

Možnosti stanovení kyseliny listové a pantothenové

Lubomír Šánek

Bakalářská práce
2007



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav potravinářského inženýrství
akademický rok: 2006/2007

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lubomír ŠÁNEK**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Možnosti stanovení kyseliny listové a pantothenové**

Zásady pro vypracování:

1. zpracovat fyziologii vitamínu B5 a kyseliny listové
2. zmapovat možnosti jejich izolace a následného stanovení s důrazem na HPLC

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

dle doporučení vedoucího bakalářské práce

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.

Ústav potravinářského inženýrství a chemie

Datum zadání bakalářské práce:

8. ledna 2007

Termín odevzdání bakalářské práce:

4. června 2007

Ve Zlíně dne 2. května 2007



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Bakalářská práce je zaměřena na vypracování metodik pro izolaci a stanovení kyseliny pantothenové a listové pomocí Vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) v různých potravinách. Principem HPLC je rozdělování složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi. Mobilní fází bývá nejčastěji v technice s rezervní fází voda, methanol, acetonitril nebo pufr. Nejčastěji používanými detektory v kapalinové chromatografii jsou detektory spektrofotometrický (UV-VIS), fluorescenční a ECD (elektrochemický). Kyselina pantothenová a listová patří mezi vitaminy rozpustné ve vodě. Organismus si nedokáže tyto vitaminy ukládat do zásoby, jejich nadbytek vylučuje močí, a proto musí být tyto vitaminy průběžně doplňovány.

Klíčová slova: vitaminy, kyselina pantothenová, kyselina listová, HPLC, UV-VIS, fluorescenční detektor, ECD

ABSTRACT

The aim of this work was to find methods for isolation and determination of vitamin B₅ and B₉ with a view to HPLC techniques. Principle HPLC is the separation of components between mobile phase and stationary phase. The most often used detectors in liquid chromatography are spectrophotometry (UV - VIS), fluorescent and ECD (electrochemical) detectors. Pantothenic acid and folic acid are rank among water soluble vitamins.

Keywords: vitamins, pantothenic acid, folic acid, HPLC, UV-VIS detektor, fluorescent detector, ECD

Chtěl bych velmi poděkovat Ing. Daniele Kramářové, PhD. za odborné vedení bakalářské práce, poskytnutí mnoha cenných rad a připomínek k danému tématu a trvalý zájem při vypracovávání bakalářské práce.

OBSAH

ÚVOD.....	9
TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1 VITAMÍN B₅ – KYSELINA PANTOTHENOVÁ.....	11
1.1 CHEMICKÁ STRUKTURA.....	11
1.2 VÝSKYT VITAMINU B ₅	13
1.3 HYPOVITAMINOSA A HYPERVITAMINOSA.....	13
1.4 DENNÍ DOPORUČENÁ DÁVKA.....	13
2 VITAMIN B₉ – KYSELINA LISTOVÁ.....	14
2.1 CHEMICKÁ STRUKTURA.....	14
2.2 BIOLOGICKÁ ROLE.....	15
2.3 VÝSKYT VITAMINU B ₉	15
2.4 AVITAMINOSA A HYPERVITAMINOSA.....	15
2.5 DENNÍ DOPORUČENÁ DÁVKA.....	157
3 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE – HPLC.....	18
3.1 SLOŽENÍ KAPALINOVÉHO CHROMATOGRAFU.....	19
3.1.1 POPIS HPLC ANALÝZY.....	19
3.1.2 MOBILNÍ FÁZE.....	20
3.1.3 STACIONÁRNÍ FÁZE.....	20
3.1.4 VYSOKOTLAKÁ PUMPA.....	21
3.1.5 DÁVKOVÁNÍ.....	21
3.1.6 KOLONA.....	22
3.1.7 DETEKTORY.....	23
3.1.8 CHROMATOGRAM.....	24

4	MOŽNOSTI STANOVENÍ KYSELINY PANTOTHENOVÉ	24
4.1	STANOVENÍ KYSELINY PANTOTHENOVÉ V MLÉCE A MLÉČNÉM PREPARÁTU PRO KOJENCE METODOU HPLC	25
4.1.1	PŘÍPRAVA VZORKU	25
4.1.2	VLASTNÍ HPLC ANALÝZA	25
4.1.3	SROVNÁVACÍ METODY	26
4.2	FLUOROMETRICKÁ STANOVENÍ KYSELINY PANTOTHENOVÉ V POTRAVINÁCH POMOCÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRFIE S FLUOROMETRICKOU DETEKCÍ	26
4.2.1	PŘÍPRAVA VZORKU	26
4.2.2	CHROMATOGRFICKÉ STANOVENÍ	27
5	STANOVENÍ KYSELINY LISTOVÉ METODOU HPLC	28
5.1	STANOVENÍ FOLÁTŮ V SYROVÉ A NAKLÁDANÉ ČERVENÉ ŘEPĚ POMOCÍ HPLC	28
5.1.1	VLASTNÍ HPLC ANALÝZA	29
5.2	KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE PRO URČENÍ PŘIDANÉ KYSELINY LISTOVÉ VE FORTIFIKOVANÝCH CEREÁLNÍCH VÝROBCÍCH	30
5.2.1	CHROMATOGRFICKÉ PODMÍNKY	31
5.2.2	MIKROBIOLOGICKÁ ZKOUŠKA	31
5.3	STANOVENÍ KYSELINY LISTOVÉ IONTOVĚ-VÝMĚNNOU HPLC V OVOCNÉM DŽUSU OBOHACENÉM VITAMINY PO PŘEDCHOZÍ EXTRAKCI TECHNIKOU SPE	32
5.3.1	HPLC ANALÝZA	32
5.3.2	VZORKY	33
5.4	STANOVENÍ FOLÁTŮ V ZELENINĚ A OVOCI VE FINSKU APLIKACÍ HPLC ANALÝZY	33
5.4.1	CHROMATOGRFICKÉ PODMÍNKY	33
5.5	STANOVENÍ FOLÁTŮ V MOŘSKÝCH ŘASÁCH METODOU HPLC	34
5.5.1	EXTRAKCE VZORKU A INKUBACE	35
5.5.2	HPLC ANALÝZA	36
5.6	STANOVENÍ FOLÁTŮ V POTRAVINÁCH METODOU HPLC S FLUORESCENČNÍ DETEKCÍ O PŘEDKOLONOVÉ KONVERZI 5-METHYLTETRAHYDROFOLÁTU	36
5.6.1	EXTRAKCE FOLÁTŮ	37
5.6.1.1	Extrakce bez enzymatického přečištění	37
5.6.1.2	Extrakce vzorku dekonjugací	37
5.6.1.3	Extrakce s enzymatickým přečištěním	38

5.6.2	PŘEDKOLONOVÁ KONVERZE FOLÁTŮ 5-CH ₃ -H ₄ PTEGLU _N	38
5.6.3	PŘEČIŠTĚNÍ VZORKU NA AFINITNÍ KOLONĚ	38
5.6.4	CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ.....	39
5.6.4.1	Chromatografická separace monoglutamátu kyseliny listové.....	39
5.6.4.2	Separace 5-CH ₃ -H ₄ PteGlu ₁₋₈	39
5.7	STANOVENÍ FOLÁTŮ V POTRAVINÁCH A V ITALSKÉ STRAVĚ POMOCÍ HPLC.....	40
5.7.1	HPLC ANALÝZA	40
5.7.2	MIKROBIOLOGIE.....	40
ZÁVĚR		41
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		44
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		446
SEZNAM OBRÁZKŮ		47
SEZNAM TABULEK.....		448
SEZNAM PŘÍLOH.....		49

ÚVOD

Vitaminy jsou esenciální látky, které spolu s bílkovinami, tuky a sacharidy patří k základním složkám lidské stravy. V lidském organismu mají funkci katalyzátorů biochemických reakcí, tudíž hrají významnou úlohu při procesech vstřebávání a výměny látek mezi vnějším prostředím a živým organismem. Vitaminy jsou pro nás esenciální látky a jsme odkázáni na jejich příjem v potravě. Podle svých chemicko-fyzikálních vlastností se vitaminy rozdělují do dvou skupin, na lipofilní (rozpuštěné v tucích) a hydrofilní (rozpuštěné ve vodě).

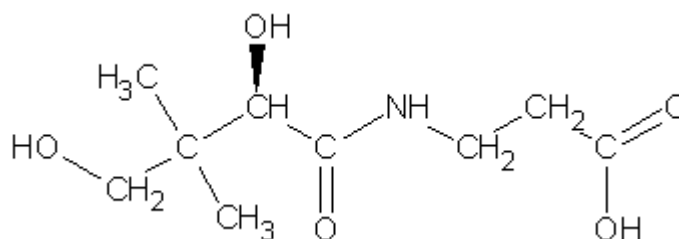
Lidé v dnešní době zapomínají na pravidla a zásady zdravé výživy, což vede ke vzniku nedostatku vitaminů v našem těle. Je proto nutné dbát na správnou výživu a mít dostatečný přívod vitaminů v konzumovaných potravinách. Dostatečný příjem vitaminů je důležitý pro každou věkovou skupinu. Na zvýšený přívod vitaminů by si měli dát pozor lidé, kteří se nacházejí v situaci, která ještě jejich příjem zvyšuje, jako je např. život ve znečištěném životním prostředí, vysoká fyzická zátěž, psychický stres, těhotenství a kojení, kouření cigaret, období rychlého růstu u dětí, ale i stáří, zvýšená hladina cholesterolu, infekční choroby, rekonvalescence po úrazech, operacích a po prodělaném infarktu myokardu.

Cílem bakalářské práce je najít metodiku HPLC pro stanovení kyseliny pantothenové a listové v potravinách.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je separační a současně analytická fyzikálně chemická metoda pro separaci a analýzu směsí látek, jejímž základním principem je rozdělování složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi, kde její hlavní výhody jsou rychlost, účinnost, automatizovatelnost, snadná kvantifikovatelnost výsledků a reprodukovatelnost. Technika HPLC byla vybrána pro práci díky její nenáročnosti, účinnosti, rychlosti, bezproblémové instrumentaci a vlastnictvím laboratoře ÚPI, UTB ve Zlíně. V práci bude uveden popis HPLC analýzy a složení kapalinového chromatografu.

TEORETICKÁ ČÁST

1 VITAMÍN B₅ – KYSELINA PANTOTHENOVÁ

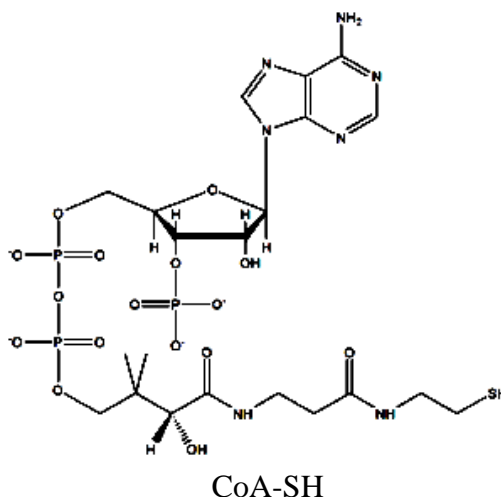


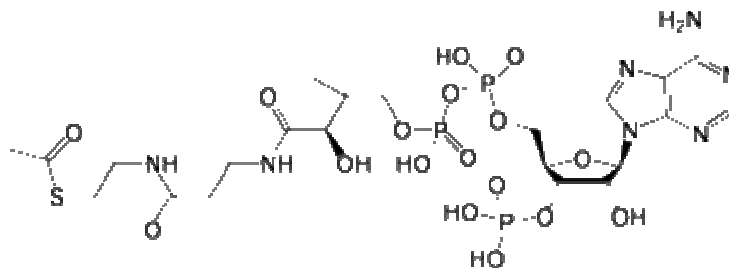
Kyselina pantothenová

Kyselina pantothenová je systematickým názvem 3-[(2R,4-dihydroxy-3,3-dimethylbutanoyl) amino] propionová kyselina; sumární vzorec: C₉H₁₇NO₅ o molární hmotnosti 219,235 g.mol⁻¹.

