

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



**Obsah vitamín skupiny B v obilovinách s barevným
zrnem**

Diplomová práce

Autor práce: Denisa Tocháková

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: doc. Ing. Alena Hejtmánková, CSc.

estné prohlá-ení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Obsah vitamin skupiny B v obilovinách s barevným zrnem" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva těchto osob.

V Praze dne

Bc. Denisa Tocháková

Pod kování

Ráda bych touto cestou pod kovala doc. Ing. Alen Hejtmánkové, CSc. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a vst ícnost, kterou mi v pr b hu zpracování diplomové práce v novala.

Obsah vitamin skupiny B v obilovinách s barevným zrnem

Souhrn

Diplomová práce se zabývá simultánním stanovením obsahu vitamin skupiny B v obilovinách s barevným zrnem metodou HPLC s využitím detektoru diodového pole (PDA). Teoretická část se zaměřuje na vybrané vitaminy skupiny B, popisuje jejich vlastnosti, funkce a účinky na lidský organismus. Práce se dále věnuje metodám izolace a stanovení vitamin B v potravinách, zmíněna je rovněž charakterizace analyzovaných obilovin.

V rámci diplomové práce byla provedena optimalizace přípravy vzorku obilovin a následná analýza 34 vybraných odrůd pšenice, ječmene a tritordea, a to ve formě ozimé i jarní. Vlastní stanovení metodou kapalinové chromatografie vycházelo z aplikace listu firmy Phenomenex, Inc. Ve všech odrůdách byly kvantifikovány vitaminy B1, B2, B3 a B6.

Odrůdy pšenice vykazovaly ve všech druzích analyzovaných obilovin nejvyšší průměrné obsahy vitamin B1 a B2. Průměrně nejvíce vitaminu B3 obsahovaly vzorky tritordea, nejvyšší průměrné množství vitaminu B6 bylo zjištěno v odrůdách ječmene. Tritordeum obsahovalo ze všech analyzovaných druhů obilovin nejvyšší průměrné celkové množství vitamin B, nejnižší celkový obsah vitamin byl stanoven v pšenicí. Mezi různými formami pšenice, pšenicí jarní pšenicí a ozimou, nebyly v obsahu jednotlivých vitamin pozorovány statisticky významné rozdíly. Rozdílné obsahy sledovaných vitamin byly zjištěny mezi odrůdami pšenice s odlišnou barvou obilky. Odrůda s purpurovým perikarpem a flutým endospermem obsahovala ze všech odrůd nejnižší množství všech analyzovaných vitamin. Nejvyšší obsah vitaminu B1 a B2 byl zjištěn v odrůdách bez pigmentu, nejvíce vitaminu B3 a B6 obsahovaly odrůdy s modře zbarvenou aleuronovou vrstvou.

Metoda simultánního stanovení vitamin skupiny B, aplikovaná v diplomové práci, poskytovala opakovatelné a reprodukovatelné výsledky. Většina stanovených obsah analyzovaných vitamin se pohybovala v rozmezí hodnot vyplývajících z literárních zdrojů.

Klíčová slova:

obiloviny, thiamin, riboflavin, niacin, pyridoxin, kyselina pantothenová, HPLC

The contents of B-group vitamins in cereals with colour grains

Summary

The diploma thesis deals with the simultaneous determination of B-group vitamins in cereals with coloured grains by HPLC using diode array detector (PDA). The theoretical part focuses on selected B-group vitamins, describes their qualities, functions and effects on human organism. The thesis also deals with methods of isolation and determination of B-group vitamins in foodstuffs, characterization of analyzed cereals is also mentioned.

Within the thesis, an optimization of the preparation methodology and a simultaneous determination of B1, B2, B3 and B6 content in cereals with coloured grains was implemented. The analysis was conducted with 34 samples of winter and spring wheat, barley and tritordeum. The liquid chromatography method was based on the Phenomenex Technical Documents Inc.

Wheat varieties showed the highest average content of B1 and B2 vitamins. Tritordeum contained most of the B3 vitamin. The highest average amount of vitamin B6 was found in barley varieties.

Tritordeum contained the highest average levels of total B-group vitamins amount in comparison with all analyzed cereal species. The lowest average levels of total vitamins amount was determined in wheat.

The difference between the content of B-group vitamins in the samples of spring and winter wheat were not statistically significant. Different contents of individual vitamins were found among wheat varieties with different color of caryopsis. The purple pericarp and yellow endosperm variety contained the lowest amount of all analyzed vitamins from all varieties. The highest levels of vitamin B1 and B2 were found in the non-pigmented variety, most of the B3 and B6 vitamins contained varieties with a blue-colored aleurone layer.

The method of simultaneous determination of B-group vitamins, applied in the diploma thesis, provided repeatable and reproducible results. Most of the results were in the range of values resulting from literary sources.

Keywords:

cereals, thiamine, riboflavin, niacin, pyridoxine, pantothenic acid, HPLC

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce a v decká hypotéza.....	9
2.1 Cíle práce	9
2.2 V decké hypotézy	9
3 Literární re-er-e.....	10
3.1 Vitaminy.....	10
3.1.1 Thiamin	11
3.1.1.1 Funkce thiaminu	11
3.1.1.2 Doporu ený denní p íjem thiaminu	11
3.1.1.3 Zdroje thiaminu	12
3.1.1.4 Nedostatek thiaminu	12
3.1.2 Riboflavin.....	13
3.1.2.1 Funkce riboflavinu	14
3.1.2.2 Doporu ený denní p íjem riboflavinu	14
3.1.2.3 Zdroje riboflavinu	14
3.1.2.4 Nedostatek riboflavinu	15
3.1.3 Niacin	15
3.1.3.1 Funkce niacinu	16
3.1.3.2 Doporu ený denní p íjem niacinu	16
3.1.3.3 Zdroje niacinu	16
3.1.3.4 Nedostatek niacinu	17
3.1.4 Pantothenová kyselina.....	17
3.1.4.1 Funkce pantothenové kyseliny.....	17
3.1.4.2 Doporu ený denní p íjem pantothenové kyseliny.....	17
3.1.4.3 Zdroje pantothenové kyseliny.....	18
3.1.4.4 Nedostatek pantothenové kyseliny.....	18
3.1.5 Pyridoxin	19
3.1.5.1 Funkce pyridoxinu.....	20
3.1.5.2 Doporu ený denní p íjem pyridoxinu.....	20
3.1.5.3 Zdroje pyridoxinu.....	20
3.1.5.4 Nedostatek pyridoxinu.....	21
3.2 Stanovení vitamin skupiny B.....	21
3.2.1 Stanovení thiaminu	21
3.2.1.1 Extrakce thiaminu	21
3.2.1.2 Spektrální metody	22

3.2.1.3	Chromatografické stanovení	22
3.2.1.4	SN EN 14122	23
3.2.2	Stanovení riboflavinu	23
3.2.2.1	Extrakce riboflavinu	23
3.2.2.2	Spektrální metody	23
3.2.2.3	Lumiflavinová metoda.....	23
3.2.2.4	Elektromigra ní metody	24
3.2.2.5	Chromatografické stanovení	24
3.2.2.6	SN EN 14152	24
3.2.3	Stanovení niacinu.....	24
3.2.3.1	Extrakce niacinu.....	24
3.2.3.2	Spektrální metody	25
3.2.3.3	Elektromigra ní metody	25
3.2.3.4	Chromatografické stanovení	25
3.2.3.5	SN 56 0051.....	26
3.2.4	Stanovení pantothenové kyseliny	27
3.2.4.1	Extrakce pantothenové kyseliny	27
3.2.4.2	Chromatografické stanovení	27
3.2.4.3	SN 56 0060.....	27
3.2.5	Stanovení pyridoxinu	27
3.2.5.1	Extrakce pyridoxinu	27
3.2.5.2	Spektrální metody	28
3.2.5.3	Chromatografické stanovení	28
3.2.5.4	SN EN 14663	28
3.2.6	Simultánní stanovení vitamin skupiny B.....	29
3.2.6.1	Chromatografické stanovení	29
3.2.6.2	Elektromigra ní stanovení	30
3.3	Obiloviny.....	31
3.3.1	Stavba a chemické složení obilného zrna.....	31
3.3.2	P-enice	32
3.3.3	Je men.....	32
3.3.4	Tritordeum.....	33
3.3.5	Netradi ní barevné odr dy obilovin.....	33
3.3.6	Vitaminy skupiny B v obilovinách	34
3.3.6.1	Vitaminy skupiny B v p-enici.....	34
3.3.6.2	Vitaminy skupiny B v je mení.....	34
4	Materiál a metody	36
4.1	Laborato	36

4.2	Vzorky	36
4.3	P ístroje	38
4.4	Pom cky.....	38
4.5	Chemikálie	38
4.6	Chromatografické podmínky	39
4.7	P íprava vzorku.....	40
4.8	Statistické vyhodnocení	40
5	Výsledky	41
5.1	Hodnocení obsahu vitamin podle druhu obiloviny	41
5.2	Hodnocení obsahu vitamin podle odr dy obiloviny	43
5.2.1	Je men.....	43
5.2.2	Tritordeum.....	45
5.2.3	P-enice	47
5.3	Hodnocení celkového obsahu vitamin skupiny B v jednotlivých odr dách.....	51
5.3.1	Jarní p-enice	51
5.3.2	Ozimá p-enice.....	51
5.3.3	Odr dy je mene.....	52
5.3.4	Odr dy tritordea.....	53
5.4	Hodnocení obsahu vitamin v p-enici podle r stové formy	53
5.4.1	Jarní p-enice	53
5.4.2	Ozimá p-enice.....	53
5.5	Hodnocení obsahu vitamin v p-enici podle zbarvení zrna	54
5.5.1	P-enice se flutým endospermem	54
5.5.2	P-enice s purpurovým perikarpem a flutým endospermem	55
5.5.3	P-enice s purpurovým perikarpem.....	56
5.5.4	P-enice s modrou aleuronovou vrstvou a purpurovým perikarpem.....	56
5.5.5	P-enice se standardní barvou zrna (tzn. erveným perikarpem).....	57
5.5.6	P-enice bez pigmentu.....	58
5.5.7	P-enice s modrou aleuronovou vrstvou.....	59
6	Diskuze	60
7	Záv r	65
8	Literatura.....	66
9	Seznam poufitých zkratek a symbol	74
10	Samostatné p ílohy	I
10.1	Ukázkový p íklad statistického zhodnocení obsahu vitamin podle druhu obiloviny	
	I	
10.1.1	Vitamin B1	I
10.1.2	Vitamin B2	I
10.1.3	Vitamin B3	II
10.1.4	Vitamin B6	III

1 Úvod

Vitaminy skupiny B jsou organické nízkomolekulární sloučeniny nezbytné pro správnou funkci lidského organismu. Jako kofaktory enzymů hrají důležitou roli v energetickém metabolismu. Významnou úlohu plní rovněž v syntéze hemoglobinu a některých neurotransmiterů a hormonů.

Bohatým zdrojem vitaminů skupiny B jsou obiloviny. V posledních letech vzbuzují zájem obiloviny s netradičním zbarvením obilky, které je způsobeno přítomností přírodních barviv. Pro tyto barviva je typická vysoká antioxidační aktivita. Strava bohatá na antioxidanty pozitivně ovlivňuje lidské zdraví, působí preventivně na výskyt aterosklerózy a ischemické choroby srdeční, snižuje pravděpodobnost vzniku některých typů rakoviny a zlepšuje funkci zraku. Díky těmto úkonom mají obiloviny s barevným zrnem velký potenciál pro využití v potravinářství.

Stanovení vitaminů rozpustných ve vodě, tedy i vitaminů skupiny B, je poměrně náročné. Potíže způsobuje jejich chemická lability, problémem však může být také příliš nízká koncentrace jednoho vitaminu ve srovnání s ostatními. Významné omezení mohou rovněž představovat rušivé látky přítomné v analyzovaném extraktu. Pro stanovení vitaminů skupiny B bylo vypracováno mnoho různých metod. V praxi se nejčastěji aplikuje vysokouinná kapalinová chromatografie (HPLC), a proto byl tento postup použit i v diplomové práci.

2 Cíl práce a vdecká hypotéza

2.1 Cíle práce

Cílem diplomové práce je optimalizace přípravy vzorku a vlastní metody vysokou a jinou kapalinovou chromatografií (HPLC) pro simultánní stanovení vitamínů skupiny B v obilovinách. Dále si práce klade za cíl stanovit vybrané vitamíny skupiny B v obilovinách s barevným zrnem a statisticky porovnat rozdíly v obsahu jednotlivých vitamínů v různých druhích i odrůdách obilovin s barevným zrnem.

2.2 Vdecké hypotézy

Vhodnou metodou HPLC lze s dostatečnou spolehlivostí stanovit souasně v jedné analýze jednotlivé vybrané vitamíny skupiny B v obilovinách.

Různé druhy obilovin s barevným zrnem se liší v obsahu vybraných vitamínů skupiny B.

Různé odrůdy jednoho druhu obilovin s barevným zrnem se liší v obsahu vybraných vitamínů skupiny B.

3 Literární re-er-e

3.1 Vitaminy

Vitaminy jsou organické nízkomolekulární sloučeniny nezbytné pro správný vývoj, růst a funkci lidského organismu. V lidském těle zastávají mnoho významných funkcí. Nejdelejší z nich je především katalýza biochemických reakcí. Vitaminy se jako kofaktory enzymů účastní téměř všech procesů látkové výměny v organismu, uplatňují se například v metabolismu bílkovin, sacharidů, tuků a nukleových kyselin (Velíšek 1999). Kromě katalytických úloh hrají vitaminy nepostradatelnou roli také v prevenci a léčbě civilizačních a národových onemocnění. Zejména vitaminy C a E se díky svým antioxidačním schopnostem podílí na prevenci vzniku aterosklerózy i cévní mozkové příhody (Hlúbik 2004).

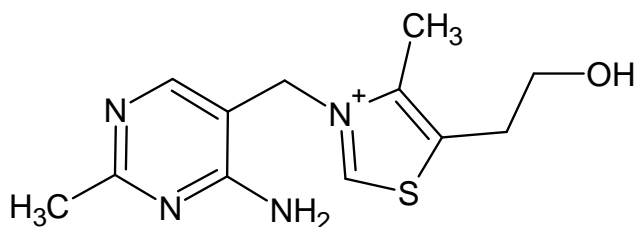
Vitaminy jsou po chemické stránce velmi heterogenní látky. Významná charakteristika, dle které lze jednotlivé vitaminy rozdělit, je jejich rozpustnost. Vitaminy se dělí do dvou skupin na vitaminy rozpustné v tucích (A, D, E, K) a vitaminy rozpustné ve vodě (C, H a vitaminy skupiny B). Vitaminy rozpustné v tucích mohou být po delší dobu skladovány v játrech a tukové tkáni organismu, čímž mohou vyvolat i stavu neřádných i toxických stavů. Vitaminy rozpustné ve vodě skladovány nejsou a jejich přebytek je z těla vyloučeno (Fajfrová 2011).

Vitaminy musí být ve většině případů přijímány potravou. Lidské tělo je nedokáže samo syntetizovat, případně není schopné vytvořit je v dostatečném množství. Při dlouhodobém nedostatku některého z vitamínů dochází k tzv. hypovitaminóze. Úplný deficit, avitaminóza, může způsobit vznik mnoha různých onemocnění, nebo zásadně narušuje biochemické procesy v organismu. Obdobně jako nedostatek vitamínů může mít fatální následky i jejich nadbytek. Nadměrné množství vitamínů se označuje jako hypervitaminóza. Tento stav nebývá příliš častý a dochází k němu pouze u vitamínů rozpustných v tucích (Hlúbik 2004).

Množství vitamínů, nezbytné k zajištění normálních fyziologických funkcí, závisí na mnoha faktorech a v průběhu života kolísá. Potřeba vitamínů vzrůstá s věkem. Roste také v těhotenství a v průběhu kojení i při velké psychické a fyzické zátěži. Zvýšené požadavky organismu na příjem vitamínů byly také pozorovány u kuřáka a u lidí pítvajících ve většině případů alkoholické nápoje (Schreiber 1993).

3.1.1 Thiamin

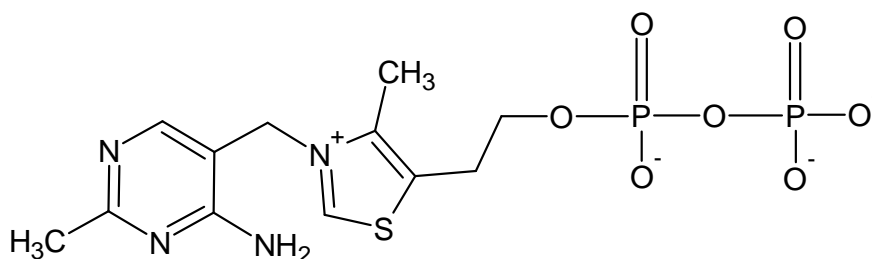
Vitamin B1 neboli thiamin (viz obrázek 1) je molekula skládající se z pyrimidinového a thiazolového jádra. V lidském organismu se vyskytuje ve dvou formách: jako volná látka thiamin a ve formě fosforených esterů – monofosfátu, difosfátu a trifosfátu (Velíšek 1999).



Obrázek 1 Thiamin (volná báze)
(Velíšek 1999)

3.1.1.1 Funkce thiaminu

Volný thiamin z potravy je v tkáních esterifikován za vzniku thiamindifosfátu (obrázek 2), který se jako koenzym účastní řady enzymatických reakcí. Významný je především v metabolismu sacharidů, kdy působí při přeměně pyruvátu na acetyl-CoA a -ketoglutarátu na sukcinyl-CoA. Podstatnou roli sehrává také v katabolismu aminokyselin s rozvětveným křídlem (Depeint et al. 2006).



Obrázek 2 Thiamidifosfát
(Velíšek 1999)

3.1.1.2 Doporučený denní příjem thiaminu

Množství potřebného thiaminu je úzce spjato s celkovým energetickým příjmem organismu. Světová zdravotnická organizace (WHO) doporučuje příjem 0,4 mg thiaminu na 1000 kcal. Pro dospělého muže, konzumujícího v průměru 3200 kcal, tak uvádí doporučený denní příjem

1,3 mg thiaminu. Na základ vy—ího energetického výdeje doporu uje WHO t hotným a kojícím ženám navý—ít množství vitamínu B1 pr m rn o 0,4 mg/den, resp. 0,5 mg/den (Prinzo 1999). V eské republice je doporu ená denní dávka thiaminu stanovena vyhlá-kou 330/2009 Sb. na 1,1 mg.

3.1.1.3 Zdroje thiaminu

Hlavním zdrojem thiaminu jsou p edevším obiloviny. Vitamin je v nich p ítomen hlavn v klí ku a otrubách, proto jsou celozrnné mouky na thiamin výrazn bohat—í nejl mouky bílé (Velí-ek 1999). Cenným zdrojem vitamínu B1 je rovn fl maso (zejména hov zí a vep ové), vejce a lu-t niny. Vysoký obsah mají také kvasnice a o echy. V mnoha zemích (zejména ve Spojených státech amerických) se thiaminem b fln fortifikují r zné potraviná ské výrobky. Nej ast ji se jedná o p-ení né mouky, snída ové cereálie, t stoviny i rýfli. Studie ukazují, fl nejvíce vitamínu B1 p íjmají dosp lí Ameri ané práv z takto obohacených potravin (Insel et al. 2006). Obsah thiaminu ve vybraných potravinách uvádí tabulka 1.

Tabulka 1 Obsah thiaminu ve vybraných potravinách (Hlúbik 2004)

Potravina	Obsah thiaminu (mg.100 g⁻¹)	Potravina	Obsah thiaminu (mg.100 g⁻¹)
Libové vep ové maso	0,834	Ovesné vlo ky	0,485
Hov zí játra	0,415	P-ení ná mouka	0,061
Fazole	0,715	Brambory	0,089
o ka	0,528	Raj ata	0,092
Vla-ské o echy	0,405	Jablko	0,050

3.1.1.4 Nedostatek thiaminu

3.1.1.4.1 Hypovitaminóza

Nedostatek thiaminu se projevuje ve dvou skupinách symptom . V první ad se manifestuje poruchami kardiovaskulárního systému, nap . tachykardií, zm nami EKG i pocitem svírání na hrudi. Druhou skupinu symptom p edstavují neurologické poruchy. U osob s nedostate ným p íjmem vitamínu B1 m fl docházet k paresteziím, psychickým zm nám

(pocit napětí, podráždění, deprese), poruchám koordinace, křečím, paralýzám atd. (Hlúbik 2004).

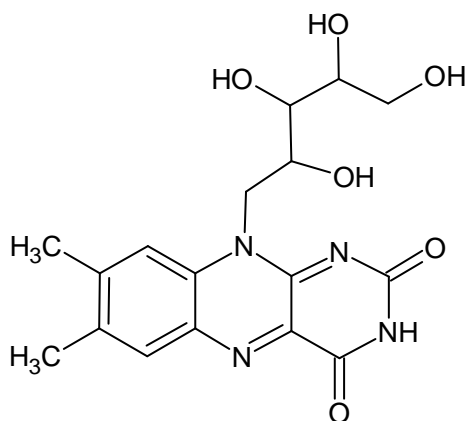
3.1.1.4.2 Avitaminóza

Thiaminová avitaminóza způsobuje onemocnění zvané beri-beri. V klinické praxi se rozlišují dvě formy této nemoci. Suché beri-beri se projevuje svalovou slabostí dolních končetin. Typickým znakem jsou pokleslá chodidla a ztížená chůze. Vlhké beri-beri způsobuje srdeční selhání. Doprovází ho také otoky obličeje a dolních končetin a problémy s dýcháním (Vanderkooi 2000).

Onemocnění beri-beri se ve vyspělých zemích vyskytuje pouze výjimečně, a to se s ním však lze setkat v jihovýchodní Asii. Hlavní složkou potravy Asiat je totiž loupaná rýže, která díky odstranění obilné kůry vitamin ztrácí (Prinzo 1999).

3.1.2 Riboflavin

Vitamin B2 (obrázek 3) nebo také riboflavin je flurozelená látka velmi odolná vůči vysokým teplotám. Základ struktury tvoří isoalloxazinové jádro s ribítolem navázaným v poloze N-10.



Obrázek 3 Riboflavin
(Velíšek 1999)

Riboflavin se v biologických systémech vyskytuje buď volně anebo je jako kofaktor součástí enzymů zvaných flavoproteiny. Mezi nejdelejší z nich patří flavinmononukleotid (FMN) a flavinadenin dinukleotid (FAD) (Velíšek 1999).

3.1.2.1 Funkce riboflavinu

FMN a FAD jsou pro organismus velmi významné. Klíovou roli sehrávají zejména v mitochondriích, kde se podílí na odbourávání sacharidů, tuků a bílkovin a tím získu energie ve formě adenosintrifosfátu (ATP).

Jako součást dýchacího řetězce se účastní přenosu elektronů skrz mitochondriální membránu, na jehož základě vzniká například membránou tzv. vodíkový gradient. Energie vodíkového gradientu je následně využita k syntéze ATP. FAD je také kofaktorem sukcinátdehydrogenázy, která v Krebsově cyklu katalyzuje konverzi sukcinátu na fumarát (Udhaybanu et al. 2017).

3.1.2.2 Doporučený denní příjem riboflavinu

Doporučená denní dávka vitamínu B2 je pro dospělé muže 1,3 mg a pro ženy 1,1 mg. Pro děti se doporučuje příjem v rozmezí 0,3 až 1,0 mg (Institute of Medicine 1998). V České republice je doporučená denní dávka riboflavinu stanovena vyhláškou 330/2009 Sb. na 1,4 mg. Vyšší dávky riboflavinu by měli užívat alkoholici, pacienti po chirurgických zákrocích a těžké ženy (Hlúbik 2004).

3.1.2.3 Zdroje riboflavinu

Vitamin B2 je obsažen převážně v potravinách živočišného původu. Odhaduje se, že mléko a mléčné výrobky kryjí potřebu vitamínu ze 40 %, maso a masné produkty z 20 % (Velíšek 1999). Ve větším množství se riboflavin nachází také ve vejcích, luštěninách a houbách. Významným zdrojem jsou i obiloviny. V nich se vitamin vyskytuje zejména v povrchových vrstvách, proto jeho obsah v mouce závisí na stupni vymletí (Hlúbik 2004).

