

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Bakalářská práce

2017

Hana Tobiášová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Vitamín K v potravinách

Hana Tobiášová

Bakalářská práce

2017

University of Pardubice
Fakulty of Chemical Technology

Vitamín K in foodstuff

Hana Tobiášová

Bachelor thesis

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Hana Tobiášová**
Osobní číslo: **C12171**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Vitamín K v potravinách**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. S využitím odborné literatury vypracovat rešerši zabývající se vitamínem K s ohledem na jeho výskyt v potravinách.
2. V první části popsat strukturu, výskyt, vlastnosti a biochemické funkce vitamínu K.
3. Dále se zaměřit na jeho výskyt v potravinách či potravních doplncích, v jaké se zde nachází formě apod. Dále zmínit metody stanovení vitamínu K v potravinách či biologických materiálech.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Odborné vědecké práce, dostupné v databázích SCOPUS, WOS, Sciencedirect apod.


Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **19. února 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **18. července 2016**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 19. února 2016

Prohlášení autora

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne: 21. 6. 2017

Hana Tobiášová

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce, vážené paní RNDr. Lucii Korecké Ph.D. za přátelský přístup, pomoc a ochotu při psaní této práce. Velice ráda bych poděkovala mé rodině za trpělivost a nekončící podporu během mého studia.

ANOTACE

Bakalářská práce je zaměřena na vitamín K, hlavně na jeho tři formy K₁, K₂ a K₃. V první části je popsána jeho struktura, kde se nejčastěji vyskytuje, a jeho chemické a biochemické funkce. Další část je zaměřena na jeho výskyt a formu v potravinách a potravinových doplňcích. Jsou shrnuty i informace o tom, jaká onemocnění může vyvolat nedostatek vitamínu K. Dále jsou uvedeny metody stanovení vitamínu K, jako je diferenčně pulsní polarografie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), která se jeví jako nejvhodnější metoda ke stanovení obsahu vitamínu K.

KLÍČOVÁ SLOVA

vitamín K, fylochion, menachinon, chromatografie, hypovitaminóza

TITLE

Vitamin K in foodstuffs

ANNOTATION

Bachelor thesis is focused on vitamin K, mainly on its three forms K₁, K₂ and K₃. In the first part there are description of its structure, where it is most common, and its chemical and biochemical functions. The next part is focused on its occurrence and its form in food and food supplements. Further, diseases caused by vitamin K deficiency are mentioned. Finally, methods used for laboratory determination of vitamin K, which are differential pulse polarography and especially by high performance liquid chromatography (HPLC) which seems to be the most appropriate method for determination of vitamin K.

KEYWORDS

vitamin K, phylloquinone, menaquinone, chromatography, hypovitaminosis

OBSAH

OBSAH	9
SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK	10
SEZNAM ZKRATEK	11
ÚVOD	12
1. HISTORIE A OBJEV	13
2. STRUKTURA	14
2.1. Vitamin K ₁	14
2.2. Vitamin K ₂	15
2.3. Vitamin K ₃	15
3. VLASTNOSTI	16
3.1. Chemické vlastnosti	16
3.2. Biochemické vlastnosti	17
4. NEDOSTATEK A TOXICITA VITAMÍNU K	21
5. VÝSKYT	22
5.1. Živočišné a rostlinné zdroje	22
5.2. Potravinové doplňky	23
6. STANOVENÍ VITAMÍNU K	24
6.1. Diferenčně pulsní polarografie	24
6.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie	24
7. ZMĚNY V OBSAHU PŘI ZPRACOVÁNÍ POTRAVIN	27
8. INTERAKCE	28
ZÁVĚR	29
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	30

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Henrik Carl Peter Dam.....	13
Obrázek 2 Vitamín K.....	14
Obrázek 3 Vitamín K ₁	14
Obrázek 4 Vitamín K ₂	15
Obrázek 5 Vitamín K ₃	15
Obrázek 6 Sodná sůl 3-sulfátmenadionu	16
Obrázek 7 Schéma karboxylace kyseliny glutamové na kyselinu karboxyglutamovou....	18
Obrázek 8 Schéma koagulační kaskády.....	20
Tabulka 1 Chemické vlastnosti vitamínu K.....	16
Tabulka 2 Obsah fyllochinonu v potravinách.....	22
Tabulka 3 Doporučený denní příjem vitamínu K podle věku	23
Tabulka 4 Obsah fyllochinonu v mražené mrkvi před a po zpracování	27
Tabulka 5 Obsah fyllochinonu v mraženém špenátu před a po zpracování	27

SEZNAM ZKRATEK

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie

VK – vitamín K

Gla – γ – karboxyglutamová kyselina

MK – n – počet isoprenylových jednotek v mastné kyselině (MK – 4, MK – 7)

MK – 4 – čtyři isoprenylové jednotky

MK – 7 – sedm isoprenylových jednotek

RP – HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází

DAD – detektor diodového pole

MS – hmotnostní spektrometrie

HPLC – MS/MS – vysokoúčinná kapalinová chromatografie se spektrometrickým detekováním látky

S.D. - signal detection – detekce signálu

G⁺ - bakterie – Gram pozitivní bakterie

ÚVOD

Předpokládá se, že vitamín K je nezbytným kofaktorem při tvorbě osteokalcinu, což je protein, který se nachází v kostech, a který je zapojen v procesu kalcifikace kostí. Vitamín K (fyllochinon) nebývá u člověka příčinou avitaminózy, protože si jej organismus je schopen vytvářet v dostatečném množství díky činnosti střevních bakterií. Nedostatek tohoto vitamínu projevující se silným krvácením i při malých poraněních, se může vyskytovat při těžkých žaludečních a střevních onemocněních, která narušují příjem a vstřebávání tuků a v případech, kdy je činnost střevní mikroflóry narušena např. dlouhodobou léčbou antibiotiky. Vitamín K je nezbytný pro tvorbu některých krevních bílkovin, které se účastní srážení krve. Jeho absence v lidském organismu má za následek zpomalení srážení krve [1, 2].

1. HISTORIE A OBJEV

Objevitelem vitamínu K je dánský fyziolog a biochemik Henrik Carl Peter Dam [1] (obr. 1). Objevil ho již v průběhu svých studií společně s Fritzem Schönheyderem a Edwadem Doisyem z univerzity v Kodani [3]. Vitamin K objevili náhodně v roce 1929 při pokusech o metabolizaci sterolu a byl spojen s procesy koagulace krve. Poté, co nakrmili pokusná kuřata stravou s minimálním obsahem tuku, začala trpět masivním podkožním krvácením. Zkoušeli ho zastavit podáváním čistého cholesterolu, ale bezvýsledně [1]. Vedle cholesterolu jim pak byla do potravy přidána druhá sloučenina, která se stala známou jako koagulační vitamin nebo vitamin K [3].



Obrázek 1 Henrik Carl Peter Dam.

