

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Stanovení obsahu vitamínů B v krvi obratlovců**

Bakalářská práce

**Marie Čížková**

Školitel: Prof. RNDr. František Vácha, Ph.D.

Školitel specialista: Ing. David Kahoun, Ph.D.

České Budějovice 2022

Čížková, M., 2022: Stanovení obsahu vitamínů B v krvi obratlovců. [Determination of B vitamins in the blood of vertebrates. Bc. Thesis, in Czech.] – 34 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Anotace**

This bachelor thesis deals with B-complex vitamins. In the theoretical part there are main information about the vitamins, such as chemical structure, physical and chemical properties, major food sources, recommended dietary allowances, their role in organism and the main manifestation of their deficiency or excess. The practical part is focused on qualitative and quantitative determination of B vitamins using LC/MS. Levels of individual vitamins B in different animals are discussed in relation to their taxa or food strategy.

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích 12.4.2022

.....

Marie Čížková

**Klíčová slova**

Vitamíny, B komplex, vitamíny rozpustné ve vodě, krev, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

**Key words**

Vitamins, B complex, water-soluble vitamins, blood, liquid chromatography, mass spectrometry

### **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Prof. RNDr. Františku Váchovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, cenné rady a motivaci v průběhu celé práce.

Dále mé poděkování patří MVDr. Romanu Vodičkovi, Ph.D. ze zoologické zahrady hlavního města Prahy za poskytnutí vzorků krve a Ing. Davidu Kahounovi, Ph.D. za ochotu a cenné rady při zpracování této práce.

V neposlední řadě děkuji mé rodině a přátelům za velkou podporu a pomoc.

## **CÍLE PRÁCE**

- Vypracovat literární řešení na dané téma.
- Komunikovat se zoologickou zahradou hlavního města Prahy, následně řešit logistiku sběru a převozu vzorků krve k analýze.
- Připravit vzorky krve na analýzu vitamínů B.
- Provést analýzu obsahu vitamínů B v krvi.
- Vyhodnocení obsahu jednotlivých vitamínů B v krvi vybraných živočichů.

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Vitamíny komplexu B</b> .....	<b>2</b>
2.1.1	Thiamin (B1) .....	3
2.1.2	Riboflavin (B2).....	4
2.1.3	Niacin (B3) .....	5
2.1.4	Kyselina pantothenová (B5).....	7
2.1.5	Pyridoxin (B6) .....	8
2.1.6	Biotin (B7).....	9
2.1.7	Kyselina listová (B9).....	10
2.1.8	Kobalamin (B12).....	11
<b>2.2</b>	<b>Metody stanovení vitamínů B</b> .....	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>Materiál a metody</b> .....	<b>14</b>
<b>3.1</b>	<b>Chemikálie</b> .....	<b>14</b>
<b>3.2</b>	<b>Přístroje a spotřební materiál</b> .....	<b>14</b>
<b>3.3</b>	<b>Převoz a uskladnění vzorků krve</b> .....	<b>15</b>
<b>3.4</b>	<b>Příprava roztoků</b> .....	<b>15</b>
3.4.1	Příprava mobilních fází .....	15
3.4.2	Příprava pracovních roztoků standardů .....	16
3.4.3	Příprava pracovního roztoku vnitřních standardů .....	17
3.4.4	Příprava kalibračních roztoků.....	17
3.4.5	Příprava kontrolních roztoků .....	18
3.4.6	Příprava deproteinizačního činidla .....	18
3.4.7	Příprava vzorků pomocí ZnSO <sub>4</sub> /metanol.....	18
<b>3.5</b>	<b>LC-MS/MS</b> .....	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuze</b> .....	<b>21</b>
<b>4.1</b>	<b>B1 - thiamin</b> .....	<b>24</b>
<b>4.2</b>	<b>B2 – riboflavin</b> .....	<b>25</b>
<b>4.3</b>	<b>B3 – nikotinamid</b> .....	<b>25</b>
<b>4.4</b>	<b>B5 – kyselina pantothenová</b> .....	<b>26</b>

4.5	B6 a kyselina 4-pyridoxinová .....	26
4.6	B9 – kyselina listová .....	26
4.7	Ostatní vitamíny .....	26
5	Závěr .....	27
6	Použitá literatura .....	28
7	Seznam symbolů a zkratk .....	32
8	Přílohy .....	34
8.1	Příloha A.....	34

# 1 Úvod

Vitamíny jsou nízkomolekulární organické sloučeniny, které jsou nepostradatelné pro správnou funkci organismu. Lidské tělo si je neumí syntetizovat samo a z toho důvodu musí být přijímány z potravy. Kromě potravy získáváme některé vitamíny prostřednictvím střevních bakterií (konkrétně vitamín K a vitamín B12) nebo je syntetizujeme ve spodních vrstvách pokožky působením ultrafialového záření (vitamín D). Při nedostatečném příjmu vitamínů, hypovitamínóze, dochází k různým poruchám jednotlivých funkcí organismu, které mohou vést k závažným onemocněním. Při úplné absenci vitamínů hovoříme o avitamínóze. Naopak hypervitamínóza se vyznačuje nadměrným příjmem vitamínů a také může vést v některých případech k poškození organismu.

Funkce vitamínů se uplatňuje především v metabolických reakcích, jsou součástí mnoha enzymů a chrání buněčné struktury před oxidačním stresem.

Obecně lidský organismus vyžaduje adekvátní množství dohromady 13 vitamínů. A to vitamínů rozpustných v tucích (vitamín A, vitamín D, vitamín E, vitamín K) a vitamínů rozpustných ve vodě (komplex vitamínů B a vitamín C).

Kapalinová chromatografie patří mezi nejvhodnější analytické metody pro kvalitativní i kvantitativní stanovení vitamínů či organických sloučenin obecně. Tato fyzikálně-chemická metoda spočívá v mnohonásobně opakovaném ustanovování rovnovážné distribuce dělených sloučenin mezi dvěma fázemi. Pro chromatografickou separaci se v poslední době nejvíc využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie, která v kombinaci s hmotnostní detekcí patří k nejefektivnějším metodám.



## 2 Teoretická část

### 2.1 Vitamíny komplexu B

Komplex vitamínů B představuje skupinu 8 ve vodě rozpustných vitamínů: thiamin (B1), riboflavin (B2), niacin (B3), kyselina pantothenová (B5), vitamín B6, biotin (B7), kyselina listová (B9) a vitamín B12. Tyto sloučeniny jsou chemicky odlišné a zastávají různé funkce. Jsou nezbytné pro buněčné interakce a zastupují funkci koenzymů, které hrají důležitou roli v katabolických a anabolických enzymatických reakcích. Jejich kolektivní vliv převládá především ve správné funkci centrální nervové soustavy, produkci energie ve formě adenosintrifosfátu (ATP) a syntézy mnoha neurochemických a signalizačních molekul a dalších metabolitů.

Vitamíny B-komplexu jsou obvykle syntetizovány v rostlinách, a to především v chloroplastech, mitochondriích a cytosolu[1]. V rostlinách zastupují stejné funkce jako v živočišných organismech. Výjimkou je vitamín B12, který je produkován pomocí střevních bakterií. Mezi potraviny rostlinného původu bohaté na vitamíny B patří obiloviny, luštěniny, ořechy, zelená listová zelenina a ovoce. Mimo potraviny rostlinného původu jsou vitamíny hojně zastoupeny i v živočišných produktech, především v masu, mléce a mléčných výrobcích, vejcích a rybách. Pro adekvátní příjem těchto vitamínů je doporučeno dodržovat tzv. středomořskou dietu, která je typická zastoupením potravin jako je ovoce, zelenina, luštěniny, olivový olej, červené víno, rozumná konzumace ryb a bílého masa. Tato dieta je spojena s vysokou hladinou všech vitamínů a minerálů zahrnující B-komplex. Naopak se nedoporučuje dodržovat tzv. západní dietu, která je zastoupena potravinami, jako jsou rafinované obiloviny a jejich výrobky, dopředu hotová jídla, zpracované červené maso (uzeniny a jakékoliv masné výrobky), dezerty a sladké, smažená jídla a produkty s vysokým obsahem tuků. Typická je snížená konzumace ovoce a zeleniny[2]. Tato dieta snižuje příjem potřebných vitamínů a minerálů[3].

Vitamíny B působí jako koenzymy ve významných enzymatických reakcích. Tyto koenzymy jsou biologicky aktivní formy vitamínů, které se váží na proteinový apoenzym za vzniku holoenzymu, který následně zajišťuje vlastní enzymatickou činnost. Obecně může být zapojení vitamínů do enzymatické činnosti rozdělena podle katabolických (rozkladných) či anabolických (syntetických) reakcí.

Při katabolických reakcích vzniká primárně buněčná energie v podobě ATP. Mnoho z vitamínů B-komplexu se podílí na jednotlivých článcích katabolického procesu vedoucí

k tvorbě buněčné energie. Aktivní formy thiaminu, riboflavinu, niacinu a kyseliny pantothenové jsou nepostradatelné koenzymy v buněčném dýchání, glykolýze, Krebsově cyklu a elektrontransportním řetězci vedoucí k vytvoření ATP.

Při anabolických reakcích jsou na vitamínech komplexu B závislé např. Krebsův cyklus, který zprostředkovává vznik klíčových sloučenin nebo prekurzorů pro vznik aminokyselin, nukleotidů a syntéza mastných kyselin[2].

Je prokázáno, že B-komplex má podstatný vliv na funkci centrální nervové soustavy, konkrétně mozku. To je dáno hlavně tím, že mozek je jedním z nejvíce metabolicky aktivních orgánů celého těla.

### **2.1.1 Thiamin (B1)**

Thiamin, také známý jako vitamín B1 nebo aneurin je bezbarvá krystalická látka složená z pyrimidinového cyklu spojeného s methylenovou skupinou na pátém uhlíku s N thiazolovým cyklem[4 – str.255]. Při nízkých teplotách je stabilní, ale po zahřátí uvolňuje toxické výpary oxidu dusnatého a oxidu siřičitého. Má mírný zápach způsobený thiazolem a hořkou chutí. Rozkládá se při cca 248 °C[5 – str.22].

Mezi potraviny bohaté na thiamin patří obiloviny, hnědá rýže, vepřové a drůbeží maso, ořechy, hrách a cereálie. Denní doporučená dávka (DDD) pro dospělé se pohybuje kolem 1,2 mg/den pro muže a 1,1 mg/den pro ženy. Pro děti v útlém věku je doporučeno tuto dávku snížit na 0,2 mg/den a postupně tuto dávku navyšovat společně s přibývajícím věkem. Těhotné ženy by naopak měly svou DDD thiaminu navýšit na 1,4 mg/den [6]. Jakmile je thiamin z potravy vstřebán do krve z gastrointestinálního traktu, putuje volně pomocí oběhového systému v plazmě a červených krvinkách, dokud není vyloučen v moči. Thiamin může být skladován v játrech, ale maximálně po dobu 18 dní[6].

V okamžiku, kdy je vstřebán do krve, je thiamin jako provitamín přeměněn pomocí fosfotransferázy na jeho aktivní formu – thiaminpyrofosfát nebo správněji thiamindifosfát (TPP). Tento koenzym je velmi důležitý pro energetický metabolismus. Můžeme ho najít v pyruvátdehydrogenázovém komplexu, kde TPP funguje jako kofaktor přeměňující pyruvát na hydroxyethyl-TPP a oxid uhličitý. V tomto komplexu vznikají NADH molekuly, které mohou dále přispívat ke vzniku ATP. Mimo jiné je tento komplex důležitý také pro vznik acetylcholinu nebo myelinu. Kromě tohoto komplexu najdeme TPP také v cyklu kyseliny citronové jako kofaktor v enzymatickém komplexu nazývaném jako oxoglutarátdehydrogenáza, ve kterém je  $\alpha$ -ketoglutarát dekarboxylován na sukcinyl-CoA a oxid uhličitý. Mimo důležitost této reakce při

získávání energie skrze citrátový cyklus, je tato reakce důležitá pro udržení hladin glutamátu, aspartátu a kyseliny  $\gamma$ -aminomaselné, která funguje jako inhibiční neurotransmitter v centrální nervové soustavě zabraňující nadměrné excitabilitě neuronů. V neposlední řadě je TPP vyžadován jako kofaktor v pentózofosfátovém cyklu vytvářející NADPH a ribózu-5-fosfát[6].

