

Stanovení vitamínů B metodou HPLC

Veronika Bieleszová

Bakalářská práce
2008/2009



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav potravinářského inženýrství
akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Veronika BIELESZOVÁ**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Stanovení vitaminů B metodou HPLC**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

- Teoreticky zpracovat problematiku vitaminů B.
- Popsat princip HPLC.

II. Praktická část

- Zavést metodiku pro simultánní stanovení vitaminů skupiny B.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] HLÚBIK, P., OPLTOVÁ, L. Vitaminy.1.vyd. Praha: 2004. 232 s. ISBN 80-247-0373-4.

[2] VOŘÍŠEK, J. a kol. Analytická chemie.1.vyd. Praha: 1965. 268 s.

[3] DEAN, J. A. Chemické dělicí metody.1.vyd. Praha: SNTL, 1974. 404 s.

[4] COMBS, G.F. The vitamins, Academic Press, San Diego 1992.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

20. února 2009

Termín odevzdání bakalářské práce:

31. května 2009

Ve Zlíně dne 31. května 2009



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Hlavním cílem bakalářské práce bylo stanovení vitamínů B v tabletách, které byly analyzovány metodou HPLC. Zabývá se kontrolou množství těchto vitamínů ve srovnání s údaji na obalu výrobce.

Klíčová slova: vitamín B, doplněk stravy, HPLC, chromatografie

ABSTRACT

The main purpose of bachelor work was the assignment of the vitamin B in tablets. Tablets were analyzed by the HPLC method. HPLC is concerned with a checking of quantity how many vitamins are involved when we compare data by a producer.

Keywords: vitamin B, tablets, HPLC, chromatography

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych chtěla poděkovat za metodické a odborné vedení, obětavý přístup, cenné rady a připomínky při vypracování bakalářské práce vedoucí Ing. Daniele Kramářové, Ph.D.

Dále bych ráda poděkovala za psychickou a finanční podporu mým rodičů.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

OBSAH

ÚVOD	8
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 VITAMÍNY	11
1.1 CHEMICKÁ STRUKTURA A FUNKCE VITAMÍNŮ	11
1.2 HYPOVITAMINOSA A HYPERVITAMINOSA	11
1.3 ROZDĚLENÍ VITAMÍNŮ PODLE ROZPUSTNOSTI.....	12
Vitamíny rozpustné v tucích:	12
Vitamíny rozpustné ve vodě:.....	12
1.4 ZTRÁTY VITAMÍNŮ A MINERÁLNÍCH LÁTEK PŘI KUCHYŇSKÝCH ÚPRAVÁCH.....	13
1.5 ZÁKON O POTRAVINÁCH A TABÁKOVÝCH VÝROBCÍCH.....	14
1.6 DOPLŇKY STRAVY NA BÁZI VITAMÍNŮ	16
2 VITAMÍNY SKUPINY B	17
2.1 THIAMIN - B ₁	17
2.2 RIBOFLAVIN - B ₂	19
2.3 KYSELINA NIKOTINOVÁ A JEJÍ AMID - B ₃	21
2.4 KYSELINA PANTOTENOVÁ - B ₅	22
2.5 PYRIDOXIN - B ₆	24
3 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE (HPLC)	27
3.1 CHROMATOGRRAFIE.....	27
3.1.1 Různá hlediska dělení chromatografie	27
3.2 CHROMATOGRAFICKÝ SYSTÉM.....	27
3.2.1 Příprava mobilní fáze v HPLC	28
3.3 KLASIFIKACE CHROMATOGRAFICKÝCH METOD	28
3.4 DĚLENÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE NA:	29
3.4.1 Příslušenství HPLC	29
3.4.1.1 Zařízení pro uchování a transport mobilní fáze	30
3.4.1.2 Zařízení pro dávkování vzorku	30
3.4.1.3 Zařízení pro separaci látek	31
3.4.1.4 Zařízení pro detekci látek, popř. sběrač frakcí.....	31
3.4.1.5 Doplněk registrující zařízení.....	32
II PRAKTICKÁ ČÁST	33
4 METODIKA	34
4.1 MATERIÁL - VZORKY	34
4.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	34
4.3 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	35
4.4 ANALYZOVANÉ VZORKY	35
4.4.1 B-komplex Zentiva.....	35
4.4.2 B-komplex s vitamínem C	36
4.4.3 Energit MULTI s příchutí pomeranče.....	37
5 ANALÝZA DOPLŇKŮ STRAVY POMOCÍ HPLC	38

5.1	PŘÍPRAVA VZORKŮ.....	38
5.2	STANOVENÍ OBSAHU VIT. B ₁ , B ₃ , B ₅ A B ₆ VE VZORCÍCH B-KOMPLEX, B-KOMPLEX S VIT. C A ENERGIT MULTI METODOU HPLC.....	38
5.3	MĚŘENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY PRO STANOVENÍ VITAMÍNŮ B METODOU HPLC.....	39
6	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	40
6.1	VÝSLEDKY MĚŘENÍ VZORKŮ DOPLŇKŮ STRAVY METODOU HPLC	40
6.2	VÝSLEDKY MĚŘENÍ KALIBRAČNÍCH KŘIVEK PRO STANOVENÍ VIT. B METODOU HPLC	46
	ZÁVĚR	51
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	53
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	55
	SEZNAM TABULEK.....	57
	SEZNAM GRAFŮ	58
	SEZNAM PŘÍLOH.....	59

ÚVOD

Být zdravý, výkonný, dobře se cítit, mít dobrou náladu - to je trend dnešní doby. Můžeme tomu pomoci zdravým životním stylem, kam jistě taky patří správně volené „zdravé“ potraviny. Již od pradávna se lidé zabývali vlastnostmi různých potravin, které mohou lidem poskytnout látky potřebné ke správnému fungování a povzbuzení našeho těla. O významu výživy pro zdraví dnes už málokdo pochybuje, ale mnozí mají z různějších důvodů poněkud zkreslené představy o správné výživě. A taky ne každý, kdo zná zásady správné výživy, se jimi řídí. V současné době někdy doplácíme na hojnost lákavých a snadno dostupných potravin, které nás obklopují, a které z nutričního hlediska nejsou vždy nejvhodnější. Jsme totiž zaplaveni takovou spoustou lákavých informací a z reklam, že si ani neuvědomujeme, jakou hrají vitamíny úlohu, v čem nám mohou prospět, kolik jich máme přijmout a kdy si jimi můžeme zdraví vážně poškodit. Vitamíny jsou skupinou třinácti různých skupin chemických látek nesmírně důležitých pro náš život. Transformují všechny tři hlavní živiny na energii. Jsou to organické látky, které tělo potřebuje pro regulaci různých metabolických dějů, a které se většinou nedovede samo vyrobit. Každý z nich má svou specifickou funkci a chybí-li ve stravě, může dojít k vážné újmě na zdraví. V takových případech pak skutečně přídavek vitamínů vede k „záračnému“ uzdravení. Vitamíny jsou přítomny téměř ve všech potravinách, ale je jejich obsah je různý. Potřeba jednotlivých vitamínů závisí na druhu vitamínu, věku, tělesné aktivitě, pohlaví a obecném zdravotním stavu. Obecně platí, že zvýšené množství vitamínů u každého z nás se doporučuje konzumovat v zimním období či v časném jaru. Ale pozor! U vitamínů, jako ostatně skoro u všech výživových faktorů, existuje dvojí riziko: riziko z nedostatku a riziko z nadbytku. Zdravé děti a zdraví dospělí by měli čerpat dostatečný přísun všech živin z běžné stravy. Pestrá strava v přiměřeném množství bez doplňků snižuje potenciální riziko vitamínových nedostatků, ale zároveň i jejich předávkování. Individuální doporučení doplňků by měl dávat lékař nebo dietní sestra. Supplement nám neprodlouží život, nezvýší naši tělesnou zdatnost ani nám život nezpříjemní. Jsou ovšem skupiny lidí, kde mimořádné okolnosti vyžadují vyšší příjem vitamínů a pak je na místě doplnit stravu o dávky vitamínů podle rady lékaře. Doplňek stravy také známe pod názvem nutraceutika, potravinové nebo výživové doplňky či doplňky výživy.

Vitamíny B jsou velmi citlivé a to hlavně na světlo, práce s nimi proto musela probíhat za sníženého přístupu světla. Pro stanovení těchto vitamínů byla použita Vysokoučinná kapalinová chromatografie - HPLC. Cílem této práce je vyizolovat vitamíny B z analyzovaných tablet, zjistit jejich množství a v závěru porovnat s množstvím uvedeném na obalu od výrobce.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VITAMÍNY

Vitamíny jsou organické látky, které lidský organismus nezbytně potřebuje, avšak není schopen si je sám syntetizovat. Tyto biologicky aktivní látky nejsou pro organismus přínosné z hlediska zdroje energie ani stavebních jednotek tkání. Jsou to exogenní esenciální nízkomolekulární sloučeniny, které jsou nezbytné pro život [1].

Vitamíny získáváme buď z potravin nebo je přijímáme ve formě suplementů, které lze koupit jako tablety, kapsle, roztoky, prášky nebo injekce [2].

1.1 Chemická struktura a funkce vitamínů

Chemické struktury a funkce vitamínů v organizmech jsou zcela odlišné. Působí jako anti-oxidanty nebo jako prekurzory biokatalyzátorů, například kofaktorů enzymů [3].

Vitamíny jsou po chemické stránce velmi rozmanité látky, které se v potravinách vyskytují v nízkých koncentracích a většina z nich je relativně velmi citlivá na fyzikálně-chemické vlivy. Rozlišovacím znakem je jejich rozpustnost, podle níž je lze rozdělit na vitamíny rozpustné v tucích - **lipofilní** a ve vodě - **hydrofilní** [1]. Jednotlivé vitamíny se liší konkrétní funkcí v buněčném metabolismu [4].

Poslední návrh doporučených výživových dávek byl přijat v roce 1989. Očekává se, že v nejbližší době budou vydány nové doporučené dávky. Tyto výživové dávky vyjadřují doporučená množství energie, základních živin, minerálních látek a vitamínů. Cílem doporučení je informovat zejména širokou veřejnost o zásadách zdravé (správné, racionální) výživy. Toto doporučení je odpovídající všestranným fyziologickým potřebám jednotlivých skupin a podskupin obyvatelstva [5].

1.2 Hypovitaminosa a hypervitaminosa

U živých organismů se nedostatek každého vitamínu projevuje chorobnými příznaky, které v lehčích případech označujeme jako **hypovitaminosa** a v těžších formách hovoříme o **avitaminose**. Při nedostatečné resorpci vitamínů bývá příčinou většinou onemocnění zažívacího traktu, např. zánětlivá a průjemová onemocnění. Proto je nutno dbát při těchto chorobách na dostatečný přísun vitamínů. Je třeba také počítat se zvýšenou potřebou vitamínů za některých fyziologických podmínek nebo při infekčních onemocněních [4].

Při nedostatku některých vitamínů B-komplexu, především vitamínu B₃, vznikala pelagra. Při nedostatku vitamínu C vznikaly kurděje, beri-beri vzniká nedostatkem thiaminu a křivice nedostatkem vitamínu D [6].

1.3 Rozdělení vitamínů podle rozpustnosti

Pro označení vitamínu se používají buď písmena abecedy, přičemž vitamíny s podobnými fyziologickými účinky jsou dále rozlišeny číselnými indexy, nebo názvy odvozenými od chemického složení vitamínů [1].

Vitamíny lipofilní se ukládají nejčastěji v játrech. Tyto vitamíny vykazují různé rozmanité funkce. Funkce hydrofilních vitamínů spočívá v jejich katalytickém účinku. Uplatňují se zejména jako kofaktory různých enzymů v metabolismu nukleových kyselin, proteinů, sacharidů, lipidů apod. Tyto vitamíny nebývají v organismu skoro vůbec skladovány a jejich přebytek je vylučován močí.

Vitamíny rozpustné v tucích:

vitamín A (retinol) a jeho provitamíny (karotenoidy),
vitamín D (kalciferoly), cholekalciferol,
vitamín E (tokoferoly a tokotrienoly),
vitamín K (fylochinony, farnochinony),
vitamín F - esenciální mastné kyseliny (dříve vitamín F).

Vitamíny rozpustné ve vodě:

- skupina vitamínu B-komplexu:

vitamín B₁ (thiamin),
vitamín B₂ (riboflavin),
vitamín B₃ (kyselina nikotinová a její amid),
vitamín B₅ (kyselina pantotenová),
vitamín B₆ (pyridoxin),
vitamín B₉ (kyselina listová),
vitamín B₁₂ (kyanokobalamin),

kyselina lipoová,

biotin (dříve vitamín H),

- vitamín C (kyselina L-askorbová a L-dehydroaskorbová) [6].

1.4 Ztráty vitamínů a minerálních látek při kuchyňských úpravách

Je pravda, že přísun vitamínů a minerálních látek průměrnou stravou občana ČR není na potřebné úrovni. Přitom je nutno brát v úvahu ztráty, ke kterým dochází při různých vzájemných reakcích některých látek současně přítomných v potravě. Daleko důležitější jsou však možné ztráty, které vznikají při nesprávném skladování surovin nebo nevhodným způsobem přípravy stravy. Ke snížení jejich obsahu může vést už pouhé čištění či jiné mechanické opracování. Např. zbytečně velký odpad při opracování brambor nás připravuje o významné množství vitamínu C, neboť toho je v bramborách nejvíce právě těsně pod slupkou. K dalším ztrátám může dojít při vyluhování. Necháme-li potraviny delší dobu ve vodě, potom se do ní vyluhují všechny látky ve vodě rozpustné, a těch není právě málo. Je to např. vitamín C, vitamíny skupiny B, mnohé minerální látky. Obsah biostimulátorů může nepříznivě ovlivnit i tepelná úprava. Dalším nepříznivým faktorem je záření, zejména ultrafialové paprsky. V praxi to znamená, že ke ztrátám dochází už působením denního světla. Zářením dochází ke žluknutí tuků, ke ztrátám vitamínu A, vitamínu B₂, B₆, B₁₂, kyseliny pantotenové, kyseliny listové, vitamínu C, vitamínu E, kyseliny lipoové, kyseliny pangamové apod. Další významnou příčinou znehodnocování potravin je působení kyslíku. Ze surovin při čištění a mechanické úpravě odstraňujeme pokud možno co nejmenší části. Potraviny omýváme vždy v celku, nerozkrájené. Nepříznivé následky může mít také tepelná úprava, proto ji provádíme pouze po dobu, která je nezbytně nutná k přípravě stravy. Je nutno dbát i na správné uložení a skladování potravin, zejména ovoce, zeleniny a brambor [7].