Vitamin B2 je hojně využíván v potravinářském průmyslu. Pro své zbarvení se pod označením E 101 užívá jako barvivo v instantních produktech. Často se jím také fortifikují cereálie a další výživná (EFSA FEEDAP Panel 2016).

Obsah riboflavinu ve vybraných potravinách dokumentuje tabulka 2.

Tabulka 2 Obsah riboflavinu ve vybraných potravinách
(Hlúbik 2004)

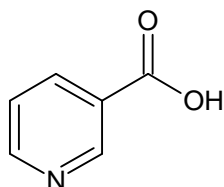
Potravina	Obsah riboflavinu (mg.100 g ⁻¹)	Potravina	Obsah riboflavinu (mg.100 g ⁻¹)
Hov zí játra	2,95	Fazole	0,24
Vep ové maso	0,17	Ovesné vlo ky	0,15
Polotučné mléko	1,96	Pšeničná mouka	0,04
Tvaroh mkký	0,42	Peenát	0,25
Veje	0,33	Jablko	0,05
o ka	0,21	fiampiony	0,33

3.1.2.4 Nedostatek riboflavinu

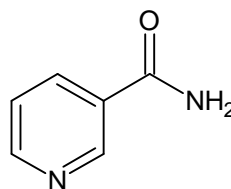
Nedostatek riboflavinu je pomrn vzácný. Nejastji se projevuje zán tlivými zm nami k fle (seboreická dermatitida, akné) a dutiny ústní (zán ty sliznice jazyka, eroze ústních koutk) (Institute of Medicine 1998). Dalším p íznakem hypovitaminózy m fle být také zán t spojivek vedoucí v krajních p ípadech afl k rozvoji edého zákalu. Nízký p íjem riboflavinu také p ispívá k druhotnému deficitu fleza a tím vzniku anémie (Fajfrová 2011).

3.1.3 Niacin

Vitamin B3 neboli niacin je společným ozna ením pro nikotinovou kyselinu a její amid nikotinamid (obrázek 4).



Kyselina nikotinová



Nikotinamid

Obrázek 4 Nikotinová kyselina a její amid
(Velí-ek 1999)

3.1.3.1 Funkce niacinu

Niacin je součástí nikotinamidadeninukleotidu (NAD) a jeho fosforeného esteru nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADP), které se jako kofaktory různých enzymů účastní oxido-redukčních reakcí probíhajících v každé buňce. Hlavní funkcí kofaktor je reverzibilní přenos vodíku (Hlúbik 2004).

NAD se uplatňuje především v reakcích katabolických, tzn. v reakcích směřujících k získání energie. Jako kofaktor dehydrogenáz katalyzuje v Krebsově cyklu konverzi isocitrátu na α -ketoglutarát, α -ketoglutarátu na sukcinyl-CoA a malátu na oxalacetát. Dále je také součástí pyruvátdehydrogenázy, která katalyzuje přeměnu pyruvátu na acetyl-CoA (Muhammad 2015).

NADP je naopak klíčové v biosyntetických drahách. Podílí se například na syntéze mastných kyselin i steroidních látek (EFSA NDA Panel 2014).

3.1.3.2 Doporužený denní příjem niacinu

Americký Institute of Medicine (1998) doporučuje denní příjem ve výši 16 mg niacinu pro muže a 14 mg niacinu pro ženy. V severních státech je od roku 2012 doporučený příjem pro muže 19 mg a pro ženy 15 mg. V německy mluvících zemích (Rakousko, Německo a Švýcarsko) činí od roku 2013 doporučený příjem pro muže 17 mg a pro ženy 13 mg vitamínu (EFSA NDA Panel 2014). V České republice je doporučená denní dávka niacinu stanovena vyhláškou 330/2009 Sb. na 16 mg.

3.1.3.3 Zdroje niacinu

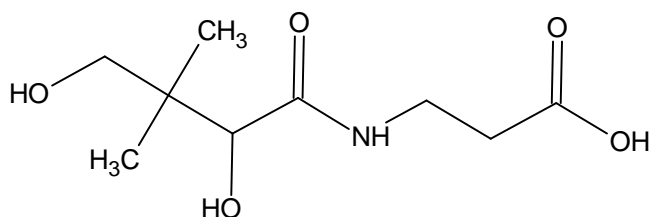
Lidský organismus dokáže niacin syntetizovat z tryptofanu. Udává se, že na syntézu 1 mg niacinu je zapotřebí průměrně 60 mg této aminokyseliny. Konverze tryptofanu na niacin je výrazně snížena při nedostatku železa, riboflavinu a vitamínu B6. Významným zdrojem vitamínu B3 jsou díky vysokému obsahu tryptofanu hlavně potraviny bohaté na bílkoviny (Tabulka 3). Potřebu vitamínu proto pokrývá zejména maso a masné produkty, mléko a mléčné výrobky a vejce. Bohatým zdrojem je také pražená káva (EFSA NDA Panel 2014). Niacin je hojně přítomen i v obilovinách, například pšenice obsahuje v průměru 30-70 mg.kg⁻¹ vitamínu. Z velké části je však lokalizován v klíčku a v otrubách, proto jeho obsah v bílé pšeničné mouce klesá jen nepatrně na 10 mg.kg⁻¹. V kukuřici a jiroku je niacin pevně vázán na glykopeptidy a jako takový je pro organismus nevyužitelný (Velíšek 1999).

3.1.3.4 Nedostatek niacinu

Nedostatek niacinu (vitaminu B3) způsobuje pelagru neboli nemoc š3 Dž. Název onemocnění vychází z počátečních písmen typických příznaků, jimiž jsou dermatitida, diaree a demence (Prousky et al. 2011). Primární pelagra vzniká v důsledku nedostatku niacinu ve stravě. Při sekundární je příčinou nízký příjem niacinu stravou, dostatek však narušeno jeho vstřebávání, například užíváním některých léků, poruchami metabolismu či alkoholismem (Thornton & Drummond 2014). Deficit niacinu vede také k poruchám sekrece kyseliny chlorovodíkové v žaludku a tím narušení vstřebávání vitamínu B12 (Fajfrová 2011).

3.1.4 Pantothenová kyselina

Pantothenová kyselina (obrázek 5), známá také jako vitamin B5, je tvořena pantoovou kyselinou a -alaninem. Biologicky aktivní je pouze jako D-izomer, L-forma nevykazuje žádnou vitaminovou aktivitu (Velíšek 1999).



Obrázek 5 Pantothenová kyselina
(Velíšek 1999)

3.1.4.1 Funkce pantothenové kyseliny

Pantothenová kyselina má pro organismus zásadní význam, neboť je součástí koenzymu A (CoA) a proteinu pantoate-acyltransferázy (ACP).

CoA je důležitým kofaktorem ve všech živých organismech. Je zapojen do více než 70 enzymatických procesů, účastní se například oxidace mastných kyselin, metabolismu sacharidů, katabolismu aminokyselin, syntézy hemoglobinu a acetylcholinu, atd.

ACP je jako součást syntézy mastných kyselin nepostradatelný při tvorbě mastných kyselin.

3.1.4.2 Doporučený denní příjem pantothenové kyseliny

Institute of Medicine (1998) i WHO doporučují denní příjem ve výši 5,0 mg pantothenové kyseliny pro obě pohlaví a všechny věkové kategorie od 19 let. Pro děti doporučený příjem

v rozmezí 1,8 až 5,0 mg (EFSA NDA Panel 2014). V České republice je doporučená denní dávka pantothenové kyseliny stanovena vyhláškou 330/2009 Sb. na 6,0 mg.

Dívají se předpoklad, že stresové situace, různé dietní zvyky nebo u některá onemocnění (diabetes mellitus) vyřadí příjem vitamínu B5, nebyly podle souasných poznatk potvrzeny (Hlúbik 2004).

3.1.4.3 Zdroje pantothenové kyseliny

Malá množství pantothenové kyseliny se vyskytují prakticky ve všech potravinách rostlinného i živočišného původu. Nejbohatším zdrojem je maso, zvláště vnitřnosti (ledviny, játra), dále vejce a mléčné výrobky. Vysoký obsah je také v celozrnných potravinách, bramborách a droždí (Sampedro et al. 2015).

V tabulce 3 je uveden obsah pantothenové kyseliny ve vybraných potravinách.

Tabulka 3 Obsah pantothenové kyseliny ve vybraných potravinách (Ball 2003)

Potravina	Obsah pantothenové kyseliny (mg.100 g⁻¹)	Potravina	Obsah pantothenové kyseliny (mg.100 g⁻¹)
Vaječný floutek	4,6	Fazole	4,9
Hovězí maso	0,6	Ovesné vločky	1,0
Kuřecí maso	1,4	Brokolice	1,2
Játra	8,0	Mléko	0,35
Ledviny	3,0	Arašídy	2,7
Brambory	0,4	Matejíka-íka	50,0

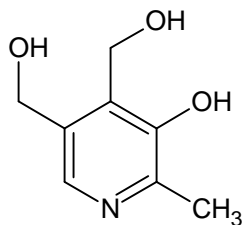
3.1.4.4 Nedostatek pantothenové kyseliny

Deficit vitamínu B5 je velmi ojedinělý, nebo se pantothenová kyselina vyskytuje téměř ve všech potravinách. Nedostatek tohoto vitamínu se tak objevuje pouze u extrémně podvyživených osob. V 50. letech minulého století vypracoval internista Hodges se svými spolupracovníky (1958) studii, ve které podával zdravým dobrovolníkům antagonistu pantothenové kyseliny (inhibitor pantothenát kinázy). Během několika týdnů se u všech

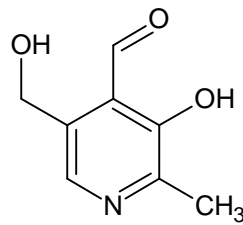
dobrovolník rozvinuly p íznaky deficitu, nej ast ji bolest hlavy a sval , malátnost, únava, zvracení a pálení chodidel. U n kterých dobrovolník bylo zaznamenáno také kolísání arteriálního krevního tlaku a tachykardie.

3.1.5 Pyridoxin

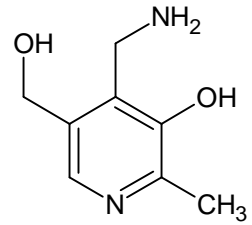
Pyridoxin neboli vitamin B6 ozna uje t i strukturn p íbuzné pyridinové deriváty (obrázek 6), pyridoxol, pyridoxal a pyridoxamin li-ící se substitucí v poloze 4 pyridinového kruhu. Pod pojem pyridoxin jsou za azeny také jejich p íslu-né 5'-fosfáty (obrázek 7).



pyridoxol

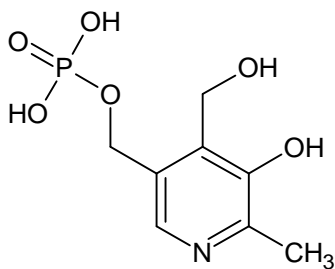


pyridoxal

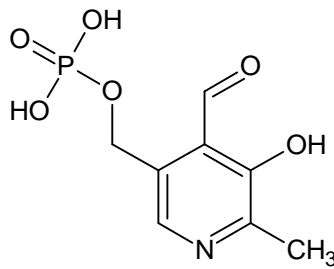


pyridoxamin

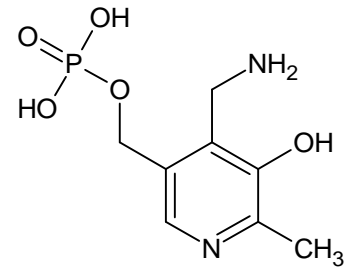
Obrázek 6 - Pyridoxol, pyridoxal, pyridoxamin
(Velí-ek 1999)



pyridoxol-5'-fosfát



pyridoxal-5'-fosfát



pyridoxamin-5'-fosfát

Obrázek 7 P íslu-né 5'-fosfáty
(Velí-ek 1999)

3.1.5.1 Funkce pyridoxinu

Pyridoxin přijatý stravou je absorbován v tenkém střevě. Volné formy (pyridoxol, pyridoxal a pyridoxamin) jsou vstřebány ihned, u fosfátů nejdelší dochází k jejich defosforylaci. Vitaminy jsou poté transportovány do jater, kde dochází k jejich přeměně na pyridoxal-5'-fosfát (P5P), což je biologicky aktivní forma vitamínu.

P5P je kofaktorem mnoha enzymů. Jako součást dekarboxylázy se podílí na dekarboxylaci aminokyselin za vzniku biogenních aminů, z nichž některé jsou důležitými neurotransmitery a hormony (např. serotonin, adrenalin, histamin). Účastní se také transaminace aminokyselin na ketokyseliny, které jsou využity při tvorbě energie ve formě ATP. Dále se jako kofaktor fosforylázy uplatňuje při štěpení glykogenu na glukózu-1-fosfát (Vitamin B6 (Pyridoxine; Pyridoxal 5'-Phosphate) 2001).

Vitamin B6 je důležitý také v metabolismu homocysteinu. Homocystein, který je meziproduktem přeměny methioninu na cystein, je pro organismus velmi toxický. Etnické studie ukazují, že jeho zvýšená hladina v krevní plazmě může být příčinou vzniku a rozvoje kardiovaskulárních onemocnění. Vitamin B6 spolu s vitaminy B9 a B12 jako kofaktory enzymů katalyzují jeho přeměnu na cystein nebo zpátky na methionin (Cuskelly et al. 2001).

3.1.5.2 Doporučený denní příjem pyridoxinu

Potřeba vitamínu B6 závisí na množství konzumovaných bílkovin. Pyridoxin hraje klíčovou roli v metabolismu aminokyselin, proto se jeho denní dávka se stoupajícím příjmem bílkovin zvyšuje. Uvádá se, že na 1 g přijatých bílkovin připadá 0,020 mg pyridoxinu (Hlúbik 2004). Institute of Medicine (1998) doporučuje denní příjem ve výši 1,3 mg pyridoxinu pro muže a ženy ve věku 19-50 let. Pro těhotné a kojící ženy doporučuje příjem navýšit na 1,9 mg, resp. 2,0 mg. V České republice je doporučená denní dávka vitamínu B6 stanovena vyhláškou 330/2009 Sb. na 1,4 mg.

3.1.5.3 Zdroje pyridoxinu

Bohatým zdrojem vitamínu je především maso, masné výrobky a vnitřnosti. Jak dokládá tabulka 4, ve vysokých koncentracích je obsažen také v kvasnicích. V potravinách rostlinného původu se hojně vyskytuje v cereáliích, pšeničných klíčcích a celozrnných produktech. Poměrně nízký je jeho obsah v mléce a mléčných výrobcích (Spinneker 2007).

K fortifikaci potravin se používá syntetický hydrochlorid pyridoxolu. Nejčastěji se vitamínem obohacuje důstředná mléčná výživka a v některých zemích bílá pšeničná mouka (Velíšek 1999).

Tabulka 4 Obsah pyridoxinu ve vybraných potravinách
(Spinneker 2007)

Potravina	Obsah pyridoxinu (mg.100 g⁻¹)	Potravina	Obsah pyridoxinu (mg.100 g⁻¹)
Hov zí játra	0,90	Kvasnice	0,81
Ku ecí maso	0,50	Vla-ské o echy	0,87
Losos	0,98	Mléko	0,05
Tu ák	0,46	P-eni ná mouka	0,46
Vejce	0,12	P-eni né klí ky	4,00
Mrkev	0,30	Bílá rýfle	0,18
Brokolice	0,17	Brambory	0,21

3.1.5.4 Nedostatek pyridoxinu

Deficience vitamínu se projevuje p edev-ím zán tlivými procesy postihující k fli (seboroická dermatitida), ústní sliznici (stomatitida, glositida) a rty. ásto se objevují poruchy nervové soustavy (periferní neuropatie), slabost a nespavost. Dal-ím p íznakem nedostatku vitamínu je také zvý-ené vylu ování kyseliny – avelové v mo i a s tím spojená tvorba kamen v mo ovém traktu (Hlúbik 2004).

3.2 Stanovení vitamin skupiny B

3.2.1 Stanovení thiaminu

K detekci vitamínu B1 byla vyvinuta áda metod jako nap íklad spektrofotometrie i fluorimetrie. V sou asné dob se ke stanovení nej ast ji poufívá metoda vysokou ínné kapalinové chromatografie (HPLC).

3.2.1.1 Extrakce thiaminu

Izolaci thiaminu z matrice provádí auto i obvykle pomocí minerálních kyselin, nap . 0,1 M HCl i 0,1 M H₂SO₄ p i teplot 121 °C po dobu 30 minut. Teplotu 121 °C doporu ují pouze

pro živější produkty, nebo obsahují vitamin p vázán ve formě fosforených esterů. U analýzy rostlinných produktů by teplota neměla přesáhnout 108 °C. Thiamin se v rostlinných materiálech vyskytuje více v defosforylované formě a vyšší teploty by mohly způsobit jeho významné ztráty. Aby došlo k uvolnění veškerého vázaného thiaminu, je předchozí krok doplněn o enzymatickou hydrolýzu. Hydrolýza nejčastěji probíhá při teplotě 45 - 50 °C po dobu 3 hodin za použití širokého spektra enzymů, jako například takadiastázy nebo α -amylázy. Ve vzorcích, ve kterých převládá vázaná forma vitamínu, se doporučuje spíše hydrolýza při 37 °C po dobu 16 hodin (Knobloch 1956; Ball 2006).

3.2.1.2 Spektrální metody

3.2.1.2.1 Fluorimetrie

Thiamin se v potravinách často stanovuje tzv. thiochromovou metodou. Alkalickou oxidací thiaminu vzniká thiochrom, který vykazuje intenzivní modrou fluorescenci. Intenzita emitovaného záření se měří fluorimetricky a analýza probíhá při excitaci vlnové délce 370 nm a emisní vlnové délce 445 nm. K oxidaci bývá typicky používán hexakyanoferritan draselný, bromkyan, oxid rtuťnatý i peroxid vodíku (Y et al. 2015).

3.2.1.2.2 Spektrofotometrie

Reakcí thiaminu s jodidnanem draselným dochází k uvolnění jodidových iontů, které v kyselém prostředí reagují s perblytkem jodidnanu za vzniku jódu. Tento jód oxiduje leukokrystalovou viole na fialově zbarvenou sloučeninu, jejíž absorpce je při 589 nm měřena spektrofotometrem (Szpikowska-Sroka 2011).

3.2.1.3 Chromatografické stanovení

Metoda vysokou tlakem kapalinové chromatografie je založena na UV detekci thiaminu anebo fluorescenční detekci thiochromu. V obou metodách je thiamin nejprve extrahován minerální kyselinou a poté defosforylován enzymatickou hydrolýzou. Při fluorescenční detekci následuje oxidace thiaminu na thiochrom, která probíhá buď před vstupem thiaminu do kolony, nebo až po jeho průchodu kolonou (tzn. mezi kolonou a detektorem). V oblasti UV záření je thiamin detektován při vlnové délce 280 nm (Marszałek et al. 2005; Edwards et al. 2017).

3.2.1.4 SN EN 14122

Stanovení vitamínu B1 v potravinách specifikuje norma SN EN 14122 vydaná v roce 2015. Thiamin se z potravin extrahuje po kyselé hydrolyze a následné enzymatické defosforylaci a kvantifikuje metodou HPLC s předkolonovou nebo postkolonovou derivatizací na triochrom.

3.2.2 Stanovení riboflavinu

Riboflavin je vysoce fotolabilní sloučenina, proto je nezbytné provádět jeho stanovení za minimálního působení světla.

3.2.2.1 Extrakce riboflavinu

V biologických systémech je riboflavin nejčastěji součástí flavoproteinů. K uvolnění z těchto enzymů se používá hydrolyza v přítomnosti minerálních kyselin, například HCl a H₂SO₄. Tato hydrolyza byla popsána jako dostatečně účinná, byla ale rovněž vypracována metoda založená na enzymatické hydrolyze pomocí takadiastázy, klarázy nebo trypsinu. V časopise International Journal of Vitamin Research (1967) byla publikována studie porovnávající enzymatickou hydrolyzu takadiastázou s kyselou hydrolyzou 0,1 M HCl na určitém preparátu FAD. Kyselá hydrolyza probíhala při teplotě 70 °C, enzymatická při teplotě 38 °C a pH 5,2 po dobu 2 hodin. Výsledky ukázaly, že FAD byl zhydrolyzován enzymatickou hydrolyzou z 90 %, kyselou pouze ze 45 %.

3.2.2.2 Spektrální metody

Charakteristickou vlastností riboflavinu je intenzivní žlutozelená fluorescence, která se stala základem metod používaných k jeho stanovení.

3.2.2.2.1 Fluorimetrie

Fluorimetrie je založena na měření intenzity přirozené fluorescence riboflavinu vyvolané excitací vhodným zářením o vhodné vlnové délce. Jako ideální uvádí Friedrich (1988) záření o délce 440 nm. Detekce emisního fluorescenčního záření probíhá při 565 nm. Stanovení se provádí v slabě kyselém prostředí, obvykle v rozmezí pH 3-5.

3.2.2.3 Lumiflavinová metoda

Působením silného světelného zdroje na alkalický roztok riboflavinu dochází k oxidaci riboflavinu a riboflavin se rozpadá na lumichrom a lumiflavin. Lumichrom se

vyzna uje modrou fluorescencí, lumiflavin flutozelenou. Oba produkty jsou po okyselení oza ovaného roztoku vyt epány do chloroformu a jejich koncentrace je fluorimetricky stanovena (Knobloch 1956).

3.2.2.4 Elektromigra ní metody

Cataldi se svými kolegy (2003) vypracovali postup kvantifikace riboflavinu, FAD a FMN ve vzorcích vybraných potravin. K analýze pouffili metodu kapilární zónové elektroforézy s laserem indukovanou fluorescen ní detekcí. Separaci provedli v p ítomnosti fosfátového pufru o koncentraci 30 mM a pH 9,8 p i 15 °C a nap tí 30 kV.

3.2.2.5 Chromatografické stanovení

Metoda HPLC umofl uje rychlé a citlivé stanovení riboflavinu v potravinách. Po kyselé a následné enzymatické hydrolyze je provedena separace na chromatografické kolon a výsledný signál je zaznamenán p íslu-ným detektorem. K analýze jsou vyuffívány r zné typy detektor . Watada & Tran (1985) stanovili obsah riboflavinu ve vybraných potravinách fluorescen ním detektorem. M ení provád li p i excita ní vlnové délce 450 nm a emisní vlnové délce 530 nm. Jin et al. (2012) vypracovali metodu s pouffitím detektoru diodového pole (PDA). Anyakora et al. (2008) aplikovali UV detekci.

3.2.2.6 SN EN 14152

Stanovení vitamínu B2 v potravinách udává norma SN EN 14152. Riboflavin se po kyselé hydrolyze a následné enzymatické defosforylaci stanovuje metodou HPLC s fluorimetrickou detekcí.

3.2.3 Stanovení niacinu

3.2.3.1 Extrakce niacinu

Niacin je spole ným ozna ením pro kyselinu nikotinovou a nikotinamid. Tyto látky jsou jako koenzymy sou ástí mnoha enzym a k jejich uvoln ní dochází kyselou i alkalickou hydrolyzou. Hydrolyza také zp sobuje konverzi nikotinamidu na kyselinu a niacin je pak stanoven jako celkový obsah obou vitamer (Ball 2006). N kte í auto i dopl ují kyselou a alkalickou hydrolyzu hydrolyzou enzymatickou. Ndaw et al. (2002) hydrolyzovali vzorky vybraných potravin (nap . p-eni ná mouka, fazole i ara-ídy) 50 ml 0,1 M fosfátového pufru

v přítomnosti 120 mg NAD⁺ (při 37 °C, 18 hod.). Rose-Sallin et al. (2001) hydrolyzovali vzorky (např. obilné výrobky, dřešťová výfiva) 70 ml 0,1 M HCl (při 100 °C, 1 hod), upravili pH roztokem NaOH na 4,5 a enzymatickou hydrolyzu provedli 150 mg klaradiastázy.

