

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019

Bc. Vendula Hladíková

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Stanovení vitamínu D v potravinách s využitím disperzní kapalinové  
mikroextrakce

Bc. Vendula Hladíková

Diplomová práce

2019

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Vendula Hladíková**  
Osobní číslo: **C17483**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Název tématu: **Stanovení vitamínu D v potravinách s využitím disperzní kapalinové mikroextrakce**  
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. Vypracujte literární rešerši na téma stanovení vitamínů rozpustných v tucích v potravinách. Zaměřte se především na metody disperzní kapalinové mikroextrakce (DLLME) vhodné pro spojení s kapalinovou chromatografií. Dále charakterizujte vitamín D a jeho výskyt v potravinách.
2. V experimentální části proveďte optimalizaci podmínek separace vitamínů řady D pomocí kapalinové chromatografie a metodu validujte. Dále optimalizujte podmínky přípravy vzorku a vlastní extrakční techniku DLLME pro izolaci vitamínů D. Nejvhodnější podmínky použijte na analýzu reálných potravinových vzorků obsahující vitamín D.
3. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte a porovnejte se současným stavem poznání.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího práce.**

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Tomáš Hájek, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2019**

Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlašuji:

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 mě požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 8.5.2019

---

Bc. Vendula Hladíková

## Poděkování

Ráda bych tímto srdečně poděkovala svému vedoucímu práce Ing. Tomáši Hájkovi Ph.D. za vstřícný přístup, odbornou pomoc a trpělivost s psáním diplomové práce.

## **ANOTACE**

Práce je zaměřena na stanovení vitamínu D metodou disperzní kapalinové mikroextrakce (DLLME) ve spojení s kapalinovou chromatografií. Byla provedena optimalizace podmínek DLLME extrakce vitamínu D, kdy extrakčním rozpouštědlem byl tetrachlormethan. Optimalizováno bylo množství extrakčního a disperzního rozpouštědla a pH vzorku. Dále byly optimalizovány podmínky chromatografické separace a provedla se validace metody. Optimalizovaná a validovaná metoda byla následně použita ke stanovení vitamínu D v mléce a mléčných výrobcích.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

vitamíny, vitamíny rozpustné v tucích, vitamín D, hydrolýza, disperzní kapalinová mikroextrakce, kapalinová chromatografie, validace

## **TITLE**

Determination of vitamin D in foodstuff by using dispersive liquid-liquid microextraction method

## **ANNOTATION**

This thesis deals with the determination of vitamin D by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) combined with liquid chromatography. The conditions of vitamin D extraction DLLME were optimized, while carbon tetrachloride was used as an extraction solvent. Similarly, an amount of extraction and dispersion solvent and pH sample was optimized. Subsequently, the chromatographic separation conditions were optimized and method validation was performed. The optimized and validated method was afterwards used for the determination of vitamin D in milk and other dairy products.

## **KEYWORDS**

vitamins, fat-soluble vitamins, vitamin D, hydrolysis, dispersive liquid-liquid microextraction, liquid chromatography, validation

# Obsah

0. ÚVOD .....	12
1. TEORETICKÁ ČÁST .....	13
1.1 VITAMÍNY .....	13
1.1.1 Charakteristika a rozdělení.....	13
1.1.2 Vitamíny rozpustné v tucích .....	13
1.1.2.1. Vitamín A .....	15
1.1.2.2. Vitamín E.....	16
1.1.2.3. Vitamín K .....	17
1.1.2.4. Vitamín D .....	17
1.2 EXTRAKCE .....	23
1.2.1 Extrakce kapalina-kapalina (LLE) .....	23
1.2.2 Extrakce na pevné fázi (SPE).....	25
1.2.3 Disperzní kapalinová mikroextrakce (DLLME) .....	26
1.3 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE .....	29
1.3.1 Princip .....	29
1.3.2 Instrumentace .....	29
1.3.2.1. Systém dodávání mobilní fáze.....	31
1.3.2.2. Dávkovací systém.....	31
1.3.2.3. Kolony .....	31
1.3.2.4. Detektory v kapalinové chromatografii .....	35
1.4 VALIDACE METODY .....	37
1.5 STANOVENÍ VITAMÍNU D A JEHO METABOLITŮ .....	39
1.5.1 Příprava vzorku .....	39
1.5.1.1. Hydrolýza .....	39
1.5.1.2. Extrakce .....	41
1.5.2 Derivatizace.....	43
1.5.3 Vlastní stanovení vitamínu D.....	44
1.5.3.1. Kapalinová chromatografie .....	44
1.5.3.2. Superkritická fluidní chromatografie.....	46



2.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	47
2.1	Přístroje a zařízení.....	47
2.2	Standardní látky a chemikálie .....	47
2.3	Vzorky.....	48
2.4	Pracovní postupy.....	49
2.4.1	Příprava mobilní fáze .....	49
2.4.2	Příprava standardů.....	49
2.4.3	Kalibrační roztoky.....	49
2.4.4	Podmínky stanovení .....	50
2.4.5	Optimalizace DLLME 1 (DoE 1).....	51
2.4.6	Optimalizace DLLME 2 (DoE 2).....	52
2.4.7	Kalibrace vitamínu D <sub>3</sub> s vlivem matrice a extrakce .....	54
2.4.8	Zpracování reálných vzorků s vitamínem D <sub>3</sub> .....	55
2.4.9	Experimentální zpracování dat.....	56
3.	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	57
3.1	Optimalizace HPLC separace .....	57
3.2	Validace metody .....	59
3.3	Příprava vzorku .....	61
3.3.1	Výběr extrakčního rozpouštědla.....	61
3.3.2	Optimalizace DLLME 1 (DoE 1).....	63
3.3.3	Optimalizace třepání při extrakci .....	67
3.3.4	Optimalizace hydrolýzy .....	68
3.3.5	Optimalizace podmínek DLLME 2 (DoE 2).....	70
3.3.6	Kalibrace vitamínu D <sub>3</sub> s vlivem matrice a extrakce .....	74
3.4	Zpracování reálných vzorků s vitamínem D <sub>3</sub> .....	76
4.	ZÁVĚR .....	77
5.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	78
6.	SEZNAM PŘÍLOH.....	87

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1	Strukturní vzorec retinolu (a) a $\beta$ -karotenu (b) [8,9].	15
Obrázek 2	Strukturní vzorec $\alpha$ -tokoferolu [10].	16
Obrázek 3	Strukturní vzorec vitamínu K <sub>1</sub> [12].	17
Obrázek 4	Vznik vitamínu D <sub>2</sub> a D <sub>3</sub> z jejich provitaminů [13].	18
Obrázek 5	Metabolismus vitamínu D [22].	21
Obrázek 6	Schéma extrakce kapalina-kapalina [35].	24
Obrázek 7	Schéma extrakce na pevné fázi [37].	25
Obrázek 8	Schéma disperzní kapalinové mikroextrakce [39].	27
Obrázek 9	Schéma kapalinového chromatografu [52].	29
Obrázek 10	Řez povrchově porézní a plně porézní částicí [55].	32
Obrázek 11	Porovnání kolon s povrchově porézními a plně porézními částicemi [57,58].	33
Obrázek 12	Derivatizace 25-hydroxyvitamínu D <sub>3</sub> pomocí PTAD [80].	43
Obrázek 13	Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci vitamínu D <sub>3</sub> .	59
Obrázek 14	Porovnání testovaných rozpouštědel na disperzní kapalinovou mikroextrakci ( $V_{inj} = 4 \mu\text{l}$ ).	62
Obrázek 15	Paretův graf standardizovaných efektů vycházející z DoE 1.	64
Obrázek 16	Graf marginálních průměrů a mezí spolehlivosti vycházející z DoE 1. a - extrakční rozpouštědlo vs. disperzní rozpouštědlo b - extrakční rozpouštědlo vs. % ethanolu ve vzorku	65
Obrázek 17	Konečné optimální podmínky DLLME vycházející z DoE 1.	66
Obrázek 18	Vliv třepání na výtěžek extrakce, n = 5.	67
Obrázek 19	Porovnání studeného a horkého zmýdelnění, n = 3.	69
Obrázek 20	Paretův graf standardizovaných efektů vycházející z DoE 2.	71

Obrázek 21 Graf marginálních průměrů a mezí spolehlivosti vycházející z DoE 2. a - extrakční rozpouštědlo vs. disperzní rozpouštědlo b - pH vzorku vs. % ethanolu ve vzorku.....	72
Obrázek 22 Profily pro předpovědi a vhodnost vycházející z DoE 2.....	73
Obrázek 23 Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci vitamínu D <sub>3</sub> .....	74
Tabulka 1 Doporučená denní dávka vitamínů rozpustných v tucích [6]. ....	14
Tabulka 2 Parametry stability vitamínů rozpustných v tucích [4]. ....	14
Tabulka 3 Množství vitamínu D <sub>3</sub> v potravinách [16]. ....	19
Tabulka 4 Seznam některých dostupných povrchově porézních kolon [54]. ....	34
Tabulka 5 Očekávaná přesnost jako funkce koncentrace analytu [61]. ....	38
Tabulka 6 Optimalizace podmínek stanovení vitamínu D [71]. ....	41
Tabulka 7 Optimální parametry DLLME stanovení vitamínu D [41]. ....	43
Tabulka 8 Seznam vybraných možností pro stanovení vitamínu D a jeho metabolitů. ....	45
Tabulka 9 Složení analyzovaných vzorků. ....	49
Tabulka 10 Příprava kalibrační řady vitamínu D <sub>3</sub> . ....	50
Tabulka 11 Chromatografické podmínky stanovení vitamínu D <sub>3</sub> . ....	50
Tabulka 12 Optimalizace DLLME 1 (DoE 1). ....	51
Tabulka 13 Optimalizace DLLME 2 (DoE 2). ....	52
Tabulka 14 Příprava kalibrační řady vitamínu D <sub>3</sub> v mléce. ....	55
Tabulka 15 Výsledky validace přesnosti a správnosti metody stanovení vitamínu D <sub>3</sub> . ....	60
Tabulka 16 Výsledky validace mezilehlé přesnosti stanovení vitamínu D <sub>3</sub> . ....	60
Tabulka 17 Validace kalibrace vitamínu D <sub>3</sub> s vlivem matrice a extrakce. ....	75
Tabulka 18 Výsledky stanovení vitamínu D <sub>3</sub> v mléčných výrobcích, n = 3. ....	76

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

*1,25(OH)<sub>2</sub>D* = 1,25-dihydroxyvitamín D<sub>3</sub> (1,25-dihydroxycholecalciferol, kalcitriol)

*25(OH)D* = 25-hydroxyvitamín D

*APCI* = chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric-Pressure Chemical Ionization)

*BHA* = butylhydroxyanisol

*BHT* = butylhydroxytoluen

*DAD* = detektor (foto)diodového pole (Diode Array Detector)

*DBP* = protein zajišťující transport vitamínu D (D-Binding Protein)

*DLLME* = disperzní kapalinová mikroextrakce (Dispersive Liquid-Liquid MicroExtraction)

*DMEQ-TAD* = 4-[2-(3,4-dihydro-6,7-dimethoxy-4-methyl-3-oxo-2-quinoxaliny)ethyl]-3H-1,2,4-triazole-3,5(4H)-dion

*ELISA* = enzymově značená imunoanalýza (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

*ELSD* = detektor rozptylu světla (Evaporative Light Scattering Detector)

*ESI* = ionizace elektrosprejem (ElectroSpray Ionization)

*HPLC* = vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)

*HPLC-MS* = kapalinová chromatografie s detekcí hmotnostním spektrometrem (High-Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry)

*HPLC-UV* = kapalinová chromatografie s detekcí v UV oblasti (High-Performance Liquid Chromatography - UV Detection)

*LC* = kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)

*LLE* = extrakce kapalina-kapalina (Liquid-Liquid Extraction)

*PED* = pulzní elektrochemická detekce (Pulsed Electrochemical Detection)

*PTAD* = 4-fenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion

*RIA* = radioizotopově značená imunoanalýza (Radio Immuno Assay)

*SFC* = superkritická fluidní chromatografie (Supercritical Fluid Chromatography)

*SFE* = extrakce nadkritickou tekutinou (Supercritical Fluid Extraction)

*SPE* = extrakce na pevné fázi (Solid-Phase Extraction)

*UHPLC* = ultra vysokotlaká kapalinová chromatografie (Ultra High-Pressure Liquid Chromatography)

*UV/Vis oblast* = oblast ultrafialového a viditelného záření

## 0. ÚVOD

Vitamín D se vyskytuje ve dvou hlavních formách a to jako vitamín D<sub>2</sub> (ergokalciferol) a vitamín D<sub>3</sub> (cholecalciferol). Lidský organismus je schopen vitamín D syntetizovat. Tato syntéza probíhá působením slunečního záření na kůži člověka. Vitamín D není v potravinách přítomen ve velkém množství. Mezi hlavní zdroje vitamínu D<sub>2</sub> patří houby a vitamínu D<sub>3</sub> ryby. Z důvodu malého výskytu je do potravin přidáván uměle. Mezi nejčastěji fortifikované potraviny patří mléko a mléčné výrobky, cereálie, margaríny nebo kojenecká výživa. Je důležité vitamín D přijímat ve stravě nebo v doplňcích stravy, neboť jeho hlavním úkolem je udržovat a regulovat homeostázu vápníku. Jeho nedostatek tudíž vede k narušení mineralizace kostí a klinické projevy se objevují ve formě křivice.

Jelikož se vyskytuje ve stopovém množství, je třeba nalézt vhodnou metodu přípravy vzorku a vlastního stanovení, která nám poskytne relevantní výsledky. Příprava vzorku je klíčovým krokem, neboť jsou vitamíny rozpustné v tucích rozpuštěny v tukových částicích a komplexně navázány na ostatní části matrice. Není tak možné je jednoduše rozpustit v běžných rozpouštědlech jako vitamíny rozpustné ve vodě. Příprava vzorku zahrnuje hydrolyzu, čímž dochází k uvolnění látek z tukových částic. Dalším krokem je extrakce nepolárním rozpouštědlem, která slouží k přečištění a zakoncentrování vitamínu D ze vzorku. V současné době je velmi populární použít k získání analytu ze vzorku disperzní kapalinovou mikroextrakci. Tato metoda je rychlá a využívá pouze desetiny mililitru rozpouštědel, čímž šetří životní prostředí. Nejčastějším způsobem stanovení vitamínu D je kapalinová chromatografie na reverzních fázích s UV detekcí, případně MS detekcí.

# 1. TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 VITAMÍNY

### 1.1.1 Charakteristika a rozdělení

Vitamíny jsou heterogenní skupina látek [1]. Jedná se o esenciální sloučeniny nezbytné pro řadu fyziologických funkcí v lidském těle [2]. Jsou důležité pro růst a vývoj, a jsou jednou ze sedmi hlavních živin, které hrají významnou roli pro lidský metabolismus [3]. Lidský organismus není schopen tyto látky syntetizovat, proto je nutné je přijímat ze stravy. Existuje celkem 13 vitamínů, které rozdělujeme do dvou hlavních skupin podle jejich rozpustnosti, a to na vitamíny rozpustné ve vodě a vitamíny rozpustné v tucích [1-3]. Mezi vitamíny rozpustné ve vodě se řadí vitamíny skupiny B a vitamín C. Mezi rozpustné v tucích pak vitamín A, D, E a K [3]. Co se týče doporučené denní dávky, například vitamín C, E a B<sub>3</sub> jsou potřebné v hodnotách desítek miligramů denně, naproti tomu vitamíny D nebo B<sub>12</sub> je třeba přijímat pouze v jednotkách mikrogramů [1].

Jednotlivé skupiny vitamínů nemají téměř žádné společné vlastnosti. Jedinou vlastností, která všechny vitamíny spojuje, je jejich stabilita. Nejdůležitější faktory, které ovlivňují stabilitu vitamínů jsou teplo, vlhkost, přítomnost kyslíku, pH a světlo. Mezi další faktory patří oxidační a redukční činidla, přítomnost kovových iontů, jiné složky potravin (např. oxid siřičitý) nebo přítomnost jiných vitamínů [1]. Ke ztrátám vitamínů může docházet přirozeně například při skladování ovoce nebo zeleniny, nebo mohou nastat ztráty při zpracování potravin [1].

### 1.1.2 Vitamíny rozpustné v tucích

Vitamíny rozpustné v tucích jsou velká skupina esenciálních mikroživin s různorodými funkcemi pro lidský organismus [4]. Zahrnují čtyři skupiny a sice vitamíny A, D, E a K, z nichž každý má jinou biologickou dostupnost, účinnost nebo fyziologickou účinnost [2,4]. U všech vitamínů může dojít k projevům nedostatku. U vitamínu A se jedná o zhoršené vidění, zejména ve tmě, u vitamínu D je primárním problémem rachitis neboli křivice. Nedostatek vitamínu E se projeví narušením imunity a u vitamínu K může dojít k poruchám krvácivosti [5]. V Tabulce 1 jsou uvedeny hodnoty doporučené denní dávky vitamínů rozpustných v tucích. Z tabulky je patrné, že nejvíce potřebujeme příjem vitamínu E, naproti tomu nejmenší je doporučená dávka u vitamínu D [6].

Tabulka 1 **Doporučená denní dávka vitamínů rozpustných v tucích [6].**

Vitamín	Doporučená denní dávka [mg]
A	800
D	5
E	12000
K	75

Vitamíny jsou citlivé na kyslík, světlo nebo prostředí. Tyto stabilitní parametry jsou uvedeny v Tabulce 2. Vitamíny A, D a E jsou vůči zásadám odolné, naproti tomu vitamín K může působením zásad degradovat [4].

Tabulka 2 **Parametry stability vitamínů rozpustných v tucích [4].**

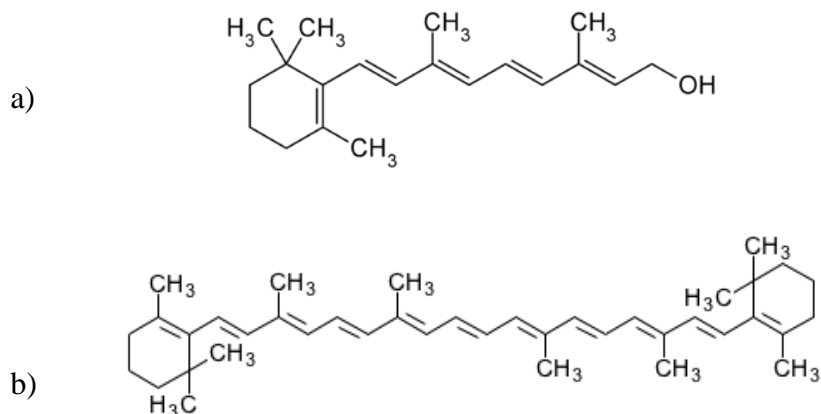
Skupina mikroživin rozpustných v tucích	Parametry stability	Hlavní opatření během analýzy
Karotenoidy	Citlivé na světlo, kyslík, teplo a kyseliny.	Slabé aktinové jantarové sklo a tlumené světlo. Centrifugace zkumavek zabalených v alobalu. Přidání vhodného antioxidantu k rozpouštědlům používaným k přípravě standardních roztoků a na extrakci (toto opatření není nutné pro vitamín K.)
Vitamín A	Citlivý na světlo, kyslík, kyseliny.	
Vitamín D	Citlivý na světlo, kyslík a kyseliny. Během zahřívání dochází k izomeraci. Stabilní vůči zásadám.	
Vitamín E	Citlivý na světlo a kyslík. Stabilní vůči zásadám (pokud je současně chráněn před světlem a kyslíkem).	
Vitamín K	Citlivý na světlo (UV), kyseliny a zásady. Stabilní vůči teplu a kyslíku.	



### 1.1.2.1. Vitamín A

Vitamín A je obecný termín, který zahrnuje dvě třídy sloučenin:

- a) Retinoidy v potravinách živočišného původu: retinol, retinal, kyselina retinová, retinolové estery [4,7]. (Obrázek 1a)
- b) Karotenoidy provitamínu A přítomné v ovoci a zelenině: lutein, lykopen,  $\alpha$ - a  $\beta$ -karoten a zeaxantin [4,7]. (Obrázek 1b)



Obrázek 1 **Strukturní vzorec retinolu (a) a  $\beta$ -karotenu (b) [8,9].**

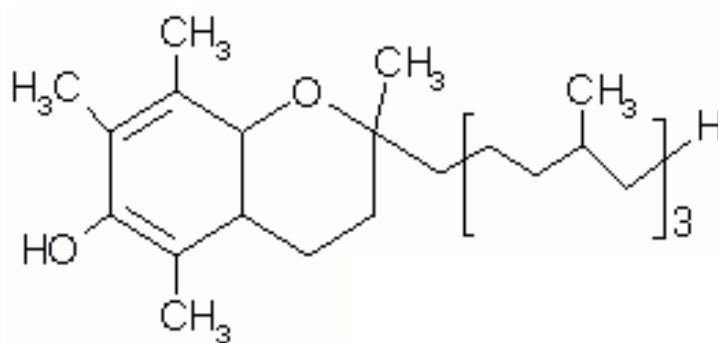
Vitamín A je jedním z labilnějších vitamínů. Z uvedených skupin vitamínu A je méně stabilní formou retinol oproti retinolovým esterům [1]. V důsledku jeho citlivosti na kyslík jsou vitamínové doplňky obsahující vitamín A dodávány s přidavkem antioxidantu, kterým může být butylhydroxyanisol (BHA) nebo butylhydroxytoluen (BHT). Vitamín A nedegraduje při zahřívání a v zásaditém prostředí. Nicméně musí být při zahřívání zamezen přístup kyslíku [1].

Vitamín A je důležitý pro správné vidění, funguje i jako podpora imunitního systému a genové exprese během embryonálního vývoje. Vyskytuje se především v orgánech, rybích olejích, másle, vejcích, mléce a mléčných výrobcích, naproti tomu obecně karotenoidy, které mají efekt provitamínu, se nacházejí v ovoci a zelenině. Nejběžnějším karotenoidem je  $\beta$ -karoten [2]. Vlastností provitamínu je, že se v těle přemění na daný vitamín. Přirozeně se vyskytující karotenoidy najdeme ve formě rostlinných pigmentů a mají obvykle charakteristické žluté, oranžové nebo červené zbarvení [1].

### 1.1.2.2. Vitamín E

Vitamín E zahrnuje osm tokochromanolů, všechny rostlinného původu:

- a) Čtyři tokoferoly, které mají nasycený isoprenoidní postranní řetězec: podle umístění methylových skupin se dělí na  $\alpha$  (Obrázek 2),  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  [4].
- b) Čtyři tokotrienoly s postranním řetězcem analogickým k tokoferolům, ale obsahujícím tři trans dvojně vazby [4].



Obrázek 2 **Strukturní vzorec  $\alpha$ -tokoferolu [10].**

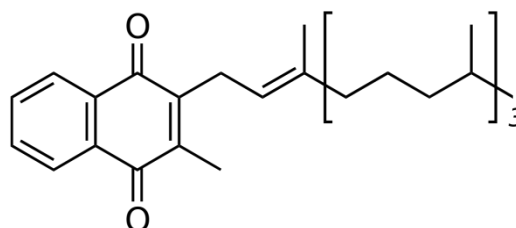
Vitamín E je považován za jeden ze stabilních vitamínů. Jeho neobvyklostí je nestabilita při teplotách bodem mrazu. Tokoferol je rovněž jako vitamín A stabilní při zahřívání, pokud je omezen přístup vzduchu [1]. Slouží jako významný antioxidant, který vycytává hydroperoxylové radikály z organismu [11]. Může být použit rovněž pro ochranu vitamínu A [1]. Jeho specifickou funkcí je ochrana polynenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem, které jsou přítomné v membránových fosfolipidech. Vitamín E působí proti ateroskleróze, oxidačnímu stresu, rakovině, artritidě nebo také Alzheimerově chorobě [11].

Hlavním zdrojem vitamínu E jsou rostlinné oleje. Slunečnicový a olivový olej obsahují zejména tokoferoly, naproti tomu palmový olej je dobrým zdrojem tokotrienolů [11]. Mezi další potraviny obsahující rostlinné oleje, a tudíž vitamín E, patří pšeničné klíčky, slunečnicová semínka nebo semena šafránu. Při smažení olejů dochází ke ztrátám vitamínu E kolem 10 % [1].

### 1.1.2.3. Vitamín K

Vitamín K je zastoupen třemi skupinami sloučenin se společným naftochinonovým jádrem a odlišným postranním řetězcem:

- a) Vitamín K<sub>1</sub> neboli fylochinon, který má fytylový řetězec a pochází z rostlinných potravin [4]. (Obrázek 3)
- b) Vitamín K<sub>2</sub> zahrnující skupiny menachinonů a farnochinonů pocházejících z bakteriálních zdrojů [4].
- c) Vitamín K<sub>3</sub> neboli menadion - který je ve vodě rozpustný [1].



Obrázek 3 **Strukturní vzorec vitamínu K<sub>1</sub>** [12].

Obecně jsou hlavními zdroji vitamínu K některé luštěniny, rostlinné oleje a zelená listová zelenina [2]. Vitamín K<sub>1</sub> se vyskytuje v zelených rostlinách, bramborách a ovoci. Vitamín K<sub>2</sub> nalezneme ve zvířecích a mikrobiálních materiálech. Všechny formy vitamínu K jsou poměrně stabilní při zahřívání, nicméně degradují působením zásad a jsou citlivé na sluneční záření. Stejně jako vitamín D podléhá vitamín K izomeraci kvůli přítomnosti násobných vazeb v molekule [1]. Vitamín K hraje důležitou roli ve srážlivosti krve [5].

### 1.1.2.4. Vitamín D

Vitamín D neodpovídá definici vitamínů, neboť lidský organismus ho není schopen syntetizovat [2]. Vyskytuje se ve dvou hlavních formách [4]:

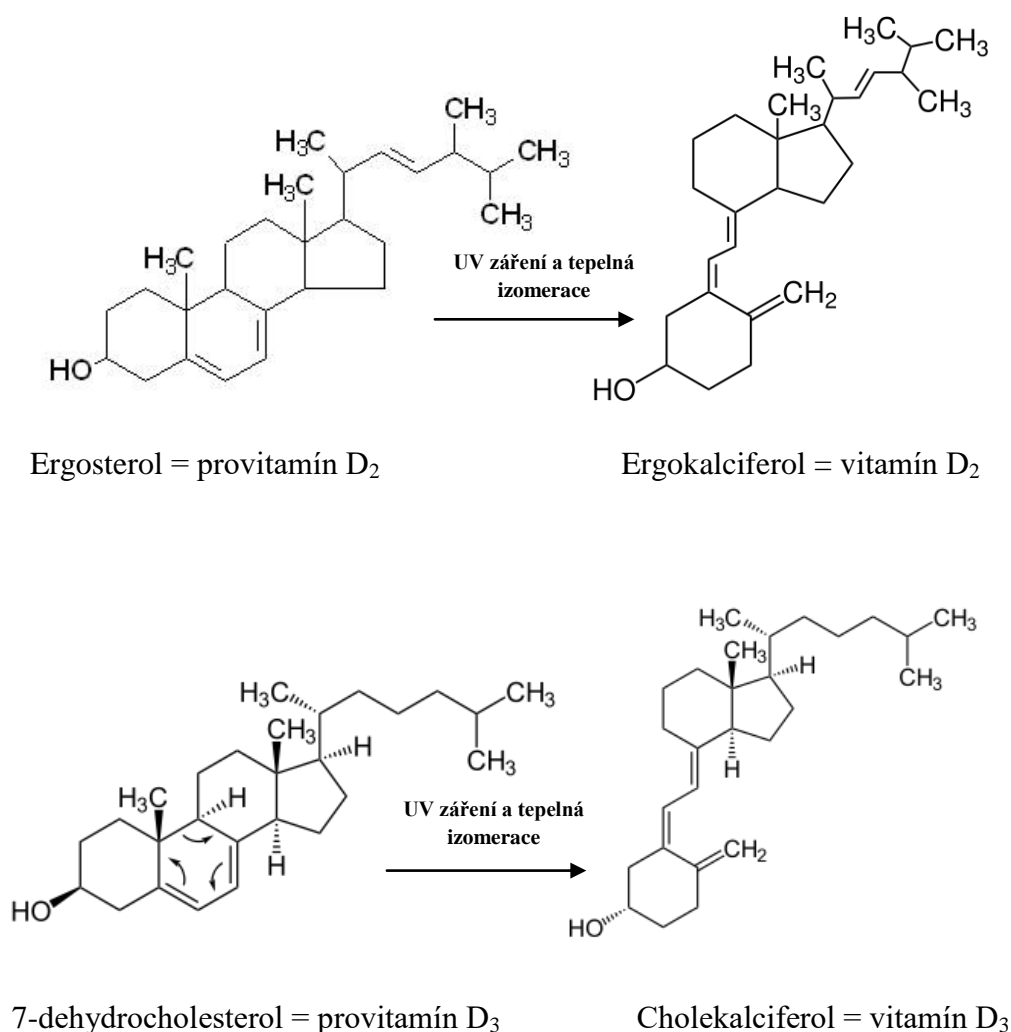
- a) Vitamín D<sub>3</sub> neboli cholekalciferol.
- b) Vitamín D<sub>2</sub> neboli ergokalciferol

Obě formy vitamínu D jsou citlivé na světlo a relativně rychle degradují. Dále jsou nepříznivě ovlivňovány působením kyselin. Doplňky stravy obsahující vitamín D ve formě jedlých olejů jsou stabilnější než práškové formy. Práškové formy vitamínu D jsou obvykle stabilizovány přidáním antioxidantu (obvykle tokoferolu). Přítomnost násobných vazeb v molekule může způsobovat za určitých podmínek (například zahříváním) izomeraci [1].

Hlavní funkcí vitamínu D je udržení homeostázy a je důležitý proti vzniku rachitis (křivice) [2].

### Struktura

Obě formy vitamínu jsou tvořeny z jejich provitaminů [13]. Vitamín D<sub>2</sub> vzniká působením UV záření na ergosterol a vitamín D<sub>3</sub> působením UV záření o vlnové délce 290–315 nm na 7-dehydrocholesterol [5,13,14]. Obě přeměny jsou uvedeny na Obrázku 4. Vitamín D<sub>2</sub> se liší od vitamínu D<sub>3</sub> v postranním řetězci, kde má dvojnou vazbu mezi 22. a 23. uhlíkem a další metylovou skupinu na 24. uhlíku [13].



