

Simultánní stanovení vitamínů metodou HPLC

Gabriela Nagyová

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: Gabriela NAGYOVÁ

Studijní program: B 2901 Chemie a technologie potravin

Studijní obor: Chemie a technologie potravin

Téma práce: Simultánní stanovení vitamínů metodou HPLC

Zásady pro vypracování:

- 1. V teoretické části rozebrat význam vitamínů pro lidský organizmus**
- 2. Provést rešerši v oblasti metod stanovení vitamínů rozpustných ve vodě i v tučných metodou HPLC s důrazem na možnosti simultánního stanovení**

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Dle doporučení vedoucího

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Marta Severová

Ústav potravinářského inženýrství a chemie

Datum zadání bakalářské práce:

8. ledna 2007

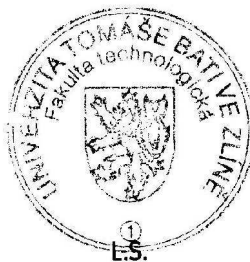
Termín odevzdání bakalářské práce:

4. června 2007

Ve Zlíně dne 2. května 2007

Ignác Hoza

prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
děkan



Ignác Hoza

prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce bylo rozebrat význam vitamínů pro lidský organismus a následně provést literární průzkum simultánního stanovení vitamínů rozpustných ve vodě a v tučích metodou HPLC.

Klíčová slova:

vitamín, HPLC, kolona, mobilní fáze, stacionární fáze

ABSTRACT

The aim of this work was to analyse the amount of vitamins for human organism and subsequently made a literary enquiry of simultaneous determination of water and fat soluble vitamins.

Keywords:

vitamin, HPLC, column, mobile phase, stacionar phase

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji touto cestou vedoucí bakalářské práce Ing. Martě Severové za odborné vedení a pomoc při zpracování práce.

OBSAH

ÚVOD	7
I TEORETICKÁ ČÁST	9
1 CHROMATOGRAFIE	10
1.1 CHROMATOGRAFICKÉ METODY	10
1.2 HPLC.....	11
1.2.1 Sestava kapalinového chromatografu.....	11
1.2.2 Proces separace	18
1.2.3 Chromatografické píky.....	19
1.2.4 Pracovní techniky při vyhodnocování.....	20
1.2.5 Nové trendy V HPLC	21
2 VITAMÍNY	23
2.1 VITAMÍNY ROZPUSTNÉ VE VODĚ	23
2.1.1 Vitamín B ₁ – thiamin.....	23
2.1.2 Vitamín B ₂ – riboflavin.....	24
2.1.3 Vitamín B ₃ – kyselina nikotinová a její amid	24
2.1.4 Vitamín B ₅ – kyselina pantotenová.....	24
2.1.5 Vitamín B ₆ – pyridoxin	25
2.1.6 Vitamín B ₉ – kyselina listová.....	25
2.1.7 Vitamín B ₁₂ – kyanokobalamin.....	26
2.1.8 Vitamín C – kyselina L-askorbová.....	26
2.2 VITAMÍNY ROZPUSTNÉ V TUCÍCH.....	27
2.2.1 Vitamín A – retinol	27
2.2.2 Vitamíny skupiny D – kalciferoly	27
2.2.3 Vitamín E – tokoferoly a tokotrienoly.....	28
3 SIMULTÁNNÍ STANOVENÍ VITAMÍNŮ	29
3.1 SIMULTÁNNÍ STANOVENÍ VITAMÍNŮ ROZPUSTNÝCH VE VODĚ	29
3.2 SIMULTÁNNÍ STANOVENÍ VITAMÍNŮ ROZPUSTNÝCH V TUCÍCH.....	35
3.3 SIMULTÁNNÍ STANOVENÍ VITAMÍNŮ ROZPUSTNÝCH VE VODĚ A V TUCÍCH VEDLE SEBE	39
ZÁVĚR	41
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	42
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	44
SEZNAM OBRÁZKŮ	45
SEZNAM TABULEK	46

ÚVOD

Důležitou skupinou biologicky významných látek, které lidský organismus potřebuje k zabezpečení normálního průběhu látkové přeměny, jsou vitamíny.

Jsou v určitém minimálním množství nezbytné také pro regulaci metabolismu člověka. Nejsou zdrojem energie, ani stavebním materiálem, ale mají ve směs funkci jako součást katalyzátorů biochemických reakcí a bývají často označovány jako exogenní esenciální biokatalyzátory.

Vitamíny obecně patří mezi velmi labilní složky potravin. Jejich základní ztráty jsou zapříčiněny enzymatickým štěpením, oxidací, teplem, působením světla a nebo vyluhováním do vody nebo tuku. K větším či menším ztrátám dochází během technologického zpracování a kulinární úpravě. Na základě toho je lze považovat za indikátory použití správných a šetrných technologických a kulinárních postupů přípravy pokrmů.

Byla vypracována řada metod pro stanovení obsahu vitamínů v potravinách. Jednou z používaných metod je HPLC.

Jde o metodu, při níž se složka separuje z kapalného média. K separaci dochází při průchodu kolonou, kde se látka naváže na sorbent. Koncentrace zkoumané látky se zjišťuje pomocí detektoru, který sleduje jednu nebo více vlastností roztoku vytékajícího z kolony. Výsledky jsou zpracovány v registračním a hodnotícím zařízení, jehož výstupem je chromatogram, kde pro danou látku je za daných podmínek charakteristické umístění a velikost píku.

Vyznačuje se vyznačuje vysokou citlivostí, účinností, přesností, umožňuje analýzu malých koncentrací zájmových látek, reprodukovatelnost měření, trvalý záznam, lze ji automatizovat a kvantifikovatelnost výsledků je snadná.

Pomocí HPLC byly stanoveny vitamíny rozpustné ve vodě a vitamíny rozpustné v tucích. Předností HPLC je, že některé metody umožňují stanovení několika vitamínů současně. Publikovány byly metody umožňující souběžné stanovení některých vitamínů rozpustných ve vodě či tucích.

Cílem předkládané bakalářské práce bylo provést literární průzkum metod simultánního stanovení vitamínů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHROMATOGRAFIE

1.1 Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou dělicí metody založeny na rozdílné distribuci dělených látek mezi dvě různé nemísitelné fáze. Jsou to nejen metody separační (dělicí), ale také metody analytické tzn. že poskytují kvalitativní a kvantitativní informace o vzorku.

Charakteristickým znakem je rozdělování látek tzv. analytů probíhající na základě postupného ustavování řady fázových rovnováh jednotlivých složek dělené směsi mezi dvě vzájemně nemísitelné směsi, které jsou vůči sobě v pohybu. Směs látek je při chromatografickém dělení fixována nepohyblivou (stacionární) fází tzv. sorbent, např. naplní chromatografické kolony, filtračním papírem atd., přes kterou prochází mobilní fáze tzv. eluent. Mobilní fáze vymývá jednotlivé složky ve směru toku. Kinetická rovnováha mezi fázemi se neustále obnovuje a je příčinou selektivity a separační schopnosti kolony. Rozdílné analyty jsou rozdílně zadržovány a rozdílně zpoždovány (retardovány). Kinetická rovnováha mezi fázemi se neustále obnovuje a je příčinou selektivity a separační schopnosti kolony.

Chromatografické metody se mohou dělit podle několika hledisek a to podle povahy mobilní fáze, v tom případě se jedná o metodu plynovou (GC) a kapalinovou (LC). Pokud jde o způsob provedení, pak je to kolonová (sloupcová) a plošná (polární) chromatografie. Pokud budeme chromatografii dělit podle principu separace, potom dostaneme rozdělovací, adsorpční, iontově výměnnou, gelovou a afinitivní. U pracovních způsobů jde o trojí rozdělení a to na eluční, frontální a vytěšňovací. Rozdělení dle účelu je na analytickou a preparativní (preparační) chromatografii [3].

Tabulka 1. Přehled chromatografických technik [3]

Typ chromatografie	Mobilní fáze	Stacionární fáze	Zkratka
plynová rozdělovací	plyn	kapalina	GLC
plynová adsorpční	plyn	tuhá látka	GSC
kolonová kapalinová rozdělovací	kapalina	kapalina	LLC
kolonová kapalinová gelová permeační	kapalina	kapalina	GPC
kolonová kapalinová adsorpční	kapalina	tuhá látka	LSC
kolonová kapalinová iontové výměnná	kapalina	tuhá látka	IEC
Planární kapalinová papírová rozdělovací	kapalina	kapalina	PC
Planární kapalinová tenkovrstvá rozdělovací	kapalina	kapalina	TLC
Planární kapalinová tenkovrstvá adsorpční	kapalina	tuhá látka	TLC

1.2 HPLC

HPLC je velmi citlivá metoda s vysokou účinností, které je dosaženo použitím vysokého tlaku mobilní fáze při dělení látek.

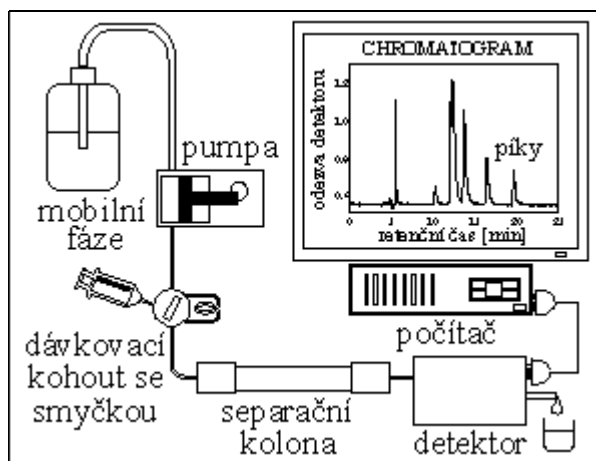
Metoda HPLC má své výhody i nevýhody.

