

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2019

Klára Kosková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Využití moderních analytických technik pro analýzu vitamínů
obsažených v pseudoobilovinách

Klára Kosková

Bakalářská práce

2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Klára Kosková**
Osobní číslo: **C16649**
Studijní program: **B2802 Chemie a technická chemie**
Studijní obor: **Chemie a technická chemie**
Název tématu: **Využití moderních analytických technik pro analýzu vitamínů
obsažených v pseudoobilovinách**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

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

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na využití moderních analytických technik v analýze vitamínů ve vybraných pseudoobilovinách. Zaměřte se na úpravu vzorku před analýzou a analýzu různých druhů vitamínů pomocí moderních analytických technik.
2. Výsledky prezentované v literatuře porovnejte a kriticky zhodnoťte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce:

5. února 2019

Termín odevzdání bakalářské práce:

4. července 2019



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlášení

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

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

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 4. 7. 2019

Klára Kosková

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a trpělivost při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

ANOTACE

Bakalářská práce je psaná formou literární rešerše a je zaměřena na stanovení vitamínů obsažených v pseudoobilovinách. Teoretická část se zabývá popisem pseudoobilovin a jejich chemickým složením včetně minerálních látek, sacharidů, vlákniny, vitamínů a aminokyselin. Dále se zabývá podrobnějším popisem vitamínů obsažených ve vybraných pseudoobilovinách, jako je amarant a pohanka. Jsou zde popsány chemické struktury a zdroje vitamínů a také důsledky nedostatku a nadměrného množství vitamínů v organismu. Závěrem je diskutována úprava vzorku před analýzou, izolace vitamínu z matrice a vlastní stanovení pomocí analytických technik.

KLÍČOVÁ SLOVA

Amarant, pohanka, vitamíny, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, extrakce, stanovení vitamínů

TITLE

Modern analytical techniques in analysis of vitamins in pseudocereals

ANNOTATION

The bachelor is written in the form of the literary research. It is concentrated on the determination of vitamins contained in pseudocereals. The teoretical part is focused on the description o pseudocereals and their composition including minerals, carbohydrates, fiber, vitamins and amino acids. It is also focused on more detailed description of vitamins contained in chosen pseudocereals as amaranth and buckwheat. Chemical structures and resources of vitamins are described here and also consequences lack and excess of vitamins in the organism. At the end is discussed the preparation of the sample before the analysis, the isolation of vitamins from the matrix and self determination using analytical techniques.

KEYWORDS

Amaranth, buckwheat, vitamins, high performance liquid chromatography, extraction, determination of vitamins

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ	10
ÚVOD	11
1 Pseudoobiloviny	12
1.1 Pohanka.....	12
1.1.1 Charakteristika.....	12
1.1.2 Chemické složení pohanky.....	13
1.1.3 Využití pohanky	17
1.2 Amarant	18
1.2.1 Charakteristika.....	18
1.2.2 Chemické složení amarantu.....	19
1.2.3 Využití amarantu	22
2 Vitamíny obsažené v pseudoobilovinách	23
2.1 Vitamíny rozpustné v tucích.....	23
2.1.1 Vitamín A (Retinol).....	24
2.1.2 Vitamín E (Tokoferol).....	25
2.2 Vitamíny rozpustné ve vodě	25
2.2.1 Vitamín B ₁ (Thiamin).....	26
2.2.2 Vitamín B ₂ (Riboflavin)	26
2.2.3 Vitamín B ₃ (Niacin).....	27
2.2.4 Vitamín B ₅ (Kyselina pantothenová).....	28
2.2.5 Vitamín B ₆ (Pyridoxin).....	29
2.2.6 Vitamín C (Kyselina askorbová).....	30
3 Analytické stanovení vitamínů	31
3.1 Extrakce	31
3.2 Chromatografické metody	31

3.2.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	32
4	Analýza vitamínů v pseudoobilovinách.....	34
4.1	Úprava vzorku před analýzou a stanovení jednotlivých vitamínů.....	35
4.1.1	Stanovení vitamínu A pomocí HPLC.....	35
4.1.2	Spektrofotometrické stanovení vitamínu A.....	36
4.1.3	Stanovení vitamínu B ₁ pomocí HPLC.....	36
4.1.4	Fluorimetrické stanovení vitamínu B ₁	36
4.1.5	Stanovení vitamínu C pomocí HPLC.....	36
4.1.6	Titrační stanovení vitamínu C.....	37
4.1.7	Stanovení vitamínu E pomocí HPLC.....	37
	ZÁVĚR.....	38
	POUŽITÁ LITERATURA.....	39

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Pohanka obecná	12
Obrázek 2: Barvy semen pohanky	13
Obrázek 3: Řez pohankového zrna	13
Obrázek 4: Chemická struktura rutinu	15
Obrázek 5: Amarant	18
Obrázek 6: Popis zrna amarantu	19
Obrázek 7: Chemická struktura skvalenu	21
Obrázek 8: Struktura vitamínu A	24
Obrázek 9: Struktura vitamínu E	25
Obrázek 10: Struktura vitamínu B ₁	26
Obrázek 11: Struktura vitamínu B ₂	27
Obrázek 12: Struktura vitamínu B ₃	28
Obrázek 13: Struktura vitamínu B ₅	28
Obrázek 14: Struktura vitamínu B ₆	29
Obrázek 15: Struktura vitamínu C	30
Obrázek 16: Schéma HPLC	33
Obrázek 17: Oxidace kyseliny L-askorbové	37
Tabulka 1: Chemické složení pohanky	14
Tabulka 2: Obsah minerálních látek v pohance	14
Tabulka 3: Obsah aminokyselin v pohance	15
Tabulka 4: Obsah rutinu v jednotlivých částech pohanky	16
Tabulka 5: Obsah kyselin v pohance seté, pohance tatarské	16
Tabulka 6: Chemické složení amarantu	19
Tabulka 7: Obsah minerálních látek v amarantu	20
Tabulka 8: Obsah aminokyselin v amarantu	20
Tabulka 9: Obsah retinolu v potravinách	24
Tabulka 10: Obsah vitamínu E v potravinách	25
Tabulka 11: Obsah thiaminu v potravinách	26
Tabulka 12: Obsah riboflavinu v potravinách	27
Tabulka 13: Obsah niacinu v potravinách	28
Tabulka 14: Obsah kyseliny pantothenové v potravinách	29
Tabulka 15: Obsah pyridoxinu v potravinách	30
Tabulka 16: Obsah vitamínu C v potravinách	30
Tabulka 17: Obsah vitamínů v pohance obecné	34
Tabulka 18: Obsah vitamínů v amarantu	34

ÚVOD

Pseudoobiloviny jsou alternativní rostliny, mezi které řadíme amarant, pohanku a quinou. Používají se v potravinářském průmyslu, kosmetickém průmyslu nebo i v lékařství. Jsou bohaté na obsah vitamínů, sacharidů, minerálních látek, bílkovin a aminokyselin. V současné době o ně roste zájem vzhledem k tomu, že zrna pseudoobilovin neobsahují lepek, a tak jsou vhodné pro pacienty trpící celiakií.

Nepostradatelnou složkou pro lidský organismus jsou vitamíny, neboť jsou složkou enzymů bez kterých by nemohly probíhat biologické procesy. Přijímáme vitamíny ve velmi malém množství. V lidském organismu se nesyntetizují, proto jsou přijímány z potravy nebo pomocí doplňkové stravy.

Pro stanovení vitamínů v pseudoobilovinách se používají různé analytické techniky. Nejpoužívanější je vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Mezi další techniky patří například titrační stanovení nebo spektrofotometrické metody.

1 Pseudoobiloviny

Pseudoobiloviny jsou nepravé obiloviny, avšak pěstováním, zpracováním a využitím jsou jim podobné. Jsou to dvouděložné rostliny, které patří do čeledi lipnicovitých [1, 2]. Mezi nejznámější pseudoobiloviny se řadí pohanka, laskavec (amarant) a merlík (quinoa), které zlepšují kardiovaskulární onemocnění, snižují vysoký krevní tlak a výskyt onemocnění rakoviny [3]. Na rozdíl do obilovin mají vyšší obsah bílkovin, minerálních látek (fosforu, hořčíku, draslíku) a vlákniny. Také jsou významným zdrojem vitamínu E a skupiny vitamínu B [1, 2].

1.1 Pohanka

1.1.1 Charakteristika

Pohanka (*Fagopyrum*) patří do čeledi rdesnovitých (*Polygonaceae*) [4]. Pochází ze střední a severovýchodní Asie. Dnes mezi země produkující pohanku patří Brazílie, USA, Japonsko, Kanada, Bhútán, Korejská republika a rovněž se pěstuje v horských a podhorských oblastech Čech a Moravy [5].

Na světě existuje několik druhů pohanky. Mezi nejpěstovanější druhy pohanky řadíme pohanku tatarskou (*Fagopyrum tataricum*), které se také říká pohanka hořká, kvůli vysokému obsahu flavonoidů. Další je pohanka setá (*Fagopyrum esculentum*) a pohanka obecná (*Fagopyrum esculentum* Moench), které se také říká pohanka sladká. [4].

Výhodou pěstování pohanky je nenáročnost na podmínky pěstování. Nejvíce se jí daří ve vlhkém, chladném podnebí. V porovnání s pohankou obecnou má pohanka tatarská lepší odolnost proti mrazům [1, 6].



