

UNIVERZITA PARDUBICE

Fakulta chemicko-technologická

Katedra analytické chemie

**IZOTACHOFRETICKÉ STANOVENÍ VITAMÍNŮ
SKUPINY B ANIONTOVÉHO CHARAKTERU**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Bc. Lenka Žemličková

Vedoucí práce: Ing. Martin Bartoš, CSc.

2018

UNIVERSITY OF PARDUBICE

Faculty of Chemical Technology

Department of Analytical Chemistry

**IZOTACHOFORETIC DETERMINATION OF B ANIONS
CHARACTERISTIC VITAMINS**

DIPLOMA THESIS

Author: Bc. Lenka Žemličková

Supervisor: Ing. Martin Bartoš, CSc.

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka Žemličková**
Osobní číslo: **C16553**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Název tématu: **Izotachforetické stanovení vitaminů skupiny B aniontového charakteru**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

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

1. Seznamte se s problematikou vitaminů skupiny B aniontového charakteru (B3, B5, B9), popište jejich chemické vlastnosti, výrobu, roli v organismu, výskyt v potravinách a nápojích.
2. Proveďte literární rešerši na téma stanovení vybraných vitaminů v potravinách a potravinových doplncích, zaměřte se především na elektromigrační separační techniky.
3. V praktické části se zaměřte na stanovení vitaminů sk. B aniontového charakteru v potravinových doplncích pomocí izotachoforézy.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Martin Bartoš, CSc.**

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Michaela Kovářová**

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **20. února 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše. Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 11. května 2018

.....
Bc. Lenka Žemličková

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji Ing. Martinu Bartošovi, CSc. za odborné vedení práce a věcné připomínky. Dále bych chtěla moc poděkovat Ing. Michaelle Kovářové za ochotnou pomoc při práci v laboratoři, za pomoc při zpracování diplomové práce, dobré rady a vstřícnost při konzultacích.

ANOTACE

Tato diplomová práce je tvořena dvěma částmi – teoretickou a experimentální. Teoretická část je zaměřena na vitamíny B₃, B₅ a B₉, popis jejich chemických vlastností, výrobu, roli v organismu a výskyt v potravinách a nápojích. Je zde také zmíněno stanovení těchto vitamínů v potravinách a potravinových doplncích se zaměřením na elektromigrační separační techniky.

V experimentální části jsou prezentovány výsledky izotachforetického stanovení vybraných vitamínů skupiny B v léčivých přípravcích. Nacházejí se zde také výsledky zkoušek stability těchto vitamínů.

Klíčová slova: vitamíny

kyselina nikotinová

nikotinamid

kyselina pantothenová

pantothenan vápenatý

kyselina listová

izotachoforéza

stanovení

ANNOTATION

This diploma thesis is consisted of two parts – theoretical and experimental. The theoretical part is focused on the description of chemical properties, production, role in the organism and presence of vitamins B₃, B₅ and B₉ in food and beverages. Determination of these vitamins in food and food supplements with a focus on electromigration separation techniques is also mentioned.

In the experimental part the results of isotachophoretic determination of selected B vitamins in food supplements are presented. There are also mentioned the results of the vitamin stability tests.

Keywords: Vitamins
 Nicotinic acid
 Nicotinamide
 Pantothenic acid
 Calcium pantothenate
 Folic acid
 Isotachophoresis
 Determination

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACP	acylový nosičový protein
CE	kapilární elektroforéza
CoA	koenzym A
CPE	uhlíková pastová elektroda
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DHFR	dihydrofolátreduktáza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPV	diferenční pulzní voltametrie
EAB	ethyl-p-aminobenzoát
FIA	průtoková injekční analýza
HPLC	kapalinová chromatografie
LC/MS/MS	kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LMT	lauroylmethyltaurat sodný
MECC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NADP	nikotinamidadenindinukleotid fosfát
NaOH	hydroxid sodný
PABA	kyselina p-aminobenzoová
PTFE	polytetrafluorethylen
RP-HPLC	kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
SDS	dodecylsulfát sodný
THF	tetrahydrofolát
UHPLC-MS/MS	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
UV	ultrafialové

SEZNAM ILUSTRACÍ

SEZNAM OBRÁZKŮ:

Obrázek 1: Chemická struktura A) kyselina nikotinová B) nikotinamid.....	20
Obrázek 2: Chemický vzorec kyseliny pantothenové	26
Obrázek 3: Chemický vzorec kyseliny listové	30
Obrázek 4: Struktura tetrahydrofolátu (vlevo) a 5-methyltetrahydrofolátu (vpravo)	31
Obrázek 5: Dělení vitamínů rozpustných ve vodě v nealkoholických nápojích ve srovnání se standardy. 1 - nikotinamid; 2 - pyridoxin; 3 - sacharin (vnitřní standard)	36
Obrázek 6: Záznam směsného roztoku kyseliny nikotinové, pantothenátu a kyseliny listové.....	81
Obrázek 7: Záznam reálného vzorku B-komplexu forte od firmy Generica (vzorek 1)	82
Obrázek 8: Záznam reálného vzorku B-komplexu od firmy Zentiva (vzorek 2).....	82
Obrázek 9: Záznam reálného vzorku B-komplexu Forte od firmy Dr. Max (vzorek 3)	83
Obrázek 10: Záznam reálného vzorku Biosilu Plus od firmy Naturvita (vzorek 4)	83
Obrázek 11: Záznam reálného vzorku Acidum folicum Léčiva od firmy Zentiva (vzorek5)	84

SEZNAM TABULEK:

Tabulka 1: Vitamíny a jejich synonyma	18
Tabulka 2: Zastoupení důležitých ve vodě rozpustných vitamínů v celozrnné mouce a frakcích pšeničné mouky	19
Tabulka 3: Doporučená denní dávka pantothenátu u různých skupin lidí	29
Tabulka 4: Mez detekce a mez stanovení.....	55
Tabulka 5: Reprodukovatelnost metody	55
Tabulka 6: Deklarovaný a zjištěný obsah pantothenátu v tabletě B-komplexu od firmy Generica	58
Tabulka 7: Deklarovaný a zjištěný obsah kyseliny listové v tabletě B-komplexu od firmy Generica	59
Tabulka 8: Deklarované a zjištěné obsahy kyseliny pantothenové v tabletě B-komplexu od firmy Zentiva	59

Tabulka 9: Deklarované a zjištěné obsahy kyseliny pantothenové v tabletě B-komplexu Forte od firmy Dr. Max.....	60
Tabulka 10: Deklarované a zjištěné obsahy kyseliny pantothenové v tabletě Biosilu Plus od firmy Naturvita	60
Tabulka 11: Udávané a zjištěné koncentrace kyseliny listové v Acidum folicum od firmy Zentiva	61
Tabulka 12: Záznamy koncentrací roztoků kalibrační křivky, odpovídajících délek zón a k nim vypočítaných směrodatných odchylek.....	75
Tabulka 13: Záznamy délek zón roztoků kalibrační křivky pomocí látkové koncentrace.	75
Tabulka 14: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných směrodatných odchylek roztoků měřených pro zjištění výtěžnosti roztoku kyseliny nikotinové	75
Tabulka 15: Záznamy délek zón roztoků měřených pro zjištění výtěžnosti roztoku pantothenátu a k nim vypočítané směrodatné odchylky	76
Tabulka 16: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných směrodatných odchylek roztoků měřených pro zjištění výtěžnosti roztoku kyseliny listové	76
Tabulka 17: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných směrodatných odchylek zkoumaných reálných vzorků bez standardního přídávku i se standardním přídávkem. N – kyselina nikotinová, P- pantothenát, KP- kyselina pantothenová, L – kyselina listová	76
Tabulka 18: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných výtěžností roztoku kyseliny nikotinové při zkouškách stability	77
Tabulka 19: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných výtěžností roztoku pantothenátu při zkouškách stability.....	77
Tabulka 20: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných výtěžností roztoku kyseliny listové při zkouškách stability	78
Tabulka 21: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných výtěžností roztoku kyseliny nikotinové – stání za laboratorní teploty po 21 dní	78
Tabulka 22: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných výtěžností roztoku pantothenátu – stání za laboratorní teploty po 21 dní.....	78
Tabulka 23: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných výtěžností roztoku kyseliny listové – stání za laboratorní teploty po 21 dní.....	79
Tabulka 24: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných výtěžností roztoku kyseliny nikotinové po zmrazení.....	79
Tabulka 25: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných výtěžností roztoku pantothenátu po zmrazení.....	79

Tabulka 26: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných výtěžností roztoku kyseliny listové po zmrazení.....	80
Tabulka 27: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných výtěžností roztoku kyseliny nikotinové po změně pH měřené ve dvou dnech	80
Tabulka 28: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných výtěžností roztoku pantothenátu po změně pH měřené ve dvou dnech	80
Tabulka 29: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných výtěžností roztoku kyseliny listové po změně pH měřené ve dvou dnech	81

SEZNAM SCHÉMAT:

Schéma 1: Syntéza niacinu z tryptofanu	23
Schéma 2: Syntéza vycházející z pyridinu.....	23
Schéma 3: Další syntézy niacinu	24
Schéma 4: Syntéza kyseliny pantothenové	28
Schéma 5: Syntéza kyseliny listové	33

SEZNAM GRAFŮ:

Graf 1: Vliv pH na separaci analyzovaných vitamínů, A – samotný vitamín, B – vitamín analyzovaný ve směsi. Nad grafem se nacházejí záznamy analýz při pH 5,2; 5,4; 5,6; 5,8; 6,0; 6,2 a 6,4 s označenými zónami.	53
Graf 2: Kalibrační křivka za použití látkové koncentrace	54
Graf 3: Kalibrační křivka za použití hmotnostní koncentrace.....	54
Graf 4: Závislost délky zóny na koncentraci standardního přídatku kyseliny nikotinové.	56
Graf 5: Závislost délky zóny na koncentraci standardního přídatku pantothenátu.....	57
Graf 6: Závislost délky zóny na koncentraci standardního přídatku kyseliny listové	58
Graf 7: Závislost výtěžnosti na čase při stání roztoku kyseliny nikotinové za laboratorní teploty	61
Graf 8: Závislost výtěžnosti na čase při stání roztoku kyseliny nikotinové za laboratorní teploty po 21 dní	62
Graf 9: Závislost výtěžnosti na čase při stání roztoku pantothenátu za laboratorní teploty	63
Graf 10: Závislost výtěžnosti na čase při stání roztoku pantothenátu za laboratorní teploty po 21 dní	63

Graf 11: Závislost výtěžnosti na čase při stání roztoku kyseliny listové za laboratorní teploty	64
Graf 12: Závislost výtěžnosti na čase při stání roztoku kyseliny listové za laboratorní teploty po 21 dní	64
Graf 13: Závislost výtěžnosti na čase roztoku kyseliny nikotinové při zahřátí na 50 °C ...	65
Graf 14: Závislost výtěžnosti na čase roztoku pantothenátu při zahřátí na 50 °C	66
Graf 15: Závislost výtěžnosti na čase roztoku kyseliny listové při zahřátí na 50 °C	66
Graf 16: Závislost výtěžnosti na čase roztoku kyseliny nikotinové při zahřátí na 96 °C ...	67
Graf 17: Závislost výtěžnosti na čase roztoku pantothenátu při zahřátí na 98 °C	68
Graf 18: Závislost výtěžnosti na čase roztoku kyseliny listové při zahřátí na 97 °C	68
Graf 19: Závislost výtěžnosti na čase roztoku kyseliny nikotinové při zmrazení	69
Graf 20: Závislost výtěžnosti na čase roztoku pantothenátu při zmrazení	70
Graf 21: Závislost výtěžnosti na čase roztoku kyseliny listové při zmrazení.....	70
Graf 22: Závislost délky zóny na pH kyseliny nikotinové měřené ve dvou dnech	71
Graf 23: Závislost délky zóny na pH pantothenátu měřené ve dvou dnech	72
Graf 24: Závislost délky zóny na pH kyseliny listové měřené ve dvou dnech.....	72

OBSAH

ÚVOD	17
1 TEORETICKÁ ČÁST	19
1.1 VITAMÍNY SKUPINY B	19
1.1.1 NIACIN (VITAMÍN B ₃)	20
1.1.1.1 CHEMICKÉ VLASTNOSTI NIACINU	20
1.1.1.2 HISTORIE NIACINU	21
1.1.1.3 ROLE NIACINU V ORGANISMU	21
1.1.1.4 SYNTÉZA NIACINU	22
1.1.1.5 VÝSKYT NIACINU V POTRAVINÁCH	25
1.1.1.6 DOPORUČENÉ DÁVKOVÁNÍ NIACINU	25
1.1.1.7 NEDOSTATEK NIACINU	25
1.1.2 KYSELINA PANTOTHENOVÁ (VITAMÍN B ₅)	26
1.1.2.1 CHEMICKÉ VLASTNOSTI KYSELINY PANTOTHENOVÉ	26
1.1.2.2 VÝSKYT KYSELINY PANTOTHENOVÉ V POTRAVINÁCH	27
1.1.2.3 SYNTÉZA KYSELINY PANTOTHENOVÉ	27
1.1.2.4 ROLE KYSELINY PANTOTHENOVÉ V ORGANISMU	28
1.1.2.5 NEDOSTATEK KYSELINY PANTOTHENOVÉ	29
1.1.2.6 DOPORUČENÉ DÁVKOVÁNÍ KYSELINY PANTOTHENOVÉ	29
1.1.3 KYSELINA LISTOVÁ (VITAMÍN B ₉)	30
1.1.3.1 CHEMICKÉ VLASTNOSTI KYSELINY LISTOVÉ	30
1.1.3.2 ROLE KYSELINY LISTOVÉ V ORGANISMU	31
1.1.3.3 NEDOSTATEK KYSELINY LISTOVÉ	31
1.1.3.4 VÝSKYT KYSELINY LISTOVÉ V POTRAVINÁCH	32
1.1.3.5 DOPORUČENÉ DÁVKOVÁNÍ KYSELINY LISTOVÉ	32
1.1.3.6 SYNTÉZA KYSELINY LISTOVÉ	32
1.2 STANOVENÍ VITAMÍNŮ V POTRAVINÁCH	34
1.2.1 STANOVENÍ NIACINU	35
1.2.1.1 KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA (CZE)	35

1.2.2.2 MICELÁRNÍ ELEKTROKINETICKÁ KAPILÁRNÍ CHROMATOGRAPHIE (MECC)	36
1.2.2.3 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAPHIE (HPLC)	37
1.2.2.4 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ	38
1.2.2.5 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ PO CHROMATOGRAPHICKÉ SEPARACI NA TENKÉ VRSTVĚ SILIKAGELU	39
1.2.3 STANOVENÍ KYSELINY PANTOTHENOVÉ	39
1.2.3.1 KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA	39
1.2.3.2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAPHIE (HPLC)	40
1.2.3.3 DIFERENČNÍ PULZNÍ VOLTAMETRIE (DPV)	40
1.2.3.4 BIOSENZORY	41
1.2.4 STANOVENÍ KYSELINY LISTOVÉ	41
1.2.4.1 KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA (CZE)	41
1.2.4.2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAPHIE (HPLC)	42
1.2.4.3 CHEMILUMINESCENCE	43
1.2.4.4 MIKROBIOLOGICKÉ TESTY	43
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	44
2.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	44
2.2 VZORKY	44
2.3 PŘÍPRAVA STANDARDNÍ ROZTOKŮ	46
2.3.1 KYSELINA NIKOTINOVÁ	47
2.3.2 PANTOTHENÁT VÁPENATÝ	47
2.3.3 KYSELINA LISTOVÁ	48
2.4 PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍCH ROZTOKŮ	48
2.5 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ VZORKŮ	49
2.6 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ	50
2.7 POUŽITÉ ELEKTROLYTOVÉ SYSTÉMY	51
2.8 PODMÍNKY ANALÝZY	51

2.9 VYHODNOCENÍ EXPERIMENTÁLNÍCH DAT	52
3 VÝSLEDKY A DISKUZE	52
3.1 VOLBA OPTIMÁLNÍHO ELEKTROLYTOVÉHO SYSTÉMU	52
3.2 KALIBRAČNÍ ZÁVISLOST	53
3.3 MEZ DETEKCE A MEZ STANOVENÍ	54
3.4 REPRODUKOVATELNOST METODY	55
3.5 VÝTĚŽNOST METODY	55
3.6 ANALÝZA REÁLNÝCH VZORKŮ	58
3.7 ZKOUŠKY STABILITY VITAMÍNŮ	61
3.7.1 STÁNÍ PŘI 25 °C	61
3.7.2 ZAHŘÍVÁNÍ NA 50 °C	65
3.7.3 ZAHŘÍVÁNÍ NA VROUCÍ VODNÍ LÁZNI	67
3.7.4 ZMRAZENÍ	69
3.7.5 MĚŘENÍ pH	71
4 ZÁVĚR	74
5 PŘÍLOHY	75
6 BIBLIOGRAFIE	85

ÚVOD

Jako vitamíny jsou označovány organické molekuly s různými chemickými strukturami, biologickými aktivitami a fyzikálně-chemickými vlastnostmi.^[1,2] Jsou nezbytné pro realizaci specifických a životně důležitých funkcí v tělesném systému, ve kterém mají velmi rozmanité a významné funkce. V malých množstvích jsou potřebné pro biochemické reakce, pro růst, přežití a reprodukci organismu.^[3] Hrají zásadní roli v ochraně zdraví.^[4] Mají velmi důležité postavení v celé řadě biochemických reakcí uvnitř buněk a buněčných drah, ovlivňujících různé buňky. Vitamíny nejsou v lidském či zvířecím organismu syntetizovány buď vůbec, nebo jsou tvořeny v nedostatečném množství, a proto musí být převzaty ze stravy jako takové nebo jako prekurzor.^[1] Strava by proto měla být pestrá a měla by zahrnovat mimo jiné i ovoce, zeleninu, obiloviny a maso.^[5]

Nedostatek vitamínů lze léčit zlepšením výživy a podáváním vitamínů ve formě tablet. Nedostatek vitamínů totiž může vést k vývoji patologických procesů ve formě specifické hypo- a avitaminózy. Deficit vitamínu nemusí mít závažné vnější projevy a symptomy, ale může mít pouze negativní vliv na výkon a odolnost vůči různým nepříznivým faktorům. Naopak předávkování vitamíny vede ke stavu hypervitaminózy s toxickými příznaky pouze v případě vitamínů A a D. Přebytek ostatních vitamínů je obvykle rychle vylučován močí.^[3]

Aby mohla být sloučenina považována za vitamín, musí být prokázáno, že je nezbytně nutná pro výživu. Její vyloučení ze stravy musí vést k více či méně jasně definované nemoci a po jejím návratu by mělo docházet k vyléčení či předcházení této nemoci. Dále musí být prokázán farmakologický účinek a fyziologická funkce jako koenzym nebo hormon. Je také nutné dokázat, že endogenní syntéza je nedostatečná pro splnění fyziologických požadavků v nepřítomnosti dietárního zdroje sloučeniny. Podle těchto kritérií by byl ze seznamu vitamínů vyloučen niacin a vitamín D, protože za normálních podmínek je jejich endogenní syntéza dostačující k normálnímu fungování organismu. Nicméně jsou stále považovány za vitamíny, i když pouze z toho důvodu, že každý byl objeven jako prevence *pelagry* a *rachitidy*.^[3]

Vitamíny se dělí do dvou skupin – vitamíny rozpustné ve vodě a vitamíny rozpustné v tucích.^[2] Mezi vitamíny rozpustné ve vodě řadíme B-komplex a vitamín C (kyselina askorbová), ty nemohou být ukládány v těle, proto potřebujeme získat denní dávku ze stravy.^[6] B-komplex zahrnuje vitamíny B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇, B₉ a B₁₂, kde každý z nich je složen z několika různých biologicky aktivních forem, zvaných vitamery, které se liší strukturou a stabilitou.^[2] Naopak vitamíny rozpustné v tucích lze ukládat v těle a vytvářet zásoby. Je zapotřebí určité množství tuku ve stravě, aby tělo dokázalo absorbovat tyto vitamíny. Mezi takové vitamíny řadíme vitamín A, D, E, K.^[6]

Vitamíny mají zdánlivě nelogický systém přijatých triviálních názvů, které vyplývají z historie jejich objevu.^[3] V tabulce 1 jsou uvedeny zkratky a názvy všech vitamínů.

Tabulka 1: Vitamíny a jejich synonyma^[3]

Vitamíny	Synonyma
Vitamín A	Retinol
Vitamín D ₂	Ergokalciferol
Vitamín D ₃	Cholekalciferol
Vitamín E	α , β , γ -tokoferoly a α -tokotrienoly
Vitamín K ₁	Fylochinon, fytomenadion
Vitamín K ₂	Menachinon, farnochinon
Vitamín K ₃	Menadion
Vitamín B ₁	Thiamin
Vitamín B ₂	Riboflavin
Vitamín B ₃	Niacin, kyselina nikotinová, nikotinamid, vitamín PP
Vitamín B ₅	Kyselina pantothenová, pantothenát vápenatý
Vitamín B ₆	Pyridoxal, pyridoxin, pyridoxamin
Vitamín B ₉	Kyselina listová, folacin, vitamín M
Vitamín B ₁₂	Kobalamin, hydroxokobalamin, cyanokobalamin
Biotin	Vitamín H
Vitamín C	Askorbová kyselina

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 VITAMÍNY SKUPINY B

Mezi B vitamíny řadíme thiamin (B₁), riboflavin (B₂), niacin (B₃), pantothenát (B₅), pyridoxin a příbuzné sloučeniny (B₆), biotin (B₇ nebo vitamin H), folát (B₉) a kyanokobalaminy (B₁₂).^[7] Významným zdrojem mnoha vitamínů B je maso, a protože se jedná o ve vodě rozpustné organické molekuly, obsahuje libové maso větší množství vitamínů B než masový tuk. Díky jejich nestabilitě dochází ke snižování množství při vaření v závislosti na délce a teplotě vaření.^[8] Dalším významným zdrojem jsou obilné výrobky, zejména celozrnné produkty bohaté na otruby a klíčky, které jsou rovněž významnými zdroji vitamínu E.^[9]

Tabulka 2: Zastoupení důležitých ve vodě rozpustných vitamínů v celozrnné mouce a frakcích pšeničné mouky^[7]

Vitamín (mg/kg)	Celozrnná mouka	otruby	klíčky	Prosívaná mouka
Thiamin (B ₁)	3,9	8,9	14,5	1,9
Riboflavin (B ₂)	0,8	3,6	6,1	0,3
Niacin (B ₃)	56	296	58	13
Pantothenová kyselina (B ₅)	6,8	24	12	5
Pyridoxin (B ₆)	3,4	13,8	14,2	0,8
Folát (B ₉)	0,5	1,4	1,9	0,3

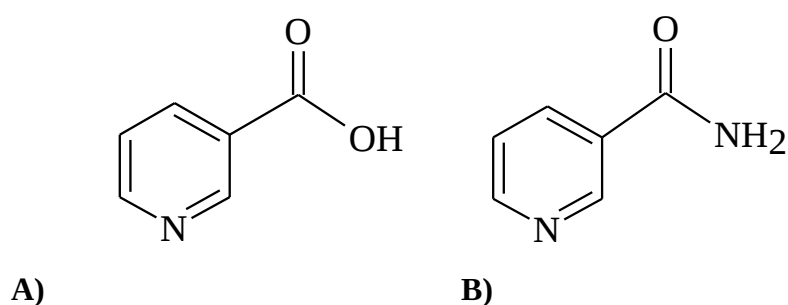
Nejčastěji tyto vitamíny působí jako součást enzymů v buňce, tvoří prostetické skupiny nebo kofaktory důležité pro enzymatické reakce.^[7,10] Vitamíny B hrají klíčovou roli v metabolismu. Podílejí se především na syntéze DNA a početných metylačních reakcích. Tyto metabolické procesy jsou důležité při vývoji embryí.^[11]

1.1.1 NIACIN (VITAMÍN B₃)

Název vitamín B₃ byl navrhnout, protože se jednalo o třetí objevenou sloučeninu z osmi sloučenin v sérii vitamínu B. Jedná se o nejstarší lék používaný ke snižování hladiny lipidů s jedinečnou antiaterosklerotickou vlastností.^[12] Vitamín B₃ může být dále označován jako vitamín PP, přičemž tento název je odvozen od „faktor prevence pelagry“. Častěji používaný název je však niacin.^[12,13,14]

1.1.1.1 CHEMICKÉ VLASTNOSTI NIACINU

Jako niacin jsou označovány látky s obdobnými účinky a to kyselina nikotinová (pyridin-3-karboxylová kyselina, viz Obrázek 1A) a nikotinamid (amid kyseliny nikotinové, viz Obrázek 1B), které jsou potřebné pro syntézu deoxyribonukleové kyseliny (DNA).^[15,16] Kyselina nikotinová převládá u rostlin a nikotinamid zase u zvířat.^[18] Většina kyseliny nikotinové je ve střevě a játrech převedena na NAD a pomocí příbuzné glykohydrolázy uvolňuje nikotinamid.^[16] Je jedním z nejdůležitějších ve vodě rozpustných vitamínů hrající důležitou roli ve zdraví, růstu a vývoji kojenců.^[17]



Obrázek 1: Chemická struktura A) kyselina nikotinová B) nikotinamid^[18]

Jeho strukturním základem je pyridinové jádro substituované kyselinou β - karboxylovou nebo odpovídajícím amidem. Nikotinamid i kyselina nikotinová jsou bezbarvé krystalické látky nerozpustné nebo málo rozpustné v organických rozpouštědlech. Nikotinamid je dobře rozpustný ve vodě a středně rozpustný v etanolu, naopak kyselina nikotinová je slabě rozpustná ve vodě i etanolu. Kyselina nikotinová je amfoterní sloučenina tvořící soli s kyselinami i bázemi. Její karboxylová skupina může být redukována nebo může vytvářet estery či anhydridy. V suché formě jsou nikotinamid a kyselina nikotinová velmi stabilní, nikotinamid se však v roztoku hydrolyzuje

s kyselinami a bázemi, čímž se získává kyselina nikotinová. Koenzymovými formami niacinu jsou pyridinové nukleotidy, NADP(H) a NAD(H).^[19]