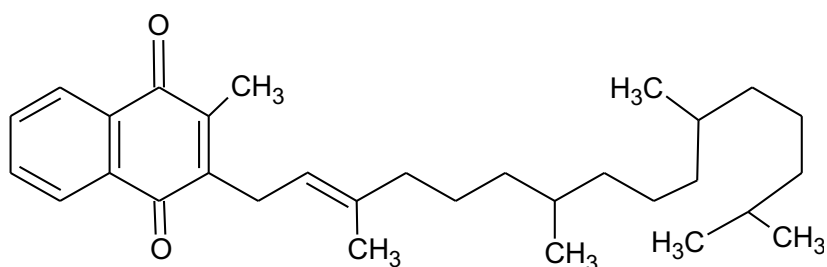
(Převzato z:[4])

Nový vitamín dostal počáteční písmeno K, protože byl v literatuře označen jako Koagulationsvitamin [3]. Později byly izolovány a charakterizovány hlavní vitamíny K, fyllochinon a menachinon. Na počátku čtyřicátých let devatenáctého století byli objeveni první antagonisté vitamínu K, které bylo možné zkrystalizovat warfarinem [5]. Warfarin, který způsobuje hemoragické onemocnění, byl poprvé použit jako účinný jed na potkany. Později se však warfarin stal průlomem při léčbě tromboembolických onemocnění [3]. Velký pokrok v chápání mechanismů účinku vitamínu K přinesl v sedmdesátých letech 20. století objev kyseliny γ -karboxyglutamové (Gla), nového derivátu této kyseliny. Tento objev poskytl nejen základ pro pochopení dřívějšího objevení protrombinu, ale později vedl k objevení proteinů, které jsou závislé na vitamínu K, které se nepodílejí na hemostáze. V sedmdesátých letech minulého století byl také objeven osteokalcin, což je kostní bílkovina, která je obsažena v kostech a zubovině [5].

Henrik Dam a Edward Doisy byli v roce 1943 oceněni Nobelovou cenou za objev vitamínu K a jeho struktury. Od té doby byla publikována celá řada vědeckých článků od mnoha vědců po celém světě, které se týkají skvělých přínosů vitamínu K pro zdraví a popisu jeho základních funkcí [4].

2. STRUKTURA

Převládající forma vitamínu K obsažená v potravinách je fyllochinon. Vitamin K existuje v několika formách. A to jako K₁, neboli fyllochinon, a dále pak K₂, neboli menachinon, který se nachází v některých bakteriích, K₃, který je vyráběn synteticky, a K₄ a K₅. Označuje se MK-n, kde n je počet isoprenylových jednotek. U člověka poskytuje přirozená mikroflóra v tlustém střevě důležitý nutriční zdroj vitamínu K [4, 6, 7, 8] Vitamin K je souhrnný název pro skupinu sloučenin, jejichž chemické vzorce jsou odvozeny od 2 – metyl – 1,4 – naftochinonu (obr. 2) [9].

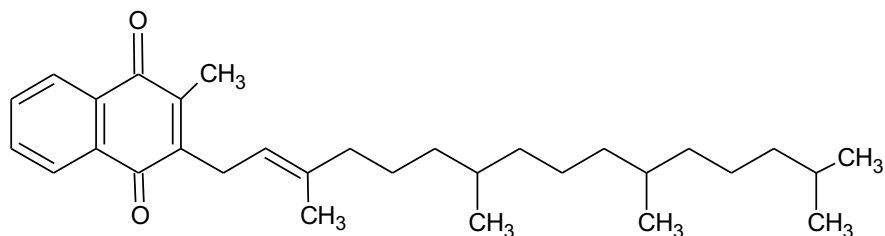


Obrázek 2 Vitamin K. (Převzato z: [10])

Jedná se o sloučeninu, která byla prvně izolována z přírodních zdrojů, konkrétně z rostliny zvané Tolice vojtěška, latinským názvem *Medicago sativa*. V rostlinách se vyskytuje pouze lipofilní vitamin K₁, který je označován jako fyllochinon nebo fytomenadion. Ve struktuře má substituovanou fitylovou skupinu na třetím uhlíku (2-metyl-3-fytyl-1,4-naftochinon) (obr. 2) [9].

2.1. Vitamin K₁

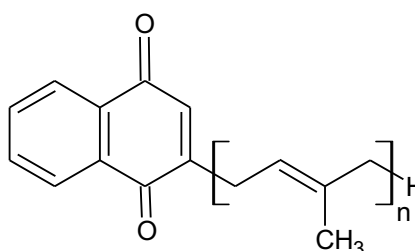
První sloučenina je reprezentována fyllochinonem K₁ (obr. 3), který má čtyři jednotky isoprenyly ve svém postranním řetězci. To je hlavní cirkulující forma vitamínu K a získává se ze stravy, a to především ze zeleniny a některých rostlinných olejů [7].



Obrázek 3 Vitamin K₁. (Převzato z: [10])

2.2. Vitamín K₂

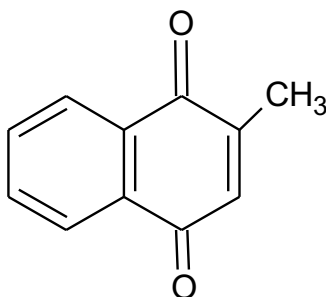
Vitamín K₂ je strukturním vzorcem 2-methyl-3-alltrans-polyprenyl-1,4-naftochinon, v organismu se dokáže vstřebávat z 95% až 100% [7]. Lipofilní vitamín K₂, označovaný jako menachinon neboli farnochinon, produkují především bakterie střevního traktu, především rodu *Lactobacilli* a *Bifidobacterium* [6]. Ve své struktuře má na třetím uhlíkovém atomu navázaný polyisoprenový řetězec, který může obsahovat 4-13 isoprenových jednotek. Nejčastěji se vyskytuje vitamín K₂ se šesti nebo sedmi isoprenovými jednotkami v postranním řetězci. Živočišné tkáně obsahují fylochinon a menachinon v různých poměrech [9].



Obrázek 4 Vitamín K₂. (Převzato z: [10])

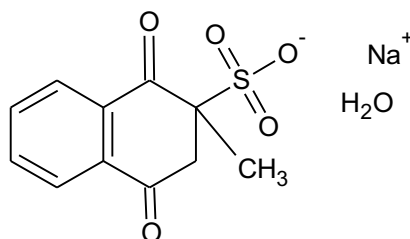
2.3. Vitamín K₃

Vitamín K₃ (menadion, 2-metyl-1,4-naftochinon) se vyrábí synteticky. Ve struktuře nemá dlouhý postranní alifatický řetězec navázaný na třetím uhlíku. Jeho biologická aktivita se v organismu projevuje až po enzymatické alkylaci na K₂ (obr. 5) [9].



Obrázek 5 Vitamín K₃. (Převzato z: [10])

Doprovodnou látkou vitamínu K₃ je sodná sůl 3-sulfátmenadionu (obr. 6), která krystalizuje se třemi molekulami vody. Je to bílá krystalická látka, dobře rozpustná ve vodě (1 g/2 ml), nerozpustná v chloroformu a málo rozpustná v ethanolu. Rozkládá se za vyšší teploty a v alkalickém prostředí. V této formě se nejčastěji používá jako přídatná látka do krmiv [10].