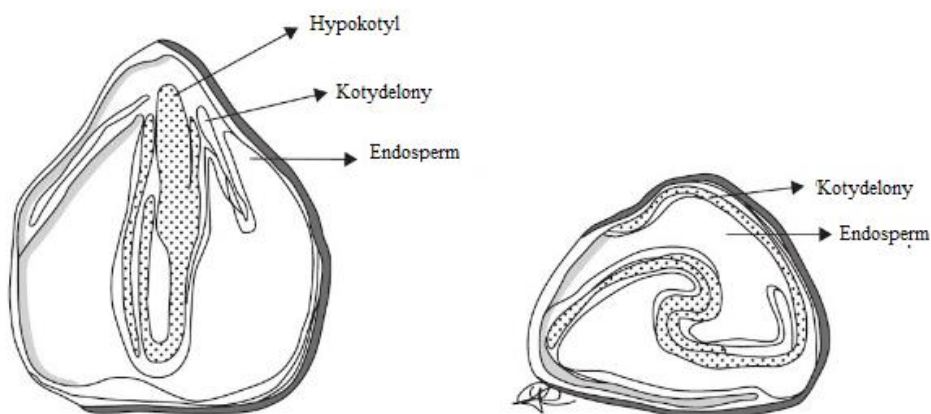
Obrázek 1: Pohanka obecná [6]

Pohanka je jednoletá rostlina (obrázek 1), která roste do výšky 0,7-1,5 m. Má červenou, dutou, podélně rýhovanou lodyhu, která je málo větvená. Horní listy jsou přisedlé, šípovitého tvaru. Spodní listy jsou srdčité, řapíkaté. Listy jsou na stonku postaveny střídavě. Květenství pohanky tvoří 7-9 lístků. Květy jsou oboupohlavné, pětičetné, drobné růžové, bílé ale i červené barvy. Plodem je trojboká hladká nažka, která je hnědá, černá nebo šedá (v závislosti na odrůdě) [5, 7].



Obrázek 2: Barvy semen pohanky [5]

Pohanková zrna jsou srdčitého tvaru dlouhá 4-9 mm s tisíci jádry o hmotnosti od 15 do 35 g. Zrna pohanky tatarské jsou menší než pohanky obecné. Zrno se skládá z endospermu obsahující škrob, dále z aleuronové vrstvy, semenného pláště a embrya [5, 8].



Obrázek 3: Řez pohankového zrna [9]

1.1.2 Chemické složení pohanky

Zrna pohanky jsou zdrojem bílkovin s vysokým obsahem esenciálních aminokyselin, hlavně lysinu. Také vyniká vysokým obsahem vitamínů (thiamin, riboflavin, pyridoxin, kyselina pantothenová, niacin, vitamín C a E) a minerálních látek (Mg, K, P, Cu, Zn a Se). Chemické složení se může lišit v závislosti na odrůdě a podmínkách pěstování. V tabulce 1 je uvedeno souhrnné chemické složení pohanky obecné [1, 7, 10].

Tabulka 1: Chemické složení pohanky [1]

	[%]
Sacharidy	58,5
Proteiny	10-14,5
Tuky	2,4
Vláknina	11,0
Popílek	1,8

Obsah minerálních látek v pohance je 2 – 2,5 %. Minerální látky jsou důležité pro různé fyziologické funkce v lidském těle. Lidské tělo vyžaduje více než 100 mg denně každého hlavního minerálu (Na, Mg, K, Ca a P). Minerální látky se nacházejí v pohance ve slupce a klíčcích. Hořčík, zinek, fosfor a draslík se nachází v zárodku a aleurové vrtvě. Železo, zinek a mangan obsahuje obalová vrstva. Slupky jsou bohatým zdrojem vápníku. Pohanka je bohatší minerální zdroj než obiloviny jako rýže a kukuřice. V porovnání s jinými pseudoobilovinami má pohanka nižší obsah vápníku [9, 11, 12]. V tabulce 2 je znázorněno porovnání obsahu minerálních látek v pohance a pšenici.

Tabulka 2: Obsah minerálních látek v pohance [1]

Minerální látky	Pohanka [mg/100g]	Pšenice [mg/100g]
Vápník	110,0	39
Železo	4,0	1,7
Hořčík	390,0	20,0
Fosfor	330,0	300,0
Draslík	450,0	140,0
Meď	1,0	0,4
Mangan	3,4	-
Zinek	0,9	3,1

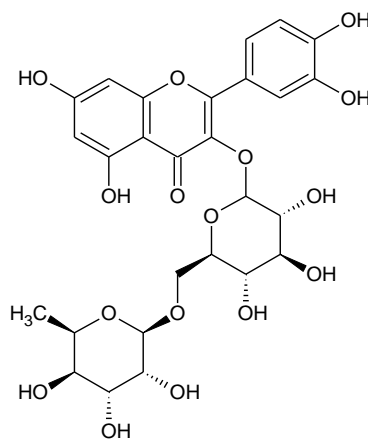
Obsah bílkovin v pohance je 7 – 21 % v závislosti na podmínkách během růstu [5]. Bílkoviny s esenciálními aminokyselinami jako je lysin, threonin a valin mají v pohance vyšší obsah než v pšenici. Obsah lysinu je 2,5x vyšší než v pšenici. Kyselina glutamová, kyselina asparagová s lysinem jsou nejvíce zastoupené neesenciální aminokyseliny. Aminokyselinová skladba je téměř shodná se skladbou aminokyselin v luštěninách. [9, 11]. Jednotlivé zastoupení

aminokyseliny v pohance a v pšenici je zobrazen v tabulce 3.

Tabulka 3: Obsah aminokyseliny v pohance [1, 8]

Aminokyselina	Pohanka [g/100 g]	Pšenice [g/100 g]
Lysin	6,0	1,8
Histidin	2,6	1,4
Threonin	4,0	1,8
Valin	5,3	2,8
Isoleucin	4,0	2,0
Serin	4,9	2,9
Fenylalanin	4,8	2,8
Glycin	6,6	2,5
Leucin	6,7	4,2
Kyselina asparagová	9,5	3,1
Kyselina glutamová	19,4	18,6

Pohanka je také bohatá na fenolické sloučeniny. Mezi tyto látky se řadí flavonoidy, fytosteroly a fenolické kyseliny. Flavonoidy jsou polyfenoly představující hlavní skupinu látek s antioxidačními vlastnostmi. Mezi hlavní flavonoidní složky patří rutin (quercetin-3-rutinosid) [8, 10, 13].



Obrázek 4: Chemická struktura rutinu [8]

Rutin je také označován jako vitamín P (obrázek 4), který udržuje kapiláry a tepny silné a pružné, chrání cévy před tvorbou sraženin a snižuje s vitamínem C hladinu krevního tlaku [1]. Dále má protizánětlivé a protirakovinné účinky [14]. V pohance je obsažen ve všech částech rostliny (listy, semena, stonky, kořeny) a způsobuje její hořkou chuť. Listy pohanky obsahují

10x více rutinu než semena. Obsah rutinu v semenech může být 12,6 - 51,1 mg/100 g v závislosti na podmínkách růstu (geografická poloha, odrůda či teplota) [8, 10, 13]. Flavonoidy jsou v semenech převážně ve vázané formě v buněčné stěně. Odtud jsou uvolňovány nejčastěji alkalickou, kyselou nebo enzymatickou hydrolýzou [15].

Tabulka 4: Obsah rutinu v jednotlivých částech pohanky [15]

Část pohanky	[mg/100 g]
Loupané zrnó	8,0
Semeno	23,4
Nať	420,8

Z fenolických kyselin jsou nejčastěji zastoupené kyselina p-hydroxybenzoová (1,7 mg/100 g), kyselina kávová (1,3 mg/100 g) a kyselina ferulová (1,2 mg/100 g). Celkový obsah flavonoidů u pohanky obecné je 2,19 g/100 g sušiny a u pohanky tatarské je obsah flavonoidů 7,4 g/100 g sušiny [5, 13].

Hlavním sacharidem obsaženým v pohankovém zrně je škrob, který tvoří 59-74 % zrna pohanky. Nejvíce je ho v jádře v endospermu [9]. Škrobové granule jsou ve velikosti 3-4 μm a tvoří je amylosa (24%) a amylopektin (76%) [5].

Malou část pohanky tvoří lipidy. Mají významnou fyziologickou roli a rozhodují o kvalitě potravin, protože mohou způsobit zhoršení semen a tím i konečný produkt. V pohance se nacházejí lipidy v embryu [9]. Nasycené kyseliny tvoří 20,5 % a kyseliny nenasycené 59,3 %. Jednotlivé zastoupení kyselin je zobrazeno v tabulce 5 [5, 9].

Tabulka 5: Obsah kyselin v pohance seté, pohance tatarské [9]

Kyselina	Pohanka setá [%]	Pohanka tatarská [%]
Linoleová	39,0	36,6
Olejová	37,0	35,2
Palmitová	15,6	19,7
Stearová	2,0	3
Eikosapentoenová	2,3	2
Arachidonová	1,8	1,8
α-linoleová	1	0,7

1.1.3 Využití pohanky

Využití pohanky je velmi pestré. Pohankové zrno lze využít jako obilovinu pro výrobu mouky, která se v Japonsku používá např. k výrobě nudlí. V Indii je pohanková mouka důležitou surovinou pro výrobu chleba. Dalším využitím je jako zelené hnojivo. Listy a mladé natě lze použít v gastronomii jako zeleninu do salátu. Listy pohanky jsou zdrojem rutinu, který udržuje tepny silné a pružné a chrání cévy před prasknutím a tvorbou sraženin. Rutin s vitamínem C snižuje vysokou hladinu krevního tlaku. V odvětví potravinářském lze použít pohankový med z nektaru květů pohanky. Speciální využití mají pohankové slupky, které se používají jako plnidlo do polštářů a matrací [1, 6, 7].

