Stanovení vitaminu B_2 v mléce a mléčných výrobcích

Bc. Zuzana Nohálová

Diplomová práce
2008

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Bc. Zuzana NOHÁLOVÁ**
Studijní program:	**N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Téma práce:	**Stanovení vitaminu B2 v mléce a mléčných výrobcích**

Zásady pro vypracování:

1. **Zpracovat teorii vitaminu B2.**
2. **Teoreticky pojednat o metodice HPLC.**
3. **Experimentální část: vlastní stanovení vitaminu B2 ve vzorcích metodou HPLC/UV.**
4. **Závěr.**

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1) Velíšek, J. Chemie potravin 2. Ossis Tábor, 1999.328 s.ISBN 80-902391-4-5
2) Davídek, J.; Janíček, G.; Pokorný, J. Chemie potravin. SNTL PRAHA, 1983.632 s
3) Šícho,V.; Vodrážka, Z.; Králová, B. Potravinářská biochemie. SNTL PRAHA,1981. 360 s.
4) Picciano, M. F. Water-Soluble Vitamins in Human Milk, Department of Nutrition, College of Health and Human Development, Pennsylvania , 2007
5) Regina Prado Zanes Furlani, Helena Teixeira Godoy. Vitamins B1 and B2 contents in cultivated mushrooms, Food Chemistry and Applied Nutrition Centre, Institute of Food Technology, Campinas, 2007

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.**
Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání diplomové práce: **21. listopadu 2007**

Termín odevzdání diplomové práce: **31. května 2008**

Ve Zlíně dne 2. května 2008

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan

UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ
Fakulta technologická
L.S.

prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Pro lidské zdraví jsou velmi důležité vitaminy. Jedním z nich je i riboflavin. Tato diplomová práce je zaměřena na stanovení vitaminu B_2 v mléce a mléčných výrobcích. Teoretická část pojednává o vitaminu B_2 a o jeho vlastnostech. V praktické části byl vitamin B_2 stanovován v syrovém kravském, kozím a ovčím mléce, v pasterovaném a znovu pasterovaném mléce, v mléce obnoveném a v syrovátce. Dále byl stanovován v sýrech a to v tvrdém sýru Eidam, tvarohu, Hermelínu, Nivě, Jadelu a v taveném sýru. Pro stanovení byla použita chromatografická metoda HPLC s UV detekcí.

Klíčová slova:

HPLC, riboflavin, vitamin B_2, mléko, sýr

ABSTRACT

The vitamins are very important for human healt. One of them it is riboflavin. This thesis is focused on determination of riboflavin in milk and milk products. The teoretical part is about vitamin B_2 and about it’s properties. In the practical part riboflavin was measured in a raw milk, raw cheep milk, raw goat milk, pasteurizated milk and in heat treatment milk. In renovated milk and in renovated whey. Then the riboflavin was determined in hard cheese Eidam, curd, Hermelín, Niva, Jadel and in processed cheese. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method with UV-detector was used.

Keywords:

HPLC, riboflavin, vitamin B_2, milk, cheese

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Daniele Kramářové, Ph.D. za odborné vedení, spolupráci, trpělivost a udělování cenných rad.

Chtěla bych také poděkovat Jaroslavě Živocké za ochotu a pomoc v laboratoři při měření praktické části diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala rodičům a mému příteli za podporu a trpělivost po celou dobu mého studia.

OBSAH

ÚVOD **9**

I TEORETICKÁ ČÁST **10**

1 VITAMINY **11**

1.1 RIBOFLAVIN 12

1.1.1 Struktura a formy riboflavinu 12
1.1.2 Vlastnosti riboflavinu 14
1.1.3 Výskyt riboflavinu 15
1.1.4 Změny množství riboflavinu v potravinách při skladování a zpracování 19
1.1.5 Fyziologie riboflavinu 22
1.1.6 Doporučená denní dávka 23
1.1.7 Nedostatek riboflavinu 23
1.1.8 Metody stanovení riboflavinu 24

2 MLÉKO A MLÉČNÉ VÝROBKY **25**

2.1 DĚLENÍ MLÉK A JEHO VLASTNOSTI 25

2.2 VÝROBKY MLÉKÁRENSKÉHO PRŮMYSLU 26

2.3 KOZÍ MLÉKO 28

2.4 OVČÍ MLÉKO 28

3 CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ **30**

3.1 VYSOCE ÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE 31

3.1.1 Instrumentace HPLC 33

4 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ **37**

II PRAKTICKÁ ČÁST **39**

5 METODIKA **40**

5.1 MATERIÁL 40

5.2 POUŽITÉ PŘISTROJE A POMŮCKY 41

5.3 POUŽITÉ ROZTOKY A CHEMIKÁLIE 41

5.4 EXTRAKCE RIBOFLAVINU ZE VZORKŮ SYROVÝCH MLÉK, MLÉK TEPELNĚ OŠETŘENÝCH, OBNOVENÝCH A ZE SYROVÁTKY 42

5.5 EXTRAKCE RIBOFLAVINU ZE VZORKŮ SÝRŮ A TVAROHU 42

5.6 ZKOUŠKA STABILITY RIBOFLAVINU 43

5.6.1 Zkouška termostability riboflavinu 43
5.6.2 Zkouška fotostability riboflavinu 43
5.6.2.1 Fotostabilita vitaminu B_2 v mléce vystavenému dennímu světlu 43
5.6.2.2 Fotostabilita vitaminu B_2 v mléce vystavenému zářivce 43
5.6.2.3 Fotostabilita vitaminu B_2 v mléce vystavenému UV záření 43

5.7 KALIBRAČNÍ KŘIVKA PRO CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ VITAMINU B_2 44
5.8 CHROMATOGRAFICKÁ ANALÝZA 44
5.8.1 Chromatografické stanovení riboflavinu v mléce syrovém i tepelně ošetřeném 44
5.8.2 Chromatografické stanovení riboflavinu v sýrech 45
6 VÝSLEDKY A DISKUSE 46
6.1 VÝSLEDKY MĚŘENÍ KALIBRAČNÍCH KŘIVEK 46
6.1.1 Výsledky měření kalibrační křivky 1 pro stanovení koncentrace vitaminu B_2 46
6.1.2 Výsledky měření kalibrační křivky 2 pro stanovení koncentrace vitaminu B_2 47
6.2 VÝSLEDKY EXTRAKCE RIBOFLAVINU ZE VZORKŮ SYROVÝCH A TEPELNĚ OŠETŘENÝCH MLÉK 49
6.3 VÝSLEDKY EXTRAKCE RIBOFLAVINU ZE VZORKŮ SÝRŮ A TVAROHU 52
6.4 VÝSLEDKY STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU VE VZORCÍCH SYROVÝCH MLÉK, MLÉK TEPELNĚ OŠETŘENÝCH, OBNOVENÉHO MLÉKA A ZE SYROVÁTKY 53
6.4.1 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v syrovém kravském mléce 53
6.4.2 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v syrovém ovčím mléce 54
6.4.3 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v syrovém kozím mléce 56
6.4.4 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v čerstvém mléce pasterovaném 57
6.4.5 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v trvanlivém mléce (UHT) 59
6.4.6 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v obnoveném mléce 60
6.4.7 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v obnovené syrovátce 62
6.5 VÝSLEDKY STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU VE VZORCÍCH SÝRŮ A TVAROHU 63
6.5.1 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v tvrdém sýru 63
6.5.2 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v taveném sýru 65
6.5.3 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v tvarohu 66
6.5.4 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v plísňovém sýru Hermelín 68
6.5.5 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v plísňovém sýru Niva 69
6.5.6 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v sýru Jadel 71
6.6 ZKOUŠKA STABILITY 73
6.6.1 Výsledky zkoušky termostability riboflavinu 73
6.6.2 Výsledky zkoušky fotostability riboflavinu 76
6.6.2.1 Výsledky zkoušky fotostability riboflavinu na denním světle 78
6.6.2.2 Výsledky zkoušky fotostability riboflavinu na umělému osvětlení (zářivka) 81
6.6.2.3 Výsledky zkoušky fotostability riboflavinu pod UV zářením 84
ZÁVĚR 89
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 92
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 96
SEZNAM OBRÁZKŮ 97

SEZNAM TABULEK **98**

SEZNAM PŘÍLOH **102**

PŘÍLOHA P I: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V SYROVÉM KRAVSKÉM MLÉCE METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8. ..... **103**

PŘÍLOHA P II: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V SYROVÉM KOZÍM MLÉCE METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8. ..... **104**

PŘÍLOHA P III: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V MLÉCE VYSTAVENÉM 24 HODIN SLUNEČNÍMU SVĚTLU METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8. ..... **105**

PŘÍLOHA P IV: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V TVAROHU METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8 ..... **106**

PŘÍLOHA P V: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V TVRDÉM SÝRU METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8 ..... **107**

PŘÍLOHA P VI: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V HERMELÍNU METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8 ..... **108**

PŘÍLOHA P VII: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V SYROVÁTCE METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8 ..... **109**

ÚVOD

V dnešním uspěchaném světě si lidé myslí, že spolykají spousty „zázračných“ pilulek a to včetně těch vitaminových a budou fit. A přitom je mnohem příjemnější sedět u pestře prostřeného stolu, který nabízí vitaminy v mnohem chutnější a přijatelnější podobě, ať už v ovoci, zelenině či v mléce a mléčných výrobcích. Vitaminy jsou látky, které si člověk nedokáže sám vytvořit a musí je přijímat ve stravě. Avšak cesta, kterou to řeší velká část obyvatel je pro tělo nepřirozená. Jejich argumenty, že je rychlejší spolknout tabletu než umýt a oškrábat mrkev jsou sice pravdivá, ale organismu neprospívající. Z přirozených zdrojů jako je ovoce a zelenina se vitaminy vstřebávají mnohem lépe. Někteří zkrátka stále ještě věří, že léky mohou získat pouze v lékárně.

Vitaminy jsou organické látky nezbytné pro fungování organismu. Spolu s bílkovinami, tuky a sacharidy patří k základním složkám lidské stravy. V lidském organismu mají funkci katalyzátoru biochemických reakcí, tudíž hrají významnou úlohu při procesech vstřebávání a výměny látek mezi vnějším prostředím a živým organismem.

Mezi vitaminy skupiny B patří i vitamin B_2, nazývaný také riboflavin. Riboflavin se poprvé podařilo izolovat ve 30. letech minulého století z vaječného bílku, mléka, syrovátky, kvasnic a jater. Vyskytuje se v biochemických systémech ve formě koenzymů, z nichž nejběžnějšími jsou flavinmononukleotid (FMN) a flavinadenindinukleotid (FAD). Riboflavin podporuje uvolňování energie, dobrou kondici a vitalitu, růst a plodnost. Dále je důležitý pro metabolismu cukrů, tuků a aminokyselin. Jako součást enzymů v dýchacím řetězci je nezbytný pro základní buněčný metabolismus.

Cílem diplomové práce je optimalizovat extrakci riboflavinu z mléka a mléčných výrobků a jejich následné stanovení pomocí metody HPLC.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VITAMINY

Vitaminy jsou esenciální exogenní biokatalyzátory, které lidský organismus není schopen sám syntetizovat a musí je přijímat ve stravě. Jsou důležité pro normální růst a funkce lidského těla. Mají zcela odlišné chemické struktury a různé funkce v organismu. Působí také jako prekurzory biokatalyzátorů, například jako kofaktory enzymů a hormonů, nebo jako antioxidanty. Producenty vitaminů jsou především rostliny a mikroorganismy. [1, 2, 3]

Za objevitele vitaminů lze považovat polského vědce K. Funka, který jako první připravil z rýžových otrub koncentrát, kterým se léčila nemoc Beri-Beri. Tato nemoc se projevuje obrnami dolních končetin, otoky, srdečními a zažívacími obtížemi. [4, 5]

Obr. 1 Projevy nemoci Beri-Beri [6]

Nejběžnější hledisko dělení vitaminů je doposud podle společných fyzikálních vlastností, rozpustnosti ve vodě (v polárním prostředí) a v tucích (v nepolárním prostředí). Vitaminy se takto dělí na dvě velké skupiny :

vitaminy rozpustné ve vodě = hydrofilní vitamíny

vitaminy rozpustné v tucích = lipofilní vitamíny. [7]

Denní dávky vitaminů jsou závislé na jejich funkci, udávají se nejčastěji v μg nebo mg na den. V případě, že vitaminů je v potravě nedostatek nebo zcela chybí, nebo naopak nadbytek, objevuje se typický soubor příznaků, tzv. choroby z nedostatku vitaminů nebo poruchy způsobené nadbytkem určitých druhů vitaminů. Avitaminosa je úplný nedostatek

vitaminů. Hypovitaminosa má mírnější průběh, vzniká při malém nedostatku vitaminů. Hypervitaminosa je vyvolána zvýšeným příjmem. [4]

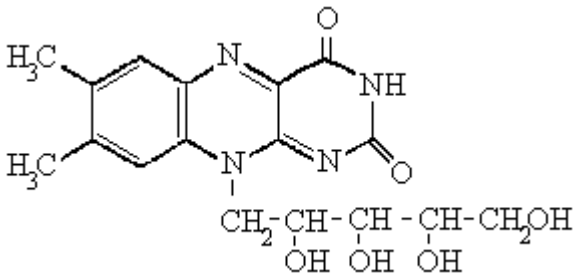
Vitaminy jsou chemicky velmi rozmanité látky. Většina z nich je relativně velmi citlivá na nejrůznější fyzikálně chemické vlivy. Tato vlastnost je z hlediska potravinářského velmi důležitá. V technologické praxi může obsah vitaminů v potravinách a surovinách znamenat indikátor nejen kvality a šetrnosti technologických operací použitých při výrobě, ale i vhodných podmínek skladování surovin a hotových potravinářských výrobků.

1.1 Riboflavin

Riboflavin neboli vitamin B_2 se poprvé podařilo izolovat ve 30. letech minulého století z vaječného bílku, mléka, syrovátky, kvasnic a jater a to vědcům GYÖRGYIMU, KUHNOVI a WAGNEROVI-JAUREGGOVI r.1933. [8]

1.1.1 Struktura a formy riboflavinu

Riboflavin je chemicky 7,8-dimethyl-10-(1´-D-ribityl)isoalloxazin. Patří do skupiny látek zvaných flaviny. Základem struktury riboflavinu je isoalloxazinové jádro, na které je vázán ribitol, alditol odvozený od D-ribosy [9]

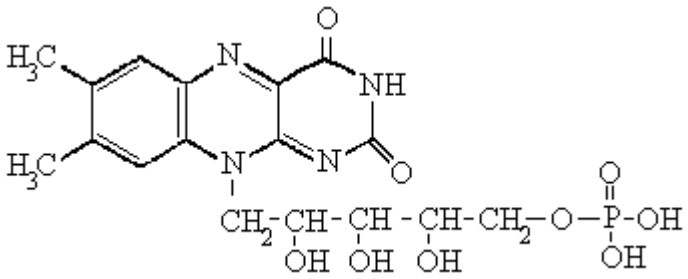


Obr. 2 Struktura vitaminu B_2

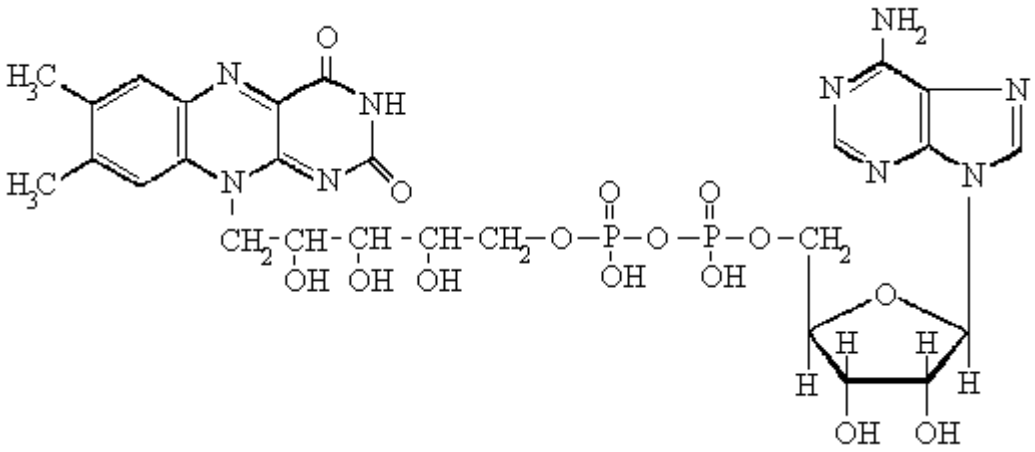
V biochemických systémech se vyskytuje volný (např. v mléce) nebo vázaný ve formě koenzymů oxidoredukčních enzymů. Nejběžnějšími jsou flavinmononukleotid (FMN) a flavinadenindinukleotid (FAD). Tyto koenzymy jsou využívány ke katalýze oxidačně redukčních dějů. [10, 11]

FMN a FAD hrají důležitou roli v látkové výměně proteinů, tuků a cukrů tím, že do reakcí dodávají nebo z nich odebírají atomy vodíku. Mohou však vstupovat i do reakcí, v nichž je přenášen kyslíkový atom, stejně jako do reakcí s jednoelektronovým přenosem. [12]

Pomáhají tělu uvolňovat energii z těchto živin. Jejich nepřítomnost blokuje výstavbu nových tkání. Riboflavin a s ním související látky jsou nezbytnýné pro růst a vývoj buněk. [13, 14]

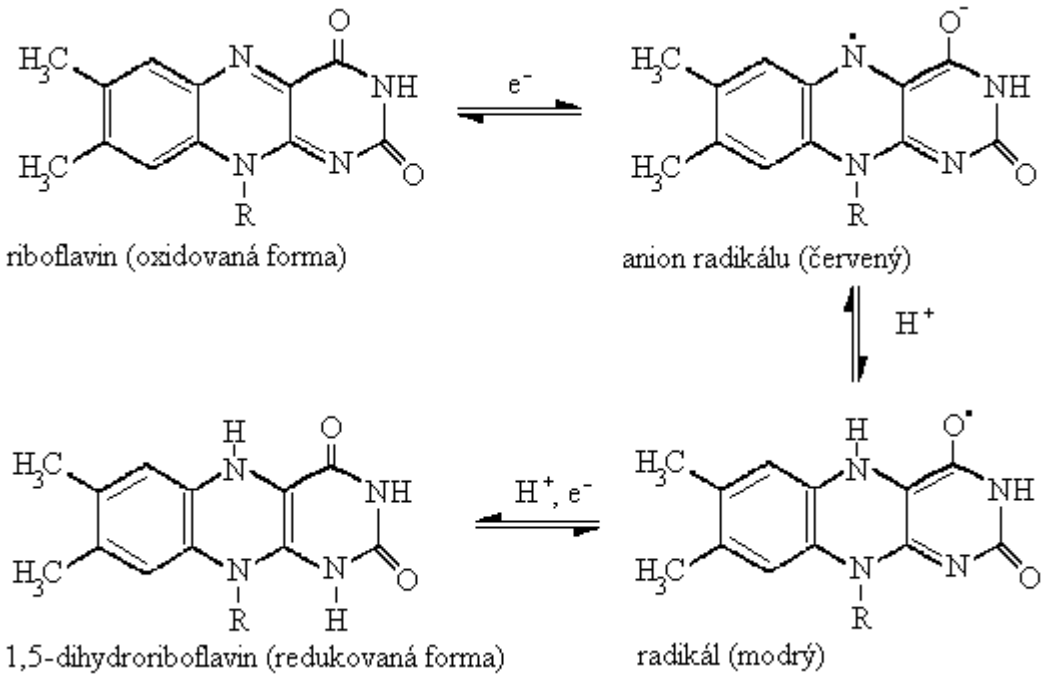


Obr. 3 Flavinmononukleotid, FMN



Obr. 4. Flavinadenindinukleotid, FAD

Redukovanou, téměř bezbarvou formou při enzymových oxidoredukčních reakcích je 1,5-dihydroriboflavin, nebo-li leukoflavin. [7, 15]



Obr. 5. Oxidované a redukované formy riboflavinu

1.1.2 Vlastnosti riboflavinu

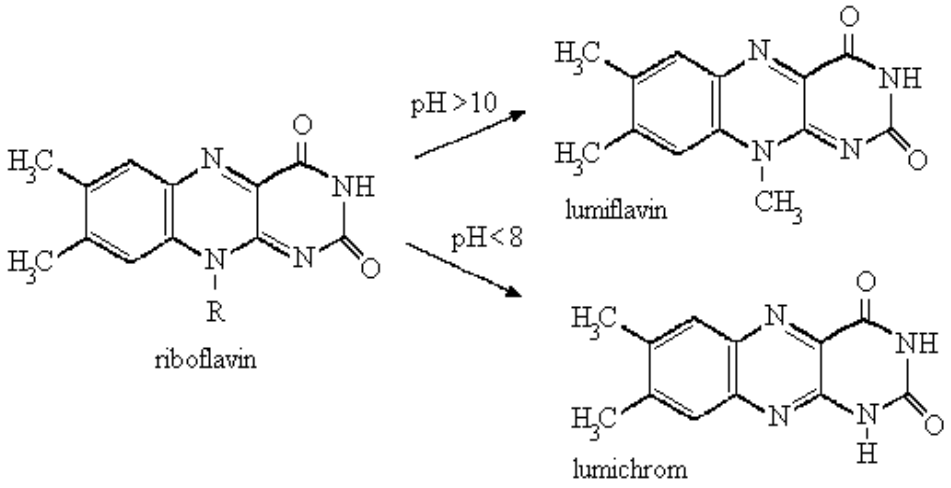
Riboflavin, patří do skupiny vitaminů rozpustných ve vodě. Tato skupina vitaminů byla poslední objevenou skupinou esenciálních živin. V rostlinách a živočišných tkáních se vyskytuje ve velmi malém množství. Riboflavin tvoří oranžově žluté jemné jehličky. Vodné neutrální roztoky riboflavinu žlutě fluoreskují, v silně kyselých a alkalických roztocích tato fluorescence zháší. [10, 16, 17, 18]

Obdobně jako většina vitaminů skupiny B je tvořen střevní mikroflórou a z tohoto důvodu je v kravském mléce ve výrazně vyšší koncentraci než v mléce mateřském. [19]

Riboflavin má bod tání 275 až 292°C. Ve vodě se rozpouští v malé míře (120 mg v 1000 ml při 27,5°C). Lehce se rozpouští ve vodných roztocích alkalických hydroxidů. Riboflavin je poměrně značně stálý vůči teplu, především v kyselých roztocích. V neutrálních a alkalických roztocích je velmi labilní a rozkládá se za vzniku fyziologicky neúčinných rozkladných produktů. Je velmi citlivý především na světelné záření. [15] V neutrálním a alkalickém prostředí za přístupu světla jsou všechny flaviny nestálé, zvláště pak volný riboflavin a FMN. Tyto sloučeniny působí jako fotosenzibilizátory, absorbovanou světelnou energii předávají vzdušnému kyslíku, ze kterého vzniká singletový

kyslík a ten oxiduje další organické sloučeniny. Současně dochází k fotolytickému štěpení flavinů. Hlavním produktem fotodegradace riboflavinu po štěpení ribitolu v kyselém a neutrálním prostředí je lumichrom, v neutrálním a alkalickém prostředí vzniká lumiflavin.

