

Stanovení vitamínu B₂ v cereáliích

Eva Mikulková

Bakalářská práce
2008



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav potravinářského inženýrství
akademický rok: 2007/2008

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Eva MIKULKOVÁ**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Stanovení vitamínu B2 v cereáliích**

Zásady pro vypracování:

1. **Teorie vitamínu B2.**
2. **Vypracujte teorii HPLC.**
3. **Praktická část – vlastní stanovení vitamínu B2 v cereálních výrobcích.**
4. **Vyhodnoťte výsledky.**
5. **Závěr**

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Hoza I, Kramářová D, Budínský P: Potravinářská biochemie II, UTB Zlín 2006

Velíšek Jan, Chemie potravin 2, 1.vydání, Tábor: OSSIS, 1999, 328 stran

Davídek J, Janíček G, Pokorný J, Chemie potravin, 1. vydání SNTL Praha 1983

www.lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/riboflavin

Kardoš E, Berek D, Základy kvapalinovej chromatografie, Alfa Bratislava

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

7. listopadu 2007

Termín odevzdání bakalářské práce:

31. května 2008

Ve Zlíně dne 12. května 2008

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.

děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.

vedoucí katedry

ABSTRAKT

Vitamín B₂ je důležitý pro dobrý stav kůže, očí, funkce srdce a dalších orgánů. Stejně jako další vitamíny řazené do skupiny vitamínů B má důležitou roli v energetickém metabolismu a je také potřebný pro metabolismus tuků, sacharidů a bílkovin. V této práci byl stanovován obsah vitamínu B₂ v cereáliích pomocí metody HPLC s UV/VIS detekcí.

Klíčová slova: Vitamín B₂, riboflavin, HPLC, cereálie

ABSTRACT

Riboflavin is important for the good condition skin and eyes and for the good functions heart and other vitals. Like the other B vitamins, it plays a key role in energy metabolism, and is required for the metabolism of fats, saccharides, and proteins. In this work was determined the amount of vitamin B₂ in cereals by HPLC with UV/VIS detection.

Keywords: Vitamin B₂, riboflavin, HPLC, cereals

Tímto chci poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Ing. Daniele Kramářové, Ph.D. za odborné vedení, rady, připomínky a všechny zodpovězené dotazy týkající se dané problematiky.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvolněno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně

.....

Podpis diplomanta

OBSAH

ÚVOD	8
TEORETICKÁ ČÁST	9
1 VITAMÍNY	10
2 RIBOFLAVIN	11
2.1 STRUKTURA RIBOFLAVINU.....	11
2.2 FYZIKÁLNĚ – CHEMICKÉ VLASTNOSTI RIBOFLAVINU	13
2.3 VÝSKYT RIBOFLAVINU.....	14
2.4 FYZIOLOGIE A VÝŽIVA	15
2.5 STANOVENÍ RIBOFLAVINU	16
3 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE	17
3.1 CHROMATOGRAFICKÉ METODY	17
3.2 PRINCIP HPLC.....	18
3.3 POUŽITÍ HPLC.....	18
3.4 CHROMATOGRAF HPLC	19
3.4.1 <i>Stacionární fáze</i>	19
3.4.2 <i>Mobilní fáze</i>	20
3.4.3 <i>Předkolona</i>	20
3.4.4 <i>Kolona</i>	20
3.4.5 <i>Detektor</i>	21
4 CEREÁLIE	22
4.1 SLOŽENÍ A VLASTNOSTI OBIHKY	22
4.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ OBILOVIN	24
4.2.1 <i>Sacharidy</i>	24
4.2.2 <i>Bílkoviny</i>	24
4.2.3 <i>Lipidy</i>	24
4.2.4 <i>Vitamíny</i>	25
4.2.5 <i>Minerální látky</i>	25
4.3 VÝZNAM OBILOVIN.....	25
PRAKTICKÁ ČÁST	26
5 METODIKA	27
5.1 MATERIÁL	27
5.2 POUŽITÉ POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	27
5.3 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	28

5.4	OPTIMALIZACE IZOLAČNÍHO POSTUPU	28
5.5	ANALÝZA VZORKŮ	29
5.6	MĚŘENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY RIBOFLAVINU.....	29
6	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	30
6.1	VYHODNOCENÍ ZÍSKANÝCH VÝSLEDKŮ	30
6.2	VÝSLEDKY MĚŘENÍ KALIBRACE RIBOFLAVINU	30
6.3	VÝSLEDKY MĚŘENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V CERÉALNÍCH VÝROBCÍCH.....	32
	ZÁVĚR	34
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	35
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	37
	SEZNAM OBRÁZKŮ	38
	SEZNAM TABULEK	39
	SEZNAM PŘÍLOH.....	40

ÚVOD

Vitamíny patří mezi základní složky potravy stejně jako sacharidy, bílkoviny a lipidy. Lidský organismus není schopný si vitamíny syntetizovat, proto musí být přijímány z potravy, pouze některé vitamíny jsou získávány prostřednictvím střevní mikroflóry. Pro organismus nejsou zdrojem energie ani stavebními jednotkami jednotlivých tkání, ale plní úlohu prekurzorů kofaktorů různých enzymů a také se uplatňují v oxidačně redukčních systémech. Některé plní funkci antioxidantů, a proto jsou obecně nazývány jako exogenní esenciální biokatalyzátory.

Podle vlastností jsou vitamíny rozděleny na dvě skupiny a to na vitamíny rozpustné ve vodě a na vitamíny rozpustné v tucích. Mezi vitamíny rozpustné ve vodě je zařazen riboflavin (vitamín B₂). Tento vitamín je součástí tzv. B – komplexu, kam řadíme vitamíny skupiny B pro jejich některé společné vlastnosti. Riboflavin se vyskytuje volný nebo vázaný, kde je součástí flavinových enzymů ve formě kofaktorů FMN a FAD. Oba kofaktory jsou součástí enzymů v dýchacím řetězci a jsou součástí metabolismu sacharidů, lipidů a bílkovin.

Obsah riboflavinu v potravinách můžeme stanovit pomocí fyzikálně – chemických nebo mikrobiologických metod. Z fyzikálně – chemických metod lze jmenovat fluorimetrické, fotometrické, polarografické a spektrální metody. Mezi nejnovější metody patří chromatografická metoda HPLC. Principem této metody je dělení vzorku na základě rozdílné adsorpce a velikosti molekul jednotlivých složek vzorku a následné stanovení pomocí detektoru. Nejčastěji se používá spektrofotometrický nebo fluorescenční detektor.

Riboflavin se vyskytuje v mléce, mase, vejcích, droždí a také v cereáliích. Cereálie jsou také významným zdrojem vitamínu E, vápníku, zinku, železa, mědi, hořčíku a fosforu. Většina těchto látek je uložena v klíčcích, proto dochází při mletí obilí k jejich ztrátám a snižuje se tak biologická hodnota obilovin. Je proto doporučováno konzumovat obiloviny nemleté v podobě celých zrn, klíčků a otrub. Zvýší se tak i podíl vlákniny, která je nezbytná pro správnou funkci střev a působí preventivně proti rakovině tlustého střeva, proti obezitě a diabetu a také proti hypercholesterolemii.

Cílem bakalářské práce bylo najít optimální postup izolace riboflavinu z cereálií a jeho stanovení pomocí metody HPLC. Pro stanovení byly použity vzorky celozrnných a kukuřičných lupínků.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VITAMÍNY

Vitamíny jsou exogenní esenciální nízkomolekulární sloučeniny nezbytné pro život organismu, které si však heterotrofní organismus nedokáže sám syntetizovat (v některých případech pouze v omezené míře) a musí mu být dodávány z vnějšku.

Vitamíny řadíme mezi biokatalyzátory, které v organismu vykonávají několik funkcí, v živých objektech plní významnou úlohu prekurzorů kofaktorů, nebo se uplatňují v oxidačně redukčních systémech.

V potravinách se vitamíny vyskytují většinou v množství $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ po stovky až tisíce $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ podle druhu vitamínu, ročního období, druhu potravin a způsobu jejího dalšího zpracování. U potravin živočišného původu závisí obsah vitamínů na způsobu skladování a zpracování suroviny, u potravin rostlinného je významný především stupeň zralosti, klimatické podmínky, způsob hnojení a další faktory. V potravinách se vyskytují vitamíny volně nebo vázané na jednotlivé složky potravy, nejčastěji na sacharidy a proteiny. Dnes jsou vitamíny používány k obohacování různých potravinářských výrobků. V potravinách rovněž slouží jako indikátory technologických a kulinárních úprav, jelikož patří mezi labilní složky potravin.