1.2 Amarant

1.2.1 Charakteristika

Amarant (laskavec) stejně jako pohanka se řadí mezi pseudoobiloviny. Patří do rodu *Amaranthus*, čeledi laskavcovitých (*Amaranthaceae*) a zahrnuje zhruba 75 druhů. *Amaranthus cruentus*, *Amaranthus caudatus* a *Amaranthus hypochondriacus* jsou nejvíce využívány druhy pro potravinářský průmysl [10].

Amarant byl dříve hlavní potravinou Aztéku, Mayů a Inků [4]. Dnes je pěstování této pseudoobiloviny velmi rozšířené. Mezi oblasti, kde se pěstuje patří jihovýchodní Asie (Tibet, Nepál a Indie), Amerika (USA a Mexiko) a Afrika [9, 10].

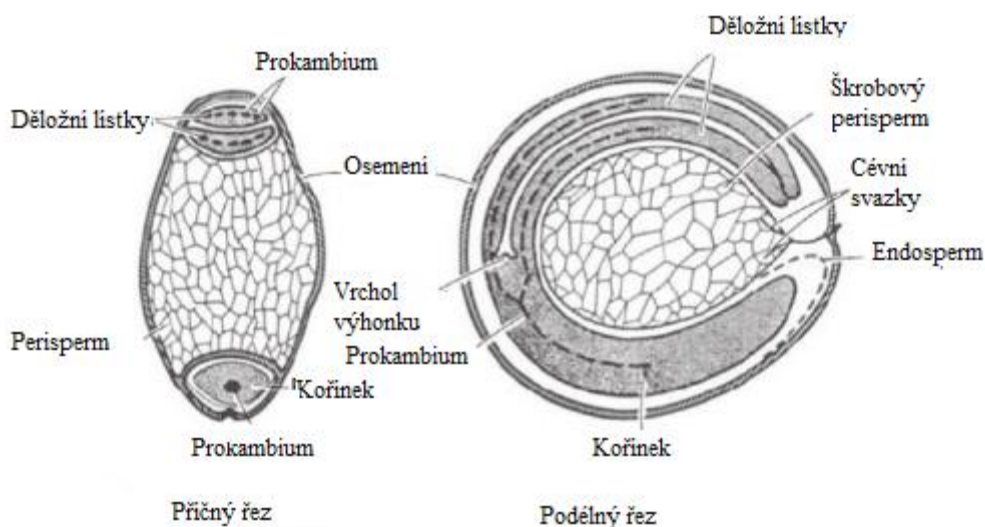
Amarant je rostlina nenáročná na podmínky pěstování, avšak Preferuje především horké, jasné sluneční světlo. Je také tolerantní vůči vysokému suchu, pH půdy, teplotám a škůdcům [10, 16].



Obrázek 5: Amarant [17]

Amarant patří mezi dvouděložné, vícelété rostliny [9], které rostou do výšky 0,8-2,5 m (obrázek 5). Listy jsou řapíkaté a velké, nejčastěji vejčité zelené barvy. Květy jsou jednopohlavné, seskupené v klubíčkách. Plodem je tobolek, ve které jsou elipsovité semena s hladkým povrchem. Tobolky jsou žlutozelené nebo načervenalé barvy ve velikosti 0,8-1,2 mm [16]. Zrno amarantu (obrázek 6) je charakterizováno vyšším obsahem bílkovin, lipidů a škrobu

než je tomu u obilovin. Dále se zde nachází různé minerální látky a vitamíny. Hladina fosforu, vápníku, draslíku a hořčíku je obvykle ve vyšších koncentracích než u obilných zrn. Amarantová zrna také obsahují poměrně vysoký obsah vitamínu C a β -karotenu [10].



Obrázek 6: Popis zrna amarantu [18]

1.2.2 Chemické složení amarantu

Chemické složení amarantu (tabulka 6) je proměnlivé, protože obsah organických a anorganických sloučenin se mění v závislosti na druhu, podmínkách pěstování či zpracování. Semena amarantu mají vysokou výživovou hodnotu. Obsah bílkovin se pohybuje okolo 16 % s vysokým obsahem esenciálních aminokyselin (lysin a methionin). Mezi hlavní mastné kyseliny patří kyselina linolenová (30-70 %) a palmitová (13-14 %) [4, 16].

Tabulka 6: Chemické složení amarantu [10]

	[%]
Sacharidy	59,2
Protein	16,6
Tuky	7,2
Vláknina	4,1
Popel	3,3

Minerální látky jsou nezbytnou součástí lidského organismu, avšak nedokáže si je vytvořit. Popílkem nazýváme minerální látky, které zůstávají po oxidaci potravin [10]. Bohatým zdrojem minerálních látek je také amarantové zrno. Hladiny vápníku, draslíku a hořčíku jsou poměrně

vysoké, i přesto je nejvíce zastoupený fosfor s hodnotou 578 mg/100 g [4]. V malé míře jsou zastoupené další minerální látky, jako jsou zinek, mangan a železo [10]. Srovnání obsahu jednotlivých minerálních látek v amarantu a pšenici je uvedeno v tabulce 7.

Tabulka 7: Obsah minerálních látek v amarantu [1, 4]

Minerální látky [mg/100 g]	Amarant [mg/100 g]	Pšenice [mg/100 g]
Vápník	212,0	39
Železo	8,2	1,7
Hořčík	327,0	20,0
Fosfor	578,0	300,0
Draslík	541,0	140,0
Meď	1,8	0,4
Mangan	3,4	-
Zinek	3,8	3,1

Amarantové listy a zrna obsahují bílkoviny. Endosperm zrna obsahuje 35 % bílkovin a zbytek je obsažen v zárodečném obalu a embryu zrna. Nejvíce zastoupenou aminokyselinou je lysin (61-80 %), který je izolovaný z listu amarantu [4, 10, 19]. Porovnání jednotlivých aminokyselin v amarantu a v pšenici je znázorněno v tabulce 8.

Tabulka 8: Obsah aminokyselin v amarantu [1]

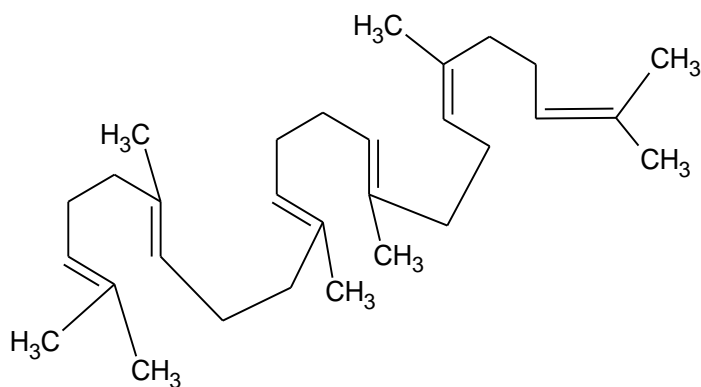
Aminokyselina	Amarant [g/100 g]	Pšenice [g/100 g]
Lysin	5,3	1,8
Histidin	2,5	1,4
Threonin	3,5	1,8
Valin	4,1	2,8
Isoleucin	3,6	2,0
Tyrosin	2,9	1,9
Serin	5,9	2,9
Fenylalanin	3,4	2,8
Glycin	6,9	2,5
Leucin	5,3	4,2

Hlavní složkou amarantových sacharidů je škrob, který obsahuje 48-69 % celkové hmotnosti v sušině. Škrob je v amarantových zrnech v perispermu. Škrobové granule jsou malé o velikosti 0,8-2,5 μm , krystalické struktury [9]. Škrob se skládá z amylozy a amylopektinu. Největší část tvoří amylopektin. Amylóza tvoří 0,96-34,3 % celkového škrobu v zrna a amylopektin zbytek. Světlá zrna obsahují více škrobu (69%) než tmavě zbarvená zrna [10].

Amarantové zrna obsahuje 6-10 % lipidů, které jsou obsaženy v klíčcích. Ze 76 % jsou to nenasycené mastné kyseliny [1]. Z nenasycených mastných kyselin amarantové zrna obsahuje kyselinu linolovou (43,4-51,4 %), z nasycených mastných kyselin je nejvíce zastoupena kyselina olejová (21,3 %) a kyselina palmitová s obsahem 18,6-21,3 %. Skvalen tvoří 6-7 % celkového množství lipidů [4].

Skvalen, chemicky (2,6,10,15,19,23-hexamethyl-2,6,10,14,18,22-tetraózahexan), je triterpenický uhlovodík se šesti dvojnými vazbami, který může být jak rostlinného tak živočišného původu (obrázek 7) [20].

Využívá se v oblasti medicíny, farmaceutického průmyslu, kosmetiky nebo jako výživa. V lidském těle se tvoří v játrech. Jednou z funkcí v lidském těle je vychytávání volných kyslíkatých radikálů, které může vést ke vzniku rakoviny. Další funkcí v lidském těle je snižování hladiny cholesterolu [10, 21]. Amarantový olej můžeme vnímat jako alternativní rostlinný zdroj skvalenu. Skvalen lze extrahovat z amarantového zrna vakuovou destilací [10].



Obrázek 7: Chemická struktura skvalenu [20]

Obsah vlákniny v amarantu je 5,4-24,6 % a záleží na věku rostliny. Staré listy a výhonky vykazují nejvyšší hodnoty vlákniny [4]. Amarantové listy a stonky jsou dobrým zdrojem o obsahu 11,1-22,9 % [10].

1.2.3 Využití amarantu

Amarant se dnes využívá velmi často v potravinářském průmyslu např. semena pro výrobu mouky, ale také amarantové květy pro výrobu čaje. Amarantové semena se využívají v kosmetice v podobě amarantového oleje. Zeleninová nať se využívá obdobně jako špenát. Dalším využitím listů a stonku je krmivo pro zvířata v mnoha zemích (Čína, Indie) [10].