Oba flaviny vznikající fotodegradací riboflavinu jsou účinější oxidační činidla než samotný riboflavin. Riboflavin působí jako fotosenzibilizátor velmi často u mléka při vystavení přímému slunečnímu světlu v nevhodných obalech. [7]

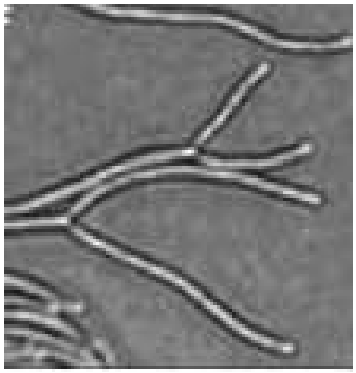


Obr. 6 Fotolýza riboflavinu

Během technologického a kulinárního zpracování potravin dochází ke ztrátám riboflavinu především vyluhováním. Při omezeném přístupu světla se ztráty riboflavinu snižují. Vzhledem k tomu, že je riboflavin fotosenzibilní, je nutno potraviny uchovávat ve vhodném obalu. [15]

1.1.3 Výskyt riboflavinu

Riboflavin je velmi rozšířen jak v rostlinách, tak v živočišných organismech. Řada mikroorganismů produkuje riboflavin, některé z nich ho vylučují do kultivačního média. Jako průmyslové kmeny byly využity askomycety, např. *Ashbya gossypii*. Toho se využívá k fermentační přípravě riboflavinových preparátů. [20,21]



Obr. 7 *Ashbya gossypii*

Odhaduje se, že téměř 40 % vitaminu získaného potravou zajišťuje mléko a mléčné výrobky, asi 20 % pak maso a 15 % cereálie. [9]

Z rostlinných produktů je riboflavin ve větším množství v luštěninách, ze živočišných surovin nejvíce riboflavinu obsahují játra, ledviny, srdce, vepřové a hovězí maso, vejce, mléko a mléčné výrobky, kvasnice. [10, 22, 23]

V mléce je riboflavin z části vázán na α_S- a β-kasein, asi 14 % riboflavinu je ve formě FAD a 4 % jako FMN. V menším množství se v mléce vyskytují také některé další flaviny jako je 10-(2-hydroxyethyl)flavin, 7-α-hydroxyriboflavin a jeho 8-α-isomer. [7]

V zelenině a ovoci je jeho obsah nízký, stejně tak jako v mase sladkovodních ryb. V naší stravě je hlavním zdrojem mléko a výrobky z něj, dále maso a vnitřnosti. V cereáliích se riboflavin nachází především v klíčcích a v aleuronové vrstvě, proto obsah riboflavinu v mouce závisí na stupni vymletí a činí přibližně jednu třetinu oproti celému zrnu. Dobrým zdrojem vitaminu B_2 jsou i některé houby. Mnoho národnostních kultur používalo houby nejen pro jejich gastronomický význam, ale také pro jejich léčivou hodnotu (např. japonská houba shiitake). Při stanovení riboflavinu v předložených vzorcích hub bylo dosaženo velmi rozmanitých výsledků. Vitamin B_2 se v různých druzích hub vyskytoval v množství od 0,037 mg až po 0,298 mg ve 100 g předloženého vzorku. Obsah vitaminu B_2 v analyzovaných houbách, byl s výjimkou konzervovaných hub vyšší, než u různých druhů zeleniny. [24, 25, 26]

Obsah riboflavinu ve vybraných potravinách uvádí Tab. 1. V potravinářství se vitamin B_2 může používat pro fortifikaci potravin (cereálie, multivitaminové nápoje, dětská výživa), používá se rovněž jako barvivo v instantních produktech. [24, 25]

Riboflavin je označen jako E 101 podle vyhlášky č.304/2004 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných a pomocných látek při výrobě potravin. [27]

Vyvážená a dostatečně rozmanitá strava připravená z čerstvých potravin obvykle obsahuje potřebná množství všech vitaminů. [28]

Tab.1. Obsah vitaminu B_2 ve vybraných potravinách [29]

Potravina	**Obsah riboflavinu** mg .100 g^{-1}	**Potravina**	**Obsah riboflavinu** mg .100 g^{-1}
Vepřové maso průměr	0,176	Pivo světlé 3,6 % alkoholu	0,060
Vepřové maso libové	0,191	Pivo tmavé 3,6 % alkoholu	0,090
Hovězí maso přední	0,155	Jogurt bílý	0,210
Hovězí maso zadní	0,154	Vejce slepičí	0,330
Játra hovězí	2,948	Vlašské ořechy neloupané	0,126
Játra vepřová	2,600	Lískové oříšky neloupané	0,110
Párky	0,172	Brambory podzimní	0,056
Salám šunkový	0,190	Čočka	0,209
Kuřecí řízky	0,159	Kapusta růžičková	0,150
Mléko	0,140	Špenát	0,253
Mléko sušené	1,960	Jablko	0,046
Sýr Eidam 30 % t.v.s.	0,354	Meruňky	0,054
Tvaroh měkký	0,421	Pomeranč	0,044
Ovesné vločky	0,154	Banány	0,133
Pšeničná mouka polohrubá	0,040	Houby čerstvé průměr	0,280
Rýže	0,041	Žampiony	0,331

1.1.4 Změny množství riboflavinu v potravinách při skladování a zpracování

Významné ztráty obsahu vitaminů mohou vznikat již při manipulacích předcházejících vlastnímu zpracování potravinářské suroviny, např. při sklizni, skladování a dopravě. V těchto případech jsou ztráty nutrientů v potravině především funkcí teploty a délky skladování, ale mohou být ovlivněny i nedostatečnou ochranou proti slunečnímu záření. Snižování teploty při dopravě a skladování a zkracování časového úseku nezbytného pro obě uvedené manipulace jsou významnými faktory pro zachování nutriční kvality suroviny před dalším zpracováním.

Při zpracování ovoce a zeleniny bývá prvním krokem opracování blanšírování. Kyzling uvádí, že retence vitaminu B_2 ve špenátu při blanšírování parou činila 88–100 % a při blanšírování ve vodě se pohybovala mezi 64–95 %. [30]

Tepelné zpracování potravin je jedním z nejefektivnějších procesů pro ochranu potravin před mikrobiologickým rozkladem a pro inaktivaci nežádoucích enzymů. Nejjednodušší kuchyňskou úpravou je vaření. Ztráty vitaminů v tomto případě jsou dvojího druhu: část vitaminů se rozloží varem s vodou, ale část je vyluhována do vývaru a záleží na dalším postupu, zda bude tento využit. Za nejlepší způsob tepelné úpravy je považován ohřev v mikrovlnné troubě, kde jsou naměřené ztráty riboflavinu nejmenší. [31, 32]

Ztráty vitaminu B_2 při pečení masa v troubě je 15 % u vepřového a hovězího masa a 10 % u masa kuřecího.

Obsah riboflavinu v mouce závisí na stupni vymílání. V tmavých moukách je jeho obsah vyšší než v moukách málo vymílaných. Během pečení jsou ztráty taky malé (do 10 %), vyšší ztráty (až 30 %) byly zjištěny u mouk obohacených riboflavinem. Ke ztrátám dochází také působením kypřících prášků. [4, 7]

Nejdůležitějším faktorem, který ovlivňuje stabilitu riboflavinu, je světlo (při ozáření viditelným i UV světlem je nestálý a dochází k odštěpení ribosového zbytku). Největší vliv má světlo o rozsahu 420 až 560 nm. Zářivkové světlo je méně škodlivé než přímé sluneční světlo, ale produkty v průhledných obalech mohou být ovlivněny osvětlením v prodejnách. K značným ztrátám riboflavinu v mléce dochází přímým ozářením slunečním světlem. Při skladování mléka na slunci degraduje za 1hodinu asi 20-40 % přítomného vitaminu.

Během sušení mléka dochází asi k 2 % ztrátám riboflavinu. Fermentované mléčné výrobky

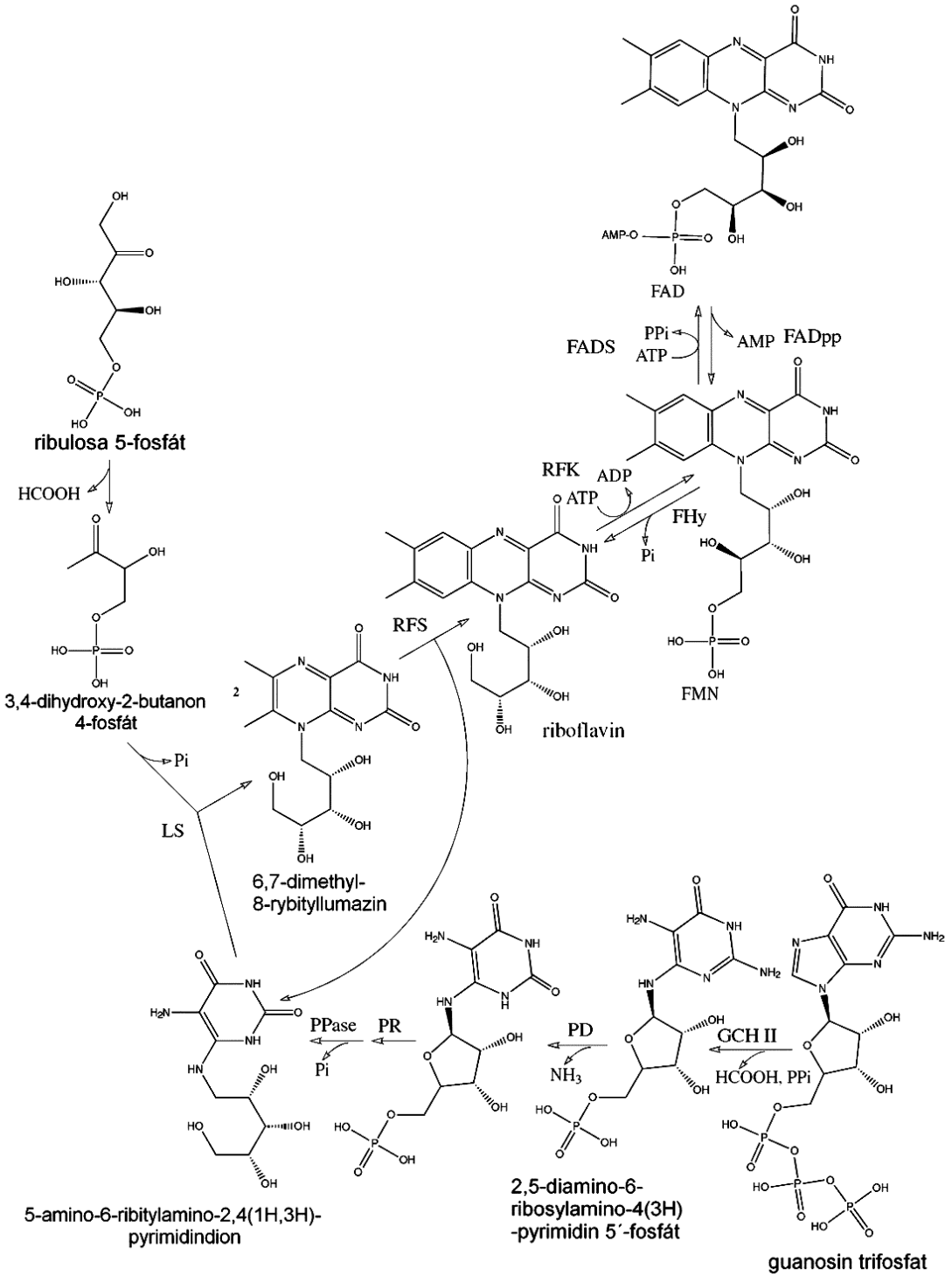
obsahují ve většině případů vyšší koncentrace riboflavinu než původní mléko, neboť vitamin je syntetizován použitými mikroorganismy.[1, 7, 33]

Tab. 2. Retence vitaminu B_2 ve vybraných potravinách po daných kulinárních úpravách [34]

Potravina	**Retence vitaminu B_2 (%)**	**Potravina**	**Retence vitaminu B_2 (%)**
Hovězí maso pečené	95	Brambory loupané vařené	95
Hovězí plátky opečené, dušené	100	Brambory smažené	95
Kuře pečené	90	Rajčata vařená, pečená	95
Vepřové maso pečené	95	Zelenina listová vařená ve vodě	90
Vepřové maso obalované smažené	100	Zelenina listová vařená ze zmrazené	95
Vepřové plátky opečené dušené	75	Zelenina kořenová vařená ve vodě	90
Vepřové maso uzené pečené	95	Zelenina kořenová vařená ze zmrazené	95
Játra smažená	90	Zelenina ostatní vařená ve vodě	90
Párky ohřívané	100	Zelenina ostatní vařená ze zmrazené	95
Vejce míchaná	95	Ovoce mražené	100
Vejce vařená natvrdo	95	Ovoce sušené	90
Mléko ohřívané 10 minut	100	Mouka, moučná jídla pečená	90

1.1.5 Fyziologie riboflavinu

Biosyntéza riboflavinu je podobná u rostlin, kvasinek a bakterií. Ve všech těchto organismech je riboflavin nejprve syntetizován z GTP a ribulosy 5-fosfátu, a po té fosforylován na FMN a následně adenylován na FAD. [35]



Obr. 8 Biosyntéza riboflavinu [35]

Flavinmononukleotid i flavinadenindinukleotid se štěpí v tenkém střevě. Absorbce v nízkých koncentracích riboflavinu je regulována pomocí saturačního mechanizmu, vyšší koncentrace jsou absorbovány pasivní difuzí. Riboflavin z potravin živočišného původu je snáze resorbován v trávicím traktu než vitamin z potravin rostlinného původu, kde převládají kovalentně vázané formy, obtížně štěpitelné *proteasami*. Pomáhá při katalýze enzymů kontrolujících tvorbu a rozklad cukrů a bílkovin tak, že je jejich kofaktorem. [7, 36, 37]

Riboflavin zásobuje lidské tělo buněčnou energií, podporuje růst vlasů a zesiluje kůži. [17]

Je to vitamin rozpustný ve vodě, který se podílí na tvorbě hormonů štítné žlázy, na zajištění činnosti enzymů v buňkách a tkáních, spolupodílí se na krvetvorbě a oxidoredukčních procesech. Účastní se také procesu vidění tím, že převádí krátkovlnné modré paprsky na žlutozelené a tím umožňuje vidění za šera. [9, 38]

Riboflavin se doporučuje přijímat jako doplněk stravy při jeho nedostatku následkem střevních poruch, alkoholismu, rozsáhlých popálenin. Užívá se taktéž u celiakie či přetrvávajících průjmech. Příznivě ovlivňuje psychiku u dlouho trvajících stresů. Napomáhá předcházet tvorbě koutků, aftů a jejich hojení. [38]

1.1.6 Doporučená denní dávka

Výše doporučeného denního příjmu riboflavinu je vzhledem k jeho působení v energetickém metabolismu a metabolismu proteinů závislá na obsahu proteinů a energetické hodnotě potravy. Doporučená denní dávka pro průměrného obyvatele ČR činí 1,5 $mg.den^{-1}$. Zvýšený denní příjem na 1,8 mg i vyšší se doporučuje kojícím matkám, při infekčních onemocněních, po chirurgických zákrocích a při zvýšené aktivitě štítné žlázy. [9]

1.1.7 Nedostatek riboflavinu

Nedostatek riboflavinu se nejrychleji projeví "na povrchu" našeho těla zánětlivými změnami sliznic a kůže, některými očními a nervovými poruchami. Např. vypadávání vlasů, praskání rtů, pokožka je lesklá, oči bývají unavené až červené, objevuje se citlivost na světlo. Dále vede nedostatek riboflavinu k nespavosti, přispívá k nástupu deprese. [38, 39]

Nedostatečný příjem riboflavinu trvající více než 100 dní vede ke vzniku hypovitaminosy. Nejčastěji je diagnostikována u osob, které konzumují nedostatečné množství mléka a mléčných výrobků. Kromě toho může být hypovitaminosa způsobena stresem organismu, nemocemi štítné žlázy nebo záněty tenkého střeva. [9]

1.1.8 Metody stanovení riboflavinu

Ke stanovení riboflavinu je možno používat fluorimetrickou metodu, která je založená na měření fluorescence. Lze jej však také stanovit fotometricky a čistší preparáty polarograficky. Byly vypracovány také mikrobiologické testy, ale pro snadnost a jednoduchost se častěji používají metody chemické. [20]

Riboflavin je vázán esterickou vazbou na kyselinu fosforečnou ve formě koenzymu FAD a FMN, které jsou vázané na svůj specifický bílkovinný nosič (apoenzym) a nejčastěji vystupují ve formě barevné bílkoviny, žlutého flavoproteinu. K uvolnění vázaného riboflavinu na bílkovinu se používá hydrolýzy pomocí zředěných minerálních kyselin HCl a H_2SO_4. Kromě kyselé hydrolýzy se používá i enzymatická hydrolýza, která slouží k uvolnění riboflavinu estericky vázaného s kyselinou fosforečnou. Používaným enzymem je zde *takadiastáza*, *trypsin* nebo *clarasa*. [40]

V dnešní době se pro stanovení riboflavinu využívá moderní metody - separační chromatografická metoda vysoceúčinné kapalinové chromatografie HPLC.

2 MLÉKO A MLÉČNÉ VÝROBKY

Mléko objevily pastevecké civilizace a v některých oblastech je dodnes ceněno jako „národní poklad“. Například v Mongolsku se z kobylího mléka vyrábí alkoholický kumis. Naopak Číňané dávají přednost rostlinnému mléku sojovému. [41]

Mléko je pravý sekret mléčné žlázy, získaný úplným a správným vydojením v období, které se nazývá laktace. Mléko je nenahraditelným pokrmem kojenců, ale i důležitou součástí stravy pro dospívající, dospělé a seniory. Mléko je také hlavní surovinou pro mlékárenský průmysl a právem patří do lidské výživy. Mléko musí pocházet od zdravých dojnic, dále pak musí být správně ošetřeno a technologicky zpracováno a nesmí být znečištěno ani při výrobě. [42]

Z domácích zvířat, které poskytují mléko se na první místo řadí hovězí dobytek. Kravské mléko se podílí více než 90 % na produkci mléka a mléčných výrobků. Mléko dále poskytují kozy, ovce, buvoli, kobyly a osli. [43]

2.1 Dělení mlék a jeho vlastnosti

Mléka se mohou dělit podle několika hledisek:

a) podle obsahu bílkovin

- kaseinová mléka

- albuminová mléka

b) podle charakteru

- zralá (nebo-li pravá mléka, mají „odpovídající“ chemické složení)

- nezralá (mlezivo)

c) podle druhu savce

- lidské

- kravské

- kozí

- ovčí

- ostatní (kobylí, oslí, velbloudí, …)

Mléko je vícesložková směs a současně polydisperzní systém třech hlavních fází – emulzní (tukové), koloidní (bílkovinné) a molekulové (laktóza, minerální soli).

Bílokrémový neprůhledný vzhled mléka způsobuje mléčný tuk, kasein a částečně nerozpustný $Ca_3(PO_4)_3$. Hustota mléka je průměrně 1,03 $g.cm^{-3}$. Čerstvé mléko má hodnotu pH v rozmezí 6,5 až 6,7. [43]

Mléko se po chemické stránce skládá z 87,5 % vody a 12,5 % sušiny.

Sušina obsahuje:

- sacharidy (4,7 %) – převážně laktosu

- lipidy (3,2 – 4,5 %)

- bílkoviny (3,3 %)

- minerální látky (0,7 %)

- vitamíny (A, B_1, B_2, B_5, B_6, B_{12}, D, E a C)

Převažujícími sacharidy mléka jsou laktosa, volná glukosa a galaktosa, aminocukry a kyselina N-acetylneuraminová.

Lipidy mléka jsou rozptýleny v podobě tukových kuliček. Mléčný tuk je v jemně rozptýleném, emulgovaném a dobře stravitelném stavu. 98-99 % lipidů v tukových kuličkách tvoří triglyceridy, malé množství je fosfolipidů a sterolů v membráně tukových kuliček.

Mezi bílkovinami mléka převládá kasein (2,5 %), dalšími bílkovinami mléka jsou syrovátkové bílkoviny (0,6 %).

Minerální látky (0,7 %) se dělí na makroprvky (Ca, P) a mikroprvky (Fe, Cu, Zn, Al, I, F, Se, Co, Sr). [33]

2.2 Výrobky mlékárenského průmyslu

- tekuté výrobky - tekutá mléka a smetany

  Jsou to výrobky, které mají základ v mléce, obsahují složky v nezměněné podobě, maximálně pozměněné tepelným záhřevem. Může u něj být upravené množství tuků, bílkovin nebo mohou být také ochuceny.

Mléko plnotučné - více než 3,5 % tuku

Mléko plnotučné nebo selské nestandardizované - více než 3,5 % tuku včetně

Mléko částečně odtučněné nebo polotučné - 1,5 až 1,8 % tuku

Mléko odtučněné - méně než 0,5 % tuku včetně

- fermentované výrobky
- výroba mražených smetanových krémů
- dehydratované výrobky

Zahuštěné

Sušený - mléčný výrobek v prášku získaný sušením mléka plnotučného, odtučněného nebo částečně odtučněného nebo smetany nebo jejich směsi, s obsahem vody nejvýše 5 % hmotnostních.

- máslo
- sýry

Mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, prokysáním a oddělením podílu syrovátky.

