

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Metody extrakce a stanovení vitamínu B₁₂

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Vojtěch Zeman**
Osobní číslo: **C17389**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Metody extrakce a stanovení vitamínu B₁₂**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. S využitím dostupných databází knihovny UPa popište charakteristiku, biochemické funkce, chemické vlastnosti, potravinové zdroje a doporučené výživové dávky pro vitamíny B komplexu.
2. Provedte detailní rešerši se zaměřením na metody extrakce a metody stanovení vitamínu B₁₂ ve vzorcích potravin.
3. Na základě výsledků rešerše stanovte, zda existuje obecná metoda pro extrakci a stanovení vitamínu B₁₂.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce:

5. února 2020

Termín odevzdání bakalářské práce:

4. července 2020

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

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

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 23. 4. 2020

.....

Vojtěch Zeman

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce doc. Ing. Liboru Červenkovi, Ph.D. za poskytnutí cenných rad, konzultaci a trpělivost při zpracování této práce.

ANOTACE

Úvod bakalářské práce pojednává o vitamínech B-komplexu. Jsou zde stručně popsány hlavní funkce, chemické struktury, doporučené denní dávky, významné potravinové zdroje a hlavní projevy nedostatku jednotlivých vitamínů. Druhá část práce je věnována metodám extrakce a stanovení vitamínu B₁₂. Jsou zde popsány nejvýznamnější metody, které lze při analýze vitamínu B₁₂ v potravinách využít.

KLÍČOVÁ SLOVA

vitamíny, B-komplex, vitamín B₁₂, metody extrakce a stanovení

TITLE

The methods of extraction and determination of vitamin B₁₂

ANNOTATION

The introduction of bachelor thesis deals with B-complex vitamins. The main functions, chemical structures, recommended daily doses, important food sources and the main manifestations of deficiency of individual vitamins are described here. The second part is devoted to methods of extraction and determination of vitamin B₁₂. The most important methods that can be used during the analysis of vitamin B₁₂ in food were described.

KEYWORDS

vitamins, B-complex, vitamin B₁₂, methods of extraction and determination

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	9
ÚVOD	10
1 VITAMÍNY	11
1. 1 Vitamíny B-komplexu	12
1. 1. 1 Vitamín B ₁	13
1. 1. 1. 1 Struktura a vlastnosti	13
1. 1. 1. 2 Doporučený příjem	14
1. 1. 1. 3 Zdroje thiaminu	14
1. 1. 1. 4 Projevy nedostatku thiaminu	14
1. 1. 2 Vitamín B ₂	14
1. 1. 2. 1 Struktura a vlastnosti	14
1. 1. 2. 2 Doporučený příjem	15
1. 1. 2. 3 Zdroje riboflavinu	16
1. 1. 2. 4 Projevy nedostatku riboflavinu	16
1. 1. 3 Vitamín B ₃	17
1. 1. 3. 1 Struktura a vlastnosti	17
1. 1. 3. 2 Doporučený příjem	18
1. 1. 3. 3 Zdroje niacinu	18
1. 1. 3. 4 Projevy nedostatku niacinu	18
1. 1. 4 Vitamín B ₅	19
1. 1. 4. 1 Struktura a vlastnosti	19
1. 1. 4. 2 Doporučený příjem	20
1. 1. 4. 3 Zdroje kyseliny pantothenové	20
1. 1. 4. 4 Projevy nedostatku kyseliny pantothenové	21
1. 1. 5 Vitamín B ₆	21
1. 1. 5. 1 Struktura a vlastnosti	21
1. 1. 5. 2 Doporučený příjem	23
1. 1. 5. 3 Zdroje pyridoxinu	23

1. 1. 5. 4	Projevy nedostatku pyridoxinu.....	24
1. 1. 6	Vitamín B ₇	24
1. 1. 6. 1	Struktura a vlastnosti.....	24
1. 1. 6. 2	Doporučený příjem.....	25
1. 1. 6. 3	Zdroje biotinu.....	26
1. 1. 6. 4	Projevy nedostatku biotinu.....	26
1. 1. 7	Vitamín B ₉	27
1. 1. 7. 1	Struktura a vlastnosti.....	27
1. 1. 7. 2	Doporučený příjem.....	28
1. 1. 7. 3	Zdroje folátu.....	28
1. 1. 7. 4	Projevy nedostatku folátu.....	28
1. 1. 8	Vitamín B ₁₂	29
1. 1. 8. 1	Struktura a vlastnosti.....	29
1. 1. 8. 2	Doporučený příjem.....	31
1. 1. 8. 3	Zdroje kobalaminu.....	31
1. 1. 8. 4	Projevy nedostatku kobalaminu.....	32
2	METODY EXTRAKCE A STANOVENÍ VITAMÍNU B₁₂	33
2. 1	Extrakce vitamínu B₁₂	34
2. 1. 1	Extrakce na pevné fázi.....	34
2. 1. 2	Imunoafinitní extrakce.....	34
2. 2	Stanovení vitamínu B₁₂	35
2. 2. 1	Mikrobiologická zkouška.....	35
2. 2. 2	Metoda vazebných proteinů (PBA).....	35
2. 2. 3	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	36
2. 2. 4	Elektrochemické metody.....	37
2. 2. 5	ELISA.....	38
2. 2. 6	Chemiluminiscenční metoda.....	38
3	ZÁVĚR	40
4	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	42

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Strukturní vzorec thiaminu	13
Obrázek 2: Strukturní vzorec riboflavinu	15
Obrázek 3: Strukturní vzorec kyseliny nikotinové.....	17
Obrázek 4: Strukturní vzorec nikotinamidu	18
Obrázek 5: Strukturní vzorec kyseliny pantothenové	20
Obrázek 6: Strukturní vzorec pyridoxolu.....	22
Obrázek 7: Strukturní vzorec pyridoxalu	22
Obrázek 8: Strukturní vzorec pyridoxaminu.....	23
Obrázek 9: Strukturní vzorec biotinu	25
Obrázek 10: Strukturní vzorec folátu.....	28
Obrázek 11: Strukturní vzorec kobalaminu [36].....	30

ÚVOD

Vitamíny jsou vedle sacharidů, bílkovin a tuků další významné látky, které jsou nezbytné pro správné fungování lidského organismu. Řadíme je mezi látky esenciální, což znamená, že je člověk nedokáže syntetizovat a je tedy nezbytné je až na pár výjimek přijímat v potravě. I přestože je jejich denní potřeba nízká, je jejich funkce v lidském těle naprosto nezastupitelná. V lidském organismu plní funkci katalyzátorů různých biochemických reakcí. Hrají tedy důležitou roli při metabolismu tuků, sacharidů a bílkovin. Některé z nich jsou rovněž důležitými antioxidanty, jejichž úkolem je chránit buňky před volnými škodlivými radikály. Podle rozdílné chemické struktury se vitamíny dělí na vitamíny hydrofilní (ve vodě rozpustné) a lipofilní (rozpustné v tucích). Mezi lipofilní vitamíny řadíme vitamíny A, D, E a K, mezi hydrofilní pak vitamíny B-komplexu a vitamín C. V případě nedostatku, způsobeného nízkým příjmem nebo poruchou absorpce kteréhokoliv vitamínu, dochází k tzv. hypovitaminóze, v těžších případech avitaminóze. Jsou to stavy, které mohou vést až k fatálnímu selhání organismu. K hypervitaminóze může dojít vlivem nadbytku některého z lipofilních vitamínů.

Do skupiny vitamínů B-komplexu patří vitamíny B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇, B₉ a B₁₂. Jejich společným znakem je jejich rozpustnost ve vodě, přínos v energetickém metabolismu a podpora správné činnosti nervové soustavy. Jsou běžnou součástí lidské stravy, Jsou více či méně zastoupeny v široké škále potravin, zejména v živočišných produktech (maso, vnitřnosti, mléko a mléčné výrobky), ale i v obilovinách, luštěninách nebo ořechách.

Samotný vitamín B₁₂ je nezbytný pro správné fungování nervového systému, účastní se procesu krvetvorby (zejména červených krvinek) a mimo jiné snižuje riziko vzniku cévních onemocnění. Téměř výhradně je obsažen v živočišných produktech, a i když je jeho denní potřeba pro člověka velice nízká, může u lidí docházet k projevům nedostatku. Ohroženou skupinou jsou především vegani, ale i jedinci s poruchou absorpce.

Stanovení vitamínu B₁₂ v potravinách je z důvodu jeho nízké koncentrace, složité struktury, špatné stability a rozdílné formě, ve které se vyskytuje, poměrně složité. Překážkou při stanovení je také jeho vazba na bílkoviny, od kterých je nutné vitamín B₁₂ předem oddělit. Ke zvýšení koncentrace vitamínu ve vzorku je důležité zvolit vhodnou extrakční metodu. Mezi metody stanovení, které lze pro analýzu vitamínu B₁₂ v potravinách využít, patří např. mikrobiologické metody, metody vazebných proteinů, chromatografické metody, metody elektroanalýzy, chemiluminiscenční metody nebo metody imunologické.

1 VITAMÍNY

Vitamíny jsou organické sloučeniny, které živé organismy vyžadují v relativně malém množství k udržení zdraví [1]. Jedná se o esenciální mikroživiny nezbytné pro správné fungování všech živých buněk, pro jejich růst a vývoj. Jsou to katalyzátory a enzymově protetické skupiny zapojené do řady funkcí buněčného metabolismu. Aktivují oxidaci potravin a usnadňují využití energie. Organismus tak může využít energetické prvky, pocházející z oxidačně redukčních reakcí [2].

Vitamíny jsou označovány jako živiny, jelikož jsou potřebné pro podporu zdraví a celkové pohody. Lidské tělo je ovšem není schopno syntetizovat [3]. Mohou být syntetizovány pouze autotrofními organismy. Jen ojediněle je to možné u organismů heterotrofních. Obecně se získávají jako exogenní látky, především z potravy, některé působením střevní mikroflóry [4]. Nejedná se o přímé zdroje energie [3]. Vzhledem k tomu, že jsou nejčastěji součástí biochemických metabolických procesů, jsou často označovány jako exogenní esenciální biokatalyzátory. Potřeba většiny vitamínů je relativně nízká a je závislá na mnoha faktorech jako je pohlaví, stáří, zdravotní stav nebo stravovací zvyklosti člověka [4]. Během fyzické činnosti se rychlost nebo aktivita metabolických procesů zvyšuje. Pro zajištění optimální fyzické výkonnosti je tedy zapotřebí zajistit i dostatečný přísun vitamínů [3]. Potřebu vitamínů může ovlivnit přítomnost složek, které vitamíny inhibují nebo znemožňují jejich plné využití. Jedná se o tzv. antivitamíny (antagonisti vitamínů). Jedná se o látky, které nějakým způsobem eliminují biologické účinky vitamínů. Může se jednat o strukturní analogy vitamínů, které reagují s příslušnými apoenzymy nebo s bílkovinami, které transportují vitamíny. Mohou to být také některé enzymy, které přeměňují vitamíny na neúčinné látky nebo látky, které tvoří s vitamíny nevyužitelné komplexy.

Nejpoužívanější způsob třídění vitamínů je na základě jejich rozdílné rozpustnosti ve vodě a tucích, tedy v polárním a nepolárním rozpouštědle. Z tohoto hlediska je dělíme do dvou velkých skupin. Rozeznáváme vitamíny rozpustné ve vodě (hydrofilní) a vitamíny rozpustné v tucích (lipofilní) [4]. Ve vodě rozpustné jsou vitamíny B-komplexu a vitamín C. Mezi lipofilní vitamíny řadíme vitamíny A, D, E a K. Některé potraviny mohou obsahovat i tzv. prekurzory vitamínů (provitamíny), které se na skutečný funkční vitamín chemicky mění až po vstupu do těla [1].

V případě nedostatku jakéhokoliv vitamínu dochází k hypovitaminóze. Je-li nedostatek vitamínu úplný, může dojít i k tzv. avitaminóze, která se pak projevuje poruchou biochemických procesů. U lipofilních vitamínů může docházet i k hypervitaminóze. Nadměrné

množství těchto vitamínů může také vyvolat různé poruchy metabolických procesů a může způsobovat těžká onemocnění [4]. Vzhledem k jejich rozpustnosti ve vodě nejsou vitamíny B a C v těle uloženy v dostatečné míře, a proto by potraviny obsahující tyto vitamíny měly být zahrnuty v každodenní stravě. Naopak vitamíny rozpustné v tucích jsou v těle uloženy v dostatečném množství, aby se zabránilo výskytu nemocí způsobených nedostatkem vitamínů i poté, co člověk dlouhodobě přijímal stravu s nedostatkem vitamínů. Protože tělo může ukládat pouze vitamíny rozpustné v tucích, skutečná hypervitaminóza byla pozorována pouze u těchto vitamínů [5].

Obsah vitamínů v potravinách je ovlivňován mnoha faktory. V živočišné stravě závisí jejich obsah především na způsobu skladování a zpracování dané suroviny. V rostlinných potravinách obsah vitamínů ovlivňují například klimatické podmínky během růstu nebo stupeň zralosti. Vitamíny obecně řadíme mezi labilní složku potravin, u kterých dochází ke ztrátám v průběhu technologického zpracování nebo gastronomických úprav.

V současnosti se vitamíny přidávají do potravin uměle. Obsah vitamínů může být doplňován na původní hladiny v dané surovině (restituční) nebo je jejich obsah obohacován na vyšší koncentrace (fortifikace). Některé vitamíny jsou také používány jako přirozená barviva (např. riboflavin nebo provitamin A – β -karoten) nebo jako antioxidanty (vitamíny C a E) [4].

