

Charakteristika a stanovení hydrofilních vitaminů

Gabriela Jasenská

Bakalářská práce
2009

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav potravinářského inženýrství
akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Gabriela JASENSKÁ**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Charakteristika a stanovení hydrofilních vitaminů**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

- Charakteristika hydrofilních vitaminů vyskytujících se v potravinách, popis jejich vlastností a zdrojů
- Popis analytických metod, především chromatografických technik, využívaných pro stanovení těchto vitaminů.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] Velíšek, J. *Chemie potravin*. 1. vyd. Tábor: Osis, 1999. 304s.

[2] Hlúbik, P., Opltová, L. *Vitaminy*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2004. 232 s.

[3] Churáček, J. a kol. *Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1990. 384 s.

[4] Opekar, F., Jelínek, I., Rychlovský, P., Plzák, Z. *Základní analytická chemie*. 1.vyd. Praha: Karolinum, 2003. 201s.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Soňa Škrovánková, Ph.D.

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

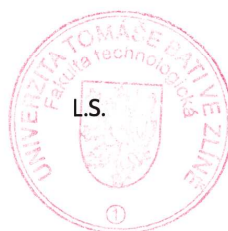
9. února 2009

Termín odevzdání bakalářské práce:

31. května 2009

Ve Zlíně dne 31. května 2009


doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan




prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zaměřuje na popis hydrofilních vitaminů (thiamin, riboflavin, niacin, kyselina pantothenová, pyridoxin, folacin, korinoidy, biotin a vitamin C) a možnosti jejich stanovení. Stanovení vitaminů je náročné, protože jsou v potravinách obsaženy ve velmi nízkých koncentracích a většinou jsou citlivé k slunečnímu záření, anebo k oxidaci. Pro stanovení vitaminů se využívají různé metody - spektrofotometrické, mikrobiologické, polarografické, titrační, fluorimetrické, a hlavně chromatografické metody (kapalinová a plynová chromatografie) s použitím různé detekce (MS, UV/VIS, ECD, FID...).

Klíčová slova: Hydrofilní vitaminy, stanovení, chromatografické metody, HPLC

ABSTRACT

The thesis deals with the characterization of water-soluble vitamins (thiamine, riboflavine, niacin, pantothenic acid, pyridoxine, folate, corinoids, biotin and vitamin C) and their determination. Determination of vitamins in foods is quite difficult because of their low concentrations and high sensitivity to sunlight or oxidation. For the determination of vitamins could be used various methods - spectrophotometric, microbiological, polarographic, titration, fluorometric, and especially chromatographic methods (liquid and gas chromatography) using various detection (MS, UV / VIS, ECD, FID...).

Keywords: Water-soluble vitamins, determination, chromatographic methods, HPLC

Poděkování, motto

Děkuji vedoucí bakalářské práce, Ing. Soni Škrovánkové, Ph.D, za její vstřícný přístup, odborné rady, doporučení a poskytnutou literaturu.

„Nevěř tomu, čemu nerozumíš, ale nezavrhuj, cos neprozkoumal.“ Karel Čapek

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

Ve Zlíně

.....

Podpis

OBSAH

ÚVOD	7
1 VITAMINY	8
1.1 DĚLENÍ VITAMINŮ	9
1.2 HISTORIE VITAMINŮ	11
1.3 HYDROFILNÍ VITAMINY	14
1.3.1 Thiamin	14
1.3.2 Riboflavin.....	16
1.3.3 Niacin	17
1.3.4 Pantothenová kyselina.....	18
1.3.5 Pyridoxin	19
1.3.6 Korinoidy	20
1.3.7 Folacin.....	22
1.3.8 Vitamin C	23
2 STANOVENÍ VITAMINŮ	25
2.1 ODBĚR VZORKU.....	25
2.2 IZOLACE A EXTRAKCE	26
2.3 METODY STANOVENÍ.....	26
2.3.1 Chromatografické metody.....	27
2.3.1.1 Kapalinová chromatografie.....	29
2.3.1.2 Kapalinová chromatografie v nadkritickém stavu	33
3 STANOVENÍ HYDROFILNÍCH VITAMINŮ	34
3.1 STANOVENÍ THIAMINU	34
3.2 STANOVENÍ RIBOFLAVINU	36
3.3 STANOVENÍ NIACINU	38
3.4 STANOVENÍ KYSELINY PANTOTHENOVÉ	39
3.5 STANOVENÍ PYRIDOXINU	41
3.6 STANOVENÍ KORINOIDŮ.....	42
3.7 STANOVENÍ FOLACINU	43
3.8 STANOVENÍ VITAMINU C	44
3.9 SPOLEČNÉ STANOVENÍ VITAMINŮ.....	46
ZÁVĚR	48
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	50
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	55
SEZNAM OBRÁZKŮ	57
SEZNAM TABULEK	58

ÚVOD

Vitaminy představují různorodou skupinu organických látek, které spolu s bílkovinami, tuky a sacharidy patří k základním složkám lidské stravy. Vitaminy si tělo většinou nedokáže vytvořit samo, proto musí být dodávány v potravě.

Vitaminy se rozdělují podle fyzikálních vlastností (rozpuštěnosti) na vitaminy lipofilní (rozpuštěné v tucích) a hydrofilní vitaminy (rozpuštěné ve vodě). Mezi hydrofobní vitaminy se řadí vitamin A (retinoidy), vitamin D (cholecalciferol, ergocalciferol), vitamin E (tokoferoly a tokotrienoly), vitamin K (fyllochinon, menachinon). Mezi hydrofilní vitaminy se řadí vitaminy B-komplexu (thiamin, riboflavin, niacin, kyselina pantothenová, pyridoxin, korinoidy, folacin), biotin a vitamin C.

Vitaminy jsou poměrně dlouho známé chemické látky, dříve používané většinou jako léky na syndromy vyvolané nepříznivými podmínkami výživy. Nejdůležitější funkcí hydrofilních vitaminů je katalytický účinek při řadě reakcí látkové přeměny; některé vitaminy zde působí přímo jako koenzymy. Další vitaminy tvoří v organismu důležité oxidačně redukční systémy, čímž mimo jiné mohou plnit i určitou ochrannou funkci apod.

Stanovení vitaminů v potravinách je důležitý, ale zároveň velmi složitý úkol, protože jejich obsah v potravinách je ve srovnání s ostatními analyzovanými složkami vzorku velmi nízký. Většina vitaminů je velmi citlivá na světelné záření, k oxidaci anebo ke změně pH.

Před vlastním stanovením se provádí několik operací, které zahrnují izolaci a extrakci vitamínu (extrakce vodou, minerální kyselinou). Pro následné vlastní stanovení hydrofilních vitaminů se dříve hojně používaly metody spektrofotometrické, fluorimetrické nebo mikrobiologické. V současné době jsou nejvíce využívány chromatografické metody, především kapalinová chromatografie – HPLC. Podstatou této metody je separace látek rozpuštěných v roztoku. K detekci složek, po dělení metodami kapalinové chromatografie se využívá různých fyzikálních a chemických vlastností. K měření těchto vlastností se využívá různých druhů detektorů. Nejčastěji se využívají detektory: UV/VIS, ECD, MSD, fluorescenční a jiné.

1 VITAMINY

Vitaminy jsou organické neenergetické látky, potřebné v malých množstvích pro látkovou přeměnu a regulaci metabolismu člověka. Vitaminy nejsou syntetizovány v těle vůbec nebo jen v nedostatečném množství, tudíž musí být přijímány z potravy. Tyto nízkomolekulární sloučeniny jsou však syntetizovány autotrofními organismy. Vyskytují se v rostlinných i živočišných organismech. Některé vitaminy jsou často přijímány ve formě inaktivních prekurzorů - provitaminů, které se v organismu působením specifických enzymů mění na vlastní účinnou látku. [1, 2, 3, 4, 5]

Vitaminy se vyskytují jak volné tak i vázané, obvykle na bílkoviny nebo sacharidy. Mnohé vitaminy jsou v podobě koenzymů součástí složených enzymů. Některé se účastní oxidačně redukčních dějů, jiné působí jako ochranné látky, zabraňují nežádoucím oxidacím v tkáních a buňkách. Fyziologickou aktivitu vitaminů zpravidla vykazuje více látek – například aktivitu vitaminu A má asi 50 přirozeně se vyskytujících sloučenin. [1, 2, 3, 4]

Deficit vitaminů v organismu se často projevuje celým komplexem poruch, které mohou způsobit velmi vážné poškození organismu a v krajních případech i smrt. Nedostatek vitaminů může vzniknout také jako důsledek poruchy jejich vstřebávání v trávicím traktu, častých stresů nebo zvýšené potřeby v průběhu nemoci. Choroby způsobené nedostatkem vitaminů se označují jako hypovitaminosy nebo avitaminosy. [1, 2, 3]

Obecně lze říci, že potřeba většiny vitaminů je poměrně nízká. Množství potřebné k zajištění normálních fyziologických funkcí člověka je závislé na mnoha faktorech, jako jsou stáří, pohlaví, zdravotní stav, životní styl, stravovací zvyky, pracovní aktivita a další. Doporučení pro denní příjem má řada zemí. [4, 5]

Potřeba jednotlivých vitaminů může být také ovlivněna přítomností některých složek potravin, které neumožňují plné využití vitaminů nebo je inhibují. Mezi tyto látky řadíme antivitaminy neboli antagonisty vitaminů. Jsou to látky, které určitým způsobem eliminují biologické účinky vitaminů, což může vést až k projevům nedostatku. Aktivita antivitaminů spočívá hlavně na těchto principech [4, 5] :

- strukturní analogy vitaminů reagují s příslušnými apoenzymy nebo s bílkovinami, které vitaminy transportují
- některé enzymy přeměňují vitaminy na neúčinné látky (např. thiaminasy degradují thiamin)

- některé látky tvoří s vitaminy nevyužitelné komplexy (např. reakce aminokyseliny linatinu s pyridoxalem)

Antivitaminy první skupiny, takzvané pravé antivitaminy, nelze obvykle běžnými technologickými postupy odstranit. Další dvě skupiny antivitaminů však lze do značné míry eliminovat vhodnými technologickými nebo kulinárními postupy. [4, 5]

Obsah vitaminů v potravinách ovlivňuje kromě genetických předpokladů daného organismu mnoho dalších faktorů. U potravin živočišného původu obsah vitaminů závisí hlavně na způsobu skladování a zpracování suroviny. U potravin rostlinného původu je významný zejména stupeň zralosti, klimatické podmínky během růstu, především množství srážek, hnojení, posklizňové skladování a zpracování. Vitaminy patří mezi velmi labilní složky potravin. Během technologického zpracování i kulinářské úpravy potravin dochází u většiny vitaminů ke ztrátám. Z toho důvodu jsou považovány za indikátory použití správných a šetrných technologií a kulinářských postupů. U hydrofilních vitaminů dochází během technologického a kulinářského zpracování ve většině případů k největším ztrátám výluhem. U lipofilních vitaminů jsou největší ztráty způsobeny oxidací. [4]

V potravinářském průmyslu se vitaminy používají k obohacování mnoha potravinářských výrobků, buď k doplnění jejich obsahu na původní hladiny v surovině nebo obohacení na vyšší koncentrace, potřebné z fyziologických či jiných důvodů. Některé vitaminy se používají jako přirozená barviva (β -karoten nebo riboflavin) a jako antioxidanty (vitamin C, E a další). [1, 2, 3, 4, 5]

1.1 Dělení vitaminů

Po chemické stránce jsou velmi heterogenní skupinou látek. Proto nejsou děleny podle struktury, ale nejčastěji podle společných fyzikálních vlastností (rozpuštěnosti). Vitaminy se takto dělí na dvě skupiny: lipofilní vitaminy (rozpuštěné v tucích) a hydrofilní vitaminy (rozpuštěné ve vodě). [1, 3, 4]

Lipofilní vitaminy

Mezi vitaminy rozpustné v tucích řadíme: vit. A (retinoidy), vit. D (nejvýznamnější jsou cholekalciferol a ergokalciferol), vit. E (tokoferoly a tokotrienoly), vit. K (nejdůležitější jsou fylochinon a menachinon). Po chemické stránce jsou to nepolární hydrofóbní molekuly, všechny jsou deriváty izoprenu. V organismu nemohou být syntetizovány v potřebném množství, proto musí být doplňovány z potravy. Vstřebávání mohou být pouze při nenarušeném vstřebávání tuků. Vstřebané musí být v krvi transportovány v lipoproteinech nebo vázané na specifické místo bílkoviny, tak jako jiné lipidy. V tucích rozpustné vitaminy mají různé úkoly v lidském těle. Například vitamin D plní i funkci prohormonu; vitamin A, β -karoten a vitamin E mohou hrát roli i v prevenci nádorů. [1, 3, 4]

Nedostatek vitaminů rozpustných v tucích mohou také vyvolat podmínky ovlivňující příjem a vstřebávání, poruchy žlučového systému. Nevhodná strava nebo následky špatného vstřebávání vyvolávají potíže způsobené tím, že vitaminy neplní své fyziologické funkce. Nedostatek vitaminu A může vyvolat noční slepotu a xeroftalmii, nedostatek vitaminu D křivici u dětí a osteomalacii u dospělých. Nedostatek vitaminu E, což je vzácné, vyvolá neurologické potíže a anemii u novorozenců, nedostatek vitaminu K u dospělých krvácivost a hemorragie u novorozenců atd. Schopnost ukládat vitaminy rozpustné v tucích v těle do zásoby se může podílet na jejich toxicitě v případě nadměrného příjmu vitaminu A a D v potravě. Téměř vždy jsou následkem nesprávného dávkování při jejich léčebném použití. [1]

Hydrofilní vitaminy

Vitaminy rozpustné ve vodě jsou: vitamin C (L-askorbová kyselina a L-dehydroxyaskorbová kyselina) a vitaminy označované jako B-komplex: vit. B₁ (thiamin), vit. B₂ (riboflavin), vit. B₃ (nikotinová kyselina a nikotinamid), vit. B₅ (pantothénová kyselina), vit. B₆ (pyridoxol, pyridoxal a pyridoxamin), vit. PP (biotin), vit. B_c (deriváty kyseliny folové) a vit. B₁₂ (korinoidy). V důsledku rozpustnosti těchto vitaminů ve vodě je jejich případný přebytek vylučován močí. Jen výjimečně se mohou hydrofilní vitaminy hromadit v toxických koncentracích. Z téhož důvodu jsou omezené i jejich zásoby v organismu, až na vitamin B₁₂, a proto musí být plynule doplňovány. [1, 3, 4]

Rezervní kapacita, definovaná jako doba, po kterou je potřeba vitaminu kryta rezervami organismu, je nejdelší pro korinoidy (3-5 let) a vitamin A (1-2 roky). U folacinu je rezervní

kapacita 3-4 měsíce, u vitamínu K a C, riboflavinu, pyridoxinu a niacinu 2-6 týdnů a u thiaminu pouze 4-10 dní. [1, 3, 4]

Společnou charakteristikou vitamínů B-komplexu je jejich funkce, vytvoření enzymových aktivátorů, koenzymů. Z mnoha studií je zřejmé, že nedostatek vitamínů rozpustných ve vodě může vést k narušení jednotlivých metabolických drah, které se však mohou do jisté míry vzájemně kompenzovat. Za experimentálních podmínek, když je vytvořená dieta s nedostatkem všech jmenovaných vitamínů, se důsledek výrazně projeví na imunitních funkcích, především sníženou cytotoxickou schopností T-lymfocytů a NK buněk (Natural killers - přirození zabíječi). [6]