Nedostatek thiaminu může vést ke snížené enzymatické aktivitě, pozměněné mitochondriální činnosti, narušenému oxidativnímu metabolismu a snížené produkci energie, která může zapříčinit poškození až smrt buněk[6]. Mezi známé nemoci spojené s nedostatkem vitamínu B1 patří beri-beri a Wernicke-Korsakovův syndrom.

Nemoc beri-beri se vyskytuje u lidí se sníženým příjmem thiaminu, ale může se objevit i u lidí s nadměrnou konzumací alkoholu. Existují 2 formy této nemoci, a to suchá a vlhká. Do projevů vlhké formy beri-beri spadají onemocnění srdce zahrnující zvětšené srdce, otoky, srdeční selhávání, hromadění výpotků v dutinách a srdeční dilataci s příznaky varixů[6]. Oproti tomu komplikace spojené se suchou formou beri-beri jsou spíše neurologického charakteru postihující především periferní nervový systém. U jedinců se suchou formou může docházet k parestézii, syndromu foot drop, kachektizaci svalů, znecitlivění a chybějící reflexy kotníku[6].

Wernicke-Korsakovův syndrom je život ohrožující nemoc postihující centrální nervovou soustavu způsobená nedostatkem vitamínu B1 převážně u chronických alkoholiků, ale může vzniknout i za jiných okolností nesouvisejícími s alkoholem[7], jako jsou podvýživové stavy[8], onemocnění gastrointestinálního traktu (např. Crohnova choroba, pankreatitida), psychiatrické stavy (např. schizofrenie, mentální anorexie)[7, 9] a jiné. Tento syndrom zahrnuje dva samostatné syndromy, a to Wernickovu encefalopatii a Korsakoffův syndrom. Wernickova encefalopatie je charakterizována nezánětlivou lézí mozku, která se vyznačuje ataxií, oftalmoplegií, mozkovým krvácením a pozměněné mentální kondici. Wernickova encefalopatie se často vyvine v Korsakoffův syndrom. Jedinci s tímto syndromem mají známky blouznění a trvalé výpadky paměti[6].

Nadbytek vitamínu B1 nezpůsobuje žádné závažné nemoci, ale mezi nejčastěji hlášené nežádoucí účinky patří návaly tepla, kopřivka, svědění, angioneurotický edém, pocení a anafylaxe[6].

### **2.1.2 Riboflavin (B2)**

Riboflavin, též známý jako vitamín B2 je žluto-oranžová organická sloučenina skládající se z heterocyklického isoalloxazinového jádra, flavinu a z cukerného alkoholu, ribitolu. Je tepelně stabilní, ale velmi citlivý na světlo, kdy dochází k jeho rozkladu.

Mléko a mléčné produkty obsahují vysoký obsah riboflavinu. K dalším potravinám bohatým na vitamín B2 patří maso, tučné ryby, tmavě zelená zelenina, ovoce a cereálie[10]. DDD riboflavinu se u dospělých žen pohybuje kolem 0,9-1,1 mg/den. U mužů je tato dávka vyšší, a to od 1,1 do 1,3 mg/den. U kojenců se DDD pohybuje mezi 0,3 a 0,4 mg/den. Opět by se tato dávka měla zvyšovat do dospívání s tím, že mezi 10 a 18 lety života by DDD neměla přesáhnout 1,3 mg/den. U těhotných žen by se příjem riboflavinu měl zvýšit z důvodu přechodu vitamínu přes placentu. Jestliže je příjem riboflavinu během těhotenství nedostačující, je více pravděpodobné, že se narodí dítě trpící nedostatkem toho vitamínu, což může vést ke zvýšenému riziku výskytu vrozené srdeční choroby. Většina riboflavinu je vstřebána v proximální části tenkého střeva[11]. Tělo si vitamín B2 neukládá ve velkém množství, ale malé zásoby můžeme najít například v játrech, srdci či ledvinách[11].

Funkce riboflavinu v organismu hraje klíčovou roli v metabolismu. Riboflavin je intracelulárně fosforylován na flavinmononukleotid (FMN) a dále metabolizován na flavinadenindinukleotid (FAD). Oba flavoproteinové koenzymy jsou zásadní v mnoha buněčných enzymatických pochodech, jako je například syntéza hemoproteinů (zahrnující hemoglobin), jsou součástí komplexů mitochondriálního elektrontransportního řetězce (konkrétně v komplexu I a komplexu II), účastní se transportu kyslíku a jeho následného uskladnění[3]. Nadto jsou flavoproteiny důležité jako kofaktory v metabolismu mastných kyselin, absorpci a využití železa[12]. Deriváty riboflavinu působí také jako antioxidanty pro jeho účast v obnově glutathionu, který je klíčový pro ochranu buněčných struktur před volnými radikály[13].

Nedostatečný příjem riboflavinu je označován také jako ariboflavinóza, která zahrnuje šeroslepost, šedý zákal, únavu, anémii, migrény, periferní neuropatie a dermatologické příznaky jako je cheilóza, glositida, popraskané rty a šupinaté kožní exantémy v oblasti šourku a vulvy[14].

Nadbytečný příjem vitamínu B2 není život ohrožující situace, jelikož enterocyty tento nadbytek neabsorbují. U těhotných žen je nutná opatrnost při podávání velkých dávek z důvodu neškodného zbarvení moči.

### **2.1.3 Niacin (B3)**

Termín niacin zahrnuje široký soubor vitamérů zastávajících biologickou aktivitu spojenou s nikotinamidem. Do tohoto souboru patří nikotinamid, kyselina nikotinová a různá škála struktur pyridinových nukleotidů. Skupina těchto látek je obecně označována jako vitamín B3. Kyselina nikotinová je bílá krystalická pevná látka, při pokojové teplotě na vzduchu stabilní [4 – str.196].

Vysokou hladinu niacinu v každodenní stravě najdeme například v červeném mase, kuřecím mase, rybách, arašídech, kávě, fazolích, pšenici a dalších. Mimo jiné si tělo dokáže syntetizovat tento vitamín z potravin bohatých na tryptofan, který je obsažen jak v rostlinné, tak i živočišné stravě (např. maso, mléčné výrobky, obilniny)[15]. DDD niacinu se udává v jednotkách NE - niacin ekvivalent. Hodnota 1 NE je rovna buď 1 mg niacinu nebo 60 mg tryptofanu. Pro muže je stanovena na 16 NE, pro ženy 14 NE. U dětí jsou tyto hodnoty přizpůsobeny věkovým skupinám a postupně se zvyšují od 6 NE denně u batolat až po 12 NE u náctiletých[16]. U niacinu jsou stanoveny i hodnoty pro horní limit, které jsou založeny na riziku zarudnutí kůže. Za toto zarudnutí je zodpovědný vysokoafinitní niacinový receptor 1 (NIACR1)[3]. Tyto hodnoty jsou stanoveny na 35 NE pro dospělé a 10 NE pro děti[4 – str. 198]. Sloučeniny niacinu vstupují do vrátnicového oběhu, kde jsou internalizovány erytrocyty nebo jsou transportovány do jater. Játra jsou ústředním orgánem, kde se niacin zpracovává a následně se kyselina nikotinová a nikotinamid metabolizují na NAD nebo vznikají sloučeniny pro vylučování močí v závislosti na množství niacinu v organismu[3].

Kyselina nikotinová a nikotinamid jsou nutriční prekurzory bioaktivních molekul, jako je nikotinamidadenindinukleotid (NAD) a nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADP). Tyto látky jsou důležité kofaktory pro většinu buněčných redoxních reakcí a jako takové jsou nezbytné pro udržení buněčného metabolismu a dýchání[16]. Kromě produkce energie k nim patří oxidačně redukční reakce, antioxidační ochrana, metabolismus (zahrnující glykolýzu), oprava kyseliny deoxyribonukleové (DNA), buněčné signalizace (prostřednictvím intracelulárního vápníku) a přeměna folátu na jeho tetrahydrofolátový derivát[3].

Nedostatek niacinu se projevuje nemocí zvanou pellagra. Tato nemoc se téměř nevyskytuje ve vyspělých zemích, kde byla jako projev primárního nutričního deficitu téměř vymýcena. Místo toho hlavní příčiny sekundární pellagry v těchto podmínkách je chronický alkoholismus, malabsorpční syndrom, mentální anorexie a drogami vyvolaný nedostatek niacinu[17, 18]. Typické kožní léze pellagry jsou doprovázeny nespavostí, ztrátou chuti, úbytkem na váze, bolestí úst a jazyka, zažívacími potížemi, průjmem, bolestmi břicha, pocitem pálení v různých částech těla, závratěmi, bolestmi hlavy, necitlivostí, nervozitou, obavami, duševním zmatkem a sklerózou. Niacin je také klíčový pro podporu metabolismu glukózy v mozku a centrální nervové soustavě. Při narušení dochází k paralýze končetin, která může vést ke křečovému nebo ataxickému pohybu, který je doprovázen zánětem periferních nervů[17].

Při nadbytku je niacin vylučován močí, proto nejsou známy žádné projevy jeho nadbytku.

### 2.1.4 Kyselina pantothenová (B5)

Kyselina pantothenová, též kyselina D-pantothenová či vitamín B5, je složena z  $\beta$ -alaninu, který je připojený na 2,4-dihydroxy-3,3-dimethylbutyrovou (pantoovou) kyselinu prostřednictvím amidové vazby. Čistá kyselina pantothenová je ve vodě rozpustná viskózní žlutá sloučenina. Je stabilní při neutrálním pH, ale je snadno degradována kyselinami, zásadami či teplem. D-pantothenan vápenatý je forma kyseliny pantothenové, která se obvykle vyskytuje v komerčních vitamínových doplňcích stravy díky větší stabilitě než má čistá kyselina. Jedná se o bílou krystalickou látku bez zápachu[4 – str. 290].

Kyselina pantothenová se vyskytuje v mnoha potravinách rostlinného i živočišného původu, ale nejvíce se vyskytuje v potravinách jako je maso (především kuřecí či hovězí), bramborách, rajčatech, vejcích, brokolici, cereáliích a celozrnných obilninách [3, 4 – str.292]. DDD kyseliny pantothenové je stanovena na 4-6 mg/den. Drtivá většina kyseliny pantothenové v jídle je zastoupena ve sloučeninách jako je koenzym A (CoA) nebo fosfopantetein. Tyto sloučeniny musí být hydrolyzovány za účelem následné absorpce vitamínu B5. K tomu dochází v lumenu střeva následnou aktivitou dvou hydroláz, pyrofosfatázy a fosfatázy, za produkce pantotheinu. Střevní fosfatázy a nukleosidázy jsou schopny velmi účinné hydrolýzy CoA, takže dochází k téměř kvantitativnímu uvolňování kyseliny pantothenové jako normální součást trávení. Pantothein je buď absorbován tak, jak je, nebo dále metabolizován na kyselinu pantothenovou třetí střevní hydrolázou, pantothenázou[4 – str.293-294].

Kyselina pantothenová je prekurzorem pro koenzym A, který je přítomný ve všech živých organismech. Kromě své role v oxidativním metabolismu přispívá CoA ke správné funkci mozkových buněk, podílí se na syntéze cholesterolu, aminokyselin, fosfolipidů a mastných kyselin. Zvláště důležitá je kyselina pantothenová, prostřednictvím CoA, při syntéze neurotransmiterů (acetylcholin) a steroidních hormonů[3].

