

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Vitamíny rozpustné ve vodě a metody jejich
stanovení

Ludmila Řezáčová

Bakalářská práce

2018

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Water-soluble vitamins and methods for their
determination

Ludmila Řezáčová

Bachelor work

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Ludmila Řezáčová**
Osobní číslo: **C14222**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Vitaminy rozpustné ve vodě a metody jejich stanovení**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

1. Vypracovat teoretickou rešerši týkající se vitaminů rozpustných ve vodě.
2. V úvodu definovat pojem vitamin a popsat rozdělení vitaminů.
3. Popsat jednotlivé vitaminy rozpustné ve vodě, jejich strukturu, vlastnosti, výskyt, klinický význam a metody jejich stanovení.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

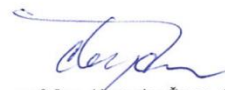
Datum zadání bakalářské práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji

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

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jiného 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne:

.....
Ludmila Řezáčová

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. za její čas, odborný dohled a cenné rady, které mi během psaní této práce věnovala.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se soustředí na vitamíny rozpustné ve vodě. V úvodu práce jsem krátce shrnula obecné rozdělení vitamínů a naznačila nejpoužívanější metodu jejich stanovení. Hlavní částí této práce je popis vitamínu C a vitamínů skupiny B. Je zde uvedena jejich struktura, vlastnosti a funkce, které plní v organismu, dále pak vliv nedostatku těchto vitamínů na lidský organismus, či přírodní zdroje těchto vitamínů. V závěru jsou pak vyjmenovány možné metody stanovení jednotlivých vitamínů i stručný popis obecného stanovení všech vitamínů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

KLÍČOVÁ SLOVA

vitamín C, vitamíny skupiny B, nedostatek, stanovení, HPLC

ANNOTATION

This bachelor thesis focuses on vitamins soluble in water. At the beginning of my work, I briefly summed up the general distribution of vitamins and suggested the most used method of their determination. The main part of this work is a description of vitamin C and vitamins of group B. Here is presented their structure, properties and functions, which they fulfill in the organism, furthermore, the effect of the lack of these vitamins on the organism, or the natural sources of these vitamins. Finally, the possible methods of determination of individual vitamins and a brief description of general determination of all vitamins by high performance liquid chromatography are listed.

KEY WORDS

vitamin C, group B vitamins, deficiency, determination, HPLC

SEZNAM ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát (adenosine diphosphate)
AIDS	syndrom získaného selhání imunity (Acquired Immuno Deficiency Syndrome)
CoA	koenzym A (coenzyme A)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou (high density lipoprotein)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou (low density lipoprotein)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)
NAD ⁺	oxidovaná forma nikotinaminadeninukleotidu
NADP ⁺	oxidovaná forma nikotinaminadeninukleotidfosfátu
PL	pyridoxal
PLP	pyridoxal-5-fosfát (pyridoxal -5-phosphate)
PM	pyridoxamin (pyridoxamine)
PMP	pyridoxamin-5-fosfát (pyridoxamine-5-phosphate)
PN	pyridoxin (pyridoxine)
PNP	pyridoxin-5-fosfát (pyridoxine-5-phosphate)
RDI	doporučený denní příjem (recommended dietary intake)
SNP	polymorfizmy jednotlivých nukleotidů (single nucleotide polymorphism)
TAG	triacylglycerol
TPP	thiaminpyrofosfát (thiamine pyrophosphate)
UV	ultrafialové záření (ultraviolet); typy záření: UVA = dlouhovlnné; UVB = středovlnné

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Stereoizomery kyseliny askorbové a jejich interakce	14
Obrázek 2: Fentonova reakce	20
Obrázek 3: Strukturní vzorec thiaminu.....	23
Obrázek 4: Schématické znázornění metabolických procesů, kterých se účastní TPP ..	25
Obrázek 5: Strukturní vzorec riboflavinu	26
Obrázek 6: Strukturní vzorec niacinu	28
Obrázek 7: Strukturní vzorec vitamínu B6	30
Obrázek 8: Strukturní vzorec kyseliny pantothenové.....	32
Obrázek 9: Strukturní vzorec biotinu.....	34
Obrázek 10: Strukturní vzorec kyseliny listové.....	36
Obrázek 11: Strukturní vzorec vitamínu B12	37
Obrázek 12: Strukturní vzorec cholinu	40
Obrázek 13: Metabolické dráhy cholinu.....	40
Obrázek 14: Schéma kapalinového chromatografu	44

Obsah

ÚVOD	13
1 VITAMÍN C	14
1.1 Nedostatek a nadbytek	16
1.2 Antioxidační vlastnosti	17
1.3 Vitamín C a rakovina	18
2 VITAMÍNY SKUPINY B	22
2.1 Thiamin	22
2.1.1 Nedostatek a nadbytek	23
2.2 Riboflavin	26
2.2.1 Nedostatek	27
2.3 Niacin	27
2.3.1 Nedostatek	29
2.4 Vitamín B6	30
2.4.1 Nedostatek	32
2.5 Kyselina pantothenová	32
2.5.1 Nedostatek	33
2.6 Biotin	34
2.6.1 Nedostatek	35
2.7 Folát	35
2.7.1 Nedostatek	36
2.8 Vitamín B12	37
2.8.1 Nedostatek	38
2.9 Cholin	39
2.9.1 Nedostatek	41

3 STANOVENÍ VITAMÍNŮ	42
3.1 HPLC	44
4 ZÁVĚR	46
CITOVANÁ LITERATURA	47

ÚVOD

Vitamíny jsou sloučeniny, které se podílejí na všech základních funkcích organismu, ale také jsou předmětem řady studií provedených různými výzkumníky (Tyśkiewicz et al., 2017).

Vitamíny jsou vyžadovány v malých množstvích jako kofaktory v biochemických reakcích a rozděleny do dvou typů na základě jejich rozpustnosti:

- vitamíny rozpustné ve vodě,
- vitamíny rozpustné v tucích.

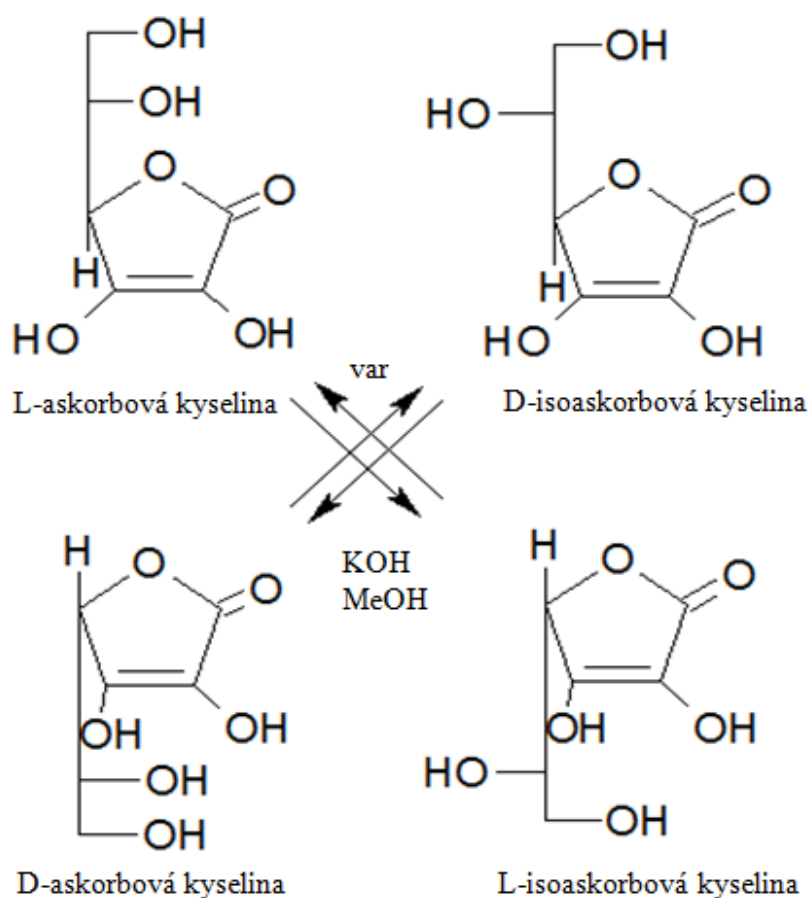
Vitamíny rozpustné ve vodě jsou vstřebávány do tenkého střeva do portálního oběhu, zatímco vitamíny rozpustné v tucích mohou být účinně vstřebávány střevem do lymfatického oběhu, pokud dochází k normální absorpci tuku. S výjimkou niacinu a vitamínu D, které se tvoří z tryptofanu a cholesterolu, nelze v lidských buňkách vitamíny syntetizovat. Nedostatky vitamínů obecně vedou k metabolickým poruchám a onemocněním s charakteristickými syndromy (Wu et al., 2012).

Chromatografie s nadkritickým CO₂ našla uplatnění při stanovení, separaci a kvantitativních analýzách vitamínů rozpustných v tucích i ve vodě. Metody separace vitamínů se v průběhu let rozvíjely a zlepšovaly. Obě skupiny sloučenin byly separovány pomocí superkritické kapalinové chromatografie s odlišnou detekcí na různých stacionárních fázích (Tyśkiewicz et al., 2017).

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) se stává standardní metodou v testování vitamínů, zejména při rutinních záležitostech. Pro každý vitamín jsou nastaveny úpravy vzorku (dle zdroje odběru) a specifické podmínky chromatografu (Rizzolo a Polesello, 1992).

1 VITAMÍN C

Přírodní vitamín C je také známý jako kyselina L-askorbová. Tato molekula má dva asymetrické atomy uhlíku, které vedou ke vzniku čtyř stereoizomerů: kyselina L-askorbová, kyselina D-askorbová, kyselina D-izo-sorbová a kyselina L-izo-sorbová (obr. 1). Ze čtyř izomerů je pouze kyselina L-askorbová neboli vitamín C biologicky aktivní a další tři formy jsou neaktivní (Yun et al., 2015).



Obrázek 1: Stereoizomery kyseliny askorbové a jejich interakce

Kyselina L-askorbová je bezbarvá krystalická pevná látka kyselé chuti a bez zápachu. Její chemické složení je $C_6H_8O_6$ s molekulovou hmotností 176 g/mol a teplotou tání 190-192 °C. Je rozpustná ve vodě a nerozpustná v organických rozpouštědlech. Snadno se oxiduje několika látkami včetně halogenů a peroxidu vodíku (Yun et al., 2015).

Pro organismus je tato látka velmi potřebná, neboť se podílí na syntéze kolagenu (podstatné složky pojivové tkáně, která drží struktury těla dohromady) a antioxidačních obranných mechanismech. Nejenže transkripčně reguluje syntézu kolagenu, ale je také nezbytným kofaktorem lysyl- a prolylhydroxyláz, enzymů katalyzujících tvorbu vodíkových můstků, které spojují různé kolagenové fibrily. Kromě kolagenu hraje také roli při syntéze glykosaminoglykanů, které jsou základními složkami chrupavky, kostí a pojivové tkáně. Též se podílí na biosyntéze hormonů, karnitinu a neurotransmiterů. To také pomáhá tělu absorbovat železo z jiných zdrojů, než je hemoglobin, a napomáhá udržovat kovy jako měď a železo ve sníženém stavu, což je nezbytné pro mnoho biologických reakcí v lidském těle. Recykluje další antioxidanty, jako je vitamín E a glutathion. Je účinným antimikrobiálním prostředkem, který inhibuje virové a bakteriální infekce v těle. Je nejdůležitějším intracelulárním a extracelulárním antioxidantem (Dayan, 2008; Rumbold et al., 2015; Yun et al., 2015).

Tato sloučenina byla izolována a její struktura byla identifikována maďarským vědcem Albertem Szent-Gyorgyiem. V roce 1933 se společnost Hoffmanna La Roche stala první farmaceutickou společností zodpovědnou za masovou výrobu vitamínu C. Úloha vitamínu C jako protirakovinného činidla byla poprvé navržena v roce 1952 McCormickem, který jej určil jako pomocného činitele v chemoterapii (Yun et al., 2015).

Narozdíl od většiny živočichů nejsou lidé schopni syntetizovat vitamín C, neboť postrádají enzym L-glukono-gamma-lakton-oxidázu (potřebnou pro syntézu vitamínu C z kyseliny glukuronové), proto vyžadují dostatečný přísun tohoto vitamínu ve stravě. Vitamín C se nachází v mnoha druzích ovoce a zeleniny - s vysokým obsahem v tropickém ovoci, černém rybízu, citrusových plodech, jahodách, paprikách, rajčatech, bramborách a brokolici. Aktivní transport z gastrointestinálního traktu je omezený, dokonce ani masivní orální dávky nezvyšují koncentraci na optimální úroveň fotoprotekce (= ochrana před účinky UV záření) v kůži. V důsledku toho je nedostatek vitamínu C zaznamenáván pouze u jedinců se standardní stravou. Ve většině západních zemí je současný doporučený příjem (RDI) vitamínu C pro dospělé v rozmezí 30-70 mg denně. Během těhotenství se požadavky na vitamín C zvyšují, protože vitamín C se aktivně transportuje přes placentu. Výsledkem je, že během těhotenství hladina vitamínu C v plazmě klesá a RDI se zvyšuje na 60 mg denně. Během laktace se hodnota

RDI zvyšuje na 85 mg denně kvůli ztrátě v mateřském mléce (Dayan, 2008; Rumbold et al., 2015).

Vitamín C poskytuje mnoho výhod pro pokožku - nejvýznamnější je zvýšená syntéza kolagenu a fotoprotektiva. Vitamín C je esenciální kofaktor pro dva enzymy potřebné pro syntézu kolagenu: prolylhydroxylázu (ke stabilizaci molekuly kolagenu) a lysylhydroxylázu (k dosažení strukturní síly zesílení). Nedávný výzkum prokázal, že vitamín C působí přímo na DNA ke zvýšení rychlosti transkripce a stabilizaci prokolagenové mRNA, čímž reguluje a udržuje mezibuněčné množství kolagenu. Zlepšením syntézy kolagenu má vitamín C také účinky proti stárnutí a lepší efektivitu hojení ran (Dayan, 2008).

