

Možnosti stanovení vitamínu D metodou HPLC

Eva Salvetová

Bakalářská práce
2008



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav potravinářského inženýrství
akademický rok: 2007/2008

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Eva SALVETOVÁ**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Možnosti stanovení vitamínu D metodou HPLC**

Zásady pro vypracování:

1. Teoretické pojednání o vitamínu D.
2. Zpracování principu HPLC.
3. Shrnutí chromatografických podmínek pro stanovení vitamínu D.
4. Závěr.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Snyder, Lloyd R., Kirhland, Joseph J., Glajch, Joseph L., Practical HPLC method development, 2nd ed., John Willey & Sons, Inc., 1997, s.175

Klouda, P., Moderní analytické metody, 2.vyd., nakladatelství Pavel Klouda, 2003, s.25

Mattila, P., Piironen, V., Uusi-Rauva, E., Koivistoinen, P., Determination of 25-hydroxycholecalciferol content in egg yolk by HPLC, Journal of food composition and analysis, 6, 1993, s.250-255

Mattila, P., Piironen, V., Uusi-Rauva, E., Koivistoinen, P., Cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol contents in fish and fish products, Journal of food composition and analysis, 8, 1995, s.232-243

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

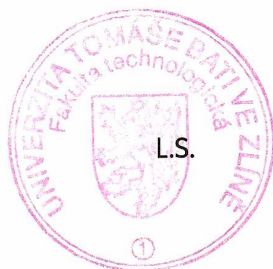
19. listopadu 2007

Termín odevzdání bakalářské práce:

31. května 2008

Ve Zlíně dne 12. května 2008

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Tato práce je zaměřena na způsob stanovení vitamínu D pomocí HPLC. V první části je popsán mechanismus vzniku tohoto lipofilního vitamínu a jeho fyziologie. Další část zpracovává princip metody HPLC. Třetí část je pak zaměřena na využití této metody při stanovení vitamínu D v konkrétních surovinách či potravinách. Význam vitamínu D spočívá v účasti při vstřebávání vápníku a fosfátu ze střeva a přispívá tak k regulaci a optimalizaci jejich hladiny v krvi. HPLC je jedna z nejpoužívanějších metod při stanovování všech vitamínů, tedy i vitamínu D. Jedná se o separační fyzikálně-chemickou metodu, která slouží k rozdělení složek vzorku rozpuštěného v roztoku mezi mobilní a stacionární fázi.

Klíčová slova: vitamin D, HPLC

ABSTRACT

The aim of this thesis is focused on method of determination of vitamin D by HPLC. In the first part mechanism of origin this liposoluble vitamin and its physiology is described. Next part describes principle of HPLC method. The third part is focused on using this method in determination of vitamin D in raw materials or foods. The importance of vitamin D consists in attendance in absorption of calcium and phosphate from intestine and support regulation and optimalization of their level in blood. HPLC is one of the most widely used method to determination all of the vitamins. It is separative physical-chemical method, which is used to separate components in sample, which is dissolved in solution, between mobile and stationary phases.

Keywords: vitamin D, HPLC

Děkuji vedoucímu své bakalářské práce Ing. Daniele Kramářové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky a také za zapůjčení studijních materiálů.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvolněno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně

.....

Podpis diplomanta

OBSAH

ÚVOD	8
1 VITAMIN D	9
1.1 HISTORIE VITAMINU D A JEHO CHEMISMUS.....	9
1.2 FYZIOLOGIE VITAMINU D.....	13
1.3 ZDROJE VITAMINU D	14
1.4 AVITAMINOSA A HYPERVITAMINOSA	16
2 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE	18
2.1 ČÁSTI KAPALINOVÉHO CHROMATOGRAFU PRO RP-HPLC	19
2.1.1 Zásobník mobilní fáze.....	19
2.1.2 Pumpa.....	20
2.1.3 Dávkovací ventil	21
2.1.4 Předkolona.....	21
2.1.5 Kolona	21
2.1.6 Detektor.....	23
2.1.6.1 UV/ VIS HPLC detektory	24
2.1.6.2 Fluorescenční HPLC detektory	25
2.1.6.3 Elektrochemické HPLC detektory	27
2.1.6.4 Vodivostní HPLC detektory.....	28
2.1.7 Chromatogram.....	29
3 STANOVENÍ VITAMINU D CHROMATOGRAFICKY V KONKRÉTNÍCH SUROVINÁCH	31
3.1 STANOVENÍ CHOLEKALCIFEROLU A 25-HYDROXYCHOLEKALCIFEROLU V RYBÁCH A RYBÍCH VÝROBCÍCH	31
3.1.1 Použité suroviny.....	31
3.1.2 Průběh stanovení	31
3.1.3 Podmínky stanovení	31
3.2 STANOVENÍ 25-HYDROXYCHOLEKALCIFEROLU VE VAJEČNÉM ŽLOUTKU	32
3.2.1 Použité suroviny.....	32
3.2.2 Průběh stanovení	32
3.2.3 Podmínky stanovení	32
3.3 PŘEHLED STANOVENÍ VITAMINU D V MLÉČNÝCH PRODUKTECH	33
3.3.1 Použité suroviny.....	33
3.3.2 Průběh stanovení	33
3.3.3 Podmínky stanovení	34
3.4 CHOLEKALCIFEROL A 25-HYDROXYCHOLEKALCIFEROL V SYROVÉM A VAŘENÉM VEPŘOVÉM MASE.....	34
3.4.1 Použité suroviny.....	34
3.4.2 Průběh stanovení	35
3.4.3 Průběh stanovení	35
ZÁVĚR	36
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	38

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	40
SEZNAM OBRÁZKŮ	41
SEZNAM TABULEK.....	42

ÚVOD

Vitamin D se řadí mezi lipofilní vitaminy, tj. vitaminy rozpustné v tucích. Pod tímto pojmem se v praxi rozumí především vitamin D₂ (ergokalciferol) a vitamin D₃ (cholecalciferol).

Vitamin D₂ je produkován při ozáření rostlinného sterolu ergosterolu. Vitamin D₃ se tvoří v kůži působením slunečního záření z provitaminu, kterým je 7-dehydrocholesterol.

Hlavními zdroji vitaminu D jsou rybí tuk, tresčí játra, sardinky, sledi, vaječný žloutek, fortifikované margariny a mléčné výrobky.

Jeho význam spočívá v účasti při vstřebávání vápníku a fosforu ze střeva a přispívá tak k regulaci a optimalizaci hladiny těchto minerálních látek, které jsou důležité pro stavbu kostí a zubů, v krvi. S tím také souvisí i fakt, že dostatečné množství vitaminu D je důležitým faktorem při prevenci onemocnění rachitidy, osteomalacie a také osteoporózy.

Avitaminosa vitaminu D se projevuje měknutím kostí v důsledku ztrát a nedostatečného vstřebávání vápníku a fosforu. U dětí se toto projevuje jako křivice, u dospělých pak jako osteomalacie.

Hypervitaminosa vitaminu D narušuje metabolismus vápníku a fosforu a vede k hyperkalcemii. Samotné sluneční záření nevede k hypervitaminose.

Pro stanovení vitaminu D v potravinách se nejčastěji používá metoda HPLC.

1 VITAMIN D

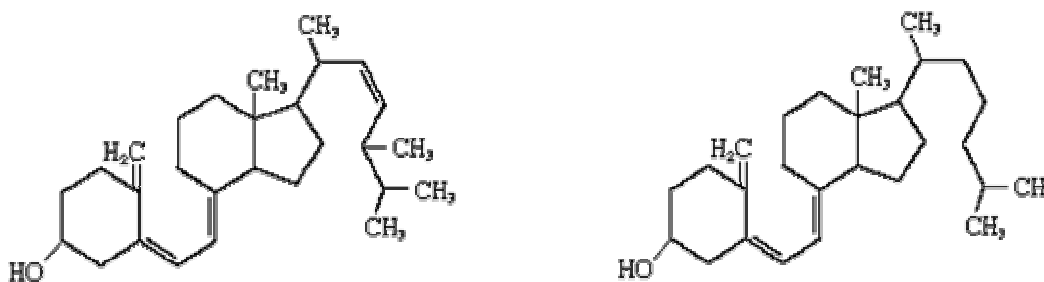
Vitamin D je v tucích rozpustný vitamin, který přispívá k udržení homeostáze vápníku a fosforu v našem organismu [1]. Pod pojem vitamin D se řadí skupina příbuzných lipofilních steroidních látek s antirachitickým účinkem, nazývaná kalciferoly. Nejvýznamnější z nich jsou ergokalciferol (vitamin D₂) a cholekalciferol (vitamin D₃), které se navzájem liší pouze postranními řetězci [2].