Vzhledem k tomu, že kyselina pantothenová je v přírodě velice rozšířená, je její nedostatek u lidí velmi vzácný. Avšak mohou se objevit různé nemoci či problémy spojené s právě zmíněným nedostatkem tohoto vitamínu. Mezi nejčastější poruchy patří snížená produkce kortizolu, zvýšená artritická bolest, myalgie, únava, bolest hlavy, deprese a nespavost. Nedostatek kyseliny pantothenové také snižuje hodnotu acetylcholinu projevující se paresteziemi a syndromem „hořící nohy“ (Grierson-Gopalan syndrom). Mimo jiné tento vitamín spouští produkci cytokinů imunitními buňkami a byl odhalen paradoxní účinek kyseliny pantothenové na přepínání protizánětlivých a prozánětlivých cytokinů[19].

Kyselina pantothenová je, co se toxicity týče, všeobecně bezpečná i při vyšších dávkách. Nadbytek je vylučován močí. Při dávkách nad 1 g/den se může objevit průjem či gastrointestinální poruchy, ale žádné akutní případy nebyly doposud pozorovány[4 – str.304].

### **2.1.5 Pyridoxin (B6)**

Obecně používaný pojem vitamín B6 označuje skupinu šesti, přirozeně se vyskytujících pyridinových derivátů zastoupených pyridoxinem, pyridoxalem, pyridoxaminem a jejich fosforylovanými deriváty [pyridoxin-5'-fosfát (PNP), pyridoxal-5'-fosfát (PLP) a pyridoxamin-5'-fosfát – (PMP)] s podobnými fyziologickými účinky[4 – str.316, 20]. Vitamery tohoto vitamínu jsou fotosenzitivní a snadno podléhají působení tepla, přičemž zpracování potravin, včetně tepelné sterilizace, má za následek ztrátu aktivity vitamínu B6[4 – str.319].

Vitamery a jejich fosforylované formy jsou přítomny ve většině potravin. Pyridoxin, pyridoxamin a jejich deriváty jsou hlavními formami vitamínu B6 přítomnými v potravinách rostlinného původu, zatímco pyridoxal a PLP jsou hlavními formami nalezenými v živočišných potravinách[4 – str.319]. Mezi potraviny s největším obsahem vitamínu B6 patří maso, ryby, drůbež, zelenina (především brambory), ovoce (zejména banány), luštěniny a ořechy[3, 20]. DDD vitamínu B6 je stanovena na 2 mg/den pro dospělé muže i ženy, 0,9 mg/den pro děti ve věkovém rozmezí od 4 do 6 let a 1,2 mg/den pro děti od 7 do 10 let. Je doporučeno u žen během laktace či u dospívajících během rychlé fáze nárůstu svalové hmoty zvýšit hodnotu vitamínu B6[4 – str.321]. Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) nedávno stanovil horní limit na 25 mg/den. Tento horní limit byl stanoven na základě neurologických potíží pozorovaných při podání pyridoxinu při hodnotě 50 mg/den[20]. Většina pyridoxalu nadbytečného pro tkáň je oxidována v játrech na kyselinu 4-pyridoxovou (4-PA), která je hlavním degradačním produktem vitamínu B6 v moči[21].

Vitamín B6 je výjimečný v tom, že se podílí na metabolismu všech tří makroživin (proteinů, bílkovin a sacharidů). Ve skutečnosti je většina těchto reakcí ko-katalyzována pyridoxal-5-fosfátem. Tento vitamér působí jako koenzym v asi 150 různých enzymatických reakcích, které katalyzují klíčové metabolické děje, jako je syntéza, transformace a degradace aminů a aminokyselin, dodání jednouhlíkových jednotek, transsulfurace, syntéza tetrapyrrolových sloučenin (včetně hemu) a polyaminů, biosyntéza a degradace neurotransmiterů (jako je dopamin, serotonin, kyselina  $\gamma$ -aminomaselná, noradrenalin a hormon melatonin)[3, 20].

Klinicky uznané známky nedostatku vitamínu B6 v důsledku primárního deficitu ve stravě jsou pozorovány jen zřídka. Nedostatek tohoto vitamínu však úzce souvisí s malabsorpčními

syndromy, jako je celiakie či zánětlivá onemocnění střev. Dokonce i příjem některých léčiv, jako je isoniazid, penicilamin a cykloserin, tak i perorální antikoncepce může snížit hladiny PLP. Tato hladina může být rovněž snížena zánětlivými stavy a stresovými hormony. Těhotenství, obezita a alkoholismus také snižují hladiny PLP[20]. U uremických pacientů může existovat funkční nedostatek vitamínu B6. K symptomům patří nervosvalová podrážděnost, deprese centrálního nervového systému, křeče a periferní neuritida[4 – str.322].

Po vyšších dávkách pyridoxinu, který byl použit k léčbě různých stavů včetně syndromu karpálního tunelu či premenstruačního napětí, byly pozorovány problémy spojené s dermatologickými lézemi nebo těžké senzorycké neuropatie[22].

### **2.1.6 Biotin (B7)**

Biotin, taktéž nazývaný jako vitamín B7 nebo vitamín H, má ve své struktuře 3 asymetrické uhlíky, z toho důvodu existuje 8 stereoizomerů. Z těchto 8 stereoizomerů se pouze jeden, a to D-(+)-biotin, vyskytuje volně v přírodě a je enzymaticky aktivní. Tato sloučenina se obecně nazývá jako biotin nebo D-biotin. Mezi další aktivní formy jako biotin patří biocytin, amid biotinu a L-lysinu. Biotin je bílá krystalická látka s kyselými vlastnostmi[5 – str.420].

Biotin je široce rozptýlený v potravinách. Mezi potraviny bohaté na tento vitamín patří především vaječný žloutek, játra, vepřové maso a listová zelenina[3]. Mimo biotin získaný z potravin také získáváme biotin pomocí střevních bakterií[23]. DDD je stanovena pro dospělé jedince na 30 µg/den. Novorozencům se doporučuje nastavovat tuto dávku od 5 µg/den a navyšovat s přibývajícím věkem. U dospívajících jedinců je DDD stanovena na 25 µg/den. Je doporučováno ženám během laktace tuto dávku navýšit na 35 µg/den[4 – str.375]. Absorpce volného biotinu probíhá v tenkém střevě přes lumen střeva a následně je většina biotinu uložena v játrech[4 – str.365].

Biotin hraje klíčovou roli jako kovalentně vázaný koenzym pro karboxylázy, konkrétně pro acetyl-CoA karboxylázu 1 a 2, pyruvátkarboxylázu, propionyl-CoA karboxylázu a 3-methylcrotonoyl-CoA karboxylázu. Mimo jiné má také důležitou funkci v buněčné signalizaci, epigenetické regulaci genů a struktuře chromatinu[24]. V neposlední řadě se podílí na metabolismu glukózy a hemostáze (včetně regulace příjmu glukózy v játrech), glukoneogenezi (a lipogenezi), transkripci inzulinového receptoru a funkci β-buněk pankreatu[3].

Nedostatek vitamínu B7 se vyznačuje především periorální dermatitidou, alopecií, ataxií, hypotonií, ketolaktátovou acidózou nebo organickou acidurií, záchvaty podobnými epileptickým záchvatům, kožní infekcí či opožděným vývojem kojenců a dětí[24].



Nadbytečný biotin je vyloučen močí v podobě oxidované formy, biotinsulfoxidu. Nebyly hlášeny nežádoucí účinky při požití vyšší dávky tohoto vitamínu. Suplementace biotinem ovlivňuje expresi několika genů, a to konkrétně cytokiny interleukin  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), interferon- $\gamma$  a interleukin 4 (IL-4). Tyto cytokiny zastupují klíčové funkce v imunitním systému organismu, např. aktivaci pomocných ( $T_H$ ) lymfocytů, maturaci a expanzi B lymfocytů[25]. Dosud není známo, zda je některá z těchto změn nežádoucí[24].

### **2.1.7 Kyselina listová (B9)**

Kyselina listová, známá také jako kyselina pteroylmonoglutamová či folát, patří do skupiny vitamínů B (tzv. foláty) s označením jako vitamín B9. Skupina folátů se skládá ze sloučenin, které se liší oxidačním stavem molekuly, délkou glutamátového postranního řetězce a specifickými uhlíkovými jednotkami připojenými k molekule. Samotnou kyselinu listovou tvoří z chemického hlediska pteridinová báze, kyselina glutamátová a kyselina p-aminobenzoová (PABA)[26]. Jedná se o plně oxidovanou monoglutamátovou formu vitamínu, která se používá komerčně v doplňcích stravy a k obohacování potravin. Molekula folátu, též známá jako tetrahydrofolát (THF), je odvozena od 5,6,7,8-tetrahydropteryolglutamátu, který se skládá z 2-amino-4-hydroxypteridinové (pterinové) části spojené pomocí methylenové skupiny v poloze C-6 na kyselinu p-aminobenzoylglutamovou. Pyrazinový kruh v THF je plně redukován v polohách 5, 6, 7 a 8. Redukované polohy 7 a 8 se vyskytují pouze u dihydrofolátu[4 – str.386]. Kyselina listová je popsána jako ve vodě rozpustná látka, nicméně její kyselá forma je, na rozdíl od její soli, ve vodě rozpustná jen málo. Molekula THF je v roztoku nestálá kvůli citlivosti na kyslík, světlo a extrémní hodnoty pH. Nestabilita vůči světlu je soudržným rysem všech forem folátu[4 – str.387].

Foláty lze nalézt jak v produktech rostlinného původu, tak i živočišného, ačkoli hodnoty folátu v živočišné stravě jsou až na pár výjimek nízké. Do produktů rostlinného původu obsahující vyšší dávku folátu patří listová zelenina, a to především špenát, hrášek a chřest. V cereálních výrobcích je nejvíce kyseliny listové obsaženo v ovesných vločkách. Z ovoce sem patří především citrusové plody[3]. V živočišných produktech se nejvíce folátu nachází v hovězích játrech. Je důležité vzít na vědomí, že pomocí tepelného zpracování se původní množství folátů výrazně snižuje[26]. DDD se uvádí v tzv. Dietary Folate Equivalent (DEF), pro muže a ženy od 14ti let je DFE stanovena na 400  $\mu\text{g}$  /den. U těhotných žen a kojících je tato dávka zvýšena na 500-600  $\mu\text{g}$  /den. Horní limit pro kyselinu listovou byl stanoven na 1000  $\mu\text{g}$ /den. Pro přirozeně se vyskytující folát horní limit nebyl dosud stanoven. Základem pro stanovení horního limitu pro

kyselinu listovou byly hlášené hematologické abnormality, které byly spojeny s nedostatkem vitamínu B12[4 – str.390]. Folát je aktivně absorbován v první třetině tenkého střeva, následně je většina plazmatického folátu volně filtrována v glomerulu a reabsorbován v proximálních renálních tubulech. Nadbytečný folát je vyloučen močí a tělo jej neskládá[4 – str.391].

Reakce využívající folát jsou důležité pro metabolismus jednoho uhlíku. Zahrnují reakce, které se účastní různých fází metabolismu aminokyselin, kdy se na buněčné úrovni 5-methylTHF primárně účastní např. transformace serinu a glycinu. 5-methylTHF se uplatňuje i při biosyntéze nukleových kyselin prostřednictvím syntézy purinů a pyrimidinů [26]. Folát se také využívá v methylačních reakcích po vytvoření primárního methylačního činidla v těle, S-adenosylmethioninu. V reakcích závislých na folátech daná forma folátového koenzymu daruje jednu uhlíkovou jednotku do reakce, což vede k regeneraci THF, který pak může volně přijímat další jednouhlíkové jednotky z folátové zásoby, a tak pokračovat v cyklu[4 – str.392].

Nedostatek folátů zvyšuje riziko rozvoje řady patologií, včetně aterosklerózy, kardiovaskulárních onemocnění, megaloblastické anémie, rakoviny a neurodegenerativních onemocnění. V porodnictví jsou spojeny především s rizikem opakovaných potratů, preeklampsie nebo předčasného porodu. Nejdůležitějším důsledkem nedostatku kyseliny listové v prokreačním věku je zvýšené riziko vrozených vývojových vad nejen nervového, ale i kardiovaskulárního či urogenitálního systému[26].

