

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Zastoupení lipofilních vitaminů v jedlém hmyzu

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Lucie Jarolímová

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Zora Kotíková, Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Zastoupení lipofilních vitaminů v jedlém hmyzu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13.4.2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Zoře Kotíkové, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce. Dále bych jí ráda poděkovala za trpělivost, ochotu, cenné rady a v neposlední řadě za velkou podporu při zpracování této práce. Velké díky patří také mé rodině a kamarádům, kteří mě podporovali po celou dobu mého snažení. Mé drahé polovičce děkuji za veškerou podporu, co mi byla poskytována a za pomoc během studijního života.

Zastoupení lipofilních vitaminů v jedlém hmyzu

Souhrn

Jelikož lidská populace stále roste, zvyšuje se i poptávka po cenově dostupných, udržitelných a kvalitních potravinách především živočišného původu. Produkce masa a masných výrobků má však významný negativní dopad na životní prostředí kvůli emisím skleníkových plynů, požadavkům na plochu a spotřebě vody. Jako alternativa se nabízí jedlý hmyz, který je výrazně nenáročnější, co se týče podmínek chovu. Proto je jedlý hmyz podrobován také analýze nutričních vlastností. Obecně je bohatý především na bílkoviny a tuky. Nutriční složení se však liší v závislosti na mnoha faktorech, jako je například druh hmyzu, stádium dospělosti či složení krmiva. Jelikož jsou maso a masné výrobky významným zdrojem lipofilních vitaminů, je snahou zjistit, zda by je jedlý hmyz mohl nahradit i z tohoto hlediska.

Cílem práce bylo vyvinout a validovat analytickou metodu stanovení lipofilních vitaminů (A, D, E) a pomocí této metody stanovit a porovnat obsah těchto vitaminů v jedlém hmyzu. K analýze byly k dispozici tři druhy jedlého hmyzu, a to cvrček domácí (*Acheta domestica*), larvy potemníka moučného (*Tenebrio molitor*) a saranče stěhovavá (*Locusta migratoria*). Všechny vitaminy byly stanoveny pomocí kapalinové chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC) a k analýze byly použity různé detektory (DAD, FLD, MS). Validace byla provedena na základě vyhodnocení parametrů správnost, přesnost, limit detekce a kvantifikace, linearita a pracovní rozsah.

Pomocí vyvinuté metody byly stanoveny obsahy lipofilních vitaminů ve vzorcích jedlého hmyzu. Vitamin A byl ve všech analyzovaných vzorcích hmyzu pod limitem detekce dané metody. Vitamin D3 se nacházel ve stopovém, nekvantifikovatelném množství pouze v druhu *Tenebrio molitor*. Všechny druhy se však ukázaly jako bohatý zdroj vitaminu E, díky vysokému zastoupení α -tokoferolu, jež má nejvyšší biologickou účinnost ze všech vitamínů. Nejvyšší množství α -tokoferolu bylo stanoveno ve vzorcích cvrčka domácího (*Acheta domestica*), a to v průměru 33,37 $\mu\text{g/g}$ sušiny. Potemník moučný (*Tenebrio molitor*) obsahoval v průměru 21,24 μg α -tokoferolu/g sušiny a saranče stěhovavá (*Locusta migratoria*) 25,94 μg α -tokoferolu/g sušiny.

Klíčová slova: Acheta, Tenebrio, Locusta, nutriční hodnota, tokoferoly, cholekalciferol, retinol

Representation of lipophilic vitamins in edible insects

Summary

Given the rate of human population increase, the demand for affordable, sustainable and high quality foods, predominantly animal based, has been on the rise. However, the production of meat and meat based products has a significant negative impact on the environment due to greenhouse gas emissions and high land and water use. Edible insects offer a viable alternative due to significantly lower breeding requirements. Consequently, edible insects have been undergoing nutritional value analysis. Generally, they are rich mainly in protein and fats. However, the nutritional composition differs depending on many factors, such as the species, its stage of development and feed composition. Given that meat and meat based products are a significant source of lipophilic vitamins, it is important to determine whether edible insects could replace them in that aspect as well.

The goal of the thesis was to develop and validate an analytical method for determining lipophilic vitamin (A, D, E) content and to use that method to determine and compare the amount of these vitamins in edible insects. The following three species of edible insects were analyzed: house cricket (*Acheta domestica*), mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) and migratory locust (*Locusta migratoria*). The amounts of all these vitamins were measured using reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) with different detectors used for analysis (DAD, FLD, MS). The validation was performed based on the evaluation of the following parameters: precision, accuracy, limits of detection and quantification, linearity and range.

The developed method was used to determine lipophilic vitamin content in edible insect samples. Vitamin A content was below the method's detection limit for all samples. Vitamin D3 was present only in *Tenebrio molitor* and only in trace, unquantifiable amounts. However, all species turned out to be a rich source of Vitamin E due to high amounts of α -tocopherol, the most biologically active vitamer. The highest amount of α -tocopherol was observed in house cricket (*Acheta domestica*) samples, being 33.37 $\mu\text{g/g}$ of dry matter on average. The mealworm (*Tenebrio molitor*) and the migratory locust (*Locusta migratoria*) contained 21.24 μg and 25.94 μg of α -tocopherol per 1 g of dry matter on average respectively.

Keywords: Acheta, Tenebrio, Locusta, nutritional value, tocopherols, cholecalciferol, retinol

Obsah

1 Úvod.....	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce.....	9
3 Literární rešerše.....	10
3.1 Jedlý hmyz.....	10
3.1.1.1 Udržitelnost.....	10
3.1.1.2 Druhy jedlého hmyzu.....	11
3.1.1.3 Nutriční hodnoty.....	12
3.1.2 Cvrček domácí.....	14
3.1.2.1 Charakteristika.....	14
3.1.2.2 Nutriční vlastnosti.....	14
3.1.3 Potemník moučný.....	16
3.1.3.1 Charakteristika.....	16
3.1.3.2 Nutriční vlastnosti.....	16
3.1.4 Saranče stěhovavá.....	18
3.1.4.1 Charakteristika.....	18
3.1.4.2 Nutriční vlastnosti.....	19
3.2 Lipofilní vitaminy.....	19
3.2.1 Vitamin A.....	20
3.2.2 Vitamin D.....	22
3.2.3 Vitamin E.....	23
3.2.4 Stanovení lipofilních vitaminů.....	26
3.2.5 Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	26
3.3 Vývoj a validace metody HPLC.....	27
3.3.1 Vývoj metody.....	27
3.3.2 Validace metody.....	27
3.3.2.1 Správnost.....	28
3.3.2.2 Přesnost.....	28
3.3.2.3 Linearita a pracovní rozsah.....	28
3.3.2.4 Limit detekce a kvantifikace.....	29
3.3.3 Kvantitativní hodnocení.....	29
4 Metodika.....	31
4.1 Materiál.....	31
4.1.1 Příprava vzorků hmyzu.....	31
4.1.2 Použité přístroje.....	32

4.1.3	Použité chemikálie	32
4.1.4	Použitý software	33
4.2	Vývoj metody	33
4.2.1	Volba chromatografického systému, typu kolony a způsobu detekce	33
4.2.2	Optimalizace přípravy vzorku	38
4.2.3	Finální metodika	39
4.2.3.1	Příprava vzorku pro stanovení vitaminů A, E a D v jedlém hmyzu.....	39
4.2.3.2	HPLC-DAD/FLD analýza retinolu a jednotlivých forem vitaminu E	39
4.2.3.3	UHPLC-ESI-MS/MS analýza vitaminu D3	40
4.3	Validace metody	40
4.4	Statistické vyhodnocení naměřených dat	41
5	Výsledky	42
5.1	Validace metody	42
5.1.1	Vitamin A.....	42
5.1.2	Vitamin D3	43
5.1.3	Vitamin E	43
5.2	Obsah lipofilních vitaminů v jedlém hmyzu	46
5.2.1	Vitamin A.....	46
5.2.2	Vitamin D3	46
5.2.3	Vitamin E	46
6	Diskuze	52
7	Závěr	55
8	Literatura.....	56
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	60
10	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Jedlý hmyz se tradičně konzumuje již v mnoha zemích především v Asii, Africe a Latinské Americe. V posledních letech se však rozšiřuje i do dalších zemí, a to v důsledku hledání alternativ živočišných bílkovin produkovaných hospodářskými zvířaty. Lidská populace neustále roste a je zapotřebí zvyšovat produkci potravin, hlavně kvalitních bílkovin živočišného původu. To má však významný ekologický dopad zejména kvůli emisím skleníkových plynů, požadavkům na velikost plochy k produkčním účelům a spotřebě vody. Nahrazením některých živočišných produktů jedlým hmyzem lze tyto dopady zmírnit (Nowakovski et al. 2022; Lumanlan et al. 2022).

Velmi ceněnou vlastností jedlého hmyzu se stal především vysoký obsah bílkovin s vhodným aminokyselinovým spektrem (Xiaoming et al. 2010). Neopomenutelný je však také vysoký obsah tuků u řady druhů jedlého hmyzu (Rumpold & Schlüter 2013). Ve snaze najít vhodnou alternativu živočišných produktů je potřeba vědět, zda by jedlý hmyz mohl plně nahradit tyto potraviny i z hlediska mikroživin. Potraviny živočišného původu, především maso a masné výrobky, nejsou totiž jen důležitým zdrojem kvalitních bílkovin, ale také jsou významným zdrojem lipofilních vitaminů (Kasper 2015). Proto se i jedlý hmyz podrobuje analýze obsahu těchto látek.

Lipofilní vitaminy A, D, E a K jsou esenciální organické látky, které lidské tělo potřebuje v malých dávkách a každý z nich má specifickou funkci, která nelze nahradit žádnou jinou látkou. Lidský organismus není schopen vitaminy dostatečně syntetizovat pro zajištění fyziologických potřeb a musí je tedy získávat především z potravy (Bayer 2008). Proto je důležité jejich obsah v potravinách sledovat.

Vitamin A potřebuje lidský organismus k normálnímu fungování zrakových funkcí, ke správnému růstu a vývoji a fungování imunitního systému. Velmi důležitou roli hraje v těhotenství, kdy je nezbytný pro udržování správného fungování zraku matky i dítěte a pro vývoj orgánů a kostry plodu (Bastos Maia et al. 2019). Vitamin D zastává klíčovou roli v řízení rovnováhy vápníku a fosforu. Jeho nedostatek u dětí ve fázi růstu a vývoje kostí může způsobit růstovou retardaci či křivici. U dospělých může nedostatek tohoto vitamínu vést k rozvoji sekundární hyperparatyreózy, což může mít za následek rozvoj osteoporózy či osteomalacie, a tedy i vyšší riziko zlomenin (Christakos et al. 2019). Vitamin E je považován za nejvýznamnější lipofilní antioxidant, který slouží v eukaryotických buňkách jako ochrana nenasycených lipidů před poškozením volnými radikály (Kiyose 2021).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotézy

1. Jedlý hmyz je díky vysokému obsahu tuku významným zdrojem lipofilních vitaminů ve stravě.
2. Mezi jednotlivými skupinami hmyzu existují významné rozdíly v obsahu a zastoupení lipofilních vitaminů.

Cíle práce

1. Vyvinout a validovat analytickou metodu stanovení lipofilních vitaminů (A, D, E) v jedlém hmyzu.
2. Pomocí této metody stanovit a porovnat obsah lipofilních vitaminů u různých skupin jedlého hmyzu.

3 Literární rešerše

3.1 Jedlý hmyz

Entomofagie pochází z řeckého slova éntomon, „hmyz“ a phagein, „jíst“. Označuje tedy obecně konzumaci hmyzu. Na základě pozorování stravovacích zvyklostí primátů lze usoudit, že hmyz byl součástí jídelníčků již dávných předků člověka. To bylo také potvrzeno z archeologických nálezů a jejich následnou analýzou například z jeskyní v USA a Mexiku (Kouřimská & Adámková 2016). Hmyz byl konzumován po celou dobu lidské existence a jako zdroj energie je využíván dodnes. Navzdory nepřítomnosti v konvenční západní stravě je hmyz jako potravina populární v celosvětovém měřítku (Testa et al. 2017; Dossey et al. 2016).

Tradičně je konzumován ve 113 zemích světa. V Číně, Japonsku či Thajsku se hmyz tradičně konzumuje či se přidává do různých pokrmů. Největšími konzumenty hmyzu jsou především Afrika, Asie a Latinská Amerika (Kouřimská & Adámková 2016). V tropických zemích se jedlý hmyz sbírá v přírodě a konzumuje se celý, avšak v západních zemích je spíše chován na farmách a dále zpracován například sušením či tepelnou úpravou, která je doporučována k minimalizaci rizika mikrobiální kontaminace (Van Huis 2022). V dnešní době se však zájem a povědomí o entomofagii nadále zvyšuje a provádějí se výzkumy v oblasti potravinové bezpečnosti, ekologické udržitelnosti a nutriční hodnoty hmyzu (Van Huis et al. 2013).

Zařazení jedlého hmyzu do našich jídelníčků má potenciální benefity jak pro životní prostředí, tak i pro lidské zdraví. Nahrazení některých živočišných produktů jedlým hmyzem může ušetřit plochy k zemědělské produkci a litry spotřebované vody a také může pomoci snížit emise skleníkových plynů. Některé druhy jedlého hmyzu jsou vhodnou alternativou běžně konzumovaného masa, jako je kuřecí, vepřové či hovězí, díky vysokému zastoupení bílkovin a esenciálních aminokyselin. Další benefity jedlého hmyzu pro lidské zdraví tkví v obsahu nenasycených mastných kyselin, vlákniny, vitaminů a minerálů z nichž lze zmínit například vitamin B12 či železo a zinek (Nowakovski et al. 2022).

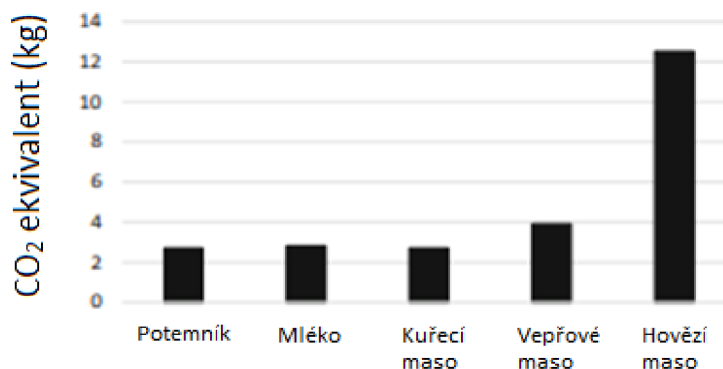
3.1.1.1 Udržitelnost

Jelikož je odhadováno, že světová populace vzroste do roku 2050 na 9,6 miliard lidí, bude zapotřebí zvýšit produkci potravin a obzvláště produkci živočišných bílkovin. Živočišná výroba má však významný ekologický dopad zejména kvůli emisím skleníkových plynů, požadavkům na velikost plochy k produkčním účelům a spotřebě vody (Lumanlan et al. 2022).

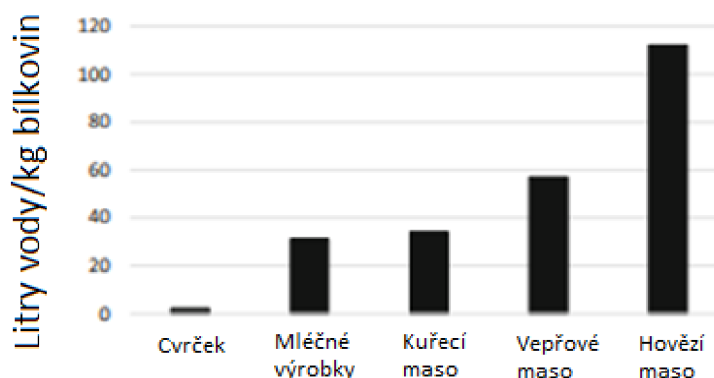
Produkce hmyzu má menší environmentální dopad v porovnání s chováním hospodářských zvířat (Van Huis et al. 2013; Dossey et al. 2016). Například skot vyprodukuje 3 g skleníkových plynů na 1 kg tělesné hmotnosti, zatímco hmyz pouze 0,2 g na kilogram tělesné hmotnosti. Obrázek 1 zobrazuje porovnání CO₂ ekvivalentu, který je ukazatelem emisí skleníkových plynů, jež vedou ke globálnímu oteplování. U hovězího dobytka se pohybuje okolo 12 kg na rozdíl od hmyzu s výsledným číslem okolo 2 kg.

Dalším zajímavým ukazatelem může být spotřeba vody na produkci 1 kg bílkovin, kdy hmyz potřebuje zhruba 2 litry vody a skot až 112 litrů vody, jak lze vidět na Obrázku 2.

Posledním atributem v porovnávání ekologických dopadů na životní prostředí by měla být zmíněna potřeba zemské plochy k produkci. Například cvrčci vyžadují pouze 25 m² k produkci 1 kg tělesné hmotnosti, kdežto hovězí dobytek vyžaduje 250 m², což je až 10krát více (Lumanlan et al. 2022).



Obrázek 1: CO₂ ekvivalent jednotlivých druhů zdrojů bílkovin
Zdroj: Lumanlan et al. 2022



Obrázek 2: Spotřeba vody v litrech na produkci 1 kg bílkovin
Zdroj: Lumanlan et al. 2022

3.1.1.2 Druhy jedlého hmyzu

Přes 2000 druhů hmyzu bylo popsáno jako vhodných k lidské výživě. Světově jsou nejvíce využívány druhy brouků, housenek, včel, vos a mravenců. Dále také cvrčci, saranče, cikády, termiti, vážky, mouchy a další (Kouřimská & Adámková 2016). V současné době se chovají pro potravinářské účely brouci z čeledi potemníkovitých (*Tenebrionidae*), cvrčci, kobylky a saranče z řádu rovnokřídlých (*Orthoptera*) a z řádu motýlů (*Lepidoptera*) například zavíječ voskový či bourec morušový. Jako krmivo se chovají především larvy potemníka moučného, známé jako mouční červi a mouchy z řádu dvoukřídlých (*Diptera*). Tyto druhy byly vybrány zejména pro

vhodné vlastnosti pro chov jako například možnosti automatizace, levné substráty či rychlost reprodukce (Van Huis 2022).

Mezi druhy hmyzu, které by mohly být chovány v Evropě vzhledem k podmínkám prostředí, patří cvrček domácí (*Acheta domestica*), cvrček banánový (*Gryllus assimilis*), saranče stěhovavá (*Locusta migratoria*), saranče pustinná (*Schistocerca gregaria*), potemník moučný (*Tenebrio molitor*), potemník brazilský (*Zophobas morio*), potemník stájový (*Alphitobius diaperinus*), včela medonosná (*Apis mellifera*) a zavíječ voskový (*Galleria mellonella*) (Kouřimská & Adámková 2016).

3.1.1.3 Nutriční hodnoty

Nutriční hodnoty hmyzu vykazují obrovskou variabilitu zejména kvůli velkému množství druhů. Variabilita je také pozorována v rámci stejného druhu, jelikož záleží, v jakém jsou stádiu vývoje, také na typu prostředí a jejich stravě. Rumpold a Schlüter (2013) ve své přehledové studii zaměřené na složení živin v jedlém hmyzu charakterizovali složení 236 druhů hmyzu. Mezi zkoumané živiny patřily bílkoviny, tuky, vláknina, bezdusíkaté látky, popeloviny a celková energie v kcal/100 g. Přestože měla data velkou variabilitu, lze z této studie vyvodit, že mnoho druhů hmyzu poskytuje uspokojivé množství energie a bílkovin s vhodným aminokyselinovým spektrem. Dále obsahuje mononenasyčené a polynenasycené mastné kyseliny a je bohatých na několik mikronutrientů jako je například měď, železo, hořčík, mangan, fosfor, selen, zinek, dále obsahuje také vitaminy riboflavin, kyselinu pantothenovou, biotin a v některých případech kyselinu listovou.

Weru et al. (2021) však poukázali, že variabilita dat je zapříčiněna nejen krmivem, pohlavím, zeměpisnou šířkou a stádiem dospělosti, ale také provedenou analýzou, tedy metodou a počtem vzorků. Studie sledující nutriční hodnoty ve hmyzu lze těžko porovnávat právě i kvůli lišícím se metodám analýzy.

V Tabulce 1 jsou vypsány průměrné obsahy bílkovin, tuků, popelu a energie u vybraných druhů hmyzu. Data vykazují variabilitu u různých druhů hmyzu, ale i v rámci stejného druhu a potvrzují, že stádium dospělosti ovlivňuje nutriční vlastnosti.

Tabulka 1: Průměrný obsah vybraných parametrů u druhů jedlého hmyzu (upraveno dle Finke 2002)

	Bílkoviny (g/kg)	Tuky (g/kg)	Popel (g/kg)	Energie (kcal/kg)
<i>Zophobas morio</i>	197	177	10	2 423
<i>Tenebrio molitor</i> (larva)	187	134	9	2 056
<i>Tenebrio molitor</i> (dospělec)	237	54	12	1 378
<i>Galleria mellonella</i>	141	249	6	2 747
<i>Bombyx mori</i>	93	14	11	674
<i>Acheta domesticus</i> (dospělec)	205	68	11	1 402
<i>Acheta domesticus</i> (nymfa)	154	33	11	949

Bílkoviny jsou jednou z hlavních složek, díky kterým je hmyz ceněn. Xiaoming et al. (2010) sledovali obsah bílkovin u více než 100 druhů hmyzu. Brouci (*Coleoptera*) obsahovali 23-66 % bílkovin v sušině, motýli (*Lepidoptera*) 14-68 % a rovnokřídlí (*Orthoptera*) 23-65 %. Lze podotknout, že data mají opět velkou variabilitu i v rámci stejného druhu hlavně kvůli stádiu vývoje. Tato analýza navíc ukázala, že obsah esenciálních aminokyselin představoval 46-96 % celkového obsahu aminokyselin.

Další studie byla provedena na 78 druzích jedlého hmyzu v Mexiku. Průměrný obsah bílkovin se pohyboval v rozmezí 15-96 % a stravitelnost těchto bílkovin byla 76-96 %, což je velmi vysoká hodnota, vzhledem k tomu, že u vaječného bílku je tato hodnota 95 %. Polovina analyzovaných druhů hmyzu obsahovala více než 50 % bílkovin (Ramos-Elorduy et al. 1997).

Druhou nejzastoupenější složkou v jedlém hmyzu je tuk. V sušině se pohybuje v rozmezí 10-70 % a více zastoupen je u stádia larvy a kukly než u dospělců. Triacylglyceroly představují zhruba 80 % z celkového obsahu tuku. Obsah fosfolipidů je obecně menší než 20 %, avšak závisí na stádiu dospělosti a druhu hmyzu (Giampieri et al. 2022). Průměrný obsah tuku se pohybuje od 13,41 % pro řád rovnokřídlí (*Orthoptera*) do 33,4 % pro řád brouci (*Coleoptera*). Nejvyšší obsah tuku byl zjištěn u larev *Phassus triangularis* z řádu *Lepidoptera* a to 77 %. Druhy hmyzu s vyšším obsahem bílkovin zpravidla obsahují méně tuku a naopak. Také bývá pravidlem, že dospělci obsahují více bílkovin než larvy a larvy jsou zase bohaté na tuky (Rumpold & Schlüter 2013). Hojně zastoupenou skupinou mastných kyselin jsou C18, tedy kyselina olejová, linolová a linolenová. Dále i obsah kyseliny palmitové je poměrně vysoký a ze skupiny sterolů má nejvýznamnější zastoupení cholesterol (Giampieri et al. 2022). Weru et al. (2021) opět poukázali na variabilitu dat, avšak uvedli, že množství esenciálních mastných kyselin je velmi malé ve všech druzích hmyzu a člověk by musel zkonzumovat velké množství jedlého hmyzu, aby naplnil své potřeby pro denní příjem esenciálních mastných kyselin.

Sacharidy se v jedlém hmyzu vyskytují v malém množství. Například larvy potemníka moučného obsahují 1-7 % sacharidů. Významný je však obsah vlákniny. Jedlý hmyz obsahuje chitin, což je N-acetyl- β -D-glukosamin polymer, jež se nachází v exoskeletu (Oonincx & Finke 2020). Průměrný obsah vlákniny se pohybuje od 5 do 14 %, kdy 5 % obsahoval hmyz z řádu *Isoptera* a 14 % obsahoval hmyz z řádu *Hemiptera* (Rumpold & Schlüter 2013).

