

# **UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Fakulta přírodovědecká  
Katedra anorganické chemie**

**ANALÝZA KOMPLETNÍCH ŽIVOČIŠNÝCH KRMIV**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor práce:

Marie Turková

Studijní obor:

Chemie pro všeoborové studium-Geologie  
a ochrana životního prostředí (učitelství)

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Lucie Hartmanová

**OLOMOUC 2010**

## Souhrn

Krmiva se rozlišují různými kritérii. Základním kritériem, podle kterého se vyčleňují kompletní a doplňková krmiva, je obsah živin. Dále lze podle obsahu vlhkosti rozlišit krmiva konzervovaná, polosuchá a suchá. Ta jsou díky své kompletnosti u spotřebitelů nejvíce vyhledávaná. Jsou vyráběna extruzí, při které jsou výchozí suroviny podrobeny vysokým tlakům a teplotám. To má za následek ztrátu termolabilních látek, např. lipofilních vitamínů, které pak musejí být do krmiv přidávána jako aditiva. Tato technika nese i určitá pozitiva. Dochází při ní k likvidaci nežádoucích plísní a bakterií.

Úlohou krmiv je zajisti zvířatům základní živiny a energii potřebné pro udržení základních životních funkcí a udržení celkového zdraví. Základním předpokladem je také nezávadnost krmiv. Proto je nezbytné regulovat obsah zdravotně závadných a životu nebezpečných látek. Jejich seznam je uveden ve Vyhlášce č. 365/2008, kterou se provádí zákon č. 91/1996 Sb., *o krmivech, ve znění pozdějších předpisů*. V této vyhlášce je také uveden seznam přídatných látek, které nesmějí mít negativní účinky na zdraví zvířat.

Pro zjištění složení krmiva se provádí analýza krmiv, která zahrnuje následující kroky: úpravu vzorku, separaci analytu a vhodnou analytickou metodou. V rámci EU platí Nařízení Komise (ES) č. 152/2009, kterým jsou stanoveny metody odběru vzorků a laboratorního zkoušení krmiv. Nejčastěji doporučovanými metodami jsou chromatografické techniky a hmotnostní spektrometrie.

Práce je zaměřena na stanovení lipofilních vitamínů. Obsah těchto látek je třeba sledovat z toho důvodu, že dochází k jejich ztrátám nejen při již zmiňované extruzi, ale také při manipulaci se vzorkem, vlivem oxidace vzdušným kyslíkem, působení UV záření, přítomnosti volných radikálů a kovů. Monitorovat jejich obsah je také důležité z toho důvodu, že legislativa určuje jejich maximální limity. Jako nejvhodnější technika stanovní lipofilních vitamínů se ukázala metoda HPLC.



Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne .....

.....

Vlastnoruční podpis

## Obsah

### Seznam použitých zkratek

1. Úvod .....	1
2. Krmiva pro domácí a hospodářská zvířata .....	2
2.1 Složení krmiv a výživa zvířat .....	3
2.1.1 Základní živiny .....	5
2.1.2 Přídavné a zakázané látky .....	11
3. Analýza krmiv .....	12
3.1 Úprava vzorku.....	12
3.2 Separace analytu .....	13
3.3 Používané metody.....	15
4. Analýza vitamínů.....	19
4.1 Vitamín A .....	20
4.2 Vitamín E.....	22
4.3 Vitamín D .....	23
4.4 Vitamín K .....	25
5. Závěr.....	27
6. Literatura .....	28

## Seznam použitých zkratk

AAS	Atomová absorpční spektrometrie
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization – Chemická ionizace za atmosferického tlaku
BHT	Butylhydroxytoluen
CI	Chemical ionization – Chemická ionizace
CNS	Centrální nervová soustava
DDT	Dichlordifenyltrichlormethylmethan
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EI	Electron ionization – Elektronová ionizace
ETA	Elektrometrická atomizace
FAAS	Atomová absorpční spektrofotometrie
GC	Gas chromatography – plynová chromatografie
GLC	Plynová rozdělovací chromatografie
GPC	Gelová permeační chromatografie
GSC	Gas solid chromatography – Plynová adsorpční chromatografie
HG	Hydridová technika atomizace
HPLC	High pressure liquid chromatography – Vysokotlaká kapalinová chromatografie
IC	Iontová chromatografie
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
IU	International unit – mezinárodní jednotka
LLC	Kapalinová rozdělovací chromatografie
LSC	Kapalinová adsorpční chromatografie
m.j.	Mezinárodní jednotka
MS	Mass spectrometry – hmotnostní spektrometrie
NFE	Nitrogen-free extract
OES	Optická emisní spektrometrie
SFC	Superkritická fluidní chromatografie
SPE	Superkritická fluidní extrakce

## 1. Úvod

Na kompletní krmiva je v současné době kladen velký důraz, protože jsou důležitá jak pro zdraví domácích zvířat, tak i hospodářských zvířat. Ta jsou často určena k přímé konzumaci. Z tohoto důvodu ovlivňuje potrava podávaná hospodářským zvířatům také zdraví nás, lidí. Proto je nepřijatelné, aby krmiva obsahovala nebezpečné látky, zejména ty s karcinogenními, mutagenními, teratogenními či radiačními účinky. Velká pozornost je soustředována na přítomnost mykotoxinů, dioxinů, aflatoxinů a reziduí v krmivech a diskutovaný je často také vliv geneticky modifikovaných organismů a růstových hormonů na zdraví lidí a zvířat. Kompletní krmiva jsou často jediným zdrojem energie a látek nezbytných pro život, mezi něž se řadí tuky, bílkoviny, sacharidy, minerální látky a vitamíny, které se účastní jako součásti enzymů metabolických pochodů. Jejich nedostatek ve stravě má za následek vážné zdravotní komplikace projevující se vývojovými vadami, poruchami reprodukce, centrální nervové soustavy a v extrémním případě mohou vézt až k úhynu zvířete. Stejně jako nedostatek vitamínů je škodlivá i jejich nadměrná konzumace. To se týká především vitamínů rozpustných v tucích. Jejich nadbytečné množství je ukládáno v tkáních a působí toxicky. Maximální množství těchto složek je stanovené legislativou.

Cílem bakalářské práce je podat ucelenou informaci o analýze lipofilních vitamínů, především o přípravě vzorku před samotným zpracováním analytickou technikou.

## 2. Krmiva pro domácí a hospodářská zvířata

Krmiva jsou čerstvé nebo průmyslově zpracované produkty živočišného nebo rostlinného původu, které jsou určeny pro krmení zvířat.<sup>1</sup> Na trhu se objevuje řada druhů krmiv, které se rozlišují různými kritérii.

Podle obsahu živin se krmiva dělí na kompletní a doplňková. Kompletní krmiva svým složením pokrývají potřebu denní krmné dávky. Naproti tomu doplňková krmiva obsahující určité látky se přidávají do jiných krmiv, aby se kompletnosti dosáhlo.

Podle obsahu vlhkosti jsou rozlišována krmiva suchá, polosuchá a konzervovaná. Suchá krmiva s obsahem vlhkosti 8 – 10 % jsou díky snadné skladovatelnosti a kompletnosti a vyváženému poměru všech složek nejpoužívanější. Jsou vyráběny procesem zvaným extruze neboli vytlačování. Varné extrudéry mechanicky zpracovávají výchozí suroviny za vysokých teplot (100 – 200 °C) a tlaků (34 – 37 atm.). Výsledkem je produkt mající vlhkost okolo 25 %, který se následně suší, dokud nedojde ke snížení vlhkosti na požadovaných 8 – 10 %. I přes to, že extruze patří k nejšetrnějším procesům tepelného zpracování při výrobě krmiv, může docházet ke ztrátám některých termolabilních látek, například vitamínu A a E. Nežádoucími účinky jsou také oxidace lipidů a snížení dostupnosti některých aminokyselin, především lysinu. Výhodou této výrobní techniky je zvýšení stravitelnosti tukových, bílkovinných a škrobových složek a díky nízkému obsahu vody i rezistence vůči plísním a bakteriím. Polosuchá krmiva jsou také vyráběna extruzí, ale výsledná vlhkost se pohybuje v rozmezí 25 – 35 %. Díky vyššímu obsahu vody jsou více náchylná k výskytu plísní, bakterií a snáze se kazí. Proto je nutné do těchto krmiv přidávat inhibitory růstu plísní a bakterií. Konzervovaná krmiva obsahují nejvíce vlhkosti, 60 – 87 %. K udržení správné konzistence se používají želírovací látky, např. škrob.<sup>1-9</sup>



## 2.1 Složení krmiv a výživa zvířat

Hlavní úlohou krmiv je zajistit zvířatům základní živiny a energii potřebné pro udržení základních životních funkcí, dobré fyzické i psychické kondice a udržení celkového zdraví. Obsah živin je jedním z jakostních znaků krmiva. Legislativa výrobcům uděluje povinnost deklarace některých složek. U kompletních krmiv pro domácí zvířata jsou povinně deklarované dusíkaté látky, tuk, vláknina a popel. Přestože nejsou výrobci povinni jiné složky uvádět, obvykle tak činí pro lepší informovanost spotřebitelů (obr. 1). Popel představuje anorganickou část krmiva, která zbude po analýze všech složek krmiva. Zjistitelná je spálením krmiva ve speciální peci při předepsané teplotě 500 °C. Nepovinná deklarace se týká aminokyselin lysinu, methioninu, cystinu, threoninu, tryptofanu, metabolizovatelné energie, veškerého cukru ve formě škrobu a sacharózy, z minerálních látek pak vápníku, sodíku, hořčíku, draslíku a fosforu. Pro krmiva hospodářských zvířat jsou deklarované jakostní znaky téměř stejné. Rozdílná je pouze povinnost deklarace pro lysin, methionin a fosfor u krmiv pro ryby (obr. 2). Kromě základních živin mohou být v krmivech obsaženy přídatné látky, které jsou do krmiv přidávány během zpracování surovin pro výrobu krmiv nebo při samotné výrobě pro zlepšení vlastností krmiva.<sup>1-4</sup>

**CZ** Kompletní krmivo určené pro dospělé psy velkých a obřích plemen.  
Eukanuba poskytuje optimální denní množství proteinu, tuku, karbohydrátů, důležitých vitamínů a minerálů pro celkové zdraví a duševní pohodu vašeho psa.

