

Katedra analytické chemie
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Univerzita Karlova v Praze

**Možnosti HPLC při stanovení
vybraných vitamínů v potravinách**

Bakalářská práce

Denisa Brejchová

2008

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Cílem této práce je shromáždit informace o vitamínu D. O jeho způsobech stanovení metodou HPLC v nejrůznějších potravinách, ve kterých se vyskytuje. Dále rozdělit metody stanovení HPLC podle úpravy vzorků (potravin), stacionární a mobilní fáze, a to vše na základě vyhledaných informací.

2. POUŽITÉ ZDROJE INFORMACÍ

V teoretické části této bakalářské práce byly použity internetové stránky google.com, kde byla použita nejčastěji slova Vitamin D, stanovení vitamínu.

Dalším zdrojem byly stránky státního ústavu pro kontrolu léčiv www.sukl.cz, kde byla zadána slova chemické a fyzikální vlastnosti vitamínu D a posléze byla i vyhledána.

V další části bakalářské práce byl využíván internetový zdroj Web of Science nebo Science Direct, kde byla do vyhledávačů zapsána slova vitamin D, HPLC, food, direction vitamin D.

Separáční metody - obecně

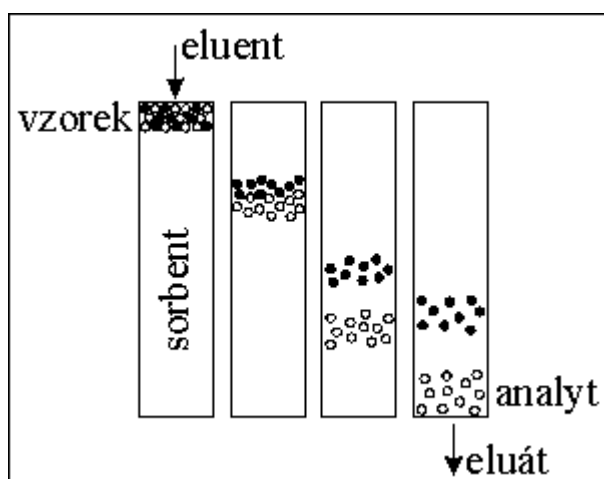
Separace jsou charakterizovány z několika hledisek:

1. *selektivita metody* (separace látek na základě jedné nebo více specifických vlastností)
2. *rozsah použitelnosti* (umožňuje rozpoznat, jaké vzorky se mohou touto metodou separovat)
3. *frakcionační kapacita* (maximální počet složek, které mohou být metodou separovány v jediné operaci)

Mezi separační metody jsou řazeny membránové separace (dialýza, ultrafiltrace, osmóza, elektrodialýza), separace polem (elektroforéza, izotachoforéza, termodifuze, hmotnostní spektrometrie).[1] Nejčastěji používanými analytickými separačními metodami jsou však plynová a kapalinová chromatografie a kapilární elektroforéza.

HPLC

Princip separace: [2]



Separáční metoda, při které se oddělují složky obsažené ve vzorku.

Vzorek se vnáší mezi dvě nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá (náplň kolony), mobilní fáze je pohyblivá a prochází kolonou za vysokého tlaku.

Složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fází zachycovány silněji.

Tím se postupně složky od sebe separují.

Kapalinový chromatogram - schéma [3]