Je zajímavé, že mnoho zvířat a rostlin může syntetizovat kyselinu nikotinovou z tryptofanu a dalších prekurzorů, proto není pro tyto druhy skutečným vitamínem. Dochází-li však k nízkému příjmu tryptofanu v potravě, je pro optimální zdravotní stav nutný i příjem kyseliny nikotinové.^[3]

1.1.1.2 HISTORIE NIACINU

Před více než dvěma stoletími španělský lékař Gasper Casal popsal onemocnění, které se vyskytovalo u chudých zemědělců kvůli špatnému stravování. Jejich strava byla chudá na maso a živili se převážně kukuřicí. *Pelagra*, jak tato nemoc byla později nazvána, kdysi postihovala hlavně podvyživené obyvatelé v jižní Evropě a jižních státech Spojených států amerických.^[20] Je však stále běžným problémem v některých částech Španělska, Rumunska a Itálie.^[3] *Pelagra* byla zpočátku považována za infekční onemocnění, ale v roce 1914 Joseph Goldberger zjistil, že tato nemoc souvisí s nedostatkem specifické aminokyseliny a identifikoval ve vodě rozpustnou látku, kterou nazval „preventivní faktor pelagry“. Došel k závěru, že tato nemoc může být vyléčena dietou. Brzy poté bylo zjištěno, že pivovarské kvasnice zabraňují vzniku této nemoci u lidí.^[3,20] V roce 1937 Elvehjem a jeho kolegové z univerzity ve Wisconsinu izolovali nikotinamid z jater a ukázali, že kyselina nikotinová může zabránit vzniku černého jazyka u psů a léčit ho. Černý jazyk je označení pro onemocnění pelagra u psů. V tom samém roce bylo dokázáno, že nikotinamid a kyselina nikotinová dokáží vyléčit pelagru i u lidí.^[3] Dnes jsou kyselina nikotinová a nikotinamid uznávány společně jako vitamín B₃.^[20]

1.1.1.3 ROLE NIACINU V ORGANISMU

Díky niacinu dochází k uvolňování energie ve tkáních a buňkách. Ve spolupráci s riboflavinem a thiaminem pomáhá udržovat zdravý nervový a zažívací systém. Podílí se i na syntéze hormonů.^[6] Niacin také vykazuje příznivé účinky na lipidový profil. Snižuje triglyceridy, lipoproteiny, LDL cholesterol a naopak zvyšuje HDL cholesterol. Působí velmi složitými mechanismy, které nejsou doposud úplně objasněny, ale je jasné, že snižuje tok mastných kyselin od tukové tkáně až po játra inhibicí lipázové aktivity.^[12] V kosmetickém průmyslu pomáhá normalizovat nerovnováhu nikotinamidových

koenzymů v kůži, která je způsobená rostoucím věkem. Zvyšuje biosyntézu lipidů pro zlepšení epidermální permeability a může také stimulovat novou syntézu kolagenu.^[6]

Tento vitamín zaujímá velmi důležité postavení v látkové přeměně díky enzymům, ve kterých je niacin význačnou složkou. Jedná se o NAD (nikotinadenindinukleotid) a NADP (nikotinadenindinukleotid fosfát), které zprostředkovávají širokou škálu energetických a oxidačně redukčních reakcí v látkové přeměně.^[15] NAD hraje velmi důležitou roli v intracelulárním dýchání a spolu s enzymy se zapojuje do oxidace mnoha molekul např. glyceraldehydu, laktátu, alkoholu a pyruvátu. Ve formě NADP se dále účastní i redukčních biosyntéz jako je syntéza steroidů a mastných kyselin.^[13] Jako prekurzor nikotinadenindinukleotidu se účastní mnoha intra- a intercelulárních procesů, které regulují některé metabolické, imunitní a stresové reakce buněk na fyziologické nebo patologické signály. Je klíčovým prekurzorem při výrobě buněčné energie.^[21]

1.1.1.4 SYNTÉZA NIACINU

Niacin může být získáván dvěma způsoby. Buď ze stravy nebo může být vyráběn různými cestami např. enzymaticky z tryptofanu.^[14,18] Díky tomu, že niacin může pocházet z aminokyseliny tryptofanu, není považován za pravý vitamín v té nejpřísnější definici. Nicméně využití tryptofanu pro syntézu niacinu není příliš vhodné, hlavně kvůli malým výtěžkům, kdy je zapotřebí 60 mg tryptofanu k syntéze 1 mg niacinu. K této syntéze je navíc vyžadována přítomnost vitamínů B₁, B₂ a B₆.^[3] Niacin může být dále syntetizován z 3-methylpyridinu, který může být vyroben z akroleinu a amoniaku, viz Schéma 1.^[14,18]

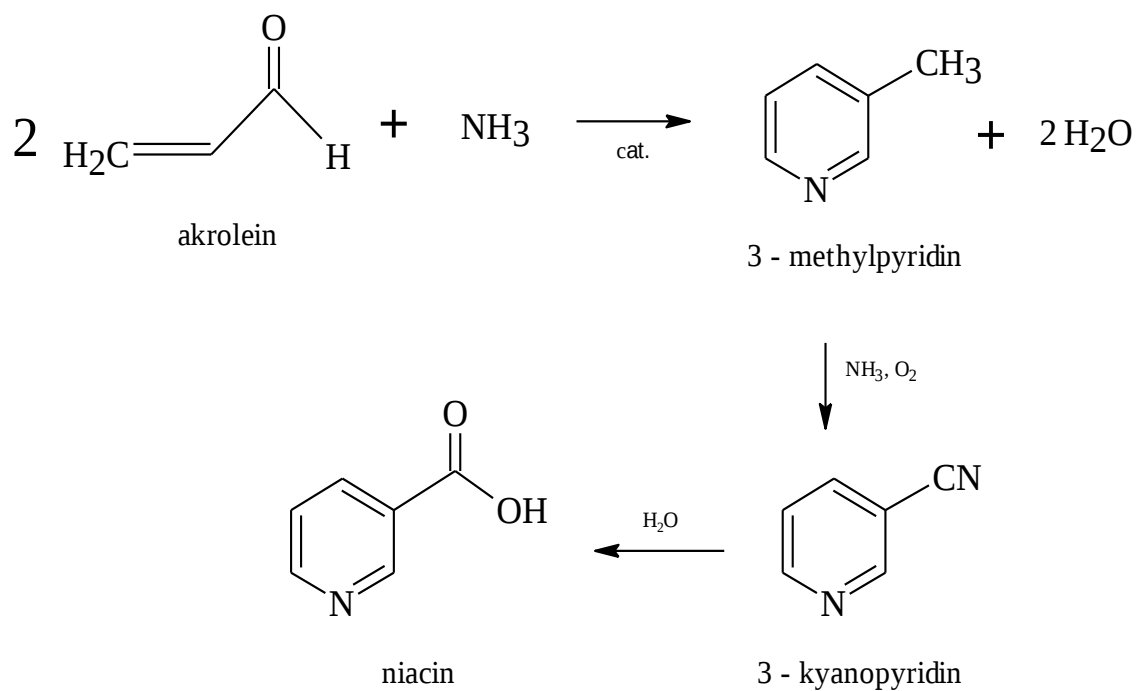


Schéma 1: Syntéza niacinu z tryptofanu^[18]

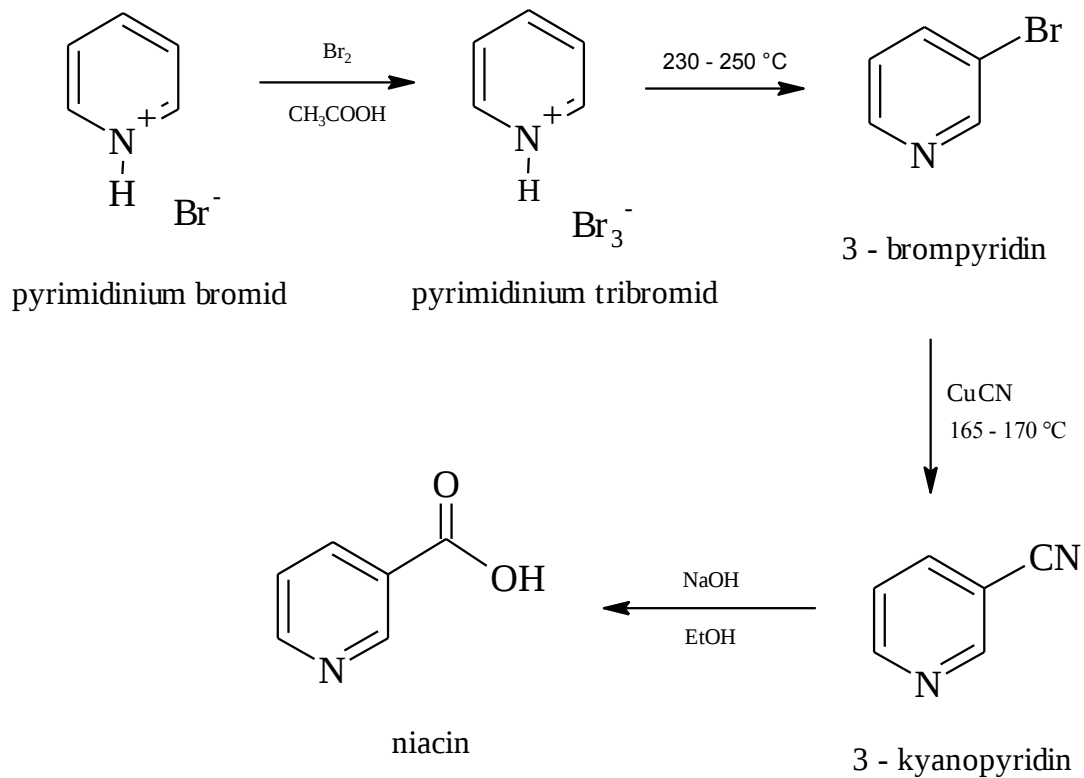


Schéma 2: Syntéza vycházející z pyridinu^[12]

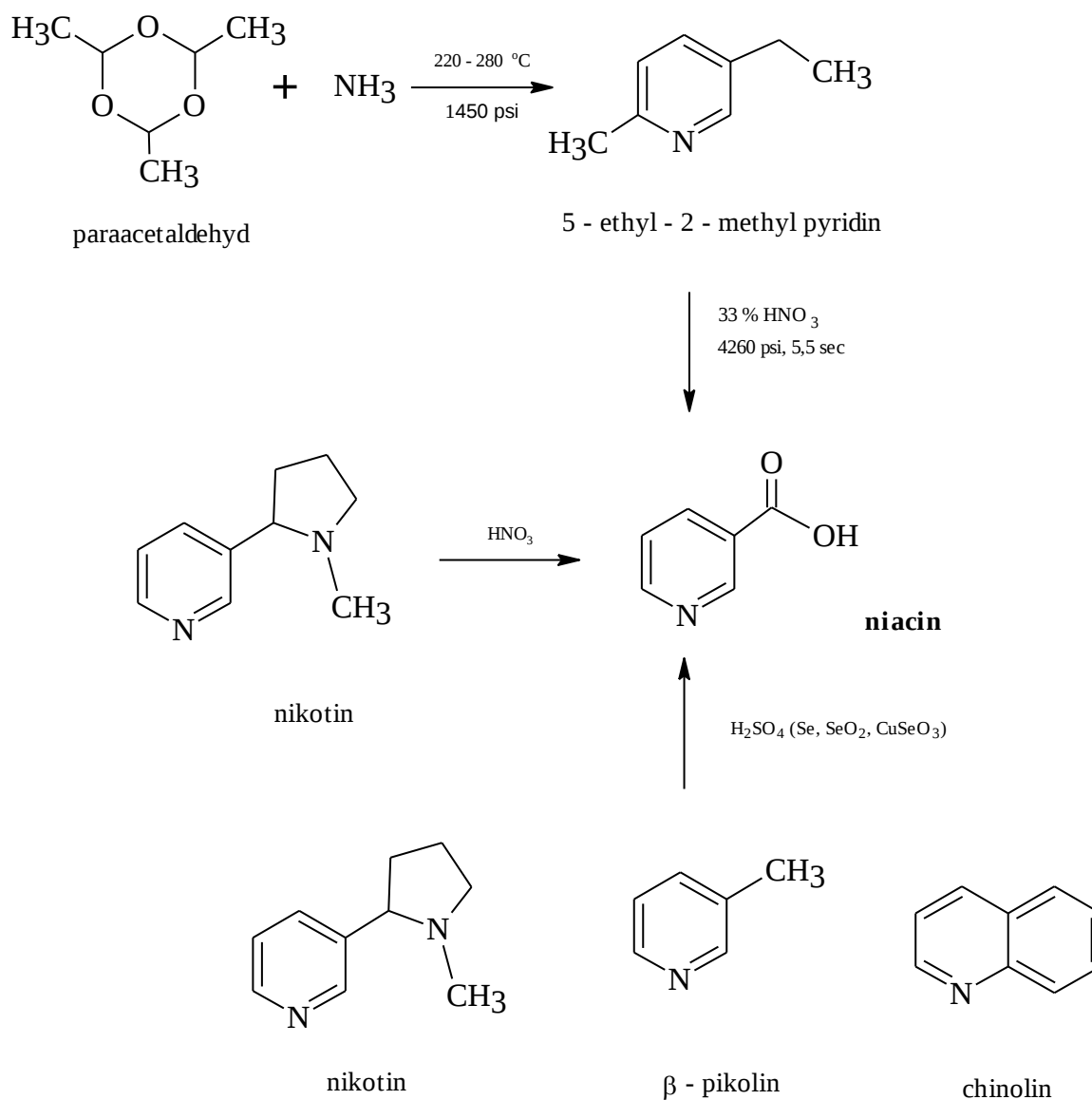


Schéma 3: Další syntézy niacinu^[12]

V průmyslu je rozšířena jiná metoda spočívající v oxidaci 2-methyl-5-ethylpyridinu, který je pro průmyslové syntézy vyráběn ve velkém množství z paraacetaldehydu a amoniaku. Mezi další způsoby syntézy řadíme i syntézu vycházející z pyridinu, který je bromován ve třetím stupni za vzniku 3-brompyridinu. Ten je následně převeden na 3-kyanopyridin a hydrolyzován na požadovanou pyridin-3-karboxylovou kyselinu, viz Schéma 2. Dále může docházet ke vzniku niacinu oxidací nikotinu, chinolinu a β -pikolinu, ale tyto syntézy se moc často nepoužívají, viz Schéma 3.^[12]

1.1.1.5 VÝSKYT NIACINU V POTRAVINÁCH

Niacin se nachází v rostlinných a živočišných zdrojích, nejvíce v hovězím a kuřecím masu nebo ve zralých zrnech. Dále se vyskytuje v hrášku, arašídech, drůbeži, játrech, kvasnicích, rybách a v čaji nebo kávě.^[15,16] V potravinách se může vyskytovat v různých formách. Většinou se nachází ve formě, ze které se nemůže uvolňovat při trávení, čímž se stává nedostupným pro strávnička. V zrnkách je však přítomen v kovalentně vázaných komplexech s malými peptidy a sacharidy, které jsou souhrnně označovány jako niacytin. V některých potravinách je niacin zase přítomen ve formě methylovaného derivátu (kyselina 1-methylnikotinová, trigonelin), fungujícího jako rostlinný hormon. V této formě však není dostupný pro zvířata.^[19]

1.1.1.6 DOPORUČENÉ DÁVKOVÁNÍ NIACINU

Menší nadbytek niacinu má vliv na snížení hladiny cholesterolu, ale pokud dojde ke konzumaci více než 500 mg za den, může dojít i k poškození jater.^[15,18] Denní dávka by měla být průměrně 18 mg.^[15] Přesné stanovení denní dávky je však velmi obtížné, protože dochází k přechodům mezi oběma formami přírodních složek a kromě toho niacin je dodáván i tryptofanem.^[16]

1.1.1.7 NEDOSTATEK NIACINU

Nedostatek vitamínu B₃ se vyskytuje především u dětí předškolního věku, zejména v rozvojových zemích.^[16] Projevuje se onemocněním kůže, zejména ve vztahu k citlivosti na světlo, dále poruchami centrálního nervového systému, bolestmi hlavy, bolestmi břicha, nevolností, zvracením, zrychleným srdečním tepem, skleslostí až ztrátou paměti a poškozením jater nebo gastrointestinálními potížemi.^[12,13,15] V gastrointestinálním traktu dochází ke změnám sliznice jazyka, jícnu, střeva a žaludku.^[19] Mezi nejznámější onemocnění, které způsobuje nedostatek niacinu, řadíme již zmíněnou *pelagru*.^[17] Při tomto onemocnění dochází k dermatologickým změnám hlavně na částech těla, které jsou vystaveny slunečnímu záření, např. obličej, ruce, záda, krk a předloktí. Někdy tyto léze u pacientů mohou vypadat jako spáleniny od slunce, v některých případech zase dochází k praskání kůže. *Pelagra* zahrnuje dále úzkost, depresi, únavu a mezi pozdější příznaky řadíme i podrážděnost, třes, závratě a bolesti hlavy.^[19] V současnosti se nedostatek niacinu v průmyslových zemích nevyskytuje, výjimku tvoří osoby požívající alkohol.^[16]

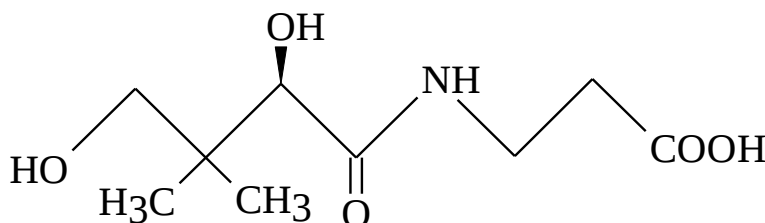
Některé fyziologické stavy (např. Hartnupova choroba a maligní karinoidní syndrom) nebo některé lékové terapie (např. léčba isoniazidem) mohou vést k nedostatku niacinu. V případě Hartnupovy choroby je narušena absorpce tryptofanu a u maligního karcinoidního syndromu dochází zase ke změně metabolismu tryptofanu, která vede k nadměrné syntéze serotoninu.^[16]

1.1.2 KYSELINA PANTOTHENOVÁ (VITAMÍN B₅)

Vitamín B₅ je označován také jako kyselina pantothenová. Je široce distribuovaná v potravinách, proto je její nedostatek velice vzácný. Už její název ukazuje, že je všudypřítomná, protože „pantothen“ pochází z řečtiny a znamená v překladu do češtiny „všude“.^[1]

1.1.2.1 CHEMICKÉ VLASTNOSTI KYSELINY PANTOTHENOVÉ

Vitamín B₅ (viz Obrázek 2) se vyskytuje v potravinách ve třech biologicky aktivních formách: kyselina pantothenová, koenzym A (CoA) a acylový nosičový protein (ACP). K obohacení potravin a jako výživové doplňky se používá vitamín B₅ ve formě pantothenátu vápenatého nebo sodného.^[2]



Obrázek 2: Chemický vzorec kyseliny pantothenové^[18]

Kyselina pantothenová byla objevena v roce 1931 jako růstový faktor, který je nezbytný pro růst potkanů a zároveň zabraňuje dermatitidě kuřat. V roce 1938 byla izolovaná z jater ovcí.^[1]

Jedná se o opticky aktivní derivát kyseliny pantoové a alaninu. Kyselina pantothenová je triviální název pro dihydroxy-β,β-dimethylbutyryl-β-alanin, dříve známý jako pantoyl-β-alanin. Základem struktury kyseliny pantothenové je β-alanin a kyselina 2,4-dihydroxy-3,3-dimethylmáslná spojené amidovou vazbou. Samotná kyselina má

formu žlutého viskózního hygroskopického oleje citlivého na kyseliny a báze, proto je vitamín B₅ prodáván jako vápenatá nebo sodná sůl nebo jako primární alkoholový derivát panthenol. Vápenatá sůl kyseliny pantothenové je bezbarvá krystalická látka, která je v suché formě stabilní vůči vzduchu a světlu.^[1,19] Vykazuje také stabilitu v rozmezí pH 4 – 7,5, přičemž optimální hodnota pH je 6, dále teplotní stabilitu do 75 °C.^[6] Vodné roztoky kyseliny pantothenové jsou nestabilní při zahřívání za kyselých a alkalických podmínek, což vede k hydrolytickému štěpení molekuly (dochází ke vzniku β-alaninu a 2,4-dihydroxy-3,3-dimethylbutyrátu).^[19]

1.1.2.2 VÝSKYT KYSELINY PANTOTHENOVÉ V POTRAVINÁCH

Kyselina pantothenová se nachází téměř v každém druhu jídla. Největší množství se nachází především ve vnitřnostech (mozek, srdce, ledviny, játra), ale také v houbách, avokádu, brokolici a i některé kvasinky jsou bohatými zdroji tohoto vitamínu.^[6,19] Dalšími zdroji je mléko, vejce, zelenina, luštěniny a celozrnné obiloviny. Zde se však vitamín vyskytuje ve vnějších vrstvách, proto je vždy z velké části odstraněn mletím.^[19] Upravované potraviny tedy obsahují menší množství vitamínu B₅, protože dochází k jeho ztrátám během různých zpracování.^[6] V potravinách se vyskytuje především ve vázaných formách (CoA estery, CoA, acyl-nosičový protein), v rajčatech byl dokonce identifikován ve formě glykosidu. Proto stanovení v potravinách a krmivech probíhá po enzymatické hydrolyze, která slouží k uvolnění vitamínu z CoA.^[19]

1.1.2.3 SYNTÉZA KYSELINY PANTOTHENOVÉ

V kyselině pantothenové se nachází hydroxylová skupina na primárním i sekundárním uhlíku. Dále se tam nachází karboxylová skupina, peptidová vazba i jedno stereogenní centrum. Výchozí sloučeninou pro výrobu kyseliny pantothenové a všech jejích derivátů je R-pantolakton. Syntéza pantolaktonu zahrnuje aldolovou kondenzaci isobutyraldehydu a formaldehydu, následovanou reakcí s kyanovodíkem za kyselých podmínek. Syntézou vzniká racemická směs R a S izomerů. Vzniklý R-pantolakton je dále transformován a jeho kondenzací s alaninem vzniká kyselina pantotenová a její deriváty. S-pantolakton je oddělen, transformován na jeho sodnou sůl a následně převeden na R-pantolakton, který může reagovat s alaninem, viz Schéma 4.^[1]

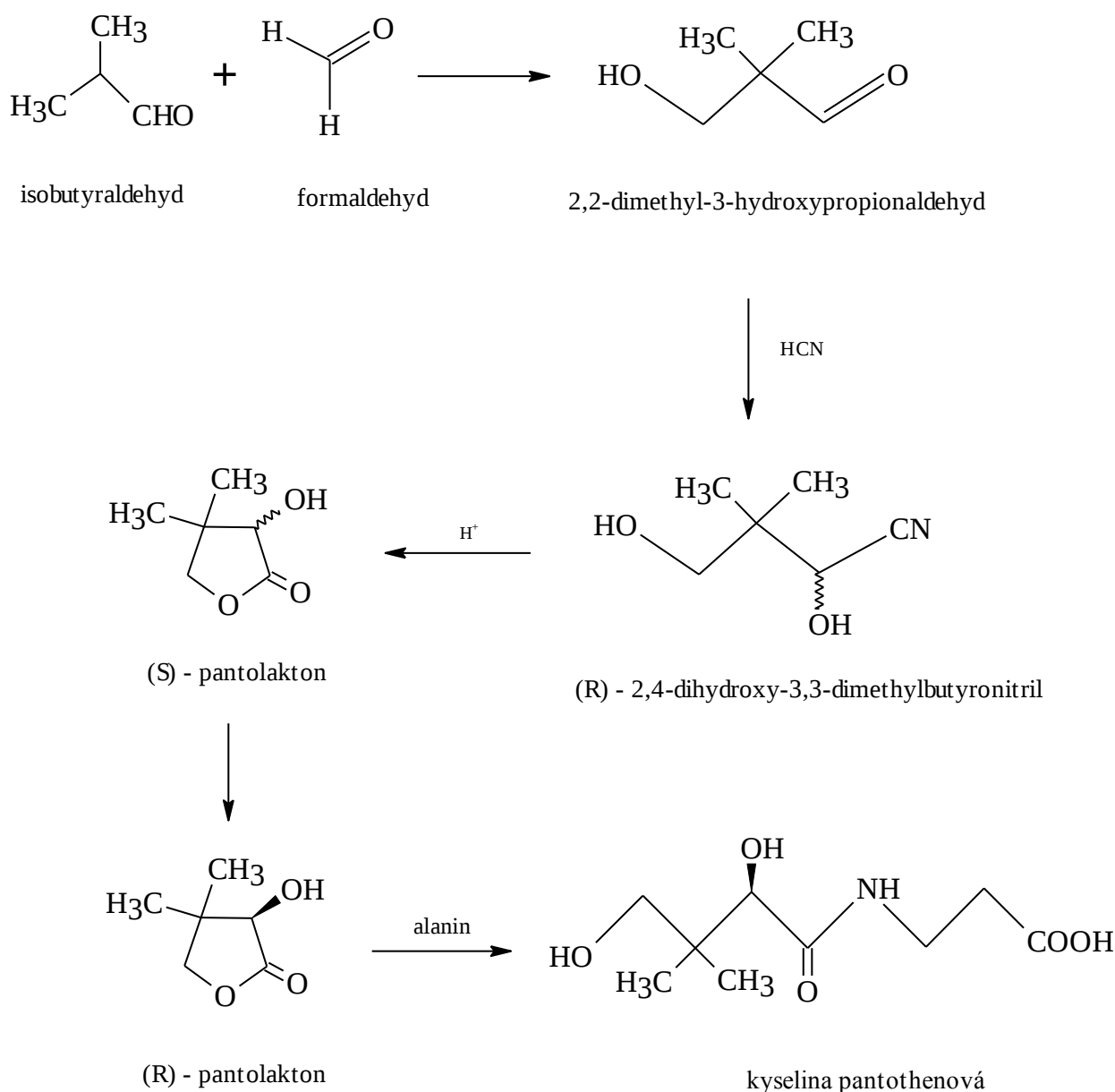


Schéma 4: Syntéza kyseliny pantothenové^[1]

