potravin jsou vyvinuty různé modifikace stanovení, které jsou pro dané vzorky potravin nejvhodnější.

Při stanovení vitaminu A a karotenoidů se po zmýdelnění vzorku provádí extrakce, např. hexanem nebo směsí chloroformu a metanolu, u karotenoidů se používá aceton. Při použití HPLC techniky se mobilní fáze liší podle použitého materiálu a konkrétní metody, může to být např. směs acetonitrilu a metanolu, u karotenoidů směs acetonitrilu, metanolu a dichlormetanu nebo etylacetátu. Jako detektory se využívají UV, fluorescenční nebo MS detektory. Pro stanovení se také mohou použít spektrofotometrické nebo fluorimetrické metody.

Při stanovení vitaminu D se nejčastěji provádí šetrnější studená hydrolýza, vitamin se extrahuje pomocí hexanu a pro HPLC se opět jako detektor nejvíce používá UV, elektrochemický nebo hmotnostní detektor. Kromě HPLC analýzy se může vitamin D stanovit také pomocí GC nebo spektrofotometricky.

Pro izolaci vitaminu E se jako extrakční činidlo může používat hexan, acetonitril, propanol nebo směs hexanu a etylacetátu. Stanovení se provádí pomocí HPLC, GC nebo spektrofotometricky. Mobilní fáze vhodné pro HPLC bývají většinou vícesložkové a mohou to být např. směsi isopropanu a hexanu, metanolu s vodou nebo s acetonitrilem. Jako detektory se opět využívají UV, DAD nebo fluorescenční, ale i další, jako MS a elektrochemický detektor.

Stanovení vitaminu K se provádí v potravinách poměrně málo, protože jeho produkce střevní mikroflórou v lidském organismu bývá u většinou dostatečná. Tento vitamin se z potravin nejčastěji extrahuje pomocí hexanu nebo směsí dichlormetanu a metanolu a stanovení se provádí spektrofotometricky nebo HPLC analýzou. Jako mobilní fáze HPLC techniky se může použít např. směs acetonitrilu, dichlormetanu a metanolu. Nejvíce využívaným detektorem je UV, fluorescenční, MS a elektrochemický detektor.

Pomocí HPLC techniky je možné stanovovat nejen jednotlivé vitaminy, ale i jejich směsi v různých typech potravin. Pro tato stanovení se nejčastěji využívá metoda HPLC se střídáním různých typů a složení mobilních fází během analýzy apod.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] HOZA, Ignác, KRAMÁŘOVÁ, Daniela, BUDÍNSKÝ, Pavel. *Potravinářská biochemie II.*, 1. vyd. Zlín: UTB 2006, 168 s. ISBN

[2] SCHREIBER, Vratislav. *Vitaminy – kdy – jak – proč – kolik*. 1. vyd. Praha: H & H, 112 s.

[3] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 2*, 2. vyd. Tábor: OSSIS 1999, 320 s. ISBN 80-902391-4-5

[4] ŠÍCHO, Vladislav, VODRÁŽKA, Zdeněk, KRÁLOVÁ, Blanka. *Potravinářská biochemie*, 2. vyd. Praha: SNTL 1981, ISBN 04-815-81

[5] MURRAY, Robert K. - *Harperova biochemie*, 23. vyd. Praha: H & H 2002, 872 s. ISBN 80-7319-013-3

[6] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. vyd. Praha: Academia 2002, 371 s., ISBN 80-200-0600-1

[7] HLÚBIK, Pavel, OPLTOVÁ, Libuše. *Vitaminy*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 232 s. ISBN 80-247-0373-4

[8] *Chromatografie a analytické metody vitaminů* [online]. Dostupná z WWW:

<http://sweb.cz/biochemie/x/metody/chromatografie.htm>,
<http://www.sweb.cz/hplc1/vitamin>

[9] ŽAMBOCH, Jan. *Vitamíny*, 1. vyd. Praha: Grada 1996, 77 s.

[10] PRÍBELA, Alexander. *Základy analýzy potravin.* Bratislava: Slovenská vysoká škola technická Bratislava 1981

[11] ŠKÁRKA, Bohumil, FERENČÍK, Miroslav. *Biochémia*. 1. vyd. Bratislava: Alfa 1983, 640 s. ISBN 63-556-83

[12] KARLSON, Peter. *Základy biochemie*. 3. vyd. Praha: Academia 1981, 504 s. ISBN 21-017-81

[13] *Vitamin E* [online]. Dostupný z WWW:
<http://www.hzp.cz/main/clanek.php?id=126z>

[14] HÁLKOVÁ, Jana, RUMÍŠKOVÁ, Marie, RIEGLOVÁ, Jana. *Analýza potravin*, 2. vyd. Újezd u Brna: RNDr. Ivan Straka, vydavatel odborných publikací 2001, 94 s. ISBN 80-86494-02-0