**KUŘECÍ MASO JE NAŠÍ PŘÍSADOU ČÍSLO 1**  
**VYSOCE KVALITNÍ PŘÍSADY,**  
**VEDOUCÍ DODAVATEL V OBLASTI VÝŽIVY ŠITÉ NA MÍRU A VĚDECKÝCH POZNATKŮ**  
**Bez přidaných konzervačních látek, příchutí, barviv nebo přísad**

Krmení Vašeho psa. Pokud přecházíte na krmivo Eukanuba, začněte postupně přidávat ve zvyšujících se dávkách Eukanubu do stávajícího krmiva vašeho psa, nejlépe v průběhu čtyř dní. Doporučujeme krmit dvakrát denně. Rozdělte denní dávku uvedenou v tabulce na počet krmení. Váš pes může přijímat více nebo méně krmiva v závislosti na věku, temperamentu a stupni aktivity. Váš pes by měl mít vždy přístup k dostatku čerstvé vody.

Hladina vitamínů garantována až do data spotřeby.

100% kompletní a vyvážené krmivo určené dospělým psům velkých a obřích plemen, s běžnou zátěží a normální tělesnou hmotností.

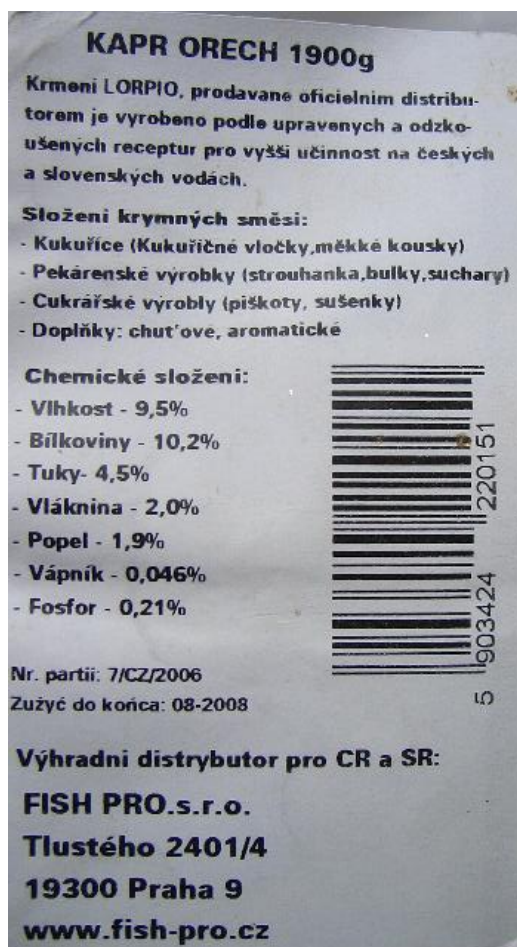
**Složení krmiva:** Sušené kuřecí a krůtí maso (>20%), kukuřice, pšenice, čirok, ječmen, živočišný tuk, sušená řepa, kuřecí vnitřnosti, sušená celá vejce, sušené pivovarské kvasnice, chlorid draselný, chlorid sodný, uhličitán vápenatý, rybí tuk, hexametafosfát sodný, DL-methionin, lněné semeno, fruktooligosacharidy, glukosamin hydrochlorid, chondroitin sulfát.

**Jakostní znaky:** protein: 23,0%, tuk: 13,0%, popel: 6,9%, vláknina: 3,0%, vlhkost: 8,0%, kalcium: 1,10%, fosfor: 0,90% **Obsah vitamínů a mikroprvků na kg:** vitamín A: 12.000IU/kg, vitamín D<sub>3</sub>: 750IU/kg, vitamín E (α-tokoferol): 200mg/kg, Měď jako síran mědnatý, pentahydrát: 14mg/kg, β-karoten: 1mg/kg.

**Obsahuje antioxidanty povolené EU: tokoferoly.**

Spotřebujte do data, číslo série a registrační číslo: podívejte se na kódování na obalu. Hmotnostní údaje na přední straně. Uchovávat v chladu a suchu.

Obr. 1 Etiketka z krmiva pro psy



Obr. 2 Etiketa z krmiva pro kapry.

Tato etiketa obsahuje všechny deklarované složky, které musí být dle zákona na obalu krmiv pro ryby uvedeny.

Pro zajištění zdraví zvířat je nezbytné regulovat přítomnost nebezpečných látek v krmivech. V Zákonu o krmivech č. 91/1996 Sb. a jeho prováděcí vyhlášce č. 356/2008 jsou uvedeny zakázané látky a jejich maximální přípustné limity.

Výživa zvířat je odvozena z vědeckých studií a doporučení veterinářů, kterými jsou stanoveny minimální požadavky pro zajištění základních životních funkcí, zdravý růst a vývoj zvířete. Požadavky se u jednotlivých zvířat liší. Například u psů se nároky na obsah a množství složek mění v závislosti na velikosti plemene, stáří, pohlaví, jeho aktivitě a fyzické zátěži. Důležité je nejen množství jednotlivých složek ale i jeho zdroj, s nímž souvisí stravitelnost dané komponenty. Cílem výživy domácích zvířat je zajištění dlouhého a kvalitního života. Výživa hospodářských zvířat, zpravidla vstupujících do potravního řetězce, je zaměřena především na bezpečnost krmiv.

### 2.1.1 Základní živiny

Savci ke svému životu nezbytně potřebují bílkoviny, tuky, cukry, minerální látky a vitamíny.

- Bílkoviny jsou dusíkaté látky, na jejichž stavbě se podílí 20 aminokyselin. V organismu zastávají stavební (tvorba tkání, svalstva, kostí, apod.), transportní (hemoglobin, albumin), ochrannou (imunoglobuliny), hormonální (inzulín, glukagon) a trávicí (enzymy) funkci. Zdrojem proteinů v krmivech jsou syrové maso a vedlejší produkty masa, jako jsou masová, kostní, masokostní či krevní moučka, kosti, sušené a odstředěné mléko a sušené kvasnice, z rostlinných materiálů sojový škrob, kukuřice a kukuřičný lepek, pšenice, ječmen, oves, rýže a další. Kromě bílkovin jsou v krmivech obsaženy i jiné látky dusíkaté povahy označované jako NPN (nebílkovinné dusíkaté sloučeniny), mezi něž se řadí nitrity, nitráty, puriny, amidy (asparagin, glutamin) a alkaloidy.
- Tuky jsou nejkoncentrovanějším zdrojem energie. Jejich důležitým rysem je rozpustnost v organických rozpouštědlech a nerozpustnost ve vodě. Negativní vlastností je jejich nestálost. Snadno podléhají oxidaci, hydrolýze a při vysokém žáru polymeraci, čímž je krmivo znehodnocováno vznikem zápachu, snížením chutnosti a tvorbě toxického účinku. Oxidace způsobuje destrukci lipofilních vitamínů. Lze jí předcházet přidávkem antioxidantů, např. vitamínů E, C nebo syntetických antioxidantů. Na stavbě lipidů se podílejí mastné kyseliny, jejichž nedostatek se projevuje vypadáváním srsti, šupinatěním kůže, svědivostí a může zapříčinit poruchy růstu a negativně ovlivnit reprodukci. Největší zásobárnou tuku je tuk z jatečných zvířat, ryb a olejnin.
- Sacharidy jsou nedusíkaté látky (označované jako NFE=Nitrogen – free extract), které jsou pro organismus významné především z hlediska zdroje energie. Obsah sacharidů v krmivech výrobci většinou neuvádějí. Na obalech krmiv spíše najdeme obsah vlákniny (někdy označovaná jako balastní látka), která z energetického i výživného hlediska nemá pro organismus téměř žádný význam a přesto je nepostradatelná. Má nenahraditelnou funkci při trávení, protože příznivě ovlivňuje peristaltiku střev.

- Vitamíny se jako součásti enzymů účastní metabolických procesů. Zpravidla si je zvířata nejsou schopna syntetizovat sama. Jejich nedostatek ale i konzumace nadbytečného množství vyvolává negativní dopad na zdraví organismu, v extrémním případě může vyvolat i smrt. Obsah vitamínů v krmivech jsou někdy uváděny v mezinárodních jednotkách m.j. (nebo též v jednotkách IU z anglického „International Unit“), přepočítání na hmotnost v mg je znázorněna v tabulce I.

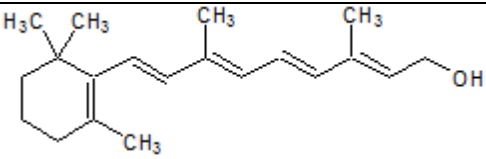
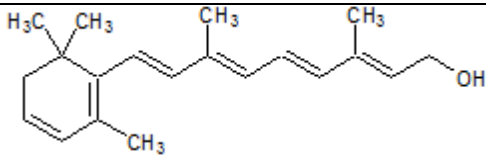
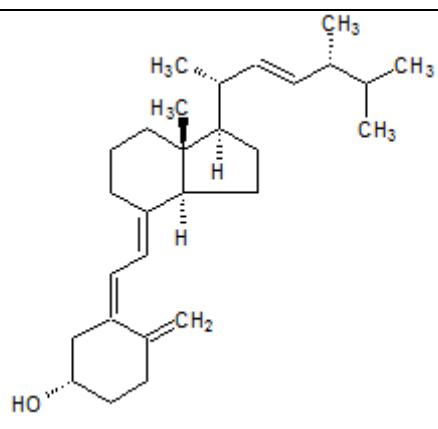
Tabulka I Přepočítání měrné jednotky na množství vitamínu (převzato z cit. 10)