1.1.2.4 ROLE KYSELINY PANTOTHENOVÉ V ORGANISMU

Ke své správné funkci potřebuje kyselina pantothenová přítomnost vitamínu A, vitamínu B₆, B₁₂, B₉ a B₃. Je životně důležitá pro uvolňování energie z potravin, pro zdravý růst, dobrý stav kůže a vlasů, ale také pro produkci protilátek. Významnou roli hraje panthenol v kosmetickém průmyslu, stal se nedílnou součástí přípravků pro péči o vlasy, nehty a pokožku. Mezi jeho základní funkce patří také lepší hojení ran.^[6]

1.1.2.5 NEDOSTATEK KYSELINY PANTOTHENOVÉ

Nedostatek kyseliny pantotenové byl objeven pouze u pacientů léčících se antagonisty kyseliny ω -methylpantotenové a u těžce podvyživených pacientů. Při nedostatku může docházet k pocitu mravenčení prstů a nohou, dále mohou pacienti vykazovat únavu, depresi, zvracení, nespavost, svalovou slabost, poruchy spánku a gastrointestinálního traktu. V některých případech může docházet i ke změně tolerance glukózy, ke zvýšené citlivosti na inzulin a snížené tvorbě protilátek.^[19]

1.1.2.6 DOPORUČENÉ DÁVKOVÁNÍ KYSELINY PANTOTHENOVÉ

Při stanovení doporučené denní dávky pantothenátu musí být zohledněn růst a velikost lidského těla, u kojenců závisí především na složení a množství spotřebovaného mléka. Doporučená denní dávka vitamínu B₅ se pohybuje v rozmezí od cca 1,5 do 7 mg za den v závislosti na věku a pohlaví (viz Tabulka 3).^[22]

Tabulka 3: Doporučená denní dávka pantothenátu u různých skupin lidí^[22]

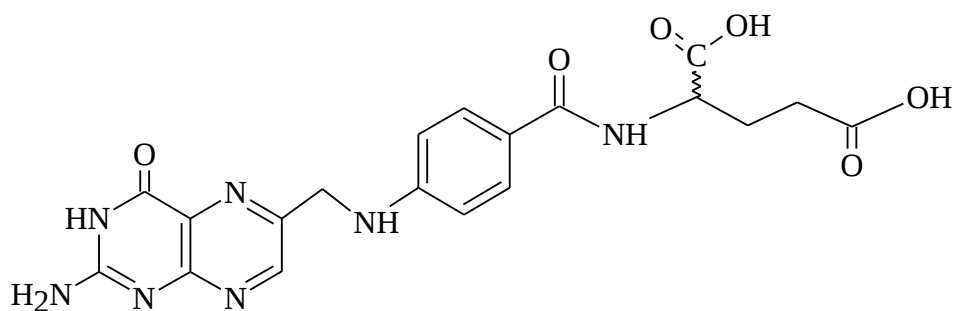
Skupina	Doporučená denní dávka (mg/den)
Kojenci a děti	
0 – 6 měsíců	1,7
7 – 12 měsíců	1,8
1 – 3 let	2,0
4 – 6 let	3,0
7 – 9 let	4,0
Adolescenti	
10 – 18 let	5,0
Dospělí	
Ženy 19 ⁺	5,0
Muži 19 ⁺	5,0
Těhotné ženy	6,0
Kojící ženy	7,0

1.1.3 KYSELINA LISTOVÁ (VITAMÍN B₉)

Vitamín B₉ je označován také jako kyselina listová, chemicky kyselina pteroylglutamová. Pro označení sloučenin s aktivitou vitamínu B₉, včetně kyseliny listové, kyseliny dihydrofolové, kyseliny tetrahydrofolové, 5-formyl-H₄-kyseliny listové a 5-methyl-H₄-kyseliny listové jsou používány termíny folát a folacin.^[15]

1.1.3.1 CHEMICKÉ VLASTNOSTI KYSELINY LISTOVÉ

Kyselina listová (viz Obrázek 3) není považována za přirozenou fyziologickou formu, nýbrž za chemickou formu a používá se jako doplněk stravy.^[2] Jedná se o oranžově žlutou krystalickou látku rozpustnou ve vodě, ale nerozpustnou v etanolu a jiných méně polárních rozpouštědlech.^[19] Je citlivá na světlo i teplo.^[23,3] Obecně se všechny foláty v přírodě vyskytují ve velmi malých množstvích převážně ve formě polyglutamátů.^[2]



Obrázek 3: Chemický vzorec kyseliny listové^[2]

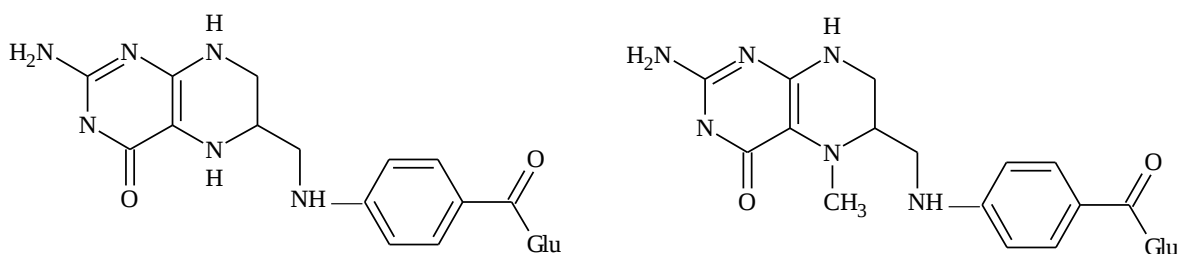
Mezi společný základ struktury folátů řadíme pteridinový kruhový systém spojený s kyselinou p-aminobenzoovou (PABA), která tvoří kyselinu pterovou, a jednu či více skupin kyseliny glutamové.^[3,23] Počet skupin kyseliny glutamové se liší u pteroylglutamátů a pteroylpolyglutamátů.^[23] Kyselina listová je monoglutamát kyseliny pterové, ale jak již bylo řečeno, nejedná se o přirozenou formu, ale o syntetickou formu vitamínu, která je používána k obohacování potravin.^[9]

Mezi foláty řadíme velké množství chemicky příbuzných látek, lišících se v závislosti na různých substituentech na třech místech v základní struktuře kyseliny pteroylglutamové. Teoreticky je možné vytvořit až 170 folátů.^[19]

1.1.3.2 ROLE KYSELINY LISTOVÉ V ORGANISMU

Základní funkcí kyseliny listové v organismu je účast v metabolismu bílkovin a nukleových kyselin, což je uplatňováno hlavně při růstu a dělení buněk, ale také při přenosu mezibuněčných informací.^[15,6]

V lidském organismu je folát absorbován ve formě pteroylmonoglutamátu v tenkém střevě. Poté dochází k jeho redukci uvnitř buněk (hlavně játra, kde je uložena) na biologicky aktivní tetrahydrofolát (THF nebo H4-folát, viz Obrázek 4) a jeho deriváty působením enzymu dihydrofolátreduktázy (DHFR). Derivát, který se ukládá do zásob v lidském těle, se nazývá 5-methyltetrahydrofolát (viz Obrázek 4).^[3,23]



Obrázek 4: Struktura tetrahydrofolátu (vlevo) a 5-methyltetrahydrofolátu (vpravo)^[3]

Kyselina listová je esenciální kyselina, která se účastní mnoha biochemických dějů, kde vystupuje jako koenzym. Podílí se na přenosu jednouhlíkových skupin (formyl-, metanyl-, metyl-), ale také ovlivňuje syntézu cholinu, serinu, histidinu a methioninu. Má nenahraditelnou úlohu v syntéze purinů a pyrimidinů. Kyselina listová je také velmi důležitá pro konverzi homocysteinu na methionin. Tato reakce je významná hlavně v souvislosti se vznikem a rozvojem chorob, které vznikají kvůli zvýšené hladině homocysteinu. Jedná se hlavně o kardiovaskulární onemocnění, rakovinu a Alzheimerovu chorobu.^[24]

1.1.3.3 NEDOSTATEK KYSELINY LISTOVÉ

Nedostatek kyseliny listové je celosvětovým problémem výživy, protože se vyskytuje v potravinách ve velmi malém množství a je velmi citlivá na oxidační podmínky a redukční činidla při zpracování potravin.^[25] Nedostatek se může vyskytovat v těhotenství

nebo při onemocnění v důsledku léčby určitými léky. Při nedostatku kyseliny listové dochází k nedostatečné tvorbě červených krvinek a krevních destiček a pomalému snižování hladiny homocysteinu. Nedostatek kyseliny listové je dále spojován i s vyšším výskytem nádorů, hlavně tlustého střeva.^[15] Dále může nedostatek způsobovat megaloblastickou anémii, jejíž příznaky zahrnují únavu, slabost, nesoustředěnost, bolesti hlavy, podrážděnost, dušnost a palpitaci srdce. Mezi příznaky nedostatku můžeme řadit i změny v pigmentaci vlasů, nehtů a kůže. Během těhotenství nedostatek kyseliny listové zvyšuje riziko předčasného porodu, může způsobit i retardaci růstu plodu či nízkou porodní hmotnost dítěte. S nedostatkem folátů jsou spojena také některá závažná onemocnění jako je např. Alzheimerova choroba, koronární onemocnění srdce, rakovina prsu, ztráta sluchu a osteoporóza.^[23] Některé léky (např. antikonvulziva a perorální antikoncepce) mohou zhoršit absorpci folátu. Antikonvulziva navíc zvyšují i rychlost metabolismu folátu.^[3]

1.1.3.4 VÝSKYT KYSELINY LISTOVÉ V POTRAVINÁCH

Kyselina listová se vyskytuje zejména v potravinách rostlinného původu, bramborách, pomerančích, celozrnném chlebu, ořechách, fazolích, ovoci, mléčných výrobcích, vejcích, mořských plodech a zrnech, tmavě zelené listové a košťálové zelenině, např. ve špenátu, brokolici, růžičkové kapustě, květáku a zelí. Mezi živočišné zdroje vitamínu patří drůbež, maso a játra, které jsou však nevhodné pro těhotné ženy kvůli vysokému obsahu vitamínu A.^[15,23]

1.1.3.5 DOPORUČENÉ DÁVKOVÁNÍ KYSELINY LISTOVÉ

Denní dávka by se u lidí měla pohybovat okolo 200 mikrogramů, u těhotných žen by měla být zvýšena na 400 mikrogramů a u kojících žen na 300 mikrogramů.^[15]

1.1.3.6 SYNTÉZA KYSELINY LISTOVÉ

Kyselina listová může být získávána několika způsoby, jeden z nich je uveden na Schématu 5. Zde je kyselina listová syntetizována z 2,3-dibrompropanalu, 2,5,6-triamino-3,4-dihydro-4-pyrimidinonu a N-(4-aminobenzoyl)-L-glutamové kyseliny.

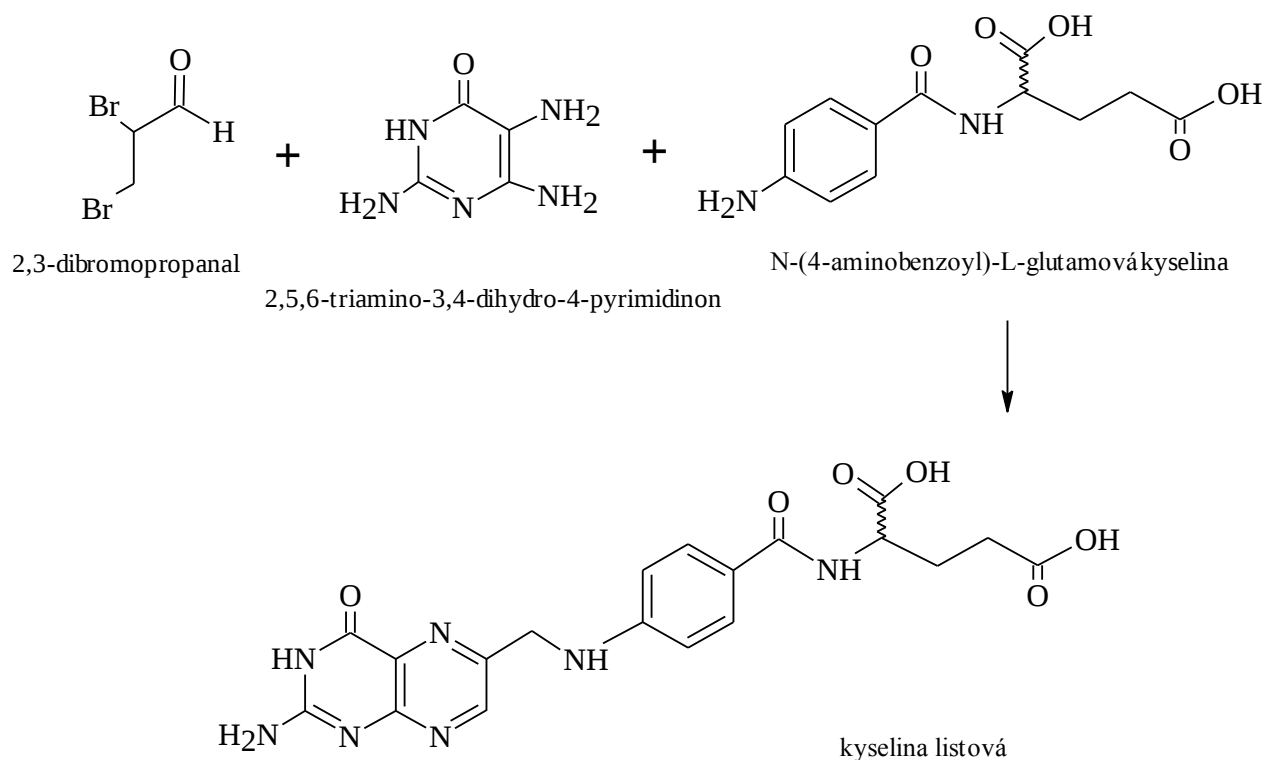


Schéma 5: Syntéza kyseliny listové^[18]

Obsah folátů v potravinách může být zvýšen procesem zvaným fermentace (kvašení). Například mléko obsahuje malé množství folátu, asi 2 – 5 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, ale pokud je mléko zpracováno na jogurt, obsah folátů může být zvýšen na více než 20 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ v závislosti na kmenech mikroorganismů použitých při fermentaci. Fermentací se zvyšuje koncentrace folátů především u kukuřičné mouky a fementované zeleniny. Mezi tradiční fermentovanou zeleninu řadíme kyselé zelí, kde jsou foláty produkovány spontánním kvašením. Kyselé zelí v konzervě obsahuje okolo 5 - 21 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ folátů. Ke zvýšení koncentrace folátů kvasinkami dochází také při kvašení žita a pšeničného těsta při výrobě chleba.^[23]

De novo produkce folátů se vyskytuje u hub, zelených rostlin, některých prvoků a bakterií (například bakterie *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, a *Leuconostoc*).^[23]

1.2 STANOVENÍ VITAMÍNŮ V POTRAVINÁCH

Díky čím dál většímu zájmu o správné stravování, došlo k nárůstu zájmu nejen o zeleninu a ovoce, ale i o konzumaci potravin obohacených o vitamíny a multivitaminových preparátů. Tento fakt vedl k zavedení povinného značení potravin. Začaly také vznikat přesné a účinné analytické separační metody pro kontrolu kvality těchto preparátů. Vitamíny jsou stanovovány především pomocí biostanovení, ale mohou být stanoveny i dalšími metodami jako jsou metody fyzikálně-chemické, mikrobiologické nebo imunometody.^[15]

Vitamíny jsou v potravinách stanovovány z celé řady důvodů:

- zachování kvality produktů,
- požadavky dané zákonem v souvislosti s nutričním značením,
- odhalení ztrát vitamínů během balení, skladování a technologických postupů,
- zamezení falšování potravin,
- stanovení vitamínů v potravinách pro tvorbu potravinových tabulek,
- nutriční studie (stanovení obsahu vitamínů v dietách),
- posouzení vlivu sezónních, environmentálních a geografických podmínek.

Výběr metody je ovlivňován celou řadou faktorů, např. rozdílnými koncentračními hladinami jednotlivých vitamínů v potravinách, rozdílné biologické a fyzikálně-chemické vlastnosti jednotlivých vitamínů.

Díky nestabilitě vitamínů je jejich stanovení často problematické, v případě potravin je problém ve složitosti analyzované matrice. Mezi nejrychlejší a zároveň nejúčinnější metody patří HPLC, která je používána především pro analýzu multivitaminových preparátů, mléčné dětské výživy a hydrofilních vitamínů v potravinách. Ke stanovení vitamínů může být využívána i mikrobiologie, spektrofotometrie, fluorimetrie, chromatografie a elektromigrační metody. Vždy před provedením analýzy však musí být provedena některá preventivní opatření, aby se předcházelo ztrátám způsobeným nestabilitou vitamínů. Mezi faktory, které nejvíce ovlivňují stanovení a tím vedou k deaktivaci vitamínu, řadíme světlo, vzduch, teplota, pH, stopové kovy a iontová síla.^[2]

1.2.1 STANOVENÍ NIACINU

Celkový obsah niacinu může být stanoven po přeměně vázané formy vitamínu či jakéhokoliv nikotinamidu přítomného v potravine kyselinou nebo zásadou na kyselinu nikotinovou.^[26] Nezbytnou součástí stanovení niacinu bez ohledu na použitou analytickou techniku je tedy hydrolýza potravin. Pokud je stanovován biologicky aktivní niacin, je používána kyselá hydrolýza, pokud je však požadován celkový niacin, je nutná alkalická hydrolýza k uvolnění nebiologicky dostupného niacinu.^[27] K určení obsahu niacinu v celé řadě potravin byly použity metody využívající vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) s detekcí v UV oblasti. U mastných výrobků byla dokonce použita i plynová chromatografie. Není však moc využívána díky nízké těkavosti niacinu a nutnosti přípravy těkavějších derivátů.^[28] Poměrně často používány jsou metody mikrobiologické, fotometrické a elektroforetické (CE).^[29] Tyto metody jsou často specifitější a rychlejší než odpovídající postupy HPLC.^[30]

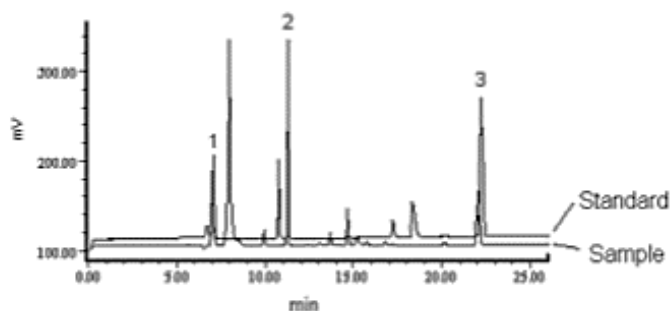
1.2.1.1 KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA (CZE)

Kapilární zónová elektroforéza je účinná pro separaci iontových látek.^[31] Iontové látky jsou oddělovány podle jejich elektroforetické pohyblivosti pod vlivem elektrického pole, čímž je vytvářen silný elektroosmotický tok uvnitř trubice. Ten způsobuje, že se každý druh rozpuštěné látky, včetně kationových a aniontových, eluuje na jednom konci trubice s velmi vysokým rozlišením. Neiontové látky nemohou být stanovovány, protože jejich rychlost migrace není ovlivňována elektrickým polem ani pH, proto migrují stejnou rychlostí jako elektroosmotický tok a nedosáhne se žádného oddělení.^[32] V důsledku toho byla vyvinuta další metoda tzv. micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC).^[31] Kapilární zónová elektroforéza má také své nevýhody, mezi které řadíme hlavně poměrně nízkou koncentrační citlivost a někdy nemožnost metodu vyvinutou pro standardy uplatnit pro skutečné vzorky.^[33]

Poprvé byla představena kapilární elektroforetická metoda pro stanovení celkového niacinu v koncentrovaných roztocích kvasnic v Austrálii Wardem a spol. v roce 1996. Bylo zjištěno, že k uvolnění kyseliny nikotinové z potravní matrice autoklávováním vzorku ve vodném roztoku hydroxidu vápenatého dochází přibližně po 2h při 121 °C. Následně byla ochlazená směs zředěna na 50 ml deionizovanou vodou, důkladně promíchána a centrifugována po dobu 15 minut při 0 °C. Po přidání kyseliny šťavelové pro úpravu pH

na 7 a další centrifugaci byl roztok podroben kationtově výměnné chromatografii. Dále následovalo stanovení kapilární elektroforézou. Extrakty byly analyzovány 75 cm kapilární kolonou z taveného křemene, jejíž účinná délka byla 50 cm. Jako pufr zde vystupovala směs 0,02 M tetraboritanu sodného a 0,02 M hydrogenfosforečnanu sodného o pH 9,2.^[34]

Schreiner a spol. použili kapilární elektroforézu pro stanovení šesti ve vodě rozpustných vitamínů (thiamin, riboflavin, pyridoxin hydrochlorid, kyselina pantothenová, nikotinamid a kobalamin) v nealkoholických nápojích a vitamínových doplncích (na Obrázku 5 můžeme vidět elektroforeogram dvou z nich). Analýza byla prováděna ve standardní 50 cm kapiláře z oxidu křemičitého a k detekci byl použit UV detektor ($\lambda = 214$ nm). K separaci byl použit boritanový pufr o pH 8,5. Napětí vložené na kapiláru bylo 30 kV a její teplota byla udržována na 23,8 °C. Byly testovány různé koncentrace borátu (25, 50, 75, 100 mM) a SDS jako povrchově aktivní látky (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 mM). Kapilára musela být na začátku každého dne proplachována separačním pufrům po dobu 30 minut.^[35]



Obrázek 5: Dělení vitamínů rozpustných ve vodě v nealkoholických nápojích ve srovnání se standardy. 1 - nikotinamid; 2 - pyridoxin; 3 - sacharin (vnitřní standard)^[35]

1.2.2.2 MICELÁRNÍ ELEKTROKINETICKÁ KAPILÁRNÍ CHROMATOGRFIE (MECC)

MECC je stejně účinná jako CZE, ale má navíc tu výhodu, že může být aplikována i na neiontové látky. Metoda je založena na přidání povrchově aktivního činidla do roztoku nosného elektrolytu, kde dochází k rozdělení rozpuštěných látek mezi vodnou a micelární fází při rychlém elektroosmotickém toku. MECC je používána pro dělení různých skupin sloučenin a nachází využití v biomedicínské analýze. Pomocí MECC jsou stanovovány

různé léky a biologické látky. Touto metodou lze analyzovat i ve vodě rozpustné vitamíny. Současně bylo stanoveno sedm ve vodě rozpustných vitamínů pomocí UV detekce. Analýza probíhala přibližně 20 minut a pro tvorbu micel byl použit dodecylsulfát sodný. Detekce, která probíhala při 254 nm s ethyl p-aminobenzoátem jako vnitřním standardem, umožnila reprodukovatelné, citlivé a přesné stanovení.^[31]

V Japonsku již v roce 1988 Fujiwara provedl stanovení kyseliny nikotinové, nikotinamidu, kyanokobalaminu, riboflavinu, kyseliny L-askorbové, pyridoxin-hydrochloridu a thiamin hydrochloridu pomocí MECC. Stanovení probíhalo v 80 cm dlouhé kapilární trubici z taveného křemene, kde vysoké napětí bylo zajištěno izotachoforetickým zařízením IP-2A. Jako surfaktant byl použit dodecylsulfát sodný (SDS) a jako interní standard ethyl-p-aminobenzoát (EAB). K udržování pH sloužil fosfátový pufr, který byl následně smíchán s SDS. UV detekce byla provedena pomocí detektoru s proměnlivou vlnovou délkou.^[31]

MECC analýza ve vodě rozpustných vitamínů (thiamin, riboflavin, riboflavin-fosfát, kyselina nikotinová, nikotinamid, pyridoxin, pyridoxal, pyridoxal-5-fosfát, pyridoxamin, pyridoxamin-5-fosfát, kyanokobalamin) byla provedena také Tsumagarim, Nishim a Kakimotem. K separaci byla použita 65 cm dlouhá křemenná kapilára s vnitřním průměrem 0,05 mm. Jako surfaktanty zde vystupovaly dodecylsulfát sodný (SDS) a lauroylmethyltaurát sodný (LMT) a jako pufr byl použit roztok, který vznikl smícháním 0,02 M roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného s 0,02 M roztokem tetraboritanu sodného. Detekce UV záření probíhala při vlnové délce 210 nm. Bylo zjištěno, že pro separaci je lepší použít SDS, protože dochází k lepšímu rozdělení vitamínů.^[32]

1.2.2.3 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC)

V dnešní době je kapalinová chromatografie nejpoužívanější technikou ke stanovení niacinu i dalších vitamínů.^[33]

Niacin může být v potravinách stanovován také fluorimetricky vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s postkolonovou derivatizací. Tato derivatizace byla navržena Inumou, Mawatarim a Watanabem v roce 1991 pro stanovení nikotinamidu a kyseliny nikotinové v lidském séru. Díky této derivatizaci nemuselo být provedeno čištění

analyzovaných vzorků. Tato metoda se vyznačuje velmi dobrou citlivostí a opakovatelností. Byla zde použita 150 mm kolona s vnitřním průměrem 4,6 mm a fluorimetrický detektor. Detektor pracoval při emisní vlnové délce 380 nm a excitační vlnové délce 322 nm. Separace byla provedena za pokojové teploty při průtoku 1 ml/min chromatografií s obrácenými fázemi. Jako mobilní fáze byla použita směs 0,07 M dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,075 M peroxidu vodíku a 5,1 až 6 M roztok síranu měďnatého. Data byla vyhodnocena porovnáním se standardními roztoky.^[36,37]

Sood a kol. použili vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii pro stanovení niacinu a niacinamidu v multivitaminových přípravcích. Analýza probíhala pomocí kapalinové chromatografie. Detekce byla prováděna při 254 nm. Byla použita 30 cm kolona z nerezové oceli s vnitřním průměrem 4 mm. Tato kolona byla naplněná částicemi oxidu křemičitého, které byly modifikovány oktadecyltrichlorsilanem. Standardní roztoky byly připraveny jako roztoky niacinamidu ve fosfátovém pufru o pH 6. Vzorek byl homogenizován a umístěn do odměrné baňky (100 ml) s fosfátovým pufrem o pH 6 a protřepáván po dobu 5 minut. Vzorek byl případně filtrován a prvních 10 až 15 ml filtrátu bylo jímáno. Obsah niacinamidu ve vzorcích byl stanoven pomocí kalibrační křivky.^[35]

1.2.2.4 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ

Kyselina nikotinová reaguje s bromkyanem a ostatními α - a γ -nesubstituovanými deriváty pyridinu za vzniku pyridinového iontu. Tento iont dále reaguje s aromatickými aminy otevřením pyridinového kruhu za vzniku hnědočerveného zbarvení, které je vhodné pro spektrofotometrické stanovení. Spektrofotometrické stanovení lze použít jako univerzální, ale není specifické, proto je potřeba zařadit ke stanovení některou z chromatografických dělicích technik. Důležité je také provedení slepých pokusů, které do jisté míry eliminují chyby této metody.