K výhodám se řadí vysoká účinnost. Déle rychlost, kdy dosažení úplného rozdělení je kratší než 1 hodina. Rozlišovací schopnost je také vysoká, protože je možné dělení takových směsí látek, které se jinými metodami nerozdělí. Další výhodou je citlivost, jelikož kvantitativní stanovení látek může probíhat v řádech pikromolů. Z dalších je to snadná automatizace, snadná kvalifikovatelnost výsledků a reprodukovatelnost.

Mezi nevýhody se řadí vysoká pořizovací cena přístroje a malá kapacita tzn. že lze stanovit jen malého množství látky [4].

1.2.1 Sestava kapalinového chromatografu

Moderní kapalinový chromatograf je skládá z několika částí. K základním patří části, které zabezpečují transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci látek, detekci látek, záznam a zpracování dat. Mezi doplňkové části jsou zařazeny ochranné filtry a předkolony, přístroje pro odplynování mobilní fáze, ventily pro přepojování několika kolon dohromady a také se může používat více detektorů řazených za sebou [5].



Obrázek 1. Základní schéma chromatografu [3]

K základním částem patří **čerpadlo mobilní fáze** (pumpa), které plynule dávkuje kapalinu bez kolísání průtoků. Čerpadla jsou trojího druhu a to plynová, velkoobjemná a dvojčinná.

U plynových je zdrojem energie stlačený plyn. Plyn je poté veden přímo nad hladinu kapaliny nebo je od ní oddělen pomocí pístu. Při kontaktu plynu s kapalinou se plyn částečně v kapalině rozpouští, proto je výhodnější oddělit plyn od kapaliny prostřednictvím pístu či membrány. Tato čerpadla jsou obvykle bezpulsní, velmi jednoduchá a levná.

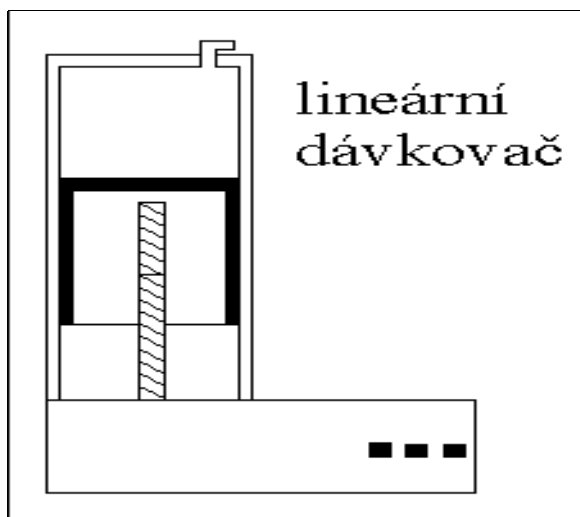
Druhým druhem jsou dvojčinná čerpadla. Tlak na píst je zde vyvoláván mechanicky použitím elektromotoru. Jejich pracovní objem je 100 až 500 ml. Hlavní výhodou je konstantní průtok, nepulsující tlak a vysoká stabilita základní linie detektoru. Mezi nevýhody se řadí to, že cena čerpadel je velmi vysoká z důvodu přesného opracování jednotlivých dílů. Také pomalé ustanovování stabilního průtoku (15 až 60 minut) se řadí mezi nevýhody. Tento typ čerpadla se musí po několika hodinách práce plnit mobilní fází a použitá mobilní fáze musí být odvzdušněna, což je také velice nákladné. Nejčastěji se používá pro práci s vysokými tlaky.

Posledním druhem jsou dvojčinná čerpadla. Jedná se o reciproční čerpadla s malým objemem činné části. Jejich charakteristickým znakem je pulsni tok mobilní fáze. Čerpaná kapalina je vytlačována pístem nebo membránou. Hlava čerpadla je opatřena dvěma ventily - sacím a výtlačným [6].

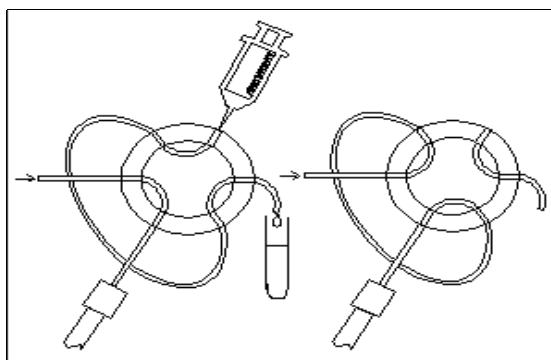
Důležité pro pumpy je nastavení jejich průtoků. Měl by být přesný a reprodukovatelný se směrodatnou odchylkou nižší než 0,5 až 1%. Pumpa musí být zkonstruována z materiálů,

kteřé nepodléhají korozi a musí být odolné agresivním mobilním fázím jako jsou slabě kyselé a bazické roztoky, organická rozpouštědla a tlumivé roztoky. Nejčastěji používaným materiálem je nerezová ocel, titan nebo keramické materiály [6].

Účinnost separace může významně ovlivnit **zařízení pro dávkování vzorku**. Při nedokonalém dávkování může docházet k významnému rozšiřování elučních zón vlivem mimokolonového příspěvku dávkovacího zařízení, zejména při použití vysoce účinných kolon. U dávkovaných vzorků je potřeba dbát na to, aby byly dokonale rozpuštěny. Nejlepší je použít rozpouštědlo o stejném složení jako mobilní fáze. Pokud jsou ve vzorku přítomny tuhé částice, musí být odfiltrovány. Pro dávkování se používají lineární dávkovače nebo dávkovací kohouty. Dávkovací kohouty mají dávkovací smyčku a jsou schopny dávkovat desítky μl [3,6].



Obrázek 2. Schéma lineárního dávkovače [3]



Obrázek 3. Dávkovací smyčka [3]

Velký význam v chromatografii má **kolona**. Výsledek analýzy je určován především kvalitou kolony a její náplně. Jde o rovné trubice s hladkým vnitřním povrchem. Trubice

jsou zhotoveny z materiálu, který je schopen odolat vysokému tlaku. Tlak může dosáhnout až 600 MPa. Musí být také odolné chemickému působení mobilní fáze a separovaných látek. Jako materiál pro kolony se většinou používá bežešvá trubice z kvalitní antikorozní oceli s leštěným vnitřním povrchem nebo tlustostěnná trubice ze speciálně tvrzeného borosilikátového skla. Druhý druh trubic má lepší odolnost chemickou, ale menší mechanickou.

Velikost kolony závisí jak na účelu použití, tak na velikosti náplně. V dnešní době se používají kolony o velikosti 5 až 30 cm s vnitřním průměrem 2 až 4 mm. Jsou plněny částicemi o průměru 3 až 10 μm . Čím je kolona delší, tím je účinnosti separace vyšší, ale na druhou stranu se zvyšuje také doba, po kterou analýza trvá a musí se použít vyšší tlak. Citlivost analýzy roste s klesající délkou a průměrem kolony a sklesajícím průměrem částic náplně. Pokud se použijí krátké kolony (5 až 6 cm), analýza se značně urychlí. Pokud jsou kolony plněny náplněmi s malým průměrem částic (3 μm popř. i menší), je menší spotřeba mobilní fáze při dobré účinnosti separace. Delší kolony s průměrem v řádech centimetrů se využívají v preparativní chromatografii, kde je cílem izolace rozdělených látek po předchozí separaci a kde je snaha zpracovat co nejvíce vzorku. V moderní analytické praxi zcela převažuje použití kolon plněných mikroparticulárními pórovitými náplněmi s částicemi o průměru 3 až 10 μm vzhledem k lepší separaci a kapacitě [6].

Materiál pro stacionární a mobilní fázi je různý dle typu chromatografie. Při kapalinové adsorpční chromatografii LSC se používá silikagel, který vzniká vysrážením gelu kyseliny křemičité z roztoku křemičitanu sodného přidávkem kyseliny chlorovodíkové. Takto vzniklá směs se vypírá vodou, pomalu se suší a následně aktivuje při 300 - 500°C. Šířka pórů bývá 5 až 20 nm a dá se regulovat podmínkami zpracování. Silikagel patří mezi polární nebo kyselé adsorbenty. Jeho specifický povrch bývá zhruba o půl řádu menší než u aktivního uhlí. Jako další se využívá alumina tvořená oxidem hlinitým, která má polární a bazický charakter. Jako poslední se uvádí aktivní uhlí. Aktivní uhlí se připravuje zuhelnatěním organických látek jako např. dřeva, kostí, krve nebo cukru. Kromě uhlíku obsahuje nejen zbytky organických sloučenin, ale i některé anorganické látky, které lze odstranit chemickou cestou. Adsorpční kapacitu uhlí je možno zvýšit aktivací. Aktivačním procesem je zde zahřívání na teplotu 400 až 1000°C za mírně oxidačních podmínek tzn. za přítomnosti vzduchu, chloru nebo vodní páry. Zahřátí vede k desorpci nečistot a k rekrystalizaci amorfního uhlíku za vzniku trhlin a jemných kapilár, a tím ke zvětšení

povrchu. Povrch aktivního uhlí (řádově $1000 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) je tvořen z velké části mikropóry průměru 3 až 9 μm . Aktivní uhlí patří mezi nepolární adsorbenty a příliš se nevyužívá [8].

Pro zlepšení činnosti HPLC se používají **předkolony** nebo **postkolony**. Úkolem předkolony je nasytit silikagelem mobilní fázi, aby nedocházelo k poškozování vlastní analytické kolony. Předkolony se často používají k ochraně kolony při analýzách biologických materiálů. Předkolony a postkolony mohou být využity k derivatizaci analytu před vlastní kolonou, anebo za kolonou.

