

Izolace a stanovení vitamínu D v mléce

Bc. Vanda Stránská

Diplomová práce
2011

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav biochemie a analýzy potravin

akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Vanda STRÁNSKÁ**
Osobní číslo: **T09550**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Izolace a stanovení vitamínu D v mléce**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Stručně popsat fyziologické a fyzikálně-chemické vlastnosti vitamínu D.
2. Stručně popsat možnosti izolace vitamínu D z mléka či mléčných výrobků.
3. Shrnout princip kapalinové chromatografie.
4. Uvést velmi stručně příklady jiných technik pro stanovení vitamínu D.

II. Praktická část

1. Vlastní izolace a stanovení vitamínu D v mléce metodou HPLC.
2. Formulace diskuse a závěr.



Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin I*, OSSIS, Tábor 2009, třetí vydání, 602 s., ISBN 978-80-86659-15-2.

[2] SNYDER, L., KIRKLAND, J., GLAJCH, J. *Practical HPLC Method Development*, A Wiley-Interscience, Canada 1997, second edition, 765 p., ISBN 0-471-00703-X.

[3] WILSON, K., WALKER, J. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*, Cambridge University press, Cambridge 2000, fifth edition, 784 p., ISBN 0-521-65-104-2.

[4] ESCRIVÁ, A., ESTEVE, M., FARRÉ, R., FRÍGOLA, A. *Determination of liposoluble vitamins in cooked meals, milk and milk products by liquid chromatography*, *Journal of chromatography A*, Vol. 947, 2002, p. 313-318.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Daniela Sumczynski, Ph.D.

Ústav biochemie a analýzy potravin

Datum zadání diplomové práce:

25. února 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

20. května 2011

Ve Zlíně dne 21. března 2011

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno:STRÁNKOVKA VANDA.....

Obor:THEVP.....

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně20. 5. 2011.....

..........

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Diplomová práce pojednává v teoretické části o fyziologických účincích vitamínu D, jeho přítomnosti v různých potravinách a možnostech jeho izolace. Dále je popsán princip kapalinové chromatografie. V experimentální části jsou popsány postupně jednotlivé izolační kroky pro stanovení vitamínu D, technika zmýdelňování a následné zakoncentrování vzorku. Byly nastaveny chromatografické podmínky, za kterých byl vitamin D v potravinách kvantifikován.

Klíčová slova: HPLC, vitamin D

ABSTRACT

The theoretical part of the graduation theses diserts on physiological effects of vitamin D, its presence in various nourishment and possibilites of its isolation. Further there is a description of liquid chromatography. In the experimental part there are subsequently described individual isolation steps of vitamin D determination, technique of saponification and concentration of sample. There were set chromatography conditions, which were suitable for quantification of vitamin D in the nourishment.

Keywords: HPLC, vitamin D

Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce Ing. Daniele Sumczynski, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a informace, které mi poskytla při řešení diplomové práce. Rovněž děkuji laborantce Ing. Lence Fojtíkové za její pomoc v laboratoři. V neposlední řadě patří mé poděkování rodině a mým blízkým za umožnění studia a podporu, kterou mi poskytli při plnění studijních povinností.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	11
1 TEORETICKÁ ČÁST	13
1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA VITAMINŮ	14
1.1 VITAMIN D	15
1.1.1 Biochemie vitamínu D	16
1.1.2 Zdroje vitamínu D	18
1.1.3 Fyziologie vitamínu D.....	19
2 MOŽNOSTI IZOLACE VITAMINU D Z MLÉKA A MLÉČNÝCH VÝROBKŮ.....	21
2.1 POSTUP ZMÝDELNĚNÍ A EXTRAKCE U STANOVENÍ VITAMINU D ₃ VE ZPRACOVANÝCH MLÉČNÝCH PRODUKTECH	23
2.2 POSTUP ZMÝDELNĚNÍ A EXTRAKCE U STANOVENÍ VITAMINŮ ROZPUSTNÝCH V TUCÍCH VE VAŘENÉM MASE, MLÉCE A MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH KAPALINOVOU CHROMATOGRÁFÍ	24
2.3 POSTUP ZMÝDELNĚNÍ A EXTRAKCE U SIMULTÁNIHO STANOVENÍ VITAMINŮ A PROVITAMINŮ ROZPUSTNÝCH V TUCÍCH V MLÉČNÝCH PRODUKTECH METODOU KAPALINOVÉ CHROMATOGRÁFIE	25
2.4 POSTUP ZMÝDELNĚNÍ A EXTRAKCE U STANOVENÍ VITAMINŮ ROZPUSTNÝCH V TUCÍCH V JOGURTU HPLC S ELEKTROCHEMICKOU DETEKČÍ	26
2.5 POSTUP ZMÝDELNĚNÍ A EXTRAKCE U STANOVENÍ VITAMINU D POUŽITÍM METODY HPLC S ELEKTROCHEMICKOU DETEKČÍ A APLIKACÍ NA LÉČIVÉ PRODUKTY	27
2.6 POSTUP ZMÝDELNĚNÍ A EXTRAKCE U STANOVENÍ VITAMINŮ A, D A E V TRADIČNÍCH JÍDLECH A STRAVĚ DOSPĚLÝCH V KANADSKÉ ARKTIDĚ.....	27
2.7 POSTUP ZMÝDELNĚNÍ A EXTRAKCE U STANOVENÍ VITAMINU D ₃ VE VYBRANÝCH POTRAVINÁCH	28
2.8 POSTUP ZMÝDELNĚNÍ A EXTRAKCE U STANOVENÍ VITAMINŮ A, D, E A K SPOLU S KOENZYMEM Q ₁₀ A KAROTENOIDY V MULTIVITAMINOVÝCH TABLETÁCH, MLÉČNÉ VÝŽIVĚ A MLÉKU	29
2.9 POUŽITÉ MOBILNÍ FÁZE.....	29
3 VYSOCE ÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRÁFIE	31
3.1 SLOŽENÍ KAPALINOVÉHO CHROMATOGRÁFU A POPIS JEHO JEDNOTLIVÝCH ČÁSTÍ.....	32
3.1.1 Zásobník s mobilní fází.....	32
3.1.2 Čerpadlo	33
3.1.3 Dávkovací zařízení.....	33
3.1.4 Kolona	34
3.1.5 Detektory	35
4 JINÉ TECHNIKY PRO STANOVENÍ VITAMINU D.....	38

4.1	PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE	38
4.2	HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	38
II	PRAKTICKÁ ČÁST	39
5	METODIKA	40
5.1	CHEMIKÁLIE	40
5.2	POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	40
5.3	VZORKY MLÉKA A MLÉČNÝCH VÝROBKŮ	41
5.3.1	Mléko a mléčné nápoje	41
5.3.2	Sýry	46
5.3.3	Máslo a margaríny.....	48
5.4	PILOTNÍ POKUSY PŘI ZMÝDELNĚNÍ A EXTRAKCI VITAMINU D.....	51
5.4.1	Zmýdelnění vzorků a extrakce nezmýdelněných částí	51
5.4.1.1	Zmýdelnění za tepla.....	51
5.4.1.2	Zmýdelnění za studena.....	53
5.4.2	Přímá extrakce tuku.....	53
5.5	PILOTNÍ CHROMATOGRAFICKÁ SEPARACE PRO OPTIMALIZACI IZOLACE VITAMINU D	54
5.6	VÝSLEDNÉ ZMÝDELNĚNÍ A EXTRAKCE VZORKŮ PRO KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ VITAMINU D.....	54
5.6.1	Zmýdelnění mléka a mléčných nápojů.....	54
5.6.2	Zmýdelnění sýrů.....	55
5.6.3	Zmýdelnění másla a margarínů	55
5.6.4	Extrakce nezmýdelněných částí	55
5.7	CHROMATOGRAFICKÁ ANALÝZA VZORKŮ	56
5.8	KALIBRAČNÍ KŘIVKA	56
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	57
6.1	VÝSLEDKY PILOTNÍCH POKUSŮ ZMÝDELNĚNÍ A EXTRAKCE VITAMINU D	57
6.1.1	Výsledky zmýdelnění vzorků za tepla a za studena a extrakce nezmýdelněných částí.....	57
6.1.2	Výsledky přímé extrakce tuků.....	57
6.2	VÝSLEDKY PILOTNÍCH POKUSŮ CHROMATOGRAFICKÉ ANALÝZY PRO OPTIMALIZACI IZOLACE VITAMINU D	57
6.3	VÝSLEDKY MĚŘENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY VITAMINU D	58
6.4	ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ	61
6.4.1	Stanovení vitamínu D ve vzorcích mléka a mléčných nápojů	61
6.4.2	Stanovení vitamínu D ve vzorcích sýra.....	66
6.4.3	Stanovení vitamínu D ve vzorcích másla a margarínů.....	68
	ZÁVĚR	72
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	74
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	80

SEZNAM OBRÁZKŮ	81
SEZNAM TABULEK.....	82
SEZNAM PŘÍLOH.....	83

ÚVOD

V současné době, kdy dochází ke zvyšování životní úrovně, lidé věnují stále více času práci. Aby však člověk podával kvalitní a hlavně stabilní výkony, musí být vyrovnaný jak po psychické, tak i fyzické, potažmo zdravotní stránce. K tomu je zapotřebí mnoha faktorů, které lidský organizmus ovlivňují. V neposlední řadě je to strava, která má na člověka významný vliv. Trendem dnešní doby je však stravování v rychloobčerstveních, popřípadě nákup hotových jídel, která jsou bohužel ne příliš vhodná. Obsahují velké množství cukrů, tuků, konzervantů apod., hlavně jsou zde ve velmi nízkých koncentracích zastoupeny látky, které jsou pro zdraví důležité (např. vitaminy a minerální látky).

Vitaminy jsou esenciální látky organického charakteru, většinu z nich si lidský organizmus nedokáže syntetizovat sám, případně pouze v omezené míře. Musí je tedy přijímat převážně z potravy. Jelikož kvalita stravování klesá, začíná se světová zdravotnická organizace na tento problém zaměřovat a začíná rozvíjet celosvětové kampaně na zlepšování kvality stravování. Doporučuje jíst více potravin, jako je například zelenina, ovoce, netučné maso, ryby, mléko, mléčné výrobky apod.

Tato práce se zabývá stanovením vitamínu D, který je pro organizmus důležitý, jelikož se podílí na vstřebávání vápníku, ovlivňuje diferenciaci buněk a také má významný vliv na samotnou imunitu, která se v poslední době začíná dostávat do popředí zájmu. Vitamin D má několik forem a každá forma se do lidského organismu dostává jiným způsobem, potažmo má jiný mechanismus tvorby. Zdrojem vitamínu D jsou jak živočišné tak i rostlinné produkty. Významnými zdroji jsou játra, oleje z rybích jater, rybí maso, ale i maso běžných hospodářských zvířat. Z rostlinných zdrojů se jedná o kokos, houby, zelí, špenát atd. Mezi významné zdroje patří také mléko a mléčné výrobky, protože je člověk konzumuje téměř denně.

Stanovení vitamínu D v mléce a mléčných produktech není jednoduché, protože vitamin D je v těchto výrobcích zastoupen ve velmi nízkých koncentracích (řádově μg). Pro analýzu vybraných vzorků byla zvolena Vysoce účinná kapalinová chromatografie. Jedná se o moderní chromatografickou metodu, která je ceněna pro svou rychlost, přesnost, selektivitu a citlivost analýzy.

Cílem této diplomové práce bylo nalézt vhodný izolační postup vitamínu D ze vzorků mléka a mléčných výrobků a kvantitativně stanovit jeho obsah ve vybraných vzorcích pomocí Vysoce účinné kapalinové chromatografie

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA VITAMINŮ

Vitaminy jsou organické nízkomolekulární sloučeniny syntetizované výhradně autotrofními organismy. Heterotrofní organismy je syntetizují jen ve velmi omezené míře (např. člověk syntetizuje niacin z tryptofanu) a získávají je jako exogenní látky především potravou a některé z nich prostřednictvím střevní mikroflóry [1]. Sloučeniny, které jsou považovány za vitaminy pro jeden živočišný druh, mohou být syntetizovány v přiměřených množstvích jinými druhy.

Mezi jednotlivými vitaminy neexistuje žádný vztah mezi sebou navzájem po stránce chemické struktury [2]. Hlavní klasifikace vitaminů je na základě jejich rozpustnosti, podle níž je lze rozdělit na vitaminy rozpustné ve vodě (hydrofilní) a na vitaminy rozpustné v tucích (lipofilní).

Mezi vitaminy rozpustné ve vodě se zařazují:

– skupina vitaminů B-komplexu:

- vitamin B₁ (tiamin)
- vitamin B₂ (riboflavin)
- vitamin B₃ (kyselina nikotinová a její amid)
- vitamin B₅ (kyselina pantotenová)
- vitamin B₆ (pyridoxin)
- vitamin B₉ (kyselina listová)
- vitamin B₁₂ (kyanokobalamin)
- biotin

– vitamin C (kyselina L-askorbová a L-dehydroaskorbová)

Mezi vitaminy rozpustné v tucích patří:

- vitamin A (retinol) a jeho provitaminy (karotenoidy)
- vitamin D (kalciferoly)
- vitamin E (tokoferoly a tokotrienoly)
- vitamin K (fylochinony, farnochinony) [3]

Pokud není zajištěn dostatečný příjem vitaminů, nedostatek těchto látek vede k hypovitaminóze, jejich úplný nedostatek pak k avitaminóze. Oba případy se mohou objevit nejen v důsledku nedostatečného příjmu vitaminů potravou (např. změny obsahu vitaminů při skladování, konzervaci apod.), také mohou být způsobeny nedostatečnou resorpcí vitaminů v zažívacím traktu (např. onemocnění zažívací soustavy), stresem a nemocemi [4,5].

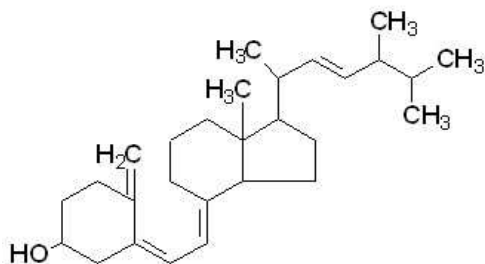
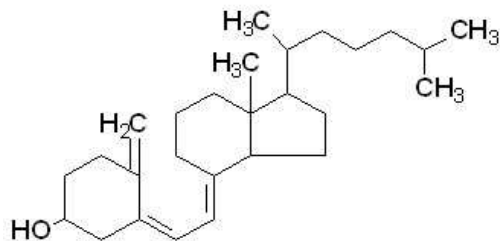
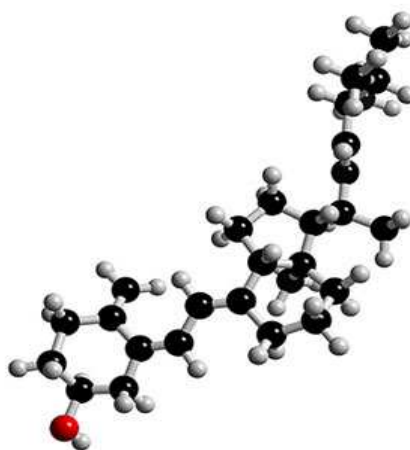
Mnohé vitaminy jsou za určitých podmínek při zpracování a skladování nestálé a jejich množství může být zpracováním potravin značně sníženo. Proto jsou používány syntetické vitaminy, které tyto ztráty kompenzují a obnovují hladinu vitaminů v potravinách. Některé vitaminy se vyskytují v potravinách jako provitaminy, sloučeniny které v těle mohou být přeměněny na vitaminy [6]. Nadbytek některých vitaminů se označuje jako hypervitaminóza. U nás se s ní prakticky nesetkáváme, příčina hypervitaminózy je většinou spojována s nadměrným přísunem vitaminů pomocí doplňků stravy. Zde jsou zejména nebezpečné zvýšené dávky vitaminů A a D [7].

1.1 Vitamin D

Vitamin D známe jako v tucích rozpustný vitamin, který v lidském těle zastává řadu fyziologických funkcí, včetně hormonální. Podílí se na udržování stabilní koncentrace vápníku, ovlivňuje diferenciaci buněk a významnou měrou ovlivňuje také imunitní procesy [8]. Jedná se o skupinu příbuzných lipofilních steroidních látek s antirachitickým účinkem nazývaných kalciferoly. Mezi nejvýznamnější patří dva vitaminy: vitamin D₂-ergokalciferol a vitamin D₃-cholecalciferol. Společně s kalcitoninem a parathormonem je důležitý pro regulaci homeostázy vápníku a pro metabolismus fosforu [3].

Formy vitaminu D:

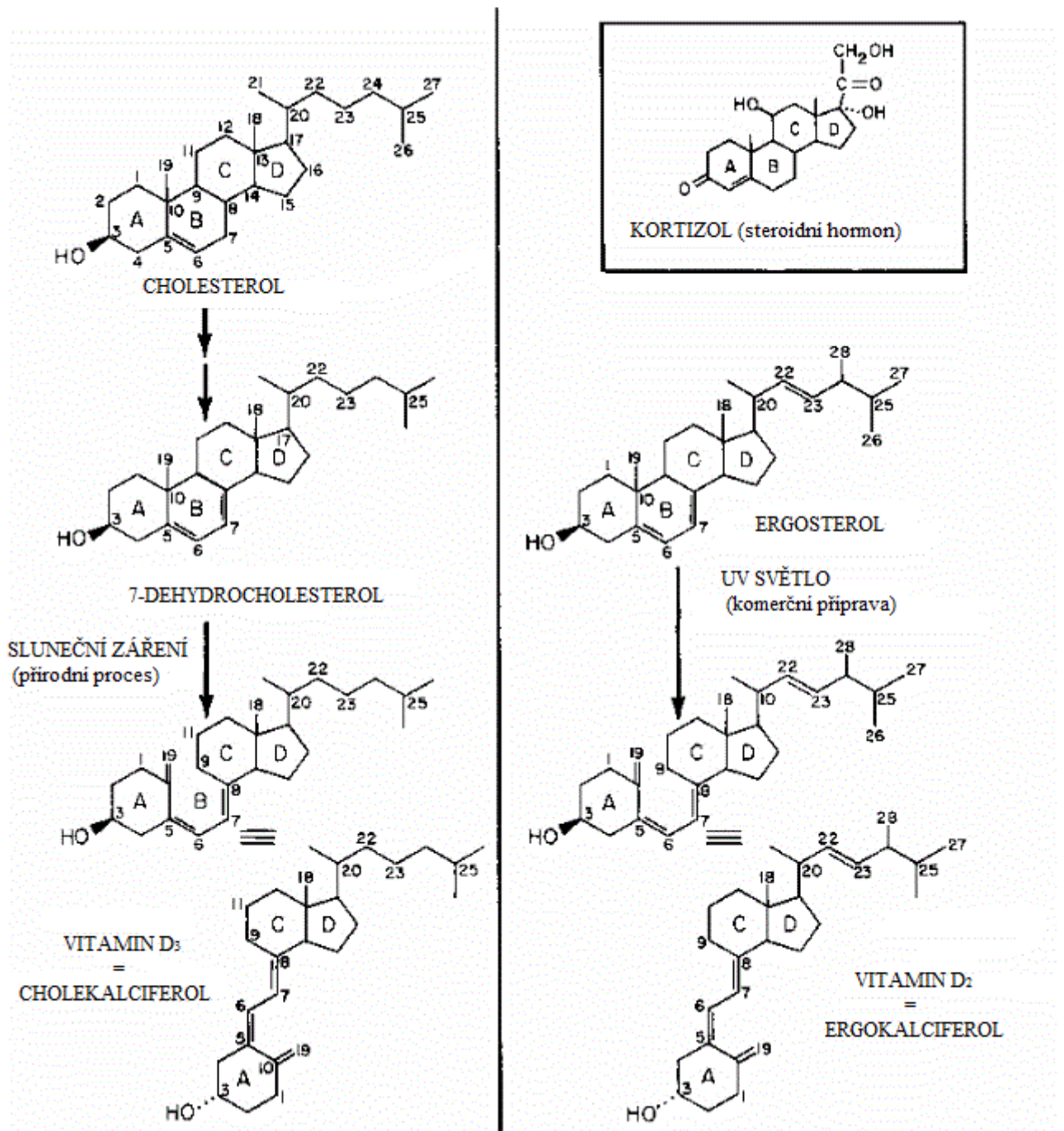
- Vitamin D₁: lamisterol
- Vitamin D₂: ergokalciferol (vzniká z ergosterolu)
- Vitamin D₃: cholecalciferol (vzniká ze 7-dehydrocholesterolu)
- Vitamin D₄: dihydrotachysterol (22:23-dihydrovitamin D₂)
- Vitamin D₅: vzniká ozářením z 7-dehydrositosterolu [9]

Obr. 1. Vitamin D₂ [10]Obr. 2. Vitamin D₃ [10]

Obr. 3. 3-D model vitamínu D [11]

1.1.1 Biochemie vitamínu D

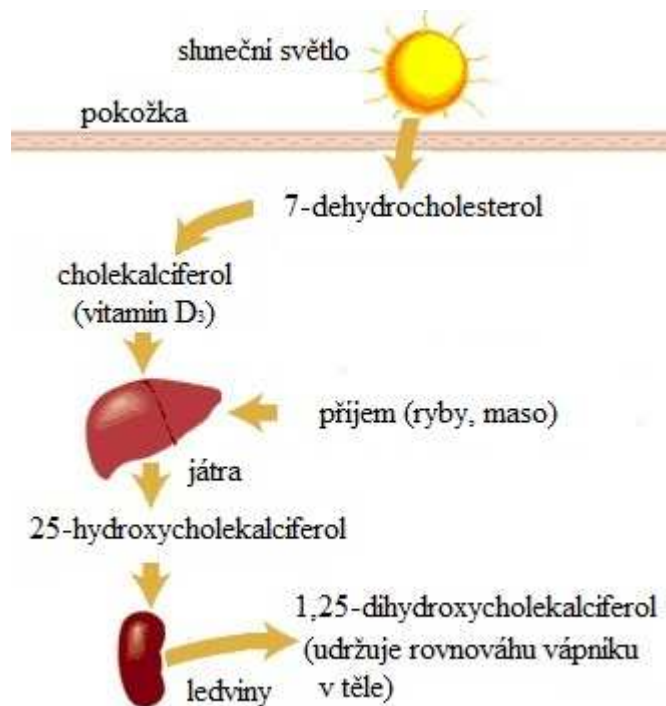
Vitaminy D₃ a D₂ vznikají z provitaminů D ozářením UV paprsky. Je třeba podotknout, že vitamin D₃ je přirozeně vyskytující se forma vitamínu, která vzniká působením slunečního záření v buňkách pokožky ze 7-dehydrocholesterolu. Vitamin D₂ je komerčně vyráběný ozářením rostlinného sterolu ergosterolu ultrafialovým zářením. Z obr. 4. je patrné, že cholecalciferol a ergocalciferol jsou molekuly podobné, navzájem se od sebe liší způsobem vzniku a svým postranním řetězcem, který je u vitamínu D₂ nenasycený a obsahuje vedlejší metylovou skupinu [12,13].



