

UNIVERZITA PARDUBICE

Fakulta chemicko-technologická

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

IZOTACHOFRETICKÉ STANOVENÍ VITAMÍNŮ SKUPINY B  
KATIONTOVÉHO CHARAKTERU

Bc. Michaela Frühbauerová

Diplomová práce

2018

UNIVERSITY OF PARDUBICE

Faculty of Chemical Technology

DEPARTMENT OF ANALYTICAL CHEMISTRY

ISOTACHOPHORETIC DETERMINATION OF CATIONIC B VITAMINS

Bc. Michaela Frühbauerová

Diploma thesis

2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Michaela Frühbauerová**  
Osobní číslo: **C16540**  
Studijní program: **N1407 Chemie**  
Studijní obor: **Analytická chemie**  
Název tématu: **Izotachoforetické stanovení vitaminů skupiny B kationtového charakteru**  
Zadávací 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. Seznamte se s problematikou vitaminů skupiny B kationtového charakteru (B1, B2, B6), popište jejich chemické vlastnosti, výrobu, role v organismu, výskyt v potravinách a nápojích.
2. Provedte literární rešerši na téma stanovení vybraných vitaminů v potravinách a potravinových doplňcích, zaměřte se především na elektromigrační separační techniky.
3. V praktické části se zaměřte na stanovení vitaminů sk. B kationtového charakteru v potravinových doplňcích pomocí izotachoforézy.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího práce.**

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Martin Bartoš, CSc.**

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce:

**Ing. Michaela Kovářová**

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce:

**20. února 2018**

Termín odevzdání diplomové práce:

**11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

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 pak 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 7.5.2018

.....  
Bc. Michaela Frühbauerová

### Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu Ing. Martinu Bartošovi, CSc. za cenné rady a připomínky při vypracování této diplomové práce. Dále bych ráda srdečně poděkovala Ing. Michaele Kovářové za její ochotu, vstřícnost, čas a informace, které mi během vypracování práce poskytla.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodičům, bratrům a příteli za jejich porozumění, psychickou a finanční podporu, kterou mi poskytovali během mých studií.

## SOUHRN

Tato diplomová práce se zabývá izotachoforetickým stanovením vitamínů skupiny B s kationtovým charakterem. Mezi tyto vitamíny patří vitamín B<sub>1</sub> (thiamin), B<sub>2</sub> (riboflavin) a B<sub>6</sub> (pyridoxin).

Teoretická část práce je zaměřena na rozdělení vitamínů dle jejich rozpustnosti, informace ohledně struktury, popis fyzikálních a chemických vlastností jednotlivých vitamínů, jejich působení v lidském organismu a výskyt v potravě, doporučené denní dávky, vliv nadbytku či nedostatku v lidském organismu a základní metody stanovení, se zvláštním důrazem na použití elektromigračních technik.

Experimentální část pak popisuje izotachoforetické stanovení jednotlivých vitamínů s kationtovým charakterem v reálných vzorcích (doplňky stravy) pomocí metod kalibrační křivky a standardního přídatku. Je zde zahrnuto i měření analytických parametrů (reprodukovatelnost, výtěžnost, mez detekce a stanovitelnosti, kalibrační křivky) vyvinuté metody. Další část tvoří měření koncentrací těchto vitamínů po působení různých vlivů (změny teploty, pH, doby stání).

**Klíčová slova:** vitamín B<sub>1</sub>  
thiamin  
vitamín B<sub>2</sub>  
riboflavin  
vitamín B<sub>6</sub>  
pyridoxin  
B-komplex  
kationty  
izotachoforéza  
stanovení

## SUMMARY

The aim of this diploma thesis is isotachophoretic determination of B group vitamins, which have cationic character. Into mentioned group of vitamins thiamine (B<sub>1</sub>), riboflavin (B<sub>2</sub>) and pyridoxine (B<sub>6</sub>) can be included.

Theoretical part is focused on basic classification, information about structure, physicochemical properties of individual vitamins, their influence on human health and presence in foodstuffs, recommended doses, influence of excess or deficit in organism, and methods of determination with emphasis on electromigration separation techniques.

Isotachophoretic determination of vitamins with cationic character is described in experimental part. Analytical parameters (reproducibility, recovery, detection and determination limit, calibration curves) of developed method were measured. Method was tested on real samples, specifically on food supplements. Influences of temperature, pH and time to concentration levels of vitamins were also assessed.

**Key words:** Vitamin B<sub>1</sub>  
Thiamine  
Vitamin B<sub>2</sub>  
Riboflavin  
Vitamin B<sub>6</sub>  
Pyridoxine  
B-complex  
Cations  
Isotachophoresis  
Determination



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATP – adenosintrifosfát

CE-LED – kapilární elektroforéza s (LED)-indukovanou fluorescenční detekcí

CTAC – cetyltrimethylamonium chlorid

CZE – kapilární zónová elektroforéza

DNA – deoxyribonukleová kyselina

FAD – flavinadenindinukleotid

FMN – flavinmononukleotid

GIT – gastrointestinální trakt

HILIC – chromatografie hydrofilních interakcí

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

ITP – izotachoforéza

L – vedoucí elektrolyt

LED – „light emitting diode“, dioda emitující světlo

LIF – laserem indukovaná fluorescence

MEKC – micelární elektrokinetická chromatografie

MS – hmotnostní spektrometrie

PL – pyridoxal

PLP – pyridoxal-5'-fosfát

PM – pyridoxamin

PMP – pyridoxamin-5'-fosfát

PN – pyridoxin

PNP – pyridoxin-5'-fosfát

RF – riboflavin

RNA – ribonukleová kyselina

RSH – relativní výška signálu

SDS – dodecylsírán sodný

T – koncový elektrolyt

TMP – thiaminmonofosfát

TDP – thiamindifosfát

TTP – thiamintrifosfát

UV – ultrafialové

## SEZNAM ILUSTRACÍ, TABULEK A GRAFŮ

### *SEZNAM ILUSTRACÍ:*

<b>Obrázek 1:</b> Vitamín B <sub>1</sub> , thiamin (volná báze) .....	22
<b>Obrázek 2:</b> Thiamindifosfát (TDP) .....	22
<b>Obrázek 3:</b> Thiochrom .....	28
<b>Obrázek 4:</b> Vitamín B <sub>2</sub> , riboflavin .....	31
<b>Obrázek 5:</b> FAD a FMN .....	32
<b>Obrázek 6:</b> Lumichrom a lumiflavin .....	35
<b>Obrázek 7:</b> Pyridoxol = pyridoxin, pyridoxal a pyridoxamin .....	38
<b>Obrázek 8:</b> Pyridoxal-5'-fosfát .....	39
<b>Obrázek 9:</b> Pyridoxin ve formě kationtu, aniontu a amfiontu .....	43
<b>Obrázek 10:</b> Pyridoxamin ve formě amfiontu s volným kladným nábojem .....	43
<b>Obrázek 11:</b> Pyridoxal ve formě hemiacetalového amfiontu .....	43
<b>Obrázek 12:</b> Schéma izotachoforetické separace látek .....	63
<b>Obrázek 13:</b> VZOREK č. 1: B-komplex GENERICA .....	65
<b>Obrázek 14:</b> VZOREK č. 2: Thiamin .....	65
<b>Obrázek 15:</b> VZOREK č. 3: Pyridoxin .....	65
<b>Obrázek 16:</b> VZOREK č. 4: Imunofit ŠKODA .....	66
<b>Obrázek 17:</b> VZOREK č. 5: B-komplex FORTE .....	66
<b>Obrázek 18:</b> VZOREK č. 6: B-komplex ZENTIVA .....	67

### *Dále v Příloze:*

<b>Obrázek 19:</b> Izotachoforetický záznam analýzy směsi stanovovaných vitamínů .....	120
<b>Obrázek 20:</b> Izotachoforetický záznam analýzy vzorku č. 1: B-komplex GENERICA .....	125
<b>Obrázek 21:</b> Izotachoforetický záznam analýzy vzorku č. 2: Thiamin .....	126
<b>Obrázek 22:</b> Izotachoforetický záznam analýzy vzorku č. 3: Pyridoxin .....	127
<b>Obrázek 23:</b> Izotachoforetický záznam analýzy vzorku č. 4: Imunofit ŠKODA .....	128
<b>Obrázek 24:</b> Izotachoforetický záznam analýzy vzorku č. 5: B-komplex FORTE .....	129
<b>Obrázek 25:</b> Izotachoforetický záznam analýzy vzorku č. 6: B-komplex ZENTIVA .....	130

## **SEZNAM REAKČNÍCH SCHÉMAT:**

<b>Schéma 1:</b> Syntéza thiaminu dle Williamse a Clina .....	29
<b>Schéma 2:</b> Syntéza thiaminu dle Todda a Bergela.....	30
<b>Schéma 3:</b> Syntéza riboflavinu dle Kuhna a Karrera.....	36
<b>Schéma 4:</b> Syntéza riboflavinu Tishlerovou reakcí .....	37
<b>Schéma 5:</b> Konverze PN, PNP, PM, PMP a PL na pyridoxal-5'-fosfát .....	39
<b>Schéma 6:</b> Syntéza pyridoxinu rozkladem isochinolinů.....	44
<b>Schéma 7:</b> Syntéza pyridoxinu z acetoctanu ethylnatého a kyanoacetamidu .....	45
<b>Schéma 8:</b> Syntéza pyridoxinu pomocí Diels-Alderovy reakce .....	45
<b>Schéma 9:</b> Zjednodušené schéma přeměny pyridoxinu na pyridoxal a pyridoxamin .....	46
<b>Schéma 10:</b> Tvorba pyridoxalu a pyridoxaminu z pyridoxinu .....	46

## **SEZNAM TABULEK:**

<b>Tabulka 1:</b> Obsah thiaminu ve vybraných potravinách.....	24
<b>Tabulka 2:</b> Obsah riboflavinu ve vybraných potravinách .....	33
<b>Tabulka 3:</b> Obsah vitamínu B <sub>6</sub> ve vybraných potravinách.....	40
<b>Tabulka 4:</b> Volba elektrolytového systému podle chemické struktury vitamínu.....	60
<b>Tabulka 5:</b> Použité chemikálie .....	64
<b>Tabulka 6:</b> Přehled vzorků .....	64
<b>Tabulka 7:</b> Koncentrace kalibračních roztoků thiaminu .....	70
<b>Tabulka 8:</b> Koncentrace kalibračních roztoků pyridoxinu .....	71
<b>Tabulka 9:</b> Koncentrace kalibračních roztoků pyridoxalu .....	71
<b>Tabulka 10:</b> Koncentrace kalibračních roztoků pyridoxaminu .....	72
<b>Tabulka 11:</b> Délky zón standardů thiaminu .....	77
<b>Tabulka 12:</b> Délky zón standardů pyridoxinu .....	78
<b>Tabulka 13:</b> Délky zón standardů pyridoxalu .....	79
<b>Tabulka 14:</b> Délky zón standardů pyridoxaminu .....	80
<b>Tabulka 15:</b> Meze detekce a meze stanovitelnosti .....	81
<b>Tabulka 16:</b> Reprodukovatelnost metody .....	82
<b>Tabulka 17:</b> Výtěžnost metody (thiamin).....	83
<b>Tabulka 18:</b> Výtěžnost metody (pyridoxin) .....	84
<b>Tabulka 19:</b> Výtěžnost metody (pyridoxal) .....	85
<b>Tabulka 20:</b> Výtěžnost metody (pyridoxamin) .....	86

<b>Tabulka 21:</b> Zjištěné množství vitamínů ve vzorku č. 1: B-komplex GENERICA .....	87
<b>Tabulka 22:</b> Zjištěné množství vitamínu ve vzorku č. 2: Thiamin.....	87
<b>Tabulka 23:</b> Zjištěné množství vitamínu ve vzorku č. 3: Pyridoxin .....	88
<b>Tabulka 24:</b> Zjištěné množství vitamínů ve vzorku č. 4: Imunofit ŠKODA .....	88
<b>Tabulka 25:</b> Zjištěné množství vitamínů ve vzorku č. 5: B-komplex FORTE .....	89
<b>Tabulka 26:</b> Zjištěné množství vitamínů ve vzorku č. 6: B-komplex ZENTIVA.....	89

Dále v Příloze:

<b>Tabulka 27:</b> Naměřená data pro zjištění výtěžnosti metody .....	121
<b>Tabulka 28:</b> Naměřené hodnoty jednotlivých vzorků .....	123
<b>Tabulka 29:</b> Naměřené hodnoty pro thiamin po určité době stání při 25 °C .....	131
<b>Tabulka 30:</b> Naměřené hodnoty pro thiamin po určité době zahřívání na 50 °C.....	131
<b>Tabulka 31:</b> Naměřené hodnoty pro thiamin po určité době zahřívání na 100 °C.....	132
<b>Tabulka 32:</b> Naměřené hodnoty pro pyridoxinu po určité době stání při 25 °C .....	132
<b>Tabulka 33:</b> Naměřené hodnoty pro pyridoxin po určité době zahřívání na 50 °C .....	133
<b>Tabulka 34:</b> Naměřené hodnoty pro pyridoxin po určité době zahřívání na 100 °C .....	133
<b>Tabulka 35:</b> Naměřené hodnoty pro pyridoxal po určité době stání při 25 °C .....	134
<b>Tabulka 36:</b> Naměřené hodnoty pro pyridoxal po určité době zahřívání na 50 °C.....	134
<b>Tabulka 37:</b> Naměřené hodnoty pro pyridoxal po určité době zahřívání na 100 °C.....	135
<b>Tabulka 38:</b> Naměřené hodnoty pro pyridoxamin po určité době stání při 25 °C .....	135
<b>Tabulka 39:</b> Naměřené hodnoty pro pyridoxamin po určité době zahřívání na 50 °C.....	136
<b>Tabulka 40:</b> Naměřené hodnoty pro pyridoxamin po určité době zahřívání na 100 °C.....	136
<b>Tabulka 41:</b> Výtěžnost měření vitamínů během jejich skladování v mrazničce.....	137
<b>Tabulka 42:</b> Výtěžnost měření vitamínů během jejich stání při laboratorní teplotě .....	137
<b>Tabulka 43:</b> Délka zóny thiaminu při změnách pH.....	138
<b>Tabulka 44:</b> Délka zóny pyridoxinu při změnách pH .....	138
<b>Tabulka 45:</b> Délka zóny pyridoxalu při změnách pH .....	138
<b>Tabulka 46:</b> Délka zóny pyridoxaminu při změnách pH .....	139

**SEZNAM GRAFŮ:**

<b>Graf 1:</b> Vliv pH vedoucího elektrolytu na separaci látek .....	76
<b>Graf 2:</b> Závislost délky zóny na koncentraci thiaminu .....	77
<b>Graf 3:</b> Závislost délky zóny na koncentraci pyridoxinu.....	78

<b>Graf 4:</b> Závislost délky zóny na koncentraci pyridoxalu.....	79
<b>Graf 5:</b> Závislost délky zóny na koncentraci pyridoxaminu.....	80
<b>Graf 6:</b> Závislost délky zóny na koncentraci standardního přídatku thiaminu .....	83
<b>Graf 7:</b> Závislost délky zóny na koncentraci standardního přídatku pyridoxinu.....	84
<b>Graf 8:</b> Závislost délky zóny na koncentraci standardního přídatku pyridoxalu .....	85
<b>Graf 9:</b> Závislost délky zóny na koncentraci standardního přídatku pyridoxaminu.....	86
<b>Graf 10:</b> Výtěžnost měření thiaminu v závislosti na čase (při 25 °C) .....	90
<b>Graf 11:</b> Výtěžnost měření thiaminu v závislosti na čase (při 50 °C) .....	91
<b>Graf 12:</b> Výtěžnost měření thiaminu v závislosti na čase (při 100 °C) .....	91
<b>Graf 13:</b> Výtěžnost thiaminu během skladování v mrazničce .....	92
<b>Graf 14:</b> Výtěžnost thiaminu během stání při laboratorních podmínkách.....	92
<b>Graf 15:</b> Závislost výtěžnosti thiaminu na pH roztoku.....	93
<b>Graf 16:</b> Výtěžnost měření pyridoxinu v závislosti na čase (při 25 °C).....	94
<b>Graf 17:</b> Výtěžnost měření pyridoxinu v závislosti na čase (při 50 °C).....	94
<b>Graf 18:</b> Výtěžnost měření pyridoxinu v závislosti na čase (při 100 °C).....	95
<b>Graf 19:</b> Výtěžnost pyridoxinu během skladování v mrazničce.....	95
<b>Graf 20:</b> Výtěžnost pyridoxinu během stání při laboratorních podmínkách .....	96
<b>Graf 21:</b> Závislost výtěžnosti pyridoxinu na pH roztoku .....	96
<b>Graf 22:</b> Výtěžnost měření pyridoxalu v závislosti na čase (při 25 °C) .....	97
<b>Graf 23:</b> Výtěžnost měření pyridoxalu v závislosti na čase (při 50 °C) .....	98
<b>Graf 24:</b> Výtěžnost měření pyridoxalu v závislosti na čase (při 100 °C) .....	98
<b>Graf 25:</b> Výtěžnost pyridoxalu během skladování v mrazničce .....	99
<b>Graf 26:</b> Výtěžnost pyridoxalu během stání při laboratorních podmínkách.....	99
<b>Graf 27:</b> Závislost výtěžnosti pyridoxalu na pH roztoku.....	100
<b>Graf 28:</b> Výtěžnost měření pyridoxaminu v závislosti na čase (při 25 °C).....	101
<b>Graf 29:</b> Výtěžnost měření pyridoxaminu v závislosti na čase (při 50 °C).....	101
<b>Graf 30:</b> Výtěžnost měření pyridoxaminu v závislosti na čase (při 100 °C).....	102
<b>Graf 31:</b> Výtěžnost pyridoxaminu během skladování v mrazničce.....	102
<b>Graf 32:</b> Výtěžnost pyridoxaminu během stání při laboratorních podmínkách .....	103
<b>Graf 33:</b> Závislost výtěžnosti pyridoxaminu na pH roztoku .....	103

# OBSAH

ÚVOD.....	17
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>18</b>
1.1 VITAMÍNY.....	19
1.1.2 Vitamíny rozpustné v tucích.....	19
1.1.3 Vitamíny rozpustné ve vodě.....	20
1.1.4 Nedostatek a přebytek vitamínů.....	21
1.2 VITAMÍN B <sub>1</sub> .....	21
1.2.1 Metabolické funkce thiaminu.....	23
1.2.2 Vitamín B <sub>1</sub> v potravinách.....	23
1.2.3 Ztráty thiaminu při zpracování a skladování potravin.....	24
1.2.4 Nedostatek vitamínu B <sub>1</sub> .....	25
1.2.5 Referenční příjem thiaminu.....	27
1.2.6 Vlastnosti thiaminu.....	28
1.2.7 Výroba thiaminu.....	29
1.3 VITAMÍN B <sub>2</sub> .....	31
1.3.1 Metabolické funkce riboflavinu.....	31
1.3.2 Vitamín B <sub>2</sub> v potravinách.....	33
1.3.3 Ztráty vitamínu B <sub>2</sub> při zpracování a skladování potravin.....	34
1.3.4 Nedostatek vitamínu B <sub>2</sub> .....	34
1.3.5 Referenční příjem riboflavinu.....	34
1.3.6 Vlastnosti riboflavinu.....	35
1.3.7 Výroba riboflavinu.....	36
1.4 VITAMÍN B <sub>6</sub> .....	38
1.4.1 Metabolické funkce pyridoxinu.....	38
1.4.2 Vitamín B <sub>6</sub> v potravinách.....	40

1.4.3	Ztráty při zpracování a skladování potravin.....	41
1.4.4	Nedostatek vitamínu B <sub>6</sub> .....	41
1.4.5	Referenční příjem pyridoxinu.....	42
1.4.6	Vlastnosti pyridoxinu .....	42
1.4.7	Výroba vitamínu B <sub>6</sub> .....	44
1.5	STANOVENÍ VITAMÍNŮ.....	47
1.5.1	Stanovení vitamínu B <sub>1</sub> .....	48
1.5.2	Stanovení vitamínu B <sub>2</sub> .....	50
1.5.3	Stanovení vitamínu B <sub>6</sub> .....	53
1.5.4	Vybraná společná stanovení některých vitamínů .....	55
<b>2</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>62</b>
2.1	POUŽITÁ METODA.....	63
2.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	63
2.3	ANALYZOVANÉ VZORKY.....	64
2.4	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ .....	67
2.4.1	Standardní roztoky jednotlivých vitamínů .....	67
2.4.2	Příprava roztoků ke kalibraci.....	70
2.4.3	Příprava roztoků vzorků .....	72
2.5	PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	74
2.6	ELEKTROLYTOVÝ SYSTÉM .....	75
2.7	VYHODNOCENÍ EXPERIMENTÁLNÍCH DAT.....	75
<b>3</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>76</b>
3.1	VLIV pH VEDOUCÍHO ELEKTROLYTU NA SEPARACI LÁTEK .....	76
3.2	PARAMETRY STANOVENÍ .....	77
3.2.1	Kalibrační závislosti jednotlivých vitamínů .....	77
3.2.2	Mez detekce a mez stanovitelnosti .....	81
3.2.3	Reprodukovatelnost metody .....	81

3.2.4 Výtěžnost.....	82
3.3 STANOVENÍ VITAMÍNŮ V REÁLNÝCH VZORCÍCH.....	86
3.4 TESTY STABILITY.....	90
<b>4 ZÁVĚR .....</b>	<b>105</b>
<b>5 ZDROJE .....</b>	<b>107</b>
<b>6 PŘÍLOHY .....</b>	<b>119</b>



## ÚVOD

Vitamíny jsou organické nízkomolekulární sloučeniny syntetizované autotrofními organismy. Jejich chemická struktura je různá, nutričně však vitamíny tvoří skupinu látek, které jsou v malých množstvích vyžadovány v potravě (mikrogramy nebo miligramy denně) pro udržení normálního fungování těla a udržování metabolické integrity. Nejsou zdrojem energie, ani stavební složkou, a někdy jsou označovány za exogenní esenciální biokatalyzátory. Metabolicky mají různé funkce, např. koenzymy, hormony, antioxidanty, regulátory růstu a diferenciací buněk a tkání.

Nejvýznamnějším dělením vitamínů je bezpochyby dělení dle jejich rozpustnosti na vitamíny rozpustné v tucích a vitamíny rozpustné ve vodě. Mezi vitamíny rozpustné v tucích, nebo též liposolubní vitamíny, patří vitamíny A, D, E a K. Do skupiny hydrosolubních vitamínů se řadí vitamíny skupiny B-komplexu (B<sub>1</sub> – thiamin, B<sub>2</sub> – riboflavin, B<sub>3</sub> – niacin, B<sub>5</sub> – kyselina pantothenová, B<sub>6</sub> – pyridoxin, B<sub>7</sub> – biotin, B<sub>9</sub> – kyselina listová a B<sub>12</sub> – kobalamin) a kyselina L-askorbová, známá též jako vitamín C.

Vitamíny jsou esenciální složkou potravy a přirozeně se vyskytují v potravinách rostlinného a živočišného původu. Je-li určitá látka pro organismus nepostradatelná, stává se vitamínem. Vzhledem k faktu, že oproti ostatním výživově důležitým látkám potřebuje organismus vitamíny přijímat ve velmi malém množství, řadíme je do skupiny mikronutrientů (mikroživin).<sup>[1-5]</sup>

# **1 TEORETICKÁ ČÁST**

## 1.1 VITAMÍNY

Slovo vitamín poprvé použil polský biochemik Kazimír Funk. Mezi lety 1911-1912 izoloval z otrub rýže látku, která byla schopna potlačit příznaky nemoci *Beri beri*. Po zjištění, že látka obsahuje aminoskupinu, navrhl název *vitamin* – „amin života“ (vita = život). Toto označení se udrželo dodnes, i přes to, že v mnoha případech u látek patřících do této skupiny nejde o aminy.<sup>[6]</sup>

Aby mohla být sloučenina považována za vitamín, musí být nezbytnou složkou ve stravě. Její vyloučení ze stravy by mělo mít za následek jasně definované onemocnění způsobené nedostatkem, a obnovení příjmu této sloučeniny musí nemoc vyléčit, nebo být prevencí proti jejímu vzniku. Potřeba většiny vitamínů je u člověka poměrně malá, závisí však na mnoha faktorech (pohlaví, věk, zdraví, aktivita,...).

Existují sloučeniny, které jsou vitamínům chemicky příbuzné, samy nevykazují fyziologické funkce, ale mohou v organismu posloužit k přeměně ve vitamín. Tyto látky nazýváme *provitamíny*. Jako příklad lze uvést  $\beta$ -karoten, který je provitamínem retinolu (vitamínu A).<sup>[1,2,4]</sup>

Významným zdrojem vitamínů je především ovoce a zelenina, maso a výrobky z něj, mléko a mléčné výrobky, vejce a cereální potraviny. Vitamíny jsou poměrně labilními složkami potravy, a proto během zpracování a kulinárních úprav dochází k jejich ztrátám. Potravinářský průmysl z tohoto důvodu využívá tzv. fortifikaci (obohacení potravin vitamíny).<sup>[2,4]</sup>

Většina vitamínů je relativně citlivá na různé fyzikální a chemické vlivy, např. zvýšenou teplotu, vzdušný kyslík, UV záření, pH prostředí aj.

Vitamíny se v potravinách nachází ve volné formě, nebo vázané na bílkoviny či cukry. Podle jejich rozpustnosti jsou rozděleny do dvou skupin, a sice na vitamíny rozpustné ve vodě a vitamíny rozpustné v tucích.<sup>[4]</sup>

### 1.1.2 Vitamíny rozpustné v tucích

Mezi lipofilní vitamíny, neboli vitamíny rozpustné v tucích, patří vitamín A (působí především proti šerosleposti), vitamín D (působí proti křivici a měknutí či deformaci kostí),

vitamín E (nedostatek způsobuje poruchy funkce placenty a zrání pohlavních buněk) a vitamín K, známý také jako koagulační vitamín (deficience může způsobit poruchy srážení krve).

Tyto vitamíny jsou u člověka skladovány v játrech.<sup>[2]</sup>

### **1.1.3 Vitamíny rozpustné ve vodě**

V případě hydrofilních vitamínů se jedná o vitamíny skupiny B (B-komplexu) a vitamín C. Funkce těchto vitamínů je převážně katalytická. Uplatňují se jako kofaktory nejrozličnějších enzymů v metabolismu bílkovin, sacharidů, nukleových kyselin a dalších látek. Zpravidla nejsou v organismu skladovány a přebytek odchází močí (vyjma lidí s porušenou funkcí ledvin).<sup>[2,7]</sup>

#### **1.1.3.1 B-komplex**

B-komplex, též skupina vitamínů B, je skupina, která sdružuje následující vitamíny<sup>[2]</sup>:

- ❖ B<sub>1</sub> (thiamin)
- ❖ B<sub>2</sub> (riboflavin)
- ❖ B<sub>3</sub> (niacin)
- ❖ B<sub>5</sub> (kyselina pantothenová)
- ❖ B<sub>6</sub> (pyridoxin)
- ❖ biotin (B<sub>7</sub>, dříve vitamín H)
- ❖ folacin (B<sub>9</sub>, kyselina listová, dříve vitamín B<sub>c</sub> či M)
- ❖ korinoidy (kobalaminy, skupina vitamínů B<sub>12</sub>)

Tyto vitamíny nejsou seskupeny na základě chemické strukturní podobnosti, ale spíše s ohledem na jejich úlohy, které sehraávají v lidském organismu. Jedná se o koenzymy (účinné komponenty enzymů), které funkčně zasahují do téměř všech dějů v lidském organismu, jako například metabolismus bílkovin, sacharidů a tuků, nebo syntéza, popř. oprava DNA a RNA. Jedná se o hydrofilní látky, nenahraditelné v zabezpečení dobré funkce centrální a periferní nervové soustavy (pozitivně působí hlavně na mozek), GIT, imunitního systému a srdce. Jejich nedostatek je doprovázen mravenčením prstů, poruchami kůže a sliznic (koutky úst),

vypadáváním a předčasným šedivěním vlasů, v horších případech může dojít k obrně (zejména dolních končetin).

Množství, které je třeba organismu dodat k jeho správnému fungování, se pohybuje ve velmi nízkých hodnotách a je ovlivněno například pohlavím, stářím a zdravotním stavem jedince. Potřebné hodnoty těchto vitamínů lze zajistit dostatečně pestrou stravou bohatou na vitamíny.

Vitamíny B-komplexu jsou typicky syntetizovány rostlinami, přičemž jejich syntéza v chloroplastech, mitochondriích a cytosolu je regulována podle požadavků rostliny. U rostlin vykonávají stejné funkce, které vykonávají v těle zvířat, které je posléze konzumují.

Sloučeniny této skupiny se pouze ve výjimečných případech vyskytují jednotlivě, častěji jsou v přírodních produktech přítomny jako komplex. Kompletní vitamíny B-komplexu (včetně dalších méně významných, či ne tolik známých) jsou v poměrně velkém množství obsaženy v kvasnicích.<sup>[4,5,7-11]</sup>

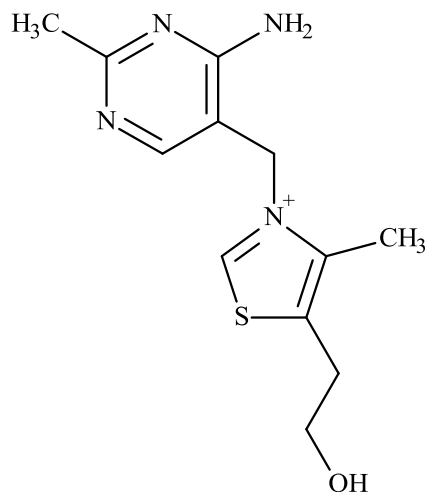
#### **1.1.4 Nedostatek a přebytek vitamínů**

Při deficienci vitamínů může dojít ke dvěma stavům. Prvním je hypovitaminóza – stav, kdy je do těla vitamín dodáván v nedostatečném množství, a druhým avitaminóza – úplný nedostatek vitamínu, který se pravděpodobně projeví poruchou některého z biochemických procesů. Dříve byla avitaminóza častou příčinou mnoha onemocnění a úmrtí.

Opačným stavem je hypervitaminóza – nadměrná hladina vitamínů v organismu. Může k ní dojít pouze u lipofilních vitamínů, neboť případný přebytek hydrofilních vitamínů je vyloučen v moči.<sup>[2]</sup>

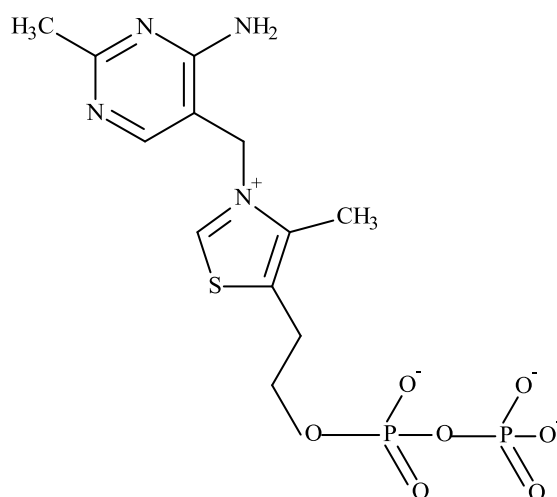
## **1.2 VITAMÍN B<sub>1</sub>**

Vitamín B<sub>1</sub> (viz Obrázek 1), nebo také thiamin, je bezbarvá až bílá krystalická látka páchnoucí po kvasnicích. Byl objeven jako první vitamín v historii. V roce 1926 byl Jansenem a Donathem izolován z přírodního materiálu v krystalické formě jako hydrochlorid.<sup>[12]</sup> Původně byl pojmenován *aneurin*, protože působí při prevenci a léčbě polyneuritidy u zvířat. Název thiamin molekula později získala díky přítomnosti jak síry, tak aminoskupiny ve své struktuře, kterou úspěšně určil v roce 1934 Williams.<sup>[1-4,7,13,14]</sup>



**Obrázek 1:** Vitamín B<sub>1</sub>, thiamin (volná báze)<sup>[15]</sup>

Molekula thiaminu se skládá z pyrimidinového a thiazolového kruhu, které jsou spojeny methylenovým můstkem. Jedná se o kvartérní amin, jež existuje jako jednomocný nebo dvojmocný kation, v závislosti na pH roztoku. Alkoholová skupina postranního řetězce může být esterifikována jedním, dvěma nebo i třemi fosfáty za vzniku thiaminmonofosfátu, thiamindifosfátu (Obrázek 2), který je aktivním koenzymem, a thiamintrifosfátu.<sup>[1,16]</sup>



**Obrázek 2:** Thiamindifosfát (TDP)<sup>[15]</sup>

### 1.2.1 Metabolické funkce thiaminu

Thiamin se v přírodě vyskytuje volný ve formě esterů, nebo vázaný na bílkoviny.

Lohmann a Schuster dokázali frakcionovat velké množství kvasinek z pivovaru Löwenbräu a izolovat "koferment", nyní přejmenovaný na kokarboxylázu. Poté ji identifikovali jako thiamindifosfát nebo také thiaminpyrofosfát. Thiamin sám byl neaktivní, ale kvasinky měly schopnost postupně přidávat fosfátové skupiny k hydroxylové skupině molekuly, a tak ji aktivovat.

Thiamindifosfát (TDP) a thiamintrifosfát (TTP), jež jsou účinnými kofaktory enzymů (neproteinová část enzymu), mají dominantní úlohu v metabolismu sacharidů a aminokyselin. TTP je také obsažen v enzymech katalyzujících oxidativní dekarboxylaci  $\alpha$ -ketokyselin, např. kyseliny pyrohroznové (na acetylkoenzym A) a  $\alpha$ -ketoglutarové, jejichž intermediáty se vyskytují v Krebsově cyklu. Koenzymovou roli thiaminu v oxidativní dekarboxylaci pyruvátu poprvé popsal ve 20. a 30. letech Sir Rudolph A. Peters.<sup>[1,4,17-19]</sup>

U kuřáků thiamin zabraňuje stoupání krevního tlaku, které je způsobeno nikotinem.<sup>[7]</sup>

Není přesně jasné, které z biochemických funkcí během nedostatku thiaminu selhávají, které pokračují normálně a které jsou částečně omezeny.<sup>[17]</sup>

### 1.2.2 Vitamín B<sub>1</sub> v potravinách

Lidský organismus není schopen vitamín B<sub>1</sub> syntetizovat, a proto ho musí získat pomocí vhodné stravy. Nejvíce thiaminu obsahují cereální výrobky (chléb), maso, mléko a mléčné výrobky, brambory, ovoce a zelenina, luštěniny a vejce. Zdrojem bohatým na vitamín B<sub>1</sub> jsou i pivovarské kvasnice.<sup>[2,18]</sup>

Z potravin živočišného původu je nejvýznamnějším zdrojem maso (vepřové, hovězí, kuřecí a rybí), vnitřnosti (hlavně játra) a vaječný žloutek. Ve většině zvířecích tkání je přítomen TDP, výjimku tvoří kosterní svalstvo prasat, kde je vitamín B<sub>1</sub> převážně ve formě thiamintrifosfátu.

Existuje enzym, který je schopen štěpit vitamín B<sub>1</sub>. Tento enzym se nazývá thiamináza a byl nalezen u měkkýšů a ve vnitřnostech sladkovodních ryb. Častý příjem syrových sladkovodních ryb a měkkýšů je proto nebezpečným faktorem pro rozvoj nedostatku vitamínu B<sub>1</sub>. Jelikož je thiamináza inaktivována teplem, vařením těchto potravin dojde k jejímu zničení.

V kravském mléce je vitamín B<sub>1</sub> přítomen hlavně jako volný, nefosforylovaný thiamin.

Co se týče potravin rostlinného původu, významný podíl vitamínu B<sub>1</sub> obsahují různé druhy zeleniny. Zejména v obilninách (pšeničné zrno, klíčky, slupka a otruby), luštěninách (hrách, fazole, čočka, sója), oříšcích (vlašské, kešu, lískové a pistácie) a bramborách je thiamin bohatě zastoupen. Ve většině obilovin a produktů z nich (včetně bílé mouky z pšenice) je přítomna téměř výhradně forma nefosforylovaného thiaminu.<sup>[4,18,20]</sup>

V potravinových doplncích lze thiamin najít převážně ve formě thiamin hydrochloridu, někdy též ve formě thiamin mononitrátu, který je také vhodný pro obohacování mouky.<sup>[16]</sup>

Následující tabulka (Tabulka 1) poskytuje informace o množství thiaminu ve vybraných potravinách:

**Tabulka 1:** Obsah thiaminu ve vybraných potravinách<sup>[21,22]</sup>

Potravina	mg thiaminu / 100 g
kravské mléko (plnotučné)	0,03
vejce	0,09
pšeničná mouka (celozrnná)	0,47
pšeničná mouka (bílá)	0,31
rýže (loupaná)	1,84
hovězí maso (syrové)	0,10
jehněčí maso (syrové)	0,09
vepřové maso (syrové)	0,98
kuřecí maso (syrové)	0,38
brambory	0,21
cizrna	0,39
hrách	0,74
červené fazole	0,65
arašídy	1,14
pivovarské kvasnice	12,12
sušené pekařské droždí	2,33

### 1.2.3 Ztráty thiaminu při zpracování a skladování potravin

Jelikož je thiamin jedním z nejlabilnějších vitamínů, dochází k jeho rozkladu již při varu ve vodě. Při teplotách vyšších než 100 °C je rozpad navíc zesílen působením světla a dochází



k fotodegradaci. K úbytku vitamínu B<sub>1</sub> též napomáhá použití siřičitanů při konzervování potravin. Tyto ztráty se týkají zejména těstovin, ovoce a zeleniny.

Při pečení masa v troubě klesá obsah vitamínu až o 10 – 25 %, při smažení o 15 – 50 %. Největší ztráty jsou však způsobeny vařením a dušením (50 – 70 %). V takto upravovaných pokrmech přechází vitamín do vody a ztráty jsou zapříčiněné i vyššími teplotami.

V případě mléka, které je průmyslově upravováno (pasterizací a sterilizací) se úbytek pohybuje mezi 15 až 18 %. V dalším poklesu vitamínu hraje roli i doba následného skladování – 10 týdnů způsobí snížení až o 7 %.<sup>[4,16,23,24]</sup>

Obilniny, jež jsou na thiamin velmi bohaté, ztrácí tento vitamín v závislosti na stupni vymílání. Při přípravě hrubé mouky zůstává 85 %, při přípravě hladké mouky však pouze 15 % z původního obsahu. Co se týče chleba, ztráty zde nejsou až tak vysoké, v důsledku použití kvasinek, které při svém množení (proces kynutí) samy produkují thiamin a tím směs obohacují. Při výrobě pečiva s použitím kypřicího prášku jsou úbytky vyšší.<sup>[4,19]</sup>

Do jisté míry je vitamín chráněn bílkovinami a ostatními složkami, ke kterým může být v potravě připojen, a proto je thiamin obsažený v potravinové matici vůči rozpadu odolnější než thiamin volný (ve vodném, nebo pufrovaném roztoku).<sup>[16,22]</sup>

#### **1.2.4 Nedostatek vitamínu B<sub>1</sub>**

Nedostatek thiaminu v kombinaci s rychlým úbytkem hmotnosti či alkoholismem může vést až ke ztrátě paměti. Dalšími příznaky mohou být podrážděnost, svalová únava, nechutenství a hubnutí. V současné době se deficiencie nejčastěji vyskytuje u případů chronického alkoholismu. U těchto lidí může nedostatek thiaminu vysvětlovat některé z vážných poškození mozku.<sup>[2,13]</sup>

Avitaminóza způsobuje následující onemocnění:

##### **1.2.4.1 *Beri beri***

Thiaminová avitaminóza může mít za následek onemocnění, které postihuje periferní nervový systém. Toto onemocnění se nazývá *Beri beri* a je známé téměř 1300 let. V 19. století se stalo problémem lidí na Dálném východě a v zemích, kde je hlavní potravinou loupaná rýže.<sup>[1,16]</sup>

Toto onemocnění vzniká jako důsledek poruchy metabolismu sacharidů, kdy dochází k hromadění kyseliny pyrohroznové v krvi.<sup>[4]</sup>

Rozlišují se 3 hlavní formy *Beri beri*:

#### 1.2.4.1.1 „Suché“ *Beri beri*

Příčinou je dlouhodobý nedostatek thiaminu ve spojení s konzumací stravy bohaté na sacharidy. Následkem je poté symetricky stoupající periferní neuritida.