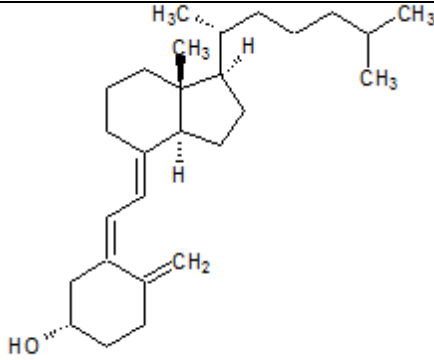
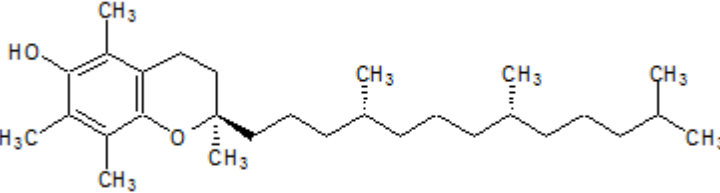
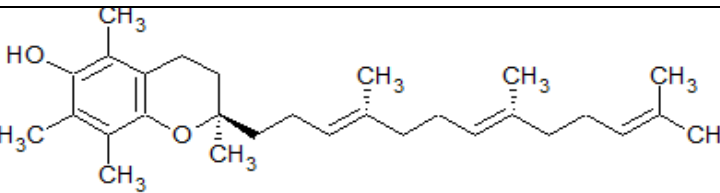
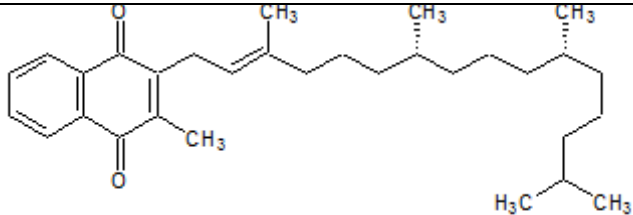
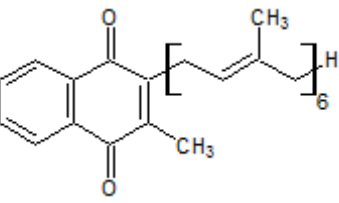
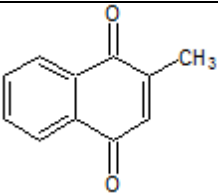
Vitamín	Měrná jednotka	Přepočítací faktor (sloučeniny vitamínů)
A (retinol)	m.j.	0,3μg vitamínu A – alkohol = 1 m.j.
		0,344 μg vitamínu A – acetátu = 1 m.j.
		0,359 μg vitamínu A – propionát = 1 m.j.
		0,55 μg vitamínu A – palmitát = 1 m.j.
D <sub>3</sub> (Cholokalciferol)	m.j.	0,025 μg vitamínu D <sub>3</sub> = 1 m.j.
E (Tokoferol)	mg	1 mg dl – α – Tokoferylacetátu = 1 m.j.
		1 mg d – α – Tokoferolu = 1,49 m.j.
		1 mg dl – α – Tokoferolu = 1,1 m.j.
		1 mg d – β – Tokoferolu = 0,33 m.j.
		1 mg d – δ – Tokoferolu = 0,25 m.j.
		1 mg d – γ- Tokoferolu = 0,01 m.j.
K <sub>3</sub> (Menadion)	mg	1 mg Menadionsodumbisulfitu = 0,51 mg Menadionu
		1 mg Menadionpyrimidinbisulfitu = 0,45 mg Menadionu
		1 mg Menadionnikotinamidbisulfitu = 0,46 mg Menadionu
B <sub>1</sub> (Thiamin)	mg	1 mg Thiamin – Mononitrátu = 0,92 mg Thiaminu
		1 mg Thiamin – Hydrochloridu = 0,89 mg Thiaminu
B <sub>6</sub> (Pyridoxin)	mg	1 mg Pyridoxin – Hydrochloridu = 0,89 mg Thiaminu
Niacin	mg	1 mg Kyseliny nikotinové = 1 mg Niacinu
		1 mg amid kyseliny nikotinové = 1 mg Niacinu
D-kyselina pantothenová	mg	1 mg Ca- D – Pantothenátu = 0,92 mg kyseliny pantotenové
		1 mg Ca- DL – Pantothenátu = 0,41 – 0,52 mg kyseliny pantotenové

Legislativa určuje maximální limity některých lipofilních vitamínů (pro vitamín E a K stanoveny nejsou). Pro vitamín A je tato hodnota 25 000 m.j./kg kompletního krmiva pro telata a 13 500 m.j./kg kompletního krmiva pro kuřata. U vitamínu D<sub>2</sub> je jeho maximální obsah stanoven na 2000 m.j./kg kompletního krmiva pro prasata i ostatní zvířata s výjimkou skotu. Pro vitamín D<sub>3</sub> platí podobné hodnoty, navíc je vymezen limit pro kompletní krmiva pro drůbež, jeho hodnota činí 5000 m.j./kg kompletního krmiva.

Dle rozpustnosti se dělí na vitamíny rozpustné ve vodě a vitamíny rozpustné v tucích. Hydrofilní vitamíny jsou reprezentovány vitamíny tzv. B – komplexu (B<sub>1</sub> - thiamin, B<sub>2</sub> - riboflavin, B<sub>6</sub> – pyridoxin a B<sub>12</sub> - kobalamin), kyselinou nikotinovou (niacinem), pantothenovou, listovou, askorbovou (vitamin C) a biotinem (vitamin H). Tabulka III popisuje funkce hydrofilních vitamínů a zdravotní komplikace způsobené jejich nedostatkem. Mezi lipofilní vitamíny se řadí vitamíny A, D, E a K. Jejich strukturální vzorce jsou uvedeny v tabulce II.

Tabulka II Strukturální a sumární vzorce lipofilních vitamínů (převzato z cit. 13)

Název	Sumární vzorec	Strukturální vzorec	Molekulová hmotnost
Vitamín A <sub>1</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O		286,4516
Vitamin A <sub>2</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O		284,4357
Vitamin D <sub>2</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> O		396,6484

Vitamin D <sub>3</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O		384,6377
Vitamin E	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>		430,7061
Vitamin E	C <sub>29</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>		424,6585
Vitamin K <sub>1</sub>	C <sub>31</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>		450,6957
Vitamin K <sub>2</sub>	C <sub>41</sub> H <sub>56</sub> O <sub>2</sub>		580,8821
Vitamin K <sub>3</sub>	C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>		172,1800

Vitamín A – retinol (původním názvem axeroftol) je alkohol obsahující ve své struktuře šestičlenný  $\beta$  – jononový kruh s bočním řetězcem složeným ze dvou isoprenoidních jednotek. Jsou známy dvě formy vitamínu A a to vitamíny  $A_1$  a  $A_2$  lišící se počtem dvojných vazeb. Ovlivňuje oční purpur, je nepostradatelný při tvorbě rhodopsinu, pigmentu oční sítnice. Ovlivňuje metabolismus bílkovin a tuků a ukládání glykogenu v játrech. Je účastníkem při procesech přenosu genetické informace a aktivaci aminokyselin.

Vitamín D – kalciferol řadí mezi steroidní látky. Jsou známy vitamíny  $D_2$  a  $D_3$  odlišující se postranním řetězcem. Cholekalciferol (vitamin  $D_3$ ) je syntetizován v kůži při expozici UV zářením jeho provitamínu 7 – dehydrokalciferolu. Ergokalciferol (vitamin  $D_2$ ) vzniká ozářením rostlinného sterolu. Má vliv na vstřebávání vápníku a hořčíku a na jejich následné ukládání v kostech. Jeho nedostatek způsobuje křivici. Ve velkém množství má toxické účinky. Legislativa deklaruje vitamíny  $D_2$  a  $D_3$  jako přídatné látky a stanovuje jejich maximální limity. Pro kompletní krmiva určená pro domácí zvířata je v rozmezí 500 - 5000 m.j./kg kompletního krmiva.

Vitamín K – fyllochinon ( $K_1$ ), farnochinon ( $K_2$ ), menadion ( $K_3$ ). Menadion má systematický název 2 – methyl – 1,4 – naftochinon, od něž jsou odvozeny další dvě formy vitamínu K, které se liší isoprenoidním postranním řetězcem. Zúčastňuje se syntézy bílkovin, které jsou nezbytné pro srážlivost krve, a přispívá k regulaci kalcifikace.

Vitamín E – tokoferol se vyskytuje v 8 známých formách, které jsou odvozeny od tokolu a tokotrienolu obsahující chromanový kruh s postranním isoprenoidním řetězcem, který je buď nenasycený ( $\alpha$ - ,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$  - tokotrienoly) nebo nasycený ( $\alpha$ - ,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$  - tokoferoly). Největší význam má  $\alpha$ - tokoferol. V současné době je do krmiv pro domácí i hospodářská zvířata dodáván ve formě acetátu  $\alpha$ -tokoferolu.<sup>14</sup> Vitamin E je významným antioxidantem, který brání produkci volných radikálů v kosterním svalstvu během zátěže. Ovlivňuje činnost pohlavních orgánů, čímž předchází neplodnosti. Také se uplatňuje při regeneraci buněk, zpomaluje jejich stárnutí a přispívá ke zlepšení buněčného dýchání a celkovému zvýšení imunity.

Tab. III Funkce a dopad na zdraví při nedostatku hydrofilních vitaminů  
(převzato z cit. 4,8-10)

<b>Thiamin</b>	Funkce	Metabolismus sacharidů, bílkovin, ovlivňuje nervový systém a trávicí ústrojí
	Nedostatek	Oslabení srdeční činnosti, poruchy vidění a růstu, křeče, ztráta koordinace, oři dlouhodobém nedostatku smrt
<b>Riboflavin</b>	Funkce	Součást enzymů (FAD, FMN) účastnících se metabolismu bílkovin a tuků, ovlivňuje reprodukci, centrální nervovou soustavu (CNS) a růst
	Nedostatek	Poruchy plodnosti, CNS, kožní problémy – ztráta pigmentace, vypadávání srsti, průjmy
<b>Pyridoxin</b>	Funkce	Metabolismus aminokyselin, součást transamináz, vliv na tvorbu krve, nervovou činnost a pohybový systém,
	Nedostatek	Poruchy CNS, nechutenství, zvracení, průjmy, kožní onemocnění, anémie, zhoršení koordinace pohybů
<b>Kobalamin</b>	Funkce	Tvorba thiaminu, hemoglobinu, bílku ve vejcích, vliv na CNS, krvetvorbu
	Nedostatek	Poruchy růstu, poškození nervů a CNS, nechutenství, anémie, záněty kůže a vypadávání srsti
<b>Vitamin H</b>	Funkce	Metabolismus aminokyselin a mastných kyselin, přeměna energie, součást dekarboxyláz
	Nedostatek	Onemocnění kůže, ztráta kvality srsti a její vypadávání, cévní poruchy
<b>Vitamin C</b>	Funkce	Účastní se oxidačně – redukčních reakcí, příznivý vliv na imunitní systém, transport železa, aktivace některých enzymů a hormonů
	Nedostatek	Pokřivení páteře, bolesti kloubů, vypadávání zubů, průjmy, slabost
<b>Kyselina nikotinová</b>	Funkce	součást koenzymů NAD <sup>+</sup> a NADP <sup>+</sup> , přeměna energie
	Nedostatek	Kožní onemocnění, průjmy, hubnutí
<b>Kyselina pantothenová</b>	Funkce	Součást koenzymu A, přeměna energie a metabolismus tuků
	Nedostatek	Kožní problémy a ztráta pigmentace, poruchy trávení
<b>Kyselina listová</b>	Funkce	Metabolismus aminokyselin, krvetvorba
	Nedostatek	Chudokrevnost, poruchy růstu