Obr. 4. Strukturální vztah vitamínu D₃ a vitamínu D₂ [12]

Působením UV světla o vlnové délce 280 - 320 nm vzniká ze 7-dehydrocholesterolu (provitamínu D₃) fotochemickou reakcí nejprve meziprodukt, tzv. precholecalciferol (previtamin D₃) s otevřeným kruhem B (vykazuje asi 35 % aktivity cholecalciferolu), který spontánně izomeruje za migrace vodíku na cholecalciferol. Cholecalciferol se váže na specifický globulin krevní plasmy DBP (vitamin D-Binding Protein) a je transportován do

jater. V játrech je skladován a podle potřeby se oxiduje na 25-hydroxycholecalciferol (kalcidiol), který je hlavním cirkulujícím metabolitem cholecalciferolu. Tato látka se v ledvinách metabolizuje na řadu dihydroxysubstituovaných vitaminů D_3 . Mezi nejdůležitější metabolity patří 1,25-dihydroxycholecalciferol (kalcitriol) a 24,25-dihydroxycholecalciferol. Biologická účinnost 1,25-dihydroxycholecalciferolu je asi desetkrát vyšší než účinnost cholecalciferolu. Je považován za biologicky aktivní formu vitaminu D_3 . Spolu s dalšími dvěma hormony, kalcitoninem a parathormonem se uplatňuje v metabolismu vápníku a fosforu [1].



Obr. 5. Vznik biologicky aktivní formy vitaminu D_3 [14]

1.1.2 Zdroje vitaminu D

Vitamin D se nachází v živočišných i rostlinných produktech. Významné množství vitaminu D obsahují játra, oleje z rybích jater, cenným zdrojem je také maso tučných ryb, jako např. sledě, makrela, losos. Menší množství vitaminu je v mase a vnitřnostech hospodářských zvířat, mléku, mléčných výrobcích a vejcích. Z rostlinné říše jsou dobrým zdrojem kokosové máslo, houby, zvláště hřiby, kvasnice, zelí, špenát, pšeničné klíčky a oleje [1,4,7,15].

Tab. 1. Obsah vitamínu D ve vybraných potravinách [3]

Potravina	Obsah vitamínu D [$\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	Potravina	Obsah vitamínu D [$\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$]
Játra hovězí a vepřová	1,13	Halibut v oleji	3500
Vaječný žloutek	7,50	Čerstvá makrela	27,50
Mléko	0,11	Rybí tuk	250,0
Máslo	2,30	Sardinky	34,50
Hřiby	2,10	Losos sterilovaný	7,85

1.1.3 Fyziologie vitamínu D

Vitamin D má mezi vitamíny zvláštní postavení, protože může být v těle syntetizován a není nutné ho vždy dodávat stravou [3]. Obsah bývá často uváděn v mezinárodních jednotkách (IU, International Units). Za jednu mezinárodní jednotku bylo stanoveno množství 0,025 μg vitamínu D₃ nebo vitamínu D₂. Oba vitamíny mají stejnou biologickou účinnost [1]. Doporučená denní dávka vitamínu D je 200 IU (200 IU je ekvivalentní 5 μg) pro děti, dorost a dospělé až do horní hranice věku 50 let. Pro lidi mezi 51 - 70 rokem je doporučená denní dávka vitamínu D 400 IU (10 μg) a pro osoby starší nad 70 let je tato dávka 600 IU (15 μg). Tyto doporučené dávky vitamínu D jsou stanoveny FAO (Food and Agriculture Organization, Organizace pro výživu a zemědělství) [16]. V doporučených výživových dávkách pro obyvatele ČR není vitamin D uveden. Bylo zjištěno, že dospělá osoba bílé pleti vystavená letnímu slunci syntetizuje ve své kůži 250 μg vitamínu D₃ za 15 - 20 minut. Při delší expozici se již žádný vitamin D nevytváří [7].

V některých případech je příjem vitamínu D potravou nutný a to zejména v zimních měsících, kdy je populace vystavena malé míře slunečního záření. Z tohoto důvodu jsou některé potraviny fortifikovány právě tímto vitamínem. Množství UV záření dopadajícího na kůži může být také ovlivněno znečištěným ovzduším ve městech, dlouhodobým používáním opalovacích krémů s vysokým ochranným faktorem a životem v oblastech, kde není dostatek slunečního záření. Všechny tyto faktory mohou přispívat k neschopnosti kůže syntetizovat dostatečné množství vitamínu D₃ [17].

Nedostatek vitamínu D vede u kojenců a malých dětí k rachitidě, která se v důsledku nedostatečně mineralizovaných kostí, projevuje deformacemi kostry. Mezi další příznaky patří snížená svalová síla, snížený tonus svalů a zvýšená náchylnost k infekcím. U dospělých se nedostatek vitamínu D projevuje jako osteomalacie (měknutí kostí), která je charakterizována demineralizací (vyplavování Ca^{2+}) a změnou již plně vyvinutých kostí.

Hypervitaminóza se projevuje nechutenstvím až anorexií, zvracením, průjmem, bolestí hlavy, zmateností [3,7]. Vysoké dávky vitamínu D přijímané dlouhodobě mohou způsobit hyperkalcinemii. V organismu dochází k zadržování vápníku, je vyplavován z kostí a současně ukládán v různých orgánech, např. srdci, plicích apod.



Obr. 6. Projevy rachitidy u malých dětí [18]



Obr. 7. Rentgenový snímek nohou u rachitidy [19]

2 MOŽNOSTI IZOLACE VITAMINU D Z MLÉKA A MLÉČNÝCH VÝROBKŮ

Lipidová frakce mléka obsahující vitamin D je složena především z triacylglycerolů s menším množstvím sterolů, karotenoidů, fosfolipidů a jiných složek. Všechny tyto sloučeniny vykazují podobnou charakteristiku co do rozpustnosti jako vitamin D, a proto vytvářejí potencionální problém při izolaci tohoto vitamínu. Část vitamínu D v mléce je vázána v lipoproteinovém komplexu a z tohoto důvodu musí být rozrušeny vazby v asociátech tuk-bílkovina, aby došlo k uvolnění vitamínu. Vitaminové přípravky přidávané do mléka častokrát obsahují ochranné želatinové obaly, které musejí být rozpuštěny před zahájením analýzy. Proto stanovení vitamínu D v mléce vyžaduje zdlouhavou přípravu vzorků – homogenizaci, izolaci, koncentraci vitamínu a eliminaci rušivých látek v co největší míře.

Mohou být použity dva postupy přípravy vzorku:

- zmýdelnění a extrakce nezmýdelněných částí
- přímá extrakce tuku [20]

Zmýdelnění

Alkalická hydrolyza neboli saponifikace je účinný postup pro odstranění neutrálních tuků, hlavně triacylglycerolových složek v mléce. Hydrolytické reakce esterových vazeb jsou následovány uvolněním mastných kyselin a glycerolu z acylglycerolů a fosfolipidů, z esterifikovaných sterolů a karotenoidů. Při této reakci se uvolňují také vitaminy [20].

- Obvykle se provádí zmýdelnění za tepla ve vodném, etanolickém nebo metanolickém roztoku KOH při teplotě 60 – 100 °C a době 20 – 45 min. Etanolický roztok KOH zabraňuje tvorbě emulzí a mísí se velmi dobře s tuky, ale vyžaduje denní přípravu. Na druhou stranu vodný roztok KOH se nemísí dobře s tuky, ale je mnohem více stabilní, což je pravděpodobně důvod, proč se více používá. Při použití roztoku KOH o koncentraci 1,9 mol.dm⁻³, se získá výtěžek vitamínu D menší než 40 %. Výtěžek se zdvojnásobí při zvýšení koncentrace roztoku KOH na 3,8 mol.dm⁻³ [20].
- Kromě toho se používá zmýdelnění za studena po dobu 12 – 24 hod. Toto se provádí ve vodném nebo etanolickém roztoku KOH při pokojové teplotě za

neustálého míchání. Tento postup předchází tepelné izomerizaci vitamínu D na previtamin D, který se může vyskytovat u zmydlení za tepla (izomerizační ztráty při zmydlení za studena jsou menší než 5 %, naproti tomu u podmínek za tepla jsou ztráty 10 - 20 %). Kromě toho vyžaduje zmydlení za studena nižší nároky na vybavení a nižší pozornost obsluhy a dosahuje lepších výtěžků než zmydlení za tepla [20].

Vitamin D je nestabilní, proto je běžné, že se při zmydlení používají antioxidanty, jako jsou pyrogalol, butylhydroxytoluen a kyselina askorbová.

Jakmile je zmydlení hotové, jsou vzorky extrahovány pomocí organických rozpouštědel, které jsou nemísitelné s vodou. Používají se hlavně hexan a jiná rozpouštědla jako petroléter, etyléter, pentan nebo směs těchto látek. Je doporučováno používat hexan namísto etyléteru, protože etyléter je více hořlavý a nestabilní než hexan a navíc se snadněji odstraňuje při teplotě nižší než 80 °C při nižším tlaku. Nicméně, někteří autoři preferují etyléter, protože je méně náchylný k tvorbě emulzí [20].

Přímá extrakce

Vitamin D může být přímo extrahován (bez předešlého zmydlení) pomocí organických rozpouštědel – nejvíce používané jsou metyldichlorid, samotný nebo ve směsi s metanolem a dále hexan samotný nebo smíchaný s etyléterem nebo chloroformem. V některých případech se používá ultrazvuk společně s přísadkou etanolu ke vzorku, kdy dojde k rozbití lipoproteinového komplexu. U přímé extrakce jsou popsány nižší výtěžky vitamínu D, se srovnáním výtěžku získaného při zmydlení [20].

Ačkoliv extrakce na pevné fázi (Solid Phase Extraction - SPE) je méně častá, je přesto možné ji použít. Při SPE extrakcích mohou být použity C₁₈ náplně společně s polárními eluenty (metanol) nebo Chromabond XTR náplň s nepolárním eluentem (hexan). Tradiční C₁₈ náplně jsou odpovědné za uchování a eluci v tučných rozpustných vitamínů, polární rozpouštědla použité při eluci nedostatečně uvolňují vitamin D zadržovaný v náplni [20].

Koncentrace vzorku a čištění

Obvyklý postup koncentrace je odpařování při sníženém tlaku ve vakuové rotační odparce nebo pod proudem dusíku při rozdílných teplotách, které jsou vždy nižší než 50 °C.

K čištění extraktu se používají následující postupy:

- SPE: polární (s náplní sep-pak 2OH nebo Si) nebo nepolární (s náplní sep-pak C₁₈). Tento postup nabízí následující výhody: je jednoduchý a reprodukovatelný, odstraňuje steroly z nezmýdelněných částí a prodlužuje život analytické kolony [20].
- Alternativou k čistícím postupům je přeměna vitaminů D₂ i D₃ přítomných v nezmýdelněné fázi na izotachisterol - směs více stabilních izomerů vitamínu D vůči teplu, světlu a suchu s menším rizikem ztrát. Vedle toho izotachisterol má absorpční maximum 301 nm, tj. při vyšších vlnových délkách než vitamin D (256 nm). To přispívá k zlepšení selekce, protože většina rušivých směsí obsažených v mléce neabsorbují tyto vlnové délky [20].

2.1 Postup zmýdelnění a extrakce u stanovení vitamínu D₃ ve zpracovaných mléčných produktech

Cílem této metody bylo rozvinout zmýdelnění a postup extrakce pro stanovení vitamínu D₃ v malém množství vzorku (1 g) kapalného mléka, sýra, jogurtu a zmrzliny. Postup byl odvozen z metody Bligha a Dyera (1959) a metoda byla modifikována Viethem a Fraserem (1979). V metodě bylo provedeno množství úprav:

- tato metoda se běžně aplikuje na velmi kapalné vzorky (obsah kolem 80 % vody), úprava metody bere v úvahu, že je potřeba vysoká vlhkost mléčných výrobků
- váhat vzorku byla snížena
- byl začleněn dodatečný krok zmýdelnění před extrakcí pro efektivní rozbití triacylglycerolů [21]

Daná polopevná fáze a rozdílný obsah vlhkosti v produktech vyžaduje z důvodu obnovení vitamínu dodatečný krok přípravy vzorku, kdy je třeba smíchat mléčný produkt s vodou v třecí misce nebo míchači před samotným zmýdelněním. Byl použit 1 g vzorku mléka pro extrakci vitamínu D₃. Z bloku sýra byl odebrán 1 g vzorku a smíchán se 4 g destilované vody a vše bylo rozetřeno v třecí misce. Pro extrakci vitamínu D₃ byl použit 1 g vzorku výsledné směsi. U analýzy syrovátky byl odebrán 1 g vzorku, byl zmýdelněn a analyzován. Vzorek jogurtu byl zhomogenizován s vodou v poměru 1:2 (jogurt:voda). Pro zmýdelnění a

analýzu byl použit 1g vzorku. Zmrzlina se nechala nejprve rozmraznout, poté byla rozmíchána a následně byla zředěna s destilovanou vodou v poměru 1:3. 1 g tohoto vzorku byl odebrán pro analýzu vitamínu D₃ [21].

Všechny vzorky (1 g) byly naváženy do 10ml zkušební zkumavky a ke vzorkům bylo přidáno 0,5 ml 60% vodného roztoku hydroxidu draselného. Všechny vzorky byly zamíchány pod proudem dusíku z důvodu minimalizace oxidace vitamínu D. Pak byly protřepány a přemístěny do vodní lázně o teplotě 70 °C po dobu 30 min. Jednou za 5 min. byly zkumavky zamíchány. Po 30 min. byly vzorky zchlazeny v ledové lázni po dobu 10 min. Následně bylo ke vzorkům přidáno 3,75 ml směsi metanol:chloroform (2:1) a každá zkumavka byla zamíchána. Následně bylo přidáno do každé zkumavky 1,25 ml chloroformu a opět byly promíchány. Vzorky byly odstředěny (1500 x g) po dobu 10 min. při 4 °C. Čistý chloroform na dně každé zkumavky byl odstraněn použitím skleněné stříkačky a byl přemístěn do odpařovací nádoby. Extrakt chloroformu byl sušen pod proudem plynu dusíku a rekonstituován ve 2 ml mobilní fáze pro HPLC (metanol:acetonitril:voda ⇒ (49,5:49,5:1) a ponechán v klidu po dobu 15 minut. Rekonstituovaný extrakt byl filtrován přes filtr o velikosti pórů 0,45 μm a ponechán v utěsněné nádobě pro HPLC analýzu [21].

2.2 Postup zmýdelnění a extrakce u stanovení vitamínů rozpustných v tucích ve vařeném mase, mléce a mléčných výrobcích kapalinovou chromatografií

Zmýdelnění bylo provedeno v atmosféře dusíku bez přítomnosti světla. Zkoumané vitaminy jsou citlivé na oxidaci, některé také na UV záření. Z tohoto důvodu byla přidávána kyselina askorbová jako antioxidant. Byly vyzkoušeny rozdílné podmínky zmýdelnění. Nejprve bylo zmýdelnění provedeno při běžné teplotě okolí přes noc, bylo však zjištěno, že zmýdelnění nebylo kompletní. Dále bylo zmýdelnění provedeno při 37 °C po dobu 15 hod. s mícháním, v tomto případě došlo ke kompletnímu zmýdelnění, avšak emulzi bylo těžké během extrakce rozbít. Nakonec byly pro saponifikaci vybrány následující podmínky: bylo naváženo 10 g vzorku, ke kterému bylo přidáno 40 ml čistého etanolu a 10 ml 50% roztoku KOH. Směs byla ponechána 30 min. při 80 °C v proudě inertního plynu (N₂) za neustálého míchání. Z důvodů možné oxidace bylo přidáno 0,3 g kyseliny askorbové [22].

Široce používaným rozpouštědlem pro extrakci vitaminů rozpustných v tucích je hexan. Stancher a Zonta studovali účinnost hexanu a dietyléteru pro stanovení α -tokoferolu a získali následující výsledky: $14,1 \pm 0,7$ % s hexanem (4 x 50 ml) a $89,8 \pm 1,4$ % s dietyléterem (1 x 200 ml). Z tohoto důvodu byl vybrán dietyléter pro tuto studii a extrakce byla provedena s 50 ml (4x). Jakmile byl nezmýdelněný podíl zchlazen, byl přemístěn do dělicí nálevky a extrakce byla provedena s 4 x 50 ml dietyléteru (bylo ověřeno, že pokud byla extrakce provedena 5x, výsledek se neměnil). Éterová frakce byla smíchána a promyta destilovanou vodou. První kapalina získána z této činnosti byla reextrahována s dietyléterem a výsledný extrakt byl přidán k éterové fázi. Éterový extrakt byl vysušen bezvodým Na_2SO_4 smícháním v 250ml nádobě a vše bylo odsáno na vakuové rotační odparce (40 °C) [22].

2.3 Postup zmýdelnění a extrakce u simultáního stanovení vitaminů a provitaminů rozpustných v tucích v mléčných produktech metodou kapalinové chromatografie

Extrakce na pevné fázi:

Vzorky mléka, 1 ml čerstvého mléka a 2,5 ml obohaceného mléka byly přemístěny do zkumavky a k nim bylo přidáno 500 μl etanolu s 0,025% butylhydroxytoluenem (BHT pro ochranu vitamínu proti oxidaci). Vzorek byl následně ponechán 2 min. v ultrazvukové lázni z důvodu rozbití lipoproteinového komplexu, které obalují v tucích rozpustné vitaminy. Vše bylo zředěno 4 ml destilované vody. Extrakce na pevné fázi byla provedena použitím Mega Bond Elut C_{18} kolony, která byla použita k odstranění potenciálních balastních látek ve vzorku a pro zakoncentrování [23].

Kolona byla oživena s 25 ml metanolu a 10 ml destilované vody. Vzorek prošel skrz Mega Bond Elut C_{18} kolonu při kontrolovaném průtoku, který byl adekvátní pro zabezpečení uchování vitaminů. Kolona byla následně promyta 5 ml metanolu:vody (1:9) a následovala eluce vitaminů rozpustných v tucích s 6 ml metanolu. Eluát byl filtrován přes filtr o velikosti pórů 0,45 μm . Následně byl vzorek odpařen do sucha pod proudem dusíku. Zbytek byl rozpuštěn ve 20 nebo 40 μl etanolu s 0,025% BHT [23].

Extrakce kapalina-kapalina:

Vzorky (5 ml čerstvého mléka a obohaceného mléka, 1g másla) byly přemístěny do 10ml zkumavky, k nim bylo přidáno 5 ml etanolu s 0,025% BHT a vše bylo homogenizováno po dobu 2 min. v ultrazvukové lázni.

Směs byla následně přemístěna do dělicí nálevy, ke které bylo přidáno 15 ml hexanu a následovalo 5 min. míchání. Organická vrstva byla přemístěna do jiné dělicí nálevky a extrakční proces se opakoval s dalšími 15 ml hexanu. Obě organické vrstvy byly smíchány a proprány 2 dávkami (5 ml každá dávka) směsí metanolu:vody (9:1). Organická vrstva byla odseparována a filtrována přes filtr o velikosti pórů 0,45 μm a větší část hexanu byla odpařena pod proudem dusíku. Následně byl roztok přemístěn do kuželové baňky a byl odsán do sucha. Zbytek byl znovu rozpuštěn ve 20 μl metanolu. Do systému HPLC bylo dávkováno 5 μl tohoto roztoku [23].

Alkalická hydrolyza:

Vzorek (5ml obohaceného mléka) byl přes noc zmýdelňován při pokojové teplotě se 3 ml 60% vodného roztoku KOH a 10 ml etanolu s 0,025% BHT z důvodu zabránění oxidace. Vitaminy byly extrahovány výše uvedenou metodou kapalina-kapalina [23].

2.4 Postup zmýdelnění a extrakce u stanovení vitaminů rozpustných v tucích v jogurtu HPLC s elektrochemickou detekcí

Postup bez hydrolyzy:

Ke vzorku jogurtu (40 g) bylo přidáno 40 ml extrakční směsi (hexan:chloroform, 2:1). Vzorek jogurtu a extrakční směsi byl míchán po dobu 2 hod. při 1000 otáčkách za min., směs byla chráněna proti světlu. Poté bylo provedeno odstředění při 4000 otáčkách za min., čímž došlo oddělení organické fáze. Organická fáze byla odpařena v odparce při 50 °C a ke zbytku bylo přidáno 6 ml metanolu. Následně bylo provedeno čištění použitím C_{18} náplně, která byla předtím napuštěna 2 ml stejného rozpouštědla a nastavena na konečné množství 10 ml. Takto připravený vzorek byl aplikován do HPLC systému [24].

Postup s hydrolyzou:

Vzorek jogurtu (20 g) byl zmýdelňován přes noc při pokojové teplotě s 15 ml 80% vodného roztoku KOH, ke kterému bylo přidáno 50 ml etanolu. Ke směsi byla přidána

kyselina askorbová z důvodu zabránění oxidace. Vitaminy byly extrahovány hexanem, rozpouštědlo bylo odpařeno a zbytek byl rozpuštěn v 5 ml metanolu. Takto získaný vzorek byl nastříknut do HPLC systému po předešlé filtraci přes filtr o velikosti pórů 0,45 μm [24].