Hodnoty obsahu minerálních látek a vitaminů se také velmi liší u různých druhů jedlého hmyzu. Bylo zjištěno, že všechny druhy kromě larev mouchy domácí obsahovaly jen velmi málo vápníku a draslíku. Na druhou stranu však většina druhů obsahovala vysoké množství fosforu a zhruba třetina z analyzovaných druhů byla bohatá i na hořčík, a to hlavně hmyz z řádu rovnokřídlých (cvrčci, kobyly či saranče). Obecně je hmyz chudý na sodík, kromě housenek řádu *Lepidoptera*, které ve dvou případech obsahovaly až přes 1500 mg ve 100 g (Rumpold & Schlüter 2013). Některé druhy se vyznačují vyšším obsahem vitamínu E. Například cvrček domácí (*Acheta domestica*) obsahuje 8-195 IU/kg sušiny, larvy potemníka moučného (*Tenebrio molitor*) obsahují 22-116 IU/kg sušiny a bráněnka (*Hermetia illucens*) obsahuje 10-235 IU/kg sušiny. Obsah závisí na složení krmiva a také na různém zpracování potravy v gastrointestinálním traktu hmyzu (Finke 2002; Pennino et al. 1991).

Důležitým zjištěním se stal fakt, že nutriční složení se dá částečně upravit podávaným krmivem. Jedinými živinami, jejichž obsah nelze upravit tak lehce, byly aminokyseliny a minerální látky. U některých druhů hmyzu bylo dokázáno, že s vyšším příjmem omega 3 mastných kyselin v krmivu se zvýšil obsah těchto kyselin i v daném druhu hmyzu. S tímto zjištěním však vyvstaly i jisté nejasnosti. Například u cvrčků a potemníků krmených potravou s přídavkem rybího oleje, se v jejich těle akumulovala eikosapentaenová kyselina, ale ne dokosahexaenová kyselina i když obě byly v krmivu přítomny (Finke 2015). Naproti tomu *Hermetia illucens* krmena také krmivem s rybím olejem akumulovala obě tyto kyseliny (Erbland et al. 2020). Nebylo však potvrzeno, zda to bylo druhem hmyzu, krmivem či provedením experimentu. Je tudíž třeba dalších studií, abychom získali dostatek informací o potenciálu ovlivnění nutričních hodnot krmivem (Gkinali et al. 2022; Kulma et al. 2022; Oonincx & Finke 2020; Finke 2015).

3.1.2 Cvrček domácí

3.1.2.1 Charakteristika

Cvrček domácí (*Acheta domestica*) se řadí do třídy hmyz (*Insecta*) a řádu rovnokřídlí (*Orthoptera*). Dorůstá délky 16-20 mm. Preferuje místa s teplotou 28°C a vysokou vlhkostí vzduchu. Patří mezi druhy jedlého hmyzu a jako jeden z nich má velký potenciál na evropském trhu. Chová se ve velkém měřítku jak ve východních, tak západních zemích světa. Mezi největší producenty cvrčků pro potravinářský průmysl patří Thajsko. Většinou se chová na speciálních farmách určených pro chov tohoto jedlého hmyzu, avšak v některých zemích se sbírá v přírodě. Bylo zjištěno, že sensorické vlastnosti tohoto druhu lze ovlivnit krmivem během množení, což rozvíjí možnosti využití v potravinářském sektoru (Ververis et al. 2022).

Cvrček domácí patří mezi druhy jedlého hmyzu chovaných v EU, které splňují bezpečnostní podmínky schválené Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA). Dále mezi tyto druhy patří: potemník moučný (*Tenebrio molitor*), bráněnka (*Hermetia illucens*), cvrček krátkokřídlý (*Gryllodes sigillatus*), cvrček banánový (*Gryllus assimilis*) a potemník stájový (*Alphitobius diaperinus*) (Raheem et al. 2019).

Životní cyklus cvrčka domácího probíhá ve třech stádiích, a to vajíčko, nymfa a dospělec. Po dokončení líhnutí z vajíček se nymfy nechají dorůst v řízených podmínkách do požadované velikosti. Nejčastěji do stádia dospělosti zhruba po 2 měsících po líhnutí (Fernandez-Cassi et al. 2019). Nejpoužívanější metoda usmrcení je zmrazení a následuje proces vaření pro omezení růstu či usmrcení nežádoucích bakterií, virů či parazitů. Následně jsou cvrčci sušeni a mohou být dále použiti na další zpracování například na mletí k výrobě moučky (Ververis et al. 2022).

3.1.2.2 Nutriční vlastnosti

Ververis et al. (2022) porovnávali hodnoty nutričního složení cvrčka domácího z různých studií. Nesušené formy cvrčka domácího obsahují okolo 52-79 % vody, 13-25 % bílkovin a 1,6-18 % tuku. Hodnoty nutriční kompozice sušené formy jsou uvedeny v Tabulkách 2 a 3.

Poměr nasycených, mononenasycených a polynenasycených mastných kyselin byl naměřen jako vyrovnaný, avšak výsledky z různých studií se liší. Hlavní nasycenou mastnou kyselinou je kyselina palmitová, a to v zastoupení 26 % z celkového obsahu mastných kyselin. Převládající polynenasycenou mastnou kyselinou je kyselina linolová a to 35 % z celkového obsahu a z mononenasycených mastných kyselin převládá kyselina olejová s obsahem 24 % z celkového obsahu.

Tabulka 2: Obsah jednotlivých složek nutriční kompozice sušené formy cvrčka domácího (upraveno dle Verweris et al. 2022)

Voda (g/100 g)	Hrubá bílkovina (g/100 g)	Tuk (g/100 g)	SFA* (g/100 g)	MUFA* (g/100 g)	PUFA* (g/100 g)	Sacharidy (g/100 g)
0,60-9,43	41,8-75,2	7,5-35,0	4,63-7,63	3,22-3,88	1,36-6,76	4,9-6,47

*SFA-nasycené mastné kyseliny; MUFA-mononenasycené mastné kyseliny;
PUFA-polynenasycené mastné kyseliny

Tabulka 3: Obsah vitaminů a minerálních látek sušené formy cvrčka domácího (upraveno dle Verweris et al. 2022)

Vitamin	Obsah (mg/kg)	Minerální látka	Obsah (mg/kg)
Vitamin A	0,4	Ca	730,0-3150,4
Vitamin C	239,0	Fe	44,4-82,5
α-Tokoferol	0,9-2,2	Mg	612,0-1279,8
Biotin	1,0-1,1	P	323,7-9117,1
Niacin	45,1	K	3653,6-12800,0
Pantothenová kyselina	43,0-44,2	Na	950,5-8633,4

Kulma et al. (2022) zkoumali vliv suplementace mrkve na nutriční hodnoty hmyzu. Studie byla provedena na příbuzném cvrčka domácího, a to na cvrčku banánovém (*Gryllus assimilis*). Bylo potvrzeno, že nutriční složení hmyzu je ovlivněno krmivem a jisté živiny mohou být navýšeny, avšak akumulace těchto živin má své limity. Dále bylo zjištěno, že denní suplementace po celý život hmyzu není nezbytná, aby bylo dosaženo maximálního obsahu dané živiny. Přídavkem mrkve do krmiva byl ovlivněn obsah karotenoidů a složení mastných kyselin. Obsah základních živin však ovlivněn nebyl. Během krátkodobého podávání krmiva s přídavkem mrkve se významně zvýšil obsah provitaminů A. Dále se u cvrčků krměných mrkví po dobu 14 a 60 dní významně snížil obsah nasycených mastných kyselin a zvýšil se obsah polynenasycených mastných kyselin.

3.1.3 Potemník moučný

3.1.3.1 Charakteristika

Potemník moučný (*Tenebrio molitor*) patří do řádu brouci (*Coleoptera*) a řadí se do čeledi potemníkovitých (*Tenebrionidae*), která je pátou největší čeledí tohoto řádu zahrnující přes 14 000 druhů. Jedná se o noční druh preferující temná a vlhká místa. Vyskytuje se především v severních zemích a živí se obilnými produkty. Tím pádem se stává také škůdcem ve skladech obilí či produktů z obilí. Jeho životní cyklus se skládá ze čtyř stádií a to vajíčko, larva, kukla a dospělec. Obvykle cyklus trvá 60 dní, avšak může trvat i o mnoho déle v závislosti na podmínkách prostředí, tedy teplotě a vlhkosti. Nejčastěji jsou konzumovány larvy, které se také hojně využívají jako krmivo pro řadu zvířat (Robinson 2005).

Vzhledem k nárůstu poptávky jedlého hmyzu a díky příznivému nutričnímu složení se potemník dostal do širšího povědomí. Farmy k chování tohoto druhu se nadále rozšiřují také díky méně náročným podmínkám chovu a menší spotřebě vody a krmiva v porovnání s hospodářskými zvířaty. V důsledku toho se rozvíjí i výzkum zaměřující se na vývoj levného a udržitelného chovu jedlého hmyzu se specifickým složením (Grau et al. 2017). Nutriční kompozice se dá upravit především krmivem. Alves et al. (2016) zjistili, že larvy potemníka krmeného směsí pšeničné a sójové mouky obsahovaly velké množství nenasycených mastných kyselin (v průměru 66 %) a antioxidantů.

3.1.3.2 Nutriční vlastnosti

Gkinali et al. (2022) ve své přehledové studii porovnávali hodnoty obsahu jednotlivých složek nutriční kompozice z různých vědeckých publikací. Obsah bílkovin v larvách potemníka moučného se pohyboval v rozmezí od 41 do 66 %. Profil aminokyselin dosahoval požadovaného poměru esenciálních aminokyselin díky vysokému obsahu leucinu, isoleucinu, lysinu, tyrosinu, valinu a methioninu. Obsah tuku se lišil v závislosti na složení krmiva. Pohyboval se od 15 do 50 %. Co se týče složení mastných kyselin, nejvíce zastoupeny byly mononenasyčené mastné kyseliny (37-55 %) a to především kyselina palmitoolejová a olejová. Nasycené mastné kyseliny byly obsaženy v množství od 23 do 34 % a polynenasycené mastné kyseliny od 11 do 40 %. Obecně jsou tedy larvy potemníka bohaté na nenasycené mastné kyseliny, ale aby byl příznivý i poměr omega 3 a omega 6 nenasycených mastných kyselin, musí být obsah upraven krmivem.

Sabolová et al. (2016) se zabývali obsahem lipofilních sloučenin ve dvou druzích jedlého hmyzu z čeledi potemníkovitých, a to právě *Tenebrio molitor* a *Zophobas morio*. Důležitými skupinami lipofilních látek jsou steroidy a lipofilní vitaminy. Steroidní látky jsou syntetizovány organismem komplexními mechanismy a nejvýznamnější látkou pro lidské tělo je cholesterol. Ten je v těle využíván na syntézu steroidních hormonů, vitamínu D3 a žlučových kyselin a tělo si ho dokáže vyrobit v játrech (Velíšek 1999). Hmyz také potřebuje cholesterol pro syntézu hormonů a vitamínu D3. Dokáže si ho však syntetizovat pouze pomocí fytoosterolů. *Tenebrio molitor* produkuje zhruba 67 % cholesterolu ze sitosterolu. Pomocí chromatografických metod

byl stanoven obsah cholesterolu, fytosterolů (kampesterolu, stigmasterolu a β -sitosterolu) a tokoferolů. Jednotlivé obsahy jsou uvedeny v Tabulce 4. Obsah cholesterolu byl značně vyšší u *Zophobas morio* než u *Tenebrio molitor*. Oba druhy obsahovaly značné množství fytosterolů a tokoferolů, což může být považováno za jeden z hlavních benefitů těchto druhů jedlého hmyzu (Sabolová et al. 2016).

Ve studii Sabolová et al. (2016) byl také porovnáván obsah tokoferolů v larvách *Zophobas morio* při různých teplotách skladování. Bylo zjištěno, že teplota skladování nemá vliv na obsah tokoferolů. Jednotlivé obsahy jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 4: Obsah cholesterolu a fytosterolů u dvou druhů jedlého hmyzu (Sabolová et al. 2016)

Hmyz	Cholesterol (mg/kg \pm SD)	Kampesterol (mg/kg \pm SD)	Stigmasterol (mg/kg \pm SD)	β -sitosterol (mg/kg \pm SD)
<i>Zophobas morio</i>	1784,1 \pm 30,4	227,6 \pm 19,9	79,3 \pm 9,4	344,1 \pm 35,8
<i>Tenebrio molitor</i>	669,4 \pm 34,7	350,5 \pm 56,0	71,9 \pm 2,5	244,7 \pm 12,0

Tabulka 5: Obsah tokoferolů v larvách *Zophobas morio* při jiných teplotách skladování (Sabolová et al. 2016)

Teplota skladování (°C)	α -tokoferol (mg/kg \pm SD)	β + γ tokoferol (mg/kg \pm SD)	δ -tokoferol (mg/kg \pm SD)
5-6	75,7 \pm 3,2	5,3 \pm 0,1	LOQ
25	77,2 \pm 0,1	5,3 \pm 0,3	LOQ

Rumpold & Schlüter (2013) ve své studii uvádí i obsah minerálních látek a určitých vitaminů v larvách *Tenebrio molitor*. Hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 6. Studií, které by se zabývaly obsahem lipofilních vitaminů, je doposud málo, tudíž jsou zmíněny pouze vitaminy rozpustné ve vodě. Byla však provedena studie zabývající se obsahem tokoferolů v larvách potměníka moučného. Jeon et al. (2016) měřili hladiny tokoferolů a zastoupení mastných kyselin v oleji larev při různé délce pražení za teploty 200 °C. Hodnoty tohoto měření jsou zaznamenány v Tabulce 7. Pražením se obsah α a γ -tokoferolů značně snížil.

Tabulka 6: Obsah vitaminů a minerálních látek v larvách *Tenebrio molitor* (upraveno dle Rumpold & Schlüter 2013)

Vitamin	Obsah v sušině (mg/100 g)	Minerální látka	Obsah v sušině (mg/100 g)
C	3,15-6,15	Ca	44,36-47,18
B1	0,31-0,63	K	761,54-895,01
B2	0,41-2,13	Mg	210,24-221,54
B3	10,59-10,68	P	697,44-748,03
B5	3,72-6,88	Na	125,38-140,94
B7	0,079-0,095	Fe	5,41-5,51
B9	0,30-0,41	Zn	11,41-13,65

Tabulka 7: Obsah α -tokoferolu a γ -tokoferolu (mg/kg) v oleji larev *Tenebrio molitor* při různých dobách pražení (Jeon et al. 2016)

	Doba pražení			
	nepražené	5 min	10 min	15 min
α -Tokoferol (mg/kg)	5,74	5,61	4,86	4,42
γ -Tokoferol (mg/kg)	186,02	165,75	169,97	169,16

Zajímavá studie byla provedena pro porovnání účinku pěti různých krmiv na profil mastných kyselin, metabolismus lipidů a antioxidační molekuly u larev potemníka moučného. Mattioli et al. (2021) uvedli, že larvy potemníka mají velký potenciál, co se týče úpravy požadovaných nutričních vlastností podávaným krmivem. Věnovali se také stanovením retinolu a tokoferolů. Obsah retinolu byl naměřen v rozmezí 0-0,6 $\mu\text{g/g}$. Celkový obsah tokoferolů se pohyboval od 0,47 do 5,3 $\mu\text{g/g}$. Nejvyšší obsah retinolu byl zaznamenán u larev, kterým byla podávána směs mláta a sušenek v poměru 1:1. Nejvyšší obsah tokoferolů byl zaznamenán u larev krmených sušenkami. Sušenky obsahovaly ze všech krmiv nejvíce tokoferolů (21,66 $\mu\text{g/g}$).

3.1.4 Saranče stěhovavá

3.1.4.1 Charakteristika

Saranče stěhovavá (*Locusta migratoria*) patří do řádu rovnokřídlí (*Orthoptera*). Dorůstá do velikosti 30 až 60 mm. Řadí se do druhů, které migrují a je rozšířená především v Africe, Asii a Evropě. Je obávaným škůdcem, jelikož pokud dojde k jejímu přemnožení, může zlikvidovat obrovské množství vegetace na zemědělných plochách. Během svého života totiž zkonsumuje až 30krát více potravy, než sama váží. Saranče se chovají ve speciálních nádržích zhotovených z jemného pletiva. K životu potřebují teplotu 28-32 °C a dostatek světla alespoň po 12 hodin denně. Jsou krmeny trávou, salátem a zeleným obilím. Jako přídavek dostávají nakrájenou zeleninu, ovoce, šrot, sušené mléko a ovesné vločky. Samice snáší vajíčka do misky s rašelinou smíchanou s pískem. Vajíčka chrání pěnový kokon a za dva týdny se z nich líhnou malé nymfy, které se pětikrát svlékají. Dospělci žijí asi 2-3 měsíce (Kořínek 1999).

Saranče spolu s dalšími druhy z řádu rovnokřídlých jsou běžně konzumovány v řadě zemích světa a patří dokonce k nejvíce konzumovaným druhům jedlého hmyzu. V Africe jsou saranče důležitým zdrojem energie stejně jako další jedlý hmyz především v časech, kdy je potravin nedostatek. Konzumují se však i k doplnění energie, jelikož v mnoha afrických zemích je strava málo výživná. V řadě dalších zemí se tento druh konzumuje i pro jeho chuť a příznivé nutriční vlastnosti (Salama 2020). Vzhledem k reprodukčním schopnostem lze také saranče považovat za velmi vhodný druh k chování pro lidskou výživu, jelikož se velmi rychle a hojně množí. V mnoha afrických a asijských zemích je saranče považována za delikatesu a připravuje se na různé způsoby. Mohou se konzumovat smažené, vařené či sušené (Mohamed 2015).

3.1.4.2 Nutriční vlastnosti

Jedlý hmyz se stává populárním při hledání alternativního živočišného proteinu s ohledem na dostupnost, náročnost na chov a udržitelnost životního prostředí. Proto i saranče byla podrobena analýze nutričních vlastností. Mohamed (2015) stanovil obsah základních makroživin a vybraných minerálních látek u tohoto druhu jedlého hmyzu. Obsahy jednotlivých živin jsou uvedeny v Tabulce 8. Stejně jako jiné druhy z řádu *Orthoptera* je saranče bohatá především na bílkoviny a dále na tuky. Bylo zjištěno, že saranče je dobrým zdrojem tuků, jelikož 80 % z celkového obsahu tuku jsou triacylglyceroly a pouze 20 % zaujímají fosfolipidy.

Tabulka 8: Obsah jednotlivých živin *Locusta migratoria* (upraveno dle Mohamed 2015)

	Obsah (%)	Průměr± SD (%)
Bílkoviny	42,16-58,62	50,42±2,00
Tuky	18,90-20,34	19,62±0,80
Sacharidy	4,05-5,51	4,78±0,74
Vláknina	14,21-17,02	15,65±1,70
Popel	5,72-6,76	6,24±0,50

Oonincx & van der Poel (2011) porovnávali efekt tří různých krmiv na nutriční kompozici saranče. Skupinám sarančí podávali do travnatého krmiva jícelek vytrvalý, pšeničné otruby nebo mrkev. Bylo zjištěno, že krmivo významně ovlivňuje nutriční složení saranče. Lze tedy podotknout, že podáváním různého krmiva mohou být ovlivněny nutriční vlastnosti a může být dosaženo výhodnějšího složení živin. Dále bylo zjištěno, že stádium vývoje nemá významný vliv na obsah retinolu a karotenoidů, avšak významný byl vliv potravy. Přídavek pšeničných otrub významně snížil obsah α -karotenu. Retinol byl přítomen ve vyšších koncentracích u sarančí krmených krmivem s přídavkem pšeničných otrub i mrkve v porovnání s normálním travnatým krmivem bez přídavku. Obsah β -karotenu se zvýšil u sarančí krmených mrkví, jak by se dalo předpokládat.

3.2 Lipofilní vitaminy

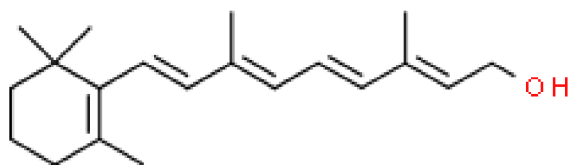
Vitaminy jsou esenciální organické látky, které lidské tělo potřebuje v malých dávkách a slouží především jako katalyzátory biochemických reakcí v organismu. Dělí se na vitaminy rozpustné ve vodě a na vitaminy rozpustné v tucích, které se označují jako lipofilní. Každý z nich má specifickou funkci, která nelze nahradit žádnou jinou látkou. Lidský organismus není schopen vitaminy dostatečně syntetizovat pro zajištění fyziologických potřeb a musí je tedy získávat především z potravy (Bayer 2008).

Vitaminy rozpustné ve vodě jsou kofaktory enzymů a při vysokých dávkách nevyvolávají hypervitaminózy, jelikož je jejich případný nadbytek vyloučen močí. Lipofilní vitaminy mají schopnost akumulovat se v tělesných tkáních a některé z nich mohou při předávkování vyvolat toxický efekt. Mezi lipofilní vitaminy se řadí vitaminy A, D, E a K (Kasper 2015; Bayer 2008).

Jelikož se tato práce zabývá stanovením vitaminů A, D a E, budou tyto vitaminy blíže charakterizovány v následujících kapitolách.

3.2.1 Vitamin A

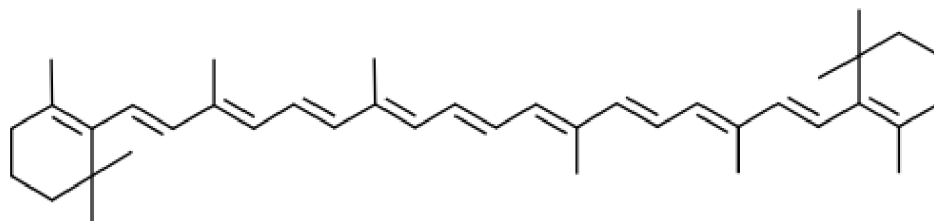
Jako vitamin A jsou označovány látky vykazující veškeré účinky tohoto vitamínu. V přírodě se vyskytují tři základní formy vitamínu A, a to retinol, retinal a kyselina retinová (Kasper 2015). Základní a nejvýznamnější aktivní formou je retinol. Retinol je izoprenoid s pěti konjugovanými dvojnými vazbami v molekule (Obrázek 3), respektive alicyklický diterpenový alkohol s tzv. β -jononovým cyklem a s postranním řetězcem čtyř konjugovaných dvojných vazeb (jeden z 15 možných izomerů). V potravinách je doprovázen řadou analogů a metabolitů lišících se strukturou jononového cyklu nebo postranního řetězce (Velíšek 1999). Tyto molekuly vykazují charakteristickou absorpci spektra ultrafialového a viditelného záření díky systému konjugovaných dvojných vazeb. Tento jev se využívá při identifikaci a stanovení koncentrace těchto sloučenin. Existuje mnoho dalších izomerů právě kvůli konjugovaným dvojným vazbám, které mohou být v *cis* či *trans* izomerii. Dále může mít funkční skupina různý oxidační stav. V tkáních se retinol vyskytuje ve formě esterů, kde esterově vázanou mastnou kyselinou je především palmitová kyselina. Esterifikace retinolu chrání hydroxylovou skupinu před oxidací a značně mění vlastnosti látky (Zempleni et al. 2013).



Obrázek 3: All-*trans* retinol

Zdroj: <https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.393012.html>

Aktivitu vitamínu A také vykazuje řada dalších přirozeně se vyskytujících sloučenin ze skupiny karotenoidů, které se označují jako provitaminy A. Mezi nejvýznamnější se řadí β -karoten (Obrázek 4). Z těchto látek si většina savců dokáže vytvořit vitamin A. Retinoidy obsahující alespoň jeden nesubstituovaný β -jononový cyklus jsou oxidací enzymově transformovány na aldehyd – all-*trans*-retinal neboli retinaldehyd. Z β -karotenu mohou vzniknout dvě molekuly retinalu. Ten je částečně redukován na all-*trans*-retinol (Velíšek 1999). Jelikož vitamin A si tělo nedokáže samo syntetizovat, musí přijímat tuto látku stravou ve formě retinolu a retinyl esterů či ve formě provitamínu A (karotenoidů) (Bastos Maia et al. 2019).