Nedostatek každého vitamínu se projevuje u živých objektů chorobnými příznaky, které v lehčích formách označujeme jako hypovitaminosa, v těžších jako avitaminosa. Přestože většina příznaků avitaminosy po dodání vitamínu rychle zmizí, dlouhotrvající avitaminosa může vést až k smrti organismu. Naopak nadbytek některých vitamínů se označuje jako hypervitaminosa. V našich klimatických podmínkách se s ní většinou neseťkáváme, objeví se většinou s nadměrným užíváním doplňků stravy.

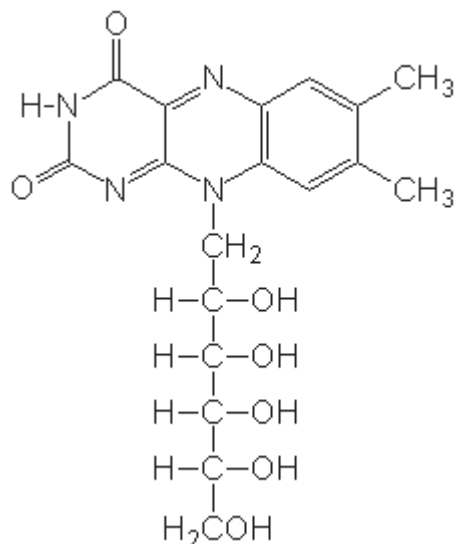
Vitamíny dělíme podle jejich rozpustnosti na lipofilní a hydrofilní.

Lipofilní vitamíny neboli vitamíny rozpustné v tucích vykazují různé funkce, například vitamín A se uplatňuje v biochemických reakcích zrakového vjemu. Tyto vitamíny jsou ukládány nejčastěji v játrech (příloha P I.).

Hydrofilní vitamíny neboli vitamíny rozpustné ve vodě mají funkce kofaktorů enzymů v metabolismu nukleových kyselin, proteinů, sacharidů a lipidů. V organismu nejsou skladovány a jejich nadbytek je vylučován močí (příloha P II.). [1]

2 RIBOFLAVIN

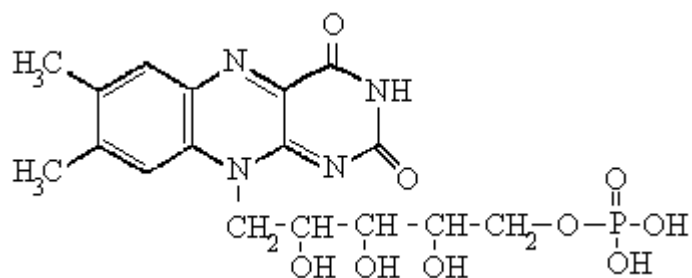
Riboflavin (E101) neboli vitamín B₂ je snadno vstřebatelný a řadíme jej mezi vitamíny rozpustné ve vodě. Jako ostatní vitamíny skupiny B hraje klíčovou roli v energetickém metabolismu tuků, sacharidů a proteinů. Je také důležitý pro metabolismus dalších vitamínů skupiny B (hlavně pyridoxinu, niacinu a kyseliny listové). [2, 3]



Riboflavin

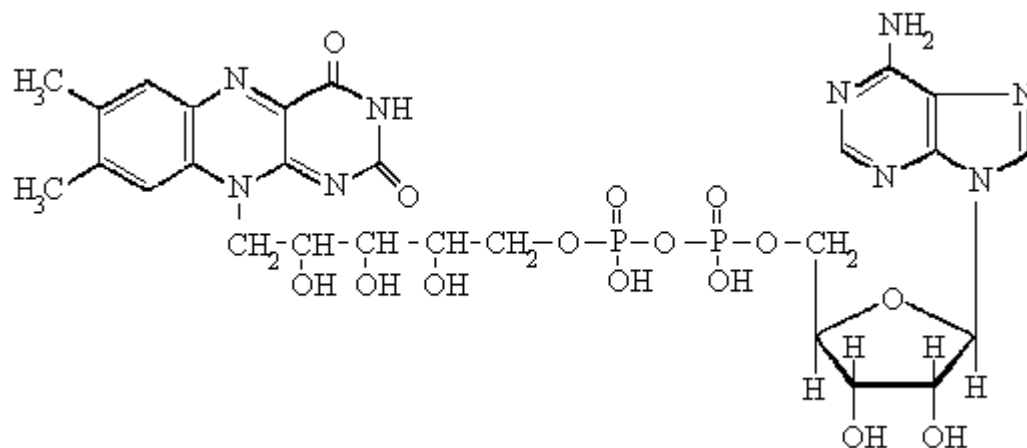
2.1 Struktura riboflavinu

Riboflavin patří do skupiny látek zvaných flaviny. Je to žlutozelená krystalická látka, jejíž vodné roztoky mají schopnost fluorescence. Základem struktury riboflavinu je isoalloxazinové jádro, na které je vázán ribitol, alditol odvozený od D-ribosy. Po chemické stránce je riboflavin 7,8-dimethyl-10-(-1-d-ribityl)isoalloxazin. [1]



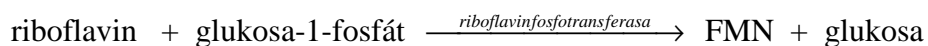
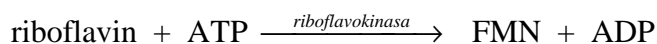
FMN

Riboflavin se vyskytuje jako volná látka, převážně však existuje ve formě FMN (flavinmononukleotidu neboli riboflavin-5'-fosfátu), dále pak ve formě FAD (flavinadenindinukleotidu) a kovalentně vázaného riboflavinu. [4]

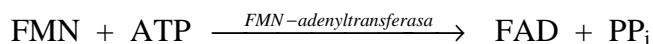


FAD

Flavinmononukleotid je syntetizován v organismech enzymem *riboflavokinasa*, patřící mezi *fosfotransferasy*, nebo *riboflavinfosfotransferasou*

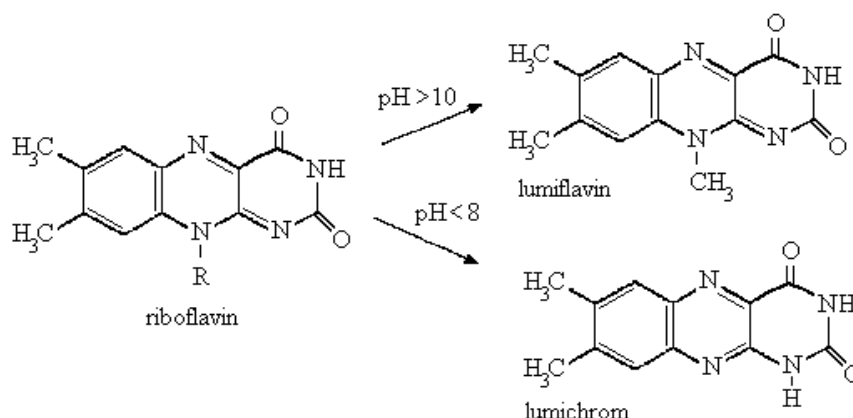


Flavinadenindinukleotid vzniká z FMN adenylací účinkem *FMN-adenyltransferasy*



Uvedené reakce probíhají v organismech, které nedovedou riboflavin syntetizovat a musí jim být dodáván.

