

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ THIAMINU V JEČMENI, SLADU A POTRAVNÍCH
DOPLŇCÍCH

HPLC DETERMINATION OF THIAMINE IN BARLEY, MALT AND FOOD SUPPLEMENTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE
DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

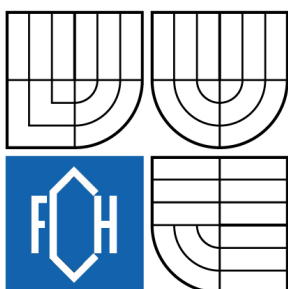
KATEŘINA VÍTKOVÁ

BRNO 2008



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ THIAMINU V JEČMENI, SLADU A POTRAVNÍCH DOPLŇCÍCH

HPLC DETERMINATION OF THIAMINE IN BARLEY, MALT AND FOOD SUPPLEMENTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

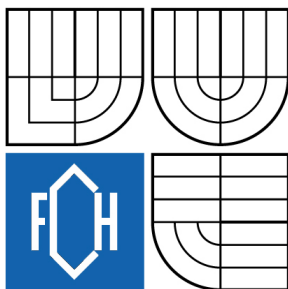
KATEŘINA VÍTKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. MILENA VESPALCOVÁ, Ph.D.

BRNO 2008



Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce	FCH-DIP0186/2007	Akademický rok: 2007/2008
Ústav	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka)	Vítková Kateřina	
Studijní program	Chemie a technologie potravin (M2901)	
Studijní obor	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí diplomové práce	RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.	
Konzultanti diplomové práce		

Název diplomové práce:

Stanovení thiaminu v ječmeni, sladu a potravních doplňcích

Zadání diplomové práce:

Literární rešerše:

- Význam thiaminu pro zdraví
- Poznatky o thiaminu v ječmeni, sladu a pivu
- Metody stanovení thiaminu v ječmeni a sladu

Experimentální část:

- Stanovení thiaminu metodou HPLC
- Stanovení thiaminu ve vzorcích ječmene, sladu a potravních doplňků
- Zpracování a vyhodnocení výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2008

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Kateřina Vítková
student(ka)

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2007

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá stanovením vitamínu B₁ v potravinách, především ve sladovnickém ječmeni a sladu.

Diplomová práce se skládá z literární a experimentální části, závěru a příloh.

Literární část obsahuje charakteristiku thiaminu, chemickou strukturu, chemické a fyzikální vlastnosti, funkce v organismu a dopady jeho deficitu na zdraví, výskyt v běžných potravinách a metody stanovení. Dále také popisuje teoretické základy vysokoúčinné kapalinové chromatografie, chromatografie na reverzní fázi, derivatizace a způsoby validace.

V experimentální části je popsána metoda použitá pro stanovení thiaminu v ječmeni a sladu, sladině a pивě, ale také v běžně dostupných potravních doplňcích jako jsou B-komplex, Pangamin a Thiamin. Stanovení bylo provedeno vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi s izokratickou elucí a fluorescenční detekcí.

Následuje kapitola prezentace výsledků, diskuse experimentální činnosti, obsah thiaminu v analyzovaných potravinách a validační parametry metody.

V závěru jsou zhodnoceny výsledky experimentální činnosti.

V příloze je uveden graf kalibrační křivky, chromatogramy vzorků, tabulky s výsledky a výpočty validačních parametrů.

Diplomová práce byla realizována v laboratoři Ústavu potravinářské chemie, Fakulty chemické VUT v Brně.

ABSTRACT

The aim of this diploma thesis is focused on determination of B vitamin in food especially in malting barley and malt.

This diploma thesis consists of theoretical and experimental parts including the conclusion and supplements.

Theoretical part describes thiamine characteristic, chemical structure, chemical and physical properties, function of thiamin in organism, impact it's insufficiency to the human health, occurrence in common food and methods for it's determination. Further are describing theoretical principles of high-efficiency liquid chromatography, chromatography on reverse phase, derivatization and ways of validation.

In the Experimental section is detailed description of used method for determination of thiamine in barley and malt, fresh mash and beer but also in common food supplements as are B-komplex, Pangamin and Thiamin. Determination was made by high-efficiency liquid chromatography on reverse phase with isocratic elution and fluorescent detection.

Next part introduce the results of theses, discussion of experimental work, volume of thiamine in analyzed food and validation parameters of used method.

In the conclusion are valorized results of experimental work.

In the attachment are graphs of standard curves, chromatogram and calculations of validation parameters.

Diploma thesis was realized in laboratory of Chemistry and Technology of Foodstuff, Faculty of chemistry, Brno University of Technology.

KLÍČOVÁ SLOVA

HPLC, Vysokoučinná kapalinová chromatografie, stanovení thiaminu, předkolumnová derivatizace, thiochrom, ječmen, slad, sladina, pivo, B-komplex, Thiamin, Pangamin BiFi

KEYWORDS

HPLC, High performance liquid chromatography, determination of thiamin, pre-column derivatization, thiochrom, barley, malt, wash, beer, B-complex, Thiamin, Pangamin BiFi

VÍTKOVÁ, K. Stanovení thiaminu v ječmeni, sladu a potravních doplňcích. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 76 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

*Poděkování:
Děkuji RNDr. Mileně Vespalcové,
Ph.D. za odborné vedení, rady
a pomoc při realizaci této diplomové
práce. Děkuji též mé rodině,
spolužákům a přátelům, kteří mě
podporovali při studiu.*

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1. VITAMINY	9
2.2. B-KOMPLEX	10
2.3. THIAMIN	11
2.3.1. <i>Biochemie thiaminu</i>	11
2.3.2. <i>Fyzikální a chemické vlastnosti thiaminu</i>	12
2.3.3. <i>Thiamin v potravě</i>	14
2.3.4. <i>Role thiaminu v organismu</i>	15
2.3.5. <i>Projevy nedostatku thiaminu</i>	15
2.3.6. <i>Předávkování thiaminem</i>	16
2.3.7. <i>Použití thiaminu</i>	16
2.3.8. <i>Výskyt</i>	16
2.3.8.1. <i>Potraviny živočišného původu</i>	17
2.3.8.2. <i>Potraviny rostlinného původu</i>	17
2.3.8.3. <i>Ostatní zdroje thiaminu</i>	17
2.3.9. <i>Ztráty thiaminu při zpracování a skladování potravin</i>	17
2.3.10. <i>Stanovení Thiaminu</i>	18
2.3.11. <i>Stanovení vitamínu B1 v potravinách metodou HPLC podle ČSN EN 14122</i>	19
2.3.12. <i>Alternativní HPLC systémy</i>	20
2.4. VYSOCE ÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE	21
2.4.1. <i>Chromatografie na reverzní fázi</i>	22
2.5. FLUORESCENČNÍ DETEKTOR.....	23
2.6. DERIVATIZACE.....	23
2.6.1. <i>Požadavky na deriváty předkolonové derivatizace:</i>	23
2.6.2. <i>Požadavky na deriváty postkolonové derivatizace:</i>	23
2.6.3. <i>Deriváty pro fluorimetrickou detekci</i>	24
2.6.3.1. <i>Derivatizace thiaminu</i>	25
2.7. VÝROBA PIVA	25
2.7.1. <i>Suroviny</i>	25
2.7.1.1. <i>Ječmen</i>	25
2.7.1.2. <i>Voda</i>	27
2.7.2.3. <i>Chmel a chmelové výrobky</i>	27
2.7.2. <i>Výroba sladu</i>	28
2.7.2.1. <i>Nákup, příjem, čištění, třídění a skladování ječmene</i>	28
2.7.2.2. <i>Máčení ječmene</i>	29
2.7.2.3. <i>Klíčení ječmene</i>	29
2.7.2.4. <i>Hvozdění zeleného sladu</i>	31
2.7.2.5. <i>Úprava hotového výrobku, jeho skladování a expedice</i>	32
2.7.3. <i>Čištění a šrotování sladu</i>	38
2.7.4. <i>Vystírání a rmutování</i>	38
2.7.5. <i>Scezování a vyslazování mláta</i>	38
2.7.6. <i>Výroba mladiny – chmelovar</i>	38

2.7.7. Chlazení a filtrace mladiny.....	39
2.7.8. Hlavní kvašení	39
2.7.9. Dokvašování a zrání piva	39
2.7.10. Filtrace, stabilizace a stáčení piva	40
2.7.11. Proces stárnutí piva	40
2.8. ZPRACOVÁNÍ ANALYTICKÝCH VÝSLEDKŮ A VALIDACE METODY	41
2.8.1. Opakovatelnost	41
2.8.2. Mez detekce a mez stanovitelnosti	41
2.8.3. Ověření linearity odezvy detektoru	42
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
4.1. SKLO, POMŮCKY, PŘÍSTROJE	43
4.2. CHEMIKÁLIE	43
4.3. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ.....	43
4.4. PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO HPLC ANALÝZU	44
4.5. CHROMATOGRAFICKÝ SEPARAČNÍ SYSTÉM	46
4.6. PŘEDKOLONOVÁ DERIVATIZACE	46
5. VÝSLEDKY A DISKUSE	47
5.1. TEST STABILITY THIOCHROMU	47
5.2. TEST STABILITY DERIVATIZAČNÍHO ČINIDLA	48
5.3. TEST ZÁVISLOSTI PRŮTOKU MOBILNÍ FÁZE NA PLOŠE PÍKU	48
5.4. KALIBRAČNÍ KŘIVKA	49
5.5. ANALYZOVANÉ VZORKY	51
5.5.1. Vzorky potravních doplňků	51
5.5.2. Vzorky ječmene, sladu, sladiny a piva	54
5.6. DŮKAZ PŘÍTOMNOSTI RIBOFLAVINU.....	63
5.7. ZTRÁTY THIAMINU VAREM A INKUBACÍ	64
5.8. VALIDAČNÍ PARAMETRY	65
5.8.1. Ověření linearity detektoru.....	65
5.8.2. Mez detekce a mez stanovitelnosti	65
5.8.3. Opakovatelnost	68
5.8.4. Interval spolehlivosti průměru.....	68
6. ZÁVĚR.....	69
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	71
8. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	74
9. SEZNAM PŘÍLOH	74
10. PŘÍLOHY	75
10.1. TABULKY	75
10.2. OBRÁZKY	78

1. ÚVOD

V lidském organismu mají vitaminy funkci katalyzátorů biochemických reakcí, podílejí se na metabolismu bílkovin, tuků a cukrů. Jsou nezbytné pro udržení řady tělesných funkcí, výstavbu nových tkání a ochranu organismu proti infekcím.

Pestrá strava s dostatkem zeleniny a ovoce je nejlepším zdrojem vitaminů. Obsahuje nejen všechny vitaminy, ale i další nezbytné živiny.

Vitamin B₁ je nezbytnou součástí výživy. Množství potřebného vitamínu souvisí s množstvím sacharidů (D-glukosy) přijímaných potravou. U dospělých osob s denním příjmem energie 12600 kJ je doporučený příjem thiaminu 1,2 – 1,5 mg.

Thiamin je stejně jako mnoho dalších vitaminů produkován intestinální mikroflórou. Množství produkované tímto způsobem je však příliš nízké, proto je potřebné jej získávat potravou.

V malém množství je přítomen v potravinách rostlinného i živočišného původu. Bohatým zdrojem jsou neloupané obiloviny, maso, pivovarské kvasnice, med a ořechy.

Deficience se projevuje nespecifickými příznaky jako je svalová únava, nechutenství, hubnutí a podrážděnost. Příčinou těchto příznaků je porucha metabolismu sacharidů při čemž dochází k hromadění kyseliny pyrohroznové v krvi. Z toho vyplývá, že thiamin ovlivňuje tkáně a orgány s vysokými nároky na energii, jako jsou nervy, ledviny a srdce. Nedostatečný příjem v potravě se projevuje jako nemoc beri-beri.

Ztráty thiaminu při zpracování a skladování mohou být velké, protože thiamin je jedním z nejlabilnějších vitaminů. K jeho rozkladu dochází ve vodných roztocích už při dosažení varu. Při teplotách nad 100 °C rozklad umocňuje účinek světla, a také přítomnost siřičitanů používaných při konzervaci potravin. Obecně vařením dochází k větším ztrátám thiaminu než pečením, smažením a mikrovlnným ohřevem.

Pro stanovení thiaminu v potravinách se nejčastěji používají metody mikrobiologické a metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV nebo fluorescenční detekcí. Při fluorescenční detekci je nutná předkolonová nebo postkolonová derivatizace analytu. Před vlastním stanovením je nezbytné vázané vitaminy uvolnit kyselou hydrolýzou a působením specifického enzymu.

V této diplomové práci byl thiamin stanoven metodou HPLC na reverzní fázi C₁₈ s izokratickou elucí a fluorescenční detekcí. Pro úspěšnou fluorescenční detekci byla použita předkolonová derivatizace. Vycházelo se z požadavků Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Brně, který poskytl vzorky ječmenů a sladů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Vitaminy

Vitaminy jsou organické nízkomolekulární sloučeniny syntetizované autotrofními organismy. Heterotrofní organismy je syntetizují jen v omezené míře a získávají je jako exogenní látky především potravou a některé z nich prostřednictvím střevní mikroflóry. Vitaminy jsou v určitém minimálním množství nezbytné pro látkovou přeměnu a regulaci metabolismu člověka. Nejsou zdrojem energie, ani stavebním materiálem, vesměs mají funkci jako součást katalyzátorů biochemických reakcí (např. metabolismus nukleových kyselin, bílkovin, sacharidů a tuků), některé také vytvářejí důležité redox-systémy, jiné působí antioxidantně.

Vitaminy se třídí podle rozpustnosti ve vodě (v polárním prostředí) a v tucích (nepolárním prostředí) na:

- o vitaminy rozpustné ve vodě, hydrofilní vitaminy (vitaminy B-komplexu, vitamin C)
- o vitaminy rozpustné v tucích, lipofilní vitaminy (vitaminy A, D, E a K)

Ve vodě rozpustné vitaminy se v organismu neskladují nebo skladují jen omezeně, jejich přebytky jsou vylučovány močí. Lipofilní vitaminy jsou skladovány v játrech. Množství potřebné k zajištění fyziologických funkcí je závislé na mnoha faktorech jako je stáří, pohlaví, zdravotní stav, životní styl, stravovací zvyklosti a pracovní zatížení. Se skladováním vitaminů se pojí pojem rezervní kapacita, která je definována jako doba, po kterou je potřeba vitaminu kryta rezervami organismu. (tabulka č.1)

Tabulka č.1: Rezervní kapacita vitaminů

Vitaminy	Rezervní kapacita
korinoidy	3-5 let
vitamin A	1-2 roky
folacin	3-4 měsíce
vitamin K a C, riboflavin, pyridoxin, niacin	2-6 týdnů
thiamin	4-10 dní

Je-li vitamin dodáván v nedostatečném množství, dochází k hypovitaminose nebo až k avitaminose, při dočasném úplném nedostatku vitaminu. Deficience se projevuje poruchami některých životních procesů a dlouhodobým nedostatkem dochází k celkovému onemocnění organismu. Opakem je hypervitaminosa, která je způsobena nadměrným příjmem lipofilních vitaminů skupiny A a D. Hypervitaminosa rovněž vyvolává poruchy biochemických procesů a může vest až k těžkým onemocněním.

Potřebu vitaminů ovlivňuje přítomnost některých složek potravin, které snižují jejich využití nebo vitaminy inhibují. Tyto látky se nazývají antivitaminy a určitým způsobem eliminují biologické účinky vitaminů, což může vest až k projevům deficience. Aktivita antivitaminů spočívá v následujících principech:

- o skupina I. - strukturální analogy vitaminů reagují s příslušnými apoenzymy (působí jako kompetitivní inhibitory enzymů) nebo bílkoviny, které vitaminy transportují,

- o skupina II. - některé enzymy přeměňují vitaminy na neúčinné látky,
- o skupina III. - některé látky (většinou bílkoviny, ale i nízkomolekulární látky) tvoří s vitaminy nevyužitelné komplexy.

Antivitaminy první skupiny (pravé antivitaminy) obvykle nelze běžnými technologickými zákroky odstranit. Zbývající dvě skupiny antivitaminů lze do značné míry eliminovat vhodnými technologickými nebo kulinárními postupy (tepelnou inaktivací enzymů nebo denaturací bílkovinné části vitamínu vázaného v nevyužitelném komplexu s bílkovinou). [1]

V potravinách se vitaminy vyskytují v množství od mg/kg po stovky až tisíce mg/kg. Vyskytují se jednak volné, jednak vázané (obvykle na sacharidy nebo bílkoviny).

Významnými zdroji vitaminů jsou především základní potraviny jako je maso a masné výrobky, mléko a mléčné výrobky, vaječný žloutek, chléb a cereální výrobky, ovoce a zelenina. U potravin živočišného původu závisí obsah vitaminů hlavně na způsobu skladování a zpracování suroviny. U potravin rostlinného původu je významný zejména stupeň zralosti, klimatické podmínky během růstu, především množství srážek, hnojení, posklizňové skladování a zpracování. Vitaminy patří mezi velmi labilní složky potravin. Během technologického zpracování a kulinární přípravy dochází u většiny vitaminů k větším či menším ztrátám. Z toho důvodu se vitaminy používají jako indikátory šetrnosti technologického a kulinárního zpracování. U vitaminů rozpustných ve vodě dochází během technologického a kulinárního zpracování ve většině případů k největším ztrátám výluhem, u vitaminů rozpustných v tucích jsou největší ztráty způsobeny oxidací. Stabilita jednotlivých forem vitaminů je různá, závisí na vnějších faktorech, konkrétní potraviny a na použité technologii zpracování potraviny. Vitaminy se dnes v potravinářském průmyslu používají k obohacení mnoha výrobků, k tzv. restituci (doplnění obsahu vitamínu na původní hladinu) a fortifikaci (oboahcení na vyšší koncentrace než v původní surovině). [1]

2.2. B-komplex

B-komplex je souhrnné označení pro vitaminy skupiny B. Jsou to ve vodě rozpustné vitaminy, nezbytné pro správné fungování metabolismu.

Hlavním zdrojem vitamínu skupiny B jsou kvasnice, maso, sýry, celozrnné obiloviny (také jáhly), luštěniny, a ořechy.

Vitamin B objevil polský biochemik Kazimierz Funk v roce 1912 v otrubách rýže.

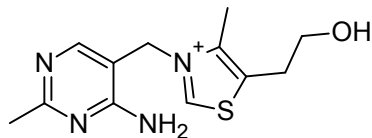
Skupina vitaminů s označením B

- Vitamin B₁ – thiamin
- Vitamin B₂ – riboflavin
- Vitamin B₃ – niacin
- Vitamin B₅ – pantothenová kyselina
- Vitamin B₆ – pyridoxal, pyridoxol, pyridoxamin
- Vitamin B₇ – biotin (vitamin H)
- Vitamin B₉ – kyselina listová (folacin, folát)
- Vitamin B₁₂ – kobalamin

2.3. Thiamin

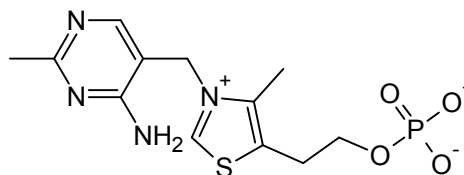
Thiamin neboli vitamin B₁ je bílá nebo bezbarvá krystalická sloučenina, rozpustná ve vodě.

Chemicky se thiamin skládá ze substituovaných jader thiazolu (5-(2-hydroxyethyl)-4-methyl-thiazol) a pyrimidinu (4-amino-2-methyl-pyrimidin), které jsou spojené methylenovou skupinou. Je to silně hydrofilní sloučenina. Thiamin se vyskytuje především jako volná látka a ve formě fosforečných esterů, monofosfátu, difosfátu a trifosfátu. [1]

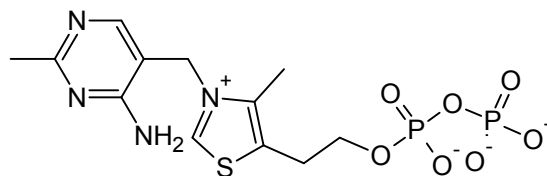


thiamin (volná báze)

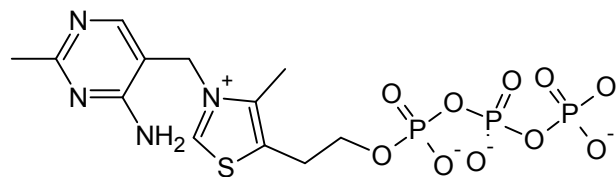
fosfáty thiaminu



thiaminmonofosfát



thiamindifosfát



thiamintrifosfát

2.3.1. Biochemie thiaminu

Volný thiamin z potravy je esterifikován na thiamindifosfát v různých orgánech a ten je kofaktorem významných enzymů souvisejících především s metabolismem sacharidů a také aminokyselin (dekarboxylas, dehydrogenas, transketolas, karboligas). [1, 2]

2.3.2. Fyzikální a chemické vlastnosti thiaminu

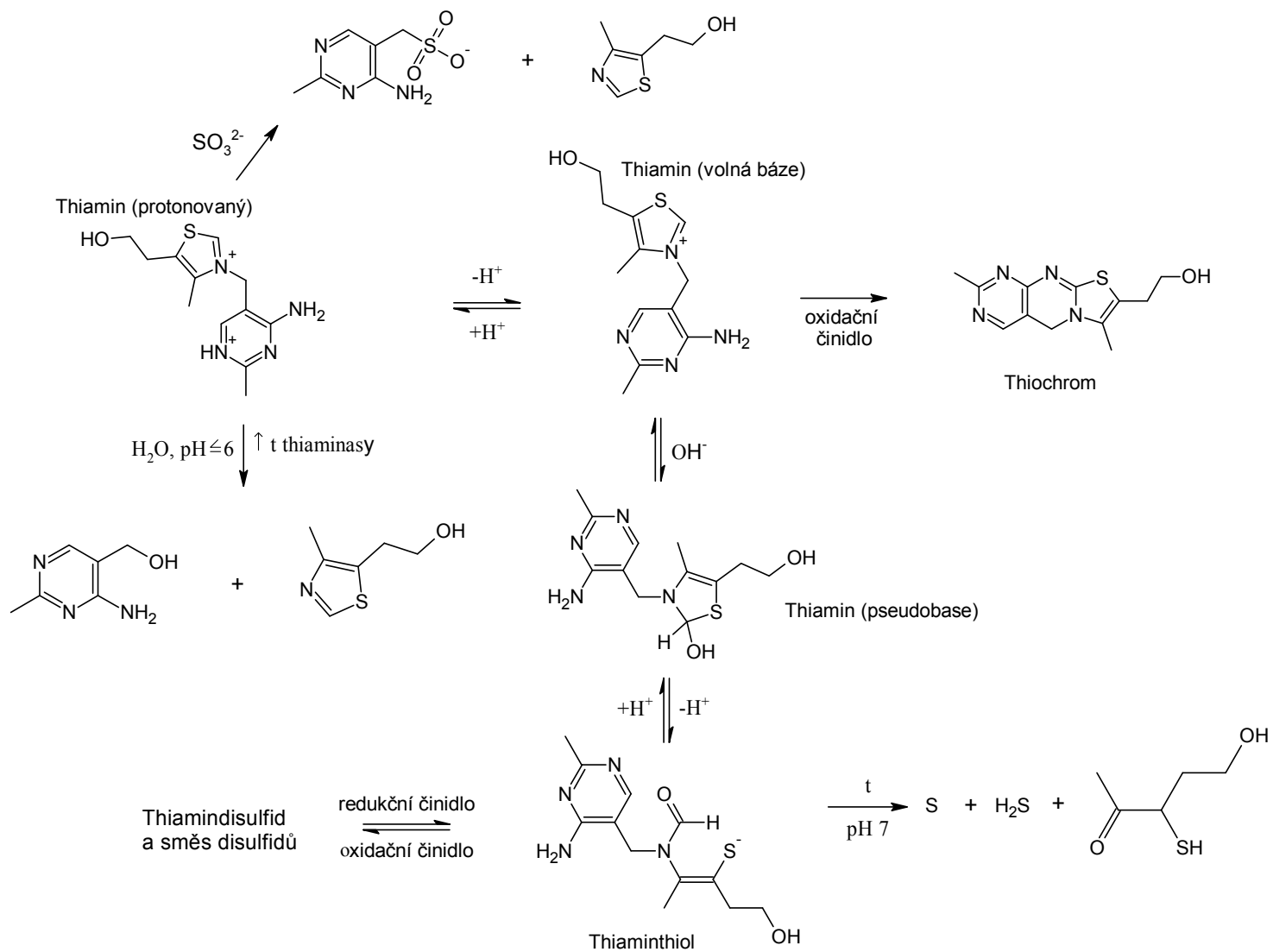
Relativně stabilní je thiamin v mírně kyselém prostředí ($\text{pH} < 5$), při $\text{pH} < 1$ vzniká oxythiamin náhradou aminoskupiny na uhlíku C-4' za hydroxylovou skupinu. V neutrálním a alkalickém prostředí, kde existuje jako volná báze, je značně nestálý díky svému kvartérnímu dusíku. V alkalickém prostředí je destrukce thiaminu velmi rychlá a vede k tvorbě různých produktů např. thiaminthiolu jehož oxidací vzniká thiamindisulfid a thiochrom. Thiochrom je žlutá biologicky inaktivní látka s výraznou modrou fluorescencí, která se využívá pro kvantitativní stanovení thiaminu. V neutrálním prostředí dochází především k rozkladu thiaminu na pyrimidinovou a thiazolovou složku, podobně se molekula thiaminu štěpí na dvě části působením oxidu siřičitého nebo hydrogensířičitanů. [1, 2, 4]

Molekula thiaminu vykazuje acidobazické vlastnosti. Průběh reakcí je znázorněn na obrázku č. 1.

Hydroxyethyllová skupina na thiazolové části thiaminu může být *in vivo* fosforylována na thiamin mono-, di- a trifosfát. Thiamin difosfát, také nazývaný thiamin pyrofosfát, je metabolicky aktivní forma, někdy bývá uváděný jako kokarboxylasa. Ve slabě kyselých a neutrálních roztocích bývá nestálý a jeho hydrolýzou vzniká thiaminmonofosfát a thiamin. [1, 4]

Velké množství dalších produktů vzniká rozkladem thiaminu ve vodných roztocích za varu, při teplotách nad $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ a fotodegradací. Identifikováno bylo více než 70 degradačních produktů. Kromě jedouhlíkatých sloučenin jako je sulfan, amoniak, methanal, ethanal, mravenčí a octová kyselina vzniká několik desítek dalších sirných sloučenin (alifatické sulfidy, alifatické karbonylové sloučeniny s thiolovou skupinou, furany obsahující v molekule síru, alicyklické, bicyklické a heterocyklické sirné sloučeniny jako jsou thiofenoly a thiazoly). Řada produktů je vonnými látkami potravin, např. masa.

Některé reakce thiaminu lze zahrnout mezi tzv. reakce neenzymového hnědnutí. Thiamin reaguje v neutrálním prostředí s redukujícími cukry a stejně tak s jinými karbonylovými sloučeninami. Reakcí s D-glukosou vzniká jako primární produkt tzv. glukothiamin. Thiamin reaguje s 2-furankarbaldehydem, který je jedním z hlavních produktů degradace kyseliny askorbové v kyselém prostředí, čímž se vysvětluje jeho rozklad v přítomnosti vitamínu C. [1]



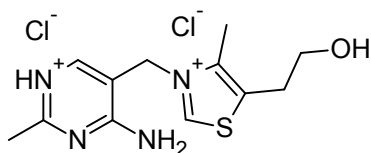
Obrázek č. 1: Přehled hlavních reakcí ionizace a degradace thiaminu [2]

2.3.3. Thiamin v potravě

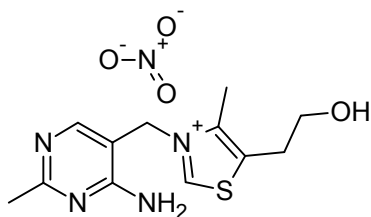
Vitamin B₁ je nutnou součástí výživy. Množství potřebného vitamínu souvisí s množstvím sacharidů (D-glukosy) přijímaných potravou, proto je na každých 4200 kJ energie získané z cukru Světovou zdravotnickou organizací (WHO) doporučen příjem 0,4 – 0,6 mg thiaminu. U dospělých osob s denním příjmem energie 12600 kJ je doporučený příjem thiaminu 1,2 – 1,5 mg. [1, 3]

Vylučování thiaminu není závislé na množství sacharidů (38 – 80 % z přijaté energie), bílkovin (75 – 200 g), riboflavinu (2,5 – 3,5 mg), vody a energie (v rozsahu 3200 – 4700 kcal/den) přijatých stravou. Proto by příjem thiaminu měl být vyjádřen v mg/den nikoli v mg/4200 kJ energie. Ani větší stres nemá na vylučování thiaminu z organismu téměř žádný vliv. [18]

Thiamin je komerčně dostupný v hydrochloridové nebo dusičnanové formě, tyto formy se obvykle užívají k fortifikaci potravin nebo jako doplňky výživy. [2]



hydrochloridová forma thiaminu



dusičnanová forma thiaminu

Tabulka č.2: Doporučená denní dávka

	Thiamin [mg]
kojenci	0,3
děti	0,7 – 1,2
muži	1,2 – 1,5
ženy	1,0 – 1,1
těhotné a kojící ženy	1,4 – 1,5

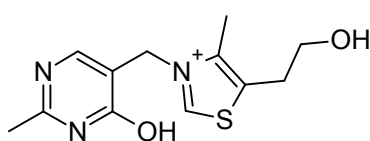
Thiamin je stejně jako mnoho dalších vitamínů produkován intestinální mikroflórou. Množství vitamínu produkované tímto způsobem je však příliš nízké, proto je potřebné jej doplňovat potravou.

