

**UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

ANALÝZA VITAMINŮ B2 A B6 V POTRAVINÁCH

Lucie Králíčková

**Bakalářská práce
2012**

**UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF ANALYTICAL CHEMISTRY**

ANALYSIS OF VITAMINS B2 AND B6 IN FOODSTUFFS

Lucie Králíčková

**Bachelor thesis
2012**

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lucie Králíčková**
Osobní číslo: **C09133**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Analýza vitaminů B2 a B6 v potravinách**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Proveďte literární rešerši zabývající se metodami analýzy hydrofilních vitaminů skupiny B v potravinách. Zaměřte se především na vitaminy B2 - riboflavin a B6 - pyridoxin.
2. Charakterizujte základní vlastnosti uvedených vitaminů a jejich výskyt a význam v potravinářství. Popište zdravotní aspekty spojené s vitaminy B2 a B6, a to jak vzhledem k jejich nedostatku, tak i přebytku.
3. Uveďte základní principy metod pro analýzu výše uvedených vitaminů i příslušných vitamérů, a to především s ohledem na analýzu potravin.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Martin Adam, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce:

Ing. Petra Pavlíková


Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce:

20. února 2012

Termín odevzdání bakalářské práce:

22. června 2012



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.

vedoucí katedry

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne: 2012

.....
Lucie Králíčková

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu bakalářské práce doc. Ing. Martinovi Adamovi, Ph.D. za odborné rady, trpělivost, přátelský přístup, podněty a připomínky při zpracování mé bakalářské práce.

Dále bych ráda poděkovala svým přátelům a rodičům za to, že mi studium umožnili a po celou dobu mě ve studiu podporovali.

SOUHRN

Bakalářská práce je zaměřená na získání souhrnných poznatků o vitamínu B2 (riboflavinu) a vitamínu B6 (pyridoxinu). V této práci jsou shrnuty informace o zmiňovaných vitamínech B2 a B6, jejich historii, vlivu na lidský organismus a informace o metodách jejich stanovení.

Úvodní část práce je věnována teoretickým informacím, mezi které jsou zahrnuty struktury vitamínů B2 a B6, fyzikálně-chemické vlastnosti, výskyt v potravinách a doporučený denní příjem. Dále jsou v této práci zmiňovány zdravotní aspekty spojené s vitamíny B2 a B6.

Druhá část práce popisuje metody, které lze využít při stanovení vitamínu B2 a B6. Mezi tyto metody patří metoda mikrobiologická, fluorimetrická, polarografická a chromatografická.

Klíčová slova: Vitamin B2
Riboflavin
Vitamin B6
Pyridoxin
Analýza potravin

SUMMARY

This bachelor thesis is focused on presenting summary information about vitamin B2 (riboflavin) and vitamin B6 (pyridoxine). In this thesis there are a summary of information about above-mentioned vitamins B2 and B6, their history, an effect of the vitamin on a human organism and also information about their determination presented.

The first part discusses the theoretical information including structures of vitamins B2 and B6, physical and chemical properties, the presence of these vitamins in food and recommended daily intake. The information about health aspects connected with vitamins B2 and B6 is presented as well.

The second part describes the methods that can be used for the determination of vitamin B2 and B6. These methods include the microbiological, fluorimetric, polarographic and chromatographic methods.

Keywords: Vitamin B2
Riboflavin
Vitamin B6
Pyridoxine
Food analysis

SEZNAM ZKRATEK

FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
MF	Mobilní fáze
SF	Stacionární fáze
CNS	Centrální nervová soustava
UV	Ultrafialová oblast
PN	Pyridoxin

OBSAH:

1.	Úvod	12
2.	B-komplex	13
3.	Charakteristika vitamínu B2	14
3.1.	Historie a objev vitamínu B2.....	14
3.2.	Struktura vitamínu B2	14
3.3.	Fyzikálně-chemické vlastnosti vitamínu B2.....	15
3.4.	Zdravotní aspekty vitamínu B2	16
3.4.1.	Hypovitaminóza	16
3.4.2.	Hypervitaminóza	16
3.5.	Zdroje vitamínu B2 v potravinách.....	17
3.5.1.	Produkty rostlinného původu	17
3.5.2.	Produkty živočišného původu	17
3.5.3.	Obsah vitamínu B2 v potravinách	17
3.6.	Doporučený denní příjem vitamínu B2	19
3.7.	Ztráty vitamínu B2 při zpracování potravin	19
4.	Charakteristika vitamínu B6.....	21
4.1.	Historie a objev vitamínu B6.....	21
4.2.	Struktura vitamínu B6	21
4.3.	Fyzikálně - chemické vlastnosti vitamínu B6.....	22
4.4.	Zdravotní aspekty vitamínu B6	23
4.4.1.	Hypovitaminóza vitamínu B6	23
4.4.2.	Hypervitaminóza vitamínu B6.....	24
4.5.	Zdroje vitamínu B6 v potravinách.....	24
4.5.1.	Potraviny rostlinného původu.....	25
4.5.2.	Potraviny živočišného původu	25
4.5.3.	Obsah vitamínu B6 v potravinách	25
4.6.	Doporučený denní příjem vitamínu B6	26
4.7.	Ztráty vitamínu B6 při zpracování potravin	26
5.	Metody stanovení vitamínu B2 a B6	28
5.1.	Chromatografické metody	28
5.2.	Mikrobiologická metoda	29
5.3.	Fluorimetrická metoda	30

5.4.	Polarografická metoda	31
5.5.	Spektrofotometrická metoda	32
6.	Stanovení vitamínu B2	33
6.1.	Lumiflavinová (fluorimetrická) metoda	33
6.2.	Metoda kapalinové chromatografie	33
6.3.	Mikrobiologická metoda stanovení vitamínu B2	34
7.	Stanovení vitamínu B6	35
7.1.	Mikrobiologické stanovení vitamínu B6	35
7.2.	Fluorimetrická metoda stanovení vitamínu B6	35
7.3.	Spektrofotometrické stanovení vitamínu B6	36
8.	Závěr	37
9.	Seznam použité literatury	38

1. Úvod

Lidské znalosti o vitamínech jsou nedokonalé, neboť v našem organismu jsou stále objeveny jejich nové funkce. Vitaminy jsou tzv. esenciální látky, které jsou součástí potravy a lze je definovat jako organické exogenní esenciální biokatalyzátory heterotrofních organismů. Značně přispívají ke správnému vývoji, růstu a procesu vstřebávání živin v těle. Vitaminy jsou látky biologicky aktivní, které si organismus neumí sám syntetizovat z jednoduchých sloučenin, a proto je musí přijímat v potravě. Působí jako prekurzory biokatalyzátorů a významnou roli vykonávají svým katalytickým účinkem při řadě reakcí látkové přeměny. Mnohé vitaminy mají antioxidační vlastnosti a vytváří i důležité oxidačně redukční systémy. Neúčastní se krytí energetických potřeb a nejsou ani stavebními nebo strukturálními jednotkami organismu.

Vitaminy jsou nenahraditelné pro správnou funkci lidského těla, a proto se provádí kontroly jejich obsahu nejen ve výsledných produktech potravinářského průmyslu, ale i v surovinách. Vitaminy se dělí nejčastěji dle společných fyzikálních vlastností a rozpustnosti ve vodě či v tucích. Vitaminy rozpustné ve vodě jsou látky hydrofilní (hydrosolubilní), které se neukládají ve větší míře v organismu, a proto je nutný jejich pravidelný příjem. Patří sem vitaminy skupiny B (B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇, B₉, B₁₂) a vitamin C (kyselina L-askorbová). Naopak vitaminy rozpustné v tucích jsou látky lipofilní (liposolubilní), které se v organismu ukládají a díky tomu není nutné je doplňovat každý den. Mezi lipofilní vitaminy patří vitaminy A, D, E a K.

Z řady vědecky podložených materiálů je známo, že nedostatek nebo nadbytek některého z vitamínů může způsobit v organismu narušení jednotlivých metabolických drah, které mohou vést i k vážným onemocněním. Při nedostatečném příjmu vitamínu se po čase vytváří hypovitaminóza projevující se nespecifickými poruchami a určení jejich příčin bývá velice obtížné. Při dlouhodobém nedostatku vitamínu z potravy vzniká avitaminóza, která se projevuje zcela typickými poruchami. Opakem nedostatku vitamínu je hypervitaminóza, která je způsobena nadbytkem.

Tato práce podrobněji rozebírá analýzu vitamínů B₂ (riboflavinu) a B₆ (pyridoxinu). Pozornost je především věnována charakteristice a stanovení uvedených vitamínů.

2. B-komplex

B-komplex, neboli skupinu vitamínu B, lze zařadit do látek rozpustných ve vodě. Jsou to vitaminy hydrofilní, které přispívají ke správnému fungování metabolismu, nervového systému, krvetvorby a vyznačují se vytvářením enzymových aktivátorů a koenzymů.