Riboflavin se účastní oxidačně redukčních reakcí. Při redukci přijímá dva atomy vodíku a vzniká bezbarvý leukoriboflavin, na vzduchu dochází k jeho zpětné oxidaci. Působením UV paprsků se riboflavin rozkládá za vzniku lumichromu (kyselé nebo neutrální pH) nebo lumiflavinu (zásadité pH). [5]



Obr. 1. Fotolýza riboflavínu

2.2 Fyzikálně – chemické vlastnosti riboflavínu

Ve tmě je riboflavin velmi stabilním vitamínem, v neutrálních a slabě kyselých roztocích je prakticky stálý. Je také velmi stálý při tepelném zpracování potravin, degraduje však při ozáření. Během technologického a kulinářského zpracování potravin dochází ke ztrátám riboflavínu především vyluhováním. Pokud jsou hydrotermické operace prováděny v podmínkách s omezeným přístupem světla, ztráty riboflavínu se snižují. Ztráty lze snížit i omezením délky blanširování před zpracováním zeleniny. Vzhledem k tomu, že je riboflavin fotosenzibilní, je nutno potraviny uchovávat ve vhodném obalu (např. mléko vystavené slunečnímu záření po dobu dvou hodin obsahuje pouze 15 % původní koncentrace riboflavínu). Riboflavin se účastní procesu vidění tím, že převádí krátkovlnné modré paprsky na žlutozelené a umožňuje tak vidění za šera. Za účelem fortifikace se přidává do některých potravin a používá se také k jejich barvení. [1, 4, 6]

Riboflavin E 101 a riboflavin - 5'-fosfát E 101 jsou zákonem povolená barviva, která mohou být používána v nezbytném množství k výrobě všech potravin, kromě potravin určených pro výživu kojenců a malých dětí. Toto barvivo se přirozeně nachází v mléčných výrobcích a pozitivně ovlivňuje imunitní systém, problémy s migrénou a napomáhá hojení poranění a popálenin. [7, 8]

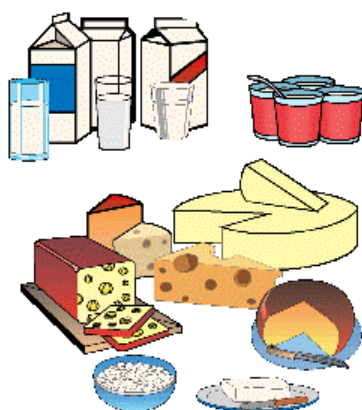
Podle vyhlášky 304/2004 sb. se barviva řadí mezi přídatné látky a jsou to takové látky, které udělují potravině barvu, kterou by bez jejich použití neměla, nebo které rekonstruují barvu, která byla poškozena, či zeslabena během technologického procesu. [7]

2.3 Výskyt riboflavinu

Volný vitamín se vyskytuje pouze v oční sítnici, syrovátce a moči. Vázaný ve formě FMN a FAD se ve větším množství nachází v droždí a obilných klíčcích. Ze živočišných surovin nejvíce riboflavinu obsahují játra, ledviny, maso, vejce, mléko a mléčné výrobky, z rostlinných produktů je obsažen ve větším množství v luštěninách. V ovoci a zelenině je jeho obsah nízký. V naší stravě je hlavním zdrojem mléko a mléčné výrobky, maso a cereálie. V cereáliích se riboflavin nachází zejména v klíčcích v aleuronové vrstvě obiliek. Dobrým zdrojem tohoto vitamínu jsou i některé houby. [9]

Tabulka 1: Obsah riboflavinu v některých potravinách [10]

Potravina	Obsah riboflavinu mg.100g ⁻¹	Potravina	Obsah riboflavinu mg.100g ⁻¹
soja	0,3	sýry	0,4-0,7
houby	0,4	netučné mléko	0,2
pivní kvasnice	4,3	vepřové srdce	1,3
tmavý chléb	0,2	játra	2,7
mléčná čokoláda	0,34	makrela	0,35
hořká čokoláda	0,14	hrách	0,29
vejce	0,34	čočka	0,25



Obr. 2. Zdroje vitamínu B₂

2.4 Fyziologie a výživa

Doporučená denní dávka pro průměrného obyvatele ČR činí $1,5 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$. Zvýšený denní příjem na $1,8 \text{ mg}$ i vyšší se doporučuje těhotným a kojícím ženám, při infekčních onemocněních, po chirurgických zákrocích a při zvýšené aktivitě štítné žlázy. Odhaduje se, že téměř 40 % vitamínu získávaného potravou zajišťuje mléko a mléčné výrobky, asi 20 % pak maso a 15 % cereálie, necelých 10 % vejce a stejné množství zelenina. Riboflavin z potravin živočišného původu je v trávicím traktu snáze resorbován než z rostlinné stravy, kde převládají kovalentně vázané formy, obtížně štěpitelné *proteasami*. [1, 4]

Nedostatek riboflavinu se u člověka projevuje zánětlivými změnami sliznic a kůže, některými očními nebo nervovými poruchami. Kromě poruch sliznic, které se projevují bolavými ústními koutky, záněty sliznice jazyka aj. K typicky pozdním projevům nedostatku tohoto vitamínu patří zmnožení cév v očních spojivkách, zejména okolo rohovky. Nedostatečný příjem riboflavinu trvající více než 100 dní vede ke vzniku hypovitaminosy. Ta byla nejčastěji diagnostikována u osob konzumujících nedostatečné množství mléka a mléčných výrobků. Kromě toho může být hypovitaminosa způsobena stresem organismu, nemocemi štítné žlázy nebo záněty tenkého střeva. Nedostatečná saturace riboflavinem byla indikována u vegetariánů a veganů. Obvykle se u těchto osob projevuje nedostatek riboflavinu spolu se symptomy nedostatku ostatních vitamínů skupiny B. Zvýšenou potřebu vitamínu B_2 mají lidé, kteří jsou léčeni antibiotiky, lidé trpící onemocněním štítné žlázy, celiakií, cirhózou jater nebo cukrovkou. Ženy, které užívají orální antikoncepci a osoby, které nepijí mléko jsou také ohroženi nedostatkem riboflavinu. Vitamín B_2 je rozpustný ve vodě a je vylučován močí. Předávkování tímto vitamínem proto není prakticky možné. [1, 2, 10]

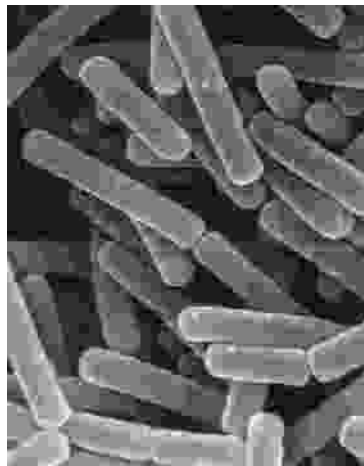


Obr. 3. Příznaky nedostatku riboflavinu

2.5 Stanovení riboflavinu

Riboflavin se nejčastěji stanovuje fluorimetrickou metodou založenou na stanovení lumiflavinu, který vzniká fotolýzou riboflavinu v alkalickém prostředí. Při této metodě se riboflavin ze vzorku uvolní pomocí kyselé nebo enzymatické hydrolýzy. Po zalkalizování se riboflavin ozáří a vzniklý lumiflavin se po extrakci chloroformem stanoví fluorimetricky. Tato metoda je vhodná pro stanovení riboflavinu ze všech druhů potravin rostlinného i živočišného původu. [11]

Pro stanovení riboflavinu lze dále použít fotometrické měření žluté barvy riboflavinu, případně lumiflavinu, dále polarografické a spektrální metody. Kromě fyzikálně-chemických metod se na stanovení riboflavinu používají mikrobiologické metody s použitím mikroorganismu *Lactobacillus helveticus*.



Obr. 4. *Lactobacillus helveticus*

Vzhledem k tomu, že je riboflavin nestálý na světle, měla by veškerá jeho stanovení probíhat v temné místnosti nebo při červeném osvětlení. [12]

3 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

3.1 Chromatografické metody

Chromatografické metody patří mezi separační metody, u nichž je dělení látek založeno na různé migraci. U těchto metod se jedná konkrétně o migraci v systému dvou fází, z nichž obvykle jedna fáze je stacionární (nepohyblivá) a druhá mobilní (pohyblivá). Z hlediska molekulární kinetiky je chromatografie kontinuálním procesem, v němž je prouděním porušována a difuzí opět nastolována rovnováha mezi látkami rozpuštěnými ve stacionární a mobilní fázi chromatografického systému. Výsledkem je rozdílná rychlost migrace rozpuštěných látek. [13]

Chromatografické metody rozdělujeme podle stacionární fáze:

- sloupcová chromatografie (CC, Column Chromatography) – stacionární fáze je v koloně,
- papírová chromatografie (PP, Paper Chromatography) – stacionární fáze je papír nebo upravená celuloza,
- chromatografie na tenké vrstvě (TLC, Thin Layer Chromatography) – fáze je suspenze v podobě tenké vrstvy,

Podle mobilní fáze rozdělujeme chromatografické metody na:

- plynová chromatografie (GC, Gas Chromatography) - mobilní fází je plyn,
- fluidní chromatografie – mobilní fází je látka v nadkritickém stavu,
- plazmová chromatografie – mobilní fází je proud iontů,
- kapalinová chromatografie (LC Liquid Chromatography, HPLC High Performance Liquid Chromatography) – mobilní fází je kapalina

Kapalinová chromatografie se dále rozděluje podle stacionární fáze na:

- adsorpční chromatografie – stacionární fází je adsorbent,
- iontová chromatografie – stacionární fází je ionex,
- gelová chromatografie – stacionární fází je neionizovaný přírodní nebo syntetický gel,
- afinitní chromatografie – stacionární fáze obsahuje zakotvené ligandy, na které se rozdělovaná látka váže.