Obrázek 4: β -karoten

Zdroj: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4444129.html>

V průmyslových zemích je většina vitamínu A konzumována ve formě retinolu z potravin živočišného původu a v rozvojových zemích je většina vitamínu A vytvářena z provitaminů – β -, α - a γ -karotenu, obsažených v potravinách rostlinného původu (Kasper 2015).

Retinol se vyskytuje téměř výhradně jen v živočišných produktech, jako jsou mateřské mléko, játra, olej z rybích jater, vaječný žloutek, kravské mléko a další mléčné výrobky. Provitaminy A, tedy karotenoidy naopak obsahují potraviny rostlinného původu, jako je listová zelenina, dýně, mrkev, mango, meruňky, papaya aj. Dále se také potraviny fortifikují retinolem. Mezi takové potraviny patří cereálie, omáčky, oleje či rostlinné náhražky mléka (WHO & FAO 2004).

Vitamin A je esenciální mikroživinou, kterou lidské tělo v malých dávkách potřebuje k normálnímu fungování zrakových funkcí, ke správnému růstu, vývoji a fungování imunitního systému. Velmi důležitou roli hraje také v těhotenství, kdy je nezbytný pro udržování správného fungování zraku matky i dítěte a pro vývoj orgánů a kostry plodu. Dále má velký vliv na správný vývoj a fungování imunitního systému plodu (Bastos Maia et al. 2019).

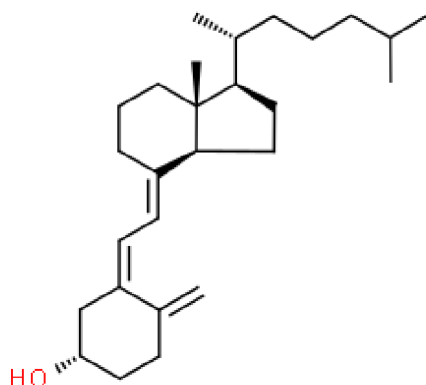
Mezi hlavní příznaky deficitu se řadí xeroftalmie, tedy chorobné vysychání oční rohovky, nebo náchylnost k šerosleposti. Dále může v důsledku nedostatku tohoto vitamínu docházet k vyšší náchylnosti infekčních chorob vzhledem k oslabení imunitního systému (WHO & FAO 2004). Naopak se může také u lidí vyskytnout hypervitaminóza. Tento pojem představuje nadměrné ukládání vitamínu A v organismu v důsledku nadměrného příjmu. Symptomy toxicity závisí na délce expozice a na množství dávky a mohou být velmi závažné. Mezi symptomy se řadí nevolnost, zvracení, bolest hlavy, rozmazané vidění, abnormální funkce jater, bolest kloubů a v nejhorších případech i smrt. Hypervitaminóza je však mnohem vzácnější než deficit vitamínu A a může nastat v důsledku nevhodného užívání doplňků stravy. Bylo hlášeno i pár případů hypervitaminózy z nadměrného příjmu jater (Penniston & Tanumihardjo 2006; Zempleni et al. 2013).

Jelikož vitamin A a jeho provitaminy mají rozdílnou míru resorpce, byl zaveden pojem „retinolový ekvivalent“, který slouží k odhadu účinnosti. Podle tohoto ekvivalentu odpovídá účinku 1 mg vitamínu A množství 2 mg β -karotenu v mléce, 4 mg β -karotenu ve vařené zelenině a 12 mg β -karotenu ve vařených pasírovaných mrkvích. Dříve běžně používaný údaj

množství je mezinárodní jednotka (IU), kdy 1 IU = 0,3 µg retinolu = 0,344 µg retinolacetátu. Požadovaný denní příjem u žen je 0,8 mg a u mužů 1 mg retinolu nebo retinolových ekvivalentů (Kasper 2015).

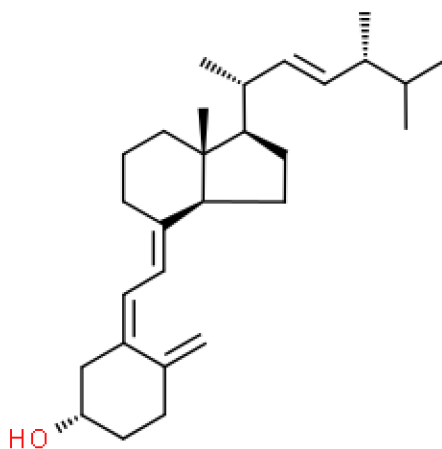
3.2.2 Vitamin D

Vitamin D je společný název pro skupinu blízce příbuzných lipofilních 9,10-sekosteroidů, z nichž nejvýznamnější je vitamin D3 neboli cholekalciferol (Obrázek 5) a vitamin D2 neboli ergokalciferol (Obrázek 6). Vznikají z provitaminů D působením UV záření. Provitaminem D3 je 7-dehydrocholesterol a provitaminem D2 je ergosterol. Vitamin D je syntetizován v buňkách pokožky neenzymatickým procesem za působení UV záření o vlnové délce 280-320 nm. Nejprve z provitaminu D3 vzniká jako meziprodukt tzv. previtamin D3 vykazující asi 35 % aktivity cholekalciferolu, který následně spontánně izomeruje na cholekalciferol. Tento proces je velmi důležitý ve smyslu získávání tohoto vitamínu, jelikož v potravě ho lidské tělo může získat pouze z omezených zdrojů (Velíšek 1999; Kasper 2015).



Obrázek 5: Cholekalciferol

Zdroj: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4444353.html>



Obrázek 6: Ergokalciferol

Zdroj: <https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4444351.html>

Cholekalciferol se váže na specifický globulin krevní plazmy DBP a je transportován do jater, kde je skladován a dle potřeby oxidován na 25-hydroxycholecalciferol (kalcidiol), což je hlavní cirkulující metabolit cholekalciferolu. V ledvinách je 25-hydroxycholecalciferol dále hydroxylován na 1,25-dihydroxycholecalciferol označovaný jako kalcitriol. Tento metabolit je aktivním produktem působícím v cílových orgánech. Má veškeré vlastnosti hormonu a to, že je syntetizován v jednom orgánu a určité regulační mechanismy přizpůsobují míru jeho syntézy aktuální potřebě, krevní cestou je dopraven k cílovým orgánům (střevo, kosti). V buňce střevní sliznice aktivuje syntézu proteinu, který je závislý na vitamínu D a váže vápník. Tento protein hraje roli v intestinálním transportu vápníku (Velíšek 1999; Kasper 2015).

Vitamin D zastává klíčovou roli v řízení rovnováhy vápníku a fosforu. Jeho nedostatek u dětí ve fázi růstu a vývoje kostí může způsobit růstovou retardaci či křivici a u dospělých může nedostatek tohoto vitamínu vést k rozvoji sekundární hyperparatyreózy, což může mít za následek rozvoj osteoporózy či osteomalacie, a tedy i vyšší riziko zlomenin. Snížená intestinální absorpce vápníku s přibývajícím věkem představuje významný rizikový faktor pro fraktury kostí (Christakos et al. 2019).

Pokud tělo zaznamená vyšší potřebu vápníku, například pokud je nedostatečně přijímán potravou nebo při růstu a vývoji kostí či v těhotenství a při kojení, probíhá absorpce vápníku ve střevě zprostředkovaná vitamínem D převážně aktivním transcelulárním transportem. Dvěma hlavními účinky 1,25-dihydroxycholecalciferolu ve střevech jsou zvýšená syntéza kalbindinu (intracelulární protein vázající vápník), který usnadňuje pohyb vápníku skrze cytoplazmu a zvýšená syntéza apikálního epiteliálního vápníkového kanálu, který zprostředkovává vstup vápníku do enterocytů. Pokud je vápníku nedostatek a intestinální absorpce není dostatečná, 1,25-dihydroxycholecalciferol s parathormonem zvyšuje resorpci vápníku z ledvin (Christakos et al. 2019).

Vitamin D nepůsobí regulačně pouze na homeostázu vápníku ale i obecně na buněčné transportní pochody. Ovlivňuje četné endokrinní regulační systémy, imunitní odpovědi, metabolismus kosterního svalstva a myokardu i řadu buněčných systémů s rychlým buněčným dělením (Kasper 2015).

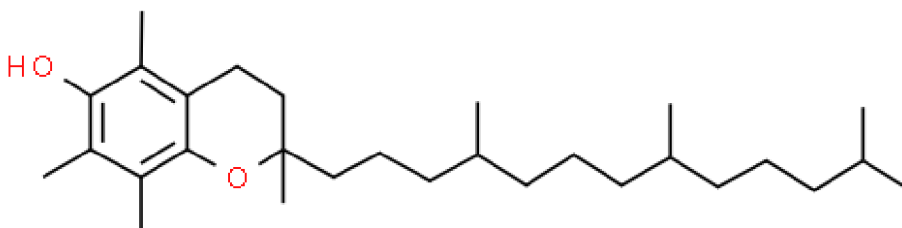
Doporučená denní dávka vitamínu D se liší napříč státy po celém světě v závislosti na klimatických podmínkách. Jelikož je vitamin D syntetizován v kůži působením UV záření, je těžké určit potřebnou denní dávku. Potřeba závisí na mnoha faktorech, jako je například míra vystavení slunečnímu záření, pigmentace kůže, věk, pohlaví či příjem vápníku a fosforu (Zempleni et al. 2013). Referenční hodnoty D-A-CH (Německo-D, Rakousko-A, Švýcarsko-CH) udávají doporučenou denní dávku vitamínu D 5 µg od 1. do 65. roku věku a od 65. roku 10 µg.

3.2.3 Vitamin E

Název vitamin E zahrnuje řadu látek, které se liší jen nepatrně ve struktuře molekuly, ale zato se velmi liší aktivitou. Patří sem osm základních strukturně příbuzných derivátů chromanu. Strukturním základem pro všechny sloučeniny vykazující aktivitu vitamínu E jsou

tokol a tokotrienol, které obsahují chromanový cyklus s nasyceným nebo nenasyceným isoprenoidním postranním řetězcem o délce 16 atomů uhlíku. Od tokolu jsou odvozené čtyři formy vitamínu E s nasyceným izoprenoidním postranním řetězcem a nazývají se tokoferoly. Další čtyři formy jsou odvozeny od tokotrienolu a nazývají se tokotrienoly. Jednotlivé formy se liší počtem a polohou methylových skupin v chromanovém cyklu. α -Tokoferol a α -tokotrienol mají methylové skupiny na pozicích 2,5,7 a 8 v chromanovém cyklu. β -tokoferol a β -tokotrienol mají methylové skupiny na pozicích 2,5 a 8, dále γ -tokoferol a γ -tokotrienol mají methylové skupiny na pozicích 2,7 a 8 a poslední skupina, tedy δ -tokoferol a δ -tokotrienol mají methylové skupiny na pozicích 2 a 8 (Kasper 2015; Velíšek 1999; Kiyose 2021).

Tokoferoly obsahují tři chirální uhlíky a každý tokoferol může existovat v osmi diastereoizomerních formách. V přírodě se však vyskytují pouze ve formě 2R, 4'R, 8'R izomerů, označovaných jako RRR izomery. Zástupcem je například RRR- α -tokoferol (Obrázek 7). Tokotrienoly obsahující tři dvojně vazby v postranním řetězci se mohou vyskytovat v osmi různých *cis* či *trans* izomerech a jejich kombinacích. V přírodě se vyskytují pouze jako all-*trans* izomery (Kasper 2015; Velíšek 1999; Kiyose 2021).



Obrázek 7: α -Tokoferol

Zdroj: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2032.html>

Nejvyšší biologickou účinnost vykazuje RRR- α -tokoferol. Jelikož ostatní formy vykazují menší účinnost, byl zaveden pojem α -tokoferolový ekvivalent. 1 mg RRR- α -ekvivalentu odpovídá 2 mg RRR- β -tokoferolu, 4 mg RRR- γ -tokoferolu a 100 mg RRR- δ -tokoferolu. Dříve se obsah vitamínu E udával v mezinárodních jednotkách IU (*International Unit*), kdy 1 mg α -tokoferolového ekvivalentu = 1,5 IU (Kasper 2015).

Absorpce tokoferolů závisí na normální sekreci žluči a pankreatických enzymů. Jejich absorpce je také ovlivněna obsahem tuku ve stravě (Jeanes et al. 2004) a spočívá ve tvorbě micel následující cestou. Triacylglyceroly jsou v těle hydrolyzovány na 2-monoacylglyceroly a volné mastné kyseliny pomocí pankreatické lipázy. Strávený tuk následně tvoří micely se žlučovými kyselinami. Tyto micely hrají roli při transportu 2-monoacylglycerolů a mastných kyselin do enterocytů. Předpokládá se, že vitamin E je také začleněn do micel, jelikož se řadí do látek lipofilního charakteru (Kiyose 2021). Následně jsou tokoferoly transportovány v chylomikronech lymfou (Kasper 2015). K transportu tokoferolů dochází hlavně

v chylomikronech, jelikož v provedené studii bylo 93 % α -tokoferolu a 100 % γ -tokoferolu nalezeno v izolované frakci chylomikronů v lymfě krysy (Traber et al. 1986). Následuje přesun tokoferolů do lipoproteinů, při kterém hraje důležitou roli LDL, HDL a VLDL frakce (Kasper 2015).

Vitamin E je považován za nejvýznamnější lipofilní antioxidant, který slouží v eukaryotických buňkách jako ochrana nenasycených lipidů před poškozením volnými radikály. Spolu s dalšími látkami chrání strukturu a integritu buněčné, cytoplazmatické membrány a membrán vnitrobuněčných organel. Dále se uplatňuje při ochraně lipoproteinů přítomných v plazmě. Přestože jeho funkce nebyla zcela vyjasněna a je stále předmětem výzkumu, lze vitamin E považovat za důležitou součást lidské stravy právě díky protektivním účinkům před oxidačním stresem (Kiyose 2021; Velíšek 1999; Zemleni et al. 2013).

Jelikož se vitamin E přirozeně vyskytuje v řadě potravin rostlinného i živočišného původu a je také často přidáván do rostlinných olejů či zpracovaných potravin, nehrozí ve většině případů deficit tohoto vitamínu. Výjimkou může být v krajních případech nějaká katastrofa s následkem potravinové krize. Nedostatek vitamínu E může být také způsoben malabsorpcí tuků u nemocných jedinců (Bayer 2008). Příjem α -tokoferolu se liší mezi zeměmi světa v závislosti na konzumaci různých druhů rostlinných olejů obsahujících jiné poměry frakcí vitamínu E. Například slunečnicový olej obsahuje přibližně 55 mg α -tokoferolu/100 g, zatímco sójový olej obsahuje pouze 8 mg α -tokoferolu/100 g (WHO & FAO 2004).

Hlavním potravinovým zdrojem vitamínu E jsou rostlinné oleje včetně olivového a slunečnicového, celozrnné obilniny, oříšky a mandle, avokádo, brokolice a listová zelenina. (Bayer 2008) V Tabulce 9 jsou uvedeny další potraviny a jejich obsah vitamínu E.

Tabulka 9: Obsah vitamínu E ve vybraných potravinách (upraveno dle Velíšek 1999)

Potravina	Obsah v jedlém podílu (mg/kg)
Maso	2,5-7,7
Játra	4-14
Mléko	0,2-1,2
Máslo	10-50
Sýry	3,0-3,5
Vejce	5-30
Ryby	4-80
Mouka pšeničná	15-50
Rýže	0,4-4,5
Jablka	1,8-7,4
Špenát	16-25

3.2.4 Stanovení lipofilních vitaminů

Jelikož se vitaminy v potravinách vyskytují ve velmi malých koncentracích, je zapotřebí citlivých a spolehlivých metod k jejich analýze. Ve srovnání s makroživinami je jejich stanovení složitější také kvůli tomu, že se vyskytují v různých formách. Díky tomu se nejvíce využívají chromatografické metody (Qian & Sheng 1998). Mezi nejpoužívanější se řadí vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), ale využívají se i další varianty kapalinové chromatografie. Stěžejní je též všestrannost této metody spojená s využitím různých způsobů použití fází a různých detektorů, která nabízí řadu využití při stanovení vitaminů ze složitějších matric, jako jsou právě potraviny. Zejména kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem byla označena jako dostatečně citlivá na stanovení velmi malých koncentrací některých forem vitaminů (Fanali et al. 2017).

Většina metod stanovení lipofilních vitaminů se skládá z těchto kroků: zmýdelnění vzorku, extrakce vitaminů a následná analýza příslušnou chromatografickou metodou (Blake 2007). Lipofilní vitaminy se vyskytují v tukové frakci, která se skládá především z triacylglycerolů a z části ze sterolů a fosfolipidů. Všechny tyto látky mají podobnou rozpustnost což komplikuje izolaci vitaminů. Zmýdelnění tedy představuje efektivní odstranění nechtěných lipidů. Principem je alkalická hydrolýza esterů s využitím směsi ethanolu a hydroxidu draselného s přidávkem antioxidantu za zvýšené teploty (Fanali et al. 2017; Ball 2006).

Následná extrakce vitaminů probíhá za využití různých rozpouštědel. Nejčastěji se využívají organická rozpouštědla jako je diethylether, petrolether, hexan etylacetát či jejich směsi. Získané extrakty se zbaví vody a odpaří se při dané teplotě. Dále se vzorky rozpustí v příslušných rozpouštědlech kompatibilních s mobilní fází a následuje analýza pomocí vybrané chromatografické metody (Karrar et al. 2022).

3.2.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Chromatografické metody jsou založené na separaci látek obsažených ve vzorku. Využívají se jak při kvalitativní, tak kvantitativní analýze. Principem kapalinové chromatografie je oddělení jednotlivých složek vneseného vzorku na základě rozdílné pohyblivosti analytickým systémem. Mezi nejčastěji používané a dnes i nejrozšířenější separační metody patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Hlavními výhodami této metody je vysoká citlivost, rychlost stanovení, dobrá opakovatelnost a robustnost (Klouda 2003; Nováková & Douša 2013).

Základem analytického systému jsou dvě vzájemně nemísitelné fáze, a to fáze stacionární, kterou je vhodný sorbent, a fáze mobilní, kterou tvoří kapalina. Stacionární fáze je uložena v koloně a tvoří ji zrnitý sorbent. Vzorek je nástřikovým zařízením vnášen do toku mobilní fáze, který jej unáší do kolony, kde dochází k separaci jednotlivých analytů vlivem interakcí s částicemi sorbentu. Průtokem rozpouštědla se jednotlivé analyty postupně eluují na základě odlišné afinity k rozpouštědлу a v různých časech zcela opouští kolonu. Na výstupu

z kolony je umístěn detektor, který zaznamenává procházející látky a vytváří grafický záznam nazývaný jako chromatogram (Klouda 2003).

Ke stanovení lipofilních vitaminů se používá nejčastěji kapalinová chromatografie, a to právě HPLC, jelikož je dostatečně citlivou metodou ke stanovení velmi malých koncentrací těchto látek. Kapalinová chromatografie je spojena s různými typy detekce jako například UV/VIS, MS či MS/MS. Při volbě chromatografie s normálními fázemi či s obrácenými fázemi se přihlíží k procesu extrakce a přečištění vitaminů. Dále se při stanovení vitaminů nejčastěji využívá izokratická eluce (Karrar et al. 2022).

3.3 Vývoj a validace metody HPLC

3.3.1 Vývoj metody

Vývoj a optimalizace chromatografické metody zahrnuje volbu chromatografických podmínek tak, aby látky ve směsi byly dokonale separovány a citlivě detekovány. Při optimalizaci metody se využívá převážně experimentální přístup. Je vhodné znát teoretické principy, jelikož při vývoji ušetří mnoho času. Optimalizaci předchází literární rešerše a shrnutí poznatků o sledovaných analytech a metodách již použitých na jejich analýzu (Nováková & Douša 2013).

Při vývoji a optimalizaci analytické metody jsou obvykle realizovány následující kroky. Jejich pořadí se může měnit nebo může docházet k jejich propojení v závislosti na typu metody.

1. Analýza fyzikálně-chemických vlastností vzorku a určení cíle metody
2. Výběr způsobu detekce analytů
3. Volba separačního módu
4. Volba stacionární a mobilní fáze
5. Předběžné experimenty s využitím standardních látek
6. Volba metody pro přípravu a úpravu vzorku
7. Vlastní optimalizace
8. Validace metody

Jelikož je vývoj úplně nové metody velmi složitý proces, lze pro zjednodušení využít z odborné literatury již provedenou metodu a následně dle podmínek stanovení vývoj provést optimalizací této metody (Nováková & Douša 2013).

3.3.2 Validace metody

Účelem analytické metody je poskytnout výsledky s přijatelnou mírou nejistoty. Po vývoji metody je tedy zapotřebí posoudit, zda dosahuje určitých standardů a zda jejím použitím lze získat kvalitní výsledky. K tomu slouží vyhodnocení určitých parametrů v procesu zvaném validace metody (Taverniers et al. 2004). Ta je tedy závěrečným krokem vývoje a poskytuje objektivní posouzení kvality dané metody. Daná metoda by měla splňovat určitá

kritéria, která určí její použitelnost a spolehlivost při opakovaném použití (Nováková & Douša 2013).

V praxi se při validaci metody hodnotí série parametrů jako je správnost, přesnost, selektivita/specifická, linearita, pracovní rozsah, limit detekce a kvantifikace, citlivost a robustnost. Při validaci se bere v potaz, jaké jsou kladené podmínky na rozsah validace a dle toho se zvolí počet a charakteristika hodnocených parametrů (Taverniers et al. 2004).

3.3.2.1 Správnost

Správnost metody je definována jako těsnost shody mezi výsledkem měření a přijatou referenční hodnotou. Rozdíl mezi těmito hodnotami je nazýván chyba výsledku. Správnost zahrnuje procento chybovosti a indikuje, zda je metoda vhodná pro použití reálných vzorků (Taverniers et al. 2004). Při hodnocení je určována přítomnost či nepřítomnost soustavné chyby a je testována statistická významnost velikosti rozdílu mezi výsledkem měření a přijatou referenční hodnotou. Správnost lze určit pomocí parametru zvaného výtěžnost, který udává množství analytu získaného ze vzorku. Lze zjistit porovnáním naměřené hodnoty analytu z reálného vzorku s naměřenou hodnotou vzorku, do něž bylo přidáno známé množství analytu. Výtěžnost by měla být provedena na různých matricích a ve vícero opakováních (Gurram et al. 2017; Nováková & Douša 2013).

3.3.2.2 Přesnost

Přesnost metody je definována jako hodnota udávající míru těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky zkoušek za předem specifikovaných podmínek. Závisí pouze na rozdělení chyb. Přesnost může být vyjádřena jako opakovatelnost, mezilehlá přesnost a reprodukovatelnost (Gurram et al. 2017; Nováková & Douša 2013). Opakovatelnost metody je definována jako těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek získanými za podmínek opakovatelnosti, tedy opakováním téže zkušební metody na identickém materiálu, v téže laboratoři, týž pracovníkem a za použití týchž přístrojů a zařízení během krátkého časového období (Nováková & Douša 2013). Mezilehlá přesnost se určuje testováním metody v rozšířeném časovém úseku, na stejných či podobných přístrojích, ale například různými pracovníky či za jiné dané podmínky v rámci jedné laboratoře. Reprodukovatelnost vychází z hodnocení výsledků z vícero laboratoří (Gurram et al. 2017).

3.3.2.3 Linearita a pracovní rozsah

Schopnost metody poskytnout v daném rozsahu přijatelnou lineární korelaci mezi odezvou detektoru a koncentrací analytu ve vzorku se nazývá linearita. Představuje přímou závislost jedné veličiny na druhé nezávisle proměnné. Linearita může být určena proměřením kalibrační řady o různých koncentracích a následně vyhodnocena pomocí lineární regrese (Taverniers et al. 2004). Lineární závislost lze matematicky vyjádřit obecnou rovnicí $y=a+bx$, kde parameter a je úsek na ose y a parameter b je směrnice kalibrační přímky. Těsnost

vzájemné závislosti vyjadřuje korelační koeficient R , který při lineární závislosti nabývá hodnot ± 1 . Čím blíže je korelační koeficient 1, tím je závislost těsnější. (Nováková & Douša 2013).

Pracovní rozsah vyjadřuje uzavřený interval hodnot měřené veličiny v němž je metoda aplikovatelná. Dolní hranicí bývá nejčastěji limit kvantifikace (Nováková & Douša 2013).