3.2.3.2 Spektrální metody

3.2.3.2.1 Kolorimetrie

Základem kolorimetrického stanovení niacinu je tzv. Königova reakce. Při soběním bromkyanu na kyselinu nikotinovou, nikotinamid a ostatní pyridinové deriváty dochází k vzniku pyridinového iontu, který reaguje s aromatickými aminy za vzniku barevné sloučeniny s absorpčním maximem při 436 nm (Eitenmiller et al. 2008).

3.2.3.3 Elektromigrační metody

Ward & Trenerry (1997) popsali stanovení niacinu v obilovinách, mase, kvasnicích a dalších vybraných potravinách pomocí kapilární elektroforézy. Niacin extrahovali alkalickou hydrolyzou a separovali v kapiláře při 30 °C a napětí 20 kV. K separaci použili pufr tvořený z 15 % acetonitrilem a z 85 % směsí dihydrogenfosforenanu draselného a dihydrogenfosforenanu disodného v poměru 1:1. UV detekce provedli při 254 nm.

3.2.3.4 Chromatografické stanovení

Pro stanovení kyseliny nikotinové a jejího amidu se nejčastěji využívá HPLC. Díky rozdílnosti této metody bylo vyvinuto mnoho různých postupů, které se navzájem značně odlišují. Rozdíly jsou již v prvním kroku analýzy, v extrakci. Některí autoři volí alkalickou extrakci, jiní preferují extrakci kyselou. Byly publikovány i práce, ve kterých je extrakce doplněna o enzymatickou hydrolyzu. Liší se také použité detektory. Přehled vybraných metod stanovení vitamínu B3 je uveden v tabulce 5.

Tabulka 5 Vybrané metody stanovení vitamínu B3

Analyzovaný vzorek	Extrakce	Mobilní fáze	Stacionární fáze	Detekce
P-eni ná mouka, snída ové cereálie (Goldschmidt & Wolf 2007)	Kyselá extrakce (H ₂ SO ₄)	Mobilní fáze A: voda Mobilní fáze B: acetonitril	C18 3 m (150 x 2,0 mm)	Hmotnostní detekce
Cereálie (Juraja et al. 2003)	Alkalická extrakce (Ca(OH) ₂)	15 % metanol + 85 % voda	C8 4 m (100 x 8 mm)	UV detekce
Cereálie (Ndaw et al. 2002)	Kyselá extrakce (HCl)	sm s KH ₂ PO ₄ , H ₂ O ₂ a CuSO ₄	C18 5 m (150 x 4,6 mm)	Fluorimetrická detekce
Cereálie (Rose-Sallin et al. 2001)	Kyselá extrakce (HCl) + enzymatická hydrolýza (klaradiastáza)	Mobilní fáze A: sm s KH ₂ PO ₄ , H ₂ O ₂ , CuSO ₄ a vody Mobilní fáze B: 10 % acetonitril v eluentu A	C18 5 m (250 x 4,6 mm)	Fluorimetrická detekce

3.2.3.5 SN 56 0051

Stanovení niacinu (nikotinové kyseliny) v potravinách a zemědělských a potravinářských surovinách specifikuje norma SN 56 0051. Metoda stanovení spočívá v uvolnění niacinu ze vzorku v prostředí zředěné H₂SO₄ a následném zaočkování analyzovaného vzorku kmenem *Lactobacillus plantarum*. Množství kyseliny vyprodukované při růstu testovacích mikroorganismů se poté stanoví titrací. Test je citlivý i na nikotinamid, který je kyselou hydrolýzou převeden na kyselinu nikotinovou.

3.2.4 Stanovení pantothenové kyseliny

3.2.4.1 Extrakce pantothenové kyseliny

Pantothenová kyselina se v potravinách vyskytuje ve dvou formách: jako volná látka a ve vázané formě na koenzym A a ACP. Před vlastním stanovením je proto nezbytné vitamin z vázaných forem uvolnit. Kyselá a alkalická hydrolyza nemohou být k extrakci použity, nebo způsobují rozklad vitamínu. Jedinou alternativou je extrakce prostřednictvím enzymů, například alkalické fosfatázy, pantetheinázy, takadiastázy a papainu (Gonthier et al. 1998).

3.2.4.2 Chromatografické stanovení

Pakin et al. (2004) popsali stanovení vitamínu B5 v různých potravinách (například kvasnice, avokádo, ořechy). K enzymatické extrakci zvolili kombinaci pepsinu (při 50 °C, 3 hod.) a směsí pantetheinázy s alkalickou fosfatázou (při 20 °C, 18 hod.). Obsah vitamínu stanovili metodou HPLC s fluorimetrickou detekcí. Analýzu provádějí při excitací vlnové délce 345 nm a emisní vlnové délce 455 nm. Romera se svými spolupracovníky (1996) použili ke stanovení pantothenové kyseliny v kojenecké výživě metodu HPLC s detektorem diodového pole. Mittermayr et al. (2004) aplikovali na vzorky snídaňových cereálií, kojenecké výživy a sojových produktů kapalinovou chromatografii s hmotnostní detekcí.

3.2.4.3 SN 56 0060

Norma SN 56 0060 popisuje metodu stanovení pantothenové kyseliny v potravinách a zemědělských a potravinářských surovinách. Pantothenová kyselina se z potravin uvolní extrakcí v prostředí octanového tlumivého roztoku o pH 4,5 a analyzovaný materiál se poté zaočkuje kmenem *Saccharomyces uvaru*. V přítomnosti pantothenové kyseliny dochází k nárůstu mikroorganismů a výsledná koncentrace vitamínu B5 se vypočte ze změny absorbance buněčné suspenze.

3.2.5 Stanovení pyridoxinu

3.2.5.1 Extrakce pyridoxinu

Stanovení vitamínu B6 je poměrně komplikované z důvodu výskytu tohoto vitamínu ve velmi nízké koncentraci v 6 rozdílných formách. Kromě triády pyridoxinu (pyridoxol, pyridoxal a pyridoxamin) je vitamin přítomen také ve formě jejich 5'-fosfátů.

Izolace pyridoxinu z analyzované matrice je nejast ji provád na kyselou hydrolyzou za vysokých teplot (121 °C). K hydrolyze jsou poufívány r zné minerální kyseliny, obvykle HCl a H₂SO₄. N kte í auto i dopl ují p edchozí krok o enzymatickou hydrolyzu. Hälvín et al. (2013) zjistili, fe enzymatická úprava zvý-ila míru extrakce afl o 35 %. Ke stejnému záv ru do-li také Bognár & Ollilainen (1997).

3.2.5.2 Spektrální metody

3.2.5.2.1 Spektrofotometrie

Reakcí pyridoxinu s 2,6-dichlorchinonchlorimidem vzniká mod e zbarvená slou enina, jejífl absorbance je spektrofotometricky m ena p i vlnové délce 620 nm (Knobloch 1956).

3.2.5.3 Chromatografické stanovení

Bergaentrzlé se svými kolegy (1995) publikovali metodu HPLC s fluorimetrickou detekcí, ve které analyzovali vybrané vzorky cereálií a d tské výflivy. Detekci provád li p i excita ní vlnové délce 290 nm a emisní vlnové délce 395 nm. Sampson et al. (1995) popsali stanovení vitamínu B6 v r zných odr dách p-enice stejnou metodou jen s rozdílem vlnových délek. Jejich m ení probíhalo p i excita ní vlnové délce 311 nm a emisní vlnové délce 360 nm. Lebedzi ska et al. (2007) vyvinuli metodu stanovení vitamínu B6 v potravinách rostlinného i flivo i-ného p vodu. K izolaci vzork z matrice poufili kombinaci kyselé a enzymatické hydrolyzy a vzorky následn analyzovali metodou HPLC s coulometrickou a UV detekcí.

3.2.5.4 SN EN 14663

Norma SN EN 141663 specifikuje stanovení vitamínu B6 v potravinách technikou HPLC. Vitamin B6 je v norm definován jako hmotnostní koncentrace sou tu pyridoxinu, pyridoxalu a pyridoxaminu v etn jejich fosforylovaných derivát a rovn fl -glykosilovaných forem. Pyridoxal, pyridoxamin a pyridoxin se z potravin extrahují kyselou hydrolyzou a enzymaticky defosforylují a deglykosilují za poufítí kyselé fosfatázy a -glukosidázy. V-echny vý-e uvedené deriváty vitamínu B6 se poté separují metodou HPLC a kvantifikují fluorimetrickou detekcí.

3.2.6 Simultánní stanovení vitamin skupiny B

3.2.6.1 Chromatografické stanovení

Jednu z metod simultánního stanovení vitamin skupiny B publikovali Sami et al. (2014) v *Journal of Chemistry*. Dle této metody byly analyzované vzorky okry (ibi-kovec jedlý) extrahovány 25 ml 0,1 M H_2SO_4 (121 °C, 30 minut) a pH vzniklé směsi bylo upraveno 2,5 M acetátem sodným na hodnotu 4,5. Následně bylo přidáno 50 mg takadiastázy, směs byla zředěna na 50 ml vody a ponechána přes noc odležet. Do systému HPLC s UV detekcí bylo dávkováno 20 μ l filtrátu a kvantifikace obsahu jednotlivých vitamin (B2, B3, B6 a B12) byla provedena metodou vnější kalibrace.

Podobnou metodu popsali také Khair-un-Nisa (2010) se svými spolupracovníky. Analyzované vzorky mléka extrahovali 65 ml 0,1 M HCl ve vodní lázni po dobu 30 minut a pH směsi upravili pomocí 2,5 M octanu sodného na pH 4,0 - 4,5. Poté přidali 5 ml 10 % enzymového roztoku takadiastázy, směs doplnili na 100 ml destilovanou vodou a nechali 3 hodiny inkubovat při teplotě 45 až 50 °C. Vitaminy B1, B2, B3, B6 a B9 stanovili HPLC metodou s UV detekcí při vlnové délce 245 nm.

Batifoulier et al. (2006) vypracovali postup stanovení vitamin B1, B2 a B6 v pšeničné mouce. Vzorky celozrnné a bílé pšeničné mouky hydrolyzovali 0,05 M octanem sodným a doplnili 500 μ l kyselého fosfatázy (20 $mg \cdot ml^{-1}$), papainu (100 $mg \cdot ml^{-1}$), α -amylázy (10 $mg \cdot ml^{-1}$) a β -glukosidázy (20 $mg \cdot ml^{-1}$). Dále ke směsi přidali 1,25 ml 1 M kyseliny glyoxylové, 200 μ l 2% roztoku síranu železnatého a 250 μ l 1% glutathionu. Připravenou směs inkubovali v teplotě vodní lázni o teplotě 37 °C po dobu 18 hodin a zředili 50 ml destilované vody. Riboflavin stanovili metodou HPLC s fluorimetrickou detekcí při excitací vlnové délce 422 nm a emisní vlnové délce 522 nm. K determinaci pyridoxinu roztok upravili přidáním 4,5 ml 0,1 M borohydridu sodného a 500 μ l ledové octové kyseliny. Měření prováděli při excitací vlnové délce 325 nm a emisní vlnové délce 400 nm. Pro stanovení thiaminu nejprve roztok doplnili 3 ml 1% roztoku kyanofelezitanu draselného v 15% NaOH a poté jej přeistili přes chromatografickou patronu SepPack C18 kondicionovanou 5 ml destilované vody a 2 ml metanolu. Thiamin analyzovali při excitací vlnové délce 365 nm a emisní vlnové délce 435 nm.

Granda et al. (2018) popsali simultánní stanovení vitamin B1, B2 a B6 v zrnech pšenice, ječmene a quinoi. 5 g vzorku extrahovali 65 ml 0,1 M HCl (1 hodina, 100 °C), poté upravili 2,5 M octanem sodným pH směsi na hodnotu 4,0, přidali roztok klaradiastázy (0,25 g enzymu

v 1 ml H₂O) a směs ponechali inkubovat 16 hodin při 37 °C. Obsah vitamín stanovili metodou HPLC s fluorescenční detekcí.

Aslam et al. (2008) analyzovali vitaminy B1, B2, B3, B5 a B6 v čiznách. K 10 g vzorku přidali 25 ml extrakčního roztoku připraveného smícháním 50 ml acetonitrilu, 10 ml ledové octové kyseliny a 1000 ml destilované vody. Směs umístili na 40 minut do teplejší vodní lázně o teplotě 70 °C a poté ji doplnili extrakčním roztokem na objem 50 ml. Obsah vitamín stanovili metodou HPLC s UV detekcí. Stejnou metodu aplikovali také Rohi et al. (2013) ve své studii porovnávající obsah vitamín B1, B2, B3 a B6 v celozrnné a hladké pšeničné mouce.

Celar se svými kolegy (2016) publikovali stanovení vitamín skupiny B metodou kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí. Vzorky domácí výživы a nutričních drinků pro dospělé provedli na ionty elektrospřejem, následně je separovali v tandemovém uspořádání kvadrupól a produktové ionty detektovali detektorem. Ve vzorcích kvantifikovali s velkou přesností a citlivostí vitaminy B1, B2, B3, B5, B6, B7 a B9.

3.2.6.2 Elektromigrační stanovení

Simultánní stanovení vitamín B1, B2, B3, B5, B6 a B12 v energetických nápojích a ovocných nektarech popsali Navarro-Pascual-Ahuir se svými kolegy (2018). Ke kvantifikaci použili metodu micelární elektrokinetické chromatografie. Jako optimální podmínky pro separaci zvolili teplotu 25 °C, napětí 25 kV a vitaminy detekovali PDA detektorem při 214 nm. Stejnou metodu aplikovali také da Silva et al. (2013) na vzorky vybraných potravinových doplňků. Analýzu provedli při teplotě 25 °C a napětí 28 kV v přítomnosti ethanolu (10%), dodecylsírany sodného (2%) a borátového pufru (0,02 M). Vitaminy B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9 a B12 detekovali při vlnové délce 214 nm.

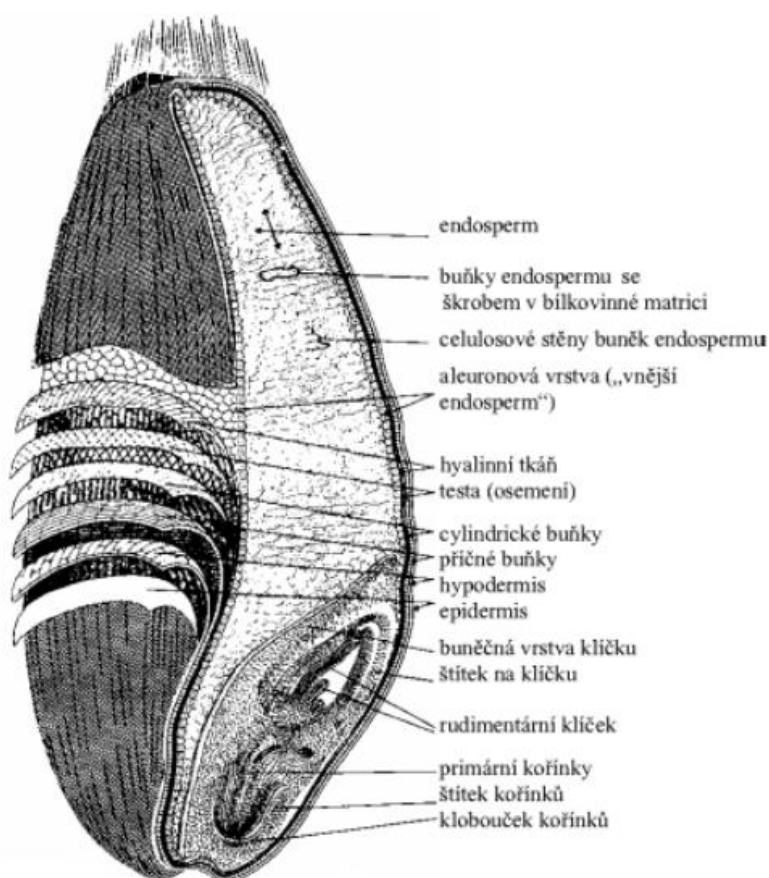
Maráková se svými spolupracovníky (2014) vyvinuli metodu založenou na kapilární elektroforéze v kombinaci s elektrospřejevou ionizací a tandemovou hmotnostní spektrometrií. Vitaminy B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9 a B12 stanovili ve vybraných farmaceutických přípravcích a doplňcích stravy. Vitaminy separovali kapilární elektroforézou při teplotě 20 °C a napětí 30 kV. K detekci a identifikaci použili trojitý kvadrupólový analyzátor s ionizací elektrospřejem. Hlavní přínosy vypracované metody spatují autoři v jednoduchosti, vynikající citlivosti a nízkých nákladech.

3.3 Obiloviny

3.3.1 Stavba a chemické složení obilného zrna

Většina obilovin patří do ředy lipnicovitých. Díky stejnému botanickému původu jsou si obiloviny vzájemně velmi podobné, a proto i anatomická stavba jejich zrn je téměř stejná. Obilky se od sebe liší vlnou pouze velikostí, tvarem a podílem jednotlivých vrstev.

Obilné zrno se skládá z obalových vrstev, endospermu a klíčku (viz obrázek 8). Obalové vrstvy, tvořené vnějším perikarpem a vnitřní testou, chrání zrno před mechanickým poškozením a úniky škodlivých látek. Z hlediska výživy představují velmi cennou část obilky, vynikají vysokým obsahem minerálních látek (zejména vápníku, hořčíku a železa) a vitamín skupiny B. Na obalové vrstvy navazuje endosperm složený z vrstvy aleuronových buněk a moučného jádra. Aleuronové buňky mají vysoký podíl bílkovin (cca 30 %), moučné jádro obsahuje hlavně škrob ve formě škrobových zrn. Funkcí endospermu je výživa klíčku. Klíček je nejdůležitější částí zrna, je zárodkem nové rostliny a nositelem genetických informací. Ve vysokých koncentracích obsahuje vitamin E, dále je také zdrojem bílkovin a tuků (Příhoda et al. 2004).



Obrázek 8 Podélný řez pšeničným zrnem se znázorněním jeho morfologických vrstev (Příhoda et al. 2004)

3.3.2 Pšenice

Pšenice obecná je jednou z nejrozšířenějších plodin ve světové republice. V ČR se nejčastěji pěstuje ve dvou formách, a to jako pšenice ozimá a pšenice jarní.

Zrno pšenice se využívá k výrobě pšeničné mouky, stovín, krup a v cukrářství. Pšeničné otravy, mouky nebo otruby se využívají jako krmivo pro hospodářská zvířata.

Pšenice je z nutričního hlediska hlavním zdrojem energie. Obsahuje 50 až 70 % škrobu, který je pro organismus lehce stravitelný. Množství bílkovin v zrně se průměrně pohybuje v rozmezí 8 až 13 %. Zásobní bílkoviny gliadin a glutenin s vodou vytvářejí lepek. Vysoký obsah lepku pozitivně ovlivňuje pekárenské vlastnosti pšenice, může ale způsobovat i trávicí obtíže. Při trávení se mění na mazlavou hmotu, která může způsobit zhoršení střevní peristaltiky a snížit absorpci živin. Obsah tuku je v pšeničném zrně nízký (cca 1,5 až 3 %) a tvoří ho především nenasycené mastné kyseliny. Z vitamínů jsou v pšeničném zrně obsaženy hlavně vitaminy skupiny B a vitamin E. Z minerálních látek je nejvíce zastoupen fosfor (Tichá & Vyzínová 2006).

3.3.3 Ječmen

Ječmen patří spolu s pšenicí k nejstarším obilovinám. Záznamy jeho pěstování se datují do předhistorické doby, kdy byl používán nejen k přímé lidské výživě, ale pro své protizánětlivé a antiseptické účinky i jako léčivá rostlina.

V současné době se největší podíl vypěstovaného ječmene využívá pro krmení hospodářských zvířat. Potravinářské využití představuje menší část a slouží především k výrobě sladu.

V zrně ječmene jsou nejvíce zastoupeny sacharidy (cca 60 %). Bílkoviny se na nutriční hodnotě podílí v průměru 14 %, tuky 4 %. Z vitamínů jsou přítomny zejména vitaminy skupiny B a vitamin E (Přihoda et al. 2004). Ječmen je také bohatým zdrojem beta-glukanů.

Beta-glukany jsou neškrobové polysacharidy s pozitivním účinkem na lidské zdraví. Pomáhají snižovat hladinu LDL cholesterolu a hladinu glukózy v krvi a působí tak preventivně proti vzniku ischemické choroby srdeční. V roce 2012 vydala Evropská komise nařízení č. 1048/2012, ve kterém schvaluje používání zdravotní tvrzení o vlivu beta-glukanů z ječmene na snížení rizika ischemické choroby srdeční (Macháčková et al. 2014).

3.3.4 Tritordeum

Tritordeum je obilovina vyselechtná v 70. letech minulého století z plané formy je měkčí a pšeničné tvrdé. Vyznačuje se vysokým obsahem bílkovin a antioxidantů, zejména luteinu. Právě pro obsah luteinu, který může být až 20krát vyšší než v pšeničce, je tritordeum potenciální plodinou pro výrobu nutričně hodnotných potravinářských produktů. Tritordeum je rovněž bohatým zdrojem vlákniny a některých stopových prvků (Koubová 2010).

3.3.5 Netradiční barevné odrůdy obilovin

Obilky obilovin mohou mít různé zbarvení. Běžně pěstované odrůdy mají obilky červené, existují ale také purpurové, modré, žluté a bílé. Odlišná barva je způsobena přítomností rozdílných skupin pigmentů. V případě purpurových a modrých obilok se jedná o antokyany.

Červené obsahují deriváty katechinu a taninu, bílé nemají žádný pigment a v obilkách žlutých je barva podmíněna zvýšeným obsahem karotenoidů. Ke tvorbě jednotlivých pigmentů dochází v obilce v rozdílných anatomických vrstvách. Lokalizace barviv je popsána v tabulce 6 (Musilová et al. 2010).

Přírodní barviva se obvykle vyznačují antioxidantní aktivitou. Strava bohatá na antioxidanty typu antokyanů, katechinů a karotenoidů přispívá preventivně na výskyt aterosklerózy, ischemické choroby srdeční a zánětlivých procesů, zlepšuje funkci zraku a pozitivně ovlivňuje ochranné procesy v organismu. Obiloviny s barevným zrnem by proto mohly být vhodné pro výrobu funkčních potravin, které by měly kromě prosté výživné hodnoty i přínivý účinek na zdraví konzumenta (Trojan et al. 2010).

Tabulka 6 Lokalizace pigmentů v různých zbarveních obilky

Zbarvení obilky	Lokalizace
červená	Perikarp
Modrá	Aleuronová vrstva
Purpurová	Perikarp, testa
žlutá	Endosperm

3.3.6 Vitaminy skupiny B v obilovinách

Obsah vitaminů skupiny B v obilovinách se liší v závislosti na odrůdách, zralosti a způsobu a místě pěstování. To je dále vodem, pro různé literární zdroje uvádí pro obsah vitaminů různé hodnoty.

3.3.6.1 Vitaminy skupiny B v pšenici

Obsah vybraných vitaminů skupiny B v pšeničném zrně dokumentuje tabulka 7. Z tabulky vyplývá, že celkový rozsah hodnot je značně široký. Obsah thiaminu se pohybuje v rozmezí 0,1360,99 mg.100g⁻¹, riboflavinu 0,0660,31 mg.100g⁻¹ a pyridoxinu 0,0960,79 mg.100g⁻¹. Největší rozdíly lze pozorovat v obsahu niacinu., který literatura udává v rozmezí 2,20611,1 mg.100g⁻¹.

Porovnání obsahu vybraných vitaminů ze skupiny B v různých druzích pšenice uvádí tabulka 8.

Tabulka 7 Obsah vybraných vitaminů skupiny B v pšeničném zrně v mg.100 g⁻¹

Thiamin	Riboflavin	Niacin	Pyridoxin	Literární zdroje
0,55	0,13	6,40	0,53	(Kulp & Ponte 2000)
0,47	0,09	5,70	0,50	(Spiller 2017)
0,1360,99	0,0660,31	2,20611,1	0,0960,79	(Khan & Shewry 2009)
0,47	0,09	8,2	0,50	(McKevith 2004)

Tabulka 8 Srovnání obsahu vybraných vitaminů skupiny B v zrně pšenice tvrdé a pšenice obecné v mg.100 g⁻¹ (Kulp & Ponte 2000)

	Thiamin	Riboflavin	Niacin	Pyridoxin
Pšenice tvrdá	0,67	0,11	11,1	0,43
Pšenice obecná	0,57	0,12	7,4	0,35

3.3.6.2 Vitaminy skupiny B v ječmeni

Obsah vybraných vitaminů skupiny B v zrně ječmene je uveden v tabulce 9. Stejně jako v případě pšenice uvádí jednotlivé literární zdroje rozdílné hodnoty.