Množství vitamínů B-komplexu potřebné ke správnému fungování organismu je velice nízké, a proto se dá dostatečné zásobování organismu zajistit pestrou smíšenou stravou. Toto množství je ovšem závislé na mnoha faktorech, jako je například stáří, pohlaví, zdravotní stav, životní styl a stravovací návyky. V rámci posuzování výživové situace se nejvíce sleduje příjem thiaminu (B1), riboflavinu (B2) a pyridoxinu (B6). V potravě jsou zdroje všech uvedených vitamínů podobné, tudíž je možné předpokládat, že při příjmu dostatečného množství těchto vitamínů nevznikne avitaminóza (úplný nedostatek vitamínu) či hypovitaminóza (částečný nedostatek vitamínu) i u zbylých vitamínů B-komplexu. Přírodní produkty nikdy neobsahují vitaminy řady B samostatně, ale vždy v komplexu. [1,12,15,20]

Avitaminóza, jak již bylo zmíněno, znamená úplný nedostatek vitamínu, který způsobuje poruchu některých biochemických procesů. Snížený obsah vitamínu v organismu způsobuje již zmíněnou hypovitaminózu. Na druhou stranu nadbytek vitamínu způsobuje hypervitaminózu, která opět způsobuje poruchy biochemických procesů a vede k vážným onemocněním. U vitamínů rozpustných ve vodě je však hypervitaminóza vzácná, protože se nezadržují v těle a jejich případný nadbytek je vyloučen ledvinami.

Vitaminy B napomáhají tělu využívat sacharidy, tuky a bílkoviny jako zdroj energie. Funkce hydrofilních vitamínů, které se uplatňují jako kofaktory řady důležitých enzymů v metabolismu látek, spočívá v katalytickém účinku. [1,12,14]

Mezi vitaminy skupiny B patří:

B1 - thiamin	B6 - pyridoxin
B2 - riboflavin	B7/H - biotin
B3 - kyselina nikotinová	B9 - folacin
B5 - pantothenová kyselina	B12 - kobalamin

3. Charakteristika vitamínu B2

3.1. Historie a objev vitamínu B2

První izolace vitamínu B2 (riboflavinu) získaného při mikroskopickém pozorování proběhla v roce 1879. Vědci objevili v mléce fluoreskující žlutozelenou látku, kterou následně pojmenovali jako „enzymatická žlut“. Roku 1933 ji Paul Gyorgy identifikoval jako riboflavin. [24]

Riboflavin byl znám pod různými jmény, jako například laktoflavin, ovoflavin, uroflavin či vitamin G. [1,24] Je důležitý pro procesy látkové přeměny v těle a je součástí zhruba 200 různých enzymů. Nejvíce je obsažen ve žlutých flavinových enzymech, kterých je více než 40. Riboflavin má také své důležité místo v metabolismu bílkovin a je biologicky aktivní součástí protetické skupiny flavoproteinů. [4,6]

Do některých potravin se riboflavin přidává za účelem zlepšování jejich složení, např. do pšeničné mouky. Dále se díky své žluto-oranžové barvě používá k barvení některých potravin, zejména cereálních výrobků. [12] Vitamin B2 je obsažen v podobných zdrojích jako thiamin (B1), ale na rozdíl od něj se vyskytuje ve vysokých koncentracích také v mléce a listové zelenině. [15]

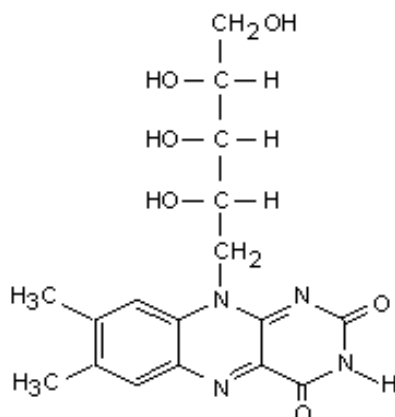
3.2. Struktura vitamínu B2

Riboflavin, systematickým názvem 7,8-dimethyl-10-(1-D-ribityl)-benzo[g]pteridin-2-4-dion, je vitamin patřící do skupiny flavinů. Jeho empirický vzorec je uváděn jako $C_{17}H_{20}N_4O_6$ a molekulová hmotnost 376,36 g/mol. [6]

Chemická struktura riboflavinu je složena z isoalloxazinového jádra. Na toto jádro je v poloze N-10 navázán ribitol (také zvaný jako alditol), který je odvozený od D-ribózy. [1,12]

Riboflavin se vyskytuje v podobě žlutého až žlutozeleného prášku a je oxidovanou formou vitamínu, které se říká flavochinon. [1,6] Při ozáření riboflavinu viditelným i UV světlem je nestálý a odštěpuje ribózový zbytek. [15] Díky jeho vysoké citlivosti vůči světlu se s ním musí manipulovat jen v tmavém prostředí. Riboflavin je rozpustný ve vodě, v ethanolu velmi špatně a v ostatních nepolárních rozpouštědlech se nerozpouští. [6] Nejčastější forma riboflavinu je riboflavin-5'-fosfát, dále také jako flavinadenindinukleotid (FAD) či kovalentně vázaný riboflavin. Lze ho však najít

i v biochemických systémech jako volnou látku. [1,2] Struktura riboflavinu je znázorněna na obrázku 1.



Obr. 1: Chemická struktura riboflavinu [2]

3.3. Fyzikálně - chemické vlastnosti vitamínu B2

Riboflavin je krystalická látka žluté barvy. Krystalizuje v ostré krystalky ve tvaru jehel, které jsou opticky aktivní a jejich teplota tání se pohybuje v rozmezí 275-282 °C. [1,6] Je málo rozpustný ve vodě a to v poměru 120 mg riboflavinu na 1 000 ml vody při 27,5 °C. Naopak lehce se rozpouští ve vodných roztocích alkalických hydroxidů. Vodné neutrální roztoky riboflavinu značně žlutě fluoreskují a tato fluorescence se ztrácí v silně kyselých a alkalických roztocích.

Vitamin B2 je velice citlivý ke světelnému záření a neutrálnímu nebo alkalickému prostředí. Na druhou stranu je velice stabilní vzhledem k vysokým teplotám v kyselých roztocích. Působením světla v neutrálním či kyselém prostředí dochází k odštěpení postranního řetězce a vzniku lumiflavinu, v alkalickém prostředí za stejných podmínek vzniká lumichrom. [1,3,14]

Účastní se skoro všech oxidoredukčních procesů a ve formě fosforylované je součástí mnohých enzymatických systémů. [4] Snadná redukce probíhá u flavinových koenzymů, přičemž tato redukce je reverzibilní. Tato reakce umožňuje přenos vodíků ze substrátu na akceptor pomocí flavinových enzymů. [3]

V biochemických systémech se riboflavin objevuje ve formě koenzymů oxidoredukčních enzymů. Nejčastější jsou FAD a flavinmononukleotid (FMN). Ve formě koenzymu FAD a FMN je riboflavin součástí flavoproteinových dehydrogenáz a oxidáz. V tomto stavu se podílí i na odbourávání mastných kyselin a oxidativních fosforylacích.

3.4. Zdravotní aspekty vitamínu B2

Riboflavin je vitamin hrající životně důležitou roli při tvorbě hormonu štítné žlázy. Tento hormon zrychluje metabolismus a napomáhá k udržování energetické potřeby pro veškeré tělesné orgány. Z velké části se podílí na léčbě kožních onemocnění a v kombinaci s dalšími vitaminy B-komplexu umožňuje i léčbu nervových a jiných onemocnění jako je třeba Alzheimerova choroba či epilepsie. Dále pak napomáhá ke vzniku imunitních buněk, které jsou potřeba v boji proti infekci a ve spojení se železem se podílí na vzniku erytrocytů. [20]

3.4.1. Hypovitaminóza

Hypovitaminóza je stav, který v organismu způsobuje nedostatek určitého vitamínu. Je to okamžik, kdy se hladina vitamínu sníží pod 0,5mg/den na více než 100 dní. Nejvíce se vyskytuje u lidí, kteří jsou vystavováni dlouhodobému stresu nebo mají nedostatečný příjem mléka a mléčných výrobků. [2] Tito lidé pak často trpí světloplachostí, zvracením a průjmami. [7] Nedostatek také může zapříčinit průmyslové zpracování potravin, které z nich vitaminy odstraňuje. [20]

Mezi nejčastější projevy nedostatku vitamínu B2 u člověka patří záněty v oblasti ústních koutků, nehnisavá onemocnění očních víček, onemocnění štítné žlázy, záněty tenkého střeva, svědění v oblasti pochvy, depresivní nálady, třes končetin a v neposlední řadě diabetes mellitus. U zvířat se tento nedostatek projevuje zastavením růstu a onemocněním kůže. Typickým místem výskytu jsou země třetího světa. [2,7,20,21]

Úplný nedostatek vitamínu B2, neboli avitaminóza, způsobuje často nervové poruchy, záněty sliznic a kůže. [3]