Tabulka 1 Formy vitaminu D [1]

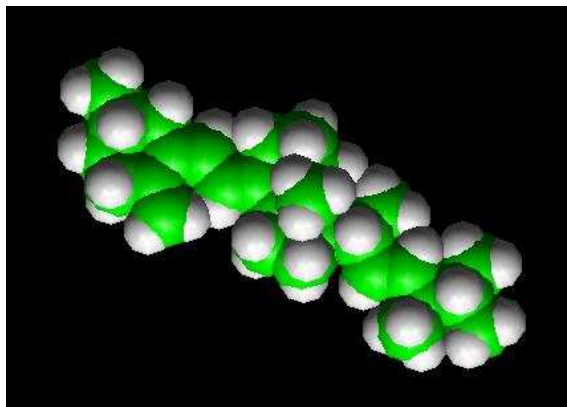
Vitamin D₁	lamisterol
Vitamin D₂	ergokalciferol (vzniká z ergosterolu)
Vitamin D₃	cholekalciferol (vzniká ze 7-dehydrocholesterolu)
Vitamin D₄	dihydotachysterol (22:23-dihydrovitamin D ₂)
Vitamin D₅	vzniká ozářením 7-dehydrositosterolu

1.1 Historie vitaminu D a jeho chemismus

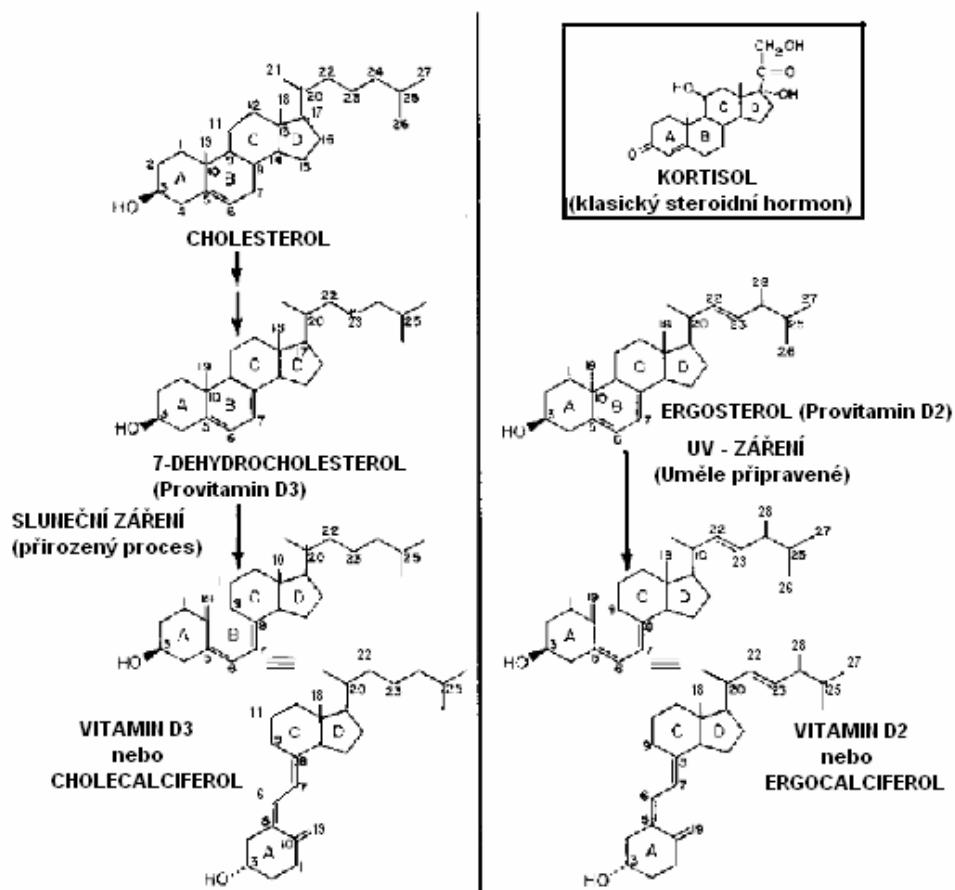
Chemická struktura vitaminu D byla určena ve 30. letech 20. století v laboratoři profesora A. Windause na univerzitě Göttingen v Německu. Prakticky současně bylo prokázáno, že antirachitická složka oleje z tresčích jater je stejná jako nově popsany vitamin D₃. Tyto výsledky taktéž naznačily, že vitamin D je po chemické stránce steroid [3].



Obr. 1 Vitamin D₂ a D₃



Obr. 2 3-D model vitamínu D

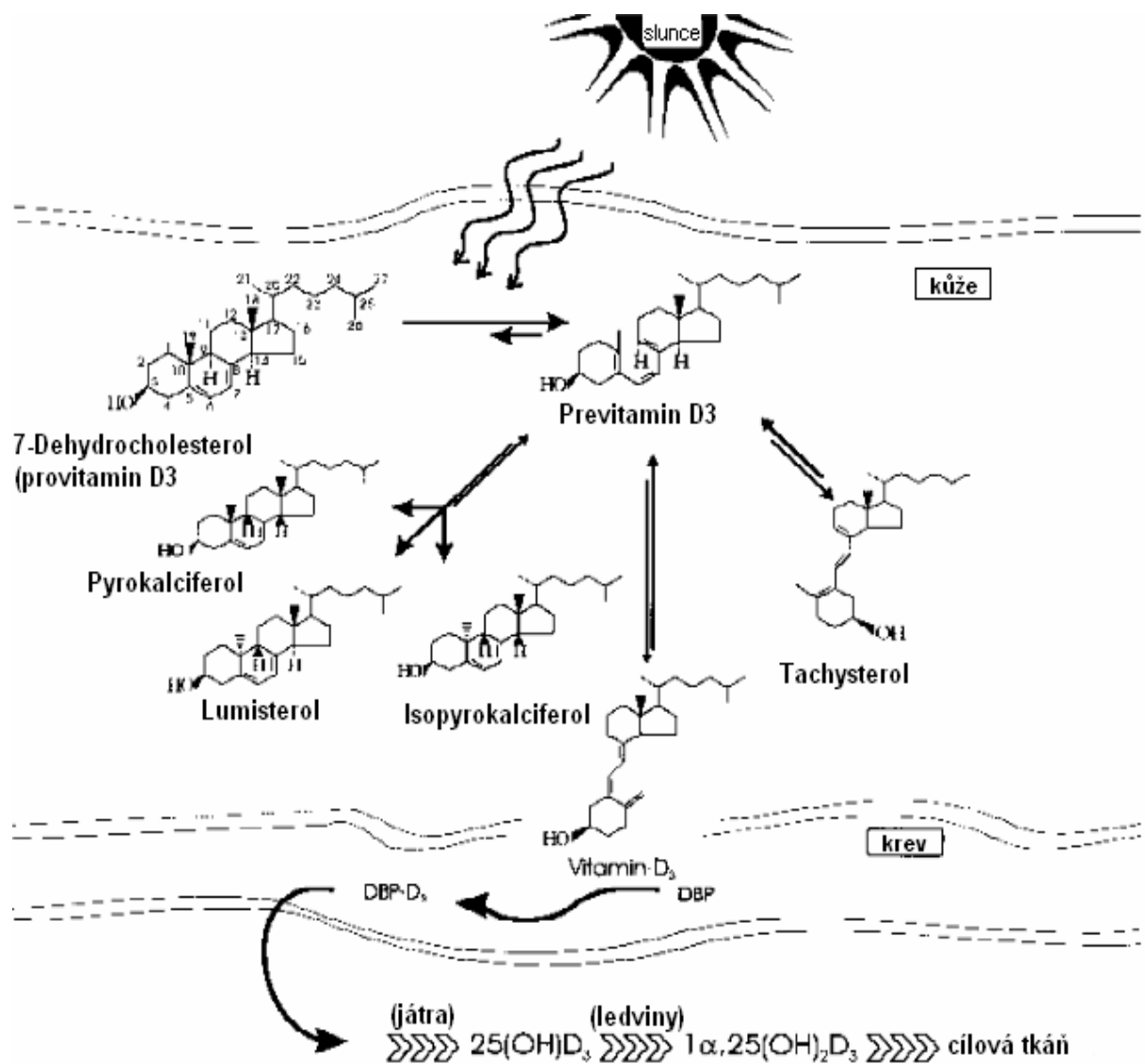


Obr. 3 Strukturální příbuznost vitamínu D₃ (cholecalciferolu) a vitamínu D₂ (ergokalciferolu) s jejich příslušnými provitaminy, cholesterolem a steroidním hormonem, kortisolem

Na obr. 3 můžeme vidět, že vitamin D₃ a vitamin D₂ jsou si navzájem podobné, jen se liší cesty vzniku jednotlivých molekul. 7-dehydrocholesterol se nachází v *epidermis* pokožky většiny živočichů. Je to sterol s $\Delta^{5,7}$ dvojnou vazbou na kruhu B. Konjugovaná dvojná vazba systému na specifickém místě molekuly umožňuje pohlcení množství světla v určitých vlnových délkách UV oblasti. Proces zahrnuje komplex sérií transformací s konečným výsledkem tvorby vitamínu D₃. Vitamin D₂, který je stejně biologicky aktivní jako vitamin D₃, je produkován při ozáření rostlinného sterolu ergosterolu [4].

Vitamin D byl nazván podle pravidel Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (International Union of Pure and Applied Chemists, IUPAC). Protože je odvozený od steroidů, struktura udržuje číslování od prekursoru cholesterolu. Nesouměrné středy jsou označeny symboly R,S; konfigurace dvojných vazeb jsou označeny symbolem E (entgegen - proti) neboli *trans*, a symbolem Z (zusammen – dohromady) neboli *cis*. Oficiální název vitamínu D₃ je tedy: 9,10-seco(5Z,7E)-5,7,10(19)cholestatriene-3 β -ol a oficiální název vitamínu D₂ je: 9,10-seco(5Z,7E)-5,7,10(19), 22-ergostatetraene-3 β -ol [4].

Po absorbování složky UV-B světla ze slunečního záření se aktivovaná molekula může vrátit do základního stavu a vytvářet nejméně šest dalších produktů. Čtyři steroidy - provitamin D, lumisterol, pyrokalciferol a isopyrokalciferol a dva produkty secosteroidů vitamin D₃, previtamin D₃ (obr.4) [4].



