

# Možnosti stanovení niacinu a pyridoxinu

Gabriela Kratinová

---

Bakalářská práce

2007



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav potravinářského inženýrství  
akademický rok: 2006/2007

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Gabriela KRATINOVÁ**  
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**  
Téma práce: **Možnosti stanovení niacinu a pyridoxinu**

Zásady pro vypracování:

1. zpracovat fyziologii niacinu a pyridoxinu
2. vyhledat možnosti izolace daných vitamínů a metodiky jejich stanovení s důrazem na HPLC

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

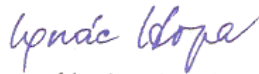
**dle doporučení vedoucího práce**

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.**  
Ústav potravinářského inženýrství a chemie

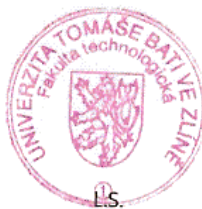
Datum zadání bakalářské práce: **8. ledna 2007**

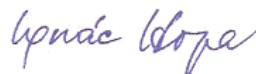
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. června 2007**

Ve Zlíně dne 2. května 2007



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.  
děkan





prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.  
ředitel ústavu

## **ABSTRAKT**

Bakalářská práce byla zaměřena na získání souhrnných poznatků o vitamínech B<sub>3</sub> (niacin) a B<sub>6</sub> (pyridoxin). Hlavním zdrojem těchto vitaminů je především maso (hovězí, vepřové i drůbeží), vnitřnosti (játra, ledviny), z rostlinných zdrojů jsou vhodné cereálie (obilí, pšeničná mouka...) a luštěniny. V práci jsou shrnuty postupy pro stanovení niacinu a pyridoxinu se zaměřením na chromatografickou techniku HPLC (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie).

Klíčová slova: niacin, pyridoxin, HPLC, HPLC – UV/VIS

## **ABSTRACT**

This thesis was focused on obtaining complete information about vitamins B<sub>3</sub> (niacin) and B<sub>6</sub> (pyridoxin). Main sources of these vitamins are meat (beef, pork and poultry), entrails (liver, kidney), fishes and trast, cereals (corns, wheat flour...) and legumens (peas, bean). Both vitamins are attended at much of metabolism reactions in organism. Therefore, these vitamins are necessary for human sustenance especially for right growth and evolution. The next part of this study was to find measurements conditions for them based on HPLC techniques (High Performance Liquid Chromatography).

Keywords: niacin, pyridoxin, HPLC, HPLC – UV/VIS

Poděkování, motto

Chtěla bych poděkovat vedoucí bakalářské práce Ing. Daniele Kramářové, Ph.D. za cenné připomínky k danému tématu, odborné vedení a trvalý zájem při vypracování bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině za podporu během celého studia.

## OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>8</b>
<b>1 VITAMINY</b> .....	<b>9</b>
1.1 HYPOVITAMINOSA A HYPERVITAMINOSA .....	9
1.2 HYDROFILNÍ A LIPOFILNÍ VITAMINY .....	9
<b>2 VITAMIN B<sub>3</sub> - NIACIN</b> .....	<b>11</b>
2.1 SYNTÉZA NIACINU .....	11
2.2 VLASTNOSTI NIACINU .....	13
2.3 ZDROJE NIACINU .....	13
2.4 PROJEVY NEDOSTATKU A NADBYTKU NIACINU .....	14
2.4.1 Niacin jako prevence .....	15
2.5 DOPORUČENÁ DENNÍ DÁVKA .....	16
<b>3 VITAMIN B<sub>3</sub> – PYRIDOXIN</b> .....	<b>17</b>
3.1 VÝZNAM PYRIDOXINU .....	18
3.2 VÝSKYT PYRIDOXINU .....	19
3.3 PROJEVY NEDOSTATKU A NADBYTKU PYRIDOXINU .....	20
3.4 DOPORUČENÁ DENNÍ DÁVKA .....	20
<b>4 HPLC – VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE</b> .....	<b>21</b>
4.1 ROZDĚLENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD .....	21
4.2 VYMEZENÍ NĚKOLIKA ZÁKLADNÍCH POJMŮ .....	22
4.3 SESTAVA KAPALINOVÉHO CHROMATOGRAFU .....	23
<b>5 STANOVENÍ NIACINU</b> .....	<b>29</b>
<b>6 STANOVENÍ PYRIDOXINU</b> .....	<b>39</b>
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>48</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>50</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>54</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>56</b>
<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>57</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH</b> .....	<b>58</b>

## ÚVOD

Živé organismy získávají energii ze základních živin, které přijímají z okolního prostředí. Biochemickou přeměnou látek obsažených v živinách se současně s uvolňováním energie syntetizují sloučeniny potřebné k výstavbě buněčných struktur. Některé potřebné sloučeniny však buňky nejsou schopny vytvářet samy a musí být proto přijímány z potravy. Tyto látky souhrnně nazýváme esenciální faktory.

Vitaminy jsou nízkomolekulární organické sloučeniny. V organismu je jejich množství poměrně malé, mají zato však velký význam pro biologické pochody. Snížený příjem vitaminů nazýváme hypovitaminózou, projevuje se v organismech funkčními poruchami. Také však v některých případech může dojít k nadměrnému přísunu vitaminů, poté hovoříme o hypervitaminóze.

V dnešní době je přísun všech vitaminů velmi nízký. Lidé se nestravují dle pravidel zdravé výživy, jsou ovlivňováni všudypřítomným stresem a znečištěným životním prostředím. Všechny tyto faktory se poté odrážejí na životních funkcích člověka. Proto je vhodné zvyšovat denní dávky vitaminů, které jsou pro lidský organismus nezbytné. Doporučuje se také konzumovat potraviny, jež byly fortifikovány vitaminy.

Tato práce je zaměřena na dva konkrétní vitaminy. Vitamin B<sub>3</sub> – dříve nazývaný jako vitamin PP, dnes se dává přednost termínu niacin. Tento vitamin se vyskytuje ve dvou formách, jako kyselina nikotinová a nikotinamid. Obě tyto látky jsou stejně biologicky účinné. Jsou součástí koenzymů NAD<sup>+</sup> a NADP<sup>+</sup>. Druhým vitaminem je vitamin B<sub>6</sub>, pyridoxin. Ten se vyskytuje ve třech formách se stejnými biologickými účinky jako pyridoxol, pyridoxal a pyridoxalamin. Oba tyto vitaminy patří do skupiny nazývané B-komplex a jsou rozpustné ve vodě. Zdrojem těchto vitaminů jsou především živočišné bílkoviny, například hovězí a vepřové maso, vnitřnosti, mléko a vejce. Již méně významným zdrojem jsou potraviny rostlinného původu – obiloviny a luštěniny.

Cílem této práce bylo provést literární rešerši o využití metody HPLC pro stanovení vitaminů rozpustných ve vodě, konkrétně vitaminů B<sub>3</sub> a B<sub>6</sub>. Existuje velká řada metodik stanovení, a proto bylo důležité uceleně uspořádat a utřídit získané informace v závislosti na charakteru potraviny.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**



## 1 VITAMINY

**Vitaminy** jsou exogenní nízkomolekulární sloučeniny, které působí ve velmi malých koncentracích. Hovoříme o nich jako o tzv. biokatalyzátorech. Vitaminy plní v těle několik důležitých funkcí. Jsou prekurzory kofaktorů mnoha enzymů (vitaminy skupiny B) nebo se uplatňují v oxidačně - redukčních systémech (vitamin E, vitamin C atd.). Pro lidský organismus jsou nepostradatelné (esenciální). Velkou většinu z nich si heterotrofní organismus nedovede syntetizovat sám, proto je musí přijímat z vnějšího prostředí potravou. [1, 2]

### 1.1 Hypovitaminóza a hypervitaminóza

Řada vitaminů vzniká z tzv. provitaminů. **Provitaminy** jsou látky, které nemají účinek vitamínu. Teprve působením ultrafialového záření nebo působením enzymových systémů se mění v účinné vitaminy. Jsou to tedy prekurzory vitaminů. Naopak **antivitaminy** brání plnému využití daného vitamínu nebo jej zcela inhibují. To může vést až k jeho deficitu. Lehké formy nedostatku vitamínu označujeme jako **hypovitaminózu**, těžší formy potom jako **avitaminózu**. Hypovitaminóza může být způsobena hned několika faktory:

- nedostatkem vitaminů v potravě
- nedostatečnou resorpcí vitaminů v zažívací soustavě (z důvodu průjemových a zánětlivých onemocnění, zrychlené peristaltice, poruše resorpce tuků, apod.)
- zvýšené potřebě vitaminů v organismu (gravidita, rekonvalescence...)
- vlivem antivitaminů

V některých případech však může dojít naopak k **hypervitaminóze** – nadbytku vitamínu. U nás se s těmito případy příliš často neseťkáváme. [2, 3]

### 1.2 Hydrofilní a lipofilní vitaminy

Vitaminy dělíme podle jejich rozpustnosti ve vodě na **hydrofilní** a rozpustnosti v tucích – **lipofilní**. Hydrofilní vitaminy jsou významné především svými katalytickými účinky. Uplatňují se zejména jako kofaktory různých enzymů, např. v metabolismu nukleových kyselin, proteinů, sacharidů a lipidů. Řadíme mezi ně:

- Vitamin B<sub>1</sub> (thiamin)
- Vitamin B<sub>2</sub> (riboflavin)

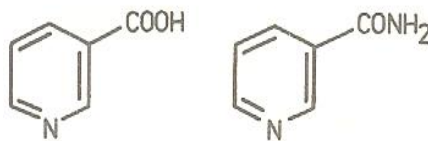
- Vitamin B<sub>3</sub> (kyselina nikotinová a její amid)
- Vitamin B<sub>5</sub> (kyselina pantothenová)
- Vitamin B<sub>6</sub> (pyridoxin)
- Vitamin B<sub>9</sub> (kyselina listová)
- Vitamin B<sub>12</sub> (kyanokobalamin)
- Kyselina lipoová
- Biotin
- Bioflavonoidy
- Vitamin C (kyselina L-askorbová a L-dehydroaskorbová)

Lipofilní vitaminy mají rozmanité funkce. Řadíme sem:

- Vitamin A (retinol) a jeho provitamíny (karotenoidy)
- Vitaminy D (kalciferoly)
- Vitamin E ( tokoferoly a tokotrienoly)
- Vitamin K (fylochinony, farnochinony)
- Vitamin F (esenciální mastné kyseliny) [2]

## 2 VITAMIN B<sub>3</sub> - NIACIN

Vitamin B<sub>3</sub> se vyskytuje v podobě kyseliny nikotinové a jejího amidu. Protože by mohlo docházet k záměně s tabákovým nikotinem, vytvořil se nový název *niacin* („ni“ pro nikotin, „ac“ pro acid a „in“ pro vitamin). **Kyselina nikotinová** – chemicky, kyselina 3-pyridinkarboxylová a její **amid** – nikotiamid, byly dříve označovány jako vitamin PP (Pellagra Preventive factor).

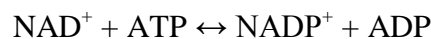
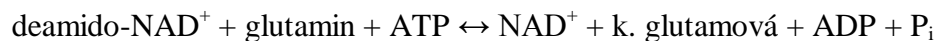
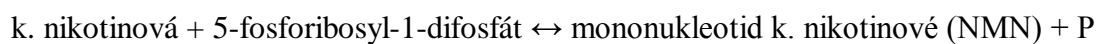


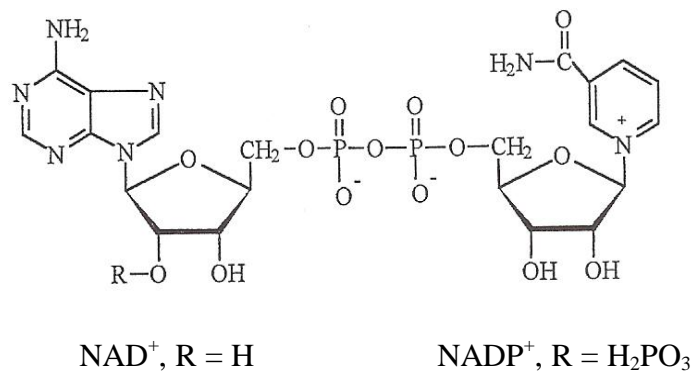
*Kyselina nikotinová a nikotinamid*

Niacin je vitamin rozpustný ve vodě. Obě jeho látky jsou biologicky stejně účinné a velmi stabilní. Lidský organismus je schopen omezeně vytvářet niacin z aminokyseliny tryptofanu pomocí enzymů obsahujících jako kofaktor vitamin B<sub>6</sub>. Amid se používá k fortifikaci potravin. [2, 4]

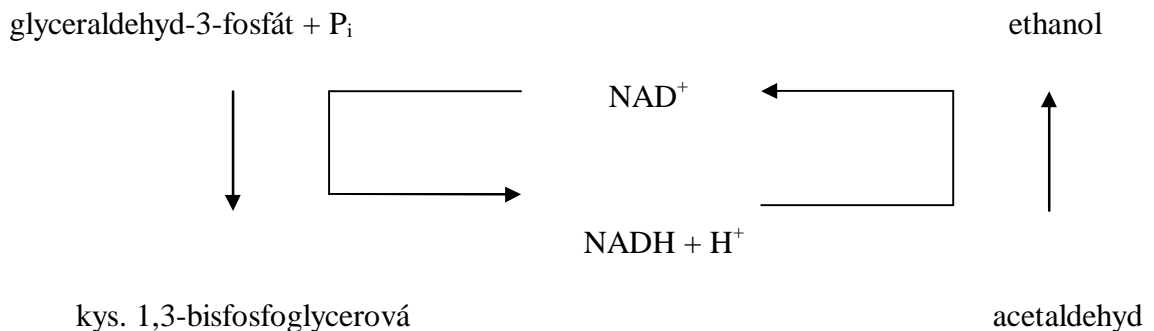
### 2.1 Syntéza niacinu

V biologických systémech se uplatňují dva koenzymy, které vznikají z kyseliny nikotinové. Jsou to *nikotinamidadenindinukleotid* ( $NAD^+$ ) a *nikotinamidadenindinukleotidfosfát* ( $NADP^+$ ), souhrně se označují jako koenzymy *pyridinových dehydrogenas*. Jsou syntetizovány z volné kyseliny nikotinové:





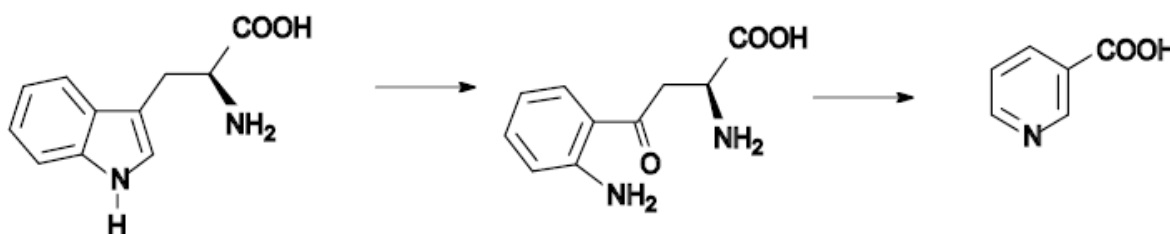
Průběh reakce spočívá v tom, že se odejmou dva atomy vodíku ze substrátu. Tím dojde k přechodu koenzymů na redukovanou formu  $\text{NADH} + \text{H}^+$  (nebo  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ ). Když předají vodíky příslušnému akceptoru, opět se samy reoxidují na původní formu. Účastní se velkého množství biochemických procesů. Je důležitý pro přenos elektronů v dýchacím řetězci, kde vytváří reverzibilní oxidoredukční systémy. Uplatňuje se především v citrátovém (Krebsově) cyklu nebo Waldově cyklu v sítnici oka. Také se podílí na přeměně cukrů, tuků, aminokyselin, cholesterolu, steroidních hormonů a mnoha dalších látek. Při ethanolovém kvašení dochází k těmto reakcím:



**Obrázek č. 1** Schéma pro ethanolové kvašení

$\text{NAD}^+$  se také účastní neredoxních reakcí při mobilizaci vápníku a při replikaci a reparaci DNA.  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADP}^+$  jako koenzymy se nejvíce váží v *alkoholdehydrogenase*, *glutamátdehydrogenase* a *malátdehydrogenase* apod. Nejdůležitějším místem syntézy koenzymů z tryptofanu jsou játra. Proto je zde také největší obsah koenzymů niacinu, ve srovnání

s ostatními tkáněmi. Všechny ostatní tkáně, které jsou metabolicky aktivní, obsahují jeho esenciální metabolické složky. [4, 5, 6]



*Syntéza kyseliny nikotinové z tryptofanu*

## 2.2 Vlastnosti niacinu

Tento vitamin se částečně vstřebává v žaludku. Převážná většina je vstřebávána v tenkém střevě. Pasivní i usnadněná difúze umožňují jeho přenos z krevního řečiště. Stará se o to, aby se buňky tvořily na správném místě a aby se mohly případně opravit poškozené molekuly DNA. Zajišťuje funkčnost nervového systému a udržuje v krvi dostatečné množství kyslíku. Také zabraňuje shlukování krevních destiček. Snižuje hladinu cholesterolu, a tedy riziko arteriosklerózy a trombózy. Ke snižování hladiny cholesterolu je především využívána kyselina nikotinová. K dosažení terapeutického účinku jsou potřebné velmi vysoké dávky, výsledná koncentrace v krvi je někdy větší než 15 mM. Vysoké dávky niacinu také napomáhají tvorbě červených krvinek (užití při léčbě oběhových potíží). [4, 7]

Studie ukazují, že nikotinamid je důležitý imunomodulátor při onemocnění *diabetes mellitus*. Hypotézy předpokládají, že nikotinamid může obnovit poškozenou kapacitu neutrofilů u diabetických pacientů zvyšováním vaznosti NADH jako elektronového donoru. [8]

## 2.3 Zdroje niacinu

Za zdroj vitamínu B<sub>3</sub> lze považovat především živočišnou bílkovinu:

- maso: skopové, hovězí, vepřové, vnitřnosti (játra, ledvinky, srdce...)
- ryby: tuňák, losos
- kvasnice, mléko, vejce...

Z rostlinných proteinů bychom mohli jmenovat:

- obiloviny, pšeničná mouka, rýže, ořechy...
- luštěniny: hrách, fazole
- houby

V ovoci a zelenině je jeho výskyt téměř zanedbatelný. Náš organismus je schopen syntetizovat niacin z tryptofanu. Pokryje přibližně jednu třetinu denní dávky. Proto jeho potřeba závisí na příjmu bílkovin potravou. Vstřebávání z rostlinné stravy je obtížnější (převažuje volná kyselina). Např. vitamin B<sub>3</sub> obsažený v kukuřici je tak pevně vázán, že náš organismus ho není schopen uvolnit. Lépe je absorbován z živočišných tkání (vyskytuje se zde ve formě amidu). [9, 10]

**Tabulka č. 1** Obsah niacinu ve vybraných potravinách

vit. B <sub>3</sub>	mg.100g <sup>-1</sup>
skopové maso	55,0
hovězí játra	15,0
vepřová játra	15,0
burské ořechy	14,0
hovězí ledvinky	12,0
králičí maso	11,0
drůbež	8,0
hovězí maso	6,0
sušený hrách, fazole	3,0
kukuřice	2,0
tvrdý sýr	1,4



## 2.4 Projevy nedostatku a nadbytku niacinu

Klasickým příznakem nedostatku niacinu je pelagra (nazývána jako „nemoc hrubé kůže“). Projevuje se zarudnutím, později zhnědnutím kůže, ekzémy, průjemy nebo zácpou, zvrace-

ním, nechutenstvím, ztrátou čichu. Dochází ke změnám na sliznici úst, žaludku a střev. Nedostatek může vést k poruchám sekrece HCl v žaludku, nakonec i nedostatečnému vstřebávání vitamínu B<sub>12</sub>. Další příznaky jsou doprovázené nespavostí, bolestmi hlavy, v těžkých případech depresi, ztrátami rozumových schopností. Tato nemoc se označuje někdy jako nemoc tří D, protože uvedené příznaky se odborně značí *dermatitis*, *diarhoea* a *dementia*. Míra postižení je závislá na míře nedostatku vitamínu B<sub>3</sub>. Pokud není pelagra léčena, může být i smrtelná. Pelagra byla identifikována a popsána na různých územích, především ve Španělsku a severní Americe. Také se vyskytla v Chorvatsku, Egyptě, Mexiku a v některých afrických státech, jejichž obyvatelstvo se živí především kukuřicí a kukuřičnými výrobky. V rozvinutých zemích se s hypovitaminosou nesetkáváme, jen velmi vzácně, a to především u alkoholiků či lidí se stravou, ve které je velmi málo proteinů. [4, 11]

Postižení mohou být i lidé trpící nemocí zvanou Hartnupova choroba (dědičná porucha metabolismu některých aminokyselin). Mají narušenou schopnost vstřebávat aminokyselinu tryptofan. S nedostatkem se mohou potýkat také lidé nemocní karcinomem a nádorem. Ten produkuje značné množství serotoninu, na jehož syntézu se používá právě tryptofan, který pak chybí na tvorbu vitamínu. [3]

Hypervitaminóza se příliš nevyskytuje, protože přebytek vitamínu je vylučován močí. Výjimečně se mohou vyskytovat ekzémy, vyrážky, svědění a bolesti hlavy, alergické reakce. Pacienti trpící na dnu, by se měli vyvarovat vyšším dávkám, protože niacin brání vylučování kyseliny močové.

Výzkum ukázal, že zvýšené dávky vitamínu B<sub>3</sub>, spolu s vitamíny B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> a A, mohou snížit riziko výskytu kataru. [11], [12]

#### 2.4.1 Niacin jako prevence

Dostatek niacinu má preventivní účinky u následujících chorob: křeče, deprese, dna, halucinace, srdeční příhoda, HIV/AIDS, hyperaktivita, hypothyreóza, menstruační bolesti, skleróza, osteoartritida, revma, porucha čichu a chuti, závratě. [13]

## 2.5 Doporučená denní dávka

Do denní dávky vitamínu B<sub>3</sub> se musí započítávat jak příjem ze stravy, tak i niacin, který byl syntetizován v játrech a ledvinách z tryptofanu. Doporučená denní dávka pro středně pracující činí 16 – 20 mg.den<sup>-1</sup>. [2]

Doporučené denní dávky niacinu pro jednotlivé skupiny obyvatelstva USA, viz. příloha č. 1, tabulka č. 2

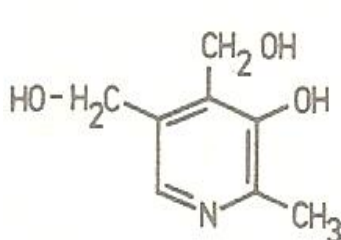


### 3 VITAMIN B<sub>3</sub> – PYRIDOXIN

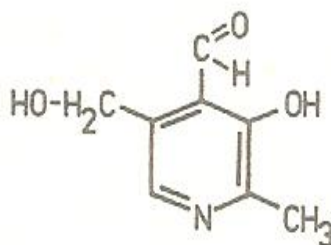
Pyridoxin je vitamin, který zahrnuje třídu látek se stejným biologickým účinkem. Patří sem **pyridoxol** (2-methyl-3-hydroxy-4,5-bishydroxymethylpyridin),

**pyridoxal** (2-methyl-3-hydroxy-4-formyl-5-hydroxymethylpyridin)

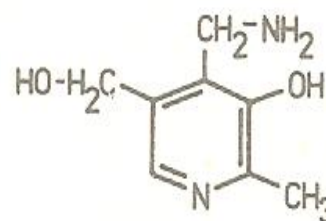
a **pyridoxalamin** (2-methyl-3-hydroxy-4-aminomethyl-5-hydroxymethylpyridin). Vitamin B<sub>6</sub> je rozpustný ve vodě. Celá triáda má bazický charakter a s minerálními kyselinami tvoří vodorozpustné soli.



*pyridoxol*

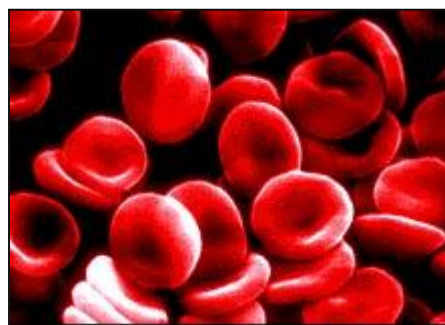


*pyridoxal*



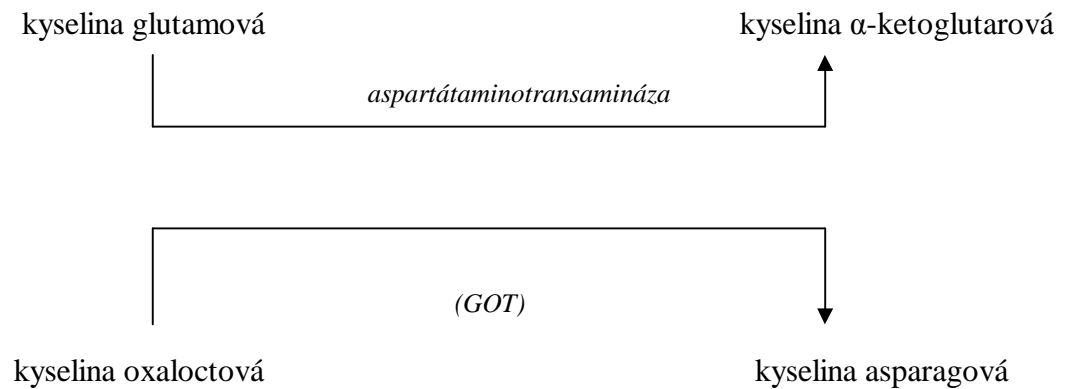
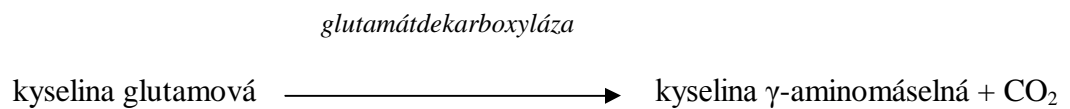
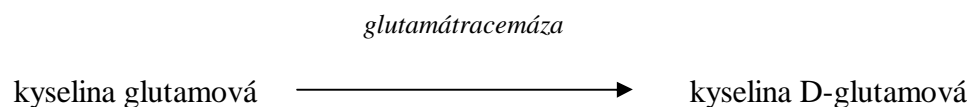
*pyridoxamin*

Pyridoxin je důležitou součástí kofaktorů enzymů a v biologických procesech se vyskytuje jako fosfátovaný derivát: **pyridoxalfosfát** a **pyridoxaminfosfát**. Jeho přítomnost je velmi významná při metabolismu aminokyselin, tuků a nukleových kyselin. Je potřebný i k převedení polynenasycených mastných kyselin na jiné látky (např. prostaglandiny – podobné hormonům) a také pro produkci červených krvinek. Velmi důležitá je syntéza neurotransmiterů, jako je serotonin a dopamin. Tyto neurotransmitery jsou potřebné pro zajištění komunikace mezi nervovými buňkami. [2, 15, 16]



*Červené krvinky*

Z konkrétních reakcí se jedná hlavně o transaminaci, při níž je pyridoxalfosfát koenzymem *aminotransferas*, o dekarboxylaci aminokyselin a jejich racemizace. [2]

Transaminace:Dekarboxylace:Racemizace:

Obrázek č. 2 Transaminace, dekarboxylace a racemizace

**3.1 Význam pyridoxinu**

Pyridoxin je důležitý pro tvorbu žlučových kyselin, krevního barviva hemoglobinu a některých tkáňových hormonů. Jako látkový přenašeč funguje v nervových procesech, zprostředkovává impulzy mezi nervovými buňkami. Vitamin B<sub>6</sub> se účastní procesu růstu u dětí a mládeže, podobně jako vitamin A a niacin, řídí dělení a specializaci buněk. Proto je tento vitamin velmi důležitý pro těhotné ženy. Používá se k léčení premenstruační tenze, v menopauze a ke zmírnění ranních těhotenských nevolností aniž by byl plod ohrožen nebo

také k ulehčení nevolnosti pacientům léčených radioterapií při rakovině. Podporuje imunitní systém. Zeslabuje svalové křeče. [10, 11]

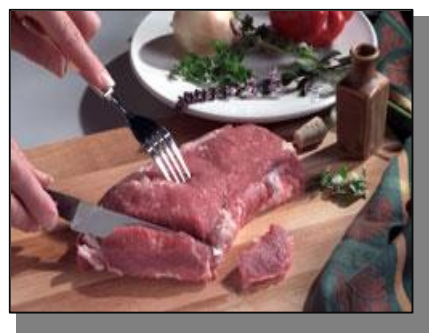
### 3.2 Výskyt pyridoxinu

Pyridoxin se vyskytuje ve většině potravin. Hlavním zdrojem jsou živočišné bílkoviny – červené maso, drůbež, ryby, v droždí a vnitřnostech. Z rostlinných zdrojů jsou to např. celozrnné výrobky, sojové boby. V mléce, vejcích a zelenině jeho množství není příliš vysoké. Velká část vitamínu bývá znehodnocována při kulinární úpravě potravin, při mražení nebo smažení je to až 70 %. Pyridoxin je velmi citlivý na světlo, je fotolabilní.