Obrázek 6 Sodná sůl 3-sulfátmenadionu. (Převzato z: [10])

3. VLASTNOSTI

3.1. Chemické vlastnosti

Jednotlivé formy vitamínu K jsou látky lipofilní. Vitamin K₁ je tepelně stabilní, rozkládá se až při teplotách nad 100°C. Spolu se zbývajícími dvěma formami vitamínu K je ale citlivý na světlo a působení silných kyselin a redukčních činidel [10]. Chemické vlastnosti jednotlivých forem vitamínu K jsou shrnuty v následující tabulce (tab.1).

Tabulka 1 Chemické vlastnosti vitamínu K (převzato z: [10])

Vitamin K	Sumární vzorec	Molekulová hmotnost [g/mol]	Teplota tání [°C]	Spektrální charakteristika $\lambda_{max} (A_{1cm}^{1\%})$
<i>Vitamin K₁</i>	C ₃₁ H ₄₆ O ₂	450,7	-	243 (395), 249 (420), 261 (390), 270 (390), 325 (68)
<i>Vitamin K₂</i>	-	-	54	243 (278), 248 (295), 261 (266), 270 (267), 325 (48)
<i>Vitamin K₃</i>	C ₁₁ H ₈ O ₂	172,1	106	246 (1100), 262 (987)

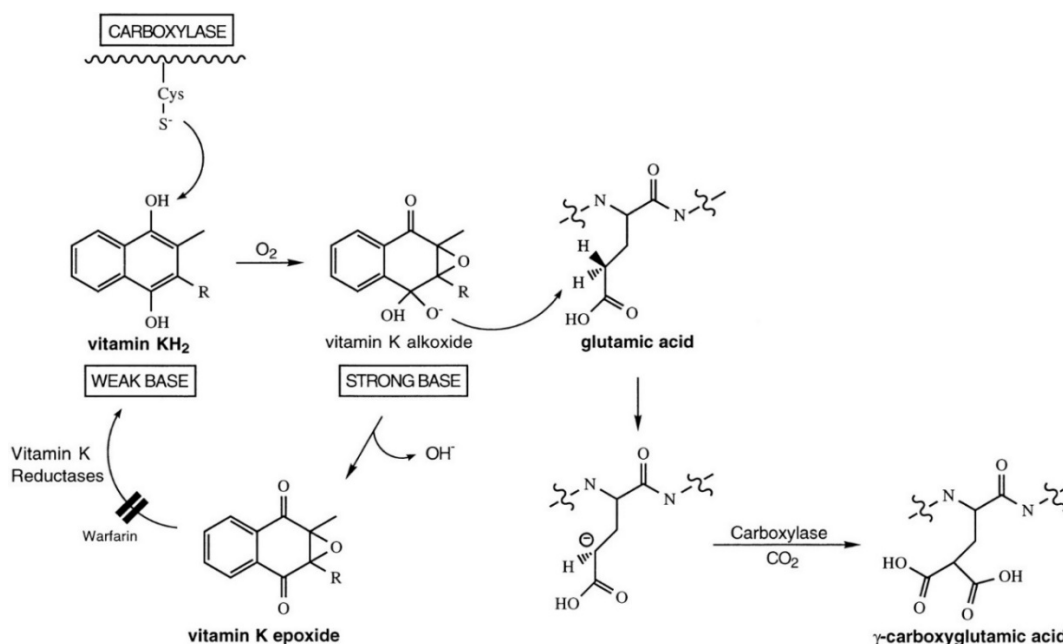
3.2. Biochemické vlastnosti

Vitamin K řadíme mezi vitamíny rozpustné v tucích a nachází se ve všech zelených rostlinách, dále pak také v zelené listové zelenině [2]. Fyllochinon je nezbytný pro produkci protrombinu a několika dalších proteinů, jako jsou protein C, protein S (jsou to plazmatické proteiny, které pracují jako antikoagulační systém [11]) a osteokalcin, které jsou přímo zapojeny do procesu srážení krve. Nedostatek fyllochinonu způsobuje snížení krevní srážlivosti a zvýšenou krvácivost. Jako adekvátní příjem fyllochinonu bylo stanoveno 90 µg/den pro ženy a 120 µg/den pro muže. Vitamin K pomáhá vyrábět čtyři ze 13 proteinů potřebných k srážení krve. Jeho úloha při udržování srážecí kaskády je tak důležitá, že lidé, kteří užívají antikoagulační léčiva, jako je warfarin (Coumadin), musí být opatrní, aby udrželi příjem vitamínu K v přijatelné hodnotě. V poslední době vědci prokázali, že vitamin K se podílí také na tvorbě kostí. Nízké hladiny cirkulujícího vitamínu K byly spojeny s nízkou hustotou kostí a doplnění vitamínem K ukazuje zlepšení zdraví kostí. Údaje ze studie Framingham Heart také ukazují souvislost mezi vysokým příjmem vitamínu K a sníženým rizikem zlomeniny kyčle u mužů a žen a zvýšením kostní minerální hustoty u žen. Lidé, kteří pravidelně nejedí listový salát nebo listovou zeleninu, pravděpodobně budou mít nedostatek vitamínu K [12].

MK-4 je specifická forma vitamínu K₂. Je to přirozeně se vyskytující vitamin rozpustný v tucích. Existují dva typy přírodního vitamínu K nazývané vitamin K₁ a vitamin K₂. Rostliny syntetizují vitamin K₁ a zvířata mohou vytvořit MK-4 formu vitamínu K₂ konverzí K₁ na MK-4. V potravinách se MK-4 vyskytuje u mléka a masa, avšak na mnohem menších úrovních, než jaké byly studovány a ukázaly se jako užitečné u lidí. Zatímco existují různé formy vitamínu K₂, v klinických studiích bylo prokázáno, že pouze MK-4 snižuje riziko zlomenin a pomáhá při léčbě nádorů. MK-4 se akumuluje v tkáních po celém těle, kde má své příznivé účinky. Akumuluje se ve slezině, játrech, ledvinách, mozku, varlatech, prsou, pankreatu, plicích a jiných tkáních. Jako jiné živiny se MK4 podílí na mnoha biochemických pochodech v organismu. Pomáhá podporovat zdravou tvorbu krevních destiček a krve, podílí se na snižování zánětlivých markerů a podporuje tvorbu pojivové tkáně (kolagenu), což je užitečné v tkáních po celém těle [13, 14].

V rostlinných systémech spolupůsobí vitamin K₁ při aerobní fosforylaci. U živočichů a člověka zasahují vitamin K₁ a vitamin K₂ především do mechanismu srážení krve. V kostních strukturách působí spolu s vitamínem D při syntéze proteinu osteokalcinu [9]. U člověka je vitamin K₁ nezbytným kofaktorem v karboxylaci kyseliny glutamové na kyselinu

karboxyglutamovou (obr. 6), která váže v organismu vápník. Jako vitamín, který je rozpustný v tucích, je resorpce vitamínu K₁ účinnější za přítomnosti tuků v potravinách [5].