Obrázek 4 Vznik vitamínu D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub> z jejich provitaminů [13].

### Výskyt

Vitamín D není v potravinách přítomen ve velkém množství. Hlavními zdroji vitamínu D<sub>3</sub> jsou oleje z rybích jater, některé ryby jako losos nebo sardinky, dále vejce, hovězí maso a mléko [2,15,16]. Množství vitamínu D<sub>3</sub> v jednotlivých potravinách je uvedeno v Tabulce 3 [16]. Z tabulky je patrné, že nejvíce vitamínu D<sub>3</sub> je obsaženo v rybím maso. Maso ryb obsahuje téměř 100x více vitamínu D než játra nebo máslo [16].

Tabulka 3 Množství vitamínu D<sub>3</sub> v potravinách [16].

Potravina	Množství vitamínu D <sub>3</sub> [mg/100 g]
Úhoř	25,6
Candát	24,6
Sleď	15,4
Losos	12,4
Vaječný žloutek	7,8
Tuňák	7,2
Treska	7,0
Vejce	2,8
Játra, hovězí maso	0,8
Máslo	0,3

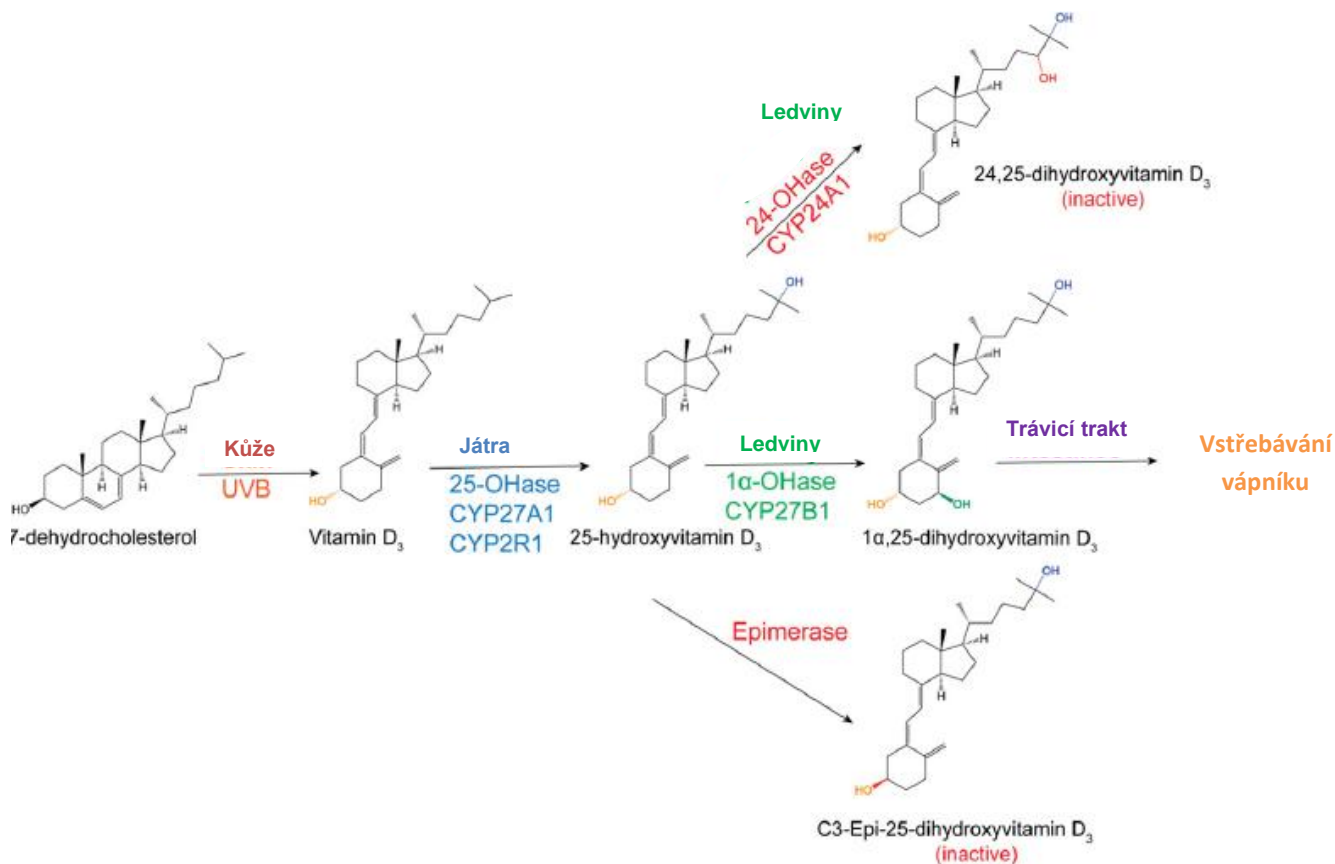
V potravinách můžeme nalézt ale i vitamín D<sub>2</sub>. Jeho zdrojem může být houba pečárka dvouvýtrusá, známá také jako žampion (lat. *Agaricus bisporus*). Houby obsahují vysokou koncentraci ergosterolu, což je prekurzor vitamínu D<sub>2</sub> [17]. Tyto houby jsou vystavené UV záření a obsahují proto vitamín D<sub>2</sub> [18]. Dalším zdrojem vitamínu D<sub>2</sub> mohou být kakaové boby z kakaovníku pravého (lat. *Theobroma cacao L.*), které jsou náchylné ke kontaminaci houbami. Kontaminované boby obsahují 3–24 mg ergosterolu na kilogram. Po fermentaci jsou fazolky bobů sušeny na slunci, což vede k přeměně ergosterolu na vitamín D<sub>2</sub>. Největší množství vitamínu D<sub>2</sub> bylo následně zjištěno v kakaovém másle [17].

Pouze málo potravin obsahuje vitamín D přirozeně. Můžeme ho nalézt v potravinách jím obohaceným. Těmi jsou mléko a mléčné výrobky, cereálie, margaríny, ovocné šťávy a současně také kojenecká výživa [19].

### ***Metabolismus***

Všechny formy vitamínu D vznikají působením UV záření na provitamín D v kůži zvířat nebo pletivu rostlin. V lidském/zvířecím organismu se oba homology vitamínu D metabolizují na 25-hydroxyvitamín D (25(OH)D) a na biologicky aktivní 1,25-dihydroxyvitamín D (1,25(OH)<sub>2</sub>D). Dále dochází k přeměně na 3-epi-25-hydroxyvitamín D nebo 24,25-dihydroxyvitamín D. Celkem bylo doposud zjištěno přes 50 různých metabolitů vitamínu D [4].

V lidském těle je několik hodin po přijetí vitamínu ze stravy, nebo po vystavení slunečnímu záření vitamín D přeměněn ve dvou fázích na biologicky aktivní metabolit 1,25(OH)<sub>2</sub>D, nebo je transportován do zásobních tkání [13]. Po přijetí ze stravy je vitamín D absorbován ve střevech pomocí chylomikronů, které následně vstupují do lymfatického systému [20]. První fáze metabolismu probíhá v játrech, kde je vitamín D hydroxylován na 25(OH)D. Druhá fáze probíhá v ledvinách, kde je 25(OH)D hydroxylován na 1,25(OH)<sub>2</sub>D [13]. Transport všech forem krevním řečištěm je zajištěn pomocí navázání na DBP (D-binding protein), což je protein zajišťující transport vitamínu D. Z těchto dvou metabolitů je v krvi nejvíce obsažen 25(OH)D, jehož poločas rozpadu činí zhruba 13–15 dnů a využívá se ke zjištění hladiny vitamínu D v séru [13,21]. 25(OH)D je z krve transportován do řady tkání včetně tukové, do svalů a jater, kde je skladován. Ve střevech usnadňuje absorpci vápníku a fosforu. V ledvinách stimuluje resorpci vápníku a v kostech dochází interakcí parathormonus 1,25(OH)<sub>2</sub>D k aktivaci osteoklastů, které zodpovídají za resorpci vápníku v kostech [13]. Metabolismus vitamínu D je uveden na Obrázku 5 [22].



Obrázek 5 Metabolismus vitamínu D [22].

### *Účinky na lidský organismus*

Nedostatek vitamínu D je považován za celosvětový problém jak u dětí, tak u dospělých [19]. Nedostatek vitamínu D je současně s nedostatkem železa nejběžněji diagnostikovaným zdravotním problémem [23]. Lidé se obávají vystavovat slunci kvůli rakovině kůže, a proto dochází k vysokému riziku nedostatku vitamínu D. Jeho jediným dalším zdrojem je strava a vitamínové doplňky [16,19].

Je známo, že působení slunečního záření na obličej a předloktí po dobu 20–30 minut vytvoří zhruba 50 µg vitamínu D. Dvě až tři takové expozice slunečního záření týdně tak stačí k dosažení dostatečného množství vitamínu D pro organismus [24]. V případě více pigmentované pokožky nebo u starších lidí je potřeba dobu vystavení slunečnímu záření zvýšit 2–10x [24]. Mezi potraviny obohacené vitamínem D patří mléko, sójové a jiné rostlinné nápoje, margaríny, některé pomerančové šťávy, chleby, jogurty a sýry [16,19]. Přirozeně větší množství vitamínu D nalezneme v těle tučnějších ryb jako je losos nebo makrela [19]. Faktory, které ovlivňují syntézu vitamínu D v pokožce, zahrnují zeměpisnou šířku, roční období, stav ozónové vrstvy, čas strávený venku, používání opalovacího krému,

oblečení, barva pokožky a stáří [13]. Bylo zjištěno, že příjem 10–20 µg vitamínu D denně může zabránit nedostatku, nicméně individuální příjem je často výrazně nižší [17]. Kojenci ve věku 7–11 měsíců by měli přijmout za den 10 µg vitamínu. Pro dospělé a děti ve věku 1–17 let je ideální denní příjem 15 µg, stejně tak jako pro těhotné ženy [13]. Nedostatek vitamínů neboli hypovitaminóza, může vést k vážným poruchám orgánů. Nebezpečný je ale i nadměrný přísun, protože se vitamíny rozpustné v tucích mohou kumulovat v játrech a ve větším množství mohou být i toxické. Tomuto jevu se říká hypervitaminóza. Proto je velmi důležité hlídat příjem vitamínů rozpustných v tucích z potravy [25].

Hlavním úkolem vitamínu D je udržovat a regulovat homeostázu vápníku [26]. Nedostatek vitamínu D vede k narušení mineralizace kostí, jelikož nedochází ke správné absorpci vápníku a fosforu ze stravy [13]. U lidí je koncentrace vápníku v séru udržována přibližně v rozmezí 2,45–2,65 mmol/l. Pokud se koncentrace dostane pod normální hladinu, snaží se tělo vyvážit a obnovit správnou hladinu pomocí resorpce ze zásobních tkání [20]. Při nedostatku vitamínu D se absorbuje ze stravy pouze 10–15 % vápníku a asi 60 % fosforu [27]. Klinické projevy nedostatku vitamínu D se objevují ve formě rachitis u dětí a osteomalacie u dospělých [13]. Rachitis u dětí se projevuje zejména problémy s růstem a deformacemi kostí. U dospělých jsou příznaky nedostatku vitamínu D méně výrazné než u dětí a zahrnují bolesti svalů, kostí a specifické zlomeniny. Zejména u starších lidí může svalová slabost způsobit celkově horší fyzický stav spojený s rizikem pádu a následně vysokým rizikem zlomenin [13]. Některé studie zmiňují, že doplňky stravy obsahující vitamín D pomáhají v boji s bolestí zad [28]. Již zmíněný 25(OH)D je cirkulující forma vitamínu D, proto se sleduje jeho koncentrace v séru. V současné době jsou mezní hodnoty pro nedostatek pod 50 nmol/l [29]. Vždy by však snaha o doplnění vitamínu D různými doplňky stravy měla být podložena výsledky skutečných hodnot v séru, neboť může dojít rovněž k intoxikaci [29].

Nadbytek vitamínu D, resp. vysoké koncentrace 25(OH)D v séru, může vést k hyperkalcémii, která má za následek kalcifikaci měkkých tkání, což způsobí poškození ledvin a kardiovaskulárního systému [13,16].



## 1.2 EXTRAKCE

Extrakce je separační metoda, při které přechází složka ze směsi látek v kapalně či tuhé fázi do jiné kapalně fáze. Na rozdíl od destilace, krystalizace a sublimace je extrakce velmi výhodná pro izolaci tepelně nestálých látek, protože se může provádět i za laboratorní teploty nebo za chladu. Obecně platí, že opakovaná extrakce několika menšími dávkami rozpouštědla je účinnější než jediná extrakce celým množstvím rozpouštědla [30].

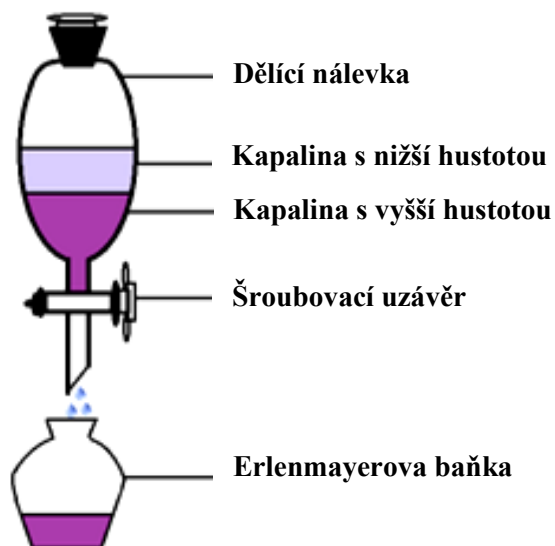
Před samotnou extrakcí je obvykle potřeba vzorek upravit, zejména pokud obsahuje více fází. Oddělit jednotlivé fáze můžeme několika způsoby. Nejjednodušší formou separace je filtrace. Na filtraci lze použít papírové filtry s velikostí pórů 2–30  $\mu\text{m}$ , skleněná vlákna 0,5–2,5  $\mu\text{m}$ , frity s velikostí pórů 70  $\mu\text{m}$ , dále také nylonové nebo polytetrafluorethylenové membrány s velikostí pórů 0,2–1  $\mu\text{m}$  [31]. Dalším způsobem oddělení fází je použití dělicích nebo filtračních nálevek. Velmi využívaná je také Büchnerova nálevka k oddělení pevné fáze od kapalně. K oddělení rozpustných a nerozpustných částic se hojně využívá centrifugace. Po oddělení čirého supernatantu je provedena extrakce [31].

Navzdory významnému zlepšení instrumentální analýzy nelze většinu analytických technik použít přímo na stanovení vitamínů a jiných látek v komplexních vzorcích, neboť jsou navázány na ostatní části matrice. Právě proto je nutná příprava vzorku [32]. Zejména u vitamínů, které se vyskytují v potravinách ve stopovém množství, je hlavním cílem extrakce zakoncentrování analytu. Jednou z možností jsou extrakční metody jako extrakce kapalina-kapalina (LLE), extrakce na pevné fázi (SPE) nebo extrakce superkritickou tekutinou (SFE). U těchto extrakčních metod však dochází k větší spotřebě rozpouštědel, proto byla vynalezena metoda disperzní kapalinové mikroextrakce (DLLME) [32]. Prezentována byla již od roku 2006 [32], nicméně je velmi populární od roku 2010 [3].

### 1.2.1 Extrakce kapalina-kapalina (LLE)

Extrakce kapalina-kapalina je založena na přenosu stanovované látky z jednoho rozpouštědla do druhého, přičemž obě rozpouštědla jsou navzájem nemísitelná nebo velmi málo mísitelná. Obvykle je jedním rozpouštědlem voda nebo vodná směs a druhým nepolární organická látka. Stejně jako u všech extrakcí zahrnuje LLE dva hlavní kroky: míchání a následné oddělení fází. Oba kroky je nutno optimalizovat, neboť zatímco intenzivní míchání je příznivé pro lepší přenos stanovovaného analytu do druhé fáze, může současně narušit stanovení vznikem emulze [33].

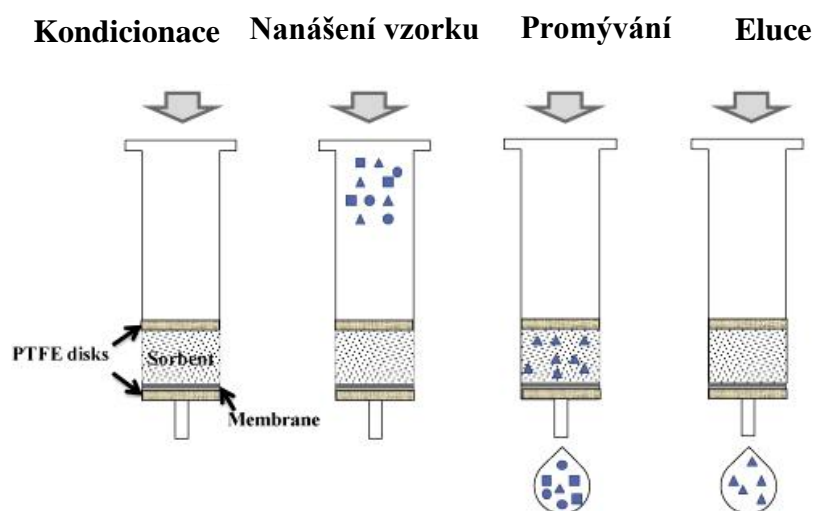
Mezi nejčastěji používaná organická rozpouštědla patří hexan, cyklohexan, tetrachlormethan, benzen, diethylether, chloroform, ethyl acetát, butan-2-ol, butan-1-ol, propan-1-ol, aceton, ethanol nebo methanol. Rozpouštědla jsou uvedena v pořadí rostoucí polarity [34]. Schéma LLE je zobrazeno na Obrázku 6 [35].



Obrázek 6 Schéma extrakce kapalina-kapalina [35].

### 1.2.2 Extrakce na pevné fázi (SPE)

Principem extrakce na pevné fázi je přenos analytu ze směsi (kapaliny nebo plynu) do pevné fáze na základě jeho afinity k pevné fázi. Po separaci jsou buď separované analyty zachyceny ve stacionární fázi a poté jsou odstraněny vhodným eluentem (extrakce), nebo jsou nežádoucí nečistoty vymyty (čištění). Eluce probíhá vždy menším objemem rozpouštědla než je objem naneseného vzorku. Dochází tak k čištění a zakoncentrování zároveň. [36]. Schéma tohoto postupu je uvedeno na Obrázku 7. [37]



Obrázek 7 Schéma extrakce na pevné fázi [37].

Nejpoužívanější sorbenty v SPE jsou na bázi oxidu křemičitého. Nejčastěji se jedná o navázaný oktyl (C8), oktadecyl (C18), kyanopropyl a aminopropyl. SPE sorbenty mohou být také na bázi oxidů kovů, jako je např. hliník, titan nebo hořčík. Další možností jsou polymerní fáze jako například polystyren-divinylbenzenová pryskyřice. Obdobně jako u chromatografických technik můžeme rozlišovat reverzní a normální fáze nebo iontoměničovou SPE [36].

U normálních fází je prvním krokem kondicionování stacionární fáze nepolárním rozpouštědlem pro rozpuštění vzorku. Po kondicionaci je vzorek na stacionární fázi a nepolární rozpouštědlo eluuje nežádoucí složky. Poté se polárním rozpouštědlem eluuje analyt. Typicky se tento postup aplikuje na vzorky uhlovodíků nebo olejů zředěných v hexanu nebo isooktanu. Eluce se provádí vodou nebo kyselinou octovou [36].

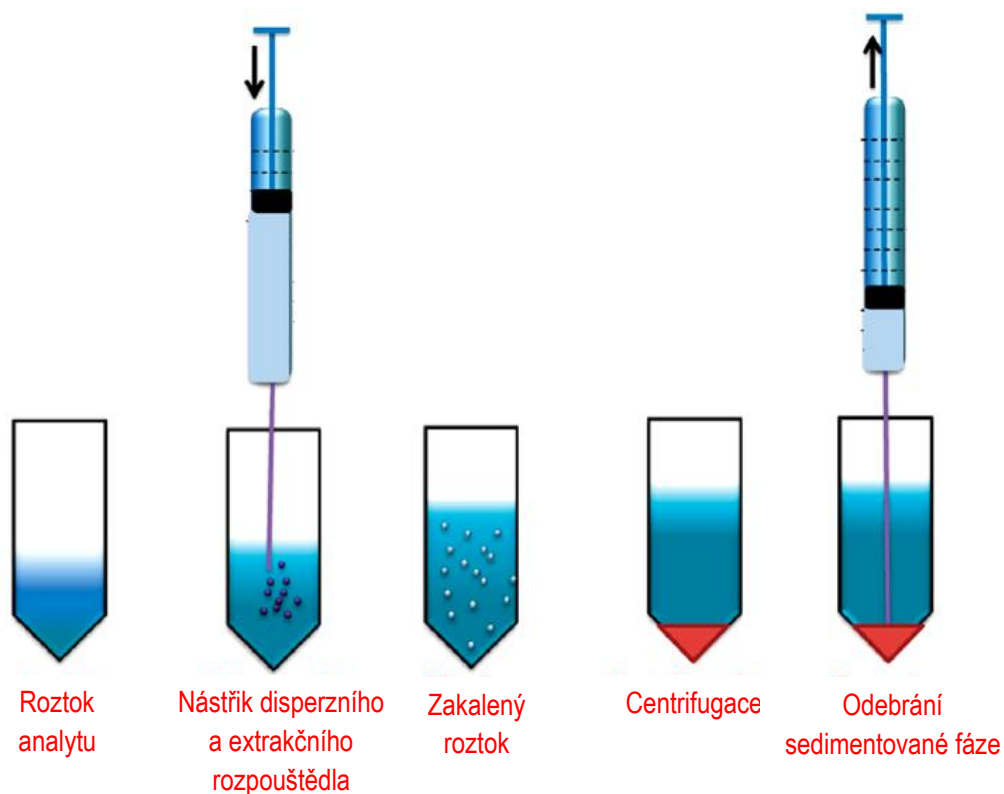
Reverzní fáze se používají pro separace středně polárních až nepolárních sloučenin. Pevná fáze se kondicionuje za použití polárních rozpouštědel a poté se promyje vodou nebo roztokem pufru. Po rozpuštění vzorku se vzorek nanese na stacionární fázi.

Nežádoucí interferenty se eluují polárním rozpouštědlem a následně se eluují stanovované látky. Reverzní fáze se obvykle používá pro stanovení vodných vzorků, například biologických tekutin nebo vzorků nápojů rozpuštěných v anorganických kyselinách [36].

### 1.2.3 Disperzní kapalinová mikroextrakce (DLLME)

V metodě DLLME se využívají celkem tři rozpouštědla, kterými jsou extrakční rozpouštědlo, dále disperzní rozpouštědlo a vodná fáze, ve které se nachází stanovovaný analyt [32,38]. Hlavním požadavkem je nemísitelnost extrakčního rozpouštědla a vodné fáze. Požadavkem na disperzní rozpouštědlo je rozpustnost v extrakčním rozpouštědle a současně ve vodě. Jako disperzní rozpouštědlo může být použit aceton, methanol, isopropanol, ethanol nebo acetonitril. Extrakční rozpouštědla mohou mít menší nebo větší hustotu než voda. Na základě odlišné hustoty odebíráme extrakt shora (plave na hladině) nebo ze dna zkumavky. Jako extrakční rozpouštědlo s vyšší hustotou se využívá tetrachlorethylen, sirouhlík nebo nitrobenzenová rozpouštědla, příp. toxická rozpouštědla jako chlorbenzen, chloroform nebo tetrachlormethan. U tetrachlormethanu pozorujeme větší výtěžnost extrakce porovnání s ostatními rozpouštědly [38-40]. Mezi extrakční rozpouštědla s nízkou hustotou patří 1-oktanol, cyklohexan, toluen, dibutylether a hexanol. Jejich výhodou je dobrá kompatibilita s analytickými přístroji a nízká toxicita. Některá rozpouštědla nejsou mísitelná s používanou mobilní fází a musí být nejprve odpařena a zbytek rekonstituován v jiném rozpouštědle [41]. Při extrakci látek iontové povahy je možné přidat do vodného vzorku sůl, která ovlivní iontovou sílu. Díky tomu dojde k vysolení analytu, což bude mít za následek zvýšení výtěžků extrakce [39].

DLLME je rychlá metoda, celková doba extrakce včetně odstředění je obvykle 5–10 minut [38]. Schéma DLLME je uvedeno na Obrázku 8 [39].



Obrázek 8 Schéma disperzní kapalinové mikroextrakce [39].

Smícháním extrakčního a disperzního rozpouštědla získáme směs na extrakci. Přípravená směs rozpouštědel je pomocí injekční stříkačky rychle nastříknuta do vodné fáze. Extrakční činidlo je rozptýleno ve vodné fázi pomocí disperzního rozpouštědla na malé kapičky, což způsobí zakalení vzorku. Díky malým kapičkám dochází k rychlému dosažení rovnovážného stavu látek mezi dvěma nemísitelnými fázemi [32]. K urychlení extrakce látek z vodné fáze do extrakčního činidla je často použit ultrazvuk, vortex, míchání na třepačce, probublávání nebo lze použít mikrovlnné energie [42]. Extrakční činidlo následně snadno izolujeme centrifugací [32]. Po centrifugaci jsou jednotlivé části odděleny a extrakční činidlo je odebráno. V případě použití rozpouštědla, které není mísitelné s mobilní fází, je extrakční činidlo odpařeno do sucha, např. pod proudem argonu nebo dusíku. Zbytek je poté rekonstituován v jiném rozpouštědle [40].

Metoda je šetrná k životnímu prostředí, jelikož využívá malá množství rozpouštědel (řádově desetiny mililitru) a má vysoký obohacovací faktor [3]. DLLME eliminuje interferující sloučeniny, je citlivá s nízkými detekční limity v porovnání s jinými metodami, proto je možné ji využít ke stanovení stopových množství látek ve vzorku [3,32]. Po extrakci je ke stanovení možné využít kapalinovou chromatografii, plynovou chromatografii nebo spektrometrické metody jako je atomová absorpční spektrometrie. Vhodné je použití zejména kapilární kapalinové chromatografie, při které jsou dávkovány řádově nanolitry extraktu [39,40].

DLLME lze využít ke stanovení polyaromatických uhlovodíků, organofosfátových pesticidů, vitamínů [43], biogenních aminů [44], hormonů [45], veterinárních léčiv [46], psychotropních látek [47] ale i ke stanovení anorganických sloučenin [48].

## 1.3 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

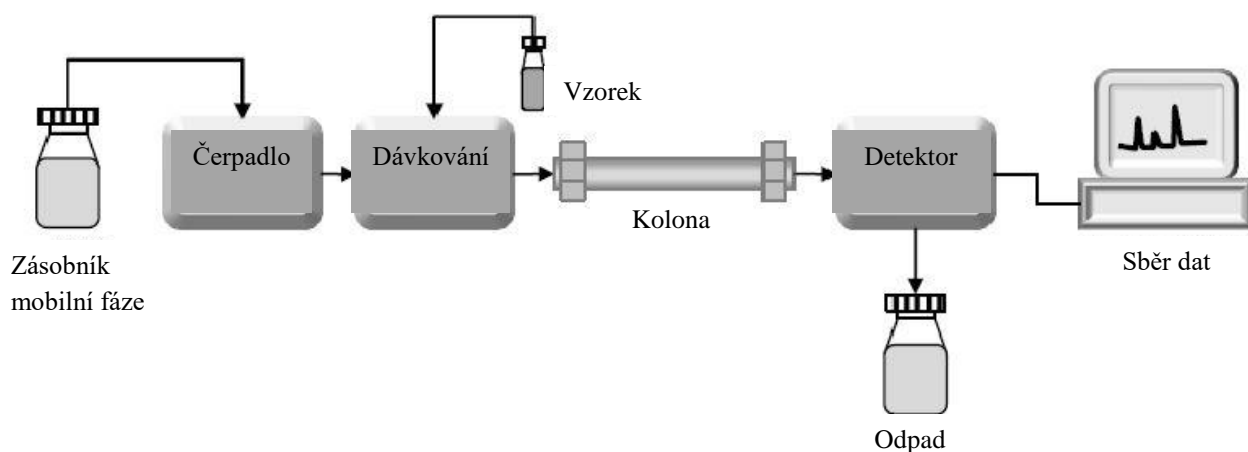
### 1.3.1 Princip

Moderní vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) využívá vysoký tlak k posunu mobilní fáze a analytu přes uzavřenou kolonu naplněnou částicemi o velikosti mikrometrů, které tvoří stacionární fázi [49]. HPLC je zdaleka nejčastěji používanou analytickou technikou. Široká škála možností z této metody dělá mimořádně všestranný nástroj [50]. Kapalinová chromatografie je založena na separaci složek na základě rozdílné rovnovážné distribuci částic mezi dvěma fázemi, kterými jsou kapalná mobilní fáze, která se pohybuje určitým směrem, a pevná stacionární fáze [49].

Kromě HPLC můžeme hovořit také o UHPLC. Termín UHPLC původně vytvořil Jorgenson v roce 1997 a označuje ultra vysokotlakou kapalinovou chromatografii. Jorgenson poprvé popsal využití nanokolon naplněných neporézními částicemi o velikost 1,0–1,5  $\mu\text{m}$  na bázi oxidu křemičitého [51].

### 1.3.2 Instrumentace

HPLC instrumentace je typicky tvořena zásobníkem mobilní fáze, systémem nasávání mobilní fáze, kterým je obvykle vysokotlaké čerpadlo, dávkovacím zařízením, kolonou, post-kolonovými aparaturami, detektorem, a systémem pro sběr dat [2]. Schéma kapalinového chromatografu je uvedeno na Obrázku 9 [52].



Obrázek 9 Schéma kapalinového chromatografu [52].

Používané mobilní fáze jsou voda, vodné roztoky pufrů, roztoky solí, organická rozpouštědla nebo jejich různé směsi [53]. Mobilní fáze by měla být vždy čerstvě připravena a přefiltrována [49]. Nejpoužívanějším způsobem HPLC je systém s reverzními fázemi, kdy je stacionární fáze méně polární než fáze mobilní. Chromatografie s normálními fázemi pak využívá polární stacionární fázi a nepolární mobilní [36].