1. 1 Vitamíny B-komplexu

Jedná se o skupinu ve vodě rozpustných vitamínů [1]. B-komplex obsahuje vitamíny, které v těle vykonávají řadu důležitých funkcí. Například poskytují energii pro metabolismus glukózy za vzniku sacharidů nebo se uplatňují při metabolismu lipidů a proteinů.

Mezi vitamíny B-komplexu patří 8 různých vitamínů. Řadíme sem vitamín B₁ (thiamin), vitamín B₂ (riboflavin), vitamín B₃ (niacin), vitamín B₅ (kyselina pantothenová), vitamín B₆ (pyridoxin, pyridoxal, pyridoxamin), vitamín B₇ (biotin), vitamín B₉ a vitamín B₁₂ (kyanokobalamin) [6]. Společně nejsou seskupeny na základě chemické podobnosti, ale podle jejich společné rozpustnosti ve vodě a vzájemně souvisejících buněčných koenzymových funkcí.

Pokud jde o jejich původ, vitamíny B-komplexu jsou syntetizovány rostlinami, kde vykonávají stejné funkce jako poté u živočichů, které je konzumují. Výjimkou je vitamín B₁₂, který je syntetizován bakteriemi a obvykle se získává z potravin získaných ze zvířat.

Vitamíny B působí jako koenzymy v různých enzymatických procesech. Jako koenzym se aktivní forma vitamínu váže v proteinovém apoenzymu a vytváří tzv. holoenzym. Díky tomu

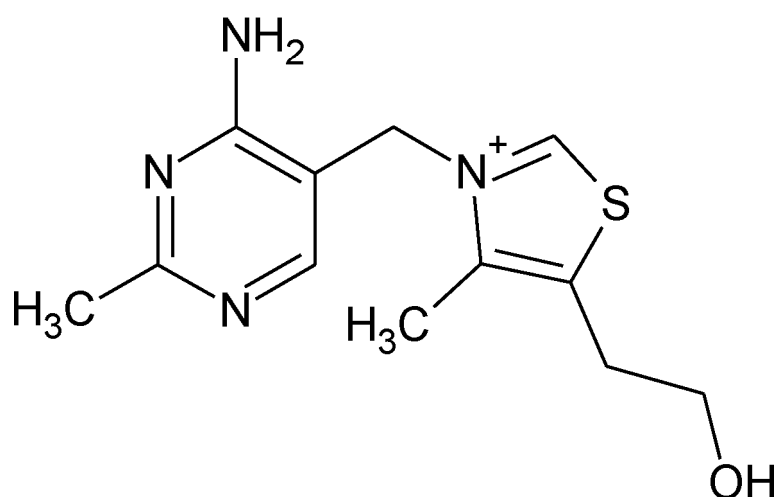
zvyšuje schopnost výsledného enzymu z hlediska rozmanitosti reakcí, které může katalyzovat. Vitamíny B mohou také fungovat jako přímé prekurzory metabolických substrátů. Příkladem je koenzym A (CoA) acetylovaný za vzniku acetylu koenzymu A (acetyl-CoA), což je významný meziprodukt při vzniku buněčné energie a při syntéze bioaktivních sloučenin [7].

1. 1. 1 Vitamín B₁

1. 1. 1. 1 Struktura a vlastnosti

Vitamín B₁, známý jako thiamin, je základní složkou všech mnohobuněčných organismů [8]. Jeho struktura obsahuje pyrimidinový cyklus, který je spojený s thiazolovým cyklem pomocí methylenové skupiny. Vyskytuje se buď volný nebo ve formě fosforečných esterů (monofosfátu, difosfátu a trifosfátu) [4].

Thiamin hraje důležitou roli při metabolismu sacharidů a bílkovin. Sloučenina thiamin pyrofosfát působí jako koenzym při přeměně pyruvátu na acetyl-CoA [3]. Volný thiamin přijímaný z potravy je následně v různých orgánech esterifikován na thiamindifosfát a právě ten je důležitým kofaktorem některých enzymů, které se uplatňují například při metabolismu sacharidů nebo aminokyselin [4]. Thiamin je klíčový v mnoha enzymatických procesech důležitých pro správnou funkci a vývoj mozku a také udržování inerneuronální komunikace. Také se podílí na opravě nervové tkáně a modulaci nervového signálu [8].



Obrázek 1: Strukturní vzorec thiaminu

1. 1. 1. 2 Doporučený příjem

Potřebné množství thiaminu souvisí s příjmem sacharidů (d-glukózy). Uvádí se, že na každých 4200 KJ energie získané z cukrů, je zapotřebí 0,4–0,6 mg vitamínu B₁ [4]. Obecně doporučená denní dávka (RDA) thiaminu je zhruba 1,1–1,2 mg u mužů i žen [9]. Nižší potřebná denní dávka thiaminu (0,3 mg) platí pro kojence. Naopak vyšší denní potřeba je u těhotných (1,4 mg) a (1,5 mg) u kojících žen [4]. Také platí, že fyzicky aktivnější jedinci by měli zvyšovat příjem thiaminu. Optimální příjem tak může být problémem u určitých skupin sportovců, kteří konzumují nízkoenergetickou stravu například z důvodu účasti v soutěžích s různými hmotnostními kategoriemi. Mezi takové sportovce můžeme zařadit např. zápasníky. U takových jedinců se může vyskytnout nedostatečný příjem thiaminu [3].

1. 1. 1. 3 Zdroje thiaminu

Volný thiamin a jeho estery se vyskytují ve všech potravinách. Jen v některých z nich však ve významném množství. Většinou se thiamin objevuje v potravinách bohatých na sacharidy. Nejvýznamnější zdroje thiaminu jsou cereální výrobky, samotný chléb kryje asi 20% celkové potřeby. V obilovinách a luštěninách se thiamin nejčastěji vykytuje volný a je nejvíce obsažen v klíčku a aleuronové vrstvě. To znamená, že obsah v mouce je závislý na stupni vymletí. Další významné zdroje vitamínu B₁ jsou maso a masné výrobky. V živočišných tkáních se velké množství vitamínu objevuje ve formě thiamindifosfátu ve vazbě na bílkoviny. Ve vepřovém a kuřecím masu se thiamin vyskytuje ve formě thiamintrifosfátu. V mléce se vitamín B₁ objevuje jak volný, tak ve formě difosfátu. Další méně významné zdroje thiaminu jsou brambory, vejce, ovoce a zelenina [4].

1. 1. 1. 4 Projevy nedostatku thiaminu

Vlivem podvýživy nebo špatné absorpce thiaminu dochází k deficitu, který má za následek polyneuropatii, kardiomyopatii, poruchy hematoencefalické bariéry a metabolickou acidózu. Mezi nejznámější onemocnění způsobená nedostatkem vitamínu B₁ patří beri-beri a Wernicke-Korsakoffův syndrom [10].

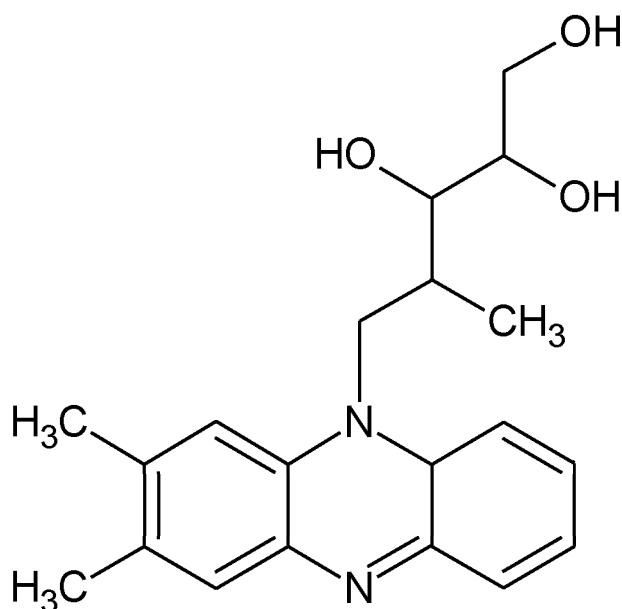
1. 1. 2 Vitamín B₂

1. 1. 2. 1 Struktura a vlastnosti

Vitamín B₂, který je také známý pod názvem riboflavin, je další ve vodě rozpustný vitamín. Plní důležité funkce v mnohých buněčných procesech, souvisejících s energetickým

metabolismem a metabolismem hlavních složek potravy [6]. Slouží jako prekurzor koenzymů flavin adenin dinukleotidu (FAD) a flavin mononukleotidu (FMN). Tudiž hraje významnou roli v energetickém metabolismu tuků, keto sloučenin, sacharidů, bílkovin a mimo jiné také léčiv. Vitamín B₂ se rovněž podílí na podpoře imunitního a nervového systému, tvorbě červených krvinek, produkci buněk a aktivaci folátu a pyridoxinu. Riboflavin se také vyznačuje silným antioxidačním potenciálem, který je odvozený z jeho role jako prekurzoru FAD a FMN [11].

Chemická struktura vitamínu B₂ je tvořena dvěma hlavními složkami, ribitolem, což je redukováná forma ribózy a flavinem. Flavin je molekula podobná pteridinu a tvoří ji tricyklický heteronukleární organický kruh, zvaný isoalloxazin. Po spojení těchto dvou molekul dojde ke vzniku riboflavinu [6].



Obrázek 2: Strukturní vzorec riboflavinu

1. 1. 2. 2 Doporučený příjem

Rostliny a mikroorganismy jsou schopny riboflavin syntetizovat a to na rozdíl od lidí a dalších živočichů, kteří musí vitamín B₂ získávat pomocí stravy [11]. Doporučený příjem riboflavinu je závislý na příjmu energie. [3] Doporučená denní dávka vitamínu B₂, která se uvádí, je asi 1,1 mg pro ženy a 1,3 mg pro muže [9].

1. 1. 2. 3 Zdroje riboflavinu

Riboflavin jako FMN a FAD, méně často jako volný vitamín, nalezneme v potravinách živočišného původu [4]. Nejvýznamnějšími zdroji vitamínu B₂ jsou v „západní“ stravě mléko a mléčné výrobky, čímž je riboflavin výjimečný mezi všemi ve vodě rozpustnými vitamíny. Například výzkumy ve Velké Británii ukázaly, že mléko a mléčné výrobky přispívají k příjmu tohoto vitamínu zhruba z 51 % u dětí v předškolním věku, 27 % u dospělých lidí a asi 36 % u seniorů [12]. V mléce je riboflavin také z části vázán na α -S a β -kasein. Kromě riboflavinu se v mléce vyskytují také další flaviny, např. 10-(2-hydroxymethyl)flavin [4]. Dalšími dobrými zdroji vitamínu B₂ v živočišné stravě jsou maso, zejména droby a také tučné ryby [12]. Platí, že riboflavin se lépe absorbuje z živočišných potravin. V potravinách rostlinného původu převládají kovalentně vázané formy, které se hůře štěpí proteasami. Kromě riboflavinu, FMN a FAD jsou ve vyšších rostlinách a mikroorganismech obsaženy mnohé další deriváty, např. glykosidy a estery, které vykazují podobnou biologickou aktivitu jako riboflavin [4]. Z rostlinné stravy jsou hlavní zdroje vitamínu B₂ obiloviny, ovoce a zelenina, zejména tmavě zelená [12]. Riboflavin je také ve významném množství zastoupen v pivu a bohatým zdrojem je i droždí [4].

Co se týká stability, tak riboflavin je velice stabilní vůči působení tepla a kyslíku. Naopak snadno ho ničí ultrafialové paprsky a sluneční svit [11]. Je proto dobré ty potraviny, které obsahují významné množství vitamínu B₂, uchovávat v neprůhledných nebo alespoň tmavých obalech [4].

1. 1. 2. 4 Projevy nedostatku riboflavinu

Jelikož je riboflavin rozšířen ve většině běžně přijímaných potravinách, je jeho nedostatek neobvyklý [3]. Po trávení a absorpci se metabolity a nestrávené mateřské molekuly riboflavinu vylučují z těla močí. Tato tendence vylučovat riboflavin vytváří možnost nedostatku riboflavinu. Kromě toho mají někteří jedinci abnormality, které brání správné absorpci riboflavinu ve střevech [6]. Nedostatek vitamínu B₂ zvaný ariboflavinosa je vzácný. Projevuje se především zánětlivými změnami pokožky (dermatitidami) a sliznic [4]. Nedostatek riboflavinu většinou souvisí s deficitem některého z dalších vitamínů B. Hlavními příznaky jsou například stomatitida, včetně zarudlého jazyka, bolest v krku, praskání rtů a koutků úst [11]. Nedostatek vitamínu B₂ je místně ojedinělý, a to zejména u populací, kde se ve stravě neobjevuje maso a mléčné výrobky. I vegetariáni, kteří konzumují stravu založenou zejména

na ovoci a zelenině, mohou nedostatku riboflavinu předejít a to přesto, že u vegetariánů může být příjem vitamínu nižší než u všežravců [12].