Důležitou součástí chromatografu jsou **detektory**, které mají za úkol zaznamenat rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující eluovanou (mobilní) složku. Detektory jsou většinou umístěny na konci kolony. Mobilní fáze se může skládat z několika komponent a také zóna eluující kolony může obsahovat směs několika složek. Detektor zaznamenává změnu některé vlastnosti eluentu. Pokud některý z experimentálních parametrů kolísá, detektor tuto změnu vyhodnotí jako šum. Experimentálním parametrem může být průtok mobilní fáze, změna teploty, napětí v síti atd. Šum se projevuje rozkmitaným zápisem nulové linie. Jde v podstatě o šířku pásu, ve které jsou zahrnuta všechna maxima a minima signálu. Eluované látky jsou na výstupu z chromatografické kolony vhodným detektorem sledovány a získaný signál je po lineárním nebo logaritmickém zesílení zaznamenán graficky. Takto získaný záznam umožňuje kvantitativní i kvalitativní zhodnocení analyzované směsi. Citlivost detektoru je závislá na velikosti průtoku mobilní fáze detektorem.

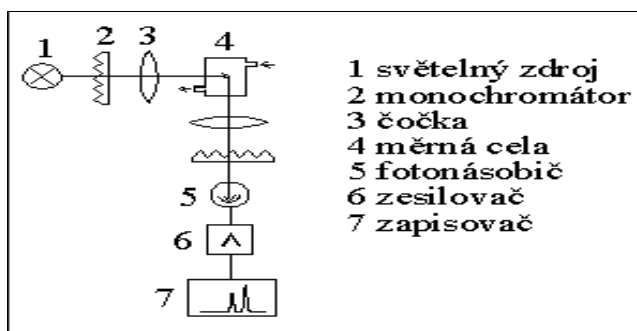
Mezi často používané detektory se řadí UV, UV-DAD, fluorescenční, elektrochemický a refraktometrický. Co jednotlivé detektory měří, jaká je minimální detegovatelná koncentrace, výhody jednotlivých druhů detektoru a nejčastěji analyzované látky jsou uvedeny v následující tabulce [6].

Tabulka 2. Přehled používaných detektorů [9]

		Minimální		
--	--	------------------	--	--

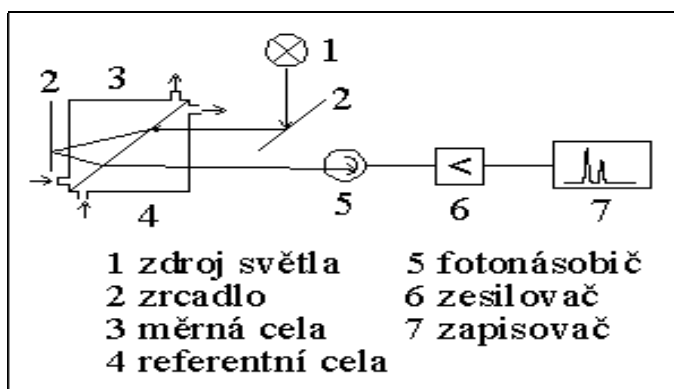
Detektor	Měřená veličina	detegovat. koncentrace [g·cm ⁻³]	Výhody	Analyzované látky
UV (různá vlnová délka)	Absorbance záření	10 ⁻⁹	Nízké náklady, univerzálnost	Organické kyseliny, mastné kyseliny
UV - DAD	Absorbance záření	10 ⁻⁹	Vysoký stupeň čistoty	Antioxidanty, aminy, barviva, mykotoxiny, pesticidy, vitamíny
Fluorescenční	Fluorescence	10 ⁻¹⁰	Vysoká citlivost	Sladidla, močovina, mykotoxiny, vitamíny,
Elektrochemický	Intenzita el. proudu	10 ⁻¹⁰	Vysoká citlivost	Vitamíny, anorganické látky
Refraktometrický	Index lomu	10 ⁻⁶	Univerzálnost	Nearomatické kyseliny, sacharidy

Fluorescenční detektor je určen pro látky vykazující fluorescenci. Je velice citlivý a vysoce selektivní. Zjišťovaný vzorek v čele detektoru absorbuje budící záření, jehož pohlcená energie se zčásti vyzáří ve formě fluorescenčního záření o vyšší vlnové délce než má záření budící (excitační). V praxi se používají rtuťové výbojky a filtr jako zdroj monochromatického excitačního záření. Tímto zařízením je možno měřit fluorescenční záření všech vlnových délek. Citlivost fluorescenčního detektoru je v rozmezí 10⁻⁹ až 10⁻¹¹ g · ml⁻¹. Využívají se především na stanovení DNA nebo RNA, při enzymatických metodách, při interakci protein – ligand a při stanovení dalších fluoreskujících látek. Z přírodních látek jde především o sladidla, mykotoxiny, vitamíny a močovinu [2,6].



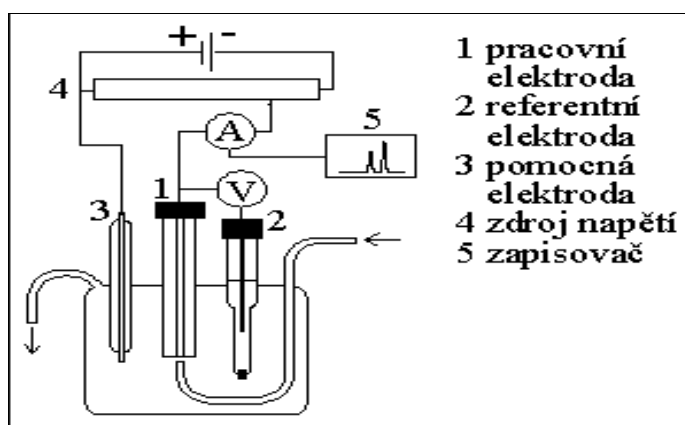
Obrázek 4. Schéma fluorescenčního detektoru [3]

Refraktometrický detektor se vyznačuje nižší citlivostí (málo ovlivnitelný průtokem mobilní fáze) a vyššími mezemi detekce než ostatní detektory. Další nevýhodou je, že odezva je stabilní pouze v případě, že celá detektoru mají konstantní teplotu. Na druhou stranu ale umožňuje zkoumání v podstatě všech látek. Pouze při gradientové eluci jej použít nelze. Čím větší je rozdíl index lomu látky a index lomu mobilní fáze, tím je detektor citlivější. Jeho minimální detegovatelná koncentrace je $10^{-6} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Měřenými vzorky jsou nearomatické kyseliny a sacharidy [6].



Obrázek 5. Schéma refraktometrického detektoru [3]

Elektrochemické detektory jsou selektivní a velice citlivé. Mezi nejdůležitějšími pozitivy tohoto detektoru patří jeho poměrně nízká cena. Jako negativní vlastnost je zde možnost zanášení povrchu tuhých elektrod a vysoké nároky na čistotu mobilní fáze. Detektor je založen na měření proudu při průchodu redukovatelné nebo oxidovatelné látky místem, kde jsou umístěny elektrody, na něž je vloženo pracovní napětí nezbytné k průběhu elektrochemické reakce.



Obrázek 6. Schéma elektrochemického detektoru [3]

Vodivostní detektor je založen na měření elektrické vodivosti mobilní fáze vytékající z kolony mezi dvěma elektrodami. Elektrody mohou být z nerezové oceli, zlata nebo platiny. Citlivost není příliš vysoká, jelikož ve vodných mobilních fázích se mohou vyskytovat stopové ionty nečistot. Další nevýhodou je citlivost detektoru na změny teplot, které probíhají během měření. Vodivostní detektor je po refraktometrickém detektoru druhý nejčastěji používaný [10].

Pro stanovení vitamínů se často používá UV-DAD detektor. Polychromatické světlo z deuteria a wolframové lampy je achromatickým objektivem detektoru zaostřováno na plovoucí částici. Světlo se rozptyluje na povrchu optické mřížky a dopadá na pole s diodou. Pásmo je proměnlivé. Měří se při vlnové délce 190-950 nm. Používá se dvojitá lampa. Pole se většinou skládá z 1024 diod, u nichž každá měří jinou šířku pásma. Velikost pásma závisí na šířce vchodové štěrbin. Vchodová štěrbina může být naprogramována na hodnotu 1 až 16 nm. Podle toho, jakou chceme citlivost, podle toho se volí hodnota štěrbin. Pro největší citlivost je to 16 nm, jelikož při této hodnotě je maximálně propouštěno světlo. Mezi výhody detektoru patří čistota píku a je možno měřit a identifikovat vzorky při různých vlnových délkách. Také data jsou vyhodnocena okamžitě a chromatogram může být vytvořen v 3D prostoru [2].

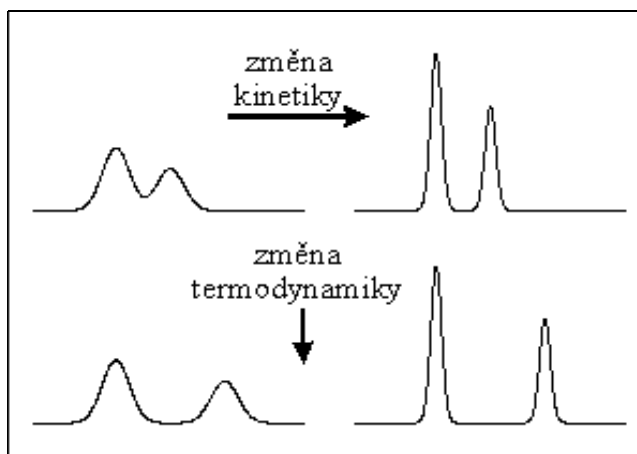
1.2.2 Proces separace

Proces separace probíhá v separační koloně, která obsahuje stacionární (nepohyblivou) fázi tzv. sorbent a mobilní (pohyblivou) fázi jinak také zvanou eluent. Rozdílné analyty (dělené látky) mají rozdílnou afinitu ke stacionární fázi. Různé analyty podléhají různé distribuci (rozdělování).