Rozlišujeme izokratickou a gradientovou eluci. Při izokratické eluci se během separace nemění složení mobilní fáze. Naproti tomu při použití gradientové eluce se rozpouštědla míchají v různém poměru, což znamená, že se mění složení mobilní fáze. Výhodou izokratické eluce je stabilní základní linie výsledného chromatogramu. Později eluující složky však vytvářejí široké rozmyté píky. Gradientová eluce umožňuje rychlou eluci složek silněji zadržovaných v koloně a jejich píky v chromatogramu jsou potom užší a ostřejší oproti izokratické separaci. Díky tomu je možné tyto složky detekovat i při nižších koncentracích. Zároveň je možné vhodnou volbou gradientu optimalizovat separaci mnohosložkových směsí. [49].

Systém (U)HPLC může být spojen s řadou detektorů jako je detekce v UV/Vis oblasti, detektor rozptylu světla (ELSD), refraktometrický a fluorescenční detektor nebo hmotnostní spektrometr [51,53]. Detekci v UV/Vis nelze použít, pokud stanovované látky nemají ve své molekule chromofory, které by absorbovaly UV/Vis záření. Pokud látka snadno oxiduje nebo redukuje, je vhodné použít elektrochemický detektor [53].

Použití systému reverzních fází u UHPLC umožňuje využití kolon plněných částicemi o velikosti menší než 2  $\mu\text{m}$ , naproti tomu standardní kolony pro HPLC obsahují částice o velikosti 2–5  $\mu\text{m}$ . Malé částice způsobí úzké píky, což se projeví lepším rozlišením. Další výhodou je rychlost analýzy, která je v porovnání s klasickou HPLC až 4x vyšší. Nevýhodou jsou vysoké náklady na instrumentaci, neboť součástky přístroje musí být odolné vůči vysokému tlaku. Další nevýhodou je nedostupnost vhodných kolon, které by splňovaly požadavky na selektivitu [4]. Další zdroje uvádí porovnání, pokud využijeme 150mm HPLC kolonu s velikostí částic 5  $\mu\text{m}$ , pak stejného výkonu separace dosáhneme na 50mm UHPLC koloně s částicemi 1,7  $\mu\text{m}$ . Doba analýzy se sníží až 9x a to díky 3x kratšímu sloupci a 3x vyšší lineární rychlosti mobilní fáze [39].



### **1.3.2.1. Systém dodávání mobilní fáze**

Vysokotlaké čerpadlo u HPLC může pracovat při tlacích cca 400 barů. U již zmíněné UHPLC jsou provozní tlaky čerpadel až 1200 barů. Hlavním účelem čerpadla je dodávat přesné, správné, reprodukovatelné a konstantní proudění mobilní fáze do kolony. Při gradientu může dojít k nahromadění vzduchu v rozpouštědlech, což způsobí tvorbu bublin. Proto se do systému musí zavést in-line odplyňovače. Zvýšený systémový tlak umožňuje rychlejší analýzu a sníženou spotřebu eluentu [2].

### **1.3.2.2. Dávkovací systém**

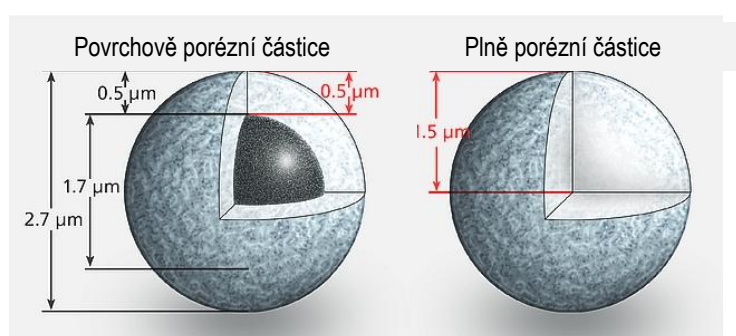
V mnoha případech je limitujícím faktorem přesnosti HPLC reprodukovatelnost systému zavádění vzorku. Nejrozšířenější systém aplikace vzorku je založen na smyčce, která může být buď v poloze dovnitř nebo ven z dráhy toku mobilní fáze pouhým přepnutím ventilu. Když je ventil v poloze ven z dráhy toku mobilní fáze, je smyčka naplněna při atmosférickém tlaku. Velikosti smyček se obvykle pohybují v rozmezí 1–500  $\mu\text{l}$ . Otočením ventilu do polohy dávkování je smyčka připojena k vysokotlakému proudu mobilní fáze a vzorek je tak dopraven do kolony. Systém použití tzv. autosamplerů zlepšuje reprodukovatelnost a umožňuje kontinuální zpracování většího množství vzorků současně. Existují také teplotně řízené autosamplery, které umožňují uskladnění vzorků v autosampleru při teplotě 4–60  $^{\circ}\text{C}$  [2].

### **1.3.2.3. Kolony**

Kolona je část HPLC systému, kde dochází k separaci stanovované látky. Kolony jsou konstruovány z trubek z nerezové oceli s hladkým povrchem kvůli vysokým tlakům v systému. Na trhu nalezneme kolony rovněž ze skla, titanu, ale také z plastu (např. polyetheretherketon). Běžné rozměry kolon jsou 3–30 cm délka a 2–10 mm tloušťka. Při těchto rozměrech mají kolony obvykle účinnost 40 000–60 000 pater. Nejčastěji používané jsou kolony s chemicky vázanými skupinami na silikagelu. Mezi nejpoužívanější patří navázaný oktadecyl (C18), dále ligandy jako fenyl, kyano nebo vložené polární skupiny [2].

### ***Neporézní, povrchově porézní kolony a plně porézní kolony***

Hlavní rozdíl mezi porézními a neporézními částicemi spočívá v rezistenci porézních částic vůči podílu přenosu hmoty ze stagnující mobilní fáze v pórech. Použití malých 1,5 $\mu\text{m}$  neporézních částic oxidu křemičitého způsobilo extrémně vysokou rychlost separace. Účinnost byla podstatně vyšší než u plně porézních částic, nicméně retence se naopak hodně snížila [54]. Proto byly navrženy povrchově porézní částice, které vykazují výhody porézních a neporézních částic. Bylo zjištěno, že povrchově porézní obal poskytuje rychlejší separace ve srovnání s porézními dříve hojně využívanými v HPLC. Na Obrázku 10 je zobrazen řez povrchově porézní částicí a plně porézní částicí [55].

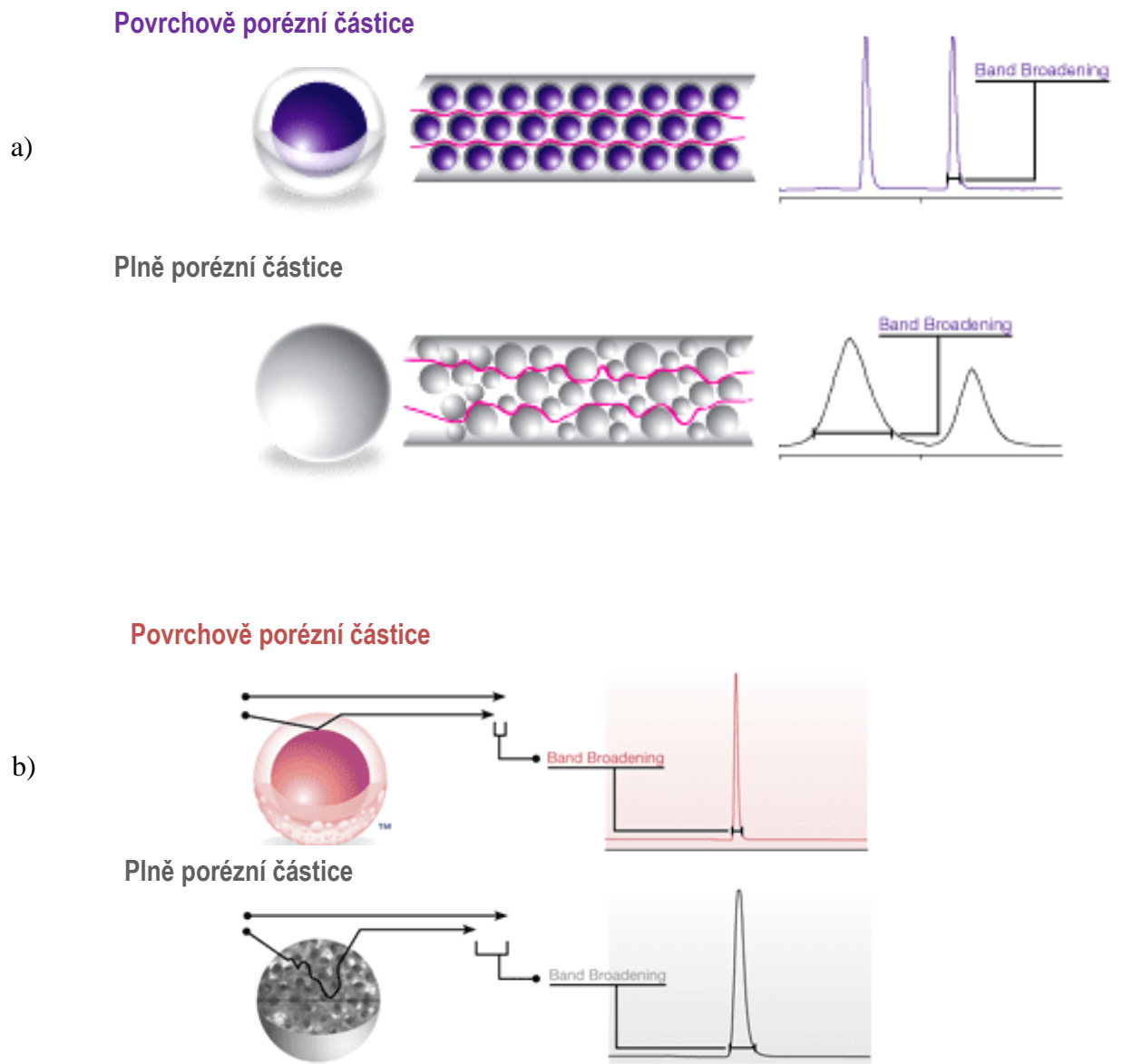


Obrázek 10 **Řez povrchově porézní a plně porézní částicí [55].**

Povrchově porézní částice se vždy skládají z neporézního jádra a porézní vrstvy oxidu křemičitého. Aktuálně jsou dostupné kolony s částicemi o průměru 1,7; 2,6; 2,7 a 5  $\mu\text{m}$ . Plně porézní kolony jsou naplněny částicemi o velikosti 1,5; 1,7; 1,8; 1,9; 2; 3; 5 a 10  $\mu\text{m}$ . Na trhu je v dnešní době obrovský výběr kolon s různou délkou, průměrem, velikostí částic nebo chemií stacionární fáze [54].

V případě nepravidelného povrchu částic může docházet ke snížení přenosu hmoty a rozšiřování píků [54]. Kolony s povrchově porézními částicemi se používají čím dál častěji hlavně kvůli vyšší účinnosti a nízkému zpětnému tlaku, což umožní vyšší průtoky mobilní fáze než u plně porézních částic [56].

Na Obrázku 11a je vyobrazen průběh látky kolonou s povrchově porézními částicemi a plně porézními. Z obrázku je patrné, že účinnější je kolona s povrchově porézními částicemi s malou distribucí částic. Další výhodou je, že látka unášená mobilní fází v koloně urazí menší dráhu, neboť se nedostane do celé částice. Při separaci látek na koloně s plně porézními částicemi urazí analyt větší dráhu a dochází tak k většímu rozmývání píků (Obrázek 11b) [57].



Obrázek 11 Porovnání kolon s povrchově porézními a plně porézními částicemi [57,58].

Seznam některých dostupných kolon naplněných povrchově porézními částicemi je uveden v Tabulce 4 [54].

Tabulka 4 Seznam některých dostupných povrchově porézních kolon [54].

Název kolony	Velikost částic [ $\mu\text{m}$ ]	Tloušťka obalu [ $\mu\text{m}$ ]	Stacionární fáze
<b>Halo</b>	2,7	0,5	C18, C8, HILIC, RP-amid, fenylhexyl, pentafluorofenyl
<b>Halo Peptide-ES 160 A</b>	2,7	0,5	C18
<b>Poroshell 300</b>	5	0,25	C18, C8, C3
<b>Poroshell 120</b>	2,7	0,5	EC-C18, SB-C18
<b>Ascentis Express</b>	2,7	0,5	C18, C8, HILIC, RP-amid, fenylhexyl, pentafluorofenyl
<b>Ascentis Express Peptide-ES 160 A</b>	2,7	0,5	C18
<b>Kinetex</b>	2,6	0,35	C18, XB-C18, C8, HILIC, pentafluorofenyl
	1,7	0,23	
<b>Nucleoshell</b>	2,7	0,5	RP-18, HILIC
<b>Accucore</b>	2,6	0,5	C18, aQ, RP-MS, HILIC, fenylhexyl, pentafluorofenyl
<b>SunShell</b>	2,6	0,5	C18
<b>Eiroshell</b>	1,7	0,35	C18
		0,25	
		0,15	

#### 1.3.2.4. Detektory v kapalinové chromatografii

Principem detektoru je přeměna eluátu z kolony na elektrický signál. HPLC detektory se dělí na detektory koncentrační a hmotnostní. Koncentrační detektory reagují na změnu hmotnostní koncentrace složky v eluátu nezávisle na přívodu složky do detektoru. Řadí se sem např. UV/Vis nebo elektrochemické detektory. Naproti tomu hmotnostní detektory reagují na změnu hmotnostního toku složky do detektoru. Při změně rychlosti toku mobilní fáze se mění výška píku, ale plocha zůstává stejná. Patří sem hmotnostní spektrometr nebo detektor rozptylu světla. Dále dělíme detektory na destruktivní a nedestruktivní. U nedestruktivních detektorů nedochází ke změně detekované komponenty, u destruktivních detektorů detekovaná látka nevratně degraduje. Ideálními vlastnostmi detektoru jsou vysoká citlivost, dobrá stabilita, linearita, krátká doba odezvy, spolehlivost, nedestruktivita, snadné použití a malý vnitřní objem. Momentálně je u HPLC nejčastěji používána UV detekce a hmotnostní spektrometr [49].

##### *UV/Vis detektory*

U tohoto typu detekce je mobilní fáze vedena malou průtokovou kyvetou, kterou prochází paprsek. Průchodem rozpuštěných látek dochází k absorpci UV záření a generaci signálu, který je úměrný koncentraci. Tento typ detektoru lze použít pouze pro látky, které absorbují UV záření jako jsou alkeny, aromáty a sloučeniny, které mají více vazeb mezi C a O, N nebo S. Lambert-Beerův zákon popisuje, že absorbance je funkcí koncentrace. Rozlišujeme tři typy UV/Vis detektorů, kterými jsou detektor s pevnou vlnovou délkou, který je nejcitlivější a nejméně nákladný, dále detektor s variabilní vlnovou délkou, jeho výhodou je široké snímání spektra a volba vhodné vlnové délky, a posledním je fotodiodové pole [49].

Detektory s více vlnovými délkami jsou známé spíše jako detektory diodového pole (DAD), resp. fotodiodové pole (PDA). První DAD byl popsán již v roce 1989. Výhodou je snímání spekter stanovovaných látek během analýzy oproti klasické UV/Vis detekci s jedinou vlnovou délkou [36]. Fotodiodové pole je dvourozměrný systém diod a hranolu. Vzorek je osvětlen UV/Vis zářením a světlo je následně rozloženo hranolem tak, že světlo různých vlnových délek dopadá na různé diody. Výstupem je absorpční spektrum, na základě kterého můžeme identifikovat danou látku [59].

### ***Fluorescenční detektory***

Principem fluorescenčních detektorů je schopnost detekované látky vyzařovat sekundární fluorescenční záření. Hlavní výhodou je selektivita a citlivost. Nevýhodou je malé množství látek, pro které je možné tento detektor použít a je nutné stanovenou látku nejprve převést na fluoreskující derivát [49].

### ***Elektrochemické detektory***

Elektrochemické detektory jsou založeny na měření proudu spojeného s oxidací nebo redukcí rozpuštěných látek během jejich eluce z kolony. Zda je vhodné použití elektrochemického detektoru, závisí na redoxních vlastnostech molekul rozpuštěných látek v prostředí mobilní fáze. Výhodou elektrochemických detektorů je jejich vysoká citlivost, selektivita a široký lineární rozsah. Pomocí pulzní elektrochemické detekce (PED) mohou být stanoveny také polární alifatické sloučeniny jako sacharidy, aminosloučeniny nebo thiosloučeniny. PED využívá elektrokatalytickou detekci u elektrod ušlechtilých kovů v kombinaci s amperometrickou detekcí [49].

### ***Refraktometrické detektory***

Tyto detektory sledují rozdíl v indexu lomu mezi eluátem vycházejícím z kolony a referenčním proudem čisté mobilní fáze. Jedná se o detektory univerzální, nicméně jejich nevýhodou je nízká citlivost stanovení. Jsou také citlivé na změny teploty, na změnu tlaku a také na složení mobilní fáze, proto je vhodnější použití izokratické eluce. Gradient lze využít v případě, že je detektor nakonfigurován na více proudů mobilní fáze [49].

### ***Hmotnostní spektrometr***

Jedná se o velmi důležitý detektor, neboť hmotnostní spektrometr poskytuje strukturní informace o eluovaných látkách. Kombinace HPLC-MS umožňují tedy jak separaci, tak identifikaci v jednom kroku, což je obrovskou výhodou [49].

## 1.4 VALIDACE METODY

Účelem validace metody je prokázat, že daná analytická metoda je vhodná pro výzkum a pro kvantitativní metody poskytuje přiměřený odhad skutečné hodnoty testovaného vzorku. Určí se výkonnostní charakteristiky jako je přesnost a správnost. Kromě validace před použitím by měla být metoda periodicky kontrolována, zda její vhodnost pro daný účel přetrvává po delší dobu, jelikož může dojít k selhání metody [2]. Mezi obecně sledované parametry validace tedy patří specifická, selektivita, přesnost, správnost, opakovatelnost, reprodukovatelnost, mez detekce, mez stanovitelnosti, linearita, rozsah stanovení a robustnost [2,60].

Validace metody zahrnuje tzv. identifikační test, který musí být schopen odlišit stanovovaný analyt od jiných příbuzných druhů, nečistot a dalších složek matrice, tato vlastnost se nazývá specifická. Typicky pro kapalinovou chromatografii demonstruje měření rozlišení mezi analytem a jeho příbuznými druhy [2]. Tento test se obvykle provádí porovnáním vlastností (např. spektra, chemické reaktivity atd.) s referenčním standardem [60].

Správnost stanovení je mírou souhlasu naměřené hodnoty se známou nebo referenční hodnotou. Přesnost pak odráží schopnost metody poskytovat konstantní měření a je dále hodnocena opakovatelností, mezilehlou přesností a reprodukovatelností. Rozdíl mezi nimi je takový, že opakovatelnost je měřítkem schopnosti metody LC poskytovat konzistentní měření v daném průběhu nebo sekvenci vzorku, jinak řečeno poskytuje přesnost za stejných provozních podmínek během krátkého časového intervalu [2,60]. Naproti tomu mezilehlá přesnost je měřítkem schopnosti metody poskytovat konzistentní měření v dané laboratoři, kdy testování provádí současně více pracovníků, používají různá zařízení, různé chemikálie a analýzy provádí v různě dlouhých časových intervalech. Reprodukovatelnost je měřítkem schopnosti metody poskytnout konzistentní výkonnost v čase v různých laboratořích, s různými analytiky, kteří používají různá zařízení, jedná se vlastně o přesnost mezi jednotlivými laboratořemi. Obecně je přesnost obvykle vyjádřena jako rozptyl, směrodatná odchylka nebo variační koeficient série měření [2,60]. V Tabulce 5 jsou uvedeny očekávané hodnoty přesnosti jako funkce koncentrace analytu [61].

Tabulka 5 Očekávaná přesnost jako funkce koncentrace analytu [61].

Analyt [%]	Hmotnostní zlomek	Jednotky	Relativní směrodatná odchylka (RSD) [%]
100	1	100 %	1,3
10	$10^{-1}$	10 %	1,9
1	$10^{-2}$	1 %	2,7
0,1	$10^{-3}$	0,1 %	3,7
0,01	$10^{-4}$	100 ppm (mg/kg)	5,3
0,001	$10^{-5}$	10 ppm (mg/kg)	7,3
0,0001	$10^{-6}$	1 ppm (mg/kg)	11,0
0,00001	$10^{-7}$	100 ppb ( $\mu\text{g/kg}$ )	15,0
0,000001	$10^{-8}$	10 ppb ( $\mu\text{g/kg}$ )	21,0
0,0000001	$10^{-9}$	1 ppb ( $\mu\text{g/kg}$ )	30,0

Validovaná metoda by měla uvádět rozsah koncentrací, u kterých se ukázalo, že metoda splňuje kritéria pro validaci. Robustnost metody je schopnost metody poskytnout vhodný výkon při malých změnách. Obvykle se jedná například o změnu průtoku nebo teploty kolony. Dalším důležitým článkem je prozkoumání stability analytů např. při jejich skladování [2].

Co se týče meze detekce, jedná se o nejmenší množství analytu ve vzorku, které lze detekovat, ale ne nezbytně kvantifikovat jeho přesnou hodnotu. Mez stanovitelnosti se pak uvádí jako nejmenší množství analytu ve vzorku, které lze kvantitativně stanovit s vhodnou přesností a správností [60]. Mez detekce se nejčastěji stanovuje na základě rozdílu signálu od šumu. Stanovení poměru signálu k šumu se provádí porovnáním naměřených signálů ze vzorků se známými nízkými koncentracemi analytu se slepými vzorky. Poměr signálu k šumu mezi 3 nebo 2:1 je obecně považován za přijatelný odhad detekčního limitu [60]. Další možností je stanovení na základě standardní odchylky odezvy a směrnice kalibrační křivky, kdy může být mez detekce vyjádřena jako poměr  $3,3 \cdot$  odchylky a směrnice křivky. Mez stanovitelnosti se zjišťuje obdobným způsobem, do zlomku však místo hodnoty 3,3 napíšeme 10 [60].



## 1.5 STANOVENÍ VITAMÍNU D A JEHO METABOLITŮ

Kvantifikace vitamínů rozpustných v tucích a jejich metabolitů je považována za jeden z nejobtížnějších cílů v chemické praxi. Významnou roli hraje optimalizace procesu přípravy vzorku pro zlepšení citlivosti a eliminace nebo snížení interference matrice v biologických vzorcích [62]. Příprava vzorku zahrnuje zejména zmýdelnění a extrakci. Při hydrolýze dochází k rozkladu komplexních lipidů, jako jsou triacylglyceroly na mastné kyseliny. Triacylglyceroly jsou interferenty analýzy [15,18]. Dalšími interferenty např. v mléčných výrobcích mohou být steroly, karotenoidy a fosfolipidy. Vitamíny rozpustné v tucích jsou ve vzorku vázány na tukové částice, proto je extrakce obtížnější než u vitamínů rozpustných ve vodě [63].

### 1.5.1 Příprava vzorku

Jelikož je vitamín D citlivý na světlo a oxidační činidla, je vhodné při zpracování vzorku zamezit přístupu světla [64]. Práškové formy vitamínu D jsou relativně stabilní cca 56 dní, pokud jsou skladovány v exsikátoru při 25 °C. Tato stabilita klesá s rostoucí teplotou a vlhkostí [65]. Během přípravy vzorku by teplota měla dlouhodobě překročit 50 °C, aby nedocházelo k významné degradaci vitamínu D [62,65].

#### 1.5.1.1. Hydrolýza

Nejúčinnějším nástrojem k úpravě vzorku je zmýdelnění [4]. Alkalická hydrolýza je účinný postup pro odstranění neutrálních lipidů a uvolnění vitamínu z tukových částí. Při hydrolýze dochází k rozpadu esterových vazeb a uvolnění mastných kyselin z glyceridů glycerolu a fosfolipidů a z esterifikovaných sterolů a karotenoidů. Dochází k odstranění tukových částí a jiných interferujících látek [63,66]. Při porovnání studeného a horkého zmýdelnění bylo zjištěno, že vyšší výtěžek vitamínu D poskytuje zmýdelnění za horka a to v čase 30 min [63,67]. Zmýdelnění obvykle zahrnuje zpracování vzorku vodným, methanolickým nebo ethanolickým roztokem KOH při teplotách 60–100 °C. Ethanolický roztok KOH vyžaduje každodenní přípravu. Na druhou stranu vodný roztok KOH je stabilní, ale ne tak dobře mísitelný s tukovými částmi [63].

Při použití zmýdelnění za studena se vzorek nechá reagovat s vodným nebo ethanolickým KOH za stálého míchání při laboratorní teplotě. Tento postup zabraňuje izomeraci vitamínu D na provitamín, která hrozí při hydrolýze za horka [63]. Vzhledem k citlivosti vitamínu D na kyslík se obvykle používají antioxidanty chránící před oxidací. Obvykle se používá pyrogallol, BHT nebo kyselina askorbová [63].

### ***Horké zmýdelnění***

Možností využití horkého zmýdelnění je smíchání 10 ml mléka nebo kojenecké výživy s 0,5 g kyseliny askorbové, 40 ml ethanolu a 10 ml roztoku hydroxidu draselného. Směs je míchána a zahřívána pod zpětným chladičem po dobu 30 minut [68].

Dalším způsobem horkého zmýdelnění vzorků mléčných výrobků a ovocných šťáv ovšem bez použití antioxidačního činidla je následující postup: do baňky se naváží 5–30 g vzorku (pro kapalné vzorky 50 g) a dovnitř se umístí magnetické míchadlo. Podle typu matrice je vzorek po dobu dvou minut umístěn do nádoby s deionizovanou vodou (15 ml pro olej, margarín, jogurt a tablety, 35 ml pro hrubozrnné vzorky). Dále se přidá 60 ml ethanolu a 10 ml 47% hydroxidu draselného. Vzorek se nechá zmýdelnit za stálého míchání přibližně 20 min ve vodní lázni při 80 °C. Po zmýdelnění se baňka ochladí, přidá se deionizovaná voda pro doplnění celkového objemu na 50 ml [69].

Ke zmýdelnění vzorku žampionů (*Agaricus bisporus*) obsahujících vitamín D<sub>2</sub> může být použit následující postup: 0,5–1 g vzorku lyofilizovaných hub se smíchá ve 250ml odměrné baňce se 4 ml roztoku askorbátu sodného (připraveno rozpuštěním 17,5 g askorbátu sodného ve 100 ml 1M NaOH), 50 ml 95% ethanolu a 10 ml 50% hydroxidu draselného. Směs se následně zmýdelní pod zpětným chladičem při 80 °C po dobu jedné hodiny a poté se ochladí [18].

### ***Zmýdelnění za studena***

V závislosti na koncentraci vitamínu D ve vzorku lze navážit 10–30 g vzorku do Erlenmayerovy baňky [70]. Obvykle se zmýdelnění provádí se směsí ethanolu a 50% roztoku hydroxidu draselného [4]. Jednou z možností bez využití vyšší teploty je přidat 40 ml alkoholu s 2% kyselinou pyrogallovou a 20 ml 50% hydroxidu draselného [70]. Směs se zmýdelní přes noc za stálého třepání [70].

Další možností zmýdelnění za studena je smíchat 25 ml tekutého vzorku nebo 10% roztok práškového vzorku ve 250ml Erlenmayerově baňce s 3 g kyseliny askorbové a 60 ml ethanolického roztoku KOH. Směs se přes noc umístí do třepačky [71]. V Tabulce 6 jsou uvedeny parametry optimalizace podmínek hydrolýzy. Bylo zjištěno, že použití 3 g kyseliny askorbové poskytuje vyšší výtěžek vitamínu D. Větší množství KOH použitého na hydrolýzu nezlepšilo výsledky, proto byl zvolen objem 15 ml. Největší plochy píků byly získány při zmýdelnění přes noc. [71].

Tabulka 6 **Optimalizace podmínek stanovení vitamínu D [71].**

Parametr	Zkoušené podmínky			
<b>Množství kyseliny askorbové</b>	1 g	2 g	3 g	
<b>Objem dané koncentrace ethanolickeho roztoku KOH</b>	15 ml 60%		20 ml 60%	
<b>Doba hydrolyzy</b>	4 h	6 h	8 h	Celou noc

Stanovení vitamínu D ve vzorku kojenecké výživy může probíhat rovněž opačným způsobem. Nejprve proběhne extrakce a poté zmýdelnění. Naváží se 0,5g vzorku do tří 50ml centrifugačních zkumavek, který se rozpustí v 10 ml destilované vody. Po extrakci isopropanolem se vrchní organická vrstva (6 ml) přenesse do 15ml centrifugační zkumavky a přidá se 150 mg KOH, 150 mg NH<sub>3</sub> a 2,4 g NaCl. Zkumavka se intenzivně míchá 1 min a poté nechá 5 min stát pro zmýdelnění. Poté se znovu přidá 6 ml vody, míchá 1 min a následuje odstředění při 4000 ot./min 5 min [72].

### 1.5.1.2. Extrakce

Dříve byla hojně využívanou metodou Soxhletova extrakce, jejíž hlavní nevýhodou je doba extrakce a použití velkého množství rozpouštědel [3]. Nyní většina metod využívá k izolaci vitamínu D ze vzorku extrakci v systému kapalina-kapalina (LLE) [15,18]. Při použití klasických metod extrakce je třeba zvolit vhodné rozpouštědlo pro konkrétní vzorek, kdy lze využít ether/petrolether, hexan, heptan, ethanol, aceton, methanol nebo tetrahydrofuran [15,66]. Například při použití heptanu pro extrakci vitamínu D z pomerančového džusu došlo ke vzniku emulzní vrstvy, naopak při použití směsi ether/petrolether pro stejný vzorek ke vzniku emulze nedocházelo [15]. V případě pevného vzorku je nutné před extrakcí využít úpravu vzorku mletím a vzorek zhomogenizovat [3].

