

Chromatografické stanovení vitaminů skupiny B v cereáliích

Bc. Eva Mikulková

Diplomová práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav biochemie a analýzy potravin
akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Eva MIKULKOVÁ**
Osobní číslo: **T08811**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Chromatografické stanovení vitamínů skupiny B
v cereáliích**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Teorie vitamínů skupiny B.
2. Vypracovat teorii cereálií.
3. Popsat metodu HPLC.

II. Praktická část

1. Stanovení vitamínů skupiny B v cereáliích metodou HPLC, z technických důvodů pouze kvalitativně, doplnit stanovení hrubé bílkoviny.
2. Vyhodnocení výsledků a závěr.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] HLÚBIK, P., OPLTOVÁ, L. Vitamíny, Praha 2004.

[2] VELÍŠEK, J. Chemie potravin 2, OSSIS, Tábor 1999.

[3] <http://ipi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins.html>.

[4] PŘÍHODA, J., SKŘIVAN, P., HRUŠKOVÁ, M. Cereální chemie a technologie 1, VŠCHT Praha 2003.

[5] <http://www.kamut.com>.

[6] KARDOŠ, E., BEREK, D. Základy kvapalinovej chromatografie, Alfa Bratislava 1979.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.

Ústav biochemie a analýzy potravin

Datum zadání diplomové práce:

4. ledna 2010

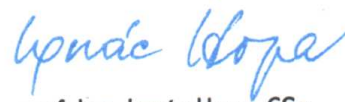
Termín odevzdání diplomové práce:

19. května 2010

Ve Zlíně dne 8. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byla jsem seznámena s tím, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce bylo stanovení vitaminů skupiny B v cereáliích pomocí chromatografické metody HPLC. Teoretická část práce se zabývá vlastnostmi vybraných vitaminů skupiny B, dále se zabývá popisem cereálií a metodou HPLC s UV detekcí. V praktické části je popsána metodika pro stanovení vitaminů skupiny B v cereáliích a stanovení vitamínu B₂ v pšenici ozimé, dále je zde uvedeno stanovení hrubé bílkoviny v cereáliích pomocí Kjeldahlovy metody.

Klíčová slova: tiamin, riboflavin, kyselina nikotinová, kyselina pantotenová, pyridoxin, cereálie, HPLC -UV

ABSTRACT

The aim of this thesis was to determine the B group vitamins in cereals by HPLC chromatographic methods. The theoretical part deals with the properties of selected group B vitamins, also deals with the description of cereal and the HPLC method using UV detection. The experimental part describes the methodology for the determination of B group vitamins in cereals, isolation and determination of vitamin B₂ in wheat, and there is also shown the determination of crude protein in cereals using the Kjeldahl method.

Keywords: tiamine, riboflavin, nicotinic acid, pantothenic acid, pyridoxine, cereals, HPLC-UV

Tímto chci poděkovat vedoucí mé diplomové práce Ing. Daniele Kramářové, Ph.D. za odborné vedení, rady, připomínky a všechny zodpovězené dotazy týkající se dané problematiky.

Dále chci poděkovat svým rodičům za psychickou i finanční podporu při studiu.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 VITAMINY	12
2 VITAMINY SKUPINY B	14
2.1 TIAMIN	14
2.2 RIBOFLAVIN	16
2.3 VITAMIN B ₃	20
2.4 KYSELINA PANTOTENOVÁ	22
2.5 PYRIDOXIN	25
3 CEREÁLIE	28
3.1 MORFOLOGICKÁ STAVBA OBILOVIN.....	28
3.1.1 Kořen a kořenová soustava	28
3.1.2 Stonek.....	29
3.1.3 Kolénko	29
3.1.4 List.....	30
3.1.5 Květenství obilovin	30
3.1.6 Plod obilovin	30
3.2 ANATOMICKÉ SLOŽENÍ A VLASTNOSTI OBIHKY.....	31
3.2.1 Obalové vrstvy (ektosperm)	31
3.2.2 Aleuronová vrstva	31
3.2.3 Klíček	32
3.2.4 Endosperm.....	32
3.3 CHEMICKÉ SLOŽENÍ OBILOVIN	32
3.3.1 Sacharidy	33
3.3.2 Bílkoviny	34
3.3.3 Lipidy	35
3.3.4 Vitaminy a minerální látky.....	35
3.3.5 Biologicky významné látky.....	35
3.4 ZÁSTUPCI OBILOVIN	36
3.4.1 Pšenice.....	36
3.4.2 Kamut.....	38
3.5 BIOPOTRAVINY	39
4 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE	41
4.1 CHROMATOGRFIE A JEJÍ ROZDĚLENÍ	41
4.2 HPLC.....	42
4.2.1 Čerpadlo	43
4.2.2 Dávkovací zařízení.....	43
4.2.3 Kolona	44
4.2.4 Detektory	45