Tabulka 9 Obsah vybraných vitaminů skupiny B v zrne je měně v mg.100 g⁻¹

Thiamin	Riboflavin	Niacin	Pyridoxin	Literární zdroje
0,36	0,14	4,07	0,26	(Lebiedzińska & Szefer 2006)
0,12	0,05	4,80	0,22	(McKevith 2004)
0,65	0,29	4,60	0,32	(United States Department of Agriculture 2018)

4 Materiál a metody

4.1 Laborato

Analýza vzork probíhala v laborato ích katedry chemie ve 4. pat e hlavní budovy FAPPZ ZU v Praze.

4.2 Vzorky

K analýze byly pouflity vzorky zrna vybraných odr d p-enice, je mene a tritordea. V-echny vzorky byly dodány společností Agrotest Fyto, s. r. o se sídlem v Krom íffi a pocházely ze sklizn z roku 2017.

Tabulka 10 Seznam analyzovaných obilovin

Obilovina	Název	Barva zrna	Forma
Je men	AF Cesar	sv tle flutá	jarní
Je men	AF Lucie	sv tle flutá	jarní
Je men	Hordeum nudimelanocrithon	erná	jarní
Tritordeum	JB1	flutý endosperm	jarní
Tritordeum	JB3	flutý endosperm	jarní
Tritordeum	HT 439	flutý endosperm	jarní
P-enice	Julie	ervený perikarp	ozimá
P-enice	Vanessa	ervený perikarp	ozimá
P-enice	Bohemia	ervený perikarp	ozimá
P-enice	Annie	ervený perikarp	ozimá
P-enice	Novosibirskaya 67	bílá ó bez pigmentu	jarní
P-enice	Bona dea x ANK-28B x CEB0211	flutý endosperm, purpurový perikarp	ozimá
P-enice	TA 4024	flutý endosperm	jarní
P-enice	Citrus x Bona Dea	flutý endosperm	ozimá

Tabulka 10 ó pokračování Seznam analyzovaných obilovin

P-enice	Bona Vita	flutý endosperm	ozimá
P-enice	Citrus	flutý endosperm	ozimá
P-enice	RU 687-12	purpurový perikarp	jarní
P-enice	Purple Feed	purpurový perikarp	jarní
P-enice	Purple	purpurový perikarp	jarní
P-enice	PS Karkulka	purpurový perikarp	ozimá
P-enice	Rosso	purpurový perikarp	ozimá
P-enice	AF Jumiko	purpurový perikarp	ozimá
P-enice	ANK -28A	purpurový perikarp	jarní
P-enice	Konini	purpurový perikarp	jarní
P-enice	Skorpion	modrá aleuronová vrstva	ozimá
P-enice	Aoi Yu	modrá aleuronová vrstva	jarní
P-enice	H 90-15-2	modrá aleuronová vrstva	jarní
P-enice	Tschermakø BlaukörnigerSommerweizen	modrá aleuronová vrstva	jarní
P-enice	Xiao Yian	modrá aleuronová vrstva	jarní
P-enice	RU 440-6 x UC 66049	modrá aleuronová vrstva, purpurový perikarp	jarní
P-enice	AF Oxana	modrá aleuronová vrstva	ozimá
P-enice	UC 66049	modrá aleuronová vrstva	jarní
P-enice	KM 15-17	modrá aleuronová vrstva, purpurový perikarp	jarní
P-enice	PSR 3628 x ANK-28A	modrá aleuronová vrstva, purpurový perikarp	jarní

4.3 P ístroje

- analytická váha Kern 770 (N mecko)
- mlýnek IKA A11 basic (Fisher Scientifics, N mecko)
- laboratorní t epa ka GFL 30006 (N mecko)
- centrifuga Eppendorf 5810R (N mecko)
- vodní láze Julabo 19 (N mecko)
- pH - metr Schott (N mecko)
- p ístoj na p ípravu destilované vody Goldman Water (R)
- p ístoj na p ípravu deionizované vody (odpor 18 M) Millipore (Francie)
- kapalinový chromatograf Waters Alliance e2695 (USA)
- detektor diodového pole Waters 996 PDA (USA)

4.4 Pom cky

- b flné laboratorní sklo (kádinky, ba ky)
- pipety s nastavitelným objemem
- -pi ky k pipetám (1, ml)
- injek ní st íka ky (3 ml)
- membránové filtry PVDF Syringe 25 mm 0,45 m (Labicom, s.r.o., R)
- plastové centrifuga ní zkumavky s ví ky (45 ml)
- vialky (2 ml) se -roubovacími závity o 9 mm (Chromservis, s.r.o., R)
- plastový stojan na zkumavky
- alobal

4.5 Chemikálie

- destilovaná a deionizovaná voda
- roztoky pro kalibraci pH - metru (Fisher Scientifics, N mecko)
- 1M kyselina chlorovodíková (p íprava z 36% HCl p. a., Lach-Ner, R)
- 2,5M octan sodný p. a. (Lach-Ner, R)
- Takadiastáza z *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich, R)
- sodná s l kyseliny hexan-1-sulfonové (Fisher Scientifics, N mecko)
- triethylamin (Lach-Ner, R)

- kyselina octová ACS reagent × 99,7% (Sigma-Aldrich, R)
- methanol gradient grade (Lach-Ner, R)
- standardy thiaminu, riboflavinu, niacinu, kyseliny pantothenové a pyridoxinu (Sigma-Aldrich, R)

4.6 Chromatografické podmínky

- analytická kolona: KINETEX 2,6 m C18 100 Å 150 x 4,6 mm
- mobilní fáze A: deionizovaná voda (992,5 ml), kyselina octová (7,5 ml), sodná s 1 kyseliny hexan-1-sulfonové (1,5 g), triethylamin (0,2 ml)
- mobilní fáze B: 100% methanol
- typ eluce: gradientová (viz tabulka 11)
- teplota kolony: 26 °C
- pr tok mobilní fáze: 0,5 ml/min
- objem nást iku: 5 l
- doba analýzy: 17 minut
- podmínky detekce: 270 nm

Tabulka 11 Podmínky gradientové eluce

as (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)	Pr tok (ml/min)	Reffim
0,0	95	5	0,5	
9,0	63	47	0,5	lineárn
9,15	2	98	0,5	skokov
12,0	2	98	0,5	
12,1	95	5	0,5	skokov
17,0	95	5	0,5	

4.7 Příprava vzorku

Vzorek zrna obiloviny byl nejprve zhomogenizován pomocí elektrického mlýnku. Do centrifugační zkumavky bylo poté odváženo 5 g vzorku, ke kterému bylo přidáno 25 ml 1M HCl, a vzorek byl umístěn do teplotní lázně po dobu 15 minut. V protřeptaném vzorku bylo upraveno pH 2,5M octanem sodným na hodnotu 4,5. Ke vzorku bylo následně přidáno 0,1 mg takadiastázy a opět byl po dobu 15 minut protřeptán na teplotě. Poté byl vzorek umístěn na 3 hodiny do vodní lázně o teplotě 50 °C. Po vyjmutí z vodní lázně byl doplněn deionizovanou vodou na objem 35 ml a 10 minut centrifugován v centrifuzě při 4000 otáčkách (6000 xg). Vzniklý supernatant byl odebrán injekční stříkačkou a zfiltrován skrz membránový filtr PVDF 0,45 µm do vialky. Vialka byla ponechána 18 hodin odležet v temnu a při laboratorní teplotě. Po této době byl obsah vialky podroben HPLC analýze. Z důvodu fotolability riboflavinu probíhala analýza ve zkumavkách obalených alobalem. Každé stanovení bylo provedeno ve 3 opakováních.

4.8 Statistické vyhodnocení

Data získaná metodou HPLC byla zpracována v programu Microsoft Office Excel 2010. Pro vyhodnocení obsahu vitamínové skupiny B byla použita jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA). Testování bylo provedeno na hladině významnosti $\alpha = 5\%$

5 Výsledky

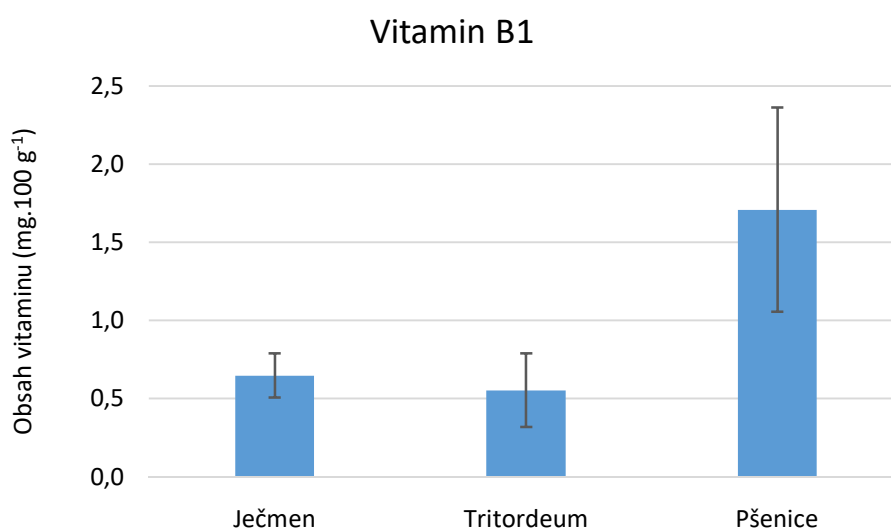
5.1 Hodnocení obsahu vitaminů podle druhu obiloviny

Průměrné obsahy vitaminů B1, B2, B3 a B6 v různých druzích obilovin s barevným zrnem uvádí tabulka 12. Obsahy byly vypočteny z 3 paralelních opakování a výsledné hodnoty byly zaokrouhleny na 3 desetinná místa. Obsahy vitaminů ve vzorcích ječmene, tritordea a pšenice byly podrobeny statistické analýze, jejíž výsledky jsou uvedeny v příloze. Statistickým zjištěním bylo zjištěno, že druh obiloviny má vliv na obsah vitaminů B1, B2, B3 i B6.

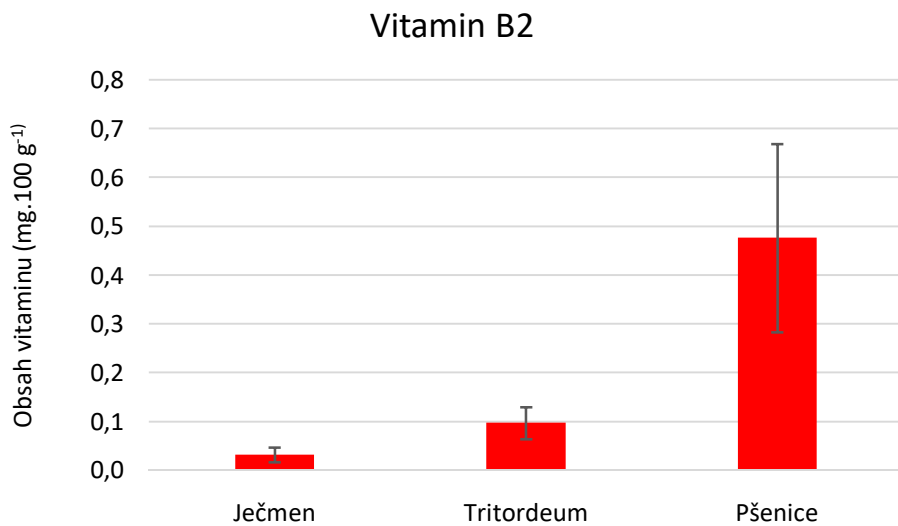
Tabulka 12 Průměrný obsah vitaminů B1, B2, B3 a B6 v ječmeni, tritordeu a pšeni (v mg.100 g⁻¹)

	B1		B2		B3		B6	
Ječmen	0,648	0,141	0,033	0,015	4,854	1,653	1,037	0,241
Tritordeum	0,554	0,235	0,098	0,032	8,437	1,024	0,297	0,091
Pšenice	1,710	0,654	0,477	0,193	4,286	1,606	0,373	0,172

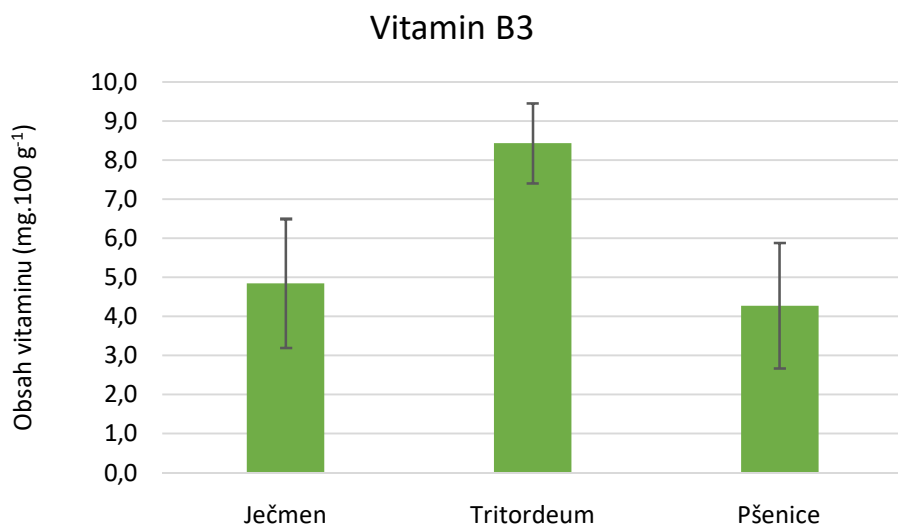
Celkem bylo analyzováno 28 vzorků pšenice, 3 vzorky ječmene a 3 vzorky tritordea. Průměrné zastoupení thiaminu, riboflavinu a niacinu v jednotlivých druzích obilovin znázorují grafy 164.



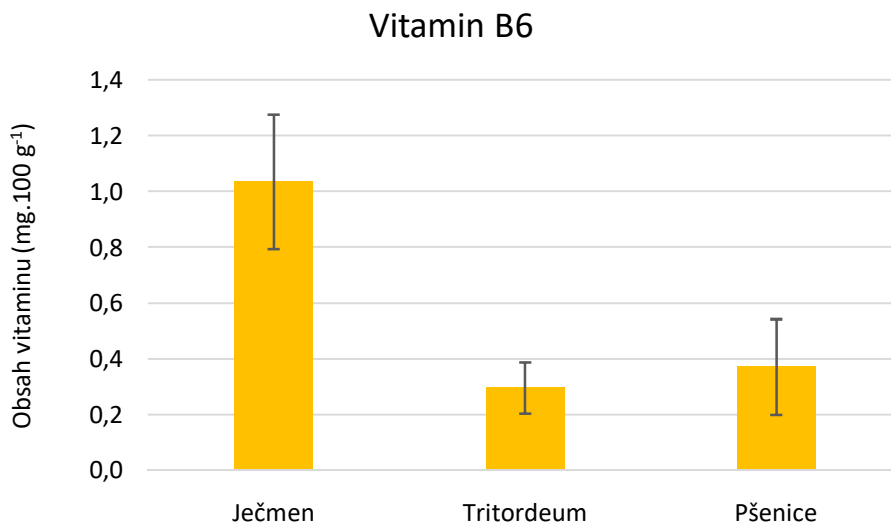
Graf 1 Průměrný obsah vitaminu B1 ve vzorcích ječmene, tritordea a pšenice



Graf 2 Průměrný obsah vitamínu B2 ve vzorcích ječmene, tritordea a pšenice



Graf 3 Průměrný obsah vitamínu B3 ve vzorcích ječmene, tritordea a pšenice



Graf 4 Průměrný obsah vitamínu B6 ve vzorcích ječmene, tritordea a pšenice

5.2 Hodnocení obsahu vitamínů podle odrůdy obiloviny

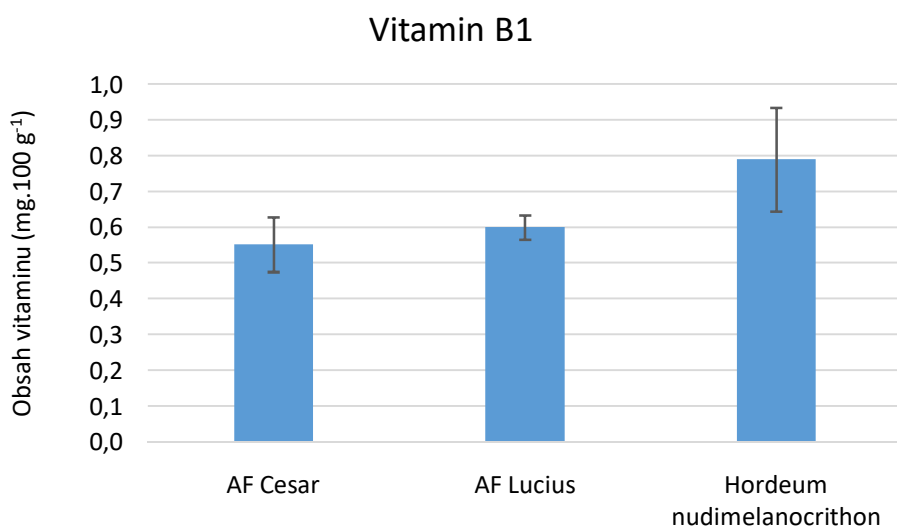
Průměrné obsahy vitamínů B1, B2, B3 a B6 v různých odrůdách ječmene, tritordea a pšenice dokumentují tabulky 13 a 15. Obsahy byly vypočteny z 3 paralelních opakování. Dále byly vypočítány směrodatné odchylky a všechny hodnoty byly zaokrouhleny na 3 desetinná místa.

5.2.1 Ječmen

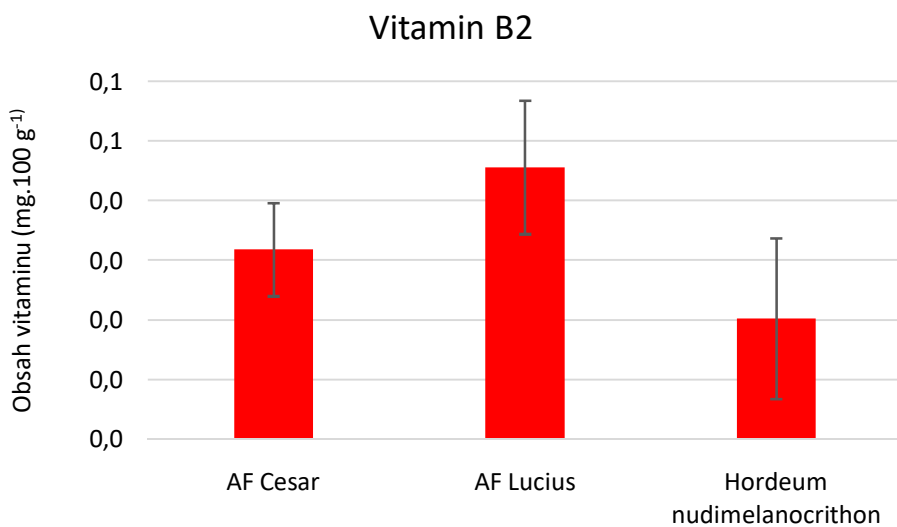
Byly analyzovány 3 vzorky různých odrůd ječmene. Obsah vitamínu B1 se pohyboval od 0,553 mg.100g⁻¹ (AF Cesar) do 0,790 mg.100g⁻¹ (Hordeum nudimelanocrithon), obsah vitamínu B2 od 0,020 mg.100g⁻¹ (Hordeum nudimelanocrithon) do 0,046 mg.100g⁻¹ (AF Lucius) a obsah vitamínu B6 od 0,727 mg.100g⁻¹ (AF Cesar) do 1,265 mg.100g⁻¹ (Hordeum nudimelanocrithon). Největší rozdíl mezi jednotlivými odrůdami byl zjištěn v obsahu vitamínu B3. Množství tohoto vitamínu bylo v rozmezí od 2,616 mg.100g⁻¹ (Hordeum nudimelanocrithon) do 6,036 mg.100g⁻¹ (AF Cesar). Obsahy vitamínů (grafy 5 a 8) ve vzorcích různých odrůd ječmene byly statisticky testovány. Bylo zjištěno, že odrůda ječmene nemá vliv na obsah vitamínů B1 a B2. Množství vitamínů B3 a B6 je však odrůdou ovlivněno.

Tabulka 13 Obsahy vitamín B1, B2, B3 a B6 ve vzorcích je mene (v mg.100 g⁻¹)

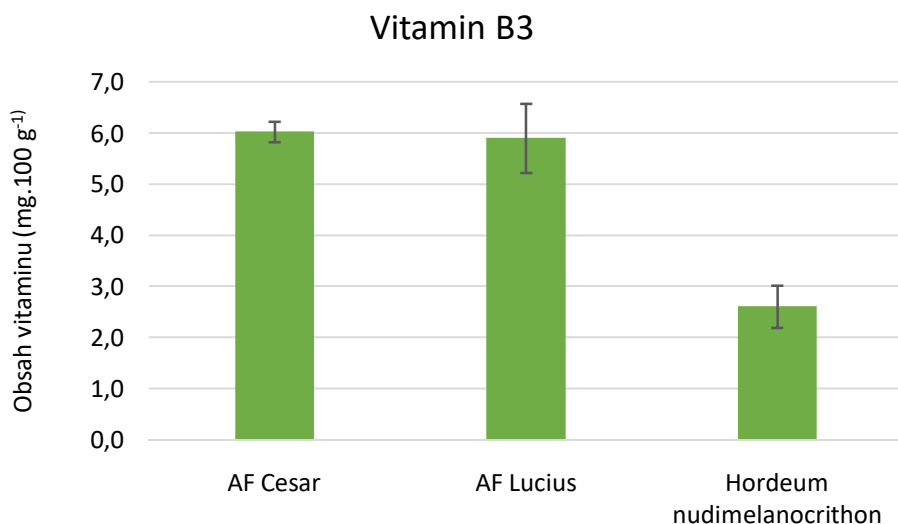
	B1		B2		B3		B6	
AF Cesar	0,553	0,076	0,032	0,008	6,036	0,202	0,727	0,016
AF Lucius	0,600	0,034	0,046	0,011	5,910	0,679	1,118	0,116
Hordeum nudimelanocrithon	0,790	0,146	0,020	0,013	2,616	0,414	1,265	0,080



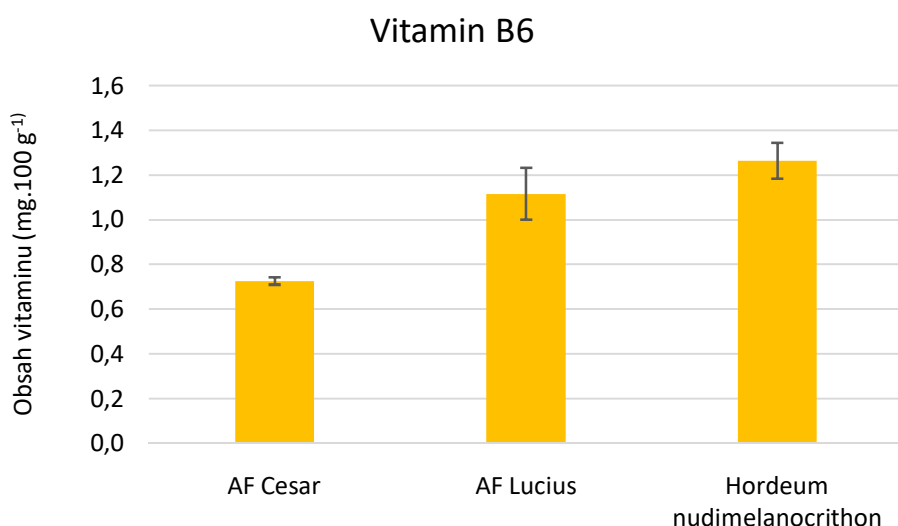
Graf 5 Pr m ný obsah vitamínu B1 ve vzorcích je mene



Graf 6 Pr m ný obsah vitamínu B2 ve vzorcích je mene



Graf 7 Průměrný obsah vitamínu B3 ve vzorcích je měně



Graf 8 Průměrný obsah vitamínu B6 ve vzorcích je měně

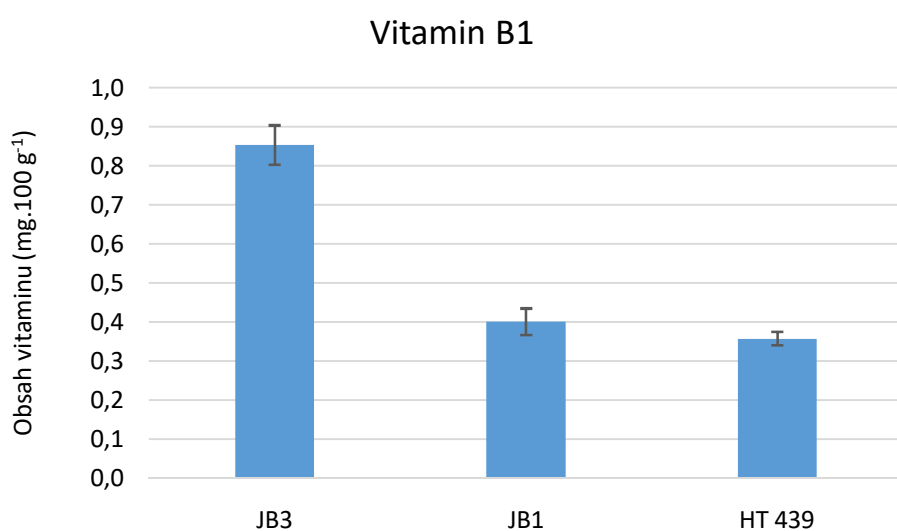
5.2.2 Tritordeum

Byly analyzovány 3 vzorky různých odrůd tritordea. Obsah vitamínu B1 se pohyboval od 0,358 mg.100g⁻¹ (HT 439) do 0,853 mg.100g⁻¹ (JB3), obsah vitamínu B2 od 0,067 mg.100g⁻¹ (JB1) do 0,137 mg.100g⁻¹ (JB3) a obsah vitamínu B6 od 0,279 mg.100g⁻¹ (JB1) do 0,312 mg.100g⁻¹ (HT 439). Nejvíce zastoupeným vitamínem ve všech vzorcích byl vitamín B3. Množství tohoto vitamínu bylo v rozmezí od 7,567 mg.100g⁻¹ (JB3) do 9,336 mg.100g⁻¹ (HT 439). Obsahy jednotlivých vitamínů (grafy 9612) byly statisticky testovány.