Při postupu vzorku kolonou se jednotlivé složky vzorku (analytu) dělí a tím pádem dospějí do detektoru v různých retenčních časech.

S tím souvisí jevy termodynamika a kinetika.

Termodynamika a kinetika separace spolu úzce souvisí a obě dvě určují, jak moc se sousední píky v chromatogramu překrývají; tj. jak dokonale nebo nedokonale jsou zóny sousedních analytů vzájemně odděleny. Termodynamika i kinetika separace ovlivňují rozlišení sousedních píků v chromatogramu [3,6].



Obrázek 7. Termodynamika a kinetika separace [3]

Termodynamika separace vychází z několika základních rovnic a pouček.

První z nich vypovídá o objemu mobilní fáze. Objem mobilní fáze má jednotku v ml a zjistíme jej, když objem průtoku mobilní fáze, která má jednotku $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ vynásobíme mrtvým časem kolony. Mrtvý čas kolony je vyjádřen v minutách a je to retenční čas analytu, který není v koloně zadržován. Jde o analyt, který se pohybuje kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze.

Retenční objem analytu, který má jednotku ml, je objem mobilní fáze, který musí projít kolonou, aby se příslušný analyt dostal od počátku ke konci separační kolony. Dá se vypočítat tak, když se objemový průtok mobilní fáze vynásobí retenčním časem i -tého analytu.

Retenční čas s jednotkou minuta se je časový interval od nástřiku vzorku do okamžiku detekce odpovídající průchodu maximální koncentrace látky detektorem.

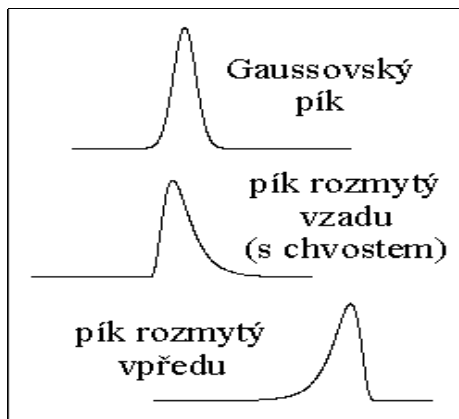
Redukovaný retenční čas je čas, který příslušný analyt stráví ve stacionární fázi. Zjistí se, když se od retenčního času i -tého analytu odečte čas mobilní fáze.

Kinetika separace popisuje to, že zóny dělených látek (analytů) se během postupu kolonou rozšiřují. Zóně analytu v chromatogramu odpovídá pík neboli eluční křivka, která charakterizuje koncentrační profil analytu v zóně.

1.2.3 Chromatografické píky

Zóny separovaných látek procházející detektorem jsou zaznamenávány jako koncentrační profily (chromatografické píky).

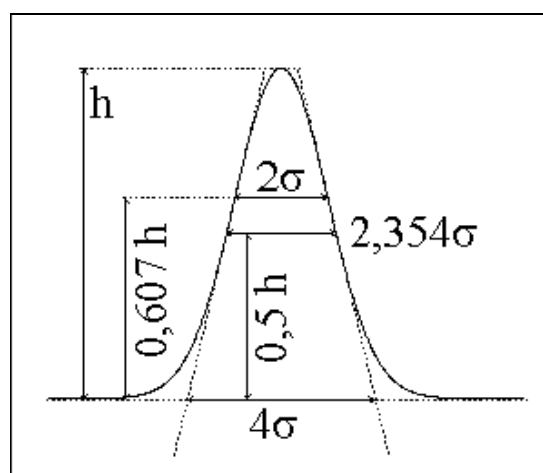
Píky mohou být různého tvaru. Pokud má pík symetrický tvar, pak je tento pík nazýván Gaussovským píkem. Dalšími druhy jsou píky, které své maximum mají rozmyté vpředu nebo vzadu [3,6].



Obrázek 8. Tvary píků [3]

Šířka píku odráží šířku zóny příslušného analytu v koloně. Dá se měřit ve třech místech píku. Prvním druhem měření je při základně, druhým v polovině výšky a třetím druhem měření je mezi inflexními body. Jednotkami měření jsou milimetry a centimetry popřípadě sekundy a minuty.

Plocha píku je plocha vymezená tečnami vzestupné a sestupné linie píku a základní linií. Šířka píku se určuje výhradně metodou numerické integrace [3,6].



Obrázek 9. Příklad výpočtu plochy píku [3]

1.2.4 Pracovní techniky při vyhodnocování

K určení obsahu analyzovaných látek na základě ploch píků jsou v chromatografii používány čtyři základní metody.

Nejjednodušší je metoda **vnitřní normalizace**. Základní podmínkou je, aby všechny složky analyzované směsi byly eluovány. Detektor musí poskytovat lineární, stejně velkou odezvu pro stejné koncentrace všech analyzovaných látek. Procentuální složení směsi se pak určí ze změřených ploch všech elučnicích křivek (analytických signálů, píků). Metoda je velmi jednoduchá, je však problematická, pokud jsou odezvy detektoru pro různé analyty odlišné.

Často je používána metoda **absolutní kalibrace**. Metoda je založena na dávkování známých množství vzorku a standardu za stejných experimentálních podmínek. Vyhodnocení se provádí podle kalibrační křivky nebo přímým srovnáním ploch získaných analytických signálů (píků). Při této metodě je nutné znát alespoň dva nástřiky do kolony (vzorek + standard).

Metoda **vnitřního standardu** se často používá v případě, kdy analýze předchází úprava vzorku. Ze standardu a čisté stanovované komponenty se připraví směs s různým hmotnostním složením a provede se analýza. Sestrojí se kalibrační graf, ve kterém se vynáší poměr ploch píků proti poměru hmotností. Při určování neznámého vzorku se tento vzorek přidá ke známému množství standardu a vyhodnotí se poměr ploch píků vnitřního standardu a stanovované složky. Ze známé hmotnosti vnitřního standardu se určí hmotnost stanovované složky. Není potřeba přesně znát množství nastříkovaných vzorků. Nevýhodou této metody je obtížné hledání vhodné standardní látky. Standard nesmí být přítomen ve vzorku, musí být dobře rozdělen, nesmí interagovat s analytem. Metoda poskytuje přesnější výsledky než absolutní kalibrace.

Poslední používaná je metoda standardního přídatku. Je založena na přidavku definovaného množství stanovované látky ke vzorku. Provádějí se dvě analýzy, první s původním vzorkem, druhá se vzorkem po přidání daného množství stanovované látky. Zvětšení plochy píku je přímo úměrné přidanému množství analytu [11].

1.2.5 Nové trendy V HPLC

Před deseti lety byly nejpoužívanější stacionární fáze 5 μm , dnes jsou nejrozšířenější fáze 3 μm . Stále běžnější jsou komerčně dostupné i sorbenty s velikostí částic pod 2 μm . Zároveň dochází ke zkracování kolon. Výsledkem je pak podstatné zkrácení dob analýz bez ztráty

účinnosti ve srovnání se separacemi provedenými na kolonách tradiční délky (25cm) plněných 5 μm sorbentem. Doba analýz na krátkých kolonách bývá 1 až 2 minuty.

Kromě zkracování kolon dochází také ke zmenšování jejich vnitřního průměru. Tradiční průměr 4,6 mm je nahrazován běžnějšími průměry kolem 3-4 mm. Je také využívána kolona s průměrem 2 mm a menším. Tento trend souvisí především se snahou o zrychlení analýz a také s úsilím o zlepšení ekonomiky provozu a ekologickými hledisky. Spotřeba mobilní fáze, obvykle obsahující organická rozpouštědla, může být takto o mnoho řádů snížena.

Co se porézních sorbentů týče, zachovávají si dlouhodobě dominantní postavení v HPLC. Začátkem 70. let byl připraven silikagel s velikostí zrn menší než 10 μm . Brzy poté byly připraveny jeho první chemicky modifikované formy.

Zpočátku byly částice silikagelu nepravidelného tvaru, ale postupně se podařilo zvládnout technologii výroby částic stejného tvaru a tak zlepšit separační účinnost, ale i další vlastnosti výsledných sorbentů

Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím stabilitu stacionární fáze je teplota. V současné době bývá chromatografická kolona v průběhu separace umístěna v termostatu a analýza obvykle probíhá za konstantní teploty, často o něco vyšší, než je teplota laboratoře, protože díky poklesu viskozity a zrychlení přenosu hmoty dochází ke zlepšení separační účinnosti. Teplotní stabilita bývá uváděna v rozmezí od 5°C do asi 100°C. Obecně ovšem platí, že zvyšování teploty vždy vede k rychlejší degradaci sorbentu, což se zejména projeví při extrémních hodnotách pH.

Moderní trendy ve vývoji a výrobě stacionárních fází směřují k produkci fází se stále větší mechanickou, chemickou a tepelnou odolností. Rozměry kolon a sorbentů se postupně zmenšují, což umožňuje zvýšit separační účinnost, zrychlit analýzy, zlepšit detekční limity [12].

2 VITAMÍNY

Vitamíny jsou exogenní esenciální nízkomolekulární sloučeniny, které organismus nezbytně potřebuje k životu. Heterotrofní organismus si je nedokáže sám syntetizovat a musí být dodávány z vnějšku. Výjimkou je například syntéza niacinu z tryptofanu.

Vitamíny vykonávají v organismu několik funkcí. Jsou prekurzorem kofaktorů různých enzymů, uplatňují se v oxidačně – redukčních systémech.

Termín provitamín označuje látky, které nemají účinek vitamínu, ale v těle se účinkem UV záření nebo enzymů na vitamíny mění.

Antivitamíny jsou látky, které zabraňují plnému využití vitamínů a nebo vitamín inhibují.

Hypovitaminosa je termín pro nedostatek vitamínu v lehčí formě.

Avitaminosa je těžší forma nedostatku vitamínu.