K nahrazení zdlouhavé extrakce v děličkách lze využít rovněž SPE kolonky. Jedná se o rychlejší a pohodlnější extrakci, kdy současně snížíme množství rozpouštědel potřebných na extrakci [64]. SPE je většinou v off-line uspořádání a je vhodná pro vzorky s obsahem tuku méně než 10 % [62,66]. K extrakci na tuhé fázi se používají kolonky obsahující oxid křemičitý, Florosil, aminopropyl nebo reverzní fáze. Kolonka je kondicionována hexanem, poté se promyje směsí hexan a hexan/ethylacetát. Frakce vitamínu D se eluuje za použití směsi hexanu a ethylacetátu [73]. Pokud chceme získat ještě čistší extrakt, je možné zkombinovat SPE s LLE, ať už v pořadí SPE a poté LLE nebo naopak [62]. Obě tyto metody však mají

řadu nevýhod, zejména velké množství rozpouštědel, což vede ke zdlouhavému odpařování. Další nevýhodou je vnášení chyby kvůli několika extrakčním krokům. SPE sice používá méně rozpouštědel, ovšem kolonky lze použít pouze 1x. Negativem je tedy finanční náročnost a velké množství odpadu [43,66].

Další možností úpravy vzorku je ultrazvuková extrakce, která může mnohonásobně zvýšit výtěžek a kvalitu extraktu. Ačkoli tento způsob extrakce zabere méně času, také spotřebovává velké množství rozpouštědel [3]. Mimo uvedené způsoby je možné využít také extrakci superkritickou tekutinou (SFE), kterou je obvykle oxid uhličitý, který snadno difunduje přes pevné materiály. Vlastnosti superkritických tekutin umožňují rychlejší extrakci [3]. Další výhodou SFE je nižší spotřeba rozpouštědel, nižší ekonomické náklady a rovněž méně náročné zpracování [66].

### ***Disperzní kapalinová mikroextrakce***

Kvůli velké spotřebě rozpouštědel a dalším nevýhodám zmíněných extrakčních technik je vhodným způsobem extrakce použití kapalinové disperzní mikroextrakce, která je rychlá a nenáročná na množství použitých chemikálií [3,38].

Zajímavým způsobem DLLME je možnost, kdy se k 0,2–2 g vzorku (podle očekávaného obsahu vitamínu) přidá 3 ml acetonitrilu a roztok se umístí do centrifugy na 10 min při 6000 ot./min. Supernatant se oddělí a použije jako disperzní rozpouštědlo, ke kterému se přidá 150  $\mu$ l tetrachlormethanu jako extrakčního rozpouštědla. Směs rozpouštědel se nastříkne do 6 ml vody a několik sekund se opatrně protřepe. Poté se centrifuguje 2 min při 3000 ot./min. 50  $\mu$ l sedimentované fáze se shromáždí, odpaří pod proudem dusíku a zbytek se rekonstituuje v 50  $\mu$ l acetonitrilu. Takto připravený vzorek je podroben analýze [74].

Po hydrolyze vzorků jogurtových nápojů a mléka se oddělí vrchní vrstva a upraví se hodnota pH na 4,5. Následně se přidá 1 ml Carrezova čířidla I a 1 ml Carrezova čířidla II pro vysrážení bílkovin. Roztok se umístí do centrifugy na 5 min při 4000 ot./min. Získaný supernatant se použije pro DLLME, kdy disperzním rozpouštědlem je 550  $\mu$ l ethanolu a 80  $\mu$ l 1-oktanolu. Směs rozpouštědel je nastříknuta do 10 ml upraveného vzorku. Vrchní fáze se oddělí a 20  $\mu$ l je použito k analýze [41]. V Tabulce 7 jsou uvedeny parametry optimalizace podmínek, kdy všechny zvýrazněné poskytovaly nejlepší výsledky [41].

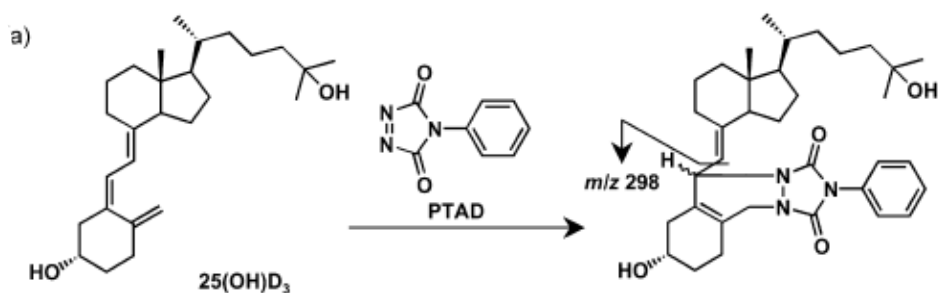
Různé koncentrace NaCl neměly významný vliv na výtěžnost extrakce, a proto nebyla v experimentu žádná sůl použita [41].

Tabulka 7 **Optimální parametry DLLME stanovení vitamínu D [41].**

Parametr	Zkoušené podmínky					
pH	2	4,5	7	9,5	11	12,5
Disperzní rozpouštědlo	aceton		acetonitril	ethanol		methanol
Extrakční rozpouštědlo	1-dekanol		1-oktanol		cyklohexan	

### 1.5.2 Derivatizace

Ačkoliv je citlivost metody stanovení nederivatizovaného vitamínu D dostačující pro rutinní analýzu pomocí LC-MS/MS až do rozmezí ng/ml, není možné takto stanovit některé jeho metabolity. K tomuto účelu se využívá možnost derivatizace pomocí Cooksonových činidel, známých také jako dienofily, které tvoří adukty se všemi sloučeninami vitamínu D [75]. Vhodná derivatizace může zvýšit účinnost ionizace vitamínu D a jeho izomeračních produktů a zlepšit fragmentaci, která zajistí vyšší citlivost [76,77]. Některé dienofily včetně 4-fenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dionu (PTAD) [76,78] a 4-[2-(3,4-dihydro-6,7-dimethoxy-4-methyl-3-oxo-2-quinoxaliny)ethyl]-3H-1,2,4-triazole-3,5(4H)dionu (DMEQ-TAD) [75] zvyšují citlivost až 100x díky zvýšení molekulové hmotnosti o 350 g/mol a přesunutí do oblasti hmotnostního spektra, kde je nižší pozadí [75]. Dále lze využít také postkolonovou derivatizaci [79]. Derivatizace pomocí PTAD je znázorněna na Obrázku 12 [80]. Použití DMEQ-TAD umožňuje detekci metabolitu v rozsahu koncentrací pg/ml [75].



Obrázek 12 **Derivatizace 25-hydroxyvitamínu D<sub>3</sub> pomocí PTAD [80].**

### 1.5.3 Vlastní stanovení vitamínu D

Vitamínem D jsou obvykle obohaceny výrobky jako mléko nebo kojenecká výživa. Tyto potraviny podléhají přísné regulační kontrole. Metody ke stanovení musí být spolehlivé, robustní, rychlé a cenově přijatelné [76]. Metody stanovení lze zařadit do dvou hlavních kategorií. Těmi jsou imunochemické metody a separační metody [41,62]. Použitými imunochemickými metodami mohou být enzymově značená imunoanalýza (ELISA) nebo radioizotopově značená imunoanalýza (RIA) [81-83]. Nevýhodami imunochemických metod jsou neschopnost analyzovat více analytů současně, zkřížená reaktivita protilátek nebo nedostatečná citlivost. Dále také neschopnost rozlišit mezi 25(OH)D<sub>3</sub> a 25(OH)D<sub>2</sub>.

Chromatografické metody poskytují dostatečnou citlivost, flexibilitu a specifitu [62]. Hlavní analytickou metodou je kapalinová chromatografie ve variantách - HPLC [53], UHPLC [70,84], nebo také dvoudimenzionální LC [85]. Použití UHPLC pro stanovení vitamínu D ve vzorcích snižuje dobu analýzy až o 50 %. Ve srovnání s HPLC vykazuje stejnou nebo i lepší účinnost separace u složitějších potravinářských vzorků [70]. Obecně je výhodou kapalinové chromatografie nedestruktivita vzorků a dosažení dobrého rozlišení [66]. Dále lze použít také tenkovrstvou chromatografii, nicméně se jedná o metodu zastaralou [86]. Po derivatizaci trimethylsilylačním činidlem lze ke stanovení vitamínu D a jeho metabolitů využít plynovou chromatografii [87]. Rovněž lze stanovit vitamín D kapilární elektrochromatografií [88], zejména v případě, že máme malé množství vzorku. Výhodou je vysoká separační účinnost, schopnost analyzovat více vzorků současně a nízká spotřeba činidel. Častou formou je micelární elektrokinetická chromatografie [89].

#### 1.5.3.1. Kapalinová chromatografie

Metoda klasické HPLC je využívána pro stanovení vitamínu D již několik desetiletí, ačkoli je stále více nahrazována metodou LC-MS [90]. Zmíněná kombinace LC-MS poskytuje jak selektivitu, tak citlivost vhodnou pro stanovení nízkých koncentrací některých forem vitamínu D [4]. Analýzu LC-MS může zkomplikovat tepelná izomerace vitamínu D na previtamín D, která se může objevit již během zmýdelnění a její reverzibilita je velmi pomalá [62]. Při použití HPLC ke stanovení vitamínu D je možné využít systémy s normálními [15,64] i reverzními fázemi [15,91]. Pro oddělení vitamínu D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub> je nutno použít reverzní fáze, neboť v systémech s normálními fázemi je nelze oddělit [63]. Stupeň separace vitamínu D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub> je pak závislý na povaze oxidu křemičitého ve stacionární fázi [90]. V Tabulce 8 jsou příklady použitých kolon, mobilních fází a detektorů pro jednotlivá stanovení vitamínu D.

Tabulka 8 Seznam vybraných možností pro stanovení vitamínu D a jeho metabolitů.

Stanovení	Kolona	Mobilní fáze	Typ eluce <sup>1</sup>	Detekce	Zdroj
<b>D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, 25(OH)D<sub>2</sub>, 25(OH)D<sub>3</sub></b>	Prevail 250 x 4,6 mm; 5 μm	Isopropanol s <i>n</i> -heptanem + <i>n</i> -heptan	GRA	MS	[64]
<b>D<sub>3</sub></b>	Inertsil ODS–2 250 x 4,6 mm; 5 μm	Methanol + Acetonitril	IZO	UV/Vis, MS	[91]
<b>D<sub>3</sub></b>	Inertsil 250 x 4,6 mm; 5 μm	Isopropanol + Methyl- <i>t</i> -butyl ether + Cyklohexan/ <i>n</i> -heptan	IZO + GRA	UV/Vis, ELSD	[15]
<b>D<sub>3</sub></b>	Inertsil ODS–2 250 x 4,6 mm; 5 μm	Methanol + Acetonitril	IZO	UV/Vis	[15]
<b>D<sub>3</sub></b>	Kinetex 50 x 2,1 mm, 2,6 μm	Voda s 0,1% HCOOH + Methanol	GRA	MS	[76]
<b>D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub></b>	Kromasil 100 150 x 4,6 mm, 5 μm	Methanol + Acetonitril	IZO	UV/Vis	[92]
<b>D<sub>2</sub></b>	Gemini 250 x 2 mm; 5 μm	Methanol + Acetonitril	neuvedeno	MS	[18]
<b>D<sub>3</sub></b>	Persuit XRs 50 x 2 mm; 5 μm	Methanol+voda (9:1) + Acetonitril	GRA	MS	[93]
<b>D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub></b>	Zorbax Eclipse ODS 250 x 4,6 mm; 5 μm	Voda + Methanol, isopropanol nebo acetonitril	IZO + GRA	UV/Vis, MS	[74]
<b>D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> a jejich provitamíny</b>	ACE C18 PFP, ACE C18 AR, Vydac 201TP, Polaris C18–Ether, ACE C18  Všechny 250 x 4,6 mm; 5 μm	Acetonitril	IZO	UV/Vis	[90]
<b>Všech 8 metabolitů vitamínu D</b>	Poroshell 120 EC-C18 150 x 2,1 mm; 2,7 μm	Voda (+0,1% HCOOH) + Methanol (+0,1% HCOOH)	IZO + GRA	MS	[78]

<sup>1</sup>IZO = izokratická eluce      GRA = gradientová eluce

Široce využívaná je detekce hmotnostním spektrometrem [15,18,21,22,64,68-70, 75-77,81,91,93]. Dále je v současné době velmi využívaná HPLC s UV detekcí při 265 nm [15,77,90,92]. UV detekce je sice nejdostupnější a všestranná metoda, ale nejméně selektivní a citlivá, naproti tomu fluorescenční detekce je mnohem citlivější i selektivnější [3]. Fluorescenční detekci ( $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$ ) lze využít po postkolonové derivatizaci vitamínu D činidlem orto-ftalaldehydem (OPA) [79]. Obecně lze rychlost analýzy zvyšovat vyšší teplotou, ale kvůli tepelné nestabilitě vitamínu D se použití nedoporučuje [3]. Díky dobré dostupnosti stabilních izotopově značených standardů a z hlediska vysoké selektivity je využití spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem výhodné [76].

Při použití LC-MS lze využít ionizaci elektrosprejem (ESI) [76,78] a chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI) [15,18,74,93]. ESI však vykazuje nízkou citlivost, naproti tomu APCI byla zjištěna jako vhodná ionizační metoda pro stanovení steroidů a vitamínu D<sub>3</sub> [64,93]. Hmotnostním analyzátozem může být iontová past [64] nebo kvadrupólový analyzátor [15,76].

### **1.5.3.2. Superkritická fluidní chromatografie**

Alternativní separační technikou pro kapalinovou a plynovou chromatografii je superkritická kapalinová chromatografie (SFC). Při této metodě se používá nadkritická tekutina jako mobilní fáze, což vede ke zlepšení rozlišení, protože superkritické tekutiny kombinují difúzní vlastnosti plynu a viskózní vlastnosti kapalin [94]. Jako mobilní fáze pro separaci vitamínu D může být použit oxid uhličitý např. s methanolem okyseleným 0,1% kyselinou mravenčí. Methanol se přidává pro zvýšení polaritu, jelikož samotný CO<sub>2</sub> je málo polární látkou (umožňuje analýzu pouze středně polárních látek) [94]. Oxid uhličitý je bezpečný, netoxický a jeho kritická teplota a tlak (31 °C, 73 barů) jsou snadno dosažitelné [95]. V porovnání s kapalinovou chromatografií jsou SFC separace obecně rychlejší, poskytují užší píky a lepší rozlišení [94,95].



## 2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Přístroje a zařízení

Veškeré chromatografické analýzy byly provedeny na kapalinovém chromatografu Agilent 1290 Infinity Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Kapalinový chromatograf se skládal ze zásobníků mobilní fáze, vysokotlakého čerpadla, odplyňovače mobilní fáze, automatického dávkovače vzorku, termostatu kolon a detektoru fotodiodového pole.

#### **Další použitá zařízení:**

- Centrifuga NF 400 (NÜVE, Turecko)
- Ultrazvuk Sonorex TK 52 (Bandelin, Německo)
- Vortex (IKA, Německo)
- Analytické váhy KERN ABT 220 (Kern & Sohn, Balingen, Německo)
- Automatické pipety
  - Eppendorf (Česká republika & Slovensko)
  - Santorius (Německo)
  - Biohit (Finsko)
- Hamiltonovy injekční stříkačky (Hamilton, Švýcarsko)
- Rotační mixér RH-18 (MIULab, Čína)
- pH metr GC 842 (Schott Glas, Mainz, Německo)
- Přístroj MILI-Q na úpravu vody (Merck Milipore, Německo)

### 2.2 Standardní látky a chemikálie

#### **Standardní látky:**

- Vitamín D<sub>2</sub> = ergokalciferol ≥ 98,0 % (HPLC) (Sigma Aldrich, Německo)
- Vitamín D<sub>3</sub> = cholekalciferol ≥ 98,0 % (HPLC) (Sigma Aldrich, Německo)

#### **Chemikálie:**

- Acetonitril ≥ 99,9 % (HPLC) (Sigma Aldrich, Německo)
- Kyselina mravenčí (Sigma Aldrich, Německo)

- Ethanol  $\geq 99,9$  % (Spektroskopie) (Merck, Německo)
- Methanol  $\geq 99,9$  % (HPLC) (Sigma Aldrich, Německo)
- 1 M Hydroxid sodný (Sigma Aldrich, Německo)
- Hydroxid draselný (Sigma Aldrich, Německo)
- Kyselina askorbová (Sigma Aldrich, Německo)
- Kyselina chlorovodíková (Penta, Česká republika)
- Tetrachlormethan (Penta, Česká republika)
- Oktanol (Sigma Aldrich, Německo)
- Dekanol (Sigma Aldrich, Německo)
- Dodekanol (Sigma Aldrich, Německo)
- Carrezovo čířidlo I. (30% síran železnatý)
- Carrezovo čířidlo II. (15% hexakynoželesnatan draselný)

### 2.3 Vzorky

- *Polotučné mléko obohacené vitamínem D* - Kunín
  - Trvanlivé plnotučné mléko obohaceno vitamínem D, obsah tuku min. 1,5 %. Tepelně ošetřeno UHT záhřevem.
- *Plnotučné mléko obohacené vitamínem D* - Kunín
  - Trvanlivé plnotučné mléko obohaceno vitamínem D, obsah tuku min. 3,5 %. Tepelně ošetřeno UHT záhřevem.
- *Actimel bílý* - Danone
  - Složení: Mléko, tekutý cukr (7,3% sacharóza), glukóza, mléčné minerály, jogurtové kultury a *L. casei* Danone® CNCM I-1518 v počtu min. 1010/100 g, vitamíny B<sub>6</sub> a D
- *Nesquik Shake - čokoládový nápoj* - Nestlé
  - Složení: Polotučné mléko 90,8 %, cukr, odtučněný kakaový prášek 1,6 %, sušené odtučněné mléko 1,6 %, zahušřovadla: celulóza, karboxymethylcelulóza, karagenan, xanthan; karamel (karamelizovaný cukr, glukózový sirup, voda), aromata, skořice, regulátor kyselosti: hydroxid sodný; vitamin D

Tabulka 9 Složení analyzovaných vzorků.

Vzorek	Tuky [g/100 g]	Bílkoviny [g/100 g]	Sacharidy [g/100 g]	Vitamin D <sub>3</sub> [μg/100 ml]
Polotučné mléko	1,5	3,3	4,9	0,75
Plnotučné mléko	3,5	3,3	4,8	0,75
Actimel bílý	1,6	3,0	10,8	0,75
Nesquik čokoládový nápoj	2,1	4,2	12,0	0,75

## 2.4 Pracovní postupy

### 2.4.1 Příprava mobilní fáze

Mobilní fázi A byla voda (upravená zařízením na úpravu vody MILI-Q) s obsahem 0,1 % kyseliny mravenčí. Připravená směs vody a kyseliny byla přefiltrována přes filtr velikosti 0,22 μm. Mobilní fázi B tvořil acetonitril rovněž s 0,1 % kyseliny mravenčí.

### 2.4.2 Příprava standardů

Standardní látky byly připravovány rozpuštěním v methanolu. Zásobní roztok vitamínu D<sub>3</sub> 1 g/l byl připraven navážením 0,1 g standardu vitamínu D<sub>3</sub> do 100 ml odměrné baňky. Baňka byla doplněna po rysku methanolem a řádně promíchána. Dále byl připraven *pracovní roztok 1* o koncentraci 12,5 mg/l ředěním 625 μl zásobního roztoku 1 g/l do 50 ml odměrné baňky a následně *pracovní roztok 2* o koncentraci 2 mg/l ředěním 1,6 ml zásobního roztoku 1 g/l do 10 ml odměrné baňky. Veškeré roztoky vitamínu D<sub>3</sub> byly kvůli jeho stabilitě uchovávány v chladu a temnu. Roztoky vitamínu D<sub>2</sub> byly připraveny stejným způsobem.

### 2.4.3 Kalibrační roztoky

K přípravě roztoků kalibrační řady byl použit *pracovní roztok 1* standardu vitamínu D<sub>3</sub>. Jednotlivé koncentrace kalibrační řady byly připraveny ředěním zásobního roztoku methanolem do vialek na objem 1 ml. Každý bod byl připraven ve třech nezávislých opakování. Roztok standardu byl dávkován stříkačkami Hamilton a methanol byl dávkován automatickou pipetou nebo injekční stříkačkou Hamilton. V Tabulce 10 jsou uvedeny jednotlivé kalibrační body.

Tabulka 10 Příprava kalibrační řady vitamínu D<sub>3</sub>.

Koncentrace [mg/l]	Objem standardu vitamínu D <sub>3</sub> [μl]	Objem methanolu [μl]
0,005	0,4	999,6
0,01	0,8	999,2
0,025	2	998
0,05	4	996
0,1	8	992
0,25	20	980
0,5	40	960
1	80	920
2,5	200	800
5	400	600

#### 2.4.4 Podmínky stanovení

Optimalizované podmínky stanovení vitamínu D<sub>3</sub> jsou uvedeny v Tabulce 11.

Tabulka 11 Chromatografické podmínky stanovení vitamínu D<sub>3</sub>.

<b>Kolona</b>	Ascentis Express C18 (150 x 3 mm; 2,7 μm)
<b>Mobilní fáze A (MF-A)</b>	Redestilovaná voda s 0,1 % kyseliny mravenčí
<b>Mobilní fáze B (MF-B)</b>	Acetonitril s 0,1 % kyseliny mravenčí
<b>Gradient mobilní fáze</b>	0–15 min 70–100% MF-B
<b>Průtok</b>	0,7 ml/min
<b>Teplota kolony</b>	40 °C
<b>Dávkovaný objem</b>	20 μl
<b>Vlnová délka detekce</b>	265 nm

#### 2.4.5 Optimalizace DLLME 1 (DoE 1)

Na optimalizaci DLLME byla použita metoda částečného faktorového experimentu se dvěma úrovněmi a jedním centrálním bodem. DoE 1 byl proveden podle parametrů uvedených v Tabulce 12. Optimalizovalo se množství tetrachlormethanu jako extrakčního rozpouštědla a množství ethanolu jako disperzního rozpouštědla. Dalšími faktory bylo procentuální množství ethanolu ve vzorku a pH vzorku před extrakcí. Každý experiment byl proveden ve třech nezávislých opakování.

Tabulka 12 **Optimalizace DLLME 1 (DoE 1).**

Množství extrakčního rozpouštědla [ $\mu$ l]	Množství disperzního rozpouštědla [ $\mu$ l]	% ethanolu ve vzorku	pH
100	400	10	3
200	400	10	7
100	1000	10	7
200	1000	10	3
100	400	30	7
200	400	30	3
100	1000	30	3
200	1000	30	7
150	700	20	5

#### *Příprava roztoků*

Nejprve byly připraveny jednotlivé baňky s redestilovanou vodou, ethanolem a kyselinou askorbovou o koncentraci 10 g/l. U všech roztoků bylo následně upraveno pH pomocí 50% KOH na požadovanou hodnotu. Poté bylo vždy do 100ml odměrných baněk napipetováno 80  $\mu$ l *pracovního roztoku 2* o koncentraci 12,5 mg/l - konečná koncentrace v baňce tedy byla 10  $\mu$ g/l. Všechny baňky byly doplněny po rysku příslušným roztokem vody s ethanolem a kys. askorbovou. Dále byly připraveny směsi disperzního a extrakčního rozpouštědla podle příložené Tabulky 12 a směs byla promíchána na vortexu.

#### *Kapalinová disperzní mikroextrakce*

Po přípravě vzorků a směsí rozpouštědel byla provedena kapalinová disperzní mikroextrakce. Do plastové 15ml centrifugační zkumavky bylo napipetováno 10 ml

požadovaného roztoku vitamínu D<sub>3</sub> o koncentraci 10 µg/l a daném pH. Následně bylo do Hamiltonovy stříkačky odměřeno příslušné množství směsi rozpouštědel. Jehla byla umístěna 2 cm pod hladinu a celý obsah byl prudce nastříknut do zkumavky. Došlo tak k rozptýlu částic extrakčního rozpouštědla a extrakci vitamínu. Zkumavka byla uzavřena a 5x opatrně promíchána. Po třech nezávislých opakování byly zkumavky umístěny do centrifugy a odstředěny 5 minut při 4000 ot./min. Po centrifugaci byla ze zkumavky Hamiltonovou stříkačkou odebrána vrchní vodná vrstva. Na dně zkumavky zůstalo extrakční rozpouštědlo (tetrachlormethan), ze kterého bylo odebráno 60 µl do 1,5ml vialky. Následovalo odpaření pod dusíkem do sucha. Po odpaření byl zbytek rekonstituován v 60 µl acetonitrilu, vortexován a na pár sekund umístěn do ultrazvuku. Poté byl vzorek přenesen do vialky s insertem a podroben analýze.

#### 2.4.6 Optimalizace DLLME 2 (DoE 2)

Na optimalizaci DLLME byla použita metoda částečného faktorového experimentu se dvěma úrovněmi a jedním centrálním bodem. DoE 2 byl proveden do matrice, kterou tvořilo plnotučné mléko. Experiment byl proveden podle parametrů uvedených v Tabulce 13. Optimalizovalo se množství tetrachlormethanu jako extrakčního rozpouštědla a množství ethanolu jako disperzního rozpouštědla. Dalšími faktory bylo procentuální množství ethanolu ve zmýdelňovací směsi a pH po hydrolyze (před extrakcí). Každý experiment byl proveden ve třech nezávislých opakování.

Tabulka 13 **Optimalizace DLLME 2 (DoE 2).**

Množství extrakčního rozpouštědla [µl]	Množství disperzního rozpouštědla [µl]	% ethanolu ve zmýdelňovací směsi	pH po hydrolyze
100	400	10	3
200	400	10	13
100	1000	10	13
200	1000	10	3
100	400	30	13
200	400	30	3
100	1000	30	3
200	1000	30	13
150	700	20	8

### ***Příprava roztoků***

Nejprve byly připraveny baňky se zmýdelňovací směsí obsahující 1M hydroxid sodný, příslušný procentuální obsah ethanolu a kyselinu askorbovou o koncentraci 10 g/l. Dále byly připraveny směsi rozpouštědel na extrakci podle přiložené Tabulky 13 a řádně promíchány na vortexu. Disperzním rozpouštědlem byl ethanol a extrakčním tetrachlormethan.

### ***Studené zmýdelnění a úprava vzorku***

Do 27 zkumavek bylo napipetováno 2 ml plnotučného mléka a 8 ml příslušné směsi hydroxidu sodného s ethanolem a kyselinou askorbovou. Poté bylo do každé zkumavky přidáno Hamiltonovou stříkačkou 50  $\mu$ l *pracovního roztoku 2* o koncentraci 2 mg/l - konečná koncentrace v každé zkumavce byla 10  $\mu$ g/l. Zkumavky byly obaleny alobalem, aby se zamezilo přístupu světla. Poté byly všechny zkumavky umístěny na rotační mixér a přes noc (cca 18 hod) zmýdelněny za studena. Po hydrolýze bylo upravováno pH. V případě požadované hodnoty pH 3 byl ke zmýdelněnému roztoku přidán 1 ml kyseliny mravenčí. K úpravě pH na hodnotu 8 bylo přidáno 300  $\mu$ l kyseliny mravenčí a 700  $\mu$ l vody, aby ve všech zkumavkách byl stejný objem. pH 13 nebylo třeba upravovat kyselinou, pouze se ke zkumavkám se zmýdelněným roztokem přidal 1 ml redestilované vody. Dále bylo ke každému roztoku ve zkumavce (resp. postupně 9 x 3 zkumavky) přidáno 0,5 ml roztoku Carrezova čiridla I. - promícháno a 0,5 ml Carrezova čiridla II. a opět promícháno. Zkumavky byly umístěny na 10 minut do centrifugy při 4000 ot./min. 8 ml odebraného čirého supernatantu bylo podrobena kapalinové disperzní mikroextrakci.

### ***Kapalinová disperzní mikroextrakce***

Do Hamiltonovy stříkačky bylo odměřeno příslušné množství směsi disperzního a extrakčního rozpouštědla. Jehla byla umístěna 2 cm pod hladinu a celý obsah byl prudce nastříknut do zkumavky s 8 ml čirého supernatantu. Došlo tak k rozptýlu částic extrakčního rozpouštědla a extrakci vitamínu. Zkumavka byla uzavřena a 10x intenzivně promíchána. Po třech nezávislých opakování byly zkumavky umístěny do centrifugy a odstředěny 5 minut při 4000 ot./min. Po centrifugaci byla ze zkumavky Hamiltonovou stříkačkou odebrána vrchní vodná vrstva. Na dně zkumavky zůstalo extrakční rozpouštědlo (tetrachlormethan), ze kterého bylo odebráno 60  $\mu$ l do 1,5ml vialky. Následovalo odpaření pod dusíkem do sucha. Po odpaření byl zbytek rekonstituován v 60  $\mu$ l acetonitrilu, vortexován a na pár sekund umístěn do ultrazvuku. Poté byl vzorek přenesen do vialky s insertem a podroben analýze.

#### **2.4.7 Kalibrace vitamínu D<sub>3</sub> s vlivem matrice a extrakce**

Kalibrační řada vitamínu D<sub>3</sub> byla připravena v koncentračním rozsahu 0,1–2,5 µg/l. Jednotlivé kalibrační body byly připravovány přímo do matrice, kterou bylo plnotučné mléko. Všechny body byly postupně zmýdelněny za studena (cca 18 hod) a podrobeny kapalinové disperzní mikroextrakci. Jednotlivé body byly provedeny ve třech nezávislých opakování.

##### ***Příprava roztoků***

Nejprve bylo připraveno 200 ml 1M hydroxidu sodného s 30 % ethanolu a kyselinou askorbovou o koncentraci 10 g/l. Dále byla připravena směs rozpouštědel na extrakci - 16 ml ethanolu s 4 ml tetrachlormethanu, což prezentuje poměr 400 µl ethanolu a 100 µl tetrachlormethanu - celkem 500 µl, které byly použity na disperzní kapalinovou mikroextrakci.

