

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra analytické chemie**



**Analýza vitamínu D  
plynovou chromatografií**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:

Bc. Kateřina Opravilová

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

**Olomouc 2018**

# BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

<b>Autor:</b>	Bc. Kateřina Opravilová
<b>Název práce:</b>	Analýza vitamínu D plynovou chromatografií
<b>Typ práce:</b>	Diplomová
<b>Pracoviště:</b>	Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
<b>Vedoucí práce:</b>	doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.
<b>Rok odevzdání práce:</b>	2018

## **Anotace:**

Cílem předložené diplomové práce bylo vyvinout vhodnou metodu pro analýzu vitamínů D (D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub>) plynovou chromatografií.

Navržená metoda pro analýzu vitamínů D plynovou chromatografií zahrnovala alkalickou hydrolýzu, extrakci kapalina-kapalina a derivatizaci pomocí silylačního činidla *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu (BSTFA). Kvantitativní vyhodnocení získaných výsledků bylo provedeno metodou kalibrační křivky a metodou vnitřního standardu. Plynová chromatografie byla použita k zjištění koncentrace vitamínu D<sub>2</sub> v sedmi druzích hub, které byly podrobeny účinku UV záření za účelem zjistit, jaký vliv bude mít UV záření na obsah tohoto vitamínu v houbách. Ukázalo se, že zásadní vliv měla nejen doba expozice, ale i vlnová délka použitého UV záření. Ozářené vzorky hub tak obsahovaly podstatně více vitamínu D<sub>2</sub> než vzorky neozářených hub. Zmíněná technika byla také využita ke zjištění koncentrace vitamínu D<sub>3</sub> v jedenácti druzích potravin živočišného původu.

<b>Klíčová slova:</b>	houby, vitamin D, UV záření, plynová chromatografie
<b>Počet stran:</b>	61
<b>Počet příloh:</b>	0
<b>Jazyk:</b>	čeština

# BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

**Author:** Bc. Kateřina Opravilová  
**Title:** Analysis of vitamin D by gas chromatography  
**Type of thesis:** Master's  
**Department:** Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science,  
Palacký University Olomouc  
**Supervisor:** doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.  
**The year of submission:** 2018

## Annotation:

The aim of the submitted thesis was to develop a suitable method for the analysis of vitamins D (D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub>) by gas chromatography.

The proposed method for the analysis of vitamins D by gas chromatography included alkaline hydrolysis, liquid-liquid extraction and derivatization with silylation agent *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA). A quantitative evaluation of the obtained results was performed using the calibration curve method and the internal standard method. Gas chromatography was used to determine the concentration of vitamin D<sub>2</sub> in seven species of UV-exposed mushrooms to find out the effect of UV radiation on the content of this vitamin in mushrooms. It turned out that not only the exposure time but also the wavelength of the used UV radiation had a major effect. The irradiated mushrooms samples contained significantly more vitamin D<sub>2</sub> than samples of non-irradiated mushrooms. The technique was also used to determine the concentration of vitamin D<sub>3</sub> in eleven food of animal origin.

**Keywords:** mushrooms, vitamin D, UV radiation, gas chromatography  
**Number of pages:** 61  
**Number of appendices:** 0  
**Language:** czech

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Petra Bartáka, Ph.D. Veškeré použité literární prameny a informace, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má diplomová práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne .....

.....

Kateřina Opravilová

Velmi ráda bych poděkovala vedoucímu své diplomové práce, doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D., za odborné vedení, trpělivost a cenné rady v průběhu celé diplomové práce. Moje poděkování patří rovněž všem členům Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Poděkování patří i mé rodině a přátelům za jejich trpělivost a podporu.

Tato závěrečná práce byla finančně podpořena Interní grantovou agenturou UP (IGA\_PrF\_2017\_020 a IGA\_PrF\_2018\_027).

# OBSAH

<b>1. Úvod a cíle.....</b>	<b>10</b>
<b>2. Teoretická část .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Charakteristika hub .....</b>	<b>11</b>
2.1.1 Základní informace o houbách .....	11
2.1.2 Postavení hub mezi živými organismy .....	11
2.1.3 Systematické třídění hub.....	12
2.1.4 Stavba těla hub.....	12
2.1.5 Výživa a rozmnožování hub .....	14
<b>2.2 Chemické složení hub (makromycety) .....</b>	<b>14</b>
2.2.1 Bílkoviny a aminokyseliny .....	14
2.2.2 Lipidy.....	16
2.2.3 Sacharidy .....	17
2.2.4 Vitaminy .....	17
2.2.5 Minerální látky.....	17
2.2.6 Indolové alkaloidy .....	19
2.2.7 Látky zodpovědné za vůni, zápach a chuťové vlastnosti.....	20
2.2.8 Pigmenty hub .....	23
2.2.9 Toxiny makromycetů.....	23
2.2.10 Zdraví prospěšné látky v hubách .....	27
<b>2.3 Charakterizace vitaminů D.....</b>	<b>28</b>
2.3.1 Struktura a názvosloví .....	28
2.3.2 Fotobiologie a metabolismus .....	28
2.3.3 Fyziologie a výživa.....	30
2.3.4 Zdroje vitaminů D.....	30
2.3.5 Fotoisomery vitaminů D .....	31
2.3.6 Ostatní formy vitaminu D.....	31
<b>2.4 Analýza vitaminů D .....</b>	<b>32</b>
2.4.1 Úprava vzorků.....	32
2.4.1 Separační metody.....	33
2.4.2 Optické metody.....	36
2.4.3 Elektroanalytické metody .....	37

2.4.4 Kvantifikace vitaminů D.....	38
<b>3. Experimentální část .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Cíl práce.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2 Použité chemikálie .....</b>	<b>39</b>
<b>3.3 Přístrojové vybavení a pomůcky .....</b>	<b>40</b>
<b>3.4 Pracovní postup.....</b>	<b>41</b>
3.4.1 Vzorky hub .....	41
3.4.2 Vzorky potravin živočišného původu .....	41
3.4.3 Zmýdelnění a extrakce .....	42
3.4.4 Derivatizace .....	43
3.4.5 Analýza vzorků a vyhodnocení.....	43
<b>4. Výsledky a diskuze.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1 Optimalizace pracovního postupu.....</b>	<b>44</b>
4.1.1 Vzorky hub .....	44
4.1.2. Živočišné produkty .....	51
<b>4.2 Vyhodnocení výsledků .....</b>	<b>51</b>
<b>5. Závěr .....</b>	<b>58</b>
<b>6. Seznam použité literatury .....</b>	<b>59</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku
a. s.	Akciová společnost
BHT	Butylhydroxytoluen
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
CE	Kapilární elektroforéza
CV	Cyklická voltametrie
ČR	Česká republika
DBP	Protein vázající vitamin D
DPV	Diferenčně pulzní voltametrie
ESI	Ionizace elektrosprejem
FID	Plamenově ionizační detektor
GC	Plynová chromatografie
GCE	Elektroda ze skelného uhlíku
GC/MS	Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
GLC	Plynová rozdělovací chromatografie (chromatografie plyn-kapalina)
h	Hodina
HMDS	Hexamethyldisilazan
HP-5MS	Kolona od společnosti Agilent (tvořena 5% fenyl-polydimethylsiloxanem) s nízkou krvácivostí
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IČ	Infračervená spektroskopie
LC	Kapalinová chromatografie
LSD	Diethylamid kyseliny lysergové
MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie
min	Minuta
MS	Hmotnostní spektrometrie
m/z	V hmotnostním spektru se jedná o poměr hmota/náboj
Nd	Není detekováno
NMR	Nukleární magnetická rezonance
Obr.	Obrázek



p. a.	Označení čistoty chemikálií, chemikálie pro analytické účely
PC	Papírová chromatografie
PDA	Detektor a diodovým polem
RNA	Ribonukleová kyselina
SCE	Nasyčená kalomelová elektroda
SDS	Dodecylsulfát sodný
SFC	Superkritická fluidní chromatografie
SIM	Režim monitorování selektivních iontů
s. r. o.	Společnost s ručením omezeným
syn.	Synonymum
Tab.	Tabulka
TDAB	Tetradecylammonium bromid
TIC	Režim celkového iontového proudu
TLC	Tenkvrstevná chromatografie
UHPLC	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UK	Spojené království Velké Británie a Severního Irska
UPLC	Ultraúčinná kapalinová chromatografie
USA	Spojené státy americké
UV	Ultrafialové (záření)
UVA	Ultrafialové záření o vlnové délce 320–400 nm
UVB	Ultrafialové záření o vlnové délce 280–320 nm
UVC	Ultrafialové záření o vlnové délce pod 280 nm
Vit.	Vitamin
v/v	Poměr objem/objem

# 1. ÚVOD A CÍLE

Vitamin D se obecně řadí mezi lipofilní vitaminy neboli vitaminy rozpustné v tucích a chemicky se rozlišuje hlavně na vitamin D<sub>2</sub> (ergokalciferol) a vitamin D<sub>3</sub> (cholecalciferol) [1]. Jedná se o steroidní prohormony, z nichž metabolickými pochody v těle vzniká hormon zvaný kalcitriol [2]. Tato sloučenina významně ovlivňuje regulaci hladiny vápníku a fosforu v krvi nezbytných pro správnou stavbu kostí. Má také důležitou úlohu při diferenciaci buněk, v imunitním a cévním systému [1].

Vitamin D<sub>3</sub> se ve velké míře vytváří v kůži po expozici UV zářením (sluneční či umělé). Tento způsob je však obtížně realizovatelný v zimních měsících, a proto je obecně vhodnou alternativou přijímání vitaminů D potravou. Přírodním zdrojem vitaminu D<sub>2</sub> jsou především houby, které se řadí mezi potraviny s nízkou kalorickou hodnotou, a jsou tak vítanou složkou redukčních diet. Mezi hlavní přírodní zdroje vitaminu D<sub>3</sub> patří potraviny živočišného původu, jako je například maso a játra mořských ryb, žloutek, mléko a jiné produkty. Celkově však většina potravin obsahuje malé množství vitaminů D, a z toho důvodu se v současnosti přistupuje k fortifikaci čili obohacení potravin o tyto vitaminy [1].

Pro stanovení vitaminů D v potravinách je v dnešní době upřednostňována zejména technika kapalinové chromatografie [3]. Technika plynové chromatografie byla pro uvedené vitaminy studována především v 60. a 70. letech 20. století. Pro své omezené možnosti však byla postupně nahrazována jinými analytickými metodami. V dosud popsané vědecké literatuře je proto známo poměrně málo informací o využití této separační techniky pro stanovení vitaminů D v různorodých potravinových maticích [4].

Cílem předložené diplomové práce bylo ověřit, jaké jsou aktuální možnosti plynové chromatografie při analýze vitaminů D v rozmanitých potravinových maticích pomocí současných vědeckých poznatků a dostupného vybavení. Pro stanovení vitaminů D bylo důležité nalézt nejen vhodný způsob zpracování příslušných vzorků, ale také parametry analýzy GC/MS a potřebnou kvantifikační metodu.

## **2. TEORETICKÁ ČÁST**

Teoretická část předložené diplomové práce je rozdělena na tři dílčí části. V první části je stručně shrnuta základní charakteristika hub, navazující druhá část pojednává o jejich chemickém složení. Třetí část je zaměřena na charakterizaci a stanovení vitaminů D v rozmanitých matricích pomocí instrumentálních metod.

### **2.1 Charakteristika hub**

#### **2.1.1 Základní informace o houbách**

Houby jsou jednobuněčné nebo mnohobuněčné stélkaté organismy, které obsahují pravá buněčná jádra, a jsou tak řazeny mezi eukaryota [5].

Houby se dělí na makromycety neboli houby viditelné okem a na mikromycety, které lze pozorovat pod mikroskopem. Pro člověka mají makromycety význam především v kulinářství a lékařství [6]. Mikromycety našly svoje uplatnění nejen v potravinářství, ale také v mikrobiologii a lékařství, a to při výrobě rozličných produktů jako jsou antibiotika, bílkoviny, enzymy, farmaceutické přípravky, fungicidy, hormony a organické kyseliny [5].

#### **2.1.2 Postavení hub mezi živými organismy**

V minulosti byly houby řazeny mezi rostliny, v současné době jsou považovány za samostatnou říši [5].

Houby na rozdíl od rostlin neobsahují chlorofyl, nejsou tak schopné využívat energii slunečního záření pro tvorbu organických sloučenin. Stejně jako živočichové jsou řazeny mezi heterotrofní organismy, přijímají živiny z prostředí ve formě organických látek [5].

Dalším podstatným znakem, kterým se houby liší od rostlin, jsou zásobní, stavební a transportní látky. U rostlin je hlavní zásobní látkou škrob, zatímco u hub jsou to glykogen a tuky. Základní stavební složkou buněčné stěny hub je chitin, kdežto u rostlin je to celulóza. Cukry jsou u rostlin transportovány ve formě glukosy, fruktosy a sacharosy, u hub pak ve formě cukerných alkoholů (mannitol a arabitol) a disacharidu trehalosy [5].

### 2.1.3 Systematické třídění hub

V současnosti používané systematické uspořádání hub navrhl holandský mykolog J.A. von Arx v roce 1968. Vzhledem k tomu, že jsou stále nalézány nové druhy hub, není tento systém ještě zdaleka kompletní [7].

V různých informačních zdrojích se liší dělení říše hub na jednotlivá oddělení. Zapřičiňuje to pravděpodobně snaha odborníků o neustálé oddělování a přejmenování jednotlivých oddělení, tříd, řádů, čeledí, rodů, sekcí a druhů [8]. Níže uvedený seznam představuje jednu z doposud používaných podob klasifikací [5]:

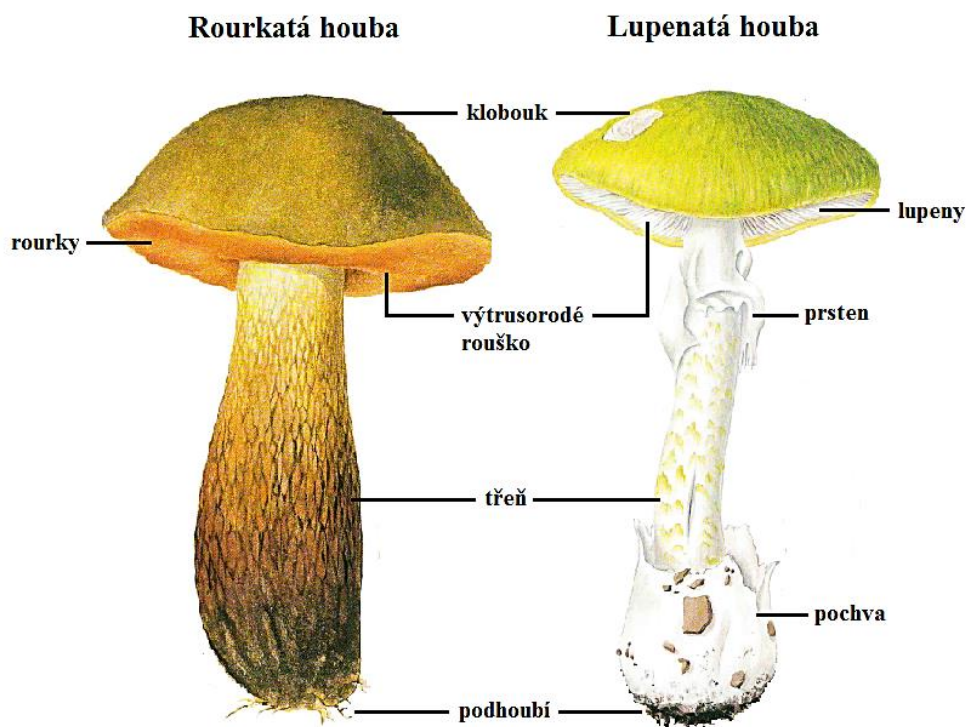
- říše: Houby (*Fungi*)
  - oddělení: Chytridiomycety (*Chytridiomycota*)
  - oddělení: Mikrosporidie (*Microsporidiomycota*)
  - oddělení: Houby spájivé (*Zygomycota*)
  - oddělení: Houby vřeckovýtrusné (*Ascomycota*)
  - oddělení: Houby stopkovýtrusné (*Basidiomycota*)

### 2.1.4 Stavba těla hub

Tělo hub tvoří stélka, která má většinou vláknitou buněčnou stavbu. Může být jak jednobuněčná, tak i mnohobuněčná s délkou až několik desítek metrů. Na rozdíl od rostlin se však nedělí na stonek, list a pravá pletiva [7].

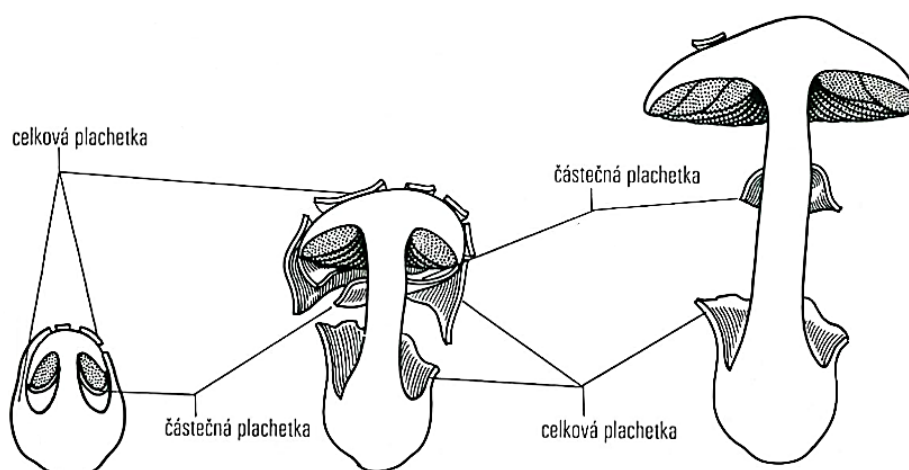
U většiny hub tvoří stélku mikroskopická vzájemně propojená a různě větvená vlákna, která se nazývají hyfy. Tato jemná vlákna mohou tvořit řidší nebo hustší spleť, tzv. podhoubí (*mycelium*). Jedná se o bílou vláknitou strukturu pod zemí, která zajišťuje výměnu látek a energie. Jak již bylo zmíněno, jako makromycety jsou označovány houby, které vytvářejí makroskopické plodnice, jež jsou viditelné pouhým okem. Plodnice, jejíž hlavním úkolem je rozmnožování, vyrůstá ve většině případů z podhoubí nad zemským povrchem a je dělena na klobouk a třeň (Obr. 1) [7].

Výtrusorodé rouško, obsahující výtrusy (rozmnožovací tělíska), se nachází na spodní části klobouku v rourkách nebo na lupenech, ostnech či lištnách [9].



**Obr. 1:** Stavba těla rourkaté a lupenaté houby [8]

Klobouk je nesen třeněm neboli nohou, na které lze u některých druhů hub spatřit prsten. Jedná se o zbytky částečné plachetky, což je původní ochranný obal, který chrání rourky nebo lupeny s výtrusy. U některých druhů hub je ve spodní části třeně viditelná pochva, což je zbytek celkové plachetky (Obr. 2). Zbytky této plachetky lze zaznamenat i na povrchu klobouku, a to ve formě útržků [9].