Prevence proti hypovitaminóze a následné avitaminóze vitamínu B2 je zařazení vhodného množství mléka, mléčných produktů, vnitřností a listové zeleniny do každodenní stravy. [7]

3.4.2. Hypervitaminóza

Vzhledem k tomu, že se vitamin B2 nekumuluje v organismu déle než je fyziologicky nutné, onemocnění spojená s hypervitaminózou nejsou prozatím zaznamenány. Účinky riboflavínu tedy nijak neohrožují zdraví, jelikož jeho přebytek se vylučují močí ven z organismu. [21]

3.5. Zdroje vitamínu B2 v potravinách

Riboflavin je velice důležitý pro dobrý stav kůže, očí, funkce srdce a dalších orgánů. V organismu výrazně ovlivňuje celkovou energetickou přeměnu, jelikož má vliv na metabolismus cukrů, tuků a aminokyselin. Jako součást enzymů v dýchacím řetězci je nepostradatelný pro základní buněčný metabolismus. [8,21]

Vitamin B2 je vysoce rozšířen jak v rostlinách, tak i v živočišných organismech. Spousta mikroorganismů vytváří riboflavin a některé z nich ho vylučují do kultivačního média. Pro výrobu riboflavinu byly jako průmyslové kmeny použity kvasinky *Ashbya gossypii* a *Eremothecium ashbyii*, které parazitují na rostlinách. Výroba se uplatňuje především v potravinářském a krmivářském průmyslu, dále jako součást výroby veterinárních či humánních léků. [28,40]

3.5.1. Produkty rostlinného původu

Ve vyšších rostlinách a mikroorganismech se mimo riboflavinu, FMN a FAD nachází i velký počet dalších derivátů riboflavinu. Tyto deriváty vykazují velice podobnou biologickou aktivitu jako vitamin B2. [12]

V dalších produktech se riboflavin vyskytuje např. ve špenátu, kvasnicích a těstovinách. [4] Ve větším množství se vyskytuje v luštěninách a celozrnných výrobcích. Naopak v chlebu a dalších cereálních výrobcích se vitamin vyskytuje ve velmi nízkých koncentracích. [1,2,12]

3.5.2. Produkty živočišného původu

U potravin živočišného původu se riboflavin vyskytuje ve všech potravinách. Nejvíce je však obsažen v játrech, mase, sýrech nebo také v mléčných výrobcích či mléce. Snadno se z těchto potravin absorbuje v trávicím traktu. [1,4,12]

3.5.3. Obsah vitamínu B2 v potravinách

Jak již bylo psáno výše, vitamin B2 je obsažen jak v potravinách rostlinného, tak i živočišného původu. Dále se v menším množství nachází v zelenině, ovoci, mase sladkovodních ryb a ve stopovém množství jej lze najít také v houbách. Naopak ve významném množství se vyskytuje v droždí a pivu (cca 0,5 mg/dm³).

Pro získání doporučeného obsahu vitamínu v těle bychom měli jíst v první řadě větší množství mléčných výrobků a v řadě druhé hodně masa.

Na základě vědecky podložených faktů bylo stanoveno, že téměř 40 % vitamínu získávaného z potravy zajišťuje mléko a mléčné výrobky, cca 20 % maso a masné výrobky, 15 % cereálie, necelých 10 % vejce a zelenina a zbylých 15 % připadá na ostatní potraviny. Riboflavin se z potravin ztrácí při vaření, ponechávání na slunci a úpravě trvanlivosti. [1,2,12,21]

Riboflavin je dle vyhlášky č.304/2004 Sb. označen jako E 101. Podle této vyhlášky se stanovují podmínky a druhy použití přídatných a pomocných látek při výrobě potravin. [29]

V oblasti potravinářského průmyslu je možno riboflavin používat pro fortifikaci potravin a také jako barvivo některých potravin, především pro cereální a instantní produkty. [1,2] Obsah vitamínu B2 v potravinách je popsán v tabulce 1.

Tabulka 1: Obsah vitamínu B2 ve vybraných potravinách [12]

Potravina	Obsah riboflavinu (μg ve 100g)
Pšeničná mouka	20-210
Žitná mouka	40-143
Chléb pšeničný	20-100
Chléb žitný	73-250
Sýr	330-565
Mléko	20-300
Rýže	30-120
Játra vepřová	2 900-4 400
Játra hovězí	100-3 300
Brambory	75-200
Špenát	57-340
Ryby	10-330

3.6. Doporučený denní příjem vitamínu B2

Denní dávka riboflavinu je závislá na obsahu bílkovin a energetické hodnotě potravy. Výše doporučeného denního příjmu vitamínu by se měla pohybovat mezi 1,5-2 mg u dospělých osob. Větší množství tohoto vitamínu by se mělo požívat po chirurgických zákrocích, při horečnatých onemocněních, průjmech, stresových situacích, fyzické námaze a v neposlední řadě v těhotenství, kde by se denní potřeba měla pohybovat nad hodnotou 1,7 mg. [5,15] Doporučené denní dávky vitamínu B2 pro různé věkové kategorie jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Doporučená denní dávka vitamínu B2 [2,15]

Věkové skupiny	Doporučená denní dávka riboflavinu (mg)
Kojenci	0,5
Děti (3-6 let)	1,1
Muži (19-59 let)	1,6
Ženy (19-59 let)	1,4
Těhotné ženy	1,6
Kojící ženy	1,8
Osoby nad 60 let	1,4

3.7. Ztráty vitamínu B2 při zpracování potravin

Významné ztráty obsahu riboflavinu se mohou projevit už při skladování, dopravě či sklizni. Při těchto manipulacích jsou ztráty v potravině nejvíce způsobeny nevhodnou teplotou, délkou skladování nebo nedostatečnou ochranou proti slunečnímu záření. [30]

Riboflavin je velice stabilní při tepelném zpracování. Potravinu obsahující zvýšené množství riboflavinu podléhá vlivem slunečního záření fotochemickému rozkladu. Při pečení a vaření jsou ztráty riboflavinu způsobeny pouze výluhem do vody a nejsou příliš velké (max. 10 %). [12]

Nejvýznamnějším činitelem ovlivňujícím stabilitu je světlo. Při ozáření UV nebo viditelným světlem je riboflavin nestabilní a dochází k odštěpení ribosového zbytku. Světlo v rozmezí 420 až 560 nm má největší vliv. Rychlost a rozsah ztrát vitamínu záleží na intenzitě světla, teplotě prostředí a vlastnostech obalu. Například vlivem zářivkového světla v prodejnách mohou být ovlivněny potraviny v průhledných obalech. K velkému úbytku riboflavínu v mléce dochází působením přímého slunečního záření. Při skladování mléka na slunci degraduje za 1 hodinu asi 20-40 % riboflavínu. Obdobné účinky má také rozptýlené denní světlo. [1,15]

4. Charakteristika vitaminu B6

4.1. Historie a objev vitaminu B6

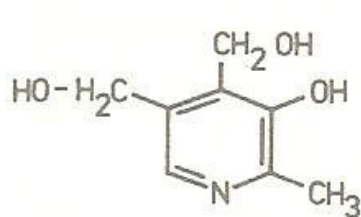
Pyridoxin (vitamin B6) byl objeven a poprvé laboratorně izolován v roce 1934. Jeho nedostatek způsobuje asi 110 poruch vnímavosti, potíží a vážných onemocnění. Na druhou stranu pyridoxin oživuje aminokyseliny, působí pozitivně na nervy a lidé jsou díky němu šťastní. Vitamin B6 je všestranná biolátka, která má důležitou roli ve funkci lidského nervového systému. [10,20]

4.2. Struktura vitaminu B6

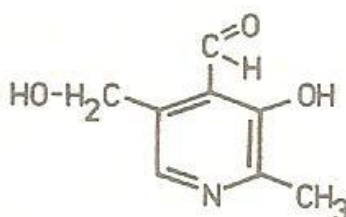
Pyridoxin (pyridoxol), dříve nazývaný jako adermin, je vitamin zahrnující tři strukturně příbuzné a biologicky účinné látky (tzv. vitamery) odvozené od 3-hydroxy-5-hydroxymethyl-2-methylpyridinu, které se odlišují substitucí v poloze 4 pyrimidinového kruhu. Dále pak zahrnuje i tři příslušné fosfáty těchto látek.