Obr. 4 Fotochemická cesta produkce vitamínu D₃ (cholecalciferolu) ze 7-dehydrocholesterolu

1.2 Fyziologie vitamínu D

Světová zdravotnická organizace (World Human Organization, WHO) má za úkol definovat mezinárodní jednotku (International Unit - IU) vitamínu D₃. Její současná definice z roku 1950 říká, že mezinárodní jednotka doporučená pro přijetí je 0,025 µg mezinárodně připraveného standardu krystalického vitamínu D₃. Tudíž 1,0 IU vitamínu D₃ je 0,025 µg, což je rovno 65,0 pmol [5].

Je známo, že podstatné procento populace je vystaveno malé míře slunečního záření, hlavně během zimních měsíců. A právě v tomto období je potřeba poskytovat obvyklou zásobu vitamínu D. Ultrafialové záření ze slunce může být blokováno v některých oblastech znečištěným ovzduším, životem ve městech, kde vysoké budovy zabraňují dostatečnému slunečnímu záření dosahujícímu až na zem, používání opalovacích krémů, které zabraňují ultrafialovým paprskům a život v zeměpisných oblastech světa, kde není dostatek slunečního záření. To vše přispívá k neschopnosti kůže biosyntetizovat dostatečné množství vitamínu D₃ [5].

Bylo zjištěno, že dospělá osoba bílé pleti exponovaná letnímu slunci syntetizuje ve své kůži 250 µg vitamínu D₃ za 15-20 minut. Při delší expozici se již žádný vitamin D nevytváří [2].

Protože vitamin D může být v těle syntetizován a dokáže se dlouho udržet v tkáních, je obtížné vymezit přesnou minimální denní dávku. Je známo, že potřeba vitamínu D je závislá na koncentraci vápníku a fosforu ve stravě, fyziologickém stavu, věku, pohlaví, stupni vystavení slunečním paprskům a množství pigmentu [6].

Tabulka 2 Současné doporučené dávky vitamínu D stanovené Organizací spojených národů pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) [5]

pro osoby do 50 let	200 IU.den ⁻¹ = 5 µg.den ⁻¹
pro osoby od 50 do 65 let	400 IU.den ⁻¹ = 10 µg.den ⁻¹
pro osoby starší 65 let	600 IU.den ⁻¹ = 15 µg.den ⁻¹
pro těhotné a kojící ženy	200 IU.den ⁻¹ = 5 µg.den ⁻¹

Klíčovou součástí ve fungování endokrinního systému vitamínu D je vysoce ionizovaný vitamin D vázající protein DBP (D-Binding Protein), který přenáší vitamin D₃ a všechny jeho metabolity k různým cílovým orgánům [6].

1.3 Zdroje vitamínu D

Mezi hlavní zdroje patří:

- játra
- sled'
- losos
- sardinky
- olej z rybích jater
- fortifikované margariny
- vaječný žloutek [5].



Obr. 5 Zdroje vitamínu D

Menší množství vitamínu D je obsaženo v:

- mléce
- másle [2].

Z rostlin jsou dobrými zdroji:

- kokosové máslo
- houby, zvláště hřiby [2].

Vitamin D_3 je vlastně prohormon a není známo, jestli má nějakou skutečnou biologickou aktivitu. Biologicky aktivní molekuly jsou produkovány poté, co je vitamin D_3 metabolizován. Poprvé na $25(OH)D_3$ v játrech a poté na $1\alpha,25(OH)_2D_3$ a $24R,25(OH)_2D_3$ ledvinami. Nakonec některé z 37 metabolitů vitamínu D_3 jsou izolovány a chemicky charakterizovány [6].

Vitamin D byl užíván k léčbě kožní tuberkulózy (TBC), někdy s pozoruhodným efektem. Ale když byly vyvinuty specifické léky proti mykobakteriím, zájem o vitamin D poklesl. Vedle své obecně známé úlohy v metabolismu vápníku je vitamin D také významným imunomodulačním hormonem. Jeho aktivní metabolit $25(OH)$ vitamin D_3 aktivuje

monocyty a potlačuje proliferaci lymfocytů, tvorbu imunoglobulinů a syntézu cytokinů. V pokusech *in vitro* metabolity vitamínu D zvyšují schopnost monocytů omezit intracelulární proliferaci *Mycobacterium tuberculosis* [7].

Vegetariánská strava obecně predisponuje k nedostatku vitamínu D v organismu, nicméně individuální stanovení jeho hladiny v plazmě je pro konkrétní hodnocení nezbytné. Studie potvrdila častou přítomnost deficitu vitamínu D v populaci i fakt, že tento deficit významně zvyšuje riziko infekce. Současně ukázala i na souvislost genetických faktorů, konkrétně polymorfizmu genu pro vitamín D receptor (VDR). Přesně definovaná změna v genu byla nalezena u 91 ze 126 neléčených pacientů s TBC a u 116 zdravých kontaktů s pozitivním kožním testem. Když je u daného jedince přítomna změna genu a současně deficit vitamínu D (neprokazatelná hladina v séru), je riziko infekce 5,1x vyšší [7].

Vitamín D uplatňuje své biologické aktivity v organismu vazbou na VDR na aktivovaných T a B lymfocytech. Již dříve bylo známo, že genetické variace VDR jsou asociovány s plazmatickými hladinami 25(OH) vitamínu D₃ a s denzitou kostního minerálu. Nyní se ukazuje, že může jít i o významný faktor predispozice k infekci TBC [7].



Obr. 6 Mikroskopický preparát *Mycobacterium tuberculosis*

Ve 40. letech 20. století si lidé začali uvědomovat, že obsah vitamínu D₃ v běžné stravě je velmi důležitý a nezbytný. Dodavatelé mléka tak usoudili, že by měli dodávat na trh svým zákazníkům mléko, které by bylo doplněné o vitamín D₃. O pár let později rozvinuli rozsáhlou průmyslovou výrobu vitamínu D₃, která pokračuje dodnes. Takto vyrobený

vitamin D₃ je používán jako doplněk stravy pro lidskou potřebu. Od 70. let 20. století je vitamin D₃ používán jako doplněk stravy pro farmářská zvířata a drůbež [8].

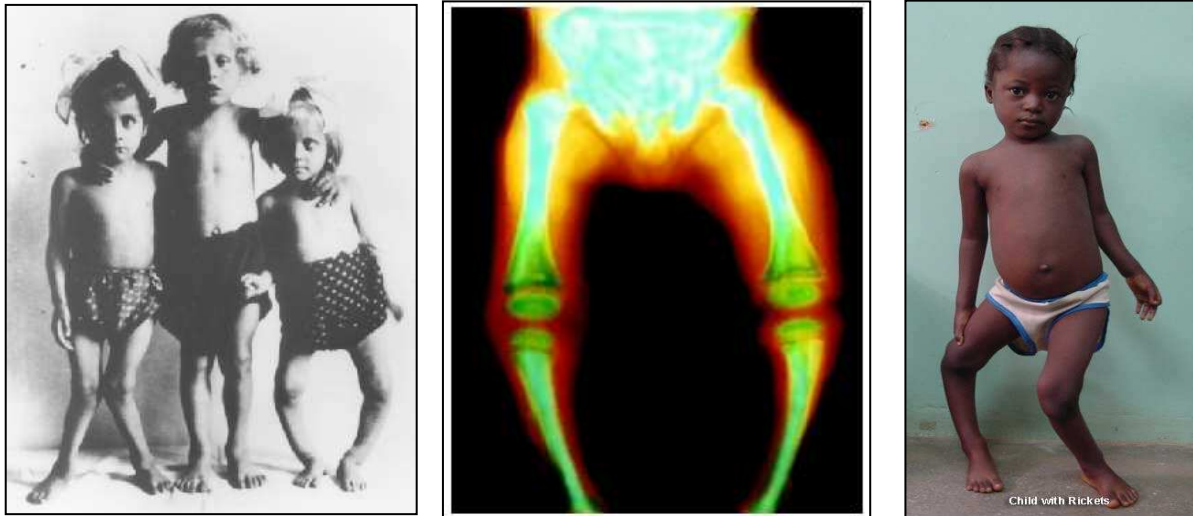
Hospodářská produkce vitamínu D₃ je kompletně závislá na dostupnosti 7-dehydrocholesterolu nebo cholesterolu. 7-dehydrocholesterol může být získán pomocí organického rozpouštědla extrakcí ze zvířecích kůží (krav, prasat nebo ovcí) a následným přečištěním. Cholesterol je získáván z lanolinu ovčí vlny a po úplném očištění a krystalizaci může být převeden složitou chemickou syntézou až na 7-dehydrocholesterol. Dále je krystalický 7-dehydrocholesterol rozpuštěn v organickém rozpouštědle a ozářen UV zářením, aby mohlo dojít k přeměně (podobné jako se vyskytuje v lidské nebo zvířecí kůži) na produkci vitamínu D₃. Před tím než je vitamin D₃ použit v mléce a jako doplněk zvířecí stravy, je dále čištěn a rekrystalizován. Pro přesné postupy chemické přeměny cholesterolu na 7-dehydrocholesterol, pro metodu přeměny na vitamin D₃ pomocí UV záření a pro následné čištění, bylo vydáno již mnoho patentů.

Hlavními producenty vitamínu D₃ používaného pro mléko a další doplňky jídla jsou firmy F. Hoffman-La Roche, Ltd (Švýcarsko) a BASF (Německo) [8].