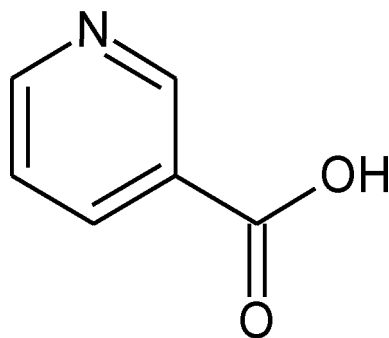
1. 1. 3 Vitamín B₃

1. 1. 3. 1 Struktura a vlastnosti

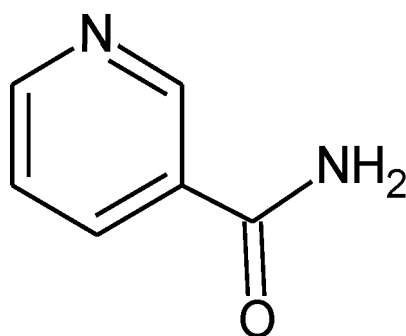
Vitamín B₃, také známý jako niacin, je další z řady vitamínu rozpustných ve vodě [13]. Jeho chemický název je kyselina pyridin-3-karboxylová. Je to tedy derivát pyridinu a obsahuje postranní řetězec funkční karboxylové kyseliny, připojený v poloze 3 nebo může být karboxylová kyselina substituována kboxamidovou skupinou [6]. Vitamín B₃ nese společné označení pro kyselinu nikotinovou a její amid, nikotinamid, přičemž obě sloučeniny disponují stejnou biologickou účinností [4]. Nikotinamid je přírodním derivátem niacinu [14]. Je důležitou složkou nikotinamid adenin nukleotidu (NAD), jak oxidované (NAD⁺), tak redukované formy (NADH). Jeho fosforečné estry jsou pak také součástí nikotinamid adenin nukleotidfosfátu (NADP), resp. NADP⁺ a NADPH, což jsou kofaktory mnoha enzymů. Tyto kofaktory se podílí na přenosu elektronů v dýchacích systémech, například jsou zastoupeny v mnoho reakcích Krebsova cyklu [4].

Niacin je extrémně důležitý pro uvolňování energie v tkáních a buňkách. Významná je jeho spolupráce s thiaminem a riboflaviem (vitamíny B₁ a B₂). Společně pomáhají udržovat zdravý trávicí a nervový systém. Niacin je také nezbytný pro růst a podílí se na syntéze hormonů [15].

Vitamín B₃ se vyznačuje tím, že může být získáván nejen z potravy, ale také může být enzymaticky syntetizován z tryptofanu. Uvádí se, že přibližně 60 mg tryptofanu je zapotřebí na produkci 1 mg niacinu. U tohoto děje je mimo jiné důležitá přítomnost vitamínů B₂ a B₆ [14].



Obrázek 3: Strukturní vzorec kyseliny nikotinové



Obrázek 4: Strukturální vzorec nikotinamidu

1. 1. 3. 2 Doporučený příjem

Potřeba vitamínu B₃ není přesně daná, jelikož je závislá na mnoha faktorech, jako je například množství konzumovaných bílkovin, respektive tryptofanu a leucinu, jenž inhibuje biosyntézu NAD [4]. Průměrná denní hodnota RDA pro niacin byla stanovena v rozmezí 12 až 16 mg pro muže a 12 až 14 mg pro ženy (od 9 let do stáří nad 70 let) [16].

1. 1. 3. 3 Zdroje niacinu

Nejdůležitějším a také nejbohatším zdrojem vitamínu B₃ jsou masné výrobky. Uvádí se, že více než třetina dodávaného niacinu (ve Velké Británii) pochází z masa a masných výrobků. Zhruba polovina niacinu, které získáváme z masa, pochází z tryptofanu, který tělo dokáže vstřebávat snadněji než niacin získávaný z rostlinných zdrojů [17]. Celkové množství niacinu v mase se pohybuje v rozmezí 5–15 mg/ 100 g. Další živočišné zdroje, jako je mléko a další mléčné výrobky, obsahují daleko méně niacinu (< 0,1 mg/ 100g). Co se týče potravin rostlinného původu, tak ovoce, zelenina a zejména pak luštěniny jsou poměrně dobrým zdrojem vitamínu B₃ (0,7–2,0 mg/ 100g). Zelené kávové boby zase obsahují sloučeninu trigonelin, která se pak v průběhu pražení přeměňuje na kyselinu nikotinovou. Platí zde, že čím více pražené boby, tím více kyseliny nikotinové obsahují. Například u tmavě upražených bobů je obsah kyseliny nikotinové až 500 mg/ kg [18]. V obilovinách je obsah niacinu také vysoký, ovšem je zde problém při dalším zpracování. Niacin je lokalizován zejména v klíčku a v otrubách, a proto při loupání a například mletí pšenice dochází k velkým ztrátám [4].

1. 1. 3. 4 Projevy nedostatku niacinu

Nedostatečný příjem vitamínu B₃ způsobuje onemocnění nazývané pelagra [17]. Název tohoto onemocnění pochází ze slov „pelle“, což znamená kůže a „agra“, tedy drsný.

Jak už tedy název napovídá, jedná se o kožní onemocnění, ovšem gastrointestinální příznaky dermatitidě vždy předcházejí.

Pelagra se v drtivé většině vyskytuje v rozvojových zemích, kde kukuřice a výrobky z ní tvoří významnou složku potravy [14]. Obsah niacinu v kukuřici je velmi nízký [6]. Nejvyšší výskyt je v některých oblastech Indie a afrického kontinentu. Pelagra je také často spojována s obdobím hladovění a silným slunečním svitem.

Mezi hlavní klinické příznaky pelagry patří dermatitida, průjem a demence [17]. Diagnóza by se tedy měla zaměřit na tyto tři body, tzv. „3D“. Mezi další nálezy v průběhu onemocnění patří anémie, hypoproteinémie, zvýšená hladina vápníku, a naopak snížené hladiny draslíku a fosforu v séru a také zvýšená hodnota sérového porfyrinu. Pro úplnou diagnózu pelagry však neexistují žádné chemické testy, avšak diagnózu lze snadno navrhnout určením hladin niacinu a tryptofanu v krvi.

Pelagra je onemocnění vyskytující se zejména u dospělých lidí, a to bez rozdílu pohlaví a rasy. Během dětství se vyskytuje jen zřídka [14]. Byla zjištěna jistá spojitost s alkoholismem. Pelagra se totiž vyskytuje u podvyživených alkoholiků a také bylo zjištěno, že je spojena s příjmem mykotoxinů plísně *Fusarium* [17]. Případy pelagry se také objevily u pacientů závislých na drogách a pacientů s malabsorpčními stavy.

I v případech, kdy je zajištěn dostatečný příjem niacinu ve stravě, může dojít k rozvoji pelagry. Vlivem jiných onemocnění nebo stavů je totiž narušena jeho absorpce nebo zpracování. Patří sem například dlouhotrvající průjem, nervová anorexie, chronický alkoholismus, chronická kolitida, ileitida, jaterní cirhóza nebo karcinoidní tumor [14]. Pelagra se také vyskytuje při tzv. Hartnupově chorobě, což je autozomálně recesivní onemocnění se zhoršenou absorpcí některých aminokyselin, včetně tryptofanu.

Při léčbě pelagry se kromě niacinu obvykle podává riboflavin a pyridoxin, včetně stravy s bohatým obsahem kalorií a bílkovin. Psychické stavy mizí po 24–48 hodinách, dermální léze pak až po 3–4 týdnech [17].

1. 1. 4 Vitamín B₅

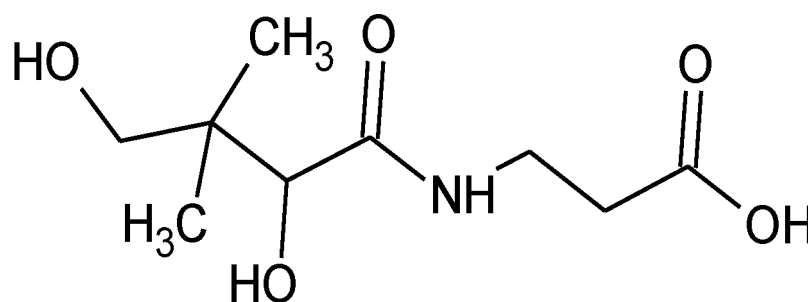
1. 1. 4. 1 Struktura a vlastnosti

Vitamín B₅, jinak také nazývaný jako kyselina pantothenová, je další z řady vitamínů rozpustných ve vodě [13]. Jeho struktura se skládá z β-alaninu, který je připojený amidovou vazbou na 2,4-dihydroxy-3,3-dimethylbutyrovou (pantoovou) kyselinu [19]. V přírodě

se vyskytuje pouze (R)-enantiomer pantothenové kyseliny, její L-(-)-forma, respektive (S)-enantiomer není biologicky aktivní a funguje jako antimetabolit (R)-pantothenové kyseliny [4].

Kyselina pantothenová je prekurzor koenzymu A (CoA), jenž plní důležité funkce v celé řadě zásadních reakcí, konkrétně v oxidaci mastných kyselin, katabolismu aminokyselin, syntéze acetylcholinu, hemu a funguje také jako protetická skupina v Krebsově cyklu [16]. Thioesterový derivát CoA, který se tvoří s organickými kyselinami, usnadňuje velké množství metabolických procesů, založených většinou na příjmu či odstraňování acylových skupin v biosyntetických a katabolických reakcích [19].

Kyselina pantothenová je životně důležitá pro uvolňování energie z potravy, pro správný a zdravý vývoj a pro produkci protilátek. Pro správnou funkci kyseliny pantothenové je také nezbytná přítomnost některých dalších vitamínů, konkrétně se jedná o vitamín A, vitamín B6, vitamín B12, vitamín B9 a vitamín B3 [15].



Obrázek 5: Strukturální vzorec kyseliny pantothenové

1. 1. 4. 2 Doporučený příjem

Vzhledem k tomu, že nedostatečný příjem vitamínu B₅ je velice vzácný, nejsou stanoveny žádné mezní hodnoty RDA. Uvádí se pouze tzv. adekvátní (postačující) hodnota příjmu, která je v současnosti na hodnotě zhruba 5 mg/ den pro dospělé muže a ženy [20]. Také platí, že adolescenti, těhotné a kojící ženy, by měli přijímat o něco více tohoto vitamínu [4].

1. 1. 4. 3 Zdroje kyseliny pantothenové

V přírodě je kyselina pantothenová široce rozšířena jak v rostlinách, tak v živočiších [21]. Střevní mikroorganismy mají schopnost kyselinu pantothenovou syntetizovat.

Produkované množství a její role ve výživě však známa není [15]. Jen malá část z celkového obsahu vitamínu B₅ vystupuje jako volná kyselina pantothenová. Velká část se vyskytuje ve vázaných formách, tedy CoA, acyl CoA a proteinu nazývaném ACP. Obsah v jednotlivých potravinových zdrojích je velice proměnlivý [4]. Mezi nejdůležitější potraviny s vysokým výskytem vitamínu B₅ patří kvasnice, maso, vnitřnosti (játra, ledviny, srdce, mozek), obiloviny, luštěniny, ořechy, ovoce a zelenina [15; 22]. V mléce je v porovnání s dalšími potravinami živočišného původu obsah kyseliny pantothenové nízký. Obsah vitamínu B₅ v mouce je podobně jako u niacinu ovlivněn vymíláním. Celozrnné výrobky obsahují vyšší množství kyseliny pantothenové [4].

Ztráty kyseliny pantothenové v průběhu kulinářských a technologických úprav nejsou obvykle příliš vysoké. V mase jsou ve srovnání s ostatními vitamíny B-komplexu ztráty menší. Při zpracování mléka činí ztráty do 10 % [21; 22]. Konkrétně například pasterace mléka nemá na obsah téměř žádný vliv. I při fermentaci ve fermentovaných mléčných výrobcích jsou ztráty jen nepatrné. Nepříznivý vliv na hodnoty vitamínu B₅ má skladování a různé tepelné úpravy. „Ztráty vyluhováním do vody během operací jako je mytí, blanširování a vaření bývají často vyšší než ztráty způsobené hydrolýzou“ [4].

1. 1. 4. 4 Projevy nedostatku kyseliny pantothenové

Jelikož je kyselina pantothenová obsažena téměř ve všech běžných potravinách, jsou projevy jejího nedostatku velmi vzácné. Během hladovění se nedostatek vitamínu B₅ může projevit. Objevené symptomy lze však snadno odstranit, a to pouhým dodáním kyseliny pantothenové [6].

Klinické příznaky způsobené nedostatečným příjmem vitamínu B₅ byly pozorovány pouze u lidí, kterým byla podávána strava bez obsahu nebo s nízkým obsahem kyseliny pantothenové nebo strava s w-methyl pantothenovou kyselinou, která je antagonistou vitamínu. Příznaky pozorované v těchto experimentech byly různorodé. Zahrnovaly neuromotorické poruchy, mentální deprese, gastrointestinální změny a různé metabolické poruchy [23].

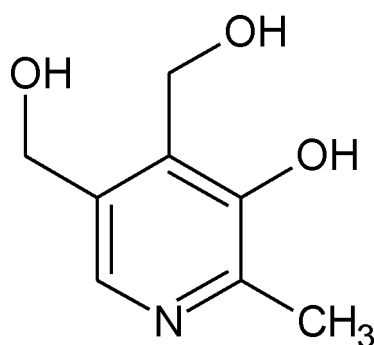
1. 1. 5 Vitamín B₆

1. 1. 5. 1 Struktura a vlastnosti

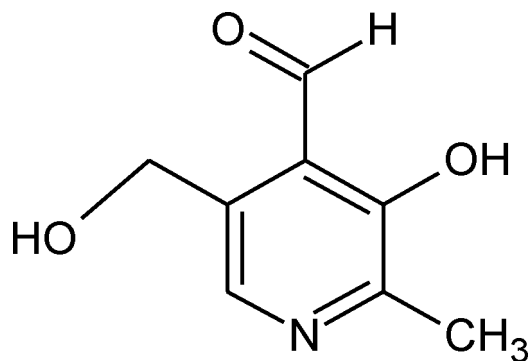
Vitamín B₆ (pyridoxin) je označení pro skupinu 2-methyl-3-hydroxy-5-hydroxymethylpyridinů s vitamínovou aktivitou. Vitamín zahrnuje různé formy, které se liší na základě rozdílného substituentu na uhlíku v poloze 4. Patří sem pyridoxol, který má jako

substituent alkohol, pyridoxal, kde je substituent aldehyd a pyridoxamin, jenž obsahuje aminovou skupinu. Všechny tři formy mohou být fosforylovány na 5'-hydroxymethylové skupině. Pak získáme pyridoxin 5'-fosfát (PNP), pyridoxal 5'-fosfát (PLP) a pyridoxamin 5'-fosfát (PMP) [19].