II	PRAKTICKÁ ČÁST	47
5	METODIKA	48
5.1	MATERIÁL	48
5.2	POUŽITÉ POMŮCKY A PŘÍSTROJE	48
5.3	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	49
5.4	POUŽITÉ ENZYMY	49
5.5	OPTIMALIZACE IZOLAČNÍHO POSTUPU	50
5.5.1	Izolace vitaminů skupiny B kyselou cestou	50
5.5.2	Izolace vitaminů skupiny B pomocí enzymů	50
5.5.3	Pilotní chromatografická analýza vzorků	51
5.5.4	Pilotní chromatografická analýza standardů vitaminů skupiny B	51
5.6	MODELACE KONEČNÉ CHROMATOGRAFICKÉ ANALÝZY VZORKŮ OBILOVIN	51
5.7	MĚŘENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY	52
5.8	STANOVENÍ OBSAHU DUSÍKU A HRUBÉ BÍLKOVINY V OBILOVINÁCH	52
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	54
6.1	VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ CHROMATOGRAFICKÉ ANALÝZY VITAMINŮ SKUPINY B	54
6.1.1	Kvalitativní stanovení vitaminů skupiny B chromatografickou analýzou	54
6.1.2	Vyhodnocení získaných výsledků pro chromatografickou analýzu riboflavinu	56
6.1.3	Výsledky měření kalibrace riboflavinu	57
6.1.4	Výsledky měření obsahu riboflavinu v obilovinách	58
6.2	STANOVENÍ OBSAHU DUSÍKU A HRUBÉ BÍLKOVINY V CEREÁLIÍCH	59
6.2.1	Vyhodnocení získaných výsledků pro stanovení dusíku a hrubé bílkoviny	60
6.2.2	Stanovení dusíku a hrubé bílkoviny ve vzorku pšenice ozimé	60
6.2.3	Stanovení dusíku a hrubé bílkoviny ve vzorku špaldy loupané	61
6.2.4	Stanovení dusíku a hrubé bílkoviny ve vzorku špaldového kernotta	62
6.2.5	Stanovení obsahu dusíku a hrubé bílkoviny ve vzorku Grünkernu	63
6.2.6	Stanovení obsahu dusíku a hrubé bílkoviny ve vzorku kamutu	64
	ZÁVĚR	66
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	69
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	76
	SEZNAM OBRÁZKŮ	77
	SEZNAM TABULEK	78
	SEZNAM GRAFŮ	79
	SEZNAM PŘÍLOH	80

ÚVOD

Vitaminy patří mezi důležité složky denní potravy každého člověka stejně jako sacharidy, bílkoviny a lipidy. V lidském organizmu plní úlohu prekurzorů kofaktorů různých enzymů a uplatňují se v oxidačně-redukčních systémech. Mohou také plnit funkci antioxidantů, proto jsou obecně nazývány jako exogenní esenciální biokatalyzátory. Mezi vitaminy rozpustné ve vodě se řadí vitaminy tzv. B-komplexu, kam mimo jiné vitaminy patří i vitamin B₁, který je nezbytný pro metabolismus sacharidů a pro dobrou funkci nervového a kardiovaskulárního systému. Dalším vitamínem je vitamin B₂, jehož přítomnost v potravě je důležitá pro zdravou pokožku, vlasy a nehty. Vitamin B₃ je nezbytný pro správnou funkci mozku a nervového systému. Vitaminy B₅ a B₆ hrají důležitou roli v metabolismu mnoha biochemických látek, v případě vitamínu B₅ se jedná o metabolismus mastných kyselin a sacharidů, zatímco v případě vitamínu B₆ jde o metabolismus aminokyselin.

Významným zdrojem vitaminů skupiny B je maso, mléko a mléčné výrobky, vejce, droždí a v neposlední řadě také cereálie. Cereálie jsou také dobrým zdrojem minerálních látek, např. vápníku, hořčíku, fosforu, železa a zinku. Jelikož je většina těchto látek uložena v klíčcích, dochází při mletí obilí k jejich ztrátám a snižuje se tak biologická hodnota obilovin. Je proto doporučováno konzumovat obiloviny nemleté v podobě celých zrn, klíčků a otrub. Docílí se tak i zvýšení podílu vlákniny, která je nezbytná pro správnou funkci střev a působí preventivně proti některým onemocněním.