Také krevní plazma, jako hlavní složka, obsahuje pyridoxal-5'-fosfát (PLP) a pyridoxamin-5'-fosfát (PNM). Například průměrná koncentrace PLP v krvi činí okolo 60 %. Nedávné studie ukazují, že snížené množství PLP je rizikovým faktorem pro vznik kardiovaskulárních a jiných nemocí. [10], [17]

**Tabulka č. 3** Obsah pyridoxinu ve vybraných potravinách

pyridoxin	mg.100g <sup>-1</sup>
hovězí játra	2,5
rybí jikry	2,2
tvaroh	2,0
kukuřice	1,9
hovězí maso	0,9
kuřecí maso	0,8
králíčí maso	0,8
rýže celozrnná	0,7
mouka pšeničná celozrnná	0,56
fazole	0,5
špenát	0,3
brambory vařené	0,25



### 3.3 Projevy nedostatku a nadbytku pyridoxinu

Hypovitaminóza se projevuje především na kůži, jenž je zanícená a mastná, záněty v dutině ústní včetně jazyka. Vyskytují se i nervové křeče (porucha fungování nervové soustavy). Jeho nedostatek nemusí být vždy způsoben nedostatečným příjmem, ale může to být důsledek špatné resorpce trávicího ústrojí nebo reakce na nevhodné léky, které brání jeho správné funkci. Příčinou bývá také alkoholismus. Ten bývá často doprovázen nedostatkem dalších vitaminů skupiny B. V našich podmínkách je avitaminosa velmi vzácná.

Dalšími příznaky nedostatku pyridoxinu jsou deprese, pocity úzkosti, ztráta libida, nespavost, zadržování vody, neschopnost tvorby glukosy, úbytek nebo naopak přírůstek hmotnosti. [10, 18]

K předávkování vitamínem může dojít při užívání většího množství po dobu několika měsíců nebo let. Hypervitaminóza se projevuje únavou, podrážděností, depresí, zánětem nervů, který způsobuje obtíže při chůzi. Postupně se objevuje necitlivost v rukou a nohou, to může vést až k projevům ochrnutí.

Více jak milion lidí dnes užívá pyridoxinové preparáty ke zvládnání stresu a zvýšení energie. Také se užívá v kombinaci s hořčíkem při onemocnění autismem. Nicméně, vědci zjistili, že dlouhodobé užívání vysokých dávek může zvýšit riziko poškození nervového systému, a tak vede ke ztrátě citlivosti v rukou a nohou. [19]



### 3.4 Doporučená denní dávka

Průměrná denní dávka pyridoxinu na jednoho obyvatele ČR činí  $1,7 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$ . V potravě se poměrně hojně vyskytuje, takže by nemělo docházet k hypovitaminóze. Navíc, malá množství vitamínu B<sub>6</sub> jsou tvořena střevními bakteriemi.

Doporučené denní dávky pyridoxinu pro jednotlivé skupiny obyvatelstva USA, viz. příloha č. 2, tabulka č. 4

## 4 HPLC – VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) patří mezi instrumentální analytické metody, které tvoří základ moderní analytické chemie, a to pro svou vysokou citlivost a selektivitu. Používá se především na rozdělení směsí tam, kde se jiné separační techniky nedají použít. Umožňuje přímé stanovení organických i anorganických látek. Výhodou chromatografických metod je především v jejich schopnosti rozdělit, případně i kvantitativně stanovit desítky až stovky složek vzorku. Metoda se vyznačuje vysokou citlivostí, přesností, umožňuje analýzu malých koncentrací studovaných látek, reprodukovatelnost měření a trvalý záznam.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie má také velkou přednost v tom, že umožňuje separovat termolabilní kapalné i tuhé látky. V potravinářství se využívá pro dělení a stanovení různých organických sloučenin jako např. konzervačních látek, barviv, kontaminujících látek, antibiotik, alkaloidů, narkotik, aminokyselin, steroidních látek, hormonů a mastných kyselin i anorganických sloučenin a vitamínů. Především hydrofilní vitamíny rozpustné ve vodě C, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> a B<sub>12</sub>. [21, 22]

V chromatografii se oddělované složky rozdělují mezi dvě fáze. Jedna z fází je nepohyblivá a má velký povrch nebo objem, druhá je fluidní a prochází nepohyblivou fází nebo podél ní. Mezi mobilní (pohyblivou) fází a stacionární (nepohyblivou) dochází k adsorpci molekul na povrch částic nebo pórů, popř. přecházejí do vrstvy kapaliny ulpívající na povrchu nebo uvnitř pórů. Charakteristickým znakem chromatografie je rozdělování látek probíhající na základě postupného ustavování řady fázových rovnováh jednotlivých složek dělené směsi mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, které jsou vůči sobě v pohybu. Mobilní fáze vymývá jednotlivé složky ve směru svého toku. Široký výběr materiálů pro nepohyblivou i pohyblivou fázi v chromatografii umožňuje dělení látek, které se jen velmi málo od sebe liší ve fyzikálních i chemických vlastnostech. [23]

### 4.1 Rozdělení chromatografických metod

Pohyblivou fází může být plyn nebo kapalina, nepohyblivou jen kapalina nebo tuhá látka. Z toho vyplývá množství kombinací, které ukazuje tabulka č. 5.

Tabulka č. 5 Přehled chromatografických metod [23]

	<b>Mobilní fáze</b>	<b>Stacionární fáze</b>
<b>Plynová chromatografie</b>		
rozdělovací GLC	plyn	kapalina
adsorpční GSC	plyn	pevná látka
<b>Kapalinová chromatografie</b>		
rozdělovací LLC	kapalina	kapalina
adsorpční LSC	kapalina	pevná látka

Při adsorpční chromatografii probíhají specifické interakce na povrchu nosiče – adsorbenta. Dělení je závislé na dynamické rovnováze, která se ustavuje na rozhraní mezi částicemi nepohyblivé fáze a pohyblivou kapalnou fází a na relativní rozpustnosti látky v pohyblivé fázi.

Při rozdělovací kapalinové chromatografii se molekuly vzorku rozdělí mezi dvě nemísitelné kapaliny, z nichž jedna je eluent a druhá je fyzikálně nebo chemicky vázaná na vhodný adsorbent (nosič), stacionární fáze.

**Gelová chromatografie** rozděluje molekuly dělených složek na základě jejich různé velikosti, což souvisí s pórovitou strukturou gelu. Největší molekuly se pohybují kolonou nejrychleji, vymývají se jako první a naopak.

**Ionexová chromatografie** je separační technika založená na jednoduché výměně iontů mezi stacionární fází (měnič iontů) a fází mobilní. Na rozdíl od předchozích metod musí mobilní fáze obsahovat vždy rozpuštěný elektrolyt.

**Plynová chromatografie** se liší od jiných druhů chromatografie pouze v tom, že pohyblivou fází je plyn a látky se dělí v plynném stavu. [21, 23]

## 4.2 Vymezení několika základních pojmů

Retenční objem je objem mobilní fáze, který musí projít kolonou, aby se příslušný analyt dostal od počátku ke konci separační kolony.

Retenční čas je celkový čas, který příslušný analyt stráví v separační koloně.

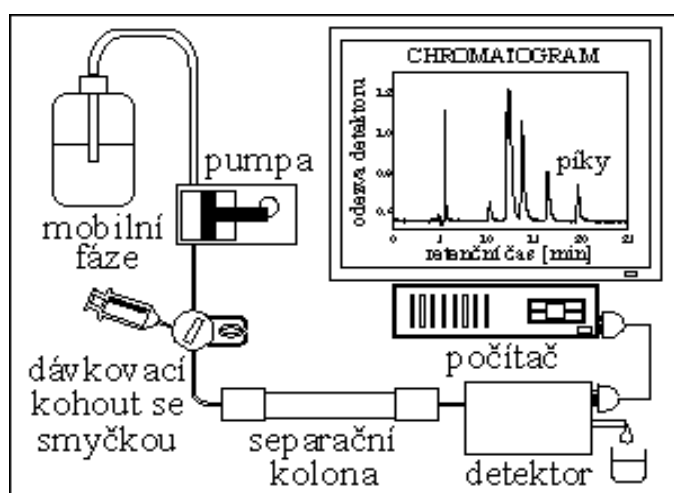
Mrtvý objem kolony je objem eluentu, který musí projít kolonou, aby se nezadržovaný analyt dostal od počátku ke konci kolony.

Mrtvý čas kolony je retenční čas analytu, který není v koloně zadržován, tj. analytu, který se pohybuje kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze.

Redukovaný retenční čas je čas, který příslušný analyt stráví ve stacionární fázi. [25]

### 4.3 Sestava kapalinového chromatografu

Kapalinový chromatograf (znázorněný na obrázku č. 3) se skládá z částí, které zabezpečují transport mobilní fáze (zásobník mobilní fáze, pumpa), dávkování vzorku, separaci látek (separační kolona) a jejich detekci (detektor), záznam a zpracování dat (PC). Přístroje jsou vybaveny i zařízením pro tvorbu gradientu mobilní fáze umožňující eluci s časově programovatelným složením mobilní fáze připravené mísením několika složek. Užitečným doplňkovým zařízením jsou ochranné filtry, předklony a zařízení na odplyňování mobilní fáze.



Obrázek č. 3 Schéma kapalinového chromatografu

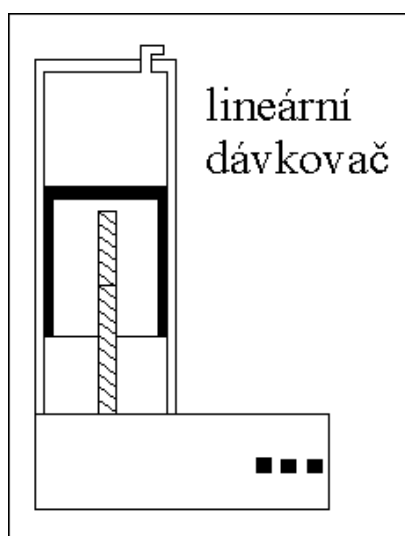
Požadavky na jednotlivé součásti HPLC:

**Čerpadlo mobilní fáze (pumpa)** musí generovat vysoké tlaky. Většinou potřebujeme až desítky MPa. Zajišťuje stabilitu a bezpulznost průtoku mobilní fáze. Čerpadlo musí být konstruováno z materiálů odolných vůči korozi i při použití poměrně agresivních mobilních fází. Z funkčního hlediska rozeznáváme čerpadla:

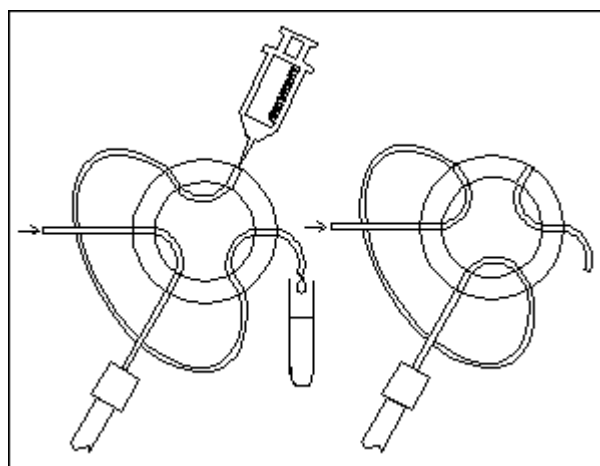
- a) pneumatická
- b) pulzní – pístová s membránou i bezmembránová
- c) s lineárním posunem pístu – injektorová
- d) rotační – zubová a lopatková
- e) peristaltická

Poslední dva typy neprodukují dostatečně vysoké tlaky a v HPLC se nepoužívají. Z hlediska regulace dopravy mobilní fáze dělíme vysokotlaká čerpadla podle toho, zda produkují konstantní tlak nebo konstantní průtok.

**Dávkovače vzorku** – vzorek určený k separaci se rozpouští v mobilní fázi nebo v jiném vhodném rozpouštědle a dávkuje se do zařízení mikrostríkačkami, dávkovacími kohouty apod. Je důležité, aby vzorky byly dokonale rozpuštěny, popř. aby přítomné tuhé částičky byly ze vzorku odfiltrovány.



Obrázek č. 4 Lineární dávkovač



Obrázek č. 5 Dávkovací kohouty

**Předkolony** mají ochrannou funkci. Jsou plněny sorbetem stejného nebo podobného typu jako je náplň analytické kolony. Umisťují se mezi dávkovací zařízení a kolony a slouží k odstranění tuhých i rozpuštěných rušivých kontaminantů z mobilní fáze nebo ze vzorku.

**Kolony** pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii jsou rovné trubice s hladkým vnitřním povrchem zhotovené z materiálu, který musí odolávat jak relativně vysokým pracovním tlakům (až 60 MPa), tak i chemickému působení mobilních fází a separovaných



látek. Zároveň nesmí způsobovat denaturaci vzorku. Na koncích trubice jsou uzávěrky (koncovky) zabraňující turbulentnímu proudění mobilní fáze. Součástí koncovky je vhodný filtr, který brání vyplavování částic náplně do detektoru. Požadavkům na materiál pro výrobu kolon vyhovuje korozivzdorná ocel a titan. Výhodná je kombinace kovového obalu s tenkou vnitřní vrstvou skla. Všeobecně lepší výsledky se dosahují s kovovými kolonami, jejichž vnitřní stěny jsou vrtané a leštěné. Určitou pórovitost a nežádoucí aktivitu kovových kolon je možné odstranit vnitřním potahem teflonu nebo skla. Tloušťka stěny kolony je odvíjena od tlaku, se kterým se bude pracovat.

Rozměry kolon závisí jak na účelu, k němuž jsou použity, tak i na velikosti částic náplně. Pro analytické aplikace se dnes používají převážně kolony plněné pórovitými náplněmi s částicemi o průměru 1 - 5  $\mu\text{m}$ . Délka těchto kolon se pohybuje mezi 5 až 25 cm a vnitřní průměr nejčastěji mezi 2 až 5 mm. Účinnost separace, doba analýzy a pracovní tlak se zvyšuje úměrně s rostoucí délkou kolony. Citlivost analýzy roste s klesající délkou a průměrem kolony a s klesajícím průměrem částic náplně. [21, 26]

**Tabulka č. 6** Přehled plnění kolon stacionárními a mobilními fázemi [25]

Chromatografie	Stacionární fáze	Mobilní fáze
LSC	silikagel, alumina, aktivní uhlí	pentan, bencen, chloroform, aceton, acetonitril, etanol, metanol, voda
LLC	ethylenglycol, skvalen na silikagelu	pentan, heptan, chloroform a jejich směsi, pro reverzní ch. - metanol, acetonitril, tetrahydrofuran, voda a jejich směsi
IEC	měníče iontů: $\sim\text{COO}^-$ $\sim\text{SO}_3^-$ $\sim\text{NH}_3^+$ $\sim\text{CH}_2\text{N}^+$ ( $\text{CH}_3$ ) <sub>3</sub>	roztoky anorg. kyselin a zásad o dané iontové síle a pH
GPC	polystyren zesíťovaný divinylbenzenem, silikagel	vodné pufrý (fosforečnanový, TRIS), acetonitril, kys. trifluoroctová (TFA)

Materiály pro plnění kolon jsou většinou založeny na anorganické matrici, na niž mohou být chemicky vázané nebo zakotvené různé stacionární fáze.