Obrázek 7 Schéma karboxylace kyseliny glutamové na kyselinu karboxyglutamovou (převzato z:[5])

Menachinon může být užitečný marker pro klasifikaci bakterií. Konkrétně G⁺ a laktózu fermentujících bakterií, které produkují vitamín K₂ [15]. Menachinon obsažený v plazmatické membráně funguje jako redoxní činidlo v transportu elektronů v dýchacím řetězci [5].

3.2.1. Koagulační kaskáda a vitamín K

Bez karboxylace prekurzorových proteinů není schopen vitamín K vázat vápník a podílet se na koagulační kaskádě (obr. 7) [5]. Při poškození cévní stěny exprimují buňky na svém povrchu tkáňový faktor z podkladových buněčných vrstev do krevního řečiště. Tkáňový faktor (TF) se pak může vázat v přítomnosti vápníku na tzv. faktor VII (FVII) – prokonvertin, který aktivuje faktor IX (plazmatická tromboplastická komponenta, aktivuje faktor X) a faktor X (Stuartův – Prowerové faktor, aktivuje faktor II), tak cirkuluje v nízké hladině v krevním oběhu, přičemž vápník tvoří most mezi TF a FVII. Tím vzniká extracelulární kaskáda zahrnující postupné aktivování serinových proteáz: TF/FVII se aktivuje automatickým štěpením na fragment TF/FVIIa, který spolu s FVIIIa (kofaktor prokonvertinu) převádí FIX na FIXa (kofaktor FIX), který převádí FX na FXa (i když TF / FVIIa může také), následně FXa (kofaktor FX) přeměňuje FII (protrombin) na FIIa což je aktivní forma protrombinu a ta aktivuje faktory I (fibrinogen), V (proakcelerin), VII, VIII (antihemofilický faktor), XI, XIII (faktor, který

stabilizuje fibrin), protein C a destičky. FIIa pak přeměňuje fibrinogen na fibrin, což vede k ukládání fibrinu, a k aktivaci krevních destiček a k tvorbě krevní sraženiny [16]. Koagulační proces vedoucí k hemostázi vyžaduje komplexní soubor reakcí zahrnujících přibližně 30 různých proteinů. Tyto reakce přeměňují fibrinogen což je rozpustný protein, na nerozpustná vlákna fibrinu, které spolu s destičkami tvoří stabilní trombus (krevní sraženina) [17]. Bylo navrženo několik modelů koagulační kaskády.

3.2.1.1. Model vnitřního a vnějšího směru

Model vnitřního a vnějšího směru rozděluje iniciaci koagulace na dvě části. Vnější cesta je zodpovědná za počáteční tvorbu aktivovaného faktoru X (faktor Xa). Vnitřní cesta vede k zesílení tvorby tohoto faktoru Xa. Faktor Xa hraje důležitou roli v koagulační kaskádě, protože propojuje vnější i vnitřní cestu [17].

3.2.1.2. Model založený na buňkách

Modely založené na buňkách zahrnují důležité interakce mezi buňkami přímo zapojenými do hemostázy (tj. buněk a destiček nesoucích TF – aktivační faktor) a koagulační faktory. Přesněji to představuje interakce mezi buňkou a koagulačními proteiny, které vedou k tvorbě trombů a následně k hemostáze, tj. zástavě krvácení. Membrány buněk a destiček nesoucích TF fungují jako místa, kde dochází k aktivaci specifických koagulačních faktorů ve třech fázích:

- Zahájení
- Zesílení
- Tvorba fibrinu

Zahájení

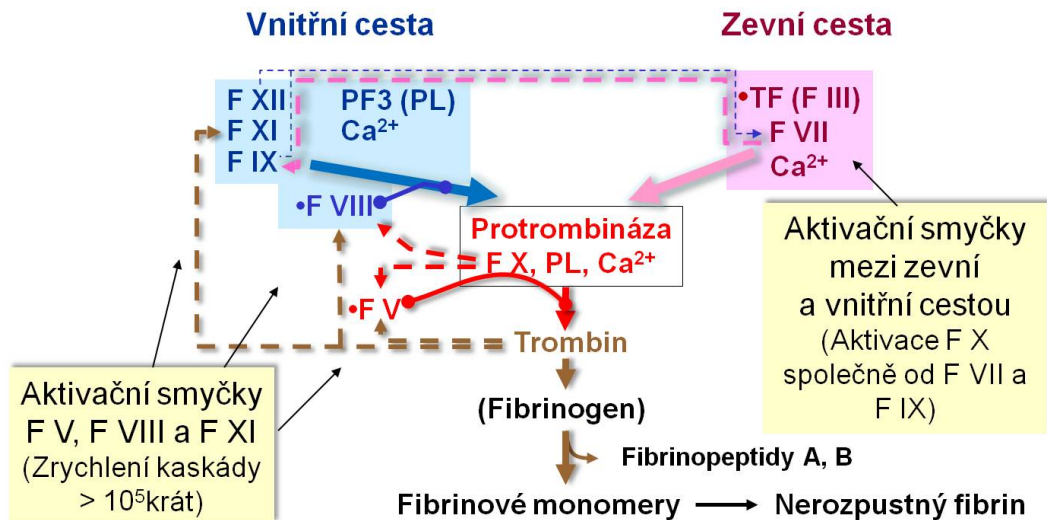
Začátek nastává po vaskulárním poškození, kdy buňky nesoucí TF aktivují koagulační faktor VII. To vede k tvorbě malého množství trombinu [16, 17].

Zesílení

Malé množství trombinu aktivuje krevní destičky. Protrombinázový komplex (obsahující faktor Xa a kofaktory spojené s aktivovanými destičkami) následně způsobuje tvorbu většího množství trombinu [16, 17].

Tvorba fibrinu

Sérií proteázových reakcí dochází k přeměně rozpustného proteinu fibrinogenu na nerozpustné fibrinové řetězce proteázou trombinem, což vede k tvorbě trombů. Trombin také aktivuje faktor XIII, který stabilizuje trombus prostřednictvím zesíťování fibrinu. Výsledná fibrinová síť zachycuje a drží buněčné komponenty trombů (destiček nebo červených krvinek) [16, 17].



Obrázek 8 Schéma koagulační kaskády (převzato z:[18])

Vitamin K je nezbytným kofaktorem při syntéze krevních koagulačních faktorů II, VII, IX, X, proteinu C, proteinu S, nebo osteokalcinu. Během posledních deseti let, zájem o vitamin K vzrostl díky zjištění, že pozitivně působí na srážení krve a snížení ztráty kostní hmoty, u osteoporotických lidí snižuje riziko zlomeniny [7]. Nedostatek vitamínu K se odráží i ve snížení koagulačních faktorů II, VII, IX a X [5].

4. NEDOSTATEK A TOXICITA VITAMÍNU K

Zjevný nedostatek vitamínu K má za následek zhoršení srážení krve, což se obvykle prokazuje laboratorními testy, které měří dobu srážení. Symptomy zahrnují zvýšenou tvorbu podlitin a krvácení, které se projevuje zejména krvácením z nosu, dásní, výskytem krve v moči a stolici, černáním stoliček nebo extrémně těžkým menstruačním krvácením [19].