Nedostatek jen jednoho vitamínu ze skupiny hydrofilních vitamínů je rovněž vzácný, neboť nedostatečná výživa je obvykle spojena s nedostatkem více těchto vitamínů současně. Nicméně příznaky nedostatku jednotlivých vitamínů jsou dobře definovány. Jsou známy například tyto potíže vyvolané nedostatkem vitamínů z uvedené skupiny: beri-beri – z nedostatku thiaminu; pelagra – při nedostatku niacinu; megaloblastická anemie, methylmalonátová acidurie a zhoubná anemie – z nedostatku kobalaminu, megaloblastická anemie – z nedostatku kyseliny listové a kurděje – z nedostatku vitamínu C. Avitaminosám se lze vyhnout konzumací pestré stravy v přiměřeném množství. [1, 2, 3, 5]

1.2 Historie vitamínů

Objev vitamínů jako látek nezbytných pro dynamickou rovnováhu živých soustav je plodem nepřetržitého vývoje přírodních věd, který můžeme sledovat od jeho počátku na konci 18. století, kdy Lavoisier položil základy chemie. Avitaminosy a hypovitaminosy jako karenční syndromy vyvolané nepříznivými podmínkami výživy mají však svou historii podstatně dříve v dějinách lidstva. [7]

Samotné slovo “vitamin” navrhl polský chemik Kazimír Funk ze spojení “vital amine”, což znamená životně důležité aminy. Na základě pokusu, pomocí kterého zjistil, že látka získaná z neloupané rýže léčící chorobu beri-beri patří mezi aminy. I když se později ukázalo, že mnohé vitaminy aminy vůbec neobsahují, název zůstal zachován. [7, 8]

V minulosti se používaly názvy související s onemocněním vyvolané nedostatkem příslušného vitamínu jako například antixeroftalmický vitamin neboli vitamin proti šerosleposti (vit. A) či antiskorbutický vitamin proti skorbutu (vit. C). Později se používala velká pís-

mena abecedy (vitamin A, C a další). Když se zjistilo, že stejné fyziologické účinky vykazuje více látek, začalo se používat u písmen číselného indexu (A_1 , A_2 atd.). V současné době se některá tato označení vitaminů ještě používají, u dalších vitaminů se však dává přednost jednoduchým triviálním názvům jako například kyselina askorbová místo vitamin C. [4, 9]

Thiamin

Domněnka, že původní vitamin B není látkou jednotnou a jedinou vitaminovou složkou přirozených zdrojů, byla vyslovena již před první izolací vitaminu B_1 . Nemoc z nedostatku vitaminu B_1 - beri-beri byla známa již v r. 2600 př. n. l. Bohaté záznamy o ní jsou také v čínských spisech ze 7. století. Její název pochází od Bontia, který ji studoval a podobně popsal ve svém díle „De medicina Indorum“ z r. 1645. Na konci 19. století se rozšířila v zemích, kde byla masivně konzumována loupaná rýže. V dalších letech byly z rýžových slupek vyrobeny koncentráty, jejichž účinnost proti tomuto onemocnění podpořila hypotézu o přítomnosti do té doby neznámého vitaminu. Ve vodě rozpustný antineuritický faktor z těchto koncentrátů byl označen jako vitamin B. V krystalické formě jako hydrochlorid byl izolován až v roce 1926, kdy byl vzhledem ke své účinnosti pojmenován jako aneurin. Teprve v roce 1951 IUPAC přijala dodnes platné označení thiamin. [7, 10]

Riboflavin

Přestože byl vitamin B_2 již dříve znám, podařilo se ho izolovat až ve 30. letech minulého století z vaječného bílku, mléka, syrovátky, kvasnic a jater. Když byl prokázán jeho chemická a biologická identita s fluoreskujícími flaviny, byl pojmenován jako riboflavin. Označení vitamin B_2 , ačkoliv původně patřilo i kyselině nikotinové, zůstalo riboflavinu. [7, 10]

Niacin

Kyselina nikotinová a její amid byly známy chemikům již od poloviny 19. století, ale jejich izolace a identifikace v biologickém materiálu byly poznamenány složitostí procesu dělení ve „vodě rozpustného faktoru B“, jak byl komplex vitaminů skupiny B pracovním názvem. V průběhu 30. let minulého století byl postupně objeven thiamin, riboflavin a konečně v roce 1937 kyselina nikotinová jako antipelagrový princip. Rozhodujícím příspěvkem k poznání jejího biologického významu i biochemických funkcí se stal objev, že je součástí

dehydrogenáz a nezbytným faktorem čtených kvasinek, bakterií, zvláště laktobacilů. Kyselina nikotinová jako antipelagrový princip byla původně nazývána vitaminem P-P, později se vžil název niacin, ale v roce 1954 IUPAC potvrdila jako správný název kyselina nikotinová (amid). [7, 10]

Kyselina pantothenová

Od počátku 20. století přitahoval pozornost vědeckých pracovníků neznámý faktor, vyskytující se ve filtrátu po zpracování jaterního extraktu, který působil proti karenčnímu syndromu u kuřat, vyznačující se dermatitidou, a podporoval i růst určitých mikroorganismů, zejména kvasinek. Tento faktor byl jako kyselina pantothenová izolován v čistém stavu v roce 1939. Cesta k bližšímu poznání jejího biologického účinku a metabolických funkcí se otevřela až v letech 1945 – 1947 objevem koenzymu A, jako hlavní funkční formy a základny široce rozvinutého působení kyseliny pantothenové v živé buňce. [10]

Pyridoxin

K izolaci vitamínu B₆ v krystalické formě došlo v roce 1938, kdy byl nově pojmenován jako pyridoxin. V dalších srovnávacích studiích byly na základě biologických, mikrobiologických a chemických testů rozlišeny jednotlivé složky pyridoxinové triády. V 50. letech minulého století IUPAC rozhodla o názvech jednotlivých členů triády s účinkem vitamínu B₆ a o názvu pyridoxin jakožto skupinového označení pro ně. [10]

Korinoidy

Historie objevu a izolace vitamínu B₁₂ je spojena s perniciózní anémií, která byla až do roku 1926 pokládána za neléčitelnou chorobu. Teprve tehdy byl podán důkaz o léčivém působení syrových jater, jejichž konzumace vyvolávala spontánní tvorbu erytrocytů a tím zotavení nemocných. Tento objev, který byl odměněn Nobelovou cenou, stál na počátku dlouhé řady prací, zabývajících se přípravou extraktů z jater, izolací a koncentrací neznámé látky. Teprve v roce 1948 byla z jater v krystalickém stavu izolována aktivní látka, jejíž účinnost se projevovala v dávkách miliontin gramu. Byla nazvána vitamin B₁₂ – kyanokobalamin. Později IUPAC přijala pro všechny látky vykazující účinek tohoto vitamínu skupinové jméno kobalaminy. Až v roce 1957 názvoslovná komise IUPAC doporučila nové označení celé skupiny těchto látek jako korinoidy. [7, 10]

Folacin

Objev folacinu spadá do 40. let minulého století, kdy byla prokázána identita faktoru nezbytného pro růst mikroorganismů *Lactobacillus casei* s kyselinou listovou, která byla v krystalické formě izolována v roce 1941 z listů špenátu. Její chemická struktura byla určena v roce 1944. [6, 11]

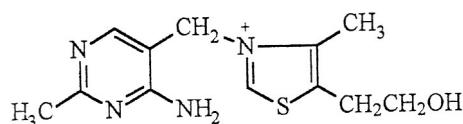
Vitamin C

Příznaky nedostatku vitamínu C jsou známy od starověku, ale intenzivnější výzkum antiskorbutového faktoru začal až po 1. světové válce, kdy byla stanovena jeho konstituce a byl pojmenován jako vitamin C. [10]

1.3 Hydrofilní vitaminy

1.3.1 Thiamin

Thiamin (vitamin B₁, dříve také aneurin) se skládá ze substituovaných jader pyrimidinu a thiazolu spojených methylenovým můstkem. Biologicky aktivní formou je koenzym thiamin-difosfát, který v průběhu oxidačních dekarboxylací α -ketokyselin váže meziprodukt této reakce, aldehydový zbytek. K přeměně thiaminu na thiamindifosfát je zapotřebí ATP. Je nezbytný pro odbourávání všech živin, zejména však sacharidů. [1, 3, 4, 10]



Doporučená denní dávka pro dospělé je přibližně 1-2 mg. Značně se zvyšuje při přebytku sacharidů v potravě, nadměrném pocení při práci v horku a u alkoholiků. Thiamin je stejně jako mnoho dalších vitaminů produkován intestinální mikroflórou. Množství vitamínu dodaného tímto způsobem je nedostatečné, proto je prakticky většina vitamínu získávána potravou. Thiamin je přítomen v mnoha potravinách rostlinného i živočišného původu, důležitým zdrojem je maso – vepřové obsahuje až desetkrát více thiaminu než jiné druhy masa, vnitřnosti, kvasnice, celozrnný chléb a pečivo. Bílé pečivo a loupaná rýže byly při zpracování zbaveny většiny původního obsahu thiaminu. Obecně se thiamin vyskytuje ve vyšších koncentracích (1-10 mg.kg⁻¹) v potravinách bohatých na sacharidy, kde probíhá intenzivní metabolismus cukrů. [1, 3, 4, 9, 10]

Za první příznaky poměrně častého nedostatku thiaminu se pokládá například zvýšená únava, svalová ochablost, sklon k neuritidám. Extrémní avitaminóza je u nás vzácná, v jihovýchodní Asii je známá jako onemocnění beri-beri, s různými formami poruch kardiiovaskulární a nervové soustavy. Toto onemocnění se vyskytuje, je-li potravou téměř výlučně loupaná rýže. Ke zjištění nedostatku thiaminu slouží měření aktivity transketolasy z červených krvinek. [1, 3, 4, 10]

Znáмым antagonistou thiaminu je oxythiamin obsahující jako substituent pyrimidinového cyklu hydroxylovou skupinu místo aminoskupiny. Oxythiamin vzniká z thiaminu v silně kyselém prostředí a vyskytuje se proto např. v tzv. kyselých hydrolyzátech bílkovin jako je polévkové koření. Snadno tvoří difosfát, který je kompetitivním inhibitorem thiaminu v enzymových reakcích. Dalšími antivitaminami jsou enzymy – thiaminasy a některé nízkomolekulární látky z potravin rostlinného původu. [4]

V roztoku je poměrně nestálý a termolabilní. Relativně stabilní je v kyselém prostředí ($\text{pH} < 5$). Molekula thiaminu se štěpí na dvě části působením oxidu siřičitého nebo hydrogensířičitanů. Ve vodných roztocích současně vzniká thiolová forma thiaminu, v alkalickém prostředí sůl thiolu, obě formy zřejmě vznikají také v potravinách. Velké množství produktů vzniká rozkladem thiaminu ve vodných roztocích za varu, při teplotách nad 100°C a fotodegradací. Identifikováno bylo více než 70 degradačních produktů. Kromě jednoduchých sloučenin jako je sulfan, amoniak, etanal, octová a mravenčí kyselina vzniká několik desítek dalších sirných sloučenin. Řada produktů je vonnými látkami potravin. Thiamin je proto často používán jako složka směsí pro simulaci masového arómatu. [4, 5]

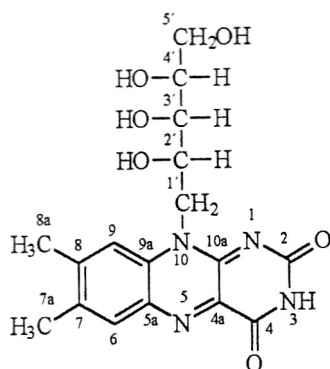
Zvláště významným produktem rozkladu thiaminu je bis(2-methyl-3-furyl)disulfid. Vzniká také jako produkt degradace při skladování tablet thiaminu a multivitaminových tablet obsahujících thiamin a je zodpovědný za jejich typické aroma. Řadu reakcí thiaminu lze zahrnout mezi tzv. reakce neenzymového hnědnutí. Thiamin reaguje v neutrálním prostředí s redukcujícími cukry a stejně tak s jinými karbonylovými sloučeninami. Reakcí s D-glukosou vzniká jako primární produkt glukothiamin. Některé aminokyseliny jako je glycin, alanin, valin a kyselina glutamová katalyzují v alkalickém prostředí rozklad thiaminu. Jako produkt vzniká sulfan a dethiothiamin. [4, 5]

Během technologického a kulinárního zpracování dochází ke ztrátám thiaminu. Průměrné ztráty při smažení masa jsou 10-50 %, při vaření a dušení 50-70 %. Výše ztrát závisí na

velikosti zpracovávaného materiálu, obsahu vody, tuku a použité metodě tepelného zpracování. Zmrazování a mrazírenské skladování podstatným způsobem neovlivňuje stabilitu thiaminu, i když dochází k jeho pomalému úbytku. Při pasterizaci, sterilizaci nebo sušení mléka za běžných podmínek se ztráty thiaminu pohybují v rozmezí 10-20 %. Také během skladování tepelně ošetřeného mléka nejsou ztráty příliš vysoké. Ztráty při vaření kořenové zeleniny jsou obvykle kolem 25 %, u listové zeleniny asi 40 %. [4, 5, 9]

1.3.2 Riboflavin

Riboflavin (vitamin B₂) se skládá z heterocyklického isoalloxazinového jádra navázaného na ribitol. Aktivní forma riboflavinu je flavinmononukleotid nebo flavinadenindinukleotid (FMN a FAD), slouží jako prostetická skupina oxidoredukčních enzymů, které mají důležitou roli v metabolismu bílkovin, tuků a cukrů. Tyto enzymy jsou známé jako flavoproteiny. Prostetické skupiny jsou obvykle pevně, ale ne kovalentně vázány na své apoproteiny. Mnohé flavoproteinové enzymy obsahují jeden nebo více kovů jako nezbytné kofaktory a jsou známé jako metaloflavoproteiny. [1, 3, 5, 10]



Denní potřeba riboflavinu pro dospělého člověka je asi 2 mg. Riboflavin je syntetizován rostlinami i mikroorganismy, ale nikoli savci. Jeho zdrojem v potravě je mléko a mléčné výrobky, vejce, maso a různé rostlinné potraviny. Většinou se v nich vyskytuje vázán v podobě FMN nebo FAD, volný riboflavin obsahuje pouze mléko. Přeměnu riboflavinu na kofaktory ovlivňují hormony, farmaka a některé složky potravy. V důsledku citlivosti riboflavinu na světlo může jeho nedostatek nastat u novorozenců s hyperbilirubinemií, pokud jsou léčeni fototerapií. Omezený příjem se projevuje zejména postižením sliznic – například zánět rtů nebo ústních koutků a kůže obličeje. [1, 3, 5, 9, 10]

V nepřítomnosti světla je riboflavin velmi stabilním vitaminem, v neutrálních a slabě kyselých roztocích je prakticky stálý. Při výrobě kyselých hydrolyzátů bílkovin bývá retence vitamínu kolem 20 %. V neutrálním a alkalickém prostředí za přístupu světla jsou všechny

flaviny nestálé, zvláště pak volný riboflavin a FMN. Tyto sloučeniny působí jako fotosenzibilizátory typu I a II, absorbovanou světelnou energii předávají vzdušnému kyslíku, ze kterého vzniká singletový kyslík a ten oxiduje další organické sloučeniny. [4, 5]

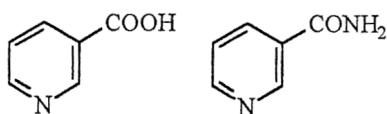
Riboflavin je barevný, fluoreskuje a je poměrně odolný vůči vysokým teplotám, ale rozkládá se světlem. Hlavním produktem fotodegradace riboflavinu po štěpení ribitolu v kyselém a neutrálním prostředí vzniká lumichrom, v alkalickém prostředí vzniká lumiflavin. Oba flaviny vznikající fotodegradací riboflavinu jsou účinnější oxidační činidla než samotný riboflavin. Interakcí těchto flavinů s kyslíkem vzniká singletový kyslík, reaktivní radikály a peroxid vodíku. Riboflavin působí jako fotosenzibilizátor velmi často u mléka, vína a piva při expozici přímému slunečnímu záření v nevhodných obalech. Singletový kyslík a produkty degradace riboflavinu zejména lumiflavin, způsobují potom rozsáhlou destrukci vitamínu C a oxidaci retinolu, esenciálních mastných kyselin a aminokyselin a dalších. Z methioninu vznikají rozkladem těkavé sirné sloučeniny. Výsledkem je nepříjemné aroma. [4, 5]