1.4 Avitaminosa a hypervitaminosa

Příznakem avitaminosy je u dětí projevující se rachitis (křivice). Rachitis je choroba způsobující měknutí kostí, jejímž následkem dochází ke zlomeninám a deformacím. Je to nejčastější dětské onemocnění především v rozvojových zemích. Hlavní příčinou je nedostatek vitamínu D, ale také i vápníku ve stravě. Ačkoliv se tato nemoc může objevit i u dospělých, hlavní výskyt je u dětí, které trpí podvýživou, obvykle plynoucí z hladomoru během raného dětství [9].

U dospělých je příznakem avitaminosy osteomalacie (měknutí kostí), kdy dojde k celkové poruše minerálního metabolismu, především vápníku a fosforu. Dochází hlavně k vyplavování Ca²⁺ z kostí a k jejich měknutí a křehnutí [9].



Obr. 7 Projev rachitis u malých dětí

Hypervitaminosa se projevuje nechutenstvím až anorexií, zvracením a vyplavováním vápníku z kostí, který se pak ukládá v ledvinách nebo žlučníku. Velmi často dochází k psychickým projevům. V akutní fázi byly u postižených pozorovány srdeční arytmie [2].

Žádné mutagenní, karcinogenní nebo teratogenní vlivy nebyly doposud u vitamínu D pozorovány. Vzhledem k tomu, že vitamin D a jeho metabolity přecházejí placentou do plodu, je třeba brát v úvahu teratogenní riziko u matek, které mají vysokou hladinu vitamínu D v krvi. To se u novorozenců projeví stenózou aortální chlopně, poruchami psychického a mentálního vývoje [2].

Při mapování výskytu rakoviny tlustého střeva v USA od roku 1976 bylo zjištěno, že lidé na jihu trpí touto chorobou o polovinu méně než lidé na severu země. Vitamin D může působit preventivně nejen v rakovině tlustého střeva, ale i prsu, prostaty a vaječnicků. To však není vše; lidé s vyšší hladinou vitamínu D trpí méně autoimunitními chorobami (vč. *Diabetes mellitus* I. typu), chorobami srdce a lépe jim pracují játra [10].

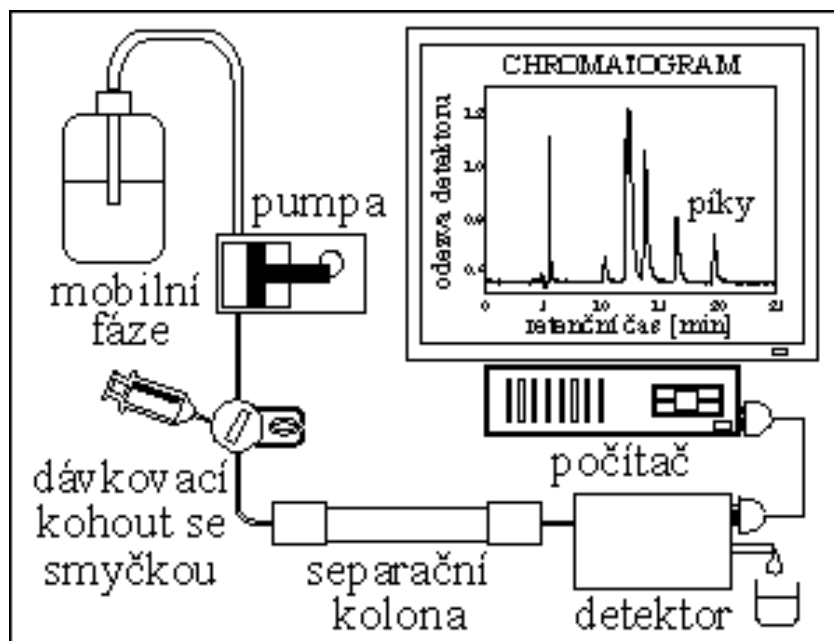
Vitamin D dále pomáhá mobilizovat imunitní systém (čímž je vysvětlena jeho funkce snižování výskytu autoimunitních chorob) a podle mínění vědců pomáhá chránit buňky před maligními změnami. V případě, že k nim však přece jen dojde, pomáhá pak v buňkách vyvolat autodestrukční procesy [10].

2 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

Vysokotlaká kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) je forma kapalinové chromatografie používaná k rozdělení sloučenin, které jsou rozpuštěné v roztoku. Zařízení, které se používá pro tuto metodu se nazývá kapalinový chromatograf. Výsledkem měření je chromatogram.

Kapalinový chromatograf se skládá z několika částí:

- a. zásobník mobilní fáze
- b. pumpa
- c. dávkovací ventil
- d. předkolona
- e. kolona
- f. detektor
- g. vyhodnocovací zařízení



Obr. 8 Schéma kapalinového chromatografu

Vysokotlaká kapalinová chromatografie může pracovat s:

1. **Normální fázi** (NP-HPLC, Normal Phase High Performance Liquid Chromatography). Tato metoda využívá polární stacionární fázi a nepolární mobilní fázi.
2. **Reverzní fázi** (RP-HPLC, Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography). Reverzní fáze se skládá z nepolární stacionární fáze a kapalné polární mobilní fáze [11].

Vysokotlaká kapalinová chromatografie byla vyvinuta v polovině 80.let 20.stol. Rychle se rozvíjela díky vývoji kolonových plnicích materiálů a detektorů. V 90. letech byla HPLC běžně používána pro separaci chemických sloučenin. Nové techniky zlepšovaly oddělování, identifikaci a kvantitativní stanovení vzorků [12].

Poslední desetiletí sledujeme obrovský pokrok ve vývoji mikrokolon a dalších specializovaných kolon. Délka typické HPLC kolony je několik cm a její vnitřní průměr je 3-5 mm [12].

V současné době má každý možnost výběru typu kolony a také různých detektorů. HPLC je považována za techniku, která je využívána především pro bootechnologické, biomedicínské a biochemické výzkumy a také pro farmaceutický průmysl. Tyto oblasti však zahrnují pouze kolem 50 % uživatelů HPLC. Dnes je HPLC využívána v mnoha dalších oblastech jako je kosmetika, energetika, potravinářství a životní prostředí [12].

2.1 Části kapalinového chromatografu pro RP-HPLC

2.1.1 Zásobník mobilní fáze

Polární mobilní fáze (např. methanol, ethanol, vodné roztoky, acetonitril, propanol, pufr) slouží jako přenašeč vzorku v roztoku. Ten je vstříkván do analyzátoru mobilní fáze vstříkovacím ventilem. Jak vzorek v roztoku protéká kolonou s mobilní fází, složky roztoku migrují podle nekovalentních interakcí sloučeniny s kolonou. Chemické interakce mobilní fáze a vzorku s kolonou určují stupeň migrace a separace součástí obsažených ve vzorku [13].

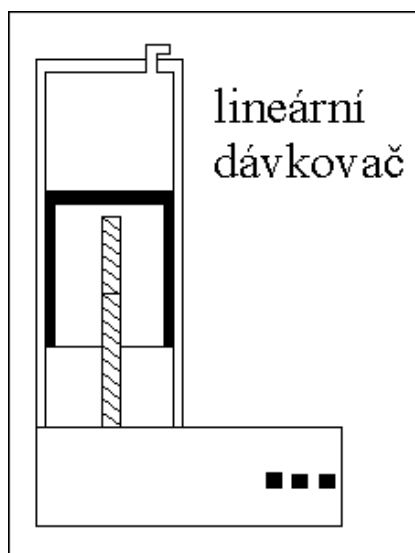
Mobilní fáze se před použitím filtrují (odstraňují se nečistoty) a odplyňují (např. s použitím ultrazvukové lázně). Do systému HPLC jsou čerpány nejčastěji ze skleněných lahví. Do lahve zasahuje čerpací hadička opatřená často skleněnou fritou [14].

2.1.2 Pumpa

Pumpa dávkuje mobilní fázi do systému pod vyšším tlakem, který může dosáhnout 40 - 60 MPa. Kapalina se do kolony čerpá pístovými nebo membránovými čerpadly. Materiál čerpadla (nerezová ocel, plast či titan) nesmí být narušován mobilní fází a nesmí do ní uvolňovat žádné látky [15].

Dávkování mobilní fáze může být:

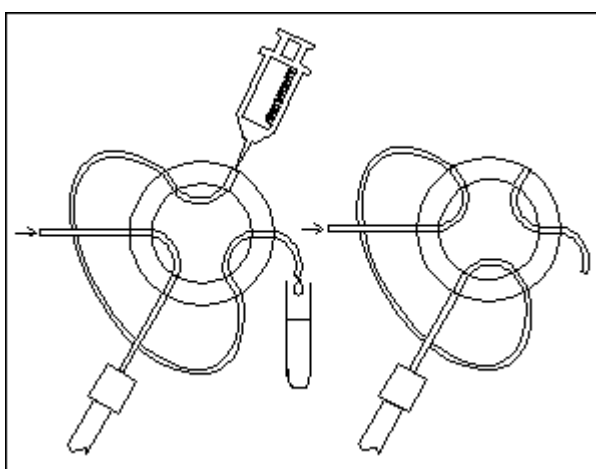
1. **Izokraticky** – tzn., že se po celou dobu analýzy nemění složení mobilní fáze.
2. **Gradientem** – tzn., že se v průběhu analýzy mění složení mobilní fáze.



