

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Vliv úpravy masa na obsah vitamínu B12

Bc. Lea Šarková

Diplomová práce

2020

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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Lea Šarková**
Osobní číslo: **C18441**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Vliv úpravy masa na obsah vitamínu B₁₂**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Charakterizujte vitamín B₁₂ a jeho výskyt v potravinách. Vypracujte literární rešerši na téma stanovení kobaltaminu (vit. B₁₂) moderními analytickými metodami. Zaměřte se především na stanovení kobaltaminu v mase a orgánovém mase pomocí separačních technik a také na způsoby přípravy vzorku k analýze.
2. V experimentální části proveďte optimalizaci podmínek separace vitamínu B₁₂ pomocí kapalinové chromatografie a metodu validujte. Dále optimalizujte podmínky přípravy vzorku pro izolaci vitamínu B₁₂. Nejvhodnější podmínky použijte na sledování obsahu kobaltaminu v mase. Sledujte vliv různých tepelných úprav masa na obsah kobaltaminu.
3. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte a porovnejte s literaturou a současným stavem poznání.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Tomáš Hájek, Ph.D.
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce:

5. února 2020

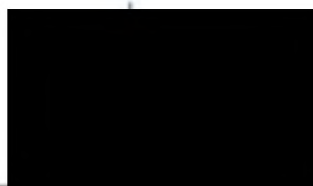
Termín odevzdání diplomové práce:

7. května 2020



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

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

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

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

V Pardubicích dne 30. 6. 2020

Bc. Lea Šarková

Velmi ráda bych tímto poděkovala svému vedoucímu práce Ing. Tomáši Hájkovi Ph.D. za vstřícný přístup, odbornou pomoc, cenné rady a trpělivost při psaní této diplomové práce.

ANOTACE

Diplomová práce pojednává o vitamínu B12, konkrétně se zabývá jeho stanovením v mase pomocí vysokoučinné kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou detekcí. Byla provedena optimalizace podmínek úpravy vzorku a extrakce samotného vitamínu B12. Za nejúčinnější metodu byla zvolena extrakce pomocí enzymatického štěpení s následným přečištěním a zakoncentrováním na imunoafinitní SPE koloně. Optimalizovaná metoda byla následně použita na sledování vlivu různých tepelných úprav na obsah vitamínu B12 v mase.

KLÍČOVÁ SLOVA

vitamín B12, maso, tepelná úprava, kapalinová chromatografie, imunoafinitní SPE kolony

TITLE

Effect of meat treatment on vitamin B12 content.

ANNOTATION

The determination of vitamin B12 in meat using a high-performance liquid chromatograph with spectrophotometric detection is topic of this thesis. The sample preparation and vitamin B12 extraction conditions were optimized. Extraction by enzymatic digestion followed by purification and concentration on an immunoaffinity SPE column was chosen as the most efficient method. The optimized method was used to determine the effect of different heat treatments on the content of vitamin B12 in meat.

KEYWORDS

Vitamin B12, meat, heat treatment, liquid chromatography, immunoaffinity SPE columns

OBSAH

Úvod.....	12
1 Teoretická část	13
1.1 Chemické vlastnosti vitamínu B12	13
1.2 Doporučené hodnoty příjmu a zdroje vitamínu B12.....	15
1.2.1 Doporučené hodnoty příjmu.....	15
1.2.2 Zdroje vitamínu B12.....	16
1.3 Nedostatek vitamínu B12 v lidském těle	18
1.3.1 Příčiny nedostatku	18
1.3.2 Projevy nedostatku	20
1.4 Výroba vitamínu B12	21
1.5 Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	22
1.5.1 Mobilní fáze.....	23
1.5.1.1 Gradientová eluce.....	23
1.5.2 Chromatografické kolony	24
1.5.2.1 Povrchově porézní částice stacionární fáze.....	25
1.5.3 Detektory	27
1.5.3.1 Spektrofotometrický detektor.....	27
1.6 Extrakce pevnou fází	28
1.6.1 Imunoafinitní kolony	29
1.7 Stanovení vitamínu B12 v potravinářských vzorcích	30
1.7.1 Uvolnění vitamínu B12 z matrice.....	30
1.7.2 Extrakce vitamínu B12	31
1.7.3 Separační metody stanovení	32
1.7.4 Mikrobiologická metoda stanovení	34
1.7.5 Další metody stanovení	35
2 Experimentální část.....	37
2.1 Přístroje a zařízení	37
2.2 Chemikálie a vzorky	38
2.2.1 Používané chemikálie	38
2.2.2 Používaný standard.....	38

2.2.3 Vzorky	38
2.3 Pracovní postup	39
2.3.1 Příprava roztoků standardu vitamínu B12	39
2.3.2 Fotodegradace vitamínu B12	40
2.3.3 Vliv ultrazvuku na koncentraci vitamínu B12	40
2.3.4 Příprava vzorků	40
2.3.4.1 Uvolnění vitamínu B12 z masa	41
2.3.4.2 Imunoafinitní přečištění a zakoncentrování	42
2.3.5 Chromatografická analýza	42
2.4 Vyhodnocení a zpracování dat	43
3 Výsledky a diskuze	44
3.1 Optimalizace chromatografické separace a detekce	44
3.2 Validace metody	45
3.3 Fotodegradace vitamínu B12	47
3.4 Vliv ultrazvuku na koncentraci vitamínu B12	48
3.5 Optimalizace extrakce vitamínu B12 z matrice a jeho zakoncentrování	49
3.5.1 Extrakce okyselenou vodou	49
3.5.2 Extrakce kyselinou trichloroctovou	49
3.5.3 Extrakce pomocí enzymů za přítomnosti kyanidu a zakoncentrování na imunoafinitní koloně	50
3.6 Analýza vzorků masa	52
3.6.1 Hmotnostní ztráty masa vlivem tepelné úpravy	52
3.6.2 Hovězí maso	53
3.6.3 Vepřové maso	54
3.6.4 Kuřecí maso	55
3.6.5 Ztráty vitamínu B12 při různých tepelných úpravách	56
3.6.6 Příjem vitamínu B12	59
4 Závěr	60
5 Bibliografie	61
6 Přílohy	73

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Chemická struktura kobalaminu (14).....	13
Obrázek 2 Vstřebávání vitamínu B12 v lidském těle (38).....	19
Obrázek 3 Schéma HPLC (59)	22
Obrázek 4 Typy profilů gradientu mobilní fáze (I, II – kontinuální gradient s nulovou (I) a nenulovou počáteční koncentrací (II) 1 – lineární, 2 – konkávní, 3 – konvexní; III – stupňovitý gradient; IV – lin. gradient (1) následovaný obráceným lin. Gradientem (65).....	24
Obrázek 5 Struktura pentafluorfenylové (PFP) a oktadecylové (C18) stacionární fáze (66; 67)	25
Obrázek 6 Povrchově porézní a plně porézní částice (70).....	26
Obrázek 7 Pohyb látky v kolonách naplněných různými typy částic (72)	26
Obrázek 8 Princip extrakce tuhou fází (78)	29
Obrázek 9 HPLC analýza hovězích jater bez předchozího působení kyanidových iontů (24).	31
Obrázek 10 MS/MS spektrum standardu kyanokobalaminu (17)	33
Obrázek 11 Kalibrační křivka vitamínu B12.....	45
Obrázek 12 Fotodegradace vitamínu B12	48
Obrázek 13 Chromatogram analýzy vzorku po enzymatickém rozkladu a zakoncentrování na imunoafinitní SPE koloně.....	51
Obrázek 14 Chromatogram analýzy vzorku po enzymatickém rozkladu bez přečištění a zakoncentrování na imunoafinitní SPE koloně.....	51
Obrázek 15 Přehled hmotnostních ztrát masa vlivem tepelných úprav	53
Obrázek 16 Ztráty vitamínu B12 v mase při různých tepelných úpravách	57
Obrázek 17 Ztráty vitamínu B12 v závislosti na typu masa	58

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Doporučené denní dávky (DDD) vitamínu B12 (2; 6; 26)	15
Tabulka 2 Obsah vitamínu B12 ve vybraných potravinách živočišného původu (2; 6; 7; 17; 32)	17
Tabulka 3 Použité vzorky pro analýzu	39
Tabulka 4 Pipetované objemy pro přípravu roztoků pro kalibraci a validaci.....	40
Tabulka 5 Přehled použitých tepelných úprav vzorků masa	41
Tabulka 6 Průběh gradientové eluce při analýze vitamínu B12	43
Tabulka 7 Výsledky statistického vyhodnocení rovnice kalibrační závislosti	46
Tabulka 8 Výsledky validace přesnosti a správnosti metody stanovení vitamínu B12.....	46
Tabulka 9 Validací výsledky mezilehlé přesnosti stanovení vitamínu B12	47
Tabulka 10 Koncentrace vitamínu B12 v hovězím mase, $n = 2$	54
Tabulka 11 Koncentrace vitamínu B12 ve vepřovém mase, $n = 2$	55
Tabulka 12 Koncentrace vitamínu B12 v kuřecím mase, $n = 2$	56
Tabulka 13 Velikosti porcí masa pro pokrytí DDD vitamínu B12.....	59

SEZNAM ZKRATEK

AAS	atomová absorpční spektrometrie
ATCC	sbírka tkáňových a buněčných kultur (American Type Culture Collection)
CFU	kolonie tvořící jednotku (Colony Forming Units)
C8	oktyl
C18	oktadecyl
DDD	doporučená denní dávka
DMEQ	hydrazin 6,7-dimethoxy-1-methyl-2(1H)-chinoxalinon-3-propionyl karboxylové kyseliny
ECD	elektrochemický detektor
ECL	elektroluminiscence
ELSD	detektor rozptylu světla (Evaporative Light-Scattering Detector)
GRAS	všeobecně považováno za bezpečné (Generally Recognized As Safe)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
LOD	mez detekce (Limit Of Detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (Limit Of Quantification)
MS	hmotnostní spektrometr
MS/MS	tandemový hmotnostní spektrometr
PFP	pentafluorfenyl
RIA	radioimunoanalýza
RP	chromatografický systém s obrácenou fází (Reversed Phase)
SPE	extrakce tuhou fází
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV/VIS	ultrafialová a viditelná oblast záření

ÚVOD

Pro správnou funkci lidského těla je velmi důležité přijímat v potravě dostatečné množství minerálů a vitamínů. V současné moderní době je velkým trendem být vegetariánem nebo veganem a počet lidí vyznávajících tento styl života stále roste. Tito lidé jsou však velmi ohroženou skupinou pro nedostatečnost vitamínu B12, stejně jako lidé žijící v rozvojových zemích nebo lidé trpící různými druhy onemocnění, které mohou způsobovat omezené vstřebávání vitamínu B12 v lidském těle.

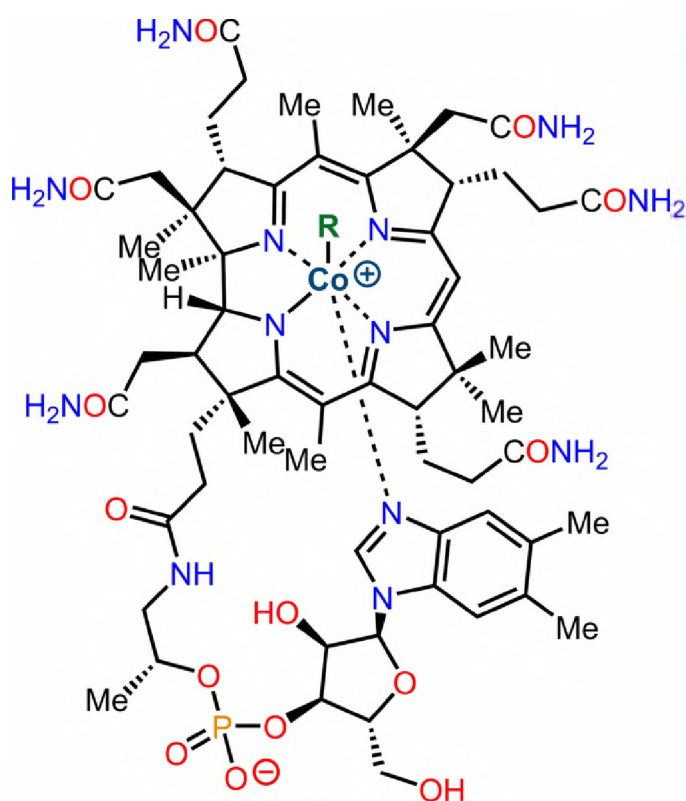
Nejdůležitější potravinou pro zajištění dostatečného příjmu vitamínu B12 je jednoznačně maso, které je symbolem živočišné stravy. Dalšími zdroji vitamínu B12, i když v menší míře, jsou také mléko nebo vejce. Maso obsahuje velké množství bílkovin, ale také minerálních látek a vitamínů, kterých je zde celá řada. Konkrétně se jedná o vitamíny A, D, E, K, B1, B2, B5, B6 a B12. Maso se však konzumuje zejména tepelně upravené s výjimkou například tatarského bifteku. Tepelně upravené maso je pro člověka bezpečnější, jelikož se teplem eliminuje přítomnost nebezpečných bakterií ze syrového masa jako jsou například bakterie salmonely nebo listerie a zároveň je takto upravené maso stravitelnější. Zároveň však vlivem tepla dochází ke znehodnocení vitamínů a minerálních látek. Která tepelná úprava masa je k vitamínu B12 nejšetrnější a kolik vitamínu B12 v něm zůstane zachováno bylo cílem zjistit v této diplomové práci.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Chemické vlastnosti vitamínu B12

Vitamín B12, jinými slovy také kobalamin, je kovový komplex (Obr. 1), který je složený z centrálního iontu kobaltu, na který je navázáno šest ligandů (1–3). Jeho strukturu lze považovat za jednu z nejsložitějších mezi biomolekulami v přírodě a jednoznačně se jedná o vitamín s nejsložitější strukturou ze všech vitamínů (4–12). Jeho základem je korinový cyklus, který připomíná porfyrinový cyklus hemových barviv a chlorofylů, což se zasloužilo o to, že se těmto sloučeninám přezdívá korinoidy (4–13).

Obrázek 1 Chemická struktura kobalaminu (14)



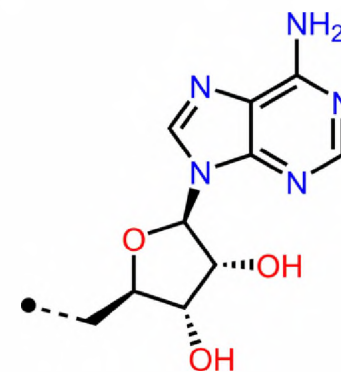
R group:

CN: cyanocobalamin

OH: hydroxocobalamin
(vitamin B_{12a})

Me: methylcobalamin (MeCbl)

Ado: adenosylcobalamin
(coenzyme B₁₂, AdoCbl)



Ado = 5'-deoxyadenosyl

Atom kobaltu je ve struktuře koordinován na čtyři atomy dusíku, které jsou součástí pyrrolových jader, a pátou koordinační vazbou je vázán dusík 5,6–dimethylbenzimidazolu. Tato pátá vazba však nemusí být vždy obsazena, protože právě 5,6–dimethylbenzimidazol zajišťuje pozitivní vliv na organismus člověka, jelikož zajišťuje jeho správnou absorpci v lidském těle (5–7; 15–17). Co se týče šesté koordinační vazby (viz. Obr.1 – R group), taktéž

nemusí být vůbec obsazena, ale nejčastěji zde bývá navázána kyanová skupina (kyanokobalamin). Kyanokobalamin je chemicky modifikovaná forma vitamínu B12, která je široce používána v léčivech a doplňcích stravy. Kyanová skupina může být nahrazena také jiným substituentem jako třeba vodou (akvakobalamin), hydroxylem (hydroxykobalamin), nebo methylem, kdy vzniklou sloučeninu nazýváme methylkobalamin. Methylkobalamin je koenzymová forma vitamínu B12 a jedná se o aktivnější formu vitamínu B12, která je důležitá pro mozek a nervovou soustavu člověka. Dalšími představiteli korinoidů je kobalamin R, kobalamin S nebo adenosylkobalamin, který taktéž patří mezi koenzymové formy vitamínu B12 a říká se mu také pseudovitamin B12, který je aktivní pouze u bakterií (2; 3; 5; 6; 12; 17–19).

Vitamin B12 patří do skupiny vitaminů B-komplexu, je rozpustný ve vodě a alkoholu a ve vodném roztoku je stabilní v rozmezí pH 4–7 a to až do teploty 120 °C bez výrazných ztrát (3; 7; 19–22). Vytváří tmavě červené krystaly bez chuti a zápachu (3; 21). Každá forma kobalaminu má jinou stabilitu (13) a ovlivňuje ji přítomnost dalších vitaminů. Za nejstabilnější formu je považován kyanokobalamin, proto se před analýzou převádějí ostatní přírodní formy kobalaminů na kyanokobalamin pomocí kyanidu draselného nebo sodného (12; 13; 17; 23; 24). Kobalamin je hygroskopický a velmi citlivý na světlo, jelikož při světelné expozici dochází ke štěpení organokovové vazby (1; 12; 13; 17; 19; 21; 24). Ve vodném roztoku je také citlivý vůči oxidačním a redukčním činidlům a vysokým teplotám (12; 17; 23). Adenosylkobalamin a methylkobalamin jsou obzvlášť fotocitlivé formy vitamínu B12 (ve vodném roztoku při 100 °C zcela degradují za 1–2 minuty) a pod ultrafialovým zářením se snadno převádějí na hydroxykobalamin (12; 19; 24; 25).

1.2 Doporučené hodnoty příjmu a zdroje vitamínu B12

1.2.1 Doporučené hodnoty příjmu

Množství vitamínu B12, které by měl člověk denně přijmout v potravě nebo výživových doplňcích, se liší v závislosti na věku a u žen záleží také na tom, zda kojí nebo jestli jsou těhotné (6; 12; 26; 27). Při kalkulaci doporučených hodnot denního příjmu je třeba počítat s přibližně 50% ztrátou při absorpci ve střevě (2). Přehled doporučených hodnot denního příjmu vitamínu B12 je shrnut v Tabulce 1.

Tabulka 1 Doporučené denní dávky (DDD) vitamínu B12 (2; 6; 26)

Věk	DDD v µg/den
<i>Kojenci</i> 0–3 měsíců ¹ 4–11 měsíců	0,4 0,8
<i>Děti</i> 1–3 roky 4–6 let 7–9 let 10–12 let 13–14 let	1,0 1,5 1,8 2,0 3,0
Dospívající a dospělí	3,0
Těhotné²	3,5
Kojící³	4,0

¹... Odhadovaná hodnota

²... Zvýšená hodnota důležitá pro doplnění zásob

³... Zvýšená hodnota asi o 0,13 µg vitamínu B12 na 100 g mateřského mléka

Doporučený denní příjem by mělo ze 70 % pokrývat maso a masné výrobky. Mléko a mléčné výrobky by měly pokrývat 20 % doporučeného denního příjmu vitamínu B12, vejce 9 % a 1 % cereální výrobky, což tvoří zanedbatelné množství (6). Aby byla denní dávka pokryta, je třeba teoreticky denně zkonsumovat 2–3 vejce standardní velikosti, 100–200 g hovězího masa nebo 200 g šunky a vypít 200 ml mléka. Absorbované množství vitamínu B12 je však omezeno na přibližně 2 µg z jednoho jídla. Omezená absorpce je dána kapacitou vnitřního faktoru (viz. kapitola 1.3.1) v žaludku, který je potřebný pro jeho vstřebávání v lidském těle (19).

1.2.2 Zdroje vitamínu B12

Vzhledem k tomu, že je vitamín B12 velmi dobře rozpustný ve vodě, lze jej přijímat v nadbytečném množství, které pro člověka není toxické, mutagenní ani karcinogenní (2; 6). Potrava je pro člověka hlavním zdrojem vitamínu B12 (1; 2; 26; 27). Vitamín B12 je částečně syntetizován střevními bakteriemi v tlustém střevu, nicméně lidský organismus bohužel takto vytvořený vitamín nedokáže využít (2; 26; 27).

Vitamín B12 se vyskytuje zejména v potravinách živočišného původu, proto se jeho nedostatek projevuje nejčastěji u vegetariánů a veganů (2; 6; 7; 12; 18; 19; 27). Ohroženou skupinou jsou také lidé se sníženou absorpcí vitamínu B12 nebo lidé žijící v rozvojových zemích, kde je nedostatek živočišných produktů (7; 12; 18; 19; 27; 28).

Přehled koncentrací vitamínu B12 ve vybraných potravinách živočišného původu je uveden v Tabulce 2. Zdaleka nejvyšší koncentrace vitamínu B12 vykazují játra a maso, hlavně vepřové a hovězí. Mezi významné zdroje patří také ryby, vejce, mléko a mléčné výrobky (2; 5; 7; 12; 17–19; 26; 27; 29). Tyto potraviny obsahují vitamín B12 navázaný většinou na proteiny zejména ve formě adenosylkobalaminu, methylkobalaminu a hydroxykobalaminu (12; 13). Najít ho můžeme také v mořských řasách, korýších a měkkýších (5; 7; 19; 29). Mořské řasy by se mohly zdát jako perfektní způsob pro doplnění vitamínu B12 namísto živočišné stravy, avšak výzkumy prokázaly, že až 17 % z celkového množství tohoto vitamínu je v mořských řasách v neaktivní formě a podobně jsou na tom také korýši a měkkýši (7; 17; 30; 31).

Tabulka 2 Obsah vitamínu B12 ve vybraných potravinách živočišného původu (2; 6; 7; 17; 32)

Potravina	µg/100 g jedlého podílu
Vepřové maso	0,6–1
Hovězí maso	0,2–2
Kuřecí maso	0,5
Vepřová játra	50–122
Šunka	0,9–1,6
Ryby	0,6–8,9
Mléko	0,3–3,8
Sýry	0,6–2,4
Veje	0,3–1,3
Mořští korýši	52

Co se týče mléka, jakožto zdroje vitamínu B12, je jeho biologická dostupnost velmi dobrá. Vyšší obsah kobalaminu nalezneme v mléce kravském než v mléce mateřském (27; 33; 34). Mléčné výrobky vyráběné pomocí kultury *Propionibacterium shermanii* mají až třicetkrát vyšší koncentrace vitamínu B12 oproti nezakysanému mléku. Tyto bakterie jsou svými metabolickými cestami schopné produkovat velmi vysoké množství vitamínu B12 (5; 6).

Dosud se nepodařilo najít potravinu rostlinného původu, která by byla vhodným a dostatečným zdrojem vitamínu B12. Rostlinné zdroje lze o tento vitamín obohatit pomocí bakteriálního kvašení (2) (kysané zelí, pivo), kdy se používají buď propionové bakterie (7; 35) nebo kvasinky rodu *Candida subtilis* (6; 18; 26). V luštěninách a zelenině (brokolice, chřest) je stopové množství vitamínu B12, které je vzhledem k hodnotám doporučeného denního příjmu zanedbatelné a velmi těžko analyticky detekovatelné (6; 7; 17). Nízký obsah vitamínu B12 byl také zjištěn v tempehu, což je potravina vyrobená fermentací sójových bobů pomocí plísní. Vitamín B12 produkují bakterie přítomné při výrobě tempehu. Koncentrace však byly zjištěny nespécifickou mikrobiologickou metodou, která nerozlišuje aktivní a neaktivní formy vitamínu B12 (17). O kyanokobalamin se velmi často obohacují obiloviny nebo sojové mléko (12; 19) a vzhledem k tomu, že kojenci patří mezi skupinu ohroženou nedostatkem vitamínu B12 jsou všechny kojenecké výživy o tento vitamín obohaceny (19).