Při kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina a stacionární fází je pevná látka (případně kapalina zakotvená v pevné látce). Kapalinová chromatografie se také nazývá jako rozdělovací chromatografie. [14]

3.2 Princip HPLC

Rozdělení látek je založeno na selektivní adsorpci molekul směsi látek z kapalně mobilní fáze na vhodném adsorbentu (stacionární fáze). Selektivní adsorpce je řízena rozdíly v adsorpčních rovnováhách adsorbovaných látek v systému kapalně roztok (mobilní fáze) - adsorbent (stacionární fáze). Obecně platí, že polárnější molekuly jsou silně adsorbovány polárními adsorbenty než molekuly méně polární. Adsorpce polárních molekul je zesílena, probíhá-li z roztoku v nepolárním rozpouštědle, a naopak je snížena, je-li rozpouštědlo polární, protože pak jsou přednostně adsorbovány molekuly rozpouštědla. Všechny formy chromatografických technik je možné definovat jako diferencovaný migrační proces, ve kterém jsou molekuly složek vzorku selektivně zpomalované stacionární fází. Společným jmenovatelem chromatografických metod je existence fázového rozhraní mezi látkou, na které rozdělování probíhá a eluentem, který rozdělovaný vzorek unáší tak, aby obtékal stacionární fází. [15, 16]

3.3 Použití HPLC

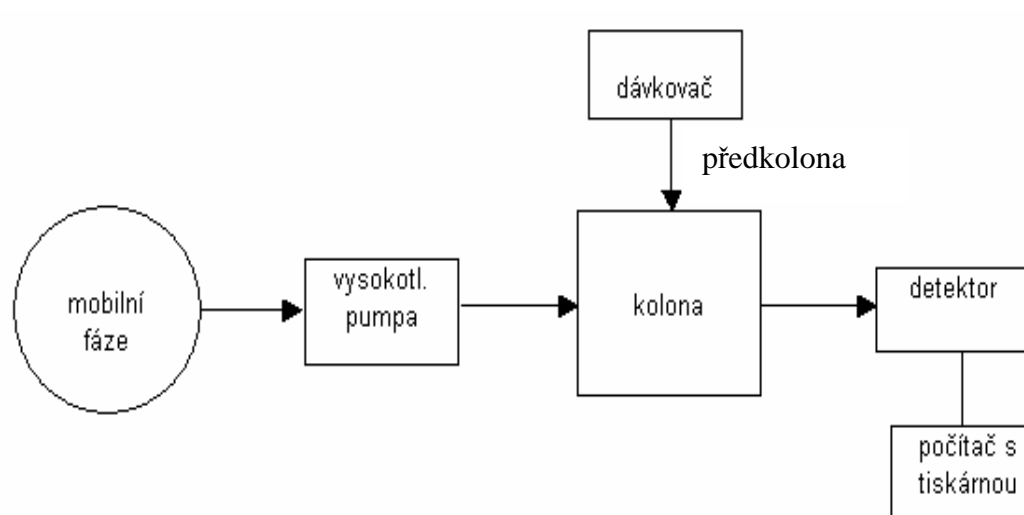
Klasická kapalinová chromatografie se původně používala na rozdělení směsí tam, kde se jiné separační metody nemohly použít. Výhody chromatografických metod jsou v jejich schopnosti rozdělit a kvantitativně stanovit desítky až stovky složek vzorku. Další předností je rychlost a přesnost při stanovování vzorku. Vysokoučinná kapalinová chromatografie má taký význam v tom, že umožňuje separovat i termolabilní kapalně a tuhé látky. [16]

Mezi základní aplikace HPLC lze zařadit separaci a identifikaci látek ze směsí, kontrola čistoty preparátů nebo kontrola surovin, výrobních meziproductů a produktů. Za zmínku stojí také jeho použití při kontrolách životního prostředí, dále klinická a toxikologická analýza hormonů nebo léčiv a v neposlední řadě i kontrola potravinářských produktů. [17]

3.4 Chromatograf HPLC

Kapalinový chromatograf se skládá z několika částí:

- zásobník s mobilní fází
- vysokotlaká pumpa
- dávkovač
- předkolona
- kolona
- detektor



Obr. 5. Schematický náčrt kapalinového chromatografu

3.4.1 Stacionární fáze

Stacionární fází je látka, na které probíhají chromatografické separace směsí unášených mobilní fází. Stacionární fáze je spolu s detektorem nejdůležitější složkou chromatografického systému. V HPLC jsou stacionární fází pevné nebo gelovité materiály. Vlastnosti stacionární fáze závisí na velikosti tvaru částic a také na tepelné, chemické a mechanické odolnosti fáze. Stacionární fáze může být tvořena například nepolárními uhlovodíky (oktan, oktadekan), nebo polárnějšími uhlovodíky s funkční skupinou.

[15, 16, 18]

3.4.2 Mobilní fáze

Od mobilní fáze se vyžaduje, aby rozpouštěla vzorek (někdy stačí částečné rozpouštění), aby byla kompatibilní s použitým detektorem a aby dobře smáčela stacionární fázi. Měla by mít také minimální viskozitu, jedovatost, hořlavost a dostatečnou stabilitu na působení vnějších vlivů jako je oxidace, fotolýza. Mobilní fází v HPLC může být voda, methanol, acetonitril a jejich směsi v různých vzájemných poměrech, pufrů a další. Zásobníky jsou skleněné láhve, kterých může být několik s navzájem různými mobilními fázemi, které je možné spolu automaticky mísit v předem zvoleném poměru. Mobilní fáze vstupuje do interakce se složkami analyzované směsi a konkrétní složení mobilní fáze může významným způsobem ovlivňovat celou analýzu. [16, 18]

3.4.3 Předkolona

Předkolony se často používají k ochraně kolony při analýzách biologických materiálů. Předkolony mohou být využity k derivatizaci analytu před kolonou nebo za kolonou. Jako předkolona se může použít stará nebo použitá HPLC kolona. [19]

3.4.4 Kolona

Zpravidla se jedná o nerezovou trubici o vnitřním průměru okolo 4 mm a délce 5 - 25 cm, která je naplněna stacionární fází. O schopnosti kolony separovat určité směsi na jednotlivé složky opět rozhoduje zejména typ stacionární fáze zakotvené na silikagelovém nosiči. Pro plnění kolony se používají částice stacionární fáze o průměru 1 - 10 μm . Naplněná kolona se poté připojuje k dávkovači a k detektoru. [15]



Obr. 6. Kolona HPLC

3.4.5 Detektor

Detektor je jednou z nejdůležitějších součástí kapalinového chromatografu. Je to zařízení na určení přítomnosti vzorku nebo na kvantitativní sledování její koncentrace v eluátu. Detektor v podstatě sleduje vhodným snímačem jednu nebo více vlastností eluátu a přenáší jejich změny na elektrické signály, které je možno zaznamenat. V některých případech může detektor určit i některé další vlastnosti analyzovaného vzorku jako například molární hmotnost vzorku nebo absorpční spektrum. Metoda HPLC využívá několik typů detektorů: spektrofotometrický detektor (UV-VIS), fluorescenční detektor, hmotnostní spektrometr, refraktometrický detektor, elektrochemický apod. Často používaným detektorem je detektor spektrofotometrický (UV-VIS) a fluorescenční. Podmínkou použití těchto detektorů je, aby daný vzorek absorboval záření určité vlnové délky (UV-VIS detekce) nebo aby emitoval fluorescenční záření (fluorescenční detekce). Pokud vzorek neabsorbuje záření v oblasti UV-VIS nebo neemituje fluorescenční záření, je použití těchto detektorů podmíněno derivatizací vzorku (vzorek je chemickou reakcí převeden na sloučeniny, které mají potřebné vlastnosti - absorpce UV-VIS, fluorescence). [16, 18]