**Obr. 2:** Stavba těla lupenaté houby s částečnou a celkovou plachetkou [9]

## 2.1.5 Výživa a rozmnožování hub

Houby přijímají živiny ve formě organických látek, a řadí se tak mezi heterotrofní organismy. Jejich způsob výživy je buď saprotrofní, nebo se může jednat o parazitismus či o symbiózu [5].

Saprofytické neboli hniložijné houby získávají živiny rozkladem odumřelých zbytků těl živočišného či rostlinného původu, jsou tedy řazeny mezi rozkladače. Obvykle zahajují rozklad mrtvých těl živočichů a rostlin, který následně dokončují bakterie [8].

Parazitické houby získávají organické látky z živých organismů, převážně z rostlin, ale i živočichů, včetně člověka. Svou činností uvedené organismy oslabují, způsobují jim různá onemocnění, případně je i ničí [8].

Symbiotické houby získávají organické látky rovněž z živých organismů, avšak jim neškodí. Z tohoto spojení mají obě zúčastněné strany užitek [10].

Houby mají schopnost se rozmnožovat jak pohlavně, tak i nepohlavně. Jejich způsob rozmnožování je poměrně složitý a liší se podle jednotlivých systematických skupin [5].

## 2.2 Chemické složení hub (makromycety)

V literatuře lze nalézt rozdílné údaje týkající se chemického složení hub. Odpařením vody z plodnic při teplotě do 104 °C až do konstantní hmotnosti je získána sušina, v níž je možné stanovit všechny základní složky. Spálením sušiny při teplotě 500–560 °C zůstane popel, jenž obsahuje pouze minerální látky. Čerstvé plodnice obsahují přibližně 90 % vody. V sušině, která tvoří zbývajících 10 %, se nachází 4–35 % bílkovin, 1,5–5 % lipidů, okolo 60 % sacharidů a 4–12 % minerálních látek [5].

### 2.2.1 Bílkoviny a aminokyseliny

Obsah bílkovin v sušině se pohybuje v rozmezí 4–35 % a je ovlivněn řadou faktorů, především druhem houby, fází jejího vývoje a také částí plodnice [5].

Houby zpravidla obsahují více bílkovin než zelenina, ve srovnání s masem je však jejich obsah výrazně nižší (Tab. I) [8].

**Tab. I:** Obsah bílkovin ve vybraných druzích hub, masa a zeleniny [8]

Surovina	Obsah bílkovin (%)
hřib smrkový ( <i>Boletus edulis</i> )	5,39
liška obecná ( <i>Cantharellus cibarius</i> )	2,64
hovězí maso	14,50
vepřové maso	21,00
brambory	2,00
mrkev	1,20

Bílkoviny jsou složeny z aminokyselin, z nichž pro člověka mají význam zejména ty esenciální. Jedná se o takové aminokyseliny, které si živočišný organismus nedokáže sám syntetizovat a získává je pouze potravou [5]. V houbách jsou sice obsaženy všechny esenciální aminokyseliny, avšak obsah některých z nich není dostatečný. Mimo jiné lze v houbách nalézt i značné množství kyseliny glutamové a asparagové, tyrosinu a dalších aminokyselin (Tab. II) [11].

**Tab. II:** Obsah některých aminokyselin ve vybraných druzích syrových hub [12]

Aminokyselina	Obsah aminokyselin (mg/100 g)		
	hlíva ústříčná ( <i>Pleurotus ostreatus</i> )	pečárka dvouvýtrusá ( <i>Agaricus bisporus</i> )	houževnatec jedlý ( <i>Lentinula edodes</i> )
fenylalanin	111	107	91
isoleucin	82	91	79
leucin	139	153	133
lysin	126	143	122
methionin	35	33	29
threonin	106	111	98
valin	112	121	124
arginin	179	116	127
histidin	65	58	56
alanin	124	159	104
cystein	28	23	24
glycin	97	106	91
kyselina asparagová	293	275	190
kyselina glutamová	364	431	355
prolin	93	104	90
serin	110	108	103
tyrosin	219	283	265

## 2.2.2 Lipidy

Lipidy jsou v sušině hub zastoupeny v poměrně malém množství (1,5–5 %) a mají především úlohu rezervních látek. Jedná se hlavně o glykolipidy, steroidy, lipoproteiny a glyceridy, méně pak o fosfolipidy [13]. U hub se ve značném množství vyskytují i jiné lipofilní látky, zejména steroly. Nejvýznamnějším steroidem je ergosterol, provitaminová forma vitamínu D<sub>2</sub>, v malé míře lze nalézt i fungisterol [5].

Význam pro člověka mají především mastné kyseliny (Tab. III). V houbových tucích jsou nejhojnější kyseliny palmitová, stearová a olejová, esenciální mastné kyseliny linolová a  $\alpha$ -linolenová se vyskytují v množství obdobném či nižším. Dále se u některých druhů hub vyskytují v různém množství i jiné, méně často zmiňované, nasycené a nenasycené mastné kyseliny [14].

**Tab. III:** Obsah mastných kyselin ve vybraných druzích sušených hub [14]

Mastná kyselina	Uhlíkový skelet	Obsah mastných kyselin (%)	
		chřapáč kadeřavý ( <i>Helvella crispa</i> )	lišák zprohýbaný ( <i>Hydnum repandum</i> )
<b>Nasycené mastné kyseliny</b>			
kyselina laurová	C12:0	Nd	5,3
kyselina myristová	C14:0	Nd	1,6
kyselina pentadecylová	C15:0	Nd	0,8
kyselina palmitová	C16:0	10,6	15,7
kyselina heptadecylová	C17:0	0,7	0,3
kyselina stearová	C18:0	Nd	0,9
kyselina arachová	C20:0	0,4	Nd
kyselina behenová	C22:0	0,1	Nd
kyselina lignocerová	C24:0	1,0	Nd
<b>Nenasycené mastné kyseliny</b>			
kyselina myristolejová	C14:1( <i>cis</i> - $\Delta^9$ )	Nd	0,5
kyselina palmitolejová	C16:1( <i>cis</i> - $\Delta^9$ )	Nd	0,7
kyselina olejová	C18:1( <i>cis</i> - $\Delta^9$ )	22,7	26,4
kyselina elaidová	C18:1( <i>trans</i> - $\Delta^9$ )	0,4	0,3
kyselina eikosenová	C20:1( <i>cis</i> - $\Delta^{11}$ )	1,1	Nd
kyselina linolová	C18:2( <i>cis</i> - $\Delta^{9,12}$ )	62,7	27,2
kyselina $\alpha$ -linolenová	C18:3( <i>cis</i> - $\Delta^{9,12,15}$ )	0,3	20,3

Nd – Není detekováno.

Složení mastných kyselin je uvedeno jako % všech mastných kyselin.



### 2.2.3 Sacharidy

V houbách se vyskytují všechny typy sacharidů, a to monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy. Celkový obsah sacharidů se v sušině hub pohybuje okolo 60 % [5].

Mezi monosacharidy obsažené v houbách se řadí pentosy (arabiosa, ribosa, xylosa), deoxysacharidy (methylpentosy, fukosa a rhamnosa) a v neposlední řadě hexosy (galaktosa, glukosa, manosa a fruktosa) [15].

V houbách se též vyskytují disacharidy, jako je sacharosa, maltosa a především trehalosa. Trehalosa se nachází ve větším množství v mladých plodnicích, v dospělých plodnicích je obsažena méně nebo vůbec, jelikož dochází k její hydrolyze na glukosu [15].

Polysacharidy jsou důležité jak pro houby, tak i pro člověka [5]. Nejvýznamnějšími polysacharidy jsou chitin, chitosan, glykogen a glukany [15]. Houbám slouží jako stavební materiál (chitin a glukany) a zásobní látky (glykogen). Chitin a glukany jsou pro člověka dieteticky důležité jako vláknina a  $\beta$ -glukany navíc ještě svým léčebným potenciálem [5].

Významnou složku hub tvoří také cukerné alkoholy (arabitol, erythritol, mannitol, sorbitol a volemitol) a další sacharidy [15].

### 2.2.4 Vitaminy

Přítomnost a množství vitaminů se odvíjí dle jednotlivých druhů hub. V houbách lze nalézt jak vitaminy rozpustné ve vodě (vitaminy B a C), tak i ty rozpustné v tucích (vitaminy D a E). U některých druhů hub byl též nalezen prekurzor vitamínu A, tzv. provitamin A [6].

V literatuře jsou často údaje o množství vitaminů v houbách značně nadsazené. V případě vitaminů B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> a vitamínu C se jedná řádově o jednotky miligramů na 100 g syrových hub. U dalších vitaminů skupiny B (B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>7</sub>, B<sub>9</sub> a B<sub>12</sub>) a vitamínu D<sub>2</sub>, jehož prekurzorem je ergosterol, to mohou být desítky mikrogramů na 100 g syrových hub [5, 16].

### 2.2.5 Minerální látky

Minerální látky tvoří zhruba 4–12 % sušiny. Jsou součástí popelovin, jež představují celkový obsah minerálních látek v houbové biomase [5]. Makromycety mají schopnost akumulovat minerály z růstového média do plodového těla neboli plodnice. Na akumulaci má vliv druh houby, morfologická část plodnice, vývojové stádium a věk mycelií [17].

Mezi majoritní minerální prvky se řadí draslík, fosfor, síra, chlor, hořčík, vápník a sodík (Tab. IV) [16].

**Tab. IV:** Obsah minerálních prvků v sušených houbách [16]

Prvek	Obsah (g/kg)
draslík	20–40
fosfor	5–10
síra	1–6
chlor	1–6
hořčík	0,8–1,8
vápník	0,1–0,5
sodík	0,1–0,4

V houbách jsou ve stopových množstvích přítomny i další minerální látky, například železo, měď, selen atd. Houby však mohou ze svého okolí vstřebávat i některé nežádoucí prvky, včetně těch jedovatých. Mezi jedovaté prvky patří zejména rtuť, kadmium, arsen, chrom, olovo, cesium ( $^{137}\text{Cs}$ ) aj. (Tab. V). Z toho důvodu není vhodné sbírat houby ve spádových oblastech škodlivých emisí elektráren, chemických či hutních závodů [7].

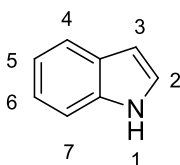
**Tab. V:** Obsah stopových prvků u sušených hub rostoucích v neznečištěných oblastech [16]

Prvek	Obsah (mg/kg)	Kumulující druhy a rody
antimon	<0,1	různé druhy klouzků ( <i>Suillus</i> )
arsen	0,5–5	lakovka ametystová ( <i>Laccaria amethystea</i> )
cesium	0,5–10	klouzek obecný ( <i>Suillus luteus</i> )
hliník	20–150	muchomůrka růžovka ( <i>Amanita rubescens</i> )
chrom	0,5–5	smrž vysoký ( <i>Morchella elata</i> )
jód	0,07–0,5	bedla vysoká ( <i>Macrolepiota procera</i> )
kadmium	1–5	různé druhy pečárek ( <i>Agaricus</i> )
kobalt	<0,5	liška obecná ( <i>Cantharellus cibarius</i> )
mangan	10–60	hřib smrkový ( <i>Boletus edulis</i> ), bedla vysoká ( <i>Macrolepiota procera</i> )
měď	20–100	bedla vysoká ( <i>Macrolepiota procera</i> )
nikl	1–15	hnojník obecný ( <i>Coprinus comatus</i> )
olovo	<1–5	některé saprofytické druhy
rtuť	<0,5–5	hřib smrkový ( <i>Boletus edulis</i> ), hřib borový ( <i>Boletus pinophilus</i> )
rubidium	desítky–stovky	čeleď hřibovité ( <i>Boletaceae</i> )
selen	<2–20	hřib smrkový ( <i>Boletus edulis</i> )
stříbro	<10	bedla vysoká ( <i>Macrolepiota procera</i> )
vanad	<0,5	hnojník obecný ( <i>Coprinus comatus</i> )
zinek	25–200	pýchavka obecná ( <i>Lycoperdon perlatum</i> )
železo	50–300	klouzek obecný ( <i>Suillus luteus</i> )

## 2.2.6 Indolové alkaloidy

Je známo, že houby produkují více než 140 přírodních produktů s indolovým heterocyklem. Zaměření na indolové alkaloidy je v této práci opodstatněné vzhledem k jejich široké aplikovatelnosti. Tyto látky slouží jako léčiva, vykazují antioxidační účinky, lze je využít jako pigmenty. Indolový skelet (Obr. 3) je též základem látek odpovědných za chuťové vlastnosti, vůni a zápach hub. Kromě zdraví prospěšných látek, je však tento skelet součástí i řady toxických látek obsažených v houbách [18].

Indolové alkaloidy lze rozdělit do 6 skupin, a to na jednoduché indoly, indolaminy, bisindoly,  $\beta$ -karboliny, pyrrolochinoliny a peptidy [18].



**Obr. 3:** Struktura indolu [18]

Mezi zástupce jednoduchých indolů patří například kyselina 5-hydroxyindol-3-octová, dále pak indol-3-acetonitril a indol-3-karbaldehyd, které jsou proslulé svými výraznými a nepříjemnými pachy. Za pachy fekální povahy jsou odpovědné především indol, skatol a 3-chlorindol [18].

Do skupiny indolaminů se řadí například sloučeniny tryptamin, serotonin, melatonin, bufotenin, které se nacházejí v rozmanitých druzích hub. Tyto indolaminy vykazují aktivitu v centrální nervové soustavě [18]. U serotoninu a melatoninu se například uvádí, že splňují úlohu neurotransmiterů, mají antioxidační a protirakovinné účinky, působí proti stárnutí a podílejí se na koagulaci krve [19].

Indolový alkaloid psilocin byl nalezen v houbách rodu lysohlávky (*Psilocybe*), které vykazují bioaktivitu podobnou diethylamidu kyseliny lysergové (LSD), harmoninu a jiným psychoaktivním tryptaminům. V houbách tohoto rodu, byl též nalezen fosforylovaný derivát psilocybin a vedlejší složky baeocystin a norbaeocystin [18].

Bisindoly patří mezi sloučeniny, které se skládají ze dvou monomerních indolových alkaloidových jednotek. Jsou mnohem účinnější s ohledem na svou biologickou aktivitu než jejich odpovídající monomerní jednotky [20]. Mezi zástupce 2,2'-bisindolin-3,3'-dionů se řadí peronatiny A a B. Jedná se o sloučeniny, které byly izolovány z penízovky hřebílkaté (*Gymnopus peronatus*) [18].

Sloučeniny harman a norharman, jež náleží mezi  $\beta$ -karbolinové deriváty, produkuje šňavňatka slonovinová (*Hygrophorus eburneus*). Jedná se o tremorgenní neurotoxiny, které působí jako inhibitory monoaminoxidázy [18].

Pyrrolochinolinové sloučeniny byly izolovány jako molekuly pigmentu u hub z rodu helmovka (*Mycena*). Bylo zjištěno, že helmovka krvonohá (*Mycena haematopus*) v případě poškození produkuje jasně červenou tekutinu. Za její zbarvení jsou zodpovědná červená barviva, především mycenaarubiny D–F, hematopodin a hematopodin B [18].

Cyklické peptidy, které jsou produkovány houbami rodu muchomůrka (*Amanita*), lze rozdělit do tří skupin, a to na amatoxiny, falotoxiny a virotoxiny. Amatoxiny jsou bicyklické oktapeptidy, které působí jako selektivní inhibitory RNA polymerázy II. Úzce příbuzné falotoxiny tvoří skupinu bicyklických peptidů, které poškozují jaterní buňky. Virotoxiny jsou monocyklické peptidy, které indukují hemoragickou jaterní nekrózu u myši. Falotoxiny a virotoxiny jsou podstatně méně toxické než výše zmíněné amatoxiny [18].

### 2.2.7 Látky zodpovědné za vůni, zápach a chuťové vlastnosti

Za vůni či zápachem jednotlivých druhů hub nestojí zpravidla jen jedna sloučenina, ale obvykle se jedná o kombinaci různých látek [5].

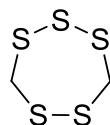
Z chemického hlediska se jedná o deriváty oktanu a oktenu (alkoholy a estery), dále o terpeny, aldehydy, ketony, karboxylové kyseliny, laktony, heterocyklické sloučeniny, sloučeniny síry a další [1]. Ze všech osmiuhlíkatých sloučenin je nejvíce zastoupen okt-1-en-3-ol [5]. Vyskytuje se ve dvou opticky aktivních formách (Obr. 4), přičemž převládající je (*R*)-okt-1-en-3-ol neboli houbový alkohol. Druhý isomer (*S*)-okt-1-en-3-ol zapáchá především po plísni a trávě [21].



**Obr. 4:** Struktura (*S*)-okt-1-en-3-olu (vlevo) a (*R*)-okt-1-en-3-olu (vpravo) [5]

Makroskopické houby (makromycety) mohou mít mnoho zajímavých vůní a pachů, a to od výrazných anýzových, ovocných, okurkových, česnekových až po moučné pachy. Za hořkomandlovou vůni žampionu mandlového (*Agaricus subrufescens*) je zodpovědný benzaldehyd a jeho deriváty. Specifická vůně houževnatce jedlého (*Lentinus edodes*) je připisována sloučeninám síry [21]. Z tohoto druhu houby byla izolována látka s výrazným

aroma nazývaná lenthionin (Obr. 5) [1]. Pavučinec libovonný (*Cortinarius suaveolens*) má silnou vůni pomerančového květu, která v něm zůstává i po sušení. Šťavnatka hyacintová (*Hygrophorus hyacinthinus*) voní po květech hyacintu, ryzec vonný (*Lactarius glyciosmus*) má příjemnou sladkou vůni po kokosu, houžovec hlemýžďovitý (*Lentinellus cochleatus*) je známý pro svou vůni podobnou anýzu [21].



**Obr. 5:** Struktura lenthioninu [5]

Houby mohou rovněž produkovat nepříjemné, pronikavé až výrazně fekální pachy. Mezi těkavé sloučeniny zodpovědné za zápach patří například indol, 3-methylindol neboli skatol a 3-chlorindol [21].

Chuť hub není rozhodujícím znakem pro to, zda je houba jedlá nebo jedovatá [22]. Nejcharakterističtější chuťové sloučeniny jsou definovány hlavně těkavými osmiuhlíkatými sloučeninami, především okt-1-en-3-olem, oktan-3-olem a oktan-3-onem. Mezi netěkavé složky chuti patří například volná kyselina glutamová, guanosin-5'-monofosfát a jiné další nukleotidy, aminokyseliny a sacharidy [21].

V houbách je obsažena celá řada dalších látek, příklady některých z nich jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. VI) [23].