Tvaroh – nezrající sýr získaný kyselým sráţením, které převládá nad sráţením pomocí syřidla (měkký tvaroh)

zrající sýr – sýr, u kterého po prokysání došlo k dalším biochemickým a fyzikálním procesům (Niva, Hermelín)

tavený sýr – sýr, který byl tepelně upraven za přídavku tavicích solí (Smetanito Želetava)

syrovátka – mléčný výrobek vznikající jako vedlejší produkt při výrobě sýrů, včetně tvarohů a kaseinů

- mléčné speciality [44]

2.3 Kozí mléko

Účinky kozího mléka znali již staří Římané, kdy kozí mléko bylo považováno za „elixír krásy a dlouhověkosti" a bylo velmi ceněné. Dlouhodobě známé léčebné účinky kozího mléka jsou podloženy i vědeckými studiemi. S pozitivními výsledky se setkáváme u několika onemocnění (onemocnění trávicího traktu, stres a migrény, alergie, revmatické bolesti - vykazuje protizánětlivé účinky, protože posiluje imunitní systém**,** kožní alergie, ekzémy, prevence nádorových onemocnění). [45]

Kozí mléko má více tuku i více bílkovin než mléko kravské, což lze eliminovat jeho ředěním. Bílkoviny kozího mléka jsou lépe stravitelné, obsahuje také kvalitnější enzymy, které mají léčebné účinky. V případě kozího mléka nejsou tak časté alergické reakce. [41]

Vyšší spotřeba kravského mléka oproti kozímu mléku je také zapříčiněna tím, že koza má větší tendenci převádět do svého mléka jedy a choroboplodné organismy, které se do ní dostanou (byly zaznamenány otravy z mléka kozy, která snědla Rulík zlomocný, nebo epidemie klíšťové encefalitidy způsobené kozami, které infikovala nakažená klíšťata). [46]

2.4 Ovčí mléko

Je bílé nebo nažloutlé barvy a příjemné nasládlé chuti. Svým složením se ovčí mléko liší od mléka jiných savců. Vzhledem k ideálnímu poměru tuku, bílkovin – aminokyselin, mastných kyselin, vitaminů, enzymů a hormonů je velmi výživné. Přímá konzumace se doporučuje jen výjimečně v případech vážného onemocnění zažívacího traktu jako energetická a výživná „bomba“. Celkový obsah bílkovin je u ovčího mléka podstatně vyšší než u kravského. Vyšší je i obsah všech esenciálních aminokyselin. [47, 48]

Tab. 3. Chemické složení jednotlivých druhů mlék

Mléko	**Tuk**	**Bílkoviny**	**Sušina**	**Cukr**	**Popeloviny**
mateřské	3,0	2,1	11,8	6,5	0,2
kravské	4,0	3,5	13,1	4,8	0,8
kozí	4,1	3,8	13,1	4,4	0,8
ovčí	8,9	6,3	21,3	5,0	1,0

3 CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ

Základním principem všech chromatografických metod je opakované ustalování rovnováhy rozpuštěné látky mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je pohyblivá (mobilní) a druhá zakotvená (stacionární). Společným rysem těchto metod je také to, že k dělení dochází na styku těchto dvou fází (tuhé, kapalné nebo plynné, prakticky v jakékoli kombinaci). Separace vzorků se dosáhne tím, že jednotlivé složky se pohybují chromatografickým systémem různými rychlostmi, které závisí na interakci složek s mobilní a stacionární fází. Průnik složek chromatografickým systémem zprostředkovává mobilní fáze. Složka, jejíž interakce se stacionární fází jsou nejsilnější, se bude nejdéle zdržovat v stacionární fázi, a proto se bude pohybovat chromatografickým systémem pomaleji než složky, které se budou přednostně zdržovat v mobilní fázi. [49]

Pro stanovení riboflavinu se používá kapalinová chromatografie. Rovnovážné stavy se vytvářejí na základě různých fyzikálně–chemických interakcí mezi složkou a mobilní fází, složkou a stacionární fází a také mobilní a stacionární fází. [50]

Chromatografických metod je velké množství, proto je nutné rozdělit je do několika skupin. Vzhledem ke značné různorodosti se dělí podle několika hledisek:

1. Podle povahy mobilní fáze

- Kapalinová chromatografie – kdy mobilní fází je kapalina.

- Plynová chromatografie – kdy mobilní fází je plyn.

2. Podle uspořádání stacionární fáze

- Kolonová chromatografie – kdy stacionární fáze je umístěna v trubici (koloně).

- Plošné techniky - Papírová chromatografie

- Tenkovrstvá chromatografie

3. Podle povahy děje, který převládá při separaci

- Rozdělovací chromatografie – o separaci rozhoduje různá rozpustnost složek vzorku ve stacionární a mobilní fázi. [51]

- Adsorbční chromatografie – rozhodující pro dělení látek je jejich rozpustnost v užitém rozpouštědle a adsorbovatelnost na daném adsorbentu. [52]

- Iontově výměnná chromatografie – o separaci rozhodují různě velké elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze a ionty vzorku. [53]
- Gelová chromatografie – složky se separují podle velikosti na pórovité stacionární fázi – gelu (menší molekuly vzorku se v pórech gelu zdržují déle).
- Afinitní chromatografie – stacionární fáze je schopna vázat ze vzorku právě určité složky, ke kterým má úzce selektivní vztah – afinitu. [51]

3.1 Vysoce účinná kapalinová chromatografie

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. O separaci složek vzorku rozhoduje jejich interakce se stacionární fází a také záleží na použité mobilní fázi. Klasické kolonové provedení se stalo základem vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC-High-Performance Liquid Chromatography). K účinné separaci je třeba použít dostatečně malých částic sorbentu, které kladou prostupující kapalině značný odpor. Proto je nutno pracovat při vysokém tlaku. [51]

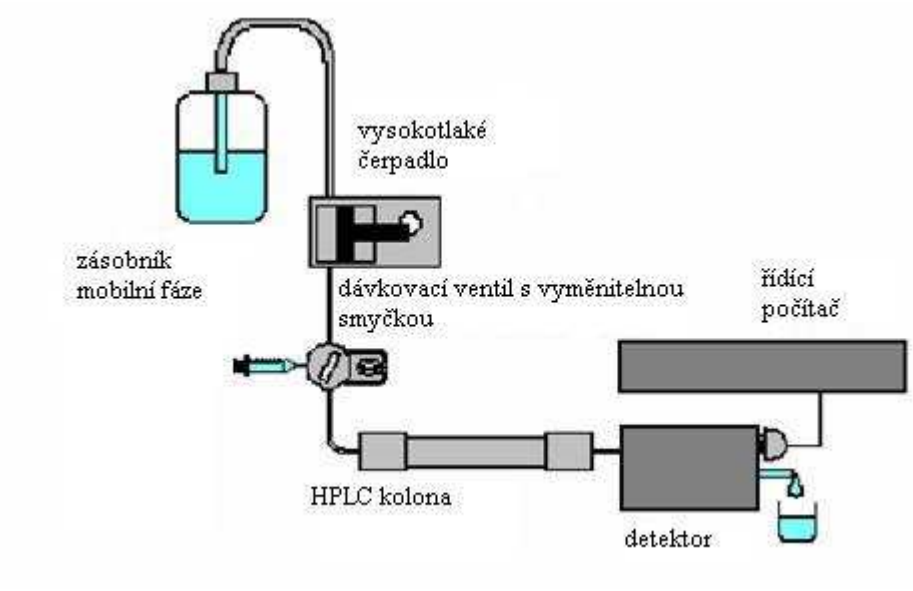
Analýzu je možné provádět eluční, frontální nebo vytěsňovací chromatografií. V případě eluční chromatografie jde o jednorázové nadávkování vzorku do kolony a vymývání složek inertní mobilní fází. Podmínkou úspěšné separace je, aby složka vzorku byla stacionární fází zadržována silněji, než složky mobilní fáze. Jednotlivé složky jsou eluovány v pořadí rostoucí velikosti interakce se stacionární fází a jsou odděleny čistou mobilní fází.[49, 51]

Eluce může být izokratická, stupňovitá nebo gradientová.

- Izokratická eluce – složení elučního činidla je po celou dobu analýzy stejné.
- Gradientová eluce – podle určité naprogramované závislosti se mění složení elučního činidla, a tím roste i jeho eluční schopnost. Gradientovou elucí se zlepší separace a zejména zkrátí trvání analýzy. [54]

U frontální chromatografie se po celou dobu analýzy přivádí do chromatografické kolony roztok vzorku v inertní mobilní fázi. Z kolony nejprve vytéká čistá mobilní fáze. Po určitém čase z ní začne vytékat roztok složky s nejmenší afinitou ke stacionární fázi. Frontální chromatografie se v analytické praxi používá jen málo, protože po každé analýze je potřeba náplň regenerovat nebo ji vyměnit. [49]

Při využití vytěsňovací chromatografie se vzorek nadávkuje do chromatografické kolony podobně jako u eluční chromatografie. Jako mobilní fáze se použije vytěsňovací činidlo v inertním rozpouštědle. Afinita vytěsňovacího činidla k stacionární fázi musí být větší než afinita kterékoliv složky vzorku k stacionární fázi. [49]



Obr. 9 Schéma HPLC [58]

Obr. 10 HPLC

3.1.1 Instrumentace HPLC

- rezervoár mobilní fáze – nejběžnějším typem rezervoáru mobilní fáze je skleněná lahev. Většina výrobců nabízí tyto lahve se speciálním uzávěrem a hadicí, která je často opatřena skleněnou fritou. Mobilní fáze se před použitím filtrují (odstranění nečistot) a odplyňují. [55, 56]
- odplynovač (degasér)

- Čerpadlo – kapalina se do kolony čerpá pístovými nebo membránovými čerpadly. Dobré čerpadlo dociluje průtoku v rozsahu od mikrolitrů do desítek mililitrů za minutu s méně než 1% kolísáním průtoku při tlaku až 35 MPa. Materiál čerpadla nesmí být narušován mobilní fází a nesmí se do ní uvolňovat žádné látky. Jednočinné pístové čerpadlo by způsobovalo rušivé tlakové nárazy, proto jsou používána dvojčinná čerpadla, v sérií zapojená čerpadla a čerpadla využívající dvou nebo více pístů.

- Směšovací zařízení – složení mobilní fáze může zůstávat stálé (izokratická eluce) nebo se během separace mění (gradientová eluce). Naprogramované směšovací zařízení může s využitím zásobníku různých kapalin připravovat směs kapalin stálého složení nebo řídit změny ve složení výsledné mobilní fáze v průběhu separace.

- Dávkovací zařízení – dávkování injekční stříkačkou přináší nevýhody z hlediska těsnosti, udržení tlaku a zejména vnášení stop materiálu injekční stříkačky. V současné době bývají injekční systémy nahrazeny dávkováním obtokovým dávkovacím kohoutem. Dávkovací smyčka má 10 až 100 μl. Smyčka je připojena na kohout a plněna pomocí injekční stříkačky.

- Předkolony bývají často používány jako ochrana hlavní kolony. Bývají umístěné mezi čerpadlo a dávkovací zařízení, nebo mezi dávkovácí zařízení a analytickou kolonu. Způsobují jen malé rozšíření pásů a chrání kolonu před nečistotami a nerozpustnými materiály, plní i funkci předseparace vzorku.

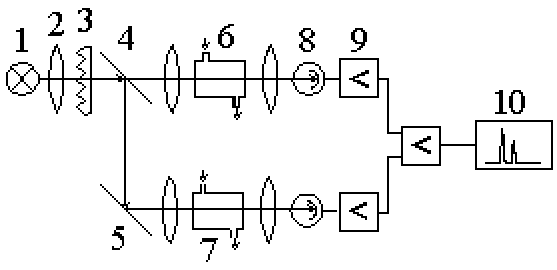
- Kolony používáme náplňové, pro většinu analýz jsou kolony zhotoveny z nerezové oceli. Kolony pro analytické využití jsou poměrně krátké (5 – 25 cm). Vnitřní průměr je 3 až 5 mm. Běžný průtok eluentu je 1–2 $ml.min^{-1}$.

- Nastavení teploty – většina separací HPLC probíhá při laboratorní teplotě a nevyžaduje termostatování. Některé separace se významně zlepší zvyšováním teploty, což většina nových chromatografů umožňuje.

- Detektory – detektory jsou zařízení, kterými se kontinuálně zjišťuje přítomnost složek analyzovaného vzorku v eluátu, který vytéká z chromatografické kolony. Detektory se může v mobilní fázi určovat koncentrace složek (koncentrační detektory) nebo její hmotnost (hmotnostní detektory).

Detektory v HPLC by měly být selektivní pro analyty a málo citlivé pro mobilní fázi. Průtočná cela detektoru musí snést tlak mobilní fáze a udržet těsnost. Nejpoužívanějšími detektory jsou fotometrický, refraktometrický, fluorescenční a elektrochemický.

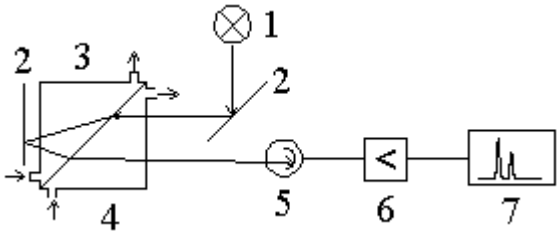
Fotometrické detektory – patří k nejběžnějším detektorům. Měří absorbanci eluátu vycházejícího z kolony. Pro optimální citlivost detektoru musí být zajištěna dostatečná absorbční dráha průtočné kyvety, jíž prochází paprsek. Jednodušší detektory měří při jedné vlnové délce v ultrafialové oblasti, nové dovolují nastavení vlnové délky pomocí monochromátoru. [51]



Obr. 11 Schéma fotometrického detektoru [56]

1 světelný zdroj	6 měrná cela
2 čočka	7 referentní cela
3 monochromátor	8 fotonásobič
4 polopropustné zrcadlo	9 zesilovač
5 zrcadlo	10 zapisovač

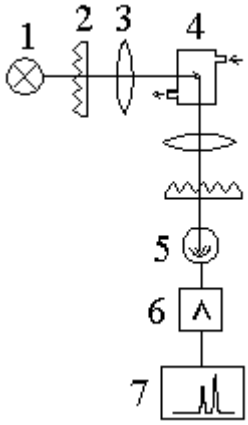
Refraktometrický detektor – měří rozdíly mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze. Obsahuje–li eluát složku, objeví se výchylka. Tento detektor není příliš citlivý, ale je univerzální. Při jeho použití je třeba přísně dodržovat teplotu. [51]



Obr. 12 Schéma refraktometrického detektoru [56]

1 zdroj světla	5 fotonásobič
2 zrcadlo	6 zesilovač
3 měrná cela	7 zapisovač
4 referentní cela	

Fluorescenční detektor – je založen na principu fluorescence – schopnosti látek absorbovat ultrafialové záření a pak vysílat záření o vyšší vlnové délce, které se měří fotonásobičem kolmo na směr vstupujícího záření. Detektor je vysoce selektivní. [51]



Obr. 13 Schéma fluorescenčního detektoru [56]

1 světelný zdroj	5 fotonásobič
2 monochromátor	6 zesilovač
3 čočka	7 zapisovač
4 měrná cela	

Elektrochemický detektor - měří určitou elektrickou veličinu (elektrodový potenciál, proud, kapacita) vyvolanou průchodem látky průtokovou celou detektoru, ve které jsou umístěny elektrody s vloženým pracovním napětím nezbytným k průběhu elektrochemické reakce a to v systému dvouelektrodového nebo tříelektrodového zapojení (elektrochemický článek). Jako další proměnná veličina se zaznamenává čas. Měřený elektrický signál je úměrný látkovému množství detekované složky a u elektrochemických detektorů se sleduje závislost mezi elektrickou veličinou a koncentrací sledované složky. Elektrochemické detektory dosahují vysoké citlivosti a jsou srovnatelné s citlivostí fluorescenčních detektorů. Vyšší požadavky se však kladou na mobilní fázi, zejména její čistotu a dokonalost odplynění. [57]

Hmotnostní spektrometr jako detektor použitelný nejen v plynové, ale i kapalinové chromatografii.[51]

4 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky statistické analýzy hodnotíme podle správnosti, tj. schopnosti metody kvantitativně určovat danou veličinu, dále podle přesnosti, tj. schopnosti metody poskytovat konzistentně stejné výsledky pro řadu opakovaných stanovení a podle reprodukovatelnosti, tj. schopnosti metody poskytovat konzistentně stejné výsledky pro nezávislá měření, prováděná se stejným vzorkem a stejným postupem různými pracovníky v různých laboratořích.

Analytická chyba představuje rozdíl mezi nalezeným obsahem analytu (x) a jeho skutečným obsahem (μ) ve vzorku. Malé, nepravidelné odchylky od skutečné hodnoty se určují statisticky ze souboru paralelních (opakovaných) analýz. Ovlivňují přesnost (reprodukovatelnost) či opakovatelnost stanovení. Aritmetický průměr všech výsledků se zpravidla nejvíce blíží skutečné hodnotě:

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

Základní charakteristikou nahodilých chyb je odhad směrodatné odchylky:

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

Ve skutečnosti máme k dispozici jen omezený počet výsledků, který je podstatně menší než n→ ∞ a tudíž je směrodatná odchylka závislá na počtu paralelních výsledků. Byl definován Studentův koeficient t, který charakterizuje Studentovo rozložení náhodných odchylek pro daný stupeň volnosti (daný počet výsledků analýz a použitou hladinu významnosti 1-α). Nejlepším vyjádřením pro průměrný výsledek ze série paralelních stanovení je potom vztah: [59]

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{\sqrt{s}}{t} n \qquad (3)$$

Tab. 4. Kvantily $t\ (n)$ Studentova rozdělení o n stupních volnosti [60]

t(n)	α		
n	0,05	0,01	0,001
1	12,71	63,66	636,58
2	4,30	9,93	31,60
3	3,18	5,84	12,92
4	2,78	4,60	8,60
5	2,57	4,03	6,87
6	2,45	3,71	5,96
7	2,37	3,50	5,41
8	2,31	3,36	5,04
9	2,26	3,25	4,78
10	2,23	3,14	4,59

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 METODIKA

5.1 Materiál

Vzorky syrového kozího, ovčího a kravského mléka: zakoupeny od soukromých chovatelů.

- Kozí - Zdenka Vykopalová, Zlín (Velíková)

- Ovčí - Marie Nohálová, Vsetín (Huslenky)

- Kravské - Josef Tkadleček, Vsetín (Jasenka)

Vzorky tepelně ošetřených mlék:

- Čerstvé mléko Olma – 1,5 % tuku

- Trvandlivé mléko Tatra – 1,5 % tuku

- Sušené mléko LAKTINO – tuk 14 % (obnovené mléko tuk 1,5 %) z něhož bylo připraveno obnovené mléko: 26 g prášku bylo rozpusštěno v 250 ml vody.

Sušená syrovátka – byla připravena obnovená syrovátka: 10 g práškové syrovátky bylo rozpuštěno ve 100 ml vody

Vzorky mlék pro stanovení tepelné stability:

Mlékárna Valašské Meziříčí, spol.s.r.o.

- Syrové mléko

- Pasterované mléko – pasterace 75°C po dobu 15 s

- Standardizovaná směs na kefirové mléko – pasterace 95°C po dobu 7 min

Vzorek mléka pro testy termo a fotostability:

- Čerstvé mléko, Madeta Řípec – 1,5 % tuku

Vzorky sýrů :

- Tavený sýr – Smetanito 65 % tvs, Želetava.

- Tvrdý sýr – Eidamská cihla 30 % tvs.

- Sýr s plísní uvnitř hmoty Niva - Niva, Otínoves

- Sýr s bílou plísní na povrchu Hermelín – Hermelín Král sýrů, Pribina

- Tvaroh – měkký tvaroh, 250g - NET PLASY, spol. s r.o. , Bystřice pod Hostýnem

5.2 Použité přistroje a pomůcky

- předvážky (Kern, SRN)

- analytické váhy (Scholler instruments, Adam AFA 210LC)

- temperovaná vodní lázeň (Memmert, SRN)

- běžné laboratorní sklo a pomůcky

- Dávkovací stříkačka (Hamilton, USA)

- Mikrofiltry 0,45 μm, Nylon (Supelco, USA)

- UV lampa

- Aparatura pro HPLC (Hewlett Packard 1100)

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

5.3 Použité roztoky a chemikálie

Methanol pro HPLC, gradient grade (Riedel-del Haën, SRN; Sigma- Aldrich, SRN)

kyselina trichloroctová (dodavatel - Lukeš, Uherský Brod)

kyselina chlorovodíková (dodavatel - Lukeš, Uherský Brod)

octan sodný (dodavatel - Lukeš, Uherský Brod)

kyselina mravenčí (dodavatel - Lukeš, Uherský Brod)

standard riboflavinu (Supelco, USA)

Azid sodný (dodavatel - Lukeš, Uherský Brod)

redestilovaná voda

5.4 Extrakce riboflavinu ze vzorků syrových mlék, mlék tepelně ošetřených, obnovených a ze syrovátky

Pipetou bylo odebráno 15,00 ml zhomogenizovaného vzorku mléka do 250 ml Erlenmayerovy baňky, která byla obalena hliníkovou folií. Ke vzorku bylo postupně přidáno 80 ml 0,2 $mol.1^{-1}$ kyseliny chlorovodíkové, která slouží pro hydrolýzu FMN a FAD, ve kterých je riboflavin vázán. Výjimkou bylo kozí mléko. V tomto případě bylo nutno použít 80 ml 0,3 $mol.l^{-1}$ kyseliny chlorovodíkové. Baňka byla vložena do vodní lázně na 1 hodinu při teplotě 97^0C a po celou dobu byla intenzivně třepána. V 50. minutě ohřevu byly přidáním 1 ml 60% kyseliny trichloroctové vysráženy proteiny a v 60. minutě byl přidán opět 1 ml 60% kyseliny trichloroctové. Poté byla směs ochlazena a kvantitativně převedena do 100 ml odměrné baňky obalené v hliníkové folii a její obsah byl doplněn redestilovanou vodou po rysku. Obsah baňky byl poté dvojstupňově zfiltrován (nejdříve byl vzorek zfiltrován přes plachetku a papírový filtr a následně byl zfiltrován přes filtr používaný pro chromatografii HPLC o velikosti pórů 0,45 μm).

5.5 Extrakce riboflavinu ze vzorků sýrů a tvarohu

S přesností na 0,01 g bylo naváženo 10 g analyzovaného vzorku. Vzorek byl kvantitativně převeden do třecí misky za postupného přidávání 80 ml 0,3 $mol.1^{-1}$ kyseliny chlorovodíkové, která slouží pro hydrolýzu FMN a FAD, ve kterých je riboflavin vázán. (V případě přípravy sýru Niva a Hermelín bylo přidáno malé mmnožství azidu sodného pro zničení plísní). Po zhomogenizování byla směs kvantitativně převedena do 250 ml Erlenmayerovy baňky, která byla obalena hliníkovou fólií. Baňka byla vložena do vodní lázně na 1 hodinu při teplotě 97 ^{0}C a po celou dobu byla intenzivně třepána. V 50. minutě ohřevu byly přidáním 1 ml 80% kyseliny trichloroctové vysráženy proteiny, v 60. minutě ohřevu byly přidány 2 ml 80% kyseliny trichloroctové. Poté byla směs ochlazena a kvantitativně převedena do 100 ml odměrné baňky obalené v hliníkové folii a její obsah byl doplněn redestilovanou vodou po rysku. Obsah baňky byl poté dvojstupňově zfiltrován

(nejdříve byl vzorek zfiltrován přes plachetku a papírový filtr a následně byl zfiltrován přes filtr používaný pro chromatografii HPLC o velikosti pórů 0,45 μm).

5.6 Zkouška stability riboflavinu

5.6.1 Zkouška termostability riboflavinu

Zkouška termostability vitaminu B_2 byla provedena na následujících vzorcích odebraných v mlékárně Valašské Meziříčí spol.s.r.o.:

1) vzorek syrového mléka
2) vzorek pasterovaného odstředěného mléka
3) vzorek standardizované směsi pro výrobu kefírového mléka tepelně ošetřeného

5.6.2 Zkouška fotostability riboflavinu

Zkouška fotostability byla provedena vystavením vzorku mléka dennímu světlu, zářivce a UV světlu.

5.6.2.1 Fotostabilita vitaminu B_2 v mléce vystavenému dennímu světlu

Mléko bylo vystaveno dennímu světlu. Po 2, 4 a 24 hodinách byl odebrán vzorek mléka a bylo provedeno stanovení vitaminu B_2.