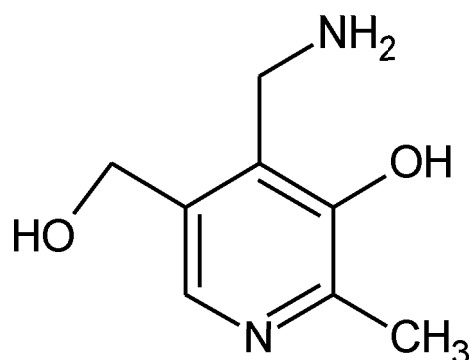
Forma PLP je biologicky nejaktivnější formou tohoto vitamínu. Jedná se o kofaktor pro transaminázy, dekarboxylázy, racemázy a mnoho dalších enzymů, které se účastní metabolických přeměn aminokyselin a dalších dusíkatých látek [24]. Společně s formou PMP plní funkci koenzymů ve více než 140 enzymatických reakcích, a to nejen v metabolismu aminokyselin, ale také sacharidů, neurotransmiterů a lipidů [19]. Během tělesné aktivity je PLP potřebný pro glukoneogenezi a pro glykogenolýzu, ve které PLP slouží jako kofaktor pro glykogenfosforylázu [3]. Celkově je vitamín B₆ nezbytný pro správné fungování nervového systému, kůže, svalů, krve a je také zapojen do produkce hormonů [15]. Pyridoxal, pyridoxamin a jejich fosforylované formy, mají možnost vzájemné přeměny transaminací. Z toho důvodu vykazují všechny formy vitamínu B₆ stejnou biologickou aktivitu [4].



Obrázek 6: Strukturní vzorec pyridoxolu



Obrázek 7: Strukturní vzorec pyridoxalu



Obrázek 8: Strukturální vzorec pyridoxaminu

1. 1. 5. 2 Doporučený příjem

Doporučený denní příjem vitamínu B₆ je zhruba 1,5 mg pro dospělé muže a 1,1 mg pro dospělé ženy [25]. Pro kojence platí doporučený příjem vitamínu B₆ asi 0,3 mg za den. Naopak zvýšená dávka se doporučuje těhotným a kojícím ženám (až 2,6 mg) [4]. Tento zvýšený příjem je potřebný z důvodů dalších požadavků plodu, respektive dítěte [15]. Co se týká sportovců, kteří mohou být postiženi nižším příjmem některých vitamínů, obvykle konzumují dostatečné množství pyridoxinu. Nedostatečný příjem vitamínu B₆ je u nich pouze zapříčiněn nízkoenergetickým příjmem nebo špatným výběrem stravy [3].

Některé výzkumy dokazují, že průměrný příjem vitamínu B₆ u dospělých jedinců značně převyšuje doporučené denní dávky a je v rozmezí 1,5–4,9 mg/ den. I přes takto vysoký příjem pyridoxinu se však až u téměř čtvrtiny starších lidí objevuje špatný biochemický stav vitamínu B₆. To naznačuje, že staří lidé by mohli mít zvýšené požadavky na příjem vitamínu B₆ v porovnání s ostatními dospělými [23].

1. 1. 5. 3 Zdroje pyridoxinu

Vitamín B₆ nalezneme jak v živočišných, tak v rostlinných potravinách. Nejbohatšími zdroji jsou maso, zvláště drůbež a ryby, dále pak luštěniny a obiloviny, vejce, fazole a hnědá rýže [23; 24]. Vysoký výskyt pyridoxinu je také v celozrnném chlebu, banánech, kvasničném extraktu, ořechách a játrech [15].

V živočišných potravinách se pyridoxin většinou vyskytuje jako pyridoxal a pyridoxamin, především ve formě svých fosforečných esterů. Konkrétně v mase tvoří hlavní podíl vitamínu B₆ PLP, který je navázaný na bílkoviny.

Rostlinné potraviny obsahují především pyridoxol a pyridoxal [4]. Obecně se zde vyskytují ve velkém množství, především v bramborách, obilninách, luštěninách, zelenině a pomerančích. Je zde ale problém, že jsou zde ve formě pyridoxinových glukosidů, pro které platí, že mají špatnou biologickou dostupnost [23]. Navíc je v rostlinách obsaženo velké množství vlákniny, která má za následek neúplné trávení [24].

1. 1. 5. 4 Projevy nedostatku pyridoxinu

Nedostatek vitamínu B₆ je v rozvinutých zemích velmi vzácný. Nicméně i zde byly hlášeny nízké hladiny pyridoxinu u starších lidí, kuřáků a alkoholiků. Mezi projevy nedostatku vitamínu B₆ patří nespavost, slabost, deprese, záněty dutiny ústní, jazyka, rtů a také narušená imunita. Nízká koncentrace pyridoxinu v těle je také spojena s rizikem rakoviny, kardiovaskulárních chorob a cukrovky [24].

Specifické klinické projevy nedostatku vitamínu B₆ se u lidí téměř neobjevují. Nedostatečný příjem jakékoliv stravy s nízkým výskytem tohoto vitamínu, se u člověka projeví i nedostatkem dalších vitamínů B-komplexu [26]. Například záněty jazyka, rtů a koutků úst lze rovněž pozorovat při nedostatku riboflavinu nebo periferní neuropatie, která je projevem nedostatku thiaminu.

Byla také zkoumána spojitost nedostatku riboflavinu se zvýšenou koncentrací homocysteinu, což je rizikový faktor pro vznik kardiovaskulárních onemocnění. Několik kroků metabolismu homocysteinu totiž závisí na pyridoxinu. Nakonec byla zjištěna jen nepatrná spojitost množství vitamínu B₆ s koncentrací homocysteinu. Mnohem více tato koncentrace souvisí se stavem kyseliny listové a vitamínu B₁₂ [17].

1. 1. 6 Vitamín B₇

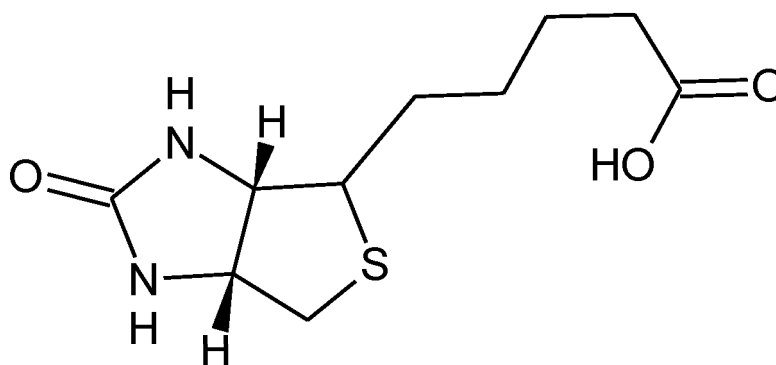
1. 1. 6. 1 Struktura a vlastnosti

Vitamín B₇ (biotin) je bicyklický vitamín rozpustný ve vodě. Přirozeně se vykytují dvě formy biotinu, d-biotin a biocytin. Celý kruhový systém vitamínu se může vyskytovat v 8 možných stereoizomerech, ovšem pouze d-biotin je přirozeně biologicky aktivní [19]. Dříve se d-biotin označoval jako vitamín H [4].

Jedná se o nepostradatelnou mikroživinu pro normální fungování lidského organismu. Je totiž nezbytný pro správný metabolismus a proliferaci buněk. V metabolismu funguje biotin jako kofaktor pěti enzymů karboxyláz, které hrají významnou roli v metabolismus mastných kyselin, glukózy, mitochondriálních sacharidů, lipidů a aminokyselin. Byla také zjištěna

důležitá role vitamínu B₇ v metabolismu buněčné energie, tedy v produkci ATP. Biotin se navíc podílí na regulaci buněčného oxidačního stresu a v genové expresi, kde je pravděpodobné, že více než 2000 genů je ovlivněno stavem biotinu. Nové důkazy také nasvědčují, že biotin má také vliv na správné fungování imunitního systému. Je totiž nezbytný pro správnou aktivitu T-lymfocytů, tvorbu tzv. cytotoxických lymfocytů a vůbec pro zrání imunitních buněk [23; 27]. Biotin je potřebný pro všechny živé buňky. Syntetizovat ho dokáže pouze většina mikroorganismů, některé houby a vyšší rostliny [4].

Co se týká stability, je biotin velmi stabilní vůči teplu, světlu i kyslíku. Jeho degradaci způsobují velmi vysoké i nízké hodnoty pH, protože dochází k hydrolyze amidové vazby v jeho struktuře. Vitamín B₇ může být také citlivý na podmínky oxidace, např. vlivem expozice peroxidu vodíku. Může dojít k oxidaci síry ve struktuře vitamínu za vzniku sulfoxidu nebo sulfonu, tedy biologicky neaktivních forem biotinu [19].



Obrázek 9: Strukturální vzorec biotinu

1. 1. 6. 2 Doporučený příjem

Denní potřeba vitamínu B₇ je pro lidský organismus velmi nízká a bez problému je kryta množstvím obsaženým v běžné stravě a činností střevních mikroorganismů [4].

Správný denní příjem biotinu by se měl pohybovat v rozmezí od 5 µg pro malé novorozené děti až do 35 µg pro kojící ženy [28]. Doporučený příjem pro muže a ženy je v rozmezí 20–30 µg/ den. Nižší potřeba biotinu platí pro malé děti ve věku od 1 do 8 let, u kterých je dostatečné denní množství vitamínu B₇ 8–12 µg. Stejně jako u kojících žen, platí zvýšená potřeba biotinu během těhotenství (30 µg/ den) [29].

1. 1. 6. 3 Zdroje biotinu

V potravinách je biotin široce rozšířen, obzvláště bohatými zdroji biotinu jsou ořechy, vaječné žloutky, játra, mléčné výrobky a některé druhy ovoce a zeleniny (maliny, avokádo, zelí, banány). Jeho obsah však u většiny potravin nebyl stanoven a ani nemá biologickou dostupnost [23]. Biotin se částečně vyskytuje jako volná látka (mléko, ovoce, zelenina). V některých potravinách, zvláště pak v živočišných tkáních, rostlinných semenech a kvasnicích je vázaný na bílkoviny. Jeho obsah v mouce je závislý na stupni vymletí. Velmi bílá mouka obsahuje něco přes 10 % původního množství, které se vykytuje v zrně [4].

Příjem vitamínu B₇ ve stravě u „západní“ populace se průměrně pohybuje mezi 35–70 µg/den. Kojenci, kteří vypijí asi 800 ml mateřského mléka, přijímají cca 6 µg biotinu. Stále není jasné, jak moc nebo zda vůbec syntéza vitamínu B₇ střevními mikroorganismy přispívá k celkové absorpci biotinu [28].

1. 1. 6. 4 Projevy nedostatku biotinu

Jelikož je biotin široce rozšířen ve většině potravin, je jeho nedostatek u lidí velmi vzácným jevem [16]. Projevy nedostatku byly popsány u pacientů s deficitem enzymu biotinidázy (BTD), u těžce podvyživených dětí v rozvojových zemích a také u jedinců, jejichž strava je založena na příjmu velkého množství vaječného bílku [28]. Syrový vaječný bílek totiž obsahuje glykoprotein avidin, který je nerozpustný ve vodě a ke kterému se biotin váže pomocí nekovalentních vazeb. Avidin tedy tvoří s biotinem pevný komplex, jenž je pro tělo nevyužitelný. Po tepelné úpravě vajec se však avidin denaturuje a s biotinem nijak nereaguje [4].

Mezi hlavní projevy nedostatku biotinu patří vyrážka v obličeji, zánět spojivek, vypadávání vlasů, ataxie, hypotonie, organická acidurie, různé kožní infekce a vývojové zpoždění kojenců a dětí [28]. Dalšími projevy nedostatku pak jsou i neurologické poruchy, jako například deprese, letargie nebo parestezie [23]. Experimentálními pokusy na zvířatech bylo dokázáno, že nedostatek vitamínu B₇ může mít také teratogenní účinky [16].

Nedostatek biotinu má nepříznivý vliv na správné buněčné imunitní funkce. Například u dětí, které mají dědičné poruchy metabolismu biotinu, může dojít k vývoji kožních kandidóz, které se projevují nedostatkem imunoglobulinu A se sníženým množstvím T lymfocytů v krvi. Deficit biotinu u lidí také může způsobovat změny ve složení mastných kyselin. U pacientů, u kterých došlo během parenterální (umělé) výživy k nedostatku biotinu, se zvýšil podíl mastných kyselin s lichým řetězcem. To může být znak snížené aktivity propionyl-CoA karboxylázy [28].