1.3 Nedostatek vitamínu B12 v lidském těle

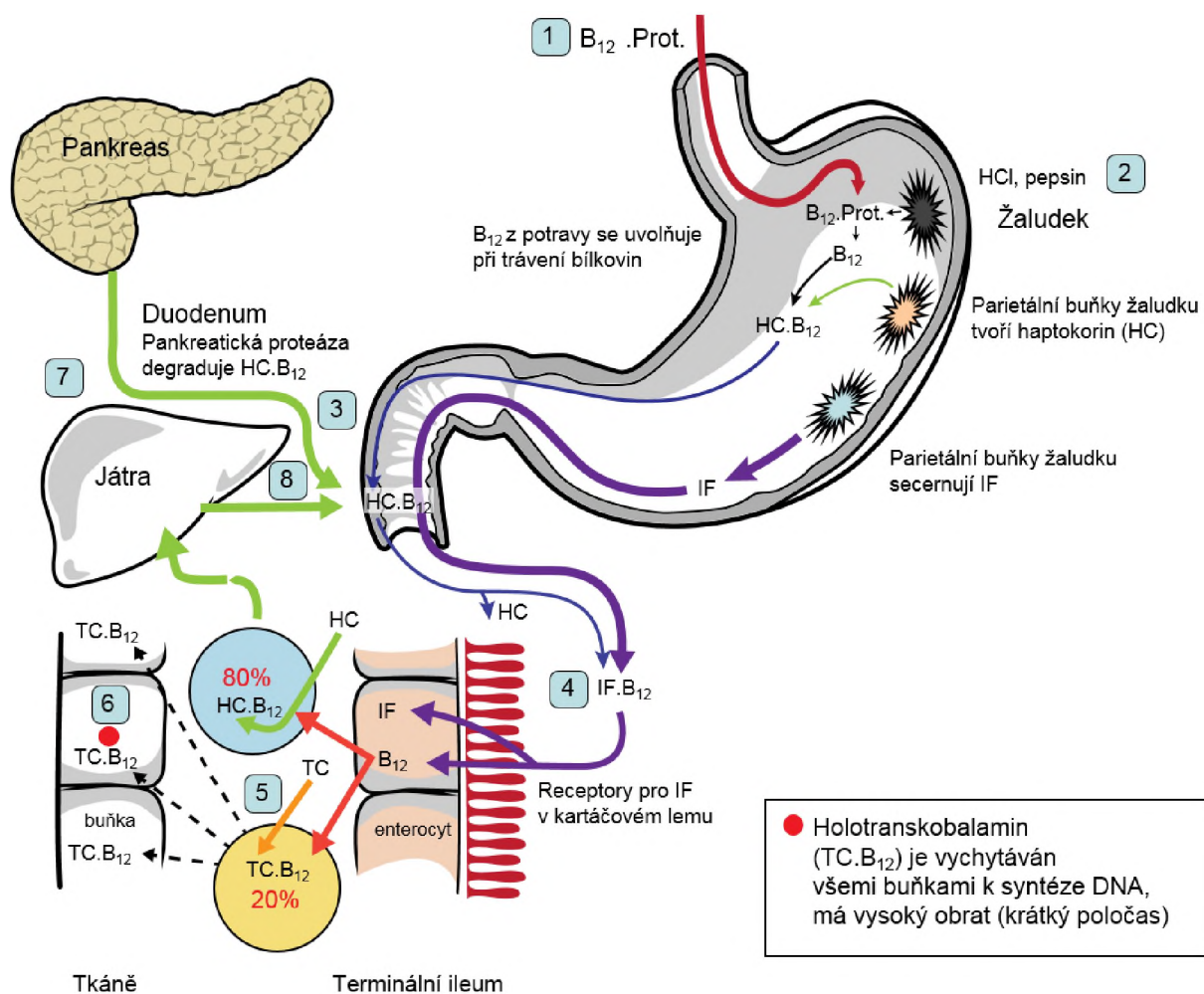
Bez vitamínu B12 se lidské tělo neobejde, jelikož je nezbytný pro tvorbu červených krvinek v kostní dřeni neboli erytropoéze (5; 19) a také působí při přeměně transportních a zásobních forem kyseliny listové na její aktivní formy (2; 19). Hraje také zásadní roli v methylačních procesech a při metabolismu lipidů a sacharidů (12). V neposlední řadě pomáhá udržovat zdravý nervový systém člověka (19).

1.3.1 Příčiny nedostatku

Nedostatek, tzv. avitaminóza, vitamínu B12 v lidském těle může nastat z mnoha důvodů. Tím nejčastějším důvodem je nedostatečný přísun z potravy, ale existuje také řada onemocnění, která mohou deficit způsobit.

K tomu, aby byl ze stravy vitamín B12 v lidském těle správně absorbován je zapotřebí složitého mechanismu. Důležité jsou žaludeční kyseliny a žaludeční intrizitní faktor, známý také jako vnitřní faktor. Vnitřní faktor je glykoprotein vylučovaný žaludečními žlázami, který na sebe váže vitamín B12 a převádí jej přes sliznici tenkého střeva. Pokud je snížena produkce vnitřního faktoru, nemůže se vitamín B12 vstřebávat (2; 27; 36). Ke snížené produkci žaludečního intrizitního faktoru může docházet po dnes již poměrně běžné operaci jako je resekce žaludku. Při chronickém zánětu žaludeční sliznice se žaludeční intrizitní faktor netvoří vůbec a buňky tvořící žaludeční kyseliny jsou poškozeny (2; 7; 27; 37). Při absorpci vitamínu B12 jsou dále podstatné pankreatické enzymy a receptory v terminálním ileu (konečná část tenkého střeva, která ústí do slepého střeva), kde dochází ke vstřebávání vitamínu B12. Na Obrázku 2 je znázorněna cesta vitamínu B12 v lidském těle od jeho příjmu, kdy je navázán na protein v potravě až po jeho uložení. Z obrázku je patrné, že je 20 % z celkového příjmu vitamínu B12 uloženo do tkání a 80 % do jater.

Obrázek 2 Vstřebávání vitamínu B12 v lidském těle (38)



Nedostatek vitamínu B12 se často objevuje u starších lidí, kteří trpí atrofickou gastritidou, při které dochází k narušení absorpce a reabsorpce vitamínu B12, a která se z dlouhodobého hlediska projevuje jako porucha enzymatických pochodů. Seniorům se proto doporučuje preventivní zvýšení příjmu vitamínu B12 v podobě doplňků stravy (2; 6; 7; 27; 36).

Deficit nemusí vznikat pouze při poškození žaludeční sliznice, ale také při poškození sliznice tenkého střeva, což způsobuje například celiakie nebo Crohnova choroba (27; 36; 39)

Riziková může být také zhoršená degradace bílkovin, nadměrný růst střevních bakterií, infekce *Helicobacter pylori* nebo dědičné narušení transportu vitamínu B12 v krvi (2; 27). S nedostatkem vitamínu B12 se spojuje také kouření, alkoholismus a dlouhodobé užívání léků. Mezi léky, které mohou ovlivňovat vstřebávání vitamínu B12 do lidského těla patří zejména ty, které upravují sekreci žaludečních kyselin nebo pH v žaludku (27).

1.3.2 Projevy nedostatku

Lidské tělo si vytváří zásoby vitamínu B12 převážně v játrech, které vystačí na několik let a normálně činí 2–5 mg vitamínu B12. Ze zásob se uvolňuje přibližně 0,1 % denně. Od dostatku vitamínu B12 ke klinické nedostatečnosti prochází tělo fází nedostatku, který se projevuje klesajícím obsahem komponentů vitamínu B12. Fáze nedostatku bývá označována jako subklinická a nejsou při ní pozorovány větší projevy nedostatečnosti (2; 27; 40). Pokud se pacient nachází v subklinické fázi nedostatku, není pro lékaře snadné určit, jak dále postupovat, jelikož se může pacientův stav zhoršit na klinickou nedostatečnost, nebo zůstat v chronickém, avšak stabilním stavu (27; 41–43).

Pokročilý nedostatek vitamínu B12 má mnoho projevů. Jedním z nich je megaloblastická anémie, což je chudokrevnost provázená přítomností velkých nezralých erytrocytů v kostní dřeni (megaloblastů) (3; 5; 12; 26; 27). Dále to může být zhoubná chudokrevnost (jinak nazýváno také jako perniciózní anémie), což je závažné onemocnění, při kterém tělo bojuje proti vlastním buňkám, které tvoří červené krvinky a hemoglobin (2–4; 6; 19; 27; 36; 44; 45). Vitamín B12 je mimo jiné velmi důležitý pro správnou funkci nervového systému a jeho klinická nedostatečnost způsobuje degeneraci některých oblastí míchy a tím pádem také trvalé poškození nervového systému (2; 5; 19; 26; 27).

Dalšími onemocněními, která se spojují s klinickou nedostatečností vitamínu B12 jsou deprese, úbytek sluchu, srdeční choroby, ateroskleróza a neurologické choroby jako je letargie nebo paralýza končetin (5; 46; 47).

Deficit vitamínu B12 je obzvláště nebezpečný u kojenců a dětí, kdy může docházet k postižení vývoje a působí jako příspěvek k pozdějším onemocněním v dospělosti jako třeba kardiovaskulárním, neurodegenerativním nebo psychiatrickým onemocněním (2; 27; 39; 48–51).

1.4 Výroba vitamínu B12

Vegetariánství a veganství je v poslední době stále větší životní trend, a proto je potřeba zajistit zdroje vitamínu B12 jinak než jen z živočišné stravy. Ideálním řešením je obohatit potraviny rostlinného původu o vitamín B12 pomocí mikroorganismů, které jsou schopny tento vitamín syntetizovat. Jedná se o šetrnou, levnou a jednoduchou cestu, jak zajistit lidem trpícím nedostatkem jeho doplnění (12; 16; 18; 52–54). V poslední době se zvyšuje produkce potravin, které byly obohaceny vitamínem B12 pomocí fermentace in situ, což znamená, že došlo k syntéze vitamínu B12 přímo v dané potravíně (5).

Vzhledem k tomu, že má vitamín B12 nejsložitější strukturu ze všech vitamínů, používá se pro jeho výrobu primárně mikrobiologická fermentační cesta. Chemická výroba vitamínu B12 je technologicky a finančně velmi náročná, jelikož zahrnuje asi 70 mezikroků (5; 17; 55).

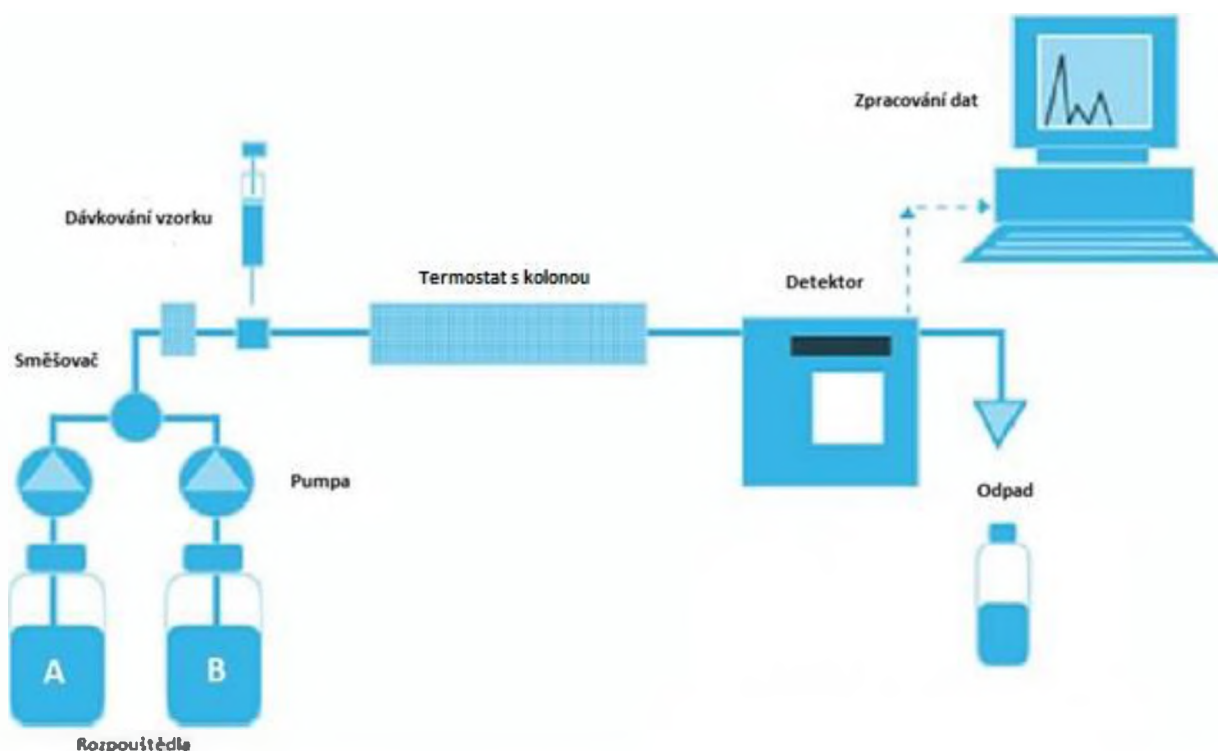
Výběr správného mikrobiologického kmene pro výrobu vitamínu B12 není zcela jednoduchý, jelikož mikroorganismy schopné produkovat tento vitamín mají mnoho nedostatků. Takovým nedostatkem může být například dlouhý fermentační cyklus, náročnost na živné půdy nebo tvorba pseudovitamínu B12. Pro masovou výrobu lze použít bakterie *Pseudomonas denitrificans* nebo *freudenreichii*, *Propionibacterium shermanii* nebo také *Escherichia coli*. Právě *Escherichia coli* má tu výhodu, že se jedná o poměrně dobře prostudovanou bakterii a používá se také při výrobě terpenoidů nebo syntetických alkoholů (4; 5; 12; 16; 18; 55–58).

Na druhou stranu byla jako nejbezpečnější bakterie se statutem GRAS (Generally Recognized As Safe) vyhodnocena bakterie *Propionibacterium freudenreichii*, která produkuje aktivní i neaktivní formu vitamínu B12, což je velká výhoda při použití v potravinách i krmivech (5; 12; 18). Původně byla *Propionibacterium freudenreichii* používána ve fermentovaných potravinách jako je třeba sýr ementál. Vzhledem k tomu, že je schopná produkovat také organické kyseliny nebo některé další vitamíny skupiny B, je v současné době v potravinářském průmyslu hojně využívána (12; 17). Tato bakterie samozřejmě není jediná, která produkuje vitamín B12 a zároveň nese označení GRAS, ale je bezesporu nejvýhodnější. Ostatní bakterie jsou z různých důvodů méně vhodné pro průmyslovou výrobu. Jako příklad lze uvést *Lactobacillus reuteri*, která neumí vázat v dolní části molekuly kobalaminu jiné ligandy než adenin, a tedy neumí produkovat aktivní formu vitamínu B12 (5; 16–18).

1.5 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je druh separační techniky, která je široce používaná nejen v chemickém, ale i potravinářském nebo farmaceutickém průmyslu. Kapalinová chromatografie je založena na separaci složek na základě rozdílné rovnovážné distribuci částic mezi dvěma fázemi, kterými jsou kapalná mobilní fáze, která se pohybuje, a pevná stacionární fáze umístěná v chromatografické koloně. Schéma kapalinového chromatografu je znázorněno na Obrázku 3.

Obrázek 3 Schéma HPLC (59)



V současné době je také hojně využívána ultra vysokoučinná kapalinová chromatografie (UHPLC), která se od HPLC liší tím, že jsou analýzy prováděny za vyšších tlaků a s menší velikostí částic sorbentu stacionární fáze. Analýza pomocí UHPLC je rychlejší (až 4×), citlivější a kolony dosahují vyšších účinností v porovnání s HPLC. S tím souvisí také nižší náklady díky menší spotřebě mobilní fáze. Nevýhodou však je vyšší pořizovací cena UHPLC, jelikož musí být celý systém odolný vůči vysokým tlakům (60).

1.5.1 Mobilní fáze

Jako mobilní fáze se používá kapalina, která se velmi často mísí s různými aditivami. Aditiva slouží k úpravě pH nebo iontové síly mobilní fáze. Úprava pH mobilní fáze se provádí s přesností na 0,1 jednotky pH, jelikož i malá změna pH může způsobit změnu retence analyzované složky. U pufrovaných mobilních fází je nejvhodnější pracovat v oblasti pK daného pufru, jelikož se zde dosahuje nejvyšší pufrací kapacity. Pufrací kapacita vyjadřuje schopnost pufru tlumit změny pH při přidávku kyseliny nebo zásady. Jako příklad lze uvést octanový pufr, který má pufrací kapacitu 3,6–5,6. Mobilní fáze by měla být připravována a filtrována vždy těsně před samotnou analýzou, aby byla zajištěna její čerstvost a čistota (61; 62).

Mobilní fáze se do systému přivádí pomocí vysokotlakého čerpadla, které charakterizuje:

- Bezpulsní průtok mobilní fáze;
- Přesnost, správnost a reprodukovatelnost dávkování mobilní fáze;
- Zajištění tlaku v koloně v rozmezí 30–60 MPa (63).

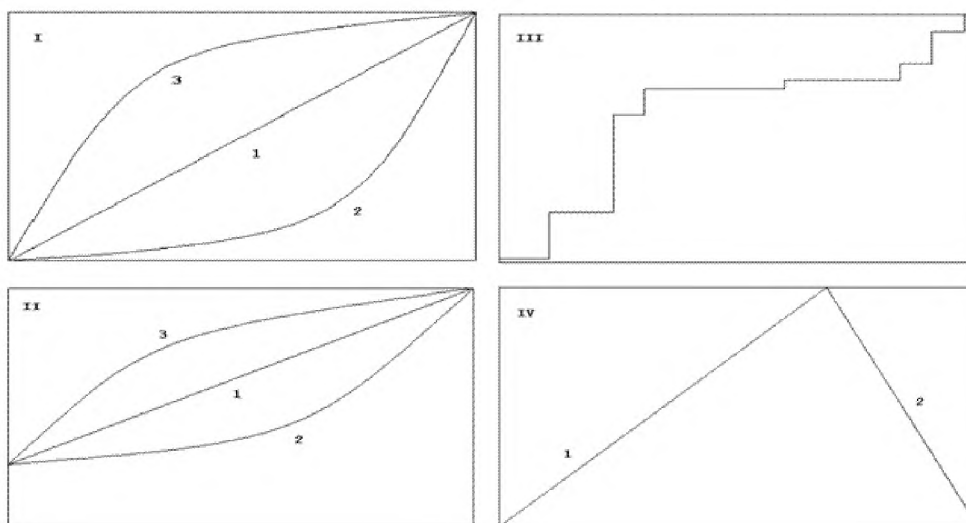
Nejčastěji se při HPLC analýze používá systém s reverzními fázemi, kdy je mobilní fáze více polární než fáze stacionární. Pokud je tomu naopak, jedná se o systém s normálními fázemi (63).

1.5.1.1 Gradientová eluce

Gradientová eluce přinesla do kapalinové chromatografie mnoho výhod a možností. Při použití gradientové eluce dochází ke změně eluční síly nebo selektivity mobilní fáze přímo během separace. Největší předností gradientové eluce je to, že je možné v jedné analýze eluovat látky s velkými rozdíly v retenci a tím zkrátit dobu separace (60; 64). Mimoto také dochází ke zmenšení šířky a zvýšení výšky jednotlivých píků, čímž se zvýší citlivost detekce (64).

Pokud se k tvorbě gradientu mobilní fáze používají dvě složky, jedná se o tzv. binární gradient mobilní fáze. Při použití tří v čase se měnících složek, hovoříme pak o ternárním gradientu (60; 64). Typy gradientu lze rozdělit podle závislosti koncentrace složek v čase. Může být spojitý nebo stupňovitý, viz. Obrázek 4. Změnu koncentrace v průběhu analýzy nazýváme profilem gradientu (60).

Obrázek 4 Typy profilů gradientu mobilní fáze (I, II – kontinuální gradient s nulovou (I) a nenulovou počáteční koncentrací (II) 1 – lineární, 2 – konkávní, 3 – konvexní; III – stupňovitý gradient; IV – lin. gradient (1) následovaný obráceným lin. Gradientem (65)



Při použití gradientové eluce je omezená možnost detekce, jelikož lze použít pouze detektory, které nejsou citlivé na změny průtoku a složení mobilní fáze (spektrofotometrický detektor, fluorescenční detektor) (60).

1.5.2 Chromatografické kolony

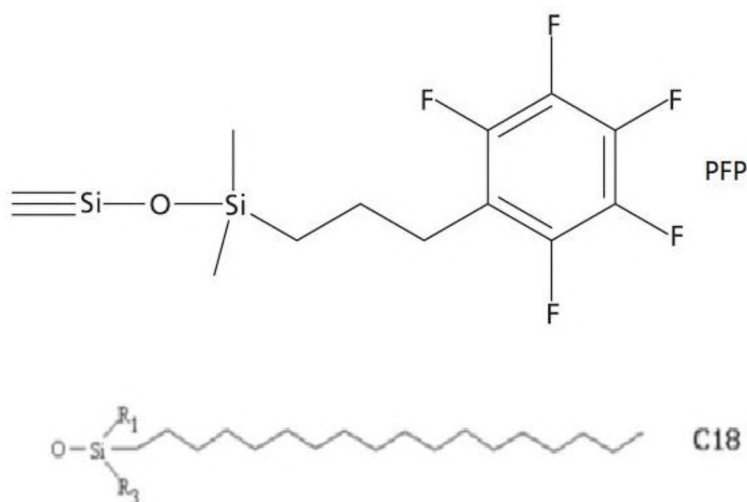
Chromatografická kolona musí být chemicky inertní, odolávat vysokým tlakům a vnitřní povrch jejího pláště musí být hladký. Materiálem pro výrobu chromatografických kolon je nejčastěji nerezová ocel, plast, titan nebo sklo (60). Nejčastější délka kolon pro kapalinovou chromatografii je 3–30 cm a průměr 2–10 mm.

Stacionární fáze v chromatografické koloně může být tuhý sorbent nebo kapalina, která je chemicky ukotvená na tuhém nosiči. Chemická a tepelná stabilita jsou u stacionárních fází důležité vlastnosti a rovněž nesmí docházet k reakci s mobilní fází nebo se v ní rozpouštět (63). Stacionární fáze lze dělit několika způsoby:

- dle chemického složení – anorganické oxidy (silikagel, oxid zirkoničitý, titaničitý a hlinitý);
- dle polaritý – polární, nepolární a amfoterní;
- stacionární fáze na bázi grafitu;
- chemicky vázané fáze na silikagel (aminopropyl, pentafluorfenyl (PFP)) (60; 63).