Obr. 7. Zařízení pro HPLC

4 CEREÁLIE

Cereálie, neboli obiloviny provázejí lidskou společnost od nepaměti. V průběhu tisíciletí si obiloviny udržely výlučné postavení základní potraviny. Jejich hlavní druhy jsou pšenice a žito, dále ječmen, kukuřice, rýže, oves, pohanka. Největší podíl vypěstovaných obilovin tvoří pšenice, jejichž hlavní produkční oblasti jsou středozápad USA, Kanada, Argentina, Austrálie a Evropa. [20]



Obr. 8. Obiloviny

Obiloviny patří do čeledi lipnicovité (*Poaceae*), řádu lipnicokvěté (*Poales*). Jsou to jednoleté i víceleté byliny se svazčítým kořenovým systémem. Stonek nazývaný stéblo je složen z dlouhých dutých článků (internody) a kolének (nody), kde dochází k prodlužování, tedy růstu celé rostliny. Většina druhů vytváří několik odnoží. Pochva listů vyrůstající z kolének přechází v listovou čepel s rovnoběžnou žilnatinou. Na rozhraní pochvy a čepele vyrůstá jazýček a čepel je zakončena ouškou. Tvar jazýčku a oušek může být rozlišovacím znakem některých obilovin (pšenice, ječmen, žito, oves) (Příloha P III.) [22]

4.1 Složení a vlastnosti obilky

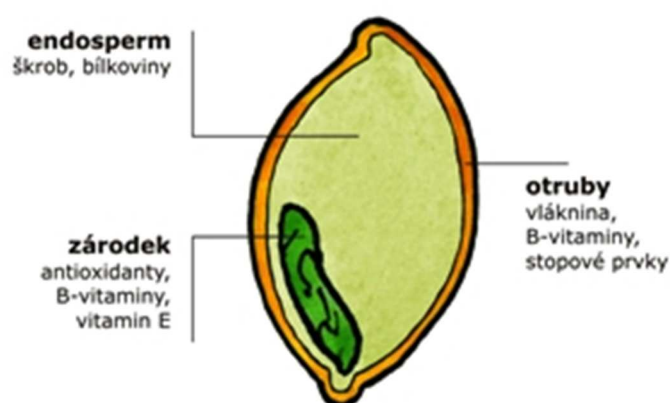
Zrna se liší především tvarem, velikostí a podílem jednotlivých vrstev. Tvary zrna jsou od tenkých protáhlých až po téměř kulatá, zastoupení a pořadí jednotlivých vrstev je však shodné. Charakteristické pro jednotlivé obiloviny je to, zda má zrno pluchy nebo je nahé. Rozměry zrna se mohou lišit i pro stejný druh obiloviny v závislosti na odrůdě, klimatických podmínkách lokality a daného období (dešťové srážky, sluneční svit, teplotní profil, nadmořská výška), kvalitě půdy a agrotechnice (především na hnojení). [21]

Každá obilka se skládá z endospermu, klíčku a obalových vrstev. Endosperm představuje 84 – 86 % hmotnosti zrna. Je tvořen velkými hranolovitými buňkami a obsahuje především škrob a bílkoviny. Od obalových vrstev je oddělen vrstvou aleuronových buněk, obsahujících

bílkoviny, minerální látky, tuky a vitamíny. Endosperm zajišťuje výživu zárodku a při zpracování tvoří podstatnou složku konečného výrobku (mouka, škrob) a při výživě a krmení je hlavním zdrojem energie a bílkovin.

Klíček tvoří nejmenší část obilky. Od endospermu je oddělen štítkem, který obsahuje až 33 % bílkovin. Obsahuje mnoho živin, protože slouží jako zárodek nové rostliny. Kromě jednoduchých cukrů obsahuje klíček bílkoviny, aminokyseliny, vitamíny rozpustné ve vodě a značné množství vitamínu E.

Obaly tvoří 8 – 14 % hmotnosti zrna. Jsou tvořena několika vrstvami buněk, které chrání endosperm a klíček před vysycháním a mechanickým poškozením. Obalové vrstvy se skládají z oplodí a osemení. Oplodí (*pericarp*) tvoří pokožka (*epidermis*), buňky podélné (*epikarp*), buňky příčné (*mesokarp*) a buňky hadicové (*endokarp*). Osemení (*perisperm*) je tvořeno vrstvou hyalinní (*skelnou*) a barevnou. [20]



Obr. 9. Obilné zrna

Tabulka 2: Srovnání hmotnostních podílů částí zrna pšenice a kukuřice [21]

Část zrna	Podíl v obilovině (% hm.)	
	pšenice	kukuřice
otruby (oplodí a osemení)	15	5
endosperm	82	82
klíček	3	13

4.2 Chemické složení obilovin

4.2.1 Sacharidy

Sacharidy tvoří hlavní podíl jednotlivých složek obsažených v obilovinách. Můžeme je rozdělit na monosacharidy, kam patří pentosy, dále pak glukosa a fruktosa. Tyto cukry jsou však většinou obsaženy v oligosacharidech, hlavně v sacharose, která je obsažena především v klíčku. Z dalších disacharidů je přítomna maltosa. Maltosové číslo slouží ke zjišťování tzv. cukrotvorné schopnosti mouky. Dále jsou přítomny koloidně disperzní sacharidy, kde hlavními zástupci jsou škrob, dextriny, celulóza, hemicelulózy a pektinové látky. Neškrobovými polysacharidy jsou nazývány rostlinné slizy. Jedná se o různě zesíťované makromolekuly polysacharidů na bázi pentos (xylosy a arabinosy). Nejdůležitější zásobní látkou v obilce je škrob, který je obsažen v parenchymatických buňkách endospermu.

4.2.2 Bílkoviny

Bílkoviny často determinují technologickou jakost surovin. Obsah bílkovin v pšenici se pohybuje v rozmezí 10 – 16 %, u žita v rozmezí 8 – 15 %. Pšenice s obsahem bílkovin nad 13 % se považují za velmi dobré, pod 12 % za střední až slabé. V obilovinách se vyskytují jednoduché i složené bílkoviny.

Zvláštní postavení má bílkovina pšeničná, která jako jediná vytváří s vodou pružný gel tzv. lepek, jehož fyzikální vlastnosti určují jakost pečiva. Hlavními složkami lepku jsou lepkové bílkoviny gliadin a glutenin. Gluteninová frakce představuje asi 40 % celkového obsahu bílkovin a je považována za klíčový faktor při výrobě těsta a pečiva a to svým vlivem na viskosoelastické vlastnosti těsta.

4.2.3 Lipidy

Tuky tvoří malý hmotnostní podíl obilného zrna. Tuk je obsažen především v klíčku a v aleuronové vrstvě. Tuky chlebových obilovin (pšenice, žito) jsou nažloutlé kapaliny, které obsahují nasycené mastné kyseliny v množství 18 – 25 %, obsah kyseliny olejové je 16 – 18 %, kyselina linolová tvoří 48 – 57 % a kyselina linoleová asi 5 %. Z fosfatidů jsou přítomny fosfatidylcholin (dříve nazývaný lecitin) a fosfatidyletanolamin.

4.2.4 Vitamíny

Vitamíny jsou v obilovinách soustředěny hlavně v klíčku a v aleuronové vrstvě. Vitamín A je obsažen ve formě provitamínu β -karotenu v klíčcích. Vitamín E je obsažen v klíčku, v endospermu se prakticky nevyskytuje. Thiamin (vit. B₁) je obsažen klíčcích a v aleuronové vrstvě, stejně jako riboflavin. Vitamín B₃ je obsažen v pšenici a ječmeni ve velkém množství, je termostabilní a stálý vůči oxidaci, je lokalizován do aleuronové vrstvy a jeho hlavní podíl přechází do otrub. Kyselina pantothenová (vit. B₅) je obsažena především ve sklovité pšenici. Pyridoxin (vit. B₆) je lokalizován v aleuronové vrstvě a ve štítku. Kyselina L-askorbová (vit.C) se ve zralém obilí nevyskytuje, její obsah ovšem vzrůstá ve vyklíčeném obilí.