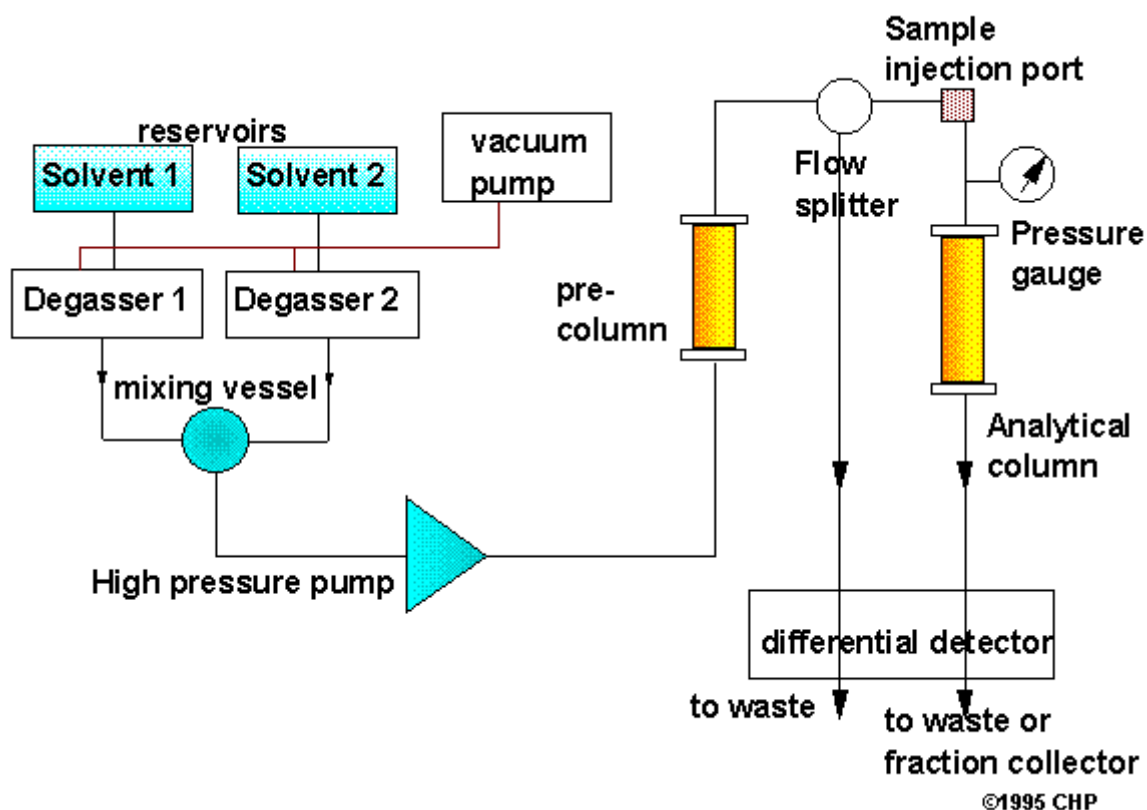


Schéma kapalinového chromatografu:

1,2-eluční činidla (mobilní fáze), vysokotlaká čerpadla (degasser 1 a 2), směšovač, předkolona, dávkovač, kolona, detektor, zapisovač, sběrač frakcí, integrátor

Při dělení směsi látek se používá izokratická eluce jedinou mobilní fází, jejíž složení se během chromatografie nemění. U některých látek se využívá gradientová eluce, při které se k mobilní fázi přimíchává rostoucí množství druhé mobilní fáze s větším elučním účinkem.

Kolony používáme jen náplňové, ocelové nebo skleněné (5-30 cm dlouhé) naplněné stacionární fází. Náplň kolony je homogenní a rovnoměrná. Spojení mezi kolonou, dávkovacím zařízením a detektorem jsou kapilární.

Dávkování vzorku se provádí speciální injekční mikrostríkačkou nebo dávkovacím kohoutem (stríkačkou lze dávkovat různé objemy, kohoutem se dávkuje přesně daný objem).

Kapalina se do kolony čerpá pístovými nebo membránovými čerpadly. Jako detektory jsou nejpoužívanější fluorimetrický, infračervený a ultrafialový. Pro účinné dělení látek je rozhodující náplň kolony (kvalita sorbentu), jeho velikost a stejnosměrnost částic, ale i tvar, porozita a struktura.

Vitamin D - Teoretická část

Vitamin D je antirachitický (hormonální steroidní) vitamín, rozpustný v tucích a tělo jej přijímá nejen z potravy, ale vzniká v těle působením slunečních paprsků – je tedy znám jako „slunečný vitamín“, protože ultrafialové záření proměňuje podkožní cholesterol na vitamín D. Vitamín D je absorbován stěvnou stěnou spolu s rozpustnými tuky.[4]

Nejdůležitější je vitamín D3 (**cholecalciferol**), který vzniká v kůži vlivem slunečního záření. Teprve však transportem do jater a přeměnou v ledvinách vzniká vlastní aktivní forma vitamínu D. V těhotenství se aktivní vitamín D tvoří také v placentě.

Další formou vitamínu D je vitamín D2 (**ergocalciferol**).[5]

Zdroje vitamínu D

Nejbohatším zdrojem vitamínu D jsou rybí tuk, rybí játra (hlavně tresčí játra), mořské ryby (sardinky, sledi, lososi, makrely). Malé množství je také obsaženo v mléce, vejcích, mase a másle. V mateřském mléce je množství vitamínu D pro kojence nedostačující.