Většinou se do potravin nepřidávají jen samotné vitamíny, ale přidávají se další mikroživiny (minerální látky a stopové prvky) a pak se jedná o obohacování nebo-li fortifikaci, restituci nebo standardizaci. Každý z těchto výrazů má zcela konkrétní smysl - nadhodnocení, doplnění či sjednocení výrobků, u kterých se obvykle upravuje obsah určité mikroživiny. Obecný termín je pouze obohacování. K vitaminizaci se užívá buď jen jeden vitamín, obvykle to bývá vitamín C, ale může se používat i soubor několika vitamínů. Vzhledem k tomu, že vitamíny jsou látky labilní, snaží se výrobci vitamínů stále jednotlivé formy vita-

mínů stabilizovat tak, aby k uvolnění aplikovaného vitamínu došlo až v organismu. Obohacují nebo vitaminizují se jednak potraviny široké spotřeby, např. nápoje nebo margaríny nebo se obohacují či vitaminizují cíleně potraviny určené pro určité skupiny populace, např. děti, sportovce atd. Vzhledem ke ztrátám při vymílání obilí, především pšenice, zahájila většina zemí obohacování mouky vitamíny B₁, B₂ a vápníkem na hodnoty původně obsažené v obilném zrně. Zcela přirozeným způsobem byl vitaminizován fermentovaný mléčný nápoj, u kterého se podařilo účelně vedeným technologickým postupem zvýšit obsah vitamínu B₁₂ a kyseliny listové, a to podstatně (až na padesátinásobek původního obsahu). Naše legislativa prochází trvale úpravami a změnami. Podle vyhlášky (Vyhláška 53/2002 Sb.) je k obohacování bez speciálního schvalování dovoleno užít následující potravní doplňky - vitamín B₁, B₂, C, E, kyselinu listovou, niacin a β -karoten a dále draslík, hořčík, vápník, zinek, měď a jód, a to do výše hodnoty stanoveného procentuálního podílu referenční dávky. Po posledních úpravách je vyhláška 53/2002 Sb. nyní označována jako vyhláška 306/2004 Sb. V současné době se připravuje novelizace tak, aby vyhovovala předpisům platným v EU [8].

1.5 Zákon O potravinách a tabákových výrobcích

Zákon č. 110/1997 Sb. O potravinách a tabákových výrobcích definuje doplněk stravy jako potravinu, jejímž účelem je doplňovat běžnou stravu a která je koncentrovaným zdrojem vitamínů a minerálních látek nebo dalších látek s nutričním nebo fyziologickým účinkem, obsaženým v potravine samostatně nebo v kombinaci, určená k přímé spotřebě v malých odměřených množstvích [9].

Vyhláškou, kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin je vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 225/2008 Sb., která byla vydána na základě vyhlášky č. 110/1997 Sb.

Označování doplňků stravy

(1) Kromě požadavků na označování obalu potravin upravených v zákoně a ve zvláštním právním předpise se na obalu pro spotřebitele uvede:

- v názvu potraviny slovo „doplněk stravy“,
- název vitamínů, minerálních látek nebo dalších látek charakterizujících výrobek,

- číselný údaj o množství vitamínů, minerálních látek nebo dalších látek vztažených na doporučenou denní dávku, přičemž u vitamínů a minerálních látek se použijí jednotky uvedené v příloze č. 1 k této vyhlášce,
- údaje o obsahu vitamínů a minerálních látek i v procentech doporučené denní dávky uvedené v příloze č. 5 k této vyhlášce, přičemž tento údaj lze uvést i v grafické podobě,
- doporučené denní dávkování a popřípadě další podmínky použití,
- varování před překročením doporučeného denního dávkování,
- upozornění, aby byly výrobky uloženy mimo dosah dětí,
- upozornění, že doplňky stravy nejsou náhradou pestré stravy,
- upozornění „Nevhodné pro těhotné ženy“ u doplňků stravy obsahujících více než 800 μg vitamínu A v denní dávce,

(2) U doplňků stravy obsahujícího *Cimicifuga racemosa* (Ploštičník hroznovitý) nebo její extrakty se dále na obalu pro spotřebitele uvede upozornění na nutnost přerušení konzumace a vyhledávání lékaře při jakémkoliv podezření na jaterní onemocnění.

(3) Údaje podle odstavce 1 (3 odrážky) se uvádějí průměrnými hodnotami zjištěnými na základě kvantitativní analýzy doplňku stravy provedené výrobcem.

(4) Údaj o celkovém množství se uvádí podle zvláštního právního předpisu nebo podle pravidel pro značení symbolů „e“. Objemová nebo hmotnostní odchylka kladná a záporná nejvýše minus 5 % se nepovažuje za klamání spotřebitele.

(5) Označování doplňků stravy nesmí

- doplňkům stravy přisuzovat vlastnosti týkající se prevence, léčby nebo vyléčení lidských onemocnění nebo na tyto vlastnosti odkazovat,
- obsahovat žádná tvrzení uvádějící nebo naznačující, že vyvážená a pestrá strava obecně nemůže poskytnout dostatečné množství vitamínů a nebo minerálních látek.

(6) Výživová a zdravotní tvrzení u doplňků stravy se mohou uvést za podmínek přímo použitelného právního předpisu Evropských společenství o požadavcích na uvádění nutričních a zdravotních tvrzení při označování potravin [10].

1.6 Doplnky stravy na bázi vitamínů

Suplementy přijaté ve formě tobolek, tablet, prášků nebo tekutin mají původ často také v potravinách. Ačkoliv mnoho vitamínů je možné připravit synteticky, většina z nich se získává z přirozených látek. Například: vitamín A má zpravidla původ v oleji rybích jater. Komplex vitamínů B se získává z droždí nebo jater, vitamín C je extrahován ze šípkových plodů a vitamín E se připravuje nejčastěji ze sójových bobů, obilných klíčků nebo kukuřice.

Každý má jiné požadavky a proto výrobní firmy dodávají mnoho vitamínů v nejrůznějších formách. Nejčastěji jsou vyráběny tablety. Dají se lépe skladovat, převážet a mají delší dobu použití než prášky a tekutiny. Kapsle je možno, podobně jako tablety, lehce skladovat a přepravovat. Nejčastěji se takto dávají do oběhu vitamíny rozpustné ve vodě. Výhodou prášků je možnost požívání ve větších dávkách, neobsahují plnicí, vazebné přídatné látky, které by u někoho mohly vyvolat alergickou reakci. Roztoky lze lehce přimíchat k nápojům. Zvláště se hodí pro osoby, které mají potíže s polykáním tablet a kapslí.

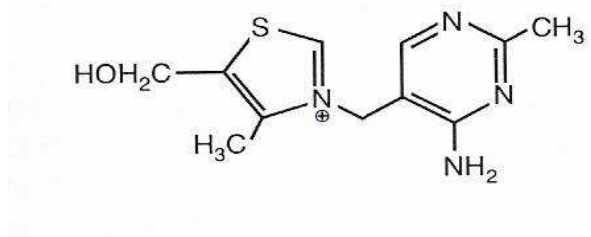
Suplementy je nejvhodnější užívat po jídle. Vitamíny jsou organické látky a proto je v zájmu efektivnějšího vstřebávání užívat je spolu s jinými potravinami a minerálními látkami! Protože vitamíny rozpustné ve vodě, především vitamín B komplexu a vitamín C, se dost rychle vyloučí močí, je nejvhodnější jejich užívání po snídani či po obědě [2].

2 VITAMÍNY SKUPINY B

Tyto vitamíny jsou ve vodě rozpustné a většinou tvoří kofaktory důležitých enzymů. Dostatečné zásobování těmito vitamíny zajišťuje pestrá strava. V určitých případech však mohou nastat problémy např. při vegetariánské stravě u kobalaminu, či u kyseliny listové u těhotných žen. Při hodnocení výživové situace se sleduje pouze příjem thiaminu a riboflavinu, popř. pyridoxinu. Všechny tyto vitamíny mají podobné zdroje v potravě, a proto je při dostatečném příjmu možno předpokládat, že nevznikne deficit ani u ostatních vitamínů skupiny B [3].

2.1 Thiamin - B₁

Dříve nazývaný aneurin je po chemické stránce 2,5-dimetyl-6-aminopyrimidin vázaný metylovým můstkem na 4-metyl-5-hydroxyetyltiazol.



Thiamin

Thiamin patří k nejméně stálým vitamínům. V neutrálním a v alkalickém prostředí je značně nestálý, v kyselém prostředí je relativně stálý. V alkalickém prostředí se za přítomnosti oxidačních činidel jako jsou $[K_3Fe(CN)_6]$, H_2O_2 nebo I_2 oxiduje na thiochrom nebo až na thiamindisulfid. Biochemicky aktivní formou je thiamindifosfát (HDP), vznikající z thiaminu účinkem enzymu *thiaminokinasy* v různých orgánech. Přeměnu pyruvátu na acetyl-CoA katalyzuje *pyruvátdehydrogenasa*, která jako kofaktor obsahuje právě TDP. Podílí se také na konečném odbourávání metabolických produktů lipidů a proteinů. Druhou účinnou formou je thiamintrifosfát (TTP), který působí v nervech a pravděpodobně i ve svalech [6].

Thiamin se nachází jak v rostlinných surovinách, kde se nachází převážně ve volné formě tak i v živočišných produktech, kde je vázán ve formě TDP. Nalezneme ho například v mase (masné výrobky a maso vepřové), vnitřnostech (játra, srdce, ledviny), pivovarských kvasnicích či tmavé mouce.

Tab. 1. Zdroje thiaminu [11]

Údaje v mg na 100 g potraviny			
Fazole bílé	0,5	Brambory	0,15
Hrách	0,3	Fazole červené	0,65
Burské ořechy	0,9	Lososová šunka	0,35
Ovesné vločky	0,6	Pšeničné klíčky	2,0
Lískové ořechy	0,4	Vepřové maso	0,8

Současný doporučený příjem pro průměrného obyvatele ČR činí $1,1 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$, pro středně těžce pracující ženy i muže produktivního věku byl stanoven na $1,2 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$, pro těžce pracující se zvyšuje o $0,2 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$. Zvýšená dávka je doporučena pro těhotné a kojící ženy a to ve výši $1,4 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$. Jeho nedostatek přináší poruchy energetického metabolismu, kardiovaskulárního aparátu a projevuje se únavou, pomalými reakcemi, svalovou slabostí, neurologickými poruchami jako deprese nebo náhlým poklesem krevního tlaku. Akutní nedostatek v potravě vede k chorobě nazývané beri-beri, která se ještě dodnes vyskytuje v jihovýchodní Asii. Toto onemocnění vede k poruchám nervového, kardiovaskulárního systému a atrofii svalů [1, 3].

Vitamín B₁ se lehce ničí varem a pečením. Dalšími nepřáteli tohoto vitamínu jsou kofein, alkohol, konzervační procesy, vzduch, voda, estrogény, látky neutralizující žaludeční šťávu aj.

Tento vitamín lze koupit v různé dávce - zpravidla v 50 mg, 100 mg a 500 mg balení. Nejúčinnější je ve formě B komplexu, doplněn o vitamíny B₂ a B₆. Účinek je ještě intenzivnější, když přípravek obsahuje kyselinu pantotenovou, kyselinu listovou a vitamín B₁₂ [2].

2.2 Riboflavin - B₂

Žlutá krystalická látka je po chemické stránce 7,8-dimetyl-10-(-1-D-ribityl)isoalloxazin.



Riboflavin

Patří do skupiny flavinů, jejíž vodné roztoky fluoreskují. Z důvodu působení UV paprsků se tento vitamín rozkládá za vzniku lumichromu (kyselé nebo neutrální pH) nebo lumiflavinu (zásadité pH). Struktura riboflavinů je složena z isoalloxazinového jádra, na který je vázán ribitol. Procesu vidění se riboflavin účastní tím, že převádí krátkovlnné modré paprsky na žlutozelené a tím umožňuje vidění za šera. Jednou z nejvýznamnějších chemických vlastností je možnost účastnit se oxidačně redukčních vlastností. V organizmech se riboflavin nachází jako součást flavinových kofaktorů FMN a FAD. Flavínové enzymy jsou považovány za akceptory vodíkových atomů z redukováných pyridinových koenzymů (NADH, NADPH) [5]. Jako volný je pouze v sítnici, syrovátce a moči.

Mezi živočišné zdroje se řadí maso, játra, ledviny, vejce a mléčné výrobky. V potravinářství se B₂ používá pro fortifikaci potravin (cereálie, dětská výživa, multivitaminové nápoje), rovněž se používá jako barvivo v instantních produktech.

Tab. 2. Zdroje riboflavinu [11]

Údaje v mg na 100 g potraviny			
Úhoř	9,3	Játrový salám jemný	1,0
Avokádo	0,15	Pistácie	0,2
Brokolice	0,2	Hovězí maso	0,3
Camembert 30%	0,7	Čokoláda	0,4
Kuřecí stehna	0,2	Celozrnné sušenky	0,8

Vzhledem k jeho působení v energetickém metabolismu a metabolismu bílkovin je výše denního příjmu závislá na obsahu bílkovin a energetické hodnotě stravy. Tato doporučená dávka by měla být v souladu s energetickým výdejem a tělesnou hmotností konzumenta. Pro průměrného obyvatele ČR činí výživová dávka $1,5 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$. Pro středně těžce pracující ženy je tato dávka $1,5 - 1,6 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$ a pro muže $1,7 - 1,8 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$. Pro ženy těhotné se doporučuje denní příjem ve výši $1,5 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$ a pro kojící $1,6 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$. Jeho zvýšený příjem se doporučuje při infekčních chorobách, po chirurgických intervencích a u pacientů s polytraumaty. Při nedostatečném příjmu riboflavinu trvajícím více než 100 dní nastane hypovitaminosa. Nastávají zánětlivé změny kůže a sliznic, některé oční a nervové poruchy a únava. Nejčastěji je indikována u osob, které konzumují nedostatečné množství mléka a mléčných výrobků. Kromě toho může být způsobena nemocemi štítné žlázy, záněty tenkého střeva a také stresem. Nedostatečná saturace byla diagnostikována u vegetariánů a veganů [1, 3].

Obdobně jako ostatní vitamíny B komplexu je vitamín B₂ nejúčinnější ve formě, která je doplněna ostatními vitamíny. V České republice se běžně prodávají 10 mg tablety a ampule [2].

2.3 Kyselina nikotinová a její amid - B₃

Dříve označovaný jako vitamín P-P („Pelagra-Preventive vitamín“). Kyselina nikotinová je po chemické stránce kyselina 3-pyridinkarboxylová a její amid - nikotinamid.