1.1 Nedostatek a nadbytek

Jedna z prvních kontrolovaných studií vitamínu C byla provedena Jamesem Lindem v roce 1753, jenž objevil, že nedostatek vitamínu C vede ke **kurdějím**, které jsou charakterizovány poškozením pojivové tkáně a kapilárních cév, vedoucím ke krvácení dásní a hlubších tkání, špatnému hojení ran, vzniku kožní vyrážky a smrti. Kojenecké kurděje se mohou vyskytovat u kojenců, kteří pili mateřské mléko s deficitem vitamínu C a jsou charakterizovány krvácením pod pojivou tkání kolem kostí, zhoršeným vývojem kostí, podrážděností, špatnou chutí k jídlu a ztrátou hmotnosti. Toto onemocnění se vyskytuje pouze u savců, kteří ztratili schopnost produkovat vitamín C a musí jej přijímat potravou, jako jsou lidé, primáti či morčata. Jedinci s kurdějemi mohou také trpět anémií z nedostatku železa a/nebo megaloblastickou anémií, protože vitamín C se podílí na metabolismu železa a folátu. Vitamín C podporuje jak mobilizaci železa z tělních zásob, tak vstřebávání železa ve střevě. Mechanismy interakcí mezi vitamínem C a kyselinou listovou jsou méně jasné (Rumbold et al., 2015; Yun et al., 2015).

Byly však pozorovány i nežádoucí účinky u nadměrného příjmu vitamínu C, jako je tvorba oxalátových ledvinových kamenů, interakce s vitamínem B12 vedoucí ke snížení dostupnosti tohoto vitamínu, nadměrná absorpce železa a gastrointestinální poruchy jako je průjem (Diplock et al., 2017).

Je možné, že využití askorbátu se zvyšuje v důsledku onemocnění zrychlením enzymatických reakčních rychlostí závislých na askorbátu, snížením redukce

askorbátového radikálu dehydroaskorbové kyseliny nebo zrychlením neenzymatické degradace vlivem oxidačních faktorů spojených s onemocněním. Koncentrace askorbátu jsou nižší u kuřáků (pravděpodobně kvůli oxidantům spojeným s kouřením), u pacientů s pankreatitidou, sepsí, závažným onemocněním, akutním infarktem myokardu a s diabetem. Důvodem může být špatný příjem, přechodná redistribuce, či ztráta ledvinami (Levine et al., 2011).

Vitamín C se u lidí a zvířat soustřeďuje v mnoha orgánech. Jeho nejvyšší hladiny se vyskytují v nadledvinách a v hypofýze. Jiné orgány bohaté na vitamín C zahrnují játra, slezinu, slinivku břišní, ledviny, mozek, brzlík a čočku oka. *In vitro* studie prokázaly, že oxidovaný vitamín C vstupuje do buňky prostřednictvím glukózových transportérů, kde je intracelulárně redukován na kyselinu L-askorbovou. Ta je dále přímo přebírána buňkami přes specifické transportéry na bázi sodíku a askorbátu (sodík-askorbátový kotransportér) (Yun et al., 2015).

1.2 Antioxidační vlastnosti

Kyselina askorbová je základní živina, která se běžně považuje za antioxidant, který produkuje cytotoxicitu závislou na peroxidu vodíku vůči různým nádorovým buňkám *in vitro* bez nepříznivého ovlivnění normálních buněk. Jako antioxidant pomáhá vitamín C chránit tkáň těla před poškozením škodlivými volnými radikály (reaktivní molekuly kyslíku) a pomáhá tak předcházet oxidačnímu stresu. **Oxidativní stres** se týká nerovnováhy v množství volných radikálů, které cirkulují v těle, a dostupnosti antioxidantů pro potlačení volných radikálů. Vitamín C funguje jako volná radikálová látka, který interaguje s vitamínem E (další antioxidant) a pomáhá mu k udržení v těle a jeho regeneraci (Bates Christopher et al., 2013; Rumbold et al., 2015).

Studie *in vivo* ukázaly, že kyselina L-askorbová se používá v buněčném metabolismu jako elektronový donor schopný darovat jeden nebo dva elektrony. V prvním stupni oxidace se vytvoří askorbylový radikál a následně se ve druhém kroku vytvoří kyselina dehydroaskorbová. Askorbylový radikál se nehromadí *in vivo*, protože dva askorbylové radikály dismutují do jedné molekuly kyseliny askorbové a jedné molekuly kyseliny dehydroaskorbové (Yun et al., 2015).

Zvýšení hladiny vitamínu C v kůži topickým podáním může být mimořádně přínosné. Avšak aktivní kyselina L-askorbová je tak vynikající antioxidant, že je

inherentně nestabilní, čímž se změní na hnědou, protože je oxidována na kyselinu dihydroaskorbovou, poté co je vystavena působení vzduchu. Proto je doba skladovatelnosti většiny složek obsahujících čistý vitamín C krátká. Vaření obecně ničí vitamín C, stejně jako skladování, protože sloučenina je nestabilní a extrémně citlivá na teplo (Dayan, 2008; Yun et al., 2015).

Vitamín C sám o sobě není ochranným faktorem, protože nemá UV absorpční spektra v oblasti UVA nebo UVB, ale jako antioxidant deaktivuje UV-indukované volné radikály a snižuje UVB erytém a pomáhá při léčbě akné. Dalším důležitým působením vitamínu C na pokožku je to, že topický vitamín C zvyšuje syntézu několika speciálních lipidů na povrchu kůže. Nejenže přispívá k přirozenému zvlhčování pokožky, ale také zvyšuje funkci ochranné bariéry (Dayan, 2008).

Příjem antioxidantů je u zdravých subjektů adekvátní. Nízká hladina byla pozorována u kuřáků, starší populace a pacientů se specifickými nemocemi nebo rizikovými faktory a u několika studií se prokázalo, že příjem určitého množství antioxidantů může být nedostačující. Důležitou úlohu také hraje lokalita, např. v zemích jako Francie a Itálie mají antioxidační příjem z velké části přiměřený, kvůli bohaté dodávce čerstvého ovoce a zeleniny, na rozdíl od jiných zemí, kde je výběr produktů omezen či sezónní (chudé země, severská oblast). Antioxidanty mohou hrát důležitou roli v prevenci chronických onemocnění (Diplock et al., 2017).

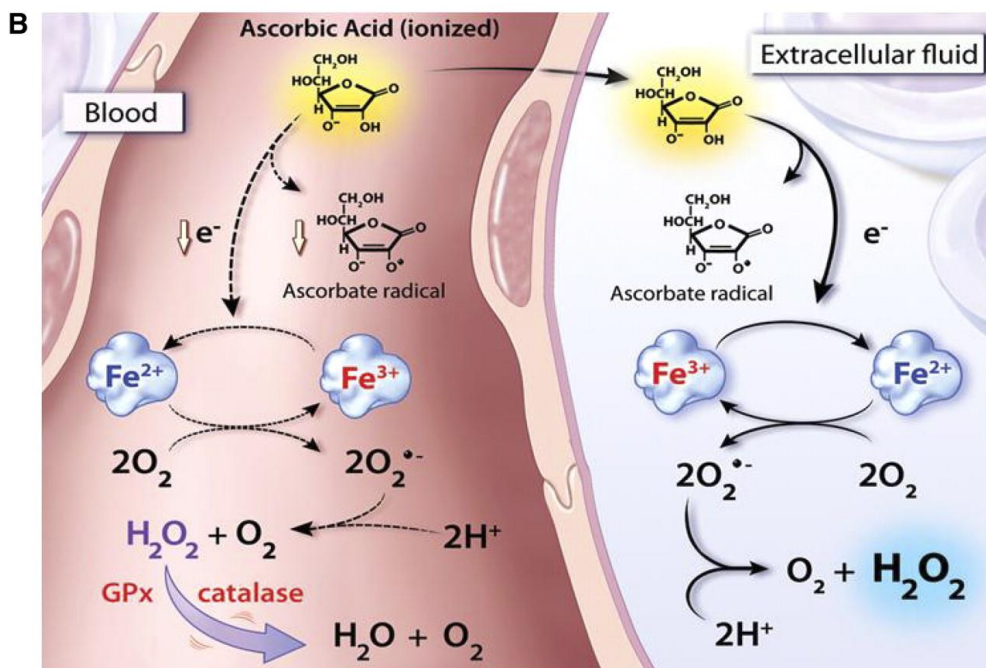
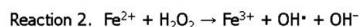
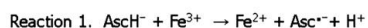
1.3 Vitamín C a rakovina

Letité důkazy ukázaly, že lidé, konzumující více ovoce a zeleniny, mají nižší pravděpodobnost vývoje rakoviny než lidé, kteří mají nižší příjem těchto potravin. Zatímco mnoho fytochemikálií a mikroživin v ovoci a zelenině může mít protirakovinné vlastnosti, vitamín C se ukazuje jako jeden z nejúčinnějších antikarcinogenních činidel. Lidská onemocnění, jako je ateroskleróza a rakovina, se mohou částečně vyskytnout při poškození tkáně oxidačním činidlem. Oxidace lipidů, proteinů a DNA vede ke specifickým oxidačním produktům. Antikarcinogenní vlastnosti vitamínu C lze tedy připisat jeho antioxidačním vlastnostem, jako je prevence poškození volných radikálů DNA, snižování tvorby karcinogenních nitrosaminů a mutagenů, posílení imunitního systému v boji proti rakovinným buňkám, urychlení působení detoxikačních jaterních enzymů a blokování toxických účinků karcinogenů (např. polycyklických uhlovodíků,

organochlorinových pesticidů a těžkých kovů). Epidemiologické studie ukazují, že diety s vysokým obsahem ovoce a zeleniny jsou spojeny s nižším rizikem kardiovaskulárních onemocnění, mrtvice a rakoviny a se zvýšenou dlouhověkostí, ovšem není prokázáno, zda tyto účinky přímo souvisí s vitamínem C. Další studie prokázaly spojitost mezi vysokým příjmem vitamínu C a sníženým rizikem rakoviny žaludku. To může být způsobeno působením vitamínu C, který blokuje tvorbu nitrozaminu a dalších karcinogenů v žaludku (Padayatty et al., 2003; Yun et al., 2015).

Ze zkoumaných vzorků se prokázalo, že jedna farmakologická dávka askorbátu produkuje trvalé askorbátové radikály a tvorbu peroxidu vodíku selektivně uvnitř intersticiálních tekutin nádorů, nikoliv však v krvi. Intravenózní dávky askorbátu významně snížily počet nádorů vaječníků, pankreatu, aj. To naznačuje, že askorbát jako prekursor může mít příznivý účinek u nádorů se špatnou prognózou a omezenými terapeutickými možnostmi. Díky novým poznatkům v klinické farmakologii bylo dalším krokem určit, zda a jak by farmakologický askorbát mohl selektivně zabíjet karcinogenní buňky. Rakovinotvorné a zdravé buňky byly inkubovány po dobu 1 hodiny v médiu buněčných kultur obsahujících koncentrace askorbátu v rozmezí od 0 do 20 mmol/l. Z testovaných normálních buněk nebyly žádné ovlivněny. Naproti tomu více než tři čtvrtiny ze 43 testovaných linií rakoviny vykazovaly senzitivitu ≤ 10 mmol/l, definovanou jako účinnou koncentraci askorbátu pro zabití 50 % typu rakovinných buněk (EC_{50}). Přidání enzymu katalázy do buněčného kultivačního média, které katalyzuje rozklad peroxidu vodíku na kyslík a vodu, zlepšilo cytotoxicitu farmakologického askorbátu. Tak bylo definováno usmrcení rakovinných buněk zprostředkované tvorbou H_2O_2 , která je, za přítomnosti redukovaných katalyzátorů přechodných kovů, klasicky považována za producenta hydroxylových radikálů ($OH\bullet$). Toto je obecně označováno jako Fentonova reakce, která je znázorněna v obr. 2. (Bates Christopher et al., 2013; Chen et al., 2005; Levine et al., 2011).

A Generation of Reactive Oxygen Species by the Fenton Reaction



Obrázek 2: Fentonova reakce

- (A) Při reakci 1 reaguje askorbát (AscH^-) s železitým kationtem (Fe^{3+}) za vzniku kationtu železnatého (Fe^{2+}) a askorbátového radikálu ($\text{Asc}^{\bullet-}$). V reakci 2 probíhá klasická tzv. Fentonova reakce, která generuje hydroxylové radikály (OH^\bullet) z H_2O_2 .
- (B) Mechanismus tvorby askorbátového radikálu a H_2O_2 v extracelulární tekutině ve srovnání s krví: po orálním a parenterálním podání dosahuje kyselina askorbová ekvivalentní koncentrace v krvi (levá strana diagramu) a extracelulární tekutině (pravá strana). V extracelulární tekutině molekula kyseliny askorbové ztrácí 1 elektron a tvoří askorbátový radikál. Tento elektron následně snižuje kov s centrem proteinu, který je znázorněn jako snížení Fe^{3+} na Fe^{2+} . Tento komplex dodává elektron na molekulární kyslík, čímž vzniká superoxidový anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) a následně H_2O_2 . V krvi (na levé straně) jsou tyto reakce tlumeny nebo inhibovány (přerušované čáry). Vzhled askorbátového radikálu je inhibován redukčními proteiny navázanými na membránu eryrocytu a/nebo velkými plazmatickými proteiny, které se nerozdělují do extracelulárního

prostoru. Enzymy v erythrocytech (glutathion peroxidáza a kataláza) zničí H_2O_2 tak, že žádný není detekovatelný v krvi (Levine et al., 2011).

Přechodné kovy, jako je železo (a měď), lze snadno redukovat pomocí askorbátu. Tato redukovaná centra kovu mohou působit jako donory elektronu pro molekulární kyslík, přičemž se produkuje superoxidové radikály ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Podobně může dojít k reverzní reakci, kdy $\text{O}_2^{\cdot-}$ redukuje oxidovaný kov. Tato reverzní reakce může být v konkurenci s reakcemi katalyzovanými superoxidodismutázami, které katalycky odstraňují $\text{O}_2^{\cdot-}$, čímž vzniká H_2O_2 . V biologickém prostředí proto může farmakologický askorbát spustit převahu reakcí, které zvýhodňují tvorbu H_2O_2 (cytotoxický účinek), kdy jeho koncentrace v rovnovážném stavu $\geq 25\text{-}50 \mu\text{mol/l}$ vyvolá buněčnou smrt. Bylo zjištěno, že tyto koncentrace mohou být dosaženy v extracelulární tekutině, nikoliv v plné krvi, jelikož erythrocyty obsahují velké množství kataláz a peroxidáz, které účinně potlačují Fentonovu reakci k ochraně hemoglobinu před oxidačním poškozením (Chen et al., 2008; Levine et al., 2011).