4.2.5 Minerální látky

Minerální látky tvoří malý podíl v závislosti na půdních a agrotechnických podmínkách. Průměrný obsah minerálních látek u žita je 1,82 % a u pšenice 1,84 %. Maximální obsah minerálních látek je v osemeni a aleuronové vrstvě. Největší podíl minerálů tvoří fosfor, který se většinou vyskytuje vázaný ve fytinu a tvoří polovinu celkového obsahu minerálních látek. Ve větším množství jsou dále přítomny oxid draselný, oxid hořečnatý a oxid vápenatý. V menším množství pak oxid sodný a oxid křemičitý. [20]

4.3 Význam obilovin

Z hlediska významu potravin jsou nejvýznamnější složkou otruby, které jsou tvořeny zejména nerozpustnou vlákninou. Vlákna otrub na sebe váže velké množství vody, což vyvolá potřebu vyprázdnění tlustého střeva a současně zvětšuje objem stolice. Uvádí se, že účinnost pšeničných otrub je ve srovnání s jinými zdroji vlákniny (ovoce, zelenina) mnohem vyšší. Pravidelný a dostatečný příjem vlákniny (25 - 35 g denně) významně snižuje riziko vzniku rakoviny tlustého střeva. Velmi účinné funkční výrobky jsou vyráběny i z ova. Oves obsahuje β -glukan (složitý polysacharid nacházející se v endospermu obilí). Pokud je denní příjem β -glukanů minimálně 3 g.den⁻¹, může snižovat hladinu LDL (Low Density Lipoproteins) cholesterolu a přitom neovlivňovat množství HDL (High Density Lipoproteins) cholesterolu. β -glukan má také schopnost snižovat hladinu krevního cukru.

[23]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 METODIKA

5.1 Materiál

FITNESS CHOCOLATE – celozrné lupínky s vitamíny, minerálními látkami a čokoládou, balení 300g, výrobce firma Nestlé, obsah vitamínu B₂ deklarovaný výrobcem je 2,1 mg.100g⁻¹.

CORN FLAKES – kukuřičné lupínky obsahující 8 vitamínů a železo, balení 250g, výrobce firma Nestlé, obsah vitamínu B₂ deklarovaný výrobcem je 1,4 mg.100g⁻¹.

5.2 Použité pomůcky a přístroje

Standardní laboratorní vybavení:

- předvážky (Kern, SRN)
- analytické váhy
- temperovaná vodní lázeň (Memmert, SRN)
- běžné laboratorní sklo a vybavení

Aparatura pro HPLC (Hewlett Packard 1100)

- vakuovaný odplyňovací modul G1322A
- binární pumpy G1312A
- termostat kolon G1316A
- detektor UV/VIS DAD G1315A
- dávkovací ventil analytický smyčkový (dávkovací smyčka o objemu 20 µl)
- kolona SUPELCOSIL - LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm, Supelco, USA)
- PC s vyhodnocovacím programem ChemStation – Instrument1 (Agilent, USA)

Dávkovací stříkačka (Hamilton, USA)

Mikrofiltry 0,45 µm, NYLON (Supelco, USA)

5.3 Použité chemikálie

- redestilovaná voda
- standard riboflavinu (Supelco, USA)
- methanol pro HPLC, gradient grade (Riedel-del Haën, SRN; Sigma - Aldrich, SRN)
- kyselina trichloroctová (dodavatel - Lukeš, Uherský Brod)
- kyselina chlorovodíková (dodavatel - Lukeš, Uherský Brod)
- octan sodný (dodavatel - Lukeš, Uherský Brod)
- kyselina mravenčí (dodavatel - Lukeš, Uherský Brod)
- síran zinečnatý (dodavatel - Lukeš, Uherský Brod)
- hexakynoželeznatan draselný (dodavatel - Lukeš, Uherský Brod)

5.4 Optimalizace izolačního postupu

Navážka jednotlivých vzorků byla ze začátku volena 15 g a 16 g, pro pozdější měření a pro hodnocení výsledků byla volena navážka vzorku 15 g s přesností na 0,0001 g.

Extrakce riboflavinu byla provedena 80 ml 0,1 mol.l⁻¹ HCl a 80 ml 0,2 mol.l⁻¹ HCl. Z důvodu lepších výsledků se v dalších měřeních používala 0,2 mol.l⁻¹ HCl.

Na vysrážení proteinů byly použity 2 ml 60 % TCA (kyselina trichloroctová) a 2 ml 80 % TCA. Z důvodu lepšího vysrážení proteinů byla při pozdějších měřeních používána 80 % TCA.

Na vysrážení polysacharidů byly přidány činidla Carrez I a Carrez II v množstvích po 5 ml a po 10 ml, z důvodu téměř stejného vysrážení bylo dále přidáváno 5 ml Carrez I a 5 ml Carrez II.

Filtrace vzorku byla prováděna přes papírový filtr a před nástřikem na kolonu byl použit filtr Nylon 0,45 μm používaný při chromatografii. Tato filtrace byla vyhodnocena jako nedostačující, proto byl vzorek nejprve filtrován přes plátěný filtr, poté přes papírový filtr a nakonec přes chromatografický filtr.

5.5 Analýza vzorků

S přesností na 0,0001 g bylo naváženo 15 g cereálií. Navážený vzorek byl kvantitativně převeden do 250 ml Erlenmayerovy baňky obalené folií a byl okyselen 80 ml 0,2 mol.l⁻¹ HCl. Baňka byla vložena na 1 hodinu do vodní lázně o teplotě 97 °C a po celou dobu byla třepána. V 50 a 60 minutě byly přidavkem 1 ml 80 % kyseliny trichloroctové vysráženy proteiny. Směs byla po ukončení vaření ochlazena a kvantitativně převedena do 200 ml Erlenmayerovy baňky. Poté byly přidavkem 5 ml Carrez I a 5 ml Carrez II vysráženy polysacharidy a baňka byla doplněna redestilovanou vodou po rysku. Vzorek byl poté zfiltrován přes plátěný a papírový filtr a následně přes nylonový filtr určený pro chromatografii o velikosti pórů 0,45 μm.

Zfiltrovaný vzorek byl dávkován alikvotním podílem 20 μl do HPLC. Analýza byla provedena na koloně SUPELCOSIL LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5 μm). Byla použita gradientová eluce mobilní fáze, která byla složena z 0,12 mol.l⁻¹ octanu sodného o pH 4,7 (pH bylo upraveno 85 % kyselinou mravenčí) a z methanolu. Průtok mobilní fází byl 0,8 ml.min⁻¹ a teplota termostatu kolony 30°C. Signál byl snímán detektorem UV/VIS při vlnové délce 254 nm. Retenční čas pro riboflavin byl 9,6 min.

Tabulka 3. Gradient mobilní fáze

Minuta	Poměr octan sodný : methanol
0	85 : 15
3	85 : 15
15	0:100
30	0:100

5.6 Měření kalibrační křivky riboflavinu

Na měření kalibrační křivky se použil standard riboflavinu, ze kterého byl připraven zásobní roztok o koncentraci 4 μg.ml⁻¹. Ze zásobního roztoku byly dále připraveny roztoky o koncentracích 0,1; 0,25; 0,5; 1 a 2 μg.ml⁻¹. Měření kalibrační křivky proběhlo za stejných chromatografických podmínek jako měření vzorků cereálií. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost naměřené plochy píku (mA.V.s⁻¹) na koncentraci riboflavinu (μg.ml⁻¹).

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

6.1 Vyhodnocení získaných výsledků

Ze získané kalibrační křivky byly do rovnice lineární regrese dosazeny jednotlivé plochy píků a takto byly získány hodnoty koncentrací riboflavinu ve stanovovaných vzorcích. Ze získaných koncentrací byl vyhodnocen aritmetický průměr obsahu riboflavinu ve vzorku podle vztahu:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{n}$$

Míra přesnosti získaných výsledků byla vyjádřena směrodatnou odchylkou, která byla vypočítaná podle vztahu:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \left(\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right)}$$

Jelikož je směrodatná odchylka závislá na počtu paralelních výsledků, byl definován Studentův koeficient, který charakterizuje Studentovo rozložení náhodných odchylek pro daný stupeň volnosti (daný počet výsledků analýz a použitou hladinu významnosti $1-\alpha$). Studentovým koeficientem pak násobíme hodnotu směrodatné odchylky.

