



VITAMINY



Běžně používané metody:

- Chromatografické – **HPLC**, GC
- Enzymové / ELISA
- Spektrofotometrické zvl. fluorimetrické
- Mikrobiologické



NÁROČNÁ ANALÝZA

- ⇒ stopové koncentrace
- ⇒ labilní analyty

Platné normy ČSN

| Norma | Název | Vydáno r. |
|--------------|---------------------------------------|-----------|
| ČSN EN 14122 | Stanovení vitamínu B1 metodou HPLC | 2004 |
| ČSN EN 14152 | Stanovení vitamínu B2 metodou HPLC | 2004 |
| ČSN 56 0056 | Stanovení vitamínu B6 v poživatinách | 1981 |
| ČSN 56 0058 | Stanovení vitamínu B12 v poživatinách | 1982 |
| ČSN EN 14130 | Stanovení vitamínu C metodou HPLC | 2004 |

| Norma | Název | Vydáno r. |
|----------------|--|-----------|
| ČSN EN 12823-1 | Stanovení vitamínu A metodou vysokoučinné kapalinové chromatografie - Stanovení all-trans retinolu a 13-cis-retinolu | 2002 |
| ČSN EN 12823-2 | Stanovení vitamínu A metodou vysokoučinné kapalinové chromatografie - Stanovení beta-karotenu | 2002 |
| ČSN EN 12822 | Stanovení vitamínu E metodou vysokoučinné kapalinové chromatografie - Stanovení alfa, beta, gama a delta-tokoferolů | 2002 |

| Norma | Název | Vydáno r. |
|--------------|--|-----------|
| ČSN EN 12821 | Stanovení vitamínu D metodou vysokoučinné kapalinové chromatografie - Stanovení cholekalciferolu (D3) a ergokalciferolu (D2) | 2002 |
| ČSN EN 14148 | Stanovení vitamínu K1 metodou HPLC | 2004 |

VITAMINY ROZPUSTNÉ VE VODĚ (hydrofilní)

Vitaminy skupiny B

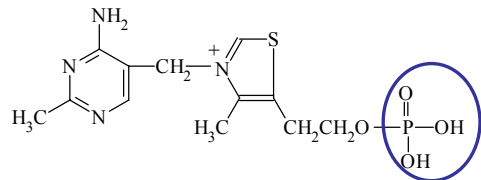
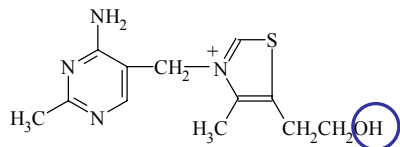
Thiamin (vitamin B₁)

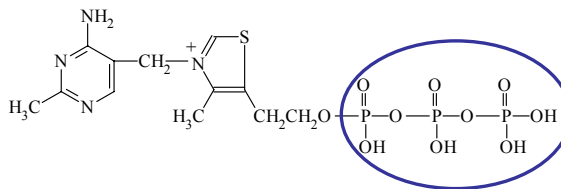
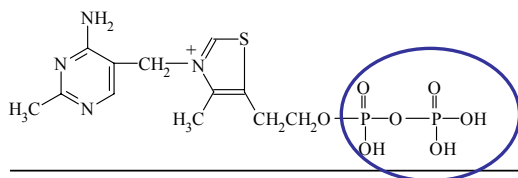
Hlavní dietární zdroje:

olejniný (semena), oříšky, cereálie (včetně povrchových vrstev), játra, mořské plody, vajíčka, luštěniny

Formy výskytu thiaminu

- ▶ v rostlinných produktech volný,
- ▶ v živočišných produktech fosfáty zvl. TPP; může být vázán na bílkovinu





⚠ Důležitá skutečnost pro stanovení vitaminů B1
 → termolabilní, rozklad v přítomnosti oxidujících sloučenin při vyšších pH

SPEKTROFOTOMETRICKÉ METODY

STANOVENÍ CELKOVÉHO THIAMINU

■ Thiochromová (fluorimetrická) metoda (AOAC)

(i) uvolnění thiaminu z vazeb na matrici a z fosfátů (defosforylace)

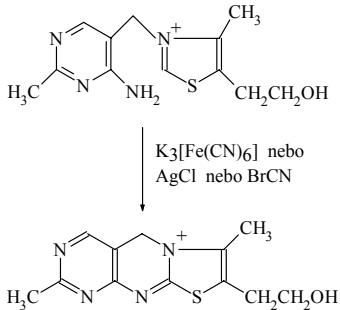
- kyselá hydrolyza (nejčastěji 0.1M HCl, 15 min, 121°C - autoklav)
- enzymová hydrolyza po úpravě pH na 4,5 – 5, inkubace cca 3 hod. 45 – 50°C (takadiastáza)

(ii) Přechištění primárního extraktu - odstranění interferujících látek (zvl. bázičických),