2 Vitamíny obsažené v pseudoobilovinách

Vitamíny jsou organické nízkomolekulární sloučeniny, které jsou ve velmi malém množství nezbytné pro život člověka. Dříve nebylo známo chemické složení, a tak se vitamíny označovaly písmeny. Toto označení se používá spíše v lékařské literatuře. Dnes jsou polysystematické, někdy i systematické názvy. Skupina vitamínů je z hlediska chemické struktury velmi různorodá. Jednotlivé vitamíny se liší konkrétní funkcí v buněčném metabolismu. Organismus je nesyntetizuje sám (výjimkou je vitamín A, B₃ a B₁₂). Syntetizují je rostliny a mikroorganismy. Do organismu se dostávají v rostlinné potravě, hotové formě (tablety) nebo jako provitamíny [22-24, 25].

Pro každý vitamín existuje denní dávka. Množství potřebné k zajištění fyziologických funkcí člověka je závislé na staří, pohlaví, zdravotním stavu, životním stylu, stravovací zvyklosti. U kojenců a batolat je třeba zvýšit příjem vitamínů A, C, D, B₁ a B₂. U mladistvých je třeba zvyšovat B-komplex a vitamíny C, D a A. Ve staří je zase nutno doplňovat vitamín A, C a B komplex [22, 26, 27].

Při nižším příjmu vitamínu se po čase vytvoří hypovitaminóza. Jestliže dojde k úplné eliminaci vitamínu ze stravy vznikne avitaminóza. Při nadměrném zvýšení denní dávky některých vitamínů (vitamín D) se může projevit hypervitaminóza [26, 28].

Hypovitaminóza nebo avitaminóza může vzniknout, nedostatkem vitamínů v potravě, nedostatečnou resorpcí vitamínů v zažívací soustavě (zánětlivá a průjemová onemocnění, zrychlená peristaltika) nebo zvýšenou potřebou vitamínů v organismu.

Některé látky nevykazují fyziologické účinky mohousloužit jako prekurzory vitamínů. Tyto látky se nazývají provitamíny. Z provitamínů organismus dokáže vitamíny syntetizovat. Příkladem je β -karoten, což je provitamín vitamínu A [22, 23].

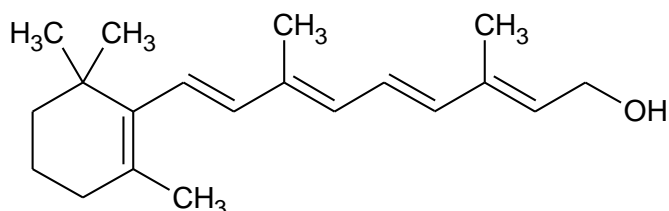
Vitamíny se dělí podle rozpustnosti na vitamíny rozpustné v tucích (lipofilní vitamíny), mezi které řadíme vitamíny A, D, K a E a vitamíny rozpustné ve vodě (hydrofilní vitamíny), mezi které patří vitamín C a celá skupina vitamínů B [25, 29].

2.1 Vitamíny rozpustné v tucích

Tyto vitamíny jsou absorbovány ze střevního traktu do krevního oběhu spolu s tuky, se kterými jsou ukládány v tukové tkáni a poté v játrech. Za normálních okolností nedochází k jejich vylučování ledvinami do moči. Vitamíny mohou být uchovávány několik let. Není tak nutné, aby byly dodávány tělu každý den [29].

2.1.1 Vitamín A (Retinol)

Nejvýznamnější látkou v živočišných tkáních je all-trans-retinol neboli vitamín A₁ (obrázek č.8) a provitamín A, který známe jako β-karoten. Retinol se řadí mezi terpenické alkoholy. Ve své molekule obsahuje β-jononový kruh s bočním řetězcem, který je složen ze dvou isoprenoidních jednotek [22, 24, 30].



Obrázek 8: Struktura vitamínu A [34]

Vitamín A se podílí na všech hlavních funkcích našeho organismu (tvorba kostí a zubů, tělesný růst, ochrana respiračního, trávicího traktu před infekcí). Je rozpustný v tucích a v organických rozpouštědlech a naopak je nerozpustný ve vodě [29, 32].

Vitamín A zlepšuje šeroslepost a zrakovou slabost, udržuje zdravou vnější vrstvu orgánů a tkání a urychluje růst. Používá se k léčbě lupenky a ekzémů. Spolu s karoteny zvyšuje vitamín A imunitní funkce a snižuje důsledky infekčního onemocnění [24, 28, 33]. Z přebytku vitamínu A praskají a krvácejí rty a svědí pokožka. Dále může nastat porucha růstu vlasů, kostí, anorexie a únava [28, 32]. Prvním projevem nedostatku vitamínu A je zhoršená schopnost vidění za šera a v noci. Dalším projevem nedostatku je bledá olupující se kůže, suché vlasy a lámavé nehty [29, 33].

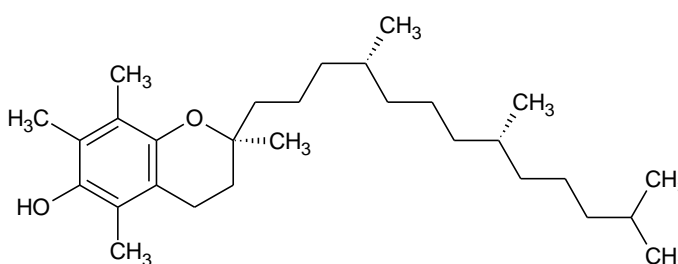
Bohatým zdrojem vitamínu A je rybí olej, játra, mléko, vejce a máslo (tabulka 9). Provitamíny jsou obsaženy v mrkvi, špenátu a paprice, z ovoce je to pomeranč nebo broskev [25, 27, 28].

Tabulka 9: Obsah retinolu v potravinách [34]

Potravina	Obsah retinolu v mg ve 100 g
Játra hovězí	8,4-41
Mléko	0,040-0,950
Vejce	0,180-0,680
Rybí olej	19-160

2.1.2 Vitamín E (Tokoferol)

Společným názvem tokoferol neboli vitamín E se označuje několik látek. Tyto látky jsou odvozené od základní struktury, která se nazývá tokol. Jedná se o chromanový cyklus s nasyceným nebo nenasyceným isoprenoidním postranním řetězcem o 16 atomech uhlíku. Podle počtu methylových skupin na chromanovém jádru rozeznáváme α , β , γ , δ -tokoferol. Nejúčinnější forma vitamínu E je α -tokoferol (obrázek 9) [22]. Obecně tokoferoly jsou nažloutlé viskózní oleje, které jsou dobře rozpustné, jak v tucích, tak v etheru a chloroformu. Nerozpustné jsou ve vodě a méně rozpustné v alkoholu a acetonu. Za přítomnosti kyslíku podléhají oxidaci. V přítomnosti UV záření se rozkládají [19].



Obrázek 9: Struktura vitamínu E [34]

Vitamín E zpomaluje proces stárnutí organismu a uplatňuje se v prevenci kardiovaskulárních chorob. Dále je důležitý pro činnost jater a ochranu jaterních buněk [22, 27]. Dlouhodobý nadměrný příjem může vyvolat nauzeu, zvracení a brišní bolesti. Projevem nedostatku vitamínu E je bledost kůže a sliznic [24, 29].

Zdrojem jsou obilné klíčky, ze kterých je lisován. Dalším zdrojem jsou rostlinné oleje, špenát, mouka a játra [35].

Tabulka 10: Obsah vitamínu E v potravinách [34]

Potravina	Obsah vitamínu E v mg ve 100 g
Sojový olej	92-280
Špenát	50
Mouka pšeničná	1,7-2
Hlávkový salát	17-56

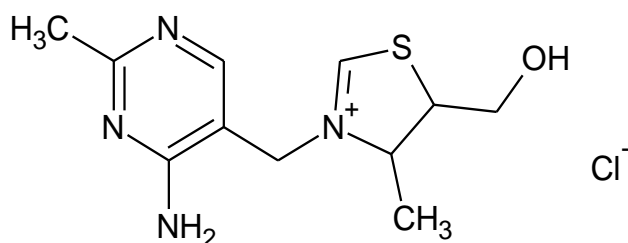
2.2 Vitamíny rozpustné ve vodě

Organismus je schopen uchovávat tyto vitamíny jen v omezeném množství. Pokud jsou konzumovány ve větším množství, tak dochází k jejich vylučování močí. Je nutné k prevenci

nedostatku vitamínů rozpustných ve vodě nezbytný pravidelný přísun v odpovídajícím množství. Výjimkou je vitamín B₁₂. Ten se ukládá v játrech a může v játrech setrvat několik let [29].

2.2.1 Vitamín B₁ (Thiamin)

Je to první objevený vitamín ze skupiny vitamínu B. Jeho struktura (obrázek 10) obsahuje pyrimidinový cyklus (4-amino-2-methyl-pyridimidin) spojený s methylenovou skupina na C5 s dusíkem thiazolového cyklus 5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazol [22, 23]. Thiamin v čistém stavu je krystalická látka o bodu tání 248-250 °C. Jeho další vlastností je termostabilita v kyselém prostředí. V neutrálním a alkalickém prostředí se rychle oxiduje na thiochrom [19].



Obrázek 10: Struktura vitamínu B₁ [34]

V organismu napomáhá trávení cukrů, udržuje normální činnost nervového systému svalů, srdečního svalu a zmírňuje bolesti po ošetření zubů [24]. Projevem nedostatku vitamínu B₁ je psychická a svalová únava a ztráta chuti k jídlu. Nemoc z nedostatku vitamínu B₁ se nazývá beri-beri. Nemoc beri-beri zahrnuje poruchy srdeční činnosti, brnění a pocit pálení [23, 29].