1. 1. 7 Vitamín B₉

1. 1. 7. 1 Struktura a vlastnosti

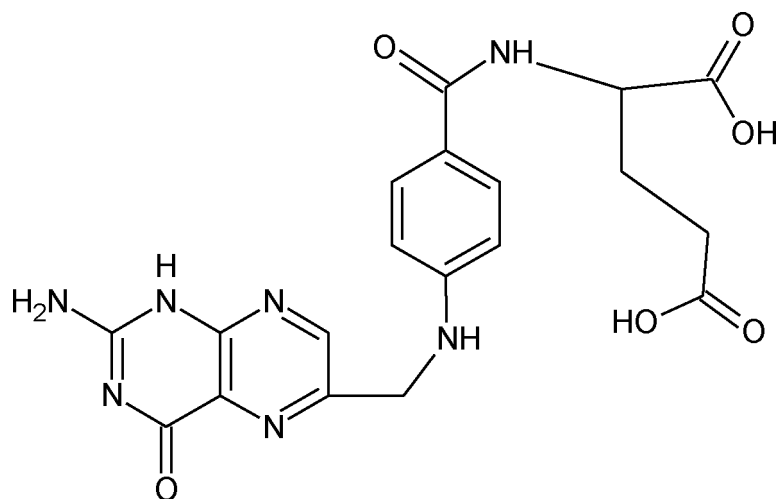
Vitamín B₉ je další vitamín rozpustný ve vodě. Je také znám pod dalšími názvy, jako folacin, kyselina listová nebo kyselina pteroylglutamová (v minulosti nazývaná také jako vitamín M) [13]. Obecný název vitamínu B₉, který se používá je folát [2]. Pojmy folát a kyselina listová jsou často zaměňovány, i když jsou mezi nimi důležité rozdíly. Kyselinou listovou označujeme syntetickou formu vitamínu B₉, kterou můžeme najít v obohacených potravinách a doplňcích stravy. Naopak foláty jsou přírodní formy vitamínu B₉, běžně se vyskytující v rostlinách a živočišných tkáních [23].

Folát není ve své přirozeně se vyskytující formě stabilní, a to jak v průběhu skladování nebo zpracování potravin [30]. Je totiž citlivý na teplo a světlo [11]. Naopak kyselina listová, díky své stabilitě, může být použita k obohacení potravin [30]. Existují mezi nimi tedy určité rozdíly ve struktuře, jenž také způsobují rozdílnou biologickou dostupnost [23]. Kyselina listová se vyskytuje v oxidovaném stavu a obsahuje pouze jeden glutamátový zbytek. Přirozeně se vyskytující formy folátu, které slouží jako koenzymy a regulační molekuly, jsou převážně ve formě redukované, například tetrahydrofoláty (THF) a většinou obsahují více glutamátových zbytků [30].

Nezbytnou funkci plní folát při přenosu uhlíku v metabolismu nukleových kyselin a aminokyselin. Je potřebný pro syntézu purinů a pyrimidinů, nezbytných na tvorbu DNA a erytropoézu [3]. Vitamín B₉ je naprosto nezbytný pro buněčné dělení a růst tkání. Navíc hraje důležitou roli v časném vývinu plodu.

Pro správné metabolické fungování se folát musí nacházet v redukované formě THF. Biologicky aktivní jsou různé formy THF. Nejčastěji vyskytující formou je 5-methylTHF, který se nachází v buňkách a volně cirkulující v plazmě.

Absorpce folátů ve střevě je dvoustupňový proces, jenž spočívá nejprve v hydrolýze polyglutamátů na monoglutamátové deriváty a následném transportu střevními membránami. Biologická dostupnost folátů je různá a často velmi omezena. Naopak biologická dostupnost kyseliny listové je při použití jako doplněk stravy 100 %, v obohacené potravě má asi 85 % biologickou dostupnost [23].



Obrázek 10: Strukturní vzorec folátu

1. 1. 7. 2 Doporučený příjem

RDA folátu je u dospělých mužů i žen asi 400 μg [9]. Vyšší příjem 500 μg / den se doporučuje ženám během kojení. 600 μg folátu denně se pak doporučuje přijímat ženám těhotným. Potřeba folátu u dětí není příliš vysoká. RDA pro děti ve věku 1–8 let je přibližně 150–200 μg [29].

1. 1. 7. 3 Zdroje folátu

Nejvýznamnějším zdrojem folátů, které se přirozeně vyskytují ve stravě, jsou listová zelenina, chřest, luštěniny, játra a kvasnice. Kyselinu listovou lze pak najít v obohacených potravinách a doplňcích stravy. Potraviny, které jsou obohaceny kyselinou listovou, pozitivně přispívají k udržení optimálního stavu folátu u lidí po celém světě [23]. V čerstvých potravinách se vitamín B₉ nejčastěji vyskytuje ve formě 5-methyltetrahydrofolátu a 10-formyltetrahydrofolátu [4].

1. 1. 7. 4 Projevy nedostatku folátu

Nedostatek kyseliny listové je uváděn jako nejčastěji se vyskytující vitamín, u kterého je problémem jeho nedostatek. Například v USA postihuje nedostatek vitamínu B₉ asi 10 % dospělé populace a až 60 % mladých nebo starších lidí z ekonomicky slabých skupin [31]. Nízký příjem folátu se nejdříve projeví jeho sníženou koncentrací v séru, poté sníženou koncentrací folátu erytrocytů, a naopak zvýšenou koncentrací homocysteinu, což je předchůdce

onemocnění megaloblastické anémie [3]. Celková koncentrace homocysteinu v plazmě je spolehlivý ukazatel stavu vitamínu B₉ v těle, jelikož pro normální metabolismus homocysteinu je vyžadována dostatečná zásoba folátu. Platí tedy, že pokud je stav folátu nízký, je zvýšena koncentrace plazmatického homocysteinu [23].

Velký nedostatek folátu způsobuje u lidí megaloblastickou anémii [31]. Jedná se o onemocnění, které je charakterizováno abnormálním vývojem červených krvinek v kostní dřeni. Jaderný vývoj je u těchto krvinek zastaven, cytoplazmatický vývoj, včetně homoglobinizace pokračuje. V krvi se pak objevují oválné makrocysty [32]. Stejný typ anémie je ovšem také způsobem nedostatkem vitamínu B₁₂ [3]. Rovněž jsou obavy, že příliš vysoký příjem folátu může maskovat deficit vitamínu B₁₂ [17].

Nedostatek folátu během těhotenství má u novorozenců za následek defekty neurální trubice. Špatný stav folátu je rovněž považován jako rizikový faktor různých srdečních onemocnění [31]. Jeho nedostatek se celkem běžný u chronických alkoholiků, u kterých dochází ke snížené absorpci střevní sliznice, jater a zvýšenému vylučování močí [23].

1. 1. 8 Vitamín B₁₂

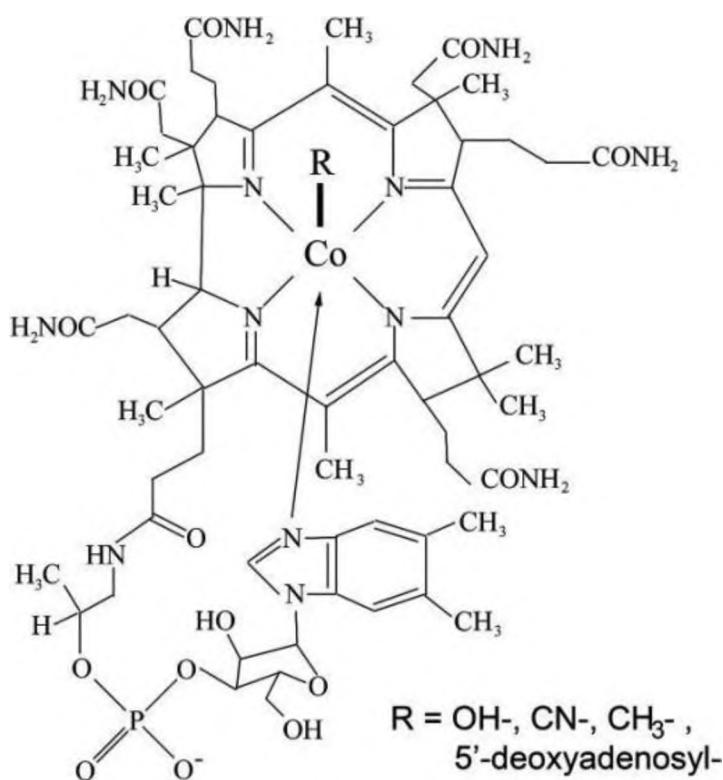
1. 1. 8. 1 Struktura a vlastnosti

Vitamín B₁₂ je komplexní molekula, jejíž strukturu tvoří korinový kruh. Centrálním atomem je pak kobalt. Jedná se o vitamín rozpustný ve vodě, který je citlivý na světlo, oxidační a redukční činidla [11]. Atom kobaltu je schopen s ligandy utvořit až 6 koordinačních vazeb. Čtyři z nich jsou atomy dusíku pyrrolových jader, pátou vazbu může tvořit 5,6-dimethylbenzimidazol v α -poloze [4]. Tento ligand je společný pro všechny kobalaminy [33]. Šestá koordinační vazba v β -poloze může být tvořena různými funkčními skupinami, sloučeninami nebo nemusí být obsazena vůbec. Přirozeně se vyskytující kobalaminy zde mají navázány adenosin, respektive 5'deoxyadenosylový zbytek (adenosylkobalamin, respektive koenzym B₁₂) methylový zbytek (methylkobalamin), hydroxylovou skupinu (hydroxykobalamin) nebo vodu (akvakobalamin). Kyanokobalamin (CN skupina) je syntetická forma vitamínu, která se používá například ve farmaceutických přípravcích a která je metabolizována na vlastní účinný koenzym B₁₂. V různých reakčních podmínkách zde můžou být navázány i další ligandy. Pokud základ tvoří korinový skelet, nazývají se souhrnně korinoidy [4].

Vitamín B₁₂ plní funkci důležitého kofaktoru pro 3 kobalamin dependentní enzymy, které se podílejí na syntéze červených krvinek, metabolismu mastných kyselin a umožňují také

dostupnost folátů. Jejich nejdůležitější funkce jako koenzymu se týkají enzymů methionin syntázy, methylmalonyl-CoA mutázy a ribonukleotid reduktázy [34]. Vitamín B₁₂ je rovněž zapojen do metabolismu homocysteinu a kyseliny methylmalonové. Je tedy důležitý pro správný vývoj kostní dřeně a centrální nervový systém [35]. Adenosylkobalamin působí jako kofaktor enzymu methylmanolyn-CoA mutázy. Ten přeměňuje methylmanolyn CoA na sukcinyl CoA, což je metabolit v cyklu tricarboxylové kyseliny. Methylkobalamin také plní funkci kofaktoru, tentokrát pro enzym methionin syntázu. Ta katalyzuje remethylaci homocysteinu na methionin, který je prekurzorem S-adenosylmethioninu. To je donor methylu, který se uplatňuje při methylaci fosfolipidů, neurotransmiterů, aminů, DNA, RNA a myelinového základního proteinu [23].

Absorpce vitamínu B₁₂ může nastávat dvěma způsoby. Při vyšších koncentracích vitamínu se uplatňuje difúze, jindy absorpce probíhá pomocí vnitřního faktoru mukoproteinu, jenž má schopnost vázat kobalaminy. Resorpce je v tomto případě docílena transportním systémem [33].



Obrázek 11: Strukturální vzorec kobalaminu [36]

1. 1. 8. 2 Doporučený příjem

V současnosti nebývá problémem přijímat dostatečné množství vitamínu B₁₂. Jeho příjem většinou značně převyšuje doporučení [23]. U dospělých lidí se doporučená denní dávka vitamínu B₁₂ pohybuje v rozmezí 2,4 až 2,8 µg, v závislosti na pohlaví a fyziologickém stavu [37]. RDA 2,6–2,8 µg/ platí pro těhotné, respektive kojící ženy [29]. Dětem od 1 do 18 let se doporučuje denně přijímat 0,9–2,4 µg tohoto vitamínu [37].

Nízký příjem vitamínu B₁₂ se může objevit u striktních vegetariánů a veganů, popřípadě u obyvatel v zemích, kde je nedostatek živočišné stravy [23]. Podle průzkumů mohou nedostatečným příjmem trpět rovněž sportovci na dietě s omezenou energií [3].

1. 1. 8. 3 Zdroje kobalaminu

Výskyt vitamínu B₁₂ je omezen pouze na potraviny živočišného původu. Jeho příjem je tedy naprosto závislý na příjmu živočišné stravy. Výjimku však tvoří potraviny, které jsou tímto vitamínem uměle obohaceny [37]. Přírodní zdroje vitamínu B₁₂ jsou tedy omezeny na maso, ryby, mléko a vejce. Co se týče již zmíněných obohacených jídel, jedná se například o cereálie.

Vůbec nejbohatším zdrojem vitamínu B₁₂ jsou orgány. Játra mohou obsahovat až 110 µg vitamínu B₁₂/ 100 g, ledviny pak o něco méně (15–54 µg/ 100 g). V hovězím, jehněčím a vepřovém mase je přítomno 1–3 µg vitamínu B₁₂ ve 100 g. Je tedy patrné, že 100 g porce masa poskytuje většinu, ne-li všechnu denní potřebu tohoto vitamínu [25]. Vitamín je během kulinářských úprav stabilní. Jeho ztráty při zpracování masa jsou závislé na použité technologii. Ani obsah v mléce se během zpracování příliš nemění. Pasterací dojde ke ztrátám do 10 %. Použitím *Propionibacterium shermanii*, při výrobě fermentovaných mléčných výrobků, se dokonce až třicetkrát zvyšuje obsah vitamínu v použitém mléce [4].