Jak je psáno výše, nadbytek folátu je vyloučen močí, avšak je třeba zdůraznit, že příliš vysoké dávky mohou mít také negativní dopad na organismus. Zvýšené dávky kyseliny listové mohou způsobit nespavost, podráždění, deprese, kožní alergické reakce nebo gastrointestinální poruchy. Existují zprávy, které zdůrazňují potenciální účinky nadměrného množství kyseliny listové během těhotenství na respirační problémy, které predisponují k výskytu astmatu[26].

### **2.1.8 Kobalamin (B12)**

Vitamín B12, také známý jako kobalamin, je kovový komplex skládající se z centrálního iontu kobaltu spojený 6 ligandy[27]. Základem je korinový kruh, který je tvořen pomocí 4 redukovaných a vzájemně vázaných pyrrolových kruhů. Strukturu tohoto vitamínu můžeme rozdělit na horní a spodní část, kdy spodní část, také nazývaná jako  $\alpha$ , je tvořená 5,6-dimethylbenzimidazolem, který je navázán na kobalt pomocí jednoho ze svých dusíků. Na horní část,  $\beta$ , může být navázána methyl-, adenosyl-, akva-, hydroxy- nebo kyano-skupina, podle které následně odvozujeme název formy vitamínu [28].

Veškeré formy vitamínu B12 vznikají primárně mikrobiální syntézou. Většina druhů bakterií a řas jsou schopny syntetizovat vitamín B12, který může poté vstoupit do potravinového řetězce. K produkci tohoto vitamínu dochází především u býložravců fermentací v gastrointestinálním traktu. Různé formy vitamínu B12 jsou následně absorbovány a inkorporovány do tkání těchto zvířat, které se stávají bohatým zdrojem vitamínu B12. Jedná se především o játra, ve kterých je vitamín B12 skladován ve vysokých koncentracích. Masožravci, popřípadě všežravci získávají tento vitamín ve stravě z tkání nebo produktů býložravých zvířat (např. mléko, máslo, sýr a vejce)[29]. Doporučená denní dávka pro muže a ženy je stanovena na 2,4 µg. Pro těhotné ženy je tato dávka zvýšena na 2,6 µg[30]. Po vstřebání je velké množství vitamínu uloženo v játrech[31].

Jakmile je kobalamin metabolizován, účastní se jako kofaktor mnoha biochemických reakcí, jako je například konverze propionylu na sukcinyl koenzym A, syntéza methioninu z homocysteinu nebo při DNA syntéze. Kobalamin se v těchto reakcích může vyskytovat v různých formách, např. jako 5'-deoxyadenosylkobalamin v methylmalonyl-CoA-mutáze, která katalyzuje přeměnu methylmalonylu-CoA na sukcinyl-CoA, což je mezistupeň při konverzi propionátu na sukcinát během oxidace mastných kyselin s lichým počtem uhlíků a katabolismu ketogenních aminokyselin [4 – str.422-423].

Deficit vitamínu B12 je v dnešní době velmi vzácný, jelikož jaterní zásoby (<1,5 mg) dokážou vydržet až na 5-10 let díky enterohepatálnímu cyklu, kdy je kobalamin vylučován žlučí a následně je reabsorbován v tenkém střevě[31]. Nejčastější příčinou klinického nedostatku vitamínu B12 je malabsorpce. Nedostatek B12 má výrazné patofyziologické účinky na krev/krvetvorbu, nervový systém a další orgány. Nejvýraznějším dopadem nedostatku je megaloblastická anémie, která je způsobena narušením syntézy DNA, které vede ke zpomalení dělení prekurzorů erytrocytů. Deficit ovlivňující nervový systém vede k demyelinizaci neuronů, kdy primárním projevem je demyelinizační syndrom postihující centrální i periferní neurony[32]. Postižena může být i myelinizace motorických vláken. Novější důkazy naznačují, že nedostatek vitamínu B12 může přispívat k riziku vaskulárního onemocnění spojeného se zvýšenými hladinami homocysteinu v krvi [33]. Mimo jiné se ještě diskutuje o rakovině (především rakovině prsu), defektech neurální trubice (spina bifida, anencefalie) či osteoporóze. Nedostatek B12 také může hrát roli v rychlosti nástupu klinického AIDS v důsledku infekce HIV[4 – str.429-434].

Předávkování vitamínem B12 je téměř nemožné, jelikož je nadbytek vyloučen močí. Při zvýšeném podání vitamínu B12 dochází i ke zhoršenému zpětnému vstřebání.

## 2.2 Metody stanovení vitamínů B

Instrumentální analytické metody, které slouží pro kvalitativní i kvantitativní analýzu, musejí v současné době splňovat celou řadu náročných kritérií, protože je kladen stále větší důraz na dostatečnou spolehlivost výsledků. S ohledem na rostoucí požadavky dosahovat stále nižších mezí stanovitelnosti, vyšší přesnosti i správnosti výsledků, je nezbytné používat analytické metody s co nejvyšší specifitou, aby bylo možné co nejvíce odlišit odezvu analytu od interferujících sloučenin z matrice vzorku, což je významné např. v případě analýz ve vodě rozpustných vitamínů v komplikovaných přírodních matricích (potravin, biologické vzorky aj.). Vzhledem k nízkým a/nebo rozdílným koncentračním hladinám, interakcím s jinými sloučeninami (např. proteiny, fosfáty, ...), přítomností různých biologicky aktivních forem (vitamerů) či chemické nestabilitě, je nutné, aby příprava vzorku zahrnovala co nejméně operací, trvala co nejkratší dobu a vlastní chemická analýza byla provedena nejlépe pomocí jedné analytické metody [34].

Jedna z metod pro stanovení vitamínů rozpustných ve vodě je založena na mikrobiologické analýze (tzv. MBAs) spočívající v rychlosti růstu druhu mikroorganismu, který ve svém metabolismu využívá stanovovaný vitamín. Tato metoda však vykazuje nedostatečnou specifickou a selektivitu pro vitamery. Navíc je tato metoda časově náročná, složitá a vykazuje nízkou přesnost[34].

Mezi další používané metody patří chemiluminiscence, spektrofotometrie, radioimunoanalýza, fluorimetrie a kapilární zónová elektroforéza.[34–36].

V poslední době je nejvíce se rozvíjející metodou stanovení vitamínů komplexu B vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS), a to především pro výhodu možnosti detekce většiny vitamínů v jediné analýze, potřeby malého objemu vzorku (jednotky až stovky mikrolitrů) a s velice vysokou mírou spolehlivosti stanovení. Tyto benefity představují velký pokrok oproti metodám, u kterých musely být vitamíny stanovovány individuálně nebo ve více skupinách.

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Chemikálie

- Tab. 1: Standardy a vnitřní standardy.

Sloučenina	Kategorie	CAS	Čistota	Zkratka
Thiamin hydrochlorid	Standard	67-03-8	CRM	B1
Riboflavin	Standard	83-88-5	CRM	B2
Niacin	Standard	59-67-6	CRM	B3
Niacinamid	Standard	98-92-0	CRM	B3-AM
Kyselina pantothenová	Standard	137-08-6	CRM	B5
Pyridoxin hydrochlorid	Standard	58-56-0	CRM	B6
Kyselina 4-pyridoxová	Standard	82-82-6	CRM	B6-acid
Biotin	Standard	58-85-5	CRM	B7
Kyanokobalamin	Standard	68-19-9	CRM	B12
Kyselina nikotinová - <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	Vnitřní standard	1189954-79-7	N.A.	VS-B3
Pantothenát vápenatý- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	Vnitřní standard	N.A.	≥97 %	VS-B5
Biotin-(ring-6,6-d2)	Vnitřní standard	1217481-41-8	≥97 %	VS-B7

- Acetonitril – čistota pro LC-MS ≥ 99,9 % (Merck)
- Metanol – čistota pro LC-MS ≥ 99,9 % (Sigma-Aldrich)
- Kyselina mravenčí – čistota pro LC-MS ≈ 98 % (Sigma-Aldrich)
- Mravenčan amonný – čistota pro LC-MS ≥ 99 % (Sigma-Aldrich)
- Síran zinečnatý heptahydrát – čistota pro LC-MS ≈ 99 % (Sigma-Aldrich)
- Deionizovaná voda vyrobená přístrojem Water purification systém Smart2Pure (Thermo)
- Krev obratlovců (ZOO Praha)

### 3.2 Přístroje a spotřební materiál

- Kapalinový chromatograf: UltiMate 3000 (Thermo)
- Chromatografická kolona: Thermo Acclaim C30 (150x2.1 mm; 3 μm)
- Hmotnostní spektrometr: VelosPro vybavený vyhřívaným elektrosprejem (Thermo)
- Analytické váhy: MS105DU (Mettler Toledo)
- Výrobník deionizované vody: Water purification systém Smart2Pure (Thermo)
- Analogový vortexový mixér 945304 (VWR)
- Automatická dávkovací pipeta BioPette Plus o objemu 10-100 μl (Labnet)

- Automatická dávkovací pipeta BioPette Plus o objemu 20-200  $\mu$ l (Labnet)
- Automatická dávkovací pipeta BioPette Plus o objemu 100-1000  $\mu$ l (Labnet)
- Automatická dávkovací pipeta Transferpette S o objemu 1–10 ml (Brand)
- Skleněné dávkovací skříkačky o objemu 5, 10, 25, 50, 100, 250 a 500  $\mu$ l (Hamilton)
- Odměrné sklo, třída přesnosti A (Fisherbrand)
- Spotřební materiál: plastové špičky, krimpovací vialky z čirého skla s hliníkovým uzávěrem a septem pryž/teflon, plastové mikrozkušavky Safe-lock o objemu 0,5 ml (Eppendorf)
- Zpracování výsledků bylo provedeno v programu Microsoft Excel 2020

### 3.3 Převoz a uskladnění vzorků krve

Pro stanovení vitamínů B byla použita plná krev obratlovců z pražské zoologické zahrady hlavního města Prahy. Krev byla odebírána zvířatům při veterinárních prohlídkách nebo lékařských zákrocích na lačno do odběrových zkumavek VACUETTE obsahující antikoagulační činidlo K2EDTA (Dialab). Následně byly tyto vzorky uloženy do tekutého dusíku a byly převezeny na Přírodovědeckou fakultu Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, kde byly uskladněny v hlubokomrazicím boxu při teplotě  $-70$  °C. Vzorky byly odebírány v období od 11. května roku 2021 do 24. června roku 2021. Podrobnosti ohledně datumu odběru, převozu a měření jsou uvedeny v Tab. I v příloze.

### 3.4 Příprava roztoků

#### 3.4.1 Příprava mobilních fází

Mobilní fáze A (MF-A) byla připravena navážením 0,6306 g mravenčanu amonného, navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky (1000 ml) a rozpuštěna v deionizované vodě obsahující 175  $\mu$ l kyseliny mravenčí (pH 4.0) do celkového objemu 1000 ml. Mobilní fáze A byla uchovávána při laboratorní teplotě po dobu max. 2 dní.

Mobilní fáze B (MF-B) byla připravena navážením 0,6306 g mravenčanu amonného, navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky (1000 ml) a rozpuštěna v deionizované vodě obsahující 1750  $\mu$ l kyseliny mravenčí (pH 3.0) do celkového objemu 1000 ml. Mobilní fáze B byla uchovávána při laboratorní teplotě po dobu max. 2 dní.

Mobilní fáze C (MF-C) byla připravena navázkou 0,0568 g mravenčanu amonného, která byla následně kvantitativně převedena do odměrné baňky (100 ml), do které bylo přidáno 10 ml mobilní fáze B a doplněno acetonitrem do celkového objemu 100 ml. Mobilní fáze C byla uchovávána při laboratorní teplotě po dobu max. 4 dní.

### 3.4.2 Příprava pracovních roztoků standardů

Směsný pracovní roztok 9 standardů o koncentraci 10 mg/l (ST-B) byl připraven odpipetováním individuálních zásobních roztoků standardů (ST-A) podle Tab. 2. do odměrné baňky (10 ml) a doplněním metanolem po rysku. Roztok ST-B byl uchováván v chladničce při teplotě 7 °C po dobu max. 2 dní.