##### ***Studené zmýdelnění a úprava vzorku***

Do 21 zkumavek bylo napipetováno 2 ml plnotučného mléka. Do jednotlivých zkumavek s mlékem bylo nadávkováno pomocí Hamiltonových stříkaček příslušné množství *pracovního roztoku 2* o koncentraci 2 mg/l podle příložené Tabulky 14. Poté bylo do každé zkumavky přidáno 8 ml směsi hydroxidu sodného s ethanolem a kyselinou askorbovou. Současně byl proveden slepý pokus, který byl proveden se vzorkem plnotučného mléka, do kterého nebyl přidán žádný vitamín D<sub>3</sub>. Zkumavky byly obaleny alobalem, aby se zamezilo přístupu světla. Poté byly všechny zkumavky umístěny na rotační mixér a přes noc zmýdelněny za studena (cca 18 hod). Po hydrolýze byl nejprve ke každému roztoku přidán 1 ml redestilované vody. Poté bylo ke každému roztoku ve zkumavce (resp. postupně 7 x 3 zkumavky) přidáno 0,5 ml roztoku Carrezova čířidla I. - promícháno a 0,5 ml Carrezova čířidla II. a opět promícháno. Zkumavky byly umístěny na 10 minut do centrifugy při 4000 ot./min. 8 ml odebraného čirého supernatantu bylo podrobeno kapalinové disperzní mikroextrakci.



Tabulka 14 **Příprava kalibrační řady vitamínu D<sub>3</sub> v mléce.**

Koncentrace kalibračního bodu [µg/l]	Objem pracovního roztoku 2 o koncentraci 2 mg/l [µl]
0,5	0,5
2,5	2,5
5,0	5,0
12,5	12,5
25,0	25,0

### ***Kapalinová disperzní mikroextrakce***

Do Hamiltonovy stříkačky bylo odměřeno 500 µl (400 µl ethanolu + 100 µl tetrachlormethanu) směsi rozpouštědel na extrakci. Jehla byla umístěna 2 cm pod hladinu a celý obsah byl prudce nastříknut do zkumavky s 8 ml čirého supernatantu. Došlo tak k rozptýlení částic extrakčního rozpouštědla a extrakci vitamínu. Zkumavka byla uzavřena a 10x intenzivně promíchána. Po třech nezávislých opakování byly zkumavky umístěny do centrifugy a odstředěny 5 minut při 4000 ot./min. Po centrifugaci byla ze zkumavky Hamiltonovou stříkačkou odebrána vrchní vodná vrstva. Na dně zkumavky zůstalo extrakční rozpouštědlo (tetrachlormethan), ze kterého bylo odebráno 60 µl do 1,5ml vialky. Následovalo odpaření pod dusíkem do sucha. Po odpaření byl zbytek rekonstituován v 60 µl acetonitrilu, vortexován a na pár sekund umístěn do ultrazvuku. Poté byl vzorek přenesen do vialky s insertem a podroben analýze.

### **2.4.8 Zpracování reálných vzorků s vitamínem D<sub>3</sub>**

Nejprve byl připraven roztok ethanolu, hydroxidu sodného a kyseliny askorbové ke zmýdelnění. Dále směs rozpouštědel k extrakci, kterými byl ethanol a tetrachlormethan. Následně byly roztoky zmýdelněny za studena (cca 18 hod) a poté podrobeny disperzní kapalinové mikroextrakci. Všechny vzorky byly zpracovány stejným způsobem.

### ***Příprava roztoků***

Nejprve bylo připraveno 200 ml 1M hydroxidu sodného s 30 % ethanolu a kyselinou askorbovou o koncentraci 10 g/l. Dále byla připravena směs rozpouštědel k extrakci - 16 ml ethanolu s 4 ml tetrachlormethanu, což prezentuje poměr 400 µl ethanolu a 100 µl tetrachlormethanu - celkem 500 µl, které byly dávkovány na disperzní kapalinovou mikroextrakci.

### ***Studené zmýdelnění a úprava vzorku***

Do jednotlivých zkumavek bylo napipetováno vždy 2 ml vzorku a 8 ml směsi hydroxidu sodného s ethanolem a kyselinou askorbovou. Jednalo se o vzorky polotučného a plnotučného mléka, Actimelu a Nesquik nápoje. Jednotlivé zkumavky byly obaleny alobalem, aby se zamezilo přístupu vzduchu. Poté byly všechny zkumavky umístěny na rotační mixér a přes noc zmýdelněny za studena (cca 18 hod). Po hydrolýze byl nejprve ke každému roztoku přidán 1 ml redestilované vody. Poté bylo ke každému roztoku ve zkumavce (resp. postupně 4 x 3 zkumavky) přidáno 0,5 ml roztoku Carrezova čířidla I. - promícháno a 0,5 ml Carrezova čířidla II. a opět promícháno. Zkumavky byly umístěny na 10 minut do centrifugy při 4000 ot./min. 8 ml odebraného čířého supernatantu bylo podrobena kapalinové disperzní mikroextrakci.

### ***Kapalinová disperzní mikroextrakce***

Do Hamiltonovy stříkačky bylo odměřeno 500  $\mu$ l (400  $\mu$ l ethanolu + 100  $\mu$ l tetrachlormethanu) směsi rozpouštědel na extrakci. Jehla byla umístěna 2 cm pod hladinu a celý obsah byl prudce nastříknut do zkumavky s 8 ml čířého supernatantu. Došlo tak k rozptylu částic extrakčního rozpouštědla a extrakci vitamínu. Zkumavka byla uzavřena a 10x intenzivně promíchána. Po třech nezávislých opakování byly zkumavky umístěny do centrifugy a odstředěny 5 minut při 4000 ot./min. Po centrifugaci byla ze zkumavky Hamiltonovou stříkačkou odebrána vrchní vodná vrstva. Na dně zkumavky zůstalo extrakční rozpouštědlo (tetrachlormethan), ze kterého bylo odebráno 60  $\mu$ l do 1,5ml vialky. Následovalo odpaření pod dusíkem do sucha. Po odpaření byl zbytek rekonstituován v 60  $\mu$ l acetonitrilu, vortexován a na pár sekund umístěn do ultrazvuku. Poté byl vzorek přenesen do vialky s insertem a podroben analýze.

#### **2.4.9 Experimentální zpracování dat**

K vyhodnocení naměřených hodnot byl použit software OpenLAB CDS ChemStation Edition for LC & LC-MS Methods (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Veškeré výsledky byly dále zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2016. Plánovaný experiment byl navržen a výsledky vyhodnoceny pomocí programu Statistica 12 (Statsoft ČR). K vyhodnocení validačních parametrů byly použity programy QC Expert (významnost regresních členů) a EffiValidation 3.0 - Effichem ČR (QC koeficient linearity).

### 3. VÝSLEDKY A DISKUZE

Vitamín D je esenciální živinou pro lidský organismus. Člověk si sice dokáže vytvořit vitamín D sám, nicméně podmínkou je vystavení se UV záření. Ve většině případů je nutné přijímat vitamín D také stravou. Pouze málo potravin obsahuje vitamín D přirozeně, proto je přidáván do potravin uměle. Do mléčných výrobků je vitamín D přidáván pro lepší vstřebávání vápníku, který se v mléčných výrobcích přirozeně vyskytuje. I v těchto výrobcích je však vitamín D stále ve stopových koncentracích, proto je třeba najít optimální podmínky stanovení, které zajistí potřebnou citlivost a mez detekce. V této práci byly optimalizovány podmínky hydrolýzy, disperzní kapalinové mikroextrakce a současně samotné chromatografické separace. Výsledky experimentu jsou popsány v následujících kapitolách.

#### 3.1 Optimalizace HPLC separace

Cílem chromatografické separace je dostatečné oddělení píků analyzované látky od dalších složek vzorku, aby mohlo dojít k následné identifikaci a kvantifikaci. Optimalizovala se vhodná mobilní fáze a vhodná chromatografická kolona. Hledala se taková kolona, na které se podaří vitamín D jednak oddělit od ostatních částí matrice a také separovat jednotlivé zástupce vitamínu D. Detekce probíhala při 265 nm, což je absorpční maximum vitamínu D. Spektrum vitamínu D<sub>3</sub> je uvedeno v Příloze na Obrázku P1.

Jako mobilní fáze A (MF-A) byla zkoušena redestilovaná voda s octanem amonným nebo kyselinou mravenčí. Mobilní fázi B (MF-B) tvořil čistý methanol nebo acetonitril. Při použití čistého methanolu docházelo k mírnému chvostování píků. Dále byl za MF-B testován acetonitril okyselený 0,1 % kyselinou mravenčí, který byl zvolen jako optimální pro stanovení vitamínu D obecně a pro separaci vitamínu D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub>. Mobilní fázi A tvořila voda také s 0,1% kyselinou mravenčí. Tato kombinace MF-A a MF-B poskytovala lepší separace jednotlivých píků v porovnání s neokyseleným acetonitrem, případně vodou.

Výběr kolony byl klíčovým prvkem k oddělení vitamínu D od ostatních částí vzorku. Rovněž byla také snaha dosažení separace jednotlivých metabolitů vitamínu D, zejména tedy vitamínu D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub>. Zkoušeny byly kolony s různými ligandy a s různou délkou. Zejména byly použity kolony s navázaným oktadecylem na silikagelu (C18), dále také s triakontylem (C30) nebo pentafluorofenylpropylem (PFP).

Byly vyzkoušeny následující kolony:

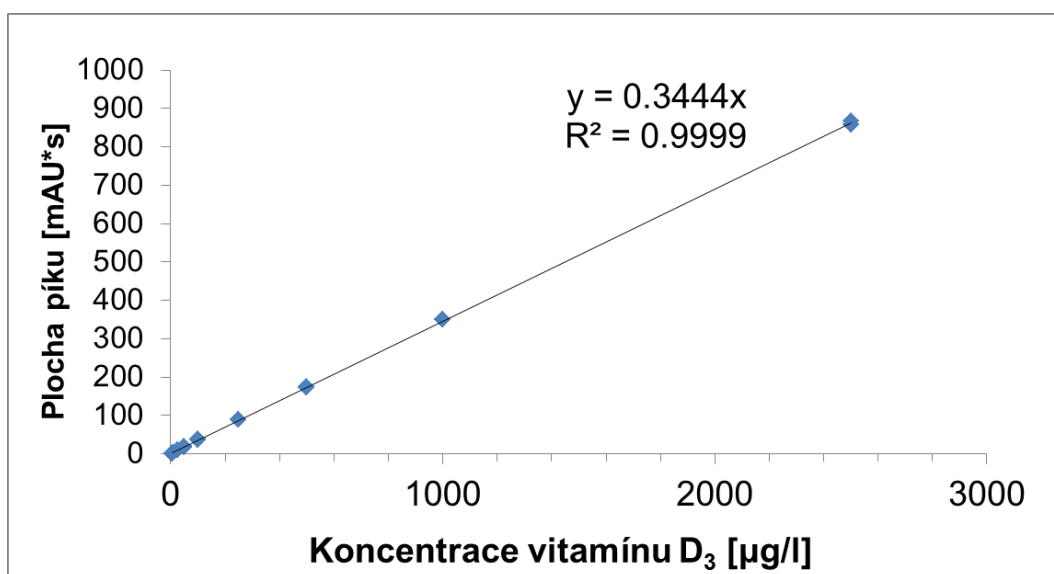
- **Zorbax Eclipse Plus C18:** 50 x 2,1 mm; 1,8  $\mu\text{m}$
- **Kinetex 1,7 u XB-C18 100A:** 150 x 2,1 mm; 1,7  $\mu\text{m}$
- tandemové zapojení dvou kolon **Kinetex:**  
150 x 2,1 mm; 1,7  $\mu\text{m}$  + 100 x 3 mm; 1,7  $\mu\text{m}$
- **Gemini C18 110A:** 150 x 3 mm; 5  $\mu\text{m}$
- **Kinetex 1,7u XB-C18 100A:** 150 x 2,1 mm; 1,7  $\mu\text{m}$
- **Kinetex 2,6u PFP 100A:** 150 x 3 mm; 2,6  $\mu\text{m}$
- **ProntoSIL 200-3-C30:** 250 x 4,6 mm; 3  $\mu\text{m}$
- **Ultracarb 5 00S 30:** 150 x 3,2 mm; 5  $\mu\text{m}$
- **Luna 5u C18 100A:** 250 x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$
- **Ascentis Express C18:** 150 x 3 mm; 2,7  $\mu\text{m}$

K výběru kolony byl použit vzorek plnotučného mléka obohaceného vitamínem D, který byl zmýdlen za varu pod zpětným chladičem s následnou extrakcí kapalina-kapalina. Na základě tohoto experimentu jsme našli vhodnou kolonu, na které bude možné oddělit vitamín D od ostatních částí matrice. Separace jednotlivých zástupců vitamínů D byla prováděna se standardy vitamínu D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub> a na žádné z uvedených kolon kromě Ascentis Express C18 nedošlo k jejich úplnému rozdělení. Na delších kolonách sice docházelo k silnějšímu zadržování látek, ale k uspokojivé separaci vitamínu D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub> nedošlo. Byly zkoušeny různé gradienty i izokratická eluce. Při izokratické eluci se látky, které jsou dlouho zadržovány na koloně, eluují později a dochází k rozmývání píků. Při příliš rychlém nebo prudkém gradientu se vitamín D od ostatních částí neoddělil, proto byl jako finální zvolen gradient od 70 do 100 % acetonitrilu v 15 minutách. Dalším parametrem separace byl optimální průtok, aby separace netrvala zbytečně dlouhou dobu, a dávkovaný objem. Optimální průtok byl nastaven v kombinaci s maximálním možným tlakem na koloně. Jelikož maximální tlak na zvolené koloně byl kolem 600 barů, byl jako optimální zvolen průtok 0,7 ml/min, při kterém se tlak na začátku separace pohyboval kolem 350 barů. Konečný dávkovaný objem souvisel s výběrem rozpouštědla pro mikroextrakci, proto je uveden v kapitole 3.3.1. Retenční čas vitamínu D<sub>2</sub> při tomto gradientu a průtoku mobilní fáze byl 15,94 min a vitamínu D<sub>3</sub> 16,13 min. Separace vitamínu D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub> proběhla s dostatečným rozlišením,  $R_{1,2}$ , které bylo 1,54, což odpovídá rozdělení píků téměř na základní linii.

Chromatogram separace vitamínu D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub> je uveden v Příloze na Obrázku P2. Z uvedených experimentů byla jako nejpříjemnější zvolena již zmíněná kolona Ascentis Express C18.

### 3.2 Validace metody

Po optimalizaci chromatografické separace byla provedena validace analytické metody na standardu vitamínu D<sub>3</sub>, která by prokázala její vhodnost. Hodnocenými validovanými parametry byla linearita hodnocená QC koeficientem a korelačním koeficientem R<sup>2</sup>. Kalibrace byla hodnocena v koncentračním rozsahu 0,01–2,5 mg/l (resp. 10–2500 µg/l) jako závislost koncentrace na ploše píku. Diagnostika regrese a významnost regresních parametrů byla ověřena studentovým t-testem v programu QC Expert. Dále byla testována významnost absolutního členu na hranici pravděpodobnosti  $p = 0,05$ ,  $p$  úseku vyšlo 0,098. Program vyhodnotil úsek regresní křivky jako nevýznamný ( $p > 0,05$ ), proto nebyl při následných výpočtech zahrnut. Graf kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci je uveden na Obrázku 13.



Obrázek 13 Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci vitamínu D<sub>3</sub>.

Pomocí programu EffiValidation byl QC koeficient vypočítán na 0,735 % a korelační koeficient regresní závislosti měl hodnotu 0,9999. Oba parametry splňují kritérium přijatelnosti, které je pro QC koeficient  $< 5 \%$  a pro korelační koeficient  $> 0,999$ .

Dalšími hodnotícími parametry byla správnost, vyjádřená jako výtěžnost, a přesnost vyjádřená jako opakovatelnost pomocí relativní směrodatné odchylky (RSD). Přesnost

a správnost byly hodnoceny na třech koncentračních úrovních: 25; 100 a 1000 µg/l. Hodnotící kritéria přesnosti jsou převzata z publikace *Guidelines for Standard Method Performance Requirements* [61]. Výsledky validace metody jsou uvedeny v Tabulce 15.

Tabulka 15 **Výsledky validace přesnost a správnosti metody stanovení vitamínu D<sub>3</sub>.**

Koncentrace [µg/l]	Přesnost		Správnost	
	Opakovatelnost (RSD) [%]	Kritérium přijatelnosti [%]	Výtěžnost [%]	Kritérium přijatelnosti [%]
25	1,10	<15	106,3	80–110
100	2,43	<15	106,4	80–110
1000	0,07	<11	101,5	80–110

Metoda na základě kritérií přesnosti byla vyhodnocena jako vyhovující pro stanovení vitamínu D<sub>3</sub>. Kompletní výsledky měření všech koncentračních úrovní jsou uvedeny v Příloze v Tabulce P1.

Dalším validačním parametrem, který byl sledován, byla mezilehlá přesnost. Byly zvoleny tři kalibrační hladiny, které byly měřeny během několika dní (1.; 5. a 12. den) a vyhodnoceny. Jako tři sledované hladiny byly zvoleny koncentrace 25; 100 a 1000 µg/l. Výsledky mezilehlé přesnosti jsou uvedeny v Tabulce 16. Všechny hodnoty odpovídají kritériu přijatelnosti, proto je metoda vhodná pro stanovení vitamínu D<sub>3</sub>. Výsledky včetně jednotlivých ploch píků jsou uvedeny v Příloze v Tabulce P2.

Tabulka 16 **Výsledky validace mezilehlé přesnosti stanovení vitamínu D<sub>3</sub>.**

Koncentrace [µg/l]	Mezilehlá přesnost (RSD) [%]	Kritérium přijatelnosti [%]
25	4,38	<15
100	2,74	<15
1000	1,14	<11

Dalším důležitým kritériem při tvorbě metody je mez detekce a mez stanovitelnosti, tedy nejnižší možné koncentrace, které lze metodou stanovit. Z chromatogramu byl vyhodnocen šum podle závislosti výšky píku na koncentraci. Z této hodnoty byla stanovena instrumentální mez detekce a instrumentální mez stanovitelnosti. Mez detekce vyšla 3,1 µg/l a mez stanovitelnosti měla hodnotu 10,4 µg/l.

### **3.3 Příprava vzorku**

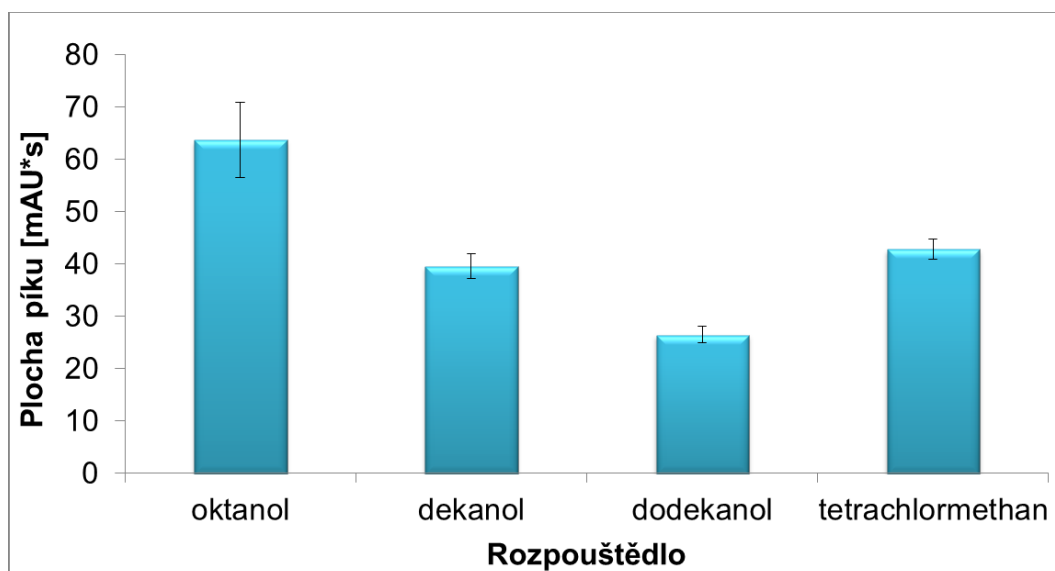
Tato metoda byla zamýšlena především ke stanovení vitamínu D<sub>3</sub> v mléce a mléčných výrobcích. Hydrolýza pod zpětným chladičem, která byla použita pro výběr vhodné kolony, jak bylo uvedeno v kapitole 3.1, zahrnovala řadu nevýhod. Těmi byly zejména časová náročnost a spotřeba velkého množství rozpouštědel - petroletheru a diethyletheru. S rozpouštědly se dále pojil problém odpařování velkého objemu organických rozpouštědel, tudíž odpařování trvalo velice dlouho. Proto byla k dalšímu stanovení vitamínu D<sub>3</sub> zvolena metoda disperzní kapalinové mikroextrakce (DLLME), která využívá malá množství rozpouštědel a není časově náročná. Tato metoda byla již ke stanovení vitamínu D<sub>3</sub> použita [41,74]. Klíčovým krokem bylo nalézt optimální podmínky hydrolýzy, abychom izolovali vitamín D<sub>3</sub> z tukových částic, ve kterých byl vázán. Poté bylo potřeba nalézt takové podmínky disperzní kapalinové mikroextrakce, které budou poskytovat maximální výtěžky.

#### **3.3.1 Výběr extrakčního rozpouštědla**

Pro použití extrakčního rozpouštědla, které bude splňovat kritéria na vhodnost, tzn. mísitelnost s disperzním rozpouštědlem a vodnou fází, a bude poskytovat nejvyšší výtěžky extrakce, byla provedena optimalizace. K optimalizaci byl použit oktanol, dekanol, dodekanol a tetrachlormethan. Rozdíl mezi rozpouštědly byl v jejich hustotě. Nechlorovaná rozpouštědla mají hustotu menší než voda a odebírала se shora. Naproti tomu tetrachlormethan má hustotu větší než voda, a proto se usadil na dně zkumavky. Jako disperzní rozpouštědlo byl použit ethanol, který je mísitelný prakticky se všemi rozpouštědly.

Na experiment byla použita směs redestilované vody s 20 % ethanolu o pH 4,5. Do vodno-ethanického roztoku byl přidán vitamín D<sub>3</sub> na koncentraci 10 µg/l. Z této směsi bylo pro provedení DLLME vzato 10 ml do plastové zkumavky. Na DLLME bylo použito 100 µl extrakčního rozpouštědla a 600 µl disperzního rozpouštědla, na základě inspirace literaturou [41]. Po provedené extrakci byl extrakt odebrán, odpařen pod dusíkem do sucha, zbytek znovu rozpuštěn v acetonitrilu a podroben analýze. Sledovanou veličinou byla plocha píku.

Při použití nechlorovaných rozpouštědel bylo zjištěno, že s rostoucí délkou řetězce (oktanol < dekanol < dodekanol) dochází ke zmenšování plochy píku. Současně docházelo také k rozšiřování a štěpení píku. Z těchto tří rozpouštědel byl tedy zvolen jako nejvhodnější oktanol. Porovnání jednotlivých rozpouštědel z hlediska výtěžnosti vitamínu D<sub>3</sub> je uvedeno na Obrázku 14.



Obrázek 14 **Porovnání testovaných rozpouštědel na disperzní kapalinovou mikroextrakci** ( $V_{inj} = 4 \mu\text{l}$ ).

S cílem zvýšit plochu píku vitamínu D<sub>3</sub> a tedy snížit mez detekce byla snaha nadávkovat do kapalinového chromatografu co největší množství vzorku. Proto byly testovány větší objemy nástřiku. U oktanolu bylo zjištěno maximální možné dávkování 4  $\mu\text{l}$ . Při pokusu o větší dávkovaný objem docházelo k významnému rozšiřování a štěpení píku. Možností, jak zvýšit dávkovaný objem je odpařit extrakční rozpouštědlo a zbytek rozpustit v jiném rozpouštědle vhodnějším pro kapalinovou chromatografii na reverzních fázích. Bohužel bod varu oktanolu je příliš vysoký (195 °C), a proto je odpařování časově náročné. Objem dávkování bylo možné zvýšit také ředění vzorku mobilní fází (acetonitrilem). Tento postup nepřinesl žádoucí výsledky. Při ředění vzorku 1:1 acetonitrilem bylo možné nadávkovat bez významného rozšíření pouze 10  $\mu\text{l}$  vzorku. Vzhledem k ředěnému vzorku se plocha zvýšila pouze o cca 25 %.

Z tohoto důvodu byl zahrnut do pokusu tetrachlormethan. Ten však není kompatibilní s použitou mobilní fází, a proto musí být odpařen. Tetrachlormethan má ale nízký bod varu (76 °C), tudíž byl odpařen během několika minut. Po odpaření byl zbytek rozpuštěn

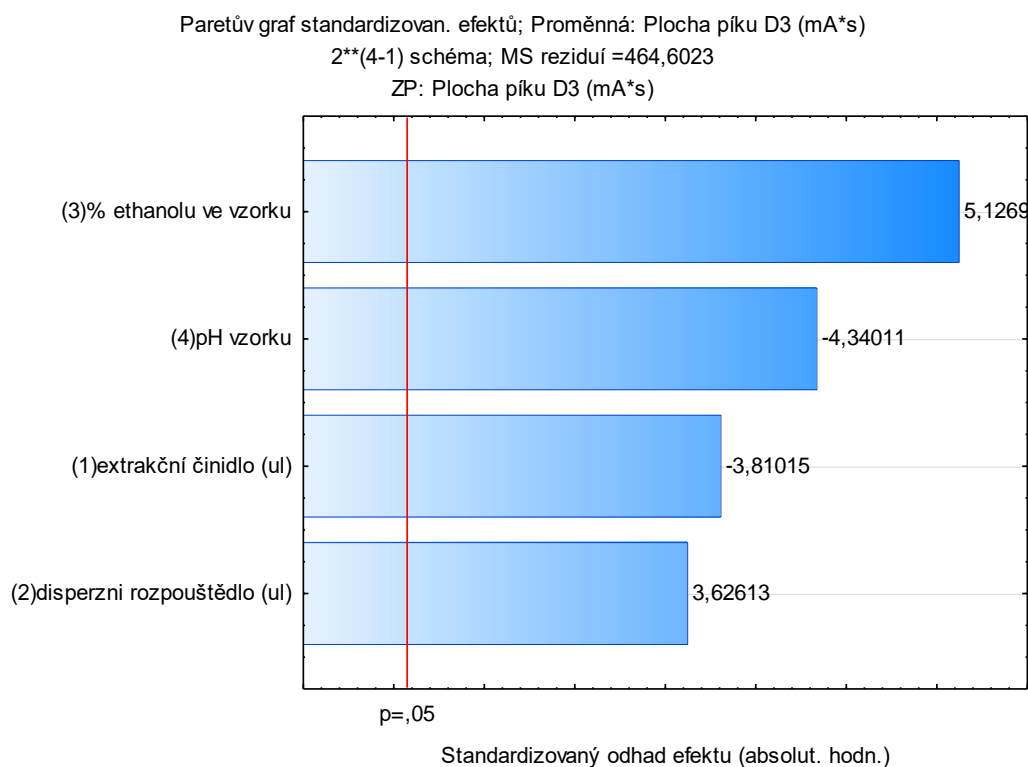


v acetonitrilu. Plocha píku při dávkování 4  $\mu\text{l}$  byla sice menší než po použití oktanolu (Obrázek 14), nicméně na kolonu bylo možné nadávkovat až 20  $\mu\text{l}$  vzorku. Díky tomu se plocha píku vitamínu  $\text{D}_3$  zvětšila o více jak 100 % v porovnání s ředěným oktanolem. Tetrachlormethan byl vybrán jako extrakční rozpouštědlo pro kapalinovou disperzní mikroextrakci.

### 3.3.2 Optimalizace DLLME 1 (DoE 1)

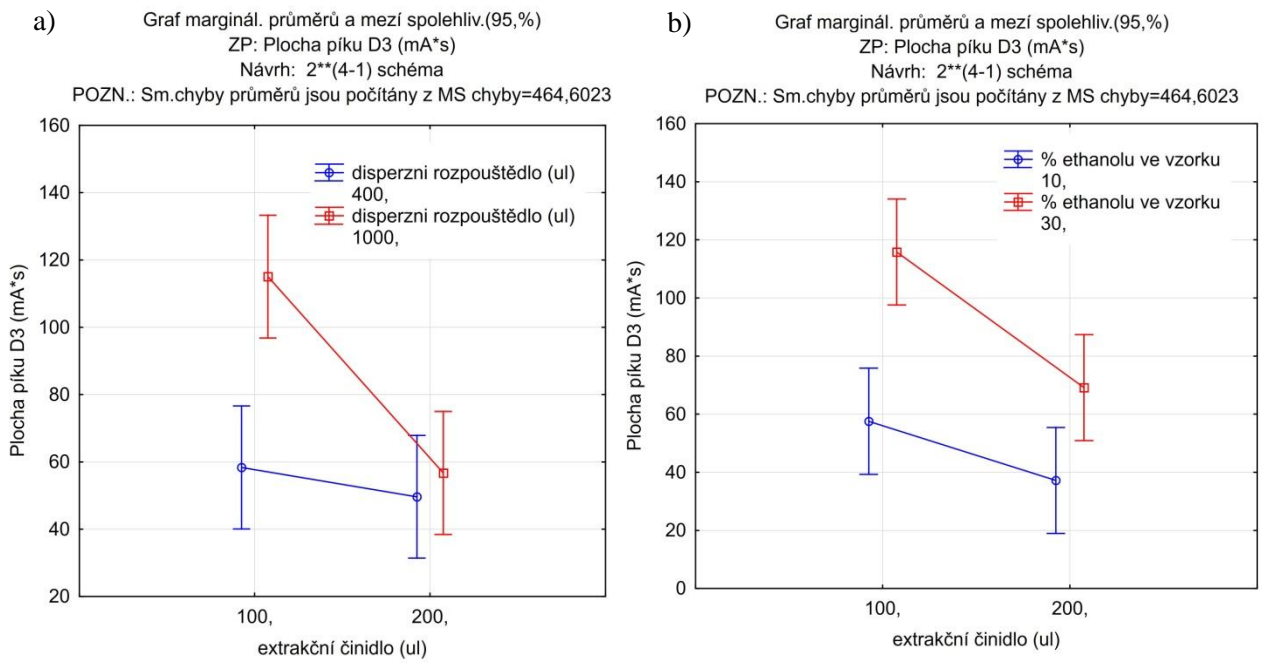
Ke zjištění optimálních podmínek extrakce byla zvolena metoda Plánování experimentu (Desing of Experiment, DoE). Cílem DoE je jednak nalezení vhodných podmínek, ale také to, zda určité faktory mají vliv na sledovanou veličinu - v našem případě koncentraci vitamínu  $\text{D}_3$  v extrakčním rozpouštědle, respective plochu píku vitamínu  $\text{D}_3$ . Z důvodu uspořené času byla optimalizace extrakce provedena ve vodno-ethanolickém roztoku vitamínu  $\text{D}_3$  o koncentraci 10  $\mu\text{g/l}$ , který měl simulovat roztok po zmýdelnění vzorku mléka. Pomocí programu Statistica byly navrženy experimenty pro částečný faktorový experiment se dvěma úrovněmi a jedním centrálním bodem. Jednalo se o nalezení optimálního pH vzorku a množství ethanolu ve vzorku. Dále se k optimalizaci podmínek extrakce zjišťovalo vhodné množství extrakčního a disperzního rozpouštědla. Sledované úrovně byly: 10 nebo 30 % ethanolu, 100 nebo 200  $\mu\text{l}$  extrakčního rozpouštědla, 400 nebo 1000  $\mu\text{l}$  disperzního rozpouštědla a pH 3 nebo 7. Centrální bod tvořila kombinace 20 % ethanolu, 150  $\mu\text{l}$  extrakčního rozpouštědla, 700  $\mu\text{l}$  disperzního rozpouštědla a pH 5. Každá extrakce byla provedena ve třech nezávislých opakování. Přehled experimentů a přesný postup je uveden v Experimentální části v kapitole 2.4.5.