V malém množství je thiamin přítomen v potravinách rostlinného i živočišného původu. Bohatým zdrojem jsou neloupané obiloviny, maso, pivovarské kvasnice, med a ořechy. Nejvýznamnějším zdrojem thiaminu jsou cereální výrobky kryjící asi 40 % potřeby vitamínu (chléb asi 20 %). Dalším významným zdrojem je maso a masné výrobky (18 – 27 %), mléko

a mléčné výrobky (8 – 14 %), brambory (10 %), luštěniny (5 %), zelenina (až 12 %), ovoce (4 %), vejce (2 %). [1, 3]

Vitamín B₁ působí příznivě na nervový systém a proti únavě. Zvýšený příjem se doporučuje při otravách nikotinem, arsenem nebo olovem. Při velké fyzické námaze, stresu a horečnatých onemocněních potřeba vitamínu B₁ taktéž stoupá. Thiamin se v lidském těle neukládá a jeho zásoba vydrží jen na 4 – 10 dní. Proto musí být stále přítomen v potravě. Mezi faktory snižující množství vitamínu B₁ v těle patří pití kávy a velkého množství čaje. [1, 3]

Známým antagonistou thiaminu je oxythiamin, který obsahuje jako substituent pyrimidinového cyklu hydroxylovou skupinu místo aminoskupiny. Oxythiamin vzniká z thiaminu v silně kyselém prostředí, proto se vyskytuje např. v kyselých hydrolyzátech bílkovin jako je polévkové koření. Oxythiamin snadno tvoří difosfát, který je kompetitivním inhibítorem thiaminu v enzymových reakcích. [1]



oxythiamin (volná báze)

Významnými antivitaminy jsou také enzymy nazývané thiaminasy a některé nízkomolekulární látky z potravin rostlinného původu (fenolové látky v borůvkách, červeném rybízu, červeném hlávkovém zelí, růžičkové kapustě). Vyšší aktivitu thiaminasy I má syrové maso sladkovodních a některých mořských ryb, mlžů a syrové vnitřnosti hospodářských zvířat). Thiaminasa II je enzymem mnoha bakterií. [1]

2.3.4. Role thiaminu v organismu

Thiamin je enzymem thiaminfosfotransferasou, který je přítomen v játrech a mozku, přeměněn na aktivní formu vitamínu B₁, thiamindifosfát.

Thiamindifosfát je koenzym enzymových reakcí, při kterých je přemísťován aktivovaný aldehydový zbytek:

- o oxidativní dekarboxylace α -ketokyselin (dekarboxylace pyruvátu, α -ketoanalogů leucinu, izoleucinu a valinu, α -ketoglutarové kyseliny),
- o transketolasová reakce.

Oxidativní dekarboxylace jsou důležité v metabolismu sacharidů a aminokyselin, transketolasová reakce probíhá v pentózovém cyklu, ve kterém jsou syntetizovány redukční ekvivalenty NADPH a deoxyribosa a ribosa k syntéze nukleových kyselin.

2.3.5. Projevy nedostatku thiaminu

Deficience se projevuje nespecifickými příznaky jako je svalová únava, nechutenství, hubnutí a podrážděnost. Příčinou je porucha metabolismu sacharidů při čemž dochází k hromadění kyseliny pyrohroznové v krvi. Z toho vyplývá, že thiamin ovlivňuje tkáně a orgány s vysokými nároky na energii, jako jsou nervy, ledviny a srdce. Příčinou deficience bývá často alkoholismus. [1, 3, 24]

Nedostatek v přijímané potravě se projevuje jako nemoc beri-beri. Nejprve se projevuje periferními myopatiemi, vyčerpaností, ztrátou chuti k jídlu. Později se příznaky stupňují, objevují se deprese, podrážděnost a zmatenost jako důsledek neurologických degenerativních změn, degenerace kardiovaskulárního systému a svalů, otoky. Beri-beri je způsobena dlouhodobou konzumací potravy bohaté na sacharidy, ale chudou na thiamin, jako je loupáná rýže, bílá mouka a rafinovaný cukr tvořící hlavní součást stravy. U chronických alkoholiků se nedostatek thiaminu často projeví jako Wernickeova encefalopatie. [1, 3, 24]

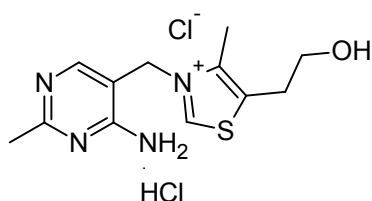
V našich zeměpisných šířkách je avitaminosa vitamínu B₁ vzácná. S hypovitaminosou se lze setkat, může být způsobena jednak nedostatečným příjmem vitamínu ve stravě, ale také poruchou jeho resorpce z tenkého střeva. [1, 3]

2.3.6. Předávkování thiaminem

Vitamin B₁ je rozpustný ve vodě a je vylučován močí. Předávkování je proto téměř vyloučeno, byly zaznamenány jen ojedinělé alergické reakce sensitivních lidí na ústní podání velkého množství tohoto vitamínu. [31]

2.3.7. Použití thiaminu

V některých zemích se thiaminem fortifikují bílé pšeničné mouky, cereální snídaně a rýže. Pro tyto účely se nejčastěji používá syntetický thiamin chlorid hydrochlorid.



Thiamin chlorid hydrochlorid

2.3.8. Výskyt

Volný thiamin a jeho fosforečné estery se vyskytují ve všech potravinách, ale jen v některých ve vyšším množství. Vyšší rostliny jej syntetizují *de novo*, u živočichů dochází pouze k fosforylaci thiaminu přijatého potravou.

Tabulka č.3: Obsah thiaminu v běžných potravinách

Potravina	Obsah v mg/kg (mg/dm ³) jedlého podílu
maso vepřové	3,9 – 11,0
maso hovězí	0,4 – 1,0
maso kuřecí	1,0 – 1,5
játra vepřová	2,7 – 7,6
ryby	0,6 – 1,7
mléko	0,3 – 0,7
sýry	0,2 – 0,6

vejce	0,7 – 1,4
mouka pšeničná	0,6 – 5,5
chléb	0,6 – 3,0
luštěniny	2,0 – 8,4
zelí	0,5 – 0,6
špenát	0,5 – 1,5
rajčata	0,6
mrkev	0,3 – 1,4
brambory	0,5 – 1,8
jablka	0,4
citrusové ovoce	0,4 – 1,0
banány	0,5
ořechy	0,5 – 0,6
droždí	7,1

2.3.8.1. Potraviny živočišného původu

V živočišných tkáních je 80 – 90 % vitamínu B₁ přítomno ve formě thiamindifosfátu vázaného na bílkoviny. Ve vepřovém a kuřecím masu je ve vyšších koncentracích přítomen také thiamintrifosfát. V mléce se thiamin vyskytuje volný a jako difosfát, zčásti vázaný na bílkoviny (50 – 75 % volného, 18 – 45 % fosforylovaného a 5 – 17 % vázaného na bílkoviny).

2.3.8.2. Potraviny rostlinného původu

V obilovinách, luštěninách a ve všech semenech rostlin je nejčastější formou volný thiamin. V obilovinách, které jsou nejdůležitějším zdrojem thiaminu je vitamin přítomen hlavně v klíčku a aleuronové vrstvě, tedy i v otrubách (v pšeničném zrna se udává 0,39 mg thiaminu ve 100 g, v klíčku 7,74 mg ve 100 g a 1,6 mg ve 100 g v aleuronové vrstvě). Bílé mouky proto obsahují podle stupně vymletí až desetkrát méně thiaminu než celozrnné mouky. Celozrnné cereální výrobky bohaté na thiamin obsahují také vyšší koncentrace vlákniny a fytátů, které inhibují intestinální absorpci thiaminu a dalších látek. Mnohem více thiaminu než loupaná rýže obsahuje rýže neloupaná a rýže předvařená (thiamin se povařením absorbuje z klíčku a aleuronové vrstvy do vnitřní části zrna). [1.3]

2.3.8.3. Ostatní zdroje thiaminu

Zvláště bohatým zdrojem jsou pivovarské, pekařské a vinařské kvasinky (obsahují asi 160 mg/kg thiaminu), protože absorbují thiamin přítomný ve sladu. V pivu jsou však koncentrace thiaminu velmi nízké (0,01 – 0,06 mg/dm³). [1, 3]

2.3.9. Ztráty thiaminu při zpracování a skladování potravin

Ztráty thiaminu při zpracování a skladování mohou být velké, protože thiamin je jedním z nejlabilnějších vitaminů. K jeho rozkladu dochází ve vodných roztocích už při dosažení varu. Při teplotách nad 100 °C rozklad umocňuje účinek světla, a také přítomnost siřičitanů

používaných při konzervaci potravin. Obecně vařením dochází k větším ztrátám thiaminu než pečením, smažením a mikrovlnným ohřevem. [22]

U masa se pečením snižuje obsah thiaminu o 15 – 25 %, opékáním a smažením o 15 – 50 %, vařením a dušením o 50 – 70 %, mikrovlnným ohřevem o 8 – 10 %. Zmrazování a mrazírenské skladování obsah thiaminu v mase neovlivňuje. Všeobecně možno říci, že velikost ztrát thiaminu závisí na způsobu tepelného opracování, hmotnosti zpracované suroviny, obsahu tuku a vody.

K průmyslovému zpracování mléka se využívá pasterizace a sterilizace. V současnosti nepoužívanější je metoda UHT, úbytek thiaminu v takto zpracovaném mléku je 15 – 18 %. Skladováním trvanlivého mléka dochází k poklesu vitamínu o několik jednotek % v závislosti na délce a teplotě skladování. Při výrobě sušeného mléka dochází k úbytku vitamínu o 15 – 20 %.

U obilovin závisí ztráta thiaminu na stupni vymílání zrna, při 85 % vymílání (výroba hrubé mouky) zůstává v mouce 85 % vitamínu, ale při 60 % vymílání (výroba hladké mouky) zůstává v mouce pouze 15 % thiaminu. Pečením chleba dochází asi ke 20 % ztrátě thiaminu a vařením těstovin ke 40 % ztrátě výluhem.

Úbytek thiaminu u zeleniny je úměrný délce tepelného zásahu a použité teplotě (vařením 25 – 40 %, sušením v přítomnosti siřičitanů dochází k totální destrukci). [3]

2.3.10. Stanovení Thiaminu

Ke stanovení thiaminu se využívá fyzikálně-chemických a mikrobiologických metod.

Mikrobiologická metoda spočívá ve sledování růstu testovaného mikroorganismu. Změny obsahu sušiny se určí vážkově a množství mikroorganismů turbidimetricky. [13]

K detekci thiaminu a některých jeho derivátů, jako jsou estery nebo koenzymy, se využívá UV zkouška při 250 nm, kdy po jednoduché kyselé extrakci následuje čištění vzorku na sloupci. Vlastní technika extrakce je ovlivněna způsobem separace a vybranou detekcí. [13]

Především se využívá thiochromová metoda, která je založena na měření intenzity fluorescence thiochromu v ultrafialovém světle. Thiochromová metoda využívá derivatizaci thiaminu na fluorescenční thiochrom. Po kyselé extrakci vzorku s autoklávováním následuje enzymatická hydrolyza s použitím diastatických a fosforolytických enzymů a precipitace proteinů kyselinou trichloroctovou. Derivatizaci může předcházet čištění na sloupci nebo probíhá až po něm. Derivatizace spočívá v oxidaci volného thiaminu alkalickým hexakvanoželezitanem draselným na thiochrom. Tato reakce není stechiometrická, ale za standardních podmínek je reprodukovatelná. [13, 14, 30]

Většina metod využívajících RPC, používá příslušnou směs methanolu a vody nebo pufráční roztoky s iontově-párovou modifikací nebo bez ní.

Vitaminy (thiamin a riboflavin) byly extrahovány z masa vyluhováním s 0,1M kyselinou chlorovodíkovou a následnou enzymatickou hydrolyzou fosforylovaných forem obou vitamínů (kyselou fosfatasou). Riboflavin ve filtrovaném hydrolyzátu byl stanoven přímo HPLC na reverzní fázi C₁₈ kolonou s použitím mobilní fáze methanol : voda (40 : 60) a fluorescenčního detektoru (excitační vlnová délka 450 nm a emisní vlnová délka 510 nm). Thiamin se po konverzi na thiochrom převede do isobuthanolu a stanoví toutéž kolonou a fluorescenčním detektorem (excitace 366 nm a emise 434 nm) za použití eluentu methanol : voda (80 : 20). [20] Metodu HPLC je možno využít také k současnemu stanovení thiaminu a riboflavínu

v cereálních produktech. K separaci se používá kolona s náplní oktadecylsilica o velikosti částic 10 μm . [19]

Thiamin a jeho mono- a pyrofosfátové estery byly stanoveny v pivu a surovém materiálu pro jeho výrobu (pivovarských kvasinkách, sladu, ječmeni a chmelu) metodou kapalinové chromatografie na reverzní fázi. Byla použita fluorescenční detekce a nová stacionární fáze na bázi amidů (netvoří iontové páry) a jednodušší mobilní fáze, která vede k úzkým píkům. Analýza byla provedena izokratickou elucí s fosfátovým pufrům jako mobilní fází, s použitím postkolonové derivatizace (alkalickým hexakynoželezitanem draselným) založené na oxidaci thiaminu na thiochrom. Thiamin byl nalezen v pivech a surových produktech, zvláště v pivovarských kvasnicích a sladu. Stabilita studie ukazuje na rychlé snížení obsahu thiaminu ve vzorcích skladovaných při pokojové teplotě a slunečním světle. Proto standardní roztoky thiaminu byly připravovány do tmavých nádob bezprostředně před stanovením a uchovávány při teplotě 4°C. [23, 31]

Vyvinuta a optimalizována byla také metoda separace a stanovení thiaminu a jeho fosfátových esterů v komerčních tabletách metodou kapilární zónové elektroforézy. K extrakci vitamínu z tablet byl použit roztok HCl. Efektivita bylo docíleno použitím pufru dekahydrátu tetraboritanu sodného (pH 8,24; 65 mM), při aplikovaném potenciálu 30 kV dává detekční limit 10^{-4} – $6 \cdot 10^{-4}$ mM a limit kvantitativního měření thiaminu a jeho esterů $6 \cdot 10^{-4}$ – $1,2 \cdot 10^{-3}$ mM. Jako elektrolyt možno použít také 0,02 M fosforečnan sodný (pH 9) při aplikovaném potenciálu 6 kV. K detekci použít UV detektor. Metoda byla uznána a aplikována ke kvantitativnímu stanovení thiaminu v komerčních tabletách obsahujících značnou i běžnou dávku thiaminu. [21, 28]

Thiamin lze kvalitativně i kvantitativně analyzovat metodou diferenční pulsní polarografie. Thiamin dává dobře definované vlny v 0,1 M KCl a pH 5,2 s $E_{1/2} = -1,2$ V a $E_p = 1,22$ V proti standardní kalomelové elektrodě. Výška vlny polarogramu je úměrná koncentraci vitamínu. Výsledky ukazují vysokou spolehlivost a přesnost. [29]

Další metodou ke stanovení thiaminu je plynová chromatografie (GC). Protože thiamin je citlivý na teplo a patří mezi netěkavé sloučeniny není možné ho stanovit GC přímo. Musí se připravit těkavý derivát thiaminu včetně O-benzyl, trimethylsilyl a trifluoracetylderivátů, ale všechny tyto sloučeniny jsou málo těkavé při nízkých teplotách a rozkládají se při teplotě nad 250 °C. Proto je vyvíjena skupina nepřímých metod, které zahrnují předúpravu za přidání sířičitanů, které rozštěpí thiamin na jeho 5(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazolový (HEMT) derivát. Mezi ně patří metoda využívající kyselou a enzymatickou (taka diastasa) hydrolyzy, jedná se o rozštěpení thiaminu sířičitany, extrakci výsledného HEMT chloroformem a přímou GC analýzu koncentrovaného extraktu na koloně Carbowax 20 M při 220 °C s injekčním dávkováním a s použitím FPD. Citlivost tohoto stanovení se pohybuje okolo 0,1 $\mu\text{g/ml}$ a je srovnatelná s thiochromovou metodou. [11, 12]

2.3.11. Stanovení vitamínu B1 v potravinách metodou HPLC podle ČSN EN 14122

Thiamin je extrahován z potravin po kyselou hydrolyze. Následuje defosforylace za použití enzymu a kvantifikace metodou HPLC s předkolonovou nebo postkolonovou derivatizací na thiochrom.

Thiamin je vázán většinou na koenzym karboxylasy (kyselina thiamindifosforečná), dále byla prokázána přítomnost kyseliny thiamintrifosforečné a lipothiaminu, proto se musí uvolnit z těchto vazeb enzymatickou hydrolyzou, nejčastěji taka diastasou. Vyzkoušeny byly též

enzymové směsi taká diastasa (nebo clarasa) + β -amylasa + cystein + pepsin (nebo papain). [26] Při použití enzymatické hydrolýzy se vzorek nejprve hydrolyzuje kyselinami (nejčastěji v autoklávu) – 0,1 M kyselinou chlorovodíkovou nebo 0,05 M kyselinou sírovou při teplotě 100 až 121°C po dobu 30 – 60 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu a úpravě pH na 4 (octanem sodným) se vázaný thiamin hydrolyzuje taká diastasou při teplotě 37 – 43°C po dobu 16 – 24 hodin.

Stanovení thiaminu je založeno na oxidaci thiaminu v alkalickém prostředí mírnými oxidačními činidly (hexakynoželezitanem draselným) za vzniku thiochromu, a to předkolonově nebo postkolonově. Oxidací dojde k uzavření kruhu mezi pyrimidinem a thiazolem přes methylenový můstek a aminoskupinu. Thiochrom je žlutá krystalická látka s teplotou tání 220 – 230°C, rozpustná ve vodě, methanolu a ethanolu na silně modře fluoreskující roztoky. Má alkalický charakter, lze ji vytřepat do buthanolu nebo penthanolu. Thiochrom se detekuje při 420 – 440 nm o excitační vlnové délce 365 – 375 nm. [27]

2.3.12. Alternativní HPLC systémy

Rozdělení a kvantifikace se jevily jako uspokojivé, jestliže byly použity následující chromatografické podmínky:

Tabulka č.4: Alternativní HPLC systémy [27]

Stacionární fáze	Rozměry kolony [mm x mm]	Mobilní fáze (V :V)	Detekce (Ex/Em) [nm]	Průtok [ml/min]	Oxidační mód
Radial silica® 10 μ m	250 x 4,6	Ethanol/fosfátový pufr, pH 7,4, c(KH ₂ PO ₄) = 0,1 mol/l (50:50)	365/435	3,0	PC ^a
Supelco® LC-18-DB 5 μ m	250 x 4,6	Methanol/fosfátový pufr, pH 3,5, c(KH ₂ PO ₄) = 9 mmol/l obsahující tetraethylamoniumchlorid, r(C ₈ H ₂₀ NCl) = 1 g/l a sodnou sůl kyseliny heptansulfonové, c (C ₇ H ₁₅ NaO ₃ S) = 5 mmol/l (35:65)	368/420	1,0	PC
Lichrospher® RP 18 5 μ m	250 x 4,6	Methanol/sodná sůl kyseliny hexansulfonové, c (C ₆ H ₁₃ NaO ₃ S.H ₂ O) = 1 mmol/l, pH 3,0 (70:30)	375/435	1,5	PC
Eurospher® 100 - C 18 5 μ m	250 x 4,6	Dihydrogenfosforečnan sodný, c(NaH ₂ PO ₄) = 10 mmol/l / chloristan sodný, c (NaClO ₄) = 0,15 mol/l (50:50)	375/435	1,0	PC
Lichrospher®	250 x 4,6	Methanol/acetátový pufr pH	366/435	0,7	PRC ^b

RP Select B 5 µm		4,0, c (CH ₃ COONa) = 50 mmol/l (40:60)			
m-Bondapack® radial C 18 5 µm	250 x 4,6	Methanol/acetátový pufr pH 4,5, c (CH ₃ COONa) = 0,5 mol/l (40:60)	366/435	0,8	PRC
Spherisorb® ODS2 5 µm	250 x 4,6	Methanol/fosfátový pufr pH 4,0, c (KH ₂ PO ₄) = 0,1 mol/l (70:30)	375/435	1,0	PRC
Lichrospher® RP 10 µm	250 x 4,6	Dihydrogenfosforečnan draselný, c (KH ₂ PO ₄) = 10 mmol/l / dimethylformamid (80:20)	368/440	1,5	PRC
Hamilton® PRP-1 5 µm	150 x 4,6	Methanol/voda (40:60), pH upraveno na 4,5 kyselinou octovou	366/435	1,0	PRC
Hamilton® PRP 5 µm	150 x 4,1	Methanol/voda (35:65), pH upraveno na 9,0 amoniakem w (NH ₃) = 25%	366/435	1,0	PRC
Hypersil® NH₂APS2 5 µm	250 x 4,6	Dichlormethan/methanol (95:5)	365/440	1,0	PRC
^a PC = Postkolonová derivatizace ^b PRC = Předkolonová derivatizace					

2.4. Vysoce účinná kapalinová chromatografie

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography) zkratka HPLC patří mezi separační metody. Separací metody jsou většinou založeny na rozdílné distribuci dělených látek a používají se pro kvalitativní i kvantitativní analýzu.

Separace směsi látek se uskutečňuje v systému dvou nemísitelných fází. K rozdělení dochází na základě různých interakcí jednotlivých složek analyzované směsi s mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) fází. Mobilní fáze je kapalné rozpouštědlo nebo směs rozpouštědel, která se pohybuje chromatografickou kolonou a vymývá analyt. Stacionární fáze je tvořena pevnou porézní hmotou, která se skládá z rigidních porézních částic na bázi oxidu křemičitého (silikagelu), se specifickými povrchovými vlastnostmi.

K dělení složek směsi se využívá mnohonásobného opakovaného vytváření rovnovážných stavů složek mezi těmito dvěma fázemi. Rovnovážné stavy se vytvářejí na základě různých fyzikálně-chemických interakcí mezi složkou a mobilní fází, složkou a stacionární fází a mezi mobilní a stacionární fází. Ve skutečnosti je chromatografie nerovnovážný děj, kdy skutečné rovnováhy nemůže být nikdy dosaženo. Složky vzorku jsou v koloně silněji sorbovány než složky mobilní fáze. Jednotlivé složky jsou eluovány v pořadí podle velikosti interakce se stacionární fází a jsou odděleny čistou mobilní fází.

Pohyb eluentu zajišťuje vysokotlaké čerpadlo. Rozdílné analyty mají rozdílnou afinitu ke stacionární fází a podléhají různé distribuci mezi mobilní a stacionární fází. Různé analyty jsou také v koloně rozdílně zadržovány a zpoždovány.

Kolonou naplněnou sorbentem proudí mobilní fáze. Směs analytu je vnášena na začátek separační kolony spolu s vhodným sorbentem do proudu mobilní fáze. Nejdříve se vytvoří eluční zóna, která obsahuje směs všech složek a ty jsou potom unášeny mobilní fází a postupně dochází k jejich separaci. Na konci opouštějí kolonu v pořadí v jakém jsou v koloně zadržovány. Při průchodu separované složky kolonou přejde každá její molekula mnohokrát z mobilní fáze do fáze stacionární a zpět. V každém okamžiku musí být systém velmi blízko rovnováže, kdy počet sorbovaných molekul se přibližně rovná počtu molekul desorbovaných.

Významná veličina charakterizující separaci je účinnost chromatografické kolony. Účinnost chromatografické kolony představuje schopnost systému oddělit píky dvou separovaných látek tak, aby byla umožněna samostatná eluce každé složky. Míra účinnosti chromatografické kolony je vyjádřena šířkou píku σ , počtem teoretických pater a výškovým ekvivalentem teoretického patra.

Šířka píku identifikuje ostrost píku a tím i efektivitu kolony. Je závislá na délce kolony, průtoku a velikosti částic.

Patro je část chromatografického sloupce umožňující za daných fyzikálních podmínek ustavení rovnováhy mezi množstvím chromatografované látky v obou fázích. Počet teoretických pater n je bezrozměrná veličina. Čím je n větší, tím méně se zóna rozšíří difúzí během průchodu kolonou, a tím je chromatografická kolona účinnější. Počet teoretických pater chromatografické kolony se vypočítá ze vztahu:

$$n = 16 \left[\frac{d_r}{Y} \right]^2$$

nebo:

$$n = 5,545 \left[\frac{d_r}{Y_{h/2}} \right]^2$$

kde n je počet teoretických pater kolony, d_r je vzdálenost na chromatogramu od nástřiku k maximu píku, Y je šířka píku na nulové linii, $Y_{h/2}$ je šířka píku v polovině jeho výšky.

Při uvádění počtu teoretických pater se musí vždy uvádět délka kolony L . Proto se k porovnávání separační účinnosti kolon různých délek používá výškový ekvivalent teoretického patra H . Má rozměr délky a vyjadřuje délku kolony připadající na jedno teoretické patro. Je to tedy délka kolony v níž se dosahuje rovnováhy mezi dvěma fázemi. Pro výškový ekvivalent teoretického patra platí proto vzorec: [16, 17]

$$H = \frac{L}{n}$$

2.4.1. Chromatografie na reverzní fázi

Chromatografie na reverzní fázi využívá nepolární stacionární fázi (C_{18}) a polární mobilní fázi. Nejčastěji používanou mobilní fází je voda, methanol a acetonitril. Stacionární fáze je tvořena řetězci osmnáctiuhlíkových zbytků navázaných na nosič (silikagel). [16]

2.5. Fluorescenční detektor

Je založen na principu fluorescence, což je schopnost 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 a minimální detekovaná koncentrace látky je $10^{-9} - 10^{-15}$ g/ml. [16]

2.6. Derivatizace

Derivatizace v HPLC se používá z několika ryze praktických důvodů:

- zvýšení citlivosti nebo umožnění detekce vůbec,
- zvýšení rozlišení nebo umožnění separace vůbec,
- zamezení nežádoucí sorpce látek na koloně.

Podle místa derivatizace můžeme rozdělit derivatizační techniky na tři kategorie:

- předkolonová derivatizace (pre-column chromatography); chemická reakce probíhá před kolonou,
- postkolonová derivatizace (post-column chromatography); chemická reakce probíhá za kolonou,
- derivatizace na koloně; chemická reakce probíhá přímo v koloně.

Všechny způsoby derivatizace mají vliv na eluční charakteristiky separovaných látek (účinnost separace a dobu analýzy), ale požadavky na deriváty a derivatizační reakce jsou poněkud odlišné.

2.6.1. Požadavky na deriváty předkolonové derivatizace:

1. derivát musí být chemické individuum a měl by být dostatečně stabilní,
2. derivatizační reakce musí probíhat kvantitativně,
3. derivatizační reakce nemusí probíhat rychle,
4. reakce by měla být pokud možno selektivní,
5. reakce by měla být bez vedlejších produktů a měla by probíhat za mírných reakčních podmínek (pH, teplota) tak, aby nebyla nutná předseparace vzniklého individua,
6. při použití nadbytku derivatizačního činidla musí být dobře separovatelné od svých produktů na koloně a pokud možno by mělo mít jiné fyzikálně-chemické vlastnosti (nevykazuje fluorescenční vlastnosti).

Z předešlého výčtu je zřejmé, že předkolonová derivatizace vyžaduje poměrně velkou experimentální náročnost a zkušenost operátora (reprodukovatelnost výsledků).