Nadbytek vitamínů se označuje jako hypervitaminosa.

Vitamíny jsou děleny na 2 skupiny dle rozpustnosti na rozpustné ve vodě, které jsou označovány jako hydrofilní a na rozpustné v tucích tzv. lipofilní. Mezi jednotlivými vitamíny neexistují žádné další strukturní vztahy po chemické stránce. Pro jejich označení se používají písmena abecedy, přičemž vitamíny s podobnými fyziologickými účinky jsou odděleny číselnými indexy.

2.1 Vitamíny rozpustné ve vodě

Tyto vitamíny nejsou v organismu ukládány a proto musí být jejich přívod potravou plynulý.

2.1.1 Vitamín B₁ – thiamin

V těle se podílí na rozkládání uhlovodíku na cukry, které uvolňují energii potřebnou pro funkci naší nervové soustavy, svalů a srdce. Účastní se také při odbourávání metabolických produktů lipidů a proteinů.

Zdrojem je většina potravin živočišného původu a to libové vepřové maso, droby a ryby.

Z rostlinných zdrojů lze uvést chléb, hrášek, fazole a kvasnice.

Při nedostatku tohoto vitamínu může dojít k nemoci beri-beri.

2.1.2 Vitamín B₂ – riboflavin

Životně důležitou roli hraje při tvorbě energie z uhlovodíků (cukrů), bílkovin a tuků v rámci látkové přeměny. Je složkou dvou koenzymů a to flavinadenindinukleotidu a flavinmononukleotidu.

Zdrojem je mléko, sýry, maso, kvasnice a vejce. Z rostlinných potravin je to brokolice, chřest, špenát a lipový květ.

Nejsou známy žádné nemoci z nedostatku ani předávkování tímto vitamínem.

2.1.3 Vitamín B₃ – kyselina nikotinová a její amid

Z chemického hlediska se jedná o derivát pyridínu. Existuje ve dvou formách a to jako kyselina nikotinová a její amid nikotinamid.

Je součástí koenzymů oxidoredukčních dějů v podobě NAD (nikotinamidadenindinukleotid) a NADP (nikotinamidadenindinukleotid fosfát).

Mezi jeho hlavní funkce patří to, že snižuje hladinu cholesterolu v krvi a tím přispívá k prevenci kardiovaskulárních onemocnění, snižuje riziko arteriosklerózy a trombózy.

Organismus sám je schopen vitamín B₃ vyrábět z aminokyseliny tryptofanu. Je přítomen ve většině potravin obsahujících bílkoviny kromě mléka a vajíček.

Klasickým syndromem nedostatku vitamínu je pelagra.

Vysoké dávky jsou vylučovány močí a proto nemohou vznikat žádné škody. Pouze těhotné ženy by neměly užívat nadměrné množství tohoto vitamínu, protože je v tomto případě podezření na poškození plodu.

2.1.4 Vitamín B₅ – kyselina pantotenová

Kyselina pantotenová hraje zásadní úlohu v našem metabolismu. Je složkou koenzymu A, který se účastní přeměny tuků, uhlovodíků a proteinů na energii. Je taky důležitý při metabolismu aminokyselin, pyruvátu a produktů glykolýzy. Účastní se Krebsova cyklu, dále je nutný pro syntézu cholesterolu, provitaminu D, žlučových kyselin a steroidních hormonů (adrenokortiko), pohlavních hormonů, porfyrinů a nukleových kyselin. Mezi jeho další funkce patří tvorba protilátek, stimuluje obnovu kožních buněk, zklidňuje pleť, zabraňuje jejím zánětům a zarudnutí při podráždění.

Zdrojem vitamínu je většina potravin. Nejvíce je ho obsaženo v hrášku, fazolích a celozrnných výrobcích.

Vitamín není toxický ani ve vysokých dávkách, přesto byly zaznamenány vzácné případy průjmu u osob, které z toho či onoho důvodu zkonzumovali velké množství tohoto vitamínu.

2.1.5 Vitamín B₆ – pyridoxin

Tento vitamín se vyskytuje ve třech formách a to jako pyridoxal, pyridoxol a pyridoxamin.

Pyridoxal fosfát je součástí enzymů, které se podílejí na dekarboxilaci a transaminaci aminokyselin, dále se jako součást enzymu fosforylázy účastní odbourávání glykogenu z jater, jakmile potřebují svaly energii. Mezi jeho další funkce patří účast na biosyntéze koenzymu A a tím i řady metabolických reakcí jako je glykolýza, tvorba porfyrinů s inkorporací železa do hemu a transmetylace methioninu. Podílí se na Krebsově cyklu a v důsledku toho tvorby energie, metabolismu mastných kyselin, syntézy hemoglobinu a syntézy proteinů. Je také určen k léčení nevolnosti, kterou trpí pacienti podstupivší radioterapii při rakovině a má preventivní a podpůrný účinek při léčbě nervových onemocnění.

Zdrojem vitamínu je čerstvé maso, drůbež, ryby, celozrnné výrobky, kvasnice, sója, mléko a vejce.

Skutečný nedostatek je vzácný, objevuje se pouze u starších osob, u kterých se projevuje únavou, podrážděností, depresí. Může vést k vyrážkám, zánětům sliznic úst a jazyka, popraskaným rtům a u novorozenců k záchvatům.

Jestliže je vitamín B₆ přijímán v nadměrně vysokých dávkách po dobu mnoha měsíců nebo let, mohou se zanítit nervy a způsobit potíže při chůzi.

2.1.6 Vitamín B₉ – kyselina listová

Tento vitamín podporuje tvorbu krve, vytváří v organismu antisklerotické látky, účastní se biosyntézy a metabolismu aminokyselin, bílkovin a nukleových kyselin a na růstových a vývojových procesech. Podílí se na biosyntéze některých složek nervových tkání a proto je důležitý pro správný vývoj a optimální funkci nervového systému v embryonálním stádiu vývoje plodu. Přenáší také methylové skupiny.

Zdrojem vitamínu je libové maso, hovězí ledviny, játra, kvasnice, zelený hrášek, mladá cibulka, zelí, celozrnné výrobky, chléb, vejce.

Nedostatek tohoto vitamínu vede k tvorbě kardiovaskulárních onemocnění, anémii. Během raných stádií těhotenství může vést k deformacím plodu v podobě vydutí části míchy z míšního kanálu plodu, předčasnému narození, případně potratu a k opožděnému vývoji mozku. Dalšími následky mohou být únava, neklid, malomyslnost, roztržitost, slabomyslnost, poruchy spánku, nedostatek životní radosti, poruchy růstu, poruchy trávení, záněty jazyka, záněty sliznice rtů, předčasné šedivění vlasů a chudokrevnost.

2.1.7 Vitamín B₁₂ – kyanokobalamin

Z chemického hlediska se jedná o derivát korinu s obsahem kobaltu.

Je velice důležitý pro dělení buněk a to především červených krvinek. Má své funkce v nervové soustavě a při rozkládání tuků a aminokyselin.

Je obsažen především v živočišných výrobcích a to v mase masných výrobcích, mléce a sýrech, vnitřnostech, rybách, škeblích, vejcích.

Rizika nedostatku jsou především u veganů, ale jsou vzácná. Kojenci veganek, kteří jsou výhradně kojeni mateřským mlékem, jsou vystaveni riziku nedostatku vitamínu B₁₂, které může vést k podrážděnosti, sníženému přibývání hmotnosti, všeobecné ztrátě zdraví a ke sníženému duševnímu rozvoji.

2.1.8 Vitamín C – kyselina L-askorbová

Je důležitý pro tvorbu kolagenu tzn. vazivové tkáně, kostí, chrupavky a zubů, tkáně při zajišťování, poraněních kůže a zlomeninách kostí. Tvoří žlučové kyseliny, hormony a přenašeče v nervové soustavě. Má také vliv na imunitní systém organismu a funkci bílých krvinek. Zvyšuje účinnost příjmu anorganického železa. Brání tvorbě nitrosoaminů v ústech a žaludku, čímž chrání proti zhoubným nádorům. Dále funguje jako antioxidantní činidlo a zpomaluje škodlivé účinky volných radikálů. Pokud je vylučován močí jako kyselina, může mít středně antibakteriální účinek proti infekcím močového ústrojí. Ve vysokých dávkách pomáhá při běžném nachlazení.

Zdrojem vitamínu je ovoce a zelenina a to především zelené a červené papriky, brokolice, špenát, pomeranče a ostatní citrusové plody.

Při nedostatku vzniká nemoc skorbut neboli kurděje, kdy dochází k poruše tvorby kolagenu, zhoubovatění dásní, vypadávání zubů a rány se pomaleji hojí.

Mnoho lidí používá velké dávky vitamínu aby bojovali s rýmou. U některých lidí může docházet ke zvracení, bolestem žaludku a průjmům.

2.2 Vitamíny rozpustné v tucích

Tyto vitamíny mohou být v těle ukládány delší dobu, přičemž vysoký přívod může mít i toxické následky.

Bylo zjištěno, že jimi lze organismus předzásobit.

2.2.1 Vitamín A – retinol

Označení vitamín A pokrývá dvě skupiny chemických sloučenin a to pravý označovaný jako vitamín A₁ (retinol) a vitamín A₂ (3-dehydroretinol), který má pouze 40% účinnost. Po chemické stránce je to terpenový alkohol s beta jononovým kruhem.

Je životně důležitý pro oči, růst, schopnost rozmnožování, normální vývoj kůže a sliznic, růst kostí a zubů a imunitní systém.

Vitamín A se nachází především v potravinách živočišného původu a to v játrech, másle, mléčných výrobcích, žloutku a tuku mořských ryb. Přidává se do některých potravin během výroby, např. do margarínů. Lidský organismus si umí vytvářet vitamín A i z provitamínu beta karotenu.