5.6.2.2 Fotostabilita vitaminu B_2 v mléce vystavenému zářivce

Mléko bylo vystaveno světlu ze zářivky. Po 2 a 4 hodinách byl odebrán vzorek mléka a bylo provedeno stanovení vitaminu B_2.

5.6.2.3 Fotostabilita vitaminu B_2 v mléce vystavenému UV záření

Mléko bylo vystaveno UV záření. Po 1, 2 a 3 hodinách byl odebrán vzorek mléka a bylo provedeno stanovení vitaminu B_2.

5.7 Kalibrační křivka pro chromatografické stanovení vitaminu B_2

Pro měření kalibrační křivky byl použit standart riboflavinu (Supelco, USA), který byl rozpuštěn v redestilované vodě. Výchozí koncentrace zásobního roztoku byla 4 $\mu g.ml^{-1}$. Ze zásobního roztoku riboflavinu byly připraveny dalším ředěním redestilovanou vodou kalibrační roztoky o danných koncentracích. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost plochy píku ($mA.V.s^{-1}$) na koncentraci riboflavinu ($\mu g.ml^{-1}$).

5.8 Chromatografická analýza

5.8.1 Chromatografické stanovení riboflavinu v mléce syrovém i tepelně ošetřeném

Vysrážení proteinů ze vzorku mléka bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 5.4. Nejlepším postupem pro vysrážení proteinů ze vzorků mléka byl určen ten, kdy byl v 50. minutě ohřevu přidán 1 ml 60% kyseliny trichloroctové a v 60 minutě byl přidán opět 1 ml 60% kyseliny trichloroctové. V případě přípravy vzorku kozího mléka bylo nutno použít 80% kyselinu trichloroctovou.

Z připraveného filtrátu byl dávkován alikvotní podíl 20 µl do HPLC. Separace byla provedena na koloně SUPELCOSIL LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm). Byla použita gradientová eluce mobilní fází o složení 0,12 $mol.l^{-1}$ octan sodný (pH 4,7 upraveno pomocí 85 % kyseliny mravenčí w/v – složka A) a methanol (složka B) o počátečním poměru 87:15 (A:B) v/v v čase 0 s gradientem uvedeným v tabulce 5. Průtok mobilní fáze byl 0,8 $ml.min^{-1}$ a teplota termostatu kolony 30^0C. Signál byl snímán detektorem UV/VIS DAD při vlnové délce 270 nm. Retenční čas pro riboflavin před opravou HPLC byl přibližně 9,7 minut a po opravě HPLC se změnil na 9,4 minut. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno za použití chromatografického softwaru ChemStation – Instrument 1 (Agilent Technologies, USA). Tento software vyhodnotil plochy píků ($mA .V.s^{-1}$)

Tab. 5. Gradient mobilní fáze pro stanovení riboflavinu metodou HPLC

Minuta	Poměr octan sodný : methanol
0	87 : 15
3	87 : 15
15	0:100
30	0:100

5.8.2 Chromatografické stanovení riboflavinu v sýrech

Vysrážení proteinů ze vzorků sýrů bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 5.5. Nejlepším postupem pro vysrážení proteinů ze vzorků sýrů byl určen ten, kdy byl v 50. minutě ohřevu přidán 1 ml 80% kyseliny trichloroctové a v 60. minutě byly přidány 2 ml 80% kyseliny trichloroctové .

Ze získaného filtrátu byl dávkován alikvotní podíl 20 μl do HPLC a podmínky analýzy byly stejné jako v kapitole 5.8.1.

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

6.1 Výsledky měření kalibračních křivek

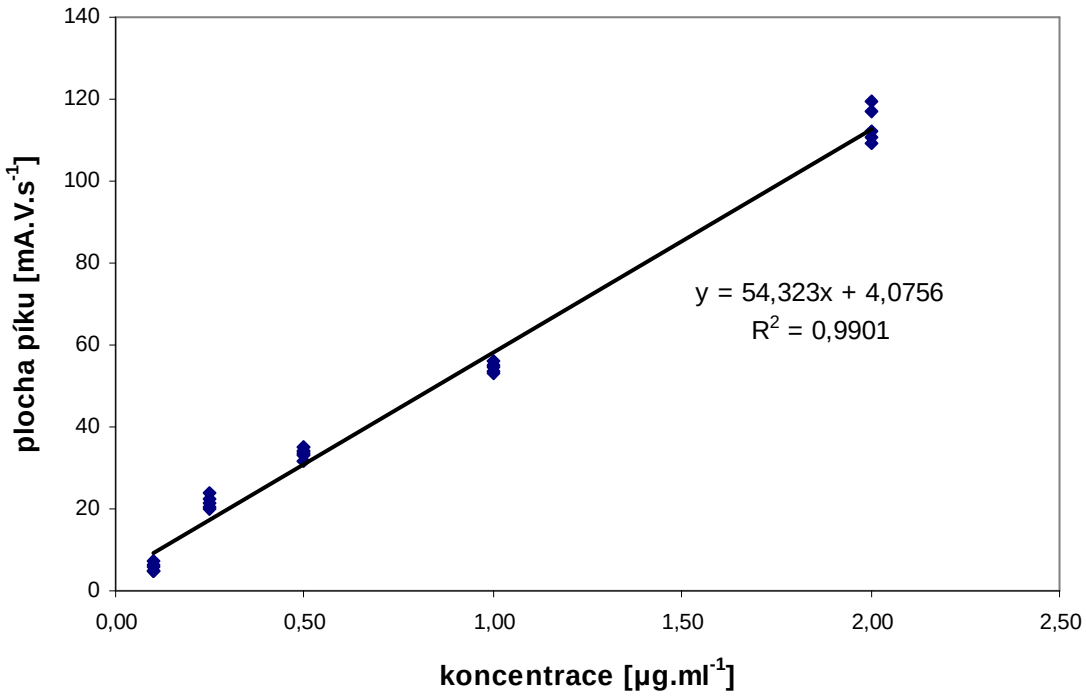
6.1.1 Výsledky měření kalibrační křivky 1 pro stanovení koncentrace vitaminu B_2

Kalibrace byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 5.7. Pro kalibraci č.1 byly proměřeny kalibrační roztoky o těchto koncentracích 2,00; 1,00; 0,50; 0,25 a 0,10 $\mu g.ml^{-1}$. Každý bod kalibrační křivky byl proměřen pětkrát. Všechna měření jsou uvedena v tabulce 6 a znázorněna v následujícím grafu 1.

Tab. 6. Kalibrace riboflavinu 1

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

Graf 1. Kalibrační křivka 1 s regresní rovnicí pro stanovení riboflavinu metodou HPLC



Z důvodu poruchy HPLC a následné výměny předkolony, byly vzorky - měření termostability a fotostability - měřeny za jiných separačních podmínek. Proto musela být znovu sestrojena kalibrační křivka, dle které byly zbylé vzorky doměřovány.

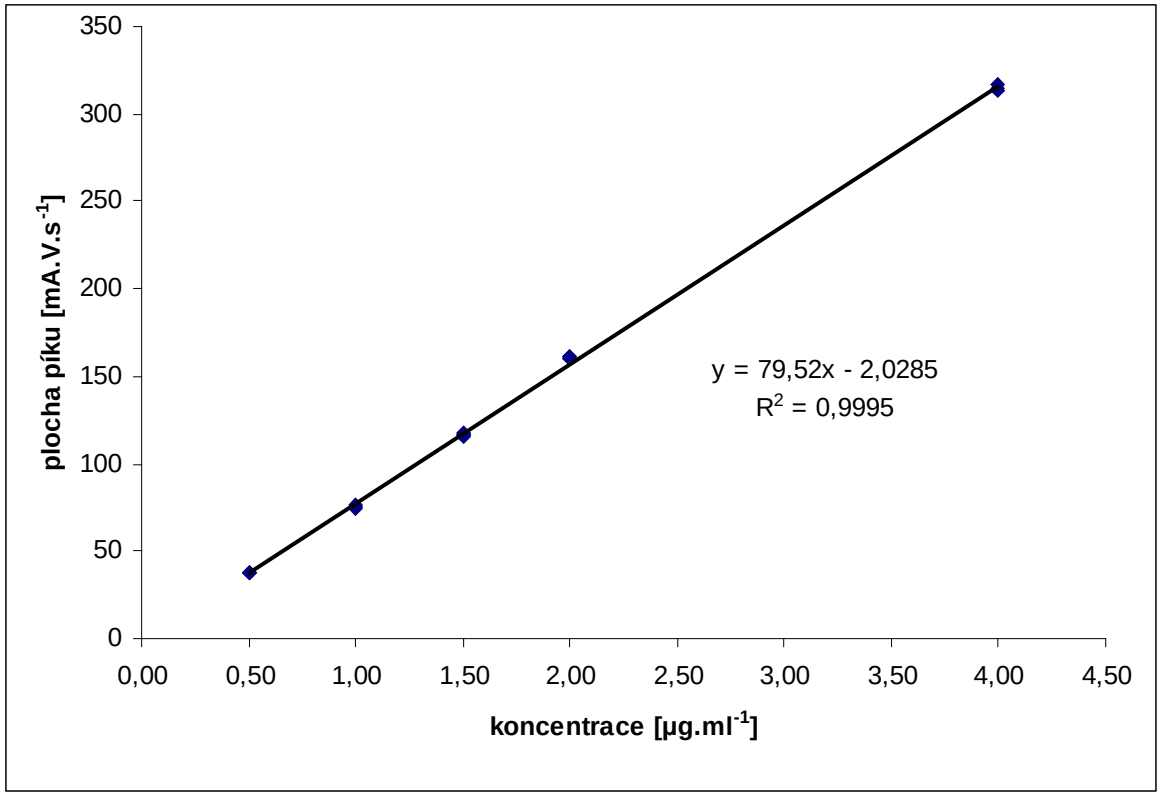
6.1.2 Výsledky měření kalibrační křivky 2 pro stanovení koncentrace vitaminu B_2

Kalibrace byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 5.7. Pro kalibraci č.2 byly proměřeny kalibrační roztoky o těchto koncentracích 4,00; 2,00; 1,50; 1,00; 0,50 µg.ml^{-1}. Každý bod kalibrační křivky byl proměřen pětkrát. Všechna měření jsou uvedena v tabulce 7 a znázorněna v následujícím grafu 2.

Tab. 7. Kalibrace riboflavinu 2

Koncentrace riboflavinu [µg,ml^{-1}]	Plocha píku[mA.V.s^{-1}]	Průměrná plocha píku [mA.V.s^{-1}]
0,50	38	37,84
	37,7	
	37,80	
	37,90	
	37,80	
1,00	73,90	75,44
	76,90	
	75,20	
	75,50	
	75,70	
1,50	115,30	116,50
	117,70	
	116,30	
	116,80	
	116,40	
2,00	160,70	160,84
	161,00	
	160,90	
	160,70	
	160,90	
4,00	313,10	314,92
	316,50	
	316,70	
	313,50	
	314,80	

Graf 2. Kalibrační křivka 2 s regresní rovnicí pro stanovení riboflavinu metodou HPLC



6.2 Výsledky extrakce riboflavinu ze vzorků syrových a tepelně ošetřených mlék

Extrakce riboflavinu z mléka byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 5.4. Při vysrážení bylo použito různých koncentrací a různého množství kyseliny trichloroctové. První srážení bylo provedeno v 50. minutě ohřevu a druhé srážení bylo provedeno v 60. minutě ohřevu. Vzorky byly vyhodnoceny symboly + a – :

\+ proteiny byly kvantitativně vysráženy

\- proteiny nebyly kvantitativně vysráženy

Pro stanovení postupu vysrážení proteinů byl použit vzorek čerstvého mléka Olma.

Tab. 8. Přídavek 50% kyseliny trichloroctové v 50. minutě ohřevu a v 60. minutě ohřevu

Přídavek kyseliny v 50. min [ml]	Výsledek srážení	Přídavek kyseliny v 60. min [ml]	Výsledek srážení
1	-	1	-
1	-	2	-
2	-	2	-

Tab. 9. Přídavek 60% kyseliny trichloroctové v 50. minutě ohřevu a v 60. minutě ohřevu

Přídavek kyseliny v 50. min [ml]	Výsledek srážení	Přídavek kyseliny v 60. min [ml]	Výsledek srážení
1	-	1	+
1	-	2	+
2	+	2	+

Tab. 10. Přídavek 80% kyseliny trichloroctové v 50. minutě ohřevu a v 60. minutě ohřevu

Přídavek kyseliny v 50. min [ml]	Výsledek srážení	Přídavek kyseliny v 60. min [ml]	Výsledek srážení
1	-	1	+
1	-	2	+
2	+	2	+

Z výsledků bylo patrné, že 50% kyselina trichloroctová byla pro vysrážení proteinů z mléka nedostatečně koncentrovaná, a proteiny tedy nebyly kvantitativně vysráženy. Kvantitativního vysrážení proteinů z mléka bylo dosaženo použitím 1 ml 60% kyseliny trichloroctové v 50. min ohřevu a 1 ml 60% kyseliny trichloroctové v 60. min. ohřevu.

Pro mléko syrové kozí a pro mléko obnovené ze sušeného mléka bylo nutno podmínky vysrážení proteinů upravit.

Tab. 11. Přídavek 60% kyseliny trichloroctové pro vysrážení kozího mléka v 50. minutě ohřevu a v 60. minutě ohřevu

Přídavek kyseliny v 50. min [ml]	Výsledek srážení	Přídavek kyseliny v 60. min [ml]	Výsledek srážení
1	-	1	-

Tab. 12. Přídavek 80% kyseliny trichloroctové pro vysrážení kozího mléka v 50. minutě ohřevu a v 60. minutě ohřevu

Přídavek kyseliny v 50. min [ml]	Výsledek srážení	Přídavek kyseliny v 60. min [ml]	Výsledek srážení
1	-	1	+

Z výsledků je patrné, že pro vysrážení proteinů z kozího mléka je potřeba použít 80% kyselinu trichloroctovou a to v dávce 1 ml v 50. minutě a 1 ml v 60. minutě ohřevu.

Tab. 13. Přídavek 60% kyseliny trichloroctové pro vysrážení obnoveného mléka v 50. minutě ohřevu a v 60. minutě ohřevu

Přídavek kyseliny v 50. min [ml]	Výsledek srážení	Přídavek kyseliny v 60. min [ml]	Výsledek srážení
1	-	1	-
1	-	2	+

Tab. 14. Přídavek 80 % kyseliny trichloroctové pro vysrážení obnoveného mléka v 50. minutě ohřevu a v 60. minutě ohřevu

Přídavek kyseliny v 50. min [ml]	Výsledek srážení	Přídavek kyseliny v 60. min [ml]	Výsledek srážení
1	-	1	+
1	+	2	+

Z výsledků je patrné, že pro vysrážení proteinů z obnoveného mléka je potřeba použít 60% kyselinu trichloroctovou a to v dávce 1 ml v 50. minutě a 2 ml v 60. minutě ohřevu.

6.3 Výsledky extrakce riboflavinu ze vzorků sýrů a tvarohu

Extrakce riboflavinu ze sýrů byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 5.5. Při vysrážení bylo použito různých koncentrací a různého množství kyseliny trichloroctové. První srážení bylo provedeno v 50. minutě ohřevu a druhé srážení bylo provedeno v 60. minutě ohřevu. Vzorky byly vyhodnoceny symboly + a – :

+ proteiny byly kvantitativně vysráženy

- proteiny nebyly kvantitativně vysráženy

Pro stanovení postupu vysrážení proteinů ze sýrů byl použit vzorek tvrdého sýra Eidamské cihly 30 % tvs.

Tab. 15. Přídavek 60% kyseliny trichloroctové v 50. minutě ohřevu a v 60. minutě ohřevu

Přídavek kyseliny v 50. min [ml]	Výsledek srážení	Přídavek kyseliny v 60. min [ml]	Výsledek srážení
1	-	1	-
1	-	2	-
2	-	2	-

Tab. 16. Přídavek 80% kyseliny trichloroctové v 50. minutě ohřevu a v 60. minutě ohřevu

Přídavek kyseliny v 50. min [ml]	Výsledek srážení	Přídavek kyseliny v 60. min [ml]	Výsledek srážení
1	-	1	-
1	-	2	+
2	+	2	+

Z výsledků je patrné, že pro vysrážení proteinů ze vzorku sýru je potřeba použít 80% kyselinu trichloroctovou a to v dávce 1 ml v 50. minutě a 2 ml v 60. minutě ohřevu.

6.4 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu ve vzorcích syrových mlék, mlék tepelně ošetřených, obnoveného mléka a ze syrovátky

6.4.1 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v syrovém kravském mléce

Extrakce riboflavinu byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 5.4. Vlastní chromatografické stanovení bylo provedeno u vzorku syrového kravského mléka podle postupu uvedeného v kapitole 5.8.1. Množství odebraného mléka k analýze bylo 15 ml. Vzorek byl analyzován pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitaminu B_2 v $\mu g.ml^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na $mg.100\ ml^{-1}$ mléka.

Tab. 17. Obsah riboflavinu ve vzorku syrového kravského mléka

Plocha píku [$mA.V.s^{-1}$]	Koncentrace riboflavinu [$\mu g.\ ml^{-1}$]	Koncentrace riboflavinu [$mg.\ 100\ ml^{-1}$]
19,70	1,917	0,192
19,60	1,905	0,191
19,50	1,893	0,189
19,50	1,893	0,189
19,60	1,905	0,191

Průměrný obsah vitaminu B_2 v syrovém kravském mléce byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky „s“ podle vzorce (2). Skutečný obsah vitaminu B_2 stanovovaný metodou HPLC byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 4. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha = 0,05$) a při čtyřech stupních volnosti 2,78 [59].

V tabulce 18 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitaminu B_2 v syrovém kravském mléce.

Tab. 18. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v syrovém kravském mléce

Koncentrace [mg. 100 ml^{-1}]	$(x_i - \overline{x})$	$(x_i - \overline{x})^2$
0,192	0,0016	0,000003
0,191	0,0006	0,0000004
0,189	-0,0014	0,000002
0,189	-0,00014	0,000002
0,191	-0,0006	0,0000004
$\overline{x} = 0,190$		$\Sigma = 0,000007$

směrodatná odchylka $s = 0,0013$ mg.100 ml^{-1}

Obsah vitaminu B_2 v syrovém kravském mléce

$\mu = 0,190 \pm 0,0527$ mg.100g^{-1} ($\alpha = 0,05$)

6.4.2 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v syrovém ovčím mléce

Extrakce riboflavinu byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 5.4. Vlastní chromatografické stanovení bylo provedeno u vzorku syrového ovčího mléka podle postupu uvedeného v kapitole 5.8.1. Množství odebraného mléka k analýze bylo 15 ml. Vzorek byl analyzován pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitaminu B_2 v μg.ml^{-1}. Tato hodnota byla přepočtena na mg.100 ml^{-1} mléka.

Tab. 19. Obsah riboflavinu u vzorku syrového ovčího mléka

Plocha píku [mA. V.s^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [μg. ml^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [mg. 100 ml^{-1}]
12,70	1,058	0,106
12,50	1,034	0,103
12,60	1,046	0,105
12,60	1,046	0,105
12,70	1,058	0,106

Pro výpočty statistických hodnot byla použita stejná metoda jako u syrového kravského mléka uvedených v kapitole 6.4.1.

V tabulce 20 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitaminu B_2 v syrovém ovčím mléce.

Tab. 20. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v syrovém ovčím mléce

Koncentrace [mg. 100 g^{-1}]	$(x_i - \overline{x})$	$(x_i - \overline{x})^2$
0,106	0,001	0,000001
0,103	-0,002	0,000004
0,105	0	0
0,105	0	0
0,106	0,001	0,000001
$\overline{x} = 0,105$		$\Sigma = 0,000006$

směrodatná odchylka $s = 0,0012$ mg.100 ml^{-1}

Obsah vitaminu B_2 v syrovém ovčím mléce

$\mu = 0,105 \pm 0,0503$ mg.100 ml^{-1} ($\alpha = 0,05$)

6.4.3 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v syrovém kozím mléce

Extrakce riboflavinu byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 5.4. Vlastní chromatografické stanovení bylo provedeno u vzorku syrového kozího mléka podle postupu uvedeného v kapitole 5.8.1. Množství odebraného mléka k analýze bylo 15 ml. Vzorek byl analyzován pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitaminu B_2 v $\mu g.ml^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na $mg.100\ ml^{-1}$ mléka.

Tab. 21. Obsah riboflavinu u vzorku syrového kozího mléka

Plocha píku [$mA.V.s^{-1}$]	Koncentrace riboflavinu [$\mu g.\ ml^{-1}$]	Koncentrace riboflavinu [$mg.100\ ml^{-1}$]
38,70	4,249	0,425
38,70	4,249	0,425
38,50	4,225	0,423
39,00	4,286	0,429
38,60	4,237	0,424

Pro výpočty statistických hodnot byla použita stejná metoda jako u syrového kravského mléka uvedených v kapitole 6.4.1. V tabulce 22 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitaminu B_2 v syrovém kozím mléce.

Tab. 22. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v syrovém kozím mléce

Koncentrace [mg. $100g^{-1}$]	$(x_i - \overline{x})$	$(x_i - \overline{x})^2$
0,425	-0,0002	0,00000004
0,425	-0,0002	0,00000004
0,423	-0,0022	0,000005
0,429	0,0038	0,00001
0,424	-0,0012	0,000001
$\overline{x} = 0,425$		$\Sigma = 0,000002$

směrodatná odchylka $s = 0,0006$ mg.100 ml^{-1}

Obsah vitaminu B_2 v syrovém kozím mléce

$\mu = 0,425 \pm 0,0420$ mg.100 ml^{-1} ($\alpha = 0,05$)

Literatura uvádí, že ovčí mléko má proti kravskému i vyšší obsah vitamínů B_2, B_6, B_{12} a kyseliny pantothenové, a také větší množství enzymů. [47] Nižší stanovené množství vitaminu B_2 v ovčím mléce mohlo být způsobené tím, že mléko bylo odebíráno na podzim, kdy už byly ovce krmeny pouze senem. Obsah riboflavinu v kozím mléce byl naměřen vyšší než v kravském mléce což potvrzuje i literatura.

6.4.4 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v čerstvém mléce pasterovaném

Extrakce riboflavinu byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 5.4. Vlastní chromatografické stanovení bylo provedeno u vzorku čerstvého pasterovaného mléka podle postupu uvedeného v kapitole 5.8.1. Množství odebraného mléka k analýze bylo 15 ml. Vzorek byl analyzován pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitaminu B_2 v $\mu g.ml^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na $mg.100\ ml^{-1}$ mléka.

Tab. 23. Obsah riboflavinu u vzorku čerstvého pasterovaného mléka

Plocha píku [$mA.V.s^{-1}$]	Koncentrace riboflavinu [$\mu g.\ ml^{-1}$]	Koncentrace riboflavinu [$mg.100\ ml^{-1}$]
12,20	1,193	0,119
12,50	1,218	0,122
12,40	1,210	0,121
12,50	1,218	0,122
12,40	1,210	0,121

Pro výpočty statistických hodnot byla použita stejná metoda jako u syrového kravského mléka uvedených v kapitole 6.4.1.