Klinické vyšetření farmakologického askorbátu by mělo být považováno za doplnění stávající léčby rakoviny. Jeho mechanismus účinku jako proléčiva pro tvorbu H_2O_2 je odlišný od většiny běžně používaných činidel, neboť je zde potenciál pro synergii nebo alespoň aditivní účinek v kombinaci s jinými léky. Toto je užíváno při léčení mnoha typů rakoviny, tuberkulózy, závažných bakteriálních infekcí, hepatitidy a selhání imunity. Ve výsledku farmakologický askorbát jako léčba může být aplikován na případy, kdy může být prospěšné použití H_2O_2 a/nebo reaktivních druhů kyslíku. Může být také řešením při rezistenci bakterií u antibiotik (Frömberg et al., 2011; Heaney et al., 2008; Levine et al., 2011).

2 VITAMÍNY SKUPINY B

Tyto živiny rozpustné ve vodě spadají do dvou kategorií (Anon, 1998):

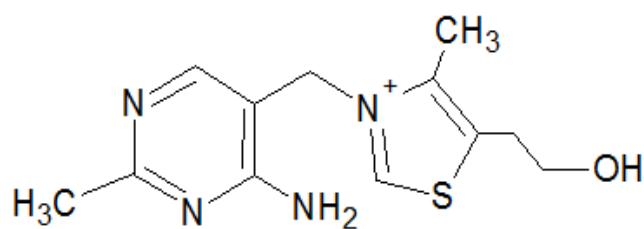
- ty, jež se podílejí na reakcích intermediárního metabolismu související s výrobou energie a oxidačně-redukčním stavem,
- ty, které se zúčastní přenosu jednoručních jednotek.

Thiamin, riboflavin, niacin, vitamín B6 a kyselina pantothenová jsou požadované pro dekarboxylaci, transaminaci, acylaci, oxidaci, a snížení jejich substrátů, které se nakonec používají pro využití energie. Jeden nebo více z nich jsou také důležité pro syntézu aminokyselin, mastných kyselin, cholesterolu, steroidů a glukózy. Biotin je nutný pro fixaci oxidu uhličitého pomocí čtyř karboxyláz. Folát, vitamín B12, cholin a riboflavin jsou potřebné pro převod methylskupiny. Jejich metabolismus se prolíná na cestě konverze homocysteinu na methionin. Folát je také důležitý pro dodávku jedno-uhlíkových jednotek pro deoxyribonukleovou kyselinu (DNA) (Anon, 1998).

Vitamín B6, kyselina listová a vitamín B12 mají značný význam při vývoji plodu kvůli své úloze v metabolismu jednoručních jednotek. Tyto reakce jsou velmi důležité pro produkci DNA bází, konverzi homocysteinu na methionin, neurologickou a imunologickou funkci, růst a vývoj a tvorbu červených krvinek (Choi a Mason, 2000; Koury a Ponka, 2004; Wu et al., 2012).

2.1 Thiamin

Vitamín B1, neboli thiamin (obr. 3) je jednou ze základních živin pro organismy. Funguje jako koenzym v metabolismu sacharidů a aminokyselin s rozvětveným řetězcem (→ účastní se Krebsova cyklu). Thiamin je prvním objeveným ve vodě rozpustným vitamínem. Je účinný při neurální aktivitě a tonu svalů v různých tělesných aktivitách, včetně hematopoézy, metabolismu sacharidů, aktivit centrálního nervového systému a neuromuskulárního systému, atd. Mezi další role, které jsou spojeny s tímto vitamínem, patří aktivace imunitního systému, signalizační a udržovací procesy v buňkách a tkáních a dynamika buněčné membrány. Pro tyto klíčové funkce thiaminu je důležitá absorpce a transport v těle. Jeho cesta vychytávání je poměrně složitá, zahrnující celou řadu proteinů. Vazba thiaminu na tyto proteiny je silně řízena elektrostatickými interakcemi (Abdollahifard et al., 2014).



Obrázek 3: Strukturální vzorec thiaminu

Thiamin není u lidí syntetizován, proto je nezbytné jej užívat v potravě. Množství přijatého thiaminu – takové, aby byla zachována přirozená rovnováha, závisí na zdravotním stavu organismu (Sica, 2007).

Vitamín B1 se používá k léčbě různých druhů fyziologických problémů, jako je nauzea a zvracení. Zvyšuje kvalitu života a snižuje deprese, únavu, svalové křeče a úzkost, zvláště co se týče žen v pozdním reprodukčním věku (Abdollahifard et al., 2014).

RDI je u mužů 1,2 mg a u žen 1,1 mg. Tělo je schopno uchovat v normálních podmínkách 25-30 mg thiaminu, většinou v metabolicky aktivních orgánech, jako je srdce, ledviny a mozek (Bates Christopher et al., 2000; Riahi et al., 2017).

2.1.1 Nedostatek a nadbytek

Nedostatek thiaminu může vyplývat z jeho nedostatečného příjmu, zvýšeného požadavku, nadměrné ztráty, spotřeby anti-thiaminových faktorů v potravinách nebo kombinace těchto faktorů. Může způsobovat různá neurologická onemocnění zapříčiněná alkoholismem, podvýživou, rakovinou žaludku a onemocněním AIDS. Chronický nedostatek thiaminu způsobuje srdeční choroby (Bates Christopher et al., 2000; Lei et al., 2018; Mayxay et al., 2007; Sica, 2007; Ventura et al., 2013).

Vitamín B1 hraje klíčovou roli v redukci buněčného oxidativního stresu a v udržování správné funkce mitochondrií. Jeho nedostatek je škodlivý pro normální buněčnou fyziologii a vede k poškození metabolismu energie vedoucím k oxidativnímu stresu, který způsobuje zvýšené aktivace imunitních buněk a zvýšené produkce volných radikálů v oblastech mozku. Dále nedostatek thiaminu způsobuje mitochondriální dysfunkci, vedoucí k dramatickému snížení obsahu trávicích enzymů

pankreatu a způsobuje nedostatečnou sekreci inzulínu, což ovlivňuje exokrinní i endokrinní funkce pankreatu a narušuje se tak správná funkce pankreatických buněk (Hazell et al., 2013; Lei et al., 2018; Srinivasan et al., 2015).

Přítomnost anti-thiaminových faktorů v potravinách také přispívá k riziku nedostatku thiaminu. Některé rostliny obsahují anti-thiaminové faktory, které reagují s thiaminem za vzniku oxidovaného neaktivního produktu. Konzumace velkého množství čaje a kávy způsobuje demineralizaci thiaminů právě díky těmto faktorům, které obsahují mykotoxiny a thiaminázy rozkládající thiamin v potravinách. Tyto enzymy působí jako přírodní antagonisté thiaminu. Konzumací syrových sladkovodních živočichů je riziko nedostatku thiaminu malé, i když tyto potraviny obsahují thiaminázu, ta se však vařením inaktivuje (Bates Christopher et al., 2000; Ventura et al., 2013).

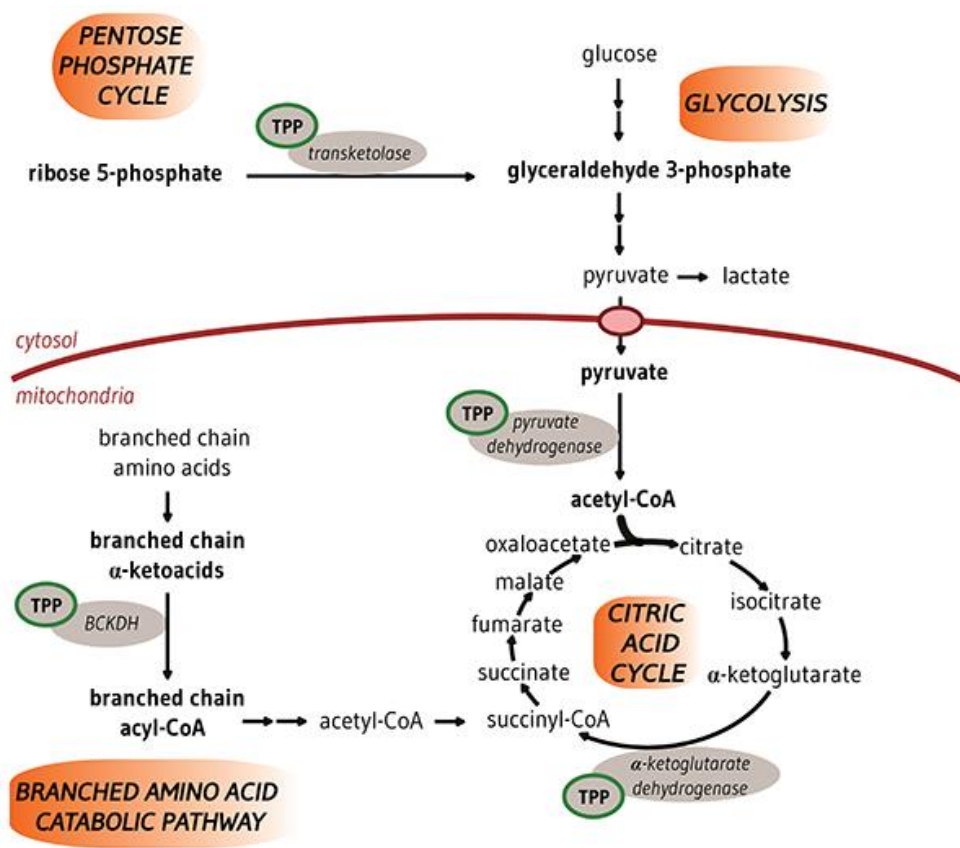
Závažná nutriční porucha, způsobená nedostatkem thiaminu, je onemocnění **beriberi**. Toto onemocnění ovlivňuje kardiovaskulární, nervový, svalový, gastrointestinální a centrální a periferní nervový systém. Podle zasažené oblasti organismu jej rozdělujeme na suché, srdeční (mokré), mozkové (cerebrální) nebo gastrointestinální (Bates Christopher et al., 2000; Mayxay et al., 2007; Riahi et al., 2017).

Případy suchého beriberi byly známy již od 19. století u námořníků po dlouhých námořních cestách a špatné stravě. V dnešní době je nedostatek výživy thiaminem ve vyspělých a většině rozvojových zemí vzácný. Může se to stát v případech například anorexie. Hlavním rysem suchého (paralytického nebo nervového) beriberi je neuropatie. V rané fázi neuropatie může dojít k "syndromu hořících nohou". Jiné příznaky zahrnují abnormální reflexy, stejně jako snížený cit a slabost končetin (Bates Christopher et al., 2000; Riahi et al., 2017).

Srdeční beriberi je charakterizováno neurologickými a kardiovaskulárními projevy zahrnujícími rychlou srdeční frekvenci, zvětšení srdce, edém, potíže s dýcháním až srdeční selhání. Thiamin ve své fosforylované formě jako thiamin-pyrofosfát (TPP) je prekurzorem kofaktoru pyruvát-dehydrogenázy a α -ketoglutarát-dehydrogenázy, které jsou důležitou součástí Krebsova cyklu. Snížením aktivity těchto dvou enzymů v důsledku nedostatku thiaminu může vést k akumulaci pyruvátu a laktátu v tkáních, to zvyšuje tok žilního krevního řečiště, čímž se zvyšuje zatížení srdce (Bates Christopher et al., 2000; Lei et al., 2018).

Cerebrální beriberi vedou k nezvratnému poškození mozku, způsobující zmatenost, apatický stav a poruchy paměti až amnézie (Bates Christopher et al., 2000).

TPP je kritický pro metabolické reakce, které využívají glukózu v glykolýze a v Krebsově cyklu (obr. 4). Snížení aktivity thiamin-dependentních enzymů omezuje konverzi pyruvátu na acetyl-CoA a tím i samotný cyklus, což vede k akumulaci pyruvátu a laktátu. Laktátová acidóza, což je stav způsobený akumulací laktátu, je často spojena s nevolností, zvracením a těžkou bolestí břicha, což jsou příznaky gastrointestinálního beriberi (Bates Christopher et al., 2000).



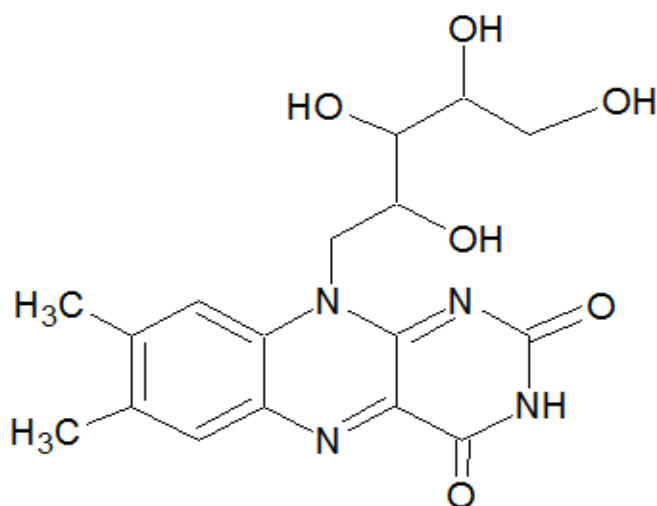
BCKDH, branched chain α -ketoacid dehydrogenase complex; CoA, coenzyme A; TPP, thiamin pyrophosphate.

Obrázek 4: Schématické znázornění metabolických procesů, kterých se účastní TPP (Bates Christopher et al., 2000)

U vyšších dávek nemá thiamin téměř žádný vedlejší účinek, ačkoli dlouhodobé užívání vitamínu B1 může způsobit bolesti hlavy a někdy i palpitace, protože jeho velké množství je vylučováno močí díky jeho rozpustnosti ve vodě (Abdollahifard et al., 2014).

2.2 Riboflavin

Riboflavin (obr. 5) je ve vodě rozpustný vitamín přítomný v širokém spektru potravin. Působí jako koenzym v mnoha oxidačně-redukčních reakcích. Je prekursorem flavin-mononukleotidu a flavin-adenin-dinukleotidu, které se podílejí na transportu elektronů v mitochondriích u oxidativního metabolismu. Riboflavin se podílí na mitochondriální oxidační fosforylaci. Nežádoucí účinky riboflavinu byly prokázány jako minimální, včetně průjmu a polyurie. Čistý riboflavin, ve formě žlutých až oranžových krystalů, je ve vodě špatně rozpustný, proto nejčastějším neškodným nežádoucím účinkem riboflavinu je změna moče až do oranžové barvy. Komerčně vyráběný riboflavin se používá v zemědělství, lékařství a potravinářském průmyslu (Abbas a Sibirny, 2011; Condò et al., 2009; Powers, 2003; Talebian et al., 2018).