Nedostatek vitamínu A může způsobit problémy se zrakem v podobě noční slepoty, snížení ochrany proti opotřebení a vysoušení rohovky. Také může dojít k deficitnímu růstu. Hlavním nebezpečím při jeho nadbytku je ohrožení plodu.

2.2.2 Vitamíny skupiny D – kalciferoly

Z chemického hlediska jde o derivát sterolu.

V těle je nutný pro absorpci vápníku a fosforu, srážení krve, udržuje správnou funkci svalů a nervů.

Zdrojem jsou houby, kvasnice, rajčata, kakao, kokos, datle, mléko, rybí tuk a vejce.

Při nedostatku vitamínu může nastat onemocnění ledvin, dále u dospělých nemoc osteomalacie, u dětí rachitis.

V případě předávkování mohou vznikat ledvinové kameny a žaludeční vředy. Docházet může také k demineralizaci kostí.

2.2.3 Vitamín E – tokoferoly a tokotrienoly

Je známo 8 forem vitamínu, přičemž nejúčinnější je alfa tokoferol.

Mezi jeho nejdůležitější funkce patří to, že jako antioxidační činidlo chrání buňky proti volným radikálům. Dále působí na růst a podporuje hojení ran.

Zdrojem jsou rostlinné oleje, suché fazole, arašídy, celozrnné výrobky a listová zelenina. Ze živočišných je to žloutek, sádlo, vnitřnosti, maso a mléko.

Při nedostatku může vznikat anémie anebo poruchy metabolismu nervstva a svalů [1,13].

3 SIMULTÁNNÍ STANOVENÍ VITAMÍNŮ

3.1 Simultánní stanovení vitamínů rozpustných ve vodě

Stanovení vitamínů rozpustných ve vodě metodou HPLC zaznamenalo v poslední době silný nárůst. Byla publikována také řada metodik, při kterých se zároveň separuje a stanoví několik vitamínů současně.

Zpočátku tato stanovení byla testována u standardů a později se aplikovala i při určení vitamínů v jednotlivých potravinách.

Nejkritičtější fází metod, u nichž se určuje několik vitamínů současně, je extrakce, chemické složení potravinového materiálu a stabilita vitamínů ze vzorku. Většina těchto metod byla vyvinuta pro ty vitamíny, které mohou být extrahovány v jednotném postupu z potravin, aniž by došlo k jejich ztrátám.

Jednotlivé faktory ovlivňují simultánní stanovení v různém měřítku. Například stanovení thiaminu je nejvíce ovlivněno délkou alkylového řetězce a pH. Na druhé straně tyto faktory mají však pouze malý vliv při stanovení riboflavinu.

Ne každá metoda je vhodná pro stanovení všech extrahovaných vitamínů. Důvodem může být příliš nízká koncentrace jednoho vitamínu s ohledem na ostatní. Významným omezením mohou být rovněž rušivé látky přítomné v extraktu.

Podmínky metod simultánního stanovení vitamínů rozpustných ve vodě publikované v roce 2003 a zpracované na základě literárního průzkumu jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 3. Základní parametry metod stanovení vitamínů metodou HPLC [9]

Stanovené vitamíny	Stacioární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Teplota [°C]
C, B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₁₂ , kys. folová, biotin	Beta Basic 4 (150mm x 4,6mm)	A: K ₂ HPO ₄ (c=0,05mol·l ⁻¹ ; pH 6,5) B: 50% K ₂ HPO ₄ (c=0,05mol·l ⁻¹ ; pH 3,5) Gradient: 0 min 4% 15 min 40% Průtok: 1 ml·min ⁻¹	UV 205 nm	
C, B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₆	AQUASIL C ₁₈ (150mm x 4,6mm; 5µm)	A: 85% C ₆ H ₁₃ SO ₃ Na (c=0,01mol·l ⁻¹) 1% HOAc. 0,13% triethanolamin ve vodě B: 15% CH ₃ OH Průtok: 1,5 ml·min ⁻¹	UV 275 nm	35
C, B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₆	Convertional C18 (150mm x 4,6mm; 5µm)	A: 85% C ₆ H ₁₃ SO ₃ Na (c=0,01mol·dm ⁻³) 1% HOAc. 0,13% triethanolamin ve vodě B: 15% CH ₃ OH Průtok: 1,5 ml·min ⁻¹	UV 275 nm	35
B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₆	Shodex RSpak NN-814	A: KH ₂ PO ₄ (c=0,045 mol·l ⁻¹) B: Na ₂ HPO ₄ (c=0,055 mol·l ⁻¹) C: 7% CH ₃ OH Průtok: 1 ml·min ⁻¹	UV 210 nm	25
C, B ₁ , B ₃ , B ₆	Shodex Rspak DM-614	A: Na ₂ PO ₄ (c=0,055 mol·l ⁻¹) B: KH ₂ PO ₄ (c=0,045 mol·l ⁻¹) Průtok: 1 ml·min ⁻¹	UV 254 nm	28
B ₂ , B ₆ , B ₁₂	LiChro CART 125-4 Purospher RP-18e (5 µm)	A: CH ₃ OH B: fosfátový pufr (c=0,02 mol·l ⁻¹ ; pH 3,5) 70:30 Průtok: 1 ml·min ⁻¹	UV 280 nm	25
B ₁ , B ₆ , B ₁₂	Purosphere RP-18 (125mmx4mm; 5 µm)	A: fosfátový pufr (c=0,02 mol·l ⁻¹ ; pH 3,5) B: CH ₃ OH 70:30 Průtok: 1 ml·min ⁻¹	UV 254 nm	

Firma Merck uvádí ve svých propagačních materiálech metodiky většinou souběžného stanovení některých vitamínů rozpustných ve vodě. Podmínky těchto metod stanovuje tabulka 4.

Tabulka 4. Základní parametry metod stanovení vitamínů použité firmou Merck [14,15,16,17]

Stanovené vitamíny	Stacioární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Teplota [°C]
B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂	LiChroCART 250-4 LiChrosorb RP-18 (10µm)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ CH₃OH ▪ H₂O ▪ 85% H₃PO₄ s přídavkem 0,65 mg · l⁻¹ C₈H₁₇SO₃H (55:45:1) Průtok: 1,5 ml · min ⁻¹	UV 254 nm	
B ₁ , B ₂ , B ₆ , B ₁₂	LiChroCART 250-4 LiChrosorb RP-18 (5µm)	A: CH ₃ OH B: H ₂ O (80:20) nebo (50:50) Průtok: 2 ml · min ⁻¹	UV 254 nm	
C, kyselina nikotinová	LiChroCART 250-4 LiChrosorb RP-8 (5µm)	A: Acetonitril B: cetyltrimethyl- amoniumbromid pH = 7 (35:65) Průtok: 2 ml · min ⁻¹	UV 262 nm	35
C, nikotinamid, kyselina nikotinová	LiChroCART 250-4 LiChrosorb RP-8 (10µm)	A: Acetonitril B: cetyltrimethyl- amoniumbromid pH = 7 (35:65) Průtok: 2 ml · min ⁻¹	UV 262 nm	35

Zafra-Gómez a spol. se zabývali simultánním stanovením vitamínů rozpustných ve vodě ve fortifikovaných potravinách. Stanovení prováděli v obohaceném mléku, produktech dětské výživy a sušeném mléku jako referenčním materiálu.

Při přípravě pevných vzorků bylo odváženo 0,5g do zkumavky a přidáno 4,5 g vody 40°C teplé. Připravená směs byla homogenizována třepáním 1 minutu. Pak se nechala stát za pokojové teploty 60 minut v temnu. U kapalných vzorků bylo do zkumavky přesně odváženo 5 g homogenizovaného vzorku.

Do zkumavky byl pak přidán 1 g srážecího roztoku, směs byla promíchána 1 minutu při pokojové teplotě a následně dána na 15 minut do temna. Poté bylo provedeno odstředění při 3500 ot · min⁻¹ po dobu 5 minut. Odstředěná kapalina byla filtrována přes 0,22 µm nylonový filtr a dávkována do HPLC kolony. Dávkovaný objem byl 50 µl.

Použitý srážecí roztok byl připraven každý týden čerstvý. Byl složen z 9,1 g octanu zinečnatého; 5,46 g fosfowolframové kyseliny; 5,8 ml ledové kyseliny octové a roztok byl doplněn do 100 ml vodou.

Podmínky separace uvádí tabulka 5.

Tabulka 5. Podmínky separace stanovení vitamínů rozpustných ve vodě

Stacionární fáze	Mobilní fáze	Teplota na koloně	Průtok
Spherisorb-2 (25cm x 4,6mm; 3µm)	gradientová eluce	40°	1,0 ml · min ⁻¹
	A:B		
	99,4:0,6 0,5 min.		
	94:6 4min.		
	70:30 12 min.		
60:40 17 min.			
99,4:40 22 min.			

Mobilní fáze byla tvořena:

A: pufr pH = 2,95; připraven rozpuštěním 6,8 g fosforečnanu draselného, 1,1 g sodné soli kyseliny 1-oktasulfonové a 5 ml triethylaminu v 1 litru vody

B: methanol

K detekci byl použit fluorescenční a UV-DAD detektor. Vlnové délky uvádí tabulka 6.

Tabulka 6. Podmínky detekce stanovení vitamínů rozpustných ve vodě

Vitamín	Detektor	Vlnová délka [nm]
B ₁	UV-DAD	245
B ₂	fluorescenční	520
B ₃	UV-DAD	261
B ₅	UV-DAD	195
B ₆	fluorescenční	410
B ₁₂	UV-DAD	370
C	UV-DAD	282

V citaci je uvedena tabulka srovnávající hodnoty naměřené popsanou metodou a hodnoty udávané v tabulkách.