V tabulce 24 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitaminu B_2 v čerstvém pasterovaném mléce.

Tab. 24. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v čerstvém pasterovaném mléce

Koncentrace [$mg.\ 100g^{-1}$]	$(x_i - \overline{x})$	$(x_i - \overline{x})^2$
0,119	-0,002	0,000004
0,122	0,001	0,000001
0,121	0	0
0,122	0,001	0,000001
0,121	0	0
$\overline{x} = 0,121$		$\Sigma = 0,000006$

směrodatná odchylka $s = 0{,}0012$ mg.100 ml^{-1}

Obsah vitaminu B_2 v pasterovaném mléce

$\mu = 0{,}121 \pm 0{,}0504$ mg.100 ml^{-1} ($\alpha = 0{,}05$)

6.4.5 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v trvanlivém mléce (UHT)

Extrakce riboflavinu byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 5.4. Vlastní chromatografické stanovení bylo provedeno u vzorku trvandlivého mléka podle postupu uvedeného v kapitole 5.8.1. Množství odebraného mléka k analýze bylo 15 ml. Vzorek byl analyzován pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitaminu B_2 v $\mu g.ml^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na mg.100 ml^{-1} mléka.

Tab. 25. Obsah riboflavinu u vzorku trvanlivého mléka

Plocha píku [mA.V.s^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [$\mu g.\ ml^{-1}$]	Koncentrace riboflavinu [mg.100 ml^{-1}]
14,90	1,419	0,142
15,30	1,453	0,145
15,00	1,428	0,143
14,90	1,419	0,142
15,20	1,444	0,144

Pro výpočty statistických hodnot byla použita stejná metoda jako u syrového kravského mléka uvedených v kapitole 6.4.1.

V tabulce 26 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitaminu B_2 v trvanlivém mléce.

Tab. 26. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v trvanlivém mléce

Koncentrace [mg. 100ml^{-1}]	$(x_i - \overline{x})$	$(x_i - \overline{x})^2$
0,142	-0,0012	0,000001
0,145	0,0018	0,000003
0,143	-0,0002	0,000000041
0,142	-0,0012	0,000001
0,144	0,0008	0,0000006
$\overline{x} = 0,143$		$\Sigma = 0,000007$

směrodatná odchylka $s = 0,0013$ mg.100 ml^{-1}

Obsah vitaminu B_2 v trvanlivém mléce

$\mu = 0,143 \pm 0,0520$ mg.100 ml^{-1} ($\alpha = 0,05$)

6.4.6 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v obnoveném mléce

Extrakce riboflavinu byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 5.4. Vlastní chromatografické stanovení bylo provedeno u vzorku obnoveného mléka podle postupu uvedeného v kapitole 5.8.1. Množství odebraného mléka k analýze bylo 15 ml. Vzorek byl analyzován pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitaminu B_2 v μg.ml^{-1}. Tato hodnota byla přepočtena na mg.100 ml^{-1} mléka.

Tab. 27. Obsah riboflavinu u vzorku obnoveného mléka

Plocha píku [mA.V.s^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [μg. ml^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [mg.100 ml^{-1}]
12,20	1,193	0,119
12,40	1,210	0,121
12,20	1,193	0,119
12,50	1,218	0,122
12,40	1,210	0,121

Pro výpočty statistických hodnot byla použita stejná metoda jako u syrového kravského mléka uvedených v kapitole 6.4.1.

V tabulce 28 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitaminu B_2 v obnoveném mléce.

Tab. 28. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v obnoveném mléce

Koncentrace [mg. 100g^{-1}]	$(x_i - \overline{x})$	$(x_i - \overline{x})^2$
0,119	-0,0014	0,000002
0,121	0,0006	0,0000004
0,119	-0,0014	0,000002
0,122	0,0016	0,000003
0,121	0,0006	0,0000004
$\overline{x} = 0,120$		$\Sigma = 0,000007$

směrodatná odchylka $s = 0,0013$ mg.100 ml^{-1}

Obsah vitaminu B_2 v obnoveném mléce

$\mu = 0,120 \pm 0,0523$ mg.100 ml^{-1} ($\alpha = 0,05$)

6.4.7 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v obnovené syrovátce

Extrakce riboflavinu byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 5.4. Vlastní chromatografické stanovení bylo provedeno u vzorku obnovené syrovátky podle postupu uvedeného v kapitole 5.8.1. Množství odebraného mléka k analýze bylo 15 ml. Vzorek byl analyzován pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitaminu B_2 v $\mu g.ml^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na $mg.100\ ml^{-1}$ mléka.

Tab. 29. Obsah riboflavinu u vzorku obnovené syrovátky

Plocha píku [$mA.V.s^{-1}$]	Koncentrace riboflavinu [$\mu g.\ ml^{-1}$]	Koncentrace riboflavinu [$mg.100\ ml^{-1}$]
15,70	1,486	0,147
15,40	1,461	0,146
15,60	1,478	0,148
15,70	1,486	0,149
15,40	1,461	0,146

Pro výpočty statistických hodnot byla použita stejná metoda jako u syrového kravského mléka uvedených v kapitole 6.4.1.

V tabulce 30 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitaminu B_2 v obnovené syrovátce.

Tab. 30. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v syrovátce

Koncentrace [mg. 100ml^{-1}]	$(x_i - \overline{x})$	$(x_i - \overline{x})^2$
0,147	-0,0002	0,0000004
0,146	-0,0012	0,000001
0,148	0,0008	0,0000006
0,149	0,0018	0,000003
0,146	-0,0012	0,000001
$\overline{x} = 0,147$		$\Sigma = 0,000007$

směrodatná odchylka $s = 0,0013$ mg.100 ml^{-1}

Obsah vitaminu B_2 v obnovené syrovátce

$\mu = 0,147 \pm 0,065$ mg.100 ml^{-1} ($\alpha = 0,05$)

V čerstvém mléce bylo stanoveno 0,104 mg.100 ml^{-1}, v mléce trvanlivém bylo stanoveno 0,143 mg.100 ml^{-1} a v obnoveném mléce bylo stanoveno 0,120 mg.100 ml^{-1}. Vyšší množství riboflavinu v trvanlivém mléce bylo způsobeno nejpravděpodobněji tím, že šlo o jiného dodavatelé mléka. V obnovené syrovátce byl obsah riboflavinu 0,147 mg.100g^{-1}.

6.5 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu ve vzorcích sýrů a tvarohu

6.5.1 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v tvrdém sýru

Extrakce riboflavinu byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 5.5. Vlastní chromatografické stanovení bylo provedeno u vzorku tvrdého sýra Eidam 30 % t.v.s. podle postupu uvedeného v kapitole 5.8.2. Navážka vzorku byla 10,00 g. Vzorek byl analyzován pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitaminu B_2 v $\mu g.g^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na $mg.100\ g^{-1}$ sýra.

Tab. 31. Obsah riboflavinu u vzorku tvrdého sýra

Plocha píku [$mA.V.s^{-1}$]	Koncentrace riboflavinu [$\mu g.\ g^{-1}$]	Koncentrace riboflavinu [$mg.100\ g^{-1}$]
26,90	3,638	0,364
26,70	3,613	0,361
26,60	3,600	0,360
26,70	3,613	0,361
26,80	3,625	0,363

Pro výpočty statistických hodnot byla použita stejná metoda jako u syrového kravského mléka uvedených v kapitole 6.4.1.

V tabulce 32 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitaminu B_2 v tvrdém sýru.

Tab. 32. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v tvrdém sýru

Koncentrace [$mg.\ 100g^{-1}$]	$(x_i - \overline{x})$	$(x_i - \overline{x})^2$
0,364	0,0022	0,000005
0,361	-0,0008	0,0000006
0,360	-0,0018	0,000003
0,361	-0,0008	0,0000006
0,363	0,0012	0,000001
$\overline{x} = 0,362$		$\Sigma = 0,00001$

směrodatná odchylka $s = 0{,}0016$ mg.100 g^{-1}

Obsah vitaminu B_2 v tvrdém sýru

$\mu = 0{,}362 \pm 0{,}0583$ mg.100 g^{-1} ($\alpha = 0{,}05$)

6.5.2 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v taveném sýru

Extrakce riboflavinu byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 5.5. Vlastní chromatografické stanovení bylo provedeno u vzorku taveného sýra Smetanito Želetava podle postupu uvedeného v kapitole 5.8.2. Navážka vzorku byla 10,00 g. Vzorek byl analyzován pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitaminu B_2 v $\mu g.g^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na mg.100 g^{-1} sýra.

Tab. 33. Obsah riboflavinu u vzorku taveného sýra

Plocha píku [mA.V.s^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [$\mu g.\ g^{-1}$]	Koncentrace riboflavinu [mg.100 g^{-1}]
12,20	1,789	0,179
12,40	1,814	0,181
12,30	1,802	0,180
12,30	1,802	0,180
12,20	1,789	0,179

Pro výpočty statistických hodnot byla použita stejná metoda jako u syrového kravského mléka uvedených v kapitole 6.4.1.

V tabulce 34 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitaminu B_2 v taveném sýru.

Tab. 34. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v taveném sýru

Koncentrace [mg. 100 g^{-1}]	$(x_i - \overline{x})$	$(x_i - \overline{x})^2$
0,179	-0,0008	0,0000006
0,181	0,0012	0,000001
0,180	0,0002	0,00000004
0,180	0,0002	0,00000004
0,179	-0,0008	0,0000006
$\overline{x} = 0,180$		$\Sigma = 0,000003$

směrodatná odchylka $s = 0,0008$ mg.100 g^{-1}

Obsah vitaminu B_2 v taveném sýru

$\mu = 0,180 \pm 0,0416$ mg.100 g^{-1} ($\alpha = 0,05$)

6.5.3 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v tvarohu

Extrakce riboflavinu byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 5.5. Vlastní chromatografické stanovení bylo provedeno u vzorku tvarohu podle postupu uvedeného v kapitole 5.8.2. Navážka vzorku byla 10,00 g. Vzorek byl analyzován pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitaminu B_2 v $\mu g.g^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na mg.100 g^{-1} tvarohu.

Tab. 35. Obsah riboflavinu u vzorku tvarohu

Plocha píku [mA.V.s^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [μg. g^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [mg.100 g^{-1}]
26,80	3,625	0,363
27,00	3,650	0,365
26,70	3,613	0,361
27,00	3,650	0,365
26,90	3,638	0,364

Pro výpočty statistických hodnot byla použita stejná metoda jako u syrového kravského mléka uvedených v kapitole 6.4.1.

V tabulce 36 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitaminu B_2 v tvarohu.

Tab. 36. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v tvarohu

Koncentrace [μg. 100 g^{-1}]	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$
0,363	-0,0006	0,0000004
0,365	0,0014	0,000002
0,361	-0,0026	0,000007
0,365	0,0014	0,000002
0,364	0,0004	0,0000002
$\bar{x} = 0,364$		$\Sigma = 0,000011$

směrodatná odchylka $s = 0,0017$ mg.100 g^{-1}

Obsah vitaminu B_2 v tvarohu

$\mu = 0,364 \pm 0,0588$ mg.100 g^{-1} ($\alpha = 0,05$)

6.5.4 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v plísňovém sýru Hermelín

Extrakce riboflavinu byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 5.5. Vlastní chromatografické stanovení bylo provedeno u vzorku plísňového sýru Hermelín podle postupu uvedeného v kapitole 5.8.2. Navážka vzorku byla 10,00 g. Vzorek byl analyzován pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitaminu B_2 v $\mu g.g^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na $mg.100\ g^{-1}$ sýra.

Tab. 37. Obsah riboflavinu u vzorku plísňového sýru Hermelín

Plocha píku [$mA.V.s^{-1}$]	Koncentrace riboflavinu [$\mu g.\ g^{-1}$]	Koncentrace riboflavinu [$mg.100\ g^{-1}$]
12,40	1,814	0,181
12,60	1,840	0,184
12,40	1,814	0,181
12,40	1,814	0,181
12,50	1,827	0,183

Pro výpočty statistických hodnot byla použita stejná metoda jako u syrového kravského mléka uvedených v kapitole 6.4.1.

V tabulce 38 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitaminu B_2 v plísňovém sýru Hermelín.

Tab. 38. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v plísňovém sýru Hermelín

Koncentrace [mg. 100 g^{-1}]	$(x_i - \overline{x})$	$(x_i - \overline{x})^2$
0,181	-0,001	0,000001
0,184	0,002	0,000004
0,181	-0,001	0,000001
0,181	-0,001	0,000001
0,183	0,001	0,000001
$\overline{x} = 0,182$		$\Sigma = 0,000008$

směrodatná odchylka $s = 0,0014$ mg.100 g^{-1}

Obsah vitaminu B_2 v plísňovém sýru Hermelín

$\mu = 0,182 \pm 0,0541$ mg.100 g^{-1} ($\alpha = 0,05$)

6.5.5 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v plísňovém sýru Niva

Extrakce riboflavinu byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 5.5. Vlastní chromatografické stanovení bylo provedeno u vzorku plísňového sýru Niva podle postupu uvedeného v kapitole 5.8.2. Navážka vzorku byla 10,00 g. Vzorek byl analyzován pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitaminu B_2 v $\mu g.g^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na mg.100 g^{-1} sýra.

Tab. 39. Obsah riboflavinu u vzorku plísňového sýru Niva

Plocha píku [mA.V.s^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [μg. g^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [mg.100 g^{-1}]
21,20	2,921	0,292
21,00	2,896	0,290
21,10	2,909	0,291
21,20	2,921	0,292
21,00	2,896	0,290

Pro výpočty statistických hodnot byla použita stejná metoda jako u syrového kravského mléka uvedených v kapitole 6.4.1.

V tabulce 40 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitaminu B_2 v plísňovém sýru Niva.

Tab. 40. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v plísňovém sýru Niva

Koncentrace [mg. 100 g^{-1}]	$(x_i - \overline{x})$	$(x_i - \overline{x})^2$
0,292	0,001	0,000001
0,290	-0,001	0,000001
0,291	0	0
0,292	0,001	0,000001
0,290	-0,001	0,000001
$\overline{x} = 0,291$		$\Sigma = 0,000004$

směrodatná odchylka $s = 0{,}0010$ mg.100 g^{-1}

Obsah vitaminu B_2 v plísňovém sýru Niva

$\mu = 0{,}291 \pm 0{,}0455$ mg.100 g^{-1} ($\alpha = 0{,}05$)

6.5.6 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v sýru Jadel

Extrakce riboflavinu byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 5.5. Vlastní chromatografické stanovení bylo provedeno u vzorku sýra Jadel podle postupu uvedeného v kapitole 5.8.2. Navážka vzorku byla 10,00 g. Vzorek byl analyzován pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitaminu B_2 v $\mu g.g^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na mg.100 g^{-1} sýra.

Tab. 41. Obsah riboflavinu u vzorku sýru Jadel

Plocha píku [mA.V.s^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [$\mu g.\ g^{-1}$]	Koncentrace riboflavinu [mg.100 g^{-1}]
23,00	3,147	0,315
23,20	3,173	0,317
23,20	3,173	0,317
23,10	3,160	0,316
23,00	3,147	0,315

Pro výpočty statistických hodnot byla použita stejná metoda jako u syrového kravského mléka uvedených v kapitole 6.4.1.

V tabulce 42 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitaminu B_2 v sýru Jadel.

Tab. 42. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v sýru Jadel

Koncentrace [mg. 100 g^{-1}]	$(x_i - \overline{x})$	$(x_i - \overline{x})^2$
0,348	-0,001	0,000001
0,358	0,001	0,000001
0,352	0,001	0,000001
0,354	0	0
0,348	-0,001	0,000001
$\overline{x} = 0,316$		$\Sigma = 0,000004$

směrodatná odchylka $s = 0,0010$ mg.100 g^{-1}

Obsah vitaminu B_2 v sýru Jadel

$\mu = 0,316 \pm 0,0455$ mg.100 g^{-1} ($\alpha = 0,05$)

Literatura uvádí, že průměrné množství ribolavinu v tvrdém sýru Eidam 30 % tvs. je 0,354 mg.100 g^{-1} a v tvarohu uvádí průměrné množství riboflavinu 0,421 mg.100 g^{-1}. Při stanovení tvrdém sýru Eidam 30 % tvs. bylo stanoveno 0,362 mg.100 g^{-1} riboflavinu, v tvarohu bylo stanoveno 0,364 mg.100 g^{-1} riboflavinu. Tyto stanovené hodnoty odpovídají hodnotám, které uvádí literatura. V taveném sýru Smetanito Želetava bylo stanoveno 0,180 mg.100g^{-1} riboflavinu, v plísňovém sýru Hermelín bylo stanoveno 0,182 mg.100 g^{-1} riboflavinu, v plísňovém sýru Niva bylo stanoveno 0,291 mg.100 g^{-1} riboflavinu a v sýru Jadel bylo stanoveno 0,316 mg.100 g^{-1} riboflavinu. V tvrdém sýru a tvarohu byly stanoveny podobné koncentrace riboflavinu. V taveném sýru bylo stanoveno mnohem menší množství riboflavinu, což může být důsledkem používání vysokých tavících teplot a vystavení surovin světlu. Rozdílná množství riboflavinu ve vzorcích sýru jsou způsobena rozdílnými technologiemi výroby daných sýru.

6.6 Zkouška stability

6.6.1 Výsledky zkoušky termostability riboflavinu

Stanovení bylo provedeno u vzorku syrového kravského mléka, pasterovaného kravského mléka (pasterace při 75°C po dobu 15 s) a u znovu pasterované standardizované směsi pro výrobu kefírového mléka (pasterace při 95°C po dobu 7 min). Vzorky byly odebrány v mlékárně Valašské Meziříčí, spol. s.r.o., do tmavých lahví. Byly uchovány do druhého dne v lednici při 6°C a poté analyzovány podle postupu uvedeného v kapitole 5.8.1. Každý ze vzorků byl analyzován pětkrát.

Extrakce riboflavinu byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 5.4. Vlastní chromatografické stanovení bylo provedeno u vzorků těchto mlék podle postupu uvedeného v kapitole 5.8.1. Množství odebraného mléka k analýze bylo 15,00 ml.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitaminu B_2 v $\mu g.ml^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na $mg.100\ ml^{-1}$ mléka.

Tab. 43. Obsah riboflavinu u vzorku syrového kravského mléka

Plocha píku [$mA.V.s^{-1}$]	Koncentrace riboflavinu [$\mu g.\ ml^{-1}$]	Koncentrace riboflavinu [$mg.100\ ml^{-1}$]
15,30	1,453	0,145
15,10	1,436	0,144
15,30	1,453	0,145
15,10	1,436	0,144
15,20	1,444	0,144

Tab. 44. Obsah riboflavinu u vzorku pasterovaného kravského mléka

Plocha píku [mA.V.s^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [μg. ml^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [mg.100 ml^{-1}]
11,00	1,092	0,109
10,90	1,084	0,108
11,20	1,109	0,111
11,00	1,092	0,109
10,90	1,084	0,108

Tab. 45. Obsah riboflavinu u vzorku standardizované směsi pro kefírové mléko

Plocha píku [mA.V.s^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [μg. ml^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [mg.100 ml^{-1}]
9,20	0,941	0,094
8,90	0,916	0,092
9,00	0,925	0,093
9,20	0,941	0,094
8,90	0,916	0,092

Pro výpočty statistických hodnot byla použita stejná metoda jako u syrového kravského mléka uvedených v kapitole 6.4.1.

V tabulkách 46, 47, a 48 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitaminu B_2 ve vzorcích mlék používaných pro stanovení termostability riboflavinu.

Tab. 46. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v syrovém kravském mléce

Koncentrace [mg. 100 ml^{-1}]	$(x_i - \overline{x})$	$(x_i - \overline{x})^2$
0,145	0,0006	0,0000004
0,144	-0,0004	0,0000002
0,145	0,0006	0,0000004
0,144	-0,0004	0,0000002
0,144	-0,0004	0,0000002
$\overline{x} = 0,144$		$\Sigma = 0,000001$

Tab. 47. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v pasterovaném kravském mléce

Koncentrace [mg. 100 ml^{-1}]	$(x_i - \overline{x})$	$(x_i - \overline{x})^2$
0,109	0	0
0,108	-0,001	0,000001
0,111	0,002	0,000004
0,109	0	0
0,108	-0,001	0,000001
$\overline{x} = 0,109$		$\Sigma = 0,000006$

Tab. 48. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 ve vzorku standardizované směsi pro kefírové mléko

Koncentrace [mg. 100 ml^{-1}]	$(x_i - \overline{x})$	$(x_i - \overline{x})^2$
0,094	0,001	0,000001
0,092	-0,001	0,000001
0,093	0	0
0,094	0,001	0,000001
0,092	-0,001	0,000001
$\overline{x} = 0,093$		$\Sigma = 0,000004$

Tab. 49. Výsledky zkoušky termostability

	Syrové mléko	**Pasterované mléko**	**Standardizovaná směs**
směrodatná odchylka (mg.100 ml^{-1})	0,0005	0,0012	0,0010
Obsah vitaminu B_2 (mg.100 ml^{-1}) (α = 0,05)	$0,144 \pm 0,0322$	$0,109 \pm 0,0503$	$0,093 \pm 0,0455$

Literatura uvádí, že bylo zjištěno, že pasterizací mléka se ztrácí nejméně 20 % riboflavinu a čím je mléko „trvanlivější“, tím méně riboflavinu obsahuje. [7]

Obsah riboflavinu v pasterovaném mléce byl 0,110 mg.100 ml^{-1}, tedy o 23 % nižší, než v mléce syrovém. Ve standardizované směsi byl obsah riboflavinu 0,093 mg.100 ml^{-1} tedy o 35 % nižší než u syrového mléka.

6.6.2 Výsledky zkoušky fotostability riboflavinu

Stanovení bylo provedeno u vzorku čerstvého polotučného mléka Madeta, a.s. Pro tuto zkoušku byl zakoupen vzorek, který byl v temném obalu. Extrakce riboflavinu u postupně odebíraných vzorků byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 5.4. Vlastní chromatografické stanovení bylo provedeno u vzorků těchto mlék podle postupu uvedené-

ho v kapitole 5.8.1. Každý ze vzorků byl analyzován pětkrát. Množství odebraného mléka k analýze bylo 15,00 ml.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitaminu B_2 v $\mu g.ml^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na $mg.100\ ml^{-1}$ mléka.

Tab. 50. Obsah riboflavinu u vzorku čerstvého mléka Madeta

Plocha píku [$mA.V.s^{-1}$]	Koncentrace riboflavinu [$\mu g.\ ml^{-1}$]	Koncentrace riboflavinu [$mg.100\ ml^{-1}$]
18,70	1,738	0,174
19,00	1,763	0,178
18,90	1,755	0,176
18,80	1,746	0,175
18,90	1,755	0,176

Pro výpočty statistických hodnot byla použita stejná metoda jako u syrového kravského mléka uvedených v kapitole 6.4.1.