- nejčastěji ionexová chromatografie
- SPE kolonky - silikagel C18

(iii) derivatizace za vzniku fluoreskujícího thiochromu

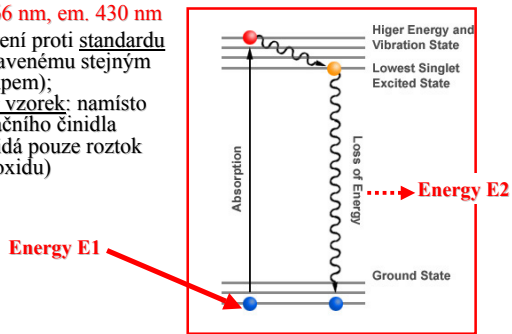
– oxidace v alkalickém prostředí:



(iv) Extrakce thiochromu do rozpouštědla (isobutanol)

(v) FLUORIMETRIE – ex. 366 nm, em. 430 nm (měření proti standardu připravenému stejným postupem); slépý vzorek: namísto oxidačního činidla se přidá pouze roztok hydroxidu)

princip fluorescence



CHROMATOGRAFICKÉ METODY

■ **Metody HPLC**

stanovení celkového thiaminu jako thiochrom
– příprava vzorku jako u fluorimetrie

stanovení jednotlivých (nativních) forem
– izolace bez razantní kyselé hydrolyzy – enzymově nebo za studena trichloroctovou kyselinou

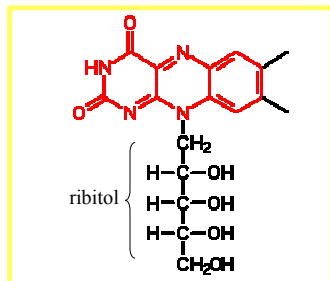
☞ možnost současného stanovení s dalšími vitaminy komplexu B

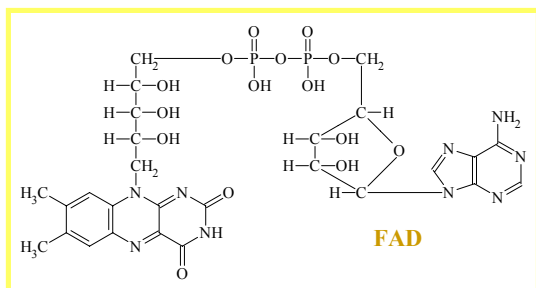
Riboflavin (vitamin B₂)

Hlavní dietární zdroje: vnitřnosti, ořišky, sýry, vajíčka, mléko; ale i listová zelenina, ryby luštěniny, celozrnné cereální výrobky

Formy výskytu:

- ▶ v mase, vejcích – hlavně jako koenzymy,
- ▶ v mléce volný





- ⚡ Důležitá fakta pro stanovení vitaminů B2**
- nízké pH - volný riboflavin; pH 5 – 7 všechny formy
 - vysoce fotolabilní
 - přirozená fluorescence

SPEKTROFOTOMETRICKÉ METODY

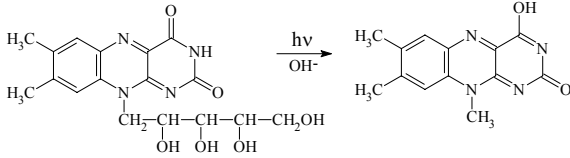
■ Fluorimetrická metoda

- Isolace analytu - hydrolýza** → uvolnění riboflavinu z kovalentních vazeb na proteiny (koenzymy)
 - kyselá (0.1 M HCl, 120°C, 30 min.)
 - někdy enzymová (pepsin, následně takadiastáza)
- Odstranění částí interferentů - precipitace proteinů** (trichloroctová kyselina) → příprava vzorku pro měření fluorescence analytu v transparentním prostředí

Varianta A

(iii) Derivatizace – tvorba lumiflavinu

- **Převod riboflavinu na lumiflavin** ultrafialovým zářením v alkalickém prostředí, extrakce lumiflavinu do chloroformu



(iv) Kvantifikace - proměření fluorescence lumiflavinu

Varianta B (AOAC) – v praxi běžnější

- (iii) Odstranění interferencí** (endogenní fluoreskující sloučeniny) - oxidace extraktu manganistanem draselným → destrukce fluoreskujících interferencí → odbarvení manganistanu H₂O₂

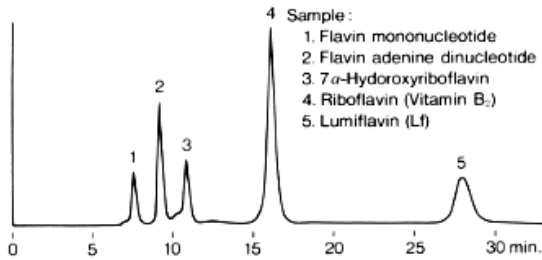
- (iv) Kvantifikace - měření fluorescence riboflavinu** (pozadí – slepý vzorek po redukci riboflavinu na nefluoreskující leukoformu hydrogensířičitanem)