Tab. 2: Příprava roztoku ST-B.

Sloučenina	Objem [μl]	Celkový objem [ml]	Koncentrace [mg/l]
Niacin	96,4	10	10
Thiamin hydrochlorid	98,8		10
Pyridoxin hydrochlorid	100		10
Kyselina pantothenová	98,1		10
Kyanokobalamin	82,7		10
Biotin	77,8		10
Niacinamid	98		10
B6-acid	963		10
Mobilní fáze A	5900		-

Směsný pracovní roztok o koncentraci 1 mg/l (ST-B) byl připraven analogicky jako roztok ST-B dle Tab. 3 jen s tím rozdílem, že jako rozpouštědlo byla použita MF-A. Roztok ST-B byl uchováván v chladničce při teplotě 7 °C po dobu max. 2 dní.

Tab. 3: Příprava roztoku ST-C.

Sloučenina	Objem [ml]	Celkový objem [ml]	Koncentrace [mg/l]
ST-B	1	10	1
Mobilní fáze A	9		

### 3.4.3 Příprava pracovního roztoku vnitřních standardů

Pracovní roztok vnitřních standardů (VS-B) byl připraven odpipetováním individuálních zásobních roztoků vnitřních standardů dle Tab. 4. Roztok VS-B byl uchováván v chladničce při teplotě 7 °C po dobu max. 2 dní.

Tab. 4: Příprava roztoku VS-B.

Sloučenina	Objem [ml]	Celkový objem [ml]	Koncentrace [mg/l]
VS-B3	0,1	5	2
VS-B5	0,1		3,4
VS-B7	0,1		4,4
Mobilní fáze A	4,7		-

### 3.4.4 Příprava kalibračních roztoků

Příprava kalibračních roztoků je shrnuta v Tab. 5. Celkem bylo připraveno 9 koncentračních úrovní. Do HPLC vialek (1,8 ml) byla odpipetována automatickou pipetou (100-1000 µl) mobilní fáze A, poté byl pod hladinu přidán skleněnou stříkačkou Hamilton (5, 10, 25, 100, 250 a 500 µl) roztok ST-C a nakonec bylo nad hladinu přidáno automatickou pipetou (1-100 µl) 100 µl roztoku VS-B.

Tab. 5: Příprava kalibračních roztoků.

Úroveň	Koncentrace [µg/l]				Objem [µl]			Celkový objem [µl]
	Analyt	VS-B3	VS-B5	VS-B7	ST-B	VS-B	MF-A	
1	1	200	338	436	1	100	899	1000
2	2,5	200	338	436	2,5	100	897,5	
3	5	200	338	436	5	100	895	
4	10	200	338	436	10	100	890	
5	25	200	338	436	25	100	875	
6	50	200	338	436	50	100	850	
7	100	200	338	436	100	100	800	
8	250	200	338	436	250	100	650	
9	500	200	338	436	500	100	400	



### 3.4.5 Příprava kontrolních roztoků

Pro provedení kontroly přístroje, mobilní fáze (MF), roztoků standardů (ST) i vnitřních standardů (VS) a vzorků kvůli případné kontaminaci, která by mohla nastat při přípravě a/nebo při měření, byly připraveny 3 roztoky, jejichž příprava je shrnuta v Tab. 6.

Tab. 6: Příprava kontrolních roztoků

Označení roztoku	Objem [μl]			Celkový objem [μl]
	ST-B	VS-B	MF-A	
MF	0	0	1000	1000
VS	0	100	900	
ST	100	0	900	

### 3.4.6 Příprava deproteinizačního činidla

Deproteinizační činidlo bylo připraveno navážením 0,4314 g heptahydrátu síranu zinečnatého do šroubovací skleněné lahvičky (24 ml) s teflonovým septem, rozpuštěním navážky v 5 ml deionizované vody a přidáním 15,7 ml metanolu. Roztok byl uchováván v chladničce při teplotě 7 °C po dobu max. 2 měsíce.

### 3.4.7 Příprava vzorků pomocí ZnSO<sub>4</sub>/metanol

Do plastové mikrozumavky Eppendorf (1,5 ml) bylo odpipetováno 33 μl vody, 33 μl vnitřního standardu, 100 μl krve a 166 μl deproteinizačního činidla a vzorek byl ihned vortexován po dobu ~10 sekund. Poté byl vzorek uložen do ledové tříště po dobu 15 minut za nepřístupu světla. Následně byl vzorek odstředěn po dobu 10 minut při teplotě 5 °C při 20 000 otáčkách/min. Nakonec byl získaný supernatant (200 μl) odpipetován do krimpovacích vialek z čirého skla obsahující 300 μl deionizované vody a vialka byla uzavřena krimpovacím víčkem s teflonovým septem. Z důvodu vysokého obsahu nikotinamidu ve většině vzorků byl vždy připraven i 100x zředěný vzorek. Bylo odpipetováno 50 μl krve do odměrné baňky o objemu 5 ml, do které byla přidána po rysku deionizovaná voda. Postup byl dále identický, jako je popsáno výše. Každý vzorek každého ředění byl připraven ve 3 nezávislých opakováních.

Dále byl pro každé ředění připravován i obohacený vzorek krve, do kterého bylo místo 33 μl deionizované vody přidáno 33 μl standardu (ST-C), slepý vzorek a kontrolní vzorek. Postup přípravy byl analogický, jak je popsáno v předchozím odstavci, rozdíly byly pouze

v pipetovaných objemech jednotlivých složek (Tab. 7). Každý obohacený i slepý vzorek byl připraven v 1 nezávislém opakování.

Tab. 7: Shrnutí přípravy vzorků.

Název vzorku	Zkratka	Objem [μl]					Celk. objem [μl]
		krev	d. voda	VS-B	ST-C	deprot. činidlo	
Vzorek krve	1N-S	100	33	33	0	166	332
	2N-S	100	33	33	0	166	332
	3N-S	100	33	33	0	166	332
Obohacený vzorek krve	1N-SS	100	0	33	33	166	332
	2N-SS	100	0	33	33	166	332
	3N-SS	100	0	33	33	166	332
Vzorek krve 100x zředěný	100xS1	100	33	33	0	166	332
	100xS2	100	33	33	0	166	332
	100xS3	100	33	33	0	166	332
Obohacený vzorek krve 100x zředěný	100xSS1	100	0	33	33	166	332
	100xSS2	100	0	33	33	166	332
	100xSS3	100	0	33	33	166	332
Slepý vzorek	B-Vs	0	133	33	0	166	332
Kontrolní vzorek	K-St-Vs	0	100	33	33	166	332

### 3.5 LC-MS/MS

Vlastní kvantitativní stanovení jednotlivých vitamínů B bylo prováděno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí dle metody [37].

Chromatografická separace (LC) byla provedena na kapalinovém chromatografu Thermo řady UltiMate 3000, který byl složený ze zásobníku mobilních fází SRD-3600, kvartérního gradientového čerpadla HPG-3400RS, autosampleru WPS-3000TRS, kolonového termostatu TCC-3000RS a detektoru diodového pole DAD-3000RS. Hmotnostní detekce (MS) byla provedena na hmotnostním spektrometru Thermo řady Velos Pro vybaveného vyhřívaným elektrosprejem HESI II a hmotnostním detektorem pracujícím na principu lineární iontové pasti. Celý LC-MS systém byl ovládán osobním počítačem pomocí počítačových programů LTQ Tune Plus 2.8 a Xcalibur 4.2.47. Kompletní specifikace nejdůležitějších parametrů chromatografické separace i hmotnostní detekce je uvedena v Tab. 8.

Tab. 8: Podmínky LC/MS analýzy.

<b>LC</b>	Chromatografická kolona	Thermo Acclaim C30 (150 x 2,1 mm, 3 µm)			
	MF-A	viz. Kapitola 3.4.1			
	MF-B	viz. Kapitola 3.4.1			
	MF-C	viz. Kapitola 3.4.1			
	Gradientový program	retenční čas [min]	A [%]	B [%]	C [%]
		0	100	0	0
		5	100	0	0
		5	0	100	0
		17	0	65	35
		17	100	0	0
		25	100	0	0
		Průtok MF	0,4 ml/min		
	Tlak čerpadla	345 bar			
	Teplota v prostoru autosampleru	7 °C			
	Teplota v kolonovém prostoru	15 °C			
	Objem nástřiku	10 µl			
	Doba analýzy	25 min			
<b>MS</b>	Typ iontového zdroje	HESI			
	Teplota iontového zdroje	350 °C			
	Průtok hlavního zmlžujícího plynu	60 arb.			
	Průtok pomocného zmlžujícího plynu	20 arb.			
	Napětí na HESI kapiláře	+4 kV			
	Teplota přenosové kapiláry	350 °C			

Pro kvantitativní vyhodnocení bylo nutné stanovit mez stanovitelnosti (LOQ – limit of quantification), která je pro každý vitamín z komplexu B jiná. Tato mez byla zapsána do Tab. 9.

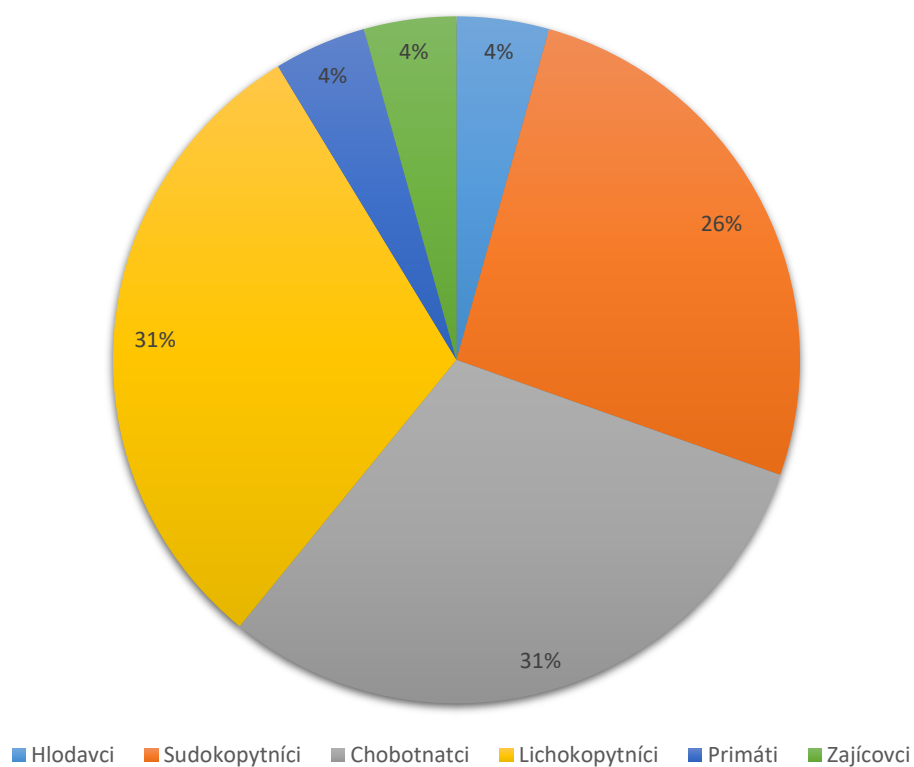
Tab. 9: Mez stanovitelnosti pro analýzu vitamínů B v krvi.

Analyt	LOQ [µg/l]
Thiamin	1,4
Riboflavin	3,0
Niacin	21
Nikotinamid	17
Kyselina pantothenová	1,9
Vitamín B6	1,5
Kyselina 4-pyridoxová	3,3
Biotin	3,0
Kyanokobalamin	3,3

## 4 Výsledky a diskuze

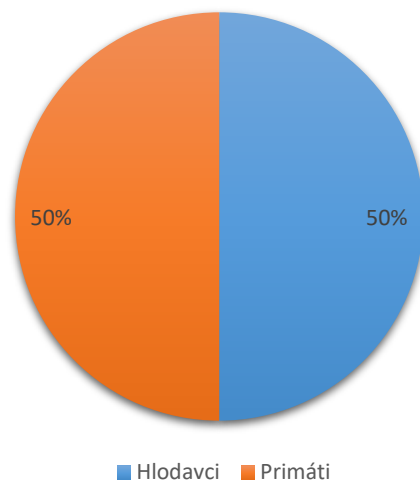
Dle potravní strategie zvířat byly vzorky rozděleny do tří skupin, a to býložravci (herbivoři), všežravci (omnivoři) a masožravci (karnivoři). Celkový počet vzorků pro účely měření činí 32. Z toho je 23 vzorků herbivorů, 2 vzorky omnivorů, 6 vzorků karnivorů. U všech těchto skupin hovoříme o třídě Savci, avšak byl změřen jeden vzorek ze třídy Ptáci.