**Tab. VI:** Těkavé sloučeniny přítomné v sušených plodnicích hříbu smrkového (*Boletus edulis*) [23]

Sloučenina	Data <sup>a</sup>	Sloučenina	Data <sup>a</sup>	Sloučenina	Data <sup>a</sup>	Sloučenina	Data <sup>a</sup>
<b>Karboxylové kyseliny</b>		<b>Aldehydy</b>		okt-3-en-2-on		<b>Pyraziny</b>	
kyselina octová	14,181	2-methylpropanal	0,422	acetofenon	0,144	2-methylpyrazin	0,999
kyselina propionová	0,717	butanal	0,012	<b>Uhlovodíky</b>		2,5-dimethylpyrazin	1,920
kyselina isomáselná	3,220	2-methylbutanal	0,904	okten	0,056	2,6-dimethylpyrazin	1,545
kyselina máselná	0,640	3-methylbutanal	0,846	ethylbenzen	17,722	2-ethyl-5-methylpyrazin	0,705
kyselina isovalerová	16,456	pentanal	0,203	xylen	11,489	2-ethyl-6-methylpyrazin	0,214
kyselina valerová	0,069	hexanal	1,037	<b>Monoterpeny</b>		<b>Furany a pyrany</b>	
kyselina kapronová	0,326	heptanal	0,070	$\alpha$ -pinen	0,617	2-pentylfuran	0,759
kyselina enanthová	0,021	2-fenylacetaldehyd	0,154	camphen	0,212	$\gamma$ -valerolakton	3,156
kyselina kaprylová	0,030	oktanal	0,116	$\beta$ -pinen	0,273	$\delta$ -valerolakton	0,715
kyselina pelargonová	0,034	nonanal	0,102	sabinen	0,047	$\gamma$ -butyrolakton	1,429
kyselina kaprinová	0,009	benzaldehyd	0,734	$\delta$ -3-karen	0,226	pantolakton	0,078
<b>Alkoholy</b>		<b>Ketony</b>		$\beta$ -myrcen	0,175	<b>Sloučeniny síry</b>	
3-methylbutanol	2,237	butan-2-on	0,910	limonen	4,100	dimetyldisulfid	0,014
hexanol	0,318	hexan-2-on	0,468	1,8-cienol	0,025	methional	0,003
okt-1-en-3-ol	4,074	heptan-2-on	0,640	$\beta$ -terpinen	0,066	3-(methylthio)-propanol	0,035
2-ethylhexanol	0,102	oktan-3-on	1,144	<i>p</i> -cymen	0,096		
oktanol	0,117	3-hydroxybutan-2-on	0,649	linalool	0,027		
2-fenylethanol	0,167	okt-1-en-3-on	1,409	bornylacetát	0,052		

<sup>a</sup> Údaje vyjádřené jako procento z celkové plochy chromatogramu.

## 2.2.8 Pigmenty hub

Pigmentace hub je proměnlivá a u jednotlivých druhů se odvíjí především od stáří plodnice, teploty a přístupu světla. Mezi barviva, která se vyskytují zejména u hub rodu liška (*Cantharellus*), se řadí karotenoidy. Pozorovatelné barevné změny se objevují u některých plodnic po mechanickém poškození pletiva, především po otláčení či rozřezání. Tyto změny jsou obvykle nežádoucí a jsou způsobeny enzymaticky katalyzovanou oxidací různých polyfenolů na chinony. Typickým příkladem je modráni hříbu hnědého (*Imleria badia*) [16].

## 2.2.9 Toxiny makromycetů

Termolabilní toxiny obsahují makromycety, které jsou za syrového stavu jedovaté. Po jejich tepelném zpracování (asi 30 minut) se však účinek těchto toxinů minimalizuje. Mezi hlavní zástupce obsahující termolabilní toxiny se řadí hřib koloděj (*Boletus luridus*) a hřib kovář (*Boletus luridiformis*), dále některé druhy václavek (*Armillaria*) a čirůvek (*Tricholoma*). Obvyklými projevy těchto otrav bývají žaludeční obtíže, které mohou trvat nanejvýše několik hodin [24].

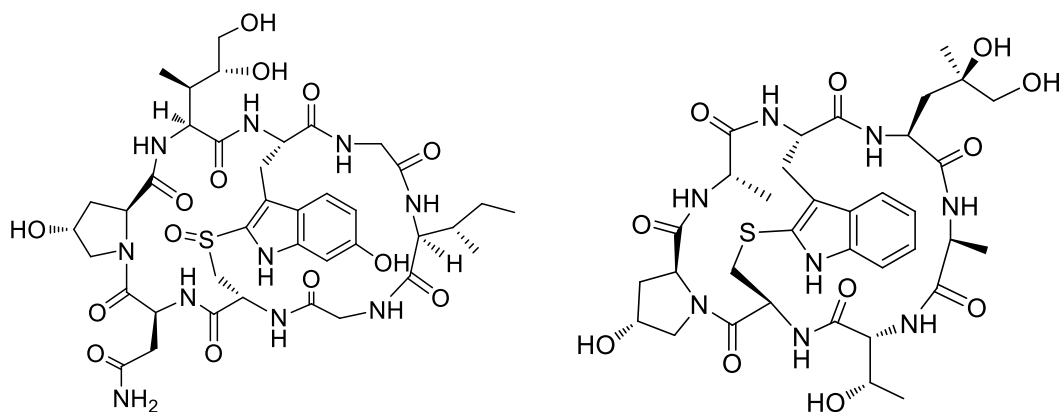
Otravy zapříčiněné termostabilními toxiny způsobují zdravotní komplikace i po důkladném tepelném zpracování hub [24]. Do této skupiny se řadí faloidní, parafaloidní, muskarinové, koprínové, orellaninové, psychotropní a gastrointestinální otravy [7].

### 2.2.9.1 Faloidní otravy

Faloidní otravy se obvykle projevují se značným zpožděním, a to za 6–12 případně 15–24 hodin po požití hub. Vyvolávají je zejména muchomůrka jarní (*Amanita verna*), muchomůrka zelená (*Amanita phalloides*) a muchomůrka jízlivá (*Amanita virosa*) [7].

Primárními příznaky otravy jsou průjemy, zvracení, poté se přidávají poruchy močení s následným hromaděním odpadních látek v těle. Výsledkem faloidních otrav může být selhání ledvin a jater, kterému asi pětina pacientů podlehně [7].

Za faloidní otravy jsou odpovědné dvě hlavní skupiny jedů, a to amatoxiny a falotoxiny [25]. Do skupiny amatoxinů patří  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\varepsilon$ -amanitin, proamanulin, amanulin, kyselina amanulinová, amanin a amaninamid. Mezi falotoxiny se řadí sloučeniny jako faloidin, profaloin, faloin, falisin, falisacin, falacin a falacidin (Obr. 6). Další skupinu látek, které způsobují tento typ otrav, tvoří virotoxiny. Jedná se o peptidy, mezi které náleží viroidin, desoxoviroidin, alaviroidin, aladesoxoviroidin, viroisin a desoxoviroisin [18].



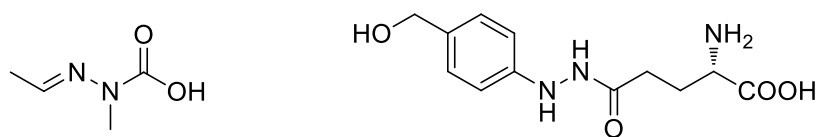
**Obr. 6:** Struktura  $\alpha$ -amanitinu (vlevo) a faloidinu (vpravo) [18]

### 2.2.9.2 Parafaloidní otravy

Původcem parafaloidních otrav bývá zejména ucháč obecný (*Gyromitra esculenta*), některé druhy smržů (*Morchella*) a třepenitka svazčitá (*Hypholoma fasciculare*) [7].

Ve srovnání s faloidní otravou je v tomto případě počet úmrtí výrazně nižší [7].

Mezi nejznámější zástupce toxinů patří gyromitrin, agaritin, methylhydrazin, agarikon, lyofylin a necatorin (Obr. 7) [25].



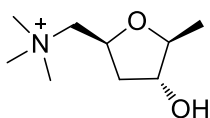
**Obr. 7:** Struktura gyromitrinu (vlevo) a agaritinu (vpravo) [26]

### 2.2.9.3 Muskarinové otravy

Muskarinové otravy se objevují sice jen zřídka, mohou být však velmi závažné až smrtelné. Jsou způsobené některými druhy vlákníc (*Inocybe*), například vláknicí začervenalou (*Inocybe erubescens*) a také bíle zbarvenými strmělkami (*Clitocybe*) [7].

Otravy se zpravidla projeví velmi rychle, k obecným příznakům patří nevolnost, zvracení, průjem, silné pocení a zúžení zornic [7].

Toxická sloučenina, která zapříčiňuje tyto otravy, se nazývá muskarin (Obr. 8) [25].



**Obr. 8:** Struktura muskarinu [25]

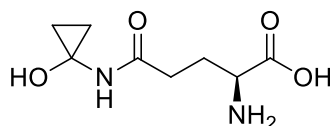


#### 2.2.9.4 Koprinové otravy

Uvedené otravy způsobují některé druhy hnojníků, především hnojník inkoustový (*Coprinopsis atramentaria*), který sám o sobě ale jedovatý není. V kombinaci s alkoholem však vyvolává koprinový neboli antabusový syndrom, který vede k intoleranci ethanolu [7].

Lehčí otravy se projevují zarudnutím pokožky, těžší jsou provázeny zvracením, průjmami, dušností a tachykardií [7].

Látka, která způsobuje tzv. antabusový syndrom, se nazývá koprin (Obr. 9) [7].



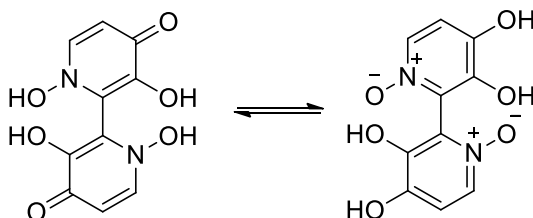
Obr. 9: Struktura koprinu [26]

#### 2.2.9.5 Orellaninové otravy

Za velmi nebezpečné orellaninové otravy jsou odpovědné některé druhy pavučinců (*Cortinarius*), zejména pavučinec plyšový (*Cortinarius orellanus*) [7].

Po konzumaci hub se tato otrava projevuje za několik dní, někdy až za 1–2 týdny. Hlavním příznakem je těžké poškození až selhání ledvin, které může skončit i smrtí [7].

Orellaninové otravy způsobuje toxická látka zvaná orellanin (Obr. 10) [25].



Obr. 10: Struktura orellaninu [26]

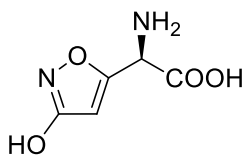
#### 2.2.9.6 Psychotropní otravy

Psychotropní otravy se dělí na otravy mykoatropinové a halucinogenní [7].

Mykoatropinové otravy jsou relativně časté. Jsou vyvolávány látkami obsaženými v muchomůrce tygrované (*Amanita pantherina*), muchomůrce červené (*Amanita muscaria*), méně pak v muchomůrce citrónové (*Amanita citrina*) [7].

Prvotními příznaky otrav jsou nevolnost, rozšíření zornic, bušení srdce a obvykle i zvracení. Hlavními psychickými projevy bývá vzrušení, halucinace a agresivita [7].

Tyto mykoatropinové otravy iniciují látky působící na centrální nervový systém, zejména kyselina ibotenová (Obr. 11) a její deriváty jako jsou muscimol a muskazon [7].

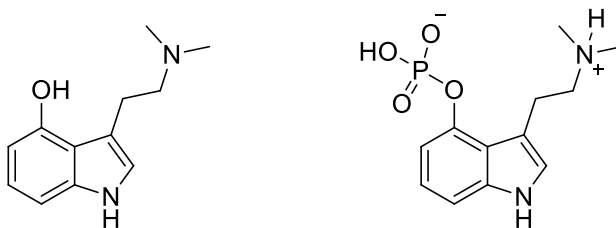


**Obr. 11:** Struktura kyseliny ibotenové [26]

Do skupiny halucinogenních otrav patří především některé druhy lysohlávek (*Psilocybe*) a kroupatců (*Panaeolus*), štitovka vrbová (*Pluteus salicinus*) a muchomůrka porfýrová (*Amanita porphyria*) [7].

Typickými příznaky jsou změny ve vnímání, změny nálad, závratě, nevolnost a rovněž barevné halucinace [18].

Za uvedené projevy jsou odpovědné zejména psilocin a psilocybin (Obr. 12) [18].



**Obr. 12:** Struktura psilocinu (vlevo) a psilocybinu (vpravo) [18]

### 2.2.9.7 Gastrointestinální otravy

Uvedené otravy bývají vyvolány konzumací hříbu satana (*Boletus satanas*), hlívy olivové (*Omphalotus olearius*) a závojenky olovové (*Entoloma sinuatum*) [25].

Tyto otravy působí pouze na trávicí soustavu, postižený trpí nevolností a bolestmi břicha doprovázenými průjmy a zvracením [25].

## 2.2.10 Zdraví prospěšné látky v hubách

Houbové  $\beta$ -glukany jsou prospěšné pro člověka tím, že významně stimulují imunitní systém, chrání před patogenními mikroby a škodlivými účinky toxinů a karcinogenů, jež poškozují imunitní systém [27].

Houby jsou zařazeny mezi potraviny se značným obsahem polyaminů, které patří do skupiny biogenních aminů. Polyaminy se podílejí na regulaci buněčného růstu, diferenciaci buněk a na hojení poraněných tkání. V nadměrném množství však mohou zapříčinit i nádorové bujení. V houbách byly klasifikovány polyaminy zvané spermin a spermidin. Obsah spermidinu je v houbách výrazně nižší než obsah sperminu [16].

Antioxidanty přítomné v houbách, například fenolické sloučeniny, tokoferoly, kyselina askorbová a karotenoidy, snižují aktivitu volných radikálů [16].

Fenolické sloučeniny jsou hlavními antioxidanty hub. Zahrnují různé podskupiny, zejména fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny, lignany a taniny, které se vyznačují značnou strukturní rozmanitostí [16].

Fenolové kyseliny mohou být rozděleny do dvou hlavních skupin. První skupinu tvoří deriváty kyseliny hydroxybenzoové, druhou skupinu tvoří deriváty kyseliny skořicové. Mezi deriváty kyseliny hydroxybenzoové patří kyseliny *p*-hydroxybenzoová, gentisová, protokatechová, vanilová a syringová. Mezi deriváty kyseliny skořicové se řadí kyseliny kávová, *p*-kumarová a ferulová [16].

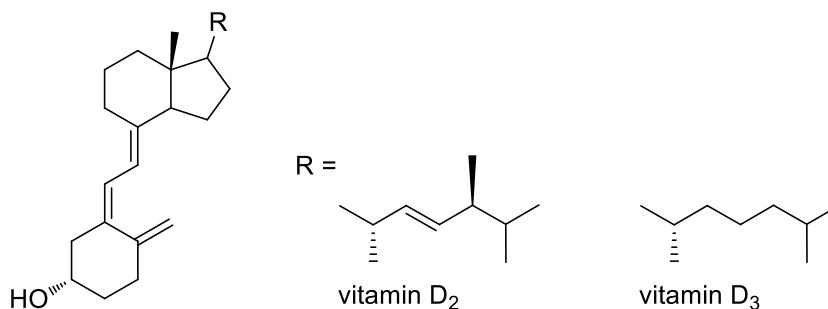
Mezi známé zástupce zdraví prospěšných hub patří například houževnatec jedlý (*Lentinus edodes*, syn. *shiitake*), hlíva ústřičná (*Pleurotus ostreatus*), ucho Jidášovo neboli boltcovitka bezová (*Auricularia auricula-judae*) a jiné další [7].

Houževnatec jedlý se podílí na regulaci hladiny cholesterolu v krvi, snižuje vysoký krevní tlak, pomáhá proti žaludečním potížím a alergiím. Posiluje též činnost imunitního systému a má antioxidantní účinky. Hlíva ústřičná příznivě ovlivňuje hladinu cholesterolu a cukru v krvi, posiluje imunitní systém. Ucho Jidášovo pomáhá při průjmech, bolestech zubů, žaludku a srdce, působí též proti vysokému krevnímu tlaku [7].

## 2.3 Charakterizace vitaminů D

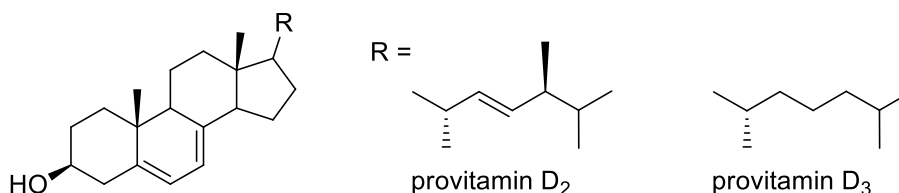
### 2.3.1 Struktura a názvosloví

Vitamin D je souhrnný název pro skupinu lipofilních 9,10-sekosteroidů, mezi něž patří vitamin D<sub>2</sub> čili ergokalciferol (9,10-seko- $\Delta^{10(19),5,7,22}$ -ergostatetraen-3 $\beta$ -ol) a vitamin D<sub>3</sub> neboli cholekalciferol (9,10-seko- $\Delta^{10(19),5,7}$ -dehydrocholestatrien-3 $\beta$ -ol) (Obr. 13) [1].



Obr. 13: Struktura vitaminů D<sub>2</sub> (vlevo) a D<sub>3</sub> (vpravo) [1]

Vitaminy D se liší uspořádáním postranního řetězce a vznikají z prekurzorů, které se nazývají provitaminy D (Obr. 14). Provitaminem D<sub>2</sub> je ergosterol a provitaminem D<sub>3</sub> je 7-dehydrocholesterol [1].