CHROMATOGRAFICKÉ METODY

HPLC/FLD metody

Příklad – separace modelové směsi:

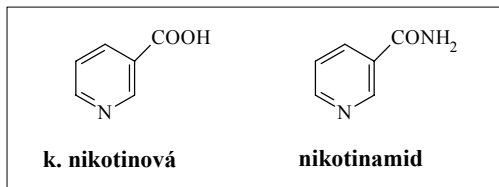
Column : Shodex Asahipak GS-320 7E (7.6mmID*250mm)
Eluent : 1M Propionic acid buffer(pH4.4) Flow rate : 1.5mL/min
Detector : Fluorescence (Ex. 250nm, Em. 520nm) Column temp. :



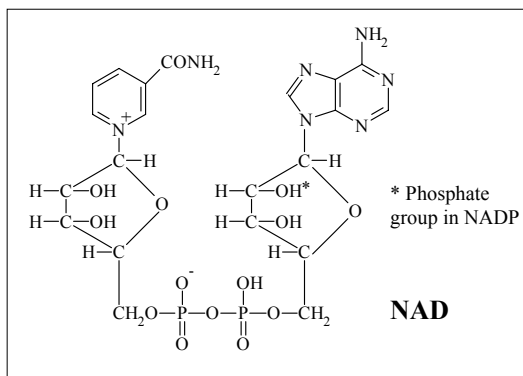
Nikotinová kyselina (vitamin B₃) a nikotinamid (vitamin PP)

Formy výskytu:

- ▶ v mase (hovězí, drůbež, ryby...) - nikotinamid,
- ▶ v cereáliích, luštěninách - kyselina nikotinová



→ jeden z nejstabilnějších vitaminů



SPEKTROFOTOMETRICKÉ METODY

STANOVENÍ CELKOVÉHO OBSAHU → konverze nikotinamidu na nikotinovou kyselinu

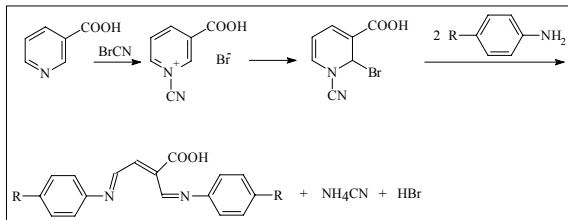
(i) Izolace

- kyselá hydrolyza (autokláv, 0,5 M HCl) – stanovení biologicky dostupného niacinu; často doplněna enzymovou hydrolyzou (takadiastáza, papain...)
- alkalická hydrolyza – uvolnění i vázaných forem, Přeměna amidu na kyselinu

Razantní reakční podmínky – autoklávování při teplotách ≈ 120 °C

(ii) Tvorba barevného produktu pro kvantifikaci v UV

Reakce s bromcyanem a aromatickými aminy (např. kyselina sulfanilová) na barevné produkty



Limitující faktory:

- nízká citlivost stanovení
 - toxická a nestabilní činidla
- jen ojediněle používaná metoda, ne zcela specifická

CHROMATOGRAFICKÉ METODY

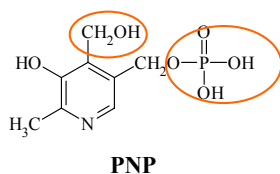
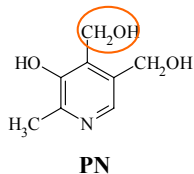
HPLC metody

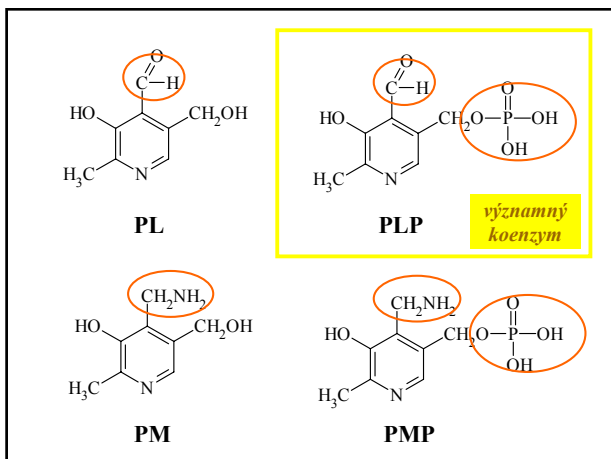
- (i) izolace – hydrolyzáza (stanovení celkového niacinu jako nikotinová kyselina)
- (ii) purifikace pomocí ionexu (katex)
- (iii) stanovení - HPLC separace na silikagelu C18 či ionexu, detekce v UV (261 nm) či pokolonová derivatizace a měření fluorescence

Pyridoxin (vitamin B₆)