Obrázek 5: Strukturní vzorec riboflavinu

Riboflavin nebo jeho deriváty se nachází v široké škále potravin – obiloviny, maso (zejména droby) a tučné ryby jsou dobrým zdrojem, dále některé druhy ovoce a zeleniny, nejvýznamnějším zdrojem je mléko a mléčné výrobky. I když je relativně tepelně stabilní, riboflavin je lehce degradován oxidačními produkty fotolýzy, které mohou poškodit mléčné lipidy. Pokles spotřeby mléka a mléčných výrobků může přispět k nízkým hodnotám riboflavinu, které jsou zaznamenány zejména u mladých lidí (Powers, 2003).

Produkce riboflavinu je soustředěna především v biotechnologii v oblasti metabolického inženýrství a bioprocenálního inženýrství. Terminální biosyntéza

riboflavinu má počátek od 2 prekurzorů – ribulóza-5-fosfátu a guanosin-trifosfátu. Flavinové nukleotidy jsou syntetizovány ve dvou po sobě jdoucích reakcích z riboflavinu. Některé mikroorganismy a všechny živočišné buňky jsou schopné vychytávat riboflavin (Abbas a Sibirny, 2011; Schwechheimer et al., 2016).

Riboflavin má blahodárné účinky při léčbě migrény, zapříčiněné mitochondriálními poruchami. Tyto účinky jsou však prokázány pouze u dospělé populace, u dětí jsou zatím ve výzkumu (Condò et al., 2009; O'Brien a Hershey, 2010).

V tkáních jsou flaviny vázány na specifické enzymy a proteiny. Nenavázané flaviny jsou relativně labilní a rychle se hydrolyzují na volný riboflavin (ten je transportován v plazmě pomocí albuminu a imunoglobulinů), který difunduje z buněk a vylučuje se jako riboflavin či jako jeho metabolity (př. 7-hydroxymethylriboflavin, lumiflavin). Některé metabolity moči odrážejí také bakteriální aktivitu v gastrointestinálním traktu. Intracelulární fosforylace riboflavinu je tedy formou metabolického záchytného klíče pro homeostázu riboflavinu (Powers, 2003).

Ukazatelem množství příjmu riboflavinu je vylučování riboflavinu a jeho metabolitů, krevní hodnoty pro riboflavin a koeficient aktivity glutation-reduktázy erytrocytu. RDI se obecně pohybuje kolem 1,5 mg (Anon, 1998).

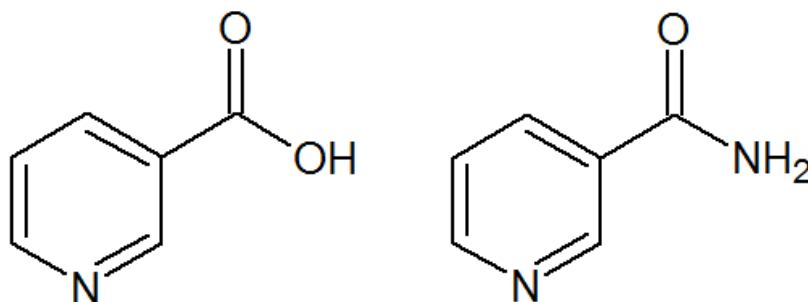
2.2.1 Nedostatek

Nedostatek riboflavinu může přispět ke zvýšení koncentrace plazmatického homocysteinu se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních onemocnění. Byly také dokumentovány příznaky neurodegenerace a periferní neuropatie. Nedostatek riboflavinu může přispět k patologii některých duševních onemocnění pro jeho roli v metabolismu tyroxinu. Dalším projevem nedostatku riboflavinu je zhoršený transport železa v těle a zhoršení zraku („noční slepota“) (Powers, 2003).

2.3 Niacin

Niacin (vitamín B3) působí jako koenzym s četnými dehydrogenázami pro přenos hydridového iontu. Primární metoda k odhadu požadavku na niacin je exkrece metabolitů niacinu v moči, vyjádřeno v ekvivalentech, což umožňuje určitou konverzi aminokyseliny tryptofanu na niacin (Anon, 1998).

Ve stravě je niacin složen ze dvou látek: kyseliny nikotinové a nikotinamidu (obr. 6), které jsou prekurzory bioaktivních molekul nikotinamidadenin-dinukleotidu (NAD^+) a nikotinamidadenin-dinukleotid-fosfátu (NADP^+). **Kyselina nikotinová** je vstřebávána z rostlinné stravy, zatímco **nikotinamid** je degradační produkt pyridinu, který se vstřebává z potravin na bázi zvířat a je převládající formou vitamínu B3. Dietní kyselina nikotinová se převádí na NAD^+ ve střevě nebo v játrech a uvolňuje se do systémového oběhu jako nikotinamid, působením NAD^+ glyko-hydroláz. NAD^+ a NADP^+ jsou důležitými kofaktory pro udržení buněčného metabolismu a dýchání a jiných redoxních reakcích buňky. NAD^+ slouží také jako kosubstrát pro velké množství ADP-ribosylačních enzymů s různými funkcemi, jako jsou genetické a epigenetické regulátory (př. ADP-ribóza). Udržení genetické stability a epigenetických kontrolních mechanismů moduluje metabolismus a stárnutí (Kirkland a Meyer-Ficca, 2018; Kirkland, 2009).



Obrázek 6: Strukturní vzorec niacinu – kyselina nikotinová (vlevo); nikotinamid (vpravo)

Niacin je vyžadován pro udržení chromozomální stability a může usnadnit opravu DNA *in vivo*. Podání niacinu může pomoci chránit buňky kostní dřeně u pacientů s rakovinou se zhoršeným výživovým stavem zapříčiněným vedlejšími účinky chemoterapeutických léků (Spronck a Kirkland, 2002).

Hladina kyseliny nikotinové a niacinu v krvi je fyziologicky velmi malá. Koncentrace nikotinu je kolem 300 nmol/l a kyseliny nikotinové často i nedetekovatelná. Zatímco farmakologické dávky obvykle obsahují 1-3 gramů kyseliny nikotinové nebo nikotinamidu, potraviny bohaté na niacin poskytují zhruba 10 mg vitamínu B3. Přijatá strava obsahuje směs kyseliny nikotinové a nikotinamidu, která se mění s podílem rostlinné a živočišné skladby (Catz et al., 2005; Kirkland, 2009).

Kyselina nikotinová se používá klinicky při léčbě hyperlipidémie. Bylo zjištěno, že receptor, na který je navázán G-protein, zprostředkovává antilipolytický účinek niacinu prostřednictvím inhibice adenylylcyklázy v adipocytech. Niacin indukuje inzulinovou rezistenci, ale zhoršení glykemické kontroly u diabetu je obvykle malé. Jaterní toxicita je častá při vyšších dávkách niacinu s prodlouženým uvolňováním. Niacin s prodlouženým uvolňováním a s okamžitým uvolňováním v podstatě neprodukuje myopatické účinky, pokud je podáván v kombinaci se statiny. Denní příjem 1-3 g k. nikotinové snižuje TAG a LDL-cholesterol v krvi, HDL-cholesterol se zvyšuje, což je pro tělo prospěšné, ovšem mohou se vyskytnout nepříjemné kožní reakce (Guyton, 2007; Kirkland, 2009).

Nikotinamid může zvýšit dopad radiace nebo chemoterapie. Perorální dávky nikotinamidu kolem 3 až 6 g v kombinaci s dostatečným okysličením krve zlepšují průtok a okysličování nádoru. Dále ovlivňuje kontrakci hladkého svalstva cév, což vede k vazodilataci (Ruddock et al., 2000; Ruddock a Hirst, 2004; Wardman, 2007).

Nikotinamid se nachází téměř ve všech kultivačních médiích. Některé ze specializovaných médií se přibližují koncentracím nikotinamidu, které by mohly změnit signalizaci cestou kinázy lehkého řetězce myozinu (Kirkland, 2009; Ruddock a Hirst, 2004).

Niacin můžeme přijímat z různých potravin, včetně vajec, mléka, fazolí a obohacené mouky. Absorpce niacinu je především v tenkém střevě, skladování pak v játrech. Niacin může být také syntetizován u lidí z esenciální aminokyseliny tryptofanu (Crook, 2014).

2.3.1 Nedostatek

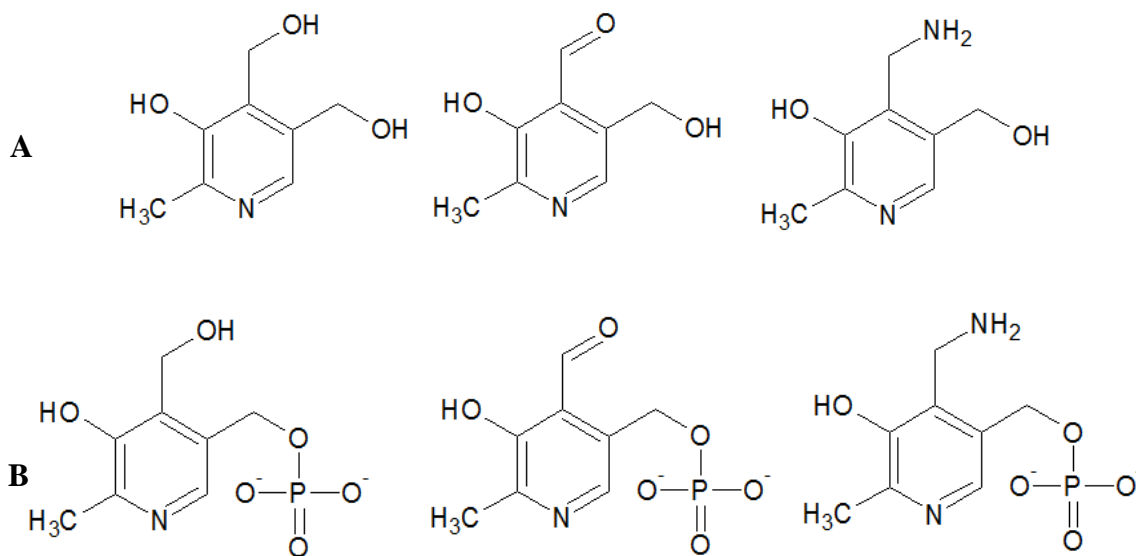
Studie *in vitro* a studie na zvířatech naznačují, že nedostatek niacinu zvyšuje genomickou nestabilitu, zejména v kombinaci s genotoxickým a oxidačním stresem. Nedostatek může také zvýšit riziko některých nádorů. Bylo prokázáno, že nikotinamid má *in vitro* antioxidační aktivitu srovnatelnou s kyselinou askorbovou. Údaje o stavu niacinu a genomové stálosti *in vivo* u lidí jsou omezené a poskytují nejednoznačné výsledky. Proto nejsou možné žádné pevné závěry ohledně optimálního příjmu niacinu. V důsledku perorálního doplnění niacinem se však mohou zvyšovat hladiny

nikotinamidu v těle, což může mít za následek zvýšenou genomovou nestabilitu (Hageman a Stierum, 2001).

Pellagra je systémové onemocnění způsobené výrazným deficitem niacinu. Projevuje se vážnou citlivostí kůže na slunci za vzniku dermatitidy, demencí podobnou schizofrenii, průjemem (což zhoršuje stav živin) a nakonec smrtí. Dermatitida začíná jako erytém. Akutní pellagra připomíná spáleniny prvního stupně (Hegyi et al., 2004; Kirkland, 2009).

2.4 Vitamín B6

Vitamín B6, neboli **pyridoxin**, se skládá ze šesti souvisejících sloučenin (obr. 7): pyridoxalu (PL), pyridoxinu (PN), pyridoxaminu (PM) a jejich příslušných fosfátů (PLP, PNP a PMP). V živočišné tkáni se vyskytuje PLP a PMP, v rostlinné najdeme především PN a PNP (někdy formou glukosidu). PLP je koenzym pro více než 100 enzymů podílejících se na metabolismu aminokyselin, včetně aminotransferáz, dekarboxyláz, racemáz a dehydratáz. Velká část z celkového PLP v těle se nachází ve svalech (PLP navázaný na fosforylázu). PLP je koenzym ve fosforylázové reakci a je také přímo zapojen do katalýzy. Funguje jako koenzym v metabolismu aminokyselin, glykogenu a sfingiodních bazí (Anon, 1998; Jacobs a Wood, 2003; Nakano a Gregory, 1995).



Obrázek 7: Strukturální vzorec vitamínu B6; A (zleva): pyridoxin, pyridoxal, pyridoxamin; B (zleva): PNP, PLP, PMP

Vitamín B6 je součástí syntézy neurotransmiterů a podílí se na odstraňování amoniaku z těla. Je také užíván ke zmírnění příznaků nevolnosti v době těhotenství (Wu et al., 2012).

Absorpce PLP v střevě zahrnuje hydrolyzu zprostředkovanou fosfatázou a následný transport nefosforylované formy do slizniční buňky. Transport je způsoben nestabilním pasivním difuzním mechanismem. PN glukosid je absorbován méně účinně než PLP a PMP a u lidí je dekonjugován slizniční glukosidázou. Některý PN glukosid je absorbován neporušený a může být hydrolyzován v různých tkáních (Anon, 1998; Nakano a Gregory, 1995).

Většina absorbovaného nefosforylovaného B6 jde do jater. V játrech jsou pyridoxin a pyridoxal (oxidovaná forma pyridoxinu) fosforylovány pyridoxal-kinázou za vzniku pyridoxin-fosfátu a PLP, aktivní formy kofaktorů. Pyridoxin-fosfát je oxidován na PLP pyridoxin-oxidázou. Tkáně a eryocyty mohou transportovat nefosforylované formy vitamínu B6 z plazmy – některé za působení fosfatázy. V tkáních se uskutečňuje přeměna transportovaného vitamínu na PLP, který se naváže na albumin, což umožňuje akumulaci a zadržování vitamínu B6 v tkáních, především v mitochondriích a cytosolu. Kapacita vazby na proteiny omezuje akumulaci PLP v tkáních při velmi vysokém příjmu B6. Když je tato kapacita překročena, volný PLP se rychle hydrolyzuje a nefosforylované formy B6 se uvolňují játry a dalšími tkáněmi do oběhu a následně se vyloučí močí (Ames et al., 2002; Anon, 1998; Merrill et al., 1984).

Tento vitamín rozpustný ve vodě není skladován a nemůže být syntetizován. Aby tedy byly splněny požadavky na metabolismus, musí být zajištěn dostatečný perorální příjem. Spolu s glykogen-fosforylázou se uplatňuje ve svalech a má důležitou roli ve funkci steroidních hormonů (Ames et al., 2002; Jacobs a Wood, 2003).