[15] DAVÍDEK, Jiří. *Laboratorní příručka analýzy potravin.* 1. vyd. Praha: STNL, 1977. 719 s. ISBN 04-830-77

[16] Učební texty Univerzity Karlovy. *Chromatografie, toxikologie* [online]. Dostupné z WWW:

<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/welcome.html>,
<http://www.lf1.cuni.cz/Data/files/Toxikologie/GC%->

[17] ČŮTA, František, POPL, Milan, HEJTMÁNEK, Miloš, KARLÍK, Milan, KSANDR, Zbyněk, KUČERA, Zbyněk, POLEJ, Bohumil, VOLKA, Karel. *Instrumentální analýza*, 1. vyd. Praha: SNTL1986, 295 s. ISBN 04-601-86

[18] OPEKAR, František, JELÍNEK, Ivan, RYCHNOVSKÝ Petr, PLZÁK Zbyněk. *Základní analytická chemie*, vyd. Praha: Karolinum 2002, 202 s. ISBN 80-246-0553-8

[19] HÁLKOVÁ, Jana, RUMÍŠKOVÁ, Marie, RIEGLOVÁ, Jana. *Fyzikální chemie laboratorní cvičení díl II*., 1. vyd. Újezd u Brna: RNDr. Ivan Straka, vydavatel odborných publikací 2000, 71 s. ISBN 80-902775-1-9

[20] DAVÍDEK, Jiří, JANÍČEK, Gustav, POKORNÝ, Jan. *Chemie potravin.* 1. vyd. Praha: SNTL/ALFA, 1983. 632 s. ISBN 04-815-83

[21] DAVÍDEK, Jiří a kol. *Chemie potravin.* 1. vyd. Praha: SNTL, 1986. 142 s.

[22] ZÍKA, Jaroslav a kolektiv – *Analytická příručka díl I.,* 4. vyd. Praha: SNTL 1988, 680 s. ISBN 04-606-88

[23] *Učební texty Biologické fakulty Jihočeské Univerzity – plynová chromatografie* [online]. Dostupná z WWW:
<http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/vybrane_kapitoly/plyn_chrom_vyber.htm>,
<http://rum.bf.jcu.cz/tix/sima/analyticka_chemie/separ_met_II.htm>

[24] *Chromatografie* [online]. Dostupná z WWW:
<http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/AJALB.htm>

[25] *Fytochemie: HPLC, GC* [online]. Dostupná z WWW:

<http://faf.vfu.cz/fytochem/hplc_gc.pdf>

[26] DAVÍDEK, Jiří, VELÍŠEK, Jan. *Analýza potravin*. 1. vyd. Praha: VŠCHT 1988, 122 s.

[27] MARASCHIELLO C., GARC´IA REGUEIRO J.A. Procedure for the determination of retinol and a-tocopherol in poultry tissues using capillary gas chromatography with solvent venting injection. *Journal of Chromatography A*, 1998, roč. 818, s. 109–121

[28] MAJCHRZAK, Dorota, FABIAN, Elisabeth a ELMADFA, Ibrahim. Vitamin A content (retinol and retinyl esters) in livers of different animals. *Food Chemistry*. 2006, roč. 98, č. 4, s. 704-710

[29] SUNGPUAG, Pongtorn, TANGCHITPIANVIT, Sommai, CHITTCHANG, Uraiporn WASANTWISUT, Emorn. Retinol and beta carotene content of indigenous raw and home-prepared foods in Northeast Thailand. *Food Chemistry.* 1999, roč. 64, s.163±167

[30] CHOI, Youngmin, JEONG, Heon-Sang a LEE, Junsoo. Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea. *Food Chemistry*. 2007, roč. 103, č. 1, s. 130-138

[31] RAJU, Marisiddaiah, VARAKUMAR, Sadineni, LAKSHMINARAYANA, R., KRISHNAKANTHA, Thirumalai Parthasarathy a BASKARAN, Vallikannan. Carotenoid composition and vitamin A activity of medicinally important green leafy vegetables. *Food Chemistry*. 2007, roč. 101, č. 4, s. 1598-1605

[32] PINHEIRO SANT'ANA, Helena Maria, STRINGHETA, Paulo César, CARDOSO BRANDÃO, Sebastião César a CORDEIRO DE AZEREDO, Raquel Monteiro. Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (Daucus carota L.) prepared by food service. *Food Chemistry*. Leden 1998, roč. 61, č. 1-2, s. 145-151

[33] PERALES S., DELGADO M.M., ALEGRÍA A., BARBERÁ R. a FATRO R. Liquid chromatographic determination of Vitamin D_3 in infant formulas and fortified milk. *Analytica Chimica Acta***.** 6. července 2005, roč.543, č. 1-2, s. 58-63