Právě zmiňovaný pentafluorfenyl (Obrázek 5) je unikátní svou retencí, selektivitou a poskytuje zpravidla obdobné separace jako oktadecylová (C18) stacionární fáze, což je nejčastěji používaná stacionární fáze hned vedle silikagelu (Obrázek 5) (63).

Obrázek 5 Struktura pentafluorfenylové (PFP) a oktadecylové (C18) stacionární fáze (66; 67)

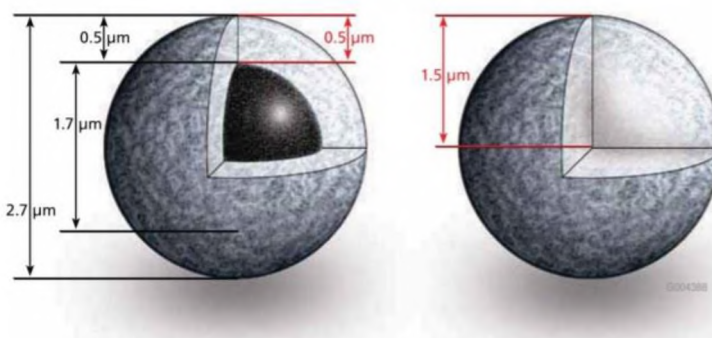


1.5.2.1 Povrchově porézní částice stacionární fáze

Chromatografické kolony mohou být naplněny plně porézními částicemi, neporézními částicemi nebo povrchově porézními částicemi. Porézní částice jsou oproti neporézním částicím odolné vůči přenosu hmoty ze stagnující mobilní fáze v pórech. Povrchově porézní částice, spojují výhody neporézních částic (rychlost separace a účinnost) a plně porézních částic (retence látek).

Jedná se o částice, které mají pevné neporézní jádro a na povrchu je porézní vrstva (Obrázek 6), většinou chemicky modifikovaného silikagelu. Komerčně dostupné velikosti částic jsou od 1,7 až 5 μm s různou tloušťkou porézní vrstvy (68; 69).

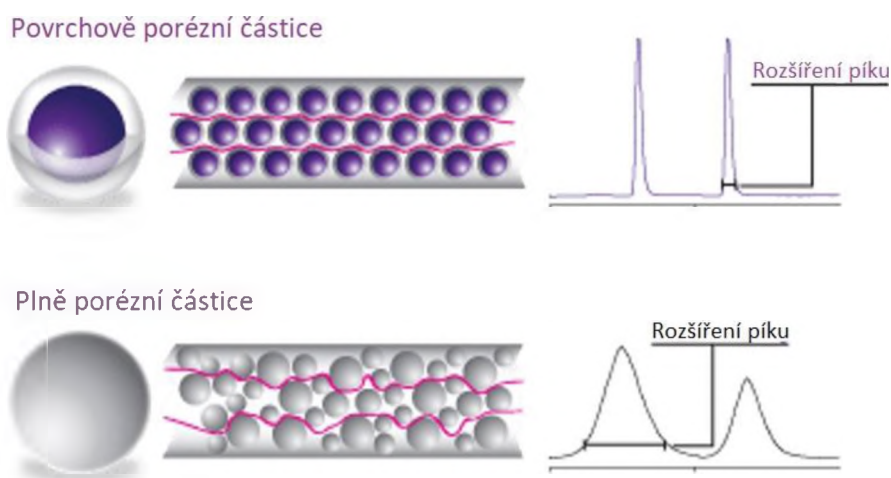
Obrázek 6 Povrchově porézní a plně porézní částice (70)



Výhod při použití těchto částic je několik. Separovaná látka neproniká do celé částice jako v případě plně porézních částic a dochází tak k menšímu rozmývání elučních zón. Další výhodou je vyšší účinnost než u použití kolon plněných plně porézními částicemi nebo kolon monolitických, které mají kontinuální porézní strukturu vyplňující objem chromatografické kolony. V neposlední řadě je výhodou také kratší doba analýzy v porovnání s tradičními kolonami, které jsou naplněny částicemi sorbentu o větším průměru (68; 69).

Povrchově porézní částice mohou mít nepravidelný povrch, což může způsobit rozšiřování píků a snižování přenosu hmoty (71). Na Obrázku 7 je znázorněn průtok látky kolonou, která je naplněna povrchově porézními částicemi a plně porézními částicemi. Obrázek zobrazuje vyšší účinnost chromatografické separace při použití povrchově porézních částic, jelikož mají plně porézní částice různé velikosti, a tak každá molekula proudící látky urazí jinou vzdálenost a dochází tak k rozšiřování píků. Rozdíl je také v tom, že proudící látka urazí kratší dráhu vzhledem k tomu, že neproniká do celé částice.

Obrázek 7 Pohyb látky v kolonách naplněných různými typy částic (72)



1.5.3 Detektory

Vysokoučinný kapalinový chromatograf lze propojit s celou řadou detektorů, které se dělí na koncentrační a hmotnostní. Koncentrační detektor reaguje na změnu hmotnostní koncentrace analytu nezávisle na jeho přívodu do detektoru. Mezi takové detektory patří například spektrofotometrický detektor (73–75), fluorescenční detektor, elektrochemický detektor (ECD) (73) nebo detektor fotodiodového pole (17; 18; 22; 73; 76). Detektor fotodiodového pole je schopen zaznamenat celé spektrum látky díky diodovému poli, na kterém je každá fotodioda nastavena na určitou vlnovou délku. Hmotnostní detektory pak reagují na změnu hmotnostního toku analytu do detektoru. Pokud se tedy změní rychlost průtoku mobilní fáze, změní se i výška píku, plocha však zůstane stejná. Příkladem hmotnostního detektoru je detektor rozptylu světla (ELSD (evaporative light-scattering detector)), refraktometrický detektor (73) nebo hmotnostní detektor (1; 24; 73; 74; 77).

1.5.3.1 Spektrofotometrický detektor

Spektrofotometrický detektor je nejpoužívanějším detektorem v kapalinové chromatografii. Je velmi citlivý, ale méně selektivní a není univerzální. Jedná se o nedestruktivní detektor, což znamená, že při detekci nedochází ke změně na analytu. Měřenou veličinou je zde absorbance, která se měří v oblasti vlnových délek od 190 do 380 nm (UV oblast) pro polynenasycené a aromatické látky a od 380 do 780 nm (viditelná oblast) pro látky barevné.

Velikost odezvy je dána Lambert-Beerovým zákonem, který vyjadřuje vztah mezi šířkou absorbující vrstvy l (délkou kyvety), koncentrací stanovované složky c a velikostí absorpce A (absorbance).

$$A = c \cdot l \cdot \varepsilon$$

Veličina ε značí molární absorpční koeficient, který má jednotku $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a vyjadřuje schopnost látky absorbovat elektromagnetické záření (světlo). Jedná se o konstantu, která je vždy vztažená k jedné látce o dané koncentraci a k délce dráhy, kterou urazí světlo při průchodu látkou (60).

1.6 Extrakce pevnou fází

Některé analyty mají tak nízkou přirozenou koncentraci ve vzorcích, že je nelze detekovat v přímém nástřiku vzorku na chromatografickou kolonu. V takovém případě musí být před vlastní analýzou provedeno zakoncentrování, aby bylo možné sledovanou sloučeninu detekovat a stanovit. Extrakce pevnou fází (SPE) představuje ideální techniku pro zakoncentrování a přečištění vzorku. Mimoto může SPE také sloužit k výměně rozpouštědel nebo derivatizaci analytu. Je to jednoduchá a rychlá metoda. Její výhodou je také menší spotřeba rozpouštědel, snadná automatizace a jednoduché spojení s instrumentálními metodami (63).

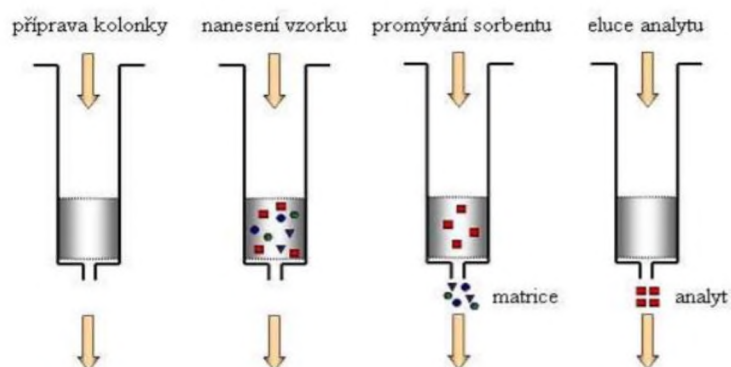
Principem je zachycení molekul stanovované látky na tuhém sorbentu. Tento děj probíhá při protékání vzorku SPE kolonou, která je naplněna vhodným sorbentem schopným tuto látku zadržet. Pro ulpívání molekul na sorbentu jsou podstatné mezimolekulární interakce, mezi které patří:

- vodíkové vazby;
- kation-aniontové interakce;
- dipól-dipólové interakce (tzv. polární interakce);
- van der Waalovy síly (tzv. nepolární interakce);
- specifická interakce protilátka-antigen (63).

Sorbenty používané v SPE kolonách jsou velmi podobné těm, které se používají pro kolony v kapalinové chromatografii. Mohou to tedy být např. nepolární sorbenty (C18, C8), polární sorbenty (silikagel) nebo sorbenty z polymerních materiálů. Pro správný výběr sorbentu jsou důležité chemické vlastnosti analytu i používaného rozpouštědla (63).

Postup práce s SPE kolonami je znázorněn na Obrázku 8 a probíhá následovně. Nejprve je SPE kolona kondicionována, aby došlo k aktivaci funkčních skupin sorbentu. Vzorek v kapalném stavu se nanese na SPE kolonu, kde jsou látky zachytávány na sorbentu. Nežádoucí příměsi se mohou odstranit promytím kolony vhodným rozpouštědlem, které nerozpouští analyzovanou látku. Stanovovaná látka je následně eluována elučním rozpouštědlem. Vzhledem k tomu, že jsou eluční objemy o mnoho nižší než původní objemy vzorku, dochází zároveň k zakoncentrování. Průtok vzorku a rozpouštědel přes kolonu lze urychlit centrifugací, připojením vakua na výstup kolony nebo tlaku na její vstup.

Obrázek 8 Princip extrakce tuhou fází (78)



1.6.1 Imunoafinitní kolony

Imunoafinitní kolony jsou speciálním a samostatným druhem SPE kolon. Mechanismus retence funguje na principu interakce protilátky a antigenu. V praxi to vypadá tak, že jsou na sorbentu kolony ukotveny specifické protilátky a analyt funguje jako antigen, který je protilátkami zachytáván. Matrice pak prochází bez zadržení a analyt je klasicky eluován elučním činidlem. Problémem imunoafinitních kolon může být tzv. zkřížená reaktivita, kdy jsou protilátkou zachyceny také látky podobné stanovovanému analytu. Imunoafinitní kolony se používají nejčastěji pro analýzu mykotoxinů nebo některých vitamínů.

Imunoafinitní kolony jsou vysoce selektivní a odstraňují ze vzorku všechny ostatní látky, které by mohly rušit stanovení (13; 19). Čištění vzorku pomocí imunoafinitní kolony výrazně přispívá ke zvýšení selektivity a citlivosti následného stanovení pomocí HPLC (13; 17; 19).

Princip imunoafinitní kolony pro extrakci vitamínu B12 je založen na technologii monoklonálních protilátek, díky kterým je metoda vysoce specifická, citlivá, rychlá a robustní. Nemůže zde docházet k již zmíněné zkřížené reaktivitě. Kolony jsou naplněny gelovou suspenzí monoklonální látky, která je specifická pro vitamín B12. Jako eluční činidlo se používá methanol (19; 79).

Vzhledem k vysoké selektivitě imunoafinitních kolon pro vitamín B12 je nezbytné převedení všech forem vitamínu B12 na kyanokobalamin pomocí kyanidu. Tento postup je nutný zejména u vzorků, které jsou přírodního původu, jelikož se zde nejčastěji vyskytuje více forem vitamínu B12 (13).

1.7 Stanovení vitamínu B12 v potravinářských vzorcích

Vitamín B12 se nachází převážně v potravinách živočišného původu, což jsou vesměs složité matrice. Nejsložitější a také nejvíce časově náročné na celém postupu analýzy, vedoucí ke stanovení množství vitamínu B12, je příprava vzorku. Vzorek je většinou nutné nejprve rozložit a současně uvolnit analyt. Následně dochází k jeho přečištění, případně zakoncentrování. Teprve po této fázi nastává vlastní stanovení např. pomocí kapalinové chromatografie.

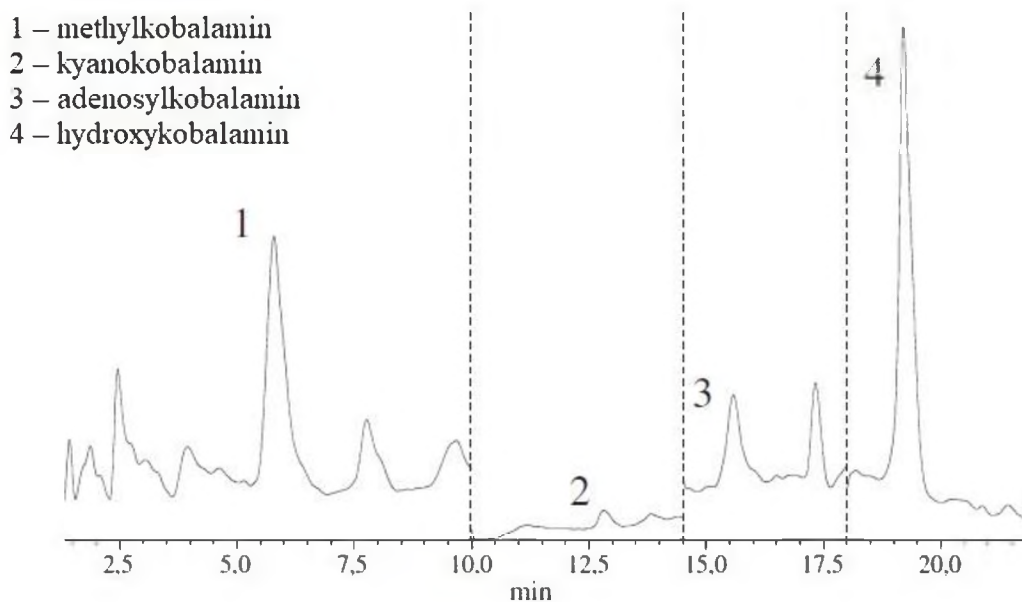
1.7.1 Uvolnění vitamínu B12 z matrice

Vitamín B12 bývá v potravinách navázán na proteinový komplex a pokud chceme stanovit jeho celkový obsah, je nezbytné ho z těchto vazeb před stanovením uvolnit. Způsobů, jak rozložit vazbu na bílkoviny a vitamín uvolnit, existuje několik.

První možností je enzymatický rozklad pomocí proteáz. Nejčastěji se pro tento způsob rozkladu proteinů používá pepsin nebo papain. Účinek těchto enzymů je velice podobný. Např. při analýze vitamínu B12 v kojenecké výživě byly srovnány výsledky za použití pepsinu a papainu a získané koncentrace byly velmi podobné (rozdíl činil pouze cca 3 %) (13).

Jedním z dalších způsobů je zahřívání vzorku v přítomnosti nadbytečného množství kyanidových iontů v neutrálním nebo slabě alkalickém prostředí, což vede k uvolnění přírodních forem vitamínu B12 a jejich přeměně na kyanokobalamin (1; 13; 17; 19; 75; 77). Reakce se provádí nejčastěji v prostředí octanového pufru a směs je zahřívána ve vodní lázni na teplotu 80–100 °C. Výtěžek reakce je přibližně 98 % (17; 24; 75; 77). Tento postup je bezesporu výhodnější, jelikož kombinuje uvolňování vitamínu B12 z proteinů a zároveň jeho převedení na kyanokobalamin. Kromě toho zabraňuje rušení stanovení v důsledku možné přítomnosti vitamínu B12 v enzimech živočišného původu, jako je tomu v případě pepsinu (1; 13; 19). Na Obrázku 9 je znázorněn chromatogram z analýzy vzorku hovězích jater pomocí HPLC bez předchozí reakce s kyanidovými ionty. Z chromatogramu je patrné, že v hovězích játrech převládá hydroxykobalamin, který je velmi málo stabilní a bez převedení na kyanokobalamin by výsledek stanovení nemusel být přesný.

Obrázek 9 HPLC analýza hovězích jater bez předchozího působení kyanidových iontů (24)



Úplného uvolnění přírodních forem vitamínu B12 z matrice lze dosáhnout použitím proteolytického kroku před působením kyanidem, což je asi nejčastější metoda (13; 18; 19; 75). Ke vzorkům obsahujícím sacharidy se přidává ještě α -amyláza, která je štěpí (17–19; 75).

Poslední možnost zahrnuje zároveň uvolnění vitamínu B12 z matrice i jeho extrakci. Tento postup se provádí pomocí kyseliny trichloroctové. Ke vzorku masa se přidá pevná kyselina trichloroctová, směs se zhomogenizuje a odstředí na odstředivce. Poté je k pevnému podílu směsi přidán 4% roztok kyseliny trichloroctové, směs se opět zhomogenizuje a odstředí. Oba kapalné kyselé extrakty jsou následně smíchány a zchlazeny při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut, aby se vyloučil tuk, který je následně odstraněn odstředěním. Vzorek se poté přefiltruje přes stříkačkový filtr s velikostí pórů $0,45\text{ }\mu\text{m}$ a je připraven pro HPLC analýzu (76).

1.7.2 Extrakce vitamínu B12

Pro extrakci vitamínu B12 po jeho uvolnění z matrice se nejčastěji používají imunoafinitní kolony EASI-EXTRACT VITAMIN B12 (R-Biopharm; Darmstadt, Německo) (12; 13; 17–19; 75). Imunoafinitní kolony pro extrakci vitamínu B12 však lze zakoupit také například od firmy Meizheng Group (Peking, Čína) nebo Eagle Biosciences (Amherst, USA).

Kapacita imunoafinitní kolony EASI-EXTRACT VITAMIN B12 je $1\text{ }\mu\text{g}$ vitamínu B12, ale optimální dávkování je $0,01\text{--}0,5\text{ }\mu\text{g}$. Princip imunoafinitních kolon je popsán v kapitole

1.6.1. Imunoafinitní kolony je nutné uchovávat v chladu, a proto se před použitím nechávají vytemperovat na laboratorní teplotu. Poté se nechá volně odkapat stabilizující pufr a nanese se kapalným vzorkem. Vitamín B12 se zachytí na protilátce a kolona se promyje redestilovanou vodou. Kolona se následně vysuší vzduchem a pomocí methanolu se eluuje zachycený vitamín B12. Eluát se vysuší při 50–60 °C pod proudem dusíku nebo vzduchu a rekonstituuje mobilní fází nebo ředícím roztokem vzorku, aby jej bylo možné dále stanovit pomocí HPLC s UV detekcí nebo UHPLC s hmotnostním spektrometrem (13; 17–19; 75).

Další z možností extrakce je použití SPE kolony s reverzní fází (RP-SPE), kterou může být např. chemicky vázaný oktyl (C8) nebo oktadecyl (C18) na silikagelu. Kolony jsou nejprve kondicionovány methanolem a vodou, čímž se aktivují funkční skupiny na sorbentu. Následně se na kolonu nanese kapalným vzorkem a vitamín B12 se zachytí na sorbentu. Kolona se promyje vodou a poté se vitamín B12 eluuje 50% acetonitrilem. Nádobka se vzorkem rozpuštěným v acetonitrilu se vysuší ve vakuu a vzorek je rekonstituován mobilní fází. Takto připravený extrakt je vhodný pro UHPLC analýzu s MS detekcí (77).

Při analýze vitamínu B12 v mléčných výrobcích nebo mase se pro jeho extrakci mohou použít také Oasis HLB kolony. Jedná se o kolony se sorbenty na principu SPE, které obsahují silně hydrofilní polymery s obrácenou fází (1; 24; 80). Prvním krokem je kondicionace kolony acetonitrilem a vodou. Po nanesení vzorku je kolona promyta vodou (případně ještě 5–10% methanolem (24)) a poté je vitamín B12 eluován 50% roztokem acetonitrilu (1) nebo 50% roztokem methanolu (24). Rozpouštědlo je následně odpařeno na rotační vakuové odparce při 30–35 °C. Odpařený vzorek je rozpuštěn a převeden ethanolem do vialky, který je následně opět odpařen pod proudem dusíku při 40 °C. Poté je vzorek znovu rozpuštěn v destilované vodě a připraven na HPLC analýzu s detekcí hmotnostním spektrometrem (24).

1.7.3 Separační metody stanovení

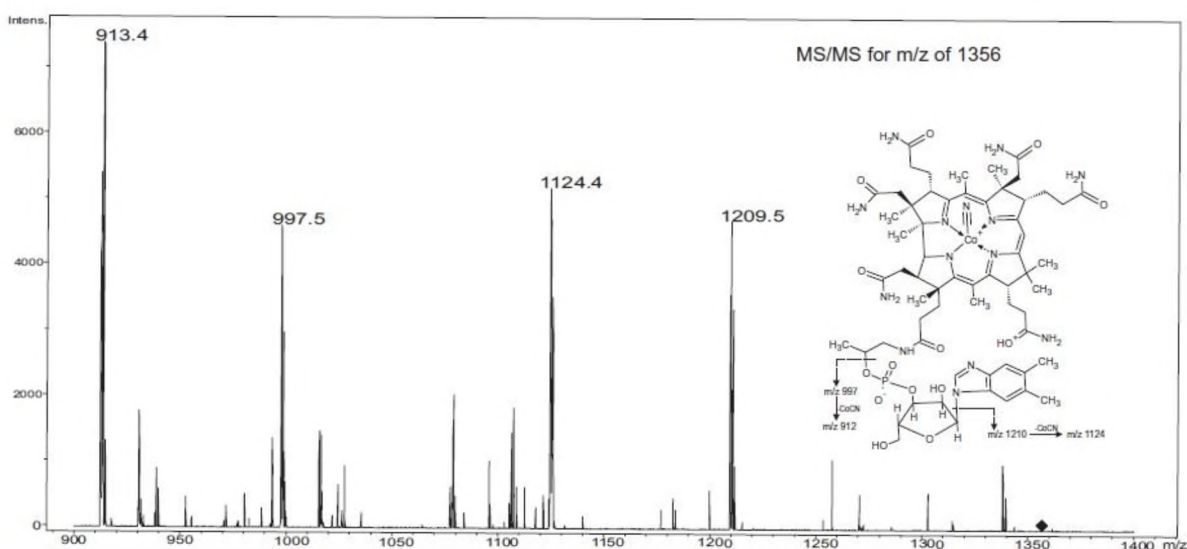
Nyní je vzorek po složitém rozložení, zakoncentrování a přečištění připraven na vlastní analýzu. Vitamín B12 lze poměrně snadno stanovit s využitím separačních technik. Je možné využít vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) (3; 17; 19; 22; 24; 75; 76; 81) nebo ultra vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (UHPLC) (1; 17; 18; 74; 77; 82). Tyto metody stanovení jsou při stanovování vitamínů nejpoužívanější. Separace se provádí ve většině případů na chromatografických kolonách s reverzní fází, které mohou být naplněny buď

částicemi silikagelu s chemicky navázanými oktadecyl uhlíkovými řetězci (C18) nebo oktylovými uhlíkovými řetězci (C8) (1; 17; 18; 22; 24; 74–77; 81; 82).