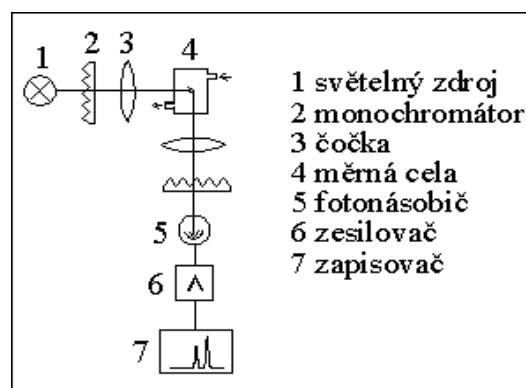
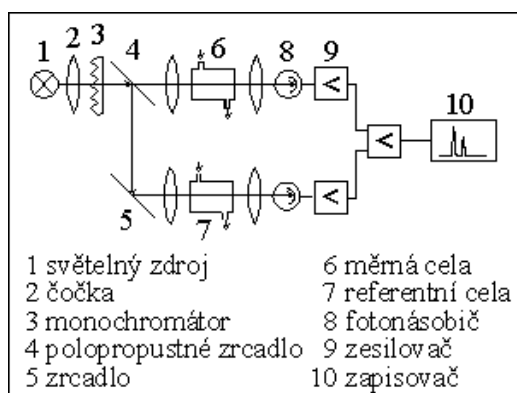
**Koncovky kolony** udržují stacionární fázi v koloně a **přípojky** jsou potřebné na připojení dávkovače a detektoru ke koloně a na propojování kolon.

**Chromatografický detektor** je zařízení na indikování přítomnosti vzorku nebo na kvantitativní sledování jeho koncentrace v eluátu. Je zpravidla umístěn na konci kolony. Detektor v podstatě sleduje vhodným snímačem jednu nebo současně několik vlastností eluátu a převádí je na elektrické signály, které po zesílení zvoleným způsobem zaznamená. Podle detekčních principů rozdělujeme detektory takto:

- a) univerzální (neselektivní) detektory, které poskytují signál úměrný určité vlastnosti eluátu jako celku - refraktometry, kalorimetry, plamenoionizační a kapacitní detektory
- b) selektivní detektory, jejichž signál je úměrný pouze koncentraci analyzované látky v eluátu – fotometry, které pracují v ultrafialové, viditelné nebo infračervené oblasti spektra, fluorimetry, polarografické, vodivostní detektory a detektory NMR, radiometry, potenciometry a coulometry
- c) směsné detektory umožňují podle potřeby pracovat univerzálně i selektivně

Výběr vhodného detektoru je ovlivněn několika základními kritérii: co největší specifíčností, snášenlivostí, vysokou citlivostí a nízkou úrovní šumu. Důležitá je i linearita (lineární koncentrační odezva), detekovatelnost minimálního množství nebo koncentrace látky, reprodukovatelnost odezvy, tvar a zkreslení píku, neměl by být příliš citlivý ke změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty. V HPLC se využívají ponejvíce:

Fotometrické detektory měří změny intenzity světla způsobené vymývaným vzorkem. Nejčastěji se měří absorpce (změna absorpce) systému v ultrafialové (UV) oblasti spektra. Někdy se využívá i oblast viditelného světla (VIS) a čím dál častěji se používá měření absorpce v infračervené (IR) oblasti spektra.

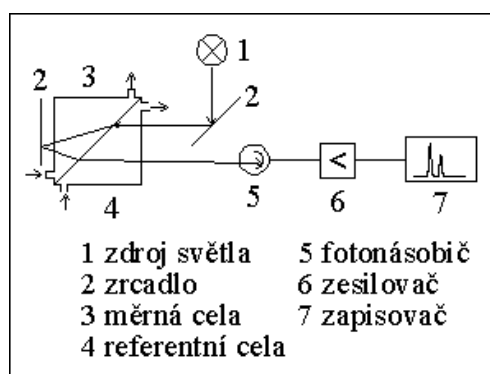


Obrázek č. 6 Fotometrický detektor

Obrázek č. 7 Fluorescenční detektor

Fluorescenční detektor je vysoce selektivní a citlivý a poskytuje odezvu pro látky vykazující fluorescenci. Detekovaná látka v detektoru absorbuje ultrafialové budící (excitační) záření, jehož pohlcená energie se zčásti vyzáří (emituje) ve formě fluorescenčního záření o nižší energii než má záření excitační.

Refraktometrické detektory měří změnu indexu lomu v závislosti na koncentraci vzorku v mobilní fázi. Měří rozdíly indexu lomu eluátu v porovnáním s čistým eluentem. Citlivost detektorů je tím větší, čím větší je rozdíl indexu lomu látky a indexu lomu mobilní fáze.



Obrázek č. 8 Refraktometrický detektor

Elektrochemické detektory jsou založené na měření elektrické vodivosti a náboje. Měří proud při průchodu redukovatelné či oxidovatelné látky měrnou celou, ve které jsou umístěny elektrody, na něž je vloženo pracovní napětí nezbytné k průběhu elektrochemické reakce.

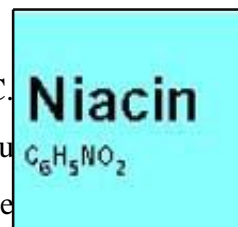
Průtokové vodivostní (konduktrometrické) detektory se používají na měření vodivosti elektrolytů i neelektrolytů, které tvoří vodorozpustné vodivé komplexy. Detektory jsou dosti citlivé na kolísání teploty během měření. [23, 26, 27, 28]

**Tabulka č. 7** *Přehled používaných detektorů* [25]

<b>Typ detektoru</b>	<b>Měřená veličina</b>	<b>Detegovatelnost [g . ml<sup>-1</sup>]</b>
Fotometrický	absorbance	$5 \cdot 10^{-10}$
Refraktometrický	index lomu světla	$5 \cdot 10^{-7}$
Florescenční	fluorescence	$5 \cdot 10^{-10}$
Konduktomerický	el. vodivost	$10^{-10}$

## 5 STANOVENÍ NIACINU

Ke stanovení niacinu v potravinách se zpravidla používá metoda HPLC. Dle výskytu a typu potravinového materiálu se ke stanovení niacinu používá různých metod extrakce a to kyselé nebo alkalické. Pokud je sledován pouze biologicky aktivní niacin, je dávána přednost kyselé hydrolyze, alkalická hydrolyza je používána při stanovení celkového množství, neboť uvolňuje i biologicky nevyužitelný niacin. Nesmí se však zapomínat na to, že niacin může dostatečně vznikat v organismu konverzí tryptofanu. Proto je někdy jeho stanovení biologické účinnosti obtížné.



Alkalická hydrolyza je časově méně náročná než hydrolyza kyselá, která je často ještě doplňována působením enzymů - *takadiastázy*, *papainu* nebo *klarázy*. Podle některých autorů zároveň vykazuje větší shodu s mikrobiologickou metodou a proto jí je obecně dávána přednost. [29]

Spektrofotometrické stanovení kyseliny nikotinové a jejího amidu je založeno na reakci bromkyanu s kyselinou nikotinovou a s ostatními  $\alpha$ - a  $\gamma$ -nesubstituovanými deriváty pyridinu za vzniku pyridinového iontu, který reaguje s aromatickými aminy otevřením pyridinového kruhu za vzniku vhodného hnědočerveného zbarvení. Tuto metodu lze použít jako univerzální, není však specifická. Je proto nutné při stanovení kys. nikotinové v potravinách zařadit některou z vhodných chromatografických dělicích technik a používat několik slepých pokusů, které do jisté míry eliminují jinak značné chyby této metody.

Kyselina nikotinová a její amid se po extrakci z potraviny chromatograficky rozdělí na tenké vrstvě silikagelu, skvrny jim odpovídající se eluují a obsah kys. nikotinové a nikotinamidu stanoví spektrofotometricky proměřením absorbance při 264 a 300 nm. Metoda dává velmi dobré výsledky srovnatelné s mikrobiologickými při analýze mletého syrového masa s přidavkem kyseliny nikotinové jako stabilizátoru barvy. [30]

CH. ROSE-SALLIN a kol. popsali stanovení niacinu kolorimetricky, mikrobiologicky a HPLC metodou.

Kolorimetrická metoda dle AOAC (Association of Official Analytical Chemists) je založena na Kőnigově reakci, ve které reagují pyridinové deriváty s kyanobromidem a aromatickými

amidy a kyselinou sulfonovou. Mikrobiologické stanovení využívá selektivní mikroorganismy jako *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* nebo pro celkový niacin *Lactobacillus plantarum*, jenž zreaguje na kyselinu nikotinovou, nikotinamid, kyselinu nikotinuridinovou a NAD, ale nezreaguje na tryptofan. Dle AOAC extrakční procedura zahrnuje autoklávování vzorku na 121 - 131°C po 30 min v 0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Stanovení niacinu kapalinovou chromatografií.

Příprava standardu:

- Zásobní roztok (1 mg.ml<sup>-1</sup>) kys. nikotinové a nikotinamidu byl připraven rozpuštěním 100 mg kys. nikotinové a nikotinamidu ve 100 ml vody. Tento roztok byl skladován maximálně 1 týden při 4°C.
- Pracovní standardní roztok (50 µg.ml<sup>-1</sup>) byl připraven z 5 ml zásobního roztoku zředěním vodou na 100 ml. Naředěním byly získány další koncentrace, 1; 2,5; a 5 µg.ml<sup>-1</sup> kys. nikotinové a nikotinamidu.

Příprava vzorků:

- Všechny vzorky byly homogenizovány rozmixováním nebo rozdrcením. Mléko a cereální výrobky byly odváženy (50g) a v baňce k nim bylo přidáno 100g 40°C vody a znovu rozmícháno. Pro analýzu bylo odebráno 6 – 15g vzorku. Snídaňové cereálie byly rozdrceny spolu s mlékem. K analýze bylo odebráno 2 – 5g směsi. Kapalné klinické nutriční produkty byly mírně promíchány na magnetické míchačce. Pro analýzu se odebíral vzorek 5g.

Extrakce niacinu proběhla třemi způsoby, kyselou hydrolyzou, alkalickou hydrolyzou a enzymatickou reakcí.

A) Kyselá hydrolyza:

Ke 2 – 5g suchého vzorku, k 5g kapalného vzorku nebo k 5 – 16g suspenze bylo přidáno 70 ml 0,1 M HCl a směs byla poté ohřívána ve 100°C vodní lázni na magnetické míchačce po dobu 1 hodiny. Po ochlazení na pokojovou teplotu bylo pH upraveno roztokem NaOH (5 M potom 1 M) na 4,5 – 4,6. Roztok byl kvantitativně pře-

veden do 100 nebo 200 ml baňky a doplněn vodou. Potom byl filtrován přes 0,45  $\mu\text{m}$  membránový filtr.

B) Alkalická hydrolyza:

50 ml filtrátu získaného v bodě A) bylo kvantitativně převedeno do 250 ml baňky a bylo přidáno 10 ml 5 M NaOH. Po 1 hodinovém autoklávování při 120°C byl alkalický roztok ochlazen pod tekoucí vodou na pokojovou teplotu. Poté bylo upraveno pH kyselinou chlorovodíkovou (5 M potom 1 M) na 4,5 – 4,6. Opět byl roztok převeden do 100 ml baňky, doplněn vodou a filtrován přes 0,45  $\mu\text{m}$  membránový filtr.

C) Enzymatická reakce se rozděluje na reakci před a po kyselé hydrolyze:

- Před kyselou hydrolyzou: 50 g suspenze bylo převedeno do 250 ml baňky. Bylo přidáno 60 ml vody a 150 mg *takadiastáza* nebo *klaradiastáza*, poté byla suspenze zahřívána na 45°C po 30 min. Bylo přidáno 7 ml 1 M HCl. Pak následovala kyselá hydrolyza 1 nebo 2 hodiny. Úprava pH a filtrace byla stejná jako v bodě A).
- Po kyselé hydrolyze: Po kyselé hydrolyze popsané v bodě A) bylo k suspenzi přidáno 150 mg *klaradiastáza* a byla inkubována při 45°C po dobu 1 hodiny. Hydrolyzát byl převeden do 150 ml baňky a doplněn vodou. Nakonec byl filtrován přes 0,45  $\mu\text{m}$  membránový filtr.

Chromatografické podmínky:

- Kolona: Inertsil ODS 3 (250 x 4,6 mm I.D.; 5  $\mu\text{m}$ )

- Mobilní fáze:

A: Byla připravena rozpuštěním 9,54 g/g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  v 800 ml vody a přidáním 7,6 ml 30% peroxidu vodíku a 1 ml 0,005 M síranu měďnatého rozředěném v 1 l vody.

B: Vymývací fáze byla připravena přimícháním 10 % (v/v) acetonitrilu k fázi A.

Gradient: 0 – 33,5 min (A), 34,0 – 36,0 min (B), 36,5 – 51,0 min (A)

- Teplota: 25°C
- Průtok mobilní fáze: 1 ml.min<sup>-1</sup>
- Dávkovací smyčka: 30 µl
- Detektor: fluorescenční, (excitace: 322 nm, emise: 380 nm)

Výsledky těchto metod jsou shrnuty v tabulkách č. 8 a 9 v příloze č. 3. [31]

Determinací niacinu ve vybraných potravinách, syrovém a vařeném masu a rybím masu se zabýval K. L. WINDAHL a kol. Využili jak metody HPLC, tak i kapilární elektroforézy (CE).

Příprava standardů:

- 100 µg.ml<sup>-1</sup> standardního roztoku kys. nikotinové bylo připraveno rozpuštěním 20 mg sušené kys. nikotinové v 200 ml deionizované vody. Roztok byl skladován v chladničce při 4°C. Pracovní standardy byly připraveny od 1 – 50 µg.ml<sup>-1</sup>, naředěním deionizovanou vodou. Pro CE byl udělán vnitřní standard přidáním sacharinu na konečnou koncentraci 40 µg.ml<sup>-1</sup>. HPLC vnitřní standard neměla.

Příprava vzorků:

- Maso a rybí maso bylo rozděleno na přibližně dvě stejné části. Jedna část byla analyzována syrová a druhá po kuchyňské úpravě. Masa byla pečena (bez přidání oleje) asi 40 min.
- Zelenina byla vařena v uzavřené nádobě v mikrovlnné troubě na nejvyšší teplotu po 5 – 6 min. Brokolice, rajče a dýně byly nakrájeny na standardní kousky, obilí bylo vařeno celé. K hrušce a fazolím bylo před vařením přidáno malé množství vody. Přebytek vody byl vysušen před vařením a vzorky byly homogenizovány. Vzorky byly skladovány při 4°C a analyzovány v co nejkratším čase po přípravě.