2.5 Postup zmýdelnění a extrakce u stanovení vitamínu D použitím metody HPLC s elektrochemickou detekcí a aplikací na léčivé produkty

V 300ml neprůhledné varné baňce bylo smícháno 40 ml vzorku s 50 ml 0,6% etanolického roztoku pyrogalolu a s 6 g pevného KOH. Poté byla směs zmýdelněna po dobu 30 min. ve vroucí vodní lázni. Zmýdelněná směs byla přemístěna do dělicí nálevky a varná baňka byla postupně vypláchnuta 2 dávkami 25 ml vody a 25 ml dietyléteru. Roztok v dělicí nálevce byl zamíchán. Vodná vrstva byla odstraněna a extrakční proces byl opakován 2x s 35 ml dietyléteru. Vrstva dietyléteru byla smíchaná s vrstvou z první extrakce. Extrakt dietyléteru byl proplachován 30 ml vody, až do doby než se přestala objevovat červená barva způsobená fenolftaleinem ve vodném roztoku. Fenolftalein byl k extraktu přidán z důvodu zviditelnění zásaditého prostředí, které bylo nutno odstranit. Roztok byl odpařen pod sníženým tlakem při teplotě 40 °C. K odpařenému zbytku bylo přidáno 5 ml etanolu a roztok byl znovu odpařen, aby se odstranily poslední stopy vody ve vzorku. Koncentrovaný extrakt byl zředěn s n-hexanem a přemístěn do 10ml neprůhledné vzorkovací ampulky a znovu odpařen do sucha v atmosféře dusíku. Ke vzorku bylo přidáno 0,3 ml n-hexanu a roztok byl použit pro HPLC analýzu [25].

2.6 Postup zmýdelnění a extrakce u stanovení vitaminů A, D a E v tradičních jídlech a stravě dospělých v Kanadské Arktidě

Zhomogenizovaný vzorek ($5,0 \pm 0,1$ g) byl navážen do 50ml centrifugační zkumavky a ke vzorku bylo přidáno 20 ml 2% etanolického roztoku pyrogalolu a 20 ml 50% etanolicko:vodného roztoku (49:1) KOH. Po důkladném zamíchání byl vzorek inkubován ve tmě po dobu 18 hod. Po inkubaci byl vzorek zamíchán a 40 ml vzorku bylo přemístěno do dělicí nálevky, kam bylo přidáno 60 ml deionizované vody a 80 ml petroléteru a vše bylo zamícháno. Po oddělení dvou fází, byla organická vrstva přemístěna do 500ml

nádoby, která byla obalena alobalem, z důvodu pronikání světla a následné oxidace. Extrakce byla zopakována 2x s 80 ml hexanu. Pokud došlo k tvorbě emulze, byl přidán etanol. Organická fáze byla zahuštěna pod dusíkem na zhruba 5 ml v rotační odparce, převedena do malé lahvičky a poté kompletně vysušena taktéž pod dusíkem. Vzorek byl rozpuštěn v 1 ml metanolu, nádoba byla 3x vypláchnuta 1 ml metanolu a proplach byl smíchán se vzorkem. Vzorek byl filtrován přes SRi Titan PTFE filtr (0,45 μm). Takto získaný vzorek byl použit pro HPLC analýzu [26].

2.7 Postup zmýdelnění a extrakce u stanovení vitamínu D₃ ve vybraných potravinách

Hmotnost analytické části odebraná u většiny vzorků byla vypočítána na 0,3 μg (12 IU) přibližně obsahujícího vitamínu D₃, na základě odhadů z existujících údajů o složení potravin. Vzorek byl navážen do 250ml Erlenmeyerovy baňky s kulatým hrdlem a ke vzorku bylo přidáno 400 mg kyseliny askorbové. K takto připraveným vzorkům bylo přidáno 15 ml etanolu a vše bylo důkladně zamícháno. K tekutým vzorkům (mléko, pomerančový džus) byl přidán pevný KOH. Ke vzorkům v pevném skupenství (cereálie, konzervovaný losos, tavený sýr) byl přidán 1 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ vodný roztok KOH. Hmotnost a objem KOH byl následující pro jednotlivé vzorky:

- 30 ml mléka, 7,5 g KOH
- 30 ml pomerančového džusu, 7,5 g KOH
- 9 g cereálií, 135 ml 1 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KOH
- 10 g konzervovaného lososa, 135ml 1 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KOH
- 9 g taveného sýra, 135 ml 1 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KOH

S baňkou bylo mícháno, dokud nebyl pevný KOH rozpuštěn v kapalném vzorku nebo pevný vzorek nebyl rovnoměrně rozmíchán v kapalině. Vzorky byly ponořeny do vodní lázně o teplotě 75 °C. Po 30 minutách byly vzorky přemístěny a umístěny do ledové vody a zchlazeny na pokojovou teplotu. Vzorky byly přemístěny do 500ml dělicí nálevky. Do nálevky ke vzorkům bylo přidáno 130 ml etyléteri, nálevka byla zazátkována a důkladně zamíchána po dobu 1 min. Do nálevky bylo přidáno dalších 130 ml petroléteri, nálevka byla opět zazátkována a důkladně zamíchána po dobu 1 minuty. Vzorky byly ponechány

v klidu při pokojové teplotě do oddělení vrstev. Spodní vrstva byla odstraněna. Do dělicí nálevky bylo přidáno 50 ml deionizované vody, nálevka byla zazátkována a její obsah byl důkladně promíchán po dobu delší než 30 sekund. Vzorky byly znovu ponechány v klidu, aby došlo k oddělení vrstev. Spodní vrstva byla odstraněna do odpadu. Deionizovaná voda byla přidána ještě jednou a celý proces se opakoval. Poté bylo do nálevky přidáno 15 ml etanolu a vše bylo zamícháno, po zamíchání bylo provedeno třetí propláchnutí 50 ml deionizované vody, nálevka byla zazátkována, vše bylo zamícháno a ponecháno v klidu, aby došlo k oddělení vrstev. Spodní vrstva byla odstraněna do odpadu. Zbývající eterová vrstva byla přemístěna do 500ml baňky s plochým kulatým dnem a roztok byl odpařen na rotační odparce. K odparku bylo přidáno 50 ml acetonu a znovu to bylo odpařeno. Vzorek byl rozpuštěn v 10 ml etyléteru za stálého míchání a přemístěn do předpromývací 50ml centrifugační zkumavky. Roztok éteru byl odpařen dosucha pod vysoce čistým N_2 . [27].

2.8 Postup zmydlnění a extrakce u stanovení vitaminů A, D, E a K spolu s koenzymem Q_{10} a karotenoidy v multivitaminových tabletách, mléčné výživě a mléku

Jeden ml mléka byl smíchán s 1,75 ml 85% vodného roztoku etanolu obsahujícího 75 $mg \cdot ml^{-1}$ KOH a 0,25 $mg \cdot ml^{-1}$ kyseliny askorbové. Následně byl vzorek umístěn do teplé vodní lázně na 45 min. při teplotě 95 °C. Výsledná směs byla 2x extrahována 4 ml hexanu. Po extrakci byla provedena centrifugace při 3000 g po dobu 10 min. Smíchané extrakty hexanu byly odpařeny pod proudem dusíku. Zbytek byl rozpuštěn v 1 ml mobilní fáze a použit pro HPLC analýzu [28].

2.9 Použité mobilní fáze

Přehled mobilních fází, které mohou být použity pro stanovení vitaminu D:

- metanol:acetonitril (50:50), (91:9)
- acetonitril:metanol (90:10), (97:3)
- metanol:voda (97,5:2,5), (99,5:0,5), (96:4), (92:8), (93:7), (99:1)
- chloroform:metanol:acetonitril (6:12:82)
- acetonitril:chloroform:etylacetát (88:4:8)

- A metanol:voda (99:1), B metanol:tetrahydrofuran (70:30)
- metanol:acetonitril:voda (49,5:49,5:1)
- dichlormetan:hexan:izopropanol (50:49,8:0,2)
- amylalkohol (0,35%) v hexanu
- izopropanol (0,5%) v hexanu
- izopropanol:hexan (1:99)
- hexan:etylacetát:metanol (97:2,5:0,5)
- izopropanol:metyl t-butyléter:cyklohexan:n-heptan (0,5:2:48,75:48,75)
- izopropanol:hexan (20:80) [20, 21, 22, 23, 27]

3 VYSOCE ÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

V počátcích 70. let byly uvedeny první studie o HPLC (Vysoce účinná kapalinová chromatografie, High Performance Liquid Chromatography). Vysokých účinností separačního procesu se dosahuje použitím kolon naplněných stacionární fází, která obsahuje malé částice pravidelného tvaru a jednotné velikosti. Průtok mobilní fáze je zajištěn vysokým tlakem (jednotky až desítky MPa), a proto bývá tato metoda někdy označována jako vysokotlaká kapalinová chromatografie (High Pressure Liquid Chromatography). Do systému se dávkuje malá množství vzorku (řádově μl). K detekci je nutné použít citlivé detektory, které umožňují kontinuální monitorování látek na výstupu z kolony. Signál detektoru se zpracovává počítačem [29].

Vysoce účinná kapalinová chromatografie má širokou oblast použitelnosti. Umožňuje analyzovat ionty, látky polární i nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární (asi 80 % veškerých známých látek je možné analyzovat touto metodou) [29].

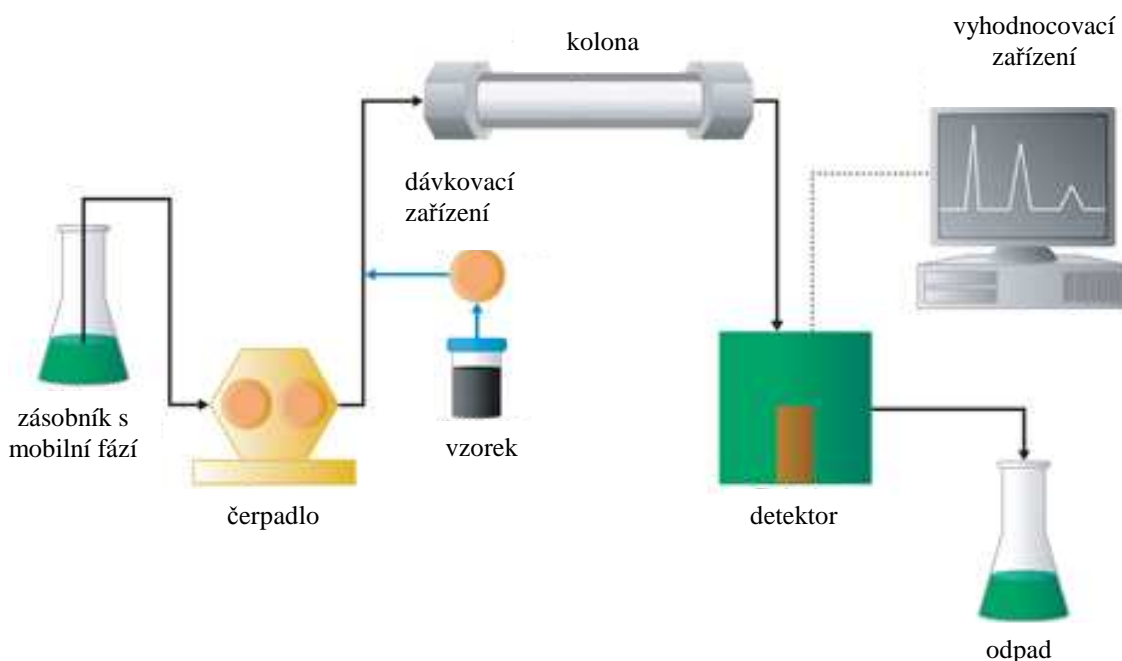
HPLC je separační, analytická fyzikálně-chemická metoda pro separaci a analýzu směsí látek, při které se směs komponent rozdělí na jednotlivé složky při průchodu přes chromatografickou kolonu. Proces separace je uskutečněn tím způsobem, že mobilní fáze obsahující směs komponent, protéká přes stacionární fázi, která je zakotvena v koloně. Fyzikální a chemické síly působící mezi složkami a dvěma fázemi jsou zodpovědné za zadržení složek na chromatografické koloně [30].

Vysoce účinná kapalinová chromatografie existuje jako tzv. „normální“ a „reverzní“:

U normální HPLC má stacionární fáze silně polární charakter a mobilní fáze je nepolární. Zatímco u reverzní HPLC je stacionární fáze nepolární a mobilní fáze je polární kapalina. Stacionární fázi je uložena v chromatografické koloně. Materiály pro plnění kolon mohou být založeny jak na typické matrici, na níž mohou být mechanicky nanesené nebo zakotvené různé stacionární fáze [31]. Tyto materiály, které se používají pro plnění kolon, jsou extrémně malé, kulovité a porézní. U polární stacionární fáze jsou na povrchu částic silikagelu vázány např. hydroxylové funkční skupiny, zatímco u nepolární nebo středně polární stacionární fáze jsou na povrchu částic silikagelu vázány alkylové (C_8 nebo C_{18}) nebo nitrilové funkční skupiny [32].

3.1 Složení kapalinového chromatografu a popis jeho jednotlivých částí

Kapalinový chromatograf se skládá ze zásobníku mobilní fáze, kdy je mobilní fáze vedena přes vysokotlaké čerpadlo do chromatografické kolony. Přes dávkovací kohout, je do proudu mobilní fáze, nadávkován vzorek. Vzorek je unášen mobilní fází do kolony, kde dochází k oddělování jednotlivých složek. Výstup z kolony vede do detektoru, kde jsou jednotlivé složky detekovány. Signál z detektoru je zaznamenáván ve vyhodnocovacím zařízení (PC) [33].



Obr. 8. Schéma kapalinového chromatografu [34]

3.1.1 Zásobník s mobilní fází

Mobilní fáze je do systému HPLC čerpána nejčastěji ze skleněných lahví [31]. Ta zde vstupuje do interakce se složkami analyzované směsi a konkrétní složení mobilní fáze může významným způsobem ovlivňovat celou analýzu [33]. Všechna rozpouštědla pro použití v HPLC systémech musí být vysoké čistoty. Před použitím je také nezbytné, aby byla všechna rozpouštědla odplyněna. K odplynění může být využit např. ultrazvuk, ohřev nebo probublávání helia skrz nádobu s rozpouštědlem [35].

3.1.2 Čerpadlo

Hlavní vlastností dobrého čerpacího systému je schopnost dávkovat mobilní fázi plynule, tj. bez pulzů, které by mohly způsobit výkyvy v detektoru. Čerpadlo také musí zaručit konstantní průtok. Materiál, z něhož jsou čerpadla vyrobena, musí být chemicky odolný proti chemickým účinkům mobilní fáze a nesmí do ní uvolňovat žádné látky. Průtok mobilní fáze u systému HPLC se pohybuje většinou v rozmezí $0,5 - 1,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ [35,36].

V kapalinové chromatografii se využívají dva principy čerpání mobilních fází:

- izokratický, kdy je za stálého průtoku čerpána jedna mobilní fáze (jednosložková nebo vícesložková předem smíchaná)
- gradientový, kdy v průběhu jedné analýzy lze měnit složení i průtok mobilní fáze [31]

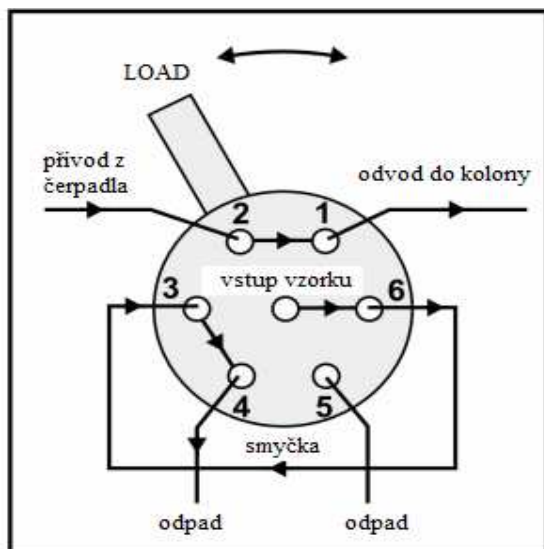
3.1.3 Dávkovací zařízení

Dávkovací zařízení umožňuje zavést přesný definovaný objem vzorku do kolony. V dnešní době jsou nejčastěji používány dávkovací ventily se smyčkou nebo autosamplery. Typickým manuálním dávkovačem je šesticečný ventil se smyčkou. Komerčně dostupné dávkovače mají různé objemy dávkovacích smyček od $0,2 \mu\text{l}$ do $2000 \mu\text{l}$.

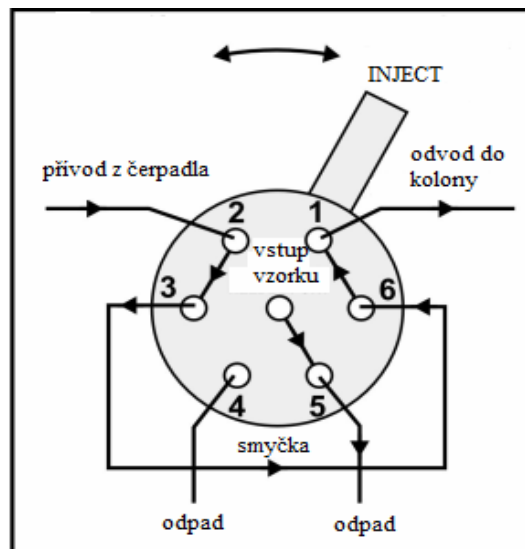
Dnes jsou velmi často používány automatické vstřikovací systémy (autosamplery) umožňující vstřikování série vzorků a standardů v průběhu časové periody, přičemž je přístroj schopen pracovat bez obsluhy [37,38,39].



Obr. 9. Stříkačka pro nástřik do HPLC [40]



Obr. 10. Ventil se smyčkou při plnění [41]



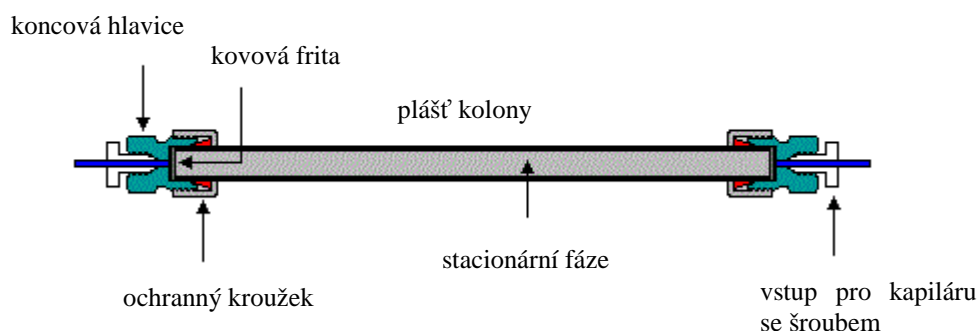
Obr. 11. Ventil se smyčkou naplněný [41]

3.1.4 Kolona

Vhodně zvolená kolona má rozhodující význam, protože výsledek chromatografické analýzy je dán kvalitou kolony a její náplní. Separační kolony používané v HPLC musí umožnit separaci s vysokou účinností a požadovanou selektivitou, musí odolávat relativně vysokým pracovním tlakům a zároveň chemickému působení mobilních fází a separovaných složek. Chromatografická kolona je trubice vyrobená nejčastěji z nerezové oceli (typ 316) nebo pevného polymeru (PEEK, Polyetereterketon) uzavřená na koncích porézními fritami (velikost pórů 0,5 – 2 μm), které zadržují částice náplně v koloně. Rozměr kolony i velikost částic náplně jsou závislé na jejich účelu, ke kterému slouží. Pro analytické účely se obvykle používají kolony plněné pórovitými náplněmi o průměru 1 – 5 μm , délce 3 – 25 cm s vnitřním průměrem 1,2 – 5 mm. Kolony, jejichž velikost částic je 3 μm , umožňují rychlejší separaci a vyšší účinnost, ale mají tendenci se snadněji zanášet, což výrazně snižuje životnost kolony [31,42,43,44].

Materiály pro plnění kolon mohou být založeny jak na anorganické tak organické matici. V současnosti patří mezi nejoblíbenější materiály založené na silikagelu, používaného buď bez úprav, nebo na něm mohou být mechanicky nanesené nebo chemicky vázané různé stacionární fáze. Mezi další typy anorganických nosičů patří např. oxid zirkoničitý a titaničitý. Rovněž kolony plněné porézními polymerními částicemi jsou užitečné pro rozvoj HPLC metody. Některé z těchto polymerních částic (např. polystyren) jsou hydrofobní, což znamená, že mohou být použity přímo pro HPLC s obrácenou fází. Většina polymerních

částic pro HPLC s obrácenou fází jsou vyrobeny ze zesíťovaného divinylbenzenpolystyrenu [42].



Obr. 12. HPLC kolona [39]

3.1.5 Detektory

Úkolem detektorů je zaznamenat rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující eluovanou složku. Jakmile je zaznamenán rozdíl, je přeměněn na elektrický signál a následně převeden na záznamové zařízení [43,44].

Ideální detektor by měl umožňovat detekci všech přítomných komponent (univerzálnost), mít vysokou citlivost a nízkou úroveň šumu, nesmí být ovlivněn změnami teplot nebo složením mobilní fáze, měl by mít minimální příspěvek k rozšiřování elučních zón, odezva detektoru by měla být okamžitá a lineární v co nejširším koncentračním rozmezí [39,43].

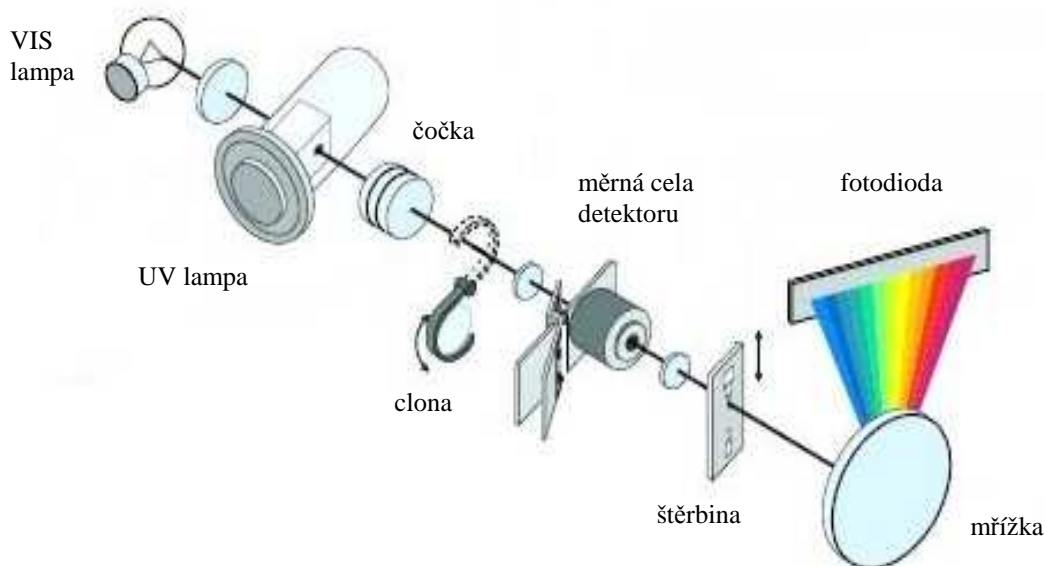
Rozeznáváme detektory selektivní, jejichž signál je úměrný pouze koncentraci analyzované látky v eluátu a univerzální, které poskytují signál úměrný určité vlastnosti eluátu jako celku, tj. analyzované látky a mobilní fáze [43].