Pacient si zpočátku stěžuje na slabost, tuhost, křeče v končetinách, někdy i necitlivost chodidel, a není schopen chůze na delší vzdálenost. Později dochází ke svalové slabosti, která se šíří směrem vzhůru přes svaly nohy, lýtka až ke svalům stehna. Stejný průběh může nastat v případě paží. Typickým znakem jsou pokleslá chodidla, nebo zápěstí.

Takto zasažené svaly se stávají velmi citlivými – dokonce i nepatrný tlak je značně bolestivý.<sup>[1,13,25,26]</sup>

#### 1.2.4.1.2 „Vlhké“ *Beri beri*

Vlhké *Beri beri* postihuje srdce, u kterého může způsobit pravostranné selhání. Dále se toto onemocnění může projevit edémem obličeje a dolních končetin. Nemocní pak nejčastěji umírají na kardiovaskulární či plicní selhání.<sup>[1,13,27]</sup>

#### 1.2.4.1.3 *Akutní (Shoshin) Beri beri*

Tato nemoc byla běžnou ve dvacátých letech v Japonsku, odtud název *shoshin* (= akutní). Bylo zaznamenáno téměř 26 000 úmrtí za rok. Jedná se v podstatě o závažnou formu vlhkého *Beri beri*. *Shoshin Beri beri* způsobuje srdeční selhání bez zvýšeného srdečního výdeje a bez edému. Může být také spojené s těžkou laktátovou acidózou.<sup>[1,28]</sup>

#### 1.2.4.2 *Wernickeho-Korsakovův syndrom*

Jedná se o onemocnění, které postihuje spíše centrální nervový systém a dochází k němu zejména u alkoholiků a narkomanů.

Carl Wernicke byl polský neurolog, který zaznamenal 3 charakteristické neurologické příznaky u alkoholiků – ataxii (neschopnost udržet rovnováhu), zmatenost a slabost očních svalů. Těmto symptomům se v současnosti přezdívá Wernickeho encefalopatie či Wernickeho triáda.

O osm let později, v roce 1889, Sergej Sergejevič Korsakov – ruský psycholog, poukázal na zvláštní druh amnézie (poruchy paměti) u alkoholiků, spojené s psychiatrickými příznaky. Poprvé popsal syndrom ztráty krátkodobé paměti a konfabulace. Konfabulace je porucha, kdy dotyčný sám věří lživým příběhům, které vypráví. Představivost je zde zaměněna za paměť. Tento jev Korsakov pozoroval kromě alkoholiků i u lidí, kteří trpěli těžkým zvracením, a je označován jako Korsakovova psychóza, i když se ve skutečnosti o psychózu nejedná.

Pokud nedojde k léčení Wernickeho encefalopatie, u pacienta se dále rozvíjí Korsakovova psychóza.

V Austrálii došlo ke snížení výskytu Wernickeho-Korsakovova syndromu po zavedení povinného obohacování mouky thiaminem. Poté, co začali nemocní užívat thiaminové potravinové doplňky, došlo k výraznému klinickému zlepšení. Některé typy poškození jsou však při tomto syndromu nevratné.<sup>[1,13,27]</sup>

#### **1.2.4.3 Vliv nedostatku thiaminu na metabolismus sacharidů**

Nedostatek thiamindifosfátu v cyklu dehydrogenace pyruvátu znamená, že dochází k poškození přeměny pyruvátu na acetylkoenzym A a tím k narušení cyklu kyseliny citronové. Zvláště při konzumaci potravin s poměrně vysokým zastoupením sacharidů může dojít k život ohrožující laktátové acidóze.<sup>[1,17]</sup>

#### **1.2.5 Referenční příjem thiaminu**

Z role thiaminu v metabolismu sacharidů je zřejmé, že příjem bude záviset ve značném rozsahu na příjmu sacharidů. Pro stravu, která obsahuje méně tuků, a tudíž více sacharidů a bílkovin, budou požadavky na vitamín B<sub>1</sub> poněkud vyšší.<sup>[1]</sup>

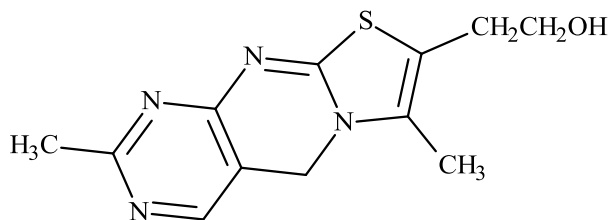
Doporučený příjem thiaminu za den u dospělých lidí s energetickým příjmem 12 600 kJ je asi 1,2 mg; u kojenců 0,3 mg; u žen 1,1 mg; u těhotných a kojících žen v rozmezí 1,4 -1,5 mg.<sup>[2]</sup>

Vyšší příjem vitamínu B<sub>1</sub> je vyžadován například u lidí, kteří trpí hypertyreózou.<sup>[16]</sup>

Neexistují důkazy, že by thiamin mohl být při vysokém příjmu toxický. Ačkoliv jsou hodnoty pro příjem poměrně vysoké, bylo zjištěno, že parenterální dávky u zvířat vyvolávají depresi dýchání a u lidí anafylaktický šok. U lidí, kteří dlouhodobě pracují s thiaminem, byla potvrzena přecitlivělost kůže a dermatitida.<sup>[1]</sup>

### 1.2.6 Vlastnosti thiaminu

Thiamin je nejméně stabilní ze všech vitamínů. Jeho teplota tání se pohybuje okolo 207 °C, při vystavení vyšším teplotám dochází k jeho rozkladu. Ke ztrátám vitamínu B<sub>1</sub> dochází především v důsledku jeho destrukce. Rychlost rozkladu se zvyšuje s rostoucí teplotou, ale není to jediný faktor. Za kyselých podmínek (pod pH 5) jsou ztráty vitamínu nižší, za alkalických podmínek úbytek výrazně vzrůstá. Thiamin je tedy stabilnější při kyselém pH. Oxidací v silně alkalickém prostředí (např. K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], nebo chloridem rtuťnatým) přechází na biologicky neaktivní thiochrom (Obrázek 3).



**Obrázek 3:** Thiochrom<sup>[19]</sup>

Vitamín B<sub>1</sub> je snadno rozpustný ve vodě (100 g / 100 ml), poměrně málo rozpustný v 95% ethanolu (1 g / 100 ml) a zcela nerozpustný v organických rozpouštědlech (ether, aceton, chloroform, atd.). Působením siřičitanů při pH 6 a vyšším, je snadno rozštěpen na pyrimidinovou a thiazolovou část.

Všechny fosfátové estery thiaminu jsou rozpustné ve vodě a v suché formě jsou stabilní po dobu několika měsíců při skladování v tmavých místnostech za nízké teploty.<sup>[16-19,22]</sup>

## 1.2.7 Výroba thiaminu

První syntézu thiaminu provedli během let 1936-1937 současně Roger Williams a dva další vědecké týmy.<sup>[27,29]</sup>

Ze syntéz byly pro průmyslové měřítko nejpraktičtější ty, jejichž postup navrhl právě zmiňovaný Williams a Cline (Schéma 1), a Todd a Bergel (Schéma 2).<sup>[14]</sup>

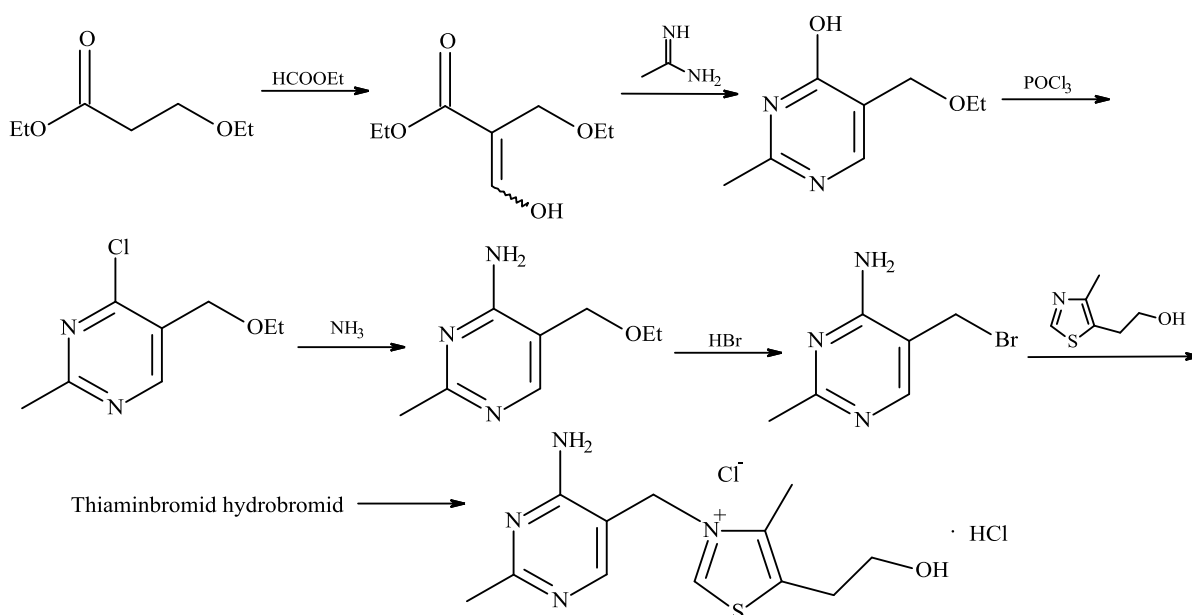
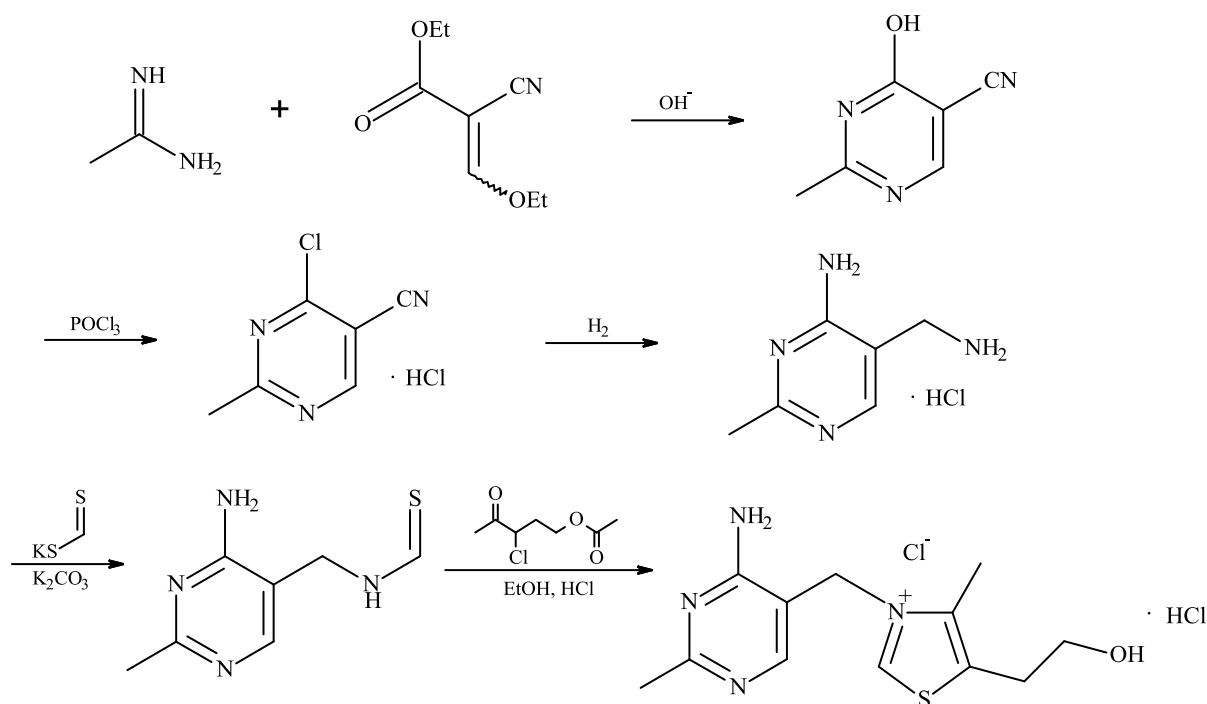


Schéma 1: Syntéza thiaminu dle Williamse a Clina<sup>[14]</sup>

Při způsobu výroby dle Williamse a Clina je v první řadě vybudován pyrimidinový kruh. Thiazolový cyklus je získán po reakci s chlorketonem, sirouhlíkem, amoniakem a peroxidem vodíku, kdy v oxidačním kroku dochází k odstranění atomu síry, zavedení dvojných vazeb a dokončení thiazolového kruhu. Kondenzace obou těchto komponent poskytla thiaminbromid hydrobromid, který byl chloridem stříbrným přeměněn na požadovaný hydrochlorid thiaminchloridu.<sup>[14,27,30]</sup>



**Schéma 2:** Syntéza thiaminu dle Todda a Bergela<sup>[14]</sup>

Todd-Bergelův postup spočívá v tvorbě diaminu (též známého jako „Grewe diamin“<sup>[31]</sup>) a jeho převedení na thioformylderivát. Ten je následně kondenzován chlorketonem za vzniku požadované látky. V dnešní době je tato syntéza poněkud pozměněna, „Grewe diamin“ je podrobován reakci se sirouhlíkem a chlorketonem. Po oxidaci vzniká thiamin hydrochlorid. Metoda je takto mnohem účinnější a využívá se při průmyslové výrobě thiaminu.<sup>[14,32]</sup>

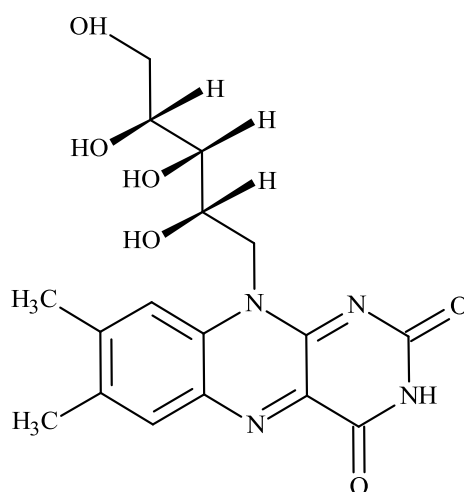
„Grewe diamin“ je základním stavebním kamenem téměř všech současných průmyslových syntéz.<sup>[14]</sup>

Thiamin nemůže být syntetizován ve tkáních jakéhokoli zvířecího druhu, všechny vyšší rostliny jsou naopak schopny tento vitamín vyrábět, čímž poskytují jeho zdroj pro zvířata. V rostlinných tkáních se pyrimidinové a thiazolové kruhy syntetizují odděleně, později jsou kondenzovány pomocí thiaminfosfátsyntetázy za vzniku thiaminmonofosfátu. Ten je posléze fosforylován ATP na thiamindifosfát, nebo defosforylován na volný thiamin.<sup>[27,30]</sup>

### 1.3 VITAMÍN B<sub>2</sub>

Vitamín B<sub>2</sub> (Obrázek 4), neboli riboflavin (dříve laktoflavin, uroflavin a ovoflavin), je žlutooranžová termostabilní látka bez zápachu, která je schopna fluorescence. Skládá se z tricyklického 7,8-dimethylisoalloxazinu, jehož kruh je v poloze 10 konjugován cukerným alkoholem ribitolem. V letech 1931-1933 byl postupně izolován z mléka (odtud název laktoflavin), syrovátky, jater, droždí a jiných přírodních zdrojů. Po objasnění chemické struktury této fluoreskující látky dostal v roce 1937 Paul Karrer Nobelovu cenu, kromě jiného za výzkum v oblasti vitamínu B<sub>2</sub>.

Riboflavin má hlavní úlohu jako redoxní koenzym v metabolismu s energetickým výdejem. Metabolicky aktivními látkami jsou riboflavin-5'-fosfát (FMN) a flavinadeninukleotid (FAD). FAD a FMN jsou též známé jako flavinové koenzymy a vyskytují se jako prostetické skupiny u enzymů dýchacího řetězce.<sup>[1,2,4,7,19]</sup>



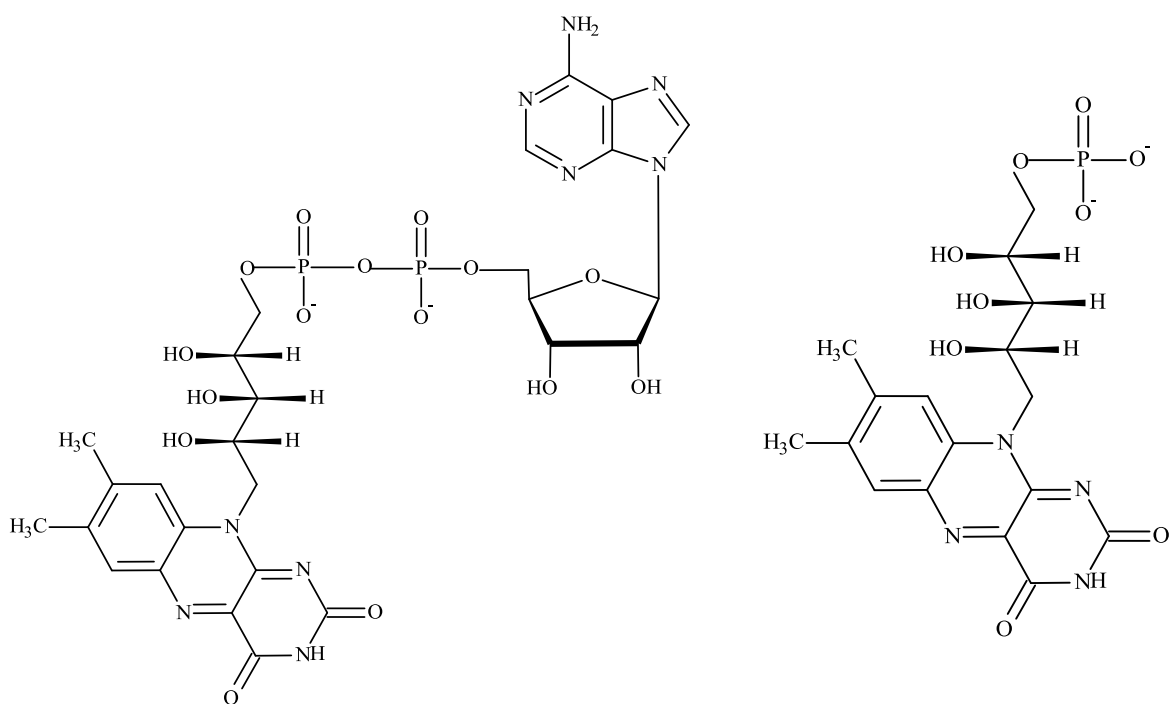
Obrázek 4: Vitamín B<sub>2</sub>, riboflavin<sup>[2]</sup>

#### 1.3.1 Metabolické funkce riboflavínu

FAD a FMN (oba viz Obrázek 5) jsou kofaktory oxidoreduktáz, které si díky svému žlutému zbarvení vysloužily název flavinenzymy či flavoproteiny. Tyto enzymy se účastní oxidačně-redukčních reakcí a většina z nich se nachází v mitochondriích, kde jsou součástí dýchacího

řetězce. FAD i FMN jsou též důležité pro konverzi některých vitamínů do jejich aktivních koenzymových forem (např. pro konverzi pyridoxinu).

Riboflavin pozitivně ovlivňuje metabolismus tuků, bílkovin, cukrů a účastní se všech metabolických procesů, jejichž výsledkem je získání energie. Důležitou roli hraje také v přeměně tryptofanu na niacin.<sup>[2-4,7,33]</sup>



**Obrázek 5:** FAD (vlevo) a FMN (vpravo)<sup>[2]</sup>

Vitamín B<sub>2</sub> je důležitý zejména pro správný růst a zdraví kůže, rtů, jazyka a očí. Má schopnost převádět krátkovlnné modré paprsky na žlutozelené, čímž je umožněno vidění za šera. Jeho koncentrace v oku je vysoká, ve volné formě je obsažen zejména na sítnici.

Mezi další úlohy riboflavinu se řadí účast na tvorbě krevních elementů a zárodečných buněk. FMN a FAD jsou také klíčové pro tvorbu niacinu, vitamínu B<sub>6</sub>, enzymů P 450 a proteinů, které jsou zapojeny do přenosu elektronů a transportu kyslíku.<sup>[2,3,7,34]</sup>



### 1.3.2 Vitamín B<sub>2</sub> v potravinách

Volný riboflavin se vyskytuje pouze v syrovátce, mléce, moči a na sítnici. Vázaný ho lze ve formě FMN a FAD najít v kvasnicích, obilných klíčcích, játrech a ledvinách. V ovoci je obsah tohoto vitamínu, stejně jako v masě sladkovodních ryb, malý. Dobrým zdrojem jsou některé houby. Uvádí se, že asi 40 % riboflavinu získáváme do organismu díky mléku a mléčným výrobkům, 20 % zajišťuje maso (játra), necelých 20 % vejce spolu se zeleninou, a 15 % cereálie.

Z potravin živočišného původu jsou na vitamín B<sub>2</sub> velmi bohaté sýry, mléko, vepřové maso, vnitřnosti, vejce, mořské ryby a drůbež. V kravském mléce je tento vitamín přítomen zejména jako volný riboflavin, FAD a FMN jsou zde pouze ve velmi malém množství. U plnotučného mléka je část flavinů nekovalentně vázána na specifické proteiny. Riboflavin je obsažen i v některých potravinách rostlinného původu, např. v sóje, luštěninách, obilninách (zejména otrubách). Vitamín B<sub>2</sub> z potravy živočišného původu podléhá absorpci v trávicím traktu snadněji než vitamín z potravy rostlinného původu (přítomnost obtížně štěpitelných forem).<sup>[2-4,7,35,36]</sup>

Díky svému žlutému zbarvení je riboflavin v potravinářském průmyslu využíván jako barvivo (E 101).<sup>[1]</sup>

Následující tabulka poskytuje přehled o množství riboflavinu ve vybraných potravinách.

**Tabulka 2:** Obsah riboflavinu ve vybraných potravinách<sup>[21]</sup>

Potravina	mg riboflavinu / 100 g
kravské mléko (plnotučné)	0,23
sýr cheddar	0,39
vejce	0,47
pšeničná mouka (celozrnná)	0,09
pšeničná mouka (bílá)	0,03
rýže	0,07
hovězí maso (syrové)	0,21
jehněčí maso (syrové)	0,20
játra (jehněčí, smažená)	5,65
vepřové maso (syrové)	0,24
kuřecí maso (syrové)	0,18
cizrna	0,24
sójové boby	0,27
červené fazole	0,19
arašídý	0,10
kvasnicový extrakt	11,90

### **1.3.3 Ztráty vitamínu B<sub>2</sub> při zpracování a skladování potravin**

Běžné tepelné zpracování potravin nezpůsobí výraznější úbytek riboflavinu, jakožto termostabilního vitamínu. Vitamín B<sub>2</sub> tak odolává zvýšeným teplotám i mrazu. Při tepelné přípravě těstovin a zeleniny dochází ke ztrátám až 60 % v důsledku vyluhování vitamínu do vody.

Díky jeho zvýšené citlivosti na světlo (zejména sluneční záření) však dochází k fotodegradaci, pokud jsou potraviny uchovávány v nevhodných obalech. Při tomto rozpadu vzniká lumichrom a lumiflavin, což jsou látky s výraznými oxidačními účinky, které způsobují znehodnocení ostatních vitamínů (hlavně vitamínu C a retinolů) a důležitých složek potravin. Jsou-li oxidovány některé esenciální aminokyseliny, může dojít ke vzniku sirných sloučenin. Potraviny pak mohou nepříjemně zapáchat.<sup>[4]</sup>

Tyto jevy lze pozorovat hlavně u mléka plněného do průhledných plastových, či skleněných lahví. Bylo zjištěno, že u mléka v lahvi, které je vystaveno působení slunečního záření po dobu dvou hodin, dojde k poklesu vitamínu až o 85 %.<sup>[16,19]</sup>

### **1.3.4 Nedostatek vitamínu B<sub>2</sub>**

Nedostatek riboflavinu, nebo též ariboflavinóza, je stav, který se vyskytuje poměrně vzácně. Projevem jsou především zánětlivé změny kůže (dermatitis) a sliznic. Dalším příznakem může být zánět spojivek, pálení či svědění očí, ztráta řas, závratě, únava a anémie.<sup>[2,7,34]</sup>

### **1.3.5 Referenční příjem riboflavinu**

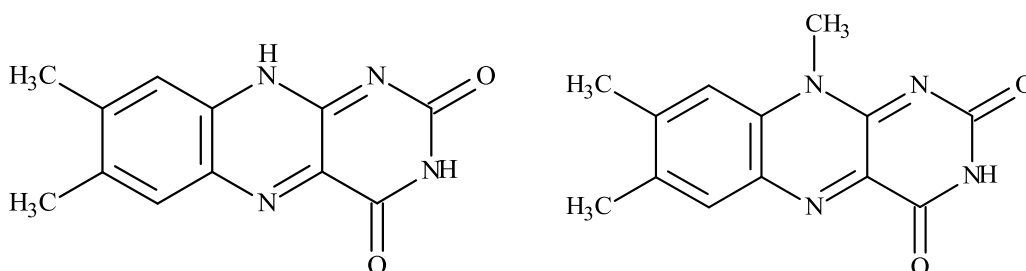
Doporučená denní dávka vitamínu pro děti se pohybuje v rozmezí 0,4 mg – 1,3 mg, pro mladistvé 1,6 – 2,4 mg. Dospělým mužům je doporučováno množství až 1,7 mg. U žen je tato dávka nižší (1,2 – 1,3 mg), u těhotných a kojících žen je vhodný denní příjem 1,6 – 1,8 mg.<sup>[2,7]</sup>

### 1.3.6 Vlastnosti riboflavinu

Vitamín B<sub>2</sub> je oproti thiaminu jedním z nejvíce tepelně stabilních vitamínů. Jeho oranžové krystaly tají při teplotě kolem 280 °C. V neutrálním vodném roztoku vykazuje riboflavin silné žlutozelené fluorescenční záření. Ve vodě je poměrně málo rozpustný (10 až 13 mg / 100 ml při 25 °C), zahřátím lze však rozpustnost výrazně zlepšit (230 mg / 100 ml při 100 °C). Sodná sůl FMN je ve vodě naopak velmi dobře rozpustná, podobně i volný FAD.

Riboflavin je nestabilní při alkalických podmínkách, které se však v potravinách vyskytují jen zřídka.

Velmi důležitou vlastností je jeho citlivost na světlo. Krystalický riboflavin je v suché formě stabilní, při převedení do roztoku dochází k rozkladu při vystavení viditelnému či UV světlu. Rychlost rozkladu se zvyšuje s nárůstem teploty a pH. Hlavním produktem po tomto ozařování je látka zvaná lumichrom, při neutrálních a alkalických pH hodnotách je produkován také lumiflavin (oba viz Obrázek 6).<sup>[16,19]</sup>



**Obrázek 6:** Lumichrom (vlevo) a lumiflavin (vpravo)<sup>[19]</sup>

Obě tyto sloučeniny nevykazují aktivitu vitamínu B<sub>2</sub>. Jsou silnějšími oxidačními činidly než samotný riboflavin a katalyzují např. masivní destrukci kyseliny askorbové (vitamínu C).<sup>[19,37]</sup>

Vodné roztoky riboflavinu, pokud jsou chráněny před světlem, jsou tepelně stabilní až do 120 °C při hodnotách pH mezi 2 a 5; nad pH 7 je isoalloxazinový kruh při zvýšených teplotách rychle zničen.<sup>[16,38]</sup>

## 1.3.7 Výroba riboflavinu

### 1.3.7.1 Chemická výroba

První chemická syntéza riboflavinu byla provedena vědeckými výzkumnými skupinami pod vedením Kuhna a Karrera v rozmezí let 1934 a 1935.

Postup Kuhnovy skupiny (Schéma 3) zahrnoval kondenzaci 6-nitro-3,4-xylidinu s D-ribózou. Vzniklá nitrosloučenina byla redukována za pomoci katalyzátoru na fenylendiamin, který v kyselém prostředí reagoval s alloxanem.<sup>[14,39,40]</sup>

Karrerův tým při syntéze (Schéma 3) vycházel také z D-ribózy, která byla podrobena reakci s 2-(ethoxykarbonylamino)-4,5-dimethylanilinem. V následném kroku proběhla hydrogenace vzniklého produktu (při bazických podmínkách) a po kondenzaci s alloxanem byl získán požadovaný riboflavin.<sup>[14,41-43]</sup>

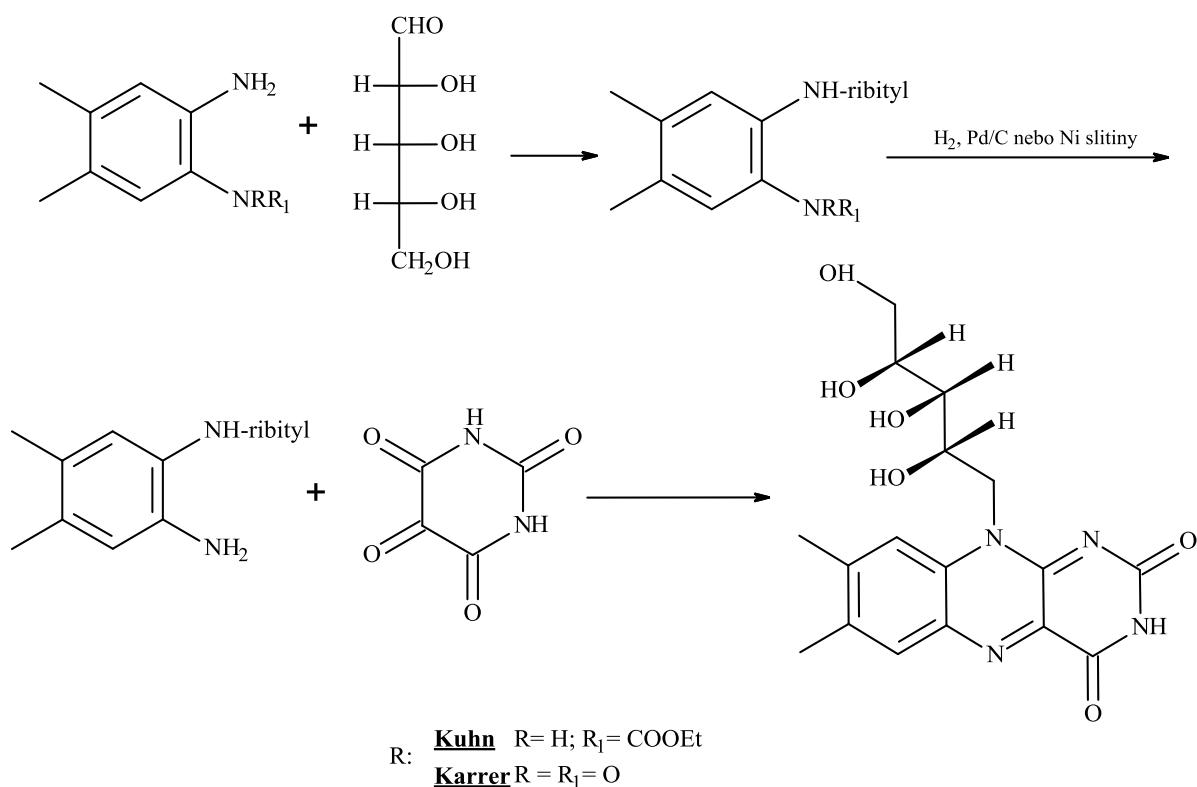


Schéma 3: Syntéza riboflavinu dle Kuhna a Karrera<sup>[14]</sup>

Od roku 1934 prošly syntézy riboflavinu zdokonalením, díky němuž je v současné době možné tento vitamín vyrábět průmyslově. Důležitým krokem byla přímá kondenzace kyseliny barbiturové s azobarvivem v prostředí kyseliny octové (tzv. Tishlerova reakce) (Schéma 4).<sup>[14]</sup>

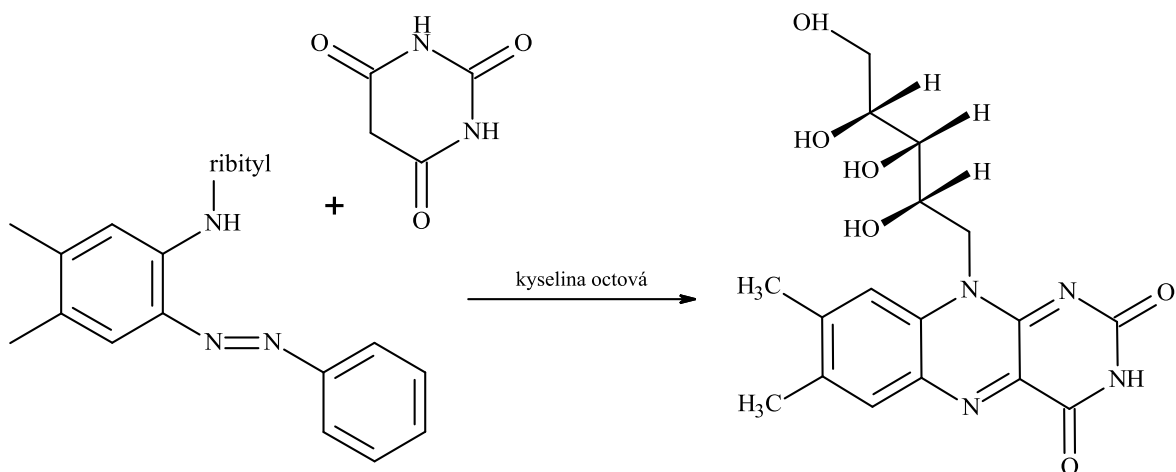


Schéma 4: Syntéza riboflavinu Tishlerovou reakcí<sup>[14]</sup>

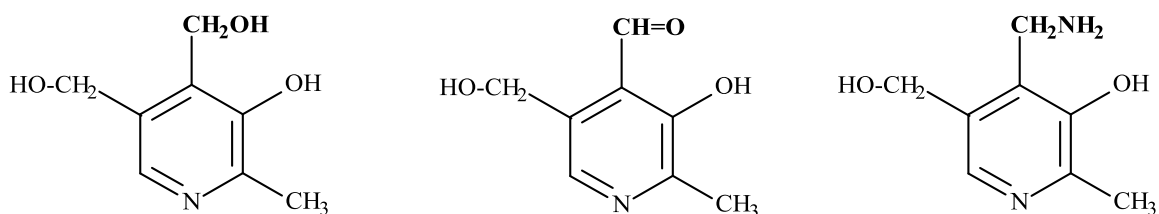
### 1.3.7.2 Biotechnologická výroba

Chemické výrobní procesy jsou čím dál častěji nahrazovány procesy mikrobiální produkce za použití *Bacillus subtilis*, *Eremothecium ashbyii*, *Ashbya gossypii* či kvasinek *Candida*. Z počátku se využívalo přirozeně se vyskytujících bakterií, kvasinek a hub, které byly schopny produkovat více riboflavinu, než požadoval jejich vlastní metabolismus. Bohatým zdrojem riboflavinu byly hlavně anaerobně rostoucí bakterie mléčného a máselného kvašení (např. *Bacillus Delbrücki*, *Clostridium butyricum*).<sup>[44,45]</sup>

Riboflavin je produkován i některými druhy plísní. Mezi známější patří *Aspergillus niger* a *Aspergillus aureus*.<sup>[45]</sup> Riboflavin je zde však vázán do buněk a za normálních okolností se nemůže vyloučit. Novou éru výzkumu odstartoval objev Yamasakiho a Yositoma.<sup>[46]</sup> Ti zjistili, že butanolacetonové bakterie dokážou za určitých podmínek syntetizovat velké množství volného riboflavinu, který se uvolňuje do okolí. Po přidání některých solí ( $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{BaCO}_3$ ) se zvýšila schopnost bakterie tvořit riboflavin asi 88krát. Problém nastal v přítomnosti většího množství železa, které způsobilo prudké snížení výtěžků.<sup>[45]</sup>

## 1.4 VITAMÍN B<sub>6</sub>

Názvem pyridoxin (dříve také adermin) jsou označovány 3 strukturálně příbuzné látky, deriváty 3-hydroxy-5-hydroxymethyl-2-methylpyridinu, které se liší v substituci polohy 4 pyridinového kruhu – *pyridoxol*, též *pyridoxin* (hydroxymethylderivát), *pyridoxal* (formylderivát) a *pyridoxamin* (aminomethylderivát) (viz Obrázek 7).<sup>[2,38]</sup>



**Obrázek 7:** Pyridoxol = pyridoxin (vlevo), pyridoxal (uprostřed) a pyridoxamin (vpravo)<sup>[2]</sup>

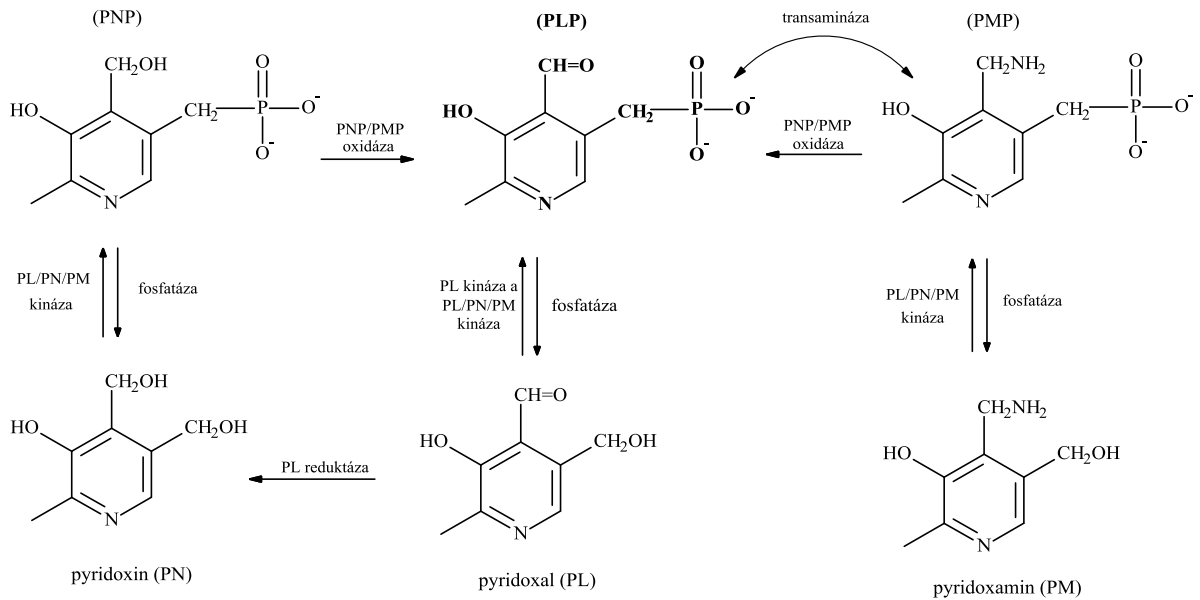
Neznámou účinnou látku pojmenoval v roce 1934 György jako vitamín B<sub>6</sub>, v roce 1938 byl poprvé izolován v krystalické formě Lepkovským a v roce 1939 nezávisle na sobě objasnili chemickou identitu této látky Harris spolu s Folkersem a Kuhn se svým týmem. Ukázalo se, že jde o hydroxylový derivát pyridinu a díky tomu získal své nové pojmenování – *pyridoxol*.