I některé rostlinné produkty jsou zdrojem vitamínu B₁₂. Množství v nich však neposkytuje vhodnou alternativu živočišných zdrojů, zejména pak z dlouhodobého hlediska. Vitamín B₁₂ je například obsažen u některých druhů hub [23]. Pouze stopové množství bylo zjištěno v hříbcích, bedlách, hlívě ústřičné a smržích. Oproti tomu, stroček trubkovitý nebo liška zlatá obsahují relativně velké množství vitamínu B₁₂ (1,09–2,65 µg/ 100 g sušiny). Znamená to, že konzumace zhruba 100 g sušeného stročka může poskytnout potřebné denní množství vitamínu. I přesto, že příjem tak velkého množství hub je téměř neproveditelné, jejich konzumace může mírně přispívat k prevenci nedostatku vitamínu B₁₂ u vegetariánů [38].

Kromě hub byl obsah vitamínu B₁₂ zjištěn také u dvou forem jedlých řas (*Enteromorpha sp.* a *Porphyria sp.*), jejichž konzumace v západní stravě však není rozšířená [23].

1. 1. 8. 4 Projevy nedostatku kobalaminu

S ohledem na to, že vitamín B₁₂ je více či méně omezen na potraviny živočišného původu, nedostatkem vitamínu B₁₂ jsou ohroženi zejména striktní vegetariáni a vegani. Riziko nedostatku je také u kojenců, kteří jsou kojeni veganskou matkou. Další rizikovou skupinu tvoří staří lidé, u kterých se může projevit snížená absorpce vitamínu z potravy [25]. Nejčastějším důvodem nedostatku vitamínu B₁₂ je tedy nízký příjem z potravy a špatná absorpce. Absorpce vitamínu B₁₂ je složitý proces, jenž zahrnuje mnoho kroků, které mohou být ovlivněny různými střevními onemocněními, infekcemi nebo léky [37].

Biochemické hodnocení stavu vitamínu B₁₂ zahrnuje hematologické ukazatele (hematokrit, hemoglobin a erytrocytární indexy), obsah vitamínu v séru a plazmě a koncentrace kyseliny methylmalonové v séru [3]. Mezi klinické příznaky nedostatku kobalaminu patří zejména megaloblastická anémie [23]. Jedná se o onemocnění, které se projevuje velkým úbytkem erytrocytů v důsledku jejich špatné maturace v kostní dřeni. Ve většině případů je způsobena nedostatečným množstvím vnitřního faktoru, jenž zodpovídá za absorpci vitamínu B₁₂ [33]. Pokud není léčena doplňky kobalaminu, způsobuje destrukci myelinových pochev kolem nervových vláken, což vede ke zhoršení zdravotního stavu a nakonec smrti [39]. U kojenců a starších dětí může nedostatek vitamínu B₁₂ způsobit poruchy ve vývoji a různé neurologické příznaky například hypotonii nebo křeče nervového systému [35]. Mezi další neurologické a psychické příznaky způsobené nedostatečným množstvím vitamínu B₁₂ patří ataxie, psychóza, demence, parestzie, dezorientace, výkyvy nálad, poruchy motoriky a špatná koncentrace. Nedostatek vitamínu B₁₂ je rovněž spojen s vysokou hladinou homocysteinu v krvi, což může být jeden z hlavních faktorů různých cévních onemocnění [40].

2 METODY EXTRAKCE A STANOVENÍ VITAMÍNU B₁₂

Struktura vitamínu B₁₂ je nejsložitější ze všech vitamínů. V přírodních materiálech se vitamín B₁₂ vyskytuje převážně v koenzymových formách, které jsou většinou vázány na buněčné proteinové složky. Tyto proteinové složky musí být před samotnou extrakcí denaturovány na formu vhodnou pro analytické stanovení [41]. Stanovení vitamínu B₁₂ v původních, přirozeně neobohacených potravinách je poměrně náročné. Důvodem je jeho nízká koncentrace. Obsah vitamínu B₁₂ v potravinách živočišného původu se pohybuje řádově v µg/ 100 g (mléko (0,9 µg), sýr (2,4 µg), maso (1–2 µg), játra (83 µg)).

Různé formy, které se v potravinách vyskytují, jsou citlivé na světlo. Z tohoto důvodu se při analytickém stanovení používá kyanid, který všechny formy převede na kyanokobalamin. Ten je ze všech forem vitamínu B₁₂ nejstabilnější [42]. Koenzymy kobalaminu a také samotný kyanokobalamin se pomalu rozkládají vlivem UV záření a alkalického prostředí, což vyžaduje jejich stabilizaci během jakéhokoli postupu pro kvantitativní extrakci [41]. Dále je také důležité vitamín B₁₂ uvolnit z bílkovin, na které je přirozeně se vyskytující vitamín vázán. Může to být prováděno enzymaticky, například použitím enzymů jako je papain nebo pepsin. Ve většině případů však stačí vzorky v přítomnosti kyanidových nebo metabisulfitových iontů (lze také použít) po krátkou dobu zahřát. To zapříčiní jak uvolnění vitamínu B₁₂ z vazeb na bílkoviny, tak jeho přeměnu na kyanokobalamin, respektive sulfokobalamin [43].

Existuje mnoho extrakčních postupů, které je možno použít. Je nutné vybrat ten nejlepší pro konkrétní materiál, jenž má být analyzován daným analytickým postupem. U živočišných produktů (maso, mléko, mléčné výrobky, mořské plody) je nejjednodušší postup pro kvantitativní extrakci vitamínu B₁₂ pomocí povaření nebo autoklávováním, po úpravě pH na hodnotu přibližně 4,8 50mM acetátovým pufrům. Přeměna koenzymových forem na stabilnější kyanokobalamin může probíhat například působením 0,01 % KCN. Pro samotnou extrakci bylo navrženo mnoho extrakčních činidel, např. benzylalkohol nebo chloroform.

U vzorků potravin lze vazby na proteiny rozrušit i přidáním α -amylázy a pepsinu. Vitamín B₁₂ je poté zcela extrahován 50mM pufrům octanu sodného (pH 4,0) a 1 ml NaCN (1%) za stálého míchání při 42 °C po dobu 30 minut. Následně se směs zahřívá na 100 °C po dobu 35 minut a pH se upraví na hodnotu 4,8. U multivitaminových tablet vitamínu B₁₂ není nutné přidávat α -amylázu ani pepsin, jelikož se zde nenachází žádný vazebný protein [41].

2. 1 Extrakce vitamínu B₁₂

2. 1. 1 Extrakce na pevné fázi

Metoda extrakce na pevné fázi (SPE) se používá z důvodu zvýšení citlivosti detekce vitamínu B₁₂ ve vzorcích potravin. Vitamín B₁₂ má totiž většinou signál nižší, než je mez detekce (LOD). Jako pevná fáze se používají oxidované vícevrstvé uhlíkové nano trubice (MWCNT), které mají velký adsorpční potenciál. Ty mají za úkol zvýšit koncentraci vitamínu B₁₂ ve vzorku. Techniky MWCNT SPE lze kombinovat s HPLC-UV detekcí pro měření stopových množství vitamínu B₁₂.

Samotná SPE spočívá v dispergaci vzorku potravin ve vhodném objemu fosfátového pufru (pH 4,0–5,0). Množství vzorku a pufru se volí na základě předpokládaného množství vitamínu. Po zamíchání je vzorek umístěn na 15 minut do ultrazvukové lázně. Za účelem lepší filtrace lze směs odstředit při 5000 ot./min po dobu 5 minut. Filtrace pak probíhá přes celulózový stříkačkový filtr (0,45 µm). K získanému vodnému extraktu se znovu přidá fosfátový pufr. Nakonec se 100 ml roztoku vzorku protlačí minikolonou. K eluci zadržného vitamínu B₁₂ se použije methanol [44]. Technika SPE byla zkoumána před analýzou B₁₂ pomocí LC-UV ve vybraných potravinách. Tento postup však není použitelný pro širokou škálu potravin z důvodu nedostatečné selektivity [45].

2. 1. 2 Imunoafinitní extrakce

Přestože metoda SPE je při analýze vitamínu B₁₂ široce využívaná, existují obavy z její nízké selektivity. Biologicky neaktivní formy kobalaminu se mohou zachovat a eluovat, což vede k nepřesným výsledkům. Imunoafinitní extrakce, vzhledem ke své vysoké selektivitě a specifčnosti, může být použita jako náhrada za SPE. Metoda byla vyvinuta pomocí technologie monoklonálních protilátek. Tyto protilátky, které jsou imobilizovány v gelové suspenzi, se po vnesení vzorku do kolony vážou na vitamín B₁₂.

Imunoafinitní extrakční metoda může být kombinována s HPLC-UV nebo LC metodou kombinovanou s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Obecně se imunoafinitní kolona, po vypuštění zásobního pufru před použitím naplní zfiltrovaným roztokem vzorku a nechá se ustálit. Poté se methanolem kolona dvakrát eluuje, přičemž se po každé eluci suší vzduchem. Hlavní výhodou použití imunoafinitní extrakce je významné zvýšení zpětně získané koncentrace kyanokobalaminu. Tím lze dosáhnout vyšších výtěžků a lepší opakovatelnosti [46].

2. 2 Stanovení vitamínu B₁₂

2. 2. 1 Mikrobiologická zkouška

Tradiční metodou stanovení vitamínu B₁₂ v potravinách je tzv. mikrobiologická zkouška (MBA). Je to metoda, která ke stanovení využívá testovací organismus *Lactobacillus delbrueckii*. Jedná se o referenční analytickou metodu [42]. Pro stanovení kyanokobalaminu v kojenecké výživě na bázi mléka a dalších kojeneckých produktech, se při této metodě dříve využíval jako testovací mikroorganismus *Lactobacillus leichmanii* [47]. Přestože je to velmi citlivá metoda, její nevýhodou je špatná selektivita, která často vede k nadhodnocení obsahu vitamínu o 5–30 %. Důvodem je to, že testovaný organismus může reagovat na další sloučeniny vyskytující se ve vzorku, jako analogy vitamínu B₁₂ nebo nukleové kyseliny [42]. Navíc, i přestože je metoda MBA relativně levná, ve srovnání např. s chromatografickými metodami, je časově náročná a méně přesná. Komerčně dostupné soupravy, které se v poslední době využívají, značně zlepšily možnost použití MBA v běžných laboratořích. Specifičnost a přesnost však zůstává hlavní nevýhodou této metody stanovení [47].

Před mikrobiologickým stanovením je nutná příprava a extrakce vzorku, včetně přeměny na kyanokobalamin. Toxický kyanid draselný může být nahrazen metabisulfitem sodným. Vzniklý sulfitokobalamin pak vykazuje stejnou aktivitu, jako kyanokobalamin. Sulfitokobalaminový standard však není komerčně dostupný a v případě použití je potřebná jeho interní syntéza. Samotný test je založen na měření růstu mikroorganismu závislého na množství vitamínu B₁₂ [46]. Tento růst se hodnotí na základě turbidimetrického měření [41].

2. 2. 2 Metoda vazebných proteinů (PBA)

Byla vyvinuta radioizotopová metoda vazebných proteinů (RPBA), také nazývána jako radioizotopové ředění, která do jisté míry splnila potřebu rychlé analýzy vzorků. Metoda může být použita pro různé druhy mléka, potraviny a doplňky stravy. Metoda je založená na soupeření o specifický ligand vitamínu B₁₂ (vnitřní faktor) s vysokou afinitou k vitamínu [34].

Výhodou RPBA je rychlost a jednoduchost provedení [48]. Naopak hlavním problémem této metody je její nespolehlivost, jelikož použitý vnitřní faktor se může vázat i na ostatní kobalaminy nebo analogy [45]. Doporučuje se proto používat tzv. purifikovaný vnitřní faktor [34].

Pro stanovení vitamínu B₁₂ v mléčných výrobcích byla vyvinuta technika PBA spojená s detekcí rezonanční spektroskopie na povrchu plazmy. Tato metoda se vyznačuje vysokou

citlivostí (2 ng/g), která umožňuje detekci i stopového množství vitamínu B₁₂ ve vzorku. Specifičnost této metody však i nadále přetrvává [45].

2. 2. 3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Pro kvantitativní i kvalitativní analýzu vitamínu B₁₂ bylo vyvinuto mnoho chromatografických metod. Většina z nich byla na principu HPLC, konkrétně nejběžněji používanou metodou je HPLC s obrácenými fázemi (RPHPLC). Aby bylo dosaženo správné separace a stanovení, je nutné optimalizovat řadu parametrů. Důležitá je správná volba gradientového nebo izokratického programu, správný obsah organického rozpouštědla v mobilní fázi, pH mobilní fáze, průtok, teplota a další specifika použité kolony (stacionární fáze, délka, vnitřní průměr a velikost částic použitého materiálu) [46].

Několik publikací uvádí stanovení vitamínu B₁₂ metodou RPHPLC za použití UV detekce [45]. UV detekce však není dostatečně citlivá pro stanovení vitamínu B₁₂ v uměle neobohacených potravinách. UV detektor má totiž omezenou citlivost a je neselektivní. Obecně je tedy nevhodný pro stanovení nízkých hladin kobalaminů v komplexních maticích [41].

