

Použití luminiscenční spektrofotometrie pro stanovení riboflavinu

Bc. Petr Ilčík

Diplomová práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Petr ILČÍK**
Osobní číslo: **T12692**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Použití luminiscenční spektrofluorimetrie pro stanovení riboflavinu**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika vitamínu B2
2. Přehled metod používaných pro stanovení riboflavinu v potravinách
3. Principy luminiscenční spektrofluorimetrie

II. Praktická část

1. Luminiscenční charakteristiky riboflavinu ve vodném roztoku
2. Odzkoušení metody pro měření riboflavinu ve vybrané pevné potravinářské matici

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. PELANT, I., VALENTA, J. Luminiscenční spektroskopie. Praha: Academia, 2006. 327 s. ISBN 80-200-1447-0.
2. KLOUDA, P. Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
3. VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. Chemie potravin I. 3. vydání. Tábor: Ossis, 2009, 602 s. ISBN 978-80-86659-15-2.
4. PREEDY, V. R. B vitamins and folate: chemistry, analysis, function and effects. Cambridge: RSC Publishing, 2013, xxxii, 855 s. ISBN 978-1-84973-369-4.
5. MINDELL, E., MUNDIS, H. Nová vitamínová bible: vitaminy, minerální látky, antioxidanty, léčivé rostliny, doplňky stravy, léčebné účinky potravin i léky používané v homeopatii. Vyd. 3. Praha: Ikar, 2010, 572 s. ISBN 978-80-249-1419-0.
6. KUBÁŇ, V., KUBÁŇ, P. Analýza potravin. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007, 202 s. ISBN 978-80-7375-036-7.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Martina Bučková, Ph.D.

Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

11. února 2013

Termín odevzdání diplomové práce:

17. května 2013

Ve Zlíně dne 11. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: **Bc. Ilčík Petr** Obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 12.5.2013

.....


¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá problematikou stanovení riboflavinu v potravinách. Teoretická část je věnována charakteristice riboflavinu, jeho úlohám v metabolismu a výčtu hlavních zdrojů ve stravě. Přehledně jsou zmíněny metody používané pro stanovení riboflavinu v potravinách, podrobněji je popsána metoda luminiscenční fluorimetrie.

Praktická část práce je zaměřena na stanovení riboflavinu v roztocích a v tavených sýrech metodou spektrální fluorimetrie a ověření degradace riboflavinu ve vodném roztoku účinkem denního světla.

Klíčová slova: Riboflavin, vitamin B₂, metoda luminiscence, spektrofluorimetrie, fotodegradace, tavený sýr

ABSTRACT

Diploma thesis deals with the determination of Riboflavin in foods. The theoretical part is dedicated to the characteristics of the riboflavin, his roles in metabolism and the list of main sources in diet. Clearly referred to the methods used for the determination of Riboflavin in food, in detail are described a method of luminescent fluorometry.

The practical part of the thesis is focused on the determination of Riboflavin in solutions and in processed cheeses using the method of spectral fluorometry and verification of degradation of Riboflavin in aqueous solution by the effect of natural light.

Keywords: Riboflavin, vitamin B₂, Luminiscence method, method Spectrofluorometry, photodegradation, cream cheese

Děkuji vedoucí diplomové práce Mgr. Martině Bučkové PhD. za odborné vedení, trpělivost, poskytnuté konzultace a především za cenné rady k teoretické i praktické části diplomové práce.

Dále pak mé poděkování patří doc. RNDr. Vojtěchu Křesálkovi, CSc. a Oliveru Polkovi za pomoc při měření diplomové práce a Ing. Richardu Nikolaosovi za pomoc při výrobě tavených sýrů.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 RIBOFLAVIN (VITAMIN_{B2})	12
1.1 CHEMICKÁ STRUKTURA	12
1.2 VLASTNOSTI.....	14
1.3 FUNKCE RIBOFLAVINU	15
1.4 ZDROJE.....	15
1.5 DŮSLEDKY NEDOSTATKU A NADBYTKU	16
2 PŘEHLED METOD POUŽÍVANÝCH PRO STANOVENÍ RIBOFLAVINU V POTRAVINÁCH	18
2.1 SPEKTROFOTOMETRICKÉ METODY	18
2.1.1 Lumiflavinová metoda	18
2.1.2 Metoda spektrofluorimetrická	19
2.2 MIKROBIOLOGICKÉ STANOVENÍ RIBOFLAVINU	19
2.3 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA S LASEREM INDUKOVANOU FLUORESCENČNÍ DETEKČÍ	19
2.4 METODA CHROMATOGRAFICKÁ	20
3 LUMINISCENČNÍ SPEKTROFLUORIMETRIE	21
3.1 VZNIK FOTOLUMINISCENČNÍCH SPEKTER	22
3.2 STRUKTURA LÁTEK VYKAZUJÍCÍCH LUMINISCENCI	23
3.2.1 Lumifory (fluorofory).....	24
3.3 SPEKTRÁLNÍ FLUORIMETRIE.....	24
3.4 EMISNÍ A EXCITAČNÍ SPEKTRA	27
3.4.1 Druhy elektromagnetického záření.....	27
3.4.2 Fluorescenční a excitační spektra.....	28
3.5 ANALYTICKÉ VYUŽITÍ FLUORESCENCE.....	30
II PRAKTICKÁ ČÁST	31
4 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	32
5 MATERIÁL A PŘÍSTROJE	33
5.1 MATERIÁL A CHEMIKÁLIE.....	33
5.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A SOFTWARE.....	33
6 METODIKA	34

6.1	STANOVENÍ RIBOFLAVINU VE VODNÉM ROZTOKU	34
6.2	FOTODEGRADACE RIBOFLAVINU V ROZTOKU.....	34
6.3	PŘÍPRAVA VZORKŮ TAVENÝCH SÝRŮ	35
6.3.1	Výroba taveného sýru v laboratorních podmínkách.....	35
6.3.2	Vzorek Smetanového taveného sýru Kunín	36
6.4	MĚŘENÍ EMISNÍCH SPEKTER VZORKŮ.....	36
7	VÝSLEDKY.....	39
7.1	STANOVENÍ VHODNÝCH PODMÍNEK MĚŘENÍ	39
7.2	MĚŘENÍ ZÁVISLOSTI INTENZITY FLUORESCENCE NA KONCENTRACI RIBOFLAVINU V ROZTOKU	40
7.3	FOTODEGRADACE RIBOFLAVINU V ROZTOKU	43
7.4	MĚŘENÍ INTENZITY FLUORESCENCE TAVENÝCH SÝRŮ S PŘÍDAVKEM RIBOFLAVINU VYROBENÝCH V LABORATORNÍCH PODMÍNKÁCH.....	45
7.5	MĚŘENÍ INTENZITY FLUORESCENCE SMETANOVÉHO TAVENÉHO SÝRU S PŘÍDAVKEM RIBOFLAVINU	48
8	DISKUSE VÝSLEDKŮ	51
8.1	STANOVENÍ OPTIMÁLNÍCH PODMÍNEK PRO MĚŘENÍ KONCENTRACE RIBOFLAVINU VE VZORCÍCH.....	51
8.2	KALIBRAČNÍ ŘADA RIBOFLAVINU A FOTODEGRADACE RIBOFLAVINU V ROZTOKU	52
8.3	STANOVENÍ RIBOFLAVINU V TAVENÉM SÝRU.....	53
	ZÁVĚR	56
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	58
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	64
	SEZNAM OBRÁZKŮ	65
	SEZNAM TABULEK.....	66
	SEZNAM PŘÍLOH.....	67

ÚVOD

Riboflavin (vitamin B₂), někdy také nazýván „laktoflavin, oboflavin, uroflavin a vitamin G“, byl poprvé objeven Warburgem a Christianem v roce 1932. Čistá forma riboflavinu je žlutozelená krystalická látka. Strukturu riboflavinu tvoří isoalloxazinové jádro, na které je vázán ribitol, alditol odvozený od D-ribosy.

Riboflavin se nejvíce vyskytuje v lidském organismu jako součást enzymů ve formě flavinmononukleotid a flavinadeninukleotid. Účastní se v lidském organismu přeměny tuků, proteinů a sacharidů, kdy dodává chemickým dějům vodík a tím pomáhá tělu uvolňovat energii ze zmíněných živin. Riboflavin ovlivňuje příznivým způsobem pokožku, vlasy a nehty. Umožňuje vidění za šera. Je součástí tkáňových oxidací ve svalstvu, srdci a játrech.

Nejlépe dostupnými zdroji riboflavinu jsou pivovarské kvasnice, vepřová játra, tvrdý sýr, vepřové maso, čočka aj. Příjem riboflavinu je nutné nepodceňovat a to zejména pro těhotné a kojící ženy. Nedostatek riboflavinu může vést ke vzniku zánětů, prasklinám rtů, poruchám kůže a sliznic, depresivním náladám a jiným poruchám.

Pro stanovení riboflavinu v potravinách lze využít fluorimetrii, kapalinovou chromatografii kombinovanou s fluorimetrickou detekcí, kapilární elektroforézu a mikrobiologické stanovení. Riboflavin se rozkládá v přítomnosti alkálií a světla a je nutno k tomu přihlížet při jeho stanovení. Každá již zmíněná metoda má své výhody a nevýhody.

V diplomové práci je věnována pozornost především detekci riboflavinu metodou spektrofluorimetrie. Tato metoda je použita pro stanovení riboflavinu v roztoku a také v pevné neprůhledné potravinářské matrici. Jako potravinářská matrice byl použit tavený sýr.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 RIBOFLAVIN (VitaminB₂)

Dříve se pro vitamin B₂ využíval název „laktoflavin“, jelikož dává mléku jeho žlutavý nádech. V některých publikacích je možné doposud nalézt také názvy jako „ovoflavin, uroflavin a vitamin G“. V současné době se nejvíce používá název riboflavin. Riboflavin je řazen do skupiny látek zvaných flaviny [1, 2, 3, 4].

Flaviny jsou skupina biologicky aktivních látek, které se vyznačují společným strukturním rysem

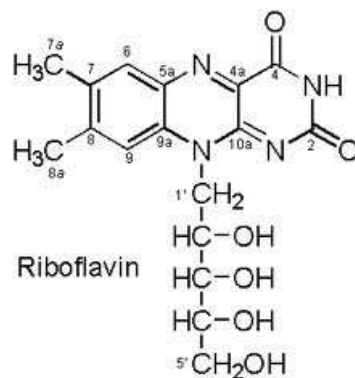
a to isoalloxazinovým seskupením. Přítomností konjugovaného systému dvojných vazeb isoalloxazinu absorbuje molekula světlo v oblasti okolo 450 nm, jež se ve výsledku projeví žlutým zbarvením. Žlutá barva dala derivátům isoalloxazinu společný název „flaviny“, který je odvozen z latinského slova *flavus*, žlutý. Čistá forma riboflavinu je žlutozelená krystalická látka (Obr. 1), jejíž roztoky mají schopnost fluorescence [1, 5].

1.1 Chemická struktura

Z chemické stránky je riboflavin 7,8-dimethyl-10-(-1-D-ribityl)isoalloxazin (Obr. 2). Strukturu tvoří isoalloxazinové jádro, na které je vázán ribitol, alditol odvozený od D-ribosy. Nastane-li redukce, přijímá riboflavin dva atomy vodíku a vzniká bezbarvý leukoriboflavin. Leukoriboflavin je dihydrosloučenina, která ztrácí schopnost fluorescence. V přítomnosti kyslíku dochází ke zpětné oxidaci na riboflavin [1, 2, 6].



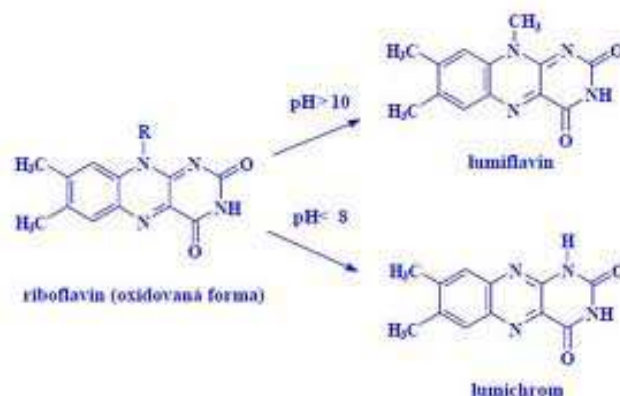
Obr. 1 Riboflavin v pevném skupenství [7]



Obr. 2 Chemická struktura riboflavinu (oxidovaná forma) [3]

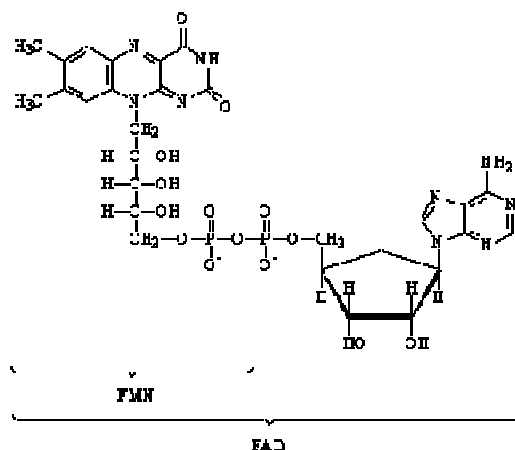
Riboflavin je odolný vůči kyslíku, vysokým teplotám a kyselinám, degraduje však v přítomnosti alkálií a světla. Působením UV paprsků se riboflavin rozkládá dle pH prostředí na dvě různé sloučeniny. Riboflavin v roztoku $\text{pH} > 10$ se za přítomnosti UV paprsků rozkládá za vzniku lumiflavinu, naopak v roztoku $\text{pH} < 8$ se riboflavin vlivem UV paprsků rozkládá

za vzniku lumichromu (Obr. 3). Na intenzitu a způsob rozkladu má vliv několik činitelů a to především viskozita roztoku, polarita rozpouštědla, iontová síla a již zmíněné pH roztoku. Hlavní příčinou rozkladu riboflavinu je vlnová délka a intenzita „světla“. Tyto činitele hrají zásadní roli v rozkladu riboflavinu [1, 8, 9, 10, 11].



Obr. 3 Rozklad riboflavinu za přítomnosti světla [2]

V organismu je riboflavin účinný jako součást enzymů (koenzym), zejména ve formách flavinmononukleotid (FMN) a flavinadenindinukleotid (FAD). Tyto koenzymy (Obr. 4) hrají důležitou roli při oxidačně-redukčních dějích v lidském organismu [12, 13, 5, 2].



Obr. 4 Struktura FAD/FMN [1]

1.2 Vlastnosti

Dle rozpustnosti je riboflavin řazen mezi látky rozpustné ve vodě. Vliv tepla a oxidace v kyselém prostředí nemá na riboflavin negativní účinek, naopak přítomnost alkálií a působení přímého denního světla, zejména UV záření, riboflavin ničí. Potraviny, jež obsahují vitamin B₂, se musí proti těmto činitelům chránit. Tyto potraviny se balí do neprůhledných obalů např. tmavá skla, alobal, neprůhledné plasty a jiné, jež zabraňují prostupu denního světla přímo k potravíně [14, 15, 2].

V lidském trávicím traktu se riboflavin nejlépe vstřebává v přítomnosti ostatních vitaminů skupiny B a minerálů jako je selen a železo. Naopak nepříznivým způsobem na vstřebávání riboflavinu v trávicím traktu člověka působí přítomnost vysokých dávek alkoholu, antidepressiv jako imipramin a amitripylin, lék adrimycin, který se užívá při chemoterapii a anti-malarikum quinakrin. Stejný negativní účinek na vstřebávání riboflavinu může mít také přítomnost většího množství železa, zinku, mědi či manganu [16, 11].

Struktura riboflavinu umožňuje projev luminiscence, která se využívá zejména při analytickém stanovení. Optimální luminiscence bez přídavku kovových aktivátorů nastává u riboflavinu v rozmezí při pH 7 – 8. Přidáním měďnatých iontů do roztoku se luminiscence zvýší, zatímco rtuťnaté ionty luminiscenci inhibují. Při oxidaci riboflavinu peroxidem vodíku, vykazuje látka světlo o přibližně stejné barvě jako riboflavin [17].

1.3 Funkce riboflavinu

Riboflavin se v organismu vyskytuje ve formách FAD a FMN jako součást enzymů, kde hraje důležitou roli v látkové výměně tuků, proteinů a sacharidů. Tyto koenzymy dodávají chemickým dějům vodík a tím pomáhají tělu uvolňovat energii ze zmíněných živin. Vitamin B₂ umožňuje také vidění za šera, kdy převádí krátkovlnné paprsky na žlutozelené. Je součástí tkáňových oxidací ve svalstvu, srdci a játrech [12, 18].