- Minerály jsou anorganické látky, které jsou v krmivech obsaženy ve stopovém množství. V organismu plní řadu úloh. Jsou stavebními látkami zubů a kostí (Ca, P, Mg, Mn, F). Pomáhají při regulaci elektrolytického a vodního režimu a osmotického tlaku (Na, K, Cl), aktivaci enzymů (Ca, Mg, Co, Mo). Podílí se na tvorbě červených krvinek (Fe, Mn, Cu) a aminokyselin (S), metabolismu vitamínu E (Se). Jod ovlivňuje funkci štítné žlázy. Ve výživě zvířat je třeba dbát nejen na jejich množství obsaženém v potravě ale také na jejich vzájemném poměru. Důležitý je například poměr vápníku a fosforu, uvádí se, že v optimálním případě by měl být 1 – 1,5 : 1.<sup>4,8-14</sup>

### 2.1.2 Přídavné a zakázané látky

Přídavné látky jsou do krmiva cíleně přidávány pro zlepšení jeho kvality. Všechna aditiva nesmějí mít negativní dopad na zdraví zvířete. Do krmiv pro domácí zvířata aplikovány následující skupiny látek: antioxidanty, zchutňovadla, emulgátory, stabilizátory, zahušťující a želírující látky, barviva včetně pigmentů, konzervanty, vitaminy, provitaminy přírodní a syntetické, stopové prvky, pojiva, protispékavé látky a koagulanty a regulátory kyselosti, které při výrobě krmiv pro hospodářská zvířata užívány nejsou. Naopak navíc jsou do krmiv pro hospodářská zvířata dodávány stimulanty růstu antibiotického i neantibiotického charakteru, antikokcidika a chemoterapeutika, radionuklidní pojiva, mikroorganismy zachycující patogenní organismy, čímž zvyšují odolnost vůči chorobám, a enzymy odstraňující z krmiv toxiny a zvyšující stravitelnost některých živin, například polysacharidů. Nejčastěji používanými enzymy jsou glukonázy, xylozánázy, proteázy, amylázy a fytázy, které snižují obsah fosforečnanů v potravě a současně zlepšují stravitelnost dusíkatých látek. Do krmiv mohou být přidávány průmyslově vyráběné základní živiny. Příkladem je používání krystalických aminokyselin vyráběných průmyslovou fragmentací nebo substrátů argininu, kyseliny aspartové, glutaminu a ornitinu, které podporují růst a tím i jatečnou kvalitu a pozitivně ovlivňují vývoj trávicího a imunitního systému.<sup>15</sup>

Z hlediska bezpečnosti krmiv je nezbytné regulovat přítomnost nežádoucích látek v krmivech. V Zákonu o krmivech č. 91/1996 Sb. a jeho prováděcí vyhlášce č. 356/2008 jsou uvedeny zakázané látky a jejich maximální přípustné limity. Velmi diskutovanými látkami jsou mykotoxiny, sekundární metabolity plísní a vláknitých hub. Aflatoxiny (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>), ochratoxiny, námelové alkaloidy, fumonisiny tvoří jen malý výčet této skupiny látek mající karcinogenní a teratogenní účinky. Často uváděné jsou také polychlorované bifenyly (např.

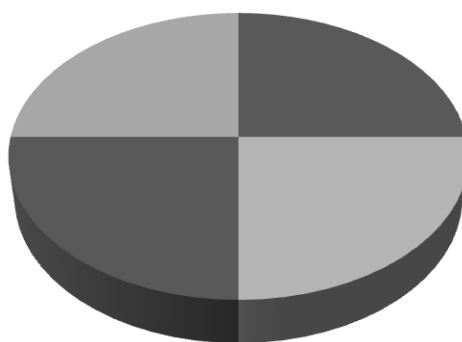
DDT, tj. dichlordifenyltrichlormethylmethan), isothiokyanáty a ftaláty mající negativní vliv na endokrinní žlázy. Prokázané jsou toxické účinky na játra, štítnou žlázu, imunitní systém, reprodukci a neurologický rozvoj.<sup>1,2,15-18</sup>

### **3. Analýza krmiv**

Pro analýzu krmiv je nezbytné provést následující kroky: úpravu vzorku, separaci dané komponenty z matrice, analýzu vybranou analytickou metodou a vyhodnocení získaných výsledků.

#### **3.1 Úprava vzorku**

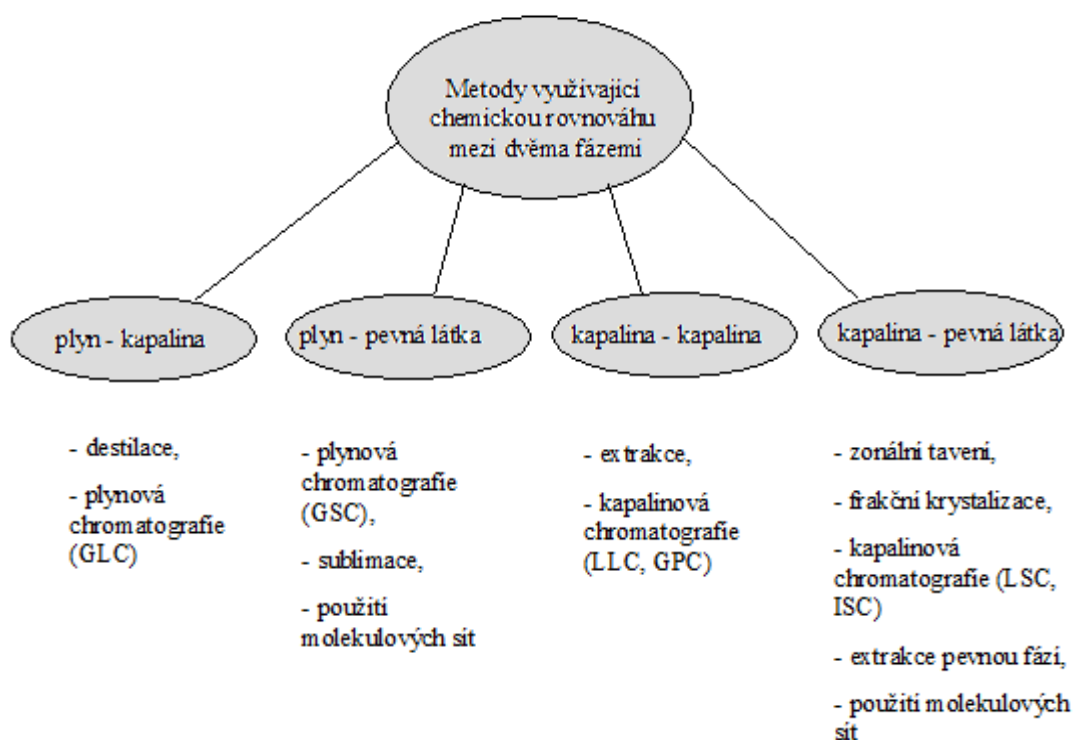
Úpravou vzorku se rozumí jeho mechanické zpracování mletím či drcením a homogenizace, jejímž cílem je dosažení reprezentativnosti vzorku. To znamená, že v každé vydělené části jsou obsaženy všechny komponenty a jsou zastoupeny ve stejném hmotnostním či objemovém poměru jako v celém materiálu. Toho lze docílit tak, že pevný vzorek o hmotnosti až 2% z celkové hmotnosti materiálu je podroben nejdříve drcení na velikost částic okolo 20 mm. Po té je provedena kvartace. Vzorek se pomocí šablony navrství do nízkého komolého kužele, který je následně rozdělen na čtyři stejné části (obr. 3). Dvě protilehlé jsou odstraněny a zbylé dvě jsou spojeny a opět podrobeny kvartací. Kvartace je opakována tak dlouho, dokud není získán laboratorní vzorek o požadované hmotnosti a velikosti částic. Následuje rozklad vzorku na mokré cestě pomocí kyselin (např. kyselina chlorovodíková nebo kyselina mravenčí s přidavkem peroxidu vodíku při analýze aminokyselin) nebo na suché cestě (např. tavení s uhličitanem vápenatým při stanovení některých minerálů). Rozklad lze provést také mineralizací (tj. převedením na jednoduché anorganické látky spalováním v muflové peci) nebo pomocí mikrovln (stanovení síry).<sup>19,20</sup>



Obr. 3 Znárodnění kvartace (převzato z cit. 19)

### 3.2 Separace analytu

Cílem separace je rozdělení vzorku na minimálně dva podíly odlišného složení, které jsou nemísitelné nebo je lze od sebe snadno oddělit, a zvýšení koncentrace analytu v jednom ze vzniklých podílů. Základním předpokladem separace je rozdílnost vlastností analytů. Separční metody lze rozlišit na metody využívající chemické rovnováhy (obr. 4), které převádí látky mezi fázemi. Tento převod je umožněn rozpustností látek, fyzikální adsorpcí, chemisorpcí nebo iontovou výměnou.