V tabulce 51 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitaminu B_2 v čerstvém mléce.

Tab. 51. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v čerstvém mléce

Koncentrace [$mg.\ 100\ ml^{-1}$]	$(x_i - \overline{x})$	$(x_i - \overline{x})^2$
0,174	-0,0014	0,000002
0,176	0,0006	0,0000004
0,176	0,0006	0,0000004
0,175	-0,0004	0,0000002
0,176	0,0006	0,0000004
$\overline{x} = 0,175$		$\Sigma = 0,000003$

směrodatná odchylka $s = 0{,}0009$ mg.100 ml^{-1}

Obsah vitaminu B_2 v čerstvém mléce

$\mu = 0{,}175 \pm 0{,}0430$ mg.100 ml^{-1} ($\alpha = 0{,}05$)

6.6.2.1 Výsledky zkoušky fotostability riboflavinu na denním světle

Čerstvé mléko Madeta bylo vystaveno dennímu světlu a po 2, 4 a 24 hodinách byl odebrán a analyzován vzorek.

Tab. 52. Obsah riboflavinu u vzorku mléka vystaveného po 2h dennímu světlu

Plocha píku [mA.V.s^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [μg. ml^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [mg.100 ml^{-1}]
13,40	1,293	0,129
13,50	1,302	0,130
13,50	1,302	0,130
13,60	1,310	0,131
13,30	1,285	0,129

Tab. 53. Obsah riboflavinu u vzorku mléka vystaveného po 4h dennímu světlu

Plocha píku [mA.V.s^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [μg. ml^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [mg.100 ml^{-1}]
7,10	0,765	0,077
6,90	0,749	0,075
7,00	0,757	0,076
7,10	0,765	0,077
6,90	0,749	0,075

Tab. 54. Obsah riboflavinu u vzorku mléka vystaveného po 24h dennímu světlu

Plocha píku [mA.V.s^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [μg. ml^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [mg.100 ml^{-1}]
7,30	0,782	0,078
7,10	0,765	0,077
7,20	0,774	0,077
7,10	0,765	0,077
7,30	0,782	0,078

Pro výpočty statistických hodnot byla použita stejná metoda jako u syrového kravského mléka uvedených v kapitole 6.4.1.

V tabulkách 55, 56 a 57 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitaminu B_2 v mléce vystaveném dennímu světlu.

Tab. 55. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v mléce vystaveném po 2h dennímu světlu

Koncentrace [mg. 100 ml^{-1}]	$(x_i - \overline{x})$	$(x_i - \overline{x})^2$
0,129	-0,0008	0,0000006
0,130	0,0002	0,00000004
0,130	0,0002	0,00000004
0,131	0,0012	0,000001
0,129	-0,0008	0,0000006
$\overline{x} = 0,130$		$\Sigma = 0,000003$

Tab. 56. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v mléce vystaveném po 4h dennímu světlu

Koncentrace [mg. 100 ml^{-1}]	$(x_i - \overline{x})$	$(x_i - \overline{x})^2$
0,077	0,001	0,000001
0,075	-0,001	0,000001
0,076	0	0
0,077	0,001	0,000001
0,075	-0,001	0,000001
$\overline{x} = 0,076$		$\Sigma = 0,000004$

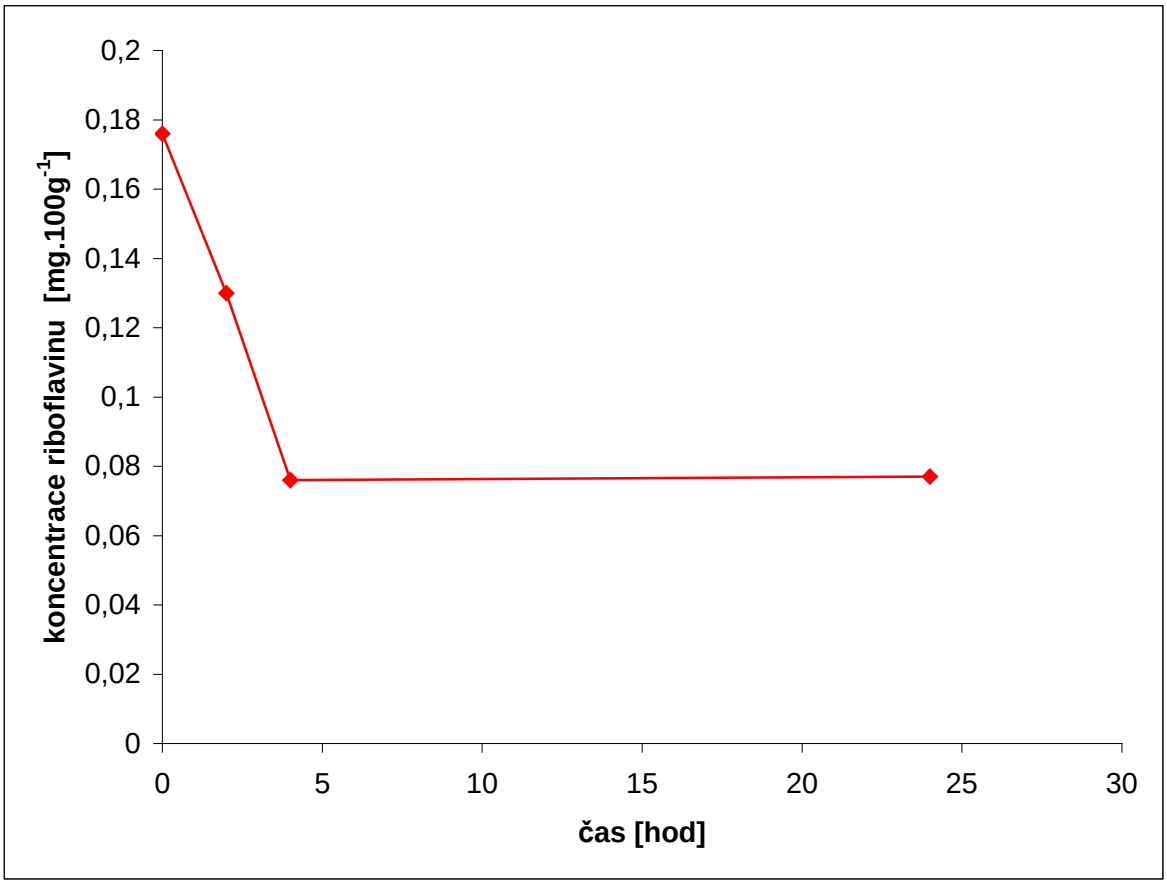
Tab. 57. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v mléce vystaveném po 24h dennímu světlu

Koncentrace [mg. 100 ml^{-1}]	$(x_i - \overline{x})$	$(x_i - \overline{x})^2$
0,078	0,0006	0,0000004
0,077	-0,0004	0,0000002
0,077	-0,0004	0,0000002
0,077	-0,0004	0,0000002
0,078	0,0006	0,0000004
$\overline{x} = 0,077$		$\Sigma = 0,000001$

Tab. 58. Výsledky zkoušky fotostability na denním světle

	Po 2 h na denním světle	**Po 4 h na denním světle**	**Po 24 h na denním světle**
směrodatná odchylka (mg.100 ml^{-1})	0,0008	0,001	0,0005
Obsah vitaminu B_2 (mg.100 ml^{-1}) (α = 0,05)	0,130 ± 0,0416	0,076 ± 0,0455	0,077 ± 0,0337

Graf 3. Fotostabilita riboflavinu na denním světle



6.6.2.2 Výsledky zkoušky fotostability riboflavinu na umělému osvětlení (zářivka)

Čerstvé mléko Madeta bylo vystaveno také umělému osvětlení a po 2 a 4 hodinách byl odebrán a analyzován vzorek.

Tab. 59. Obsah riboflavinu u vzorku mléka vystaveného po 2h umělému osvětlení

Plocha píku [mA.V.s^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [μg. ml^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [mg.100 ml^{-1}]
16,30	1,537	0,154
15,90	1,503	0,150
16,10	1,520	0,152
16,20	1,528	0,153
16,20	1,528	0,153

Tab. 60. Obsah riboflavinu u vzorku mléka vystaveného po 4h umělému osvětlení

Plocha píku [mA.V.s^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [μg. ml^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [mg.100 ml^{-1}]
14,70	1,402	0,140
14,90	1,419	0,142
14,90	1,419	0,142
14,80	1,411	0,141
14,60	1,394	0,139

Pro výpočty statistických hodnot byla použita stejná metoda jako u syrového kravského mléka uvedených v kapitole 6.4.1.

V tabulkách 61 a 62 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitaminu B_2 v mléce vystaveném umělému světlu.

Tab. 61. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v mléce vystaveném po 2h umělému osvětlení

Koncentrace [mg. 100 ml^{-1}]	$(x_i - \overline{x})$	$(x_i - \overline{x})^2$
0,154	0,0016	0,000003
0,150	-0,0024	0,000006
0,152	-0,0004	0,0000002
0,153	0,0006	0,0000004
0,153	0,0006	0,00000004
$\overline{x} = 0,153$		$\Sigma = 0,000009$

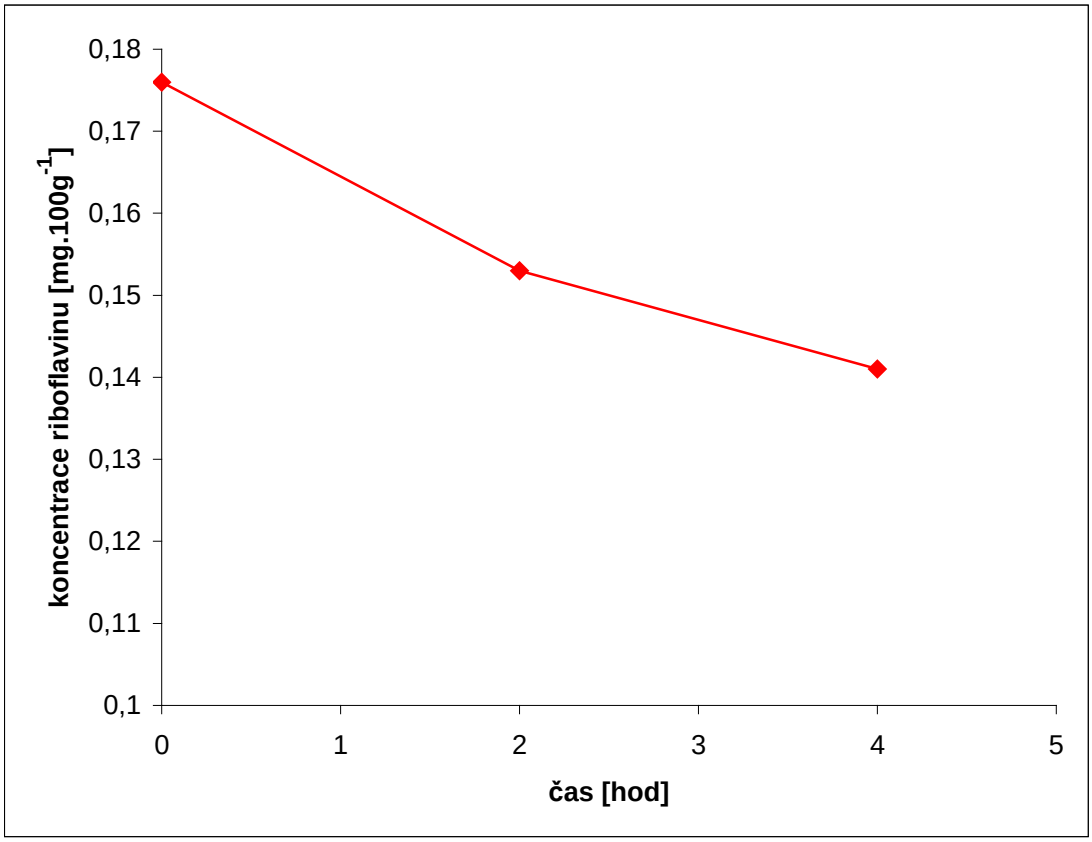
Tab. 62. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v mléce vystaveném po 4h umělému osvětlení

Koncentrace [mg. 100 ml^{-1}]	$(x_i - \overline{x})$	$(x_i - \overline{x})^2$
0,140	-0,0008	0,0000006
0,142	0,0012	0,000001
0,142	0,0012	0,000001
0,141	0,0002	0,00000004
0,139	-0,0018	0,000003
$\overline{x} = 0,141$		$\Sigma = 0,0000007$

Tab. 63. Výsledky zkoušky fotostability na umělém světle

	Po 2 h na umělém osvětlení	**Po 4 h na denním světle**
směrodatná odchylka (mg.100 ml^{-1})	0,0015	0,0013
Obsah vitaminu B_2 (mg.100 ml^{-1}) (α = 0,05)	0,153 ± 0,0560	0,141 ± 0,0520

Graf 4. Fotostabilita riboflavinu na umělém osvětlení



6.6.2.3 Výsledky zkoušky fotostability riboflavinu pod UV zářením

Čerstvé mléko Madeta bylo vystaveno UV záření a po 1, 2 a 3 hodinách byl odebrán a analyzován vzorek.

Tab. 64. Obsah riboflavinu u vzorku mléka vystaveného po 1h UV záření

Plocha píku [mA.V.s^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [μg. ml^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [mg.100 ml^{-1}]
15,60	1,478	0,148
15,80	1,495	0,150
15,70	1,486	0,149
15,60	1,478	0,148
15,60	1,478	0,148

Tab. 65. Obsah riboflavinu u vzorku mléka vystaveného po 2h UV záření

Plocha píku [mA.V.s^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [μg. ml^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [mg.100 ml^{-1}]
14,50	1,386	0,139
14,70	1,402	0,140
14,80	1,411	0,141
14,70	1,402	0,140
14,50	1,386	0,139

Tab. 66. Obsah riboflavinu u vzorku mléka vystaveného po 3h UV záření

Plocha píku [mA.V.s^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [μg. ml^{-1}]	Koncentrace riboflavinu [mg.100 ml^{-1}]
12,10	1,184	0,118
11,80	1,159	0,116
11,90	1,168	0,117
11,90	1,168	0,117
12,00	1,176	0,118

Pro výpočty statistických hodnot byla použita stejná metoda jako u syrového kravského mléka uvedených v kapitole 6.4.1.

V tabulkách 67, 68 a 69 uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitaminu B_2 v mléce vystaveném UV záření.

Tab. 67. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v mléce vystaveném po 1h UV záření

Koncentrace [mg. 100 ml^{-1}]	$(x_i - \overline{x})$	$(x_i - \overline{x})^2$
0,148	-0,0006	0,0000004
0,150	0,0014	0,0000020
0,149	0,0004	0,0000002
0,148	0,0006	0,0000004
0,148	-0,0006	0,0000004
$\overline{x} = 0,149$		$\Sigma = 0,000003$

Tab. 68. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v mléce vystaveném po 2h UV záření

Koncentrace [mg. 100 ml^{-1}]	$(x_i - \overline{x})$	$(x_i - \overline{x})^2$
0,139	-0,0008	0,0000006
0,140	0,0002	0,00000004
0,141	0,0012	0,000001
0,140	0,0002	0,00000004
0,139	-0,0008	0,0000006
$\overline{x} = 0,140$		$\Sigma = 0,000003$

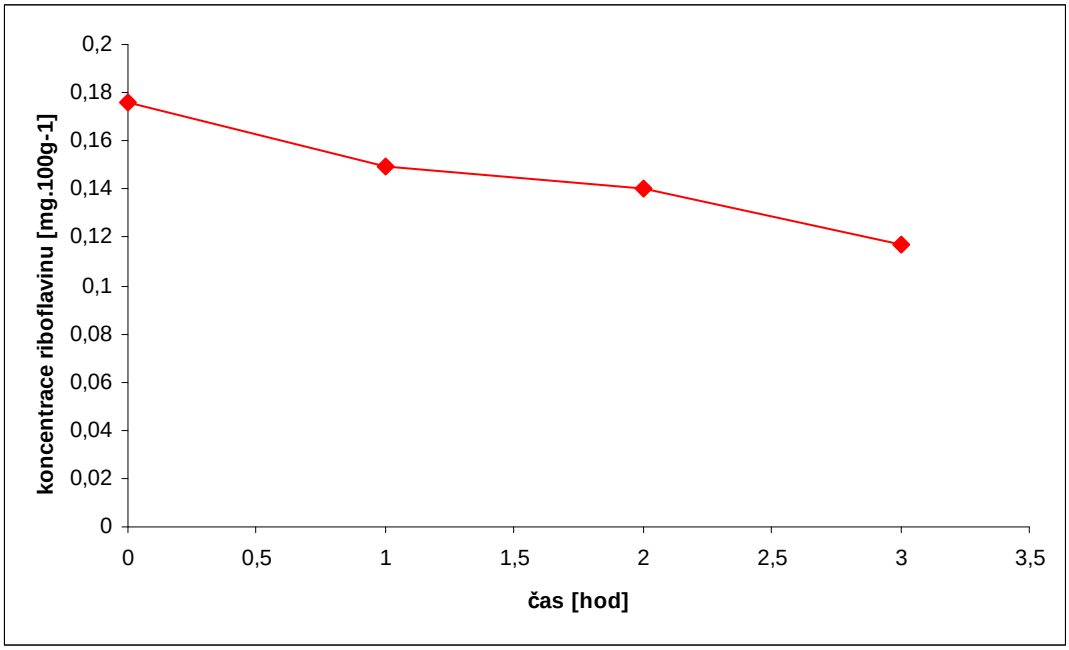
Tab. 69. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v mléce vystaveném po 3h UV záření

Koncentrace [mg. 100 ml^{-1}]	$(x_i - \overline{x})$	$(x_i - \overline{x})^2$
0,118	0,0008	0,0000006
0,116	-0,0012	0,000001
0,117	-0,0002	0,00000004
0,117	-0,0002	0,00000004
0,118	0,0008	0,0000006
$\overline{x} = 0,117$		$\Sigma = 0,000003$

Tab. 70. Výsledky zkoušky fotostability pod UV zářením

	Po 1 h pod UV záření	**Po 2 h pod UV záření**	**Po 3 h pod UV záření**
směrodatná odchylka (mg.100 ml^{-1})	0,0009	0,0008	0,0008
Obsah vitaminu B_2 (mg.100 ml^{-1}) (α = 0,05)	$0,149 \pm 0,0430$	$0,140 \pm 0,0416$	$0,117 \pm 0,0416$

Graf 5. Fotostabilita riboflavinu pod UV osvětlením



Literatura uvádí, že například mléko vystavené slunečnímu záření po dobu čtyř hodin obsahuje pouze 15 % původní koncentrace riboflavinu. [15] V tomto případě bylo naměřeno, že mléko po dvou hodinách na slunečním světle průměrně obsahovalo 0,130 mg.100 ml^{-1} tedy 74 % původní koncentrace riboflavinu, po čtyřech hodinách byla zbývající průměrná koncentrace riboflavinu 0,076 mg.100 ml^{-1}, tedy 43 % původní koncentrace riboflavinu a po 24 hodinách byla průměrná koncentrace 0,077 mg.100 ml^{-1} tedy 44 % původní koncentrace riboflavinu.

V případě mléka, které bylo vystaveno umělému osvětlení byl po 2 hodinách obsah riboflavinu 0,153 mg.100 ml^{-1} a po 4 hodinách vystavení mléka umělému osvětlení byl obsah riboflavinu 0,141 mg.100 ml^{-1}. Po 2 hodinách se obsah riboflavinu snížil o 13 % a po 4 hodinách se obsah riboflavinu snížil o 20 % z původního množství riboflavinu. Tato zkouška fotostability poukazuje na to, že se v mléce, které je balené v průhledných obalech a v obchodech skladováno v regálech osvětlených zářivkou, ničí riboflavin poměrně rychle.

V případě, kdy bylo mléko ozařováno UV lampou byl úbytek riboflavinu po 1h 15 %, po 2h byl úbytek 20 % a po 3h ozařování byl úbytek 34 %.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byla optimalizace extrakčního postupu vitaminu B_2 a jeho stanovení v mléce a mléčných výrobcích.

Riboflavin neboli vitamin B_2 byl poprvé izolován ve 30. letech minulého století z živočišných produktů, patří do skupiny vitaminů rozpustných ve vodě. V biochemických systémech se riboflavin vyskytuje volný (např. ve mléce) nebo vázaný ve formě koenzymů oxidoredukčních enzymů. Riboflavin je poměrně stálý vůči teplu ale velmi citlivý především na světelné záření.

Pro chromatografické stanovení riboflavinu v mléce a mléčných výrobcích byla použita separační chromatografická metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC. K separaci byla použita kolona SUPELCOSIL LC8. Mobilní fáze se skládala z 0,12mol.l^{-1} octanu sodného (složka A) a methanolu (složka B). Jejich počáteční poměr byl 87:15 (A:B) s gradientem uvedeným v tabulce 5. Průtok mobilní fáze byl 0,8 ml.min^{-1} a teploty termostatu kolony byla 30°C. Detekce byla prováděna při vlnové délce 270 nm pomocí detektoru UV/VIS. Vyhodnocení výsledku bylo provedeno za použití chromatografického softwaru ChemStation – Instrument 1 (Agilent Technologies, USA).

Ke stanovení byly vybrány tyto vzorky. Syrové mléko kozí, ovčí a kravské. Mléko trvanlivé, mléko tepelně ošetřené pasterací 75°C po dobu 15 s a standardizovaná směs připravená pro výrobu kefírového mléka tepelně ošetřená 95°C po dobu 7 min. Obnovené mléko a syrovátka byly připravené podle návodu uvedeném na obalu. Ze vzorků sýrů byly vybrány tavený sýr Smetanito, tvrdý sýr Eidam 30 % tvs., měkký tvaroh, plísňové sýry Hermelín a Niva a pařený sýr Jadel. Byl proveden test fotostability a termostability riboflavinu na vzorku mléka.

Při srovnání obsahu riboflavinu u syrových mlék byl jeho nejvyšší obsah stanoven v syrovém kozím mléce (0,425 mg.100 ml^{-1}), v syrovém kravském mléce byl stanoven obsah riboflavinu výrazně nižší (0,190 mg.100 ml^{-1}). Nejnižší obsah riboflavinu byl stanoven v syrovém ovčím mléce (0,105 mg.100 ml^{-1}), přestože literatura uvádí, že syrové ovčí mléko by mělo být bohatým zdrojem riboflavinu. Tento nízký obsah mohl být způsobený tím, že ovčí mléko bylo odebíráno na podzim, kdy už byly ovce krmené senem.

Při analýze tepelně opracovaných mlék byl stanoven nejvyšší obsah riboflavinu v trvanlivém mléce (0,143 mg.100 ml^{-1}), ve vzorku pasterovaného mléka byl obsah riboflavinu nižší (0,121 mg.100 ml^{-1}). Nejnižší obsah riboflavinu byl ve vzorku obnoveného mléka (0,120 mg.100 ml^{-1}). Literatura uvádí, že čím je mléko „trvanlivější“, tím obsahuje méně riboflavinu. V tomto případě mohl být vysoký obsah riboflavinu v trvanlivém mléce způsobený tím, že mléko bylo od odlišných mlékáren, které mají rozdílné dodavatele mléka.