Pro kvantitativní stanovení vitamínu B₁₂ lze také použít metodu využívající kapilární elektroforézu a mikro HPLC, která využívá jako detektor techniku hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS), schopnou detekovat kobalt ve struktuře kobalaminů. Jedná se o metodu, která umožňuje rychlou detekci a stanovení kobalaminů v potravinářských produktech. Množství schopné stanovit touto metodou (1500–600 ng/ g) je však stále výrazně nad úrovní obsahu, které se běžně vyskytuje v potravinách (3–20 ng/ g).

Takové stopové množství umožňuje stanovení pomocí fluorimetrické detekce. Tady je ale problém v tom, že vitamín B₁₂ není přirozeně fluorescenční. Je zde tedy nejprve potřeba uvolnit fluorescenční sloučeninu vitamínu B₁₂ pomocí chemické reakce a enzymatické hydrolýzy [45]. Pakin ve své práci z roku 2005 popisuje uvolnění α -ribazolu (fluorescenční látky) z molekuly vitamínu B₁₂ pomocí enzymatické a alkalické hydrolýzy, což umožnilo stanovení vitamínu B₁₂ metodou HPLC s fluorimetrickou detekcí ve vybraných vzorcích potravin [49].

Z dalších možností detekce vitamínu B₁₂, kterou lze použít, je coulometrická elektrochemická detekce. Její výhodou je účinná kvantifikace vitamínu B₁₂ ve vzorcích potravin bez nutnosti předchozí přeměny na kyanokobalamin [43].

V nedávné době byla vyvinuta ultra-vysoce účinná kapalinová chromatografie (UHPLC), jejíž separační kolonu tvoří částice menší než 2 μ m. Výrazně tak zvýšila citlivost

chromatografické analýzy. Pro stanovení vitamínu B₁₂ v mléce a mléčných výrobcích byla popsána metoda UHPLC s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) [42].

2. 2. 4 Elektrochemické metody

Mezi různými metodami, které lze použít pro stanovení vitamínu B₁₂, si elektrochemické metody vyžádaly velkou pozornost zejména díky své snadné obsluze, vysoké citlivosti a nízkým nákladům. V elektrochemických studiích, za účelem stanovení vitamínu B₁₂, lze použít modifikované i nemodifikované elektrody, popřípadě biosenzory [50].

Elektrochemické techniky byly použity pro zkoumání redoxních charakteristik kyanokobalaminu. Tyto redoxní procesy byly zkoumány pomocí polarografie. Dalšími metodami identifikace a stanovení vitamínu B₁₂ jsou oscilopolarografie a stanovení polarografickou katalytickou vlnou. Při iontově selektivním stanovení lze kyanokobalamin redukovat buď kyselinou askorbovou, chloridem cínatým v kyselině chlorovodíkové nebo hypofosfátem vápenatým, za účelem kvantitativního uvolnění kyseliny kyanovodíkové. Uvolnit lze také fotochemicky. Kyselina kyanovodíková v mikrogramovém množství, se detekuje za použití kyanidové membránově selektivní elektrody. Kyanid lze rovněž stanovit titračně dusičnanem stříbrným. Hlavním problémem těchto metod je interference kovových iontů, které se ve vzorku vyskytují [41].

Mezi modifikované elektrody, které našly uplatnění při stanovení vitamínu B₁₂, patří například uhlíková pastová elektroda modifikovaná trans-1,2-dibromocyklohexanem, bismutová filmová elektroda, sítotisková grafitová elektroda, zlatá elektroda modifikovaná pyrrolem, feromagnetickými nanočásticemi nebo triazinovým dendrimerem a bórem dopovaná diamantová elektroda (BDDE).

Právě BDD elektrody se ve srovnání s dalšími typy uhlíkových elektrod vyznačují pozoruhodnými fyzikálními, chemickými a elektronickými vlastnostmi, díky nimž našly velké uplatnění v elektroanalýze biologicky aktivních organických látek v různých matricích. Využitím BDDE při analýze vitamínu B₁₂ se ve své práci z roku 2016 zabýval Stanković [51]. Ve své práci společně se spoluautory vyvinul metodu, která zahrnovala monitorování Co²⁺/Co³⁺ redoxního páru vitamínu B₁₂. Metodou „square wave voltametry“ (SWV) byl sestaven kalibrační graf (za použití Britton-Robinsonova pufru; pH 2,0), který byl lineární v rozmezí koncentrací (2,0–35,0 μmol/l) s detekčním limitem 0,7 μmol/l [52].

2. 2. 5 ELISA

Enzymaticky vázaný imunosorbentový test (ELISA) je biospecifická metoda, která spočívá ve specifické interakci mezi protilátkou a jejím antigenem. Obvykle se tato metoda provádí v mikrotitrační destičce.

Při stanovení vitamínu B₁₂ se postupuje následovně: volný antigen (standard nebo vzorky vitamínu B₁₂) a enzymem značený antigen (vitamín B₁₂ značený avidinem peroxidázou) se přidají do každé mikrotitrační jamky. Následně dojde ke kompetitivnímu navázání na omezená vazebná místa přítomných protilátek. Nenavázané antigeny se odstraní. Avidin substrátový roztok, který se poté přidá, vytváří s vitamínem B₁₂ konjugát za tvorby absorbujícího produktu. Měřená absorbance je produkovaná značeným vitamínem B₁₂, tudíž je nepřímo úměrná jeho koncentraci v přítomných vzorcích a standardech.

Metoda ELISA může být použita například pro stanovení vitamínu B₁₂ v mléce. V případě stanovení vitamínu B₁₂ v dalších vzorcích potravin, jsou zapotřebí další kroky při přípravě a úpravě vzorku, včetně přeměny na kyanokobalamin a extrakci na pevné fázi. Kromě toho je ELISA limitována ve vytváření specifických protilátek [46]. Naopak další nespornou výhodou metody ELISA je kromě rychlosti provedení také používání stabilních nereaktivních činidel, které mohou být dlouhou dobu skladovány [41].

2. 2. 6 Chemiluminiscenční metoda

Chemiluminiscenční metoda (CL) pro stanovení vitamínu B₁₂ je založená na měření emitovaného světla, které vzniká v důsledku chemických reakcí. Pro měření se používá plně automatizovaný CL analyzátor [41].

Vzorky jsou automaticky přidávány do reakční nádoby společně s kyanidem draselným a dithiotreiolem. Všechny formy vitamínu B₁₂ jsou tak převedeny na kyanokobalaminovou formu. Po zneutralizování se do vzorku přidá konjugát s vnitřním faktorem a částice potažené monoklonálním antiintegračním faktorem, aby došlo k navázání vitamínu B₁₂ na konjugát s vnitřním faktorem. Aby nedošlo k interferencím, ostatní složky se vymyjí. Poté se do nádoby přidá chemiluminiscenční substrát a světlo, které vzniká reakcí s proteinem vázající vitamín B₁₂ se měří luminometrem. Intenzita vznikajícího světla je nepřímo úměrná koncentraci vitamínu B₁₂ ve vzorku.

Metoda CL se uplatňuje při stanovení vitamínu B₁₂ v mase a masných výrobcích, kde je jeho stanovení rychlejší a přesnější než u klasickým mikrobiologických testů. Výhodou CL

je také její plná automaticnost, která umožňuje snadnou manipulaci s toxickými sloučeninami [53].

3 ZÁVĚR

Vitamín B₁₂ (kobalamin) je jedním z 8 vitamínů B-komplexu. Jeho struktura je tvořena tzv. korinovým kruhem, kde kobalt vystupuje jako centrální atom. Podle navázané specifické funkční skupiny rozlišujeme adenosylkobalamin, methylkobalamin, hydroxykobalamin a akvakobalamin, které se v potravinách vyskytují přirozeně. Syntetická forma vitamínu B₁₂, kyanokobalamin, je přidáván uměle například do farmaceutických přípravků. Mezi hlavní funkce vitamínu B₁₂ patří syntéza červených krvinek, metabolismus mastných kyselin, správný vývoj centrálního nervového systému a syntéza DNA. Doporučený denní příjem vitamínu B₁₂ je 2,4–2,8 µg pro dospělé muže i ženy. Zvýšená potřeba 2,6–2,8 µg pak platí pro těhotné a kojící ženy. Hlavními zdroji vitamínu B₁₂ jsou potraviny živočišného původu, tedy maso, mléko, mléčné výrobky a vejce. Vůbec největší množství vitamínu B₁₂ je obsaženo ve vnitřnostech, především v játrech a ledvinách. V potravinách rostlinného původu je vitamín B₁₂ zastoupen jen výjimečně, snad kromě uměle obohacených potravin, například cereálií. Z důvodu velmi nízké denní potřeby je nedostatek vitamínu B₁₂ vzácný. Ohroženou skupinou jsou z důvodu výskytu v živočišné stravě především vegani a striktní vegetariáni, dále pak lidé s poruchami absorpce.

Stanovení vitamínu B₁₂ v přírodních neobohacených potravinách je z důvodu jeho nízké koncentrace poměrně složité. Dalším důvodem je i to, že se vyskytuje v různých koenzymových formách, které jsou navíc citlivé na světlo. Další překážkou je i fakt, že v drtivé většině případů, je vitamín B₁₂ v potravinách vázán na bílkoviny. Uvolnit ho z těchto vazeb je možné enzymaticky nebo zahřátím v přítomnosti vhodných sloučenin.

Za účelem zvýšení citlivosti detekce vitamínu B₁₂ se používají různé extrakční metody, díky kterým dojde k značnému zvýšení meze detekce. Hojně využívaná je metoda SPE, jejíž nevýhodou je nízká selektivita. Další možnou metodou je imunoafinitní extrakce, která spočívá v navázání monoklonálních protilátek na vitamín B₁₂. Hlavní výhodou této metody je její značná selektivita a specifita.

Ke stanovení vitamínu B₁₂ v potravinách lze využít různé metody, které se liší v selektivitě, specifitě, citlivosti, časové náročnosti a náročnosti provedení. Nejstarší, ale stále hojně využívanou metodou, je mikrobiologická zkouška, která ke stanovení využívá vhodný mikroorganismus, například *Lactobacillus delbrueckii*. Test je založen na měření růstu mikroorganismů. Jeho výhodou je vysoká citlivost a snadná finanční dostupnost. Nevýhodou je špatná selektivita a přesnost. Metoda radioizotopového ředění je založená na soupeření o specifický ligand vitamínu B₁₂. Její hlavní výhodou je dobrá citlivost a rychlost provedení,

nevýhodou pak její špatná specifita. Velmi rozšířenou možností stanovení jsou různé chromatografické metody. Jako nejlepší pro vitamín B₁₂ se ukázala vysokoučinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi (RPHPLC), za použití vhodné detekce, například ICP-MS, UV nebo detekce fluorimetrické. Nedávno byla vyvinuta metoda ultra-HPLC, která výrazně zvýšila citlivost chromatografických metod. Pro stanovení vitamínu B₁₂ lze rovněž využít metody elektrochemické. Z široké škály možných použití je zřejmě nejvýznamnější využití BDD elektrody, která se vyznačuje vysokou citlivostí. Právě citlivost a snadná obsluha jsou hlavní výhody využití elektrochemie při stanovení vitamínu B₁₂. Biospecifická metoda stanovení ELISA, která spočívá ve specifické interakci mezi protilátkou a antigenem, našla rovněž uplatnění při stanovení vitamínu B₁₂. Její velkou výhodou je rychlost provedení a použití stabilních nereaktivních činidel. Nevýhodou je mimo jiné vytváření specifických protilátek. Poslední zmíněnou metodou stanovení vitamínu B₁₂ v potravinách je chemiluminiscenční metoda. Ta spočívá v měření emitovaného světla vznikajícího v důsledku daných chemických reakcí. Vzniklé světlo měřené luminometrem je nepřímo úměrné množství vitamínu B₁₂ ve vzorku. Její výhodou je automaticnost provedení, která umožňuje manipulaci s toxickými látkami. Navíc stanovení vitamínu B₁₂ v mase a masných výrobcích je zde rychlejší a přesnější než u běžné mikrobiologické metody.

4 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] DAINTITH, John a Elizabeth MARTIN. *Dictionary of Science* [online]. 6th ed. Oxford University Press, c2010. ISBN 978-1-61583-540-9. Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpDSE00001/dictionary-science-6th/dictionary-science-6th>

[2] MOTARJEMI, Yasmine, Gerald MOY a Ewen TODD. *Encyclopedia of Food Safety* [online]. Elsevier, c2014. ISBN 978-0-12-378613-5. Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpEFS00001/encyclopedia-food-safety/encyclopedia-food-safety>

[3] LUKASKI, Henry C. Vitamin and Mineral Status: Effects on Physical Performance. *Nutrition*. 2004, **20**(7-8), 632-644. DOI: 10.1016/j.nut.2004.04.001.

[4] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-866-5901-1.

[5] BROWN, Theodore L., H. Eugene LEMAY a Bruce E. BURSTEN. *Chemistry: The Central Science*. 6th ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1994. ISBN 0-13-336397-X.

[6] MSAGATI, Titus A. M. *Chemistry of Food Additives and Preservatives* [online]. John Wiley, c2013. ISBN 978-1-5231-1111-4. Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpCFAP000C/chemistry-food-additives/chemistry-food-additives>

[7] KENNEDY, David. B Vitamins and the Brain: Mechanisms, Dose and Efficacy—A Review. *Nutrients*. 2016, **8**(2). DOI: 10.3390/nu8020068.

[8] MANZETTI, Sergio, Jin ZHANG a David VAN DER SPOEL. Thiamin Function, Metabolism, Uptake, and Transport. *Biochemistry*. 2014, **53**(5), 821-835. DOI: 10.1021/bi401618y.