Z herbivorů bylo zastoupeno dohromady 23 zvířat, a to především chobotnatci (7x slon indický), sudokopytčníci (1x zubr evropský, 1x sob karelský, 1x dikdik kirkův, 1x přímorožec beisa, 1x přímorožec šavlorohý, 1x žirafa núbijská), lichokopytčníci (6x kuň převalského, 1x tapír čabakový) a v neposlední řadě primáti (1x guereza plástíková), hlodavci (1x mara slaništní) a zajícovci (1x králík domácí). Pro lepší orientaci je zastoupení herbivorů zobrazeno na Obr. 1 níže.



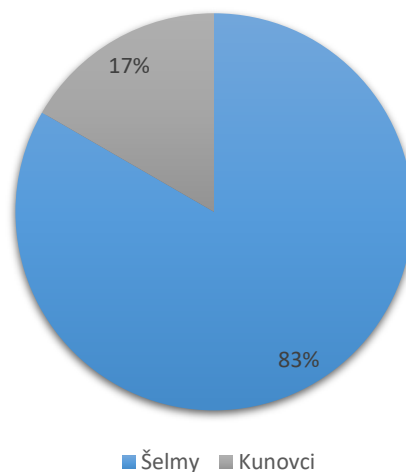
Obr. 1: Graficky znázorněné zastoupení herbivorů.

Omnivoři byli zastoupeni 2 zvířaty, a to hlodavcem (1x hutie kubánská) a primátem (1x makak vepří). Zastoupení je graficky znázorněno na Obr. 2.



Obr. 2: Graficky znázorněné zastoupení omnivorů.

Poslední skupinou jsou karnivoři, která je zastoupená 6 zvířaty, a to šelmami (2x tygr ussurijský, 1x lachtan jihoafrický, 1x pes ušatý a 1x pes pralesní) a kunovci (1x ďábel medvědovitý).



Obr. 3: Graficky znázorněné zastoupení karnivorů.

Jak již bylo zmíněno, byl změřen i jeden vzorek ze třídy Ptáci patřící do řádu Brodiví a pelikáni, a to volavka vlasatá.

Výsledky kvantitativního zastoupení sledovaných vitamínů B v analyzované krvi jednotlivých zástupců zvířat je shrnuta do přehledné Tab. 10, včetně směrodatných odchylek.

Tab. 10: Výsledky\* analýzy krve obratlovců, obsah jednotlivých vitamínů v µg/l:

Název česky	Název latinsky	Potravinová strategie	B2	B3	B3-amid	B5	B6	B6-4PA	B7	B12
Mara slaništní <sup>E</sup>	Dolichotis salinicola		83,0 ± 6,9	< 21,0	12000 ± 1100	130,0 ± 1,4	< 1,5	28,000 ± 0,062	< 3,0	< 3,3
Zubr evropský	Bison bonasus		18,0 ± 1,7	< 21,0	3100 ± 260	360 ± 12	< 1,5	< 3,3	< 3,0	< 3,3
Slon indický	Elephas maximus		6,3 ± 1,1	< 21,0	290 ± 17	12,00 ± 0,21	< 1,5	< 3,3	< 3,0	< 3,3
Slon indický	Elephas maximus		5,50 ± 0,70	< 21,0	570 ± 65 <sup>A</sup>	12,00 ± 0,14	< 1,5	< 3,3	< 3,0	< 3,3
Slon indický	Elephas maximus		5,10 ± 0,50	< 21,0	2200,0 ± 6,0	13,0 ± 1,0	< 1,5	< 3,3	< 3,0	< 3,3
Slon indický	Elephas maximus		5,4 ± 1,2	< 21,0	2000 ± 96 <sup>C</sup>	24,0 ± 1,0	< 1,5	< 3,3	< 3,0	< 3,3
Slon indický	Elephas maximus		9,60 ± 0,75	< 21,0	440 ± 31 <sup>A</sup>	30,0 ± 1,3	< 1,5	< 3,3	< 3,0	< 3,3
Slon indický	Elephas maximus		< 3,0	< 21,0	230 ± 33 <sup>A</sup>	13,0 ± 2,1	< 1,5	< 3,3	< 3,0	< 3,3
Slon indický	Elephas maximus		< 3,0	< 21,0	380 ± 21 <sup>A</sup>	< 1,9	< 1,5	5,700 ± 0,095	< 3,0	< 3,3
Kůň převalského	Equus przewalskii		9,5 ± 1,0	< 21,0	4300 ± 260	91,0 ± 6,1	< 1,5	< 3,3	< 3,0	< 3,3
Kůň převalského	Equus przewalskii		7,3 ± 0,9	< 21,0	7200 ± 630	220 ± 12	< 1,5	< 3,3	< 3,0	< 3,3
Kůň převalského	Equus przewalskii	Herbivor	12,00 ± 0,87	< 21,0	3900 ± 120	260,0 ± 6,3	< 1,5	6,90 ± 0,28	<sup>D</sup>	< 3,3
Kůň převalského	Equus przewalskii		18,0 ± 3,1	< 21,0	3300 ± 180	210,0 ± 6,9	< 1,5	< 3,3	<sup>D</sup>	< 3,3
Kůň převalského	Equus przewalskii		7,0 ± 2,3	< 21,0	3500 ± 340	130,0 ± 4,1	< 1,5	7,30 ± 0,43	< 3,0	< 3,3
Kůň převalského	Equus przewalskii		3,50 ± 0,42	< 21,0	4700 ± 520	80,0 ± 2,8	< 1,5	< 3,3	< 3,0	< 3,3
Sob karelský	Rangifer tarandus fennicus		70,0 ± 2,3	< 21,0	26000 ± 14000	700 ± 47	< 1,5	< 3,3	< 3,0	< 3,3
Dikdik kirkův <sup>E</sup>	Madoqua kirkii		45,3	< 21,0	4600 ± 310 <sup>A</sup>	245	< 1,5	< 3,3	< 3,0	< 3,3
Guereza plástíková	Colobus guereza		47,0 ± 2,6	< 21,0	19000 ± 2200	< 1,9	< 1,5	< 3,3	<sup>D</sup>	< 3,3
Přimorožec beisa	Oryx beisa		23,0 ± 3,3	< 21,0	3700 ± 26	< 1,9	< 1,5	15,00 ± 0,59	< 3,0	< 3,3
Přimorožec šavlorohý	Oryx dammah		17,0 ± 3,7	< 21,0	25000 ± 3200	< 1,9	< 1,5	< 3,3	<sup>D</sup>	< 3,3
Králík domácí	Oryctolagus cuniculus f. domesticus		35,0 ± 3,7 <sup>A</sup>	< 21,0	7800 ± 1200	140,0 ± 4,0	< 1,5	57,0 ± 3,2	< 3,0	< 3,3
Tapír čabakový	Tapirus indicus		< 3,0	< 21,0	3500 ± 560	< 1,9	< 1,5	< 3,3	< 3,0	< 3,3
Žirafa núbijská	Giraffa camelopardalis camelopardalis		13,0 ± 1,1 <sup>A,C</sup>	< 21,0	1400 ± 63	81,0 ± 4,0	< 1,5	18,0 ± 1,7	< 3,0	< 3,3
Hutie kubánská	Capromys pilorides	Omnivor	16,0 ± 1,7 <sup>A,C</sup>	< 21,0	620 ± 29	950 ± 20	< 1,5	< 3,3	< 3,0	< 3,3
Makak vepří	Macaca nemestrina		< 3,0	< 21,0	16000 ± 2000	< 1,9	< 1,5	5,90 ± 0,57	< 3,0	< 3,3
Lachtan jihoafrický	Arctocephalus pusillus		16,0 ± 0,54	< 21,0	1800 ± 37	8,50 ± 0,71	< 1,5	< 3,3	< 3,0	< 3,3
Ďábel medvědivitý	Sarcophilus harrisii		14,0 ± 2,2	< 21,0	5900 ± 250	260,0 ± 6,7	< 1,5	< 3,3	< 3,0	< 3,3
Tygr ussurijský	Panthera tigris altaica		12,0 ± 1,2	< 21,0	71,0 ± 1,4 <sup>A</sup>	< 1,9	< 1,5	< 3,3	< 3,0	< 3,3
Tygr ussurijský	Panthera tigris altaica	Karnivor	19,00 ± 0,31	< 21,0	61,0 ± 2,7 <sup>A</sup>	< 1,9	< 1,5	< 3,3	< 3,0	< 3,3
Pes ušatý	Otocyon megalotis		60,0 ± 2,2	< 21,0	2400 ± 340	85,000 ± 0,019	< 1,5	< 3,3	< 3,0	< 3,3
Pes pralesní	Speothos venaticus		38,0 ± 3,9	< 21,0	7200 ± 230	28,00 ± 0,80	< 1,5	< 3,3	< 3,0	< 3,3
Volavka vlasatá	Ardeola ralloides	Ptáci	130 ± 13	< 21,0	570 ± 29 <sup>A</sup>	440,0 ± 2,2	< 1,5	22,00 ± 0,92	< 3,0	< 3,3

\*Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr ze 3 opakování ± směrodatná odchylka

<sup>A</sup> nestandardně vysoká výtěžnost

<sup>D</sup> kontaminace

<sup>B</sup> vysoký rozptyl

<sup>E</sup> malý počet replikátů

<sup>C</sup> mimo rozsah kalibrace

## 4.1 B1 - thiamin

Výsledky obsahu vitamínu B1 nemohly být z důvodu nevyhovující spolehlivosti výsledků prezentovány. Analýzou obohacených vzorků, které byly připravovány v rámci každého měření a slouží pro průběžnou kontrolu procesu přípravy vzorků i vlastní analýzy, bylo totiž ve všech případech zjištěno několikanásobné překročení očekávaných hodnot obsahu vitamínu B1. Parametr správnosti hodnocený jako výtěžnost v % dosahoval hodnot v řádu několika stovek procent, přičemž ideální hodnotou je 100 % a akceptovatelný rozsah na daných koncentračních úrovních v řádu stovek  $\mu\text{g/l}$  činí 80 – 110 % [38]. Kontaminace vnitřního standardu či kontaminace v průběhu přípravy nebo z přístroje standardem analytu či směsným standardem analytu byla vyloučená, protože všechny výsledky příslušných kontrolních vzorků (MF, VS i B-Vs) byly dle očekávání negativní. Jelikož je thiamin difosfát přítomen výhradně v erytrocytech [39], byly vyzkoušeny dva různé parametry postupu přípravy vzorku k analýze, které mohou ovlivňovat mechanické narušení buněk/erytrocytů. Důvodem pro toto rozhodnutí byl předpoklad, že lýza erytrocytů není provedena úplně a že v průběhu dalších operací v rámci přípravy vzorku dochází k dalšímu výraznému a nerovnoměrnému uvolňování tohoto analytu.

První pokus spočíval v hodnocení vlivu doby vortexování reálných vzorků krve v eppendorfci po přidání deproteinizačního činidla. Vzorky byly vortexovány po dobu 15, 30, 45 a 60 sekund. Následně byly vzorky připraveny dle standardního postupu. Výsledky výtěžností všech vzorků se však bohužel i přes různou dobu vortexování stále pohybovaly na obdobných nadlimitních úrovních.

Druhý pokus spočíval v hodnocení vlivu přítomnosti skleněných kuliček o rozměru 0,1 mm (BioSpec Products, Inc.) napomáhající narušení buněk při vortexování reálných vzorků krve v eppendorfci po přidání deproteinizačního činidla. Vzorky byly vortexovány opět po dobu 15, 30, 45 a 60 sekund, ale i při použití skleněných kuliček se výsledky výtěžností stále pohybovaly v řádu stovek procent.