Roztok vzorku byl připraven smícháním 1 ml extraktu vzorku s 0,5 ml zředěného amoniaku, 5 ml roztoku bromkyanu, 2 ml 10 % roztoku kyseliny sulfanilové a 0,5 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové (1:5). Poté byl obdobným způsobem připraven standardní roztok, kde místo 1 ml extraktu vzorku byl použit 1 ml standardního roztoku kyseliny nikotinové. Při této metodě je nutné připravit slepý pokus pro každý vzorek i standard.^[38]

1.2.2.5 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ PO CHROMATOGRAFICKÉ SEPARACI NA TENKÉ VRSTVĚ SILIKAGELU

Při této metodě dochází k chromatografickému rozdělení na tenké vrstvě silikagelu kyseliny nikotinové a nikotinamidu po jejich extrakci. Odpovídající skvrny se eluují a obsah nikotinamidu a kyseliny nikotinové se stanoví spektrofotometricky proměřením absorbance při 264 a 300 nm. Tato metoda je velmi spolehlivá a dává velmi dobré výsledky srovnatelné s mikrobiologickými testy u vzorků, které obsahují okolo 10 až 20 mg daného vitamínu na 100 g vzorku.^[38]

1.2.3 STANOVENÍ KYSELINY PANTOTHENOVÉ

Stanovení kyseliny pantothenové je mnohem častější než stanovení pantothenátu vápenatého. Pantothenát vápenatý je však stanovován v některých farmaceutických přípravcích, jako jsou např. šampóny, krémy a gely na vlasy, různé masti, vlasové toniky či pleťové krémy nebo i multivitaminové tablety.^[39,40] Dříve bylo stanovení kyseliny pantothenové v krvi a tkáních založené na mikrobiologických testech, nyní jsou však používány i enzymatické, hmotnostní, spektrometrické a další postupy. Kyselina pantothenová je stanovována především pro tvorbu potravinářských tabulek a k tomuto účelu byly vyvinuty chemické postupy.^[41]

1.2.3.1 KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA

Pro stanovení celé řady vitamínů B i kyseliny pantothenové v tabletách byla použita metoda kapilární zónové elektroforézy (CZE). Při této metodě probíhá separace v kapiláře z taveného křemene o celkové délce 48,5 cm (40 cm k detektoru) a vnitřním průměru 50 μm . Kapilára musí být před použitím vždy promyta vodou a bazickými roztoky, nejdříve 1 M NaOH a poté 0,1 M NaOH. Na začátku každého dne byla promývána ještě separačním pufrem po 10 min. Je zde použit borátový pufr o koncentraci 50 mM při pH 8,5 a látky jsou detekovány UV detektorem při 215 nm a pracovním napětí 25 kV.^[42]

V prostředí fosfátového pufru o koncentraci 60 mmol.l^{-1} a pH 7 s přídavkem 10 % (v/v) methanolu a 60 mM 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrinu mohly být metodou CZE stanoveny dokonce oba izomery kyseliny pantothenové v nealkoholickém nápoji. Celé

stanovení probíhalo při teplotě 20 °C a napětí 20 kV. Ke spektrofotometrické detekci docházelo při 200 nm. Byla použita kapilára z taveného křemene o délce 56 cm a s vnitřním průměrem 75 µm.^[43]

1.2.3.2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC)

Metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi (RP-HPLC) byl stanovován pantothenát vápenatý společně s methylparabenem a propylparabenem v masti. Byly zkoušeny kolony s různými stacionárními fázemi, ale u většiny z nich docházelo ke společné eluci pantothenátu vápenatého s mrtvým objemem kolony. Nakonec byla použita kolona Hypersil ODS o délce 250 mm, vnitřním průměru 4,6 mm a velikostí částic stacionární fáze 5 µm. Jako mobilní fáze byla použita směs kyseliny fosforečné a methanolu (35:65 v/v) o pH 2,5. Analýza trvala asi 12 minut při průtoku 0,7 ml za minutu a látky byly detekovány UV detektorem při vlnové délce 214 nm.^[39]

Metoda RP-HPLC s UV detekcí byla použita i pro analýzu pantothenátu vápenatého ve směsi vitamínů. K tomuto stanovení směsi vitamínů řady B, ale i vitamínu C, byla použita kolona o délce 250 mm, vnitřním průměru 4,6 mm a velikostí částic stacionární fáze 5 µm. Byla zde použita gradientová eluce a jako mobilní fáze byla použita kyselina trifluoroctová o pH 2,6 a acetonitril. Oddělení bylo dosaženo během 17 minut při průtoku 0,8 ml za minutu. Detekce pantothenátu vápenatého probíhala při vlnové délce 210 nm.^[44]

RP-HPLC s UV i s MS detekcí byla použita pro stanovení kyseliny pantothenové v léčivých přípravcích. Byla použita kolona o délce 150 mm, vnitřním průměru 4,6 mm a velikostí částic stacionární fáze 3 µm. Jako mobilní fáze zde vystupoval methanol a 0,01 % kyselina trifluoroctová o pH 3,9. Ke spektrofotometrické detekci docházelo při vlnové délce 280 nm nebo byl použit hmotnostní spektrometr.^[45]

1.2.3.3 DIFERENČNÍ PULZNÍ VOLTAMETRIE (DPV)

Často používaná metoda pro stanovení kyseliny pantothenové, pantothenátu vápenatého a D-panthenolu v nejrůznějších farmaceutických a kosmetických přípravcích je diferenční pulzní voltametrie (DPV). Byla použita uhlíková pastová elektroda potažená

kobaltem (CPE) ponořena ve fosfátovém pufru o pH 6,08. Pracovní elektroda byla vyrobena z PTFE tyče o délce 7 mm, ve které se nacházel na jedné straně hluboký otvor o průměru 3 mm. Tento otvor byl naplněn uhlíkovou pastou pomocí PTFE stěrky. Uhlíková pasta byla vyrobena z 1,2 g grafitového prášku a 0,01 g až 0,03 g oxidu kovu. Tato směs byla míchána po dobu 5 minut, poté bylo přidáno 0,8 g kapalného parafínu a opět bylo vše pořádně promícháno. Kvantitativní analýzy probíhaly v režimu diferenčně-pulzní voltametrie. Potenciál byl měněn v rozmezí 0,0 - 0,7 V versus Ag/AgCl, výška pulzu byla 50 mV a rychlost skenování 10 mVs⁻¹.^[40]

1.2.3.4 BIOSENZORY

Tato technologie byla vyvinuta pro analýzu ve vodě rozpustných vitamínů (B₂, B₁₂, biotin, kyselina listová a kyselina pantothenová), které se nacházejí ve vzorcích kojenecké výživy. Byly prozkoumány parametry jako je opakovatelnost, přesnost a využití pro analýzu reálných vzorků.^[49] Nejčastěji byla pomocí biosenzorů stanovována kyselina pantothenová a to nejen v léčivých přípravcích, ale také v potravinách jako jsou např. ovocné džusy, mléko, dezerty či cereálie. Technologie biosenzorů se ukázala jako citlivá a spolehlivá metoda.^[45,46,47]

1.2.4 STANOVENÍ KYSELINY LISTOVÉ

Díky velkému množství přítomných forem, omezené stabilitě a složitosti způsobené variabilní biologickou dostupností, je analýza folátů v potravinách velkou výzvou. Protože se tetrahydrofoláty přítomné v potravinách velmi snadno oxidují a některé oxidované formy jsou biologicky neaktivní, je vhodné přidávat do extrakčního média redukční činidlo, kterým je nejčastěji kyselina askorbová. Dále také dochází kvůli složitosti folátových polyglutamatů, bezprostředně po počátečním extrakčním procesu, ke zjednodušení struktury pomocí enzymatické dekonjugace na monoglutamátové formy.^[41]

1.2.4.1 KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA (CZE)

Tato metoda byla vyvinuta ke stanovení kyseliny listové a dalších ve vodě rozpustných vitamínů (B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₉ a B₁₀) v multivitaminových farmaceutických přípravcích. Analýza probíhala v kapiláře z taveného křemene za konstantního napětí 20 kV při teplotě 25 °C. Celková doba analýzy byla 9 minut. Jako pufr byl použit tetraborát o koncentraci 20 mM a pH 9,2. Pro optimalizaci dané metody byly provedeny

analýzy při napětí mezi 10 a 30 kV. Oddělení všech analytů bylo dosaženo při nízkém napětí (10 kV), ale doba analýzy se zvýšila na 20 minut. Naopak při 30 kV byla separace analytů rychlá, ale neúplná. Nakonec byla zvolena hodnota 20 kV.^[48]

1.2.4.2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC)

Ke stanovení kyseliny listové, ale i kyseliny pantothenové, se využívá metoda kombinující RP-HPLC a MS s přidavkem radioaktivních izotopů. Byla použita kolona o délce 250 mm s vnitřním průměrem 4,6 mm a s velikostí částic stacionární fáze 5 μm . Detekce byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru. Tato metoda se vyznačuje velmi vysokou citlivostí. Byla zde použita gradientová eluce, mobilní fáze byla tvořena acetonitrilem a vodným roztokem kyseliny mravenčí o koncentraci 0,1 %.^[46]

Dalším způsobem stanovení kyseliny listové a ostatních ve vodě rozpustných vitamínů je ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS). Tato metoda byla použita pro stanovení těchto vitamínů v multivitaminových doplňkových tabletách. MS/MS bylo použito pro nejlepší citlivost a selektivitu ve zvoleném režimu. Pro lepší kvantifikaci byl použit izotopově značený vnitřní standard. Byla zde použita gradientová eluce. Chromatografická separace byla provedena na koloně (2,1 x 150 mm) s velikostí částic 3 μm . Průtok byl nastaven na 0,6 ml/min a teplota kolony na 15 °C.^[49]

Kyselina listová a dalších 13 ve vodě rozpustných vitamínů může být stanoveno pomocí spojení kapalinové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie (LC/MS/MS) s elektrosprejem (ESI) v nejrůznějších potravinových matricích. Tato metoda je jednoduchá, rychlá a citlivá. Analyty byly odděleny pomocí kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi. Separace byla provedena na koloně o délce 25 cm, vnitřním průměru 4,6 mm s velikostí částic 5 μm . K detekci byl použit hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem.^[50]

Pro současné stanovení vitamínů řady B (B_1 , B_2 , B_6 , B_{12} , kyseliny nikotinové, nikotinamidu a kyseliny listové byla použita metoda chromatografie iontových párů s UV detekcí. Pro urychlení analýzy byla použita gradientová eluce. V mléčné dětské výživě

byly tyto vitamíny analyzovány stejnou metodou s výjimkou detekce, ta byla v tomto případě fluorescenční.^[15]

1.2.4.3 CHEMILUMINESCENCE

Pro stanovení kyseliny listové pomocí chemiluminescence ve farmaceutických přípravcích byla popsána metoda průtokové injekční analýzy (FIA). Tato metoda je založena na reakci kyseliny listové s $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ a $\text{Ce}(\text{IV})$ za vzniku chemiluminescence. K průtokové injekční analýze byly použity dvě peristaltické pumpy, čerpadlo, šestistupňový vstřikovací ventil a spektrofluorimetr s průtočnou komorou. Byla zaznamenávána intenzita luminiscence vs. čas.^[51]

1.2.4.4 MIKROBIOLOGICKÉ TESTY

V pěti druzích bílého vína a osmi druzích červeného vína byl stanovován folát a další ve vodě rozpustné vitamíny (thiamin, riboflavin, niacin, biotin, pantothenát, vitamín C, vitamín B_{12} a vitamín B_6). Bylo zjištěno, že v červených vínech se nacházejí vyšší obsahy stanovovaných vitamínů (kromě pantothenátu) než ve vínech bílých. V červených vínech hraje významnou roli hlavně riboflavin, niacin a vitamín B_6 . Úroveň folátů ve vínech byla ještě nižší než u předchozích studií. Castor v roce 1953 zkoumal změny způsobené fermentací u hroznových moštů. Bylo zjištěno, že obsah riboflavinu se zvyšuje, obsah pantothenátu obvykle klesá, obsah vitamínu B_6 je mírně snížen a biotin je téměř ztracen. Zatímco thiamin a pantothenát se ztrácejí během procesu vinifikace, riboflavin a kyselina listová klesá během extrakce moštu. Během pětiletého stárnutí vína došlo ke ztrátě 36 % riboflavinu a 45 % pantothenátu. Folát byl analyzován pomocí *Lactobasillus casei* a pantothenát s niacinem byly stanoveny za použití testů *Lactobacillus plantarum*.^[52]

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Všechny chemikálie, které byly v laboratoři použity, byly určené pro analýzu (p. a.). K přípravě standardních roztoků byl použit pantothenát vápenatý (SIGMA-Aldrich), kyselina listová (SIGMA-Aldrich) a kyselina nikotinová (SIGMA-Aldrich). Pro přípravu elektrolytového systému byl použit histidinchlorid (Reanal), histidin (Serva), kyselina morfolinethansulfonová (Serva), kyselina octová (Lach:ner) a kyselina chlorovodíková (Lach:ner). Dále byl použit hydroxid sodný (PENTA) k alkalizaci kyseliny listové.

2.2 VZORKY

Jako reálné vzorky byly použity vitamínové tablety B-komplex (Generica), B-komplex (Zentiva), B-komplex Forte (Dr. Max), Biosil (Naturvita), Acidum Folicum (Zentiva). Všechna tato léčiva byla zakoupena v lékárně. Vzorek s obsahem kyseliny nikotinové nebyl k dispozici, jelikož ve většině preparátů je vitamín B₃ přítomen ve formě nikotinamidu.



Vzorek 1

Dostupné z: <https://www.drmax.cz/b-komplex-forte-generica-tbl-20>

Složení:

thiamin mononitrát (10 mg), riboflavin (10 mg), pyridoxin hydrochlorid (10 mg), pantothenát vápenatý (40 mg), nikotinamid (50 mg), kyselina listová (1 mg), kyanokobalamin (10 µg), D-biotin (0,5 mg)

pomocné látky – hydrogenfosforečnan vápenatý dihydrát, mikrokrytalická celulóza, maltodextrin, kroskarmelóza, polydextróza, stearan hořečnatý, mastek, hydroxypropylmethylcelulóza, oxid titaničitý, žlutý a červený oxid železa



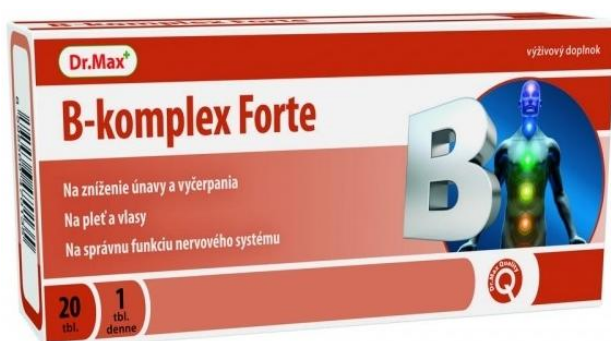
Vzorek 2

Dostupné z: <https://www.magister.sk/produkt/detail/produkty-od-a-po-z/b-komplex-leciva-30tbl/>

Složení:

thiamin hydrochlorid (2 mg), riboflavin (2 mg), pyridoxin hydrochlorid (1 mg), nikotinamid (20 mg), kyselina pantothenová (3 mg)

pomocné látky – monohydrát laktózy, kukuřičný škrob, želatina, stearan vápenatý, mastek, sacharóza, oxid titaničitý, sodná sůl karamelózy, tekutý parafín, oxid křemičitý, žlutková žluť, bílý a karnaubský vosk, tuk z ovčí vlny (lanolin)



Vzorek 3

Dostupné z: <https://vitaminy-a-minerality.heureka.sk/dr-max-b-komplex-forte-20-tablet/>

Složení:

nikotinamid (50 mg), kyselina pantothenová (25 mg), thiamin mononitrát (15 mg), riboflavin (15 mg), pyridoxin hydrochlorid (10 mg), biotin (0,5 mg)

pomocné látky – mikrokrytalická celulóza, hypromelóza, polyvinylalkohol, polyethylenglykol 4000, talek, polydextróza, oxid křemičitý, zesíťovaná sůl karboxymethylcelulózy, oxid titaničitý, hořečnaté soli mastných kyselin, oxidy železa



Vzorek 4

Dostupné z: <http://www.vlasy.info/leky/biosil-plus/>

Složení:

biotin (150 µg), kyselina pantothenová (6 mg), oxid křemičitý (15 mg), zinek (10 mg)



Vzorek 5

Dostupné z: <https://www.lekarna-doktorka.cz/8594739010253-acidum-folicum-drg-30x10mg-leciva>

Složení:

kyselina listová (10 mg)

pomocné látky – monohydrát laktosy, sacharóza, kukuřičný škrob, želatina, mastek, kalcium-stearát, oxid titaničitý, sodná sůl karmelosy 20, arabská klovatina, žlutý oxid železitý, směs bílého a karnaubského vosku

2.3 PŘÍPRAVA STANDARDNÍCH ROZTOKŮ

2.3.1 KYSELINA NIKOTINOVÁ

0,01 M roztok kyseliny nikotinové

Na analytických vahách bylo naváženo 0,123 g kyseliny nikotinové. Navážka byla kvantitativně převedena do 100 ml odměrné baňky a doplněna po rysku destilovanou vodou.

0,001 M roztok kyseliny nikotinové

Bylo odpipetováno 10 ml 0,01 M roztoku kyseliny nikotinové do 100 ml odměrné baňky, která byla doplněna destilovanou vodou po rysku.

0,0001 M roztok kyseliny nikotinové

Z 0,001 M roztoku kyseliny nikotinové bylo do odměrné baňky o objemu 50 ml odebráno 5 ml. Následně byl roztok doplněn po rysku destilovanou vodou.

0,0002 M roztok kyseliny nikotinové

Bylo odpipetováno 10 ml z 0,001 M roztoku kyseliny nikotinové do 50 ml odměrné baňky. Tento roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

2.3.2 PANTOTHENÁT

0,01 M roztok pantothenátu

0,238 g pantothenátu bylo naváženo na analytických vahách, kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky a doplněno po rysku destilovanou vodou.

0,001 M roztok pantothenátu

Bylo odpipetováno 10 ml 0,01 M roztoku pantothenátu do 100 ml odměrné baňky. Tato baňka byla následně doplněna po rysku destilovanou vodou.

0,0001 M roztok pantothenátu

Z roztoku pantothenátu o koncentraci 0,001 M bylo do 50 ml odměrné baňky odebráno 5 ml. Tento roztok byl poté doplněn destilovanou vodou po rysku.

0,0002 M roztok pantothenátu

Z 0,001 M standardního roztoku pantothenátu bylo odpipetováno 10 ml do 50 ml odměrné baňky. Roztok byl doplněn po rysku destilovanou vodou.

2.3.3 KYSELINA LISTOVÁ

0,01 M roztok kyseliny listové

Bylo naváženo 0,441 g kyseliny listové, poté byla navážka kvantitativně převedena do 100 ml odměrné baňky. Následně byl roztok doplněn po rysku destilovanou vodou.

0,001 M roztok kyseliny listové

Bylo odpipetováno 10 ml 0,01 M roztoku kyseliny listové do 100 ml odměrné baňky, která byla doplněna destilovanou vodou po rysku.

0,0001 M roztok kyseliny listové

Ze standardního roztoku kyseliny listové o koncentraci 0,001 M, jehož příprava byla již popsána, bylo do odměrné baňky o objemu 50 ml odebráno 5 ml. Roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

0,0002 M roztok kyseliny listové

Z 0,001 M roztoku kyseliny listové, jehož příprava byla již popsána, bylo do odměrné baňky o objemu 50 ml odpipetováno 10 ml. Takto připravený roztok byl doplněn po rysku destilovanou vodou.

2.4 PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍCH ROZTOKŮ

Kyselina nikotinová

Na analytických váhách bylo naváženo 130 mg kyseliny nikotinové, převedeno do 100 ml odměrné baňky a doplněno po rysku destilovanou vodou. Takto připravený roztok byl před měřením zředěn 1000x (10,6 $\mu\text{mol/l}$, 1,3 mg/l), 400x (26,4 $\mu\text{mol/l}$, 3,25 mg/l), 200x (52,8 $\mu\text{mol/l}$, 6,5 mg/l), 100x (105,6 $\mu\text{mol/l}$, 13 mg/l), 50x (211,2 $\mu\text{mol/l}$, 26 mg/l) a 25x (422,4 $\mu\text{mol/l}$, 52 mg/l). Tyto roztoky byly proměřeny v aniontovém elektrolytovém systému s vedoucím roztokem o pH 6,2.

Pantothenát

Do 100 ml odměrné baňky bylo převedeno 232,3 mg pantothenátu, který byl navážen na analytických váhách. Odměrná baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Tento roztok byl před měřením zředěn 200x (48,8 $\mu\text{mol/l}$, 11,6 mg/l), 100x (97,3 $\mu\text{mol/l}$, 23,2 mg/l), 50x (194,6 $\mu\text{mol/l}$, 46,4 mg/l) a 25x (389,2 $\mu\text{mol/l}$, 92,8 mg/l). Takto připravené roztoky byly proměřeny v aniontovém elektrolytovém systému.

Kyselina listová

448,3 mg kyseliny listové bylo naváženo a převedeno do 100 ml odměrné baňky, poté byl přidáván roztok hydroxidu sodného, dokud nedošlo k vyčerení roztoku. Nakonec bylo vše doplněno po rysku destilovanou vodou. Takto připravený roztok byl před měřením zředěn 1000x (10,1 $\mu\text{mol/l}$, 4,48 mg/l), 400x (27,8 $\mu\text{mol/l}$, 11,2 mg/l), 200x (55,5 $\mu\text{mol/l}$, 22,4 mg/l), 100x (101 $\mu\text{mol/l}$, 44,8 mg/l), 50x (202 $\mu\text{mol/l}$, 89,6 mg/l) a 25x (404 $\mu\text{mol/l}$, 179,2 mg/l). Tyto roztoky byly proměřeny v aniontovém elektrolytovém systému.

2.5 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ VZORKŮ

Vzorek 1: Jedna tableta B-komplexu od firmy Generica byla rozdrobena v achátové třecí misce, kvantitativně převedena do 50 ml odměrné baňky a doplněna destilovanou vodou po rysku. Před samotnou analýzou byl takto připravený roztok zředěn 20x. Poté byl připraven roztok vzorku se standardním přídatkem pantothenátu a kyseliny listové připravený smícháním 0,25 ml původního neředěného roztoku vzorku s 25 μl roztoku standardu o koncentraci 4,8 g/l (navýšení koncentrace o 24 mg/l), poté bylo vše doplněno destilovanou vodou na 5 ml.

Vzorek 2: V achátové třecí misce byla rozdrobena jedna tableta B-komplexu od firmy Zentiva, kvantitativně převedena do 50 ml odměrné baňky a doplněna destilovanou vodou po rysku. Takto připravený roztok byl zředěn 10x. Dále byl připraven roztok vzorku se standardním přídatkem pantothenátu připravený smícháním 0,5 ml původního neředěného roztoku vzorku s 25 μl roztoku standardu o koncentraci 2,05 g/l (navýšení koncentrace o 10,23 mg/l), poté bylo vše doplněno destilovanou vodou na 5 ml.

Vzorek 3: Tableta B-komplexu Forte od firmy Dr. Max byla vložena do achátové třecí misky, rozdrobena, kvantitativně převedena do 50 ml odměrné baňky a doplněna destilovanou vodou po rysku. Před samotnou analýzou byl tento roztok zředěn 10x. Poté byl připraven roztok vzorku se standardním přídatkem pantothenátu připravený smícháním 0,5 ml původního neředěného roztoku vzorku s 25 µl roztoku standardu o koncentraci 2,05 g/l (navýšení koncentrace o 10,23 mg/l), vše bylo doplněno destilovanou vodou na 5 ml.

Vzorek 4: Jedna tableta Biosilu Plus od firmy Naturvita byla rozdrobena v achátové třecí misce, kvantitativně převedena do 50 ml odměrné baňky a doplněna destilovanou vodou po rysku. Roztok byl před samotnou analýzou zředěn 5x. Dále byl připraven roztok vzorku se standardním přídatkem pantothenátu připravený smícháním 1 ml původního neředěného roztoku vzorku s 25 µl roztoku standardu o koncentraci 2,05 g/l (navýšení koncentrace o 10,23 mg/l), poté bylo vše doplněno destilovanou vodou na 5 ml.

Vzorek 5: V achátové třecí misce byla rozdrobena jedna tableta Acidum Folicum od firmy Zentiva, kvantitativně převedena do 50 ml odměrné baňky a doplněna destilovanou vodou po rysku. Takto připravený roztok byl před samotnou analýzou zředěn 10x. Byl připraven roztok vzorku se standardním přídatkem kyseliny listové připravený smícháním 0,5 ml původního neředěného roztoku vzorku s 25 µl roztoku standardu o koncentraci 8,82 g/l (navýšení koncentrace o 44,1 mg/l), poté bylo vše doplněno destilovanou vodou na 5 ml.