Při tepelném zpracování potravin je riboflavin velmi stálý, degraduje však při ozáření. Ve vodě je riboflavin málo rozpustný, proto i ztráty při vaření a pečení masa jsou zanedbatelné, zpravidla nepřesahují 10% a jsou způsobeny především výluhem. Při zmrazování a mrazírenském skladování rovněž nejsou ztráty vysoké. Ztráty při technologických operacích a skladování trvanlivého mléka jsou malé. U konzervovaného ovoce a zeleniny jsou ztráty riboflavinu v rozmezí 25-70 % podle druhu zpracovávané suroviny a jsou způsobeny v největší míře vyluhováním. Při vaření zeleniny se vyluhováním ztrácí 30-40 % vitamínu. [4, 9]

1.3.3 Niacin

Dva deriváty pyridinu nikotinová kyselina a její amid – nikotinamid (vit. B₃) se označují společným názvem niacin (faktor PP, z angl. pellagra preventive factor). Přestože mohou vznikat v organismu člověka a ostatních savců z aminokyselin tryptofanu, patří mezi vitaminy skupiny B. Biochemický význam nikotinamidu spočívá v tom, že je stavebním kamenem pyridinových nukleotidů, NAD⁺ a NADP⁺, uplatňujících se jako koenzymy přenášející vodík v reakcích katalyzovaných mnoha dehydrogenasami. Proto jsou klíčovými složkami mnoha metabolických drah důležitých pro metabolismus sacharidů, lipidů i aminokyselin. Kyselina nikotinová může být využívána ke snižování plasmatické hladiny cholesterolu. Tento účinek je zprostředkován inhibicí uvolňování volných mastných kyselin

z tukové tkáně, což vede ke snížení tvorby lipoproteinů nesoucích cholesterol VLDL, IDL a LDL. [1, 3, 5, 10]



Denní potřeba niacinu pro zdravého dospělého je 13-20 mg. Člověk má omezenou schopnost syntetizovat niacin z tryptofanu pomocí enzymů obsahujících jako kofaktor vitamin B₆. Proto příjem dostatečného množství biologicky plnohodnotných bílkovin, mléka nebo vajec potřebu nikotinamidu pokryje, i když je v nich jeho obsah nepatrný. Bohatým zdrojem niacinu jsou játra, maso, droždí, též arašídý, pražená káva a houby. Závažný deficit niacinu i tryptofanu vyvolává onemocnění nazývané pelagra. Projevuje se mj. průjmy, kožními záněty s pigmentacemi a psychickými poruchami, později srdečními a nervovými poruchami. Pelagra se endemicky vyskytuje jen tam, kde je hlavní potravinou kukuřice. [1, 3, 4, 9, 10]

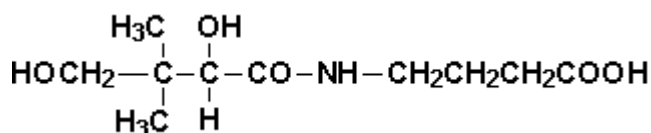
Antagonisty niacinu jsou některé deriváty pyridinu. Z látek vyskytujících se v potravinách to mohou být např. 3- a 4-acetylpyrin, které vznikají v reakcích neenzymového hnědnutí. Také niacinu škodí voda, léky obsahující síru, alkohol, uklidňující léky a estrogen. [4, 9]

Nikotinamid je velmi stálý v neutrálních roztocích, v kyselém a alkalickém prostředí se hydrolyzuje na nikotinovou kyselinu, která je stabilní při zahřívání ve vodných roztocích a velmi stabilní je také v kyselém i alkalickém prostředí. [4]

Ztráty při zpracování masa, mléka i ovoce a zeleniny jsou zanedbatelné. Jako u jiných ve vodě rozpustných vitaminů bývají největší ztráty způsobeny výluhem. Rovněž při nevhodném rozmrazování mohou ztráty odkapem činit až 50 %. [4, 5]

1.3.4 Pantothenová kyselina

Pantothenová kyselina je amid vzniklý z β-alaninu, na jehož aminoskupinu je navázán acyl pantoové kyseliny. V přírodě je velmi rozšířena, v potravě dostatečně zastoupena. Nachází se v krvi, v buňkách je převážně jako složka pantetheinu, který je součástí koenzymu A a multienzymového komplexu syntetizujícího mastné kyseliny. [1, 3, 4, 5, 12]



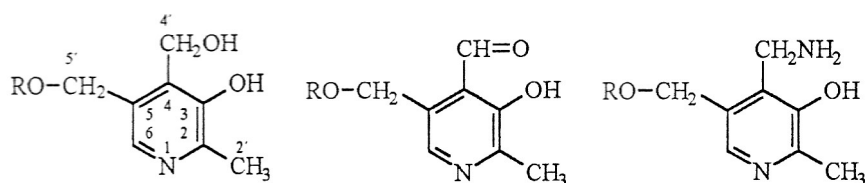
Denní potřeba je přibližně 6 – 8 mg, smíšená strava ji pokrývá. Bohatým zdrojem jsou například játra, celozrnné cereální výrobky, kvasnice a vaječné žloutky. Suplementace pantothenátu je nezbytná při úplné parenterální výživě. Deficit se nijak charakteristicky neprojevuje. Vápenatá sůl nebo alkoholický prekurzor panthenol mohou být doplňkem urychlujícím hojení neinfikovaných popálenin, povrchových poranění nebo katarů horních dýchacích cest. Působení panthenolu v četných kosmetických přípravcích se přes mohutnou propagaci zdá být sporné. [3, 9, 10]

Stabilita kyseliny pantothenové ve vodných roztocích je značně závislá na hodnotě pH. Nejstabilnější je slabě kyselém prostředí. V kyselém i alkalickém prostředí dochází k hydrolýze amidové vazby, kdy vzniká sůl kyseliny pantoové a β -alanin. [4, 5]

Vitamin je poměrně nestálý při skladování a především při termickém zpracování potravin. Ztráty vyluhováním do vody během operací jako je mytí, blanšírování a vaření bývají ztráty často vyšší než způsobené hydrolýzou. [4, 9]

1.3.5 Pyridoxin

Pyridoxin (vitamin B₆) je skupinový název pro tři příbuzné deriváty 3-hydroxymethyl-2-methylpyridinu. Všechny mají stejnou biologickou účinnost, vzájemně se liší skupinou navázanou v poloze 4; pyridoxin (pyridoxol) má druhou primárně alkoholickou skupinu (hydroxymethyl) a pyridoxal skupinu aldehydovou a pyridoxamin primární aminovou (aminomethyl). Aktivní formou je kofaktor pyridoxal-5-fosfát, prostetická skupina enzymů zúčastněných zejména v přeměnách aminokyselin a při glykogenolýze. [1, 3, 5]



Denní potřeba dospělých kolem 2 mg je kryta běžnou smíšenou stravou, výrazně se však zvyšuje např. během laktace, při všech katabolických stavech, při velké konzumaci ethanolu nebo léčení tuberkulózy isoniazidem. Dobrymi zdroji tohoto vitamínu jsou játra, makrely, avokádo, banány, maso, zelenina, vejce, droždí a obiloviny. Projevy nedostatku vitamínu B₆ jsou vzácné, dříve se mohou projevit u alkoholiků, těhotných nebo kojících žen poruchami kůže a sliznic, nervovými poruchami nebo anémií. [1, 3, 4, 5, 10]

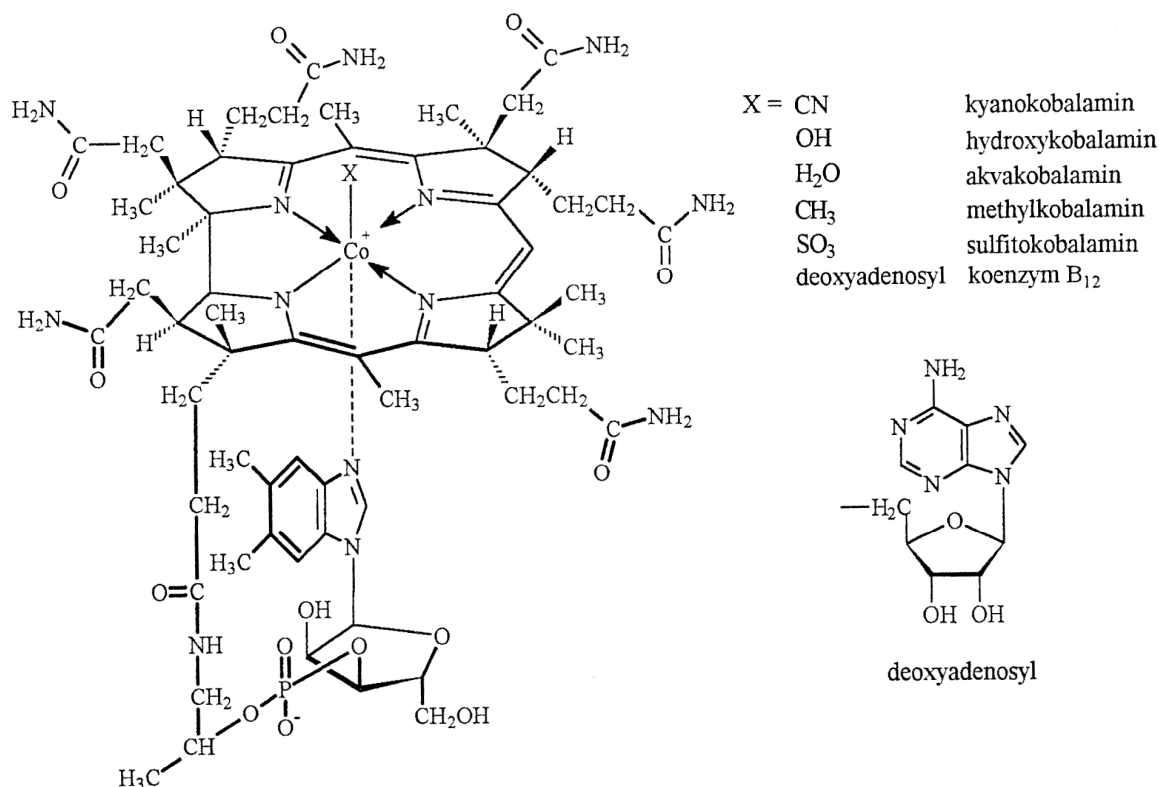
Antagonisty vitamínu jsou látky reagující s karbonylovou skupinou pyridoxalu. Z přírodních látek to mohou být některé metabolity tryptofanu, hydraziny a hydroxylaminy reagující za vzniku příslušných hydrazonů a oximů. Antagonistou je např. linatin vyskytující se v semenech lnu. [4]

Vitamin je relativně stálý v kyselých roztocích, méně stálý v neutrálním a alkalickém prostředí, zvláště na světle. Pyridoxol je stálejší než pyridoxal a pyridoxamin. Aminokyseliny, peptidy a proteiny reagují s pyridoxalem a jeho fosfátem v neutrálním prostředí za vzniku iminů. Pyridoxal-5'-fosfát je reaktivnější než pyridoxal. Aminokyseliny obsahující další reaktivní funkční skupiny reagují s pyridoxalem za vzniku heterocyklických sloučenin. Reakcí s cysteinem například při sterilizaci mléka, vzniká derivát thiazolidinu. Sulfan vzniklý degradací cysteinu se aduje na karbonylovou skupinu pyridoxalu. Reakcí s bílkovinami obsahujícími vázaný cystein vznikají smíšené disulfidy. Pyridoxylthiol a příslušný disulfid vykazují jen malou aktivitu vitamínu B₆. [4, 5]

Ztráty vitamínu při skladování a zpracování potravin se značně liší podle převládající formy vitamínu. U potravin rostlinného původu, které obsahují stálejší pyridoxol, jsou ztráty vitamínu zpravidla malé, u potravin živočišného původu, které obsahují reaktivnější pyridoxal, jsou ztráty vyšší. Případné vyluhování vitamínu bývá hlavní příčinou ztrát. Ztráty se připisují také reakcím pyridoxalu s bílkovinami. [4, 9]

1.3.6 Korinoidy

Korinoidy (vitaminy B₁₂) mají dosti složitou strukturu: jejím základem je částečně hydrogenovaná téměř planární tetrapyrrolová struktura. Centrálním atomem je kobalt, který může tvořit až 6 koordinačních vazeb s ligandy. Formy vitamínu B₁₂, které obsahují 5,6-dimethylbenzenimidazol se nazývají kobalaminy. Šestou koordinační vazbou v β-poloze mohou být vázány různé skupiny nebo sloučeniny nebo je tato poloha neobsazená. U přírodně se vyskytujícího kobalamínu je vázán přes uhlík C-5'adenosin, tato forma se nazývá koenzym B₁₂. Další z přírodně se vyskytujících koenzymů, methylkobalaminy, mají jako ligand methylovou skupinu. Všechny strukturní analogy, jejichž základem je tetrapyrrolová struktura se nazývají souhrnně korinoidy. [1, 3, 4, 5, 13]



Kobalamin, resp. koenzym B₁₂ je prostetickou skupinou řady enzymů a je součástí metabolismu některých aminokyselin. Katalytická aktivity vitamínu souvisí s přenosem jednoválcových zbytků, štěpením vazeb C-O a C-C. [4, 13]

Denní potřeba B₁₂ u dospělých je přibližně 2 µg. Bohatým zdrojem jsou potraviny živočišného původu: vnitřnosti, maso, mléčné výrobky a vejce. V rostlinách se kobalamin vyskytuje jen ve velmi malé míře. Příčinou deficitu kobalaminu bývá poměrně zřídka nevhodná strava. Zpravidla je jeho příčinou nedostatek vnitřního faktoru a nedostatečná resorpce kobalaminu z potravy. Projevuje se jako megaloblastická či makrocytová anémie a určité neurologické poruchy. [1, 3, 4, 5, 10, 13]

Kobalamin je produkován pouze mikroorganismy, nachází se hlavně v potravinách živočišných. K resorpci kobalaminu přijatého potravou je nezbytný specifický glykoprotein vylučovaný žaludeční sliznicí, zvaný vnitřní faktor. V buňkách je kobalamin přeměněn na aktivní formu kobalamidové kofaktory, methylkobalamin a deoxyadenosylkobalamin. Jsou potřebné v odbourávání některých aminokyselin a zejména, společně s listovou kyselinou, k methylačním reakcím. [1, 3]

Přes složitou strukturu je kobalamin v roztocích o pH 4-7 relativně stálý. Z kyanokobalaminu vzniká v kyselém prostředí hydroxykobalamin, který v kyselých a neutrálních roztocích existuje jako akvakobalamin. Při kyselé hydrolýze korinoidů dochází nejprve

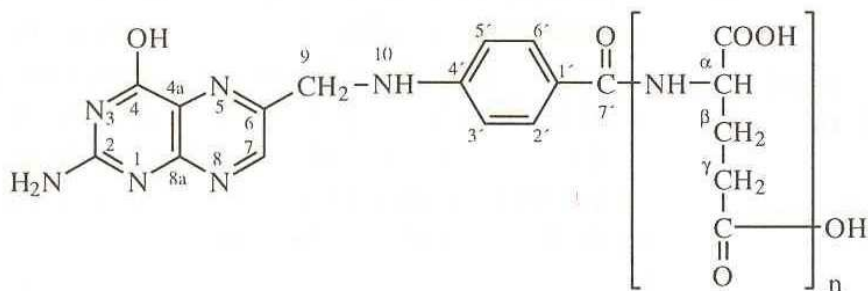
k hydrolyze vázaných propionamidů a vznikají příslušné karboxylové kyseliny. Hydrolyzou ve zředěných roztocích hydroxidů alkalických kovů vzniká biologicky inaktivní dehydrovitamin B₁₂. Při alkalické hydrolyze vzniká dále kyanokobalamin, 1- α -D-ribofuranosyl-5,6-dimethylbenzimidazol a fosfát. [4, 5]