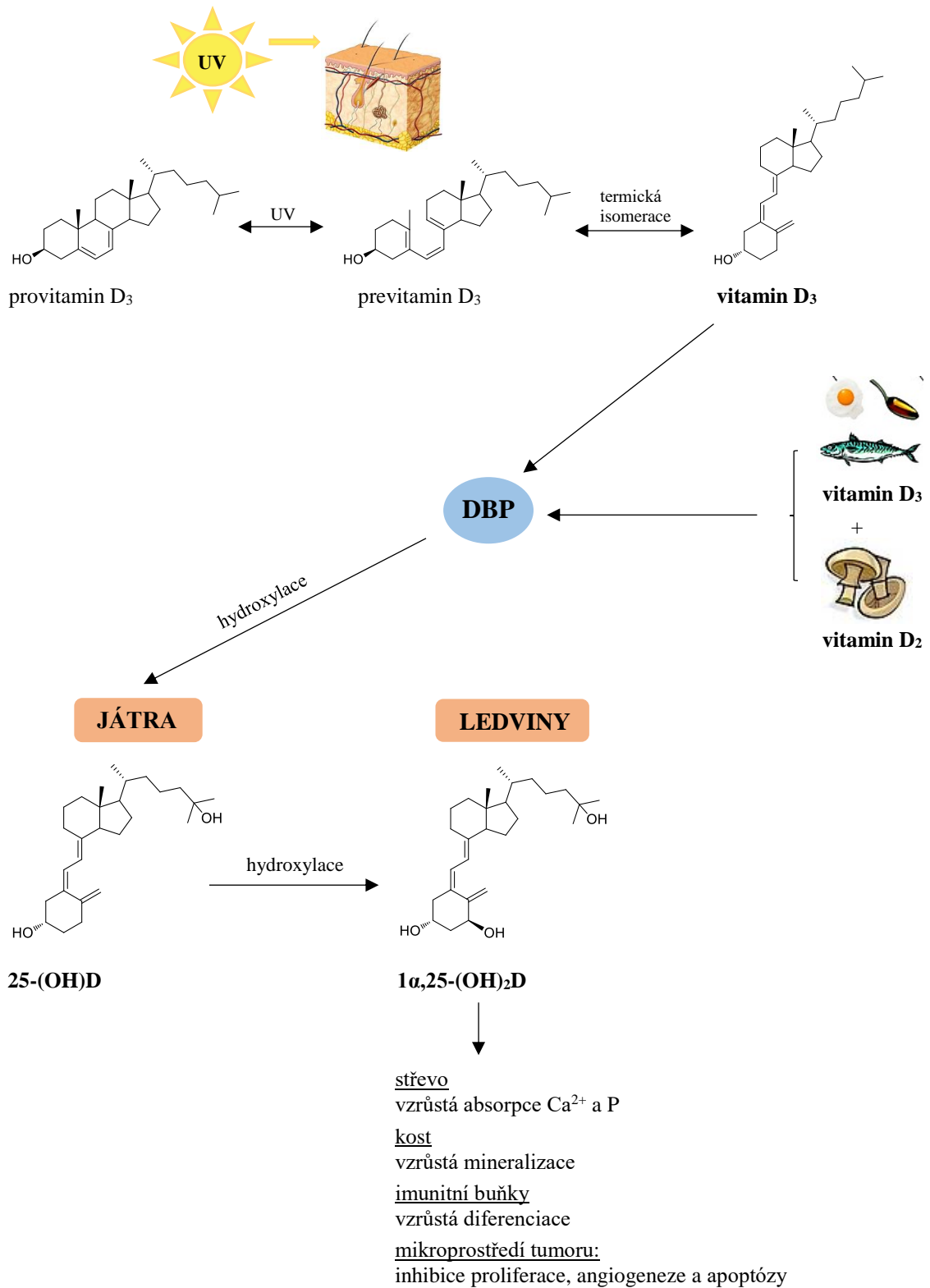
Obr. 14: Struktura provitaminů D<sub>2</sub> (vlevo) a D<sub>3</sub> (vpravo) [1]

### 2.3.2 Fotobiologie a metabolismus

Vlivem UV záření o vlnové délce 280–320 nm (UVB) je vytvářen z provitaminu D<sub>3</sub> fotochemickou reakcí v buňkách pokožky meziprodukt, tzv. previtamin D<sub>3</sub>. Tato sloučenina působením tělesného tepla následně spontánně isomerizuje na vitamin D<sub>3</sub> [1].

Vitaminy D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub> přijaté potravou a vitamin D<sub>3</sub> získaný biosyntézou z odpovídajícího provitaminu v kůži se váží na specifický protein DBP a v této formě jsou transportovány do jater. Působením enzymu 25-hydrolázy dochází, podle potřeb organismu, ke konverzi na 25-hydroxycholecalciferol (25-(OH)D, kalcidiol). Tato sloučenina je poté v ledvinách působením hormonu parathormonu a enzymu 1 $\alpha$ -hydroxylázy metabolizována na příslušný

1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol (1 $\alpha$ ,25-(OH) $_2$ D, kalcitriol). Tento metabolit je považován za biologicky aktivní formu vitamínu D (hormon) [2, 28]. Fotobiologie a metabolismus působení vitamínů D v těle jsou shrnuty na Obr. 15 [28, 29].



**Obr. 15:** Fotobiologie a metabolismus působení vitamínů D v těle [28, 29]

### 2.3.3 Fyziologie a výživa

Doporučená denní dávka vitamínu D se pohybuje v rozmezí 2,5–10 µg. Je pokryta vitamínem D<sub>3</sub> získávaným biosyntézou z 7-dehydrocholesterolu a současně též vitamíny D<sub>2</sub> či D<sub>3</sub> obsaženými v potravě [1].

Vitamíny D slouží jako výchozí sloučeniny pro syntézu kalcitriolu, který se uplatňuje v metabolismu vápníku a fosforu. Má význam při tvorbě a mineralizaci kostí a zubů. Hraje také důležitou roli v imunitním systému, při diferenciaci buněk, jsou popsány i jeho kardiovaskulární účinky [1].

Hypovitaminosa se u dětí projevuje onemocněním zvaným křivice (*rachitis*), u dospělých měknutím a deformacemi již vyvinutých kostí [1].

Vitamin D je rozpustný v tucích a nedochází k jeho vylučování z těla močí. V těle se soustavně hromadí a tvoří se ho zásoba, kterou organismus při zvýšené spotřebě využívá. Vysoké dávky, odpovídající zhruba pětinasobku doporučené denní dávky, mohou vyvolat průjmy, časté močení a pocit na zvracení. Dlouhodobě přijímané vysoké dávky vitamínu D mohou způsobit hyperkalcinémii. V organismu potom dochází k retenci vápníku, který je vyplavován z kostí a ukládán v orgánech (srdce, plíce atd.) [1].

### 2.3.4 Zdroje vitaminů D

Nejjednodušší cestou, jak získat pro lidský organismus vitamin D<sub>3</sub>, je pomocí UV záření, jehož přirozeným zdrojem je Slunce. Tento způsob je však v zimních měsících obtížně realizovatelný a z toho důvodu je nedostatek vitaminů D doplněn zejména potravou. V současné době jsou navíc některé potraviny, za účelem zvýšení obsahu vitaminů D, těmito vitamíny obohacovány, tzv. fortifikovány (mléko, džusy, margaríny aj.) [17].

#### 2.3.4.1 Zdroje vitamínu D<sub>2</sub>

Významným přírodním zdrojem vitamínu D<sub>2</sub> jsou houby. Tento vitamin v nich vzniká z ergosterolu, a to v závislosti na míře jejich vystavení UV záření. Komerčně pěstované pečárky dvouvýtrusé (*Agaricus bisporus*) mají tedy výrazně nižší obsah vitamínu D<sub>2</sub> (1–2 µg/kg čerstvých hub) než divoce rostoucí houby. Zástupcem divoce rostoucích hub může být například hřib smrkový (*Boletus edulis*) obsahující přibližně 30 µg/kg uvedeného vitamínu. Z toho důvodu je tedy vhodné vystavit koupené čerstvé houby několik minut slunečnímu záření [1, 30].

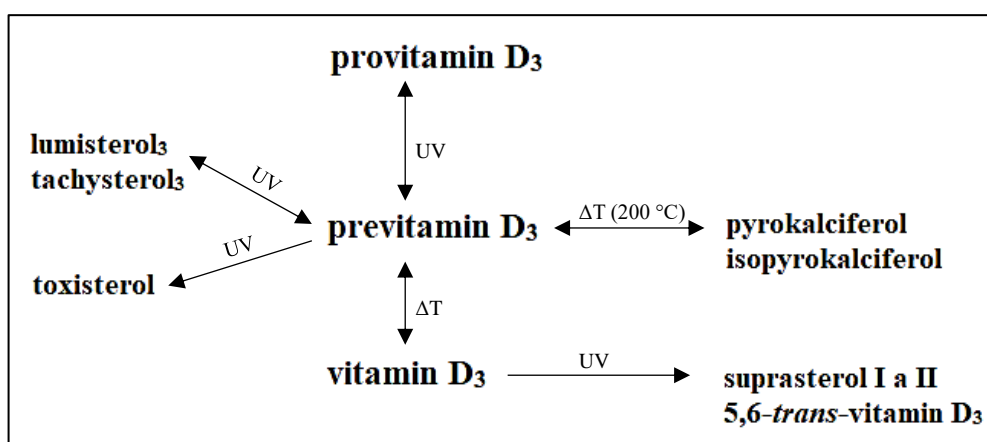
### 2.3.4.2 Zdroje ergosterolu a vitaminu D<sub>3</sub>

Obdobným způsobem jako člověk, syntetizují vitamin D<sub>3</sub> (cholecalciferol) i savci, ptáci a ryby. Tento vitamin se proto vyskytuje hlavně v potravinách živočišného původu spolu s provitaminem D<sub>3</sub>. Vyšší koncentrace vitaminu D<sub>3</sub> jsou obsaženy v játrech mořských ryb, jako je halibut (30 mg/kg), makrela (15 mg/kg) a treska (2,5 mg/kg). Cenným zdrojem je rovněž maso mořských ryb, jako je například sled', makrela a losos (50–450 µg/kg). Menší obsah má naopak maso a vnitřnosti hospodářských zvířat a jiné živočišné produkty (žloutek, mléko, smetana, sýry, máslo, jogurty atd.) [1].

### 2.3.5 Fotoisomery vitaminů D

Při ozařování provitaminu D<sub>3</sub> nejprve vzniká previtamin D<sub>3</sub>, který je následně tepelně isomerisován na vitamin D<sub>3</sub>. V ozářených potravinách však mohou vznikat i fotodegradační produkty (Obr. 16), které nemají antirachitickou aktivitu [31, 32].

Řadu isomerů podobných těm, které jsou odvozeny od provitaminu D<sub>3</sub>, lze získat též z provitaminu D<sub>2</sub> [32].



Obr. 16: Přehled fotodegradačních produktů [31, 32]

### 2.3.6 Ostatní formy vitaminu D

Existují i jiné formy vitaminu D. Vitaminem D<sub>1</sub> je označována směs vitaminu D<sub>2</sub> a lumisterolu [1]. Vitamin D<sub>4</sub> (22,23-dihydroergokalciferol) lze získat z provitaminu D<sub>4</sub> (22,23-dihydroergosterol) působením UV záření [31]. Jako vitamin D<sub>5</sub> (sitokalciferol) je pojmenován steroid vytvořený ozářením prekurzoru 7-dehydrositosterolu [1].

## 2.4 Analýza vitaminů D

V potravinách je přítomné relativně malé množství vitaminů D, proto je jejich stanovení poměrně obtížné. Zatím neexistuje jednoduchý, rychlý a poměrně nenákladný způsob analýzy vitaminů D v potravinách [4].

V dnešní době je nejpoužívanější technikou kapalinová chromatografie, která může nabídnout uspokojivé podmínky pro stanovení vitaminů D v potravinách. Tato technika je však spolu s jinými metodami komplikována přítomností dalších sloučenin ve stanovovaném vzorku, které mohou například reagovat se stejnými kolorimetrickými činidly či absorbovat záření ve stejných oblastech spektra. Z toho důvodu je stanovení vitaminů D v potravinách obecně složitější [4].

Mezi další metody, navržené pro analýzu vitaminů D, patří například papírová, tenkovrstevná a plynová chromatografie, spektrofotometrie, kolorimetrie, případně i některé elektroanalytické metody [4].

### 2.4.1 Úprava vzorků

Pečlivá příprava vzorků je důležitá pro spolehlivou analýzu. Pro uvolnění esterů, při stanovení vitaminů D, se obvykle používá zmýdelnění (saponifikace), následovaná extrakcí za použití vhodných organických rozpouštědel [33].

Zmýdelnění je účinný postup při odstraňování neutrálních lipidů v příslušné potravinové matrici. Jedná se o alkalicky katalyzovanou hydrolýzu esterů, jež vede k rozkladu esterových vazeb a k uvolnění příslušného alkoholu a soli mastné kyseliny například z glyceridů, fosfolipidů, esterifikovaných sterolů či karotenoidů. Tato reakce také umožňuje uvolnit příslušný vitamin D, který je v potravinové matrici navázaný na lipoproteinový komplex [34].

Zmýdelnění se nejčastěji provádí pomocí alkoholického (methanol, ethanol) nebo vodného roztoku KOH. Je preferována studená saponifikace oproti horké z důvodu reverzibilní a teplotně závislé rovnováhy mezi vitaminem D a příslušným previtaminem D [33]. Za studena probíhá při pokojové teplotě přibližně 12–18 hodin (ideálně na třepačce), za horka při teplotě 60–100 °C po dobu 20–45 minut. Vzhledem k nedostatečné stabilitě vitaminů D se k zabránění jejich oxidace používají antioxidanty, jako například kyselina askorbová, pyrogallol a butylhydroxytoluen (BHT) [34].



Po dokončení saponifikace se provádí extrakce daného vitamínu D pomocí vhodných organických rozpouštědel. Nejčastěji se používá hexan, cyklohexan nebo též petrolether, diethylether, pentan či dichlormethan [34].

Vitamíny D mohou být také extrahovány organickými rozpouštědly přímo, bez předchozí saponifikace. Nejčastěji používanými rozpouštědly bývají dichlormethan či hexan nebo jejich kombinace s methanolem, případně diethyletherem. V některých případech se jako způsob rozkladu lipoproteinového komplexu, zapouzdřujícího vitamín D, využívá ultrazvuku s přidavkem ethanolu k příslušnému vzorku [34].

Přímá extrakce je sice poměrně rychlá, avšak výtěžky vitamínů D dosažené tímto postupem jsou nižší, než výtěžky získané zmýdlením a poté následující extrakcí [34].

## **2.4.1 Separační metody**

### **2.4.1.1 Papírová a tenkovrstevná chromatografie**

Mezi první separační metody, které byly použity pro separaci vitamínů D, patřily papírová (PC) a tenkovrstevná (TLC) chromatografie [4].

V minulosti byla navržena řada technik PC, které využívaly buď papír impregnovaný chinolinem nebo papír s reverzní fází. Neuspokojivé výsledky, omezená kapacita a dlouhá doba optimalizace postupu byly jejich hlavními nevýhodami [35].

V literatuře bylo také popsáno použití papírů impregnovaných oxidem hlinitým od společnosti Schleicher & Schuell. Jejich výhodou bylo, že poskytovaly mnohem větší kapacitu ve srovnání s papíry s reverzní fází [32].

Tenkovrstvá chromatografie patří k poměrně vhodným metodám pro separaci a identifikaci vitamínů D. Její výhodou je to, že nevyžaduje příliš nákladné vybavení [4].

Bolliger, Heaysman a Sawyer informovali o možnosti stanovení obsahu vitamínů D ve farmaceutických výrobcích pomocí TLC. Zjistili, že dobré separace vitamínů D od ostatních lipidů bylo dosaženo pomocí aktivovaného silikagelu G. Jako rozpouštědlo byla použita směs cyklohexan/ether (1:1 či 4:1 v/v), detekčním činidlem byla 0,2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [32].

### 2.4.1.2 Kapalinová chromatografie

Stanovení vitaminů D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub> se většinou provádí pomocí kapalinové chromatografie (LC). Jedná se o techniku, která se nejčastěji využívá pro separaci a stanovení těchto vitaminů v lipidovém materiálu. Nevýhodou je, že vyžaduje důkladnou saponifikaci a extrakci příslušného materiálu. Oproti jiným technikám má také vyšší spotřebu použitých rozpouštědel a reakčních složek [3].

Pro detekci vitaminů D v potravinách lze použít vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) v kombinaci s PDA detektorem (265 nm). Detekci je možné provádět i pomocí hmotnostní spektrometrie (MS), kdy nejčastěji používaným ionizačním zdrojem je ESI, APCI a APPI. V neposlední řadě je také možné využít elektrochemických či jiných detektorů (NMR, IČ) [33].

Kapalinová chromatografie je vhodnou technikou pro stanovení vitamínu D<sub>2</sub> v houbách. Autoři článku uvádí, že před samotnou analýzou bylo potřeba, aby byly vzorky hub nejprve saponifikovány pomocí ethanolu a 50% KOH (2:1 v/v) při teplotě 85 °C po dobu 30 minut. Následně byly vzniklé suspenze naředěny deionizovanou H<sub>2</sub>O a extrahovány hexanem (1:3 v/v). Vlastní analýza vitamínu D<sub>2</sub> v houbách byla provedena technikou UHPLC využívající kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity spojený s Agilent 6460 trojitým kvadrupólem. Jako iontový zdroj byl použit elektrosprej (ESI). Systém UHPLC byl složen z binárního čerpadla, autosampleru, termostatu a detektoru PDA, jenž zaznamenával signál při vlnové délce 265 nm. Separace byla provedena na analytické koloně Zorbax Plus C18 (100 mm x 2,1 mm x 1,8 μm). Jako mobilní fáze byl použit methanol o průtoku 0,3 ml/min. Kvantifikace byla provedena pomocí vitamínu D<sub>3</sub> (interní standard) [30].

Pro simultánní kvantifikaci vitaminů D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub> v mléce byla vyvinuta spolehlivá separace pomocí UPLC s použitím laurofenonu jako interního standardu. Vlastní vzorky byly připraveny přes noc inkubací mléka se směsí 50% KOH a ethanolu (2:8 v/v) a poté byly extrahovány hexanem. Následně byl získaný hexanový extrakt přečištěn směsí 5% KOH a ethanolu (95:5 v/v). Chromatografie byla provedena pomocí Acquity Ultra Performance System sestávajícího se z kvarterní pumpy, autosampleru, termostatu a PDA detektoru, jenž zaznamenával signál při vlnové délce 265 nm. Pro separaci byla použita kolona s reverzní fází Acquity UPLC BEH C18 (100 mm x 2,1 mm x 1,7 μm) chráněná předkolonou BEH C18 (100 mm x 2,1 mm x 1,7 μm). Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu, acetonitrilu a H<sub>2</sub>O (80:10:10 v/v) o průtoku 0,35 ml/min [36].

### 2.4.1.3 Plynová chromatografie

Stanovení vitaminů D pomocí plynové chromatografie (GC) bylo studováno zejména v 60. a 70. letech 20. století. Důvodem byla snaha o překonání analytických problémů, které se vyskytly s do té doby používanými metodami [4]. Postupem času se zjistilo, že plynová chromatografie má jistá omezení jako separační technika pro stanovení vitaminů D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub>, jelikož vyžaduje důkladnou purifikaci a extrakci zkoumaného materiálu. Rovněž bylo zjištěno, že vitaminy D podléhají tepelné cyklizaci v GC split/splitless injektoru nebo při přímém vstřikování do kolony, což má za následek pokles citlivosti GC. Výše uvedené skutečnosti však nejsou pro použití této techniky výrazně limitující, a nabízejí tak další cestu pro její modifikaci i v současnosti [33].

Plynová chromatografie může být například použita pro stanovení vitaminu D<sub>2</sub> v sušeném plnotučném mléce, které je tímto vitaminem obohaceno (fortifikováno). Tato metoda může být rovněž aplikována i pro stanovení vitaminu D<sub>3</sub>, jenž se přirozeně nachází ve zmíněném druhu matrice [37].

Postup měření byl založen na přidání činidla, které se sestávalo ze směsi ethanolu, povrchově aktivního činidla (Triton X-100) a hexametafosforečnanu sodného, do vzorku mléka. Použití této směsi umožňovalo, aby lipidová frakce obsahující vitamin D<sub>2</sub> byla extrahována z mléka v jediném stupni pomocí směsi petroletheru a diethyletheru (1:1 v/v). Po odstranění rozpouštědel, byl lipidový zbytek zahříván ve vodní lázni s etanolovým roztokem NaOH při teplotě 70–80 °C po dobu 15 minut. Po provedení této horké saponifikace následovala extrakce vzorku směsí petroletheru a diethyletheru (1:1 v/v). Cholesterol a jiné další interferující látky byly následně odstraněny sloupcovou chromatografií, využívající deaktivovaný Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> jako sorbent [37].