Malé množství vitamínu se vyskytuje i v rostlinných produktech (avokádo, kakao, banány a obilné klíčky).

80% denní potřeby vitamínu D by měl člověk získávat ze slunečního záření.[6]

Obsah vitamínu v některých složkách potravy (orientační hodnoty) [7]

Rybí tuk (1 lžíce)	1360 IU (34 µg)
Losos (100g)	500 IU (12,5 µg)
Sleď (100g)	900 IU (22,5 µg)
Sardinky konzervované (100g)	300 IU (7,5 µg)
Vaječný žloutek (1 ks)	25 IU (0,625 µg)
Máslo	30 IU (0,75 µg)
Mléko	30 IU (0,75 µg)

Účinky vitamínu D

1. Zdravé kosti

Vitamín D je důležitým činitelem při tvorbě a mineralizaci kostí. Potřebujeme ho nejen při růstu, ale také při hojení kostí po zlomeninách. Ovlivňuje metabolismus vápníku a fosforu, které vstřebává ze zažívacího traktu. Zpomaluje ztrátu kostní hmoty a tím i působí v prevenci řídnutí kostí (osteoporóze).[6]

2. Zdravé svaly a prevence diabetu

Zvyšuje svalovou činnost srdce a udržuje optimální hodnoty krevního tlaku. Má vliv na vylučování inzulínu (zlepšuje glukózovou toleranci) a tím i na metabolismus cukrů.[6]

Pomáhá zachovávat zdravý nervový systém, normální pulz a úměrnou srážlivost krve.[7]

3. Prevence rakoviny

Tlumí množení buněk, ale podporuje jejich zrání. Také hraje důležitou roli v obranyschopnosti organismu.[8]

Také dokáže brzdit růst abnormálních buněk, které tvoří zhoubné nádory (rakovina). Zejména se týká rakoviny tlustého střeva, konečníku, dále prostaty a prsu.[6]

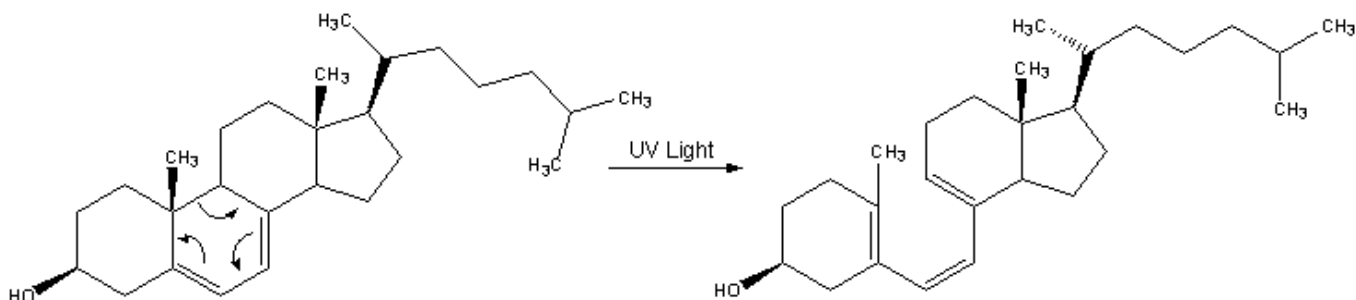
Denní doporučené dávkování [6]

Kojenci (0-6 měsíců)	1,25 µg/kg
Kojenci (6-12 měsíců)	1,10 µg/kg
Batolata (1-3 roky)	0,77 µg/kg
Děti (3-6 let)	10 µg
Děti (7-18 let)	5 µg
Těhotné a kojící ženy	10 µg