A) Kyselá extrakce:

Přibližně k 1g potraviny (3g ovoce) bylo přidáno 10 ml 2 M kys. sulfonové a 25 ml deionizované vody. Pro regenerační testy byl přidáván 1 ml 100 µg.ml<sup>-1</sup> roztoku kys.



nikotinové. Směs byla zamíchána a zahřívána v autoklávu po 2 hodiny při 121°C ( $\approx$  104 kPa). Ochlazená směs byla zředěna 50 ml deionizované vody, zamíchána a dána do centrifugy na 1500 ot.min<sup>-1</sup> po 15 min při 0°C. 15 ml podílu supernatantu bylo upraveno na pH 7 nasyceným roztokem hydroxidu barnatého a doředěno na 100 ml deionizovanou vodou. Výsledná suspenze byla centrifugována na 2500 ot.min<sup>-1</sup> po 10 min při 0°C,

B) Alkalická extrakce:

Tyto vzorky byly analyzovány C. M. WARD a V. C. TRENERRY v roce 1997.

Příprava tlumivého roztoku pro CE:

- Tlumivý roztok byl připraven smícháním 3,75 ml acetonitrilu a 46,25 ml směsi 0,02 M dihydrogenortofosfátu draselného a 0,02 M hydrogenortofosfátu draselného v poměru 1 : 1. Roztok byl před testováním filtrován přes 0,45  $\mu$ m teflonový filtr.

Podmínky kapilární elektroforézy:

- 3D kapiláry (64,5 cm x 50  $\mu$ m)
- Napětí: + 25 kV, Tlak: 250 mbar.s<sup>-1</sup>
- Teplota: 28°C
- Kyselina nikotinová byla detekována při 254 nm.

Podmínky kapalinové chromatografie:

- Detektor: fotodiodový
- Předkolona: C<sub>18</sub> (Waters Corporation, Milford)
- Kolona: C<sub>8</sub> NOVAPAK Radial-PAK (8 x 100 mm; 4 $\mu$ m)
- Mobilní fáze: 15 % metanol, 85 % deionizovaná voda s 0,005M PIC A reagentem
- Průtok mobilní fáze: 1,5 ml.min<sup>-1</sup>
- Kyselina nikotinová byla detekována při 254 nm.

Výsledky byly shrnuty v tabulkách č. 10, 11 viz příloha č. 4. [32]

Determinaci niacinu v cereáliích alkalickou extrakcí a kapalinovou chromatografií zpracoval S. M. JURAJA a kol.

Vybrané vzorky potravin byly skladovány ve vzduchotěsné chladničce při 4°C. Přibližně k 1g potravin bylo přidáno 0,75g hydroxidu vápenatého a 20 ml deionizované vody. Pro regenerační testy byl přidáván 1 ml 100 µg.ml<sup>-1</sup> roztoku niacinu. Směs byla rozmixována a zahřívána v autoklávu po 2 hodiny při 121°C (≈ 104 kPa). Poté byla směs rozředěna na přibližně 50 ml deionizovanou vodou, zamíchána a zchlazena. Konečný objem naředěný na 50 ml byl centrifugován při 0°C na 2500 ot.min<sup>-1</sup> 15 min. 15 ml supernatantu bylo upraveno na pH 7 vodným roztokem kyseliny oxalové (10% a následně 1%) a doplněno na 25 ml deionizovanou vodou. Výsledná suspenze byla dána do centrifugy na 2500 ot.min<sup>-1</sup> na 10 min k vysrážení oxalátu vápenatého. Roztok byl před analýzou filtrován přes 0,45 µm.

Chromatografické podmínky:

- UV detektor
- Předkolona: C<sub>18</sub> (Waters Corporation, Milford)
- Kolona: C<sub>8</sub> NOVA-PAK Radial Pak (8 mm x 100 mm; 4 µm)
- Mobilní fáze: 15 % metanol, 85 % deionizovaná voda obsahující 0,005M PIC A reagentu (Waters Corporation)
- Průtok mobilní fáze: 1,5 ml.min<sup>-1</sup>

Kyselina nikotinová byla detekována při 254 nm při retenčním čase přibližně 9 min. [33]

Enzymatické extrakce pro kapalinovou chromatografií využil k detekci niacinu v potravinových materiálech S. NDAW a kol.

Byly použity následující enzymy:

- *NAD glykohydroláza*, *NAD-áza* produkované *Neurospora crassa*
- *Papain*
- *α-amyláza* produkovaná *Aspergillus oryzae*

Roztok *NAD-ázy* byl připraven takto: 3 ml enzymu byly rozpuštěny v 5 ml 100 mM fosfátovém tlumivém roztoku (pH 6,8), do použití byl skladován při  $-20^{\circ}\text{C}$ . Aktivita enzymů byla měřena při pH 4,5 (50 mM roztok acetátu sodného) a teplotě  $37^{\circ}\text{C}$ .

K extrakci bylo bráno asi 5g vzorku potravin, mimo kvasnice (1g), zváženo a dáno do baňky.

- A) Extrakce *NAD-ázou* (pH 6,8): 50 ml 100 mM fosfátového tlumivého roztoku a 200  $\mu\text{l}$  roztoku *NAD-ázy* bylo přidáno k vzorku. Směs byla inkubována při  $37^{\circ}\text{C}$  po 18 hodin. Poté byl roztok doplněn na objem 100 ml destilovanou vodou. Byl proveden stejný pokus, pouze s vynecháním enzymatické úpravy.
- B) Extrakce *NAD-ázou* (pH 4,5): 50 ml 50 mM roztoku octanu sodného bylo přidáno ke vzorku. Směs byla inkubována při  $37^{\circ}\text{C}$  po 18 hodin v přítomnosti *NAD-ázy*. Potom byl roztok doplněn na objem 100 ml destilovanou vodou. Také zde byl proveden stejný pokus, při němž byla vynechána enzymatická úprava.

(Předběžná inkubace vzorku: 50 ml 0,1 M kyseliny chlorovodíkové bylo přidáno ke vzorku. Bylo upraveno pH 2,5 M octanem sodným na pH 2. Směs byla inkubována při  $37^{\circ}\text{C}$  po 3 hodiny. Po ochlazení byl roztok upraven 2,5 M octanem sodným na pH 4,5.

- C) Extrakce třemi enzymy (pH 4,5): Ke vzorku bylo přidáno 50 ml mM roztoku acetátu sodného, 200  $\mu\text{l}$  roztoku *NAD-ázy*, 100 mg papainu, 500  $\mu\text{l}$  1% glutationu a 100 mg  *$\alpha$ -amylasy*. Směs byla inkubována při  $37^{\circ}\text{C}$  po 18 hodin. Pak byl roztok doplněn destilovanou vodou na 100 ml.
- D) Extrakce kyselinou chlorovodíkovou: 50 ml 0,1 M HCl bylo přidáno ke vzorku. Roztok byl umístěn do  $100^{\circ}\text{C}$  vodní lázně na 1 hodinu. Po ochlazení byl roztok upraven 2,5 M octanem sodným na pH 4,5 a doplněn na 100 ml destilovanou vodou.

Získané roztoky byly po extrakci filtrovány přes 0,45  $\mu\text{m}$  acetát-celulosový filtr. Filtráty byly použity pro chromatografii.

Chromatografické podmínky:

- Dávkovací ventil: 20 nebo 100  $\mu\text{l}$

- Předkolona: C<sub>18</sub> HDO (4 mm i.d. x 4 mm; 5 μm)
- Kolona: C<sub>18</sub> HDO (4,6 mm i.d. x 150 mm; 5 μm)
- Detektor: fluorescenční (excitace: 322 nm, emise: 380 nm)
- Průtok mobilní fáze: 1 ml.min<sup>-1</sup>
- Eluce: izokratická
- Mobilní fáze: 0,07 M fosforečnan draselný, 0,075 M peroxid vodíku, 5.10<sup>-6</sup> M roztok síranu měďnatého.

Výsledky měření jsou shrnuty v tabulce č. 12 viz příloha č. 5. [34]

Optimální metodu pro stanovení kyseliny nikotinové, v čerstvém a soleném vepřovém mase hledal G. SACCANI a kol. Zvolili chromatografickou determinaci pomocí iontoměničů.

Příprava vzorků:

- Bylo shromážděno 140 vzorků masa. Po padesáti různých čerstvých kusech mas s rozdílnou strukturou z přední a zadní části jatečně opracovaných těl a 40 druhů bylo rozmixováno a použito na výrobu čerstvých uzenin a salámů.
- Další vzorky: sušená šunka (stará 12 měsíců), čerstvá a solená uzenina (stará 3 měsíce) – byly zakoupeny v tamějším obchodu.
- Z čerstvých i solených mas, byl niacin extrahován kyselou hydrolyzou. Adekvátní podíl homogenizovaného vzorku (5–10g, obsahující 50–1000μg niacinu) byl dán do ohnivzdorné baňky a bylo přidáno 25 ml 1 N kyseliny chlorovodíkové a 5 ml metanolu. Roztok byl autoklávován při 121°C po 30 min. Po ochlazení byl přebytek proteinů vysrážen kyselinou trichloroctovou a roztok byl doplněn na 100 ml destilovanou vodou. Poté byl roztok filtrován, nejprve přes papírový filtr a nakonec přes acetát – celulosový filtr (0,45 μm). Filtrát byl použit pro analýzu HPLC metodou.

Chromatografické podmínky:

- Kolona: OmniPac PCX – 500 i.d. = 2 mm
- Mobilní fáze: 140 mM HCOOH – 15 mM NH<sub>4</sub>COOH – 5% acetonitril
- Průtok mobilní fáze: 250 µl.min<sup>-1</sup>
- Teplota: 40°C
- Dávkovací smyčka: 10 µl
- Detektor: UV (262 nm) a MS – hmotnostní spektrometr (mass spectrometry)
- MS poměry: MSQ<sup>TM</sup> + ESI, 50 V, 350°C

Výsledky měření jsou shrnuty v následující tabulce: [35]

**Tabulka č. 14** Niacin v čerstvém a sušeném vepřovém masu

	<b>Kyselina nikotinová (mg.kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Střední hodnota (min - max)</b>
<i>Vzorky čerstvého masa</i>		
Zadní	50	28 (20 - 50)
Přední	50	45 (18 - 73)
Rozmixované kusy	40	33 (18 - 57)
<i>Vzorky sušeného masa</i>		
Sušená šunka	34	64 (29 - 170)
Sušené uzeniny	32	51 (24 - 117)

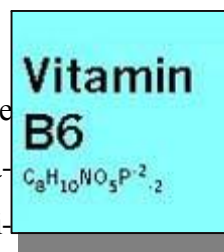
K determinaci niacinu ve fortifikovaných dětských potravinách a mléčných výrobcích využili LaCROIX a kol. analytickou LC metodu. Kyselina nikotinová a nikotinamid byly detekovány při 260 nm. Volný nikotinamid z fortifikovaných cereálií byl extrahován 0,6M trichloroctovou kyselinou a přečištěn v C<sub>18</sub> koloně s reverzní fází za použití této mobilní fáze: 75 % metanolu a voda (pH 2,8 upraveno kys. mravenčí) s dioctyl sulfosukcinátem sodným. [36]

Hydrofilní vitaminy B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> a B<sub>6</sub> z Parmské šunky stanovili C. CONNSIGLIERI a kol. za použití solné extrakční fáze v HPLC (jednorázová C<sub>18</sub> kolona). Reverzní fáze chromatografické C<sub>8</sub> kolony byla vázána na izokratickou eluci. K detekci vitaminů byl zvolen fluorescenční detektor. [37]

HPLC metodu využily M. HOLASOVÁ a E. MAŠKOVÁ pro determinaci niacinu v mase a otrubách. Pro srovnání bylo použito i mikrobiologického stanovení. Kyselá (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, autoklávováno při 121°C po 60 min) a následná enzymatická (*takadiastáza* při 37°C po 15 h) hydrolyza byla využita k uvolnění niacinu. Překážející původní hmota byla odstraněna průtokem přes křemičitou desku C<sub>18</sub> kolony. Pro separaci vitamínu bylo použito iont-párové reverzní fáze v Separon SGX C<sub>18</sub> koloně s touto mobilní fází: 200 ml metanolu, 800 ml acetátového tlumivého roztoku o pH 3,9 a 5 x 10<sup>-3</sup> mol.l<sup>-1</sup> bromidu tetrabutylamonného. Niacin byl detekován diodovým detektorem při 261 nm. Tato metoda byla aplikována na analýzu vepřového, hovězího a kuřecího masa, vepřové ledviny a játra. Výsledky byly v porovnání s mikrobiologickými testy téměř shodné v průměru menší o 9 %. [38]

## 6 STANOVENÍ PYRIDOXINU

Vitamín B<sub>6</sub> je relativně stálý v kyselých roztocích, méně stálý je v neutrálním a alkalickém prostředí. Sluneční záření, zejména záření ultrafialové, jej destruuje, na oxidaci citlivý není. Pyridoxol je stálejší než pyridoxal a pyridoxamin. [39].



Důležitým krokem při stanovení vitamínů je příprava vzorku. Za účelem podpory extrakce jsou používána kyselá média spojená s vysokou teplotou ( $H_2SO_4$ ;  $c = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ ,  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ ), což jsou podmínky potřebné k denaturaci bílkovin a rozkladu vzorku. [40]

Mezi nejběžněji používané deproteinizující směsi patří kyselina chloristá, kyselina trichloroctová a kyselina sulfosalicylová. Použití kyseliny chlorovodíkové a sírové jako extrakčního činidla za vysokého tlaku (v autoklávu) je vhodné pouze ke stanovení triády pyridoxinu. K extrakci všech forem vitamínů B<sub>6</sub> se používá kyselina chloristá nebo sulfosalicylová. Nevýhodou kyseliny sulfosalicylové je nízká hodnota výtěžnosti a interference při stanovení s fluorescenční detekcí. [39]

Pro stanovení pyridoxinové triády lze použít z chemických a fyzikálně chemických metod spektrofotometrickou metodu. Pyridoxin reaguje s 2,6-dichlorchinonchlorimidem za vzniku pyridoxinu. Vzniklá sloučenina nereaguje s 2,6-dichlorchinonchlorimidem, z rozdílu stanovení v prostředí boratového pufru a jiného pufru stejného pH, lze stanovit koncentraci pyridoxinu vedle ostatních fenolů, které jinak stanovení ruší. Metoda není specifická, je rušena již zmíněnými fenoly, dále pak kreatinem, kreatininem, hydroxylaminem, thiaminem a jinými látkami. Pyridoxal a pyridoxalmin reagují s 2,6-dichlorchinonchlorimidem i za přítomnosti kyseliny borité. Metodu lze použít jen pro analýzu jednodušších vzorků, jinak je zatížena vyšší chybou. Je vhodné tuto metodu doplnit vhodnou dělicí technikou.