Konečné stanovení vitaminu D<sub>2</sub> bylo provedeno technikou GLC s použitím derivatizačního činidla *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamidu a plamenově ionizačního (FID) či hmotnostního detektoru. Závěrečná kvantifikace byla provedena metodou vnitřního standardu, využívající vitamin D<sub>3</sub> jako vnitřní (interní) standard [37].

#### **2.4.1.4 Kapilární elektroforéza**

Vhodnou alternativou k HPLC jsou techniky kapilární elektroforézy (CE), které slouží k separaci látek na základě jejich rozdílné mobility v elektrickém poli. Jejich výhodou oproti HPLC je rychlý vývoj metody, nižší spotřeba rozpouštědel a reakčních složek [3].

Neutrální vitaminy a směsi nabitých či nenabitých vitaminů lze separovat pomocí micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC). Tento typ CE je možné použít pro oddělení vitaminů, které jsou rozpustné ve vodě i v tucích. Vitaminy rozpustné v tucích mohou být odděleny pomocí SDS a solí žlučových kyselin, jako je například cholát či deoxycholát sodný. Pomocí MEKC lze separovat vitamin D<sub>3</sub> i za použití směsi rozpouštědel acetonitril a H<sub>2</sub>O (80:20 v/v) obsahujících TDAB [3].

#### **2.4.1.5 Superkritická fluidní chromatografie**

Superkritická fluidní chromatografie (SFC) umožňuje separaci látek za použití mobilní fáze, kterou je kapalina v superkritickém stavu (nejčastěji superkritický oxid uhličitý). Tato mobilní fáze může být směšována s polárními modifikátory, kterými jsou například methanol, ethanol či 2-propanol. Ve srovnání s kapalinovou chromatografií se jedná o podstatně rychlejší a ekologicky šetrnější metodu [38].

Technika SFC s PDA detektorem, využívající ethanol jako polární modifikátor, se ukázala být jako vhodná pro kontrolu kvality vitaminu D<sub>3</sub> jako farmaceutické suroviny [38].

### **2.4.2 Optické metody**

#### **2.4.2.1 Spektrofotometrie**

Spektrofotometrie v UV oblasti je jednou z prvních metod používaných pro stanovení vitaminů D. Jedním z nejcharakterističtějších rysů těchto vitaminů je konjugovaný trienový systém dvojných vazeb. V souladu s tím mají tyto sloučeniny velmi specifická ultrafialová absorpční spektra. Techniky dostupné pro kvantifikaci vitaminů D jsou založeny na měření absorpce UV záření při vlnové délce 265 nm. Hlavní nevýhodou těchto postupů je to, že před testováním musí být vzorek důkladně přečištěn, aby se odstranily potenciální kontaminanty absorbující UV záření [39]. Z toho důvodu je samotná UV spektrofotometrie méně vhodná pro rutinní stanovení vitaminů D [4].

### 2.4.2.2 Kolorimetrie

V průběhu let bylo navrženo jen málo kolorimetrických metod, které lze použít pro kvantitativní stanovení vitaminů D [39].

Nejpoužívanější kolorimetrická metoda dle Brockmanna a Chena je založena na tvorbě růžového odstínu absorbujícího při vlnové délce 400 nm, který vytváří chloroformový roztok  $\text{SbCl}_3$  v přítomnosti vitaminů D [39]. Uvedená reakce je poměrně citlivá, avšak je interferována přítomností vitaminu A, což znemožnilo její použití na přírodní zdroje vitaminů D a multivitaminové produkty. Tato interference může být odstraněna předběžným separačním procesem nebo zpracováním s anhydridem kyseliny maleinové za vzniku aduktů vitaminu A, jež nereagují s  $\text{SbCl}_3$ . Další komplikací bylo i to, že  $\text{SbCl}_3$  je poměrně nestabilní, citlivost metody tak klesala hlavně se stářím reagentie [40]. V roce 1940 Nield modifikoval postup dle Brockmanna a Chena přidáním acetylchloridu jako stabilizátoru barvy [39].

### 2.4.2.3 Nukleární magnetická rezonance

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je relativně účinným nástrojem pro detekci a identifikaci vitaminů  $\text{D}_2$  a  $\text{D}_3$ . Umožňuje rozlišit sloučeniny, které mají stejnou hmotnost, avšak různé polohy funkčních skupin. Obecně nachází svoje uplatnění v lékařství, potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Nicméně značnou nevýhodou NMR analýzy je její nižší citlivost a potřeba předchozího přečištění vzorků [33].

### 2.4.2.4 Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie (IČ) může být použita pro rozlišení mezi strukturou vitaminů  $\text{D}_2$  a  $\text{D}_3$ . Bylo zjištěno, že infračervené spektrum vitaminu  $\text{D}_2$  vykazuje silný pás při  $970 \text{ cm}^{-1}$  s vedlejším vrcholem při  $962 \text{ cm}^{-1}$  v důsledku vibrace C-H skupiny v postranním nenasyceném řetězci. Naproti tomu nasycený postranní řetězec vitamínu  $\text{D}_3$  vykazuje pouze jediný vrchol, a to při  $962 \text{ cm}^{-1}$ . Jistou nevýhodou této techniky je však to, že není dostatečně citlivá a vyžaduje předchozí přečištění vzorků [41].

## 2.4.3 Elektroanalytické metody

Výhodou elektroanalytických metod je to, že pro stanovení vitaminů  $\text{D}_2$  a  $\text{D}_3$  využívají jednorázové a levné elektrody [42]. Tyto techniky umožňují stanovit vitaminy D v biologických tekutinách, farmaceutických výrobcích a potravinách [43].

V literatuře byla popsána elektroanalytická detekce vitaminů D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub> pomocí elektrody ze skelného uhlíku (GCE) modifikované Au-Pd. Pro analýzu pomocí cyklické voltametrie (CV) a diferenční pulsní voltametrie (DPV) byl použit model elektrochemického systému PGSTAT 302 Autolab. Elektrochemický článek byl sestaven ze tří elektrod, a to z pracovní (modifikovaná GCE o průměru 3 mm), pomocné (platinový drát) a referenční elektrody (Ag/AgCl v 3M KCl). Elektrokatalytická odezva vitaminů D na povrchu GCE byla výrazně ovlivněna poměrem organického a vodného rozpouštědla. V přítomnosti nosného elektrolytu (LiClO<sub>4</sub>) a směsi ethanolu a H<sub>2</sub>O (40:60 v/v) vykazovaly vitaminy D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub> dobře definované vrcholy. Tato práce poukazuje na vysokou citlivost GCE vůči detekci vitaminů D, bez zjevných interferenčních účinků vitaminů A, E a K. Metoda DPV poskytuje levné a rychlé měření s možností miniaturizace [42].

Dalšími autory byla zveřejněna voltamperometrická studie o elektroanalytickém chování vitaminu D<sub>3</sub> v methanolovém roztoku za použití LiClO<sub>4</sub> jako nosného elektrolytu. Elektrochemický článek byl opět sestaven ze tří elektrod, a to z pracovní (rotační elektroda ze skelného uhlíku), pomocné platinové a referenční elektrody (SCE). Tento postup se osvědčil jako vhodný pro stanovení vitaminu D<sub>3</sub> ve farmaceutických přípravcích [43].

#### **2.4.4 Kvantifikace vitaminů D**

Při kvantifikaci metodou vnitřního standardu se ke vzorku přidává zvolené množství známé látky, tzv. vnitřní (interní) standard. Tato sloučenina nesmí být přítomna v původním vzorku a nesmí reagovat s žádnou složkou vzorku. Interní standard je nezbytný k odstranění analytických chyb způsobených ztrátami vitaminů D během přípravy vzorku a ke kompenzaci změn signálu při použití detekce pomocí hmotnostní spektrometrie [33].

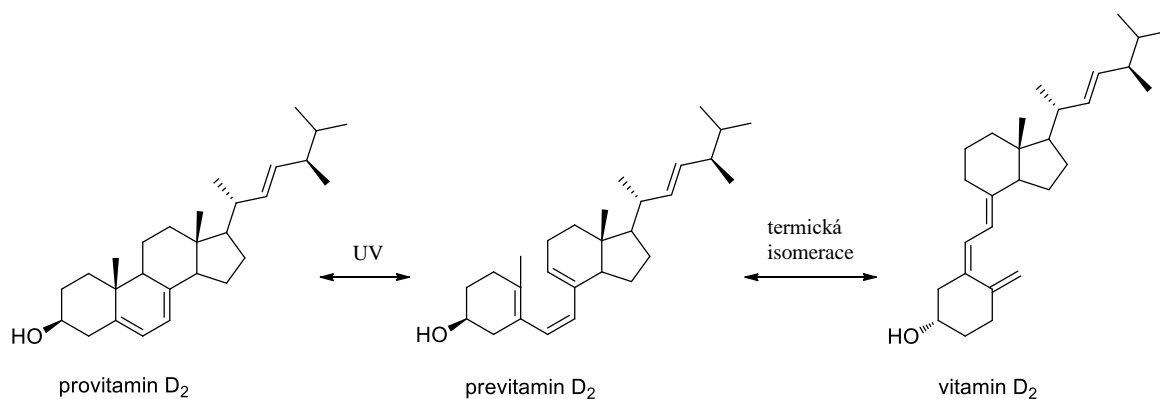
Vitaminy D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub> jsou si chemicky velmi podobné, a z toho důvodu se vitamin D<sub>2</sub> často používá jako interní standard pro stanovení vitaminu D<sub>3</sub> a naopak. Nejedná se však o nejlepší způsob v případě, kdy se tyto dva vitaminy vyskytují v surovinách současně. Ideálními vnitřními standardy pro kvantifikaci vitaminů D pomocí hmotnostní spektrometrie jsou izotopicky značené sloučeniny [33].

## 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Cíl práce

V současné době existuje relativně málo publikací zaměřených na stanovení vitaminů D (D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub>) pomocí plynové chromatografie (GC). Cílem diplomové práce bylo tedy zjistit, do jaké míry je tato metoda vhodná pro analýzu zmíněných vitaminů D.

V této práci byly jako výchozí matrice použity sušené vzorky hub, které lze běžně nalézt na území České republiky. Cílem bylo ověřit, jaký vliv má UV záření na obsah vitaminu D<sub>2</sub> ve zmíněných vzorcích hub. Vitamin D<sub>2</sub> v nich vzniká z provitaminu D<sub>2</sub> (ergosterol) v závislosti na míře jejich vystavení UV záření (Obr. 17). Jedná se o analogický mechanismus, jakým vzniká vitamin D<sub>3</sub> z provitaminu D<sub>3</sub> [1].



Obr. 17: Vznik vitaminu D<sub>2</sub> z provitaminu D<sub>2</sub> (ergosterol) [1]

### 3.2 Použité chemikálie

- Aceton (p. a., Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Deionizovaná voda Milli-Q (Merck Millipore, Darmstadt, Německo)
- Dusík (99,99 %, Messer, Bad Soden, Německo)
- Ethanol (p. a., Tereos TTD, a. s. – Lihovar Kojetín, Kojetín, ČR)
- Helium 4.8 (čistota 99,998 %, SIAD, Bergamo, Itálie)
- Hexamethyldisilazan (HMDS) (p. a., Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Hexan (p. a., Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Hydroxid sodný (p. a., PENTA, Chrudim, ČR)
- Chloroform (p. a., Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Kyselina L-askorbová (p. a., PENTA, Chrudim, ČR)

- *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) (p. a., Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
- Pyridin (p. a., PENTA, Chrudim, ČR)
- Standardy:
  - Ergosterol (p. a., Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
  - Chrysen-D<sub>12</sub> (p. a., Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
  - Vitamin D<sub>2</sub> (p. a., Sigma-Aldrich, Praha, ČR)
  - Vitamin D<sub>3</sub> (p. a., Sigma-Aldrich, Praha, ČR)

### 3.3 Přístrojové vybavení a pomůcky

- Analytické váhy AB204 (Mettler Toledo, Greifensee, Švýcarsko)
- Centrifuga 5702 (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- Mlýnek mini P-23 (Fritsch, Idar-Oberstein, Německo)
- Plynový chromatograf Agilent 7890A s hmotnostním spektrometrem 5975C inert (Agilent Technologies, Kalifornie, USA). Křemenná kapilární kolona HP-5MS (parametry 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Agilent Technologies, Kalifornie, USA). Nosný plyn helium 4.8 (rychlost průtoku 0,9 ml/min).
- Sušárna UN110 (Memmert, Schwabach, Německo)
- Sušička ovoce Kenya 2300 90050 (ETA, Praha, ČR)
- Termostat blokový SBH130 + blok hliníkový SBH (Stuart, Staffordshire, UK)
- Třepačka Reax Top (Heidolph, Schwabach, Německo)
- Třepačka Vibramax 100 (Heidolph, Schwabach, Německo)
- Ultrazvuková lázeň 10LM (Kraintek Czech s. r. o., Hradec Králové, ČR)
- UV lampa ENF-240C/FE (Spectroline, Westbury, New York, USA)
- Běžné laboratorní sklo, plastové pomůcky a automatické pipety



## 3.4 Pracovní postup

### 3.4.1 Vzorky hub

Plodnice hub (Tab. VII), které byly podrobeny analýze, byly nalezeny koncem září roku 2017 v okolí obce Stupava (okres Uherské Hradiště).

Pro analýzu byly použity pouze klobouky středně starých hub, které byly nakrájeny na plátky o tloušťce 3–4 mm. Tyto plátky byly následně usušeny při teplotě 60 °C v domácí sušičce ovoce umístěné v temnější místnosti. Poté byly takto získané vzorky vloženy do skleněných nádob, jež byly skladovány v temnu při pokojové teplotě.

K přípravě vzorků pro vlastní analýzu byly usušené plátky hub homogenizovány v kulovém mlýnku. Vzniklý prášek byl rovnoměrně rozprostřen na větší hodinové sklo, které bylo umístěno přibližně 3 cm pod UV lampou. Houbový prášek byl následně ozařován při vlnové délce 254 nm po dobu 4 hodin, během ozařování byl pravidelně promícháván, a to každých 20 minut.

**Tab. VII:** Seznam vybraných vzorků hub a doba jejich sušení při 60 °C

Druh	Doba sušení (h)
<b>bedla vysoká</b> ( <i>Macrolepiota procera</i> )	3,0
<b>hlíva ústříčná</b> ( <i>Pleurotus ostreatus</i> )	4,5
<b>hřib smrkový</b> ( <i>Boletus edulis</i> )	4,0
<b>klouzek sličný</b> ( <i>Suillus grevillei</i> )	4,0
<b>kozák dubový</b> ( <i>Leccinellum crocipodium</i> )	3,0
<b>pečárka polní</b> ( <i>Agaricus campestris</i> )	3,5
<b>plešivka dlabaná</b> ( <i>Handkea utrififormis</i> )	3,0

### 3.4.2 Vzorky potravin živočišného původu

Živočišné produkty (Tab. VIII), které byly podrobeny analýze, byly zakoupeny v běžných obchodních řetězcích. Pro srovnání bylo použito i slepičí vejce, které bylo odebráno v březnu roku 2018 z domácího chovu (obec Hrubčice, okres Prostějov).

Všechny pevné potraviny, použité pro vlastní analýzu, byly předem homogenizovány v kulovém mlýnku.

**Tab. VIII:** Seznam vybraných živočišných produktů

<b>Produkt</b>		<b>Bližší informace</b>
<b>1.</b>	<b>losos obecný</b>	filet chlazený produkt farmového chovu, Norsko
<b>2.</b>	<b>tuňák žlutoploutvý Nixe</b>	v přírodním nálevu výrobce Conservas Selectas de Galicia Pontevedra, Španělsko
<b>3.</b>	<b>hovězí maso mělněné</b>	masný polotovar, 95 % hovězího masa výrobce Kostecké uzeniny a. s. Kostelec u Jihlavy, ČR
<b>4.</b>	<b>kuřecí prsní řízky</b>	čerstvé chlazené dodavatel Vodňanská drůbež a. s. Modřice, ČR
<b>5.</b>	<b>žloutek (kur domácí; kupované)</b>	čerstvé vejce z nosnic v klecích, ČR
<b>6.</b>	<b>žloutek (kur domácí; domácí)</b>	odebráno z domácího chovu, Hrubčice, ČR
<b>7.</b>	<b>mléko polotučné Moravia</b>	pasterované, obsah 1,5 % tuku výrobce Moravia Lacto a. s. Jihlava, ČR
<b>8.</b>	<b>máslo</b>	obsah tuku 82 % výrobce Milchprodukte GmbH & Co. KG Hamburg, Německo
<b>9.</b>	<b>Choceňský bílý jogurt</b>	obsah tuku minimálně 10 % výrobce Choceňská mlékárna s. r. o. Choceň, ČR
<b>10.</b>	<b>smetana ke šlehání Boni</b>	trvanlivé, obsah tuku 30 % výrobce Hochwald Foods GmbH Kaiserslautern, Německo
<b>11.</b>	<b>sýr Gran Moravia</b>	přírodní dlouhozrající, obsah tuku cca 30 % výrobce Brazzale Moravia a. s. Litovel, ČR

### 3.4.3 Zmýdelnění a extrakce

Vlastní vzorky byly připraveny navážením ozářeného, resp. neozářeného houbového prášku (0,2 g) nebo vybrané potraviny živočišného původu (0,4 g) do skleněné vialky o objemu 40 ml. Následně byly do vialky postupně přidány kyselina L-askorbová (0,1 g), ethanol (2,5 ml), roztok chrysen-D<sub>12</sub> jako vnitřní standard (0,02 ml; 1 mg/ml v acetonu), deionizovaná H<sub>2</sub>O (4 ml) a jako poslední 50% NaOH (1 ml).

Vzniklá suspenze byla umístěna do kovového bloku a zmýdelněna při teplotě 85 °C po dobu 30 minut. Po uplynutí této doby byla vialka se suspenzí vyjmuta z kovového bloku. Po ochlazení byla viskózní suspenze přelita do centrifugační zkumavky, ve které byla

naředěna deionizovanou H<sub>2</sub>O (1 ml) a následně extrahována hexanem (2 ml). Obsah ve zkumavce byl důkladně protřepán a poté byl umístěn do ultrazvukové lázně na 5 minut. Pro lepší oddělení fází byla provedena centrifugace po dobu 3 minut (4400 otáček/min). Z obsahu ve zkumavce byla následně odebrána horní hexanová fáze obsahující sledované analyty. Extrakce byla poté opakována ještě jednou s použitím 1 ml hexanu.

Spojené hexanové extrakty byly ve skleněné vialce umístěny do kovového bloku vyhřívaného na teplotu 85 °C, ve kterém byl její obsah pomocí proudu dusíku odpařen do sucha. Po odpaření rozpouštědla byl takto upravený vzorek připraven k derivatizaci.