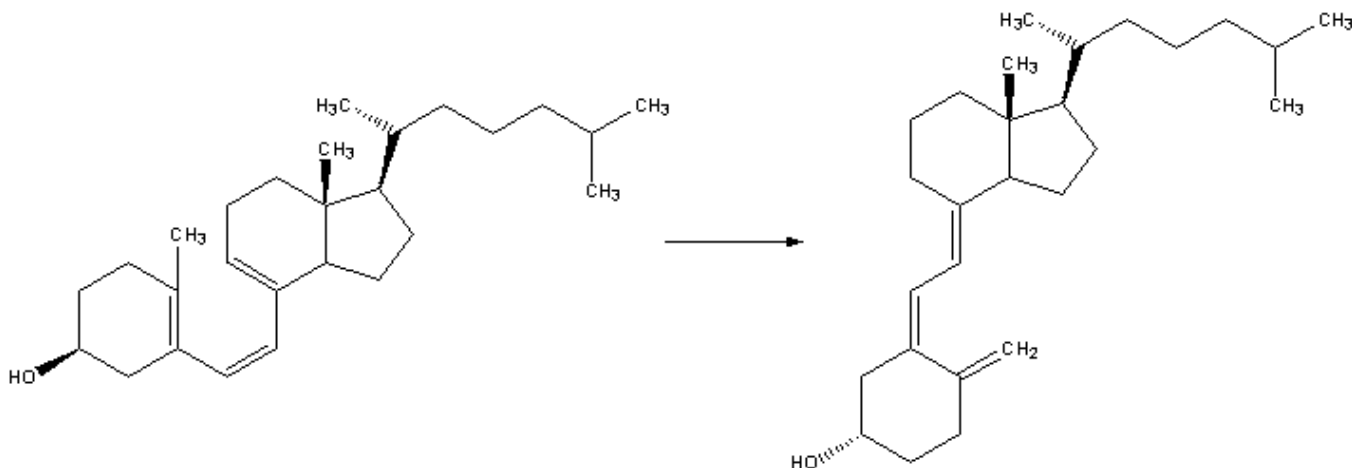
(Zajímavost: K tomu, aby naše kůže vyrobila doporučenou denní dávku vitamínu D, stačí vystavit celé tělo (nahé) na 1 minutu denně slunci, anebo uskutečnit denně hodinovou procházku na čerstvém vzduchu.)

Biosyntéza vitamínu D

1. v prvním kroku je 7-dehydrocholesterol (derivát cholesterolu) štěpen UVB zářením za vzniku provitamínu D3



2. provitamin D3 se spontánně přemění na svůj izomer cholekalciferol

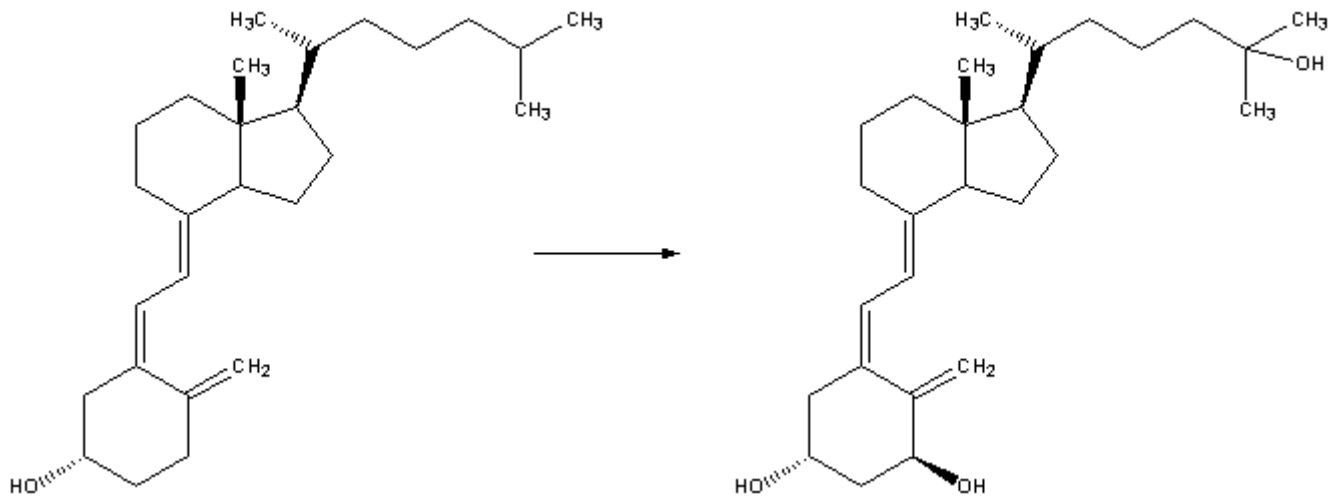


3. cholekalciferol je vychytáván játry, kde je v endoplazmatickém retikulu hydroxylován enzymem D3-25-hydrolázou.