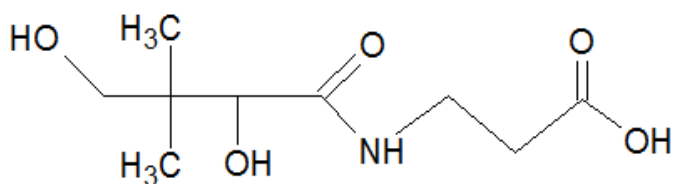
RDI pro vitamín B6 je pro dospělé 1,3 mg/den. Jeho příjem je však závislý na rychlosti metabolismu organismu, takže denní příjem pyridoxinu se s fyzickou zátěží zvyšuje. Zvýšené dávky jsou potřebné také u těhotných a kojících žen a u starší populace. Nejbohatší zdroje vitamínu B6 jsou zelí, banány, ryby, mléko, pivovarské kvasnice, sójové boby, vejce a otruby (Ames et al., 2002; Jacobs a Wood, 2003).

2.4.1 Nedostatek

Klasické klinické příznaky deficitu B6 jsou seboroická dermatitida, mikrocytická anémie (formou snížené syntézy hemu), epileptické křeče, deprese a zmatenost. Závažná homocysteinemie, způsobená genetickými defekty buď PLP dependentní cystathionin-beta-syntázy nebo enzymů v metabolismu vitamínu B12 a folátu, je spojena s velmi častým cévním onemocněním. Nedostatečné přísuny B6 mají také vliv na funkci trombocytů a mechanismy srážlivosti krve (Anon, 1998; Brattström et al., 1990).

2.5 Kyselina pantothenová

Kyselina pantothenová (obr. 8) je prekurzorem důležitého enzymatického koenzymu A (CoA) a je obsažena ve fosfopanthenu. Tyto složky se podílejí na metabolismu mastných kyselin (Anon, 1998; Spry et al., 2005).



Obrázek 8: Strukturální vzorec kyseliny pantothenové

Analoga kyseliny pantothenové jsou známa již více než půl století kvůli inhibici růstu řady mikroorganismů (např. *Plasmodium gallinaceum* způsobující malárii). Biochemické analýzy ukázaly, že paraziti nemají CoA, takže jej přebírají z hostitelské buňky. **Pantothenát** (ionizovaná forma kyseliny pantothenové) není přebírán neinfikovanými lidskými erytrocyty, ale vstoupí do parazitovaných erytrocytů novými permeabilními cestami indukovanými parazitem v membráně erytrocytů hostitele. Lidský erytrocyt má omezenou schopnost metabolizovat pantothenát, takže je vitamín převzat do intracelulárního prostoru parazita (prostřednictvím transportéru s nízkým afinitním H⁺-přenosem) a fosforylován pantothenát kinázou s vysokou afinitou jako první krok při přeměně pantothenátu na CoA. Lidský parazit *Plasmodium falciparum* syntetizuje CoA z pantothenátu, který byl odebrán z cytosolu hostitelské buňky (Saliba a Kirk, 2001; Saliba et al., 1998; Spry et al., 2005).

Inkubace Ehrlichových nádorových buněk při 22–32 °C s kyselinou pantothenovou, kyselinou 4'-fosfopantothenovou, pantothenolem nebo panthethinem se snížila peroxidace lipidů (měřeno produkcí sloučenin reagujících s kyselinou thiobarbiturovou) – indukováno Fentonovou reakcí (viz kapitola 1.3) a z části chráněno plazmatickou membránou k zabránění úniku proteinů produkovaných stejným činidlem. Tento proces významně zvýšil množství buněčného CoA a umožnil přidání palmitátu do fosfolipidů a esterů cholesterolu. Kyselina pantothenová a její příbuzné sloučeniny chrání plazmatickou membránu před poškozením volnými radikály kyslíku v důsledku zvyšující se úrovně hladiny CoA v buňce. CoA zmenšuje šíření peroxidace lipidů a podporuje reparační mechanismy, zejména syntézu fosfolipidů (Slyshenkov et al., 1995).

Preinkubace buněk kyselinou pantothenovou nebo jejími deriváty, které slouží jako prekurzory CoA, chrání před poškozením mitochondriální energie radikály kyslíku tvořenými UV světlem nebo Fentonovou reakcí. Inkubace nádorových Ehrlichových buněk kyselinou pantothenovou zvyšuje obsah glutathionu o 40 % (většina z nich je přítomna v redukované formě). Dospělo se k závěru, že ochranný účinek prekurzorů CoA proti lézím mitochondriálního systému, je hlavně způsoben odstraněním volných radikálů a peroxidů glutathion-peroxidázou a fosfolipid-hydroperoxid-glutathion-peroxidázou (Slyshenkov a Rakowska, 1995).

Studie ukazují, že podávání pantothenolu při léčbě ozařováním, udržuje stabilní hladinu parametrů měřených v játrech a obsah kyseliny pantothenové je až trojnásobný. Pantothenol je používán ve zdravotnictví (např. v multivitaminových doplňcích) a kosmetickém průmyslu (např. šampony, péče o pokožku) (Salibaet al., 2005; Slyshenkov et al., 1998).

2.5.1 Nedostatek

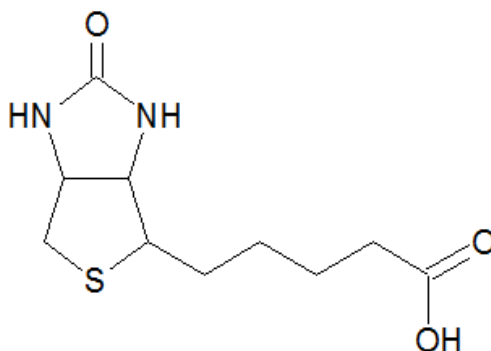
Tento vitamín je nezbytný pro růst, zdraví a rozmnožování živočichů a je nezbytný v lidské výživě. Spontánní vývoj takového nedostatku je ale nepravděpodobný, protože tento vitamín je velmi rozšířen v potravinách a je odolný před varem a chemickými činidly (Bean a Hodges, 1954; Hodges et al., 1959).

Deficit kyseliny pantotenové se projevuje nedostatečnou funkcí kůry nadledvin, doprovázenou nízkou hladinou cholesterolu a jeho esterů v krvi, zvýšenou citlivostí

na inzulín, gastrointestinálními příznaky, poklesem krevního tlaku způsobující zvýšenou únavu, emoční labilitou, neurologickými lézemi projevujícími se poškozením motoriky a koordinace, zrychlenou sedimentací erytrocytů, eozinopenií, chybami v tvorbě protilátek, náchylností k infekcím horních cest dýchacích a kožními projevy. Je tedy zřejmé, že kyselina pantotenová či její metabolický derivát – CoA jsou nezbytné ke správné homeostáze organismu (Bean a Hodges, 1954; Hodges et al., 1959).

2.6 Biotin

Biotin (obr. 9) je ve vodě rozpustný vitamín, který působí jako esenciální kofaktor pro čtyři karboxylázy závislé na bikarbonátu, z nichž každá katalyzuje zásadní krok v intermediárním metabolismu. Například enzym acetyl-CoA-karboxyláza katalyzuje rychlost-určující krok v prodloužení mastných kyselin. Začleněním biotinu do tohoto enzymu je regulována jeho aktivita vytěsněním biotin-karboxytransferázové proteinové podjednotky obsahující biotin (Anon, 1998; Keereetaweep et al., 2018; Mock, 1991).



Obrázek 9: Strukturální vzorec biotinu

Absorpce biotinu do intersticia je zprostředkovávána nosičem, který zahrnuje multivitaminový transportér závislý na sodíku, který je nadměrně exprimován v různých agresivních nádorových buňkách. Dále byla zjištěna jeho nadměrná exprese jako nadbytek folátového receptoru. Proto je poptávka po biotinu v rychle rostoucích nádorech vyšší než v normálních tkáních. Konjugované molekuly s biotinem vykazují vyšší výskyt cytotoxicity u buněčných linií pozitivních na biotin než normální buňka. Cytotoxicita a selektivita léčiva v rakovinových buňkách se po konjugaci s biotinem zvětšila (Maiti a Paira, 2018; Sabui et al., 2018).

2.6.1 Nedostatek

Nedostatek biotinu způsobuje retardaci růstu těla, abnormální histologii tlustého střeva, vyvolává závažná zánětlivá onemocnění a změny permeability střev vedoucí až ke smrti (Sabui et al., 2018).

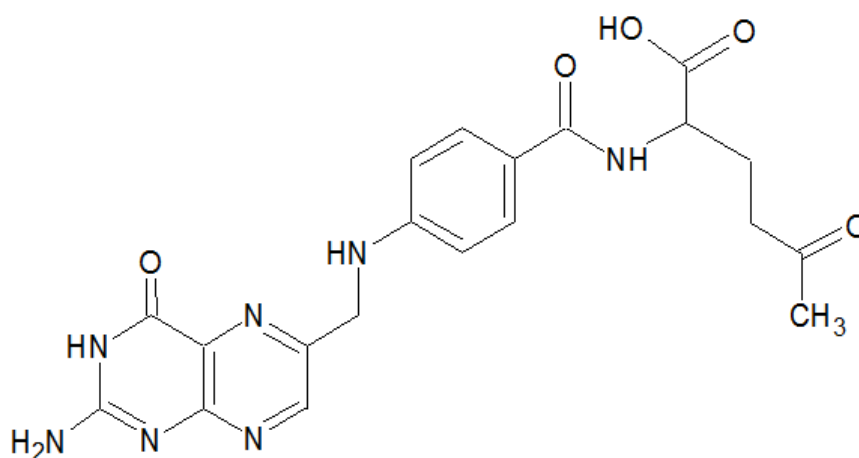
U kojenců, dětí a dospělých způsobuje nedostatek biotinu kožní onemocnění jako je alopecie, charakteristická šupinatost, erytematózní dermatitida rozptýlená kolem tělních otvorů. Z kožních lézí je často kultivována kvasinka *Candida albicans*. Infekce způsobené *C. albicans* spolu s poškozenou imunitou k dermatitidě přispívají. Existují důkazy, že poškozený metabolismus mastných kyselin sekundárně se sníženou aktivitou biotin-dependentních karboxyláz (zejména acetyl-CoA-karboxylázy) hraje etiologickou úlohu v dermatologických projevech nedostatku biotinu (Mock, 1991).

Vysoký nedostatek biotinu je během těhotenství velmi závažný, působí totiž teratogenně. Vyvolává u gravidních žen poruchy metabolismu a je příčinou různých malformací plodu. Zkoumání potenciálních mechanismů dokládá, že biotinový transport lidskou placentou je slabý. Dále proliferující buňky akumulují biotin rychlostí pětikrát vyšší než klidové buňky; toto zjištění naznačuje, že existuje zvýšený požadavek na biotin spojený s proliferací buněk. Snížená aktivita enzymů závislých na biotinu - acetyl-CoA-karboxyláza a propionyl-CoA-karboxyláza - může způsobit změny metabolismu lipidů a může teoreticky vést ke změnám metabolismu polynenasycených mastných kyselin a prostaglandinu, které narušují normální vývoj skeletu. Vylučování kyseliny 3-hydroxyisovalerové v moči se zvyšuje v důsledku snížené aktivity biotin-dependentního enzymu methylkrotonyl-CoA-karboxylázy, který katalyzuje podstatný krok v degradaci aminokyseliny leucinu s odštěpenými řetězci. Zvýšená exkrece kyseliny 3-hydroxyisovalerové močí je včasným a citlivým indikátorem snížení biotinového stavu (Mock et al., 2002; Zempleni a Mock, 2008).

2.7 Folát

Folát je ve vodě rozpustný vitamín přítomný v luštěninách, listové zelenině (jako je špenát a okurka) a u některých druhů ovoce (například citrusové plody). **Kyselina listová** (obr. 10) je považována za základní živinu, protože nemůže být syntetizována v lidském těle. Je to uměle vytvořená a nejstabilnější forma folátu, která je často používána v potravinových doplňcích. Biologická dostupnost kyseliny listové je

přibližně o 70 % vyšší než u folátu přirozeně obsaženého v potravinách, přestože v závislosti na metodologii měření jsou rozdíly. Dále je kofaktorem pro mnoho základních buněčných reakcí včetně syntézy DNA a nukleových kyselin (např. jako koenzym při přenosu karbonové skupiny v metabolismu nukleových kyselin a aminokyselin). Potřeba kyseliny listové se zvyšuje v době rychlého růstu tkáně, které se uplatňuje během těhotenství, kde se zvyšuje hmotnost červených krvinek, zvětšení dělohy a růst placenty a plodu. Tepelná úprava potravin snižuje množství folátu v nich obsaženého (Abu-Saad a Fraser, 2010; McNulty a Pentieva, 2004).



Obrázek 10: Strukturální vzorec kyseliny listové

Stav folátu u populace se obecně hodnotí pomocí statických biochemických testů, které přímo měří folát v séru nebo v červených krvinkách. Doporučená mezní hodnota pro definici deficitu je pod 10 nmol/l folátu v séru a pod 340 nmol/l pro folát v červených krvinkách. Měření koncentrace folátu se liší v závislosti na metodě, která byla použita při hodnocení, zejména u nižších koncentrací RDI kyseliny listové se pohybuje v rozmezí 200-400 µg/den (De-Regil et al., 2010; Fenech, 2001).

Metabolismus folátu je úzce spjat s vitamínem B12, který je nezbytný pro konverzi N⁵-methyltetrahydrofolátu na tetrahydrofolát. Tetrahydrofolát je aktivní forma folátu podílející se na syntéze DNA a metabolismu homocysteinu (Wu et al., 2012).