3.3.2.4 Limit detekce a kvantifikace

Limit detekce označovaný jako LOD (limit of detection) udává nejnižší koncentraci analytu ve vzorku, jež může být detekována a pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Může být určen různými způsoby jako například vizuálním hodnocením, výpočtem s využitím poměru signálu a šumu („signal-to-noise ratio“) či dle vzorce $LOD = 3,3 \times \sigma/S$, kde σ je směrodatná odchylka členu a v regresní rovnici $y = a + bx$ stanovená z kalibračních křivek a S je průměrný sklon křivky kalibrace (Gurram et al. 2017; Taverniers et al. 2004).

Limit kvantifikace označovaný jako LOQ (limit of quantification) odpovídá koncentraci, při které přesnost a správnost stanovení dovoluje kvantitativní vyhodnocení. Je to tedy nejnižší koncentrace analytu ve vzorku, která je stanovena s danou přesností a správností. Lze vyhodnotit stejnými způsoby jako limit detekce s odlišností ve vzorci, kdy $LOQ = 10 \times \sigma/S$ (Gurram et al. 2017; Nováková & Douša 2013).

3.3.3 Kvantitativní hodnocení

Hlavním účelem kvantitativního hodnocení je nalezení vztahu mezi plochou či výškou píku a množstvím eluované látky. Nejpřesnější vyhodnocení ploch píků poskytují chromatografické softwary. Závislost mezi naměřenou plochou nebo výškou píku a neznámou koncentrací analytu je třeba určit pomocí standardů a následné vyhodnocení je provedeno porovnáním (Nováková & Douša 2013).

Tím nejjednodušším způsobem kvantifikace je metoda vnějšího standardu neboli kalibrační křivky. Princip této metody spočívá v analýze série standardů o známé postupně rostoucí koncentraci a je hledána závislost kalibrační funkce $X = f(c)$. Pro konstrukci kalibrační křivky se připraví nejčastěji 5 až 7 kalibračních standardů, které se 2-3 krát proměří. Kalibrační přímkou lze vyjádřit vztahem $x_i = a + bc_i$ kde x_i je hodnota veličiny X (plocha či výška píku) pro koncentraci c_i , b je směrnice kalibrační přímky vyjadřující citlivost metody, a je úsek (posunutí) na ose y (Nováková & Douša 2013). Po proměření vzorku lze pomocí sestavené kalibrační křivky určit obsah stanovované látky. Nejvyšší přesnost má lineární závislost, pokud bude závislost nelineární, bude stanovení zatíženo větší chybou (Klouda 2003).

Další metodou kvantifikace je metoda přídavku standardu. Principem této metody je přídavek přesného a známého množství té samé látky, která je stanovována, k samotnému vzorku. Kvůli tomu je analýza prováděna minimálně ve dvou opakováních, jelikož při první analýze je dávkován samotný vzorek a při druhé analýze je dávkován vzorek se známým

přídavkem standardu (Nováková & Douša 2013). Zvýšení hodnoty měřené veličiny je přímo úměrné přidanému množství standardu a z tohoto vztahu lze dále vypočítat obsah složky ve vzorku (Klouda 2003).

Třetím způsobem kvantitativního hodnocení je metoda vnitřního standardu. Má velkou výhodu v tom, že se analýza může uskutečnit v jediném nástřiku. Jejím principem je přídavek roztoku vnitřního standardu k roztoku vzorku i k roztoku standardu. Koncentrace vnitřního standardu (IS) musí být známá. Jako vnitřní standard může být použita chemická látka, která je dobře oddělena od všech složek analyzovaného vzorku a je eluována v blízkosti analytu (Nováková & Douša 2013).

4 Metodika

Cílem výzkumné části práce bylo vyvinout a validovat analytickou metodu stanovení lipofilních vitaminů (A, D, E) a pomocí této metody porovnat obsah lipofilních vitaminů u různých skupin jedlého hmyzu. Byly vybrány tři druhy jedlého hmyzu, a to cvrček domácí (*Acheta domestica*), larvy potemníka moučného (*Tenebrio molitor*) a saranče stěhovavá (*Locusta migratoria*).

Velmi málo vědeckých publikací se zabývá popisem analytické metody stanovení vitaminů v jedlém hmyzu, či v podobných maticích. Proto jako základ pro vývoj metody byly vybrány články Gill et al. (2016) a Yang et al. (2017), které se věnují stanovení vitaminu D v práškových formách mléčných produktů. Z nich byla vyvinuta finální metodika stanovení jednotlivých vitaminů. Vývoj probíhal optimalizací metod především experimentálně. Dále byla provedena validace metody pomocí následujících parametrů: správnost, přesnost, limit detekce a kvantifikace, linearita a pracovní rozsah.

Posledním krokem bylo samotné stanovení obsahu vitaminů vyvinutou metodou v jednotlivých druzích hmyzu a následné statistické vyhodnocení naměřených dat.

4.1 Materiál

4.1.1 Příprava vzorků hmyzu

Jedlý hmyz určený k analýze byl chován na fakultě Agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity na Katedře zoologie a rybářství. Jednotlivé skupiny hmyzu byly chovány ve třech biologických variantách (stejný druh hmyzu, chovaný za stejných podmínek v odlišném čase).

Podmínky chovu byly následující. Při chovu cvrčků (*Acheta domestica*) a potemníků (*Tenebrio molitor*) se teplota pohybovala od 26 do 28 °C a vlhkost dosahovala 40-50 %. Při chovu sarančí (*Locusta migratoria*) byla teplota 27±2 °C s lokálním výhřevem na 28-40 °C a vlhkost se pohybovala v rozmezí 25-35 %. Cvrčci byli chováni v plastových boxech (Samla, IKEA) o velikosti 390x280x280 mm, které byly vyplněny proložkami na vejce. Jako krmivo jim byla podávána kompletní krmná směs (KKS) pro brojlerová kuřata, namletá na částice menší než 1 mm a složená z pšenice (77,9 %), sójové moučky (17,6 %), řepkového oleje (1,8 %) a minerálních látek (2,7 %). Sklizeň cvrčků proběhla po 60 dnech chovu. Larvy potemníků byly chovány v plastových boxech (Samla, IKEA) o velikosti 390x280x140 mm a žily přímo v substrátu, kterým se živily. Substrát se skládal ze stejné KKS pro brojlerová kuřata a pšeničných otrub v poměru 1:4. Po 35 dnech byly larvy vysety ze substrátu a byly použity k dalšímu zpracování. Saranče byly chovány ve flexáriu (Exo Terra) o velikosti 450x400x800 mm a jako krmivo sloužilo seno, pšeničné otruby a čerstvá tráva. Sklizeny byly po 60 dnech chovu.

Cvrčci a saranče dostávali vodní gel (Oslavan, Náměšť nad Oslavou, Česká republika) jako zdroj vody a larvám potemníků byly podávány nakrájené proužky jablek. Před usmrcením

byly všechny tři druhy hmyzu nechány vyhladovět po dobu 24 hodin a poté byly usmrceny zamražením.

Zamražený hmyz byl následně lyofilizován (120 hodin; Lyovac GT2; Steris, Německo) a zhomogenizován. Zvážením vzorku před a po lyofilizaci byla stanovena lyofilizovaná sušina. Vzorky byly namlety mlýnkem IKA Multidrive basic (Janke & Kunkel, Staufen, Německo).

4.1.2 Použité přístroje

- laboratorní váha (EG420-3NM, KERN, Německo)
- vakuová rotační odparka (Rotavapor R-200, Büchi Labortechnik, Švýcarsko)
- vortex (Basic 3, IKA Werke, Německo)
- třepací vodní lázeň (VLSB12, VWR International, PA, USA)
- třepačka (3006, GFL, Německo)
- centrifuga (5800 R, Eppendorf, Německo)
- přístroj na úpravu vody (Simplicity UV, Merck Millipore, Německo)
- kapalinový chromatograf Ultimate 3000 HPLC ve spojení s detektorem diodového pole (DAD) a fluorescenčním detektorem (FLD) (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)
- kapalinový chromatograf Ultimate 3000 RS HPLC (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) ve spojení s hmotnostním detektorem (hybridní trojitý kvadrupól s lineární iontovou pastí, 3200 QTRAP, Sciex, MA, USA)

4.1.3 Použité chemikálie

- destilovaná voda
- dichlormethan (p.a., Lachner, ČR)
- diethylether (p.a. stabilizovaný, Lachner, ČR)
- pyrogallol (p.a., Lachner, ČR)
- hexan (p.a., Lachner, ČR)
- aceton (p.a., Lachner, ČR)
- ethanol (p.a., Lachner, ČR)
- ethanol absolute (ACS, Reag.Ph.Eur., VWR International, PA, USA)
- methanol (p.a., Lachner, ČR)
- hydroxid draselný (p.a., Lachner, ČR)
- methanol (HPLC grade, Lachner, ČR)
- acetonitril ($\geq 99,9\%$, HPLC gradient grade, VWR International, PA, USA)
- 4-fenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion (PTAD, $\geq 97\%$, Merck, Německo)
- kyselina mravenčí (99-100 %, ACS, Reag.Ph.Eur., VWR International, PA, USA)
- retinol ($\geq 95\%$, HPLC, Merck, Německo)
- cholekalciferol ($\geq 98\%$, HPLC, Merck, Německo)
- směsný standard tokoferolů a tokotrienolů (ChromaDex, CA, USA)

- stabilní isotopicky značený 6,19,19-D3 cholekalciferol (SIL-D3, 97%, Cambridge Isotope Laboratories, MA, USA)
- Deionizovaná voda připravena pomocí Simplicity UV (Millipore, Německo)

4.1.4 Použitý software

- Microsoft Office Excel (Microsoft, WA, USA)
- Chromeleon (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)
- Analyst (Sciex, MA, USA)
- Statistica (StatSoft Inc., OK, USA)

4.2 Vývoj metody

Vývoj metody probíhal na základě studia odborné literatury. Naprostá většina metod zaměřených na stanovení lipofilních vitaminů zahrnuje alkalickou hydrolyzu vzorku za zvýšené teploty s následnou extrakcí vitaminů do organického rozpouštědla, přečištění organického extraktu vodou, zakoncentrování vzorku a rekonstituci do vhodného rozpouštědla. Jako výchozí byly zvoleny metodiky autorů Gill et al. (2016) a Yang et al. (2017) zaměřené na stanovení vitaminu D2 a D3 v práškových formách mléčných výrobků, které byly modifikovány a optimalizovány tak, aby docházelo k co nejnižším ztrátám všech sledovaných vitaminů (A, D a E).

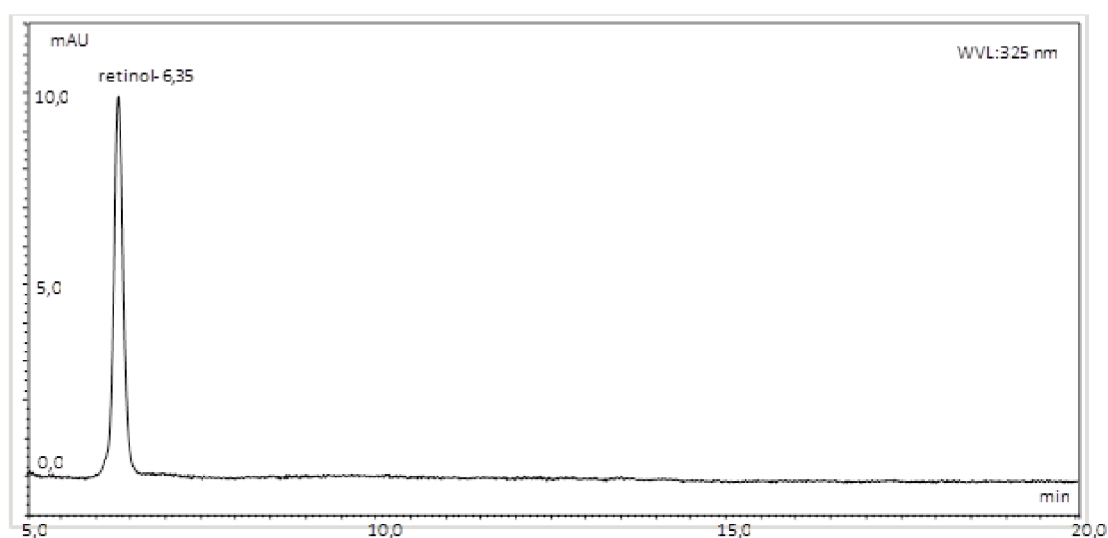
4.2.1 Volba chromatografického systému, typu kolony a způsobu detekce

Pro všechny analyzované skupiny vitaminů byla zvolena kapalinová chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC), která je v současné době nepoužívanějším typem chromatografie a pomocí které lze stanovit naprostou většinu netěkavých, různě polárních organických látek.

Při volbě typu detektoru byly brány v úvahu spektrální vlastnosti daných sloučenin a koncentrační rozmezí, ve kterém se pohybují v matricích živočišného původu. Vitamin A vykazuje absorpci záření v ultrafialové oblasti spektra s absorpčním maximem při 325 nm, proto byl pro jeho detekci zvolen detektor diodového pole (DAD). Jednotlivé vitamery vitaminu E, tj. α -, β -, γ - a δ -tokoferol a α -, β -, γ - a δ -tokotrienol vykazují absorpci záření v UV oblasti mezi 292 až 298 nm. Zároveň mají tyto molekuly schopnost po absorpci excitačního záření uvolnit přebytečnou energii ve formě fluorescenčního záření, které má zpravidla nižší energii než záření excitační. V případě molekul tokolů dochází k excitaci valenčních elektronů při absorpci záření o vlnové délce 292 nm. Vlnová délka emitovaného záření pak odpovídá 330 nm (Thompson & Hatina 1979). Díky této unikátní vlastnosti lze tokoly stanovit také pomocí fluorescenčního detektoru. Pro detekci tokolů byl zvolen právě fluorescenční detektor, a to z důvodu podstatně vyšší citlivosti a také výrazně vyšší selektivity oproti DAD detektoru. Vitamin D vykazuje absorpci záření v ultrafialové oblasti (okolo 265 nm) a mohl by být detekován pomocí DAD detektoru, ale vzhledem k jeho nízkým koncentracím v živočišných matricích byl pro jeho detekci zvolen hmotnostní detektor typu trojitý kvadrupól, který má

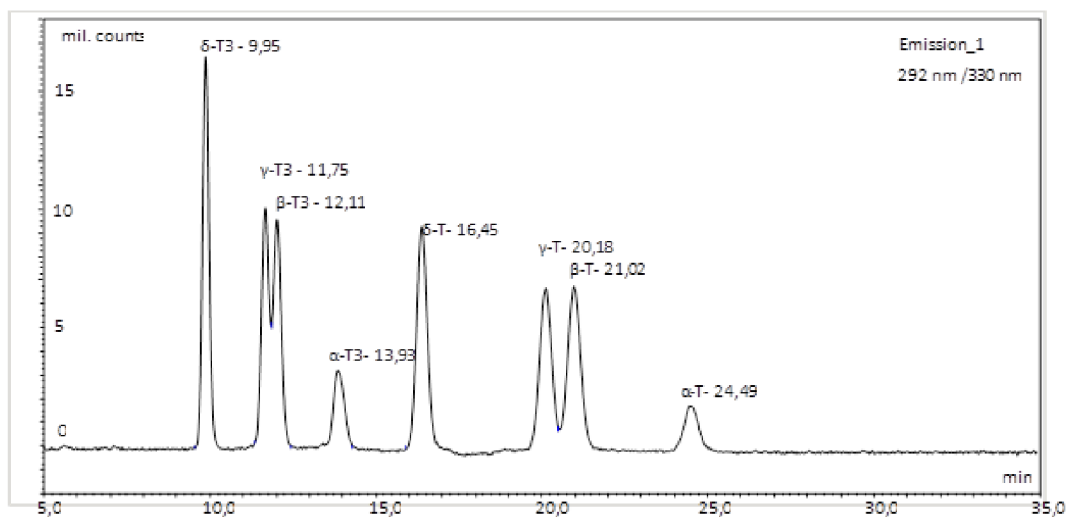
oproti DAD detektoru výrazně vyšší citlivost a selektivitu. Málo polární sloučeniny, kam patří i vitamin D, obecně špatně ionizují při ionizaci molekul elektrosprejem (ESI ionizace), která je nejběžnějším typem ionizace v hmotnostních detektorech spojených s HPLC. Z toho důvodu byl vitamin D3 (podobně také SIL-D3) derivatizován pomocí PTAD na více polární dobře ionizovatelnou sloučeninu (vitamin D3:PTAD adukt).

Pro stanovení tokolů ve vzorcích hmyzu byla použita na Katedře chemie ČZU vyvinutá chromatografická metoda publikovaná např. v Burešová et al. (2021). Jednotlivé vitamery vitaminu E jsou v této metodice eluovány pomocí izokratické eluce o složení mobilní fáze methanol:voda (97:3). Separace probíhá na C30 koloně, která je obecně vhodná pro separaci méně polárních sloučenin s dlouhým uhlíkatým řetězcem. Snahou této DP bylo ověřit, zda by pomocí této metody bylo možné stanovit také vitamin A (retinol) v jednom runu a tím zefektivnit celý proces analýzy lipofilních vitaminů. Metodika byla ověřována a optimalizována nejprve prací se standardními roztoky tokolů a retinolu a poté se samotnými vzorky hmyzu. Propojení chromatografických metod s různými typy detekce se podařilo. Ukázkové chromatogramy standardních roztoků jsou znázorněny na obrázcích 3 a 4. Chromatogramy reálných vzorků hmyzu jsou znázorněny na obrázcích 5, 6 a 7.



Obrázek 3: HPLC-DAD chromatogram standardu retinolu (1 µg/ml)

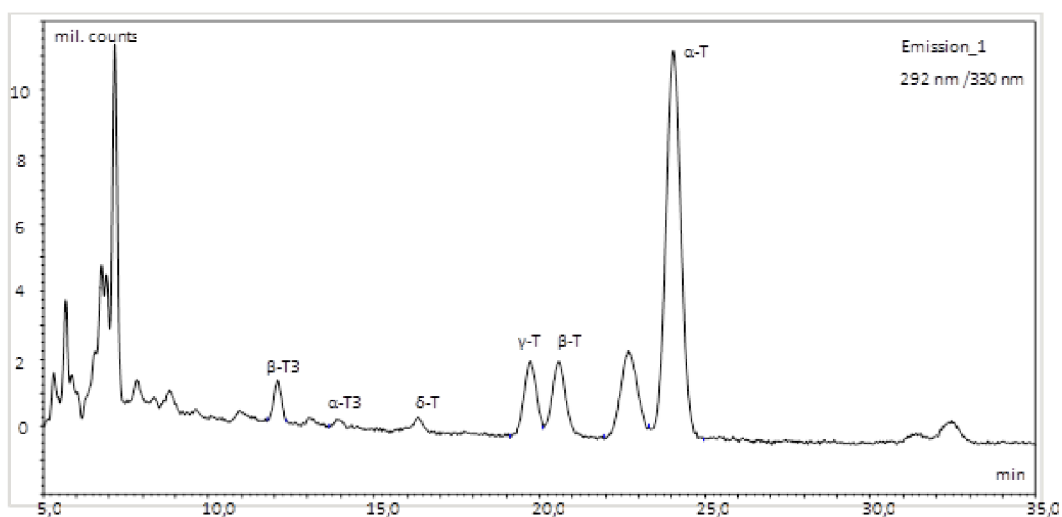
Zdroj: Chromeleon



α -T= α -tokoferol; β -T= β -tokoferol; γ -T= γ -tokoferol; δ -T= δ -tokoferol; α -T3= α -tokotrienol; β -T3= β -tokotrienol; γ -T3= γ -tokotrienol; δ -T3= δ -tokotrienol

Obrázek 4: HPLC-FLD chromatogram standardu tokolů (1 μ g/ml)

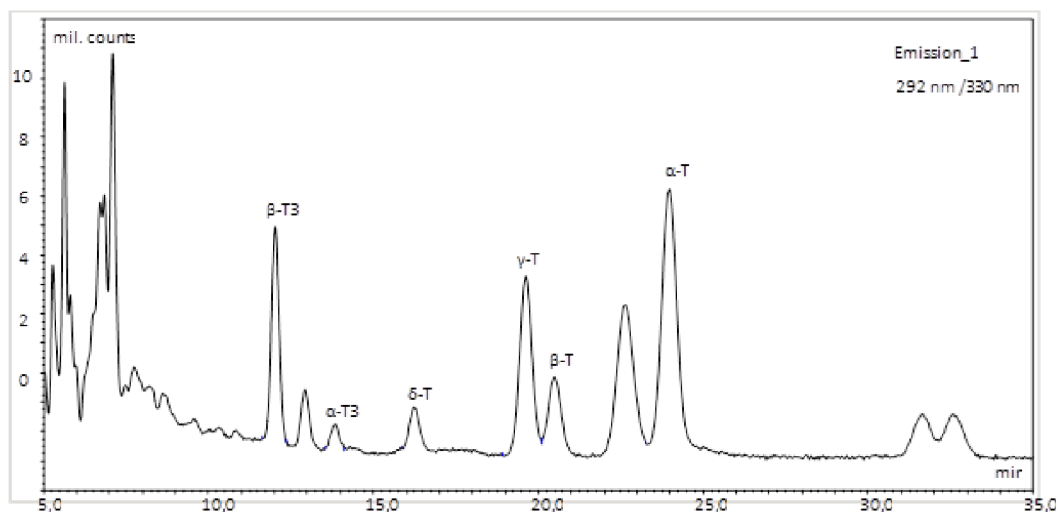
Zdroj: Chromeleon



α -T= α -tokoferol; β -T= β -tokoferol; γ -T= γ -tokoferol; δ -T= δ -tokoferol; α -T3= α -tokotrienol; β -T3= β -tokotrienol

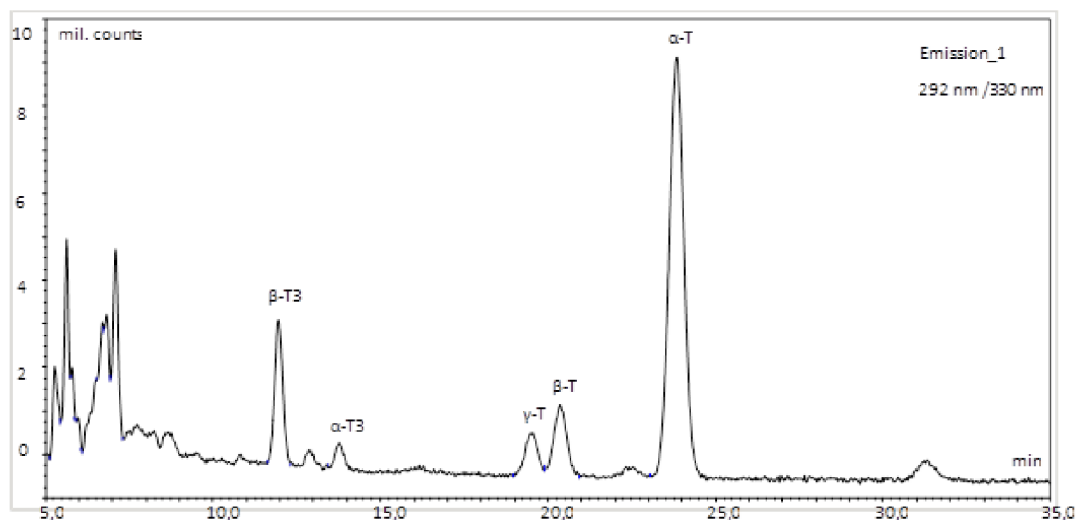
Obrázek 5: HPLC-FLD chromatogram jednotlivých tokolů ve vzorku *Acheta domesticus*

Zdroj: Chromeleon



α -T= α -tokoferol; β -T= β -tokoferol; γ -T= γ -tokoferol; δ -T= δ -tokoferol; α -T3= α -tokotrienol; β -T3= β -tokotrienol

Obrázek 6: HPLC-FLD chromatogram jednotlivých tokolů ve vzorku *Tenebrio molitor*
Zdroj: Chromeleon