Kyselina nikotinová a její amid

Obě tyto látky jsou biologicky stejně účinné. Termín niacin se používá pro celou skupinu příbuzných látek tvořenou kyselinou nikotinovou, jejím amidem a jejich deriváty. Lidský organismus je schopen omezeně vytvářet niacin z aminokyseliny tryptofanu pomocí enzymů obsahujících jako kofaktor vitamín B₆ - pyridoxin. Pro biosyntézu 1 mg niacinu je zapotřebí asi 60 mg tryptofanu. V biochemických systémech vznikají z kyseliny nikotinové dva koenzymy, které mají neobyčejně významnou úlohu. Tyto koenzymy *pyridinových dehydrogenas* jsou nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺, NADH) a nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADP⁺, NADPH). *Oxidoreduktasy* s NAD⁺ nebo NADP⁺ se účastní syntézy a odbourávání cukrů, koenzymy katalyzují oxidace primárních a sekundárních alkoholů, aldehydů, α -aminokyselin nebo také α - a β -hydroxykarboxylových kyselin [6].

Volná kyselina se vyskytuje převážně v rostlinách a v živočišných tkáních její amid. Jejich nejbohatším zdrojem jsou kvasnice, z hlediska nutričního maso a vnitřnosti (játra). Obiloviny jsou rovněž bohaté na kyselinu nikotinovou. Jelikož se nachází především v obalových vrstvách zrna a v klíčku, její obsah v moukách závisí na stupni vymletí [1].

Tab. 3. Zdroje niacinu [11]

Údaje v mg na 100 g potraviny			
Pečené kuře	9,3	Hovězí maso	11,3
Burské ořechy	20,5	Vepřové maso	10,0
Vajíčko na měkko	3,8	Celozrnné těstoviny	7,0
Telecí kotleta	10,0	Mandle	7,0

Při stanovení doporučeného příjmu kyseliny nikotinové je třeba započítat nejen niacin z potravy, ale také ten, který byl syntetizován v játrech a ledvinách z tryptofanu. Smíšená dieta obsahující 60 g bílkovin je tedy zdrojem 600 mg tryptofanu, ze kterého může teoreticky vzniknout až 10 mg niacin-ekvivalentu. Doporučené výživové dávky pro průměrného obyvatele až středně pracující v ČR činí 16-20 mg.den⁻¹. Toxická dávka niacinu je pro dospělou osobu 1,8 mg na 1 kg tělesné hmotnosti a vyvolává hemoragie v ledvině. Místo kyseliny nikotinové bývá při suplementaci doporučován nikotinamid, který je lépe tolerován [1].

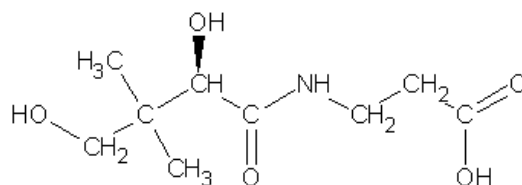
Nedostatek vyvolává nemoc pelagru, která se projevuje kožními a nervovými příznaky, ale později se objevují i choroby trávicího systému (průjemy), poruchy duševních pochodů (demence) aj., které mohou končit i smrtí [3]. V našich podmínkách je výskyt niacinové deficiencie vzácný. Deficit niacinu rovněž vede k poruchám sekrece kyseliny chlorovodíkové v žaludku a v konečném důsledku k poruchám vstřebávání vitamínu B₁₂. Objevují se poruchy transportu sodíku, draslíku a glukózy [6].

Mezi protivníky tohoto vitamínu řadíme vodu, alkohol, některé kulinární postupy při přípravě jídla, hypnotika a estrogenery.

Prodává se buď jako niacin (kyselina nikotinová) nebo niacinamid (amid kyseliny nikotinové). Běžně jsou k dostání tablety s obsahem 50 až 1000 mg účinné látky a prášková forma. B komplex a multivitaminové přípravky zpravidla obsahují 50 až 100 mg niacinu nebo niacinamidu. V ČR je zatím dostupný tento vitamín v kombinovaných preparátech s jeho maximálním obsahem 50 mg [2].

2.4 Kyselina pantotenová - B₅

Je to vitamín velmi dobře rozpustný ve vodě a zahříváním s kyselinami nebo zásadami se hydrolyzuje. V přírodě se kyselina pantotenová nejčastěji vyskytuje jako přirozená součást



Kyselina pantotenová

koenzymu A (CoA neboli CoA-SH), který vzniká v heterotrofních organizmech z volné kyseliny pantotenové. Savčí organismus, kvasinky a bakterie nemohou kyselinu pantote-

novou syntetizovat, jsou schopny ji jen přenášet do molekuly koenzymu A a do speciálního proteinu označovaného jako ACP-SH (=ACP, Acyl Carrier Protein). Hlavní biochemickou funkcí koenzymu A je přenos acylových skupin prostřednictvím thioesteru, za katalytického působení enzymu *acetyl-CoA-syntetasy*. Kyselina pantotenová zasahuje prostřednictvím koenzymu A do významných metabolických cyklů, jako je β -oxidace mastných kyselin a citrátový cyklus [6].

Živočišné produkty jsou bohatšími zdroji, rostlinné kromě luštěnin, jí obsahují zpravidla velmi málo. Dobrymi zdroji jsou například játra, ledviny, rybí maso, kvasnice, sýry, mléko, vejce (vaječný žloutek), tmavá mouka, luštěniny, rýže, zelenina se zelenými listy a houby.

Tab. 4. Zdroje kyseliny pantotenové [11]

Údaje v mg na 100 g potravin			
Pečené kuře	1,0	Ovesné vločky	1,1
Brokolice	1,3	Fazole mungo	3,9
Camembert	1,1	Hovězí filé	1,0
Žampiony	2,1	Celozrnný chléb	2,0
Burské oříšky	2,7	Vodní meloun	1,6

Do současnosti nebyl stanoven minimální denní požadavek na příjem kyseliny pantotenové. Mezinárodně uznávané doporučené dávky, které byly stanoveny na základě nutričních studií, se pohybují v rozmezí 3 - 14 mg.den⁻¹. Výživová doporučená dávka pro průměrného obyvatele ČR byla vypočtena ve výši 7,3 mg.den⁻¹ [1,4].

Hypovitaminosa kyseliny pantotenové nebyla u lidí pozorována. U pokusných zvířat se její nedostatek projeví zažívacími obtížemi s průjmy, kožními příznaky a změnami na sliznicích. U podvyživených jedinců je nedostatek této kyseliny spojován s úplnou vyčerpaností, únavou, slabostí, nespavostí, depresemi a parestézií v končetinách, zvláště syndromem "pálení nohou" [1,4].

Nadbytečná množství se z organismu odvádí močí, menší část se metabolizuje na CO₂. V organismu se vitamín uchovává po dobu 4 - 10 dní. Na základě Směrnice 46/2002

O doplňcích stravy vydala v červnu 2006 komise EU zprávu, která se zabývá bezpečností příjmu vitamínů a minerálních látek, z níž jasně vyplynulo, že žádné riziko při nadměrné konzumaci kyseliny pantotenové neexistuje [12].

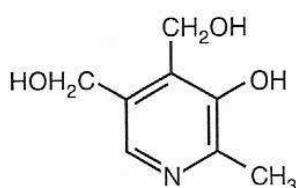
Spolehlivě ho ničí konzervační postupy, průmyslové zpracování jídel, kofein, alkohol, antikoncepční prostředky či léky na spaní. Varem se ztrácí až 50 %, při technologickém zpracování - mletí, zmrazování i konzervování - pak téměř 80 %. Na druhé straně je potěšující, že při pasterizaci mléka jsou ztráty jen minimální [12].

U nás jsou dostupné zahraniční pantenolové přípravky, především ve formě dexpanthenolových tablet a sprejů [2].

2.5 Pyridoxin - B₆

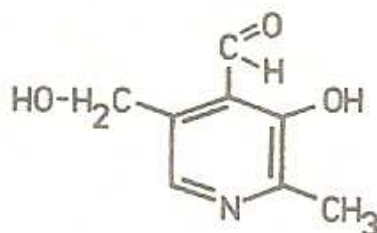
Do skupiny B₆ náleží tři navzájem příbuzné látky, které všechny prokazují biologický účinek vitamínu.

Jsou to pyridoxol (2-metyl-3-hydroxy-4,5-bishydroxymethylpyridin),



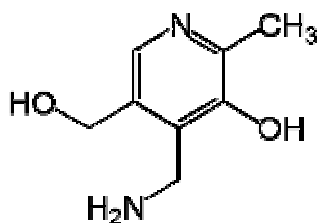
Pyridoxol

pyridoxal (2-methyl-3-hydroxy-4-formyl-5-hydroxymethyl-pyridin)



Pyridoxal

a pyridoxamin (2-metyl-3-hydroxy-4-aminometyl-5-hydroxymethylpyridin).



Pyridoxamin

Vitamín B₆ je proto označován jako pyridoxinová triáda. Všechny tři látky mají bazický charakter a vytvářejí s minerálními kyselinami soli rozpustné ve vodě. V biochemických systémech vystupuje pyridoxin ve formě fosfátových derivátů pyridoxalfosfátu a pyridoxaminfosfátu. Pyridoxalfosfát se jako kofaktor *dekarboxylas* zúčastňuje reakcí v metabolismu aminokyselin. Z reakcí se jedná hlavně o transaminaci, při níž je pyridoxalfosfát koenzymem *aminotransferas*, o dekarboxylaci aminokyselin a jejich racemizaci [4, 6].

Vitamín B₆ je široce rozšířen v rostlinných i živočišných potravinách. Ve vyšších koncentracích se vyskytuje v droždí, ve zvířecích vnitřnostech, ve vepřovém, drůbežím a rybím masu. Z rostlinných potravin je nejhojněji obsažen v pšeničných klíčcích, cereáliích, celozrnných produktech a v sójových bobech. Rovněž brambory, zelí, kukuřice, mrkev, banány, zelené fazole a hrách jsou dobrými zdroji tohoto vitamínu. Poměrně nízký je jeho obsah v pasterizovaném mléce.

Tab. 5. Zdroje pyridoxinu [11]

Údaje v mg na 100 g potraviny			
Knackebrot	2,7	Krůtí řízek	0,35
Losos	1,0	Sardinky	1,0
Játrový sýr	0,3	Vepřové maso	0,4
Játrový salám	0,45	Pšeničné otruby	2,5
Mrkev	0,3	Pšen. celozrnný chléb	0,35

K příjmu toho vitamínu přispívá do určité míry i střevní mikroflóra. Při přípravě stravy je pyridoxin celkem termostabilní, při ozáření světlem se postupně rozkládá.

Pyridoxin hraje klíčovou roli v metabolismu aminokyselin, proto se jeho denní dávka zvyšuje, jestliže stoupá příjem bílkovin. Výživová doporučená dávka vitamínu B₆ pro průměrného obyvatele ČR je 1,7 mg.den⁻¹. Zvýšený příjem tohoto vitamínu na 2,0 mg.den⁻¹ je doporučen pro těhotné a kojící ženy. Některé léky, například estrogény ve vysokých dávkách, antidepresiva a některá cytostatika, jestliže jsou užívána po delší dobu, mohou rovněž vyžadovat zvýšený příjem pyridoxinu. Totéž platí pro dietu bohatou na tuky.

Riziko nedostatečného příjmu vitamínu B₆ v potravě se vyskytuje v mužské a ženské populaci ve věkovém rozmezí 20 - 50 let. Nedostatečná saturace organismu postihuje především těhotné a kojící ženy, adolescenty, starší osoby a kuřáky [1].

Nedostatek pyridoxinu se projevuje nervovými příznaky, které doprovázejí nevolnosti. Její častější příčinou bývá zmenšená absorpce vitamínu v trávicím traktu, alkoholismus nebo antagonismus některých léčiv. Antivitaminosa je vzácná, ale v posledních letech je stále častěji diskutován vztah nedostatku vitamínu B₆ a kardiovaskulárních onemocnění [6].

Toxicita pyridoxinu je velmi nízká. V mnohých případech nebyly zjištěny žádné vedlejší účinky ani u dávek do 300 mg tohoto vitamínu na den. Kritická dávka se pohybuje mezi 300 až 500 mg.den⁻¹.

Vitamín B₆ lze koupit v různých dávkováních od 20 do 500 mg nebo též v B komplexu a multivitaminových preparátech. V zájmu prevence nedostatku vitamínu B je vhodné jeho současné používání se stejným množstvím vitamínu B₁ a vitamínu B₂. Rovněž je možné koupit preparát s prodlouženým vstřebáváním, který se v organismu uvolňuje postupně v průběhu 10 hodin. V ČR se prodávají 20 mg tablety a 50 mg injekce, ale i řada dalších forem [2].

3 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE (HPLC)

3.1 Chromatografie

Tato důležitá analytická metoda umožňuje na základě různých adsorpčních nebo rozdělovacích koeficientů některých látek jejich stanovení. Za určitých podmínek můžeme jediným pracovním postupem rozdělit a stanovit směs několika látek, což je vhodné při analýze složitých směsí [13].

Slouží k dělení směsi i k izolaci a částečnému popisu oddělovaných látek, z nichž některé se mohou objevit nečekaně nebo jejichž přítomnost ve směsi nemusí být předem známa. Dělení složek vzorku je založeno na tom, že rychlost pohybu jednotlivých rozpuštěných molekul kolonou nebo tenkou vrstvou sorbentu je přímo závislá na rozdělování těchto molekul mezi pohyblivou a nepohyblivou fázi. Rozdělovací konstanta každé složky určuje její obsah v pohyblivé fázi v kterékoli době a tedy i celkový čas, po který tato složka setrvává v nepohyblivé fázi. Ten pak určuje zadržení nebo zpomalení pohybu rozpuštěné látky. Jestliže se složky dělí, vycházejí z kolony v různém časovém intervalu [14].

3.1.1 Různá hlediska dělení chromatografie

- povaha mobilní fáze: plynová (GC), kapalinová (LC),
- způsob provedení: kolonová (sloupcová), plošná (planární),
- princip separace: rozdělovací, adsorpční, iontově vyměňená, afinitní,
- pracovní způsob: eluční, frontální, vytěšňovací,
- účel: analytická, preparativní (preparační).

3.2 Chromatografický systém

Zahrnuje tři základní prvky - mobilní fázi, složky vzorku a stacionární fázi. Mobilní fáze unáší složky vzorku ložiskem stacionární fáze. Pojmeme stacionární fáze se rozumí ta část chromatografického systému, která splňuje alespoň jednu z těchto vlastností:

- fyzikálně-chemicky adsorbuje nebo absorbuje vzorek z mobilní fáze,
- na povrchu probíhá proces iontové výměny,
- má pórovitou strukturu, která umožňuje separaci složek vzorku na základě efektivních rozměrů jeho molekul [15].