Pozdější studie poukázaly na další dvě sloučeniny s biologickými vlastnostmi podobnými pyridoxinu. Jednalo se o látky *pyridoxal* a *pyridoxamin*. Spolu s pyridoxinem je tato skupina sloučenin též nazývána jako pyridoxinová triáda. Největší zásluhu o rozšíření členů triády měl v letech 1942 – 1944 Snell.<sup>[4,47,48]</sup>

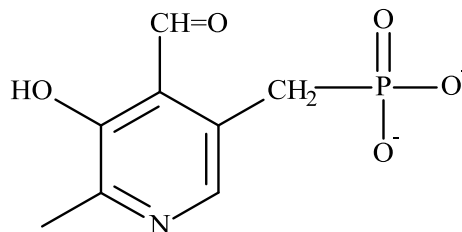
### 1.4.1 Metabolické funkce pyridoxinu

Všech šest vitamerů (PL, PM, PN a jejich estery s kyselinou fosforečnou – PLP, PMP a PNP) má u lidí přibližně ekvivalentní biologickou aktivitu, v důsledku jejich enzymatické konverze (Schéma 5) na pyridoxal-5'-fosfát, jež je metabolicky aktivní formou. PLP (Obrázek 8), nebo též 5'-fosfát pyridoxalu (dříve nazýván jako kodekarboxyláza) je aktivován ve tkáních. Tato látka je kofaktorem dekarboxyláz, aminotransferáz a řady jiných enzymů. Ve srovnání s jinými

vitamíny a prosthetickými skupinami je pyridoxalfosfát poměrně všestranný, pokud jde o reakce, kterých se účastní. PLP je součástí více než 140 enzymů, které jsou potřebné pro syntézu a degradaci aminokyselin.<sup>[2,16,19,49]</sup>



**Schéma 5:** Konverze PN, PNP, PM, PMP a PL na pyridoxal-5'-fosfát<sup>[50,51]</sup>



**Obrázek 8:** Pyridoxal-5'-fosfát<sup>[2]</sup>

Vitamín B<sub>6</sub> je též důležitý pro krvetvorbu (ovlivňuje tvorbu hemu, který je součástí hemoglobinu). Jeho přítomnost v organismu je potřebná i pro transport aminokyselin do buněk, pro správné fungování imunitního systému, vývoj, a psychický a fyzický stav jedince. Tento vitamín hraje roli při přeměně glykogenu na glukózu, čímž se podílí na její regulaci v mozku.<sup>[4,7,49,52]</sup>

### 1.4.2 Vitamín B<sub>6</sub> v potravinách

Vitamín B<sub>6</sub> je v potravinách přítomen hlavně jako pyridoxin (PN), pyridoxal-5'-fosfát (PLP) a pyridoxamin-5'-fosfát (PMP). Různé formy tohoto vitamínu získáváme ve 40 % z masa a výrobků z něj, 27 % ze zeleniny, 12 % z mléka a mléčných výrobků, 10 % z cereálií, 8 % z ovoce a 2 % z vajec.<sup>[2,4,18]</sup>

Mezi potraviny živočišného původu bohaté na pyridoxin se řadí maso, vnitřnosti a vaječný žloutek. V těchto potravinách se vitamín B<sub>6</sub> vyskytuje zejména jako pyridoxal a pyridoxamin ve formě esteru kyseliny fosforečné.<sup>[2]</sup>

Vitamín B<sub>6</sub> obsahují i některé potraviny rostlinného původu, jako např. luštěniny, kapusta, špenát či brambory. V ovoci (maliny, banány, jablka, švestky) a zelenině ho lze nalézt jako pyridoxin a pyridoxal, oba zpravidla vázané na jednoduché cukry (např. glukózu). Tento vitamín je v potravinách rostlinného původu méně biologicky dostupný než u potravin živočišného původu.

Stejně jako ostatní vitamíny B-komplexu, je i tento hojně obsažen v droždí.<sup>[4,53]</sup>

V následující tabulce (Tabulka 3) je uveden přehled obsahu vitamínu B<sub>6</sub> ve vybraných potravinách.

**Tabulka 3:** Obsah vitamínu B<sub>6</sub> ve vybraných potravinách<sup>[21]</sup>

Potravina	mg vitamínu B <sub>6</sub> / 100 g
kravské mléko (plnotučné)	0,06
sýr cheddar	0,15
vejce	0,12
pšeničná mouka (celozrnná)	0,50
pšeničná mouka (bílá)	0,15
hovězí maso (syrové)	0,53
jehněčí maso (syrové)	0,30
játra (jehněčí, smažená)	0,53
vepřové maso (syrové)	0,54
kuřecí maso (syrové)	0,38
brambory	0,44
cizrna	0,53
sójové boby	0,38
hrách	0,12
květák	0,28
banány	0,29
červené fazole	0,40
arašidy	0,59
kvasnicový extrakt	1,60



### 1.4.3 Ztráty při zpracování a skladování potravin

V důsledku rozdílných fyzikálně-chemických vlastností pyridoxinu, pyridoxalu a pyridoxaminu, závisí ztráty především na formě, která v dané potravíně převládá.

Největší zastoupení v potravinách živočišného původu má pyridoxal. Při pečení, grilování a dušení masa dochází k 45 – 70% ztrátám vitamínu B<sub>6</sub>. Úbytek je způsoben nejen vyluhováním, ale i reakcí pyridoxalu s bílkovinami a aminokyselinami.<sup>[4]</sup>

Při tepelném opracování mléka nedochází k tak výrazným ztrátám pyridoxinu, jako při následném skladování, kdy hodnoty úbytku dosahují až 45 %.

Obilniny a cereálie obsahují zejména volný a na glukózu vázaný pyridoxol. Jelikož hlavní příčinou úbytku je vymílání, bude záležet na jeho stupni. Nejvíce vitamínu zůstane ve výrobcích z celozrnné mouky. Při pečení chleba je vitamín B<sub>6</sub> v pšeničné mouce stabilní.<sup>[4,54]</sup>

Přípravu těstovin doprovází vyluhování vitamínu do vody a ztráta, která dosahuje 30 až 50 %. Tepelné zpracování zeleniny (a ovoce) varem a konzervace sterilizací způsobí pokles až o 50 %.<sup>[4]</sup>

Při pětiměsíčním skladování různých potravin při teplotě -18 °C došlo k poklesu celkového vitamínu B<sub>6</sub> o 19 – 60 %. Ztráta byla výrazně vyšší u potravin živočišného původu (v průměru 55 %), než u rostlinných potravin.<sup>[55]</sup>

Vitamín B<sub>6</sub> není citlivý na oxidaci vzduchem a jeho stabilita v potravě při jejím zpracování a skladování závisí do určité míry na tom, jaká forma je v ní obsažena. Pyridoxol je v rozsahu pH, které se obvykle vyskytuje v potravinách, při ohřevu poměrně stabilní, zbylé dvě formy jsou stabilní méně. Hlavní příčina ztrát je, stejně jako u všech ve vodě rozpustných vitamínů, louhování během vaření.<sup>[4,19,56]</sup>

### 1.4.4 Nedostatek vitamínu B<sub>6</sub>

Pyridoxin ovlivňuje mnoho systémů v organismu. Jedním z těch, které trpí při jeho nedostatku, je nervový systém. Vitamín B<sub>6</sub> v tomto systému ovlivňuje tvorbu serotoninu a jiných neurotransmisních látek, jejichž úbytek je často spojován se vznikem depresí. Mezi další projevy nedostatku tohoto vitamínu patří podrážděnost, křeče, zhoršená ostražitost a anémie.

Nedostatek tohoto vitamínu může u žen vyvolat tzv. premenstruační syndrom, který se nejčastěji projevuje depresemi, změnami nálad, nevolností, bolestmi hlavy a únavou.<sup>[4,5,49]</sup>

U lidí trpících alkoholismem je splněn požadavek na energii dodanou do organismu, dochází ale k úbytku přijímané potravy až o 50 %. Díky tomu se u takto nemocných pacientů mohou snadněji vyskytnout projevy nedostatku vitamínu B<sub>6</sub>. Ten totiž alkoholické nápoje prakticky postrádají. Chronické užívání velkého množství alkoholu může mít také za následek narušení normálních procesů metabolismu vitamínu B<sub>6</sub> a vylučování jeho nefosforylovaných forem močí.<sup>[16,57,58]</sup>

#### **1.4.5 Referenční příjem pyridoxinu**

Denní požadované množství na vitamín B<sub>6</sub> se zvyšuje s příjmem bílkovin (maso, mléko, vejce, atd.). Doporučená dávka na den se pro kojence pohybuje v rozmezí 0,3 – 0,6 mg, pro děti 0,6 – 1,2 mg, pro mladistvé 1,5 – 1,7 mg, pro dospělé 1,8 – 1,9 mg a pro těhotné a kojící ženy 2,5 mg.<sup>[7]</sup>

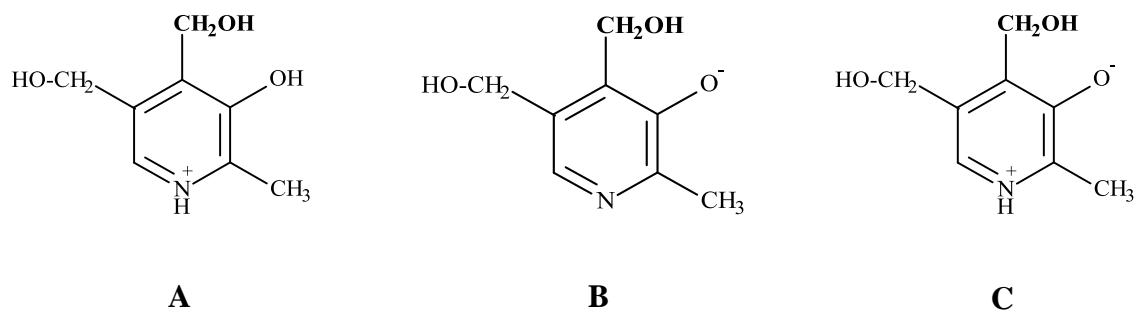
#### **1.4.6 Vlastnosti pyridoxinu**

Hydrochlorid pyridoxinu je bílý krystalický prášek se slanou chutí, který nemá žádný zápach. Teplota tání se pohybuje v rozmezí 204 až 208 °C. Je snadno rozpustný ve vodě (1 g / 5 ml), mírně rozpustný v ethanolu (1 g / 100 ml) a velmi málo rozpustný v diethyletheru a chloroformu.

V případě pyridoxal hydrochloridu se jedná o béžový prášek, jehož teplota tání se pohybuje okolo 165 °C (za rozkladu). Je dobře rozpustný ve vodě a 95% ethanolu.

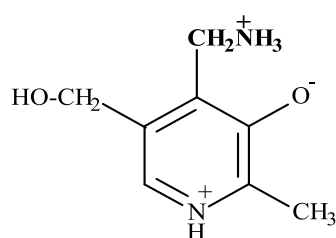
Pyridoxamin dihydrochlorid má vzhled bílé krystalické látky a lze ho bez potíží rozpustit ve vodě a 95% ethanolu. Taje při teplotě 226 až 227 °C, kdy současně podléhá rozkladu.

Ve vodných roztocích existují vitamery B<sub>6</sub> v různých rovnovážných stavech v závislosti na pH. Pyridoxin existuje jako kation v kyselých roztocích, jako anion v alkalických roztocích a především jako elektricky neutrální amfiont při neutrálním pH (viz Obrázek 9).<sup>[16,59,38]</sup>



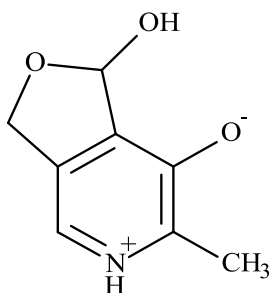
**Obrázek 9:** Pyridoxin ve formě kationtu (A), aniontu (B) a amfiontu (C)<sup>[16]</sup>

Pyridoxamin také existuje jako kation v kyselých roztocích a anion v alkalických roztocích, ale při neutrálním pH je přítomna forma amfiontu s volným kladným nábojem (viz Obrázek 10).



**Obrázek 10:** Pyridoxamin ve formě amfiontu s volným kladným nábojem<sup>[16]</sup>

Situace s pyridoxalem je komplikovanější kvůli možnosti tvorby hemiacetalu, nebo hydratace. Při neutrálním pH je převládající formou pyridoxalu hemiacetalový amfiont (viz Obrázek 11).<sup>[16]</sup>



**Obrázek 11:** Pyridoxal ve formě hemiacetalového amfiontu<sup>[16]</sup>

Stabilita různých forem vitamínu B<sub>6</sub> se liší. V roztocích pyridoxinu chráněných před světlem, udržovaných při teplotě 40 – 60 °C a v rozmezí pH 4 – 7 se neprojeví žádné významnější ztráty. Poměrně citlivý na světlo je však v alkalických a neutrálních roztocích. V případě pyridoxaminu dochází za stejných podmínek k rostoucím ztrátám při zvyšujícím se pH, zatímco obsah pyridoxalu vykazuje značný pokles pod pH 5, ale pouze mírné změny nad touto hodnotou pH. Pyridoxin je nejvíce a pyridoxamin nejméně stabilní z těchto tří vitamérů po vystavení jejich vodných roztoků světlu při různých hodnotách pH.<sup>[60-62]</sup>

## 1.4.7 Výroba vitamínu B<sub>6</sub>

### 1.4.7.1 Pyridoxin

Do dnešní doby bylo vyvinuto 5 principiálně odlišných cest k získání pyridoxin hydrochloridu. Každý z těchto postupů má několik možných variant.

Poprvé byl PN syntetizován rozkladem substituovaných chinolinů a isochinolinů (Schéma 6). Tento způsob je však velmi náročný, kvůli omezené dostupnosti výchozí látky a ekonomicky nákladné redukci meziprojektu s dvěma karboxylovými skupinami na pyridoxin.<sup>[14,63]</sup>

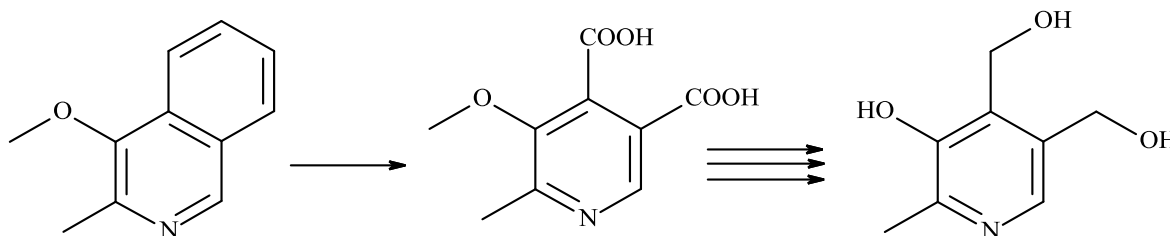
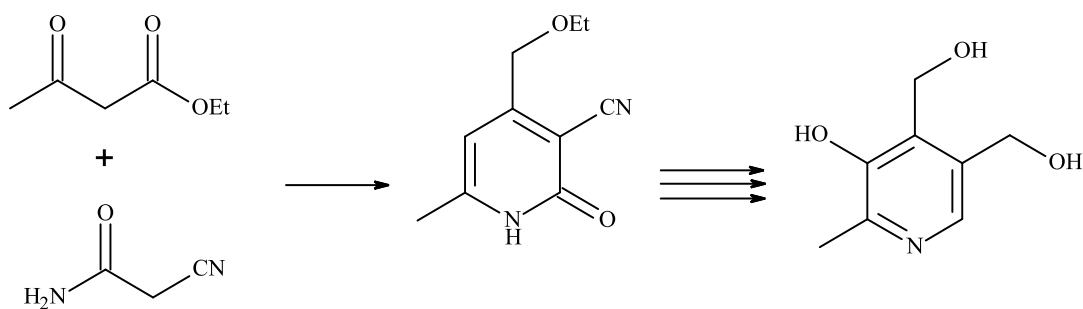


Schéma 6: Syntéza pyridoxinu rozkladem isochinolinů<sup>[14]</sup>

První komerční příprava vycházela z alifatických sloučenin – acetoctanu ethylnatého a kyanoacetamidu, nebo malononitrilu (Schéma 7).<sup>[14,64]</sup>

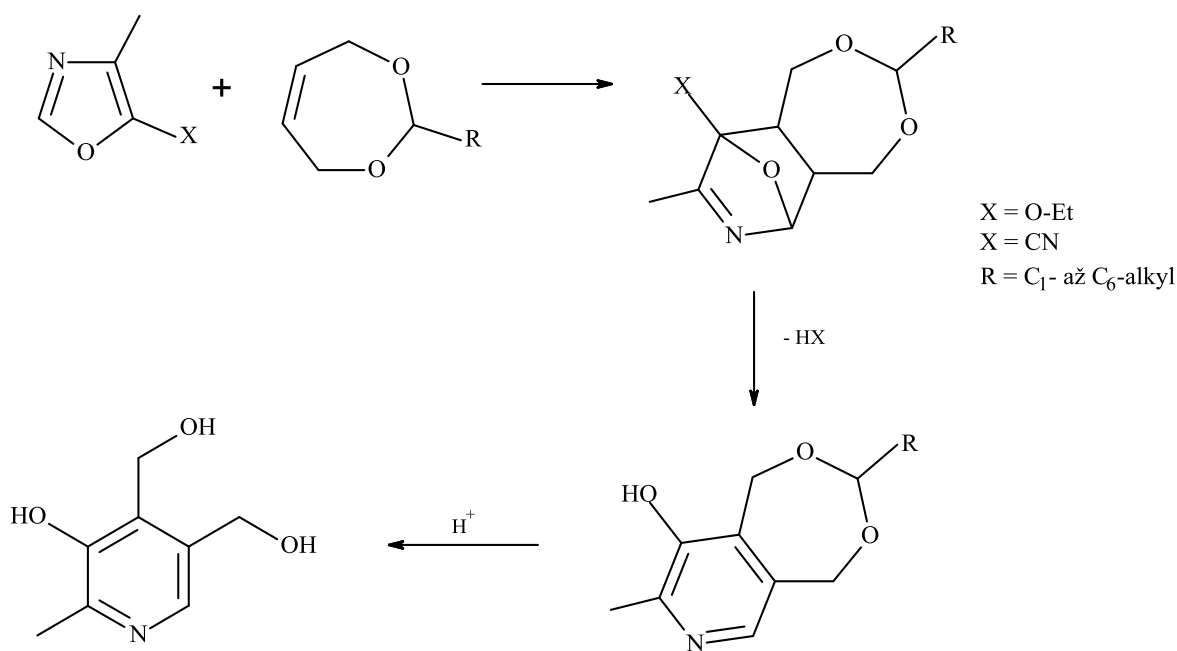


**Schéma 7:** Syntéza pyridoxinu z acetocianu ethylnatého a kvanoacetamidu<sup>[14]</sup>

Další možnou metodou k získání pyridoxinu je využití Diels-Alderovy reakce. Od 60. let je používána vesměs všemi výrobci vitamínu B<sub>6</sub>.

Výchozí látkou může být buď 5-ethoxy-4-methyloxazol, nebo např. poněkud levnější 4-methyl-5-kyanooxazol. Oxazol je podroben reakci s 2-alkyl-4,7-dihydro-1,3-dioxepinem, po eliminaci HX (ethanol, nebo HCN) a následném okyselení je získán požadovaný produkt (Schéma 8).

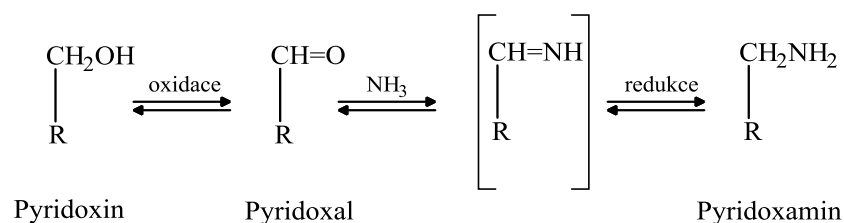
Současné komerční syntézy prováděné velkými společnostmi jsou při tomto postupu odlišné právě díky použití různých derivátů oxazolu – výrobci z Asie používají jako reaktant ethoxyoxazol, výrobci z Evropy naopak kvanooxazol.<sup>[14,65]</sup>



**Schéma 8:** Syntéza pyridoxinu pomocí Diels-Alderovy reakce<sup>[14]</sup>

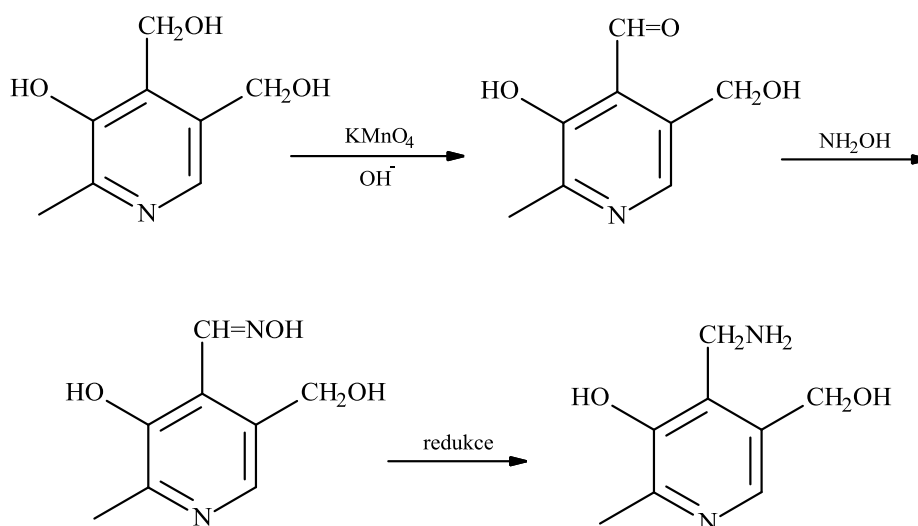
### 1.4.7.2 Pyridoxal a pyridoxamin

Tyto dvě látky poprvé připravil E. E. Snell, když při svých experimentech zahříval pyridoxin s amoniakem a oxidem mangančitým v autoklávu. Výsledná směs obsahovala substance, které měly výrazně vyšší aktivitu než samotný pyridoxin. Produkt oxidace Snell pojmenoval pyridoxal, a produkt aminace pyridoxamin (Schéma 9).<sup>[48,66]</sup>



**Schéma 9:** Zjednodušené schéma přeměny pyridoxinu na pyridoxal a pyridoxamin<sup>[48]</sup>

Další kdo provedl přeměnu PN na PL a PM byly pánové Harris, Heyl a Folkers. Pyridoxal byl v tomto případě připraven opatrnou oxidací pyridoxinu pomocí KMnO<sub>4</sub> v alkalickém prostředí, následnou reakcí PL s hydroxylaminem byl získán oxim, který po katalytické redukci poskytl pyridoxamin (Schéma 10).<sup>[67]</sup>



**Schéma 10:** Tvorba pyridoxalu a pyridoxaminu z pyridoxinu<sup>[67]</sup>

## 1.5 STANOVENÍ VITAMÍNŮ

Pro chemiky byly vitamíny vždy velkou výzvou. Jelikož jsou v potravinách, tkáních a tělních tekutinách přítomny ve velmi malém množství (řády  $\mu\text{mol/kg}$ , či dokonce  $\text{pmol/kg}$ ), jejich analýza může být mnohdy velmi složitá kvůli přítomnosti velkého množství dalších sloučenin, které mohou zasahovat do chemických analýz.

Původní metodou stanovení vitamínů byly biologické testy, které zpočátku vyžadovaly drahé, dlouhodobé a vyčerpávající experimenty se zvířaty. Později se přešlo k použití různých mikroorganismů s definovanými požadavky. Tyto mikrobiologické testy se v dnešní době stále běžně využívají, například testy vyvinuté ve 40. letech 20. století zůstávají oficiálními metodami ke stanovení vitamínu B<sub>6</sub>, kyseliny pantothenové, kyseliny listové a vitamínu B<sub>12</sub>.

Biologické testy s potkany, kuřaty a dalšími zvířaty jsou mnohdy stále nezbytné, jelikož jsou přímým prostředkem k určování biologické aktivity vitamínu. Tyto testy navíc mohou napomáhat k objevování vitamínových analogů, které by mohly mít potenciální terapeutický účinek.<sup>[1,16]</sup>

Přítomnost chemické formy většiny vitamínů lze nyní určit s velkou přesností a specifičností pomocí technik HPLC, často s minimální potřebou extrahovat stanovovanou látku z komplexu biologického materiálu. Nicméně, každá hodnota získaná z chemické analýzy potravin je pouze nepřímý odhad, který může být chybný, zejména v případě dosud nestudovaných potravin. Velkou nevýhodou analytických technik prováděných *in vitro* je skutečnost, že nezohledňují složité trávení a absorpci v organismu savců. Tím pádem nejsou schopny přesně určit biologickou dostupnost vitamínů (zejména pokud jsou vitamíny vázány k ostatním složkám potravinové matrice).<sup>[1,16,17,19]</sup>

Laboratoře, které rutinně určují hodnoty různých vitamínů v potravinách, často využívají mikrobiologických testů. Ty jsou založeny na existenci speciálních kmenů bakterií, které ztratí schopnost vytvářet konkrétní vitamín. Tyto kmeny jsou získány vystavením ozařování nebo mutagenním chemikáliím. Míra růstu bakterií v kultuře, kde byl použit tento speciálně připravený kmen, pak závisí na tom, kolik vitamínu je přidáno z extraktu vzorku potravin či ze standardního roztoku používaného pro srovnání. Chemické laboratoře bohužel nejsou dostatečně technicky vybavené na tento druh zkoušek, a proto jsou tyto testy prováděny pouze ve specializovaných zařízeních.<sup>[19,45]</sup>

## 1.5.1 Stanovení vitamínu B<sub>1</sub>

Je samozřejmě problém najít způsob měření koncentrace určité chemické látky, která může být přítomna pouze jako jedna část z milionu v tak komplexní matrici, jako je jídlo. Hlavní technikou používanou pro stanovení je HPLC, kde se využívá UV/VIS detekce thiaminu, nebo fluorescenční detekce thiochromu. Použití společné extrakce navíc umožňuje stanovení jak thiaminu, tak riboflavinu pomocí HPLC, a to buď současně, nebo postupně.<sup>[16]</sup>

### 1.5.1.1 Spektrální metody

#### 1.5.1.1.1 Spektrofotometrické stanovení

Moderní, citlivou metodu, při které se využívá leukokrystalové violeti, představila Barbara Szpikowska-Sroka. Thiamin byl při ní podroben oxidaci s jodičnanem draselným za vzniku bezbarvého produktu a jodidových iontů, které v kyselém prostředí (HCl) zreagovaly s přebytkem jodičnanu. Vzniklý jód následně oxidoval leukokrystalovou violet' na fialové barvivo, pro které byla zaznamenávána absorpce záření při 589 nm (pH 4,1 ± 0,1). Tímto postupem byl úspěšně stanoven vitamín B<sub>1</sub> ve farmaceutických přípravcích.<sup>[68]</sup>

#### 1.5.1.1.2 Fluorimetrické stanovení

V roce 1935 bylo zjištěno, že pokud se thiamin podrobí reakci s mírným oxidačním činidlem, vznikne silně fluoreskující, biologicky neaktivní sloučenina, která byla nazvána "thiochrom" (viz str. 28, Obrázek 3). K uvolnění thiaminu do roztoku z okolní matrice bylo třeba potravinu zahřát ve zředěném roztoku kyseliny a následně enzymaticky štěpit. Po zfiltrování se roztok vedl přes kolonu se speciálně připraveným křemičitanem, který absorboval kationty, včetně thiaminu. Kolona byla následně promývána horkým koncentrovaným roztokem chloridu draselného, což vedlo k vytěsnění thiaminu a jeho zachycení v eluátu, ke kterému byl přidán alkalický roztok ferrikyanidu (hexakynoželezitanu), zajišťující oxidaci vitamínu na thiochrom. Po vytřepání thiochromu do isobutylalkoholu byla měřena intenzita emitovaného modrého světla pomocí fluorimetru (pro excitaci je využita vlnová délka 375 nm, emise je sledována při 435 nm).<sup>[12,16,17,19,22,69]</sup>



### **1.5.1.2 Chromatografické stanovení**

V současné době se ke stanovení thiaminu využívá převážně metoda HPLC. Postup použitelný pro thiamin v potravinách byl vyvinut v 80. letech.<sup>[70,71]</sup> V první řadě je nutné vitamín extrahovat zředěnou HCl a defosforylovat pomocí enzymů, následuje převedení thiaminu na thiochrom oxidací, ke které může docházet před chromatografickou separací, nebo později mezi kolonou a detektorem. Většina postupů využívá kolony se systémem s obrácenými fázemi (jako stacionární fázi lze použít např. oktadecylsilikagel), nebo kolony s činidly tvořícími iontové páry s kladně nabitým atomem dusíku v molekule thiaminu. V současnosti je obvykle upřednostňována fluorescenční detekce.<sup>[16,17,19,22,27,70-72]</sup>

### **1.5.1.3 Mikrobiologické testy**

Testy na thiamin tradičně používají druhy *Lactobacillus viridescens*, který je preferován, či *Lactobacillus fermenti*. Jedná se o specifický a vysoce spolehlivý test, kdy se detekované množství může pohybovat až v řádu nanogramů.

Baker společně se svými kolegy vyvinul alternativní, vysoce citlivý a specifický test založený na druhu *Ochromonas danica*. Využívá se pro stanovení thiaminu v krvi.<sup>[70,73]</sup>

Míra růstu bakterií se stanovuje nefelometrickým či turbidimetrickým měřením. Mikrobiologické metody jsou pomalu nahrazovány rychlejšími instrumentálními technikami, stále se však využívají díky své jednoduchosti a vysoké citlivosti.<sup>[22]</sup>

### **1.5.1.4 Stanovení pomocí elektromigračních technik**

Vidal-Valverde a Diaz-Pollán ve svých člancích popisují metodu stanovení thiaminu v mase<sup>[74]</sup> a mléce<sup>[75]</sup> pomocí micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC). Separační pufr tvořil tetraboritan sodný, dihydrogenfosforečnan sodný, dodecylsírán sodný a isopropylalkohol. Ideální podmínky analýzy byly při teplotě 50 °C a napětí 15 kV. Metoda využívala UV detekci (sledování absorpce při 254 nm). Bylo zjištěno, že výsledky získané touto metodou jsou srovnatelné s HPLC, avšak meze detekce při použití MEKC jsou přibližně 100x vyšší.<sup>[16,74]</sup>

Mrestani a Neubert vyvinuli metodu využívající CE s vysoce citlivou detekční celou (Z-cela), díky které lze stanovit thiamin v moči, slinách a plazmě. Moč bylo možno předložit do přístroje po jejím naředění vodou, u vzorků plazmy bylo nutné vysrážet proteinovou složku. Dobrých výsledků bylo dosaženo i při zředění vzorku acetonitrem. Použitím kapiláry s vysoce citlivou detekční celou se oproti standardním kapilárám zlepšil detekční limit přibližně 9x. Pro analýzu byl použit 10 mM fosfátový pufr a aplikované napětí mělo hodnotu 30 kV.<sup>[76]</sup>

Metoda kapilární zónové elektroforézy, kterou navrhli Shabangi a Sutton, umožňuje separaci a stanovení thiaminu a jeho esterů s kyselinou fosforečnou. Jako pufr byl použit roztok kyseliny borité s tetraboritanem sodným (pH 8,24), bylo aplikováno napětí 30 kV a detekce byla provedena pomocí UV detektoru. Měření probíhalo při teplotě 25 °C.<sup>[77]</sup>

### **1.5.2 Stanovení vitamínu B<sub>2</sub>**

Při provádění fyzikálně-chemických nebo mikrobiologických testů na vitamín B<sub>2</sub> je nezbytné uvolnit flaviny z jejich spojení s proteiny a v dalším kroku je zcela převést FAD na FMN. Oba tyto požadavky lze provést (pro nekovalentní vazbu flavinů) autoklávováním vzorků potravin při teplotě 121 °C po dobu 30 minut se zředěnými minerálními kyselinami (např. HCl) při pH nižším než 3.

Obvykle je nutné určit celkový obsah vitamínu B<sub>2</sub>, který je definován v nutričním kontextu jako součet FAD, FMN a riboflavinu. Aktuální techniky pro určení celkového vitamínu B<sub>2</sub> jsou lumiflavinová metoda, mikrobiologické stanovení a stanovení pomocí HPLC s fluorimetrickou detekcí. Při vysokých koncentracích vitamínu ve vzorku je možné využít i polarografické techniky.<sup>[16,78]</sup>

#### ***1.5.2.1 Spektrální metody***

##### ***1.5.2.1.1 Přímé fluorimetrické stanovení***

Nejprve je nutné uvolnit veškerý vitamín z potravinové matrice kyselou a enzymatickou hydrolyzou pomocí H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a takadiastázy. Stanovení se následně provádí ve slabě kyselém prostředí, na základě přirozené žlutozelené fluorescence riboflavinu při 464 nm (excitace zářením o vlnové délce 362 nm).<sup>[38,78]</sup>

#### 1.5.2.1.2 Lumiflavinová metoda

Jedná se o vysoce citlivou metodu, s jejíž pomocí lze stanovit množství 0,05 až 1 µg v 1 ml extraktu získaného ze vzorku. Principem je fotolýza riboflavinu v alkalickém prostředí za vzniku lumiflavinu. Ten je následně extrahován do chloroformu a stanoven na základě měření intenzity zeleného fluorescenčního záření (excitace při 435,8 nm, emise při 525 nm). Celé stanovení je nutné provádět s minimálním přístupem světla kvůli možnému rozpadu riboflavinu před samotnou analýzou.<sup>[78,79]</sup>

#### 1.5.2.2 Chromatografické stanovení

Metoda HPLC umožňuje buď samostatnou detekci riboflavinu, FAD a FMN, nebo analýzu, při které jsou tyto tři formy stanovovány současně. I v tomto případě je nutno pracovat pod tlumeným světlem a se zatmaveným nádobím.

Nejčastěji používané jsou systémy s reverzními fázemi, kde je jako stacionární fáze využíván oktadecylsilikagel a jako mobilní fáze roztoky na bázi vody, methanolu, či acetonitrilu. Pro detekci je upřednostňováno měření fluorescence. Absorpce záření vitamínem při 440 nm je totiž doprovázena emisí záření o vlnové délce 525 nm.

Před samotnou analýzou je třeba upravit vzorek zředěnou kyselinou chlorovodíkovou při vysoké teplotě, účelem je uvolnění riboflavinu z proteinů, na které je zpravidla vázán.<sup>[19,79]</sup>

#### 1.5.2.3 Mikrobiologické testy

Pro test na riboflavin se používají bakterie kmene *Lactobacillus casei*, podruh *rhamnosus*. Jedná se o jednu z nejspřávnějších metod stanovení riboflavinu. Je možné využít i další mikroorganismy, jako např. *Enterococcus faecalis*, nebo *Leuconostoc mesenteroides*. Míra růstu bakterií je úměrná množství riboflavinu v použitém médiu a lze ji měřit pomocí turbidimetrie.<sup>[19,45,79]</sup>

#### ***1.5.2.4 Stanovení s využitím elektromigračních separačních technik***

Cataldi spolu se svými kolegy stanovil optimální podmínky pro kvantifikaci riboflavinu, flavinmononukleotidu (FMN) a flavinadeninukleotidu (FAD) v běžných vzorcích potravin (např. víno, mléko a jogurt) pomocí kapilární zónové elektroforézy (CZE) s využitím nepokrytých křemenných kapilár a laserem indukované fluorescenční detekce (LIF). Citlivost detektoru je o dva nebo tři řády vyšší než u běžného fluorescenčního detektoru, což umožňuje zředění extraktu vzorku a tím i snížení vlivů matrice (např. interference jiných sloučenin schopných fluorescence). Optimální podmínky pro stanovení byly: teplota 15 °C, použití fosfátového pufru o koncentraci 30 mM a pH 9,8 a aplikované napětí 30 kV. Metoda byla použitelná pro stanovení koncentrací riboflavinu v rozmezí 0,5 – 350 µg/l. Detekční limit riboflavinu byl 50 amol, pro FAD a FMN byla tato hodnota vyšší, 300 a 350 amol.<sup>[16,80]</sup>

Pérez-Ruiz spolu s dalšími kolegy provedl úspěšné stanovení RF, FMN a FAD v biologických tkáních různých zvířat. Použitou metodou byla, stejně jako v předchozím případě, kapilární zónová elektroforéza s LIF detekcí. Pro separaci byl použit 50 mM roztok fosfátového pufru o pH 8,5. Analýza probíhala při 25 °C s aplikovaným napětím 14 kV. Detekce fluorescenčního záření probíhala při 520 nm. Detekční limity jednotlivých forem byly u této metody 0,23 nmol/l a nižší.<sup>[81]</sup>

Další metodu, pomocí níž lze stanovit riboflavin, popsali Su a Lin. Jedná se o jednoduchou, levnou a spolehlivou rutinní analýzu pro určení koncentrace RF v moči za pomoci kapilární elektroforézy s (LED)-indukovanou fluorescenční detekcí – CE–LED. Separační pufr (pH 9,25) pro analýzu vzorku moči tvořil směsný roztok H<sub>2</sub>O – CH<sub>3</sub>CN (9 : 1), který navíc obsahoval tetraboritan sodný a dodecylsírán sodný. Separace probíhala při napětí 16 kV. Při použití zdroje záření v podobě diody emitující modré světlo bylo dosaženo detekčního limitu 0,48 µg riboflavinu na ml.<sup>[82]</sup>

Trojice Su, Chang a Lin provedla s metodou CE–LED i analýzu riboflavinu v různých druzích komerčně nabízených piv. Ve 12 analyzovaných vzorcích bylo nalezeno množství v rozmezí 130 – 280 ng riboflavinu na ml.<sup>[83]</sup>

### 1.5.3 Stanovení vitamínu B<sub>6</sub>

Analýza pyridoxinu představuje značné problémy, jelikož získání skutečně spolehlivých údajů je velmi obtížné. Určení jeho obsahu v potravinách není prakticky s využitím chemických analytických postupů možné. U mikrobiologických metod mohou nastat potíže kvůli rozdílné účinnosti jednotlivých forem vitamínu pro různé mikroorganismy. Sloučeniny vitamínu B<sub>6</sub> musí být před vlastní analýzou extrahovány z potravinové matrice za vysoké teploty pomocí kyselin (např. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl).<sup>[19,84]</sup>

#### 1.5.3.1 *Spektrální stanovení*

##### 1.5.3.1.1 *Spektrofotometrické stanovení*

Spektrální metoda, založená na tvorbě modrého zbarvení, které pyridoxin poskytuje po reakci s 2,6-dichlorchinonchlorimidem, je použitelná pouze pro analýzu jednodušších vzorků. Následné měření absorbance je prováděno při vlnové délce 620 nm. Sloučeninami, které ruší stanovení, jsou např. fenoly, thiamin, kreatin a kreatinin.<sup>[78]</sup>

##### 1.5.3.1.2 *Fluorimetrické stanovení pyridoxalu*

Metoda spočívá v převedení pyridoxalu na lakton kyseliny 4-pyridoxinové pomocí kyanidu draselného v OH<sup>-</sup> prostředí. Tento postup je vhodný pro zjištění množství pyridoxalu v sušeném mléce. Pro měření je využívána excitační vlnová délka 365 nm a emisní vlnová délka 465 nm. V kombinaci s přečištěním extraktů na ionexu lze dosáhnout spolehlivějších výsledků.<sup>[78]</sup>

#### 1.5.3.2 *Chromatografické stanovení*

Pomocí HPLC je možné současně měřit na úrovni nanogramů všechny formy vitamínu B<sub>6</sub>, které mohou být přítomny v potravinářském extraktu. Pro běžné jídlo je obvyklé hydrolyzovat fosforylované formy a následně určit množství PN, PL a PM. Výsledek tím pádem představuje součet fosforylovaných a nefosforylovaných forem. Čím dál více preferovanou se stává metoda, kdy jsou veškeré přítomné formy vitamínu B<sub>6</sub> převedeny na PN. Detekce je nejčastěji

prováděna pomocí fluorescenčního detektoru. Zvýšení přesnosti lze dosáhnout použitím vnitřního standardu (4-deoxypyridin).<sup>[16,84]</sup>

### **1.5.3.3 Mikrobiologický test**

Celková aktivita vitamínu B<sub>6</sub> v potravinách se obvykle odhaduje mikrobiologicky turbidimetrickým kvasinkovým testem za účasti *Saccharomyces uvarum* (dříve nazývaných *S. carlsbergensis*). Možné je i použití *Streptococcus faecalis*, kdy je sledován PL a PM, a *Lactobacillus casei*, který reaguje pouze na PL. Před samotným mikrobiologickým testem je nutné u přítomných forem provést defosforylaci. PN, PL a PM od sebe mohou být odděleny pomocí katexové chromatografie na pryskyřici Dowex, při třech různých hodnotách pH. Modernější inovací je radiometrický mikrobiologický test s využitím kvasinek *Kloeckera brevis* (dříve *K. apiculata*).<sup>[16,84]</sup>