- **Fotometrický detektor (UV/VIS)**

Měří absorbanci eluátu vycházejícího z kolony. UV/VIS detektor využívá dva světelné zdroje: deuteriovou obloukovou lampu pro odpovídající intenzitu v UV oblasti (190 - 380 nm) a wolfram halogenovou lampu pro odpovídající intenzitu ve viditelném spektru (380 - 800 nm). Detektory mohou pracovat s fixní vlnovou délkou (nejčastěji 254 nm), s možností výběru několika vlnových délek (DAD – Diode Array Detector), nebo jsou opatřeny monochromátorem a pracují na principu spektrofotometru v rozsahu 190 - 400 nm [31,45,46].

- **Detektor diodového pole (Photodiode – Array, PDA)**

Jedná se o spektrofotometrické detektory s rychlým záznamem spektra bez přerušení separace na koloně pracující s velkým počtem plošných fotodiód, umístěných na destičce o délce asi 1 cm. Záření ze zdroje se po průchodu průtokovou celou spektrálně rozkládá holografickou mřížkou, takže na každou z miniaturních fotodiód dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v cele detektoru [43].



Obr. 13. Detektor diodového pole [47]

- **Fluorescenční detektor**

Jsou založeny na principu fluorescence a měření sekundárního záření (emisního), které látka vydá po absorpci primárního elektromagnetického záření (excitačního) [39].

- **Refraktometrický detektor**

Pracují na principu měření rozdílu indexu lomu mezi čistou mobilní fází a eluátem, který vychází z kolony [48]. Detektor využívá toho, že při změně složení mobilní fáze v měrné cele (a tím změně indexu lomu), dojde ke změně vychýlení světelného paprsku, který prochází celou [49].

- **Elektrochemický detektor**

Tyto detektory se používají k detekci látek, které jsou schopné elektrochemické reakce, probíhající na fázovém rozhraní elektroda - mobilní fáze. Elektrochemické detektory měří určitou elektrickou veličinu (elektrodotový potenciál, proud, kapacita), při průchodu

redukovatelné či oxidovatelné látky průtokovou celou, ve které jsou umístěny elektrody s vloženým pracovním napětím nezbytným k průběhu elektrochemické reakce [39,43].

- **Vodivostní detektor**

Jedná se o detektory, které měří elektrickou vodivost eluátu v průtokové cele mezi dvěma elektrodami, na něž je vkládáno střídavé napětí, z důvodu zabránění polarizace těchto elektrod [39].

- **Evaporative Light Scattering Detector (ELSD)**

ELSD se používá především k detekci látek, které ve své molekule nemají obsažený žádný chromofor nebo fluorofor. Zaznamenává rozptyl světla na částicích analytu, které vznikají po zmlžení eluentu a následném odpaření mobilní fáze. Odezva fotodetektoru je přímo úměrná hmotnosti přítomného netěkavého solutu procházející optickým paprskem a nikoli jeho chemickému složení nebo přítomnosti určitých funkčních skupin [39,44,50].

- **Corona™ Charged Aerosol Detector (CAD)**

Principem CAD je detekce kladně nabitých částic, které mají odlišnou pohyblivost (hmotnost). Získaný signál je závislý na velikosti částic solutu a není příliš závislý na fyzikálně-chemických vlastnostech solutu [39].

- **Hmotnostní detektor**

Hmotnostní detektor detekuje ionty, které vznikly ionizací analytů. První fází je převod analytů rozpuštěných v mobilní fázi na ionty v plynné fázi. V dalším kroku se ionty analyzují, to znamená že se určuje poměr hmotnosti ku náboji. Iontové zdroje pracují za atmosférického tlaku, analyzátoři za vakua. Hmotnostní detektor umožňuje identifikaci analytů na základě jejich hmotnostních spekter [50].

4 JINÉ TECHNIKY PRO STANOVENÍ VITAMINU D

4.1 Plynová chromatografie

Nair a kol. prokázali, že mikrogramové množství vitamínu D může být odděleno z biologického materiálu diferenciální extrakcí rozpouštědlem a stanoveno pomocí **plynové chromatografie**. Výše zmínění autoři použili pro stanovení vitamínu D plynovou chromatografii v systému plyn – kapalina \Rightarrow GLC [51]. GLC je příkladem rozdělovací chromatografie, kdy dochází k rozpouštění látek v obou fázích. Kapalná fáze je v koloně ukotvena, musí mít nízkou tenzi par a musí být chemicky stabilní i při vysoké pracovní teplotě [52].

4.2 Hmotnostní spektrometrie

Jedná se o separační techniku, která převádí vzorek na ionizovanou plynnou fázi a vzniklé ionty separuje podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje m/z [45]. Phillips a kol. použili ve své studii hmotnostní spektrometr s kvadrupólovým iontovým zdrojem jako pomocný detekční limit u RP-HPLC systému [27].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 METODIKA

5.1 Chemikálie

Standard Cholekalciferol (Sigma – Aldrich, Švýcarsko)

Hydroxid draselný (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, Česká republika)

n-Hexan (Ing. Petr Švec, PENTA; dodavatel Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, Česká republika)

Metanol (Ing. Petr Švec, PENTA, Česká republika)

Etanol denaturovaný (Moravský lihovar Kojetín, Česká republika)

Kyselina L-askorbová (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, Česká republika)

Metanol pro HPLC (CHROMSERVIS, Praha, Česká republika)

Redestilovaná voda

5.2 Pomůcky a přístroje

Standardní laboratorní vybavení

- Předvážky (KERN, Německo)
- Analytické váhy (Adam, AFA – 210 – LC, Schoeller instruments, Česká republika)
- Multikráječ (ETA 0078, Česká republika)
- Lednice (Whirpool, Česká republika)
- Vakuová rotační odparka (KIKA – WERKE RV 05 – ST, Německo)
- Temperovaná vodní lázeň s třepačkou (Memmert, Německo)
- Ultrazvuková vodní lázeň PS 04000A (Notus – Powersonic s.r.o., Slovenská republika)
- Hliníková folie
- Injekční stříkačka (Chirana, Slovenská republika)
- Bežné laboratorní sklo a pomůcky

Speciální laboratorní vybavení

- HPLC aparatura (Hewlett Packard 1100)
 - Odplyňovací zařízení G1322A
 - Binární pumpy G1312A
 - Termostat kolon G1316A
 - Dávkovací ventil se smyčkou – objem smyčky 20 μ l
 - Kolona – Discovery C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 μ m), Supelco, USA
 - Detektor UV/VIS DAD G1315A
 - PC s vyhodnocovacím programem ChemStation – Instrument 1 (Agilent, USA)
- Dávkovací stříkačka – objem 50 μ l (Hamilton, USA)
- LUT Syringes Filters Nylon 13 mm x 0,45 μ m (UK)

5.3 Vzorky mléka a mléčných výrobků

Pro analýzu byly vzaty vzorky mléka, mléčných nápojů, sýrů a ztužených pokrmových tuků. Tyto vzorky byly zakoupeny v super a hypermarketech České republiky. Vzorky pro analýzu byly zakoupeny čerstvé a před analýzou skladovány v temnu, v lednici při 7 °C po dobu nejdéle 48 hod. Doprava vzorků od zakoupení do uložení do lednice nepřesáhla 1 hod.

5.3.1 Mléko a mléčné nápoje

- Selské mléko čerstvé

Mléko bylo homogenizováno a ošetřeno vysokou pasterací. Obsah tuku nejméně 3,5 %.

Výrobce: OLMA, a.s.

Průměrné výživové hodnoty udávané výrobcem ve 100 ml výrobku: energie 280 kJ (66 kcal), 3,2 g bílkovin, 4,6 g sacharidů a 3,8 g tuků

Spotřeba do: 31.3.2011

Výrobce doporučuje skladování při teplotě 2 – 8 °C.

Objem výrobku: 1 l

Obal: PET (polyetylentereftalát) láhev



Obr. 14. Selské mléko čerstvé

- **Jihočeské mléko polotučné trvanlivé**

Mléko bylo homogenizováno a ošetřeno UHT (Ultra High Temperature, za vysoké teploty) záhřevem. Obsah tuku nejméně 1,5 %.

Výrobce: Madeta, a.s.

Průměrné výživové hodnoty udávané výrobcem ve 100 ml výrobku: energie 190 kJ (45 kcal), 3,2 g bílkovin, 4,7 g sacharidů a 1,5 g tuků

Minimální trvanlivost do: 17.6.2011

Výrobce doporučuje skladování uzavřeného obsahu při teplotě do 24 °C, po otevření při teplotě 4 – 8 °C.

Objem výrobku: 1 l

Obal: Tetra Pak



Obr. 15. Jihoceske mléko polotučné trvanlivé

- **Jihoceske mléko plnotučné trvanlivé**

Mléko bylo homogenizováno a ošetřeno UHT záhřevem. Obsah tuku nejméně 3,5 %.

Výrobce: Madeta. a.s.

Průměrné výživové hodnoty udávané výrobcem ve 100 ml výrobku: energie 270 kJ (65 kcal), 3,27 g bílkovin, 4,75 g sacharidů a 3,5 g tuků

Minimální trvanlivost do: 22.6.2011

Výrobce doporučuje skladování uzavřeného obsahu při teplotě do 24 °C, po otevření při teplotě 4 – 8 °C.

Objem výrobku: 1 l

Obal: Tetra Pak



Obr. 16. Jihoceske mléko plnotučné trvanlivé

- **Kravík vanilkový**

Trvanlivé ochucené mléko polotučné s obsahem tuku 1,5 % ošetřeno UHT záhřevem.

Výrobce: Mlékárna Hlinsko, s.r.o.

Průměrné výživové hodnoty udávané výrobcem ve 100 ml výrobku: energie 260 kJ (60 kcal)

Minimální trvanlivost do: 16.7.2011

Výrobce doporučuje skladování při teplotě 2 – 24 °C.

Objem výrobku: 250 ml

Obal: Tetra Pak



Obr. 17. Kravík vanilkový

- **Actimel**

Actimel je zakysaný jogurtový nápoj, který obsahuje jogurtové kultury *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* a navíc je ještě obohacen o *Lactobacillus casei*.

Výrobce: Danone, a.s.

Průměrné výživové hodnoty udávané výrobcem ve 100 g výrobku: energie 301 kJ (71 kcal), 2,8 g bílkovin, 10,5 g sacharidů – z toho 10,5 g cukrů, 1,6 g tuků – z toho 1,1 g nasycených mastných kyselin, 0,04 g sodíku, 0,21 mg vitamínu B₆ a 0,75 µg vitamínu D

Spotřebujte do: 13.4.2011

Výrobce doporučuje skladování při teplotě 4 – 8 °C.

Objem výrobku: 4 x 100 g

Obal: HDPE (High Density Polyetylen, vysokohustotní polyetylen) lahvička



Obr. 18. Actimel

- **Monte drink**

Monte drink je mléčný nápoj s čokoládou a lískovými oříšky, se sníženým obsahem tuku.

Výrobce: Zott, s.r.o.

Průměrné výživové hodnoty udávané výrobcem ve 100 g výrobku: energie 359 kJ (85 kcal), 3,8 g bílkovin, 12,7 g sacharidů – z toho 11,3 g cukrů, 2,1 g tuků – z toho 1,4 g nasycených mastných kyselin, 0,1 g vlákniny, 0,07 g sodíku a 0,12 g vápníku

Spotřebujte do: 26.4.2011

Výrobce doporučuje skladování při teplotě 4 – 8 °C.

Objem výrobku: 4 x 100 g

Obal: HDPE lahvička



Obr. 19. Monte drink

- **Laktino sušené mléko plnotučné**

Je vyrobeno z pasterovaného mléka sušením v proudu horkého vzduchu.

Výrobce: PML Protein.Mléko.Laktóza, a.s.

Průměrné výživové hodnoty udávané výrobcem ve 100 g výrobku: energie 2058 kJ (492 kcal), 25,0 g bílkovin, 39,5 g sacharidů, 26 g tuků, 1,0 g vápníku a 1,4 mg vitamínu B₂

Minimální trvanlivost do: 6.9.2011

Výrobce doporučuje skladování při teplotě do 24 °C a relativní vlhkosti do 70 %.

Hmotnost výrobku: 400 g

Obal: papírový sáček uvnitř s hliníkovou fólií, uložený v papírové krabici



Obr. 20. Laktino sušené mléko plnotučné

5.3.2 Sýry

- **Apetito pro děti**

Jedná se o tavený sýr, který se vyrábí mletím, mícháním a tavením směsi přírodních sýrů a dalších surovin a přísad.

Výrobce: TPK spol. s.r.o.

Průměrné výživové hodnoty udávané výrobcem ve 100 g výrobku: energie 871 kJ (210 kcal), 10,0 g bílkovin, 3,8 g sacharidů – z toho 2,5 g cukrů, 17,2 g tuků – z toho 11,4 g nasycených mastných kyselin, 0,47 g vápníku, 0,7 g sodíku a 0,8 µg vitamínu D

Minimální trvanlivost do: 3.9.2011

Výrobce doporučuje skladování při teplotě 4 – 8 °C.

Hmotnost výrobku: 100 g

Obal: jednotlivé porce – hliníková fólie, papírová krabička



Obr. 21. Apetito pro děti

- **Bergader Almkäse**

Bergader Almkäse je přírodní zrající sýr s plísní na povrchu.

Výrobce: Soukromá mlékárna Bergader, Německo

Průměrné výživové hodnoty udávané výrobcem ve 100 g výrobku: energie 1873 kJ (454 kcal), 13,5 g bílkovin, 0,5 g sacharidů, 44,2 g tuků

Spotřebujte do: 25.4.2011

Výrobce doporučuje skladování při teplotě 2 – 7 °C.

Hmotnost výrobku: 175 g

Obal: papír s hliníkovou fólií, papírová krabička



Obr. 22. Bergader Almkäse

- **Primator**

Primator patří mezi přírodní sýry ementálského typu s vysokodohřívanou sýřeninou. Je pro něj typická mandlově nasládlá chuť, která je výsledkem dlouhodobého zrání.

Výrobce: Madeta, a.s.

Průměrné výživové hodnoty udávané výrobcem ve 100 g výrobku: energie 1560 kJ (373 kcal), 28,8 g bílkovin, 0,3 g sacharidů, 27,5 g tuků

Spotřebujte do: 4.4.2011

Výrobce doporučuje skladování při teplotě 4 – 8 °C.

Hmotnost výrobku: 100 g

Obal: PP (polypropylen) podložka, PE (polyetylen) fólie



Obr. 23. Primator

5.3.3 Máslo a margaríny

- **Jihočeské máslo**

Máslo je mléčný výrobek, který obsahuje výhradně mléčný tuk ve formě emulze vody a tuku, vyrobený tepelným a mechanickým zpracováním sladké smetany.

Výrobce: Madeta, a.s.

Průměrné výživové hodnoty udávané výrobcem ve 100 g výrobku: energie 3100 kJ (741 kcal), 0,75 g bílkovin, 0,8 g sacharidů, 82,5 g tuků

Spotřebujte do: 15.4.2011

Výrobce doporučuje skladování při teplotě 4 – 8 °C.

Hmotnost výrobku: 125 g

Obal: papír s hliníkovou fólií



Obr. 24. Jihočeské máslo

- **Rama MultiVita**

Rama MultiVita je margarín s nízkým obsahem tuku, vyrobený z rostlinných olejů a tuků a obohacený o vitaminy A, D, E, B₁, B₂, B₆, B₉ a B₁₂.

Výrobce: Unilever ČR, spol. s.r.o.

Průměrné výživové hodnoty udávané výrobcem ve 100 g výrobku: energie 1500 kJ (370 kcal), > 0,5 g bílkovin, 3,0 g sacharidů – z toho > 0,5 g cukrů, 39,0 g tuků – z toho 12,0 g nasycených mastných kyselin, 14,0 g monoenoových mastných kyselin, 13,0 g polyenoových mastných kyselin – z toho 11,0 g ω -6 a 2,0 g ω -3, > 0,5 g *trans*-izomerů mastných kyselin, 0,12 g sodíku, 800 μ g vitamínu A, 7,5 μ g vitamínu D, 18 mg vitamínu E, 1,4 mg vitamínu B₁, 2,0 mg vitamínu B₂, 2,0 mg vitamínu B₆, 200 μ g vitamínu B₉ a 1 μ g vitamínu B₁₂

Minimální trvanlivost do: 10.6.2011

Výrobce doporučuje skladování při teplotě 2 – 15 °C.

Hmotnost výrobku: 500 g

Obal: PP krabíčka



Obr. 25. Rama MultiVita

- **Perla**

Perla je margarín s nízkým obsahem tuku, vyrobený z rostlinných olejů obohacený o 8 důležitých vitaminů – A, D, E, B₁, B₂, B₆, B₉ a B₁₂.

Výrobce: Unilever ČR, spol. s.r.o.

Průměrné výživové hodnoty udávané výrobcem ve 100 g výrobku: energie 1500 kJ (350 kcal), 0,0 g bílkovin, 0,0 g sacharidů – z toho 0,0 g cukrů, 39,0 g tuků – z toho 11,0 g nasycených mastných kyselin, > 0,5 g *trans*-izomerů mastných kyselin, 0,2 g sodíku, 800 μg vitamínu A, 7,5 μg vitamínu D, 18 mg vitamínu E, 1,1 mg vitamínu B₁, 1,2 mg vitamínu B₂, 1,5 mg vitamínu B₆, 150 μg vitamínu B₉ a 0,8 μg vitamínu B₁₂

Minimální trvanlivost do: 13.5.2011

Výrobce doporučuje skladování při teplotě 2 – 15 °C.

Hmotnost výrobku: 500 g

Obal: PP krabička



Obr. 26. Perla

5.4 Pilotní pokusy při zmýdelnění a extrakci vitamínu D

5.4.1 Zmýdelnění vzorků a extrakce nezmýdelněných částí

5.4.1.1 Zmýdelnění za tepla

Zmýdelnění za tepla bylo provedeno se vzorky mléka, taveného sýra, sýra ementálského typu a Perly (margarín). Pro zmýdelnění byly použity $1,9 \text{ mol.dm}^{-3}$ a $3,8 \text{ mol.dm}^{-3}$ vodný roztok KOH, etanolický roztok KOH a metanolický roztok KOH. V průběhu práce bylo vyzkoušeno několik obměn zmýdelnění:

- Do každé ze šesti Erlenmayerových baněk bylo odpipetováno 10 ml mléka. Do první baňky bylo přidáno 30 ml $1,9 \text{ mol.dm}^{-3}$ vodného roztoku KOH, do druhé 30 ml $1,9 \text{ mol.dm}^{-3}$ etanolického roztoku KOH a do třetí stejné množství $1,9 \text{ mol.dm}^{-3}$ metanolického roztoku KOH. Do čtvrté, páté a šesté baňky bylo přidáno stejné množství a stejné roztoky jako do předchozích baněk. U následujících vzorků byla však použita koncentrace $3,8 \text{ mol.dm}^{-3}$. Ke vzorkům bylo přidáno malé množství kyseliny L-askorbové v pevném skupenství, z důvodu zabránění možné oxidace vitamínu D. Baňky byly obaleny hliníkovou fólií kvůli zabránění přístupu světla. Takto připravené vzorky byly umístěny do vodní lázně. Vzorky s etanolickým a metanolickým roztokem KOH byly vloženy do vodní lázně s třepačkou vyhřáté na $60 \text{ }^\circ\text{C}$ na dobu 30 min. Po uplynutí doby byly vzorky vytaženy a zchlazeny. Teplota vodní lázně byla zvýšena na $95 \text{ }^\circ\text{C}$ a byly do ní vloženy vzorky s vodným roztokem KOH a zmýdelňovány po dobu 30 min. Po 30 min. byly vzorky vyjmuty a zchlazeny. Nezmýdelněná část byla extrahována organickými rozpouštědly, která jsou nemísitelná s vodou. Zchlazené vzorky byly přelity do dělicí nálevky, bylo k nim přidáno 50 ml n-hexanu a s nálevkou bylo třepáno asi 2 min. Oddělená hexanová vrstva byla slita do baňky s kulatým dnem a odpařena na vakuové rotační odparce při teplotě vodní lázně nepřesahující teplotu $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Získané odparky byly rozpuštěny v 10 ml metanolu a přefiltrovány do vialek přes nylonový filtr o velikosti pórů $0,45 \text{ }\mu\text{m}$.
- Tvrdý sýr byl na multikráječi rozmělněn na malé kousky a ze získané rozmělněné směsi bylo do Erlenmayerových baněk odváženo 10 g. Ke vzorkům bylo stejným způsobem jako v předešlém bodě přidáno 50 ml vodného, etanolického a

metanolickeho roztoku KOH a koncentracích $1,9 \text{ mol.dm}^{-3}$ a $3,8 \text{ mol.dm}^{-3}$. Taveného sýra bylo také odváženo 10 g, byl rozetřen v třecí misce s danými roztoky a pak převeden do Erlenmayerových baněk. Ke vzorkům byla přidána kyselina L-askorbová a baňky byly obaleny hliníkovou fólií. Připravené vzorky byly umístěny do vodní lázně o teplotě $60 \text{ }^\circ\text{C}$ a byly neustále třepány. V lázni byly vzorky ponechány 1 hod. Po vyjmutí z lázně byly vzorky zchlazeny a extrahovány třepáním v dělicí nálevce s 50 ml n-hexanu po dobu nejméně 2 min. Po oddělení vrstev byla hexanová vrstva slita do baňky s kulatým dnem a odpařena na vakuové rotační odparce při teplotě vodní lázně do $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Získané odparky byly rozpuštěny v 10 ml metanolu a přefiltrovány do vialek přes nylonový filtr o velikosti pórů $0,45 \text{ }\mu\text{m}$.

Stejný pracovní postup byl opakován ještě jednou, ale doba zmýdelnění byla prodloužena na 2 hod.