Podle Paretova grafu standardizovaných efektů (Obrázek 15) je patrné, že všechny sledované parametry jsou významné a je nutné je optimalizovat ( $p > 0,05$ ). Čím větší je hodnota  $p$ , tím více ovlivňuje parametr sledovanou veličinu. Nejvýznamnějším parametrem ovlivňujícím výtěžek vitamínu  $\text{D}_3$  ze vzorku je procentuální množství ethanolu ve vzorku a dále pH vzorku. Nejmenší vliv, avšak stále statisticky významný, na extrakci má množství disperzního rozpouštědla.



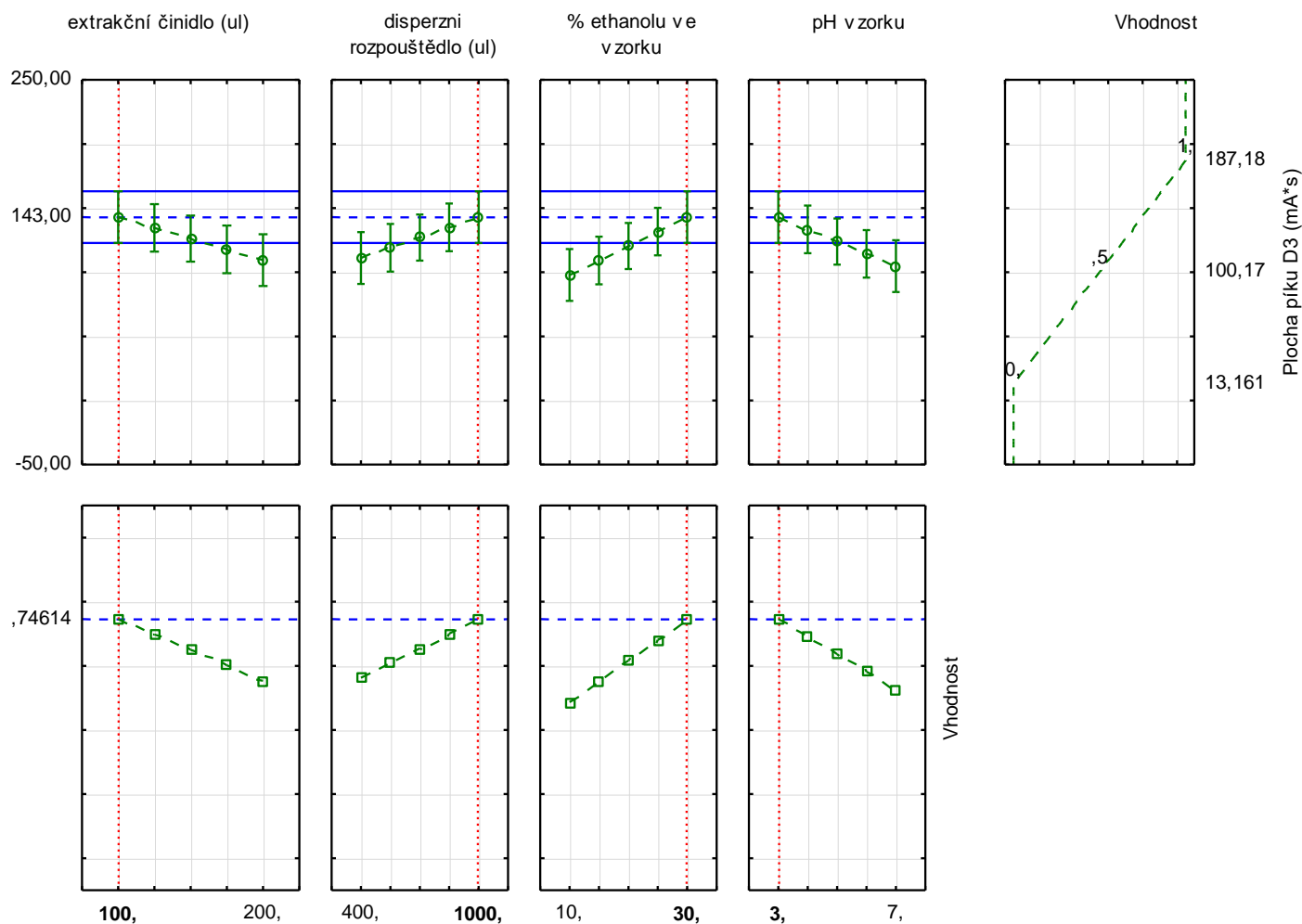
Obrázek 15 Paretův graf standardizovaných efektů vycházející z DoE 1.

Na Obrázku 16a můžeme pozorovat rozdílný vliv extrakčního a disperzního rozpouštědla. Zatímco při použití 400  $\mu$ l disperzního rozpouštědla není významný rozdíl, zda použijeme 100 nebo 200  $\mu$ l extrakčního rozpouštědla. U použití 1000  $\mu$ l disperzního rozpouštědla dochází k významnému poklesu plochy píku při použití 200  $\mu$ l extrakčního rozpouštědla. Plocha píku klesne téměř o 50 %. Obdobně je výtěžek extrakce ovlivněn při použití 30 % ethanolu ve vzorku v kombinaci se 100 nebo 200  $\mu$ l extrakčního rozpouštědla, což je znázorněno na Obrázku 16b. Kompletní výsledky DoE 1 jsou uvedeny v Příloze v Tabulce P3.



Obrázek 16 **Graf marginálních průměrů a mezí spolehlivosti vycházející z DoE 1.**  
**a - extrakční rozpouštědlo vs. disperzní rozpouštědlo**  
**b - extrakční rozpouštědlo vs. % ethanolu ve vzorku**

Na Obrázku 17 jsou uvedeny profily pro předpovědi a vhodnost, které slouží k výběru nejlepších podmínek extrakce s ohledem na získání největší plochy píku vitamínu D<sub>3</sub>. Z tohoto experimentu vychází optimální podmínky 30 % ethanolu ve vzorku, pH 3 a použití směsi 1000 µl disperzního a 100 µl extrakčního rozpouštědla. V Příloze na Obrázku P3 je uvedeno toto vyhodnocení pomocí vrstevnic. Červená barva značí pozitivní hodnoty, které jsou pro experiment vhodné, naproti tomu zelené jsou nevyhovující.

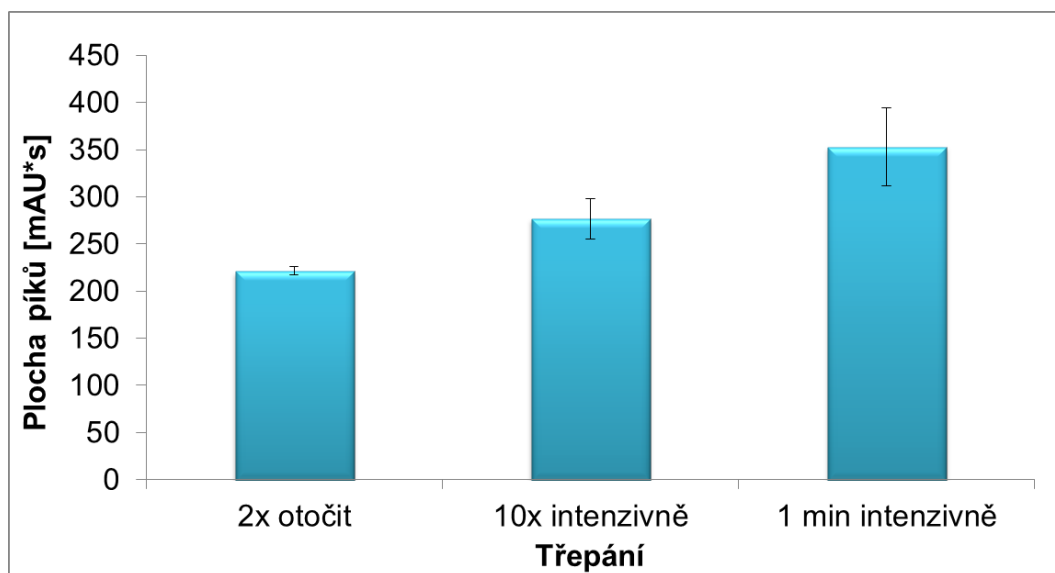


Obrázek 17 **Konečné optimální podmínky DLLME vycházející z DoE 1.**

### 3.3.3 Optimalizace třepání při extrakci

Dalším z faktorů, které by mohly ovlivnit výtěžek extrakce, bylo třepání vzorku po nástřiku směsi rozpouštědel. K optimalizaci byly použity podmínky vycházející z provedeného DoE 1. Byl tedy použit vodno-ethanolický roztok vitamínu D<sub>3</sub> o koncentraci 2,5 µg/l o pH 3 obsahující 30 % ethanolu. Na disperzní kapalinovou mikroextrakci byla použita směs 1000 µl ethanolu jako disperzního rozpouštědla a 100 µl tetrachlormethanu jako extrakčního rozpouštědla. Byly testovány možné způsoby třepání: 2x otočit zkumavkou, 10x intenzivně zatřepat a 1 minutu intenzivně třepat. Extrakt byl odebrán, odpařen pod dusíkem do sucha, zbytek rekonstituován v acetonitrilu a podroben analýze. Sledovanou veličinou byla plocha píku vitamínu D<sub>3</sub>.

Jednotlivé experimenty byly provedeny během tří dnů vždy ve třech nezávislých opakování. Při otočení 2x byly plochy píků menší oproti ostatním zkoušeným parametrům. Bylo zjištěno, že minutové třepání poskytuje nejvyšší výtěžek, nicméně tento způsob nebylo možné použít, protože výsledky v jednotlivých dnech nebyly konstantní. Bylo proto zvoleno 10x intenzivní zatřepání, které přinášelo uspokojivé a stabilní výsledky. Porovnání jednotlivých způsobů třepání je zobrazeno na Obrázku 18.



Obrázek 18 Vliv třepání na výtěžek extrakce, n = 5.

### 3.3.4 Optimalizace hydrolýzy

Pro stanovení vitamínu D<sub>3</sub> v mléčných výrobcích je hydrolýza klíčovým krokem. Dochází při ní k rozložení tuků, uvolnění vitamínů do roztoku, a následně k jejich snadnější extrakci. Optimalizace podmínek hydrolýzy byla provedena po vyhodnocení DoE 1. Získaný hydrolyzovaný a vyčreňovaný vzorek byl poté podroben optimalizované disperzní kapalinové mikroextrakci, tedy 30 % ethanolu ve vzorku, pH vzorku 3 a použití směsi 1000 µl disperzního a 100 µl extrakčního rozpouštědla.

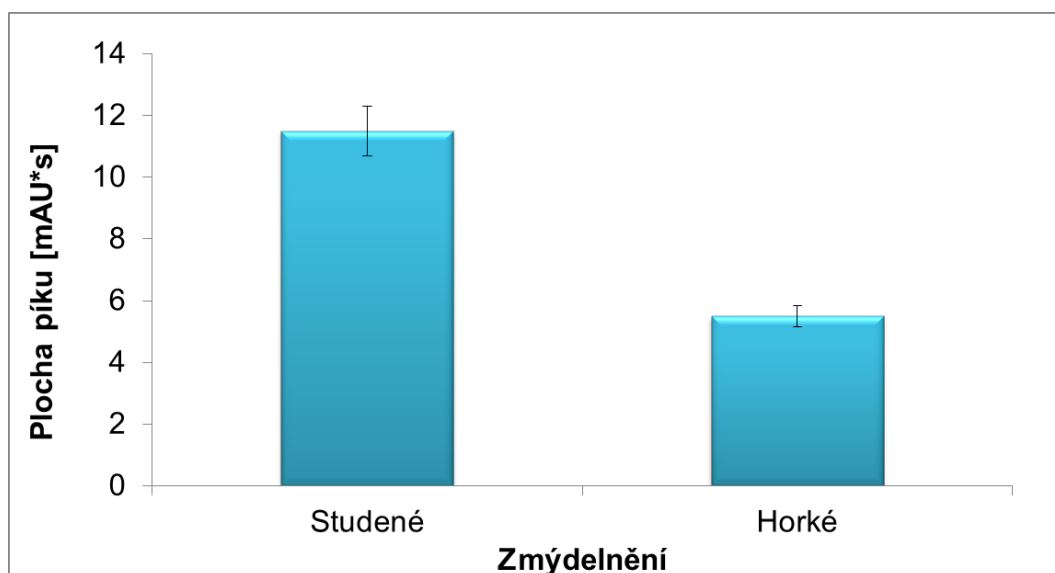
K optimalizaci podmínek hydrolýzy bylo použito 2 ml vzorku plnotučného mléka a 8 ml zmýdelňovací směsi ethanolu a hydroxidu sodného, ve které byla navíc přidána kyselina askorbová jako antioxidant. Do zkumavky byl navíc přidán přídatek vitamínu D<sub>3</sub>. Přidaná koncentrace byla stejná jako při postupu DoE 1, tedy 10 µg/l. Následovalo horké zmýdelnění. Testováno bylo zmýdelnění při 60 °C po dobu 15; 30; 45; 60 a 90 minut. Po úpravě pH na hodnotu 3 (které vyšlo z DoE 1 jako optimální) byly přidány postupně Carrezovo čířidlo I. a Carrezovo čířidlo II. Vždy byl přidán 1 ml čířidla a zkumavka byla promíchána. Mezi jednotlivými časy hydrolýzy nebyl rozdíl, neboť vitamín nebyl ani v jednom chromatogramu vůbec detekován. V oblasti retenčního času vitamínu D<sub>3</sub> nebyl nalezen téměř žádný pík, což je patrné na chromatogramu v Příloze (Obrázek P4). Zjišťovala se tedy příčina ztráty vitamínu D<sub>3</sub>.

Testován byl vliv Carrezových čířidel, zda nedochází k absorpci vitamínu D<sub>3</sub> na vznikající sraženinu hexakynoželeznatanu železnatého. V případě, že nebyly Carrezova čířidla do roztoku přidána, nebylo možné provést disperzní kapalinovou mikroextrakci. Shluky vzniklé po zmýdelnění se usazovaly spolu s tetrachlormethanem na dně zkumavky. Zkoušen byl tedy přídatek polovičního objemu Carrezových čířidel (0,5 + 0,5 ml). Z tohoto pokusu bylo zjištěno, že nebyl patrný rozdíl. Stále nebylo možné pík vitamínu ve vzorku nalézt. Vyčreňování polovičním množstvím Carrezových čířidel bylo dostatečné, a proto k dalším pokusům bylo použito vždy po 0,5 ml každého čířidla. Zabránilo se tak dalšímu ředění vzorku.

Přistoupilo se dále k testování přidávaných kyselin na úpravu pH - kyselina mravenčí, ředěná kyselina chlorovodíková a kyselina askorbová. U žádného z pokusů nebyl vitamín D<sub>3</sub> detekován. Ačkoliv díky optimalizaci DLLME bylo jako optimální pH zvoleno pH 3, byl proveden pokus, jakým způsobem ovlivní pH extrakci po hydrolýze reálného vzorku. Některé zdroje uvádějí, že vitamín D<sub>3</sub> je mírně citlivý až citlivý na kyselé pH [1,4]. Byly testovány

hodnoty pH 3; 4,5; 6; 8,5 a 13. pH 13 odpovídalo neupravenému zmýdelněnému roztoku bez přidání kyseliny. Z tohoto experimentu bylo zjištěno, že pouze při pH 13 je možné vitamín D<sub>3</sub> v reálném vzorku mléka stanovit. Vitamín D<sub>3</sub> byl identifikován na základě retenčního času, UV/Vis spektra a standardního přídávku. Porovnání chromatogramu se standardním přídávkem je zobrazeno v Příloze na Obrázku P5. Plocha píku se se standardním přídávkem zvedla o dvojnásobek, čímž bylo potvrzeno, že námi sledovaný pík odpovídá vitamínu D<sub>3</sub>.

Dále bylo testováno zmýdelnění za studena, které by mohlo vést k menším ztrátám analytu během zmýdelnění. Zmýdelnění za studena probíhalo po celou noc (cca 18 hod). Současně bylo provedeno i horké zmýdelnění při 60 °C po dobu 30 min. Po obou zmýdelnění bylo pH ponecháno na hodnotě 13. Výsledkem bylo zjištění, že zmýdelnění za studena poskytuje vyšší výtěžky a to až dvojnásobné oproti horkému zmýdelnění (Obrázek 19). Pravděpodobně to je dáno částečnou citlivostí vitamínu D<sub>3</sub> k vysoké teplotě.



Obrázek 19 Porovnání studeného a horkého zmýdelnění, n = 3.

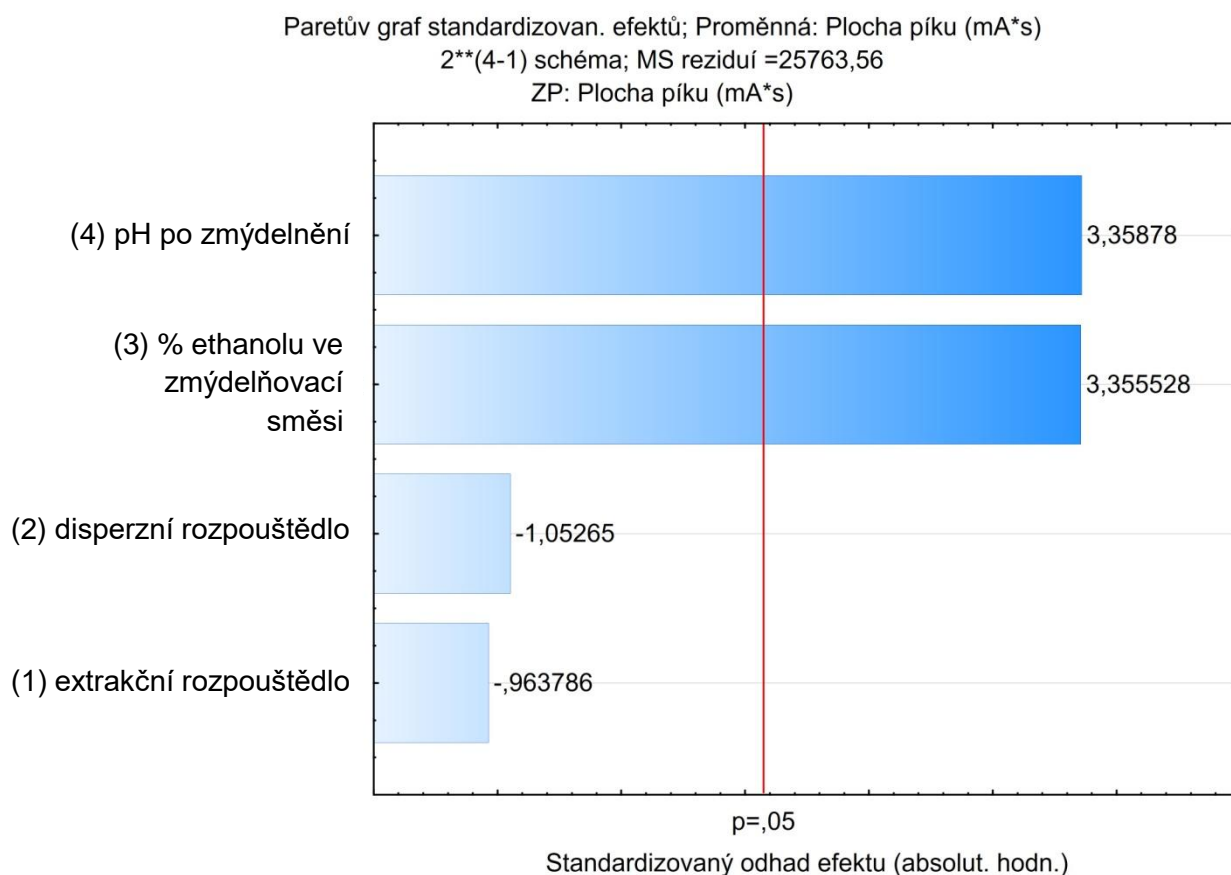
pH 3 vzorku před extrakcí nebylo možné vzhledem k výše zmíněným skutečnostem použít. Z tohoto důvodu bylo nutné opakovat optimalizaci disperzní kapalinové mikroextrakce. Tentokrát byla extrakce optimalizována na vzorku mléka s přidáním vitamínu D<sub>3</sub> s využitím studeného zmýdelnění po celou noc (cca 18 hodin) a pH vzorku od 3 do 13.

### 3.3.5 Optimalizace podmínek DLLME 2 (DoE 2)

Při použití podmínek vycházejících z DoE 1 na reálné vzorky mléka došlo ke zjištění, že složky v matici mléčných výrobcích silně ovlivňují výtěžek vitamínu D<sub>3</sub>. Bylo tedy nutno provést nový plánovaný experiment, který bude zahrnovat vliv matrice, hydrolýzy i extrakce. Tentokrát bylo jako vzorek použito plnotučné mléko, do kterého byl přidán vitamín D<sub>3</sub>. Výsledná koncentrace vitamínu D<sub>3</sub> ve zkumavce obsahující 2 ml mléka a 8 ml zmýdelňovací směsi ethanolu a NaOH byla 10 µg/l. Pomocí programu Statistica byly navrženy experimenty pro částečný faktorový experiment se dvěma úrovněmi a jedním centrálním bodem. Byla snaha zjistit optimální procentuální množství ethanolu ve zmýdelňovací směsi (10 nebo 30 %), pH po hydrolýze (3 nebo 13), množství extrakčního rozpouštědla (100 nebo 200 µl) a disperzního rozpouštědla (400 nebo 1000 µl) na DLLME. Centrální bod tvořila kombinace 20 % ethanolu ve zmýdelňovací směsi, pH po hydrolýze 8 a směs rozpouštědel na DLLME v poměru 150 µl extrakčního a 700 µl disperzního rozpouštědla. Každý pokus byl proveden ve třech nezávislých opakování. Přehled experimentů je uveden v Experimentální části v kapitole 2.4.6. Sledovanou veličinou byla plocha píku vitamínu D<sub>3</sub>.

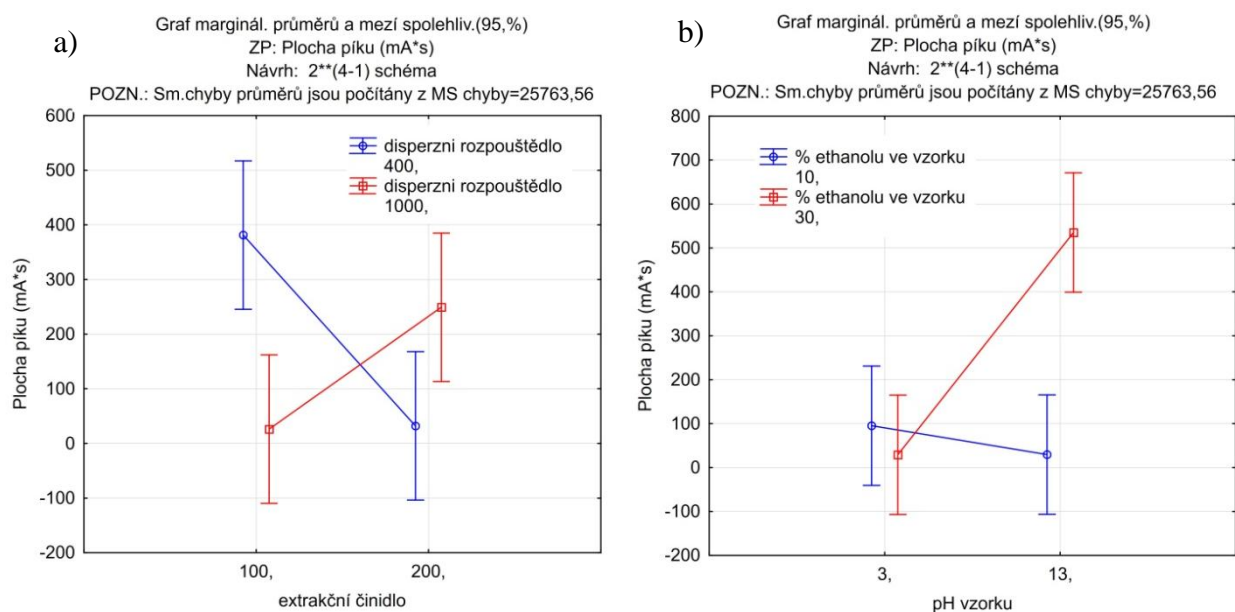
Podle Paretova grafu standardizovaných efektů (Obrázek 20) můžeme vidět, že výsledky jsou rozdílné oproti DoE 1. Z Paretova grafu je patrné, že vliv pH i vliv % ethanolu ve zmýdelňovací směsi byly stejně významné a prakticky jen tyto parametry ovlivňovaly výtěžek extrakce. Zanedbatelný byl vliv disperzního a extrakčního rozpouštědla ( $p < 0,05$ ).





Obrázek 20 Paretův graf standardizovaných efektů vycházející z DoE 2.

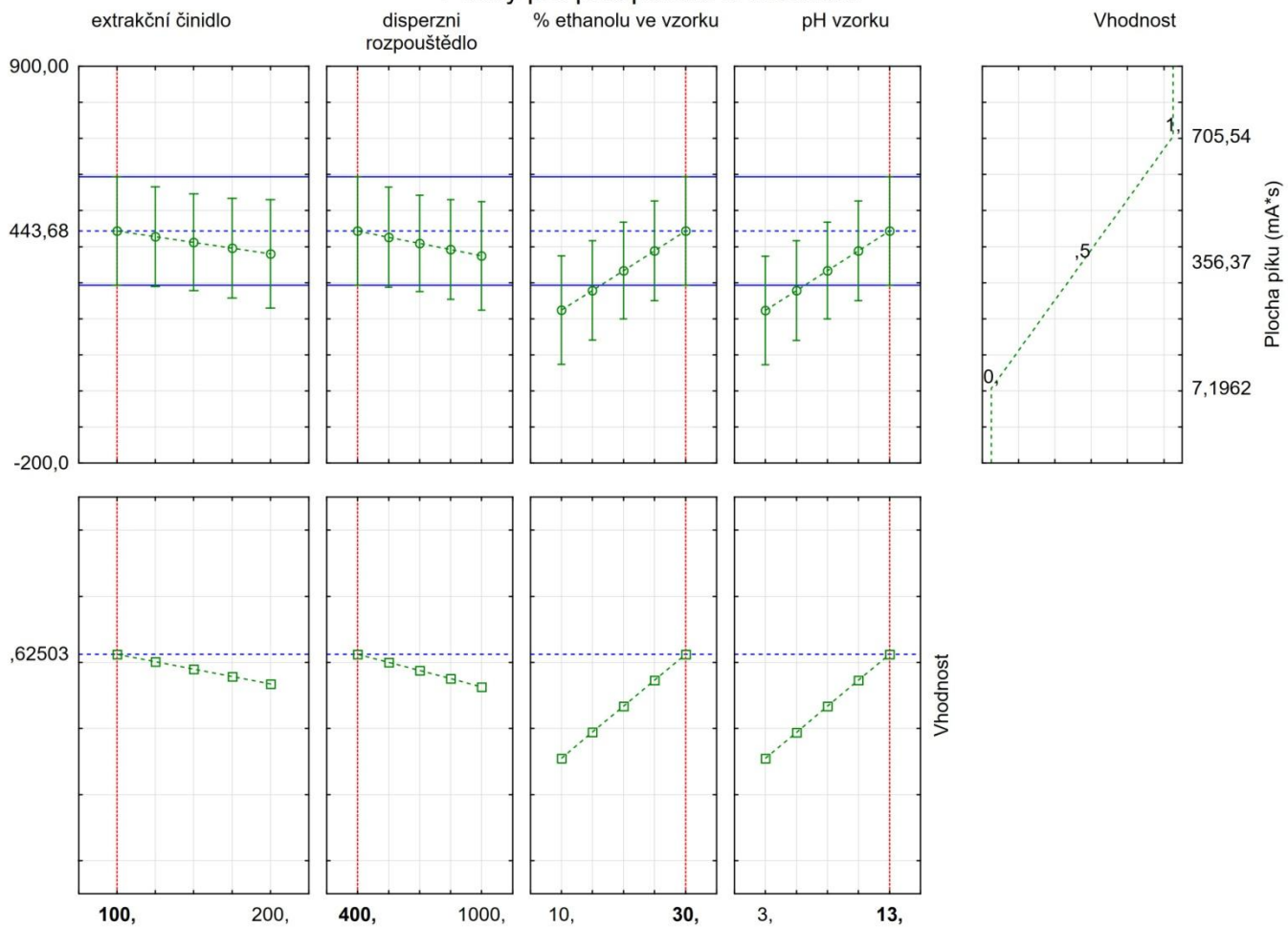
Při použití 400  $\mu$ l disperzního rozpouštědla klesá plocha píku s rostoucím množstvím extrakčního rozpouštědla o více než 95 %. U použití 1000  $\mu$ l disperzního rozpouštědla je závislost naopak - s rostoucím množstvím extrakčního rozpouštědla roste plocha píku. Tyto závislosti jsou ukázány na Obrázku 21a. Na Obrázku 21b můžeme pozorovat vliv procentuálního obsahu ethanolu ve zmýdelňovací směsi a vliv pH na výtěžek stanovení vitamínu D<sub>3</sub> ze vzorku. Plocha píku byla nižší opět o více jak 95 % při použití 30 % ethanolu a pH 3 oproti pH 13. Při použití 10 % je vliv pH naopak opačný. Vyšší pH poskytuje mírně horší výtěžek.