1.1 Chemická struktura

Vitamin B₅ je velmi dobře rozpustný ve vodě a zahříváním s kyselinami nebo zásadami se hydrolyzuje. V přírodě se kyselina pantotenová nejčastěji vyskytuje jako přirozená součást **koenzymu A** (CoA-SH, chemický vzorec : C₂₁H₃₆N₇O₁₆P₃S), který vzniká v heterotrofních organismech z volné kyseliny pantotenové. Její biologický účinek je specificky vázán na uvedenou strukturu. Hraje důležitou roli v syntéze a oxidaci mastných kyselin a oxidaci pyruvátu v citrátovém cyklu. Koenzym A je po chemické stránce thiol, může reagovat s karboxylovými kyselinami za vzniku příslušných thioesterů a je nosičem acylových zbytků. Molekula koenzymu A nesoucí acetylovou skupinu je označována jako **acetyl-CoA**, jedná se o aktivní kyselinu octovou.





Acetyl-CoA

Tabulka č.1: Aktivní formy vitamínu B₅

Koenzymy A aktivované acylovými skupinami	acetyl-CoA
	propionyl-CoA
	acetoacetyl-CoA
Acyl deriváty odvozené od dikarboxylových kyselin	malonyl-CoA
	succinyl-CoA
	hydroxymethylglutaryl-CoA
	pimelyl CoA

Přítomnost α -alaninu (3-aminopropionové kyseliny) ve struktuře kyseliny pantothenové je nezbytná, jeli nahrazen jinou látkou, je fyziologicky neúčinný nebo dokonce vykazuje antivitaminovou aktivitu. Savčí organismus, kvasinky a bakterie nemohou kyselinu pantothenovou syntetizovat, jsou schopny ji jen přenášet do molekuly koenzymu A a do speciálního proteinu označovaného jako ACP-SH (= ACP, Acyl Carrier Protein). Koenzym A se účastní klíčových reakcí v metabolismu aminokyselin, tuků a sacharidů. Zasahuje také do biosyntézy cholesterolu, steroidních hormonů, porfyrinu a hemoglobinu. Hraje důležitou roli v syntéze a oxidaci mastných kyselin a oxidaci pyruvátu v citrátovém cyklu. Hlavní biochemickou funkcí koenzymu A je přenos acylových skupin, s nimiž vytváří thioestery, za katalytického působení enzymu *acetyl-CoA-syntetasy*.

Vzniklé thioestery lze pokládat za aktivované formy původních metabolitů, které vstupují do biochemických reakcí. Tímto způsobem jsou přenášeny acyly mastných kyselin, radikály a ketokyseliny některých dikarboxylových kyselin.

V malém množství kyselinu pantothenovou doprovází její vyšší homolog kyselina hopen-thenová, která místo β -alaninu obsahuje γ -aminomáselnou kyselinu. [1]

1.2 Výskyt vitamínu B₅

Kyselina pantothenová se vyskytuje prakticky ve všech potravinách živočišného a rostlinného původu, ovšem v relativně nízkém množství. Pouze malý podíl z celkového obsahu vitamínu představuje volná kyselina, větší část vitamínu reprezentují vázané formy jako koenzym A, acyl-koenzym A a ACP-SH. Kyselinu pantothenovou můžeme nejčastěji nalézt v potravinách živočišného původu (vaječné žloutky, ledviny, játra, rybí maso), v obilných zrnech, sýrech, luštěninách, rýži, houbách a kvasnicích. Poměrně chudým zdrojem je mléko. Při vaření potravin, popř. mletí obilných zrn dochází ke značným ztrátám kyseliny pantothenové. [1,2]

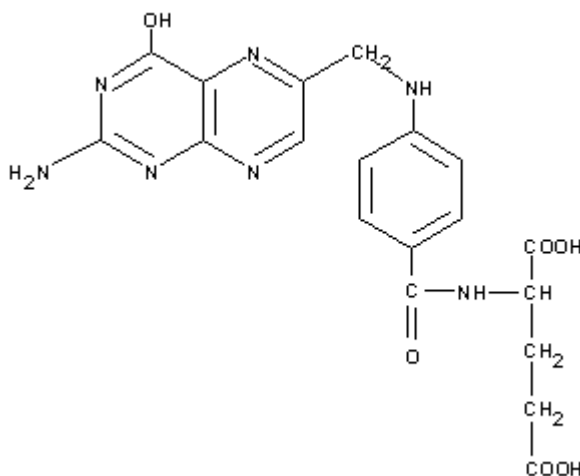
1.3 Hypovitaminosa a hypervitaminosa

Hypovitaminosa není u lidí pozorována, u pokusných zvířat se jeho nedostatek projeví zažívacími obtížemi s průjmami, únavou, bolestí břicha, kožními příznaky a změnami na sliznicích. Podle dosud známých poznatků tělo přijímá pouze potřebné množství a nadbytečné množství se vylučuje z těla ven.

1.4 Denní doporučená dávka

Do současnosti nebyl stanoven minimální denní požadavek na příjem kyseliny pantothenové, v lidském organismu. Je totiž velmi obtížné vyvolat klinické symptomy nedostatku tohoto vitamínu. Doporučené dávky byly stanoveny na základě nutričních studií a pohybují se v rozmezí 3 až 14 mg.den⁻¹. Výživová doporučená dávka pro průměrného obyvatele ČR byla vypočtena ve výši 7,3 mg.den⁻¹. [1]

2 VITAMIN B₉ – KYSELINA LISTOVÁ



Kyselina listová

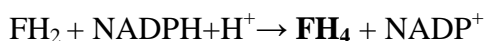
Kyselina listová je systematickým názvem N-[4(2-Amino-4-hydroxy-pteridin-6-ylmethylamino)-benzoyl]-L(+)-glutamová kyselina; (sumární vzorec: C₁₉H₁₉N₇O₆) o molární hmotnosti 441,14 g.mol⁻¹.

2.2 Chemická struktura

Kyselina listová vzniká vazbou aminoskupiny kyseliny glutamové na karboxylovou skupinu kyseliny pterové. Její molekula se tedy skládá z pteridinového kruhu a kyseliny p-aminobenzoové, na jejíž karboxylovou skupinu je navázána molekula kyseliny glutamové. Pod název **foláty** se zahrnuje skupina dalších látek odvozených od kyseliny listové. V přírodě se vyskytují deriváty kyseliny listové, které mají ve své molekule navázáno až šest zbytků kyseliny glutamové. Tyto deriváty však vykazují nižší účinnost než kyselina listová.

Aktivita vitamínu je podobná aktivitě kobalaminů. Kyseliny listové se v redukované formě vyskytují jako **tetrahydrofoláty (FH₄)**. Ty jsou významnými kofaktory *transferas* přenášejících jednouhlíkaté zbytky (methylové -CH₃, methylenové-CH₂-, formylové -CHO), jejichž donorem jsou hlavně cholin, glyoxylová kyselina, serin aj.

Tetrahydrofoláty vznikají z kyseliny listové ve dvouступňové reakci: nejprve enzym *dihydrofolátdehydrogenasa* redukuje kyselinu listovou na **dihydrofolát (FH₂)** a ten je pak redukován *tetrahydrofolátdehydrogenasou* na **tetrahydrofolát (FH₄)**.



Druhá ze dvou reakcí je účinně inhibována některými strukturními analogy dihydrofolátu, zejména tzv. aminopterinem a amethopterinem. Tetrahydrofoláty jako přenašeče formylových, methylových a hydroxymethylových skupin zasahují do biosyntézy purinových a pirimidinových nukleotidů, thyminu, serinu a glycinu a do regenerace methioninu. Hlavním místem biologického působení jsou játra. [1]

2.2 Biologická role

Foláty jsou nutné pro výrobu a údržbu nových buněk. Toto je zvláště důležité během období rychlého buněčného dělení a růstu, jako je dospívání a těhotenství. Foláty se podílejí na replikaci DNA. To také pomáhá předejít změnám DNA, což by mohlo vést k výskytu rakoviny. Protože RNA při syntéze bílkovin není chráněna, červené krvinky produkují megaloblasty, mající za následek megaloblastickou anémii. Proto je třeba přijímat foláty a předejít tak chudokrevnosti. [3]

2.3 Výskyt vitamínu B₉

Foláty jsou v potravě obsaženy ve formě pteroylmonoglutamátu nebo pteroylpolyglutamátu. Kyselina listová se v přírodě vyskytuje zejména v listové zelenině (chřest, špenát, tuřín) a v obilovinách (obilné klíčky, celozrnné pečivo). Ze živočišných tkání jsou zdrojem tohoto vitamínu játra. V biologických substrátech je kyselina listová vázána na proteiny, zejména v mléce (syrovátka), sýrech, vejcích a v masu. Tato vazba se uvolňuje při tepelném zpracování suroviny nebo enzymatickým štěpením. Ve vodném prostředí její oxidaci zabraňuje vitamin C. Účinkem UV záření podléhá fotolýze. [1]

2.4 Avitaminosa a hypervitaminosa

Nadbytek kyseliny listové by mohl způsobit podrážděnost či mírné zažívací potíže. Ve vzácných případech může kyselina listová vyvolat alergické projevy, u citlivých osob se vyskytuje zčervenání kůže, svědění, výjimečně by mohlo dojít až ke křeči svalstva průdu-

šek. [4] Při velkém množství kyseliny listové v organismu dochází k jejímu vyloučení ledvinami. [5]

Průjem, nechutenství, ztráta hmotnosti, dále se pak může projevit celková slabost organismu, bolest hlavy, zvýšená srdeční činnost, podrážděnost a celkové poruchy chování. U těhotných žen může vést nedostatek kyseliny listové k předčasnému porodu, nízké porodní hmotnosti a poškození neurální trubice u novorozence. [3] Nedostatečný příjem folátů zpomaluje tvorbu DNA a dělení buněk, a tak zasahuje především rychle se dělící tkáň, jako je kostní dřeň – výsledkem je anémie. Některé organismy nepotřebují kyselinu listovou jako vitamin, ale pouze kyselinu p-aminobenzoovou, z níž jsou schopny si tento vitamin vytvářet. Jedná se většinou o mikroorganismy, pro něž je kyselina p-aminobenzoová růstovým faktorem.

Avitaminosa se u savců projevuje poruchami krvetvorby. Antagonisté kyseliny listové, zvláště aminopterin, který brání redukci FH_2 na FH_4 , našly klinické uplatnění při zpomalení růstu některých maligních (zhoubných) buněk, zejména při leukémii. Vzhledem k tomu, že při biosyntéze nukleových kyselin je vyžadován tetrahydrofolát jako kofaktor, antagonisté jeho syntézy blokují také syntézu nukleových kyselin. Takto inhibované buňky pak nemohou replikovat chromozómy a zastavuje se proto jejich dělení. Po delší době použití však získávají leukemické buňky schopnost překonávat inhibici způsobem antagonisty a léčebný účinek pomíjí. V poslední době je stále větší pozornost věnována roli folátů ve vztahu ke kardiovaskulárnímu onemocnění a k rakovině. Bylo zjištěno, že nedostatek kyseliny listové vede k hyperhomocysteinemii. Vysoká hladina homocysteinu v plazmě je považována za rizikový faktor vzniku aterosklerózy. Zvýšení plazmatické hladiny homocysteinu o každých $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ je spojeno až s 80% zvýšením rizika koronárních onemocnění. Vyšší příjem folátů je spojován s redukcí rizika rakoviny plic a tlustého střeva, obzvláště při častější konzumaci alkoholu. Dostatečný příjem kyseliny listové ve stravě těhotných zabezpečuje adekvátní hladinu v séru a v metabolicky aktivních tkáních je nezbytný pro fyziologickou embryogenezi.

Nízké koncentrace folátů, vitaminu B_{12} nebo vitaminu B_6 umí zvýšit hladinu homocysteinu a aminokyselin v naší krvi. Vysoké hodnoty homocysteinu mohou poškodit tepny nebo usnadnit srážení krve. Vyšší příjem těchto vitaminů může napomoci snížení hladiny homocysteinu a tím snížit riziko kardiovaskulárních chorob. [6,7]

Důkazy ukazují, že nízké množství folátů v krvi souvisí se zvýšením rizika rakoviny. [8] Foláty hrají důležitou roli na funkci DNA. Nízký příjem folátů může mít za následek poškození DNA, což může vést ke vzniku rakoviny. [9] Několik studií prokázalo, že při nízké konzumaci folátů dochází k zvětšení rizika rakoviny tlustého střeva. [10] Výzkumníci dále pokračují v tom, zda zvýšení příjmu folátů v potravinách může redukovat vznik rakoviny.