Thiamin je obecně jeden z vitamínů, který se v těle velmi špatně ukládá. Savci mohou zásoby vitamínu B1 vyčerpat během 1 až 2 týdnů. Díky tomuto krátkému časovému úseku je rozvoj nedostatku tohoto vitamínu relativně rychlý. Nedostatek vitamínů u přežvýkavců je doprovázen slabostí, která se nejprve projeví špatnou koordinací nohou (zejména předních končetin), neschopností vstát a stát, dále nechutenstvím, těžkým průjmem následovaným průjmem vedoucím

k smrti. Nejvíce náchylná k neuromuskulárním účinkům nedostatku thiaminu je drůběž oproti savcům[40 – str.289].

## 4.2 B2 – riboflavin

Obsah vitamínu B2 se u všech pozorovaných zvířat vyskytuje v řádech od jednotek do desítek  $\mu\text{g/l}$  s výjimkou volavky vlasaté, kde je v řádu stovek. Tato poměrně vysoká koncentrace ( $130 \mu\text{g/l}$ ) může u volavky souviset s riboflavinovým nosičovým proteinem (RCP), který se vyskytuje především v oběhu ptáků snašejících vejce (tedy s výjimkou nedospělých kuřat a dospělých kohoutů)[41]. Kromě ptáků byly nalezeny specifické přenašečové proteiny i v séru z březích krav a potkanů, lidské fetální krvi a děložních sekretů u prasete[40 – str.316]. Riboflavin, podobně jako thiamin, je obsažen v červených krvinkách, nicméně u nosnic je význačným indikátorem koncentrace riboflavinu vaječný bílek[40 – str.339].

U herbivorů se vyskytují 2 případy, u kterých však bylo připraveno méně replikátů z důvodu malého objemu krve. Bylo to u maryl slaništní z řádů hlodavců, u které bylo k dispozici množství krve na 2 replikáty a dikdik birkův z řádu sudokopytníků, u kterého mohl být realizován dokonce pouze 1 replikát. Mimo malý počet replikátů se u herbivorů vyskytla nestandardně vysoká výtěžnost u králíka domácího z řádu zajícův.

## 4.3 B3 – nikotinamid

U nikotinamidu bylo pozorováno nejvíce nestandardně vysokých hodnot výtěžností, vysokých rozptylů a obsahů mimo rozsah kalibrace. Vzhledem k organizačním důvodům při měření vzorků však byly tyto skutečnosti zjištěny až příliš pozdě po analýze vzorků, takže nebylo možné provést vhodné ředění vzorků a jejich následné změření a ani nebylo k dispozici dostatečné množství vzorků pro provedení zcela nových analýz. Spolehlivost těchto výsledků je tedy snížena, ale tyto výsledky jsou označeny, směrodatné odchylky jsou uvedeny a průměrné hodnoty přepočteny s ohledem na příslušné hodnoty výtěžností.

Nikotinamid je přítomem ve všech potravních kategoriích. Tento vitamín se objevuje ať už v řádech desítek  $\mu\text{g/l}$ , tak i v množstvích 1000x vyšších. Nejnižší hodnoty byly zjištěny u tygrů usurijských z řádů šelem ( $61 \mu\text{g/l}$  a  $71 \mu\text{g/l}$ ). Důvodem by mohl být fakt, že konkrétně u kočky byla zjištěna vyšší (30-50x) aktivita karboxylázy kyseliny pikolinové, což je vedlejší produkt rozkladu tryptofanu. Kočka, která má tohoto enzymu nadbytek takpravděpodobně nemá dostatek volného tryptofanu pro jeho přeměnu na niacin a nikotinamid[40 – str.355]. Nižší koncentrace



byly naměřeny i u většiny slonů, kromě dvou jedinců, samice Gulab (\*1959) a mláděte Rudolfa – Rudy (\*2016).

#### **4.4 B5 – kyselina pantothenová**

Kyselina pantothenová, vitamín B5, je hojně zastoupená jak v potravinách živočišného, tak i rostlinného původu. Proto je tento vitamín zastoupený jak u karnivorů, tak i herbivorů v řádech od jednotek do stovek  $\mu\text{g/l}$ . Nejnižší hodnota byla pozorována u lachtana jihoafrického (8,50  $\mu\text{g/l}$ ), dále pak u slona indického (12,00  $\mu\text{g/l}$ ).

#### **4.5 B6 a kyselina 4-pyridoxinová**

Vitamín B6 nebyl kvantifikován v žádném vzorku. Kyselina 4-pyridoxinová, degradační produkt vitamínu B6, nebyla detekována u žádného z karnivorů a u značné části herbivorů. Nejvyšší koncentraci tohoto metabolitu můžeme pozorovat u králíka domácího či u volavky vlasaté. Vysoká koncentrace u králíka by mohla být zapříčinená aktivitou aldehydoxidázy[42], která přeměňuje pyridoxal právě na kyselinu 4-pyridoxovou[43]. Z důvodu příbuzenského vztahu s králíkem by se dala očekávat vyšší koncentrace kyseliny 4-pyridoxinové i u mary slaništní. U té byly změřeny pouze 2 replikáty, nicméně i tak lze konstatovat, že je hladina kyseliny 4-pyridoxinové ve vzorcích krve mary slaništní pravděpodobně vyšší v porovnání s ostatními herbivory.

#### **4.6 B9 – kyselina listová**

Vitamín B9 nebyl měřen z důvodu nemožné validace této metody pro vitamín B9 z důvodu příliš nízkých hodnot výtěžnosti.

#### **4.7 Ostatní vitamíny**

V případě vitamínů B3 – kyselina nikotinová, B6, B7 a B12 byly jejich obsahy ve vzorcích analyzované krve pod mezemi stanovitelnosti této metody (viz Tab. 9). U vitamínů B7 a B12 se v literatuře uvádí koncentrace v krvi nebo krevním séru v řádech stovek  $\text{pg/ml}$ [44].

## 5 Závěr

V teoretické části této bakalářské práce jsou přehledně shrnuty nejdůležitější informace o všech vitamínech komplexu B, jejich chemická struktura, fyzikálně-chemické vlastnosti, hlavní zdroje v potravě, doporučené denní dávky, jejich role v organismu a projevy nedostatků či nadbytku těchto vitamínů. Dále jsou zde stručně zmíněny i různé možnosti jejich kvantitativní analýzy.

Metodická část je zaměřena především na kvalitativní a kvantitativní stanovení vitamínů komplexu B v krvi vybraných zvířat pomocí LC/MS. Je zde popsáno, jak byly vzorky krve získávány, převáženy a uchovávány a následně i samotná příprava a zpracování krve na vlastní analýzu jednotlivých vitamínů.

Cílem práce bylo aplikovat nově vyvinutou metodu stanovení obsahu vitamínů komplexu B v krvi na vybrané živočichy a jejich vyhodnocení. Ve spolupráci se zoologickou zahradou hlavního města Prahy bylo získáno přes 50 vzorků krve různých zvířat, které mohly být rozděleny podle jejich potravinové strategie na herbivory, karnivory a omnivory.

Z vitamínů komplexu B byly v krvi stanoveny obsahy vitamínů B1, B2, B3-amid, B5 a kyseliny 4-pyridoxinové. U ostatních vitamínů (B3-kyselina nikotinová, B6, B7, B12) bylo jejich množství v krvi pod mezí stanovitelnosti použité metody. U vitamínu B1 byla prokázána nedostatečná spolehlivost výsledků vlivem příliš vysoké výtěžnosti obohacených vzorků, a proto nejsou v práci uvedeny.

Na závěr bylo provedeno hodnocení obsahu vitamínů B u jednotlivých zvířat rozdělených podle jejich potravinové strategie. Ve všech vzorcích jednoznačně dominuje B3-nikotinamid, který se nachází v krvi všech jedinců v převážné většině ve vysokých koncentracích. Hojně zastopený je i vitamín B2. V případě kyseliny 4-pyridoxinové nebyla detekována v žádném vzorku karnivorů ve srovnání s některými jedinci herbivorů nebo omnivorů. Obecně lze konstatovat, že výskyt vitamínů komplexu B je poměrně variabilní v závislosti nejen na potravinové strategii, ale především mezidruhově a pro hlubší závěry by bylo potřebné změřit výskyt a obsah těchto vitamínů na větším a druhově širším vzorku jedinců.

## 6 Použitá literatura

- [1] SMITH, Alison G., Martin T. CROFT, Michael MOULIN and Michael E. WEBB. Plants need their vitamins too. *Current Opinion in Plant Biology*. 2007, **10**(3):266-275.
- [2] GUILLEMINAULT, Laurent, Evan J. WILLIAMS, Hayley A. SCOTT, Bronwyn S. BERTHON, Megan JENSEN and Lisa G. WOOD. Diet and asthma: Is it time to adapt our message? *Nutrients*. 2017, **9**(11):1227.
- [3] KENNEDY, David O. B vitamins and the brain: Mechanisms, dose and efficacy—A review. *Nutrients*. 2016, **8**(2):68.
- [4] ZEMPLÉNI, Janos, Robert B. RUCKER, Donald B. MCCORMICK and John W. SUTTIE. Handbook of vitamins. Fourth edition. Boca Raton: CRC Press, 2007.
- [5] ROBINSON, F. A. The vitamin B complex. London: Chapman & Hall, 1951.
- [6] MARTEL, Julianna L, Connor C KERNDT and David S FRANKLIN. Vitamin B1 (Thiamine). Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. [online]
- [7] SCALZO, Simon J., Stephen C. BOWDEN, Margaret L. AMBROSE, Greg WHELAN and Mark J. COOK. Wernicke-Korsakoff syndrome not related to alcohol use: A systematic review. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 2015, **86**(12):1362–1368.
- [8] SHARP, Christopher S., Michael P. WILSON and Kimberly NORDSTROM. Psychiatric Emergencies for Clinicians: Emergency Department Management of Wernicke-Korsakoff Syndrome. *Journal of Emergency Medicine*. 2016, **51**(4):401-404.
- [9] MCCORMICK, Laurie M., Judith R. BUCHANAN, Obiora E. ONWUAMEZE, Ronald K. PIERSON and Sergio PARADISO. Beyond Alcoholism: Wernicke-Korsakoff Syndrome in Patients With Psychiatric Disorders. *Cognitive and Behavioral Neurology*. 2011, **24**(4):209-216.
- [10] MORGAN, Karen J., Mary E. ZABIK and Gilbert A. LEVEILLE. The role of breakfast in nutrient intake of 5-to 12-year-old children. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1981, **34**(7):1418-1427.
- [11] Advanced Nutrition and Human Metabolism, Sixth Edition, Sareen S. Gropper and Jack L. Smith. 2013. Wadsworth: Cengage Learning, Wadsworth, USA, page 326-327.
- [12] POWERS, Hilary J., Marilyn H. HILL, Sohail MUSHTAQ, Jack R. DAINTY, Gosia MAJSK-NEWMAN and Elizabeth A. WILLIAMS. Correcting a marginal riboflavin deficiency improves hematologic status in young women in the United Kingdom (RIBOFEM). *American Journal of Clinical Nutrition*. 2011, **93**(6):1274–1284.