2.6.2. Požadavky na deriváty postkolonové derivatizace:

1. derivatizační reakce nemusí poskytovat jednoznačné chemické individuum,
2. derivatizační reakce nemusí probíhat kvantitativně, ale rozhodující je dobrá reprodukovatelnost chemické reakce,

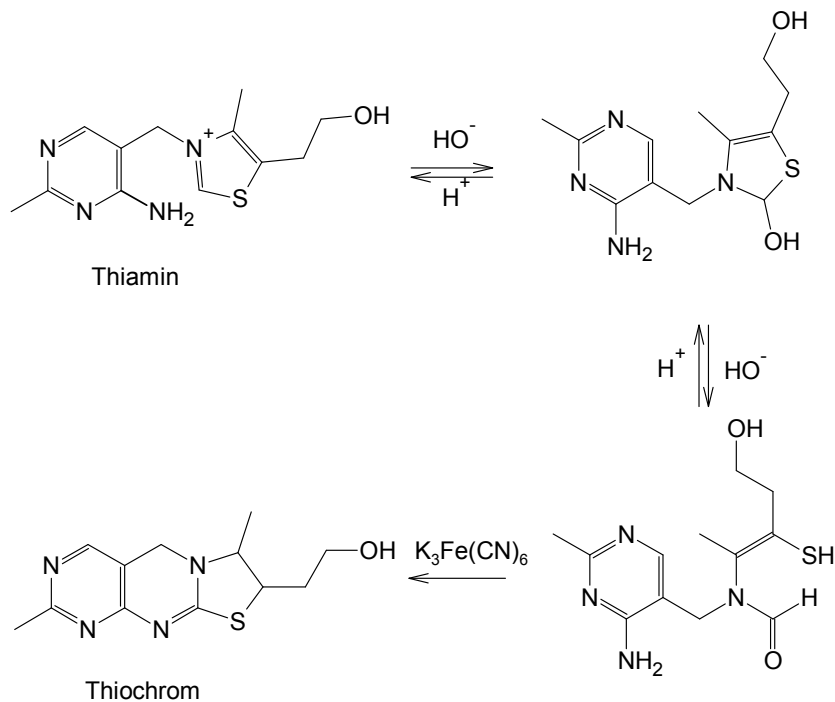
3. derivatizační reakce musí probíhat rychle, reakce může probíhat za extrémních podmínek (pH, teplota),
4. používá se nadbytek reakčního činidla a dochází tak ke zředování mobilní fáze činidlem a dochází ke snížení účinnosti separace vlivem rozmytí chromatografické zóny,
5. reakce může být neselektivní, vedlejší produkty reakce nejsou na závadu,
6. není nutné hledat nové podmínky separace, neboť se vzorek separuje v nezměněné podobě,
7. vysoké náklady na techniku, neboť se musí používat speciální zařízení a reaktory, v nichž je nutno provádět řadu operací, výhodou je automatizace procesu derivatizace,
8. veškeré manuální operace jsou eliminovány.

2.6.3. Deriváty pro fluorimetrickou detekci

Účelem této techniky je zavést do molekuly takovou skupinu, která vykazuje fluorescenční vlastnosti, a umožní tak detekci těchto látek. Tyto deriváty vykazují detekční limit až o tři řády nižší než deriváty detekované v ultrafialové a viditelné oblasti spektra. Pro praktické použití fluoroderivátů by měly platit určité předpoklady:

1. rychlá a kvantitativní reakce za mírných reakčních podmínek (vodně-organická rozpouštědla, laboratorní teplota),
 2. Velká schopnost fluorescence, emise o dostatečné vlnové délce, vyvarování se modravého fluorescenčního pozadí rozpouštědel a adsorbentů, vysoké rozpětí citlivosti na použitém detektoru,
 3. vysoký molární koeficient absorpce, pásy excitace a emise se nesmí překrývat,
 4. nadbytek derivatizačního činidla musí být snadno separován od jeho produktů,
 5. deriváty by měly mít uspokojivé chromatografické vlastnosti a měly by být dostatečně stabilní,
 6. je-li reagent použit k detekci koncových skupin peptidů a proteinů nebo je-li studována vazba určitých skupin, musí být deprivatizace stabilní vůči hydrolýze.
- [5, 6]

2.6.3.1. Derivatizace thiaminu



Obrázek č.2: Derivatizace thiaminu

2.7. Výroba piva

2.7.1. Suroviny

2.7.1.1. Ječmen

Ječmen je hlavní surovina pro výrobu sladu. Pro svoji adaptabilitu a významné pěstitelské přednosti se rychle rozšířil na všechny světadíly.

Na našem území se pro výrobu sladu a sladových výtažků pěstují vybrané odrůdy jarního, dvouřadého, níčího ječmene (*Hordeum distichum* var. *Nutans*). Tyto odrůdy patří k nejkvalitnějším odrůdám na světě.

Obilka ječmene je podlouhlého, vejčitého, na obou koncích zašpičatělého tvaru. Jednotlivé anatomické části zrna mají ze sladařského hlediska svůj specifický význam.

Složení obilky:

- *Endosperm* představuje část obilky, jenž se v průběhu zpracování zrna a následně sladu velmi biochemicky mění. Tyto změny rozhodují o úspěchu výroby sladu a piva. Poměr škrobu k ostatním, především dusíkatým látkám, rozhoduje o moučnatosti ječmene a extraktivnosti sladu.
- *Aleuronová vrstva* je tvořena ze dvou řad hrubostěnných buněk, které obsahují převážně bílkoviny a tuky. Čím více je vrstev aleuronových buněk v obilce, tím je bohatší na bílkoviny. Zde se aktivují na počátku klíčení enzymy a poté se šíří jejich činnost do endospermu.

- *Klíček (zárodek)* dává podněty k tvorbě enzymů potřebných k hydrolýze složitějších zásobních látek důležitých pro klíčení a tvorbu extraktu.
- *Obalové vrstvy* chrání klíček a endosperm před nadměrným vysycháním, mechanickým poškozením a mikrobiálním napadením. Jsou tvořeny pluchou (složena z vysoce rezistentních polymerních sloučenin jako lignin, celulóza, pentosany), oplodím a osemením, které spolu srůstají. Osemení je permeabilní, propouští vodu a čtené ionty, zadržuje však vysokomolekulární látky. Obalové vrstvy ovlivňují přístup kyslíku k zárodku a jsou proto důležitým regulátorem klíčení.

Obilka ječmene obsahuje 80 – 88 % sušiny a 12 – 20 % vody.

1. Sušinu tvoří organické látky dusíkaté, bezdusíkaté a látky minerální. Z nich nejdůležitějšími složkami pro pivovarnicko-sladařské účely jsou sacharidy, které přejdou do rozpustné a zkvasitelné formy, dusíkaté látky, polyfenolové látky, enzymy (amylolytické, proteolytické, cytolytické, fosfatasy) a minerální látky.
2. Obsah vody u dobře skladovaného zrna se pohybuje v rozmezí od 12 do 14 % a nesmí klesnout pod 10 %, kdy dochází k porušení enzymatické rovnováhy a ke snížení klíčivosti.

2.7.1.1.1. Hodnocení jakosti ječmene

Jakost sladovnického ječmene se posuzuje podle ČSN 46 1100-5 „Ječmen sladovnický“. Za sladovnický ječmen se považují odrůdy ječmene setého dvouřadého:

- z domácí produkce zapsané ve "Státní odrůdové knize" mezi odrůdy označené jako vhodné pro výrobu pivovarského sladu
- z dovozu, pokud svou jakostí odpovídají odrůdám ječmenů z domácí produkce zapsaných do "Státní odrůdové knihy".

Kvalita sladovnického ječmene je posuzována:

Subjektivními zkouškami

- Barva zrna – slámově žlutá, nežádoucí zbarvení svědčí o nižší kvalitě, ovlivňuje vzhled sladu.
- Biologické poškození – zrna s hnědě zbarvenou částí pluchy v okolí špičky, ukazatel výskytu plísní.
- Jemnost pluchy – jemná až velmi jemná, podíl pluchy z hmotnosti zrna tvoří 7 – 9 %.
- Lesk a vůně – přirozený lesk a vůně.
- Porostlost ječmene – zrna s viditelným kořínkem nebo klíčkem, se zřejmými známkami růstu.

Objektivními zkouškami

- Podíl předního zrna (vyrovnanost) – podíl zrna nad sítem 2,5 mm, optimum 90 %. Stanovuje se proséváním ječmene na sítích s otvory o velikosti 2,5 x 22 mm a 2,2 x 22 mm. Hmotnostní podíl na síti 2,5 mm se označuje jako přední zrno, propad pod sítem 2,2 mm jako odpad.
- Celkový odpad – zahrnuje propad pod sítem 2,2 mm a zlomky, příměsi a nečistoty v podílu nad síty 2,2 a 2,5 mm. Poškozená zrna – zrna bez pluch, mechanicky poškozená, zapařená, poškozená sušením. Neodstranitelné příměsi - zrna ostatních obilovin. Zelená zrna – nedozrálá zrna z pozdě vytvořených odnoží.

- Objemová hmotnost – poměr hmotnosti zrna k objemu (600 - 720 g/l).
- Hmotnost tisíce semen – silný vliv ročníku a odrůdy, u předního zrna by neměla klesnout pod 40 g.
- Moučnatost – charakter endospermu (moučnatý, polosklovitý, sklovitý)
- Vlhkost – optimální hodnoty 12 – 14 %.
- Klíčivost a energie klíčení – rozhodující ukazatel kvality, nízká klíčivost negativně ovlivňuje všechny ostatní kvalitativní parametry sladu. Energie klíčení se stanovuje jako procentický podíl vyklíčených obilek za 72 hodin.
- Obsah škrobu v sušině – by se měl pohybovat mezi 63 – 64 %, pozitivně koreluje s extraktivností sladu.
- Obsah dusíkatých látek – obsah dusíku přepočítaný koeficientem 6,25. Optimální hodnota 10,8 %; neměl by překročit 11,5 %. Výrazný vliv ročníku a agrotechniky. [7]

Tabulka č.5: Hodnoty jakostních ukazatelů ječmene sladovnického (ČSN 46 1100-5)

Jakostní ukazatele	Základní jakost (%)	Závazná jakost (%)
Vlhkost	15,0	nejvýše 16,0
Podíl zrna nad sítím 2,5x2,2 mm	90,0	nejméně 70,0
Zrna poškozená	2,0	nejvýše 5,0
Zrna se zahnědlými špičkami	2,0	nejvýše 6,0
Zrna porostlá	0,0	nejvýše 0,5
Celkový odpad, z toho:	3,0	nejvýše 7,0
neodstranitelná příměs	-	nejvýše 1,0
zelená zrna	-	nejvýše 1,0
Klíčivost	98,0	nejméně 92,0
Obsah N-látek (N x 6,25)	11,0	nejvýše 12,5
Barva zrna	světle žlutá	žlutá, i méně vyrovnaná
Plucha	jemně vrásčitá	i méně jemně vrásčitá

Do odrůdové skladby Soufflet Agro, a. s., pro sklizeň sladovnického ječmene 2008 budou patřit odrůdy Jersey, Prestige, Sebastian, Xanadu, Tolar, Malz, Bojos, Kangoo, Publican a ozimá Mascara, přičemž novinky Kangoo a Publican budou při nákupu pro Soufflet Agro, a. s., od roku 2008 preferovanými odrůdami. [8]

2.7.1.2. Voda

Má podstatný vliv na charakter a jakost piva. Používaná voda musí mít stálé fyzikální, chemické a mikrobiologické vlastnosti. Musí být čirá, bezbarvá, bez rušivých příchutí a pachů a hlavně zdravotně nezávadná.

2.7.2.3. Chmel a chmelové výrobky

Chmel je představován usušenými chmelovými hlávkami rostlin chmele evropského (*Humulus lupulus* var. *Europeus*). Poskytuje pivu typickou hořkou chuť, přispívá k tvorbě charakteristického aroma a má další technologicky důležité vlastnosti.

Chmelové hlávky, které se sklízají pro pivovarnické účely, se skládají ze stopky, vřeténka, pravých a krycích listenů a při oplození obsahují navíc semeno neboli pecku. Na vnitřní straně listenů se při zrání chmele vylučují pryskyřičná zrnka lupulinu, obsahující chmelové pryskyřice, polyfenoly a silice.

Odrůdy chmele se podle složení dělí na jemně aromatické, aromatické, hořké a vysokoobsažné, podle zbarvení chmelové révy na červeňáky a zeleňáky.

Chemické složení chmele je závislé na odrůdě, provenienci, ročníku a posklizňové úpravě. Chmel tvoří průměrně 10 % vody a 90 % sušiny. Obsahuje pryskyřice, polyfenoly, silice, vosky, lipidy, dusíkaté látky, sacharidové složky a minerální látky. K pivovarsky cenným složkám patří zejména pryskyřice, polyfenoly a silice. Chmelové pryskyřice jsou původcem hořké chuti piva, polyfenoly se uplatňují v průběhu technologie při srážení vysokomolekulárních bílkovin a silice vytvářejí chmelové aroma.

2.7.2. Výroba sladu

Cílem sladování je řízeným klíčením zajistit aktivaci a syntézu nových enzymů, jejichž katalytického působení se později využívá k přeměně rezervních látek zrna. Nedostatečná tvorba, ale i nadbytek enzymů je nežádoucí, neboť snižuje výtěžek a jakost sladu.

Výrobu sladu lze rozdělit na:

- 1) nákup, příjem, čištění, třídění a skladování ječmene
- 2) máčení ječmene
- 3) klíčení ječmene
- 4) hvozďení zeleného sladu
- 5) úprava hotového výrobku, jeho skladování a expedice

2.7.2.1. Nákup, příjem, čištění, třídění a skladování ječmene

Sladovnický ječmen je posuzován na základě několika ukazatelů: vlhkost, podíl zrna nad sítem 2,5 mm, poškození zrna, počet zrn se zahnědlými špičkami, porostlost, celkový odpad (z toho neodstranitelné příměsi), klíčivost, N-látky v sušině. Ječmen musí být zdravý, vyzrálý, bez škůdců a cizích pachů, bez naplesnivělé pluchy.

Před uskladněním se musí zrno zbavit příměsí a nečistot, vytřídit se podle velikosti. K čištění dochází v čistírně a to na základě velikostí (síta), spec. hmotnosti (aspirátory), tvaru a délky (triéry). Železné příměsi se odstraňují na elektromagnetech nebo permanentních magnetech, jenž se zařazují nejčastěji za aspirátér. Zrno se třídí pomocí sít. Podle podílu nad sítem 2,5 mm (I.třída) a podílem nad sítem 2,2 mm (II. třída). Propad pod sítem 2,2 mm tvoří zadinu, která se nesladuje a používá se ke krmení. Účinnost třídícího zařízení musí být 96 %.

K zajištění životaschopnosti a minimálních ztrát dýcháním je třeba skladovat zrno s nízkým obsahem vody (14 – 15 %). Jinak dochází k poklesu klíčivosti a klíčivé energie.

Sušení může probíhat pomocí aktivního větrání nebo termicky. Po vysušení se zrno zchladí, dočistí a vytřídí. Během skladování se provádí kontroly teploty a výskytu skladištních škůdců.

2.7.2.2. Máčení ječmene

Cílem máčení je zvýšit obsah vody v zrně na 42 – 48 % , aby se zabezpečil optimální průběh klíčení a enzymových reakcí. Máčení zrna se provádí v kónických náduvnících (z legované oceli se spádovým kónusem dna 45 °, aby ječmen mohl samovolně vytékat ven) a při konstantní teplotě.

Suché zrně přijímá zpočátku vodu rychle (asi do 40 %), pak příjem vody klesá. Příjem vody ječmenem je závislý na době máčení, teplotě vody (rozhodující vliv na rychlost příjmu vody), době odležení ječmene, pohybu zrna ve vodě, velikosti zrna (jen velikostně stejné obilky mají předpoklad ke stejně rychlému příjmu vody), moučnatosti zrna (zrna moučnatá přijímají vodu rychleji, stejně jako ječmen s nižším obsahem bílkovin), odrůdě ječmene a také ročníku.

Nezbytné je zajistit dostatečné množství kyslíku pro dýchání zrna, jinak dochází ke snížení extraktivnosti sladu, slad má větší počet nevyklíčených obilek, nedostatečně rozluštěné bílkoviny a následkem toho dochází u piva ke koloidním zákalům. Pokud není ječmen provětráván a není zaručen přívod kyslíku, dochází k intramolekulárnímu dýchání (vznikající etanol je pro embryo toxický), které v extrémních případech může vést až k poškození nebo umrtvení embrya zrna. Přemočená zrna mají přebytek vody, nedostatek kyslíku, růst obilek je nestejněměrný, snižuje se obsah extraktu, rozluštění bílkovin je nedokonalé, v pivu vznikají nebiologické zákaly. Jelikož na stupni domočení závisí přímo činnost enzymů, musí se před zahájením kampaně u každého ročníku pokusně zjistit optimální máčecí technika a stupeň domočení zrna, který se pak musí v provozu dodržovat.

Spotřeba vody při máčení je rozdílná, protože závisí na postupu máčení, typu a zařízení máčírny.

Dobrá spotřeba vody je asi 6 m³/t, nejmenší spotřeba je u sprchového máčení. Při používání pračky ječmene lze snížit spotřebu vody až na 3-4 m³/t. Celkové ztráty při máčení by neměly být větší jak 3 % z hmotnosti namáčeného ječmene.

2.7.2.3. Klíčení ječmene

Účelem klíčení je aktivace enzymatického potenciálu, syntézy nových enzymů a dosažení požadovaného stupně rozluštění zrna podle typu vyráběného sladu. Vyšší než optimální aktivita není žádoucí, jelikož by došlo ke snížení extraktu v pivu.

Klíčení začíná cytolysou, která ovlivňuje jakost šrotu, zcukření mladiny a výstřelků i proces kvašení, působí na rychlost a čírost zcezení, snižuje strhávání lipidů, ovlivňujících stabilitu pěny i chuť piva.

K rozluštění zrna dochází v blízkosti zárodka a pokračuje k vrcholu obilky. Stupeň rozluštění zrn se posuzuje podle délky střelky, moučnatosti, objemové hmotnosti a extraktivního rozdílu moučka - šrot. Délka střelky má být u plzeňského sladu od 2/3 do 3/4 délky zrna, u tmavého sladu od 3/4 až do celé délky zrna. Délka střelky je ve vztahu k postupu a hloubce látkových přeměn uvnitř zrna. Střelka nesmí přerůst délku zrna, když přeroste, je pro sladaře nežádoucí, neboť se snižuje výtěžnost sladování.

Při klíčení a sladování dochází k aktivaci:

- *amylasy* – α -amylasa a β -amylasa – hydrolyzují škrob při procesu rmutování. V zrně je přítomna β -amylasa, ale α -amylasa vzniká teprve při klíčení za přítomnosti kyslíku.

Množství vzniklých amylas při klíčení je závislé na mnoha faktorech:

1. obsah amylas je odrůdovou závislostí, je ovlivněn i klimatickými podmínkami ročníku,
 2. vyšší obsah vody v zeleném sladu zvyšuje množství amylas,
 3. studené vedení klíčení dává vždy vyšší hodnoty amylas. Vyšší teploty při máčení a klíčení jsou příznivé pro činnost enzymů, ale celkové vzniklé množství enzymů je menší.
- *cytolytické enzymy* (štěpící buněčné stěny) – především β -glukanasa a cytasa,
 - *proteolytické enzymy* – *proteasy* – štěpí nativní bílkoviny. K nejintenzivnějšímu štěpení bílkovin dochází při rmutování, ale také je důležitá hluboká proteolýza při sladování, jelikož obě tyto proteolýzy mají jiný průběh a charakter.
 - *fosfatasy* – enzymy uvolňující kyselinu fosforečnou, anorganické fosfáty a estery, čímž se zvyšuje acidita a ústojná schopnost zrna.

Na rozluštění bílkovin má vliv odrůda, ročník, velikost obilky, sklizňová zralost, stupeň domočení, větrání při máčení. Stupeň rozluštění bílkovin se projeví na pěnivosti piva. Slady přelouštěné, slady krátké (nedoluštěné) snižují pěnivost i chlebnatost, zhoršují chuť a koloidní stabilitu piva. Hluboké rozluštění bílkovin je příčinou prázdné chuti.

Obsah tuku klesá při máčení a klíčení. Enzymové štěpení tuku závisí na odrůdě a podmínkách skladování.

Při klíčení jsou nejprve spotřebovávány nízkomolekulární látky na dýchání a syntézu. Později získává zrno energii prodýcháváním rezervních látek (škrob, bílkoviny, tuk). Dýchání je tedy k aktivaci enzymů nezbytnou nutností. Klíčení se musí vést tak, aby se vyrobil zdravý, vyrovnaný, optimálně rozluštěný slad za minimálních ztrát především škrobu. Používá se pomalý postup klíčení a pozvolné stoupaní teploty.

Při klíčení dochází k hydrolýze neškrobových polysacharidů (hemicelulosa, gumovitě látky, pentosany), dusíkatých látek a škrobu.

Při klíčení rozlišujeme následující stádia máčení:

- a) mokrá hromada – ječmen vymočený na humna nebo do klíčidel
- b) suchá, oschlá hromada – stadium do 24 hodin po vymočení, objevuje se první hlavní zárodečný kořínek, hromada vyžaduje přísuv vzduchu, ječmen špicuje.
- c) pukavka – hromada vyžaduje dostatek vzduchu, objevují se další koříny a pokračuje jejich růst, hromada intenzivně dýchá a má výraznou vůni okurek, postupně přechází do stadia vidličkování a mladíku - mladá hromada.
- d) mladík – nejdůležitější fáze klíčení, zrno intenzivně dýchá, intenzivně probíhají enzymatické přeměny, je-li v hromadě nedostatek oxidu uhličitého nadměrně se zvyšují ztráty dýcháním zrna a růstem kořínků.
- e) vyrovnaná hromada – délka kořínků a střílky se vyrovnává, dýchání se zpomaluje, hromada stárne.
- f) stará hromada – intenzita dýchání klíčících zrn nadále klesá a je patrné postupné zavádání kořínků.

Hromada se cíleně kypří tak, aby v ní zůstala určitá koncentrace oxidu uhličitého, který tlumí intenzitu dýchání a tím růst vegetativních orgánů. V tomto stadiu už nesmí být zelený

slad dokrápěn. Závěr klíčení má výrazný vliv na tzv. prodýchání extraktu a na sladovací ztráty. Hromada postupně čím dál více zavadá a fáze klíčení je ukončena nastíráním zeleného sladu na hvozdu.

Sladovací zařízení lze rozdělit na klasická a pneumatická. Do klasických sladoven se řadí humna. Systémy pneumatické se rozdělují na bubnové, skříňové a věže (posuvné hromady, Saladinovy skříňe, kombinovaná sladovadla, Gallandovy bubny, Poppovy bubny).

2.7.2.4. Hvozdnění zeleného sladu

Cílem hvozdnění je zastavit klíčení, snížit obsah vody, redukovat část enzymové aktivity, vytvořit chuťové, barevné a oxidoredukční vlastnosti charakteristické pro jednotlivé typy sladu. Při hvozdnění probíhají ve sladu hluboké fyzikální a chemické změny, které závisí na tom, při jakých teplotách, při jakém obsahu vody a jakou rychlostí dochází k odsoušení vody (fáze předsoušení sladu na 10 – 12 %, fáze zvyšování teplot a dotahování sladu – odsoušení vázané vlhkosti). Na biochemické a chemické pochody při hvozdnění má rozhodující vliv teplota a obsah vody. Nižší počáteční teploty a vyšší obsah vody podporují enzymovou hydrolýzu. Technologicky důležité štěpení bílkovin a škrobu nastává při teplotách 40 – 60 °C. Produkty štěpení bílkovin jsou aminokyseliny, z nichž se při dotahovacích teplotách tvoří barevné a aromatické látky (melanoidiny). Teploty nad 70 °C poškozují enzymy tím více, čím je vyšší obsah vody. Tyto změny probíhají v závislosti od typu vyráběného sladu a postupu při hvozdnění. Proces hvozdnění se provádí na hvozdech a lze ho rozdělit z hlediska chemických a biochemických změn na tři fáze:

- 1) *Růstová fáze* – snižuje se obsah vody na 20 %, teplota se pohybuje do 40 °C, zrno je schopné ještě klíčit. Stoupá obsah rozpustného dusíku a nízkomolekulárních produktů štěpení škrobu.
- 2) *Enzymatická fáze* – klesá obsah vody pod 20 %, teplota se pohybuje od 40 do 60 °C, zastavuje se růst kořínků a střílky, ale v zrně pokračují dále enzymatické reakce, především amylolytické, proteolytické a v menší míře i cytolytické.
- 3) *Chemická fáze* – klesá obsah vody pod 10 %, teplota se pohybuje nad 60 °C a zastavují se enzymové reakce, tvoří se aromatické a barevné látky (dusíkaté melanoidy i bezdusíkaté melaniny). Podle vyráběného typu nabývá slad charakteristické barvy, vůně a chuti v závislosti na obsahu vody a době, po kterou vysoká teplota působí. Při hvozdnění se částečně inaktivují enzymy teprve při zahřátí na dotahovací teplotu.

U nás se používají nejčastěji hvozdy dvoulískové, které vyhovují výrobě plzeňských sladů. Slady českého typu se zpravidla hvozdní dvakrát 12 hodin a jejich řádné dotažení ovlivňuje jakost. Během dotahování dochází ke koagulaci srazitelných bílkovin. Možná je též technologie dvakrát 24 hodin, tento způsob hvozdnění není typický pro slady plzeňského typu, byl však v našich sladovnách dříve rozšířen pro nesporné ekonomické přednosti (úspora tepelné energie a zjednodušení práce).

Hvozdnění světlého sladu na jednolískovém hvozdně, technologie jedenkrát 24 hodin, musí proběhnout všechny hlavní technologicky významné fáze hvozdnění sladu plzeňského typu jako na dvoulískovém hvozdně.

Slad se suší nepřímým ohřevem.

2.7.2.5. Úprava hotového výrobku, jeho skladování a expedice

Po hvozdnění se slad odkličuje (slad se zbaví kořínků, poškozených zrn a prachu) a leští (zbavení zbytků prachu, nečistot a oloupaných pluch). Jejich jakost se vyrovná odležením. Čerstvě odhvozdněný slad musí být dobře odklíčený, studený a suchý. Uskladňuje se na sladové půdy nebo do sil, kde se nechává 4 – 6 týdnů odležet – dozrát. Přitom se mírně zvýší vlhkost sladu, dochází ke zvláchnění pluchy a fyzikálněchemickým změnám v endospermu, které pak usnadňují zpracování v pivovaře. Neodleželý slad způsobuje při zpracování v pivovaře potíže při zcezdování, kvašení, může snižovat pěnivost piva, způsobovat zákaly a snižovat varní výtěžky. Během odležení se regeneruje koloidně-chemická rovnováha sladu narušená hvozdněním a oslabené enzymy se opět aktivují. Projeví se to nepatrným doluštěním sladu. Nejdůležitější změnou je enzymové štěpení bílkovin. Odležením se stává slad křehčí, lépe se zpracovává a celkově se zlepšují jeho vlastnosti. Slad se může dopravovat pouze v krytých a k tomu účelu určených dopravních prostředcích.

2.7.2.5.1. Druhy vyráběného sladu

Podle způsobu výroby a vlastnosti finálního výrobku se vyrábějí následující typy sladu:

- a) *slad český (plzeňský)* se vyrábí z nejkvalitnějších ječmenů s nízkým nebo středním obsahem bílkovin (do 11,2 %). Pro výrobu je charakteristické kratší máčení zrna. Slad českého typu se používá k výrobě piva se středním obsahem alkoholu, méně chlebnatých, s nižším obsahem extraktu. Pro snadné zpracování ve varně je nutné dokonalé zcukření rmutu, snadné zcezdování sladiny a nízká barva sladiny po povaření. Obsah vody v hotovém sladu okolo 4 %.
- b) *slad bavorský (mnichovský)* se vyrábí z ječmenů bohatších na bílkoviny (12 % i více). Ječmen pro výrobu bavorského sladu je klíčen (luštěn) o 1– 2 dny déle s vyšším obsahem vody a při vyšší teplotě. Zelený slad je přelouštěn. Je odlišně hvozdněn, s cílem ještě podpořit tvorbu melanoidů a je dotahován při teplotách okolo 105 °C. Obsah vody je okolo 2 %. Slad se používá k výrobě piva s vysokou barvou, výraznějším aromatem a nižším obsahem alkoholu.

Oba hlavní typy sladu, tj. plzeňský a bavorský, se liší nejen fyzikálními a chemickými vlastnostmi, ale i obsahem enzymů.

c) *slad speciální*

Mezi speciální slady se počítají slady diastatické, karamelové, barvicí a pšeničné.

1. **Diastatický slad**

K výrobě sladu se používá většinou ječmen s vyšším obsahem bílkovin a po třídění na síti 2,2 mm. Ječmen se sladuje s vyšším obsahem vody, 46 – 48 % při nízkých teplotách do 14 °C a při delším vedení hromady 6 – 8 dní. Slad se hvozdní při nízkých teplotách za maximálního tahu hvozdu. Dotahovací teplota u diastatického sladu nepřesáhne 65 °C, vlhkost sladu se pohybuje okolo 6 %. Ječmen s vyšším obsahem bílkovin dává předpoklady vyššího obsahu enzymů a tento efekt se ještě navyšuje používáním ječmene s nižší absolutní hmotností zrna. Tak se dosáhne toho, že na jednotku hmotnosti ječmene je více obilek, které při sladování s vyšším obsahem vody a déle klíčené poskytnou zelený slad

s vysokou diastatickou mohutností. Šetrným přesoušením a nedotažením sladu se ochrání amylolytická síla sladu. Diastatický slad je charakteristický vysokou diastatickou mohutností, alespoň 350 j.Wk.

2. Karamelový slad

Slady karamelové, které podle barvy rozdělujeme na světlý, polotmavý a tmavý karamel, se praží ve speciálním pražiči. Princip výroby spočívá v tom, že zelený slad nebo navlhčený již odklíčený světlý slad se nejprve nechá v bubnu pražiče dokonale zcukřit. Zcukření v obilce se dosáhne tím, že vsádka se zapaří na 70 °C a uzavřou se odtahy páry. Asi po 60 min, za stálého otáčení bubnu pražiče slad dokonale zcukří, otevřou se odtahy páry a zcukřený slad se zvolna vyhřeje na karamelizační teplotu. Pro světlý karamel je teplota asi 120 – 130 °C, pro polotmavý asi 160 °C a tmavý karamel asi 180 °C. Po vizuálním posouzení barvy se zkaramelizovaný slad vysype na síto, kde se za stálého míchání a provětrávání vzduchem zchladí. Karamelový slad je charakteristický vysokým obsahem cukrů, aromatických a barevných sloučenin. Slad je enzymaticky inaktivní, extraktivnost se pohybuje mezi 60-70 %. Vlhkost sladu okolo 2 %. Používá se při výrobě tmavých a speciálních piv.