Mezi hlavní deriváty patří:

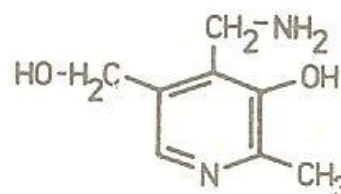
- pyridoxol (2-methyl-3-hydroxy-4,5-bishydroxymethylpyridin)
- pyridoxal (2-methyl-3-hydroxy-4-formyl-5-hydroxymethylpyridin)
- pyridoxalamin (2-methyl-3-hydroxy-4-aminomethyl-5-hydroxymethylpyridin)



Pyridoxol



Pyridoxal



Pyridoxamin

Obr. 2: Chemické struktury vitaminu B6 [10]

Celá zmíněná triáda vytváří s minerálními kyselinami ve vodě rozpustné soli a má bazický charakter. Název pyridoxin se používá pro veškeré biologicky aktivní látky jako synonymum názvu vitamin B6. Jeho empirický vzorec je uváděn jako $C_8H_9O_3N$ a molekulová hmotnost 167,2 g/mol. [10,11,12]

Pyridoxin je dobře rozpustný ve vodě, termolabilní, syntetizovaný rostlinami a mikroorganismy. Má velký podíl na enzymatických reakcích a jeho využitelnost v těle se pohybuje mezi 70-80 %. Vitamin B6 se v těle také uplatňuje jako stabilizátor rovnováhy sodíku a draslíku v tělesných tekutinách. [10,11,21]

Nejběžnější forma v lidské tkáni je pyridoxal-5'-fosfát. Jeho největší množství se nachází ve svalech, kde je vázán fosforylázou. Pyridoxal-5'-fosfát je metabolicky aktivní forma, která je zapojena do cca 100 enzymatických reakcí včetně metabolismu sacharidů, aminokyselin a mastných kyselin. V této formě je využíván k dekarboxylaci a transaminaci aminokyselin. [10,13,37,38]

Existují důkazy, že v některých situacích vitamin B6 může fungovat jako antioxidant. V plazmě je pyridoxal a pyridoxal-5'-fosfát transportován ve vazbě na albumin nebo na hemoglobin v erytrocytech. Všechny formy pyridoxinu jsou vylučovány do moči. [10]

4.3. Fyzikálně - chemické vlastnosti vitaminu B6

Pyridoxin je látka vytvářející za pokojové teploty bezbarvé krystalky, které jsou ve vodě rozpustné, méně rozpustné v ethanolu a téměř nerozpustné v chloroformu. Vytvořené krystalky mají bod tání 160 °C. Pyridoxin je poměrně stálý v kyselém prostředí a méně stálý v neutrálním či alkalickém prostředí. Dále je stabilní vůči tepelnému opracování a značně citlivý na světlo. [1,12]

Vitamin B6 zajišťuje využití kyanokobalaminu v organismu a stabilitu hořčičku v krvi a tkáních. V živočišných tkáních je pyridoxin přítomen ve formě pyridoxamin-5-fosfátu a pyridoxol-5'-fosfátu. [21]

Pyridoxin se účastní metabolismu jako kofaktor (koenzym), kde základní formou je pyridoxal-5-fosfát. Ten se podílí na reakcích, jako jsou transaminace, racemizace, dekarboxylace, odbourávání, syntéza aj. Jeho přítomnost je velice důležitá při metabolismu aminokyselin, tuků a nukleových kyselin. Závisí na něm transport aminokyselin do buněk, důležité chemické reakce v nervovém systému a mozku a v neposlední řadě i produkce červených krvinek. [1,2,11]

Antagonisty pyridoxinu jsou látky, které reagují s karbonylovou skupinou pyridoxalu. U přirozených látek lze mluvit o metabolitech tryptofanu, hydrazinu a hydroxylaminu reagujících za vzniku náležitých hydrazonů a oximů. Jeden z antagonistů je například linatin, který se vyskytuje v semenech lnu. [1,14]

4.4. Zdravotní aspekty vitamínu B6

Pyridoxin pozitivně ovlivňuje imunitní systém, svalovou činnost, výkon srdce, krevní oběh, zpracování bílkovin, růst vlasů a působí v organismu jako přirozený močopudný prostředek. Dále se podílí na vestavbě genotypu do buněčného jádra, účastní se procesu vzniku červených krvinek a hemoglobinu. V neposlední řadě napomáhá rovnoměrnému zásobování organismu glukózou, jejíž nedostatek má za následek např. únavu, nespavost a nižší nervovou odolnost.

U žen, které užívají antikoncepční pilulky, klesá koncentrace vitamínu B6 až o 20 %. K poklesu hladiny pyridoxinu dochází několik hodin po požití antikoncepce.

Za spoluúčasti hořčičku a vitamínu B2 je vstřebávání pyridoxinu podstatně lepší. Bez těchto komponent je vitamin B6 téměř bez účinku, a proto by měla být strava pestrá a obohacená o veškeré vitaminy řady B. [21]

4.4.1. Hypovitaminóza vitamínu B6

Hypovitaminóza, jak bylo dříve zmíněno, je stav vzniklý nedostatkem určitého vitamínu. U pyridoxinu při normální pestré stravě je klinický nedostatek velice vzácný. Ovšem v současném světě, který je plný diet a nedostatku času na správné stravování se případy hypovitaminóz vyskytují čím dál častěji. [1,10, 12,15]

Již při nízkém, zdánlivě nepodstatném, nedostatku, je možné v moči nalézt kyselinu xanthurenovou, která sníženou hladinu pyridoxinu objektivně prokáže. [15]

Zejména ženy v přechodu, kterým hrozí vznik osteoporózy či edému v těle (hromadění vody v břiše, horních a dolních končetinách a obličeji), by měly dbát na pravidelný přísun pyridoxinu. Zvýšené nároky na příjem pyridoxinu (PN) by měly brát v úvahu i těhotné a kojící ženy. [21]

Nejčastější projevy nedostatku vitamínu jsou chudokrevnost, křeče, deprese, neschopnost koncentrace, různé nevolnosti, nespavost, bolest hlavy, závratě, bolavé rty, ústa, jazyk a zmatek. Dále se také projevuje různými dermatitidami a nervovými poruchami. U dětí způsobuje degenerativní změny centrální nervové soustavy (CNS). [1,10,12,15,21]

Avitaminóza pyridoxinu způsobuje seborrhoickou dermatitidu ve vlasech a obočí. Tato anomálie se projevuje zánětem kůže, který se v první řadě objeví na lebce, kolem nosu, za ušima nebo v okolí genitálií. [21] Seborrhoická dermatitida je zobrazena na obrázku 3.



Obr. 3: Seborrhoická dermatitida [23]

4.4.2. Hypervitaminóza vitaminu B6

Dlouhodobé vysoké dávky vitaminu B6 (> 200 mg/den) mohou způsobit poruchy periferních nervů projevující se zejména u senzorních orgánů. Dále mohou vyvolat motorické neuropatie vedoucí ke ztrátě citlivosti v nohou a rukou, špatné koordinaci, nočním neklidem aj. Nadbytek může způsobit i nedostatek zinku a hořčíku. Ovšem pouze z potravy není zvýšený příjem možný. [15,21,38]

4.5. Zdroje vitaminu B6 v potravinách

Vitamín B6 je získáván zejména z rostlinných zdrojů a představuje jednu ze základních živin v lidské stravě. Nedávno bylo také zjištěno, že působí jako velmi silný antioxidant. [39]

Pyridoxin je lokalizován v krvi, játrech, červených krevních buňkách v cytoplasmě a extracelulárním prostoru. Dále ho pak lze lokalizovat v celé řadě potravin, včetně masa, vnitřností (zejména v játrech), snídaňových cereálií, zeleniny a ovoce.

Biologická dostupnost vitaminu B6 se obecně uvádí jako 75 % ve smíšené stravě. [10] Vitaminem se nejvíce obohacují dětské mléčné výživy a v mnohých zemích i bílá pšeničná mouka. Příjem pyridoxinu z potravy zajišťuje do určité míry střevní mikroflóra. [9,12,15]

4.5.1.Potraviny rostlinného původu

Rostlinné potraviny obsahují především PN a jeho 5'-fosfát. [10] V ovoci a zelenině zastupuje 5-80 % celkového obsahu vitamínu pyridoxin v podobě 5'-O-(β -D-glukopyranosyl)pyridoxolu. Bohatým zdrojem vitamínu B6 jsou obiloviny, některé druhy zeleniny, celozrnné cereální výrobky, pivovarská melasa, luštěniny a brambory. [12,21]

4.5.2.Potraviny živočišného původu

V potravinách živočišného původu se pyridoxin nejčastěji vyskytuje v mase, masných výrobcích, rybách, banánech a také ve vaječném žloutku. Naopak obsah vitamínu v mléce a sýrech je velice nízký. V potravinách tohoto typu se nejvíce vyskytuje pyridoxal a pyridoxamin, zejména ve formě fosfátů. [12,21]

4.5.3.Obsah vitamínu B6 v potravinách

Pro vitamín B6 jsou bohatým zdrojem potraviny rostlinného a hlavně živočišného původu (maso, masné výrobky nebo vnitřnosti). Nejvíce je však pyridoxin obsažen v potravinářském droždí. [12] V těchto potravinách se objevuje nejčastěji pyridoxal a pyridoxamin, a to zejména ve formě fosfátů. Například v mase je nejvýznamnější složkou pyridoxal-5'-fosfát, který je vázán na různé bílkoviny.