Tabulka 7. Hodnoty obsahu vitamínů tabelované a naměřené

Vzorek [mg·kg ⁻¹]		Obsah vitamínů [mg·kg ⁻¹]					
		Vitamín C	Vitamín B ₁	Vitamín B ₂	Vitamín B ₃	Vitamín B ₅	Vitamín B ₆
obohacené mléko	uvedené	90	2,1	2,4	27	9	3
	změřené	110	2,1	2,5	30	11,2	3,1
dětská výživa	uvedené	500	6	12	80	30	4
	změřené	490	7,3	14,8	67,8	35	5
UHT mléko	uvedené	12,8	0,33	1,8	0,9	0,35	0,41
	změřené	0	0,33	1,679	0,78	0,356	0,376

Z uvedených výsledků lze na závěr říci, že údaje tabelované a zjištěné měřením jsou stejné anebo odlišné pouze s malými odchylkami [18].

Stanovením vitamínů rozpustných ve vodě se zabýval Vinas a kol. v potravinách pro děti a to konkrétně v mléce, cereálních výrobcích obsahujících med, ovoci a mléčné rýži. V tomto případě bylo speciálně pozorováno to, jak ovlivní obsah vitamínů vysušení výrobku a jeho znovuoživení vodou.

5-10 g vzorku bylo smícháno s 25 ml 0,1 M kyseliny chlorovodíkové a dáno do polypropylenové lahve. Suspenze byla zhomogenizovaná a vložena na 30 minut do horké lázně 90°C teplé. Po ochlazení se upravilo pH na hodnotu 4 pomocí octanu sodného a

přidal se 0,1g enzymu taka-diastry. Takto vzniklý vzorek byl umístěn do vodní lázně 50°C teplé na dobu 2 hodin. Po přidavku kyseliny trichloroctové byla láhev znovu vložena do vodní lázně o teplotě 90°C na dobu 10 minut. Po vychladnutí bylo pH upraveno na hodnotu 6 pomocí 10M hydroxidu draselného. Alikvotní podíl vzniklého vzorku byl dán do centrifugy na 10 minut, následně zfiltrován přes 0,45 µm nylonový filtrační papír a vstříknut do kolony.

Podmínky separace jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 8. Podmínky separace stanovení vitamínů rozpustných ve vodě

Stacionární fáze	Mobilní fáze	Teplota na koloně	Průtok
Rp-Amide C ₁₆ (5µm)	Acetonitril-fosfát	20°C	1,0 ml· min ⁻¹

K detekci byl použit UV-DAD detektor. Vlnové délky pro jednotlivé skupiny vitamínů uvádí tabulka 9.

Tabulka 9 Podmínky detekce stanovení vitamínů rozpustných ve vodě

Vitamín	Vlnová délka [nm]
B ₁ ,B ₂ , kyselina nikotinová	266
B ₆	362
B ₁₂	361

Ve studii byly uvedeny pouze hodnoty již po obnovení vysušených výrobků vodou a to v procentuelní změně obsahu vitamínu. Tyto hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 10. Procentuelní změna obsahu vitamínu v dětských potravinách

Vitamín	B ₁	B ₂	B ₃	B ₆	B ₁₂
Procenta	98,7	99,7	99,7	99,1	96,7

Z uvedené tabulky lze na závěr říci, že ztráty vitamínů rozpustných ve vodě při vysušení byly minimální [19].

3.2 Simultánní stanovení vitamínů rozpustných v tucích

Stanovením vitamínu A a E se zabýval Rodas-Mendoza a kol. v potravinách pro děti. Standardní roztok byl připraven tak, že 1 mg nebo 1 ml zkoumaného vzorku byl smíchán se 100% ethanolem a skladován při teplotě -20°C v tmavé místnosti jeden měsíc.

Vitamíny byly posléze stanoveny dvěma metodami.

Metoda I byla založena na tom, že dětská výživa byla extrahována dichloromethanem a methanolem (2:1). Dichlormethan byl použit namísto chloroformu, který je více toxický a má stejný účinek. Přibližně 25 g z dětské výživy bylo naváženo do Erlenmeyerovy baňky, přidalo se 150 ml dichloromethanu a 75 ml methanu. Vzorek byl poté intenzivně míchán 30 minut při pokojové teplotě. Vzniklý roztok byl zfiltrován, přidalo se 40 ml vody a vše bylo dáno odstředit. Dichlormethanová fáze byla následně odfiltrována pomocí bezvodého síranu sodného. Vzniklý filtrát byl dvakrát promyt 10 ml dichlormethanu. Organická fáze byla odpařena a zbytek rozpuštěn v diethyletheru. Solvent byl poté dán vysušit do rotační odparky. Zbytek obsahující tuk byl umístěn do tmavé zkumavky, která byla naplněna dusíkem, pevně uzavřena a umístěna do místnosti s teplotou -20°C . 0,5 g takto vzniklého extraktu bylo umístěno do centrifugy a poté rozpuštěno pomocí 1 ml ethanolu. Vzniklá směs byla smíchána s 200 μl *n*-hexanu. Před vstříknutím do kolony byl vzorek ještě přefiltrován přes 0,45 μm nylonový filtr.

Metoda II byla založena na stejném principu s tím rozdílem, že nebyl vzat 0,5 g ale 1 g extraktu.

Podmínky stanovení jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 11. Podmínky stanovení vitamínu A a E

Stacionární fáze	Mobilní fáze	Průtok	Detekce vitamínu A	Detekce vitamínu E	Teplota
ODS2 C ₁₈ , 250x4,6mm i.d. (5 μm)	methanol	1 [ml·min ⁻¹]	UV 325 nm	UV 292 nm	50 [$^{\circ}\text{C}$]

Naměřené hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 12. Stanovené množství vitamínu A a E

	vit. A (μg retinolu/100g)	vit. E (mg α-Tokoferol)
Metoda I	15,90	201,3
Metoda II	18,09	330,4

Z výše uvedené přípravy vzorku by se očekávalo, že zjištěný obsah vitamínů druhou metodou bude dvojnásobný, ale výsledky tuto skutečnost nepotvrdily [20].

Stanovením vitamínu A a E v dětské výživě se zabýval Chavez-Servín a kol. V tomto projektu byly provedeny 3 metody stanovení, které byly na konci průzkumu vyhodnoceny.

Metoda I byla provedena tak, že 250 miligramů dětské výživy v prášku byly smíchány s 4 ml ethanolu a homogenizovány na dobu 4 minut. Poté byl přidán 1 ml hexanu. Vše bylo dáno homogenizovat po dobu 3 minut. Poté byl přidán ještě 1 ml hexanu a rehomogenizován 1 minutu. Nakonec byl přilít 1 ml vody a vše bylo vloženo do centrifugy na 5 minut.

Hexanová fáze byla přefiltrována přes 0,22 μm nylonový filtr a poté bylo 20 μl vstříknuto do kolony.

Vzorek metody II byl zhotoven z 1 ml 20% roztoku dětské výživy. Tento roztok byl smíchán s 5 ml dichlormethanu a methanolu (2:1) a mechanicky míchán 3 minuty. Poté bylo vše necháno 5 minut stát. Nakonec byl přidán 1 ml roztoku NaCl a vzorek byl umístěn do centrifugy na 10 minut. Organická fáze byla obnovena a vysušena dusíkem a 1 ml hexanu. Dále se pokračovalo jako v metodě I.

V metodě III byla tuková frakce extrahována dichlormethanem a methanolem (2:1). Z tohoto vzorku se odebralo 50 mg, přidal se 1 ml hexanu a dále se pokračovalo jako v metodě I.

Podmínky stanovení jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 13. Podmínky stanovení vitamínu A a E

Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce vitamínu A	Detekce vitamínu E
-------------------------	---------------------	---------------------------	---------------------------

Zipax HPC (50mm x 2,1mm; 3µm)	A: ethylacetát B: hexan	UV 325 nm	UV 292 nm
-------------------------------------	----------------------------	--------------	--------------

Metoda I byla vyhodnocena jako ne příliš vhodná z důvodu nízké obnovy vitamínů.

Metoda II ukázala lepší výsledky než metoda I. Hlavním problémem ale byl s obnovou dichlormethanové fáze.

Metoda III prokázala nejlepší výsledky [21].

Stanovením vitamínu E se zabýval Hewavitharana a kol. v kuřecím masu.

Vzorek byl odebrán 24 hodin postmortem, vakuově zabalen a dán do teploty -20°C. Kousek masa byl rozsekán a 1 gram byl poté vložen do 50 ml polyethylenové tuby. Bylo odebráno 300µl vzorku a přidány 4 ml ethanolu. Směs byla homogenizována 30 sekund, smísená s 5 ml destilované vody a homogenizována 15 sekund. Vše bylo nakonec dáno do centrifugy na dobu 10 minut. 100 µL vzorku bylo vstříknuto do HPLC kolony.

Tabulka 14. Podmínky stanovení vitamínu E v kuřecím masu

Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce
Lichrosphere Si 100 (250mmx4,6mm;5µm)	A: 4% 1,4-dioxan B: 0,04% kyselina octová	fluorescenční 295 nm

Zjištěné množství udává následující tabulka.

Tabulka 15. Naměřené množství vitamínu E

Vitam.	α-tokoferol	γ-tokoferol	α-tokotrienol	β-tokotrienol	γ-tokotrienol	δ-tokotrienol
Obsah	0,73 ng	0,86 ng	1,0 ng	1,2 ng	1,7 ng	1,3 ng

Tato studie byla provedena na zjištění obsahu všech forem vitamínu E v kuřecím masu [22].