3.2.1 Příprava mobilní fáze v HPLC

V mnoha případech problémy, které vznikají v chromatografickém systému, jsou způsobeny špatnou přípravou a užitím mobilní fáze. Problémy, které souvisí s přípravou a užitím mobilní fáze mohou být tyto:

- zavzdušněná hlava chromatografické pumpy (čerpadla),
- přítomnost vzduchových bublinek v cele detektoru,
- nízká citlivost fluorimetrické detekce vlivem přítomného kyslíku v mobilní fázi,
- nízká přesnost a reprodukovatelnost nástřiku vzorku,
- zanesení in-line filtrů, frit nebo kapilár vlivem přítomných nečistot v mobilní fázi,

které se projevují zejména:

- zvýšeným tlakovým spádem na koloně,
- zvýšeným šumem základní linie,
- kolísavými retenčními časy,
- abnormálním profilem chromatografického píku [16].

3.3 Klasifikace chromatografických metod

Podle typu mobilní fáze můžeme chromatografické techniky rozdělit na:

- chromatografii plynovou,
- fluidní,
- plazmovou,
- kapalinovou - kolonová (HPLC)

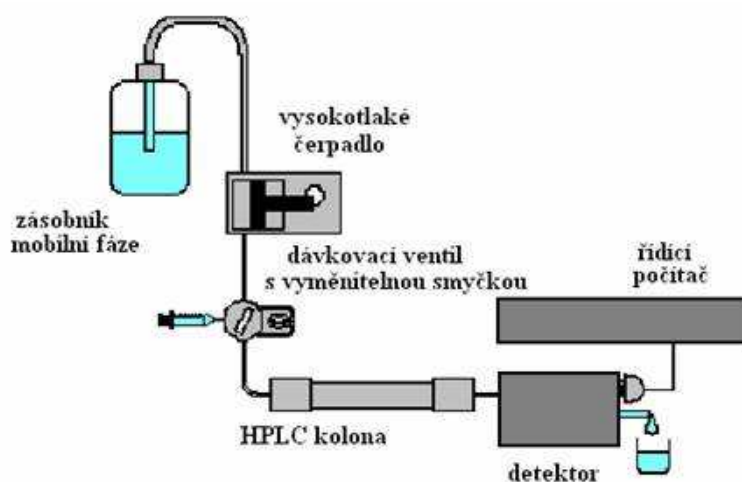
- planární (plošná) - (papírová a tenkovrstvá (TLC) - (=Thin Layer Chromatography).

3.4 Dělení kapalinové chromatografie na:

- sorpční chromatografii, kdy se separace uskutečňuje specifickými interakcemi částice s povrchem adsorbentu - adsorpční chromatografie (Liquid-Solid Chromatography) - LSC nebo stagnující kapalnou stacionární fází nanesenou na nosiči - rozdělovací (absorpční) chromatografie (Liquid-Liquid Chromatography) - LLC.
- gelovou (permeační) chromatografii (GPC), kdy se separace uskutečňuje na základě velikosti částic a velikosti pórů gelu.
- ionexová chromatografie (Ion-Exchange Chromatography, IEC), kdy dochází k separaci iontů na základě specifických interakcí s nabitým nosičem.
- speciální chromatografii - afinitní, chirální aj.

3.4.1 Příslušenství HPLC

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography) využívá dávkování mobilní fáze pod tlakem 20 - 60 MPa.



Obr. 1. Obecné schéma kapalinového chromatografu

Kapalinový chromatograf se skládá z těchto základních částí:

- zařízení pro uchování a transport mobilní fáze,
- zařízení pro dávkování vzorku,
- zařízení pro separaci látek,
- zařízení pro detekci látek, popř. sběrač frakcí,
- kromě toho může být k detektoru připojen integrátor nebo počítač [17].

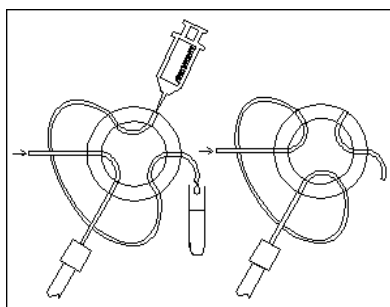
3.4.1.1 Zařízení pro uchování a transport mobilní fáze (vysokotlaké čerpadlo)

Čerpadlo mobilní fáze (pumpa) musí generovat vysoké tlaky. Většinou potřebujeme až desítky MPa. Zajišťujeme 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:

- pneumatická,
- pulzní - pístová s membránou i bezmembránová,
- s lineárním posunem pístu - injektorová,
- 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 [18].

3.4.1.2 Zařízení pro dávkování vzorku



*Obr. 2. Dávkovací kohouty
s dávkovací smyčkou*

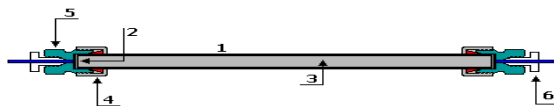
Při vysokých tlacích na vstup se dávkuje injekční stříkačkou při zastavení průtoku nebo bez zastavení průtoku speciálními ventily. Pro kapalinovou chromatografii se stále vyvíjejí nové dávkovače, které více vyhovují požadavkům vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC). Dávkují se desítky μl .



Obr. 3. Injekční stříkačka Hamilton

3.4.1.3 Zařízení pro separaci látek (chromatografická kolona, termostat kolony)

Nejpoužívanější materiál k výrobě kolon je nerezová ocel, plasty nebo sklo.

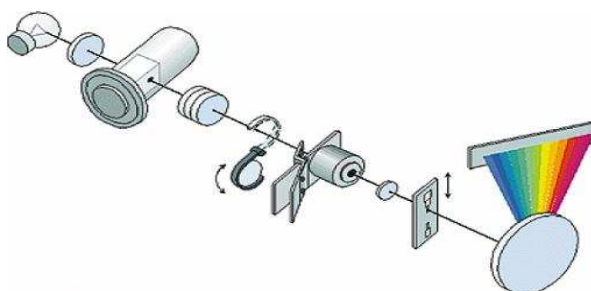


Obr. 4. Kolona HPLC

Vlastní klasická HPLC kolona se skládá z kovového pláště (1), který je uzavřen porézní kovovou fritou (2), která zabraňuje uvolňování stacionární fáze (3) z kolony a současně umožňuje plynulý průtok mobilní fáze. Oba konce kolony jsou ukončeny ochranným kroužkem (4) a koncovou hlavici (5), ve které je navrtán vstup pro kapiláru se šroubem (6).

Dělení látek kapalinovou chromatografií probíhá zpravidla při laboratorní teplotě, méně často se pracuje při zvýšené teplotě do 80°C. V moderních kapalinových chromatographech se obvykle uplatňuje vzdušné termostátování s otevřeným topením a s rychlým vynuceným mícháním [16].

3.4.1.4 Zařízení pro detekci látek, popř. sběrač frakcí



Obr. 5. UV/VIS DAD detektor [15]

Nejčastěji užívané typy detektorů v HPLC:

- UV detektory pro jednu nebo více fixovaných vlnových délek,
- UV detektory s variabilní vlnovou délkou,
- refraktometry,
- fluorescenční detektor,
- elektrochemické detektory,
- infračervené detektory,
- hmotnostní spektrometr jako detektor.

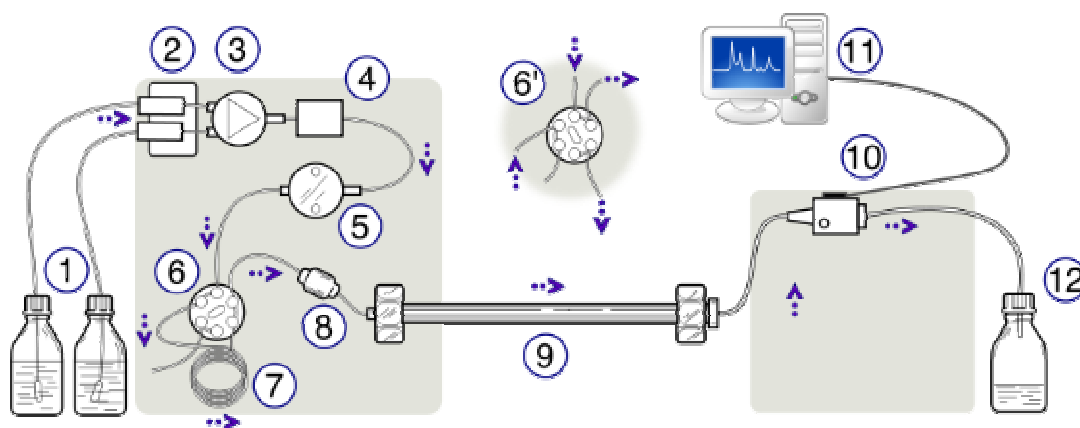
3.4.1.5 Doplněk registrující zařízení



Obr. 6. HPLC HP 1100 [19]

Kromě toho může být k detektoru připojen integrátor nebo počítač jako doplněk registrující zařízení. Kapalinový chromatograf může mít samozřejmě řadu obměn, některé komponenty lze vyřadit neb naopak přidat. Při isokratické eluci je mobilní fáze vedena ze zásobníku mobilní fáze do vysokotlakého čerpadla nebo při gradientové eluci se přiváděné proudy ze dvou nebo více zásobníků mísí podle programu ve směšovači, který je zařazen před nebo za vysokotlakým čerpadlem. Dále je mobilní fáze vedena přes zařízení pro dávkování vzorku do chromatografické kolony, která je přímo spojena s detektorem, za ním může být na výstupu zařazen ještě sběrač jednotlivých frakcí. Z detektoru může být signál veden s počítači s příbuzným softwarem pro zpracování dat [17, 20].

Tato metoda byla úspěšně aplikována pro stanovení množství z vitamínů B₁, B₆ a B₁₂ ve farmaceutických preparátech a dietních suplementech [21].



Obr. 7. Metoda HPLC

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 METODIKA

4.1 Materiál - vzorky

- Standard vit. B₁ (Supelco, USA)
- Standard vit. B₂ (Supelco, USA)
- Standard nikotinamid (Supelco, USA)
- Standard vit. B₅ (Supelco, USA)
- Standard vit. B₆ (Supelco, USA) - byl stanoven jako pyridoxinová triáda

4.2 Použité přístroje a pomůcky

- aparatura pro HPLC (Hewlett Packard 1100)
 - vakuovaný odplyňovací modul G1322A
 - binární pumpy G1312A
 - termostat kolon G1316A
 - detektor UV/VIS DAD G1315A
 - dávkovací ventil analytický smyčkový (dávkovací smyčka 20 µl)
 - kolona SUPELCOSIL - LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm, Supelco, USA)
 - PC s vyhodnovacím programem ChemStation - Instrument 1 (Agilent, USA)
- dávkovací mikro stříkačka (Hamilton, USA)
- nylonový mikrofiltr o velikosti pórů 0,45 µm (Supelco, USA)
- pH metr (HANNA instrument, pH 211 Microprocessor pH metr)
- míchadlo (Heidolph instrument) a míchadélko
- ultrazvuková lázeň (Notus - Powersonic s.r.o, Vrable)
- předvážky (Kern, SRN)
- analytické váhy (Adam - Afa - 210LC)
- laboratorní sklo
- třecí miska s tloučkem
- stojan, filtrační kruh, nálevka + modrý filtrační papír pro kvantitativní analýzu KA1 (Papírna Pernštejn s.r.o)

- pipetovací balónek a pipeta
- chladnička (Samsung - Calex, CZ)
- alobal

4.3 Použité chemikálie

- metanol HPLC (Lach-ner s.r.o)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Ing. Petr Švec, Penta)
- hydroxid sodný a draselný (Ing. Petr Švec, Penta)
- isopropanol (Ing. Petr Švec, Penta)
- redestilovaná voda

4.4 Analyzované vzorky

4.4.1 B-komplex Zentiva



Obr. 8. B-komplex Zentiva

Je to doplněk stravy, který není určen pro děti do 3 let. Tento výrobek obsahuje 30 dražé. Doporučené dávkování je 1 tableta denně a důležité je nepřekračovat toto dávkování. Doporučuje se ukládat mimo dosah dětí a nepoužívat jako náhradu pestré stravy. Výrobce doporučuje uchovávat v suchu při teplotě 10 - 25 °C v dobře uzavřeném obalu, chránit před vlhkem a přímým slunečním světlem. Hmotnost jednoho dražé je 2,8 g.

Složení: sacharosa, nikotinamid, laktosa, kukuřičný škrob, talek (protispěková látka), D-pantotenan vápenatý, oxid titaničitý (barvivo), riboflavin, thiaminhydrochlorid, želatina, pyridoxin hydrochlorid, stearan vápenatý (protispěková látka), karboxymethylcelulosa (stabilizátor), karnaubský vosk (leštící látka), chinolinová žluť, žluť SY, azorubin, Ponceau 42, čern BN (barviva).

Tento unikátní komplex vitamínů skupiny B ZENTIVA a.s., v ČR používají dospělí i děti pro prevenci a léčeni stavů spojených s nedostatkem vitamínů skupiny B v organizmu. Zvýšená potřeba vitamínů skupiny B je při dlouhotrvajících hořčnatých stavech a infekcích, při zvýšené funkci štítné žlázy, po chirurgickém odstranění části žaludku, při vlekých onemocněních zažívacího ústrojí, při poruše vstřebávání ze střev, u alkoholiků, při chronických zánětech jater, při žloutence vzniklé bloádou odtoku žluči do střeva, při dlouhodobém duševním stresu, při prudkém váhovém úbytku u pacientů s jednostrannou výživou, při některých kožních a nervových onemocněních, dále při užívání některých léků. B-komplex Zentiva mohou užívat těhotné a kojící ženy nesmí se užívat při známé přecitlivělosti na některou složku.

4.4.2 B-komplex s vitamínem C



*Obr. 9. B-komplex
+ vitamin C*

Balení obsahuje 30 tablet. Hmotnost tohoto balení je 9,9 g.

Dávkování je doporučeno v množství 1 tableta denně. Upozornění: nepřekračovat doporučené dávky. Přípravek není určen jako náhrada pestré stravy. Není vhodný pro děti do 3 let. Nadměrná konzumace může vyvolat projímavé účinky. Skladovat v suchu a temnu při teplotě do 25 °C. Ukládat mimo dosah dětí. Tento doplněk stravy vyrábí firma WALMARK, a.s. v ČR.