- [9] Listing of Vitamins. *Health Information and Medical Information – Harvard Health* [online]. Cambridge: Harvard Health Publishing, c2010-2020 [cit. 2020-03-26]. Dostupné z: https://www.health.harvard.edu/staying-healthy/listing_of_vitamins
- [10] DE JONG, Liesbeth, Yan MENG, Joseph DENT a Siegfried HEKIMI. Thiamine Pyrophosphate Biosynthesis and Transport in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 2004, **168**(2), 845-854. DOI: 10.1534/genetics.104.028605.
- [11] FRIAS, Juana, Cristina MARTINEZ-VILLALUENGA a Elena PEÑAS. *Fermented Foods in Health and Disease Prevention* [online]. Elsevier, c2017. ISBN 978-0-12-802549-9. Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpFFHDP00D/fermented-foods-in-health/fermented-foods-in-health>
- [12] POWERS, Hilary J. Riboflavin (Vitamin B-2) and Health. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2003, **77**(6), 1352-1360. DOI: 10.1093/ajcn/77.6.1352.
- [13] BENVENUTO, Mark A. *Industrial Chemistry - For Advanced Students* [online]. De Gruyter, c2015. ISBN 978-1-5231-0457-4. Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpICFAS004/industrial-chemistry/industrial-chemistry>
- [14] HEGYI, Juraj, Robert A. SCHWARTZ a Vladimir HEGYI. Pellagra: Dermatitis, Dementia, and Diarrhea. *International Journal of Dermatology*. 2004, **43**(1), 1-5. DOI: 10.1111/j.1365-4632.2004.01959.x.
- [15] SALVADOR, Amparo a Alberto CHISVERT. *Analysis of Cosmetic Products* [online]. Elsevier, c2007. ISBN 978-0-080-47531-8. Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpACP00005/analysis-cosmetic-products/analysis-cosmetic-products>
- [16] GRIFFITHS, Mansel W. *Improving the Safety and Quality of Milk, Volume 2 - Improving Quality in Milk Products* [online]. Woodhead Publishing, c2010. ISBN 978-1-84-569943-7. Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpISQMVIQ2/improving-safety-quality-2/improving-safety-quality-2>

- [17] HENRY, C.J.K a C. CHAPMAN. *Nutrition Handbook for Food Processors* [online]. Woodhead Publishing, c2002. ISBN 978-1-85-573665-8. Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpNHFP0004/nutrition-handbook-food/nutrition-handbook-food>
- [18] COULTATE, T. P. *Food - The Chemistry of its Components* [online]. 5th ed. Royal Society of Chemistry, c2009. ISBN 978-1-62198-201-2. Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpFTCCE001/food-chemistry-its-components/food-chemistry-its-components>
- [19] DAMODARAN, Srinivasan a Kirk L. PARKIN. *Fennema's Food Chemistry* [online]. 5th ed. CRC Press, c2017. ISBN 978-1-5231-1785-7. Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpFFCE001G/fennemas-food-chemistry/fennemas-food-chemistry>
- [20] SINGH, Jaspreet a Lovedeep KAUR. *Advances in Potato Chemistry and Technology* [online]. 2nd ed. Elsevier, c2016. ISBN 978-0-12-800576-7. Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpAPCTE001/advances-in-potato-chemistry/advances-in-potato-chemistry>
- [21] SKIBSTED, Leif H, Jens RISBO a Mogens L. ANDERSEN. *Chemical Deterioration and Physical Instability of Food and Beverages* [online]. Woodhead Publishing, c2010. ISBN 978-1-84-569926-0. Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpCDPIFB02/chemical-deterioration/chemical-deterioration>
- [22] PAQUIN, Paul. *Functional and Speciality Beverage Technology* [online]. Woodhead Publishing, c2009. ISBN 978-1-84-569556-9. Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpFSBT000T/functional-speciality/functional-speciality>
- [23] STRAIN, JJ, Catherine HUGHES, Kristina PENTIEVA, Mary WARD, Leane HOEY a Helene MCNULTY. The B-Vitamins. *Sustainable Nutrition in a Changing World*. Cham: Springer International Publishing, 2017, 2017-07-19, s. 185-203. DOI: 10.1007/978-3-319-55942-1_12. ISBN 978-3-319-55940-7.

[24] KIM, Young-Nam a Youn-Ok CHO. Evaluation of Vitamin B 6 Intake and Status of 20- to 64-year-old Koreans. *Nutrition Research and Practice*. 2014, **8**(6), 688-694. DOI: 10.4162/nrp.2014.8.6.688.

[25] DIKEMAN, Michael a Carrick DEVINE. *Encyclopedia of Meat Sciences* [online]. 2nd ed. Elsevier, c2014. ISBN 978-1-68015-340-8. Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpEMSE0003/encyclopedia-meat-sciences/encyclopedia-meat-sciences>

[26] COULTATE, Tom. *Food - The Chemistry of its Components* [online]. 6th ed. Royal Society of Chemistry, c2016. ISBN 978-1-5231-1944-8. Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpFTCCCE018/food-chemistry-its-components/food-chemistry-its-components>

[27] AGRAWAL, Sudhanshu, Anshu AGRAWAL a Hamid M. SAID. Biotin Deficiency Enhances the Inflammatory Response of Human Dendritic Cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2016, **311**(3), C386-C391. DOI: 10.1152/ajpcell.00141.2016.

[28] ZEMPLÉNI, Janos, Subhashinee S.K. WIJERATNE a Yousef I. HASSAN. Biotin. *BioFactors*. 2009, **35**(1), 36-46. DOI: 10.1002/biof.8.

[29] TRUMBO, Paula, Sandra SCHLICKER, Allison A. YATES a Mary POOS. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids. *Journal of the American Dietetic Association*. 2002, **102**(11), 1621-1630. DOI: 10.1016/S0002-8223(02)90346-9.

[30] CRIDER, Krista S., Lynn B. BAILEY a Robert J. BERRY. Folic Acid Food Fortification—Its History, Effect, Concerns, and Future Directions. *Nutrients*. 2011, **3**(3), 370-384. DOI: 10.3390/nu3030370.

[31] DUTHIE, S. J. Folic Acid Deficiency and Cancer: Mechanisms of DNA Instability. *British Medical Bulletin*. 1999, **55**(3), 578-592. DOI: 10.1258/0007142991902646.

- [32] CAMMACK, R., T. K. ATTWOOD, P. N. CAMPBELL, J. H. PARISH, A. D. SMITH, J. L. STIRLING a F. VELLA. *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2nd ed. Oxford University Press, c2006. ISBN 978-1-61344-113-8.
Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpODBMBE01/oxford-dictionary-biochemistry/oxford-dictionary-biochemistry>
- [33] ELVERS, Barbara, ed. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. 7th, completely rev. ed. Weinheim: Wiley-VCH, c2011. ISBN 978-3-527-32943-4.
- [34] INDYK, Harvey E, Bjorn S PERSSON, Malin C B CASELUNGHE, Anna MOBERG, Enrico L FILONZI a David C WOOLLARD. Determination of Vitamin B12 in Milk Products and Selected Foods by Optical Biosensor Protein-Binding Assay: Method Comparison. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 2002, **85**(1), 72-81. DOI: 10.1093/jaoac/85.1.72.
- [35] ESTOURGIE-VAN BURK, G. Frederiek, P. Hugo M. VAN DER KUY, Tim G. DE MEIJ, Marc A. BENNINGA a C. M. Frank KNEEPKENS. Intranasal Treatment of Vitamin B12 Deficiency in Children. *European Journal of Pediatrics* [online]. 2020, **179**(2), 349-352. DOI: 10.1007/s00431-019-03519-0.
- [36] FROESE, D.S., S. HEALY, M. MCDONALD, G. KOCHAN, U. OPPERMANN, F.H. NIESEN a R.A. GRAVEL. Thermolability of Mutant MMACHC Protein in the Vitamin B12-Responsive cblC Disorder. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2010, **100**(1), 29-36. DOI: 10.1016/j.ymgme.2010.02.005.
- [37] ALLEN, Lindsay H. Causes of Vitamin B 12 and Folate Deficiency. *Food and Nutrition Bulletin* [online]. 2008, **29**(2_suppl1), S20-S34. DOI: 10.1177/15648265080292S105.
- [38] WATANABE, Fumio, Yukinori YABUTA, Yuri TANIOKA a Tomohiro BITO. Biologically Active Vitamin B 12 Compounds in Foods for Preventing Deficiency among Vegetarians and Elderly Subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2013, **61**(28), 6769-6775. DOI: 10.1021/jf401545z.
- [39] KIRK, Raymond E., Donald F. OTHMER a Arza SEIDEL. *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*. 5th ed. Hoboken: John Wiley, c2004-2007. ISBN 0-471-48494-6.

- [40] CRAIG, Winston J. Health Effects of Vegan Diets. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2009, **89**(5), 1627S-1633S. DOI: 10.3945/ajcn.2009.26736N.
- [41] KUMAR, Sagaya Selva, Raghuraj Singh CHOUHAN a Munna Singh THAKUR. Trends in Analysis of Vitamin B12. *Analytical Biochemistry*. 2010, **398**(2), 139-149. DOI: 10.1016/j.ab.2009.06.041.
- [42] CHAMLAGAIN, Bhawani, Minnamari EDELMANN, Susanna KARILUOTO, Velimatti OLLILAINEN a Vieno PIIRONEN. Ultra-High Performance Liquid Chromatographic and Mass Spectrometric Analysis of Active Vitamin B12 in Cells of Propionibacterium and Fermented Cereal Matrices. *Food Chemistry*. 2015, **166**, 630-638. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.06.068.
- [43] CAMPOS-GIMNEZ, Esther, Patric FONTANNAZ, Marie-Jose TRISCONI, Tamara KILINC, Catherine GIMENEZ a Pierre ANDRIEUX. Determination of Vitamin B12 in Food Products by Liquid Chromatography/UV Detection with Immunoaffinity Extraction: Single-Laboratory Validation. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 2008, **91**(4), 786-793. DOI: 10.1093/jaoac/91.4.786.
- [44] FILIK, Hayati, Asiye Aslıhan AVAN a Sevda AYDAR. Electrochemical Determination of Vitamin B-12 in Food Samples by Poly(2,2'-(1,4-phenylenedivinylene) Bis-8 hydroxyquinaldine)/Multi-Walled Carbon Nanotube-Modified Glassy Carbon Electrode. *Food Analytical Methods*. 2016, **9**(8), 2251-2260. DOI: 10.1007/s12161-016-0420-y.
- [45] HEUDI, O., T. KILINÇ, P. FONTANNAZ a E. MARLEY. Determination of Vitamin B12 in Food Products and in Premixes by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography and Immunoaffinity Extraction. *Journal of Chromatography A*. 2006, **1101**(1-2), 63-68. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.09.059.
- [46] LI, Yanan, Brendon D. GILL, Megan N.C. GRAINGER a Marilyn MANLEY-HARRIS. The Analysis of Vitamin B12 in Milk and Infant Formula: A Review. *International Dairy Journal*. 2019, **99**. DOI: 10.1016/j.idairyj.2019.104543.

- [47] MARTIN, Frederic, Ester Campos GIMÉNEZ a Erik KONINGS. New Methods for the Analysis of Water-Soluble Vitamins in Infant Formula and Adult/Pediatric Nutritionals. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 2016, **99**(1), 19-25. DOI: 10.5740/jaoacint.15-0245.
- [48] LUO, Xubiao, Bo CHEN, Li DING, Fei TANG a Shouzhuo YAO. HPLC-ESI-MS Analysis of Vitamin B12 in Food Products and in Multivitamins-Multimineral Tablets. *Analytica Chimica Acta*. 2006, **562**(2), 185-189. DOI: 10.1016/j.aca.2006.01.073.
- [49] PAKIN, C., M. BERGAENTZLÉ, D. AOUDÉ-WERNER a C. HASSELMANN. A-Ribazole, a Fluorescent Marker for the Liquid Chromatographic Determination of Vitamin B12 in Foodstuffs. *Journal of Chromatography A*. 2005, **1081**(2), 182-189. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.05.066.
- [50] PARVIN, Mohammad Hadi, Elmira AZIZI, Jalal ARJOMANDI a Jin Yong LEE. Highly Sensitive and Selective Electrochemical Sensor for Detection of Vitamin B12 Using an Au/PPy/FMNP@TD-modified Electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018, **261**, 335-344. DOI: 10.1016/j.snb.2018.01.168.
- [51] STANKOVIĆ, Dalibor M., Darko KUZMANOVIĆ, Dragan MANOJLOVIĆ, Kurt KALCHER a Goran ROGLIĆ. Electroanalytical Approach for Vitamin B12 Quantification Based on Its Oxidation at Boron Doped Diamond Electrode. *Journal of The Electrochemical Society*. 2016, **163**(7), B348-B351. DOI: 10.1149/2.1041607jes.
- [52] PEREIRA, Daniel F., Edson R. SANTANA, Jamille V. PIOVESAN a Almir SPINELLI. A Novel Electrochemical Strategy for Determination of Vitamin B12 by Co(I/II) Redox Pair Monitoring with Boron-doped Diamond Electrode. *Diamond and Related Materials*. 2020, **105**. DOI: 10.1016/j.diamond.2020.107793.
- [53] WATANABE, Fumio, Shigeo TAKENAKA, Katsuo ABE, Yoshiyuki TAMURA a Yoshihisa NAKANO. Comparison of a Microbiological Assay and a Fully Automated Chemiluminescent System for the Determination of Vitamin B 12 in Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998, **46**(4), 1433-1436. DOI: 10.1021/jf970807j.