**Obrázek 21 Graf marginálních průměrů a mezí spolehlivosti vycházející z DoE 2.**  
**a - extrakční rozpouštědlo vs. disperzní rozpouštědlo**  
**b - pH vzorku vs. % ethanolu ve vzorku**

Z DoE 2 bylo zjištěno, že vliv pH byl nejvýznamnějším parametrem stanovení. Na Obrázku 22 jsou uvedeny profily pro předpovědi a vhodnost stanovení, které slouží k výběru nejlepších podmínek extrakce s ohledem na získání největší plochy píku vitamínu D<sub>3</sub>. Z tohoto porovnání můžeme potvrdit, že vliv extrakčního a disperzního rozpouštědla byl zanedbatelný. Oproti tomu výtěžky vitamínu D<sub>3</sub> rapidně klesají s klesajícím pH a klesajícím procentuálním obsahem ethanolu ve zmýdelňovací směsi. Jako optimální podmínky z DoE 2 vycházelo tedy použití 30 % ethanolu ke zmýdelnění, po zmýdelnění ponechání pH 13 a použití směsi 400 µl disperzního a 100 µl extrakčního rozpouštědla k disperzní kapalinové mikroextrakci. Tyto podmínky byly dále použity na získání kalibrační závislosti vitamínu D<sub>3</sub> a ke stanovení vitamínu D<sub>3</sub> v reálných vzorcích mléčných výrobků. V Příloze na Obrázku P6 je uvedeno toto vyhodnocení pomocí vrstevnic. Červená barva značí pozitivní hodnoty, které jsou pro experiment vhodné, naproti tomu zelené jsou nevyhovující. Kompletní výsledky DoE 2 jsou uvedeny v Příloze v Tabulce P4.

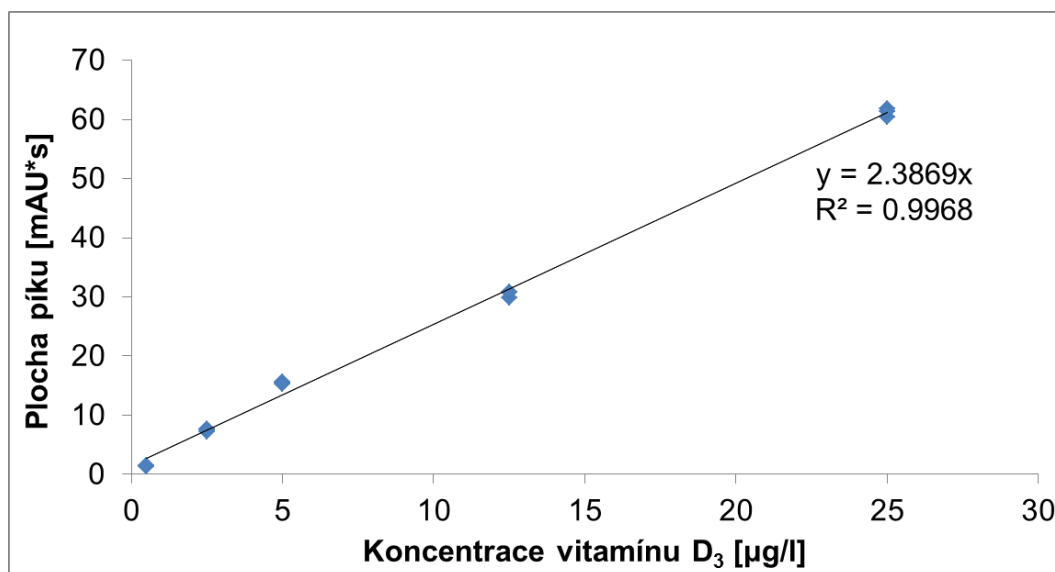
### Profily pro předpovědi a vhodnost



Obrázek 22 Profily pro předpovědi a vhodnost vycházející z DoE 2.

### 3.3.6 Kalibrace vitamínu D<sub>3</sub> s vlivem matrice a extrakce

Ke kvantifikaci vitamínu D<sub>3</sub> ve vzorcích mléčných výrobků byla použita metoda kalibrační křivky. Kalibrace byla provedena po zjištění nevyhovujících výsledků DoE 1 také jako DoE 2 do mléka. Zahrnovala tak vliv matrice, hydrolýzy i extrakce. Kalibrace byla provedena v koncentračním rozsahu 0,5–25 µg/l vitamínu D<sub>3</sub> v mléce. Jelikož byla kalibrace provedena v mléce obohaceném o vitamín D<sub>3</sub>, bylo nutné od každého výsledku odečíst hodnotu slepého pokusu, který byl proveden bez námi přidaného vitamínu D<sub>3</sub>. Každý kalibrační bod včetně slepého pokusu byl proveden ve třech nezávislých opakování. Diagnostika regrese a významnost regresních parametrů byla ověřena studentovým t-testem v programu QC Expert. Dále byla testována významnost absolutního členu na hranici pravděpodobnosti  $p = 0,05$ ,  $p$  úseku vyšlo 0,116. Program vyhodnotil úsek regresní křivky jako nevýznamný ( $p > 0,05$ ), proto nebyl při výpočtech obsahu vitamínu D<sub>3</sub> v reálných vzorcích zahrnut. Kompletní výsledky kalibrační závislosti jsou uvedeny v Příloze v Tabulce P5. Graf kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci vitamínu D<sub>3</sub> je uveden na Obrázku 23.



Obrázek 23 Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci vitamínu D<sub>3</sub>.

Pomocí programu EffiValidation byl QC koeficient vypočítán na 4,43 % a korelační koeficient regresní závislosti měl hodnotu 0,9968. Korelační koeficient by měl mít hodnotu  $> 0,999$ , nicméně QC koeficient splňuje kritérium přijatelnosti, které je pro QC koeficient  $< 5 \%$ , proto může být závislost považována za lineární v uvedeném koncentračním rozsahu.

Validovanými parametry byla správnost vyjádřená jako výtěžnost a přesnost vyjádřená jako opakovatelnost pomocí relativní směrodatné odchylky (RSD). Přesnost a správnost byly hodnoceny na třech koncentračních úrovních: 0,1; 1 a 5 µg/l. Hodnotící kritéria přesnosti jsou převzata z publikace *Guidelines for Standard Method Performance Requirements* [61]. Výsledky validace metody jsou uvedeny v Tabulce 17. Metoda splňovala validační kritéria a byla shledána vyhovující ke kvantifikaci vitamínu D<sub>3</sub> ve vzorcích mléka a mléčných výrobců. Vyhodnocení mezilehlé přesnosti nebylo s časových důvodů provedeno.

Tabulka 17 **Validace kalibrace vitamínu D<sub>3</sub> s vlivem matrice a extrakce.**

Koncentrace [µg/l]	Přesnost		Správnost	
	Opakovatelnost (RSD) [%]	Kritérium přijatelnosti [%]	Výtěžnost [%]	Kritérium přijatelnosti [%]
<b>2,5</b>	3,4	<21	114,5	60–115
<b>12,5</b>	1,7	<15	102,2	80–110
<b>25,0</b>	1,2	<15	102,4	80–110

Dalším důležitým kritériem při validaci metody je mez detekce a mez stanovitelnosti, tedy nejnižší možné koncentrace, které lze metodou stanovit. Z chromatogramů byl vyhodnocen šum a podle lineární závislosti výšky píku na koncentraci byla spočítána mez detekce a mez stanovitelnosti. Mez detekce byla stanovena na 0,6 µg/l a mez stanovitelnosti 2,1 µg/l. V porovnání s instrumentální kalibrací jsme díky zakoncentrování schopni stanovit až 5x nižší koncentraci vitamínu D<sub>3</sub> ve vzorku.

V porovnání s obdobnou metodou [41] byla naší metodou stanovena nižší mez stanovitelnosti až o 30 % a nepatrně nižší i mez detekce. Naproti tomu Viñas a kolektiv [74] stanovili mez detekce 0,4 µg/l a mez stanovitelnosti 1,3 µg/l, což je o více než 35 % nižší hodnota, kterou lze kvantifikovat. Při použití metody HPLC-MS [69] lze stanovit mez detekce 0,8 µg/l a mez stanovitelnosti 1,6 µg/l.

### 3.4 Zpracování reálných vzorků s vitamínem D<sub>3</sub>

Po optimalizaci a validaci byla metoda otestována na reálných vzorcích mléka a mléčných výrobků obohacených vitamínem D<sub>3</sub>. Ke stanovení bylo použito polotučné a plnotučné mléko, Actimel a Nesquik nápoj. Seznam vzorků včetně složení je uveden v Experimentální části v kapitole 2.3.

Každý vzorek byl zpracován již uvedenými způsoby ve třech nezávislých opakování a koncentrace byla vyhodnocena pomocí kalibrační závislosti. V Tabulce 18 jsou uvedeny konečné výsledky koncentrace vitamínu D<sub>3</sub> v jednotlivých vzorcích. Chromatogram vzorku polotučného mléka je uveden v Příloze na Obrázku P6. V Tabulce P6 v Příloze jsou uvedeny výsledky měření vzorků.

Tabulka 18 Výsledky stanovení vitamínu D<sub>3</sub> v mléčných výrobcích, n = 3.

Vzorek	Deklarovaná hodnota vitamínu D <sub>3</sub> [µg/l]	Stanovená hodnota vitamínu D <sub>3</sub> [µg/l]
<b>Polotučné mléko Kunín</b>	7,5	7,88 ± 0,17
<b>Plnotučné mléko Kunín</b>	7,5	7,66 ± 0,55
<b>Actimel</b>	7,5	6,39 ± 0,54
<b>Nesquik čokoládový nápoj</b>	7,5	6,25 ± 0,90

Vzorky mléka, neobsahující žádné další rušící složky, se nejvíce přiblížily uváděné koncentraci vitamínu D<sub>3</sub>, který uvádí výrobce na obalu. Deklarovaná koncentrace vitamínu D<sub>3</sub> byla pro všechny vzorky 7,5 µg/l. Větší rozdíly byly u vzorku Actimel, kde je mimo jiné možný také vliv přidaných jogurtových kultur *L. casei*. U vzorku čokoládového nápoje Nesquik vyšla hodnota nejnižší, což může být způsobeno řadou dalších přítomných složek ve vzorku, například velkým množstvím sacharidů a poměrně velkým množstvím bílkovin.

## 4. ZÁVĚR

Cílem této práce byla optimalizace podmínek separace vitamínů řady D pomocí kapalinové chromatografie a úkolem bylo metodu validovat. Dalším krokem bylo provést optimalizaci podmínek přípravy vzorku a vlastní extrakční techniku disperzní kapalinové mikroextrakce.

K separaci vitamínu D od ostatních částí matrice bylo testováno několik chromatografických kolon s různou délkou a chemií stacionární fáze, z nichž se podařilo nalézt vhodnou kolonu Ascentis Express C18. Na této koloně bylo současně možné separovat také vitamín D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub>. Vhodnou mobilní fází byla směs okyseleného acetonitrilu i vody s 0,1 % kyseliny mravenčí.

Podařilo se nalézt optimální podmínky pro přípravu vzorku, která zahrnovala studenou hydrolyzu přes noc a disperzní kapalinovou mikroextrakci. Za extrakční rozpouštědlo byl zvolen tetrachlormethan. Po několika experimentech bylo zjištěno, že je nutné udržovat pH vzorku v zásadité oblasti, neboť vitamín D v přítomnosti složek matrice vzorku působením kyselin degraduje. Dále bylo zjištěno, že kvůli jeho tepelné nestabilitě je vhodnější použít zmýdelnění za studena přes noc, které poskytuje až dvojnásobné výtěžky oproti horkému zmýdelnění při 60 °C. Ke zmýdelnění byla jako optimální zjištěna směs 30 % ethanolu a 70 % 1 M hydroxidu sodného s 1 % kyseliny askorbové jako antioxidantu. K nalezení vhodných podmínek extrakce byla využita metoda Plánovaného experimentu. Nejlepších výsledků DLLME bylo dosaženo s 400 µl ethanolu jako disperzního rozpouštědla a 100 µl tetrachlormethanu jako extrakčního rozpouštědla. Nejnižší možné množství vitamínu D<sub>3</sub> ve vzorku, které lze stanovit touto metodou bylo 2,1 µg/l.

Optimalizovaná a validovaná metoda byla použita pro stanovení vitamínu D<sub>3</sub> ve čtyřech reálných vzorcích mléka a mléčných výrobků fortifikovaných vitamínem D<sub>3</sub>. Ve všech vzorcích byly nalezeny podobné koncentrace cholekalciferolu, jaké deklaroval výrobce. Metoda tedy hodnocena jako vhodná pro stanovení vitamínu D<sub>3</sub> v mléce a mléčných výrobcích. Pro vzorky jogurtů a dalších kvašených mléčných výrobků obsahujících vitamín D<sub>3</sub> by bylo vhodné provést optimalizaci hydrolyzy samostatně z důvodu obsahu většího množství bílkovin a sacharidů.

## 5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. SKIBSTED L. H., RISBO J., ANDERSEN M. L., *Chemical deterioration and physical instability of food and beverages*. Woodhead Publishing 2010, ISBN 978-1-84569-495-1.
2. FANALI S., HADDAD P. R., POOLE C. F., SCHOENMAKERS P., LLOYD D., *Liquid Chromatography Applications*. Elsevier 2017, ISBN 978-0-12-415806-1.
3. ZHANG Y., ZHOU W. E., YAN J. Q., LIU M., ZHOU Y., SHEN X., MA Y. L., FENG X. S., YANG J., LI G. H., *A Review of the Extraction and Determination Methods of Thirteen Essential Vitamins to the Human Body: An Update from 2010*. *Molecules* 2018, 23.
4. FANALI C., D'ORAZIO G., FANALI S., GENTILI A., *Advanced analytical techniques for fat-soluble vitamin analysis*. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 2017, 87, 82-97.
5. BENVENUTO M. A., *Industrial Chemistry*. De Gruyter 2015, ISBN 978-3-11-035169-9.
6. EAGRI, *Resortní portál Ministerstva zemědělství* 2019, [online]. Dostupné z <http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/ostatni/100065067.html>.
7. RATHI D. N., LIEW C. Y., FAIRULNIZAL M. N. M., ISAMEYAH D., BARKNOWITZ G., *Fat-Soluble Vitamin and Carotenoid Analysis in Cooking Oils by Ultra-Performance Convergence Chromatography*. *Food Analytical Methods* 2017, 10, 1087-1096.
8. WIKIWAND, 2019, [online]. Dostupné z <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/09/Retinol.png/400px-Retinol.png>.
9. *Fykologická laboratoř na katedře botaniky Přírodovědecké fakulty JU v Českých Budějovicích* 2019, [online]. Dostupné z [http://www.sinicearasy.cz/files/beta\\_karoten.gif](http://www.sinicearasy.cz/files/beta_karoten.gif).
10. KODÍČEK M., *Biochemické pojmy, výkladový slovník* 2019, [online]. Dostupné z [https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002/equations/tokoferol.01.gif](https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-002/equations/tokoferol.01.gif).
11. GIMENEZ T., MULA D., GEA-BOTELLA S., MARTINEZ-MADRID M. C., MARTI N., VALERO M., SAURA D., *Lipase catalyzed deacidification of tocopherol-rich distillates obtained from natural Vitamin E sources*. *Process Biochemistry* 2019, 77, 70-76.
12. WIKIPEDIA, 2019, [online]. Dostupné z [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/93/Phylloquinone\\_structure.svg/1280px-Phylloquinone\\_structure.svg.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/93/Phylloquinone_structure.svg/1280px-Phylloquinone_structure.svg.png).



13. BRESSON J. L., BURLINGAME B., DEAN T., FAIRWEATHER-TAIT S., HEINONEN M., HIRSCH-ERNST K. I., MANGELSDORF I., MCARDLE H., NASKA A., NEUHAUSER-BERTHOLD M., NOWICKA G., PENTIEVA K., SANZ Y., SIANI A., SJODIN A., STERN M., TOME D., TURCK D., VAN LOVEREN H., VINCETI M., WILLATTS P., NUTRITION E. P. D. P., *Dietary reference values for vitamin D*. Efsa Journal 2016, 14.
14. QUESADA-GOMEZ J. M., BOUILLON R., *Is calcifediol better than cholecalciferol for vitamin D supplementation?* Osteoporosis International 2018, 29, 1697-1711.
15. BYRDWELL W. C., *Comparison of Analysis of Vitamin D-3 in Foods Using Ultraviolet and Mass Spectrometric Detection*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2009, 57, 2135-2146.
16. LAMBERG-ALLARDT C., *Vitamin D in foods and as supplements*. Progress in Biophysics & Molecular Biology 2006, 92, 33-38.
17. KUHN J., SCHROTER A., HARTMANN B. M., STANGL G. I., *Cocoa and chocolate are sources of vitamin D-2*. Food Chemistry 2018, 269, 318-320.
18. KOYYALAMUDI S. R., JEONG S.-C., PANG G., TEAL A., BIGGS T., *Concentration of vitamin D2 in white button mushrooms (Agaricus bisporus) exposed to pulsed UV light*. Journal of Food Composition and Analysis 2011, 24, 976-979.
19. LU Z., CHEN T. C., ZHANG A., PERSONS K. S., KOHN N., BERKOWITZ R., MARTINELLO S., HOLICK M. F., *An evaluation of the vitamin D-3 content in fish: Is the vitamin D content adequate to satisfy the dietary requirement for vitamin D?* Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 2007, 103, 642-644.
20. PLUDOWSKI P., HOLICK M. F., GRANT W. B., KONSTANTYNOWICZ J., MASCARENHAS M. R., HAQ A., POVOROZNYUK V., BALATSKA N., BARBOSA A. P., KARONOVA T., RUDENKA E., MISIOROWSKI W., ZAKHAROVA I., RUDENKA A., LUKASZKIEWICZ J., MARCINOWSKA-SUCHOWIERSKA E., LASZCZ N., ABRAMOWICZ P., BHATTO H. P., WIMALAWANSA S. J., *Vitamin D supplementation guidelines*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 2018, 175, 125-135.
21. VAN DEN OUWELAND J. M. W., *Analysis of vitamin D metabolites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. TRAC Trends in Analytical Chemistry 2016, 84, 117-130.
22. GALIOR K., KETHA H., GREBE S., SINGH R. J., *10 years of 25-hydroxyvitamin-D testing by LC-MS/MS-trends in vitamin-D deficiency and sufficiency*. Bone Reports 2018, 8, 268-273.

23. WIMALAWANSA S. J., RAZZAQUE M. S., AL-DAGHRI N. M., *Calcium and vitamin D in human health: Hype or real?* The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 2018, 180, 4-14.
24. PEARCE S. H. S., CHEETHAM T. D., *Diagnosis and management of vitamin D deficiency.* British Medical Journal 2010, 340.
25. CHIRKIN V. A., KARPOV S. I., SELEMENEV V. F., SHUMSKIY N. I., *Determination of fat-soluble vitamins in foods, vitamin and mineral formulations, feed premixes, and blood serum by reversed-phase HPLC.* Journal of Analytical Chemistry 2013, 68, 748-753.
26. SAARELA M., *Functional foods.* Woodhead Publishing 2011, ISBN 978-0-85709-255-7.
27. KAUSHIK R., SACHDEVA B., ARORA S., KAPILA S., WADHWA B. K., *Bioavailability of vitamin D2 and calcium from fortified milk.* Food Chemistry 2014, 147, 307-311.
28. BRADY S. R. E., NADERPOOR N., DE COURTEN M. P. J., SCRAGG R., CICUTTINI F., MOUSA A., DE COURTEN B., *Vitamin D supplementation may improve back pain disability in vitamin D deficient and overweight or obese adults.* The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 2019, 185, 212-217.
29. LEE S., ONCESCU V., MANCUSO M., MEHTA S., ERICKSON D., *A smartphone platform for the quantification of vitamin D levels.* Royal Society of Chemistry 2014, 14, 1437-1442.
30. *Laboratorní technika* 2019, [online]. Dostupné z <http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech/pages/extrakce.html>.
31. SELF R., *Extraction of Organic Analytes from Foods – A Manual of Methods.* Royal Society of Chemistry 2005, ISBN 978-0-85404-592-1.
32. MOUSAVI L., TAMIJI Z., KHOSHAYAND M. R., *Applications and opportunities of experimental design for the dispersive liquid–liquid microextraction method – A review.* Talanta 2018, 190, 335-356.
33. BERK Z., *Food Process Engineering and Technology.* Elsevier 2018, ISBN 978-0-12-812018-7.
34. STANBURY P. F., WHITAKER A., HALL S. J., *Principles of Fermentation Technology.* Elsevier 2017, ISBN 978-0-08-099953-1.
35. WIKIBOOKS, 2019, [online]. Dostupné z [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d1/Liquid\\_liquid\\_extraction.png/220px-Liquid\\_liquid\\_extraction.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d1/Liquid_liquid_extraction.png/220px-Liquid_liquid_extraction.png).
36. ANDERSON J. L., BERTHOD A., ESTÉVEZ V. P., STALCUP A. M., *Analytical Separation Science.* John Wiley & Sons 2015, ISBN 978-3-527-33374-5.

37. GAÑÁN J., PÉREZ-QUINTANILLA D., MORANTE-ZARCERO S., SIERRA I., *Comparison of different mesoporous silicas for off-line solid phase extraction of 17 $\beta$ -estradiol from waters and its determination by HPLC-DAD*. Journal of Hazardous materials 2013, 260, 609-617.
38. LEONG M.-I., FUH M.-R., HUANG S.-D., *Beyond dispersive liquid–liquid microextraction*. Journal of Chromatography A 2014, 1335, 2-14.
39. NÚÑEZ O., GALLART-AYALA H., MARTIN C. P. B., LUCCI P., *Fast Liquid Chromatography – Mass Spectrometry Methods in Food and Environmental Analysis*. World Scientific 2015, ISBN 978-1-78326-494-0.
40. VIÑAS P., PASTOR-BELDA M., CAMPILLO N., BRAVO-BRAVO M., HERNÁNDEZ-CÓRDOBA M., *Capillary liquid chromatography combined with pressurized liquid extraction and dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of vitamin E in cosmetic products*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2014, 94, 173-179.
41. KAMANKESH M., SHAHDOOSTKHANY M., MOHAMMADI A., MOLLAHOSSEINI A., *Fast and sensitive low density solvent-based dispersive liquid–liquid microextraction method combined with high-performance liquid chromatography for determining cholecalciferol (vitamin D3) in milk and yogurt drink samples*. Analytical Methods 2018, 10, 975-982.
42. ŠANDREJOVÁ J., CAMPILLO N., VIÑAS P., ANDRUCH V., *Classification and terminology in dispersive liquid–liquid microextraction*. Microchemical Journal 2016, 127, 184-186.
43. ZGOLA-GRZESKOWIAK A., GRZESKOWIAK T., *Dispersive liquid-liquid microextraction*. Trac-Trends in Analytical Chemistry 2011, 30, 1382-1399.
44. WOJNOWSKI W., NAMIEŚNIK J., PŁOTKA-WASYLKA J., *Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry for in situ determination of biogenic amines in meat: Estimation of meat's freshness*. Microchemical Journal 2019, 145, 130-138.
45. ABUJABER F., CORPS RICARDO A. I., RÍOS Á., GUZMÁN BERNARDO F. J., RODRÍGUEZ MARTÍN-DOIMEADIOS R. C., *Ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction combined with LC-UV-Vis for the fast and simultaneous determination of cortisone and cortisol in human saliva samples*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2019, 165, 141-146.

46. TEGLIA C. M., GONZALO L., CULZONI M. J., GOICOCHEA H. C., *Determination of six veterinary pharmaceuticals in egg by liquid chromatography: Chemometric optimization of a novel air assisted-dispersive liquid-liquid microextraction by solid floating organic drop*. Food Chemistry 2019, 273, 194-202.
47. ASGHARI A., FAHIMI E., BAZREGAR M., RAJABI M., BOUTORABI L., *Rapid determination of some psychotropic drugs in complex matrices by tandem dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography B 2017, 1052, 51-59.
48. AL-SAIDI H. M., EMARA A. A. A., *The recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction for preconcentration and determination of inorganic analytes*. Journal of Saudi Chemical Society 2014, 18, 745-761.
49. IAN D. WILSON C. F. P., *Handbook of Methods and Instrumentation in Separation Science*. Elsevier 2009, ISBN 978-0-12-375727-2.
50. RAITH K., FARWANAH H., WARTEWIG S., NEUBERT R. H. H., *Progress in the analysis of Stratum corneum ceramides*. European Journal of Lipid Science and Technology 2004, 106, 561-571.
51. FEKETE S., SCHAPPLER J., VEUTHEY J. L., GUILLARME D., *Current and future trends in UHPLC*. Trac-Trends in Analytical Chemistry 2014, 63, 2-13.
52. *Laboratory info, High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principle, Types, Instrumentation and Applications* 2019, [online]. Dostupné z <https://laboratoryinfo.com/wp-content/uploads/2015/07/High-performance-liquid-chromatography-hplc.jpg>.
53. ARMAREGO W. L. E., CHAI C. L. L., *Purification of Laboratory Chemicals*. Elsevier 2003, ISBN 0-7506-7571-3.
54. FEKETE S., OLÁH E., FEKETE J., *Fast liquid chromatography: The domination of core-shell and very fine particles*. Journal of Chromatography A 2012, 1228, 57-71.
55. SIGMA-ALDRICH, *Ascentis Express C18 HPLC Columns* 2019, [online]. Dostupné z <https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=17841440>.
56. HAYES R., AHMED A., EDGE T., ZHANG H., *Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A 2014, 1357, 36-52.

57. PHENOMENEX, *Improve HPLC/UHPLC Sensitivity, Efficiency and Performance with Kinetex Core Shell Columns* 2019, [online]. Dostupné z [https://phenomenex.blob.core.windows.net/cdn/Content/Images/kinetexNew/coreShell/core\\_direction\\_en.png](https://phenomenex.blob.core.windows.net/cdn/Content/Images/kinetexNew/coreShell/core_direction_en.png).
58. *Core-Shell Technology – HPLC, GC, SPE* 2019, [online]. Dostupné z [http://gclceblast.weebly.com/uploads/6/4/8/9/6489958/9780072\\_orig.png](http://gclceblast.weebly.com/uploads/6/4/8/9/6489958/9780072_orig.png).
59. *Royal Society of Chemistry* 2019, [online]. Dostupné z <https://www.rsc.org/publishing/journals/prospect/ontology.asp?id=CMO:0002503&MSID=B101354H>.
60. *ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2 (R1)*. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use 2005.
61. *AOAC International, AOAC Official Methods of Analysis*. Guidelines for Standard Method Performance Requirements Appendix F. 2012.
62. KASALOVA E., AUFARTOVA J., KRCMOVA L. K., SOLICHOVA D., SOLICH P., *Recent trends in the analysis of vitamin D and its metabolites in milk - A review*. Food Chemistry 2015, 171, 177-190.
63. PERALES S., ALEGRIA A., BARBERA R., FARRE R., *Review: Determination of vitamin D in dairy products by high performance liquid chromatography*. Food Science and Technology International 2005, 11, 451-462.
64. STROBEL N., BUDDHADASA S., ADORNO P., STOCKHAM K., GREENFIELD H., *Vitamin D and 25-hydroxyvitamin D determination in meats by LC-IT-MS*. Food Chemistry 2013, 138, 1042-1047.
65. LOEWEN A., CHAN B., LI-CHAN E. C. Y., *Optimization of vitamins A and D3 loading in re-assembled casein micelles and effect of loading on stability of vitamin D3 during storage*. Food Chemistry 2018, 240, 472-481.
66. DIKEMAN M., DEVINE C., *Encyclopedia of Meat Sciences*. Elsevier 2004, ISBN 978-0-12-384731-7.
67. KAUSHIK R., SACHDEVA B., ARORA S., WADHWA B. K., *Development of an analytical protocol for the estimation of vitamin D2 in fortified toned milk*. Food Chemistry 2014, 151, 225-230.
68. TRENERRY V. C., PLOZZA T., CARIDI D., MURPHY S., *The determination of vitamin D3 in bovine milk by liquid chromatography mass spectrometry*. Food Chemistry 2011, 125, 1314-1319.

69. SCHADT H., GÖSSL R., SEIBEL N., AEBISCHER C.-P., *Quantification of Vitamin D-3 in Feed, Food, and Pharmaceuticals Using High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry*. Journal of AOAC International 2012, 95, 1487-1494.
70. HUANG M., WINTERS D., SULLIVAN D., DOWELL D., *Application of Ultra-High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry for the Measurement of Vitamin D in Infant Formula and Adult/Pediatric Nutritional Formula: First Action 2011.11*. Journal of AOAC International 2012, 95, 319-321.
71. PERALES S., DELGADO M. M., ALEGRÍA A., BARBERÁ R., FARRÉ R., *Liquid chromatographic determination of Vitamin D3 in infant formulas and fortified milk*. Analytica Chimica Acta 2005, 543, 58-63.
72. KWAK B.-M., JEONG I.-S., LEE M.-S., AHN J.-H., PARK J.-S., *Rapid determination of vitamin D3 in milk-based infant formulas by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Food Chemistry 2014, 165, 569-574.
73. MAHMOODANI F., PERERA C. O., ABERNETHY G., FEDRIZZI B., GREENWOOD D., CHEN H., *Identification of Vitamin D3 Oxidation Products Using High-Resolution and Tandem Mass Spectrometry*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry 2018, 29, 1442-1455.
74. VIÑAS P., BRAVO-BRAVO M., LÓPEZ-GARCÍA I., 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.
75. JONES G., KAUFMANN M., *Vitamin D metabolite profiling using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 2016, 164, 110-114.
76. GILL B. D., ZHU X. J., INDYK H. E., *A Rapid Method for the Determination of Vitamin D-3 in Milk and Infant Formula by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry*. Journal of AOAC International 2015, 98, 431-435.
77. MAHMOODANI F., PERERA C. O., FEDRIZZI B., ABERNETHY G., CHEN H., *Degradation studies of cholecalciferol (vitamin D3) using HPLC-DAD, UHPLC-MS/MS and chemical derivatization*. Food Chemistry 2017, 219, 373-381.
78. GOMES F. P., SHAW P. N., WHITFIELD K., HEWAVITHARANA A. K., *Simultaneous quantitative analysis of eight vitamin D analogues in milk using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta 2015, 891, 211-220.