Složení: náhradní sladidla (sorbitol, mannitol, acesulfam), mikrokrystalická celulóza, kyselina askorbová, nikotinamid, pantotenát vápenatý, kyselina jablečná, stearát hořčnatý, pyridoxinhydrochlorid, thiaminhydrochlorid, riboflavin, látka protispěková (oxid křemičitý), přírodní identická aroma (jahoda, malina).

Tyto vitamíny jsou potřebné zejména pro nervový systém a pro fungování základních funkcí lidského organismu. Jejich užívání zlepší psychický stav, zmírní nevolnost, pomůže udržet zdravou pokožku, nehty a vlasy, přispěje k lepšímu vidění a zmírní se únava očí i bolest hlavy, urychlí hojení ran, posílí imunitní systém a rovněž pomůže při nadměrné únavě.

4.4.3 Energit MULTI s příchutí pomeranče



*Obr. 10. Energit MULTI
s příchutí pomeranče*

Tyto vitamínové tablety jsou určeny pro všechny generace. Jsou bez cukru a obsahují 10 nejdůležitějších vitamínů pro posílení organismu. Jelikož je tento výrobek bez přidaného cukru, je vhodný pro diabetiky. Obsahuje fenylalanin, takže je nevhodný pro osoby nemocné fenylketurií. Tento výživový doplněk obsahuje 50 tablet, o hmotnosti 50 g. Tento vitamínový preparát vyrábí firma VITAR, s.r.o., v ČR. Maximální denní dávka pro děti od 3 let jsou 3 tablety a dospělí 6 tablet.

Složení: 19,8 mg vit. C, 0,05 mg biotin, 3,3 mg vit. E, 0,462 mg B₁, 0,528 mg B₂, 0,66 mg B₆, 0,33 µg B₁₂, 5,94 mg nikotinamid, 1,98 mg B₅, 66 µg kyselina listová, sladidlo - sorbitol, vitamínový premix, kyseliny, zásady, soli a estery - kyselina citrónová, stearan hořečnatý, barvivo β-karoten, sladidlo aspartam, přírodně identické aroma pomeranče.

5 ANALÝZA DOPLŇKŮ STRAVY POMOCÍ HPLC

5.1 Příprava vzorků

Po zvážení na analytických váhách s přesností na 0,0001 g se tableta rozdrtí v třecí misce, která se důkladně opláchne, vzorek se převede kvantitativně do 25 ml odměrné baňky, a doplní se mobilní fází po rysku. Po té se vloží do ultrazvukové vany na 5 min., z důvodu rozbití malých shluků látek, které slouží jako plnivo tablet či spékací látka. Takto připravený vzorek se zfiltruje pomocí filtrační aparatury přes filtr o velikosti 0,22 μm . Před dávkováním do HPLC je tento roztok opět přefiltrován přes mikrofiltr nylon o velikosti pórů 45 μm . Před analýzou je nutno vyzkoušet vzorek, z důvodu srážlivosti s mobilní fází, aby nedošlo k poškození kolony. Veškeré operace prováděné se vzorkem se musejí dělat za nepřítomnosti světla, z důvodu fotolability některých vitamínů skupiny B.

5.2 Stanovení obsahu vit. B₁, B₃, B₅ a B₆ ve vzorcích B-komplex, B-komplex s vit. C a energit MULTI metodou HPLC

Z filtrátu připraveného postupem uvedeným v kapitole 5.1 bylo na stanovení použito pouze 20 μl vzorku, což je objem dávkovací smyčky. Jako mobilní fáze byla použita směs KH_2PO_4 a metanolu v poměru 90:10, kdy dihydrogenfosforečnan draselný měl koncentraci 0,1 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a pH 7,00, které bylo upraveno hydroxidem sodným nebo draselným. Průtok mobilní fáze byl 0,8 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Stacionární fází pro separaci jednotlivých složek vzorku byla reverzní fáze C8 a kolona SUPELCOSIL LC 8 (150 x 4,6 mm; 5 μm). Teplota termostatu kolony při měření byla 25 °C. Pro analýzu vitamínů skupiny B se nejčastěji pracuje s max. teplotou 30 °C, teploty nad 30 °C nejsou doporučovány. Na stanovení množství vitamínů B byl použit UV/VIS detektor a měření proběhlo při vlnové délce 204 nm pro vitamín B₃, B₅, B₆ a při vlnové délce 220 nm u vitamínu B₁. Retenční čas pro vitamín B₁ se pohybuje okolo 13,24 min., pro vitamín B₃ asi 4,6 min., pro vitamín B₅ 3 min. a pro vitamín B₆ je 3,7 minuty. Analýza (STOPtime) probíhala 20 min. a prodleva (POSTtime) byla 5 min. Na vyhodnocení byl použit chromatografický software ChemStation-Instrument I. (Agilent Technologies, USA), pomocí které byly získány plochy píků ($\text{mA}\cdot\text{V}\cdot\text{S}^{-1}$).

5.3 Měření kalibrační křivky pro stanovení vitamínů B metodou HPLC

Pro měření kalibrační křivky byly použity standardy (SUPELCO USA), které jsou uvedené v kapitole 4.1. Byl připraven zásobní roztok, z kterého byly připraveny různé koncentrace. U standardu vitamínů B₅ a B₁ byla použita koncentrace 4; 6; 8; 10 a 12 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a u vitamínů B₆ a B₃ byla 2; 4; 6; 8 a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Kromě vitamínu B₁, který měl dobu analýzy 15 min. probíhala doba analýzy (STOPTIME) 10 min. Měření proběhlo za stejných chromatografických podmínek jako je uvedeno v kapitole 5.2. Kalibrační křivka byla sestavena jako závislost naměřené plochy píků ($\text{mA}\cdot\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$) na jejich koncentraci ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Výsledky měření vzorků doplňků stravy metodou HPLC

U vzorků z B-komplexu byla vážena hmotnost 15-ti tablet, z nichž byla zjištěna průměrná hmotnost jedné tablety. Taktéž byla provedena navážka u B-komplexu s vitamínem C a energitu MULTI, ale s 20-ti tabletami. Tyto navážky jsou uvedeny v *Tab. 6*. Průměrná hmotnost vzorku tablety B-komplexu byla 0,1041 g, B-komplexu s vit. C 0,3327 g a energit MULTI 1,0000 g. Z těchto tablet byl připraven vzorek postupem uvedeným podle kapitoly 5.1. Měření bylo provedeno vždy z 5-ti tablet a každý vzorek byl 3x proměřen.

Tab. 6. Navážka jednotlivých tablet

	B-komplex (g)	B-komplex s vit.C (g)	Energit MULTI (g)
1.	0,1071	0,3282	0,9972
2.	0,1037	0,3318	0,9879
3.	0,1052	0,3313	0,9938
4.	0,0955	0,3333	0,9936
5.	0,1011	0,3325	1,0030
6.	0,1050	0,3320	0,9942
7.	0,0978	0,3329	0,9990
8.	0,1088	0,3319	1,0114
9.	0,1087	0,3330	1,0049
10.	0,1053	0,3330	1,0004
11.	0,1039	0,3320	1,0164
12.	0,1007	0,3330	0,9913
13.	0,1001	0,3340	0,9897
14.	0,1049	0,3326	1,0092
15.	0,1122	0,3321	0,9988
16.	-	0,3339	0,9982
17.	-	0,3356	1,0108
18.	-	0,3305	1,0010
19.	-	0,3350	0,9916
20.	-	0,3348	1,0080
Ø	0,1041	0,3327	1,0000

Výsledky naměřených ploch píků jsou uvedeny v *Tab. 8* a z nich vypočítané výsledky jsou uvedeny v *Tab. 9*, tyto výsledky jsou uvedeny s příslušnými směrodatnými odchylkami. Výsledky měření vzorku B-komplexu s vit. C jsou uvedeny v *Tab. 10 - 12*. Výsledky měření vzorku tablet preparátu energit MULTI jsou uvedeny v *Tab. 13 - 15*.

U analyzovaného vzorku B-komplexu bylo naměřeno větší množství vit. B₁ než je uvedeno na obalu. Rozdíl mezi množství, které bylo naměřeno od množství, které uvádí výrobce se pohybuje kolem 0,6 mg na 1 tabletu. Taktéž u vit. B₅ bylo zaznamenáno vyšší množství než je tvrzeno na obalu a jeho odchylka se pohybuje okolo 0,4 mg na 1 analyzovanou tabletu. Zatímco u vit. B₆ bylo naměřeno menší množství, na rozdíl od množství které výrobce uvádí. Tento rozdíl se pohybuje asi kolem 0,4 mg na 1 tabletu. Jelikož výrobce uvádí pouze množství niacinu nebylo možno porovnat množství nikotinamidu, který bylo analyzováno metodou HPLC, ale bylo zjištěno, že vit. B₃, který se vyskytoval v tomto vzorku obsahoval 1,8 mg na 1 dražé.

U měřeného vzorku B-komplexu s vit.C bylo zjištěno, že vit. B₃ a vit. B₅ se vyskytuje ve větším množství, zatímco u vit. B₁ bylo toto množství nedostatečné. U vit. B₁ postrádáme 0,5 mg na 1 dražé. Zatímco u vit. B₃ nám přebývá 0,7 mg a u vit. B₅ 0,3 mg na 1 měřenou tabletu. Vit. B₆ nebylo možno stanovit z důvodu rušení další aktivní složky ve vzorku.

U třetího analyzovaného vzorku energit MULTI byla naměřena nadměrná odchylka u nikotinamidu a to 2,3 mg na 1 tabletu, zatímco u vit. B₁, B₅ a B₆ byla tato odchylka minimální pouze 0,01 mg. V tomto výživovém doplňku bylo zjištěné množství vit.B v porovnání s množství uváděné výrobcem nejstabilnější a dostatečné, tedy až na nikotinamid.

Tab. 7. Retenční časy vitamínů B v B-komplexu

	B ₁	B ₃	B ₅	B ₆
Retenční čas (min)	13,0	4,5	3,0	3,7

Tab. 8. Výsledky stanovení vit. B ve vzorcích B-komplexu metodou HPLC

	B ₁ (mA.V.s ⁻¹)	B ₃ (mA.V.s ⁻¹)	B ₅ (mA.V.s ⁻¹)	B ₆ (mA.V.s ⁻¹)
Tableta 1	2552	45888	1716	1432
	2551	45695	1741	1413
	2531	45619	1793	1397
Tableta 2	2595	45445	1846	1442
	2628	45382	1834	1404
	2616	45848	1859	1364
Tableta 3	2656	44712	2116	1371
	2693	44753	2169	1303
	2628	44864	2138	1297
Tableta 4	2621	43975	1547	1133
	2605	43571	1478	1095
	2611	43282	1453	1073
Tableta 5	2674	44375	2259	1159
	2673	44524	2219	1146
	2640	44171	2255	1125

Tab. 9. Naměřené plochy píků a množství vitamínů v B-komplexu

B ₁ plocha píku	B ₁ mg.tabl. ⁻¹	B ₃ plocha píku	B ₃ mg.tabl. ⁻¹	B ₅ plocha píku	B ₅ mg.tabl. ⁻¹	B ₆ plocha píku	B ₆ mg.tabl. ⁻¹
2545	2,51	45734	18,20	1750	3,10	1414	0,67
2613	2,58	45558	18,13	1846	3,27	1403	0,66
2628	2,59	44776	17,82	2141	3,80	1324	0,63
2612	2,58	43609	17,36	1493	2,64	1100	0,52
2663	2,63	44357	17,65	2244	3,98	1143	0,54
mg.tabl. ⁻¹ ± S.D.	2,58 ± 0,039		17,83 ± 0,310		3,36 ± 0,484		0,60 ± 0,062

tabl. = tableta

S. D. = směrodatná odchylka

Tab. 10. Retenční časy u vitamínu B v B-komplexu s vit.C

	B ₁	B ₃	B ₅	B ₆
Retenční čas (min)	12,55	4,5	3,0	3,7

Tab. 11. Kalibrace B-komplexu s vit.C metodou HPLC

	Vit. B ₁ (mA.V.s ⁻¹)	Vit. B ₃ (mA.V.s ⁻¹)	Vit. B ₅ (mA.V.s ⁻¹)
Tableta 1	1525	21573	2685
	1553	22700	2848
	1538	21850	2894
Tableta 2	1404	18177	2441
	1109	18418	2409
	1132	18401	2613
Tableta 3	1195	18966	2672
	1175	22094	2970
	1175	22090	3035
Tableta 4	1174	21653	2914
	1099	21478	2892
	1164	21685	2871
Tableta 5	1301	20596	2691
	1348	20678	2687
	1376	20701	2662

Tab. 12. Naměřené plochy píků a množství vitamínů v B-komplexu s vit. C

B_1 plocha píku	B_1 mg.tabl. ⁻¹	B_3 plocha píku	B_3 mg.tabl. ⁻¹	B_5 plocha píku	B_5 mg.tabl. ⁻¹
1538	1,51	22041	8,77	2809	5,00
1215	1,20	18332	7,29	2488	4,42
1182	1,17	21050	8,38	2892	5,14
1146	1,13	21605	8,60	2892	5,14
1342	1,32	20658	8,22	2680	4,76
mg.tabl. ⁻¹ ± S.D.	1,27 ± 0,137		8,25 ± 0,516		4,89 ± 0,274

Tab. 13. Retenční časy vitamínu B v energitu MULTI

	B_1	B_3	B_5	B_6
Retenční čas (min)	14,15	4,5	3,0	3,7

Tab. 14. Kalibrace energitu MULTI metodou HPLC

	Vit. B_1 (mA.V.s ⁻¹)	Vit. B_3 (mA.V.s ⁻¹)	Vit. B_5 (mA.V.s ⁻¹)	Vit. B_6 (mA.V.s ⁻¹)
Tableta 1	454	10080	2204	1489
	456	10072	1167	1358
	392	9005	1141	1242
Tableta 2	4612	8954	1047	1205
	458	8916	1086	1287
	421	8961	1080	1208
Tableta 3	450	8528	1030	1269
	447	8555	1102	1391
	479	8875	1103	1291
Tableta 4	436	8974	1097	1251
	391	8984	1092	1178
	426	8408	1055	1271
Tableta 5	381	8559	1005	1262
	471	8648	1011	1255
	435	8753	1018	1271

Tab. 15. Naměřené plochy píků a množství vitamínů v energitu MULTI

B_1 plocha píku	B_1 mg.tabl. ⁻¹	B_3 plocha píku	B_3 mg.tabl. ⁻¹	B_5 plocha píku	B_5 mg.tabl. ⁻¹	B_6 plocha píku	B_6 mg.tabl. ⁻¹
434	0,43	9719	3,87	1504	2,66	1363	0,65
447	0,44	8944	3,56	1071	1,89	1233	0,58
459	0,45	8653	3,44	1078	1,90	1317	0,62
418	0,41	8789	3,50	1081	1,91	1233	0,58
429	0,42	8654	3,44	1011	1,79	1263	0,60
mg.tabl. ⁻¹ ± S.D.	0,43 ± 0,014		3,56 ± 0,160		2,03 ± 0,318		0,61 ± 0,026

Výsledky množství jednotlivých vitamínů v příslušných doplňcích stravy jsou shrnuty v Tab. 16.