2.7.1 Nedostatek

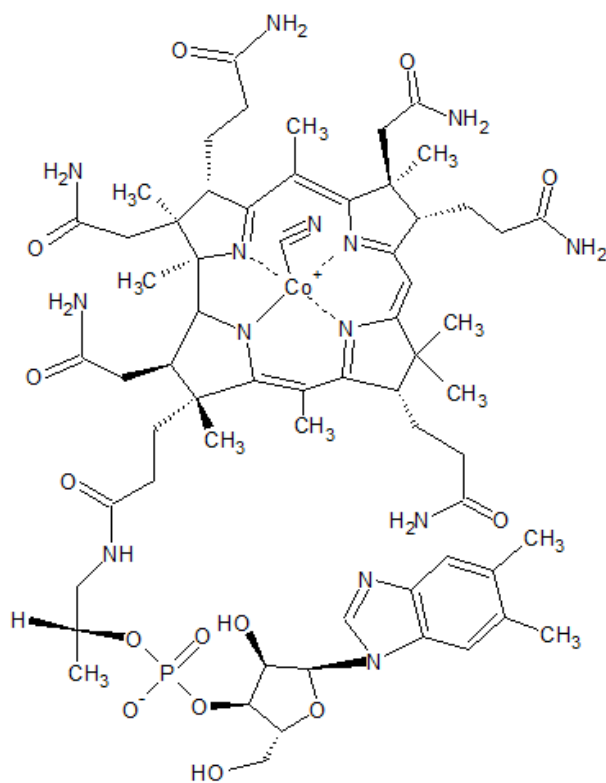
Folát je potenciální činidlo proti rakovině, protože hraje důležitou roli v syntéze nukleotidů, stejně jako v biologické methylaci molekul jako jsou nukleové kyseliny, proteiny a fosfolipidy. Nedostatek folátu způsobuje masivní začlenění uracilu do lidské

DNA (pomocí enzymu DNA-polymeráza), či deaminaci cytosinu, a způsobí tak přerušení chromozomů, to zvyšuje riziko vzniku rakoviny. Epidemiologické studie zjistily, že snížený stav folátu je spojen s rakovinou děložního čípku, kolorekta, plic, jícnu, mozku, pankreatu a prsu. Nedostatek folátů byl také považován za důležitý faktor při zvyšování rektální karcinogeneze v souvislosti s alkoholem, protože alkohol mění různé metabolické procesy folátu několika způsoby (Blount et al., 1997; Choi a Mason, 2000; Fenech et al., 1998).

Folát, vitamín B12 a železo hrají zásadní roli v erythropoéze. Erytroblasty vyžadují folát a vitamín B12 pro proliferaci během jejich diferenciace. Nedostatek folátu nebo vitamínu B12 inhibuje syntézu purinu a thymidylátu, narušuje syntézu DNA a způsobuje apoptózu erytroblastů, což vede k anémii z neúčinné erythropoézy. Dále jeho nedostatek způsobuje homocysteinemii (Brattström et al., 1990; Koury a Ponka, 2004).

2.8 Vitamín B12

Vitamín B12, také znám jako **kobalamin** (obr. 11), funguje jako koenzym v metabolismu mastných kyselin kyseliny s dlouhým řetězcem a při přenosu methylů (Anon, 1998).



Obrázek 11: Strukturní vzorec vitamínu B12

Kobalamin se mísí s haptokorin- α -kobalamin vázajícím proteinem produkovaným slinnými a žaludečními žlázami během žvýkání a polykání potravy. Po jeho uvolnění z bílkovin v potravě (pomocí žaludeční kyseliny a pepsinu), je vázán na haptokorin v kyselém prostředí žaludku, dále je proteolytickými enzymy vyvázan v alkalickém pH tenkého střeva, kde se naváže na vnitřní faktor sekretovaný žaludkem. Následně se vitamín absorbuje jako komplex kobalamin-vnitřní-faktor pomocí vazby na specifické receptory v ileální sliznici. Komplex je přijat do lysosomů, kde je kobalamin-vnitřní-faktor uvolněn a vnitřní faktor je degradován. Kobalamin je metabolizován na methyl- α -deoxyadenosyl- části, poté se methyl- uvolňuje do plazmy. V plazmě se kobalamin transportuje a přenáší do buněk. Zbytek je vázán na haptokorinu (Allen, 2008).

Vitamín B12 se nachází pouze v potravinách živočišného původu, takže příjem je zcela závislý na množství živočišného podílu stravy, kromě případů, kdy jsou potraviny obohaceny s vitamínem. Ačkoli se kobalaminy vyskytují i v potravinách rostlinného původu (např. ve vodních řasách), pro organismus není možné využití vitamínu B12, protože tyto kobalaminy nejsou biologicky aktivní. Ve skutečnosti obsahují analoga kobalaminu, která mohou inhibovat enzymy závislé na kobalaminu a způsobit další zhoršení stavu vitamínu B12. Vegetariánství a další obdobné směry nejsou tudíž vhodné pro rizikovou populaci, jako jsou děti, těhotné a kojící ženy či starší osoby (Allen, 2008; Dagnelie et al., 1991; Stabler et al., 1991; Rauma et al., 1995).

RDI pro dospělé je 2,4 – 2,8 $\mu\text{g}/\text{den}$ v závislosti na pohlaví a fyziologickém stavu; pro děti ve věku od 1 do 18 let se pohybuje v rozmezí od 0,9 do 2,4 $\mu\text{g}/\text{den}$ (Allen, 2008; Fenech, 2001).

2.8.1 Nedostatek

Nedostatek vitamínu B12 je způsoben jeho nedostatečným příjmem v potravě. Hraje důležitou roli při udržování funkce neuronálních buněk a nedostatek této živiny může vést k neurologickému poškození charakterizovanému částečně ztrátou paměti a zmatením. Nedostatek vitamínu B12 způsobuje homocysteinemii a je problémem obzvláště u starší populace kvůli snížené absorpci stravy. Absorpce vitamínu B12 je složitý proces s řadou kroků, kterou mohou nepříznivě ovlivňovat střevní onemocnění, infekce či léky. S výjimkou některých malabsorpčních syndromů je sérový vitamín B12

pozitivně spojen s příjmem, zvláště když příjem je z multivitaminů nebo z obohacených potravin (Allen, 2008; Brattström et al., 1990; Morris et al., 2005; Tucker et al., 2000).

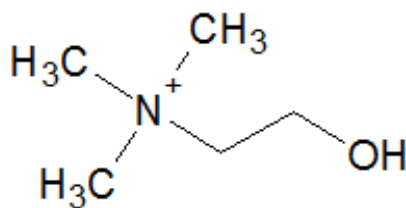
Stejně jako nedostatek produkce folátů, tak i nedostatek vitamínu B12 narušuje tvorbu červených krvinek a vede k megaloblastické anémii (Koury a Ponka, 2004; Wu et al., 2012).

Potravinová a **kobalaminová malabsorpce** je charakterizována neschopností uvolňovat kobalamin z potravy. Malabsorpce způsobuje vyčerpání vitamínu B12 z organismu, kdy perorální příjem tohoto vitamínu není schopen pokrýt výdej. Symptomy se projevují s pozdějším nástupem (v průběhu 2 až 5 let) v podobě intestinálních abnormalit, protože je narušena také enterohepatální cirkulace vitamínu. Pokud je však malabsorpce způsobena špatným uvolněním vitamínu z potravy, jako u žaludeční atrofie, účinnost enterohepatální recirkulace může být normální, ale množství reabsorbovaného vitamínu je nízké po vyčerpání zásob jater. Pro kobalamin obsažený v potravě je vhodnější užití testů obsahujících vejce nebo kuřecí sérum. Schillingův test slouží k detekci volného krystalického kobalaminu a je vhodnější pro referenční účely. Uvolňování kobalaminu z potravin vyžaduje žaludeční kyselinu a pepsin a většina potravinových malabsorpcí poukazuje na žaludeční vadu (Allen, 2008; Carmel, 1995).

Vitamín B12 je absorbován v ileu, špatná absorpce tohoto vitamínu může být odrazem patologie ilea. Jedním z onemocnění abnormální funkce ilea je celiakie. **Gluténová enteropatie (celiakie)** je způsobena alergickou reakcí na lepek (gluten) obsažený v obilovinách. Zánět tenkého střeva způsobuje zploštění klků a ztrátu absorpční kapacity. Bezlepková strava, která je celoživotní, umožňuje opravu sliznic a zlepšuje absorpci vitamínu B12 (Allen, 2008; Hjelt a Krasilnikoff, 1990).

2.9 Cholin

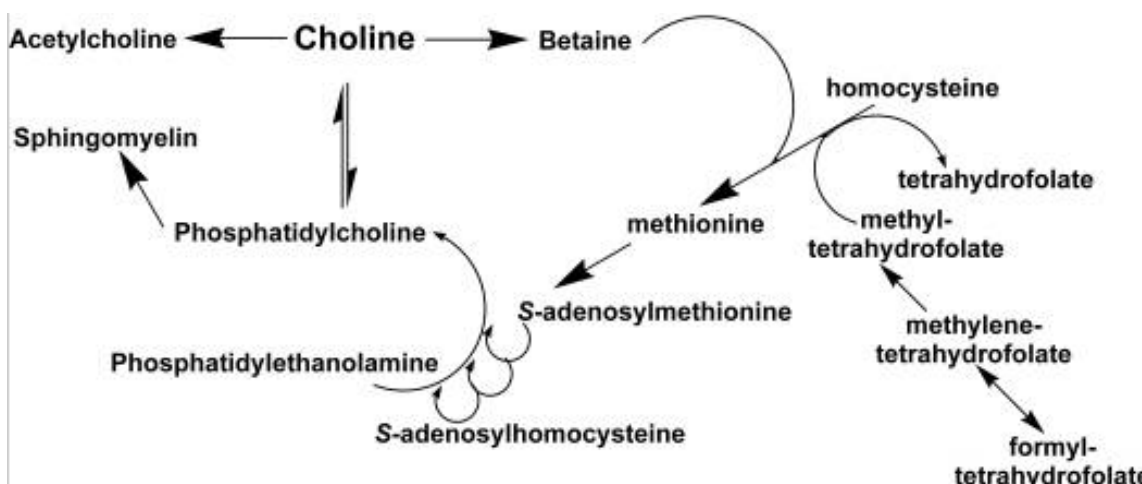
Cholin (obr. 12) je nezbytnou živinou a hlavním donorem methylů, který podporuje fyziologické procesy od normálního metabolismu k neurologickému vývoji plodu. Funguje jako prekurzor pro syntézu acetylcholinu a fosfolipidů (Anon, 1998; Zeisel a da Costa, 2009).



Obrázek 12: Strukturní vzorec cholinu

Cholin se používá jako společný termín pro skupinu sloučenin, včetně sfingomyelinu, glycerofosfocholinu, fosfatidylcholinu, fosfocholinu a volného (neesterifikovaného) cholinu. Přestože jsou fosfatidylcholin a sfingomyelin rozpustné v lipidech, jiné typy cholinu jsou rozpustné ve vodě a absorbovány různými cestami, což může vést k různým biologickým dostupnostem a osudům v těle. Rakoviny obvykle vykazují významně pozměněný profil metabolitů cholinu, který je charakterizován zvýšením fosfocholinu a celkovými sloučeninami obsahujícími cholin ve srovnání s normálními tkáněmi (Xu et al., 2009).

Vzhledem k jeho širokému zastoupení v metabolismu člověka (obr. 13), od buněčné struktury až po syntézu neurotransmiterů, se má dnes cholin-deficit projevit na chorobách, jako je onemocnění jater, ateroskleróza a možná neurologické poruchy. Cholin se nachází v široké škále potravin (Zeisel a da Costa, 2009).



Obrázek 13: Metabolické dráhy cholinu (Zeisel a Costa, 2009)

Lidé získávají cholin ze 2 hlavních zdrojů: stravou a endogenní produkcí v játrech. RDI je 550 mg/den pro muže a 425 mg/den pro ženy. Střevní bakterie mohou hydrolyzovat cholin za vzniku dimethylaminu a trimethylaminu. Fosfatidylcholin je složkou buněčné stěny u některých bakterií (Bidulescu et al., 2009; Spencer et al., 2011).

Běžné polymorfizmy jednotlivých nukleotidů (SNP = single nucleotide polymorphism) u několika genů ovlivňují produkci cholinu a metabolismus. Změny spojené s menopauzou u žen, zejména v kombinaci se SNP, mohou narušit endogenní produkci cholinu, zvýšit potřebu cholinu ve stravě a predisponovat postmenopauzální ženy k tvorbě tukové tkáně v játrech (Spencer et al., 2011).

2.9.1 Nedostatek

Mikroflóra se mění v reakci na změnu z nízkotučné stravy na stravu s vysokým obsahem tuků a cukrů, následně vznikají modifikace metabolických drah. Symbiotické mikroby jsou klíčové pro přístup k živinám a energii z potravinových zdrojů, také identifikují vztahy mezi specifickými střevními bakteriemi a hostitelským metabolismem. Strava s vysokým obsahem tuku a s nedostatečným příjmem cholinu způsobuje, že mikrobiální flóra narušuje biologickou dostupnost cholinu k hostiteli. Střevní bakterie tedy ovlivňují potřebu organismu pro cholin a následné zdravotní komplikace spojené s nedostatkem cholinu (Spencer et al., 2011).

Střevní mikroby využívají živiny a produkují metabolity, které ovlivňují širokou škálu lidských fenotypů, včetně náchylnosti na poruchy stravy jako je obezita, inzulinová rezistence, metabolický syndrom a Crohnova choroba. Nedostatek cholinu způsobuje nealkoholické tukové jaterní onemocnění, defekty neurální trubice, rakovinu jater a zvýšené riziko rakoviny prsu (Spencer et al., 2011; Xu et al., 2009).

3 STANOVENÍ VITAMÍNŮ

Současné stanovení několika vitamínů rozpustných ve vodě je obtížné a často se musí provést mnoho různých analýz. Pro stanovení vitamínů skupiny B je možné využití různých instrumentálních metod jako jsou: elektrochemie, spektrofotometrie, spektrofluorimetrie, HPLC a elektroforéza (Amidžić et al., 2005; P. Ortega-Barrales et al., 1998; Song a Wang, 2000).

Níže uvedené techniky stanovení vitamínů jsou popsány všeobecně. Stanovení vitamínů v potravinách nebo vitamínových doplňků se provádí dle specifik vlastního vzorku (Multon et al., 1997).

- Vitamín B6

Pyridoxin-hydrochlorát, který je velmi rozpustný ve vodě, je stabilní v kyselém prostředí. Může být stanoven mnoha technikami:

- 1) kolorimetricky

- reakce s 2,6-dichlorchinonchlorimidem, kdy v 1 ml vzorku může být detekováno až 0,5 µg vitamínu (JOHh, 1941; Multon et al., 1997).

- 2) mikrobiologicky

- mikroorganismy: *Neurospora sitophila*, *Saccharomyces carlsbergensis* (Multon et al., 1997).

- 3) chromatograficky

- extrakce tří forem (pyridoxal, pyridoxin, pyridoxamin) enzymaticky a kyselou hydrolyzou (Multon et al., 1997).
- stanovení pomocí HPLC s fluorimetrickou detekcí při 290-395 nm (Multon et al., 1997).