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{t_\alpha * S}{\sqrt{n}}$$

Kritická hodnota Studentova stanovení byla v tomto případě stanovena na $t_\alpha = 2,78$ podle hladiny významnosti $\alpha = 0,05$.

Chromatogram pro stanovení riboflavinu v cereáliích je uveden v příloze P IV.

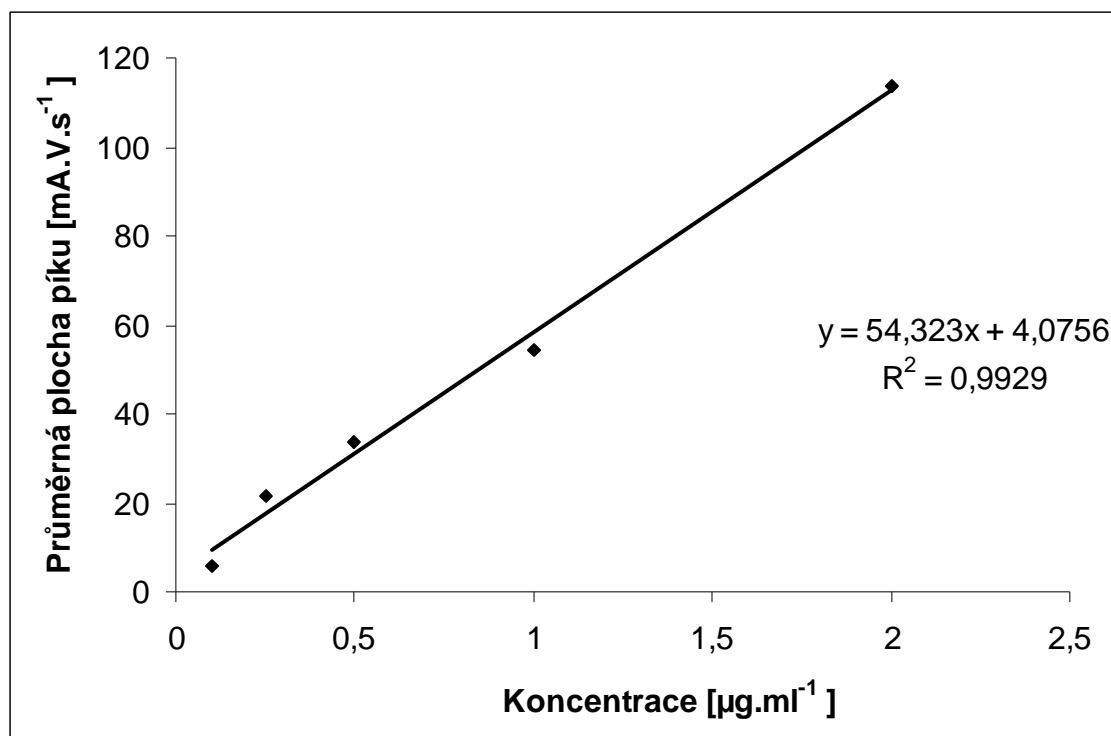
6.2 Výsledky měření kalibrace riboflavinu

Velikost plochy píku u jednotlivých koncentrací byla měřena podle postupu v kap. 5.6 a byla vytvořena kalibrační křivka závislosti plochy píku (mA.V.s^{-1}) na koncentraci ($\mu\text{g.ml}^{-1}$). Výsledky kalibrace jsou uvedeny v tabulce 4 a v grafu 1.

Tabulka 4. Kalibrace riboflavinu

Koncentrace riboflavinu [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Průměrná plocha píku [mA.V.s ⁻¹]
0,10	5,1	5,98
	5,1	
	7,4	
	6,5	
	5,8	
0,25	23,7	21,66
	21,6	
	20,0	
	20,6	
	22,4	
0,50	35,2	33,58
	31,8	
	34,2	
	33,6	
	33,1	
1,00	53,1	54,58
	56,2	
	53,9	
	54,5	
	55,2	
2,00	110,6	113,72
	117,2	
	119,3	
	109,1	
	112,4	

Graf 1. Kalibrační křivka



6.3 Výsledky měření obsahu riboflavinu v cereálních výrobcích

Stanovení obsahu riboflavinu bylo provedeno ve dvou různých vzorcích cereálních výrobků. Postup izolace vzorku je uveden v kapitole 5.5. Získaná plocha píku byla dosazena do rovnice regresivní přímky kalibrační křivky a tak byla zjištěna koncentrace riboflavinu v jednotlivých vzorcích. Výsledky byly ověřeny metodou standardního přídatku.

Tabulka 5. Obsah riboflavinu v cereáliích Fitness Chocolate

Plocha píku (mAV.s^{-1})	Koncentrace riboflavinu ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	Koncentrace riboflavinu (mg.100g^{-1})
37,80	0,62	0,83
42,50	0,71	0,95
39,60	0,65	0,87
40,70	0,67	0,89
41,10	0,68	0,91

Tabulka 6. Průměrný obsah riboflavinu v cereáliích Fitness Chocolate

Průměrná koncentrace (mg.100g⁻¹)	Směrodatná odchylka (mg.100g⁻¹)
0,89	0,045

Obsah riboflavinu: $\mu = 0,89 \pm 0,056 \text{ mg.100g}^{-1}$

Tabulka 7. Obsah riboflavinu v cereáliích Corn Flakes

Plocha píku (mAV.s⁻¹)	Koncentrace riboflavinu ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	Koncentrace riboflavinu (mg.100g⁻¹)
28,30	0,46	0,61
27,60	0,43	0,57
29,90	0,48	0,64
25,60	0,40	0,53
30,10	0,48	0,64

Tabulka 8. Průměrný obsah riboflavinu v cereáliích Cornflakes

Průměrná koncentrace (mg.100g⁻¹)	Směrodatná odchylka (mg.100g⁻¹)
0,60	0,048

Obsah riboflavinu: $\mu = 0,60 \pm 0,060 \text{ mg.100g}^{-1}$

ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo nalezení optimálního postupu izolace vitamínu B₂ z cereálií, konkrétně z celozrných a kukuřičných lupínků, pomocí metody HPLC.

Pro stanovení obsahu vitamínu B₂ z cereálií byla použita separační chromatografická metoda vysoceúčinné kapalinové chromatografie HPLC. Analýza byla provedena na koloně SUPELCOSIL LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5 μm). Při měření byla použita gradientová eluce mobilní fáze, která byla složena z 0,12 mol.l⁻¹ octanu sodného o pH 4,7 (pH bylo upraveno 85 % kyselinou mravenčí) a z methanolu o počátečním poměru 85 : 15, časový průběh gradientové eluce je uveden v tabulce 3. Průtok mobilní fází byl 0,8 ml.min⁻¹ a teplota termostatu kolony 30°C. Signál byl snímán detektorem UV/VIS při vlnové délce 254 nm. Retenční čas pro riboflavin byl 9,6 min. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno za použití chromatografického programu ChemStation – Instrument 1 (Agilent USA). Na měření kalibrační křivky byl použit standard riboflavinu (Supelco, USA).

Výsledky jednotlivých analýz byly zpracovány pomocí standardních statistických parametrů za využití Studentova rozdělení náhodných odchylek pro daný stupeň volnosti. Výsledky byly testovány na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (95 %).

Průměrný obsah riboflavinu v celozrných cereáliích Fitness Chocolate byl stanoven na $0,89 \pm 0,056$ mg.100g⁻¹. Hodnota uvedená výrobcem činí 2,1 mg.100g⁻¹. Stanovený obsah je tudíž o 1,21 mg.100g⁻¹ menší než je hodnota deklarovaná výrobcem.

Průměrný obsah riboflavinu v kukuřičných cereáliích Cornflakes byl stanoven na $0,60 \pm 0,060$ mg.100g⁻¹. Výrobce uvádí hodnotu 1,4 mg.100g⁻¹. Rozdíl v obou hodnotách činí 0,80 mg.100g⁻¹.

