

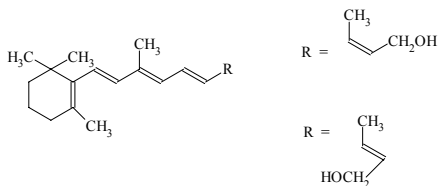
VITAMÍNY ROZPUSTNÉ V TUCÍCH

A, E a D v nezmýdelnitelném podílu, K se rozkládá

Retinoidy (vitamin A)

Účinná forma vitaminu A:

retinol (all trans-), neoretinal (Δ^{13} -cis, trans-), retinal



Izolace z potravin

▪ VITAMIN A

(i) Přímé zmýdelnění vzorku pomocí ethanolického KOH \rightarrow *uvolnění analytů z esterových vazeb*

↳ oxilabilní - vhodná inertní atmosféra nebo přídavek antioxidantu (např. pyrogallol, askorbová k.)

↳ při zmýdelnění se rozloží se retinaldehyd, chlorofyly přejdou na polární malé molekuly rozpustné ve vodě

(ii) přídavek vody \rightarrow *izolace analytů do nepolárního resp. s vodou nemísitelného rozpouštědla*

(např. diethylether, - hexan)

• **Provitaminy A, karotenoidy**

důležitá prevence oxidace!

- ▶ skladování vzorků v nedezintegrovaném stavu
- ▶ nutnost extrahovat rychle

- rostlinné materiály s nízkým obsahem vody – extrakce nemísitelným rozpouštědlem;
- vyšší vlhkost – acetonem, tetrahydrofuranem
- živočišné materiály stejně jako vitamin A

→ Nový trend – aplikace superkritické fluidní extrakce (SFE) – oxid uhličitý

Vlastní stanovení

VITAMIN A

■ **Spektrofotometrické metody**

Reakce retinolu s SbCl_3 → modrý produkt, měření absorpance při 620 nm

standard: retinol acetát

PROBLÉM: čistota nižší než 100% - koncentrace se určí na základě tabelovaných absorptivit [A 1%, 1cm] při λ_{max}

☞ metoda není specifická (reagují též karotenoidy a některé steroly) → **nutnost důkladného přečištění na sloupci oxidu hlinitého**

■ **Metody HPLC**

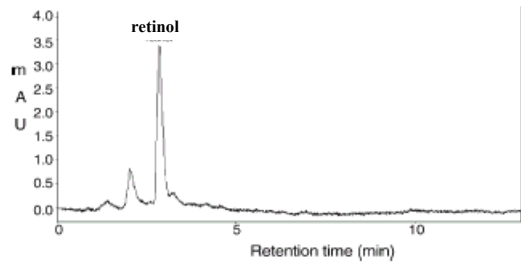
nejvhodnější, umožňují stanovení jednotlivých forem

- u složitějších matic vhodné **předběžné přečištění**

Separace: normální (silikagel) či reverzní (silikagel C18) fáze

Detekce: UV - nejlépe detektor s diodovým polem („diode array“, DAD)- λ pro retinol – 325 nm, karotenoidy 430 - 450 nm

někdy fluorescenční, příp. elektrochemický detektor



Příklad: HPLC stanovení retinolu v krevetách

Detektor: DAD (325 nm)

Kolona: SGE Exil ODS (25 x 0.4 cm)

Mobilní fáze: methanol/acetonitril/voda (68:28:4, v/v/v)

Cervantes et al., J. Chromatogr.A 1105 (2006) 135 - 139

Vyjadřování obsahu vitamínu A v mezinárodních jednotkách IU

1 IU = aktivita vitamínu A odpovídající 0.344 µg all-trans retinyl-acetátu = 0.300 µg all-trans retinolu

Česká legislativa – požadavek vyjádření v mg/kg

Vitamin D

→ *Výskyt zejména v živočišných materiálech, vznik z provitaminů účinkem UV záření*

D₂ – ergokalciferol z ergosterolu

D₃ – cholekalciferol ze 7-dehydrocholesterolu

IZOLACE Z POTRAVIN

- zmýdelnění v inertní atmosféře

👉 možnost tepelné izomerace

*nutnost odstranění interferujících komponent
nezmýdelnitelného podílu, zvl. sterolů a karotenů –
nejčastěji sloupcová chromatografie či SPE*