Nedostatek vitamínu K se může vyskytnout v jakékoli věkové skupině, ale nejčastěji se vyskytuje v dětství [20]. Pokud je příčinou nedostatku vitamínu K malabsorpce tuku, tedy porucha jeho vstřebávání, tak se vitamín K podává perorálně [21]. U dospělých lidí je nedostatek vitamínu K méně častý kvůli příjmu široké škály zeleniny a jiných potravin bohatých na vitamín K, a díky adekvátní tvorbě vitamínu K střevní mikroflórou [19]. Nedostatek vitamínu K vede ke snížení hladiny protrombinu a jiných vitamín K-dependentních koagulačních faktorů [21]. Nedostatek vitamínu K také úzce souvisí s osteoporózou, což je porucha charakterizovaná porézností a vyšší lomivostí kostí a je závažným problémem všeobecného zdraví, který postihuje více než 10 milionů dospělých, z nichž 80% tvoří ženy. Některé výzkumy naznačují, že vysoké sérové hladiny dekarboxylovaného osteokalcinu jsou spojeny s horší mineralizací kostní hmoty [22].

Nedostatkem vitamínu K jsou ohroženi zejména novorozenci kvůli nízkým hladinám vitamínu K v mateřském mléce a minimální syntézou bakteriemi tlustého střeva. Velké množství vitamínu K užívané těhotnými ženami však může naopak způsobovat novorozeneckou žloutenku [19]. K hemoragickému onemocnění, projevujícím se u novorozenců zejména krvácením do mozku, dochází během druhého a třetího dne života. Výskyt tohoto onemocnění je 0,25 - 0,5%. Může docházet i ke zvýšenému krvácení z pupečního pahýlu, nosu, gastrointestinálního traktu nebo po chirurgickém zákroku. Pokud se u novorozenců vyvíjí žloutenka, tak krvácení obvykle začíná 4. nebo 5. den. [21, 23]. Až 50% z pozdního nástupu krvácení u kojenců se projevuje jako nitrolební krvácení [24]. Dalšími riziky, které zvyšují možnost výskytu krvácení, může patřit přechod na pevnou a pestrou stravu a změny ve střevní mikroflóře v důsledku použití antibiotik. V současné době nebyla stanovena žádná horní hranice tolerance vitamínu K. Toxicita je vzácná a je nepravděpodobné, že se objeví při konzumaci potravin obsahujících vitamín K [25].

Toxicita může být způsobena užíváním jakéhokoliv doplňku [21]. Akutní a chronická toxicita vitamínu K byla studována u myši, potkanů a kuřat. Perorálním podáváním bylo zjištěno u myši, že je přibližně 0,4 g na kg pro. Dávky 0,35 g na kg způsobily výrazný pokles počtu erytrocytů a hemoglobinu. V břišní dutině zvířat usmrcených 10 dní po injekci vitamínu

K bylo možné pozorovat značné množství olejové suspenze, což ukazuje na jeho extrémně pomalou absorpci [26].

5. VÝSKYT

5.1. Živočišné a rostlinné zdroje

Lipofilní vitaminy K jsou v přírodě rozšířeny jak v živočišných, tak i v rostlinných zdrojích. Na vitamin K₁ je bohatá zelenina, jako je např. špenát, zelí, květák, brokolice, růžičková kapusta, hlávkový salát, ale také luštěniny. Z živočišných potravin jsou dobrým zdrojem obou vitaminů K maso, vnitřnosti, mléko a mléčné výrobky [9, 27]. Hydrogenace rostlinných olejů může snížit biologickou dostupnost vitamínu K. Některé zdroje vitamínu K₁ jsou uvedeny v následující tabulce spolu s obsahem vitamínu K₁ v µg/100 g. (tab. 2) [28].

Tabulka 2 Obsah fylochinonu v potravinách (Převzato z:[28])

<i>1000 - 100 [µg/100g]</i>	<i>100 - 10 [µg/100g]</i>	<i>10 - 1 [µg/100g]</i>	<i>1,0 - 0,1 [µg/100g]</i>
Brokolice	Avokádo	Jablka	Banány
Růžičková kapusta	Fazole	Houby	Hovězí steak
Zelí, zelené	Zelí, červené	Pečené fazole	Bílý chleba
Hlávkový salát	Květák	Hovězí maso, mleté maso	Kuřecí maso
Petržel	Cizrna	Borůvky	Kokosový olej
Řepkový olej	Okurka	Otruby, pšenice	Treska, filet
Sójový olej	Kiwi	Celozrnný chléb	Cornflakes
Špenát	Panenský olivový olej	Lilek	Bílá mouka
Sójové boby	hrášek	Máslo	Grapefruit
Květák	Jahody	Mrkve	Zmrzlina

Jak je vidět v následující tabulce (tab. 3), tak doporučený dostatečný příjem vitamínu K závisí na věku a pohlaví: [19, 25].

Tabulka 3 Doporučený denní příjem vitamínu K podle věku (převzato z: [19, 25])

věk	doporučený příjem ($\mu\text{g}/\text{den}$)
0-6 měsíců	2
7-12 měsíců	2,5
1-3 roky	30
4-8 roků	55
9-13 roků	60
14-18 roků	75
19+ roků pro ženy	90
19+ roků pro muže	120
těhotné ženy <18	75
těhotné ženy 19+	90

5.2. Potravinové doplňky

Vitamín K se používá v doplňcích stravy ve formě K_1 a K_2 jako MK-4 a MK-7. MK-4 používaný v doplňcích stravy se vytváří chemickou syntézou. MK-7 se produkuje bakteriální fermentací sóji a je lépe využitelný, jelikož má delší poločas rozpadu. K_3 se v těchto doplňcích nevyskytuje, jelikož bylo prokázáno, že poškozuje jaterní buňky [13, 22].

Pouze MK-4 však prokázala schopnost snížit zlomeniny, což je nejdůležitější bod při zjišťování vlastností vitamínu K. Lidé s alergií na sóju mohou na MK-7 navíc reagovat, protože se vyrábí ze sójové fermentace. MK-4 je hypoalergenní [13].

6. STANOVENÍ VITAMÍNU K

Ke stanovení vitamínu K lze využít řadu analytických metod, jako jsou například diferenčně pulsní voltametrie nebo vysoce účinná kapalinová chromatografie.

6.1. Diferenčně pulsní polarografie

Hart a Catterail (1982) ve své studii zjišťovali, zda se mění obsah vitamínu K u pacientů se zlomeninou. Pro svůj výzkum zvolili metodu diferenčně pulsní polarografie, jelikož díky ní je možné stanovit obsah vitamínu K v plazmě i v nízkých koncentracích. A to tak, že kanylou z jedné paže bylo odebráno 10 ml krve, a převedeno do zkumavky, která obsahovala heparin. Do druhé paže byla zavedena intravenózně injekce s vitamínem K, a poté byly odebírány vzorky po 2, 5, 10, 30, 60, 120, 180 a 240 minutách po injekci. Pro studii použili nasycenou kalomelovou elektrodu jako referentní, a měrnou rtuťovou kapkovou elektrodu [2].