Ve vzorku obnovené syrovátky bylo stanoveno množství riboflavinu 0,147 mg.100 ml^{-1}.

Při stanovení riboflavinu v sýrech bylo stanoveno jeho nejvyšší množství v tvarohu (0,364 mg.100 g^{-1}). Podobné množství riboflavinu obsahoval tvrdý sýr Eidam 30 % tvs. (0,362 mg.100 g^{-1}). Nižší obsah riboflavinu byl stanoven v sýrech Jadel, Niva, Hermelín. Nejnižší množství riboflavinu byl stanoven ve vzorku taveného sýra Smetanito (0,180 mg.100 g^{-1}).

Množství riboflavinu v analyzovaných vzorcích sýrů se shodovalo s množstvím riboflavinu uváděném v literatuře. Odlišné obsahy riboflavinu v jednotlivých sýrech jsou způsobeny rozdílnými technologiemi výroby analyzovaných sýrů.

Pro provedení testu termostability byly použity vzorky mlék odebrané v Mlékárně Valašské Meziříčí. Byly to tyto vzorky: syrové mléko (0,144 mg.100 ml^{-1}), pasterované mléko (0,109 mg.100 ml^{-1}) a standardizovaná znovu pasterovaná směs pro výrobu kefírového mléka (0, 093 mg.100 ml^{-1}). Test termostability dokazuje úbytek riboflavinu při jeho vystavení pasteračním teplotám.

Pro důkaz citlivosti riboflavinu na světlo byl proveden test fotostability. Test fotostability potvrdil citlivost riboflavinu na světlo. V případě vystavení mléka slunečnímu světlu po dobu 2 h bylo množství riboflavinu sníženo o 26 %, po 4 h bylo nižší o 57 % než v původním čerstvém mléce a po 24 h se již obsah riboflavinu nezměnil. U mléka, které bylo vystaveno po 2 a 4 h umělému osvětlení, byl úbytek riboflavinu nejprve 13 % z původní koncentrace a po 4 h byl úbytek 20 %. Tato zkouška dokazuje, že mnohem horší účinek má sluneční světlo než umělé, ale přesto i pod umělým osvětlením dochází k postupnému ubývání riboflavinu. Tyto výsledky tedy ukazují, že pokud je mléko baleno v průhledných obalech, tak přestože dnešní „markety“ jsou převážně obchody bez

oken, dochází k významnému úbytku riboflavinu v potravinách. U vzorku mléka, který byl vystaven UV záření po dobu 1, 2 a 3 h byly úbytky riboflavinu 15, 20 a 34 %.

Mléko a mléčné výrobky jsou významným a nepostradatelným zdrojem riboflavinu, a je tedy nutné a zdraví prospěšné je denně zařazovat do našeho jídelníčku.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] Pánek, J., Pokorný, J., Dostálová, J., Kohout, P. *Základy výživy.* Svoboda servis, 2002. 206s. ISBN 80-86320-23-5

[2] Zhi Chen; Bo Chen; Shouzhuo Yao. *High-performance liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry for simultaneous determination of taurine and 10 water-soluble vitamins in multivitamin tablets*. Hunan Normal University, China, 2006.

[3] Lai-Sheng Li, Shi-Lu Da, Yu-Qi Feng, Min Liu. Study on the chromatographic behavior of water-soluble vitamins on p-tert-butyl-calix[8]arene-bonded silica gel stationary phase by HPLC, Nanchang University China, 2004.

[4].Odstrčil, J., Odstrčilová, M. *Chemie potravin*. Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2006. ISBN 80-7013-435-6

[5] Dostupné na: <http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/27846-beri-beri> [cit. 2007-10-21 SEČ]

[6] Dostupné na:<http://en.wikipedia.org/wiki/Beriberi> [cit. 2007-12-15 SEČ]

[7] Velíšek, J. *Chemie potravin* 2. Ossis Tábor, 1999. 328 s.ISBN 80-902391-4-5

[8] Karlson,P. *Základy biochemie*. 3. přepracované vydání, Academia Praha, 1981. 504 s.

[9] Hoza, I., Kramářová D. *Potravinářská biochemie* II. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006. ISBN 80-7318-395-1

[10] Vodrážka, Z. *Biochemie 3,* Academia Praha, 1993. 184 s. ISBN 80-200-0471-8

[11] Dostupné na: <http://www.stripky.cz/nemoci/zdravi/vitaminy.html#5 > [cit. 2007-10-21 SEČ]

[12] Vodrážka, Z. *Biochemie 1,* Academia Praha, 1992. 184 s. ISBN 80-200-0438-6

[13] Rahul, M. K., Purvi, B. D., Ashwini, K. S. *Behavior of riboflavin on plain carbon paste and aza macrocycles based chemically modified electrodes*. Department of Chemistry, University of Mumbai India, listopad 2006.

[14] Feng Wang, Wei Huang, Zhongxiang Dai. *Spectroscopic investigation of the interaction between riboflavin and bovine serum albumin*, Department of Chemistry, ZaoZhuang University, China, 2007

[15] Davídek, J., Janíček, G., Pokorný, J. *Chemie potravin*. SNTL PRAHA, 1983. 632 s

[16] Dostupné na: <http://www.stripky.cz/nemoci/zdravi/vitaminy.html#5 > [cit. 2007-10-21 SEČ]

[17] Oberbeil, K., Lentzová Ch. *Léčba ovocem a zeleninou*. Fortuna Print Praha, 2001. ISBN 80-7309-242-5

[18] Picciano, M. F. *Water-Soluble Vitamins in Human Milk*, Department of Nutrition, College of Health and Human Development, Pennsylvania, 2007

[19] Gajdůšek,S., *Laktologie.* Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2003

[20] Šícho,V., Vodrážka, Z., Králová, B. *Potravinářská biochemie*. SNTL PRAHA,1981 360 s.

[21] *Mikrobní technologie II*., VŠCHT, [online] [cit. 2007-10-21 SEČ]

Dostupné na: <http://www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/mikroII.pdf >

[22] Kodíček, M. *Biochemické pojmy,* VŠCHT PRAHA, 2004. ISBN80-7080-551

[23] Mišurcová, L. *Základy biologie*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006. ISBN 80-7318-434-6

[24] Dostupné na: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Riboflavin > [cit. 2007-10-25 SEČ]

[25] FRAGNER, J., Riboflavin, [online], [cit. 2007-10-25 SEČ]

Dostupné na: <http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_21516.html >

[26] Regina Prado Zanes Furlani, Helena Teixeira Godoy. *Vitamins B_1 and B_2 contents incultivated mushrooms*, Food Chemistry and Applied Nutrition Centre, Institute of Food Technology, Campinas, 2007

[27] vyhláška č.304/2004 Sb.

[28] Dostál, J., Kaplan, P.*Lékařská chemie II*, Masarykova univerzita v Brně, 2003. ISBN 80-210-2731-2

[29] Žáček, Z., Žáček, A. *Potravinové tabulky*. Praha: SPN, 1994. 484 s

[30] Kyzlink, V. *Základy konzervace potravin*. 2. vyd. Praha: SNTL, 1980. 550 s.

[31] Albala-Hurtado, S. Ztráty vitaminů při zpracování potravin. [online], [cit. 2008-01-30 SEČ]

Dostupné na: <http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_23742.html >

[32] Dostupné na: <http://obchod.hormonalniantikoncepce.cz/shop.php?action=show_product_detail&product_id=44791 > [cit. 2008-01-25 SEČ]

[33] Gösta, B. *Dairy processing handbook*. Tetra Pak Processing Systems AB Sweden, 1995

[34] Dostupné na: <http://pohodaveskole.net/referat/chemie/ > [cit. 2008-01-25 SEČ]

[35] Sanja Roje. *Vitamin B biosynthesis in plants*. Institute of Biological Chemistry, Washington State University, 2007

[36] Hlúbik, P., Opltová, L. Vitaminy. 1. vydání. Praha:Grada Publishing, 2004. 232s. ISBN 80 – 247 – 0373 – 4.

[37] Pokorný, J. *Fyziologie*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2007

[38] Generica, *Riboflavin*, [online], [cit. 2007-10-25 SEČ]
Dostupné na: <http://www.lekarna.cz/riboflavin-generica-tbl-30/ >

[39] Min Wang, Lixia Zhao, Meilin Liu, Jin-Ming Lin, *Determination of riboflavin by enhancing the chemiluminescence intensity of peroxomonosulfate–cobalt(II) systém*. The Key Laboratory of Bioorganic Phosphorus Chemistry & Chemical Biology, Department of Chemistry, Tsinghua University, China, 2006

[40] Roughead, Z. K., Mc Cormick, D. B. *Metody stanovení ve vodě rozpustných vitamínů* [online], [cit. 2007-15-12 SEČ]
Dostupné na <http://sweb.cz/HPLC1/vitamin.htm/>

[41] Strýčková, J., Teslíková, K. *Pod pokličkou*. Nakladatelství XYZ Praha, 2005. ISBN 80-86864-38-3

[42] Turek, B. *Mléko ve výživě člověka* [online], [cit. 2007-15-12 SEČ]
Dostupné na: <http://www.stripky.cz/nemoci/vyziva/mleko.html >

[43] Drdák, M., Studnický, J., Mórová, E., Karovičová, J. Základy potravinárských technologii. Malé centrum Bratislava, 1996. 512s. ISBN 80-967064-1-1

[44] vyhláška č.77/2003 Sb.

[45] Dostupné na: <http://kozimleko.cz/ > [cit. 2008-15-2 SEČ]

[46] Dostupné na: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Koz%C3%AD_ml%C3%A9ko > [cit. 2008-15-2 SEČ]

[47] Dostupné na: <http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92073 > [cit. 2007-15-12 SEČ]

[48] Zelenka, V., *Ovčí mléko* , [online], [cit. 2007-15-12 SEČ] Dostupné na: <http://www.mikroregion.net/rakovnicko/cz/ovci_farma_v_a_m/ >

[49] Garaj,J, Bustin,D., Hladký,Z,. *Analytická chemie*, ALFA BRATISLAVA, 744s, 1987.

[50] Michal, J. *Chromatografie v anorganické analýze*. SNTL PRAHA, 1970. 260 s.

[51] Klouda, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava,2003

[52] Doležal, J. a kolektiv. *Analytická chemie*, SPN PRAHA, 1966. 196 s.

[53] Holzbecher, Z. a kolektiv. *Analytická chemie*, SNTL PRAHA, 1974

[54] Zýka, J. a kolektiv. *Analytická příručka*. 4.upravené vydání, SNTL PRAHA, 680 s, 1988

[55] Kazakevich, Y., *HPLC*, [online], [cit. 2008-20-03 SEČ] Dostupné na: <http://hplc.chem.shu.edu/HPLC/index.html >

[56] Dostupné na: <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html >[cit. 2007-15-11 SEČ]

[57] Douša, M., *HPLC*, [online], [cit. 2008-20-03 SEČ] Dostupné na: <http://www.hplc.cz>

[58] Dostupné na: <http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa_soubory/image004.jpg > [cit. 2008-20-03 SEČ]

[59] Hendl, J.: *Přehled statistických metod zpracování dat: Analýza a metaanalýza***.** Praha: Portál, 2005. 2. vydání, 586 s.

[60] Likeš, J., Laga, J.: *Základní statistické tabulky*. Praha: SNTL, 1978.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

FMN flavinmononukleotid

FAD flavinadenindinukleotid

HPLC vysoceúčinná kapalinová chromatografie

GTP Guanosin trifosfat

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Projevy nemoci Beri-Beri 11
Obr. 2 Struktura vitaminu B_2 12
Obr. 3 Flavinmononukleotid, FMN 13
Obr. 4. Flavinadenindinukleotid, FAD 13
Obr. 5. Oxidované a redukované formy riboflavinu 14
Obr. 6 Fotolýza riboflavinu 15
Obr. 7 *Ashbya gossypii* 16
Obr. 8 Biosyntéza riboflavinu 22
Obr. 9 Schéma HPLC 32
Obr. 10 HPLC 32
Obr. 11 Schéma fotometrického detektoru 34
Obr. 12 Schéma refraktometrického detektoru 35
Obr. 13 Schéma fluorescenčního detektoru 35

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Obsah vitaminu B_2 ve vybraných potravinách……...……..18

Tab. 2. Retence vitaminu B_2 ve vybraných potravinách po daných kulinárních úpravách..21

Tab. 3. Chemické složení jednotlivých druhů mlék…….29

Tab. 4. Kvantily $t\ (n)$ Studentova rozdělení o n stupních volnosti……38

Tab. 5. Gradient mobilní fáze pro stanovení riboflavinu metodou HPLC……..….44

Tab. 6. Kalibrace riboflavinu 1…….……46

Tab. 7. Kalibrace riboflavinu 2……48

Tab. 8. Přídavek 50% kyseliny trichloroctové v 50. minutě ohřevu a v 60. minutě ohřevu……...…50

Tab. 9. Přídavek 60% kyseliny trichloroctové v 50. minutě ohřevu a v 60. minutě ohřevu……...50

Tab. 10. Přídavek 80% kyseliny trichloroctové v 50. minutě ohřevu a v 60. minutě ohřevu……...50

Tab. 11. Přídavek 60% kyseliny trichloroctové pro vysrážení kozího mléka v 50. minutě ohřevu a v 60. minutě ohřevu……...51

Tab. 12. Přídavek 80% kyseliny trichloroctové pro vysrážení kozího mléka v 50. minutě ohřevu a v 60. minutě ohřevu……...51

Tab. 13. Přídavek 60% kyseliny trichloroctové pro vysrážení obnoveného mléka v 50. minutě ohřevu a v 60. minutě ohřevu……..51

Tab. 14. Přídavek 80 % kyseliny trichloroctové pro vysrážení obnoveného mléka v 50. minutě ohřevu a v 60. minutě ohřevu……..51

Tab. 15. Přídavek 60% kyseliny trichloroctové v 50. minutě ohřevu a v 60. minutě ohřevu……...52

Tab. 16. Přídavek 80% kyseliny trichloroctové v 50. minutě ohřevu a v 60. minutě ohřevu……...52

Tab. 17. Obsah riboflavinu ve vzorku syrového kravského mléka……...……...53

Tab. 18. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v syrovém kravském mléce…….....54

Tab. 19. Obsah riboflavinu u vzorku syrového ovčího mléka……..55

Tab. 20. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v syrovém ovčím mléce……..55

Tab. 21. Obsah riboflavinu u vzorku syrového kozího mléka……..56

Tab. 22.Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v syrovém kozím mléce……...57

Tab. 23. Obsah riboflavinu u vzorku čerstvého pasterovaného mléka……..…..58

Tab. 24. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v čerstvém pasterovaném mléce…...…..58

Tab. 25. Obsah riboflavinu u vzorku trvanlivého mléka…..…….……...59

Tab. 26. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v trvanlivém mléce..…….……...60

Tab. 27. Obsah riboflavinu u vzorku obnoveného mléka…..……...61

Tab. 28. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v obnoveném mléce……..……..….61

Tab. 29. Obsah riboflavinu u vzorku obnovené syrovátky……..……62

Tab. 30. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v syrovátce…...……...63

Tab. 31. Obsah riboflavinu u vzorku tvrdého sýra...……64

Tab. 32. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v tvrdém sýru.....……...64

Tab. 33. Obsah riboflavinu u vzorku taveného sýra…..……..65

Tab. 34. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v taveném sýru..…….66

Tab. 35. Obsah riboflavinu u vzorku u vzorku tvarohu..…….……67

Tab. 36. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v tvarohu..…….……..67

Tab. 37. Obsah riboflavinu u vzorku u vzorku plísňového sýru Hermelín……...……...68

Tab. 38. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v plísňovém sýru Hermelín…..……..69

Tab. 39. Obsah riboflavinu u vzorku u vzorku plísňového sýru Niva…..……...70

Tab. 40. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v plísňovém sýru Niva…..…….70

Tab. 41. Obsah riboflavinu u vzorku sýru Jadel……..……71

Tab. 42. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v sýru Jadel…..……..……72

Tab. 43. Obsah riboflavinu u vzorku syrového kravského mléka…….73

Tab. 44. Obsah riboflavinu u vzorku pasterovaného kravského mléka…….74

Tab. 45. Obsah riboflavinu u vzorku standardizované směsi pro kefírové mléko……74

Tab. 46. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v syrovém kravském mléce……..75

Tab. 47. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v pasterovaném kravském mléce…….75

Tab. 48. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v standardizované směsi pro kefírové mléko……...76

Tab. 49. výsledky zkoušky termostability…….76

Tab. 50. Obsah riboflavinu u vzorku čerstvého mléka Madeta…….77

Tab. 51. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v čerstvém mléce……..77

Tab. 52. Obsah riboflavinu u vzorku mléka vystaveného po 2h dennímu světlu……..78

Tab. 53. Obsah riboflavinu u vzorku mléka vystaveného po 4h dennímu světlu……..78

Tab. 54. Obsah riboflavinu u vzorku mléka vystaveného po 24h dennímu světlu……79

Tab. 55. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v mléce vystaveném po 2h dennímu světlu……..…..79

Tab. 56. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v mléce vystaveném po 4h dennímu světlu……..……..80

Tab. 57. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v mléce vystaveném po 24h dennímu světlu…….…..……..80

Tab. 58. Výsledky zkoušky fotostability na denním světle…….……...81

Tab. 59. Obsah riboflavinu u vzorku mléka vystaveného po 2h umělému osvětlení…....82

Tab. 60. Obsah riboflavinu u vzorku mléka vystaveného po 4h umělému osvětlení.……82

Tab. 61. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v mléce vystaveném po 2h umělému osvětlení……..…….…….83

Tab. 62. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v mléce vystaveném po 4h umělému osvětlení……...……..…….……..83

Tab. 63. Výsledky zkoušky fotostability na umělém světle……..…..…….……...…84

Tab. 64. Obsah riboflavinu u vzorku mléka vystaveného po 1h UV záření……..……..85

Tab. 65. Obsah riboflavinu u vzorku mléka vystaveného po 2h UV záření……..……..85

Tab. 66. Obsah riboflavinu u vzorku mléka vystaveného po 3h UV záření……..……..85

Tab. 67. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v mléce vystaveném po 1h UV záření…86

Tab. 68. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v mléce vystaveném po 2h UV záření....86

Tab. 69. Přesnost stanovení obsahu vitaminu B_2 v mléce vystaveném po 3h UV záření…87

Tab. 71. Výsledky zkoušky fotostability pod UV zářením……..87

SEZNAM PŘÍLOH

P I. **STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V SYROVÉM KRAVSKÉM MLÉCE METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.**

P II. **STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V SYROVÉM KOZÍM MLÉCE METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.**

P III. **STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V MLÉCE VYSTAVENÉM 24H SLUNEČNÍMU ZÁŘENÍ HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.**

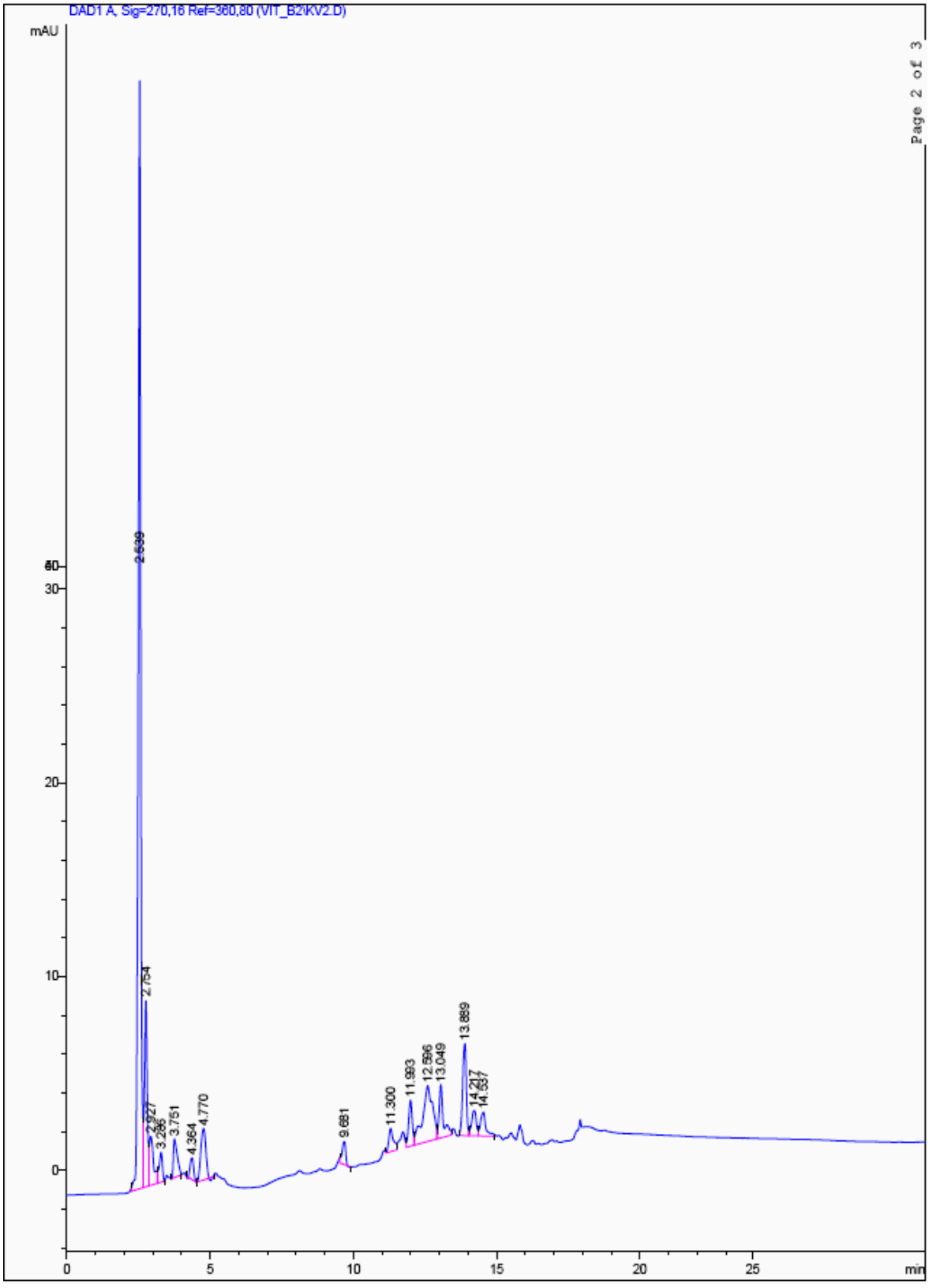
P IV. **STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V TVAROHU METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.**

P V. **STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V TVRDÉM SÝRU METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.**