2.6 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ

Elektroforetický analyzátor EA 102, Villa Labeco, Slovensko

Laboratorní pH metr Sentron, Nizozemí

Magnetické míchadlo Fisher Scientific, ČR

Analytické váhy KERN ABT 120-4M, KERN a Sohn GmbH, Německo

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

Pipety Biohit a Finnpiquette

Obměrné baňky, kádinky, teploměr

K měření byly používány dva stejné izotachforetické analyzátory s různými kolonami. Jedná se o dvoukolonové elektroforetické analyzátory EA 102 (VILLA LABECO, Spišská Nová Ves, Slovensko). První z nich měl předseparační kolonu dlouhou 160 mm o průměru 0,8 mm a jeho analytická kolona byla dlouhá 160 mm a měla průměr 0,3 mm. Druhý z elektroforetických analyzátorů se lišil jen délkou předseparační kolony, která byla 90 mm. Na konci každé kolony byl zabudován vodivostní detektor. Vzorky byly vnášeny dávkovacím kohoutem. Vyhodnocení i řízení analýzy bylo prováděno pomocí počítačového programu ITPPro.

2.7 POUŽITÉ ELEKTROLYTOVÉ SYSTÉMY

Vedoucí elektrolyt: 0,01 M histidinchlorid + histidin (pH 6,2)

Vedoucí elektrolyt (leading) byl připraven navážením 1,0485 g histidinchloridu do 500 ml odměrné baňky a doplněním po rysku destilovanou vodou. Poté bylo pH roztoku upraveno na hodnotu 6,2 pomocí přídatku pevného histidinu.

Koncový elektrolyt: 0,01 M kyselina 2-morfolinethansulfonová (MES)

Koncový elektrolyt (terminátor) byl připraven navážením 0,7808 g kyseliny 2-morfolinethansulfonové do 400 ml odměrné baňky a doplněním po rysku destilovanou vodou.

2.8 PODMÍNKY ANALÝZY

Izotachforetická analýza byla uskutečněna v aniontovém režimu. V případě měření vzorků probíhala na obou kolonách. Hnací proud byl nastaven na předseparační koloně na 250 μA a na analytické koloně 50 μA a před detekcí byl snížen na 30 μA . Při zkouškách stability byla používána pouze předseparační kolona, kde byl hnací proud nastaven na 250 μA .

2.9 VYHODNOCENÍ EXPERIMENTÁLNÍCH DAT

Relativní výška signálu tzv. RSH byla použita pro vyhodnocení jednotlivých dat. Vypočítá se podle vzorce:

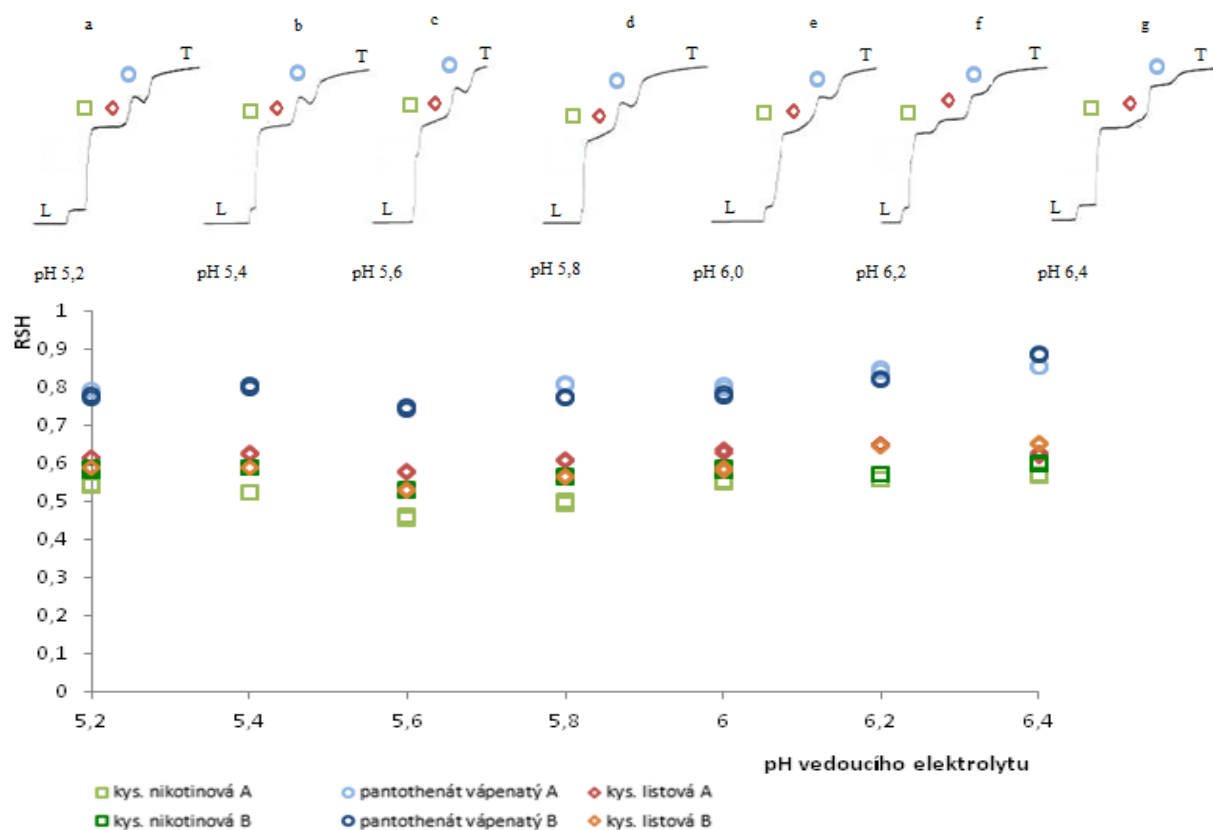
$$\text{RSH} = \frac{S - L}{T - L} \cdot 100$$

kde **L** je velikost signálu vedoucího elektrolytu, **T** je velikost signálu koncového elektrolytu a **S** je velikost signálu analyzovaného iontu.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 VOLBA OPTIMÁLNÍHO ELEKTROLYTOVÉHO SYSTÉMU

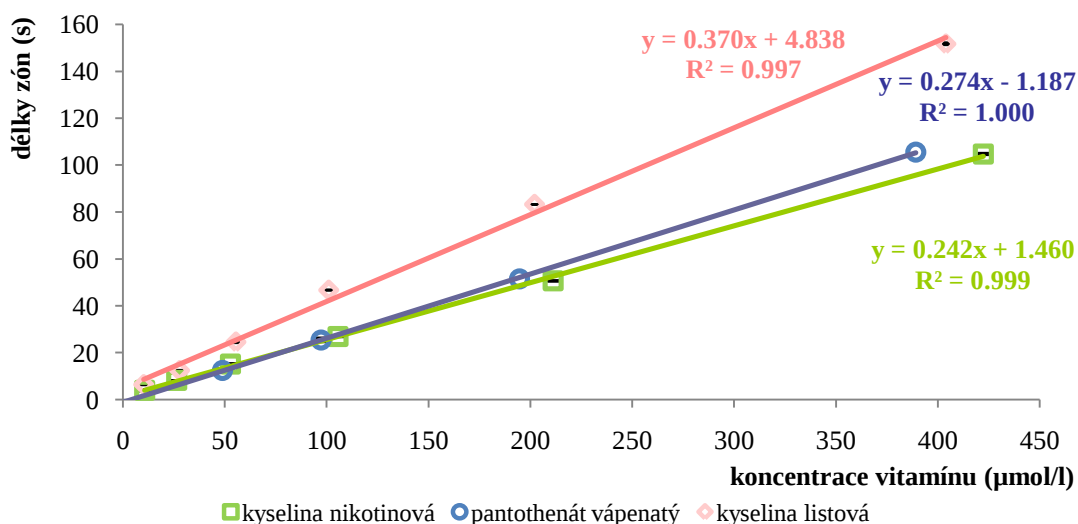
Prvním úkolem v experimentální části práce bylo zjistit, jaký elektrolytový systém bude nejvhodnější k analýze vitamínů aniontového charakteru (tj. kyseliny nikotinové, pantothenátu a kyseliny listové). Cílem bylo najít takový elektrolytový systém, ve kterém, by bylo možné stanovit všechny zmíněné vitamíny během jedné analýzy. Byly zkoušeny elektrolytové systémy s vedoucím elektrolytem o různém pH v rozmezí od 5,2 do 6,4. Problémem většiny elektrolytových systémů bylo to, že rychlost migrace kyseliny nikotinové a kyseliny listové byla stejná, tudíž nedocházelo k jejich rozdělení. K úspěšné separaci všech tří vitamínů došlo pouze v elektrolytovém systému s vedoucím elektrolytem o pH 6,2. Proto byl tento systém používán k dalším analýzám.



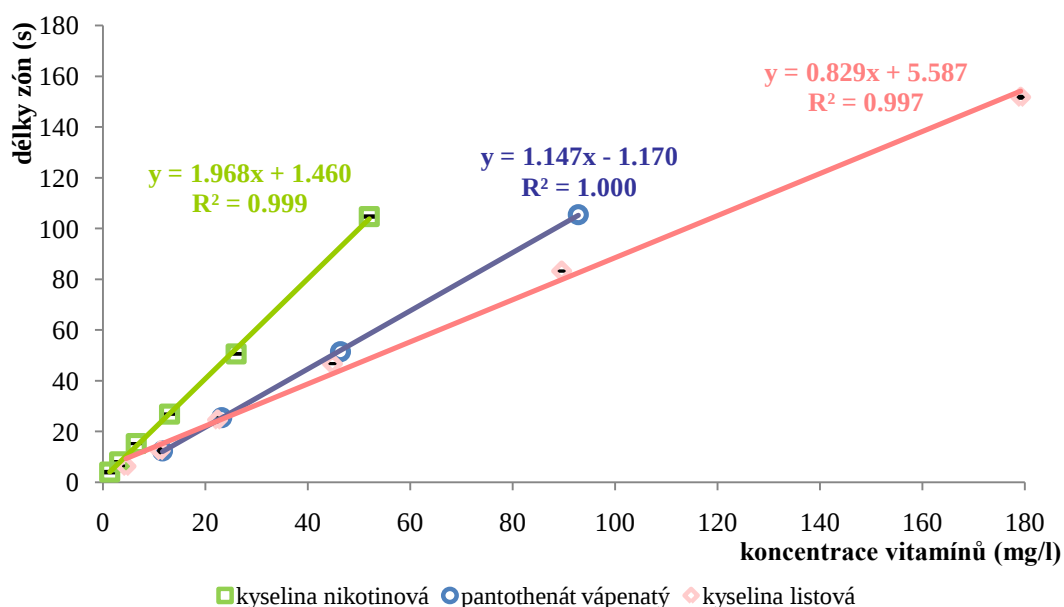
Graf 1: Vliv pH na separaci analyzovaných vitamínů, A – samotný vitamín, B – vitamín analyzovaný ve směsi. Nad grafem se nacházejí záznamy analýz při pH 5,2; 5,4; 5,6; 5,8; 6,0; 6,2 a 6,4 s označenými zónami.

3.2 KALIBRAČNÍ ZÁVISLOST

Ke zjištění kalibračních závislostí jednotlivých vitamínů byla proměřená řada jejich standardů. Měření byla provedena na obou kolonách – předseparační i analytické. Byly zhotoveny dvě křivky, jedna pro látkovou a jedna pro hmotnostní koncentraci. Kalibrační křivky s rovnicemi regrese jsou uvedeny v Grafu 2 a 3. Výsledky měření jsou zaznamenány v Tabulce 12 a 13, které se nacházejí v přílohách.



Graf 2: Kalibrační křivka za použití látkové koncentrace



Graf 3: Kalibrační křivka za použití hmotnostní koncentrace

3.3 MEZ DETEKCE A MEZ STANOVENÍ

Jako mez stanovení pro analýzu byla zvolena koncentrace, která se projevuje zónou o délce 1 sekunda a mez detekce měla obdobně délku zóny 0,33 sekund (třetina meze stanovení). Ze směrnice kalibrační křivky dosazením příslušných délek zón byly vypočteny koncentrace odpovídající mezi detekce a mezi stanovení. Zjištěné meze detekce a stanovení daných vitamínů jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4: Mez detekce a mez stanovení

	Kyselina nikotinová	Pantothenát	Kyselina listová
mez detekce (μmol/l)	1,38	1,22	0,91
mez detekce (mg/l)	0,17	0,29	0,4
mez stanovení (μmol/l)	4,13	3,65	2,7
mez stanovení (mg/l)	0,51	0,87	1,21

3.4 REPRODUKOVATELNOST METODY

Pro zjištění reprodukovatelnosti, charakterizované relativní směrodatnou odchylkou (RSD), bylo provedeno pět měření standardních roztoků o koncentraci 0,1 mmol/l. Relativní směrodatná odchylka byla vypočítána podělením směrodatné odchylky průměrnou hodnotou délky zóny, kdy směrodatná odchylka byla získána pomocí programu Microsoft Office Excel 2007. Relativní směrodatná odchylka byla následně vynásobena stem, aby byla získána hodnota v procentech. Výsledky měření reprodukovatelnosti metody jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5: Reprodukovatelnost metody

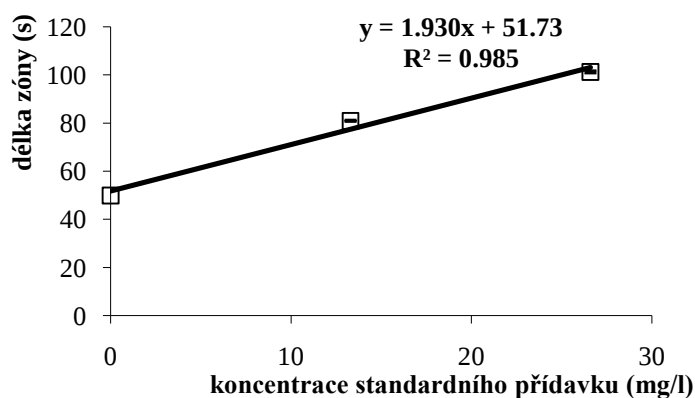
měření \ délka zóny (s)	kyselina nikotinová	kyselina listová	pantothenát vápenatý
1	16,18	91,66	28,44
2	16,87	86,78	28,41
3	15,96	87,17	29,79
4	15,85	86,98	30,84
5	16,54	88,49	29,63
průměr (s)	16,28	88,22	29,42
směrodatná odchylka (s)	0,42	2,04	1,02
reprodukovatelnost (%)	2,59	2,31	3,47

3.5 VÝTĚŽNOST METODY

Kyselina nikotinová

Pro zjištění výtěžnosti byly postupně proměřeny tři roztoky. První roztok vznikl odpipetováním 2 ml standardního roztoku o koncentraci 675 mg/l do 50 ml odměrné baňky. Roztok byl doplněn po rysku destilovanou vodou. Koncentrace kyseliny nikotinové v tomto roztoku činila 27 mg/l. Dále byl proměřen druhý roztok vzniklý smícháním 2 ml

standardního roztoku o koncentraci 675 mg/l a 1 ml roztoku o koncentraci 665 mg/l (1. standardní přídavek) do 50 ml odměrné baňky. To vše bylo doplněno destilovanou vodou po rysku. Celková koncentrace kyseliny nikotinové ve druhém roztoku činila 40,3 mg/l (koncentrace standardního přídavku 13,3 mg/l). Třetí roztok tvořily 2 ml standardního roztoku o koncentraci 675 mg/l a 2 ml roztoku o koncentraci 665 mg/l (2. standardní přídavek) v 50 ml odměrné baňce, která byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Celková koncentrace kyseliny nikotinové ve třetím roztoku činila 53,6 mg/l (koncentrace standardního přídavku 26,6 mg/l). Nakonec byla sestrojena závislost délek zón na koncentraci standardního přídavku (Graf 4) a z rovnice regrese byla vypočítána koncentrace modelového roztoku $26,8 \pm 0,1$ mg/l. Výsledky výtěžnosti kyseliny nikotinové jsou zaznamenány v Tabulce 14, která se nachází v přílohách.

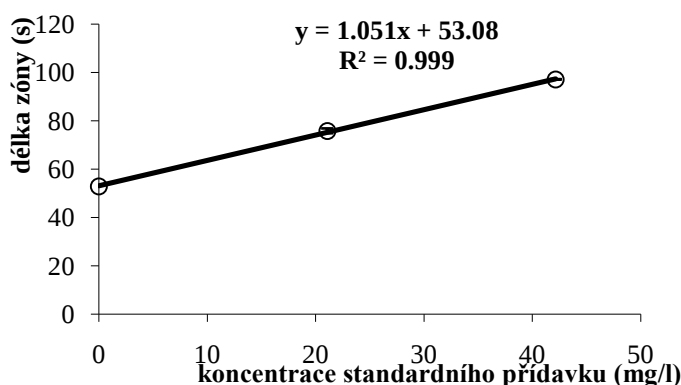


Graf 4: Závislost délky zóny na koncentraci standardního přídavku kyseliny nikotinové

Pantothenát

K výpočtu výtěžnosti byly postupně proměřeny tři roztoky. První roztok vznikl odpipetováním 2 ml standardního roztoku o koncentraci 1180 mg/l do 50 ml odměrné baňky. Roztok byl doplněn po rysku destilovanou vodou. Koncentrace pantothenátu v tomto roztoku činila 47,2 mg/l. Dále byl proměřen druhý roztok vzniklý smícháním 2 ml standardního roztoku o koncentraci 1180 mg/l a 1 ml roztoku o koncentraci 1055 mg/l (1. standardní přídavek) do 50 ml odměrné baňky. To vše bylo doplněno destilovanou vodou po rysku. Celková koncentrace pantothenátu ve druhém roztoku činila 68,3 mg/l (koncentrace standardního přídavku 21,1 mg/l). Třetí roztok tvořily 2 ml standardního roztoku o koncentraci 1180 mg/l a 2 ml roztoku o koncentraci 1055 mg/l (2. standardní přídavek) v 50 ml odměrné baňce, která byla doplněna po rysku destilovanou vodou.

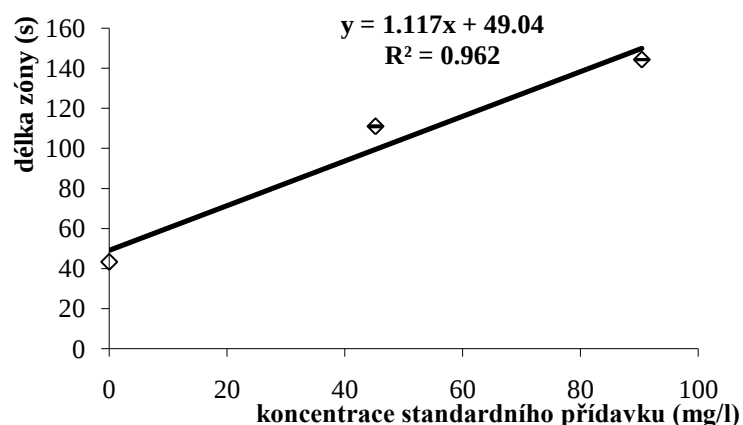
Celková koncentrace pantothenátu ve třetím roztoku činila 89,4 mg/l (koncentrace standardního přídávku 42,2 mg/l). Poté byla sestrojena závislost délek zón na koncentraci standardního přídávku (Graf 5) a z rovnice regrese byla vypočítána koncentrace modelového roztoku $50,5 \pm 0,7$ mg/l. Výsledky výtěžnosti pantothenátu jsou zaznamenány v Tabulce 15, která se nachází v přílohách.



Graf 5: Závislost délky zóny na koncentraci standardního přídávku pantothenátu

Kyselina listová

Pro zjištění výtěžnosti byly postupně proměřeny tři roztoky. První roztok vznikl odpipetováním 2 ml standardního roztoku o koncentraci 1145 mg/l do 50 ml odměrné baňky. Roztok byl doplněn po rysku destilovanou vodou. Koncentrace kyseliny listové v tomto roztoku činila 45,8 mg/l. Dále byl proměřen druhý roztok vzniklý smícháním 2 ml standardního roztoku o koncentraci 1145 mg/l a 1 ml roztoku o koncentraci 2260 mg/l (1. standardní přídavek) do 50 ml odměrné baňky. To vše bylo doplněno destilovanou vodou po rysku. Celková koncentrace kyseliny listové ve druhém roztoku činila 91 mg/l (koncentrace standardního přídávku 45,2 mg/l). Třetí roztok tvořily 2 ml standardního roztoku o koncentraci 1145 mg/l a 2 ml roztoku o koncentraci 2260 mg/l (2. standardní přídavek) v 50 ml odměrné baňce, která byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Celková koncentrace kyseliny listové ve třetím roztoku činila 136,2 mg/l (koncentrace standardního přídávku 90,4 mg/l). Dále byla sestrojena závislost délek zón na koncentraci standardního přídávku (Graf 6) a z rovnice regrese byla vypočítána koncentrace modelového roztoku $43,9 \pm 0,1$ mg/l. Výsledky výtěžnosti kyseliny listové jsou zaznamenány v Tabulce 16, která se nachází v přílohách.



Graf 6: Závislost délky zóny na koncentraci standardního přídatku kyseliny listové

3.6 ANALÝZA REÁLNÝCH VZORKŮ

Vzorek 1: B-komplex od firmy Generica byl proměřen nejdříve bez standardního přídatku a poté i se standardním přídatkem (příprava viz kapitola 2.5). V tomto vzorku byl analyzován obsah pantothenátu a kyseliny listové, kyselina nikotinová nebyla v preparátu přítomná. Hodnoty délek zón a směrodatných odchylek se nacházejí v příloze v Tabulce 17. Obsahy pantothenátu a kyseliny listové v tabletě deklarované výrobcem a zjištěné obsahy bez i se standardním přídatkem jsou zaznamenány v Tabulce 6 a 7.

Tabulka 6: Deklarovaný a zjištěný obsah pantothenátu v tabletě B-komplexu od firmy Generica

B-komplex (Generica)	množství pantothenátu v tabletě	relativní množství
udáváno výrobcem	40,0 mg	-
kalibrační křivka	43,6 ± 0,7 mg	109,0 ± 1,8 %
st. přídavek	37,4 ± 0,4 mg	93,5 ± 1,0 %

Tabulka 7: Deklarovaný a zjištěný obsah kyseliny listové v tabletě B-komplexu od firmy Generica

B-komplex (Generica)	množství kyseliny listové v tabletě	relativní množství
udáváno výrobcem	1 mg	-
kalibrační křivka	$0,9 \pm 0,1$ mg	$90,0 \pm 1,8$ %
st. přídavek	$0,9 \pm 0,1$ mg	$90,0 \pm 1,0$ %

Vzorek 2: B-komplex od firmy Zentiva byl proměřen nejdříve bez standardního přídávku a poté i se standardním přídavkem (příprava viz kapitola 2.5). V tomto vzorku byl stanovován pouze obsah pantothenátu. Hodnoty délek zón a směrodatných odchylek se nacházejí v příloze v Tabulce 17. Obsah kyseliny pantothenové v tabletě deklarovaný výrobcem a zjištěné obsahy bez i se standardním přídavkem jsou zaznamenány v Tabulce 8.

Tabulka 8: Deklarované a zjištěné obsahy kyseliny pantothenové v tabletě B-komplexu od firmy Zentiva

B-komplex (Zentiva)	množství v tabletě	relativní množství
udáváno výrobcem	3,0 mg	-
kalibrační křivka	$3,1 \pm 0,1$ mg	$103,3 \pm 3,3$ %
st. přídavek	$2,9 \pm 0,1$ mg	$93,5 \pm 3,3$ %

Vzorek 3: B-komplex od firmy Dr. Max byl proměřen nejdříve bez standardního přídávku a poté i se standardním přídavkem (příprava viz kapitola 2.5). V tomto vzorku byl stanovován obsah kyseliny pantothenové. Hodnoty délek zón a směrodatných odchylek se nacházejí v příloze v Tabulce 17. Obsah kyseliny pantothenové v tabletě deklarovaný výrobcem a zjištěné obsahy bez i se standardním přídavkem jsou zaznamenány v Tabulce 9.

Tabulka 9: Deklarované a zjištěné obsahy kyseliny pantothenové v tabletě B-komplexu Forte od firmy Dr. Max

B-komplex Forte (Dr. Max)	množství v tabletě	relativní množství
udáváno výrobcem	25,0 mg	-
kalibrační křivka	$27,6 \pm 0,1$ mg	$110,4 \pm 0,4$ %
st. přídavek	$24,0 \pm 0,1$ mg	$96,0 \pm 0,4$ %

Vzorek 4: Biosil Plus od firmy Naturvita byl proměřen nejdříve bez standardního přídavku a poté i se standardním přídavkem (příprava viz kapitola 2.5). V tomto vzorku byla z hodnocených vitamínů přítomná pouze kyselina pantothenová. Hodnoty délek zón a směrodatných odchylek se nacházejí v příloze v Tabulce 17. Obsah kyseliny pantothenové deklarovaný výrobcem a zjištěné obsahy bez i se standardním přídavkem jsou zaznamenány v Tabulce 10.

Tabulka 10: Deklarované a zjištěné obsahy kyseliny pantothenové v tabletě Biosilu Plus od firmy Naturvita

Biosil Plus (Naturvita)	množství v tabletě	relativní množství
udáváno výrobcem	6,0mg	-
kalibrační křivka	$6,3 \pm 0,4$ mg	$105,0 \pm 6,7$ %
st. přídavek	$6,3 \pm 0,2$ mg	$105,0 \pm 3,3$ %

Vzorek 5: Acidum folicum od firmy Zentiva byl proměřen nejdříve bez standardního přídavku a poté i se standardním přídavkem (příprava viz kapitola 2.5). V tomto vzorku byl stanoven obsah kyseliny listové. Hodnoty délek zón a směrodatných odchylek se nacházejí v příloze v Tabulce 16. Obsah kyseliny listové deklarovaný výrobcem a zjištěné obsahy bez i se standardním přídavkem jsou zaznamenány v Tabulce 11.