- Nikotin (nikotinamid)

Pro tento vitamín je možné stanovení:

- 1) mikrobiologicky

- mikroorganismy: *Lactobacillus arabinosus* a *Lactobacillus casei* (Multon et al., 1997).

- 2) chromatograficky

- stanovení pomocí HPLC s fotometrickou detekcí při 260 nm (Multon et al., 1997).

- Kyselina pantothenová

Pro tento vitamín je možné pouze mikrobiologické stanovení použitím mikroorganismů *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cerevisiac*, *Leuconostoc mesenteroids* a *Saccharomyces cerevisiac* (Multon et al., 1997).

- Biotin

Pro tento vitamín je možné pouze mikrobiologické stanovení použitím mikroorganismu *Lactobacillus arabinosis* (Multon et al., 1997).

- Folát

Pro tento vitamín je možné mikrobiologické stanovení použitím mikroorganismů *Streptococcus faecalis* a *Lactobacillus casei* (Multon et al., 1997).

- Vitamín B12

Uplatňuje se mikrobiologické stanovení s možností přidání radioizotopu. Používá se kultivační půda s *Lactobacillus Laris*, *Lactobacillus leischmani* a *Escherichia coli* (Multon et al., 1997).

- Vitamín C (kyselina askorbová)

Je možné stanovení pomocí těchto metod:

- 1) chemicky – titrací

- rozpuštěním extraktu vzorku ve směsi kyseliny metafosforečné + kyseliny octové + vody – přidáním škrobu a smícháním; následuje titrace v roztoku jódu (Multon et al., 1997).

- 2) kolorimetricky

- oxidací kyseliny askorbové s 2-6-dichloro-fenolindofenolem na dehydroaskorbovou kyselinu, která je přeměněna na 2-4-dinitrofenylhydrazin, poté rozpuštěno v 85 % kyselině sírové a měřeno při 520 nm (Multon et al., 1997).

- 3) enzymaticky

- přeměna kyseliny askorbové na kyselinu dihydroaskorbovou pomocí askorbát-oxidázy (Multon et al., 1997).

- 4) kapalinovou chromatografií

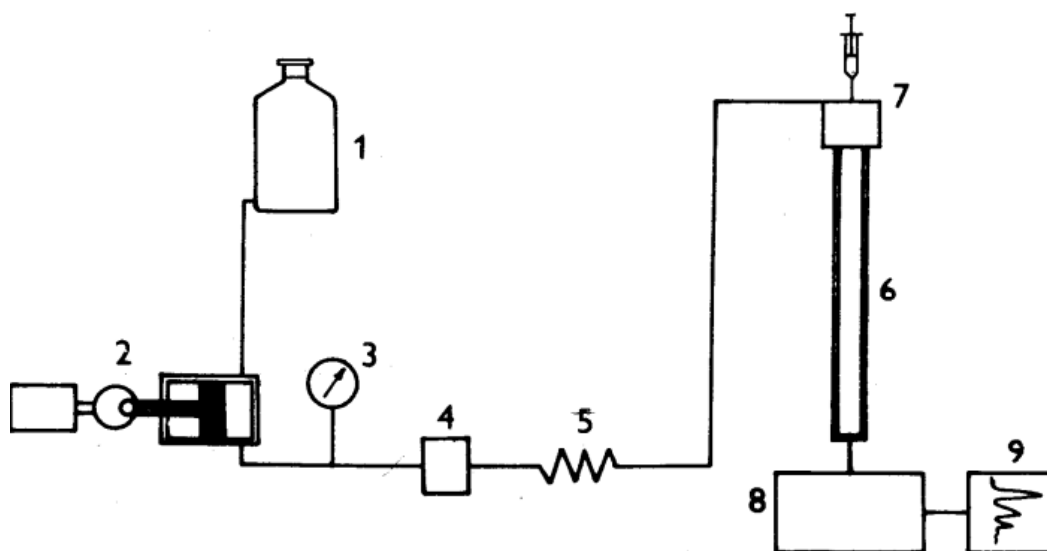
- L-askorbová kyselina je extrahována ze vzorku s použitím 0,4 % kyseliny metafosforečné. L-askorbová kyselina je izolována

metafosforečnany, oddělena chromatograficky kapalnou fází a stanovena fotometricky při 254 nm (Multon et al., 1997).

3.1 HPLC

Kapalinová chromatografie je založena na opakované distribuci látek mezi mobilní (kapalnou) a stacionární (pevnou) fází. Migraci se tyto látky vzájemně separují. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) dokáže pracovat s malými dávkami objemů vzorku, takže je možné tuto metodu používat ke stanovení širokého spektra látek včetně vitamínů (Ahuja a Dong, 2005; Lightfoot a Moscariello, 2004).

Schéma kapalinového chromatografu je uvedeno na obr. 14.



Obrázek 14: Schéma kapalinového chromatografu (1 - zásobník mobilní fáze; 2 - vysokotlaká čerpadla; 3 - měřidlo tlaku; 4 - filtr; 5 - tlumič tlakových pulsů; 6 - kolona; 7 - dávkovač vzorku; 8 - detektory; 9 - vyhodnocovací zařízení)

(VŠCHT, n.d.)

Posouzení a validace spolehlivých analytických metod pro stanovení vitamínů v matricích na bázi cukru jsou dosud zkoumané. HPLC s reverzní fází je rychlá a jednoduchá metoda pro současné stanovení pěti vitamínů rozpustných ve vodě (riboflavinu, kyseliny nikotinové, kyseliny pantothenové, kyseliny listové a kyseliny askorbové). Metoda poskytuje nízké limity detekce a kvantifikace, velmi dobrou linearitu ve velkém koncentračním intervalu, velmi dobrou přesnost a absenci jakéhokoli zkreslení. HPLC s reverzní fází je využívána především ve farmaceutickém

průmyslu. Většina metod používá buď ultrafialovou nebo fluorescenční detekci (Amidžić et al., 2005; Bavand Savadkouhi et al., 2017; Ciulu et al., 2011; Lynch a Young, 2000).

Byla vyvinuta metoda s vysokou propustností, která detekuje současně riboflavin, pyridoxin, nikotinamid, kofein a taurin v energetických nápojích. Vzorky se po patřičné úpravě (odplynění v ultrazvukové lázni, kalibrace) stanoví pomocí kapalinové chromatografie a následně se odečítají absorbance UV spektra se specifickými vlnovými délkami (Aranda a Morlock, 2006).

4 ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsem se věnovala vitamínům rozpustným ve vodě, jejich funkcím v organismu a klinickými projevy na organismus.

Vitamín C má výborné antioxidační vlastnosti, podporuje správný chod organismu (např. podporuje správný průběh enzymatických reakcí) a je významným antikarcinogenním činidlem. Je obsažen v široké škále ovoce a zeleniny a jeho deficit je velmi vážný.

Vitamíny skupiny B (thiamin, riboflavin, niacin, vitamín B6, kyselina pantothenová, biotin, folát, vitamín B12 a cholin) jsou důležité pro metabolické a redox procesy organismu. Také jsou nezbytné pro syntézy důležitých stavebních složek organismu. Tyto vitamíny jsou obsaženy v potravinách rostlinného a živočišného původu. Jejich příjem je nutný pro zdárný růst dětí. Nedostatek těchto vitamínů způsobuje různá onemocnění s chronickým průběhem.

Vitamíny rozpustné ve vodě není člověk schopen syntetizovat, jsou tedy pro náš organismus esenciální, takže je nutné je získávat stravou.

Dále jsem se zabývala možnými metodami stanovení těchto vitamínů. Nejrozšířenější metodu HPLC jsem krátce popsala.

CITOVANÁ LITERATURA

- Abbas, C.A. and Sibirny, A.A., 2011. Genetic Control of Biosynthesis and Transport of Riboflavin and Flavin Nucleotides and Construction of Robust Biotechnological Producers. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(2), str.321–360. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21646432> [Citováno: Duben 24, 2018].
- Abdollahifard, S., Koshkaki, A.R., Moazamiyanfar, R., 2014. *Global journal of health science.*, Dostupné z: <http://www.ccsenet.org/journal/index.php/gjhs/article/view/36220/21661> [Citováno: Říjen 3, 2017].
- Abu-Saad, K., Fraser, D., 2010. Maternal Nutrition and Birth Outcomes. *Epidemiologic Reviews*, 32(1), str.5–25. Dostupné z: <https://academic.oup.com/epirev/article-lookup/doi/10.1093/epirev/mxq001> [Citováno: Říjen 3, 2017].
- Ahuja, S., Dong, M.W., 2005. Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC. *Knihy Google*, Dostupné z: https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=k_pD5hlj5DkC&oi=fnd&pg=PP1&dq=related:Ubz68COK56UJ:scholar.google.com/&ots=PHfnuDPZ1d&sig=cSdFjBIRyORDix5B6hw6IbicMvM&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false [Citováno: Květen 18, 2018].
- Allen, L.H., 2008. Causes of vitamin B 12 and folate deficiency Causes of vitamin B12 deficiency. *Food and Nutrition Bulletin*, 29(2). Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/15648265080292S105> [Citováno: Duben 29, 2018].
- Ames, B.N., Elson-Schwab, I., Silver, E.A., 2002. High-dose vitamin therapy stimulates variant enzymes with decreased coenzyme binding affinity (increased K(m)): relevance to genetic disease and polymorphisms. *The American journal of clinical nutrition*, 75(4), str.616–58. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11916749> [Citováno: Listopad 28, 2017].
- Amidžić, R. et al., 2005. RP-HPLC Determination of vitamins B1 , B3 , B6 , folic acid and B12 in multivitamin tablets. *J. Serb. Chem. Soc.*, 70(10), str.1229–1235. Dostupné z: <http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/0352-5139/2005/0352-51390510229A.pdf> [Citováno: Květen 10, 2018].

- Anon, 1998. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin and Choline A Report of the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B. , 592(9). Dostupné z: <http://www.nap.edu/catalog/6015.html> [Citováno: Říjen 3, 2017].
- Aranda, M., Morlock, G., 2006. Simultaneous determination of riboflavin, pyridoxine, nicotinamide, caffeine and taurine in energy drinks by planar chromatography-multiple detection with confirmation by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1131(1–2), str.253–260. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967306013707> [Citováno: Květen 10, 2018].
- Bates Christopher, D.P. et al., 2000. Thiamin | Linus Pauling Institute | Oregon State University. Dostupné z: <http://lpi.oregonstate.edu/mic/vitamins/thiamin#reference2> [Citováno: Duben 4, 2018].
- Bavand Savadkouhi, M. et al., 2017. RP-HPLC Method Development and Validation for Determination of Eptifibatide Acetate in Bulk Drug Substance and Pharmaceutical Dosage Forms. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, 16(2), str.490–497. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28979304> [Citováno: Květen 11, 2018].
- Bean, W.B., Hodges, R.E., 1954. Pantothenic Acid Deficiency Induced in Human Subjects. *Experimental Biology and Medicine*, 86(4), str.693–698. Dostupné z: <http://ebm.sagepub.com/lookup/doi/10.3181/00379727-86-21204> [Citováno: Květen 4, 2018].
- Bidulescu, A. et al., 2009. Repeatability and measurement error in the assessment of choline and betaine dietary intake: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Nutrition Journal*, 8(1), str.14. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19232103> [Citováno: Květen 10, 2018].
- Blount, B.C. et al., 1997. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7), str.3290–5. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9096386>

[Citováno: Květen 1, 2018].

- Brattström, L. et al., 1990. Impaired homocysteine metabolism in early-onset cerebral and peripheral occlusive arterial disease. Effects of pyridoxine and folic acid treatment. *Atherosclerosis*, 81(1), str.51–60. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2407253> [Citováno: Duben 28, 2018].
- Carmel, R., 1995. 10 Malabsorption of food cobalamin. *Baillière's Clinical Haematology*, 8(3), str.639–655. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0950353605802240> [Citováno: Květen 2, 2018].
- Catz, P. et al., 2005. Simultaneous determination of myristyl nicotinate, nicotinic acid and nicotinamide in rabbit plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using methyl ethyl ketone as a deproteinization solvent. *Journal of Chromatography B*, 829(1–2), str.123–135. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S157002320500704X> [Citováno: Duben 27, 2018].
- Ciulu, M. et al., 2011. RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. *Talanta*, 83(3), str.924–929. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914010008556> [Citováno: Květen 10, 2018].
- Condò, M. et al., 2009. Riboflavin prophylaxis in pediatric and adolescent migraine. *The Journal of Headache and Pain*, 10(5), str.361–365. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19649688> [Citováno: Duben 22, 2018].
- Crook, M.A., 2014. The importance of recognizing pellagra (niacin deficiency) as it still occurs. *Nutrition*, 30(6), str.729–730. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24679717> [Citováno: Duben 28, 2018].
- Dagnelie, P.C., van Staveren, W.A., van den Berg, H., 1991. Vitamin B-12 from algae appears not to be bioavailable. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53(3), str.695–697. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/53/3/695/4731861> [Citováno: Duben 29, 2018].
- Dayan, N., 2008. Skin aging handbook. Dostupné z: http://www.anme.com.mx/libros/Skin_Aging_Handbook.pdf#page=168 [Citováno: Listopad 18, 2017].