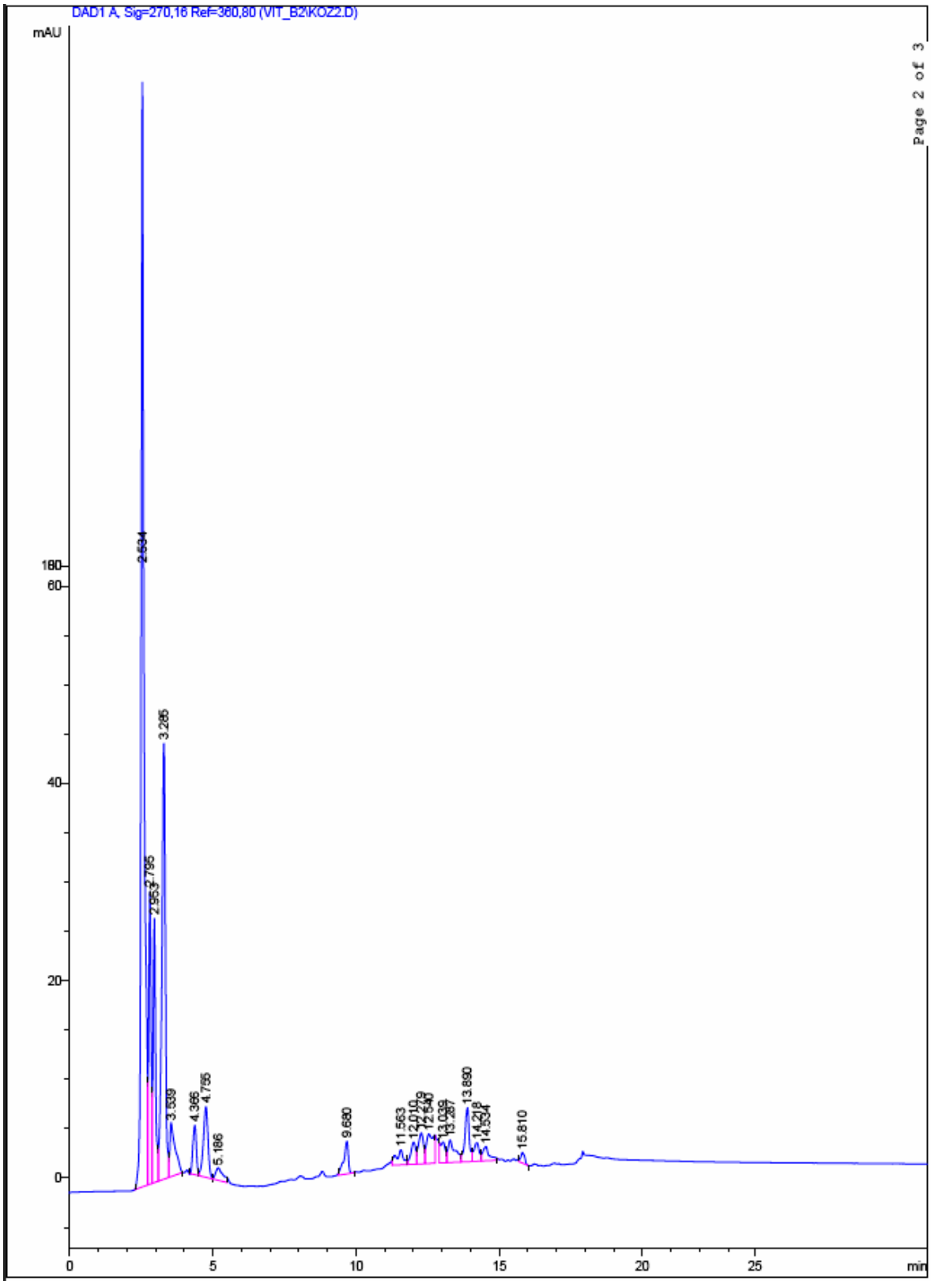
P VI. **STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V HERMELÍNU METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.**

P VII. **STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V SYROVÁTCE METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.**

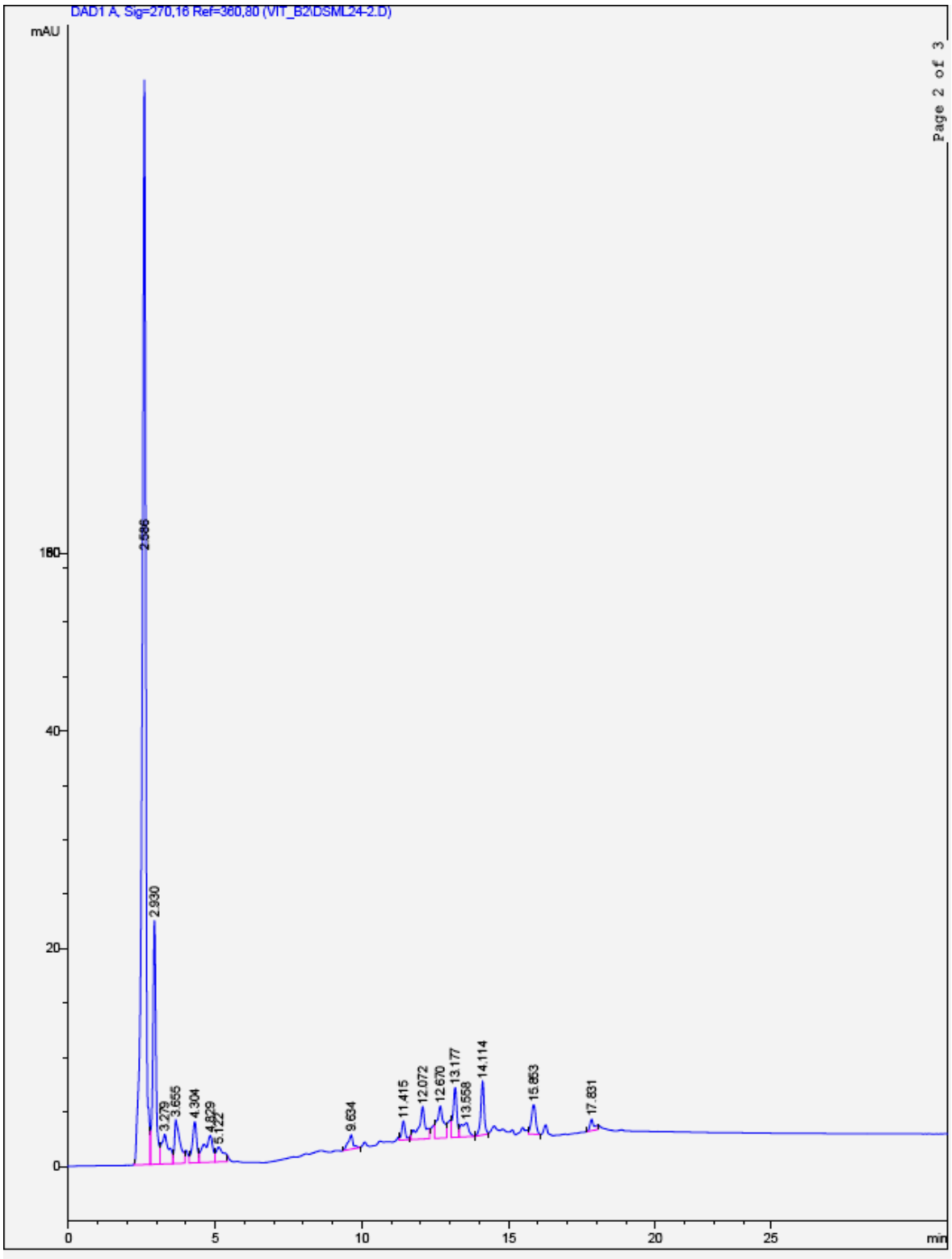
PŘÍLOHA P I: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V SYROVÉM KRAVSKÉM MLÉCE METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.



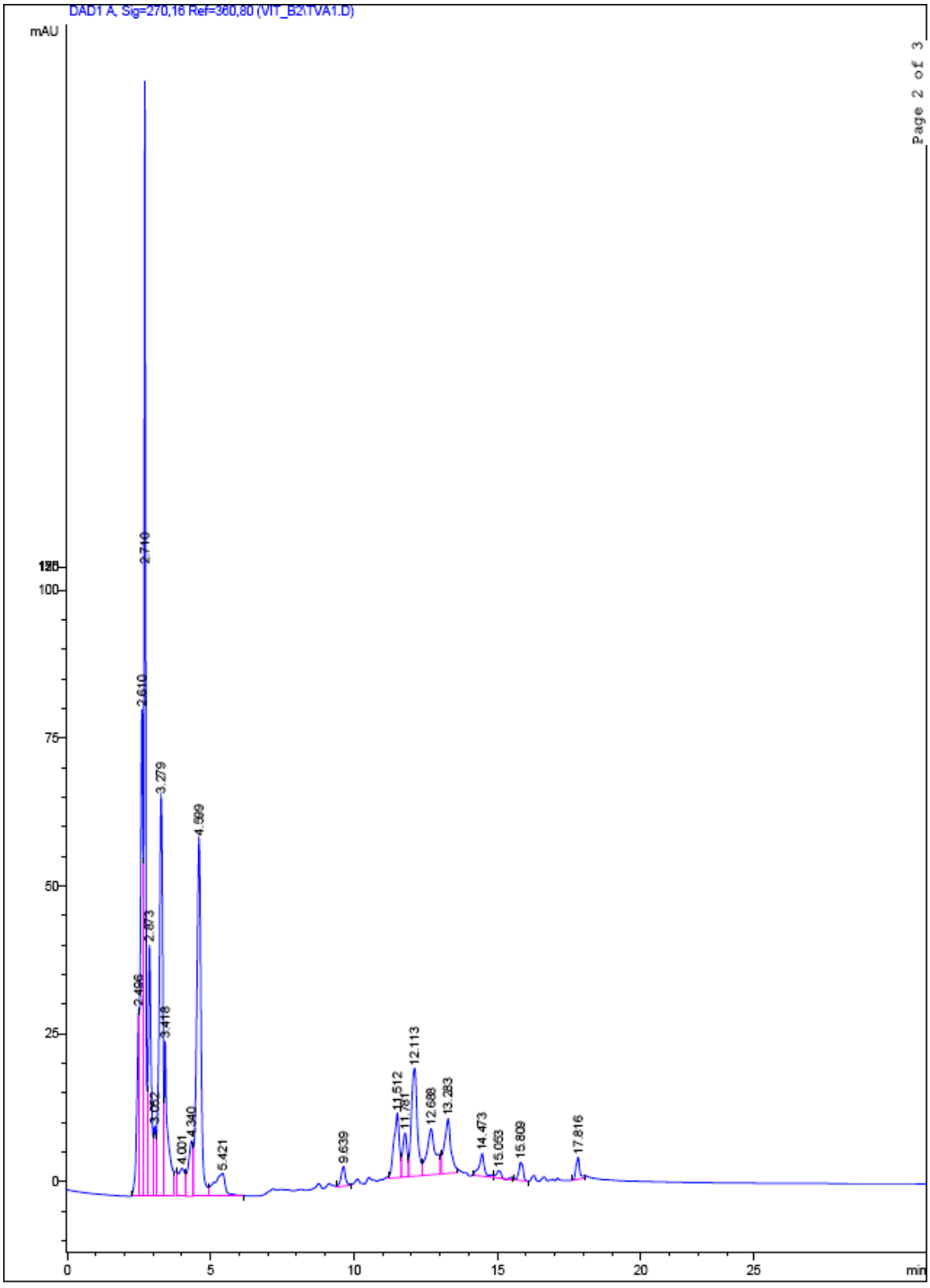
PŘÍLOHA P II: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V SYROVÉM KOZÍM MLÉCE METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.



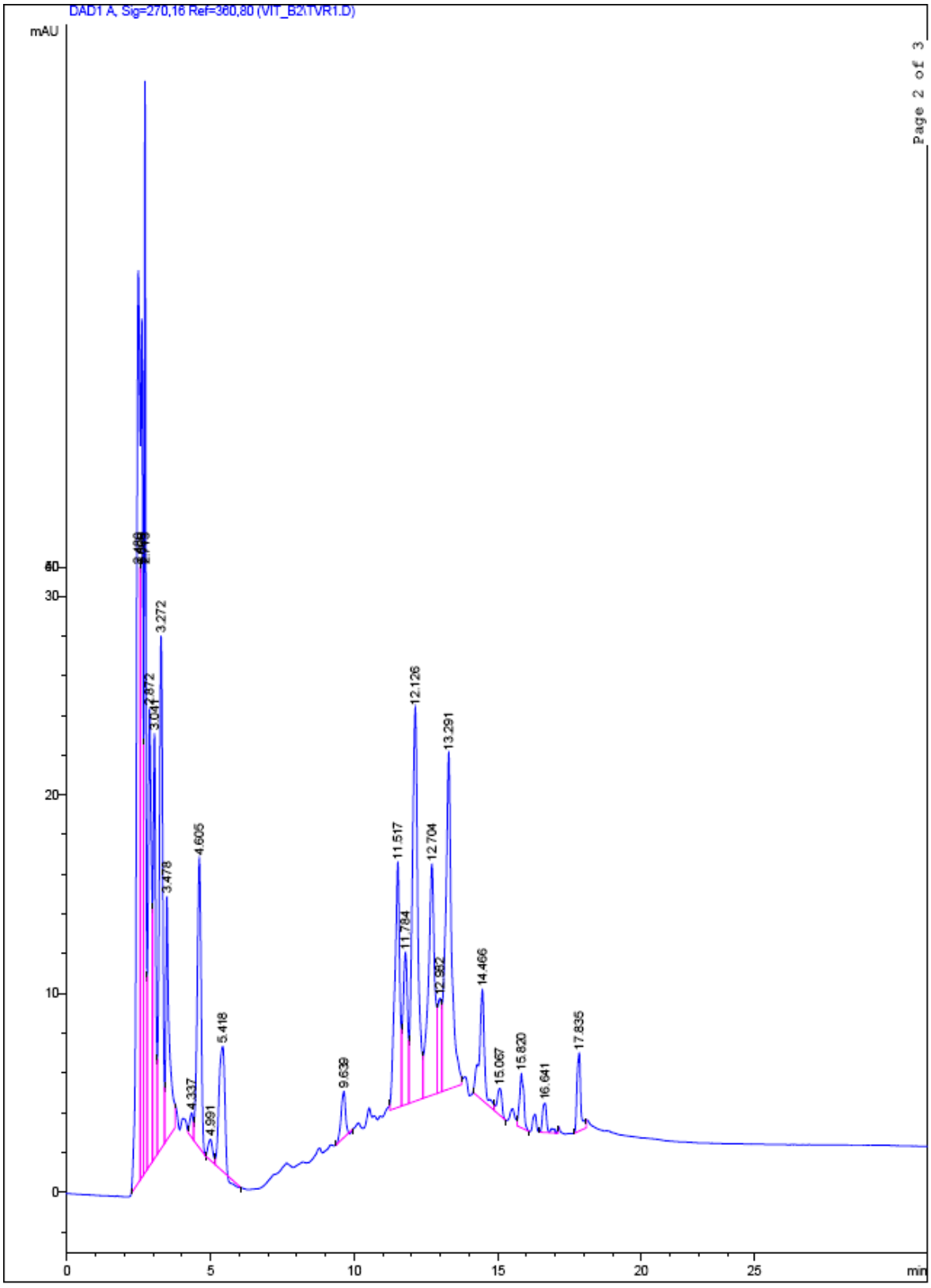
PŘÍLOHA P III: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V MLÉCE VYSTAVENÉM 24 HODIN SLUNEČNÍMU SVĚTLU METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.



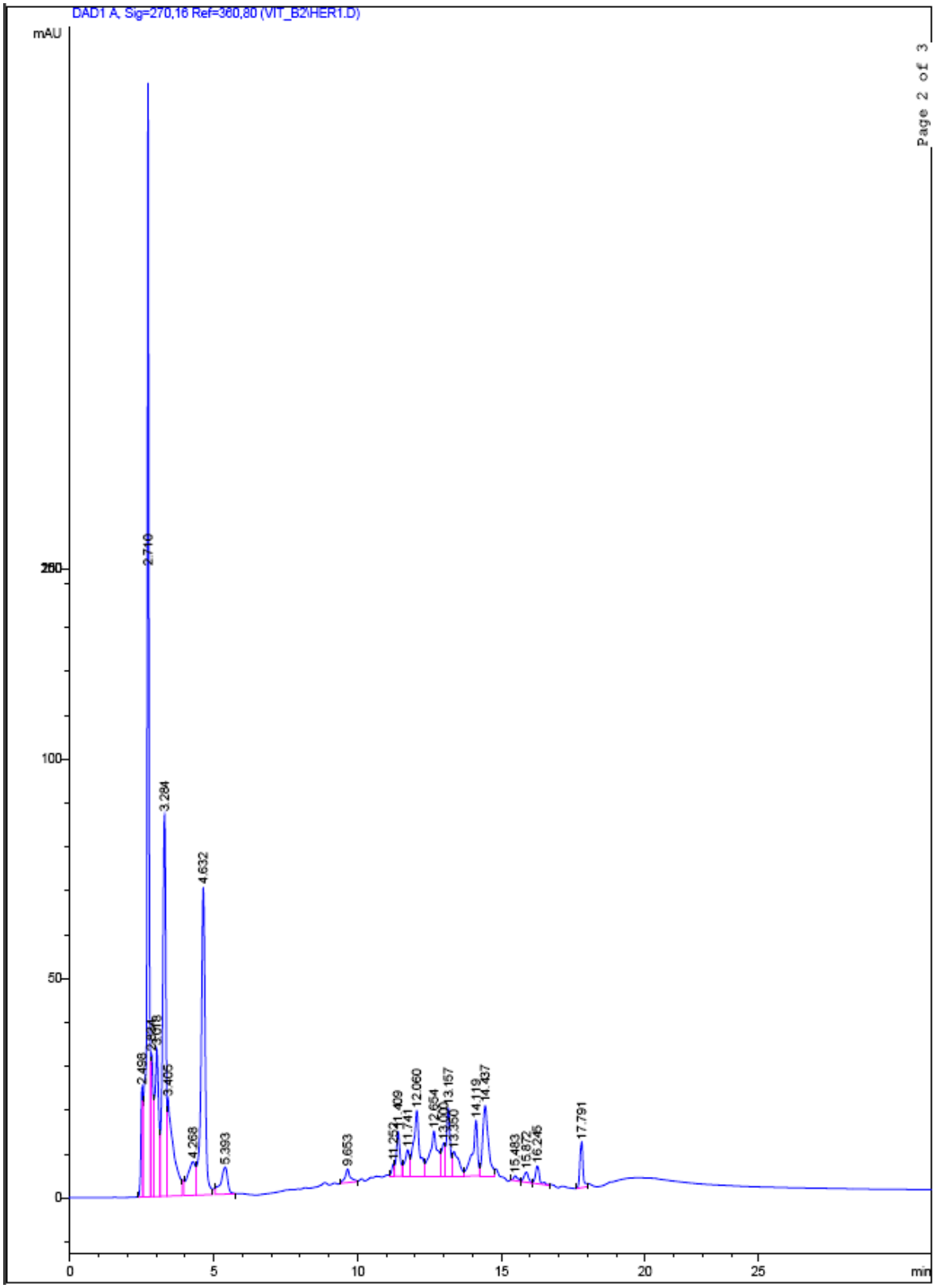
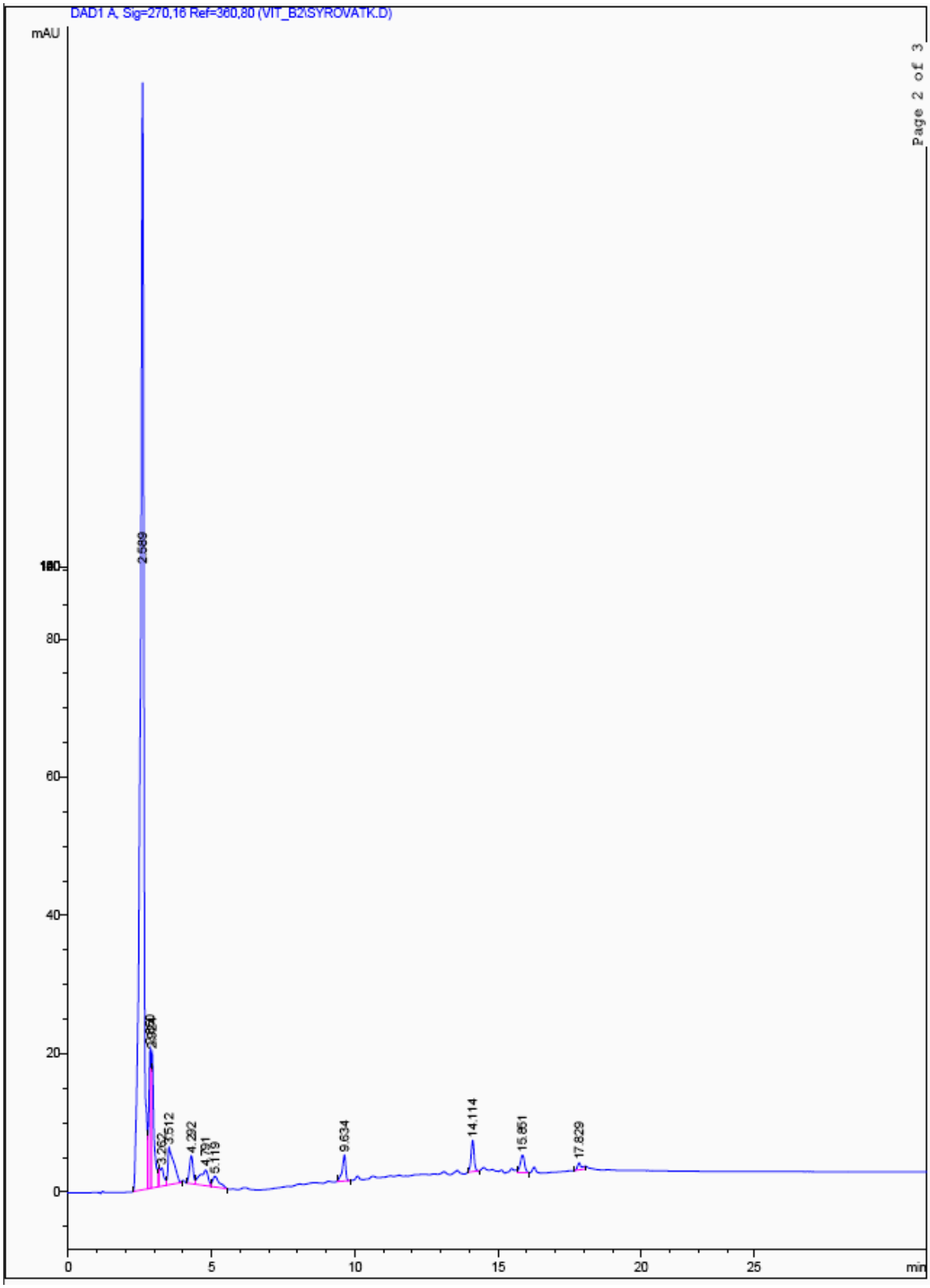
PŘÍLOHA P IV: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V TVAROHU METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.



PŘÍLOHA P V: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V TVRDÉM SÝRU METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.



PŘÍLOHA P VI: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V HERMELÍNU METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.



PŘÍLOHA P VII: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V SYROVÁTCE METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.