Fotodegradací adenosylkobalaminu v nepřítomnosti kyslíku vzniká kobalamin a 5,8-cykloadenosin. V přítomnosti kyslíku vzniká akvakobalamin a adenosin-5'-karboxaldehyd. Fotolýzou methylkobalaminu ve vodných roztocích v nepřítomnosti kyslíku vznikají jako hlavní produkty akvakobalamin a methan, přítomnosti kyslíku akvakobalamin a formaldehyd. Hydroxylová skupina hydroxylkobalaminu může být snadno substituována jiným ligandem, například chlorem. Korinový cyklus může být také halogenován na C-10. Při reakci methylkobalaminu s ionty kovů ve vodných roztocích vznikají methylderiváty kovů a akvakobalamin. [4]

Vitamin B₁₂ se při zpracování potravin i během kulinárních operací zdá být velmi stabilní. Hlavní příčinou ztrát je opět vyluhování. Při běžných podmínkách průmyslového zpracování mléka se obsah vitamínu příliš nemění. Při zpracování masa jsou ztráty závislé na použité technologii, mohou činit 55-70 %. [4, 5]

1.3.7 Folacin

Kyselina listová (folát) je název obvyklý pro pteroylglutamovou kyselinu. Je to jeden z mnoha podobných derivátů pteroové kyseliny, které vykazují stejnou biologickou aktivitu a souhrnně se označují jako folaciny. Živočichové tyto látky nedovedou syntetizovat, jsou závislí jen na jejich přívodu potravou. Aktivní formou je v buňkách tetrahydrofolát, kofaktor přenášející jednouhlíkaté zbytky v různých oxidačních stavech. Všechny jsou metabolicky vzájemně směnitelné. [1, 3, 5]



Denní potřeba folátů pro dospělého je přibližně 0,15 - 0,2 mg. Nejbohatším zdrojem jsou játra, z rostlinných potravin listová zelenina a droždí. V rostlinách je kyselina listová při-

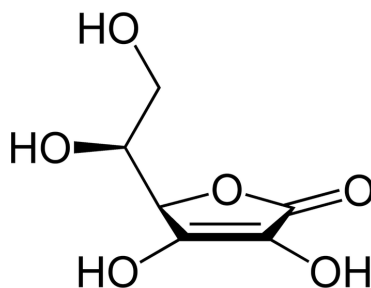
tomna jako polyglutamátový konjugát složený ze 7 glutamátových zbytků spojených v poloze gama do polypeptidového řetězce. V játrech je většina vitamínu vázána jako pentaglutamátový konjugát. Nedostatek folátů má obvykle příčinu v nedostatečné resorbci, projevuje se především v krevním obraze. [1, 3, 9, 10]

Folacin je nestálý v kyselém, neutrálním i alkalickém prostředí, za vyšších teplot a zvláště na světle, v přítomnosti kyslíku, kovů s přechodnou valencí a riboflavinu. K oxidaci a jiným reakcím dochází běžně při zpracování a skladování potravin. Degradací folátů vzniká velké množství produktů v závislosti na pH prostředí a dalších faktorech. [4, 5]

Ztráty folacinu při tepelném zpracování masa dosahují až 95 %, většina ztrát, tak jako i při zpracování jiných potravin, nastává výluhem. Stabilita folacinu v mléce závisí na přítomnosti kyslíku. Obvyklé ztráty při pasterizaci dosahují 5%. Při vaření a konzervování zeleniny dochází v průměru k 20-50 % ztrátám folacinu. [4, 9]

1.3.8 Vitamin C

Základní biologicky aktivní sloučeninou je askorbová kyselina. Ze čtyř možných stereoisomerů vykazuje aktivitu vitamínu C pouze L-askorbová kyselina. Názvem vitamin C se označuje také celý reversibilní oxidačně-redoxní systém kyseliny L-askorbové, který zahrnuje samotnou kyselinu a produkt její elektronové oxidace: L-monodehydroaskorbová kyselina a produkt dvouelektronové oxidace L-dehydroaskorbovou kyselinu. Přenos elektronů je reverzibilní, dokud není porušena kruhová struktura kyseliny L-dehydroaskorbové. [4, 10]



Vitamin C se podílí především na významných hydroxylačních reakcích probíhajících v organismu. Dále se účastní biosyntézy mukopolysacharidů, prostaglandinů, adsorbce iontových forem železa, jeho transportu, stimuluje transport sodných, chloridových iontů a zřejmě i vápenatých iontů, uplatňuje se v metabolismu cholesterolu, drog a v řadě dalších reakcí. [4]

Denní dávka 10 mg vitamínu C bývá postačující k prevenci skorbutu, ale doporučený denní příjem se pohybuje v rozmezí 60-200 mg. U pacientů s respiračními chorobami, při rekonvalescenci a v dalších případech se podávají denní dávky v množství 1000 mg i více. Veškerá potřeba vitamínu C je kryta vitaminem z potravy, hlavně bramborami, zeleninou, ovocem a mlékem. Deficit vitamínu C či hypovitaminosa se projevuje řadou nespecifických příznaků, nejčastěji tzv. jarní únavou. Nejznámějším syndromem akutní avitaminosy jsou kurděje (skorbut). [4, 10]

K antivitaminům C patří řada oxidoreduktas uplatňujících se v metabolismu vitamínu C živočichů a rostlin. Náleží sem například askorbát oxidasa, dále askorbátperoxidasa, monodehydroaskorbát reduktasa, dehydroaskorbát reduktasa, superoxid dismutasa, a askorbát:cytochrom-*b*-reduktasa. Nepřímo způsobují ztráty askorbové kyseliny další oxidoreduktasy, jako jsou enzymy triviálně nazývané polyfenolasy a některé další. [4]

Velmi důležitými reakcemi souvisejícími s antioxidačními vlastnostmi vitamínu jsou reakce s aktivními formami kyslíku, resp. s volnými radikály, a reakce s oxidovanými formami vitamínu E, které zabezpečují ochranu vitamínu E a lipidů membrán před oxidací. Ochrannou funkci má i pro labilní formy listové kyseliny. Inhibuje také tvorbu nitrosaminů a působí tak jako modulátor mutageneze a karcinogeneze. Mnoho dalších aktivit vitamínu C je dosud známo jen částečně. [4]

Askorbová kyselina je jedním z nejméně stálých vitaminů. Ke ztrátám při skladování, kulinárním a průmyslovém zpracování potravin dochází různými způsoby. Nejvýznamnější jsou ztráty výluhem a ztráty oxidací. V nepřítomnosti vzdušného kyslíku jsou ztráty způsobeny kyselinami katalyzovanou degradací. Celkové ztráty se pohybují zpravidla mezi 20 až 80 %. [4]

2 STANOVENÍ VITAMINŮ

Stanovení vitaminů v potravinách je velmi složitý úkol, neboť jejich koncentrace jsou ve srovnání s ostatními složkami analyzovaného vzorku velmi nízké. Vitaminy jsou ve většině případů velmi citlivé k oxidaci a někdy i na světelné záření. Proto je často nutné provádět veškeré analytické operace s maximální opatrností v prostředí inertní atmosféry a sníženého přístupu přímého denního světla. [14, 15]

Skupina vitaminů je chemicky natolik heterogenní, že nelze použít žádné univerzální metody ke stanovení celé skupiny vitaminů. Z těchto důvodů je u většiny analytických metod nutné analyzované látky nejprve rozdělit vhodnou dělicí technikou. Většina dříve používaných extrakčních postupů byla dnes nahrazena modernějšími chromatografickými metodami, jimiž je možné rozdělit i takové složité směsi látek, které by se jinými technikami dělily jen nesmírně obtížně nebo vůbec. [14, 15]

Obecně lze říci, že stanovení vitaminů v potravinářských materiálech vyžaduje značné analytické zkušenosti. Přitom je nezbytné přesné dodržování pracovních předpisů, čistota chemikálií a rozpouštědel, snížený přístup kyslíku, dodržování teplot a pH, omezení světelného záření. [14, 15]

2.1 Odběr vzorku

Správný odběr a uchování vzorků před vlastní analýzou je základem správné analýzy. Je nutné, aby byl vzorek reprezentativní, to znamená, že musí být zastoupeny všechny složky analyzovaného materiálu ve stejném hmotnostním nebo objemovém poměru jako má daný materiál. Veškeré manipulace se vzorkem se musí provádět tak, aby během odběru, dopravy a skladování vzorku nedošlo ke změnám jeho složení. Potraviny, které se rychle kazí, je nutné po odběru vzorku uchovat za chladu, a pokud je to z hlediska další analýzy možné, skladovat ve zmraženém stavu. [14, 15, 16]

Všeobecně použitelný návod na získání a homogenizaci správného vzorku není možno předepsat. Pro různé případy je přesný způsob odběru vzorků stanoven příslušnou technickou normou. Metoda odběru vzorku se řídí i druhem a cílem analýzy. [14, 16]

2.2 Izolace a extrakce

Před samotným stanovením vitaminů se musí ze vzorku izolovat vitamin. K izolaci se používají různé metody extrakce. Extrakce je dělicí metoda založená na kontaktu dvou makroskopicky zřetelně oddělených nemísitelných fází. Tyto fáze mohou být různého skupenství. Extrakce bývá často prováděna tak, aby při ní došlo nejen k separaci, ale i k nakoncentrování analytu z relativně velkého objemu fáze analytu do malého objemu kontaktní fáze - extrakčního činidla. Různé druhy extrakcí mají v praktické analýze velký význam. [11, 16]

K extrakci vitaminů rozpustných ve vodě z potravin se nejčastěji používá voda, zředěné roztoky minerálních kyselin a pufr. Výběr vhodného extrakčního činidla se řídí druhem vitamínu, ale i druhem analyzovaného materiálu. Avšak nejen zvolené extrakční činidlo určuje výtěžek extrakce, ale i podmínky ve vodné fázi a zvolená technika extrakce. [14, 16]

Po extrakci vitaminů z analyzovaného materiálu je vhodné a v některých případech nutné odstranit hrubý extrakt, který většinou obsahuje řadu ostatních ve vodě rozpustných látek v koncentracích mnohonásobně převyšujících koncentraci vitaminů. Proto je třeba extrakt před vlastním chromatografickým dělením vitaminů přechistit pomocí extrakčních nebo chromatografických postupů. Pro čištění extraktů vitaminů rozpustných ve vodě nalezlo širší uplatnění především chromatografické čištění na vhodných adsorpčních materiálech, jako jsou: silikagel, celuloza, ionexy a další. Vhodnost výběru je dána především druhem vitamínu. [14, 15]

2.3 Metody stanovení

Ke stanovení hydrofilních vitaminů se používají různé metody - především spektrofotometrie, fluorimetrie nebo mikrobiologické testy, v současné době jsou nejvíce využívány chromatografické techniky, především metody kapalinové a plynové chromatografie. [14]

K chromatografickému dělení a detekci vitaminů se dříve využívaly techniky jako chromatografie na papíře a na tenké vrstvě (nejrozšířenější sorbent silikagel). Nyní se však široce uplatňuje pro obě skupiny vitaminů - kapalinová chromatografie (HPLC) s vhodnou stacionární a mobilní fází, nebo plynová chromatografie (GC). [14]

2.3.1 Chromatografické metody

Objev chromatografie sahá do devadesátých let 19. století a je spojován se jménem botanika M. Cvětá, který použil skleněnou kolonu naplněnou uhličitánem vápenatým pro dělení a izolaci barviv z rostlinných extraktů. Název vznikl spojením dvou řeckých slov – chroma a grafo, v překladu barva a psát. Na nějakou dobu byla tato metoda zapomenuta a znovuobjevena Martinem a Syngem v roce 1941. Oba za svoji práci získali v roce 1952 Nobelovu cenu. V souvislosti s rozvojem chemického průmyslu po druhé světové válce došlo k dalšímu rychlému vývoji v oblasti separačních metod, který pokračuje do současnosti. [11, 15]

Pod názvem chromatografické metody jsou zahrnuty všechny operace, jež spočívají na různých fyzikálně-chemických principech, při nich dochází k postupnému, mnohonásobně opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi dvěma, popřípadě i více fázemi. [11, 17, 18, 19, 20]

Jedna z fází – stacionární (sorbent) je umístěna v koloně nebo v ploché vrstvě, druhá, která unáší separované látky stacionární fáze je nazývána mobilní fáze. Při styku stacionární i mobilní fáze s dělenými látkami dochází k vzájemným interakcím, které jsou základním předpokladem pro jejich separaci. Interakce dělených látek se stacionární i mobilní fází je zpravidla různá jak co do kvality, tj. mechanismu interakcí, tak i co do kvantity, tj. velikosti vzájemně působících sil. [11, 17, 18, 19, 20]

Přístroje, na nichž se chromatografická separace provádí, se nazývají chromatografy. Důležitou součástí chromatografu je detektor, který detekuje složku vycházející z kolony. Signál z detektoru se následně zpracuje ve formě chromatogramu. [19]

Interakce složek v chromatografickém systému mohou být posuzovány ze dvou hledisek. V makroměřítku jde o rovnováhy mezi dvěma fázemi, v mikroměřítku jde o charakter intermolekulárních sil. Pro potřeby chromatografie je vhodnější se zabývat fázovými rovnováhami podle základních principů uvedených v tabulce (Tab. 1). Následující popis jednotlivých mechanismů je zjednodušený, situace v reálných chromatografických systémech je složitější. [16]

Tab. 1: Rozdělení chromatografických metod podle separační funkce [17]

Separací mechanismus	Chromatografická metoda	Zúčastněné fáze stacionární - mobilní
adsorpce	Adsorbční chromatografie plynová (GSC)	tuhá fáze (adsorbent) – plyn
	adsorpční chromatografie kapalinová na koloně (LSC) nebo na tenké vrstvě (TLC)	tuhá fáze (adsorbent) - kapalina
rozdělování (rozdělovací rovnováha)	plynová rozdělovací chromatografie (GLC)	kapalina (zakotvená fá- ze) – plyn
	kapalinová rozdělovací chromatografie na koloně (LLC) nebo na tenké vrstvě (TLC) nebo na papíře (PC)	kapalina (zakotvená fá- ze) - kapalina
sítový efekt (afinitní chromatografie)	plynová chromatografie na molekulár- ních sítích (GSC)	tuhá fáze (mol. síto) - plyn
	gelová permeační chromatografie (GPC)	kapalina v pórech gelu - kapalina
chemická reakce – chemi- sorbce – výměna iontů	kapalinová ionexová chromatografie (IEC)	tuhá fáze (ionex) – kapa- lina

Nejčastěji používané chromatografické metody:

Adsorpční kapalinová chromatografie LSC využívá mezimolekulových přitažlivých sil mezi stacionární fází a analytem. Dělicím mechanismem je adsorpce separovaných látek na povrchu sorbentu. Adsorpční děj je charakterizován adsorpční izotermou. Liší-li se dostatečně od sebe adsorpční izotermie separovaných látek, dochází při průchodu kolonou k jejich rozdělení do jednotlivých pásů. [15, 18, 19]

Rozdělovací chromatografie je založena na tom, že o separaci rozhoduje odlišná rozpustnost složek vzorku ve stacionární fázi a mobilní fázi. V rozdělovací kapalinové chromatografii LLC se analyty rozdělují mezi dvě nemísitelné kapalně fáze. Mobilní fáze unáší analyty, stacionární fází je kapalina zakotvená na pevném nosiči. Retenční čas analytů závisí na tom, jak jsou rozpustné v každé z obou fází rozdílné polarity. [15, 18, 19]

