

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko – technologická

Stanovení vitamínu B12 v mase připravené metodou sous – vide  
Michaela Merclová

Bakalářská práce  
2021

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Michaela Merclová**  
Osobní číslo: **C17250**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Téma práce: **Stanovení vitamínu B<sub>12</sub> v mase připravené metodou sous-vide**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

### Zásady pro vypracování

Vypracujte literární rešerši:

1. Vypracujte literární rešerši na téma stanovení různých forem vitamínu B<sub>12</sub> v potravinách. Zaměřte se na metody využívající kapalinovou chromatografii.
2. V experimentální části práce stanovte obsah vitamínu B<sub>12</sub> v syrovém mase, mase upraveném pomocí metody sous-vide, a také v kapalině, která po přípravě masa zůstane v obalu na maso. Na stanovení použijte již optimalizovanou metodu s využitím B<sub>12</sub> imunoafinitních kolonek a kapalinové chromatografie s UV/VIS detekcí.
3. Získané poznatky kriticky zhodnoťte a porovnejte s literaturou.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Tomáš Hájek, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **5. února 2021**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Ing. Karel Ventura, CSc.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2021

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 17. 1. 2017

Michaela Merclová

# PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu bakalářské práce Ing. Tomáši Hájkovi, PhD. za jeho ochotu, vstřícnost, cenné rady, odborné vedení a připomínky při zpracování této bakalářské práce.

## **ANOTACE**

Bakalářská práce pojednává o stanovení množství vitamínu B12 ve vybraných vzorcích masa. Použitá metoda stanovení je vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV/VIS spektrofotometrickou detekcí. Vitamín B12 byl extrahován ze vzorku pomocí enzymů, poté byl zachycen zakoncentrováním na imunoafinitní SPE koloně. Obsah vitamínu B12 byl analyzován v mase syrovém a v mase upraveném metodou sous – vide pro porovnání ztrát vitamínu působením tepelné úpravy.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Vitamín B12, maso, tepelná úprava, sous-vide, kapalinová chromatografie, imunoafinitní kolony

## **TITLE**

Effect of sous-vide heat treatment on vitamin B12 content in meat.

## **ANNOTATION**

Determination of vitamin B12 content in chosen samples of meat is the topic of this bachelor thesis. The method of determination is high performance liquid chromatography with UV/VIS spectroscopy detector. Vitamin B12 was extracted by enzymes and then was purified and preconcentrated on an immunoafinite SPE column. For the purposes of comparing the loss of vitamin B12 during the heat treatment, content of vitamin B12 was determined in fresh meat and in cooked meat by the sous-vide method.

## **KEYWORDS**

Vitamin B12, meat, sous – vide, heat treatment, liquid chromatography, immunoaffinity columns

<b>Seznam obrázků</b> .....	<b>10</b>
<b>Seznam tabulek</b> .....	<b>11</b>
<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>12</b>
<b>Úvod</b> .....	<b>14</b>
<b>1 Teoretická část</b> .....	<b>15</b>
1.1 Vitamín B12 a jeho vlastnosti.....	15
1.2 Biochemická aktivita .....	16
1.3 Doporučený denní příjem a zdroje vitamínu B12.....	16
1.3.1 Doporučený denní příjem .....	16
1.3.2 Zdroje vitamínu B12.....	17
1.4 Absorpce vitamínu B12 do organismu .....	17
1.4.1 Projevy nedostatku vitamínu B12.....	19
1.5 Výroba vitamínu B12.....	20
1.6 Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....	21
1.6.1 Mobilní fáze .....	22
1.6.1.1 Čerpadla mobilní fáze .....	22
1.6.1.2 Gradientová eluce .....	23
1.6.2 Chromatografické separační kolony a jejich plnění .....	24
1.6.2.1 Kolony s povrchově porézními částicemi.....	25
1.6.3 Detektory .....	26
1.6.3.1 Spektrofotometrické detektory .....	26
1.7 Extrakce pevnou fází .....	27
1.7.1 Imunoafinitní kolony .....	28
1.8 Stanovení vitamínu B12 v potravinách.....	29
1.8.1 Převedení forem vitamínu B12 na kyanokobalamin.....	29
1.8.2 Uvolnění vitamínu B12 ze vzorku .....	30

1.8.3	Extrakce vitamínu B12 .....	30
1.8.4	Stanovení vitamínu B12.....	31
1.8.4.1	Mikrobiologická zkouška .....	32
1.8.4.2	Další metody stanovení.....	33
<b>2</b>	<b>Experimentální část .....</b>	<b>35</b>
2.1	Přístroje a zařízení .....	35
2.1.1	Chemikálie a vzorky .....	36
2.1.2	Chemikálie .....	36
2.1.3	Vzorky .....	37
2.2	Pracovní postup.....	37
2.2.1	Příprava roztoků kalibrační řady.....	37
2.2.2	Příprava vzorků.....	37
2.2.3	Příprava roztoků k analýze .....	38
2.2.4	Uvolnění vitamínu B12 z masa.....	38
2.2.5	Imunoafinitní přečištění a zakoncentrování.....	38
2.2.6	Chromatografická analýza .....	39
2.2.7	Vyhodnocení a zpracování dat.....	39
<b>3</b>	<b>Výsledky a diskuze.....</b>	<b>40</b>
3.1	Kalibrační závislost.....	41
3.2	Analýza vzorků masa.....	42
3.2.1	Hmotnostní ztráty masa vlivem tepelné úpravy .....	42
3.2.2	Hovězí maso .....	44
3.2.2.1	Hovězí kýta .....	44
3.2.2.2	Hovězí váleček.....	45
3.2.3	Vepřové maso .....	45
3.2.3.1	Vepřová kýta.....	45



3.3	Rozdělení vitamínu B12 v mase a šťávě.....	46
<b>Závěr</b>	.....	<b>47</b>
<b>Použitá literatura</b>	.....	<b>49</b>
<b>Přílohy</b>	.....	<b>55</b>

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Struktura kobalaminu [4] .....	15
Obrázek 2 Transport a absorpce kobalaminu v lidském organismu [16] .....	18
Obrázek 3 Chromatografický proces, dělení analytů mezi tekoucí kapalinou a sférickou částicí, chromatogram [22] .....	21
Obrázek 4 Typy gradientů mobilní fáze [23].....	23
Obrázek 5 Povrchově pórzní částice [29] .....	25
Obrázek 6 Záznam z DAD detektoru [33].....	27
Obrázek 7 Princip imunoafinitní kolony [42].....	28
Obrázek 8 Chromatogram standartu vitamínu B12 .....	40
Obrázek 9 Chromatogram vzorku.....	41
Obrázek 10 Kalibrační křivka standartu vitamínu B12 .....	41
Obrázek 11 Hmotnostní ztráty masa upraveného metodou sous – vide .....	43

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Doporučené denní dávky vitamínu B12 [8].....	17
Tabulka 2 Příčiny nedostatku vitamínu B12 [18].....	19
Tabulka 3 Příznaky nedostatku vitamínu B12 [18] .....	20
Tabulka 4 Použité vzorky pro analýzu .....	37
Tabulka 5 Průběh gradientové eluce.....	39
Tabulka 6 Koncentrace vitamínu B12 v hovězí kýtě.....	44
Tabulka 7 Koncentrace vitamínu B12 v hovězím válečku .....	45
Tabulka 8 Koncentrace vitamínu B12 ve vepřové kýtě.....	45
Tabulka 9 Průměrné procentuální zastoupení vitamínu B12 ve vařeném mase metodou sous-vide a ve šťávě z masa vypočítané z obsahu vitamínu B12 v syrovém mase .....	46

## SEZNAM ZKRATEK

CL .....	chemiluminiscence
CNCbl .....	kyanokobalamin (Cyanocobalamin)
CoA.....	koenzym A
C18.....	oktadecyl
C8.....	oktyl
C4.....	butyl
C3.....	propyl
DAD.....	detektor s diodovým polem (Diode – Array Detector)
DDD.....	doporučená denní dávka
DTT.....	dithiotreitol
ELISA .....	enzymaticky vázaný imunosorbent (Enzyme – Linked Immunoassay)
HPLC .....	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
ICP – MS .....	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (inductively coupled plasma – mass spectrometry)
IF.....	intrizitní faktor
KCN .....	kyanid draselný
LC .....	kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
LLE .....	extrakce kapalinou (Liquid – Liquid Extraction)
LOQ .....	mez stanovitelnosti (Limit Of Quantification)
MBA .....	mikrobiologická zkouška (Microbiological Assay)
MO.....	mikroorganismus
PA .....	perniciózní anemie
RP-HPLC .....	chromatografie s obrácenými fázemi (Reversed Phase)
SPE.....	extrakce pevnou fází (Solid Phase Extraction)

TCA ..... trichloroctová kyselina

TFA ..... trifluoroctová kyselina

UHPLC ..... ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie

## ÚVOD

Vitamíny jsou esenciální látky, bez kterých tělo nefunguje tak, jak má. V lidském organismu mají nezastupitelnou funkci katalyzátorů biochemických reakcí týkajících se vstřebávání a výměny látek. Některé vitamíny si lidské tělo dokáže v omezené míře syntetizovat samo, avšak pro správné fungování organismu je důležité jejich doplňování na dostatečné množství potravou.

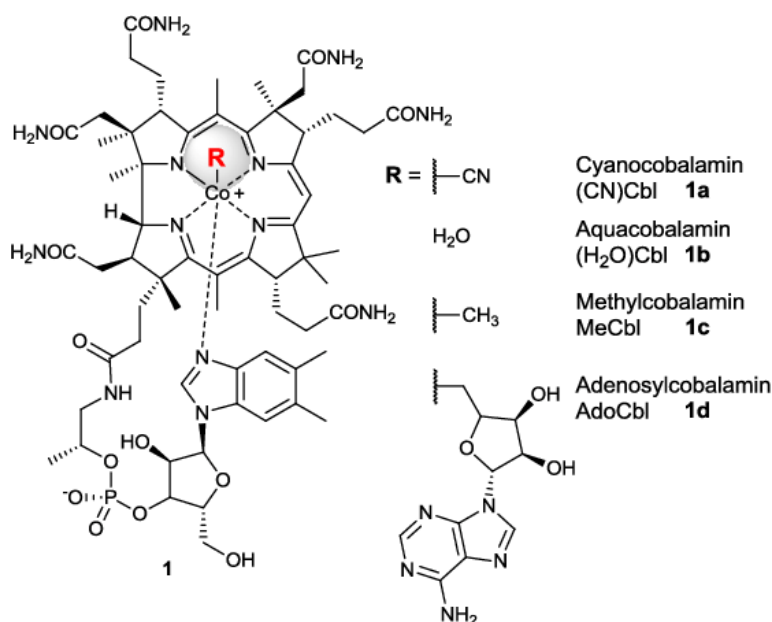
Vitamín B12 patří mezi vitamíny skupiny B, které mají významnou roli jednak v procesech spojených s metabolismem, jednak při tvorbě červených krvinek a vzniku genetického materiálu. Vitamín B12 se v potravě vyskytuje převážně v živočišných produktech. Pokud tedy chceme udržovat v organismu dostatečné množství tohoto vitamínu ale i jiných důležitých látek, je potřeba mít pestrý jídelníček jehož součástí by měly být masné výrobky, vejce a mléčné výrobky.

Největším zdrojem vitamínu B12 je maso. Nejvíce vitamínu B12 obsahuje maso v syrovém stavu. Protože konzumovat syrové maso není pro člověka zdravé ani bezpečné, je nutné ho před spotřebou tepelně upravit. Tepelnou preparací však masné výrobky ztrácí na obsahu vitamínů. Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, jak hodně velká je degradace vitamínu B12 vlivem zvolené tepelné úpravy a kolik vitamínu B12 se vyskytuje ve šťávě z tepelně upraveného masa.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Vitamín B12 a jeho vlastnosti

Vitamín B12, nazývaný také kobalamin, je ve vodě rozpustný vitamín s klíčovou úlohou pro správnou funkci nervového systému a krvetvorby. Pod pojem vitamín B12 patří skupina komplexních chemických látek, kobalaminů, obsahující ve své molekule pevně vázaný kobalt. Do této skupiny patří kyanokobalamin, hydroxykobalamin, methylkobalamin a adenosylkobalamin [1]. Chemická struktura vitamínu B12 je velmi komplexní. Kobalt je umístěn ve středu tetrapyrrolového makrocyklu, na kterém jsou koordinované čtyři atomy dusíku patřící pyrrolovým jádrům (viz Obrázek 1).



Obrázek 1 Struktura kobalaminu [4]

Jádro molekuly je známé také jako korinový cyklus. Název cyklu je odvozen od obdobné tetrapyrrolové struktury, kterou můžeme nalézt u hemových barviv a chlorofylů [2]. Pátá koordinačně kovalentní vazba ke kobaltu je s atomem dusíku, pocházejícího ze skupiny dimethylbenzimidazolu. Tento ligand je společný pro všechny kobalaminy. Šestá pozice může být obsazena kyanidem, 5'-deoxyadenosylovou skupinou, methylovou skupinou, glutationem, vodou, hydroxylovým iontem nebo jinými ligandy, například dusitanem, amoniem nebo sulfátem. Tato pozice také nemusí být obsazena vůbec. Pokud je ligandem kyanid, je název látky kyanokobalamin; když je ligandem methyl, je název methylkobalamin, atd [3].

Kyanokobalamin, syntetická forma vitamínu B12, je používán k obohacování potravin a ve výživových doplňcích. Vykazuje velmi dobrou stabilitu a je snadno komerčně dostupný [5].

Čistý vitamín B12 může být ve formě červených krystalů nebo jako amorfní krystalický prášek. Bezvodý je velmi hygroskopický. Je poměrně dobře rozpustný ve vodě a v alkoholu a nerozpustný je v acetonu, chloroformu nebo v etheru [6].

## **1.2 Biochemická aktivita**

Vitamín B12 je mikroživinou, která má v lidském organismu významnou úlohu jako kofaktor důležitých enzymů intermediárního metabolismu. Podílí se na syntéze červených krvinek, metabolismu mastných kyselin a zprostředkovává dostupnost aktivních forem vitamínu B9 (folátů) [7].

Methylkobalamin funguje koenzymaticky v rámci přemístování methylové skupiny z 5-methyltetrahydrofolátu při přeměně homocysteinu na methionin. Význam této reakce spočívá především v regeneraci tetrahydrofolátu, který je aktivní formou kyseliny listové. Tetrahydrofolát je velmi důležitý při syntéze DNA a buněk [1]

5'-deoxyadenosylkobalamin slouží v enzymatické přesmykové reakci, která je katalyzována methylamonylem – koenzym A– mutázou. Tento enzym urychluje přeměnu methylmalonyl-CoA na sukcinyl – CoA. Reakce je klíčová při vstřebávání vyšších mastných kyselin a tím také při syntéze myelinové pochvy, která je důležitá pro správné fungování centrální a periferní nervové soustavy [1].

## **1.3 Doporučený denní příjem a zdroje vitamínu B12**

### **1.3.1 Doporučený denní příjem**

Doporučená denní dávka vitamínu B12 je dána jeho esenciálním množstvím potřebným k udržení normálního hematologického stavu a obsahu krevního séra. Pro dospělé je doporučená denní dávka vitamínu B12 2,4 µg, u těhotných žen je potřeba vyšší. U 10 až 30 procent lidí starších padesáti let se mohou rozvinout malabsorpční jevy, při kterých je vitamín B12 vstřebáván pouze částečně. Pro tuto konkrétní skupinu lidí je proto doporučeno konzumovat potraviny obohacené o vitamín B12 nebo potravinové doplňky jej obsahující. Nízký příjem se může objevit i u lidí, kteří se stravují striktně vegetariánsky a vegansky, popřípadě u obyvatel zemí, ve kterých je nedostatek živočišných produktů [8; 9].