Tabulka 11: Udávané a zjištěné koncentrace kyseliny listové v Acidum folicum od firmy Zentiva

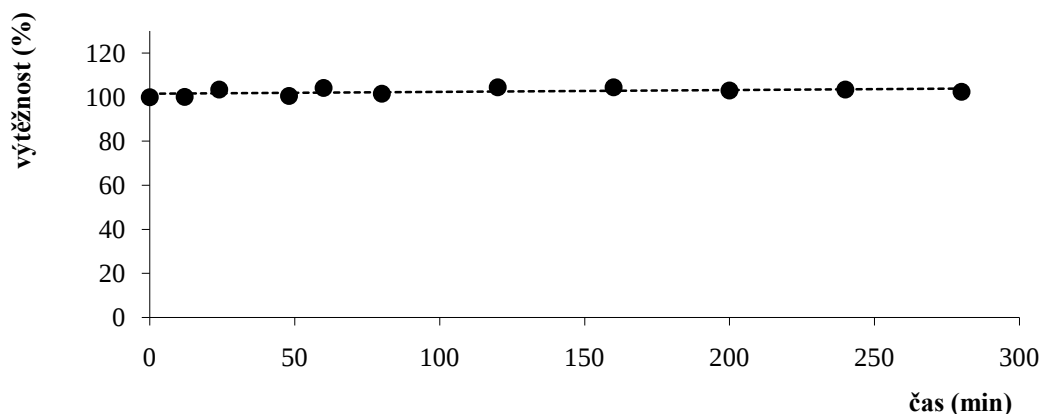
Acidum Folicum	množství v tabletě	relativní množství
udáváno výrobcem	10,0 mg	-
kalibrační křivka	$12,6 \pm 0,7$ mg	$126,0 \pm 7,0$ %
st. přídavek	$9,4 \pm 0,2$ mg	$94,0 \pm 2,0$ %

3.7 ZKOUŠKY STABILITY VITAMÍNŮ

3.7.1 STÁNÍ ZA LABORATORNÍ TEPLoty

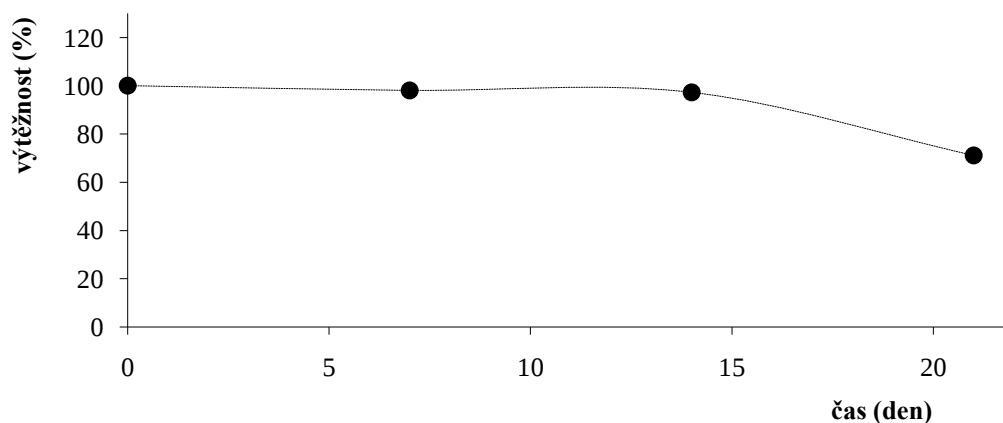
Kyselina nikotinová

Po přípravě 0,001 M roztoku kyseliny nikotinové byla část roztoku odlita do kádiny a proměřena, zbytek byl nechán stát. Poté byl roztok proměřován po 12, 24, 48, 60, 80, 120, 160, 200, 240 a 280 minutách. Nakonec byl vytvořen graf závislosti výtěžnosti na čase (Graf 7), kde výtěžnost byla vypočítána z délky zóny vitamínu změřené v určitém čase podělené délkou zóny v čase přípravy a vynásobené stem, aby byl výsledek v procentech. Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 18, která se nachází v přílohách.



Graf 7: Závislost výtěžnosti na čase při stání roztoku kyseliny nikotinové za laboratorní teploty

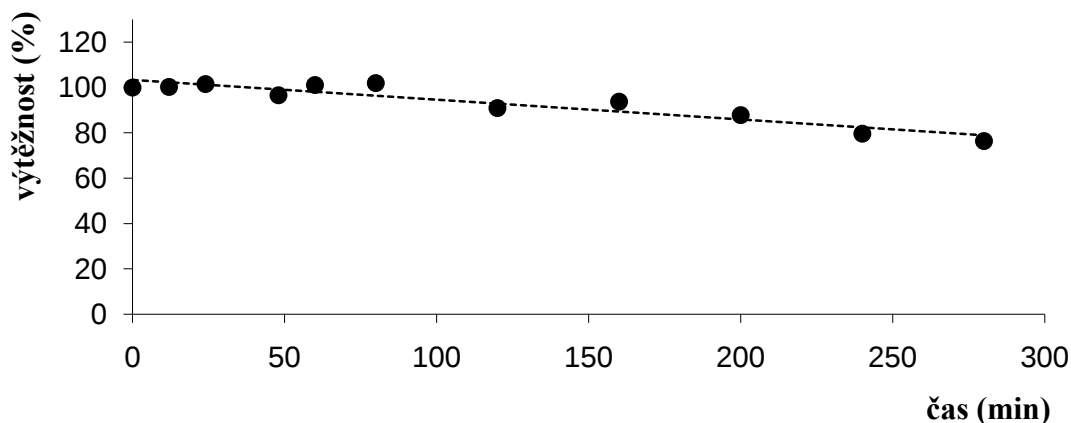
Tento roztok byl nechán stát ještě dalších 21 dní a po týdnu byl vždy proměřen stejným způsobem. Byl opět vytvořen graf závislosti výtěžnosti na čase (Graf 8). Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 21, která se nachází v přílohách.



Graf 8: Závislost výtěžnosti na čase při stání roztoku kyseliny nikotinové za laboratorní teploty po 21 dní

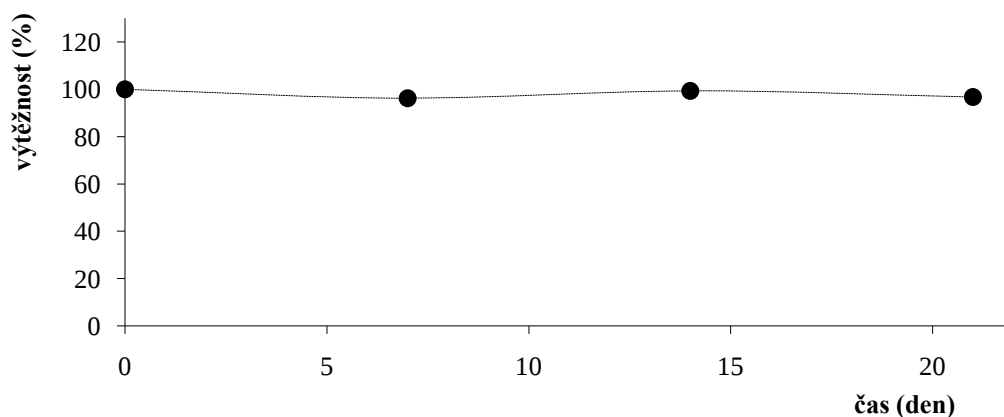
Pantothenát

0,001 M roztok pantothenátu byl ihned po jeho přípravě proměřen tak, že část roztoku byla odlita do kádiny a proměřena, zbytek byl nechán stát. Poté byl roztok proměřován po 12, 24, 48, 60, 80, 120, 160, 200, 240 a 280 minutách. Nakonec byl vytvořen graf závislosti výtěžnosti na čase (Graf 9), kde výtěžnost byla vypočítána stejně jako v případě kyseliny nikotinové. Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 19, která se nachází v přílohách.



Graf 9: Závislost výtěžnosti na čase při stání roztoku pantothenátu za laboratorní teploty

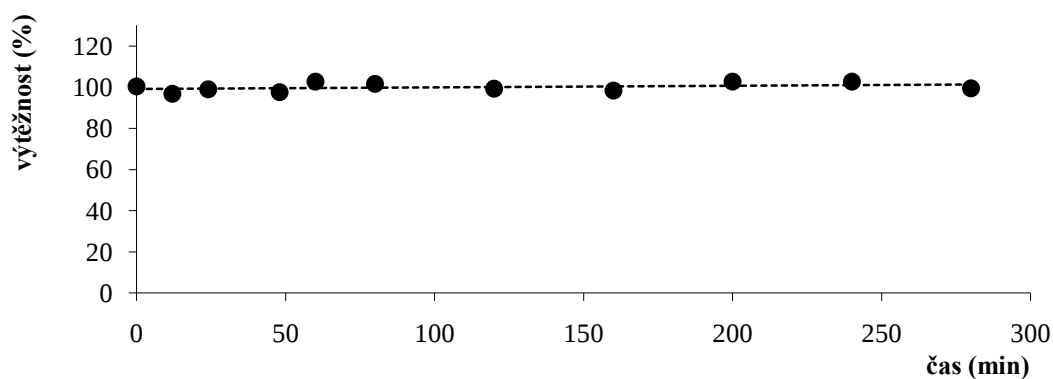
Tento roztok byl nechán stát ještě dalších 21 dní a po týdnu byl vždy proměřen stejným způsobem. Byl opět vytvořen graf závislosti výtěžnosti na čase (Graf 10). Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 22, která se nachází v přílohách.



Graf 10: Závislost výtěžnosti na čase při stání roztoku pantothenátu za laboratorní teploty po 21 dní

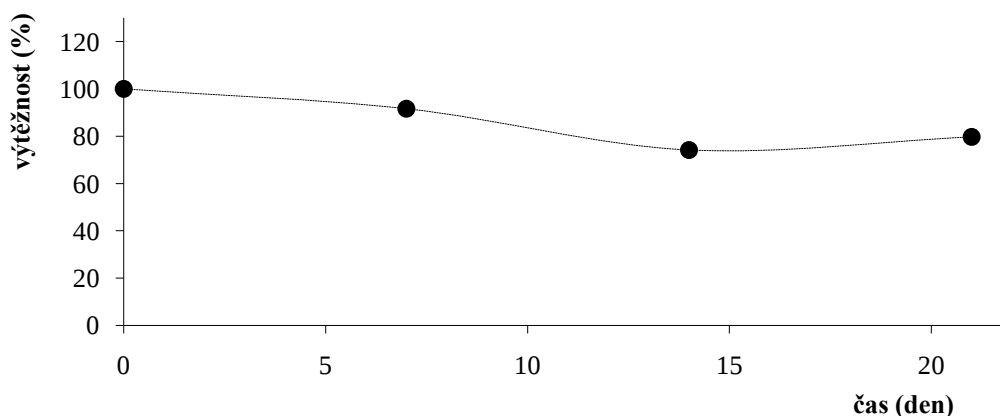
Kyselina listová

Část 0,001 M roztoku kyseliny listové byla ihned po jeho přípravě odlita do kádiny a proměřena, zbytek byl nechán stát. Poté byl roztok proměřován po 12, 24, 48, 60, 80, 120, 160, 200, 240 a 280 minutách. Nakonec byl vytvořen graf závislosti výtěžnosti na čase (Graf 11), kde výtěžnost byla vypočítána stejně jako v předchozích případech. Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 20, která se nachází v přílohách.



Graf 11: Závislost výtěžnosti na čase při stání roztoku kyseliny listové za laboratorní teploty

Tento roztok byl nechán stát ještě dalších 21 dní a po týdnu byl vždy proměřen. Byl opět vytvořen graf závislosti výtěžnosti na čase (Graf 12). Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 23, která se nachází v přílohách.



Graf 12: Závislost výtěžnosti na čase při stání roztoku kyseliny listové za laboratorní teploty po 21 dní

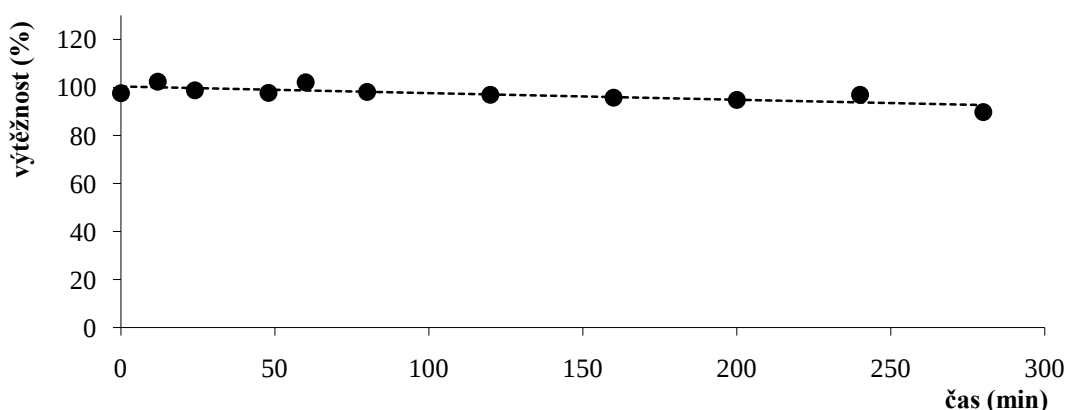
Po proměření všech tří roztoků vitamínů během stání při laboratorní teplotě byly všechny tři roztoky vitamínů stabilní po dobu 280 min. Při ponechání vitamínů po dobu několika dnů se jako nejstabilnější jevil pantothenát, jehož koncentrace neklesla ani po 21 dnech. Roztok kyselina nikotinové byl stabilní po dobu 14 dnů, ale po 21 dnech její koncentrace klesla na přibližně 70 % původní hodnoty. Koncentrace kyseliny listové se

snížovala postupně, mírný pokles byl zaznamenán už po 7 dnech. Během 14 dní její koncentrace klesla na 80 % původní hodnoty a dále se nesnižovala.

3.7.2 ZAHŘÍVÁNÍ NA 50 °C

Kyselina nikotinová

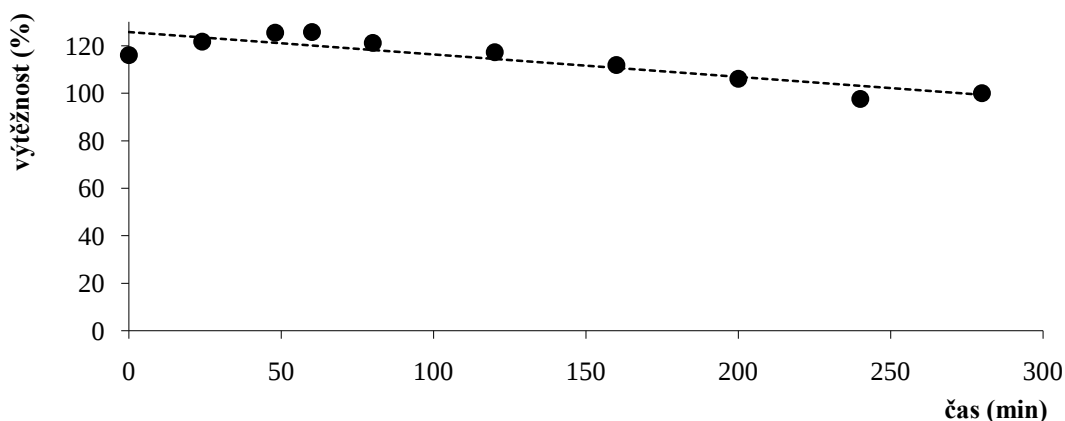
0,001 M roztok kyseliny nikotinové byl proměřen a vložen do vodní lázně, kde byl zahřát na 50 °C. Po dosažení 50 °C byl roztok vyndán, odlit do kádiny, znovu proměřen a vložen zpět do lázně. Takto byl proměřován i po 12, 24, 48, 60, 80, 120, 160, 200, 240 a 280 minutách. Nakonec byl vytvořen graf závislosti výtěžnosti na čase (Graf 13), kde výtěžnost byla vypočítána jako délka zóny naměřená po ochlazení zahřívaného roztoku v určitém čase podělená délkou zóny získanou proměřením téhož nezahřátého roztoku a vynásobená stem, aby byl výsledek v procentech. Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 18, která se nachází v přílohách.



Graf 13: Závislost výtěžnosti na čase roztoku kyseliny nikotinové při zahřátí na 50 °C

Pantothenát

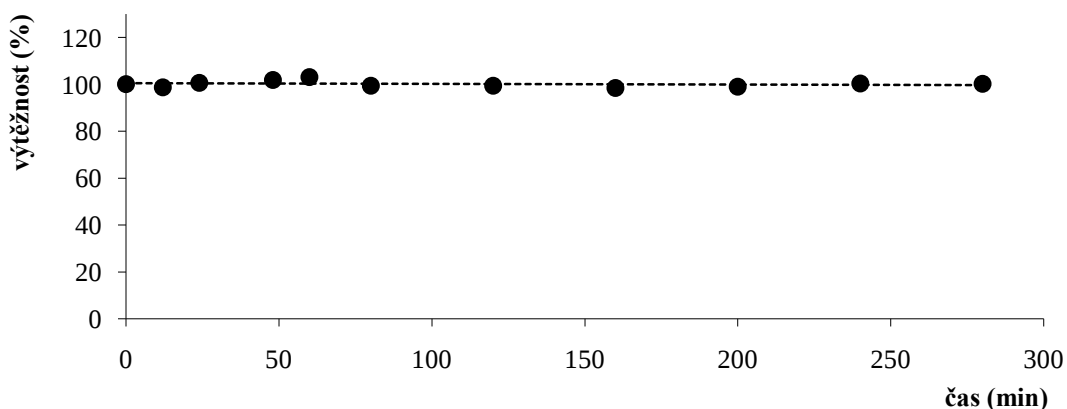
0,001 M roztok pantothenátu byl proměřen a vložen do vodní lázně, kde byl zahřát na 50 °C. Po dosažení 50 °C byl roztok znovu proměřen (obdobným způsobem jako u kyseliny nikotinové) a vložen zpět do lázně. Takto byl proměřován i po 12, 24, 48, 60, 80, 120, 160, 200, 240 a 280 minutách. Nakonec byl vytvořen graf závislosti výtěžnosti na čase (Graf 14), kde výtěžnost byla vypočítána stejně jako v případě kyseliny nikotinové. Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 19, která se nachází v přílohách.



Graf 14: Závislost výtěžnosti na čase roztoku pantothenátu při zahřátí na 50 °C

Kyselina listová

0,001 M roztok kyseliny listové byl proměřen a vložen do vodní lázně, kde byl zahřát na 50 °C. Po dosažení 50 °C byl roztok znovu proměřen (obdobným způsobem jako u předchozích roztoků vitamínů) a vložen zpět do lázně. Takto byl proměřován i po 12, 24, 48, 60, 80, 120, 160, 200, 240 a 280 minutách. Nakonec byl vytvořen graf závislosti výtěžnosti na čase (Graf 15), kde výtěžnost byla vypočítána stejně jako v případě kyseliny nikotinové. Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 20, která se nachází v přílohách.



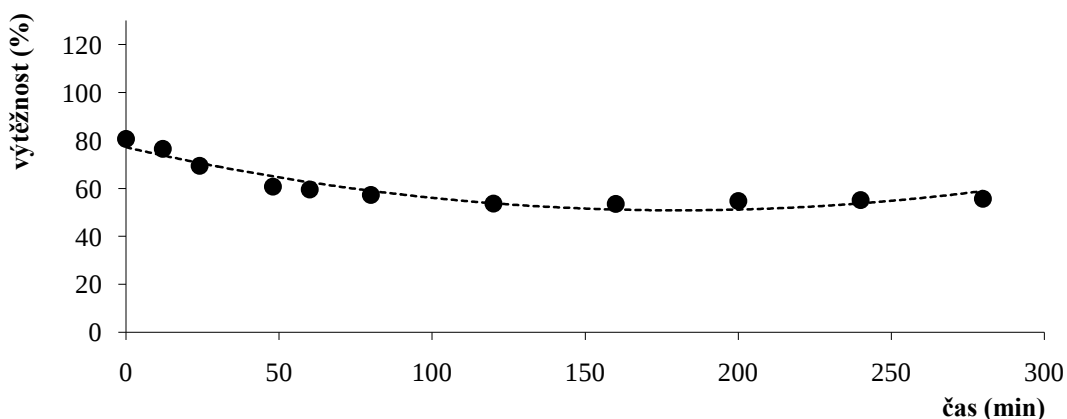
Graf 15: Závislost výtěžnosti na čase roztoku kyseliny listové při zahřátí na 50 °C

Po proměření všech tří roztoků, které byly zahřívány na 50 °C lze říci, že v tomto případě se jako nejstabilnější jevila kyselina listová (její obsah zůstával stejný), kterou následovala kyselina nikotinová (jejíž obsah s časem mírně klesal). Pantothenát vykazoval neobvyklé chování, protože délka jeho zóny po zahřátí nejprve vzrůstala a po určité době zase klesala. Toto chování zatím nebylo blíže vysvětleno.

3.7.3 ZAHŘÍVÁNÍ NA VROUCÍ VODNÍ LÁZNĚ

Kyselina nikotinová

0,001 M roztok kyseliny nikotinové byl proměřen a vložen do vodní lázně, kde byl zahřát na 96 °C. Po dosažení 96 °C byl roztok znovu proměřen a vložen zpět do lázně. Takto byl proměřován i po 12, 24, 48, 60, 80, 120, 160, 200, 240 a 280 minutách. Nakonec byl vytvořen graf závislosti výtěžnosti na čase (Graf 16), kde výtěžnost byla vypočítána jako délka zóny naměřená po ochlazení zahřívaneho roztoku v určitém čase podělená délkou zóny získanou proměřením téhož nezahřátého roztoku a vynásobená stem, aby byl výsledek v procentech. Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 18, která se nachází v přílohách.

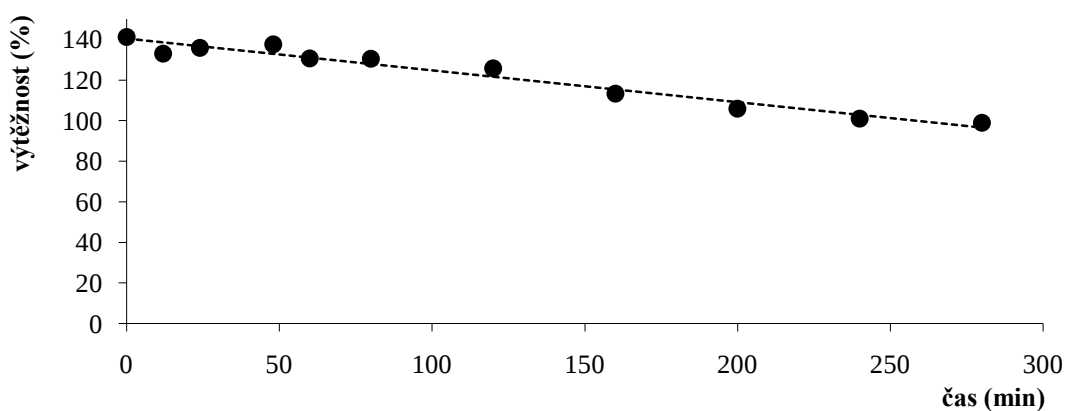


Graf 16: Závislost výtěžnosti na čase roztoku kyseliny nikotinové při zahřátí na 96 °C

Pantothenát

0,001 M roztok pantothenátu byl proměřen a vložen do vodní lázně, kde byl zahřát na 98 °C. Po dosažení 98 °C byl roztok znovu proměřen a vložen zpět do lázně. Takto byl proměřován i po 12, 24, 48, 60, 80, 120, 160, 200, 240 a 280 minutách. Nakonec byl vytvořen graf závislosti výtěžnosti na čase (Graf 17). Výtěžnost byla vypočtena stejně jako

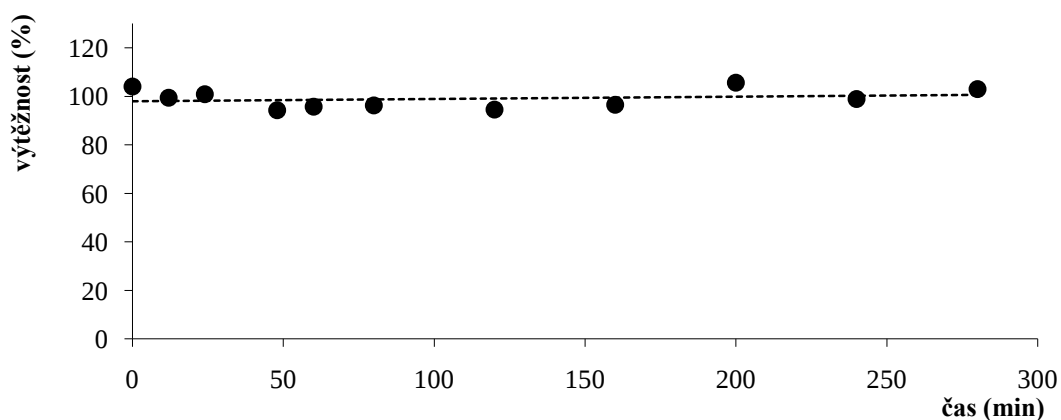
v předchozích případech. Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 19, která se nachází v přílohách.



Graf 17: Závislost výtěžnosti na čase roztoku pantothenátu při zahřátí na 98 °C

Kyselina listová

0,001 M roztok kyseliny listové byl proměřen a vložen do vodní lázně, kde byl zahřát na 97 °C. Po dosažení 97 °C byl roztok znovu proměřen a vložen zpět do lázně. Takto byl proměřován i po 12, 24, 48, 60, 80, 120, 160, 200, 240 a 280 minutách. Nakonec byl vytvořen graf závislosti výtěžnosti na čase (Graf 18), kde výtěžnost byla vypočítána stejně jako v případě ostatních vitamínů. Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 20, která se nachází v přílohách.