Zdrojem vitamínu B₁ jsou obiloviny, luštěniny, brambory, špenát a kvasnice (tabulka 11). Doporučená denní dávka je 1,4 mg [22, 34].

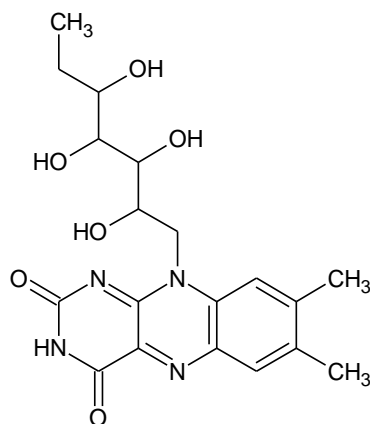
Tabulka 11: Obsah thiaminu v potravinách [34]

Potravina	Obsah thiaminu v mg ve 100 g
Čočka	0,22-0,56
Maso vepřové	0,39-0,82
Brambory	0,05-0,18
Zelený hrách	0,20-0,80

2.2.2 Vitamín B₂ (Riboflavin)

Riboflavin se dříve nazýval laktoflavin. Základní strukturou (obrázek 11) je isoalloxazinové

jádro, na kterém je v poloze N-10 navázán ribitol odvozený od D-rybosy [23, 27]. Riboflavin tvoří oranžovožluté jehličky, které jsou citlivé na světelné záření. Dále je stálý vůči teplu, a to především v kyselých roztocích [19, 34].



Obrázek 11: Struktura vitamínu B₂ [34]

Je důležitý pro sítnici oka, podporuje jasnější vidění. Spolu s retinolem zlepšuje vidění za šera. Riboflavin se účastní tvorby nových buněk, podporuje správnou funkci jater a imunitní systém [36]. Nedostatek riboflavinu se projevuje zánětlivými změnami sliznic a kůže (praskání ústních koutků). Dále migrénami, akné a svalovými křečmi [23, 33].

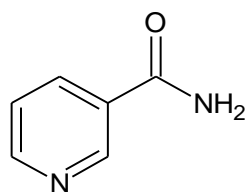
Volný riboflavin se vyskytuje v zanedbatelném množství v syrovátce. Jinými zdroji jsou mléčné výrobky, játra, luštěniny a kvasnice (tabulka 12). Denní spotřeba je 2 mg denně [27, 37].

Tabulka 12: Obsah riboflavinu v potravinách [34]

Potravina	Obsah riboflavinu v µg ve 100 g
Játra vepřová	2900-4400
Sýr	330-565
Mléko	20-300
Hrách	10-280

2.2.3 Vitamín B₃ (Niacin)

Vitamín B₃ neboli niacin se skládá z kyseliny nikotinové (3-pyridinkarboxylovou kyselinu) a amidu kyseliny nikotinové (amid kyseliny 3-pyridinkarboxylové kyseliny) [22]. Nikotinamid je krystalická látka, která je bezbarvá a bez zápachu. Bod tání kyseliny nikotinové je 234-237 °C. Od 150 °C začíná kyselina sublimovat [19]. Struktura vitamínu B₃ je uvedena na obrázku 12.



Obrázek 12: Struktura vitamínu B₃ [34]

Hlavní podíl má na funkci nervového a trávicího systému, produkci pohlavních hormonů a zachování zdravé kůže. Je zapojený do metabolismu sacharidů a tuků [29]. V nadměrných dávkách je kyselina nikotinová toxická. Může způsobit poškození jater a ledvin [37]. Projevem nedostatku je suchost a bledost rtů a nervosvalové bolesti [33].

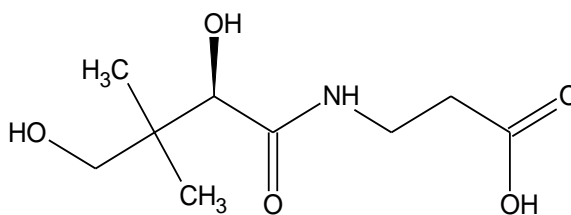
Zdrojem vitamínu B₃ jsou ryby, vepřové maso, játra a kvasnice (tabulka 13). Naopak ovoce a zelenina obsahuje niacinu málo [23, 27]. Doporučený denní příjem je 10 až 20 mg [34].

Tabulka 13: Obsah niacinu v potravinách [36]

Potravina	Obsah niacinu v mg ve 100 g
Játra vepřová	9,7- 27,5
Vepřové maso	3,3-13
Rýže loupaná	6,0
Zelí	0,3

2.2.4 Vitamín B₅ (Kyselina pantothenová)

V přírodě se vyskytuje (R)-enantiomer kyseliny pantothenové. Strukturou je 2,4-dihydroxy-3,3-dimethylbutonová kyselina vazaná amidovou vazbou na 3-aminopropionovou kyselinu (obrázek 13), tzv. β-alanin [22]. Je to viskózní, slabě nažloutlý olej, který je dobře rozpustný ve vodě. Pantothenová kyselina tvoří krystalické soli (např. sodnou nebo vápenatou) rozpustné ve vodě [34].



Obrázek 13: Struktura vitamínu B₅ [34]

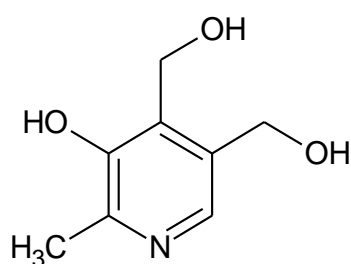
Podílí se na metabolismu sacharidů a tuků, funkci nervového systému a nadledvin, na růstu a vývoji [29]. Projevem nedostatku vitamínu B₅ je vyčerpání, nespavost, deprese, vypadávání a lámání nehtů [33]. Hlavní zdrojem jsou hovězí játra, mléko, vejce, luštěniny a některé druhy zeleniny (tabulka 14). Denní dávka se pohybuje mezi 5-15 mg [26].

Tabulka 14: Obsah kyseliny pantothenové v potravinách [37]

Potravina	Obsah kyseliny pantothenové v µg ve 100 g
Játra hovězí	5700-8200
Vejce	2700
Špenát	180-2680
Květák	920

2.2.5 Vitamín B₆ (Pyridoxin)

Pyridoxin neboli vitamín B₆ jsou tři strukturně příbuzné látky, tzv. pyridoxinová triáda - která je tvořena pyridoxolem (2-methyl-3-hydroxy-4,5-bishydroxymethylpyridin), jehož struktura je zobrazena na obrázku 14. Dále je tvořena pyridoxalem (2-methyl-3-hydroxy-4-formyl-5-hydroxymethylpyridin) a pyridoxaminem (2-methyl-3-hydroxy-4-aminomethyl-5-hydroxymethylpyridin) [19, 22]. Všechny tři látky mají bazický charakter a vytvářejí s minerálními kyselinami soli rozpustné ve vodě. Vitamín B₆ je dobře rozpustný v ethanolu a acetonu. Báze tvoří bezbarvé krystaly o bodu tání 160 °C [23, 19, 34].



Obrázek 14: Struktura vitamínu B₆ [34]

Ovlivňuje tvorbu kolagenu, a tím tedy zasahuje do struktury cévních stěn a chrupavek. Může se uplatnit v prevenci artrózy a revmatických potíží. Také se podílí na přeměně bílkovin a sacharidů v těle, zlepšuje funkci trávicího a nervového systému a zachovává zdravou kůži [27, 29]. Nadměrný příjem způsobuje neuritidu, což znamená zánět nervu. Naopak nedostatek vede k nervozitě, nespavosti a lámavosti nehtů [29, 33].

K dobrým zdrojům patří ryby, kvasnice, zelenina, vejce a banány (tabulka 15). V malém

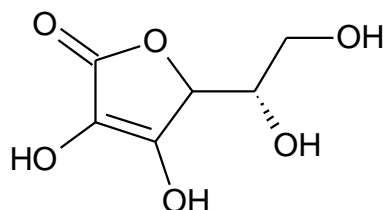
množství vyrábějí pyridoxin střevní bakterie [27, 29].

Tabulka 15: Obsah pyridoxinu v potravinách [37]

Potravina	Obsah pyridoxinu v μg ve 100 g
Pšeničné klíčky	850-1600
Kvasnice	620-700
Zelí	120-290
Játra hovězí	290-580

2.2.6 Vitamín C (Kyselina askorbová)

Vitamín C (obrázek 15) tvoří kyselina L-askorbová (γ -lakton L-threo-2-hexenové kyseliny). Názvem vitamín C se označuje také celý reverzibilní redoxní systém, který zahrnuje L-askorbovou kyselinu a produkt jednoelektronové oxidace, což je L-monodehydroaskorbová kyselina a produkt dvouelektronové oxidace, tj. L-dehydroaskorbovou kyselinu [22]. Je to bezbarvá krystalická látka která má silně redukční vlastnosti, tzn. snadno podléhá oxidaci. Rozpuští se ve vodě, methanolu a ethanolu. [30, 34].



Obrázek 15: Struktura vitamínu C [34]

Má velký význam pro růst a zdraví kostí, zubů, dásní, vazů a krevních cév. Dále pro hojení ran a tvorbu neurotransmiterů, které zodpovídají za přenos nervových impulsů mezi nervovými buňkami [29]. Pomáhá při stresu, fyzické zátěži, opakované infekci, nádorových onemocněních, odbourává nadbytek alkoholu [33]. Nejvyšší obsah má čerstvá zelenina a ovoce. Mezi zdroje vitamínu C patří šípky, petržel nebo černý rybíz (tabulka 16) [22].