V následující Tabulka 1 jsou uvedené doporučené denní dávky vitamínu B12 pro jednotlivé demografické skupiny.

**Tabulka 1 Doporučené denní dávky vitamínu B12 [8]**

<b>Skupina</b>	<b>DDD (µg/den)</b>
<i><b>Kojenci a děti</b></i>	
<b>0–6 měsíců</b>	0,4
<b>7–12 měsíců</b>	0,7
<b>1–3 roky</b>	0,9
<b>4–6 let</b>	1,2
<b>7–9 let</b>	1,8
<i><b>Dospívající</b></i>	
<b>10–18 let</b>	2,4
<i><b>Dospělí</b></i>	
<b>19–65 let</b>	2,4
<b>65+ let</b>	2,4

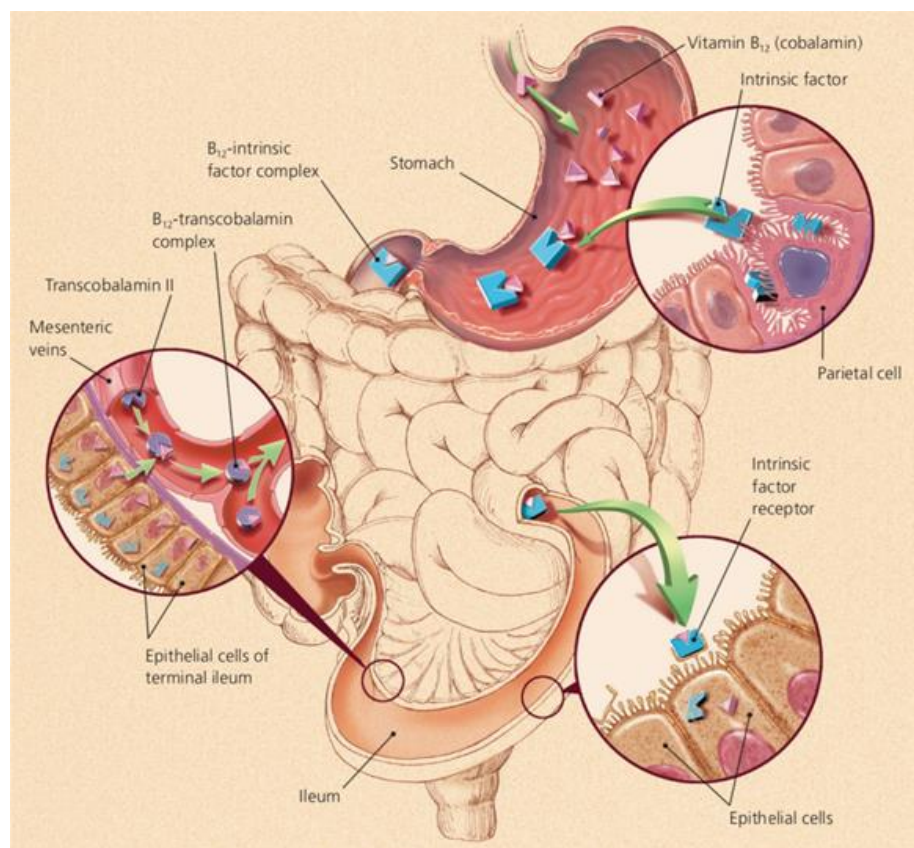
### **1.3.2 Zdroje vitamínu B12**

Pro kobalamin je charakteristická jeho přítomnost v potravinách živočišného původu. Vysoké množství vitamínu B12 se vyskytuje například v játrech (26–58 µg/100 g), v hovězím a jehněčím mase (1–3 µg/100 g), kuřecím mase (méně než 1 µg/100 g), ve vejcích (1–2,5 µg/100 g) a v mléčných produktech (0,3–2,4 µg/100 g). Z vajec se ale obvykle vstřebává velmi malé množství vitamínu v porovnání s již zmíněnými potravinami. V rostlinných produktech se vitamín B12 může vyskytovat, velmi často se ale nejedná o jeho bioaktivní formu. Nalézt ho můžeme například u některých druhů hub a mořských řas [10; 11]. Vitamín je během kulinářských úprav stabilní, ztráty během nich závisí na použité technologii [12].

### **1.4 Absorpce vitamínu B12 do organismu**

Vitamín B12 se vstřebává do organismu poměrně složitým způsobem. Kobalamin je v potravinách vázán na proteiny a polypeptidy. Aby mohl být v lidském těle vstřebán, musí dojít k narušení těchto vazeb. K narušení vazeb dochází v žaludku vlivem žaludečních šťáv. Ty obsahují kyselinu chlorovodíkovou, která navozuje v žaludku dostatečně nízké pH pro aktivaci proteolytického enzymu pepsinu, který je nutný k rozštěpení vazby mezi vitamínem B12 a proteiny [13]. Vitamín se po uvolnění váže na tzv. R-faktor.

R-faktor je vazebným proteínem z řad glykoproteinů, který je přítomný ve slinách, žaludečních tekutinách a je možné jej nalézt i v krevním séru. Dokáže vázat všechny analogy vitamínu B12. Následně je ve dvanáctníku R-faktor rozložen pankreatickými proteázami, přičemž je vitamín uvolněn a ihned se na něj váže vnitřní neboli intrinziční faktor (IF). IF je taktéž glykoprotein, který je syntetizovaný buňkami žaludeční sliznice. Váže na sebe pouze takové formy kobalaminu, které jsou v lidském těle aktivní. Komplex IF a vitamínu poté postupuje do tenkého střeva, ve kterém dochází k jeho rozštěpení pomocí pankreatických enzymů a uvolněný vitamín putuje do krve [2; 14; 15]. Na níže uvedeném Obrázku 2 je znázorněna popsána cesta vitamínu B12 trávicím traktem.



**Obrázek 2 Transport a absorpce kobalaminu v lidském organismu [16]**

### 1.4.1 Projevy nedostatku vitamínu B12

Vitamín B12 patří k vitamínům skupiny B, které jsou nezbytné pro správnou tvorbu červených krvinek, reparaci buněk a tkání a normální funkci nervových buněk. Vitamín B12 si lidské tělo neumí syntetizovat samo, je tedy nutné ho přijímat potravou. Nedostatkem jsou proto ohroženi striktní vegetariáni a vegani, kteří záměrně nekonzumují živočišné výrobky. Zdroje vitamínu v tomto případě mohou být obohacené obiloviny, například cereálie.

Nedostatečná konzumace živočišných produktů se velmi často týká i lidí žijících v rozvojových zemích, kteří kvůli tomu také mohou být postihnuti avitaminózou.

Jinou rizikovou skupinu představují starší lidé, kteří mohou trpět malabsorpčními jevy, při kterých se projevuje snížená schopnost absorpce vitamínu B12 z potravy [3; 17]. Špatné vstřebávání vitamínu také může být zapříčiněno onemocněními žaludku, střev a slinivky břišní. Na vině může být rovněž užívání některých léků, hormonální antikoncepce a nadměrná konzumace alkoholu [18]. V Tabulce 2 jsou uvedeny konkrétní příčiny nedostatku vitamínu B12.

**Tabulka 2 Příčiny nedostatku vitamínu B12 [18]**

<b>Příčina</b>	<b>Příklady</b>
<b>Nízký příjem vitamínu B12</b>	Vegetariánství, alkoholismus
<b>Autoimunitní onemocnění</b>	Perniciózní anemie
<b>Malabsorpce kobalaminu z potravin</b>	Chronické záněty žaludku, infekce bakterií <i>Helicobacter pylori</i>
<b>Malabsorpce po operacích</b>	Resekce tenkého střeva, částečné odstranění žaludku
<b>Gynekologická</b>	Užívání hormonální antikoncepce, hormonální terapie při změně pohlaví, těhotenství
<b>Léky</b>	Inhibitory protonové pumpy

Nedostatek vitamínu B12 se může projevovat neurologickými, hematologickými a neuropsychiatrickými příznaky. Tyto příznaky mohou mít mírnější projevy, jako například dezorientace nebo brnění a pálení horních i dolních končetin, ale i závažné, ke kterým patří degenerace míchy a snížení množství všech druhů elementů v krvi (tj. stav pancytopenie) [18; 19]. Podrobněji jsou příznaky uvedeny v Tabulce 3.

**Tabulka 3 Příznaky nedostatku vitamínu B12 [18]**

<b>Příznaky</b>	<b>Příklady</b>
<b>Hematologické</b>	Snížení počtu bílých krvinek, krevních destiček, krevních elementů v krvi, nízká hladina hemoglobinu
<b>Neurologické</b>	Degenerace páteře, poruchy periferních nervů, inkontinence
<b>Neuropsychiatrické</b>	Psychóza, deprese, mánie, Alzheimerova choroba

Mezi další klinické příznaky nedostatku vitamínu B12 se řadí perniciozní anemie (PA). Jedná se o onemocnění, které má původ v atrofii tkáně žaludku. Jejím následkem je snížena produkce vnitřního faktoru, který je nutný ke správné absorpci vitamínu B12. Vnitřní faktor je rovněž nezbytný při procesu tvorby červených krvinek a při syntéze myelinu [20]. Pacienti při PA obvykle vykazují příznaky anemie spojené s bledostí, únavou, závratí a tachykardií [18]. Projevují se i neurologické příznaky, které již byly uvedené v Tabulce 3. PA je obvykle léčena užíváním doplňků vitamínu B12 nebo jeho injekcemi. Pokud není perniciozní anemie léčena, může skončit smrtí v důsledku degenerace nervů [20].

### **1.5 Výroba vitamínu B12**

Kompletní chemická syntéza vitamínu B12 byla vynalezena v roce 1970 vědci Woodwardem a Eschenmoserem. Tento způsob výroby, zahrnující kolem 70 mezikroků, je však značně komplikovaný, technicky náročný a drahý. V dnešní době se proto dává přednost výrobě pomocí biosyntetických fermentačních procesů za použití určitých druhů geneticky upravených mikroorganismů. Mezi druhy produkující vitamín B12 patří následující rody: *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium*, *Protaminobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Streptococcus* a *Xanthomonas*. Pro tento způsob výroby vitamínu B12 se využívá principu mutagenese.

Proces mutagenese probíhá tak, že se nejprve pečlivě vyberou mikroorganismy s určitými využitelnými vlastnostmi, jako je například vysoká produktivita, genetická stabilita, optimální rychlost růstu a rezistence vůči vyšším koncentracím toxických meziproductů přítomných v médiu. Tyto MO jsou vystaveny mutagenním faktorům, jako je například UV záření. Výsledkem mutagenese je generování nových, speciálně upravených kmenů, které produkují vitamín B12 ve vysokých výtěžcích.

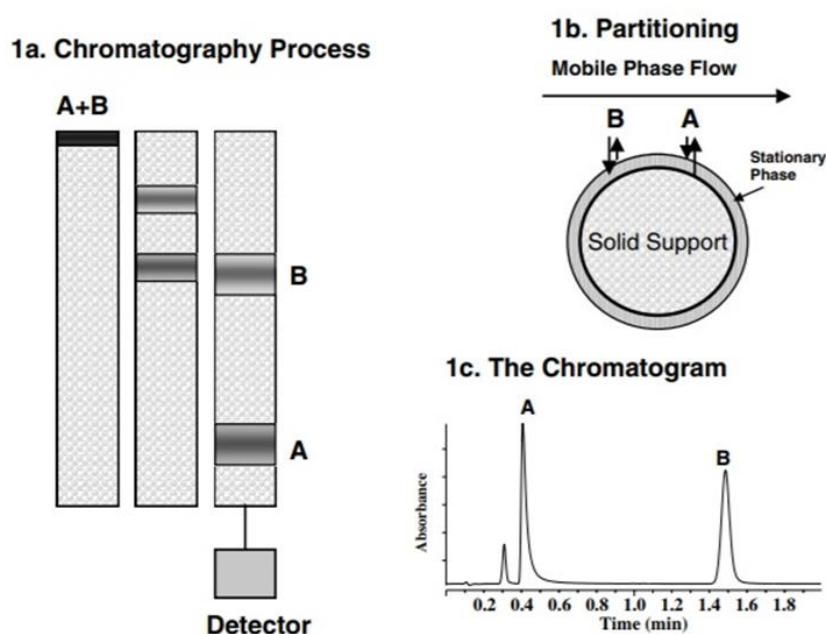
Pro průmyslovou výrobu vitamínu B12 výše popsaným způsobem se dnes nejvíce využívají kmeny *Propionibacterium shermanii* a kmeny *Pseudomonas denitrificans*. Mají přirozeně vysokou produktivitu a dostatečně rychlý růst [21].

## 1.6 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je univerzální analytickou technologií, která je hojně používána pro analýzu léčiv, biomolekul, polymerů a mnoha organických a iontových sloučenin.

Kapalinová chromatografie (LC) je technika fyzikální separace, která je prováděna v kapalně fázi. Vzorek je separován na své základní složky distribucí mezi mobilní fází (kapalina) a stacionární fází (sorbenty uvnitř kolony). Kapalinou může být například organické rozpouštědlo jako například hexan a stacionární fází mohou být pórovité částičky křemíku uvnitř kolony. HPLC je moderní druh kapalinové chromatografie, která využívá kolony s malými částčkami, kterými je mobilní fáze čerpána pod vysokým tlakem.

Na obrázku je v části 1a schéma chromatografického procesu, kde je směs analytů A a B separována na dvě oddělené látky při migraci kolonou. V části 1b je znázornění procesu dynamického dělení analytů mezi tekoucí kapalinou a sférickou částicí. 1c je graf zvaný chromatogram, což je grafický výstup z detektoru, vznikající během chromatografického procesu [22].



Obrázek 3 Chromatografický proces, dělení analytů mezi tekoucí kapalinou a sférickou částicí, chromatogram [22]

Při separaci látek se v současné době čím dál více uplatňuje ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC – ultra high performance chromatography). Separační proces využívá speciálních sorbentů, které vynikají svojí mechanickou pevností a mimořádnou separační účinností. Celý proces probíhá za velmi vysokých tlaků. Výhody UHPLC oproti klasické vysokoúčinné kapalinové chromatografii jsou kratší doba analýzy díky menším částicám a tím i vyšší produktivita, zvýšení separační účinnosti a snížení nákladů [23; 24].

### **1.6.1 Mobilní fáze**

Mobilní fáze je v HPLC kapalina, která se pohybuje kolonou a unáší složky dělené směsi přes stacionární fázi [22]. Druh a složení mobilní fáze má vliv na účinnost a selektivitu separace.

Používají se dvousložkové (binární), tříložkové (ternární) i složitějších mobilní fáze, které jsou složeny z různých rozpouštědel, někdy s přísadou solí, tlumivých roztoků, bází a kyselin [25]. Klíčovým kritériem pro mobilní fáze je jejich polarita, protože eluční pořadí látek je dáno vzájemným vztahem polarit separovaných látek a polarit mobilní a stacionární fáze [26]. Voda a roztoky zředěných kyselin patří mezi silně polární skupinu, běžné alkoholy a aceton patří mezi středně polární, alkany a cykloalkany jsou nepolární [27]. Při použití polární stacionární fáze jsou kolonou nejméně zadržovány nepolární složky vzorku, a naopak při použití nepolárních stacionárních fází jsou na koloně nejméně zadržovány polární složky [26]. Mobilní fáze by měla být chemicky inertním médiem, které nereaguje se stacionární fází ani s rozdělovanými složkami.