### **1.5.3.4 Stanovení s využitím elektromigračních separačních technik**

Burton a Sepaniak ve svém článku popsali separaci a stanovení šesti vitamerů B<sub>6</sub> pomocí MEKC. Jako mobilní fáze byl při tomto experimentu použit roztok obsahující dodecylsírán sodný (0,05 M), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,01 M), Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (0,006 M) a destilovanou vodu. Křemenné kapiláry byly modifikovány tenkou vrstvou polyimidu. Bylo aplikováno napětí o velikosti 30 kV a laserem indukovaná fluorescenční detekce byla zajišťována při vlnové délce 430 nm. Eluce látek probíhala v pořadí: PM, PL, PN, kyselina pyridoxinová, PMP a PLP. Retenční čas PLP bylo možno snížit použitím vyššího napětí.<sup>[85]</sup>

Klampfl a Vo se ve své studii zabývali porovnáním různých CZE metod s kyselými a bazickými elektrolytovými systémy v kombinaci s několika detekčními postupy (přímá a nepřímá UV detekce, MS detekce). Sledovanými látkami byly aminokyseliny a vitamín B<sub>6</sub> přítomné v infúzních roztocích. Jako nejvhodnější pro stanovení přítomných aminokyselin a vitamínu B<sub>6</sub> v reálném vzorku se jevil postup, ve kterém byla použita přímá UV detekce (při 195 nm) a kyselý elektrolyt tvořený roztokem na bázi H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, který obsahuje vhodné množství alkylsulfonátu (pH roztoku bylo upraveno pomocí LiOH na hodnotu 2,2). Navržená metoda vykazovala dobrou citlivost vůči vitamínu B<sub>6</sub>.<sup>[86]</sup>

## 1.5.4 Vybraná společná stanovení některých vitamínů

### 1.5.4.1 Spektrální metody

#### 1.5.4.1.1 Simultánní fluorimetrické stanovení thiaminu, riboflavinu a pyridoxinu

García, Blázquez, San Andrés a Vera studovali možnost synchronního fluorimetrického stanovení těchto vitamínů v přítomnosti micel bis-2-ethylhexylsulfosukcinátu sodného (AOT). Micely byly při fluorescenčním stanovení použity za účelem zvýšení citlivosti a potlačení vlivů kyslíku. Vitamíny B<sub>2</sub> a B<sub>6</sub> jsou schopny přirozené fluorescence, v případě thiaminu bylo nutné převedení na thiochrom pomocí alkalického hexakvanoželezitanu. Hodnoty detekčních limitů po proměření standardů byly 12 µg/l pro thiamin, 9 µg/l pro riboflavin a 10 µg/l pro pyridoxin. Metoda byla následně úspěšně aplikována při analýze léčiv s obsahem těchto ve vodě rozpustných vitamínů.<sup>[87]</sup>

### 1.5.4.2 Chromatografické metody

#### 1.5.4.2.1 Stanovení hydrofilních a lipofilních vitamínů kapalinovou chromatografií

Klejdus, Petrlová a kolegové ve své studii popsali simultánní stanovení vitamínů ve farmaceutických přípravcích, multivitaminových instantních směsích a potravinách s poměrně složitými maticemi pomocí HPLC s obrácenými fázemi za použití lineární gradientové eluce. Mobilní fáze byla tvořena 0,01% kyselinou trifluoroctovou o pH 3,9 (rozpouštědlo A) a methanolem (rozpouštědlo B). Gradient začínal s poměrem složek 95 : 5 (A:B) a byl 4 minuty neměnný. Během dalších 6 minut lineárně klesl až na poměr 2 : 98 a toto složení zůstalo konstantní pro dalších 20 minut měření. Nakonec došlo během posledních 5 minut analýzy k růstu gradientu na původní poměr 95 : 5. K detekci při vlnové délce 280 nm bylo využito diodové pole. Získané hodnoty odpovídaly deklarovaným obsahům jednotlivých vitamínů.<sup>[88]</sup>

Moreno a Salvadó ve své studii popsali separaci a stanovení vybraných vitamínů rozpustných ve vodě a v tucích. Jednalo se o analýzu thiaminu, FMN, nikotinamidu, pyridoxinu, kyanokobalaminu, retinol-palmitátu, cholekalciferolu a  $\alpha$ -tokoferol-acetátu v multivitaminových doplňcích stravy. V prvním kroku byly vitamíny rozpustné v tucích extrahovány na sorbent obsahující skupiny C<sub>18</sub>. Vitamíny rozpustné ve vodě byly analyzovány

na koloně Nova-Pak C<sub>18</sub> za použití směsi 0,05 M octanu amonného (rozpouštědlo A) s methanolem (rozpouštědlo B) jako mobilní fáze v režimu gradientové eluce. UV detekce byla měřena při 270 nm (u vitamínu B<sub>12</sub> při 362 nm). Následně bylo provedeno postupné uvolnění vitamínů rozpustných v tucích z pevné fáze pomocí methanolu a chloroformu. Analýza uvolněných vitamínů probíhala v isokratickém režimu s mobilní fází tvořenou směsí CH<sub>3</sub>OH – CH<sub>3</sub>CN (95 : 5), na stejné koloně jako v případě vitamínů hydrofilních. Při analýze reálných vzorků, které obsahovaly jak vitamíny rozpustné ve vodě, tak vitamíny rozpustné v tucích, byla k detekci použita vlnová délka 285 nm. Detekční limity měřených vitamínů se pohybovaly v rozmezí 0,05 mg/l (D<sub>3</sub>) – 9,92 mg/l (B<sub>3</sub>).<sup>[89]</sup>

#### *1.5.4.2.2 Analýza hydrofilních vitamínů pomocí HILIC*

V článku z roku 2009 představil Karatapanis a kolegové analýzu ve vodě rozpustných vitamínů (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> (amid i kyselina), B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub> a B<sub>12</sub>) metodou chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC) s detekcí diodovým polem při 272 nm. Stanovení bylo prováděno na HILIC-diol koloně s koncovými fritami a mobilní fáze byla tvořena směsí CH<sub>3</sub>CN – H<sub>2</sub>O (90 : 10), která dále obsahovala 10 mM octan amonný a 20 mM triethylamin (pH 5). Izokratickou analýzou bylo dosaženo separace pouze 6 vitamínů, zatímco gradientovou elucí bylo možno stanovit všech 8. Výhodou byla skutečnost, že vysoce polární sloučeniny (kyselina askorbová a nikotinová) eluovaly při vyšších retenčních časech oproti eluci blízké mrtvému retenčnímu času, která je pro ně typická u HPLC s obrácenými fázemi. Pro urychlení analýzy bylo nutné aplikovat minimálně třikrát větší průtok, než byl původní 0,8 ml/min. HILIC metoda byla úspěšně použita při analýze doplňků stravy a energetických nápojů.<sup>[90]</sup>

#### *1.5.4.3 Elektrochemické stanovení vitamínů*

Siddiqui a Pitre použili pro stanovení vitamínu B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> a B<sub>6</sub> ve farmaceutických přípravcích metodu DC a diferenční pulzní polarografie. Všechny zmíněné vitamíny byly na povrchu kapající rtuťové elektrody (DME) snadno redukovatelné.

Thiamin poskytoval dobře definovanou vlnu s půlvlnným potenciálem  $E_{1/2} = -1,2$  V a potenciálem píku  $E_p = -1,22$  V proti nasycené kalomelové elektrodě v roztoku 0,1 M KCl o pH 5,2. Do reversibilního elektrodového procesu se zapojil jeden elektron.



Pro riboflavin byly nalezeny dvě odlišné vlny v Britton-Robinsonově pufru. Hodnoty půlvlnného potenciálu a potenciálu píku byly  $E_{1/2} = -0,13$  a  $E_p = -0,34$  V (při pH 1,8) a  $E_{1/2} = -1,10$  V a  $E_p = -1,2$  V (při pH 6,5), v obou případech oproti nasycené kalomelové elektrodě. Jednalo se o reversibilní redukční vlny. Elektrodového děje se účastnil jeden (v prvním případě) a dva elektrony (v druhém případě).

U pyridoxinu byla zaznamenána reversibilní vlna v Britton-Robinsonově pufru o pH 6,5. Hodnota půlvlnného potenciálu  $E_{1/2} = -1,7$  V a potenciálu píku  $E_p = -1,68$  V byla naměřena proti nasycené kalomelové elektrodě. Do elektrodového děje se zapojil pouze jeden elektron.

Výsledky ukázaly, že pro stanovení vitamínů ve vzorcích je přesnější DC polarografie, jelikož metoda diferenčně pulzní polarografie byla silně ovlivněna přítomností rušivých sloučenin, jejichž signály byly v těsné blízkosti signálů vitamínů.<sup>[91]</sup>

#### ***1.5.4.4 Stanovení pomocí elektromigračních separačních technik***

##### ***1.5.4.4.1 Stanovení ve vodě rozpustných vitamínů metodou MEKC***

Postup, který navrhl Schreiner se svými dvěma kolegy, je vhodný pro určení množství thiaminu, riboflavinu, pyridoxinu, kyseliny pantothenové, nikotinamidu a kobalaminu v různých nealkoholických nápojích a potravinových doplňcích během jedné analýzy. Všechna měření byla provedena pomocí elektroforetického přístroje s UV detekcí (při 214 nm). Pro separaci při 23 °C byl použit borátový pufr (pH 8,5), který obsahoval SDS jako surfaktant. Aplikované napětí mělo hodnotu 30 kV. Po analýze standardů byly pro jednotlivé vitamíny získány následující detekční limity: thiamin – 0,25 µg/ml, riboflavin – 0,06 µg/ml, pyridoxin 0,07 µg/ml, nikotinamid – 0,25 µg/ml, kobalamin – 0,30 µg/ml a pantothenát – 2,00 µg/ml. Metoda poskytuje rychlou, jednoduchou a levnou alternativu k jiným technikám (např. HPLC). Nevýhodou však je, že není vhodná pro všechny typy vzorků.<sup>[92]</sup>

Sánchez a kol. ve svém článku popsali stanovení ve vodě rozpustných vitamínů pomocí MEKC. Jako surfaktant byl testován dodecylsírán sodný (SDS) a cetyltrimethylamonium chlorid (CTAC). Všechna měření probíhala za teploty 25 °C, při napětí 15 kV. UV detekce byla provedena při 254 nm. Bylo zjištěno, že CTAC neplnil funkci surfaktantu příliš dobře, jelikož nebyl schopen od sebe oddělit nikotinamid, pyridoxin a kobalamin. Při použití SDS byly od sebe vitamíny odlišeny a bylo možno je kvantifikovat.<sup>[93]</sup>

Ong, Ng, Lee a Li ve svém článku z roku 1991 představili stanovení pomocí MEKC, kde byl jako součást elektroforetického média, kromě SDS, použit jako modifikátor  $\gamma$ -cyklodextrin, který umožnil zvýšení selektivity. Tato metoda byla použita pro stanovení 7 vitamínů rozpustných ve vodě (kromě jiných i B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> a B<sub>6</sub>) a 2 vitamínů rozpustných v tucích (A a E) v jedné analýze. Experiment probíhal v křemenné kapiláře pokryté vrstvou polyimidu. Jako elektrolyt pro separaci posloužila směs 0,1 M tetraboritanu sodného a 0,05 M dihydrogenfosforečnanu sodného (pH 7,6) s přidavkem 3 mM  $\gamma$ -cyklodextrinu a 30 mM SDS. Bylo aplikováno napětí 20 kV. UV detekce byla zaznamenávána při 210 nm. Bylo zjištěno, že hydrofilní vitamíny migrují mnohem rychleji než vitamíny rozpustné v tucích.<sup>[94]</sup>

#### *1.5.4.4.2 Stanovení vybraných hydrofilních vitamínů pomocí CZE*

Huopalahti a Sunell ve své studii popsali společné stanovení thiaminu, riboflavinu, pyridoxalu, pyridoxinu a pyridoxaminu pomocí kapilární zónové elektroforézy. Vitamíny byly roztokem HCl uvolněny z multivitaminových tablet a následně analyzovány na elektroforetickém přístroji s UV detektorem. Pro experiment bylo aplikováno napětí 6 kV, jako elektrolyt byl použit 0,02 M roztok fosfátového pufru o pH 9 a samotná detekce probíhala při 254 nm.<sup>[95]</sup>

Fotsing a kol. vyvinul CZE metodu umožňující kvantitativní analýzu šesti vitamínů (thiaminu, riboflavinu, nikotinamidu, pyridoxinu, kyseliny pantothenové a kyseliny askorbové) obsažených ve farmaceutických přípravcích. K měření byl použit elektroforetický přístroj s nepokrytými křemennými kapilárami a UV detekcí. Separace byla provedena pomocí 50 mM borátového pufru o pH 8,5, při teplotě 25 °C a napětí 25 kV. Pro thiamin, riboflavin, nikotinamid a kyselinu askorbovou byla detekce prováděna při vlnové délce 225 nm, pro pyridoxin a kyselinu pantothenovou při 215 nm. Problém však nastal v případě nikotinamidu, který při těchto podmínkách nemohl být oddělen od kyanokobalaminu (při tomto pH jsou oba bez náboje). Řešením bylo přidání dodecylsírany sodného (25 mM) do separačního pufru a převedení celé metody do režimu MEKC.<sup>[96]</sup>

Franco, Jasionowska a Salvatore představily metodu pro stanovení vybraných vitamínů B-komplexu ve farmaceutických a veterinárních přípravcích. Analýza pro thiamin, TMP, riboflavin, FMN, nikotinamid (vitamín B<sub>3</sub>), pantothenát vápenatý (vitamín B<sub>5</sub>), pyridoxin, kyselinu listovou (vitamín B<sub>9</sub>) a 4-aminobenzoovou (vitamín B<sub>10</sub>) probíhala při teplotě 25 °C. Jako základní elektrolyt byl použit 20 mM roztok borátového pufru o pH 9,2 a napětí bylo

nastaveno na 20 kV. Separace probíhala v nepokrytých křemenných kapilárách. Detekce byla zprostředkována diodovým polem a probíhala při 214 nm pro všechny analyzované látky, kromě vitamínu B<sub>5</sub> (při 190 nm) a FMN (260 nm). Detekční limity látek se pohybovaly v rozmezí 0,9 – 9,0 µg/ml.<sup>[97]</sup>

#### *1.5.4.4.3 Separace a stanovení vitamínů B<sub>2</sub> a B<sub>6</sub> s využitím metody CZE-CCD*

Priego-Capote a Luque de Castro ve svém článku z roku 2005 prezentovali metodu kapilární zónové elektroforézy s CCD detekcí (spočívá v přeměně energie dopadajícího fluorescenčního záření vitamínů na energii elektrického signálu) pro stanovení riboflavinu, FAD, FMN, pyridoxinu, pyridoxaminu, pyridoxalu a pyridoxal-5'-fosfátu. Pufrem, určeným pro separaci, byl 30 mM roztok KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> upravený kyselinou mravenčí na pH 8,5. Do systému bylo aplikováno napětí 25 kV při teplotě 35 °C. Spolu s CCD detekcí poskytující trojrozměrné elektroforeogramy byla při analýze testována i detekce pomocí fotonásobiče, při které ovšem nebylo dosaženo takového rozlišení. Metoda byla díky rychlosti analýzy a výborné přesnosti navržena pro klinickou rutinní analýzu.<sup>[98]</sup>

#### *1.5.4.4.4 ITP analýza ve vodě rozpustných vitamínů*

Röben a Rubach představili rychlou a přesnou izotachoforetickou analýzu vybraných hydrofilních vitamínů ve vzorcích multivitaminových doplňků. Největší nevýhodou této metody je, že vitamíny není možné stanovit společně, jelikož v jedné analýze může probíhat separace buď kationtů, nebo aniontů (podle použitého vedoucího a koncového elektrolytu). Samotný experiment probíhal na dvou izotachoforetických přístrojích s teflonovými kapilárami (délka 23 a 43 cm). Ty byly vybaveny vodivostním a UV detektorem, nebo teplotním a UV detektorem. UV detekce v obou případech zaznamenávala absorpci při vlnové délce 254 nm. Byly popsány 3 elektrolytové systémy vhodné ke stanovení hydrofilních vitamínů skupiny B (Tabulka 4). Použití jednotlivých systémů se odvíjelo od chemické struktury stanovovaných látek. Zlepšení kvality záznamů bylo docíleno přidáním hydroxypropylmethylcelulózy (HPMC) do roztoku vedoucího elektrolytu. Po interpretaci izotachoforeogramů byly získány hodnoty, které přibližně odpovídaly deklarovanému množství uvedenému výrobcem.<sup>[99]</sup>

**Tabulka 4:** Volba elektrolytového systému podle chemické struktury vitamínu  
(označení (+) značí kationt, (-) značí aniont)<sup>[99]</sup>

Stanovovaný vitamín	Elektrolytový systém
<b>THIAMIN (+)</b>	<b>L:</b> 20 mM CH <sub>3</sub> COOK / CH <sub>3</sub> COOH (pH 4,95) <b>T:</b> 20 mM kyselina $\gamma$ -aminomáselná / CH <sub>3</sub> COOH (pH 4,73)
<b>PYRIDOXIN (+)</b>	
<b>PYRIDOXAL (+)</b>	
<b>PYRIDOXAMIN (+)</b>	
<b>NIKOTINAMID (+)</b>	<b>L:</b> 20 mM CH <sub>3</sub> COOK / CH <sub>3</sub> COOH (pH 4,95) <b>T:</b> 10 mM $\beta$ -alanin / HCl (pH 1,8)
<b>KYSELINA NIKOTINOVÁ (-)</b>	<b>L:</b> 10 mM HCl / ammediol (pH 8,95) <b>T:</b> 20 mM $\beta$ -alanin / Ba(OH) <sub>2</sub> (pH 10,00)
<b>RIBOFLAVIN-5'-FOSFÁT SODNÝ (-)</b>	

Jastrzębska, Kowalska a Szlyk stanovovali vitamín B<sub>1</sub> a pyridoxin ve vzorcích piva odebraných z vybraných procesů vaření pomocí dvoukolonové ITP s vodivostní detekcí. Jako vedoucí elektrolyt byl použit 10 mM roztok octanu sodného, jehož pH bylo upraveno pomocí kyseliny octové na hodnotu 5,0. Pro zlepšení tvaru záznamů byla do leadingu přidána 1% hydroxyethylcelulóza. Koncovým elektrolytem byla 10 mM kyselina  $\epsilon$ -aminokapronová (pH 6,0). Proud v předseparační koloně (průměr 0,8 mm, délka 90 mm) byl nastaven na hodnotu 250  $\mu$ A a během detekce byl snížen na 200  $\mu$ A. V analytické koloně (průměr 0,3 mm, délka 180 mm) měl proud hodnotu 150  $\mu$ A, s následným poklesem na 50  $\mu$ A při detekci.<sup>[62]</sup>

Petra Offizorz spolu s Klausem Rubachem provedli separaci a následné stanovení čtyř ve vodě rozpustných vitamínů (thiaminu, pyridoxinu, pyridoxalu a nikotinamidu) pomocí jedné ITP analýzy. Použitým vedoucím elektrolytem byl 10 mM roztok acetátu draselného (pH 4,0 – 5,5) a mravenčanu draselného (pH 3,5 – 4,0), koncovým elektrolytem byl  $\beta$ -alanin. Při separaci byly použity látky (např. diethanolamin, arginin a kyselina  $\epsilon$ -aminokapronová), které napomáhají rozdělení jednotlivých vitamínů kationtového typu. Pyridoxal bylo možné stanovit až po jeho redukci na pyridoxin s využitím NaBH<sub>4</sub>. UV detekce absorbovaného záření byla u všech stanovovaných látek prováděna při vlnové délce 254 nm. Analýza čtyř vitamínů probíhala při 200  $\mu$ A přibližně 20 minut.<sup>[100]</sup>

#### *1.5.4.4.5 Stanovení thiaminu a pyridoxinu pomocí kombinace ITP s MS*

Tomáš spolu s kolegy provedli spojení izotachoforézy s MS s iontovou pastí. Princip spočíval v oddělení složek vzorku do zón a následném přenosu směrem k hmotnostnímu spektrometru. Spojovací kapilára sloužila také jako vstup vzorku pro elektrosprejovou ionizaci.

Nově vzniklá konstrukce byla testována při stanovení vitamínů v tabletách B-komplexu a v krvi. Touto metodou byly zjišťovány hladiny thiaminu a pyridoxinu. Jako vedoucí elektrolyt byl použit 10 mM roztok octanu amonného (pH 7,8) a jako koncový elektrolyt 20 mM roztok kyseliny octové (pH 3,5). Oba tyto roztoky byly kompatibilní s ionizací pomocí elektrospreje.<sup>[101,102]</sup>

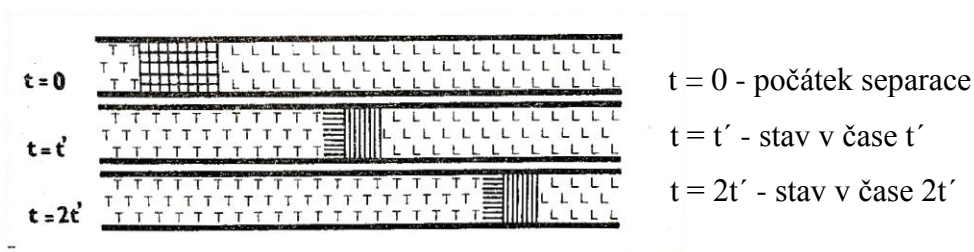
## **2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## 2.1 POUŽITÁ METODA

Izotachoforéza (ITP) se řadí mezi analytické separační techniky. Umožňuje analyzovat vzorky ionogenních látek v roztoku a získat snadno vyhodnotitelné údaje (kvalitativní i kvantitativní) za poměrně krátkou dobu.

Jedná se o elektroforetickou techniku, která spočívá v migraci nabitých částic v elektrickém poli. Jednotlivé složky vzorku migrují za sebou stejnou rychlostí (odtud název izo-tacho) a jsou rozděleny do ostře ohraničených, stabilních zón.

Následující ilustrace (Obrázek 12) vyobrazuje izotachoforetickou separaci látek. Vzorek je dávkován mezi zóny dvou pomocných elektrolytů – vedoucího (L) a koncového (T), kdy musí platit následující vztah mezi jednotlivými elektroforetickými pohyblivostmi složek:  $\mu_L > \mu_i > \mu_T$  ( $\mu_i$  značí pohyblivost zkoumané látky). Po ukončení separace obsahuje každá ze zón kromě protiiontu pouze ionty jedné látky. Izotachoforetická analýza umožňuje v jednom experimentu stanovovat buď anionty, nebo kationty. Současně totiž mohou být separovány pouze látky migrující jedním směrem. Po připojení zdroje proudu směsná zóna migruje kapilárou, dochází k jejímu zkracování a zároveň prodlužování zón čistých látek.<sup>[103-105]</sup>



Obrázek 12: Schéma izotachoforetické separace látek<sup>[103]</sup>

## 2.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

V Tabulce 5 je uveden přehled všech chemikálií, které byly při vypracování práce použity.

**Tabulka 5:** Použité chemikálie

Chemikálie	Čistota	Výrobce
Kyselina octová 99,8 %	p. a.	Penta
Octan draselný	p. a.	Lachema
Thiamin hydrochlorid	≥ 99 %	Sigma Aldrich
Pyridoxin hydrochlorid	≥ 98 %	Sigma Aldrich
Pyridoxal hydrochlorid	≥ 99 %	Sigma Aldrich
Pyridoxamin dihydrochlorid	≥ 98 %	Sigma Aldrich
Hydroxid sodný	p. a.	Penta

### 2.3 ANALYZOVANÉ VZORKY

V Tabulce 6 je uveden seznam všech vzorků, které byly analyzovány.

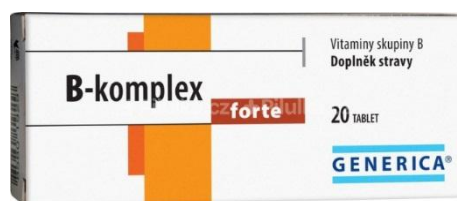
**Tabulka 6:** Přehled vzorků

Číslo vzorku	Název vzorku	Výrobce	Země původu
1	B-komplex GENERICA	Generica	Slovensko
2	Thiamin	Generica	Slovensko
3	Pyridoxin	Generica	Slovensko
4	Imunofit ŠKODA	JuWital	Česká republika
5	B-komplex FORTE	Dr. Max Pharma	UK
6	B-komplex ZENTIVA	Zentiva	Česká republika

U vzorku č. 1 (Obrázek 13) bylo výrobcem uvedeno následující složení: objemová činidla (hydrogenfosforečnan vápenatý dihydrát, mikrokrytalická celulóza, maltodextrin, kroskaramelóza, polydextróza), nikotinamid, D-pantothénát vápenatý, thiamin mononitrát,



pyridoxin hydrochlorid, riboflavin, kyanokobalamin, protihrudkující látky (stearan hořečnatý, mastek, hypromelóza), barviva (oxid titaničitý, oxidy železa), kyselina listová, D-biotin.



**Obrázek 13:** VZOREK č. 1: B-komplex GENERICA

Dostupné z: <https://www.pilulka.cz/data/images/preview/5/68165.jpg>

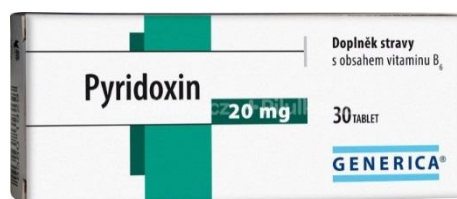
Výrobce deklarované složení ve vzorku č. 2 (Obrázek 14) bylo následující: objemová činidla (kalcium fosfát dihydrát, mikrokrystalická celulóza, kroskaramelóza), thiamin hydrochlorid, protihrudkující látka (stearan hořečnatý).



**Obrázek 14:** VZOREK č. 2: Thiamin

Dostupné z: <https://www.pilulka.cz/data/images/preview/1/68181.jpg>

Ve vzorku č. 3 (Obrázek 15) výrobce uvedl toto složení: objemová činidla (dihydrogenfosforečnan vápenatý dihydrát, mikrokrystalická celulóza, kroskaramelóza), pyridoxin hydrochlorid, protihrudkující látka (stearan hořečnatý).



**Obrázek 15:** VZOREK č. 3: Pyridoxin

Dostupné z: <https://www.pilulka.cz/data/images/product-detail/7/68167.jpg>

Pro vzorek č. 4 (Obrázek 16) výrobce na obale deklaroval toto složení: sušené pivovarské kvasnice (*Saccharomyces cerevisiae*), L-askorbová kyselina, mléčnan zinečnatý, DL- $\alpha$ -tokoferyl-acetát, nikotinamid, Juwim<sup>®</sup> (směs esenciálních aminokyselin, oligopeptidů, RNA, DNA), glukonan měďnatý, thiamin hydrochlorid, riboflavin, pyridoxin hydrochlorid,  $\beta$ -karoten, seleničitan sodný, biotin, kyanokobalamin, kapsle (želatina, oxid titaničitý, fosforečnany hořečnaté).



**Obrázek 16:** VZOREK č. 4: Imunofit ŠKODA

(Autor fotografie: Michaela Frühbauerová)

Pro vzorek č. 5 (Obrázek 17) bylo výrobcem deklarované složení následující: plnidlo (mikrokrytalická celulóza, polyvinylpyrrolidon), nikotinamid, pantothenát vápenatý, thiamin nitrát, riboflavin, pyridoxin hydrochlorid, protihrudkující látka (stearan hořečnatý, oxid křemičitý), biotin, potah tablety (hydroxypropylmethylcelulóza, polyvidon, oxid titaničitý, mastek, polyethylenglykol, oxidy železa).



**Obrázek 17:** VZOREK č. 5: B-komplex FORTE

Dostupné z: <https://www.drmax.sk/images/catalog-fullsize/17/40/1/160331-dr.max-b-komplex-forte.jpg>

U vzorku č. 6 (Obrázek 18) bylo uvedeno toto výrobcem deklarované složení: thiamin hydrochlorid, riboflavin, pyridoxin hydrochlorid, pantothenát vápenatý, nikotinamid, přídavné látky (monohydrát laktózy, kukuřičný škrob, želatina, stearan vápenatý, mastek), potahová vrstva (sacharóza, tuk z ovčí vlny (lanolin), oxid titaničitý, sodná sůl karamelózy, tekutý parafín, oxid křemičitý, žlutková žluť, bílý vosk, karnaubský vosk).



**Obrázek 18:** VZOREK č. 6: B-komplex ZENTIVA

Dostupné z: <https://www.lekarnaave.cz/pharmdata/obrazek.php?apa=2215656>

## 2.4 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

### 2.4.1 Standardní roztoky jednotlivých vitamínů

#### 2.4.1.1 *Thiamin*

##### 2.4.1.1.1 *0,01 M roztok thiaminu*

Navážka 0,1686 g thiamin hydrochloridu byla převedena do 50ml odměrné baňky a doplněna destilovanou vodou po rysku.

##### 2.4.1.1.2 *0,001 M roztok thiaminu*

Na analytických vahách bylo odváženo 0,0337 g thiamin hydrochloridu, který byl následně kvantitativně převeden do 100ml odměrné baňky. Roztok byl doplněn po rysku destilovanou vodou.

#### *2.4.1.1.3 0,0004 M roztok thiaminu*

20 ml 0,001 M roztoku thiaminu (příprava je popsána v kapitole 2.4.1.1.2) bylo převedeno do odměrné baňky o objemu 50 ml. Celý roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

#### *2.4.1.1.4 0,0001 M roztok thiaminu*

5 ml 0,001 M roztoku thiaminu (jeho příprava je popsána v kapitole 2.4.1.1.2) bylo převedeno do 50ml odměrné baňky. Roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

### **2.4.1.2 Pyridoxin**

#### *2.4.1.2.1 0,01 M roztok pyridoxinu*

Navážka 0,1028 g pyridoxin hydrochloridu byla převedena do 50ml odměrné baňky a doplněna destilovanou vodou po rysku.

#### *2.4.1.2.2 0,001 M roztok pyridoxinu*

0,0206 g pyridoxin hydrochloridu bylo kvantitativně převeden do 100ml odměrné baňky. Roztok byl doplněn po rysku destilovanou vodou.

#### *2.4.1.2.3 0,0004 M roztok pyridoxinu*

20 ml 0,001 M roztoku pyridoxinu (příprava je popsána v kapitole 2.4.1.2.2) bylo převedeno do odměrné baňky o objemu 50 ml. Celý roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

#### *2.4.1.2.4 0,0001 M roztok pyridoxinu*

Z 0,001 M roztoku pyridoxinu (příprava je popsána v kapitole 2.4.1.2.2) bylo do odměrné baňky o objemu 50 ml odebráno 5 ml. Roztok byl následně doplněn destilovanou vodou po rysku.

### **2.4.1.3 Pyridoxal**

#### *2.4.1.3.1 0,01 M roztok pyridoxalu*

Navážka 0,1018 g pyridoxal hydrochloridu byla převedena do 50ml odměrné baňky a doplněna destilovanou vodou po rysku.

#### *2.4.1.3.2 0,001 M roztok pyridoxalu*

Na analytických vahách bylo odváženo 0,0204 g pyridoxal hydrochloridu. Navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 100 ml. Roztok byl doplněn po rysku destilovanou vodou.

#### *2.4.1.3.3 0,0004 M roztok pyridoxalu*

20 ml 0,001 M roztoku pyridoxalu (příprava je popsána v kapitole 2.4.1.3.2) bylo převedeno do odměrné baňky o objemu 50 ml. Celý roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

#### *2.4.1.3.4 0,0001 M roztok pyridoxalu*

Ze standardního roztoku pyridoxalu o koncentraci 0,001 M (příprava je popsána v kapitole 2.4.1.3.2) bylo odebráno 5 ml do 50ml odměrné baňky. Roztok byl následně doplněn destilovanou vodou po rysku.

### **2.4.1.4 Pyridoxamin**

#### *2.4.1.4.1 0,01 M roztok pyridoxaminu*

Navážka 0,1206 g pyridoxamin dihydrochloridu byla převedena do 50ml odměrné baňky a doplněna destilovanou vodou po rysku.

#### *2.4.1.4.2 0,001 M roztok pyridoxaminu*

Navážka 0,0241 g pyridoxamin dihydrochloridu byla kvantitativně převedena do 100ml odměrné baňky. Roztok byl následně doplněn destilovanou vodou po rysku.

#### *2.4.1.4.3 0,0004 M roztok pyridoxaminu*

20 ml 0,001 M roztoku pyridoxaminu (příprava je popsána v kapitole 2.4.1.4.2) bylo převedeno do odměrné baňky o objemu 50 ml. Celý roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

#### *2.4.1.4.4 0,0001 M roztok pyridoxaminu*

Do 50ml odměrné baňky bylo napipetováno 5 ml standardního roztoku pyridoxaminu o koncentraci 0,001 M (příprava je popsána v kapitole 2.4.1.4.2). Roztok byl doplněn na požadovaný objem destilovanou vodou.

## 2.4.2 Příprava roztoků ke kalibraci

### 2.4.2.1 Thiamin

0,3448 g thiamin hydrochloridu bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 100 ml. Roztok byl doplněn po rysku destilovanou vodou. Připravený roztok byl dále ředěn 1000x, 400x, 200x, 100x, 50x, 25x. V následující tabulce (Tabulka 7) jsou uvedeny koncentrace jednotlivých kalibračních roztoků.

Tabulka 7: Koncentrace kalibračních roztoků thiaminu

Ředění	Koncentrace [mg/l]	Koncentrace [μmol/l]
1000x	3,45	10,20
400x	8,62	25,60
200x	17,24	51,10
100x	34,48	102,20
50x	68,96	204,50
25x	137,92	408,90

### 2.4.2.2 Pyridoxin

Na analytických vahách bylo odváženo 0,2152 g pyridoxin hydrochloridu. Navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 100 ml a roztok byl následně doplněn po rysku destilovanou vodou. Takto připravený roztok byl dále ředěn 1000x, 400x, 200x, 100x, 50x, 25x. V Tabulce 8 jsou uvedeny koncentrace jednotlivých kalibračních roztoků.

**Tabulka 8:** Koncentrace kalibračních roztoků pyridoxinu

<b>Ředění</b>	<b>Koncentrace [mg/l]</b>	<b>Koncentrace [μmol/l]</b>
1000x	2,15	10,46
400x	5,38	26,16
200x	10,76	52,32
100x	21,52	104,65
50x	43,04	209,30
25x	86,08	418,60

#### **2.4.2.3 Pyridoxal**

Navážka 0,2172 g pyridoxal hydrochloridu byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 100 ml a roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku. Tento roztok byl dále ředěn 1000x, 400x, 200x, 100x, 50x, 25x. V následující tabulce (Tabulka 9) jsou uvedeny koncentrace jednotlivých kalibračních roztoků.

**Tabulka 9:** Koncentrace kalibračních roztoků pyridoxalu

<b>Ředění</b>	<b>Koncentrace [mg/l]</b>	<b>Koncentrace [μmol/l]</b>
1000x	2,17	10,66
400x	5,43	26,67
200x	10,85	53,29
100x	21,70	106,57
50x	43,40	213,14
25x	86,80	426,28

#### 2.4.2.4 Pyridoxamin

Do 100ml odměrné baňky bylo kvantitativně převedeno 0,2896 g pyridoxamin dihydrochloridu. Roztok byl destilovanou vodou doplněn na požadovaný objem. Takto připravený roztok byl dále ředěn 1000x, 400x, 200x, 100x, 50x, 25x. V Tabulce 10 jsou uvedeny koncentrace jednotlivých kalibračních roztoků.

**Tabulka 10:** Koncentrace kalibračních roztoků pyridoxaminu

Ředění	Koncentrace [mg/l]	Koncentrace [μmol/l]
1000x	2,90	12,03
400x	7,24	30,03
200x	14,48	60,06
100x	28,96	120,11
50x	57,92	240,22
25x	115,84	480,44

#### 2.4.3 Příprava roztoků vzorků

Kromě vzorků, které jsou uvedeny níže, bylo stanovováno množství vitamínů i v šumivých multivitaminových tabletách. Analýza však byla neúspěšná, jelikož tablety obsahovaly značné množství sodíku a po celou dobu analýzy byla zaznamenávána pouze jeho zóna.

##### 2.4.3.1 Vzorek č. 1: B-komplex *GENERICA*

Tableta vzorku byla rozdrcena v achátové třecí misce pomocí tloučku a kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 50 ml. Bylo přidáno malé množství roztoku hydroxidu sodného pro lepší rozpouštění kyseliny listové, která byla ve vzorku přítomna. Celá směs byla následně doplněna po rysku destilovanou vodou. Pro analýzu thiaminu byl vzorek zředěn 60x a pro analýzu pyridoxinu 100x.



#### **2.4.3.2 Vzorek č. 2: Thiamin**

Tableta vzorku byla rozdracena v achátové třecí misce pomocí tloučku a kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 50 ml. Obsah baňky byl následně doplněn po rysku destilovanou vodou. Takto připravený roztok byl před analýzou 10x zředěn.

#### **2.4.3.3 Vzorek č. 3: Pyridoxin**

V achátové třecí misce byla pomocí tloučku rozdracena tableta vzorku. Po kvantitativním převedení do 50 ml odměrné baňky byla směs doplněna po rysku destilovanou vodou. Takto připravený roztok byl před analýzou 10x zředěn.

#### **2.4.3.4 Vzorek č. 4: Imunofit ŠKODA**

Obsah dvou kapslí vzorku byl vsypán do kádinky, ze které byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 50 ml. Do roztoku bylo přidáno malé množství roztoku hydroxidu sodného, které napomohlo lepšímu rozpouštění přítomné kyseliny listové. Celá směs byla následně doplněna po rysku destilovanou vodou. Takto připravený roztok byl dále 5x ředěn.

#### **2.4.3.5 Vzorek č. 5: B-komplex FORTE**

Tableta vzorku byla rozdracena v achátové třecí misce pomocí tloučku a kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 50 ml. Rozpustnost kyseliny listové přítomné ve vzorku se podpořila přidavkem malého množství roztoku hydroxidu sodného. Celá směs byla následně doplněna destilovanou vodou po rysku. Takto připravený roztok byl před analýzou 10x zředěn.

#### **2.4.3.6 Vzorek č. 6: B-komplex ZENTIVA**

V třecí misce byly pomocí tloučku rozdraceny dvě tablety vzorku, které byly následně převedeny do odměrné baňky o objemu 50 ml. Ve vzorku byla přítomna kyselina listová, jejíž rozpustnost se zvýšila po přidavku malého množství roztoku hydroxidu sodného. Roztok vzorku byl doplněna po rysku destilovanou vodou. Takto připravený roztok byl dále 5x ředěn.

## 2.5 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ

Elektroforetický/izotachoforetický analyzátor EA 102, Villa Labeco, Slovensko

pH-metr Sentron SI400 7400-010, SENTRON, Nizozemsko

Analytické váhy KERN ABT 120-4M, KERN & SOHN GmbH., Německo

Ultrazvuková lázeň K2, KRAINTEK s. r. o., Slovensko

Magnetická míchačka s ohřevem, Fisher Scientific, ČR

Pipety Finnpiette (Labsystems) a BIOHIT Proline

Achátová třecí miska s tloučkem

Laboratorní nádobí

### 2.5.1 Elektroforetický / izotachoforetický analyzátor EA 102

Jedná se o dvoukolonový přístroj, do kterého je vzorek dávkován pomocí dávkovacího kohoutu, jehož objem činí 30  $\mu\text{l}$ . Předseparační kolona má průměr 0,8 mm a délku 90 mm, analytická kolona má průměr 0,3 mm a délku 160 mm. Objem předseparační kolony je přibližně 100  $\mu\text{l}$ , objem analytické kolony je asi 10  $\mu\text{l}$ .

U přístroje je používána vodivostní detekce. Nastavení analýzy a její vyhodnocení se provádí pomocí počítače v programu ITPPro.