Tabulka 16: Obsah vitamínu C v potravinách [37]

Potravina	Obsah kyseliny askorbové v mg ve 100 g
Šípky	600-1 000
Petržel kadeřavá	193
Paprika zelená	84-120
Chřest	24,8-40

3 Analytické stanovení vitamínů

Stanovení vitamínů v potravinářském materiálu je složitý úkol. Důvodem je koncentrace vitamínů, která je ve srovnání s ostatními složkami analyzovaného vzorku velmi nízká. Vitamíny jsou citlivé k oxidaci a v některých případech na světelné záření. Je proto nutné všechny analytické separace provádět s maximální opatrností, v prostředí inertní atmosféry a sníženého přístupu přímého denního světla. Skupina vitamínů je chemicky heterogenní, proto nelze použít žádné univerzální metody ke stanovení většího počtu nebo celé skupiny vitamínů. Při samotném analytickém stanovení je nutno dodržet dané pracovní postupy (pH, teplota).

Nejčastější analytickou metodou stanovení je chromatografie, spektrofotometrie, titrace, polarografie nebo mikrobiologické metody [38].

3.1 Extrakce

Extrakce je separační metoda, při které dochází k distribuci analyzované látky mezi dvě fáze, které jsou nemísitelné. Nejdůležitější je volba vhodného rozpouštědla, neboť dělicí schopnost závisí na selektivní rozpustnosti látek a na výběru mobilní a stacionární fázi v chromatografii, která se následně pro stanovení vyextrahovaných látek používá. Extrakcí jsou pojmenovány i další metody, při kterých je převáděna složka směsi fázovým rozhraním z jedné (plynné, kapalné, pevné) do druhé fáze (kapalné, pevné). Extrakci lze dělit na [39-41]:

- Z pevné fáze do kapaliny – z pevného materiálu se rozpouští ve vhodném rozpouštědle požadovaná složka, ostatní složky nikoli.
- Z kapaliny do kapaliny – extrakce je založena na rozdělovací rovnováze dvou nemísitelných kapalin. Složka přechází do rozpouštědla, ve kterém je lépe rozpustná.
- Z kapaliny na pevnou fázi – extrakce pevnou fází z roztoku selektivně zachycuje požadované složky z roztoku.
- Z kapaliny nebo plynu na pevnou fázi – mikroextrakce pevnou fází, kde zakoncentrování analytu adsorpcí na polymer pokrývající křemenné vlákno.

3.2 Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou separační metody, při kterých se oddělují složky obsažené ve vzorku na základě rozdílné afinity dělených látek vůči mobilní (pohyblivé) a stacionární (nepohyblivé) fázi, které jsou vzájemně nemísitelné. Vzorek se dávkuje do proudu mobilní fáze přes stacionární fázi, která je umístěna v koloně. Jednotlivé složky vzorku se separují na základě schopnosti různě silně se poutat se stacionární fází. Složky opouštějící kolonu indikuje detektor.

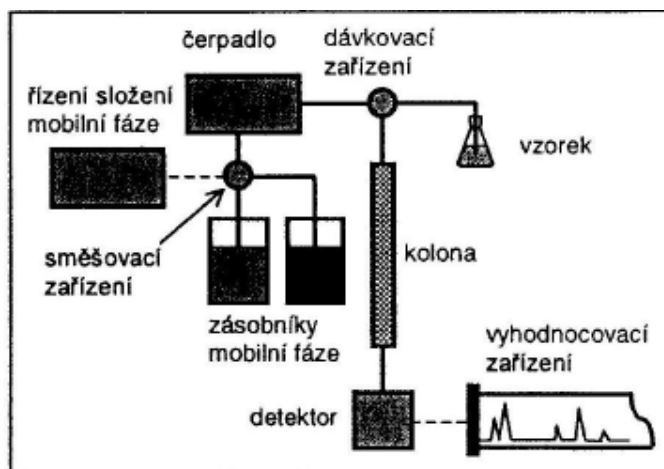
Chromatografické metody umožňují kvantitativní i kvalitativní analýzu. Chromatografické metody lze rozdělit podle skupenství mobilní fáze, podle uspořádání stacionární fáze a podle povahy děje, který převládá při separaci. Podle skupenství mobilní fáze se dělí chromatografické metody na kapalinovou chromatografii, kde je mobilní fází kapalina a plynovou chromatografii, kde je mobilní fází plyn. Podle uspořádání stacionární fáze lze rozdělit chromatografii na kolonovou chromatografii, kde je stacionární fáze umístěna v přímo koloně a dále sem patří plošné techniky, které zahrnují papírovou chromatografii (stacionární fáze je součástí chromatografického papíru) a tenkovrstvou chromatografii, kdy stacionární fáze je umístěna na pevném podkladu (sklo, hliníková fólie). Podle povahy děje, který převládá při separaci se dělí na [39, 42]:

- Rozdělovací chromatografie – uplatňuje se odlišná rozpustnost složek ve vzorku ve stacionární fází (kapalina) a mobilní fází (kapalina nebo plyn).
- Adsorpční chromatografie – uplatňuje se různá schopnost složek adsorbovat se na povrch stacionární fáze (tuhá látka).
- Iontové – výměnné chromatografie – rozhodují různě velké elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze a ionty vzorku.
- Gelová chromatografie – složky se separují podle velikosti na pórovitou stacionární fází, kterou je gel (menší molekuly vzorku se v pórech gelu zdržují déle).
- Afinitní chromatografie – stacionární fáze je schopna vázat ve vzorku složky, ke kterým má úzce selektivní vztah.

3.2.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC je nejčastěji používaná separační metoda, která se využívá v mnoha odvětvích, například ve farmacii, medicíně a potravinářství. Mobilní fáze je čerpána ze zásobníků pomocí vysokotlakého čerpadla. Do proudu mobilní fáze je nadávkován vzorek dávkovacím ventilem a postupuje do chromatografické kolony. V koloně dochází k opakovanému ustanovení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází a k separaci složek vzorku dle rozdílné afinity ke stacionární fází. Za kolonou je detektor, který je připojen k počítači pro vyhodnocení dat. Pokud je stacionární fáze polárnější než mobilní fáze mluvíme o systémech s normálními fázemi (NP-HPLC), kde se jako stacionární fáze používá silikagel nebo oxid hlinitý, který je zakotvený v koloně. Jako mobilní fáze se používá hexan nebo heptan. Pokud je to naopak jedná se o systém s obrácenými fázemi (RP-HPLC), kde se jako mobilní fáze používá methanol nebo ethanol a jako stacionární fáze se používají uhlovodíky nebo alkyly vázané na silikagel. V HPLC se používá množství detektorů, kdy nejpoužívanějším je spektrofotometrický detektor.

Dále se používá fluorimetrický nebo elektrochemický detektor či hmotnostní spektrometr [39, 43].



Obrázek 16: Schéma HPLC [39]

4 Analýza vitamínů v pseudoobilovinách

Pohankové zrno obsahuje největší množství vitamínu B, vitamínu C (kyseliny askorbové) [1]. V listech a květech pohanky, ze kterých se vyrábí čaj je zastoupen vitamín E. V pohance obecné jsou především zastoupeny vitamíny rozpustné ve vodě [8]. V porovnání s pohanka tatarskou má vyšší obsah vitamínu B, ale menší obsah vitamínu E [10]. Naopak v porovnání s pšenicí obsahuje pohanka menší množství vitamínů. Zastoupení jednotlivých vitamínů v pohance a v pšenicí je zobrazeno v tabulce 17.

Tabulka 17: Obsah vitamínů v pohance obecné [9]

Vitamín	Pohanka [mg/100 g]	Pšenice [mg/1000 g]
Vitamín A (β -karoten)	0,21	-
Vitamín B ₁ (Thiamin)	0,46	4
Vitamín B ₂ (Riboflavin)	0,14	1,5
Vitamín B ₃ (Niacin)	1,8	50
Vitamín B ₅ (Kyselina pantothenová)	1,05	11
Vitamín B ₆ (Pyridoxin)	0,73	3
Vitamín C (Kyselina askorbová)	5	0
Vitamín E (Tokoferoly)	5,46	32

Amarant je důležitým zdrojem vitamínů. Obsah u jednotlivých druhů amarantu se příliš neliší. Množství vitamínu B₁, B₂, kyseliny nikotinové a vitamínu C jsou podobné těm, které se vyskytují u jiných zelených rostlin. Avšak obsah β -karotenu je vyšší než u jiných zelených rostlin. Nejvíce zastoupenými vitamíny v amarantovém zrnu jsou vitamíny C a β -karoteny [4].

Tabulka 18: Obsah vitamínů v amarantu [4]

Vitamín	Amarant [mg/100 g]
Vitamín B ₁ (thiamin)	0,1
Vitamín B ₂ (riboflavin)	0,2
Vitamín B ₃ (niacin)	1,2
Vitamín C (kyselina askorbová)	4,5
β -karoteny	4,6

4.1 Úprava vzorku před analýzou a stanovení jednotlivých vitamínů

Odběr vzorku a jeho úprava pro analýzu je nejdůležitějším procesem při samotném stanovení vitamínů. Proto musíme při zpracování vzorku být opatrní a pečliví. Ještě před samotnou analýzou oloupeme semena pseudoobiloviny a upravíme lyofilizací [4, 44]. Stanovení vitamínů v potravinách zahrnuje následující kroky: přípravu vzorku, alkalickou hydrolýzu vzorku (zmýdelnění), enzymatickou hydrolýzu u vitamínu K a vitamínů skupiny B, kyselou hydrolýzu u vitamínů skupiny B [44], extrakci vitamínů rozpouštědlem [44] a vlastní analytické stanovení [38].