HPLC se dá provádět v režimu s normální fází („Normal Phase“ – NP HPLC) nebo s reverzní fází („Reverse phase“ – RP HPLC). V případě, že je stacionární fáze polární a mobilní fáze nepolární, je výsledná kombinace nazývána chromatografie s normální fází. Je-li stacionární fáze nepolární a mobilní polární, jde o případ chromatografie na obrácených fázích [27].

#### **1.6.1.1 Čerpadla mobilní fáze**

Čerpadla mají v HPLC dvojí účel – načerpat rozpouštědlo ze zásobníku a dopravovat jej do kolony [27]. Požadavky kladené na čerpadla jsou značně náročné:

1. Čerpadla musí být konstruována z materiálů odolných vůči korozi i při použití poměrně agresivních mobilních fází (jako jsou tlumivé roztoky, slabě kyselé a bazické roztoky, organická rozpouštědla), k čemuž se hodí nerezová ocel, titan či některé keramické materiály.
2. Čerpadla musí být schopna dávkovat plynule kapaliny bez kolísání (pulsů) průtoku do tlaků 30 až 50 MPa, a to při průtocích od 0,1 do 5 nebo 10 ml/min pro analytické aplikace.

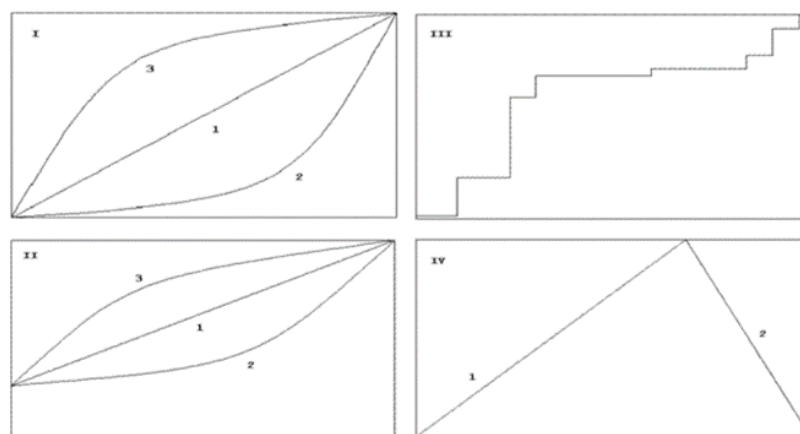
3. Vnitřní objem čerpadla má být co nejmenší, aby umožnil rychlou výměnu mobilní fáze, eventuálně práci s gradientem tvořeným v nízkotlaké části přístroje.

Konkrétní čerpadlo se volí podle typu použitého gradientu [25].

### 1.6.1.2 Gradientová eluce

Když se při separaci používá mobilní fáze s pevným složením po celou dobu analýzy, tak se tento proces nazývá isokratická eluce. Často je obtížné najít mobilní fázi s takovým složením, která je vhodná pro všechny separované látky. Například mobilní fáze, která je vhodná pro málo zadržované látky může vést k příliš dlouhým retenčním časům pro látky, které se zadržují silněji. A naopak, pokud použijeme mobilní fázi, která je vhodnější pro látky s pozdní elucí, může se stát, že látky s dřívější elucí nebudou dostatečně separovány [28]. Řešením těchto problémů je využití gradientové eluce. Při gradientové eluci se pracuje s mobilní fází, jejíž složení se mění s časem, takže v průběhu separace dochází ke zvyšování její eluční síly. Většinou se pracuje s binární elucí, kdy jedna fáze má výrazně nižší eluční sílu než druhá. Při separaci na obrácené fázi je složení mobilní fáze na počátku relativně polární a jak separace pokračuje, tak je mobilní fáze méně polární.

Časová změna koncentrace v průběhu separace se označuje jako profil gradientu. Gradient může být spojitý nebo stupňovitý. Spojitý gradient může být přímkový, konvexní nebo konkávní, viz. obrázek 4 [23].



Různé 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 - lineární gradient (1) následovaný obráceným lineárním gradientem (2))

**Obrázek 4** Typy gradientů mobilní fáze [23]



Výhody gradientové eluce:

- Lepší pro komplexní vzorky a aplikace, které vyžadují kvantifikaci všech píků nebo více analytů s různou polaritou
- Lepší rozlišení píků s časnou a pozdní elucí
- Lepší citlivost píků s pozdní elucí
- Vyšší kapacita píků (více se jich vejde na chromatogram)

Nevýhody gradientové eluce:

- Potřeba složitějšího přístroje pro HPLC
- Vývoj, implementace a přenos metod jsou obtížnější
- Typicky delší doby stanovení, protože kolona musí být ekvilibrována počáteční mobilní fází [22].

### **1.6.2 Chromatografické separační kolony a jejich plnění**

Kolony pro HPLC analýzy jsou tenké trubice o různých rozměrech. Vnější plášť je zhotovován z pevných materiálů, aby byly kolony schopné odolávat vysokém tlaku, pod kterým je přiváděna mobilní fáze. Běžně se používá nerez, ocel, příležitostně mosaz, použitelný je i plast (polyetereterketonová vlákna – PEEK) nebo speciální skla [27; 28]. Délka kolony je dána velikostí částic použité náplně. Čím je velikost částic náplně menší, tím je kolona kratší [26].

Uvnitř kolony se nachází adsorbent, který slouží pro ukotvení stacionární fáze. Tímto adsorbentem může být vnitřní stěna kolony, substrát na vnitřní stěně nebo náplň částicového charakteru. Jako náplň částicového charakteru lze použít například oxid hlinitý, škrob, celulózu nebo různé polymery. Nejvíce používaným částicovým nosičem je silikagel, oblíbený pro své vynikající adsorpční vlastnosti.

Na nosiči je chemicky uchycena stacionární fáze, která může být dvojího typu – tuhý sorbent nebo kapalný film. Také pro stacionární fáze je klíčovým kritériem míra polarity, ale důležitá je i kyselost nebo zásaditost [27]. Funkčními skupinami stacionární fáze pro chromatografii s obrácenými fázemi mohou být například oktadecyl, oktyl, aminoskupina, kyanoskupina nebo fenylová skupina. Velikost částic může být 2, 3 nebo 5  $\mu\text{m}$ .

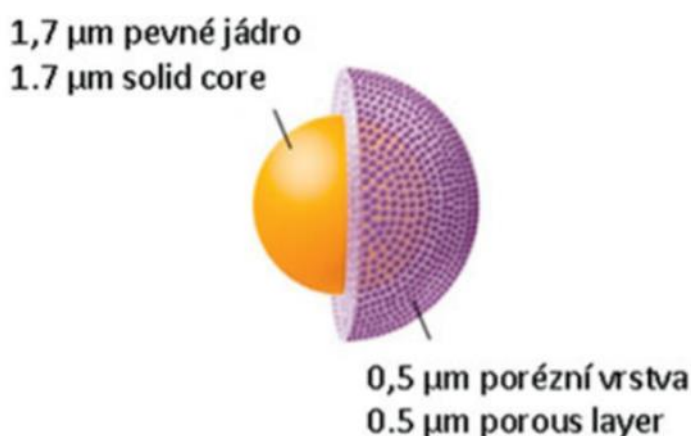
Pro stacionární fázi taktéž platí, že by neměla reagovat s mobilní fází ani se separovanými látkami [22].



### 1.6.2.1 Kolony s povrchově porézními částicemi

Pro HPLC jsou využívány kolony s různým typem sorbentu – kolony monolitické, které obsahují jeden kus pórovitého materiálu, kolony s neporézními částicemi, s plně porézními částicemi nebo s povrchově porézními částicemi [29].

Chromatografické kolony obsahující povrchově porézní částice spojují vlastnosti neporézních a plně porézních částic. Částice, jak je znázorněno na obrázku 5, jsou tvořeny pevným nepropustným jádrem, které jsou většinou tvořeny skleněnými kuličkami o průměru kolem 1,7  $\mu\text{m}$  a porézní silikagelovou slupkou o hloubce asi 0,5  $\mu\text{m}$ , v jejichž pórech dochází k difuzi analytu a přenosu hmoty [25; 29].



Obrázek 5 Povrchově porézní částice [29]

Povrchově porézní částice mají oproti plně porézním částicím výhodu v tom, že analyty díky pevnému jádru nemusí pronikat skrz celou částici. Tím se zkrátí jejich dráha pohybu, a tedy i prodleva v koloně, čímž se analýza značně urychlí. Díky částečné pórovitosti je rovněž minimalizováno rozmývání elučních píků. Další výhodou je větší velikost částic, které jsou o průměru kolem 2,7  $\mu\text{m}$ , díky které je možné při analýze použít přibližně o polovinu nižší tlak při stejné velikosti kolony i za stejných podmínek. Aby byly zachovány optimální vlastnosti kolony co nejdéle, neměla by pracovní teplota přesáhnout 60  $^{\circ}\text{C}$ , pH by mělo být v rozmezí 2–9 a pracovní tlak by měl být maximálně do 60 MPa [30; 31]. Účinnost kolon s povrchově porézními částicemi je dvakrát větší než u kolon, které obsahují částice o velikosti 3  $\mu\text{m}$  a téměř srovnatelná s kolonami plněnými částicemi o velikosti menší než 2  $\mu\text{m}$  [32].

### 1.6.3 Detektory

Detektory v chromatografii mají za úkol zaznamenat rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující eluovanou složku. Jsou umístěny zpravidla na konci kolony a analyzují tzv. efluent neboli odtok. V podstatě všechny typy detektorů používané v dnešní době v kapalinové chromatografii jsou koncentrační, tj. poskytují odezvu úměrnou koncentraci látek v eluátu. Lze je dělit do dvou skupin na:

- a) selektivní detektory, jejichž signál je úměrný pouze koncentraci analyzované látky v eluátu,
- b) univerzální (nespecifické) detektory, které poskytují signál úměrný určité vlastnosti eluátu jako celku, tj. analyzované látky a mobilní fáze.

Ideální detektor pro LC by měl umožňovat detekci všech typů látek, měl by poskytovat okamžitou a lineární koncentrační odezvu v co nejširším rozmezí koncentrací rozpuštěných látek, měl by mít vysokou citlivost a nízkou úroveň šumu, neměl by být citlivý ke změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty, měl by mít minimální příspěvek k rozšiřování elučních zón látek a měl by umožňovat použití gradientové eluce či jiných technik s programovanou změnou pracovních podmínek [25].

#### 1.6.3.1 Spektrofotometrické detektory

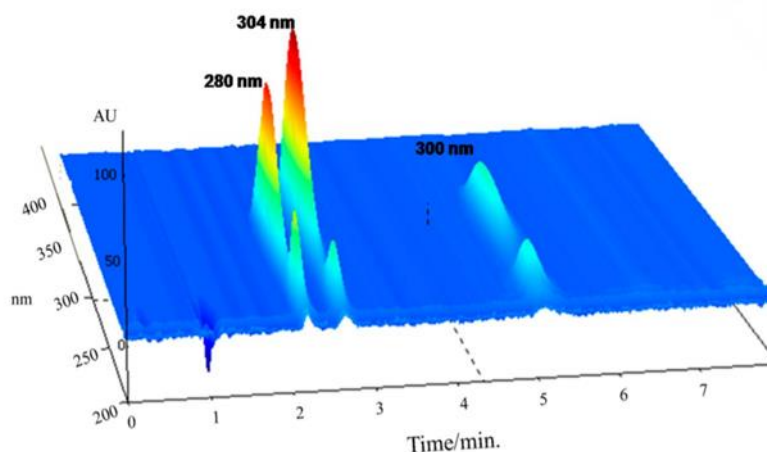
Spektrofotometrické detektory jsou v moderní HPLC velmi často využívány, uplatňují se až v 70 až 80 % všech analýz [25]. Spektrofotometrické detektory jsou selektivní, velmi citlivé ale nejsou univerzální. Tyto detektory měří absorbanci eluátu v oblasti vlnových délek od 190 do 780 nm, přičemž v oblasti od 190 do 380 nm se měří absorbance polynenasycených a aromatických látek, v oblasti od 380 do 780 nm se měří absorbance barevných látek [33]. Odezva detektoru je dána Lambert-Beerovým zákonem (rovnice (1)), vyjadřující vzájemný vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy ( $l$ ), koncentrací absorbující složky ( $c$ ) a vlastní velikostí absorpce, vyjádřenou jako absorbance ( $A$ ):

$$A = \varepsilon \times c \times l \quad (1)$$

kde  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient (l/mol/cm) [23].

Běžný spektrofotometrický detektor se skládá z deuteriové lampy jakožto zdroje záření, monochromátoru, který rozděljuje záření podle vlnových délek a malé průtokové kyvety se vzorkem [22]. Oblíbenou variantou je detektor s diodovým polem (Diode Array detector = DAD), který zaznamenává celé spektrum v reálném čase bez přerušování chromatografické separace. Detektorem je pole fotodiod, jejichž počet určuje spektrální rozlišení detektoru. Umožňuje detekci látky při jakékoliv zvolené vlnové délce, porovnání

snímaného spektra s knihovnou spekter a vypočítání čistoty píku (= identifikaci látky). Na obrázku je výstup z DAD detektoru, poskytovaný ve 3D projekci [23; 27].



**Obrázek 6 Záznam z DAD detektoru [33]**

## 1.7 Extrakce pevnou fází

Extrakce pevnou fází (solid phase extraction – SPE) je metoda přípravy vzorků pro izolaci určitých analytů. Vzorkem může být pevná látka, kapalina, případně i plyn. Byla vyvinuta jako náhrada pro extrakci z kapaliny do kapaliny (LLE).

SPE pro kapalné vzorky se stala široce používanou díky zavedení jednorázových kazet, které obsahují chemicky vázané sorbenty na bázi oxidu křemičitého. Typická kazetová zařízení se skládají z krátkých kolon (obvykle otevřený válec injekční stříkačky) obsahující sorbent s velikostí částic okolo 50–60  $\mu\text{m}$  [34].