Fluorimetrická metoda je založena na stanovení pyridoxalu po jeho převedení na lakton kyseliny 4-pyridoxinové vznikajícího reakcí s kyanidem draselným v alkalickém prostředí. Tato metoda je vhodná pro stanovení pyridoxalu v sušeném mléce. V kombinaci s chromatografickým čištěním na ionexu je nespecifičtější než předešlá metoda.

Dobrých výsledků bylo dosaženo i s použitím mikrobiologických metod, u některých případech se dává přednost těmto metodám před metodami fyzikálně chemickými. [30]

TALWAR a kol. se zabývali stanovením vitamínu B<sub>6</sub> z krevní plazmy a červených krvinek. Nabízí se řada metod, ale jako nejslibnější se ukázalo stanovení aktivní formy vitamínu B<sub>6</sub> pomocí HPLC metody. Venozní krev byla jímána do EDTA do zkumavky, odstředěna a převedena do plastické zkumavky. Zahuštěné červené krvinky byly připraveny k šetrnému odstranění plazmy a před analýzou skladovány při -70°C.

Příprava vzorku:

- A) 500 µl vzorku plazmy, 40 µl derivačního činidla obsahujícího 250 mg.ml<sup>-1</sup> semikarbazidu a glycinu, bylo dáno do zkumavky, zamícháno a inkubováno ve tmě při pokojové teplotě po dobu 30 min. Bylo přidáno 40 µl 70 % kyseliny chloristé, deproteinizovaný vzorek byl dostředován na centrifuze 10 min. Supernatant (300 µl) byl přenesen do čisté zkumavky a pro stabilizaci bylo přidáno 30 µl 25 % NaOH (pH 3,0 – 5,0). Poté bylo 40 µl vstříkováno do HPLC kolony.
- B) Vzorek 300 µl červených krvinek a 700 µl destilované vody bylo dáno do zkumavky a mícháno 30 s. 500 µl zředěného podílu bylo derivováno, stabilizováno a vstříkováno stejným postupem jako plasma.

Chromatografické podmínky:

- Vodní zásobní systém a vodní fluorimetr, model 474
- Izokratická mobilní fáze: 60 mmol.l<sup>-1</sup> hydrogenufosfát sodný obsahující 9,5 % metanolu (v/v) a 400 mg/l EDTA
- pH 6,5 (upraveno kyselinou fosforečnou)
- Kolona: Luna C<sub>18</sub> (4,6 x 250 mm; 5 µm)
- Předkolona: 3 x 4 mm
- Průtok mobilní fáze: 1,5 ml.min<sup>-1</sup>
- Detektor: fluorescenční (excitace a emise při vlnové délce 380 a 450 nm) [41]

Ke stanovení vitamínu B<sub>6</sub> v různých druzích koření využil S.W.Leonard, K. Hardin a J. E. Leklem mikrobiologickou metodu v souladu s AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Jednotlivé druhy koření byly rozdrceny v třecí misce. Tvrdá semena byla nejprve zmrazena kapalným dusíkem a teprve poté byla rozdrcena.



Příprava vzorku:

- 2 g koření byly hydrolyzovány 200 ml 0,44 N HCl v autoklávu (121 °C) po 2 hodiny, aby se uvolnil vitamin B<sub>6</sub> z bílkovin, hydrolyzovány jsou především fosfátové estery (pyridoxaminfosfát a pyridoxalfosfát) a pro uvolnění pyridoxinu z glykosidické vazby, která převládá v rostlinných produktech. Protože vitamin B<sub>6</sub> je fotolabilní, byly všechny pokusy prováděny při žlutém světle.

Výsledná měření měla široký rozptyl hodnot od 0,11 až po 4,02 mg vit.B<sub>6</sub>.100g<sup>-1</sup>. Největším zdrojem tohoto vitaminu byli česnek, chili, majoránka, oregano, pepř, paprika a rozmarýn. [42]

**Tabulka č. 15** Vitamin B<sub>6</sub> v některých druzích koření

Koření	vit. B <sub>6</sub> mg.100g <sup>-1</sup>
kardamon	0,23
cibule	1,09
česnek	2,94
chili	3,67
kari	1,15
majoránka	1,19
oregano	2,32
paprika	4,02
pepř bílý	0,11
pepř černý	0,29
pepř červený	2,45
rozmarýn	1,74

Rozmanitost kapalinové chromatografie dokazuje i stanovení vitamínu B<sub>6</sub> v mléce a v multivitaminových preparátech. Spolu s vitamínem B<sub>2</sub> jej detekoval R. GATTI a M. G. GIOIA.

Všechny zakoupené vzorky – PLP, 4-PA, PL, PM, PN, pyridoxin hydrochlorid a vitamín B<sub>2</sub>, byly převedeny na roztok přidávkem deionizované vody. Rozředěním s mobilní fází byly získány standardní roztoky. Po dva dny se nechaly stát ve tmě při teplotě 4°C. 10 mM pentanesulfonid sodný byl připraven rozpuštěním 960 mg v 500 ml 1 % (v/v) vodném roztoku kyseliny octové.

Příprava vzorků:

- A) Mléko: 5 ml mléka bylo dáno do zkumavky s přidávkem 0,5 ml 1M kyseliny trifluoroctové. Zamíchaný vzorek byl inkubován při pokojové teplotě po 30 min. Po rozložení kyseliny, byla směs dána dvakrát do centrifugy na dobu 15 min při 3000 ot.min<sup>-1</sup>. Obsah se rozdělil na dvě části, na dně zkumavky byly bílkoviny a nahoře tuk. Poté byl 1 ml roztoku zředěn 5 ml mobilní fází.
- B) Kapsle: 5 kapslí obsahujících asi 3 mg vitamínu B<sub>6</sub> a 2,4 mg vitamínu B<sub>2</sub> byly kvantitativně převedeny do 500 ml zábrusové baňky s 1 % kyselinou octovou. Pak bylo 0,2 ml roztoku zředěno 10 ml mobilní fází.
- C) Šumivé tablety: 20 tablet obsahujících asi 0,22 mg vitamínu B<sub>6</sub> a 0,18 mg vitamínu B<sub>2</sub> bylo rozpuštěno ve 3 – 4 ml vody, 3 min byl dán do ultrazvuku při laboratorní teplotě a zředěn 50 ml vody. Poté bylo 0,25 ml rozředěno 10 ml mobilní fází.
- D) Sirup: 2,5g sirupu, který obsahoval přibližně 0,125mg vitamínu B<sub>6</sub> a 0,125mg vitamínu B<sub>2</sub>, bylo zředěno 10 ml vody. Pak bylo odebráno 0,1 ml vzorku a rozředěno 5 ml mobilní fází.

Chromatografické podmínky:

- Teplota 32 ± 2 °C
- Kolona: Phenomenex Luna C<sub>8</sub> (250 mm x 3 mm i.d.; 5 μ)
- Předkolona o stejné stacionární fázi
- Mobilní fáze: směs A:B;
  - A - 10 mM pentanesulfonid sodný v 1 % kyselině octové (v/v)
  - B - byl metanol/tetrahydrofuran 98:2 (v/v)

- Průtok mobilní fáze: 0,4 ml/min
- Detektor: fluorescenční s vlnovou délkou 254 nm. [43]

HADJMOHAMMADI MR. a kol. provedli separaci forem vitaminů B<sub>6</sub> RP-HPLC za použití micelární mobilní fáze. Byly hledány optimální podmínky pro stanovení vitamínu. Nejvhodnějšími podmínkami se ukázala:

- Teplota 35°C
- 3,0 % (v/v) 1-butanolu v mobilní fázi
- pH = 5,5
- 65 mM SDS v mobilní fázi
- Potenciál +1,2 V na Ag/AgCl(Sat.)
- Detekce: UV detektor o vlnové délce 254 nm a elektrochemický detektor

Při těchto podmínkách vitamíny vykazovaly optimalizované elektrochemické chování. [44]

Nealkoholické nápoje fortifikované vitamíny jsou zcela běžné v dnešním světě. Je zde velmi rychlá a levná metoda kontroly kvality. Kapilární elektroforéza (CE) s charakteristickou vysokoúčinnou separací a nízkými náklady. Výhodou je separace sedmi hydrofilních vitamínů v jednom kroku jen za 6 minut.

M. SCHREINER a kol. provedli analýzu těchto nápojů na aparatuře Beckman P/ACE 5000 CE – systémem vybaveným UV detektorem a standardními kapilárami (50 cm x 75 μm; neobalené křemenem), automatickým vstřikovačem a teplotním kontrolním systémem.

Příprava vzorků:

- Vitaminové standardy byly rozpuštěny zvlášť. Koncentrace zásobních roztoků byla 300 μg.ml<sup>-1</sup> pro hydrochlorid thiaminu, hydrochlorid pyridoxinu, kyselinu pantothenovou, nikotinamid a 30 μg.ml<sup>-1</sup> pro kobalamin a riboflavin.
- Nápoje byly zbaveny CO<sub>2</sub> a rozředěny 1 : 1 interním standardem (40 mg.l<sup>-1</sup> Na-sacharin). Výsledná koncentrace sacharinu byla 20 mg.l<sup>-1</sup>. Jeden podíl každé dávky vitaminového integrátoru byl rozpuštěn v 1 l vody filtrované přes 45 μm filtr. [45]

Jednoduchou, citlivou, izokratickou kapalinovou chromatografií pro separaci všech forem vitamínu B<sub>6</sub> použil CH. J. ARGOUDELIS. Všechny složky byly eluovány za méně než 20 minut a jejich kvantifikace se zlepšila pro použití vnitřního standardu.

Příprava vzorků:

- A) Extrakt z pekařských kvasnic. 50mg pekařských kvasnic bylo dáno do zkumavky, poté bylo přidáno 50 $\mu$ l 1 mM isopyridoxalu (iso-PL) a 3 ml 1 M kyseliny perchlorové. Směs byla zamíchána a po 30 min dána do centrifugy na 15 min na 600g. Supernatant byl odlit do jiné zkumavky, jeho pH bylo upraveno na 3–4 roztokem hydroxidu draselného a přemístěn do chladničky na několik hodin. Sraženina perchloridu draselného byla dána do centrifugy a 0,5 ml supernatantu bylo filtrováno přes 0,45  $\mu$ m nylon-66 membránový filtr. Filtrát byl použit pro HPLC.
- B) Extrakt vaječného žloutku. 2 g žloutku s přídatkem 100  $\mu$ l 1 mM iso-PL a 6 ml 1M kyseliny perchlorové bylo dáno do zkumavky. Dále stejný postup jako v bodě B). Filtrát byl poté vstříkovan do HPLC.
- C) Extrakt mléka. Mléko s 2 % tuku. Asi 2g mléka byly dány do zkumavky spolu s přídatkem 10 $\mu$ l 1 mM iso-PL a 1 ml 1 M kyseliny perchlorové. Další postup byl opět stejný jako v předešlých bodech B) a C). Filtrát byl použit pro analýzu v HPLC.

Chromatografické podmínky:

- 510 pumpa (Waters, Milford, MA, USA)
- Dávkoř: Rheodyne model 7125 s 20  $\mu$ l smyčkou
- Detektor: fluorescenční s průtokovou kyvetou 5  $\mu$ l
- Excitace: 290 nm, emise: 389 nm
- Kolona: Phenosphere ODS2(250 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m)
- Předkolona: 3 cm, stejný materiál jako kolona
- Kolonová průtoková rychlost: 1 ml.min<sup>-1</sup>, tlak cca 130 bar
- Mobilní fáze: 0,15 dihydrogenfosforečnan sodný, pH 2,5 bylo upraveno 70 % kyselinou perchlorovou a přepuštěno přes 0,45  $\mu$ m filtr
- Post – kolonový reagen: 1 g.l<sup>-1</sup> roztok disiřičitanu
- Průtok mobilní fáze: 0,1 ml.min<sup>-1</sup>

Všechny experimenty byly prováděny za podmínek oslabeného světla. [46]

M. KIMURA a kol. rozvinul jednoduchou a citlivou metodu HPLC k měření hlavních aktivních forem vitamínu B<sub>6</sub> – PL, PLP a 4-PA v plazmě. Vitamíny a 4-PA byly z plazmy extrahovány 0,8 mol.l<sup>-1</sup> kyselinou perchlorovou. Separace pomocí HPLC je dokonalá při použití ODS reverzní fáze kolony a mobilní fáze 0,1 mol.l<sup>-1</sup> dihydrogenfosfátu draselného obsahujícího 0,1 mol.l<sup>-1</sup> perchloridu sodného a 0,5 g.l<sup>-1</sup> disířičitanu sodného upravující pH na 3. Průtoková rychlost činila 1,0 ml.min<sup>-1</sup>. Vitamíny a 4-PA byly eluovány do 13 minut a jejich koncentrace byla zjištěna fluorescenčním detektorem (excitace: 300 nm, emise: 400 nm). Tato metoda umožňuje detekci PLP v plazmě s velmi citlivou derivatizací při použití disířičitanu sodného v mobilní fázi. [47]

E. L. PONDER a kol. se zabývali separací hydrofilních vitaminů – thiamin (B<sub>1</sub>), riboflavin (B<sub>2</sub>), niacin (B<sub>3</sub>), pyridoxin (B<sub>6</sub>), kobalamin (B<sub>12</sub>), kyselina askorbová (C) a kyselina listová. Vitamíny byly srovnávány za použití 14 mobilních fází a běžně dostupných silikagelových desek a chemicky vázaných silikagelů Thin-Layer Chromatography (TLC) a High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC). Nejlepší separace jednotlivých i směsí vitaminových standardů bylo dosaženo na silikagelových deskách s:

- 1-butanol – chloroform – kys. octová – amoniak – voda; 7 : 4 : 5 : 1 : 1
- benzen – metanol – aceton – kys. octová; 70 : 20 : 5 : 5
- chloroform – etanol – aceton – amoniak; 2 : 2 : 2 : 1 jako mobilní fázi.

Předešlé reagenty hydrofilních vitaminů mohou být také testovány a srovnávány. [48]

P. VINAS a kol. determinovali kapalinovou chromatografií šest aktivních forem vitamínu B<sub>6</sub>, jejich tři fosfátové estery a extrakční produkty. Optimální bylo použití techniky reverzní fáze se stacionární fází mající ligandy s amidovými skupinami. Izokratická mobilní fáze obsahovala fosfátové tlumící roztoky. Fluorescenční detekce zahrnovala post kolonovou derivatizační reakci za použití hydrogensířičitanu sodného pro zvýšení fluorescence fosfátových esterů. Píky ukazovaly charakteristické poměry a fluorescenční spektra. Detekční limity měly rozsah 1–25 ng.ml<sup>-1</sup>. Pro dva extrakční procesy byly pro srovnání použity kyselinová a enzymová hydrolyza. Metoda byla aplikována na stanovení derivátů vitamínu B<sub>6</sub> v různých typech potravin zahrnující i hovězí játra, vaječný žloutek, dětské cereálie a med.