Pro extrakci vitamínu K z lidské plazmy, použili směs methanolu a chloroformu. Po extrakci a odpaření chloroformu pomocí tekutého dusíku byl vzorek rozpuštěn v nosném elektrolytu. Po přenesení do polarografické cely byl roztok odvdzdušňován po dobu 10 minut a dále byl veden přes chlorid vanadičitý a směs 90% ethanolu v 0,5 M acetátovém pufru. Vzorky poté byly centrifugovány a výsledné vzorky plazmy pak byly extrahovány a ihned měřeny. Jako počáteční potenciál byl zvolen - 0,1V a rychlost snímání pulzu byla 2 mV/s. Stanovoval se obsah vitamínu K v lidské plazmě po 20 mg intravenózní injekci. V této studii bylo zjištěno, že průměrné využití vitamínu K, který byl přidán do lidské plazmy, bylo 72,3%. Měření vitamínu K v plazmě od pacientů, podpořilo myšlenku, že metabolický cyklus vitamínu K je základem kalcifikace kostí [2].

6.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Pro analýzu vitamínu K v různých druzích vzorků pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) je možné použít různé typy detektorů a kolon. Pokud záleží na rychlosti stanovení, tak se jeví jako nejlepší metoda kapalinová chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC) s detektorem diodového pole (DAD) při atmosférickém tlaku. Metodou, kde je použit hmotnostní spektrometrie (MS) jako detekce je možné stanovit fylochinon (K_1), menachinon-4 (K_2) a syntetickou formu vitamínu K, menadion (K_3) [29]. V následujících odstavcích bude popsána metoda HPLC se spektrofluorimetrickou detekcí, dále pak HPLC s hmotnostně spektrometrickou detekcí v případě měření obsahu vitamínu K v lidském mléce. Je možné

použit HPLC s fluorescenčním detektorem v případě zjištění obsahu tohoto vitamínu v potravinách. [24, 30, 31]

6.2.1. Měření vitamínu K v lidské plazmě

K. Hirauchi a kolektiv (1988) stanovovali ve své studii obsah vitamínu K v krevní plazmě u žen a mužů ve věku 22 – 46 let. Použili k tomu HPLC systém, který byl mimo jiné složen z pístového čerpadla a z kolony s reverzní fází o délce 20 cm. Jako rozpouštědlo byl použit ethanol. Pro toto stanovení byla využita metoda vnitřního standardu. Po extrakci byl roztok před vlastní analýzou zfiltrován. Detekce byla provedena spektrofotometricky při excitační vlnové délce 320 nm a emisní vlnové délce 430 nm. Analýza probíhala 30 minut. Kvantifikace byla provedena na základě vyhodnocení z kalibrační křivky. Mobilní fáze, ve které byl použit chloristan sodný jako elektrolyt, byla probublávána argonem.

Popsaná metoda vykazovala dobrou citlivost pro detekci K_1 a může být použita pro měření jejich hladin v lidské plazmě. Detekční limity pro standardní látky jsou méně než 10 pg ve srovnání s 25 pg pro metodu redukce zinku, což je nejnižší z uvedené metody [30].

6.2.2. Měření obsahu vitamínu K v mateřském mléce

Gentili a kol. (rok) ve své studii zjišťovali obsah vitamínu K v mateřském mléce u italských žen, protože chtěli také zjistit, jaký dopad to má na kojence. Pro svou studii použili ke stanovení obsahu vitamínu K, konkrétně fyllochinonu, v mateřském mléce metodu HPLC-MS/MS. Po izolaci vitamínu K z mléka a po zmýdelnění a extrakci analytů za pomoci hexanu poskytla tato metoda výtěžek vyšší než 75%. Tímto postupem, kombinovaným s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS), dosáhli limitu detekce (LOD) 0,8 ng/ml. Jednotlivé zásobní roztoky analytů a interní standardy (IS) (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) byly připraveny rozpuštěním zvážených množství vzorků v ethanolu. Podle výsledků studování stability ve 40 dnech byly tyto roztoky připraveny znova každý měsíc. Fotodegradaci analytu se zabránilo použitím jantarového skla pro všechny roztoky, které byly při nepoužívání skladovány při teplotě -18°C ve tmě. Vzorek byl pak analyzován kapalinovou chromatografií s kolonou s reverzní fází, a jako detektor byl použit hmotnostní spektrometr [25]. Tato studie ukázala HPLC-MS/MS jako spolehlivou metodu pro stanovení vitamínu K_1 v mateřském mléce s vysokou přesností a správností. Jednoduchost a rychlost umožňují touto metodou ověřovat u novorozenců příjem tohoto vitamínu nepřímým a neinvazivním způsobem, jelikož ke stanovení je použito pouze mateřské mléko, nikoli krev novorozence. A také se snažili o to, aby se

zamezilo plýtvání mateřského mléka při stanoveních. Výsledky sloužily k ověření, zda mateřské mléko je adekvátní, nebo zda musí být výživa pro kojence doplněna tímto vitamínem [24].

6.2.3. Měření obsahu vitamínu K v potravinách

Další studii prováděli Tikkanen a kol. (2000), kteří se zabývali výzkumem obsahu fylochinonu a menachinonu v potravinách živočišného původu. Pro svou studii využili masné a rybí výrobky a mléčné výrobky.

Extrakce byla provedena buď pomocí 2-propanol-hexanu (masné a rybí výrobky), nebo kyselou hydrolýzou (mléčné výrobky). Kromě toho, tuk obsažený například v sýrech byl odstraněn enzymatickou hydrolýzou pomocí lipázy. Před kvantifikací byl vzorek extraktu přečištěn pomocí semipreparativní HPLC s reverzní fází. Vitamín K byl detegován pomocí fluorescenčního detektoru, při excitační vlnové délce od 238 do 244 nm a emisní vlnové délce od 418 do 425 nm. Touto metodou byl stanoven obsah fylochinonu a menachoninu (MK-4 do MK-10), nacházejících se v několika reprezentativních vzorcích potravin živočišného původu. Pomocí HPLC byl stanoven menachinon s dlouhým řetězcem v játrech skotu a prasat, i v různých sýrech. Celkový obsah vitamínu K je obecně nízký (předpokládaný obsah 10 až 100 ng/g); nejvyšší množství bylo detegováno v kuřecím mase (600 ng/g) [31].