Obr. 9 Schéma pumpy

2.1.3 Dávkovací ventil

Funkcí dávkovacího ventilu je vstříknout vzorek do systému dávkovacím otvorem. Dávkovací otvor je složen ze záklopkou a smyčky. Vzorek je rozpuštěn nejčastěji v mobilní fázi, poté je natažen do stříkačky a vstříkovan do otvoru vstříkací záklopkou. Otočením ventilu se zavře záklopka a otevře se smyčka, aby vstříkla vzorek do proudu mobilní fáze. Dávkovače mají různé objemy dávkovacích smyček od 2 μl do 100 μl . Dávkovací ventily mohou být ovládané elektricky nebo pneumaticky [16].



Obr. 10 Dávkovací ventil se smyčkou

2.1.4 Předkolona

Předkolona chrání vlastní kolonu před nečistotami a nerozpustnými materiály. Probíhá zde v malé míře předseparace vzorku. Náplň je většinou shodná s náplní kolony.

2.1.5 Kolona

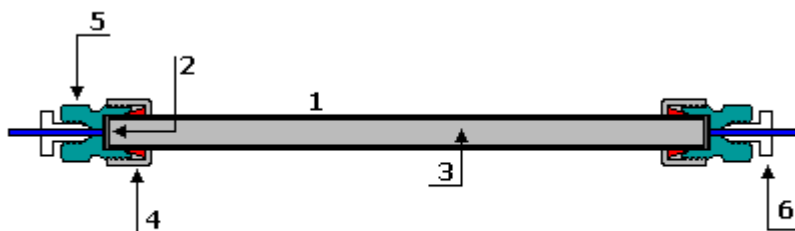
Kolona je srdcem separačních procesů HPLC [17], probíhá zde vlastní separace vzorku. Je to v podstatě rovná trubka nebo kapilára, rovnoměrně naplněná nebo pokrytá stacionární fází. Tou je polární pevná látka (např. silikagel, deriváty celulózy, aktivní uhlí...) se zakotvenou nepolární fází C₄, C₈ nebo C₁₈. Chemické interakce stacionární fáze a vzorku s mobilní fází určují stupeň migrace a separace komponent obsažených ve vzorku.

Např. vzorky, které mají silnější interakce se stacionární fází než s mobilní fází, budou vymývány z kolony méně rychleji a tudíž mají delší retenční čas [18].

Plášť kolony (hardware) má za úkol udržet pohromadě stacionární fází, přičemž na hardware kolony jsou kladeny určité požadavky:

1. Chemická odolnost.
2. Odolnost vůči vysokým tlakům.

Nejpoužívanější materiál k výrobě kolon je nerezová ocel (typ 316), plasty (PEEK) nebo sklo [18].



Obr. 11 Schéma HPLC kolony (1 – kovový plášť, 2 – porézní kovová fritu, 3 – stacionární fáze, 4 – ochranný kroužek, 5 – koncová hlavice, 6 – vstup pro kapiláru se šroubem)

Pro analytické aplikace se převážně používají kolony o délce 5 – 30 cm a vnitřním průměru 3 – 4 mm. Kolony jsou naplněné stacionární fází (sorbetem) o průměru zrn 3 - 10 μm . Charakter stacionární fáze závisí na chromatografickém systému. RP-HPLC používá chemicky vázanou nepolární stacionární fází. Nejpoužívanější je typ C_{18} , kde jsou molekuly octadecylsilanu vázány na částicích silikagelu. Dále pak obsahují mobilní fází (eluent), která je v systému RP-HPLC polární [14]. Nejčastější rozměry chromatografických kolon, které jsou komerčně dodávány, jsou 50, 75, 100, 125, 150, 250 a 300 mm o vnitřním průměru 2 - 5 mm. Chromatografické kolony se dodávají v současné době jako klasické kovové kolony nebo kovové kolony typu „cartridge“ a při skladování a transportu jsou plněné mobilní fází (Tabulka 3) [20].

Rozdílné analyty (dělené látky) mají rozdílnou afinitu ke stacionární fází, podléhají různé distribuci (rozdělování) mezi mobilní a stacionární fází a jsou rozdílně zadržovány a rozdílně zpoždovány (retardovány) [21].

Účinnost separace, doba analýzy a pracovní tlak se zvyšují s rostoucí délkou kolony a naopak klesají s rostoucím průměrem částic náplně. Při práci s kolonami o průměru menším než 2 mm se jedná o tzv. mikrokolonovou kapalinovou chromatografii, jejíž výhodou je hlavně snížení spotřeby mobilní fáze i vzorku a zvýšení citlivosti detekce [14].

Tabulka 3: Typy kolon a jejich uchovávání [20]

Kolona	Mobilní fáze
Silica	Hexan/acetonitril
C ₈ ,C ₁₈	Acetonitril/voda (methanol/voda)
NH ₂	Dichlormethan/methanol
CN (normální fáze)	Hexan
CN (reverzní fáze)	Acetonitril/síran amonný (0,05 mol.l ⁻¹)
Phenyl	Acetonitril/voda

2.1.6 Detektor

Detektory jsou umístěny na konci kolony a analyzují eluent. Zaznamenávají rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující eluovanou složku celého detektoru.

Detektory se nejčastěji dělí na:

1. Koncentrační detektory - reagují na změnu hmotnostní koncentrace složky v eluentu dm/dV nezávisle na přívodu složky do detektoru.
2. Hmotnostní detektory - reagují na změnu hmotnostního toku složky v eluentu dm/dt do detektoru.

Jiný způsob dělení je na detektory:

1. Nedestrukční - v detektorech nedochází k chemické změně detekované komponenty.
2. Destrukční - v detektorech se detekovaná komponenta irreverzibilně mění [18].

V současné době jsou v podstatě všechny typy používaných detektorů koncentrační a lze je rozdělit do dvou skupin a to na:

1. Selektivní, jejichž signál je úměrný pouze koncentraci detekované komponenty v eluentu.
2. Univerzální, jejichž signál je úměrný celkové vlastnosti eluentu jako celku, tj. mobilní fázi a detekované komponenty [18].

Na detektor jsou kladeny určité požadavky:

- možnost detekce všech přítomných komponent (univerzálnost),
- odezva detektoru by měla být okamžitá a lineární v co nejširším koncentračním rozmezí (široký lineárně dynamický rozsah),
- vysoká citlivost a nízká úroveň šumu,
- robustní vůči změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty,
- mimokolonový příspěvek k rozšiřování elučnicích zón co nejmenší,
- umožnit gradientovou eluci [18].

2.1.6.1 UV/ VIS HPLC detektory

Spektrofotometrické detektory jsou založeny na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm [21].

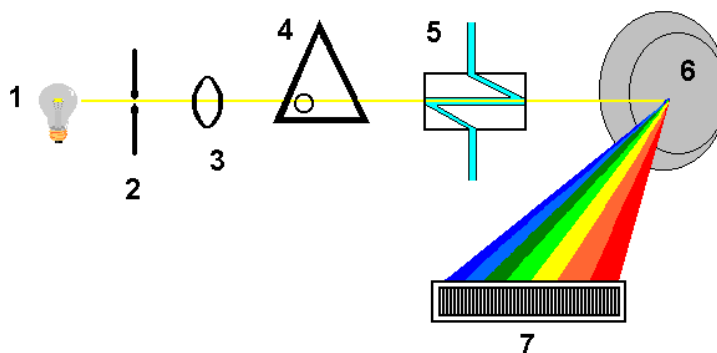
Podle konstrukčního typu se mohou rozdělit detektory na:

1. Detektory s programovatelnou vlnovou délkou

Vlnovou délku lze nastavovat v určitém rozmezí, nejčastěji od 190 do 700 nm. Vlnová délka je měnitelná během analýzy, některé typy detektorů dokáží snímat pak spektra látek (scan) v měrné cele při zastaveném průtoku mobilní fáze (stop flow).

2. Detektory diodového pole (photodiode-array, PDA, DAD)

Detektory snímají celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace [21].

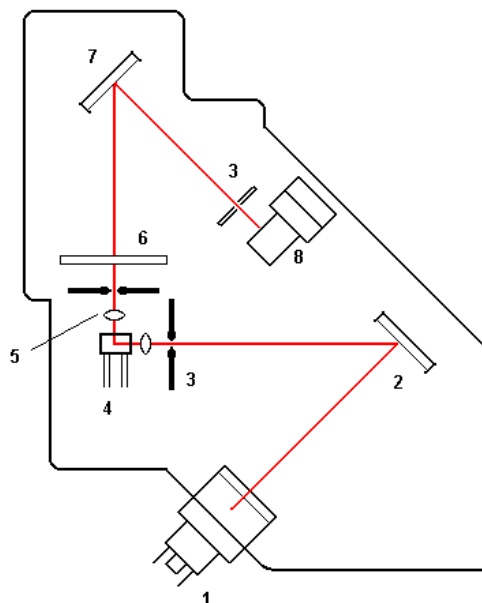


Obr. 12 Schéma detektoru s diodovým polem (1 – zdroj, 2 – štěrbinu, 3 – čočka, 4 – clona, 5 – měrná cela detektoru, 6 – holografická mřížka, 7 – fotodiody)

Záření ze zdroje po průchodu štěrbinou, čočkou, clonou a měrnou celou detektoru se spektrálně rozkládá holografickou mřížkou, takže na každou z fotodiód dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v cele detektoru. Každá fotodioda je spojena s kondenzátorem, který je předem nabitý na určitou hodnotu. Fotoelektrický proud, který vzniká po dopadu záření na diodu pak vybije kondenzátor, který je úměrný intenzitě dopadajícího záření. V další fázi se kondenzátory nabíjí a měří se proud, který je potřebný na dobítí příslušných kondenzátorů. Velikost tohoto proudu se ukládá do paměti řídicí jednotky. Tato sekvence vybíjení a nabíjení se velmi rychle opakuje a takto se zaznamenávají údaje o absorpci při každé vlnové délce v každém okamžiku. Spektrální rozlišení je dáno počtem diód na poli, který se pohybuje od 512 do 1024 diód, pak pro spektrální rozsah od 190 do 800 nm je při počtu diód 512 spektrální rozlišení 1,2 nm. Tyto detektory umožňují ve spolupráci s řídicí jednotkou (počítačem) detekci látky při jakékoliv zvolené vlnové délce, umožňují porovnávat snímaná spektra s knihovnou spekter, vypočítají čistotu píku (identifikace látky) [21].