Obr. 4 Separční metody fungující na základě chemické rovnováhy

Jiné techniky využívají rozdílné pohyblivosti částic v silovém poli (elektroforéza, izotachoforéza, termodifúze, ultracentrifugace, hmotnostní spektrometrie) nebo rozdílné rychlosti migrace přes polopropustnou membránu, jejichž hnacím motorem je gradient chemických nebo elektrochemických potenciálů (dialýza, elektrodialýza, obrácená osmóza, ultrafiltrace).<sup>20-25</sup>

V analýze krmiv jsou nejčastěji uplatňovány extrakce z kapaliny do kapaliny, extrakce na tuhou fázi (SPE – solid phase extraction), chromatografické metody a superkritická fluidní extrakce (SFE – supercritical fluid extraction).<sup>26</sup>

- Extrakce z kapaliny do kapaliny – nejjednodušším způsobem je vytřepání vzorku v rozpouštědle, v němž je analyt dobře rozpustný. Výběr vhodného rozpouštědla se řídí podle Liebigova pravidla, které říká, že podobné má být v podobném rozpuštěno. To znamená, že například polární látky mají být rozpuštěny v rozpouštědle polárním. Při použití této techniky může docházet k vytvoření nežádoucí emulze. Tento problém lze odstranit filtrací, odstředěním nebo přidáním přípravků rozbíjejících emulzi. Pro zvýšení účinnosti extrakce je dobré tento krok několikrát opakovat. Výtěžek extrakce roste s počtem extrakcí podle vztahu (1.1).<sup>20-25</sup>

$$R_n = 1 - \left[ \frac{1}{1 + r \cdot D_c} \right]^n \quad (1.1)$$

$R_n$  = výtěžek extrakce

$r$  = poměr objemů jednotlivých fází ( $r = V_{II}/V_I$ )

$D_c$  = počet extrakcí

$n$  = počet extrakcí

- SPE – tato technika je oproti předchozí výhodnější díky úspoře času a organických rozpouštědel, která jsou nahrazena pevným sorbentem (např. silikagel, oxid hlinitý, florosil) umístěným ve speciálních SPE kolonách nebo discích. Základním předpokladem přechodu analytu z kapalně fáze do tuhé je silnější interakce analytu se sorbentem než s kapalinou, ve které je rozpuštěn. Proto je třeba pečlivě zvážit jeho výběr, při kterém by měly být zohledněny např. polarita analytu nebo jeho disociační konstanta. Na sorbent se mohou zachytit i nežádoucí látky, které pak ruší následné stanovení. Ty je nutné odstranit promýváním. Dalším

krokem je desorpce analytu, k čemuž se často využívá extrakce kapalinou nebo tepelná desorpce.<sup>20-25</sup>

- Chromatografie - všechny chromatografické metody jsou založeny na separaci složek mezi mobilní a stacionární fází. Podle skupenství mobilní fáze lze chromatografii rozdělit na kapalinovou (LC – liquid chromatography) a plynovou (GC – gas chromatography). Separace složek je založena na jejich rozdílné rychlosti průtoku kolonou. Některé látky jsou v koloně zachycovány stacionární fází, čímž se opožďují vůči ostatním látkám. Doba, kterou látka v koloně stráví, se nazývá retenční čas  $t_R$ . Na separaci látek má také vliv jejich rozdílná hodnota distribuční konstanty vyjadřující ustavenou chemickou rovnováhu mezi mobilní a stacionární fází, která je během průtoku kolonou neustále narušována a opět vytvářena. Distribuční konstanta  $K_D$  je dána podílem koncentrace látky ve stacionární fází a koncentrace látky v mobilní fází. Čím vyšší je hodnota distribuční konstanty, tím je látka více vázána ve stacionární fází.<sup>20-25</sup>

- SFE – výhodou extrakce superkritickými tekutinami je kratší čas přípravy a nižší spotřeba často škodlivých organických rozpouštědel. Extrakčními činidly mohou být oxid uhličitý, oxid dusný, ethan, propan, n-pentan, amoniak, fluoroform nebo fluorid sírový v nadkritických podmínkách, tj. ve vyšších hodnotách kritického tlaku a kritické teploty. V nadkritické oblasti neexistuje rozhraní mezi kapalnou a plynovou fází. Superkritické tekutiny mají viskozitu podobnou viskozitě plynu. Ta má velice kladnou charakteristiku a to takovou, že zrychluje přenos hmoty analytu a má za následek snadné pronikání nadkritických tekutin různými typy vzorků matric vzorků. Kromě toho sílu rozpouštědla lze snadno ovlivnit změnou tlaku nebo teploty. To umožňuje použití jedné tekutiny namísto více různých rozpouštědel. Tato technika má ovšem i své nevýhody, a to nízkou polaritu rozpouštědla. Proto lze SFE využít jen pro nepolární analyty.<sup>27,28</sup>

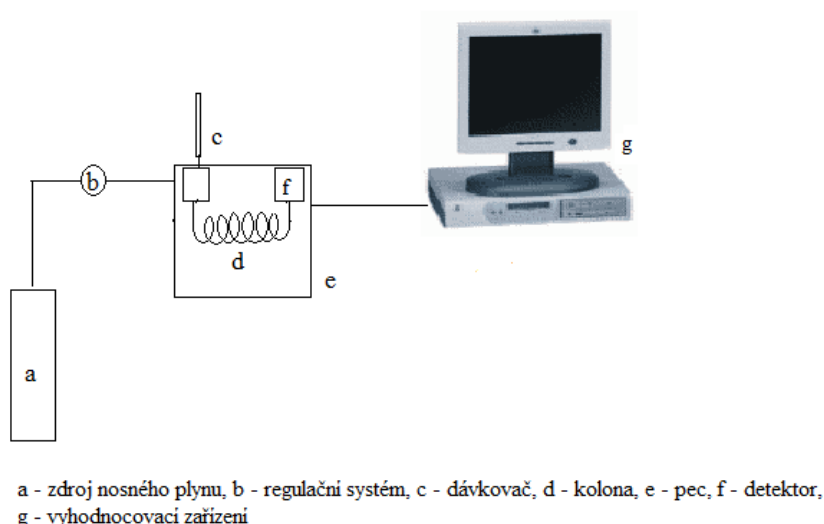
### 3.3 Používané metody

Analytické metody aplikované na analýzu jednotlivých komponent krmiv jsou stanoveny Nařízením Komise Evropského Společenství č. 152/2009. K nejčastěji doporučovaným metodám se řadí chromatografické metody. V drtivé většině převažující vysokotlaká kapalinová chromatografie HPLC (high pressure liquid chromatography),

kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem LC–MS, plynová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem GC–MS a iontová chromatografie IC. Dále k používaným metodám patří hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ICP–MS. Menšinové zastoupení tvoří absorpční metody (atomová absorpční spektrofotometrie FAAS, atomová absorpční spektrometrie s hydridovou technikou AAS–HG, atomová absorpční spektrometrie – elektrometrická atomizace AAS–ETA), a optické metody (optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ICP–OES).<sup>26</sup>

- Plynová chromatografie

Plynový chromatograf (obr. 5) se skládá ze zdroje nosného plynu (He, N, Ar, H) představující mobilní fázi, který transportuje plynný vzorek chromatografickou kolonou, v níž je umístěna stacionární fáze. Průtok nosného plynu je řízen regulačním systémem. Vzorek je do systému dodáván pomocí dávkovače. Nosný plyn může obsahovat nežádoucí složky ostatních plynů. Ty jsou odstraněny v čistícím zařízení. Složky vycházející z kolony jsou indikovány detektorem. V plynové chromatografii jsou uplatňovány tepelně – vodivostní, ionizační, atomový emisní detektor a hmotnostní spektrometr. Signál z detektoru je snímán počítačem vyhodnocující intenzitu signálu a časový průběh. Výsledkem je chromatogram, z něhož lze určit kvalitativní a kvantitativní zastoupení obsažených látek ve vzorku.<sup>21-25</sup>

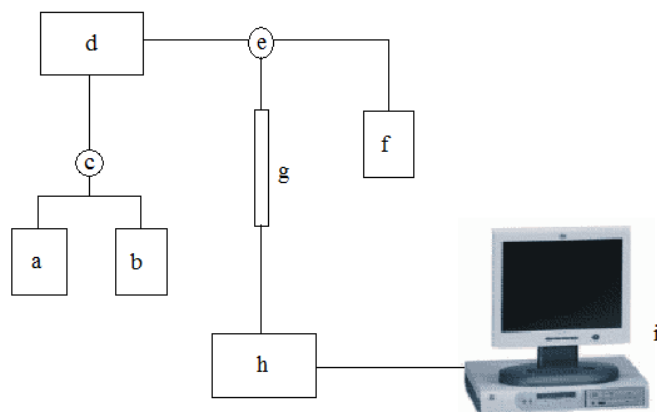


Obr. 5 Schéma plynového chromatografu (převzato z cit. 24)

- Kapalinová chromatografie

Součástí kapalinového chromatografu je zásobník mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, dávkovací zařízení, chromatografická kolona, detektor a zařízení na zpracování signálu detektoru (obr. 6). Vysokotlaké čerpadlo, pracující při tlaku až 40 MPa, je důležité k překonání tlaku, který vynakládají velice malé částičky o velikosti 2 – 10  $\mu\text{m}$  stacionární fáze vůči protékající mobilní fázi, a zajišťuje konstantní průtok mobilní fáze. Stacionární fázi může být kapalina ukotvená na pevný nosič ze skla nebo silikagelu (rozdělovací chromatografie LLC – *Liquid Liquid Chromatography*). V metodě HPLC mohou být stacionární fázi adsorbenty (polymery anorganické i organické nebo silikagel), iontoměniče (iontově – výměnná chromatografie), gel (gelová permeační chromatografie), chemicky vázané stacionární fáze a tuhý nosič s vázaným ligandem (afinitní chromatografie).

Mezi LLC a HPLC je rozdíl i v délce a průměru používaných kolon (v HPLC se pracuje s kolonami o délce 3 – 30 cm a vnitřním průměru 0,5 – 4 mm, v LLC bývají tyto parametry vyšší)<sup>22</sup>. V kapalinové chromatografii se používají fotometrické, refraktometrické, fluorescenční a elektrochemické detektory a stejně jako v plynové chromatografii i hmotnostní spektrometr. Součástí kapalinového chromatografu někdy bývá směšovací zařízení, díky němuž jsou řízeny změny ve složení mobilní fáze.<sup>21-25</sup>



a,b - zásobníky mobilní fáze, c - směšovací zařízení, d - čerpadlo, e - dávkovací zařízení, f - vzorek, g - kolona, h - detektor, i - vyhodnocovací zařízení

Obr. 6 Schéma kapalinového chromatografu (převzato z cit. 24)

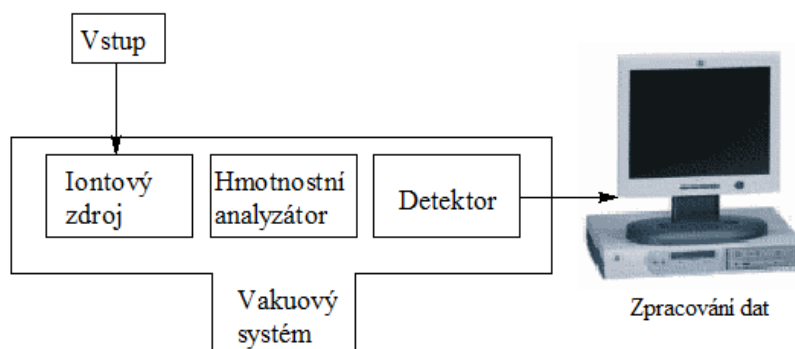
- Hmotnostní spektrometrie (MS – *Mass spectrometry*)

Hmotnostní spektrometr je složen ze vstupu vzorku, iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru, detektoru, vyhodnocovacího zařízení a vakuového čerpadla (obr 7). Kromě těchto základních jednotek jsou jeho součástí také sonda pro zavádění vzorků a iontová technika.