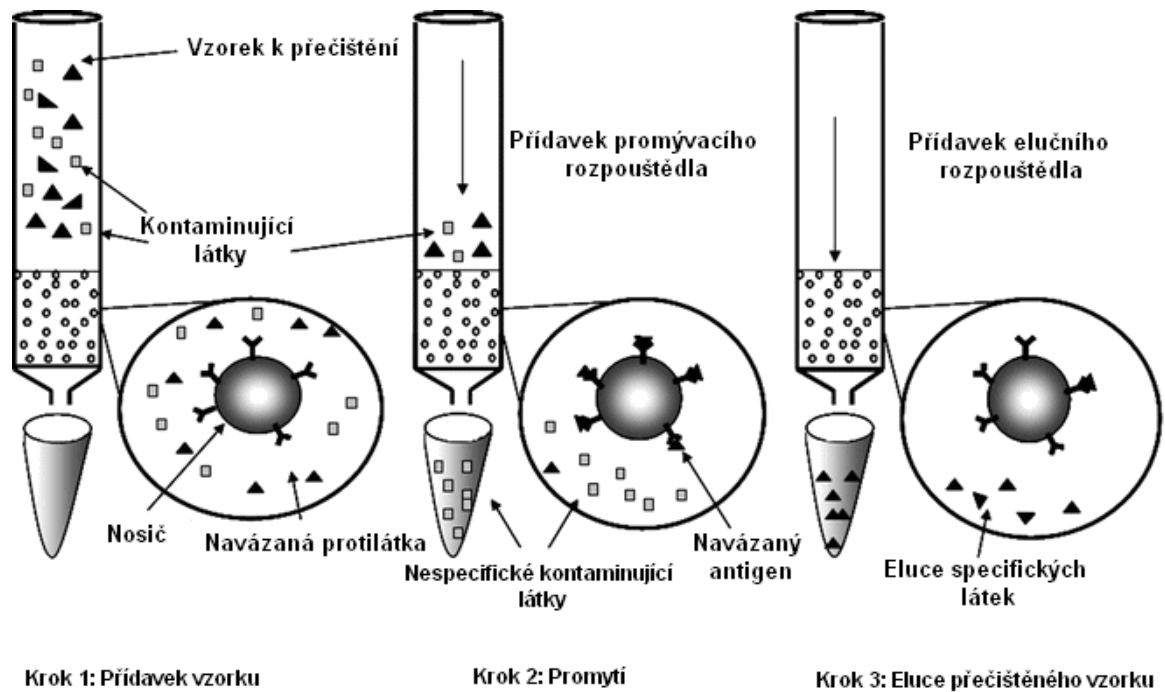
Extrakce pevnou fází se využívá tehdy, vyskytuje-li se ve vzorku analyt o koncentraci, která je nižší, než je jeho limit stanovení příslušnou analytickou metodou. V tomto případě musíme tedy provést zakoncentrování analytu ještě před jeho stanovením. Při extrakci z kapaliny na tuhou fází nejprve proléváme velké objemové množství kapalného vzorku kolonkou (desítky ml) naplněnou pevným adsorbentem, který na svém povrchu analyty zachycuje. Následně se analyty vymyjí malým množstvím vhodného rozpouštědla se silnou eluční silou (obvykle 1–2 ml), které látky z kolonky uvolní. Pomocí SPE tedy dochází jak k zakoncentrování stanovovaných látek z velkého objemu kapalného vzorku do malého objemu rozpouštědla, tak k přečištění a odstranění interferujících látek.

Takto zakoncentrovaný analyt pak můžeme stanovit vhodnou analytickou metodou, jako je plynová či kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza nebo spektrofotometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti [35].

### 1.7.1 Imunoafinitní kolony

Principem imunoafinitních kolon je využití schopnosti biologicky aktivních látek rozpoznat jinou molekulu, ke které mají vzájemný specifický vztah [36]. Mechanismus retence je založen na specifické interakci protilátka versus antigen.

Na níže uvedeném obrázku 7 je popsán mechanismus imunoafinitní kolony včetně znázornění interakce protilátka a antigenu. Na sorbentu stacionární fáze kolony jsou ukotveny specifické protilátky. Cílová látka, jejíž obsah je zjišťován, se chová jako antigen. Ty jsou zachytávány protilátkami a zbytek vzorku prochází bez zadržení [37]. V tu chvíli vznikne komplex protilátka s antigenem, přičemž ligandem je biologicky aktivní látka. Komplex se při eluci vlivem změny složení mobilní fáze rozštěpí a cílové molekuly se uvolní [36].



**Obrázek 7 Princip imunoafinitní kolony [Chyba! Záložka není definována.]**

Vazba mezi protilátkou a antigenem je výsledkem čtyř různých typů nekovalentních interakcí: iontové interakce, vodíkové vazby, van der Waalsovy interakce a hydrofobní interakce [38]. Problémem při použití imunoafinitních kolon může být tzv. cross-reaktivita, při které mohou být látky podobné přítomným analytům zachyceny společně s cílovým analytem.

Práce s imunoafinitními kolonami se velmi podobná postupu s SPE kolonami. Nejčastěji se imunoafinitní kolony využívají pro čištění nebo analýzu mykotoxinů a vitamínů [37].

## **1.8 Stanovení vitamínu B12 v potravinách**

Stanovení vitamínu B12 je poměrně složité, zejména kvůli tomu, že jeho koncentrace v potravinářských produktech bývají velmi nízké a také kvůli tomu, že má různé chemické formy, které nejsou příliš chemicky stabilní. Stabilita forem vitamínu B12 může být obzvláště malá, pokud jsou vystaveny světlu [39]. Obecně lze říci, že ke stanovení vitamínů v potravinářských produktech jsou potřeba určité analytické zkušenosti. Při analýze je nutné přesné dodržování pracovních předpisů, čistota chemikálií a rozpouštědel, snížený přístup kyslíku a omezení světelného záření, dodržování předepsaných teplot a pH. [40; 41].

### **1.8.1 Převedení forem vitamínu B12 na kyanokobalamin**

Prvním krokem ke stanovení vitamínu B12 je převedení všech jeho forem na formu nejstabilnější, což je kyanokobalamin. Kyanokobalamin je stabilní i v podmínkách, kdy je vystaven vodnému prostředí a světlu. Převedení kobalaminů na CNCbl rovněž snižuje LOQ (mez stanovitelnosti), což je výhodné, protože jsou většinou analyzovány nízké koncentrace vitamínu B12 [39].

Nejčastěji se k přeměně na kyanokobalaminy využívá reakce v neutrálním nebo mírně alkalickém médiu s 1% roztokem kyanidu sodného. Provádí se tak, že je ke vzorku umístěném v extrakční zkumavce, přidán octanový pufr pro navození vhodného pH a kyanid sodný. Extrakční zkumavka je následně umístěna do vodní lázně zahříváné na teplotu kolem 42 °C po dobu přibližně třiceti minut a po uplynutí této doby je přemístěna do vodní lázně o teplotě kolem 100 °C a znovu inkubována po dobu třicet minut. Výtěžek této reakce je zhruba 98 % [39]. K přeměně forem vitamínu B12 na kyanokobalaminy lze také použít 0,01% roztok kyanidu draselného [42].

Obdobnou reakci lze provést i v přítomnosti metabisulfitových iontů, přičemž se uvolněné kobalaminy převádí na sulfitokobalaminy, které jsou stabilní a mají stejnou aktivitu jako kyanokobalaminy [43].

### 1.8.2 Uvolnění vitamínu B12 ze vzorku

V potravinách živočišného původu se vitamín B12 vyskytuje převážně v koenzymových formách, které jsou obvykle vázané na buněčné proteinové složky. Abychom mohli vitamín B12 kvantitativně stanovit, musíme tuto vazbu nejprve rozštěpit a proteiny denaturovat na formu vhodnou pro analytické stanovení [42].

Vitamín B12 lze ze struktury matrice uvolnit prostřednictvím enzymů, které rozkládají bílkoviny (proteolytické). Ke vzorku lze přidat enzymy pepsin, papain nebo  $\alpha$ -amyláza. Poté se vzorek inkubuje při teplotě kolem 40 °C po dobu třiceti minut až 2,5 hodiny [42; 44].

Další z možností je extrakce vitamínu B12 kyselým srážením roztokem octanu sodného nebo kyseliny trichloroctové (TCA) [45]. Vzorek se nejprve smíchá s pevnou kyselinou trichloroctovou a směs se poté nechá odstředovat po dobu kolem deseti minut, čímž dojde k oddělení kapalně fáze od pevné. Následně je k pevné fázi přidána 4 % TCA a směs se opět odstředí. Pevný podíl je poté odstraněn a kapalně extrakty se smíchají a zchladí na -20 °C po dobu 10 minut. Poté se extrakty znovu odstředí a následně zchladí, čímž se objeví tuk, který je odstraněn. Extrakty se znovu odstředí a zfiltrují. Takto upravený vzorek je připraven na stanovení pomocí HPLC [46; 47; 48].

### 1.8.3 Extrakce vitamínu B12

K extrakci vitamínu B12 se používají kolony na principu SPE, například oxidované vícevrstvé uhlíkové nano trubice, které mají v tomto případě vynikající adsorpční potenciál [49]. Při HPLC s obrácenými fázemi (Reversed Phase = RP) lze použít například SPE kolony obsahující oktadecylovaný silikagel [50]. Kolony se nejprve promyjí a kondicionují malým množstvím methanolu a vody. Vitamín B12 je následně na sorbentu zachycen. Kolona se promyje vodou, směsí vody a methanolu a suší se po dobu 30 sekund pomocí vakua. Vitamín B12 se poté eluuje za použití směsi methanolu a vody a eluát je následně zředěn na potřebný objem vodou. Takto připravený extrakt je připraven pro RP-HPLC analýzu se spektrofotometrickou detekcí [51].

Nejpoužívanějšími SPE kolonami pro extrakci vitamínu B12 jsou immunoafinitní EASI-EXTRACT VITAMIN B12, vyráběné firmou R-Biopharm v Německu. Tyto kolony obsahují protilátky, které jsou vysoce specifické pro vitamín B12. Pro optimální účinnost kolony by měl být obsah vitamínu B12 v analyzovaném vzorku kolem 0,01  $\mu$ g až 0,5  $\mu$ g. Aby byly kolony co nejdéle použitelné, je třeba skladovat je v chladu při teplotách kolem 2 až 8 °C. Před samotnou analýzou by měly být temperovány na laboratorní teplotu, a to nejméně po dobu

30 minut. Po vytemperování se z kolony nechá odkapat vnitřní stabilizační pufr. Následně se do kolony nanese kapalný vzorek a důkladně se promíchá na třepačce. Kolona se poté omyje vodou, vysuší vzduchem a následně se eluuje vitamín B12 pomocí 100 % methanolu. Eluát se odebere do vialky a odpaří se při 50 °C pod proudem dusíku. Zbytek po odpaření se rekonstituuje vodou a takto upravený vzorek se dávkuje do HPLC systému [44; 52].

Dalšími kolonami na principu SPE, které lze použít pro extrakci vitamínu B12 z matric živočišných produktů, jsou např. kolony s reverzními fázemi Oasis HLB. Tyto kolony obsahují silně hydrofilní porézní polymerní sorbenty. Výhodou těchto kolon je, že si zachovávají vysokou retenci a kapacitu i když po kondicionaci vyschnou [53; 54]. Postup práce s kolonou při stanovení vitamínu B12 je následující – kolona se nejprve promyje směsí acetonitrilu a vody. Poté je na kolonu nanesené přiměřené množství superatantu. Kolona je následně promyta malým množstvím vody a poté je vitamín B12 eluován 1 ml roztoku acetonitrilu s vodou. Takto připravený extrakt může být analyzován pomocí kapalinové chromatografie [55].

#### **1.8.4 Stanovení vitamínu B12**

Stanovení vitamínu B12 ve vzorku, který je zpracován výše uvedenými postupy, lze dosáhnout různými metodami. V současné době jsou ke stanovení vitamínu B12 nejvíce používané chromatografické metody, a to zejména na principu kapalinové chromatografie. Konkrétně je nejběžněji využívána HPLC, při které je separace prováděna na kolonách s obrácenými fázemi (RP HPLC) [39; 45; 56; 57]. Hojně se používá i modernější metody ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) [45; 55]. Kolony jsou naplněny vhodnou stacionární fází, nejčastěji chemicky vázanou na inertním nosiči (silikagelu). Na separaci vitamínu B12 se hodí zejména kolony s navázaným oktylem (C8) [56] nebo oktadecylem (C18) [57]. V HPLC se také často používají předkolony nebo ochranné kolony, které chrání separační kolonu před nečistotami a nerozpustnými materiály [26].

Mobilní fázi nejčastěji představuje směs vody a acetonitrilu [39; 56; 59]. Okyselení mobilní fáze se provádí přidávkem kyseliny trifluoroctové (TFA) [59] nebo kyseliny mravenčí [56].

K eluci lze využít izokratickou [56] i gradientovou eluci [45; 55; 59]. Pro gradientovou eluci lze použít jako mobilní fázi i směs 0,05 M octanu amonného ve vodě a 100 % methanolu [58].

Další možností stanovení vitamínu B12 ve vzorku je metoda využívající kapilární elektroforézu a mikro HPLC kombinovaná s detekční technikou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Jedná se o metodu, která umožňuje poměrně rychlou detekci

různých forem kobalaminů. Výhodou této metody je, že vzorek před samotnou analýzou není třeba komplikovaně zpracovávat. Nevýhodou však je skutečnost, že množství vitamínu, které je možné touto metodou stanovit je výrazně vyšší (od 600 až po 1500 ng/g) než množství, které se v potravinách běžně vyskytuje (3–10 ng/g) (tzn. má nízkou mez detekce) [59].

Stopová množství vitamínu B12 lze stanovit například fluorimetrickou detekcí, která je více selektivní a citlivá. Vitamín B12 ale není přirozeně fluorescenční. Je tedy potřeba z vitamínu B12 uvolnit fluorescenční sloučeninu  $\alpha$ -ribazol pomocí enzymatické a alkalické hydrolyzy [60; 61].

Nejpoužívanější metoda detekce vitamínu B12 je pomocí UV/VIS spektrofotometrického detektoru s fotodiodovým polem. Při tomto způsobu detekce se vzorky proměřují při vlnových délkách 278 nm, 361 nm a 550 nm, protože při nich roztoky kyanokobalaminu vykazují absorpční maxima. Tento způsob detekce je vhodný spíše pro detekci vitamínu B12 v uměle obohacených potravinách, protože se v nich vyskytuje větší množství vitamínu než v potravinářských produktech s přirozeným výskytem. Pro detekci vitamínu B12 například v mase tedy nemusí být dostatečně selektivní a citlivý [42].

#### **1.8.4.1 Mikrobiologická zkouška**

Mikrobiologická zkouška (MBA) je poměrně stará metoda stanovení vitamínu B12 v potravinách. Principem této metody je sledování vývoje určitého mikroorganismu, jehož růst je podmíněný přítomností vitamínu B12 v jeho blízkém okolí [62]. Ačkoliv je MBA metoda ve srovnání s chromatografickou metodou stanovení vitamínu B12 levnější, není dostatečně přesná a je časově náročnější. Nízká selektivita může zapříčinit, že obsah vitamínu bude vyhodnocen o 5 až 30 % vyšší oproti reálnému obsahu, z důvodu reakce MO i na neaktivní formy vitamínu B12 a na další rušivé látky vyskytující se ve vzorku [44]. Stanovení metodou MBA musí předcházet zpracování a extrakce vzorku, která zahrnuje i přeměnu různých forem vitamínu B12 na stabilní kyanokobalamin.

Nejběžněji se stanovení vitamínu B12 provádí s využitím organismu *Lactobacillus delbrueckii* (ATCC 7830), což je také referenční analytická metoda. K vyhodnocení obsahu vitamínu B12 v kojenecké výživě na bázi mléka a v dalších kojeneckých produktech byl dříve využíván mikroorganismus *Lactobacillus leichmanii* [64]. Pro stanovení vitamínu B12 metodou MBA lze využít i další mikroorganismy jako je například *Euglena gracilis* (krásnoočko zelené), *Propionibacterium freudenreichii* nebo geneticky pozměněná *Escherichia coli* [64; 65].



Pro stanovení vitamínu B12 v cereáliích lze použít například *Propionibacterium freudenreichii*. Připravený vzorek cereálií se zaočkuje danou kulturou a inkubuje se při teplotě 30 °C po dobu 168 hodin za nepřítomnosti vzduchu (anaerobně). Při inkubaci dojde k fermentaci a tím k růstu bakteriálních buněk [45]. Tento růst se hodnotí na základě turbidimetrického měření [42].

#### **1.8.4.2 Další metody stanovení**

Ke stanovení vitamínu B12 byly vyvinuty také různé elektrochemické metody. Tyto metody stanovení jsou výhodné zejména díky snadné manipulaci, vysoké citlivosti, nízkým nákladům na analýzu a také přenositelnosti použitého zařízení [64]. Tyto techniky se využívají nejen ke stanovení kobalaminů, ale také ke studiu jejich redoxních charakteristik. Konkrétními elektrochemickými metodami kvantitativní a kvalitativní analýzy vitamínu B12 jsou například jednofázová oscilopolarografie a polarografie s katalytickými vlnami. Iontově selektivní stanovení funguje na principu redukce kyanokobalaminů, při kterém se uvolní kvantitativní množství kyseliny kyanovodíkové. Kyselina kyanovodíková se posléze detekuje za použití kyanidově selektivní membránové elektrody. Kyanokobalaminy lze redukovat kyselinou askorbovou, chloridem cínatým nebo fosforečnanem vápenatým. Alternativně lze kyselinu kyanovodíkovou fotochemicky uvolňovat pomocí 500 W lampy [42].