Tab. 16. Množství vitamínů v 1 tabletě v daném doplňku stravy

	B-komplex	B-komplex + vit.C	energiti MULTI
Vit. B ₁	2,58 ± 0,039	1,27 ± 0,137	0,43 ± 0,014
Vit. B ₃	17,83 ± 0,310	8,25 ± 0,516	3,56 ± 0,160
Vit. B ₅	3,36 ± 0,484	4,89 ± 0,274	2,03 ± 0,318
Vit. B ₆	0,60 ± 0,062	-	0,61 ± 0,026

V analyzovaných vzorcích B-komplexu, B-komplexu s vit. C a energitu MULTI byly naměřeny rozdíly v množství, které uvádí výrobce na obalu.

V prvním měřeném vzorku „B-komplexu“ se rozdíl pohyboval kolem +0,6 mg na 1 tabletu. Taktéž u vit. B₅ bylo naměřena odchylka okolo +0,4 mg na 1 tabletu. Zatímco u vit. B₆ bylo naměřeno menší množství asi kolem -0,4 mg na 1 tabletu. Jelikož výrobce uvádí pouze množství niacinu nebylo možno porovnat množství nikotinamidu, který byl analyzován metodou HPLC.

V druhém analyzovaném vzorku „B-komplexu s vit. C“ bylo zjištěno, že u vit. B₁ postrádáme -0,5 mg na 1 dražé. Zatímco u vit. B₃ přebývá +0,7 mg a u vit. B₅ +0,3 mg na 1 měřenou tabletu. Vit. B₆ nebylo možno stanovit z důvodu rušení další aktivní složky ve vzorku.

U třetího zkoumaného vzorku „energít MULTI“ byla naměřena nadměrná množství u nikotinamidu a to 2,3 mg na 1 tabletu, zatímco u vit. B₁, B₅ a B₆ byla tato odchylka minimální pouze 0,01 mg.

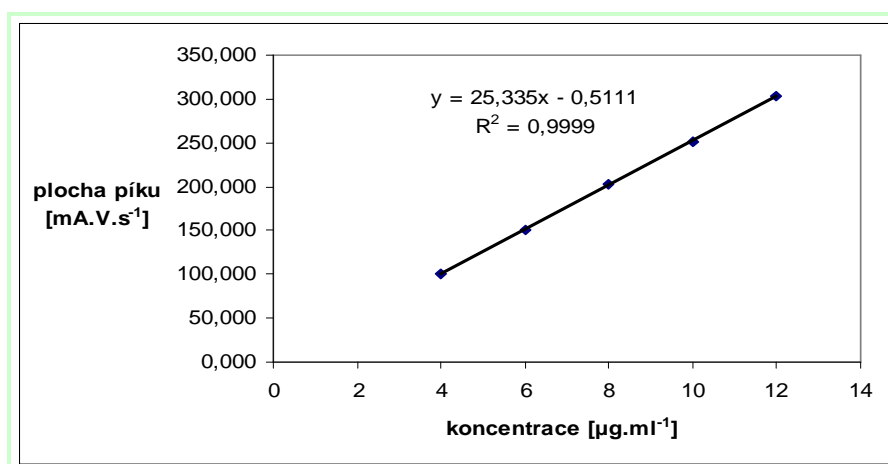
6.2 Výsledky měření kalibračních křivek pro stanovení vit. B metodou HPLC

V daných koncentracích příslušné kalibrační řady byly změřeny velikosti plochy píků podle postupu v kapitole 5.3. Jednotlivé kalibrační křivky pro příslušné vitamíny skupiny B byly sestrojeny jako závislost ploch píků (mA.V.s^{-1}) na jejich koncentracích ($\mu\text{g.ml}^{-1}$). Výsledky měření jsou uvedeny v *Tab. 17 - 20* a grafu kalibrační křivky - *Graf 1 - 4*. Tyto kalibrační křivky byly měřeny při různých vlnových délkách, a to při 204, 220, 234, 254 a 270 nm. Nejvhodněji pro měření se projeví vlnové délky 204 a 220 nm. Stanovení bylo provedeno v různých koncentracích pro vitamíny. U vitamínu B₁ byla použita koncentrace 4; 6; 8; 10 a 12 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ při vlnové délce 220 nm. Taktéž to bylo provedeno u vitamínu B₅, ale při vlnové délce 220 nm. U vitamínů B₃ a B₆ byla použita koncentrace 2; 4; 6; 8 a 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ při vlnové délce 220 nm. Vzorky byly připraveny podle postupu v kapitole 5.3 a každý byl 4x přeměřen. Získaná plocha píků byla dosazena do rovnice regresní přímky kalibrační křivky, čímž bylo zjištěno množství těchto vitamínů v analyzovaných vzorcích $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

Navíc tahle jednoduchá a rychlá metoda v isokratických podmínkách bez potřeby fotochemické přeměny byla navrhována pro analýzu vitamínu B₆ a vitamínu B₂ v lécích. Pro každou analýzu směsi byla nalezena dostatečná linearita, preciznost, náhrada, selektivnost - možnost výběru, citlivost [22].

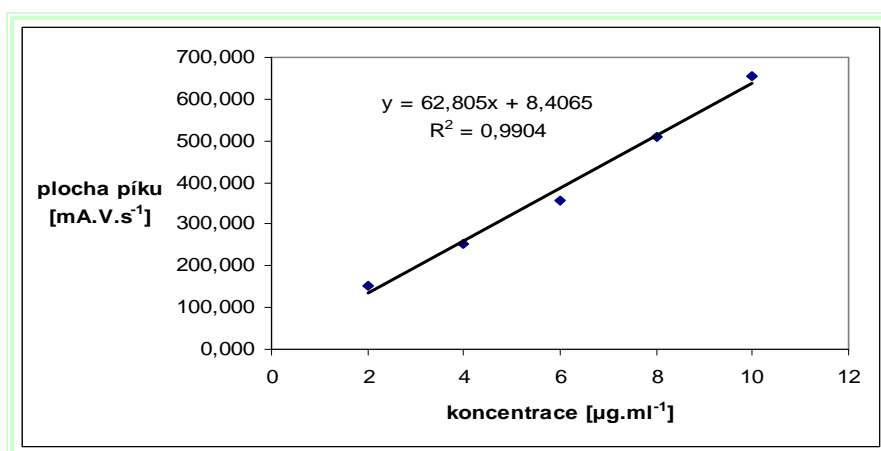
Tab. 17. Kalibrace vit. B₁ metodou HPLC

Koncentrace vit. B ₁ ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Plocha píků ($\text{mA}\cdot\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$)	Průměrná plocha píků ($\text{mA}\cdot\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$)
4	101,237	100,714
	101,289	
	99,921	
	100,407	
6	151,950	151,175
	148,761	
	153,177	
	150,810	
8	204,486	203,463
	203,729	
	202,739	
	202,896	
10	251,928	251,693
	250,515	
	254,402	
	249,927	
12	300,329	303,805
	303,657	
	303,667	
	307,568	

Graf 1. Kalibrační křivka s regresní přímkou pro vit. B₁ při měření HPLC

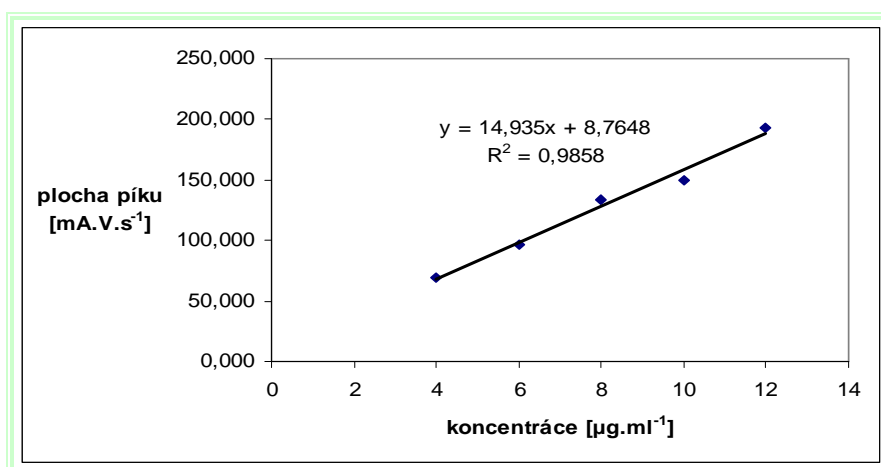
Tab. 18. Kalibrace vit. B₃ metodou HPLC

Koncentrace vit. B ₁ ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Plocha píků ($\text{mA}\cdot\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$)	Průměrná plocha píků ($\text{mA}\cdot\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$)
2	152,191	152,834
	152,008	
	153,743	
	153,393	
4	252,777	254,534
	253,992	
	255,817	
	255,549	
6	355,511	356,318
	357,723	
	359,140	
	352,896	
8	506,150	508,702
	509,767	
	509,693	
	509,197	
10	650,614	653,802
	652,155	
	656,617	
	655,821	

Graf 2. Kalibrační křivka s regresní přímkou pro vit. B₃ při měření HPLC

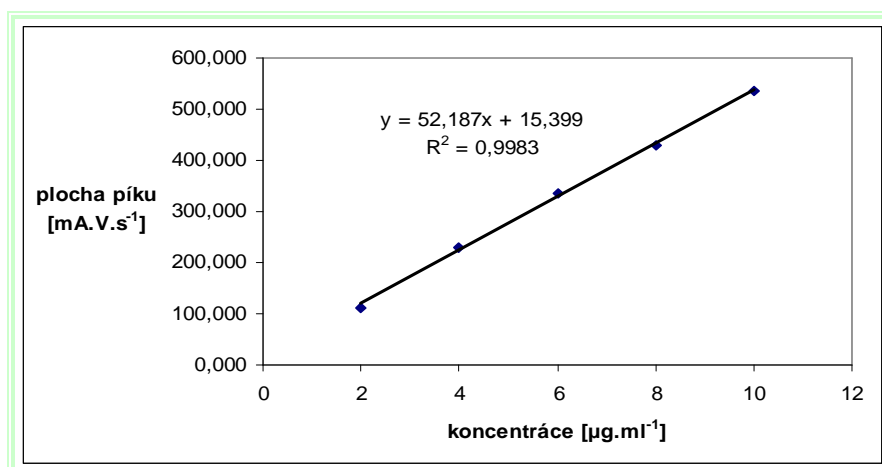
Tab. 19. Kalibrace vit. B₅ metodou HPLC

Koncentrace vit. B ₁ ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Plocha píků ($\text{mA}\cdot\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$)	Průměrná plocha píků ($\text{mA}\cdot\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$)
4	70,657	69,496
	68,830	
	69,567	
	68,932	
6	97,657	96,689
	96,015	
	94,407	
	98,676	
8	135,351	133,231
	136,599	
	131,134	
	129,839	
10	149,091	149,236
	143,979	
	150,206	
	153,666	
12	192,153	192,573
	192,124	
	193,028	
	192,987	

Graf 3. Kalibrační křivka s regresní přímkou pro vit. B₅ při měření HPLC

Tab. 20. Kalibrace vit. B₆ metodou HPLC

Koncentrace vit. B ₁ ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Plocha píků ($\text{mA}\cdot\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$)	Průměrná plocha píků ($\text{mA}\cdot\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$)
2	112,054	111,987
	112,410	
	111,752	
	111,733	
4	231,312	230,159
	228,318	
	232,250	
	228,755	
6	338,860	336,672
	337,362	
	333,051	
	337,416	
8	430,884	429,714
	432,478	
	425,026	
	430,469	
10	533,360	534,083
	529,845	
	537,941	
	535,186	

Graf 4. Kalibrační křivka s regresní přímkou pro vit. B₆ při měření HPLC

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo ověřit, zda množství vitamínů B, které uvádí výrobce na obalu se je pravdivé. Toto množství bylo zjišťováno pomocí Vysokoučinné kapalinové chromatografické metody s UV - detekcí.

Separace byla provedená na koloně SUPELCOSIL LC 8 (150 x 4,6 mm; 5 μ m). Byla použita mobilní fáze při složení dihydrogenfosforečnan draselný o koncentraci 0,1 mol.dm⁻³ a metanolu v poměru 90:10, která byla upravována na pH 7 pomocí hydroxidu draselného nebo sodného. Průtok mobilní fáze byl 0,8 ml.min⁻¹ a teplota termostatu kolony byla 25 °C. Signál byl snímán UV/VIS detektorem o různých vlnových délkách. Měření probíhalo při vlnové délce 204 nm pro vitamín B₃, B₅, B₆ a při vlnové délce 220 nm u vitamínu B₁. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí chromatografického softwaru ChemStation-Instrumen 1. Na měření kalibračních křivek byly použity standardy B₁ - **thiaminchlorid**, nikotinamid, B₅ a B₆. Jednotlivé výsledky analýz byly poté zpracovány podle statistických parametrů s pomocí směrodatných odchylek.

Byly testovány 3 vzorky od různých firem. První analyzovaný vzorek byl B-komplex, Zentiva s.r.o. Tento vitamínový doplněk prokázal množství, které tvrdí výrobce na obalu, ale s odchylkou cca 0,5 mg na 1 zkoumanou tabletu. Pouze u vit. B₆ bylo stanoveno nedostatečné množství. Druhý vzorek byl B-komplex+vit.C od firmy WALMARK s.r.o. Tento vzorek se neprojevil jako ztrátový z pohledu množství vit. B, až na množství vit. B₁, kterého bylo o 0,5 mg méně. V tomto doplňku stravy nebylo možno stanovit vit. B₆ z důvodu rušení dalších složek doplňku stravy. Jako třetí vzorek byl použit energit MULTI s příchutí pomeranče z firmy VITAR s.r.o. Tyto vitamínové tablety jsou určeny pro všechny generace, jak pro diabetiky, tak pro osoby nemocné s fenylketouríí. Tyto tablety s umělým sladidlem odpovídají nejpřesněji s množstvím vitamínů, které uvádí výrobce. Jediná odchylka, která se zjistila byla u nikotinamidu, ta se pohybovala okolo 2 mg na 1 tabletu.