Tabulka 3: Obsah vitamínu B6 v potravinách [2]

Potravina	Obsah vitamínu B6 (μg ve 100 g)
Pšeničná mouka	120-600
Šunka	330-580
Chléb pšeničný	100
Droždí pekařské	620-700
Sýr	98-800
Mléko sušené	220-820
Mléko neporušené	54-110
Játra vepřová	290-590
Játra hovězí	600-710
Pivo	50-60
Treska	340

V potravinách rostlinného původu je nejvíce přítomen pyridoxol a pyridoxal. Nejrozšířenější formou je 5'-O-(beta-D-glukopyranosyl) pyridoxal, který je nejvíce obsažen v ovoci a zelenině. Kvalitním zdrojem vitamínu jsou i obiloviny a celozrnné cereální výrobky. [1,9,41] Obsah vitamínu v různých potravinách znázorňuje tabulka 3.

4.6. Doporučený denní příjem vitamínu B6

Doporučený denní příjem vitamínu B6 ve stravě je úměrný výši spotřeby bílkovin. Denní dávka by se měla pohybovat v rozmezí od 1,4 do 2,0 mg/den pro dospělého člověka. Během těhotenství a kojení se požadavek na vitamín B6 ve stravě zvyšuje přibližně o 0,3-0,4 mg/den. Zvýšenou potřebu mají také lidé s cukrovkou a epilepsií, vegetariáni a vegani, ženy před menstruací a sportovci, kteří užívají proteinové preparáty. [10,37] Doporučené denní dávky vitamínu B6 pro různé věkové kategorie uvádí tabulka 4.

Tabulka 4: Obsah vitamínu B6 v potravinách [2,15]

Věkové skupiny	Doporučená denní dávka vitamínu B6 (mg)
Kojenci	0,4
Děti (4-10 let)	1,2
Muži (19-59 let)	1,9
Ženy (19-59 let)	1,8
Těhotné	2,2
Kojící	2,1
Osoby nad 60 let	1,8

4.7. Ztráty vitamínu B6 při zpracování potravin

Ztráty pyridoxinu se výrazně liší podle komodity, respektive dle převládající formy vitamínu. Vlivným činitelem, který významně ovlivňuje definitivní koncentraci vitamínu v hotovém jídle, je obsah vitamínu v potravinářské surovině. U potravin rostlinného původu, které obsahují stabilnější pyridoxol, jsou ztráty vitamínu malé. Kdežto u potravin živočišného původu obsahujících reaktivnější pyridoxal, jsou ztráty vyšší.

Hlavním důvodem ztrát pyridoxinu bývá manipulace předcházející vlastnímu zpracování suroviny, a to zejména při sklizni, skladování či dopravě. Dále také vyluhování vitamínu do vody či reakce pyridoxalu s bílkovinami. [12]

Jedním z nejúčinnějších postupů pro ochranu potravin před mikrobiologickým rozkladem je tepelné zpracování. Tento proces má vliv i na inaktivaci nežádoucích enzymů, ale působí negativně na retenci vitamínu v potravíně. Vedle tepelného zpracování potravin se jejich trvanlivost může významně prodloužit sušením či zmražením. Zmrazování se používá zejména pro maso, protože jeho vlivem nedochází k eminentním a nežádoucím chemickým procesům. [12,30]

5. Metody stanovení vitamínu B2 a B6

Stanovení vitaminů B-komplexu je velmi složitý proces, protože jejich koncentrace jsou velice nízké v porovnání s ostatními složkami zkoumaného vzorku. Navíc vitaminy jsou látky vysoce citlivé k oxidaci, popř. ke světelnému záření. Z tohoto důvodu je téměř vždy nutné všechny analytické metody provádět s nejvyšší opatrností, za sníženého přístupu přímého denního světla a nejlépe v inertní atmosféře. Izolaci těchto vitaminů nelze provádět univerzálními metodami, neboť každý vitamin má jiné chemické složení. [16]

5.1. Chromatografické metody

Chromatografie je metoda separační, při níž dochází k oddělování jednotlivých složek obsažených ve vzorku. Tato metoda slouží především ke kvalitativní a kvantitativní analýze vzorku. [17]

Chromatografie je proces, při kterém se látky vnášejí mezi dvě nemísitelné fáze, jednu pohyblivou (mobilní, MF) a druhou nepohyblivou (stacionární, SF). Látky se rozdělují mezi dvě fáze na základě fyzikálně-chemických interakcí, jako jsou adsorpce, rozpouštění, iontová výměna apod.

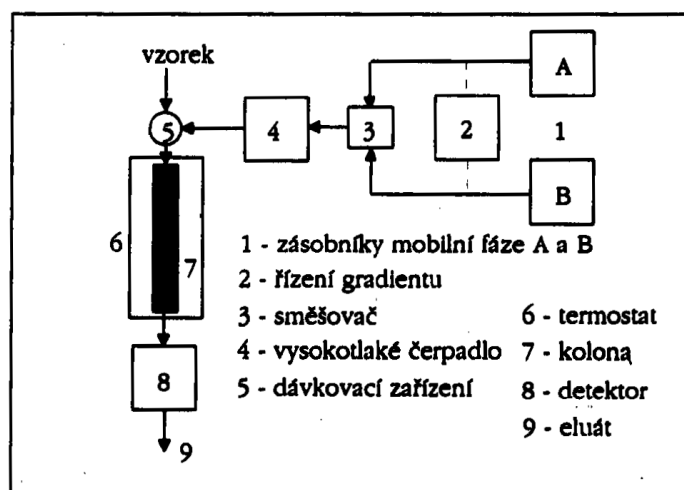
Zpočátku se vzorek umístí na začátek stacionární fáze, která představuje nepohyblivou náplň separačního prostoru. Následně je pak pohybem mobilní fáze, jejíž složky se pohybují podél stacionární fáze, vzorek unášen prostorem, ve kterém dochází k separaci. Složky vzorku jsou SF selektivně brzděny, a proto se při pohybu zdržují. Míra brzdění molekuly určité složky je závislá na velikosti vzájemné interakce složky a nepohyblivé fáze. Větší interakce vyjadřují delší dobu zadržení určité složky a menší interakce znamenají kratší dobu zadržení. Složky, které jsou nepohyblivou fází poutány silněji, se na konec SF dostávají později než složky méně zadržované. Zde tedy dochází k postupnému oddělování složek od sebe. [16,17,18,19]

Kapalinová chromatografie je fyzikálně-chemická metoda, která umožňuje dělení organických kapalných i tuhých látek. Tyto látky jsou rozpustné v organických rozpouštědlech, vodě nebo ve zředěných minerálních kyselinách. Kapalinová chromatografie zahrnuje všechny chromatografické separační způsoby, kdy je MF kapalná. O separaci složek vzorku rozhoduje nejen jejich vzájemné působení se stacionární fází, ale i typ mobilní fáze. Tato metoda využívá princip stanovení v uzavřeném a otevřeném

systému. Stanovení v uzavřeném systému představuje klasickou sloupcovou vysokoúčinnou kolonovou chromatografií (HPLC). Kdežto v otevřeném systému, které se provádí při plošném uspořádání, jde o papírovou a tenkovrstvou chromatografií. Toto rozdělení se rozlišuje dle uspořádání stacionární fáze.

Kapalinový chromatograf se skládá z části zabezpečující transport mobilní fáze, separaci složek, detekci složek a jejich automatický záznam. Při sestavení chromatografu musí být zachováno řazení základních součástí. V některých případech je možné určitou součást vynechat a zapojit novou.

Základní části kapalinového chromatografu, které lze vidět na obrázku 4, jsou čerpadlo, směšovací zařízení, dávkovací zařízení, kolona a detektor. Mobilní fáze je během eluce (vymývání) vedena ze zásobníku do vysokotlakého čerpadla a dále na chromatografickou kolonu, která je nejčastěji vyrobena z nerezové oceli nebo z vysoce pevného skla. Kolona je spojena s detektorem ústícím do sběrače frakcí. [17,18,22,43]



Obr. 4: Schéma kapalinového chromatogramu [22]