2.5 Denní doporučená dávka

Bylo prokázáno, že pro fertilní ženy je nezbytná suplementace tímto vitamínem v dávkách vyšších než $400 \mu\text{g}\cdot\text{den}^{-1}$, aby se maximálně snížilo riziko poškození neurální trubice u novorozenců.

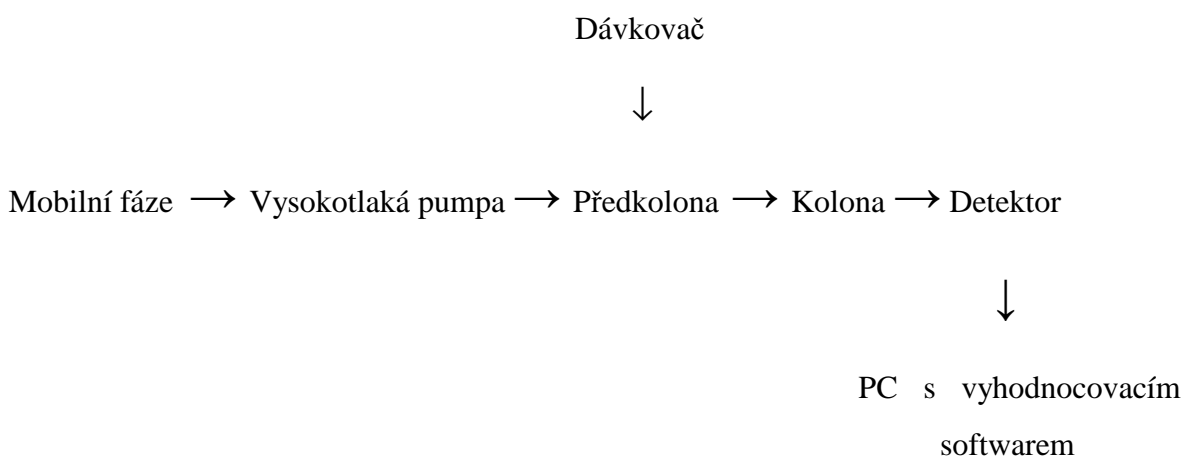
V ČR činí doporučená denní dávka kyseliny listové pro osoby v produktivním věku $200 \mu\text{g}\cdot\text{den}^{-1}$. Zvýšený příjem až na $800 \mu\text{g}\cdot\text{den}^{-1}$ je doporučen pro těhotné a kojící ženy. Tento příjem je doporučen i u těžkých alkoholiků a kuřáků. Horní limitní příjem byl stanoven na hranici 800 až $1000 \mu\text{g}\cdot\text{den}^{-1}$. Hodnoty těchto limitů se vztahují na syntetické formy vitamínu, které pocházejí ze suplementů nebo fortifikovaných potravin. [1]

3 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE – HPLC

Chromatografie je analytická fyzikálně - chemická metoda pro separaci a analýzu směsí látek, jejímž **základním principem je rozdělování složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi.** [11]

- Mobilní fáze je ta, která se v chromatografickém systému pohybuje. Může jí být kapalina nebo plyn. Je-li mobilní fází kapalina, pak takovou chromatografii nazýváme „**kapalinová chromatografie**“.
- Stacionární fáze je v chromatografickém systému ta fáze, která je nepohyblivá. Stacionární fází může být pevná látka nebo film kapaliny zakotvený na pevné fázi.

Mezi metodami kapalinové chromatografie zaujímá významné místo technika **HPLC** (High Performance Liquid Chromatography). Zkratka je odvozena od dvou přípustných názvů této techniky a to „High Performance Liquid Chromatography“ (Vysokoučinná kapalinová chromatografie) nebo „High Pressure Liquid Chromatography“ (Vysokotlaká kapalinová chromatografie). Mobilní fází je v tomto případě kapalina, stacionární fází je pevný adsorbent. Přístroj, na kterém se provádí HPLC analýzy se nazývá **kapalinový chromatograf**.



Obrázek 1. Schématický nákres kapalinového chromatografu

Technika HPLC existuje ve dvou základních uspořádáních, normální a reverzní.

- Normální HPLC- při **normální HPLC** je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní.
- Reverzní HPLC- při **reverzní HPLC** je naopak stacionární fáze méně polární než fáze mobilní. Reverzní HPLC bývá též označovaná jako RP - HPLC (Reverse Phase HPLC). Tato HPLC technika je již řadu let častěji používána než normální HPLC.

3.1 Složení kapalinového chromatografu

Kapalinový chromatograf tvoří tyto hlavní části: zásobníky na mobilní fáze, vysokotlakou pumpu, dávkovač, předklonu, kolonu, detektor a počítač s vyhodnocovacím softwarem.

3.1.1 Popis HPLC analýzy

Aparaturou protéká mobilní fáze, která je ze zásobních lahví vedena přes vysokotlakou pumpu do kolony, z ní do detektoru a dále pak do odpadních nádob. Dávkovačem je do proudu mobilní fáze nadávkován vzorek (řádově několik málo μl). Vzorek je unášen mobilní fází do kolony, kde dochází k separaci jednotlivých složek. Výstup z kolony vede do detektoru, kde jsou jednotlivé složky detekovány. Signál z detektoru je zaznamenáván a softwarem vyhodnocen.

HPLC analýza je ve srovnání s GLC (Gas Liquid Chromatography) analýzou mnohem méně citlivá na teplotu kolony a průtokovou rychlost mobilní fáze. Je však citlivá na složení a pH mobilní fáze. Výhodou HPLC je schopnost analyzovat **termolabilní látky** (např. vitamíny a jiné), které by při použití plynové chromatografie degradovaly a byly by tak neanalyzovatelné.

HPLC analýzu lze použít pro stanovení vitamínů rozpustných ve vodě a v tucích, kortikoidů, kortikosteroidů, antidepresiv, antioxidantů, karbonylových sloučenin (environmentální analýzy), třaskavin, výbušnin, PCB (polychlorovaných bifenyly) apod.

3.1.2 Mobilní fáze

Mobilní fáze v RP - HPLC může být např. voda, methanol, acetonitril a jejich směsi v různých vzájemných poměrech, pufrů a další. Zásobníky jsou skleněné láhve, ve kterých je příslušná složka mobilní fáze. Tyto je možné spolu automaticky mísit v předem zvoleném poměru. Na rozdíl od GLC zde mobilní fáze vstupuje do interakce se složkami analyzované směsi a konkrétní složení mobilní fáze může významným způsobem ovlivňovat celý separační proces.

Od mobilní fáze se vyžaduje, aby především rozpouštěla vzorek, aby byla kompatibilní s použitým detektorem a smáčela stacionární fázi. Dále by měla mít minimální viskozitu, toxicitu, hořlavost a koroziivnost, dostatečnou stabilitu v porovnání s vnějším vlivem (oxidace, fotolýza atd.) a měla by být běžně dostupná.

Eluce vzorku mobilní fáze může být nejčastěji:

- Izokratická – po celou dobu analýzy je složení mobilní fáze stále stejné
- Gradientová – v průběhu analýzy se složení mobilní fáze mění v příslušném poměru

3.1.3 Stacionární fáze

Stacionární fáze je látka, na které probíhají chromatografické separace směsí unášených mobilní fáze - eluentem. Stacionární fáze jsou s detektory nejdůležitějšími složkami chromatografického systému a na jejich výběr pro určitý experiment je třeba věnovat potřebnou pozornost. Důležitou charakteristikou je i její tepelná, chemická a mechanická odolnost.

Stacionární fáze je tvořena nejčastěji mikročásticemi **silikagelu** (1,5-5 μm), na kterých je navázána vlastní reverzní fáze. Reverzní fáze může být tvořena například **nepolárními uhlovodíky** (C8 – oktan, C18 – oktadekan) nebo polárnějšími uhlovodíky s funkční skupinou (např. $-\text{CN}$, NH_2 apod.). Další používané materiály pro stacionární fázi kapalinové chromatografie jsou materiály uváděné pod obchodním názvem Zorbax, Porasil, Corasil, aj.

3.1.4 Vysokotlaká pumpa

Vysokotlaká pumpa je velmi důležitou součástí HPLC aparatury. Kolony pro HPLC jsou plněny mikročásticemi (viz. stacionární fáze), které při průchodu mobilní fáze kladou značný odpor. Z toho důvodu musí být mobilní fáze pod vysokým tlakem (až 40 MPa), aby mohla projít přes kolonu. Dostatečný tlak a konstantní průtok mobilní fáze zajišťuje právě vysokotlaká pumpa.

Ani jedno do teď vyvinuté čerpadlo v celém rozsahu neodpovídá uvedeným technickým požadavkům. Z funkčního hlediska čerpadla rozdělujeme na :

- pneumatická
- pulzní – pístové s membránou i bezmembránové
- s lineárním posunem pístu – injektorové čerpadla
- rotační – zubové a lopatkové
- peristaltická

Z hlediska regulace dopravy mobilní fáze dělíme vysokotlaká čerpadla na:

- produkující konstantní tlak
- produkující konstantní průtok.

Pneumatická čerpadla s neformovatelnou membránou mají několik fyzikálních a chemických omezení. Odolnost membrány je často limitovaná, její impermeabilita není obvykle 100% a vymývání různých příměsí z membrány do mobilních fází není zanedbatelná. Výhodou je použití nedeformovatelné membrány.

Nejvhodnější pulzová čerpadla pro kapalinovou chromatografii jsou pístová čerpadla s membránou, uvádí Perry. [12] Objem čerpané kapaliny je daný průměrem pístu, jeho zdvihem a frekvencí.

3.1.5 Dávkování

Vzorek je dávkován do proudu mobilní fáze pomocí dávkovací smyčky nebo pomocí automatického dávkovače. Objem dávkovacích smyček se může pohybovat od 1-20 μ l.

Nejvhodnější je vzorek dávkovat přímo na vstup do kolony.

- Septální systémy – dávkování mikrostřičkami, velmi pohodlné, dávkování libovolného množství vzorku, výměna septálních uzávěrů je jednoduchá, spolehlivě těsní do tlaku 2 až 10 MPa
- Dávkovací ventily – přednostně se používají na reprodukovatelné dávkování většího množství počtu vzorků, na dávkování větších objemů a v takových systémech, kde je třeba dávkovat vzorek při vyšším tlaku.

3.1.6 Kolona

Zpravidla se jedná o nerezovou trubici o vnitřním průměru okolo 4,6 mm a délce 5-25 cm, která je naplněna stacionární fází. Na obou dvou koncích je uzavřena koncovkami tak, aby po naplnění kolony zůstali minimálně nevyplněné objemy a aby na koncovkách nenastalo turbulentní proudění mobilní fáze. Součástí koncovky je vhodný filtr, který zabraňuje vyplavování částic náplně do detektoru.

Materiál, z kterého se zhotovují chromatografické kolony, musí vyhovovat těmto podmínkám:

- musí dostatečně odolávat chemickým účinkům mobilní fáze a nesmí způsobovat změny (př. denuraci) rozdělovaného vzorku.
- musí snášet vysoké tlaky, chvění a teploty do 150°C
- musí se dát lehce opracovat (např. leštit).

O schopnosti kolony separovat určité směsi na jednotlivé složky opět rozhoduje zejména typ stacionární fáze zakotvené na silikagelovém nosiči (viz. stacionární fáze).

Kolony na základě způsobu použití můžeme rozdělit na:

- **Analytické** – průměr okolo 4 mm, délka 30, 100 a 250 mm, nerezavějící ocel, plnivo částice o průměru 3-10 μm , většinou anorganická matrice-silikagel, na něm zakotvené různé stacionární fáze
- **Preparativní** – větší průměr, větší délka, větší objem naneseného vzorku, designované pro dělení větších množství látek, řádově miligramů až desítek miligramů
- **Mikrokolony**

3.1.7 Detektor

Chromatografický detektor je zařízení na indikování přítomnosti vzorku a nebo na kvantitativní sledování jeho koncentrace v eluentu. Detektor v podstatě sleduje vhodným snímačem jednu a nebo současně několik vlastností eluentu a převádí jeho změny na elektrické signály, které je možné po zesílení zvoleným způsobem zaznamenat. V některých případech detektor určuje i vybrané vlastnosti eluovaného vzorku (molární hmotnost, absorpční spektrum apod...).