Riboflavin ovlivňuje příznivým způsobem pokožku, vlasy a nehty. Umožňuje výživu potních a mazových žláz, což má vliv na zachování zdravé kůže. Podílí se na vzniku krevních elementů (krvinek), zárodečných buněk a ovlivňuje činnost nervové soustavy a mozku. Spolu s vitamínem B₆ (pyridoxin) ovlivňuje výstavbu svalové tkáně [12, 19].

1.4 Zdroje

Riboflavin musí lidský organismus přijímat exogenní cestou a to zejména přirozeně z potravin nebo v podobě doplňků stravy. Riboflavin není však ze všech skupin potravin absorbován v lidském traktu stejnou měrou. Z potravin živočišného původu je riboflavin v trávicím traktu lépe vstřebáván než z potravin rostlinného původu, kde převládají kovalentně vázané formy, jež jsou obtížně štěpitelné proteázami [1].

Mezi přírodní zdroje s nejvyšším obsahem riboflavinu řadíme mléko, játra, ledviny, sýry, kvasnice, zeleninu, ryby, vajíčka, jogurty, kokos a zrniny (Tab. 1).

Dalším zdrojem riboflavinu jsou výživové doplňky. Tyto doplňky jsou na trhu k dispozici ve vyšších a menších koncentracích. Nejvíce účinnou formou je však užívání celého komplexu vitamínů řady B [14, 20].

Tab. 1 Průměrný obsah riboflavinu v potravinách [mg/kg] [21]

Průměrný obsah riboflavinu v potravinách [mg/kg]					
Potravina	Množství	Potravina	Množství	Potravina	Množství
Hovězí maso	2,0	Tvrdý sýr	4,6	Zelí	1,1
Vepřové maso	3,5	Vejece	3,5	Fazole	2,7
Telecí maso	3,2	Mrkev	0,4	Čočka	3,1
Drůbež	1,8	Hl. salát	1,0	Kukuřice	1,7
Ryby	2,0	Petržel	2,2	Rýže	0,4
Játra hovězí	3,3	Brambory	1,8	Mouka pš.	1,6
Játra vepřová	4,4	Květák	1,7	Bílý chléb	0,8
Mléko	1,8	Paprika č.	0,4	Mat. mléko	0,5
Máslo	1,0	Špenát	2,3	Piv. kvas.	40,0

Doporučený denní příjem riboflavinu z roku 1999 se uvádí v hodnotách mg a to pro osoby ve věku 7 – 18 let 1,2 – 2 mg/den. Osobám ve věku 19 – 59 let lehce pracujícím je doporučován příjem riboflavinu 1,6 mg/den pro muže a 1,4 mg/den pro ženy. Vykonávají-li tyto osoby těžkou práci, měly by denní příjem riboflavinu zvýšit. Mužům těžce pracujícím je doporučován příjem riboflavinu 1,8 mg/den a ženám 1,6 mg/den [22].

Vyšší příjem riboflavinu je doporučen pro těhotné ženy, kojící ženy a pro ženy užívající antikoncepci. Vyšší denní dávka je také doporučována pro osoby trpící zvýšenou hladinou stresu a pro konzumenty velkého množství alkoholu. Potřeba riboflavinu se zvyšuje při užívání antibiotik.

Naopak příliš vysoký příjem vitamínu B₂ může být rizikem pro osoby užívající protirakovinový lék metotrexát. Příliš mnoho vitamínu B₂ snižuje účinnost tohoto léku [14, 19].

1.5 Důsledky nedostatku a nadbytku

Nedostatek každého vitamínu se u živých organismů projevuje různými příznaky, které jsou při mírném nedostatku označovány jako hypovitaminóza. Při úplném nedostatku vitamínu se hovoří o avitaminóze. Přestože většina příznaků vymizí po dodání chybějící látky, dlouhotrvající nedostatek vitamínu B₂ může zapříčinit i smrt organismu. Mluvíme-li

o nadbytku vitaminů v organismu, hovoříme o stavu tzv. hypervitaminózy. V našich klimatických podmínkách se s tímto stavem prakticky nesetkáváme [1].

Nedostatek riboflavinu může vést ke vzniku zánětů, prasklinám rtů, poruchám kůže a sliznic. Nedostatek může také způsobit šedý zákal a zrakové potíže. Na tvářích alkoholiků se objevují červené žilky a může způsobit také katar dýchacích cest. Nedostatečný příjem riboflavinu způsobuje citlivost na světlo, potíže s močením, depresivní nálady a neschopnost soustředění se. Projevem dlouhodobého nedostatku riboflavinu může být pocit unavených očí, jejich zarudnutí a pálení. Nedostatek riboflavinu může vést až poruchám spánku a závratím [23, 24, 15, 2, 11].

Nadbytek riboflavinu se v organismu prakticky nevyskytuje, jelikož je rozpustný ve vodě a přebytky jsou vyloučeny z těla močí [23, 25].

2 PŘEHLED METOD POUŽÍVANÝCH PRO STANOVENÍ RIBOFLAVINU V POTRAVINÁCH

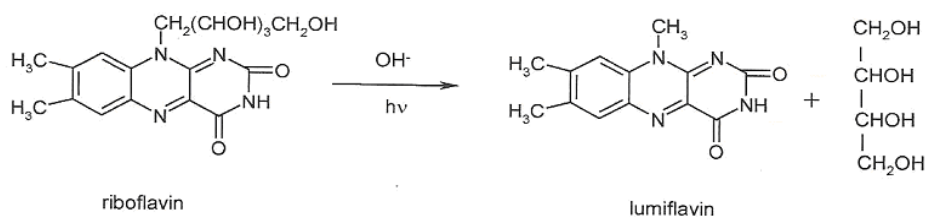
Stanovení riboflavinu je možné provést několika způsoby. V dnešní době se riboflavin stanovuje především pomocí fluorimetrie, kapalinové chromatografie kombinované s fluorimetrickou detekcí, kapilární elektroforézou a mikrobiologicky [26, 15].

2.1 Spektrofotometrické metody

Spektrofotometrické metody stanovení riboflavinu jsou založeny na principu fluorescence a emisní pásma pro stanovení riboflavinu je dáno rozmezím od 475 až do 600 nm s maximem 523 nm. Principem fluorescence je absorpce záření, která vede k excitaci z vibračního stavu na základní elektronové hladině na jednu z mnoha vibračních hladin v elektronovém excitovaném stavu. Molekula ztrácí na vysoké vibrační hladině rychle energii a přechází na nejnižší vibrační hladinu, dochází k tzv. vibrační relaxaci molekuly. Fluorescence se projeví, nastane-li přechod na základní elektronovou hladinu ze singletového excitovaného stavu vyzářením nadbytečné energie tzv. emisí fotonu. Pro stanovení riboflavinu se na principu luminiscence využívá několika metod [27, 28].

2.1.1 Lumiflavinová metoda

Lumiflavinová metoda je založena na principu nepřímého stanovení riboflavinu. Tato metoda je využívána, jsou-li ve vzorku další látky, jež by mohly ovlivnit výsledek analýzy. Nejdříve se provede kyselá nebo enzymová hydrolýza vzorku, případně jejich kombinace. Následně se převede riboflavin na lumiflavin (Obr. 5) pomocí ultrafialového záření v alkalickém prostředí a výsledná látka se extrahuje do chloroformu. Stanovení je provedeno pomocí fluorescenční detekce [29, 30, 31].



Obr. 5 Rozklad riboflavinu na lumiflavin [31]

2.1.2 Metoda spektrofluorimetrická

Přímá fluorimetrická metoda je využívána v případě, kdy nejsou v potravíně obsaženy látky, které by mohly ovlivnit výsledek analýzy. Vzorky riboflavinu jsou měřeny pomocí přístroje zvaného fluorescenční spektrofotometr. O principu této metody bude pojednávat kapitola č. 3 [29, 27].

2.2 Mikrobiologické stanovení riboflavinu

Mikrobiologická metoda pro stanovení riboflavinu je založena na růstu mikroorganismu v přítomnosti riboflavinu. Pro stanovení se využívá mikroorganismus *Lactobacillus rhamnosus*, který je naočkován na živnou půdu, která obsahuje definované množství riboflavinu, jež je nezbytné pro růst tohoto mikroorganismu. Takto připravený vzorek je nechán kultivovat při určité teplotě a po dobu několika hodin. Růst mikroorganismu v závislosti na riboflavinu se může stanovit turbidimetricky při vlnové délce 600 nm. Zmíněná metoda má však velkou nevýhodu a tou je časová náročnost, která je dána rychlostí růstu mikroorganismu [32, 31].

2.3 Kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescenční detekcí

Kapilární elektroforéza je elektromigrační separační metoda využitelná pro široké spektrum analyzovaných látek, od jednoduchých anorganických iontů až po složité molekuly. Tato metoda přináší několik výhod a to rychlou a účinnou separaci látek a vysoce selektivní detekci. K nejcitlivějším způsobům detekce se řadí právě LIF, jež je laserem indukovaná fluorescenční detekce. Princip separace je založen na dělení látek dle migrace analytů v kapilární koloně o průměru několika desítek mikrometrů mezi dvěma elektrodami. Nejčastěji je využíván postup, kdy je kapilára naplněna jedním puftrem a separace probíhá v konstantním elektrickém poli. Kladně nabitě částice jsou přitahovány k záporné elektrodě a naopak, dokud nedojde k úplné separaci látek. Čas potřebný k migraci látek v analytu je dán nábojem a velikostí elektroosmotického toku [33, 34, 15].

Detekce je založena na změně absorbance, vodivosti, iontovém signálu a v případě detekce riboflavinu je využíván princip fluorescence. Je-li využita laserem indukovaná fluorescence, je využito směrových vlastností a monochromatickosti laserového paprsku. Budící pa-

prsek je zaostřeno kapiláry a ve směru kolmém na analyt je po prostorové a spektrální filtraci detekována citlivým detektorem fluorescence [33].

2.4 Metoda chromatografická

Základem chromatografické metody je rozdělení látek ve směsném vzorku na jednotlivé složky. Tato metoda je využívána jak ke kvalitativní tak ke kvantitativní analýze. Chromatografická kolona se vyrábí především ze skla, oceli nebo plastu. Kolona je trubice naplněná částicemi vhodného materiálu (sorbent). Mezi částicemi sorbentu proudí mobilní fáze (kapalina, plyn). Vzorek se vnáší mezi zmíněné dvě fáze, které jsou navzájem nemísitelné. Vzorek umístěný na začátek kolony je unášen mobilní fází přes fázi stacionární. Principem dělení jednotlivých látek, je zachycování látek stacionární fází a tím jsou látky v koloně zadržovány různě dlouhou dobu a následně děleny. Složky zadržované v koloně kratší dobu se dostávají na konec stacionární fáze dříve [27, 35, 36, 31].

Stanovuje-li se riboflavin metodou HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) ve vzorku, kde je vázán v potravinách na proteiny, je třeba nejdříve provést oddělení vitamínu B₂ kyselou hydrolyzou. Kyselinou chlorovodíkovou (0,2 M) ve vodní lázni (95°C) s přidavkem kyseliny trichloroctové (80 %) se provede extrakce. Po vysrážení proteinů pomocí činidel Carez I a Carez II a následné filtraci lze riboflavin stanovit metodou HPLC. Vzorek je třeba chránit před denním světlem, aby nedošlo k fotodegradaci stanovované látky.

Při stanovení riboflavínu pomocí HPLC se používá detektorů UV/VIS DAD při vlnové délce 270 nm v mobilní fázi CH₃COONa:CH₃OH. Další modifikací může být stanovení riboflavínu detektorem s fluorescenční detekcí [37, 19, 38].

3 LUMINISCENČNÍ SPEKTROFLUORIMETRIE

Záhadný jev luminiscence, jiným slovem „světélkování“, zaujal lidstvo už v dávných dobách

a popisy světélkujícího moře je možné dohledat už v antické literatuře. Poznatek o principu těchto jevů však přineslo až 20. století, kdy nastal rozvoj kvantové techniky.

Vyzáření fotonu je vždy spjato s přechodem hmotné částice, např. molekuly, atomu, dokonce atomového jádra, z vyššího energetického stavu do základního stavu s nižší energetickou hladinou. Má-li vyzářený foton vlnovou délku v ultrafialové nebo viditelné oblasti spektra, je nazýván tento jev luminiscencí [39].

Luminiscence je tedy definována jako přebytek světelného záření tělesa nad úroveň tepelného vyzařování v dané spektrální oblasti při dané teplotě, trvá-li tento přebytek déle než 10^{-20} s. Luminiscenci lze také vysvětlit na principu vyzáření světla (emise) látkou, kdy emise nastane při návratu elektronu na základní stav ze stavu excitovaného [40].

Převést hmotné částice do excitovaného stavu lze několika způsoby. Mohou to být důsledky fyzikálních jevů (srážky atomů s rychle letícími ionty či elektrony). Příčinou luminiscence můžou být i chemické přeměny, kdy příčinou reakce je molekula v excitovaném stavu a v neposlední řadě i absorpce fotonu příslušné vlnové délky. Luminiscenční spektrometrie se dělí do tří skupin:

- molekulová fluorescenční spektrometrie
- molekulová fosforescenční spektrometrie
- zpožděná fluorescence [27, 39, 41].

Fluorescence nastane, je-li emise záření z excitovaného elektronového stavu jedním či více spontánními energetickými přechody. Fluorescence je pozorována během buzení a po jeho zastavení prakticky mizí. Doba dohasínání bývá řádově 10^{-8} s.

Fosforescence nastane, je-li emise z excitovaného elektronového stavu nestabilní. Má delší dobu dohasínání než fluorescence ($> 10^{-8}$ s). Většinou není pozorovatelná v roztocích při pokojové teplotě [42].

Zpožděná fluorescence je přechod elektronů z téhož singletového stavu (S_1) jako při fluorescenci. Přechod elektronů má však delší dobu dohasínání danou časem, při kterém je molekula v nestabilním tripletovém stavu [43].

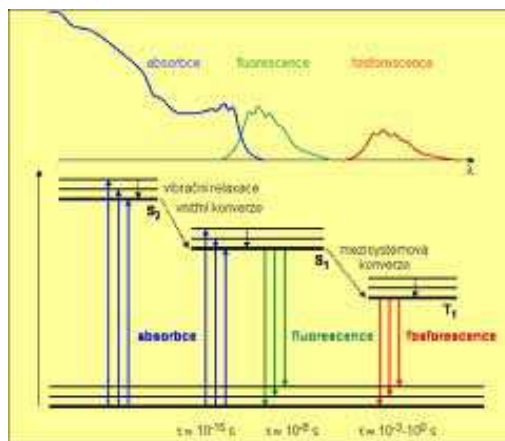
Luminiscenční záření lze také dělit dle povahy absorbované energie látkou do několika skupin:

- fotoluminiscence – energie dodána ve formě světelného záření, tzn., že fotoluminiscence je buzena světlem o vlnové délce, které je obvykle kratší než luminiscenční emisní vlnová délka.
- chemiluminiscence – energie dodána látce chemickou reakcí. Tento jev doprovází určitý typ exotermních chemických reakcí, kdy uvolněné reakční teplo či jeho část se vyzáří ve formě světla.
- bioluminiscenci – energie dodána biologickými pochody
- elektroluminiscence – energie dodána působením elektrického pole a průchodem elektrického pole látkou [41, 44].

3.1 Vznik fotoluminiscenčních spekter

Má-li dojít k luminiscenci, musí molekula přejít nejprve do excitovaného stavu. Do tohoto stavu se molekula dostane pomocí absorpce energetického záření o vhodné vlnové délce. Absorpcí energie může jeden z párových elektronů molekulového orbitalu (zpravidla jeden z elektronů

π orbitalů) přejít do prvního excitovaného singletového stavu S_1 , ve kterém se výsledný spinový moment nezměnil. Excitovaná molekula má jen krátkou dobu života (10^{-7} až 10^{-8} s). Srážkami s jinými molekulami pak může excitovaná molekula předat svou energii jiným částicím. Je-li však stav S_1 relativně stabilní, mohou excitované molekuly přecházet zpět do základního stavu S_0 složitějším mechanismem (Obr. 6) [45].



Obr. 6 Elektronový přechod molekul [46]

Excitovaná molekula přejde nezářivým přechodem na nejnižší hladinu, tzv. vibrační základní hladinu excitovaného singletového stavu S_1 . Následně může dojít k fluorescenční fotonové emisi v ultrafialové nebo viditelné oblasti spektra, tedy k fluorescenci. Při této reakci se elektrony vracejí do různých vibračních podhladin základního singletového stavu S_0 .