7. ZMĚNY V OBSAHU PŘI ZPRACOVÁNÍ POTRAVIN

Vzhledem k tomu že při jakékoliv úpravě potravin dochází ke ztrátám vitamínu K, existují i studie, které se tím již zabývaly. Následující tabulky popisují vliv vaření na koncentraci fylochinonu ve zmrazené mrkvi a špenátu. Analýzy prokázaly významně vyšší koncentraci fylochinonu ve zmrazeném špenátu, který byl uvařený nebo zpracovávaný v mikrovlnné troubě v porovnání se zmrzlým špenátem, který nebyl uvařen ($p = 0,01$) (tab. 5), jelikož se fylochinon nachází v chloroplastech v rostlinách. Vaření v páře nebo v mikrovlnné troubě může narušit stěny rostlinné buňky, čímž se uvolní fylochinon. Příprava vzorku před vlastní analýzou zahrnovala homogenizaci a úpravu ultrazvukem pro narušení buněčné integrity. Nicméně je možné, že pomocí uvedených kroků není extrakce před vlastní analýzou kvantitativní, a to zejména ze syrové zeleniny s intaktní buněčnou stěnou. Na rozdíl od toho nebyl pozorován žádný zjevný účinek vaření na obsah fylochinonu ve zmrazené mrkvi ($p = 0,32$) (tab. 4). Vzorky byly analyzovány HPLC s reverzní fází. Jako mobilní fáze byla použita směs dvou rozpouštědel, a to methanolu s 10 mM $ZnCl_2$, 5,0 mM CH_3COOH a 5,0 mM CH_3COONa a methylenchlorid. Při této analýze byl využit fluorescenční detektor [8].

Tabulka 4 Obsah fylochinonu v mražené mrkvi před a po zpracování (Převzato z: [8])

Obsah fylochinonu ($\mu\text{g}/100\text{g}$) ve vzorku mrkve – zcela zmrazené a nakrájené				
	n	průměr	S.D.	rozsah
syrová	4	16,4	4,7	9,8 – 20,6
uvařená	3	15,0	1,2	13,6 – 16,0
v mikrovlnné troubě	3	13,4	2,4	11,5 – 16,1

Tabulka 5 Obsah fylochinonu v mraženém špenátu před a po zpracování (Převzato z: [8])

Obsah fylochinonu ($\mu\text{g}/100\text{g}$) ve vzorku špenátu – zcela zmrazený sekaný a celé listy				
	n	průměr	S. D.	rozsah
syrová	5	369	53,9	293 - 441
uvařená	3	541	7,4	533 - 547
v mikrovlnné troubě	3	457	99,5	348- 544

8. INTERAKCE

Některé léky mohou inhibovat produkci a vstřebávání vitamínu K v těle, zvláště u těhotných žen [32]. Antibiotika, zejména cefalosporiny, snižují absorpci vitamínu K v těle. Používání těchto látek po dobu delší než 10 dní může snížit hladinu vitamínu K, protože tyto léky mají baktericidní účinek na bakterie obecně, tedy nejen na původce infekce, ale i na ty, které ve střevech tvoří vitamín K. Fenytoin (Dilantin) narušuje schopnost těla tvořit vitamín K. Užívání těchto antibiotik během těhotenství nebo během kojení může snížit hladinu vitamínu K u novorozenců. Vitamin K blokuje účinky warfarinu, takže se nedoporučuje jíst potraviny, které jsou bohaté na obsah vitamínu K, během užívání warfarinu [33]. Orlistat (Xenical, Alli) a Olestra - Orlistat, lék který se užívá při hubnutí, a olestra, látka která je přidávána do některých potravin, snižuje množství tuku, které tělo může absorbovat. Protože vitamín K je vitamín rozpustný v tucích, tyto léky mohou také snížit hladinu vitamínu K. Léky snižující hladinu cholesterolu - sekvestranty žlučových kyselin, které se používají ke snížení hladiny cholesterolu, snižují množství tuku, které tělo je schopné absorbovat, a může také snížit vstřebávání vitamínů rozpustných v tucích [33].

Vitamin K také interaguje s jinými vitamíny způsobem, který může být pro pacienta škodlivý. Například bylo prokázáno, že velké množství vitamínu A a vitamínu E ovlivňuje účinnost vitamínu K v těle. Bylo prokázáno, že vitamín A brání správné absorpci vitamínu K, a vitamín E inhibuje produkci vitamínu K ve střevech [32].

Koenzym Q-10 je chemicky podobný vitamínu K a jako vitamín K může podpořit srážení krve. Tato kombinace může být problémem pro osoby, které užívají warfarin ke zpomalení srážení krve. Koenzym Q-10 a vitamin K by mohl překonat účinky warfarinu a mohl by umožnit srážení krve. Dále pak u zvířat vysoké dávky vitamínu A narušují schopnost vitamínu K srážet krev. Není však známo, zda se to také děje u lidí [34].

ZÁVĚR

V bakalářské práci je shrnuta historie objevu vitamínu K, jeho struktura, souhrn vlastností, jak chemických, tak i biochemických. Dále pak je rozebráno, co způsobuje nedostatek vitamínu K a kde je obsažen, aby se zabránilo avitaminóze. V neposlední řadě je zde souhrn dvou analytických metod, kterými lze analyzovat vitamín K v lidské plazmě nebo lidském mléce.

Mezi velké poznatky o vitamínu K patří hlavně zjištění, že je velice důležitou látkou, která se zúčastňuje srážlivosti krve, nebo kalcifikace kostí. Je-li tohoto vitamínu nedostatek, tak člověk může mít problém s osteoporózou. Ráda bych vyzdvihla i nedostatek vitamínu K u kojenců, což může být života ohrožující problém. Je známo, že vitamín K není v dostatečné míře obsažen v těle novorozence nebo kojence, proto je důležitý jeho přísun v mateřském mléce nebo kojenecké výživě. Je důležité, aby se ve věku, kdy se tělo formuje a roste, zabránilo nedostatku vitamínů, které napomáhají vápníku se vstřebávat do kostí. Doporučený příjem vitamínu K se odvíjí od věku, pohlaví i od toho, zda-li je žena těhotná nebo nikoliv.

Jelikož je vitamín K produkován i střevními bakteriemi, tak je jeho minimální příjem zajištěn. Do své bakalářské práce jsem zařadila i přehled obsahu tohoto vitamínu v různých druzích potravin. Největší obsah však je v listové zelenině, a to hlavně ve špenátu. Dále pak se vyskytuje v dostatečné míře i v mrkvi. Je třeba dbát i na tepelnou úpravu, jelikož se zvyšující se teplotou, obsah vitamínu K klesá.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] TESARŮK, B. Výročí objevitele vitamínu K. *Bulletin Asociace českých chemických společností* [online]. 1995, **26**(1) [cit. 2017-06-21]. Dostupné z: <http://chemicke-listy.cz/Bulletin/bulletin261/vitk.html>
- [2] HART, J.P., NAHIR., A.M., CHAYEN, J. a CATTERALL, A. Determination of vitamin k1 in plasma by differential pulse polarography and its possible clinical application. *Analytica Chimica Acta*. 1982, **144**, 267-271.
- [3] FERLAND, G. The Discovery of Vitamin K and Its Clinical Applications. *Annals of Nutrition and Metabolism* 2012, **61**(3), 213-218
- [4] A Brief History of Vitamin K. *NattoMK-7: history of vitamin K* [online]. 2015 [cit. 2017-06-21]. Dostupné z: <http://nattomk7.com/about-vitamin-k-2/history-of-vitamin-k/>
- [5] FURIE, B., BOUCHARD B. A., a FURIE, B. C. Vitamin K-Dependent Biosynthesis of γ -Carboxyglutamic Acid. *Blood*. 1999, **93**(6), 1798-1808
- [6] RAMOTAR, K., CONLY J. M., CHUBB, H. a LOUIE, T.J. Production of Menaquinones by Intestinal Anaerobes. *The Journal of Infectious Diseases*. 1984, **150** (2), 213–218
- [7] WANG, L. Y., BATES, C. J., YAN, L., HARRINGTON, D. J., SHEARER, M. J. a PRENTICE, A. Determination of phylloquinone (vitamin K1) in plasma and serum by HPLC with fluorescence detection. *Clinica Chimica Acta*. 2004, **347**(1-2), 199-207
- [8] DAMON, M., ZHANG, N. Z., HAYTOWITZ, D. B. a BOOTH, S. L. Phylloquinone (vitamin K1) content of vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2005, **18**(8), 751-758
- [9] HLÚBIK, P. a OPLTOVÁ, L. *Vitaminy*. Praha: Grada Publishing. 2004. ISBN 80-247-0373-4.