#### 2.5.1.2 Pracovní podmínky ITP analýzy

Při měření jednotlivých roztoků byl hnací proud v předseparační koloně nastaven na hodnotu 300  $\mu\text{A}$ , pro analytickou kolonu byl tento proud snížen na 80  $\mu\text{A}$ .

Každé měření trvalo přibližně 35 minut a většinou probíhalo v obou kolonách.

## 2.6 ELEKTROLYTOVÝ SYSTÉM

**Vedoucí elektrolyt:** Směs 0,02 M CH<sub>3</sub>COOK + CH<sub>3</sub>COOH (pH = 5,0)

0,4907 g CH<sub>3</sub>COOK bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 250 ml a doplněno destilovanou vodou po rysku. Připravený roztok byl vlit do kádinky s míchadlem. Po malých objemech byla za míchání přidávána 1 M CH<sub>3</sub>COOH do doby, než se hodnota na displeji pH metru ustálila na čísle 5,0.

Pro stanovení závislosti relativní výšky signálu (RSH) vitamínů na pH vedoucího elektrolytu byly stejným způsobem připraveny elektrolyty o pH 4,0; 4,2; 4,4; 4,6 a 4,8.

**Koncový elektrolyt:** 0,02 M CH<sub>3</sub>COOH

Do 100ml odměrné baňky byly odpipetovány 2 ml kyseliny octové ze zásobního roztoku, jehož koncentrace byla 1 mol/l. Roztok v baňce byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

## 2.7 VYHODNOCENÍ EXPERIMENTÁLNÍCH DAT

Při vyhodnocení získaných dat byla využita hodnota RSH neboli relativní výška signálu, která se zjišťuje podle následujícího vzorce:

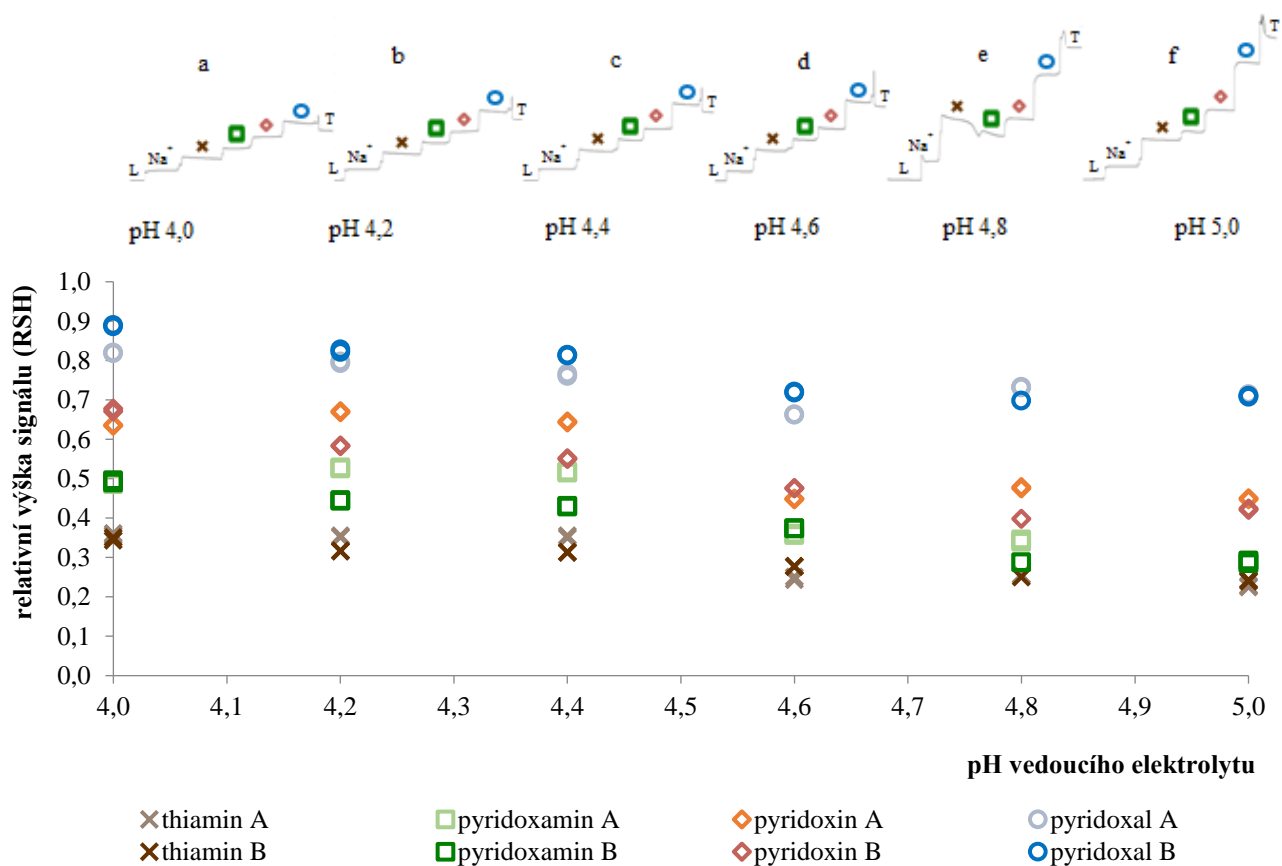
$$RSH = \frac{S - L}{T - L} \times 100$$

Písmeno **S** značí velikost signálu analyzovaného iontu, **T** odpovídá velikosti signálu koncového elektrolytu a **L** velikosti signálu vedoucího elektrolytu.

### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

#### 3.1 VLIV pH VEDOUČÍHO ELEKTROLYTU NA SEPARACI LÁTEK

Zásadní pro stanovení byla volba vhodného elektrolytového systému. Analýza vitamínů byla prováděna za použití vedoucích elektrolytů o pH 4,0 – 5,0 (Graf 1). Měření **A** u každého vitamínu představovalo samostatné stanovení, bez přítomnosti dalších vitamínů. Měření **B** bylo uskutečňováno vždy pro celou vitamínovou směs. Následující graf zobrazuje vliv pH vedoucího elektrolytu na separaci jednotlivých vitamínů.



**Graf 1:** Vliv pH vedoucího elektrolytu na separaci vybraných vitamínů (nad grafem je pro každou zkoušenou hodnotu pH vedoucího elektrolytu k nahlédnutí izotachoforetický záznam vitamínů ve směsi (a-f))

(A – samostatné měření, B – měření vitamínové směsi, L – vedoucí elektrolyt, T – koncový elektrolyt)

Je patrné, že nejvhodnějším systémem pro analýzu je elektrolytový systém s vedoucím elektrolytem o pH 5,0, jelikož samostatné měření a měření ve směsi zde poskytovalo nejmenší rozdíly RSH, současně jsou zóny jednotlivých vitamínů dobře rozlišené a nacházejí se mezi

zónami vedoucího a koncového elektrolytu (izotachoforeogram k nahlédnutí v Příloze (Obrázek 19)). Ve všech následně prováděných stanoveních byl proto jako vedoucí elektrolyt použit roztok 0,02 M CH<sub>3</sub>COOK, jehož pH bylo nastaveno přidavkem 1 M CH<sub>3</sub>COOH na hodnotu 5,0. Jako koncový elektrolyt byla použita 0,02 M CH<sub>3</sub>COOH.

## 3.2 PARAMETRY STANOVENÍ

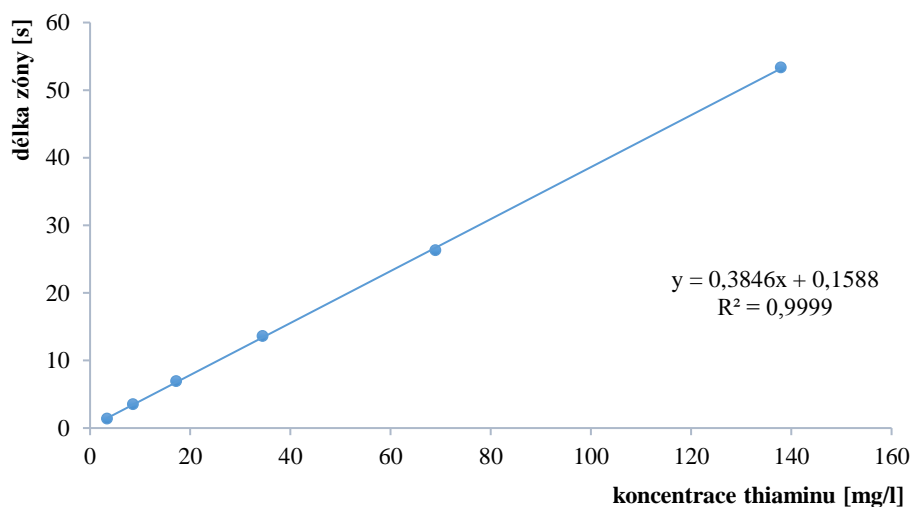
### 3.2.1 Kalibrační závislosti jednotlivých vitamínů

#### 3.2.1.1 Thiamin

Byla proměřena řada standardů thiaminu. Údaje o koncentracích a jim odpovídajících délkách zón jsou uvedeny v Tabulce 11. Kalibrační závislost je uvedena v Grafu 2.

Tabulka 11: Délky zón standardů thiaminu

Koncentrace [mg/l]	Délka zóny [s]		Průměr [s]	Odchylka [s]
3,45	1,37	1,39	1,38	0,01
8,62	3,44	3,57	3,51	0,09
17,24	6,90	6,95	6,93	0,04
34,48	13,60	13,62	13,61	0,01
68,96	26,31	26,25	26,28	0,04
137,92	53,45	53,20	53,33	0,18



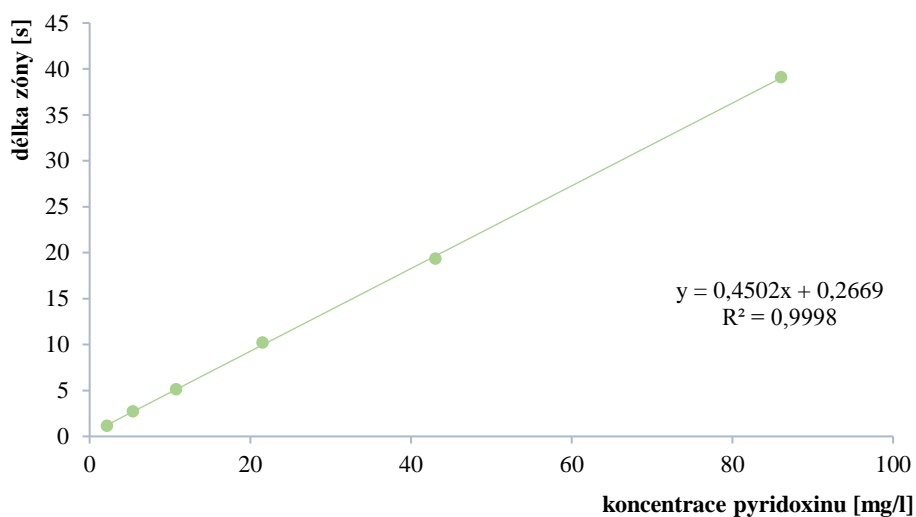
Graf 2: Závislost délky zóny na koncentraci thiaminu

### 3.2.1.2 Pyridoxin

Byla proměřena řada standardů pyridoxinu. Údaje o koncentracích a jim odpovídajících délkách zón jsou uvedeny v Tabulce 12. Kalibrační závislost tohoto vitamínu je uvedena v Grafu 3.

**Tabulka 12:** Délky zón standardů pyridoxinu

Koncentrace [mg/l]	Délka zóny [s]		Průměr [s]	Odchylka [s]
2,15	1,17	1,14	1,16	0,02
5,38	2,71	2,70	2,71	0,01
10,76	5,17	5,11	5,14	0,04
21,52	10,24	10,16	10,20	0,06
43,04	19,40	19,26	19,33	0,10
86,08	39,15	39,06	39,11	0,06



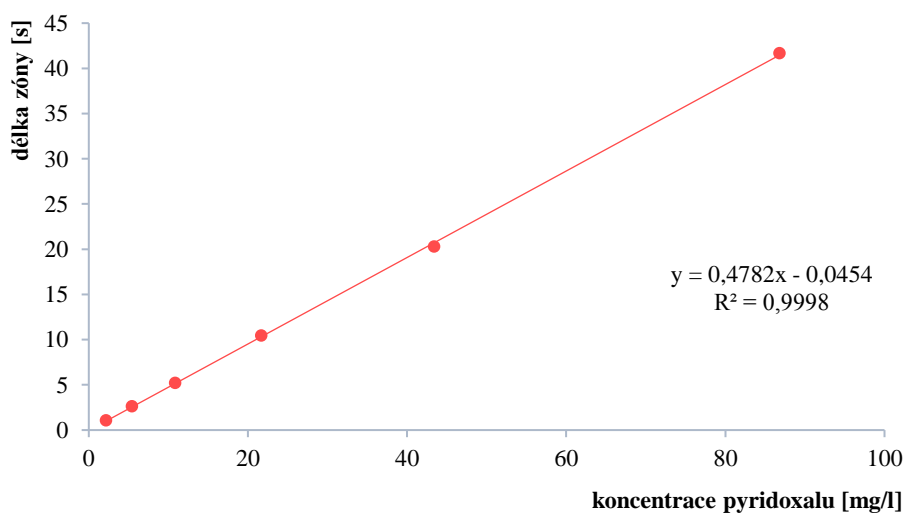
**Graf 3:** Závislost délky zóny na koncentraci pyridoxinu

### 3.2.1.3 Pyridoxal

Byla proměřena řada standardů pyridoxalu. Údaje o koncentracích a jim odpovídajících délkách zón jsou uvedeny v Tabulce 13. V Grafu 4 je k nahlédnutí získaná závislost délky zóny na koncentraci pyridoxalu.

Tabulka 13: Délky zón standardů pyridoxalu

Koncentrace [mg/l]	Délka zóny [s]		Průměr [s]	Odchylka [s]
2,17	1,03	1,05	1,04	0,01
5,43	2,58	2,65	2,62	0,05
10,85	5,17	5,19	5,18	0,01
21,70	10,40	10,47	10,44	0,05
43,40	20,88	20,26	20,57	0,44
86,80	41,40	41,89	41,65	0,35



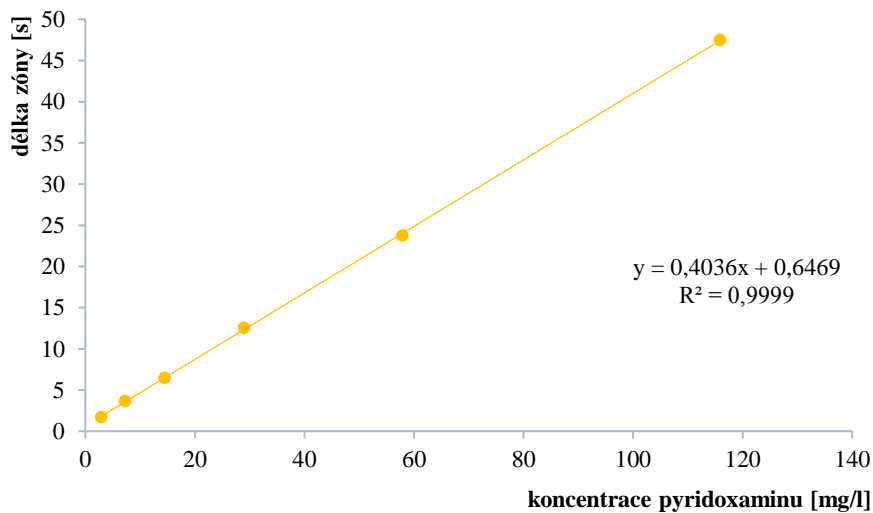
Graf 4: Závislost délky zóny na koncentraci pyridoxalu

### 3.2.1.4 Pyridoxamin

Byla proměřena řada standardů pyridoxaminu. Údaje o koncentracích a jim odpovídajících délkách zón jsou uvedeny v Tabulce 14. Získaná kalibrační závislost je k nahlédnutí v Grafu 5.

**Tabulka 14:** Délky zón standardů pyridoxaminu

Koncentrace [mg/l]	Délka zóny [s]		Průměr [s]	Odchylka [s]
<b>2,90</b>	1,72	1,68	<b>1,70</b>	0,03
<b>7,24</b>	3,77	3,57	<b>3,67</b>	0,14
<b>14,48</b>	6,51	6,47	<b>6,49</b>	0,03
<b>28,96</b>	12,48	12,60	<b>12,54</b>	0,08
<b>57,92</b>	23,84	23,68	<b>23,76</b>	0,11
<b>115,84</b>	47,68	47,28	<b>47,48</b>	0,28



**Graf 5:** Závislost délky zóny na koncentraci pyridoxaminu



### 3.2.2 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Pro zjištění meze stanovitelnosti byla 1 sekunda, jakožto nejmenší zóna, kterou lze spolehlivě stanovit, podělena směrnici kalibrační křivky každého z vitamínů. Mez detekce je rovna třetině hodnoty meze stanovitelnosti. V následující tabulce (Tabulka 15) jsou uvedeny meze detekce a stanovitelnosti pro jednotlivé vitamíny.

**Tabulka 15:** Meze detekce a meze stanovitelnosti

<b>THIAMIN</b>	<b>[mg/l]</b>	<b>[<math>\mu</math>mol/l]</b>
Mez detekce	0,87	2,58
Mez stanovitelnosti	2,60	7,71
<b>PYRIDOXIN</b>	<b>[mg/l]</b>	<b>[<math>\mu</math>mol/l]</b>
Mez detekce	0,74	3,60
Mez stanovitelnosti	2,22	10,80
<b>PYRIDOXAL</b>	<b>[mg/l]</b>	<b>[<math>\mu</math>mol/l]</b>
Mez detekce	0,70	3,44
Mez stanovitelnosti	2,09	10,26
<b>PYRIDOXAMIN</b>	<b>[mg/l]</b>	<b>[<math>\mu</math>mol/l]</b>
Mez detekce	0,83	3,44
Mez stanovitelnosti	2,48	10,29

### 3.2.3 Reprodukovanost metody

Pro určení reprodukovanosti bylo proměřeno pět standardních roztoků od každého z vitamínů, jejichž koncentrace činila 0,0001 mol/l. Nejdříve byl v programu Microsoft Excel proveden výpočet směrodatné odchylky (s), následně výpočet relativní směrodatné odchylky (RSD), která je dána podílem směrodatné odchylky a průměrné délky zóny. Pro získání procentuálního vyjádření byla relativní směrodatná odchylka vynásobena stem. Tuto veličinu lze použít jako zhodnocení reprodukovanosti metody. V tabulce 16 jsou uvedeny hodnoty pro jednotlivé vitamíny.

**Tabulka 16:** Reprodukovatelnost metody

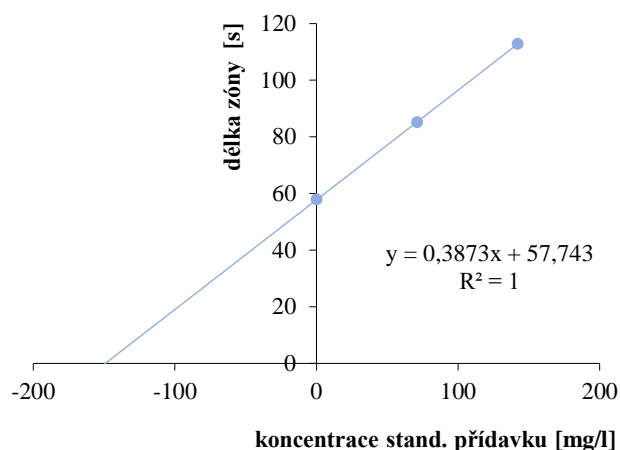
	<b>Délka zóny [s]</b>			
	<b>THIAMIN</b>	<b>PYRIDOXIN</b>	<b>PYRIDOXAL</b>	<b>PYRIDOXAMIN</b>
1	15,02	18,63	12,62	13,22
2	15,03	19,04	12,02	13,03
3	14,83	18,41	12,06	12,87
4	14,52	18,25	11,93	12,86
5	14,27	18,98	11,86	12,78
<b>Průměr [s]</b>	14,73	18,66	12,10	12,95
<b>Směr. odchylka [s]</b>	0,33	0,35	0,30	0,18
<b>RSD [%]</b>	<b>2,25</b>	<b>1,85</b>	<b>2,50</b>	<b>1,35</b>

### 3.2.4 Výtěžnost

Výtěžnost metody byla nejdříve zjišťována proměřením standardního roztoku každého z vitamínů s následným dosažením zjištěné délky zóny do kalibrační závislosti. V dalším kroku byly proměřeny roztoky s jedním a dvěma přídávky. Pro roztoky se standardními přídávky byly u všech vitamínů do 50 ml baňky nadávkovány 2 ml 0,01 M standardního roztoku vitamínu, ke kterému bylo přidáno množství 1 ml (1. přídavek) nebo 2 ml (2. přídavek) 0,01 M roztoku vitamínu. Všechny vypočtené koncentrace byly porovnány. Naměřené hodnoty jsou k nahlédnutí v Příloze (Tabulka 27).

#### 3.2.4.1 Thiamin

Na izotachoforetickém přístroji byl třikrát proměřen standardní roztok thiaminu o koncentraci 138,2 mg/l (0,0004 M). Po dosažení průměrné délky zóny do kalibrační závislosti byla zjištěna koncentrace  $149,9 \pm 1,6$  mg/l. Ke standardnímu roztoku byly následně přidány dva přídávky, přičemž každý zvýšil koncentraci o 71 mg/l. Proměřením roztoku s jedním a následně i dvěma přídávky byla zjištěna koncentrace  $147,8 \pm 0,9$  mg/l. Následující graf (Graf 6) zobrazuje hodnoty délek zón po aplikaci přídavek do standardního roztoku.



**Graf 6:** Závislost délky zóny na koncentraci standardního přídatku thiaminu

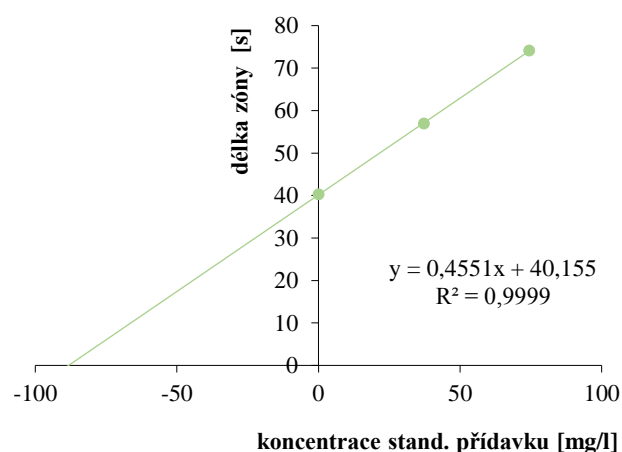
V Tabulce 17 je uvedena výtěžnost stanovení s využitím metody kalibrační křivky a metody standardního přídatku.

**Tabulka 17:** Výtěžnost metody (thiamin)

<b>SKUTEČNÁ KONCENTRACE</b>	<b>138,2 mg/l</b>	<b>VÝTĚŽNOST [% ± s]</b>
<b>ZJIŠTĚNÁ KONCENTRACE (kalibrační křivka)</b>	149,9 ± 1,6 mg/l	108,5 ± 1,2 %
<b>ZJIŠTĚNÁ KONCENTRACE (standardní přídatek)</b>	147,8 ± 0,9 mg/l	106,9 ± 0,6 %

### 3.2.4.2 Pyridoxin

Standardní roztok pyridoxinu s koncentrací 85,9 mg/l (0,0004 M) byl třikrát proměřen na izotachoforetickém přístroji. Po dosažení průměrné délky zóny do kalibrační závislosti byla zjištěna koncentrace 88,8 ± 0,6 mg/l. Ke standardnímu roztoku byly následně přidány dva přídatky, přičemž každý zvýšil koncentraci o 37,2 mg/l. Proměřením roztoku s jedním a následně i dvěma přídatky byla zjištěna koncentrace 87,3 ± 0,2 mg/l. Graf 7 zobrazuje hodnoty délek zón po aplikaci přídatků do standardního roztoku.



**Graf 7:** Závislost délky zóny na koncentraci standardního přídatku pyridoxinu

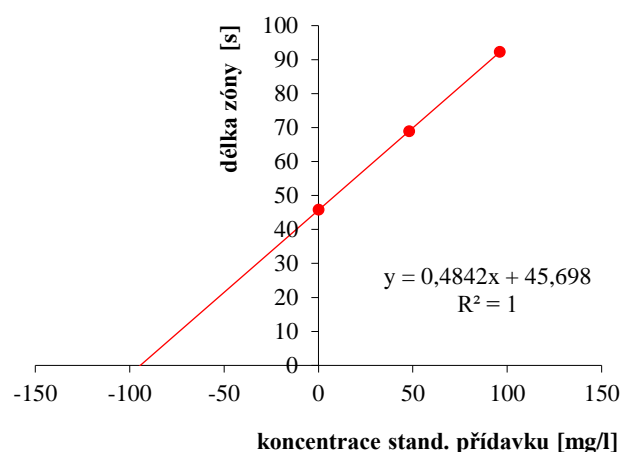
V Tabulce 18 je uvedena výtěžnost stanovení s využitím metody kalibrační křivky a metody standardního přídatku.

**Tabulka 18:** Výtěžnost metody (pyridoxin)

SKUTEČNÁ KONCENTRACE	85,9 mg/l	VÝTĚŽNOST [% ± s]
ZJIŠTĚNÁ KONCENTRACE (kalibrační křivka)	88,8 ± 0,6 mg/l	103,4 ± 0,7 %
ZJIŠTĚNÁ KONCENTRACE (standardní přídatek)	87,3 ± 0,2 mg/l	101,6 ± 0,2 %

### 3.2.4.3 Pyridoxal

Na izotachoforetickém přístroji byl třikrát proměřen standardní roztok pyridoxalu o koncentraci 86,7 mg/l (0,0004 M). Po dosazení průměrné délky zóny do kalibrační závislosti byla zjištěna koncentrace 95,8 ± 0,9 mg/l. Ke standardnímu roztoku byly následně přidány dva přídatky, přičemž každý zvýšil koncentraci o 48 mg/l. Proměřením roztoku s jedním a následně i dvěma přídatky byla zjištěna koncentrace 94,4 ± 0,2 mg/l. Následující graf (Graf 8) zobrazuje hodnoty délek zón po aplikaci přídatků do standardního roztoku.



**Graf 8:** Závislost délky zóny na koncentraci standardního přídatku pyridoxalu

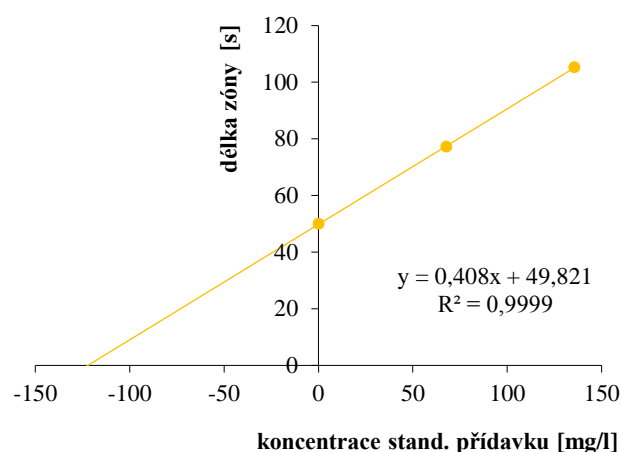
V Tabulce 19 je uvedena výtěžnost stanovení s využitím metody kalibrační křivky a metody standardního přídatku.

**Tabulka 19:** Výtěžnost metody (pyridoxal)

SKUTEČNÁ KONCENTRACE	86,7 mg/l	VÝTĚŽNOST [% ± s]
ZJIŠTĚNÁ KONCENTRACE (kalibrační křivka)	95,8 ± 0,9 mg/l	110,5 ± 1,0 %
ZJIŠTĚNÁ KONCENTRACE (standardní přídavek)	94,4 ± 0,2 mg/l	108,9 ± 0,2 %

#### 3.2.4.4 Pyridoxamin

Standardní roztok pyridoxaminu s koncentrací 115,9 mg/l (0,0004M) byl třikrát proměřen na izotachoforetickém přístroji. Po dosažení průměrné délky zóny do kalibrační závislosti byla zjištěna koncentrace 122,1 ± 1,3 mg/l. Ke standardnímu roztoku byly následně přidány dva přídatky, přičemž každý zvýšil koncentraci o 67,8 mg/l. Proměřením roztoku s jedním a následně i dvěma přídatky byla zjištěna koncentrace 121,2 ± 0,2 mg/l. Graf 9 zobrazuje hodnoty délek zón po aplikaci přídatků do standardního roztoku.



**Graf 9:** Závislost délky zóny na koncentraci standardního přídatku pyridoxaminu

V Tabulce 20 je uvedena výtěžnost stanovení s využitím metody kalibrační křivky a metody standardního přídatku.

**Tabulka 20:** Výtěžnost metody (pyridoxamin)

SKUTEČNÁ KONCENTRACE	115,9 mg/l	VÝTĚŽNOST [% ± s]
ZJIŠTĚNÁ KONCENTRACE (kalibrační křivka)	122,1 ± 1,3 mg/l	105,3 ± 1,1 %
ZJIŠTĚNÁ KONCENTRACE (standardní přídavek)	121,2 ± 0,2 mg/l	104,6 ± 0,2 %

Ve všech případech dosahovala výtěžnost hodnot blízkých 100 %.

### 3.3 STANOVENÍ VITAMÍNŮ V REÁLNÝCH VZORCÍCH

Přesný postup přípravy vzorků k analýze je popsán v kapitole 2.4.3. Roztoky vzorků byly dvakrát proměřeny. Následně byl ke každému vzorku přidán standardní přídavek (vždy 25 µl 0,01 M roztoku vitamínu do 5 ml vzorku) a byla provedena další dvě měření.

### 3.3.1 Vzorek č. 1: B-komplex GENERICA

Následující tabulka (Tabulka 21) obsahuje zjištěné množství vitamínů obsažených ve vzorku č. 1. Hodnoty jednotlivých měření se nacházejí v Tabulce 28, která je součástí Přílohy. V Příloze je také k nahlédnutí izotachforetický záznam tohoto vzorku (Obrázek 20).

**Tabulka 21:** Zjištěné množství vitamínů ve vzorku č. 1: B-komplex GENERICA

<b>Vzorek č. 1: B-komplex GENERICA</b>	
<b>THIAMIN</b> (deklarované množství: 10 mg v 1 tabletě)	
Zjištěné množství (kalibrační křivka)	Zjištěné množství (standardní přídavek)
8,9 ± 0,1 mg	10,3 ± 0,1 mg
<b>PYRIDOXIN</b> (deklarované množství: 10 mg v 1 tabletě)	
Zjištěné množství (kalibrační křivka)	Zjištěné množství (standardní přídavek)
9,8 ± 0,1 mg	9,4 ± 0,1 mg

### 3.3.2 Vzorek č. 2: Thiamin

Tabulka 22 obsahuje zjištěné množství thiaminu obsaženého ve vzorku č. 2. Naměřené hodnoty se nacházejí v Tabulce 28, která je součástí Přílohy. V Příloze je také k nahlédnutí izotachforetický záznam tohoto vzorku (Obrázek 21).

**Tabulka 22:** Zjištěné množství vitamínu ve vzorku č. 2: Thiamin

<b>Vzorek č. 2: Thiamin</b>	
<b>THIAMIN</b> (deklarované množství: 50 mg v 1 tabletě)	
Zjištěné množství (kalibrační křivka)	Zjištěné množství (standardní přídavek)
57,8 ± 0,1 mg	63,2 ± 0,4 mg

### 3.3.3 Vzorek č. 3: Pyridoxin

Tabulka 23 obsahuje zjištěné množství pyridoxinu obsaženého ve vzorku č. 3. V Příloze jsou k nahlédnutí hodnoty jednotlivých měření (Tabulce 28) a izotachoforetický záznam tohoto vzorku (Obrázek 22).

**Tabulka 23:** Zjištěné množství vitamínu ve vzorku č. 3: Pyridoxin

<b>Vzorek č. 3: Pyridoxin</b>	
<i>PYRIDOXIN (deklarované množství: 20 mg v 1 tabletě)</i>	
Zjištěné množství (kalibrační křivka)	Zjištěné množství (standardní přídavek)
19,7 ± 0,2 mg	16,9 ± 0,3 mg

### 3.3.4 Vzorek č. 4: Imunofit ŠKODA

Následující tabulka (Tabulka 24) obsahuje zjištěné množství vitamínů ve vzorku č. 4. Hodnoty jednotlivých měření se nacházejí v Tabulce 28, která je součástí Přílohy. Izotachoforetický záznam tohoto vzorku je k nahlédnutí v Příloze (Obrázek 23).

**Tabulka 24:** Zjištěné množství vitamínů ve vzorku č. 4: Imunofit ŠKODA

<b>Vzorek č. 4: Imunofit ŠKODA</b>	
<i>THIAMIN (deklarované množství: 1 mg v 1 tabletě)</i>	
Zjištěné množství (kalibrační křivka)	Zjištěné množství (standardní přídavek)
1,0 ± 0,1 mg	0,9 ± 0,1 mg
<i>PYRIDOXIN (deklarované množství: 1 mg v 1 tabletě)</i>	
Zjištěné množství (kalibrační křivka)	Zjištěné množství (standardní přídavek)
1,2 ± 0,1 mg	1,2 ± 0,1 mg



### 3.3.5 Vzorek č. 5: B-komplex FORTE

V Tabulce 25 je uvedeno zjištěné množství vitamínů obsažených ve vzorku č. 5. Hodnoty jednotlivých měření se nacházejí v Tabulce 28, která je součástí Přílohy. K nahlédnutí je v Příloze je také izotachforetický záznam vzorku (Obrázek 24).

**Tabulka 25:** Zjištěné množství vitamínů ve vzorku č. 5: B-komplex FORTE

<b>Vzorek č. 5: B-komplex FORTE</b>	
<b>THIAMIN</b> (deklarované množství: 15 mg v 1 tabletě)	
Zjištěné množství (kalibrační křivka)	Zjištěné množství (standardní přídavek)
19,4 ± 1,0 mg	16,5 ± 1,0 mg
<b>PYRIDOXIN</b> (deklarované množství: 10 mg v 1 tabletě)	
Zjištěné množství (kalibrační křivka)	Zjištěné množství (standardní přídavek)
13,2 ± 0,1 mg	12,7 ± 0,1 mg

### 3.3.6 Vzorek č. 6: B-komplex ZENTIVA

Zjištěné množství vitamínů obsažených ve vzorku č. 6 shrnuje následující tabulka (Tabulka 26). Hodnoty jednotlivých měření jsou k nahlédnutí v Tabulce 28, která se nachází v Příloze. Součástí Přílohy je také izotachforetický záznam tohoto vzorku (Obrázek 25).

**Tabulka 26:** Zjištěné množství vitamínů ve vzorku č. 6: B-komplex ZENTIVA

<b>Vzorek č. 6: B-komplex ZENTIVA</b>	
<b>THIAMIN</b> (deklarované množství: 2 mg v 1 tabletě)	
Zjištěné množství (kalibrační křivka)	Zjištěné množství (standardní přídavek)
2,0 ± 0,1 mg	2,2 ± 0,2 mg
<b>PYRIDOXIN</b> (deklarované množství: 1 mg v 1 tabletě)	
Zjištěné množství (kalibrační křivka)	Zjištěné množství (standardní přídavek)
1,2 ± 0,1 mg	1,0 ± 0,1 mg

### 3.4 TESTY STABILITY

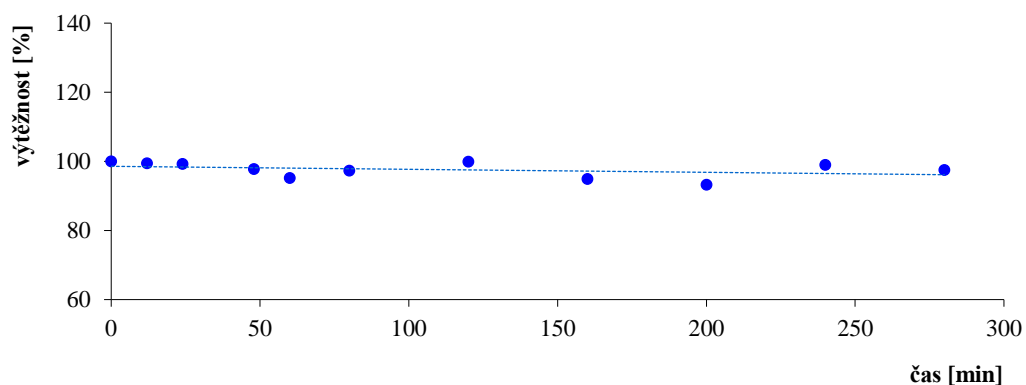
Posledním studovanou oblastí bylo sledování stability vitamínů během jejich stání po dobu 280 minut při laboratorní teplotě, zahřívání na 50 °C a 100 °C po dobu 280 minut, dlouhodobější stání při laboratorních podmínkách a zmrazení. Součástí měření byly i zkoušky odolnosti roztoků vůči změnám pH v rozmezí hodnot 2 – 12. Pro větší přehlednost a lepší možnost porovnání jsou výsledky uvedeny jako výtěžnost jednotlivých měření.

#### 3.4.1 Thiamin

##### 3.4.1.1 Stání roztoku při laboratorní teplotě, zahřívání na 50 a 100 °C

###### 3.4.1.1.1 Stání při 25 °C

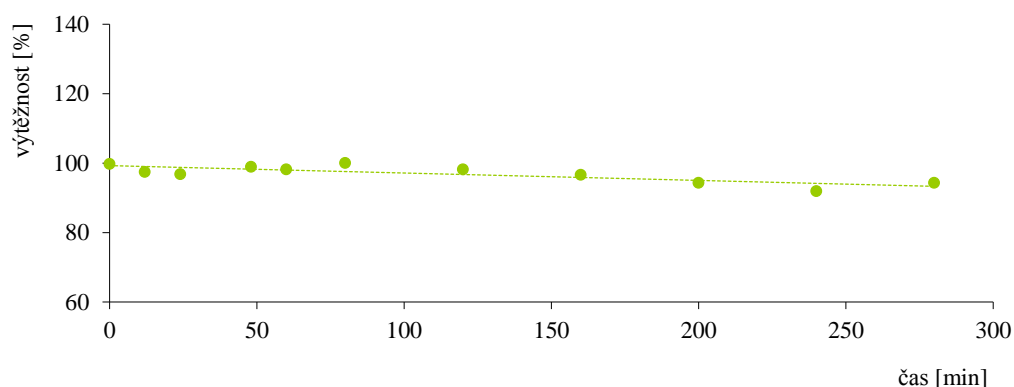
0,001 M roztok thiaminu byl podroben stání při laboratorní teplotě. Postupně byly odebírány malé objemy v určitých časech a byla provedena analýza (hodnoty měření viz Tabulka 29 v Příloze). Graf 10 popisuje změny v množství vitamínu ve standardním roztoku.



**Graf 10:** Výtěžnost měření thiaminu v závislosti na čase (při 25 °C)

### 3.4.1.1.2 Zahřívání na 50 °C

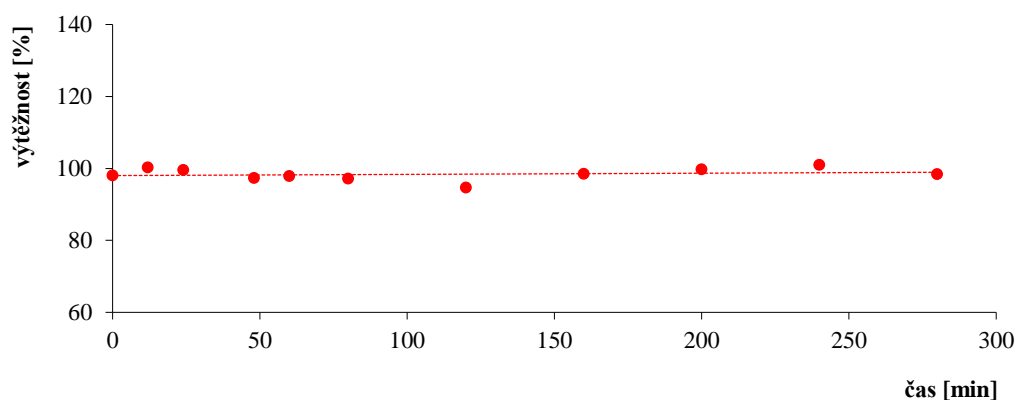
Roztok thiaminu o koncentraci 0,001 M byl zahříván na 50 °C ve vodní lázni na magnetické míchačce s vaříčem. Postupně byly v určitých časech odebírány malé objemy roztoku k analýze (hodnoty měření viz Tabulka 30 v Příloze). Graf 11 popisuje změny v množství vitamínu ve standardním roztoku.