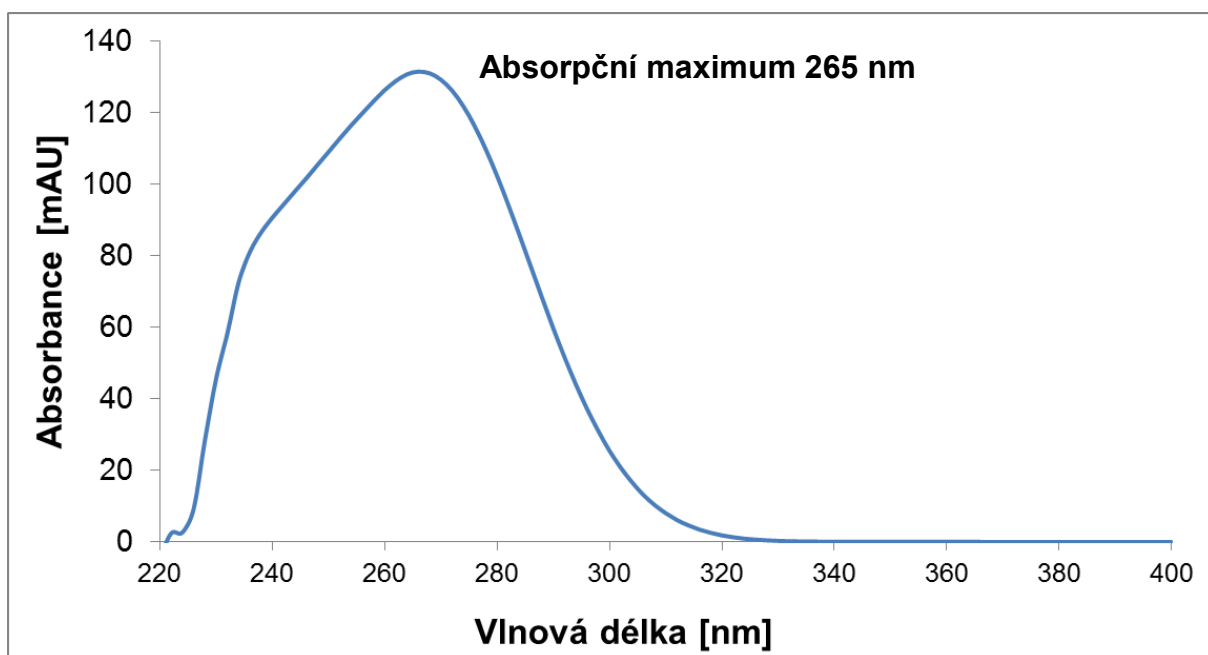
79. JONES A., NAIR-SHALLIKER V., DENNIS G. R., ANDREW SHALLIKER R., *The future of liquid chromatographic separations should include post column derivatisations: A discussion view point based on the perspective for the analysis of vitamin D*. *Microchemical Journal* 2018, 138, 501-508.
80. HIGASHI T., SHIMADA K., TOYO'OKA T., *Advances in determination of vitamin D related compounds in biological samples using liquid chromatography-mass spectrometry: A review*. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2010, 878, 1654-1661.
81. JÜRGEN ROTH H., SCHMIDT-GAYK H., WEBER H., NIEDERAU C., *Accuracy and clinical implications of seven 25-hydroxyvitamin D methods compared with liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a reference*. *Annals of Clinical Biochemistry* 2008, 45, 153-159.
82. HOLLIS B. W., HORST R. L., *The assessment of circulating 25(OH)D and 1,25(OH)2D: where we are and where we are going*. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2007, 103, 473-476.
83. WALLACE A. M., GIBSON S., DE LA HUNTY A., LAMBERG-ALLARDT C., ASHWELL M., *Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: Current procedures, performance characteristics and limitations*. *Steroids* 2010, 75, 477-488.
84. ALVI S., ELTABACHE C., HAMMAMI M., *Determination of Vitamin-D Level in Fortified Milk by Ultra-Performance Liquid Chromatography*. *World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences* 2015, 4, 170-181.
85. JENSEN B. P., SARAF R., MA J., BERRY S., GRANT C. C., CAMARGO C. A., SIES C. W., *Quantitation of 25-hydroxyvitamin D in dried blood spots by 2D LC-MS/MS without derivatization and correlation with serum in adult and pediatric studies*. *Clinica Chimica Acta* 2018, 481, 61-68.
86. PINELLI A., WITZKE F., NAIR P. P., *Separation of vitamin D from cholesterol by thin-layer chromatography*. *Journal of Chromatography A* 1969, 42, 271-274.
87. YANG M.-Y., HUANG C.-Y., CHIU T. H. T., CHANG K.-C., LIN M.-N., CHEN L.-Y., HU A., *Using gas chromatography and mass spectrometry to determine 25-hydroxyvitamin D levels for clinical assessment of vitamin D deficiency*. *Journal of Food and Drug Analysis* 2019, 27, 494-501.
88. YAMADA H., KITAGAWA S., OHTANI H., *Simultaneous separation of water- and fat-soluble vitamins in isocratic pressure-assisted capillary electrochromatography using a methacrylate-based monolithic column*. *Journal of Separation Science* 2013, 36.

89. LIU Q., JIA L., HU C., *On-Line Concentration Methods for Analysis of Fat-Soluble Vitamins by MEKC*. *Chromatographia* 2010, 72, 95-100.
90. WOOLLARD D. C., INDYK H. E., GILL B. D., *Significance of previtamin D chromatographic resolution in the accurate determination of vitamin D3 by HPLC–UV*. *Journal of Food Composition and Analysis* 2019, 79, 1-4.
91. BYRDWELL W. C., HORST R. L., PHILLIPS K. M., HOLDEN J. M., PATTERSON K. Y., HARNLY J. M., EXLER J., *Vitamin D levels in fish and shellfish determined by liquid chromatography with ultraviolet detection and mass spectrometry*. *Journal of Food Composition and Analysis* 2013, 30, 109-119.
92. BARBA F., ESTEVE M. J., FRIGOLA A., *Determination of vitamins E ( $\alpha$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocopherol) and D (cholecalciferol and ergocalciferol) by liquid chromatography in milk, fruit juice and vegetable beverage*. *European Food Research and Technology* 2011, 232, 829-836.
93. BARTOLUCCI G., GIOCALIERE E., BOSCARO F., VANNACCI A., GALLO E., PIERACCINI G., MONETI G., *Vitamin D3 quantification in a cod liver oil-based supplement*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2011, 55, 64-70.
94. JENKINSON C., TAYLOR A., STORBECK K.-H., HEWISON M., *Analysis of multiple vitamin D metabolites by ultra-performance supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry (UPSFC-MS/MS)*. *Journal of Chromatography B* 2018, 1087-1088, 43-48.
95. OBERSON J. M., CAMPOS-GIMENEZ E., RIVIERE J., MARTIN F., *Application of supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry to the determination of fat-soluble vitamins in selected food products*. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2018, 1086, 118-129.

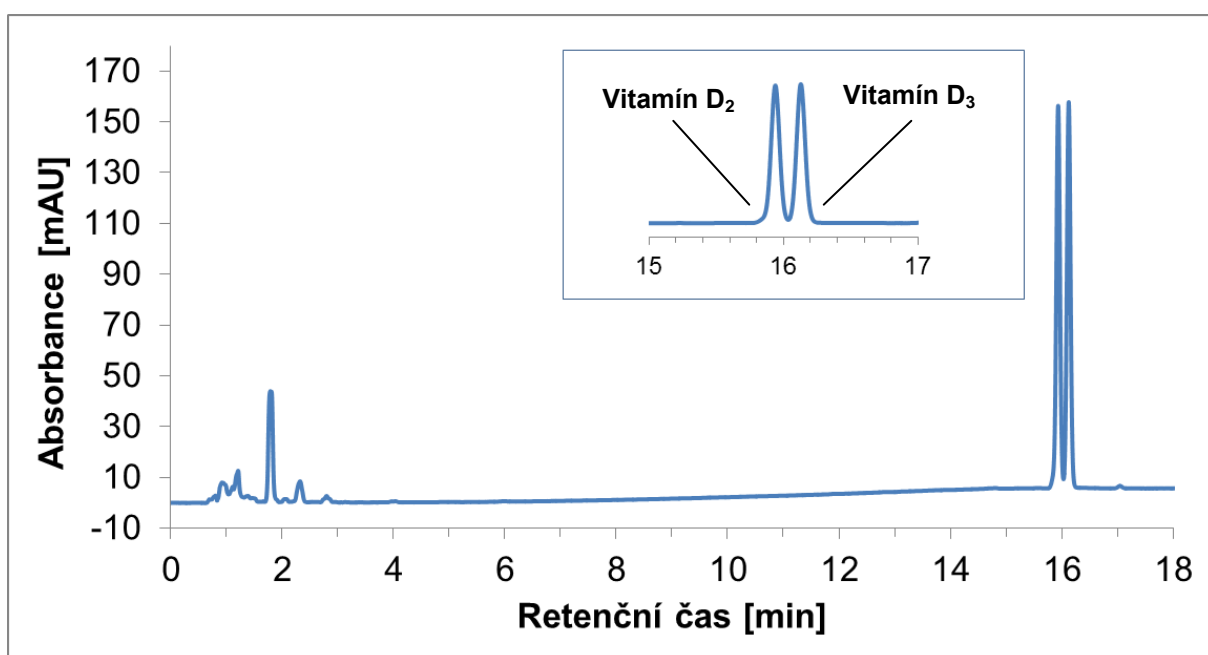


## 6. SEZNAM PŘÍLOH

Obrázek P1 UV/Vis spektrum vitamínu D <sub>3</sub> .	88
Obrázek P2 Chromatogram standardů vitamínu D <sub>2</sub> a D <sub>3</sub> .	88
Obrázek P3 Vyhodnocení DoE 1 pomocí vrstevnicového uspořádání.	89
Obrázek P4 Chromatogram vzorku plnotučného mléka při pH 3. Po hydrolýze a čiření pH upraveno na hodnotu 3.	89
Obrázek P5 Chromatogram plnotučného mléka bez přídavku a s přídavkem vitamínu D <sub>3</sub> . Po hydrolýze a čiření pH neupravováno (pH 13).	90
Obrázek P6 Vyhodnocení DoE 2 pomocí vrstevnicového uspořádání.	90
Obrázek P7 Chromatogram vzorku polotučného mléka.	91
Tabulka P1 Výsledky kalibrace standardu vitamínu D <sub>3</sub> .	92
Tabulka P2 Kompletní výsledky mezilehlé přesnosti kalibrace vitamínu D <sub>3</sub> .	92
Tabulka P3 Kompletní výsledky DoE 1.	93
Tabulka P4 Kompletní výsledky DoE 2.	94
Tabulka P5 Výsledky kalibrace vitamínu D <sub>3</sub> s vlivem matrice a extrakce.	95
Tabulka P6 Výsledky měření mléka a mléčných výrobků.	95

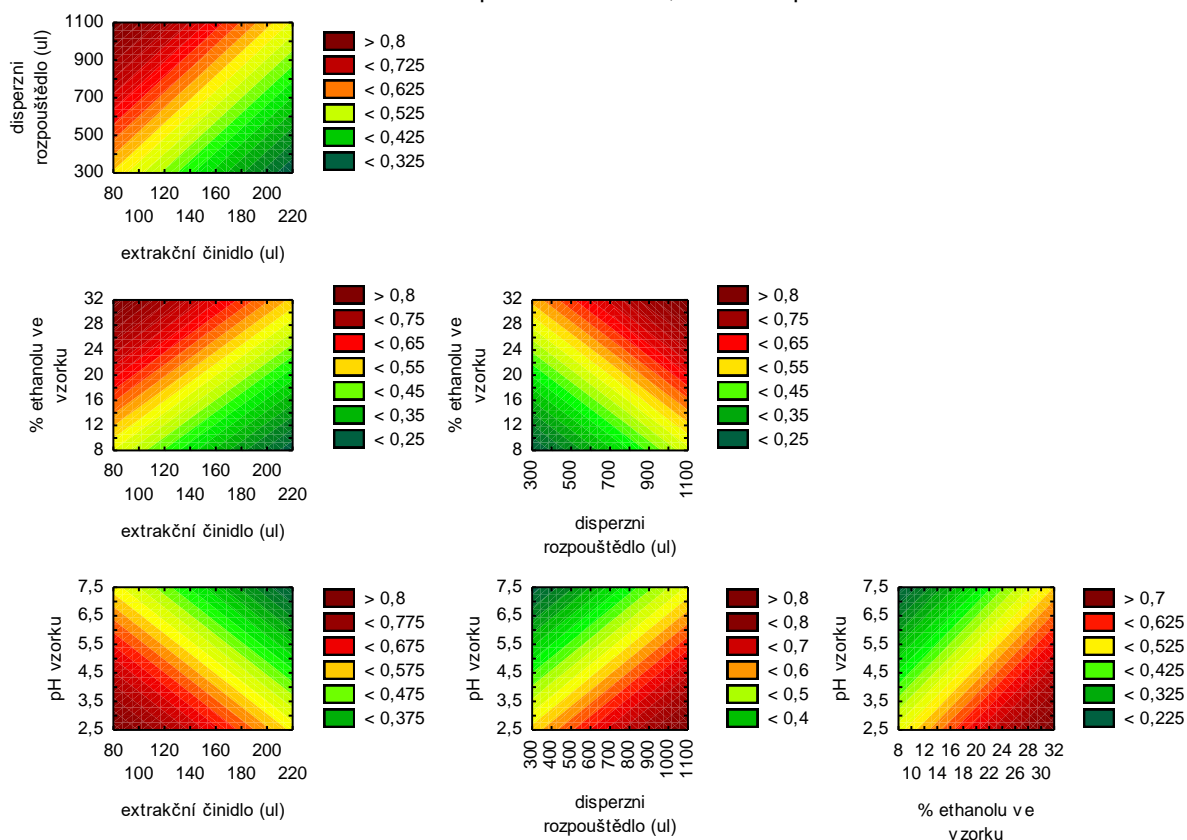


Obrázek P1 UV/Vis spektrum vitamínu D<sub>3</sub>.

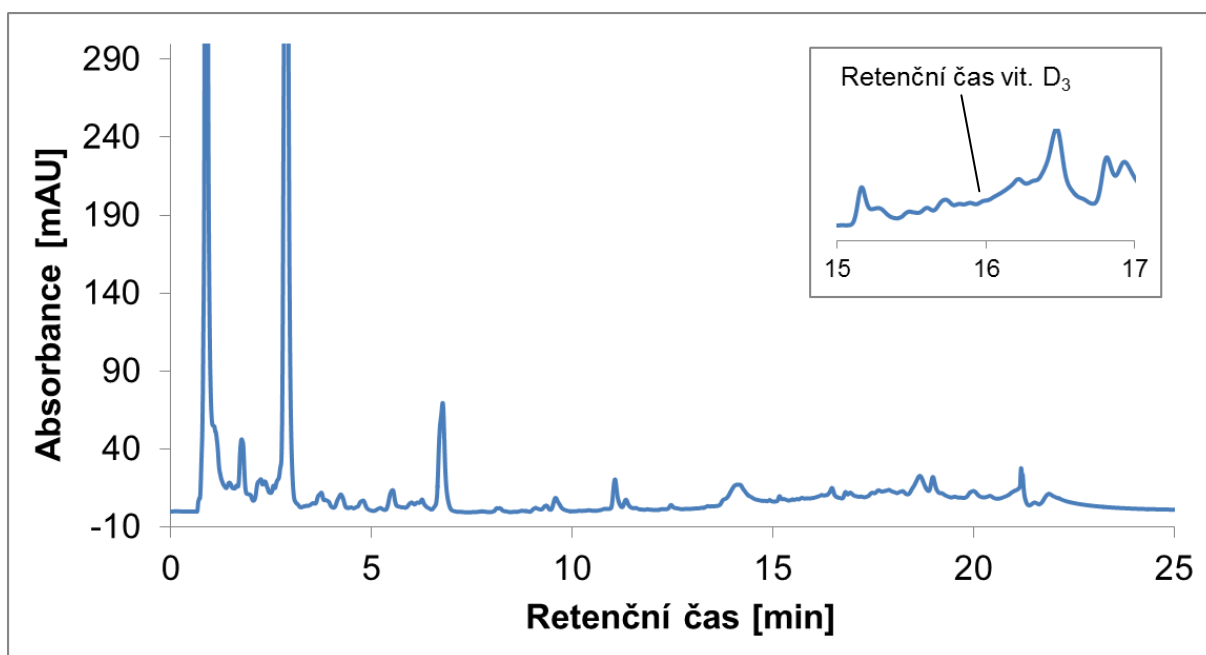


Obrázek P2 Chromatogram standardů vitamínu D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub>.

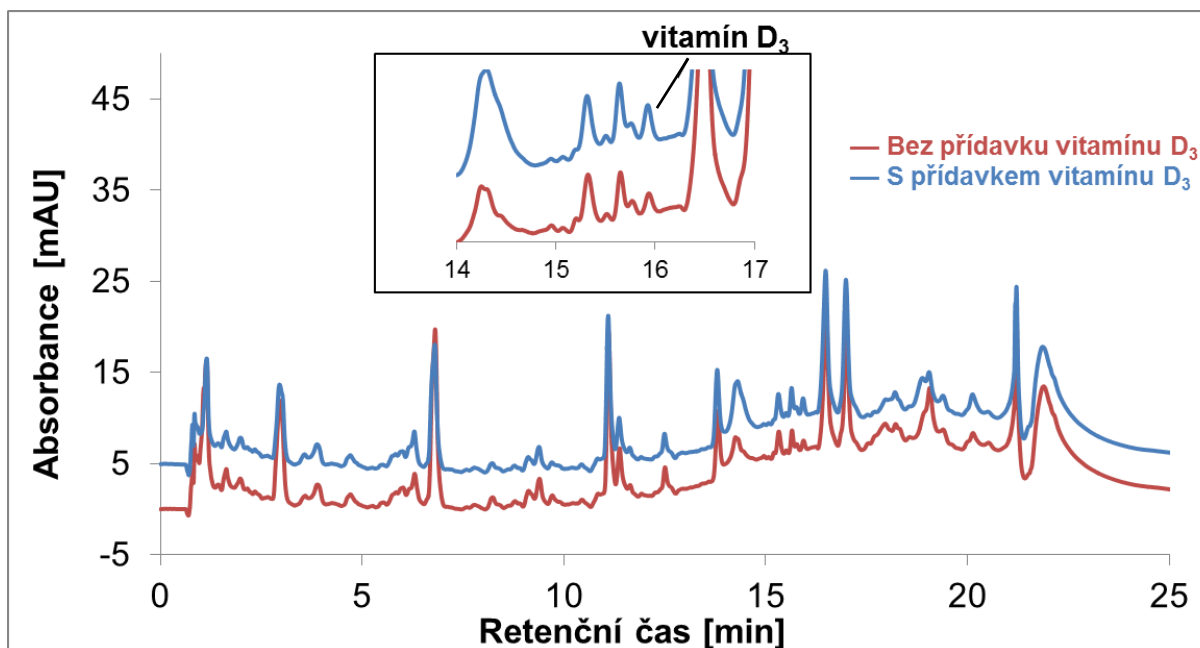
Vhodnostní povrch/vrstevnice; Metoda:Spline



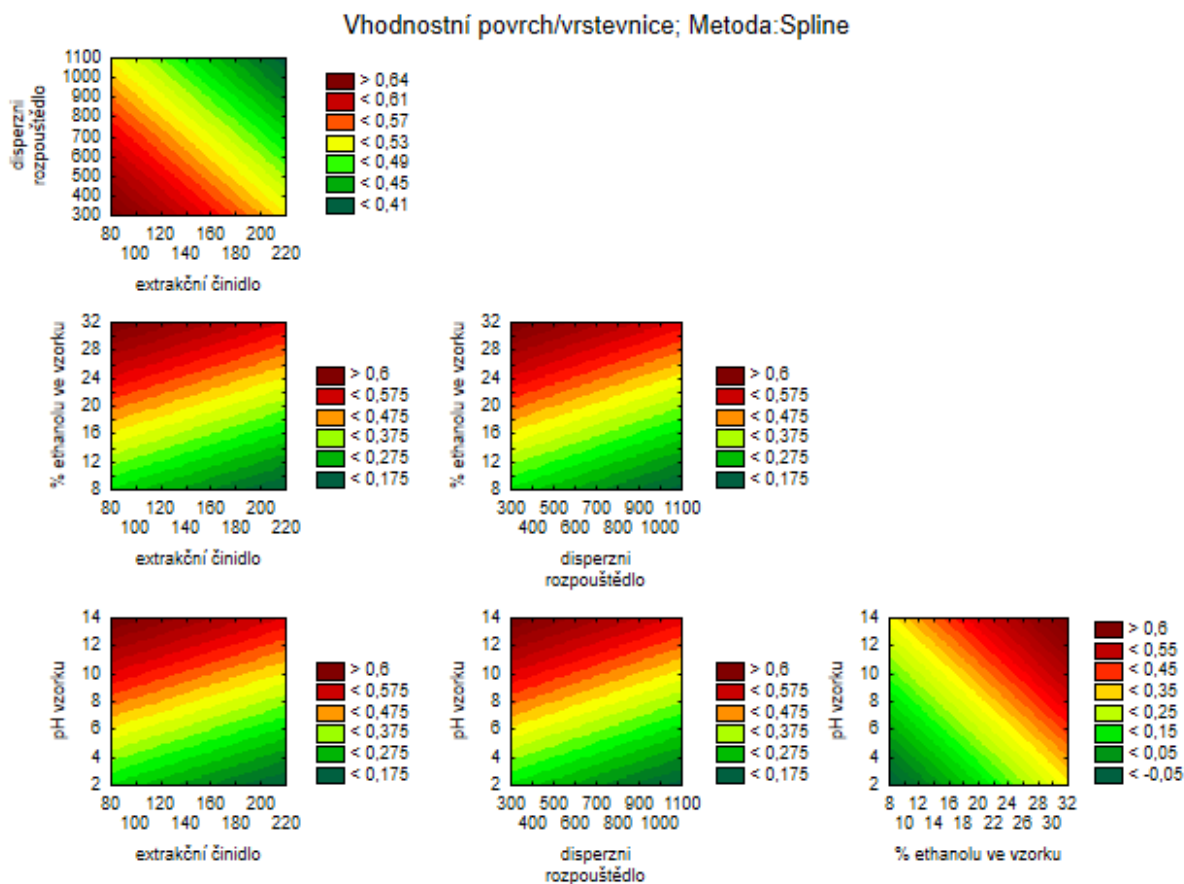
Obrázek P3 Vyhodnocení DoE 1 pomocí vrstevnicového uspořádání.



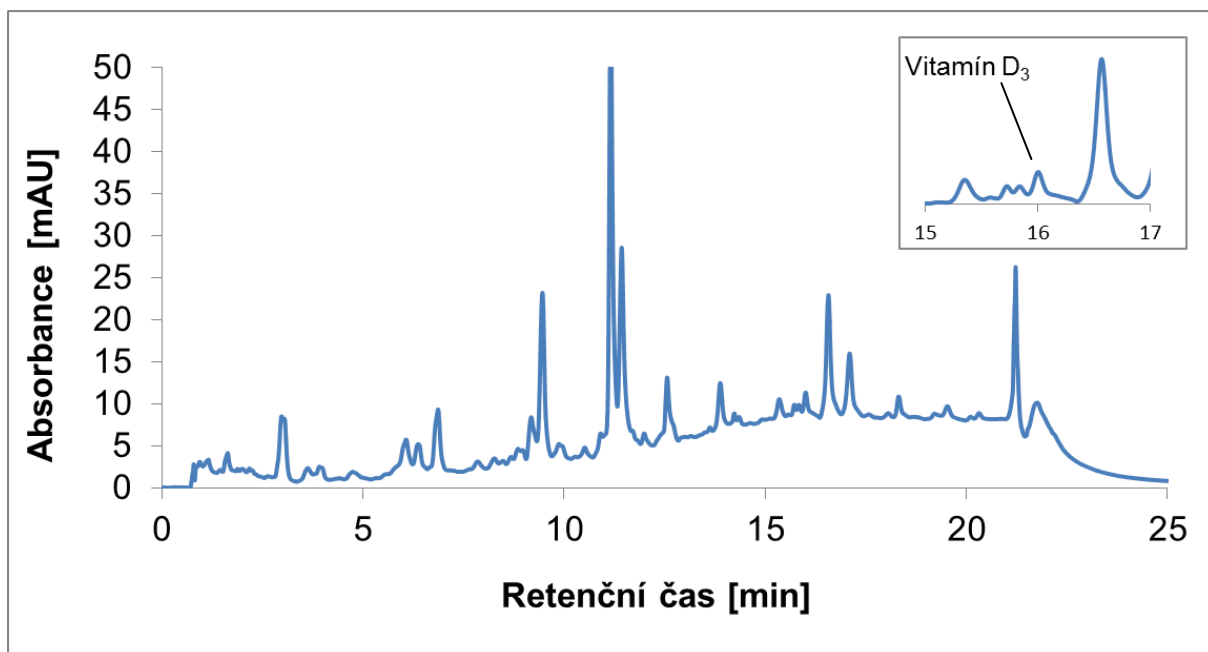
Obrázek P4 Chromatogram vzorku plnotučného mléka při pH 3. Po hydrolýze a čiření pH upraveno na hodnotu 3.



Obrázek P5 Chromatogram plnotučného mléka bez přídavku a s přídavkem vitamínu D<sub>3</sub>. Po hydrolýze a číření pH neupravováno (pH 13).



Obrázek P6 Vyhodnocení DoE 2 pomocí vrstevnicového uspořádání.



Obrázek P7 Chromatogram vzorku polotučného mléka.

Tabulka P1 Výsledky kalibrace standardu vitamínu D<sub>3</sub>.

Koncentrace [µg/l]	Opakování	Plocha píku [mAU*s]	Výška píku [mAU]
10	A	2,468	0,454
	B	2,618	0,481
	C	2,681	0,476
25	A	9,243	1,354
	B	9,043	1,387
	C	9,161	1,344
50	A	17,608	2,560
	B	17,767	2,640
	C	18,756	2,667
100	A	37,466	5,551
	B	36,795	5,345
	C	35,701	5,312
250	A	87,738	13,146
	B	87,738	13,146
	C	88,890	13,309
500	A	171,874	25,844
	B	173,821	26,143
	C	171,832	25,815
1000	A	349,282	51,665
	B	349,725	51,757
	C	349,696	51,822
2500	A	866,651	128,477
	B	856,617	127,028
	C	857,980	127,191

Tabulka P2 Kompletní výsledky mezilehlé přesnosti kalibrace vitamínu D<sub>3</sub>.

Koncentrace [µg/l]	Plocha píku [mAU*s]		
	Den 1.	Den 5.	Den 12.
25	9,243	9,880	9,442
	9,043	9,998	10,018
	9,161	9,119	9,077
100	37,466	35,455	35,581
	36,795	34,855	35,807
	35,701	34,258	35,013
1000	349,282	341,651	340,405
	349,725	344,423	347,609
	349,696	340,481	347,226

Tabulka P3 **Kompletní výsledky DoE 1.**

% ethanolu ve vzorku	pH	Množství extrakčního rozpouštědla [μl]	Množství disperzního rozpouštědla [μl]	Opakování	Plocha píku [mAU*s]
10	3	100	400	A	52,364
				B	53,544
				C	57,982
10	7	200	400	A	13,161
				B	27,071
				C	22,321
10	7	100	1000	A	75,052
				B	59,165
				C	47,333
10	3	200	1000	A	58,826
				B	53,176
				C	48,482
30	7	100	400	A	33,027
				B	77,372
				C	75,714
30	3	200	400	A	80,083
				B	77,477
				C	77,599
30	3	100	1000	A	147,211
				B	174,389
				C	187,182
30	7	200	1000	A	71,930
				B	77,932
				C	29,941
20	5	150	700	A	58,977
				B	60,515
				C	45,341

Tabulka P4 **Kompletní výsledky DoE 2.**

% ethanolu ve zmydelňovací směsi	pH po hydrolyze	Množství extrakčního rozpouštědla [μl]	Množství disperzního rozpouštědla [μl]	Opakování	Plocha píku [mAU*s]
10	3	100	400	A	147,817
				B	127,146
				C	100,900
10	13	200	400	A	50,291
				B	52,66
				C	48,547
10	13	100	1000	A	8,794
				B	7,196
				C	8,661
10	3	200	1000	A	91,802
				B	57,411
				C	46,367
30	13	100	400	A	705,538
				B	621,480
				C	584,889
30	3	200	400	A	18,358
				B	11,307
				C	11,818
30	3	100	1000	A	41,046
				B	56,536
				C	35,810
30	13	200	1000	A	442,684
				B	436,318
				C	420,389
20	8	150	700	A	41,592
				B	40,432
				C	40,135



Tabulka P5 Výsledky kalibrace vitamínu D<sub>3</sub> s vlivem matrice a extrakce.

Koncentrace vitamínu D <sub>3</sub> v mléce [µg/l]	Plocha píku [mAU*s]	Výška píku [mAU]
0,5	1,254	0,288
	1,440	0,381
	1,402	0,197
2,5	7,123	0,453
	7,618	0,605
	7,452	0,694
5	15,567	1,542
	15,556	1,369
	15,327	1,677
12,5	29,902	3,497
	30,776	3,637
	30,823	3,217
25	60,369	6,066
	61,761	7,130
	61,269	6,409

Tabulka P6 Výsledky měření mléka a mléčných výrobků.

Vzorek	Opakování	Plocha píku [mAU*s]	Koncentrace vitamínu D <sub>3</sub> [µg/l]
Polotučné mléko	A	18,666	7,82
	B	18,970	7,95
	C	18,799	7,88
Plnotučné mléko	A	17,840	7,48
	B	18,074	7,58
	C	18,840	7,90
Actimel	A	15,735	6,59
	B	15,245	6,39
	C	14,750	6,18
Nesquik	A	14,579	6,11
	B	14,234	5,97
	C	14,900	6,66