V **gelové permeační chromatografii GPC** jsou molekuly separovány podle své velikosti. Dochází k rozdělování látek mezi pohyblivou část mobilní fáze, která se nachází mezi jednotlivými zrny gelu, a nepohyblivou část mobilní fáze, nacházející se uvnitř pórů gelu. Při průchodu kolonou jsou molekuly složek zdržovány v důsledku svého pronikání do rozpouštědlem naplněných pórů. [15, 18, 19]

Afinitní chromatografie využívá k dělení směsi látek jejich specifických biochemických vlastností. Stacionární fázi tvoří vhodným způsobem upravený gel. Izolací na základě rozdílné biochemické afinity lze využít v nejrůznějších kombinacích, například izolace bílkovin vytvářejících komplexy s vitaminy, hormony nebo peptidy; izolace protilátek na sloupci s vázanými antigeny. [18, 19]

Iontově měničová chromatografie IEC může být charakterizována jako výměnná adsorpce. Stacionární fází je měnič iontů. Tím je makromolekulární matrice (polystyren, celulóza, dextran aj.) s vhodnými funkčními skupinami kyselé nebo zásadité povahy. Každá funkční skupina je pevně vázaným iontem, na který je iontovou vazbou připojen protion s opačným nábojem. Ten je vyměňován iontem obsaženým v mobilní fázi. Při tom se uplatňují elektrostatické přitažlivé síly. [18, 19]

2.3.1.1 Kapalinová chromatografie

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Na rozdíl od plynové rozhodují o separaci složek vzorku nejen jejich interakce se stacionární fází, ale velmi výrazně i použítá mobilní fáze. Během separace se analyt rozděluje mezi mobilní a stacionární fázi. Čas, jaký stráví v jedné nebo v druhé fázi, závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Jsou využitelné všechny možné mechanismy separace – adsorbce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt nebo specifické interakce v afinitní chromatografii. [17, 18, 19]

Planární chromatografie patří mezi instrumentálně nejjednodušší variantu kapalinové chromatografie s širokým praktickým uplatněním. Planární chromatografie se obvykle dělí podle typu použité stacionární fáze na papírovou chromatografii (PC), kde dochází k separaci na proužku papíru, a na tenkovrstevnou chromatografii (TLC) se stacionární fází tvořenou tenkou vrstvou sorbentu. [11, 15, 18, 19]

U **papírové a tenkovrstevné chromatografie** se využívá prakticky výhradně tzv. vzeštné uspořádání, kdy spodní okraj papíru (tenké vrstvy) je smáčen mobilní fází, k jejímu

průtoku papírem (tenké vrstvy) dochází k vzlínání. Aby se zabránilo vysychání mobilní fáze z vrstvy papíru (tenké vrstvy), je celé zařízení umístěno v uzavřené nádobě nasycené párami mobilní fáze. [11, 15, 18]

Chromatografie na koloně - často jsou používány tři varianty kapalinové chromatografie. Nízkotlaká kolonová chromatografie, která se pro analytické účely využívá jen výjimečně a nachází uplatnění převážně v oblasti preparativní, při čištění směsi látek. Zejména pro svoji jednoduchost a nenáročnost provedení se pro analytické i mikropreparativní účely používá technika planární chromatografie. V současnosti má však v analytické chemii dominantní postavení vysokotlaká vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). [11]

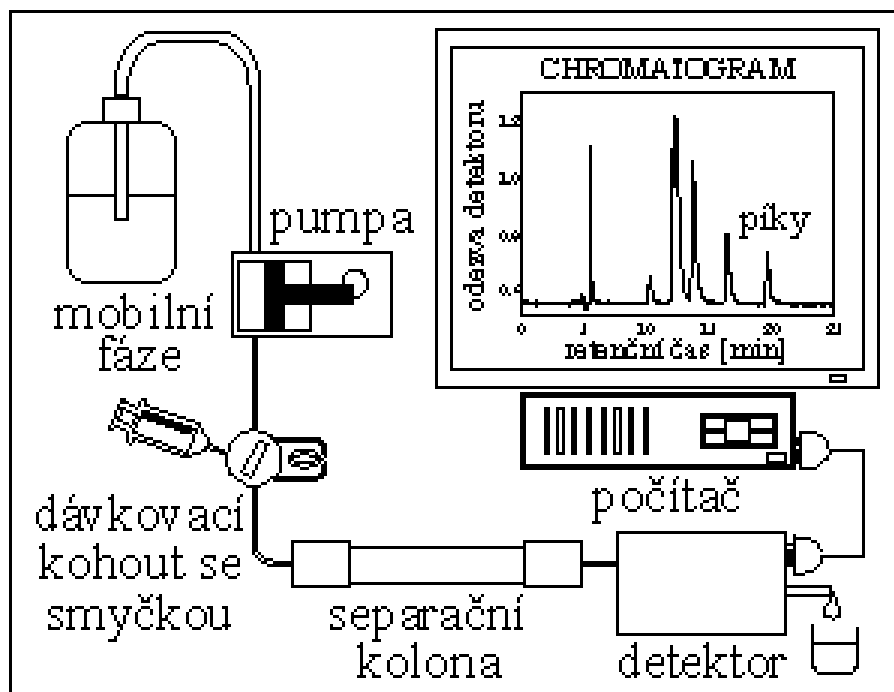
Chromatografie na reverzních fázích – jde o zakotvení nepolární stacionární fáze (modifikovaný silikagel, parafinový olej, laurylalkohol). Mobilní fáze musí opět splňovat podmínku vzájemné nerozpustnosti, bývá to směs polárních organických rozpouštědel (methanol, acetotintril, aceton), vždy v určitém poměru s vodou. Pojem reverzní fáze je odvozen z toho, že pořadí separovaných složek se v tomto systému obrací. [16, 21]

Klasické kolonové provedení chromatografu nemá potřebnou účinnost, ale stalo se základem **HPLC**. K účinné separaci je třeba použít dostatečně malých zrníček sorbentu, která kladou prostupující kapalině značný odpor. Proto je nutno pracovat při vysokém tlaku. Přístroj pro HPLC se skládá z čerpadla mobilní fáze, dávkovacího zařízení, kolony a detektoru (Obr. 1). [11, 18]

Tok mobilní fáze je zajišťován **vysokotlakým čerpadlem**. V HPLC jsou používány dva základní typy čerpadel – lineární a reciproční. Lineární čerpadlo se skládá z pístu, který se pohybuje v pracovním válci. Mobilní fáze je před analýzou naplněna do válce a posuvem pístu následně vytlačována do dávkovacího ventilu a separační kolony. Výhodou tohoto čerpadla je bezpulzní provoz, principiálním nedostatkem je nemožnost změny složení během analýzy. Tento nedostatek však eliminuje v současnosti nejčastěji používané reciproční uspořádání čerpadla, kde píst ve válci periodicky nasává a vytlačuje mobilní fázi. [11, 18]

Dávkování vzorku. Přesně definovaný objem vzorku musí být nastříknut do proudu mobilní fáze protlačované kolonou pod velkým tlakem. Při dávkování nesmí dojít k výrazným fluktuacím průtokové rychlosti mobilní fáze. K dávkování se běžně používá šesticestný ventil s dávkovací smyčkou definovaného objemu. [11]

Obr. 1: Části kapalinového chromatografu [6]



Separační kolony používané v HPLC musí odolat vysokému tlaku mobilní fáze. Kolony jsou naplněny vhodnou stacionární fází (nejčastěji silikagel). V HPLC jsou běžně používány hydrofobní stacionární fáze s navázanými uhlovodíkovými funkčními skupinami, stacionární fáze je pojmenována podle délky uhlovodíkových řetězců (např. C8-oktyl). Jako ochrana hlavní kolony jsou hodně používány předkolony umístěné mezi čerpadlo a dávkovací zařízení nebo ochranné kolony umístěné mezi dávkovací zařízení a analytickou kolonu. Způsobují jen malé rozšíření píků a chrání kolonu před nečistotami a nerozpustnými materiály. [11, 18]

Detektory v chromatografii zaznamenávají rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující eluovanou složku. Jsou umístěny zpravidla na konci kolony a analyzují efluent. Mobilní fáze se může skládat z několika komponent a také zóna eluující z kolony může obsahovat směs několika složek. Detektor potom zaznamenává celkovou změnu některé vlastnosti efluentu. [11, 16, 17]

Nejjednodušší detekce u chromatogramů se provádí u chromatografie na papíře a tenké vrstvě. Po vyjmutí chromatogramu se nejprve nechá odpařit rozpouštědlo. Z fyzikálních způsobů detekce se nejčastěji používá pozorování v ultrafialovém světle, a to buď přímo, nebo po aplikaci některých činidel. Řada organických látek sama fluoreskuje po ozáření ultrafialovým světlem vyšších vlnových délek. [15]

Nejběžněji používaný **fotometrický detektor (UV/VIS)** umožňuje sledovat absorpenci látek vystupujících z chromatografické kolony. Základem detektoru je průtočná křemenná měrná cela, spojená s výstupem chromatografické kolony. Přes stěnu kyvety prochází světelný paprsek přicházející ze zdroje přes fokusační čočku a štěrbinu. Typ světelného zdroje závisí na sledovaném oboru vlnových délek, pro ultrafialovou oblast (200 nm – 350 nm) se používá deuteriová výbojka, pro oblast viditelného záření (350 nm – 700 nm) halogenová žárovka. Za měrnou celou je umístěna disperzní mřížka a vhodný detektor dopadajícího záření. Fotometrický detektor pracující v ultrafialové oblasti je pro organické látky prakticky univerzální. [11, 18]

Hmotnostní spektrometr (MS) má v kapalinové chromatografii nezastupitelný význam. Ionty jsou v hmotnostním spektrometru analyzovány kvadrupólovým analyzátozem nebo ještě méně místa vyžadující iontovou pastí, kde je prostor analýzy iontů společný s iontovým zdrojem. Pro každou složku lze získat její hmotnostní spektrum a identifikovat ji porovnáním jejího spektra s knihovnou spekter sloučenin. [11, 18]

Alternativně je možné v HPLC použít **elektrochemické detektory**. Ampérometrické detektory se využívají pro detekci látek, jež je možno elektrochemicky redukovat či oxidovat. [11, 18]

V iontové chromatografii je při analýze anorganických iontů běžně používán **detektor vodivostní**. [11, 18]

Vyhodnocování výsledků v kapalinové chromatografii i k identifikaci látek je využíváno retenčního času či retenčních objemů. Ke zjišťování množství chromatografovaných látek se využívá většinou velikosti ploch pod elučními křivkami (ploch píků), méně často i výšek píků. Retenční objemy jsou vyhodnocovány ze vzdálenosti elučního maxima od nástřiku, který je přepočítán na eluční objem za pomoci známé rychlosti posunu a objemové průtokové rychlosti mobilní fáze. [17]

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je pokročilou a instrumentálně náročnou technikou kapalinové chromatografie. V HPLC je dosahováno vysoké účinnosti separačního procesu použitím kolon naplněných stacionární fází o malé a dobře definované velikosti částic. Separační kolony pro HPLC se vyznačují vysokou hustotou a homogenitou náplně stacionární fáze a tedy i velkým hydrodynamickým odporem. Pro dosažení dostatečného průtoku mobilní fáze je nutno aplikovat přetlak jednotek až desítek MPa. [11]

2.3.1.2 Kapalinová chromatografie v nadkritickém stavu

Zajímavou alternativou, stojící svou podstatou mezi plynovou a kapalinovou chromatografií, je metoda kapalinové chromatografie v nadkritickém stavu (Supercritical Fluid Chromatography - SFC). U této metody je mobilní fází plyn při nadkritické teplotě, proto při stlačení nemůže zkapalnět, ale stává se tzv. kapalinou v nadkritickém stavu. Svou viskozitou se blíží plynné fázi a hustotou fázi kapalné. Takovou mobilní fází lze díky nízké viskozitě protlačovat náplňovými i kapilárními kolonami bez použití extrémně vysokých tlaků a dochází k rychlému ustavování rovnováh se vzorkem. [11]

Dosahované hodnoty separační účinnosti jsou srovnatelné s metodou GC. Současně, v důsledku vysoké hustoty, zůstává zachována její dobrá rozpouštěcí schopnost. Metoda SFC umožňuje analyzovat i látky netěkavé, aplikační oblast je srovnatelná s metodou HPLC. Vzhledem k cenové náročnosti instrumentace a ceně vlastní analýzy není tak široce uplatněna jako metody GC a HPLC. [11]

3 STANOVENÍ HYDROFILNÍCH VITAMINŮ

Vitaminy jsou nízkomolekulární organické sloučeniny. Jejich stanovení v potravinách je obtížné, protože jsou v potravinách obsaženy ve velmi nízkých koncentracích. Většina vitaminů je velmi citlivá k oxidaci a někdy i na světelné záření. Proto je často nutné provádět analytické operace s maximální opatrností v prostředí inertní atmosféry a sníženého přístupu přímého denního světla a UV záření. Vitaminy jsou natolik chemicky heterogenní, že pro ně nelze použít žádnou univerzální metodu ke stanovení celé skupiny vitaminů. [14, 15]

3.1 Stanovení thiaminu

Před vlastním stanovením je nutno nejprve thiamin izolovat, eventuálně uvolnit z vázaných forem enzymatickou hydrolyzou, nejčastěji takadiastazou nebo β -amylasou, nebo kyselou hydrolyzou pomocí kyselin – HCl, H₂SO₄. Thiamin se v potravinách stanovuje fluorimetrickou metodou, chromatografickou metodou (HPLC) a rovněž ho lze stanovit i mikrobiologickými metodami a GC. [5, 14, 15, 21, 22]

Thiochromová (fluorimetrická) metoda

Thiamin se po extrakci izopropanolem čistí chromatograficky na ionexech. V eluátu se následně thiamin zoxiduje v alkalickém prostředí hexakynoželezitanem draselným na thiochrom, který se stanoví fluorimetricky - měřením přímé žlutozelené fluorescence nebo měřením modré fluorescence thiochromu. Jako mobilní fáze byla použita směs metanolu a vody (40:60). Vlnové délky při detekci byly 360 nm a 425 nm. [14, 15, 22]

Fluorimetrická metoda stanovení thiaminu je vhodná pro všechny druhy potravinářských materiálů. Metoda je velmi citlivá a pro thiamin specifická. Je však nutné ostatní fluoreskující látky chromatograficky oddělit, nejlépe za použití křemičitanového adsorbentu. [15]

Mikrobiologická metoda

Pro stanovení obsahu vitamínu B₁ v potravinách se sleduje růst testovaného mikroorganismu (*L. fermentum*, *L. viridescens*). Konkrétně se pozorují změny obsahu sušiny vázkovým stanovením nebo se stanoví množství mikroorganismů turbidimetricky případně metabo-

lická aktivita CO₂ manometricky nebo úbytek pyruvátu – spektrofotometricky. [14, 15, 22, 23]

GLC

Thiamin lze stanovovat rovněž pomocí plynové chromatografie s FPD detektorem. Nejdříve je provedena hydrolyza vzorku. Poté proběhne derivatizace hydrogensířičitanem sodným a extrakce těkavého 5-(2'-hydroxyethyl)-4-methylthiazolu. Jako stacionární fáze se může použít 10 % Carbowax. Detekce pomocí FPD je provedena při teplotách 230 °C. [22]

HPLC

Ke stanovení thiaminu pomocí metody HPLC jsou používány různé detektory. Nejčastěji používané jsou fluorescenční a UV/VIS detektor. [22]

Stanovení thiaminu metodou HPLC s fluorimetrickou detekcí se provádí při vlnových délkách 356 nm a 425 nm. Rovněž jako u fluorimetrické metody je nejdříve provedena extrakce, chromatografické čištění vzorku a oxidace na thiochrom. Jako mobilní fáze se může použít například směs methanol-voda (40:60). [22]