**Graf 11:** Výtěžnost měření thiaminu v závislosti na čase (při 50 °C)

### 3.4.1.1.3 Zahřívání na 100 °C

0,001 M roztok thiaminu byl na magnetické míchačce s vaříčem zahříván na 100 °C ve vodní lázni. V určitých časech došlo k odebírání malých objemů roztoku, které byly podrobeny analýze (hodnoty měření viz Tabulka 31 v Příloze). Graf 12 popisuje změny v množství vitamínu ve standardním roztoku.

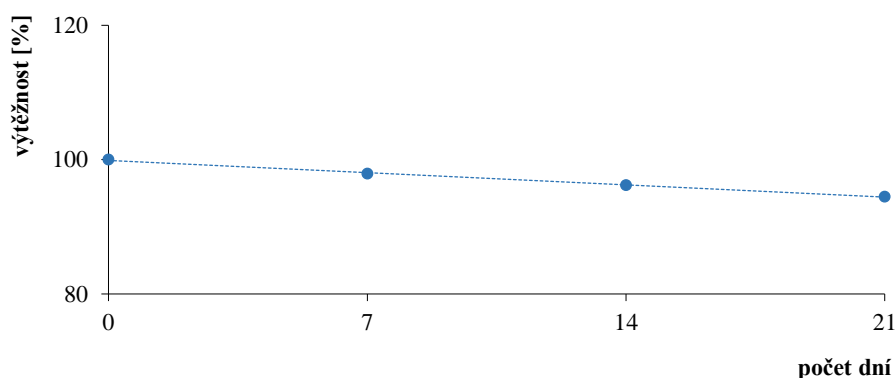


**Graf 12:** Výtěžnost měření thiaminu v závislosti na čase (při 100 °C)

### 3.4.1.2 Zmrazení roztoku a stání při laboratorních podmínkách po delší dobu

#### 3.4.1.2.1 Zmrazení roztoku

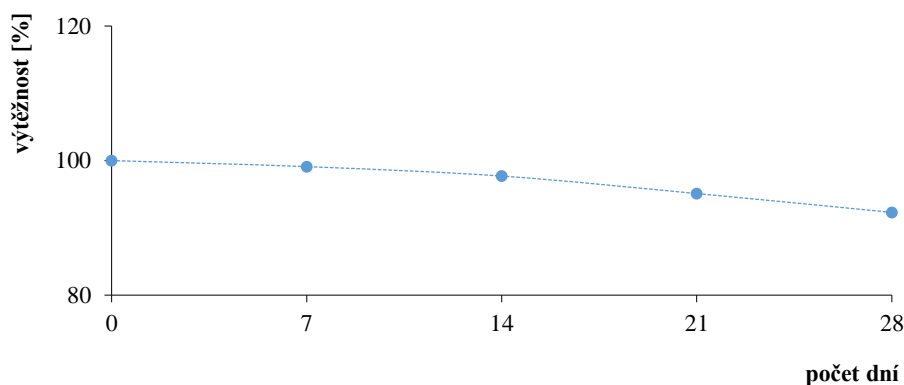
0,001 M roztok thiaminu byl určitou dobu skladován v mrazničce. V den stanovení se celý roztok ponechal volně rozmraznout. Roztok byl analyzován pro zjištění výtěžnosti stanovení. Po analýze byl roztok navrácen do mrazničky. V Grafu 13 je znázorněna závislost výtěžnosti na počtu dní, kdy byl roztok umístěn v mrazničce. Zjištěné hodnoty jsou k nahlédnutí v Příloze (Tabulka 41).



**Graf 13:** Výtěžnost thiaminu během skladování v mrazničce

#### 3.4.1.2.2 Stání při laboratorních podmínkách

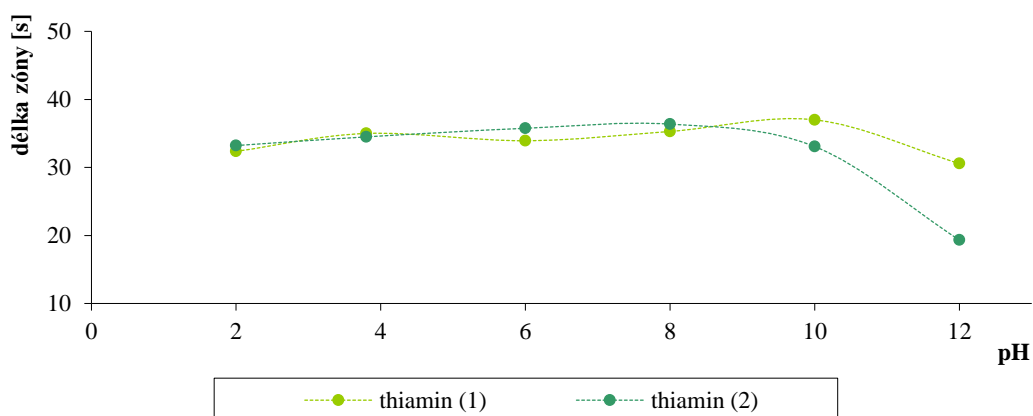
Roztok thiaminu o koncentraci 0,001 M byl ponechán stát po určitou dobu při laboratorní teplotě. Postupně byly odebírány vzorky pro zjištění výtěžnosti měření. V Grafu 14 je znázorněna závislost výtěžnosti na počtu dní. Naměřené hodnoty jsou k nahlédnutí v Tabulce 42 v Příloze.



**Graf 14:** Výtěžnost thiaminu během stání při laboratorních podmínkách

### 3.4.1.3 Odolnost roztoku vůči změnám pH

150 ml 0,001 M roztoku thiaminu bylo rozděleno na 6 totožných částí (po 25 ml). U roztoků bylo postupně upraveno pH (pomocí CH<sub>3</sub>COOH a NaOH) na hodnoty 2, 6, 8, 10 a 12. Jedna část byla ponechána bez přidavku a po proměření byla získána hodnota pH, která odpovídala vodnému roztoku vitamínu (v tomto případě pH = 3,8). U každého pH byla prováděna dvě měření (Graf 15) – okamžité měření (1) a měření následující den (2). Naměřené hodnoty jsou k nahlédnutí v Příloze (Tabulka 43).



Graf 15: Závislost délky zóny thiaminu na pH roztoku

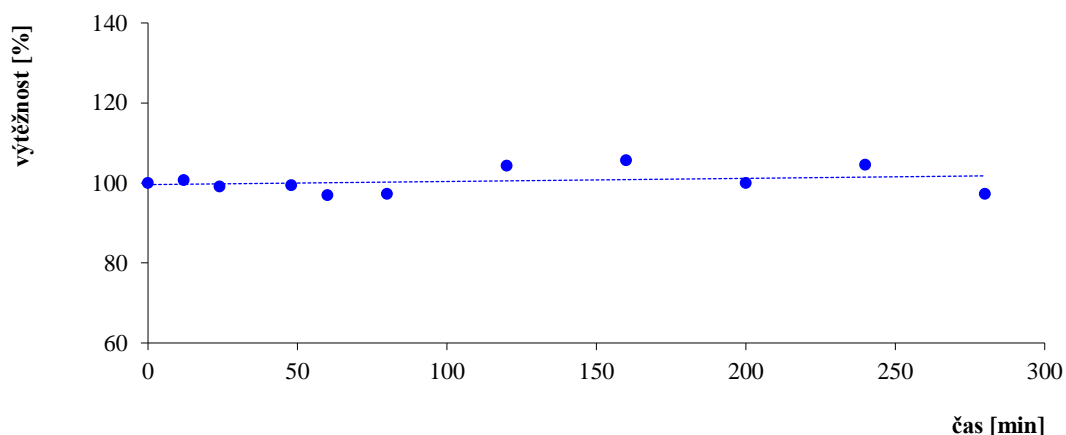
Thiamin se v roztoku jevil jako poměrně stabilní, a to i při zahřevu (ztráty do 5 %). Co se týče uchovávání v mrazničce, ztráty vitamínu B<sub>1</sub> byly v tomto případě srovnatelné s poklesem při volném stání za laboratorních podmínek. Vlivem pH nedocházelo k výrazným změnám délek zón, k většímu poklesu došlo až v silně zásaditém prostředí (při pH 12).

## 3.4.2 Pyridoxin

### 3.4.2.1 Stání roztoku při laboratorní teplotě, zahřívání na 50 a 100 °C

#### 3.4.2.1.1 Stání při 25 °C

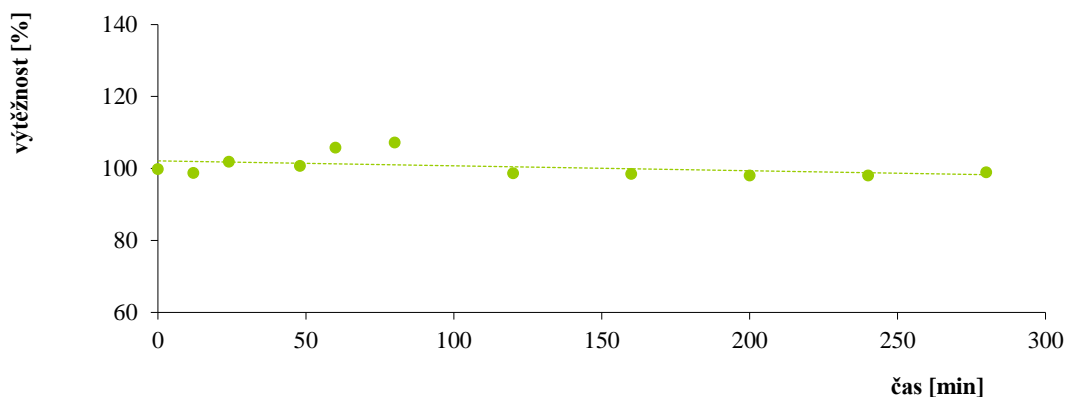
0,001 M roztok pyridoxinu byl podroben stání při laboratorní teplotě. Postupně byly odebírány malé objemy v určitých časech a byla provedena analýza (hodnoty měření viz Tabulka 32 v Příloze). Graf 16 popisuje změny v množství vitamínu ve standardním roztoku.



**Graf 16:** Výťažnost měření pyridoxinu v závislosti na čase (při 25 °C)

#### 3.4.2.1.2 Zahřívání na 50 °C

Roztok pyridoxinu o koncentraci 0,001 M byl zahříván na 50 °C ve vodní lázni na magnetické míchačce s vaříčem. Postupně byly v určitých časech odebírány malé objemy roztoku k analýze (hodnoty měření viz Tabulka 33 v Příloze). Graf 17 popisuje změny v množství vitamínu ve standardním roztoku.

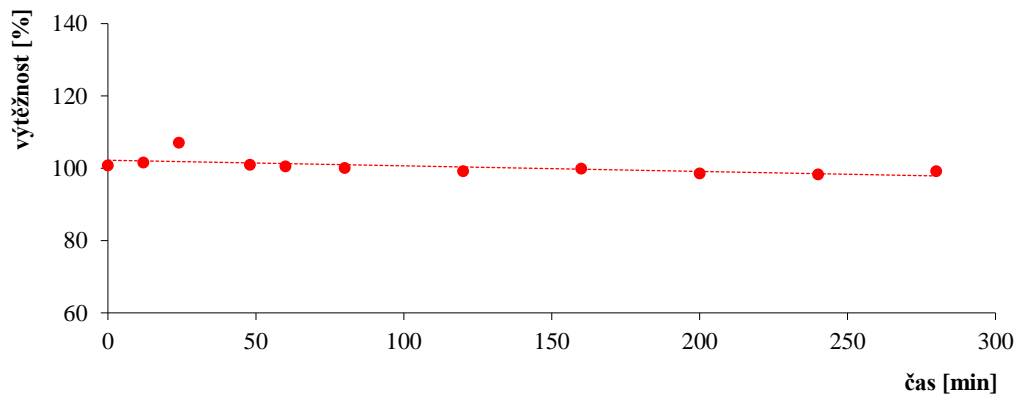


**Graf 17:** Výťažnost měření pyridoxinu v závislosti na čase (při 50 °C)

#### 3.4.2.1.3 Zahřívání na 100 °C

0,001 M roztok pyridoxinu byl na magnetické míchačce s vaříčem zahříván na 100 °C ve vodní lázni. V určitých časech došlo k odebírání malých objemů roztoku, které byly podrobeny

analýze (hodnoty měření viz Tabulka 34 v Příloze). Graf 18 popisuje změny v množství vitamínu ve standardním roztoku.

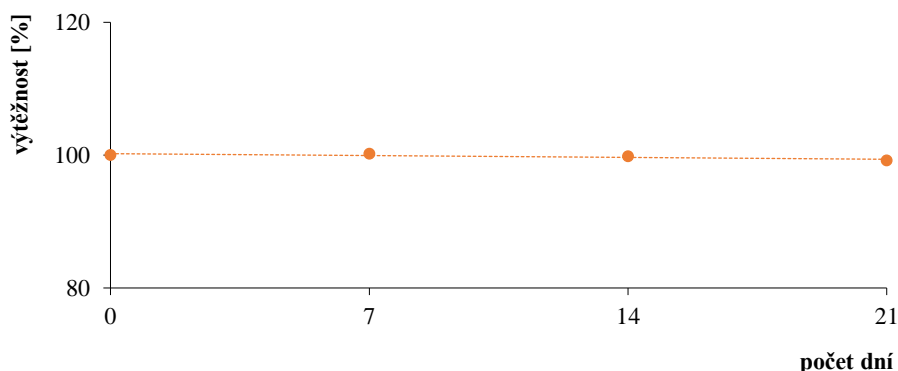


**Graf 18:** Výtěžnost měření pyridoxinu v závislosti na čase (při 100 °C)

### 3.4.2.2 Zmrazení roztoku a stání při laboratorních podmínkách po delší dobu

#### 3.4.2.2.1 Zmrazení roztoku

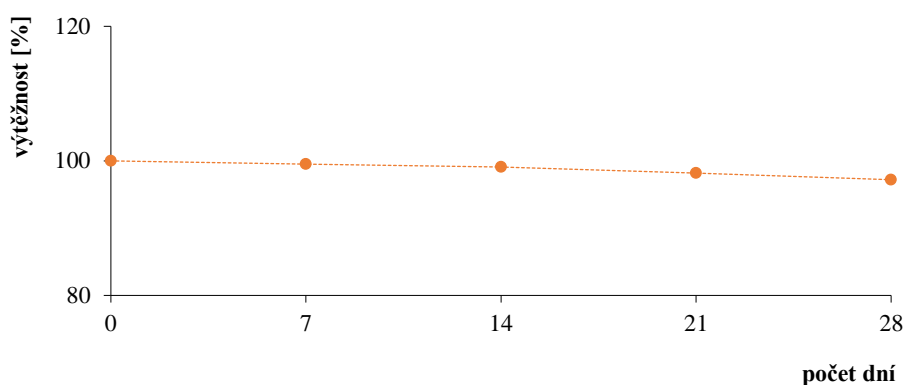
0,001 M roztok pyridoxinu byl určitou dobu skladován v mrazničce. V den stanovení se celý roztok ponechal volně rozmraznout. Roztok byl analyzován pro zjištění výtěžnosti stanovení. Po analýze byl roztok navrácen do mrazničky. V Grafu 19 je znázorněna závislost výtěžnosti na počtu dní, kdy byl roztok umístěn v mrazničce. Zjištěné hodnoty jsou k nahlédnutí v Příloze (Tabulka 41).



**Graf 19:** Výtěžnost pyridoxinu během skladování v mrazničce

### 3.4.2.2 Stání při laboratorních podmínkách

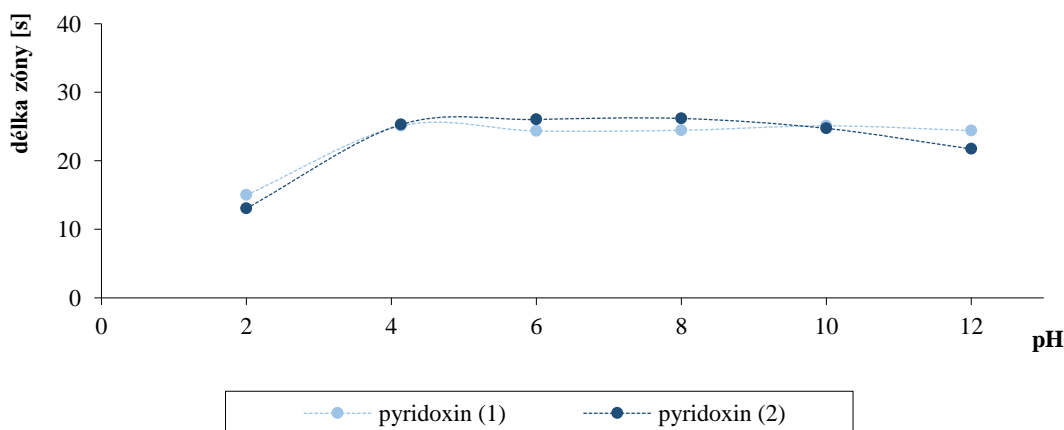
Roztok pyridoxinu o koncentraci 0,001 M byl ponechán stát po určitou dobu při laboratorní teplotě. Postupně byly odebírány vzorky pro zjištění výtěžnosti měření. V Grafu 20 je znázorněna závislost výtěžnosti na počtu dní. Naměřené hodnoty jsou k nahlédnutí v Tabulce 42 v Příloze.



**Graf 20:** Výtěžnost pyridoxinu během stání při laboratorních podmínkách

### 3.4.2.3 Odolnost roztoku vůči změnám pH

150 ml 0,001 M roztoku pyridoxinu bylo rozděleno na 6 totožných částí (po 25 ml). U roztoků bylo postupně upraveno pH (pomocí  $\text{CH}_3\text{COOH}$  a  $\text{NaOH}$ ) na hodnoty 2, 6, 8, 10 a 12. Jedna část byla ponechána bez přídavku a po proměření byla získána hodnota pH, která odpovídala vodnému roztoku vitamínu (v tomto případě  $\text{pH} = 4,13$ ). U každého pH byla prováděna dvě měření (Graf 21) – okamžité měření (1) a měření následující den (2). Naměřené hodnoty jsou k nahlédnutí v Příloze (Tabulka 44).



**Graf 21:** Závislost délky zóny pyridoxinu na pH roztoku



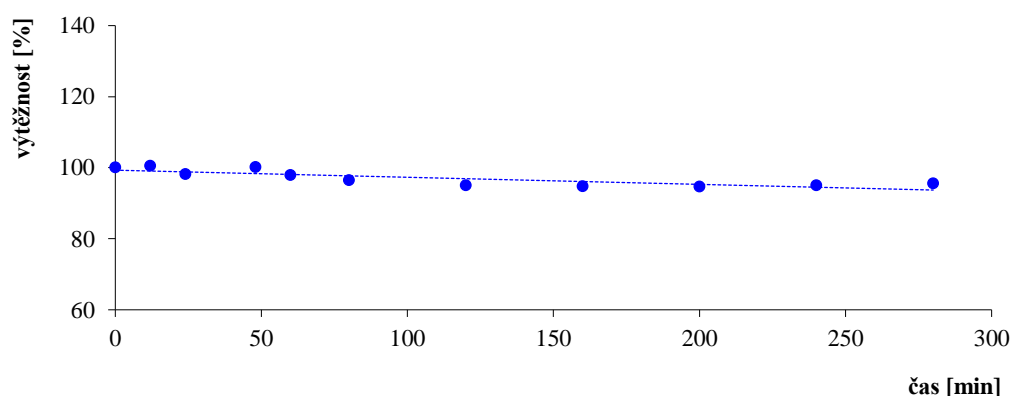
U roztoku pyridoxinu nedocházelo při záhřevu a krátkodobém stání k výraznějším ztrátám. Co se týče uchovávání v mrazničce, ztráty této formy byly srovnatelné s poklesem množství při volném stání za laboratorních podmínek. Vlivem pH nedocházelo k výrazným změnám délek zón, k většímu poklesu došlo až v silně kyselém prostředí (pH 2), při měření druhý den došlo k mírnému zkrácení zóny i v zásaditém prostředí. Bylo zjištěno, že tato forma vitamínu B<sub>6</sub> je nejvíce odolná vůči okolním vlivům.

### 3.4.3 Pyridoxal

#### 3.4.3.1 Stání roztoku při laboratorní teplotě, zahřívání na 50 a 100 °C

##### 3.4.3.1.1 Stání při 25 °C

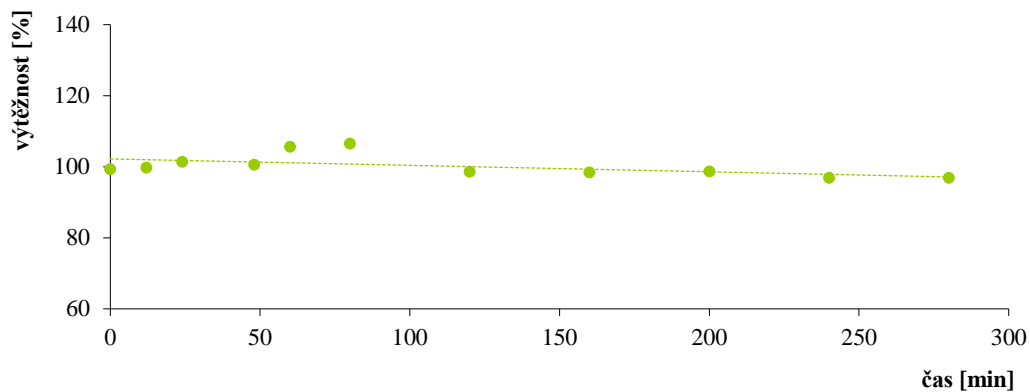
0,001 M roztok pyridoxalu byl podroben stání při laboratorní teplotě. Postupně byly odebírány malé objemy v určitých časech a byla provedena analýza (hodnoty měření viz Tabulka 35 v Příloze). Graf 22 popisuje změny v množství vitamínu ve standardním roztoku.



**Graf 22:** Výtěžnost měření pyridoxalu v závislosti na čase (při 25 °C)

##### 3.4.3.1.2 Zahřívání na 50 °C

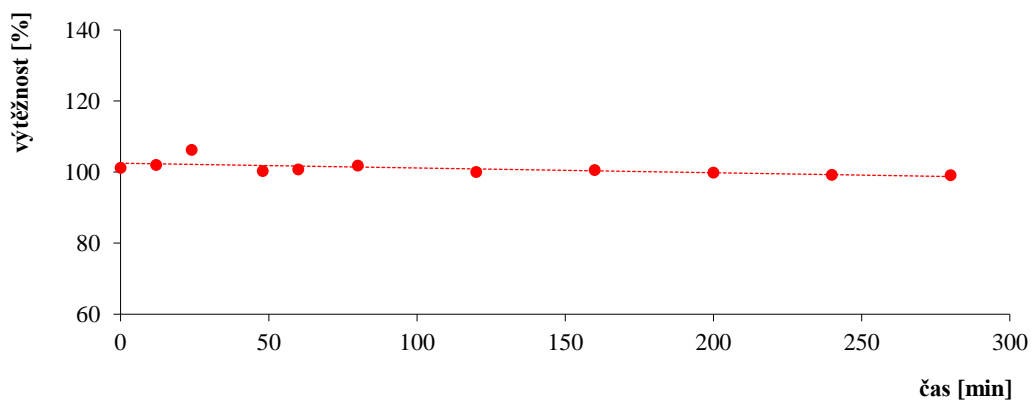
Roztok pyridoxalu o koncentraci 0,001 M byl zahříván na 50 °C ve vodní lázni na magnetické míchačce s vaříčem. Postupně byly v určitých časech odebírány malé objemy roztoku k analýze (hodnoty měření viz Tabulka 36 v Příloze). Graf 23 popisuje změny v množství vitamínu ve standardním roztoku.



**Graf 23:** Výtěžnost měření pyridoxalu v závislosti na čase (při 50 °C)

#### 3.4.3.1.3 Zahřívání na 100 °C

0,001 M roztok pyridoxalu byl na magnetické míchačce s vaříčem zahříván na 100 °C ve vodní lázni. V určitých časech došlo k odebrání malých objemů roztoku, které byly podrobeny analýze (hodnoty měření viz Tabulka 37 v Příloze). Graf 24 popisuje změny v množství vitamínu ve standardním roztoku.

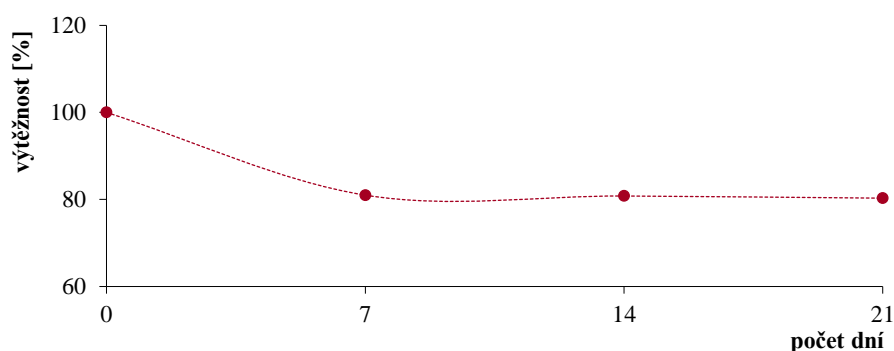


**Graf 24:** Výtěžnost měření pyridoxalu v závislosti na čase (při 100 °C)

### 3.4.3.2 Zmrazení roztoku a stání při laboratorních podmínkách po delší dobu

#### 3.4.3.2.1 Zmrazení roztoku

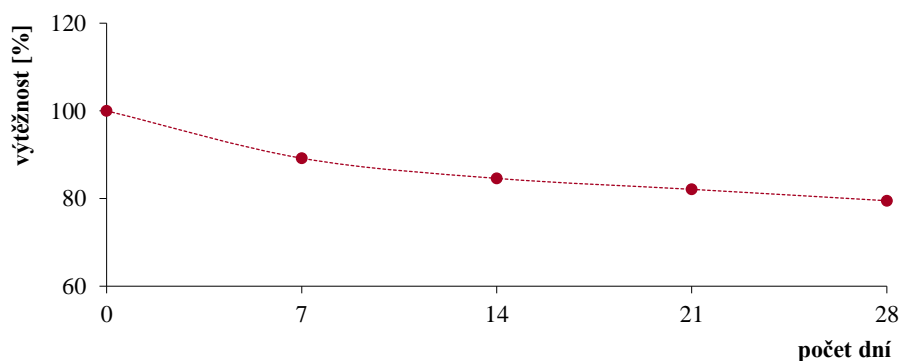
0,001 M roztok pyridoxalu byl určitou dobu skladován v mrazničce. V den stanovení se celý roztok ponechal volně rozmraznout. Roztok byl analyzován pro zjištění výtěžnosti stanovení. Po analýze byl roztok navrácen do mrazničky. V Grafu 25 je znázorněna závislost výtěžnosti na počtu dní, kdy byl roztok umístěn v mrazničce. Zjištěné hodnoty jsou k nahlédnutí v Příloze (Tabulka 41).



**Graf 25:** Výtěžnost pyridoxalu během skladování v mrazničce

#### 3.4.3.2.2 Stání při laboratorních podmínkách

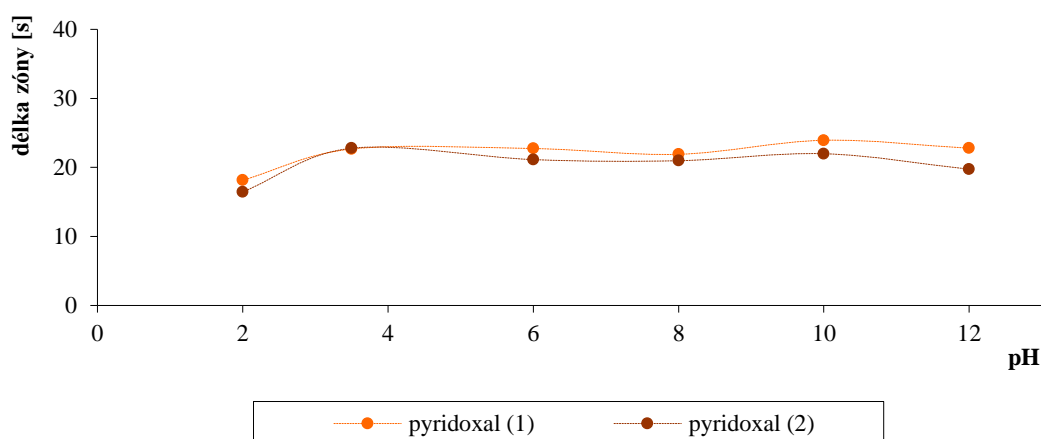
Roztok pyridoxalu o koncentraci 0,001 M byl ponechán stát po určitou dobu při laboratorní teplotě. Postupně byly odebírány vzorky pro zjištění výtěžnosti měření. V Grafu 26 je znázorněna závislost výtěžnosti na počtu dní. Naměřené hodnoty jsou k nahlédnutí v Tabulce 42 v Příloze.



**Graf 26:** Výtěžnost pyridoxalu během stání při laboratorních podmínkách

### 3.4.3.3 Odolnost roztoku vůči změnám pH

150 ml 0,001 M roztoku pyridoxalu bylo rozděleno na 6 totožných částí (po 25 ml). U roztoků bylo postupně upraveno pH (pomocí CH<sub>3</sub>COOH a NaOH) na hodnoty 2, 6, 8, 10 a 12. Jedna část byla ponechána bez přídavku a po proměření byla získána hodnota pH, která odpovídala vodnému roztoku vitamínu (v tomto případě pH = 3,5). U každého pH byla prováděna dvě měření (Graf 27) – okamžité měření (1) a měření následující den (2). Naměřené hodnoty jsou k nahlédnutí v Příloze (Tabulka 45).



**Graf 27:** Závislost délky zóny pyridoxalu na pH roztoku

U roztoku pyridoxalu nedosahovaly ztráty při krátkodobém stání i při zahřevu více než 5 %. V případě uchovávání v mrazničce byly ztráty srovnatelné s poklesem, ke kterému došlo při volném stání za laboratorních podmínek (u obou cca 20 %). Vlivem pH nedocházelo k výrazným změnám délek zón, k většímu poklesu došlo až v silně kyselém prostředí (pH 2), při měření druhý den došlo k mírnému zkrácení zóny i v alkalickém prostředí.

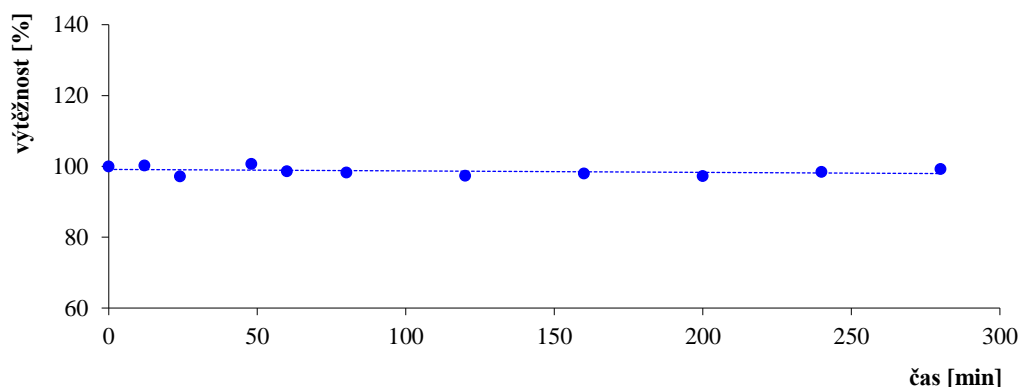
## 3.4.4 Pyridoxamin

### 3.4.4.1 Stání roztoku při laboratorní teplotě, zahřívání na 50 a 100 °C

#### 3.4.4.1.1 Stání při 25 °C

0,001 M roztok pyridoxaminu byl podroben stání při laboratorní teplotě. Postupně byly odebírány malé objemy v určitých časech a byla provedena analýza (hodnoty měření

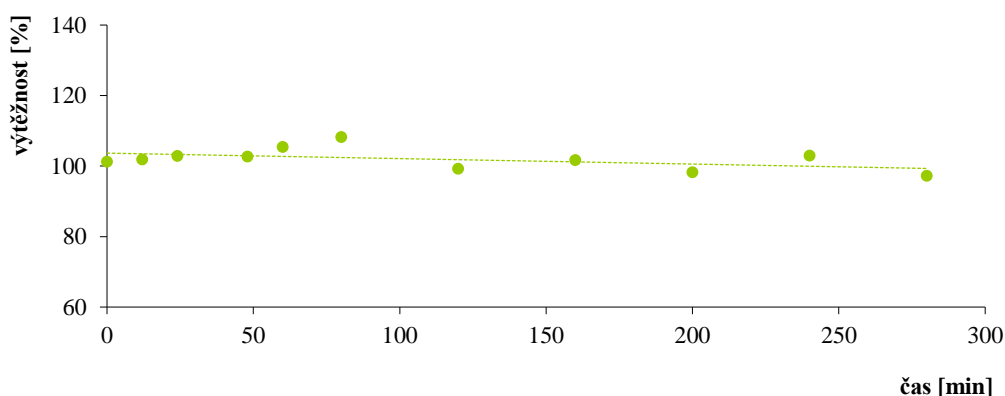
viz Tabulka 38 v Příloze). Graf 28 popisuje změny v množství vitamínu ve standardním roztoku.



**Graf 28:** Výtěžnost měření pyridoxaminu v závislosti na čase (při 25 °C)

#### 3.4.4.1.2 Zahřívání na 50 °C

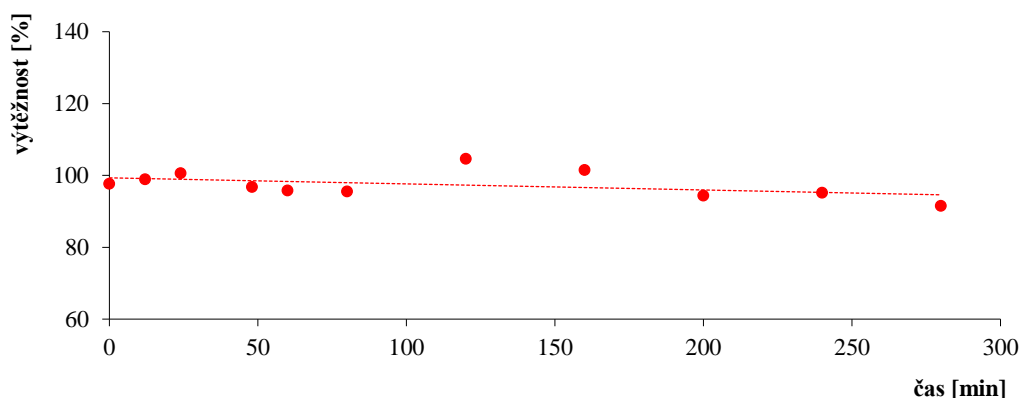
Roztok pyridoxaminu o koncentraci 0,001 M byl zahříván na 50 °C ve vodní lázni na magnetické míchače s vaříčem. Postupně byly v určitých časech odebírány malé objemy roztoku k analýze (hodnoty měření viz Tabulka 39 v Příloze). Graf 29 popisuje změny v množství vitamínu ve standardním roztoku.



**Graf 29:** Výtěžnost měření pyridoxaminu v závislosti na čase (při 50 °C)

### 3.4.4.1.3 Zahřívání na 100 °C

0,001 M roztok pyridoxaminu byl na magnetické míchačce s vaříčem zahříván na 100 °C ve vodní lázni. V určitých časech došlo k odebrání malých objemů roztoku, které byly podrobeny analýze (hodnoty měření viz Tabulka 40 v Příloze). Graf 30 popisuje změny v množství vitamínu ve standardním roztoku.

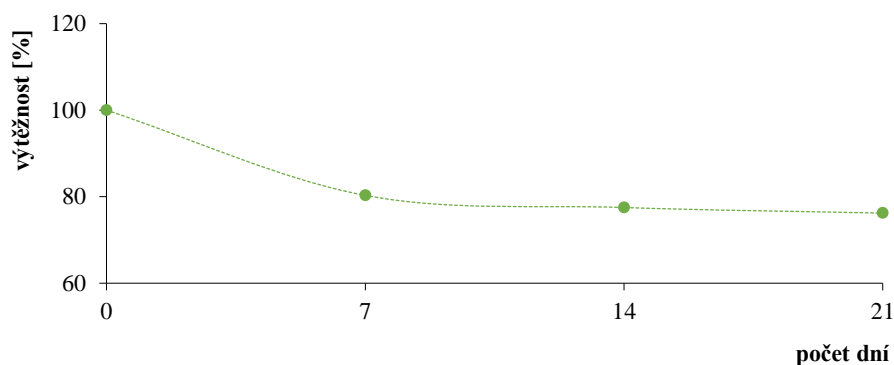


**Graf 30:** Výtěžnost měření pyridoxaminu v závislosti na čase (při 100 °C)

### 3.4.4.2 Zmrazení roztoku a stání při laboratorních podmínkách po delší dobu

#### 3.4.4.2.1 Zmrazení roztoku

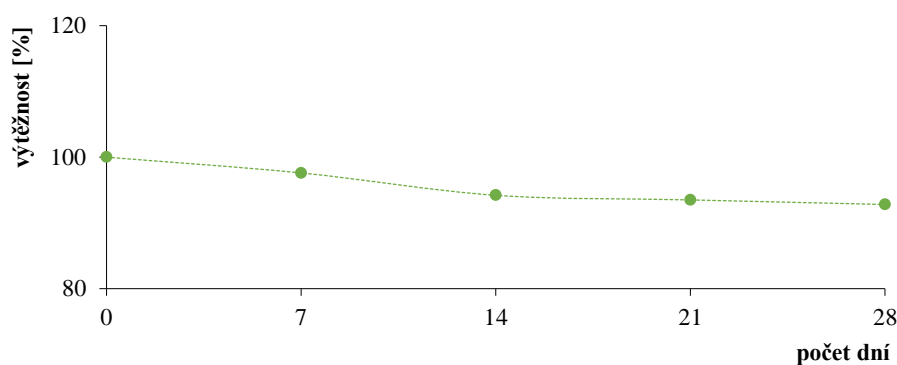
0,001 M roztok pyridoxaminu byl určitou dobu skladován v mrazničce. V den stanovení se celý roztok ponechal volně rozmraznout. Roztok byl analyzován pro zjištění výtěžnosti stanovení. V Grafu 31 je znázorněna závislost výtěžnosti na počtu dní, kdy byl roztok umístěn v mrazničce. Zjištěné hodnoty jsou k nahlédnutí v Příloze (Tabulka 41).