Množství vitamínů B v analyzovaných doplňcích stravy se jak shodovalo tak lišilo s hodnotou uvedenou na příbalovém letáku od výrobce. Důvodem jejich klesání a vzrůstání bylo pravděpodobné působení světla, na nichž jsou vitamíny B citlivé, také mohlo dojít k nevhodné manipulaci a skladování.

Stabilita vitamínů skupiny B je jistě také ovlivněna složením dané tablety, spékacími a plnicími látkami, které mohou mít vliv např. na homogenní přípravu vzorku směsi před tabletováním.

Ačkoli jsou vit. B obsaženy v živočišných i rostlinných produktech, a tudíž by jejich nedostatek při dodržování vyvážené stravy neměl vůbec vzniknout, existuje řada stavů a situací, kdy může být dostatečný přísun vitamínů B z potravy nedostatečný či je potřebné zvýšit jejich dávky. Vitamíny skupiny B se pomocí svých funkcí doplňují, proto je vhodné je užívat jako celý B-komplex. Přebytečné množství vitamínů B se vylučuje močí.

Na druhé straně při užívání vitamínových preparátů by nikdo neměl věřit, že čím větší množství, tím lépe. Naše tělo je nanejvýš komplexní útvar, kde navzájem spolupůsobí nej-různější podstaty. Záleží při tom především na harmonickém a poměrném množství látek. Ráda bych proto na tomto místě varovala před módou rozšířenou v USA, která zapříčiňuje nadměrné užívání vitamínovými preparáty [23].

Pokud sáhneme k vitamínovým preparátům, držme se prosím doporučeného dávkování výrobce či příslušné instituce. Optimální jsou ty produkty, které se svým složením blíží nejvíce našim potravinám.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HLÚBIK, P., OPLTOVÁ, L. *Vitamíny*. 1.vyd. Praha: 2004. 232 s.
ISBN 80-247- 0373-4
- [2] MINDELL, E. *Vitamínová bible*. České vyd. Budapest: 1994.
- [3] PANEK, J., POKORNÝ, J., DOSTÁLOVÁ, J., KOHOUT, P. *Základy výživy*.
1.vyd. Praha: 2002. 207 s. ISBN 978-80-86320-23-6
- [4] ŠÍCHO, V., VODRÁŽKA, Z., KRÁLOVÁ B. *Potravinářská biochemie*. 1.vyd.
Praha: STNL, 1981. 360s.
- [5] NOVÁK, Václav, BUŇKA František, *Základy ekonomiky výživy*. 1. vyd. Zlín:
UTB, 2005. ISBN 80 – 7318 – 262 - 9
- [6] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., BUDÍNSKÝ, P. *Potravinářská biochemie II*.
1.vyd. Zlín: UTB, 2006. 102 s. ISBN 80-7318-395-1
- [7] HRUBÝ, S., Ztráty vitamínů a minerálních látek při kuchyňské úpravě, *Výživa
potravin*, **125**, 2007, 5, s.140.
- [8] BLATTNÁ, J., Vitamínizace potravin, *Výživa a potraviny*, **21**, 2004, 2, s. 104.
- [9] Vyhláška [online]. Dostupný z www:
<http://www.jidelny.cz/zakony_show_print.asp?id=459>.
- [10] Vyhláška [online]. Dostupný z www:
<<http://www.szpi.gov.cz/ViewFile.aspx?docid=1005977>>.
- [11] ZITTLAU, J. *Vhodná strava = klíč ke zdraví aneb jak se léčit bez lékaře*.
1.vyd. Brno: 2009, ISBN 978-80-251-1839-9
- [12] BLATTNÁ, J., TLÁSKAL, P. Vitamíny X, *Moje zdraví*, **82**, 2008, s. 116.
- [13] VOŘÍŠEK, J. a kol. *Analytická chemie*. 1.vyd. Praha: 1965. 268 s.
- [14] DEAN, J. A. *Chemické dělicí metody*. 1.vyd. Praha: SNTL, 1974. 404 s.
- [15] CHURÁČEK, J., JANDERA, P. *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové
chromatografie*. Praha: SNTL, 1984.
- [16] HPLC [online]. Dostupný z www: <<http://hplc.sweb.cz/>>.
- [17] HPLC [online]. Dostupný z www: < <http://cs.wikipedia.org/wiki/HPLC> >.

- [18] KRATINOVÁ, G. *Možnosti stanovení niacinu a pyridoxinu*.
Bakalářská práce, UTB ve Zlíně, FT: 2007.
- [19] KOŽÁKOVÁ, Z. *Stanovenie riboflavínu v kvasniciach metódou HPLC*.
Bakalářská práce, UTB ve Zlíně, FT: 2007.
- [20] Chromatografie [online]. Dostupný z www:
<<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>>.
- [21] MARSZALL, M. L., LEBIEDZIŃSKA, A., CZARNOWSKI, W., SZEFER, P.
High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and cyanocobalamin in pharmaceutical formulations using coulometric electrochemical and ultraviolet detection, Journal of Chromatography A, Volume 1094, 2005, p.91–98
- [22] GATTI, R., GIOIA, M. G. *Liquid chromatographic determination with fluorescence detection of B6 vitamers and riboflavin in milk and pharmaceuticals*,
Analytica Chimica Acta, Volume 538, 2005, p. 135–141
- [23] UNGEROVÁ-GOBELOVÁ, U. *Vitamíny*.
1.vyd. Praha: 1999, ISBN 80- 7202-508-2

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

TDP	Thiamindifosfát
TTP	Thiamintrifosfát
FMN	Flavinmononukleotid
FAD	Flavinadenindinukleotid
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
CoA neboli CoA-SH	Koenzym A
ACP-SH	Acyl Carrier Protein - speciální protein
HPLC	High Performance Liquid Chromatography - Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LSC	Liquid-Solid Chromatography - adsorpční chromatografie
LLC	Liquid-Liquid Chromatography - rozdělovací chromatografie
GPC	Gelová chromatografie
IEC	Ion-Exchange Chromatography - ionexová chromatografie
TLC	Thin Layer Chromatography - tenkovrstvá chromatografie
DDD	Doporučené denní dávky

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Obecné schéma kapalinového chromatografu</i>	<i>29</i>
<i>Obr. 2. Dávkovací kohouty</i>	<i>30</i>
<i>Obr. 3. Injekční stříkačka Hamilton</i>	<i>30</i>
<i>Obr. 4. Kolona HPLC</i>	<i>31</i>
<i>Obr. 5. UV/VIS DAD detektor [15]</i>	<i>31</i>
<i>Obr. 6. HPLC HP 1100 [19]</i>	<i>32</i>
<i>Obr. 7. Metoda HPLC.....</i>	<i>32</i>
<i>Obr. 8. B-komplex Zentiva.....</i>	<i>35</i>
<i>Obr. 9. B-komplex + vitamín C.....</i>	<i>36</i>
<i>Obr. 10. Energit MULTI s příchutí pomeranče</i>	<i>37</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Zdroje thiaminu</i>	<i>18</i>
<i>Tab. 2. Zdroje riboflavinu.....</i>	<i>20</i>
<i>Tab. 3. Zdroje niacinu.....</i>	<i>21</i>
<i>Tab. 4. Zdroje kyseliny pantotenové</i>	<i>23</i>
<i>Tab. 5. Zdroje pyridoxinu</i>	<i>25</i>
<i>Tab. 6. Navážka jednotlivých tablet.....</i>	<i>40</i>
<i>Tab. 7. Retenční časy vitamínů B v B-komplexu.....</i>	<i>41</i>
<i>Tab. 8. Výsledky stanovení vit. B ve vzorcích B-komplexu metodou HPLC.....</i>	<i>42</i>
<i>Tab. 9. Naměřené plochy píků a množství vitamínů v B-komplexu</i>	<i>42</i>
<i>Tab. 10. Retenční časy u vitamínu B v B-komplexu s vit.C.....</i>	<i>43</i>
<i>Tab. 11. Kalibrace B-komplexu s vit.C metodou HPLC.....</i>	<i>43</i>
<i>Tab. 12. Naměřené plochy píků a množství vitamínů v B-komplexu s vit. C.....</i>	<i>44</i>
<i>Tab. 13. Retenční časy vitamínu B v energitu MULTI.....</i>	<i>44</i>
<i>Tab. 14. Kalibrace energitu MULTI metodou HPLC.....</i>	<i>44</i>
<i>Tab. 15. Naměřené plochy píků a množství vitamínů v energitu MULTI.....</i>	<i>45</i>
<i>Tab. 16. Množství vitamínů v 1 tabletě v daném doplňku stravy.....</i>	<i>45</i>
<i>Tab. 17. Kalibrace vit. B₁ metodou HPLC.....</i>	<i>47</i>
<i>Tab. 18. Kalibrace vit. B₃ metodou HPLC.....</i>	<i>47</i>
<i>Tab. 19. Kalibrace vit. B₅ metodou HPLC.....</i>	<i>49</i>
<i>Tab. 20. Kalibrace vit. B₆ metodou HPLC.....</i>	<i>49</i>

SEZNAM GRAFŮ

<i>Graf 1. Kalibrační křivka s regresní přímkou pro vit.B_1 při měření HPLC</i>	<i>47</i>
<i>Graf 2. Kalibrační křivka s regresní přímkou pro vit.B_3 při měření HPLC</i>	<i>48</i>
<i>Graf 3. Kalibrační křivka s regresní přímkou pro vit.B_5 při měření HPLC</i>	<i>49</i>
<i>Graf 4. Kalibrační křivka s regresní přímkou pro vit.B_6 při měření HPLC</i>	<i>50</i>

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: DOPORUČENÉ DENNÍ DÁVKY VITAMÍNŮ A MINERÁLNÍCH LÁTEK

PŘÍLOHA P II: STRUČNÝ PŘEHLED FUNKCÍ VITAMÍNŮ

PŘÍLOHA P III: STRUČNÝ PŘEHLED ZDROJŮ VITAMÍNŮ

PŘÍLOHA P IV: VITAMÍNOVÉ A MULTIVITAMÍNOVÉ PREPARÁTY

PŘÍLOHA P V: VITAMÍNY A MINERÁLNÍ LÁTKY, KTERÉ LZE POUŽÍT PRO VÝROBU DOPLŇKŮ STRAVY

PŘÍLOHA P VI: CHROMATOGRAMY STANOVENÍ OBSAHU VITAMÍNŮ SKUPINY B VE VZORCÍCH B-KOMPLEXU, B-KOMPLEXU S VIT. C A ENERGITU MULTI METODOU HPLC

PŘÍLOHA P I: DOPORUČENÉ DENNÍ DÁVKY (DDD) VITAMÍNŮ A MINERÁLNÍCH LÁTEK

Minerální látky	Jednotky	Doporučená denní dávka
Vitamín A	μg	800
Vitamín D	μg	5
Vitamín E	mg	10
Vitamín C	mg	60
Vitamín B ₁ (thiamin)	mg	1,4
Vitamín B ₂ (riboflavin)	mg	1,6
Niacin	mg	18
Vitamín B ₆ (pyridoxin)	mg	2
Kyselina listová	μg	200
Vitamín B ₁₂ (kobalamin)	μg	1
Biotin	mg	0,15
Kyselina pantotenová	mg	6
Vápník	mg	800
Hořčík	mg	300
Železo	mg	14
Jód	μg	150
Zinek	mg	15
Fosfor	mg	800

PŘÍLOHA P II: STRUČNÝ PŘEHLED FUNKCÍ VITAMÍNŮ

Vitamín	Funkce
A	pro dobré vidění, pro podporu imunitního systému, udržuje kůži a sliznice v dobrém stavu
Karoteny	provitamín A, antioxidant
D	pro rovnováhu minerálních látek – především vápníku a fosforu, jejich resorpci v organizmu, pro dobré kosti
E	antioxidant, chrání organismus před nežádoucími vlivy při léčení nádorového onemocnění, působí na optimální využití vitamínu A
K	má zásadní význam pro dobrou srážlivost krve a pro kostní metabolismus
C	zvyšuje resorpci železa, je nezbytný pro tvorbu kolagenu, antioxidant, napomáhá k odolnosti proti infekcím
B ₁	pro metabolismus sacharidů, pro normální vývoj a funkci mozku, nervů a srdce
B ₂	pro energetický metabolismus, dobré vidění a zdravou pokožku
B ₃	pro energetický metabolismus
B ₅	pro energetický metabolismus
B ₆	pro energetický metabolismus, pro krevtvorbu, účinný v imunitním systému, pro štěpení homocysteinu
B ₉	pro krevtvorbu, pro optimální funkci nervového systému a kostní dřeně, pro štěpení homocysteinu
B ₁₂	pro krevtvorbu, pro metabolismus sacharidů, tuků a bílkovin, pro štěpení homocysteinu, pro funkci nervové soustavy
Biotin	pro růst a funkci organismu, pro imunitní systém

PŘÍLOHA P III: STRUČNÝ PŘEHLED ZDROJŮ VITAMÍNŮ

Vitamín	Zdroje
A	máslo, tučné výrobky, mléčné výrobky, vejce, játra, rybí tuk
Karoteny	mrkev, rajčata, zelená listová zelenina, vejce, mléko, játra
D	rybí tuk, játra, mořské ryby, malá množství ve vejci, zelenina
E	rostlinné oleje, ořechy, ryby, vejce, zelenina
K	zelená listová zelenina, sója, játra, zelený čaj
C	citrusové ovoce, paprika, černý rybíz, šípky, játra, ledviny
B ₁	játra, maso, kvasnice, obiloviny, ořechy
B ₂	játra, vaječný bílek, mléčné výrobky, maso, obiloviny, kvasnice
B ₃	kvasnice, játra, maso, mléčné výrobky, zelenina, ořechy
B ₅	prakticky ve všech potravinách
B ₆	játra, maso, ryby, zelenina, obilovina, kvasnice
B ₉	játra, zelená listová zelenina, fazole, kvasnice, žloutek, celozrnný chléb
B ₁₂	játra, ryby, vejce, mléčné výrobky, fermentované potraviny, kvasnice
Biotin	játra, sója, ořechy, obiloviny, kvasnice