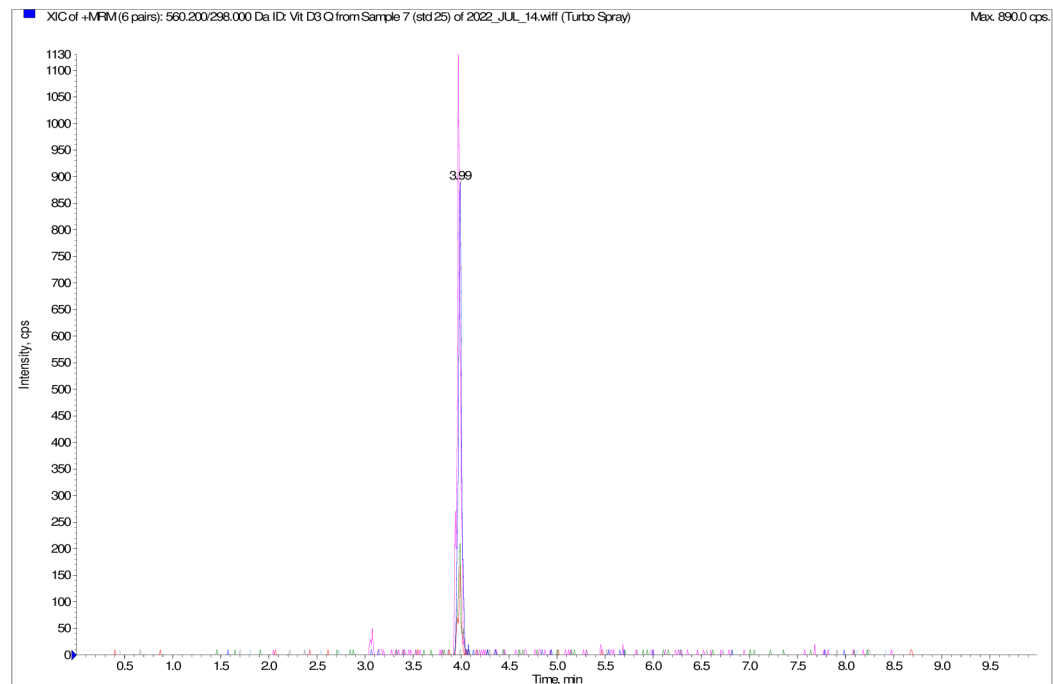


α -T= α -tokoferol; β -T= β -tokoferol; γ -T= γ -tokoferol; α -T3= α -tokotrienol; β -T3= β -tokotrienol

Obrázek 7: HPLC-FLD chromatogram jednotlivých tokolů ve vzorku *Locusta migratoria*
Zdroj: Chromeleon

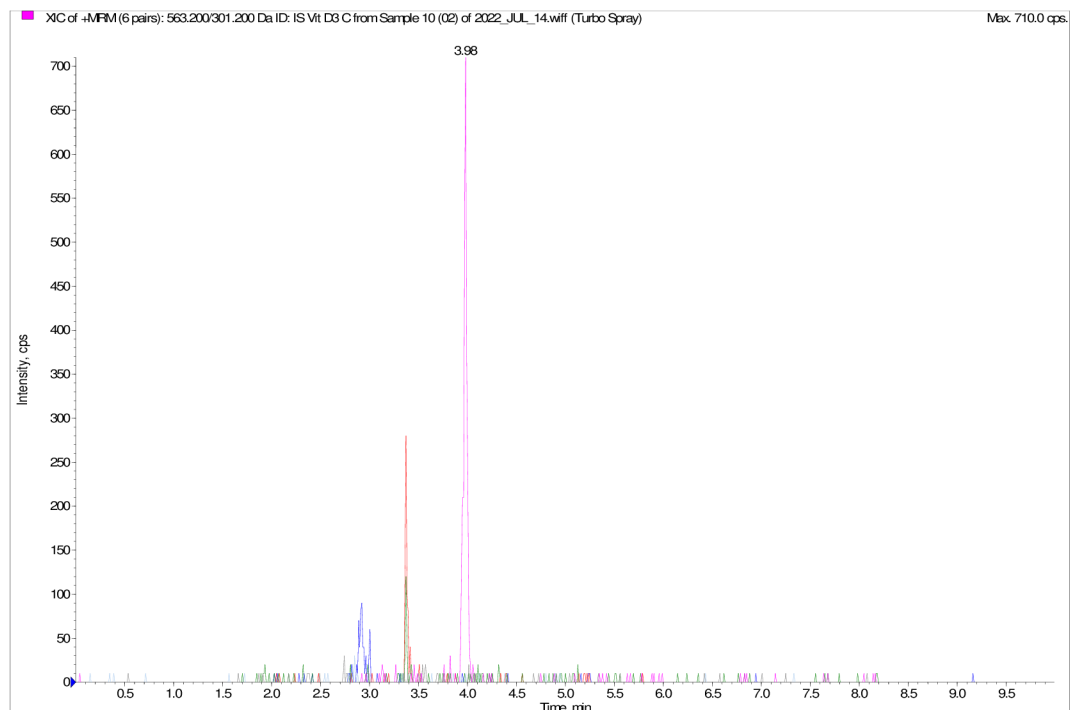
Pro chromatografickou separaci vitamínu D3 byla zvolena C18 kolona o malých částicích (1,7 μ m). Malé částice stacionární fáze (< 2 μ m) výrazně zvyšují zpětný tlak na koloně, zároveň ale také zvyšují účinnost vlastní separace. V případě použití těchto kolon v chromatografickém systému, který jejich využití umožňuje, hovoříme o tzv. ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografii (UHPLC). Díky kratší délce těchto kolon a menšímu vnitřnímu průměru dochází také k významné úspoře času a použitých rozpouštědel. Pro separaci vitamínu D3 byl zvolen binární gradient o složení A) 0,1% kyselina mravenčí ve vodě, B) 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu. Optimalizací jednotlivých parametrů za pomoci derivatizovaných standardních roztoků vitamínu D3 a SIL-D3 byla vyvinuta finální metoda chromatografické separace a detekce vitamínu D3, která byla následně ověřena na reálných vzorcích hmyzu.

Chromatogramy standardních roztoků vitamínu D3 a SIL-D3 a reálného vzorku hmyzu jsou uvedeny na obrázcích 8 a 9.



Obrázek 8: UHPLC-ESI-MS/MS chromatogram standardu vitamínu D3 (25 ng/ml)/ IS D3 (20 ng/ml)

Zdroj: Analyst



Obrázek 9: UHPLC-ESI-MS/MS chromatogram reálného vzorku *Acheta domesticus*

Zdroj: Analyst

4.2.2 Optimalizace přípravy vzorku

Prvním krokem v přípravě vzorku byla extrakce tuku z lyofilizovaného vzorku hmyzu. V rámci optimalizace byly zkoušeny jako extrakční činidla dichlormethan, diethylether, hexan, směs ethanol:aceton:hexan (1:2:2, v/v/v) a směs methanol:isopropanol:hexan (1:2:2, v/v/v). Každá varianta byla provedena ve třech opakováních. Vitaminy A a D3 byly do vzorku přidány uměle, metodou standardního přídatku, neboť se ve zkušebních vzorcích přirozeně nevyskytovaly. Všechny varianty byly následně hydrolyzovány, extrahovány do organického rozpouštědla, přečištěny vodou, zakoncentrovány, rekonstituovány do ethanolu a analyzovány na HPLC. Porovnáním ploch chromatografických píků jednotlivých analytů byla zhodnocena extrakční účinnost zkoumaných činidel, z nichž nejvyšší účinnost byla zaznamenána u směsi ethanol:aceton:hexan (1:2:2, v/v/v).

Pro extrakci tuku byly zkoušeny následující dva postupy. 1 g lyofilizovaného vzorku byl extrahován 2x 12 ml extrakční směsí, byl vložen na 1 min na vortex a na 10 minut do ultrazvukové lázně a poté odstředěn po dobu 10 minut. Spojený extrakt byl odpařen na vakuové rotační odparce do sucha. Druhý postup zahrnoval pouze navážení 1 g lyofilizovaného vzorku do 20 ml stříkačky vycpané buničinou a následnou filtraci pod vakuem 3x 5 ml extrakční směsí. Spojený extrakt byl následně odpařen na vakuové rotační odparce do sucha. Obě varianty byly provedeny v šesti opakováních. Následný postup byl totožný s postupem popsaným výše. Druhý postup vykazoval vyšší účinnost extrakce a byl zahrnut do finální metodiky.

Dalším důležitým krokem byla optimalizace alkalické hydrolyzy vzorku. Byly zkoušeny čtyři různé koncentrace KOH, 2,5%, 5%, 10% a 15%. Všechny varianty (tři opakování) byly hydrolyzovány po dobu 1 hodiny při 70 °C. S ohledem na nižší stabilitu vitamérů vitamínu E oproti vitaminům A a D3 byla zvolena šetrnější hydrolyza pomocí 5% KOH. Tato koncentrace byla nejvhodnější z hlediska stability testovaných vitaminů, nebyla však dostatečná na zhydrolyzování veškerého tuku obsaženého ve vzorku. Nezhydrolyzovaný tuk byl ze vzorku odstraněn vymražením (-18 °C) a následným odstředěním při nízké teplotě (-9 °C) před samotnou HPLC analýzou.

Dalším optimalizovaným parametrem byla liquid-liquid extrakce vitaminů do organického rozpouštědla. Byly zkoušeny dvě varianty extrakčních činidel v šesti opakováních, čistý hexan a směs diethylether:hexan (1:1, v/v). Mírně vyšší výtěžnost extrakce (o 5 %) vykazovala směs diethylether:hexan, která byla následně použita ve finální metodice přípravy vzorku.

Posledním krokem optimalizace byl výběr směsi pro rekonstituci suchého odparku. Byla zkoušena směs absolutní ethanol:aceton (3:2, v/v) a absolutní ethanol. Obě varianty provedené v šesti opakováních vykazovaly srovnatelné výsledky, ve finální metodice byl jako rekonstituční činidlo zvolen absolutní ethanol.

4.2.3 Finální metodika

4.2.3.1 Příprava vzorku pro stanovení vitaminů A, E a D v jedlém hmyzu

1 g lyofilizovaného, homogenizovaného vzorku hmyzu byl extrahován 3× pomocí 5 ml směsi ethanol:aceton:hexan (1:1:2, v/v/v) a odpařen do sucha na vakuové rotační odparce.

K vyextrahovanému oleji bylo přidáno 80 µl 6,19,19-D3 cholekalciferolu (isotopicky značený vnitřní standard vitaminu D3, 1 µg/ml v ethanolu), 10,72 ml 2% pyrogallolu v ethanolu a 1,2 ml 50% KOH. Následovala hydrolýza vzorku v třepací vodní lázni po dobu 1 h při 70 °C. Vzorek byl každých 10 min promíchán. Po hydrolýze byl vzorek schlazen ve vodní lázni na pokojovou teplotu. 6 ml hydrolyzátu bylo převedeno do 50ml centrifugační kyvety spolu s 6 ml H₂O a 6 ml extrakční směsi diethylether:hexan (1:1, v/v). Vzorek byl vložen na 10 min na třepačku a poté byl odstředěn při 8228 rcf 5 minut. Vodná fáze byla odebrána pomocí Pasteurovy pipety, organická fáze byla ještě dvakrát propláchnuta 6 ml H₂O. Po přečištění byla organická fáze kvantitativně převedena do odparných 50ml baněk a byla odpařena při 30 °C do sucha na vakuové rotační odparce. Suchý odparek byl rekonstituován do 2 ml absolutního ethanolu a byl vložen do mrazáku. Po zamrazení vzorku došlo k vypadnutí velkých molekul a zbylého nehydrolyzovaného tuku. Po vymrazení byl vzorek odstředěn při -9 °C a 8228 rcf. Supernatant byl zfiltrován přes nylonový 0,22µm stříkačkový filtr.

1 ml extraktu byl pipetován do 8ml skleněných vialek a byl použit pro stanovení vitaminu D3. Zbýlý extrakt byl použit přímo pro analýzu vitaminů A a E ve vzorku metodou HPLC-DAD/FLD.

Pro stanovení vitaminu D byl 1 ml extraktu odpařen při 40 °C pod proudem dusíku. Následovala derivatizace vitaminu D3 a SIL-D3 provedená podle Yang et al. (2017). K suchému extraktu bylo přidáno 0,6 ml roztoku PTAD (1 mg/ml v acetonitrilu). Vzorek byl promíchán na vortexu a byl vložen na 40 min do temna, kde proběhla derivatizace vitaminu D na D3:PTAD a SIL-D3:PTAD. Derivatizační reakce byla zastavena přidáním 0,4 ml vody ke vzorku. Vzorek byl poté zfiltrován přes nylonový 0,22µm stříkačkový filtr do vialky a byl analyzován metodou UHPLC-ESI-MS/MS.

Každý druh hmyzu byl chován ve třech biologických variantách a každá biologická varianta druhů *Acheta domesticus* a *Tenebrio molitor* byla analyzována ve čtyřech opakováních, celkem tedy dvanáct analýz pro každý z těchto druhů hmyzu. Biologické varianty druhu *Locusta migratoria* byly z důvodu malého množství vzorku analyzovány jen ve třech opakováních, celkem tedy devět analýz pro tento druh hmyzu.

4.2.3.2 HPLC-DAD/FLD analýza retinolu a jednotlivých forem vitaminu E

Retinol i jednotlivé formy tokolů byly separovány izokratickou elucí na chromatografické koloně Develosil RP-Aqueous C30 (250 × 4,6 mm, S = 5 µm; Phenomenex, CA, USA) s ochrannou předkolonou Zorbax SB-C18 (12,5 × 4,6 mm, S = 5 µm; Agilent Technologies, CA, USA). Mobilní fáze se skládala ze směsi methanol:voda v poměru 97:3.

Podmínky separace byly následující: průtok 1,0 ml/min; teplota kolony 30 °C; teplota autosampleru 10 °C; objem nástřiku 10 µl; doba analýzy 35 min.

Podmínky FLD detekce: excitační vlnová délka $\lambda = 292$ nm, emisní vlnová délka $\lambda = 330$ nm.

Podmínky DAD detekce: $\lambda = 325$ nm, spektrální akvizice: 250-500 nm.

Retinol a individuální formy tokolů byly ve vzorcích identifikovány porovnáním retenčních časů s časy analytických standardů. Kvantifikace byla provedena metodou externí kalibrace.

4.2.3.3 UHPLC-ESI-MS/MS analýza vitamínu D3

Vitamin D3 byl separován na analytické koloně Kinetex XB-C18 (50 × 2,1 mm, $S = 1,7$ µm; Phenomenex, CA, USA). Mobilní fáze se skládala z 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě (A) a 0,1% kyseliny mravenčí v acetonitrilu (B). K separaci byla použita gradientová eluce: 0-0,2 min 20 % B, 0,2-3,5 min 100 % B, 3,5-7,5 min 100 % B, 7,5-8,0 min 20 % B, 8,0-10,0 min 20 % B. Podmínky chromatografické separace byly následující: teplota kolony 40 °C, teplota autosampleru 10 °C, průtok 0,5 ml/min, objem nástřiku 3 µl, čas analýzy 10 min.

Podmínky ve zdroji detektoru (ESI pozitivní mód): ochranný plyn 25 psi, kolizní plyn střední, napětí zdroje 5000 V, teplota 500 °C, zmlžovací plyn 50 psi a turbo plyn 50 psi. Pro cholekalciferol (vitamin D3) byly monitorovány dva iontové přechody, kvantifikační iontový přechod 560 → 298 (kolizní energie 22 V, deklasterační potenciál 37 V) a konfirmační iontový přechod 560 → 280 (kolizní energie 38 V, deklasterační potenciál 39 V). Pro stabilní isotopicky značený 6,19,19-D3 cholekalciferol (SIL-D3) byl sledován jeden kvantifikační přechod 563 → 301 (kolizní energie 20 V, deklasterační potenciál 30 V).

Kvantifikace vitamínu D3 ve vzorcích hmyzu byla provedena metodou interní kalibrace.

4.3 Validace metody

Po vývoji finální metody byla provedena validace, jejímž účelem bylo prokázat její funkčnost na základě objektivního posouzení pomocí validačních parametrů. Pro ověření funkčnosti metody stanovení lipofilních vitaminů byla provedena validace dle následujících parametrů:

- Limit detekce a limit kvantifikace
- Linearita
- Pracovní rozsah
- Správnost
- Přesnost

Limit detekce a limit kvantifikace byly vypočítány dle metodiky Q2B za použití vzorců: $LOD = 3,3 \times \sigma/S$ a $LOQ = 10 \times \sigma/S$, kde σ je směrodatná odchylka členu a v regresní rovnici $y = a + bx$ stanovená z pěti tříbodových kalibračních křivek sestavených okolo odhadovaného limitu detekce a S je průměrný sklon křivky kalibrace.

Linearita a pracovní rozsah byly vyhodnoceny z kalibrační křivky sestavené z 6 kalibračních roztoků na různých koncentračních úrovních, která byla proměřena třikrát. Linearita byla vyjádřena pomocí koeficientu korelace (R). Pracovní rozsah byl dán limitem kvantifikace na spodní hranici rozsahu, na horní hranici byl dán koncentrací analytu, pro kterou ještě byla odezva detektoru lineární.

Pro zhodnocení správnosti byla použita metoda přídatku známého množství standardní látky (výťažnost). Bylo zpracováno šest nezávislých vzorků hmyzu bez přídatku standardů a šest vzorků s přídatkem známého množství standardních látek. Z rozdílu ploch chromatografických píků byla spočítána průměrná plocha vytěženého standardu, která byla porovnána s plochou standardu, která by odpovídala 100 % vytěženého standardu. Výťažnost je pak uvedena jako průměrné procento vytěženého standardu.

Přesnost metody byla vyjádřena jako opakovatelnost, kdy byl ten samý vzorek hmyzu zpracován stejnou metodou v ten samý den v šesti nezávislých opakováních. Opakovatelnost je vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka od průměru z těchto šesti nezávislých opakování vzorku.

4.4 Statistické vyhodnocení naměřených dat

Naměřená data byla zaznamenána do tabulek a následně využita ke statistickému vyhodnocení pomocí softwaru Statistica. Předpokladem k použití parametrického testu jednofaktorová ANOVA je normální rozdělení dat a homoskedasticita dat. Normalitu dat lze ověřit například vizuálně pomocí histogramů nebo pomocí Shapiro-Wilk testu. K prokázání homoskedasticity je možné využít více testů jako je Bartlettův test, Hartleyův test, Cochranův test či Leveneův test. Při těchto testech je testován statisticky významný rozdíl ve variabilitě srovnávaných souborů. Pokud existuje statisticky významný rozdíl ve variabilitě srovnávaných souborů, není splněn předpoklad homoskedasticity dat. V případě nesplnění předpokladů lze použít neparametrickou obdobu analýzy rozptylu.

Jelikož naměřená data nesplnila předpoklad o homoskedasticitě dat, byl použit Kruskalův - Wallisův test, který je neparametrickou obdobou jednofaktorové ANOVY. Nejprve byla testována hypotéza, že všechny náhodné výběry pochází z téhož rozložení. Pokud byla zamítnuta, následovalo bližší statistické vyhodnocení, a to mezi kterými dvojicemi náhodných výběrů je rozdíl na hladině významnosti $\alpha=0,05$. Pokud byla p hodnota menší než hladina významnosti, existoval statisticky významný rozdíl mezi danými dvojicemi.

U *Locusta migratoria* byl naměřen obsah δ -tokoferolu pod limitem detekce, tudíž byly porovnávány pouze dva druhy jedlého hmyzu *Acheta domesticus* a *Tenebrio molitor* v obsahu tohoto vitamínu. V tomto případě byl použit dvouvýběrový T-test pro nezávislé vzorky. Nejprve byla testována hypotéza, že rozdíly rozptylů daných souborů nejsou statisticky významné. Pokud byla zamítnuta, následovalo vyhodnocení testu zvaného Welchův test. Pokud byla p hodnota menší než hladina významnosti, existoval statisticky významný rozdíl mezi danými dvěma soubory.

5 Výsledky

Výsledky jsou rozděleny do dvou částí. První část se věnuje vyhodnocení validačních parametrů pro jednotlivé vitaminy. Druhá část je věnována výsledkům stanovení obsahu vitaminů v jednotlivých druzích jedlého hmyzu a statistickému porovnání naměřených dat mezi danými druhy.

5.1 Validace metody

5.1.1 Vitamin A

V Tabulce 10 jsou uvedeny výsledné hodnoty validačních parametrů vitaminu A ve formě retinolu získané metodikou popsanou v kapitole 4.3. Limit detekce a limit kvantifikace (LOD a LOQ) jsou uvedeny v μg vitaminu/g suchého vzorku. Správnost metody byla vyjádřena jako výtěžnost a přesnost metody byla vyjádřena jako opakovatelnost. Hodnoty těchto parametrů pro jednotlivé matrice jedlého hmyzu jsou zaznamenány v Tabulce 11. Kalibrační křivka je znázorněna v příloze 1.

Tabulka 10: Validační parametry vitaminu A

Parametry	Vitamin A
LOD ($\mu\text{g/g}$)	0,08
LOQ ($\mu\text{g/g}$)	0,24
Kalibrační body	6
Kalibrační typ	lineární
Rovnice regrese	$y = 1,4964x$
Korelační koeficient R	0,9999
Pracovní rozsah ($\mu\text{g/ml}$)	0,05-10

Tabulka 11: Opakovatelnost a výtěžnost vitaminu A v jednotlivých maticích

	Vitamin A		
	<i>Acheta domesticus</i>	<i>Tenebrio molitor</i>	<i>Locusta migratoria</i>
Opakovatelnost (%; n=6)	4,70	8,30	3,61
Výtěžnost (%; n=6)	71,93	77,81	103,47

Vitamin A byl ve všech analyzovaných vzorcích hmyzu pod limitem detekce dané metody.

5.1.2 Vitamin D3

V Tabulce 12 jsou uvedeny výsledné hodnoty validačních parametrů vitamínu D3 získané metodikou popsanou v kapitole 4.3. Limit detekce a limit kvantifikace (LOD a LOQ) jsou uvedeny v ng vitamínu/g suchého vzorku. Správnost metody byla vyjádřena jako výtěžnost a přesnost metody byla vyjádřena jako opakovatelnost. Hodnoty těchto parametrů pro jednotlivé matrice jedlého hmyzu jsou zaznamenány v Tabulce 13. Kalibrační křivka je znázorněna v příloze 2.

Tabulka 12: Validační parametry vitamínu D3

Parametry	Vitamin D3
LOD (ng/g)	1,64
LOQ (ng/g)	4,96
Kalibrační body	6
Kalibrační typ	lineární
Rovnice regrese	$y=0,0307x+0,0137$
Korelační koeficient R	0,9989
Pracovní rozsah (ng/ml)	1-50

Tabulka 13: Opakovatelnost a výtěžnost vitamínu D3 v jednotlivých maticích

	Vitamin D3		
	<i>Acheta domesticus</i>	<i>Tenebrio molitor</i>	<i>Locusta migratoria</i>
Opakovatelnost (%; n=6)	5,68	8,82	7,57
Výtěžnost (%; n=6)	52,14	56,40	90,47

Vitamin D3 byl ve vzorcích kvantifikován metodou vnitřního standardu. Jako vnitřní standard byl použit stabilní, isotopicky značený 6,19,19-D3 cholekalciferol, který byl dávkován o stejné koncentraci (20 ng/ml) do všech kalibračních roztoků a všech vzorků hmyzu. Do kalibrační křivky byl vnesen poměr koncentrací (osa x) a poměr ploch analytu/vnitřního standardu (osa y). Z poměru ploch analytu/vnitřního standardu ve vzorku byla dosazením do kalibrační rovnice spočítána koncentrace vitamínu D3 ve vzorcích hmyzu.

5.1.3 Vitamin E

V Tabulce 14 jsou uvedeny výsledné hodnoty validačních parametrů jednotlivých forem tokoferolů získané metodikou popsanou v kapitole 4.3. Limit detekce a limit kvantifikace (LOD a LOQ) jsou uvedeny v µg vitamínu/g suchého vzorku. Správnost metody byla vyjádřena jako výtěžnost a přesnost metody byla vyjádřena jako opakovatelnost. Hodnoty těchto parametrů pro jednotlivé matrice jedlého hmyzu jsou zaznamenány v Tabulce 15. Kalibrační křivky jednotlivých tokoferolů jsou znázorněny v přílohách 3, 4, 5 a 6.