V jiných případech přechází elektrony tzv. interkombinační konverzí, tedy nezářivým přechodem. Při tomto mechanismu přechází elektrony z nejnižšího vibračního stavu excitovaného singletu S_1 na vyšší vibrační hladinu excitovaného triplexového stavu T_1 . V tomto systému existují dva elektrony se stejným spinem. Stav T_1 má obecně menší energii než stav S_1 . Protože molekula bude mít přebytek vibrační energie, přejde nejdříve deaktivacím nezářivým přechodem do základního vibračního stavu v T_1 . V tomto stavu setrvávají elektrony poměrně dlouhou dobu, řádově 10^{-4} s, neboť přechody do S_0 jsou spinově zakázané a proto přechod elektronů z tohoto stavu opět do stavu základního singletového S_0 tzv. fosforescencí, je velmi závislý na experimentálních podmínkách. Dojde-li k přechodu do základního stavu kolizní deaktivací, nebude fosforescence pozorována [45, 47].

3.2 Struktura látek vykazujících luminiscenci

Základní podmínkou pro vznik fotoluminiscence je, aby její molekuly absorbovaly ultrafialové nebo viditelné záření. Čím více je látka schopna energii absorbovat, tím intenzivnější fotoluminiscence může být u látky pozorována.

S luminiscencí se můžeme setkat u látek s konjugovanými dvojnými vazbami, zejména u aromatických sloučenin a látek s tuhou, nepohyblivou planární multicyklickou strukturou. Výraznější fosforescenci než fluorescenci mají látky obsahující heteroatomy [45].

3.2.1 Lumifory (fluorofory)

Lumifory jsou skupiny látek, které jsou schopny pohlcovat energii a následně ji vyzařovat ve formě světla. Tyto látky jsou děleny do dvou základních skupin:

- vnitřní lumifory – vyskytují se přirozeně
- vnější lumifory – jsou přidávány ke vzorkům, které nemají schopnost přirozené luminiscence

Jsou-li dodány nebo přítomny tyto látky ve sloučenině, dodávají látce schopnost fluorescence. Tuto schopnost mají nejvíce látky organické povahy. Z anorganických látek jeví fluorescenci méně sloučenin. Důležitou roli hrají ovšem i skupiny látek, které jsou s lumifory vázány. Skupiny –OH, –CH₂, =CH₂, –NH₂, –CN fluorescenci zesilují. Vyšší intenzitu fluorescence podporuje také přítomnost elektron-donorových skupin. Opakem jsou skupiny =CO, –COOH a elektrofilní skupiny, jež fluorescenci zeslabují. Fluorescenci také potlačují skupiny –azo, –nitro, –nitrozo. Tento jev je využíván při rozlišování organických barviv.

Zavedením atomu prvku s vyšším atomovým číslem do π elektronového systému látky se zvyšuje fosforescence, negativně je však ovlivněna fluorescenci, která se snižuje.

U některých látek může fluorescenci ovlivnit také pH roztoku a to reakcí, kdy se změnou náboje iontu při disociaci změní struktura molekuly a tím fluorescenci mizí [48, 49, 45].

3.3 Spektrální fluorimetrie

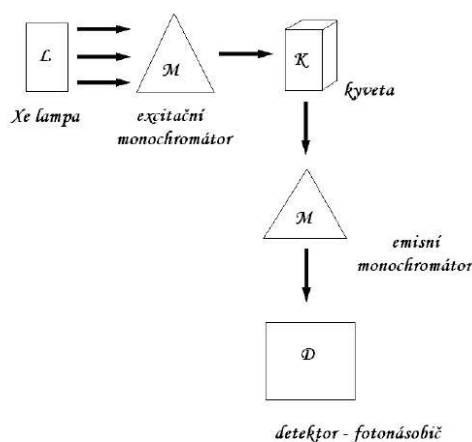
Fluorimetrie je metoda zabývající se studiem záření emitovaného molekulami, které přešly do excitovaného stavu pomocí absorpce záření o vhodné vlnové délce. Děj, který je při fluorimetrii sledován, se skládá z několika dílčích kroků:

1. Molekula, obvykle v základním vibračním stavu absorbuje foton a přejde tak do elektronově excitovaného stavu, většinou na vyšší vibrační hladinu. Při měření

fluorescence je excitační foton poskytován zdrojem světla (xenonová lampa, rtuťová výbojka) a excitačním monochromátorem.

2. Molekula přechází velmi rychle do základního vibračního stavu v rámci dané elektronové excitované hladiny. Zde setrvává nějakou dobu udávanou jako průměrná doba excitovaného stavu – pro fluorescenci jsou udávány doby excitace v řádech nanosekund.
3. Molekula se zbaví nadbytečné energie tím, že přebytečnou energii vyzáří v podobě fotonu. Vzniklé emitované záření je při analýze spektrofluorimetrem zpracováno emisním monochromátorem tak, aby pomocí detekčního zařízení (fotonásobič), mohla být zjištěna intenzita světla emitovaná při různých vlnových délkách.
4. Výsledná data jsou zpracována příslušným softwarem ve formě píků [39].

Přístroje pro pozorování a měření intenzity fotoluminiscence v jednopaprskovém uspořádání zahrnují zdroj excitačního záření, dva monochromátory (excitační a emisní), kyvetu a detektor (Obr. 7) [45].



Obr. 7 Obecné schéma spektrofluorimetru [50]

Fluorescence je pozorována v kyvetě u roztoku a na podložce u pevných vzorků v úhlu 90° ke směru paprsku vycházejícího ze zdroje primárního záření. Spektrofluorimetry obsahují monochromátory, jež využívají hranolu nebo mřížky jako disperzního prvku pro zaznamenávání celého luminiscenčního spektra. Monochromátor je přítomen v luminiscenční spektroskopii jednak ke zjištění spektrálního složení luminiscenčního záření a v případě fotoluminiscence může být použit také k výběru vhodné budící vlnové délky z excitačního svě-

telného zdroje. Je-li potřeba vyvolat viditelnou fluorescenci, využívá se pro excitaci ultrafialového záření, které může být vyvoláno rtuťovou výbojkou jako zdrojem záření. Pomocí filtrů je odfiltrováno viditelné záření a podle typu filtru je vzorek excitován některou emisní spektrální čarou rtuti [45, 44, 47].

Nastavení budícího záření je důležitou součástí analýzy, neboť emitované záření látky nebude mít pro všechny vlnové délky excitace stejnou intenzitu. Spektrometry využívají k poskytnutí kontinuálního excitačního spektra xenonové výbojky v kombinaci s monochromátory.

Pro záznam emisního záření ze vzorku se využívají detektory emisního záření. Tyto detektory lze rozdělit do několika základních typů:

- Fotonásobič – pracuje na principu detekce optického záření vnějšího fotoelektrického jevu a efektu sekundární emise elektronů.
- Lavinová fotodioda – princip je stejný jako u ostatních fotovoltaických polovodičových detektorů záření. Tyto detektory pracují na principu vytvoření elektron-děrových párů v polovodiči dopadajícími fotony v důsledku vnitřního fotoelektrického jevu. Následně dojde k rozdělení náboje v elektrickém poli a k ustavení fotovoltaického napětí na výstupu detektoru, které je pak zpracováno elektronickou částí detekčního řetězce.
- Mnohokanálové detektory – fotonásobič a lavinová fotodioda jsou řazeny mezi jednokanálové detektory. Tyto detektory měří fotonový tok v daném čase pouze v jediném bodě. Mnohokanálové detektory, lineární řetězce nebo dvourozměrné matice miniaturních detektorů mohou současně detekovat tok fotonů v mnoha bodech [44, 39].

Při záznamu excitačního spektra se mění plynule vlnová délka zařízení, které vychází z prvního excitačního monochromátoru. Druhý (emisní monochromátor), je nastaven na určitou konstantní vlnovou délku, převážně odpovídající vlnové délce maxima fluorescenční emise. Pro záznam emisního spektra, které se využívá pro analytické potřeby, se tento postup provede obráceně.

V případě jednoduchých jednopaprskových přístrojů jsou získaná emisní spektra nekorigována, na rozdíl od korigovaných spekter, které jsou získávány pomocí dvouprskových přístrojů [45, 39, 44].

3.4 Emisní a excitační spektra

3.4.1 Druhy elektromagnetického záření

Elektromagnetické záření je jednou z forem pro přenos energie prostorem. Teplo krby, rentgenové záření nebo sluneční záření, to všechno jsou příklady přenosu energie pomocí elektromagnetického záření. Všechny tyto formy záření by se mohly zdát rozdílné, avšak vykazují všechny stejnou vlnovou podstatu a přenos ve vakuu se děje stejnou vlnovou rychlostí a to rychlostí světla. Většina energetických forem záření, jako jsou paprsky rentgenové a ultrafialové, nebo radiové vlny, jsou pro lidské oko nepostřehnutelným jevem [51, 52, 53].

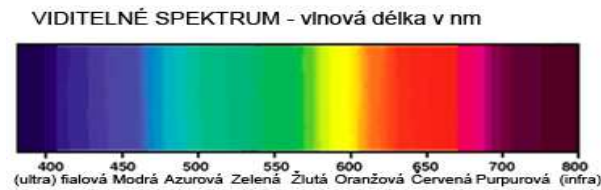
Elektromagnetické záření v prostoru je možné znázornit jako složení rovinných elektromagnetických vln různých frekvencí, různých směrů šíření a různých polarizací. Vlastnosti elektromagnetického záření jsou dány spektrem frekvencí vln a úhlovým spektrem. Šíření energie prostorem probíhá jako postupné přelévání energie od magnetického k elektrickému poli a stejně tak i opačným směrem. Ve volném prostoru se vlna šíří tzv. rychlostí světla $c \approx 299\,792\,458 \text{ ms}^{-1}$.

V závislosti na frekvencích (vlnových délek) rozdělujeme gama záření, optické záření, radiové vlny aj. (Tab. 2) [51, 52, 53].

Tab. 2 Druhy elektromagnetické záření [51]

Frekvence [Hz]	Označení	Vlnová délka [m]
Nad 10^{20}	<i>Gama záření</i>	pod 10^{-11}
$10^{18} - 10^{20}$	<i>Rentgenové záření</i>	$10^{-9} - 10^{-11}$
$10^{15} - 10^{18}$	<i>Ultrafialové záření</i>	$10^{-7} - 10^{-9}$
$10^{14} - 10^{15}$	<i>Viditelné záření</i>	$10^{-6} - 10^{-7}$
$10^{12} - 10^{14}$	<i>Infračervené záření</i>	$10^{-3} - 10^{-6}$
$10^9 - 10^{11}$	<i>Mikrovlny</i>	$10^{-1} - 10^{-3}$
10^8	<i>Televizní vlny</i>	1
$10^3 - 10^7$	<i>Radiové vlny</i>	10^5

„Optos“ znamená viditelný. Pod pojmem optické záření se však v současnosti rozumí záření z oblastí viditelného spektra a z oblastí přilehlých jako jsou infračervená a ultrafialová pásma. Oblast viditelného záření vnímaného jako světlo, je dána citlivostí lidského oka. Lidské oko je schopno vnímat signály různých frekvencí z viditelného spektra jako různé barvy (Obr. 8) [51].



Obr. 8 Viditelné spektrum elektromagnetického záření [54]

3.4.2 Fluorescenční a excitační spektra

Jednotlivé částice atomu či molekuly se nacházejí v určitých energetických hladinách. Při interakci této částice s elektromagnetickým zářením může dojít k procesům absorpce, stimulované emise a spontánní emise. Pro zjednodušení jsou uvedeny dvě energetické hladiny

částic E_1 a E_2 .

Částice o energii E_1 absorbuje foton o frekvenci f a přejde do stavu E_2 , je-li splněna rezonanční podmínka:

- $\Delta E = E_2 - E_1 = h f$

<i>kdy:</i>	h ...	Planckova konstanta
	f ...	frekvence
	E_2 ...	vyšší energie
	E_1 ...	nižší energie

Pravděpodobnost, že částice uskuteční tento přechod, je úměrná spektrální hustotě o zářivé energii f . Tento děj je nazýván absorpce.

Foton stejné frekvence, splňující stejnou rezonanční podmínku, také stimuluje přechod částic ze stavu o vyšší energii E_2 do stavu o nižší energii E_1 . Rozdíl obou energií se vyzáří jako foton stejných vlastností, jež měl foton, který proces vyvolal. Tento proces se označuje jako stimulovaná emise.

Každá jednotlivá absorpce a jednotlivá emise jsou stimulovány zářením, lze tedy předpokládat, že absorpce a emise jsou stejně pravděpodobné.

Mimo těchto již zmíněných jevů, které závisí na spektrální hustotě zářivé energie, dochází také k samovolnému ději. V tomto případě přechází částice s vyšší energií E_2 na nižší energii E_1 , za současného vyzáření energie samovolně. Této energii odpovídá foton o frekvenci:

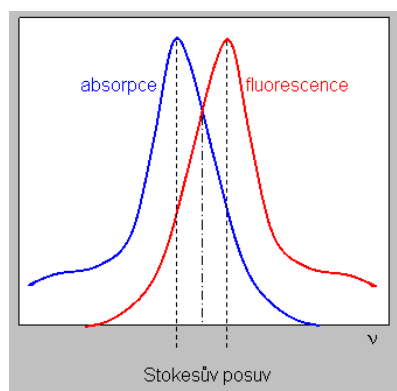
- $f = \Delta E / h = E_2 - E_1 / h$

<i>kdy:</i>	$h...$	Planckova konstanta
	$f...$	frekvence
	$E_2...$	vyšší energie
	$E_1...$	nižší energie

Popsaný děj je nazýván spontánní emise [55, 56, 57].

Dodáním tepla, nebo elektrické energie, bombardování látek urychlenými částicemi s vysokou energií nebo působením elektromagnetického záření, tj. pohlcením světelných kvant, fotonů, lze danou látku vybudit do excitovaného stavu. Přejde-li látka zpět přímo do základního stavu a vyzáří při tom záření o frekvenci, které přijala, mluvíme o rezonanční emisi [32].

Emitované záření se vyznačuje nižší energií (vyšší vlnovou délkou), než záření absorbované. Příčinou tohoto jevu je posun vlnových délek tzv. Stokesův posuv (Obr. 9). Tento jev je definován jako energetický rozdíl v přechodu mezi fotoluminiscencí a absorpčním spektrem [39, 58].



Obr. 9 Stokesův posuv [59]

3.5 Analytické využití fluorescence

Analýza látek přítomných v potravinách s pomocí spektrální fluorescence je prováděna za účelem zjištění přítomnosti analyzované látky v potravinách tzv. kvalitativní analýza, nebo jsou zjišťovány koncentrace analyzované látky v potravině tzv. kvantitativní analýza.

- kvalitativní analýza – dle zbarvení, nebo tvaru křivky emisního spektra lze dokázat přítomnost dané látky ve vzorku
- kvantitativní analýza – dle intenzity fluorescenčního záření lze stanovit množství látky ve vzorku

Fluorimetrie je využívána především pro fluoreskující látky s nízkou koncentrací ve zkoumaném vzorku. V dnešní době jde stanovit touto metodou převážná část organických a anorganických látek přímo nebo po jejich převedení na fluoreskující deriváty.

Fluorescence se uplatňuje při měření aktivity enzymů, které často využívají substráty, které byly přeměněny na fluoreskující produkt. V ultrafialové oblasti vykazují fluorescenci mitochondrie

a jádérka, dále aromatické aminokyseliny a fenylalanin v bílkovinách. Vitamin A vykazuje intenzivní fluorescenci ve 480 nm a toho se využívá při jeho identifikaci ve tkáních. Fluorescence je využívána také pro stanovení vitamínu B₂ a po převedení na thiochrom lze stanovit i vitamin B₁. Fluorescence je aplikována při studiu porfyrinů v buňkách (cytochromy, peroxidáza, hemoglobin, myoglobin).

Pro studium vlastností struktur, které nevykazují vlastní luminiscenci, se používá tzv. fluorescenčních sond, kdy se naváže na původně nefluoreskující látka na sérový albumin, na bílkoviny nebo na biologické membrány, kde se stává silně fluoreskující. Pro studium nukleových kyselin se používá např. ethidium bromid. Zmíněné metody lze využít pro zkoumání konformace bílkovin, tloušťky membrán, membránového potenciálu apod. [60, 50].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo odzkoušet použití luminiscenční spektrofluorimetrie pro stanovení riboflavinu ve vodných roztocích a v pevné matrici.