Další z možností je biospecifická metoda stanovení vitamínu B12 pomocí enzymaticky vázaného imunosorbentu (ELISA). Tato technika využívá specifické interakce protilátky s antigenem [42]. Při analýze se postupuje tak, že se nejprve protilátka adsorbuje na pevnou fázi, což je obvykle polystyren nebo mikrotitrační destička. Po adsorpci se k protilátce přidá vzorek obsahující měřený antigen. Poté dochází k navázání antigenu na receptory přítomných protilátek. Následně se přidá druhá protilátka, která je označena enzymem. Posléze se přidá enzymový substrát, který je vybraný tak, aby s antigenem a vytvořil barevný produkt. Míra zabarvení je úměrná množství antigenu [65]. Výhodou je nízká cena testů, rychlost a také používání stabilních a nereaktivních činidel. [42].

Vitamin B12 je možné stanovit také s využitím chemiluminiscence (CL). Při CL se měří světlo, které je vyzařované v důsledku probíhající chemické reakce [42]. K analýze se používá zařízení zvané luminometr [67]. Při analýze vitamínu B12 v mateřském mléku se postupuje tak, že se nejprve vzorek podroben varu v přítomnosti dithiothreitolu (DTT) a kyanidu draselného (KCN), aby došlo k uvolnění vitamínu z proteinů [68]. Tato metoda využívá interakce antigenu (vitamínu B12) a protilátky, kterou je v tomto případě vnitřní faktor (IF). IF, který je značený rutheniem, je nejprve inkubován s připraveným vzorkem. Poté se ke směsi přidá biotinylovaný vitamin B12 a streptavidin. Biotinylace je modifikací, která umožňuje vitamínu snadnější

navázání na streptavidin. Následně jsou obsazena dosud volná vazebná místa na značeného IF komplexem antigenu. Celý komplex se váže na pevnou fázi prostřednictvím interakce mezi biotinem a streptavidinem. Reakční směs je následně převedena do měřicí cely, kde jsou vzniklé komplexy zachyceny prostřednictvím magnetu na pracovní elektrodu. Směs je posléze stimulována napětím přivedeným prostřednictvím pracovní elektrody, které způsobí uvolnění světla. Toto světlo je nepřímo úměrné měřenému množství vitamínu B12 [69].

Výhodami CL je jednoduchost, dostatečná citlivost a selektivita. Představuje vhodnou alternativu pro stanovování různých organických a anorganických látek [70].

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Přístroje a zařízení

Standart vitamínu B12 byl navážen pomocí digitálních analytických vah s přesností na čtyři desetinná místa od značky Sartorius, model BP 211 D (Sartorius, Göttingen, Německo). Maso, šťáva z masa a potřebné chemikálie k analýze byly naváženy na digitálních analytických vahách s přesností na tři desetinná místa značky KERN, model ABT 220–4M (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo).

K úpravě pH roztoku octanu sodného byl používán pH metr značky SCHOTT, model CG 842 (SCHOTT GLAS, Mainz, Německo).

Objemy roztoku standartu pro přípravu kalibrační řady a dalších chemikálií byly vyměřeny automatickými pipetami Biohit-Proline (Biohit, Helsinky, Finsko) a Sartorius Proline (Sartorius, Göttingen, Německo). Pro velmi malé objemy v řádu desítek až stovek  $\mu\text{l}$  byly použity mikropipety značky Hamilton (Reno, Nevada, USA).

Maso bylo rozmixováno pomocí nožového mlýnu Grindomix GM 200 (Retsch; Verder s.r.o., Praha, Česká republika) a následně bylo homogenizováno za použití homogenizátoru IKA Ultra Turrax (Staufen, Německo). Poté se vzorky inkubovaly ve vodní lázni značky Memmert (Büchenbach, Německo), jejíž součástí byla i třepačka. Následně byly zhomogenizovány a inkubované vzorky odstředěny na odstředivce Sorvall ST Plus Series (Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

Supernatant byl zakoncentrován a pročištěn na imunoafinitních kolonách EASI-EXTRACT® VITAMIN B12 (produktové číslo P80/P80B; R-Biopharm, Darmstadt, Německo). Vialky obsahující eluát byly vysušeny za použití vyhřívaného bloku Dry block heater 1 (IKA, Staufen, Německo). Poté byly vialky s rozpuštěným eluátem protřepány na třepačce Vortex 1 (IKA, Staufen, Německo).

Ultra čistá voda pro mobilní fázi byla připravena za použití zařízení MilliQ (Merck Millipore, Německo). Voda byla okyselena kyselinou mravenčí a pak byla přefiltrována membránovou vývěvou KnF N035 AN.18 (KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Německo), obsahující filtr Milipak® Express s póry o velikosti  $0,45 \mu\text{m}$ .

Analýza byla prováděna v HPLC systému Agilent 1290 Infinity s detektorem s diodovým polem (Agilent 1200 Infinity Series Diode Array Detector (G4212B)); Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Byla použita chromatografická kolona plněná povrchově porézními částicemi Kinetex PFP 100 A, 150×3 mm s velikostí částic 2,6 μm od firmy Phenomenex (Torrance, USA). Chromatografický systém se skládal z několika částí:

- automatický dávkovač (Agilent 1290 Infinity Autosampler (G4226A));
- čerpadlo mobilní fáze (Agilent 1290 Infinity Binary Pump (G4220A));
- termostat kolon (Agilent 1200 Series Thermostatted Column Compartment (G1316A));

### **2.1.1 Chemikálie a vzorky**

#### **2.1.2 Chemikálie**

Při analýze bylo použito mnoho různých chemikálií. Pro přípravu roztoku standartu vitamínu B12 byl použit vitamín B12 (CAS 68-19-9; Cyanocobalamin, V2876-1G; čistota ≥ 98 %) od firmy Sigma-Aldrich (Louis, Missouri, USA). Octanový pufr byl připraven z bezvodého octanu sodného od firmy Lach-Ner, s.r.o. (Neratovice, Česká republika). Pro přípravu roztoku kyanidu sodného byl použit kyanid sodný od firmy Sigma-Aldrich (Louis, Missouri, USA).

Pro okyselení roztoků a úpravu pH byly využity kyselina octová od firmy Penta s.r.o. (Praha, Česká republika) a kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, Louis, Missouri, USA).

Pro uvolnění vitamínu ze složek masa byly použity enzymy α-amyláza (A3176- -1MU; ≥ 10 jednotek/1 mg) a pepsin (P7125; ≥ 400 jednotek/1 mg) od firmy SigmaAldrich (Louis, Missouri, USA).

Vitamín B12 byl v imunoafinitní kolonce eluován pomocí methanolu od firmy Honeywell (Chralotte, USA).

Mobilní fázi HPLC systému představovala ultračistá voda, která byla připravena prostřednictvím systému na čištění vody Ultrapure Lab Water (Milli-Q ®; Merck Millipore, Německo) v kombinaci s acetonitrem od firmy Sigma-Aldrich (Louis, Missouri, USA). Mobilní fáze byla okyselená malým množstvím kyseliny mravenčí.

### 2.1.3 Vzorky

K potřebám analýzy byly zakoupeny tři kusy masa, konkrétně jedno vepřové a dvě hovězí. V Tabulce 4 je uveden přehled jednotlivých druhů masa, země jejich původu a řetězce, ve kterém byly zakoupeny. Maso bylo vybíráno tak, aby bylo dostatečně libové s minimálním obsahem tukových vláken. Kuřecí maso analyzováno nebylo, viz. vysvětlení v kapitole 3.

**Tabulka 4 Použité vzorky pro analýzu**

Maso	Druh	Prodávající	Země původu	Typ balení
Hovězí	Kýta	Globus ČR, v.o.s. Kostecká 822/75 19600 Praha 9 Čakovice	Česká republika	Baleno v ochranné atmosféře, chlazené
	Váleček			
Vepřové	Kýta	Kaufland ČR, v.o.s. Bělohorská 2428/203, Břevnov (Praha 6), 169 00		Pultový prodej, chlazené

## 2.2 Pracovní postup

### 2.2.1 Příprava roztoků kalibrační řady

Obsah vitamínu B12 byl vyhodnocen prostřednictvím metody kalibrační závislosti. Nejprve byl připraven zásobní roztok standartu vitamínu B12 o koncentraci 1 mg/ml navážením přesně cca 0,1 g standartu do 100ml odměrné baňky a baňka byla doplněna ultračistou vodou po rysku. Z tohoto zásobního roztoku byl připraven pracovní roztok o koncentraci 12,5 µg/ml odpipetováním 625 µl do 50 ml odměrné baňky. Tento pracovní roztok byl následně použit pro vytvoření roztoků kalibrační řady. Postupným ředěním byly připraveny roztoky o koncentracích 0,1 až 0,005 µg/ml. Pro každou koncentraci byly připraveny vždy dva roztoky.

### 2.2.2 Příprava vzorků

Obsah vitamínu B12 byl zjišťován v tepelně upraveném mase a pro výsledné porovnání ztrát vitamínu během tepelné úpravy i v mase syrovém. Dále byl obsah vitamínu B12 zjišťován také ve šťávě, která se z masa uvolnila během tepelné úpravy.

Maso bylo naporcováno na vzorky o hmotnosti cca 80 g. Z každého masa byly připraveny čtyři vzorky, dva zůstaly v syrovém stavu a dva byly tepelně upraveny. Všechny vzorky byly před

analýzou zváženy. Maso bylo připraveno metodou sous-vide, což je technika, při které je maso umístěno v neprodyšném sáčku, ze kterého byl odstraněn vzduch. Následně je zahříváno ve vodní lázni při konstantní teplotě, která je nižší než bod varu vody. Všechny vzorky použitého masa se připravovaly při teplotě 60 °C po dobu kolem čtyř hodin. Poté se od uvařeného masa nejprve opatrně oddělila uvolněná šťáva a zvážíla se. Potom bylo zváženo i samotné uvařené maso.

### **2.2.3 Příprava roztoků k analýze**

Pro další postup bylo nezbytné připravit si roztok octanového pufru o koncentraci 50 mmol/l, jehož pH se doupravilo kyselinou octovou na hodnotu 4,2 a 1% roztok kyanidu sodného.

### **2.2.4 Uvolnění vitamínu B12 z masa**

Vzorky masa v syrovém nebo uvařeném stavu byly nejprve nakrájeny na malé kousky, poté vloženy do nožového homogenizátoru a důkladně rozemlety při 10 000 otáčkách po dobu deseti sekund. Z takto upraveného vzorku masa bylo naváženo přibližně 30 g do 100 ml lahve obalené alobalem a potom bylo přidáno 50 ml octanového pufru. Poté se tato směs vzorku s pufrem zhomogenizovala v ultrazvukovém homogenizátoru Ultra Turrax. Ke směsi pak bylo přidáno 1,5 ml 1% roztoku kyanidu sodného, aby došlo k převedení všech forem vitamínu B12 na stabilní formy. Následně byly přidány 2 g pepsinu a 0,05 g  $\alpha$ -amylázy, které působily na uvolnění vitamínu B12 z masa. Lahev se směsí byla promíchána protřepáním a umístěna do vodní lázně vyhřáté na 37 °C, ve které se inkubovala 30 minut. Po uplynutí této doby byla lahev přemístěna do vodní lázně vyhřáté na 95 °C a inkubována dalších 30 minut. Potom byla lahev z vodní lázně vyndána a temperována na laboratorní teplotu. Po vytemperování byla směs doplněna octanovým pufrem na 100 ml a nechala se sedimentovat. Kapalná fáze byla poté odebrána pipetou do 50 ml centrifugační zkumavky a odstředěna rychlostí 10000 ot/min (13640x g) po dobu 10 minut. Šťáva, která byla odebrána od vařeného masa, byla také odstředěna, a to za stejných podmínek. Kapalná fáze zbavená pevných částic byla takto připravena k zakoncentrování a přečištění na imunoafinitní koloně.

### **2.2.5 Imunoafinitní přečištění a zakoncentrování**

Kolonky byly minimálně 30 minut temperovány na laboratorní teplotu. Po odšroubování víčka se nechal odkapat stabilizační roztok. Následně bylo na kolonku nanášeno 15 ml supernatantu, poté se promyla 10 ml deionizované vody a vysušila 10 ml vzduchu. Vitamín B12 byl poté eluován 3 ml methanolu. Eluát byl následně umístěn do vyhřívacího bloku vyhřátého na 50 °C

a vysušen proudem dusíku. Potom byl vitamín B12 rekonstituován 300 µl mobilní fáze (ultra čistá voda + 0,1% kyselina mravenčí) a vialka byla protřepána na Vortexu.

### 2.2.6 Chromatografická analýza

Chromatografická analýza vitamínu B12 probíhala za použití chromatografické kolony Kinetex 2,6 µm PFP 100 A o délce 150 mm a průměru 3 mm. Mobilní fázi byla směs ultra čisté voda s acetonitrilem, přičemž obě složky byly okyseleny kyselinou mravenčí. Analýza probíhala v režimu gradientové eluce, jejíž průběh v čase je popsán v tabulce 5. V průběhu analýzy byl zachovávan konstantní průtok 0,3 ml/min. Teplota kolona byla 40 °C. Vzorek byl do systému dávkován po 20 µl a detekce probíhala při vlnové délce 361 nm a 550 nm. V průběhu celé separace byly sbírány UV/VIS spektra.

**Tabulka 5 Průběh gradientové eluce**

Čas [minuty]	0,1% kyselina mravenčí v ultračisté vodě [%]	0,1 % kyselina mravenčí v acetonitrilu [%]
0	95	5
15	80	20
20	5	95
21	95	5

### 2.2.7 Vyhodnocení a zpracování dat

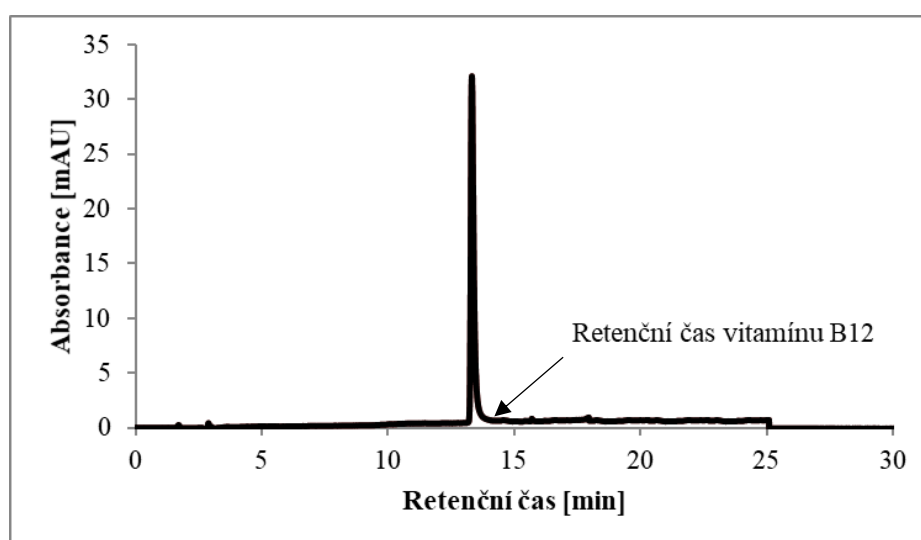
Chromatogramy byly získány a zpracovány programem OpenLab CDS ChemStation Edition for LC & LC/MS Systems (Agilent Technologies, USA). Výsledky měření byly zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2016 a Microsoft Office Word 2019

### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Maso je pro člověka zdrojem poměrně velkého množství živin včetně mikroživin, jako jsou například vitamíny. Vitamíny se v maso nejvíce vyskytují v čerstvém syrovém stavu. Pro člověka však může být konzumace syrového masa značně riziková. Maso se proto před konzumací v naprosté většině případů tepelně upravuje, což způsobuje určitou ztrátu obsahu vitamínů. Dá se obecně říct, že maso, které je tepelně zpracované není tak bohaté na živiny jako maso syrové.