3. Barvicí slad

Barvicí slad se vyrábí tak, že hotový odklíčený slad se vyhřeje v pražiči až na 220 °C a po zuhelnatění zrna se slad intenzivně a rychle zchladí na síť, neboť je zde značné riziko samovznícení. Stupeň vybarvení sladu je úměrný době pražení při 220 °C. Provoz pražírny musí být klimatizován a odsáván. Úlety jsou silně aromatické, ohrožují životní prostředí a proto musí být pražič opatřen vlastním zařízením na spalování úletů a prachu. Teprve po dodatečném spálení úletů a prachu je možné odvést směs spalin, vzduchu a odsávaného vzduchu z pražírny do komína. Barvicí slad - se používá při výrobě tmavých piv. Slad je enzymaticky inaktivní a extraktivnost se pohybuje mezi 60-70 %.

4. Pšeničný slad

Pšeničný slad se používá při výrobě speciálních piv (tzv. bílých piv) nebo v pekárenství. Sladování pšenice má své odlišnosti pro snadný příjem vody do zrna, zrno je bezpluché. Sladuje se při nižším stupni domočení do 43 %. Zrno snadněji vysychá a míra rozluštění je posuzována obtížně, neboť zrno má silně škrobnatý vzhled. Zelený slad je méně kyprý a proto zejména předsušení a hvozdnění pšeničného sladu musí být velmi šetrné, neboť slad se obtížně suší. Dotahovací teplota nesmí být vyšší než 75 °C, po dobu 3 hodin. Vlhkost sladu je okolo 5 %. [15]

Celková výroba speciálních sladů činí asi 5 % z celkové výroby sladu v Česku.

Český slad



- **nejužívanější druh sladu**
- *základní surovina*: jarní sladovnický ječmen
- *charakteristika*: dodává pivu sladové aroma a zlatavou barvu
- *použití*: základní surovina pro výrobu všech druhů piv (kromě pšeničných)

Slad mnichovský



- *základní surovina:* jarní sladovnický ječmen
- *charakteristika:* zvyšuje barvu a zvýrazňuje sladové aroma piva
- *použití:* při výrobě tmavých piv.

Slad typu "Karapils"



- *základní surovina:* jarní sladovnický ječmen
- *charakteristika:* dodává pivu plnost při zachování světlé barvy, příznivě ovlivňuje konzistenci pěny a stabilitu piva
- *použití:* při výrobě nealkoholických světlých piv

Slad karamelový



- *základní surovina:* jarní sladovnický ječmen
- *charakteristika:* příznivě působí na stabilitu piva, předává pivu měděnou barvu a jemné sladové aroma
- *použití:* při výrobě tmavých piv mnichovského typu dále pak v pekárenství, cukrárenství i při výrobě limonád

Slad karamelový tmavý



- *základní surovina:* jarní sladovnický ječmen
- *charakteristika:* zlepšuje stabilitu piva, předává pivu tmavě rubínovou barvu a výraznou karamelovou chuť
- *použití:* při výrobě tmavých piv mnichovského typu dále pak v pekárenství, cukrárenství i při výrobě limonád

Slad čokoládový



- *základní surovina:* český slad
- *charakteristika:* zlepšuje stabilitu piva, dává pivu tmavou barvu při zachování lehce pražené chuti
- *použití:* při výrobě tmavých a polotmavých piv mnichovského typu dále pak v pekárenství, cukrárenství

Slad barevný



- *základní surovina:* český slad
- *charakteristika:* předává pivu tmavou až černou barvu a výrazně pražené aroma
- *použití:* při výrobě tmavých piv mnichovské typu a v pekárenství

Slad pšeničný – pivovarský



- *základní surovina:* vybrané odrůdy pšenice vhodné pro pivovarské účely
- *charakteristika:* povzbuzuje činnost kvasinek, zvyšuje čírost piva a stabilitu pěny
- *použití:* na výrobu pšeničných piv, přidává se při výrobě ječmenných ležáckých i svrchně kvašených piv

Slad pšeničný - pekařský diastatický



- *základní surovina:* potravinářská pšenice
- *charakteristika:* díky nepřítomnosti pluchy je lépe použitelný pro pekařské účely
- *použití:* v pekárenství i cukrárenství

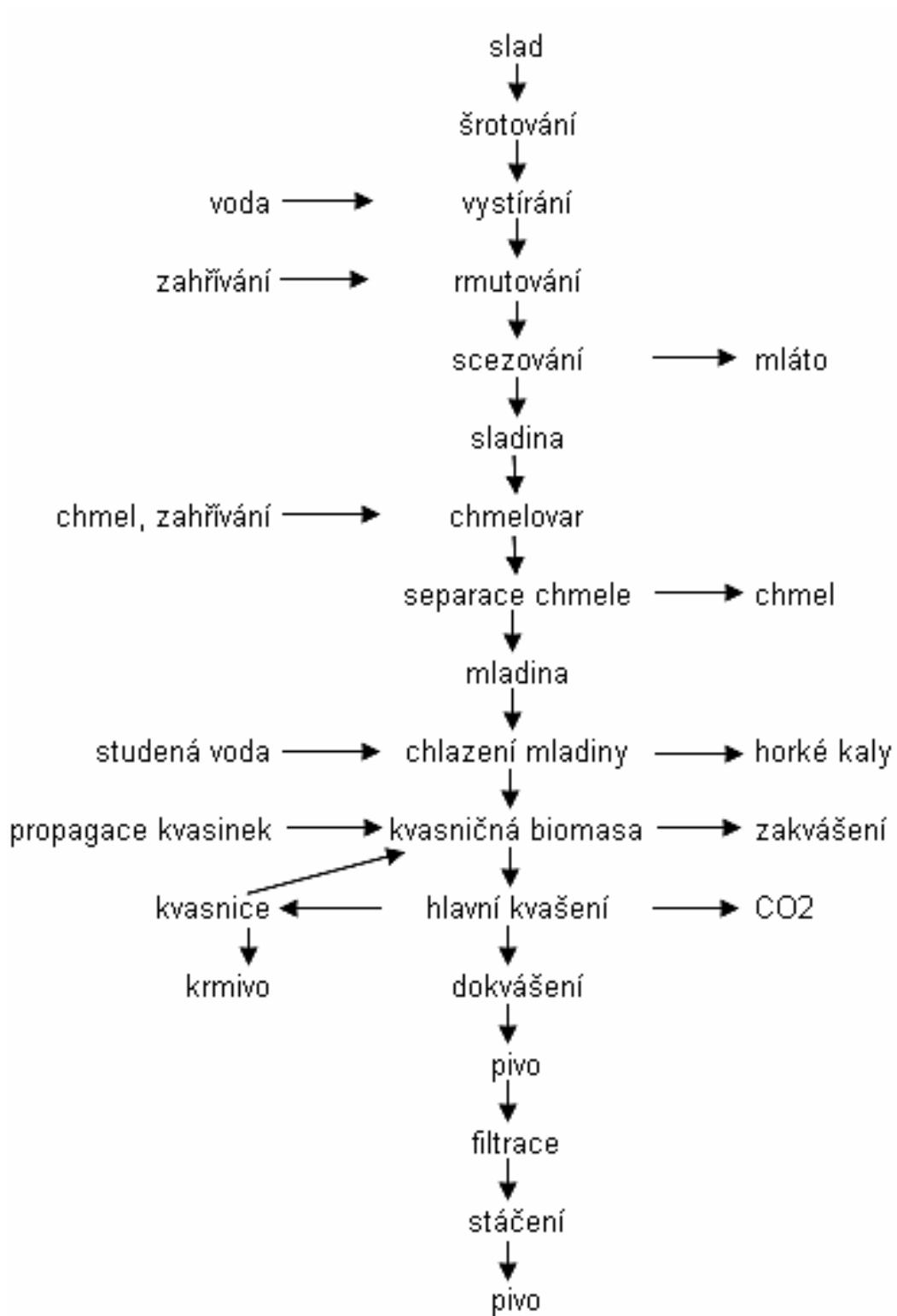
Slad karamelový pšeničný



- *základní surovina:* potravinářská pšenice
- *charakteristika:* obdobná jako u ječmenného karamelového sladu výhodou je nepřítomnost pluchy
- *použití:* při výrobě tmavých pšeničných piv

Tento typ sladu je výrobní novinkou a v České republice se dosud nevyráběl. Jeho uplatnění se předpokládá zejména v pekárenské a cukrárenské výrobě.[10]

Schéma výroby piva



Technologický postup výroby piva lze rozdělit do dvou hlavních výrobních fází:

- 1) Výroba mladiny
 - a) Čištění a šrotování sladu
 - b) Vystírání a rmutování
 - c) Scezování a vyslazování mláta
 - d) Vaření sladiny s chmelem - chmelovar
 - e) Filtrace a chlazení mladiny
- 2) Výroba piva
 - a) Hlavní kvašení mladiny
 - b) Dokvašování a zrání
 - c) Filtrace, stabilizace, stáčení a expedice piva

Cílem přípravy mladiny je převést v optimálním množství extraktivní látky ze sladu a chmele do roztoku, zajistit dostatek živin pro kvasinky a požadovanou hořkost finálního výrobku. Nejdůležitějším procesem je štěpení škrobu a bílkovin, které navazují na hydrolytické pochody při sladování.

2.7.3. Čištění a šrotování sladu

Čištěním sladu se odstraňuje organický prach, který vzniká při dopravě a manipulaci. Provádí se na aspirátorech. Šrotováním dochází k rozdrčení endospermu sladu na optimální podíl jemných a hrubších částic při zachování celistvosti obalů důležitých při scezování sladiny. Na kvalitě šrotu závisí průběh varného procesu, výtěžek extraktu, kvalita mladiny a piva.

2.7.4. Vystírání a rmutování

Cílem vystírání je dokonalé smíchání sladového šrotu s nálevem vody a rmutování má zajistit optimální rozštěpení a převedení extraktu do roztoku. Působí při něm děje mechanické, fyzikální, chemické, biochemické a především enzymové. Prioritní je činnost amylolytických, proteolytických a kyselinotvorných enzymů a pouze druhotný význam má biokatalytické štěpení hemicelulos a gumovitých látek.

Způsob rmutování se volí takový, aby produkty štěpení škrobu a bílkovin, tvořící hlavní podíl extraktu, vyhovovaly kvalitativnímu složení charakteru finálního výrobku. Sleduje se zároveň maximální výtěžek extraktu.

2.7.5. Scezování a vyslazování mláta

Cílem scezování je oddělit sladinku od nerozpustných zbytků, kdežto účelem vyslazování je získat z mláta v optimální míře zbylý extrakt. Jedná se výlučně o fyzikální procesy. Scezování a vyslazování mláta se provádí ve scezovací kádi.

2.7.6. Výroba mladiny – chmelovar

Cílem chmelovaru je sterilizace a zahuštění mladiny na optimální hodnotu, koagulace vysokomolekulárních látek a přechod hořkých látek z chmele do roztoku. Provádí se

v mladinkovém kotli za varu po dobu 90 – 100 min. Probíhají zde fyzikální změny a chemické reakce většinou na sobě vzájemně závislé. Uplatňuje se vliv doby a intenzity varu, pohybu a odparu, pH a přítomných tříslovin. Dochází zde ke koagulaci bílkovin, k rozpouštění a k chemickým změnám hořkých látek, vznikají barevné a redukující látky. Sterilizace a inaktivace enzymů varem má zásadní význam pro další zpracování mladiny kvašením. Sterilizace je nutnou podmínkou čistoty hlavního kvašení i dokvašování a biologické stability piva.

2.7.7. Chlazení a filtrace mladiny

Účelem chlazení je vysrážet z mladiny hrubé i jemné kaly, mladinu provzdušnit a zchladit na zákvasnou teplotu 4 – 7 °C, čímž se poněkud změní její chemické složení. Oxidace chmelových pryskyřic, tříslovin a v menší míře také bílkovin nastává působením kyslíku při teplotě kolem 80 °C a podporuje vylučování kalů. Nejprve se vylučuje hrubý a pak jemný kal. Často se ještě zchlazená mladina filtruje a odstřeďuje, aby jemný kal negativně neovlivňoval kvašení a nesnižoval odolnost piva proti zákalům při nízkých teplotách. Chlazení mladiny se provádí na stokách a dochlazuje se na sprchových chladičích nebo modernější metodou je chlazení a oddělování kalů ve vířivých kádích.

Takto připravená mladina obsahuje především sacharidy s převahou maltosy, dusíkaté látky, růstové látky (vitamíny), které katalyzují životní funkce kvasinek.

2.7.8. Hlavní kvašení

Cílem hlavního kvašení je neúplné prokvašení cukrů za tvorby etylalkoholu, CO₂ a vedlejších produktů.

Klasické stacionární kvašení probíhá v kvasných nádobách ve spilce. Chlazení spilek se zajišťuje soustavou trubek s chladícím médiem nebo vháněním zchlazeného vzduchu. Odvádí se CO₂. Mladina se zakvašuje kvasinkami spodního kvašení, *Saccharomyces uvarum*, jenž tvoří velmi chudou pěnu. Během kvašení, zejména po prokvašení cukru, sedimentují kvasinky velmi snadno ke dnu, médium se lehce vyčeříje.

Obsah dusíkatých látek při kvašení mladiny vždy klesá. Úbytek nastává asimilací aminokyselin a nízkomolekulárních štěpných produktů bílkovin kvasinkami, koagulací vysokomolekulárních frakcí, vyvolané poklesem pH a vznikem alkoholu. Na druhé straně vylučují kvasnice při kvašení dusíkaté látky do prostředí, takže obsah rozpustného dusíku klesá při kvašení asi o 1/3. Hlavní kvašení probíhá za nízkých teplot a výsledkem je mladé pivo.

Hlavními produkty jsou ethanol a CO₂. Další vzniklé metabolity mají vliv na chuťový charakter piva a jsou to alkoholy, estery, organické kyseliny, aldehydy, sirné sloučeniny, diacetyl.

2.7.9. Dokvašování a zrání piva

Dokvašování představuje pomalé dokvašování zbylých sacharidů při nízkých teplotách, optimální nasycení a fixace CO₂ při současném zabezpečení vyčeření a organoleptické vyzrálости finálního výrobku. Z hlediska jakosti je důležité, aby dokvašování probíhalo zvolna,

dostatečně dlouhou dobu a aby se postupně dosáhlo požadovaného přetlaku CO₂. Dokvašování a zrání piva probíhá v ležáckém sklepe v sudech nebo v tancích.

2.7.10. Filtrace, stabilizace a stáčení piva

Po ukončení kvasného procesu je pivo vyzrálé a má požadované organoleptické vlastnosti. Před expedicí se však zbavuje zbytků kalických látek a všech mikroorganismů, které snižují biologickou stabilitu a zhoršují chuť piva svými metabolity. Děje se tak filtrací, jenž nesmí ovlivnit vůni, barvu a stabilitu pěny. Filtrace je založena na sedimentaci (hrubé částice), na působení síta (velikost částic a pórů filtračního materiálu) a na adsorpci (rozpuštěné koloidy podle elektrického náboje nebo podle míry afinity k filtračnímu materiálu). K filtraci slouží naplavovací filtry, za kterými se často řadí deskové nebo svíčkové filtry.

Procesem stabilizace se zajišťuje trvanlivost, chuťová a koloidní stabilita piva, které se dosáhne snížením obsahu koloidních látek, pomocí stabilizačních prostředků. Stabilizační prostředky se dělí podle účinnosti na:

- 3) přípravky, které sráží, adsorbují nebo štěpí vysokomolekulární dusíkaté látky piva (tanin, bentonity, silikagelové přípravky)
- 4) přípravky, které sráží, adsorbují nebo štěpí polyfenoly piva (nerozpuštěné polymerní hmoty)
- 5) enzymové přípravky (štěpí vysokomolekulární dusíkaté látky)
- 6) antioxidantní látky (snižují negativní vliv kyslíku)

Nejpřirozenější ochranou je maximální zachování přirozených reduktonů ze sladu a chmele. Biologická stabilita se zvyšuje pasterací, dojde k umrtvení kvasinek a laktobacilů.

Účelem stáčení je převést dokvašené, chuťově vyzrálé a zfiltrované pivo do transportních nádob při minimálních ztrátách na hmotnosti a změnách jakosti.

2.7.11. Proces stárnutí piva

Jedním z hlavních problémů pivovarského průmyslu je zajištění dostatečně vysoké trvanlivosti piva. Vysoká trvanlivost piva neznamena pouze zachování čirosti, ale také udržení všech ostatních kvalitativních vlastností, jako je chuť, vůně, barva a pěnovost, a to během transportu i při následném skladování.

Proces stárnutí piva se projevuje snížením sensorické kvality dlouhodobě skladovaného piva. Jedná se o reakce hydrolytické, isomerační, kondenzační až polymerační a oxidoredukční. *Hydrolytické reakce* vedou obvykle ke štěpení glykosidů na aglykony a odpovídající sacharidické složky a výrazně se v kvalitě hotového piva neuplatňují.

Kondenzační až polymerační reakce se uplatňují především ve smyslu tvorby vysokomolekulárních celků s velkou srážecí aktivitou vůči bílkovinám extraktu piva. Tím dochází k tvorbě polyfenol-bílkovinných komplexů, které za určitých podmínek mohou vypadávat z roztoku, a tím vytvářet koloidní zákaly.

2.8. Zpracování analytických výsledků a validace metody

2.8.1. Opakovatelnost

Opakovatelnost metody je definována jako těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek získanými za podmínek opakovatelnosti (podmínky, kdy navzájem nezávislé výsledky zkoušek se získají opakovaným použitím téže zkušební metody na identickém materiálu, v téže laboratoři, týmž pracovníkem, za použití týchž přístrojů a zařízení, během krátkého časového rozmezí).

Opakovatelnost je vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka RSD:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100(\%), \quad (1.1)$$

s – směrodatná odchylka opakovatelnosti z n stanovení,

\bar{x} – průměrná hodnota z n stanovení

n – počet stanovení

Odhad směrodatné odchylky pro $n < 10$ se vypočítá z rozpětí (R), tj. rozdílu mezi největší (x_{\max}) a nejmenší (x_{\min}) hodnotou výsledku v sérii.

$$R = x_{\max} - x_{\min} \quad (1.2)$$

$$s = k_n \cdot R, \quad (1.3)$$

kde hodnota k_n je tabelována.

2.8.2. Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Udává skutečnou úroveň signálu, která ještě umožňuje detekci koncentrace.

U separačních metod se používá k výpočtu meze detekce velikost hodnoty signálu slepého pokusu. K dispozici musí být chromatogram slepého pokusu a směrnice kalibrační přímky. Z chromatogramu slepého pokusu se určí maximální kolísání základní linie (h_{\max}) v oblasti dané 20-ti násobkem pološířky píku stanovovaného analytu. Pro odezvu meze detekce platí:

$$y_D = 3h_{\max} \quad (1.4)$$

a pro koncentraci na mezi detekce:

$$x_D = \frac{y_D}{b_1}, \quad (1.5)$$

přičemž směrnice kalibrační přímky b_1 musí vycházet z koncentrační závislosti $y = b_1x$, kde y je výška chromatografického píku a x je plocha jak je obvyklé.

Mez stanovitelnosti je nejnižší koncentrace analytu, která může být stanovena s přijatelnou mírou správnosti a přesnosti.

U separačních metod se používá k výpočtu meze stanovitelnosti velikost hodnoty signálu slepého pokusu. K dispozici musí být chromatogram slepého pokusu a směrnice kalibrační přímky. Z chromatogramu slepého pokusu se určí maximální kolísání základní linie (h_{\max}) v oblasti dané 20-ti násobkem pološířky píku stanovovaného analytu. Pro odezvu meze stanovitelnosti platí:

$$y_s = 10 h_{\max}, \quad (1.6)$$

a pro mez stanovitelnosti:

$$x = \frac{y_s}{b_1}, \quad (1.7)$$

přičemž směrnice kalibrační přímky b_1 musí vycházet z koncentrační závislosti $y = b_1x$, kde y je výška chromatografického píku a ne plocha jak je obvyklé.

2.8.3. Ověření linearit odezvy detektoru

Stanovení se provede minimálně pro tři různé koncentrace standardní látky pro jednotlivé analyty. Korelační koeficient nesmí být nižší než 0,9800 a rozdíly směrnic přímek by neměly přesahovat 15%.

Interval spolehlivosti průměru

Je to rozmezí hodnot, v němž s určitou pravděpodobností leží skutečná hodnota výsledku. Interval spolehlivosti je tím užší, čím jsou získané výsledky přesnější. Charakterizuje tedy spolehlivost výsledku. Počítá se podle toho, kolik změřených hodnot je k dispozici.

Při $n < 10$ se interval spolehlivosti $L_{1,2}$ vypočítá ze vztahu:

$$L_{1,2} = \bar{x} \pm K_n R, \quad (1.8)$$

kde hodnota K_n je tabelována. [32,33]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Sklo, pomůcky, přístroje

- o magnetická míchačka Lavat, Lavat a.s., Chotutice, Česká republika
- o ultrazvuková lázeň Kraitex, Kraitex s.r.o., Podhájská, Slovenská republika
- o pH-metr MPH 372, Monokrystaly, Trutnov, Česká republika
- o kombinovaná pH elektroda, typ 0,1 – 29, Monokrystaly, Trutnov, Česká republika
- o analytické váhy AND GR-202-EC, San Jose, Spojené státy americké
- o lednička Amica Fresh line, Amica Commerce s.r.o, Praha, Česká republika
- o přístroj na přípravu deionizované vody Watrex, Watrex Praha, s.r.o., Praha, Česká republika
- o mikropipeta Biohit proline 100 – 1000 μm , Labor-Komplet s.r.o., Praha, Česká republika
- o třepačka Yellow line, TTS 2, IKA[®] Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo
- o inkubátor Incucell, BMT Medical Technology s.r.o., Brno, Česká republika
- o vodní lázeň
- o běžné laboratorní sklo
- o injekční stříkačka
- o membránový filtr o velikosti pórů 0,20 a 0,45 μm
- o míchadlo

4.2. Chemikálie

Všechny použité chemikálie jsou p.a. a HPLC čistoty

- o deionizovaná voda
- o kyselina chlorovodíková, Penta, Praha, Česká republika
- o hydroxid sodný, Penta, Praha, Česká republika
- o kyselina octová, min. 99 %, Onex chemie, s.r.o., Rožnov pod Radhoštěm, Česká republika
- o hexakynoželezitan draselný, Merk s.r.o., Říčany-Jažlovice, Česká republika
- o taka diastasa, Sigma-Aldrich, St. Louis, Spojené státy americké
- o thiamin chlorid hydrochlorid, Fluka analytical, Seelze, Německo
- o methanol, Riedel-de Haën, Seelze, Německo
- o octan sodný, trihydrát, Lachema, Brno, Česká republika

4.3. Příprava roztoků

Příprava 0,1M roztoku HCl

8,82 ml 35% kyseliny chlorovodíkové bylo přidáno do 1000 ml odměrné baňky a deionizovanou vodou doplněno po rysku.

Příprava 15% roztoku NaOH

150 g 98% pevného hydroxidu sodného bylo rozpuštěno v deionizované vodě a doplněno na objem 1000 ml.

Příprava 1% roztoku $K_3[Fe(CN)_6]$

0,1 g 99% krystalického hexakynoželezitanu draselného bylo rozpuštěno v deionizované vodě a doplněno na objem 10 ml. Roztok se připravuje vždy čerstvý v den analýzy.

Příprava 2,5M roztoku CH_3COONa

170,10 g 99% trihydrátu octanu sodného bylo rozpuštěno v deionizované vodě a doplněno na konečný objem 500 ml.

Příprava mobilní fáze

600 ml deionizované vody bylo okyseleno kyselinou octovou na pH 4,5, a pak přidáno 400 ml methanolu.

Příprava derivatizačního činidla pro předkolonovou derivatizaci

1 ml 1% roztoku hexakynoželezitanu draselného bylo naředěno na 25 ml 15% roztokem hydroxidu sodného. Roztok se připravuje vždy čerstvý v den analýzy.

Příprava standardních roztoků vitamínu B_1

Zásobní roztok thiaminu o koncentraci 100 mg/l byl připraven rozpuštěním 0,01 g thiaminu ve 100 ml 0,1M kyseliny chlorovodíkové.

Při uchování v lednici při teplotě 4 °C je tento zásobní roztok stálý 1 týden.

Roztoky standardů o koncentraci 8; 6; 4; 2; 0,4; 0,2 a 0,04 mg/l se připravují bezprostředně před použitím.

Všechny připravené roztoky byly odplyněny v ultrazvukové lázni z důvodu prodloužení životnosti kolony.

Princip použité metody

Thiamin byl extrahován z potraviny po kyselé hydrolyze. Následovala defosforylace za použití enzymu taka diastasy a kvantifikace metodou HPLC s předkolonovou derivatizací na thiochrom.

4.4. Příprava vzorků pro HPLC analýzu

Zpracování pevných vzorků ječmene a sladu kyselou a enzymatickou hydrolyzou

Vzorky ječmene a sladu byly nejemno namlety na elektrickém mlýnku.

▪ přímé stanovení

Do reakční baňky bylo naváženo 10 g tohoto zhomogenizovaného vzorku a k němu přidáno 40 ml 0,1M kyseliny chlorovodíkové. Hrdlo baňky bylo překryto alobalem a baňka na

1 hodinu vložena do vodní lázně o teplotě 100 °C. Po uplynutí této doby se vzorek z lázně vyjmul a nechal vychladit na laboratorní teplotu. Pomocí 2,5M octanu sodného bylo jeho pH upraveno na hodnotu 4. K takto okyselenému vzorku byla přidána taka diastasa (1,1 g), hrdlo bylo překryto alobalem a vzorek byl uložen do termostatu, kde byl inkubován 22 hodin při teplotě 39 °C. Poté se vzorek kvantitativně převedl do 50 ml odměrné baňky a doplnil se po rysku 0,1M kyselinou chlorovodíkovou. Baňka se protřepala, nechala odplynit v ultrazvukové lázni a vzorek se po usazení zfiltraval přes membránový filtr 0,45 µm. Je nezbytně nutné, aby filtrát byl naprosto čistý.

Zkoncentrování roztoku vzorku pomocí vakuové odparky

U 12 ml zfiltrovaného vzorku Starobrno slad byla pro zkoncentrování obsahu thiaminu v roztoku použita metoda vakuového odpaření roztoku. Vodní lázeň byla nastavena na 50 °C, vzorek se odpařoval 2,5 hodiny. Částečně odpařený vzorek byl doplněn na objem 3 ml, znovu zfiltrován přes membránový filtr a analyzován.

▪ metoda přidavku standardu

Do reakční baňky bylo naváženo 10 g zhomogenizovaného vzorku, k němu přidáno 10 ml roztoku standardu o koncentraci 1020 mg/100 ml a 50 ml 0,1M kyseliny chlorovodíkové. Paralelně byl připraven také roztok standardu, 10 ml téhož roztoku standardu a 50 ml 0,1M kyseliny chlorovodíkové. Hrdlo baňky bylo překryto alobalem a baňka na 1 hodinu vložena do vodní lázně o teplotě 100 °C. Po uplynutí této doby se vzorek z lázně vyjmul a nechal vychladit na laboratorní teplotu. Pomocí 2,5M octanu sodného bylo jeho pH upraveno na hodnotu 4. K takto okyselenému vzorku byla přidána taka diastasa (1,1 g), hrdlo bylo překryto alobalem a vzorek byl uložen do termostatu, kde byl inkubován 20 hodin při teplotě 40 °C. Poté se vzorek kvantitativně převedl do 100 ml odměrné baňky a doplnil se po rysku 0,1M kyselinou chlorovodíkovou. Baňka se protřepala, nechala odplynit v ultrazvukové lázni a vzorek se po usazení zfiltraval přes membránový filtr 0,45 µm. Je nezbytně nutné, aby filtrát byl naprosto čistý.

Zpracování kapalných vzorků sladiny a piva

Sladina byla použita neředěná, ultrazvukem odplyněná a zfiltrovaná přes membránový filtr 0,2 µm.

Pivo bylo použito také neředěné, nutno důkladně a dlouho odplynit kvůli obsahu CO₂.

Zpracování tablet

Tablety Pangaminu BiFi, B- komplexu forte a Thiaminu byly rozpuštěny v 0,1M kyselině chlorovodíkové a v odměrných baňkách doplněny na celkový objem 100 ml. Roztok tablety Pangaminu BiFi byl použit neředěný, roztok B-komplexu byl zředěn 10x a roztok Thiaminu 25x. Roztoky byly odplyněny v ultrazvuku a filtrovány přes membránový filtr.

Slepý pokus

Slepý pokus byl prováděn souběžně se vzorky. Pracovní postup přípravy slepého pokusu byl shodný se zpracováním vzorků, ale byl proveden pouze s reakčním činidlem a taka diastasou. Provádět slepý pokus je nutné, protože použitý enzym může obsahovat malé množství thiaminu.