Mobilní fáze je nejčastěji voda (1; 17–19; 24; 74; 75; 77; 81) a acetonitril (1; 17–19; 22; 24; 74; 75; 77), kdy je voda poměrově ve značné převaze (1; 17–19; 24; 75; 77). K okyselení mobilní fáze se používá buď kyselina trifluoroctová (17; 19; 24; 74; 75) nebo kyselina mravenčí v koncentraci 0,025–0,5 %, která se mísí buď s jedním (1; 77) nebo s oběma komponenty mobilní fáze (17; 18). Při separaci směsi ve vodě rozpustných vitamínů lze jako mobilní fázi pro gradientovou eluci použít také 5 mM kyselinu mravenčí o pH=3 a 100% methanol (82). K eluci lze použít jak izokratickou (75; 76), tak gradientovou eluci (1; 17; 18; 22; 24; 74; 77; 82), při které se zvyšuje obsah organického rozpouštědla v mobilní fázi s časem separace.

K detekci vitamínu B12 při analýze kapalinovou chromatografií se mohou používat různé typy detektorů. Jedním z nich je hmotnostní spektrometr (1; 17; 24; 74; 77) s trojitým kvadrupólem, který je typický pro kvantitativní analýzu (1). Nejběžnější ionizační technikou při stanovení vitamínu B12 je ionizace elektrosprejem (17; 18; 24; 74; 82). Molekulová hmotnost kyanokobalaminu je $1355,38 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, proto se skenování iontů provádí v rozsahu m/z 900–1400 (24) nebo také m/z 50–1500 za pozitivního iontového režimu (18). Tento typ detektoru je velmi citlivý a jeho detekční limity jsou asi $70 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (3). Na Obrázku 11 je znázorněno MS/MS spektrum iontu m/z 1356 pro standard kyanokobalaminu.

Obrázek 10 MS/MS spektrum standardu kyanokobalaminu (17)



Další možností detekce je použití spektrofotometrického detektoru (3; 13; 17; 19; 74; 75) (detektor s fotodiodovým polem (18; 22; 76)). Při spektrofotometrické detekci se vzorky měří při vlnových délkách 278 nm, 361 nm a 550 nm (3; 18; 19; 75; 76), což jsou absorpční maxima kyanokobalaminu. Absorbance při 361 nm je cca 3,3× větší než při 550 nm. Pro detekci vitamínu B12 lze využít také hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) (3; 13; 24; 81), který je založen na detekci kobaltu v molekule kobalaminu a velmi často se používá při analýze vitamínových přípravků (13). Detekce pomocí ICP-MS je vysoce citlivá a je schopna stanovit koncentrace vitamínu B12 pod 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, nicméně cena zařízení a provozní náklady ICP-MS jsou velmi vysoké (3; 24).

Další z možností, jak detekovat vitamín B12 je použit velice selektivní a citlivou fluorescenční detekci (13; 19; 24; 83; 84). Bohužel vitamín B12 sám o sobě nefluoreskuje, ale lze ho převést alkalickou fosfatázou na fluoreskující formu α -ribazol (17; 83). Lze ho také derivatizovat pomocí derivatizačních činidel DMEQ (hydrazin 6,7-dimethoxy-1-methyl-2(1H)-chinoxalinon-3-propionyl karboxylové kyseliny) nebo 4,4'-diazobenzendiazoamino-azobenzen (3; 24). Nevýhodou použití tohoto detektoru je dlouhá a náročná příprava vzorku, absence komerčně dostupného standardu a zvýšení celkových nákladů (vysoká cena derivatizačních činidel) (13; 19; 24; 84).

Kapilární elektroforéza ve spojení s ICP-MS je další možností stanovení a přináší výhodu rozlišení různých forem vitamínu B12. Rovněž nevyžaduje složitou přípravu vzorku, má však nízkou mez detekce, a tak se používá hlavně pro základní výzkum (3; 85).

Vitamín B12 má elektrochemické vlastnosti, a proto lze na jeho detekci využít také coulometrický detektor, který měří proud vznikající při průchodu oxidovatelné nebo redukovatelné látky měrnou celou. Výhodou tohoto detektoru je, že není nutné převádět všechny formy vitamínu B12 na kyanokobalamin (13).

1.7.4 Mikrobiologická metoda stanovení

Mikrobiologická metoda stanovení je jednou z nejstarších metod měření obsahu vitamínu B12 (3; 24). Principem metody je proliferace mikroorganismů, které k růstu využívají vitamín B12. Rychlost růstu mikroorganismů tedy závisí na koncentraci vitamínu v testovacím médiu (18; 24). Tato metoda je pracovní i časově velmi náročná (až několik dní, kvůli růstu mikroorganismů), málo přesná a v neposlední řadě není selektivní (3; 13; 17; 19; 24; 86). Nízká

selektivita má často za následek chybu 5–40 %, jelikož touto metodou nelze rozlišit jednotlivé formy vitamínu B12 (17; 19; 24; 75). Na druhou stranu je mikrobiologická metoda velmi citlivá a levná (13; 19). Nejčastějšími mikroorganismy používanými při stanovení koncentrace vitamínu B12 jsou *Euglena gracilis* (krásnoočko štíhlé), *Propionibacterium freudenreichii*, *Lactobacillus leishmanii* (3; 13; 19; 87–90) a *Lactobacillus delbrueckii* (ATCC 7830) (12; 17). Metoda za použití mikroorganismu *Lactobacillus delbrueckii* pro stanovení koncentrace vitamínu B12 je referenční analytickou metodou (12; 17).

Samotné stanovení pomocí *Propionibacterium freudenreichii* probíhá následovně. Zpracovaná matrice (zpracování se liší dle druhu potravin) se zaočkuje kulturou a nechá se fermentovat při teplotě 28 °C po dobu 24 hodin. Po inkubaci se zjistí počet buněk a vyjádří se v jednotkách CFU/g (17; 18). Jako kalibrátor se používá kyanokobalamin (12).

Detekční limity se u mikrobiologické metody velmi liší v závislosti na použitém mikroorganismu. Například při použití indikátorového mikroorganismu *Lactobacillus delbrueckii* je možno dosáhnout detekčních limitů 1,12 µg·ml⁻¹ a nejnižší detekční limity vykazuje metoda za použití mikroorganismu *Lactobacillus leishmanii*, který je nejcitlivější a s jeho pomocí může být stanovena koncentrace vitamínu B12 1–20 pg·ml⁻¹. Opět je třeba počítat s nízkou specifitou, jelikož tento mikroorganismus nerozlišuje aktivní a neaktivní formy vitamínu B12 a u výsledků se musí uvažovat chyba 5–40 % (13; 18; 19).

1.7.5 Další metody stanovení

Vitamín B12 je možno stanovovat metodou elektroluminiscence (ECL). Je to metoda, při které se mění elektrická energie luminiscence ve světlo. K této přeměně dochází, jakmile projde proud speciálním elektroluminiscenčním materiálem. Při měření vitamínu B12 touto metodou se aplikuje tzv. konkurenční princip, který využívá jako protilátku intrizitní faktor, který je značený rutheniovým komplexem. Vzorek se inkubuje spolu s protilátkou a následně se ke směsi přidává biotinylovaný vitamín B12 spolu se streptavidinem, který je potažen paramagnetickými mikročásticemi. Volná vazebná místa značené protilátky obsadí komplex antigenu. Po inkubaci je reakční směs transportována do měrné cely, kde se imunitní komplexy magneticky zachytí na pracovní elektrodě. Reakce je pak elektricky stimulována tak, aby produkovala světlo, které je nepřímo úměrné množství vitamínu B12 v původním vzorku.

Výhodou této metody je vysoká přesnost, selektivita, rychlost a dlouhá životnost používaných přístrojů bez nákladů na údržbu.

Mez stanovitelnosti vitamínu B12 pomocí ECL je asi $30 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Nejčastěji se tato metoda stanovení používá ve farmakologickém, klinickém a chemickém výzkumu (3; 24).

Ke stanovení vitamínu B12 lze použít také atomovou absorpční spektrometrii (AAS), která je založená na měření množství kobaltu ve vzorku. Detekční limit této metody je asi $20 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Výhodou AAS je to, že se jedná o snadnou a přesnou metodu. Používá se hlavně ve farmaceutickém a klinickém průmyslu. Ve farmakologickém a klinickém průmyslu se také často používá metoda radioimunoanalýzy (RIA), která má mez detekce $200 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (3).

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje a zařízení

Pro odměření objemů při přípravě vzorků a kalibrační křivky byly použity automatické pipety s nastavitelným objemem Biohit-Proline (Biohit, Helsinky, Finsko) a Sartorius Proline (Sartorius, Göttingen, Německo). Pro odměřování velmi malých objemů při přípravě kalibrační řady byly použity mikrostříkačky značky Hamilton (Reno, Nevada, USA) o objemu 1, 10, 100 a 250 μl . Úprava pH octanového pufru byla prováděna pomocí pH metru SCHOTT CG 842 (SCHOTT GLAS, Mainz, Německo).

Navazování standardu pro přípravu kalibrační řady bylo provedeno na digitálních analytických vahách s přesností na čtyři desetinná místa značky Sartorius BP 211 D (Sartorius, Göttingen, Německo). Všechna ostatní vážení vzorků a činidel pro stanovení byla prováděna na digitálních analytických vahách s přesností na tři desetinná místa značky KERN ABT 220-4M (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo).

Pro homogenizaci vzorků byl použit nožový mlýn Grindomix GM 200 (Retsch; Verder s.r.o., Praha, Česká republika) a homogenizátor IKA Ultra Turrax (Staufen, Německo). Pro následnou inkubaci zhomogenizovaných vzorků byla využívána vodní lázeň s třepačkou značky Memmert (Büchenbach, Německo). Pro odstředování vzorků byla použita odstředivka Sorvall ST Plus Series (Fisher Scientific, Massachusetts, USA). K zakoncentrování a pročištění vzorků byly používány imunoafinitní kolony EASI-EXTRACT® VITAMIN B12 (produktové číslo P80/P80B; R-Biopharm, Darmstadt, Německo). Eluát byl vysoušen pomocí vyhřívacího bloku Dry block heater 1 (IKA, Staufen, Německo) a následně znovu rozpouštěn pomocí ultrazvukové lázně typu Sonorex RK 31 (Bandelin, Berlin, Německo).

Pro přípravu ultra čisté vody jako mobilní fáze bylo použito zařízení MilliQ (Merck Millipore, Německo) a po jejím okyselení byla voda přefiltrována pomocí membránové vývěvy KnF N035 AN.18 (KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Německo). Membránová vývěva obsahovala filtr Milipak® Express s velikostí pórů 0,45 μm . Při analýze vitamínu B12 byl použit vysokoučinný kapalinový chromatograf, který byl složen z těchto částí:

- binární čerpadlo mobilních fází (Agilent 1290 Infinity Binary Pump (G4220A); Agilent Technologies, Santa Clara, USA);

- autosampler (Agilent 1290 Infinity Autosampler (G4226A); Agilent Technologies, Santa Clara, USA);
- termostat kolony (Agilent 1200 Series Thermostatted Column Compartment (G1316A); Agilent Technologies, Santa Clara, USA);
- detektor diodového pole (Agilent 1200 Infinity Series Diode Array Detector (G4212B); Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

Pro analýzu vzorků byla využívána chromatografická kolona plněná povrchově porézními částicemi Kinetex PFP 100 A, 150×3 mm, s velikostí částic 2,6 μm která byla vyrobena firmou Phenomenex (Torrance, USA).

2.2 Chemikálie a vzorky

2.2.1 Používané chemikálie

Pro přípravu vodného roztoku pufru potřebného při přípravě vzorku byl použit trihydrát octanu sodného p.a. zakoupený od firmy Lach-Ner, s.r.o. (Neratovice, Česká republika) a pro následnou úpravu jeho pH kyselina octová zakoupená od firmy Penta s.r.o. (Praha, Česká republika). Při přípravě vzorku byl dále používán kyanid sodný a enzymy α -amyláza (A3176–1MU; ≥ 10 jednotek/1 mg) a pepsin (P7125; ≥ 400 jednotek/1 mg) zakoupené od firmy Sigma-Aldrich (Louis, Missouri, USA). Pro eluci vitamínu B12 z imunoafinitní kolony byl používán methanol (HPLC grade) zakoupený od firmy Honeywell (Charlotte, USA).

Jako mobilní fáze byl mimo ultračisté vody získané pomocí čistícího systému na úpravu vody (Milli-Q®; Merck Millipore, Německo) používán také acetonitril LC-MS čistoty (Sigma-Aldrich, Louis, Missouri, USA). Na okyselení obou složek mobilní fáze byla používána 99% kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, Louis, Missouri, USA).

2.2.2 Používaný standard

Při optimalizaci a přípravě kalibrační řady byl používán standard vitamínu B12 (CAS 68-19-9; Cyanocobalamin, V2876–1G; čistota ≥ 98 %) zakoupený od firmy Sigma-Aldrich, USA.

2.2.3 Vzorky

Všechny vzorky masa byly zakoupeny v potravinových řetězcích v ČR a jejich přehled je uveden v následující Tabulce 3.

Tabulka 3 Použité vzorky pro analýzu

Maso	Druh	Prodávající	Země původu	Typ balení
Hovězí	Kýta	Albert Česká republika, s.r.o., Radlická 520/117, Praha 5	Česká republika	Pultový prodej Chlazen
Vepřové	Kýta	Lidl Česká republika v.o.s., Nárožní 1359/11, Praha 5		Baleno v ochranné atmosféře Chlazen
Kuřecí	Stehenní řízek			

2.3 Pracovní postup

2.3.1 Příprava roztoků standardu vitamínu B12

Koncentrace vitamínu B12 byla vyhodnocována metodou kalibrační křivky, která byla vytvořena pomocí kalibrační řady roztoku standardu vitamínu B12, a to následujícím způsobem.

Navážením 0,1000 g standardu vitamínu B12 do 100ml odměrné baňky a doplněním vodou po rysku byl připraven Zásobní roztok o koncentraci $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tento roztok byl dále naředěn na koncentraci $12,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ odměřením 1250 μl do 100ml odměrné baňky a následným doplněním po rysku ultračistou vodou. Takto vytvořený Pracovní roztok byl dále použit pro přípravu kalibrační řady podle Tabulky 4. Každý roztok byl připraven třikrát pro každou koncentraci. Roztoky standardu vitamínu B12 o koncentracích 0,05; 0,5 a $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byly používány také pro validační měření.

Tabulka 4 Pipetované objemy pro přípravu roztoků pro kalibraci a validaci

Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Objem Pracovního roztoku [μl]	Objem ultračisté vody [μl]
0,005	0,4	999,6
0,01	0,8	999,2
0,025	2	998
0,05	4	996
0,1	8	992
0,25	20	980
0,5	40	960
1	80	920
2,5	200	800

2.3.2 Fotodegradace vitamínu B12

Do čirých vialek a vialek z tmavého skla o objemu 1 ml bylo odměřeno vždy po 1 ml roztoku standardu vitamínu B12 o koncentraci $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Dvě vialky z tmavého skla byly uloženy do lednice, dvě tmavé a dvě čiré vialky byly ponechány v blízkosti okna při laboratorní teplotě. Obsah vitamínu B12 ve všech vialkách byl poté postupně proměřen po 24 hodinách, 5 dnech a po dvou měsících pomocí HPLC.

2.3.3 Vliv ultrazvuku na koncentraci vitamínu B12

Roztok standardu vitamínu B12 o koncentraci $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl napipetován do dvou vialek o objemu 1 ml, které byly následně ponechány v zapnuté ultrazvukové lázni po dobu 1 a 3 minuty. Vialky se standardem vitamínu B12 byly poté proměřeny pomocí HPLC jako všechny ostatní vzorky.

2.3.4 Příprava vzorků

Před samotným zpracováním vzorků byl připraven roztok octanu sodného o koncentraci $50 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a jeho pH bylo upraveno pomocí kyseliny octové na hodnotu 4,2. Dále byl

připraven 1% roztok kyanidu sodného, který byl připravován vždy čerstvý a v přesně požadovaném objemu pro danou analýzu, aby se zamezilo vytváření odpadu obsahující kyanidy.

Vzhledem k tomu, že bylo cílem práce monitorovat změny obsahu vitamínu B12 v maso při tepelné úpravě, byly vzorky tepelně upravovány za různých podmínek. Současně byla provedena analýza vzorků za syrového stavu pro posouzení ztrát. Z každého druhu masa byly odebrány vždy 2 kusy vzorku pro jednu tepelnou úpravu. Všechno maso bylo naporcováno na plátky o tloušťce 2 cm. Podmínky tepelných úprav pro každý druh masa je znázorněn v Tabulce 5.

Tabulka 5 Přehled použitých tepelných úprav vzorků masa

Maso	Vaření v tlakovém hrnci	Pečení při 190 °C	Smažení na rostlinném oleji	Grilování na kontaktním grilu	Vaření ve vakuu, tzv. sous-vide
Hovězí	20 min	45 min	3 min z každé strany	4 min	60 °C, 4 hodiny
Vepřové	15 min	35 min			
Kuřecí	13 min	30 min		3 min	70 °C, 2 hodiny

Jelikož při tepelné úpravě masa dochází k hmotnostním ztrátám vlivem odpařování vody a rozpouštění tuku, byly všechny vzorky před i po tepelné úpravě zváženy, aby bylo možno při výpočtu obsahu vitamínu B12 zohlednit ztrátu hmotnosti.

2.3.4.1 Uvolnění vitamínu B12 z masa

Čerstvé nebo tepelně upravené maso bylo nejprve po malých kouscích rozmixováno v nožovém mixéru (1000 otáček/min po dobu 10 sekund). Z rozmixované hmoty bylo následně naváženo 30 g do 100ml lahve se šroubovacím uzávěrem obalené alobalem pro zamezení přístupu světla a bylo přidáno 50 ml octanového pufru. Tato směs byla zhomogenizována pomocí homogenizátoru Ultra-Turrax (25 000 otáček/min po dobu 5 sekund) a poté k ní bylo přidáno 1,5 ml 1% roztoku kyanidu sodného, 2 g pepsinu a 0,05 g α -amylázy. Takto připravená směs byla protřepána a inkubována ve vodní lázni při teplotě 37 °C po dobu 30 minut. Po uplynutí této doby byla směs vložena do vodní lázně o teplotě 95 °C a po uplynutí dalších 30 minut byla

směs z lázně vyjmuta a vytemperována na laboratorní teplotu. Lahev se směsí byla poté doplněna octanovým pufrům na objem 100 ml. Po sedimentaci pevných částic byla kapalná fáze odebrána do 50ml centrifugační zkumavky a odstředěna rychlostí 10000 ot/min (13640x g) po dobu 10 minut. Supernatant byl připraven na extrakci vitamínu B12 pomocí imunoafinitní kolony.

2.3.4.2 Imunoafinitní přečištění a zakoncentrování

Imunoafinitní kolonka byla vytemperována na laboratorní teplotu a po odstranění víčka byl stabilizující pufr nechán volně odkapat. Následně bylo na kolonu nanášeno 15 ml supernatantu, poté byla kolona promyta 10 ml deionizované vody a vysušena 10 ml vzduchu. Vysušení vzduchem bylo provedeno následujícím způsobem. Plastové víčko imunoafinitní kolony bylo propíchnuto 5ml stříkačkou, která byla naplněna vzduchem, který byl následně vypuštěn do imunoafinitní kolony. Tento postup byl opakován dvakrát. Zachycený vitamín B12 byl poté eluován 3 ml methanolu. Eluát byl vysušen pod proudem dusíku ve vyhřívaném bloku při teplotě 50 °C. Vzorek byl rekonstituován v 300 µl mobilní fáze (ultra čistá voda + 0,1% kyselina mravenčí) a vialka byla na chvíli ponořena do ultrazvukové lázně. Takto připravený vzorek byl podroben analýze HPLC se spektrofotometrickou detekcí.

2.3.5 Chromatografická analýza

Jak už bylo uvedeno dříve, pro analýzu vitamínu B12 byla použita chromatografická kolona Kinetex 2,6 µm PFP 100A o délce 150 mm a průměru 3 mm. Mobilní fáze se skládala z ultra čisté vody a acetonitrilu, oba komponenty byly okyseleny kyselinou mravenčí na koncentraci 0,1 %. Pro analýzu bylo využito gradientové eluce s průběhem, který je popsán v Tabulce 6. V průběhu chromatografické separace byl udržován konstantní průtok 0,3 ml/min a teplota kolony byla 40 °C. Dávkováno bylo 20 µl vzorku a detekce probíhala při vlnové délce 361 nm a 550 nm. Současně byly sbírány UV/VIS spektra během celé analýzy.

Tabulka 6 Průběh gradientové eluce při analýze vitamínu B12

Čas [minuty]	Ultračistá voda + 0,1 % kyseliny mravenčí [%]	Acetonitril + 0,1 % kyseliny mravenčí [%]
0	95	5
15	80	20
20	5	95
21	95	5

2.4 Vyhodnocení a zpracování dat

Experimentálně získaná data byla získávána a zpracována pomocí programu OpenLab CDS ChemStation Edition for LC & LC/MS Systems (Agilent Technologies, USA). Výsledky měření byly zpracovávány v programu Microsoft Office Excel 2016, dále v programu QC Expert 2.5 a EffiValidation 3.0.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Nejdůležitějším zdrojem vitamínu B12 je pro člověka jednoznačně maso. To se však v drtivé většině případů konzumuje tepelně upravené a je všeobecně známé, že vysoká teplota má na vitamíny degradační účinky. Kolik tepelně upraveného masa je tedy zapotřebí sníst, aby byla spolehlivě pokryta denní dávka vitamínu B12?

Cílem této diplomové práce bylo prozkoumat vlivy různých tepelných úprav masa na obsah vitamínu B12. Jelikož různé formy vitamínu B12 mají velmi vysoký bod varu, byla na stanovení použita metoda kapalinové chromatografie. Prvním krokem tedy bylo nalezení optimálních podmínek na separaci a detekci. Před zpracováním vzorků byl zjišťován vliv světelné expozice a ultrazvuku na vitamín B12. Následně bylo nutné vyhledat nejlepší metodu na extrakci vitamínu B12 ze vzorku a jeho zakoncentrování na koncentraci, kterou by bylo možné pomocí HPLC detekovat a kvantifikovat. Nakonec byly proměřeny vzorky masa, které prošly různými tepelnými úpravami.