Při stanovení vitamínů rozpustných v tucích je vzorek zmýdelněn methanolickým nebo ethanolickým roztokem hydroxidu draselného za přítomnosti antioxidantů (kyselina askorbová). Hydrolýza probíhá pod zpětným chladičem pod proudem dusíku. Při stanovení vitamínu K se využívá enzymatické hydrolýzy lipázami [18, 44, 46].

K extrakci vitamínů se používají zpravidla organická rozpouštědla (petroether, n-hexan) a poté se k hydrolyzátu přidává voda a minerální kyseliny. Pomocí chromatografie se u některých extraktů provádí přečištění na vhodných adsorpčních materiálech (např. silikagelu) [46, 47, 48]. U vitamínů rozpustných v tucích se provádí filtrace přes vrstvu bezvodého síranu sodného, kdy dochází k vysušení extraktu, který se následně odpařuje ve vakuové odparce za snížené teploty [18].

4.1.1 Stanovení vitamínu A pomocí HPLC

Při stanovení vitamínu A byla nejdříve provedena hydrolýza vzorku ethanolickým roztokem NaOH za přítomnosti antioxidantů (kyseliny askorbové) pod zpětným chladičem po dobu 30 minut ve zmýdelňovací aparatuře při teplotě 60-70 °C s proudem dusíku [45, 49].

Vitamín A byl extrahován do hexanu z vodně-ethanolického roztoku. Stopové zbytky vody byly odstraněny vrstvou bezvodého síranu sodného a roztok byl následně filtrován přes skládaný filtr. Při zakoncentrování extraktu byla použita destilace za sníženého tlaku ve vakuové odparce, kdy bylo dosaženo koncentrace vhodné pro nástřik do HPLC kolony. K detekci byl vybrán spektrofotometrický detektor při vlnové délce 325 nm [18, 45, 47]. Jako mobilní fáze byl použit methanol a jako stacionární fáze oktadecylsilikagel [50]. Ke kvantitativnímu vyhodnocení byla použita plocha píku z chromatogramu a pro kvalitativní vyhodnocení bylo použito porovnání vzorku se standardním vzorkem all-trans-retinol palmitátu [47, 50].

4.1.2 Spektrofotometrické stanovení vitamínu A

Retinol byl po zmýdelnění ethanolickým roztokem hydroxidu sodného izolován extrakcí petroletherem a po chromatografickém čištění extraktu na sloupci oxidu hlinitého stanoven pomocí spektrofotometrie. Po reakci s chloridem antimonitým byla změřena intenzita modrého zbarvení při vlnové délce 620 nm. Absorbance byla měřena proti slepému vzorku, kterým byl chloroform [18, 38]

4.1.3 Stanovení vitamínu B₁ pomocí HPLC

Při stanovení thiaminu byla provedena kyselá hydrolyza vzorku s využitím 0,1M HCl nebo 0,1M H₂SO₄ v autoklávu nebo ve vodní lázni při 90-100 °C [46, 47, 51]. Po ochlazení a úpravě pH byl přidán do vzorku enzym takadiastáza, který byl inkubován při 37 °C 15 hodin. Jako mobilní fáze byla použita směs 0,01M NaH₂PO₄ a 0,15M NaClO₄ s methanolem v poměru 95:5. Pro separaci byla zvolena chromatografická kolona s chemicky vázanou oktadecylsilikagelovou fází. Vitamín B₁ byl detekován s využitím fluorimetrického detektoru při excitační vlnové délce 375 nm a emisní vlnové délce 440 nm [46, 52, 53].

4.1.4 Fluorimetrické stanovení vitamínu B₁

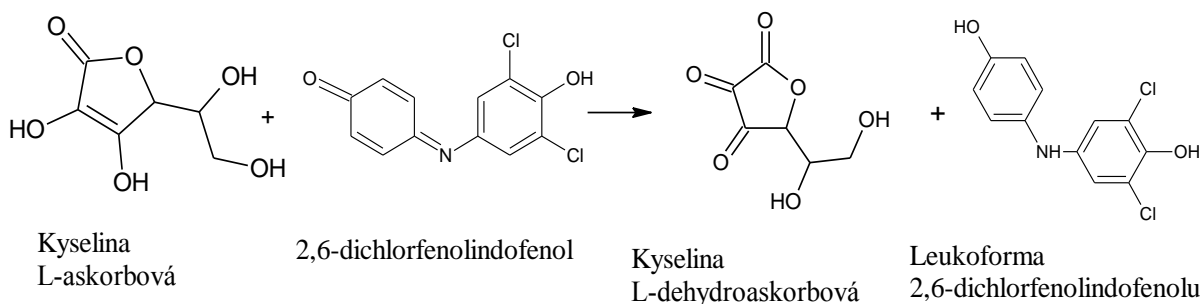
Fluorimetrická metoda je založena na oxidaci thiaminu oxidačním činidlem v alkalickém prostředí na thiochrom. Nejčastěji se používá jako oxidační činidlo hexakynoželezitan draselný. Thiochrom se po oxidaci extrahoval isobutanolem a jeho koncentrace byla stanovena fluorimetricky, neboť vykazovala modrou fluorescenci. Fluorescence vzniklého thiochromu byla detekována při vlnové délce 420-460 nm o excitační vlnové délce 365,5 nm [38, 54].

4.1.5 Stanovení vitamínu C pomocí HPLC

Vitamín C byl extrahován z homogenizovaného vzorku roztokem 5% kyseliny metafosforečné, 8% kyseliny octové a 0,005M ethylendiamintetraoctové kyseliny a nechal se stát za stálého míchání [46, 55]. Poté byl kvantitativně převeden do odměrné baňky a zfiltrován přes filtrační papír. Extrakt byl stanoven HPLC při teplotě 35 °C se spektrofotometrickým detektorem a pro detekci vitamínu C byla nejvhodnější vlnová délka v rozmezí 240 – 265 nm, kdy nejčastěji se používá vlnová délka 254 nm s použitím chromatografické kolony C18. Pro separaci byla použita izokratická eluce mobilní fáze 5% methanolu ve vodě [46, 47].

4.1.6 Titrační stanovení vitamínu C

Titrační metoda je založena na oxidaci kyseliny askorbové (obrázek 17). Kyselina askorbová se oxiduje titračním činidlem 2,6-dichlorfenolindofenolem na kyselinu dehydroaskorbovou v kyselém prostředí (např. kyseliny metafosforečné) za současné redukce 2,6-dichlorfenolindofenolu na bezbarvou bázi. Vzorek byl titrován do vzniku prvního růžového zbarvení vlivem přebytku nezreagovaného titračního činidla [56, 57].



Obrázek 17: Oxidace kyseliny L-askorbové [38]

4.1.7 Stanovení vitamínu E pomocí HPLC

Při stanovení vitamínu E ve vzorku byla provedena alkalická hydrolýza KOH za přítomnosti kyseliny askorbové pod zpětným chladičem ve vodní lázni za stálého míchání. Následně extrakce vzorku byla provedena hexanem a rozpouštědlo bylo odstraněno ve vakuové odparce při teplotě 40 °C. Pro stanovení vitamínu E metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie se systémem s obrácenými fázemi byl použit fluorimetrický detektor s excitační vlnovou délkou 292 nm a emisní vlnovou délkou 330 nm. Mobilní fází byla směs methanolu a vody v poměru (85:15). K separaci byla použita chromatografická kolona C18 [58, 59].

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo zpracování literární rešerše, která se zabývá stanovením vitamínů v pseudoobilovinách s využitím moderních analytických technik.

V první části je popsána charakteristika, chemické složení pohanky a amarantu a následně jejich využití. Složení obou dvou pseudoobilovin je podobné.

Druhá část shrnuje vlastnosti jednotlivých vitamínů, které jsou obsažené v pseudoobilovinách, jejich biologické funkce a obsah jednotlivých vitamínů v potravinách.

Následně je věnována pozornost úpravě vzorku před samotnou analýzou vitamínů, která je zdlouhavá a náročná. Úprava vzorku zahrnuje alkalickou hydrolyzu vzorku či enzymatickou nebo kyselou hydrolyzu u skupiny vitamínu B. Z upraveného vzorku se izolují vitamíny většinou pomocí extrakce a jejich stanovení se provádí především pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s využitím fluorimetrického nebo spektrofotometrického detektoru. Také lze použít ke stanovení jiné analytické metody jako například fluorimetrii, spektrofotometrii nebo titrační metody.