Pro stanovení vitaminů v nejrůznějších druzích potravin existuje spousta metod. Mezi moderní metody analýzy potravin patří chromatografická metoda HPLC. Principem této metody je dělení vzorku na základě rozdílné adsorpce složek vzorku a jejich následné stanovení.

Cílem diplomové práce bylo najít optimální postup izolace vitaminů skupiny B z cereálií a jejich stanovení pomocí metody HPLC s UV detektorem. Z technických důvodů nebylo možné změřit všechny výše uvedené vitaminy skupiny B, ale kvantitativně byl změřen pouze vitamin B₂.

Dalším cílem diplomové práce bylo stanovit obsah dusíku v cereáliích a stanovit množství hrubé bílkoviny v cereáliích. Toto měření bylo provedeno metodou podle Kjeldahla. Pro stanovení byly použity vzorky pšenice ozimé, pšenice špaldy, špaldového kernotta, Grünkernu a kamutu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VITAMINY

Vitaminy jsou exogenní esenciální nízkomolekulární sloučeniny nezbytné pro život organismu, které si heterotrofní organizmus nedokáže sám syntetizovat (v některých případech pouze v omezené míře, např. niacin člověk syntetizuje z tryptofanu, vitamin K a biotin jsou syntetizovány ze střevní mikroflory) a musí mu být dodávány z vnějšku [1, 2].

Pojem vitamin zavedl v roce 1912 polský biochemik Kazimierz Funk, který izoloval látku obsaženou v rýžových slupkách, která byla účinná v prevenci onemocnění beri-beri. Funk se domníval, že se jedná o aminokyselinu a nazval ji proto vitamin neboli amin života [3].

Vitaminy jsou v určitém množství nezbytné pro látkovou přeměnu a regulaci metabolismu člověka. Nejsou však zdrojem energie ani nejsou stavebním materiálem, mají však funkci katalyzátorů biochemických reakcí [4].

Vitaminy dělíme podle jejich rozpustnosti na lipofilní a hydrofilní.

Lipofilní vitaminy rozpustné v tucích vykazují různé funkce. Například vitamin A se uplatňuje v biochemických reakcích zrakového vjemu. Tyto vitaminy jsou ukládány nejčastěji v játrech (příloha I.). Hydrofilní vitaminy rozpustné ve vodě mají funkce kofaktorů enzymů v metabolismu nukleových kyselin, proteinů, sacharidů a lipidů. V organismu nejsou skladovány a jejich nadbytek je vylučován močí (příloha II.).

Nedostatek každého vitamínu se projevuje u živých objektů chorobnými příznaky, které v lehčích formách označujeme jako hypovitaminóza, v těžších jako avitaminóza. Přestože většina příznaků avitaminózy po dodání vitamínu rychle zmizí, dlouhotrvající avitaminóza může vést až k smrti organismu. Naopak nadbytek některých vitamínů se označuje jako hypervitaminóza [1].

V potravinách se vitaminy vyskytují v množstvích od $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ po stovky až tisíce $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ volně nebo vázané na jednotlivé složky potravy, nejčastěji na sacharidy a proteiny. Významnými zdroji vitamínů jsou hlavně základní potraviny jako je maso a masné výrobky, mléko a mléčné výrobky, vejce, cereální výrobky, ovoce a zelenina. Obsah vitamínů v jednotlivých potravinách ovlivňuje mnoho faktorů. U potravin živočišného původu závisí obsah vitamínů na způsobu skladování a zpracování suroviny. U potravin rostlinného původu záleží na stupni zralosti, klimatických podmínkách během růstu, na způsobu hnojení a také na posklizňovém skladování a zpracování.

Obecně patří vitaminy mezi labilní složky potravin, během technologického zpracování a během kulinární úpravy dochází ke ztrátám, z tohoto důvodu jsou vitaminy považovány za indikátory použití správných a šetrných technologických a kulinárních postupů. U vitaminů rozpustných ve vodě dochází k největším ztrátám výluhem, u vitaminů rozpustných v tucích jsou největší ztráty způsobeny oxidací.

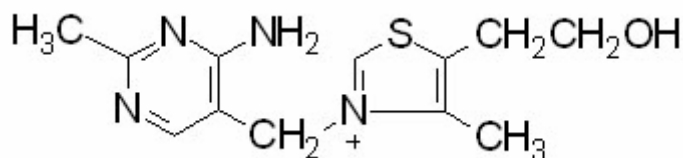
Dnes se vitaminy používají v potravinářském průmyslu k restituci, což je doplnění obsahu vitaminů na původní hladinu v potravine a také se používají k fortifikaci neboli obohacení na vyšší koncentrace než bylo původně v potravine. Některé vitaminy se používají jako přirozená barviva (riboflavin, vitamin A, provitaminy A) i jako antioxidanty (vitamin C, A, E) (příloha III.) [4].