Chromatografický systém umožňuje použít více typů detektorů, případně potřebujeme porovnat detektory založené na jistém principu, ale s rozdílnou konstrukcí. V takovém případě bereme do úvahy další kritéria: absolutní a relativní citlivost, linearita, detekovatelnost, reprodukovatelnost, tvar a zakreslení píku, stabilita nulové linie a závislost odezvy od tlaku, rychlosti průtoku eluátu a od teploty.

V metodě HPLC je dostupná opět řada různých detektorů, které se liší principem funkce, konstrukcí, selektivitou, citlivostí, mezí detekce aj. Na rozdíl od GLC zde však není k dispozici tak univerzální detektor, jakým je v GLC detektor FID (Flame Ionization Detektor).

Metoda HPLC využívá nejčastěji tyto typy detektorů: spektrofotometrický detektor (UV-VIS), fluorescenční detektor, hmotnostní spektrometr, refraktometrický detektor, elektrochemický detektor (ECD), coulometrické a další. Volba detektoru opět závisí na konkrétní aplikaci. Často používaným detektorem je detektor **spektrofotometrický** (UV-VIS) a **fluorescenční**. Podmínkou použití těchto detektorů je, aby daný analyt absorboval záření určité vlnové délky (UV-VIS detekce) a nebo aby emitoval fluorescenční záření (fluorescenční detekce).

Pokud analyt sám o sobě neabsorbuje záření v oblasti UV-VIS nebo neemituje fluorescenční záření, je použití těchto detektorů podmíněno **derivatizací** vzorku (vzorek je chemickou reakcí převeden na sloučeniny, které mají potřebné vlastnosti - absorpce UV-VIS, fluorescence). Principem coulometrického detektoru v kapalinové chromatografii je měření náboje při konstantním napětí v coulometrické cele, kterou protéká eluent. Možnost použití je především pro detekci látek schopných přímé elektrolytické oxidace nebo redukce (např. Coulochem III.).

3.1.8 Chromatogram

Výsledkem HPLC analýzy je **chromatogram**. Pokud je analyzovaná směs dobře rozdělena, pak každé složce směsi odpovídá jeden pík. Výsledná tabulka, která je zobrazena příslušným softwarem nám poskytne odezvu detektoru o relativním čase a ploše píku příslušné látky, kterou stanovujeme (plocha píku odpovídá koncentraci analyzovaného vzorku).

4 MOŽNOSTI STANOVENÍ KYSELINY PANTOTHENOVÉ

Kolorimetrie, plynová chromatografie a mikrobiologické techniky byly značně prostudované, ale tyto metody často byly časově náročné a měly malou reprodukovatelnost. [13,15] Nejběžněji užívaná metoda pro stanovení kyseliny pantothenové v potravinách byla mikrobiologická metoda s využitím bakterie *Lactobacillus plantarum*. [14] Tato metoda, jako další mikrobiologické metody pro vitamíny, je extrémně časově náročná a potřebuje péči a vyžaduje pravidelnou údržbu kultur.



Lactobacillus plantarum

Mezi další metody analýzy kyseliny pantothenové patří radiometricko-mikrobiologická zkouška, která byla vyvinuta pro stanovení vitamínu B₅ v krevním séru a mléce. [15]

Morris *et al.* [16] vyvinul ELISA metodu pro analýzu kyseliny pantothenové a její analogy. Ačkoli tato metoda je potenciálně užitečná v potravinách kvůli její vysoké specifitě a citlivosti, antisera nejsou komerčně dostupná a musí být získaná před analýzou. Kapalinová chromatografie slouží také pro analýzu kyseliny pantotenové. [13, 17]

4.1 Stanovení kyseliny pantothenové v mléce a mléčném preparátu pro kojence metodou HPLC

Pro detekci kyseliny pantothenové bylo použito několik systémů. Manuální systém složený ze dvou pump, dávkovače vzorku a SPD-M10A diodového detektoru řízeným Class softwarem (Shimadzu, Tokyo, Japonsko). Jako další chromatografy byly použity HP1050 a HP1100 s autosaplerem, čerpadlem, degasérem a diodovým detektorem. Vyhodnocovací software byl Hewlett Packard (Waldbronn, Německo). [18]

Pilotní pokusy proběhly použitím kolony Resolve C₁₈, 100x8 mm, 5 μm (Waters). Jako další kolony C₁₈ pro výzkum byly vybrány kolony: Nomura Develosil ODS-Mg-5, 250x4,6 mm, 5 μm (Phenomenex, Torrance, Ca, USA), YMC AQ312, 150x4,6 mm, 5 μm (YMC Inc., Wilmington, NC, USA), Paltinum EPS, 53x7 mm, 3 μm (Alltech, deerfield, IL, USA) a Luna Phenyl-C₆, 250x4,6 mm, 5 μm (Phenomenex).

4.1.1 Příprava vzorku

0,5g práškového vzorku bylo dáno do centrifugační zkumavky o objemu 10 ml. Přidalo se přibližně 5 ml teplé vody (<40°C) a za stálého míchání se vzorek nechal odstát 20 minut. Pak bylo přidáno 0,5 ml 3% kyseliny octové a opět se nechal vzorek stát 20 minut. Poté byl objem vzorku doplněn vodou na celkový objem 10 ml. Přichystaný vzorek byl odstředován při 3 500 otáčkách 15 min. Poté bylo odpipetováno přibližně 1-2 ml vzorku z vodné fáze (vyvarovat se lipidům a sedimentům), tento vzorek se přefiltroval přes 0,45 mm membránový filtr (Sartorius, Goettingen, Německo) a vzorek byl přemístěn do vialek na autosampler.

4.1.2 Vlastní HPLC analýza

Předběžná optimalizace procesu byla provedena s kolonou Resolve. Mobilní fáze byla složená z acetonitrilu a vody (v poměru 50:50). Izokratická eluce kyseliny pantothenové byla nastavena na průtok mezi 1 a 2 ml.min⁻¹ po dobu 10-20 min s udržováním vhodného tlaku. Kolona byla následně vymyta acetonitrem s vodou (50:50), vodou (100%) a nakonec acetonitrem (100%). Detekce byla prováděna při vlnové délce 200, 205 a 240 nm. Analytické podmínky byly porovnatelné pro YMC AQ 312, LUNA Phenyl-C₆ a Luna C₈ kolony.

Retenční čas pro kyselinu pantothenovou byl v případě použití kolony Platinum přibližně v 6 minutě a použitím kolony Develosil přibližně v 17,5 minutě.

4.1.3 Srovnávací metody

Několik vzorků bylo také analyzováno pomocí plynové chromatografie (Davidek *et al*, 1985). Ke 2g vzorku bylo přidáno 40 ml 25% HCl při 95°C po dobu 5 hodin za vzniku pantoyl laktonátu a alaninu. Extrakt byl přemístěn do 100 ml baňky obsahující 0,5g KH_2PO_4 a neutralizován na pH 5 pomocí 40% NaOH. Extrakty se nechaly odpařit a analýza byla dokončena na BPX70 koloně (30x0,25 mm) s FID detektorem. Nosný plyn byl vodík s teplotním gradientem 80 - 210°C ($5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$), 210 - 250°C ($30^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) a 250°C (3min).

4.2 Fluorometrická stanovení kyseliny pantothenové v potravinách pomocí kapalinové chromatografie s fluorometrickou detekcí

Analytický postup byl aplikován pro stanovení kyseliny pantothenové v různých potravinách, př: kvasnice, vepřová játra, kuřecí maso, losos, vejce, sušené mléko, zmražený špenát, hrášek, fazolové lusky, čočku a avokádo. [19]

4.2.1 Příprava vzorku

Při přípravě vzorku bylo použito dvou postupů; a to první postup pomocí chemické extrakce a druhý pomocí enzymatické hydrolýzy.

V případě chemické analýzy byl příslušný vzorek navážen do 100 ml Erlenmeyerovy baňky. Bylo přidáno 25 ml 200 mM Tris (trihydroxymethylaminomethane) pufru (pH 8). Směs byla 5 minut protřepána s 50 ml destilované vody a odstředována při 11 500 otáčkách po dobu 10 minut. Supernatant byl poté přefiltrován přes 0,45 μm filtr z acetátcelulosity.

V případě přípravy vzorku enzymatickou cestou se vzorek navázil do 100 ml Erlenmeyerovy baňky. Bylo přidáno 15 ml 50 mM octanového pufru (pH 4,5) a 1 ml roztoku *pepsinu* ($50\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Směs se nechala inkubovat při 50°C po dobu 3 hodin. Poté bylo přidáno tolik 5M NaOH aby výsledné pH bylo 8. Poté bylo přidáno 10 ml 200 mM Tris pufru (pH 8), 0,6 ml alkalického roztoku *fosfatasy* ($20\text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 2,5 ml *pantotheinasového* roztoku ($80\text{ mU}\cdot\text{ml}^{-1}$). Tato směs byla inkubována při 20°C 18 hodin, a pak s 50 ml destilované

vody byla odstředována při 11 500 otáčkách 10 minut. Pak byl supernatant přefiltrován přes 0,45 μm filtr z acetátcelulosity.

Přečištění enzymatického extraktu bylo provedeno následně: 5 ml extraktu bylo vloženo do kazety s aniontovým měničem (SPE cartridge Chromafix 400-SB, Macherey-Nagel, Düren, Německo), ale předtím byl ještě extrakt postupně promyt 5 ml methanolu a 5 ml destilované vody. 2 ml alikvotního pročištěného vzorku bylo dáno do 5 ml odměrné baňky. Pak bylo přidáno 0,25 ml 250 mM HCl. Roztok byl poté doplněn 300 mM fosfátovým pufr (pH 3) na celkový objem 5 ml (u jakékoliv potraviny bylo pH vždy mezi 2,8-3,2). Získaný roztok (5 ml) byl následně vložen do kazety s kationtovým měničem (SPE kazeta Chromafix 400-SB, Macherey-Nagel, Německo), ale předtím byl ještě extrakt postupně promyt s 5 ml methanolu a 5 ml destilované vody. 2 ml alikvotní pročištěné části vzorku byly dány do 5 ml odměrné baňky.

4.2.2 Chromatografické stanovení

Jako mobilní fáze byl použit methanol a fosfátový pufr (33 mM, pH 2,5). Poměr methanolu byl v mobilní fázi lineárně zvětšován od 0 do 10 % během 25 minut. Dalších 8 min byla eluce prováděna mobilní fází o složení methanol:fosfátový pufr (90:10). Průtok mobilní fáze byl 1 ml.min⁻¹. Pokud byl vzorek připraven enzymatickou cestou, poměr methanolu v mobilní fázi se zvětšoval lineárně od 10 do 45 % během 7 minut. Dále eluce probíhala po dobu 11 min, kdy mobilní fáze měla složení methanol:fosfátový pufr 55:45, poté se opět mobilní fáze vrátila na výchozí složení methanol fosfátový pufr 90:10. Jako kolona byla použita Lichrospher 100 RP C₁₈, 250x5 mm, 5 μm (Merk, Darmstadt, Německo) a předkolona RP C₁₈, 4x4 mm; 5 μm (Merk). Fluorometrická detekce byla provedena při excitační vlnové délce 345 nm a emisní vlnové délce 455 nm. Detekce byla provedena na základě post-kolonové derivatizace vzorku roztokem 200 mM NaOH, 1 mM ortophtaldialdehydu a 1,6 mM 3-merkaptopropionové kyseliny. Retenční čas kyseliny pantothenové byl přibližně ve 29 minutě.