5.2. Mikrobiologická metoda

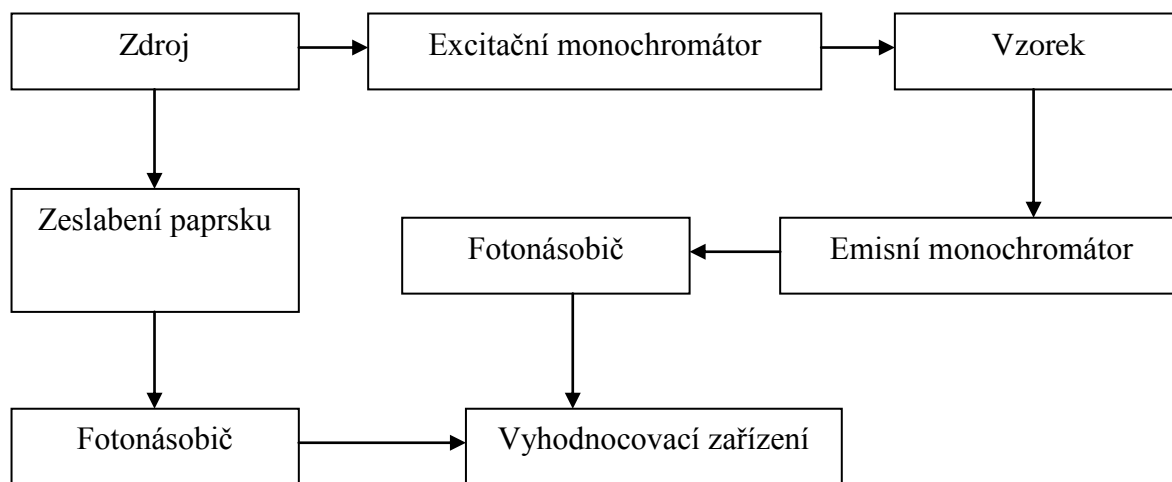
Pro stanovení vitamínu touto metodou se používá řada mikroorganismů, a to zejména bakterií. Metodika je založena na pozorování růstu sledovaného mikroorganismu v přítomnosti daného vitamínu. Nejčastěji používané bakterie jsou *Euglena gracilis*, *Escherichia coli*, *Tetrahymena thermophila* a *Lactobacillus fermentum*. [25]

5.3. Fluorimetrická metoda

Fluorescenční metoda patří mezi metody luminiscenční. Principem fluorimetrie je využívání jevu fotoluminiscence.

U fluorescenční metody pohlcuje molekula foton a tím zahájí excitaci z vibračního stavu na základní elektronové hladině na některou z mnoha vyšších vibračních hladin v elektronovém excitovaném stavu. Jde obvykle o první excitovaný singletový stav, kde se molekula ocitá pouhou nanosekundu. Zmíněná molekula na vysoké vibrační hladině postupně ztrácí nadbytečnou energii, díky čemuž se samovolně vyzáří foton a ona se vrací zpět na základní elektronovou hladinu. Energie vyzařovaného záření je proto vždy nižší než energie záření excitačního záření (vyzařené světlo má větší vlnovou délku). Toto světlo se snímá vždy ve směru kolmém na excitační paprsek

K měření fluorescenčního záření se využívají přístroje zvané fluorescenční spektrofotometry, které mají fluorescenční nástavce upravující záření na vhodnou vlnovou délku. Vlnová délka se u měření fluorescence pohybuje v rozsahu ultrafialové a viditelné oblasti. Po průchodu emisním monochromátorem se intenzita záření měří fotonásobičem. Fluorescenční spektrofotometr je v podobě blokového schématu znázorněn na obrázku 5.



Obr. 5: Blokové schéma fluorescenčního spektrofotometru [17]

Paprsek vycházející ze zdroje se rozděluje rotujícími zrcadlovými segmenty na dva. První paprsek vstupuje do excitačního monochromátoru, který upravuje vlnovou délku na vhodnou frekvenci (viditelné nebo UV). Druhý paprsek, který je před měřením zeslaben, slouží jako srovnávací. Poté co projde první paprsek monochromátorem,

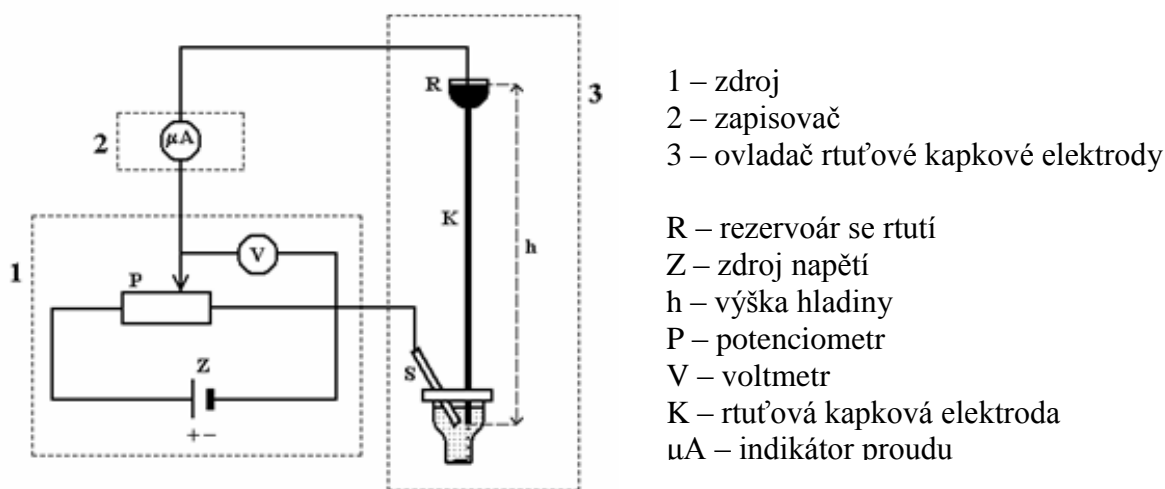
vstupuje do květy se vzorkem a vyvolává zde fluorescenční emisi. Poté dochází ke zpracování paprsku emisním monochromátorem, který izoluje vhodné vlnové délky záření pro nastávající měření ve fotonásobiči, jehož signál je srovnáván a vyhodnocován. [17,18,27]

5.4. Polarografická metoda

Tato metoda se využívá při analýze organických a anorganických látek. Pro měření polarografie se používá polarograf, který je znázorněn na obrázku 6 a umožňuje rovnoměrnou změnu napětí vloženého mezi pracovní polarizovatelnou a srovnávací elektrodu. Tímto mechanismem dochází ke změně potenciálu polarizovatelné elektrody ve směru záporných či kladných hodnot. Principem této metody je sledování elektrického proudu, který se zaznamenává v podobě křivky. Ze zmíněného záznamu křivky lze vyhodnotit polohu a výšku.

Roztok, do kterého zasahuje rtuťová kapková elektroda, je umístěn v polarografické nádobce. Rtuťová kapková elektroda je tlustostěnná kapilára napojená hadičkou na rtuťový zásobník. Kapka z elektrody odkapává za 2-5 s. Nepolarizovatelnou srovnávací nebo pomocnou elektrodou je rtuťové dno. Na toto dno zasahuje platinový drátek, který je napojený na polarograf.

Rozhraní rtuti a roztoku se chová jako kondenzátor, který se vlivem napětí nabíjí. Ovšem v okamžiku kdy dochází k odtržení kapky, se začne tvořit nová kapka chovající se jako nenabitý kondenzátor. [17,18,43]

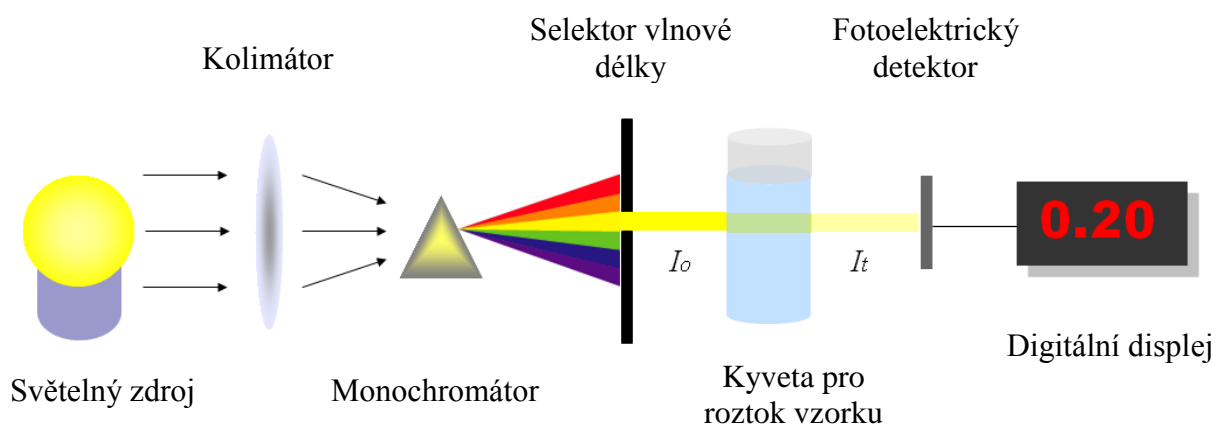


Obr. 6: Schematické znázornění polarografu [26]

5.5. Spektrofotometrická metoda

Spektrofotometrické stanovení lze zařadit mezi metody optické. Využívá se pro stanovení látek, které jsou schopné pohlcovat elektromagnetické záření dané vlnové délky ve viditelné, ultrafialové či infračervené části spektra. Měření v těchto oblastech se využívá jak pro kvantitativní, tak pro kvalitativní účely. Množství pohlceného záření specifické vlnové délky je závislé na množství a struktuře stanovované látky. Propustnost (transmittance) T měřené vrstvy je relativní část prošlého záření a záporný dekadický logaritmus transmittance je roven hodnotě absorbance A . Hodnota absorbance při určité vlnové délce je přímo úměrná koncentraci látky a tloušťce absorbující vrstvy. [17,43,45]

Zařízení, které se používá při spektrofotometrické metodě, se nazývá spektrofotometr. Na obrázku 7 je znázorněno základní schéma spektrofotometru.