2.1.6.2 Fluorescenční HPLC detektory

Fluorimetrické detektory jsou založeny na principu fluorescence a měření sekundárního záření (emisního), které látka vydá po absorpci primárního elektromagnetického záření (excitačního) [22].



Obr. 13 Schéma fluorescenčního detektoru (1 – výbojka, 2 – excitační mřížka, 3 – štěrбина, 4 – průtoková cela, 5 – mikročočky, 6 – cut – off filtr, 7 – emisní mřížka, 8 – fotonásobič)

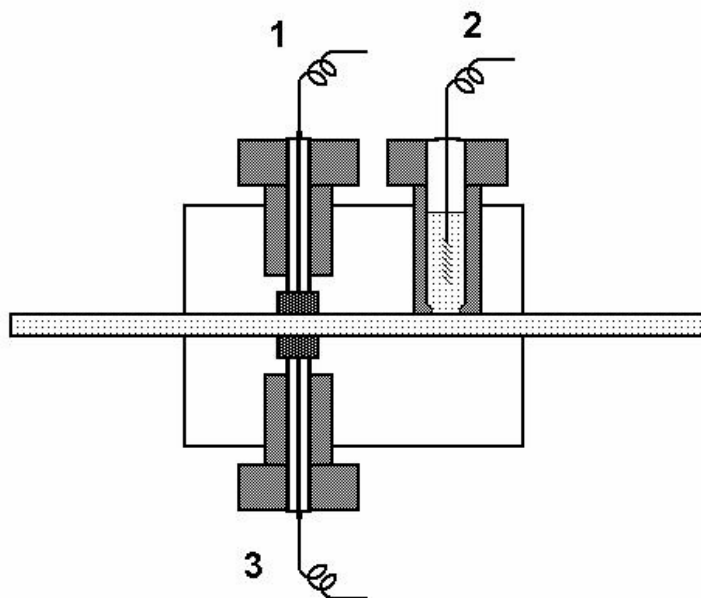
Konstrukce fluorimetrického detektoru umožňuje zachycení maximálního množství fluorescenčního záření vznikajícího v cele detektoru násobičem, přičemž toto čidlo musí být chráněno před dopadem excitačního záření. Tohoto se dosahuje kombinací interferenčních filtrů a násobič je umístěn kolmo na zdroj excitačního záření. Fluorimetrické detektory jednoduché konstrukce používají rtuťové výbojky a interferenční filtr jako zdroj monochromatického excitačního záření a detekují fluorescenční záření současně při všech vlnových délkách po oddělení zbytku rozptýleného excitačního záření. Fluorimetrické detektory moderní konstrukce umožňují nastavit délku excitačního i emitovaného záření použitím monochromátoru, současně lze programovat tyto vlnové délky v průběhu eluce k dosažení maximální citlivosti pro každou separovanou látku [22].

2.1.6.3 Elektrochemické HPLC detektory

Elektrochemické detektory se používají k detekci látek, které jsou schopné elektrochemické reakce, probíhající na fázovém rozhraní elektroda - roztok (mobilní fáze). Elektrochemické detektory měří určitou elektrickou veličinu (elektroodový potenciál, proud, kapacitu) vyvolanou průchodem látky průtokovou celou detektoru, ve které jsou umístěny elektrody s vloženým pracovním napětím nezbytným k průběhu elektrochemické reakce a to v systému dvouelektrodového nebo tříelektrodového zapojení (elektrochemický článek). Měřený elektrický signál je úměrný látkovému množství detekované složky a u elektrochemických detektorů se tedy sleduje závislost mezi elektrickou veličinou a koncentrací sledované složky. Nejčastěji je využívána elektrochemická reakce redoxního systému $Ox + ne^- \rightarrow Red$ a podle podmínek měření můžeme rozdělit elektrochemické detektory na několik typů [23].

Podle podmínek měření elektrolytických metod se rozdělují elektrolytické metody na:

1. metody potenciostatické – měří se při konstantním potenciálu pracovní elektrody
2. metody amperostatické – měří se za konstantního proudu [23].



Obr. 14 Schéma elektrochemického detektoru (1 – pracovní elektroda, 2 – pomocná elektroda, 3 - referenční elektroda)

2.1.6.3.1 Amperometrické detektory

Amperometrické (polarografické) detektory měří proud vyvolaný průchodem redukované nebo oxidované látky průtokovou celou detektoru. Jako měrné elektrody se u amperometrických detektorů používají tuhé měrné elektrody zhotovené ze skelného uhlíku, grafitových vláken, zlata, platiny, mědi či jiného kovu [23].

2.1.6.3.2 Coulometrické detektory

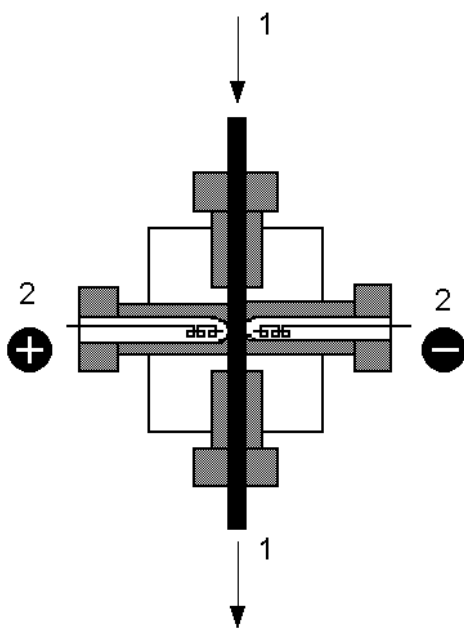
Coulometrické detektory měří náboj potřebný k oxidaci či redukcii celkového množství látky při jejím průtoku měrnou celou detektoru a dosahuje se tak vyšší citlivosti detekce než u amperometrických detektorů. Účinnost elektrochemické reakce je možné zvýšit použitím tzv. elektrody fritového typu, kdy mobilní fáze protéká porézní grafitovou pracovní elektrodou. Výhodou této coulometrické elektrody je její vysoká účinnost, stabilita (snižuje se poměr signálu k šumu) a selektivita. Coulometrická elektroda tohoto typu má daleko větší povrch proti klasické elektrodě a oxidačně-redukční reakci na povrchu elektrody podléhá více jak 90 % přítomného analytu [23].

Další výhodou coulometrické elektrody je možnost zvýšení selektivity zapojením dvou a více elektrod v sérii na nichž je vloženo různé napětí. Protože se analyt na coulometrické elektrodě podrobuje 100% elektrolýze, eluent neobsahuje již žádnou elektroaktivní komponentu, která by mohla podléhat elektrochemické reakci při daném vloženém napětí [23].

2.1.6.4 Vodivostní HPLC detektory

Vodivostní detektory patří mezi univerzální detektory a měří elektrickou vodivost eluátu v průtokové cele mezi dvěma elektrodami, na něž je vkládáno střídavé napětí, aby se zabránilo polarizaci těchto elektrod [24].

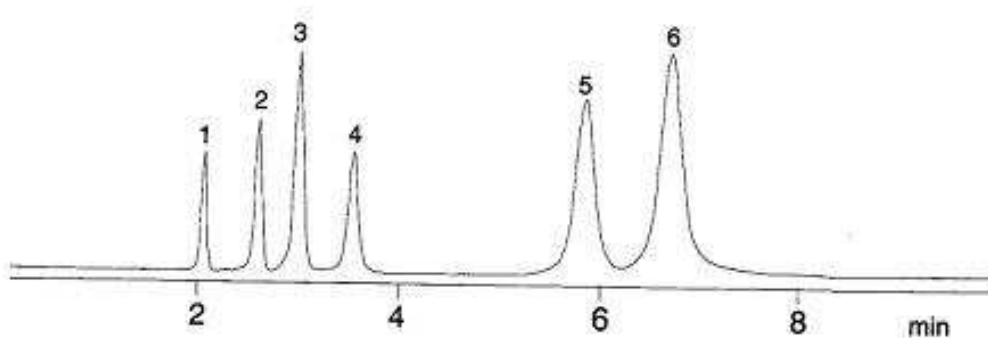
Vodivostní detektory se uplatňují nejvíce v iontové chromatografii, kdy se používá kolon plněných ionexy s nízkou kapacitou, které umožňují použití mobilní fáze s nízkým obsahem elektrolytů (mmol.l^{-1}) [24].



Obr. 15 Schéma vodivostního detektoru (1 – tok mobilní fáze, 2 – elektrody)

2.1.7 Chromatogram

Chromatogram je výsledkem analýzy. Je tvořen soustavou píků, které mají různou plochu a výšku, mají od sebe různou vzdálenost a v ideálním případě jsou symetrické a mají tvar Gaussovy křivky.



Obr. 16 Ukázka chromatogramu

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) 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 [25].