Teoretická část je zaměřena na:

- charakteristiku vitamínu B₂ (riboflavin)
- přehled metod používaných pro stanovení riboflavinu v potravinách
- principy luminiscenční spektroskopie

Praktická část byla zaměřena na použití luminiscenční spektrofluorimetrie pro stanovení:

- riboflavinu ve vodném roztoku
- poklesu luminiscence riboflavinu následkem jeho fotodegradace
- pro stanovení riboflavinu v pevné potravinářské matrici

5 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

5.1 Materiál a chemikálie

- Riboflavin ($C_{17}H_{20}N_4O_6$) Fluka Biochemika
množství riboflavinu > 98 % HPLC
- Smetanový tavený sýr Mlékárna Kunín Klatovy a. s.
sušina 44 % (w/w), t. v. s. 55 % (w/w)
Složení: sýry, pitná voda, máslo, sušené mléko,
stabilizátor E 407, konzervant E 234, tavicí soli:
E 452, E 450
- Eidamská cihla Kromilk, a. s. Kroměříž, ČR
sušina 50 % (w/w), t. v. s. 30 % (w/w), zralost 7 týdnů
- Máslo Základ Meieczarski, s. r. o., Polsko
sušina 84 % (w/w), mléčný tuk 82 % (w/w)
- Tavicí soli Fosfa a. s., Břeclav
monofosforečnan sodný (Na_2HPO_4), difosforečnan sodný
($Na_4P_2O_7$), polyfosforečnan sodný ($n = 15 - 20$)
- Pitná voda, destilovaná voda

5.2 Použité přístroje a software

- Běžné laboratorní sklo a pomůcky
- Předvážky, analytické váhy, pH metr
- Vorwerk Thermomix TM 31 (Vorwerk & Co., GmbH, Wuppertal, Germany)
- PC – 1 Photon Counting 001 Steady-State Spectrofluorometer (ISS, USA)
- VINCI – Multidimensional Fluorescence Spectroscopy (software)

6 METODIKA

6.1 Stanovení riboflavinu ve vodném roztoku

Vzorky pro kalibrační řadu riboflavinu v roztoku byly připraveny následujícím postupem. Byl navážen sypký riboflavinu (5 mg) a kvantitativně převeden do odměrné baňky obalené alobalem o objemu 500 ml. Odměrná baňka byla následně doplněna po risku destilovanou vodou. Připravený zásobní roztok o objemu 500 ml a koncentraci riboflavinu 10 mg/l, který byl dále ředěn destilovanou vodou na roztoky s výslednou koncentrací riboflavinu 10 mg/l, 8 mg/l, 7 mg/l, 5 mg/l, 4 mg/l, mg/l, 3,5 mg/l, 3 mg/l, 2 mg/l, 1 mg/l, 0,5 mg/l, 0,25 mg/l a 0,1 mg/l. Tímto způsobem byla připravena 12 ti bodová řada roztoků riboflavinu. Roztoky byly uchovány v nádobách z tmavého skla obalenými alobalem, aby nedošlo k fotodegradaci riboflavinu.

6.2 Fotodegradace riboflavinu v roztoku

Pro zachycení procesu degradace riboflavinu na světle byla vytvořena řada roztoků lišících se dobou osvitů. Ze zásobního roztoku o koncentraci riboflavinu 10 mg/l (pH 6,2) byly pipetou odebrány jednotlivé podíly o objemu 25 ml do kádinek o objemu 100 ml.

Takto připravená řada 8 roztoků riboflavinu byla vystavena účinku denního světla. Pro zajištění konstantní intenzity a geometrie světla dopadajícího na vzorky, byly roztoky umístěny do sensorické kóje v laboratoři sensorické analýzy na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně, kde je zdrojem světla zářivka imitující bílé denní světlo (TL-D 90 DeLuxe Pro, 18W/965, výrobce Philips) rovnoměrně ozařující pracovní plochu sensorické kóje.

V intervalu 15 minut od zahájení ozařování byly takto připravené vzorky jednotlivě odebrány a skladovány v uzavřených, tmavých nádobách obalených alobalem. Tímto způsobem vznikla 9 ti bodová řada roztoků, které byly vystaveny účinku světla v intervalu 0 – 120 min.

6.3 Příprava vzorků tavených sýrů

6.3.1 Výroba taveného sýru v laboratorních podmínkách

Jako pevná potravinářská matrice pro stanovení obsahu riboflavinu byl zvolen tavený sýr. Výroba taveného sýru probíhala na ústavu Technologie potravin na UTB, kde je problematika výroby tavených sýrů dlouhodobě sudována.

Dle receptury v příloze (P I) bylo připraveno 6 vzorků tavených sýrů. Tavené sýry se skládaly z Eidamské cihly, másla, pitné vody a tavicích solí. Pro všechny připravené vzorky byla použita kombinace tří tavicích solí (mofosforečnan sodný, difosforečnan sodný a polyfosforečnan sodný) v poměru 20 % : 10 % : 70 %. Tento poměr byl navržen z důvodu zajištění vhodných texturních vlastností vzorků. Vzorky tavených sýrů (sušina 40 % w/w, t. v. s. 50 % w/w) se lišily obsahem riboflavinu, který byl přidáván do vzorku v koncentracích 0 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg a 10 mg/kg.

Příprava vzorků tavených sýrů probíhala v přístroji Vorwerk Thermomix, kdy při nižších otáčkách byla přisypána Eidamská cihla, která byla mělněna při teplotě 70°C po dobu 30 sec. Následně byly přidány zbylé pokrájené suroviny – máslo, Eidamská cihla, tavicí sůl, pitná voda a přídavek riboflavinu. Hmota byla dále mělněna a promíchávána s ostatními surovinami, dokud nebyla dosažena teplota 90°C. Po dosažení dané teploty byla hmota tavena další minutu a poté byla vyrobená tavenina za horka nadávkována do polypropylenových kelímků (válcový tvar, objem 50 ml) s přivařitelným víčkem. Takto připravené vzorky (Obr. 10) byly uchovávány v lednici.



Obr. 10 Vzorky laboratorně vyrobených tavených sýrů s přídavkem riboflavinu

6.3.2 Vzorek Smetanového taveného sýru Kunín

Z důvodů zajištění většího počtu vzorků o jiné koncentraci riboflavinu byl použit Smetanový tavený sýr Kunín (Obr. 11), který byl obohacený o rozdílné podíly riboflavinu.

Řada koncentrací riboflavinu byla připravena ze základního vzorku taveného sýra, do kterého byla zašlehána ručním šlehačem sypká forma riboflavinu a vznikl tak základní vzorek o koncentraci riboflavinu 40 mg/kg. Takto připravený základní vzorek byl dle vypočtených navážek smícháván se sýrem bez přídavku riboflavinu a vznikla tak řada vzorků o koncentracích přidaného riboflavinu 0 mg/kg, 1 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg a 40 mg/kg.



Obr. 11 Vzorek Smetanového taveného sýru Kunín

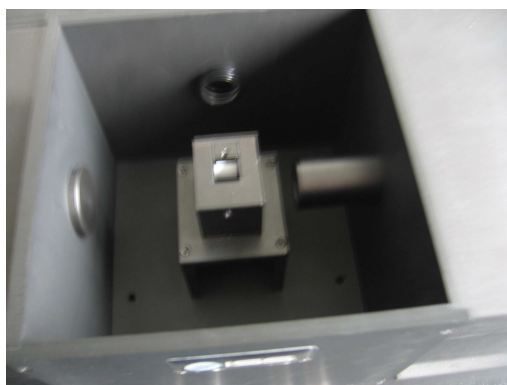
6.4 Měření emisních spekter vzorků

Všechna měření byla provedena na přístroji PC – 1 Photon Counting 001 Steady-State Spectrofluorometer (Obr. 12), který obsahuje kromě standardní konfigurace pro měření kapalin (Obr. 13) také modul pro měření pevných vzorků (Obr. 14). Intenzita fluorescence byla následně vyhodnocena pomocí softwaru VINCI – Multidimensional Fluorescence Spectroscopy.

Budícím zdrojem excitace byla vysokotlaká xenonová oblouková lampa (45 mW). Dle schématu (Obr. 15) byly vzorky excitovány za pomoci budícího zdroje a dvojité mřížky (monochromátoru). Kapalné vzorky byly měřeny za použití křemenné kyvety s teflonovým víčkem o objemu 4,8 ml (10 mm x 10 mm x 48 mm). Pevné vzorky byly nanášeny v tenké vrstvě na plastovou podložku (polystyren, 10 x 50 mm) [60].



Obr. 12 Příklad přístroje PC – 1 Photon Counting 001 Steady-State Spectrofluorimeter (ISS, USA) [61]



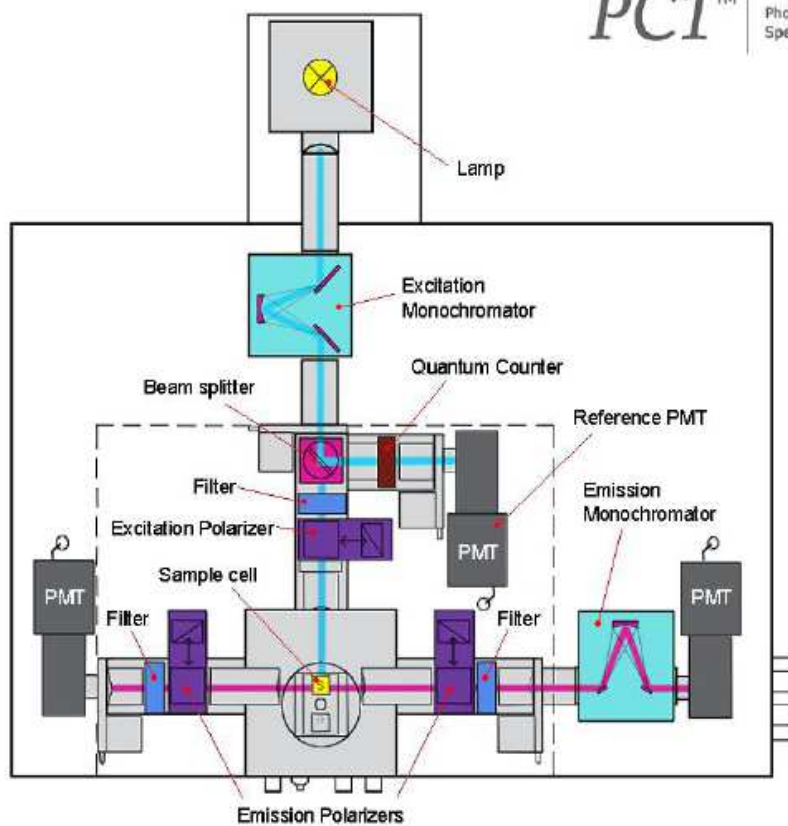
Obr. 13 Modul pro kapalné vzorky



Obr. 14 Modul pro pevné vzorky



PC1™

Photon Counting
Spectrofluorimeter

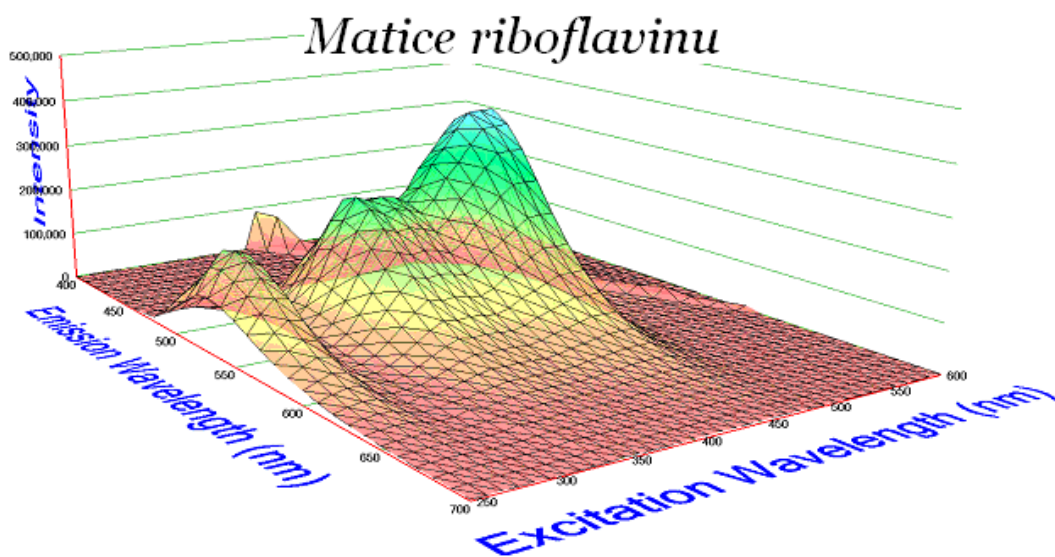
Obr. 15 Schéma - PC – 1 Photon Counting 001 Steady-State Spectrofluorimeter [61]

7 VÝSLEDKY

7.1 Stanovení vhodných podmínek měření

Pro stanovení riboflavinu ve vodném roztoku a v tavených sýrech spektrální fluorimetrií bylo nutné nalézt optimální podmínky pro měření intenzity fluorescence. Z tímto účelem byla změřena matice riboflavinu v roztoku (Obr. 16), dle které bylo stanoveno excitační a emisní spektrum při detekci riboflavinu ve vzorcích.

Výsledkem je matice tedy závislost intenzity fluorescenčního záření na excitační a emisní délce. Matice byla sestrojena v rozmezí excitačního pásma 250 – 400 nm a emisního pásma 400 – 700 nm a pro měření byl použit roztok riboflavinu o koncentraci 10 mg/l.



Obr. 16 Matice riboflavinu ve vodném roztoku (10 mg/l)

Na základě vyhodnocení zobrazené matice byla vybrána excitační vlnová délka 360 nm a rozsah emisního spektra byl zvolen v rozmezí od 400 do 700 nm. Tyto parametry měření byly použity pro všechny analyzované vzorky, které byly stanovovány spektrální fluorescencí.

Jak je z obr. 16 patrné, intenzita fluorescence nedosahuje při zvolené excitační vlnové délce maxima. Hodnota maximální intenzity fluorescence nastává při excitační vlnové délce 450 nm. Tato hodnota však nebyla zvolena záměrně, jelikož by při této hodnotě excitace nebylo možné analyzovat vzorky s vyšší koncentrací riboflavinu než 10 mg/l.

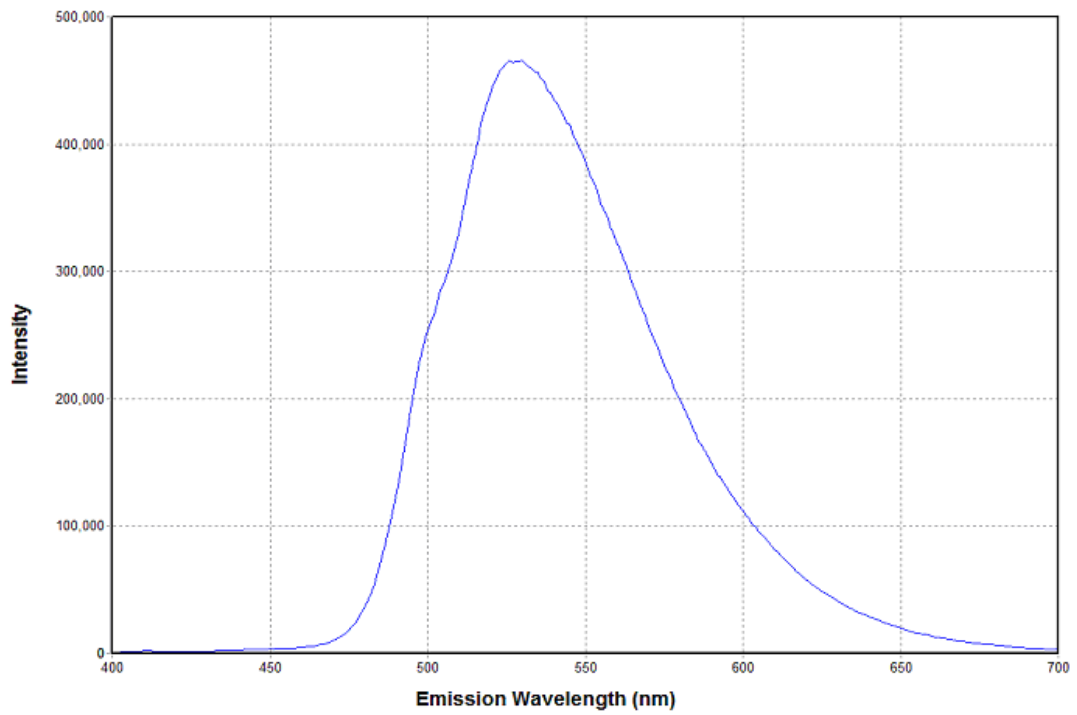
Vzorky by nebylo možné analyzovat z důvodu, že detektor přístroje má omezenou hranici detekce intenzity fluorescence a to 800 000 světelných kvant vyzářených za sekundu.