3.1 Optimalizace chromatografické separace a detekce

Na začátku celé práce bylo třeba nalézt vhodné složení mobilní fáze, průběh gradientu a rychlost průtoku mobilní fáze pro optimální separaci vitamínu B12. Dále bylo potřeba nalézt odpovídající metodu detekce. Při hledání vhodných podmínek pro chromatografickou separaci byl používán standard vitamínu B12 o koncentraci $4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Jako mobilní fáze pro kapalinovou chromatografii bylo vyzkoušeno několik organických rozpouštědel v různých poměrech s vodnou částí mobilní fáze při isokratické nebo gradientové eluci, několik typů chromatografických kolon i rychlostí průtoku. Vše je přehledně uvedeno v Příloze P1 a P2 v pořadí, v jakém byly metody zkoušeny. Použitý typ mobilní fáze, gradient i chromatografická kolona pro separaci vitamínu B12 a analýzu vzorků jsou v tabulkách vyznačeny tučně.

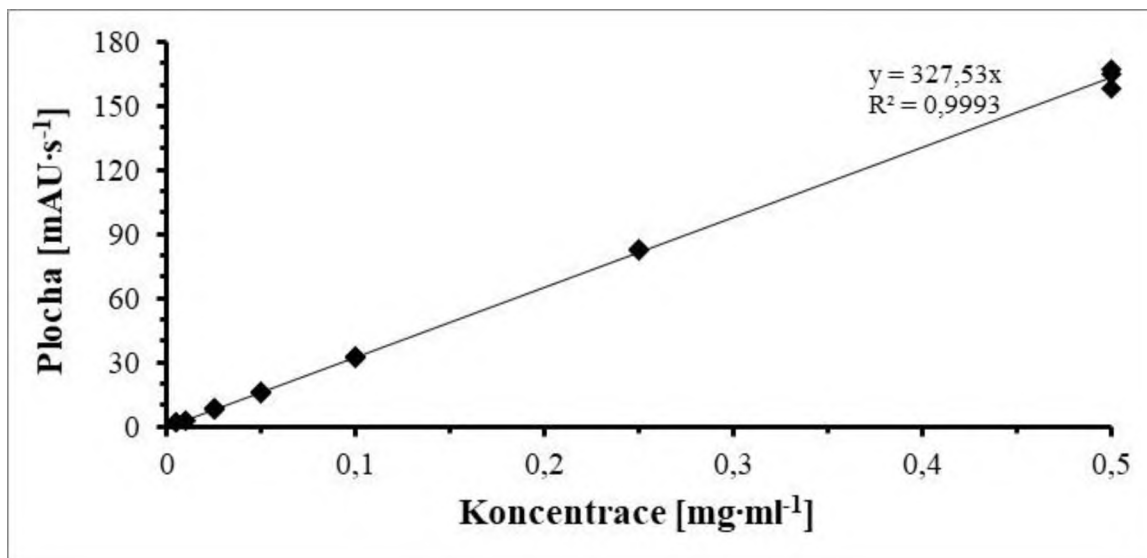
Zdaleka nejlepší separaci a tvar píku vykazovala chromatografická kolona Kinetex 2,6 μm PFP 100A o délce 150 mm a průměru 3 mm při gradientové eluci za použití mobilní fáze složené z ultračisté vody a acetonitrilu. Obě tyto složky byly okyseleny kyselinou mravenčí na koncentraci 0,1 %. Průběh používaného gradientu je znázorněn v Tabulce 6 v kapitole 2.6.3. Standard vitamínu B12 měl při něm eluční čas 13,0 minut.

Při optimalizaci detekce byl nejprve vyzkoušen hmotnostní spektrometr s ionizací elektrosprejem nebo chemickou ionizací za atmosférického tlaku spojený s hmotnostním analyzátozem na bázi iontové pasti. Mez detekce byla bohužel velice vysoká na zamýšlené použití a tak bylo přistoupeno k detekci pomocí detektoru fotodiodového pole, kdy byla absorbance měřena při vlnových délkách 361 a 550 nm, což jsou absorpční maxima UV/VIS spektra (Příloha P3).

3.2 Validace metody

Po nalezení vhodných podmínek chromatografické separace bylo dále potřeba provést validaci chromatografické metody. Validace se provádí pro posouzení vhodnosti použití daného procesu. Pro měření byl používán roztok standardu vitamínu B12 o různých koncentracích v rozmezí od $0,005 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ do $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Kalibrace byla vytvořena jako lineární závislost koncentrace (od $0,005 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ do $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) na ploše píku s ohledem na koncentraci vitamínu B12 ve vzorcích. Na kvantifikaci byla použita vlnová délka 361 nm, neboť absorbance a tedy i plochy píků byly větší než u 550 nm. Výsledná lineární kalibrační závislost je znázorněna na následujícím Obrázku 11 a kompletní hodnoty jsou uvedeny v Příloze P4. Tato kalibrační křivka byla také následně používána pro vyhodnocování obsahu vitamínu B12 ve vzorcích masa.

Obrázek 11 Kalibrační křivka vitamínu B12



Hodnoceným parametrem linearity kalibrační závislosti byl koeficient determinace regresní závislosti R^2 , který měl hodnotu 0,9993 a QC koeficient, který měl hodnotu 2,37 %.

Oba parametry byly vyhodnoceny pomocí programu EffiValidation a splňovaly kritérium přijatelnosti, které je pro koeficient determinace $> 0,999$ a pro QC koeficient $< 5 \%$.

Dále bylo provedeno statistické vyhodnocení pomocí programu QC Expert 2.5 pro odhalení odlehlých bodů a významnosti členů rovnice přímky kalibrační závislosti. Odlehlé body nebyly odhaleny a na hladině pravděpodobnosti $p = 0,05$ byl úsek přímky vyhodnocen jako nevýznamný ($p > 0,05$) (Tabulka 7). Úsek přímky byl ve všech následujících výpočtech zanedbán. Ostatní výsledky statistického vyhodnocení jsou zobrazeny v Tabulce 7.

Tabulka 7 Výsledky statistického vyhodnocení rovnice kalibrační závislosti

	Odhad	Směrodatná odchylka	Pravděpodobnost p	Závěr
Směrnice	327,526	2,225	0	Významný
Úsek	-0,0578	0,5015	0,9096	Nevýznamný

Dalšími hodnotícími parametry byly správnost, vyjádřená jako výtěžnost, a přesnost, vyjádřená jako opakovatelnost pomocí relativní směrodatné odchylky (RSD). Tyto parametry byly hodnoceny na třech koncentračních úrovních a to 0,05, 0,5 a 2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Hodnotící kritéria byla převzata z publikace *Guidelines for Standard Method Performance Requirements* (91). Získané validační hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 8.

Tabulka 8 Výsledky validace přesnosti a správnosti metody stanovení vitamínu B12

Koncentrace $[\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}]$	Přesnost (opakovatelnost)		Správnost (výtěžnost)	
	Přesnost (RSD) [%]	Kritérium přijatelnosti [%]	Správnost [%]	Kritérium přijatelnosti [%]
0,05	0,24	<15	101,40	80–110
0,5	3,82	<15	100,10	
2,5	6,88	<11	105,97	

Na základě kritérií přijatelnosti pro přesnost a správnost byla metoda vyhodnocena jako vyhovující.

V neposlední řadě byla hodnoceným parametrem také mezilehlá přesnost. Stejně jako u přesnosti a správnosti byly zvoleny tři koncentrační úrovně (0,05, 0,5 a 2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), které byly měřeny a následně vyhodnoceny po jednom, sedmi a 52 dnech. Mezilehlou přesností se ověřuje schopnost přístroje měřit se stejnou odezvou v delším časovém úseku, případně s jiným

operátorem, přístrojem nebo jinou šarží chemikálií. Výsledky validačního měření pro mezilehlou přesnost jsou uvedeny v následující Tabulce 9 a odpovídají kritériím přijatelnosti, takže i mezilehlá přesnost byla vyhodnocena jako validní. Veškeré výsledky měření pro stanovení přesnosti a správnosti jsou uvedeny v Příloze P5, P6 a P7.

Tabulka 9 Validační výsledky mezilehlé přesnosti stanovení vitamínu B12

Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Mezilehlá přesnost (RSD) [%]	Kritérium přijatelnosti [%]
0,05	0,002	<15
0,5	0,012	<15
2,5	0,034	<11

Důležitým parametrem při hodnocení metody je také mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ). Mez detekce je nejnižší možná koncentrace analytu, kterou je možné detekovat a mez stanovitelnosti je nejnižší možná koncentrace analytu, kterou je možné s definovanou přesností kvantitativně stanovit. Z chromatogramu analýzy standardu vitamínu B12 byl vyhodnocen šum a podle závislosti výšky píku na koncentraci roztoku standardu byl vypočten mez detekce na $8,0\cdot 10^{-4} \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a mez stanovitelnosti na $2,6\cdot 10^{-3} \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

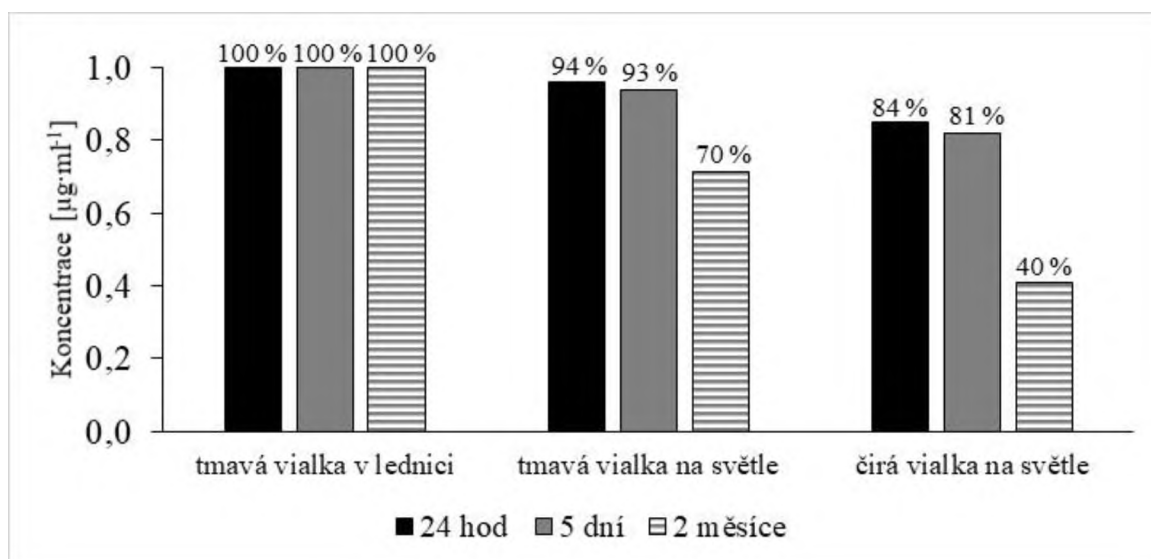
3.3 Fotodegradace vitamínu B12

Světlo má na degradaci vitamínu B12 významný vliv, jelikož při světelné expozici dochází ke štěpení organokovové vazby ve struktuře kobalaminu (1; 12; 13; 17; 19; 21; 24), důležitá je však doba, po kterou je tento vitamín vystaven světelné expozici. Při přípravě roztoků standardu i úpravách vzorků bylo dbáno na zamezení přístupu světla, a tak byly používány vialky z tmavého skla, nebo byly nádoby obsahující vitamín B12 obalovány alobalem. I přesto docházelo k občasné expozici roztoků vitamínu B12 světlem. Jak moc je ale dodržování těchto podmínek podstatné a jak dlouhá doba je potřebná k jeho degradaci bylo potřeba zjistit.

Do čirých vialek a vialek z tmavého skla byl odpipetován roztok standardu vitamínu B12 o koncentraci $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Dvě vialky z tmavého skla byly uloženy do lednice, další dvě vialky z tmavého skla a dvě čiré vialky byly volně položeny na okenní parapet laboratoře. Obsah vitamínu B12 ve všech vialkách byl postupně proměřen po 24 hodinách, pěti dnech a dvou měsících.

Výsledky měření jsou přehledně zobrazeny na Obrázku 12. Z něj je patrné, že pokud je vitamín B12 vystaven světelné expozici v řádu hodin nebo pár dní, ztráta obsahu je necelých 20 %. Z tohoto můžeme usuzovat, že rychlé laboratorní práce v řádu minut nevyžadují extrémně přísné dodržování zamezování přístupu světla k vitamínu B12. Největší riziko pro vitamín B12 pak ale samozřejmě představuje vystavení světelné expozici po delší dobu v řádu týdnů a měsíců, kdy se jeho obsah sníží více jak o polovinu. Na druhou stranu roztoky vitamínu B12 uchovávané v chladničkové teplotě a bez přístupu světla vydrží i několik měsíců. Nižší obsah vitamínu B12 v tmavé vialce vystavené světelnému záření, než v tmavé vialce v lednici mohl být způsoben částečným pronikáním světelného záření do vialky, případně zvýšenou teplotou. Nicméně koncentrace po 5 dnech byla nižší jen o cca 7 %.

Obrázek 12 Fotodegradace vitamínu B12



3.4 Vliv ultrazvuku na koncentraci vitamínu B12

Vzhledem k tomu, že byly vzorky obsahující vitamín B12 po vysoušení znovu rozpouštěny v mobilní fázi a ponořeny do ultrazvukové vodní lázně, bylo nutné zjistit, zda nemá ultrazvuk na vitamín B12 degradační účinky. Opět byla použita koncentrace $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a standard ve vialce byl ponořen do ultrazvukové lázně na jednu minutu a na tři minuty (viz. kapitola 2.3.3)

Po jednodominutové i třiminutové expozici ultrazvukem byla plocha píku, a tedy i koncentrace vitamínu B12 stále stejná v porovnání s původním roztokem, který nebyl vlivu ultrazvuku vystaven. Byl tedy prokázán negativní krátkodobý vliv ultrazvukových vln na koncentraci vitamínu B12.

3.5 Optimalizace extrakce vitamínu B12 z matrice a jeho zakoncentrování

Maso je velmi složitou matricí a vitamín B12 je v něm navázán na proteiny, což komplikuje jeho extrakci. Bylo tedy zapotřebí najít vhodnou techniku pro jeho uvolnění a následnou extrakci, což se zpočátku zdálo jako velmi složitý problém. Pro optimalizaci extrakce vitamínu B12 byla použita matrice, obsahující vyšší koncentraci vitamínu B12 než svalovina, a to játra. Některé druhy svaloviny totiž obsahují velmi nízké koncentrace vitamínu B12 (i 200× nižší, než játra) a optimalizace s jejich použitím by byla složitější. Pro srovnání 100 g vepřových jater obsahuje od 50 do 122 µg vitamínu B12 a stejné množství vepřové svaloviny obsahuje 0,6 až 1 µg vitamínu B12 (2; 6; 7; 17; 32). Pík vitamínu B12 byl vždy identifikován na základě retenčního času a UV/VIS spektra, případně pomocí standardního přídatku.

3.5.1 Extrakce okyselenou vodou

Jelikož je vitamín B12 dobře rozpustný ve vodě, byla jako první vyzkoušena jednoduchá extrakce vodou okyselenou kyselinou mravenčí na pH 4,5. Kyanokobalamin je ve vodných roztocích poměrně stabilní. Vyrží var několik hodin a ve vodných roztocích s pH 4–7 může být i autoklávován při 120 °C (3; 19; 22). Postup extrakce byl následující: rozmělněná kuřecí játra byla smíchána a zhomogenizována s okyselenou vodou a odstředěna na centrifuze. Supernatant byl dále vyčeřen Carrezovými čiridly a přefiltrován.

Z chromatogramu (Příloha P8) bylo patrné, že tento způsob přípravy vzorku není vhodný. Standard vitamínu B12 měl při stejném složení gradientu eluční čas 7,7 minut. Žádný pík vitamínu B12 však nebyl v tomto čase v extraktu vzorku zaznamenán. Pro kontrolu byl ke vzorku přidán standard vitamínu B12, který se poté v chromatogramu projevil jako pík ve správném elučním čase.

3.5.2 Extrakce kyselinou trichloroctovou

Druhý vyzkoušený způsob extrakce byl popsán ve vědeckém článku, který vypracovali Fortuna Riccio a kol. (76). Rozmělněná kuřecí játra byla smíchána s pevnou kyselinou trichloroctovou a společně zhomogenizována. Poté byla směs odstředěna a supernatant oddělen od pevného podílu, ke kterému byla přidán 4% roztok kyseliny trichloroctové. Směs byla znovu odstředěna a následně byly oba supernatanty smíchány a zchlazeny pro vysrážení tuku. Vzorek byl

přefiltrován přes stříkačkový filtr a zakoncentrován pomocí SPE kolony s oktadecylovou fází. Konkrétně byla použita kolona Strata C18-E (55 μ m, 70 Å; Phenomenex, Torrance, USA).

Kolona byla nejprve několikrát promyta methanolem a poté ultračistou vodou. Po nanesení vzorku byla kolona opět promyta vodou a vitamín B12 byl eluován methanolem. Methanol byl poté vysušen pod proudem dusíku ve vyhřívaném bloku a následně byl vzorek rekonstituován mobilní fází (voda + 0,1 % kyseliny mravenčí). Z chromatogramu bylo patrné (Příloha P9), že ani takto připravený vzorek, který byl zakoncentrován 5 \times , neobsahoval žádný extrahovaný vitamín B12, který by měl mít eluční čas 7,7 minut.

3.5.3 Extrakce pomocí enzymů za přítomnosti kyanidu a zakoncentrování na imunoafinitní koloně

Ani jedna z popsaných technik nebyla dostačující pro analýzu vzorků, a tak byla vyzkoušena metoda enzymatického rozkladu za přítomnosti kyanidu sodného, pomocí kterého se převedou všechny přítomné formy vitamínu B12 na kyanokobalamin, s následným zakoncentrováním na imunoafinitní SPE koloně. Postup práce (92) byl převzat z originálního návodu poskytovaného výrobcem imunoafinitních kolon a byl upraven pro vzorek masa.

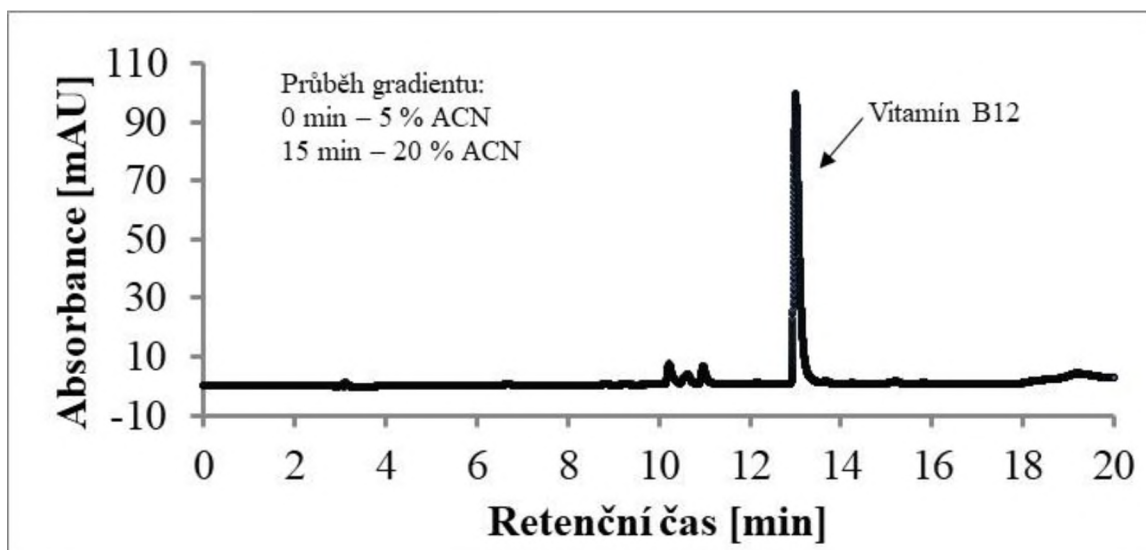
Při tomto postupu se využívají enzymy, které vzorek rozloží a dojde tak k uvolnění veškerého vitamínu B12. Na vzorky masa byl použit pepsin a α -amylasa. Pepsin je proteáza, která rozkládá bílkoviny, a α -amylasa je enzym štěpící polysacharidy škrobu.

Zhomogenizovaná kuřecí játra byla smísena s octanovým pufrům (pH = 4,2), 1% roztokem kyanidu sodného, pepsinem a α -amylasou. Tato směs byla inkubována ve vodní lázni nejprve při 37 °C a poté při 95 °C. Po vytemperování na laboratorní teplotu byla směs doplněna octanovým pufrům a odstředěna. Supernatant byl dávkován na imunoafinitní kolonu, ze které byl vitamín B12 eluován methanolem. Methanol byl následně vysušen pod proudem dusíku ve vyhřívacím bloku. Poté byl vzorek rekonstituován mobilní fází a podroben analýze HPLC. Podrobný postup této metody je popsán v podkapitole 2.6.2.

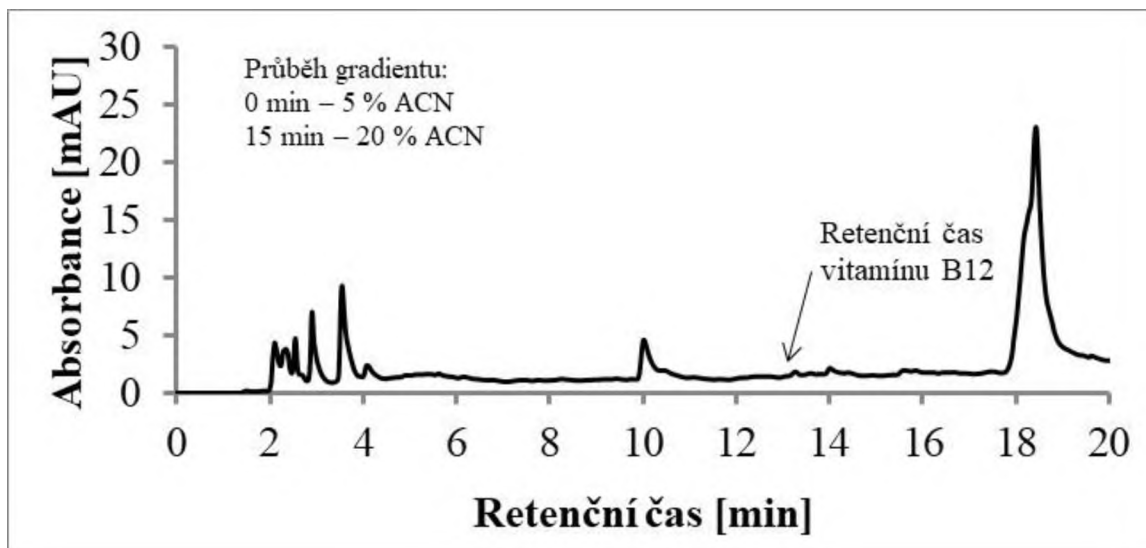
UV/VIS spektrum zakoncentrovaného vzorku odpovídalo spektru standardu vitamínu B12 (Příloha P3) a chromatogram analýzy takto připraveného a zakoncentrovaného vzorku (Obrázek 13) poskytoval štíhlý a vysoký pík ve stejném elučním čase jako standard vitamínu B12. Pro porovnání je na Obrázku 14 znázorněn chromatogram analýzy vzorku, který byl zpracován stejně, ale bez zakoncentrování a pročištění na imunoafinitní koloně. Je zřejmé,

že bez zakoncentrování není možné vitamín B12 ve vzorku stanovit, jelikož jeho koncentraci nelze detekovat a imunoafinitní SPE je velice účinná metoda na obohacení analytu a vyčištění vzorku.