- [13] ASHOORI, Marziyeh and Ahmad SAEDISOMEOLIA. Riboflavin (vitamin B2) and oxidative stress: A review. *The British journal of Nutrition*. 2014, **111**(11):1985-1991.
- [14] BALASUBRAMANIAM, Shanti, John CHRISTODOULOU and Shamima RAHMAN. Disorders of riboflavin metabolism. *Journal of inherited metabolic disease*. 2019, **42**(4):608-619.
- [15] HILL, Lisa J. and Adrian C. WILLIAMS. Meat intake and the dose of vitamin B3-nicotinamide: Cause of the causes of disease transitions, health divides, and health futures? *International Journal of Tryptophan Research*. 2017, **10**:1-22.
- [16] KIRKLAND, James B. and Mirella L. MEYER-FICCA. Niacin. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2018, **83**:83-149.
- [17] BERDANIER, Carolyn D. Corn, Niacin, and the History of Pellagra. *Nutrition Today*. 2019, **54**(6):283-288.
- [18] BROWN, Thomas M. Pellagra: An Old Enemy of Timeless Importance. *Psychosomatics*. 2010, **51**(2):93–97.
- [19] GHEITA, Alaa A., Tamer A. GHEITA and Sanaa A. KENAWY. The potential role of B5: A stitch in time and switch in cytokine. *Phytotherapy Research*. 2020, **34**(2):306-314.
- [20] MASCOLO, Elisa and Fiammetta VERNÌ. Vitamin B6 and diabetes: Relationship and molecular mechanisms. *International Journal of Molecular Science*. 2020, **21**(10):3669.
- [21] VROLIJK, Misha F., Antoon OPPERHUIZEN, Eugène H.J.M. JANSEN, Geja J. HAGEMAN, Aalt BAST and Guido R.M.M. HAENEN. The vitamin B6 paradox: Supplementation with high concentrations of pyridoxine leads to decreased vitamin B6 function. *Toxicology in Vitro*. 2017, **44**:206–212.
- [22] SIMPSON, Joe L., Lynn B. BAILEY, Klaus PIETRZIK, Barry SHANE and Wolfgang HOLZGREVE. Micronutrients and women of reproductive potential: Required dietary intake and consequences of dietary deficiency or excess. Part i Folate, Vitamin B12, Vitamin B6. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2010, **23**(12):1323-1343.
- [23] MAGNÚSDÓTTIR, Stefanía, Dmitry RAVCHEEV, Valérie DE CRÉCY-LAGARD and Ines THIELE. Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests cooperation among gut microbes. *Frontiers in Genetics*. 2015, **6**:148.
- [24] ZEMPLÉNI, Janos, Subhashinee S.K. WIJERATNE and Yousef I. HASSAN. Biotin. *Biofactors*. 2009, **35**(1):36-46.

- [25] WIEDMANN, Silke, James D. EUDY and Janos ZEMPLÉNI. Biotin supplementation increases expression of genes encoding interferon-gamma, interleukin-1beta, and 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase, and decreases expression of the gene encoding interleukin-4 in human peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of Nutrition*. 2003, **133**(3):716-719.
- [26] MYSZCZYSZYN, Aneta, Rafał KRAJEWSKI, Monika OSTAPÓW and Lidia HIRNLE. Folic acid-role in the body, recommendations and clinical significance. *Pielęgniarstwo XXI Wieku*. 2019, **18**(1):50–59.
- [27] REPOSSI, Adele, Elisa ZIRONI, Teresa GAZZOTTI, Andrea SERRAINO and Giampiero PAGLIUCA. Vitamin B12 determination in milk, whey and different by-products of ricotta cheese production by ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Italian Journal of Food Safety*. 2017, **6**(4):152–155.
- [28] LAMBERG-ALLARDT, Christel, Monika NEUHÄUSER-BERTHOLD, Grażyna NOWICKA, Kristina PENTIEVA, Hildegard PRZYREMBEL, Sean (J.J.) STRAIN, Inge TETENS, Daniel TOMÉ and Dominique TURCK. Scientific opinion on dietary reference values for cobalamin (vitamin B12). *EFSA Journal*. 2015, **13**(7):4150.
- [29] SCOTT, Jonh M. Folate and vitamin B12. *Proceedings of the Nutrition Society*. 1999, **58**:441-448.
- [30] ROMAIN, Marc, Sigal SVIRI, David M. LINTON, Ilana STAV and Peter V. VAN HEERDEN. Vitamin B12 in the critically ill--a review. *Anaesth Intensive Care*. 2016, **44**(4):447-452.
- [31] ANDRÈS, Emmanuel, Nouredine H. LOUKILI, Esther NOEL, Georges KALTENBACH, Maher BEN ABDELGHENI, Anne E. PERRIN, Marie NOBLET-DICK, Frédéric MALOISEL, Jean Louis SCHLIENGER and Jean Frédéric BLICKLÉ. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *Canadian Medical Association Journal*. 2004, **171**(3):251-259.
- [32] GREEN, Ralph and Laurence J KINSELLA. Current concepts in the diagnosis of cobalamin deficiency. *Neurology*. 1995, **45**(8):1435-1440.
- [33] GREEN, Ralph. Metabolite assays in cobalamin and folate deficiency. *Bailliere's Clinical Haematology*. 1995, **8**(3):533-566.

- [34] FATIMA, Zakia, Xiangzi JIN, Yilin ZOU, Han Yeong KAW, Maurizio QUINTO and Donghao LI. Recent trends in analytical methods for water-soluble vitamins. *Journal of Chromatography A*. 2019, **1606**:360245.
- [35] ANTAL, Irina P., Yaroslav BAZEL and Zholt A. KORMOSH. Electrochemical methods for determining group B vitamins. *Journal of Analytical Chemistry*. 2013, **68**(7):565-576.
- [36] MARTIN, Frederic, Ester Campos GIMÉNEZ and Erik KONINGS. New methods for the analysis of water-soluble vitamins in infant formula and adult/pediatric nutritionals. *Journal of AOAC International*. 2016, **99**(1):19–25.
- [37] KAHOUN, David, Pavla FOJTÍKOVÁ, František VÁCHA, Eva NOVÁKOVÁ and Václav HYPŠA. Development and validation of an LC-MS/MS method for determination of B vitamins and some its derivatives in whole blood. *BioRxiv*. 2021, [preprint].
- [38] AOAC International. Guidelines for Standard Method Performance Re-quirements AOAC Official Methods of Analysis. 2016, Appendix F, 1-18.
- [39] TALWAR, Dinesh K., Mohammed K. AZHARUDDIN, Cathy WILLIAMSON, Yee Ping TEOH, Donald C. MCMILLAN and Denis St J. O'REILLY. Biological variation of vitamins in blood of healthy individuals. *Clinical Chemistry*. 2005, **51**(11):2145–2150.
- [40] RUSSELL MCDOWELL, Lee. Vitamins in Animal and Human Nutrition. Second edition. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2000.
- [41] ADIGA, P R, S SUBRAMANIAN, Jayasimha RAO and Mukesh KUMAR. Prospects of riboflavin carrier protein (RCP) as an antifertility vaccine in male and female mammals. *Human Reproduction Update*. 1997, **3**(4):325-334.
- [42] FUKIYA, Kensuke, Kunio ITOH, Satoshi YAMAGUCHI, Akiko KISHIBA, Mayuko ADACHI, Nobuaki WATANABE and Yori-hisa TANAKA. A single amino acid substitution confers high cinchonidine oxidation activity comparable with that of rabbit to monkey aldehyde oxidase 1. *Drug Metabolism and Disposition*. 2010, **38**(2), 302–307.
- [43] AL, Khaled and Khaled S AL SALHEN. In vitro oxidation of aldehyde oxidase from rabbit liver: Specificity toward endogenous substrates. *Journal of King Saud University – Science*. 2014, **26**:67-74.
- [44] Advanced Nutrition and Human Metabolism, Sixth Edition, Sareen S. Gropper and Jack L. Smith. 2013. Wadsworth:Cengage Learning, Wadsworth, USA, page 343-359.

## 7 Seznam symbolů a zkratek

4-PA	kyselina 4-pyridoxová
AIDS	syndrom získaného selhání imunity
ATP	adenosintrifosfát
B-Vs	slepý vzorek
CAS	chemical abstract service
Celk.	celkový
CoA	koenzym A
CRM	certified reference material
D.	deionizovaný/á
DDD	doporučená denní dávka
DEF	dietary folate equivalent
Deprot.	deproteinizační
DNA	kyselina deoxyribonukleová
EFSA	evropský úřad pro bezpečnost potravin
ESI	ionizace elektrosprejem
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
HESI	ionizace vyhřívaným elektrosprejem
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
IL-1 $\beta$	interleukin 1 $\beta$
IL-4	interleukin 4
K-St-Vs	kontrolní vzorek
LC	kapalinová chromatografie
LC/MS	spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní detekce
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NE	niacin ekvivalent
NIACR1	receptor hydroxykarboxylové kyseliny 2

PABA	kyselina 4-aminobenzoová
PLP	pyridoxal-5'-fosfát
PMP	pyridoxamin-5'-fosfát
PNP	pyridoxin-5'-fosfát
ST	standard
T <sub>H</sub> lymfocyt	pomocný (helper) lymfocyt
THF	tetrahydrofuran
TPP	thiamindifosfát
VS	vnitřní standard



## 8 Přílohy

### 8.1 Příloha A

Tab. I: Zpracované vzorky krve bezobratlých zvířat z pražské ZOO.

Zvíře	Jméno	Datum odběru	Datum převozu	IČ	Datum měření
Žirafa nábijská*	Eliška	06.05.2021	11.05.2021	1	17.08.2021
Makak vepří	x	03.05.2021	11.05.2021	2	16.08.2021
Králík domácí	Dom	07.05.2021	11.05.2021	3	16.08.2021
Kůň převalského	Karo P	03.05.2021	11.05.2021	4	17.08.2021
Tapír čabrakový	Niko	07.05.2021	11.05.2021	5	16.08.2021
Antilopa vraná*	x	30.04.2021	11.05.2021	6	18.08.2021
Kůň převalského	x	03.05.2021	11.05.2021	7	17.08.2021
Lachtan jihoafrický	Meloun	06.05.2021	11.05.2021	8	18.08.2021
Přímorožec beisa	Xena	05.05.2021	11.05.2021	9	16.08.2021
Pes pralesní	x	04.05.2021	11.05.2021	10	17.08.2021
Kůň převalského	Yper	11.05.2021	14.05.2021	14	06.08.2021
Slon indický	Gulad	13.05.2021	14.05.2021	16	06.08.2021
Sob karelský	FFL	14.05.2021	14.05.2021	17	06.08.2021
Kůň převalského	Yzop	11.05.2021	14.05.2021	20	06.08.2021
Kůň převalského	Haza	18.5.2021	21.05.2021	21	12.08.2021
Kůň převalského	Jessica	18.05.2021	21.05.2021	22	12.08.2021
Guereza pláštiková	Lucie	19.05.2021	21.05.2021	23	12.08.2021
Oryx šavlorohý	x	17.05.2021	21.05.2021	25	12.08.2021
Lachtan jihoafrický	Nebr	27.05.2021	28.05.2021	26	05.08.2021
Slon indický	Tamara	23.05.2021	28.05.2021	28	05.08.2021
Slon indický	Lacuna	23.05.2021	28.05.2021	29	13.08.2021
Slon indický	Auknor	28.05.2021	28.05.2021	31	13.08.2021
Ďábel medvědotivý	Nutmag	26.05.2021	28.05.2021	34	05.08.2021
Mara slaništní	x	25.05.2021	28.05.2021	35	13.08.2021
Slon indický	Janita	28.05.2021	28.05.2021	36	13.08.2021
Slon indický	Shanty	28.05.2021	28.05.2021	37	04.08.2021
Tygr ussurijský	Raja	05.06.2021	07.06.2021	38	10.08.2021
Volavka vlasatá	x	07.06.2021	07.06.2021	39	10.08.2021
Tygr ussurijský	Igor	05.06.2021	07.06.2021	40	10.08.2021
Slon indický	Rudi	02.06.2021	07.06.2021	41	10.08.2021
Tapír čabrakový*	Niko	09.06.2021	15.06.2021	42	18.08.2021
Pes ušatý	Rx	11.06.2021	15.06.2021	43	11.08.2021
Zubr evropský	Prixi	15.06.2021	15.06.2021	44	11.08.2021
Hutie kubánská	x	11.06.2021	15.06.2021	45	11.08.2021
Dikdik kirkův	x	15.06.2021	15.06.2021	46	11.08.2021
Zebu zakrslý*	Pavel	22.06.2021	24.06.2021	47	18.08.2021

\*krev byla analyzována, nicméně bez reprodukovatelného výsledku