7.2 Měření závislosti intenzity fluorescence na koncentraci riboflavinu v roztoku

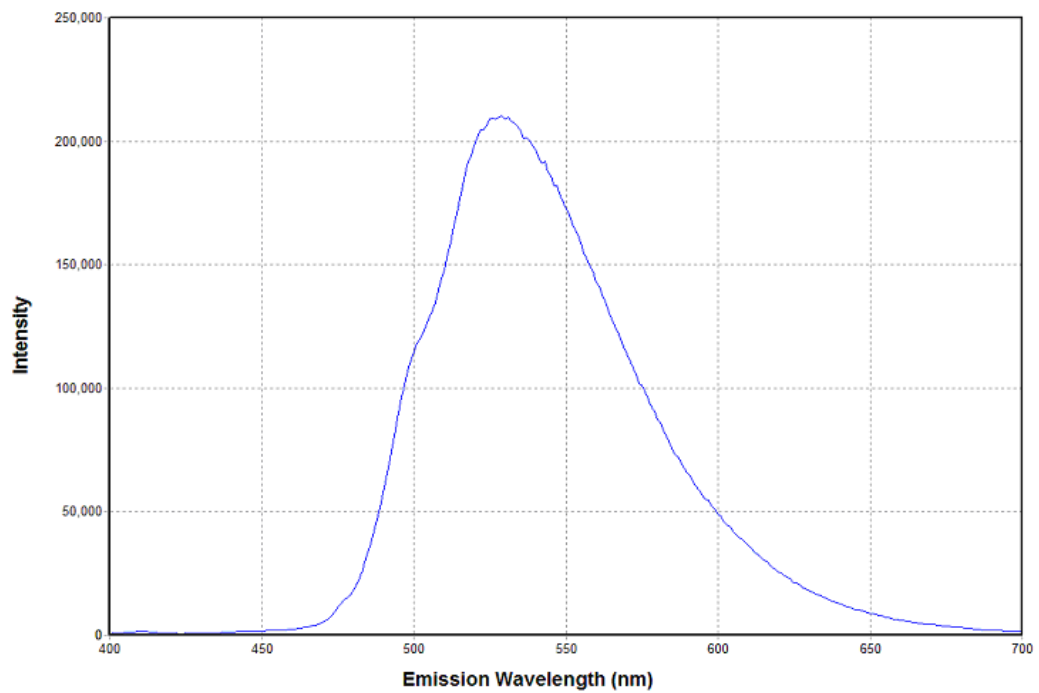
Pro stanovení koncentrace riboflavinu ve vodném roztoku bylo nutné nejdříve sestavit kalibrační křivku závislosti intenzity fluorescence na koncentraci riboflavinu ve vodném roztoku. K vytvoření kalibrační křivky byla připravena řada roztoků o obsahu riboflavinu v rozmezí 0,1 mg/l – 10 mg/l (viz. kap. 6. 1).

Vzorky byly excitovány světlem o vlnové délce 360 nm a následně byla analyzována emisní spektra riboflavinu v rozmezí 400 – 700 nm. Všechna emisní spektra vykazují maximum při vlnové délce 531 nm.

Na obr. 17 a 18 jsou uvedena emisní spektra riboflavinu ve vodném roztoku s koncentrací riboflavinu 8 mg/l a 3 mg/l.



Obr. 17 Emisní spektrum riboflavinu 8 mg/l



Obr. 18 Emisní spektrum riboflavinu 3 mg/l

Intenzita fluorescence riboflavinu v roztoku dosahuje maxima při 531 nm vlnové délky. S poklesem koncentrace riboflavinu ve vodném roztoku klesá intenzita fluorescence, což dokumentují příklady emisních spekter (Obr. 17 a 18). Při koncentraci riboflavinu v roztoku 8 mg/l dosahovala intenzita fluorescence 463 335 counts/s, po poklesu množství riboflavinu v roztoku na 3 mg/l klesla intenzita fluorescence k hranici 209 660 counts/s.

Dle výsledné intenzity fluorescence u analyzovaných vzorků byla sestavena tabulka, uvedená v příloze (P II), ve které jsou srovnány jednotlivé intenzity fluorescence pro každý jednotlivý vzorek s různou koncentrací riboflavinu.

Z výsledků měření v příloze (P II) byl sestaven graf (Obr. 19), který zaznamenává závislost intenzity fluorescence na koncentraci riboflavinu ve vodném roztoku. Intenzita fluorescence byla odečtena z emisního spektra v oblasti 531 nm, kde dosahovala již zmíněného maxima.

Vynesením výsledků do grafu (Obr. 19) a lineárním proložením vznikla rovnice regrese, která má tvar:

- $\text{koncentrace riboflavinu [mg/l]} = (y - 23525) / 55755$

kdy: y... intenzita fluorescence

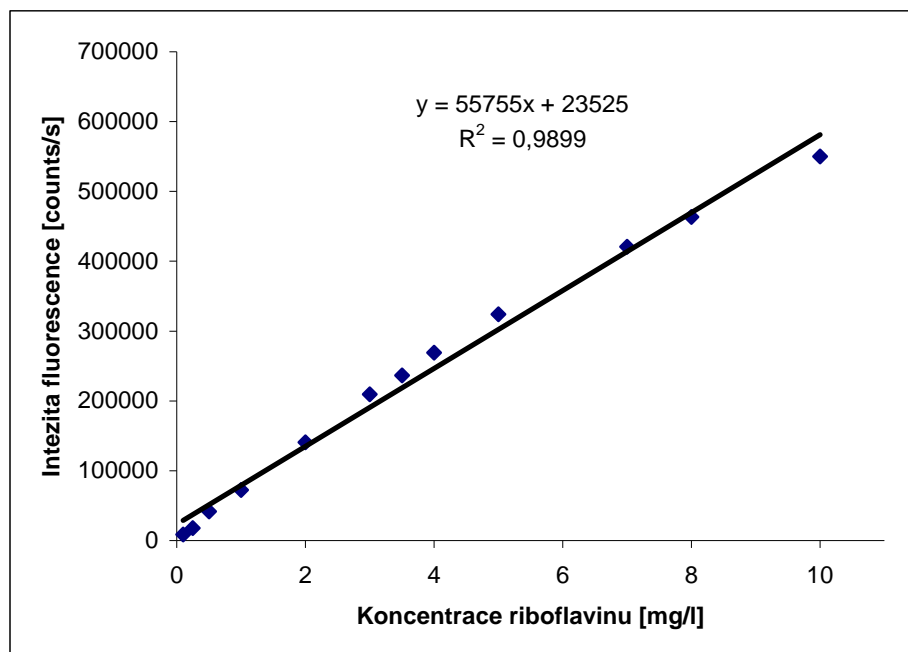
Korelační koeficient pro závislost intenzity fluorescence na obsahu riboflavinu je:

- $R^2 = 0,9899$

Tento vzorec může být použit pro stanovení koncentrace riboflavinu ve vodných roztocích neznámého množství riboflavinu.

Opakovatelnost měření riboflavinu ve vodném roztoku je 5 653, 21 counts/s (0,10 mg/l). Opakovatelnost vyjadřuje 2,8 násobek směrodatné odchylky na 5 % hladině významnosti.

Stanovení koncentrace riboflavinu v těchto vzorcích musí probíhat za stejných podmínek, jako byla stanovena a proměřená kalibrační řada roztoků.



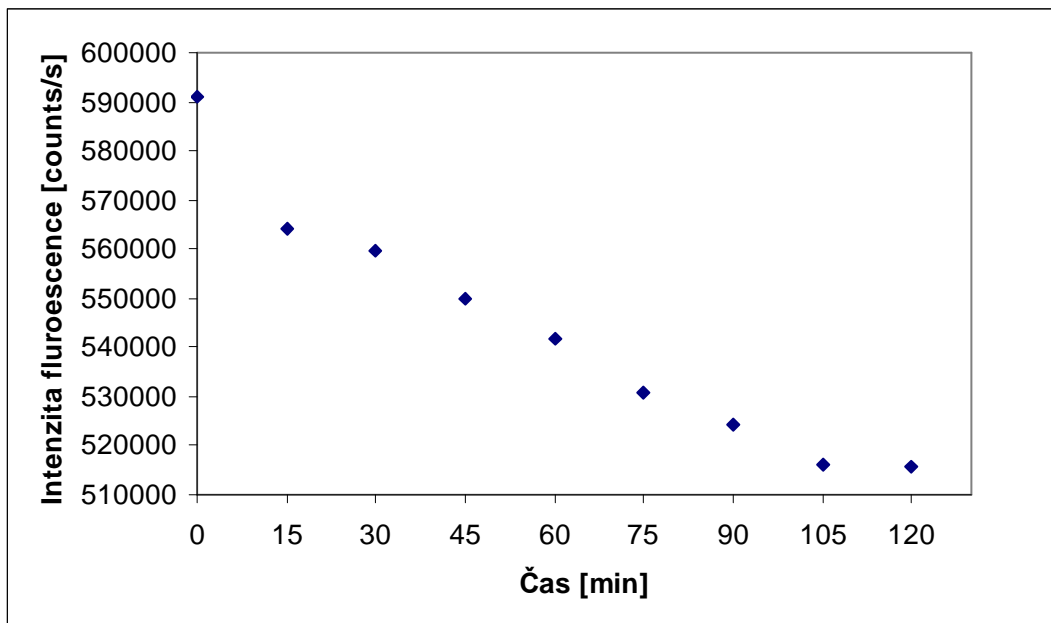
Obr. 19 Kalibrační křivka riboflavinu v roztoku

7.3 Fotodegradace riboflavinu v roztoku

Jelikož je riboflavin ve vodném roztoku náchylný na degradaci působením denního světla, byl proveden pokus pro ověření této vlastnosti [3].

Dle postupu v kapitole 6.2. byly připraveny roztoky riboflavinu s pH 6,5 o koncentraci riboflavinu 10 mg/l, které byly ponechány vlivu konstantního záření imitujícího denní bílé světlo po dobu 0 – 120 min. Změřená intenzita fluorescence byla odečítána u 11 vzorků při vlnové délce 531 nm. Konkrétní data závislosti poklesu intenzity fluorescence na době ozařování vzorku jsou uváděna v příloze (P III).

Pokles intenzity fluorescence v závislosti na délce ozařování vzorku denním světlem je zaznamenán na obr. 20.



Obr. 20 Fotodegradace riboflavinu v roztoku.

Závislost intenzity fluorescence na době ozařování vzorku

Obr. 20 dokumentuje pokles intenzity fluorescence jednotlivých roztoků v závislosti na délce ozařování. Dle zmíněného grafu můžeme prokázat, že ponecháme-li roztok riboflavinu na denním světle, aktivita riboflavinu se s délkou působení záření snižuje.

Po dobu 120 min, kdy byl vzorek ozařován, klesla naměřená intenzita fluorescence o 12,8 %, což odpovídá snížení koncentrace riboflavinu ve vodném roztoku o 1,28 mg/l.

Nejvýznamnější pokles riboflavinu můžeme zaznamenat po prvních patnácti minutách, kdy se intenzita fluorescence snížila o 4,5 %.

Intenzita fluorescence nadále klesala s rostoucím časem ozařování a pokles fluorescence se průměrně pohyboval v rozmezí 1,1 – 2 % za 15 minut osvětlování.

Protože měření probíhalo za shodných podmínek jako příprava kalibrační křivky, lze vzorec lineární závislosti použít pro přepočítání naměřené intenzity fluorescence na konkrétní množství riboflavinu v roztoku vyjádřené v mg/l. Výsledné hodnoty množství riboflavinu v roztoku jsou uvedeny v příloze (P III).

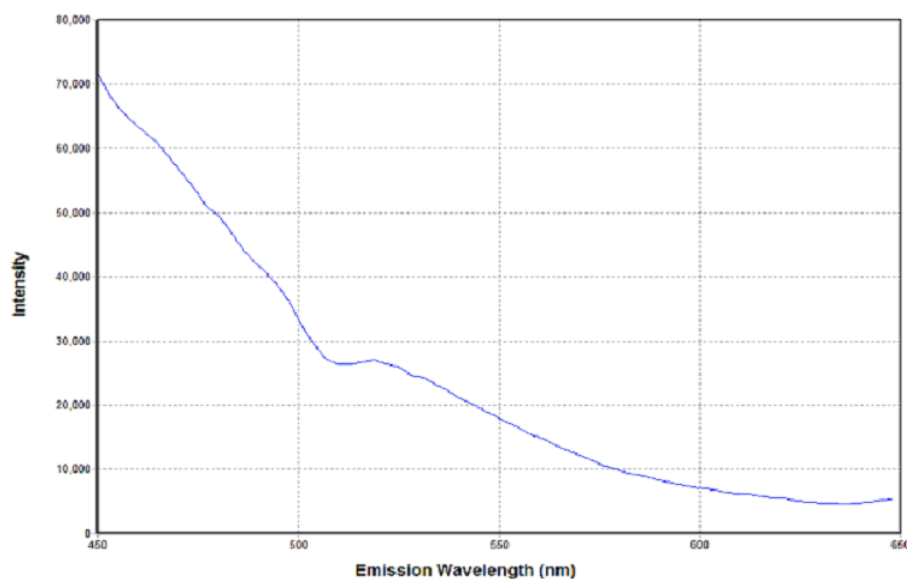
7.4 Měření intenzity fluorescence tavených sýrů s přídavkem riboflavinu vyrobených v laboratorních podmínkách

Přístroj PC – 1 Photon Counting 001 Steady-State Spectrofluorimeter je kromě intenzity fluorescence kapalných roztoků schopen proměřit i intenzitu fluorescence pro pevné vzorky bez speciální úpravy.

Pevné vzorky byly proměřovány s pomocí modulu (Obr. 14), který umožňuje upevnění roztíratelných vzorků taveného sýru v poloze kolmé na dopadající paprsek

Pro měření změny intenzity fluorescence závislé na obsahu riboflavinu v taveném sýru byly dle kapitoly 6. 3. 1 připraveny vzorky tavených sýrů, do kterých bylo přidáváno různé množství sypkého riboflavinu. Koncentrace přidaného riboflavinu se pohybovaly v rozmezí 0 – 10 mg/kg. Vzorky byly postupně natřeny na polystyrenovou podložku, která nevykazuje fluorescenční aktivitu a bylo zaznamenáno jejich emisní spektrum v rozmezí 450 – 650 nm. Excitační vlnová délka byla stejná jako při excitaci riboflavinu v roztoku (360 nm).

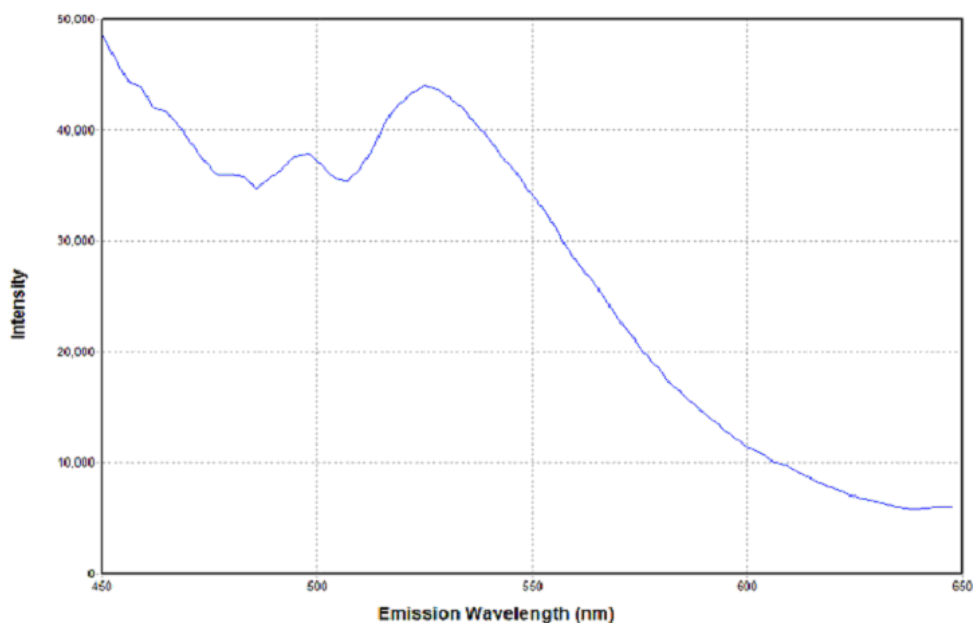
Pro ilustraci zvyšování intenzity fluorescence po přídavku riboflavinu do vzorku taveného sýra jsou uvedena emisní spektra taveného sýru bez přídavku riboflavinu a s přídavkem riboflavinu 10 mg/kg (Obr. 21 a 22).



Obr. 21 Emisní spektrum taveného sýru vyrobeného v laboratorních podmínkách bez přídavku riboflavinu

Na obrázku 21 je zachyceno charakteristické emisní spektrum pro vzorek taveného sýru bez přídavku riboflavinu. Fluorescenční křivka je zobrazena v emisním pásmu 450 – 650 nm a byla excitována při 360 nm vlnové délky. Ve spektrech byla opět sledována oblast 531 nm vlnové délky, kde riboflavin vykazuje maximum.