- [10] Vitamín K. *HPLC* [online]. 2014 [cit. 2016-05-11]. Dostupné z: http://hplc1.sweb.cz/Vitamin/ch_vitaminK.htm
- [11] ESMON, C. T., VIGANO-D'ANGELO, S., D'ANGELO, A. a COMP, P. C. Anticoagulation Proteins C and S. *The New Dimensions of Warfarin Prophylaxis* Boston, MA: Springer US. 1987, 47-57. ISBN 978-1-4757-5987-7.
- [12] Vitamin K. *Harvard T.H. Chan: School of Public Health* [online]. c2017 [cit. 2017-06-21]. Dostupné z: <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/vitamin-k/>
- [13] The MK4 Power. *NBI: A Revolution In Health* [online]. c2017 [cit. 2017-06-21]. Dostupné z: <http://www.nbihealth.com/t-mk4-power.aspx>
- [14] MANDAL, A. Chemical Structure of Vitamin K. *News: Medical Life Sciences* [online]. c2000-2017, Last Updated: Nov 17, 2014 [cit. 2017-06-21]. Dostupné z: <http://www.news-medical.net/health/chemical-structure-of-vitamin-K.aspx>
- [15] DALBY, M. The menaquinone (vitamin K2) content of animal products and fermented foods. *The call of the Honeyguide* [online]. 2014 [cit. 2017-06-21]. Dostupné z: <https://honey-guide.com/2014/03/10/menaquinones-k2-and-phyloquinone-k1-content-of-animal-products-and-fermented-foods/>
- [16] Tissue factor. *InterPro* [online]. [2006] [cit. 2017-06-21]. Dostupné z: https://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2006_3/Page2.htm
- [17] The coagulation cascade. *Thrombosis adviser* [online]. c2017. [cit. 2017-05-25]. Dostupné z: <https://www.thrombosisadviser.com/the-coagulation-cascade/>
- [18] Hemostáza a hemofilie. *Tvorba o ověření e-learningových prostředích pro integraci výuky preklinických a klinických předmětů na LF a FZV UP Olomouc.* [online]. 2012 [cit. 2017-06-21]. Dostupné z: <http://pfyziollfup.upol.cz/castwiki2/?p=1797>

- [19] HIGDON, J. Vitamin K. *Oregon State University* [online]. 2000, Reviewed in August 2014 [cit. 2017-06-21]. Dostupné z: <http://lpi.oregonstate.edu/mic/vitamins/vitamin-K#authors-reviewers>
- [20] NGUYEN-KHOA, D. Vitamin K Deficiency. *Medscape* [online]. 2015 [cit. 2017-06-21]. Dostupné z: <http://emedicine.medscape.com/article/126354-overview>
- [21] JOHNSON, L. E. Vitamin K. *Merck Manual Professional Version* [online]. 2016 [cit. 2017-06-21]. Dostupné z: <https://www.merckmanuals.com/professional/nutritional-disorders/vitamin-deficiency,-dependency,-and-toxicity/vitamin-k>
- [22] Vitamin K. *National Institutes of Health: Office of Dietary Supplements* [online]. 2016 [cit. 2017-06-21]. Dostupné z: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminK-HealthProfessional/>
- [23] GÁNDARA, E., HAMMOND, D. a NAGPAL, S. Role of Vitamin K Antagonists in the Prevention of Thrombotic Bypass Occlusion After Infrainguinal Venous Bypass. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2016, **52**(1), 124-131
- [24] GENTILI, A., MICCHELI, A., TOMAI, P., BALDASSARRE, M. E., CURINI, R. a PÉREZ-FERNÁNDEZ, V. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of vitamin K homologues in human milk after overnight cold saponification. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2016, **47**, 21-30
- [25] WARE M., Vitamin K: Health Benefits and Recommended Intake. *Medical news today* [online]. c2004-2017, last updated on Tue 29 September 2015 [cit.2017-05-25]. Dostupné z: <http://www.medicalnewstoday.com/articles/219867.php>
- [26] MOLITOR, H. a ROBINSON, H. J. Oral and Parenteral Toxicity of Vitamin K1, Phthiocol and 2 Methyl 1, 4, Naphthoquinone. *Experimental Biology and Medicine*. 1940, **43**(1), 125-128

- [27] Vitamín K. *Institut Galenus* [online]. c2008-2017 [cit. 2017-06-21]. Dostupné z: <http://www.galenus.cz/clanky/vyziva/vitaminy-vitamin-K>
- [28] INDYK H. E., SHEARER, M. J. a WOLLARD, D. C. Vitamin K. *Encyclopedia of food sciences and nutrition*, Vol. 9. Editors Caballero, B., Trugo, L. C., Finglas, P. M. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press, c2003, 6032-6038. ISBN 0-12-227064-9.
- [29] VIÑAS, P., BRAVO-BRAVO, M., LÓPEZ-GARCÍA, I. a HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M.. Dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of vitamins D and K in foods by liquid chromatography with diode-array and atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry detection. *Talanta*. 2013, **115**, 806-813
- [30] HIRAUCHI, K., SAKANO, T., NAGAOKA, T. a MORIMOTO, A.. Simultaneous determination of vitamin K1, vitamin K1 2,3-epoxide and menaquinone-4 in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1988, **430**, 21-29
- [31] KOIVU-TIKKANEN, T. J., OLLILAINEN, V. a PIRONEN V. I. Determination of Phylloquinone and Menaquinones in Animal Products with Fluorescence Detection after Postcolumn Reduction with Metallic Zinc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, **48**(12), 6325-6331
- [32] WANG, K. Vitamin K. *Natural Remedies* [online]. c2010-2017 [cit. 2017-06-21]. Dostupné z: <http://www.naturalremedies.org/vitamin-k/>
- [33] EHRLICH, S. D. Vitamin K. *Univerity of Maryland: Medical Center* [online]. 2013 [cit. 2017-06-21]. Dostupné z: <http://www.umm.edu/health/medical/altmed/supplement/vitamin-k>
- [34] U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. Vitamin K. *MedlinePlus* [online]. 2015 [cit. 2017-06-08]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/druginfo/natural/983.html>