4.5. Chromatografický separační systém

Pro stanovení vitamínu B₁ byl použit chromatograf Shimadzu, který se skládá z: gradientového čerpadla Shimadzu GT-104 a FCV-10AI, autosampleru LC-10AD, Shimadzu column oven CTO-10A, fluorescenčního detektoru Shimadzu RF-551, komunikačního modulu Shimadzu CBM-10A a počítače s operačním systémem Class-LC10/M10A, version 1.6.

Pro separaci byla použita kolona Supelco LC-18-DB o rozměrech 250 x 4,6 mm. Je to pětimikronová kolona s reversní fází.

Pro izokratickou eluci vitamínu B₁ byla použita směs methanol : voda o složení 40 % methanolu a 60 % vody upravené kyselinou octovou na pH 4,5. Tuto mobilní fázi je nezbytné před použitím odplynit v ultrazvukové lázni.

K detekci byl použit fluorescenční detektor typu Shimadzu RF-551. Zdrojem záření detektoru je xenonová lampa s dvojí monochromatickou mřížkou pro výběr excitační i emisní vlnové délky. Pro thiamin byla použita excitační vlnová délka 366 nm a emisní vlnová délka 435 nm.

Chromatografické podmínky

Z průzkumu reakční doby a stability thiochromu vyšla jako nejvhodnější reakční doba 1 minuta.

Z vlivu rychlosti průtoku na plochu píku vyplynul nejvhodnější průtok mobilní fáze 0,3 ml/minutu.

Nástřík: 10 μ l (5 μ l vzorku + 5 μ l derivatizačního činidla)

Kolona: Supelco LC-18-DB, 5 μ m

Velikost kolony: 250 x 4,6 mm

Detektor: $\lambda_{em}/\lambda_{ex} = 366/435$ nm

4.6. Předkolonová derivatizace

Při této metodě je thiamin nejprve derivatizován derivatizačním činidlem, a poté separován na chromatografické koloně a detekován fluorescenčním detektorem. Derivatizační činidlo oxiduje nefluoreskující thiamin na thiochrom, který fluorescenci vykazuje.

K 1 ml enzymaticky ošetřeného vzorku, roztoku standardu či roztoku pro slepé stanovení byl přidán 1 ml alkalického roztoku hexakyno-železitanu draselného. Směs se nechala na 10 sekund protřepat a před nastříknutím na kolonu se nechala 1 minutu stát. Nutno dodržet časové intervaly pro dosažení shodných výsledků.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1. Test stability thiochromu

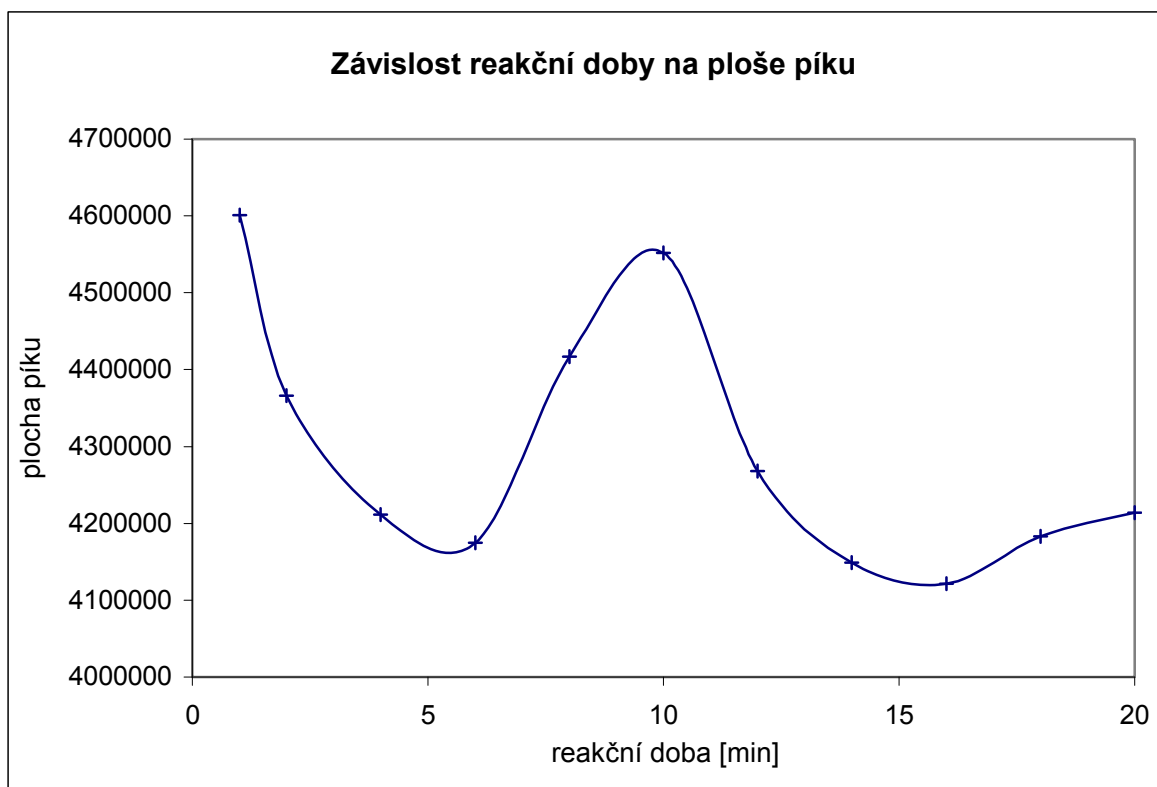
Pro test stability thiochromu byl použit roztok standardu thiamin chlorid hydrochloridu o koncentraci 10 mg/l. Při průtoku mobilní fáze 0,3 ml/minutu. Tento vzorek byl analyzován v intervalech od 1 minuty do 20 minut a byla sledována závislost plochy píku na reakční době vzniku thiochromu.

Výsledky

Test stability byl proveden na roztoku standardu thiamin chlorid hydrochloridu o koncentraci 10 mg/l po smíchání s derivatizačním činidlem. Při průtoku mobilní fáze 0,3 ml/min byla proměřena reakční doba od 1 minuty do 20 minut. Po 20 minutách byl prokázán úbytek obsahu thiochromu o 8,42 %, bylo dokázáno, že nejvíce thiochromu obsahuje vzorek 1 minutu po smíchání.

Tabulka č.6: Závislost plochy píku na reakční době (přeměny thiaminu na thiochrom)

Reakční doba [min]	Plocha píku [strojová jednotka]
1	4601289
2	4366373
4	4211008
6	4174816
8	4416928
10	4551730
12	4267902
14	4149228
16	4121904
18	4182743
20	4213710



Obrázek č.3: Graf závislosti reakční doby na ploše píku

5.2. Test stability derivatizačního činidla

K provedení testu stability derivatizačního činidla byl využit standardní roztok thiamin chlorid hydrochloridu o koncentraci 10 mg/ml. Analýza proběhla v 24 hodinovém intervalu.

Výsledek

Testováním stability derivatizačního činidla bylo potvrzeno, že toto činidlo je stabilní po dobu 24 hodin. Po uplynutí této doby je nutné připravit činidlo znovu.

5.3. Test závislosti průtoku mobilní fáze na ploše píku

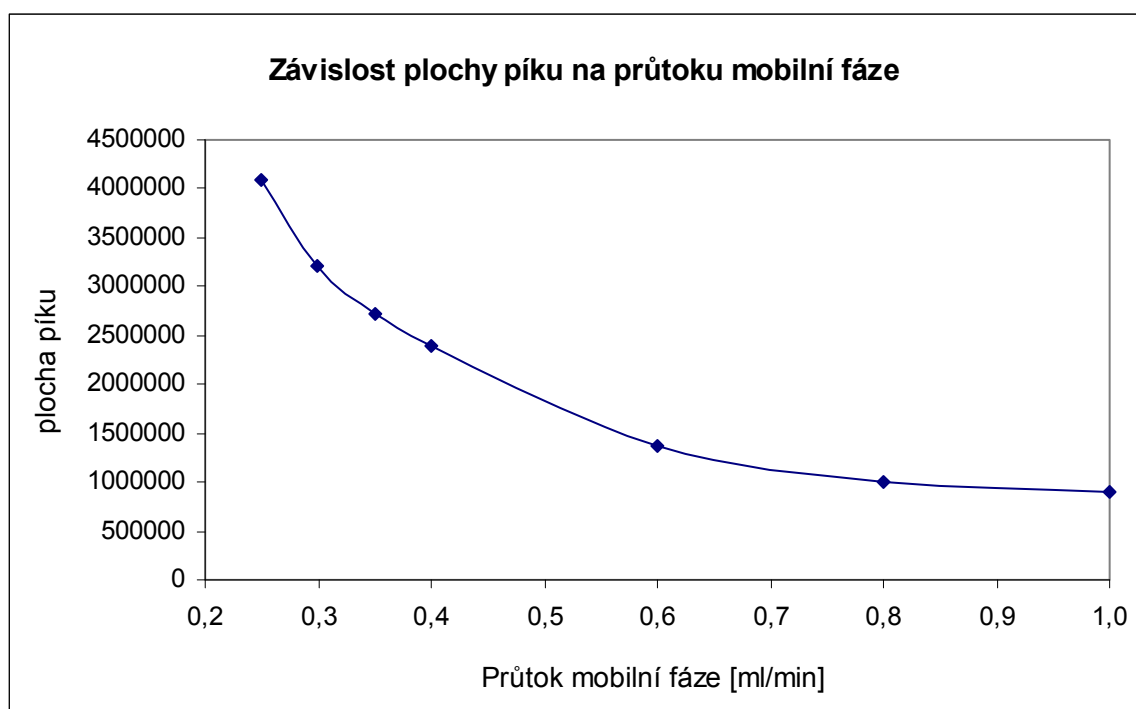
Pro tento test byl použit roztok standardu thiamin chlorid hydrochloridu o koncentraci 10 mg/l. Roztok standardu byl analyzován při průtoku 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,60; 0,80 a 1,00 ml/minutu.

Výsledky

Menší průtok než 0,25 ml/min nemohl být aplikován, protože pumpa vykazovala problémy s udržením tlaku. Maximum fluorescence bylo naměřeno při průtoku 0,25 ml/min. Vyšší průtoky vykazovaly velký pokles fluorescence, protože čas byl nedostatečný pro derivatizační reakci. Pro další měření byl jako optimální zvolen průtok mobilní fáze 0,3 ml/min, jako kompromis mezi retenčním časem a maximem plochy píku.

Tabulka č.7: Závislost plochy píku na rychlosti průtoku mobilní fáze

Průtok [ml/min]	Plocha píku [strojová jednotka]
0,25	4099936
0,30	3221154
0,35	2727154
0,40	2384701
0,60	1361227
0,80	1011476
1,00	901669



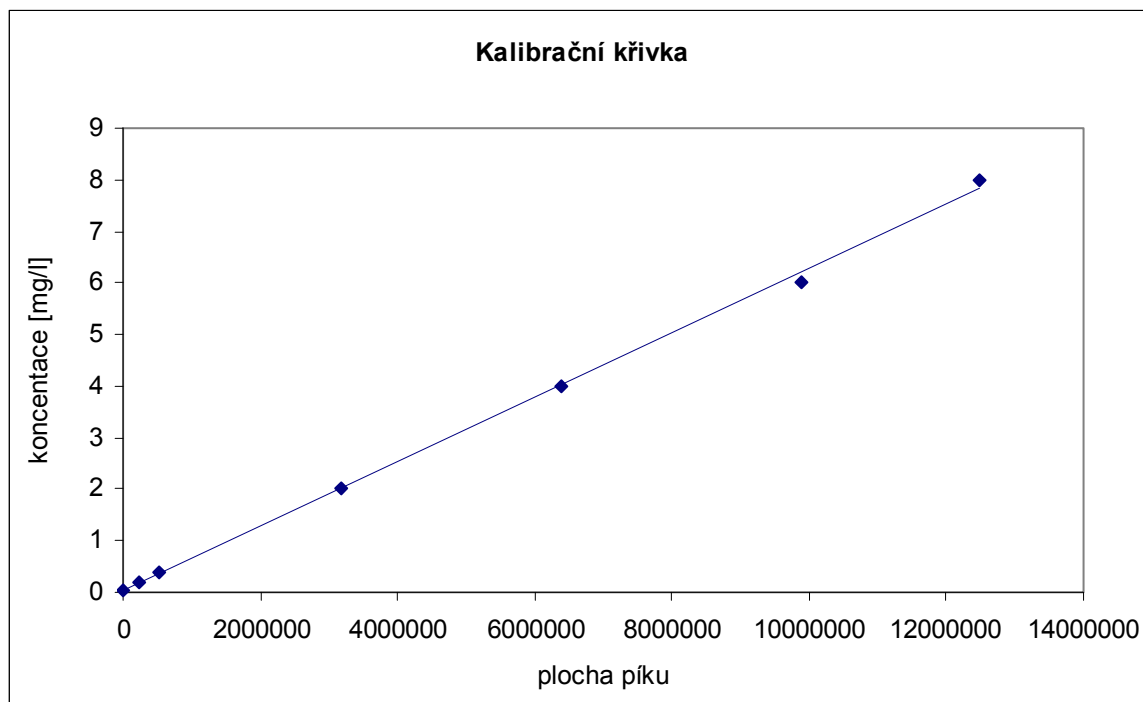
Obrázek č.4: Graf závislosti plochy píku na rychlosti průtoku mobilní fáze

5.4. Kalibrační křivka

Pro sestavení kalibrační křivky byly použity roztoky standardů o známé koncentraci, které byly připraveny ze zásobního roztoku thiamin chlorid hydrochloridu o koncentraci 10 mg/100 ml a zředěny 0,1M kyselinou chlorovodíkovou. Bylo použito standardních roztoků o následujících koncentracích: 8; 6; 4; 2; 0,4; 0,2 a 0,04 mg/l.

Tabulka č.8: Kalibrační hodnoty

Koncentrace [mg/50ml]	Koncentrace [mg/l]	Plocha píku [strojová jednotka]	Průměr
0,002	0,04	4656	4207
		3196	
		4769	
0,01	0,2	230705	227478,7
		226574	
		225157	
0,02	0,4	507002	526644,3
		528194	
		544737	
0,1	2	3086327	3166698
		3173827	
		3239939	
0,2	4	6253743	6380519
		6567051	
		6320764	
0,3	6	10398010	9884653
		9534125	
		9721825	
0,4	8	12458595	12481604
		12693245	
		12292972	

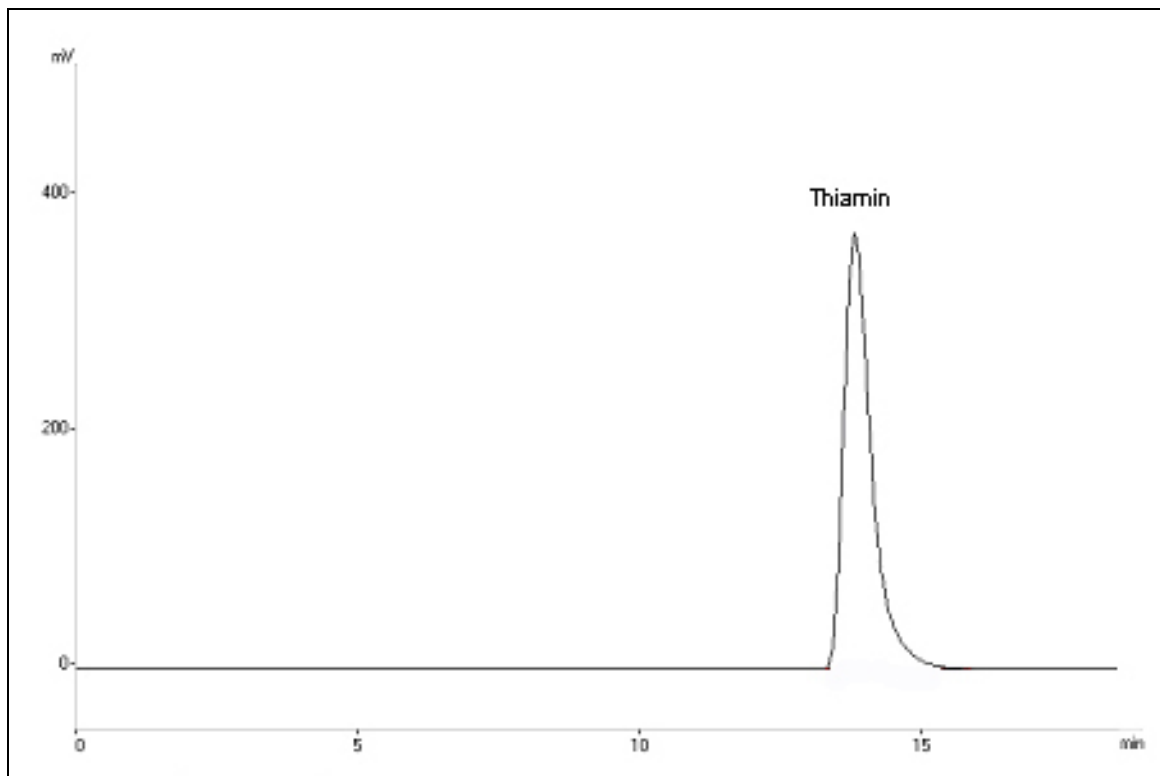


Obrázek č.5: Graf kalibrační křivky thiaminu

Rovnice regresní přímky

$$y = 6 \cdot 10^{-7} \cdot x + 0,0348$$

$$R^2 = 0,9987$$



Obrázek č.6: Chromatogram - thiamin, standard

5.5. Analyzované vzorky

V první fázi výzkumu byly analyzovány potravinové doplňky o známém obsahu thiaminu, dále pak různé odrůdy sladovnického ječmene a z něj vyrobené slady, vzorek sladiny a piva. Potravní doplňky byly zakoupeny v lékárně, vzorky ječmenů a sladů byly dodány Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským v Brně a vzorek sladiny odebrán v pivovaru Starobrno, dne 2.4.2008.

5.5.1. Vzorky potravních doplňků

Tableta B-komplex forte, Zentiva

U tablety B-komplexu byla stanovena volná forma thiaminu. Deklarovaný obsah thiaminu v 1 tabletě je 15 mg.

Tableta Thiamin, Zentiva

U tablety Thiaminu byla stanovena volná forma thiaminu. Deklarovaný obsah thiaminu v 1 tabletě je 50 mg.

Tableta Pangamin Bifi

V tabletě Pangamin BiFi byla stanovena volná forma thiaminu. Obsah thiaminu v 1 tabletě není deklarován z důvodu proměnného obsahu vitamínu produkovaného kvasinkami *Sacharomyces cerevisiae*.

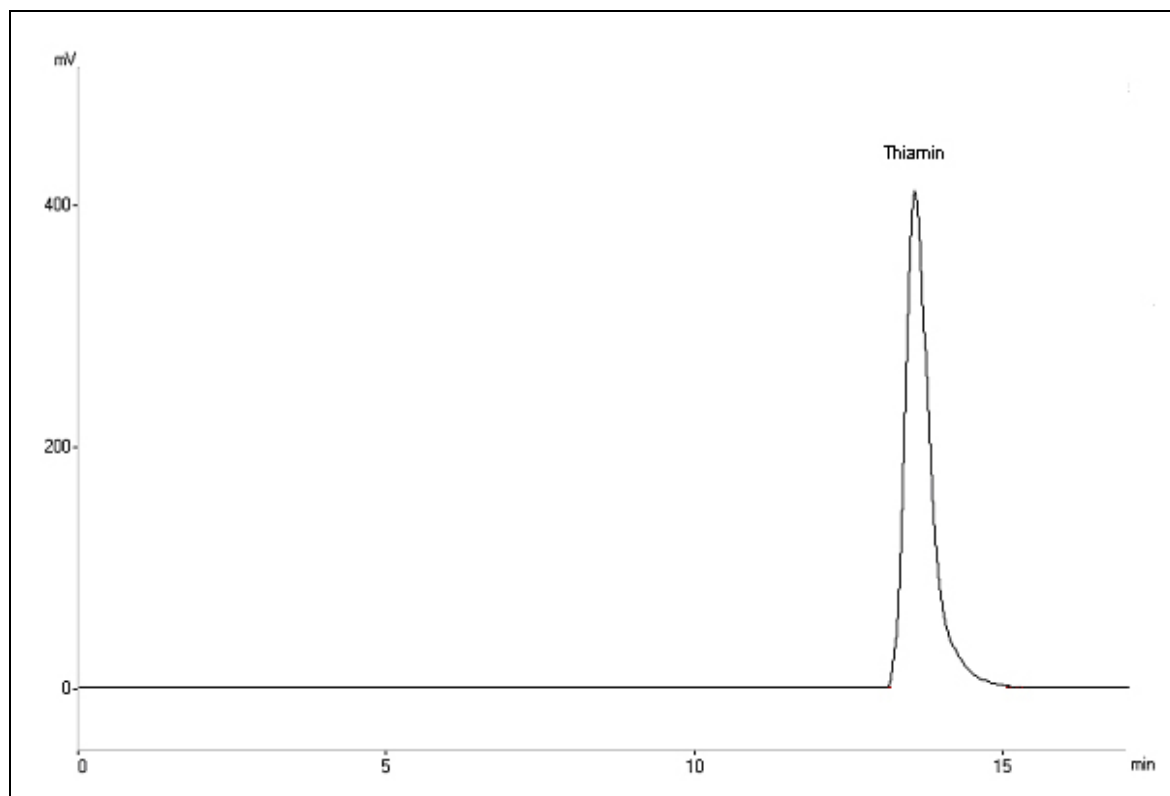
V tabulce jsou vyobrazeny naměřené hodnoty thiaminu (thiamin chlorid hydrochloridu) v tabletách v porovnání s deklarovanými hodnotami vitamínu B₁ a odchylky měření.

Tabulka č.9: Výsledky a porovnání naměřených a deklarovaných hodnot

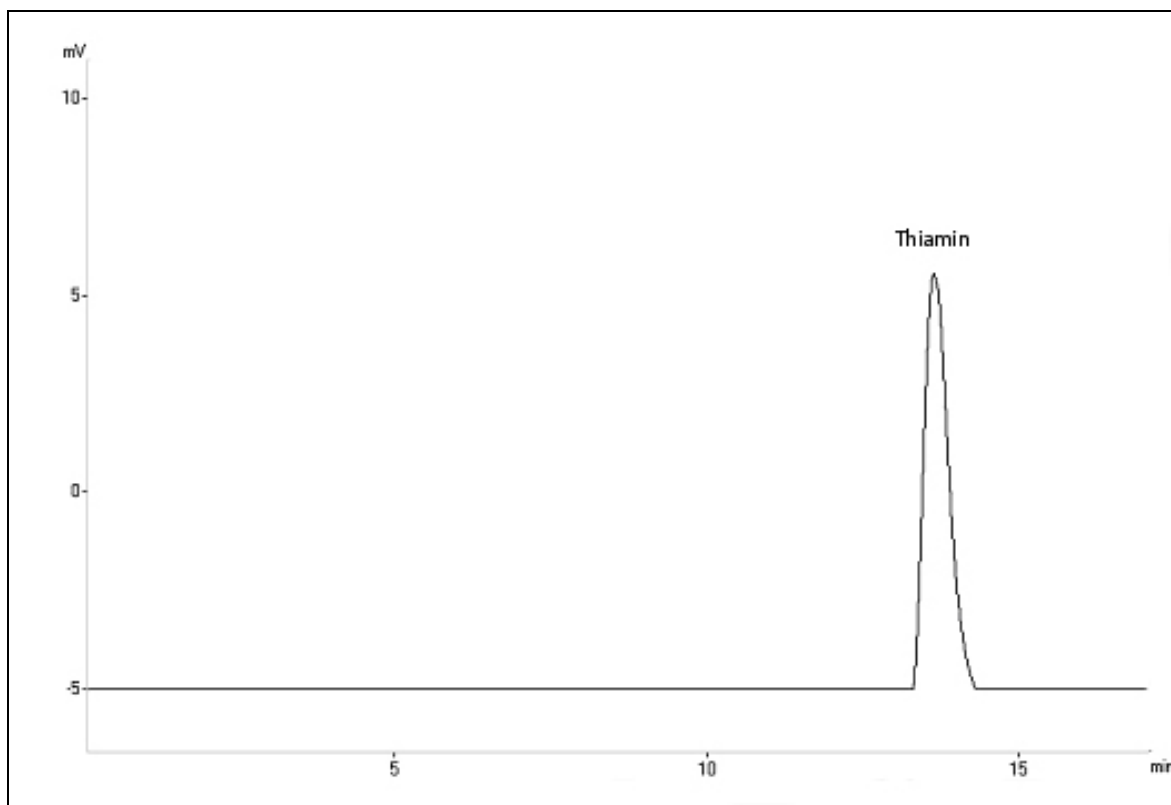
Název	B ₁ [mg/1 tableta] deklarovaná	B ₁ [mg/1 tableta] naměřená	Odchylka měření [%]
B-komplex forte, Zentiva	15	16,9303	0,97
Thiamin, Zentiva	50	66,1787	8,09
Pangamin BiFi	neuveveno	0,0206	-

Tabulka č.10: Validací parametry jednotlivých vzorků

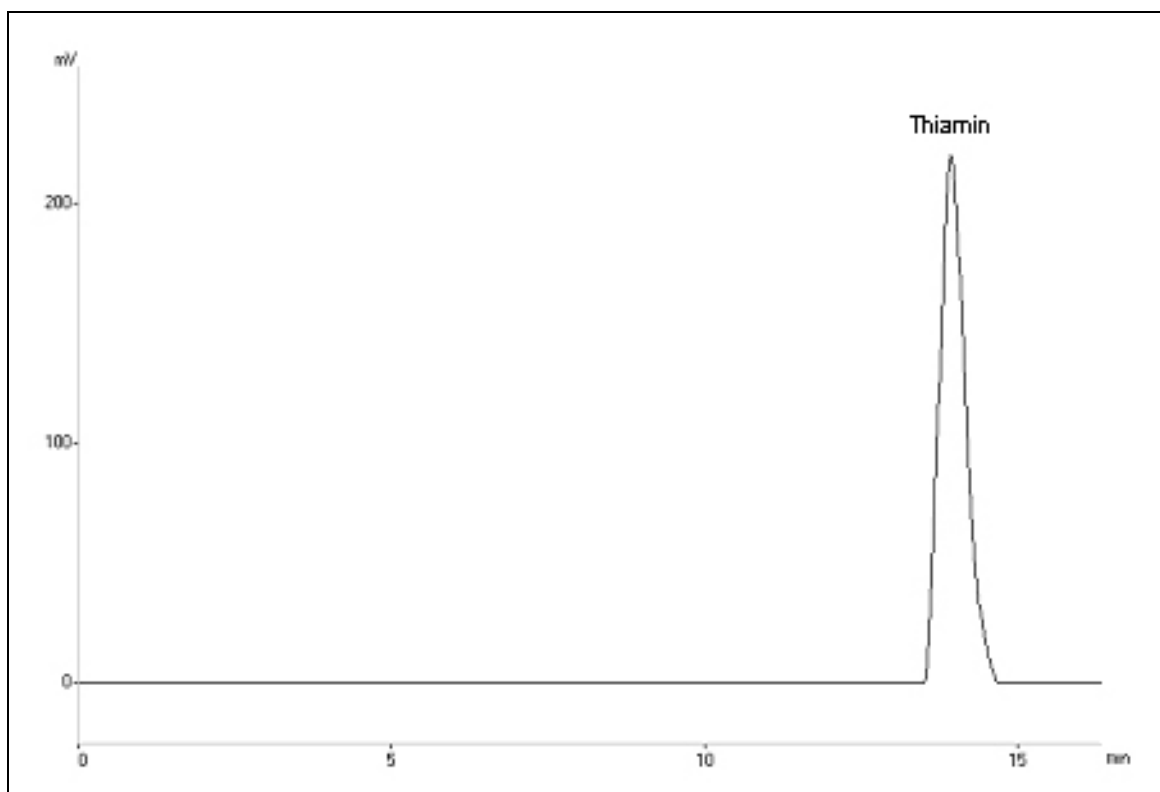
Název	B ₁ [mg/1 tableta] naměřená	Směrodatná odchylka	Relativní opakovatelnost [%]
B-komplex forte, Zentiva	16,9303	0,1039	1,45
Thiamin, Zentiva	66,1787	0,0433	1,12
Pangamin BiFi	0,0206	0,0046	2,26



Obrázek č.7: Chromatogram - B-komplex, Zentiva



Obrázek č.8: Chromatogram - Pangamin BiFi



Obrázek č.9: Chromatogram - Thiamin, Zentiva

Tabulka naměřených a vypočtených hodnot vzorků tablet je uvedena v příloze Tabulka 1.

5.5.2. Vzorky ječmene, sladu, sladiny a piva

Vzorek sladovnického ječmene

Ve vzorcích ječmene byl stanoven celkový obsah thiaminu, byla prokázána též přítomnost riboflavinu.

Vzorek sladu

Ve vzorcích sladu byl stanoven celkový obsah thiaminu, prokázána byla též přítomnost riboflavinu.

Vzorek sladiny

Ve vzorku sladiny byla prokázána volná forma thiaminu, a také volná forma riboflavinu.

Vzorek piva

Ve vzorku piva byla prokázána pouze volná forma riboflavinu. Thiamin v pivu nebyl detekován.