Tabulka 14: Validační parametry jednotlivých forem tokoferolů

Parametry	α -tokoferol	β -tokoferol	γ -tokoferol	δ -tokoferol
LOD ($\mu\text{g/g}$)	0,56	0,20	0,20	0,16
LOQ ($\mu\text{g/g}$)	1,70	0,60	0,60	0,48
Kalibrační body	6	6	6	6
Kalibrační typ	lineární	lineární	lineární	lineární
Rovnice regrese	$y = 870920x$	$y = 2E+06x$	$y = 2E+06x$	$y = 3E+06x$
Korelační koeficient R	0,9997	0,9999	0,9999	0,9999
Pracovní rozsah ($\mu\text{g/ml}$)	0,2-12	0,2-14	0,2-14	0,1-6

Tabulka 15: Opakovatelnost a výtěžnost jednotlivých forem tokoferolů v jednotlivých maticích

<i>Acheta domesticus</i>				
	α -tokoferol	β -tokoferol	γ -tokoferol	δ -tokoferol
Opakovatelnost (%; n=6)	10,51	2,60	2,60	3,07
Výtěžnost (%; n=6)	81,47	92,41	89,13	68,68
<i>Tenebrio molitor</i>				
	α -tokoferol	β -tokoferol	γ -tokoferol	δ -tokoferol
Opakovatelnost (%; n=6)	5,83	8,51	8,71	7,53
Výtěžnost (%; n=6)	91,01	93,28	91,24	87,76
<i>Locusta migratoria</i>				
	α -tokoferol	β -tokoferol	γ -tokoferol	δ -tokoferol
Opakovatelnost (%; n=6)	4,31	4,10	3,96	3,53
Výtěžnost (%; n=6)	88,92	95,04	96,91	72,30

V Tabulce 16 jsou uvedeny výsledné hodnoty validačních parametrů jednotlivých forem tokotrienolů. Limit detekce a limit kvantifikace (LOD a LOQ) jsou uvedeny v μg vitamínu/g suchého vzorku. Správnost metody byla vyjádřena jako výtěžnost a přesnost metody byla vyjádřena jako opakovatelnost. Hodnoty těchto parametrů pro jednotlivé matrice jedlého hmyzu jsou zaznamenány v Tabulce 17. Kalibrační křivky jednotlivých tokotrienolů jsou znázorněny v přílohách 7, 8, 9 a 10.

Tabulka 16: Validační parametry jednotlivých forem tokotrienolů

Parametry	α -tokotrienol	β -tokotrienol	γ -tokotrienol	δ -tokotrienol
LOD ($\mu\text{g/g}$)	0,32	0,12	0,12	0,09
LOQ ($\mu\text{g/g}$)	0,97	0,36	0,36	0,28
Kalibrační body	6	6	6	6
Kalibrační typ	lineární	lineární	lineární	lineární
Rovnice regrese	$y = 852747x$	$y = 2E+06x$	$y = 2E+06x$	$y = 3E+06x$
Korelační koeficient R	0,9998	0,9999	0,9997	0,9999
Pracovní rozsah ($\mu\text{g/ml}$)	0,2-12	0,1-6	0,1-6	0,07-7

Tabulka 17: Opakovatelnost a výtěžnost jednotlivých forem tokotrienolů v jednotlivých maticích

	<i>Acheta domestica</i>			
	α -tokotrienol	β -tokotrienol	γ -tokotrienol	δ -tokotrienol
Opakovatelnost (%; n=6)	6,63	2,60	2,46	2,63
Výtěžnost (%; n=6)	57,54	87,03	85,84	54,75
	<i>Tenebrio molitor</i>			
	α -tokotrienol	β -tokotrienol	γ -tokotrienol	δ -tokotrienol
Opakovatelnost (%; n=6)	5,43	8,34	8,32	7,47
Výtěžnost (%; n=6)	85,95	89,49	90,81	84,49
	<i>Locusta migratoria</i>			
	α -tokotrienol	β -tokotrienol	γ -tokotrienol	δ -tokotrienol
Opakovatelnost (%; n=6)	5,72	4,66	4,58	5,04
Výtěžnost (%; n=6)	100,48	88,85	88,27	54,97

Jednotlivé vitamery vitamínu E byly ve vzorcích hmyzu kvantifikovány metodou externí kalibrace. Původním plánem bylo použití metody interní kalibrace pomocí vnitřního standardu (δ -tokotrienolu), která by ošetřila ztráty jednotlivých analytů během přípravy vzorku. Tato metoda byla vyhodnocena jako nevhodná z důvodu různé stability jednotlivých vitamérů (viz Tabulky 15 a 17). β - a γ -vitamery vykazovaly v průměru vyšší stabilitu než α - a δ -vitamery. Ke kvantifikaci naměřených výsledků byly použity stanovené koeficienty výtěžnosti. Ztráty jednotlivých vitamérů ve vzorcích byly ošetřeny dělením naměřených hodnot koeficientem výtěžnosti.

5.2 Obsah lipofilních vitaminů v jedlém hmyzu

5.2.1 Vitamin A

V Tabulce 18 jsou uvedeny naměřené hodnoty vitamínu A ve formě retinolu. Vitamin A byl ve všech analyzovaných vzorcích hmyzu pod limitem detekce dané metody. Vzhledem k této skutečnosti nebylo provedeno bližší statistické vyhodnocení.

Tabulka 18: Obsah vitamínu A v jednotlivých druzích jedlého hmyzu

	Průměrný obsah (µg/g)
<i>Acheta domestica</i>	<LOD
<i>Tenebrio molitor</i>	<LOD
<i>Locusta migratoria</i>	<LOD

5.2.2 Vitamin D3

V Tabulce 19 jsou uvedeny naměřené hodnoty vitamínu D3. U cvrčka domácího (*Acheta domestica*) a saranče stěhovavé (*Locusta migratoria*) byl vitamin D3 pod limitem detekce metody. U larev potemníka moučného (*Tenebrio molitor*) byl obsah vitamínu D3 naměřen pod limitem kvantifikace, tudíž je v tabulce uveden jako menší než hodnota LOQ. Stejně jako u vitamínu A nebylo provedeno statistické vyhodnocení kvůli nedostatku naměřených hodnot.

Tabulka 19: Obsah vitamínu D3 v jednotlivých druzích jedlého hmyzu

	Průměrný obsah (ng/g)
<i>Acheta domestica</i>	<LOD
<i>Tenebrio molitor</i>	<4,96
<i>Locusta migratoria</i>	<LOD

5.2.3 Vitamin E

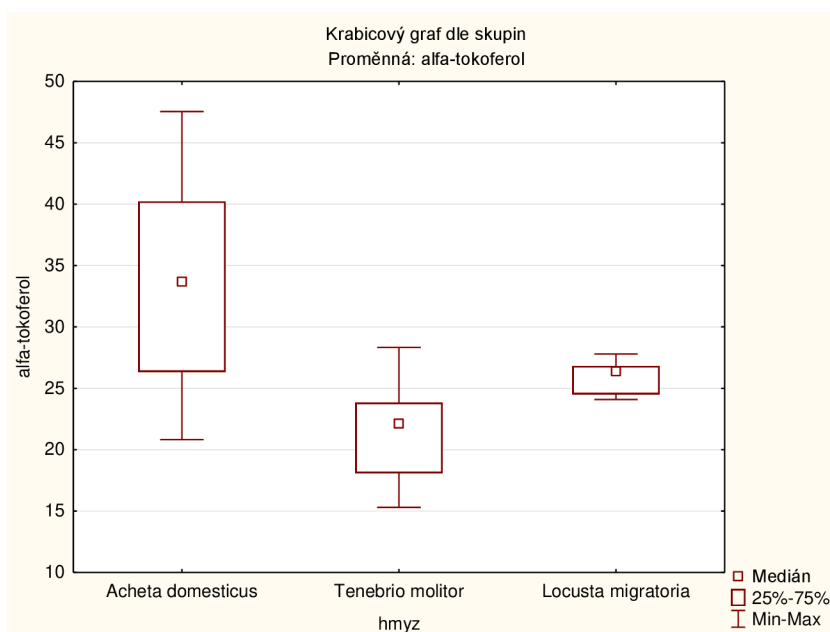
V Tabulce 20 jsou uvedeny naměřené hodnoty jednotlivých forem tokoferolů. Všechny analyzované druhy jedlého hmyzu obsahovaly nejvíce α -tokoferolu. Ostatní formy tokoferolů byly zastoupeny v menším množství a u saranče stěhovavé (*Locusta migratoria*) byl δ -tokoferol pod limitem detekce.

Tabulka 20: Obsah jednotlivých forem tokoferolů v jednotlivých druzích jedlého hmyzu

	Průměrný obsah \pm SD (µg/g)			
	α-tokoferol	β-tokoferol	γ-tokoferol	δ-tokoferol
<i>Acheta domestica</i>	33,37 \pm 7,90	1,94 \pm 0,21	2,00 \pm 0,21	0,20 \pm 0,01
<i>Tenebrio molitor</i>	21,24 \pm 3,70	9,50 \pm 1,44	3,16 \pm 0,50	0,31 \pm 0,05
<i>Locusta migratoria</i>	25,94 \pm 1,34	1,56 \pm 0,11	0,89 \pm 0,08	<LOD

Jednotlivé formy tokoferolů byly následně podrobeny statistickému vyhodnocení. Byly porovnávány naměřené hodnoty mezi jednotlivými druhy jedlého hmyzu pomocí statistického testu Kruskal-Wallisova ANOVA. Byla zjišťována statistická významnost rozdílu obsahů α -, β -, γ -, δ -tokoferolů.

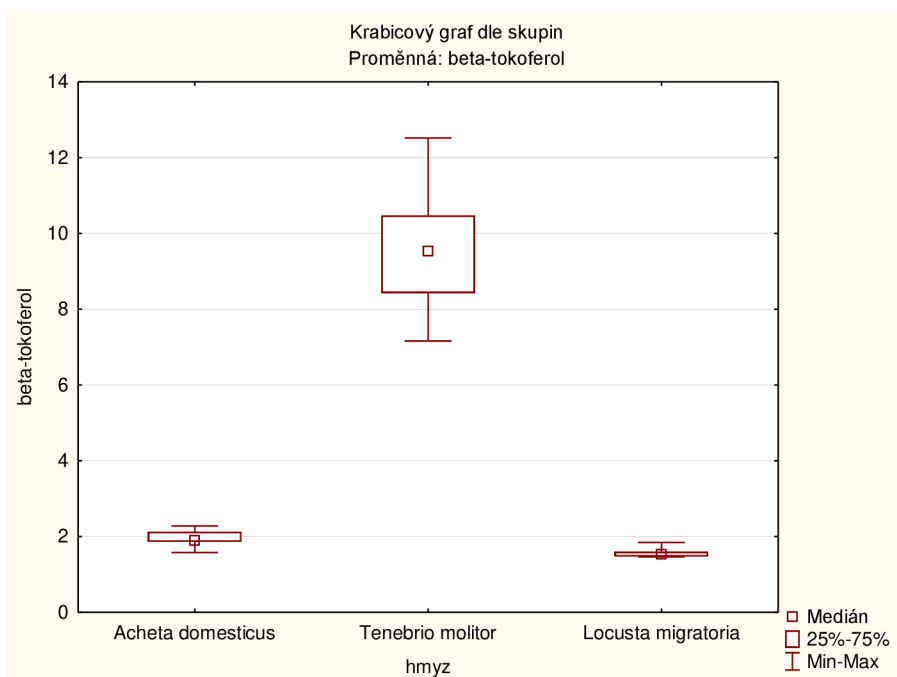
Mezi druhy *Acheta domesticus* a *Tenebrio molitor* byl nalezen statisticky významný rozdíl v obsahu α -tokoferolu na hladině významnosti $\alpha=0,05$. *Acheta domesticus* obsahoval významně vyšší množství α -tokoferolu než *Tenebrio molitor*. Příslušné p hodnoty jsou uvedeny v tabulce v příloze 11. Mezi dalšími druhy jedlého hmyzu však statisticky významný rozdíl prokázán nebyl. Na Obrázku 10 je vyobrazen krabicový graf pro porovnání obsahu α -tokoferolu mezi jednotlivými druhy.



Obrázek 10: Porovnání obsahu α -tokoferolu

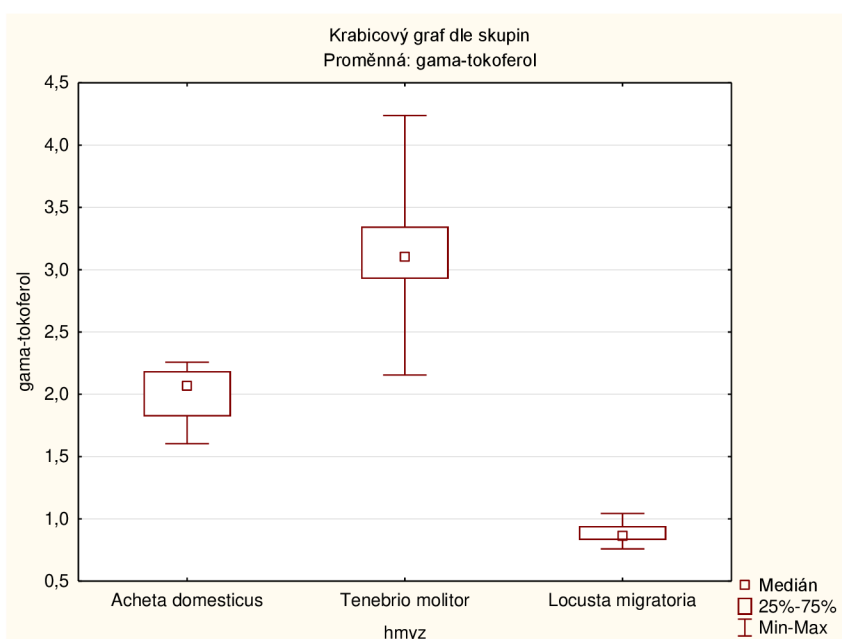
Zdroj: Statistica

Tenebrio molitor obsahoval významně vyšší množství β -tokoferolu než *Acheta domesticus* a *Locusta migratoria*. Mezi těmito druhy byl prokázán statisticky významný rozdíl v obsahu β -tokoferolu na hladině významnosti $\alpha=0,05$. Příslušné p hodnoty jsou uvedeny v tabulce v příloze 12. Mezi *Acheta domesticus* a *Locusta migratoria* nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v obsahu β -tokoferolu. Na Obrázku 11 je vyobrazen krabicový graf pro porovnání obsahu β -tokoferolu mezi jednotlivými druhy.



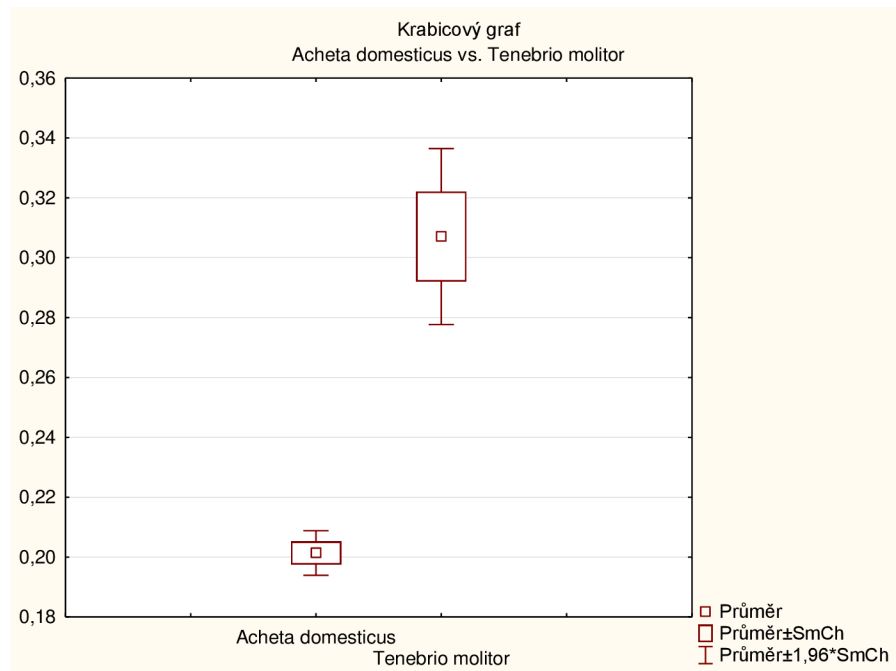
Obrázek 11: Porovnání obsahu β -tokoferolu
Zdroj: Statistica

Mezi všemi analyzovanými druhy jedlého hmyzu byl prokázán statisticky významný rozdíl v obsahu γ -tokoferolu na hladině významnosti $\alpha=0,05$. Nejvyšší hodnoty γ -tokoferolu byly naměřeny v larvách *Tenebrio molitor*, nejnižší pak v *Locusta migratoria*. Příslušné p hodnoty jsou uvedeny v tabulce v příloze 13. Na Obrázku 12 je vyobrazen krabicový graf pro porovnání obsahu γ -tokoferolu mezi jednotlivými druhy.



Obrázek 12: Porovnání obsahu γ -tokoferolu
Zdroj: Statistica

Mezi druhy *Tenebrio molitor* a *Acheta domesticus* byl prokázán statisticky významný rozdíl v obsahu δ -tokoferolu na hladině významnosti $\alpha=0,05$. Larvy *Tenebrio molitor* obsahovaly významně vyšší množství δ -tokoferolu než *Acheta domesticus*. Příslušné p hodnoty jsou uvedeny v tabulce v příloze 14. Na Obrázku 13 je vyobrazen krabicový graf pro porovnání obsahu δ -tokoferolu mezi jednotlivými druhy.



Obrázek 13: Porovnání obsahu δ -tokoferolu

Zdroj: Statistica

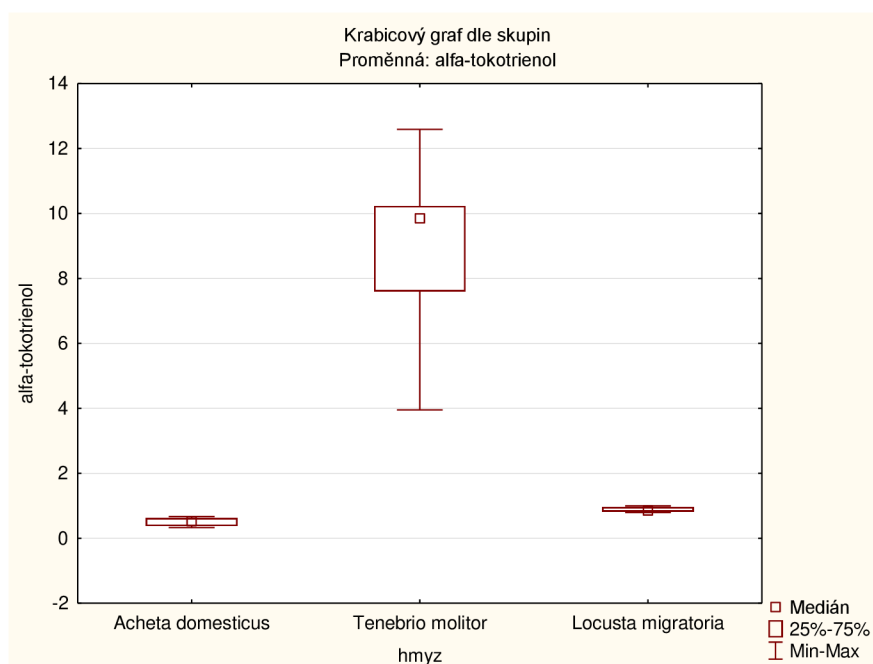
V Tabulce 21 jsou uvedeny naměřené hodnoty jednotlivých forem tokotrienolů. Všechny analyzované druhy jedlého hmyzu obsahovaly α -tokotrienol a β -tokotrienol. Obsah γ -tokotrienolu a δ -tokotrienolu byl pod limitem detekce u všech sledovaných druhů hmyzu.

Tabulka 21: Obsah jednotlivých forem tokotrienolů v jednotlivých druzích jedlého hmyzu

	Průměrný obsah \pm SD ($\mu\text{g/g}$)			
	α -tokotrienol	β -tokotrienol	γ -tokotrienol	δ -tokotrienol
<i>Acheta domesticus</i>	0,50 \pm 0,12	0,75 \pm 0,06	<LOD	<LOD
<i>Tenebrio molitor</i>	9,01 \pm 2,24	6,27 \pm 0,45	<LOD	<LOD
<i>Locusta migratoria</i>	0,88 \pm 0,07	2,15 \pm 0,14	<LOD	<LOD

Jednotlivé formy tokotrienolů byly následně podrobeny statistickému vyhodnocení. Byly porovnávány naměřené hodnoty mezi jednotlivými druhy jedlého hmyzu pomocí statistického testu Kruskal-Wallisova ANOVA. Byla zjišťována statistická významnost rozdílů obsahů α - a β -tokotrienolů. Ze statistického hodnocení byly vyřazeny γ - a δ - tokotrienol jelikož byly jejich hodnoty pod limitem detekce.

Mezi všemi analyzovanými druhy jedlého hmyzu byl prokázán statisticky významný rozdíl v obsahu α -tokotrienolu na hladině významnosti $\alpha=0,05$. Larvy *Tenebrio molitor* obsahovaly významně vyšší množství α -tokotrienolu než *Locusta migratoria* a *Acheta domesticus*, ve kterém byl naměřen nejnižší obsah tohoto vitamery. Příslušné p hodnoty jsou uvedeny v tabulce v příloze 15. Na Obrázku 14 je vyobrazen krabicový graf pro porovnání obsahu α -tokotrienolu mezi jednotlivými druhy.



Obrázek 14: Porovnání obsahu α -tokotrienolu

Zdroj: Statistica

Mezi všemi analyzovanými druhy jedlého hmyzu byl prokázán statisticky významný rozdíl v obsahu β -tokotrienolu na hladině významnosti $\alpha=0,05$. Nejvyšší obsah β -tokotrienolu byl naměřen v larvách *Tenebrio molitor*, naopak nejnižší obsah tohoto vitamery byl naměřen v *Acheta domesticus*. Příslušné p hodnoty jsou uvedeny v tabulce v příloze 16. Na Obrázku 15 je vyobrazen krabicový graf pro porovnání obsahu β -tokotrienolu mezi jednotlivými druhy.



Obrázek 15: Porovnání obsahu β -tokotrienolu
Zdroj: Statistica

6 Diskuze

Vyvinutá metoda pro stanovení lipofilních vitaminů v jedlém hmyzu byla validována dle základních validačních parametrů k určení kvality získávání výsledků. Výsledky validačních parametrů se liší pro každý vitamin obzvlášť kvůli simultánnímu stanovení všech vitaminů jednou metodou přípravy vzorku. Pokud by byl každý vitamin analyzován jinou metodou, mohly by být podmínky optimalizovány tak, aby došlo k lepším výsledkům validačních parametrů a tím i kvality dané metody. To by však s sebou neslo i jisté nevýhody. Hlavními výhodami vyvinuté metody stanovení vitaminů v rámci jedné metody jsou totiž významné ušetření času, menší náročnost a tím i nižší požadavky na finanční prostředky. I tak jsou však výsledky validačních parametrů uspokojivé. Limit detekce a kvantifikace dosahují nízkých hodnot a naznačují tím vysokou citlivost vyvinuté metody, tudíž lze stanovit i velmi nízké koncentrace v reálných vzorcích. Dále byla prokázána linearita a pracovní rozsah, který byl vyhodnocen jako dostačující pro stanovení analytů v reálných vzorcích.

S ohledem na definici validace by měla být požadovaná kritéria pro hodnoty validačních parametrů takzvaně „ušíť na míru“ dle zamýšlené aplikace metody a měla by být vhodná pro užití na dané účely. Posoudit vhodnost dané metody je tedy na uživateli dle jeho požadavků na spolehlivost výsledků (Stöckl et al. 2009). Jiný případ nastává například při validaci analytických metod pro farmaceutické účely. Tam jsou dány hodnoty validačních parametrů, jichž musí daná metoda dosahovat (Nováková & Douša 2013). V rámci této vyvinuté metody byla stanovena nejnižší hodnota výtěžnosti 52,14 % (vitamin D3, *Acheta domestica*) a nejvyšší dosahovala 103,47 % (vitamin A, *Locusta migratoria*). Opakovatelnost se pohybovala od 2,60 (β-tokoferol, *Acheta domestica* a β-tokotrienol, *Acheta domestica*) do 10,51 % (α-tokoferol, *Acheta domestica*). Vzhledem k podmínkám a účelům této metody jsou hodnoty výtěžnosti a opakovatelnosti všech vitaminů dostačující.