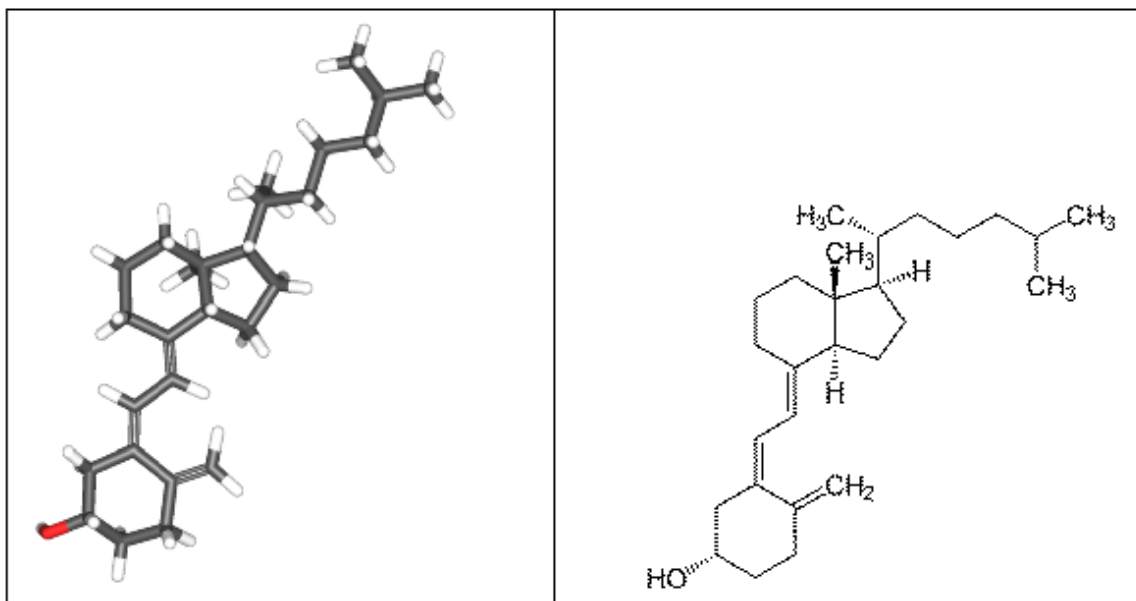
Vzniklý produkt, 25-hydroxycholekalciferol, je převažující formou vitamínu D v oběhu. Velká část hydrokalciferolu přechází do žluče (enterohepatální oběh).

Dále je hydroxylován v ledvinách na biologicky aktivní \Rightarrow

⇒ 1,25-dihydroxycholecalciferol (=kalcitriol), který už ovlivňuje metabolismus vápníku.[4]



Chemické vlastnosti vitamínu D



1. Fyzikálně-chemické vlastnosti vitamínu D₂ [8]

Vitamin D₂: ergokalciferol (9,10-seco- $\Delta^{10(19)5,7,22}$ -ergostatetraen-3- β -ol)

Provitamin D₂: ergosterol (3 β ,22E-ergosta-5,7,22-trien-3-ol)

	Ergosterol (provitamin D ₂)	Ergokalciferol (vitamin D ₂)
Sumární vzorec	C ₂₈ H ₄₄ O	C ₂₈ H ₄₄ O
Molekulová hmotnost (g/mol)	396,63	396,63
Teplota tání (°C)	166-169	115-118
Spektrální charakteristika (λ_{\max} ; $A^{1\%}_{1\text{cm}}$)	262, 271, 282, 293 nm (ethanol)	264,5 nm (hexan); 458,9 \pm 7,5

2. Fyzikálně-chemické vlastnosti vitamínu D3[8]

Vitamin D₃: cholekalciferol (9,10-seco- $\Delta^{10(19)5,7}$ -dehydrocholestatrien-3- β -ol)

Provitamin D₃: 7-dehydrocholesterol (cholesta-5,7-dien-3-ol)

	7-dehydrocholesterol (provitamín D3)	Cholekalciferol (vitamín D3)
Sumární vzorec	C ₂₇ H ₄₄ O	C ₂₇ H ₄₄ O
Molekulová hmotnost (g/mol)	384,62	384,62
Teplota tání (°C)	150-151	84-85
Spektrální charakteristika (λ_{\max} ; $A_{1\text{cm}}^{1\%}$)	260, 270, 281, 294 nm	264,5 nm (hexan); 450-490