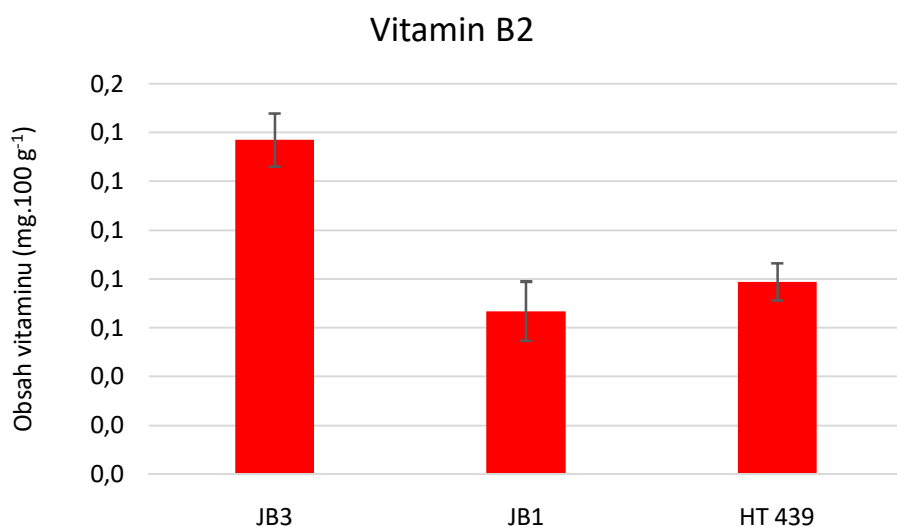
Bylo zjištěno, že odrůda tritordea má vliv na obsah vitamínu B1 a B2. Množství vitamínu B3 a B6 není odrůdou ovlivněno.

Tabulka 14 Obsahy vitamínů B1, B2, B3 a B6 ve vzorcích tritordea (v mg.100 g⁻¹)

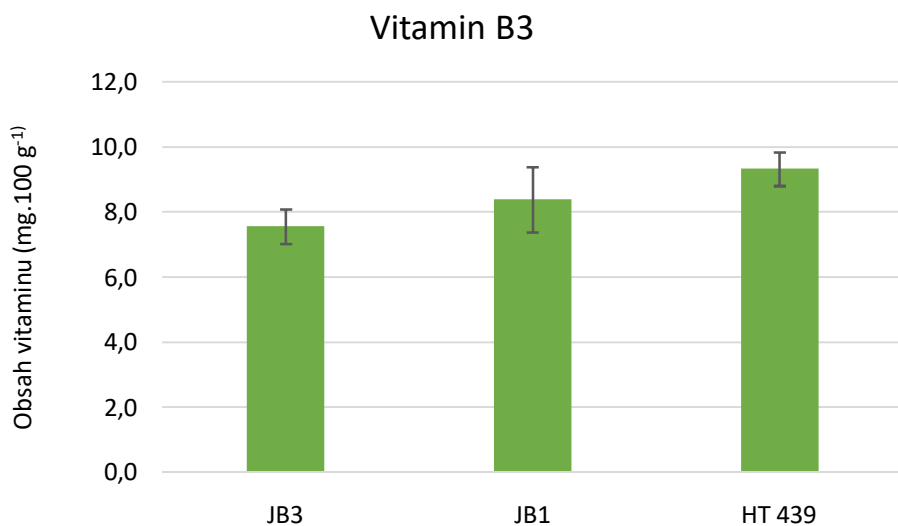
	B1		B2		B3		B6	
JB 3	0,853	0,051	0,137	0,011	7,567	0,532	0,300	0,081
JB 1	0,401	0,034	0,067	0,012	8,394	1,006	0,279	0,092
HT 439	0,358	0,018	0,079	0,008	9,336	0,519	0,312	0,098



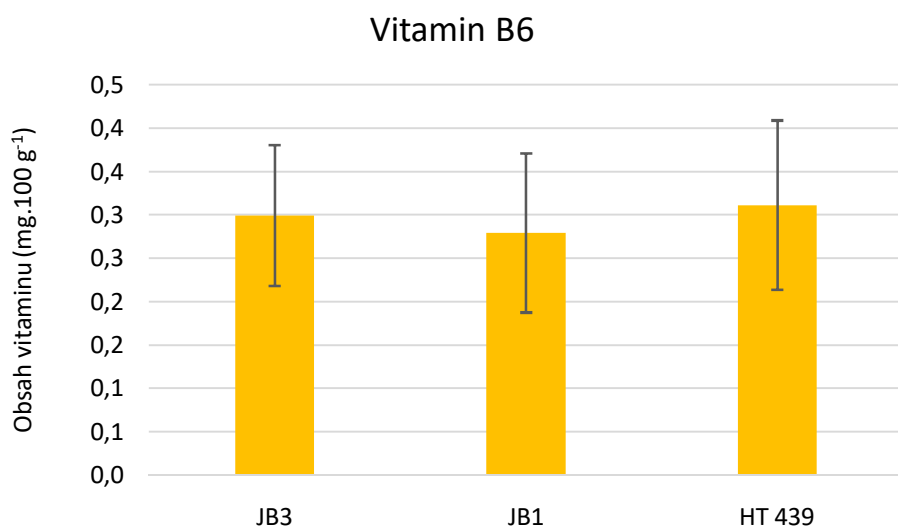
Graf 9 Průměrný obsah vitamínu B1 ve vzorcích tritordea



Graf 10 Průměrný obsah vitamínu B2 ve vzorcích tritordea



Graf 11 Průměrný obsah vitamínu B3 ve vzorcích tritordea



Graf 12 Průměrný obsah vitamínu B6 ve vzorcích tritordea

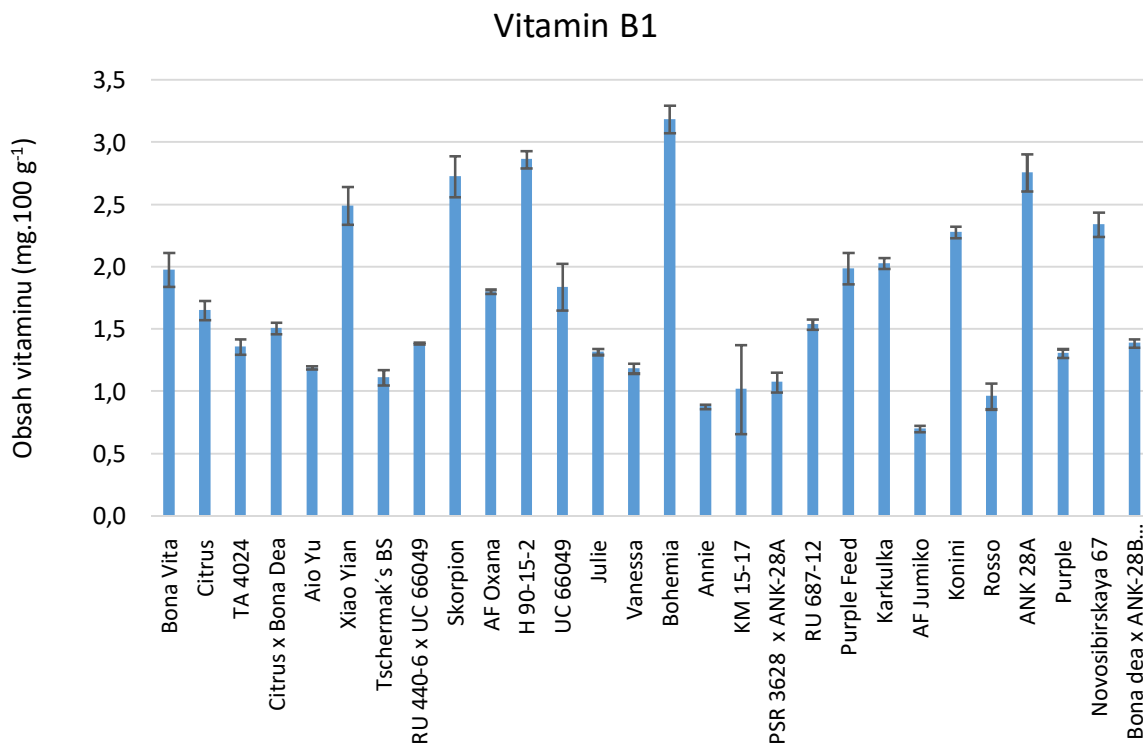
5.2.3 P-ence

Bylo analyzováno 28 vzorků různých odrůd jarní a ozimé p-ence. Obsah vitamínu B1 se pohyboval od 0,701 mg.100g⁻¹ (AF Jumiko) do 3,187 mg.100g⁻¹ (Bohemia), obsah vitamínu B2 od 0,208 mg.100g⁻¹ (AF Jumiko) do 0,921 mg.100g⁻¹ (Bona Vita) a obsah vitamínu B3 od 1,623 mg.100g⁻¹ (Julie) do 7,517 mg.100g⁻¹ (Tschermak's BS). Množství vitamínu B6 bylo v rozmezí od 0,106 mg.100g⁻¹ (Citrus x Bona Dea) do 0,831 mg.100g⁻¹ (Aio Yu).

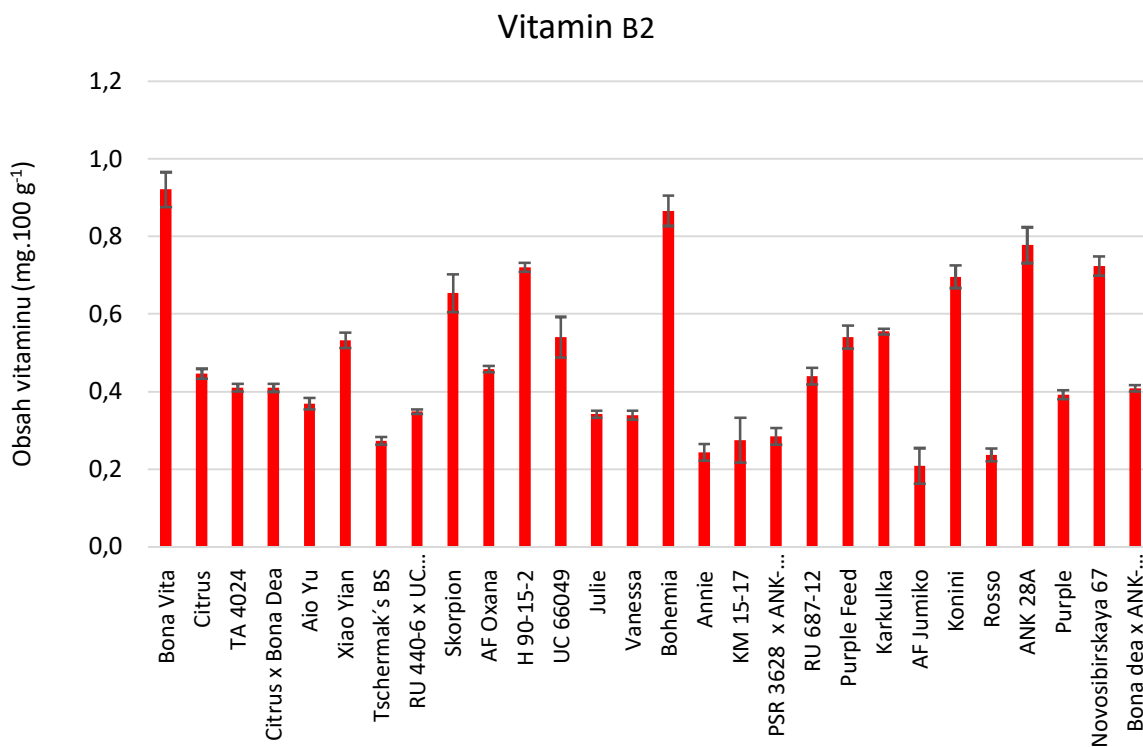
V grafech 13616 jsou vyneseny průměrné obsahy jednotlivých vitaminů. Statistickým testem bylo zjištěno, že odrůda pšenice má vliv na obsah vitamínů B1, B2, B3 a B6.

Tabulka 15 Obsahy vitaminů B1, B2, B3 a B6 ve vzorcích pšenice (v mg.100 g⁻¹)

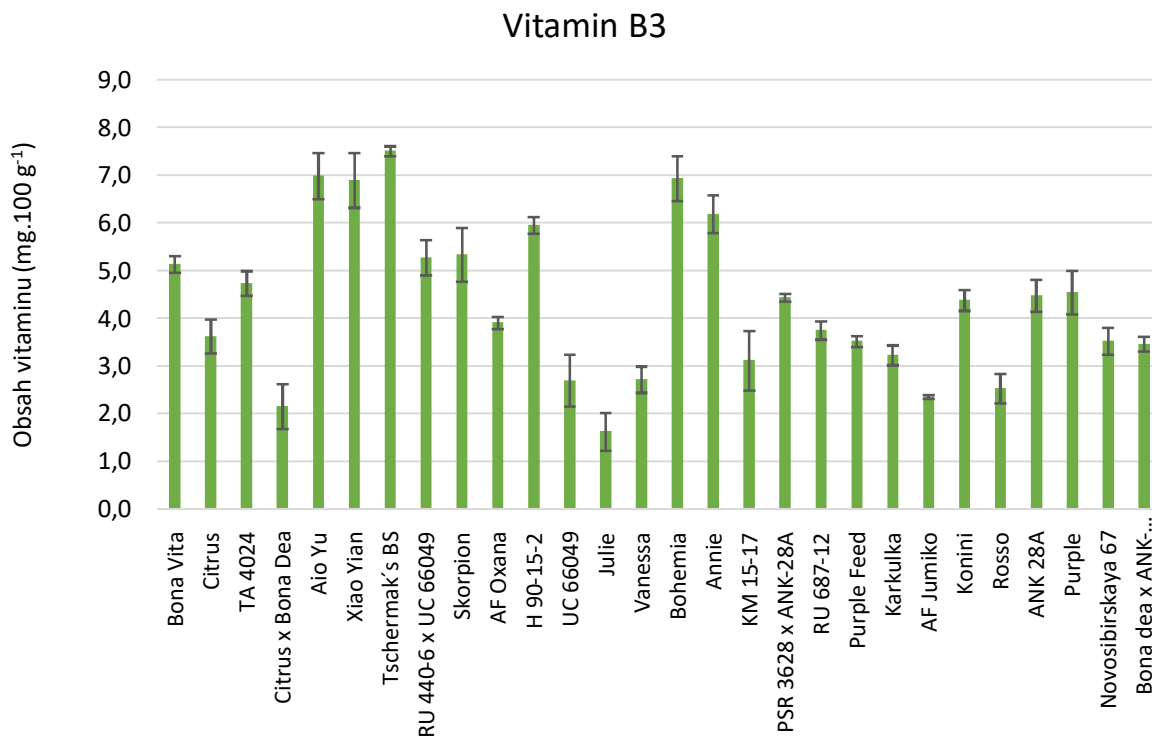
	B1		B2		B3		B6	
Bona Vita	1,979	0,137	0,921	0,045	5,137	0,173	0,281	0,025
Citrus	1,653	0,077	0,446	0,013	3,625	0,361	0,316	0,088
TA 4024	1,359	0,060	0,410	0,010	4,736	0,261	0,487	0,160
Citrus x Bona Dea	1,509	0,047	0,410	0,010	2,154	0,471	0,106	0,029
Aio Yu	1,191	0,013	0,369	0,015	6,994	0,485	0,831	0,065
Xiao Yian	2,494	0,153	0,532	0,020	6,903	0,574	0,637	0,093
Tschermak's BS	1,113	0,062	0,273	0,010	7,517	0,103	0,423	0,011
RU 440-6 x UC 66049	1,387	0,007	0,348	0,006	5,280	0,375	0,615	0,020
Skorpion	2,728	0,165	0,654	0,049	5,342	0,563	0,495	0,105
AF Oxana	1,802	0,018	0,458	0,008	3,912	0,127	0,312	0,032
H 90-15-2	2,865	0,069	0,721	0,012	5,961	0,175	0,442	0,061
UC 66049	1,840	0,189	0,541	0,052	2,696	0,545	0,124	0,019
Julie	1,318	0,024	0,342	0,009	1,623	0,397	0,378	0,090
Vanessa	1,186	0,040	0,339	0,011	2,718	0,276	0,217	0,048
Bohemia	3,187	0,111	0,867	0,039	6,938	0,471	0,361	0,068
Annie	0,878	0,019	0,244	0,022	6,194	0,395	0,259	0,010
KM 15-17	1,017	0,356	0,275	0,058	3,116	0,625	0,221	0,024
PSR 3628 x ANK -28A	1,074	0,081	0,284	0,021	4,435	0,081	0,284	0,026
RU 687-12	1,539	0,041	0,440	0,022	3,753	0,194	0,387	0,052
Purple Feed	1,989	0,126	0,541	0,029	3,521	0,114	0,513	0,076
Karkulka	2,030	0,042	0,555	0,007	3,229	0,209	0,383	0,085
AF Jumiko	0,701	0,026	0,208	0,046	2,353	0,041	0,209	0,005
Konini	2,280	0,045	0,696	0,029	4,381	0,218	0,556	0,053
Rosso	0,962	0,105	0,237	0,017	2,530	0,310	0,354	0,056
ANK 28A	2,760	0,149	0,778	0,046	4,482	0,334	0,422	0,061
Purple	1,307	0,034	0,392	0,011	4,550	0,455	0,359	0,014
Novosibirskaya 67	2,342	0,096	0,725	0,025	3,528	0,280	0,315	0,055
Bona dea x ANK-28B x CEB0211	1,387	0,033	0,409	0,009	3,464	0,158	0,120	0,009



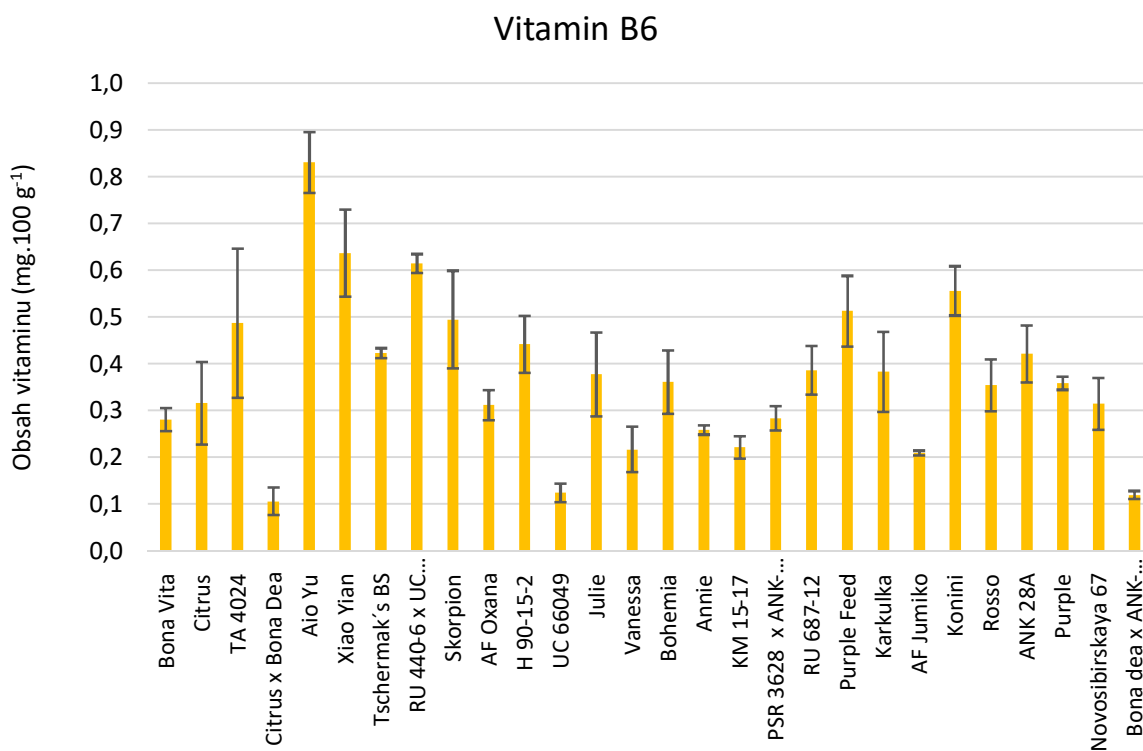
Graf 13 Obsah vitamínu B1 ve vzorcích p-ence



Graf 14 Obsah vitamínu B2 ve vzorcích p-ence



Graf 15 Obsah vitamínu B3 ve vzorcích p-ene



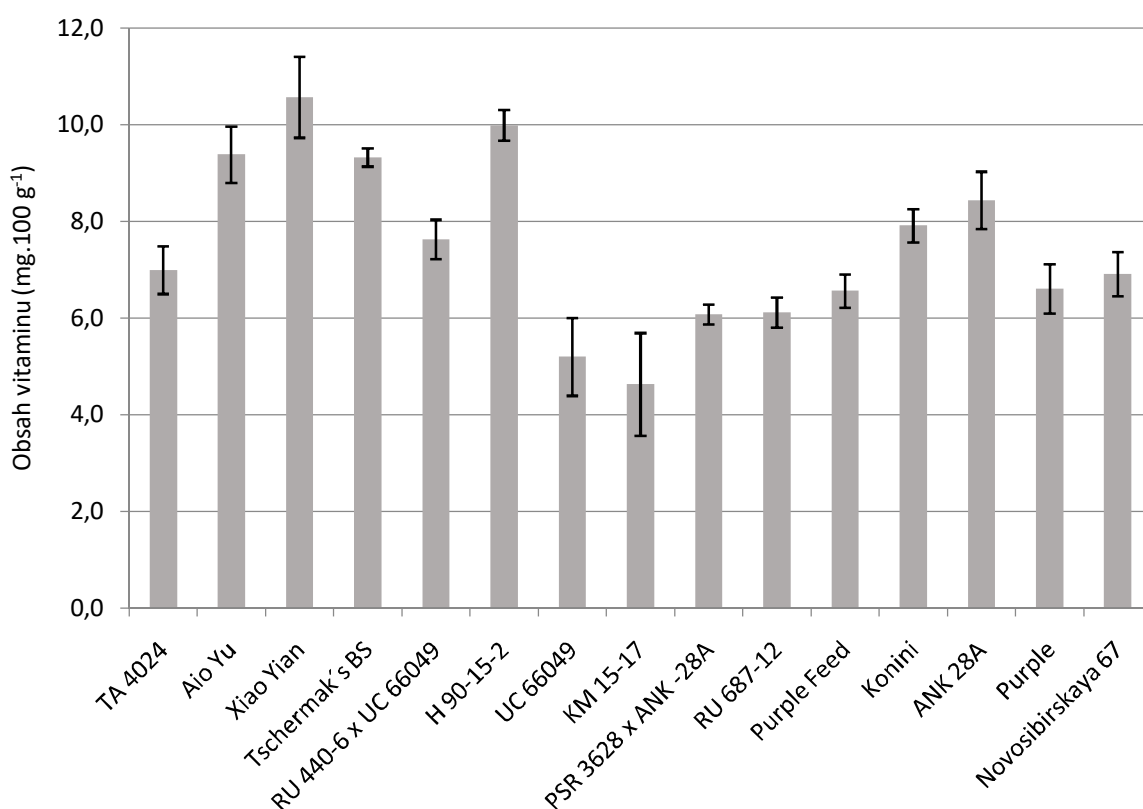
Graf 16 Obsah vitamínu B6 ve vzorcích p-ene

5.3 Hodnocení celkového obsahu vitamin skupiny B v jednotlivých odrách

Celkové obsahy vitamin skupiny B v obilovinách s barevným zrnem dokumentují grafy 17620.