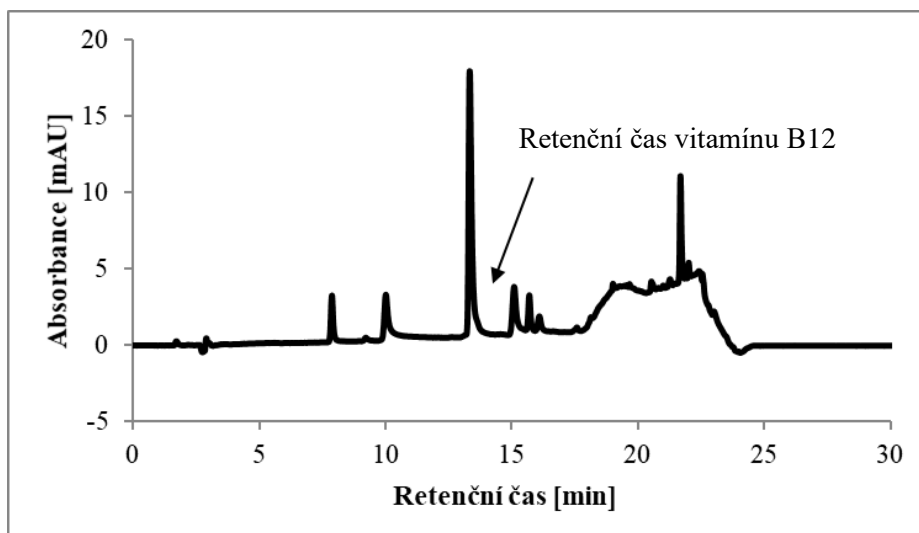
Tato bakalářská práce navazuje na diplomovou práci Ing. Ley Šarkové – Stanovení vitamínu B12 v maso [72]. Cílem bylo více prostudovat, jak velké ztráty vitamínu B12 způsobí tepelná úprava metodou sous-vide, zda dochází vlivem vaření při nízké teplotě ke ztrátám vitamínu B12, nebo tento vitamín přechází do šťávy, která zůstává v uzavřeném sáčku po úpravě. K analýze bylo použito hovězí a vepřové maso. Záměrně nebylo použito maso kuřecí, protože podle zjištěných poznatků je množství vitamínu B12 v tomto maso velmi malé [72].

Podmínky přípravy vzorku i vlastní analýzy byly převzaty z výše zmíněné diplomové práce. Vzorek masa byl nejprve zhomogenizován a rozložen směsí enzymů z důvodu uvolnění vitamínu B12. Následně byl vitamín B12 z uvařených nebo syrových vzorků nejprve extrahován, poté přečištěn a zakoncentrován na imunoafinitní koloně a následně analyzován za použití metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detekcí. Ukázkový chromatogram standardu vitamínu B12 a vzorku jsou na obrázcích 8 a 9. Retenční čas vitamínu B12 byl 13,44 min. Současně s vařeným masem byla i šťáva, která se uvolnila z masa a zůstala v plastovém sáčku po tepelné úpravě, testována na přítomnost vitamínu B12.



Obrázek 8 Chromatogram standardu vitamínu B12

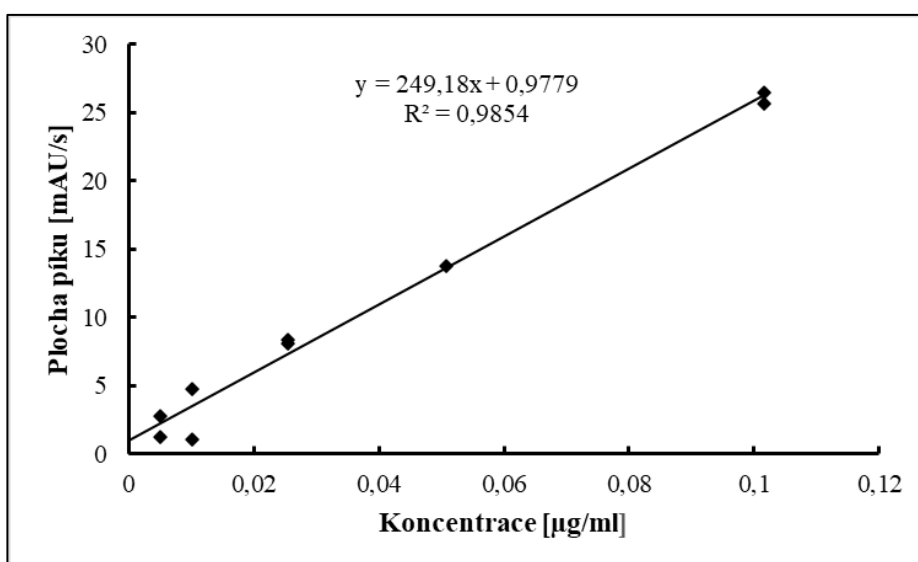




Obrázek 9 Chromatogram vzorku

### 3.1 Kalibrační závislost

Koncentrace vitamínu B12 byla vyhodnocována metodou kalibrační závislosti plochy píku vitamínu B12 na koncentraci. Tato metoda umožňuje stanovit neznámou koncentraci sledované látky ve vzorku prostřednictvím řady roztoků o známých koncentracích. K tomuto účelu byly připraveny roztoky standardu vitamínu B12 o koncentracích 0,1 až 0,005  $\mu\text{g/ml}$ . Kalibrační přímka představuje lineární závislost koncentrace roztoků na velikosti plochy píku. Ke kvantifikaci byla použita data naměřená při vlnové délce 361 nm, při které má kobalamin absorpční maximum. Výsledná kalibrační přímka je uvedena na Obrázku 10 a hodnoty ploch píku jsou uvedeny v Příloze 1. Koefficient determinace regresní závislosti,  $R^2$ , jakožto parametr linearit kalibrační přímky měl hodnotu 0,9854.



Obrázek 10 Kalibrační křivka standartu vitamínu B12

## 3.2 Analýza vzorků masa

K analýze byla vybrána hovězí kýta, hovězí váleček a vepřová kýta. Tyto druhy mas byly vybrány jednak z důvodu, že jsou obecně často konzumované a jednak kvůli potřebám analýzy, aby bylo maso co nejvíce libové. Dalším z důvodů je, že podle dat vycházejících z práce L. Šarkové obsahuje hovězí i vepřové maso detekovatelné množství vitamínu B12 i po tepelné úpravě. Kuřecí maso obsahovalo po tepelné úpravě minimální množství vitamínu B12, a proto bylo záměrně z analýzy vynecháno.

Masa byla zpracována metodou sous-vide při podmínkách, které byly podrobně popsány v kapitole 2.2.2. Samotná tepelná úprava masa uzavřeného neprodyšně v sáčku byla provedena při 60 °C po dobu 4 hodin ve vodní lázni. Tato technika tepelné úpravy byla vybrána proto, že vaření masa tímto způsobem provázají nejnižší hmotnostní ztráty v porovnání s jiným tepelným zpracováním a také proto, že šťáva, která se během vaření uvolní, se díky použití sáčku nikam neztratí a může být taktéž analyzována [72]. Maso bylo tepelně upraveno dostatečným způsobem tak, aby nebylo maso ani uvnitř syrové.

Z jednoho kusu masa byly vždy připraveny čtyři vzorky mas, přičemž dva vzorky zůstaly v syrovém stavu a zbylé dva vzorky byly podrobeny tepelné úpravě. Další dva vzorky představovala šťáva uvolněná masa během tepelné úpravy. Následně byly vzorky masa upraveny tak, aby se uvolnil vitamín B12, a vzorek byl zcentrifugován. Byl získán roztok obsahující vitamín B12. Poté byl vitamín zachycen na imunoafinitních kolonkách, eluován methanolem, a nakonec byl stanoven za použití HPLC s UV detekcí. Postup je detailněji popsán v kapitole 2.2.3 a 2.2.4.

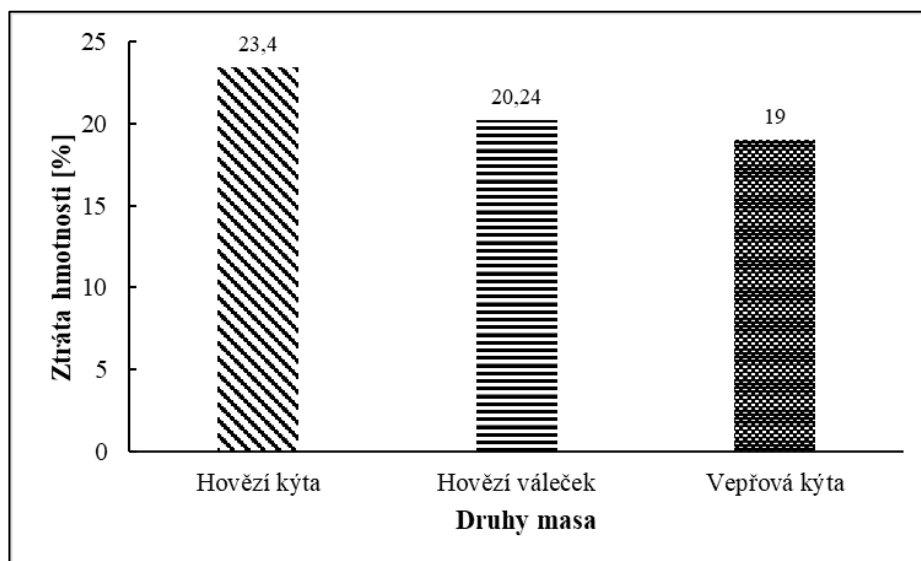
Koncentrace vitamínu B12 v masech i šťávách byly zjištěny pomocí kalibrační přímky a přepočteny na  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  masa syrového i uvařeného. U vařeného masa byla také přepočítána koncentrace vitamínu na původního hmotnost masa (koncentrace se započítanou ztrátou hmotnosti), neboť hmotnostní ztráty byly u každého druhu masa jiné a ke stanovení bylo vždy vzato stejné množství vzorku.

### 3.2.1 Hmotnostní ztráty masa vlivem tepelné úpravy

Pokles hmotnosti masa během tepelné úpravy s sebou nese i úbytek živin, potažmo i ztrátu vitamínu B12. Jelikož navážka vzorku nebyla vždy stejná a množství uvolnění kapaliny mohlo být různé, byly zjišťovány i hmotnostní ztráty, ke kterým docházelo během tepelné úpravy.

Každý vzorek byl zvážen před vařením a po vaření, aby mohl být vypočten hmotnostní úbytek způsobený tepelnou úpravou. Průměrná procenta ztrát z každého druhu masa jsou uvedena

v Obrázku 11 a hmotnosti jednotlivých vzorků jsou uvedeny v Příloze 2. Tyto průměrné hodnoty byly následně použity k výpočtu koncentrace vitamínu B12 se započítanou ztrátou hmotnosti.



**Obrázek 11 Hmotnostní ztráty masa upraveného metodou sous – vide**

Ve srovnání s hmotnostními ztrátami vlivem jiných způsobů tepelných zpracování je metoda vaření ve vakuu poměrně šetrná. Díky nízkým teplotám vaření (kolem 60 °C) totiž nedochází k uvolnění tuku z masa. Použitím vakua je rovněž zamezeno uvolnění většího množství vody. Největší hmotnostní ztráty byly u hovězí kýty (23,4 %) a nejmenší u vepřové kýty (19 %). Rozdíl ve hmotnostních ztrátách hovězího masa z kýty a hovězího válečku může být důsledkem toho, že maso z různých částí těl může mít jiný obsah vody a tuku. Měření přineslo výsledky, které jsou srovnatelné s daty publikovanými v práci L. Šarkové [72].

### 3.2.2 Hovězí maso

Hovězí maso je surovinou, která je velmi dostupná a často konzumovaná. Obvykle není prorostlé tukovými vlákny ani vazivy, jedná se tedy o libové maso.

#### 3.2.2.1 Hovězí kýta

Průměrné výsledky měření obsahu vitamínu B12 v hovězí kýtě jsou uvedené v následující Tabulce 6. V Příloze 3 a 4 jsou uvedeny výsledky měření u jednotlivých vzorků.

**Tabulka 6 Koncentrace vitamínu B12 v hovězí kýtě**

Stav masa	Koncentrace [µg/100 g]	Koncentrace se započtenou ztrátou hm. [µg/100 g]	Ztráta vitamínu oproti syrovému [%]
Syrové	1,06	-	-
Vařené	0,98	0,75	29,3
Šťáva	0,07	-	-

V syrové hovězí kýtě byla naměřena poměrně vysoká hodnota vitamínu B12 (1,06 µg/100 g) a v uvařeném mase se jej i dost zachovalo – koncentrace se započtenou ztrátou hmotnosti masa vlivem tepelné úpravy byla průměrně 0,75 µg/100g masa.

Ztráta činidla pouhých 29,3 %. Výsledky měření jsou ve srovnání s výsledky publikovanými v práci L. Šarkové rozdílné, uvedená ztráta vitamínu B12 je až kolem 58 %. Rozdílné výsledky analýzy stejných kusů masa mohou být zapříčiněny například různým stářím masa a různou zdravotní kondicí zvířat, ze kterých maso pocházelo. Z hodnoty v tabulce vyplývá, že se ve šťávě z masa vitamín B12 vyskytuje, ale pouze ve velmi malém množství (0,07 µg/100g šťávy).

### 3.2.2.2 Hovězí váleček

Výsledky měření obsahu vitamínu B12 v hovězím válečku jsou uvedené v následující Tabulce 7. Výsledky měření jednotlivých vzorky jsou uvedené v Příloze 5 a 6.

**Tabulka 7 Koncentrace vitamínu B12 v hovězím válečku**

Stav masa	Koncentrace [µg/100 g]	Koncentrace se započtenou ztrátou hm. [µg/100 g]	Ztráta vitamínu oproti syrovému [%]
Syrové	1,12	-	-
Vařené	0,45	0,36	67,8
Šťáva	0,11	-	-

Podle výsledků měření je hovězí váleček v syrovém stavu ještě bohatší na vitamín B12 než hovězí kýta. Je překvapivé, že tepelnou úpravou ztratil až 67,8 %.

### 3.2.3 Vepřové maso

Vepřové maso je další velmi často konzumované maso v České republice. Na rozdíl od hovězího je více tučné a obsahuje menší množství bílkovin a je také hůře stravitelné.

#### 3.2.3.1 Vepřová kýta

Výsledky měření obsahu vitamínu B12 ve vepřové kýtě jsou uvedené v následující Tabulce 8. Výsledky měření jednotlivých vzorky jsou uvedené v Příloze 7 a 8.