Hypervitaminóza

Předávkování vitamínem D nastává při překročení hladiny v séru nad 400 μ g/ml. Projevuje se nechutenstvím, vysokým krevním tlakem, nadměrným močením a zvracením. Z kostí se vyplavuje vápník, který se pak usazuje v měkkých tkáních. Zvýšené slunění nezpůsobuje předávkování vitamínem D, protože se včas zastaví tvorba jeho aktivní formy.[9]

Vysoké dávky vitamínu D mohou vést k hyperkalcémii a následně až ke smrti.

Hypovitaminóza

Příčinou nedostatku vitamínu D je vyhýbání se slunečnímu záření, jeho malý příjem v potravě, ale také onemocnění jater a ledvin. V organismu se uchovává 2 – 4 měsíce.

Kritický je jeho nedostatečný příjem v dětství, kdy dochází k poruše růstu chrupavek a kostí, které jsou měkké a lámavé. Následkem je nevratné zkřivení kostí a tvorba zlomenin, které se špatně hojí. Toto onemocnění se nazývá rachitis = křivice. [6]



U dospělých se nedostatek vitamínu D projevuje osteomalácií, kdy nastává porucha v ukládání vápníku do kostí a je zpomalené uvolňování, čímž se zvyšuje riziko vzniku zlomenin a osteoporózy.



Na deficit vitamínu D v organismu lze usuzovat, pokud je snižená hladina vápníku a fosforu v krvi, vyskytuje se slabost svalů a je vyšší riziko infekce.[6]

REŠERŠE

(možnosti stanovení)

V této části jsou souhrnně pomocí tabulek zpracovány možnosti HPLC při stanovení vitamínu D v potravinách.

Potravina	Druh úpravy vzorku	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Vnitřní standard	Poznámka	Cítace
Rybí olej	Purifikace (margarin)	Oxid hlinitý					10
Maso	Alkalická hydrolyza, extrakce na pevné fázi			220-320 nm			11
Rostlinný olej	Extrakce s diethyl-etherem, centrifugace, Rozpuštění v THF		Směs methanol-acetonitril (D ₂) Methanol-THF				12
Sýr	Extrakce s petrolejovým etherem:diethyl-ether (90 : 10 vol/vol)					Retenční čas (9 min.)	13
Lidská plasma	Centrifugace se směsí ethanol-acetonitril		6% acetonitril v 5mmol fosfátovém pufru (pH = 6,5)	265 nm			14
Ryby	Saponifikace + Liquid-liquid extrakce						15
Hovězí maso	Hydrolyza + extrakce na pevné fázi			265 nm			16

Potraviná	Druh úpravy vzorku	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Vnitřní standard	Poznámka	Citace
Krmivo pro dobytek	Alkalické štěpení	silikagelová kolona modifikovaná obrácenou fází)					17
Mléko	Vystavení světlu a oxidaci, purifikace	Běžné kolony nebo mikrokolony		Elektrochemická, UV, hmotnostní			18
Jedlé houby	Zmýdelnění, extrakce						19
Potraviny obecně (mléko, vejce, máslo, ryby)	Zmýdelnění ethanolickým nebo hydroxidovým roztokem a hexanem	gel kyseliny křemičité (kolona RP-C 18)	Methanol				20
Mléčné výrobky	Zmýdelnění, rafinace, extrakce			UV detekce			21
Dětská strava	Alkalická hydrolyza, purifikace, extrakce	Reverzní fáze					22

Potravina	Druh úpravy vzorku	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Vnitřní standard	Poznámka	Citace
Čerstvé ryby	Zmýdelnění, extrakce						23
Potraviny (maso, mléko, vejce)		C18 kolona, 3% dodecylsulfát, 0,02 mol/l fosfátový pufr pH = 7	15% butyl alkohol, .. (methanol, acetonitril)	230 nm 280 nm 300 nm			24
Vaječný žloutek	Extrakce, purifikace						25

6. ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena zejména na stanovení vitamínu D metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) v nejrůznějších potravinách, ve kterých se vitamín D vyskytoval. Nejvíce vitamínu D bylo obsaženo v tučných rybách (losos, makrela, sled').