Iontový zdroj vytváří částice nesoucí náboj. K ionizaci analyzované látky může docházet vlivem proudu urychlených elektronů přímo na molekuly analytu (Ionizace elektronem – EI – *Electron Ionization*) nebo vlivem proudu urychlených elektronů, který je přenášen na molekuly analyzované látky prostřednictvím reakčního média, kterým je nejčastěji plyn, např. methan (Chemická ionizace – CI – *Chemical ionization*). CI a EI se užívá v kombinaci hmotnostní spektrometru s plynovým chromatografem. Ve spojení s kapalinovým chromatogramem jsou charakteristické aplikace sprejových ionizačních technik. U elektrospreje je mobilní fáze rozprašena vlivem nehomogenního elektrického pole, které je lokalizováno v okolí kovové kapiláry. Rozprašování mobilní fáze může být způsobeno také pneumatickým rozprašovačem, jehož plášť má vysokou teplotu, až 700 °C (Chemická ionizace za atmosférického tlaku APCI). Ve všech případech postupuje ionizovaná látka do hmotnostního analyzátoru, kde jsou rozlišovány ionty podle hodnoty poměru jejich hmotnosti a náboje  $m/z$ .

Magnetický analyzátor je elektromagnetem. Vlivem magnetického pole dochází k zakřivení dráhy iontů. Poloměry zakřivených drah se mění v závislosti na hodnotě  $m/z$ . Dalším hojně využívaným typem je kvadrupólový analyzátor tvořený čtyřmi kovovými tyčemi. Funguje jako určitý filtr. Podle nastavení napětí a určitých veličin radiofrekvenčního pole na každé tyči prochází analyzátozem pouze ionty s určitou hodnotou  $m/z$ . Výsledkem hmotnostního spektrometru je hmotnostní spektrum vyjadřující závislost relativní intenzity iontového proudu na podílu  $m/z$ .<sup>21-25,29</sup>

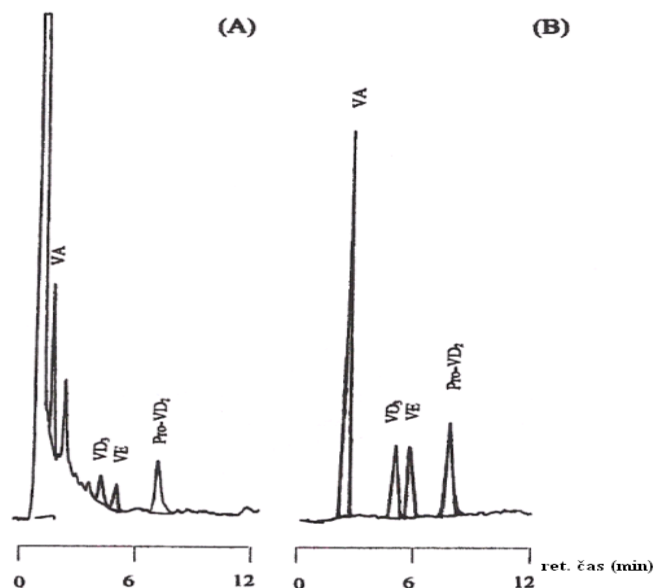




Obr.7 Schéma hmotnostního spektrometru (převzato z cit. 23)

#### 4. Analýza vitamínů

Analýza vitamínu vyžaduje úpravu vzorku, hydrolýzu (saponifikaci alkalickými hydroxidy), extrakci, v některých případech přečištění extraktu a analýzu vybranou metodou. Quian H. a Sheng M. vyvinuli metodu pro současné stanovení vitamínů A, D, E a provitamínu D<sub>2</sub> v krmivech. Více fázovou přípravu vzorku nahradili jedнокrokovou extrakcí s následným stanovením metodou HPLC. Vzorek nejprve mechanicky zpracovali pomocí mixéru a poté převedli do extrakční zkumavky opatřené šroubem. Přidali *n*-hexan a zavedli proud dusíku, pro vytlačení vzduchu, aby nedocházelo k nežádoucí oxidaci vitamínů. Po protřepání směsi byla provedena centrifugace. Po rozdělení vrstev, bylo z horní vrstvy odpařeno rozpouštědlo. Zbytek byl rozpuštěn v *n*-butanolu a vložen do HPLC systému s UV detektorem. Jako mobilní fázi aplikovali methanol. Do systému přidali standardy vitamínů A, D, E a provitamínu D<sub>2</sub> o známém množství (v µg). Z regresní rovnice získané z grafu závislosti plochy píků na množství vitamínu (v µg) určili množství vitamínů ve vzorku. Chromatogram této analýzy je zobrazen v obrázku č. 8.<sup>30</sup>



Obr. 8 Typický chromatogram současného stanovení vitamínu A (VA), D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>), E (VE) a provitamínu D<sub>2</sub> (VD<sub>2</sub>) za použití standardů těchto vitamínů (A) a chromatogram získaný při výše popsané analýze (B) (převzato z cit. 30).

Ze srovnání retenčních časů vyplývá, že stacionární fází je nejméně zadržován vitamín A. Naopak z kolony vychází jako poslední provitamín D<sub>2</sub>.

Stanovení jednotlivých vitamínů je popsáno v následujících kapitolách.

#### 4.1 Vitamín A

Vitamín A má snahu tvořit isomery. Isomerace *all trans*-isomerů na *cis*-isomery je podporována přítomností kovů (tedy i minerálních látek), kyselin, lipoxygenasy, zvýšenou teplotou a expozicí světlem. Za 60 minut klesá obsah vitamínu A až na 25% z původního množství.<sup>20</sup> Proto se pracuje s tmavým sklem. Vitamín A podléhá oxidaci, které lze předejít použitím antioxidantů (pyrogallol, vitamín E, sodná sůl kyseliny askorbové, butylhydroxytoluen, sulfid sodný) a zamezením přístupu vzduchu.

- Úprava vzorku

Úprava vzorku zahrnuje mechanické rozmělnění na částice o maximální velikosti 1 mm. Během této operace nesmí docházet k zahřívání vzorku, protože by mohlo dojít ke ztrátám termolabilního vitamínu A. Tento krok musí být proveden těsně před následující hydrolýzou, jinak by mohlo dojít ke ztrátám vitamínu A. Hydrolýza (saponifikace) se provádí v

ethanolickém roztoku hydroxidu draselného KOH, zabraňujícím isomeraci vitamínu, s přidavkem antioxidantů butylhydroxytoluenu (BHT) a roztoku askorbátu sodného. Dále je přidáván sulfid sodný, který je známý tvorbou sulfidů s kovovými prvky. Přidává se tedy za účelem vyvázání kovů ze vzorku. Stejnou funkci má i EDTA (sodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny). Během hydrolýzy se doporučuje přivádět proud dusíku pro zamezení oxidace.

- Extrakce

Před samotnou extrakcí se provádí dekantace. Na extrakci vitamínu A mají vliv ostatní komponenty vzorku, především tuky. Bez vlivu je naopak obsah bílkovin a sacharidů. Vhodnou extrakční metodou je přímá extrakce saponifikovaného vzorku v dělicí nálevce nebo extrakčním zařízením za použití ethanolu a petroletheru. Po rozdělení vrstev je petroletherová vrstva opět podrobována extrakci petroletherem. Kromě již uvedených rozpouštědel jsou vhodnými rozpouštědly diethylether, *n*-hexan a směsi diisopropylether – petrolether, hexan – chloroform či *n*-hexan – octan ethylnatý. Získané extrakty se suší bezvodým síranem sodným. Jako další krok následuje přečištění extraktu. K tomu slouží kolonová chromatografie (za použití sorbentů – oxidu hlinitého, oxidu hořečnatého nebo silikagelu) nebo technika SPE.

- Metody stanovení

Oficiální metoda stanovení je HPLC s možností využití spektrofotometrického, fluorescenčního nebo elektrochemického detektoru. Výhodou HPLC je dokonalá separace vitamínu A. Použit lze separaci na normální i reverzní fázi. Mobilní fázi je nepolární rozpouštědlo (např. *n*-hexan nebo cyklohexanon) s přidavkem polárního rozpouštědla (2-propanolu, 1-oktanolu). Jednotlivé isomery retinolu lze separovat za použití stacionární fáze silikagelu a mobilní fáze *n*-hexanu nebo směsi *n*-hexanu a *tert*-butylmethyletheru. To ovšem není při stanovení vitamínu A v krmivech nutné, protože obsah vitamínu A je sumou všech *all trans*-isomerů. Jinou alternativou mobilní fáze může být chloroform, isopropylether nebo dichlormethan. Octan ethylnatý je aplikován pro vymývání glyceridů a mastných kyselin z kolony. Při separaci na reverzní fázi, je stacionární fázi oktadecyl a mobilní fázi směs methanol – voda nebo acetonitril – voda. Do systému jsou přidány standardy vitamínu A o známé koncentraci (m.j./ml). Zaznamenávají se hodnoty plochy píků, z kterých se vytvoří

kalibrační křivka. Po proložení regresní rovnicí lze určit také množství vitamínu ve vzorku.  
20,26,31,32

## 4.2 Vitamín E

Vitamín E má obdobné vlastnosti jako vitamín A. Na vzdušném kyslíku, vlivem UV záření a přítomnosti volných radikálů, kovů (např. Fe, Cu) snadno podléhá oxidaci a sám se snadno redukuje, proto je využíván jako antioxidant. Některé formy vitamínu E jsou vůči oxidaci odolné. Jedná se o acetát a sukcinát tokoferolu. Všechny přírodní tokoferoly jsou pravotočivé (D, +), syntetické tokoferoly tvoří racemickou směs (DL, ±).

- Úprava vzorku

Úprava vzorku opět zahrnuje mechanickou úpravu a následnou hydrolýzu. Vzorek rozmělněný na částice o maximální velikosti 1 mm je hydrolyzován směsí ethanolu, BHT, askorbátu sodného a sulfidu sodného. Přes chladič se přidá hydroxid draselný a voda.