5 STANOVENÍ KYSELINY LISTOVÉ METODOU HPLC

5.1 Stanovení folátů v syrové a nakládané červené řepě pomocí HPLC

Vzorky syrové a nakládané řepy byly získány od švédské potravinářské společnosti Procordia Food. Tři různé kultivary z červené řepy (Boltardy, Ricky, Kim) byly pěstovány v písčité půdě s rašelinou ve dvou různých lokalitách v jižním Švédsku. Řepa byla sklizena v září roku 2000. Následně byla skladována 1 týden nebo 3 měsíce. Syrová řepa byly přepravena na Katedru potravinářských věd švédské zemědělské univerzity v Uppsale na analýzu folátů. Ihned po doručení byly vzorky vakuově zabaleny do plastových obalů a uloženy zmražené při -20°C až do doby analýzy (ne však déle než 1 týden). Reprezentativní vzorky řepy byly připraveny z 5-7 kusů řepy. Poté byly vzorky oprány, oloupany a rozkrájeny a naplněny do sklenic s vodným roztokem v poměru vzorek ku nálevu (2:1). Nálev obsahoval kyselinu octovou, cukr, konzervační prostředek (sorbit draselný) a koření. Naplněné sklenice byly uzavřeny hliníkovými uzávěry a pasterovány po dobu 40 min při 90°C . Sklenice (1 týden, 3 měsíce a 15 měsíců po zpracování) poté byly zaslány švédské univerzitě na analýzu. Sklenice na univerzitě byly uloženy při 8°C do analýzy nejdéle 2 dny. Připravené extrakty vzorků byly ihned zmraženy při -20°C . [20]

Vlastní přípravě vzorku předcházela příprava enzymatického preparátu *folátové konjugasy*. Suspenze *folátové konjugasy* z vepřové ledviny byla připravena podle Phillipse a Wrighta [21] homogenizací 10g vepřové ledviny v acetonu ve 100 ml L-cystein hydrochloridového roztoku ($100\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, pH upraveno NaOH na 4.6). Poté byl preparát inkubován 4 hodiny při 37°C a následně odstředěn při 27 000 otáčkách po dobu 30 minut. Enzym byl izolován ze získaného supernatantu podle autorů Gregory, Sartain a kol. (1984) precipitací 75% síranem amonným, následně odstředěn a znovu rozpuštěn ve 100 ml 50 mM acetátodraselného pufru (pH 4,5) obsahujícího 10 mM 2-merkapt ethanol. Pro odstranění získaných endogenních folátů byla enzymová suspenze podrobena dialýze skládající se ze dvou kroků; použitím 2 l octanového pufru v každém kroku po dobu 2 hod a potom přes noc. Dialýza byla provedena mícháním při 4°C . Připravený vzorek *folátové konjugasy* byl skladován při -20°C do doby použití (ne však déle než 3 měsíce).

Všechny vzorky řepy byly analyzovány 2x. Předem rozsekané a zvážené vzorky (6g) byly homogenisovány v Ultra-Turrax homogenizátoru (IKA, Německo) ve 20 ml extrakčního pufru (0,1M fosfátový pufr o pH6 obsahující 2 % askorbáru sodného a 0,1 %

2-merkapt ethanolu) dokud se neutvořila homogenní suspenze. Homogenizační zkumavky obsahující homogenát byly propláchnuty dusíkem, pevně zavíčkované a zahřáty 10 minut ve vroucí vodní lázni. Tuby byly během zahřívání dvakrát protřepány. Následně byly extrakty rychle zchlazeny ledem, pH extraktů bylo upraveno pomocí kyseliny octové na hodnotu 4,9 a byla přidána vepřová ledvinová *konjugasa*. Vzorke byly opět vystaveny dusíku, zavíčkované a inkubovány ve vodní lázni při 37°C za stálého protřepávání po dobu 3 hodin. Inkubované extrakty byly následně zahřáty 5 min ve vroucí vodní lázni, aby došlo k inaktivaci enzymů, poté byly zchlazeny ledem a odstředovány 15 min při 4°C a při 27 000 otáčkách. Supernatanty byly přemístěny do 50 ml odměrné baňky a zbytky vzorků byly znovu rozpuštěny ve 20 ml 0,1M fosfátového pufru (pH 6) obsahujícího 0,1 % 2-merkapt ethanolu, následně vystaveny dusíku a odstředěny 15 min při 27 000 otáčkách a teplotě 4°C. Tyto podíly supernatantů byly přidány do odměrné baňky k prvnímu supernatantu a doplněny na 50 ml 0,1M fosfátovým pufrem (pH 6) obsahujícím 0,1 % 2-merkapt ethanolu a důkladně promíchány.

Čištění extraktů před HPLC analýzou bylo provedeno SPE-extrakcí aniontovým měničem (SAX) Isolutic kazetou (500 mg, 3 ml, International Sorbent Technology, UK). Pro vymývání pod sníženým tlakem bylo užíváno zařízení Visiprep SPE Vacuum Manifold (Supelco, USA). Kazeta byla kondicionována methanolem (2x2,5 ml) a vodou (2x2,5 ml) s průtokem 1-2 kapky.s⁻¹. 2,5 ml extrahovaného vzorku bylo aplikováno do kazety a eluováno rychlostí nepřesahující 1 kapku.s⁻¹. Kazeta byla promyta vodou (2x2,5 ml), aby došlo k odstranění interferujících složek (průtok 1-2 kapky.s⁻¹). Zachycené foláty byly eluovány pomalu (průtok nepřesahoval 1 kapku.s⁻¹) 0,1M octanem sodným obsahujícím 10 % NaCl, 1 % kyseliny askorbové a 0,1 % 2-merkapt ethanolu. První část eluátu (0,7 ml) byla vyřazena a druhá část (3,8 ml) byla zachycena.

5.1.1 Vlastní HPLC analýza

Všechny experimenty byly provedeny s použitím chromatografu Agilent 1100 vybaveným čerpadlem, termostatovým autosamplerem, vyhřívanou kolonou, fluorescenčním a diodovým detektorem. Agilent Chemstation software byl použit pro kontrolu HPLC analýzy a pro zpracování dat. Pro separaci folátů byly testovány 2 analytické kolony: Lichrospher 100 RP-18, 125x4,0 mm, 5 μm (Merck, Darmstadt, Německo) s předkolonou (4x4,0 mm, 5 μm) a jako druhá Zorbax SB C₈, 150x4,6 mm, 5 μm (Agilent Technologies, USA) s předkolonou (12,5x4,6 mm, 5 μm). Chromatografické podmínky pro gradientovou eluci

byly následující: průtok $0,4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, objem vzorku $20 \mu\text{l}$, teplota kolony 23°C , teplota autosampleru 8°C , fluorescenční detekce s excitací 290 nm a emisí 360 nm , UV detekce při 290 nm . Mobilní fáze byla složena ze směsi z 30 mM fosforečno-draselného pufru (pH 2,3) a acetonitrilu. Gradient začal při 6% acetonitrilu, prvních 5 min byla mobilní fáze udržována izokraticky, potom byl obsah acetonitrilu zvednut lineárně až na 25% během 20 min . Celková doba analýzy byla 33 min . Izokratická eluce byla provedena s mobilní fází obsahující 8% acetonitrilu ve 30 mM fosforečno-draselném pufru (pH 2,3) a celková doba analýzy byla 26 min , další podmínky viz. výše.

HPLC metodou byly stanoveny tetrahydrofolát, 5-methyl-tetrahydrofolát, 5-formyl-tetrahydrofolát a kyselina listová (retenční čas $20,6$ a $21,7 \text{ min}$).

5.2 Kapalinová chromatografie pro určení přídatku kyseliny listové ve fortifikovaných cereálních výrobcích.

Vzorky komerčních snídaňových cereálních potravin fortifikovaných kyselinou listovou na 25 až 100% z doporučeného denního příjmu ($400 \mu\text{g}$ na porci), byly zakoupeny v supermarketu. [22]

Snídaňové cereálie byly rozemlety (Model A-10, Tekmar, Cincinnati, OH, USA). Všechny vzorky (2 g) byly homogenizovány 1 hod. v 50 ml $0,1 \text{ M}$ K_2HPO_4 (pH bylo upraveno na hodnotu $8-9$ pomocí KOH nebo H_3PO_4) obsahující $0,05 \%$ askorbátu. Pak bylo pH upraveno na $6,9$ pomocí kyseliny fosforečné, následně byl pomocí α -amylasy hydrolyzován škrob po dobu 1 hodiny ve vodní lázni při 65°C . α -amylasa byla získána z *Aspergillus oryzae* (Type X-A, Sigma), enzym byl rozpuštěn v destilované vodě, přefiltrován, aby výsledná koncentrace enzymu byla $25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Na každý 1 g vzorku byl použit 1 ml roztoku enzymatického preparátu. Po enzymatické hydrolýze byla teplota zvednuta na 90°C , aby došlo k inaktivaci enzymu. Vzorek byl následně zchlazen a odstředěn při $5\ 000$ otáčkách 15 minut , poté byl jeho objem upraven na 50 ml a supernatant byl pak filtrován přes $0,45 \mu\text{m}$ filtr před aplikací vzorku do HPLC systému.

Pro přečištění vzorku byla použita technika SPE–extrakce; modifikované procedury pomocí Vahteristo *et al.* s aniontovými měniči. Kazeta byla smáčena 3 ml hexanu,

následně 3 ml methanolu, pak upravena 5 ml K_2HPO_4 pufrům na pH 8-9 obsahujícím 0,05 % kyseliny askorbové. Část vzorku (4 ml) pak byla zředěna s 2 ml fosfátového pufru a aplikována na kolonu při průtoku $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Kolona byla vypláchnuta 2 ml zředěného 0,02M fosfátového pufru. Kyselina listová byla vymývána z kazety minimálně 4 ml 0,1M octanu sodného (pH 4,5) obsahujícího 5 % Na_2HPO_4 a 0,05 % kyseliny askorbové.

5.2.1 Chromatografické podmínky

Analýza byla vykonána pomocí metody HPLC. Přístroj se skládal z pumpy Waters Model 510 (Waters, Milford, MA, USA), vstřikovacího ventilu Rheodyne (Cotati, CA, USA) s 20 μl smyčkou a detektorem Waters 486 UV-VIS operujícím při 280 nm. Předkolona Brownlee 30x2,1 mm, 5 μm ODS náplní (Varian, Sunnyvale, Ca, USA), byla nainstalována před vlastní kolonu Microsorb-MV C_{18} , 100x4,6 mm, 3 μm (Varian). Mobilní fáze byla složena z (24-26 %):(76-74 %) methanolu ve fosforečno-draselném pufru (0,0035M KH_2PO_4 a 0,0032 M K_2HPO_4), pH 6,8, obsahující 0,005M tetrabutylammonium dihydrogenfosfát (Sigma), jako ion-párové činidlo. Průtok mobilní fáze byl $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a eluce probíhala izokraticky. Chromatogramy byly vyhodnoceny použitím Hewlett-Packard (Wilmington, DE, USA) Model HP 3395A integrátoru.

Retenční čas kyseliny listové u vzorku cornflake byl 14,35 min.

5.2.2 Mikrobiologická zkouška

Extrakty připravené pro techniku HPLC byly podrobeny také mikrobiologické zkoušce pro stanovení obsahu folátů. Celkový obsah folátů byl stanoven pomocí *Lactobacillus casei* ATCC 7469 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) v bacto-FA mediu (Difco Labs, Detroit, Mi, USA). Po inkubaci za 24 hodin při 37°C byl nárůst *L. casei* měřen turbidimetricky při 640 nm.



Lactobacillus casei

5.3 Stanovení kyseliny listové iontově-výměnnou HPLC v ovocném džusu obohaceném vitaminy po předchozí extrakci technikou SPE

Standart kyseliny listové byl získán od firmy Fluka (Steinheim, Německo : čistota (HPLC) ≥ 97 %). Standardní roztok (200 mg.l^{-1}) byl připraven rozpuštěním $10,0 \text{ mg}$ FA (Folic Acid) v 50 ml $0,1\text{M}$ fosfátového pufru (pH 7,0) obsahujícího 1 % askorbátu sodného. 5 ml alikvotní podíl standardního roztoku byl skladován při -18°C . Pracovní standardní roztoky byly připravovány denně rozpuštěním v $0,1\text{M}$ octanovém pufru (pH 4,9) obsahujícím 1 % askorbátu sodného. Standardní roztok byl stabilní po dobu 4 týdnů při teplotě -18°C . [23]

5.3.1 HPLC analýza

Pro analýzu kyseliny listové byl použit chromatograf Hewlett-Packard HP 1100 (Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn, Německo) s autosamplerem, pumpou, diodovým detektorem (DAD) a termostatovanou kolonou. Pro zpracování dat byl použit HP3D ChemStation software. Podmínky analýzy byly následující: teplota kolony 25°C , průtok 1 ml.min^{-1} , objem dávkovací smyčky $20 \mu\text{l}$, UV-detekce 284 nm . Chromatografická separace byla provedena na koloně Eurospher 100 C_{18} , $250 \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ s předkolonou C_{18} , $20 \times 4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ (obě Knauer, Berlín, Německo). Pro gradientovou eluci byly připraveny mobilní fáze A a B. Mobilní fáze A i B obsahovaly 5 mM tetra-*n*-butylamonium hydrogensulfát a 25 mM NaCl ve vodě, mobilní fáze B navíc obsahovala ještě 1 mM dihydrogenfosforečnan draselný ve vodě a 65 % acetonitrilu. Eluce mobilní fází probíhala prvních 10 min lineárně až na hodnotu 36 %. Po 35 min analýzy byl poměr obou mobilních fází $50:50$ a tento poměr byl udržován po dobu dalších 3 min . Před HPLC analýzou byly všechny roztoky filtrovány použitím Chromafil-Pet-45/25 filtru (Macherey-Nagel, Düren, Německo) s rozměrem $0,45 \mu\text{m}$.