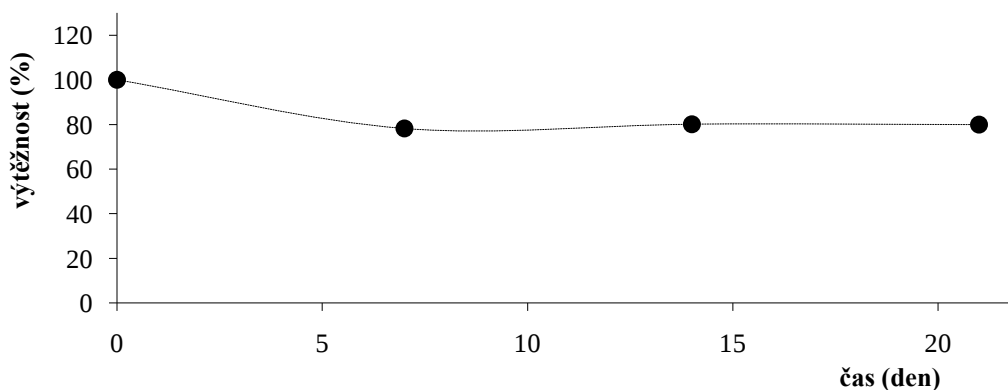
Graf 18: Závislost výtěžnosti na čase roztoku kyseliny listové při zahřátí na 97 °C

Po proměření všech tří roztoků, které byly zahřívány na vroucí vodní lázni lze říci, že stejně jako při zahřívání na 50 °C se jako nejstabilnější jevila kyselina listová, jejíž obsah se vlivem zahřívání neměnil. Obsah kyseliny nikotinové po zahřátí klesl na 80 % a poté se postupně s časem snižoval až na konečných 60 %. Pantothenát vápenatý se choval stejně jako v případě zahřívání na 50 °C, kdy po zahřátí na 100 °C se délka zóny prodloužila ještě více než při 50 °C.

3.7.4 ZMRAZENÍ

Kyselina nikotinová

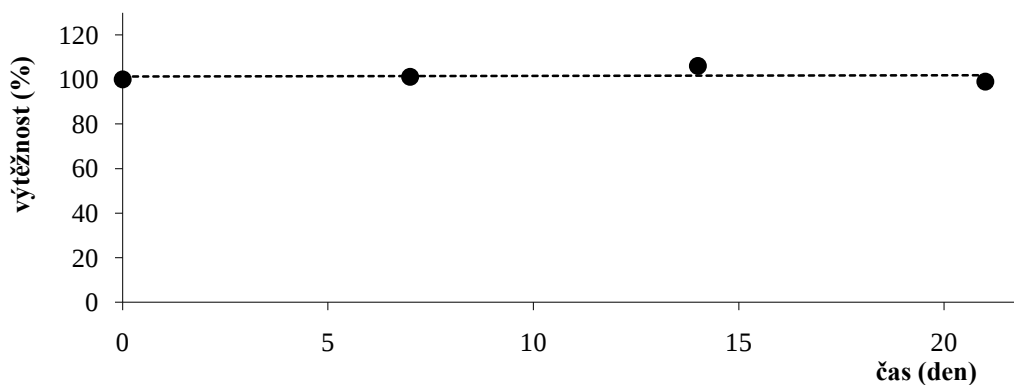
0,001 M roztok byl připraven navážením 0,0123 g kyseliny nikotinové do 100 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku. Takto připravený roztok byl vložen do mrazáku. Zmrazený roztok byl vždy nejdříve celý rozmrazen a poté proměřen po 7, 14 a 21 dnech. Byl vytvořen graf závislosti výtěžnosti na čase (Graf 19). Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 24, která se nachází v přílohách.



Graf 19: Závislost výtěžnosti na čase roztoku kyseliny nikotinové při zmrazení

Pantothenát

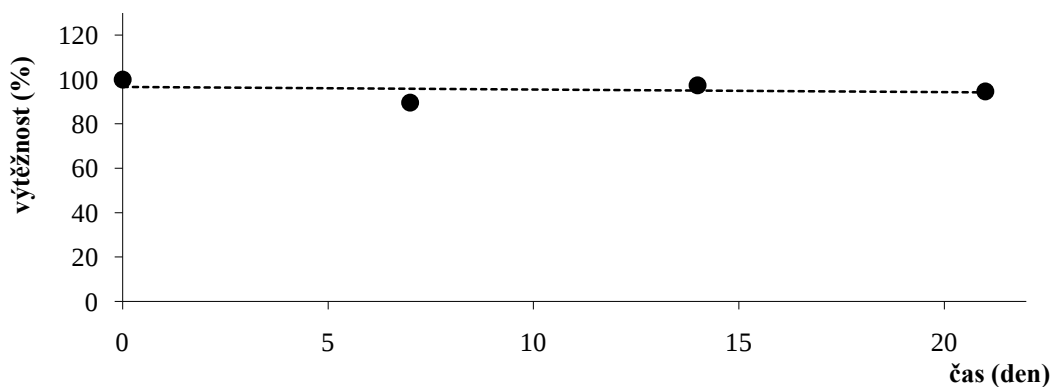
0,001 M roztok byl připraven navážením 0,0238 g pantothenátu do 100 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku. Takto připravený roztok byl vložen do mrazáku. Zmrazený roztok byl vždy nejdříve celý rozmrazen a poté proměřen po 7, 14 a 21 dnech. Byl vytvořen graf závislosti výtěžnosti na čase (Graf 20). Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 25, která se nachází v přílohách.



Graf 20: Závislost výtěžnosti na čase roztoku pantothenátu při zmrazení

Kyselina listová

0,001 M roztok byl připraven navážením 0,0441 g kyseliny listové do 100 ml odměrné baňky. Do roztoku byl přidáván roztok hydroxidu sodného tak dlouho, dokud nedošlo k vyčerení roztoku, poté byla odměrná baňka doplněna destilovanou vodou po rysku. Takto připravený roztok byl vložen do mrazáku. Zmrazený roztok byl vždy nejdříve rozmrazen a poté proměřen po 7, 14 a 21 dnech. Byl vytvořen graf závislosti výtěžnosti na čase (Graf 21). Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 26, která se nachází v přílohách.



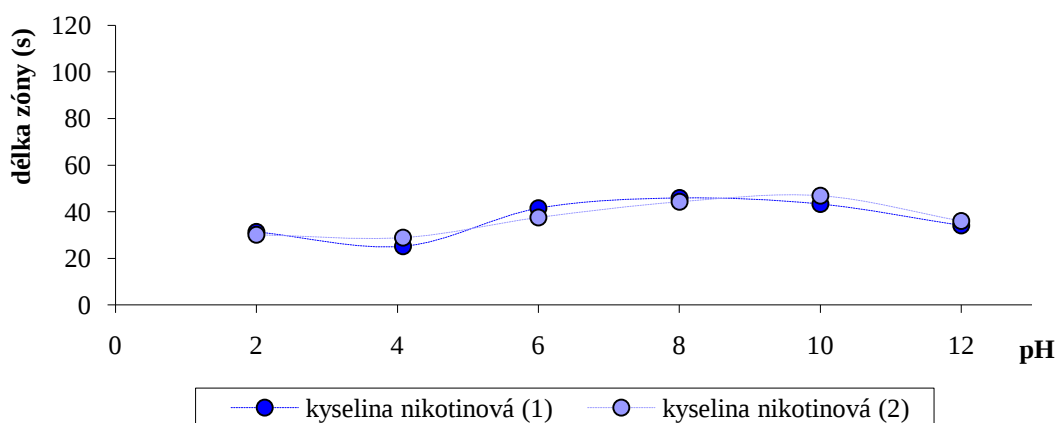
Graf 21: Závislost výtěžnosti na čase roztoku kyseliny listové při zmrazení

Po proměření všech tří roztoků, které byly vloženy do mrazáku a proměřeny po 7, 14 a 21 dnech lze říci, že pantothenát vápenatý i kyselina listová jsou stabilní, jejich koncentrace neklesá ani po 21 dnech. Kyselina nikotinová je po vystavení nízkým teplotám nejméně stabilní, už po 7 dnech dochází ke snížení koncentrace na 80 % původní hodnoty. Po 14 a 21 dnech už nedochází k dalšímu snížení koncentrace.

3.7.5 MĚŘENÍ pH

Kyselina nikotinová

Po připravení roztoku kyseliny nikotinové o koncentraci 0,001 M bylo změřeno jeho pH. Bylo zjištěno, že daný roztok má hodnotu pH 4,08. Poté byly vytvořeny další roztoky o pH 2, 6, 8, 10 a 12. pH roztoků bylo upraveno kyselinou sírovou a roztokem hydroxidu sodného. Všechny tyto roztoky byly proměřeny v den přípravy i druhý den. Byla vytvořena závislost délky zóny na pH (Graf 22). Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 27, která se nachází v přílohách.

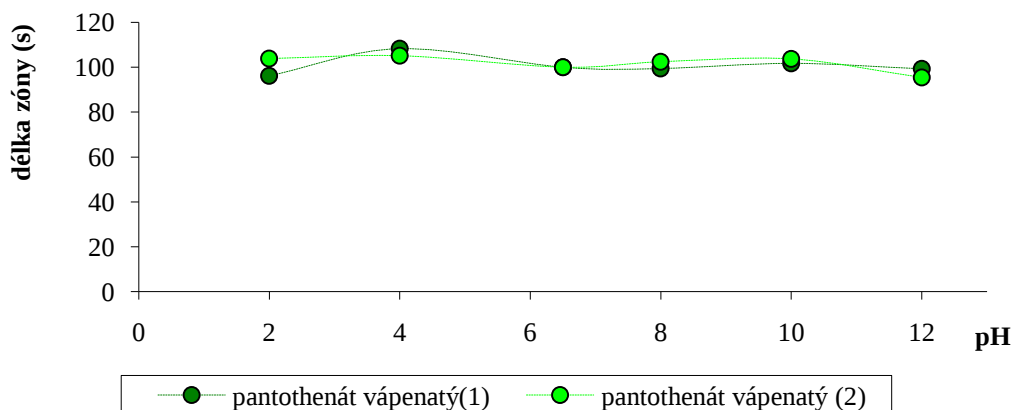


Graf 22: Závislost délky zóny na pH kyseliny nikotinové měřené ve dvou dnech

Délka zóny kyseliny nikotinové se v rozmezí pH 6 - 10 nemění, ke zkrácení dochází při pH 12 a při pH 2 a 4.

Pantothenát

Po připravení roztoku pantothenátu o koncentraci 0,001 M bylo změřeno jeho pH pomocí pH metru. Bylo zjištěno, že daný roztok má hodnotu pH 6,5. Poté byly vytvořeny další roztoky o pH 2, 4, 8, 10 a 12. pH roztoků bylo upraveno kyselinou sírovou a roztokem hydroxidu sodného. Všechny tyto roztoky byly proměřeny v den přípravy i druhý den. Byla vytvořena závislost délky zóny na pH (Graf 23). Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 28, která se nachází v přílohách.

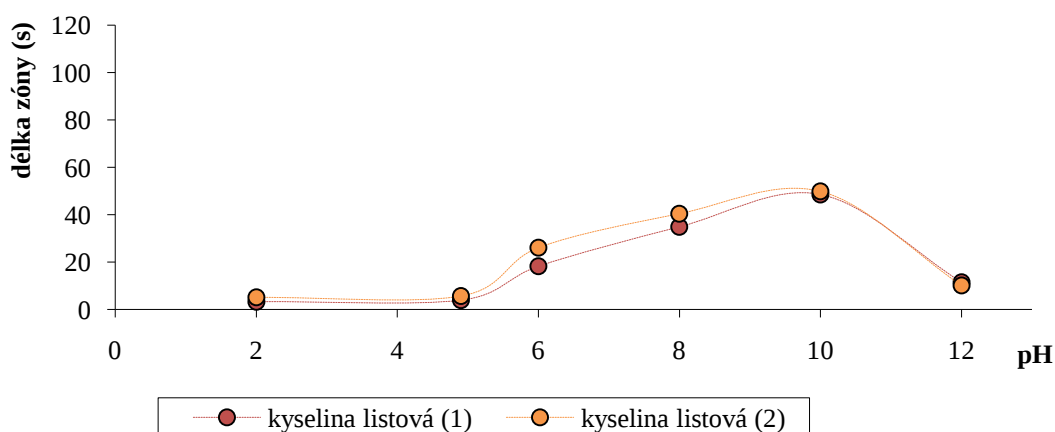


Graf 23: Závislost délky zóny na pH pantothenátu měřené ve dvou dnech

Délka zóny pantothenátu je v rozmezí pH 2 - 12 stále stejná.

Kyselina listová

Po připravení roztoku kyseliny listové o koncentraci 0,001 M bylo změřeno jeho pH pomocí pH metru. Bylo zjištěno, že daný roztok má hodnotu pH 4,9. Poté byly vytvořeny další roztoky o pH 2, 6, 8, 10 a 12. pH roztoků bylo upraveno koncentrovanou kyselinou sírovou a hydroxidem sodným. Všechny tyto roztoky byly proměřeny v den přípravy i druhý den. Byla vytvořena závislost délky zóny na pH (Graf 24). Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 29, která se nachází v přílohách.



Graf 24: Závislost délky zóny na pH kyseliny listové měřené ve dvou dnech

pH 0,001 M roztoku kyseliny listové v destilované vodě je 4,9. Při tomto pH nedochází k dostatečnému rozpuštění kyseliny, a proto je délka zóny minimální. Už při zvýšení pH na hodnotu 6 došlo ke zvýšení rozpustnosti, a tudíž i k prodloužení zóny. Optimální hodnota pH pro analýzu kyseliny listové je 10, při tomto pH je délka zóny největší.

4 ZÁVĚR

Teoretická část diplomové práce se zabývá vitamíny patřící do skupiny B-komplexu, konkrétně niacinem, kyselinou pantothenovou a kyselinou listovou. Byly zde popsány jejich chemické vlastnosti, výroba, role v organismu i jejich výskyt v potravinách a nápojích. Byl také sepsán přehled stanovení vybraných vitamínů v potravinových doplncích a potravinách se zaměřením na elektromigrační separační techniky.

První polovina experimentální části diplomové práce se zabývá izotachoforetickým stanovením vitamínů B₃, B₅ a B₉ v nejrůznějších potravinových doplncích. Jako reálné vzorky byly vzaty B-komplexy od tří různých výrobců (Zentiva, Dr. Max, Generica), Biosil Plus (Naturvita) a Acidum folicum Léčiva (Zentiva). Měření probíhalo v elektrolytovém systému, kde vedoucím elektrolytem byl 0,01 M histidin-chlorid + histidin (pH 6,2) a koncovým elektrolytem byla kyselina 2-morfolinethansulfonová (MES). Ukázalo se, že zjištěné koncentrace víceméně odpovídají koncentracím udávaným výrobcem na obalu či příbalových letácích. Naměřená množství vitamínů v reálných vzorcích byla buď stejná nebo o trochu vyšší, nikdy však nižší, než udával výrobce.

Druhá polovina experimentální části je zaměřena na zkoušky stability kyseliny nikotinové, pantothenátu vápenatého a kyseliny listové. Tyto vitamíny byly podrobeny stání za laboratorní teploty zahřáté na 50 °C a na vroucí vodní lázni, a také bylo měněno pH jejich původních roztoků na hodnoty 2, 4, 6, 8, 10 a 12. Při této analýze byl pro kyselinu nikotinovou, pantothenát a kyselinu listovou použit elektrolytový systém, kde vedoucím elektrolytem byl 0,01 M histidinchlorid + histidin (pH 6,2) a koncovým elektrolytem MES. Při stání za laboratorní teploty byly stabilní všechny tři roztoky vitamínů, při zahřívání na 50 °C a na vroucí vodní lázni se jako nejstabilnější jevila kyselina listová. Zmrazení odolala kyselina listová a pantothenát, v případě kyseliny nikotinové došlo ke snížení obsahu přibližně o 20 %.

5 PŘÍLOHY

Tabulka 12: Záznamy koncentrací roztoků kalibrační křivky, odpovídajících délek zón a k nim vypočítaných směrodatných odchylek

	B₃	B₅	B₉
navážky (mg/100ml)	130	232,3	448,3

koncentrace (mg/l)			délka zóny (s)		
B₃	B₅	B₉	B₃	B₅	B₉
1,30	-	4,48	4,01 ± 0,37	-	6,39 ± 0,14
3,25	-	11,20	8,16 ± 0,04	-	12,49 ± 0,04
6,50	11,60	22,40	15,24 ± 0,08	12,41 ± 0,04	24,66 ± 0,44
13,00	23,20	44,80	26,88 ± 0,14	25,46 ± 1,70	46,71 ± 0,01
26,00	46,40	89,60	50,60 ± 0,21	51,53 ± 0,92	83,25 ± 0,02
52,00	92,80	179,20	104,72 ± 0,34	105,48 ± 0,86	151,72 ± 0,47

Tabulka 13: Záznamy délek zón roztoků kalibrační křivky pomocí látkové koncentrace

koncentrace (μmol/l)			délka zóny (s)		
B₃	B₅	B₉	B₃	B₅	B₉
10,55	-	18,80	10,60	-	10,10
26,4	-	47,00	26,40	-	27,80
52,8	26,28	94,01	52,80	48,80	55,50
105,60	52,56	188,02	105,60	97,30	101,00
211,19	105,12	376,04	211,20	194,60	202,00
422,39	210,24	752,09	422,40	389,20	404,00

Tabulka 14: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných směrodatných odchylek roztoků měřených pro zjištění výtěžnosti roztoku kyseliny nikotinové

přídavek	délka zóny (s)		průměr (s)	směr. odchylka (s)
	1. měření	2. měření		
bez přídavku	50,89	49,60	49,95	0,68
1. přídavek	81,30	80,68	80,99	0,31
2. přídavek	101,79	100,82	101,31	0,49

Tabulka 15: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných směrodatných odchylek roztoků měřených pro zjištění výtěžnosti roztoku pantothenátu

přídavek	délka zóny (s)		průměr (s)	směr. odchylka (s)
	1.měření	2. měření		
bez přídavku	51,72	52,91	52,80	0,84
1. přídavek	76,81	74,81	75,81	1,00
2. přídavek	97,02	97,21	97,12	0,10

Tabulka 16: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných směrodatných odchylek roztoků měřených pro zjištění výtěžnosti roztoku kyseliny listové

přídavek	délka zóny (s)		průměr (s)	směr. odchylka (s)
	1.měření	2. měření		
bez přídavku	43,17	43,52	43,32	0,15
1. přídavek	111,35	110,68	111,02	0,34
2. přídavek	144,23	144,44	144,335	0,11

Tabulka 17: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných směrodatných odchylek zkoumaných reálných vzorků bez standardního přídavku i se standardním přídavkem.

N – kyselina nikotinová, P- pantothenát, KP- kyselina pantothenová, L – kyselina listová

vzorek	délka zóny (s)				standardní přídavek				
					prodloužení zóny (s)	délka zóny (s)		průměr (s)	směr. odchylka (s)
1 N	47,98	49,59	48,79	0,81	24,04	79,32	80,97	80,15	0,83
1 L	20,88	20,28	20,58	0,30	44,10	76,15	79,63	77,89	1,74
2 P	40,70	38,32	38,32	1,19	44,10	101,78	98,53	100,16	1,63
3 KP	6,44	6,88	6,66	0,22	10,23	17,38	17,22	17,38	0,22
4 KP	32,54	34,02	33,28	0,74	10,23	-	-	-	-
5 L	32,12	28,86	30,49	1,63	10,23	41,97	-	41,97	-

Tabulka 18: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných výtěžností roztoku kyseliny nikotinové při zkouškách stability

B₃	délka zóny (s)			výtěžnost (%)		
čas (min)	25 °C	50 °C	100 °C	25 °C	50 °C	100 °C
0	26,36	26,98	41,24	100,00	97,60	80,60
12	26,38	28,32	39,16	100,10	102,40	76,50
24	27,25	27,32	35,53	103,40	98,80	69,40
48	26,48	27,05	31,05	100,50	97,80	60,70
60	27,44	28,26	30,42	104,10	102,20	59,40
80	26,75	27,15	29,29	101,50	98,20	57,20
120	27,53	26,80	27,41	104,40	96,90	53,60
160	27,54	26,49	27,37	104,50	95,80	53,50
200	27,13	26,23	27,98	102,90	94,90	54,70
240	27,25	26,83	28,22	103,40	97,00	55,10
280	27,00	24,83	28,46	102,40	89,80	55,60

Tabulka 19: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných výtěžností roztoku pantothenátu při zkouškách stability

B₅	délka zóny (s)			Výtěžnost (%)		
čas (min)	25 °C	50 °C	100 °C	25 °C	50 °C	100 °C
0	25,39	23,93	29,07	100,00	116,00	141,25
12	25,44	-	27,38	100,20	-	133,04
24	25,77	25,12	27,95	101,50	121,76	135,81
48	24,50	25,90	28,31	96,49	125,55	137,56
60	25,68	25,95	26,88	101,14	125,79	130,61
80	25,88	24,99	26,86	101,93	121,13	130,52
120	25,08	24,18	25,89	98,78	117,21	125,80
160	25,81	23,08	23,31	101,45	111,88	113,27
200	25,31	21,88	21,80	98,21	106,06	105,93
240	25,23	20,13	20,79	102,98	97,58	101,02
280	25,40	20,63	20,38	98,91	100,00	99,03

Tabulka 20: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných výtěžností roztoku kyseliny listové při zkouškách stability

B₉	délka zóny (s)			výtěžnost (%)		
čas (min)	25 °C	50 °C	100 °C	25 °C	50 °C	100 °C
0	39,86	40,55	40,05	100,34	100,07	103,97
12	38,47	40,01	38,27	96,84	98,74	99,35
24	39,31	40,77	38,84	98,95	100,62	100,83
48	38,74	41,26	36,29	97,52	101,83	94,21
60	40,76	41,74	36,83	102,60	103,01	95,61
80	40,33	40,28	37,04	101,52	99,41	96,16
120	39,44	40,26	36,37	99,28	99,36	94,42
160	39,03	39,89	37,15	98,25	98,45	96,44
200	40,79	40,13	40,68	102,68	99,04	105,61
240	40,79	40,66	38,08	102,68	100,35	98,86
280	39,47	40,60	39,65	99,35	100,20	102,93

Tabulka 21: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných výtěžností roztoku kyseliny nikotinové – stání za laboratorní teploty po 21 dní

B₃	délka zóny (s)	výtěžnost (%)	čas (den)
0,001 M standard 20. 3. 2018	26,36	100,00	0
0,001 M standard	26,11	100,00	-
měření 27. 3. 2018	25,61	98,09	7
0,001 M standard	23,13	100,00	-
měření 3. 4. 2018	22,49	97,23	14
0,001 M standard	27,69	100,00	-
měření 10. 4. 2018	19,70	71,14	21

Tabulka 22: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných výtěžností roztoku pantothenátu – stání za laboratorní teploty po 21 dní

B₅	délka zóny (s)	výtěžnost (%)	čas (den)
0,001 M standard 4. 4. 2018	25,39	100,00	0
0,001 M standard	20,14	100,00	-
měření 11. 4. 2018	19,39	96,28	7
0,001 M standard	22,75	100,00	-
měření 18. 4. 2018	22,60	99,34	14
0,001 M standard	20,70	100,00	-
měření 25. 4. 2018	20,03	96,76	21

Tabulka 23: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných výtěžností roztoku kyseliny listové – stání za laboratorní teploty po 21 dní

B₉	délka zóny (s)	výtěžnost (%)	čas (den)
0,001 M standard 27. 3. 2018	39,86	100,00	0
0,001 M standard	38,52	100,00	-
měření 3. 4. 2018	35,28	91,59	7
0,001 M standard	36,45	100,00	-
měření 10. 4. 2018	27,04	74,18	14
0,001 M standard	36,79	100,00	-
měření 17. 4. 2018	29,34	79,75	21

Tabulka 24: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných výtěžností roztoku kyseliny nikotinové po zmrazení

B₃	délka zóny (s)	výtěžnost (%)	čas (den)
0,001 M standard 21. 3. 2018	26,36	100,00	0
0,001 M standard	23,13	100,00	-
měření 28. 3. 2018	18,1	78,25	7
0,001 M standard	27,69	100,00	-
měření 4. 4. 2018	22,20	80,17	14
0,001 M standard	26,31	100,00	-
měření 11. 4. 2018	21,05	80,01	21

Tabulka 25: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných výtěžností roztoku pantothenátu po zmrazení

B₅	délka zóny (s)	výtěžnost (%)	čas (den)
0,001 M standard 21. 3. 2018	25,39	100,00	0
0,001 M standard	25,58	100,00	
měření 28. 3. 2018	25,88	101,17	7
0,001 M standard	20,14	100,00	
měření 4. 4. 2018	21,36	106,06	14
0,001 M standard	22,75	100,00	
měření 11. 4. 2018	22,53	99,03	21

Tabulka 26: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných výtěžností roztoku kyseliny listové po zmrazení

B₉	délka zóny (s)	výtěžnost (%)	čas (den)
0,001 M standard 21. 3. 2018	39,86	100,00	0
0,001 M standard	38,52	100,00	-
měření 4.4.	34,49	89,54	7
0,001 M standard	36,79	100,00	-
měření 11.4.	35,82	97,36	14
0,001 M standard	36,45	100,00	-
měření 17.4.	23,44	94,65	21

Tabulka 27: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných výtěžností roztoku kyseliny nikotinové po změně pH měřené ve dvou dnech

B₃	délka zóny (s)		výtěžnost (%)	
pH	1. den	2. den	1. den	2. den
2	31,31	30,07	124,44	104,12
4,08	25,16	28,88	100,00	100,00
6	41,45	37,51	164,75	129,88
8	45,91	44,20	182,47	153,05
10	43,27	46,78	171,98	161,98
12	34,10	35,96	135,53	124,52