Přírodní volné vitaminy byly objeveny v medu a dětských cereáliích. Fosforylátové estery byly nalezeny v potravinách živočišného původu. [49]

Stanovením vitamínu B<sub>6</sub> z potravin metodou HPLC se zabýval V. OLLILAINEN. Jako hlavní cíl si stanovil zpracování vzorků s vysokou extrakční účinností se zachováním původní koncentrace vitamínů. Většina kyselých extrakčních procesů se testovala pro jejich účelovost. Kyselina perchlorová byla určena jako extrakční činidlo. Běžný postup analýzy potravin se uskutečňuje použitím extrakce rozpuštěné ledové kyseliny perchlorové s následným stanovením pomocí RP-HPLC. Vzorky potravin byly hydrolyzovány *β*-glukosidázou a alkalickými fosfátovými enzymy. Tento proces umožnil extrakci vitamínů B<sub>6</sub>, jejich neporušených forem a měření fosfátovaných a glykosidových forem. Stanovení vitamínu B<sub>6</sub> bylo provedeno u padesáti běžných potravin. Výsledky zahrnovaly maso drůbeží, rybí a rybí produkty, mléčné výrobky, cereálie a zeleninu a hotové pokrmy. Volné a fosforylované vitaminy B<sub>6</sub> byly naměřeny ve všech skupinách potravin a glykosidové vitamínové frakce byly analyzovány ve všech rostlinných potravinách. [50]

J. VANSCHOONHOVEN a kol. pro stanovení vitamínu B<sub>6</sub> z potravin a krmiva použili HPLC s fluorometrickou detekcí. Jednoduchá extrakce vzorků roztokem 5 % trichloroctové kyseliny. Fosfátová skupina byla enzymaticky odstraněna pro ulehčení analýzy HPLC. Nefosforylátové formy vitamínu B<sub>6</sub> byly zcela separovány reverzní fází (C<sub>18</sub>) HPLC do 35 minut a byly detekovány fluorometricky. Jako vnitřní standard byl použit 4-deoxypyridoxin. Vitamin B<sub>6</sub> obsahuje několik druhů potravin a krmiv. Může být stanoven metodou kapalinové chromatografie a klasickou mikrobiální metodou za použití *Saccharomyces uvarum*. Měření HPLC metodou může objasnit větší podíl systematických chyb při mikrobiální metodě. Získané výsledky ukazují, že HPLC je jednodušší a spolehlivější metodou při stanovení vitamínu B<sub>6</sub> v potravinách a krmivech. [51]

Také H. MASCHER se zabýval stanovením pyridoxalu v lidské plazmě. Metodou HPLC determinoval celkový obsah pyridoxalu v plazmě. Po rozštěpení PLP kyselým enzymem *fosfatázou*, stanovil pyridoxal metodou HPLC. Pyridoxal byl separován reverzní kolonovou fází, post-kolonově derivován a nakonec byl fluorescenčně detekován a kvantifikován.

Ve studii bylo 16 lidí, kteří měli nasazenou dietu s nízkým obsahem vitamínu B<sub>6</sub> ve 3denních periodách. Druhý a třetí den bylo odebráno 14 vzorků krve, vždy ve stejný čas. Celkový vnitřní pyridoxal byl stanovován druhý den v plazmě v rozsahu 13 – 17 ng.ml<sup>-1</sup>.  
[52]

S. J. OLDS a kol. studovali obsah vitamínu v syrovém a pečeném kuřeti. Izokratiká aniontová výměna metodou HPLC byla rozvinuta pro analýzu pěti forem vitamínů B<sub>6</sub>. Obnova vitamínů ve standardu byla 97% až 100%. Regenerace vitamínů v pečeném kuřecím prsu měla rozsah od 96 % pyridoxalfosfátu (PLP) až 102 % pyridoxinu (PN). V syrovém kuřecím prsu byl rozsah regenerace od 86 % pyridoxaminu (PM) až 102 % PN. Proces pečení kuřete snížil celkový obsah vitamínu o 6,5 %. Vitamíny B<sub>6</sub> byly při pečení relativně stabilní.  
[53]

## ZÁVĚR

První část této práce byla zaměřena na popis jednotlivých vitaminů, jejich biologických účinků v organismech a projevech při jejich nedostatku či nadbytku.

Kyselina nikotinová a její amid je důležitý při metabolismech cukrů, tuků, aminokyselin, cholesterolu, steroidních hormonů a mnoha dalších látek. Částečně je také niacin syntetizován z aminokyseliny tryptofanu samotným organismem. Proto je jeho nedostatek vzácný. Především v chudých zemích (Asie, Afrika), kde se lidé žijí hlavně kukuřicí a kukuřičnými výrobky. Je zde sice vysoký obsah tryptofanu, ale organismus jej nedovede vstřebat. Příznakem hypovitaminózy je nemoc zvaná pelagra, také nazývána jako „nemoc hrubé kůže“ (zarudnutí, později zhnědnutí kůže, ekzémy, průjmy nebo zácpa). Nadbytek niacinu je vylučován močí. Doporučená dávka pro středně pracující je  $16 - 20 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$ .

Pyridoxin se vyskytuje ve formě fosfátových derivátů. Vitamin B<sub>6</sub> je nutný pro syntézu aminokyselin, tuků, nukleových kyselin a červených krvinek. Také zprostředkovává impulzy mezi nervovými buňkami a účastní se procesu růstu u dětí. Proto je důležitý pro těhotné ženy. Projevy hypovitaminózy jsou záněty na kůži, v dutině ústní včetně jazyka. Také se mohou objevit nervové křeče, pocity úzkosti a nespavost. Dlouhodobá hypervitaminóza se projevuje únavou, podrážděností, zánětem nervů, které mohou způsobovat potíže při chůzi.

Metoda HPLC byla zvolena jako nejvhodnější pro její vysokou citlivost a selektivitu. Umožňuje stanovení složení vzorku i tam, kde není možná jiná separační metoda. Využívá se především pro stanovení hydrofilních látek, např. vitaminy rozpustné ve vodě. Ale je také možné stanovení termolabilních kapalných a tuhých látek. Její velkou výhodnou schopnost rozdělit, případně i kvantitativně stanovit desítky až stovky složek vzorku.

Principem metody je rozdělování složek vzorku mezi mobilní a stacionární fázi. V koloně se ustanovuje řada fázových rovnováh. Mobilní fáze vymývá jednotlivé složky, v rozdílném (retenčním) čase, ve směru svého toku. Složky jsou poté stanoveny vhodným detektorem.

Před stanovením vitaminu B<sub>3</sub> je nutná jeho extrakce ze vzorku. Nejčastěji se využívá extrakce kyselá (HCl nebo kys. sulfonovou) a extrakce alkalická (NaOH nebo Ca(OH)<sub>2</sub>). Také lze použít enzymatickou extrakci, ta je však náročná a vzniká při ní velké množství štěpných produktů, které mohou ovlivnit samotné stanovení. Existuje značné množství kombinací sloučenin, které se využívají pro mobilní fáze. Základem je deionizovaná voda,



v níž je rozpuštěn fosforečnan draselný, peroxid vodíku a síran měďnatý. Jinou variantou je rozpuštěný metanol nebo acetonitril v deionizované vodě. Rozměry kolon se liší v závislosti na účelu použití, délka kolon 5 – 25 cm, vnitřní průměr 2 – 5 mm. Velikost částic náplně se pohybuje 1 - 5  $\mu\text{m}$  v průměru. Konkrétními příklady jsou kolony Inertsil ODS 3 (250 x 4,6 mm; 5 $\mu\text{m}$ ), NovaPak C<sub>8</sub> (8 x 100 mm; 4 $\mu\text{m}$ ) a C<sub>18</sub> HDO (4,6 x 150 mm; 5 $\mu\text{m}$ ). Důležitá je také rychlost průtoku mobilní fáze. Ta se pohybuje v rozmezí 1 – 2,5 ml.min<sup>-1</sup>. Nejvhodnějšími detektory jsou fluorescenční a UV.

Vitamin B<sub>6</sub> se extrahuje kyselinově nebo enzymaticky. Je častá extrakce kyselinou perchlorovou, octovou nebo kombinací několika sloučenin, např. semikarbazid, glycin a kyselina chloristá. Z mobilních fází máme na výběr velké množství kombinačních variant. Pro ukázkou můžeme uvést hydrogenfosfát s metanolem nebo benzen, chloroform, kyselina octová, amoniak a voda. Rozměry kolon se pohybují ve stejném rozmezí, jako je uvedeno u vitamínu B<sub>3</sub>. Konkrétními příklady kolon jsou Luna C<sub>18</sub> (4,6 x 250 mm; 5 $\mu\text{m}$ ), Phenomenex Luna C<sub>18</sub> (250 x 3 mm; 5 $\mu\text{m}$ ) nebo Phenosphere ODS2 (250 x 4,6 mm; 5 $\mu\text{m}$ ). Rychlost průtoku mobilní fáze může být od 0,1 do 1,5 ml.min<sup>-1</sup>. Z detektorů je nejvyužívanější fluorescenční, dalšími detektory jsou UV nebo elektrochemické.

Pro rychle stanovení vitamínu B<sub>3</sub> bych doporučila kyselou extrakci kyselinou chlorovodíkovou, jako mobilní fázi bych vybrala například fosforečnan draselný s peroxidem vodíku a síranem měďnatým ve vodě. Vitamin B<sub>6</sub> bych extrahovala kyselinou perchlorovou. Z mobilních fází bych zvolila hydrogenfosfát sodný s metanolem. Výběr kolon závisí na vybavení laboratoře. A pro stanovení obou vitamínů bych doporučila fluorescenční detektor.

Předložená bakalářská práce bude soužit jako podklad pro navazující diplomovou práci, ve které budou studovány tyto dva vitamíny. Pro jejich stanovení bude využito těchto kolon:

- Supelconsil LC-8 (15cm x 4,6mm; 5 $\mu\text{m}$ ) fa: Supelco USA
- Discovery C8 (25cm x 4,6mm; 5 $\mu\text{m}$ )
- Discovery C18 (25cm x 4,6mm; 5 $\mu\text{m}$ )
- Supelcosil LC18DB (25cm x 4,6mm; 5 $\mu\text{m}$ ),

které máme k dispozici v naší univerzitní laboratoři.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] ŠÍCHO, V., VODRÁŽKA, Z., KRÁLOVÁ, B. *Potravinářská biochemie*, SNTL/ALFA, Praha 1981
- [2] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., BUDÍNSKÝ, P. *Potravinářská biochemie II*, UTB Academia centrum Zlín, Zlín 2006
- [3] BLATNÁ, J., BUDĚŠÍNSKÝ, Z. a kol. *Vitaminy, jejich chemie a biochemie*, Nakladatelství československé akademie věd, Praha 1961
- [4] CABALARO, G. *Encyklopedia of human nutrition*, 253 – 259 s., Second edition, Oxford 2005
- [5] Dostupné na: <http://www.whfoods.com/genpage.php?tname=nutrient&dbid=83>
- [6] Dostupné na: <http://www.nutrition.org./nutinfo/content/niac.shtml>
- [7] GAUDINEAU, C., AUCLAIR, K. Inhibition of human P450 enzymes by nicotinic acid and nicotinamide, *Department of Chemistry*, McGill University, Canada 2004
- [8] OSAR, Z. a kol. Nicotinamide effects oxidative burst activity of neutrophils in patients with poorly controlled type 2 diabetes mellitus, *Experimental diabetes research* 5 (2), 155 – 162 s., 2004
- [9] <http://en.wikipedia.org/wiki/Niacin>
- [10] AGERBO, P., ANDERSEN, H. F. *Vitaminy a minerály pro zdravý život*, Ferrosan 1997
- [11] UNGEROVÁ-GÖBOLOVÁ, V. *Vitaminy, účinné látky podporující zdraví*, Mnichov 1996
- [12] Dostupné na: <http://www.umm.edu/altmed/ConsSupplements/VitaminB3Niacins.html>
- [13] Dostupné na: <http://www.whfoods.com/genpage.php?tname=nutrient&dbid=83>
- [14] Dostupné na:  
[http://www.pdrhealth.com/drug\\_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/niac\\_0184.shtml](http://www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/niac_0184.shtml)
- [15] Dostupné na: [http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2002/bevan/\(5\)pyridoxin.htm](http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2002/bevan/(5)pyridoxin.htm)
- [16] Dostupné na: <http://healthlink.mcw.edu/article/985640580.htm>

- [17] TALWAR, D. a kol. Optimisation nad validation of a sensitive high performance liquid chromatography assay for routine measurement of pyridoxal 5-phosphate in human plasma and red cells using pre-column semicarbazide derivatisation, *Department of Biochemistry*, Royal Infirmary, UK 2003
- [18] Dostupné na: [http://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin\\_B6](http://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_B6)
- [19] Dostupné na: [http://news.bbc.co.uk/2/hi/health/medical\\_notes/91597.stm](http://news.bbc.co.uk/2/hi/health/medical_notes/91597.stm)
- [20] Dostupné na: <http://pi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/vitaminB6/>
- [21] KARDOŠ, E., BEREK, D. *Základy kvapalinovej chromatografie*, ALFA Bratislava 1978
- [22] ARMAREGO, W. L. F., CHAR, C. L. L. Purification of Laboratory chemicals, Fifth edition, *Elsevir Science*, USA 2003
- [23] DEAN, J. A. *Chemické dělicí metody*, SNTL, Praha 1974
- [24] DETERMANN, H. *Gelová chromatografie*, Akademia, Praha 1972
- [25] Dostupné na: <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
- [26] CHURÁČEK, J. a kol. *Analytická separace látek*, 1. vydání, SNTL, Praha 1990
- [27] KOMÁREK, K. a kol. *Reakční chromatografie v organické analýze*, 1. vydání, SNTL, Praha 1989
- [28] Nové typy HPLC kolon SUPELCO. In *Novinky Sigma Aldrich*, 1995
- [29] DRABINOVÁ, M. *Stanovení vitamínů rozpustných ve vodě metodou HPLC*, (Diplomová práce), Vysoká vojenská škola pozemního vojska, Vyškov 2003
- [30] DAVÍDEK, J. a kol. *Laboratorní příručka analýzy potravin*, SNTL, Praha 1977
- [31] ROSE-SALLIN, C. a kol. Comparison of microbiological and HPLC – fluorescence detection methods for determination of niacin in fortified food products, *Food Chemistry* 73, 473 – 480s., 2001
- [32] WINDAHL, K. L. a kol. The determination of niacin in selected foods by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography: acid extraction, *Food Chemistry* 65, 263 – 270s., 1998