6 biologicky aktivních forem

- ▶ **v rostlinách** – jako pyridoxin (PN) či PN glykosid (cca 60 % biologická dostupnost)
- ▶ **v živočišných produktech (maso, ryby)** – dominantní pyridoxamin fosfát (PMP) a pyridoxal fosfát (PLP) (při vaření PLP snadno konvertován na PMP)





🔥 Kritické aspekty při stanovení vitaminů B₆:

- výskyt ve formách se značně odlišnými fyzikálně chemickými vlastnostmi
- relativně velmi nízké hladiny přirozeného výskytu
- nemožnost zakonzcentrace či purifikace pomocí organických rozpouštědel (značná hydrofilita)
- fotolabilní

(i) Isolace vitaminu B₆ z analyzované matrice

a) použití silné minerální kyseliny za vysokých teplot (autokláv) → hydrolýza fosfátů a glykosylovaných forem

b) chloristá či sulfosalicylová kyselina → nedestruktivní postup, možnost interferencí při fluorimetrické detekci

c) hydrolýza glykosidů – enzymově β-glykosidázami

SPEKTROFOTOMETRICKÉ METODY

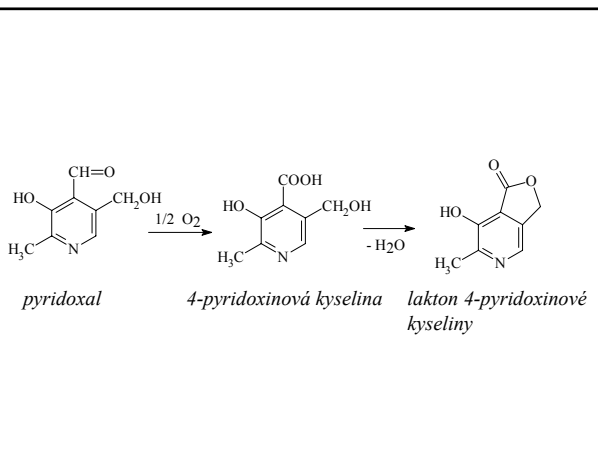
■ Fluorimetrická metoda

Kyselá hydrolyza

→ chromatografie na měničích iontů

→ převedení na laktón 4-pyridoxinové kyseliny

→ fluoreskující interference, případně zhášení (quenching), velmi zdlouhavé čištění



Fluorescenční charakteristiky vitamínu B₆

| Vitaminer | Excitation /emission wavelengths (nm) | Observed fluorescence intensity | pH range of maximum fluorescence |
|-----------------|---------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| PN | 332 /400 | 238 | 6.5 – 7.5 |
| | 320 /380 | 168 | 12.0 – 14.0 |
| PL (hemiacetal) | 330 /382 | 207 | 6.0 |
| PLP | 310 /365 | 283 | 12.0 |
| | 330 /410 | 11 | 6.0 |
| | 315 /370 | 17.5 | 12.0 – 14.0 |

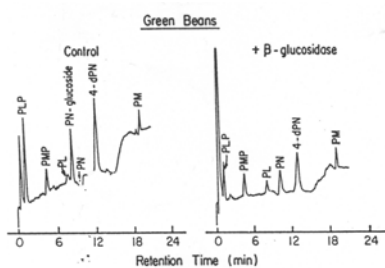
Fluorescenční charakteristiky vitamínu B₆

| Vitamin | Excitation /emission wavelengths (nm) | Observed fluorescence intensity | pH range of maximum fluorescence |
|---------------------|---------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| PM | 337 /400 | 370 | 4.0 – 5.5 |
| | 320 /370 | 410 | 14.0 |
| 4 - PA | 320 /420 | 770 | 1.5 – 4.0 |
| | 315 /425 | 650 | 6.1 – 9.4 |
| 4 - pyridoxolactone | 365 /423 | 32 | 2.5 – 4.8 |
| | 360 /430 | 2150 | 8.7 – 13.0 |

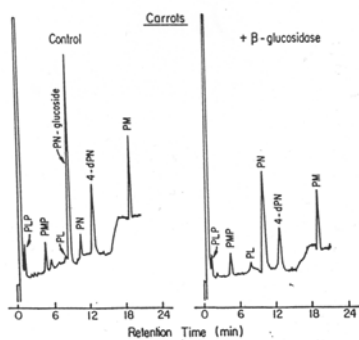
CHROMATOGRAFICKÉ METODY

Metody HPLC

dnes převažující v rutinní analýze



HPLC/FLD analýza vitamínu B₆ v hrášku

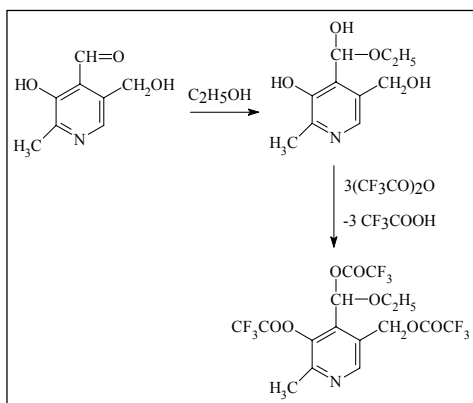


HPLC/FLD analýza vitamínu B₆ v mrkvi

Metody GC

➤ reakce pyridoxalu s ethanolem na poloacetal, převedení na trifluoracetáty (příp. předchází redukce borohydridem)