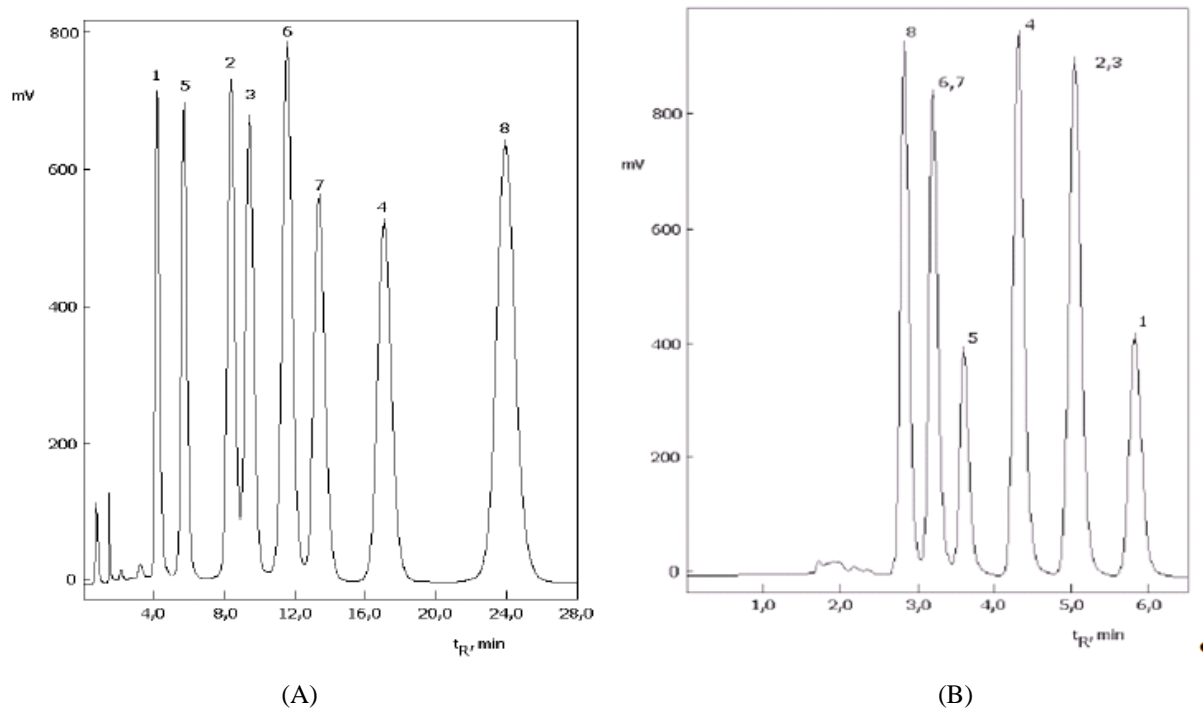
- Extrakce

Pro extrakci se do saponifikovaného roztoku přidává voda a ethanol. Uvádí se, že poměr mezi ethanolem a vodou musí být 1:2.<sup>26</sup> Jiné zdroje uvádí, že koncentrace ethanolu ve vodné fázi má být mezi 30 – 40 %.<sup>20</sup> Po oddělení vrstev je vždy petroletherová vrstva extrahována petroletherem. Spojené extrakty se protřepávají vodou, dokud po přidavku fenolftaleinu zůstane bezbarvá. J. L. Luque-García and M. D. Luque de Castro využili pro extrakci superkritickou fluidní extrakci superkritickým oxidem uhličitým.<sup>33</sup>

- Metody stanovení

Oficiální metodou stanovení vitamínu E je, stejně jako u vitamínu A, HPLC. Obsah vitamínu E v krmivu se vyjadřuje v mg DL- $\alpha$ -tokoferol acetátu na kilogram. 1 mg DL- $\alpha$ -tokoferol acetátu představuje 0,91 mg DL- $\alpha$ -tokoferolu.<sup>26</sup> Ostatní formy vitamínu E se do celkového obsahu vitamínu E nezapočítávají, i když celkový obsah ovlivňují.<sup>14</sup> Proto je nutné jej odseparovat od ostatních forem. K tomu lze využít jak normální tak reverzní fázi. Při separaci na normální fázi (stacionární fázi je silikagel, mobilní fázi směs *n*-hexanu a 1,4-dioxanu) dochází k oddělení všech forem vitamínu E (obr.9). To ovšem při analýze krmiv není nutné. Proto se častěji využívá ne tak časově náročná reverzní fáze. Mobilní fázi je v tomto případě

směs metanol – voda nebo cyklohexan – ethanol, stacionární fázi zůstává silikagel. Pro detekci lze využít fluorescenční nebo UV detektory. V prvním případě je mez kvantifikace 2 mg vitamínu E/kg, v druhém případě je tato hodnota 10 mg/kg.



Obr. 9 Srovnání chromatogramů při separaci vitamínu E na normální (A) a reverzní fázi (B).

1:  $\alpha$ -tokoferol; 2:  $\beta$ -tokoferol; 3:  $\gamma$ -tokoferol; 4:  $\delta$ -tokoferol; 5:  $\alpha$ -tokotrienol; 6:  $\beta$ -tokotrienol; 7:  $\gamma$ -tokotrienol; 8:  $\delta$ -tokotrienol. (převzato z cit. 14)

Z obrázku je patrné, že při separaci na reverzní fázi nedochází k oddělení  $\beta$ -tokotrienolu a  $\gamma$ -tokotrienolu od sebe. Totéž platí i pro  $\beta$ -tokoferol a  $\gamma$ -tokoferol. Dále je zřejmé, že separace na normální fázi je časově náročnější.<sup>14,20,26,31,33,34</sup>

### 4.3 Vitamín D

Vitamín D je třeba chránit před UV zářením, jehož účinkem a účinkem tepla dochází k fotoisomeraci na příslušný previtamín. Musí se tedy pracovat s materiály, které toto záření nepropouští (tmavé sklo nebo hliníková fólie) a za chladna (k izomeraci nedochází při teplotě menší než 20 °C. Je také citlivý na kyselá látky a na oxidaci.

- Úprava vzorku

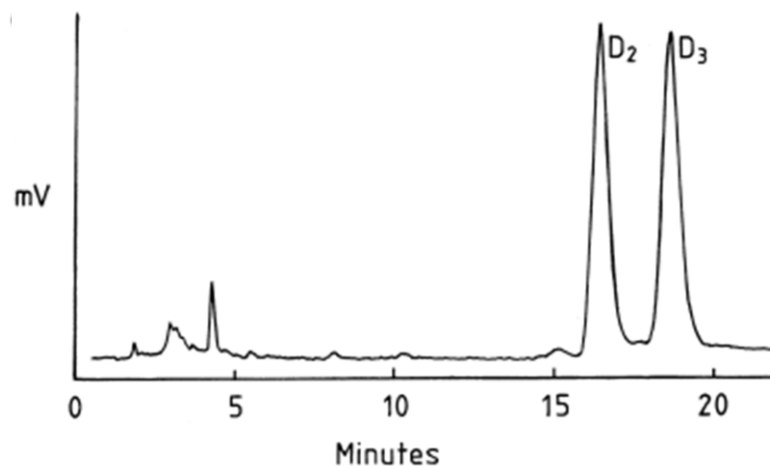
Vzorek se upravuje mletím, kterým je potřeba dosáhnout velikosti částic o maximálním rozměru 0,5 mm. Zmýdelnění vzorku se provádí za studena rozpuštěním v ethanolu, jehož koncentrace v hydrolyzátu ovlivňuje následnou extrakci. Uvádí se, že optimální koncentrace je v rozmezí 40 – 50 %. Dále jsou přidávány kyselina askorbová, EDTA, popřípadě BHT, pevný hydrochinon a 40 – 50% roztok hydroxidu draselného.

- Extrakce

Extrakčním činidlem pro extrakci z hydrolyzátu se používá pentan, n-hexan nebo diethylether ve směsi s pentanem. Extrakce může také být provedena přímo v organickém rozpouštědle bez nutnosti hydrolýzy. Ovšem je pak potřeba provést přečištění extraktu. To se provádí tzv. semipreparativním přečištěním vitamínu D. Na semipreparativní kolonu je nanesen roztok standardu vitamínu D v cyklohexanu. Následně je na kolonu aplikován získaný extrakt a sbírá se frakce, která je pak odpařena při určité teplotě pod proudem dusíku. Výsledný produkt je rozpuštěn v methanolu.<sup>36</sup>

- Metody stanovení

Vitamin D je možné stanovit metodou HPLC na normální i na reverzní fázi. Na normální fázi ovšem lze separovat jen provitamíny, vznikající při expozici vitamínu D na světlo, od vitamínů D, ale není možné odseparovat vitamín D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub>. Proto se více využívá HPLC na reverzní fázi (obr. 10). Jako mobilní fáze se nejčastěji používá směs acetonitril – methanol, acetonitril – chloroform – methanol nebo methanol – voda. Celkový obsah vitamínu D nelze určit jako součet všech vitamínů a previtamínů. Previtamín a vitamín se isomerací chloridem antimonitým převádí na isotachysterol, pro kvantifikaci se využívá fluorescenční nebo UV detektor.<sup>20,26,32,35,36</sup>



Obr. 10 Rozdělení vitamínu D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub> na reverzní fázi HPLC (převzato z cit. 36)

#### 4.4 Vitamín K

Důležitou vlastností tohoto vitamínu je jeho nestálost v alkalickém prostředí. Nestabilní je také účinkem světla a v přítomnosti silných kyselin a redukčních činidel, která redukují vitamín D na hydrochinon. Naopak vykazuje odolnost vůči teplotě a oxidačním látkám.

- Úprava vzorku

Vzhledem k tomu, že se vitamín K v alkalickém prostředí rozkládá, je alkalická hydrolýza vyloučena a je nahrazena hydrolýzou enzymatickou za použití lipázy.