3 STANOVENÍ VITAMINU D CHROMATOGRAFICKY V KONKRÉTNÍCH SUROVINÁCH

3.1 Stanovení cholekalciferolu a 25-hydroxycholekalciferolu v rybách a rybích výrobcích

3.1.1 Použité suroviny

Ke stanovení bylo použito celkem 39 ryb a rybích výrobků, které byly konzumovány ve Finsku. V čerstvém stavu byly použity např. štika, okoun, cejn, sled', různé druhy tresky a pstruhů. Dále byly použity konzervované sardinky, tuňák a ančovičky, zmrazené krevety a uzené makrely.

Vzorky čerstvých ryb byly naporcovány a nakrájeny na kostky, zmrazené vzorky byly rozmrazeny a z konzerv byla odstraněna přebytečná tekutina [26].

3.1.2 Průběh stanovení

Před samotnou analýzou byly vzorky homogenizovány pomocí mixéru, porce po cca 100 g byly vakuově zabaleny a zmrazeny na -20°C .

Ke 20 g vzorku ryby nebo rybího výrobku byly přidány standardy ergokalciferolu a 25-hydroxyergokalciferolu. Takto připravený vzorek byl přes noc alkalicky zmýdlen při pokojové teplotě a následně extrahován směsí (petrolether:diethylether, 1:1). V další fázi byl extrakt vymýván destilovanou vodou až do neutrálního pH, odpařen, zbytek byl rozpuštěn v 1,5 ml hexanu a přefiltrován přes filtr (Millex HV; $0,45\ \mu\text{m}$, 1,5 cm, Millipore,). Frakce ergokalciferolu (standard) + cholekalciferolu a 25-hydroxyergokalciferolu (standard) + 25-hydroxycholekalciferolu byly v dalším kroku separovány [26].

3.1.3 Podmínky stanovení

Při stanovení byla použita technika HPLC s reverzní fází. Typ předkolony nebyl uveden. Při předčištění byl použit typ kolony μ - Porasil se silikagelem ($10\ \mu\text{m}$, 300 mm x 3,9 mm, Waters, U.S.A). Při stanovení cholekalciferolu a 25-hydroxycholekalciferolu byla použita kolona typu Vydac 201 TP 54. Objem dávkovaného vzorku byl při předčištění 1 ml a při stanovení 50 μl . Složení mobilní fáze při stanovení cholekalciferolu bylo 93 % methanol +

7 % voda, při stanovení 25-hydroxycholekalCIFerolu 83 % methanol + 17 % voda. Průtok mobilní fáze ani její dávkování při stanovení nebyly uvedeny. Jako detektor byl použit UV detektor (264 nm) [26].

3.2 Stanovení 25-hydroxycholekalCIFerolu ve vaječném žloutku

3.2.1 Použité suroviny

Vzorek vaječného žloutku byl připraven homogenizací 110 ks vajec, následně byl vakuově zabalen po malých cca 100 g porcích a zmražen na -20°C [27].

3.2.2 Průběh stanovení

Ke 20 g vzorku byl přidán standard 25-hydroxyergokalCIFerolu, vše bylo zmýdelněno a extrahováno. Extrahovaný vzorek byl smíchán s 10 ml hexanu a filtrován přes filtr (Miller HV; 0,45 μm , Millipore). Následně proběhla extrakce (Solid Phase Extraction, SPE), kdy byl analyt sorbován na tuhou fázi z fáze kapalně pomocí sorbentu silikagelu. Výsledkem byla frakce obsahující 25-hydroxyergokalCIFerol a 25-hydroxycholekalCIFerol, která byla dále separována [27].

3.2.3 Podmínky stanovení

Při stanovení byla použita HPLC s reverzní fází. Typ předkolony nebyl uveden. Dále byla použita pro předčištění kolona typu $\mu\text{Porasil}$ (10 μm , 300 mm x 3,9 mm) a při stanovení 25-hydroxycholekalCIFerolu typ Vydack 201 TP 54 (250 x 4,6 mm). Objem vzorku dávkovaného do kolony byl při předčištění 800 – 1000 μl , při stanovení 25-hydroxycholekalCIFerolu 25 μl . Mobilní fáze byla složena při předčištění z 97 % hexanu + 3 % isopropanolu, při stanovení 25-hydroxycholekalCIFerolu z 83 % metanolu + 17 % vody. Průtok mobilní fáze byl při stanovení 25-hydroxycholekalCIFerolu 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Dávkování mobilní fáze nebylo uvedeno. Jako detektor byl použit UV detektor – diode array (264 nm) [27].

3.3 Přehled stanovení vitamínu D v mléčných produktech

3.3.1 Použité suroviny

Níže uvedený průběh a podmínky stanovení jsou určeny pro mléko a umělou kojeneckou výživu [28].

3.3.2 Průběh stanovení

Při přípravě vzorku lze použít dvě metody: zmydelnění a extrakci nezmýdelnitelné frakce nebo přímou extrakci.

Alkalická hydrolyza neboli zmydelnění je účinná procedura pro odstranění neutrálních lipidů, především triglyceridů, které jsou obsaženy v mléce a umělé kojenecké výživě. Může být provedeno tzv. „horké“ zmydelnění nebo „studené“ zmydelnění přes noc.

Horké zmydelnění spočívá v úpravě vzorku s vodným, methanolvým nebo etanolvým KOH při teplotách 60 – 100°C a v čase 20 – 45 minut. Nejčastěji používané jsou vodné KOH, které se sice nemíchají tak dobře s tukem jako etanolové KOH, ale jsou více stabilnější.

Druhý způsob zmydelnění spočívá v úpravě vzorku s vodným nebo etanolvým KOH při pokojové teplotě za neustálého pomalého míchání. Tento způsob zmydelnění předchází tepelné přeměně vitamínu D na previtamin D, což právě může nastat u horkého zmydelnění. Kromě toho, tato metoda vyžaduje méně vybavení a výtěžnost je větší než u zmydelnění za tepla.

Pro nedostatečnou stabilitu vitamínu D jsou ve zmydelňovacím procesu běžně přidávány antioxidanty, jako pyrogallol nebo kyselina askorbová.

Zmydelnění je dokončeno extrakcí nezmýdelnitelné frakce organickými rozpouštědly nemísitelnými s vodou. Nejvhodnějším rozpouštědlem je hexan.

Vitamin D může být také extrahován přímo, bez předchozího zmydelnění, za použití organických rozpouštědel. Nejčastěji se používá dichlormethan, samostatně nebo smíchaný s methanolem, a hexan samostatně nebo smíchaný s ethyletherem nebo chloroformem.

Dále probíhá úprava koncentrace vzorku odpařením na vakuové odparce nebo pod parami dusíku za různých teplot, ale vždy méně než 50°C. Následují procedury, které čistí výsledný extrakt. Konečnou fází je samotné stanovení vitamínu D pomocí HPLC [28].

3.3.3 Podmínky stanovení

Při stanovení lze použít HPLC s normální fází nebo s reverzní fází. Pokud použijeme HPLC s normální fází, můžeme použít kolonu typu Pologasil Si 60 (250 x 4,6 mm). Dávkování mobilní fáze je izokraticky a její složení je 99,5 % hexanu + 0,5 % isopropanolu. Jako detektor použijeme UV detektor (254 nm).

Pokud použijeme HPLC s reverzní fází, můžeme použít kolonu Vydac TP 201 (250 x 4,6 mm). Dávkování mobilní fáze nebylo uvedeno a její složení bylo acetonitril:methanol (9:1). Jako detektor použijeme UV detektor (265 nm) [28]

3.4 Cholekalciferol a 25-hydroxycholecalciferol v syrovém a vařeném vepřovém mase

3.4.1 Použité suroviny

Jako vzorek vepřového masa bylo použito maso z chovu vepřů, kteří byli chováni bez možnosti absorbovat sluneční záření. Jejich strava však byla obohacena o vitaminy (vitamin D₃) a minerální látky. Z jatečně upraveného těla byla použita vykostěná pečeně s kůží, noha, bůček a lalok. Před analýzou byly tyto části těl zabaleny do plastových obalů a zmrazeny na -20°C. Vykostěná pečeně s kůží určená na vaření byla uvařena den po porážce a 1 hodinu po uvaření byla taktéž zabalena do plastového obalu a zmrazena. Doba mrazírenského skladování byla maximálně 6 měsíců. Těsně před analýzou byly syrové i vařené vzorky naporcované na libové maso, špek, mezisvalový tuk a kůži. Všechny naporcované části byly smíchány a mixovány pomocí mixeru. Vykostěná pečeně s kůží byla rozdělena na čtyři části, dvě z nich byly analyzovány za syrova a dvě uvařeny [29].

3.4.2 Průběh stanovení

K danému vzorku byl přidán standard ergokalciferolu. Vše bylo zmýdleno pomocí KOH a extrahováno směsí diethylether:petrolether (1:1). Dále proběhla extrakce na pevné fázi pomocí kolony se silikagelem. Následovala separace frakce cholekalciferolu a 25-hydroxycholekalciferolu a jejich stanovení.

Pro stanovení obsahu tuku, byl vzorek vařen s HCl a po přidání etanolu byl tuk extrahován frakcí diethylether:petrolether (1:1). Po odpaření rozpouštědel byl tuk zvážen. Obsah vody byl stanoven vysušením homogenizovaného vzorku po dobu 16–18 hodin při 102-105°C [29].