- Do dvou Erlenmayerových baněk bylo pipetováno 30 ml mléka, do první bylo přidáno 30 ml $1,9 \text{ mol.dm}^{-3}$ etanolickeho roztoku KOH a do druhé stejné množství $3,8 \text{ mol.dm}^{-3}$ etanolickeho roztoku KOH. Vzorek tvrdého sýra byl rozmělněn na multikráječi a z takto rozmělněného sýra bylo do Erlenmayerových baněk odváženo 2 x 10 g vzorku, ke kterým bylo přidáno 50 ml $1,9 \text{ mol.dm}^{-3}$ a $3,8 \text{ mol.dm}^{-3}$ etanolickeho roztoku KOH. Dvakrát 10 g bylo odváženo i taveného sýra, který byl s 50 ml $1,9 \text{ mol.dm}^{-3}$ a 50 ml $3,8 \text{ mol.dm}^{-3}$ etanolickým roztokem KOH nejprve rozetřen v třecí misce a pak převeden do Erlenmayerových baněk. Bylo odváženo 15 g Perly do Erlenmayerovy baňky, která byla smíchána s 50 ml $1,9 \text{ mol.dm}^{-3}$ a 50 ml $3,8 \text{ mol.dm}^{-3}$ etanolickým roztokem KOH. S baňkami bylo chvíli mícháno, aby došlo k lepší homogenizaci vzorku. Ke všem vzorkům bylo přidáno malé množství kyseliny L-askorbové a baňky byly obaleny hliníkovou fólií. Takto připravené vzorky byly umístěny do ultrazvukové vodní lázně vyhřáté na $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Vzorek mléka a Perly byl do ultrazvukové lázně umístěn na 15 min., vzorky sýrů na 1 hod. Po uplynutí času byly vzorky vytaženy a zchlazeny. Vzorky byly přelity do dělicí nálevky a každý vzorek byl extrahován dvakrát. Do dělicí nálevky ke vzorku bylo nejprve přilito 50 ml n-hexanu a vše bylo protřepáno po dobu alespoň dvou min. Hexanová vrstva byla slita do baňky s kulatým dnem a ke zbytku bylo přidáno už jen 30 ml n-hexanu a vše bylo znovu protřepáno. Hexanové vrstvy byly spojeny a odpařeny na vakuové rotační odparce při teplotě vodní lázně do $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Získané

odparky byly rozpuštěny v 5 ml metanolu a přefiltrovány do vialek přes nylonový filtr o velikosti pórů 0,45 μm .

Stejný pracovní postup byl opakován ještě několikrát, byla však prodlužována doba zmýdelnění. U vzorků mléka a másla byla doba prodloužena z 15 min. na 30 min. a nakonec na 45 min. U vzorků sýra byla změněna i navážka a to z původních 10 g na 100 g, váženo s přesností na dvě desetinná místa. Doba zmýdelnění byla prodloužena z 1 hod. na 2 hod. a následně až na 3 hod.

5.4.1.2 Zmýdelnění za studena

Ke zmýdelnění za studena byly použity vzorky mléka, taveného sýra a sýra ementálského typu. Zmýdelnění bylo provedeno s 1,9 mol.dm⁻³ a 3,8 mol.dm⁻³ vodným a etanolickým roztokem KOH. K analýze bylo pipetováno do každé Erlenmayerovy baňky 10 ml mléka, ke kterým bylo přidáno 30 ml 1,9 mol.dm⁻³ 3,8 mol.dm⁻³ vodného a etanolického roztoku KOH. Sýr ementálského typu byl pomlet na multikráječi a z pomleté směsi bylo odváženo 10 g vzorku do Erlenmayerových baněk, ke kterým byly přidány roztoky KOH, stejně jako u vzorků mléka. Taveného sýra vzatého k analýze bylo také 10 g. Pro lepší rozptýlení taveného sýra byl vzorek rozetřen v třecí misce s danými roztoky KOH a následně převeden do Erlenmayerových baněk. Do jednotlivých baněk bylo přidáno malé množství kyseliny L-askorbové a všechny byly obaleny hliníkovou fólií. Baňky byly přemístěny do vodní lázně o teplotě 20 °C a po celou dobu s nimi bylo třepáno. Zmýdelnění probíhalo při těchto podmínkách 24 hod. Za 24 hod. byly baňky vyjmuty a nezmýdelněná část byla extrahována do 50 ml hexanu. Extrakce byla provedena v dělicí nálevce, se kterou bylo třepáno nejméně 2 min. Jakmile došlo k oddělení vrstev, byla hexanová vrstva slita do baňky s kulatým dnem a odpařena na vakuové rotační odparce s teplotou vodní lázně nepřesahující teplotu 50 °C. Získané odparky byly rozpuštěny v 10 ml metanolu a přes nylonový filtr o velikosti pórů 0,45 μm přefiltrovány do vialek.

5.4.2 Přímá extrakce tuku

K analýze bylo do Erlenmayerových baněk pipetováno 10 ml mléka, odváženo 10 g sýra ementálského typu a 10 g taveného sýra. Ke vzorkům bylo přidáno 50 ml hexanu. Takto připravené vzorky byly umístěny do vodní lázně s třepačkou a po dobu 30 min. s nimi bylo třepáno. Po této době byly vzorky přelity do dělicí nálevky, kde s nimi bylo ještě dalších

5 min. intenzivně třepáno. Hexanová vrstva byla oddělena do baňky s kulatým dnem a odpařena na vakuové rotační odparce při teplotě vodní lázně do 50 °C. Získané odparky byly rozpuštěny v 10 ml metanolu a přefiltrovány přes nylonový filtr o velikosti pórů 0,45 µm do vialek.

5.5 Pilotní chromatografická separace pro optimalizaci izolace vitamínu D

Vzorky připravené v kapitole 5.4 byly aplikovány do systému HPLC, za účelem ověření vhodnosti různých způsobů zmýdelnění a extrakcí vitamínu D. Chromatografická separace a analýza vitamínu D byla provedena na přístroji Hewlett Packard 1100. Pro separaci vitamínu D byla použita kolona s reverzní fází Discovery C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm) s ochrannou předkolonou MetaGuard 4 x 3 mm. Do HPLC byl dávkován alikvotní podíl 20 µl. Mobilní fáze byla tvořena směsí metanol : redestilovaná voda v poměru 95 : 5. Analýza byla provedena v izokratickém režimu při průtoku mobilní fáze 1 ml.min⁻¹. V průběhu stanovení byla udržována stabilní teplota termostatu kolony 30 °C. Celková doba analýzy byla 30 min. Tlak v systému se pohyboval mezi 101 až 115 bary, což je 10,1 až 11,5 MPa. Signál byl snímán detektorem UV/VIS DAD při vlnových délkách 210, 230, 254 a 280 nm.

5.6 Výsledné zmýdelnění a extrakce vzorků pro kvantitativní stanovení vitamínu D

5.6.1 Zmýdelnění mléka a mléčných nápojů

Pro analýzu byly vybrány tyto vzorky: selské mléko, trvanlivé mléko polotučné a plnotučné, sušené mléko, Actimel, Monte drink a mléčný nápoj Kravík.

Ze selského mléka, trvanlivého polotučného a plnotučného mléka a mléčného nápoje Kravík bylo do Erlenmayerových baněk odpipetováno 30 ml. Actimelu a Monte drinku vzatého k analýze bylo 94,5 ml. Ze sušeného mléka bylo připraveno mléko tekuté, z něhož bylo pipetováno také 30 ml do Erlenmayerovy baňky. Ke vzorkům mléka bylo přidáno 30 ml 1,9 mol.dm⁻³ etanolického roztoku KOH, kromě vzorků Actimelu a Monte drinku. K těmto vzorkům bylo přilito 100 ml 1,9 mol.dm⁻³ etanolického roztoku KOH. Ke všem vzorkům bylo přidáno malé množství kyseliny L-askorbové v pevném skupenství. Ta

slouží jako antioxidant, čímž by mohla přispět k ochraně vitamínu D před oxidací. Baňky byly obaleny hliníkovou fólií, která vzorky chrání před působením světla. Nachystané vzorky mléka a mléčných nápojů byly vloženy do ultrazvukové vodní lázně vyhřáté na 60 °C a byly zde ponechány po dobu 30 min. Po 30 min. byly vzorky vytaženy a zchlazeny.

5.6.2 Zmýdelnění sýrů

Primator, sýr ementálského typu, plísňový sýr Bergader Almkäse a tavený sýr Apetito byly použity pro stanovení vitamínu D.

Sýr Primator byl nejprve rozmělněn na multikráječi. Z rozmělněné sypké hmoty bylo do Erlenmayerovy baňky odváženo 100 g vzorku s přesností na 0,001 g. Taveného sýra bylo do Erlenmayerovy baňky odváženo 96 g a plísňového sýra 25 g s přesností na čtyři desetinná místa. Tavený sýr byl v třecí misce rozetřen s 250 ml 1,9 mol.dm⁻³ etanolickým roztokem KOH pro lepší zmýdelnění vzorku. Ke zbylým vzorkům bylo přidáno 250 ml 3,8 mol.dm⁻³ etanolického roztoku KOH. Do každé baňky bylo přidáno malé množství kyseliny L-askorbové a baňky byly obaleny hliníkovou fólií. Pro zmýdelnění byla použita ultrazvuková vodní lázeň o teplotě 60 °C, kam byly vzorky vloženy. Vzorek taveného sýra byl zmýdelňován po dobu 1 hod, ostatním vzorky byly v lázni ponechány 3 hod. Poté byly vzorky zchlazeny.

5.6.3 Zmýdelnění másla a margarínů

K analýze byly použity následující vzorky: máslo, Rama MultiVita a Perla.

Do Erlenmayerových baněk bylo odváženo 15 g s přesností na 0,0001 g másla, Ramy a Perly. Ke vzorkům bylo přilito 50 ml 1,9 mol.dm⁻³ etanolického roztoku KOH a s baňkami bylo zamícháno, aby došlo k lepšímu rozptýlení vzorku v roztoku. Ke vzorkům bylo přidáno malé množství kyseliny L-askorbové a baňky byly chráněny před světlem hliníkovou fólií. Vzorky byly umístěny do ultrazvukové vodní lázně zahřáté na 60 °C, kde byly ponechány 30 min. Po uplynutí této doby byly vzorky vytaženy a zchlazeny.

5.6.4 Extrakce nezmýdelněných částí

Po proběhnutém zmýdelnění, jsou nezmýdelněné složky extrahovány pomocí organického rozpouštědla, které je nemísitelné s vodou. K extrakci byl použit n-hexan a extrakce byla provedena dvakrát. Vzorky byly přelity do dělicí nálevky, ke kterým bylo přidáno 50 ml n-

hexanu. S dělicí nálevkou bylo intenzivně třepáno alespoň po dobu 2 min. Po oddělení vrstev byla hexanová vrstva slita do baňky s kulatým dnem. Ke zbytku bylo přidáno už jen 30 ml n-hexanu a opět bylo vše intenzivně protřepáno. Obě hexanové vrstvy byly spojeny a odpařeny vakuové rotační odparce, přičemž teplota vodní lázně nepřesahovala 50 °C. Získané odparky byly rozpuštěny v 5 ml metanolu a přes nylonový filtr o velikosti pórů 0,45 µm přefiltrovány do vialek. Takto připravené vzorky byly nastříkovány do systému HPLC.

5.7 Chromatografická analýza vzorků

Zmýdelnění a následná extrakce vzorků byla popsána v kapitole 5.6. Chromatografické podmínky separace byly stejné jako je uvedeno v kapitole 5.5.

Vyhodnocení výsledků bylo provedeno za použití chromatografického programu ChemStation – Instrument 1.

5.8 Kalibrační křivka

Pro sestavení kalibrační křivky byl použit standard cholekalciferol. Rovnice kalibrační křivky je důležitá pro kvantitativní stanovení obsahu vitamínu D ve vzorku. Bylo naváženo 0,01 g standardu s přesností na 0,0001 g. Navážka byla kvantitativně převedena do 100 ml odměrné baňky a rozpuštěna v metanolu. Byl získán zásobní roztok o koncentraci 100 µg.ml⁻¹. Zásobní roztok byl ještě zředěn na koncentraci 20 µg.ml⁻¹. Ze zásobního roztoku o koncentraci 20 µg.ml⁻¹ byla pro následná měření připravena kalibrační řada roztoků o koncentracích 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 a 2,0 µg.ml⁻¹.

Měření připravené kalibrační řady standardů bylo provedeno za stejných chromatografických podmínek, jako je uvedeno v kapitole 5.5. Každý vzorek byl proměřen třikrát.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Výsledky pilotních pokusů zmýdelnění a extrakce vitamínu D

Pro izolaci vitamínu D ze vzorků a jeho následné kvantitativní stanovení bylo vyzkoušeno zmýdelnění za tepla, za studena i přímá extrakce tuku.

6.1.1 Výsledky zmýdelnění vzorků za tepla a za studena a extrakce nezmýdelněných částí

Zmýdelnění za tepla bylo popsáno v kapitole 5.4.1.1. Pro zmýdelnění byl použit 1,9 mol.dm⁻³ a 3,8 mol.dm⁻³ vodný, etanolický a metanolický roztok KOH. V případě použití metanolickeho roztoku KOH došlo v průběhu chlazení vzorků taveného sýra a sýra ementálského typu ke vzniku sraženiny, kterou nebylo možné vytřepat do hexanu. Použití vodného roztoku KOH pro zmýdelnění vzorků mléka a sýra ementálského typu nebylo rovněž vhodné, protože po smíchání těchto vzorků s n-hexanem vznikl gel, a ani po několika minutovém stání nedošlo k oddělení vrstev. Postup a podmínky zmýdelnění za studena byly popsány v kapitole 5.4.1.2. Také při zmýdelnění za studena při použití vodného roztoku KOH došlo po přidání n-hexanu ke zmýdelněným vzorkům mléka a sýra ementálského typu ke vzniku gelu.

Z těchto důvodů byl vodný a metanolický roztok KOH považován za nevhodný pro zmýdelnění a následnou extrakci, a proto pro výsledné zmýdelnění nebyly použity. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití etanolickeho roztoku KOH.

6.1.2 Výsledky přímé extrakce tuků

Vzorky byly připraveny za podmínek uvedených v kapitole 5.4.2. Jestliže je možné tímto způsobem izolovat a následně kvantifikovat vitamin D, bylo ověřeno chromatografickou analýzou.

6.2 Výsledky pilotních pokusů chromatografické analýzy pro optimalizaci izolace vitamínu D

Za účelem zjištění zda zmýdelnění a následná extrakce byly dostatečné, byly vzorky připravené v kapitole 5.4 nastříkovány do systému HPLC.

Z výsledků předběžné chromatografické analýzy byly zjištěny optimální časy pro dokonalé zmýdelnění za tepla konkrétních vzorků. Doba zvolená pro zmýdelnění mléka, mléčných nápojů, másla a margarínů byla 30 min., vzorek taveného sýra byl zmýdelňován 1 hod., sýr ementálského typu 3 hod. Rovněž bylo srovnáno použití $1,9 \text{ mol.dm}^{-3}$ a $3,8 \text{ mol.dm}^{-3}$ etanolického roztoku KOH. Perales a kol. mají ve své studii uvedeno, že při použití $1,9 \text{ mol.dm}^{-3}$ roztoku KOH se získá výtěžek vitamínu D menší než 40 %, avšak při použití $3,8 \text{ mol.dm}^{-3}$ roztoku KOH se získá výtěžek vitamínu D dvojnásobný. Tato skutečnost nebyla potvrzena, výsledky při použití $1,9 \text{ mol.dm}^{-3}$ a $3,8 \text{ mol.dm}^{-3}$ etanolického roztoku KOH byly téměř shodné, proto byl téměř pro všechny vzorky použit $1,9 \text{ mol.dm}^{-3}$ etanolický roztok KOH [20].

Zmýdelnění za studena nepřineslo žádné výsledky. Po nástřiku vzorků a uplynutí doby analýzy nebyly na chromatogramu v požadovaném čase zaznamenány žádné píky. Tento způsob zmýdelnění se využívá z toho důvodu, že se předchází tepelné izomerizaci vitamínu D na previtamin D, který se může objevit u zmýdelnění za tepla. Pro zmýdelnění mléka a mléčných výrobků byl tento postup nevyhovující.

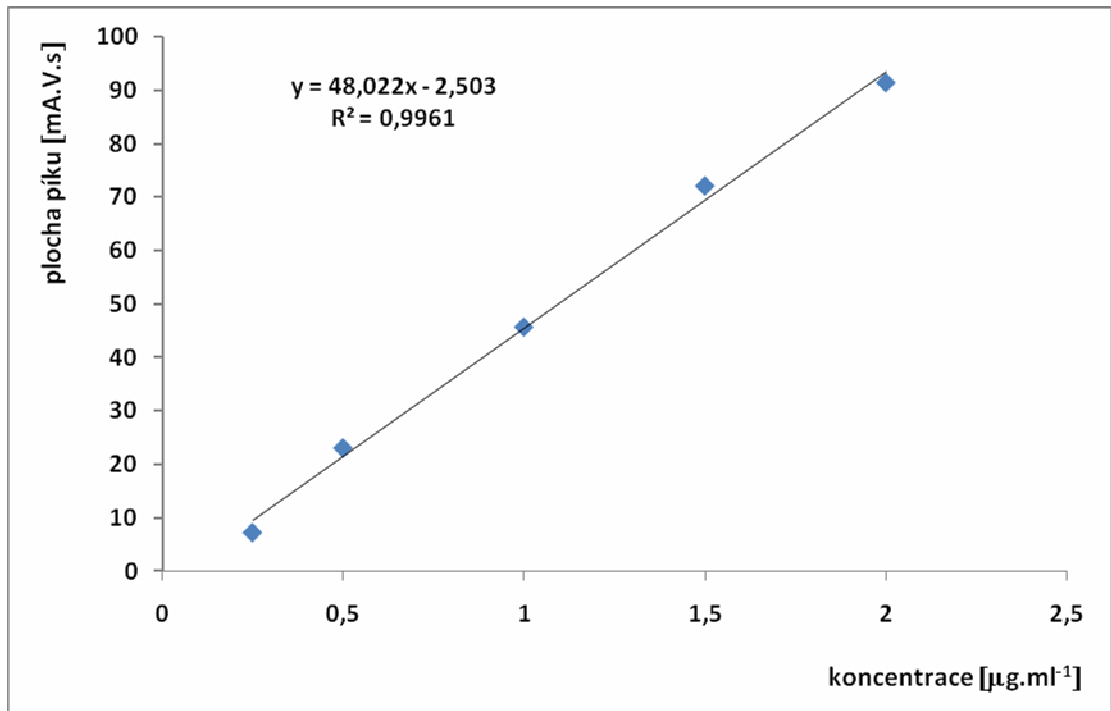
Přímá extrakce tuku, jejíž postup je popsán v kapitole 5.4.2, nepřinesla v závěru stanovení obsahu vitamínu D žádné výsledky. Po nástřiku připravených vzorků do chromatografu, nebyl detektorem v požadovaném retenčním čase zaznamenán žádný signál. Tato metoda se neosvědčila jako vhodná pro získání vitamínu D ze vzorků.

6.3 Výsledky měření kalibrační křivky vitamínu D

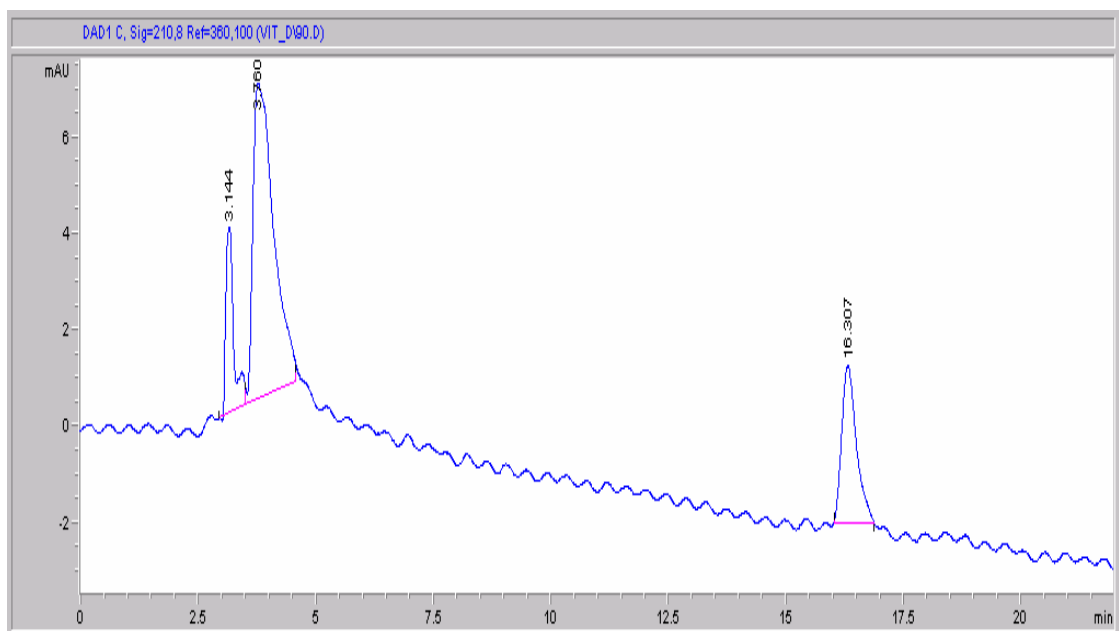
Podle postupu uvedeného v kapitole 5.8 byly změřeny velikosti plochy píků standardu cholekalciferolu o koncentracích 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 a $2,0 \mu\text{g.ml}^{-1}$. Každá koncentrace připraveného standardu byla proměřena třikrát a detekce byla provedena při vlnové délce 210, 230, 254 a 280 nm. Nejlepší odezva detektoru, čili nejvyšší absorpance měl vitamin D při vlnové délce 210 nm. Proto byla také kalibrační křivka sestrojena za těchto podmínek, stejně tak tomu bylo i při měření vzorků. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost plochy píku (mA.V.s) na koncentraci vitamínu D ($\mu\text{g.ml}^{-1}$). Při vyhodnocování se vychází z toho, že plocha píku je přímo úměrná koncentraci vzorku. Retenční čas vitamínu D byl 16,3 min. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 2 a sestrojená kalibrační křivka na obrázku 27.

Tab. 2. Kalibrace vitamínu D při vlnové délce 210 nm

Koncentrace vitamínu D [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Plocha píku [mA.V.s]	Průměrná plocha píku
0,25	7,6	7,3
	7,2	
	7,0	
0,5	23,0	23,1
	23,9	
	22,3	
1,0	44,9	45,7
	45,8	
	46,5	
1,5	73,2	72,1
	71,8	
	71,3	
2,0	92,5	91,4
	90,9	
	90,8	



Obr. 27. Kalibrační křivka vitamínu D při vlnové délce 210 nm

Obr. 28. Chromatogram cholekalciferolu o koncentraci $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ při 210 nm

6.4 Zpracování výsledků

Odečtená plocha píku byla dosazena do rovnice regrese kalibrační křivky, která má tvar $y = 48,022x - 2,503$ a byl vypočten obsah vitamínu D ve vzorcích.