Výsledky

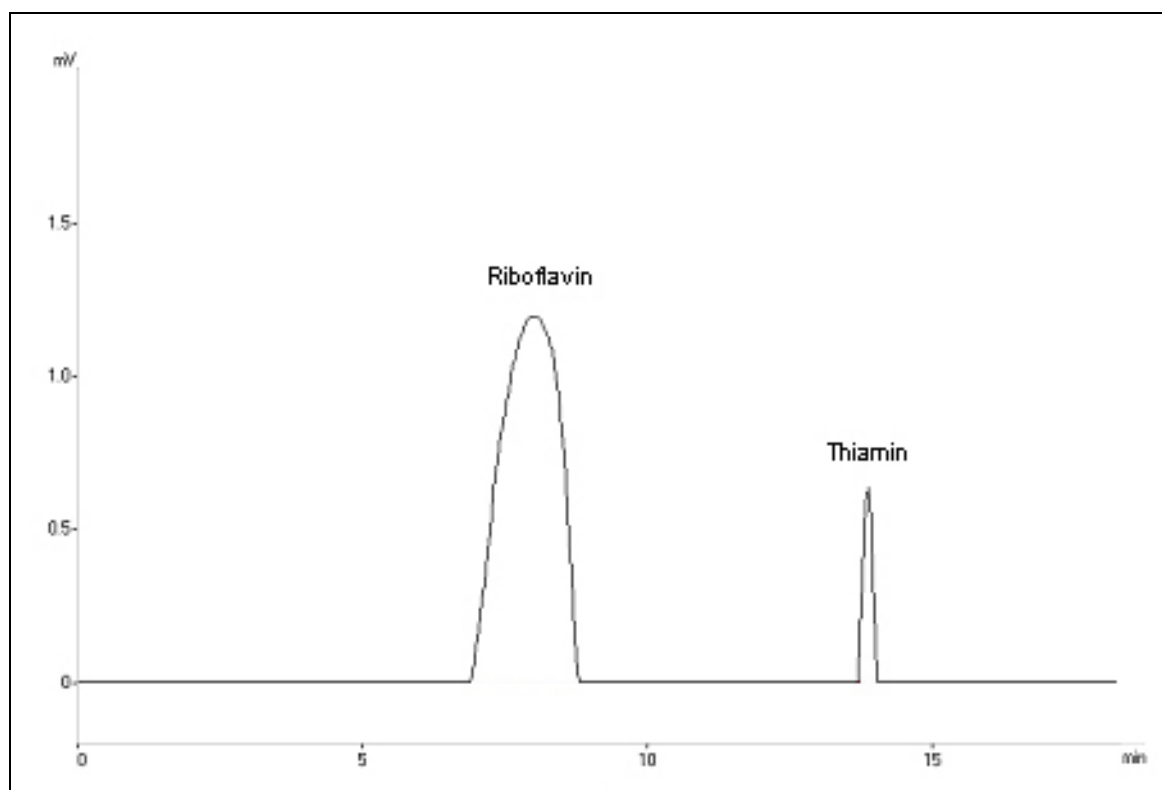
▪ **přímá metoda**

V tabulce jsou zobrazeny naměřené hodnoty thiaminu ve sladině, pivu a v jednotlivých odrůdách ječmene a sladu.

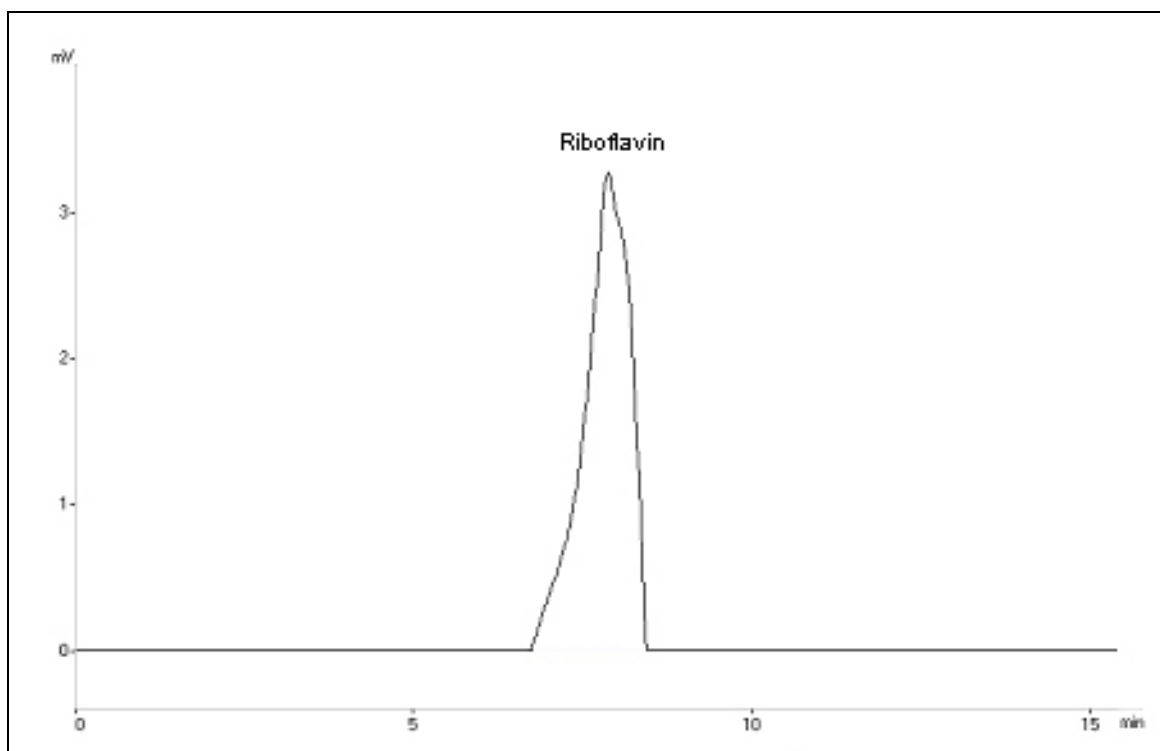
Tabulka č.11: Výsledky naměřených hodnot thiaminu ve vzorcích ječmene, sladu, sladiny a piva. Validační parametry jednotlivých vzorků. (přímá metoda)

Vzorek	Název	B ₁ [mg/kg] volná forma	B ₁ [mg/kg] naměřený obsah	B ₂
ječmen	Calgary	-	0,2127	přítomen
	Blaník	-	0,2126	přítomen
	Ebson	-	0,2232	přítomen
slad	Calgary	-	0,2012	přítomen
	Blaník	-	0,1501	přítomen
	Ebson	-	0,1636	přítomen
	Starobrno	-	0,1712	přítomen
sladina	Starobrno	0,0395 mg/l	-	přítomen
pivo	Pilsner Urquel, 12°	-	-	přítomen
slепý vzorek		-	1,5906 (v enzymu)	přítomen

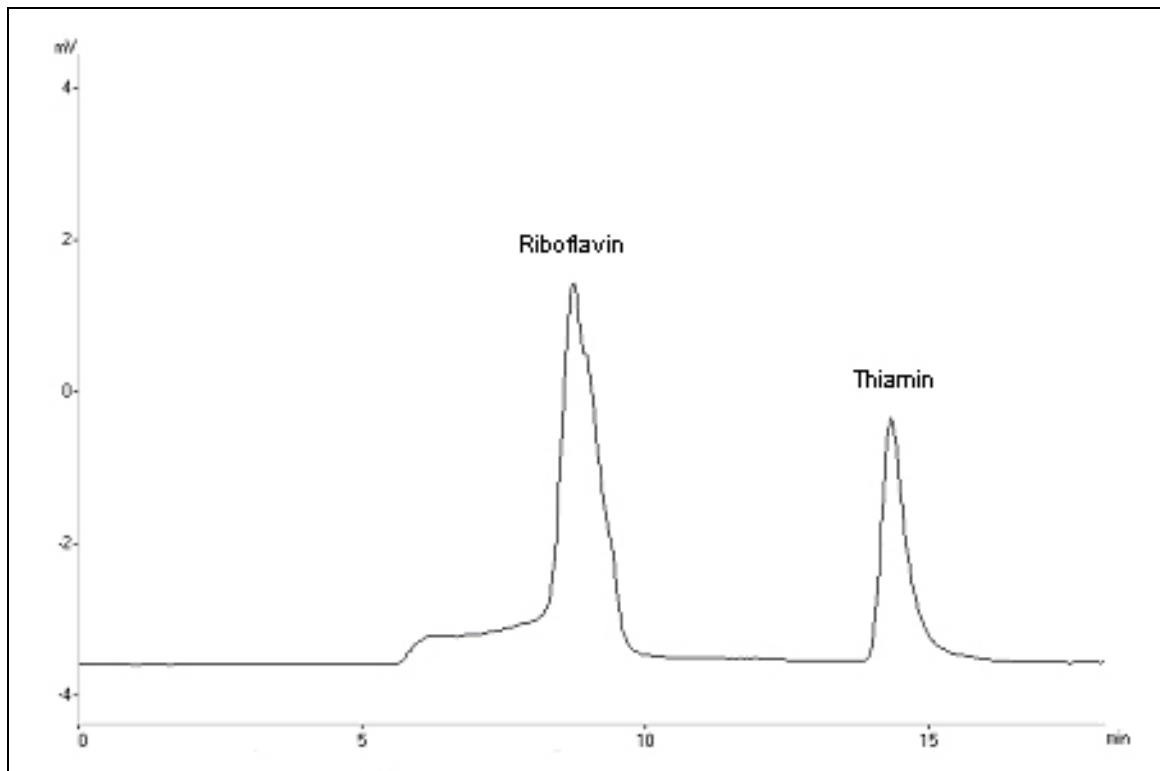
Vzorek	Název	B ₁ [mg/kg] naměřený obsah	B ₁ [mg/kg] naměřený obsah + ztráty	Směrodatná odchylka	Relativní opakovatelnost [%]
ječmen	Calgary	0,2127	1,1901	3,4108E-03	4,30
	Blaník	0,2126	1,1895	2,5569E-03	3,22
	Ebson	0,2232	1,2492	8,0286E-03	9,85
slad	Calgary	0,2012	1,1260	6,1222E-03	3,58
	Blaník	0,1501	0,8401	4,9664E-03	7,43
	Ebson	0,1636	0,9153	2,4899E-03	7,62
	Starobrno	0,1712	0,9582	4,4710E-03	6,29
sladina	Starobrno	0,0395 mg/l	-	2,1856E-05	0,06
pivo	Pilsner Urquel, 12°	-	-	-	-
	slépý vzorek	-	-	6,1490E-05	0,17



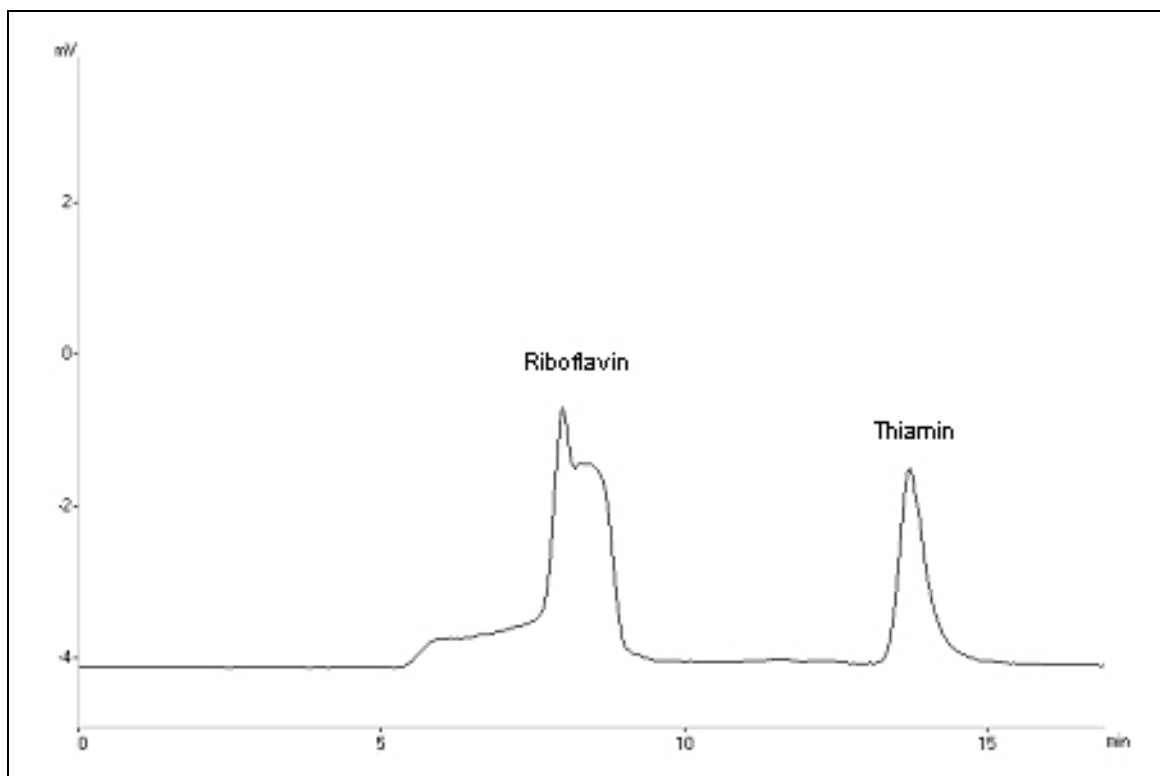
Obrázek č.10: Chromatogram - Starobrno sladina



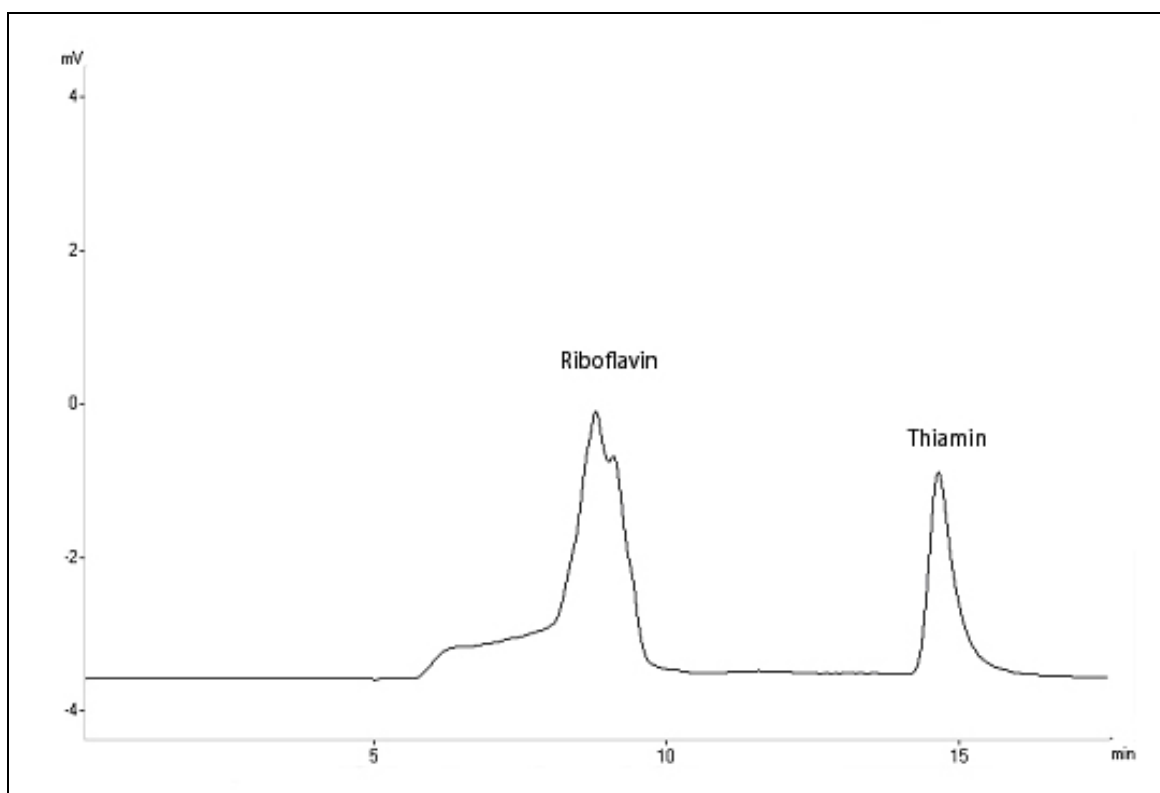
Obrázek č.11: Chromatogram - pivo Pilsner Urquell 12°



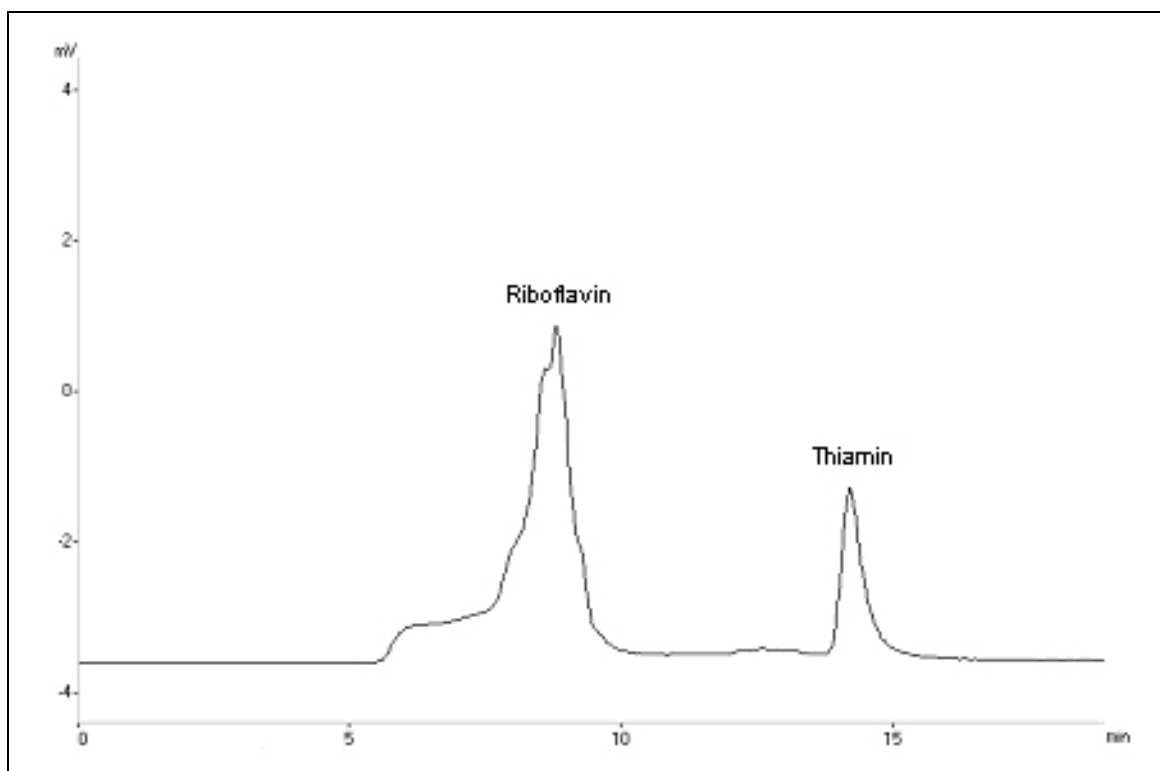
Obrázek č. 12: Chromatogram - Ebson ječmen



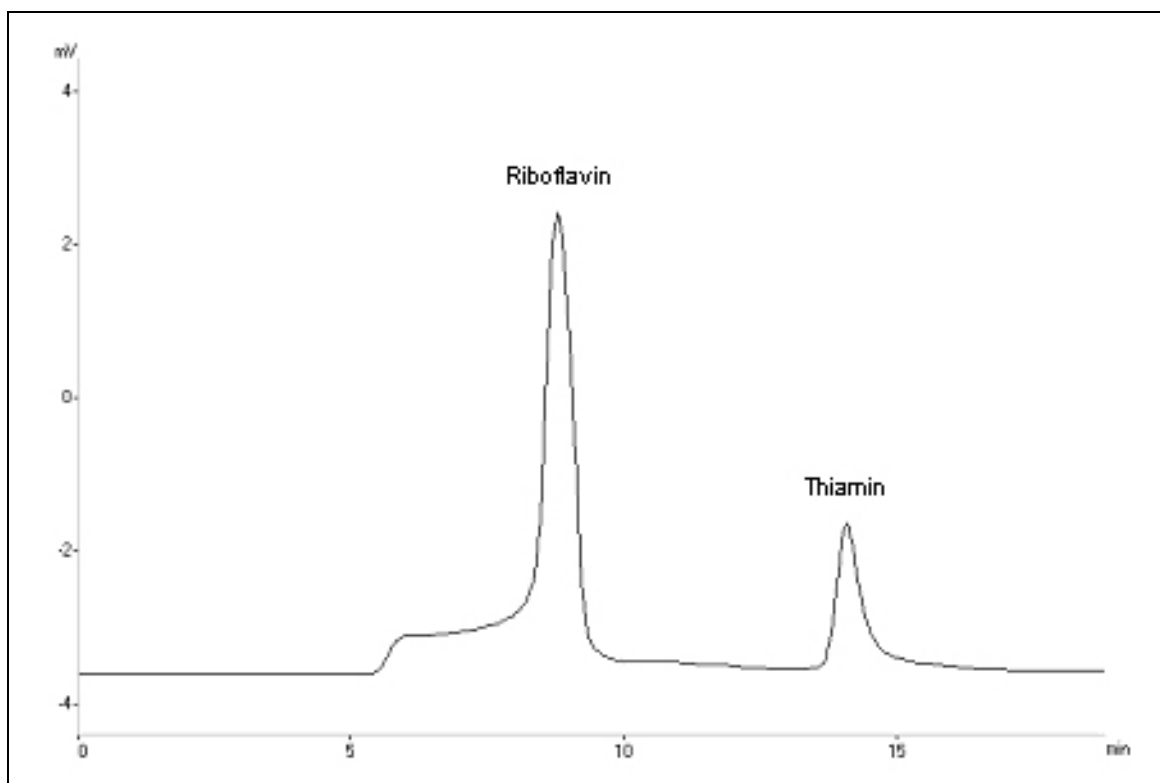
Obrázek č.13: Chromatogram - Blaník ječmen



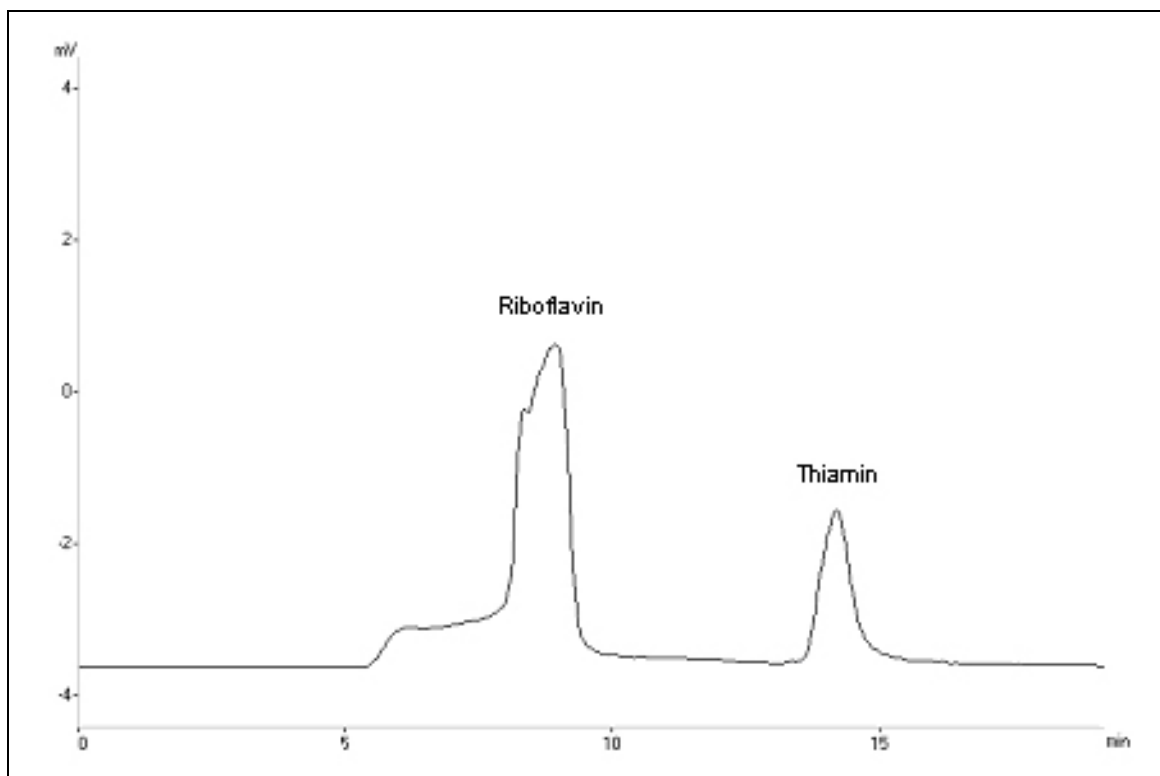
Obrázek č.14: Chromatogram - Calgary ječmen



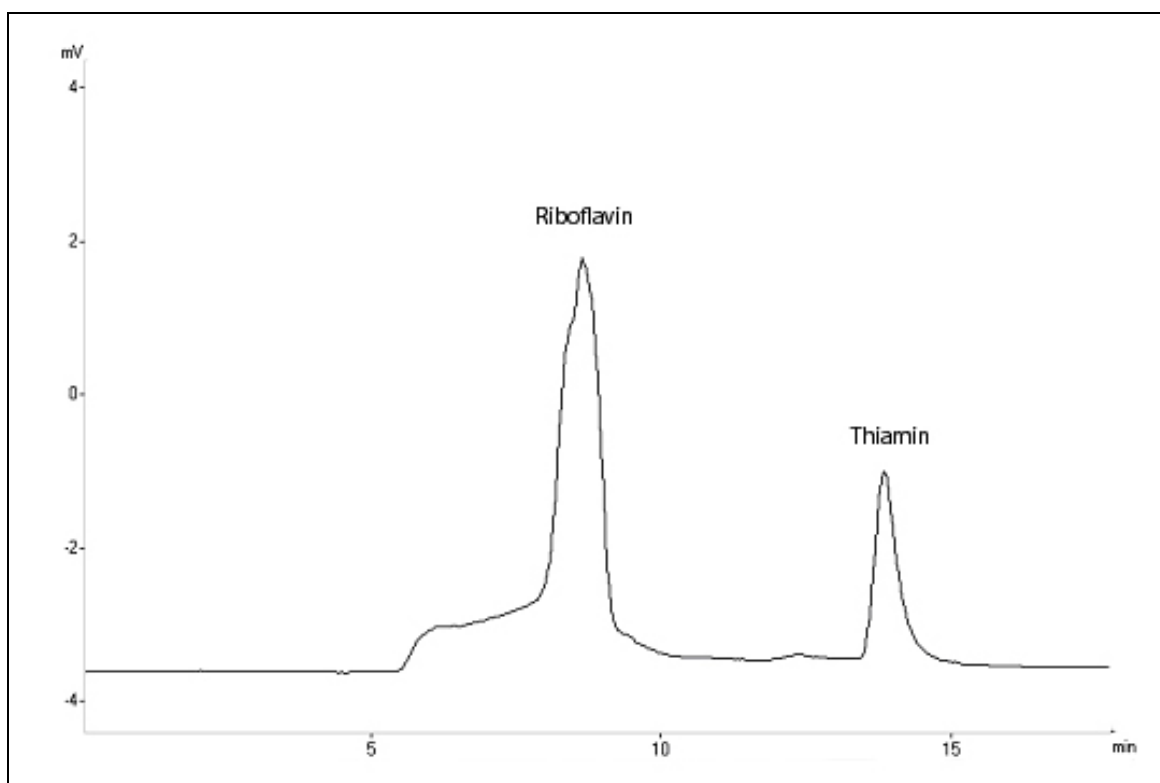
Obrázek č.15: Chromatogram - Ebson slad



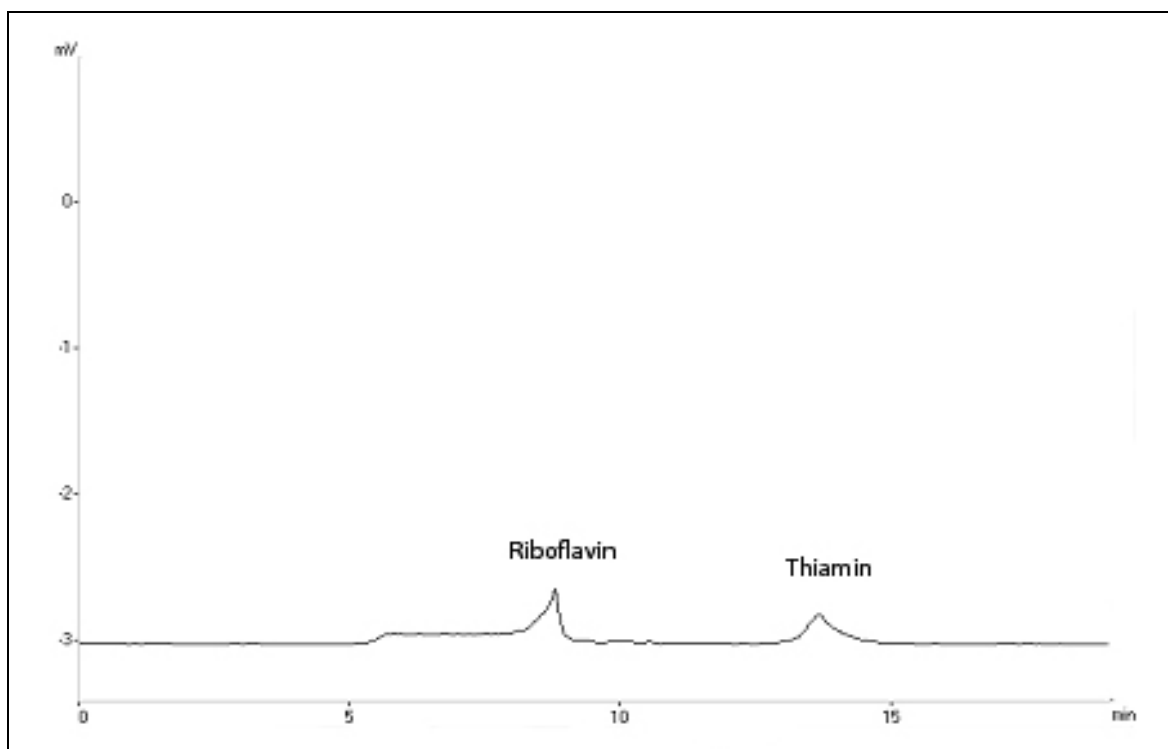
Obrázek č.15: Chromatogram - Blanik slad