Intenzita fluorescence při vlnové délce 531 nm odpovídá fluorescenci vitamínu B₂ a v tomto případě charakterizuje fluorescenční intenzitu matrice, tzv. jakési pozadí, jehož intenzita emise (24 605 counts/s), odpovídá signálu riboflavinu, který byl ve vzorku přítomen.

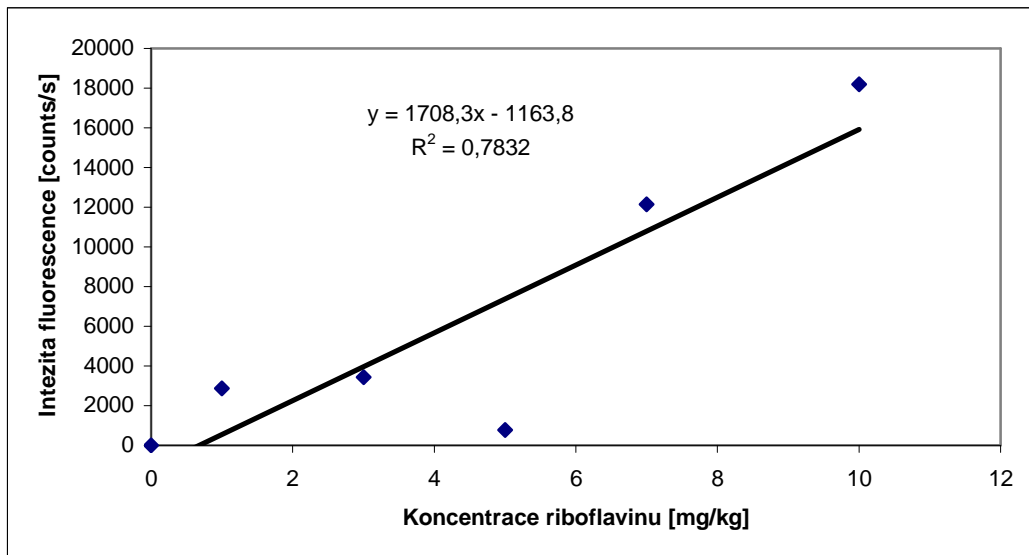


Obr. 22 Emisní spektrum taveného sýru vyrobeného v laboratorních podmínkách s přídavkem riboflavinu 10 mg/kg

Vzorek taveného sýra, který je obohacen o přídavek riboflavinu 10 mg/kg (Obr. 22), vykazuje v emisní vlnové délce 531 nm vyšší intenzitu fluorescence než byla hodnota fluorescence ve vzorku bez přídavku riboflavinu.

Ze zjištěných dat můžeme prokázat, že s přídavkem riboflavinu do vzorku taveného sýra stoupá intenzita fluorescence při vlnové délce 531 nm emisního spektra.

Celkem byla proměřena intenzita fluorescence v 6 ti vzorcích taveného sýra, kdy jednotlivé vzorky byly obohacovány o přídavky riboflavinu v rozmezí 0 – 10 mg/kg. Výsledné hodnoty fluorescence při 531 nm byly vyneseny do grafu (Obr. 23) a konkrétní data jsou uvedena v příloze (P IV).



Obr. 23 Závislost intenzity fluorescence na koncentraci riboflavinu v taveném sýru vyrobeném v laboratorních podmínkách

Dle uvedeného obr. 23 je možné potvrdit stoupající intenzitu fluorescence se stoupající koncentrací riboflavinu ve vzorcích taveného sýra. Pouze u vzorku č. 6 a 4 intenzita fluorescence klesla příliš intenzivně. Tento jev může být zapříčiněn rozdílnou strukturou plochy analyzovaného vzorku.

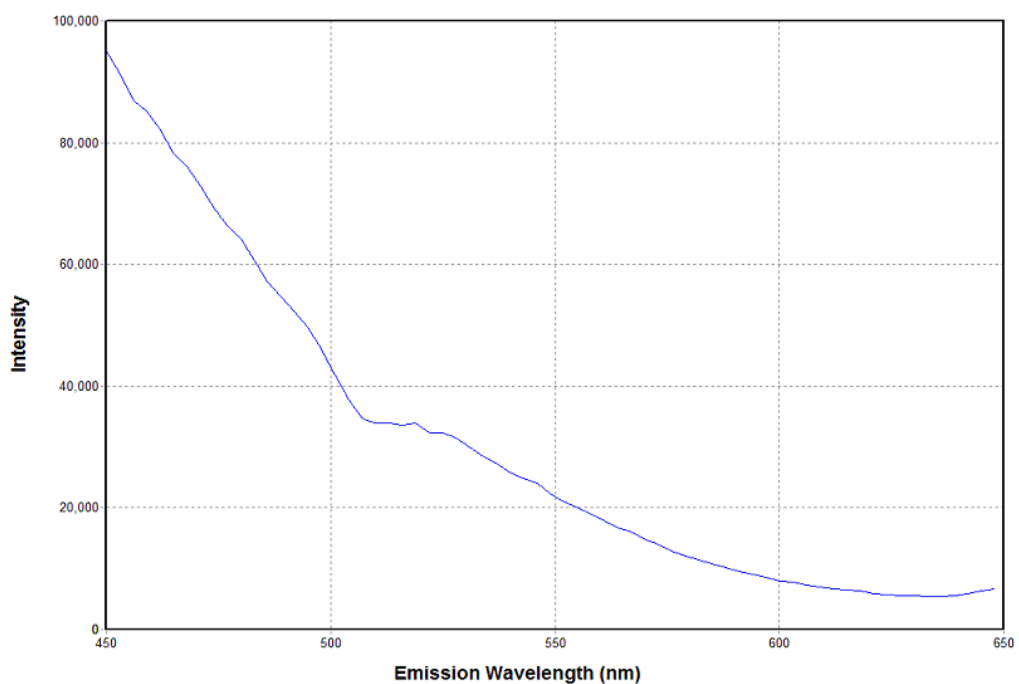
Směrodatná odchylka opakovatelnosti je 3 730,45 counts/s. Hodnota opakovatelnosti měření riboflavinu v taveném sýru je 10 445,27 counts/s (2,4 mg/kg). Opakovatelnost vyjadřuje 2,8 násobek směrodatné odchylky na 5 % hladině významnosti.

7.5 Měření intenzity fluorescence Smetanového taveného sýru s přidavkem riboflavinu

Záměrem tohoto experimentu bylo prozkoušení stanovení množství riboflavinu v taveném sýru, který je běžně dostupný v obchodní síti. Tavený sýr byl v laboratorních podmínkách obohacen o riboflavin ve vyšším množství než v předchozím experimentu.

Celkem bylo připraveno 11 vzorků, jejichž postup výroby je popsán v kapitole č. 6. 3. 2. Vzorky byly připraveny ze Smetanového taveného sýru Kunín, který byl v laboratorních podmínkách obohacen práškovým riboflavinem. Tímto způsobem byla připravena řada vzorků s přidavkem riboflavinu v rozmezí 0 – 40 mg/kg a následně byla proměřena intenzita fluorescence.

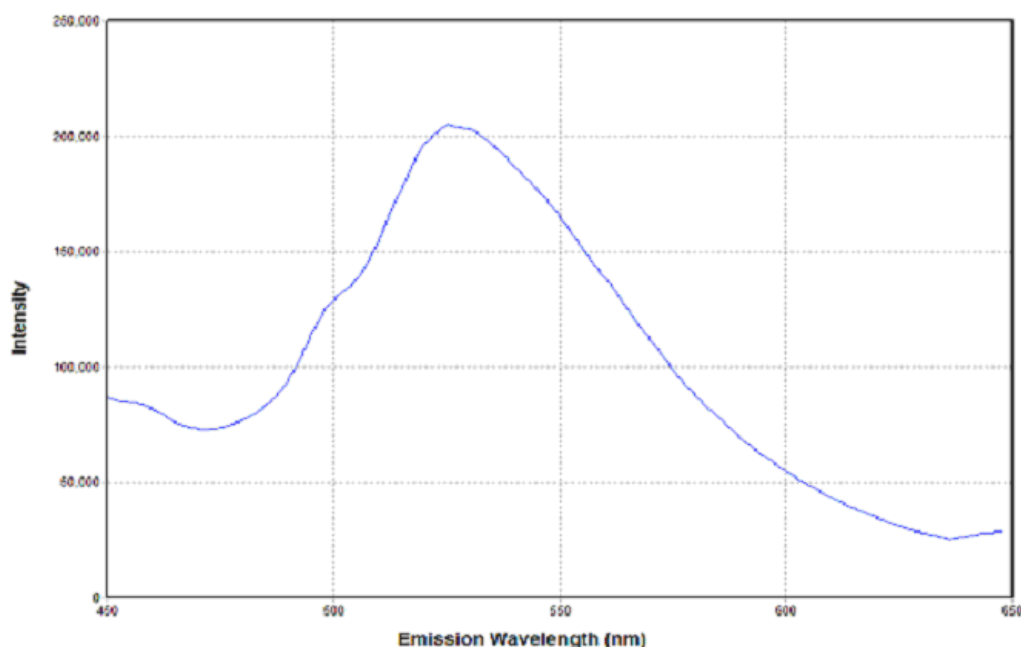
Charakteristický průběh emisních spekter v rozsahu 450 – 650 nm dokumentují obrázky č. 24 a 25. Záměrem uvedení zmíněných emisních spekter bylo poukázat na změnu intenzity fluorescence po přidavku riboflavinu do vzorku.



Obr. 24 Emisní spektrum Smetanového taveného sýru Kunin bez přidavku riboflavinu

Je-li srovnáno emisní spektrum taveného sýru, který byl vyrobený v laboratorních podmínkách bez přídavku riboflavinu (Obr. 21) a emisní spektrum Smetanového taveného sýru Kunín bez přídavku riboflavinu (Obr. 24), dojdeme k závěru, že průběh obou emisních křivek se podobá. Podobnost může být zapříčiněna podobnou surovinovou skladbou, která byla použita na výrobu tavených sýrů.

Na obr. 24 je opět zobrazen měřitelný signál v oblasti 531 nm, který odpovídá přítomnosti riboflavinu. Tento signál je považován za signál tzv. pozadí pevné matrice, proto byl odečítán od ostatních hodnot naměřené intenzity fluorescence (P V).

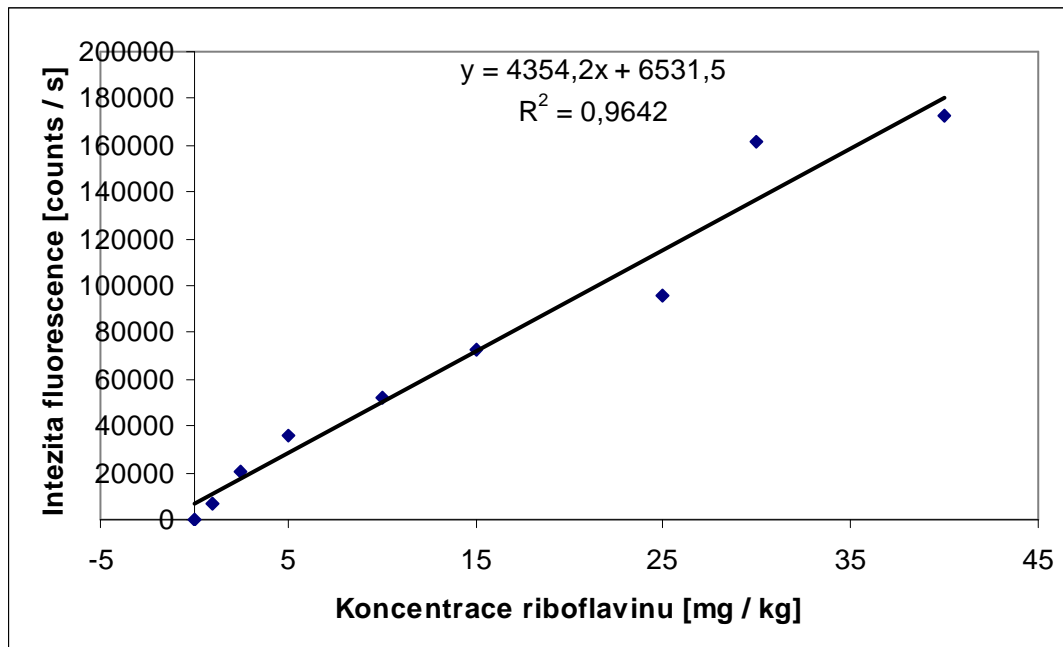


*Obr. 25 Emisní spektrum Smetanového taveného sýru Kunín
s přídavkem riboflavinu 40 mg/kg*

Zvýšení intenzity fluorescence přidáním riboflavinu do vzorku Smetanového taveného sýru Kunín můžeme vidět na obr. 25. Zde se intenzita fluorescence měřená v emisní délce 531 m zvýšila na hodnotu 202 711 counts/s.

Intenzita fluorescence koreluje s množstvím přidaného riboflavinu. Se zvyšujícím se množstvím přidaného riboflavinu do vzorku Smetanového taveného sýru Kunín, stoupá intenzita fluorescence při vlnové délce 531 nm.

Naměřené hodnoty intenzity fluorescence v závislosti na koncentraci riboflavinu ve vzorku taveného sýru byly vyneseny do grafu na obr. 26, konkrétní data jsou uvedena v příloze (P V).



Obr. 26 Závislost intenzity fluorescence na koncentraci riboflavinu ve Smetanovém taveném sýru Kunín

Obr. 25 zobrazuje naměřené hodnoty intenzity fluorescence v závislosti na koncentraci přidaného riboflavinu do Smetanového taveného sýru Kunín. Porovnáme-li intenzitu fluorescence pro jednotlivé vzorky, můžeme poukázat na stoupající intenzitu fluorescence se zvyšujícími přídávky riboflavinu do taveného sýru. Všechny hodnoty byly korigovány o hodnotu pozadí (29 909 counts/s).

Na základě zobrazené závislosti, která není úplně lineární a vykazuje vyšší rozptyl, byla stanovena opakovatelnost měření pro tyto vzorky a směrodatná odchylka měla hodnotu 1 045,27 counts/s (tabulka P VI). V případě odečtu z grafu na obr. 24 by se jednalo o hodnotu 2,4 mg/kg. Výsledná hodnota opakovatelnosti je 2,8 násobek směrodatné odchylky na 5 % hladině významnosti

8 DISKUSE VÝSLEDKŮ

Praktická část diplomové práce byla zaměřena na stanovení kalibrační řady riboflavinu ve vodném roztoku, ověření degradace riboflavinu ve vodném roztoku při působení denního světla a využití modulu pro pevné látky na stanovení riboflavinu v taveném sýru.

8.1 Stanovení optimálních podmínek pro měření koncentrace riboflavinu ve vzorcích

Před samotným měřením intenzity fluorescence riboflavinu ve vodném roztoku a v taveném sýru musely být nejdříve stanoveny optimální podmínky pro tato měření.

Za tímto účelem byla proměřena matice riboflavinu ve vodném roztoku (10 mg/l). Matice je 3 D model, jež zobrazuje závislost intenzity fluorescence na emisním a excitačním spektru. Na základě této luminiscenční charakteristiky byla vybrána optimální excitační vlnová délka a rozsah emisního spektra, ve kterém byla emise zaznamenávána.

Maximální intenzita fluorescence riboflavinu byla zaznamenána při excitační vlnové délce 450 nm. Tato hodnota excitace pro měření tavených sýrů nebyla zvolena záměrně, jelikož by při této hodnotě excitace nebylo možné analyzovat vzorky s vyšší koncentrací riboflavinu než 10 mg/l. Důvodem je kapacita detektoru, jelikož spektrální fluorimetr má omezenou hranici detekce intenzity fluorescence a to 800 000 světelných kvant vyzářených za sekundu a tato hodnota nesmí být překročena. Proto byla zvolena hodnota 360 nm, která byla použita pro excitaci všech námi měřených vzorků v emisním spektru 450 – 650 nm.

JOSÉ NATERA a kol. ve svém článku uvádí pro stanovení riboflavinu ve vodném roztoku excitační délku 445 nm (pomocí přístroje Hewlett Packard 8453 spektrofotometr) a maximální fluorescenční aktivitu při 515 nm [62]. Naopak AHMAD, Iqbal a kol. popisuje měření riboflavinu v roztoku (za pomoci přístroje Versa Fluor fluorimetru). Excitace riboflavinu byla provedena pomocí křemíkové halogenové žárovky, kdy roztok riboflavinu byl excitován při 374 nm a intenzita emise byla měřena při vlnové délce 525 nm [63].