[34] CLAUSEN,Ina, JAKOBSEN, Jette, LETH, Torben a OVESEN, Lars. Vitamin D_3 and 25-hydroxyvitamin D_3 in raw and cooked pork cuts. *Journal of Food Composition and Analysis***,** Říjen 2003, roč. 16, č. 5, s. 575-585

[35] DELGADO-ZAMARREÑO, M.M., BUSTAMANTE-RANGEL, M., SÁNCHEZ-PÉREZ, A. a CARABIAS-MARTÍNEZ, R. Pressurized liquid extraction prior to liquid chromatography with electrochemical detection for the analysis of vitamin E isomers in seeds and nuts. *Journal of Chromatography A*. 12. listopad 2004, roč. 1056, č. 1-2, s. 249-252

[36] CHO, Il Kyu, RIMA, Jamil, CHANG, Chiou Ling a LI, Qing X.. Spectrofluorometric and high-performance liquid chromatographic determination of all-rac-α-tocopheryl acetate in virgin olive oil. *Journal of Food Composition and Analysis*. Únor 2007, roč. 20, č. 1 , s. 57-62

[37] GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, Anna a SIKORSKA, Ewa**.** Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. *Journal of Chromatography A***,** 10. srpna 2004, roč. 1048, č. 2, s. 195-198

[38] GIMENO, E., CASTELLOTE, A. I., LAMUELA-RAVENTÓS, R. M., DE LA TORRE, M. C. a LÓPEZ-SABATER, M. C. Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 9. června 2000, roč. 881, č. 1-2, s. 251-254

[39] OTLES, Semih a CAGINDI, Ozlem. Determination of vitamin K_1 content in olive oil, chard and human plasma by RP-HPLC method with UV–Vis detection. *Food Chemistry*, 2007, roč. 100, č. 3 , s. 1220-1224

[40] DAMON, Molly, ZHANG, Nancy Z., HAYTOWITZ, David B. a BOOTH, Sarah L. Phylloquinone (vitamin K_1) content of vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*. Prosinec 2005, roč. 18, č. 8, s. 751-758

[41] PÉREZ-RUIZ, Tomás, MARTÍNEZ-LOZANO, Carmen, GARCÍA, M. Dolores a MARTÍN, Jesús. High-performance liquid chromatography–photochemical reduction in aerobic conditions for determination of K vitamins using fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. 2. února 2007, roč. 114, č. 1, s. 67-72

[42] SINGH, Jagdish, UPADHYAY, A.K., PRASAD, Kundan, BAHADUR, Anant a RAI, Mathura. Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in Brassica vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*. Březen 2007, roč. 20, č. 2, s. 106-*112*

[43] SALO-VÄÄNÄNEN, P., OLLILAINEN, V., MATTILA, P., LEHIKOINEN, K., SALMELA-MÖLSÄ, E. a PIIRONEN, V. Simultaneous HPLC analysis of fat-soluble vitamins in selected animal products after small-scale extraction. *Food Chemistry*. Prosinec 2000, roč. 71, č. 4, s. 535-543

[44] DELGADO ZAMARREFIO, M. M., SANCHEZ PEREZ, A., SANCHEZ RODRIGUEZ, M., GOMEZ PEREZ, M. C., HERNANDEZ MENDEZ, J. Determination of fat-soluble vitamins in yogurt by HPLC with electrochemical detection. *Talanta*. 1996, roč. 43, s. 1555-1563

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BHT	Butylhydroxytoluen
GC	Plynová chromatografie
LC	Kapalinová chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
PC	Papírová chromatografie
TLC	Tenkovrstvá kapalinová chromatografie
GLC	Plynová rozdělovací chromatografie
TCD	Tepelně vodivostní detektor
FID	Plamenově – ionizační detektor
ECD	Detektor elektronového záchytu
MS - D	Hmotnostní detektor
RP HPLC	Reverzní HPLC
IEC	Iontově výměnná chromatografie
UV – Vis	Fotometrický detektor
DAD	Detektor s diodovým polem
THF	Tetrahydrofuran

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 All-trans-retinol……...…..14

Obr. 2 β-karoten……...…16

Obr. 3 Ergokalciferol a cholekalciferol…….……..…..18

Obr. 4 Tokoferol a tokotrienol……...19 -20

Obr. 5 Fyllochinon a farnochinon……...…….….22

Obr. 6 Zmýdelňovací aparatura……26

Obr. 7 Příklad chromatogramu…….……30

Obr. 8 Části plynového chromatografu…….…...32

Obr. 9 Ukázka GLC chromatogramu……...…….....32

Obr. 10 Části kapalinového chromatografu……...……...…35

Obr. 11 Vyvíjení chromatogramu při PC a TLC……..…...….38