Obrázek 13 Chromatogram analýzy vzorku po enzymatickém rozkladu a zakoncentrování na imunoafinitní SPE koloně



Obrázek 14 Chromatogram analýzy vzorku po enzymatickém rozkladu bez přečištění a zakoncentrování na imunoafinitní SPE koloně



Dále bylo potřeba ověřit, zda teploty vodních lázní neovlivní výsledky tím, že by docházelo k degradaci různých forem vitamínu B12. K tomuto účelu byl jeden vzorek masa rozdělen na dvě části a k jedné části bylo přidáno známé množství kyanokobalaminu (0,3 μg). Oba vzorky byly zpracovány stejným postupem. Výsledky tohoto měření jsou uvedeny v Příloze P9.

Po provedení analýzy pomocí HPLC bylo zjištěno, že rozdíl koncentrace přidané a naměřené je velmi nepatrný (cca 6 %), a mohl být zapříčiněn různým obsahem vitamínu B12 ve dvou kouscích masa. Lze tedy usuzovat, že je metoda k vitamínu B12 šetrná a lze ji aplikovat na vzorky masa. Takto bylo také ověřeno, zda imunoafinitní kolona pracuje správně a zachytává veškerý vitamín B12 z rozloženého vzorku. Výrobce udává, že je imunoafinitní kolona schopna zachytit 0,01–0,50 µg vitamínu B12.

3.6 Analýza vzorků masa

Po tom, co byla dokončena veškerá optimalizace, bylo možno přejít k samotné analýze vzorků. Pro studium vlivu tepelných úprav byly vybrány tři druhy masa: hovězí kýta, vepřová kýta a kuřecí stehenní řízek. Tyto druhy masa byly vybrány kvůli tomu, že pochází ze stejných částí těl zvířat a zároveň jsou velmi často konzumované. Dále byly zvoleny čtyři nejčastější tepelné úpravy masa: vaření v tlakovém hrnci, pečení v troubě, smažení na rostlinném oleji, grilování na kontaktním grilu a jedna méně obvyklá tepelná úprava, a to vaření ve vakuu tzv. sous-vide. Cílem tepelné úpravy bylo vždy maso zcela propéct nebo uvařit, aby bylo možné výsledky porovnat a také aby se vliv tepelné úpravy naplno projevil. Všechny použité podmínky tepelných úprav jsou uvedeny v Tabulce 5 v kapitole 2.3.4. Každý vzorek masa a každá tepelná úprava byla zpracována nezávisle dvakrát (od syrového masa až po HPLC analýzu) a získaný extrakt byl analyzován dvakrát pomocí HPLC. V tabulkách s výsledky jsou uvedeny vždy průměry z obou nezávislých stanovení a výsledky z měření jednotlivých kusů vzorků masa jsou uvedeny v Příloze. Koncentrace vitamínu B12 ve vzorcích byla vypočtena podle kalibrační přímky a jak na µg/100 g tepelně upraveného masa, tak přepočítána na µg/100 g syrového masa pomocí hmotnostní ztráty při tepelné úpravě. Díky tomu mohla být vypočítána ztráta vitamínu B12 nezávislá na změně hmotnosti masa během tepelné úpravy.

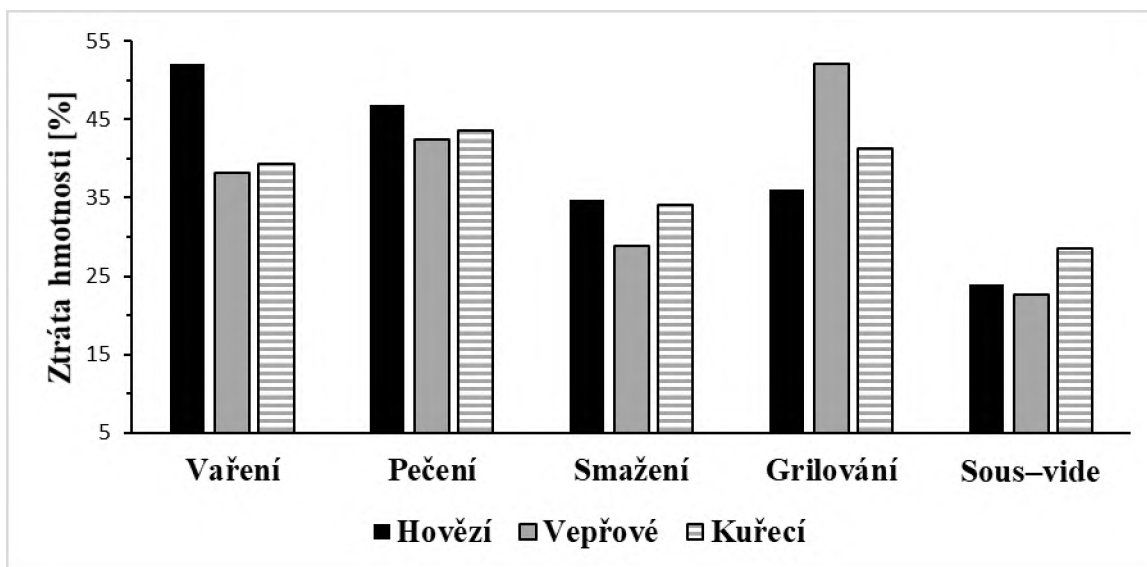
3.6.1 Hmotnostní ztráty masa vlivem tepelné úpravy

Při tepelné úpravě masa vznikají hmotnostní ztráty, které jsou mnohdy velmi výrazné a mohou poté ovlivnit konečný výpočet obsahu vitamínu B12.

Každým způsobem tepelné úpravy byly zpracovány vždy 2 kusy masa z jednoho původního vzorku. Kusy masa byly před i po tepelné úpravě zváženy, aby mohly být zjištěny hmotnostní ztráty vzniklé danou tepelnou úpravou. Průměrná procenta hmotnostních ztrát jsou přehledně

uvedeny Obrázku 15 a jednotlivé hodnoty hmotností jsou rozepsány v Příloze. Tyto hodnoty byly použity při finálním výpočtu koncentrací vitamínu B12 ve vzorcích masa.

Obrázek 15 Přehled hmotnostních ztrát masa vlivem tepelných úprav



Z grafu můžeme usuzovat, že k nejvyšší ztrátě hmotnosti dochází při vaření hovězího masa nebo grilování vepřového. Naopak smažení, pečení nebo metoda sous-vide poskytují poměrně stabilní hmotnostní ztráty, ať už jde o hovězí, vepřové nebo kuřecí maso. Vařením metodou sous-vide však docílíme jednoznačně nejnižších hmotnostních ztrát, jelikož se při něm maso nachází v zataveném obalu a únik vody a tuku z masa je značně ztížen. Mimoto úprava masa metodou sous-vide je realizovaná pouze při 60 °C, respektive 70 °C, a nedochází k odloučení tukových částí jako v případě pečení nebo smažení.

3.6.2 Hovězí maso

Hovězí maso je třetím nejčastěji konzumovaným masem v České republice. Hovězí kýta obsahuje velmi málo tuku a vaziva a jedná se tak o velmi libové části masa. Výsledky měření vitamínu B12 v hovězím mase jsou uvedeny v následující Tabulce 10 spolu s písmeny značícími statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$). Různá písmena znamenají statisticky významné rozdíly a naopak stejné písmeno znamená nevýznamný rozdíl mezi danými hodnotami. Statistické vyhodnocení bylo provedeno vícenásobným párovým porovnáním pomocí Duncanova testu. Kompletní výsledky jsou zobrazeny v Příloze P12.

Tabulka 10 Koncentrace vitamínu B12 v hovězím mase, $n = 2$

Tepelná úprava	Koncentrace [µg/100 g]	Koncentrace se započtenou ztrátou hmotnosti [µg/100 g]	Ztráta vitamínu oproti syrovému [%]
Syrové	0,6904		
Vaření	0,5036	0,2412	65,06 ^C
Pečení	0,8237	0,4374	36,65 ^B
Smažení	0,9389	0,6131	11,20 ^A
Grilování	0,2434	0,1558	77,44 ^D
Sous-vide	0,3856	0,2935	57,48 ^C

Největší ztráta vitamínu B12 byla při grilování na kontaktním grilu (až 77 %) a při tepelné úpravě vařením, při kterém ubylo cca 65 %. Důvodem vysoké ztráty při grilování mohlo být použítá vysoká teplota kontaktního grilu, který byl nastaven na teplotní program pro hovězí steaky. Dalším důvodem mohl být větší kontakt masa s vysokou teplotou díky struktuře plotýnek a působení tepla z obou stran plátku masa. Při vaření dochází k velkým ztrátám vzhledem k tomu, že je v tlakovém hrnci teplota až 130 °C a zároveň je vitamín B12 velmi dobře rozpustný ve vodě. Kvůli tomu může vitamín B12 volně přecházet do vývaru z masa. Pokud porovnáme ztráty vitamínu B12 v mase vařeném (C) a vařeném ve vakuu (C), jsou rozdíly mezi nimi statisticky nevýznamné. Naopak rozdíly ztrát mezi ostatními druhy příprav jsou statisticky významné. Nejšetnější metodou pro úpravu hovězího masa vzhledem k obsahu vitamínu B12 je smažení na rostlinném oleji, kde byla ztráta průměrně pouhých 11 %, což je pozoruhodné vzhledem k vysoké teplotě oleje na pánvi. Na druhou stranu bylo maso smaženo po velmi krátkou dobu v porovnání například s dobou vaření nebo pečení.

Dosažené výsledky se poměrně liší oproti již publikovným závěrům. Např. Czerwonka a kol. (10), kteří zkoumali vliv tepelných úprav v hovězím mase, zjistili, že nejvíce vitamínu B12 bylo zachováno v grilovaném mase, kde ztráta činila pouhých šest procent a u smaženého masa byla ztráta až 32 %. Rozdílné výsledky mohou být způsobeny různou délkou tepelné úpravy, použité teplotě, testovaném druhu masa nebo v plemeni skotu.

3.6.3 Vepřové maso

Vepřové maso má oproti hovězímu vyšší obsah tuku, vyšší energetickou hodnotu a je také hůře stravitelné. Jak je na tom ale z hlediska vitamínu B12? Ztráty obsahu vitamínu B12

ve vepřovém masu během tepelných úprav byly o něco nižší, než v masu hovězím (Tabulka 11).

Tabulka 11 Koncentrace vitamínu B12 ve vepřovém masu, $n = 2$

Tepelná úprava	Koncentrace [µg/100 g]	Koncentrace se započtenou ztrátou hmotnosti [µg/100 g]	Ztráta vitamínu oproti syrovému [%]
Syrové	0,1646		
Vaření	0,1034	0,0639	61,19 ^C
Pečení	0,2374	0,1365	17,07 ^A
Smažení	0,1841	0,1309	20,49 ^A
Grilování	0,1697	0,0814	50,53 ^B
Sous-vide	0,1111	0,0860	47,73 ^B

Jako šetrné se opět jeví tepelně upravené maso pomocí smažení (A) (ztráta pouhých 20 %), ale ještě o tři procenta nižší ztráta byla zjištěna v masu pečeném (A). Ze statistického hlediska jsou však rozdíly mezi těmito dvěma úpravami zanedbatelné. Nejvyšší ztráty byly naměřeny v masu vařeném (C) a grilovaném (B), které sekunduje vepřové maso vařené ve vakuu (B). Tento fakt je velmi překvapivý, jelikož se podle literatury má touto metodou zachovat až 100 % vitamínu B12 (7; 93) a ve skutečnosti to bylo pouhých 52 %. U grilovaného masa a masa vařeného ve vakuu jsou ze statistického hlediska rozdíly ztrát vitamínu B12 nevýznamné a lze je tedy považovat za stejné. Důvodem může být délka doby tepelné úpravy nebo druh použitého masa. Je možné, že maso obsahuje vitamín B12 zejména ve formách adenosylkobalaminu a methylkobalaminu, což jsou zvláště citlivé formy vitamínu B12, a tak je délka tepelné úpravy velmi podstatná. Kompletní výsledky jsou zobrazeny v Příloze P13.

3.6.4 Kuřecí maso

Kuřecí maso je celosvětově nejkonzumovanější druh masa a z počátku se v něm analýza vitamínu B12 zdála jako nereálná, jelikož je zde jeho koncentrace na opravdu nízkých úrovních. Nakonec však bylo dosaženo účinného zakoncentrování a poměrně nízké meze stanovitelnosti, a tak bylo měření provedeno také na kuřecím masu. Výsledky měření vitamínu B12 v kuřecím masu jsou přehledně zobrazeny v Tabulce 12 a kompletní výsledky jsou zobrazeny v Příloze P14.

Tabulka 12 Koncentrace vitamínu B12 v kuřecím mase, $n = 2$

Tepelná úprava	Koncentrace [µg/100 g]	Koncentrace se započtenou ztrátou hmotnosti [µg/100 g]	Ztráta vitamínu oproti syrovému [%]
Syrové	0,0911		
Vaření	0,0802	0,0487	46,59 ^{AB}
Pečení	0,0786	0,0444	51,23 ^{AB}
Smažení	0,1071	0,0672	26,26 ^A
Grilování	0,1490	0,0495	45,64 ^{AB}
Sous-vide	0,0440	0,0315	65,44 ^B

Stejně jako u předchozích dvou druhů masa bylo opět nejšetrnější metodou smažení na rostlinném oleji (ztráta pouhých 26 %), zřejmě z důvodu krátké doby pobytu masa na pánvi. Naopak nejvíce ztrátovou pro vitamín B12 byla metoda vaření ve vakuu, kdy se zachovalo pouhých 35 % vitamínu B12. Důvodem může být zřejmě to, že kuřecí maso obsahovalo velké množství vody, která se vyloučila do vakuovacího sáčku a vitamín B12 do vody volně přešel, stejně jako je tomu u vaření, kde byla ztráta okolo 47 %. Ze statistického hlediska byly rozdíly ztrát mezi vařeným, pečeným a grilovaným masem nevýznamné (AB). Naproti tomu rozdíly mezi smaženým (A) a grilovaným (B) masem byly statisticky významné.

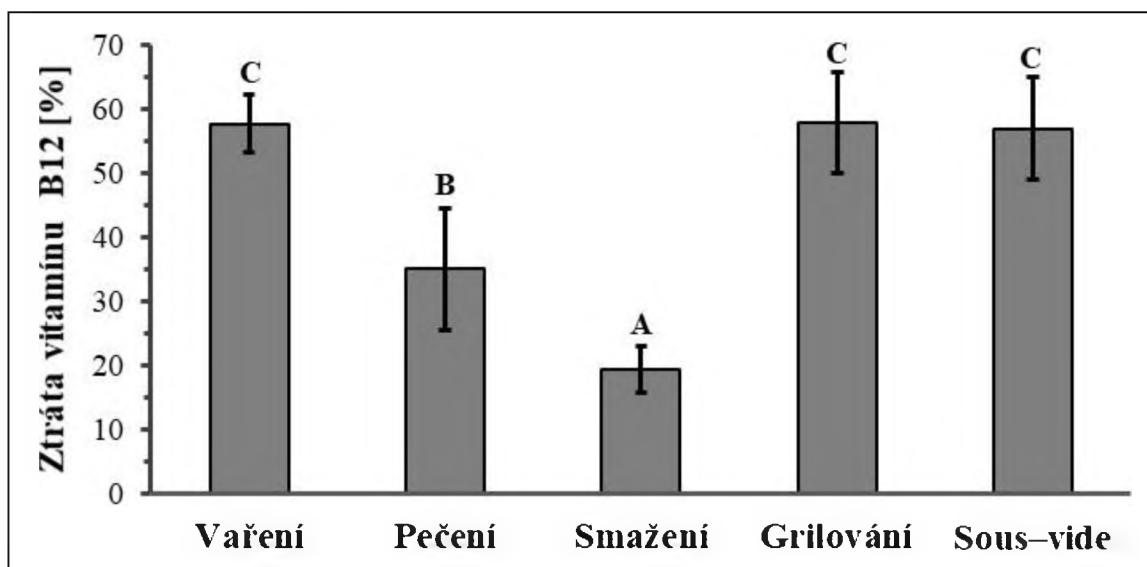
3.6.5 Ztráty vitamínu B12 při různých tepelných úpravách

Pokud porovnáme všech pět tepelných úprav z pohledu procenta ztrát vitamínu B12 v mase dosáhneme možná překvapivých výsledků. Zda jsou rozdíly mezi jednotlivými typy úprav statisticky významné bylo ověřeno pomocí dvoufaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) a Duncanovým testem. Jak je názorně zobrazeno na Obrázku 16, průměrně byly nejvyšší ztráty v mase vařeném, grilovaném a vařeném ve vakuu metodou sous-vide.

Chybové úsečky v grafu zobrazují intervaly spolehlivosti a různá písmena nad nimi znamenají statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) hodnocený podle Duncanova testu. Nejmenší ztráty vitamínu B12 byly zjištěny u mas připravených smažením a rozdíl od ostatních tepelných úprav je statisticky významný (A). Naopak největší ztráty byly zjištěny při vaření, grilování a u metody sous-vide. Rozdíly mezi těmito úpravami masa jsou statisticky nevýznamné (C). Pečení (B) se se jeví jako šetrnější úprava než vaření nebo grilování, avšak s větší ztrátou

vitamínu B12 než smažení. Můžeme tedy říci, že typ úpravy má statisticky významný vliv na ztráty vitamínu B12 ($p < 0,001$).

Obrázek 16 Ztráty vitamínu B12 v mase při různých tepelných úpravách



U vařeného masa byla ztráta poměrně logická (průměrně 56 %), vzhledem k velmi dobré rozpustnosti vitamínu B12 ve vodě. Dá se tedy předpokládat, že vitamín volně přešel do vývaru z masa, nebo byl degradován vysokou teplotou v tlakovém hrnci, která může dosahovat až 130 °C. U grilovaného masa byla vysoká ztráta (v průměru 56 %) zřejmě způsobena několika faktory. Maso při grilování sice nebylo ve vodném roztoku, ale bylo vystaveno vysoké teplotě na velmi velké ploše povrchu masa (z vrchní i spodní strany), a také se povrch zvětšil díky vroubkované struktuře plotýnek kontaktního grilu.

Nejpřekvapivější byl výsledek analýzy masa vařeného ve vakuu. Některé zdroje uvádějí, že by mělo dojít k zachování téměř veškerého vitamínu B12 (7; 93). Tyto závěry potvrzeny nebyly, jelikož ztráta byla prakticky stejná jako u grilování a vaření a to cca 56 %. 100% zachování vitamínu B12 se zdá nereálné vzhledem k dlouhé době, po kterou je maso ve vakuu vařeno.

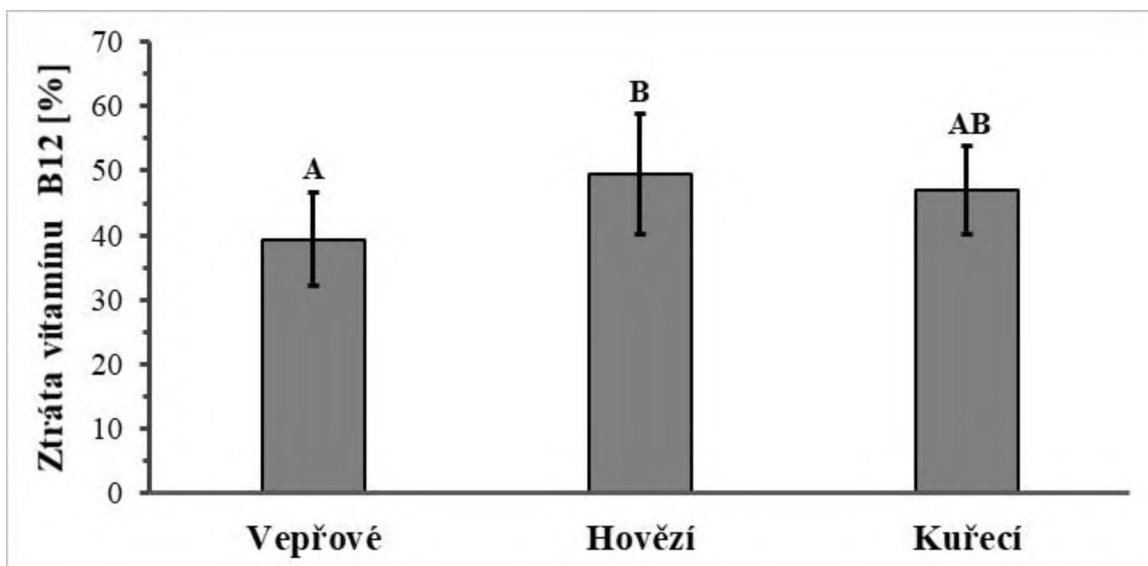
Pečené maso si vedlo co se týče obsahu vitamínu B12 relativně dobře, průměrná ztráta byla 33 % a důvodem bylo zřejmě to, že bylo maso pečeno zprudka, bez dopékání při nižší teplotě a tudíž po kratší dobu.

Smažení masa sice nepatří mezi nejzdravější variantu tepelné úpravy co se týče nutričních hodnot, avšak z pohledu zachování vitamínu B12 je to jistě nejlepší možnost. Průměrně bylo v mase zachováno 82 % původní koncentrace vitamínu B12. Nejnižší ztráta byla nejspíše

zajištěna díky krátké době tepelné úpravy a zároveň menší styčné ploše masa s teplotním zdrojem oproti grilování na kontaktním grilu.

Dále bylo pomocí dvoufaktorové analýzy rozptylu testováno, zda také druh masa má vliv na obsah vitamínu B12 v tepelně upraveném mase. Na statistickou analýzu byly použity procentuální ztráty vitamínu B12 získané ze všech tepelných úprav. Byl prokázán efekt úpravy masa na obsahu vitamínu B12 a byl prokázán statistický rozdíl mezi hovězím a vepřovým masem, což je názorně zobrazeno na Obrázku 17. Zatímco mezi kuřecím a hovězím statisticky významný rozdíl není, stejně jako u kuřecího a vepřového masa. Chybové úsečky v grafu opět zobrazují intervaly spolehlivosti a různá písmena nad nimi znamenají statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$).