Aritmetický průměr všech výsledků se nejvíce blíží hodnotě, která se vypočte podle vzorce:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{n} \quad (1)$$

n - počet všech měření, x_i - hodnota jednotlivého měření

Základní charakteristikou nahodilých chyb je odhad směrodatné odchylky, která byla zjištěna ze vztahu:

$$S.D. = \sqrt{\frac{1}{n-1} \left(\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right)} \quad (2)$$

n - počet všech měření, $x_i - \bar{x}$ - míra odchylky jednotlivého měření

Skutečný obsah vitamínu D byl vypočítán podle vzorce:

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{S.D.}{\sqrt{n}} \cdot t \quad (3)$$

\bar{x} - aritmetický průměr, $S.D.$ - směrodatná odchylka, n - počet všech měření, t - Studentův koeficient

Studentův koeficient t charakterizuje Studentovo rozdělení náhodných odchylek pro daný stupeň volnosti (daný počet analýz a použitou hladinu významnosti $1-\alpha$). Hodnota Studentova koeficientu při testované hladině významnosti $\alpha=0,05$ a při pěti stupních volnosti je 2,571 [53]. Metoda byla ověřena metodou standardního přídatku.

6.4.1 Stanovení vitamínu D ve vzorcích mléka a mléčných nápojů

Postup izolace vitamínu D ze vzorků je uveden v kapitolách 5.6.1 a 5.6.4. K analýze bylo vzato 2x 30 ml různých druhů mléka a mléčného nápoje Kravíka. Actimelu a Monte drinku bylo vzato 94,5 ml. Ke všem vzorkům byl přidán $1,9 \text{ mol.dm}^{-3}$ etanolický roztok KOH. Získané filtráty vzorků byly podrobeny chromatografické analýze, jejíž podmínky jsou uvedeny v kapitole 5.7. Každý filtrát byl analyzován 3x.

V tabulkách 3, 5, 7, 9, 11 a 13 jsou uvedeny plochy píků jednotlivých měření, které jsou pomocí rovnice regrese kalibrační křivky přepočítány na koncentraci [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$] a následně na μg vitamínu D přítomného v 1 l vzorku. Množství vitamínu D ve vzorcích je uvedeno v tabulkách 4, 6, 8, 10, 12 a 14.

Tab. 3. Obsah vitamínu D v selském čerstvém mléku

Objem vzorku [ml]	Plocha píku [mA.V.s]	Obsah vitamínu D [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Obsah vitamínu D [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]
30	0,8861	0,0706	11,76
	0,7541	0,0678	11,30
	0,8204	0,0692	11,53
30	0,7824	0,0684	11,40
	0,8457	0,0697	11,62
	0,8662	0,0702	11,69

Tab. 4. Průměrný obsah vitamínu D v selském čerstvém mléku

Průměrný obsah vitamínu D [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	S.D. [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	μ [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]
11,55	0,16	11,55 \pm 0,17

Tab. 5. Obsah vitamínu D v polotučném trvanlivém mléku

Objem vzorku [ml]	Plocha píku [mA.V.s]	Obsah vitamínu D [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Obsah vitamínu D [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]
30	0,2725	0,0578	9,63
	0,3545	0,0595	9,92
	0,2987	0,0583	9,72
30	0,3558	0,0595	9,92
	0,3172	0,0587	9,79
	0,3047	0,0585	9,74

Tab. 6. Průměrný obsah vitamínu D v polotučném trvanlivém mléku

Průměrný obsah vitamínu D [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	S.D. [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	μ [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]
9,79	0,10	$9,79 \pm 0,10$

Tab. 7. Obsah vitamínu D v plnotučném trvanlivém mléku

Objem vzorku [ml]	Plocha píku [mA.V.s]	Obsah vitamínu D [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Obsah vitamínu D [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]
30	0,6262	0,0652	10,86
	0,5769	0,0641	10,69
	0,5347	0,0633	10,54
30	0,6074	0,0648	10,80
	0,5964	0,0645	10,76
	0,6152	0,0649	10,82

Tab. 8. Průměrný obsah vitamínu D v plnotučném trvanlivém mléku

Průměrný obsah vitamínu D [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	S.D. [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	μ [$\mu\text{g.l}^{-1}$]
10,74	0,10	$10,74 \pm 0,10$

Tab. 9. Obsah vitamínu D ve vanilkovém Kravíku

Objem vzorku [ml]	Plocha píku [mA.V.s]	Obsah vitamínu D [$\mu\text{g.ml}^{-1}$]	Obsah vitamínu D [$\mu\text{g.l}^{-1}$]
30	0,3647	0,0597	9,95
	0,3247	0,0589	9,81
	0,3065	0,0585	9,75
30	0,2947	0,0583	9,71
	0,3439	0,0593	9,88
	0,3378	0,0592	9,86

Tab. 10. Průměrný obsah vitamínu D ve vanilkovém Kravíku

Průměrný obsah vitamínu D [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	S.D. [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	μ [$\mu\text{g.l}^{-1}$]
9,83	0,08	$9,83 \pm 0,08$

Průměrný obsah vitamínu D ve vzorku selského čerstvého mléka byl $11,55 \pm 0,17 \mu\text{g.l}^{-1}$. Polotučné trvanlivé mléko obsahovalo v průměru $9,79 \pm 0,10 \mu\text{g.l}^{-1}$ vitamínu D. Ve vzorku plnotučného trvanlivého mléka byl zjištěn průměrný obsah vitamínu D $10,74 \pm 0,10 \mu\text{g.l}^{-1}$. Ve vanilkovém Kravíku byla detekována průměrná koncentrace vitamínu D $9,83 \pm 0,08 \mu\text{g.l}^{-1}$. Literatura uvádí obsah vitamínu D v mléce $0,3 - 1,0 \mu\text{g.l}^{-1}$ [4,54]. Ve vzorcích selského čerstvého mléka, polotučného a plnotučného trvanlivého mléka a mléčném nápoji Kravík bylo naměřeno desetinásobné množství vitamínu D. Obecně je vitamin D v mléce zastoupen ve velmi nízkých koncentracích (μg), z tohoto důvodu mohlo dojít při analýze těchto vzorků k interferenci píku vitamínu D s píkem jiné složky obsažené v připravených

vzorcích. Z tohoto důvodu bylo ke vzorkům přidáno známé množství vitamínu D a analýza byla znovu provedena (včetně zmýdelnění) se stejným výsledkem. Opět se objevila pravděpodobně interference s jinou složkou mléka, zvýšenou jen o přídavek standardu. V sušeném mléce nebyl obsah vitamínu D stanoven, množství vitamínu D bylo v tomto vzorku naopak pod hranicí detekce. Sušené mléko se vyrábí sušením v proudu horkého vzduchu, jehož teplota dosahuje až 200 °C. Při takto vysoké teplotě může vznikat z vitamínu D pyrovitamin D a izopyrovitamin D [1].

Tab. 11. Obsah vitamínu D v Actimelu

Objem vzorku [ml]	Plocha píku [mA.V.s]	Obsah vitamínu D [$\mu\text{g.ml}^{-1}$]	Obsah vitamínu D [$\mu\text{g.l}^{-1}$]
94,5	0,8954	0,0708	3,74
	0,9047	0,0710	3,75
	0,8645	0,0701	3,71
94,5	0,9152	0,0712	3,77
	0,9032	0,0709	3,75
	0,9003	0,0709	3,75

Tab. 12. Průměrný obsah vitamínu D v Actimelu

Průměrný obsah vitamínu D [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	S.D. [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	μ [$\mu\text{g.l}^{-1}$]
3,75	0,02	$3,75 \pm 0,02$

Ve vzorku Actimelu byl zjištěn průměrný obsah vitamínu D $3,75 \pm 0,02 \mu\text{g.l}^{-1}$. Výrobce na obalu uvádí, že obsah vitamínu D je v tomto výrobku $7,5 \mu\text{g.l}^{-1}$. Výsledek byl opět ověřen metodou standardního přídávku se stejným výsledkem. Pravděpodobně došlo k destrukci tohoto vitamínu při nevhodných operacích s ním, případně mohl být jeho obsah snížen degradací při procesu zmýdelňování.

Tab. 13. Obsah vitamínu D v Monte drinku

Objem vzorku [ml]	Plocha píku [mA.V.s]	Obsah vitamínu D [$\mu\text{g.ml}^{-1}$]	Obsah vitamínu D [$\mu\text{g.l}^{-1}$]
94,5	0,1654	0,0556	2,94
	0,2163	0,0566	3,00
	0,2214	0,0567	3,00
94,5	0,1764	0,0558	2,95
	0,1865	0,0560	2,96
	0,2072	0,0564	2,99

Tab. 14. Průměrný obsah vitamínu D v Monte drinku

Průměrný obsah vitamínu D [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	S.D. [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	μ [$\mu\text{g.l}^{-1}$]
2,97	0,02	$2,97 \pm 0,02$

Mléčný nápoj Monte drink obsahoval v průměru $2,97 \pm 0,02 \mu\text{g.l}^{-1}$ vitamínu D. Bohužel výrobce na svém obalu jeho množství nedeklaruje, nicméně kvantitativnost našeho stanovení byla opět ověřena metodou standardního přídatku.

6.4.2 Stanovení vitamínu D ve vzorcích sýra

Izolace vitamínu D ze vzorků byla provedena podle postupu uvedeného v kapitolách 5.6.2 a 5.6.4. K analýze bylo naváženo 2x přibližně stejné množství vzorků sýra (taveného sýra asi 96 g, Primatoru 100 g a plísňového sýra 25 g). Ke vzorku taveného sýra byl přidán $1,9 \text{ mol.dm}^{-3}$, k ostatním vzorkům $3,8 \text{ mol.dm}^{-3}$ etanolický roztok KOH. Získané filtráty byly použity pro analýzu, jejíž podmínky jsou uvedeny v kapitole 5.7. Každý filtrát byl proměřen 3x.

V tabulce 15 jsou uvedeny plochy píků jednotlivých měření, které jsou pomocí rovnice regrese kalibrační křivky přepočítány na koncentraci [$\mu\text{g.ml}^{-1}$] a následně na μg vitamínu D

přítomného v 1 kg vzorku. Průměrný obsah vitamínu D ve vzorku taveného sýra je uveden v tabulce 16.

Tab. 15. Obsah vitamínu D v taveném sýru

Hmotnost vzorku [g]	Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Obsah vitamínu D [µg.ml ⁻¹]	Obsah vitamínu D [µg.kg ⁻¹]
96,9004	0,3664	0,0598	3,08
	0,4151	0,0608	3,14
	0,3898	0,0602	3,11
97,5402	0,4074	0,0606	3,11
	0,3684	0,0598	3,07
	0,3621	0,0597	3,06

Tab. 16. Průměrný obsah vitamínu D v taveném sýru

Průměrný obsah vitamínu D [µg.kg ⁻¹]	S.D. [µg.kg ⁻¹]	µ [µg.kg ⁻¹]
3,09	0,03	3,09 ± 0,03

Průměrný obsah vitamínu D ve vzorku taveného sýra byl $3,09 \pm 0,03 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Hodnota vitamínu D uvedená výrobcem na obalu výrobku je $8,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Jedná se o tavený sýr pro děti, kam je vitamin D přidávaný úmyslně pro obohacení stravy o tento vitamin. Výrobce sice uvádí obohacení vitamínem D až na koncentraci $8,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$, ale už neuvádí, v jaké chemické formě byl vitamin D přidán. V naší studii byl použit vitamin D₃, který má od vitamínu D₂ jiný retenční čas a tudíž nebyl kvantifikován. Vitamin D ve vzorku Primatora a plísňového sýra nebyl stanoven. U těchto vzorků pravděpodobně nedošlo ke kompletnímu zmýdelnění a množství vitamínu D v těchto vzorcích bylo velmi nízké, proto ho nebylo možné stanovit, neboť se nacházelo pod hranicí detekce.

6.4.3 Stanovení vitamínu D ve vzorcích másla a margarínů

Izolace vitamínu D ze vzorků másla a margarínů byla provedena podle návodu v kapitole 5.6.3 a 5.6.4. K analýze bylo vzato 2x 15 g od každého vzorku. Ke vzorkům byl přilít 1,9 mol.dm⁻³ etanolický roztok KOH. Připravené filtráty byly použity pro chromatografickou analýzu popsanou v kapitole 5.7. Každý filtrát byl proměřen 3x.

V tabulkách 17 a 19 jsou uvedeny plochy píků jednotlivých měření, které jsou pomocí rovnice regrese kalibrační křivky přepočítány na koncentraci [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$] a následně na μg vitamínu D přítomného v 1 kg vzorku. Množství vitamínu D ve vzorcích je uvedeno v tabulce 18 a 20.

Tab. 17. Obsah vitamínu D v Ramě MultiVita

Hmotnost vzorku [g]	Plocha píku [mA.V.s]	Obsah vitamínu D [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Obsah vitamínu D [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]
15,1645	0,4909	0,0623	20,56
	0,5472	0,0635	20,94
	0,5234	0,0630	20,78
15,8463	0,5078	0,0627	20,90
	0,5506	0,0636	21,20
	0,5498	0,0636	21,19

Tab. 18. Průměrný obsah vitamínu D v Ramě MultiVita

Průměrný obsah vitamínu D [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	S.D. [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	μ [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]
20,93	0,23	20,93 \pm 0,24

Tab. 19. Obsah vitamínu D v Perle

Hmotnost vzorku [g]	Plocha píku [mA.V.s]	Obsah vitamínu D [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Obsah vitamínu D [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]
15,3992	0,4485	0,0615	19,96
	0,4512	0,0615	19,97
	0,4223	0,0609	19,78
15,1247	0,4165	0,0608	20,10
	0,4462	0,0614	20,30
	0,4214	0,0609	20,13

Tab. 20. Průměrný obsah vitamínu D v Perle

Průměrný obsah vitamínu D [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	S.D. [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	μ [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]
20,04	0,16	$20,04 \pm 0,17$

Ve vzorku Ramy byl zjištěn průměrný obsah vitamínu D $20,93 \pm 0,24 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Vzorek Perly obsahoval v průměru $20,04 \pm 0,17 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ vitamínu D. U obou výrobků garantuje výrobce obsah vitamínu D v 1 kg 75 μg . Bohužel ani při opakovaných analýzách toto množství stanoveno nebylo, přičemž vzorky byly kvantitativně zmydelněny. V klasickém másle obsah vitamínu D nebyl zjištěn. Jeho koncentrace se nacházela pod hranicí detekce. To může být ale způsobeno i technologií jeho výroby, skladováním, či sezónními výkyvy ve výživě dojníc apod.

Ve vzorku Actimelu, Monte drinku, taveného sýra, Ramy a Perly byly zjištěny nižší koncentrace vitamínu D, než udává výrobce. Důvodem nižšího obsahu vitamínu D v těchto vzorcích mohl být i přechod vitamínu D na příslušný previtamin vlivem izomerace. Izomerace vitamínu D na jeho previtamin je katalyzována zejména zvýšenou teplotou při alkalické hydrolyze [55]. Odlišnost naměřených hodnot od skutečného množství mohla být také způsobena ulpíváním vitamínu D na laboratorním skle při zmydelnění a extrakci. Vitamin D je nestabilní a vliv na jeho nižší koncentraci mohla mít i samotná degradace

tohoto vitamínu mezi jednotlivými chromatografickými měřeními, i přesto že byla provedena ochranná opatření, jako např. přidání kyseliny L-askorbové a ochrana před světlem hliníkovou fólií.

Stanovení vitamínu D představuje komplikovaný chromatografický problém, jehož složitost spočívá ve velmi nízkém obsahu tohoto vitamínu v mléce a mléčných výrobcích. Odborné studie, které se zabývají stanovením vitamínu D, používají ke zjištění obsahu vitamínu D potraviny obohacené o tento vitamin. V Kanadě předpisy stanovují, že margarín a mléko musí být obohacené o vitamin D. V USA je obohacování potravin vitamínem D dobrovolné a je povoleno např. pro snídaňové cereálie, mléko a ovocné šťávy. Tento vitamin je u obohacovaných potravin obecně přidáván v množství 40 – 400 IU na dávku [21].

Dalším problémem, který komplikuje stanovení vitamínu D v mléce a mléčných produktech, je přítomnost sterolů, karotenoidů, lipofilních vitaminů a dalších přítomných látek, které se zde nachází ve značném množství, a proto je nutné separovat vitamin D od těchto látek [55]. Z tohoto důvodu bych pro další práci doporučila předseparační techniku, např. SPE. Principem je zachycení molekul látky na tuhém sorbentu, přes který protéká vzorek. Pro extrakci se využívá chemických vlastností molekul, které jsou v důsledku mezimolekulových interakcí zadrženy na sorbentu. Použitím SPE dochází k přečištění extraktu, zakoncentrování stopových množství látek a rovněž jsou odstraněny interferující nečistoty, které snižují životnost analytické kolony [45].

Z nejrůznějších příčin neměly některé píky ideální gaussovský profil, některé byly rozmyté. Z důvodů chvostování a rozmývání píků je vhodné ke vzorkům přidávat triethylamin nebo trimethylamin. Pro kvantitativní stanovení vitamínu D, by bylo vhodné pro další práci použít jinou kolonu, která by měla lepší interakci vzorku se stacionární fází. Lepších výsledků by mohlo být dosaženo i modifikováním mobilní fáze. Přehled mobilních fází, které jsou vhodné pro stanovení vitamínu D, jsou uvedeny v kapitole 2.9.

Ke vzorkům byla přidávána kyselina L-askorbová, jako další antioxidační činidla se mohou použít např. vitamin E, pyrogalol a BHT. Nevýhodou některých antioxidačních činidel (pyrogalol, BHT) je, že při extrakci lipofilních vitaminů ze zmydelněné matrice rovněž přechází do organické fáze a mohou tak dělat obtíže při vlastním stanovení vitaminů [55].

Důležité je rychlé ochlazení hydrolyzátu po ukončení vlastní hydrolyzy. Množství KOH použitého k hydrolyze je závislé na množství tuku ve vzorku. Uvádí se, že na každý 1 g tuku je nutné použít 5 ml 60% roztoku KOH a 15 ml etanolu [55].

Všechny výše uvedené problémy při analýze vitamínu D se mohou řešit použitím off-line multidimenzionální HPLC metodou, kdy se používá semipreparativní kolona s reverzní fází k frakcionaci vitamínu D. Frakce vitamínu D je podrobena přečištění na silikagelu a následně po odpaření do sucha, rozpuštění v příslušném rozpouštědle, se provede separace a kvantifikace na reverzní fázi [55].

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo nalézt vhodné podmínky pro izolaci vitamínu D z mléka a mléčných výrobků a jeho následné stanovení pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie ve vybraných vzorcích.

Ke zmýdelnění vitamínu D byly použity různé roztoky KOH o různých koncentracích. Bylo provedeno zmýdelnění za tepla, za studena, vyzkoušena byla i přímá extrakce tuku. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při zmýdelnění za tepla. Při použití vodného a metanického roztoku KOH se nepodařilo připravit vzorky, které by mohly být podrobeny chromatografické analýze. Jako nejvhodnější se jevil 1,9 mol.dm⁻³ etanický roztok KOH. Pro některé vzorky byl použit 3,8 mol.dm⁻³ etanický roztok KOH, ten však v závěru zjištění nepřinesl požadovaný efekt. Nezmydelněná část byla extrahována 2x do hexanu, nejprve do 50 ml, pro druhou extrakci bylo použito 30 ml.

Pro stanovení vitamínu D v mléce a mléčných produktech byla využita vysoce účinná kapalinová chromatografie. K analýze vzorků byl použit přístroj Hewlett Packard 1100 s detektorem UV/VIS DAD. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno za použití chromatografického programu ChemStation – Instrument 1. Pro separaci vitamínu D byla použita kolona s reverzní fází Discovery C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 μm) s ochrannou předkolonou MetaGuard 4 x 3 mm. Mobilní fáze byla tvořena směsí metanol : redistilovaná voda v poměru 95 : 5. Analýza byla provedena v izokratickém režimu při průtoku mobilní fáze 1 ml.min⁻¹. Celková doba analýzy byla 30 min. V průběhu stanovení byla udržována stabilní teplota termostatu kolony na 30 °C. Měření bylo provedeno při vlnových délkách 210, 230, 254 a 280 nm, přičemž nejlépe se jevila vlnová délka 210 nm.

K sestrojení kalibrační křivky byl použit standard cholekalciferol. Chromatografické podmínky pro měření kalibrační křivky byly shodné jako u stanovení vitamínu D ve vzorcích mléka a mléčných výrobků.

Pro analýzu vitamínu D byly vybrány tyto vzorky: selské mléko čerstvé, trvanlivé mléko polotučné a plnotučné, mléčný nápoj Kravík, Actimel, Monte drink, sušené mléko, tavený sýr Apetito, plísňový sýr Bergader Almkäse, sýr ementálského typu Primator, máslo, Rama MultiVita a Perla. Průměrný obsah vitamínu D ve vzorku selského čerstvého mléka byl 11,55 ± 0,17 μg.l⁻¹. Polotučné trvanlivé mléko obsahovalo v průměru 9,79 ± 0,10 μg.l⁻¹ vitamínu D. Ve vzorku plnotučného trvanlivého mléka byl zjištěn průměrný obsah

vitaminu D $10,74 \pm 0,10 \mu\text{g.l}^{-1}$. Ve vanilkovém Kravíku byla detekována průměrná koncentrace vitaminu D $9,83 \pm 0,08 \mu\text{g.l}^{-1}$. Ve vzorku Actimelu byl zjištěn průměrný obsah vitaminu D $3,75 \pm 0,02 \mu\text{g.l}^{-1}$. Mléčný nápoj Monte drink obsahoval v průměru $2,97 \pm 0,02 \mu\text{g.l}^{-1}$ vitaminu D. Průměrný obsah vitaminu D ve vzorku taveného sýra byl $3,09 \pm 0,03 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Ve vzorku Ramy byl zjištěn průměrný obsah vitaminu D $20,93 \pm 0,24 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Vzorek Perly obsahoval v průměru $20,04 \pm 0,17 \mu\text{g.kg}^{-1}$ vitaminu D. V sušeném mléce, plísňovém sýru Bergader Almkäse, v sýru ementálského typu Primator a másle nebyl zjištěn obsah vitaminu D. Rozpory ve výsledcích jsou komentovány v kapitole diskuze.