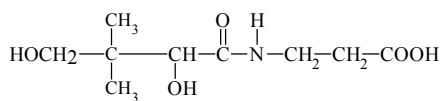
➔ V praxi méně používaná metoda, výhodné spojení s hmotnostní spektrometrií (identifikace, konfirmace)



Pantothénová kyselina (vitamin B₅)

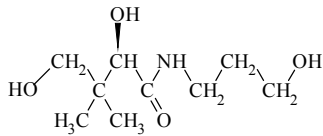
Formy výskytu:

- ▶ volná
- ▶ vázaná v koenzymu A
- ▶ vázaná na protein („acyl-carrier“ protein – ACP)

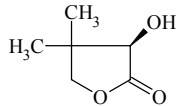


Pantothénová kyselina

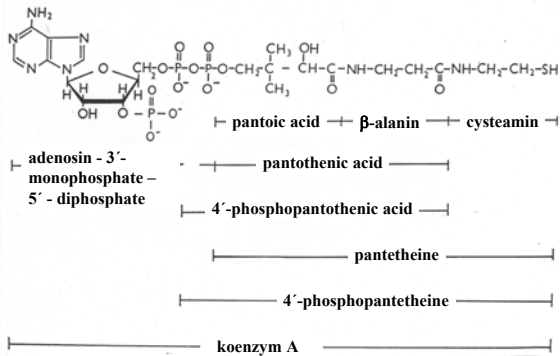
Panthenol - další forma s vitaminovou účinností



Panthenová kyselina relativně labilní – spontánní rozklad v kyselém prostředí → **pantoyl lakton** (= pantolakton):



Struktura koenzymu A



CHROMATOGRAFICKÉ METODY

Metody GC

a) Stanovení nativních (mateřských) sloučenin

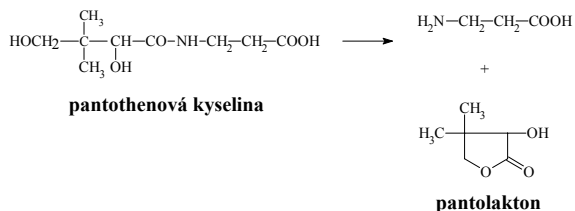
- šetrná extrakce (např. vodou)
- přečištění, nejčastěji chromatografické
- DERIVATIZACE (silylace, acetylace)

⇒ aplikace nejčastěji pro multivitaminové preparáty

b) Stanovení degradačních produktů

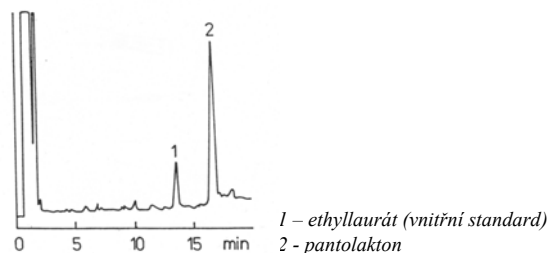
➤ kyselá extrakce → hydrolyza analytu → vznik pantolaktonu a β-alaninu

➤ GC stanovení – pantolakton přímo či po silylaci, β-alanin po acylaci a esterifikaci



Příklad: Stanovení pantothenové kyseliny v játrech metodou GC - jako pantolakton

Náplňová kolona (2400 x 2 mm), 10 % Carbowax 20M, FID, programovaná teplota 120 – 220 °C



HPLC metody

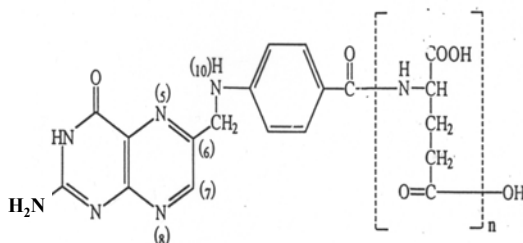
⇒ vhodné pro jednodušší matrice jako jsou multivitaminové preparáty

Folacin (vitamin B_C)

Komplex sloučenin odvozených od listové resp. folové (= pteroylglutamové) kyseliny → liší se stupněm redukce a počtem zbytků glutamové kyseliny (teoreticky asi 150 látek)

➤ v biologickém materiálu asociována s bílkovinami (při pH 3.6 disociuje), nejvyšší hladiny v zelenině (desítky µg)

k. folová (PteGlu)