Dánský chemik stanovoval thiamin metodou HPLC s fluorescenční detekcí ve vzorcích mléčných výrobků, masa, zeleniny (zelí, brokolice), obilovin (ovesné, pšeničné otruby, mouka) a sušených kvasnic. Pro hydrolyzu aktivních forem vitamínu B₁ byla použita enzymová směs složená z α -amylázy, proteinázy a fosfatázy. Byla použita kolona LC18. Jako mobilní fáze byl použit metanol s pufrem (35:65), složeným ze směsi sulfonátu sodného, chloridu amonného a dihydrogenfosforečnanu draselného, v isokratické eluci, pH bylo upraveno na 3,3. Vlnové délky při fluorescenční detekci byly 468 nm a 520 nm. Ve vzorcích byl stanoven obsah thiaminu v tomto pořadí: kvasnice, brokolice, pšeničné otruby, vepřová játra, mléko a nejméně v pšeničné mouce. [24]

Polští vědci stanovovali vitamin B₁ v ovocných džusech metodou HPLC s ultrafialovou detekcí. Kombinací kyselé a enzymatické hydrolyzy se uvolnily vázané bílkoviny a fosforylované vitaminy. Následně byla použita analýza pomocí HPLC. Analýza byla provedena na koloně LC18 s použitím mobilní fáze, která se skládala z methanolu a fosfátového pufru (10:90) a trimethylaminu (pH 3,55). Při UV detekci byla použita vlnová délka 283 nm. Obsah thiaminu v jablečném džusu byl pouze 0,012 mg/100g, kdežto v obohacených džusech bylo 0,204 mg/100g. [25]

El-Arab a kol. stanovovali vitamin B₁ v potravinách (pečivo, cereálie, ovoce, zelenina, mléčné výrobky, maso a vejce) metodou HPLC s fluorescenční detekcí. Thiamin byl hydrolyzován kyselinou chlorovodíkovou. Byla použita kolona C18. Jako mobilní fáze byla použita směs metanolu s acetonitrilem, vodou a hydroxidem amonným (5:95). Fluorescenční detekce byla provedena při dvou vlnových délkách – 360 nm a 436 nm. Bylo zjištěno, že obsah thiaminu v potravinách je v následujícím pořadí: brambory, rybí maso, pšenice, karotka, vejce, arašídý, med a nejméně v mléku. [26]

3.2 Stanovení riboflavinu

Pro stanovení riboflavinu se využívá několik metod – fluorimetrická metoda, chromatografické i mikrobiologické metody. Nejpoužívanější metodou je ale především HPLC s širokým rozsahem použitelnosti a dobrou přesností analýzy umožňující stanovení malých množství látek s vysokým rozlišením. Riboflavin ve vyšších koncentracích lze stanovit polarograficky. [5, 22, 27]

Lumiflavinová (fluorimetrická) metoda

Riboflavin se také často stanovuje fluorimetrickými metodami založenými na měření přímé žlutozelené fluorescence nebo na měření modré fluorescence lumiflavinu, který vznikl fotolýzou v alkalickém prostředí. Tuto metodu lze použít pro veškerý potravinářský materiál rostlinného i živočišného původu a pro farmaceutické preparáty. Lumiflavinová metoda stanovení riboflavinu je velmi citlivá a lze jí stanovit 0,05-1 µg riboflavinu v 1 ml extraktu vzorku. Riboflavin se ze vzorku uvolní kyselou a enzymovou hydrolýzou, po zalkalizování se převede ozáření na lumiflavin, který se stanoví po extrakci fluorimetricky například při vlnových délkách 360 nm a 500 nm. [14, 15, 22]

Mikrobiologická metoda

Pro stanovení obsahu vitamínu B₂ v potravinách se sleduje růst testovaného mikroorganismu (*L. rhamnosus*, *Enterococcus faecalis*). Konkrétně se pozorují změny obsahu sušiny vážkovým stanovením nebo se stanoví množství mikroorganismů turbidimetricky případně metabolická aktivita CO₂ manometricky nebo úbytek pyruvátu – spektrofotometricky. [14, 15, 22, 23]

HPLC

Při stanovení pomocí HPLC metody se používají různé detektory např. fluorescenční, UV-VIS.

Pro rutinní analýzu riboflavinu, flavinmononukleotidu a flavinadenindinukleotidu ve víně, pivě a ovocných džusech byla vyvinuta přímá metoda HPLC bez izolačního kroku s fluorescenční detekcí. Riboflavin, flavinmononukleotid a flavindinukleotid jsou hlavními činiteli odpovědnými za „světelnou chuť“, která se rozvíjí u některých bílých vín a jiných nápojů, pokud jsou vystaveny světlu, díky tvorbě sirných sloučenin, které vytvářejí cibulový nebo česnekový zápach. Pro zlepšení selektivity byly vitamínové formy sledovány při 2 vlnových délkách: 265 nm a 525 nm. Byla použita kolona Hypersil C18, mobilní fáze: NaH_2PO_4 s H_3PO_4 (pH 3,0) a acetonitril. Nejvyšší obsah riboflavinu byl v pivech, v bílých vínech a nejméně v ovocných džusech. [28]

Riboflavin byl stanovován Sikorskou a kol., metodou HPLC s fluorescenční detekcí opět v pivu. Analýza riboflavinu byla provedena na koloně C18. Byla použita mobilní fáze - methanol a NaH_2PO_4 (pH 3,0) s gradientovou elucí. Vzorok piva byly nadávkovány přímo na HPLC kolonu. Riboflavin byl detekován při 450 nm a 530 nm. Obsah riboflavinu v pivě byl zjištěn v rozmezí 0,169-0,508 mg/l. [29]

Kanadští vědci provedli stanovení riboflavinu, FMN a FAD v živočišných potravinách také pomocí HPLC s fluorescenční detekcí. Ze vzorků byly extrahovány formy riboflavinu methanolem, methylchloridem a citrátovým pufrům. Byly použity dvě kolony v sérii PLRP-S. Mobilní fáze se skládala z acetonitrilu a citrát-fosfátového pufru (pH=5,50). Detekce byla provedena při vlnových délkách 450 nm a 522 nm. Nejvyšší obsah riboflavinu byl nalezen v hovězích játrech, dále v hovězím steaku a vejci na tvrdo a nejméně v pasteurizovaném mléku. [30]

Polští vědci stanovovali riboflavin a jeho deriváty (FAD, FMN) v živočišných potravinách (vejci a mléčných výrobcích) metodou HPLC s fluorescenční detekcí. Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu s octanem amonným (pH 6,0). Byla použita kolona C18 v reverzní fázi. Riboflavin byl detekován při dvou vlnových délkách 450 nm a 530 nm. Obsah thiaminu byl stanoven v následujícím pořadí: vejce, jogurt, kefir, acidofilní mléko a podmáslí. [31]

Kramářová a kol. stanovovali riboflavin v játrech (hovězích, vepřových, kuřecích a krůtích) metodou HPLC s UV-VIS detekcí. Pro izolaci vitamínu B_2 vázaného v potravinách

byla provedena kyselá hydrolýza pomocí HCl s přidavkem kys. trichloroctové. Jako vhodná mobilní fáze byla zvolena směs octanu sodného (pH 4,5) a methanolu s gradientovou elucí. Signál byl snímán detektorem při vlnové délce 270 nm. Vzorky obsahovaly vitamin B₂ v následujícím pořadí: vepřová játra, hovězí játra, kuřecí játra a krůtí játra. [27]

3.3 Stanovení niacinu

Pro stanovení nikotinové kyseliny a jejího amidu v potravinách se používají metody spektrofotometrické, chromatografické a mikrobiologické. V současnosti se nikotinová kyselina a nikotinamid stanovují především kapilární elektroforézou a chromatografickými metodami, jako jsou metoda HPLC a GC. [5, 14, 15, 22]

Ke konverzi nikotinamidu na kyselinu nikotinovou může být použita kyselá nebo enzymatická hydrolýza (takadiastaza, papain nebo klarasa). Extrakt může být přečištěn například technikou záměnné extrakce na tuhé fázi (SPE). [14, 21, 32]

Spektrofotometrická metoda

Před samotnou spektrofotometrickou metodou musí být niacin uvolněn ze vzorku kyselou hydrolýzou. Detekce niacinu je založena na barevné Königově reakci s bromkyanem. Při detekci se používá dvoustupňová postkolonová derivatizace chloraminem T a kyanidem draselným při 60 °C s UV detekcí při 410 nm. [5, 14, 15, 22]

Mikrobiologická metoda

Pro stanovení niacinu v potravinách se také používá mikrobiologická metoda, která je založena na sledování růstu mikroorganismu (*Lactobacillus plantarum*). Pozorují se změny obsahu sušiny vážkovým stanovením nebo se stanoví množství mikroorganismů. [33]

HPLC

Při stanovení pomocí HPLC metody se používají různé chromatografické systémy, nejvíce se používá reverzní fáze a iontoměničová chromatografie. [14, 21, 32]

Niacin byl stanoven v mase a rybách metodou HPLC s UV/VIS (DAD) detekcí. Nejdříve byla provedena hydrolýza niacinu kyselinou sírovou. Dále izolovali niacin methanolem a vodou. K separaci byla použita kolona C18 Sep-Pak. Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu a deionizované vody. Niacin byl detekován při vlnové délce 254 nm. Množství

niacinu stanovené pomocí HPLC byl v tomto pořadí: vepřové maso, jehněčí maso, kuřecí maso a nejméně v rybách. [32]

Francouzští vědci stanovovali kyselinu nikotinovou a nikotinamid v potravinách (hrášek, špenát, hovězí svíčková, vepřový řízek, kvasnice, pšeničná mouka, rýže a arašídý) pomocí HPLC s fluorimetrickou detekcí. Extrakce byla provedena enzymatickým postupem pomocí NAD glykohydrolasy, která byla navržena jako náhrada za hydrolýzu kyselinou chlorovodíkovou, která se obvykle používá. Při stanovení byla použita kolona C18 HDO a jako mobilní fáze byl použit roztok dihydrogenfosforečnanu draselného, peroxidu vodíku a síranu měďnatého. Pro zlepšení selektivity byly vitamínové formy sledovány při 2 vlnových délkách 322 nm a 380 nm. Niacin byl v největším množství obsažen v kvasnicích, vepřovém řízku, hovězí svíčkové a arašídech. [34]

Kapilární elektroforéza (CE)

Australští vědci stanovovali niacin v mase a ve vzorcích ryb pomocí kapilární elektroforézy. K separaci byla použita kolona C18. Extrakce byla provedena pomocí extrakce na tuhé fázi (SPE). Separace niacinu byla provedena při +25 kV a jako mobilní fáze byla použita směs obsahující acetonitril, dihydrogenfosforečnan draselný a hydrogenfosforečnan sodný. Niacin se detekuje při vlnové délce 254 nm. Množství niacinu stanovené pomocí CE bylo nejvyšší ve vepřovém mase a nejnižší v rybách. [32]

3.4 Stanovení kyseliny pantothenové

Pro stanovení kyseliny pantothenové existuje poměrně málo vhodných chemických metod. Chemické metody založené na stanovení hydrolytických produktů nejsou ve většině případů ani po chromatografickém vyčištění a nakoncentrování pro stanovení této kyseliny v potravinách vhodné. V potravinářských materiálech se nejčastěji stanovuje mikrobiologickými testy, kapalinovou chromatografií, GLC metodou s FID detektorem a jinými detektory. [5, 14, 21, 22]

Na extrakci kyseliny pantotenové se používá kyselá (kyselina chlorovodíková) nebo enzymatická hydrolýza za použití papainu, klarázy, takadiastazy. [21]

GLC

Před samotným stanovením kyseliny pantothenové je nutné provést kyselou hydrolýzu vzorku. Pro detekci je nutná derivatizace kyseliny pantothenové na pantolakton, který se

stanoví GC. Jako stacionární fáze se může použít 10% Carbowax. Detekce pomocí FID se provádí při teplotách 120-220 °C. [22]

HPLC

Francouzští vědci použili pro stanovení obsahu volné kyseliny pantotenové v rostlinných i živočišných potravinách kapalinovou chromatografií s fluorimetrickou detekcí. Tato metoda zahrnuje čištění vzorků na ionexech. Enzymatickou hydrolýzou (pepsin, pantetheinasa a alkalická fosfatáza) před čištěním bylo možné uvolnit vázanou kyselinu pantotenovou, a tak získat všechny vitamín B₅ z těchto potravin. Jako mobilní fáze byl použit methanol a fosfátový pufr (pH 2,5) s gradientovou elucí. Byla použita kolona s reverzní fází. Fluorimetrická detekce byla provedena při vlnových délkách 345 nm a 455 nm. Bylo zjištěno, že nejvíce vitamínu B₅ je obsaženo v následujícím pořadí: kvasnice, vepřová játra, sušené mléko, špenát, karotka a nejméně v hrachu. Vzhledem k nízkému detekčnímu limitu a dobremu rozlišení maxima kyseliny pantothenové by tato metoda mohla být s největší pravděpodobností použita pro stanovení tohoto vitamínu v jakékoli potravine. [12]

Gonthier a kol. stanovovali kyselinu pantotenovou v rostlinných i živočišných potravinách pomocí metody HPLC s fluorescenční detekcí. Analýza vitamínu B₅ v potravinách vyžaduje uvolnění kyseliny pantotenové, přítomné ve vázané formě jako CoA, pouze pomocí alkalické fosfatázy a pantetheinasy. Byly testovány potraviny přirozeně bohaté na vitamín B₅ (např. pekařské droždí, rýže, vepřové ledviny, losos, vejce, sýr Roquefort, avokádo). Kyselina pantothenová byla detekována při dvou vlnových délkách 450 nm a 620 nm. Bylo zjištěno, že obsah kyseliny pantothenové v droždí se liší od ostatních potravin, zřejmě v důsledku toho, že kvasinky v droždí jsou schopny syntetizovat kyselinu pantotenovou. [35]

Pro stanovení vitamínu B₅ v široké škále obohacených potravinářských výrobků (např. cereálie, kojenecká výživa, sója, mléko) byla použita kapalinová chromatografie s detekcí pomocí hmotnostního spektrometru (LC-MS). Pro separaci na koloně C18 s gradientovou elucí, byla použita mobilní fáze složená z vody a acetonitrilu a kyseliny trifluoroctové. Napětí bylo nastaveno na 4500 V. Kvantifikátory iontů používaných pro vitamín B₅ byly 220 a 234. Největší obsah kyseliny pantothenové byl v cereáliích (určených ke snídani), kojenecké výživě a sóji. [36]

3.5 Stanovení pyridoxinu

Ke stanovení pyridoxinu slouží několik metod - spektrofotometrické stanovení a chromatografické metody HPLC a GLC. Dobrých výsledků bylo dosaženo i s použitím mikrobiologických metod, avšak ve většině případů se dává přednost chromatografickému stanovení. [5, 14, 15, 22]

Spektrofotometrická metoda

Spektrofotometrické stanovení je založeno na vzniku modře zbarveného reakčního produktu s 2,6-dichlorchinonchlorimidem. Z rozdílu stanovení v prostředí boratového pufru a dalšího pufru stejného pH, lze stanovit koncentraci pyridoxinu vedle ostatních fenolů, které jinak stanovení ruší. [14, 15, 22]

GLC

Před samotným stanovením je nutná kyselá hydrolyza. Poté proběhne reakce pyridoxalu s ethanolem na poloacetal a převedení vitamínu B₆ na trifluoracetáty. Detekce je provedena například pomocí detektoru ECD při teplotách 125 °C a 205 °C. Tato metoda byla využita například při stanovení vitamínu B₆ v mléce. [22]

Mikrobiologická metoda

Při mikrobiologické analýze H. van den Berg, Kall a kol. použili *Saccharomyces uvarum* jako testovaný mikroorganismus. Vzorke potravin rostlinného i živočišného původu byly extrahovány H₂SO₄ o různé koncentraci poté se sledoval růst kvasinky. Detekce byla provedena pomocí absorbance při 660 nm. Obsah vitamínu B₆ byl zjištěn v tomto pořadí: neloupaná rýže, telecí játra, krůta, vepřové maso, mouka a nejméně v mléku, sýru a jogurtu. [23, 37]