- Extrakce

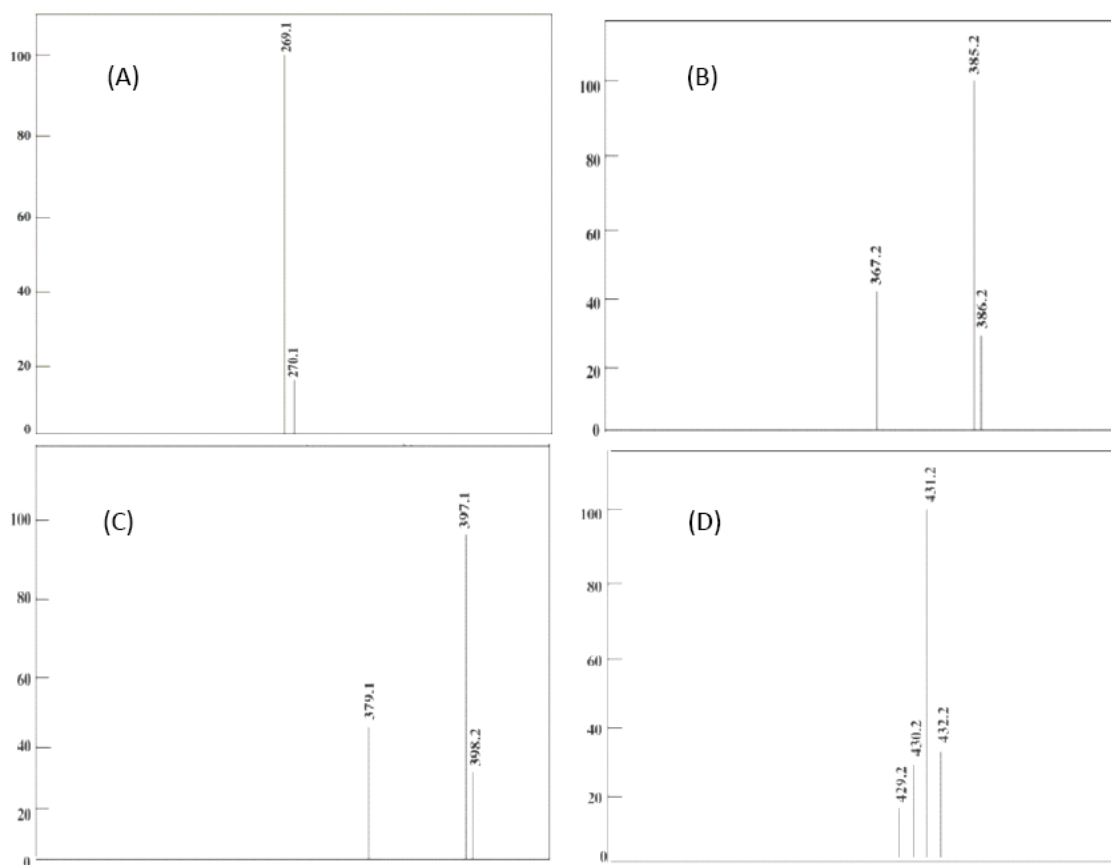
Hydrolyzovaný vzorek je extrahován přímo organickým rozpouštědlem, např. chloroformem, směs chloroform – methanol, chloroform – 2-propanol, methanol – voda nebo petrolether – diethylether. Extrakt je nutné před samotnou analýzou přečistit a odstranit tak lipidy. To se provádí semipreparativní HPLC, technikou SPE nebo enzymatickou hydrolýzou za použití lipázy.

- Metody stanovení

Ke stanovení vitamínu K se využívá metoda HPLC na reverzní fázi za použití methanolu, acetonitrilu nebo kombinací těchto dvou rozpouštědel s dichlormethanem jako mobilní fáze a silikagelu jako stacionární fáze. K detekci lze využít UV detektor.

Ke stanovení vitamínu K může být využito spojení superkritické fluidní extrakce a superkritické fluidní chromatografie (SFE – SFC), kde jako mobilní fáze byl aplikován 0,005% acetonitril.<sup>20,26,33,37,38</sup>

Metoda HPLC je sice nejvíce užívanou a nejvhodnější metodou pro stanovení lipofilních vitamínů v krmivech, ale ne jedinou. Využít lze také plynovou chromatografii (stanovení vitamínů E a K). Tato metoda ovšem vyžaduje podrobení vzorku vysokým teplotám. To nese zvýšené riziko ztrát termolabilních vitamínů. Všechny lipofilní vitamíny lze také stanovit pomocí polarografie a spektrofotometrie nebo voltametrie. Pro stanovení vitamínu A jsou navíc vhodné fluorimetrické metody. Heudi O., Trisconi J.M. a Blake J.CH. využili ke stanovení vitamínu A, D<sub>3</sub> a E spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem. Hmotnostní spektra těchto vitamínů jsou zobrazena na obrázku 11.<sup>20,39</sup>



Obr. 11 Hmotnostní spektra vitamínu A (A), vitamínu D<sub>3</sub> (B), vitamínu D<sub>2</sub> (C) a vitamínu E (D) (převzato z cit. 39)



## 5. Závěr

Látky obsažené v kompletních krmivech pokrývají denní dávku nutričních hodnot potřebných pro zdravý vývoj zvířete. Proto je potřebné tyto látky analyticky stanovit. Důležité je také sledovat celý průběh zpracování, jelikož i tam může docházet ke ztrátám. Před samotnou analýzou látek v krmivech je třeba optimalizovat přípravu vzorku, separaci analytu a analýzu pomocí vybrané metody. Při stanovení lipofilních vitamínů by měl být kladen největší důraz na přípravu vzorku, při které dochází k největším ztrátám těchto látek. Tento krok vyžaduje mechanické rozmělnění, při němž nesmí docházet k zahřívání vzorku. Vysoká teplota je totiž jedním z faktorů jejich nestability. K dalším faktorům se řadí přítomnost oxidujících látek, volných radikálů, kovů a vliv UV záření, před kterým musí být vzorek během manipulace chráněn tmavým sklem nebo hliníkovou fólií.

Nejvhodnější a nejvíce využívanou metodou v praxi pro stanovení lipofilních vitamínů je vysokotlaká kapalinová chromatografie HPLC. Tato metoda ovšem není jediná. Využít lze také spektrofotometrii, polarografii, voltometrii, fluorimetrické metody nebo hmotnostní spektrometrii. Ovšem s rozvojem HPLC význam těchto technik poklesl.

## 6. Literatura

1. Zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech ve znění pozdějších předpisů.
2. Vyhláška č. 365/2008, kterou se provádí zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech, ve znění pozdějších předpisů.
3. Zicker C. S. : Topics in Companion Animal Medicine, **23**, 121 (2008).
4. Škrdlík V., Císařovský M.: *Jak nakrmit pejska a kočičku*. Canis, 1994.
5. Okelo O.P., Wagner D.D, Carr E.L., Wheaton F.W., Douglass L.W., Joseph S.W.: Animal Feed Science and Technology **129**, 116-137 (2006).
6. Lankhorst C., Tran D.Q., Havenaar R., Hendriks H.W., van der Poel A.F.B.: Animal Feed Science and Technology **138**, 285-297 (2007) .
7. [http://www.agroweb.cz/Extruze-pri-vyrobe-krmiv\\_s45x9225.html](http://www.agroweb.cz/Extruze-pri-vyrobe-krmiv_s45x9225.html).
8. Kváš M.: *Výživa psů*. Dona, České Budějovice 1998.
9. Kořínek M.: *Velká kniha pro chovatele savců*. Rubico, Olomouc 2000.
10. Jeroch H., Čermák B., Kroupová V.: *Základy výživy a krmení hospodářských zvířat*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, České Budějovice 2006.
11. Čermák B. a kolektiv.: *Krmiva konveční a ekologická*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, České Budějovice 2006.
12. Thompson A.: Topics in Companion animal medicine, **23**, 127 (2008).
13. Hoza I., Kramářová D., Budínský P.: *Potravinářská biochemie II*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín 2007.
14. Hosmanová R., Douša M.: Chem. Listy **101**, 578 – 583 (2007).
15. Bonneau M., Laarveld B.: Livestock Production Science **59**, 223-241 (1999).
16. Binder M.E.: Animal Feed Science and Technology **133**, 149 - 166 (2007).
17. Hartog J.: Food Control **14**, 95 - 99, (2003).
18. Mantovani A., Frazzoli CH., La Rocca C.: The Veterinary Journal **182**, 392 – 401 (2009).
19. Volka K. a kolektiv.: *Analytická chemie I*. VŠCHT, Praha 1995.
20. Douša M., *Stanovení vitamínů, doplňkových látek a vybraných léčiv v krmivech*. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno 2007.
21. <http://ach.upol.cz/cs/materialy-k-vyuuce.php>.
22. Helán V.: *Analýza organických látek*, 2 Theta, Český Těšín 2005. ....

23. Pertile E., Čablík V. : *Instrumentální metody analýzy*. VŠB - Technická univerzita Ostrava, Ostrava 2006.
24. Klouda P.: *Moderní analytické metody*. Ostrava 2003.
25. Štulík K. a kolektiv: *Analytické separační metody*. Karolinum, Praha 2004.
26. Nařízení komise (ES) č. 152/2009,  *kterým se stanoví metody odběru vzorků a laboratorního zkoušení pro ústřední kontrolu krmiv*.
27. S. Scalia, G. Ruberto and F. Bonina. *J. Pharm. Sci.* **84**, 433 – 436 (1995).
28. Turner CH., King W.J., Mathiasson L.: *Journal of Chromatography A* **936**, 215 – 237 (2001).
29. Vidová V., Lemr K., Havlíček V.: *Chem. Listy* **102**, 957 – 959 (2008).
30. Quian H., Sheng M.: *Journal of Chromatography A* **825**, 127 – 133 (1998).
31. Castan S., Villard C., Jakob S., Puigserver A., Ajandouz H. E.: *Journal of Chromatography B* **822**, 339-346 (2005).
32. Wieliencki S., Olszanowski A.: *Chromatographia* **50**, ? (1999).
33. Luque-García J. L.: Luque de Castro M.D.: *Journal of Chromatography A* **935**, 3-11 (2001).
34. González-Martín I., González-Cabrera M.J., Bustamante-Rangel M., Delgado-Zamarreño M.M.: *Analytica Chimica Acta* **558**, 132 – 136 (2006).
35. Jakobsen J., Clausen I., Leth T., Ovesen L.: *Journal of Food Composition and Analysis* **17**, 777 – 787 (2004).
36. Salo-Väänänen P., Ollilainen V., Mattila P., Lehikoinen K., Salmela-Mölsä E, Piironen V.: *Food Chemistry* **71**, 535-543 (2000).
37. Billedeau M.S.: *Journal of Chromatography A* **472**, 371-379 (1989).
38. Speek A.J., Schrijver J., Schreurs W.H.P.: *Journal of Chromatography A* **301**, 441-447 (1984).
39. Heudi O., Trisconi J.M., Blake J.CH.: *Journal of Chromatography A* **1022**, 115 – 123 (2004).