- De-Regil, L.M. et al., 2010. Effects and safety of periconceptional folate supplementation for preventing birth defects. In L. M. De-Regil, ed. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, p. CD007950. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20927767> [Citováno: Květen 3, 2018].
- Diplock, A.T. et al., 2017. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*, 80(1), str.77–112. Dostupné z: https://www.cambridge.org/core/services/aop-cambridge-core/content/view/D63DEA9DF99A59E3394F233F15F09418/S0007114598001202a.pdf/functional_food_science_and_defence_against_reactive_oxidative_species.pdf [Citováno: Říjen 5, 2017].
- Fenech, M., 2001. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutation research*, 475(1–2), str.57–67. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11295154> [Citováno: Květen 3, 2018].
- Fenech, M., Aitken, C., Rinaldi, J., 1998. Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults. *Carcinogenesis*, 19(7), str.1163–71. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9683174> [Citováno: Květen 2, 2018].
- Frömberg, A. et al., 2011. Ascorbate exerts anti-proliferative effects through cell cycle inhibition and sensitizes tumor cells towards cytostatic drugs. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 67(5), str.1157–1166. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20694726> [Citováno: Květen 14, 2018].
- Guyton, J.R., 2007. Niacin in cardiovascular prevention: mechanisms, efficacy and safety. *Current Opinion in Lipidology*, 18(4), str.415–420. Dostupné z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00041433-200708000-00007> [Citováno: Duben 27, 2018].
- Hageman, G.J., Stierum, R.H., 2001. Niacin, poly(ADP-ribose) polymerase-1 and genomic stability. *Mutation research*, 475(1–2), str.45–56. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11295153> [Citováno: Duben 27, 2018].
- Heaney, M.L. et al., 2008. Vitamin C Antagonizes the Cytotoxic Effects of Antineoplastic Drugs. *Cancer Research*, 68(19), str.8031–8038. Dostupné z:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18829561> [Citováno: Květen 14, 2018].
- Hegyi, J., Schwartz, R.A., Hegyi, V., 2004. Pellagra: Dermatitis, dementia and diarrhea. *International Journal of Dermatology*, 43(1), str.1–5. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-4632.2004.01959.x> [Citováno: Duben 28, 2018].
- Hjelt, K., Krasilnikoff, P.A., 1990. The Impact of Gluten on Haematological Status, Dietary Intakes of Haemopoietic Nutrients and Vitamin B₁₂ and Folic Acid Absorption in Children with Coeliac Disease. *Acta Paediatrica*, 79(10), str.911-919. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1651-2227.1990.tb11352.x> [Citováno: Květen 2, 2018].
- Hodges, R.E. et al., 1959. Human pantothenic acid deficiency produced by omega-methyl pantothenic acid. Dostupné z: <https://dm5migu4zj3pb.cloudfront.net/manuscripts/103000/103918/JCI59103918.pdf> [Citováno: Květen 4, 2018].
- Chen, Q. et al., 2005. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: Action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(38), str.13604–13609. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16157892> [Citováno: Květen 14, 2018].
- Chen, Q. et al., 2008. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(32), str.11105–9. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18678913> [Citováno: Duben 16, 2018].
- Choi, S.-W., Mason, J.B., 2000. Folate and Carcinogenesis: An Integrated Scheme. *The Journal of Nutrition*, 130(2), str.129–132. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jn/article/130/2/129/4686648> [Citováno: Květen 2, 2018].
- Jacobs, P., Wood, L., 2003. Vitamin B6. *Disease-a-Month*, 49(11), str.666–672. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011502903001640> [Citováno: Duben 28, 2018].
- JOHh, B., 1941. On the colorimetric determination of vitamin Bs. Dostupné z: <http://www.jbc.org/content/139/2/707.full.pdf> [Citováno: Květen 31, 2018].

- KeereetawEEP, J. et al., 2018. Biotin Attachment Domain-Containing Proteins Irreversibly Inhibit Acetyl CoA Carboxylase. *Plant Physiology*, 177(1), p.pp.00216.2018. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29626162> [Citováno: Květen 9, 2018].
- Kirkland, J.B., 2009. Niacin status, NAD distribution and ADP-ribose metabolism. *Current pharmaceutical design*, 15(1), str.3–11. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19149597> [Citováno: Duben 26, 2018].
- Kirkland, J.B., Meyer-Ficca, M.L., 2018. Niacin. In *Advances in food and nutrition research*. str. 83–149. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29477227> [Citováno: Duben 26, 2018].
- Koury, M.J., Ponka, P., 2004. New insights into erythropoiesis: The Roles of Folate, Vitamin B₁₂ and Iron. *Annual Review of Nutrition*, 24(1), str.105–131. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15189115> [Citováno: Květen 1, 2018].
- Lei, Y. et al., 2018. Wet beriberi with multiple organ failure remarkably reversed by thiamine administration: A case report and literature review. *Medicine*, 97(9), p.e0010. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29489643> [Citováno: Duben 21, 2018].
- Levine, M., Padayatty, S.J., Espey, M.G., 2011. Vitamin C: a concentration-function approach yields pharmacology and therapeutic discoveries. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, 2(2), str.78–88. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22332036> [Citováno: Listopad 28, 2017].
- Lightfoot, E.N., Moscariello, J.S., 2004. Bioseparations. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(3), str.259–273. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.20111> [Citováno: Květen 18, 2018].
- Lynch, P.L., Young, I.S., 2000. Determination of thiamine by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography. A*, 881(1–2), str.267–84. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10905711> [Citováno: Květen 10, 2018].
- Maiti, S., Paira, P., 2018. Biotin conjugated organic molecules and proteins for cancer therapy: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 145, str.206–223. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523418300011> [Citováno: Květen 9, 2018].

- Květenxay, M. et al., 2007. Thiamin deficiency and uncomplicated falciparum malaria in Laos. *Tropical Medicine & International Health*, 12(3), str.363–369. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3156.2006.01804.x> [Citováno: Duben 21, 2018].
- McNulty, H., Pentieva, K., 2004. Folate bioavailability. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 63(4), str.529–36. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15831124> [Citováno: Květen 3, 2018].
- Merrill, A.H. et al., 1984. Metabolism of Vitamin B-6 by Human Liver. *The Journal of Nutrition*, 114(9), str.1664–1674. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6088736> [Citováno: Duben 28, 2018].
- Mock, D.M., 1991. Skin manifestations of biotin deficiency. *Seminars in dermatology*, 10(4), str.296–302. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1764357> [Citováno: Květen 9, 2018].
- Mock, D.M., Quirk, J.G., Mock, N.I., 2002. Marginal biotin deficiency during normal pregnancy. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 75(2), str.295–299. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/75/2/295/4689307> [Citováno: Květen 9, 2018].
- Morris, M.C. et al., 2005. Dietary Folate and Vitamin B12 Intake and Cognitive Decline Among Community-Dwelling Older Persons. *Archives of Neurology*, 62(4), p.641. Dostupné z: <http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archneur.62.4.641> [Citováno: Duben 29, 2018].
- Multon, J.L., Jean L., Stadelman, W.J., Watkins, B.A., 1997. *Analysis of food constituents*, Wiley-VCH. Dostupné z: https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=Nanp7jmUQZoC&oi=fnd&pg=PA281&dq=determination+of+vitamins&ots=ktic_3m1yy&sig=kF2RGz1k8pCbcCnR76rEGzSyajI&redir_esc=y#v=onepage&q=determination+of+vitamins&f=false [Citováno: Květen 10, 2018].
- Nakano, H., Gregory, J.F., 1995. Pyridoxine and Pyridoxine-5'- β -D-Glucoside Exert Different Effects on Tissue B-6 Vitamers but Similar Effects on β -Glucosidase Activity in Rats. *The Journal of Nutrition*, 125(11), str.2751–2762. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jn/article-abstract/125/11/2751/4730516?redirectedFrom=fulltext> [Citováno: Duben 28, 2018].

- O'Brien, H.L., Hershey, A.D., 2010. Vitamins and paediatric migraine: Riboflavin as a preventative medication. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0333102410378358> [Citováno: Duben 22, 2018].
- P. Ortega-Barrales, M. L. Fernández-de Córdova,, Molina-Díaz, A., 1998. Microdetermination of Vitamin B1 in the Presence of Vitamins B2, B6 and B12 by Solid-Phase UV-Spectrophotometry. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac9708093> [Citováno: Květen 11, 2018].
- Padayatty, S.J. et al., 2003. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(1), str.18–35. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12569111> [Citováno: Duben 20, 2018].
- Powers, H.J., 2003. Riboflavin (vitamin B-2) and health. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(6), str.1352–1360. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/77/6/1352/4689829> [Citováno: Duben 22, 2018].
- Rauma, A.-L. et al., 1995. Vitamin B-12 Status of Long-Term Adherents of a Strict Uncooked Vegan Diet (“Living Food Diet”) Is Compromised. *The Journal of Nutrition*, 125(10), str.2511–2515. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jn/article-abstract/125/10/2511/4730551> [Citováno: Duben 29, 2018].
- Riahi, A. et al., 2017. Acute beriberi neuropathy mimicking Guillain-Barré syndrome after a strict vegetarian diet. *Iranian journal of neurology*, 16(2), str.100–102. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28761634> [Citováno: Duben 21, 2018].
- Rizzolo, A., Polesello, S., 1992. Chromatographic determination of vitamins in foods. *Journal of Chromatography A*, 624(1–2), str.103–152. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002196739285676K> [Citováno: Květen 10, 2018].
- Ruddock, M.W. et al., 2000. Contractile properties of human renal cell carcinoma recruited arteries and their response to nicotinamide. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 54(2), str.179–84. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10699482> [Citováno: Duben 28, 2018].

- Ruddock, M.W., Hirst, D.G., 2004. Nicotinamide Relaxes Vascular Smooth Muscle by Inhibiting Myosin Light Chain Kinase-Dependent Signaling Pathways: Implications for Anticancer Efficacy. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 14(10), str.483–489. Dostupné z: <http://www.ingentaconnect.com/content/10.3727/0965040042380478> [Citováno: Duben 28, 2018].
- Rumbold, A. et al., 2015. Vitamin C supplementation in pregnancy. In A. Rumbold, ed. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD004072.pub3> [Citováno: Říjen 5, 2017].
- Sabui, S. et al., 2018. Biotin and pantothenic acid over-supplementation to conditional SLC5A6 KO mice prevents the development of intestinal mucosal abnormalities and growth defects. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, p.ajpcell.00319.2017. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29669219> [Citováno: Květen 9, 2018].
- Saliba, K.J., Ferru, I., Kirk, K., 2005. Provitamin B5 (pantothenol) inhibits growth of the intraerythrocytic malaria parasite. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(2), str.632–7. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15673744> [Citováno: Květen 4, 2018].
- Saliba, K.J., Horner, H.A., Kirk, K., 1998. Transport and metabolism of the essential vitamin pantothenic acid in human erythrocytes infected with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *The Journal of biological chemistry*, 273(17), str.10190-5. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9553068> [Citováno: Květen 4, 2018].
- Saliba, K.J., Kirk, K., 2001. H⁺-coupled pantothenate transport in the intracellular malaria parasite. *The Journal of biological chemistry*, 276(21), str.18115–21. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11278793> [Citováno: Květen 4, 2018].
- Schwechheimer, S.K. et al., 2016. Biotechnology of riboflavin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5), str.2107–2119. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26758294> [Citováno: Duben 24, 2018].

- Sica, D.A., 2007. Loop diuretic therapy, thiamine balance and heart failure. *Congestive heart failure (Greenwich, Conn.)*, 13(4), str.244–7. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17673878> [Citováno: Duben 21, 2018].
- Slyshenkov, V.S. et al., 1995. Pantothenic acid and its derivatives protect Ehrlich ascites tumor cells against lipid peroxidation. *Free radical biology & medicine*, 19(6), str.767–72. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8582649> [Citováno: Květen 4, 2018].
- Slyshenkov, V.S. et al., 1998. Pantothenol protects rats against some deleterious effects of gamma radiation. *Free radical biology & medicine*, 24(6), str.894–9. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9607598> [Citováno: Květen 4, 2018].
- Song, Z., Wang, L., 2000. Determination of Riboflavin Using Flow Injection Inhibitory Chemiluminescence. *Analytical Letters*, 33(13), str.2767–2778. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00032710008543221> [Citováno: Květen 11, 2018].
- Spencer, M.D. et al., 2011. Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty liver with choline deficiency. *Gastroenterology*, 140(3), str.976–86. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21129376> [Citováno: Květen 10, 2018].
- Spronck, J.C., Kirkland, J.B., 2002. Niacin deficiency increases spontaneous and etoposide-induced chromosomal instability in rat bone marrow cells in vivo. *Mutation research*, 508(1–2), str.83–97. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12379464> [Citováno: Duben 27, 2018].
- Spry, C. et al., 2005. A class of pantothenic acid analogs inhibits Plasmodium falciparum pantothenate kinase and represses the proliferation of malaria parasites. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(11), str.4649–57. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16251308> [Citováno: Květen 4, 2018].
- Srinivasan, P. et al., 2015. Chronic Nicotine Exposure In Vivo and In Vitro Inhibits Vitamin B1 (Thiamin) Uptake by Pancreatic Acinar Cells. Dostupné z: <http://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC4669105&blobtype=pdf> [Citováno: Duben 4, 2018].

- Stabler, S.P. et al., 1991. Inhibition of cobalamin-dependent enzymes by cobalamin analogues in rats. *The Journal of clinical investigation*, 87(4), str.1422–30. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1672697> [Citováno: Duben 29, 2018].
- Talebian, A. et al., 2018. Prophylactic effect of riboflavin on pediatric migraine: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Electronic physician*, 10(2), str.6279–6285. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29629048> [Citováno: Duben 22, 2018].
- Tucker, K.L. et al., 2000. Plasma vitamin B-12 concentrations relate to intake source in the Framingham Offspring Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(2), str.514–522. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10648266> [Citováno: Duben 29, 2018].
- Tyśkiewicz, K. et al., 2017. Determination of fat- and water-soluble vitamins by supercritical fluid chromatography: A review. *Journal of Separation Science*. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201700598> [Citováno: Říjen 3, 2017].
- Ventura, A. et al., 2013. Encefalopatía de Wernicke secundaria a hipertiroidismo e ingesta de productos ricos en tiaminasas. *Neurología*, 28(4), str.257–259. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22436368> [Citováno: Duben 21, 2018].
- VŠCHT, Kapalinová chromatografie - LC. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/matejka/ACH2-03-sepa2.pdf> [Citováno: Květen 21, 2018].
- Wardman, P., 2007. Chemical Radiosensitizers for Use in Radiotherapy. *Clinical Oncology*, 19(6), str.397–417. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0936655507005808> [Citováno: Duben 28, 2018].
- Wu, G., Imhoff-Kunsch, B., Girard, A.W., 2012. Biological Mechanisms for Nutritional Regulation of Maternal Health and Fetal Development. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 26, str.4–26. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3016.2012.01291.x> [Citováno: Květen 1, 2018].

- Xu, X. et al., 2009. High intakes of choline and betaine reduce breast cancer mortality in a population-based study. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(11), str.4022–8. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635752> [Citováno: Květen 10, 2018].
- Yun, J. et al., 2015. Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH. *Science*, 350(6266), str.1391–1396. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.aaa5004> [Citováno: Listopad 19, 2017].
- Zeisel, S.H., da Costa, K.-A., 2009. Choline: an essential nutrient for public health. *Nutrition Reviews*, 67(11), str.615–623. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19906248> [Citováno: Květen 10, 2018].
- Zempleni, J., Mock, D.M., 2008. Marginal Biotin Deficiency Is Teratogenic. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 223(1), str.14-21. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1525-1373.2000.22303.x> [Citováno: Květen 9, 2018].