Obr. 7: Základní struktura spektrofotometru [44]

6. Stanovení vitamínu B2

V dnešní době se metody používané pro stanovení riboflavinu neustále rozvíjí a zlepšují. Nejvíce používanou metodou pro stanovení riboflavinu je flourometrická metoda, která je založena na měření fluorescence. Vitamin B2 lze však stanovit také chromatograficky a čistší preparáty s vysokou koncentrací riboflavinu i polarograficky (metoda se málo používá a obecně je popsána v kapitole 5.4.). Spolehlivé výsledky poskytují i mikrobiologické testy, ale pro ulehčení práce se častěji používají chemické metody. [16,28,31]

Před samotným stanovením musí být riboflavin izolován. Riboflavin je v potravinách vázán na kyselinu fosforečnou esterovou vazbou ve formě koenzymu FAD a FMN. Koenzymy jsou vázané na svůj specifický bílkovinný nosič a následně vystupují jako žlutý flavoprotein. K odpoutání navázaného riboflavinu na bílkovinu se používá hydrolýza minerálními kyselinami (HCl, H₂SO₄) nebo také enzymatická hydrolýza. [1,6]

6.1. Lumiflavinová (fluorimetrická) metoda

Tato metoda se používá pro všechny potravinářský materiál rostlinného i živočišného původu a pro farmaceutické preparáty. Lumiflavinová metoda je založená na stanovení lumiflavinu. Vzhledem k tomu, že je riboflavin fotolabilní, musí se celé stanovení provádět za minimálního přístupu světla.

Lumiflavinovou metodou se vitamin B2 od vzorku oddělí kyselou či enzymovou hydrolýzou a po alkalizaci se přemění ozářením na lumiflavin, který je po extrakci chloroformem stanovován fluorimetricky. Měření se provádí při excitační vlnové délce 440-460 nm a emisní vlnové délce 520-535 nm. Metoda je velice citlivá a lze jí stanovit 0,05 -1 µg riboflavinu v 1 ml extraktu vzorku. [16,31]

Přímé fluorimetrické stanovení se používá jen v některých případech, protože je méně specifické a je rušené ostatními fluoreskujícími látkami. [31]

6.2. Metoda kapalinové chromatografie

Obsah riboflavinu se zřídka kdy vyhodnocuje samostatně. Nejčastěji se určuje společně s vitamínem B1 (thiaminem). Vázané formy obou vitamínů se uvolňují ze vzorku upraveného kyselou nebo enzymovou hydrolýzou. Následně dochází k odstranění bílkovin

působením kyseliny trichloroctové a riboflavin se stanoví přímou fluorimetrickou metodou. [16]

U kapalinové chromatografie se používá stejný postup jako pro stanovení thiaminu. Vzorek obsahující riboflavin se nejprve extrahuje s využitím enzymové hydrolýzy, na níž byla použita směs enzymů. Homogenizovaný vzorek je následně smíchán s 0,01M HCl a autoklávován při 121°C po dobu 30 minut. Poté dochází k uvolňování vitamínu ze vzorku. [34]

Metoda HPLC se také využívá k rychlému a citlivému stanovení riboflavinu v potravinách. Používá se zejména pro stanovení množství riboflavinu u potravin rostlinného původu. U vzorků se nejprve provede kyselá hydrolýza pomocí HCl a následně enzymatická hydrolýza. Pro stanovení se používá pohyblivá (mobilní) fáze, která obsahuje fosfátový pufr (93 %) a acetonitril (7 %) upravené na pH 7,5 s isokratickou elucí při průtoku 1 ml/min. Separace byla provedena na koloně Phenomenex Hypersil 3 μ C18 o rozměrech 150 x 4,6 mm. Signál je pak snímán detektorem při vlnových délkách 333 nm a 385 nm. [46]

6.3. Mikrobiologická metoda stanovení vitamínu B2

U mikrobiologické metody je v přítomnosti riboflavinu sledován růst a metabolismus testovaného mikroorganismu, kterým je *Lactobacillus rhammosus* nebo *Enterococcus faecalis*. Podstatným ukazatelem je změna obsahu sušiny, která se stanovuje vážkově. Ke zjištění obsahu přítomného vitamínu je také možné sledovat a měřit intenzitu vzniklého zákalu turbidimetricky či měření metabolické aktivity CO₂ manometricky. [16,31,32,42]

7. Stanovení vitamínu B6

Ke stanovení pyridoxinové triády, která zahrnuje pyridoxol, pyridoxal a pyridoxamin, lze použít z chemických a fyzikálně chemických metod spektrofotometrickou metodu. Metoda je založená na reakci těchto látek s 2,6-dichlorchinonchlorimidem za vzniku pyridoxinu, ovšem kvůli její nespecifičnosti ji lze použít jen v kombinaci s vhodnou dělicí technikou. Metoda je vhodná jen pro analýzu jednodušších vzorků, protože jinak je zatížena chybou a poskytuje nepřesné výsledky. Další metodou stanovení pyridoxinu je fluorimetrická metoda založená na měření fluorescence laktonu kyseliny 4-pyridoxinové. Tato metoda zajišťuje spolehlivější výsledky zejména v kombinaci s chromatografickým čištěním extraktu na ionexech. Pro různé druhy analyzovaného materiálu je třeba vždy metody a pracovní postupy přezkoušet a vhodně upravit.

Výborných výsledků bylo dosaženo i metodou mikrobiologickou. U spousty případů se dává této metodě přednost před metodami fyzikálně chemickými. [16]

7.1. Mikrobiologické stanovení vitamínu B6

Mikrobiologickými metodami se dá stanovit pouze volný pyridoxin. Pro stanovení vitamínu B6 se používají kmeny mikrobů lišící se růstovou reakcí na pyridoxin, pyridoxal a pyridoxamin. Kvasinka *Saccharomyces carlsbergensis* reaguje energicky na všech třech volných bázích. Kvasinky jsou tedy jedním z nejpoužívanějších a nejsledovanějších mikroorganismů pro stanovení vitamínu B6. V metodě je nezbytně nutná kyselá hydrolyza vzorku, protože *S. carlsbergensis* využívá pouze nevázané formy vitamínu. [16,35,42]

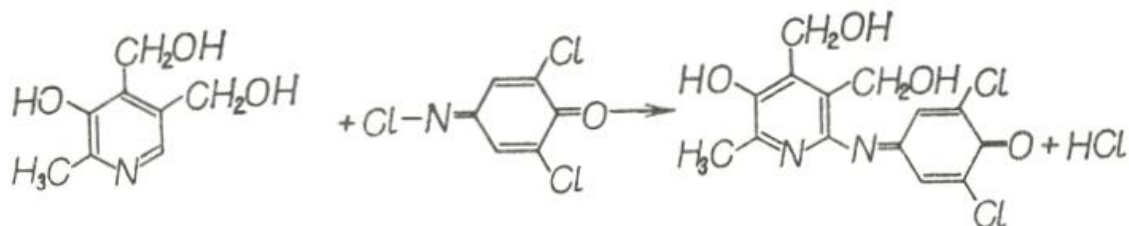
7.2. Fluorimetrická metoda stanovení vitamínu B6

Fluorimetrická metoda se používá pro stanovení pyridoxalu v sušeném mléce a je založena na fluorimetrickém stanovení pyridoxalu po jeho převedení na lakton kyseliny 4-pyridoxinové vznikajícího reakcí s kyanidem draselným v alkalickém prostředí. Pro měření se používá excitační vlnová délka v rozsahu od 290 do 340 nm a emisní vlnová délka od 370 do 560 nm. Pro hodnocení jiných potravin je třeba metodu přezkoušet a případně upravit dle potřeby. [16,36]

7.3. Spektrofotometrické stanovení vitamínu B6

Spektrofotometrická metoda je většinou z velké míry rušena fenoly. Dále pak kreatinem, kreatininem, hydroxylaminem, thiaminem a jinými látkami.

Spektrofotometrická metoda není specifická a je založena na reakci pyridoxinu s 2,6-dichlorchinonchlorimidem za vzniku modře zbarveného reakčního produktu dle obrázku 7.



Obr. 7: Reakce spektrofotometrického stanovení pyridoxinu [16]

Pyridoxin vytváří komplex s kyselinou boritou, která na sebe váže dvě molekuly pyridoxinu. Sloučenina pyridoxinu, která vznikne touto reakcí, nereaguje s 2,6-dichlorchinonchlorimidem, tudíž se z rozdílu stanovení při 620 nm v prostředí boratového pufru a jiného pufru totožného pH může stanovit koncentrace pyridoxinu vedle jiných fenolů, které jinak ruší stanovení.