VLASTNÍ STANOVENÍ

■ Spektrofotometrické metody

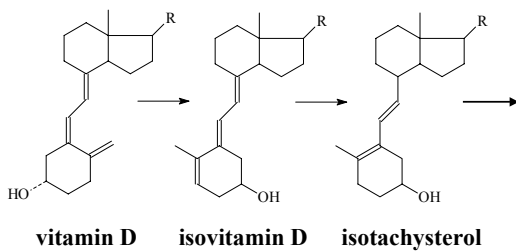
➤ Reakce s SbCl_3

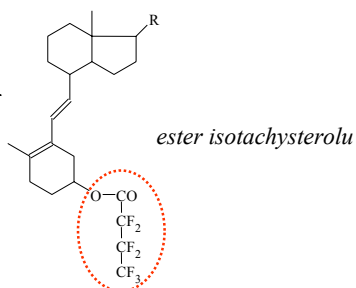
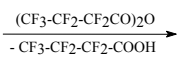
zmýdelnění → izolace nezmýdelnitelného podílu →
chromatografie na sloupci nebo na tenké vrstvě →
proměření absorbance

CHROMATOGRAFICKÉ METODY

■ Metody GC

převedení na isotachysteroly nebo jejich
heptafluorbutyráty





■ Metody HPLC

dnes nejpoužívanější

Tokoferoly a tokotrienoly (vitamin E)

4 tokoferoly + 4 tokotrienoly

Přirozený výskyt: hlavní dietární zdroj – cereálie, rostlinné oleje, margariny

→ **Odlišná biologická aktivita**

- neúčinnější α -tokoferol, zvláště ve formě esteru

→ **Antioxidační účinky** - klesají s počtem CH_3

IZOLACE, PŘÍPRAVA VZORKU

(i) extrakce vroucím 2-propanolem - zvl. nefortifikované vzorky

(ii) navazuje často zmýdelnění (za tepla / za studena), a extrakce hexanem

možnost přímého rozpuštění před vlastní analýzou - tuky, oleje

VLASTNÍ STANOVENÍ

■ Spektrofotometrické metody

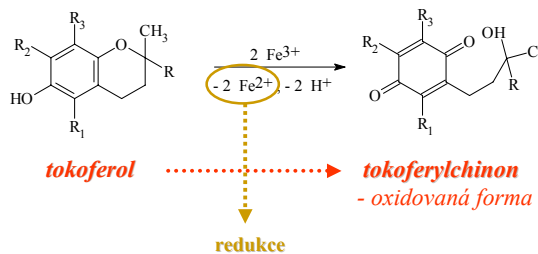
Reakce s FeCl_3 (metoda Emmerieho – Engelova)

přečistění nezmýdelnitelného podílu – chromatografie na tenké vrstvě či na sloupci oxidu hlinitého

→ Reakce s FeCl_3 a 2,2' - bipyridylem (stanovení Fe^{2+})

→ *Stanovení celkového obsahu vitamínu E*

OXIDOREDUKČNÍ REAKCE



■ CHROMATOGRAFICKÉ METODY

➤ Metody GC

vhodná **derivatizace** - analyty se převedou na trimethylsilyl ethery - zlepšení tvaru chromatografických zón a potažmo pracovních charakteristik,

Separace: na nepolárních stacionárních fázích

➤ Metody HPLC

➔ **nejvhodnější, dnes nejčastěji používané**

Separace: nejčastěji v **normální fázi** na silikagelu, mobilní fáze např. 0.3% 2-propanol v hexanu

Detekce: měření **fluorescence** (FLD – ex. 290 nm, em. 330 nm), fluorescence acetátu nízká

Selektivní, vysoce citlivá detekce vitamínu E po HPLC separaci:

ELEKTROCHEMICKÝ DETEKTOR

Princip:

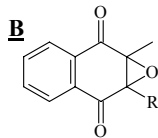
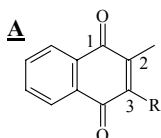
měření proudu při oxidaci/redukci analytu na příslušné elektrodě - jeho velikost je úměrná koncentraci



Coulchem® III, ESA,
Biosciences, USA

Vitamin K

Methyl deriváty 1,4-naftochinonu



(i) Izolace

- *cereálie, ovoce, zelenina, maso, ryby* → extrakce acetonem, roztrpání do hexanu
- *tuky, oleje, mléčné výrobky* → využití enzymové hydrolýzy lipázami (**namísto zmýdelnění**), extrakce hexanem a přečištění vzorku např. na silikagelu

(ii) Vlastní stanovení

HPLC s UV nebo elektrochemickou detekcí