### 3.4.4 Derivatizace

Postup derivatizace byl založen na přidání silylačního činidla BSTFA (0,05 ml) a pyridinu (0,05 ml) do vialky obsahující odpařený vzorek houby nebo živočišného produktu (č. 1, 2, 4, 7 či 9; Tab. VIII). Následně byla tato vialka uzavřena, umístěna do vyhřívaného kovového bloku a inkubována při teplotě 85 °C po dobu 30 minut. Na závěr byla vyjmuta z bloku a po jejím vychladnutí byl k původnímu obsahu přidán hexan (0,4 ml). Poté byla vialka opět uzavřena a vzniklý roztok byl připraven pro GC/MS analýzu.

V případě zbylých živočišných produktů (č. 3, 5, 6, 8, 10 či 11) byl kvůli vyššímu obsahu matricových komponent použit větší objem činidla BSTFA (0,075 ml), pyridinu (0,075 ml) a také hexanu (0,6 ml).

### 3.4.5 Analýza vzorků a vyhodnocení

Automatický dávkovač plynového chromatografu dával objem 1 µl vzorku do nástřikové komory. V ní došlo při 280 °C k zplynění tohoto vzorku, který byl poté, bez děliče toku, pulzně (140 kPa, 12 s) dávkován na kolonu. Průtok nosného plynu (helium) byl 0,9 ml/min. Vzorky byly v koloně analyzovány za podmínek GC separace 50 °C – 2 min – – 10 °C/min – 300 °C – 15 min. Průměrná lineární rychlost plynu byla 34,6 cm/s. Délka analýzy činila 42 minut.

Hmotnostní spektra byla snímána v režimu celkového iontového proudu (TIC) v intervalu 29–600 m/z a v režimu monitorování selektivních iontů (SIM) pro selektivní ionty 240, 351 a 363 m/z.

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem praktické části diplomové práce bylo vyvinout vhodnou metodu pro analýzu vitaminů D pomocí plynové chromatografie. Pozornost byla zaměřena především na přípravu vlastního vzorku, jež zahrnovala alkalickou hydrolýzu, extrakci kapalina-kapalina a derivatizaci. Vyhodnocení získaných výsledků bylo provedeno metodou kalibrační křivky a metodou vnitřního standardu.

Jako výchozí matrice byly použity sušené vzorky hub, jelikož sušení těchto potravin je nejčastějším způsobem konzervace na území České republiky. Z výsledků experimentální části vyplynulo, že expozice sušených vzorků hub UV zářením přispěla k významnému zvýšení obsahu vitamínu D<sub>2</sub>. Po optimalizaci pracovního postupu, bylo přistoupeno k jeho aplikaci na jiné potravinové matrice. Pro tyto účely byly vybrány výhradně potraviny živočišného původu, ve kterých se nachází vitamin D<sub>3</sub>.

### 4.1 Optimalizace pracovního postupu

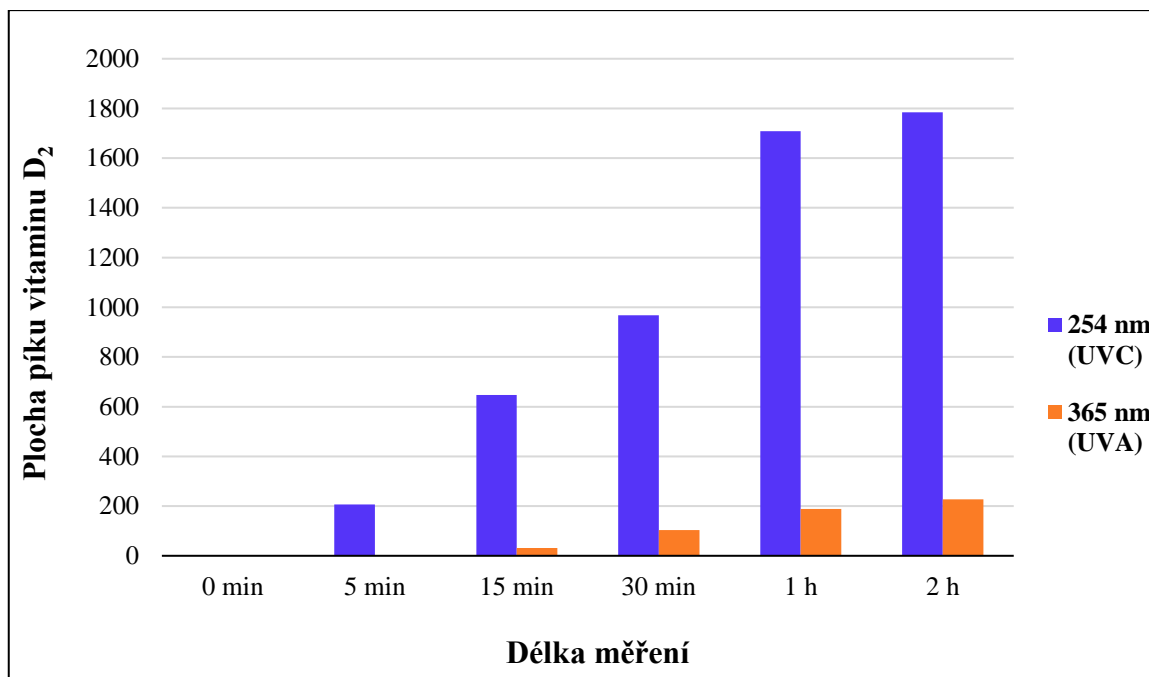
#### 4.1.1 Vzorky hub

##### 4.1.1.1 Optimalizace doby ozařování

Ergosterol (provitamin D<sub>2</sub>), který je součástí fungálních buněčných membrán, může být v houbách přeměněn na vitamin D<sub>2</sub>, je-li vystaven působení ultrafialového záření. Ozařením se tak mohou výrazně zlepšit původní nutriční hodnoty vybraných hub.

Standard ergosterolu byl nejprve rozpuštěn v acetonu (2 mg/ml) a poté byl vzniklý roztok postupně nadávkován po 0,1 ml do připravených skleněných vialek. Tyto vialky byly následně umístěny do kovového bloku, kde bylo rozpouštědlo odpařeno pomocí proudu dusíku. Odparky standardu ergosterolu byly exponovány ultrafialovým zářením při vlnové délce 254 nm (UVC) a 365 nm (UVA). Ozařování odparků trvalo po dobu 5 minut až 2 hodin ve výšce přibližně 3 cm pod UV lampou. Takto získané vzorky byly následně derivatizovány a v konečné fázi analyzovány pomocí GC/MS.

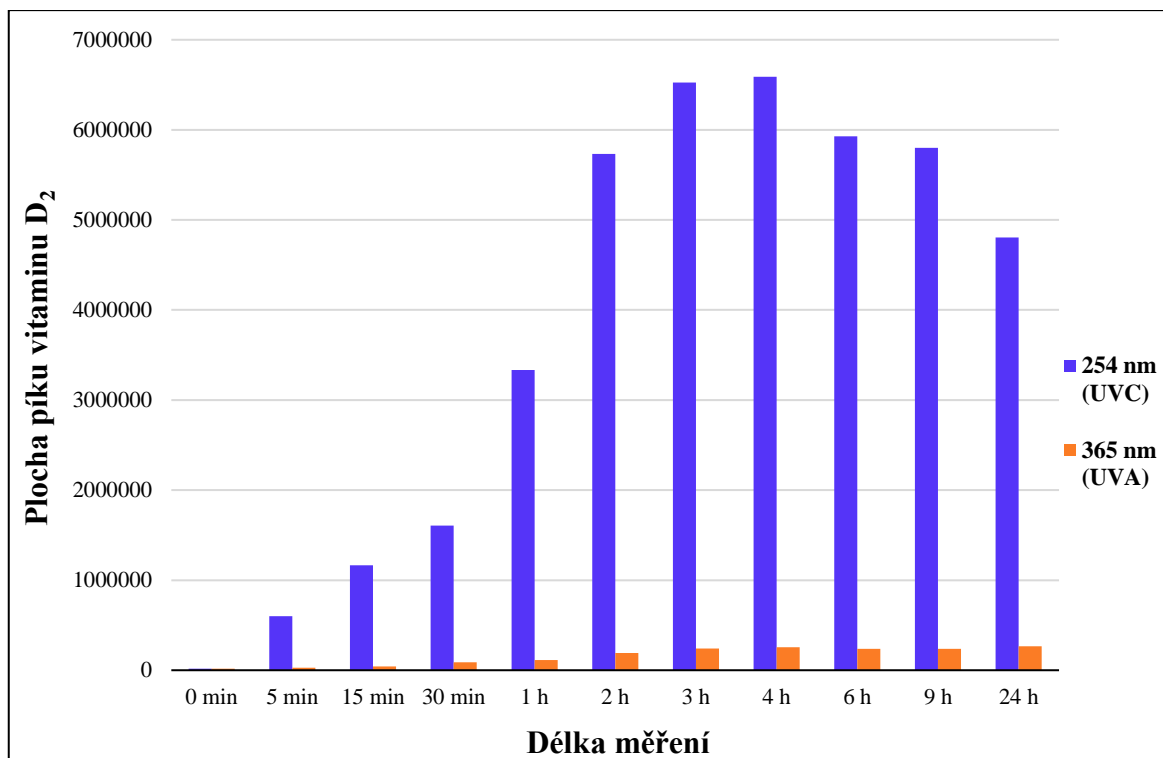
Cílem bylo zjistit, která ze dvou zvolených vlnových délek, při různých expozičních časech, umožnila nejvyšší konverzi ergosterolu na vitamin D<sub>2</sub> (Obr. 18).



**Obr. 18:** Porovnání ploch píků vitamínu D<sub>2</sub> po expozici UV zářením při různých časech

Z obrázku je patrné, že ozařování při vlnové délce 365 nm (UVA) nezpůsobilo tak výraznou konverzi standardu ergosterolu na vitamin D<sub>2</sub> jako při vlnové délce 254 nm (UVC). K nejvýraznější konverzi došlo po 2 hodinové expozici pomocí tvrdého UVC záření. Při závěrečném srovnání ploch píků standardu ergosterolu a vzniklého vitamínu D<sub>2</sub> vyplynulo, že po 2 hodinovém ozařování se celková přeměna uskutečnila v rozsahu okolo 3 %.

Po tomto experimentu byly expozici ultrafialovým světlem podrobeny i reálné vzorky hub, konkrétně hřib smrkový (*Boletus edulis*). Pro vlastní analýzu byly použity pouze klobouky tohoto druhu houby, které byly nejprve nakrájeny na tenké plátky a poté usušeny a homogenizovány v kulovém mlýnku. Vzniklý houbový prášek byl opět vystaven účinku ultrafialovému záření o vlnové délce 254 nm (UVC) a 365 nm (UVA). Ozařování probíhalo po dobu 5 minut až 24 hodin (Obr. 19) ve výšce přibližně 3 cm pod UV lampou. Ozářené vzorky byly následně zmýdelněny, extrahovány, derivatizovány a poté analyzovány GC/MS.

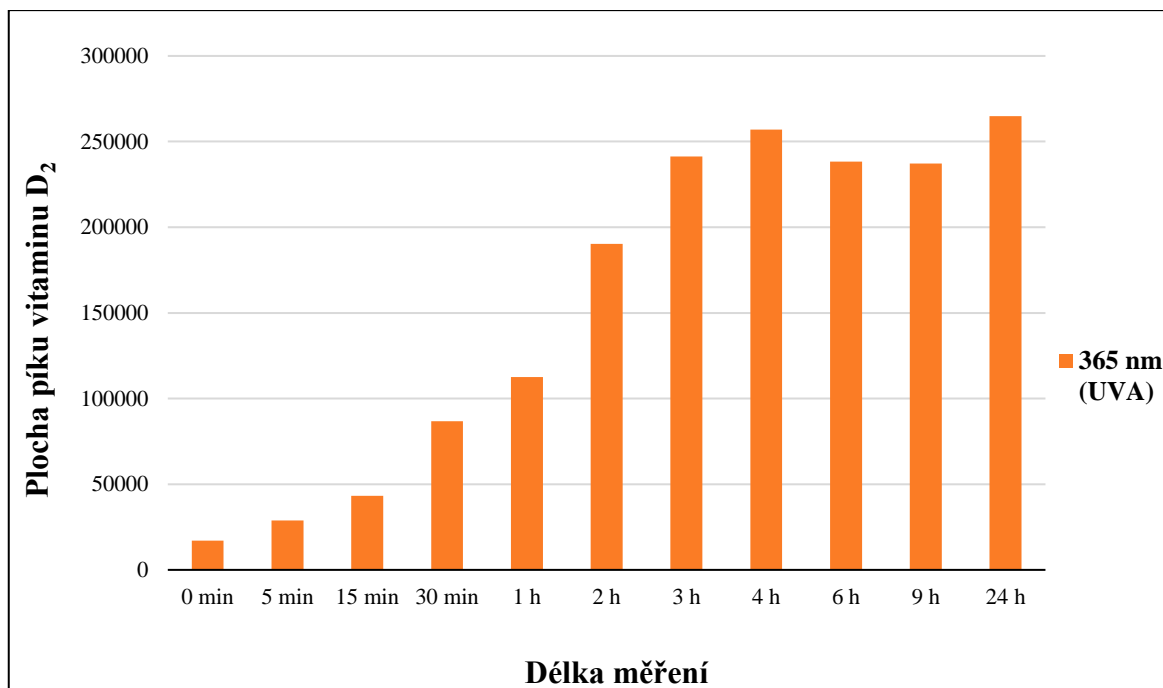


**Obr. 19:** Porovnání ploch píků vitamínu D<sub>2</sub> u sušeného hříbu smrkového (*Boletus edulis*) po expozici UV zářeními při různých časech

Z obrázku je patrné, že i v případě použití reálného vzorku dochází při vlnové délce 254 nm (UVC) k výrazné konverzi ergosterolu na vitamin D<sub>2</sub>. Na rozdíl od předchozího experimentu, který využíval standard ergosterolu, byla v tomto případě prodloužena doba expozice UV zářeními. Tento krok se ukázal být jako správný, protože k nejvýraznější přeměně došlo až po 4 hodinové expozici. Ze závěrečného srovnání ploch píků ergosterolu a vzniklého vitamínu D<sub>2</sub> po 4 hodinovém ozařování UVC vyplývá, že celková konverze se uskutečnila v rozsahu asi 5 %. Je tedy o něco vyšší ve srovnání s konverzí standardu.

Z obrázku výše je rovněž zjevné, že u reálných vzorků hub docházelo při ozařování delším než 4 hodiny k postupnému snižování obsahu vitamínu D<sub>2</sub>. Toto snižování bylo pravděpodobně způsobeno rozkladem zmíněného vitamínu.

V případě použití záření o vlnové délce 365 nm (UVA) byl s prodloužující se expozicí zpozorován méně výrazný pokles obsahu vitamínu D<sub>2</sub> (Obr. 20). K tomuto jevu mohlo patrně dojít z toho důvodu, že UVA je oproti UVC níže energetické UV záření.



**Obr. 20:** Porovnání ploch píků vitamínu D<sub>2</sub> u sušeného hříbu smrkového (*Boletus edulis*) po expozici UVA zářením při různých časech

#### 4.1.1.2 Optimalizace zmýdelnění a extrakce

Důležitým krokem po ozáření hub bylo zmýdelnění následované extrakcí vhodnými rozpouštědly. Cílem zmýdelnění bylo narušit strukturu houbové matrice, aby se vitamin D<sub>2</sub> vázaný na lipoproteinový komplex lépe uvolnil do extrakčního média.

Zmýdelnění a extrakce byly provedeny dle postupu popsaného v literatuře, pouze s jistými modifikacemi [30, 36]. Vlastní vzorky byly připraveny z ozářeného i neozářeného houbového prášku (0,2 g), kyseliny L-askorbové (0,1 g), ethanolu (2,5 ml) a chrysen-D<sub>12</sub>, který sloužil jako vnitřní standard (0,02 ml; 1 mg/ml v acetonu).

Proměrování probíhalo při různých objemech 50% NaOH a deionizované H<sub>2</sub>O, při různých časech a teplotách zahřívání (Tab. IX). Takto získané vzorky byly následně extrahovány, derivatizovány a v konečné fázi analyzovány pomocí GC/MS.

**Tab. IX:** Podmínky zmýdelnění sušeného ozářeného hříbu smrkového (*Boletus edulis*)

Měření	Podmínky	SIM Plocha píku	
		Vitamin D <sub>2</sub>	Ergosterol (provitamin D <sub>2</sub> )
1.	0 ml 50% NaOH 5 ml H <sub>2</sub> O 20 °C, 30 min	252988	67424432
2.	0 ml 50% NaOH 5 ml H <sub>2</sub> O 85 °C, 30 min	312094	61107930
3.	0,25 ml 50% NaOH 4,75 ml H <sub>2</sub> O 85 °C, 30 min	659207	130534552
4.	1 ml 50% NaOH 4 ml H <sub>2</sub> O 20 °C, 24 h	825059	92571950
5.	1 ml 50% NaOH 4 ml H <sub>2</sub> O 50 °C, 30 min	758398	116891108
6.	1 ml 50% NaOH 4 ml H <sub>2</sub> O 85 °C, 30 min	<b>830374</b>	<b>139419673</b>
7.	1 ml 50% NaOH 4 ml H <sub>2</sub> O 100 °C, 30 min	649968	149704380
8.	2,5 ml 50% NaOH 2,5 ml H <sub>2</sub> O 20 °C, 24 h	601878	34795116
9.	2,5 ml 50% NaOH 2,5 ml H <sub>2</sub> O 85 °C, 10 min	281165	6340516
10.	2,5 ml 50% NaOH 2,5 ml H <sub>2</sub> O 85 °C, 30 min	586749	76898472
11.	2,5 ml 50% NaOH 2,5 ml H <sub>2</sub> O 85 °C, 60 min	620251	5827454



Z výsledků shrnutých v tabulce je patrné, že v případě, kdy nebyl použit žádný objem 50% NaOH (měření č. 1 a 2) pravděpodobně nedošlo k dostatečnému rozrušení matrice, a tudíž bylo uvolněno méně vitamínu D<sub>2</sub> i ergosterolu. Při zmýdelnění, které probíhalo za vysoké teploty (měření č. 7), už naopak patrně docházelo k rozkladu vitamínu D<sub>2</sub>.

Z tabulky je rovněž zjevné, že saponifikace za laboratorní teploty (například měření č. 4) byla relativně účinná z pohledu uvolnění vitamínu D<sub>2</sub> z vázaných forem, ale nebyla dostatečná k uvolnění ergosterolu (provitamin D<sub>2</sub>). Další nevýhodou tohoto postupu byla i jeho časová náročnost.

Z dosažených výsledků tedy vyplývá, že nejvíce vitamínu D<sub>2</sub> se podařilo uvolnit z matrice při použití 1 ml 50% NaOH a 4 ml deionizované H<sub>2</sub>O. Zahřívání probíhalo při teplotě 85 °C po dobu 30 minut (měření č. 6).