Obrázek č.16: Chromatogram - Calgary slad



Obrázek č.17: Chromatogram - Starobrno slad



Obrázek č.18: Chromatogram - slepý pokus

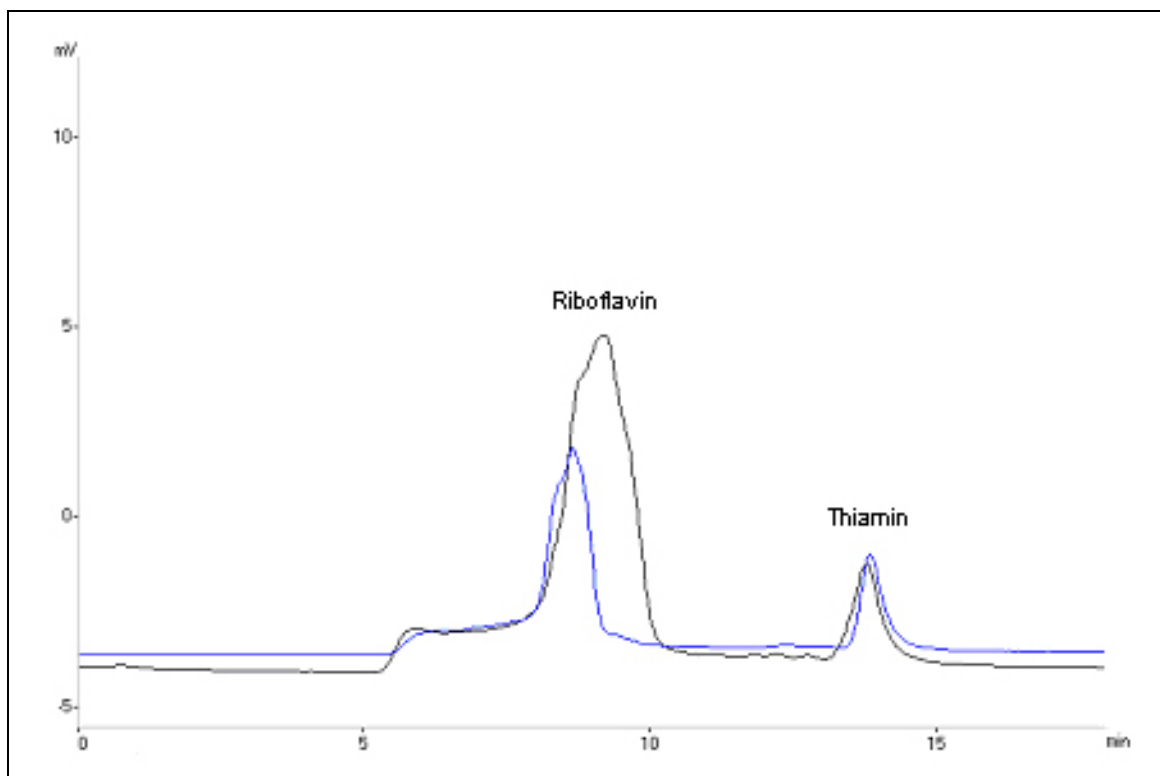
Tabulky naměřených a vypočtených hodnot příslušných vzorků jsou uvedeny v příloze Tabulka 2, 3 a 4.

Zkoncentrování roztoku vzorku pomocí vakuové odpary

Použitím této metody, při 4 násobném zkoncentrování, 50°C, 2,5 hodiny došlo k 64,19% ztrátě thiaminu v důsledku působení teploty a světla a tedy 35,81% výtěžnosti.

Nižší teplota nemohla být použita z důvodu výrazného prodloužení času odparu.

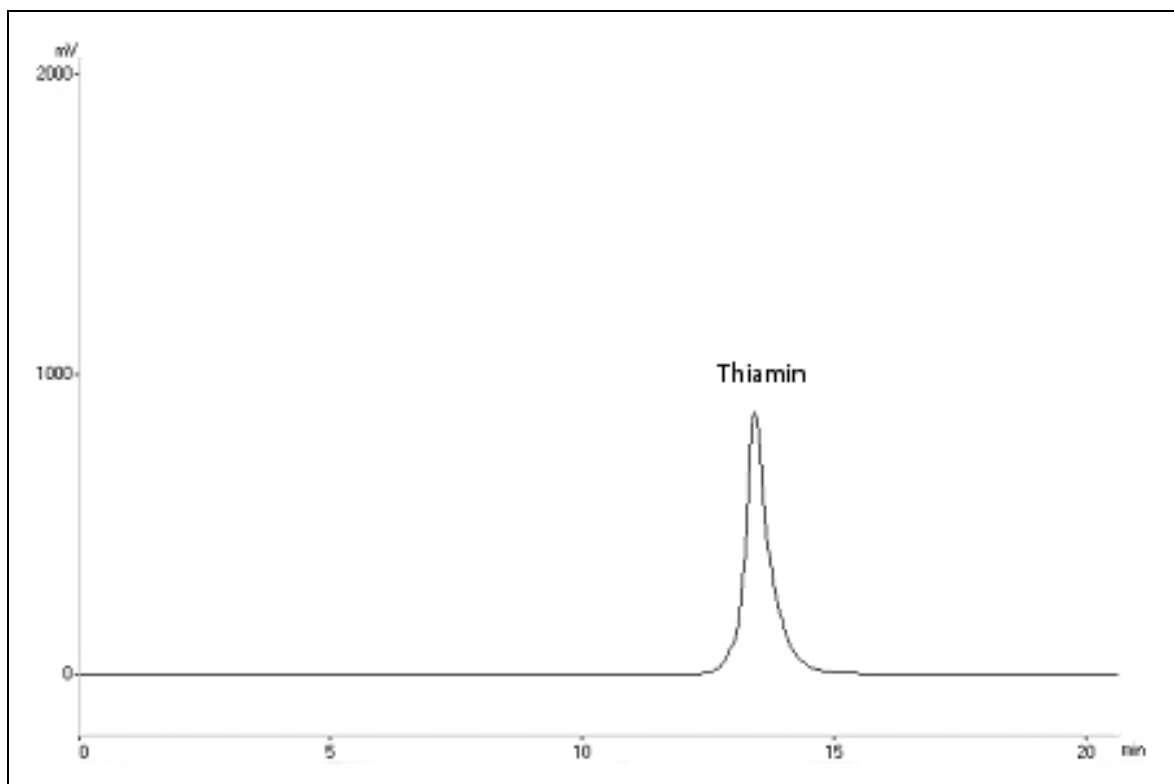
Tabulka naměřených a vypočtených hodnot vzorku Starobrno slad je uvedena v příloze Tabulka 7.



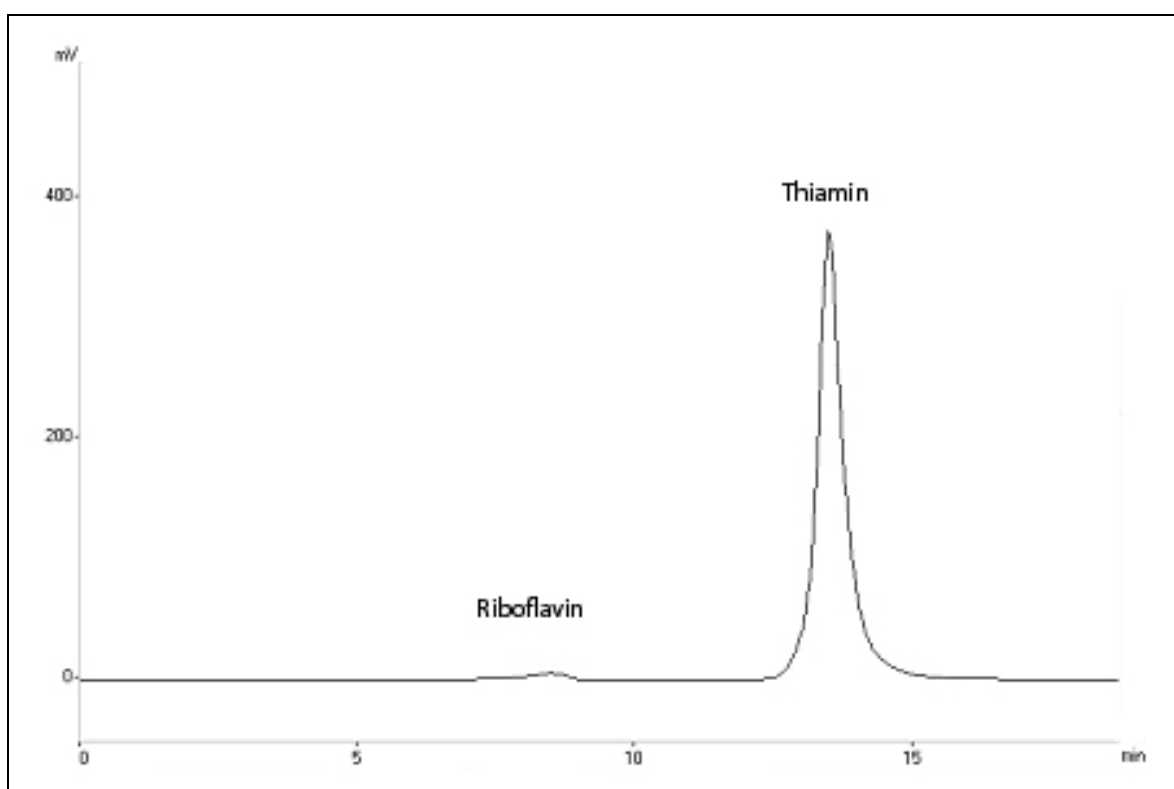
Obrázek č.21: Chromatogram - srovnání vakuově odpařeného vzorku a vzorku bez odparu u Starobrnno slad

- **metoda přidavku standardu**

Metoda přidavku standardu nevedla ke zdárným výsledkům. Z logického hlediska by vzorky s přidavkem standardu měly mít vyšší koncentraci thiaminu než standardní roztok, v praxi tomu ale bylo naopak. Konzultace s odborníky z Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Brně přinesla jediné možné vysvětlení, a to, že nedostatečná enzymatická hydrolýza mohla být způsobena absencí třepání při inkubaci vzorku. Toto tvrzení nemohlo být podloženo experimentem jednak z časových důvodů a protože třepací termostátová lázeň nebyla k dispozici. Pokud tato metoda opravdu vypovídá o nedostatečné defosforylaci, je tedy pravděpodobné, že v přímé metodě došlo k nedostatečné defosforylaci také. To vysvětluje poměrně nízký naměřený obsah thiaminu ve vzorcích ječmenů a sladů ve srovnání s obsahem uváděným v literatuře. Literatura uvádí obsah thiaminu v obilí kolem 3 - 4 mg/kg.



Obrázek č.22: Chromatogram - thiamin, standard



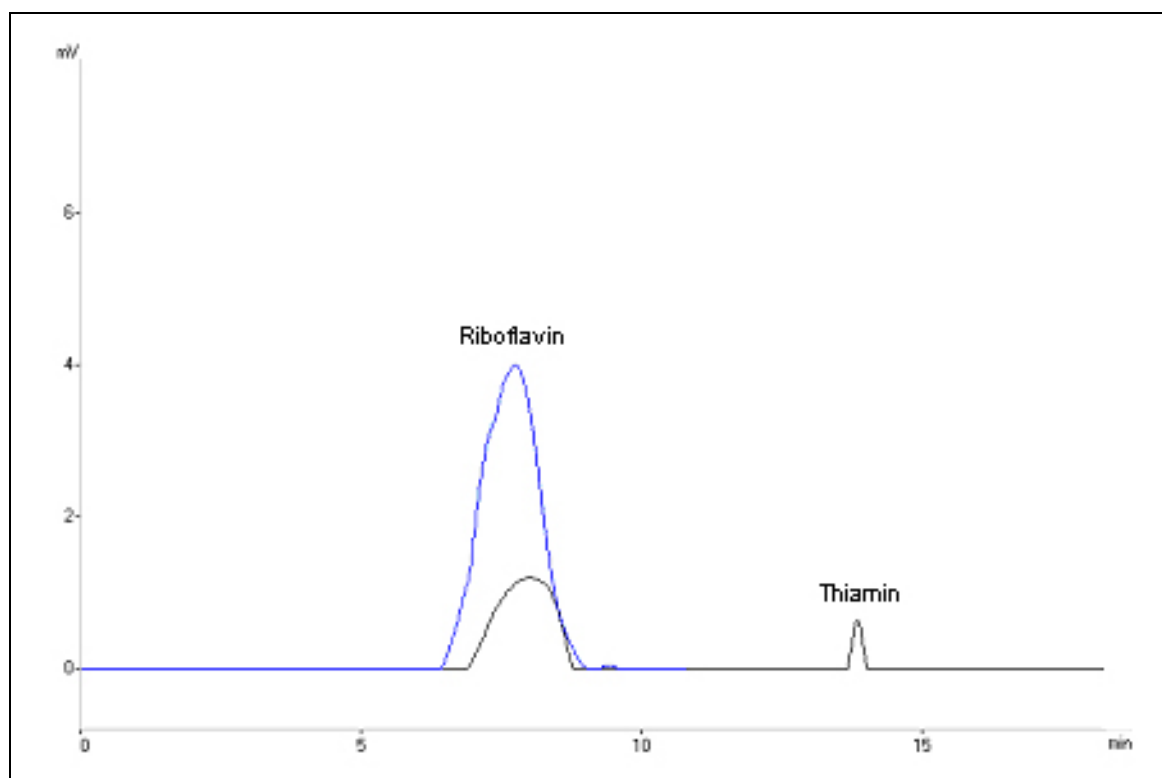
Obrázek č.23: Chromatogram - Calgary ječmen se standardním přidavkem thiaminu

Tabulka naměřených a vypočtených hodnot příslušných vzorků je uvedena v příloze Tabulka 5.

5.6. Důkaz přítomnosti riboflavinu

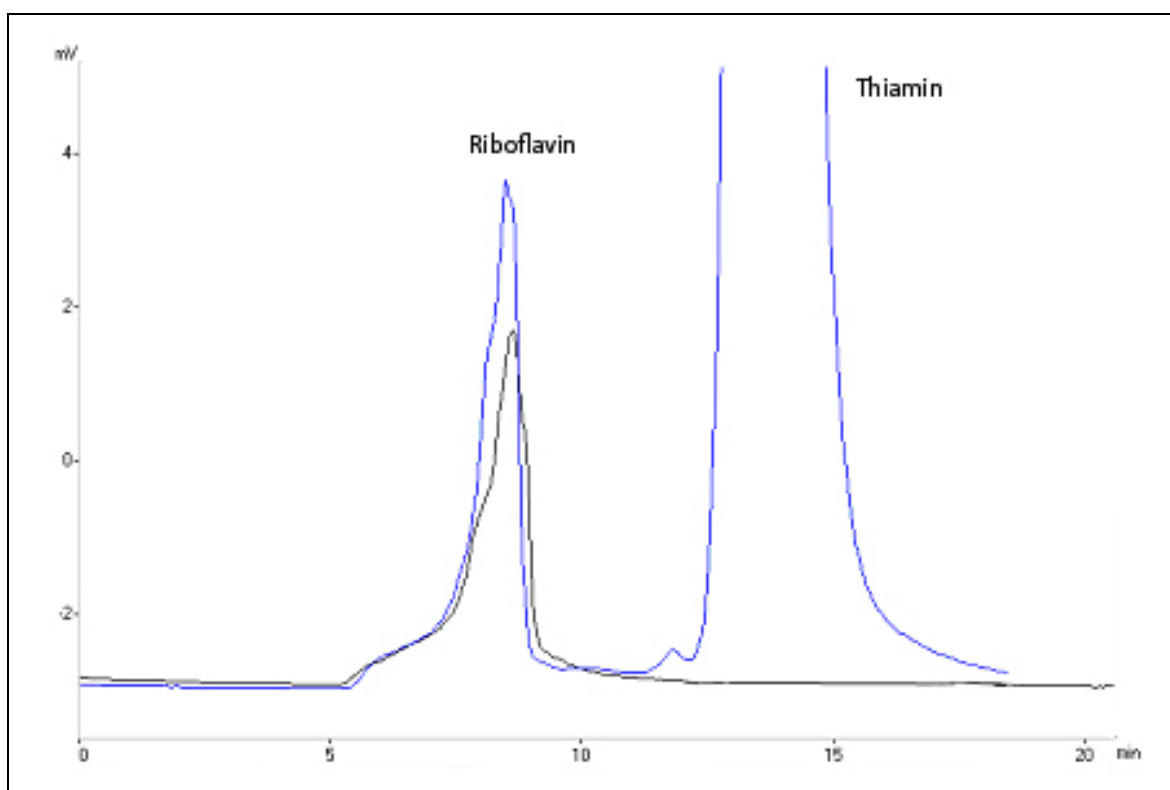
Vzorek sladiny byl nastříknut na kolonu bez derivatizačního činidla, protože nebyl zředěn 1:1 s derivatizačním činidlem, výška a plocha píku je vyšší.

Ze schopnosti přirozené fluorescence a obsahu v pivu a sladince vyšším než je koncentrace thiaminu bylo usouzeno že přítomný pík je s největší pravděpodobností píkem riboflavinu. [31,34]



Obrázek č.19: Chromatogram - důkaz riboflavinu ve sladince

Tento pokus byl znovu ověřen na vzorku sladu s přidavkem standardu thiamin chlorid hydrochloridu, opět se prokázala přirozená fluorescence prvního píku. Roztok sladu byl zředěn 1:1 s 0,1M HCl.



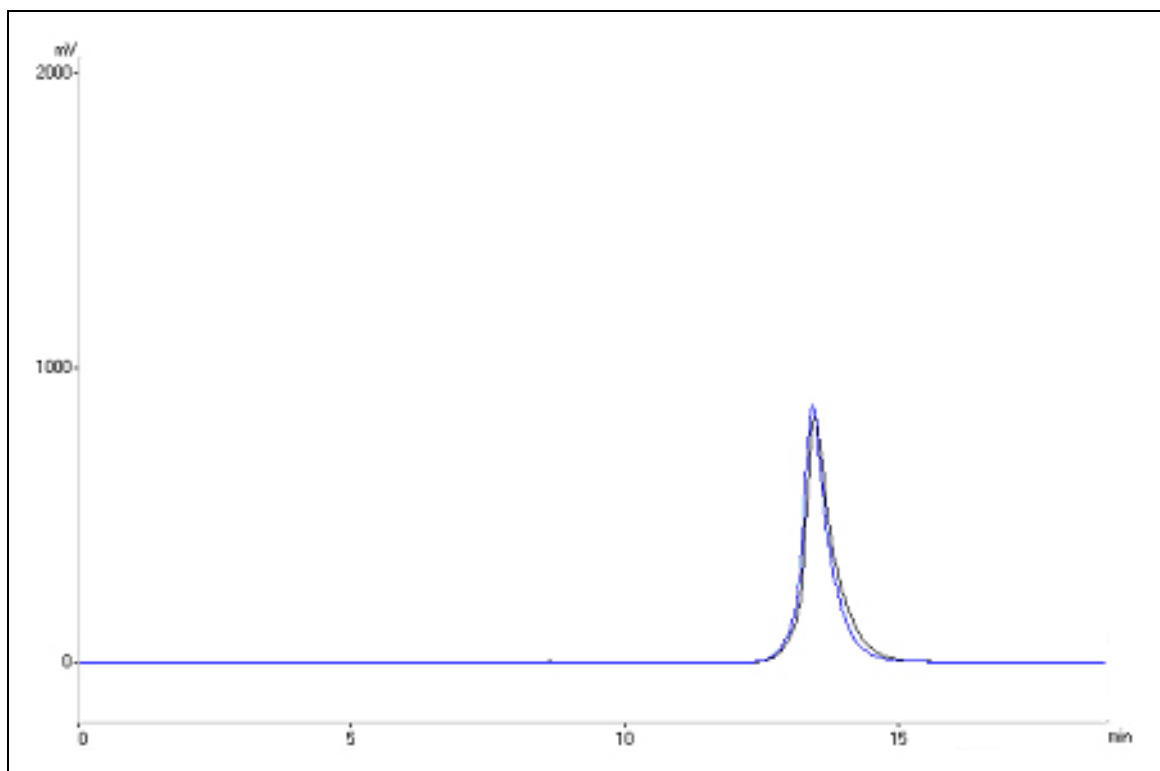
Obrázek č.20: Chromatogram - důkaz riboflavinu - nástřik s derivatizačním činidlem, nástřik bez derivatizačního činidla

5.7. Ztráty thiaminu varem a inkubací

Ztráty thiaminu byly prokázány na roztoku o koncentraci 10,2 mg/100 ml. Byly připraveny 2 roztoky standardu o shodné koncentraci 10,2 mg thiamin chlorid hydrochloridu s 60 ml kyseliny chlorovodíkové. Z nichž jeden byl pouze povařen (1 hodinu, 100 °C), po vychladnutí doplněn na 100 ml, odplyněn v ultrazvukové lázni a rovnou analyzován. Druhý roztok byl povařen za shodných podmínek, po vychladnutí bylo pH roztoku upraveno 2,5M octanem sodným na hodnotu 4, přidáno 1,1 g taka diastasy a roztok byl vložen do inkubátoru na 20 hodin při 40 °C. Po inkubaci byl roztok doplněn na celkový objem 100 ml, odplyněn a analyzován.

Výsledky

Srovnáním ploch 2 roztoků standardu o shodné koncentraci při provedení enzymové hydrolýzy a vynecháním kroku enzymové hydrolýzy byla zjištěna celková ztráta varem a inkubací 82,13 %, z toho ztráta varem (1 hodina, 100 °C) tvořila 81,47 % a ztráta inkubací 0,66 %. Výtěžnost reakce tedy 17,87 %.



Obrázek č.24: Chromatogram - srovnání standardů thiaminu o stejné koncentraci bez enzymatické hydrolýzy a s enzymatickou hydrolýzou

Tabulka naměřených a vypočtených hodnot je uveden v příloze Tabulka 6.

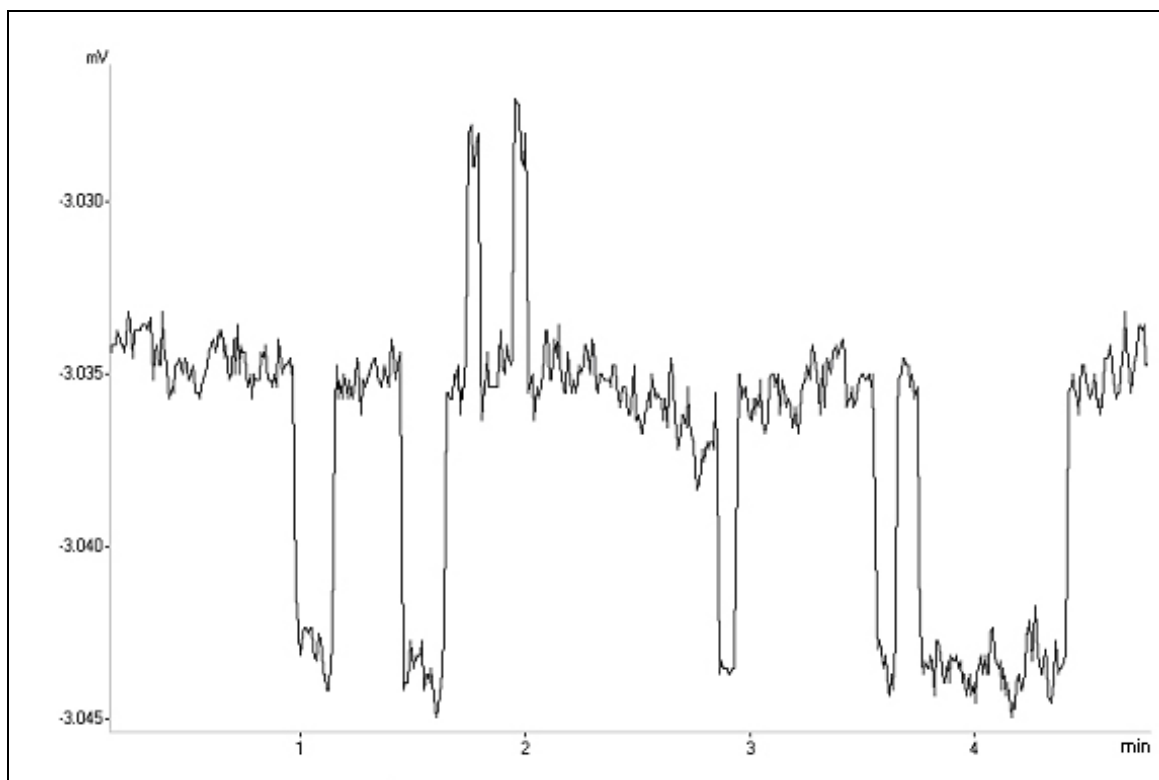
5.8. Validační parametry

5.8.1. Ověření linearity detektoru

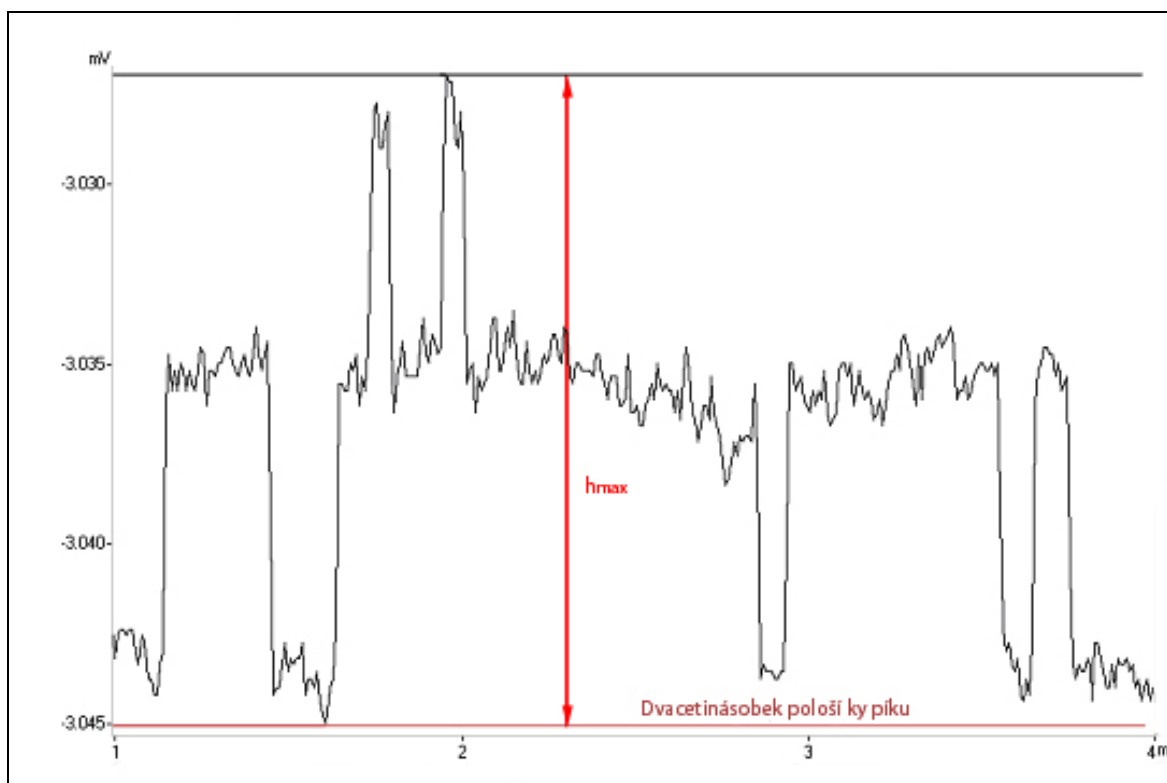
Linearita detektoru byla ověřena u standardu thiamin chlorid hydrochloridu. Kalibrační křivka standardu byla v širokém rozsahu koncentrací 0,04 až 8 mg/l lineární. Korelační koeficient standardu byl 0,9987, což je vyšší než 0,98, metoda je tedy přijatelná pro stanovení.