Bylo zjištěno, že nejbohatším zdrojem vitamínu E je pohanka. Naopak v amarantu se vyskytuje nejvíce vitamínu C a β -karotenu. Celkově je v pseudoobilovinách nejvíce zastoupena skupina vitamínu B.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] FULEKY, Gyorgy. *Cultivated plants, primarily as food sources*. Oxford, United Kingdom: EOLSS Publications, 2009. ISBN 978-1-84826-100-6.
- [2] *Using Cereal Science and Technology for the Benefit of Consumers: Proceedings of the 12th International ICC Cereal and Bread Congress*. UK: Elsevier, 2005. ISBN 978-1-845-69063-2.
- [3] CHLOPIČKA J. et al. Total phenolic and total flavonoid content, antioxidant activity and sensory evaluation of pseudocereal breads. *Food Science and Technology*. 2012; 46: 548-555.
- [4] TRUGO, Luiz C., Paul M FINGLAS a Benjamin CABALLERO. *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. 2nd ed. Oxford: Academic Press, c2003. ISBN 0-12-227055-X
- [5] JANOVSKÁ, Dagmar, Jana KALINOVÁ a Anna MICHALOVÁ. *Metodika pěstování pohanky obecné v ekologickém a konvenčním zemědělství*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2008. ISBN 978-80-7427-000-0.
- [6] Kosmetikasvé pomoci [online]. 2015 [cit. 2019-07-03]. Dostupné z: <http://kosmetikasvepomoci.blog.cz/1503/pohanka-obecna>
- [7] FAUBION. *Encyclopedia of food grains*. Second edition. Waltham, MA: Academic Press is an imprint of Elsevier, [2016]. ISBN 978-0-12-8035375.
- [8] MOUDRÝ, Jan. *Pohanka a proso*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2005. ISBN 80-7271-162-8.
- [9] TAYLOR, J. R. N. a Joseph M. AWIKA. *Gluten-free ancient grains: cereals, pseudocereals, and legumes : sustainable, nutritious, and health-promoting foods for the 21st century*. Duxford, United Kingdom: Woodhead Publishing, an imprint of Elsevier, [2017]. Woodhead Publishing in food science, technology, and nutrition. ISBN 978-0-08-100866-9.
- [10] WRIGLEY, Colin W., Harold CORKE, Koushik SEETHARAMAN a Jon M. FAUBION. *Encyclopedia of food grains*. Second edition. Waltham, MA: Academic Press is an imprint of Elsevier, [2016]. ISBN 978-0-12-803536-8.
- [11] HÁLKOVÁ, Jana, Marie RUMÍŠKOVÁ a Jana RIEGLOVÁ. *Analýza potravin*. Újezd u Brna: Ivan Straka, 2000. ISBN 80-902775-3-5.
- [12] ARENDT, Elke K. a Fabio Dal BELLO. *Gluten-Free Cereal Products and Beverages*. USA: Academic Press, 2008. ISBN 9780123737397.

- [13] LEIFERTO VÁ, Irena a Milena LISÁ. *Pohanka zdravá a léčivá i dnes: historie - vlastnosti - 25 receptů levných pokrmů - léčivé čaje*. Praha: Art Press Servis, 1991. Edice rad a návodů. ISBN 80-900730-0-x.
- [14] ALVAREZ-JUBETE, L., H. WIJNGAARD, E.K. ARENDT a E. GALLAGHER. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chemistry*. 2010, 119(2), 770–778.
- [15] XU, Jun-Ping. *Natural substances for cancer prevention*. Boca Raton: CRC Press, [2018]. ISBN 978-0-8153-6538-9.
- [16] DAS, Saubhik. *Amaranthus: a promising crop of future*. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2016. ISBN 978-981-10-1468-0.
- [17] SHAHIDI, Fereidoon a Marian. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. 2. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2003. ISBN 978-0-20350-873-2.
- [18] ELVERS, Barbara a Giuseppe BELLUSSI. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. 7th, completely rev. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2011. ISBN 978-3-527-32943-4.
- [19] DAVÍDEK, Jiří, Gustav JANÍČEK a Jan POKORNÝ. *Chemie potravin*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1983.
- [20] SZAROWSKÁ, Eva. *Charakteristika a vlastnosti amarantu*. Zlín, 2010. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [21] YANG, Shang-Tian. *Bioprocessing for value-added products from renewable resources: new technologies and applications*. Boston: Elsevier, 2007. ISBN 978-0-444-52114-9.
- [22] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902391-4-5.
- [23] ŠÍCHO, Vladislav, Zdeněk VODRÁŽKA a Blanka KRÁLOVÁ. *Potravinářská biochemie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1981.
- [24] MINDELL, Earl. *Vitamínová bible: Jak můžete žít zdravěji s pomocí vhodných vitamínů a potravin?*. Budapest: Glória Kiadó, 1994.
- [25] DUCHOŇ, Jiří. *Lékařská chemie a biochemie: učebnice pro lékařské fakulty*. Praha: Avicenum, 1985.
- [26] POKORNÝ, Jan a Jan PÁNEK. *Základy výživy a výživová politika*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1996. ISBN 80-7080-260-x.

- [27] HORNA, Aleš. *Konference Vitamíny 2001: sborník konference*, Pardubice, 5.-6. září 2001. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2001. ISBN 80-7194-380-0.
- [28] HYNIE, Sixtus. *Speciální farmakologie. Díl 6, Hormony a vitamíny. 2., zcela přeprac.* vyd. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0416-7.
- [29] HOŘEJŠÍ, Jaroslav a René PRAHL. *Rodinná encyklopedie zdraví: abecední průvodce vysvětlující více než 5000 termínů včetně příznaků a názvů chorob, léků a diagnostických i léčebných postupů. 2.* Praha: Gemini, 1993. ISBN 80-7176-872-3.
- [30] FRAGNER, Jiří. *Vitamíny, jejich chemie a biochemie*. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1961.
- [31] GRIFFITH, H. Winter. *Complete guide to vitamins, minerals & supplements*. Tucson: Fischer, 1988. ISBN 1-55561-006-4.
- [32] JANČA, Jiří. *Co nám chybí: Kovy, jiné prvky a vitamíny v lidském těle*. Rozš. vyd. Praha: Eminent, 1992. ISBN 80-900176-2-2.
- [33] FOŘT, Petr. *Zdraví a potravní doplňky: encyklopedie potravních doplňků pro racionální výživu a péči o zdraví : podrobný popis, při jakých potížích je používat, hodnocení účinnosti, doporučené denní dávky : vitamíny, minerální látky, beta-glukany, aminokyseliny, mozkové nutrienty, byliny, speciality jako řasy, chrupavky, propolis, ovosan*. V Praze: Ikar, 2005. ISBN 80-249-0612-0.
- [34] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie. 3, Od objevu genu ke genovému inženýrství*. Praha: Academia, 1993. ISBN 80-200-0471-8.
- [35] PAPAS, Andreas a Dana BURIÁNOVÁ. *Vitamin E: zázračný antioxidant při prevenci a léčbě srdečních chorob, rakoviny a stárnutí*. Praha: Pragma, 2001. ISBN 80-7205-773-1.
- [36] MANDŽUKOVÁ, Jarmila. *Léčivá síla vitaminů, minerálů a dalších látek*. Benešov: Start, 2005. Praktický domácí rádce. ISBN 80-86231-36-4.
- [37] HLÚBIK, Pavel a Libuše OPLTOVÁ. *Vitamíny*. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0373-4.
- [38] DAVÍDEK, Jiří. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1977. ISBN (váz.).
- [39] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd.* Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.

- [40] HOLZBECHER, Závaš a Jaroslav CHURÁČEK. *Analytická chemie*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987.
- [41] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0852-9.
- [42] ČŮTA, František a Milan POPL. *Instrumentální analýza*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1986.
- [43] SOMMER, Lumír. *Teoretické základy analytické chemie III*. Brno: Vysoké učení technické, 1995. ISBN 80-214-0660-7.
- [44] ARENDT, Elke K. *Cereal grains for the food and beverage industries*. Philadelphia, PA: Woodhead Pub., 2013. ISBN 978-0-85709-413-1.
- [45] KASPER, Heinrich. *Výživa v medicíně a dietetika*. Praha: Grada, 2015. ISBN 978-80-247-4533-6.
- [46] DAVÍDEK, Jiří. *Laboratorní příručka analýzy potravin. 2.*, nezm. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1981. ISBN (váz.)
- [47] MÜLLER-MULOT, W., D. A. T. SOUTHGATE a G. B. BRUBACHER. *Methods for the determination of vitamins in food: Recommended by COST 91*. London: Elsevier, 1985. ISBN 0-85334-339-X.
- [48] TOWNSHEND, Alan. *Encyclopedia of analytical science*. Volume 8, Sam-Sur. London: Academic Press, 1995. ISBN 0-12-226708-7.
- [49] MEYERS, Robert A. *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory, and instrumentation*. New York: Wiley, c2000. ISBN 9780471976707.
- [50] KLYUEV A. S., A modified procedure for determination of vitamins A and E by reversed-phase HPLC. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 1996, 270-272.
- [51] FANALI, Salvatore. *Liquid chromatography*. Second edition. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2017. ISBN 9780128053928.
- [52] YOSHIDA, Mikihiro et al. A novel method for determining vitamin B1 in a wide variety of foodstuffs with or without polyphenols. *Food Chemistry*. 2012, č. 135, s. 2387– 2392. ISSN 0308-8146.
- [53] ULUSOY, Songül a MEHMET AKCAY. Simultaneous determination of vitamins B1 and B2 in food samples by modified cloud point extraction method and HPLC-DAD. *Food Anal. Methods*. 2018, 260-269.
- [54] WILHELM F.: *Vitamins*, Walter de Gruyter, 1988.

- [55] LINTSCHINGER, J., FUCHS N., HOSER M., JAGER R, HLEBEINA T., MARKOLIN G. a GOSSLER W. Uptake of various trace elements during germination of wheat, buckwheat and quinoa. *Plants food for human nutrition*. 1997, 223-237.
- [56] DOUBRAVA, Jaroslav, Josef KOŠTÍŘ a Jiří POSPÍŠIL. *Základy biochemie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1984.
- [57] CUNHA-SANTOS, Carla, Juliane VIGANÓ, Daniela Andrade NEVES, Julian MARTÍNEZ a Helena Teixeira GODOY. Vitamin C in camu-camu: evaluation of extraction and analytical methods. *Food Research International*. 2019, 160-166.
- [58] LEHMANN, James W., Daniel H. PUTNAM a Asaf A. QURESHI. Vitamin E isomers in grain amaranths. *Lipids*. 1994, 177-181.
- [59] ZHANG, Zhen, Caian HE, Ruixue ZHU, et al. Seed oils of five black tartary buckwheat cultivars with biochemical characterization and antioxidant properties. *CroosMark*. 2016, 1127-1136.