Pro přečištění vzorku byla použita SPE-extrakce, která byla provedena použitím Chromabond-SB kazety se silným aniontovým měničem (Macherey-Nagel, Düren, Německo). Extrakce probíhala při tlaku 80 kPa . Přečišťující proces byl následující : SPE kazeta (500 mg , 3 ml) byla kondicionována elucí *n*-hexanu, methanolu a vody (6 ml). Po posledním promývacím kroku bylo odstraněno asi $0,5 \text{ cm}$ supernatantu a na kolonu byla aplikováno 5 ml vzorku. Eluce vzorku byla nastavena na 1 kapkou za sekundu.

Před HPLC analýzou byly všechny roztoky filtrovány použitím Chromafil-Pet-45/25 filtru (Macherey-Nagel, Düren, Německo) s 0,45 μm .

5.3.2 Vzorky

Jablečný džus, višňový nektar (40%) a rybízový nektar (30%) a 9 ovocných džusů a nápojů obohacených o vitaminy. Retenční čas u višňového nektaru pro kyselinu listovou byl přibližně v 17 min.

5.4 Stanovení folátů v zelenině a ovoci ve Finsku aplikací HPLC analýzy

Vzorky zeleniny a ovoce byly zakoupeny v obchodech, supermarketech a stáncích (celkem 10 vzorků) ve finských městech Helsinky, Espoo a Vantaa v době mezi květnem 1995 a květnem 1996. Čerstvé vzorky byly skladovány 2 dny po nákupu a uskladněny při 4°C. Konzervované a zmražené potraviny byly skladovány 4 dny před analýzou za vhodných podmínek. Pro analýzu byla z každého vzorku odebrána malá část (100-150g).

5-7g vzorků bylo umístěno do skleněných lahví. Bylo přidáno 10-12 ml chladného extrakčního pufru a vystaveno dusíku před uskladněním při -20°C. Vzorky byly uloženy maximálně několik týdnů před analýzou. [24]

Pro hydrolyzu vzorku byla použita vepřová *konjugasa*. Vzorky byly inkubovány při 37°C 3 hodiny (pomeranč 5 hod) při pH 4,9. Extrakty poté byly zanechány 5 min ve vroucí vodní lázni, aby došlo k inaktivaci enzymu a následně zchlazeny ledem.

Vzorky bohaté na škrob (syrové a vařené brambory, smažené hranolky, řepka olejka, banán, mražení hrášek a hrachový polévkový koncentrát) byly před dekonjugací přečištěny α -amylasou. 200 μl α -amylasy (Sigma A0273) o koncentraci 500 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ bylo přidáno k extraktu (3 ml) a vzorek byl inkubován 3 hodiny a pH bylo upraveno kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 4,9 před ošetřením vepřovou *dekonjugasou*.

Inkubované extrakty vzorků byly podrobeny SPE extrakci s aniontovým měničem (kvartérní amin, J.T. Baker Inc., Phillipsburg, NJ). Před SPE extrakcí byly vzorky přefiltrovány pře nylonový filtr o velikosti pór 0,8 μm .

5.4.1 Chromatografické podmínky

Kapalinový chromatograf Varian Vista 5500 byl vybaven chlazeným Waters 700 Satellite WISP autosamplerem a Waters 470 fluorescenčním detektorem a Varian UV-200 detektorem. Pro vyhodnocení chromatografických dat byl použit software (Millennium 2010

chromatography manager). Separace probíhala na kolonách Spherisorb ODS (fázová separace, Clwyd, UK, 250x4,6 mm, 5 μm), a Shandon (Cheshire, UK) Hypersil ODS (150x4,6 mm, 3 μm) a předkoloně (Novapak C₁₈ Guard-Pak, Waters, Milford, MA). Separace probíhala při 30°C. Pro některé deriváty folátů byla excitační a emisní vlnová délka detektoru 290 a 356 nm a pro ostatní 360 a 460 nm. UV detektor byl nastaven na vlnovou délku 290 nm. Byla použita gradientová eluce, kde mobilní fáze obsahovala acetonitril a 30 mM fosforečno-draselný pufr (pH 2,2). Množství acetonitrilu stoupalo prvních 14 min lineárně z 9 % na 25 %. Celková doba analýzy byla 30 min a průtok byl 0,5 ml.min⁻¹. Retenční čas u brambor a karotky byl u tetrahydrofolátu přibližně 20 min, 5-methyltetrahydrofolátu 24 min a u 5-formyltetrahydrofolátu 26 min.

5.5 Stanovení folátů v mořských řasách metodou HPLC

Sušené mořské řasy rodu *Himanthalia elongata*, *Laminaria ochroleuca*, *Palmaria* spp., *Undaria pinnatifida* a *Porphyra* spp. byly získány od firmy Algamar (Redondela, Pontevedra, Španělsko). Vzorky byly přesušeny 24 hodin při 45°C a následně zabaleny do polypropylenových obalů. Konzervované vzorky řas rodu *Himanthalia elongata* a *Saccorhiza polychides* byly získány z konzervárny Conservas y Ahumados LOU (Ribeira, La Coruna, Španělsko). Řasy byly připraveny konzervací a sterilizací s vodou a solí. Konzervace vyžadovala zahřátí na teplotu 112°C po dobu 40 min v autoklávu. Sušené a konzervované vzorky řas byly sesbírány na atlantickém pobřeží v regionu Galicia (NW Španělsko). [25]



Undaria pinnatifida

Před analýzou byly všechny vzorky vysušeny. Nadměrné množství vody z konzervovaných řas bylo odstraněno tak, že řasy byly vysušeny v termostatu při 45°C 48 hodin a potom při 50°C 10 hodin ve vakuu.

Enzym z vepřové ledviny byl připraven extrakcí acetonem (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) podle postupu Kamena a Castona. [26] Aktivita vepřové konjugasy byla hodnocena měřením uvolněné kyseliny listové z PteGlu₃. Jeden mililitr vepřové konjugasy byl

přidán k 16 μg PteGlu₃ v 1,5 ml 0,1M octanovém pufru, 1 % askorbátu (pH 4,9). Reakce byla ukončena po 45 min při inkubační teplotě 37°C. Uvolněná kyselina listová byla analyzována pomocí HPLC. Efektivní dekonjugace byla provedena smícháním 3 ml alikvotního podílu z každého vzorku řas obsahujícího 57 nmol PteGlu₃ s 1 ml připravené *konjugásky*. Dekonjugace proběhla ve vodní lázni po dobu 3 hodin při 37°C.

5.5.1 Extrakce vzorku a inkubace

Foláty byly extrahovány z řas metodou Vahteristo *et al.* [27] s nepatrnou modifikací. Ke 2g vzorku bylo přidáno 30 ml extrakčního pufru (75 mM K₂HPO₄ obsahující směs 52 mM kyseliny askorbové/askorbátu a 0,1 % 2-merkapoethanol, pH bylo upraveno kyselinou fosforečnou na pH 6) a ihned byla směs míchána po dobu 20 s. Homogenizované vzorky byly propláchnuty dusíkem, zavíčkované a umístěny do vodní lázně při 100°C po dobu 10 min. Po ochlazení ledem byla směs odstředěna při 11 000 otáčkách za 20 min a následně odstraněn supernatant. Zbytek vzorku byl znovu rozpuštěn v 10 ml extrakčního pufru a znovu odstředěn po dobu 10 min. Oba získané supernatanty byly smíchány a doplněny na objem 50 ml extrakčním pufrům v odměrné baňce. 3 ml extraktu vzorku byly upraveny na pH 4,9 kyselinou octovou a smíchány s 1 ml připravené *konjugásky*. Směs byla následně vystavena dusíku a potom inkubována ve vodní lázni po dobu 120 minut. Aby došlo k inaktivaci enzymů, byl extrakt ponechán 5 min ve vroucí vodní lázni a nakonec ochlazen ledem.

SPE extrakce byla provedena 3 ml silného aniontového měniče (kvartérní amin) (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Extrakt vzorku byl zředěn 6 ml deionizované vody a 1 μl 2-merkapoethanolu před zavedením do kolony. Před použitím byla extrakční kazeta SPE (3 ml) aktivována promytím postupně methanolem (2 ml) a deionizovanou vodou (2 ml). Po aktivaci byly na kolonu aplikovány 2 ml směsi 0,01M fosfátového pufru obsahujícího 0,1 % 2-merkapoethanolu (pH 7). Aplikovaný vzorek procházel kolonou rychlostí menší než 1 ml.min⁻¹. Kolona byla dvakrát vymyta 0,01M fosfátovým pufrům (1,5 ml) a foláty byly eluovány s 3 ml 0,1M octanu sodného obsahujícího 10 % NaCl a 1 % kyseliny askorbové. Před HPLC analýzou byly vzorky filtrovány přes 0,5 μm Millipore filtr (Bedford, MA, USA) a potom aplikovány do kolony na HPLC systém.

5.5.2 HPLC analýza

Kapalinový chromatograf (Hewlett-Packard, CA, USA) se skládal z HP1100 kvartérní pumpy, HP1100 degaséru a objem vstříkovací smyčky byl 20 μl (Rheodyne, Cotati, CA). Kolona byla termostatována (San José, CA, USA), jako detektor byl použit detektor fluorescenční a UV (HP1100). Výsledky analýzy byly vyhodnoceny pomocí počítače s HP ChemStation Softwarem. Separace byla provedena na koloně Tracer Extrasil ODS2, 250x4,6 mm, 5 μm s předkolonou TR-C160-1 ODS, 15x4,0 mm, 5 μm (Teknokroma, Barcelona, Španělsko) při 30°C.

Operační podmínky byly: teplota kolony 30°C, průtok 0,8 ml.min⁻¹, objem smyčky 20 μl . Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a 30 mM fosforečnanu draselného (pH 2,2). Během prvních 4 min probíhala mobilní fáze izokraticky ve složení 10 % acetonitrilu a 90 % fosfátového pufru, následně do 8 minuty byl poměr acetonitrilu zvednut na 15 % a během dalších 3 minut bylo množství acetonitrilu vráceno na výchozí hodnotu 10 %.

Absorbance všech vymývaných folátů byla sledována UV detektorem při vlnové délce 290 nm pro kyselinu listovou a fluorescenčním detektorem při excitaci 290 nm a emisi 356 nm pro tetrahydrofolát, 5-methyltetrahydrofolát a 5-formyltetrahydrofolát. Retenční čas kyseliny listové byl přibližně v 9 minutě.

5.6 Stanovení folátů v potravinách metodou HPLC s fluorescenční detekcí po předkolonové konverzi 5-methyltetrahydrofolátu.

Standardy folátů byly získány z laboratoře Schirck (Jona, Švýcarsko) a Sigma (Saint-Quentin Fallavier, Francie). [28]

Z enzymatických preparátů byly použity: kuřecí pankreatická *konjugasa* (Difco Laboratoř, Detroit, MI, USA), *konjugasa* z plazmy krys z univerzitní laboratoře, připravená podle postupu Koninga [29] a *konjugasa* z vepřových ledvin, připravená z čerstvých vepřových ledvin podle postupu Pedersena. [30] Ostatní enzymy, které byly použity byly získané z plísně *Aspergillus oryzae*.



Aspergillus oryzae

Jako vzorky byly použity následující potraviny: zmražený hrášek, zmražený špenát, sušené mléko, kvasnice, pšeničná mouka, ovocný džus, vaječný žloutek, jablka, čerstvá hovězí játra a filety. Pouze ovocný džus byl suplementován kyselinu listovou. S výjimkou sušených produktů (sušené mléko, kvasnice, pšeničná mouka) byly všechny potraviny před analýzou uloženy ve zmraženém stavu. Pevné vzorky byly nejprve rozemlety. Všechny operace byly provedeny za nepřístupu denního světla.