**Graf 31:** Výtěžnost pyridoxaminu během skladování v mrazničce

### 3.4.4.2 Stání při laboratorních podmínkách

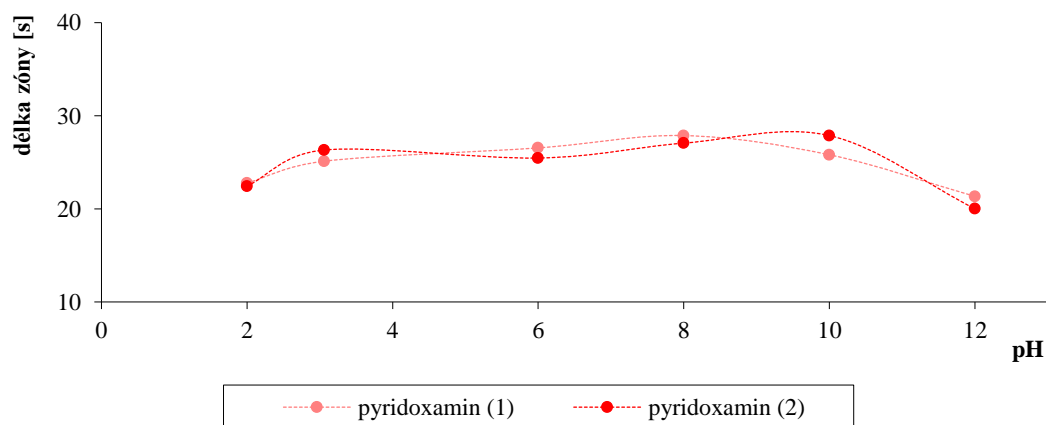
Roztok pyridoxaminu o koncentraci 0,001 M byl ponechán stát po určitou dobu při laboratorní teplotě. Postupně byly odebírány vzorky pro zjištění výtěžnosti měření. V Grafu 32 je znázorněna závislost výtěžnosti na počtu dní. Naměřené hodnoty jsou k nahlédnutí v Tabulce 42 v Příloze.



**Graf 32:** Výtěžnost pyridoxaminu během stání při laboratorních podmínkách

### 3.4.4.3 Odolnost roztoku vůči změnám pH

150 ml 0,001 M roztoku pyridoxaminu bylo rozděleno na 6 totožných částí (po 25 ml). U roztoků bylo postupně upraveno pH (pomocí  $\text{CH}_3\text{COOH}$  a  $\text{NaOH}$ ) na hodnoty 2, 6, 8, 10 a 12. Jedna část byla ponechána bez přídavku a po proměření byla získána hodnota pH, která odpovídala vodnému roztoku vitamínu (v tomto případě  $\text{pH} = 3,06$ ). U každého pH byla prováděna dvě měření (Graf 33) – okamžité měření (1) a měření následující den (2). Naměřené hodnoty jsou k nahlédnutí v Příloze (Tabulka 46).



**Graf 33:** Závislost délky zóny pyridoxaminu na pH roztoku

Pyridoxamin se v roztoku jevil jako poměrně stabilní při stání a záhřevu na 50 °C. Při teplotě 100 °C docházelo k výraznějším ztrátám (až 10 %). Při uchovávání v mrazničce byly ztráty pyridoxaminu výrazně vyšší než při stání roztoku za laboratorních podmínek. V silně kyselém (při pH 2) a silně zásaditém (pH 12) prostředí délka zóny pyridoxaminu klesala, v rozmezí hodnot 3 – 10 byla relativně stabilní.



## 4 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo poskytnout ucelený souhrn údajů, týkajících se vitamínů skupiny B kationtového typu. V teoretické části jsou proto uvedeny informace ohledně základního rozdělení vitamínů, důležitých funkcí v lidském organismu, jejich výskytu ve vybraných potravinách, fyzikálně-chemických vlastností, ztrát při skladování a zpracování potravin, syntéz a stanovení se zaměřením na elektromigrační separační techniky.

Thiamin (vitamín B<sub>1</sub>), riboflavin (vitamín B<sub>2</sub>) i pyridoxin (vitamín B<sub>6</sub>) patří mezi vitamíny rozpustné ve vodě. Nejdůležitější funkcí zmíněných vitamínů je účast v metabolických procesech, kde vystupují jako kofaktory enzymů. Požadavky na příjem vitamínů se pohybují ve velmi nízkých hodnotách, nedostatek těchto látek však způsobuje nejružnější poruchy a onemocnění. Je proto nutné udržovat dostatečný příjem v potravě, nebo hladinu vitamínů zvyšovat pomocí potravinových doplňků. Ztráty vitamínů v potravinách jsou způsobeny zejména vyluhováním při jejich zpracování. Co se týče analýzy daných vitamínů, jsou známy postupy s využitím chromatografických, spektrálních, elektrochemických, elektromigračních technik a mikrobiologických testů. Důležitým krokem před vlastní analýzou je extrakce látek z komplexní potravinové matrice.

Izotachoforetické stanovení vitamínu B<sub>1</sub> a tří forem vitamínu B<sub>6</sub> (pyridoxin, pyridoxal a pyridoxamin) je popsáno v experimentální části. Riboflavin nebylo možné touto metodou stanovit, jelikož neposkytuje v izotachoforetickém systému žádnou zónu. Měření lze provést pro riboflavin-5'-fosfát (FMN) v aniontovém izotachoforetickém režimu. Standard však nebyl pro analýzu k dispozici.

V první řadě bylo potřeba najít optimální složení elektrolytového systému, ve kterém by byly zóny jednotlivých vitamínů dobře rozlišeny. Bylo zjištěno, že ideálním řešením je použití vedoucího elektrolytu, který se skládá ze směsi 0,02 M CH<sub>3</sub>COOK + CH<sub>3</sub>COOH o pH 5,0, a roztoku 0,02 M CH<sub>3</sub>COOH jako koncového elektrolytu. Tento systém byl následně využit pro veškeré analýzy daných vitamínů.

Pro jednotlivé vitamíny byly stanoveny meze detekce a meze stanovitelnosti. Pro thiamin jsou tyto hodnoty: mez detekce – 0,87 mg/mol, mez stanovitelnosti – 2,6 mg/l, pro pyridoxin: mez detekce – 0,74 mg/l, mez stanovitelnosti – 2,22 mg/l, pro pyridoxal: mez detekce – 0,7 mg/l, mez stanovitelnosti – 2,09 mg/l a pro pyridoxamin: mez detekce – 0,83 mg/l, mez stanovitelnosti – 2,48 mg/l.

Pro analýzu šesti reálných vzorků byly použity dvě metody – metoda kalibrační křivky a metoda standardního přídatku. Zjištěné množství téměř ve všech případech odpovídalo deklarovanému množství, které výrobce uvedl na obale.

Na samém konci experimentální části jsou uvedeny testy stability, při kterých byly roztoky vitamínů podrobeny změnám teploty, pH a působení času.

Bylo potvrzeno, že pomocí izotachografie lze stanovit některé vitamíny. Tato metoda se však nachází ve stínu rychlejších a přesnějších technik, které často mohou dosahovat nižších detekčních limitů a v dnešní době se primárně využívají (např. HPLC).

## 5 ZDROJE

- [1] BENDER, David A. *Nutritional Biochemistry of the Vitamins*. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. 511 s. ISBN: 978-0-521-80388-5.
- [2] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. 2. upravené vydání. Tábor: OSSIS, 2002. 320 s. ISBN 80-86659-01-1.
- [3] HLÚBIK, Pavol, OPLTOVÁ, Libuše. *Vitaminy*. Praha: Grada, 2004. 232 s. ISBN 80-247-0373-4.
- [4] UHEROVÁ, Ružena. *Čo vieme o vitamínoch dnes*. Bratislava: Malé centrum, 2002. 144 s. ISBN 80-968737-0-9.
- [5] KENNEDY, David O. B Vitamins and the Brain: Mechanisms, Dose and Efficacy – A Review. *Nutrients*. 2016, **8** (2), 68. 29 s. ISSN 2072-6643.
- [6] TYLICKI, Adam, ŁOTOWSKI, Zenon, SIEMIENIUK, Magdalena, RATKIEWICZ, Artur. Thiamine and Selected Thiamine Antivitamins – Biological Activity and Methods of Synthesis. *Bioscience Reports*. 2018, **38** (1), BSR20171148. ISSN 0144-8463.
- [7] WOLF, Augustin, HÁJEK, Miloš, HRUBÝ, Stanislav. *Elixíry života: povzbuzující a posilující látky*. Praha: Pragma, 1997. 306 s. ISBN 80-7205-432-5.
- [8] PÁNEK, Jan, POKORNÝ, Jan, DOSTÁLOVÁ, Jana, KOHOUT, Pavel. *Základy výživy*. 1. vydání. Praha: Svoboda Servis, 2002. 207 s. ISBN 80-86320-23-5.
- [9] KARLSON, Peter. *Základy biochemie*, 3. přepracované vydání. Praha: Academia, 1981. 501 s.
- [10] DAVÍDEK, Jiří, HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin: určeno pro posluchače fakulty potravinářské a biochemické technologie*, 2. vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1991. ISBN 80-7080-097-6.
- [11] SMITH, Alison G., CROFT, Martin T., MOULIN, Michael, WEBB, Michael E. Plants Need Their Vitamins too. *Current Opinion in Plant Biology*. 2007, **10** (3), s. 266–275. ISSN 1369-5266.

- [12] JANSEN, B. C. P., DONATH, W. F. On the Isolation of the Anti-Beri-Beri Vitamin. *Proceedings R. Acad. Amsterdam*. 1926, **29**, s. 1390-1400.
- [13] FRANKENBURG, Frances R. *Vitamin Discoveries and Disasters: History, Science, and Controversies*. Santa Barbara: Praeger / ABC - CLIO, 2009. 143 s. ISBN 978-0-313-35475-5.
- [14] EGGERSDORFER, Manfred, LAUDERT, Dietmar, LÉTINOIS, Ulla, McCLYMONT, Tom, MEDLOCK, Jonathan, NETSCHER, Thomas, BONRATH, Werner. One Hundred Years of Vitamins – A Success Story of the Natural Sciences. *Angewandte Chemie International Edition*. 2012, **51** (52), s. 12960-12990. ISSN 1433-7851.
- [15] CHANDRA-HIOE, M. V., ARCOT, J., BUCKNALL, M. P. *Thiamin: Properties and Determination*. In: *Encyclopedia of Food and Health*. Editors: CABALLERO, Benjamin, FINGLAS, Paul M., TOLDRÁ, Fidel. 1. ed. Boston: Elsevier/Academic Press, 2016. s. 297-302. ISBN 978-0-12-384947-2.
- [16] BALL, George F. M. *Vitamins in Foods: Analysis, Bioavailability, and Stability*. Boca Raton, FL: Taylor & Francis, 2006. 814 s. ISBN 978-1-57444-804-7.
- [17] CARPENTER, Kenneth J. *Beriberi, White Rice, and Vitamin B: A Disease, a Cause, and a Cure*. Berkeley: University of California Press, 2000. 297 s. ISBN 978-0-520-22053-9.
- [18] BALL, George F. M. *Vitamins: Their Role in the Human Body*. Ames: Blackwell Science, 2004. 449 s. ISBN 978-0-632-06478-6.
- [19] COULTATE, Tom P. *Food: The Chemistry of Its Components*. 3rd ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2001. 359 s. ISBN 0-85404-513-9.
- [20] NICOLAS, E. C., PFENDER, K. A. Fast and Simple Liquid Chromatographic Determination of Nonphosphorylated Thiamine in Infant Formula, Milk, and Other Foods, *Journal Association of Official Analytical Chemists*. 1990, **73** (5), s. 792-198. ISSN 0004-5756.
- [21] McCANCE, R. A., WIDDOWSON, Elsie M. *McCance and Widdowson's The Composition of Foods*. 7 th ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2014. 644 s. ISBN 978-1-84973-636-7.

- [22] EGI, Y., KAWASAKI, T. *Thiamin: Properties and Determination*. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2.ed. Editors: CABALLERO, Benjamin, TRUGO, Luiz C., FINGLAS, Paul M. Amsterdam: Academic Press, 2003. s. 5767-5772. ISBN 978-0-12-227055-0.
- [23] DWIVEDI, Basant K., ARNOLD, Roy G. Chemistry of Thiamine Degradation in Food Products and Model Systems: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1973, **21** (1), s. 54-60. ISSN 1520-5118.
- [24] FELICIOTTI, E., ESSELEN, W. B. Thermal Destruction Rates of Thiamine in Pureed Meats and Vegetables. *Food Technology*. 1957, **11** (2), s. 77-84.
- [25] TAKAHASHI, Kazuro, KITTAGAWA, Tatsuya, SHIMAO, Mitsuko. Acute Polyneuritis Associated with Edema: A Recent Revival of Beriberi Neuropathy in Japan. *Japanese Journal of Medicine*. 1976, **15** (3), s. 214-222. ISSN 0021-5120.
- [26] CARPENTER, Kenneth J. Acute Versus Marginal Deficiencies of Nutrients, *Nutrition Reviews*. 2002, **60** (9), s. 277-280. ISSN 1753-4887.
- [27] BATES, Christopher J. *Chapter 8: Thiamine*. In: *Handbook of Vitamins*. 4th ed. Editors: ZEMPLÉNI, Janos, RUCKER, Robert B., McCORMICK, Donald B., SUTTIE, John W. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007. s. 253-288. ISBN 978-0-8493-4022-5.
- [28] KAWAI, Chuichi, WAKABAYASHI, Akira, MATSUMURA, Tadashi, YUI, Yoshiki. Reappearance of Beriberi Heart Disease in Japan. A Study of 23 Cases. *The American Journal of Medicine*. 1980, **69** (3), s. 383-386. ISSN 0002-9343.
- [29] WILLIAMS, Robert R. *Toward the Conquest of Beriberi*. Cambridge: Harvard University Press, 1961. 338 s. ISBN 978-0-674-59393-0.
- [30] TANPHAICHITR, Vichai. *Chapter 8: Thiamine*. In: *Handbook of Vitamins*. 3. ed. Editors: RUCKER, Robert B., SUTTIE, John W., McCORMICK, Donald B., MACHLIN, Lawrence J. NY: Marcel Dekker, Inc., 2001. s. 275-316. ISBN 0-8247-0428-2.
- [31] GREWE, Rudolf. Die Konstitution des Aneurin (Vitamin B<sub>1</sub>). *Naturwissenschaften*. 1936, **24**, s. 657-662. ISSN 1432-1904.

- [32] MATSUKAWA, Taizo, IWATSU, Takeo. Studies on Vitamin B<sub>1</sub> and Related Compounds. XLIII: Synthesis of Allithiamine Homologs. *Yakugaku Zasshi*. 1951, **71**, s. 1215-1218. ISSN 1347-5231.
- [33] NORTHROP-CLEWES, Christine A., THURNHAM, David I. The Discovery and Characterization of Riboflavin. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2012, **61** (3), s. 224-230. ISSN 1421-9697.
- [34] RIVLIN, Richard S. *Chapter 7: Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>)*. In: *Handbook of Vitamins*. 4th ed. Editors: ZEMPLÉNI, Janos, RUCKER, Robert B., McCORMICK, Donald B., SUTTIE, John W. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007. s. 233-252. ISBN 978-0-8493-4022-5.
- [35] KANNO, C., KANEHARA, N., SHIRAFUJI, K., TANJI, R., IMAI, T. Binding Form of Vitamin B<sub>2</sub> in Bovine Milk: Its Concentration, Distribution and Binding Linkage. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 1991, **37** (1), s. 15-27. ISSN 0301-4800.
- [36] KANNO, C., SHIRAHUJI, K., HOSHI, T. Simple Method for Separate Determination of Three Flavins in Bovine Milk by High Performance Liquid Chromatography, *Journal of Food Science*. 1991, **56** (3), s. 678-681. ISSN 1750-3841.
- [37] HARTMAN, Arthur M., DRYDEN, Leslie P. *Vitamins in Milk and Milk Products*. Champaign, IL: American Dairy Science Association, 1965. 123 s.
- [38] EITENMILLER, Ronald R., YE, Lin, LANDEN, W. O. *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008. 662 s. ISBN 978-0-8493-9771-4.
- [39] KUHN, Richard, RUDY, Hermann. Syntetische Vitamin-B<sub>2</sub>-Phosphosäure. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 1935, **68** (2), s. 383-386. ISSN 1099-0682.
- [40] KUHN, Richard, REINEMUND, Karl, WEYGANG, Friedrich, STRÖBELE, Rudolf. Über die Synthese des Lactoflavins (Vitamin B<sub>2</sub>). *European Journal of Inorganic Chemistry*. 1935, **68** (9), s. 1765-1774. ISSN 1099-0682.
- [41] KARRER, P., SCHÖPP, K., BENZ, F. Synthesis of Flavins IV. *Helvetica Chimica Acta*. 1935, **18** (1), s. 426-429. ISSN 1522-2675.

- [42] VON EULER, H., KARRER, P., MALMBERG, M., SCHÖPP, K., BENZ, F., FREI, P. Synthese des Lactoflavins (Vitamin B<sub>2</sub>) und anderer Flavine. *Helvetica Chimica Acta*. 1935, **18** (1), s. 522-535. ISSN 1522-2675.
- [43] KARRER, P., BECKER, B., BENZ, F., FREI, P., SALOMON, H., SCHÖPP, K. Zur Synthese des Lactoflavins. *Helvetica Chimica Acta*. 1935, **18** (1), s. 1435-1448. ISSN 1522-2675.
- [44] BACHER, A., EBERHARDT, S., FISCHER, M., KIS, K., RICHTER, G. Biosynthesis of Vitamin B<sub>2</sub> (Riboflavin). *Annual Review of Nutrition*. 2000, **20**, s. 153-167. ISSN 0199-9885.
- [45] VAŠÁTKO, Jozef, HALAŠA, Vladimír. Biosyntéza riboflavínu. *Chemické zvesti*. 1949, **10**, s. 354-358. ISSN 1336-9075.
- [46] YAMASAKI, I., YOSITOME, W. Über die Bildung des Vitamin B<sub>2</sub> – Komplexes aus Cerealien bei der Gärung von Aceton-Butylalkoholbakterien. *Biochemische Zeitschrift*. 1938, **297**, s. 398-411. ISSN 0336-0753.
- [47] GYÖRGY, Paul. The History of Vitamin B<sub>6</sub>. Introductory Remarks. *Vitamins & Hormones*. 1964, **22**, s. 361-365. ISSN 0083-6729.
- [48] SNELL, Esmond E. The Vitamin B<sub>6</sub> Group. I. Formation of Additional Members from Pyridoxine and Evidence Concerning their Structure. *Journal of the American Chemical Society*. 1944, **66** (12), s. 2082-2088. ISSN 0002-7863.
- [49] DAKSHINAMURTI, Shyamala, DAKSHINAMURTI, Krishnamurti. *Chapter 10: Vitamin B<sub>6</sub>*. In: *Handbook of Vitamins*. 4th ed. Editors: ZEMPLENI, Janos, RUCKER, Robert B., McCORMICK, Donald B., SUTTIE, John W. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007. s. 315-360. ISBN 978-0-8493-4022-5.
- [50] GONZÁLEZ, Eugenia, DANEHOWER, David, DAUB, Margaret E. Vitamer Levels, Stress Response, Enzyme Activity, and Gene Regulation of Arabidopsis Lines Mutant in the Pyridoxine/Pyridoxamine 5'-Phosphate Oxidase (PDX3) and the Pyridoxal Kinase (SOS4) Genes Involved in the Vitamin B<sub>6</sub> Salvage Pathway. *Plant Physiology*. 2007, **145** (3), s. 985-996. ISSN 1532-2548.

- [51] SPINNEKER, A., SOLA, R., LEMMEN, V., CASTILLO, M. J., PIETRZIK, K., GONZÁLEZ-GROSS, M. Vitamin B<sub>6</sub> Status, Deficiency and its Consequences – On Overview. *Nutrición Hospitalaria*. 2007, **22** (1), s. 7-24. ISSN 1699-5198.
- [52] ANITHA, M., ABRAHAM, P. M., PAULOSE, C. S. Striatal Dopamine Receptors Modulate the Expression of Insulin Receptor, IGF-1 and GLUT-3 in Diabetic Rats: Effect of Pyridoxine Treatment. *European Journal of Pharmacology*. 2012, **696** (1-3), s. 54–61. ISSN 0014-2999.
- [53] NGUYEN, L. B., GREGORY, J. F., III, Effects of Food Composition on the Bioavailability of Vitamin B-6 in the Rat. *The Journal of Nutrition*. 1983, **113** (8), s. 1550-1560. ISSN 1541-6100.
- [54] PERERA, A. D., LEKLEM, J. E., MILLER, L. T. Stability of Vitamin B<sub>6</sub> during Bread Making and Storage of Bread and Flour. *Cereal Chemistry*. 1979, **56** (6), s. 577-580. ISSN 1943-3638.
- [55] VEDRINA-DRAGOJEVIĆ, Irena, ŠEBEČIĆ, Blaženka. Effect of Frozen Storage on the Degree of Vitamin B<sub>6</sub> Degradation in Different Foods, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. 1994, **198** (1), s. 44-46. ISSN 1438-2385.
- [56] GREGORY, J. F. III., HINER, M. E. Thermal Stability of Vitamin B<sub>6</sub> Compounds in Liquid Model Food Systems. *Journal of Food Science*. 1983, **48** (4), s. 1323-1327. ISSN 1750-3841.
- [57] LI, Ting-Kai. *Chapter 13: Factors influencing Vitamin B<sub>6</sub> Requirement in Alcoholism*. In: National Research Council. *Human Vitamin B<sub>6</sub> Requirements*. Washington, DC: National Academy of Sciences, 1978, s. 210-225. ISBN 0-309-02642-3.
- [58] HOYUMPA, Anastacio M. Mechanisms of Vitamin Deficiencies in Alcoholism. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*. 1986, **10** (6), s. 573-581. ISSN 1530-0277.
- [59] SNELL, Esmond E. Chemical Structure in Relation to Biological Activities of Vitamin B<sub>6</sub>. *Vitamins & Hormones*. 1958, **16**, s. 77-125. ISSN 0083-6729.
- [60] SAIDI, Bouchta, WARTHESEN, Joseph J. Influences of pH and Light on the Kinetics of Vitamin B<sub>6</sub> Degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1983, **31** (4), s. 876-880. ISSN 1520-5118.



- [61] ANG, C. Y. W. Stability of Three Forms of Vitamin B<sub>6</sub> to Laboratory Light Conditions. *Journal Association of Official Analytical Chemists*. 1979, **62** (5), s. 1170-1173. ISSN 0004-5756.
- [62] JASTRZEBSKA, Aneta, KOWALSKA, Sylwia, SZŁYK, Edward. New Procedure for Column-Switching Isotachophoretic Determination of Vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>6</sub> in Beer Samples. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2017, **57**, s. 80-86. ISSN 0889-1575.
- [63] KUHN, R., WESTPHAL, K., WENDT, G., WESTPHAL, O. Synthesis of Adermin. *Naturwissenschaften*. 1939, **27**, s. 469-470. ISSN 1432-1904.
- [64] HARRIS, Stanton A., FOLKERS, Karl. Synthesis of Vitamin B<sub>6</sub>. *Journal of the American Chemical Society*. 1939, **61** (5), s. 1245-1247. ISSN 0002-7863.
- [65] TALINLI, Naciye, KARLIĞA, Bekir, ANAÇ, Olcay. Investigations on the Reactions of a Carbonylcarbene with Substituted 1,3-Dioxepins. *Helvetica Chimica Acta*. 2000, **83** (5), s. 966-971. ISSN 1522-2675.
- [66] URBANSKI, T. Vitamin B<sub>6</sub>: Pyridoxine, Pyridoxal and Pyridoxamine. *Research*. 1949, **2** (11), s. 507-511.
- [67] HARRIS, Stanton A., HEYL, Dorothea, FOLKERS, Karl. The Vitamin B<sub>6</sub> Group. II. The Structure and the Synthesis of Pyridoxamine and Pyridoxal. *Journal of the American Chemical Society*. 1944, **66** (12), s. 2088-2092. ISSN 0002-7863.
- [68] SZPIKOWSKA-SROKA, Barbara. A Simple and Sensitive Analytical Method for the Determination of Thiamine in Pharmaceutical Preparations. *Journal of Analytical Chemistry*. 2013, **68** (3), s. 218-222. ISSN 1061-9348.
- [69] BARGER, G., BERGEL, F., TODD, A. R. A Crystalline Fluorescent Dehydrogenation Product from Vitamin B<sub>1</sub>. *Nature*. 1935, **136** (3433), s. 259. ISSN 1476-4687.
- [70] BALL, G. F. M. *Bioavailability and Analysis of Vitamins in Foods*. London: Chapman and Hall, 1998. 267. 569 s. ISBN 978-0-412-78090-5.

- [71] LYNCH, P. L. M., YOUNG, Ian S. Determination of Thiamine by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2000, **881** (1-2), s. 267-284. ISSN 0021-9673.
- [72] YOSHIDA, Mikihiro, HISHIYAMA, Takashi, OGAWARA, Masako, FUSE, Koji, MORI, Mitsuaki, IGARASHI, Tomoji, TANIGUCHI, Makoto. A Novel Method for Determining Vitamin B<sub>1</sub> in a Wide Variety of Foodstuffs with or without Polyphenols. *Food Chemistry*. 2012, **135** (4), s. 2387-2392. ISSN 0308-8146.
- [73] BAKER, Herman, FRANK, Oscar, FENNELLY, James, LEEVY, Carroll M. A Method for Assaying Thiamine Status in Man and Animals. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1964, **14** (4), s. 197-201. ISSN 1938-3207.
- [74] VIDAL-VALVERDE, Concepción, DIAZ-POLLÁN, Concepción. Optimization Analysis by Capillary Electrophoresis of Thiamine in Meat: Comparison with High Performance Liquid Chromatography. *European Food Research and Technology*. 1999, **209** (5), s. 355-359. ISSN 1438-2377.
- [75] VIDAL-VALVERDE, Concepción, DIAZ-POLLÁN, Concepción. Comparison of Capillary Electrophoresis and High Performance Liquid Chromatographic Thiamin Determination in Milk. *Milchwissenschaft*. 2000, **55** (6), s. 307-309. ISSN 0026-3788.
- [76] MRESTANI, Yahya, NEUBERT, Reinhard H. H. Thiamine Analysis in Biological Media by Capillary Zone Electrophoresis with a High-Sensitivity Cell. *Journal of Chromatography A*. 2000, **871** (1-2), s. 351-356. ISSN 0021-9673.
- [77] SHABANGI, Masangu, SUTTON, Jeffrey A. Separation of Thiamin and Its Phosphate Esters by Capillary Zone Electrophoresis and Its Application to the Analysis of Water-Soluble Vitamins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005, **38** (1), s. 66-71. ISSN 0731-7085.
- [78] DAVÍDEK, Jiří a kolektiv. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. Praha: SNTL, 1977. 720 s.
- [79] BITSCH, R. *Riboflavin: Properties and Determination*. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2.ed. Editors: CABALLERO, Benjamin, TRUGO, Luiz C., FINGLAS, Paul M. Amsterdam: Academic Press, 2003. s. 4983-4989. ISBN 978-0-12-227055-0.

- [80] CATALDI, Tommaso R. I., NARDIELLO, Donatella, DE BENEDETTO, Giuseppe E., BUFO, Sabino A. Optimizing Separation Conditions for Riboflavin, Flavin Mononucleotide and Flavin Adenine Dinucleotide in Capillary Zone Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection. *Journal of Chromatography A*. 2002, **968**, s. 229-239. ISSN 0021-9673.
- [81] PÉREZ-RUIZ, Tomás, MARTÍNEZ-LOZANO, Carmen, SANZ, Antonio, BRAVO, Eva. Determination of Riboflavin, Flavin Mononucleotide and Flavin Adenine Dinucleotide in Biological Tissues by Capillary Zone Electrophoresis and Laser-Induced Fluorescence Detection. *Electrophoresis*. 2001, **22** (6), s. 1170-1174. ISSN 1522-2683.
- [82] SU, An-Kai, LIN, Cheng-Huang. Determination of Riboflavin in Urine by Capillary Electrophoresis-Blue Light Emitting Diode-Induced Fluorescence Detection Combined with a Stacking Technique. *Journal of Chromatography B*. 2003, **785** (1), s. 39-46. ISSN 1570-0232.
- [83] SU, An-Kai, CHANG, Yen-Sheng, LIN, Cheng-Huang. Analysis of Riboflavin in Beer by Capillary Electrophoresis/Blue Light Emitting Diode (LED)-Induced Fluorescence Detection Combined with a Dynamic pH Junction Technique. *Talanta*. 2004, **64** (4), s. 970-974. ISSN 0039-9140.
- [84] DRISKELL, J. A. *Vitamin B<sub>6</sub>: Properties and Determination*. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2.ed. Editors: CABALLERO, Benjamin, TRUGO, Luiz C., FINGLAS, Paul M. Amsterdam: Academic Press, 2003. s. 6012-6020. ISBN 978-0-12-227055-0.
- [85] BURTON, D. E., SEPANIAK, M. J., MASKARINEC, M. P. Analysis of B<sub>6</sub> Vitamins by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography with Laser-Excited Fluorescence Detection. *Journal of Chromatographic Science*. 1986, **24** (8), s. 347-351. ISSN 1945-239X.
- [86] KLAMPFL, Christian W., VO, Thuy Diep Thanh. Comparison of Capillary Zone Electrophoretic Techniques Combined with Indirect UV, Direct UV, and Mass Spectrometric Detection for the Determination of Underivatized Amino Acids and Vitamin B<sub>6</sub> in Infusion Solutions. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2007, **26** (17), s. 2783-2795. ISSN 1082-6076.

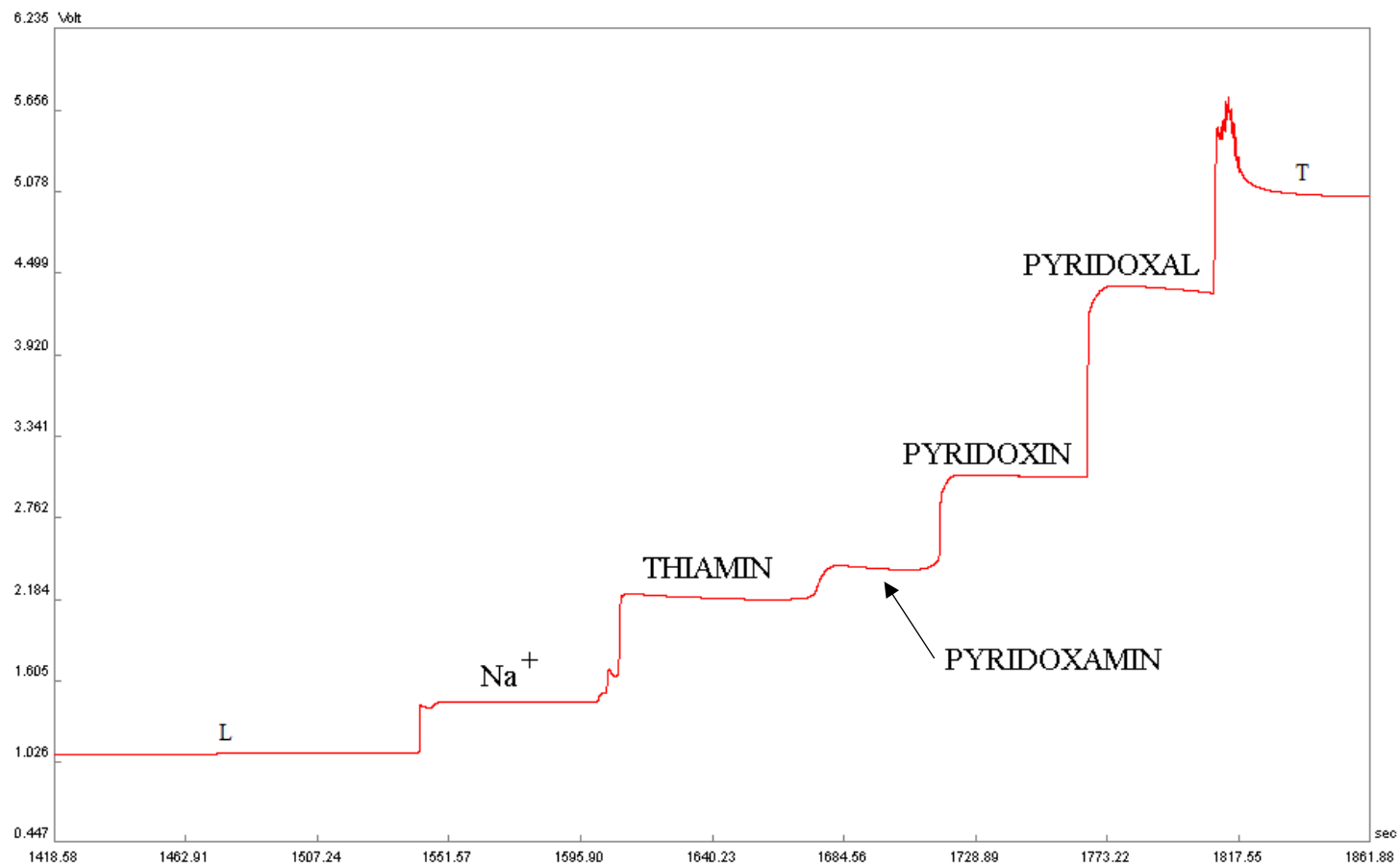
- [87] GARCÍA, L., BLÁZQUEZ, S., SAN ANDRÉS, M. P., VERA, S. Determination of Thiamine, Riboflavin and Pyridoxine in Pharmaceuticals by Synchronous Fluorescence Spectrometry in Organized Media. *Analytica Chimica Acta*. 2001, **434** (2), s. 193-199. ISSN 0003-2670.
- [88] KLEJDUS, Bořivoj, PETRLOVÁ, Jitka, POTĚŠIL, David, ADAM, Vojtěch, MIKELOVÁ, Radka, VACEK, Jan, KIZEK, Rene, KUBÁŇ, Vlastimil. Simultaneous Determination of Water- and Fat-Soluble Vitamins in Pharmaceutical Preparations by High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Diode Array Detection. *Analytica Chimica Acta*. 2004, **520** (1-2), s. 57-67. ISSN 0003-2670.
- [89] MORENO, P., SALVADÓ, V. Determination of Eight Water- and Fat-Soluble Vitamins in Multi-Vitamin Pharmaceutical Formulations by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2000, **870** (1-2), s. 207-215. ISSN 0021-9673.
- [90] KARATAPANIS, Andreas E., FIAMEGOS, Yiannis C., STALIKAS, Constantine D. HILIC Separation and Quantitation of Water-Soluble Vitamins Using Diol Column. *Journal of Separation Science*. 2009, **32** (7), s. 909-917. ISSN 1615-9306.
- [91] SIDDIQUI, Imrana, PITRE, K. S. Voltammetric Determination of Vitamins in a Pharmaceutical Formulation. *Journal of a Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2001, **26** (5-6), s. 1009-1015. ISSN 0731-7085.
- [92] SCHREINER, Matthias, RAZZAZI, Ebrahim, LUF, Wolfgang. Determination of Water-Soluble Vitamins in Soft Drinks and Vitamin Supplements Using Capillary Electrophoresis. *Die Nahrung*. 2003, **47** (4), s. 243-247. ISSN 1521-3803.
- [93] SÁNCHEZ, Juan M., SALVADÓ, Victòria. Comparison of Micellar and Microemulsion Electrokinetic Chromatography for the Analysis of Water- and Fat-Soluble Vitamins. *Journal of Chromatography A*. 2002, **950** (1-2), s. 241-247. ISSN 0021-9673.
- [94] ONG, C. P., NG, C. L., LEE, H. K., LI, S. F. Y. Separation of Water- and Fat-Soluble Vitamins by Micellar Electrokinetic Chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1991, **547**, s. 419-428. ISSN 0021-9673.

- [95] HUOPALAHTI, Rainer, SUNELL, Jarna. Use of Capillary Zone Electrophoresis in the Determination of B Vitamins in Pharmaceutical Products. *Journal of Chromatography A*. 1993, **636** (1), s. 133-135. ISSN 0021-9673.
- [96] FOTSING, L., FILLET, M., BECHET, I., HUBERT, Ph., CROMMEN, J. Determination of Six Water-Soluble Vitamins in a Pharmaceutical Formulation by Capillary Electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1997, **15** (8), s. 1113-1123. ISSN 0731-7085.
- [97] FRANCO, Marina, JASIONOWSKA, Renata, SALVATORE, Elisa. Application of CZE Method in Routine Analysis for Determination of B-Complex Vitamins in Pharmaceutical and Veterinary Preparations. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2012, **2012**, s. 1-7. ISSN 1687-8760.
- [98] PRIEGO-CAPOTE, Feliciano, LUQUE DE CASTRO, Maria. Determination of B<sub>2</sub> and B<sub>6</sub> Vitamins in Serum by Electrophoresis-Molecular Fluorescence-Charge Coupled Detector. *Electrophoresis*. 2005, **26** (12), s. 2376-2383. ISSN 1522-2683.
- [99] RÖBEN, R., RUBACH, K. *Determination of Water-Soluble Vitamins in Vitamin Preparations by Isotachophoresis*. In: *Analytical and Preparative Isotachophoresis: Proceedings: 3rd International Symposium on Isotachophoresis (Goslar, Germany, June 1-4, 1982)*. Editor: HOLLOWAY, Christopher J. Berlin: Walter de Gruyter & Co., 1984. s. 109 – 116. ISBN 978-3-1101-0178-2.
- [100] OFFIZORZ, Petra, RUBACH, Klaus. Isotachophoretische Bestimmung der B-Vitamine im ng-Bereich unter Verwendung Kationischer Spacerionen. *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie*. 1984, **317** (6), s. 662-663. ISSN 0016-1152.
- [101] TOMÁŠ, Roman, KOVAL, Marian, FORET, František. Coupling of Hydrodynamically Closed Large Bore Capillary Isotachophoresis with Electrospray Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2010, **1217** (25), s. 4144-4149. ISSN 0021-9673.
- [102] MALÁ, Zdena, GEBAUER, Petr, BOČEK, Petr. Recent Progress in Analytical Capillary Isotachophoresis. *Electrophoresis*. 2013, **34** (1), s. 19-28. ISSN 1522-2683.
- [103] BOČEK, Petr, DEML, Mirko, GEBAUER, Petr, DOLNÍK, Vladislav. *Pokroky chemie: (18) Analytická kapilární izotachoforéza*. 1. vydání. Praha: Academia, 1987. 136 s.

- [104] FRITSCH, R. J., KRAUSE, I. *Electrophoresis*. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2.ed. Editors: CABALLERO, Benjamin, TRUGO, Luiz C., FINGLAS, Paul M. Amsterdam: Academic Press, 2003. s. 2062-2069. ISBN 978-0-12-227055-0.
- [105] CHURÁČEK, Jaroslav a kolektiv. *Analytická separace látek*. Praha: SNTL, 1990. 384 s. ISBN 80-03-00569-8.