**Tabulka 8 Koncentrace vitamínu B12 ve vepřové kýtě**

Stav masa	Koncentrace [µg/100 g]	Koncentrace se započtenou ztrátou hm. [µg/100 g]	Ztráta vitamínu oproti syrovému [%]
Syrové	0,81	-	-
Vařené	0,28	0,23	71,8
Šťáva	0,17	-	-

Vepřové maso obsahovalo menší množství vitamínu B12 než maso hovězí (0,81 µg/100 g) a mělo i větší ztráty vitamínu B12 vlivem tepelné úpravy (71,8 %). Naproti tomu se do šťávy uvolnilo větší množství vitamínu ve srovnání s jeho koncentracemi ve šťávě z masa hovězího (0,17 µg/100g šťávy). Výsledky měření se výrazně liší od výsledků v práci L. Šarkové. Podle jejích publikovaných výsledků měření bylo v uvařeném mase naměřeno mnohem menší množství vitamínu B12 (0,11 µg/100 g) a ztráty byly také mnohem menší (kolem 48 %). Tyto rozdíly se mohou vyskytnout opět z důvodů záviselých na různém stáří masa, kondici zvířete, ze kterého maso pocházelo, ale i na míře tepelné úpravy.

### 3.3 Rozdělení vitamínu B12 v mase a šťávě

Teoreticky by měl součet koncentrace vitamínu B12 v mase tepelně upraveném a ve šťávě z masa dávat hodnotu koncentrace vitamínu B12 v mase syrovém. Ve skutečnosti však vitamín B12 může degradovat vlivem tepla, vzduchu a světla. Maso je metodou sous-vide upravováno při relativně nízkých teplotách, ve srovnání s jinými druhy tepelných úprav, avšak poměrně dlouhou dobu [72]. Degradace vitamínu B12 by proto teoreticky neměla být velká.

**Tabulka 9 Průměrné procentuální zastoupení vitamínu B12 ve vařeném mase metodou sous-vide a ve šťávě z masa vypočítané z obsahu vitamínu B12 v syrovém mase**

Druh masa	Obsah vitamínu B12		
	Syrové maso [%]	Vařené maso [%]	Šťáva z masa [%]
Hovězí kýta	100	92,2	1,0
Hovězí váleček	100	40,3	1,3
Vepřová kýta	100	34,9	2,5

V Tabulce 9 je pro každý druh masa v procentech uvedeno, kolik vitamínu B12 se zachovalo po tepelné úpravě a kolik se ho uvolnilo do šťávy. Výpočet vychází z průměru množství vitamínu B12 naměřeného ve vzorcích syrového masa jakožto celku a zachovaný zbytek je vypočten z průměru hodnot naměřených ve vzorcích vařeného masa.

Podle dat uvedených v Tabulce 9 se ve vzorcích hovězí kýty zachovalo průměrně až 92,2 % vitamínu B12, což je ve srovnání s ostatními vzorky masa nejvíce. Naproti tomu se do šťávy z vařené vepřové kýty uvolnilo nejméně vitamínu B12 (1 %). V hovězím válečku se vitamín B12 zachoval průměrně jen ze 40,3 %, což je překvapivé, protože by se dalo předpokládat, že obsah vitamínu B12 by mohl být podobný jako v hovězí kýtě, neboť se v obou případech jedná o kvalitní hovězí maso. Vepřová kýta je na vitamín B12 nejhudší, zachovalo se pouze 34,9 %, do šťávy se ale uvolnilo nejvíce (2,5 %). Vitamín B12, který se ve vzorcích masa nedochoval, nejpravděpodobněji degradoval vlivem tepla při vaření. Kompletní výsledky jsou v Příloze 9.

## ZÁVĚR

Stanovení vitamínu B12 ve vzorcích potravin není jednoduchým úkolem. Vitamín B12 se obvykle vyskytuje ve velmi nízkých koncentracích, jeho koenzymové formy jsou citlivé na okolní podmínky a velmi často je nutné jej uvolnit z vazeb na bílkoviny. Důležité je zpracování vzorku před samotným stanovením. To se obvykle skládá z několika kroků, při kterých se vitamín B12 extrahuje ze vzorku, stabilizují se jeho koenzymové formy a následně se přečistí a zakoncentruje.

Cílem analýzy bylo určení ztrát vitamínu B12 v mase tepelně upraveném metodou sous-vide a také určení jeho obsahu ve šťávě uvolněné z vařeného masa. Pro stanovení byly vybrány tři druhy mas – hovězí kýta, hovězí váleček a vepřová kýta. Pro porovnání ztrát vitamínu B12 v tepelně upraveném mase bylo vždy analyzováno i syrové maso. Maso bylo dostatečně tepelně upraveno a poté mechanicky rozmělněno. Vitamín B12 byl poté z bílkovinných vazeb uvolněn enzymatickým rozkladem. Poté, co byl vitamín B12 stabilizován působením kyanidu sodného, byl zachycen a přečištěn na imunoafinitní koloně a následně stanoven za použití HPLC s UV spektrofotometrickou detekcí.

Z výsledků je patrné, že vzorkem masa, obsahující nejméně vitamínu B12 před i po tepelné úpravě je vepřová kýta (0,23  $\mu\text{g}/100$  g masa vč. započtené ztráty hmotnosti). Nejvíce vitamínu B12 se dochovalo v hovězí kýtě (0,75  $\mu\text{g}/100$  g). V syrovém hovězím válečku bylo naměřeno ještě vyšší množství vitamínu B12 než v syrové hovězí kýtě, avšak ztráty vlivem tepelné úpravy byly dvakrát vyšší. Ve výsledku se pak obsah vitamínu B12 v uvařeném hovězím válečku příliš nelišil od obsahu vitamínu B12 v uvařené vepřové kýtě (0,36  $\mu\text{g}/100$  g masa). Tento výsledek je překvapivý, protože by se dalo předpokládat, že obsah vitamínu B12 po tepelné úpravě v hovězím válečku bude srovnatelný s obsahem vitamínu B12 v hovězí kýtě, jelikož se v obou případech jedná o hovězí maso. Po výsledném propočítání hodnot koncentrací vitamínu B12 ve vzorcích bylo zjištěno, že v hovězí kýtě bylo průměrně zachováno až 92 %, do šťávy z vařené hovězí kýty se uvolnilo pouze 1 %. Nejméně se zachovalo ve vepřové kýtě (34,9 %), přičemž ve šťávě bylo nalezeno 2,5 % vitamínu B12. Hovězí váleček na tom byl s obsahem zbylého vitamínu B12 o trochu lépe než vepřová kýta (40,3 %).

Většina výsledků se výrazně liší od výsledků publikovaných v diplomové práci Ing. L. Šarkové. V syrových vzorcích masa vepřového a hovězího byly naměřeny mnohem nižší hodnoty obsahu vitamínu B12. Rovněž ztráty vitamínu B12 vlivem tepelné úpravy jsou odlišné, například ztráta vitamínu B12 v hovězí kýtě se liší téměř o polovinu.

Významným poznatkem je to, že obsah vitamínu B12 v mase stejného druhu se může výrazně lišit, protože hodně záleží i na stáří a kondici poraženého zvířete a na vlivu okolních podmínek během uchovávání masa.

Zajímavým námětem pro další závěrečnou práci by mohlo být srovnání obsahu vitamínu B12 v mase pocházejícího z ekofaremu a v mase dostupného v běžných řetězcích, které má většinou původ v konvenčním chovu.



## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] MARTINKA, Ivan. Neurologické prejavy deficitu vitamínu B12. *Neurologie pro praxi*. 2013, 14(6), s. 287-291.
- [2] SMITH, David A., Martin J. WARREN a Helga REFSUM. Chapter Six – Vitamin B12. 83. *Advances in Food and Nutrition Research*. Academic Press, 2018. s. 215-279. ISBN 9780128118030. DOI: 10.1016/bs.afnr.2017.11.005
- [3] SCOTT, John W. Vitamin B12. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. Hoboken, USA: John Wiley & Sons, 2000. s. 1-26. ISBN 9780471238966. DOI: 10.1002/0471238961.2209200119031520.a01
- [4] GIEDYK, M., K. GOLISZEWSKA a D. GRYKO. Vitamin B12 catalysed reactions. *Chemical Society reviews*. 2015, 44(11), s. 3391-3404. DOI: 10.1039/c5cs00165j
- [5] FENNEMA, Owen R., Srinivasan DAMODARAN a Kirk L. PARKIN. *Fennema's Food Chemistry*. 5. vydání. Boca Raton, USA: CRC Press, 2017. ISBN 9781482208122.
- [6] Food Chemicals Codex – Interactive Table of Food Ingredient Properties. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/itble/rcid:kpFCCE0002/id:kt008H1D72/food-chemicals-codex/food-chemi-chemicals-codex>
- [7] INDYK, Harvey E, Bjorn S PERSSON, Malin C B CASELUNGHE, Anna MOBERG, Enrico L FILONZI a David C WOOLLARD. Determination of Vitamin B12 in Milk Products and Selected Foods by Optical Biosensor Protein-Binding Assay: Method Comparison. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 2002, 85(1), s. 72-81. DOI: 10.1093/jaoac/85.1.72
- [8] PEREIRA, João, Manuel SIMÕES a Joana L. SILVA. Microalgal assimilation of vitamin B12 toward the production of a superfood. *Journal of food biochemistry*. 2019, 43(8), s. 9-15. DOI: 10.1111/jfbc.12911
- [9] ALLEN, Lindsay H. Vitamin B-12. *Advances in Nutrition: An international review journal*. 2012, 3(1), s. 54-55. DOI: 10.3945/an.111.001370
- [10] WANATABE, Fumio. Vitamin B12 Sources and Bioavailability. *Experimental Biology and Medicine*. 2007, 232(10), s. 1266-1274. DOI: 10.3181/0703-MR-67
- [11] O'LEARY, Fiona a Samir SAMMAN. Vitamin B12 in Health and Disease. *Nutrients*. 2010, 2(3), s. 299-316. DOI: 10.3390/nu2030299
- [12] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. 2. vydání. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-866-59011.
- [13] GROPPER, Sareen S. a Jack L. SMITH. *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. 6. vydání. Cengage Learning, 2012. ISBN 9781285401133.
- [14] STIPANUK, Martha H. a Marie A. CAUDILL. *Biochemical, Physiological, and Molecular Aspects of Human Nutrition*. 4. vydání. Elsevier Health Sciences, 2018. ISBN 9780323402132.

- [15] MOLL, Rachel a Bernard DAVIS. Iron, vitamin B12 and folate. *Medicine*. 2017, 45(4), s. 198-203. DOI: 10.1016/j.mpmed.2017.01.007
- [16] LANGAN, Robert C. a Andrew J. GOODBRED. Vitamin B12 Deficiency: Recognition and Management. *American Family Physician*. 2017, 96(6), s. 384-389.
- [17] ALLEN, Lindsay H. How common is vitamin B-12 deficiency? *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2008, 89(2), s. 693-696. DOI: 10.3945/ajcn.2008.26947A
- [18] SHIPTON, Michael J a Jecko THACHIL. Vitamin B12 deficiency – A 21st century perspective. *Journal of Clinical Medicine*. 2015, 15(2), s. 145-150. DOI: 10.7861/clinmedicine.15-2-145
- [19] GAYATHRI, B. N. a Kadam Satyanarayan RAO. Pancytopenia: A Clinico Hematological Study. *Journal of Laboratory Physicians*. 2011, 3(1), s. 15-20. DOI: 10.4103/0974-2727.78555
- [20] BIZZARO, Nicola a Antonio ANTICO. Diagnosis and classification of pernicious anemia. *Autoimmunity Reviews*. 2014, ročník 13, s. 565-568. DOI: 10.1016/j.autrev.2014.01.042
- [21] MARTENS, J.H., H. BARG, M WARREN a D. JAHN. Microbial production of vitamin B12. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002, ročník 58, s. 275-285. DOI: 10.1007/s00253-001-0902-7
- [22] DONG, Michael W. *Modern HPLC for practicing scientists*. Hoboken, USA: John Wiley, 2006. ISBN 978-0471727897.
- [23] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013, 2 sv. (299, 235 s.). ISBN 978-80-260-4243-3.
- [24] SZABOLCS, Fekete, Julie SCHAPPLER, Jean-Luc VEUTHEY a Davy GUILLARME. Current and future trends in UHPLC. *Trends in Analytical Chemistry*, 2014, 63, s. 2-13. DOI: 10.1016/j.trac.2014.08.007
- [25] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-030-0569-8.
- [26] OPEKAR, František a kol. *Základní analytická chemie*. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 9788024617756.
- [27] ŠVANCARA, Ivan a kol. *Úvod do instrumentální analýzy – interní učební texty*. 2015-2019. Univerzita Pardubice. Dostupné z intranetu Univerzity Pardubice.
- [28] HARVEY, David. *Modern Analytical Chemistry*. USA: McGraw-Hill, 2000. ISBN 0072375477.
- [29] OLŠOVSKÁ, Jana a Marie JURKOVÁ. *Nové trendy v kapalinové chromatografii a jejich využití v analýze piva a pivovarských surovin. Část 1. Teoretický úvod. Kvasný průmysl*. 2012, 58(2), s. 30-35. DOI: 10.18832/kp2012005

- [30] ALI, Imran, Zeid A. AL-OTHMAN a Mohammed AL-ZA'ABI. Superficially porous particles columns for super fast HPLC separations. *Biomed Chromatography*. 2012, 26(8), s. 1001-1008. DOI:10.1002/bmc.2690
- [31] GRITTI, Fabrice, Irene LEONARDIS, Jude ABIA a Georges GUIOCHON. Physical properties and structure of fine core-shell particles used as packing materials for chromatography Relationships between particle characteristics and column performance. *Journal of Chromatography A*. 2010, 1217(24), s. 3819-3843. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.04.026
- [32] RAIS, D., J. HAIN, A. PICH, S. POCHKAILOV, S. NEŠPŮREK, H. J. P. ADLER, A. HAMÁČEK a J. ŘEBOUN. Electrical conductivity in thin films fabricated from nanoparticles of a polymeric composite based on PEDOT. *Materials Science-Poland*. 2009, 27(3), s. 769-780
- [33] Detektory pro kapalinovou chromatografii: Izolační a separační metody. VŠCHT v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav analýzy potravin a výživy, 2018. Dostupné z: [https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20PIGA%20Cz-15%20Detektory%20v%20kapalinov%C3%A9%20chromatografii\\_VH2018.pdf](https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20PIGA%20Cz-15%20Detektory%20v%20kapalinov%C3%A9%20chromatografii_VH2018.pdf).
- [34] Colin F. Poole, New trends in solid-phase extraction, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(6), 2003, s. 362-373, DOI: 10.1016/S0165-9936(03)00605-8.
- [35] Extrakce na pevné fázi. In: CUNI IS: Informační systém Univerzity Karlovy. Praha. 2012. Dostupné z: [https://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/spf\\_fe.pdf](https://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/spf_fe.pdf)
- [36] BÍLKOVÁ, Zuzana. Metody izolace a purifikace antigenů a protilátek: Afinitní chromatografie – Imunochemie. Univerzita Pardubice. Dostupné z: <https://dokumenty.upce.cz/FCHT/kbbv-vk/imunochemie/imunochemie-izolace-a-purifikace-ig-iac.pdf>
- [37] Extrakce vzorku tuhou fází: Izolační a separační metody. VŠCHT v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav analýzy potravin a výživy, 2018. Dostupné z: [https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20PIGA%20Cz-12%20Extrakce%20vzorku%20tuhou%20f%C3%A1z%C3%AD%20\(LSC\\_SPE\\_MSPDQuEChERS\)VH2018.pdf](https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20PIGA%20Cz-12%20Extrakce%20vzorku%20tuhou%20f%C3%A1z%C3%AD%20(LSC_SPE_MSPDQuEChERS)VH2018.pdf)
- [38] ABI-GHANEM, Daad A. a Luc R. BERGHMAN. Immunoaffinity Chromatography: A Review. MAGDELDIN, Sameh. *Affinity Chromatography*. Intech, 2012, s. 91-104. ISBN 978-953-51-0325-7. DOI:10.5772/35871
- [39] SZTERK A., ROSZKO M., MAŁEK K., CZERWONKA M., WASZKIEWICZ-ROBAK B., Application of the SPE reversed phase HPLC/MS technique to determine vitamin B12 bio-active forms in beef, *Meat Science*, 2012, 91(4), s. 408-413, DOI: 10.1016/j.meatsci.2012.02.023
- [40] DAVÍDEK J. a kol. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. 2. vyd. Praha: SNTL, 1981. ISBN 04-814-81
- [41] HÁLKOVÁ J., RUMÍŠKOVÁ M., RIEGROVÁ J. *Analýza potravin*. 1.vyd. Újezd u Brna: Straka Ivan, 2000. 102 s. ISBN 80-902-7753-5