5.6.1 Extrakce folátů

5.6.1.1 Extrakce bez enzymatického přečištění

Navážené vzorky byly dány do 100 ml Erlenmeyerovy baňky. Ke vzorkům bylo přidáno 30 ml 100 mM fosfátového pufru (pH 7) obsahujícího 1 % kyseliny L-askorbové a následně byly vzorky umístěny do vroucí vodní lázně a zahřívány 10 min při 100°C (u vzorku pšeničné mouky byl tento krok vynechán). Po zchlazení vzorku, byl objem doplněn do 50 ml 100 mM fosfátovým pufrům (pH 7) obsahujícím 1 % kyseliny L-askorbové (u sušeného mléka bylo pH během analýzy sníženo na pH 4,5 přidávkem 5M HCl za účelem vysrážení proteinů). Vzorky byly odstředěny při 5000 otáčkách po dobu 10 min. 5-10 ml supernatantu bylo přemístěno do 150 ml Erlenmeyerovy baňky (u vzorku sušeného mléka bylo pH upraveno 5M NaOH na pH 7).

5.6.1.2 Extrakce vzorku dekonjugací

5-10 ml supernatantu získaného v předchozím postupu bylo umístěno do 150 ml Erlenmeyerovy baňky. Ke vzorku byl přidán 1 ml roztoku kuřecí pankreatické *konjugasy* (koncentrace 5 mg.ml⁻¹) nebo 500 µl *konjugasy* s krysí plazmy. Směs byla následně zahřáta při 37°C 1 h (pro kuřecí pankreatickou *konjugasu*) nebo 2 h (krysí plazmatickou *konjugasu*).

5.6.1.3 Extrakce s enzymatickým přečištěním

Vzorky byly naváženy do 100 ml Erlenmeyerovy baňky. Ke vzorku bylo přidáno 30 ml 100 mM fosfátového pufru (pH 6) obsahujícího 1 % kyseliny askorbové, 25mg *serin proteasy* a 50mg α -*amylasy*. Následně byla směs inkubována při 37°C po dobu 4 h a poté umístěna do vroucí vodní lázně (100°C, 10 min). Po zchlazení vzorku, bylo pH upraveno 5M NaOH na pH 7 a poté byl objem doplněn do 50 ml 100 mM fosfátovým pufrem (pH 7) obsahujícím 1 % kyseliny L-askorbové, vzorek byl odstředěn při 5000 otáčkách po dobu 10 min. 5-10 ml supernatantu bylo umístěno do 150 ml Erlenmeyerovy baňky a dále byl vzorek přečištěn podle postupu v kapitole 5.6.1.2.

5.6.2 Předkolonová konverze folátů 5-CH₃-H₄PteGlu_n

K připraveným roztokům bylo přidáno 5 ml 100 mM fosfátového pufru, obsahujícího 40 % askorbátu sodného (pH 7,4) a to samé množství bylo přidáno k 500 μ l standardního roztoku kyseliny listové. Dále bylo přidáno 15 ml 66 mM Tris pufru (pH 7,8), 1 ml 2-oktanolu a poté 10 ml NaBH₄ o koncentraci přibližně 32 mmol. Poté byl vzorek protřepáván a nechán stát 10 min. pH bylo upraveno 5M kyselinou octovou na 7,4. Po upravení pH byl vzorek 1 min protřepán a bylo přidáno 80 μ l 1 mmol formaldehydu a 10 ml NaBH₄ o koncentraci 32 mmol. Dále bylo pH upraveno koncentrovanou (37 %) HCl na pH<1. Následně se roztok nechal stát 10 min a poté bylo pH upraveno 5M NaOH na 5. Poté bylo ještě jednou opatrně přidáno 10 ml NaBH₄ a roztok se nechal stát 20 min. Objem vzorku byl doplněn na konečnou hodnotu (100 ml) Tris pufrem. Roztok byl přefiltrován přes cellulóso-acetátový filtr (0,45 μ m).

5.6.3 Přečištění vzorku na afinitní koloně

K přečištění vzorku byl použit afinitní chromatografický sorbent (Affi-gel 10) s imobilizovanými proteiny pojícími foláty (FBPs), připraven podle postupu Koninga. [30] Před použitím, byla kolona promyta 10 ml 100 mM fosfátového pufru (pH 7). Přibližně 10 ml překonvertovaného vzorku (podle 5.6.2.) bylo aplikováno na kolonu. Kolona byla ještě promyta 10 ml 25 mM fosfátového pufru (pH 7) před aplikací vzorku na kolonu. Foláty byly eluovány 8 ml roztoku obsahujícího 20 mM trifluoroctovou kyselinu a 20 mM dithioerytritol do 10 ml odměrné baňky, která již obsahovala 200 μ l 25% roztoku kyseliny

askorbové a 40 μl roztoku KOH (600 g.l^{-1}). Konečný objem byl doplněn na 10 ml eluentem. Průtok kolonou při eluci byl asi 0,3 ml.min^{-1} .

5.6.4 Chromatografické stanovení

HPLC systém obsahoval zásobník mobilní fáze 3012 (Varian, Les Ulis, Francie), 9300 dávkovací smyčku (Varian), 9050 UV-vis detektor (Varian) a 9075 fluorescenční detektor (Varian). K vyhodnocení výsledků analýzy byl použit Star Chromatographic integrátor (Varian). Pro analýzu byly použity kolony LiChrospher 100RP 18; 250x5 mm; octadecylsilyl; 5 μm (Merck, Darmstadt, Německo) a předkolona RP 18; 4x4 mm, octadecylsilyl, 5 μm (Merck).

5.6.4.1 Chromatografická separace monoglutamátu kyseliny listové

Eluce probíhala gradientově a mobilní fází byl acetonitril a fosfátový pufr (33 mM, pH 2,3). Prvních 8 min byl poměr fosfátový pufr:acetonitril (95:5). Poté koncentrace acetonitrilu lineárně stoupala na hodnotu 10 % po dobu 10 min a po dobu 7 min na 20 %. Posledních 5 min byla mobilní fáze udržována v poměru 80:20. Poté byla mobilní fáze ihned upravena na výchozí složení (fosfátový pufr:acetonitril, 95:5) a eluce pokračovala dalších 15 min za účelem zregenerování kolony. Průtok mobilní fáze byl 1 ml.min^{-1} a objem smyčky 100 μl . Fluorometrický detektor pracoval při excitační vlnové délce 295 nm a emisní vlnové délce 356 nm. UV detekce probíhala při absorbanci 280 nm.

5.6.4.2 Separace 5-CH₃-H₄PteGlu₁₋₈

Byla použita gradientová eluce a mobilní fází byl acetonitril a fosfátový pufr (50 mM, pH 4,6). Startovací mobilní fází byl pouze čistý fosfátový pufr. Poté obsah acetonitrilu stoupal lineárně 15 min na 10 %, a během dalších 5 min na 20 %. Konečné složení mobilní fáze (80:20) bylo udržováno po dobu 5 min. Poté byla mobilní fáze ihned upravena na počáteční složení a eluce pokračovala dalších 20 min za účelem zregenerování kolony. Průtok mobilní fáze byl 0,8 ml.min^{-1} a objem smyčky 100 μl . Retenční čas byl přibližně 15 min. Fluorometrická detekce, kalibrace a obnovovací testy byly provedeny podle části 5.6.4.1.

5.7 Stanovení folátů v potravinách a v italské stravě pomocí HPLC

Nejvíce folátů se v potravinách vyskytuje ve formě polyglutamátů. Převládající přirozená forma folátů v potravinách, v ovoci a zelenině je 5-methyltetrahydrofolát, v živočišných

produktech je to 5-methyltetrahydrofolát a tetrahydrofolát, v obilných produktech také 5-formyltetrahydrofolát. 10-formylhydrofolát a 10-formyllistová kyselina byly objeveny v přiměřeném množství společně s 5-methyltetrahydrofolátem a kyselinou listovou. [31]

5g tepelně opracovaných masných výrobků (př. Parmská šunka) bylo naváženo do 50 ml odměrné baňky. Vzorky byly extrahovány 35 ml horkého extrakčního 0,1M fosfátového pufru (pH 6) obsahujícího 1 % askorbátu sodného a 0,1 % 2-merkptoethanolu.

Po přidání horkého pufru a přidání plynného dusíku se vzorek uzavřel a zahříval 10 minut v horké vodní lázni. Zchlazené vzorky byli pak odstředovány v odstředivce Ultra Turrax po dobu 30 sekund při 13 500 otáčkách.

5.7.1 HPLC analýza

Varian Vista 5500 kapalinový chromatograf byl vybaven chlazeným Waters WISP 700 autosamplerem a dvěma detektory (UV, fluorescenční). Fluorescenční detektor Waters 470 a UV detektor Waters 487 (Waters, Milford, MA, USA) a softwarem (MILLEN-NIUM chromatography manager). Monoglutamát kyseliny listové byl separován použitím Shandon (Cheshire, UK) Hypersil ODS kolony 150x34,6 mm, 3 μm . Eluce vzorku byla gradientová. Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a 30mM fosfátového pufru (pH 2,2) a průtok mobilní fáze byl 0,8 ml.min⁻¹. Doba analýzy byla 30 minut. Gradientová eluce začala po dobu 9 min s obsahem 5 % acetonitrilu po celou tuto dobu. Poté se koncentrace acetonitrilu zvyšovala lineárně na 17 % do 30 min analýzy. Objem dávkovacího vzorku byl 100 μl . Absorbance folátů byla sledována při vlnové délce 290 nm a s fluorescenčním detektorem při excitaci 290 nm a emisi 356 nm (pro redukovaný folát monoglutamát). Retenční čas 5-methyltetrahydrofolátu byl přibližně 23 min.

5.7.2 Mikrobiologie

Celkový obsah folátů byl taky stanoven mikrobiologickou zkouškou s *Lactobaciillus casei* používáním kaseinového media pro kyselinu listovou (Difco, Detroit, MI, USA). Část extraktů byla vystavena dusíku a uložena při -20°C až do doby analýzy (Difco, Detroit, MI, USA).

ZÁVĚR

Kyselina pantothenová a listová patří do skupiny vitaminů rozpustných ve vodě. Organismus si nedokáže tyto vitaminy ukládat do zásoby, jejich nadbytek vylučuje močí a proto musí být tyto vitaminy průběžně doplňovány. Zdrojem těchto vitaminů jsou potraviny jak rostlinného, tak i živočišného původu. Mezi potraviny rostlinného původu obsahující kyselinu pantothenovou patří především obiloviny, luštěniny, rýže, ovoce, zelenina a mezi potraviny živočišného původu především játra, vejce, hovězí maso a mléko. Kyselina listová má největší zastoupení v zelenině (chřest, špenát, tuřín, brokolice) a mezi potravinami živočišného původu hrají hlavní roli játra.

Cílem bakalářské práce bylo najít metodiku pro jejich izolaci v potravinách a stanovit je pomocí Vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Principem HPLC je rozdělování složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi a je velmi rozšířenou a komplexní metodou pro stanovování vitaminů. Bakalářská práce obsahuje mimojiné popis a složení kapalinového chromatografu. Mezi základní zařízení kapalinové chromatografie patří zásobníky na mobilní fáze, vysokotlaká pumpa, dávkovače, předkolona, kolona, detektor a počítač s vyhodnocovacím softwarem. Mobilní fázi bývá nejčastěji v technice s rezervní fází voda, methanol, acetonitril nebo pufr. Nejčastěji používanými detektory v kapalinové chromatografii jsou detektory spektrofotometrický (UV-VIS), fluorescenční a ECD (elektrochemický).

Vlastní stanovení kyseliny pantothenové pomocí HPLC analýzy je popsáno v kapitole 4. Při stanovení kyseliny pantothenové v mléce a mléčných preparátech, byla jako mobilní fáze použita směs vody a acetonitrilu v poměru 50:50 a detekce prováděna při vlnové délce 200, 205 a 240 nm. Retenční čas pro kyselinu pantothenovou byl v případě použití kolony Platinum (53x7 mm, 3 μm) přibližně v 6 minutě a použitím kolony Develosil (250x4,6 mm, 5 μm) přibližně v 17,5 minutě. Při stanovení např. v játrech, hrášku, čočce a kuřecím masu byla jako mobilní fáze použita směs methanol a acetonitril. Fluorometrická detekce byla provedena při excitační vlnové délce 345 nm a emisní vlnové délce 455 nm. Retenční čas kyseliny pantothenové byl přibližně ve 29 minutě.