## **6 PŘÍLOHY**

**Obrázek 19:** Izotachoforetický záznam analýzy směsi stanovovaných vitamínů v elektrolytovém systému s vedoucím elektrolytem o pH 5,0  
(L – vedoucí elektrolyt, T – koncový elektrolyt)





**Tabulka 27:** Naměřená data pro zjištění výtěžnosti metody

VITAMÍN	SKUTEČNÁ KONCENTRACE [mg/l]	KALIBRAČNÍ KŘIVKA				
		délka zóny [s]	průměr [s]	směr. odchylka [s]	zjištěná koncentrace [mg/l]	výtěžnost [% ± s]
THIAMIN	138,2	58,36	57,82	0,6	149,9 ± 1,6	108,5 ± 1,2
		58,11				
		56,98				
PYRIDOXIN	85,9	40,43	40,24	0,3	88,8 ± 0,6	103,4 ± 0,7
		40,41				
		39,89				
PYRIDOXAL	86,7	46,20	45,75	0,4	95,8 ± 0,9	110,5 ± 1,0
		45,72				
		45,33				
PYRIDOXAMIN	115,9	50,46	49,94	0,5	122,1 ± 1,3	105,3 ± 1,1
		50,14				
		49,21				

**Tabulka 27:** Naměřená data pro zjištění výtěžnosti metody (pokračování)

VITAMÍN	SKUTEČNÁ KONCENTRACE [mg/l]	STANDARDNÍ PŘÍDAVEK					
		koncentrace stand. přídávku	délka zóny [s]	průměr [s]	směr. odchylka [s]	zjištěná koncentrace [mg/l]	výtěžnost [% ± s]
<b>THIAMIN</b>	138,2	<b><u>1. přídavek:</u></b> 71 mg/l	85,60	85,10	0,51	147,8 ± 0,9	106,9 ± 0,6
			84,59				
		<b><u>2. přídavek:</u></b> 142 mg/l	113,23	112,82	0,42		
			112,40				
<b>PYRIDOXIN</b>	85,9	<b><u>1. přídavek:</u></b> 37,2 mg/l	56,93	56,91	0,02	87,3 ± 0,2	101,6 ± 0,2
			56,89				
		<b><u>2. přídavek:</u></b> 74,4 mg/l	74,43	74,11	0,33		
			73,78				
<b>PYRIDOXAL</b>	86,7	<b><u>1. přídavek:</u></b> 48 mg/l	68,96	68,84	0,13	94,4 ± 0,2	108,9 ± 0,2
			68,71				
		<b><u>2. přídavek:</u></b> 96 mg/l	92,24	92,24	0,01		
			92,23				
<b>PYRIDOXAMIN</b>	115,9	<b><u>1. přídavek:</u></b> 67,8 mg/l	77,29	77,25	0,04	121,2 ± 0,2	104,6 ± 0,2
			77,21				
		<b><u>2. přídavek:</u></b> 135,6 mg/l	105,6	105,26	0,35		
			104,91				

**Tabulka 28:** Naměřené hodnoty jednotlivých vzorků

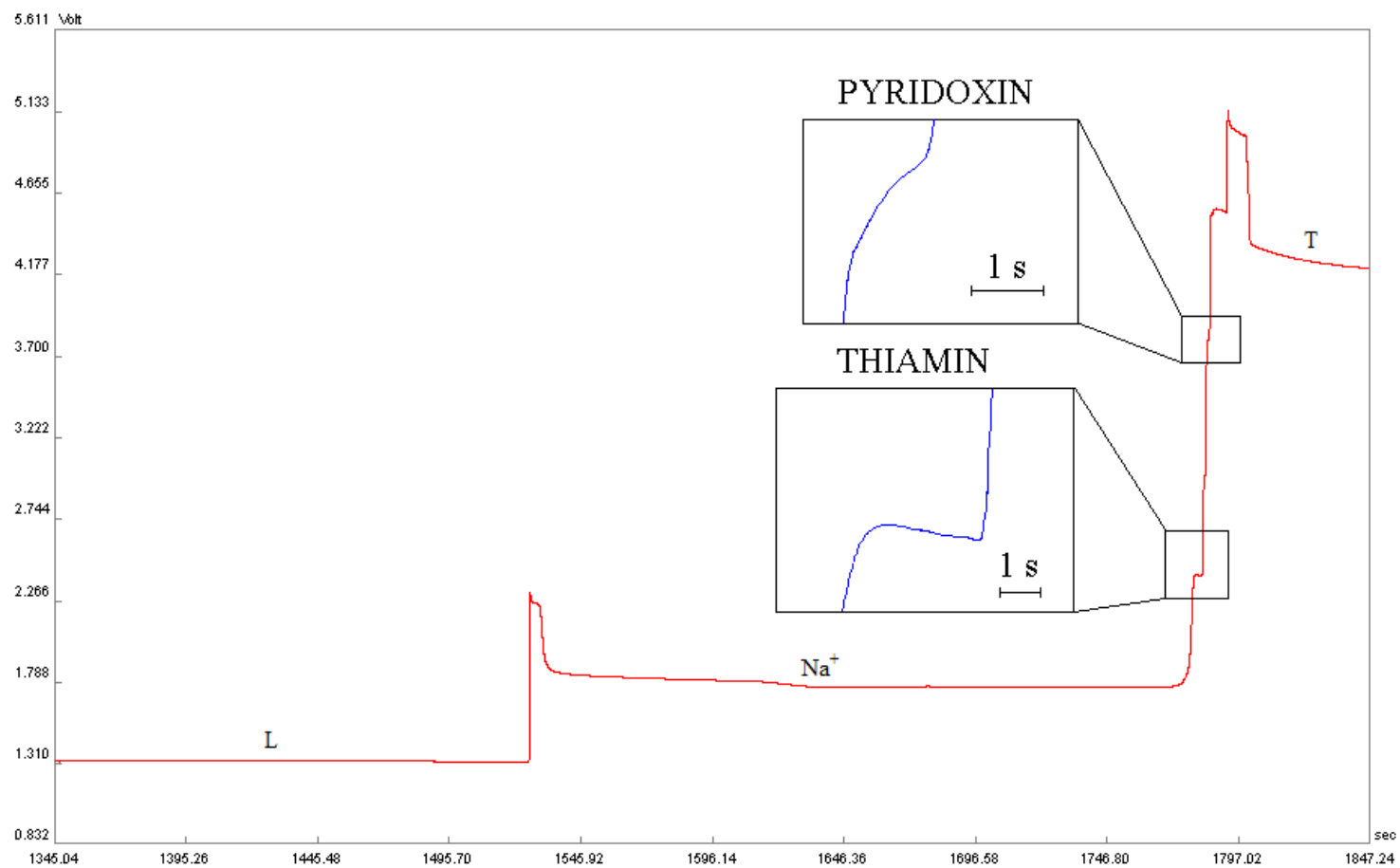
VZOREK	STANOVOVANÝ VITAMÍN	KALIBRAČNÍ KŘIVKA				
		délka zóny [s]	průměr [s]	směr. odchylka [s]	zjištěné množství [mg/tab.]	výtěžnost [% ± s]
č. 1	THIAMIN	1,17	1,23	0,06	8,9 ± 0,1	89,0 ± 1,0
		1,29				
	PYRIDOXIN	1,53	1,60	0,07	9,8 ± 0,1	98,0 ± 1,0
		1,67				
č. 2	THIAMIN	44,60	44,61	0,01	57,8 ± 0,1	115,6 ± 0,2
		44,62				
č. 3	PYRIDOXIN	17,90	17,96	0,06	19,7 ± 0,2	98,5 ± 0,3
		18,02				
č. 4	THIAMIN	3,33	3,24	0,09	1,0 ± 0,1	100,0 ± 10,0
		3,15				
	PYRIDOXIN	4,46	4,42	0,04	1,2 ± 0,1	120,0 ± 10,0
		4,39				
č. 5	THIAMIN	15,87	15,10	0,77	19,4 ± 1,0	129,3 ± 6,7
		14,33				
	PYRIDOXIN	12,02	12,11	0,09	13,2 ± 0,1	132,0 ± 1,0
		12,19				
č. 6	THIAMIN	6,67	6,42	0,30	2,0 ± 0,1	100 ± 5,0
		6,17				
	PYRIDOXIN	4,52	4,48	0,05	1,2 ± 0,1	120,0 ± 10,0
		4,43				

**Tabulka 28:** Naměřené hodnoty jednotlivých vzorků (pokračování)

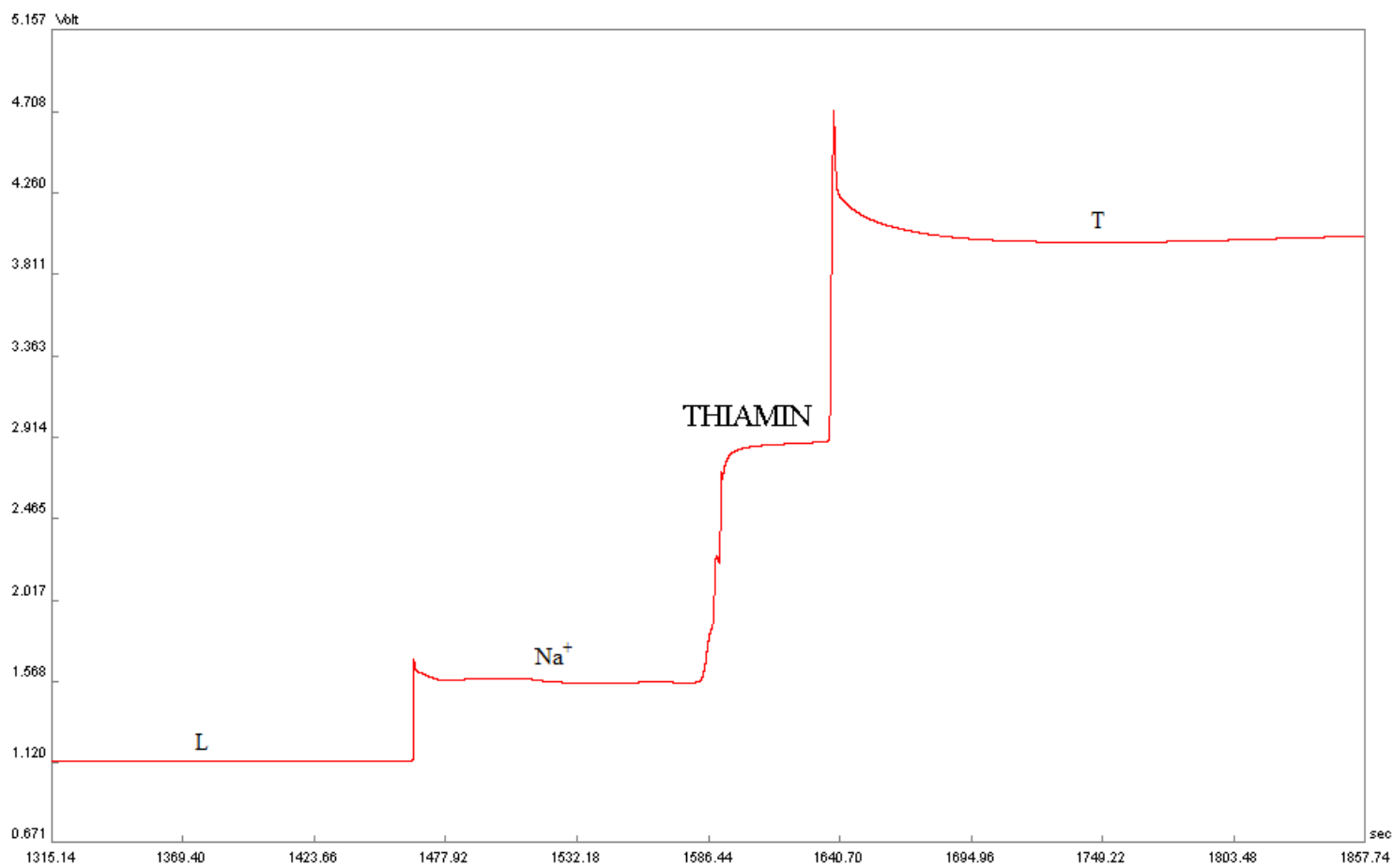
VZOREK	STANOVOVANÝ VITAMÍN	STANDARDNÍ PŘÍDAVEK				
		koncentrace přídatku [mg/l]	délka zóny [s]	průměr [s]	zjištěné množství [mg/tab.]	výtěžnost [% ± s]
č. 1	THIAMIN	17,20	7,34	7,38	10,3 ± 0,1	103,0 ± 1,0
			7,41			
	PYRIDOXIN	10,75	7,12	7,11	9,4 ± 1,0	94,0 ± 1,0
			7,09			
č. 2	THIAMIN	17,20	51,00	50,69	63,2 ± 0,4	126,4 ± 0,8
			50,37			
č. 3	PYRIDOXIN	10,75	23,58	23,68	16,9 ± 0,3	84,5 ± 1,5
			23,78			
č. 4	THIAMIN	17,20	11,00	10,8	0,9 ± 0,1	90,0 ± 10,0
			10,51			
	PYRIDOXIN	10,75	9,68	9,60	1,2 ± 0,1	120,0 ± 10,0
			9,45			
č. 5	THIAMIN	17,40	23,11	23,07	16,5 ± 1,0	110,0 ± 6,7
			23,03			
	PYRIDOXIN	10,84	17,34	17,28	12,7 ± 0,1	127,0 ± 1,0
			17,21			
č. 6	THIAMIN	17,40	11,90	12,87	2,2 ± 0,2	110,0 ± 10,0
			13,84			
	PYRIDOXIN	10,84	10,37	10,40	1,0 ± 0,1	100,0 ± 10,0
			10,43			

**Obrázek 20:** Izotachoforetický záznam analýzy vzorku č. 1: B-komplex GENERICA (60x zř.)

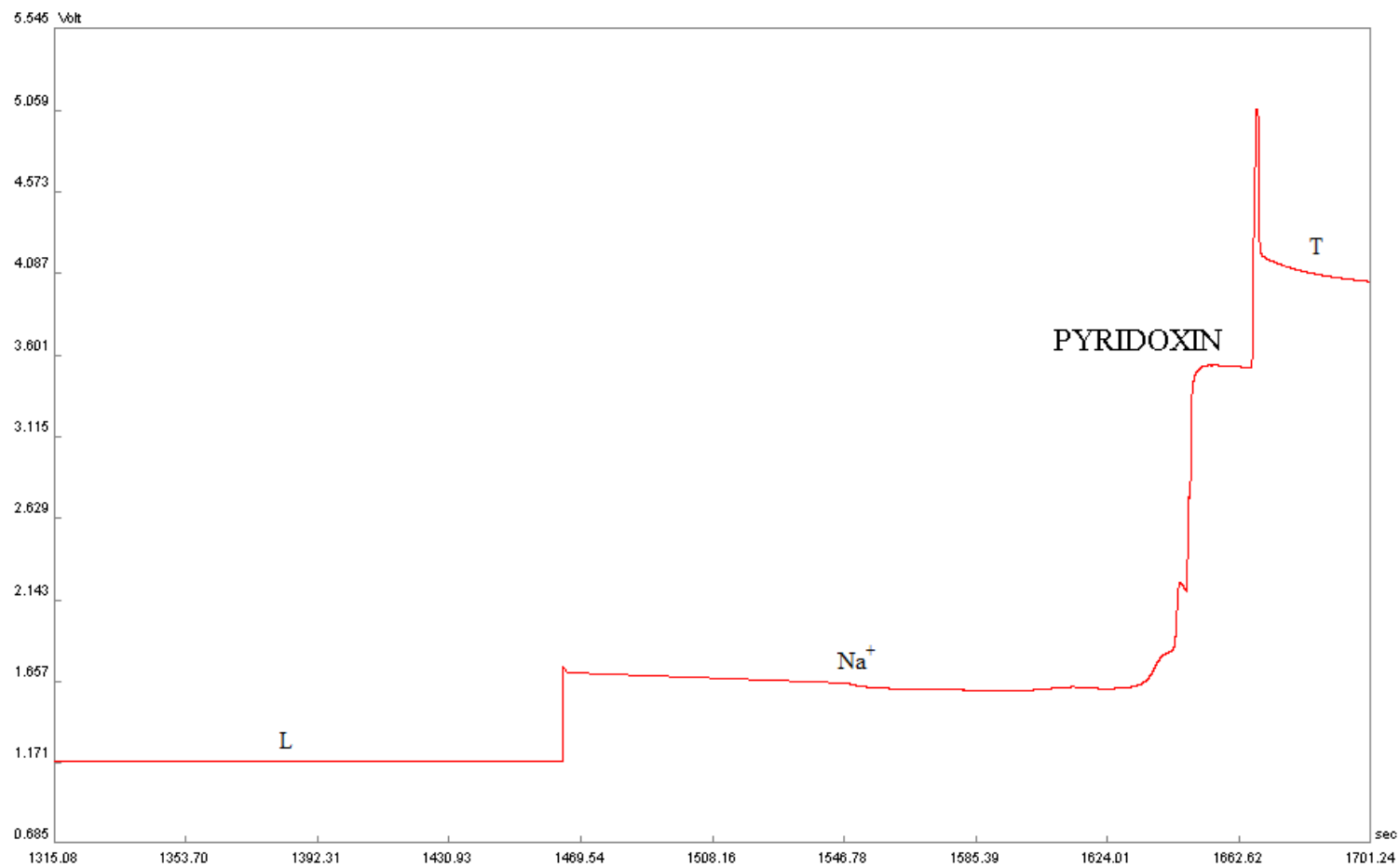
(L – vedoucí elektrolyt, T – koncový elektrolyt)



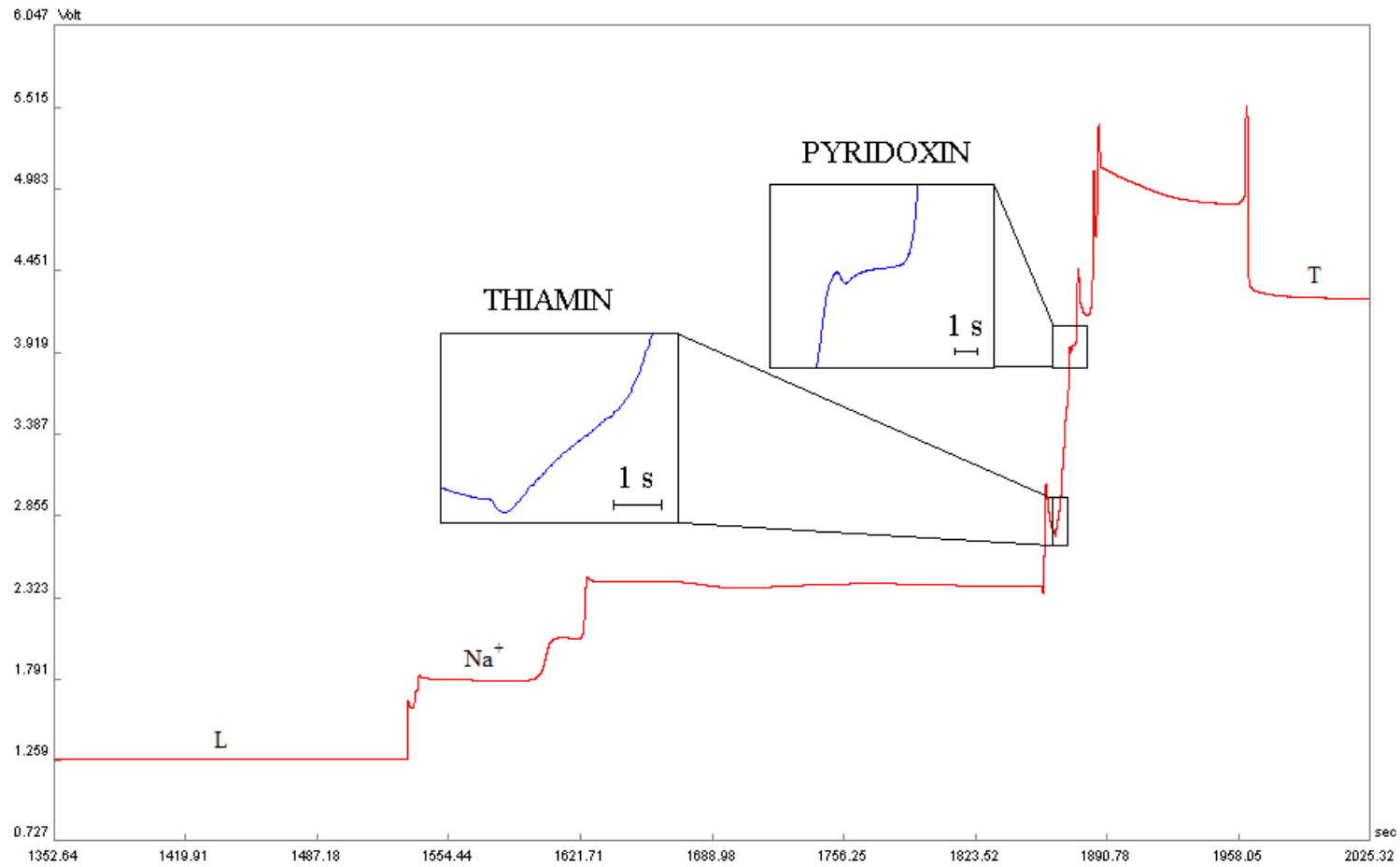
**Obrázek 21:** Izotachoforetický záznam analýzy vzorku č. 2: Thiamin  
(L – vedoucí elektrolyt, T – koncový elektrolyt)



**Obrázek 22:** Izotachoforetický záznam analýzy vzorku č. 3: Pyridoxin  
(L – vedoucí elektrolyt, T – koncový elektrolyt)

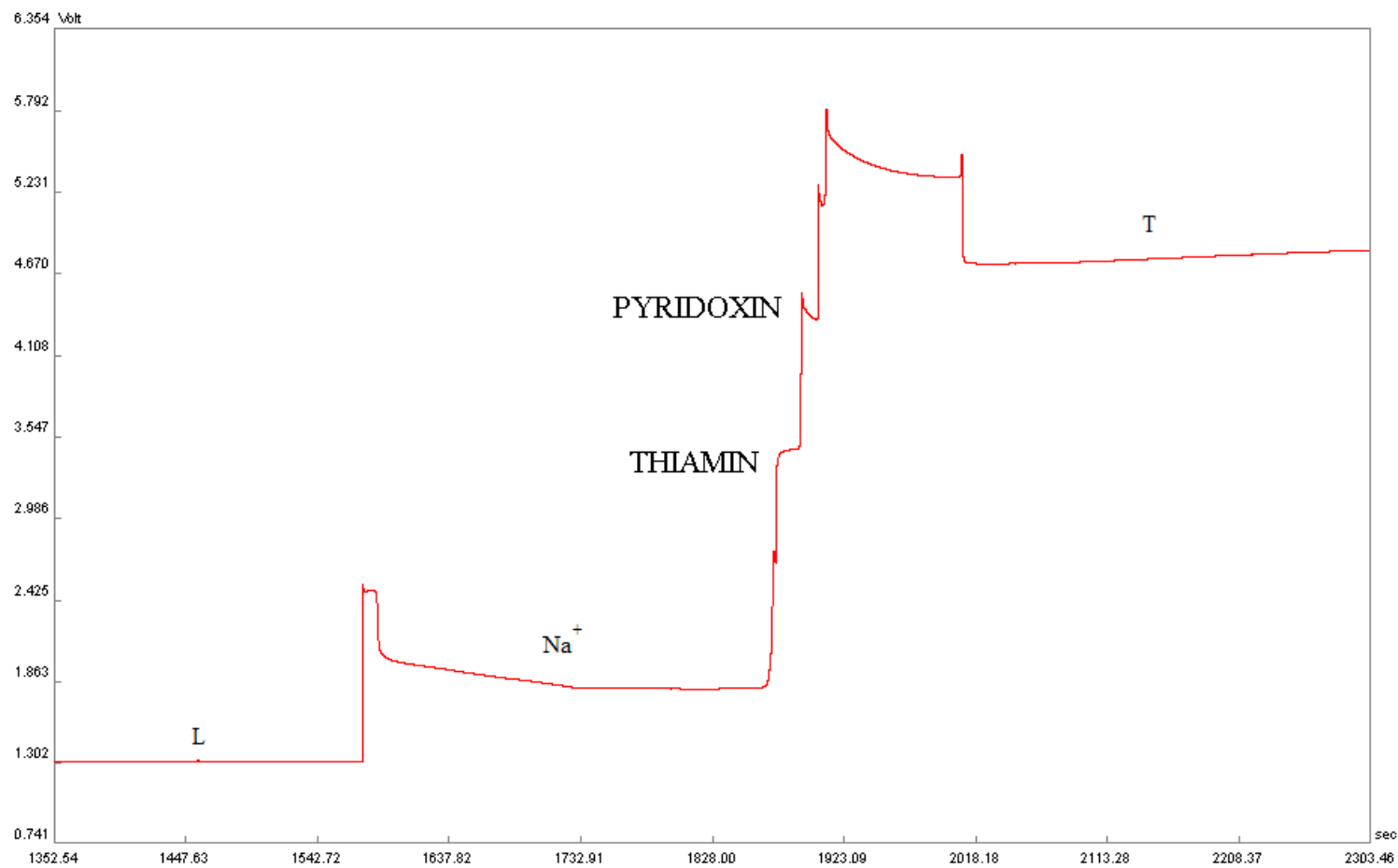


**Obrázek 23:** Izotachoforetický záznam analýzy vzorku č. 4: Imunofit ŠKODA  
(L – vedoucí elektrolyt, T – koncový elektrolyt)

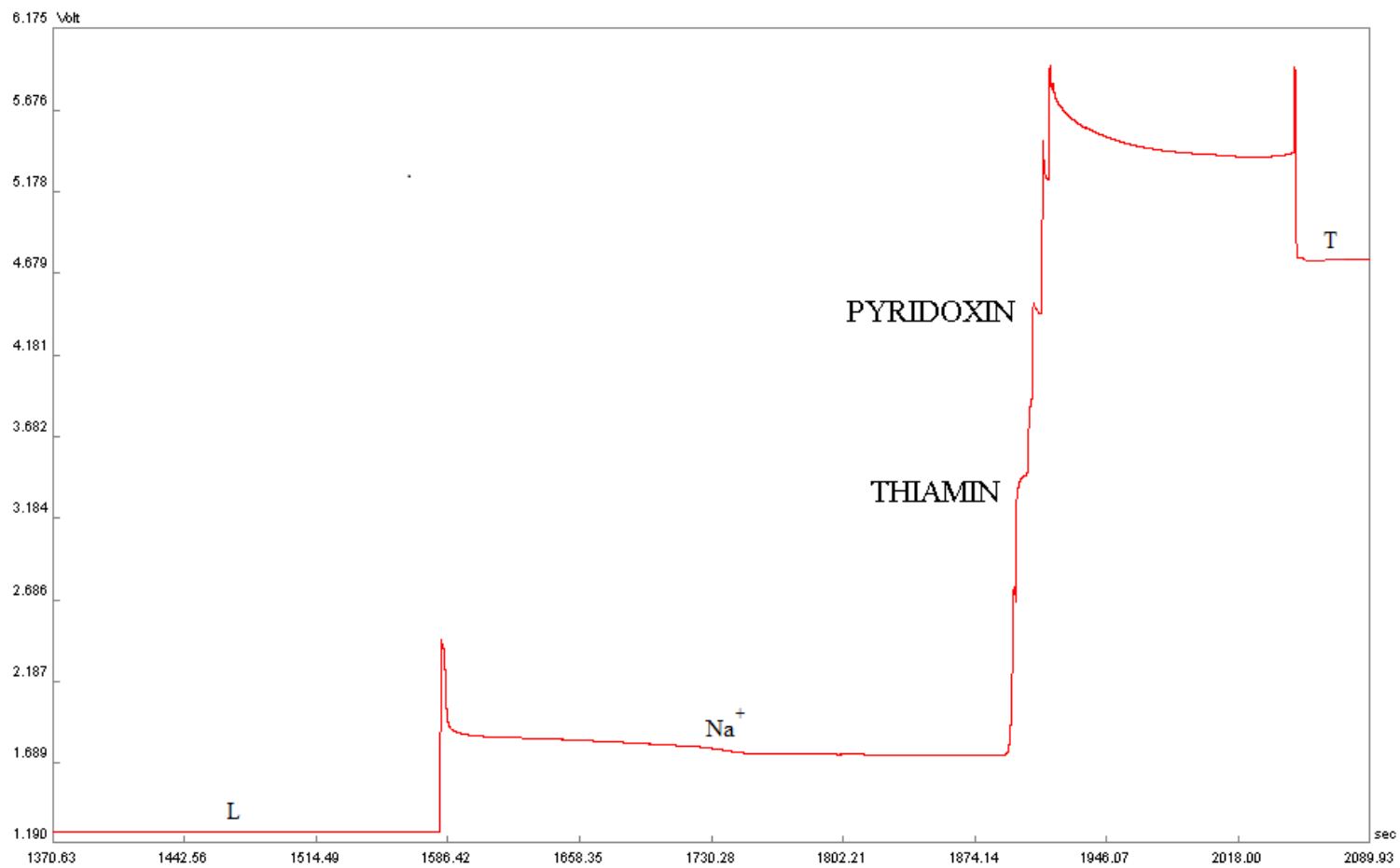




**Obrázek 24:** Izotachoforetický záznam analýzy vzorku č. 5: B-komplex FORTE  
(L – vedoucí elektrolyt, T – koncový elektrolyt)



**Obrázek 25:** Izotachoforetický záznam analýzy vzorku č. 6: B-komplex ZENTIVA  
(L – vedoucí elektrolyt, T – koncový elektrolyt)



**Tabulka 29:** Naměřené hodnoty pro thiamin po určité době stání při 25 °C

<b>THIAMIN</b>		<b>0,001 M roztok, 25 °C</b>	
<b>čas [min]</b>	<b>délka zóny [s]</b>	<b>výtěžnost [%]</b>	
0	45,77	100,0	
12	45,52	99,5	
24	45,45	99,3	
48	44,77	97,8	
60	43,56	95,2	
80	44,52	97,3	
120	45,53	99,9	
160	43,45	94,9	
200	42,66	93,2	
240	45,32	99,0	
280	44,64	97,5	
<b>průměr [s]</b>	44,67		
<b>směr. odchylka [s]</b>	0,99		
<b>%</b>	2,23		

**Tabulka 30:** Naměřené hodnoty pro thiamin po určité době zahřívání na 50 °C

<b>THIAMIN</b>		<b>0,001 M roztok, 50 °C</b>	
<b>čas [min]</b>	<b>délka zóny [s]</b>	<b>výtěžnost [%]</b>	
srovnávací roztok	37,66	-	
0	37,56	99,7	
12	36,69	97,4	
24	36,44	96,8	
48	37,23	98,9	
60	36,96	98,1	
80	37,66	100,0	
120	36,96	98,1	
160	36,37	96,6	
200	35,49	94,2	
240	34,58	91,8	
280	35,50	94,3	
<b>průměr [s]</b>	36,49		
<b>směr. odchylka [s]</b>	0,91		
<b>%</b>	2,50		

**Tabulka 31:** Naměřené hodnoty pro thiamin po určité době zahřívání na 100 °C

<b>THIAMIN</b>	<b>0,001 M roztok, 100 °C</b>	
<b>čas [min]</b>	<b>délka zóny [s]</b>	<b>výtěžnost [%]</b>
srovnávací roztok	37,15	-
0	36,42	98,0
12	37,25	100,3
24	36,97	99,5
48	36,16	97,3
60	36,33	97,8
80	36,07	97,1
120	35,16	94,6
160	36,57	98,4
200	37,05	99,7
240	37,49	100,9
280	36,55	98,4
<b>průměr [s]</b>	36,55	
<b>směr. odchylka [s]</b>	0,62	
<b>%</b>	1,69	

**Tabulka 32:** Naměřené hodnoty pro pyridoxinu po určité době stání při 25 °C

<b>PYRIDOXIN</b>	<b>0,001 M roztok, 25 °C</b>	
<b>čas [min]</b>	<b>délka zóny [s]</b>	<b>výtěžnost [%]</b>
0	27,23	100,0
12	27,41	100,7
24	26,99	99,1
48	27,06	99,4
60	26,39	96,9
80	26,48	97,2
120	28,39	104,3
160	28,77	105,7
200	27,23	100,0
240	28,46	104,5
280	26,48	97,2
<b>průměr [s]</b>	27,35	
<b>směr. odchylka [s]</b>	0,80	
<b>%</b>	2,92	

**Tabulka 33:** Naměřené hodnoty pro pyridoxin po určité době zahřívání na 50 °C

<b>PYRIDOXIN</b>		<b>0,001 M roztok, 50 °C</b>
<b>čas [min]</b>	<b>délka zóny [s]</b>	<b>výtěžnost [%]</b>
srovnávací roztok	25,79	-
0	25,75	99,8
12	25,47	98,8
24	26,28	101,9
48	25,98	100,7
60	27,28	105,8
80	27,65	107,2
120	25,45	98,7
160	25,41	98,5
200	25,30	98,1
240	25,30	98,1
280	25,51	98,9
<b>průměr [s]</b>	25,94	
<b>směr. odchylka [s]</b>	0,78	
<b>%</b>	2,99	

**Tabulka 34:** Naměřené hodnoty pro pyridoxin po určité době zahřívání na 100 °C

<b>PYRIDOXIN</b>		<b>0,001 M roztok, 100 °C</b>
<b>čas [min]</b>	<b>délka zóny [s]</b>	<b>výtěžnost [%]</b>
srovnávací roztok	26,02	-
0	26,20	100,7
12	26,42	101,5
24	27,85	107,0
48	26,25	100,9
60	26,13	100,4
80	26,02	100,0
120	25,80	99,2
160	25,97	99,8
200	25,63	98,5
240	25,57	98,3
280	25,79	99,1
<b>průměr [s]</b>	26,15	
<b>směr. odchylka [s]</b>	0,59	
<b>%</b>	2,27	

**Tabulka 35:** Naměřené hodnoty pro pyridoxal po určité době stání při 25 °C

<b>PYRIDOXAL</b>	<b>0,001 M roztok, 25 °C</b>	
<b>čas [min]</b>	<b>délka zóny [s]</b>	<b>výtěžnost [%]</b>
0	28,52	100,0
12	28,67	100,5
24	27,98	98,1
48	28,56	100,1
60	27,91	97,9
80	27,50	96,4
120	27,10	95,0
160	27,02	94,7
200	26,98	94,6
240	27,09	95,0
280	27,24	95,5
<b>průměr [s]</b>	27,69	
<b>směr. odchylka [s]</b>	0,64	
<b>%</b>	2,29	

**Tabulka 36:** Naměřené hodnoty pro pyridoxal po určité době zahřívání na 50 °C

<b>PYRIDOXAL</b>	<b>0,001 M roztok, 50 °C</b>	
<b>čas [min]</b>	<b>délka zóny [s]</b>	<b>výtěžnost [%]</b>
srovnávací roztok	27,08	-
0	26,88	99,3
12	27,00	99,7
24	27,43	101,3
48	27,23	100,6
60	28,58	105,5
80	28,84	106,5
120	26,69	98,6
160	26,63	98,3
200	26,72	98,7
240	26,22	96,8
280	26,22	96,8
<b>průměr [s]</b>	27,13	
<b>směr. odchylka [s]</b>	0,82	
<b>%</b>	3,04	

**Tabulka 37:** Naměřené hodnoty pro pyridoxal po určité době zahřívání na 100 °C

<b>PYRIDOXAL</b>		<b>0,001 M roztok, 100 °C</b>
<b>čas [min]</b>	<b>délka zóny [s]</b>	<b>výtěžnost [%]</b>
srovnávací roztok	31,61	-
0	31,98	101,2
12	32,25	102,0
24	33,60	106,3
48	31,71	100,3
60	31,86	100,8
80	32,20	101,9
120	31,62	100,0
160	31,78	100,5
200	31,55	99,8
240	31,36	99,2
280	31,33	99,1
<b>průměr [s]</b>	31,93	
<b>směr. odchylka [s]</b>	0,60	
<b>%</b>	1,88	

**Tabulka 38:** Naměřené hodnoty pro pyridoxamin po určité době stání při 25 °C

<b>PYRIDOXAMIN</b>		<b>0,001 M roztok, 25 °C</b>
<b>čas [min]</b>	<b>délka zóny [s]</b>	<b>výtěžnost [%]</b>
0	24,57	100,0
12	24,63	100,2
24	23,88	97,2
48	24,75	100,7
60	24,23	98,6
80	24,15	98,3
120	23,93	97,4
160	24,07	98,0
200	23,90	97,3
240	24,20	98,5
280	24,38	99,2
<b>průměr [s]</b>	24,24	
<b>směr. odchylka [s]</b>	0,29	
<b>%</b>	1,19	

**Tabulka 39:** Naměřené hodnoty pro pyridoxamin po určité době zahřívání na 50 °C

<b>PYRIDOXAMIN</b>		<b>0,001 M roztok, 50 °C</b>
<b>čas [min]</b>	<b>délka zóny [s]</b>	<b>výtěžnost [%]</b>
srovnávací roztok	24,00	-
0	24,29	101,2
12	24,44	101,8
24	24,68	102,8
48	24,63	102,6
60	25,29	105,4
80	25,97	108,2
120	23,82	99,3
160	24,39	101,6
200	23,58	98,3
240	24,70	102,9
280	23,33	97,2
<b>průměr [s]</b>	24,47	
<b>směr. odchylka [s]</b>	0,71	
<b>%</b>	2,92	

**Tabulka 40:** Naměřené hodnoty pro pyridoxamin po určité době zahřívání na 100 °C

<b>PYRIDOXAMIN</b>		<b>0,001 M roztok, 100 °C</b>
<b>čas [min]</b>	<b>délka zóny [s]</b>	<b>výtěžnost [%]</b>
srovnávací roztok	25,31	-
0	24,71	97,6
12	25,03	98,9
24	25,45	100,6
48	24,48	96,7
60	24,23	95,7
80	24,16	95,5
120	26,46	104,5
160	25,67	101,4
200	23,87	94,3
240	24,08	95,1
280	23,15	91,5
<b>průměr [s]</b>	24,66	
<b>směr. odchylka [s]</b>	0,89	
<b>%</b>	3,61	



**Tabulka 41:** Výtěžnost měření vitaminů během jejich skladování v mrazničce

MRAZNIČKA												
Počet dní v mrazničce	THIAMIN			PYRIDOXIN			PYRIDOXAL			PYRIDOXAMIN		
	Délka zóny [s]		Výtěžnost [%]	Délka zóny [s]		Výtěžnost [%]	Délka zóny [s]		Výtěžnost [%]	Délka zóny [s]		Výtěžnost [%]
	SROV. ROZTOK			SROV. ROZTOK			SROV. ROZTOK			SROV. ROZTOK		
0	-	-	100,0	-	-	100,0	-	-	100,0	-	-	100,0
7	40,59	39,74	97,9	24,12	24,17	100,2	26,86	21,75	81,0	31,55	25,32	80,3
14	41,06	39,49	96,2	25,53	25,48	99,8	26,91	21,73	80,8	30,78	23,86	77,5
21	40,44	38,21	94,5	25,79	25,58	99,2	27,62	22,18	80,3	30,12	22,95	76,2

**Tabulka 42:** Výtěžnost měření vitaminů během jejich stání při laboratorní teplotě

STÁNÍ												
Počet dní stání	THIAMIN			PYRIDOXIN			PYRIDOXAL			PYRIDOXAMIN		
	Délka zóny [s]		Výtěžnost [%]	Délka zóny [s]		Výtěžnost [%]	Délka zóny [s]		Výtěžnost [%]	Délka zóny [s]		Výtěžnost [%]
	SROV. ROZTOK			SROV. ROZTOK			SROV. ROZTOK			SROV. ROZTOK		
0	-	-	100,0	-	-	100,0	-	-	100,0	-	-	100,0
7	37,83	37,50	99,1	24,24	24,12	99,5	26,21	23,39	89,2	30,42	29,70	97,6
14	38,16	37,28	97,7	25,79	25,56	99,1	27,62	23,36	84,6	31,73	29,89	94,2
21	38,02	36,16	95,1	24,92	24,47	98,2	27,13	22,27	82,1	30,87	28,86	93,5
28	37,47	40,59	92,3	25,78	25,06	97,2	26,97	21,44	79,5	31,40	29,14	92,8

**Tabulka 43:** Délka zóny thiaminu při změnách pH

THIAMIN			
<i>MĚŘENÍ (1)</i>		<i>MĚŘENÍ (2)</i>	
pH	délka zóny [s]	pH	délka zóny [s]
2	32,36	2	33,21
<b>3,8</b>	<b>34,99</b>	<b>3,8</b>	<b>34,49</b>
6	33,92	6	35,75
8	35,29	8	36,36
10	36,99	10	33,06
12	30,57	12	19,32

**Tabulka 44:** Délka zóny pyridoxinu při změnách pH

PYRIDOXIN			
<i>MĚŘENÍ (1)</i>		<i>MĚŘENÍ (2)</i>	
pH	délka zóny [s]	pH	délka zóny [s]
2	15,02	2	13,07
<b>4,13</b>	<b>25,09</b>	<b>4,13</b>	<b>25,28</b>
6	24,35	6	26,03
8	24,45	8	26,18
10	25,11	10	24,73
12	24,41	12	21,73

**Tabulka 45:** Délka zóny pyridoxalu při změnách pH

PYRIDOXAL			
<i>MĚŘENÍ (1)</i>		<i>MĚŘENÍ (2)</i>	
pH	délka zóny [s]	pH	délka zóny [s]
2	18,15	2	16,46
<b>3,5</b>	<b>22,67</b>	<b>3,5</b>	<b>22,78</b>
6	22,73	6	21,13
8	21,90	8	20,97
10	23,93	10	21,98
12	22,78	12	19,74

**Tabulka 46:** Délka zóny pyridoxaminu při změnách pH

<b>PYRIDOXAMIN</b>			
<i>MĚŘENÍ (1)</i>		<i>MĚŘENÍ (2)</i>	
<b>pH</b>	<b>délka zóny [s]</b>	<b>pH</b>	<b>délka zóny [s]</b>
2	22,78	2	22,44
<b>3,06</b>	<b>25,12</b>	<b>3,06</b>	<b>26,32</b>
6	26,55	6	25,46
8	27,87	8	27,06
10	25,81	10	27,87
12	21,34	12	20,01