- [42] KUMAR, Sagaya Selva, Raghuraj Singh CHOUHAN a Munna Singh THAKUR. Trends in Analysis of Vitamin B12. *Analytical Biochemistry*. 2010, 398(2), s. 139-149. DOI: 10.1016/j.ab.2009.06.041.
- [43] TAKENAKA, S., S SUGIYAMA, S. EBARA, E. MIYAMOTO, K. ABE, Y. TAMURA a Y. NAKANO. Feeding dried purple laver (nori) to vitamin B12-deficient rats significantly improves vitamin B12 status. *British Journal of Nutrition*. 2001, 85(6), s. 699-703. DOI: 10.1079/BJN2001352.
- [44] CAMPOS-GIMNEZ, Esther, Patric FONTANNAZ, Marie-Jose TRISCONI, Tamara KILINC, Catherine GIMENEZ a Pierre ANDRIEUX. Determination of Vitamin B12 in Food Products by Liquid Chromatography/UV Detection with Immunoaffinity Extraction: Single Laboratory Validation. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 2008, 91(4), s. 786-793. DOI: 10.1093/jaoac/91.4.786.
- [45] 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(1), s. 630-638. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.06.068
- [46] RICCIO, Fortuna, Carmela MENNELA a Vincenzo FOGLIANO. Effect of cooking on the concentration of Vitamins B in fortified meat products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006, 41(5), s. 1592-1595. DOI: 10.1016/j.jpba.2006.01.061
- [47] ALBALÁ-HURTADO, Soledad, M. Teresa VECIANA-NOGUÉS, María IZQUIERDO-PULIDO a Abel MARINÉ-FONT. Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1997, 778, s. 247-253. DOI: 10.1017/S0022029900004064
- [48] SHETTY, Sweekruthi A., Melissa F. 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, 1609, s. 452-460. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.460452
- [49] FILIK, Hayati, Asiye ASLIHAN AVAN a Sevda AYDAR. Electrochemical Determination of Vitamin B-12 in Food Samples by Poly(2,2'-(1,4-phenylenedivinylene) Bis-8 hydroxyquinoline) /Multi-Walled Carbon Nanotube-Modified Glassy Carbon Electrode. *Food Analytical Methods*. 2016, 9, s. 2251-2260. DOI: 10.1007/s12161-016-0420-y.
- [50] *Základy analýzy potravin – Separáční metody*. VŠCHT Praha. Dostupné z: [https://web.vscht.cz/~koplikr/%c4%8c%c3%a1stA6\\_2.pdf](https://web.vscht.cz/~koplikr/%c4%8c%c3%a1stA6_2.pdf).
- [51] DALLBACKE, Johan a Irene DAHLQUIST. Determination of vitamin B12 in multivitamin-multimineral tablets by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*. 1991, ročník 541, s. 383-392. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)96010-8.

- [52] EASI-EXTRACT® VITAMIN B12 (LGE): Art. No.: P88 / P88B. R-biopharm. Německo: Food & Feed Analysis, 2020. Dostupné z: <https://food.rbiopharm.com/products/easi-extract-vitamin-b12-lge/>.
- [53] DIAS, N. C. a C. F. POOLE. Mechanistic Study of the Sorption Properties of OASIS + HLB and its Use in Solid-Phase Extraction. *Chromatographia*. 2002, 56(5/6), s. 269-275. DOI: 10.1007/BF02491931.
- [54] Oasis Sample Extraction Products. Waters. Waters Corporation, 2020. Dostupné z: [https://www.waters.com/waters/en\\_CZ/Waters-Oasis-SampleExtraction-SPE-Products/nav.htm?cid=513209&locale=en\\_CZ](https://www.waters.com/waters/en_CZ/Waters-Oasis-SampleExtraction-SPE-Products/nav.htm?cid=513209&locale=en_CZ).
- [55] 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), s. 67-95. DOI: 10.4081/ijfs.2017.6795.
- [56] LUO, Xubiao a, Bo CHEN, Li DING, Fei TANGA a Shouzhuo YAOAB. HPLC-ESI-MS analysis of Vitamin B12 in food products and in multivitamins-multimineral tablets. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 562(2), 185-189. DOI: 10.1016/j.aca.2006.01.073.
- [57] Yanan, Brendon D. GILL, Megan N.C. GRAINGER a Marilyn MANLEY-HARRIS. The analysis of vitamin B12 in milk and infant formula: A review. *International Dairy Journal*. 2019, ročník 99, s. 1-9. DOI: 10.1016/j.idairyj.2019.104543.
- [58] OKBAMICHAEL, Mussie a Sergio A. SANUDO-WILHELMY. A new method for the determination of Vitamin B12 in seawater. *Analytica Chimica Acta*. 2004, 517(1/2), s. 33-38. DOI: 10.1016/j.aca.2004.05.020.
- [59] HEUDI, O., T. KILINÇ, P. FONTANNAZ a E. MARLEY. Determination of Vitamin B12 in food products and in premixes by reversed-phase high performance liquid chromatography and immunoaffinity extraction. *Journal of Chromatography A*. 2006, 1101(1/2), s. 63-68. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.09.059
- [60] 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), s. 23-32.
- [61] PAKIN, C., M. BERGAENTZLÉ, D. AOUDÉ-WERNER a C. HASSELMANNA. Alpha-ribazole, a fluorescent marker for the liquid chromatographic determination of vitamin B12 in foodstuffs. *Journal of Chromatography A*. 2005, 1081(2), s. 182-189. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.05.066.
- [62] HEWITT, William. *Theory and application of Microbiological Assay*. Elsevier, 2012. ISBN 0323155286, 9780323155281.
- [63] CHIAO, J. S. a W. H. PETERSON. Microbiological Assay of Vitamin B12 with a Mutant Strain of *Escherichia coli*. *Applied Microbiology*. 1953, 1(1), s. 42-46.

- [64] MARTIN, Frederic, Ester CAMPOZ GIMENEZ a Erik KONINGS. New Methods for the Analysis of Water-Soluble Vitamins in Infant Formula and Adult/Pediatric Nutritionals. *Journal of AOAC*. 2016, 99(1), s. 19-25. DOI: 10.5740/jaoacint.15-0245.
- [65] PEREIRA, Daniel F., Edson R. SANTANA, Jamille V. PIOVESAN a Almir SPINELLI. A novel electrochemical strategy for determination of vitamin B12 by Co(I/II) redox pair monitoring with boron-doped diamond electrode. *Diamond and Related Materials*. 2020, ročník 105. DOI: 10.1016/j.diamond.2020.107793.
- [66] GAASTRA, W. Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELISA). *Proteins. Methods in Molecular Biology*. Humana Press, 1984, ročník 1. DOI: 10.1385/0-89603-062-8:349
- [67] KUMAR, Sagaya Selva a Raghuraj Singh CHOUHAN. Enhancement of chemiluminescence for vitamin B12 analysis. *Analytical Biochemistry*. 2009, 388(2), s. 312-316. DOI: 10.1016/j.ab.2009.02.029
- [68] HAMPEL, Daniela, Setareh SHAHAB-FERDOWS, Joseph M. DOMEK, Towfida SIDDIQUA, Rubhana RAQIB a Lindsay H. ALLEN. Competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for vitamin B12 analysis in human milk. *Food Chemistry*. 2014, 153(15), s. 60-65. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.12.033.
- [69] Vitamin B12: Princip testu. Cobas, 2016. Dostupné také z: <https://objednavky.roche-diagnostics.cz/objednavky/info/04745736190p.pdf>.
- [70] SONG, Zhenghua a Shuang HOU. Sub-picogram determination of Vitamin B12 in pharmaceuticals and human serum using flow injection with chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta*. 2003, 488(1), s. 71-79. DOI: 10.1016/S0003-2670(03)00665-2.
- [71] LEE, Jung-Hoon, Jin-Ho SHIN, Jung-Min PARK, Ha-Jung KIM, Jang-Hyuk AHN, Byung-Man KWAK a Jin-Man KIM. Analytical Determination of Vitamin B12 Content in Infant and Toddler Milk Formulas by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 2015, 35(6), s. 765-771. DOI: 10.5851/kosfa.2015.35.6.765
- [72] ŠARKOVÁ, Lea. Vliv úpravy masa na obsah vitamínu B12. Pardubice, 2020. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko – technologická. Dostupné z: [https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/76492/SarkovaL\\_Vliv\\_upravy\\_TJ\\_2020.pdf](https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/76492/SarkovaL_Vliv_upravy_TJ_2020.pdf).

## **PŘÍLOHY**

Příloha 1 Výsledky kalibrace .....	56
Příloha 2 Hmotnostní ztráty masa tepelnou úpravou .....	56
Příloha 3 Změny koncentrací vitamínu B12 v hovězí kýtě vlivem tepelné úpravy .....	56
Příloha 4 Koncentrace vitamínu B12 ve šťávě z tepelně upravené hovězí kýty .....	56
Příloha 5 Změny koncentrací vitamínu B12 v hovězím válečku vlivem tepelné úpravy .....	57
Příloha 6 Koncentrace vitamínu B12 ve šťávě z tepelně upraveného hovězího válečku .....	57
Příloha 7 Změny koncentrací vitamínu B12 ve vepřové kýtě vlivem tepelné úpravy .....	57
Příloha 8 Koncentrace vitamínu B12 ve šťávě z tepelně upravené vepřové kýty .....	58
Příloha 9 Degradace vitamínu B12 vlivem tepelných úprav v jednotlivých vzorcích .....	58

### Příloha 1 Výsledky kalibrace

Koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Plocha píku [mAU/s]	Výška píku [mAU]
0,102	26,45	1,74
0,102	25,68	1,74
0,051	13,8	1,27
0,051	13,8	1,27
0,0254	8,4	1,09
0,0254	8,08	1,05
0,0102	4,76	0,96
0,0102	1,03	0,90
0,0051	1,25	0,91
0,0051	2,82	0,95

### Příloha 2 Hmotnostní ztráty masa tepelnou úpravou

Parametr	Hovězí kýta			Hovězí kýta			Hovězí kýta		
	1.	2.	průměr	1.	2.	průměr	1.	2.	průměr
Před vařením [g]	86	77	81,5	82	81	81,5	105,5	102	103,7
Po vaření [g]	67	58	62,5	66	64	65	85	83	84
Ztráta [%]	22	24,6	23,3	19,5	20,9	20,2	19,4	18,6	19
Šťáva [g]	13	14	13,5	12,5	11,5	12	17,5	9	13,3

### Příloha 3 Změny koncentrací vitamínu B12 v hovězí kýtě vlivem tepelné úpravy

Stav masa	Vzorek	Plocha píků [mAU/s]	Koncentrace [ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ]	Konc. se započt. Ztrátou hm. [ $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ]	Ztráta vitamínu oproti syrovému masu [%]
Syrové	1.	45,16	1,18		
		45,39	1,19		
	2.	36,10	0,94		
		36,30	0,94		
Vařené	1.	43,46	1,14	0,87	18,15
		43,41	1,14	0,87	18,24
	2.	32,19	0,84	0,64	39,86
		31,45	0,82	0,62	41,29

### Příloha 4 Koncentrace vitamínu B12 ve šťávě z tepelně upravené hovězí kýty

Šťáva	Vzorek	Plocha píků [mAU/s]	Koncentrace ve 100 g šťávy [ $\mu\text{g}$ ]
	1.		14,36
8,92			0,08
2.		4,46	0,03
		5,49	0,04



**Příloha 5 Změny koncentrací vitamínu B12 v hovězím válečku vlivem tepelné úpravy**

Stav masa	Vzorek	Plocha píků [mAU/s]	Koncentrace [μg/100 g]	Konc. se započt. Ztrátou hm. [μg/100 g]	Ztráta vitamínu oproti syrovému masu [%]
Syrové	1.	38,97	1,02		
		38,98	1,02		
	2.	46,96	1,23		
		45,91	1,20		
Vařené	1.	18,10	0,46	0,37	66,96
		21,47	0,55	0,44	60,47
	2.	16,31	0,41	0,32	70,96
		15,25	0,38	0,30	72,97

**Příloha 6 Koncentrace vitamínu B12 ve šťávě z tepelně upraveného hovězího válečku**

Šťáva	Vzorek	Plocha píků [mAU/s]	Koncentrace ve 100 g šťávy [μg]
	1.		14,52
14,33			0,14
2.		7,73	0,07
		6,83	0,06

**Příloha 7 Změny koncentrací vitamínu B12 ve vepřové kýtě vlivem tepelné úpravy**

Stav masa	Vzorek	Plocha píků [mAU/s]	Koncentrace [μg/100 g]	Konc. se započt. Ztrátou hm. [μg/100 g]	Ztráta vitamínu oproti syrovému masu [%]
Syrové	1.	36,94	0,96		
		35,21	0,92		
	2.	26,82	0,69		
		26,16	0,67		
Vařené	1.	13,29	0,33	0,27	67,24
		13,14	0,33	0,26	67,65
	2.	10,06	0,24	0,20	75,62
		9,68	0,23	0,19	76,61

**Příloha 8 Koncentrace vitamínu B12 ve šťávě z tepelně upravené vepřové kýty**

	Vzorek	Plocha píků [mAU/s]	Koncentrace ve 100 g šťávy [μg]
Šťáva	1.	27,46	0,21
		27,29	0,20
	2.	19,81	0,28
		16,53	0,23

**Příloha 9 Degradace vitamínu B12 vlivem tepelných úprav v jednotlivých vzorcích**

Koncentrace vitamínu B12				
Hovězí kýta	Syrové maso před tep. úpravou [μg]	Vařené maso [μg]	Šťáva [μg]	Suma
1.	0,91	0,98	0,013	0,99
2.	0,82	0,64	0,005	0,64
		<b>% ze syrového masa</b>		
		106,8	106,8	
		77,6	77,6	
<b>Průměrně [%]</b>		92,2	92,2	
Hovězí váleček	Syrové maso před tep. úpravou [μg]	Vařené maso [μg]	Šťáva [μg]	Suma
1.	0,92	0,41	0,016	0,43
2.	0,90	0,32	0,007	0,33
		<b>% ze syrového masa</b>		
		45,1	1,8	
		35,5	0,8	
<b>Průměrně [%]</b>		40,3	1,3	
Vepřová kýta	Syrové maso před tep. úpravou [μg]	Vařené maso [μg]	Šťáva [μg]	Suma
1.	0,86	0,35	0,032	0,38
2.	0,83	0,24	0,011	0,25
		<b>% ze syrového masa</b>		
		40,4	40,4	
		29,3	29,3	
<b>Průměrně [%]</b>		34,9	34,9	