5.3.1 Jarní p-ence

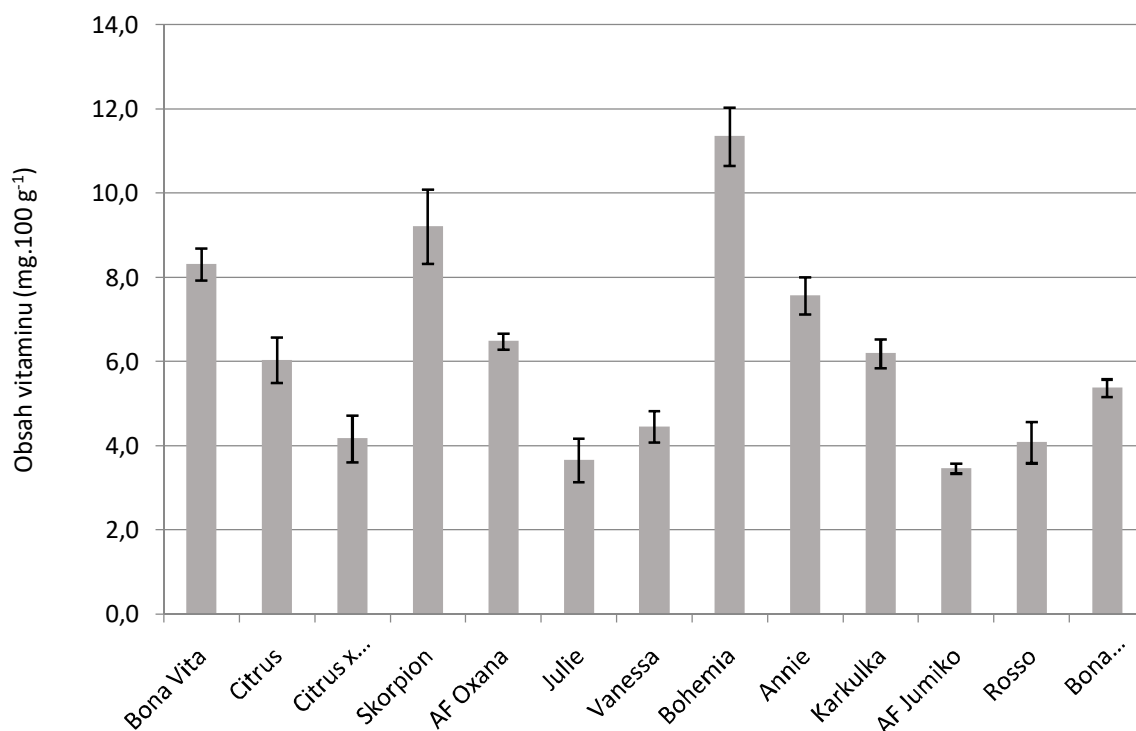
Vzorky jarní p-ence vykazovaly v celkovém součtu vyšší obsahy vitamin B než vzorky p-ence ozimé. Na vitaminy byly bohaté zejména odrdy Xiao Yian ($10,576 \pm 0,840 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) a Aio Yu ($9,384 \pm 0,578 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$).



Graf 17 Celkový obsah vitamin skupiny B ve vzorcích jarní p-ence

5.3.2 Ozimá p-ence

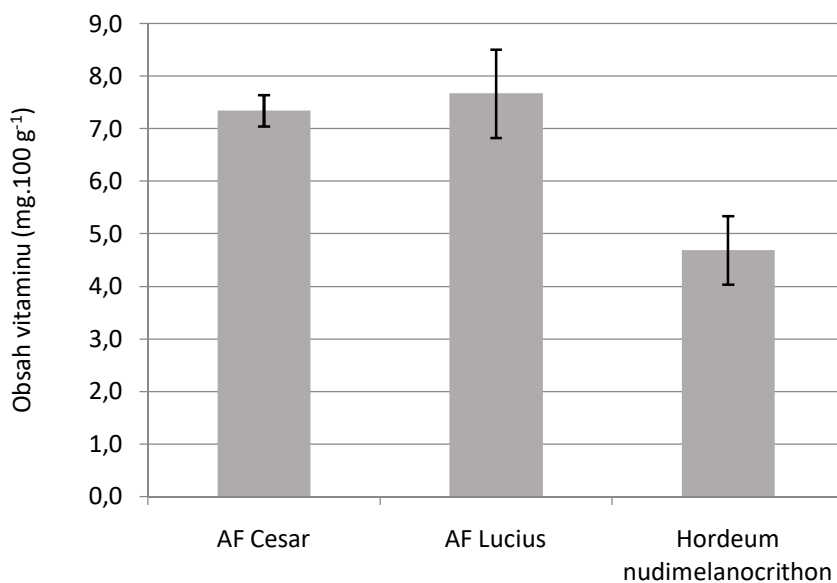
Z odrd ozimé p-ence vynikala vysokým celkovým obsahem vitamin skupiny B odrda Bohemia ($11,352 \pm 0,689 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$). Nejnižší obsah byl naopak pozorován v případě odrdy AF Jumiko ($3,471 \pm 0,118 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$).



Graf 18 Celkový obsah vitamín skupiny B ve vzorcích ozimé p-ence

5.3.3 Odr dy je mene

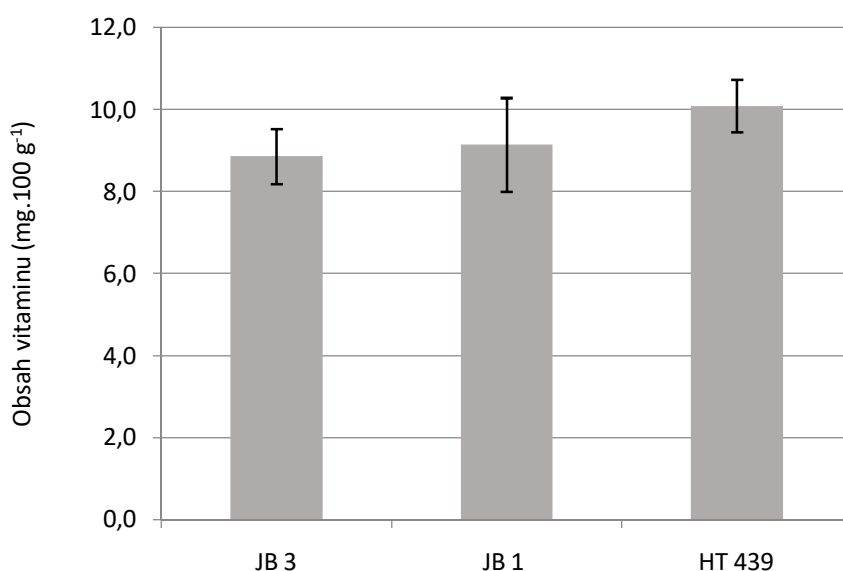
Podobný celkový obsah vitamín B byl sledován u odr d AF Cesar ($7,348 \pm 0,302 \text{ mg.100g}^{-1}$) a AF Lucius ($7,674 \pm 0,840 \text{ mg.100g}^{-1}$). Odr da *Hordeum nudimelanocrithon* vykazovala celkový obsah vitamín výrazn nižší, a to $4,691 \pm 0,653 \text{ mg.100g}^{-1}$.



Graf 19 Celkový obsah vitamín skupiny B ve vzorcích je mene

5.3.4 Odr dy tritordea

Celkový obsah vitamin skupiny B inil v odr d JB3 $8,857 \pm 0,675 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$, v odr d JB1 $9,141 \pm 1,144 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ a v odr d HT 439 $10,085 \pm 0,643 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$. Jednotlivé odr dy tritordea se vzájemn odli-ovaly, v porovnání s je menem v-ak rozdíly nebyly tolik významné.



Graf 20 Celkový obsah vitamin skupiny B ve vzorcích tritordea

5.4 Hodnocení obsahu vitamin v p-enici podle r stové formy

5.4.1 Jarní p-enice

Analýze bylo podrobena 15 vzork r zných odr d jarní p-enice. Nam ený obsah vitaminu B1 byl v rozmezí od $1,017 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (KM 15-17) do $2,865 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (H 90-15-2), obsah vitaminu B2 od $0,273 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (Tschernak's BS) do $0,778 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (ANK 28A), obsah vitaminu B3 od $2,696 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (UC 66049) do $7,517 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (Tschernak's BS) a obsah vitaminu B6 od $0,124 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (UC 66049) do $0,831 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (Aio Yu).

5.4.2 Ozimá p-enice

V 13 analyzovaných odr dách ozimé p-enice se mnofství vitaminu B1 pohybovalo od $0,701 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (AF Jumiko) do $3,187 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (Bohemia), vitaminu B2 od $0,208 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (AF Jumiko) do $0,921 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (Bona Vita), vitaminu B3 od $1,623 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (Julie) do $6,938 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (Bohemia) a vitaminu B6 od $0,106 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (Citrus x Bona Dea) do $0,495 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (Skorpion).

Dle výsledků statistického testování mezi sebou odrůdy pšenice ozimé a pšenice jarní nevykazují statisticky významné rozdíly.

5.5 Hodnocení obsahu vitamínů v pšeničce podle zbarvení zrna

Průměrné obsahy vitamínů B1, B2, B3 a B6 v odrůdách pšenice se stejnými zbarvenými obilkami uvádí tabulka 16.

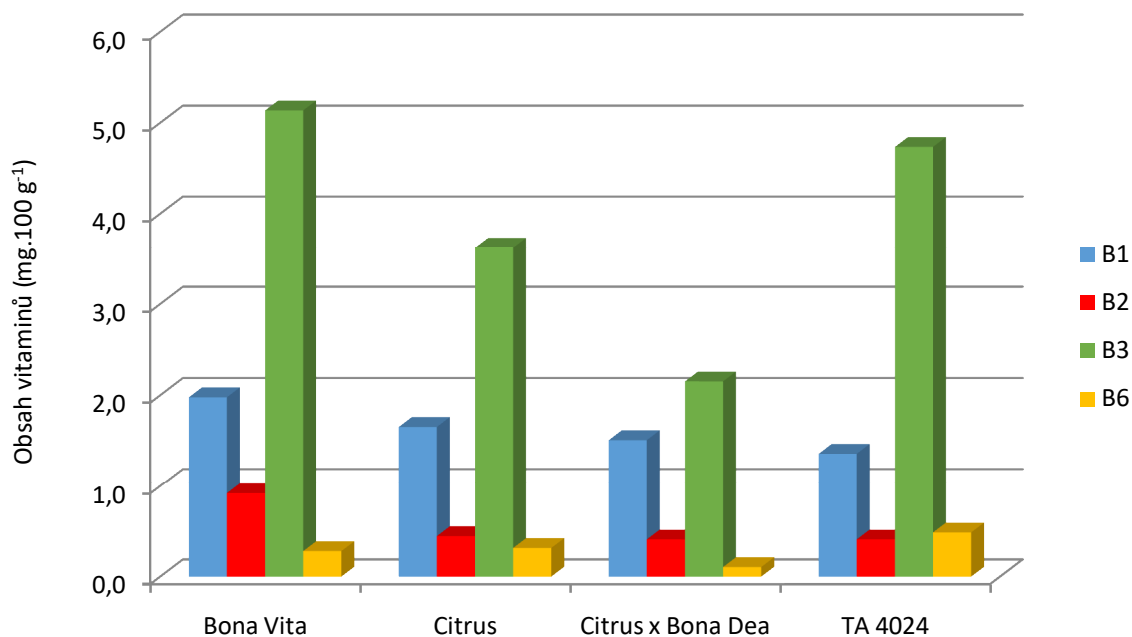
Tabulka 16 Průměrné obsahy vitamínů B1, B2, B3 a B6 v odrůdách pšenice se stejnou barvou zrna

	B1	B2	B3	B6
Pšenice se flutým endospermem	1,625	0,547	3,913	0,298
Pšenice s modrou aleuronovou vrstvou	2,005	0,507	5,618	0,466
Pšenice s červeným perikarpem	1,642	0,448	4,368	0,304
Pšenice s purpurovým perikarpem	1,696	0,481	3,600	0,398
Pšenice s modrou aleuronovou vrstvou a purpurovým perikarpem	1,757	0,501	4,633	0,356
Pšenice s purpurovým perikarpem a flutým endospermem	1,387	0,409	3,464	0,120
Pšenice bez pigmentu	2,342	0,725	3,528	0,315

Porovnání obsahu vitamínů B1, B2, B3 a B6 v odrůdách pšenice se stejnou barvou zrna uvádí grafy 21 a 27.

5.5.1 Pšenice se flutým endospermem

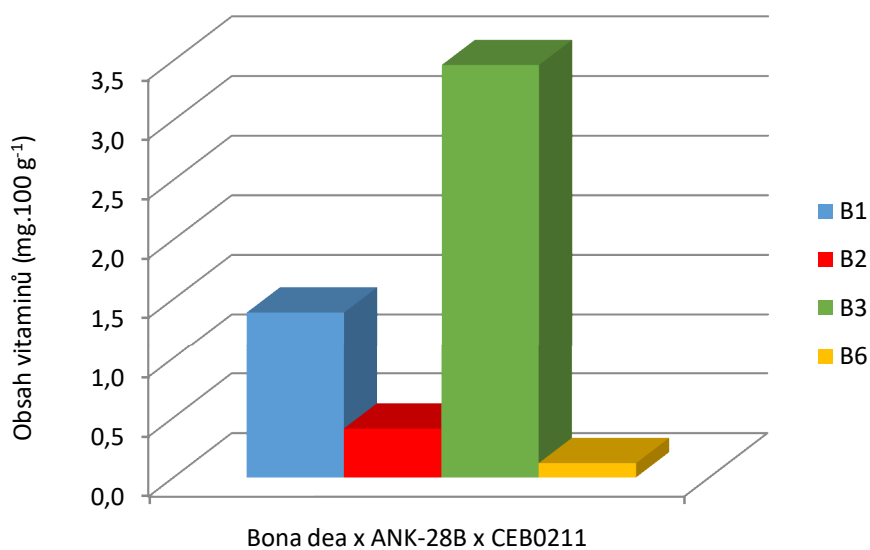
Byly analyzovány 4 vzorky různých odrůd pšenice se flutým endospermem. Obsah vitamínu B1 se pohyboval od 1,359 mg.100g⁻¹ (TA 4024) do 1,979 mg.100g⁻¹ (Bona Vita), obsah vitamínu B2 od 0,410 mg.100g⁻¹ (Citrus x Bona Dea, TA 4024) do 0,921 mg.100g⁻¹ (Bona Vita) a obsah vitamínu B6 od 0,106 mg.100g⁻¹ (Citrus x Bona Dea) do 0,487 mg.100g⁻¹ (TA 4024). Nejvíce zastoupeným vitamínem ve všech vzorcích byl vitamín B3. Množství tohoto vitamínu bylo v rozmezí od 2,154 mg.100g⁻¹ (Citrus x Bona Dea) do 5,137 mg.100g⁻¹ (Bona Vita).



Graf 21 Porovnání obsahu vitaminů B1, B2, B3 a B6 v p-enci se flutým endospermem

5.5.2 P-ence s purpurovým perikarpem a flutým endospermem

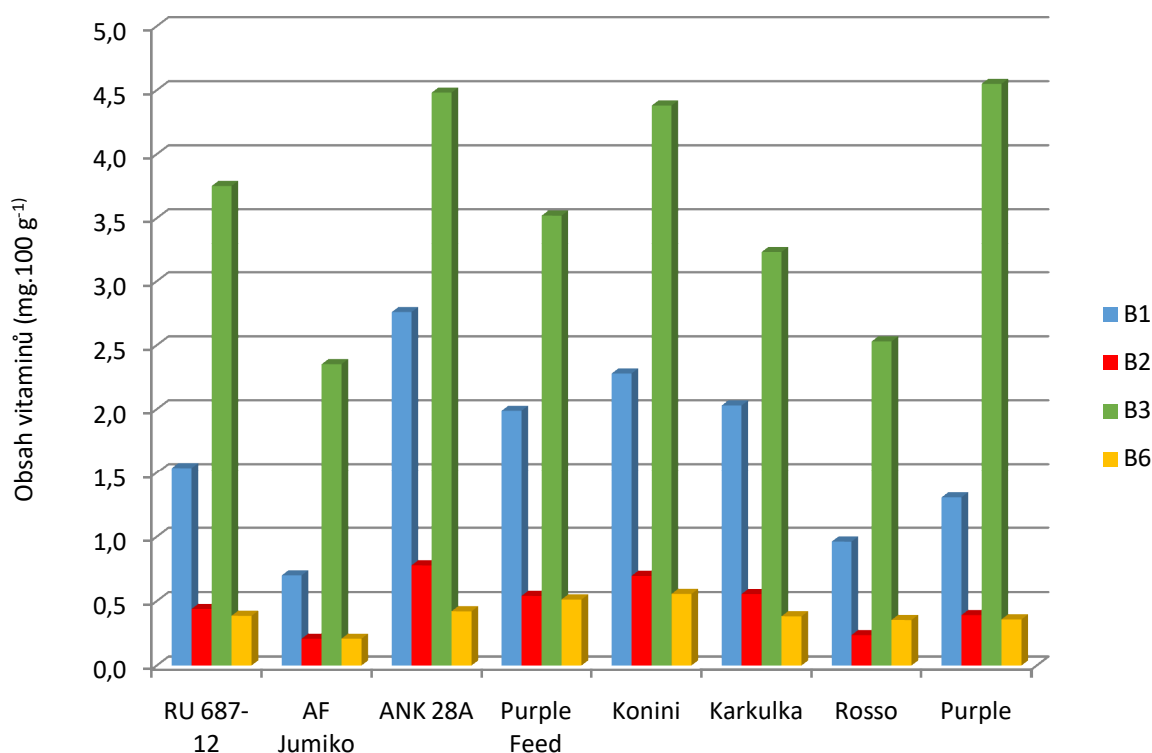
Byl analyzován jeden vzorek p-ence s purpurovým perikarpem a flut zbarveným endospermem. Obsah vitaminu B1 ve vzorku činil 1,387 mg.100g⁻¹, vitaminu B2 0,409 mg.100g⁻¹ a vitaminu B6 0,120 mg.100g⁻¹. Vitamin B3 byl zastoupen nejvíce, jeho hodnota byla 3,464 mg.10 g⁻¹.



Graf 22 Obsah vitaminu B1, B2, B3 a B6 v p-enci s purpurovým perikarpem a flutým endospermem

5.5.3 P-ence s purpurovým perikarpem

Bylo analyzováno 8 vzorků různých odrůd p-ence s purpurovým zbarveným perikarpem. Obsah vitamínu B1 se pohyboval od 0,701 mg.100g⁻¹ (AF Jumiko) do 2,760 mg.100g⁻¹ (ANK 28A), obsah vitamínu B2 od 0,208 mg.100g⁻¹ (AF Jumiko) do 0,778 mg.100g⁻¹ (ANK 28A) a obsah vitamínu B6 od 0,209 mg.100g⁻¹ (AF Jumiko) do 0,556 mg.100g⁻¹ (Konini). Nejvíce zastoupeným vitamínem ve všech vzorcích byl vitamín B3. Množství tohoto vitamínu bylo v rozmezí od 2,353 mg.100g⁻¹ (AF Jumiko) do 4,550 mg.100g⁻¹ (Purple). Odrůda AF Jumiko vykazovala v porovnání s ostatními odrůdami nejnižší obsahy všech sledovaných vitamínů.