5.8.2. Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce byla stanovena podle postupu uvedeného v kapitole 2.8.2. Ze záznamu šumu detektoru bylo určeno maximální kolísání základní linie v oblasti dané dvacetinásobkem pološířky píku. Pro příkladné vyhodnocení byl použit pík chromatogramu standardu thiaminu o koncentraci 0,04 mg/l. Pološířka píku, stanovená z chromatogramu standardu thiaminu byla 0,15 minut. Dvacetinásobek pološířky píku je tedy 3 minuty.



Obrázek č.25: Chromatogram - záznam šumu detektoru



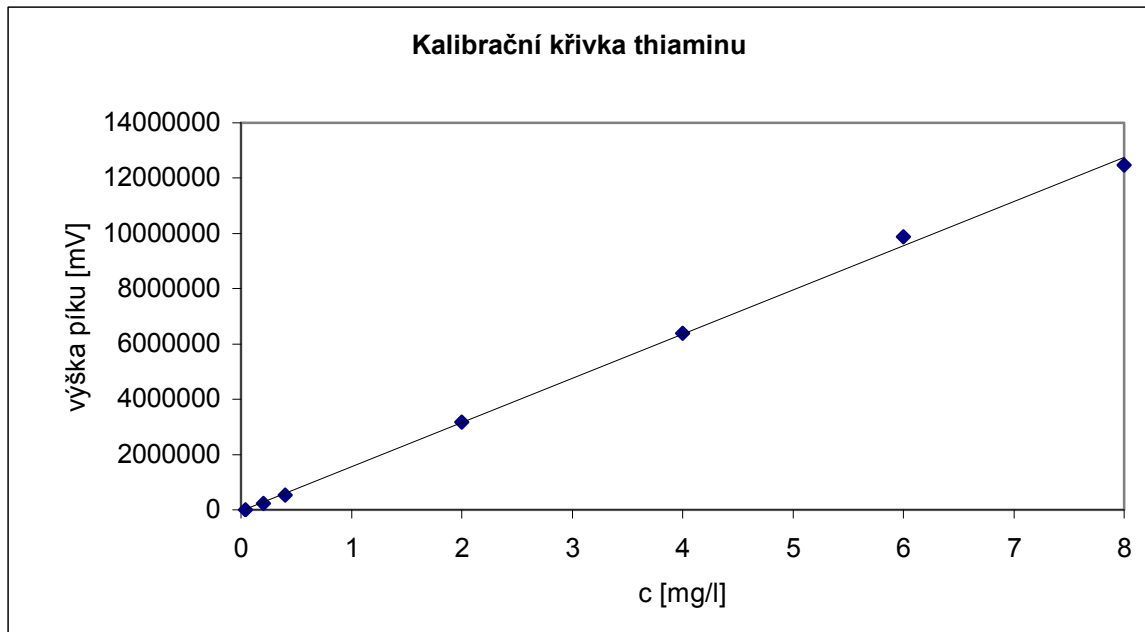
Obrázek č.26: Chromatogram - maximální kolísání základní linie

Maximální kolísání základní linie je $h_{\max} = 18 \text{ mV}$

Pro odezvu meze detekce platí:

$$y_d = 3 \cdot h_{\max}$$

$$y_d = 3 \cdot 18 = 54$$



Obrázek č.27: Kalibrační křivka thiaminu, závislost výšky píku na koncentraci

Rovnice regresní přímky

$$y = 1599805,5459x - 49740,3048$$

$$R^2 = 0,9987$$

Z rovnice regresní přímky sestrojené kalibrační křivky (závislost výšky píku na koncentraci) byla určena směrnice $b_1 = 1599805,5459$.

Koncentrace na mezi detekce:

$$x_d = \frac{y_d}{b_1}$$

$$x_d = \frac{54}{1599805,5459} = 3,3754 \cdot 10^{-5} \text{ mg/l}$$

Mez stanovitelnosti byla stanovena stejným způsobem, přičemž:

$$y_s = 10 \cdot h_{\max}$$

$$y_s = 10 \cdot 18 = 180$$

Pro koncentraci na mezi stanovitelnosti tedy platí:

$$x_s = \frac{y_s}{b_1}$$

$$x_s = \frac{180}{1599805,5459} = 0,0001 \text{ mg/l}$$

Tabulka č.12: Naměřené hodnoty B-komplex tablety

n	Plocha píku	Koncentrace(mg/l)
1	11813096	7,1227
2	12106250	7,2986
3	11815123	7,1239
\bar{x}	11911490	7,1817

5.8.3. Opakovatelnost

$$R = x_{\max} - x_{\min} = 7,2986 - 7,1227$$

$$R = 0,1759 \text{ mg/l}$$

$$s = k_n \cdot R = 0,5908 \cdot 0,1759$$

$$s = 0,1039 \text{ mg/l}$$

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 = \frac{0,1039}{7,1817} \cdot 100$$

$$RSD = 1,45 \%$$

5.8.4. Interval spolehlivosti průměru

$$L_{1,2} = \bar{x} \pm K_n \cdot R = 7,1817 \pm 1,30 \cdot 0,1759$$

$$L_{1,2} = 7,1817 \pm 0,2287 \text{ mg/l}$$

$$K_n = 1,30 \text{ pro } n = 3$$

6. ZÁVĚR

V této diplomové práci byla optimalizována a aplikována metoda izolace vitamínu B₁ v reálných vzorcích sladovnického ječmene a sladu s ohledem na jeho labilitu, nízký obsah v potravinách a výskyt ve vázané formě.

Základem postupu byla ČSN EN 14122 pro stanovení vitamínu B₁ v potravinách metodou HPLC. Úkolem této diplomové práce bylo především stanovit obsah vitamínu B₁ ve vzorcích ječmene a sladu, které byly dodány Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským v Brně. Byly však stanoveny i obsahy tohoto vitamínu v tabletách Thiaminu, B-komplexu, Pangaminu BiFi a též ve sladině a pivu.

V případě kapalných vzorků sladiny a piva nebylo potřeba kyselá ani enzymatické hydrolýzy neboť thiamin se v roztocích nacházel ve volné formě. Tablety byly rozpuštěny v 0,1M HCl a u vzorků ječmenů a sladů byla provedena jak kyselá, tak enzymatická hydrolýza, neboť se v nich thiamin nachází ve vázané formě. Kyselá hydrolýza byla prováděna 0,1M HCl ve vodní lázni vyhřáté na 100 °C po dobu 1 hodiny, enzymatická hydrolýza pomocí taka diastasy a 20 – 22 hodinové inkubace při 39 – 40 °C. Po provedení filtrace byl vzorek připraven k derivatizaci. K derivatizaci se používal silně alkalický roztok K₃[Fe(CN)₆], který thiamin oxidoval na thiochrom. Reakce vyžadovala naprosto přesné dodržení doby míchání a reakční doby, neboť thiochrom je v alkalickém prostředí velmi nestabilní a rychle se rozkládá. Pro reprodukovatelnost výsledku bylo nutné zachovat standardně 10 s míchání vzorku a 60 s reakční doby v klidu. Takto připravený vzorek byl analyzován metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi a detekován fluorescenčním detektorem. Pro detekci thiaminu byla použita excitační vlnová délka 366 nm a emisní vlnová délka 435 nm.

U metody byly vypočteny základní validační parametry.

Celkem byly stanoveny 4 vzorky sladu, 3 vzorky sladovnického ječmene, vzorek sladiny, piva a 3 vzorky tablet potravinových doplňků. Při stanovení obsahu thiaminu v tabletách bylo dosaženo relativní shody mezi naměřenými a deklarovanými hodnotami. V B-komplex tabletě byl zjištěn obsah thiaminu 16,86 mg, deklarovaný obsah je 15 mg. V tabletě thiaminu byl zjištěn obsah 66,17 mg a deklarovaný obsah 50 mg. V tabletě Pangaminu BiFi byl zjištěn obsah 0,02 mg thiaminu, obsah thiaminu není deklarován z důvodu nestabilní produkce thiaminu kvasinkami *Sacharomyces cerevisiae*. U sladovnických ječmenů byla naměřena hodnota přibližně 0,21 – 0,22 mg/kg. U vzorků sladů byla naměřena hodnota přibližně 0,15 – 0,17 mg/kg. Experimentálně byla ale prokázána ztráta thiaminu hodinovým varem přibližně 83 %, což musí být bráno v potaz při vyčíslování celkového obsahu thiaminu ve vzorcích ječmene a sladu. Ve vzorku sladiny byl zjištěn obsah vitamínu 0,0394 mg/l a ve vzorku piva byl obsah thiaminu pod mezí detekce.

Byla prokázána též nevhodnost zkoncentrování vzorků pomocí vakuové odparky. Při teplotě 50°C, délce 2,5 hodiny došlo k 64% ztrátě thiaminu v důsledku působení teploty a světla.

Při kontrolním stanovení metodou přídatku standardu byla proti vzorku standardu zjištěna nedostatečná defosforylace vzorků ječmenů a sladů. Z toho lze usuzovat na chybu v procesu inkubace, a to, že enzym pro svoji plnou účinnost vyžaduje třepání. To by vysvětlovalo poměrně nízký naměřený obsah thiaminu ve vzorcích ječmenů a sladů ve srovnání s obsahem uváděným v literatuře. Literatura uvádí obsah thiaminu v obilí kolem 3 - 4 mg/kg.

Proto doporučuji v následující práci zařazení termostatové třepací lázně, přestože norma toto neuvádí.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*. Tábor: OSSIS. s. 1-9. ISBN 80-902391-4-5.
- [2] FENNEMA, O. R. *Food Chemistry*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 568-574. ISBN 0-8247-9691-8
- [3] UHEROVÁ, R. *Čo vieme o vitamínoch dnes*, 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2002. s. 13-74. ISBN 8096873709
- [4] COMBS, G.F. *The Vitamins Fundamentals Aspekt in Nutrition and Health*. 2nd ed. London: Academic Press, 1998. p. 58-401. ISBN 0-12-183492-1
- [5] BLAU K., HALKET J. *Hand book of Derivatives for Chromatography*, 2nd ed., John Wiley & Sons, New York, NY 10158-0012 USA
- [6] DOUŠA, Michal. *HPLC.CZ* [online]. 1999-2007 , Last modified: 26. října 2007 [cit. 2008-03-09]. Dostupný z WWW: <<http://sweb.cz/HPLC/>>.
- [7] ŠABARTOVÁ, Tatjana . *Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně* [online]. [1993-] , 9. 03. 2008 [cit. 2008-03-09]. Dostupný z WWW: <http://old.mendelu.cz/~upsr/prezentace/obilniny/contents/hod_jak_jec.html>.
- [8] Copyright Profi Press s.r.o.. *Agroweb* [online]. Profi Press s.r.o., 2003 , 17.12.2007 [cit. 2008-03-09]. Dostupný z WWW: <http://www.agroweb.cz/roslinna-vyroba/Vykupni-ceny-jecmene-zdrasily%20slad__s44x29564.html>. ISSN 1214-762.
- [9] PERLÍN, C. *Gate2biotech* [online]. 2006 [cit. 2008-03-09]. Dostupný z WWW: <<http://www.gate2biotech.cz/jecmen-a-pivo/>>. ISSN 1802-268.
- [10] CATHEDRAL Software. *Sladovny Soufflet ČR, a.s.* [online]. c2004 [cit. 2008-03-09]. Dostupný z WWW: <<http://www.bmc.cz/vyrobky.php>>.
- [11] LYNCH, P. L. M., YOUNG, I. S. . Determination of thiamine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2000, vol. 881, is. 1-2, s. 267-284. Dostupný z WWW: <sciencedirect.com>.
- [12] RIZZOLO , A., POLESELLO, S. Chromatographic determination of vitamins in foods. *Journal of Chromatography A*. 1992, vol. 624, is. 1-2, s. 103-152. Dostupný z WWW: <sciencedirect.com>.
- [13] HÁLKOVÁ, J., RUMÍŠKOVÁ, M., RIEGLOVÁ, J. *Analýza potravin*, 2. vyd. Újezd u Brna: Ivan Straka, 2001. s. 71-73. ISBN 80-86494-02-0

[14] BRUBACHER, G., MÜLLER, W. M., SOUTHGATE, D. A. T. *Methods for the Determination of Vitamins in Food*, London: Elsevier Applied Science, 1985. pp. 51-65. ISBN - 0-85334-339-X

[15] PROKEŠ, J.. *Pivovarskaskola.cz* [online]. 2006. Brno : Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s. , c2006 , 2006 [cit. 2008-03-09]. Dostupný z WWW: <<http://www.pivovarskaskola.cz/slad.htm>>.

[16] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 1. vyd. Ostrava : Pavel Klouda, 1996. 203 s. ISBN 80-902155-0-5.

[17] CHURÁČEK, J., JANDERA, P. *Separace látek – Kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie*. 2. nezměněné vyd. Praha : SNTL, 1986. 140 s.

[18] CASTER, W.O., MICKELSEN, O. Effect of diet and stress on the thiamin and pyrimin excretion of normal young men maintained on controlled intakes of thiamin. *Nutrition research*. 1991, vol. 11, is. 6, s. 549-558. Dostupný z WWW: <sciencedirect.com>.

[19] REYES, Erlinda S. P., SUBRYAN, Lionel. An improved method of simultaneous HPLC and thiamin in selected cereal products. *Journal of Food Composition and Analysis*. 1989, vol. 2, is. 1, s. 41-47. Dostupný z WWW: <sciencedirect.com>.

[20] TANG, Xueyan, CRONIN, Denis A., BRUNTON, Nigel P. A simplified approach to the determination of thiamine and riboflavin in meats using reverse phase HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006, vol. 19, is. 8, s. 831-837. Dostupný z WWW: <sciencedirect.com>.

[21] SHABANGI, Masangu, SUTTON, Jeffrey A. Separation of thiamin and its phosphate esters by capillary zone electrophoresis and its application to the analysis of water-soluble vitamins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005, vol. 38, is. 1, s. 66-71. Dostupný z WWW: <sciencedirect.com>.

[22] ORZÁEZ VILLANUEVA, M. T., et al. Modification of vitamins B1 and B2 by culinary processes: traditional systems and microwaves. *Food chemistry*. 2000, vol. 80, is. 4, s. 417-421. Dostupný z WWW: <sciencedirect.com>.

[23] VINAS, P, LOPEZ-ERROZ, C, BALSALOBRE, N. Determination of thiamine and its esters in beers and raw materials used for their manufacture by liquid chromatography with postcolumn derivatization . *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY* . 2003, vol. 51, is. 11, s. 3222-3227. Dostupný z WWW: <apps.isiknowledge.com>.

[24] HOMEWOOD, J., BOND, N. W. Thiamin Deficiency and Korsakoff's Syndrome: Failure to Find Memory Impairments Following Nonalcoholic Wernicke's Encephalopathy. *Alcohol*. 1999, vol. 19, is. 1, s. 75-84. Dostupný z WWW: <sciencedirect.com>.

[25] HERNANDEZ, F.P.G., ROMERO, C.D., DELATORRE, A.H. Stability of thiamin and riboflavin respect to some physicochemical factors. *Afinidad*. 1994, vol. 51, is. 451, s. 237-240. Dostupný z WWW: <apps.isiknowledge.com>.

[26] OTLES, S. Comparative determination of vitamin B1 and vitamin B2 in foods by using different enzyme preparations. *Zeitschrift fur lebensmittel-untersuchung und-forschung*. 1991, vol. 193, is. 4, s. 347-350. Dostupný z WWW: <apps.isiknowledge.com>.

[27] ČSN EN 14122: 2004. Potraviny – Stanovení vitamínu B₁ metodou HPLC. Praha: Český normalizační institut, 2004. 20 s.

[28] HUOPALAHTI, Rainer, SUNELL, Jarna. Use of capillary zone electrophoresis in the determination of B vitamins in pharmaceutical products. *Journal of Chromatography A*. 1993, vol. 636, is. 1, s. 133-135. Dostupný z WWW: <sciencedirect.com>.

[29] SIDDIQUI, Imrana, PITRE, K. S. Voltammetric determination of vitamins in a pharmaceutical formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2001, vol. 26, is. 5-6, s. 1009-1015. Dostupný z WWW: <sciencedirect.com>.

[30] OLLILAINEN, Velimatti, et al. The HPLC Determination of Total Thiamin (Vitamin B1) in Foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 1993, vol. 6, is. 2, s. 152-165. Dostupný z WWW: <sciencedirect.com>.

[31] VINAS, P., et al. Comparison of ion-pair and amide-based column reversed-phase liquid chromatography for the separation of thiamine-related compounds. *Journal of chromatography B*. 2001, vol. 757, is. 2, s. 301-308. Dostupný z WWW: <apps.isiknowledge.com>.

[32] DOUŠA, M.: Oficilní stránky o HPLC, [online], 1999-2006, last modified: 23.3.2007, [cit. 25.3.2008]. Dostupný z <http://www.sweb.cz/hplc>

[33] HOLZBECHER Z., Churáček J.: Analytická chemie, str.441 – 444, 632 – 649. SNTL Praha 1987.

[34] MÍŠA, D.: beers.cz, [online], 1998-2006, last modified: 6.5.2008, [cit. 7.5.2008]. Dostupný z <http://www.beers.cz/dokumenty/7.pdf>

8. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

UV – ultra fialová oblast záření

RPC – chromatografie na reverzní fázi

HPLC – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

C₁₈ – stacionární fáze je tvořena řetězcí osmnáctiuhlíkových zbytků navázaných na nosič (silikagel)

NADPH – nikotinamidadeninukleotid

UHT – metoda ultravysokého záhřevu

HEMT - 5(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazolový derivát thiaminu

FPD - plamenově fotometrický detektor

9. SEZNAM PŘÍLOH

10.1. Tabulky

Tabulka 1: Tabulka výsledků a výpočtů pro vzorky potravinových doplňků

Tabulka 2: Tabulka výsledků a výpočtů pro vzorky ječmenů, sladů a sladiny (přímou metodou)

Tabulka 3: Tabulka výpočtů validačních parametrů vícenásobného měření pro vzorky ječmenů, sladů a sladiny

Tabulka 4: Tabulka výpočtů validačních parametrů dvou paralelních měření pro vzorky ječmenů, sladů a sladiny

Tabulka 5: Tabulka výsledků a výpočtů pro vzorky ječmenů a sladů (metodou standardního přídatku)

Tabulka 6: Tabulka výpočtu výtěžnosti kyselé a enzymatické hydrolýzy

Tabulka 7: Tabulka výpočtu výtěžnosti reakce pro vzorek Starobrno slad za použití vakuové odparky

10.2. Obrázky

Obrázek 1: Vysokoúčinný kapalinový chromatograf Shimadzu

10. PŘÍLOHY

10.1. Tabulky

Tabulka 1: Tabulka výsledků a výpočtů pro vzorky potravinových doplňků

	plocha 1	plocha 2	plocha 3	průměr	koncentrace [mg/l]	[mg/l]	[mg/100ml]	[mg/1 tableta]
B-komplex	11813096	12106250	11815123	11911489,67	7,1817	71,8169	7,1817	16,8624
Pangamin BiFi	292983	279892	280986	284620,3333	0,2056	0,2056	0,0206	0,0206
Thiamin	6391184	6318374	6440614	6383390,667	3,8648	96,6209	9,6621	66,1787

	koncentrace [mg/l]			průměr	R	k _n pro n=3	SD	RSD %	L _{1,2}
B-komplex	7,1227	7,2986	7,1239	7,1817	0,1759	0,5908	0,1039	1,45	0,2287
Pangamin BiFi	0,2106	0,2027	0,2034	0,2056	0,0079	0,5908	0,0046	2,26	0,0102
Thiamin	3,8695	3,8258	3,8992	3,8648	0,0733	0,5908	0,0433	1,12	0,0953

Tabulka 2: Tabulka výsledků a výpočtů pro vzorky ječmenů, sladů a sladiny (přímou metodou)

	23.4.2008		24.4.2008		průměr	koncentrace [mg/l]	[mg/50ml]	[mg/kg]	[mg/kg] + 82,13% ztrát varem a inkubací
	plocha 1	plocha 2	plocha 1	plocha 2					
Calgary ječmen	73089	74653	80597	68893	74308	0,0794	0,0040	0,2127	1,1901
Blaník ječmen	78321	69547	75812	73408	74272	0,0794	0,0040	0,2126	1,1895
Ebson ječmen	70994	75366	68713	96263	77834	0,0815	0,0041	0,2232	1,2492
Ebson slad	58213	52756	59490	61300	57939,75	0,0696	0,0035	0,1636	0,9153
Blaník slad	44587	50557	57065	61629	53459,5	0,0669	0,0033	0,1501	0,8401
Calgary slad	76444	63913	84921	78112	75847,5	0,0803	0,0039	0,2012	1,1260
Starobrno slad	52339	59812	62148	67681	60495	0,0711	0,0036	0,1712	0,9582
Slepý vzorek	3304	3412	3403	3515	3408,5	0,0368	0,0018	1,5906	
Starobrno sladina	7565	7640	7584	7621	7602,5	0,0394			

Tabulka 3: Tabulka výpočtů validačních parametrů vícenásobného měření pro vzorky ječmenů, sladů a sladiny

	koncentrace [mg/l]				průměr	R	k_n pro n=4	SD	RSD [%]
Calgary ječmen	0,07865	0,0796	0,0832	0,07614	0,0794	7,0224E-03	0,4857	3,4108E-03	4,30
Blaník ječmen	0,08179	0,0765	0,0803	0,07884	0,0794	5,2644E-03	0,4857	2,5569E-03	3,22
Ebson ječmen	0,0774	0,08	0,076	0,09256	0,0815	1,6530E-02	0,4857	8,0286E-03	9,85
Ebson slad	0,06973	0,0665	0,0705	0,07158	0,0696	5,1264E-03	0,4857	2,4899E-03	3,58
Blaník slad	0,06155	0,0651	0,069	0,07178	0,0669	1,0225E-02	0,4857	4,9664E-03	7,43
Calgary slad	0,08067	0,0731	0,0858	0,08167	0,0803	1,2605E-02	0,4857	6,1222E-03	7,62
Starobrno slad	0,0662	0,0707	0,0721	0,07541	0,0711	9,2052E-03	0,4857	4,4710E-03	6,29
Slepý vzorek	0,03678	0,03685	0,03684	0,03691	0,0368	1,2660E-04	0,4857	6,1490E-05	0,17
Starobrno sladina	0,03934	0,03938	0,03935	0,03937	0,0394	4,5000E-05	0,4857	2,1856E-05	0,06

Tabulka 4: Tabulka výpočtů validačních parametrů dvou paralelních měření pro vzorky ječmenů, sladů a sladiny

	koncentrace [mg/l]				průměr paralel.měření	průměr SD	RSD [%]
Calgary ječmen	0,0787	0,0796	0,0832	0,0761	0,0794	3,5274E-03	4,44
Blaník ječmen	0,0818	0,0765	0,0803	0,0788	0,0794	2,9718E-03	3,74
Ebson ječmen	0,0774	0,0800	0,0760	0,0926	0,0815	8,4868E-03	10,41
Ebson slad	0,0697	0,0665	0,0705	0,0716	0,0696	1,9320E-03	2,78
Blaník slad	0,0616	0,0651	0,0690	0,0718	0,0669	2,8006E-03	4,19
Calgary slad	0,0807	0,0731	0,0858	0,0817	0,0803	5,1417E-03	6,40
Starobrno slad	0,0662	0,0707	0,0721	0,0754	0,0711	3,4578E-03	4,86
Slepý vzorek	0,0368	0,0368	0,0368	0,0369	0,0368	5,8489E-05	0,16
Starobrno sladina	0,0393	0,0394	0,0394	0,0394	0,0394	2,9776E-05	0,08

Tabulka 5: Tabulka výsledků a výpočtů pro vzorky ječmenů a sladů (metodou standardního přídávku)

	plocha 1	plocha 2	průměr	koncentrace [mg/l]	[mg/100ml]	koncentrace [mg/kg]
slepý vzorek	6425	6540	6482,5	0,0387	0,0039	
standard	29915119	30717244	30316181,5	18,2245	1,8225	
Calgary ječmen	13444690	12107981	12776335,5	7,7006	0,7701	-105,6080176
Blaník ječmen	14891035	15508809	15199922	9,1548	0,9155	-91,07898726
Ebson ječmen	14800375	12651680	13726027,5	8,2704	0,8270	-99,92382205
Calgary slad	11165432	10095375	10630403,5	6,4130	0,6413	-118,4814212
Blaník slad	10599029	11226430	10912729,5	6,5824	0,6582	-116,7947596
Ebson slad	11535662	10508124	11021893	6,6479	0,6648	-116,1433345
Starobrno slad	10898705	12066878	11482791,5	6,9245	0,6924	-113,3804322

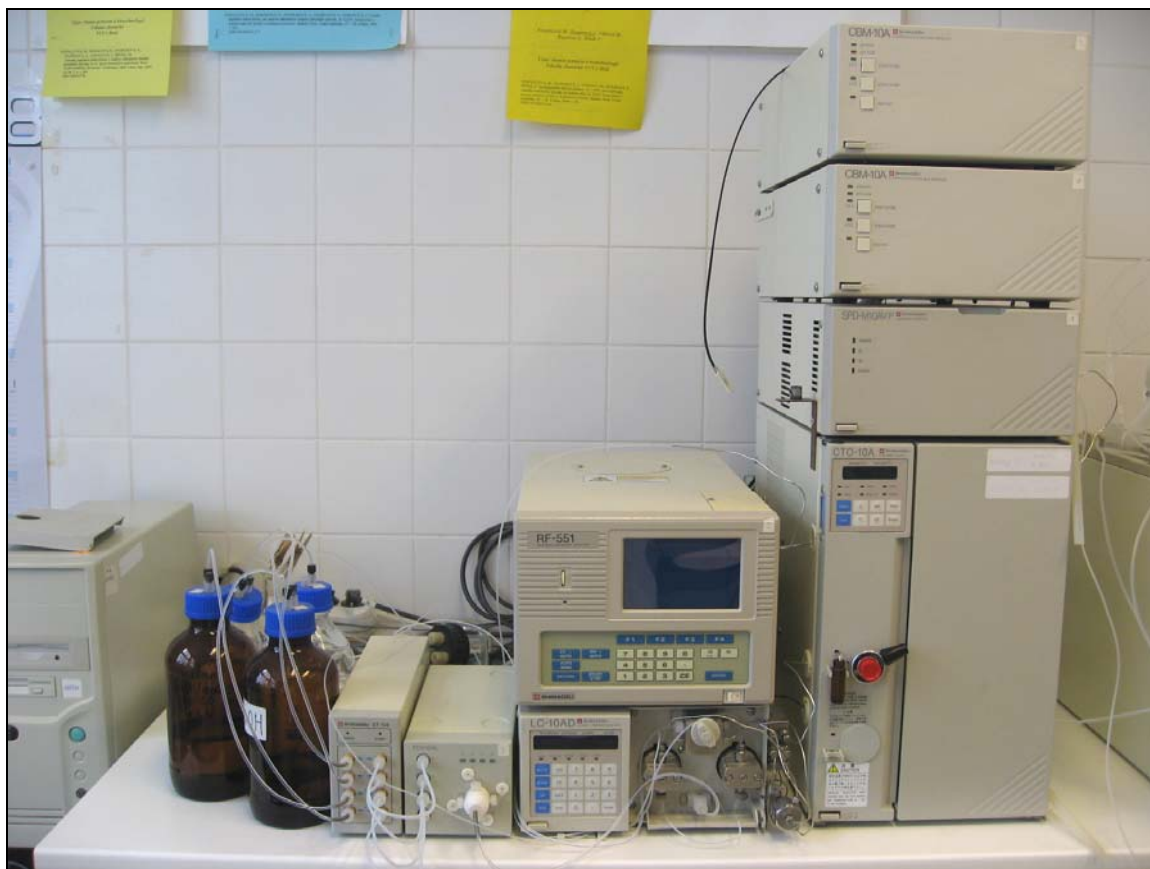
Tabulka 6: Tabulka výpočtu výtěžnosti kyselá a enzymatické hydrolyzy

standard	plocha 1	plocha 2	průměr	[mg/l]	[mg/100ml]	ztráta varem [%]	ztráta inkubací [%]	ztráty celkem [%]	výtěžnost [%]
s enzymatickou hydrolyzou	29915119	30717244	30316182	18,2245	1,8225	82,13	0,66	82,13	17,87
bez enzymatické hydrolyzy	31633245	31256431	31444838	18,9017	1,8902	81,47			

Tabulka 7: Tabulka výpočtu výtěžnosti reakce pro vzorek Starobrno slad za použití vakuové odparky

	plocha 1	plocha 2	plocha 3	plocha 4	průměr	koncentrace [mg/l]	výtěžnost [%]	ztráta [%]
Starobrno slad	116289	128137	90830		111752,03	0,1019	35,81	64,19
Starobrno slad	52339	59812	62148	67681	60495,00	0,0711		

10.2. Obrázky



Obrázek č.28: Vysokoúčinný kapalinový chromatograf Shimadzu