Rozdíly ve stanovených hodnotách a hodnotách deklarovanými výrobcem mohly být způsobeny tím, že došlo k nadměrnému osvětlení výrobků během technologického procesu. Ztráta riboflavinu mohla být způsobená také stárnutím jednotlivých výrobků. V neposlední řadě se taky naskytuje možnost, že množství deklarované výrobcem neodpovídá skutečnosti a že výrobky obsahují méně vitamínu B₂ než uvádí výrobce.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., BUDÍNSKÝ, P. *Potravinářská biochemie II*.
1.vyd, Zlín UTB 2006, 102 s. ISBN 80-7318-395-1
- [2] Riboflavin [online]. Dostupný z www:
<<http://www.en.wikipedia.org/wiki/riboflavin/>>
- [3] Vitamíny [online]. Dostupný z www:
<<http://www.lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/riboflavin/>>
- [4] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*
1.vyd, Tábor OSSIS, 1999, 328 s. ISBN 80-902391-4-5
- [5] ŠÍCHO, V., VODRÁŽKA, Z., KRÁLOVÁ, B. *Potravinářská biochemie*
2.vyd, Praha SNTL, 1981, 360 s.
- [6] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J. *Chemie potravin*
1.vyd, Praha SNTL, 1983, 632 s.
- [7] VYHLÁŠKA 304/2004 sb. [online]. Dostupný z www:
<<http://www.mvcr.cz/sbirka/2004/sb100-04.pdf/>>
- [8] Přídavné látky [online]. Dostupný z www:
<http://www.bezkonzervantu.cz/ecka-detail/E_101.html/>
- [9] BUŇKA, F., NOVÁK, V., KADIDLOVÁ, H. *Ekonomika výživy a výživová politika 1*, 1.vyd, Zlín UTB, 2006, 159 s.
- [10] SCHREIBER, V. *Vitamíny kdy – jak – proč – kolik*
1.vyd, Jinočany H&H, 1993
- [11] DAVÍDEK, J. *Laboratorní příručka analýzy potravin*
Praha SNTL, 1977
- [12] Analýza potravin přírodní látky [online]. Dostupný z www:
<<http://www.utb.cepac.cz/>>
- [13] Chromatografie [online]. Dostupný z www:
<<http://www.sweb.cz/biochemie/x/metody/chromatografie.htm/>>

- [14] Chromatografické metody [online]. Dostupný z www:
<<http://www.cs.wikipedia.org/wiki/Chromatografie/>>
- [15] ZÝKA, J. *Analytická příručka*
3.vyd, Praha SNTL, 1979
- [16] KARDOŠ, E., BEREK, D. *Základy kvapalinové chromatografie*
1.vyd, Bratislava Alfa, 1979, 269 s.
- [17] Metody HPLC [online]. Dostupný z www:
<http://www.tomcat.prf.jcu.cz/sima/vybrane_kapitoly/kapal_chrom_vyber.htm/>
- [18] Chromatografie [online]. Dostupný z www:
<http://www.old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc/>
- [19] Analytická chemie [online]. Dostupný z www:
<http://www.tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa.htm/>
- [20] HRABĚ, J., ROP, O., HOZA, I. *Technologie výroby potravin rostlinného původu*
1.vyd, Zlín UTB, 2006, 177 s. ISBN 80-7318-372-2
- [21] PŘÍHODA, J., SKŘIVAN, P., HRUŠKOVÁ, M. *Cereální chemie a technologie 1*
1.vyd, Praha VŠCHT, 2004, 202 s. ISBN 80-7080-530-7
- [22] Obiloviny [online]. Dostupný z www:
<<http://www.cs.wikipedia.org/wiki/Obiloviny/>>
- [23] Význam obilovin [online]. Dostupný z www:
<<http://www.fitlife.cz/clanky/vyznamne-zdroje-funkcnich-potravin/>>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

FMN	flavinmononukleotid
FAD	flavinadenindinukleotid
ATP	adenosintrifosfát
ADP	adenosindifosfát
CC	sloupcová chromatografie
PP	papírová chromatografie
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
GC	plynová chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
HPLC	vysoceúčinná kapalinová chromatografie
UV-VIS	spektrofotometrický detektor
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Fotolýza riboflavinu	13
Obr. 2. Zdroje vitamínu B ₂	14
Obr. 3. Příznaky nedostatku riboflavinu	15
Obr. 4. <i>Lactobacillus helveticus</i>	16
Obr. 5. Schematický nákres kapalinového chromatografu	19
Obr. 6. Kolona HPLC.....	20
Obr. 7. Zařízení pro HPLC.....	21
Obr. 8. Obiloviny	22
Obr. 9. Obilné zrno.....	23

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Obsah riboflavinu v některých potravinách [10]	14
Tabulka 2: Srovnání hmotnostních podílů částí zrna pšenice a kukuřice [21].....	23
Tabulka 3. Gradient mobilní fáze.....	29
Tabulka 4. Kalibrace riboflavinu	31
Tabulka 5. Obsah riboflavinu v cereáliích Fitness Chocolate.....	32
Tabulka 6. Průměrný obsah riboflavinu v cereáliích Fitness Chocolate.....	33
Tabulka 7. Obsah riboflavinu v cereáliích Corn Flakes.....	33
Tabulka 8. Průměrný obsah riboflavinu v cereáliích Cornflakes.....	33

SEZNAM PŘÍLOH

P I: VITAMÍNY ROZPUSTNÉ V TUCÍCH

P II: VITAMÍNY ROZPUSTNÉ VE VODĚ

P III: ROZDĚLENÍ OBILOVIN PODLE MORFOLOGICKÝCH A FYZIOLOGICKÝCH
VLASTNOSTÍ

P IV: CHROMATOGRAM PRO STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU
V CEREÁLÍCH

PŘÍLOHA P I: VITAMÍNY ROZPUSTNÉ V TUCÍCH

Vitamín A (retinol) a jeho provitaminy (karotenoidy)

Vitamíny D (kalciferoly)

Vitaminy E (tokoferoly a tokotrienoly)

Vitaminy K (fylochinony, farnochinony)

Vitamin F (esenciální mastné kyseliny)

PŘÍLOHA P II: VITAMÍNY ROZPUSTNÉ VE VODĚ

Vitamín B₁ (thiamin)

Vitamin B₂ (riboflavin)

Vitamin B₃ (kyselina nikotinová a nikotinamid)

Vitamin B₅ (kyselina pantothenová)

Vitamin B₆ (pyridoxin)

Vitamin B₉ (kyselina listová)

Vitamin B₁₂ (kyanokobalamin)

Biotin

Bioflavonoidy

Vitamin C (kyselina L – askorbová a L – dehydroaskorbová)

PŘÍLOHA P III: ROZDĚLENÍ OBILOVIN PODLE MORFOLOGICKÝCH A FYZIOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ

I. skupina	II. skupina
<p>Rod:</p> <p><i>Triticum</i> - pšenice</p> <p><i>Secale</i> - žito</p> <p><i>Hordeum</i> - ječmen</p> <p><i>Avena</i> - oves</p> <p>Mezidruhový kříženec:</p> <p><i>Triticosecale</i> - tritikale (žitovec)</p> <p><i>Tritordeum</i></p>	<p>Rod:</p> <p><i>Zea</i> - kukuřice</p> <p><i>Panicum</i> - proso</p> <p><i>Sorghum</i> - čirok</p> <p><i>Oryza</i> - rýže</p> <p><i>Setaria</i> - (druhy: čumíza, mohár)</p> <p><i>Fagopyrum</i> - pohanka</p>
Charakteristické znaky:	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Na spodní straně obilky je podélná rýha. 2. Při klíčení roste více zárodečných koříneků. 3. Stéblo duté, jen kolénka vyplněna dřemí. 4. V klásku nejvíce plodné dolní kvítky. 5. Méně náročné na teplo, více na vodu. 6. Existují ozimé i jarní formy. 7. V době jarovizace vyžadují nižší teploty. 8. Při fotoperiodické reakci vyžadují dlouhý světelný den. 9. Počáteční vývin je rychlejší, vytvářejí odnože již po druhém až třetím listu. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obilka je bez rýhy. 2. Při klíčení roste jeden zárodečný kořínek. 3. Stéblo vyplněno dřemí. 4. V klásku nejvíce plodné horní kvítky. 5. Více náročné na teplo, méně na vodu. 6. Existují pouze jarní formy. 7. V době jarovizace vyžadují vyšší teploty. 8. Při fotoperiodické reakci vyžadují krátký světelný den nebo jsou k délce dne neutrální. 9. Počáteční vývin je pomalý, vytvářejí odnože po čtvrtém až osmém listu.

PŘÍLOHA P IV: CHROMATOGRAM PRO STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V CEREÁLIÍCH