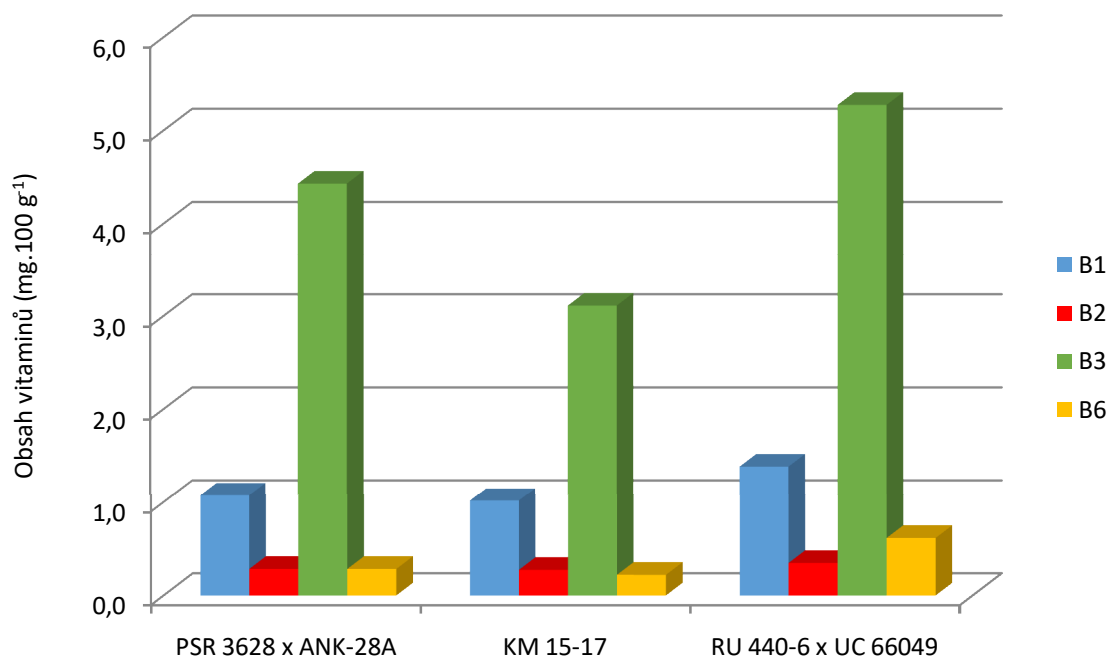


Graf 23 Porovnání obsahu vitamínů B1, B2, B3 a B6 v p-enci s purpurovým perikarpem

5.5.4 P-ence s modrou aleuronovou vrstvou a purpurovým perikarpem

Byly analyzovány 3 vzorky různých odrůd p-ence s modrou aleuronovou vrstvou a purpurovým perikarpem. Obsah vitamínu B1 se pohyboval od 1,017 mg.100g⁻¹ (KM 15-17) do 1,387 mg.100g⁻¹ (RU 440-6 x UC 66049), obsah vitamínu B2 od 0,275 mg.100g⁻¹ (KM 15-17) do 0,348 mg.100g⁻¹ (RU 440-6 x UC 66049) a obsah vitamínu B6 od 0,221 mg.100g⁻¹ (KM 15-17) do 0,615 mg.100g⁻¹ (RU 440-6 x UC 66049). Nejvíce

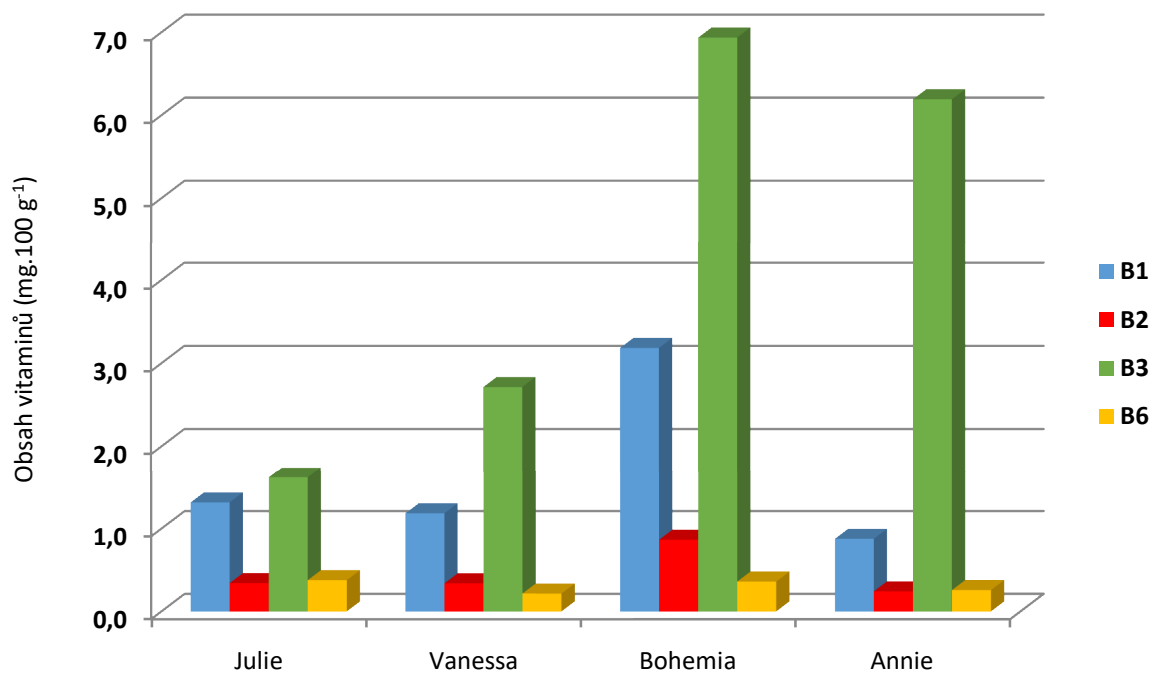
zastoupeným vitamínem ve všech vzorcích byl vitamín B3. Množství tohoto vitamínu bylo v rozmezí od 3,116 mg.100g⁻¹ (KM 15-17) do 5,280 mg.100g⁻¹ (RU 440-6 x UC 66049). Odrda KM 15-17 vykazovala v porovnání s ostatními odrdami nejnižší obsahy všech sledovaných vitamínů, odrda RU 440-6 x UC 66049 naopak nejvyšší.



Graf 24 Porovnání obsahu vitamínů B1, B2, B3 a B6 v pšenicích s modrou aleuronovou vrstvou a purpurovým perikarpem

5.5.5 Pšenice se standardní barvou zrna (tzn. červeným perikarpem)

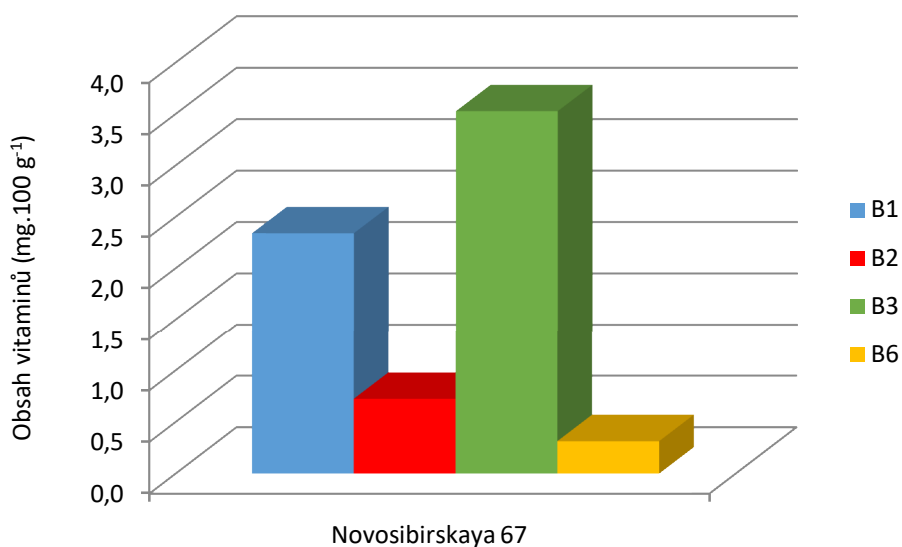
Byly analyzovány 4 vzorky různých odrd pšenice se standardní barvou zrna. Obsah vitamínu B1 se pohyboval od 0,878 mg.100g⁻¹ (Annie) do 3,187 mg.100g⁻¹ (Bohemia), obsah vitamínu B2 od 0,244 mg.100g⁻¹ (Annie) do 0,867 mg.100g⁻¹ (Bohemia) a obsah vitamínu B6 od 0,217 mg.100g⁻¹ (Vanessa) do 0,378 mg.100g⁻¹ (Julie). Největší rozdíl mezi jednotlivými odrdami byl zjištěn v obsahu vitamínu B3. Množství tohoto vitamínu bylo v rozmezí od 1,623 mg.100g⁻¹ (Julie) do 6,938 mg.100g⁻¹ (Bohemia).



Graf 25 Porovnání obsahu vitaminů B1, B2, B3 a B6 v p-enci s červeným perikarpem

5.5.6 P-ence bez pigmentu

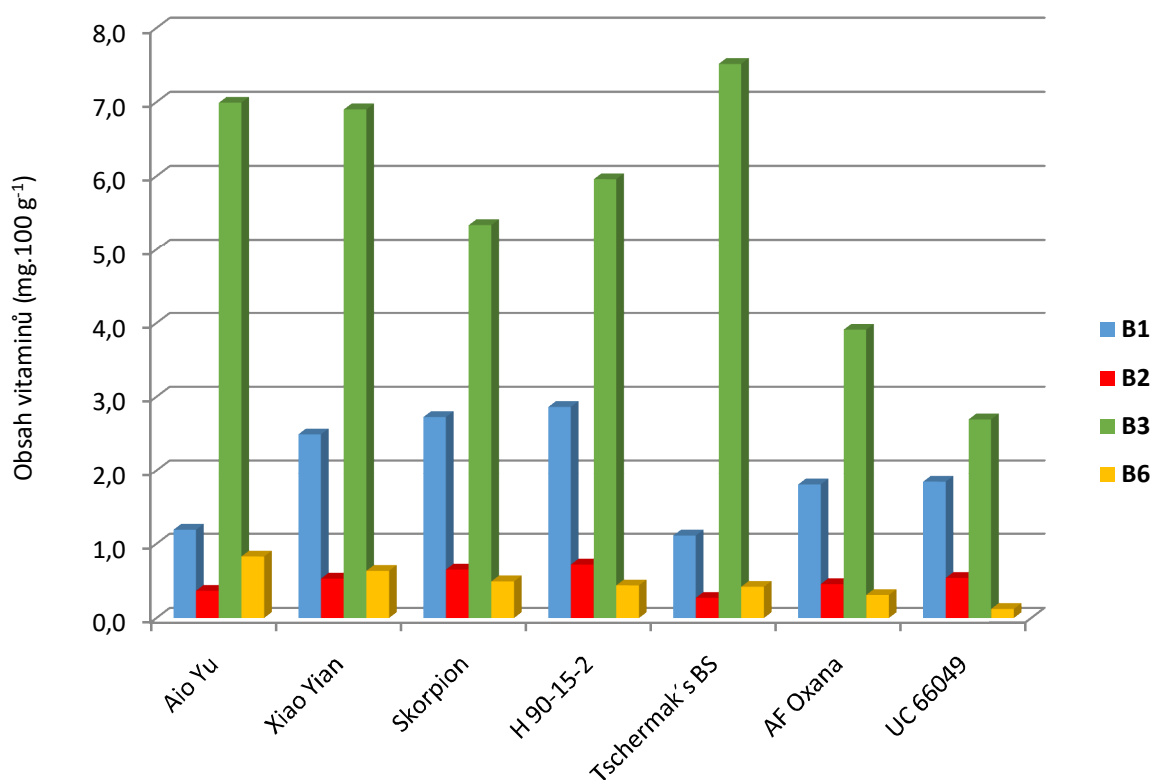
Byl analyzován jeden vzorek p-ence bez pigmentu. Obsah vitaminu B1 ve vzorku činil 2,342 mg.100g⁻¹, vitaminu B2 0,725 mg.100g⁻¹ a vitaminu B6 0,315 mg.100g⁻¹. Nejvyšší obsah vykazoval vitamin B3, a to 3,528 mg.100g⁻¹.



Graf 26 Obsah vitaminu B1, B2, B3 a B6 v p-enci bez pigmentu

5.5.7 P-énice s modrou aleuronovou vrstvou

Bylo analyzováno 7 vzorků různých odrůd p-énice s modrou aleuronovou vrstvou. Obsah vitamínu B1 se pohyboval od 1,113 mg.100g⁻¹ (Tschermak's BS) do 2,865 mg.100g⁻¹ (H 90-15-2), vitamínu B2 od 0,273 mg.100g⁻¹ (Tschermak's BS) do 0,721 mg.100g⁻¹ (H 90-15-2), vitamínu B3 od 2,696 mg.100g⁻¹ (UC 66049) do 7,517 mg.100g⁻¹ (Tschermak's BS) a vitamínu B6 od 0,124 mg.100g⁻¹ (UC 66049) do 0,831 mg.100g⁻¹ (Aio Yu).



Graf 27 Porovnání obsahu vitamínů B1, B2, B3 a B6 v p-énici s modrou aleuronovou vrstvou

6 Diskuze

Jedním z cílů diplomové práce byla optimalizace přípravy vzorku a vlastní metody vysokou tlakem kapalinové chromatografie pro simultánní stanovení vitamínů skupiny B v obilovinách s barevným zrnem. Stanovení vitamínů rozpustných ve vodě, tedy i vitamínů skupiny B, je poměrně náročné. Největší potíže způsobuje jejich chemická labilita, problémem však může být také příliš nízká koncentrace jednoho vitamínu ve srovnání s ostatními. Významné omezení mohou rovněž představovat rušivé látky přítomné v analyzovaném extraktu. Abano & Dadzie (2014) uvádí, že dosud nebyla vypracována metoda, která by spolehlivě dokázala simultánně stanovit všechny vitamíny rozpustné ve vodě.

Příprava vzorků obilovin a jejich následná analýza vycházela z práce autorů Khair-un-Nisa et al. (2010). Při přípravě vzorků byly analyzované vitamíny extrahovány kombinací kyselých a enzymatické hydrolyzy. Právě enzymatická úprava je dle autorů (Bognár & Ollilainen 1997; De Leenheer et al. 2000; Ball 2006) klíčovým krokem, a proto byla aplikována i v této diplomové práci. Účinek enzymatické hydrolyzy spočívá v uvolnění vázaných forem vitamínů, a tedy jejich vyšší výtěžitelnosti z analyzovaných vzorků. Například Hälvín et al. (2013) ve své práci zjistili, že enzymatická úprava zvýšila míru extrakce pyridoxinu o 35 %. Navržená metodika byla ověřena analýzou 34 vzorků obilovin s barevným zrnem.

Diplomová práce si kládla za cíl stanovit vitamíny skupiny B v různých druzích a odrůdách obilovin s barevným zrnem. Ke stanovení byly vybrány pouze vitamíny B1, B2, B3 a B6. Vitamin B5 nebylo možné stanovit zároveň s ostatními vitamíny z důvodu jeho rozkladu při kyselých hydrolyzách. Vitamíny B7, B9 a B12 se v obilovinách téměř nevyskytují, proto nejsou v práci diskutovány.

Množství vitamínů skupiny B v obilovinách je ovlivněno řadou faktorů, například odrůdou, zralostí i způsobem a místem pěstování. Obsahy jednotlivých vitamínů v různých vzorcích téhož druhu i odrůdy proto mohou být značně odlišné. Z toho důvodu uvádí různé literární zdroje pro obsahy vitamínů různé hodnoty.

Jednotlivé druhy obilovin s barevným zrnem se mezi sebou lišily v obsahu všech analyzovaných vitamínů. Průměrný obsah vitamínu B1 ve vzorcích pšenice ($1,710 \pm 0,654 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) byl ve srovnání s průměrnými obsahy v ječmeni ($0,648 \pm 0,141 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) a tritordeu ($0,554 \pm 0,235 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) téměř trojnásobný. Také průměrné množství vitamínu B2 bylo v pšeničce ($0,477 \pm 0,193 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) mnohonásobně

vy—í. V tritordeu inil stanovený průměrný obsah riboflavinu $0,098 \pm 0,032 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$, v je mení pouhých $0,033 \pm 0,015 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$. Nejvíce zastoupeným vitamínem ve všech druzích obilovin s barevným zrnem byl niacin. V jeho množství vynikalo tritordeum, ve kterém bylo průměrně stanoveno $8,437 \pm 1,024 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$. V je mení ($4,854 \pm 1,653 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$) a pěnici ($4,286 \pm 1,606 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$) byl zjištěný obsah niacinu poloviční. Podobné průměrné obsahy vitamínu B6 vykazovaly vzorky pěnice ($0,373 \pm 0,172 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$) a tritordea ($0,297 \pm 0,091 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$). V porovnání s těmito hodnotami byl průměrný obsah pyridoxinu v je mení trojnásobný ($1,037 \pm 0,241 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$). Statistické testy potvrdilo hypotézu, že se různé druhy obilovin s barevným zrnem liší v obsahu všech sledovaných vitamínů, tzn. vitamínu B1, B2, B3 i B6.

Ve vzorcích je méně byl zjištěn průměrný obsah vitamínu B1 $0,648 \pm 0,141 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$, vitamínu B2 $0,033 \pm 0,015 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$, vitamínu B3 $4,854 \pm 1,653 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ a vitamínu B6 $1,037 \pm 0,241 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$. Dle práce McKeivith (2004) je průměrný obsah thiaminu v je mení $0,12 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$, riboflavinu $0,05 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$, niacinu $4,80 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ a pyridoxinu $0,22 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$. USDA (United States Department of Agriculture 2018) udává průměrné množství vitamínu B1 $0,65 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$, vitamínu B2 $0,29 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$, vitamínu B3 $4,60 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ a vitamínu B6 $0,32 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$. Z provedených analýz vyplývá, že obsah thiaminu byl srovnatelný s obsahem uváděným USDA. V porovnání s prací McKeivith (2004) byl však zjištěný obsah tohoto vitamínu více než pětinašobně vyšší. V případě riboflavinu byla stanovená hodnota naopak podobná hodnotě zveřejněné v práci McKeivith (2004) a od hodnoty udávané USDA (2018) se velmi lišila. Průměrný obsah niacinu se shodoval s údaji uvedenými v obou citovaných zdrojích. Pro tyto obsahy niacinu odpovídal literárním údajem, mezi jednotlivými odrádkami je méně byl v jeho obsahu pozorován statisticky významný rozdíl. V odrádkách se lišit zbarveným endospermem, inil jeho obsah $6,036 \pm 0,202 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (odrůda AF Cesar) a $5,910 \pm 0,679 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (odrůda AF Lucius). Odrůda *Hordeum nudimelanocrithon*, pro kterou jsou typická černá zbarvená zrna, obsahovala niacin ve výrazně nižším množství, a to $2,616 \pm 0,414 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$. Lze tedy usuzovat, že zbarvení zrn může mít na množství vitamínu B3 významný vliv. Dále byly ve vzorcích je méně stanoveny výrazně vyšší obsahy pyridoxinu, než jaké uvádí oba výše citované zdroje. Vzhledem k této diferenci lze předpokládat, že barevnost zrn může obsah vitamínu B6 ovlivnit. Statistické testy prokázalo, že odrůda je méně nemá vliv na obsah vitamínu B1 a B2. Množství vitamínu B3 a B6 je naopak odrůdou ovlivněno. Výsledky statistické analýzy však mohou být zatíženy chybou v důsledku malého počtu analýz.

V odrách tritordea byl stanoven průměrný obsah vitamínu B1 $0,554 \pm 0,235 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, vitamínu B2 $0,098 \pm 0,032 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ a vitamínu B6 $0,297 \pm 0,091 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$. Nejvíce zastoupeným vitamínem ve všech vzorcích byl obdobně jako v pěnici a je menší niacin, průměrný obsah tohoto vitamínu činil $8,437 \pm 1,024 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$. Tritordeum není plíseňovou plodinou. Prozatím nebyly publikovány studie, které by sledovaly obsah vitamínů skupiny B v této netradiční obilovině, a proto není možné ověřit správnost výsledků srovnáním s údaji v literatuře. Statistickou analýzou obsahu jednotlivých vitamínů bylo zjištěno, že odrda tritordea má vliv na množství vitamínu B1 a B2. Obsah vitamínu B3 a B6 odrdou ovlivněn není. Obdobně jako v pěnípadě je možné, že z důvodu malého počtu pozorování, výsledky statistického testování volatelní.

Vzorky ozimé a jarní pěníce s netradičním zbarvením zrna zahrnovaly obilky se flutým endospermem, obilky s červeným perikarpem, obilky s purpurovým perikarpem, obilky s modrou aleuronovou vrstvou a purpurovým perikarpem, obilky s purpurovým perikarpem a flutým endospermem, obilky s modrou aleuronovou vrstvou a obilky bez pigmentu. Analýzou vzorků byl stanovován průměrný obsah thiaminu $1,710 \pm 0,654 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, riboflavinu $0,477 \pm 0,193 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, niacinu $4,286 \pm 1,606 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ a pyridoxinu $0,373 \pm 0,172 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$. Mezi jednotlivými odrdami byly v obsahu vitamínů zjištěny statisticky významné rozdíly. Obsah vitamínu B1 se pohyboval od $0,701 \pm 0,026 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (odrda AF Jumiko) do $3,187 \pm 0,111 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (odrda Bohemia), vitamínu B2 od $0,208 \pm 0,046 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (odrda AF Jumiko) do $0,921 \pm 0,045 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (odrda Bona Vita), vitamínu B3 od $1,623 \pm 0,397 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (odrda Julie) do $7,517 \pm 0,103 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (odrda Tschermak's BS) a vitamínu B6 od $0,106 \pm 0,029 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (kříženec Citrus a Bona Dea) do $0,831 \pm 0,065 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (odrda Aio Yu). Podobně široká rozmezí v obsahích jednotlivých vitamínů publikovali ve své práci Khan & Shewry (2009). Autoři udávají průměrné množství thiaminu v rozmezí $0,13$ až $0,99 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, riboflavinu $0,06$ až $0,31 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, niacinu $2,20$ až $11,1 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ a pyridoxinu $0,09$ až $0,79 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$. Stanovené hodnoty niacinu a pyridoxinu odpovídaly rozmezí hodnot uvedených tímto autory. Rovněž obsah riboflavinu byl blízký údajům v literatuře. Stanovené obsahy thiaminu byly výše než obsahy thiaminu zveřejněné v práci Khan & Shewry (2009). S hodnotami publikovanými Khan & Shewry (2009) se shodují také další autoři. McKeivith (2004) udává průměrný obsah thiaminu v pěníci $0,47 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, Kulp & Ponte (2000) $0,55 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$. Stanovený obsah vitamínu B1 byl porovnáním s tímto autory více než trojnásobný. Analyzované odrdy se však od klasických odrd popisovaných v literatuře lišily barvou zrna. Lze tedy předpokládat, že odlišnost zbarvení mohla koncentraci vitamínu B1 ovlivnit. Obsahy

stanovených vitaminů byly statisticky testovány. Bylo zjištěno, že odrůda pšenice má vliv na obsah vitaminů B1, B2, B3 i B6. Výsledek statistického testování potvrdil hypotézu, že se rozdíl v obsahu odrůdy pšenice s barevným zrnem liší v obsahu vybraných vitaminů.

Porovnáním obsahu jednotlivých vitaminů bylo zjištěno, že se mezi sebou rozdíl formy pšenice aťž na výjimky téměř nelíží. Průměrný obsah vitaminu B1 se v odrůdách jarní pšenice pohyboval od $1,017 \pm 0,356 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (KM 15-17) do $2,865 \pm 0,069 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (H 90-15-2). V pšenci ozimé bylo množství tohoto vitaminu v podobném rozmezí, a to od $0,701 \pm 0,026 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (AF Jumiko) do $3,187 \pm 0,111 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (Bohemia). Téměř shodné hodnoty byly naměřeny také v případě vitaminu B2. Průměrné množství riboflavinu v pšenci jarní bylo od $0,273 \pm 0,010 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (Tschernak's BS) do $0,778 \pm 0,046 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (ANK 28A), v pšenci ozimé od $0,208 \pm 0,046 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (AF Jumiko) do $0,921 \pm 0,045 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (Bona Vita). Podobný trend byl sledován i v obsahu vitaminu B3. Odrůdy pšenice jarní vykazovaly průměrné zastoupení niacinu v rozsahu od $2,696 \pm 0,545 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (UC 66049) do $7,517 \pm 0,103 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (Tschernak's BS), odrůdy pšenice ozimé od $1,623 \pm 0,397 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (Julie) do $6,938 \pm 0,471 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (Bohemia). V případě vitaminu B6 byla u obou rozdíl forem naměřená stejná dolní hranice hodnot. Nejnižší průměrný obsah pyridoxinu v pšenci jarní byl $0,124 \pm 0,019 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (UC 66049), v pšenci ozimé $0,106 \pm 0,029 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (Citrus x Bona Dea). V nejvyšším stanoveném průměrném obsahu se rozdíl formy vzájemně liší. Odrůdy pšenice jarní ($0,831 \pm 0,065 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, Aio Yu) obsahovaly pyridoxinu téměř dvakrát více než odrůdy pšenice ozimé ($0,495 \pm 0,105 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, Skorpion). Dle výsledků statistického testování mezi sebou odrůdy pšenice jarní a pšenice ozimé nevykazovaly statisticky významné rozdíly. Lze tedy konstatovat, že rozdíl forma pšenice nemá vliv na obsah vitaminů B1, B2, B3 a B6.

Mezi odrůdami pšenice, které se vzájemně liší barvou obilky, byly pozorovány určité rozdíly v obsahu sledovaných vitaminů. Nejvyšší průměrný obsah vitaminu B1 byl zjištěn v odrůdách pšenice bez pigmentu ($2,342 \pm 0,096 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) a s modrou aleuronovou vrstvou ($2,005 \pm 0,658 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$). Nejnižší obsah tohoto vitaminu vykazovala odrůda s purpurovým perikarpem a flutým endospermem ($1,387 \pm 0,033 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$). Obsah vitaminu B2 se mezi jednotlivě zbarvenými zrny příliš neliší. Průměrné množství vitaminu se pohybovalo od $0,409 \pm 0,009 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (odrůda s purpurovým perikarpem a flutým endospermem) do $0,725 \pm 0,025 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (odrůda bez pigmentu). Nejvíce vitaminu B3 obsahovaly odrůdy s modrou aleuronovou vrstvou ($5,618 \pm 1,639 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), naopak nejnižší průměrný obsah vitaminu byl naměřen v odrůdách s purpurově zbarveným perikarpem a flutým endospermem.