Vitamín E byl stanoven z výrobků pro děti. 1ml vzorku byl rozmíchán s 5 ml chloroformu a methanolu (poměr 2:1) a 3 minuty mechanicky míchán. Poté byl vzorek nechaný 5 minut

odležet, přidal se 1 ml vody a vše bylo dáno do centrifugy na 10 minut. Chloroformová fáze byla ze vzorku odstraněna dusíkem. Nakonec byl k roztoku přidán 1ml *n*-hexanu a roztok byl přefiltrován přes 0,2 µm membránu. Podmínky stanovení jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 16. Podmínky stanovení vitamínu E z výrobků pro děti

Stacionární fáze	Mobilní fáze	Průtok [ml·min ⁻¹]	Detekce
Nova-Pak (150x3,9mm; 5µm)	A: <i>n</i> -hexan B:ethylacetát (98:2)	neuveden	fluorescenční 295 nm

Na obale byl uveden obsah vitamínu E $271 \pm 25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a zjištěná hodnota metodou HPLC byla $275 \pm 19 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, což je s uvedenou možnou odchylkou malý rozdíl [23].

Stanovení vitamínu E provedl také výzkum pro kvalitu a bezpečnost potravin. V tomto případě byla použita také metoda HPLC a detekce byla provedena UV detektorem. Podmínky stanovení vitamínu E a potraviny, ve které byl obsah vitamínu měřen jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 17. Podmínky stanovení vitamínu E [24]

Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Potravina
Spheri-5 RP-18 (100 mm x 2,1mm; 5µm)	A: methanol B: voda (95:5)	UV 300 nm	rostlinný olej
Zorbax ODS (250 mm x 4,6mm; 5µm)	A: acetonitril B: methanol C: CH ₂ Cl ₂ (60:35:5)	UV 295 nm	palmový olej
YMC Pack- C30 (250mm x 4,6mm; 3µm)	A: aceton-voda B: AgClO ₄ (90:10)	UV 295 nm	potraviny
YMC Pack- C30 (250mm x 4,6mm;	methanol	UV	palmový olej

3 μ m)		295	
------------	--	-----	--

3.3 Simultánní stanovení vitamínů rozpustných ve vodě a v tucích vedle sebe

Stanovením vitamínu C a karotenů z rajčat se zabýval Abushita a spol.

Vzorek byl připraven tak, že 10 gramů rajčatové šťávy bylo smícháno s 20 ml methanolu. Ke vzniklé směsi bylo přidáno 60 ml CCl_4 a methanolu (poměr 3:1) a vše bylo dáno míchat po dobu 20 minut. Nakonec by přidán síran sodný. Vzniklý filtrát byl odstředěn a sušen v prostředí vakua při 40°C. Extrahované lipidy byly zmýdelněny přidávkem 4 ml 30% KOH, vzorek byl zahříván na stupeň varu methanolu s přítomností vitamínu C. Po ochlazení bylo přidáno 15 ml vody se solí a poté dvakrát extrahováno etherem, který byl posléze odpařen a vzorek byl nakonec dvakrát promyt destilovanou vodou.

Pro stanovení vitamínu C z rajčat byl vzorek smíchán s 50 ml 2% metafosforečné kyseliny, intenzivně míchán 15 minut a poté filtrován.

Podmínky stanovení jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 18. Podmínky stanovení vitamínu A a C

Vitamín	Kolona	Mobilní fáze	Průtok [ml·min ⁻¹]	Detektor	Vlnová délka[nm]
A	Chromsil C-18 (46x250m m; 6 μ m)	A:Acetonitril B: isopropanol C: methanol D: voda (29:52:5:4)	0,9-1,2	Visible 440	neuvedena
C	Lichrosorb C-18 (46x250m m; 10 μ m)	A:0,1M KH_2PO_4 B: methanol C: TBAOH (97:3:0,05)	1	UV	225

Výsledný obsah vitamínu A byl 60-100mg, vitamínu C 25-37 mg a vitamínu E 6-10mg [25].

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo provést literární průzkum simultánního stanovení vitamínů rozpustných ve vodě a v tucích metodou HPLC.

První část byla zaměřena na popis samotné chromatografické metody. Byly zde popsány jednotlivé části přístroje včetně jejich funkcí, pracovní techniky při vyhodnocování chromatogramu a také nové trendy, které přispěly ke zlepšení a zrychlení stanovení vitamínů.

V druhé části byly zkoumány jednotlivé vitamíny a to jak po chemické stránce, tak také jejich zdroje, hlavní funkce a problémy, které mohou nastat, pokud je přijat nadbytek nebo nedostatek určitého vitamínu.

Jako jedna z nejlepších se pro sledování samotného obsahu vitamínů, a nebo jejich ztrát kulinárními úpravami, skladováním či jinými faktory, osvědčila metoda HPLC. Proto bylo na základě literárního průzkumu provedeno simultánní stanovení vitamínů a to jak rozpustných ve vodě, tak i v tucích.

V této práci jsou uvedeny nejnovější studie týkající se nejen samotného stanovení, ale také přípravy vzorků a vhodnosti použití jednotlivých podmínek.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VELÍŠEK, J.: *Chemie potravin 2* 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999.
ISBN 80-902391-2-9
- [2] http://faf.vfu.cz/fytochem/hplc_gc.pdf [cit. 2007-02-12]
- [3] <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html> [cit. 2007-02-23]
- [4] VOET, D., VOETOVÁ, J.: *Biochemie* 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995.
ISBN 80-85-605-44-9
- [5] CHURÁČEK, J. a kol.: *Analytická separace látek* 1.vyd. Praha: SNTL, 1990.
ISBN 80-03-00569-8
- [6] http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa.htm [cit. 2007-04-01]
- [7] CHURÁČEK, J.: *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod* 1 vyd. Praha: Academia, 1993. ISBN 80-200-0010-0
- [8] Bartovská L., Šišková M.: *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 5. vyd.
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2005. ISBN 80-7080-579-X
- [9] DRABINOVÁ, M.: *Diplomová práce na téma stanovení vitamínů rozpustných ve vodě metodou HPLC*, Vyškov 2003
- [10] KOMÁREK, K. a kol.: *Reakční chromatografie v organické analýze* 1. vyd.
Praha: SNTL, 1989. ISBN 80-03-00153-6
- [11] ŠTULÍK, K. a kol. : *Analytické separační metody* 1. vyd. Praha: UK Karolinum,
ISBN 80-246-0852-9
- [12] Chemické listy, 190-199, 2007
- [13] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., BUDÍNSKÝ, P.: *Potravinářská biochemie II.*,
1. vyd. Zlín 2006. ISBN 80-7318-395-1
- [14] Merck, HPLC Application Note 643
- [15] Merck HPLC Application Note 669
- [16] Merck, HPLC Application Note 820443

- [17] Merck, HPLC Application Note 820445
- [18] Journal of Agricultural and Food Chemistry, J.Arcic.Food Chem. 2006, 54,
4531-4536
- [19] Journal- of- Chromatography-A. 2003; 1007
- [20] Journal- of- Chromatography-A. 2003; 1018 (2); 36 ref.
- [21] Journal- of- Chromatography-A. 2006; 1122 (1-2)
- [22] Journal- of- Chromatography-A. 2004; 1025(2); 11 ref.
- [23] Journal- of- Chromatography-A. 2002; 947 (1); 19 ref.
- [24] Journal-of-Chromatography-A. 2000; 881
- [25] Food Chemistry, vol. 60, No.2; 1997

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

DAD	Detektor diodového pole
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
GC	Plynová chromatografie
GLC	Plynová rozdělovací chromatografie
GPC	Kolonová kapalinová gelová permeační chromatografie
GSC	Plynová adsorpční chromatografie
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IEC	Iontově výměnná chromatografie
LC	Kapalinová chromatografie
LLC	Kapalinová rozdělovací chromatografie
LSC	Kapalinová adsorpční chromatografie
NAD	Nikotiamidadenindinukleotid
NADP	Nikotiamidadenindinukleotid fosfát
PC	Planární kapalinová papírová rozdělovací chromatografie
RNA	Ribonukleová kyselina
RP	Reverzní fáze
TLC	Planární kapalinová tenkovrstvá rozdělovací a adsorpční chromatografie
UV	Ultrafialová

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Základní schéma chromatografu.....	11
Obrázek 2. Schéma lineárního dávkovače.....	12
Obrázek 3. Dávkovací smyčka.....	13
Obrázek 4. Schéma fluorescenčního detektoru.....	15
Obrázek 5. Schéma refraktometrického detektoru.....	16
Obrázek 6. Schéma elektrochemického detektoru.....	16
Obrázek 7. Termodynamika a kinetika separace.....	18
Obrázek 8. Tvary píků.....	19
Obrázek 9. Příklad výpočtu plochy píku.....	19

SEZNAM TABULEK

Tabulka	1.	Přehled	chromatografických	
technik.....				10
Tabulka	2.	Přehled	používaných	
detektorů.....				15
Tabulka	3.	Základní parametry metod stanovení vitamínů metodou HPLC.....		29
Tabulka	4.	Základní parametry metod stanovení vitamínů použité firmou Merck.....		30
Tabulka	5.	Podmínky separace vitamínů rozpustných ve vodě.....		31
Tabulka	6.	Podmínky detekce stanovení vitamínů rozpustných ve vodě.....		32
Tabulka	7.	Hodnoty obsahu vitamínů tabelování a naměřené.....		32
Tabulka	8.	Podmínky separace stanovení vitamínů rozpustných ve vodě.....		33
Tabulka	9.	Podmínky detekce stanovení vitamínů rozpustných ve vodě.....		33
Tabulka	10.	Procentuelní změna obsahu vitamínu v dětských potravinách.....		33
Tabulka	11.	Podmínky stanovení vitamínu A a E.....		34
Tabulka	12.	Stanovené množství vitamínu A a E.....		35
Tabulka	13.	Podmínky stanovení vitamínu A a E.....		35

Tabulka 14.	Podmínky stanovení vitamínu E v kuřecím mase.....	36
Tabulka 15.	Naměřené množství vitamínu E.....	36
Tabulka 16.	Podmínky stanovení vitamínu E z výrobků pro děti	37
Tabulka 17.	Podmínky stanovení vitamínu E.....	37
Tabulka 18.	Podmínky stanovení vitamínu A a C.....	38