Metodu lze aplikovat jen pro analýzu jednodušších vzorků, protože jinak je zatížena velkou chybou stanovení. [16,31]

8. Závěr

Cílem bakalářské práce bylo podat ucelený přehled o vitamínech B2 (riboflavinu) a B6 (pyridoxinu). V bakalářské práci jsou shrnuty charakteristiky vitaminů a jejich stanovení.

Vitamin B2, též nazývaný jako riboflavin, je esenciální látka, která se řadí mezi vitaminy rozpustné ve vodě. Hraje životně důležitou roli při tvorbě hormonu štítné žlázy a napomáhá ke vzniku imunitních buněk. Dále se podílí ve velké míře i na léčbě kožních onemocnění. Vzhledem k tomu, že v organismu nedochází ke kumulaci riboflavinu do zásob, je nutné ho neustále doplňovat. Hladinu riboflavinu lze dostatečně zvýšit specifickými potravinami (maso, mléčné výrobky, droždí aj.) nebo pomocí různých vitaminových preparátů. Při nedostatečném příjmu riboflavinu hrozí vznik hypovitaminózy, která se projevuje formou depresivních nálad, třesu končetin či záněty v oblasti ústních koutků. Naopak hypervitaminóza se zatím neprokázala, jelikož veškeré přebytky riboflavinu jsou močí vylučovány.

Vitamin B6, tzv. pyridoxin (adermin), je stejně jako riboflavin vitamin rozpustný ve vodě a lze jej zařadit do vitaminů B-komplexu. Jeho důležitost spočívá v podpoře imunitního systému, svalové činnosti a v neposlední řadě i k rovnoměrnému zásobování organismu glukózou. Nadbytek a nedostatek tohoto vitaminu nebývá častý, avšak při současném stravování se objevuje čím dál více. Nedostatečný příjem pyridoxinu se projevuje například chudokrevností, dermatitidami či nervovými poruchami. Kdežto hypervitaminóza je charakteristická vznikem špatné koordinace pohybu, nočním neklidem aj. Mezi hlavní zdroje vitaminu B6 patří obiloviny, ryby, pivovarská melasa a maso.

Stanovení vitaminu B2 a B6 v potravinách je velice obtížný proces, protože množství vitaminu ve vzorku je velice nízké v porovnání s ostatními složkami. Nejčastěji se ke zjištění obsahu vitaminu používají metody chromatografické, fluorimetrické, mikrobiologické a spektrofotometrické.

9. Seznam použité literatury

- [1] Velíšek J.: *Chemie potravin 2*, OSSIS, druhé vydání, Tábor 2002
- [2] Hlúbik P., Opltová L.: *Vitaminy*, první vydání, Grada publishing, Praha 2004
- [3] Davídek J., Janíček G., Pokorný J.: *Chemie potravin*, první vydání, SNTL, Praha 1983
- [4] Syxtus H.: *Speciální farmakologie*, díl VI, Karolinum, Praha 2002
- [5] Turek B.: *Aktuálně o vitamínech*, Vitamíny 2001, první vydání, Univerzita Pardubice, Pardubice 2001
- [6] Caballero B.: *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, druhé vydání, volume 8, Academic Press, Oxford 2003
- [7] Kleinwächterová H., Brázdová Z.: *Výživový stav člověka a způsoby jeho zjišťování*, druhé přepracované vydání, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, Brno 2001
- [8] Rofles S.R., Pinna K., Whitney E.: *Understanding normal and clinical nutrition*, 8th ed. Belmont, CA: Wadsworth/Cengage Learning, 2009
- [9]Sizer F.S., Whitney E.: *Nutrition: concepts and controversies*, 11th ed. Belmont, CA: Thomson/ Wadsworth, 2008
- [10] Bowling F.G.: *Pyridoxine supply in human development*, Seminars in Cell, s. 611- 618 (2011)
- [11] Caballero B.: *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, volume 9, Academic Press, Oxford 2003
- [12] Velíšek J., Hajšlová J.: *Chemie potravin*, třetí rozšířené a přepracované vydání, OSSIS, Tábor 2009
- [13] Šterzl J.: *Imunitní systém a jeho fyziologické funkce*, Česká imunologická společnost, Praha 1993
- [14] Davídek J., Hajšlová J.: *Chemie potravin: určeno pro posl. fak. potravinářské a biochemické technologie*, druhé vydání, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha 1991
- [15] Pánek J., Pokorný J., Dostálová J., Kohout P.: *Základy výživy*, první vydání, Svoboda Servis, Praha 2002
- [16] Davídek J.: *Laboratorní příručka analýzy potravin*, druhé vydání, SNTL, Praha 1981
- [17] Holtbecher Z., Churáček J.: *Analytická chemie*, SNTL, Praha 1987

- [18] Opekar F.: *Základní analytická chemie : pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*, první vydání, Karolinum, Praha 2003
- [19] www.kch.zcu.cz/cz/di/sks/02-KAPALINOVA_CHROMATOGRRAFIE.pdf, staženo 5. 5.2012
- [20] Karlson P.: *Základy biochemie*, třetí přepracované vydání, Academia, Praha 1981
- [21] Jordán V., Hemzalová M.: *Antioxidanty: zázračné zbraně : vitaminy, minerály, stopové prvky, aminokyseliny a jejich využití pro zdravý život*, první vydání, Jota, Brno 2001
- [22] www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/ana/chm.html, staženo 6.6.2012
- [23] Janniger CK, Schwartz RA.: *Seborrheic dermatitis*, Am Fam Physician, s. 149–55 (1995)
- [24] <http://www.nutrition.tum.de/index.php?id=115>, staženo 5. 5. 2012
- [25] Wilhelm F.: *Vitamins*, Walter de Gruyter, Berlín 1988
- [26] www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/fchlab/polarograf.htm, staženo 5. 5. 2012
- [27] Gore M.G.: *Spectrophotometry and spectrofluorimetry: a practical approach*, první vydání, Oxford University Press, Oxford 2000
- [28] Šícho V., Vodrážka Z., Králová B.: *Potravinářská biochemie*, SNTL, Praha 1981
- [29] www.epravo.cz/top/zakony/sbirka-zakonu/vyhlaska-ze-dne-15-dubna-2005kterou-se-meni-vyhlaska-c-3042004-sb-kterou-se-stanovi-druhy-a-podminky-pouziti-pridatnych-a-pomocnych-latek-pri-vyrobe-potravin-14594.htm, staženo dne 18.5.2012
- [30] Kyzlink, V.: *Základy konzervace potravin*, druhé vydání, SNTL, Praha 1980
- [31] Davídek J., Velíšek, J.: *Analýza potravin*, VN MON, Praha 1988
- [32] Ball. G.F.M.: *Vitamins: their role in the human body*, John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey 2004
- [33] Vodrážka Z., Rausch P., Káš J.: *Enzymologie*, VŠCHT, Praha 1998
- [34] Barna É., Dworschák E.: *Determination of thiamine (vitamin B₁) and riboflavin (vitamin B₂) in meat and liver by high-performance liquid chromatography*, Journal of Chromatography A., s. 359-363 (1994)
- [35] Ball. G.F.M.: *Bioavailability and analysis of vitamins in foods*. 1st ed., Chapman, London 1998
- [36] Ball. G.F.M.: *Human vitamin B₆ requirements*, 1st ed., National Academy of Sciences, Washington 1978

- [37] Jesse S., Ludolph A.C.: *Die Vitamine B1, B6 und B12*, Der Nervenarzt., s. 521-534 (2012)
- [38] Di Salvo M.L., Contedtable R., Safo M.K.: *Vitamin B6 salvage enzymes: Mechanism, structure and regulation*, Biochemica at Biophysica Acta – Proteomics, s. 1597-1608 (2011)
- [39] Fitzpatrick T.B.: *Vitamin B6 in Plants: More Than Meets the Eye*, University of Geneva, s. 1-38 (2011)
- [40] Vodrážka Z.: *Biochemie*, druhé opravené vydání, Academia, Praha 1996
- [41] Leklem J.E.: *Vitamin B6*. In: *Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, ed. Modern Nutrition in Health and Disease*, 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, s. 413-421 (1999)
- [42] Berg H., Schaik F.: *Third EU MAT intercomparison on methods for the determination of vitamins B-1, B-2 and B-6 in food*, Food chemistry, s. 101-108 (1996)
- [43] Čůta F., Popl M.: *Instrumentální analýza*, SNTL, Praha 1986
- [44] http://chemwiki.ucdavis.edu/Physical_Chemistry/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetics/Spectrophotometry, staženo 6.6.2012
- [45] www.kch.zcu.cz/cz/di/sks/04VIS_ABSORPCNI_SPEKTROFOTOMETRIE.pdf, staženo 6.6.2012
- [46] Kall M. A.: *Determination of total vitamin B6 in food by isocratic HPLC: a comparison with microbiological analysis*, Food Chemistry, s. 315-327 (2003)