HPLC

Vitamin B₆ byl stanoven v různých potravinách rychlou a citlivou, vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s fluorescenčním detektorem. Vzorke rostlinného původu byly extrahovány kyselinou chlorovodíkovou a následnou enzymatickou hydrolyzou. Byla použita kolona Phenomenex Hypersil C18. Jako mobilní fáze byl použit fosfátový pufr a acetonitril (pH 7,5) s isokratickou elucí. Fluorescenční detekce byla provedena při dvou vlnových délkách 333 nm a 375 nm. Obsah vitamínu B₆ byl zjištěn v následujícím pořadí:

krůta, šunka, losos, vepřové maso, grahamová mouka, pórek banán, neloupaná rýže a nejméně v řeckém sýru. [37]

Francouzští vědci stanovovali obsah vitamínu B₆ v potravinách pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie a fluorescenční detekcí. Jako mobilní fáze byl použit acetonitril s dihydrogenfosforečnanem draselným (pH 2,50). Fluorimetrická detekce byla provedena při dvou vlnových délkách 290 nm a 395 nm. Vitamin B₆ byl stanovován ve vzorcích kvasnic, pšeničných klíčků, cereáliích a mýsli. Pyridoxin byl v největším množství obsažen v kvasnicích a mýsli. [38]

3.6 Stanovení korinoidů

Pro stanovení korinoidů v potravinách se používají mikrobiologické testy a chromatografická metoda (HPLC s fluorimetrickou nebo UV detekcí). Mezi moderní metody pro stanovení kobalaminů patří kapilární elektroforéza a HPLC s detekcí pomocí MS. Pro stanovení korinoidů nejsou vhodné všechny metody stanovení s ohledem na nízké koncentrace korinoidů v potravinách. [5, 14]

Mikrobiologická metoda

Vitamin B₁₂ se běžně stanovuje v potravinářských výrobcích mikrobiologickým rozbořem, který využívá *Lactobacillus leishmanii* jako testovací mikroorganismus. Přestože tato metoda je vysoce citlivá postrádá specifitu. Dalším nedostatkem je, že metoda je časově náročná a ne moc přesná. [13]

HPLC

Pro stanovení vitamínu B₁₂ v potravinách (mléko, maso) byla použita metoda HPLC s UV detekcí. Vitamin B₁₂ byl extrahován z potravinářských výrobků. Enzymatická hydrolýza (pepsinem) před zahájením čištění účinně uvolňuje vázaný vitamin B₁₂, a tím umožňuje stanovit celkový obsah vitamínu B₁₂. Jako mobilní fáze byla použita voda s acetonitrilem a trifluoroctová kyselina s gradientovou elucí. Vitamin B₁₂ byl sledován pomocí UV detektoru při 361 nm. Tato metoda byla úspěšně použita u několika potravinářských výrobků. [13]

Francouzští vědci stanovovali vitamin B₁₂ v živočišných potravinách pomocí HPLC metody s fluorimetrickou detekcí. Extrakce byla provedena pomocí acetátového pufru a pepsini-

nu. Byla použita kolona Lichrospher 100 RP 18. Jako mobilní fáze byl použit methanol a voda s gradientovou elucí. Fluorimetrická detekce byla provedena při dvou vlnových délkách 250 nm a 312 nm. Obsah vitamínu B₁₂ byl zjištěn v následujícím pořadí: vepřová játra, makrela, vejce, mléko a losos. [39]

3.7 Stanovení folacinu

S ohledem na relativně nízký obsah folacinu v potravinách lze pro jeho stanovení použít jen chromatografickou metodou HPLC s UV detekcí a mikrobiologické metody. Chemické ani jiné fyzikálně chemické metody nejsou pro tyto účely dostatečně citlivé. [5, 14]

Mikrobiologická metoda

Hybenová a kol. analyzovali kyselinu listovou v různých odrůdách pšenice. Foláty stanovovali mikrobiologickou metodou s použitím kmene *Lactobacillus rhamnosus*. Obsah folátů byl v jednotlivých vzorkách rozdílný, pohyboval se v rozmezí 0,264 až 0,792 mg/kg. Nejnižší obsah folátů stanovili v české odrůdě Leguan a nejvyšší v německé odrůdě Kris. Obsah folárů uváděný v literatuře se značně lišil. [40]

HPLC

Jastrebova a kol. stanovovali folacin v zelenině HPLC metodou s fluorescenční detekcí. Metoda zahrnovala extrakci folacinu puřem, poté enzymatickou hydrolýzu konjugazou a čištění extraktu prostřednictvím extrakce na tuhé fázi (SPE). Chromatografická separace folátů byla provedena na koloně Zorbax C8. Jako mobilní fáze byla použita směs fosforečnanu draselného (pH 2,3) a acetonitrilu s gradientem. Fluorescenční detekce byla provedena při vlnových délkách 290 nm a 360 nm. Zjistili, že kultivační rozdíly a růstové podmínky neměly výraznější vliv na obsah folacinu v červené řepě. Zpracování má za následek značné ztráty folacinu, přičemž ztráty během skladování zeleniny se zdají být malé. [41]

Ndaw a kol. stanovovali folacin v potravinách pomocí kapalinové chromatografie s fluorimetrickou detekcí. Jako mobilní fáze byl použit acetonitril a fosfátový puřr s gradientovou elucí. Fluorimetrický detektor pracoval při vlnových délkách 295 nm a 356 nm. Folacin byl stanovován v kvasnicích, špenátu, hovězích játrech, hovězí svíčkové a hrášku. Největší obsah folacinu byl stanoven v kvasnicích a v hovězích játrech. [42]

3.8 Stanovení vitamínu C

Pro stanovení kyseliny askorbové se využívá několik metod: titrační metoda, spektrofotometrická metoda, GLC, polarografická, enzymová metoda. Avšak nejpoužívanější metoda je HPLC s širokým rozsahem použitelnosti a dobrou přesností analýzy. K běžně používaným detektorům k HPLC na stanovení vitaminů patří DAD detektor (UV/VIS) a elektrochemický detektor (ECD). [14, 43]

Při všech typech stanovení kyseliny askorbové jsou velmi důležité podmínky extrakce, protože kyselina askorbová je velmi nestabilní. Při extrakci se stabilizuje zajištěním nízkého pH, přítomností komplexotvorných látek a redukujících látek (kyselina šťavelová, zředěná kys. chloristá, kys. fosforečná za přítomnosti EDTA a siřičitanu sodného). [21]

Titrační metoda

Titrační metoda je založená na tom, že kyselina askorbová se v kyselém prostředí oxiduje 2,6-dichlorfenolindofenolem na kyselinu L-dehydroaskorbovou a 2,6-dichlorfenolindofenol se redukuje na bezbarvou bázi. Prvním přebytkem odměrného roztoku se vzorek zbarvuje do růžova. Metoda je vhodná pro většinu potravinářských výrobků a je velmi rychlá. [14, 15, 22]

Kyselina askorbová se může stanovit jodometrickou titrací, kdy se v kyselém prostředí oxiduje jodem na kyselinu dehydroaskorbovou. Odměrným roztokem pro stanovení kyseliny askorbové je roztok jodu. Jako indikátor se používá škrobový maz. Reakce probíhá v kyselém prostředí. Thiosíran se oxiduje na tetrathionan sodný do tmavě modrého zbarvení. [44]

Spektrofotometrická metoda

Tato metoda stanovení vitamínu C je založena na měření vzniklého barevného produktu, který poskytuje kyselina dehydroaskorbová, vzniklá oxidací bromovou vodou z kyseliny askorbové s činidlem s 2,4-dinitrofenylhydrazinem. [14, 22]

Polarografická metoda

Polarografická metoda využívá ke stanovení kyseliny askorbové její oxidace na rtuťové kapkové elektrodě a redukce chinoxalinového derivátu, který vzniká kondenzací kyseliny dehydroaskorbové s o-fenylldiaminem. Tato metoda je velmi specifická a lze ji použít k stanovení vitamínu C ve všech potravinářských materiálech. [14, 15, 22]

GLC

Tato metoda je založena na stanovení dehydroaskorbové kyseliny po redukci sirovodíkem. Redukce probíhá po převedení kyseliny askorbové na trimethylsilylderivát. Vitamin C se detekuje pomocí FID detektoru. [22]

HPLC

Pro stanovení vitaminů se nejčastěji používá metoda HPLC s různou detekcí (elektrochemickou, UV a jinou). [14]

Škrovánková a kol. stanovovali vitamin C pomocí HPLC-ECD. Byla použita kolona SUPELCOSIL – LC 8. Jako vhodná mobilní fáze byla zvolena směs $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_3\text{PO}_4:\text{H}_2\text{O}$. Vzhledem k nenáročnosti zvolených matric (ovoce a zelenina) bylo možné provést extrakci vitaminu C přímo touto mobilní fází. Signál byl snímán elektrochemickým detektorem (ECD) s kanály 600 mV a 650 mV. Bylo zjištěno, že obsah vitaminu C je v následujícím pořadí: paprika, grep, citron a kiwi. [43]

Iwase a Ono stanovovali kyselinu askorbovou v potravinách (mléko pro kojence, džusech) metodou HPLC s elektrochemickým detektorem. Byla použita kolona Inertsil ODS-3 v reverzní fázi. Jako mobilní fáze byla použita kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), fosforečnan draselný (pH 3). Signál byl snímán elektrochemickým detektorem (ECD) s kanálem 400 mV. Bylo zjištěno, že nejvyšší obsah kyseliny askorbové je přítomno v mléku pro kojence, jablečném a pomerančovém džusu. [45, 46]

Italští vědci stanovovali kyselinu askorbovou v potravinách (ovoce, zelenina, mléčné výrobky) pomocí HPLC metody s elektrochemickou detekcí. Jako mobilní fáze byla použita kyselina sírová s isokratickou elucí. Signál byl snímán elektrochemickým detektorem (ECD) s kanálem 750 mV. Obsah kyseliny askorbové byl zjištěn v následujícím pořadí: ananasový džus, grapefruit, mléko, jahodový jogurt a meruňkový jogurt. [47]

Švýcarští vědci stanovovali vitamin C v potravinách (kojenecké výživa, snídaňové cereálie, nápoje, kompoty) metodou HPLC s UV detekcí. Byla použita kolona Li Chrospher RP-18. Jako mobilní fáze byla použita směs: decylaminu, acetonitrilu a octanu sodného (pH 5,4). UV detektor pracoval při vlnové délce 265 nm. Obsah vitaminu C byl zjištěn v následujícím pořadí: sojové mléko pro kojence, snídaňových cereáliích, pomerančovém džusu a nejméně v jablečných a meruňkových kompotech. [48]

3.9 Společné stanovení vitaminů

Stanovení jednotlivých vitaminů je časově i finančně náročné, proto je mnohdy výhodnější společné stanovení více vitaminů najednou.

Stanovení thiaminu a riboflavinu

Thiamin a riboflavin, resp. jejich vázané formy se uvolní ze vzorku potravin kyselou a enzymovou hydrolýzou. Bílkoviny se odstraní vysrážením s kyselinou trichloroctovou. Riboflavin se stanoví přímou fluorimetrickou metodou, thiamin po oxidaci na thiochrom. Metody lze použít pro všechny druhy potravin obsahující vyšší množství thiaminu a riboflavinu. Výhodou této metody je rychlost. [15]

Barna a Dworschák stanovovali thiamin a riboflavin v živočišných potravinách pomocí HPLC s UV detekcí. Byla provedena kyselá hydrolýza homogenizovaných vzorků, dále enzymatická hydrolýza (klaradiastáza). Po extrakci bylo provedeno současně probíhající stanovení thiaminu a riboflavinu. Jako mobilní fáze byl použit fosfátový pufr (pH = 3,0) a acetonitril (84:16). UV detekce byla provedena při vlnové délce 254 nm. Touto metodou lze stanovit oba vitaminy zároveň. Obsah vitaminů byl zjištěn v následujícím pořadí: - thiaminu: vepřová šunka, kotleta, žebra; riboflavinu: vepřová játra, šunka a kotleta. [49]

Francouzští vědci kontrolovali ztráty thiaminu, riboflavinu při mletí a pečení pšeničného chleba metodou HPLC s fluorescenčním detektorem. Vzorky byly hydrolyzovány kyselou fosfatázou, papainem, α -amylázou a β -glukosidázou. Byla použita kolona μ Bondapak C18 s mobilní fází octan sodný-methanol (30/70, pH 6). Vitaminy byly detekovány při různých délkách: thiamin – 365 nm a 435 nm; riboflavin – 422 nm a 522 nm. Bylo zjištěno, že největší obsah vitaminů je v chlebu, pokud se použije dlouhá fermentace chleba. [50]

Stanovení thiaminu, riboflavinu a pyridoxinu

Ndaw a kol. stanovovali thiamin, riboflavin a vitamin B₆ v potravinách (např. droždí, mléko, maso, makrela, pšenice, rýže a mrkev) metodou HPLC s fluorescenční detekcí. Nejprve byla provedena hydrolýza kyselinou chlorovodíkovou v kombinaci s enzymatickou hydrolýzou (α -amyláza, papain a kyselá fosfatázy). K separaci byla použita kolona RP 18 a jako mobilní fáze methanol a acetonitril. Zjištěný obsah vitaminů v potravinách byl následující: thiaminu – nejvíce v kvasnicích a nejméně v makrele; riboflavinu – nejvíce v kvasnicích a

mléku, nejméně v rýži a ovse; pyridoxinu – nejvíce v kvasnicích a vepřovém mase, nejméně v hrachu a pšenici. [51]

Stanovení více hydrofilních vitaminů

Wojciechowski a kol. stanovovali hydrofilní vitaminy (thiamin, riboflavin, vitamin B₆ a niacin) ve vitaminových směsích FTIR spektroskopii. FTIR se zdá být vhodná pro rychlé a nízko-nákladové analýzy směsi vitaminů. Kvantitativní analýza vycházela z doplňkové povahy Beerova zákona. S ohledem na tradiční postupy, jedna analýza je asi desetkrát méně nákladná a vyžaduje pouze 1 g více-vitaminové směsi. [52]

Švýcarští vědci stanovovali hydrofilní vitaminy (thiamin, kyselina askorbová, nikotinamid, pyridoxin, pantothenát vápenatý, kyselina listová, kyanokobalamin, riboflavin a biotin) ve vitaminové směsi pomocí HPLC s UV detekcí. Byla použita kolona C18. Mobilní fáze byla složena z kyseliny trifluoroctové (pH 2,6) a acetonitrilu s gradientovou elucí. Detekce byla provedena při dvou vlnových délkách - 210 nm a 275 nm. Koncentrace vitaminů nalezené ve vitaminové směsi touto metodou byly srovnatelné s deklarovanými hodnotami. [53]

Španělští vědci stanovovali thiamin, riboflavin, pyridoxin, kyanokobalamin a folacin v sušeném a připraveném kojeneckém mléku metodou HPLC s UV detekcí. Pro extrakci byla použita kyselina trichloroctová. Byla použita kolona C18 v reverzní fázi. Jako mobilní fáze byla použita směs methanol-voda (15:85), sulfonová kyselina s trimethylaminem (pH 3,6). UV detekce byla provedena při různých vlnových délkách (thiamin – 246 nm, riboflavin -268 nm, pyridoxin – 290 nm, pyridoxal – 287 nm, pyridoxamin – 290 nm, kyanokobalamin-361 nm a folacin – 282 nm). Bylo zjištěno, že touto metodou lze stanovit najednou šest hydrofilních vitaminů v kojeneckém mléku, přičemž metoda je rychlá a nabízí uspokojivou specifitu a přesnost. Kromě toho je také schopna stanovit jednotlivé formy vitaminu B₆. [54]

ZÁVĚR

Vitaminy jsou nízkomolekulární organické neenergické látky, potřebné v malých množstvích pro látkovou přeměnu a regulaci metabolismu člověka. Vitaminy nejsou syntetizovány v těle vůbec nebo jen v nedostatečném množství, tudíž musí být přijímány z potravy. Hydrofilní vitaminy se vyskytují v potravinách rostlinného i živočišného původu, přičemž vitaminy B-komplexu se vyskytují hlavně v obilninách, mléce, vejci, masu, droždí, játrech a listové zelenině. Vitamin C se vyskytuje hlavně v ovoci a zelenině.