State of Reduction

7,8-dihydro, e.g. H₇PteGlu
5,6,7,8-tetrahydro, e.g. H₄PteGlu

One Carbon Substituent

5-methyl, e.g. 5-CH₃-H₄PteGlu
5-formyl, e.g. 5-HCO-H₄PteGlu
10-formyl, e.g. 10-HCO-H₄PteGlu
5,10-methylenyl, e.g. 5,10-CH₂-H₄PteGlu
5,10-methenyl, e.g. 5,10-CH=H₄PteGlu

◇ Izolace, příprava vzorku

homogenizace vzorku, precipitace proteinů
(okyselení, zahřátí, přidavek trichloroctové kyseliny, případně papain)

☞ **před stanovením vhodné ošetřit vzorek dekonjugázou** (jaterní, pankreatickou, bakteriální, rostlinnou) → stanovení celkového folátu ve formě monoglutamátu

☞ vhodné průběžné použití redukčního činidla
(0,025 – 0,1 % askorbová kyselina,
2-merkptoethanol)

Nejúčinnější extrakce přírodních folacinů při pH 7.8

◇ Vlastní stanovení

◆ Mikrobiologické metody

➔ nejlepší mezilaboratorní shodnost

➔ rozhodčí metody

Měření odezvy *Lactobacillus casei* (inokulum v
logaritmické fázi růstu, 10^4 – 10^6 buněk/ml
testovaného media)

➤ turbidimetrie (540 – 660 nm, po 6 – 20 h.
kultivace při 37 °C)

➤ acidimetrie (doba inkubace až 72 hod., titrace
0.02M NaOH)

➤ plotnové metody (měření růstových zón)

☞ různá odezva mikroorganismu k různým
formám folacinu

- ◆ Metody založené na vazbě proteinu (radioizotopově značený)

~~☞ proměnná afinita jednotlivých derivátů folacinu~~

- ◆ Metody HPLC

často ionexová chromatografie, elektrochemická detekce, měření absorpance či fluorescence (selektivnější a citlivější, ale jen pro některé formy)

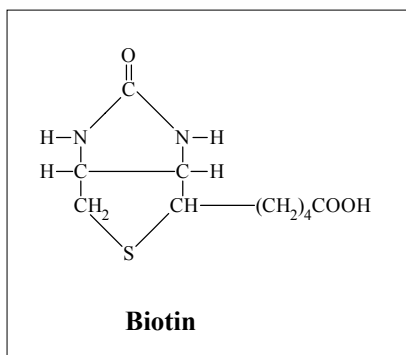
Biotin (vitamin H)

Dietární zdroje: některé druhy zeleniny, játra, cereálie – obtížná využitelnost pro savce

Výskyt: často vázaný na proteiny (koenzym ligázy, karboxylázy)

☞ *Tvorba nevyužitelného komplexu s avidinovou frakcí vaječného bílku (nelze rozložit proteázami)*

→ **Stabilita:** termostabilní, zvl. v neutrálním vodném prostředí



(i) Izolace

- enzymová hydrolýza papainem
- někdy nutné razantní podmínky – autoklávování 120 °C, 2 hod. 4N H₂SO₄

(ii) Přečištění hydrolyzátu

adsorpční nebo ionexová chromatografie

(iii) Vlastní stanovení

☝ velmi obtížné - nízké koncentrace,
problematická separace od složek matrice
přednost se dává **imunochemickým metodám**

někdy mikrobiologické metody

„rozhodčí“ metoda není k dispozici

■ Fluorescenční metoda

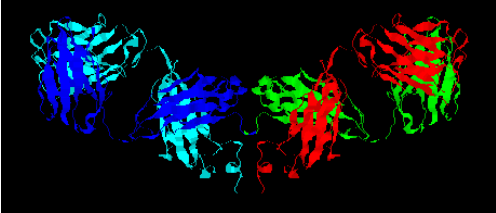
- ~~Titrace biotinu avidinem při současném monitorování fluorescence:~~
 - ~~zhášení fluorescence tryptofanu v avidinu~~
 - ~~vzrůst fluorescence značeného avidinu po přidávku biotinu~~

IMUNOCHEMICKÉ TECHNIKY

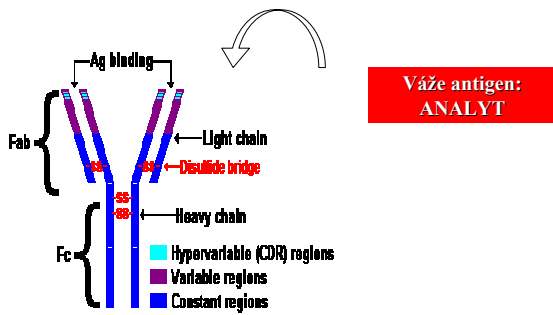
Enzyme Linked Immunoasorbent Assay (ELISA)

vysoká citlivost, často vysoká specifita

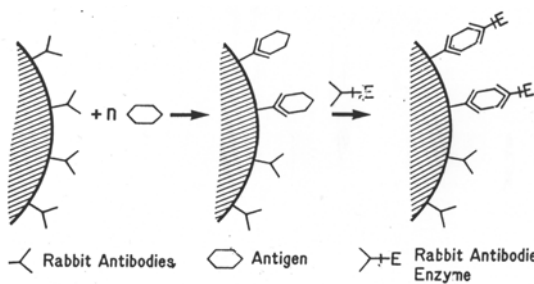
→ Riziko křížových reakcí s podobnými sloučeninami (závisí na přípravě protilátky)