3.4.3 Průběh stanovení

Při stanovení byla použita HPLC s reverzní fází. Typ předkolony nebyl uveden. Dále byla použita kolona se silikagelem (Luna, Phenomenex, Torrance, CA, USA) a kolona s dusíkem (Spheracclone, Phenomenex, Torrance, CA, USA). Mobilní fáze byla při předčištění složena z 2-propanol:*n*-heptan, při stanovení cholekalciferolu a 25-hydroxycholekalciferolu byla tvořena z acetonitril:methanol a methanol:voda. Průtok mobilní fáze ani její dávkování nebyli uvedeny. Jako detektor byl použit UV detektor – diode array (220-320 nm) [29].

ZÁVĚR

Bakalářská práce byla vypracována formou rešerže. Cílem první části bylo teoretické pojednání o vitamínu D, především pak mechanismus jeho vzniku díky slunečnímu záření a jeho fyziologie. Druhá část byla zaměřena na zpracování principu HPLC, jakožto jedné z nejpoužívanějších metod při stanovení tohoto lipofilního vitamínu. Závěrečná část pak byla věnována shrnutí chromatografických podmínek při jeho stanovování.

Největší význam mají ergokalciferol (vitamin D₂) a cholekalciferol (vitamin D₃) lišící se pouze postranními řetězci a cestou jejich vzniku. Cholekalciferol je odvozen od cholesterolu. Vzniká ze 7-dehydrocholesterolu, který je přítomen v *epidermis* pokožky živočichů, po ozáření kůže slunečními paprsky. Ergokalciferol je odvozen od kortisolu a vzniká po ozáření rostlinného sterolu ergosterolu. Současné doporučené dávky tohoto vitamínu se pohybují v rozmezí od 5 do 15 $\mu\text{g}\cdot\text{den}^{-1}$ v závislosti na věku. Důležitými zdroji jsou kromě slunečního záření i rybí tuk, tresčí játra, sled' sardinky nebo vaječný žloutek. Vitamin D je velmi důležitý pro udržení homeostáze vápníku a fosforu v krvi, které jsou potřeba pro správnou stavbu kostí a zubů. Podle některých studií má také významný vliv na imunitu. Jeho nedostatek vede k řadě onemocnění, nejčastější je u dětí projevující se rachitis a u dospělých osteomalacie, které se projevují měknutím kostí a jejich následnou deformací. Pro zajištění dostatečného přísunu tohoto vitamínu probíhá v některých evropských zemích i USA fortifikace mléka a jiných produktů vitamínem D₃, u nás k tomu však nedochází. Obecně lze říci, že lidé v našich zeměpisných šířkách jeho nedostatkem netrpí, čímž se neprojevují ani výše uvedená onemocnění. Nedostatek vitamínu D je typický pro africký kontinent, kde lidé tmavé pleti jednak neabsorbují tolik slunečního záření a také nemají možnost konzumovat potraviny, které jsou zdrojem tohoto vitamínu.

HPLC je separační metoda, která slouží k rozdělení složek vzorku rozpuštěného v roztoku mezi dvě nemísitelné fáze, mobilní a stacionární. Toto probíhá v zařízení zvaném chromatograf, výsledkem je pak chromatogram. Kapalinový chromatograf se skládá ze zásobníku mobilní fáze, pumpy, která může dávkovat mobilní fázi do systému izokraticky nebo gradientem. Následuje dávkovací ventil, který dávkuje vzorek a předkolona, jejíž funkcí je ochrana kolony před nečistotami a nerozpustnými materiály. Kolona je velmi důležitou částí celého systému, zde se totiž jednotlivé složky vzorku dělí (separují). Obsahuje stacionární fázi – sorbent a je do ní přiváděna mobilní fáze – eluent. Doba, po kterou analyzovaná látka setrvává v koloně, se nazývá retenční čas. Po koloně následuje

detektor, kam vstupují jednotlivé složky (analyty) v různých retenčních časech. Funkcí detektoru je analyzování mobilní fáze. Existuje řada různých druhů detektorů, které se liší především principem funkce. HPLC využívá nejčastěji spektrofotometrické (UV/VIS) a fluorescenční detektory. V menší míře jsou využívány i elektrochemické a vodivostní detektory. Výsledkem analýzy je chromatogram, který je vyhodnocován jak kvantitativně tak kvalitativně.

Ze shrnutí chromatografických podmínek pro stanovení vitamínu D vyplývá, že každý vzorek, který má být analyzován, musí být nejprve homogenizován. Poté jsou přidávány standardy, vzorek je alkalicky zmýdlen použitím vodného KOH a extrahován, nejčastěji směsí petrolether:diethylether (1:1). Extrahovaný vzorek je rozpuštěn v organickém rozpouštědle, např. hexanu a filtrován. Filtrát je poté připraven k analýze. Při stanovování se v praxi používá především RP – HPLC. Složení mobilní fáze i její dávkování může být různé. Jako detektor se využívá především UV detektor.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] http://www.worldofmolecules.com/supplements/vitamin_D.html
- [2] Hoza, I., Kramářová, D., Budínský, P., *Potravinářská biochemie II.*, 1. vyd., Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006, s.40-42
- [3] <http://vitamind.ucr.edu/history.html>
- [4] <http://vitamind.ucr.edu/chem.html>
- [5] <http://vitamind.ucr.edu/nutri.html>
- [6] <http://vitamind.ucr.edu/biochem.html>
- [7] http://www.zdrava-rodina.cz/med/med0400/med400_20.html
- [8] <http://vitamind.ucr.edu/milk.html>
- [9] <http://en.wikipedia.org/wiki/Rickets>
- [10] <http://www.bezlepkovadieta.cz/?url=vitaminy-mineraly&clanek=3773>
- [11] <http://elchem.kaist.ac.kr/vt/chem-ed/sep/lc/hplc.htm>
- [12] <http://kerouac.pharm.uky.edu/asrg/hplc/history.html>
- [13] http://kerouac.pharm.uky.edu/ASRG/HPLC/mobile_phase.html
- [14] http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/AJALB.htm
- [15] Klouda, P., *Moderní analytické metody*, 2.vyd., nakladatelství Pavel Klouda, 2003, s.25
- [16] <http://kerouac.pharm.uky.edu/asrg/hplc/injectors/html>
- [17] Snyder, Lloyd R., Kirhland, Joseph J., Glajch, Joseph L., *Practical HPLC method development*, 2nd ed., John Willey & Sons, Inc., 1997, s.175
- [18] <http://www.hplc.cz/>
- [19] http://www.hplc.cz/Tip/column_capilar.htm
- [20] <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
- [21] http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html
- [22] http://www.hplc.cz/Teorie/FL_detector.html

- [23] http://www.hplc.cz/Teorie/EC_detector.html
- [24] http://www.hplc.cz/Teorie/COND_detector.html
- [25] http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc
- [26] Mattila, P., Piironen, V., Uusi-Rauva, E., Koivistoinen, P., Cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol contents in fish and fish products, *Journal of food composition and analysis*, 8, 1995, s.232-243
- [27] Mattila, P., Piironen, V., Uusi-Rauva, E., Koivistoinen, P., Determination of 25-hydroxycholecalciferol content in egg yolk by HPLC, *Journal of food composition and analysis*, volume 6, 1993, s.250-255
- [28] Perales, S., Alegría, A., Barberá, R., Farré, R., Review of vitamin D determination in milk products, *Nutrition and Food Chemistry*, Faculty of Pharmacy, University of Valencia
- [29] Clausen, I., Jakobsen, J., Leth, T., Ovesen, L., Vitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 in raw and cooked pork cuts, *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 2003, s.575-585

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemists Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
WHO	World Human Organisation Světová zdravotnická organizace
IU	International Unit Mezinárodní jednotka
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations Organizace Spojených národů pro výživu a zemědělství
DBP	D-Binding Protein
TBC	Tuberkuóza
VDR	Vitamin D Nuclear Receptor
HPLC	High Performance Liquid Chromatography Vysokotlaká kapalinová chromatografie
NP-HPLC	Normal Phase High Performance Liquid Chromatography Vysokotlaká kapalinová chromatografie s normální fází
RP-HPLC	Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography Vysokotlaká kapalinová chromatografie s reverzní fází
PDA	Photodiode Array Detektor diodového pole
SPE	Solid Phase Extraction Extrakce na tuhou fázi

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr.1 Vitamin D ₂ a D ₃	9
Obr.2 3-D model vitamínu D.....	10
Obr.3 Strukturální příbuznost vitamínu D ₃ a vitamínu D ₂ s jejich příslušnými provitaminy, cholesterolem a steroidním hormonem kortisolem.....	10
Obr.4 Fotochemická cesta produkce vitamínu D ₃ ze 7-dehydrocholesterolu.....	12
Obr.5 Zdroje vitamínu D.....	14
Obr.6 Mikroskopický preparát <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15
Obr.7 Projev rachitis u malých dětí.....	17
Obr.8 Schéma kapalinového chromatografu.....	18
Obr.9 Schéma pumpy.....	20
Obr.10 Dávkovací ventil se smyčkou.....	21
Obr.11 Schéma HPLC kolony.....	22
Obr.12 Schéma detektoru s diodovým polem.....	25
Obr.13 Schéma fluorescenčního detektoru.....	26
Obr. 14 Schéma elektrochemického detektoru.....	27
Obr.15 Schéma vodivostního detektoru.....	29
Obr. 16 Ukázka chromatogramu.....	29

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Formy vitamínu D.....	9
Tabulka 2. Současné doporučené dávky vitamínu D stanovené Organizací Spojených národů pro výživu a zemědělství.....	13
Tabulka 3. Typy kolon a jejich uchovávání.....	23