Obrázek 17 Ztráty vitamínu B12 v závislosti na typu masa



3.6.6 Příjem vitamínu B12

Nyní se dostáváme k poslednímu bodu vyhodnocení, a tedy kolik tepelně upraveného masa je třeba sníst, aby byla doporučená denní dávka vitamínu B12 spolehlivě pokryta. Pro příklad je v následující Tabulce 13 uvedeno pět příkladů různých pokrmů z masa spolu s velikostí porce, kterou by bylo potřeba sníst pro naplnění předepsané doporučené denní dávky vitamínu B12 pro dospělého člověka a to 3 µg (2; 6; 26).

Tabulka 13 Velikosti porcí masa pro pokrytí DDD vitamínu B12

Typ pokrmu	Hmotnost porce po tepelné úpravě [g]
Hovězí vařená kýta	600
Hovězí pečená kýta	370
Kuřecí smažený stehenní řízek	2800
Grilovaný vepřový plátek z kýty	1800
Kuřecí stehenní řízek vařený ve vakuu	6800

Z Tabulky 13 je samozřejmě patrné, že takovéto velikosti porcí nejsou pro běžného člověka reálné, a tudíž nelze vitamín B12 přijímat pouze z masa. Absorbované množství vitamínu B12 z jedné porce je navíc omezeno na 2 µg (19), takže je potřeba dodržovat pestrý jídelníček, do kterého pravidelně zařazujeme maso, masné výrobky, mléko a mléčné výrobky a také vejce, aby byl příjem vitamínu B12 rovnoměrný a mohl se tak postupně ukládat v našem těle.

4 ZÁVĚR

Z počátku se zdála analýza vitamínu B12 velmi složitá vzhledem k jeho nízké koncentraci v mase a také kvůli jeho citlivosti na světlo. Po úspěšné optimalizaci chromatografické separace pomocí kapalinového chromatografu s UV/VIS detekcí byla nakonec zvolena separace na chromatografické koloně Kinetex 2,6 μm PFP 100A. Nejlepší separace bylo dosaženo s použitím gradientové eluce s mobilní fází obsahující kyselinu mravenčí o koncentraci 0,1 % jak ve vodné fázi, tak v acetonitrilu. Detekce probíhala při vlnové délce 361 nm.

Optimalizace extrakce vitamínu B12 ze vzorku masa byla poněkud zdlouhavá, ale nakonec bylo dosaženo uspokojivých výsledků. Ty byly získány díky enzymatickému rozkladu masa pomocí pepsinu a α -amylázy a následnému pročištění a zakoncentrování na imunoafinitní SPE koloně.

Pro analýzu byly zvoleny 3 druhy masa, která byla vybrána tak, aby reprezentativně zastupovala nejčastěji konzumované maso v České republice. Proto byla studie prováděna na hovězí kýtě, vepřové kýtě a kuřecím stehenním řízkem. Všechna tato masa byla upravována čtyřmi tepelnými úpravami, které jsou v české kuchyni nejčastější (vaření, pečení, smažení, grilování) a jednou méně častou a tou je metoda tzv. sous-vide, neboli vaření ve vakuu při nízké teplotě.

Výsledky měření byly poněkud překvapivé, jelikož se největší ztráta vitamínu B12 prokázala u grilování, kdy bylo průměrně zachováno pouze 42 % vitamínu B12. U tepelné úpravy vařením bylo poněkud jasné, že bude ztráta velmi vysoká vzhledem k rozpustnosti vitamínu B12 ve vodě. U vařeného masa se tak průměrně zachovalo 43 % vitamínu B12 a stejná čísla poskytovalo také maso vařené na vakuu. Maso vařené metodou sous-vide si mělo podle literatury zachovat veškerý obsah vitamínu B12, což je poněkud nereálné vzhledem k délce doby této tepelné úpravy. Ze statistického hlediska poskytovalo vaření, grilování a sous-vide srovnatelné ztráty. Nejlépe si pak vedlo maso pečené (průměrná ztráta 35 %) a smažené, které mělo jednoznačně nejmenší ztráty a průměrně si takto upravené maso zachovalo celých 81 % obsahu vitamínu B12. Také bylo prokázáno, že ztráty vitamínu jsou ovlivněny druhem masa. Hovězí maso ztratilo v průměru méně vitamínu B12 než vepřové.

Je možné, že maso obsahuje vitamín B12 zejména ve formách adenosylkobalaminu a methylkobalaminu, což jsou zvláště citlivé formy vitamínu B12 a tak je délka tepelné úpravy velmi podstatná. Toto už však z časových důvodů nebylo možno prozkoumat a bylo by to jistě zajímavým tématem pro další diplomovou práci.

5 BIBLIOGRAFIE

- (1) REPOSSI, Adele, Elisa ZIRONI, Teresa GAZZOTTI, Andrea SERRAINO a Giampiero PAGLIUCA. Vitamin B12 determination in milk, whey and different by-products of ricotta cheese production by ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Italian Journal of Food Safety*. 2017, **6**(4), 152-155. DOI: 10.4081/ijfs.2017.6795. ISSN 2239-7132.
- (2) HLÚBIK, Pavol a Libuše OPLTOVÁ. *Vitaminy*. První. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0373-4.
- (3) KARMI, Ola, Ashraf ZAYED, Suheir BARAGHETHI, Muhammad QADI a Rasha GHANEM. Measurement of vitamin B12 concentration: A review on available methods. *The IIOAB Journal*. 2011, **2**(2), 23-32.
- (4) FANG, Huan, Jie KANG a Dawei ZHANG. Microbial production of vitamin B12: a review and future perspectives. *Microbial Cell Factories*. 2017, **16**(1), -. DOI: 10.1186/s12934-017-0631-y. ISSN 1475-2859.
- (5) PIWOWAREK, Kamil, Edyta LIPIŃSKA, Elżbieta HAĆ-SZYMAŃCZUK, Marek KIELISZEK a Iwona ŚCIBISZ. Propionibacterium spp.—source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018, **102**(2), 515-538. DOI: 10.1007/s00253-017-8616-7. ISSN 0175-7598.
- (6) VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Vyd. 1. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902-3914-5.
- (7) 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*. 2013, **61**(28), 6769-6775. DOI: 10.1021/jf401545z. ISSN 0021-8561.
- (8) BUTLER, Philip a Bernhard KRÄUTLER. Biological Organometallic Chemistry of B12. *Bioorganometallic Chemistry*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2006,

- 2006(17), 1-55. Topics in Organometallic Chemistry. DOI: 10.1007/3418_004. ISBN 3-540-33047-X.
- (9) WATANABE, Fumio. Vitamin B 12 Sources and Bioavailability. *Experimental Biology and Medicine*. 2016, **232**(10), 1266-1274. DOI: 10.3181/0703-MR-67. ISSN 1535-3702.
- (10) CZERWONKA, Małgorzata, Arkadiusz SZTERK a Bożena WASZKIEWICZ-ROBAK. Vitamin B12 content in raw and cooked beef. *Meat Science*. 2014, **96**(3), 1371-1375. DOI: 10.1016/j.meatsci.2013.11.022. ISSN 03091740.
- (11) FRAGNER, Jiří, Jarmila BLATTNÁ, Zdeněk BUDĚŠÍNSKÝ et al. *Vitaminy, jejich chemie a biochemie*. [1. vydání]. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1961.
- (12) EDELMANN, Minnamari, Bhawani CHAMLAGAIN, Marco SANTIN, Susanna KARILUOTO a Vieno PIIRONEN. Stability of added and in situ-produced vitamin B12 in breadmaking. *Food Chemistry*. 2016, **204**, 21-28. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.02.071. ISSN 03088146.
- (13) CAMPOS-GIMENEZ, FONTANNAZ, TRISCONI, KILINC, GIMENEZ a ANDRIEUX. Determination of Vitamin B12 in Food Products by Liquid Chromatography/UV Detection with Immunoaffinity Extraction: Single-Laboratory Validation. *Journal of AOAC International* [online]. 2008, **91**(4), 786-793. ISSN 10603271.
- (14) Vitamin B12. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-2020 [cit. 2020-03-16].
- (15) HAZRA, Amrita, Andrew HAN, Angad MEHTA, Kenny MOK, Vadim OSADCHIY, Tadhg BEGLEY a Michiko TAGA. Anaerobic biosynthesis of the lower ligand of vitamin B 12. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015, **112**(34), 10792-10797. DOI: 10.1073/pnas.1509132112. ISSN 0027-8424.
- (16) DEPTULA, Paulina, Bhawani CHAMLAGAIN, Minnamari EDELMANN, Panchanit SANGSUWAN, Tuula NYMAN, Kirsi SAVIJOKI, Vieno PIIRONEN a Pekka VARMANEN. Food-Like Growth Conditions Support Production of Active Vitamin

- B12 by *Propionibacterium freudenreichii* 2067 without DMBI, the Lower Ligand Base, or Cobalt Supplementation. *Frontiers in Microbiology*. 2017, **8**(368), -. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00368. ISSN 1664-302X.
- (17) 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. ISSN 03088146.
- (18) CHAMLAGAIN, Bhawani, Tessa SUGITO, Paulina DEPTULA, Minnamari EDELMANN, Susanna KARILUOTO, Pekka VARMANEN a Vieno PIIRONEN. In situ production of active vitamin B12 in cereal matrices using *Propionibacterium freudenreichii*. *Food Science & Nutrition*. 2018, **6**(1), 67-76. DOI: 10.1002/fsn3.528. ISSN 20487177.
- (19) MARLEY, MACKAY a YOUNG. Characterisation of vitamin B12 immunoaffinity columns and method development for determination of vitamin B12 in a range of foods, juices and pharmaceutical products using immunoaffinity clean-up and high performance liquid chromatography with UV detection. *Food Additives & Contaminants: Part A*. [online]. 2009, **26**(3), 282-288. DOI: 10.1080/02652030802429104. ISSN 19440049.
- (20) SHERMA, Joseph a Bernard FRIED. *Handbook of thin-layer chromatography*. 3rd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, 2003, s. 589-605. Chromatographic science, v. 89. ISBN 0-8247-0895-4.
- (21) Vitamin B12. *PubChem Database* [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA: National Center for Biotechnology Information, 2004 [cit. 2020-01-31].
- (22) QIU, Xiao, Haoshu ZHANG, Yuhao YIN, Hillel BRANDES, Teresa MARSALA, Katherine STENERSON, Hugh CRAMER a Hong YOU. Determination of active vitamin B12 (cobalamin) in dietary supplements and ingredients by reversed-phase liquid chromatography: Single-laboratory validation. *Food Chemistry*, **2019**(298), 1-6. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125010. ISSN 03088146.

- (23) LEŠKOVÁ, Emília, Jana KUBÍKOVÁ, Eva KOVÁČIKOVÁ, Martina KOŠICKÁ, Janka PORUBSKÁ a Kristína HOLČÍKOVÁ. Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006, **19**(4), 252-276. DOI: 10.1016/j.jfca.2005.04.014. ISSN 08891575.
- (24) SZTERK, Arkadiusz, Marek ROSZKO, Krystian MAŁEK, Małgorzata CZERWONKA a Bożena WASZKIEWICZ-ROBAK. Application of the SPE reversed phase HPLC/MS technique to determine vitamin B12 bio-active forms in beef. *Meat Science*. 2012, **91**(4), 408-413. DOI: 10.1016/j.meatsci.2012.02.023. ISSN 03091740.
- (25) JUZENIENE, Asta a Zivile NIZAUSKAITE. Photodegradation of cobalamins in aqueous solutions and in human blood. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2013, **122**, 7-14. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2013.03.001. ISSN 10111344.
- (26) *Referenční hodnoty pro příjem živin*. V ČR 1. vyd. Praha: Společnost pro výživu, 2011. ISBN 978-80-254-6987-3.
- (27) GREEN, Ralph, Lindsay ALLEN, Anne-Lise BJØRKE-MONSEN et al. Vitamin B12 deficiency. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017, **3**(17040), 1-19. DOI: 10.1038/nrdp.2017.40. ISSN 2056-676X.
- (28) THANKACHAN, Prashanth, Jee RAH, Tinku THOMAS, Sumithra SELVAM, Vani AMALRAJAN, Krishnamachari SRINIVASAN, Georg STEIGER a Anura KURPAD. Multiple Micronutrient-Fortified Rice Affects Physical Performance and Plasma Vitamin B-12 and Homocysteine Concentrations of Indian School Children. *The Journal of Nutrition*. 2012, **142**(5), 846-852. DOI: 10.3945/jn.111.149021. ISSN 0022-3166.
- (29) NISHIOKA, Michiko, Fuki KANOSUE, Yukinori YABUTA a Fumio WATANABE. Loss of Vitamin B12 in Fish (Round Herring) Meats during Various Cooking Treatments. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 2011, **57**(6), 432-436. DOI: 10.3177/jnsv.57.432. ISSN 0301-4800.
- (30) STUPPERICH, Erhard a Ebba NEXO. Effect of the cobalt-N coordination on the cobamide recognition by the human vitamin B12 binding proteins intrinsic factor,

- transcobalamin and haptocorrin. *European Journal of Biochemistry*. 1991, **199**(2), 299-303. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16124.x. ISSN 0014-2956.
- (31) UETA, Kazumi, Yukio ISHIHARA, Yukinori YABUTA, Shinya MASUDA a Fumio WATANABE. TLC-analysis of a corrinoid compound from japanese rock-oyster "IWA-GAKI" (*Crassostrea Nippona*). *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2011, **34**(10-11), 928-935. DOI: 10.1080/10826076.2011.571170. ISSN 1082-6076.
- (32) DAVÍDEK, Jiří, G. JANÍČEK a J. POKORNÝ. *Chemie potravin*. První. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1983, 629 s.
- (33) TUCKER, Katherine, Sharron RICH, Irwin ROSENBERG, Paul JACQUES, Gerard DALLAL, Peter WILSON a Jacob SELHUB. Plasma vitamin B-12 concentrations relate to intake source in the Framingham Offspring Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2000, **71**(2), 514-522. DOI: 10.1093/ajcn/71.2.514. ISSN 0002-9165.
- (34) HAY, Gry, Carole JOHNSTON, Andrew WHITELOW, Kerstin TRYGG a Helga REFSUM. Folate and cobalamin status in relation to breastfeeding and weaning in healthy infants. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2008, **88**(1), 105-114. DOI: 10.1093/ajcn/88.1.105.
- (35) BABUCHOWSKI, Andrzej, Lucja LANIEWSKA-MOROZ a Iwona WARMINSKA-RADYKO. Propionibacteria in fermented vegetables. *Le Lait*. 1999, **79**(1), 113-124. DOI: 10.1051/lait:199919. ISSN 0023-7302.
- (36) GREEN, Ralph. Vitamin B 12 deficiency from the perspective of a practicing hematologist. *Blood*. **2017**(19), 2603-2611. DOI: 10.1182/blood-2016-10-569186.
- (37) PARK, Sohyun a Mary JOHNSON. What is an Adequate Dose of Oral Vitamin B 12 in Older People with Poor Vitamin B 12 Status?. *Nutrition Reviews*. 2006, **64**(8), 373-378. DOI: 10.1111/j.1753-4887.2006.tb00222.x. ISSN 00296643.
- (38) Vitamin B12 (S/P). In: *FN Plzeň* [online]. Plzeň [cit. 2020-04-03]. Dostupné z: <http://old.fnplzen.cz/pracoviste/ukbh/detail.asp?id=349&retezparametru=~bh=~mk=~kat=hormony~merene=~vypocet=~pismenko=>

- (39) A comprehensive review of B12 biochemistry, nutrition and metabolism. ZEMPLENI, Janos, John SUTTIE, Jesse GREGORY III a Patrick STOVER. *Handbook of vitamins*. Fifth edition. Hoboken: CRC Press, 2014, s. 447-489. ISBN 9781466515574.
- (40) CARMEL, Ralph. Subclinical cobalamin deficiency. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2012, **28**(2), 151-158. DOI: 10.1097/MOG.0b013e3283505852. ISSN 0267-1379.
- (41) CARMEL, R. Cobalamin, the stomach, and aging. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1997, **66**(4), 750-759. DOI: 10.1093/ajcn/66.4.750. ISSN 0002-9165.
- (42) YUEN, Man-Fung a Ching-Lung LAI. Hbsag seroclearance in the natural history of chronic hepatitis b infection. *Current Hepatitis Reports*. 2006, **5**(1), 23-26. DOI: 10.1007/s11901-006-0019-7. ISSN 1540-3416.
- (43) CARMEL, R. Update on Cobalamin, Folate, and Homocysteine. *Hematology*. **2003**(1), 62-81. DOI: 10.1182/asheducation-2003.1.62. ISSN 1520-4391.
- (44) STABLER, Sally. Vitamin B 12 Deficiency. *New England Journal of Medicine*. 2013, **368**(2), 149-160. DOI: 10.1056/NEJMcp1113996. ISSN 0028-4793.
- (45) ZÁPALOVÁ, Tereza. Perniciózní anémie. In: *Medixa.org* [online]. Chomutov: Medixa s.r.o., 2012 [cit. 2020-02-21]. Dostupné z: <http://cs.medixa.org/nemoci/perniciozni-anemie>
- (46) BIEMANS, Elke, Huberta HART, Guy RUTTEN, Viviana CUELLAR RENTERIA, Antoinette KOOIJMAN-BUITING a Joline BEULENS. Cobalamin status and its relation with depression, cognition and neuropathy in patients with type 2 diabetes mellitus using metformin. *Acta Diabetologica*. 2015, **52**(2), 383-393. DOI: 10.1007/s00592-014-0661-4. ISSN 0940-5429.
- (47) PARK, Sohyun, Mary JOHNSON, Kelly SHEA-MILLER, Albert CHICCHIS, Robert ALLEN a Sally STABLER. Age-Related Hearing Loss, Methylmalonic Acid, and Vitamin B 12 Status in Older Adults. *Journal of Nutrition For the Elderly*. 2007, **25**(3-4), 105-120. DOI: 10.1300/J052v25n03_08. ISSN 0163-9366.

- (48) DROR, Daphna a Lindsay ALLEN. Effect of vitamin B12 deficiency on neurodevelopment in infants: current knowledge and possible mechanisms. *Nutrition Reviews*. 2008, **66**(5), 250-255. DOI: 10.1111/j.1753-4887.2008.00031.x. ISSN 00296643.
- (49) FLETCHER, Robert a Kathleen FAIRFIELD. Vitamins for Chronic Disease Prevention in Adults. *JAMA*. 2002, **287**(23), 3127-3129. DOI: 10.1001/jama.287.23.3127. ISSN 0098-7484.
- (50) OMENN, Gilbert, Shirley BERESFORD a Arno MOTULSKY. Preventing Coronary Heart Disease. *Circulation*. 1998, **97**(5), 421-424. DOI: 10.1161/01.CIR.97.5.421. ISSN 0009-7322.
- (51) SELHUB, Jacob, Paul JACQUES, Irwin ROSENBERG, Gail ROGERS, Barbara BOWMAN, Elaine GUNTER, Jacqueline WRIGHT a Clifford JOHNSON. Serum Total Homocysteine Concentrations in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (1991–1994): Population Reference Ranges and Contribution of Vitamin Status to High Serum Concentrations. *Annals of Internal Medicine*. 1999, **131**(5), 331-339. DOI: 10.7326/0003-4819-131-5-199909070-00003. ISSN 0003-4819.
- (52) BURGESS, Catherine, Eddy SMID a Douwe VAN SINDEREN. Bacterial vitamin B2, B11 and B12 overproduction: An overview. *International Journal of Food Microbiology*. 2009, **133**(1-2), 1-7. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.012. ISSN 01681605.
- (53) LEBLANC, J.G., J.E. LAÍÑO, M. DEL VALLE et al. B-Group vitamin production by lactic acid bacteria - current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology*. 2011, **111**(6), 1297-1309. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05157.x. ISSN 13645072.
- (54) CAPOZZI, Vittorio, Pasquale RUSSO, María DUEÑAS, Paloma LÓPEZ a Giuseppe SPANO. Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, **96**(6), 1383-1394. DOI: 10.1007/s00253-012-4440-2. ISSN 0175-7598.

- (55) MUROOKA, Yoshikatsu, Yongzhe PIAO, Pornpimon KIATPAPAN a Mitsuo YAMASHITA. Production of tetrapyrrole compounds and vitamin B12 using genetically engineering of *Propionibacterium freudenreichii*. An overview. *Le Lait*. 2005, **85**(1-2), 9-22. DOI: 10.1051/lait:2004035. ISSN 0023-7302.
- (56) MARTENS, H. Microbial production of vitamin B 12. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001, **2001**(58), 275-285. DOI: 10.1007/s00253-001-0902-7.
- (57) MARTIN, Vincent, Douglas PITERA, Sydnor WITHERS, Jack NEWMAN a Jay KEASLING. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nature Biotechnology*. 2003, **2003**(21), 796-802. DOI: 10.1038/nbt833.
- (58) ZHANG, K., M. SAWAYA, D. EISENBERG a J. LIAO. Expanding metabolism for biosynthesis of nonnatural alcohols. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008, **105**(52), 20653-20658. DOI: 10.1073/pnas.0807157106. ISSN 0027-8424.
- (59) Water for HPLC: Application Overview. In: *Merck* [online]. Darmstadt, Německo: Merck KGaA, 2020 [cit. 2020-04-03]. Dostupné z: <https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/water-purification/learning-centers/applications/organic-analysis/hplc/.u6b.qB.UnwAAAFUs.ESsxWy,nav>
- (60) *HPLC.cz* [online]. Michal Douša, 1999 [cit. 2020-03-29]. Dostupné z: <http://hplc.cz/>
- (61) Pufry. In: *MUNI IS: Informační systém Masarykovy univerzity* [online]. Brno: Fakulta informatiky MU, 1999 [cit. 2020-04-03]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/med/podzim2012/BLKLC011p/um/Pufry_12.pdf
- (62) CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-030-0569-8.
- (63) NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.

- (64) JANDERA, Pavel a Jaroslav CHURÁČEK. *Pokroky chemie: Kapalinová chromatografie s programovaným složením mobilní fáze*. První. Praha: Academia, 1984.
- (65) DOUŠA, Michal. Gradientová eluce. In: *HPLC.cz* [online]. 1999 [cit. 2020-03-29]. Dostupné z: <http://hplc.cz/>
- (66) DOUŠA, Michal. Adsorbenty a chemicky vázané fáze: Chemicky vázané nepolární stacionární fáze. In: *HPLC.cz* [online]. 1999 [cit. 2020-03-29]. Dostupné z: <http://hplc.cz/>
- (67) Mechanisms of Interaction Responsible for Alternative Selectivity of Fluorinated Stationary Phases. In: *Chromatography online* [online]. Spojené státy americké: MultiMedia Pharma Sciences, LLC, 2020 [cit. 2020-04-16]. Dostupné z: <http://www.chromatographyonline.com/mechanisms-interaction-responsible-alternative-selectivity-fluorinated-stationary-phases>
- (68) FEKETE, Szabolcs, Erzsbet OLH a Jen FEKETE. Fast liquid chromatography: The domination of core-shell and very fine particles. *Journal of Chromatography A*. 2012, (1228), 57-71. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.09.050. ISSN 00219673.
- (69) HAYES, Richard, Adham AHMED, Tony EDGE a Haifei ZHANG. Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2014, (1357), 36-52. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.05.010. ISSN 00219673.
- (70) Ascentis® Express Columns for Fast HPLC. In: *Merck* [online]. Darmstadt, Německo: Merck KGaA, 2020 [cit. 2020-05-05]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=17841436>
- (71) FEKETE, Szabolcs, Erzsbet OLH a Jen FEKETE. Fast liquid chromatography: The domination of core-shell and very fine particles. *Journal of Chromatography A*. 2012, (1228), 57-71. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.09.050. ISSN 00219673.