($3,464 \pm 0,158 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$). Nejvyšší průměrný obsah vitamínu B6 vykazovaly odrůdy pšenice s modrou aleuronovou vrstvou, a to $0,466 \pm 0,209 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$. Ve srovnání s odrůdou, jejíž obilky mají purpurovzbarvený perikarp se flutým endospermem ($0,120 \pm 0,009 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), byl jejich obsah téměř násobný.

Triticum obsahovalo ze všech druhů obilovin nejvyšší průměrné celkové množství vitamínu B ($9,361 \pm 0,525 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$). V porovnání s triticum byl celkový obsah vitamínu v ječmeni téměř jeden a půlkrát nižší ($6,571 \pm 0,598 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$). Jarní pšenice vykazovala celkový obsah vitamínu B vyšší než pšenice ozimá. Na vitaminy byly bohaté zejména jarní odrůdy Xiao Yian ($10,576 \pm 0,840 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) a Aio Yu ($9,384 \pm 0,578 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$). Nejnižší celkový obsah byl stanoven v odrůdách KM 15-17 ($4,630 \pm 1,063 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$). Z ozimé pšenice vynikala vysokým celkovým obsahem vitamínu odrůda Bohemia ($11,352 \pm 0,689 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$). Nejnižší obsah byl naopak zjištěn v odrůdách AF Jumiko ($3,471 \pm 0,118 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$). Průměrné celkové množství vitamínu B činilo v jarní pšenici $7,491 \pm 0,497 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, v pšenici ozimé $6,186 \pm 0,441 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$.

Navzdory složitosti simultánní analýzy vitamínů rozpustných ve vodě, dokázala metoda použitá v diplomové práci zajistit opakovatelné a reprodukovatelné výsledky měření. Většina obsahů stanovených vitamínů skupiny B se navíc pohybovala v rozmezí hodnot vyplývajících z literárních zdrojů. Aplikovaný postup by proto mohl být základem pro vývoj dalších metod použitelných pro stanovení vitamínů skupiny B v rozmanitých potravinách a zemědělských komoditách.

7 Závěr

Byla optimalizována příprava vzorku a ověřena vlastní metoda vysokouinné kapalinové chromatografie pro simultánní stanovení vitamín skupiny B v obilovinách s barevným zrnem. Ve vybraných odrůdách pšenice, ječmene a tritordea byly kvantifikovány vitaminy B1, B2, B3 a B6.

Jednotlivé druhy obilovin se mezi sebou lišily v obsahu všech analyzovaných vitamínů. Odrůdy pšenice vykazovaly ze všech druhů obilovin nejvyšší obsahy vitamínů B1 a B2. Průměrné množství thiaminu ve vzorcích pšenice bylo ve srovnání s průměrnými obsahy v ječmeni a tritordeu téměř trojnásobné. Rovněž průměrný obsah riboflavinu byl mnohonásobně vyšší. Nejvíce vitamínu B3 obsahovaly odrůdy tritordea, v ječmeni a pšeničce byl průměrný obsah tohoto vitamínu poloviční. Nejvyšší množství vitamínu B6 bylo stanoveno v ječmeni. Oproti pšeničce a tritordeu byl průměrný obsah pyridoxinu trojnásobně vyšší.

Mezi různými formami pšenice, pšeničce jarní pšeničce a ozimou, nebyly v obsahu jednotlivých vitamínů pozorovány statisticky významné rozdíly.

Odlisné obsahy sledovaných vitamínů byly zjištěny mezi odrůdami pšenice s odlišnou barvou obilky. Odrůda s purpurovým perikarpem a flutým endospermem obsahovala ze všech odrůd nejnižší množství všech analyzovaných vitamínů. Nejvyšší obsah vitamínů B1 a B2 byl zjištěn v odrůdce bez pigmentu, nejvíce vitamínu B3 a B6 obsahovaly odrůdy s modře zbarvenou aleuronovou vrstvou.

Tritordeum obsahovalo ze všech druhů obilovin nejvyšší průměrné celkové množství sledovaných vitamínů skupiny B. V porovnání s tritordeem byl celkový obsah vitamínů v ječmeni a pšeničce téměř jeden až pětkrát nižší.

Vlastní stanovených obsahů analyzovaných vitamínů se pohybovala v rozmezí hodnot vyplývajících z literárních zdrojů. Výsledky měření byly opakovatelné a reprodukovatelné. Aplikovaný postup přípravy vzorku a vlastní metody simultánního stanovení vitamínů skupiny B by proto mohlo být základem pro vývoj dalších metod stanovení vitamínů skupiny B v potravinách a agrárních komoditách.

8 Literatura

- Abano EE, Dadzie RG. 2014. Simultaneous detection of water-soluble vitamins using the high performance liquid chromatography (HPLC) - a review. *Croatian Journal of Food Science and Technology* **6**:116-123.
- Anyakora C, Afolami I, Ehianeta T, Onwumere F. 2008. HPLC analysis of nicotinamide, pyridoxine, riboflavin and thiamin in some selected food products in Nigeria. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2**:29-36.
- Aslam J, Mohajir MS, Khan AS, Khan QA. 2008. HPLC analysis of water-soluble vitamins (B1, B2, B3, B5, B6) in in vitro and ex vitro germinated chickpea (*Cicer arietinum L.*). *African Journal of Biotechnology* **7**: 2310-2314.
- Ball FMB. 2003. Pantothenic Acid/Properties and Determination. In: Caballero, B. (ed). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2nd ed. Academic Press, Cambridge.
- Ball FMB. 2006. *Vitamins in Foods: Analysis, Bioavailability, and Stability*. CRC Press, Boca Raton.
- Batifoulier F, Verny MA, Chanliaud E, Rémesy C, Demigné C. 2006. Variability of B vitamin concentrations in wheatpan grain, milling fractions and bread products. *European Journal of Agronomy* **2**:163-169.
- Bergaentzlé M, Arella F, Bourguignon JB, Hasselmann C. 1995. Determination of vitamin B6 in foods by HPLC ó a collaborative study. *Food Chemistry* **52**:81-86.
- Bognår A, Ollilainen W. 1997. Influence of extraction on the determination of vitamin B6 in food by HPLC. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und - Forschung* **5**:327-335.
- Cataldi TR., Nardiello D, Carrara V, Ciriello R, De Benedetto GE. 2003. Assessment of Riboflavin and Flavin Content in Common Food Samples by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection. *Food Chemistry* **82**:309-314.
- Cellar NA, McClure S, Salvati LM, Reddy TM. 2016. A new sample preparation and separation combination for precise, accurate, rapid, and simultaneous determination of vitamins B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇, and B₉ in infant formula and related nutritionals by LC-MS/MS. *Analytica Chimica Acta* **934**:180-185.

Cuskelly GJ, Stacpoole PW, Williamson J, Baumgartner TG, Gregory JF. 2001. Deficiencies of folate and vitamin B₆ exert distinct effects on homocysteine, serine, and methionine kinetics. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **281**: 1182-1190.

SN EN 14122. 2014. Potravinový Stanovení vitamínu B₁ metodou vysokou i jiné kapalinové chromatografie. Český normalizační institut, Praha.

SN EN 14152. 2014. Potravinový Stanovení vitamínu B₂ metodou vysokou i jiné kapalinové chromatografie. Český normalizační institut, Praha.

SN 56 0051. 1987. Stanovení niacinu (kyseliny nikotinové). Český normalizační institut, Praha.

SN 56 0060. 1983. Stanovení kyseliny pantotenové v pořivatinách. Český normalizační institut, Praha.

SN EN 14663. 2006. Potravinový Stanovení vitamínu B₆ (včetně jeho glykosilovaných forem) metodou HPLC. Český normalizační institut, Praha.

De Leenheer AP, Lambert WE, Van Bocxlaer JF. 2000. *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins: Revised and Expanded*. 3rd ed. CRC Press, New York.

Depeint F, Bruce WR, Shangari N, O'Brien JP. 2006. Mitochondrial function and toxicity: Role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism. *Chemico-Biological Interactions* **163**:94-112.

Edwards AK., Tu-Maung N, Cheng K, Wang B, Baeumner JA, Kraft EC. 2017. Thiamine Assays - Advances, Challenges, and Caveats. *Open Chemistry Journal* **6**:178-191.

EFSA FEEDAP Panel (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed). 2016. Safety and efficacy of vitamin B₂ (riboflavin and riboflavin 5- α -phosphate ester monosodium salt) produced by *Bacillus subtilis* for all animal species based on a dossier submitted by DSM. *EFSA Journal* **14**:4349-4375.

EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies). 2014. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for niacin. *EFSA Journal* **12**:3759-3801.

EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies). 2014 Scientific Opinion on Dietary Reference Values for pantothenic acid. *EFSA Journal* **12**:3581-3606.

Dostupné z <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2014.358> .

Eitenmiller RR, Landen WO, Ye L. 2008. *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences*. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton.

Fajfrová J. 2011. Vitaminy a jejich funkce v organismu. *Interní medicína pro praxi* **13**:466-468.

Friedrich W. 1988. *Vitamins*. Walter de Gruyter, Berlín.

Goldschmidt RJ, Wolf WR. 2007. Determination of Niacin in Food Materials by Liquid Chromatography Using Isotope Dilution Mass Spectrometry. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* **90**:1084-1089.

Gonthier A, Fayol V, Violle J, Hartmann DJ. 1998. Determination of pantothenic acid in foods: influence of the extraction method. *Food Chemistry* **63**:287-294.

Granda L, Rosero A, Benešová K, Pluháková H, Neuwirthová J, Cerkal R. 2018. Content of Selected Vitamins and Antioxidants in Coloured and Nonpigmented Varieties of Quinoa, Barley, and Wheat Grains. *Journal of Food Science* **83**:2439-2447.

Hälvin K, Paalme T, Nisamedtinov I. 2013. Comparison of different extraction methods for simultaneous determination of B complex vitamins in nutritional yeast using LC/MS-TOF and stable isotope dilution assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **4**:1213-1222.

Hlúbik P, Opltová L. 2004. *Vitaminy*. Grada Publishing, Praha.

Hodges RE, Olhson MA, Bean WB. 1958. Pantothenic Acid Deficiency in Man. *The Journal of Clinical Investigation* **37**:1642-1657.

Insel PM, Turner RE, Ross D. 2006. *Discovering Nutrition*. 2nd ed. Jones&Bartlett Learning, Sudbury.

Institute of Medicine. 1998. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin and Choline. National Academies Press, Washington (DC).

Jip P, Xia L, Che N, Zou D, Hu X. 2012. Rapid determination of thiamine, riboflavin, niacinamide, pantothenic acid, pyridoxine, folic acid and ascorbic acid in Vitamins with Minerals Tablets by high-performance liquid chromatography with diode array detector. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **70**:151-157.

Juraja SM, Trenerry VC, Millar GR, Scheelings P, Buick RB. 2003. Asia Pacific food analysis network (APFAN) training exercise: the determination of niacin in cereals by alkaline extraction and high performance liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis* **16**:93-106.

Khair-un-Nisa A, Tarar OM, Ali SA, Jamil K, Begum A. 2010. Study to evaluate the impact of heat treatment of water soluble vitamins in milk. *Journal of the Pakistani Medical Association* **60**:909-912.

Khan K, Shewry PR. 2009. *Wheat: Chemistry and Technology*. 4th ed. AACCI International. St. Paul.

Knobloch E. 1956. *Fyzikální chemické metody stanovení vitaminů*. Nakladatelství československé akademie věd, Praha.

Koubová D. 2010. Pšenice x je men = tritordeum. *DLZ Agrarmagazin*. Available from <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=103&ch=1&typ=1&val=105253> (accessed November 2018).

Kulp K., Ponte JG. 2000. *Handbook of Cereal Science and Technology*, Revised and Expanded. 2nd ed. CRC Press, New York.

Lebiedzka A, Marszałek ML, Kuta J, Szefer P. 2007. Reversed-phase high-performance liquid chromatography method with coulometric electrochemical and ultraviolet detection for the quantification of vitamins B₁ (thiamine), B₆ (pyridoxamine, pyridoxal and pyridoxine) and B₁₂ in animal and plant foods. *Journal of Chromatography A*. **1173**:71680.

Lebiedzi ska A, Szefer P. 2006. Vitamins B in grain and cereal-grain food, soy-products and seeds. *Food Chemistry* **95**:116-122.

Machá P, Ehrenbergerová J, Cerkal R. 2014. Sladovnický a dietetický významné ne-krobové polysacharidy zrna je mene. *Kvasný prmysl* **10**:258-265.

Maráková K, Pieňanský J, Havránek E, Mikuš P. 2014. Simultaneous analysis of vitamins B in pharmaceuticals and dietary supplements by capillary electrophoresis hyphenated with triple quadrupole mass spectrometry. *Pharmazie* **69**:663-668.

Marszałek LM, Lebiedzi ska A, Czarnowski W, Szefer P. 2005. High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and cyanocobalamin in pharmaceutical formulations using coulometric electrochemical and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography* **1094**:91-98.

McKevith B. 2004. Nutritional aspects of cereals. *Nutrition Bulletin* **29**:111-142.

Ministerstvo zdravotníctví. 2009. Vyhláška č. 330/2009 Sb. ze dne 15. září 2009 o označování výživové hodnoty potravin. Pages 4678-4684 in *Sbírka zákonů České republiky*, částka 102. Česká republika.

Mittermayr R, Kalman A, Trisconi MJ, Heudi O. 2004. Determination of Vitamin B5 in a range of fortified food products by reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionisation. *Journal of Chromatography* **1032**:1-6.

Muhammad AJ. 2015. The Citric Acid Cycle: Process and contextual comments. *IRA-International Journal of Applied Sciences* **1**:5-11.

Musilová M, Trojan V, Vyhnánek T, Havel L. 2010. The RNA Isolation from Genetic Resources of Coloured Grain Wheat. Pages 826-830 in *TKarpa P, editor. MendelNet. Mendel University in Brno, Brno.*

Navarro-Pascual-Ahuir M, Lerma-García MJ, Simó-Alfonso EF, Herrero-Martínez JM. 2016. Determination of water-soluble vitamins in energy and sport drinks by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Control* **63**:110-116.

- Ndaw S, Bergaentzlé M, Aoudé-Werner D, Hasselmann C. 2002. Enzymatic extraction procedure for the liquid chromatographic determination of niacin in foodstuffs. *Food Chemistry* **78**:129-134.
- Pakin C, Bergaentzlé M, Aoudé-Werner D, Hubscher V, Hasselmann C. 2004. Fluorimetric determination of pantothenic acid in food by liquid chromatography with post-column derivatization. *Journal of chromatography* **1**:87-95.
- Prinzo ZW. 1999. Thiamine deficiency and its prevention and control in major emergencies. World Health Organization. Available from http://who.int/nutrition/publications/en/thiamine_in_emergencies_eng.pdf (accessed October 2018).
- Prousky J, Millman CG, Kirkland JB. 2011. Pharmacologic Use of Niacin. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine* **16**:91-101.
- Příhoda J, Škřivan P, Hrušková M. 2004. *Cereální chemie a technologie I: cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin*. Vydavatelství VÚMOP Praha, Praha.
- Rohi M, Pasha I, Butt MS, Nawaz H. 2013. Variation in the Levels of B-Vitamins and Protein Content in Wheat Flours. *Pakistan Journal of Nutrition* **12**:441-447.
- Romera JM, Ramirez M, Gil A. 1996. Determination of Pantothenic Acid in Infant Milk Formulas by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Dairy Science* **79**:523-526.
- Rose-Sallin C, Blake CJ, Genoud D, Tagliaferri EG. 2001. Comparison of microbiological and HPLC - fluorescence detection methods for determination of niacin in fortified food products. *Food Chemistry* **73**:473-480.
- Sami R, Li Y, Qi B, Wang S, Zhang Q, Han F, Ma Y, Jing J, Jiang L. 2014. HPLC Analysis of Water-Soluble Vitamins (B2, B3, B6, B12 and C) and Fat-Soluble Vitamins (E, K, D, A, and β -Carotene) of Okra (*Abelmoschus esculentus*). *Journal of Chemistry* (e831357) DOI: [org/10.1155/2014/831357](https://doi.org/10.1155/2014/831357).
- Sampedro A, Rodriguez-Granger J, Ceballos J, Aliaga L. 2015. Pantothenic Acid: an Overview Focused on Medical Aspects. *European Scientific Journal* **21**:1-18.

- Sampson DA, Eoff LA, Yan LX, Lorenz K. 1995. Analysis of Free and Glycosylated Vitamin B6 in Wheat by High-Performance Liquid Chromatography. *Cereal Chemistry* **72**:217-221.
- Schreiber V. 1993. Vitaminy kdy a jak a pro a kolik. Nakladatelství a vydavatelství H&H, Praha.
- Silva da DC, Visentainer JV, de Souza NE, Oliveira CC. 2013. Micellar Electrokinetic Chromatography Method for Determination of the Ten Water-Soluble Vitamins in Food Supplements. *Food Analytical Methods* **6**:1592-1606.
- Spiller M. 2017. Whole Wheat Flour & Bread Nutritional Values. The Whole Grain Connection. Available from <http://wholegrainconnection.org/sitebuildercontent/sitebuilderfiles/wholewheatnutritionalvalues.pdf> (accessed February 2019).
- Spinneker A, Sola R, Lemmen V, Castillo MJ, Pietrzik K, González-Gross M. 2007. Vitamin B6 status, deficiency and its consequences - an overview. *Nutrición Hospitalaria* **22**: 7-24.
- Szpikowska-Sroka B. 2011. A Simple and Sensitive Analytical Method for Determination of Thiamine in Pharmaceutical Preparations. *Journal of Analytical Chemistry* **3**:218-222.
- Thornton AM, Drummond CJ. 2014. An unexpected case of pellagra. *The Medical Journal of Australia* **200**:546-548.
- Tichá M, Vyzínová P. 2006. *Polní plodiny*. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno.
- Trojan V, Musilová M, Vyhnánek T, Havel L. 2010. The Genetic Variability of Coloured Grain Wheat Collection. Pages 845-851 in TMKarpa P, editor. *MendelNet*. Mendel University in Brno, Brno.
- Udhaybanu T, Manole A, Rajeshwari M, Varalakshmi P, Houlden H, Ashokkumar B. 2017. Riboflavin Responsive Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Diseases. *Journal of Clinical Medicine* (e28475111). DOI: 10.3390/jcm6050052.
- United States Department of Agriculture. 2018. USDA National Nutrient Database for Standard Reference: barley, hulled. United States Department of Agriculture. Available from

<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/20004?fgcd=&manu=&format=&count=&max=25&offset=0&sort=default&order=asc&qlookup=barley&ds=&qt=&qp=&qa=&qn=&q=&ing>
(accessed February 2019).

Vanderkooi M. 2000. Village Medical Manual: A Layman's Guide to Health Care in Developing Countries, Volume II Diagnosis and Treatment. 5th ed. William Carey Library, Pasadena.

Velf-ek J. 1999. Chemie potravin 2. OSSIS, Tábor.

Vitamin B6 (Pyridoxine; Pyridoxal 5'-Phosphate). 2001. Alternative Medicine Review **6**:87-92.

Ward CM, Trenerry CV. 1997. The Determination of Niacin in Cereals, Meat and Selected Foods by Capillary Electrophoresis and High Performance Liquid Chromatography. Food Chemistry **60**:667-674.

Watada AE, Tran TT. 1985. A sensitive high-performance liquid chromatography method for analyzing riboflavin in fresh fruits and vegetables. Journal of Liquid Chromatography **8**:1651-1662.

Y Y, Yj C, Yn T. 2015. A Simple and Fast Fluorimetric Method for Thiamine (Vitamin B1) Detection by Au³⁺ - Mediated Formation of Thiochrome. Austin Journal of Biosensors & Bioelectronics **1**:1004-1007.

9 Seznam použitých zkratk a symbol

ACP	protein p ená-ející acyly
ATP	adenosintrifosfát
CoA	koenzym A
EKG	elektrokardiografie
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
HPLC	vysokou ínná kapalinová chromatografie
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NADP	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
PDA	detektor diodového pole
P5P	pyridoxal-5'-fosfát
USDA	United States Department of Agriculture
UV	ultrafialová oblast spektra
VIS	viditelná oblast spektra
WHO	Sv tová zdravotnická organizace

10 Samostatné príklady

10.1 Ukázkový príklad statistického zhodnotenia obsahu vitamínu podľa druhu obiloviny

Pro hodnotenie obsahu vybraných vitamínov skupiny B bola použitá analýza rozptylu (ANOVA). Testovanie bolo provedeno na hladine významnosti $\alpha = 5\%$.

10.1.1 Vitamín B1

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$ (Druh obiloviny nemá vplyv na obsah vitamínu B1)

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$ (Druh obiloviny má vplyv na obsah vitamínu B1)

Anova: jeden faktor						
Faktor						
Výběr	Počet	Součet	Průměr	Rozptyl		
Ječmen	9	5,829831	0,647759	0,022394		
Tritordium	8	4,43555	0,554444	0,06321		
Pšenice	87	148,788	1,710207	0,432065		
ANOVA						
Zdroj variability	SS	Rozdíl	MS	F	Hodnota P	F krit
Mezi výběry	17,44406	2	8,722031	23,31773	4,72173E-09	3,086371
Všechny výběry	37,7792	101	0,374052			
Celkem	55,22327	103				

P hodnota $< \alpha (5\%) =$ zamítame H_0

$H_1 =$ Druh obiloviny má vplyv na obsah vitamínu B1.

10.1.2 Vitamín B2

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$ (Druh obiloviny nemá vplyv na obsah vitamínu B2)

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$ (Druh obiloviny má vplyv na obsah vitamínu B2)

Anova: jeden faktor						
Faktor						
Výběr	Počet	Součet	Průměr	Rozptyl		
Ječmen	9	0,29342	0,032602	0,000258		
Tritordium	8	0,781976	0,097747	0,001202		
Pšenice	87	41,51549	0,47719	0,037539		
ANOVA						
Zdroj variability	SS	Rozdíl	MS	F	Hodnota P	F krit
Mezi výběry	2,45461	2	1,227305	38,2721	4,24865E-13	3,086371
Všechny výběry	3,238855	101	0,032068			
Celkem	5,693465	103				

P hodnota < (5 %) = zamítáme H₀

H₁ = Druh obiloviny má vliv na obsah vitamínu B₂.

10.1.3 Vitamin B₃

H₀: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$ (Druh obiloviny nemá vliv na obsahu vitamínu B₃)

H₁: $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$ (Druh obiloviny má vliv na obsahu vitamínu B₃)

Anova: jeden faktor						
Faktor						
Výběr	Počet	Součet	Průměr	Rozptyl		
Ječmen	9	43,68745	4,854161	3,073528		
Tritordium	8	67,49782	8,437227	1,197814		
Pšenice	87	372,8587	4,285733	2,60885		
ANOVA						
Zdroj variability	SS	Rozdíl	MS	F	Hodnota P	F krit
Mezi výběry	126,6621	2	63,33103	24,85655	1,66573E-09	3,086371
Všechny výběry	257,334	101	2,547861			
Celkem	383,9961	103				

P hodnota < (5 %) = zamítáme H₀

H₁ = Druh obiloviny má vliv na obsah vitamínu B₃.

10.1.4 Vitamin B6

H0: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$ (Druh obiloviny nemá vliv na obsahu vitamínu B6)

H1: $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$ (Druh obiloviny má vliv na obsahu vitamínu B6)

Anova: jeden faktor						
Faktor						
<i>Výběr</i>	<i>Počet</i>	<i>Součet</i>	<i>Průměr</i>	<i>Rozptyl</i>		
Ječmen	9	9,331144	1,036794	0,065571		
Tritordium	9	2,67252	0,296947	0,009411		
Pšenice	87	32,41359	0,37257	0,029852		
ANOVA						
<i>Zdroj variability</i>	<i>SS</i>	<i>Rozdíl</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Hodnota P</i>	<i>F krit</i>
Mezi výběry	3,754947	2	1,877474	60,4662	4,80591E-18	3,085465
Všechny výběry	3,167097	102	0,03105			
Celkem	6,922044	104				

P hodnota < (5 %) = zamítáme H0

H1= Druh obiloviny má vliv na obsah vitamínu B6.