Protilátka – ANTIBODY



Schematické znázornění „sendvičového“ ELISA testu



Komerčně dostupné ELISA testy pro stanvení vitamínů



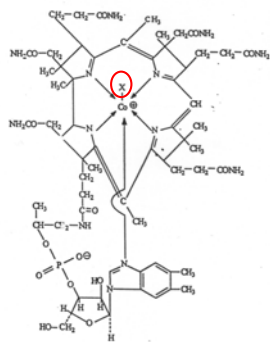
1.2. Vitamíny

Enzymatická imunoanalýza

| Název | Kód produktu | Počet | Cena v € |
|--|--------------|-------|----------|
| RIDASCREEN® FAST Vitamin B ₁₂ | R2101 | 48 | 272 |
| RIDASCREEN® Biotin | R2201 | 96 | 450 |
| RIDASCREEN® FAST Folic acid | R3202 | 48 | 272 |

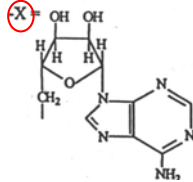


Kyanokobalamin (vitamin B₁₂)



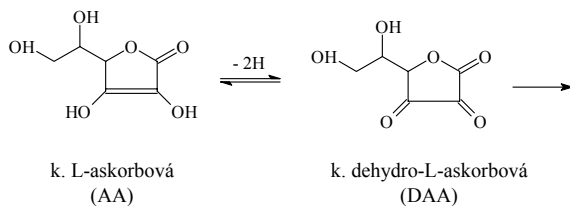
Kyanokobalamin (-X) = -CN
 Hydroxykobalamin (-X) = -OH
 Methylkobalamin (-X) = -CH₃

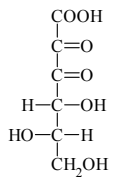
Adenosylkobalamin



Askorbová a dehydroaskorbová kyselina (vitamin C)

Oxidace askorbové kyseliny (nízký redox potenciál):



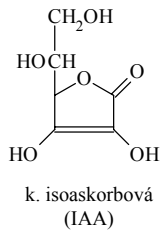
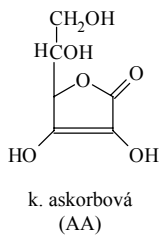


degradační produkty

k. 2,3 - dioxogulonová

- AA i DAA relativně stabilní v krystalické formě
- relativně rychlý rozklad ve vodných roztocích – zejména při vyšších pH (urychluje kyslík, kovů, teplotě, degradujících enzymů atd.)

Syntetický strukturální analog – **kyselina isoaskorbová** (= **erythorbová**) – antioxidant, biologická účinnost malá



(i) IZOLACE

Extrakční činidla

- ▶ kyselina metafosforečná
- ▶ trichloroctová
- ▶ šťavelová

často v kombinaci s nízkomolekulárními alkoholy jako je methanol či ethanol

NUTNÁ PREVENCE OXIDACE A HYDROLÝZY:

- okyselení vzorku ihned po odběru
- přidavek antioxidantů a chelatačních činidel (maskování kovů – EDTA)
- odstranění kyslíku – probublávání tekutých vzorků inertním plynem
- přidavek redukujících sloučenin, např. homocystein

(ii) VOLBA STRATEGIE STANOVENÍ

- ✓ AA a DHAA přímo vedle sebe
- ✓ AA nebo DHAA z rozdílu stanovení před a po redukci / oxidaci jedné z komponent

(iii) VLASTNÍ STANOVENÍ


- ➔ **TITRAČNĚ**
- ➔ **SPEKTROFOTOMETRICKY**
- ➔ **HPLC**

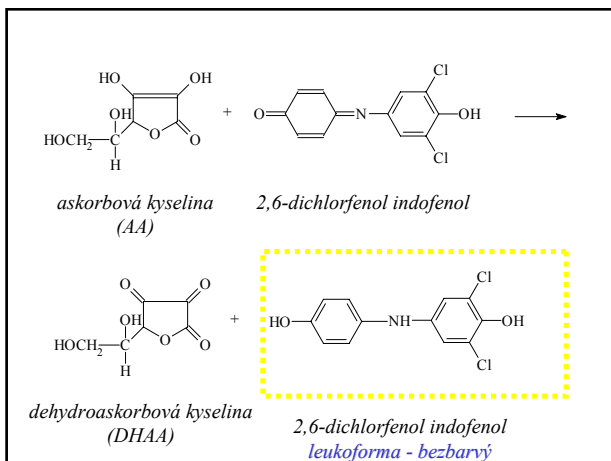
TITRAČNÍ METODY

■ Oxidoredukční stanovení s 2,6-dichlorfenol indofenolem

- (i) stanovení AA** - reakce s oxidoredukčním indikátorem ➔ odbarvení (tvorba jeho redukované leukoformy)
- (ii) stanovení DHAA** - po redukci (homocystein, cystein, H₂S)