- (72) Core-Shell Science. In: *Phenomenex* [online]. Torrance, USA: Phenomenex Inc., 2020 [cit. 2020-05-06]. Dostupné z: <https://www.phenomenex.com/Kinetex/CoreShellTechnology>
- (73) FEKETE, Szabolcs, Julie SCHAPPLER, Jean-Luc VEUTHEY a Davy GUILLARME. Current and future trends in UHPLC. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2014**(63), 2-13. DOI: 10.1016/j.trac.2014.08.007. ISSN 01659936.
- (74) EDELMANN, Minnamari, Sanni AALTO, Bhawani CHAMLAGAIN, Susanna KARILUOTO a Vieno PIIRONEN. Riboflavin, niacin, folate and vitamin B12 in commercial microalgae powders. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2019**(82), 1-10. DOI: 10.1016/j.jfca.2019.05.009. ISSN 08891575.
- (75) GUGGISBERG, RISSE a HADORN. Determination of Vitamin B12 in meat products by RP-HPLC after enrichment and purification on an immunoaffinity column. *Meat Science*. 2012, **90**(2), 279-283. DOI: 10.1016/j.meatsci.2011.07.009. ISSN 03091740.
- (76) RICCIO, Fortuna, Carmela MENNELLA a Vincenzo FOGLIANO. Effect of cooking on the concentration of Vitamins B in fortified meat products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006, **2006**(41), 1592-1595. DOI: 10.1016/j.jpba.2006.01.061. ISSN 07317085.
- (77) SHETTY, Sweekruthi, Melissa YOUNG, Sunita TANEJA a Kannan RANGIAH. Quantification of B-vitamins from different fresh milk samples using ultra-high performance liquid chromatography mass spectrometry/selected reaction monitoring methods. *Journal of Chromatography A*. 2020, **2020**(1609), 1-14. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.460452. ISSN 00219673.
- (78) Izolace léčiv ze skupiny sulfonamidů pomocí SPE. In: *Fakulta veterinární hygieny a ekologie* [online]. Brno [cit. 2020-04-06]. Dostupné z: https://fvhe.vfu.cz/files/navody_na_cviceni_izolace_leciv_pomoci_spe.pdf
- (79) EASI-EXTRACT® VITAMIN B12 (LGE): Art. No.: P88 / P88B. *R-biopharm* [online]. Německo: Food & Feed Analysis, 2020 [cit. 2020-03-05]. Dostupné z: <https://food.r-biopharm.com/products/easi-extract-vitamin-b12-lge/>

- (80) Oasis Sample Extraction Products. *Waters* [online]. Waters Corporation, 2020 [cit. 2020-04-07]. Dostupné z: https://www.waters.com/waters/en_CZ/Waters-Oasis-Sample-Extraction-SPE-Products/nav.htm?cid=513209&locale=en_CZ
- (81) WENZEL, Ross, Derek MAJOR, Karly HESP a Philip DOBLE. Determination of vitamin B12 in equine urine by liquid chromatography – inductively coupled plasma – mass spectrometry. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2018, **2018**(50), 634-639. DOI: 10.1016/j.jtemb.2018.05.005. ISSN 0946672X.
- (82) WIRKUS, Dorota, Aleksandra JAKUBUS, Radoslaw OWCZUK, Piotr STEPNOWSKI a Monika PASZKIEWICZ. Development and application of novelty pretreatment method for the concurrent quantitation of eleven water-soluble B vitamins in ultrafiltrates after renal replacement therapy. *Journal of Chromatography B*. ELSEVIER, 2016, **2017**(1043), 228-234.
- (83) PAKIN, BERGAENTZLÉ, AOUDÉ-WERNER a HASSELMANN. α -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. ISSN 00219673.
- (84) HEUDI, KILINÇ a FONTANNAZ. 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. ISSN 00219673.
- (85) CHEN, Jing-Huan a Shih-Jen JIANG. Determination of Cobalamin in Nutritive Supplements and Chlorella Foods by Capillary Electrophoresis–Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, **56**(4), 1210-1215. DOI: 10.1021/jf073213h. ISSN 0021-8561.
- (86) O'BROIN a KELLEHER. Microbiological assay on microtitre plates of folate in serum and red cells. *Journal of Clinical Pathology*. 1992, **45**(4), 344-347. DOI: 10.1136/jcp.45.4.344. ISSN 0021-9746.

- (87) FORD, The Microbiological Assay of Vitamin B 12. *British Journal of Nutrition*. 1952, **6**(1), 324-330. DOI: 10.1079/BJN19520034. ISSN 0007-1145. Dostupné z: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007114552000371/type/journal_article
- (88) DAVIS, MOULTON a KELLY. An automated microbiological method for the measurement of vitamin B12. *Journal of Clinical Pathology*. 1973, **26**(7), 494-498. DOI: 10.1136/jcp.26.7.494. ISSN 0021-9746.
- (89) HUTNER, MICHAEL BACH a ROSS. A Sugar-Containing Basal Medium for Vitamin B 12 -Assay with Euglena; Application to Body Fluids*. *The Journal of Protozoology*. 1956, **3**(3), 101-112. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1956.tb02442.x. ISSN 00223921.
- (90) WILLIAM HORWITZ, editor a assistant GEORGE W. LATIMER. *Official methods of analysis of AOAC International*. 18th ed., 2005. Gaithersburg, MD: AOAC International, 2007. ISBN 09-355-8478-1.
- (91) Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. In: *AOAC International: Official Methods of Analysis* [online]. Rockville, USA: AOAC International, 2005 [cit. 2020-06-08].
- (92) EASI-EXTRACT® VITAMIN B12: Product Code: P80/P80B. In: *R-biopharm* [online]. Německo: R-Biopharm AG, 2020 [cit. 2020-03-05]. Dostupné z: <https://www.azmax.co.jp/wp-content/uploads/2015/11/EASI-EXTRACT-VITAMIN-B12-IFU-P80V20.pdf>
- (93) CREED, Philip G. The sensory and nutritional quality of 'sous vide' foods. *Food Control*. 1995, **6**(1), 45-52. DOI: 10.1016/0956-7135(95)91453-R. ISSN 09567135.

6 PŘÍLOHY

Příloha P1 Použité podmínky pro optimalizaci chromatografické separace vitamínu B12	74
Příloha P2 Přehled chromatografických kolon používaných pro optimalizaci separace vitamínu B12.....	74
Příloha P3 Obrázek P3 UV/VIS spektrum vitamínu B12.....	75
Příloha P4 Výsledky kalibrace.....	75
Příloha P5 Validační hodnoty pro přesnost a správnost 1. den	76
Příloha P6 Validační hodnoty pro přesnost a správnost 7. den	76
Příloha P7 Validační hodnoty pro přesnost a správnost 52. den	76
Příloha P8 Chromatogram analýzy vzorku po extrakci okyselenou vodou.....	77
Příloha P9 Chromatogram analýzy vzorku po extrakci kyselinou trichloroctovou.....	77
Příloha P10 Získané koncentrace po přidavku standardu vitamínu B12 ke vzorku masa	77
Příloha P11 Hmotnostní ztráty masa vlivem tepelných úprav.....	78
Příloha P12 Vitamín B12 v hovězím mase při různých tepelných úpravách	79
Příloha P13 Vitamín B12 ve vepřovém mase při různých tepelných úpravách	79
Příloha P14 Vitamín B12 v kuřecím mase při různých tepelných úpravách	80

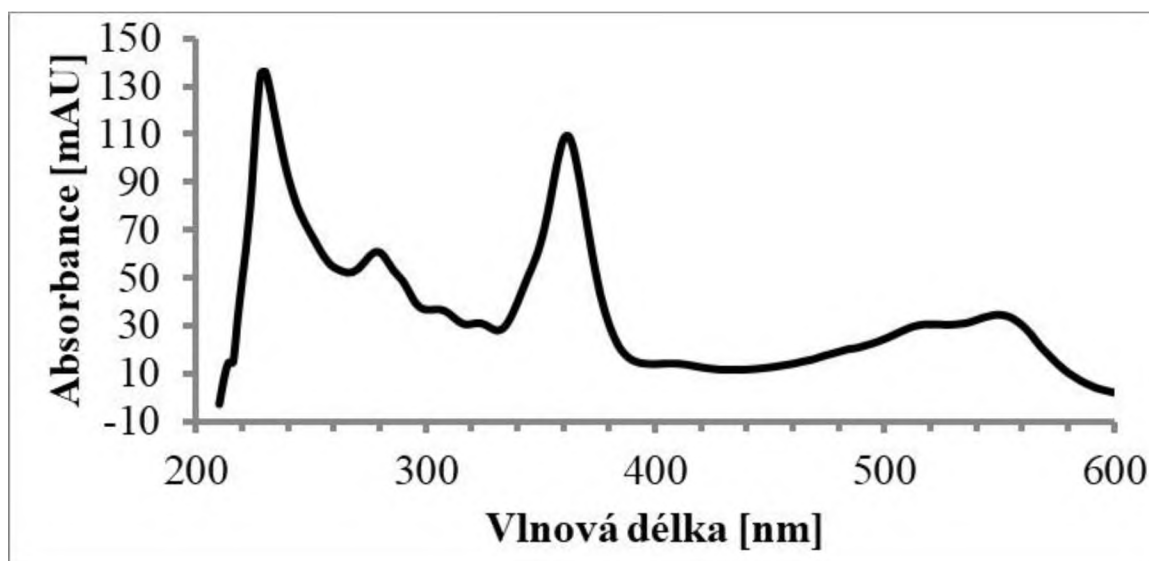
Příloha P1 Použité podmínky pro optimalizaci chromatografické separace vitamínu B12

Mobilní fáze - Komponent A	Mobilní fáze - Komponent B	Průběh gradientu		Rychlost průtoku [ml/min]
		Čas [minuty]	Množství B [%]	
Octan amonný $c = 10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ pH = 3,2	Acetonitril	0	10	0,15
		15	90	
		0	2	0,15
		15	90	0,6
		0	5	0,5
		10	30	
Ultračistá voda + 0,1 % kyselina mravenčí	Acetonitril + 0,1 % kyselina mravenčí	0	5	0,3
		10	30	
		0	5	0,3
15	20			

Příloha P2 Přehled chromatografických kolon používaných pro optimalizaci separace vitamínu B12

	Poroshell 300 SB C18	Zorbax SB C18	Zorbax SB C18	Kinetex PFP 100 A
Výrobce	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	Agilent Technologies, Santa Clara, USA	Phenomenex, Torrance, USA
Délka [mm]	75	150	150	150
Průměr [mm]	2,1	1	2,1	3
Velikost částic [μm]	5	3,5	5	2,6
Typ sorbentu	C18	C18	C18	Pentafluoro- fenylyl (PFP)
Částice	Povrchově porézní	plně porézní	plně porézní	Povrchově porézní

Příloha P3 UV/VIS spektrum vitamínu B12



Příloha P4 Výsledky kalibrace

Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Plocha [$\text{mAU}\cdot\text{s}^{-1}$]	Výška [mAU]
0,005	1,919	0,235
0,005	1,847	0,229
0,005	1,704	0,219
0,010	2,987	0,375
0,010	3,023	0,365
0,010	2,967	0,393
0,025	7,764	0,952
0,025	7,992	1,018
0,025	8,979	1,169
0,050	16,012	1,982
0,050	16,167	1,979
0,050	15,817	1,976
0,100	32,625	3,994
0,100	32,855	4,035
0,100	32,345	4,029
0,250	82,258	10,326
0,250	82,100	10,353
0,250	82,991	10,306
0,500	158,512	19,823
0,500	167,248	20,925
0,500	164,767	20,865

Příloha P5 Validační hodnoty pro přesnost a správnost 1. den

Koncentrace teoretická [ug·ml ⁻¹]	Plocha [mAU·s ⁻¹]	Koncentrace podle kalibrace [ug·ml ⁻¹]	Přesnost (RSD) [%]	Správnost [%]	Průměr [%]
0,05	16,012	0,0489	0,18	97,8	97,7
0,05	16,167	0,0494		98,8	
0,05	15,817	0,0483		96,6	
0,5	158,512	0,4840	4,50	96,8	99,8
0,5	167,248	0,5106		102,1	
0,5	164,767	0,5031		100,6	
2,5	853,909	2,6071	3,45	104,3	104,8
2,5	860,559	2,6274		105,1	
2,5	858,819	2,6221		104,9	

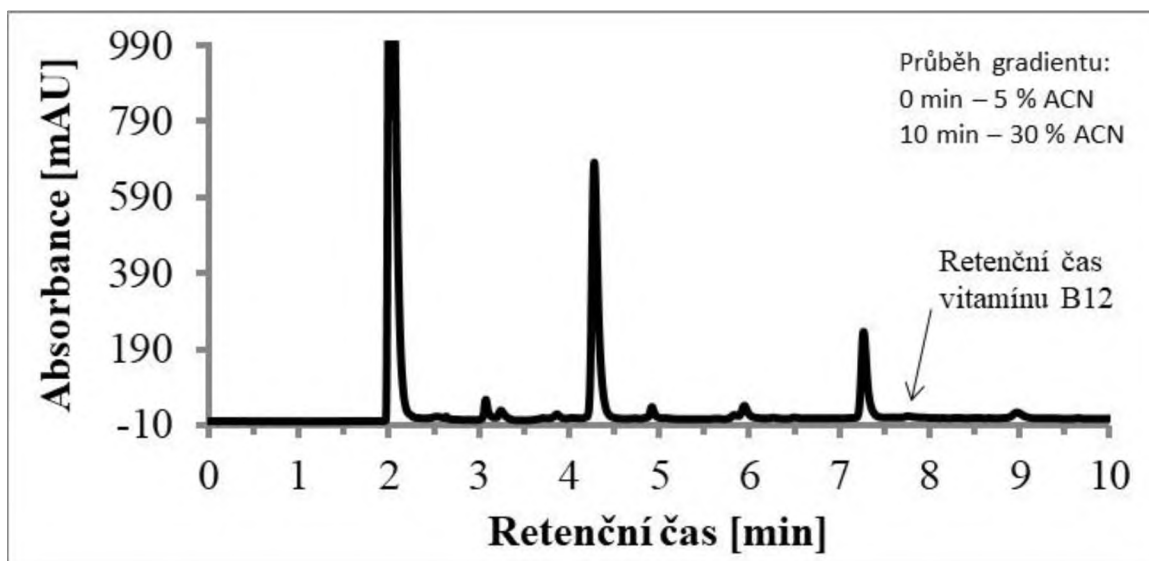
Příloha P6 Validační hodnoty pro přesnost a správnost 7. den

Koncentrace teoretická [ug·ml ⁻¹]	Plocha [mAU·s ⁻¹]	Koncentrace podle kalibrace [ug·ml ⁻¹]	Přesnost (RSD) [%]	Správnost [%]	Průměr [%]
0,05	16,4091	0,0501	0,05	100,2	99,9
0,05	16,3551	0,0499		99,9	
0,05	16,3085	0,0498		99,6	
0,5	157,4881	0,4808	3,99	96,2	99,0
0,5	164,8711	0,5034		100,7	
0,5	163,819	0,5002		100,0	
2,5	855,7987	2,6129	9,18	104,5	105,8
2,5	871,3608	2,6604		106,4	
2,5	872,033	2,6625		106,5	

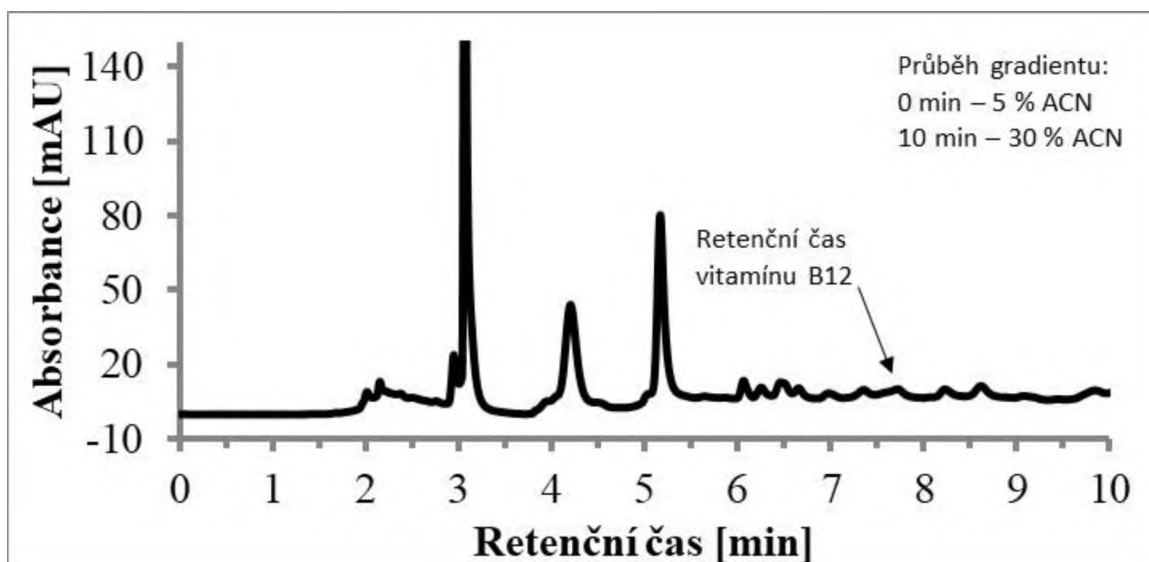
Příloha P7 Validační hodnoty pro přesnost a správnost 52. den

Koncentrace teoretická [ug·ml ⁻¹]	Plocha [mAU·s ⁻¹]	Koncentrace podle kalibrace [ug·ml ⁻¹]	Přesnost (RSD) [%]	Správnost [%]	Průměr [%]
0,05	17,9536	0,0548	0,49	109,6	106,6
0,05	16,9749	0,0518		103,7	
0,05	17,4582	0,0533		106,6	
0,5	162,9613	0,4975	2,97	99,5	101,5
0,5	168,7004	0,5151		103,0	
0,5	167,1442	0,5103		102,1	
2,5	870,5538	2,6579	8,02	106,3	107,3
2,5	879,5333	2,6854		107,4	
2,5	886,5483	2,7068		108,3	

Příloha P8 Chromatogram analýzy vzorku po extrakci okyselenou vodou



Příloha P9 Chromatogram analýzy vzorku po extrakci kyselinou trichloroctovou



Příloha P10 Získané koncentrace po přidavku standardu vitamínu B12 ke vzorku masa

	Plocha píku [mAU·s ⁻¹]	Koncentrace [µg·ml ⁻¹]
Syrové hovězí maso	28,2117	0,0861
Syrové hovězí maso + 0,3 µg vitamínu B12	119,0912	0,3636

Příloha P11 Hmotnostní ztráty masa vlivem tepelných úprav

Kus	Hmotnost/ztráta	Vaření	Pečení	Smažení	Grilování	Sous- vide
Hovězí maso						
1.	před úpravou [g]	64	64	72	52	49
	po úpravě [g]	31	30	46	33	35
	ztráta [%]	51,7	46,9	36,1	36,5	28,6
2.	před úpravou [g]	59	64	75	62	73
	po úpravě [g]	28	30	50	40	59
	ztráta [%]	52,5	46,9	33,3	35,5	19,2
Vepřové maso						
1.	před úpravou [g]	58	68	59	95	68
	po úpravě [g]	35	38	39	46	54
	ztráta [%]	39,7	44,1	33,9	51,6	20,6
2.	před úpravou [g]	90	61	96	63	57
	po úpravě [g]	57	36	73	30	43
	ztráta [%]	36,7	40,9	23,9	52,4	24,6
Kuřecí maso						
1.	před úpravou [g]	64	59	43	60	46
	po úpravě [g]	39	33	30	36	31
	ztráta [%]	39,1	44,1	30,2	40,0	32,6
2.	před úpravou [g]	53	40	50	54	41
	po úpravě [g]	32	70	31	31	31
	ztráta [%]	39,6	42,9	38,0	42,6	24,4

Příloha P12 Vitamín B12 v hovězím mase při různých tepelných úpravách

Tepelná úprava	Plocha píku [mAU·s⁻¹]	Koncentrace [µg/100 g]	Konc. se započt. ztrátou hm. [µg/100 g]	Ztráta vitamínu oproti syrovému [%]
Syrové	41,5691	0,8461		
	28,4008	0,5781		
Vaření	23,3529	0,4753	0,2277	67,02
	26,2248	0,5338	0,2557	62,96
Pečení	46,1764	0,9399	0,4991	27,71
	35,1826	0,7161	0,3803	44,92
Smažení	46,4161	0,9448	0,6169	10,64
	45,8356	0,9330	0,6092	11,76
Grilování	13,2758	0,2702	0,1729	74,95
	10,5762	0,2153	0,1378	80,04
Sous-vide	18,1877	0,3702	0,2818	59,18
	19,6596	0,4002	0,3046	55,88

Příloha P13 Vitamín B12 ve vepřovém mase při různých tepelných úpravách

Tepelná úprava	Plocha píku [mAU·s⁻¹]	Koncentrace [µg/100 g]	Konc. se započt. ztrátou hm. [µg/100 g]	Ztráta vitamínu oproti syrovému [%]
Syrové	7,0536	0,1436		
	8,9108	0,1814		
Vaření	4,5765	0,0932	0,0576	65,03
	5,6077	0,1141	0,0705	57,14
Pečení	10,0606	0,2048	0,1177	28,46
	12,1292	0,2469	0,1420	13,76
Smažení	9,4945	0,1933	0,1374	16,52
	8,9511	0,1822	0,1295	21,30
Grilování	9,3955	0,1912	0,0918	44,23
	7,1776	0,1461	0,0701	57,39
Sous-vide	5,4388	0,1107	0,0857	47,93
	5,3147	0,1082	0,0838	49,15

Příloha P14 Vitamín B12 v kuřecím masu při různých tepelných úpravách

Tepelná úprava	Plocha píku [mAU·s⁻¹]	Koncentrace [μg/100 g]	Konc. se započt. ztrátou hm. [μg/100 g]	Ztráta vitamínu oproti syrovému [%]
Syrové	4,2734	0,0870		
	4,6269	0,0942		
Vaření	4,0328	0,0821	0,0498	45,32
	4,0210	0,0818	0,0497	45,48
Pečení	5,0086	0,1019	0,0576	36,74
	3,0936	0,0630	0,0356	60,92
Smažení	5,0995	0,1038	0,0651	28,52
	5,4847	0,1116	0,0700	23,12
Grilování	4,0870	0,0832	0,0480	47,27
	4,3385	0,0883	0,0510	44,02
Sous-vide	3,4238	0,0697	0,0498	45,30
	0,8169	0,0166	0,0119	86,95