V rámci dalšího výzkumu provedl AHMAD Iqbal a kol. měření, kdy byl pozorován vliv různých přísad fosfátů do roztoku riboflavinu při pH 7. Stanovení intenzity fluorescence bylo provedeno při jiných podmínkách měření. Za pomoci xenonové obloukové lampy

při excitaci 440 nm a intenzita emise riboflavinu v roztoku byla měřena intenzita fluorescence při 530 nm [64].

Pro srovnání jsou uvedena i data od autorů THU TRANG Vu a kol, jež provedli stanovení riboflavinu v mléce metodou HPLC, kdy byl použit fluorescenční detektor Shimadzu RF-10 AXL. Pro excitaci riboflavinu ve vzorku uvádí autoři 450 nm a emisi 510 nm [65]. Stanovení riboflavinu s pomocí metody HPLC popisuje také CRISTINA ANDRÉŠ-LACUEVA a kol., která použila pro excitaci vzorku 265 nm a emise byla odečítána při 525 nm (Hewlett-Packard 1100 s HP-1046A fluorescenčním detektorem) [66].

Zmínění autoři uvádějí excitační vlnové délky při stanovení riboflavinu v rozmezí 265 – 450 nm a emisní délky 515 – 530 nm. Excitační délce 360 nm a emisní délce 531 nm, použité pro analýzu vzorků v této diplomové práci, se nejvíce přibližuje excitační délka 374 nm a emisní délka 525 nm (AHMAD, Iqbal, a kol., Versa Fluor fluorimetru) [62].

8.2 Kalibrační řada riboflavinu a fotodegradace riboflavinu v roztoku

V diplomové práci byl proveden experiment, který byl zaměřen na sestavení kalibrační křivky riboflavinu v roztoku, dle které byl následně vyhodnocen obsah riboflavinu v roztoku po rozkladu za přítomnosti denního světla.

Působením denního světla na roztok riboflavinu při $\text{pH} < 8$ degraduje riboflavin za vzniku lumichromu, který je účinnější oxidační činidlo než samotný riboflavin. Interakcí lumichromu s tripletovým kyslíkem vzniká singletový kyslík, který působí na destrukci vitamínu C a na oxidaci dalších významných látek jako je retinol a retinoidy, esenciální mastné kyseliny a esenciální aminokyseliny. Zejména u piva, vína a mléka se tomuto jevu předchází, s použitím materiálů, které nepropouští denní světlo [2].

Byl ověřen vliv denního světla na degradaci riboflavinu ve vodném roztoku při $\text{pH} 6,2$. Degradace riboflavinu byla nejintenzivnější v prvních 15 minutách expozice, kdy došlo k poklesu intenzity fluorescence riboflavinu o 4,5 %. Následný rozklad riboflavinu byl pozvolný a to 1 – 2 % za 15 minut. Za dobu 120 min, kdy byl vzorek osvětčován, klesla aktivita riboflavinu o 12,8 %, což odpovídá poklesu o 1,28 mg/l. Je možné předpokládat, že pokud by fotodegradace dál probíhala konstantně, při další expozici vzorku za stejných podmínek by mohlo dojít k úplné degradaci riboflavinu.

Pro stanovení opakovatelnosti měření bylo proměřeno 7 vzorků a stanovená směrodatná odchylka množství riboflavinu ve vodném roztoku odpovídá 0,04 mg/l (P VI). Její 2,8 násobek udává opakovatelnost metody na 5 % hladině významnosti, což činí 0,112 mg/l.

AHMAD Iqbal a kol. provedli podobný výzkum, jež byl založen na rozkladu riboflavinu v roztoku s přítomností Na_2HPO_4 , kdy pH bylo upraveno na hodnotu 7. Roztok byl ozařován rtuťovou výbojkou s emisí 366 nm. Autoři zjistili, že roztok riboflavinu s přidavkem nízké koncentrace fosfátů degradoval za daných podmínek o 36,9 %, naopak je-li přítomna vyšší koncentrace fosfátů v roztoku, degrduje riboflavin za daných podmínek o 65,3 %. Degradace byla odečtena po 70 min [67]. V další studii je uveden vliv pH a přítomnosti dvojmocných iontů kyseliny citrónové v roztoku na rozklad riboflavinu při ozáření vysokotlakou rtuťovou lampou. Dvojmocné ionty kyseliny citrónové způsobily 39 – 20 % snížení fluorescence riboflavinu v roztoku při pH 4,0 – 7,0. Pokles intenzity fluorescence roztoku riboflavinu při zmíněných podmínkách a pH 7,00 byl po 120 minutách 72,8 % [68].

Z citovaných dat plyne, že na degradaci riboflavinu denním světlem má vliv několik činitelů. Intenzita rozkladu riboflavinu stoupá s větší plochou ozařovaného vzorku. Rozklad riboflavinu vlivem denního světla závisí také na pH roztoku, přítomností fosfátů a kyseliny citrónové.

Rozdílnost mezi námi naměřeným poklesem aktivity riboflavinu a hodnotami, které uvádí citované publikace, může být dán zdrojem světla použitým pro ozařování vzorků. Citovaný autor uvádí použití rtuťové výbojky, která působí v oblasti UV záření, při němž probíhá degradace riboflavinu intenzivněji. Zářivka imitující bílé denní světlo, použitá pro osvětlování vzorků v diplomové práci, není tak významným zdrojem UV záření. Působí především v oblasti viditelného spektra vlnových délek, které nemají tak intenzivní vliv na degradaci riboflavinu.

8.3 Stanovení riboflavinu v taveném sýru

Jednou z výhod přístroje PC – 1 Photon Counting 001 Steady-State Spectrofluorimeter je možnost použití modulu pro stanovení intenzity fluorescence v pevných vzorcích

(Obr. 14). Jelikož Ústav technologie potravin Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně se již řadu let zabývá problematikou tavených sýrů, byly jako pevný vzorek zvoleny tavené sýry.

Pro analýzu riboflavinu byly použity vzorky tavených sýrů, které byly vyrobeny v laboratorních podmínkách a Smetanový tavený sýr Kunín z obchodní sítě. Vzorky byly následně obohaceny různými koncentracemi sypkého riboflavinu. Pro tavený sýr v laboratorních podmínkách se přídavky riboflavinu pohybovaly v rozmezí 0 – 10 mg/kg. U těchto vzorků byly přídavky riboflavinu voleny tak, aby se koncentrace riboflavinu nejvíce blížily hodnotám reálně se vyskytujícím v sýrech (Tab. 1). Pro Smetanový tavený sýr Kunín byly koncentrace voleny v širším rozsahu 0 – 40 mg/kg.

Použití modulu pro analýzu pevných vzorků se sebou nese problémy s upevněním, jelikož vzorek musí být upevněn kolmo k excitačním paprsku. Z tohoto důvodu bylo nutno nejdříve odzkoušet materiál, ze kterého byla následně vyrobena podložka vhodná pro nanášení vzorku taveného sýru. Bylo nutné najít materiál s dostatečnou pevností a nízkou fluorescenční aktivitou. Celkem bylo proměřeno 6 vzorků z různého materiálu (papírový karton, povoskovaný karton, průhledná fólie, lepenka s izolepou a polystyren). Jako nejvhodnější materiál pro přípravu podložky byl vyhodnocen polystyren, jež nevykazoval žádnou fluorescenční aktivitu.

Pro měření množství přidaného riboflavinu do vzorků byla použita excitační vlnová délka 360 nm a intenzita fluorescence byla odečítána při 531 nm vlnové délky. Nejdříve byla proměřena emisní spektra riboflavinu (450 - 650 nm) jak u vzorku taveného sýru bez přídavku riboflavinu, tak i u Smetanového sýru Kunín bez přídavku riboflavinu. Při srovnání obou emisních spekter můžeme vidět téměř totožný průběh emisních křivek s pozitivní fluorescenční aktivitou při vlnové délce 531 nm. Tato fluorescenční aktivita je důkazem přítomnosti riboflavinu ve vzorcích, aniž by byly tavené sýry o riboflavin obohaceny. Důvodem přítomnosti riboflavinu může být surovinová skladba taveného sýru, pro kterou byly použity přírodní sýry, ve kterých se riboflavin běžně vyskytuje (Tab. 1).

Ve vzorcích taveného sýru vyrobeného v laboratorních podmínkách a Smetanového taveného sýru Kunín byla proměřena intenzita fluorescence v závislosti na koncentraci riboflavinu ve vzorku.

Ze zjištěných dat byly odečteny intenzity fluorescence (531 nm) tavených sýrů bez přídavku riboflavinu a byly sestaveny grafy, které dokumentují rostoucí intenzitu fluorescence s rostoucím přídavkem riboflavinu do vzorků. Grafy byly proloženy lineárně přímkou regrese, kde byl stanoven korelační faktor. Porovnáme-li korelační faktor pro intenzity flu-

orescence taveného sýru vyrobeného v laboratorních podmínkách ($R^2 = 0,7832$) a korelační faktor pro měření Smetanového taveného sýru Kunín ($R^2 = 0,9642$), zjistíme lepší lineární závislost intenzity fluorescence na koncentraci riboflavinu ve vzorcích Smetanového taveného sýru Kunín, kde byly zvoleny vyšší přídavky riboflavinu do vzorku.

Jelikož bylo zjištěno, že měření tavených sýrů je velmi závislé na struktuře povrchu analyzovaného vzorku, byla provedena měření opakovatelnosti. Opakovatelnost je vlastnost metody, ne však výsledků. Následná měření poskytla 7 výsledků (P VI), z nichž byla vypočtena směrodatná odchylka. Její 2,8 násobek udává opakovatelnost na 5% hladině významnosti. Pro měření opakovatelnosti tavených sýrů metodou spektrální fluorimetrie byla za zmíněných podmínek stanovena hodnota 2,4 mg/kg (10445,27 counts/s).

ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývá spektrální fluorimetrií a jejím použitím pro stanovení riboflavinu v potravinách. Hlavním cílem bylo odzkoušení a nalezení vhodných podmínek, za kterých by mohl být riboflavin stanoven v roztoku a v pevných vzorcích. Všechna měření byla provedena na přístroji PC – 1 Photon Counting 001 Steady-State Spectrofluorimeter.

Nejdříve byly stanoveny podmínky, při kterých byly všechny vzorky proměřovány. Pro excitaci byla použita hodnota 360 nm a intenzita fluorescence byla odečítána při 531 nm. Následně byla proměřena řada vodných roztoků s koncentrací riboflavinu v rozmezí 0 – 10 mg/l, kdy intenzita fluorescence stoupala s vyšší koncentrací riboflavinu v roztoku. Z naměřených hodnot byla vypočtena rovnice regrese, dle které bylo stanoveno množství riboflavinu ve vodném roztoku, který byl osvětčován denním světlem.

Vlivem denního světla se riboflavin rozkládá ve vodném roztoku při $\text{pH} < 8$ na lumichrom. Roztok o koncentraci riboflavinu 10 mg/l a $\text{pH} 6,2$ byl osvětčován po dobu 0 – 120 min. Po 120 minutách expozice byl zaznamenán pokles intenzity fluorescence o 12,8 %, což odpovídá 1,28 mg/l. Nejintenzivnější degradace riboflavinu nastala v prvních 15 minutách expozice (pokles 4,5 %). Následný rozklad riboflavinu byl pozvolný a to 1 – 2 % za 15 minut.

Jako pevná matrice byly zhotoveny vzorky tavených sýrů. Pro zajištění dobré roztíratelnosti vzorků byla použita při tavení vzorků trojkombinace tavících solí (monosforečnan sodný, difosforečnan sodný a polyfosforečnan sodný) v poměru 20 % : 10 % : 70 %.

Celkem bylo připraveno 6 vzorků, které byly při výrobě obohacovány o koncentrace riboflavinu 0 – 10 mg/kg. Přídavky riboflavinu byly voleny tak, aby se co nejvíce blížily koncentracím riboflavinu v běžně dostupných tavených sýrech.

Pro srovnání emisních spekter laboratorně vyrobených vzorků taveného sýru a taveného sýru z obchodní sítě byl použit Smetanový tavený sýr Kunín, který byl také obohacen o známé koncentrace riboflavinu v rozmezí 0 – 40 mg/kg.

Z naměřených hodnot bylo zjištěno, že intenzita fluorescence stoupá s vyšším přídatkem riboflavinu do vzorku taveného sýru. Při měření však vznikla řada problémů, které ovlivňují analýzu riboflavinu v taveném sýru. Měření intenzity fluorescence je velmi závislé na

strukturu povrchu analyzovaného vzorku. Při měření dochází k zasychání vzorku na povrchu a tím ke změně struktury a vzniku rušivých jevů odrazem světla na povrchu.

Spektrofluorimetrie je vhodnou metodou pro stanovení riboflavinu v roztoku, neobsahuje-li vzorek luminiscenční látku, která ovlivní zásadním způsobem měření. Pro analýzu riboflavinu v taveném sýru by bylo vhodné navrhnout systém nanášení vzorků, aby byla vždy zachována stejná vrstva a struktura povrchu. Různorodost povrchu nanášeného vzorku hraje velkou roli v intenzitě fluorescence.

Stanovení riboflavinu metodou spektrofluorimetrie může být jednou z možností pro stanovení riboflavinu v potravinách, avšak by bylo nutné se metodě dále věnovat a vyřešit problematiku s nanášením pevného vzorku.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KRAMÁŘOVÁ, D., BUDINSKÝ, P. *Potravinářská biochemie II*. 1. vydání. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006. 104 s. ISBN 80-7318-395-1
- [2] EDWARDS, A. M. General properties of flavins. *COMPREHENSIVE SERIES IN PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY*, 2006, 1.
- [3] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin I*. 3. vydání. Tábor: OSSIS, 2009. 602 s. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [4] UNGEROVÁ-GÖBELOVÁ, U. *Vitaminy*. 1. vydání. Praha: Ikar Praha, a. s. 1999. 91 s. ISBN 80-7202-508-2
- [5] CIBULKA, R. Flaviny – perspektivní katalyzátory oxidací a redukcí. *Chem. Listy*, 2010, 104: 326-333.
- [6] *Leukoriboflavin* [online] [cit. 2013-04-19] Dostupné z www: <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/leukoriboflavin>
- [7] *Riboflavin v pevném skupenství* [online] [cit. 2013-04-19] Dostupné z www: <http://www.vitalvibe.eu/197-320-home/kakaovy-prasek-bio-500-g.jpg>
- [8] HUANG, R.; KIM, H. J.; MIN, D. B. Photosensitizing effect of riboflavin, lumiflavin, and lumichrome on the generation of volatiles in soy milk. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2006, 54.6: 2359-2364.
- [9] AHMAD, I. et al. Effect of caffeine complexation on the photolysis of riboflavin in aqueous solution: a kinetic study. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2009, 57.12: 1363-1370
- [10] NISHA, P., SINGHAL, R. S., PANDIT, A. B. A study on degradation kinetics of riboflavin in spinach. *Journal of food engineering*, 2005, 67.4: 407-412.
- [11] FREEDY, V. R. *B vitamins and folate: chemistry, analysis, function and effects*. Cambridge: RSC Publishnig, 2013, xxxii, 855 s. ISBN 978-1-84973-369-4
- [12] *Vitamin B₂*. [online] [cit. 17-3-2013] Dostupné z www: <http://vitainfo.cz/eshop/detail.php?idzb=261>

- [13] VOICESCU, M. et al. The oxidative activity of riboflavin studied by luminescence methods: the effect of cysteine, arginine, lysine and histidine amino acids. *Revue Roumaine de Chimie*, 2006, 51.7/8: 683.
- [14] MINDELL, E., MUNDISOVÁ, H. *Nová vitaminová bible*. 2. vydání. Praha: Euromedia Group, k. s. – Ikar. 2006. 576 s. ISBN 80-249-0744-5
- [15] HU, L. et al. Determination of riboflavin in urine and beverages by capillary electrophoresis with in-column optical fiber laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 2007, 856.1: 245-251.
- [16] URSELL, A. *Vitaminy a minerály. Doplnky pro zdraví a vitalitu inspirované přírodou*. 1. vydání. Bratislava: NOXI. 2004. 128. s. ISBN 80-89179-00-2
- [17] STREHLER, B. L., SHOUP, CH. S. The chemiluminescence of riboflavin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1953, 47.1: 8-15.
- [18] WANG, M. et al. Determination of riboflavin by enhancing the chemiluminescence intensity of peroxomonosulfate–cobalt (II) system. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2007, 66.4: 1222-1227.
- [19] ŠKROVÁNKOVÁ, S., SIKOROVÁ, P. Vitamin B2 (riboflavin) content in cereal products. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 2010
- [20] KATEŘIAN, P. *Antioxidanty – zpomalte čas dietou*. 1. vydání. Praha: Sun. 2010. 111 s. ISBN 978-80-7371-344-7
- [21] *Vitamin B₂* [online] [cit. 2013-04-25] Dostupné z [www http://galenus.cz/vitaminy-vitamin-B2.php](http://galenus.cz/vitaminy-vitamin-B2.php)
- [22] BUŇKA, F., NOVÁK, V., KADIDLOVÁ, H. *Ekonomika výživy a výživová politika*. 1. vydání. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. 2006. 159 s. ISBN 80-7318-429-x
- [23] JORDÁN, V., HEMZALOVÁ, M. *Antioxidanty zázračné zbraně. Vitaminy, minerály, stopové prvky aminokyseliny a jejich využití pro zdravý život*. 2001. vydání 1. Brno: JOTA s. r. o. 153 s. ISBN 80-7217-156-9
- [24] POWERS, Hilary J. Riboflavin (vitamin B-2) and health. *The American journal of clinical nutrition*, 2003, 77.6: 1352-1360.