Bylo zjištěno, že metoda HPLC se využívá také pro stanovení jiných vitamínů, z nejčastějších to byl vitamín A a E. Metoda vyniká svou jednoduchostí a citlivostí.

Nejlepší uplatnění má HPLC v oblasti kontroly jakosti ve farmaceutickém průmyslu a také v oblasti analýz životního prostředí.

7. SUMMARY

This work deals with determination of vitamin D by high performance liquid chromatography (HPLC) in all nutritive, where vitamin D was occurred. The big amount of vitamin D was contained in fatty fish (salmon, Spanish mackerel, herring).

There was found, that HPLC method had been used for determination of other vitamins, such as vitamins A and E. HPLC method is excellent of simplicity and sensitivity.

HPLC method is widely used in the area of pharmaceutical control, industry and environmental analysis.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1 Prof. RNDr. Rolf Karlíček, DrSc. a kolektiv, Analytická chemie pro Farmaceuty, Praha 2005
- 2 Pavel Coufal, <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html> citace 5. 3. 2008-04-
- 3 Bryan M. Tissue, Science Hypermedia Home Page, 1996
- 4 <http://www.kulturistika.com/2006120004-Vse-o-vitaminu-D.html> citace 10. 2. 2008
- 5 http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/64_1958.html citace 22. 2. 2008
- 6 <http://www.vasedeti.cz/clanky.php?clanek=2879> citace 22. 2. 2008
- 7 <http://de.wikipedia.org/wiki/Cholecalciferol> citace 10. 2. 2008
- 8 http://www.sweb.cz/HPLC1/Vitamin/ch_vitD.htm#_edn1 citace 13. 2. 2008

- 9 <http://vitainfo.cz/eshop/detail.php?idzb=265> citace 13. 2. 2008
- 10 Homberg. E. FETT WISSENSCHAFT TECHNOLOGIE-FAT SCIENCE TECHNOLOGY (str. 228-230), červen 1993
- 11 Jette Jacobsen, Ina Clausen, Torben Leth and Lars Ovesen, Institute of Food Safety and Nutrition, Danish Food Administration, DK-2860, Soborg, Denmark, květen 2004
- 12 Sarioglu K., Celebi SS., Mutlu M., JOURNAL OF LIQUID CHROMATOGRAPHY & RELATED TECHNOLOGIES, 2001
- 13 Upreti P., Mistry VV., Varthesen JJ., JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, prosinec 2002
- 14 Brunetto MR., Obando MA., Gallignani M., Alarcon OM., Nieto E., Salinas R., Burguera JL., Burguera M., TALANTA, prosinec 2004
- 15 Ostermeyer U., Schmidt T., EUROPEAN FOOD RESEARCH AND TECHNOLOGY, (str. 403-413), únor 2006

- 16 Jakobsen J., Clausen I., Leth T., Ovesen L., JOURNAL OF FOOD COMPOSITION AND ANALYSIS, (str.777-787), prosinec 2004
- 17 Thomson JN., Ploufel L., FOOD CHEMISTRY, (str.313-318), 1993
- 18 Perales S., Alegria A., Barbera R., Farrere R., FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY INTERNATIONAL, (str.451-462), prosinec 2005
- 19 Mattila PH., Piironen VI., Uusirauva EJ., Koivistoinen PE, JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, listopad 1994
- 20 Bognar A., ZEITSCHRIFT FUR LEBENSMITTEL-UNTERSUCHUNG UND-FORSCHUNG, (str.469-475), květen 1992
- 21 Mattila PH., Piironen VI., Uusirauva EJ., Koivistoinen PE, JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, říjen 1995
- 22 Konings EJM, NETHERLANDS MILK AND DAIRY JOURNAL , (str.31-34), 1994
- 23 Mattila Pirjo, Piironen Vieno, Uusi-Rauva Esko, Koivistoinen Pekka, Journal of Food Composition and Analysis, říjen 1995

24 Vanessa Kienen, Willian F. Costa, Jesuí V. Visentainer, Nilson E. Souza, Cláudio C. Oliveira, Development of a green chromatographic Method for determination of fat-soluble vitamins in food and farmaceutical supplement, březen 2008

25 R. M. Bauwens, J. A. Kint, M. P. Devos, K. A. Van Brussel, A. P. De Leenheer, Production, purification and characterization of antibodies to 1,25-hydroxyvitamin D raised in chicken egg yolk, leden 2003