PŘÍLOHA P IV: VITAMÍNOVÉ A MULTIVITAMÍNOVÉ PREPARÁTY

PREPARÁTY	vit. B ₁	vit. B ₂	niacin	vit. B ₆	vit. B ₅	vit. C	
Doporučená denní dávka mg.den ⁻¹	1,4	1,6	18	2	6	60	Pozn.
MARŤÁNCI	1,05	1,20	3,60	1,05	2,70	45	s vit. B ₁₂ , D a ML
ABC Spektrum	1,5	1,7	20,0	2,0	10,0	60,0	s β karotenem, vit. B ₁₂ , D, K a ML
Multivitamín classic	1,5	1,7	18	1,8	-	75	s vitamíny B ₁₂ a D
Multivitamín šumivý	1,4	2,6	13,4	1,5	9,0	100	s vitamíny B ₁₂ a D
Stresvit	10,0	10,0	100,0	5,0	20,0	500	s vit. B ₁₂ , zinkem a mědí
Centrum	1,5	1,7	20	2	10	60	s vitamíny B ₁₂ , K a D
Aditiva Multivitamín	3,75	7,0	37,5	4,25	25	187,5	s vitamíny B ₁₂
Geriavit Pharmaton	2,0	2,0	15,0	1,0	10,0	60	s vitamíny B ₁₂ , D a ML
Multivitamín Junior	0,6	0,8	-	1,0	-	30	s vitamíny B ₁₂ , D a železem
Multivitamín	1,5	1,7	20,0	1,8	-	75	s vitamíny B ₁₂ a D
Pangamin	9,7	3,2	46	3,4	-	-	s ML

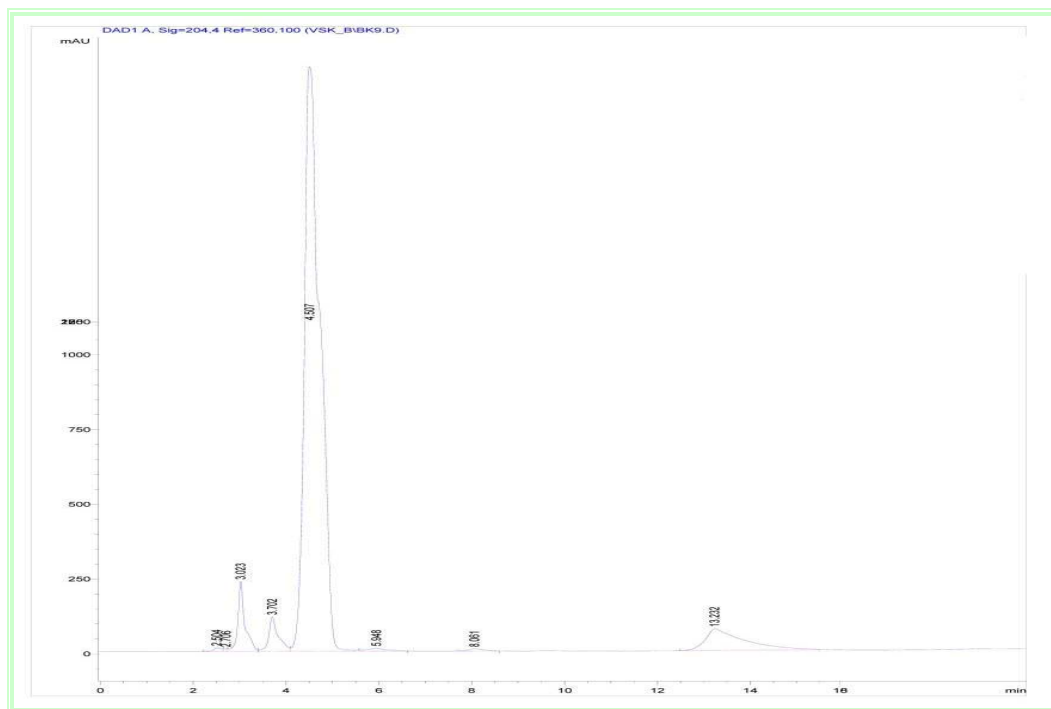
* ML = minerální látky

**PŘÍLOHA P V: VITAMÍNY A MINERÁLNÍ LÁTKY, KTERÉ LZE
POUŽÍT PRO VÝROBU DOPLŇKŮ STRAVY**

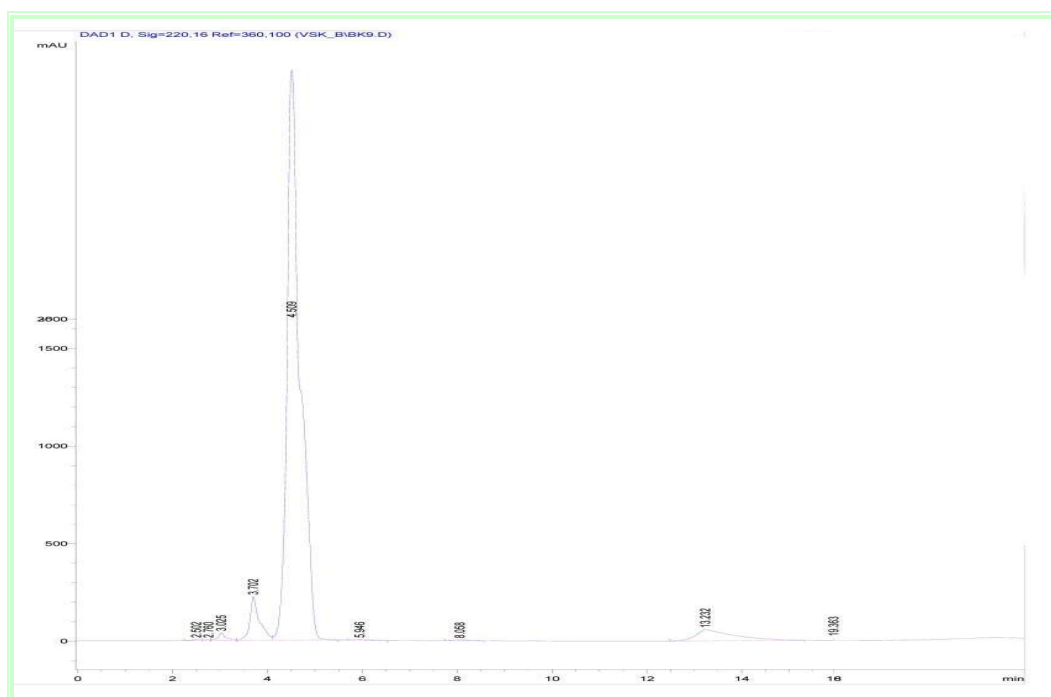
1. Vitamíny	2. Minerální látky
Vitamín A (µg)	Vápník (mg)
Vitamín D (µg)	Hořčík (mg)
Vitamín E (mg)	Železo (mg)
Vitamín K (µg)	Měď (µg)
Vitamín B ₁ (mg)	Jód (µg)
Vitamín B ₂ (mg)	Zinek (mg)
Niacin (mg)	Mangan (mg)
Pantotenová kyselina (mg)	Sodík (mg)
Vitamín B ₆ (mg)	Draslík (mg)
Kyselina listová (µg)	Selen (µg)
Vitamín B ₁₂ (µg)	Chrom (µg)
Biotin (µg)	Molybden (mg)
Vitamín C (mg)	Chlor (mg)
	Fosfor (mg)

PŘÍLOHA P VI: CHROMATOGRAMY STANOVENÍ OBSAHU VITAMÍNŮ SKUPINY B VE VZORCÍCH B-KOMPLEXU, B-KOMPLEXU S VIT. C A ENERGITU MULTIMETODOU HPLC

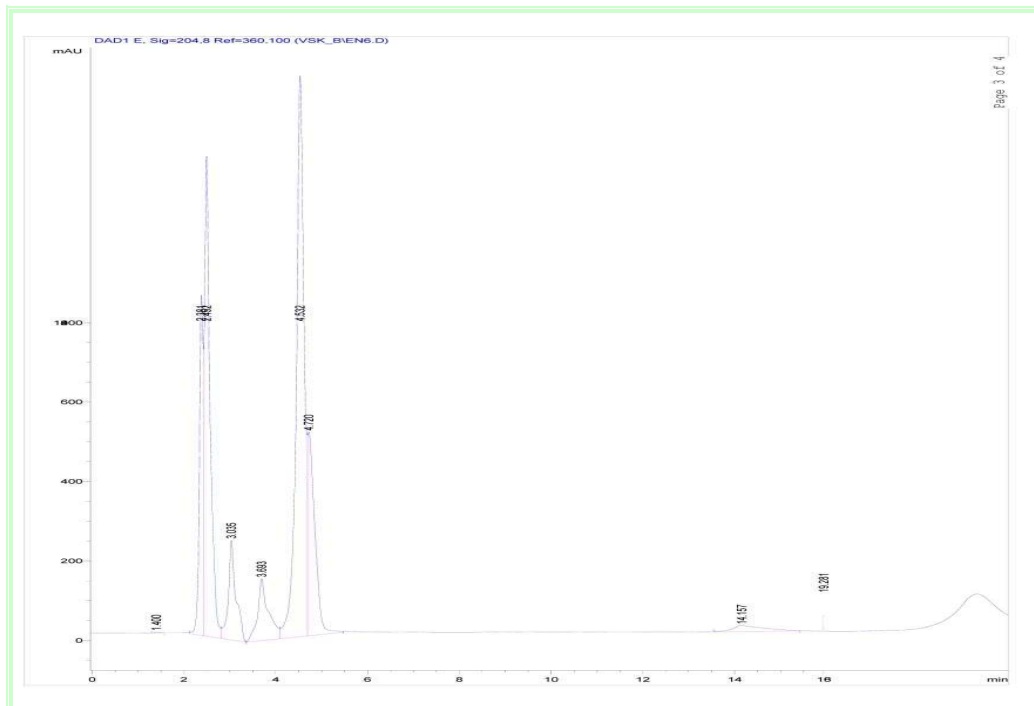
Stanovení B-komplexu metodou HPLC při vlnové délce 204 nm



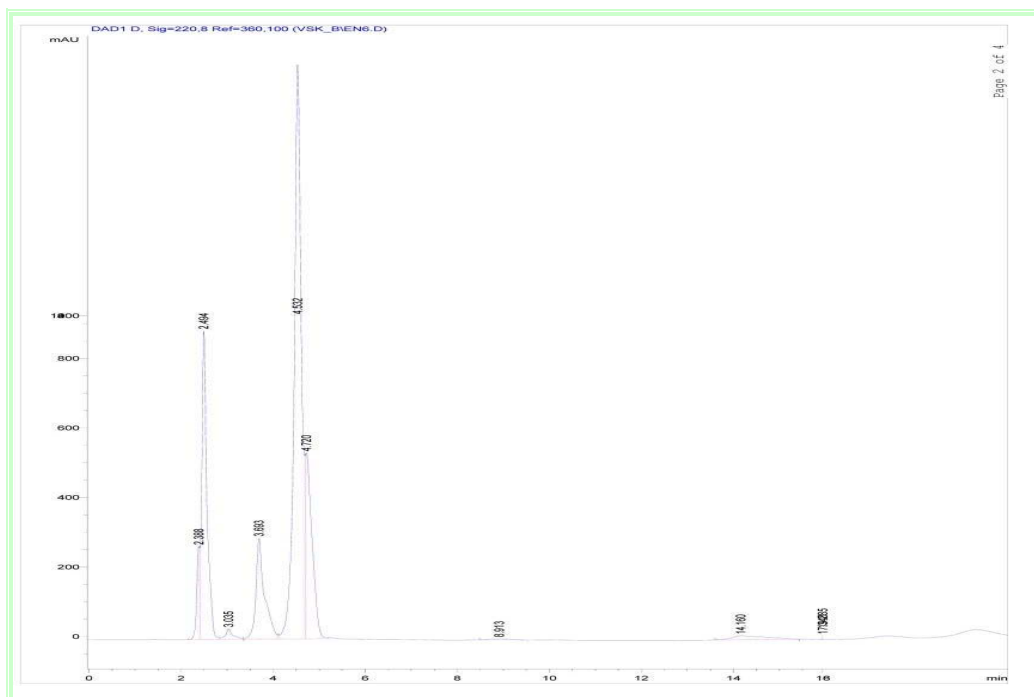
Stanovení B-komplexu metodou HPLC při vlnové délce 220 nm



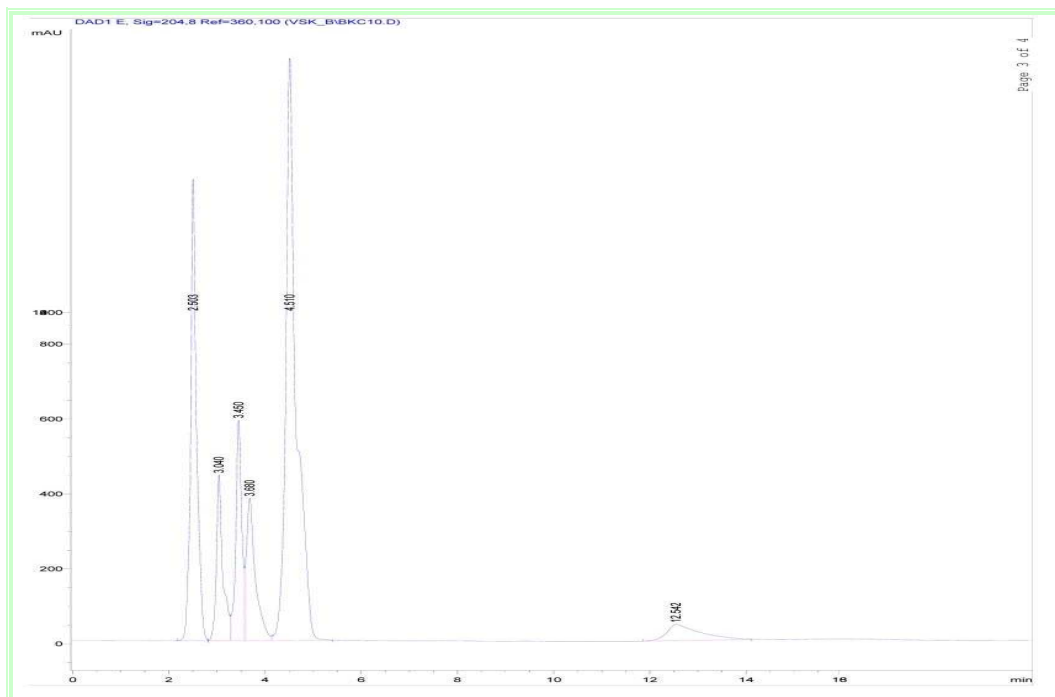
Stanovení B-komplexu s vit. C metodou HPLC při vlnové délce 204 nm



Stanovení B-komplexu s vit. C metodou HPLC při vlnové délce 220 nm



Stanovení energitu MULTI metodou HPLC při vlnové délce 204 nm



Stanovení energitu MULTI metodou HPLC při vlnové délce 220 nm