Dalším krokem, který následoval po zmýdelnění, byla extrakce. Jako efektivní se ukázal být postup založený na zředění vzniklé suspenze deionizovanou H<sub>2</sub>O (1 ml) a na následné extrakci hexanem (2 ml). Extrakce byla poté provedena ještě jednou s 1 ml hexanu. Spojené hexanové extrakty byly dále odpařeny, derivatizovány a analyzovány GC/MS.

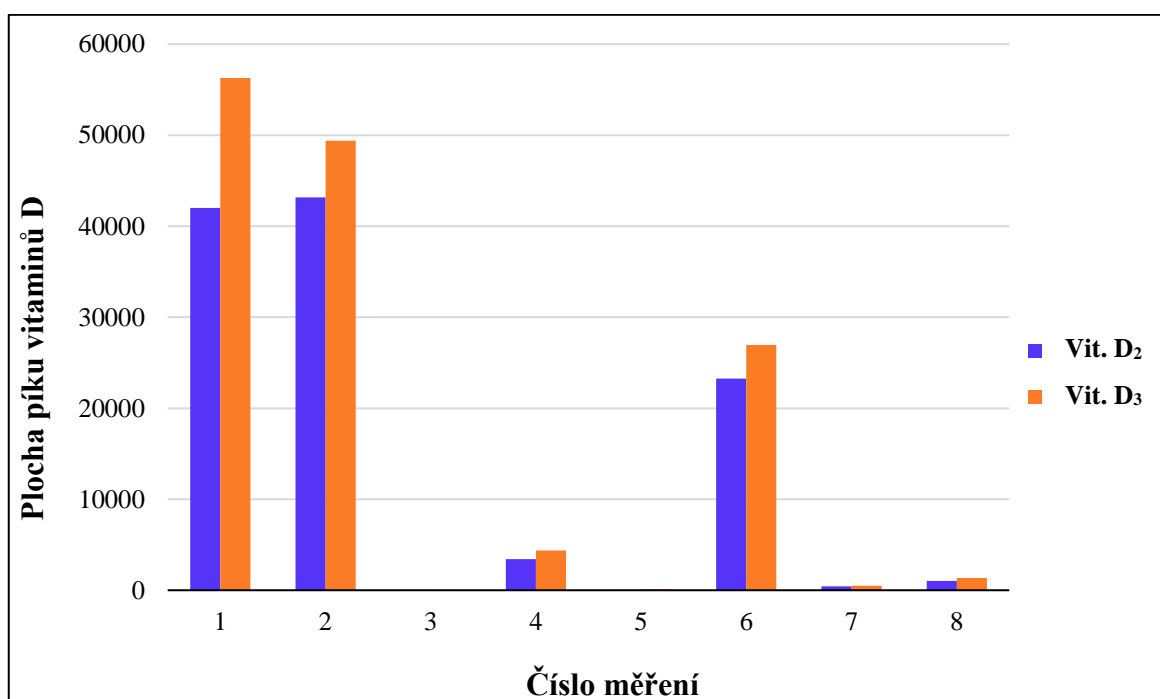
#### **4.1.1.3 Optimalizace derivatizace**

Posledním krokem potřebným k vývoji metody bylo nalezení vhodných podmínek pro derivatizaci. Pro měření byla použita směs standardů vitamínu D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub> (0,05 ml; 1 mg/ml v chloroformu). Derivatizace byla provedena za pomoci silylačních činidel HMDS, HMDS v pyridinu a BSTFA v pyridinu.

Přehled provedených experimentů, zahrnujících variabilitu objemů činidel, teploty a doby inkubace, je uveden v Tab. X. Po provedené inkubaci byl k obsahu ve vialce přidán hexan (0,4 ml) a takto připravený vzorek byl přichystán pro GC/MS analýzu.

**Tab. X:** Podmínky derivatizace

Měření	BSTFA (ml)	HMDS (ml)	Pyridin (ml)	Teplota (°C)	Čas (min)
1.	0,05	–	0,05	50	30
2.	<b>0,05</b>	–	<b>0,05</b>	<b>85</b>	<b>30</b>
3.	–	0,05	0,05	50	10
4.	–	0,05	0,05	85	10
5.	–	0,05	0,05	50	30
6.	–	0,05	0,05	85	30
7.	–	0,1	–	50	30
8.	–	0,1	–	85	30

**Obr. 21:** Výsledky analýzy po optimalizaci derivatizace

Z výsledků GC/MS analýzy (Obr. 21) je zjevné, že pro derivatizaci jsou nejvhodnější podmínky měření č. 1 nebo č. 2, mezi nimiž není patrný významný rozdíl. Tyto postupy se lišily pouze teplotou, při níž derivatizace probíhala. Jelikož předchozí zmýdelnění reálného vzorku probíhalo při 85 °C, byla tato teplota ponechána i pro vlastní derivatizaci.

Na základě zhodnocení všech sledovaných parametrů byla pro analýzu reálných vzorků hub zvolena silylace probíhající při 85 °C po dobu 30 min, využívající BSTFA v pyridinu jako derivatizační činidlo. Druhé použité činidlo HMDS, které je považováno za relativně slabší donor trimethylsilylové skupiny, nebylo v tomto případě dostatečně účinné.

### 4.1.2. Živočišné produkty

Jak již bylo zmíněno, cílem této diplomové práce bylo najít vhodné podmínky pro stanovení vitamínu D<sub>2</sub> v sušených plodnicích hub (pouze klobouky).

Později bylo přistoupeno k aplikaci optimalizovaného postupu i na jiné potravinové matrice. Jednalo se pouze o potraviny živočišného původu (Tab. VIII), ve kterých se přirozeně nachází vitamin D<sub>3</sub>.

Vlastní vzorky byly připraveny ze syrových živočišných produktů, které byly dle potřeby homogenizovány v kulovém mlýnku. K takto připraveným vzorkům byly následně přidány kyselina L-askorbová (0,1 g), ethanol (2,5 ml) a chrysen-D<sub>12</sub> jako vnitřní standard (0,02 ml; 1 mg/ml v acetonu). Zmýdelnění bylo provedeno pomocí 1 ml 50% NaOH a 4 ml deionizované H<sub>2</sub>O při teplotě 85 °C po dobu 30 minut. Jednalo se tedy o nejvhodnější postup použitý při zmýdelnění hub (kapitola 4.1.1.2).

Dalším krokem, který byl proveden po zmýdelnění, bylo zředění vzniklé suspenze deionizovanou H<sub>2</sub>O (1 ml) následované extrakcí hexanem (2 ml). Extrakce byla poté opakována ještě jednou s použitím hexanu (1 ml). Jednalo se o analogický způsob jako v případě reálných vzorků hub (kapitola 4.1.1.2).

Posledním krokem, provedeným před vlastní analýzou GC/MS, byla derivatizace. V případě potravin jako hovězí maso, žloutek, máslo, smetana a sýr byla kvůli vyššímu obsahu matricových komponent zvolena silylace pomocí činidla BSTFA (0,075 ml) v pyridinu (0,075 ml) probíhající při teplotě 85 °C po dobu 30 min. Po provedené inkubaci byl na závěr k obsahu ve vialce přidán hexan (0,6 ml).

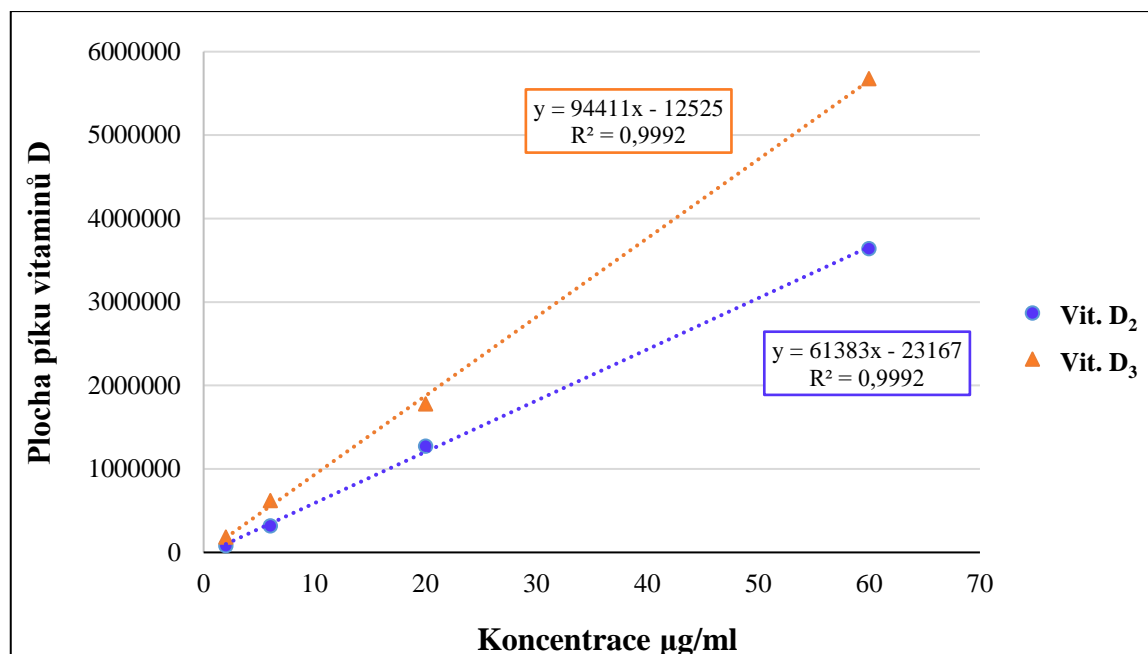
U zbývajících vzorků potravin (losos, tuňák, kuřecí maso, mléko a jogurt) byl, stejně jako u vzorků hub, dostačující nižší objem činidla BSTFA (0,05 ml), pyridinu (0,05 ml) a také hexanu (0,4 ml) (kapitola 4.1.1.3).

## 4.2 Vyhodnocení výsledků

Pro kvantifikaci reálných vzorků sušených hub a živočišných produktů byly použity dvě metody, a to metoda kalibrační křivky a metoda vnitřního (interního) standardu.

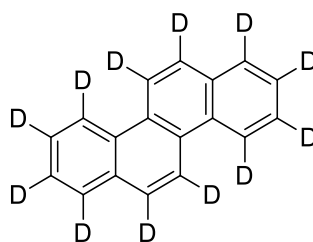
Pro kvantifikaci metodou kalibrační křivky byla připravena sada čtyř kalibračních roztoků standardů vitamínů D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub> (1 mg/ml chloroformu) o koncentraci 2, 6, 20 a 60 µg/ml.

Z výsledků měření byla sestrojena kalibrační křivka závislosti plochy píku příslušného standardu vitamínu D na koncentraci (Obr. 22). Ze získané rovnice lineární regrese byla určena koncentrace hledané složky ve vzorku.



**Obr. 22:** Kalibrační křivky standardů vitamínů D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub>

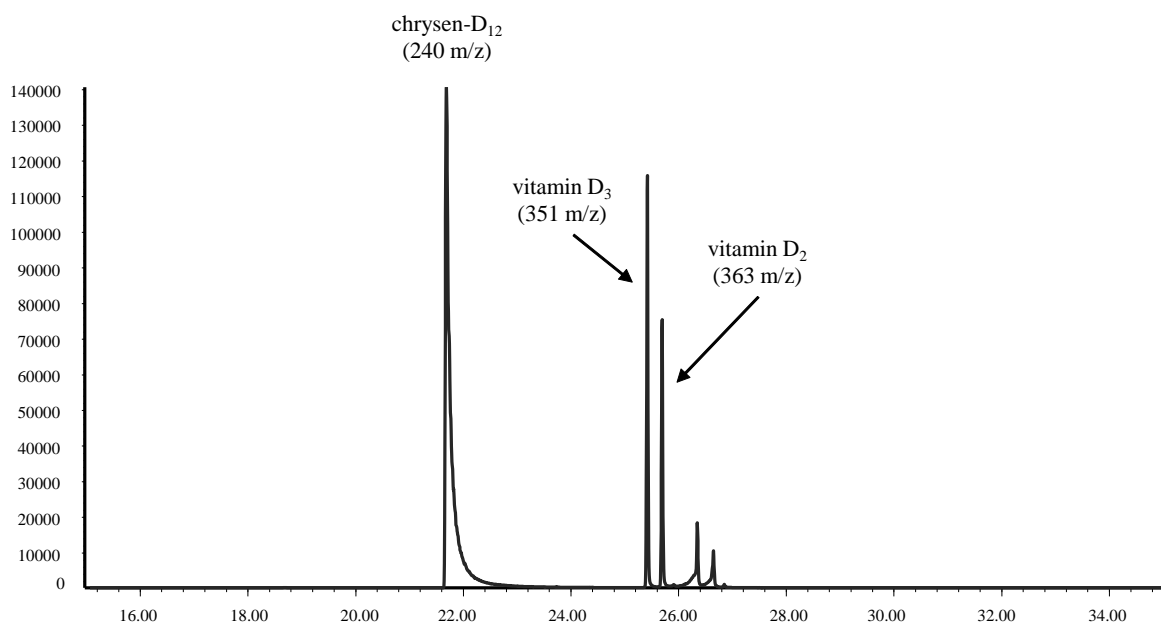
Při metodě vnitřního standardu se ke stanovovanému vzorku přidává známé množství vnitřního standardu [33]. Jako vhodný vnitřní standard byl vybrán izotopicky značený chrysen-D<sub>12</sub> (0,02 ml; 1 mg/ml v acetonu), jehož struktura je znázorněna na Obr. 23.



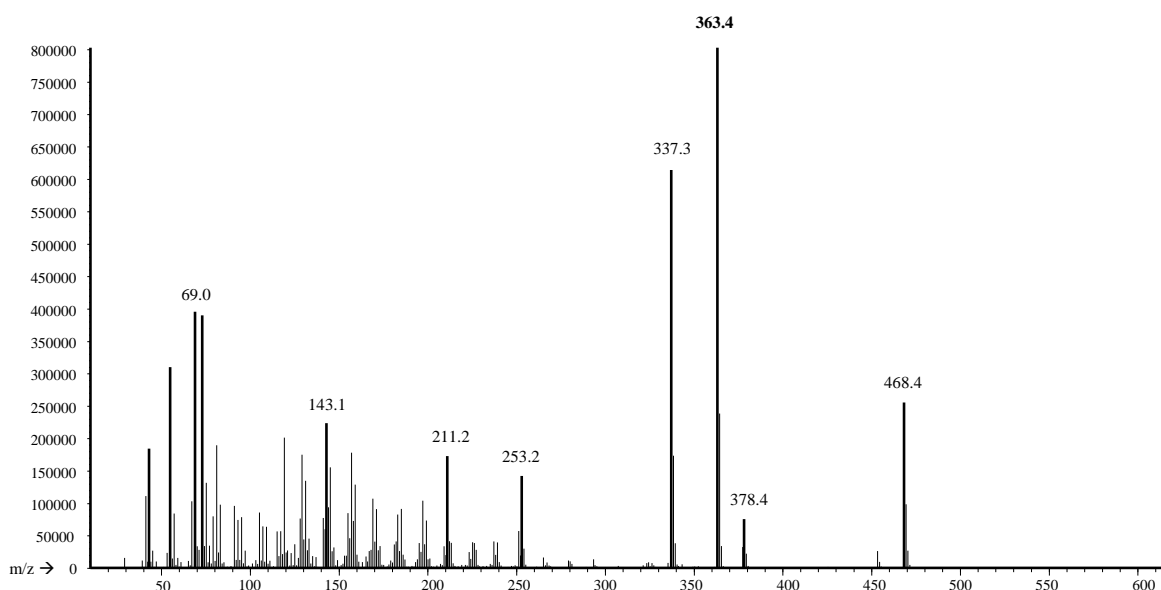
**Obr. 23:** Struktura chrysen-D<sub>12</sub>

Ke kvantifikaci v režimu SIM byl vybrán fragmentový ion  $m/z = 363$  ( $C_{27}H_{39}^+$ ) pro vitamin D<sub>2</sub> a fragmentový ion  $m/z = 351$  ( $C_{26}H_{39}^+$ ) pro vitamin D<sub>3</sub>. Chromatogram a hmotnostní spektra jednotlivých derivatizovaných standardů vitamínů D jsou znázorněny na Obr. 24–26.

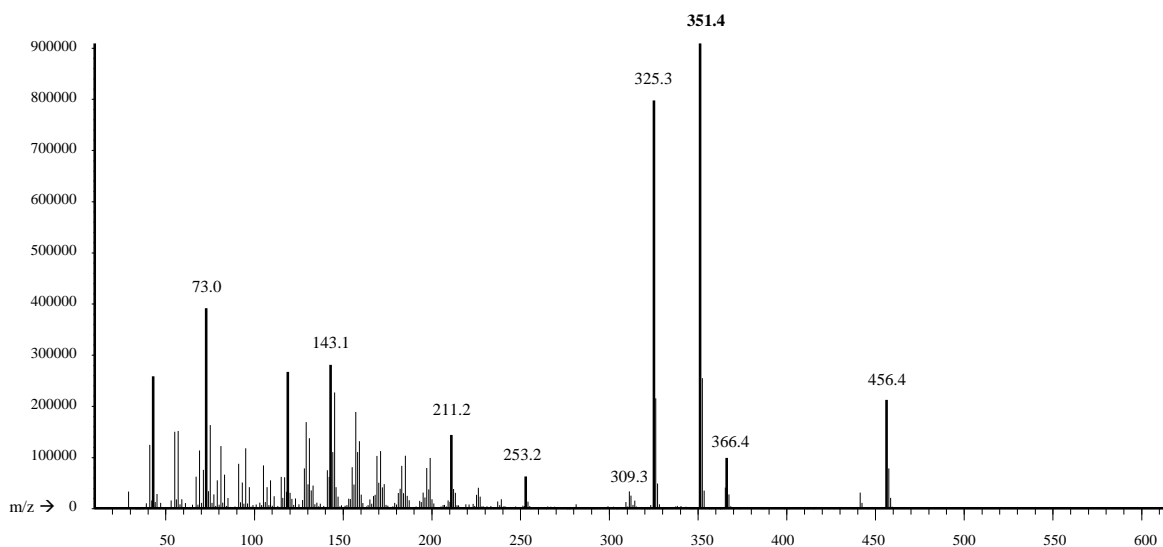
Pro izotopicky značený vnitřní standard chrysen-D<sub>12</sub> byl ke kvantifikaci v režimu SIM vybrán molekulární ion  $m/z = 240$  ( $C_{18}D_{12}^+$ ). Chromatogram standardu této sloučeniny je znázorněn na Obr. 24.



**Obr. 24:** Chromatogram derivatizovaných standardů vitaminů D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub> a standardu chrysen-D<sub>12</sub> v režimu SIM (240, 351, 363 m/z)



**Obr. 25:** Hmotnostní spektrum derivatizovaného standardu vitaminu D<sub>2</sub>



**Obr. 26:** Hmotnostní spektrum derivatizovaného standardu vitamínu D<sub>3</sub>

Výsledky získané metodou kalibrační křivky a metodou vnitřního standardu jsou v případě sušených neozářených a ozářených vzorků hub uvedeny v Tab. XI.