Vitamíny jsou nezbytné složky potravy vyskytující se v nízkých koncentracích. V poslední době konzumenty stále více zajímají informace o nutričním složení potravin. Proto se neustále zvyšuje počet obohacených (fortifikovaných) potravin. Vitamíny jsou také přidávány (restituce) do potravin, protože se předpovídají ztráty, které mohou nastat v průběhu zpracování nebo skladování potravin. [53, 54]

Stanovení hydrofilních vitaminů je velmi složitý úkol, protože jsou v potravinách obsaženy ve velmi malém množství a většina je citlivá na různé fyzikální nebo chemické změny. Thiamin a riboflavin jsou vitaminy citlivé na světelné záření. Thiamin je dále citlivý na pH, teplotu (var). Niacin je poměrně stabilní, kyselina pantothenová je citlivá ke změně pH - nestabilní v kyselém a alkalickém prostředí. Pyridoxin je citlivý na přítomnost látek reagujících s karbonylovou skupinou pyridoxalu. Korinoidy jsou rovněž citlivé na světlo, v kyselém a alkalickém prostředí dochází k jejich hydrolýze. Folacin je velmi citlivý k oxidaci, pH, na vyšší teploty a zvláště na světlo. Vitamin C (kys. askorbová a dehydroaskorbová) je jeden z nejméně stálých vitaminů. Jeho stabilita závisí na teplotě, na pH prostředí a na přítomnosti těžkých kovů (Fe^{3+} , Cu^{2+}).

Vlastnímu stanovení vitaminů musí předcházet několik následujících kroků: příprava vzorku (homogenizace), hydrolýza (kyselá nebo enzymatická), extrakce a případné přečištění. Hydrofilní vitaminy jsou poté stanovovány pomocí různých metod – spektrofotometrických, polarografických, titračních, mikrobiologických a nyní nejčastěji pomocí chromatografických metod, zvláště HPLC a GC. V HPLC se nejčastěji používají MS, UV/VIS, ECD a fluorimetrické detektory, v GC detektory FID, ECD a TCD.

Uvedené metody nejsou vhodné pro všechny hydrofilní vitaminy. Například pro stanovení korinoidů a folacinu jsou vhodné jen některé metody (HPLC, mikrobiologická metoda), protože obsah těchto vitaminů v potravinách je velmi nízký. Pro stanovení ostatních vita-

minů je výběr metod poněkud širší. Při stanovení více vitaminů najednou, často se využívá společné stanovení vitaminů, protože je časově i finančně méně náročné.

Pro všechny hydrofilní vitaminy je nejvhodnější a nejpoužívanější metodou především HPLC s širokým rozsahem použitelnosti a dobrou přesností analýzy umožňující stanovení malých množství látek s vysokým rozlišením.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MURRAY R., GRANNER D. a kol. *Harperova biochemie*. 1. vyd. Jihočany: H+H, 2002. 872 s. ISBN 80-7319-013-3
- [2] MAREČEK A., HOZA J. *Chemie pro čtyřletá gymnázia*. 1. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2000. 250 s. ISBN 80-7182-057-1
- [3] DOSTÁL J., KAPLAN P. *Lékařská chemie II. Bioorganická chemie*. 1. vyd. Masarykova univerzita v Brně: Vydavatelství MU, 2001. 223 s. ISBN 80-210-2731-2
- [4] VELÍŠEK J. *Chemie potravin 2*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999. 328 s. ISBN 80-902391-4-5
- [5] DAVÍDEK J., JANÍČEK G., POKORNÝ J. *Chemie potravin*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1983. 632 s. ISBN 04-815-83
- [6] Učební texty Univerzity Karlovy. *Chromatografie, toxikologie*. [online].[cit. 2009-04-01]. Dostupné z WWW: <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/welcome.html>
- [7] FRAGNER J. a kol. *Vitaminy jejich chemie a biochemie*. 1.vyd. Praha: Československé akademie věd, 1961. 647 s.
- [8] *Vitamín C - historie objevu: chemweb* [online]. [cit. 2008-8-30]. Dostupné z WWW: <http://www.jergym.hiedu.cz/~canovm/>
- [9] MINDELL E., MUNDISOVÁ H. *Vitaminová bible*. 2. vyd. Praha: Euromedia Group - Ikar, 2006. 576 s. ISBN 80-249-0744-5
- [10] HLÚBIK P., OPLTALOVÁ L. *Vitaminy*. 1. vyd. Praha: Grada, 2004. 232 s. ISBN 80-247-0373-4
- [11] OPEKAR F., JELÍNEK I. a kol. *Základní analytická chemie*. 1.vyd. Praha: Karolinum, 2003. 201 s. ISBN 80-246-0553-8
- [12] PAKIN C., BERGAENTZLÉ M. a kol. Fluorimetric determination of pantothenic acid in foods by liquid chromatography with post-column derivatization. *Journal of Chromatography A*, 2004, roč. 1035, č. 1, s. 87-95
- [13] HEUDI O., FONTANNAZ P. a kol. Determination of Vitamin B₁₂ in food products and in premixes by reversed-phase high performance liquid chromatography and immunoaffinity extraction. *Journal of Chromatography A*, 2006, roč. 1101, č. 1-2, s. 63-68

- [14] HÁLKOVÁ J., RUMÍŠKOVÁ M., RIEGROVÁ J. *Analýza potravin*. 1.vyd. Újezd u Brna: Straka Ivan, 2000. 102 s. ISBN 80-902-7753-5
- [15] DAVÍDEK J. a kol. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. 2. vyd. Praha: SNTL, 1981. 720 s. ISBN 04-814-81
- [16] CHURÁČEK J. a kol. *Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1990. 384 s. ISBN 04-626-90
- [17] CHURÁČEK J., JANDERA P. *Separace látek*. 2. vyd. Praha: SNTL, 1986. 140 s. ISBN 05-033-86
- [18] KLOUDA P. *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2
- [19] ČŮTA F. a kol. *Instrumentální analýza*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1986. 296 s. ISBN 04-601-86
- [20] DOUŠA M. *Základy separačních metod se zaměřením na HPLC*. 1. vyd. Brno: ÚKZÚZ, 2002. 129 s. ISBN 80-86548-09-0
- [21] *Metody stanovení ve vodě rozpustných vitaminů* [online]. [cit. 2009-3-22]. Dostupné z WWW: http://hplc1.sweb.cz/Vitamin/methods_water.htm
- [22] DAVÍDEK J., VELÍŠEK J. *Analýza potravin*. 2.vyd. Praha: VŠCHT, 1992. 122 s. ISBN 80-7080-163-8
- [23] VAN DEN BERG H., VAN SCHAIK F. a kol. Third EU MAT intercomparison on methods for the determination of vitamins B-1, B-2 and B-6 in food. *Food chemistry*, 1996, roč. 57, č. 1, s. 101-108
- [24] JAKOBSEN J. Optimisation of the determination of thiamin, 2-(1-hydroxyethyl)thiamin, and riboflavin in food samples by use of HPLC. *Food Chemistry*, 2008, roč. 106, č. 3, s. 1209-1217
- [25] LEBIEDZIŃSKA A., MARSZAŁŁ M. L. a kol. Reserved-phase high-performance liquid chromatography method with coulometric electrochemical and ultraviolet detection for the quantification of vitamins B₁ (thiamine), B₆ (pyridoxamine, pyridoxal and pyridoxine) and B₁₂ in animal and plant foods *Journal of Chromatography A*, 2007, roč. 1173, č. 1-2, s. 71-80
- [26] EL-ARAB A., ALI M., HUSSEIN L. Vitamin B₁ profile of the Egyptian core foods and adequacy of intake. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2004, roč. 17, č. 1, s. 81-97

- [27] KRAMÁŘOVÁ D., ŠKROVÁNKOVÁ S. a kol. Stanovení vit. B₂ (riboflavin) v játrech metodou HPLC. *Laboralim*, 2007, 282-285 s.
- [28] ANDRÉS-LACUEVA C., MATTIVI F., TONON D. Determination of riboflavin, flavin mononucleotide and flavinadenine dinucleotide in wine and other beverages by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1998, roč. 823, č. 1-2, s. 355-363
- [29] SIKORSKA E., GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO A. a kol. Simultaneous analysis of riboflavin and aromatic amino acids in beer using fluorescence and multivariate calibration methods. *Analytica chimica acta*, 2008, roč. 613, č. 2, s. 207-217
- [30] RUSSELL L. F., BROOKS L., MCRAE K. B. Development of a robotic-HPLC determination of riboflavin vitamers in food. *Food Chemistry*, 1998, roč. 63, č. 1, s. 125-131
- [31] GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO A., KOZIOŁOWA A. Chromatographic determination of riboflavin and its derivatives in food. *Journal of Chromatography A*, 2000, roč. 881, č. 1-2, s. 285-297
- [32] WINDAHL K. L., TRENERRY V. C., WARD C. M. The determination of niacin in selected foods by capillary electrophoresis and liquid chromatography: acid extraction. *Food Chemistry*, 1998, roč. 65, č. 2, s. 263-270
- [33] ROSE-SALLIN CH., BLAKE CH. J. a kol. Comparison of microbiological and HPLC – fluorescence detection methods for determination of niacin in fortified food products. *Food Chemistry*, 2001, roč. 73, č. 4, s. 473-480
- [34] NDAW S., BERGAENTZLÉ M. a kol. Enzymatic extraction procedure for the liquid chromatographic determination of niacin in foodstuffs. *Food Chemistry*, 2002, roč. 78, č. 1, s. 129-134
- [35] GONTHIER A., FAYOL V. a kol. Determination of pantothenic acid in foods: influence of the extraction method. *Food Chemistry*, 1998, roč. 63, č. 2, s. 287-294
- [36] MITTERMAYR R., KALMAN A. a kol. Determination of vitamin B₅ in a range of fortified food products by reversed-phase liquid chromatography – mass spectrometry with electrospray ionisation. *Journal of Chromatography A*, 2004, roč. 1032, č. 1-2, s. 1-6

- [37] KALL M. A.. Determination of total vitamin B₆ in food by isocratic HPLC: a comparison with microbiological analysis. *Food Chemistry*, 2003, roč. 82, č. 2, s. 315-327
- [38] REITYER-BERGAENTYLE M., MARCHIONI E., HASSELMANN C., HPLC determination of vitamin B₆ in food after pre-column derivatization of free and phosphorlated vitamers into pyridoxol. *Food Chemistry*, 1993, roč. 48, č. 3, s. 321-324
- [39] PARKIN C., BERGAENTZLÉ M. a kol. α -Ribazole, a fluorescent marker for the liquid chromatographic determination of vitamin B₁₂ in foodstuffs. *Journal of Chromatography A*, 2005, roč. 1081, č. 2, s. 182-189
- [40] HYBENOVÁ E., REPAŠSKÁ M a kol. Výskyt kyseliny listovej v rôznych odrodách pšenice ovoci a zelenině. *Laboralim*. 2007, 229-232 s.
- [41] JASTREBOVA J., WITTHÖFT C. a kol. HPLC determination of folates in raw and processed beetroots. *Food Chemistry*, 2003, roč. 80, č. 4, s. 579-588
- [42] NDAW S., BERGAENTZLÉ M. a kol. Determination of folates in foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after precolumn conversion to 5-methyltetrahydrofolates. *Journal of Chromatography A*, 2001, roč. 928, č. 1, s. 77-90
- [43] ŠKROVÁNKOVÁ S., KRAMÁŘOVÁ D. a kol. Chromatografické stanovení kyseliny askorbové (vit. C) v ovoci a zelenině. *Laboralim*. 2007, 429-433 s.
- [44] Výukový portál Masarykovy univerzity. *Titrační metody*. [online].[cit. 2009-04-24]. Dostupné z WWW:
<http://www.ped.muni.cz/wchem/comenius2000/vitaminC/titracni.htm>
- [45] IWASE H., ONO I. Determination of ascorbic acid in food by column liquid chromatography with electrochemical detection using eluent for prerun sample stabilization. *Journal of Chromatography A*, 1998, roč. 806, č. 2, s. 361-364
- [46] IWASE H. Use of an amino acid in the mobile phase for determination of ascorbic acid in food by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 2000, roč. 881, č. 1-2, s. 317-326
- [47] MANNINO S., COSIO M. S. Determination of ascorbic acid in foodstuffs by microdialysis sampling and liquid chromatography with electrochemical detection. *Analyst*, 1997, roč. 122, č. 10, s. 1153-1154

- [48] FONTANNAY P., KILINÇ T., HEUDI O. HPLC-UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products. *Food Chemistry*, 2006, roč. 94, č. 4, s. 626-631
- [49] 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, roč. 668, č. 2, s. 359-363
- [50] BATIFOULIER F., VERNY M.-A. a kol. Effect of different breadmaking methods in thiamine, riboflavin and pyridoxine contents of wheat bread. *Journal of Cereal Science*, 2005, roč. 42, č. 1, s. 101-108
- [51] NDAW S., BERGAENTZLÉ M. a kol. Extraction procedures for the liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and vitamin B₆ in foodstuffs. *Food Chemistry*, 2000, roč. 71, č. 1, s. 129-138
- [52] WOJCIECHOWSKI C., DUPUY N. a kol. Quantitative analysis of water-soluble vitamins by ATR-FTIR spectroscopy. *Food Chemistry*, 1998, roč. 63, č. 1, s. 133-140
- [53] HEUDI O., KILINÇ T., FONTANNAZ P. Separation of water-soluble vitamins by reserved-phase high performance liquid chromatography with ultra-violet detection: Application to polyvitaminated premixes. *Journal of Chromatography A*, 2005, roč. 1070, č. 1-2, s. 49-56
- [54] ALBALÁ-HURTADO S., VECIANA-NOGUÉS M. T. a kol. Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1997, roč. 778, č. 1-2, s. 247-253

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HPLC	High Performance Liquid Chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
GC	Gas Chromatography, plynová chromatografie
UV/VIS	Ultraviolet-Visible, ultrafialová a viditelná oblast světla
ECD	Electrochemical detection, elektrochemická detekce
LC/MS	Liquid Chromatography with Mass Spectroscopy detection, kapalinová chromatografie s hmotnostně spektroskopickou detekcí
FID	Flame ionization detector, plamenově ionizační detektor
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemists, Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
NK buňka	natural killer cell, "přirození zabíječi"
ATP	adenosintrifosfát
FMN	flavinadeninmononukleotid
FAD	flavinadenindinukleotid
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
IDL	lipoproteiny o střední hustotě
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid, kyselina ethylendiamintetraoctová
CoA	Koenzym A
LSC	Liquid Solid Chromatography, kapalinová adsorpční chromatografie
LLC	Liquid-Liquid Chromatography, kapalinová rozdělovací chromatografie
GPC	Gel Permeation Chromatography, gelová permeační chromatografie
IEC	Ion Exchange Chromatography, iontově měničová chromatografie

PC	Paper Chromatography, papírová chromatografie
TLC	Thin Layer Chromatography, tenkovrstevná chromatografie
SFC	Supercritical Fluid Chromatography, superkritická fluidní chromatografie
FPD	Flame Photometric Detector, plamenově fotometrický detektor
DAD	Diode Array Detector, detektor diodového pole
SPE	Solid Phase Extraction, extrakce na tuhou fázi
CE	Capillary electrophoresis, kapilární elektroforeza

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Části kapalinového chromatografu [6].....</i>	<i>31</i>
--	-----------

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Rozdělení chromatografických metod podle separační funkce [17] 28