Na závěr diskuze byly dány další doporučení, jak dále postupovat v chromatografické analýze pro lepší optimalizaci jak izolace, tak separace.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin I*, OSSIS, Tábor, 2009, třetí vydání, 602 s., ISBN 978-80-86659-15-2
- [2] FOX, P. F., McSWEENEY, P. L. H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*, BLACKIE ACADEMIC & PROFESSIONAL, Londýn, 1998, první vydání, 463 s., ISBN 0-412-72000-0
- [3] HLÚBIK, P., OPLTOVÁ, L. *Vitaminy*, Grada Publishing, Praha, 2004, první vydání, 232 s., ISBN 80-247-0373-4
- [4] BELITZ, H. D., GROSCH, W., SCHIEBERLE, P. *Food Chemistry*, SPRINGER, Mnichov, 2009, čtvrté vydání, 989 s., ISBN 978-3-540-69933-0
- [5] ŠÍCHO, V., VODRÁŽKA, Z., KRÁLOVÁ, B. *Potravinářská biochemie*, SNTL, Praha, 1981, 360 s.
- [6] deMAN, J. M., *Principles of Food Chemistry*, AN ASPEN PUBLICATION, Gaithersburg, 1999, třetí vydání, 497 s., ISBN 0-8342-1234-X
- [7] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., BUDÍNSKÝ, P. *Potravinářská biochemie II.*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín, 2007, první vydání, 104 s., ISBN 80-7318-395-1
- [8] SLÍVA, J. Vitamin D v současné medicíně, *MediNews*, vyd. 11, 2009, s. 26
Dostupné na: <http://www.edukafarm.cz/soubory/medinews/2009-11/VitaminD.pdf>
[online 10.3.2011]
- [9] World of Molecules, Vitamin D
Dostupné na: http://www.worldofmolecules.com/supplements/vitamin_D.htm
[online 10.3.2011]
- [10] KING, M., W. Vitamins and Minerals, *The medical biochemistrypage*
Dostupné na: <http://themedicalbiochemistrypage.org/vitamins.html#d> [online 10.3.2011]
- [11] HARRISON, K. Vitamin D, Structures of Vitamins
Dostupné na: <http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=70> [online 10.3.2011]

- [12] About Vitamin D, Chemistry of Vitamin D, University of California
Dostupné na: <http://vitamind.ucr.edu/chem.html> [online 10.3.2011]
- [13] MURRAY, R., K., GRANNER, D., K., MAYES, P., A., RODWELL V., W.
Harperova Biochemie, H & H, Jihočany, 1998, první vydání, 872 s., ISBN 80-85787-38-5
- [14] Healthy Fellow, Sunlight and Depression
Dostupné na: <http://www.healthyfellow.com./93/sunlight-and-depression/> [online 10.3.2011]
- [15] COMBS, G., F. *The vitamins*, ACADEMIC PRESS, New York, 1992, druhé vydání, 618 s., ISBN 0-12-183492-1
- [16] Encyclopaedia Britannica, Vitamin D
Dostupné na: <http://www.britannica.com./EBchecked/topic/631106/vitamin-D> [online 10.3.2011]
- [17] About Vitamin D, Nutritional Aspects of Vitamin D, University of California
Dostupné na: <http://vitamind.ucr.edu/nutri.html> [online 10.3.2011]
- [18] Osteoporose – Handeln bevor der Knochen bricht, Osteo..... was?
Dostupné na: http://osteoporose-infos.blogspot.com/2010_09_01_archive.html [online 10.3.2011]
- [19] Minerálne látky, Trnavská univerzita v Trnave
Dostupné na:
http://pdfweb.trunit.sk/katchem/VCZV/Zdrava_vyziva/mineralne%20látky.htm [online 10.3.2011]
- [20] PERALES, S., ALEGRÍA, A., BARBERÁ, R., FARRÉ, R. Review of vitamin D determination in milk products, *Food Science and Technology International*, Vol. 11, No. 6, 2005, p. 451 – 462
- [21] KAZMI, S., A., VIETH, R., ROUSSEAU, D. Vitamin D₃ fortification and quantification in processed dairy products, *International Dairy Journal*, Vol. 17, 2007, p. 753 – 759

- [22] ESCRIVÁ, A., ESTEVE, M., J., FARRÉ, R., FRÍGOLA, A. Determination of liposoluble vitamins in cooked meals, milk and milk products by liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, Vol. 947, 2002, p. 313 – 318
- [23] BLANCO, D., FERNÁNDEZ, M., P., GUTIÉRREZ, M., D. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in dairy products by liquid chromatography with a narrow-bore column, *The Analyst*, Vol. 125, 2000, p. 427 – 431
- [24] DELGADO ZAMARRENO, M., M., SANCHEZ PEREZ, A., SANCHEZ RODRIGUEZ, M., GOMEZ PEREZ, M., C., HERNANDEZ MENDEZ, J. Determination of fat-soluble vitamins in yogurt by HPLC with electrochemical detection, *Talanta*, Vol. 43, 1996, p. 1555 – 1563
- [25] HASEGAWA, H. Vitamin D determination using high-performance liquid chromatography with internal standard-redox mode electrochemical detection and its application to medical nutritional products, *Journal of Chromatography*, Vol. 605, 1992, p. 215 – 220
- [26] KUHNLEIN, H., V., BARTHET, V., FARREN, A., FALAHI, E., LEGGEE, D., RECEVEUR, O., BERTI, P. Vitamins A, D and E in Canadian Arctic traditional food and adult diets, *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 19, 2006, p. 495 – 506
- [27] PHILLIPS, K., M., BYRDWELL, W., G., EXLER, J., HARNLY, J., M., HOLDEN, J., M., HOLICK, M., F., HOLLIS, B., W., HORST, R., L., LEMAR, L., E., PATTERSON, K., Y., TARRAGO-TRANI, M., T., WOLF, W., R. Development and validation of control materials for the measurement of vitamin D₃ in selected US foods, *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 21, 2008, p. 527 – 534
- [28] DeVRIES, E., J., BORSIE, B. Simultaneous Measurement of Vitamins A, D, E, K, along with CoQ10 and Carotenoids, in Multivitamin Tablets, Infant Formula and Milk, *Analytical Biochemistry*, Vol. 65, 1994, p. 1228 – 1236
- [29] ŠTULÍK, K. a kolektiv, *Analytické separační metody*, Karolinum – Univerzita Karlova v Praze, Praha, 2005, první vydání, 264 s., ISBN 80-246-0852-9

- [30] FALLON, A., BOOTH, R., F., G., BELL, L. D., *Applications Of HPLC in Biochemistry*, Elsevier, Nizozemí, 1987, první vydání, 338 s., ISBN 0-444-80863-9
- [31] Datový standard MZ ČR – verze 4, Webové služby pro distribuci číselníků datového standardu, DTD a schémat
- Dostupné na: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/AJALB.htm
[online 14.3.2011]
- [32] KRUPADANAM, G., L., D., PRASAD, D., V., RAO, K., V., REDDY, K., L., N., SUDHAKAR, C. *Analytical Chemistry*, Universities press, India, 2001, první vydání, 224 s., ISBN 81-7371-385-5
- Dostupné na:
http://books.google.cz/books?id=dTfQ4m8ZK4C&printsec=frontcover&dq=analytical+chemistry&hl=cs&ei=0XuETebTnemo4AaA8v2nCQ&sa=X&oi=book_result&ct=bookthumbnail&resnum=5&ved=0CE0Q6wEwBA#v=onepage&q&f=false
[online 14.3.2011]
- [33] Chromatografie, Kapalinová chromatografie
- Dostupné na: http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc
[online 12.3.2011]
- [34] Waters, How Does High Performance Liquid Chromatography Work?
- Dostupné na:
http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10049055&locale=en_US [online 12.3.2011]
- [35] WILSON, K., WALKER, J. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*, Cambridge University press, Cambridge, 2000, páté vydání, 784 s., ISBN 0-521-65-104-2
- [36] MIKEŠ, O. a kolektiv, *Laboratorní chromatografické metody*, SNTL, Praha, 1980, první vydání, 676 s.
- [37] DONG, M., W. *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC*, Elsevier, Londýn, 2005, první vydání, 658 s., ISBN 0-12-088547-6

- [38] FIFIELD, F., W., KEALEY, D. *Principles and practice of analytical chemistry*, Blackwell Science, Oxford, 2000, páté vydání, 562 s., ISBN 0-632-05384-4
- [39] DOUŠA, M. HPLC
Dostupné na: <http://www.hplc.cz/> [online 12.3.2011]
- [40] CHROMSERVIS, Stříkačka Agilent s vyměnitelnou jehlou
Dostupné na: <http://chromservis.cz/item/10rx-hp-0-47-10-1-diamond-syringe-for-agilent-gc-as?lang=CZ> [online 12.3.2011]
- [41] ECOM, Valve D, Analytical injection loop UNI
Dostupné na: <http://www.ecomsro.cz/files/products/5/596/en/Info-Valves-en.pdf>
[online 12.3.2011]
- [42] SNYDER, L., KIRKLAND, J., GLAJCH, J. *Practical HPLC Method Development*, JOHN WILEY & SONS, Canada, 1997, druhé vydání, 765 s., ISBN 0-471-00703-X
- [43] CHURÁČEK, J. a kolektiv. *Analytická separace látek*, SNTL, Praha, 1990, první vydání, 384 s., ISBN 80-03-00569-8
- [44] MEYER, V., R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, JOHN WILEY & SONS, Londýn, 2004, čtvrté vydání, 351 s., ISBN 0-470-09377-3
- [45] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*, Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava, 2003, 132 s., ISBN 80-902155-0-5
- [46] Diode-Array Spectrophotometer, College of Arts and Sciences, Department of Chemistry and Biochemistry, New Mexico State University
Dostupné na: <http://www.chemistry.nmsu.edu/Instrumentation/HP8452.html>
[online 15.3.2011]
- [47] 1200 HPLC System, College of Arts and Sciences, Department of Chemistry and Biochemistry, New Mexico State University
Dostupné na:
http://www.chemistry.nmsu.edu/Instrumentation/NMSU_1200HPLC_Procd.html
[online 15.3.2011]

- [48] JANDERA, P., CHURÁČEK, J., FRANC, J., MANDÍK, L. *Kapalinová chromatografie*, ČVTS – pobočka VŠCHT Pardubice, Pardubice, 1979, 242 s.
- [49] KOLEKTIV AUTORŮ, *Instrumentální analýza*, SNTL, Praha, 1986, první vydání, 296 s.
- [50] CVAČKA, J. Detekce ve vysoko účinné kapalinové chromatografii
Dostupné na: <http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc3.pdf> [online 16.3.2011]
- [51] AVIOLI, L., V., LEE, S., W. Detection of nanogram quantities of vitamin D by gas-liquid chromatography, *Analytical Biochemistry*, Vol. 16, 1966, p. 193 – 199
- [52] Plynová chromatografie (GC)
Dostupné na:
http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/GC/uvod.pdf
[online 16.3.2011]
- [53] SOMMER, L. *Teoretické základy analytické chemie III.*, Chemická fakulta Vysokého učení technického v Brně, Brno, 1995, první vydání, 102 s., ISBN 80-214-0660-7
- [54] BÖSZE, Z. *Bioactive Components of Milk*, Springer Science, Gödöllo, 2008, 485 s., ISBN 978-0-387-74086-7
- [55] DOUŠA, M. Obecná problematika stanovení lipofilních vitaminů
Dostupné na: <http://hplc1.sweb.cz> [online 15.4.2011]

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

UV	Ultraviolet
	Ultrafialové
DBP	Vitamin D-Binding Protein
IU	International Unit
	Mezinárodní jednotka
FAO	Food and Agriculture Organization
	Organizace pro výživu a zemědělství
SPE	Solid phase extraction
	Extrakce na pevné fázi
BHT	Butylhydroxytoluen
HPLC	High Performance (Pressure) Liquid Chromatography
	Vysoce účinná (tlaká) kapalinová chromatografie
PEEK	Polyetereterketon
PDA	Photodiode–Array
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
CAD	Corona™ Charged Aerosol Detector
GLC	Systém plyn-kapalina chromatografie
PET	Polyetylentereftalát
UHT	Ultra high temperature
	Za vysoké teploty
HDPE	High density polyethylen
	Vysokohustotní polyetylen
PP	Polypropylen
PE	Polyetylen

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Vitamin D ₂ [10]	16
Obr. 2. Vitamin D ₃ [10]	16
Obr. 3. 3-D model vitamínu D [11]	16
Obr. 4. Strukturální vztah vitamínu D ₃ a vitamínu D ₂ [12]	17
Obr. 5. Vznik biologicky aktivní formy vitamínu D ₃ [14].....	18
Obr. 6. Projevy rachitidy u malých dětí [18]	20
Obr. 7. Rentgenový snímek nohou u rachitidy [19].....	20
Obr. 8. Schéma kapalinového chromatografu [34]	32
Obr. 9. Stříkačka pro nástřik do HPLC [40]	33
Obr. 10. Ventil se smyčkou při plnění [41]	34
Obr. 11. Ventil se smyčkou naplněný [41]	34
Obr. 12. HPLC kolona [39]	35
Obr. 13. Detektor diodového pole [47].....	36
Obr. 14. Selské mléko čerstvé.....	42
Obr. 15. Jihočeské mléko polotučné trvanlivé.....	43
Obr. 16. Jihočeské mléko plnotučné trvanlivé.....	43
Obr. 17. Kravík vanilkový	44
Obr. 18. Actimel	45
Obr. 19. Monte drink	45
Obr. 20. Laktino sušené mléko plnotučné	46
Obr. 21. Apetito pro děti	47
Obr. 22. Bergader Almkäse.....	47
Obr. 23. Primator	48
Obr. 24. Jihočeské máslo	49
Obr. 25. Rama MultiVita	50
Obr. 26. Perla.....	50
Obr. 27. Kalibrační křivka vitamínu D při vlnové délce 210 nm	60
Obr. 28. Chromatogram cholekalciferolu o koncentraci 1,5 µg.ml ⁻¹ při 210 nm	60

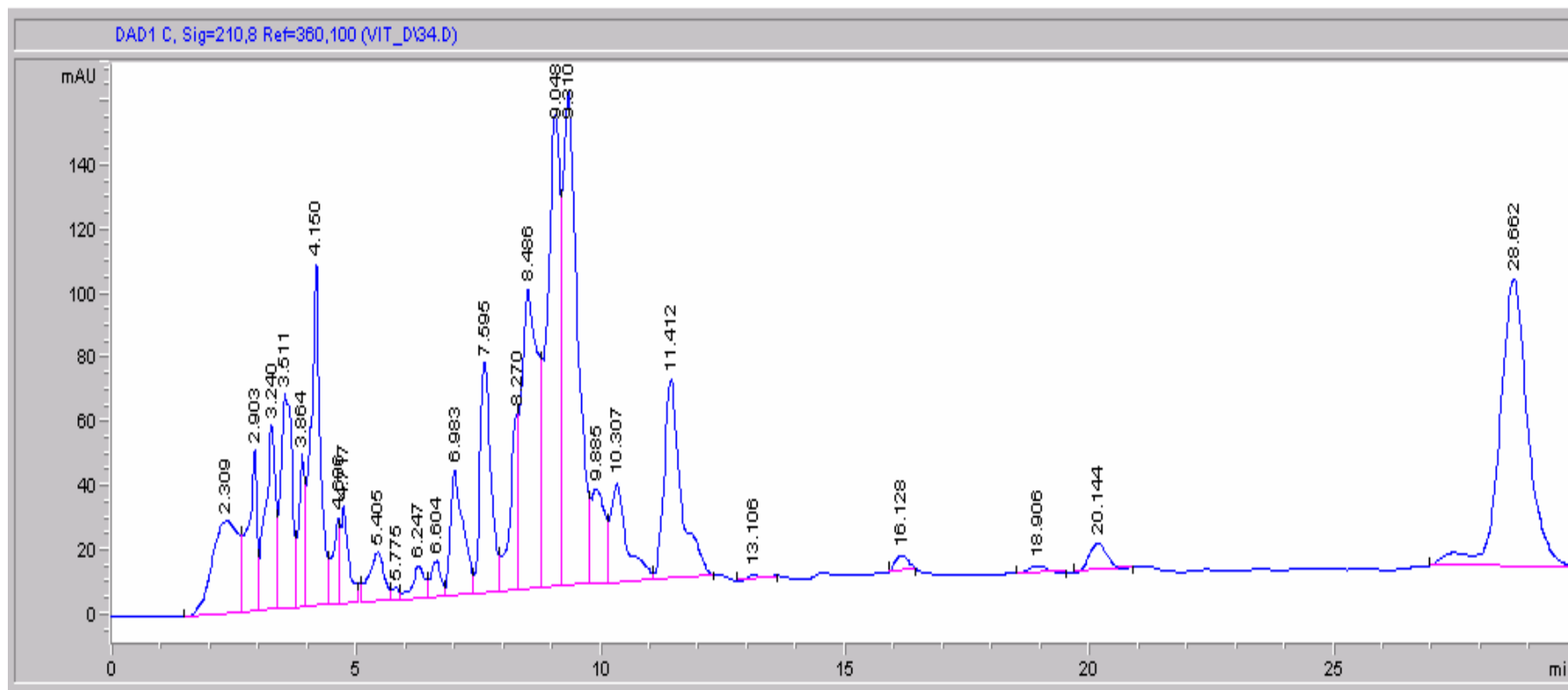
SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Obsah vitamínu D ve vybraných potravinách [3]	19
Tab. 2. Kalibrace vitamínu D při vlnové délce 210 nm.....	59
Tab. 3. Obsah vitamínu D v selském čerstvém mléku.....	62
Tab. 4. Průměrný obsah vitamínu D v selském čerstvém mléku.....	62
Tab. 5. Obsah vitamínu D v polotučném trvanlivém mléku.....	63
Tab. 6. Průměrný obsah vitamínu D v polotučném trvanlivém mléku.....	63
Tab. 7. Obsah vitamínu D v plnotučném trvanlivém mléku.....	63
Tab. 8. Průměrný obsah vitamínu D v plnotučném trvanlivém mléku.....	64
Tab. 9. Obsah vitamínu D ve vanilkovém Kravíku	64
Tab. 10. Průměrný obsah vitamínu D ve vanilkovém Kravíku	64
Tab. 11. Obsah vitamínu D v Actimelu	65
Tab. 12. Průměrný obsah vitamínu D v Actimelu	65
Tab. 13. Obsah vitamínu D v Monte drinku	66
Tab. 14. Průměrný obsah vitamínu D v Monte drinku	66
Tab. 15. Obsah vitamínu D v taveném sýru.....	67
Tab. 16. Průměrný obsah vitamínu D v taveném sýru.....	67
Tab. 17. Obsah vitamínu D v Ramě MultiVita.....	68
Tab. 18. Průměrný obsah vitamínu D v Ramě MultiVita.....	68
Tab. 19. Obsah vitamínu D v Perle.....	69
Tab. 20. Průměrný obsah vitamínu D v Perle.....	69

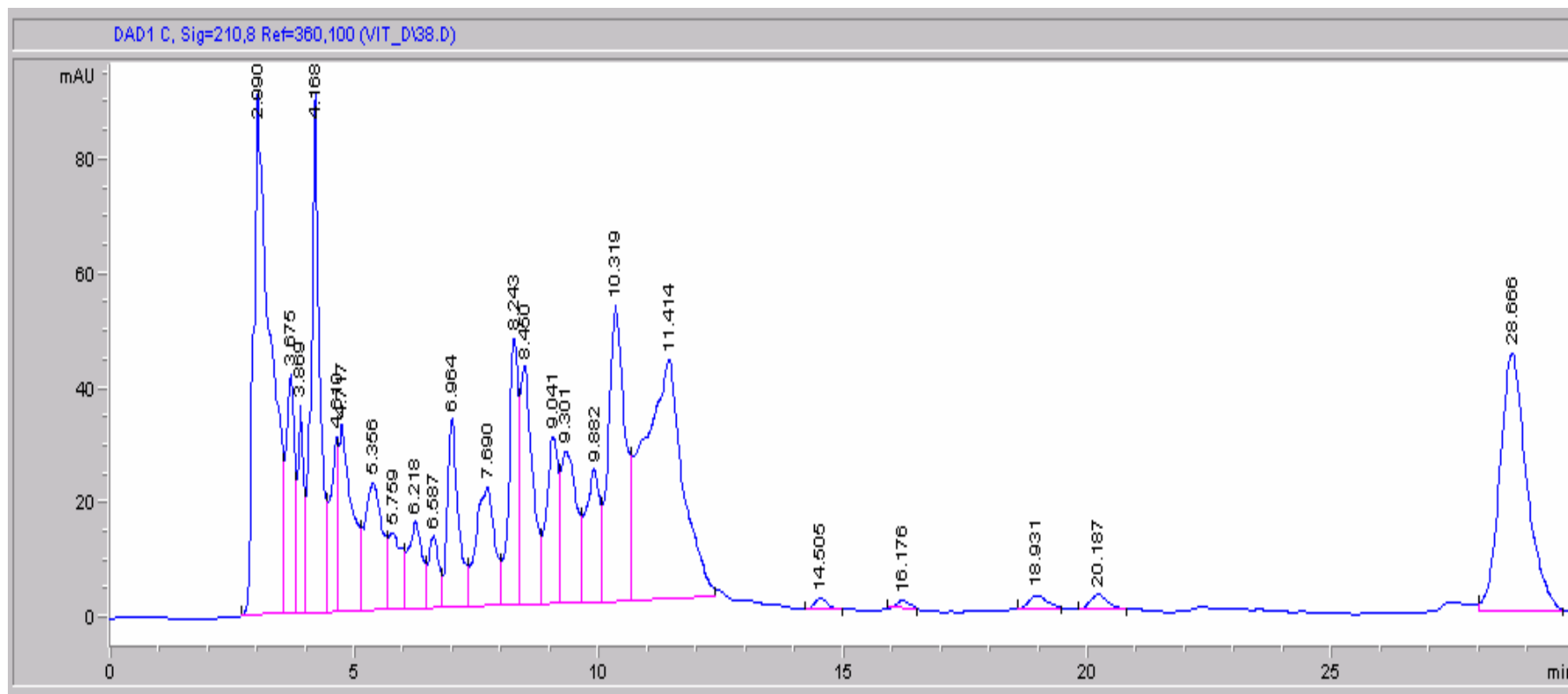
SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha P I: Chromatogram selského čerstvého mléka při vlnové délce 210 nm
- Příloha P II: Chromatogram polotučného trvanlivého mléka při vlnové délce 210 nm
- Příloha P III: Chromatogram plnotučného trvanlivého mléka při vlnové délce 210 nm
- Příloha P IV: Chromatogram vanilkového Kravíku při vlnové délce 210 nm
- Příloha P V: Chromatogram Actimelu při vlnové délce 210 nm
- Příloha P VI: Chromatogram Monte drinku při vlnové délce 210 nm
- Příloha P VII: Chromatogram taveného sýra při vlnové délce 210 nm
- Příloha P VIII: Chromatogram Ramy při vlnové délce 210 nm
- Příloha P IX: Chromatogram Perly při vlnové délce 210 nm