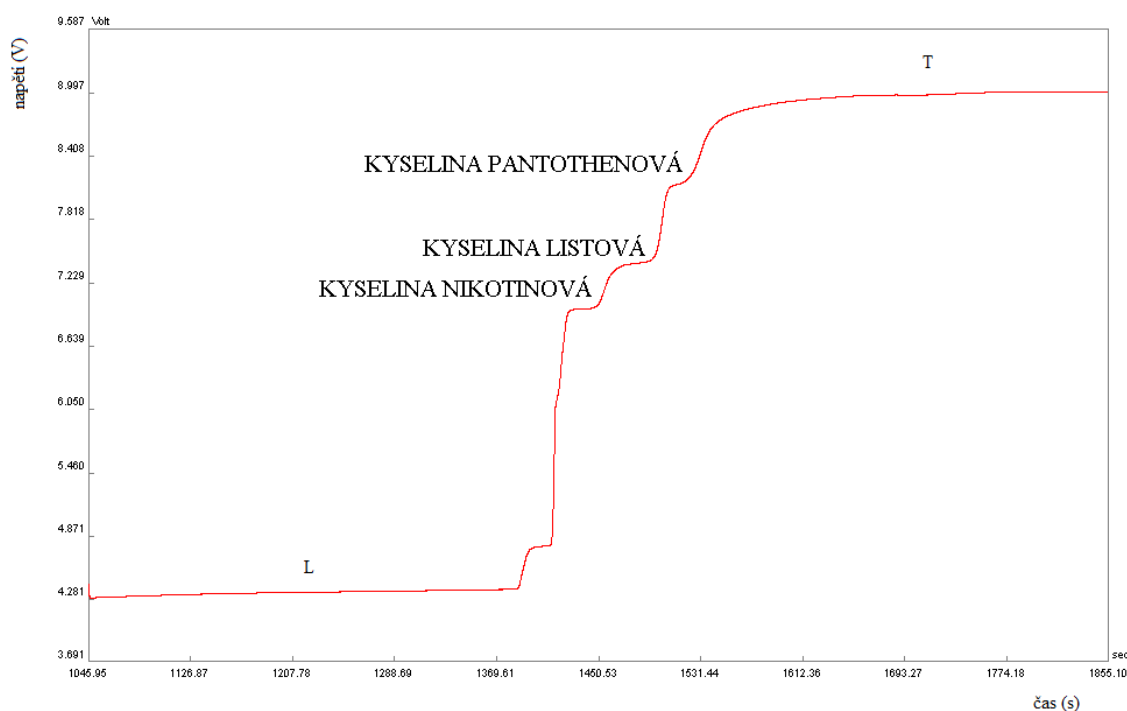
Tabulka 28: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných výtěžností roztoku pantothenátu po změně pH měřené ve dvou dnech

B₅	délka zóny (s)		výtěžnost (%)	
pH	1. den	2. den	1. den	2. den
2	27,11	25,48	96,20	103,83
4	30,51	25,80	108,27	105,13
6,5	28,18	24,54	100,00	100,00
8	28,02	25,14	99,43	102,44
10	28,68	25,46	101,77	103,75
12	28,01	23,44	99,40	95,52

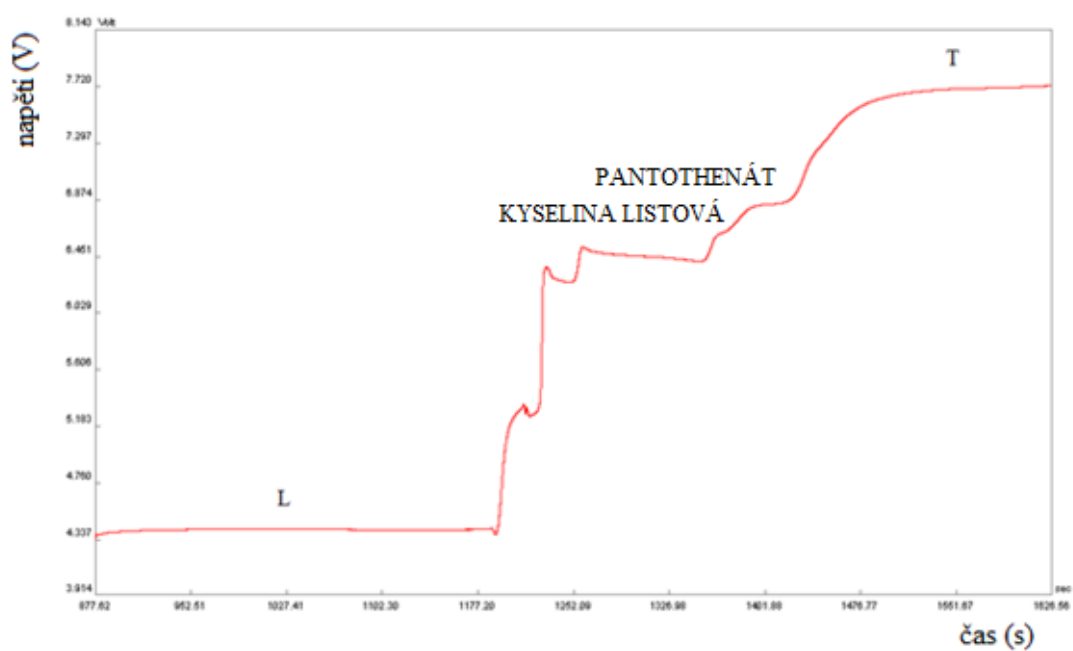
Tabulka 29: Záznamy délek zón a k nim vypočítaných výtěžností roztoku kyseliny listové po změně pH měřené ve dvou dnech

B ₉ pH	délka zóny (s)		výtěžnost (%)	
	1. den	2. den	1. den	2. den
2	3,32	5,15	83,63	89,88
4,9	3,97	5,73	100,00	100,00
6	18,30	26,16	460,96	456,54
8	34,84	40,44	877,58	705,76
10	48,58	49,86	1223,68	870,16
12	11,58	10,17	291,69	177,49

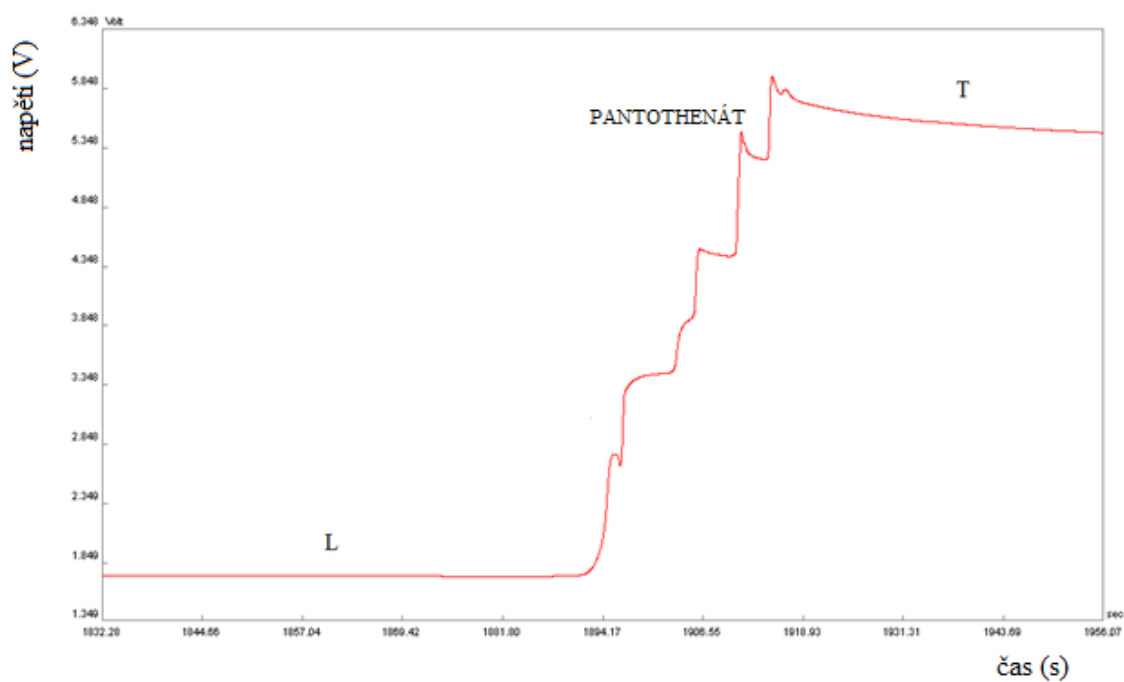
ZÁZNAMY ANALÝZ REÁLNÝCH VZORKŮ



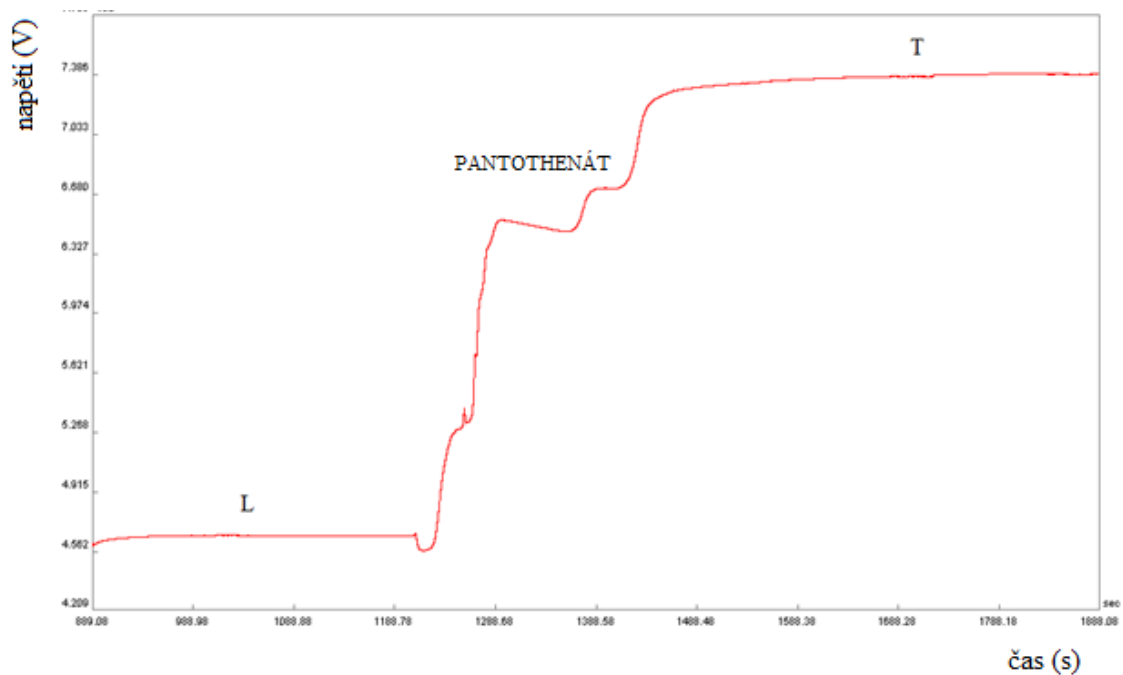
Obrázek 6: Záznam směsného standardního roztoku kyseliny nikotinové, pantothenátu a kyseliny listové, všechny o koncentraci 10 mmol/l



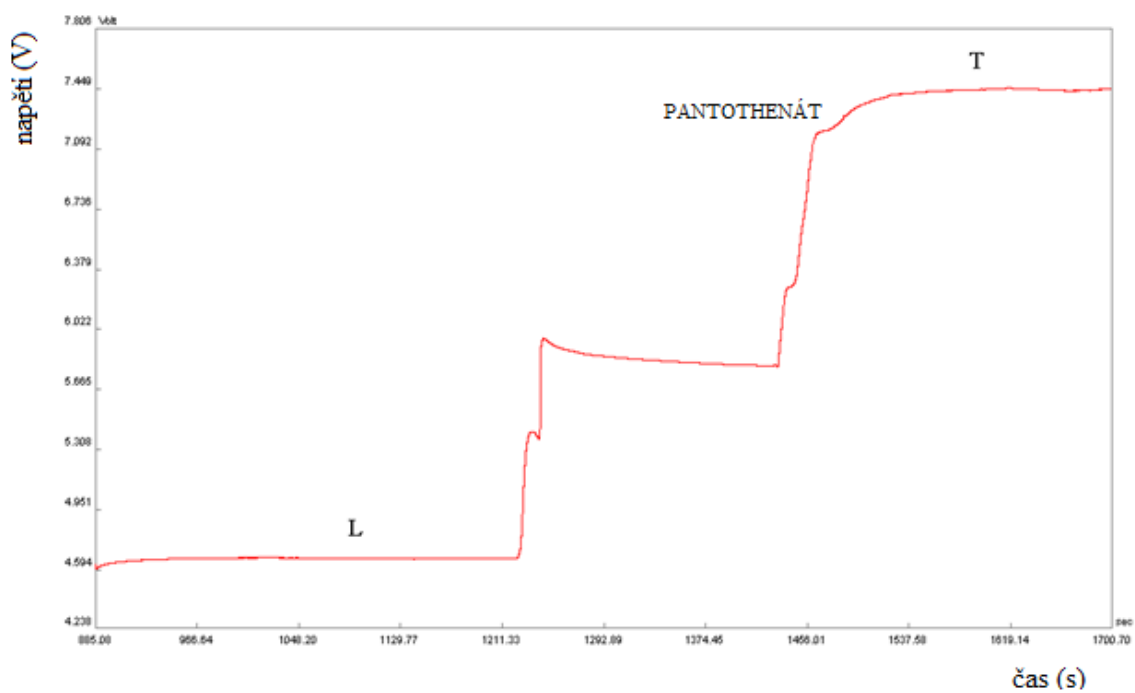
Obrázek 7: Záznam reálného vzorku B-komplexu forte od firmy Generica (vzorek 1)



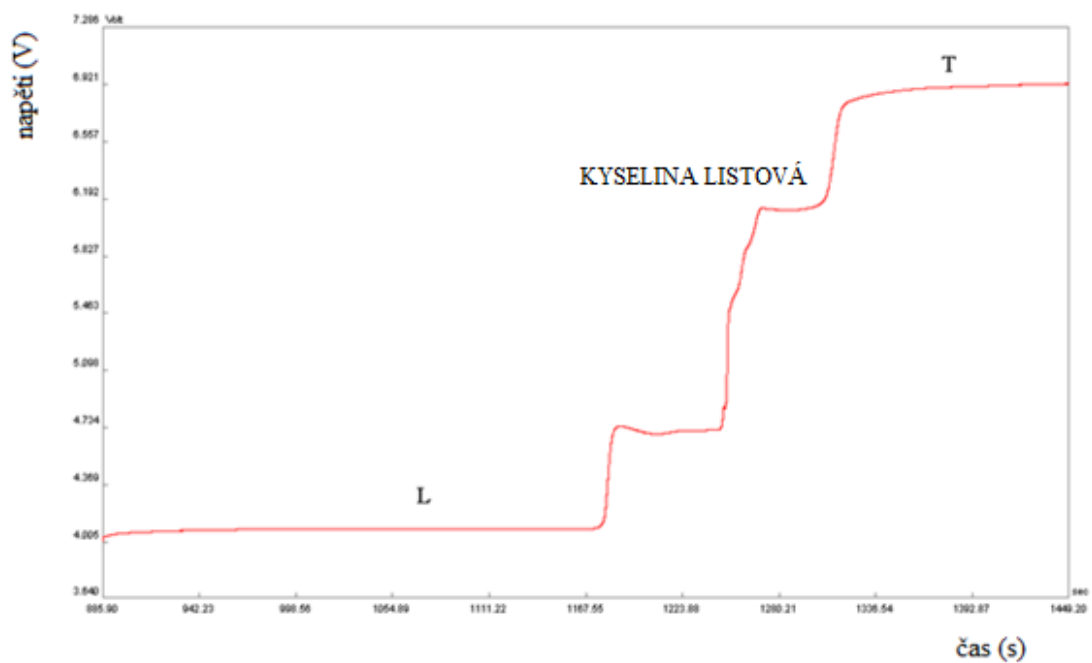
Obrázek 8: Záznam reálného vzorku B-komplexu od firmy Zentiva (vzorek 2)



Obrázek 9: Záznam reálného vzorku B-komplexu Forte od firmy Dr. Max (vzorek 3)



Obrázek 10: Záznam reálného vzorku Biosilu Plus od firmy Naturvita (vzorek 4)



Obrázek 11: Záznam reálného vzorku Acidum folicum Léčiva od firmy Zentiva
(vzorek 5)

6 BIBLIOGRAFIE

- 1) Eggersdorfer, M., Laudert, D., Létinois, U., McClymont, T., Medlock, J., Netscher, T., Bonrath, W. *One hundred years of Vitamins – A Success story of the natural science*. Angewandte Chemie. 2012, **51**(52), 12960–12990.
- 2) Gentili, A., Caretti, F. *Analysis of vitamins by liquid chromatography*. Liquid Chromatography [online]. Elsevier, 2017, [cit. 2018-05-04]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128053928000190>
- 3) Aleksandrova, K. V., Rudko, N. P. *Biochemistry of vitamins*. Zaporizhzhya: Zaporizhzhya State Medical University, 2016.
- 4) Zakerhamidi, M. S., Haghighi, Zare L., Ahmadian, Sayed S. M. *Photo-physical and interactional behavior of two members of group B vitamins in different solvent media*. Journal of Molecular Structure. 2017, **1114**, 265-272.
- 5) Ottaway, Berry P., Associates Ltd. *Stability of vitamins during food processing and storage*. Chemical Deterioration and Physical Instability of Food and Beverages [online]. Elsevier, 2010, [cit. 2018-05-04]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781845694951500198>
- 6) Salvador, A., Chisvert, A. *Analysis of Cosmetic Products*. London: Elsevier, 2007. ISBN 0444522603.
- 7) Ranhotra, G., Gelroth, J., Novak, F., Bohannon, F. *Bioavailability for rats of thiamin in whole wheat and thiamin-restored white bread*. Journal of Nutrition. 1985, **115**(5), 601-606.
- 8) Arboix, J. *Ham production/Cooked Ham*. Encyclopedia of Meat Sciences [online]. Elsevier, 2004, [cit. 2018-05-02]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B012464970X001653>
- 9) Kamal-Eldin, A. *Micronutrients in cereal products: their bioactivities and effects on health*. Technology of functional cereal products. 2003, **93**, 86-101.
- 10) Helliwell, K. E. *The roles of B vitamins in phytoplankton nutrition: new perspectives and prospects*. New phytol. 2017, **216**, 62-68.
- 11) Obeid, R., Munz, W., Jäger, M., Schmidt, W., Herrmann, W. *Biochemical indexes of the B vitamins in cord serum are predicted by maternal B vitamin status*. The American Journal of Clinical Nutrition. 2005, **82**(1), 9-133.
- 12) Vardanyan, R., Hruby, V. *Synthesis of best-seller drugs*. Amsterdam: Elsevier/AP, 2016. ISBN 9780124114920.

- 13) Saghiri, Mohammad Ali, Asatourian, Armen, Ershadifar, Soroush, Moghadam, Mona Momeni, Sheibani, Nader. *Vitamins and regulation of angiogenesis:[A, B1, B2, B3, B6, B9, B12, C, D, E, K].* Journal of Functional Foods. 2017, **38**, 180-196.
- 14) Denu, John M. *Vitamin B₃ and sirtuin function.* Trends in Biochemical Sciences. 2005, **30**(9), 479-483.
- 15) Blatná, J., Horna, A., Zima, T. *Vitamíny 2001.* Pardubice: Univerzita Pardubice, 2001. ISBN: 80-7194-380-0.
- 16) Higdon, J., Linus, Pauling. *Niacin.* PubMed. 2002, **22**(10), 25-40.
- 17) Ting, Huang, Wei, Zhang, Jun, Liu, Ying, Tian, Gaixia, Yang, Can, Quan. *A new certified reference material (GBW10037) of vitamin B₃ in infant formula.* Journal of Food Composition and Analysis. 2010, **23**, 367-372.
- 18) McCormick, Donald B., Wright, Lemuel D. *Vitamins and coenzymes.* New York: Academic Press, 1970.
- 19) Gerald, F., Combs, Jr. *The Vitamins: fundamental aspects in nutrition and health.* Burlington : Elsevier Academic Press, 2008. ISBN 978-0-12-183493-7.
- 20) Yang, Yue, Sauve, Anthony A. *NAD⁺ metabolism: Bioenergetics, signaling and manipulation.* Biochimica et Biophysica Acta. 2016, **1864**, 1787-1800.
- 21) Rennie, G., Chen, A. C., Dhillon, H., Vardy, J., Damian, D. L. *Nicotinamide and nerocognitive function.* Nutritional Neuroscience. 2015, **18**(5), 193-200.
- 22) Joint FAO/WHO Expert Consultation on Human Vitamin and Mineral Requirements. *Vitamin and mineral requirements in human nutrition.* Bangkok (Thailand): World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations , 1998. ISBN 924 154 612 3.
- 23) Walther, B., Schmid, A. *Vitamins, Phytonutrients, and Minerals in Potato.* Advances in Potato Chemistry and Technology. 2016, **10**, 117-166.
- 24) Šimonová, I., Karovičová, J., Kohajdová, Z. *Význam kyseliny listovej a jej derivátov v ľudskom organizme.* Potravinárstvo. 2008, **2**(1), 60-68.
- 25) Navarre, D. A., Shakya, R., Hellmann, H. *Vitamins, Phytonutrients, and Minerals in Potato.* Advances in Potato Chemistry and Technology. 2016, **10**, 117-166.
- 26) Tanaka, A., Iijima, M., Kikuchi, Y., Hoshino, Y., Nose, N. *Gas chromatographic determination of nicotinamide in meats and meat products as 3-cyanopyridine.* Journal of Chromatography. 1989, **466**, 307-317.

- 27) Lahélya, S., Bergaentzléa, M., Hasselmannab, C. *Fluorimetric determination of niacin in foods by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization*. Food Chemistry. 1999, **65**, 129–133.
- 28) Lindeberg, J. *Capillary electrophoresis in food analysis*. Food Chemistry. 1996, **55**, 73-94.
- 29) Thompson, C. O., Trenerry, V. C. *Determination of synthetic colours in confectionery and cordials by micellar electrokinetic capillary chromatography*. Journal of Chromatography A. 1995, **704**(1), 195-201.
- 30) Ward, C. M., Trenerry, C. V, Pant, Ira. *The application of capillary electrophoresis to the determination of total niacin in concentrated yeast spreads*. Food Chemistry. 1997, **58**(3), 185-192.
- 31) Hiroyuki, Nishi, Nobuchika, Tsumagari, Toshio, Kakimoto. *Separation of water-soluble vitamins by micellar electrokinetic chromatography*. Journal of Chromatography A. **1989**, 465, 331-343.
- 32) Williams, S. *Official Methods of the AOAC*. Arlington (USA): Association of Official Analytical Chemists, 1984.
- 33) Schreiner, M., Razzazi, E., Luf, W. *Determination of water-soluble vitamins in soft drinks and vitamin supplements using capillary electrophoresis*. Molecular Nutrition and Food Research. 2003, **47**(4), 243-24.
- 34) Finglas, P. M., Faulks, R. M. *Nutritional composition of UK detail potatoes, both raw and cooked*. Journal of Food and Agriculture. 1984, **35**, 1347-1356.
- 35) Sood, S. P., Wittmer, D. P., Ismaiel, S. A., Haney, W. G. *Simultaneous High-pressure Liquid Chromatographic Determination of Niacin and Niacinamide in Multivitamin Preparations: Reversed-Phase, Ion-Pairing Approach*. Journal of Pharmaceutical Sciences. 1977, **66**(1), 40-42.
- 36) Miller, J. C. *Statistics for analytical chemistry*. London: Ellis Horwood Ltd., 1993.
- 37) Delgado-Zamarreno, M. M., González-Maza, I., Sánchez-Peréz, A., Carabians-Martinez, R. *Separation and simultaneous determination of water-soluble and a fat-soluble vitamins by electrokinetic capillary chromatography*. Journal of Chromatography A. 2002, **953**, 257-262.
- 38) Davídek, J. a kolektiv. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1977.

- 39) Havlíková, L., Matysová, L., Nováková, L., Solich, P. *HPLC determination of calcium pantothenate and two preservatives in topical cream*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2006, **41**(2), 671-675.
- 40) Wang, L.-H., Tseng, S.-W. *Direct determination of d-panthenol and salt of pantothenic acid in cosmetic and pharmaceutical preparations by differential pulse voltammetry*. Analytica Chimica Acta. 2001, **432**, 39–48.
- 41) Bates, Ch. *Vitamins: Fat and Water Soluble, Analysis of*. Encyclopedia of Analytical Chemistry [online]. Chichester (UK): John Wiley & Sons, 2006, [cit. 2018-05-02]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470027318.a1924>
- 42) Fotsing, L., Fillet, M., Bechet, I., Hubert, Ph., Crommen, J. *Determination of six water-soluble vitamins in a pharmaceutical formulation by capillary electrophoresis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 1997, **15**(8), 1113-1123.
- 43) Kodama, S., Yamamoto, A., Matsunaga, A. *Direct chiral resolution of pantothenic acid using 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin in capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A. 1998, **811**, 269-273.
- 44) Heudi, O., Kilinc, T., Fontannaz, P. *Separation of water-soluble vitamins by reversed-phase high performance liquid chromatography with ultra-violet detection: Application to polyvitaminated premixes*. Journal of Chromatography A. 2005, **1070**, 49-56.
- 45) Klejdus, B., Petřlová, J., Potěšil, D., Adam, V., Mikelová, R., Vacek, J., Kizek, R., Kubáň, V. *Simultaneous determination of water- and fat-soluble vitamins in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection*. Analytica Chimica Acta. 2004, **520**, 57-67.
- 46) Rychlik, M. *Simultaneous analysis of folic acid and pantothenic acid in foods enriched with vitamins by stable isotope dilution assays*. Analytica Chimica Acta. 2003, **495**, 133-141.
- 47) Gao, Yanling, Guo, Fei, Gokavi, Sumangala, Chow, Andrew, Sheng, Qinghai, Guo, Mingruo. *Quantification of water-soluble vitamins in milk-based infant formulae using biosensor-based assays*. Food Chemistry. 2008, **110**, 769-776.
- 48) Franco, M., Jasionowska, R., Salvatore, E. *Application of CZE Method in routine analysis for determination of B-complex vitamins in pharmaceutical and veterinary preparations*. Journal of Analytical Chemistry. 2012, **2009**, 1-7.

- 49) Wang, Jinyuan, Liu, Xiaodong, Schnute, William. *Simultaneous analysis of water-soluble vitamins in vitamin-enriched beverages and multivitamin dietary supplements by UHPLC-MS/MS*. Thermo Scientific. 2000, **294**, 1-5.
- 50) Gentili, A., Caretti, F., D'Ascenzo, G., Marchese, S., Perret, D., Di Corcia, D., Rocca, L. *Simultaneous determination of water-soluble vitamins in selected food matrices by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2008, **22**(13), 2029-2043.
- 51) Wabaidur, S. M., Alam, S. M., Lee, S. H., Alothman, Z. A., Eldesoky, G. E. *Chemiluminescence determination of folic acid by a flow injection analysis assembly*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Molecular Spectroscopy. 2013, **105**, 412-417.
- 52) Voight, M. N., Eitenmiller, R. R., Powers, J. J., Ware, G. O. *Water-soluble vitamin content of some california wines*. Journal of Food Science. 1978, **43**, 1071-1073.