Pomocí vyvinuté a validované metody byl stanoven obsah lipofilních vitaminů A, D a E u třech druhů jedlého hmyzu. Cvrček domácí (*Acheta domestica*) neobsahoval vitamin A ani vitamin D3. Ververis et al. (2022) porovnávali výsledky analýz z různých vědeckých publikací a uvedli, že obsah vitaminu A v sušených formách cvrčka nebyl detekován nebo se pohyboval ve velmi nízkých koncentracích (do 0,4 μg/g). Dále byl ve studii uveden obsah α-tokoferolu v rozmezí 0,93–2,16 μg/g a obsah γ-tokoferolu 2,26–3,32 μg/g. Obsah β-tokoferolu a δ-tokoferolu nebyl detekován. Analyzované vzorky cvrčka domácího v této práci obsahovaly v průměru 33,37 μg/g α-tokoferolu a 2,00 μg/g γ-tokoferolu. Vyšší obsah α-tokoferolu může být zapříčiněn například jiným krmivem či jinými podmínkami chovu. Cvrčci analyzovaní v této práci byli krmeni směsí pšenice, sójové moučky, řepkového oleje a minerálních látek. Pšenice je obecně bohatá na β-tokotrienol (19,0–33,0 mg/kg) a dále i na α-tokoferol (9,7–14,0 mg/kg). V menším množství obsahuje i β-tokoferol a α-tokotrienol. Řepkový olej je zase velmi bohatý na γ-tokoferol (481 mg/kg) a α-tokoferol (300 mg/kg) (Velíšek 1999). Jelikož bylo cvrčkům podáváno krmivo bohaté na α-tokoferol, může být důvodem vyššího naměřeného obsahu tohoto vitamínu právě složení krmiva.

Larvy potemníka moučného (*Tenebrio molitor*) také neobsahovaly vitamin A. Vitamin D3 byl detekován, avšak nemohl být kvantifikován, jelikož byl naměřen pod limitem kvantifikace. Mattioli et al. (2021) se zabývali porovnáním obsahu retinolu a tokoferolů v larvách potemníka krmených různými směsí krmiv. Obsah retinolu byl naměřen v rozmezí 0-0,6 µg/g. Celkový obsah tokoferolů se pohyboval od 0,47 do 5,3 µg/g. Nejvyšší obsah tokoferolů (5,30 µg/g) byl zaznamenán u larev krmených sušenkami, které obsahovaly ze všech krmiv nejvíce tokoferolů (21,66 µg/g). Larvy krmené sušenkami obsahovaly 93,71 % α-tokoferolu z celkového obsahu tokoferolů. Sušenky obsahovaly 96,71 % α-tokoferolu z celkového obsahu tokoferolů. Pro porovnání byl v této práci naměřen celkový obsah tokoferolů v larvách *Tenebrio molitor* 34,21 µg/g a z toho 62,1 % zaujímal α-tokoferol. Tyto larvy byly krmeny stejnou směsí jako cvrčci a pšeničnými otrubami v poměru 1:4. Pšeničné otruby mohou být bohatým zdrojem α-tokoferolu (Zhou et al. 2004), a tedy směs tohoto krmiva mohla být celkově na vitamin E bohatší než krmivo z výše uvedené studie. Dále lze pro porovnání uvést naměřené hodnoty tokoferolů v oleji z larev potemníka moučného ze studie Jeon et al. (2016), kde byl porovnáván účinek pražení na obsah tokoferolů. Nepražené larvy obsahovaly 5,74 µg/g α-tokoferolu a 186,02 µg/g γ-tokoferolu. V této práci byly naměřeny hodnoty obsahu α-tokoferolu 21,24 µg/g a γ-tokoferolu 3,16 µg/g. Hodnoty obsahu γ-tokoferolu se liší o několik řádů, tudíž se opět může jednat o odlišně krmené a chované vzorky. Vzhledem k neuvedení složení krmiva nelze porovnávat, zda to bylo zapříčiněno právě tímto faktorem. Dále není uvedeno, zda larvy byly před analýzou vyhladověny, což může mít také velký vliv na obsah živin kvůli zbytkům krmiva v trávicím traktu (Finke 2002).

Saranče stěhovavá (*Locusta migratoria*) stejně jako ostatní analyzované druhy neobsahovala vitamin A ani vitamin D. Oonincx & van der Poel (2011) se věnovali vlivu různých krmiv na obsah retinolu a β-karotenu. Obsah retinolu v sušených formách sarančí se pohyboval v rozmezí 0,11-0,19 µg/g. Retinol byl přítomen ve vyšších koncentracích u sarančí krmených krmivem s přísadkou pšeničných otrub i mrkve v porovnání s normálním travnatým krmivem bez přísadky. Saranče analyzované v této práci byly krmeny senem, pšeničnými otrubami a čerstvou trávou. Retinol byl zde naměřen pod limitem detekce metody. Odlišnost výsledků může spočívat v jiném poměru obsažených surovin v krmivech. Obsah vitaminu E nelze porovnat s vědeckými publikacemi z důvodu nedostatečného množství dat.

Jak vyplývá z naměřených dat v této práci, všechny tři analyzované druhy jedlého hmyzu nejsou významným zdrojem vitaminu A a vitaminu D3. Co se týče vitaminu E, vzhledem k vysokému obsahu α-tokoferolu, jež má nejvyšší biologickou účinnost ze všech vitamínů, lze považovat tyto druhy jedlého hmyzu za významný zdroj vitaminu E. Záleží ovšem na více faktorech. Jak již bylo uvedeno v literární rešerši, nutriční složení záleží na kompozici podávaného krmiva. Dále záleží na podmínkách chovu, stádiu dospělosti daného druhu i obecně na druhu jedlého hmyzu. Nelze tedy zobecnit tvrzení, že jedlý hmyz je významným zdrojem vitaminu E. Dále lze na základě nepřítomnosti vitaminu A a vitaminu D vyvrátit hypotézu „Jedlý hmyz je díky vysokému obsahu tuku významným zdrojem lipofilních vitamínů ve stravě“. Stále však zůstává velký potenciál pro jedlý hmyz být vhodným zdrojem například

vitaminu E, pokud bude upraveno krmivo dle požadovaných vlastností. Je zde však prostor pro doplnění vědeckých publikací k pochopení úplného principu fungování této metody.

7 Závěr

V praktické části této práce byla vyvinuta a validována analytická metoda stanovení lipofilních vitaminů (A, D, E) v jedlém hmyzu. Vývoj metody probíhal na základě studia odborné literatury a optimalizace probíhala především experimentálně, aby docházelo k co nejmenším ztrátám všech vitaminů. Validace byla provedena dle parametrů správnost, přesnost, limit detekce a kvantifikace, linearita a pracovní rozsah. Funkčnost dané metody byla poté ověřena stanovením lipofilních vitaminů v reálných vzorcích. První cíl práce byl tímto splněn.

Dále byly pomocí vyvinuté metody stanoveny obsahy lipofilních vitaminů u třech druhů jedlého hmyzu, a to cvrček domácí (*Acheta domestica*), potěmník moučný (*Tenebrio molitor*) a saranče stěhovavá (*Locusta migratoria*). Vitamin A nebyl detekován ani v jednom druhu jedlého hmyzu. Vitamin D₃ se nacházel ve stopovém, nekvantifikovatelném množství pouze v druhu *Tenebrio molitor*. Všechny tři druhy však byly bohaté na vitamin E, přesněji na jeho vitamér α -tokoferol. Byla vyvrácena hypotéza „Jedlý hmyz je díky vysokému obsahu tuku významným zdrojem lipofilních vitaminů ve stravě“ právě díky nepřítomnosti vitaminu A a vitaminu D. Obsahy jednotlivých vitamérů byly statisticky porovnány mezi jednotlivými druhy jedlého hmyzu. Mezi jednotlivými druhy existují významné rozdíly v obsahu vitaminu E. Nejbohatším zdrojem vitaminu E byl v tomto případě cvrček domácí (*Acheta domestica*) kvůli nejvyššímu obsahu α -tokoferolu, jež má nejvyšší biologickou účinnost ze všech vitamérů. Neexistuje však významný rozdíl v zastoupení lipofilních vitaminů, jelikož všechny tři druhy obsahovaly stejné vitaminy. Druhý cíl práce byl tímto také splněn.

Nejdůležitějším poznatkem z literární rešerše je fakt, že nutriční složení jedlého hmyzu je ovlivněno několika faktory, z nichž nejdůležitější je vliv složení krmiva. Tento poznatek má potenciál pro budoucí zaměření experimentů. Dále by měl být zmíněn celkový potenciál jedlého hmyzu jako alternativa běžně konzumovaných živočišných produktů. Některé druhy jedlého hmyzu jsou vhodným zdrojem bílkovin, tuku, minerálních látek a některých vitaminů. Jak bylo potvrzeno v této práci, mohou být i vhodným zdrojem vitaminu E.

Jelikož se velmi málo vědeckých publikací zabývá obsahem lipofilních vitaminů v jedlém hmyzu, přispívá tato práce k dosavadním poznatkům o tomto tématu.

8 Literatura

- Alves AV, Sanjinez-Argandoña EJ, Linzmeier AM, Cardoso CAL, Macedo MLR. 2016. Food Value of Mealworm Grown on *Acrocomia aculeata* Pulp Flour. *PLoS ONE* **11(3)** (e0151275) DOI: 10.1371/journal.pone.0151275
- Ball GFM. 2006. *Vitamins in Foods. Analysis, Bioavailability, and Stability*. CRC Press. Boca Raton.
- Bastos Maia S, Rolland Souza AS, Costa Caminha MdF, Lins da Silva S, Callou Cruz RdSBL, Carvalho dos Santos C, Batista Filho M. 2019. Vitamin A and Pregnancy: A Narrative Review. *Nutrients* **11(3)**:681.
- Bayer M. 2008. Vitaminy rozpustné v tucích. *Praktické lékařství* **4(5)**:235-237.
- Blake CJ. 2007. Status of Methodology for the Determination of Fat-Soluble Vitamins in Foods, Dietary Supplements, and Vitamin Premixes. *Journal of AOAC International* **90(4)**: 897-910.
- Burešová B, Paznocht L, Kotíková Z, Giampaglia B, Martinek P, Lachman J. 2021. Changes in carotenoids and tocopherols of colored-grain wheat during unleavened bread preparation. *Journal of Food Composition and Analysis* **103**:104108.
- Dossey AT, Morales-Ramos JA, Rojas MG. 2016. *Insects as Sustainable Food Ingredients: Production, Processing and Food*. Academic Press. London.
- Erbland P, Alyokhin A, Perkins LB, Peterson M. 2020. Dose dependent retention of omega-3 fatty acids by black soldier fly larvae (Diptera: Stratiomyidae). *Journal of Economic Entomology* **113(3)**:1221-1226.
- Fanali C, D'Orazio G, Fanali S, Gentili A. 2017. Advanced analytical techniques for fat-soluble vitamin analysis. *Trends in Analytical Chemistry* **87**:82-97.
- Fernandez-Cassi X, Supeanu A, Vaga M, Jansson A, Boqvist S, Vagsholm I. 2019. The house cricket (*Acheta domesticus*) as a novel food: a risk profile. *Journal of Insects as Food and Feed* **5(2)**:137-157.
- Finke MD. 2002. Complete Nutrient Composition of Commercially Raised Invertebrates Used as Food for Insectivores. *Zoo Biology* **21(3)**:269–285.
- Finke MD. 2015. Complete Nutrient Content of Four Species of Commercially Available Feeder Insects Fed Enhanced Diets During Growth. *Zoo Biology* **34(6)**:554-564.
- Giampieri F, Alvarez-Suarez JM, Machi M, Cianciosi D, Navarro-Hortal MD, Battino M. 2022. Edible insects: A novel nutritious, functional, and safe food alternative. *Food frontiers* **3(3)**:358–365.
- Gill BD, Abernethy GA, Green RJ, Indyk HE. 2016. Analysis of vitamin D2 and vitamin D3 in fortified milk powders and infant and nutritional formulas by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: single-laboratory validation, first action 2016.05. *Journal of AOAC International* **99(5)**:1321-1330.

- Gkinali A-A, Matsakidou A, Vasileiou E, Paraskevopoulou A. 2022. Potentiality of *Tenebrio molitor* larva-based ingredients for the food industry: A review. *Trends in Food Science & Technology* **119**: 495-507.
- Gurram I, Kavitha MVS, Nagabhushnam MV, Bonthagara B, Reddy DN. 2017. Overview of validation, basic concepts and analytical method process validation. *Indo american journal of pharmaceutical sciences* **4(6)**:1665-1680.
- Grau T, Vilcinskas A, Joop G. 2017. Sustainable farming of the mealworm *Tenebrio molitor* for the production of food and feed. *Zeitschrift für Naturforschung C* **72(9-10)**:337-349.
- Christakos S, Li S, De La Cruz J, Bikle DD. 2019. New developments in our understanding of vitamin D metabolism, action and treatment. *Metabolism Clinical and Experimental* **98**:112-120.
- Jeanes YM, Hall WJ, Ellard S, Lee E, Lodge JK. 2004. The absorption of vitamin E is influenced by the amount of fat in a meal and the food matrix. *British Journal of Nutrition* **92(4)**:575-579.
- Jeon YH, Son YJ, Kim SH, Yun EY, Kang HJ, Hwang IK. 2016. Physicochemical properties and oxidative stabilities of mealworm (*Tenebrio molitor*) oils under different roasting conditions. *Food science and biotechnology* **25**:105-110.
- Karrar E, Ahmed IAM, Manzoor MF, Wei W, Sarpong F, Wang X. 2022. Lipid-soluble vitamins from dairy products: Extraction, purification, and analytical techniques. *Food Chemistry* **373**:131436.
- Kasper H. 2015. *Výživa v medicíně a dietetika*. Grada publishing. Praha.
- Kiyose C. 2021. Absorption, transportation, and distribution of vitamin E homologs. *Free Radical Biology and Medicine* **177**:226-237.
- Klouda P. 2003. *Moderní analytické metody*. Pavel Klouda. Ostrava.
- Kořínek M. 1999. *Zoologická zahrada*. RUBICO s.r.o. Olomouc.
- Kouřimská L, Adámková A. 2016. Nutritional and sensory quality of edible insects. *NFS Journal* **4**:22-26
- Kulma M, Petříčková D, Kurečka M, Kotíková Z, Táborský J, Michlová T, Kouřimská L. 2022. Effect of carrot supplementation on nutritional value of insects: a case study with Jamaican field cricket (*Gryllus assimilis*). *Journal of insects as food and feed* **8(6)**:621-629.
- Lumanlan JC, Williams M, Jayasena V. 2022. Edible insects: environmentally friendly sustainable future food source. *International Journal of Food Science and Technology* **57(10)**: 6317–6325.
- Mattioli S, Paci G, Fratini F, Dal Bosco A, Tuccinardi T, Mancini S. 2021. Former foodstuff in mealworm farming: Effects on fatty acids profile, lipid metabolism and antioxidant molecules. *LWT-Food science and technology* **147**:111644

- Mohamed EH. 2015. Determination of nutritive value of the edible migratory locust *Locusta migratoria*, Linnaeus, 1758 (Orthoptera: Acrididae). *Int. J. Adv. Pharm. Biol. Chem* **4**:144-148.
- Nováková L, Douša M. 2013. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi 2*. Michal Douša. Hradec Králové.
- Nowakowski AC, Miller AC, Miller ME, Xiao H, Wu X. 2022. Potential health benefits of edible insects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **62(13)**:3499-3508.
- Oonincx DGAB, Finke MD. 2021. Nutritional value of insects and ways to manipulate their composition. *Journal of Insects as Food and Feed* **7(5)**:639–659.
- Oonincx DGAB, Van der Poel AFB. 2011. Effects of Diet on the Chemical Composition of Migratory Locusts (*Locusta migratoria*). *Zoo biology* **30(1)**:9-16.
- Pennino M, Dierenfeld ES, Behler, JL. 1991. Retinol, alpha tocopherol, and proximate nutrient composition of invertebrates used as feed. *International Zoo Yearbook* **30(1)**:143-149.
- Penniston KL, Tanumihardjo SA. 2006. The acute and chronic toxic effects of vitamin A. *The American Journal of Clinical Nutrition* **83(2)**:191–201.
- Stöckl D, D'Hondt H, Thienpont LM. 2009. Method validation across the disciplines – Critical investigation of major validation criteria and associated experimental protocols. *Journal of Chromatography B* **887(23)**:2180-2190.
- Qian H, Sheng M. 1998. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D and E and pro-vitamin D in animal feeds by one-step extraction and 2 high-performance liquid chromatography analysis. *Journal of Chromatography A* **825(2)**:127-133.
- Raheem D, Raposo A, Oluwole OB, Nieuwland M, Saraiva A, Carrascosa C. 2019. Entomophagy: Nutritional, ecological, safety and legislation aspects. *Food Research International* 126:108672
- Ramos-Elorduy J, Pino JM, Prado EE, Perez MA, Otero JL, De Guevara OL. 1997. Nutritional value of edible insects from the state of Oaxaca, Mexico. *Journal of Food Composition and Analysis* **10(2)**:142–157.
- Robinson, WH. 2005. *Urban Insects and Arachnids: A Handbook of Urban Entomology*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Rumpold BA, Schlüter OK. 2013. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular nutrition and food research* **57(5)**:802-823.
- Sabolová M, Adámková A, Kouřimská L, Chrpová D, Pánek J. 2016. Minor lipophilic compounds in edible insects. *Potravinářstvo* **10**:400-406.
- Salama SM. 2020. Nutrient composition and bioactive components of the migratory locust (*Locusta migratoria*). *African Edible Insects as Alternative Source of Food, Oil, Protein and Bioactive Components* 231-239.

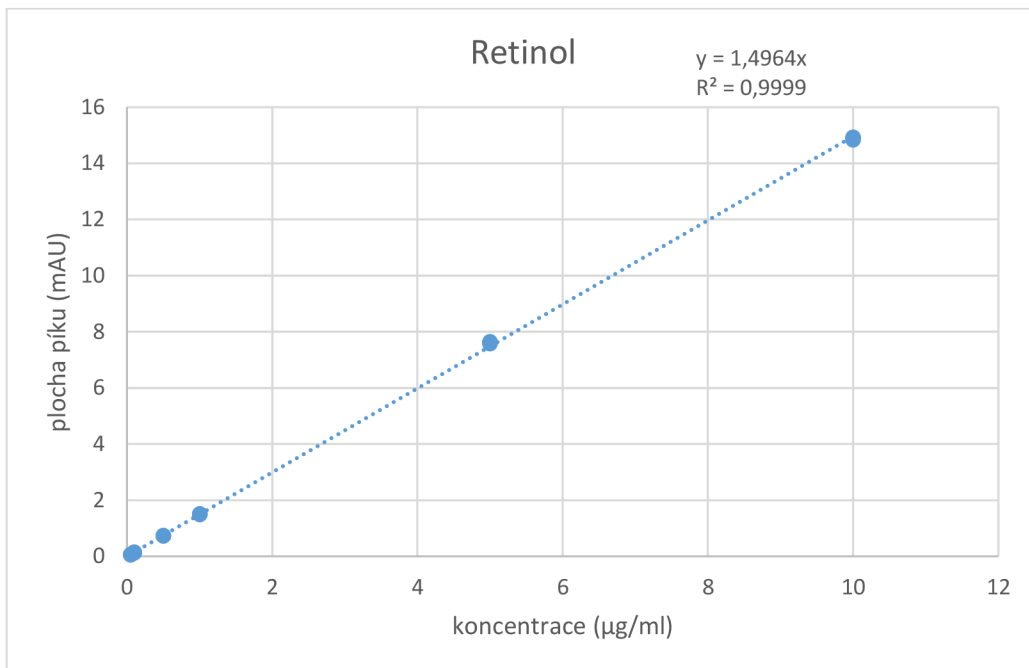
- Taverniers I, De Loose M, Van Bockstaele E. 2004. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry* **23(8)**:535-552.
- Testa M, Stillo M, Maffei G, Andriolo V, Gardois P, Zotti CM. 2017. Ugly but tasty: A systematic review of possible human and animal health risks related to entomophagy. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **57(17)**:3747-3759.
- Thompson JN, Hatina G. 1979. Determination of tocopherols and tocotrienols in foods and tissues by high performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography* **2(3)**: 327-344.
- Traber MG, Kayden HJ, Green JB, Green MH. 1986. Absorption of water-miscible forms of vitamin E in a patient with cholestasis and in thoracic duct-cannulated rats. *The American Journal of Clinical Nutrition* **44(6)**:914-923.
- Van Huis A, Van Itterbeeck J, Klunder H, Mertens E, Halloran A, Muir G, Vantomme P. 2013. Edible insects: future prospects for food and feed security. Food and agriculture organization of the united nations. Rome.
- Van Huis A. 2022. Edible insects: Challenges and prospects. *Entomological Research* **52(4)**: 161–177.
- Velíšek J. 1999. *Chemie potravin 2*. Osis. Tábor.
- Ververis E, Boué G, Poulsen M, Pires SM, Niforou A, Thomsen ST, Tesson V, Federighi M, Naska A. 2022. A systematic review of the nutrient composition, microbiological and toxicological profile of *Acheta domesticus* (house cricket). *Journal of Food Composition and Analysis* 104859.
- Weru J, Chege P, Kinyuru J. 2021. Nutritional potential of edible insects: a systematic review of published data. *International Journal of Tropical Insect Science* **41**:2015–2037.
- WHO, FAO. 2004. *Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition*. World Health Organization, Food and Agricultural Organization of the United Nations. Geneva, Switzerland.
- Xiaoming C, Ying F, Hong Z, Zhiyong C. 2010. Review of the nutritive value of edible insects. *Forest insects as food: humans bite back*:85-92. Bangkok, Thajsko.
- Yang J, Cleland GE, Organtini KL. 2017. Determination of Vitamin D and Previtamin D in Food Products. *Waters Corp* 1-8.
- Zempleni J, Suttie JW, Gregory III JF, Stover PJ. 2013. *Handbook of vitamins*. CRC Press. USA.
- Zhou K, Su L, Yu L. 2004. Phytochemicals and Antioxidant Properties in Wheat Bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52(20)**: 6108-6114.