Mezi další metody pro stanovení kyseliny pantothenové patří mikrobiologická metoda s využitím bakterie *Lactobacillus plantarum*, dále kolorimetrie, plynová chromatografie

a radiometricko-mikrobiologická zkouška. Tyto metody jsou již na ústupu a to právě díky novým technikám HPLC.

Stanovení kyseliny listové pomocí HPLC analýzy je popsáno v kapitole 5. Stanovení bylo provedeno u vzorků potravin: červená řepa, cereální výrobky, ovocný džus, ovoce, zelenina, mořské řasy, masné výrobky atd. U vzorku červené řepy byla jako mobilní fáze použita směs složená z 30 mM fosforečno-draselného pufru (pH 2,3) a acetonitrilu. Detekce byla provedena pomocí fluorescenčního detektoru při excitaci 290 nm a emisí 360 nm a pomocí UV detektoru při 290 nm. Retenční čas kyseliny listové byl 20,6 a 21,7 min. Při stanovení kyseliny listové ve vzorcích cereálií byla mobilní fáze složena z methanolu a fosforečno-draselného pufru. UV-VIS detektor operoval při 280 nm. Retenční čas kyseliny listové u vzorku cornflake byl 14,35 min. U vzorku ovocného džusu byla mobilní fáze složena z fáze A a B. Mobilní fáze A i B obsahovaly 5 mM tetra-n-butylamonium hydrogensulfát a 25 mM NaCl ve vodě, mobilní fáze B navíc obsahovala ještě 1 mM dihydrogenfosforečnan draselný ve vodě a 65 % acetonitrilu. Detekce byla provedena UV detektorem při 284 nm. Retenční čas u višňového nektaru pro kyselinu listovou byl přibližně v 17 min. U vzorků ovoce a zeleniny (banán, karotka, brambory, hranolky, mražený hrášek) byl mobilní fází acetonitril a 30 mM fosforečno-draselný pufr (pH 2,2). Pro některé deriváty folátů byla excitační a emisní vlnová délka detektoru 290 a 356 nm a pro ostatní 360 a 460 nm. UV detektor byl nastaven na vlnovou délku 290 nm. Retenční čas u brambor a karotky byl u tetrahydrofolát přibližně 20 min, 5-methyltetrahydrofolátu 24 min a u 5-formyl-tetrahydrofolátu 26 min. U vzorků sušených mořských řas rodů *Himantalia elongata*, *Laminaria ochroleuca*, *Palmaria* spp., *Undaria pinnatifida* a *Porphyra* spp. byla mobilní fáze složena z acetonitrilu a 30 mM fosforečnanu draselného (pH 2,2). Absorbance všech vymývaných folátů byla sledována UV detektorem při vlnové délce 290 nm pro kyselinu listovou a fluorescenčním detektorem při excitaci 290 nm a emisí 356 nm pro tetrahydrofolát, 5-methyltetrahydrofolát a 5-formyltetrahydrofolát. Retenční čas kyseliny listové byl přibližně v 9 minutě. Při stanovení kyseliny listové u vzorků kvasnic, jablka, vaječného žloutku, sušeného mléka eluce probíhala gradientově a mobilní fází byl acetonitril a fosfátový pufr. Fluorometrický detektor pracoval při excitační vlnové délce 295 nm a emisní vlnové délce 356 nm. UV detekce probíhala při vlnové délce 280 nm. Retenční čas byl přibližně 15 min. Jako poslední bylo stanovení kyseliny listové u vzorku masných výrobků (Parmská šunka). Eluce vzorku byla gradientová. Mobilní fáze byla složena

z acetonitrilu a 30 mM fosfátového pufru (pH 2,2) a absorbance folátů byla sledována při vlnové délce 290 nm a s fluorescenčním detektorem při excitaci 290 nm a emisi 356 nm (pro redukovaný folát monoglutamát). Retenční čas 5-methyltetrahydrofolátu byl přibližně 23 min.

Cílem bakalářské práce bylo shrnout různé extrakční a detekční podmínky pro stanovení kyseliny pantothenové a listové. Tato práce bude sloužit jako podklad pro následnou diplomovou práci, která bude zaměřená na zavedení metodiky HPLC pro již zmiňované vitaminy na ÚPI, UTB ve Zlíně.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Hoza, I., Kramářová, D. *Potravinářská biochemie II.*, UTB ve Zlíně, FT, 2006
- [2] Dostupné na: http://en.wikipedia.org/wiki/Pantothenic_acid
- [3] Dostupné na: http://en.wikipedia.org/wiki/Folic_acid
- [4] Dostupné na: <http://referaty.atlas.sk/prirodne-vedy/biologia-a-geologia/23983/prebytok-vitaminov>
- [5] Dostupné na: <http://nase.rodina.cz/dotaz37707.htm>
- [6] Refsum, H., Ueland, P.M., Nygard, O., Vollset, S.E., Homocysteine and cardiovascular disease. *Annual Review of Medicine* 49 (1) p.31-62, 1998
- [7] Malinow, M.R., Plasma homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases: A mini-review. *Clinical Chemistry* 41 (1) p.173-176, 1995
- [8] Freudenheim, J.L, Grahm, S., Marshall, J.R., Haughey, B.P., Cholewinski, S, Wilkinson, G. Folate intake and carcinogenesis of the colon and rectum. *International Journal of Epidemiology* 20 (2) p.368-374, 1991
- [9] Jennings, E. Folic acid as a cancer preventing agent. *Medical Hypotheses* 45 (3): p.297-303, 1995
- [10] Giovannucci, E., Stampfer, M.J, Colditz, G.A, Hunter, D.J, Fuchs, C, Rosner, B.A, Speizer, F,E, Willett WC. "Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurses' Health Study". *Annals of Internal Medicine* 129 (7): p.517-524. 1998
- [11]. RNDr. Emil Kadoš - Ing. Dušan Berek, Csc. : *Základy kvapalinovej chromatografie*
Alfa, Bratislava, 1978
- [12] Perry, S. G. Amos, R. Brewer, P.I, *Practical Liquid Chromatography*.
Plenum Press, New York, p.166, 1972
- [13] Association of Official Analytical Chemists International. *Official Methods of Analysis*. Vol. 2. 15th ed. AOAC, Arlington, VA, 1990
- [14] Bell, J.G. Microbiological assay of vitamins of the Bgroup in foodstuffs. *Lab. Pract.* 23, p.235, 1974

- [15] Davidek, J., Velisek, J., Cerna, J. and Davidek, T. Gas chromatographic determination of pantothenic acid in foodstuffs. *J. Micronutr. Anal.* 1, p.39, 1985
- [16] Guilarte, T. R., A radiometric microbiological assay for pantothenic acid in biological fluids. *Anal. Biochem.* 178, p.63, 1989
- [17] Moms, H. C., Finglas, P. M., Faulks, R. M. and Morgan, M.R.A., The development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the analysis of pantothenic acid and analogues, Part I. Production of antibodies and establishment of ELISA systems. *J. Micronutr. Anal.*, 4, p.33, 1984
- [18] Woollard, D.C., *Food Chemistry* 69, p.201-208, 2000
- [19] Pakin, C. *et al.*, *J. Chromatogr. A* 1035, p.87–95, 2004
- [20] Jastrebova, J. *et al.*, *Food Chemistry* 80, p.579–588, 2003
- [21] Philips, D.R., Wright, A. J. A., Studies on the response of *Lactobacillus casei* to folate vitamin in foods. *British Journal of Nutrition*, 49, p.181-186, 1983
- [22] Osseyi, E.S. *et al.*, *J. Chromatogr. A* 826, p.235–240, 1998
- [23] Breithaupt, D.E., *Food Chemistry* 74 (2001) p.521–525, 2001
- [24] Vahteristo, L. *et al.*, *Food Chemistry*, Vol. 59, No. 4, p.589-591, 1997
- [25] Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A. *et al.*, *J. Chromatogr. A* 1032, p.135–139, 2004
- [26] Kamen, B.A., Caston, J.D., *J. Lb. Clin. Med.* 83, p.164, 1974
- [27] Vahteristo, L.T., Ollilainen, V., Koivistoinen, P.E., Varo, P., *J. Agric.Food Chem.* 44 p.477, 1996
- [28] Ndaw, S. *et al.*, *J. Chromatogr. A* 928, p.77–90, 2001
- [29] Konings, E.J.M., *J. A.O.A.C Int.* 82, p.119, 1999
- [30] Pedersen, J.C., *Br. J. Nutr.* 59, p.261, 1988
- [31] Ruggeri, S. *et al.*, *J. Chromatogr. A* 855, p.237–245, 1999

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HPCL	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
RP-HPCL	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází
UV-VIS	Ultrafialová oblast/Viditelná oblast spektra
ECD	Elektrochemický detektor
ACP	Acyl Carrier Protein.
CoA, CoA-SH	Koenzym A.
FID	Plamenoionizační detektor (Flame Ionization Detektor)
FH ₂	Dihydrofolát
FH ₄	Tetrahydrofolát
PCB	Polychlorované bifenyly
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
SPE	Extrakce na tuhé fázi (Solid phase extraction)
FA	Kyselina listová (Folic Acid)
GLC	Plynová chromatografie (Gas Liquid Chromatography)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)
RNA	Ribonukleová kyselina (Ribonucleic Acid)
NADP ⁺	Nikotinamidadeninukleotidfosfát

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Schématický nákres kapalinového chromatografu

SEZNAM TABULEK

Tabulka č.1: Aktivní formy vitamínu B₅

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I: Obsah kyseliny pantothenové a listové ve vybraných druzích potravin

Příloha II: Doplnky stravy obsahující kyselinu pantothenovou a listovou

Příloha III: Instrumentální zařízení HPLC

Příloha IV: Ukázka chromatogramů

**PŘÍLOHA I: OBSAH KYSELINY PANTOTHENOVÉ A LISTOVÉ VE
VYBRANÝCH DRUZÍCH POTRAVIN**

Potravina	Obsah kyseliny pantothenové (mg.100g⁻¹)
mléko	35 - 100
vaječný žloutek	100 - 200
ledvinky	100 - 200
játra	100 - 200
hovězí maso	35 - 100
kvasnice	100 - 200
brokolice	35 - 100

Potravina	Obsah kyseliny listové (μg.100g⁻¹)
pšeničné klíčky	331 - 520
brokolice	111
kapusta růžičková	30 - 182
květák	30 - 125
vejce	8 - 67
sója	54 - 240
vlašské ořechy	66 - 77

PŘÍLOHA II: DOPLŇKY STRAVY



COPYRIGHT PEARS HEALTH CYBER



COPYRIGHT PEARS HEALTH CYBER



COPYRIGHT PEARS HEALTH CYBER



COPYRIGHT PEARS HEALTH CYBER

PŘÍLOHA III: INSTRUMENTÁLNÍ ZAŘÍZENÍ HPLC

HPLC chromatograf Clas P



HPLC kolonový termostat CO₂H



Čerpadlo Linear 30



HP 1050 HPLC s Chemstation softwarem

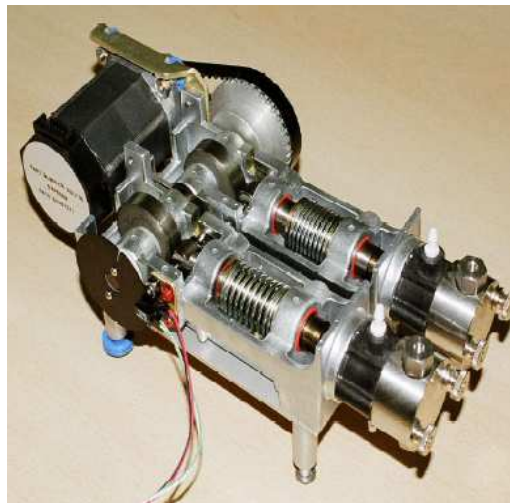


UV detektor a Elektrochemický detektor

(Coulochem III) pro HPLC



Pístové čerpadlo CP 05



PŘÍLOHA IV: UKÁZKA CHROMATOGRAMŮ