pro barevné roztoky ➔ **POTENCIOMETRICKÁ** indikace bodu ekvivalence

 **Metoda není specifická, ruší reduktony a thiolové sloučeniny, použitelná pouze pro omezené spektrum potravin**

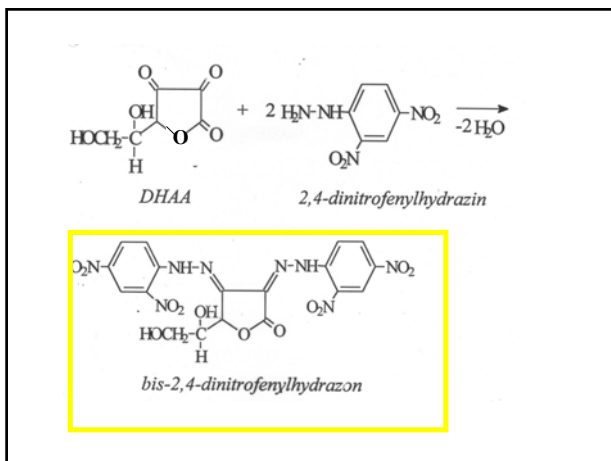


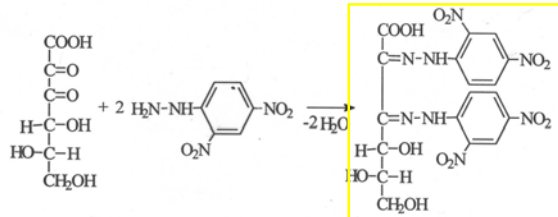
SPEKTROFOTOMETRICKÉ METODY

■ Reakce s 2,4-dinitrofenylhydrazinem (kondenzace)

- (i) reakce DHAA a 2,3-dioxogulonové kyseliny s činidlem
- (ii) reakce AA po oxidaci (např. bromová voda) → DHAA + 2,3 dioxogulonová + AA
- (iii) redukce DHAA (např. H₂S) na AA → 2,3 dioxogulonová

Proměřování absorpance ve viditelné oblasti (510 – 540 nm)





2,3-dioxogulonová kyselina

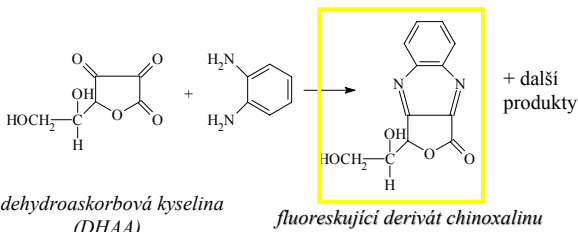
RUŠÍ látky schopné za experimentálních podmínek oxidace

■ **Reakce s o-fenyldiaminem (1,2-diaminobenzenem)**

(i) reakce **DHAA**

(ii) reakce **AA** po oxidaci (aktivní uhlí)

→ fluoreskující produkt



dehydroaskorbová kyselina (DHAA)

fluoreskující derivát chinoxalinu

CHROMATOGRAFICKÉ METODY

HPLC nejrozšířenější způsob stanovení !

Separáční kolony:

- ▶ **ionexy** (často NH₂ silica – slabý anex)
- ▶ **reverzní fáze** (C18 či C8) – analyty někdy jako iontové páry (kvarterní či terciární aminy)
- ▶ **styren-divinylbenzenové kopolymery**

Mobilní fáze:

kyselé či acetátové pufrы, přídavek organického s vodou mísitelného rozpouštědla

Různé způsoby detekce po HPLC separaci:

- ▶ měření absorbance v UV (254 – 268 nm)
- ▶ měření fluorescence (po převedení na derivát chinoxalinu)
- ▶ elektrochemická – oxidace AA na DHAA (nízký redox potenciál) → **vysoká citlivost a selektivita**

Vyhodnocení z kalibračního grafu nebo metodou standardního přídatku

Metody GC

převedení askorbové kyseliny na trimethylsilylderivát, stanovení dehydroaskorbové kyseliny po redukci (H_2S)

ELEKTROMETRICKÉ METODY

Metody polarografické

- Askorbová kyselina přímo ve slabě kyselém prostředí → anodická oxidace (-0.2 – +0.4 V) – dvouelektronová vlna
- Dehydroaskorbová kyselina nepřímo po reakci s *o*-fenylenediaminem → katodická redukce derivátů chinoxalinu (-0.5 V →...)

Příklad:

Polarografické stanovení AA v jahodovém extraktu

1 – vzorek, 2 – vzorek + standardní přídatek AA