- [25] JANSEN, A. P. The riboflavin-analysis in foods by a microbiological and chemical (lumiflavin) method. *Internationale Zeitschrift für Vitaminforschung. Beiheft*, 1955, 25.4: 365.
- [26] SUKOVÁ, I. Stanovení thiaminu a riboflavinu v různých druzích mléka. [online] [cit. 16-3-2013] Dostupné z www: <http://agronavigator.cz/default.asp?ch=13&typ=1&val=13600&ids=312>
- [27] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vydání. Ostrava: Pavel klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2
- [28] BHATTAR, S. L.; KOLEKAR, G. B.; PATIL, S. R. Fluorescence resonance energy transfer between perylene and riboflavin in micellar solution and analytical application on determination of vitamin B₂ *Journal of Luminescence*, 2008, 128.3: 306-310.
- [29] GUO, X. et al. Studies on Photochemical Fluorimetric Method Wave Scanning-Differential Rate Method. *Chemical Research In Chinese Universities*, 1992, 10: 011.
- [30] DAVÍDEK, J., VELÍŠEK, J. *Analýza potravin*. 1. vydání. VŠCHT Praha v Čs. redakce VN MON, 1988. 122 s.
- [31] KUBÁŇ, V., KUBÁŇ, P. *Analýza potravin*. 1. vydání. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. 202 s. ISBN 978-80-7375-036-7
- [32] GOLBACH, J. L., et al. Adaptation of *Lactobacillus rhamnosus* riboflavin assay to microtiter plates. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007, 20.7: 568-574.
- [33] PREISIER, J. *Kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescenční detekcí*. Chemopoint. [online] [cit. 2013-04-28] Dostupné z www: <http://www.chempoint.cz/kapilarni-elektroforeza-s-laserem-indukovanou-fluorescenci-detekci>
- [34] RYVOLOVÁ, M. a kol. Deprivatizace aminokyselin, peptidů a proteinů laserem indukovanou fluorescenční detekcí v kapilární elektroforéze. *Chem. Listy*, 2006, 100: 191-195.

- [35] ŠVEC, F. Co dnes hýbe kapalinovou chromatografií. *Chem. Listy*, 2009, 103.4: 266-270.
- [36] SÝKORA, D., FÄHNRIK, J. Kapalinová chromatografie a absorpční UV spektrofotometrie. 2008.
- [37] BARNA, É., DWORSCHÁK, E. Determination of thiamine (vitamin B₁) and riboflavin (vitamin B₂) in meat and liver by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1994, 668.2: 359-363.
- [38] GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, A., KOZIOŁOWA, A. Chromatographic determination of riboflavin and its derivatives in food. *Journal of Chromatography A*, 2000, 881.1: 285-297.
- [39] KÁŠ J., KODÍČEK M., VALENTOVÁ O.: *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2006. ISBN 80-7080-586-2
- [40] KRIST, J., GÉLA, F., FRONČEK F., KUBALA, M. Luminiscence v běžném životě i v laboratoři. *Chemické listy* 102, 2008, 1012-1016
- [41] ŠIMSÁ, D., SKOPAL, J. Chemická luminiscence luminolu a jeho syntéza ze snadno dostupných chemikálií. *Chemické listy* 102, 2008, 1017-1019
- [42] FIŠAR, Z. *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách*. Publikováno v roce 2003 [online] [cit. 2013-04-128]. Dostupné z www: <http://www1.lf1.cuni.cz/%7Ezfishar/fluorescence/Default.htm>
- [43] *Principy fluorescenční spektroskopie* [online] [cit. 2013-04-18] Dostupné z www: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy.htm>
- [44] PELANT, I. VALENTA, J. *Luminescenční spektroskopie*. Praha: Academia, 2006. 327 s. ISBN 80-200-1447-0
- [45] NĚMCOVÁ, I., ČERMÁKOVÁ, L., RYCHLOVSKÝ, P. *Spektrometrické analytické metody I.1*. vydání. Praha: Univerzita Karlova - Karolínium, 1997. 166 s. ISBN 382- 81-97
- [46] *Elektronový přechod molekul* [online] [cit. 2013-04-19] Dostupné z www: <https://encrypted->

tbn2.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSunqwEDKxOr6nAMYEx8OZIpKChAZ1
ywt-Ai1XcdEo4WGC25gPIWA

- [47] PRAUS, P., DOMBEK, V., KLIKA, Z. *Základy analytické chemie*. 1. vydání. Ostrava: VŠB-TECHNICKÁ UNIVERZITA OSTRAVA, 2001. 110 s. ISBN 80-7078-896-8
- [48] ANDRLÍK, K., SCHLEMMER, J. *Analytická chemie*. 2. vydání. Praha: Polytechnická knižnice, 1964. 190 s.
- [49] *Fluorofory v biomedicíně*. [online] [cit. 2013-04-30] Dostupné z www: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>
- [50] VIDRMANOVÁ, M. Fluorimetrie s využitím spektrofluorimetru. *Bakalářská práce*. Brno: Masarykova universita. Přírodovědecká fakulta – ústav chemie., 2011. 39 s.
- [51] VRBOVÁ, M; GAVRILOV, P; JELÍNKOVÁ, H. *Uvod do laserové techniky*. České vysoké učení technické, 1994.
- [52] MYSLÍK, J. *Elektromagnetické pole*. 1. vydání BEN-Technická literatura, 2002. 159 s. ISBN 80-86056-43-0
- [53] GENUIS, S. J. Fielding a current idea: exploring the public health impact of electromagnetic radiation. *Public Health*, 2008, 122.2: 113-124.
- [54] *Viditelné elektromagnetické spektrum*. [online] [cit. 2013-05-1] Dostupné z www: <http://www.fotoradce.cz/blog/soubory/clanky/227/mspektrum.jpg>
- [55] HOFMAN, J., URBANOVÁ, M. *Fyzika I*. 3. vydání. Praha: VŠCHT, 2011. 259 s. ISBN 978-80-7080-777-4
- [56] DIAN, J., JELÍNEK, I., Viditelná fotoluminiscence materiálů na bázi křemíku. *Chem. Listy*, 2010, 104: 770-777.
- [57] DUBAYOVÁ, K, KUŠNÍR, J, HANUS, M. Trojrozmerné fluorescenčné spektrá – riešiteľný problém aj pre staršie prístroje. *Chemické listy* 95. 2001, 310 – 313.
- [58] WANG, Bo-Cheng, et al. Theoretical investigation of stokes shift of 3, 4-diaryl-substituted maleimide fluorophores. *Journal of luminescence*, 2005, 113.3: 321-328.

- [59] *Stokesův posuv*. [online] [cit. 2013-05-3] Dostupné z www: http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy_soubory/image006.gif
- [60] ROSINA, J., KOLÁŘOVÁ, H., STANEK, J. *Biofyzika pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vydání. Grada Publishing, a. s., 2006. 232 s. ISBN 80-247-1383-7
- [61] *Hardware manual. Pc 1 - Photon Counting Steady-State Spectrofluorometer*
- [62] Natera, J., Massad, W., García, N. A. The role of vitamin B6 as an antioxidant in the presence of vitamin B2-photogenerated reactive oxygen species. A kinetic and mechanistic study. *Photochemical and Photobiological Science*. 2012, 11, 938 – 945.
- [63] AHMAD, I. et al. Effect of borate buffer on the photolysis of riboflavin in aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2008, 93.2: 82-87.
- [64] AHMAD, I., FASIHULLAH, Q., VAID, F. HM. Effect of phosphate buffer on photodegradation reactions of riboflavin in aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2005, 78.3: 229-234.
- [65] THU TRANG, Vu, et al. Protective effect of aminoreductone on photodegradation of riboflavin. *International Dairy Journal*, 2008, 18.4: 344-348.
- [66] ANDRÉS-LACUEVA, C., MATTIVI, F., TONON, D., Determination of riboflavin, flavin mononucleotide and flavin–adenine dinucleotide in wine and other beverages by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1998, 823.1: 355-363.
- [67] AHMAD, I.; FASIHULLAH, Q., VAID, F. HM. A study of simultaneous photolysis and photoaddition reactions of riboflavin in aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2004, 75.1: 13-20.
- [68] AHMAD, I. et al. Stabilizing effect of citrate buffer on the photolysis of riboflavin in aqueous solution. *Results in Pharma Sciences*, 2011, 1.1: 11-15.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

FAD	Flavinaminomononukleotid
FMN	Flavinadenindinukleotid
LIF	Laserem indukovaná fluorescenční detekce
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
UTB	Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
PS	Polystyren

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Riboflavin v pevném skupenství [7]	12
Obr. 2 Chemická struktura riboflavinu (oxidovaná forma) [3]	13
Obr. 3 Rozklad riboflavinu za přítomnosti světla [2]	13
Obr. 4 Struktura FAD/FMN [1]	14
Obr. 5 Rozklad riboflavinu na lumiflavin [31]	18
Obr. 6 Elektronový přechod molekul [46]	23
Obr. 7 Obecné schéma spektrofluorimetru [50]	25
Obr. 8 Viditelné spektrum elektromagnetického záření [54]	28
Obr. 9 Stokesův posuv [59]	29
Obr. 10 Vzorky laboratorně vyrobených tavených sýrů s přísávkem riboflavinu	35
Obr. 11 Vzorek Smetanového taveného sýru Kunín	36
Obr. 12 Přístroj PC – 1 Photon Counting 001 Steady-State Spectrofluorimeter (ISS, USA) [61]	37
Obr. 13 Modul pro kapalné vzorky	37
Obr. 14 Modul pro pevné vzorky	37
Obr. 15 Schéma - PC – 1 Photon Counting 001 Steady-State Spectrofluorimeter [61]	38
Obr. 16 Matice riboflavinu ve vodném roztoku (10 mg/l)	39
Obr. 17 Emisní spektrum riboflavinu 8 mg/l	41
Obr. 18 Emisní spektrum riboflavinu 3 mg/l	41
Obr. 19 Kalibrační křivka riboflavinu v roztoku	43
Obr. 20 Fotodegradace riboflavinu v roztoku. Závislost intenzity fluorescence na době ozařování vzorku	44
Obr. 21 Emisní spektrum taveného sýru vyrobeného v laboratorních podmínkách bez přísávkem riboflavinu	45
Obr. 22 Emisní spektrum taveného sýru vyrobeného v laboratorních podmínkách s přísávkem riboflavinu 10 mg/kg	46
Obr. 23 Závislost intenzity fluorescence na koncentraci riboflavinu v taveném sýru vyrobeném v laboratorních podmínkách	47
Obr. 24 Emisní spektrum Smetanového taveného sýru Kunín bez přísávkem riboflavinu	48
Obr. 25 Emisní spektrum Smetanového taveného sýru Kunín s přísávkem riboflavinu 40 mg/kg	49
Obr. 26 Závislost intenzity fluorescence na koncentraci riboflavinu ve Smetanovém taveném sýru Kunín	50

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1 Průměrný obsah riboflavinu v potravinách [mg/kg] [21]</i>	<i>16</i>
<i>Tab. 2 Druhy elektromagnetické záření [51]</i>	<i>27</i>

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Surovinová skladba taveného sýru vyrobeného v laboratorních podmínkách

Příloha P II: Hodnoty závislosti intenzity fluorescence na koncentraci riboflavinu ve vodném roztoku

Příloha P III: Hodnoty intenzity fluorescence v závislosti na koncentraci riboflavinu ve vodném roztoku po světelné degradaci

Příloha P IV: Hodnoty intenzity fluorescence a koncentrací riboflavinu taveného sýru vyrobeného v laboratorních podmínkách

Příloha P V: Hodnoty intenzity fluorescence a koncentrací přidaného riboflavinu do Smetanového taveného sýru Kunín

Příloha P VI: Opakovatelnost měření

PŘÍLOHA P I: SUROVINOVÁ SKLADBA TAVENÉHO SÝRU VYROBENÉHO V LABORATORNÍCH PODMÍNKÁCH

Sušina: 39,95 %

Tuk: 19,98 %

Tuk v sušině: 50,03 %

Surovina	Množství [kg]	Obsah sušiny [%]	Obsah tuku [%]
Eidamská cihla	0,410	50,0	15,0
Máslo	0,133	64,0	82,0
Tavicí sůl	0,0255	95,0	0,0
Pitná voda	0,285	0,0	0,0

Tavicí soli:

- monofosforečnan sodný 20 %
- difosforečnan sodný 10 %
- polyfosforečnan sodný 70 %

**PŘÍLOHA P II: HODNOTY ZÁVVISLOSTI INTENZITY
FLUORESCENCE NA KONCENTRACI RIBOFLAVINU
VE VODNÉM ROZTOKU**

Vzorek	Přídavek riboflavinu [mg/l]	Intenzita fluorescence [counts/s]
1	0,10	8645
2	0,25	17987
3	0,50	41644
4	1,00	72464
5	2,00	140561
6	3,00	209660
7	3,50	236491
8	4,00	269296
9	5,00	324188
10	7,00	420787
11	8,00	463335
12	10,00	550002

**PŘÍLOHA P III: HODNOTY INTENZITY FLUORESCENCE
V ZÁVISLOSTI NA KONCENTRACI RIBOFLAVINU VE VODNÉM
ROZOTOKU PO SVĚTELNÉ DEGRADACI**

Vzorek	Čas [min]	Intenzita fluorescence [counts/s]	Intenzita fluorescence [%]	Koncentrace riboflavinu [mg/l]
1	0	591075	100,0	10,17
2	15	564358	95,5	9,70
3	30	559540	94,7	9,61
4	45	550089	93,1	9,44
5	60	541962	91,7	9,30
6	75	530941	89,8	9,10
7	90	524137	88,7	8,97
8	105	516234	87,3	8,83
9	120	515539	87,2	8,82

**PŘÍLOHA P IV: HODNOTY INTENZITY FLUORESCENCE A
KONCENTRACÍ RIBOFLAVINU TAVENÉHO SÝRU VYROBENÉHO
V LABORATORNÍCH PODMÍNKÁCH**

Vzorek	Přídavek riboflavinu [mg/kg]	Intenzita fluorescence [counts/s]	Intenzita fluorescence po odečtení matrice [counts/s]
1	0,0	24605	0
2	1,0	27477	2872
3	3,0	28048	3443
4	5,0	25381	776
5	7,0	36750	12145
6	10,0	42803	18198

**PŘÍLOHA P V: HODNOTY INTENZITY FLUORESCENCE
A KONCENTRACÍ PŘIDANÉHO RIBOFLAVINU
DO SMETANOVÉHO TAVENÉHO SÝRU KUNÍN**

Vzorek	Přídavek ri- boflavinu [mg/kg]	Intenzita fluorescence [counts/s]	Intenzita fluorescence po odečtení matrice [counts/s]
1	0,00	29 909	0
2	1,00	36 646	6 737
3	2,50	50 673	20 764
4	5,00	65 811	35 902
5	10,00	81777	51 868
6	15,00	102 871	72 962
7	25,00	125 818	95 909
8	30,00	191 268	161 359
9	40,00	202 711	172 802

PŘÍLOHA P VI: OPAKOVATELNOST MĚŘENÍ

Číslo měření	Roztok		Tavený sýr	
	Intenzita fluorescence [counts/s]	Koncentrace riboflavinu [mg/kg]	Intenzita fluorescence [counts/s]	Koncentrace riboflavinu [mg/kg]
1	271 672	4,45	26 010	4,47
2	274 142	4,49	24 157	4,05
3	270 768	4,43	34 718	6,47
4	268 897	4,40	33 837	6,27
5	268 501	4,39	31 514	5,74
6	267 892	4,38	28 536	5,05
7	269 428	4,41	32 482	5,96
Průměr	270 185,71	4,42	30 179,14	5,43
Směrodatná odchylka	2 019,00	0,04	3 730,45	0,86
Opakovatelnost měření (5 % význam.)	5 653,21	0,10	10 445,27	2,40