- [33] JURAJA, S. M. a kol. Asia Pacific food analysis network (APFAN) training exercise: the determination of niacin in cereals by alkalit extraction and high performance liquid chromatography, *Journal of Food Composition and Analysis* 16, 93 – 106s., 2003
- [34] NDAW, S. a kol. Enzymatic extraction procedur efor the liquid chromatographic, *Food Chemistry* 78, 129 – 134s., 2002
- [35] SACCANI, G. a kol. Determination of niacin in fresh and dry cured pork products by ion chromatography: experimental design approach for the optimisation of nicotinic acid separation, *Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari*, Italy 2003
- [36] LaCROIX, D. E., WOLF, W. R. a KWANSA, A. L. Rapid trichloroacetic acid extraction and liquid chromatography method for determination of nikotinamide in commercial cereals, *Cereal Chemistry* 82(3), 277-281s., Journal Article, 2005
- [37] CONSIGLIERI, C. a AMENDOLA, F. High performance liquid chromatography (HPLC) of hydro-soluble vitamins in Parma ham, *Industrie Alimentari* 42(426), 602-604s., Journal Article, 2003
- [38] HOLASOVÁ, M. a MAŠKOVÁ, E. Niacin determination in meat and offals by HPLC and its comparison with microbiological assai, *Czech Journal of Food Science* 17(5), 166-170s., Journal Article, 1999
- [39] Dostupné na: [http://www.webprostor.cz/veda\\_a\\_vyzkum](http://www.webprostor.cz/veda_a_vyzkum)
- [40] POLESELLO, S., RIZZOLO, A. Chromatografic determination of vitamins in food – Review, *Journal of Chromatography* 624, 103 – 152s., 1992
- [41] TALWAR, D. a kol. Optimisation and validation of a sensitive high-performance liquid chromatohraphy assay for routine neasurment of pyridoxal 5-phosphate in human plasma and red cells using pre-column samicarbazide derivatisation, *Department of Biochemistry*, Royal Infirmary, UK 2003
- [42] SCOTT, W. a kol. Vitamin B-6 Content of Spices, *Journal of Food Composition and Analysis* 14, 163 – 167s., 2001
- [43] GATTI, R. a GIOIA, M. G. Liquid chromatigraphic determinaiton with fluorescence detection of B<sub>6</sub> vitamers nad riboflavin in milk and pharmaceuticals, *Dipartimento di Scienze Farmaceutiche*, Universita di Bologna, Italy 2004

- [44] HADJMOHAMMADI, M. R. a kol. Separation of B-6 vitamers with micellar liquid chromatography using UV and electrochemical detection, *Annali di Chimica* 94(11), 857 – 866s., Journal Article, Italy 2004
- [45] SCHREINER, M., RAZZAZI, E. a LUF W. Determination of water-soluble vitamins in soft drinks and vitamin supplements using capillary electrophoresis, *Food* 47, 243 – 247s., 2003
- [46] ARGOUDELIS, C. J. Simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of all seven vitamin B<sub>6</sub>-related compounds, *Journal of Chromatography A*, 790(1-2), 83 – 91s., 1997
- [47] KIMURA, M., KANEHIRA, K. a YOKOI, K. Highly sensitive and simple liquid chromatographic determination in plasma of B<sub>6</sub> vitamers, especially pyridoxal 5'-phosphate, *Journal of Chromatography A*, 722(1-2), 295 – 301s., 1996
- [48] PONDER, E. L., FRIED, B. a SHERMA, J. Thin-layer chromatographic analysis of hydrophilic vitamins in standards and from *Helisoma trivolvis* snails, *ACTA Chromatographica* 14, 70 – 81s., Journal Article, 2004
- [49] VINAS, P. a kol. Determination of vitamin B-6 compounds in foods using liquid chromatography with post-column derivatization fluorescence detection, *Chromatographia* 59 (5-6), 381 – 386s., 2004
- [50] OLLILAINEN, V. HPLC analysis of vitamin B-6 foods, *Agricultural and Food Science in Finland* 8(6), Journal Article, 1999
- [51] VANSCHOONHOVEN, J. a kol. Reliable and sensitive high-performance liquid chromatographic method with fluorometric detection for the analysis of vitamin B-6 in food and feeds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42(7), 1475 – 1480s., 1994
- [52] MASCHER, H. Determination of total pyridoxal in human plasma following oral-administration of vitamin B-6 by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 82(9), 972 – 974s., 1993
- [53] OLDS, S. J. a kol. Vitamin B-6 in raw and fried chicken by HPLC, *Journal of Food Science* 58(3), Journal Article, 1993

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

NAD <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
ATP	Adenzin trifosfát
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
PN	Pyridoxin
PM	Pyridoxamin
PL	Pyridoxal
4-PA	Kyselina 4-pyridoxová
PLP	Pyridoxalfosfát
PNM	Pyridoxalamin 5' - fosfát
Iso-PL	Isopyridoxal
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
Kys.	Kyselina
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
RP-HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie s reverzní fází
LLC	Kapalinová rozdělovací chromatografie s kapalnou stacionární fází
LSC	Kapalinová adsorpční chromatografie s pevnou látkou jako stacionární fází
GLC	Plynová rozdělovací chromatografie s kapalnou stacionární fází
GSC	Plynová adsorpční chromatografie s pevnou látkou jako stacionární fází
IEC	Iontově výměnná, iontová chromatografie
GPC	Gelová chromatografie
GC	Plynová chromatografie

LC	Kapalinová chromatografie
TLC	Tenkvrstvá kapalinová chromatografie
HPTLC	Vysokoučinná tenkvrstvá kapalinová chromatografie
CE	Kapilární elektroforéza
MS	Hmotnostní spektrometr
UV	Ultrafialové světlo
VIS	Viditelné světlo
IR	Infračervené světlo
PP	Pelagra Preventive factor

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1 Schéma etanolového kvašení.....	13
Obr. 2 Transaminace, dekarboxylace a racemizace.....	19
Obr. 3 Schéma kapalinového chromatografu.....	24
Obr. 4 Lineární dávkovač.....	25
Obr. 5 Dávkovací kohouty.....	25
Obr. 6 Fotometrický detektor.....	28
Obr. 7 Fluorescenční detektor.....	28
Obr. 8 Refraktometrický detektor.....	28



**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1 Obsah niacinu ve vybraných potravinách.....	15
Tab. 2 DDD niacinu pro jednotlivé skupiny obyvatelstva USA.....	příloha č. 1
Tab. 3 Obsah pyridoxinu ve vybraných potravinách.....	20
Tab. 4 DDD pyridoxinu pro jednotlivé skupiny obyvatelstva USA.....	příloha č. 2
Tab. 5 Přehled chromatografických metod.....	23
Tab. 6 Přehled plnění kolon stacionárními a mobilními fázemi.....	26
Tab. 7 Přehled používaných detektorů.....	29
Tab. 8, 9 Výsledky stanovení niacinu ve fortifikovaných potravinách.....	příloha č. 3
Tab. 10,11 Výsledky stanovení niacinu v daných potravinách.....	příloha č. 4
Tab. 12 Vliv způsobu extrakce na koncentraci niacinu.....	příloha č. 5

**SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha č. 1 DDD niacinu pro jednotlivé skupiny obyvatelstva USA, tabulka č. 2

Příloha č. 2 DDD pyridoxinu pro jednotlivé skupiny obyvatelstva USA, tabulka č. 4

Příloha č. 3 Porovnání výsledků stanovení niacinu u fortifikovaných potravin,  
tabulky č. 8, 9

Příloha č. 4 Množství niacinu v daných potravinách, tabulky č. 10, 11

Příloha č. 5 Vliv způsobu extrakce na koncentraci niacinu, tabulka č. 12

**PŘÍLOHA Č. 1: DOPORUČENÉ DENNÍ DÁVKY NIACINU PRO JEDNOTLIVÉ SKUPINY OBYVATELSTVA USA**

**Tabulka č. 2 [15]**

<b>Skupina</b>	<b>DDD [mg/den]</b>
<i>Kojenci</i>	
0 - 6 měsíců	2
7 - 12 měsíců	4
<i>Dítě</i>	
1 - 3 roky	6
4 - 8 let	8
<i>Chlapci</i>	
9 - 13 let	12
14 - 18 let	16
<i>Dívky</i>	
9 - 13 let	12
14 - 18 let	14
<i>Muži</i>	
19 a více let	16
<i>Ženy</i>	
19 a více let	14
<i>Těhotné ženy</i>	
14 - 50 let	18
<i>Kojící ženy</i>	
14 - 50 let	17

**PŘÍLOHA č. 2: DOPORUČENÉ DENNÍ DÁVKY PYRIDOXINU PRO JEDNOTLIVÉ SKUPINY OBYVATELSTVA USA**

**Tabulka č. 4 [21]**

<b>Skupina</b>	<b>DDD [mg/den]</b>
<i>Kojenci</i>	
0 - 6 měsíců	0,1
7 - 12 měsíců	0,3
<i>Dítě</i>	
1 - 3 roky	0,5
4 - 8 let	0,6
<i>Chlapci</i>	
9 - 13 let	1
14 - 18 let	1,3
<i>Dívky</i>	
9 - 13 let	1
14 - 18 let	1,2
<i>Muži</i>	
19 - 50 let	1,3
51 a více let	1,7
<i>Ženy</i>	
19 - 50 let	1,3
51 a více let	1,5
<i>Těhotné ženy</i>	
14 - 50 let	1,9
<i>Kojící ženy</i>	
14 - 50 let	2

**PŘÍLOHA č. 3: POROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ STANOVENÍ NIACINU U FORTIFIKOVANÝCH POTRAVIN [32]**

Tabulka 8 Provozní výsledky stanovení niacinu v různých fortifikovaných potravinových produktech na trhu HČP kyselý hydrolyzátní sůl niacinu a sůl niacinu a sůl niacinu a sůl niacinu

Typ potraviny	Vztek	Dělová hodnota ng 100g	Kyselý hydrolyzátní sůl niacinu		Kyselý a alkalický hydrolyzátní sůl niacinu	
			Niacin (100g)	R <sub>niacin</sub> (NM/%)	Niacin (100g)	R <sub>niacin+NA+NM</sub> (%)
Dělová výživa	A	41	546549	995	442444	66
	Náslévné dělové produkty	651	628623	102nd	575594	82
	C	51	644646	108101	491462	72
	D (přípravky z bílí)	09	138133	995	138132	98
Cenaí produkty	Státní cenaí A	31	470466	998	443442	92
	Státní cenaí B	153	185186	10799	165164	89
	Státní cenaí C	241	254253	10989	264256	100
	Státní cenaí D	168	194199	102nd	208174	106
	Dělové cenaí a o a e A	8	910897	nd	749777	nd
	Dělové cenaí a o a e B	4	480475	94100	410404	78
	Kákoýníj a káidé	19	211205	102103	162155	88
	niční produkty	517	632578	nd	598612	nd
Káidé niční produkt B	266	314313	997	295302	97	
Káidé niční produkt C	264	375381	9794	369362	96	
Káidé niční produkt D	197	237242	8897	246253	94	
Káidé niční produkt E	154	191198	nd	162144	nd	
Káidé niční produkt F	161	190198	100102	177179	95	

Pozn:

nd - nedetekováno

NA - lysedimarniková

NM - nikotinid

Niacin je uctně vzakžerelutně



**PŘÍLOHA č. 4: MNOŽSTVÍ NIACINU V DANÝCH POTRAVINÁCH [33]**

**Tabulka 10: Niacin v syrovém a vařeném masa a v uzených a kávičce**

Vzorek masa		CE (ng 10g <sup>-1</sup> )	CE (mg 100g <sup>-1</sup> %)	HLC (ng 10g <sup>-1</sup> )
Kůrčička	syrové	6	101	55
	vařené	8	111	75
Hovězí	syrové	37	105	34
	vařené	49	97	43
Skopové	syrové	77	106	77
	vařené	76	102	76
Vepřové	syrové	10	80	88
	vařené	11,6	121	102
Rybí	syrové	11	100	09
	vařené	17	104	15

**Tabulka 11: Niacin v uzených potravinách**

Vzorek potravin	CE (ng 10g <sup>-1</sup> )	CE (mg 100g <sup>-1</sup> %)	HLC (ng 10g <sup>-1</sup> )
Rajče	11	74	1
Rajčelupré	09	80	1
Brkvice	06	-	<02
Brán	04	100	03
Rožmárek	02	80	<02
Kvasník	<05	84	<05
Spojník	<05	95	<05
Čech	09	99	1
Mádro	31	107	22
Kvasice	35	35	38

## PŘÍLOHA č. 5: VLIV ZPŮSOBU EXTRAKCE NA KONCENTRACI NIACINU

Tabulka č. 12: Vliv způsobu extrakce na koncentraci niacinu v potravinách				
Potravina	Extrakce	Koncentrace ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )		
		Kyselina nikotinová	Nikotinamid	Niacin
Hrušky	1	0,29	11	11,3
	2	0,27	10,7	10,9
	3	1,22	10,2	11,4
	4	0,32	0,41	0,73
Špenát	1	0	0,72	0,72
	2	0	0,71	0,71
	3	0	0,69	0,69
	4	0	0	0
Francouzské fazole	1	0,19	2,8	3
	2	0,25	2,9	3,2
	3	0,37	2,6	3
	4	0	0	0
Kukuřice sladká	1	3,6	13,8	17,4
	2	-	-	-
	3	4,3	12,7	17
	4	3,8	13,7	17,5
Rýže	1	10,3	0	10,3
	2	9,9	0	9,9
	3	10	0	10
	4	9,8	0	9,8
Mouka pšeničná	1	3,4	1,7	5,2
	2	3,2	1,7	5
	3	5,7	1,9	7,6
	4	3,5	0,44	4
Klíčky pšeničné	1	10,8	0	10,8
	2	11	0	11
	3	13,8	0	13,8
	4	11,1	0	11,1
Oříšky lískové	1	26,5	3,7	30,2
	2	25,6	3,4	29
	3	93,4	1,9	95,8
	4	26,8	2,9	29,7
Kvasnice	1	17	182	199
	2	-	-	-
	3	22	174	196
	4	17	177	194
Hovězí plátek	1	3,8	53	57
	2	3,5	50	54
	3	3,6	50	54
	4	3,51	52	56
Vepřový řízek	1	0	64	64
	2	-	-	-
	3	0,2	57	58
	4	0	60	60

Pozn.: Extrakce č.:  
 1 - NADáza (120  $\mu\text{g}$ ) (pH 4,5; 18 h, 37°C)  
 2 - NADáza (120  $\mu\text{g}$ ), papain (100 mg),  $\alpha$ -amyláza (10 mg) (pH 4,5; 18 h, 37°C)  
 3 - HCl 0,1 M (vodní lázeň 100°C po 1 h)  
 4 - bez NADázy (pH 4,5; 18 h, 37°C)