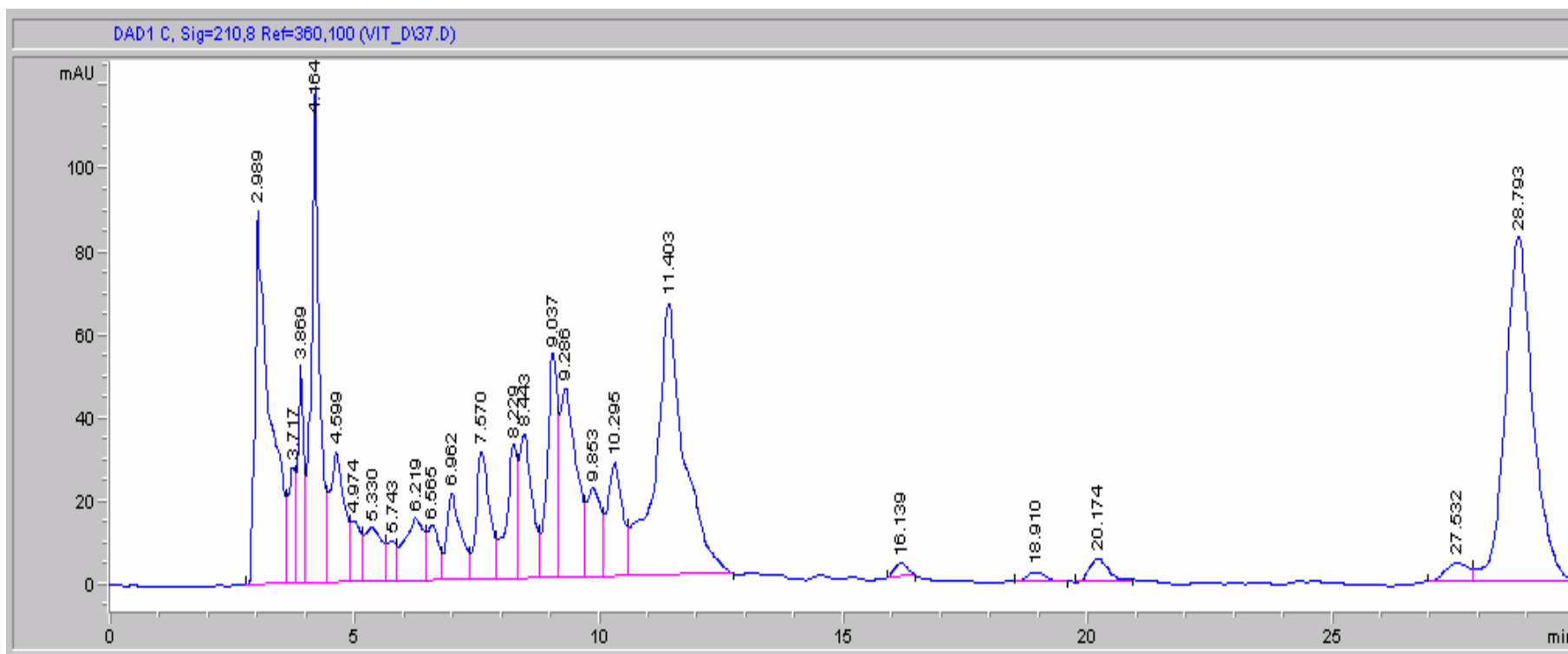
PŘÍLOHA P I: CHROMATOGRAM SELSKÉHO ČERSTVÉHO MLÉKA PŘI VLNOVÉ DÉLCE 210 NM



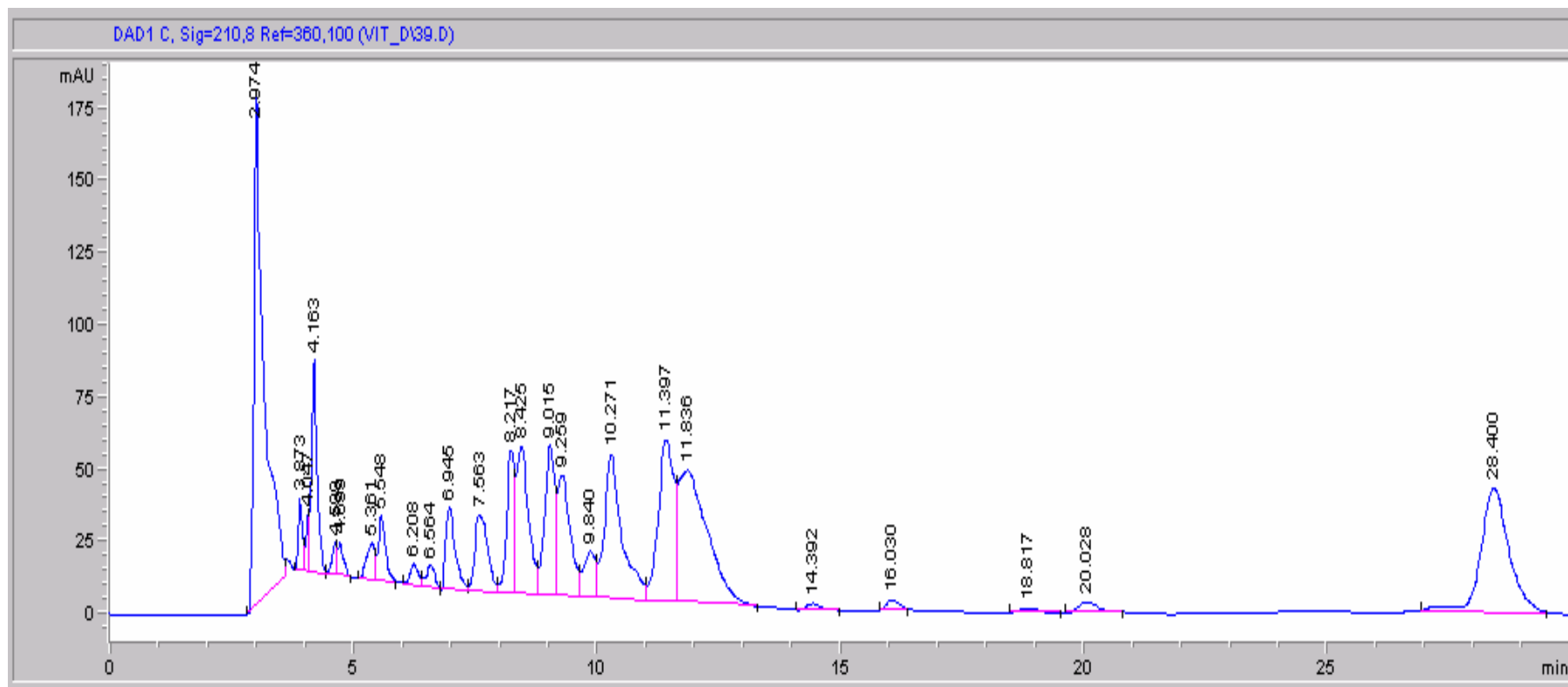
PŘÍLOHA P II: CHROMATOGRAM POLOTUČNÉHO TRVANLIVÉHO MLÉKA PŘI VLNOVÉ DÉLCE 210 NM



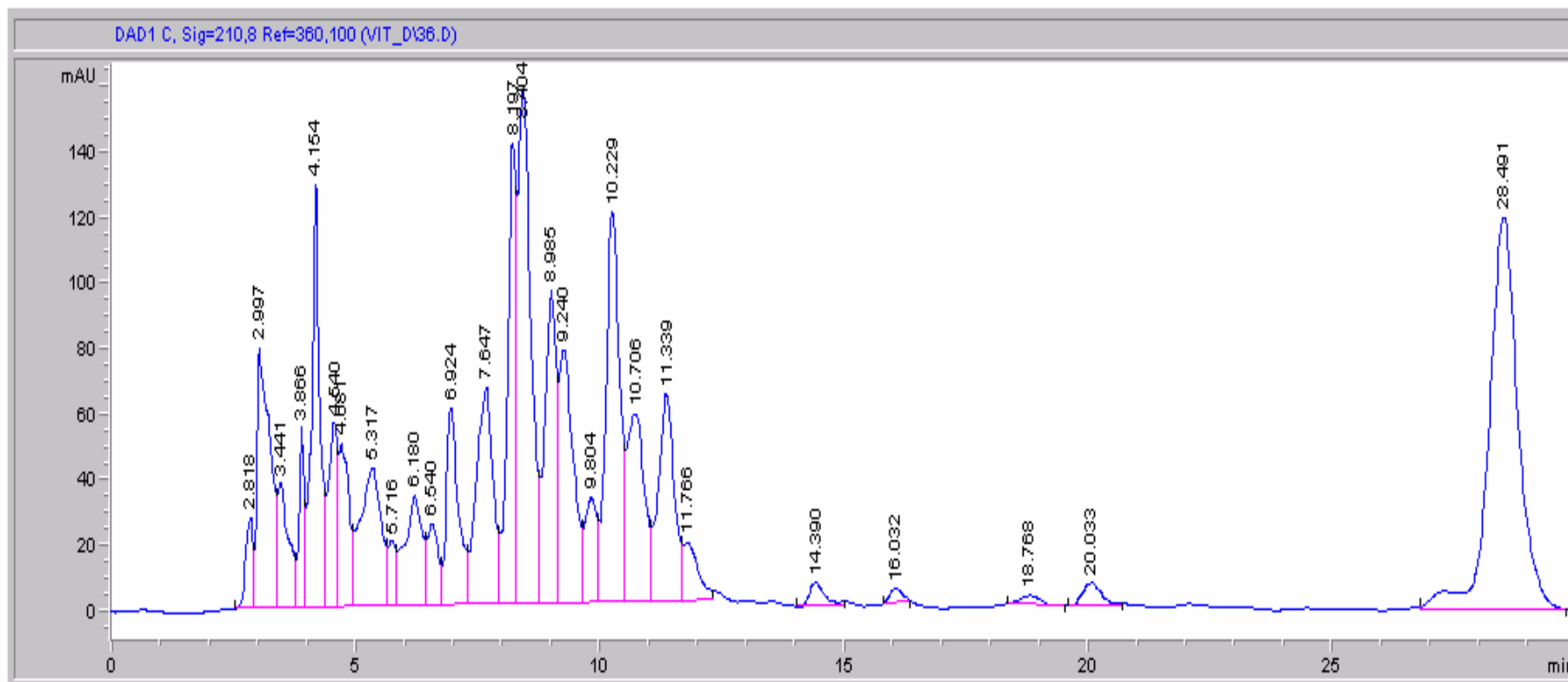
PŘÍLOHA P III: CHROMATOGRAM PLNOTUČNÉHO TRVANLIVÉHO MLÉKA PŘI VLNOVÉ DÉLCE 210 NM



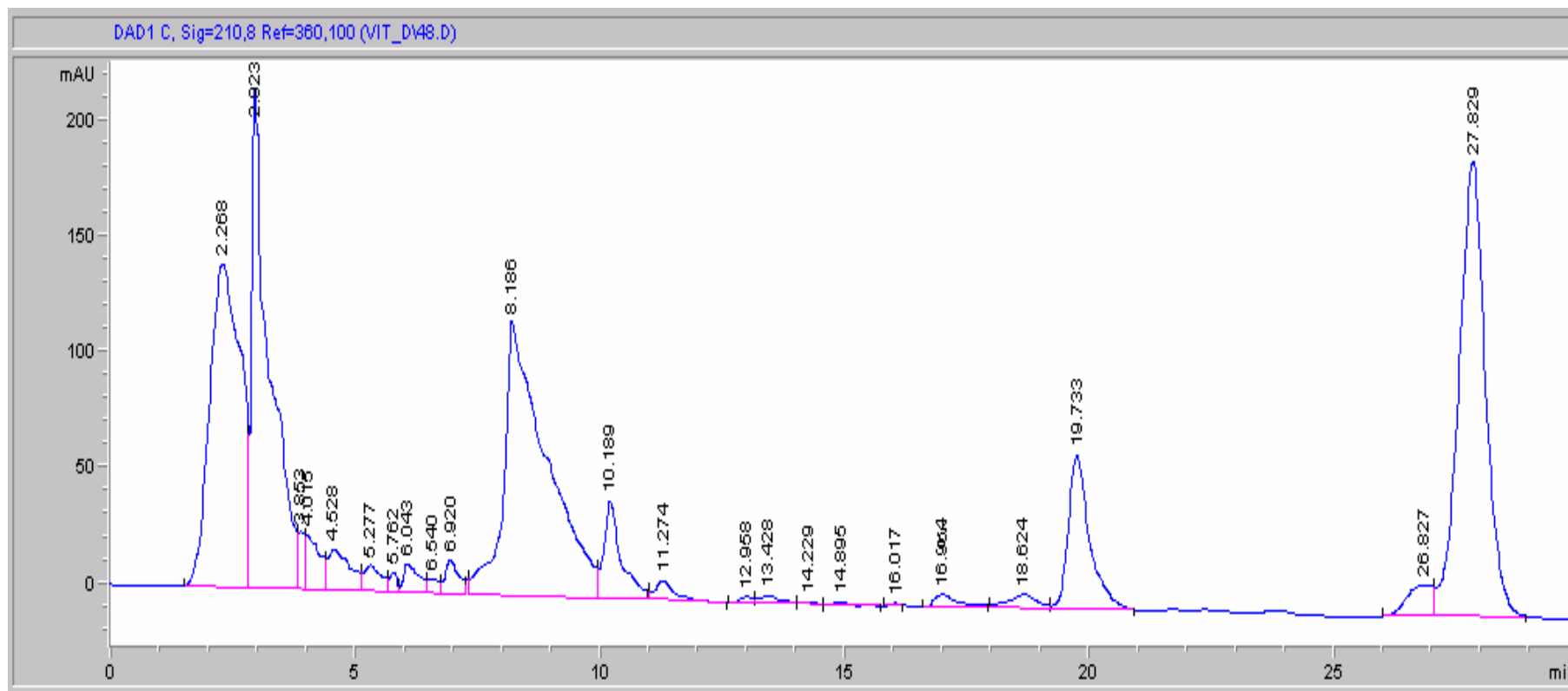
PŘÍLOHA P IV: CHROMATOGRAM VANILKOVÉHO KRAVÍKA PŘI VLNOVÉ DÉLCE 210 NM



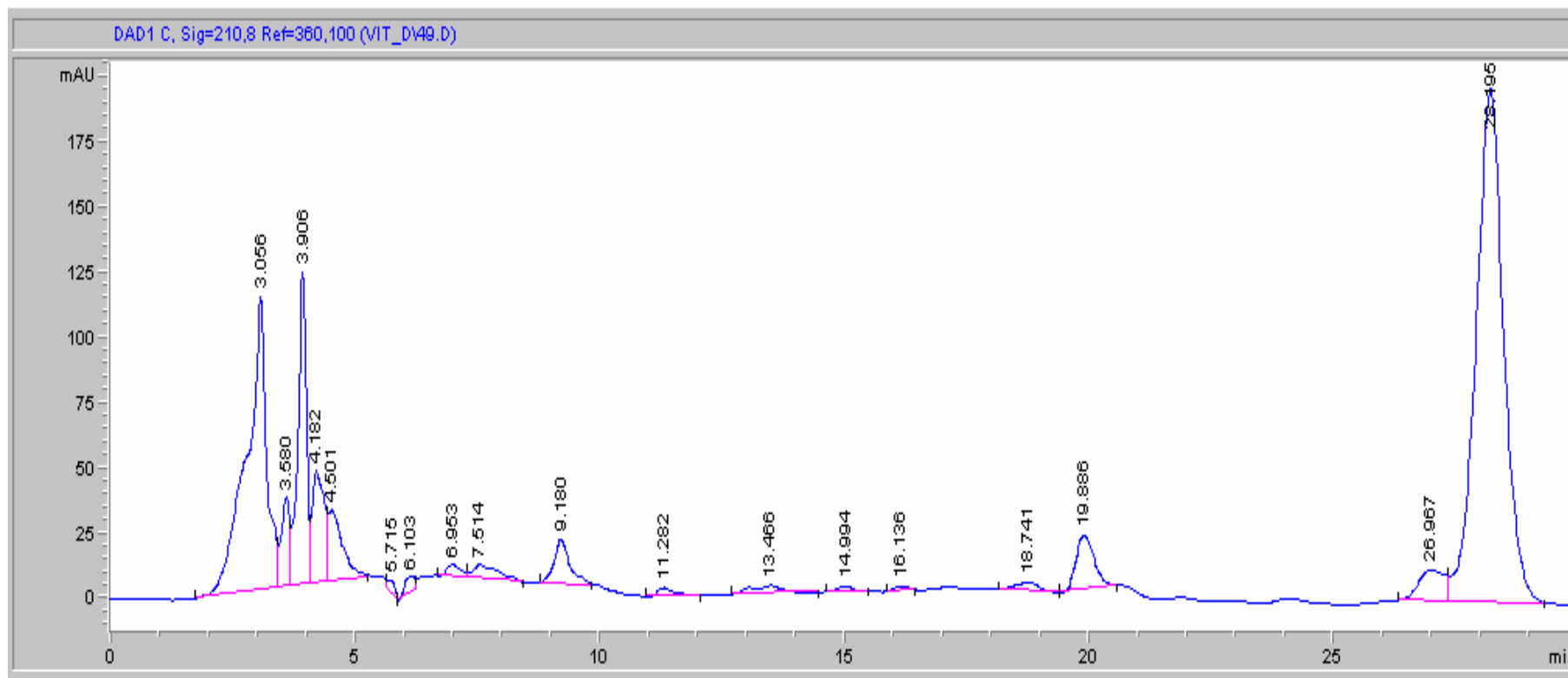
PŘÍLOHA P V: CHROMATOGRAM ACTIMELU PŘI VLNOVÉ DÉLCE 210 NM



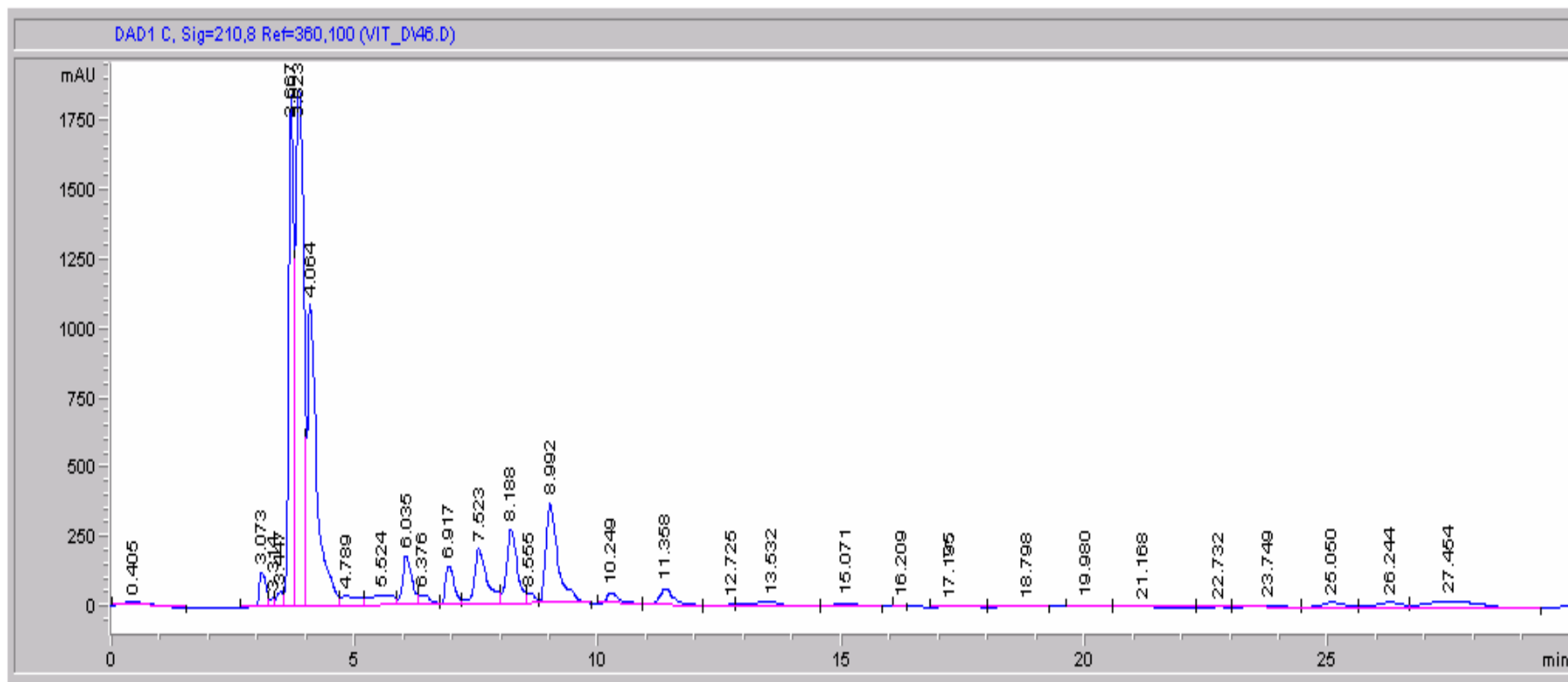
PŘÍLOHA P VI: CHROMATOGRAM MONTE DRINKU PŘI VLNOVÉ DÉLCE 210 NM



PŘÍLOHA P VII: CHROMATOGRAM TAVENÉHO SÝRA PŘI VLNOVÉ DÉLCE 210 NM



PŘÍLOHA P VIII: CHROMATOGRAM RAMY MULTIVITA PŘI VLNOVÉ DÉLCE 210 NM



PŘÍLOHA P IX: CHROMATOGRAM PERLY MULTIVITA PŘI VLNOVÉ DÉLCE 210 NM