9 Seznam použitých zkratk a symbolů

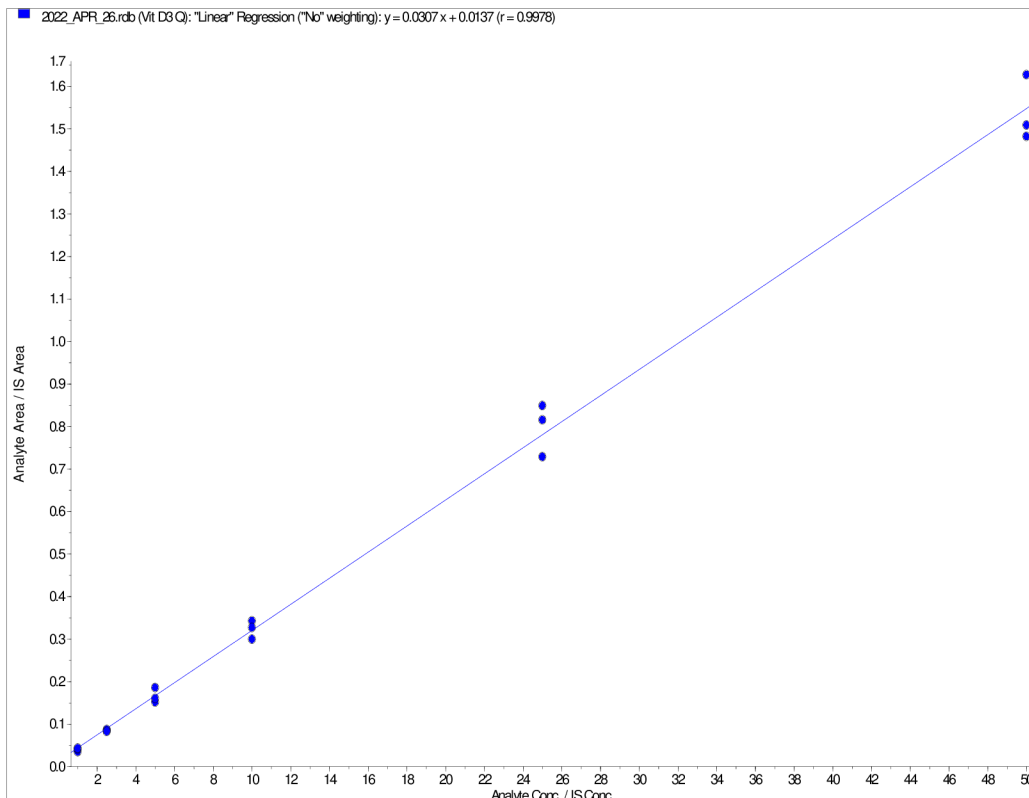
DAD	detektor diodového pole
D-A-CH	D-Německo; A-Rakousko; CH-Švýcarsko
ČZU	Česká zemědělská univerzita
EFSA	European Food Safety Authority (Evropský úřad pro bezpečnost potravin)
ESI	elektrosprejová ionizace
FAO	Food and Agriculture Organisation (Organizace pro výživu a zemědělství)
FLD	fluorescenční detektor
HPLC	high-performance liquid chromatography (vysokoučinná kapalinová chromatografie)
IU	international unit (mezinárodní jednotka)
LOD	limit of detection (limit detekce)
LOQ	limit of quantification (limit kvantifikace)
MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny
MS	hmotnostní spektrometrie
PTAD	4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
RP	reverzní fáze
SFA	nasycené mastné kyseliny
SIL	stable isotopically labeled (stabilní isotopicky značený)
UHPLC	ultra-high-performance liquid chromatography (ultra účinná kapalinová chromatografie)
UV/VIS	ultrafialovo-viditelná
WHO	World health organization (Světová zdravotnická organizace)

10 Samostatné přílohy

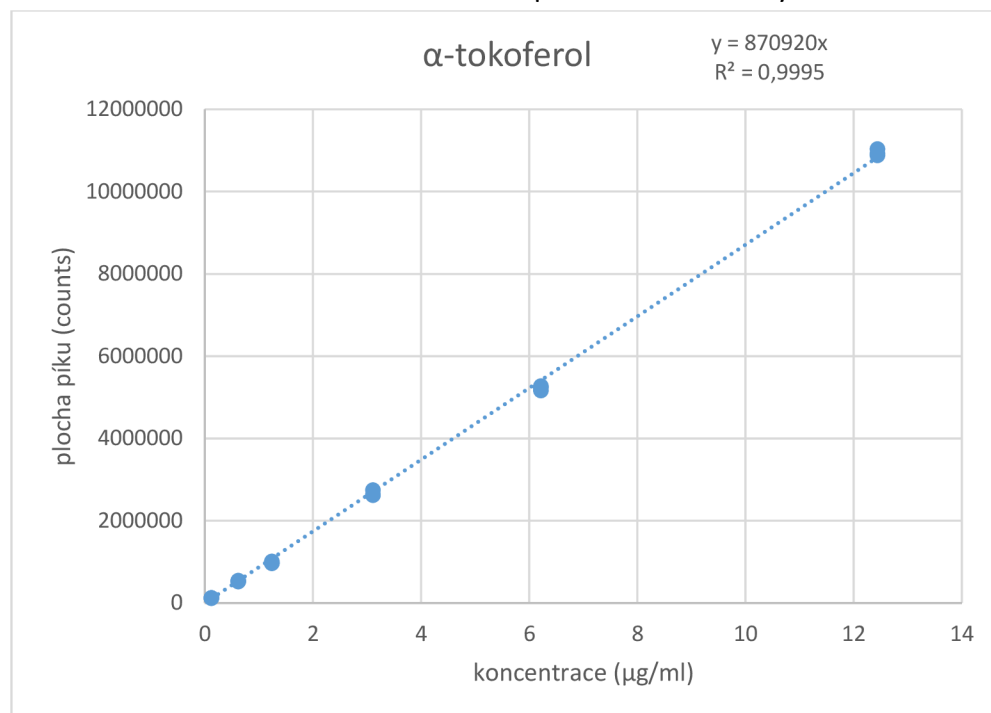
Příloha 1: Kalibrační křivka retinolu pro validaci metody



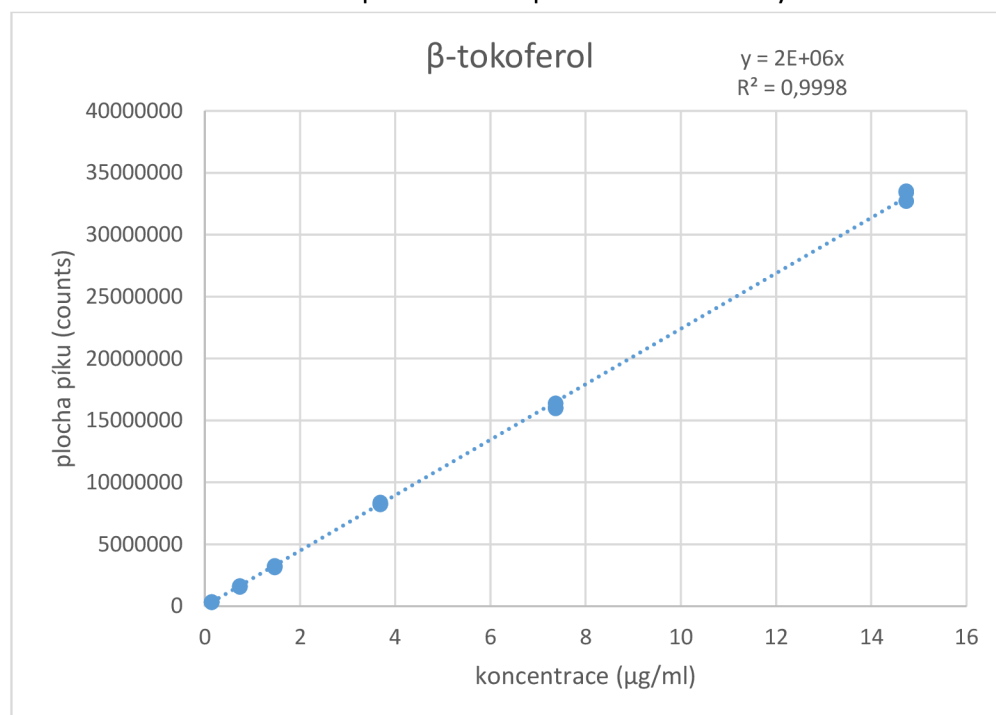
Příloha 2: Kalibrační křivka vitamínu D pro validaci metody



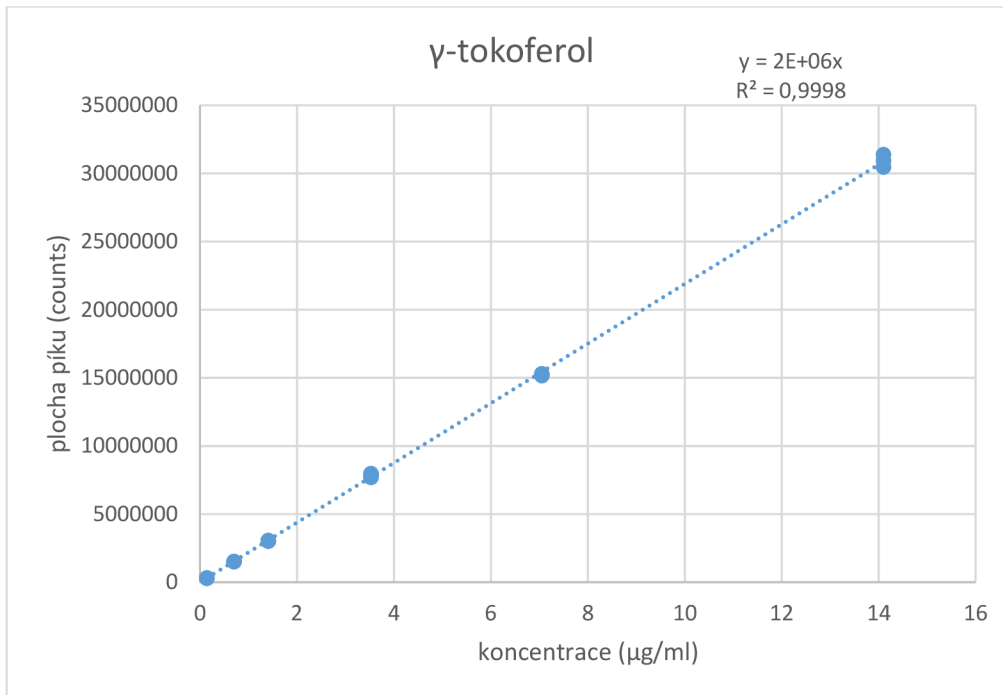
Příloha 3: Kalibrační křivka α -tokoferolu pro validaci metody



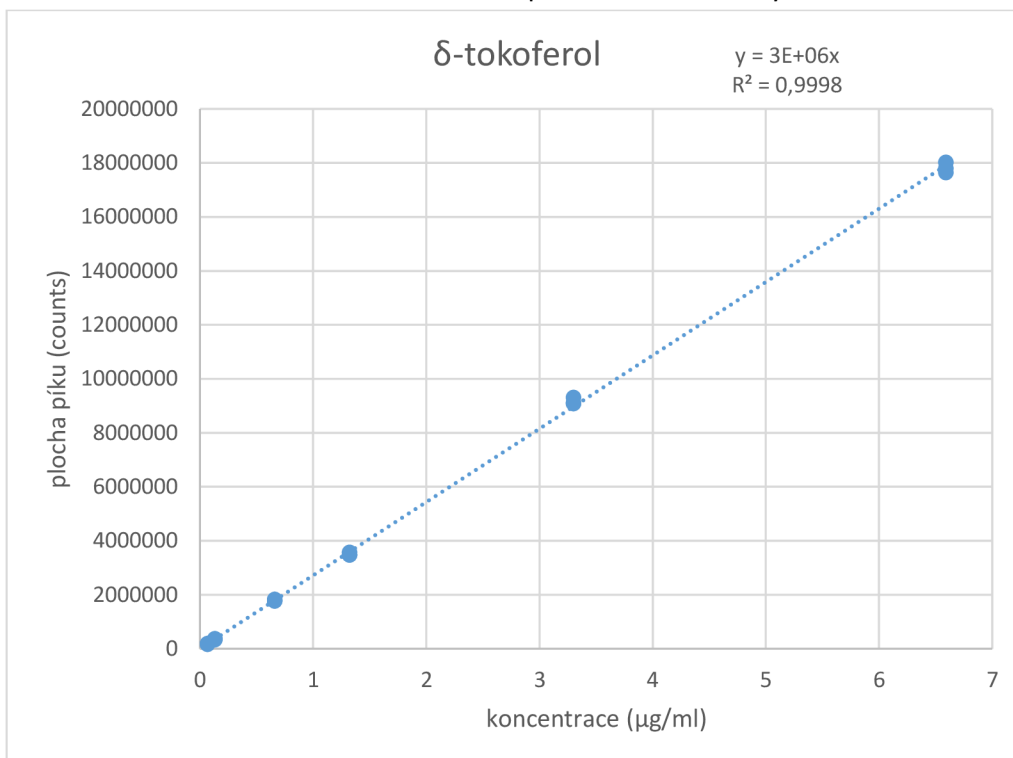
Příloha 4: Kalibrační křivka β -tokoferolu pro validaci metody



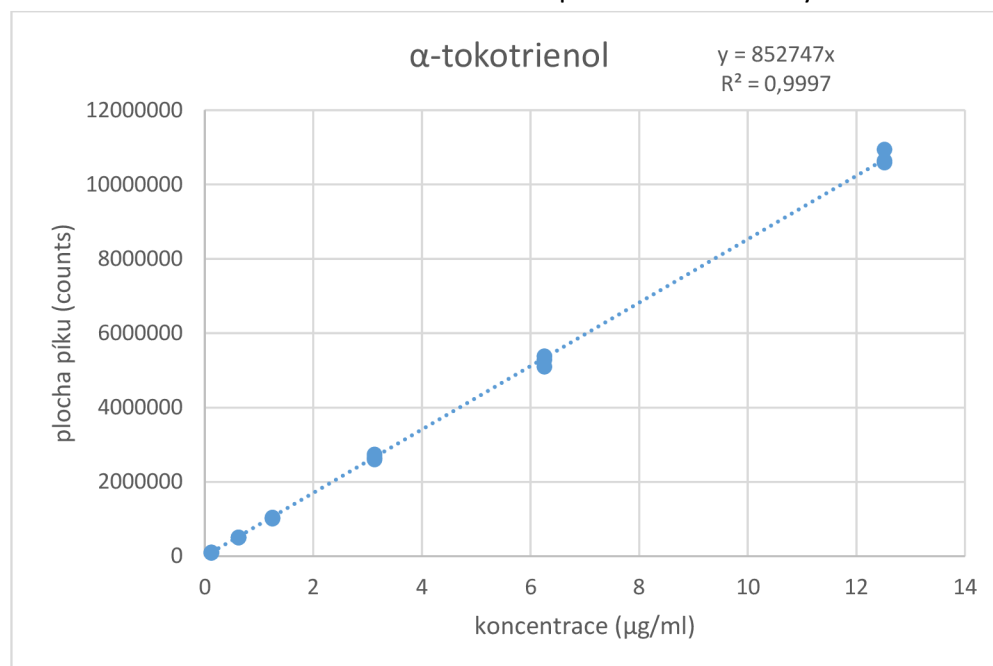
Příloha 5: Kalibrační křivka γ -tokoferolu pro validaci metody



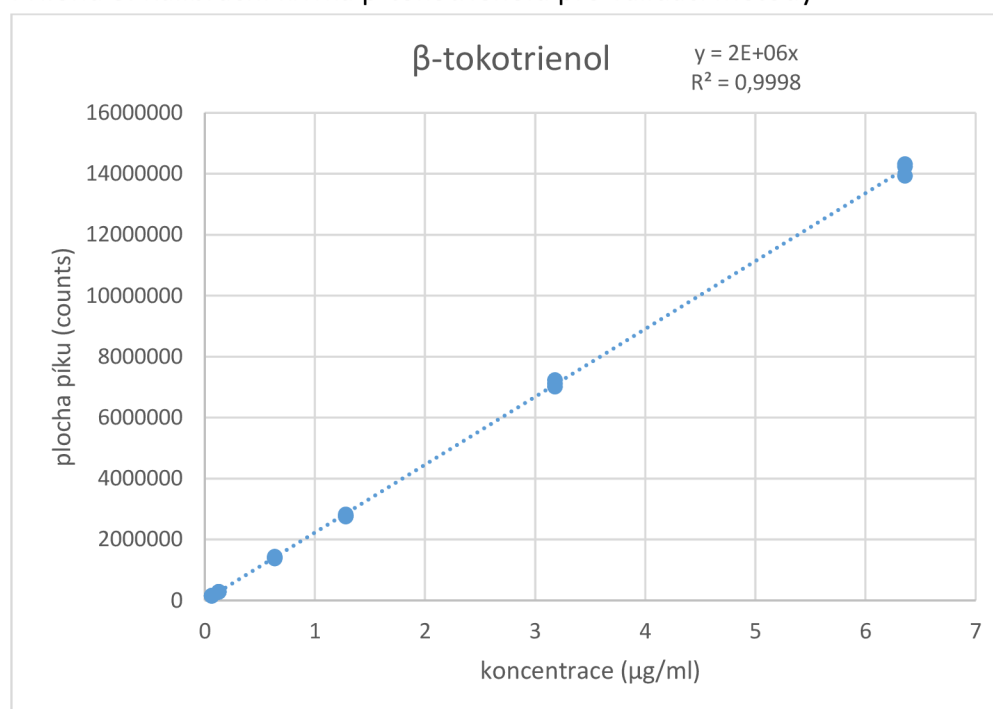
Příloha 6: Kalibrační křivka δ -tokoferolu pro validaci metody



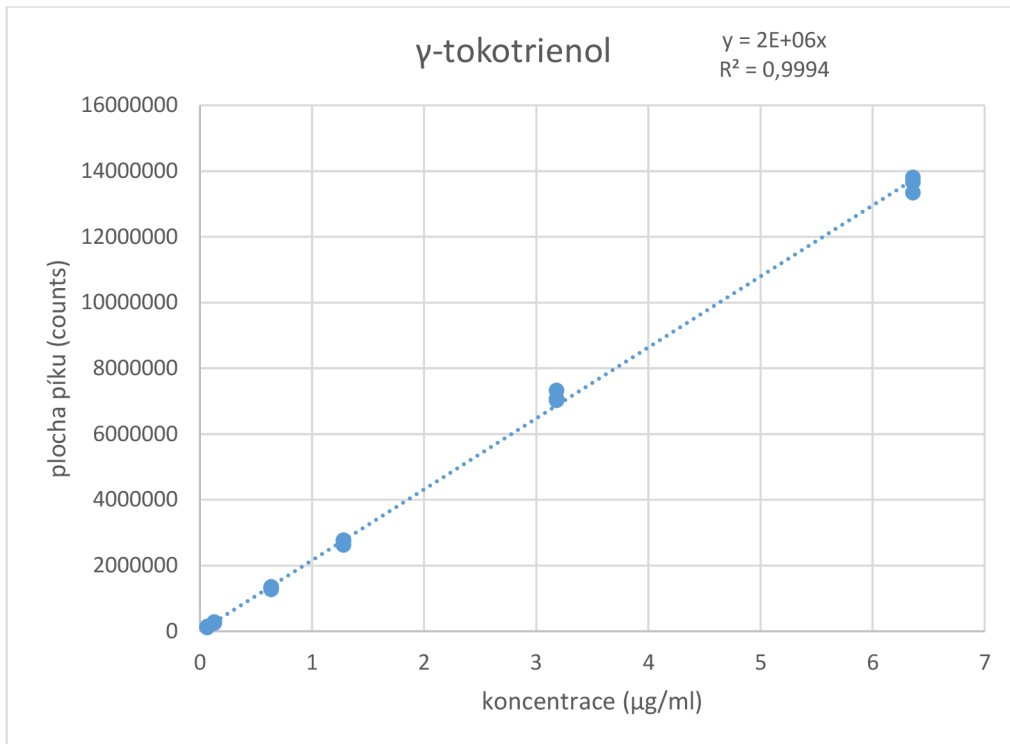
Příloha 7: Kalibrační křivka α -tokotrienolu pro validaci metody



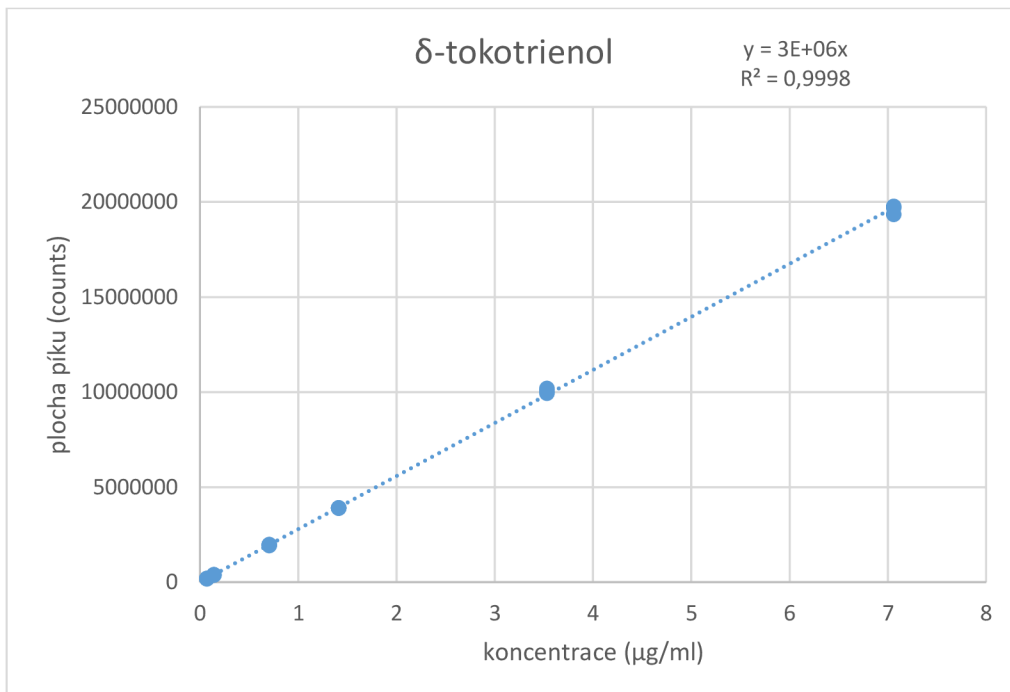
Příloha 8: Kalibrační křivka β -tokotrienolu pro validaci metody



Příloha 9: Kalibrační křivka γ -tokotrienolu pro validaci metody



Příloha 10: Kalibrační křivka δ -tokotrienolu pro validaci metody



Příloha 11: Výsledné p-hodnoty statistického vyhodnocení porovnání obsahu α -tokoferolu

Závislá: alfa-tokoferol	Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); alfa-tokoferol Nezávislá (grupovací) proměnná : druh hmyzu Kruskal-Wallisův test: $H(2, N=33) = 17,14290$ $p = ,0002$		
	Acheta domesticus R:24,667	Tenebrio molitor R:8,4167	Locusta migratoria R:18,222
Acheta domesticus		0,000115	0,392053
Tenebrio molitor	0,000115		0,064398
Locusta migratoria	0,392053	0,064398	

Příloha 12: Výsledné p-hodnoty statistického vyhodnocení porovnání obsahu β -tokoferolu

Závislá: beta-tokoferol	Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); beta-tokoferol Nezávislá (grupovací) proměnná : druh hmyzu Kruskal-Wallisův test: $H(2, N=33) = 27,22846$ $p = ,0000$		
	Acheta domesticus R:15,083	Tenebrio molitor R:27,500	Locusta migratoria R:5,5556
Acheta domesticus		0,004976	0,076343
Tenebrio molitor	0,004976		0,000001
Locusta migratoria	0,076343	0,000001	

Příloha 13: Výsledné p-hodnoty statistického vyhodnocení porovnání obsahu γ -tokoferolu

Závislá: gama-tokoferol	Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); gama-tokoferol Nezávislá (grupovací) proměnná : druh hmyzu Kruskal-Wallisův test: $H(2, N=33) = 27,30125$ $p = ,0000$		
	Acheta domesticus R:15,833	Tenebrio molitor R:27,167	Locusta migratoria R:5,0000
Acheta domesticus		0,012277	0,033186
Tenebrio molitor	0,012277		0,000001
Locusta migratoria	0,033186	0,000001	

Příloha 14: Výsledné p-hodnoty statistického vyhodnocení porovnání obsahu δ -tokoferolu

Skup. 1 vs. skup. 2	T-test pro nezávislé vzorky (delta-tokoferol) Pozn.: Proměnné byly brány jako nezávislé vzorky				
	F-poměr Rozptyly	p Rozptyly			
Acheta domesticus vs. Tenebrio molitor	15,60535	0,000074			
Skup. 1 vs. skup. 2	T-test pro nezávislé vzorky (delta-tokoferol) Pozn.: Proměnné byly brány jako nezávislé vzorky				
	Průměr skup. 1	Průměr skup. 2	Hodnota t	sv	p
Acheta domesticus vs. Tenebrio molitor	0,201376	0,307073	-6,83243	22	0,000001

Příloha 15: Výsledné p-hodnoty statistického vyhodnocení porovnání obsahu α -tokotrienolu

Závislá: alfa-tokotrienol	Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); alfa-tokotrienol Nezávislá (grupovací) proměnná : druh hmyzu Kruskal-Wallisův test: $H(2, N=33) = 28,29947$ $p = ,0000$		
	Acheta domesticus R:6,5000	Tenebrio molitor R:27,500	Locusta migratoria R:17,000
Acheta domesticus		0,000000	0,041385
Tenebrio molitor	0,000000		0,041385
Locusta migratoria	0,041385	0,041385	

Příloha 16: Výsledné p-hodnoty statistického vyhodnocení porovnání obsahu β -tokotrienolu

Závislá: beta-tokotrienol	Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); beta-tokotrienol Nezávislá (grupovací) proměnná : druh hmyzu Kruskal-Wallisův test: $H (2, N= 33) =28,29947$ $p =,0000$		
	Acheta domesticus R:6,5000	Tenebrio molitor R:27,500	Locusta migratoria R:17,000
Acheta domesticus		0,000000	0,041385
Tenebrio molitor	0,000000		0,041385
Locusta migratoria	0,041385	0,041385	