**Tab. XI:** Srovnání metod kvantifikace vitamínu D<sub>2</sub> u sušených vzorků hub

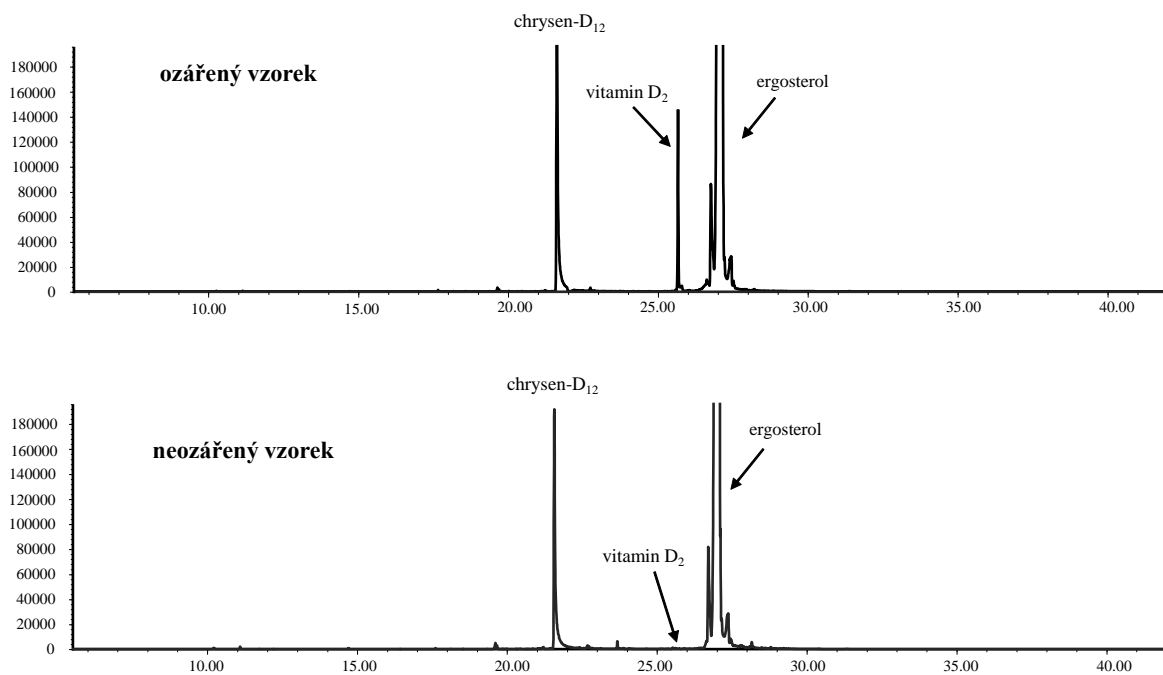
Vzorky hub	Ozařování (h) při 254 nm	Koncentrace vitamínu D <sub>2</sub> (µg/g)	
		Metoda kalibrační křivky	Metoda vnitřního standardu
<b>bedla vysoká</b> ( <i>Macrolepiota procera</i> )	0	0,068	0,067
	4	10,062	9,895
<b>hlíva ústříčná</b> ( <i>Pleurotus ostreatus</i> )	0	0,459	0,475
	4	65,742	62,037
<b>hřib smrkový</b> ( <i>Boletus edulis</i> )	0	0,170	0,179
	4	34,763	35,630
<b>klouzek sličný</b> ( <i>Suillus grevillei</i> )	0	0,383	0,368
	4	<b>100,922</b>	<b>101,581</b>
<b>kozák dubový</b> ( <i>Leccinellum crocipodium</i> )	0	0,106	0,081
	4	40,815	38,750
<b>pečárka polní</b> ( <i>Agaricus campestris</i> )	0	0,082	0,075
	4	62,098	66,190
<b>plešivka dlabaná</b> ( <i>Handkea utriformis</i> )	0	0,027	0,029
	4	6,041	5,982

Z Tab. XI je patrné, že metoda kalibrační křivky a vnitřního standardu poskytuje dobrou shodu při nízkých i vysokých koncentracích.

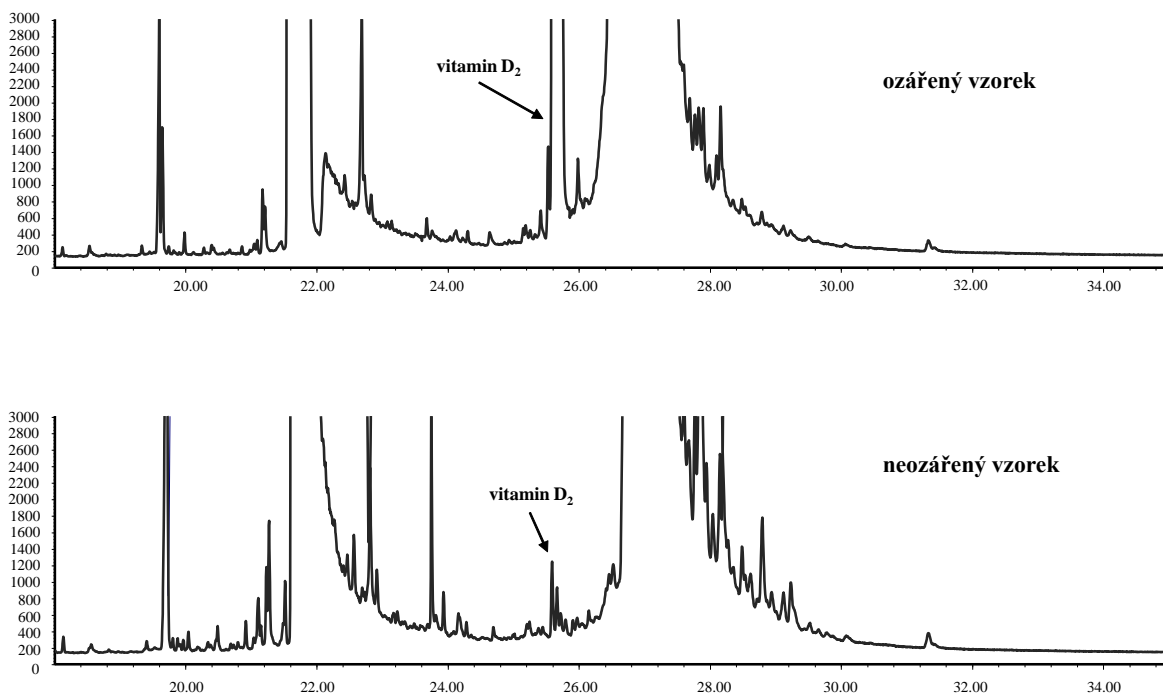
Nejvyšší koncentrace vitamínu D<sub>2</sub> byla nalezena v sušeném ozářeném klobouku klouzku sličného (*Suillus grevillei*), její hodnota se pohybovala okolo 101 µg/g. Naopak nejnižší koncentrace vitamínu D<sub>2</sub> v ozářených vzorcích byla nalezena v sušeném ozářeném klobouku plešivky dlabané (*Handkea utriformis*), hodnota činila zhruba 6 µg/g. Tato nižší hodnota je pravděpodobně způsobená nízkým počátečním obsahem provitaminu D<sub>2</sub> (ergosterol) v tomto vzorku houby.

Obecně nízké hodnoty vitamínu D<sub>2</sub> stanovené v neozářených vzorcích hub jsou způsobeny nedostatečnou konverzí provitaminu D<sub>2</sub> na odpovídající vitamin. Z toho důvodu je tedy vhodné vystavovat houby alespoň několik minut UV záření (sluneční či umělé).

Ukázkové chromatogramy vzorku sušeného ozářeného a neozářeného klouzku sličného (*Suillus grevillei*) jsou znázorněny na Obr. 27 a 28.



**Obr. 27:** Chromatogram vzorku sušeného ozářeného a neozářeného klouzku sličného (*Suillus grevillei*) v režimu SIM



**Obr. 28:** Přiblížený chromatogram vzorku sušeného ozářeného a neozářeného klouzku sličného (*Suillus grevillei*) v režimu SIM



Výsledky získané metodou kalibrační křivky a metodou vnitřního standardu jsou u vzorků potravin živočišného původu uvedeny v Tab. XII.

**Tab. XII:** Srovnání metod kvantifikace vitamínu D<sub>3</sub> u živočišných produktů

Vzorky živočišných produktů	Koncentrace vitamínu D <sub>3</sub> (µg/g)	
	Metoda kalibrační křivky	Metoda vnitřního standardu
losos obecný	0,035	0,036
tuňák žlutoploutvý	0,016	0,016
hovězí maso mělněné	0,008	0,008
kuřecí prsní řízký	0,031	0,029
<b>žloutek (kupované; kur domácí)</b>	<b>0,238</b>	<b>0,239</b>
žloutek (domácí; kur domácí)	0,155	0,193
mléko polotučné	0,058	0,061
máslo	0,034	0,094
bílý jogurt	0,043	0,043
smetana ke šlehání	0,031	0,044
sýr	0,038	0,033

Z Tab. XII je zřejmé, že nejvyšší koncentrace vitamínu D<sub>3</sub> byla nalezena ve žloutku kupovaných slepičích vajec, jejíž hodnota se pohybovala okolo 0,24 µg/g. Významná je i koncentrace vitamínu D<sub>3</sub> ve žloutku domácích slepičích vajec. Nejnižší koncentrace vitamínu D<sub>3</sub> byla naopak detekována u masa hospodářských zvířat.

Ve vzorcích sušených ozářených, resp. neozářených hub nebylo zpozorováno žádné množství vitamínu D<sub>3</sub>, v živočišných produktech se naopak nenacházel vitamin D<sub>2</sub>.

## 5. ZÁVĚR

Cílem předložené diplomové práce bylo vyvinout vhodnou metodu pro analýzu vitaminů D (D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub>) pomocí plynové chromatografie.

Jako výchozí matrice byly vybrány druhy hub, které lze běžně nalézt na území České republiky. Pro vlastní analýzu byly použity pouze klobouky sušených hub neozářených a ozářených při vlnové délce 254 nm po dobu 4 hodin, jelikož k výraznému nárůstu obsahu vitaminu D<sub>2</sub> dochází právě vlivem působení UV záření. Vzorokly byly dále podrobeny alkalické hydrolyze, extrakci kapalina-kapalina a derivatizaci. Po optimalizaci pracovního postupu, bylo přistoupeno k jeho aplikaci na další matrice, a to na potraviny živočišného původu, ve kterých se přirozeně nachází vitamin D<sub>3</sub>.

Množství zdraví prospěšných vitaminů D závisí na řadě rozličných faktorů. Významný je nejen obsah příslušných prekurzorů vitaminů D v potravinách, ale také míra jejich vystavení UV záření. Intenzita UV záření souvisí se zeměpisnou šířkou, nadmořskou výškou, ročním obdobím apod. Koncentrace vitaminů D byla ve studovaných vzorcích sušených hub a živočišných produktech stanovena metodou kalibrační křivky a metodou vnitřního standardu (chrysen-D<sub>12</sub>). Tyto metody poskytovaly dobrou shodu při nízkých i vysokých koncentracích příslušných vitaminů D.

Jak se předpokládalo, nejvyšší koncentrace vitaminu D<sub>2</sub> byla nalezena v sušených ozářených kloboučích hub, jelikož u nich došlo k významné konverzi provitaminu D<sub>2</sub> na odpovídající vitamin. Ukázalo se tedy, že je vhodné vystavovat tyto potraviny účinkům UV záření před jejich samotnou konzumací. V potravinách živočišného původu byla nejvyšší koncentrace vitaminu D<sub>3</sub> nalezena ve žloutku kupovaných i domácích slepičích vajec. Zanedbatelné nebyly ani koncentrace tohoto vitaminu v jiných produktech hospodářských zvířat.

Na závěr je tedy možné konstatovat, že byla navržena vhodná metoda pro analýzu vitaminů D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub> plynovou chromatografií. Podařilo se optimalizovat způsob zpracování příslušných vzorků, který zahrnuje alkalickou hydrolyzu, extrakci kapalina-kapalina a také derivatizaci. Pro vyhodnocení získaných výsledků se rovněž podařilo nalézt potřebné kvantifikační metody.

## 6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] J. Velíšek, J. Hajšlová, *Chemie potravin, rozš. a přeprac. 3. vyd., OSSIS, Tábor 2009.*
- [2] M.F. Holick, *Vitamin D Status: Measurement, Interpretation, Clinical Application, Ann. Epidemiol. 19 (2009) 73–78.*
- [3] D.B. Parrish, *Determination of vitamin D in foods: a review, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 12 (1979) 29–57.*
- [4] T.G. Morzunova, *Structure of chemical compounds, methods of analysis and process control, Pharm. Chem. J. 40 (2006) 158–170.*
- [5] V. Antonín, I. Jablonský, V. Šašek, Z. Vančuríková, *Houby jako lék, Ottovo nakladatelství, Praha 2013.*
- [6] L. Kovář, *Breviř o houbách, Olympus, Praha 1999.*
- [7] P. Váňa, *Léčivé houby podle bylináře Pavla, Eminent, Praha 2003.*
- [8] V. Antonín, *Houby: česká encyklopedie, 1. vyd., Reader's Digest Výběr, Praha 2003.*
- [9] H. Grünert, R. Grünert, *Houby, Knižní klub, Praha 1995.*
- [10] S. Rosypal a kol., *Nový přehled biologie, Scientia, Praha 2003.*
- [11] P. Mattila, P. Salo-Väänänen et al., *Basic Composition and Amino Acid Contents of Mushrooms Cultivated in Finland, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 6419–6422.*
- [12] P. Valíček, *Houby a jejich léčivé účinky, 1. vyd., Start, Benešov 2011.*
- [13] M. Svrček, *Houby, Aventinum, Praha 2005.*
- [14] S. Kavishree, J. Hemavathy et al., *Fat and fatty acids of Indian edible mushrooms, Food Chem. 106 (2008) 597–602.*
- [15] J. Klán, *Houby, 1. vyd., Aventinum, Praha 1999.*
- [16] P. Kalač, *A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms, J. Sci. Food. Agric. 93 (2013) 209–218.*
- [17] S.E. Mallikarjuna, A. Ranjini, D.J. Haware et al., *Mineral Composition of Four Edible Mushrooms, J. Chem. 2013 (2013) 1–5.*
- [18] A. Joshua, H. Sperry, J. Sperry, *Mushroom-Derived Indole Alkaloids, J. Nat. Prod. 80 (2017) 2178–2187.*

- [19] B. Muszyńska, P. Komendacki, K. Kała et al., L-Tryptophan and its derivatives in edible mushrooms species, *Medicina Internacia Revuo* 26 (2014) 82–88.
- [20] M.T. Rahman et al., Synthesis of Bisindole Alkaloids from the Apocynaceae Which Contain a Macroline or Sarpagine Unit: A Review, *Molecules* 21 (2016) 1525.
- [21] E. Moliszewska, Mushroom flavour, *Folia Biol.* 10 (2014) 80–88.
- [22] A. Příhoda, L. Urban, L. ml. Urban, *Kapesní atlas hub*, 1. díl 2. vyd., Státní pedagogické nakladatelství (SPN), Praha 1988.
- [23] E. Aprea, A. Romano et al., Volatile compound changes during shelf life of dried *Boletus edulis*: comparison between SPME-GC-MS and PTR-ToF-MS analysis, *J. Mass Spectrom.* 50 (2015) 56–64.
- [24] E. Bielli, *Houby: Obsáhlý rádce pro určování a sběr hub*, 1. vyd., Ikar, Praha 2001.
- [25] V. Hrdina et al., *Přírodní toxiny a jedy*, 1. vyd., Galén, Praha 2004.
- [26] W.S. Jo, M.A. Hossain, S.C. Park, Toxicological Profiles of Poisonous, Edible, and Medicinal Mushrooms, *Mycobiology* 42 (2014) 215–220.
- [27] M.E. Valverde, T. Hernández-Pérez, Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life, *Int. J. Med. Microbiol.* 2015 (2015) 1–14.
- [28] K. Drábová, P. Lokaj et al., Vitamin D – jeho fyziologie, patofyziologie a význam v etiopatogenezi nádorových onemocnění, *Čas. Lék. čes.* 152 (2013) 20–30.
- [29] A.K. Coussens, A.R. Martineau, Anti-Inflammatory and Antimicrobial Actions of Vitamin D in Combating TB/HIV, *Scientifica* 2014 (2014) 1–13.
- [30] Sławińska et al., Study on vitamin D<sub>2</sub> stability in dried mushrooms during drying and storage, *Food Chem.* 199 (2016) 203–209.
- [31] R.J.H. Keegan, Z. Lu, J.M. Bogusz et al., Photobiology of vitamin D in mushrooms and its bioavailability in humans, *Dermatoendocrinol* 5 (2014) 165–176.
- [32] P. György, W.N. Pearson, *The Vitamins: Chemistry, Physiology, Pathology, Methods*, 2. ed. 6. díl, Academic Press, New York 1967.
- [33] R.B. Jäpelt, J. Jakobsen, Vitamin D in plants: a review of occurrence, analysis, and biosynthesis, *Front. Plant. Sci.* 4 (2013) 1–20.
- [34] S. Perales, A. Alegría, R. Barberá, R. Farré, Review: Determination of Vitamin D in Dairy Products by High Performance Liquid Chromatography, *Food Sci. Technol. Int.* 11 (2005) 451–462.

- [35] A.W. Norman, H.F. DeLuca, Chromatographic Separation of Mixtures of Vitamin D<sub>2</sub> Ergosterol, and Tachysterol<sub>2</sub>, *Anal. Chem.* 35 (1963) 1247–1250.
- [36] S.N. Alvi, C.E. Tabache, M.M. Hammami, Determination of vitamin D level in fortified milk by ultra-performance liquid chromatography, *World J. Pharm. Pharm. Sci.* 4 (2015) 170–181.
- [37] J.G. Bell, A.A. Christie, Gas-liquid chromatographic determination of vitamin D<sub>2</sub> in fortified full-cream dried milk, *Analyst* 99 (1974) 385–396.
- [38] B. Andri, P. Lebrun et al., Optimization and validation of a fast supercritical fluid chromatography method for the quantitative determination of vitamin D<sub>3</sub> and its related impurities, *J. Chromatogr. A* 1491 (2017) 171–181.
- [39] A.W. Norman, *Vitamin D: The calcium homeostatic steroid hormone*, Academic Press, New York 1979.
- [40] S.S.M. Hassan, Colorimetric Determination of Vitamin D<sub>2</sub> (Calciferol), *Methods Enzymol.* 67 (1980) 323–326.
- [41] W.W. Jr. Morris, J.B. Wilkie et al., Differentiation of Vitamins D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> by Infrared Spectrophotometry, *Anal. Chem.* 34 (1962) 381–384.
- [42] K. Men, Y. Chen, J. Lui, D. Wei, Electrochemical Detection of Vitamin D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> Based on a Au-Pd Modified Glassy Carbon Electrode, *Int. J. Electrochem. Sci.* 12 (2017) 9555–9564.
- [43] J.H. Méndez, A.S. Pérez et al., Voltammetric determination of vitamin D<sub>3</sub> with a rotating glassy carbon electrode, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 6 (1988) 737–741.