2 VITAMINY SKUPINY B

Do vitaminů skupiny B patří osm ve vodě rozpustných vitaminů, které hrají důležitou roli v buněčném metabolismu. Řadí se sem vitamin B₁ (tiamin), vitamin B₂ (riboflavin), vitamin B₃ (kyselina nikotinová a její amid), vitamin B₅ (kyselina pantotenová), vitamin B₆ (pyridoxin), biotin, vitamin B₉ (kyselina listová) a vitamin B₁₂ (kyanokobalamin). Všechny vitaminy skupiny B jsou vylučovány močí, proto není známá žádná forma jejich předávkování a jen výjimečně se mohou hromadit v toxických koncentracích. Jelikož jsou tyto vitaminy z těla vylučovány, jsou omezeny i jejich zásoby v organismu a proto musí být plynule doplňovány (výjimku tvoří kobalamin) [5, 6].

2.1 Tiamin

Tiamin neboli vitamin B₁, dříve nazývaný aneurin, byl izolován a charakterizován v roce 1930. Po chemické stránce se jedná o 2,5-dimetyl-6-aminopyrimidin vázaný metylenovým můstkem na 4-metyl-5-hydroxyetyltiazol. Jedná se o krystalickou látku s bodem tání 248 - 250 °C. Tiamin se chová jako dvojsytná báze, která tvoří s kyselinami příslušné soli. Za přítomnosti oxidačních činidel se v alkalickém prostředí oxiduje na tiochrom nebo až na tiamindisulfid [1, 7, 8].



Tiamin [9]

Tiamin existuje ve čtyřech možných formách a to jako volný tiamin, tiaminmonofosfát, tiaminpyrofosfát a tiamintrifosfát. Nejúčinnější formou je tiaminpyrofosfát, nazývaný také jako tiamindifosfát, který je nezbytný jako kofaktor pro enzymy, které se účastní metabolismu sacharidů [10].

Tiamin je přítomen prakticky ve všech rostlinných i živočišných tkáních používaných jako obvyklá potrava, ale v malých množstvích [6]. Obecně se vyskytuje ve vyšších koncentracích v potravinách bohatých na sacharidy, např. obiloviny, luštěniny, vepřové maso a játra. V živočišných tkáních je asi 80 – 90 % vitamínu přítomno ve formě

tiamindifosfátu, který je zde vázaný na bílkoviny. Bohatým zdrojem tiaminu je vepřové maso, které obsahuje až 10x více tohoto vitamínu než ostatní druhy masa. Vhodným zdrojem jsou dále mléko a mléčné výrobky a vejce. V rostlinných surovinách se vyskytuje převážně ve volné formě tiaminu a to zejména v obilovinách, luštěninách a v bramborách. V obilovinách je tiamin přítomen hlavně v klíčku a v aleuronové vrstvě a tedy i v otrubách. Bílé mouky tedy obsahují mnohem méně tiaminu než mouky celozrnné. Celozrnné cereální výrobky bohaté na tiamin však obsahují relativně vysoké koncentrace vlákniny a fytátů, které inhibují intestinální absorpci tiaminu i dalších látek. Bohatým zdrojem tiaminu jsou pivovarské kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*), jelikož absorbují tiamin přítomný ve sladu [4].



Obr. 1: Zdroje vitamínu B₁ [11]

Tiamin patří k nejméně stálým vitaminům. Relativně stabilní je v kyselém prostředí (pH < 5), v neutrálním a alkalickém prostředí, kdy existuje jako volná báze, je značně nestálý. Průměrné ztráty v maso a masných výrobcích při smažení jsou 10 – 50 %, při vaření a dušení 50 – 70 %. Při nakládání masa dojde v důsledku reakce s dusitany k částečnému rozkladu tiaminu. Při pasteraci, sterilaci nebo při sušení mléka za běžných průmyslových podmínek se ztráty tiaminu pohybují v rozmezí 10 – 20 %. Při vaření těstovin dojde asi k 40% úbytku tiaminu, který je z větší části způsoben výluhem, při vaření kořenové zeleniny jsou ztráty asi 25 %, v případě vaření listové zeleniny jsou ztráty asi 40 % [4].

Současná doporučená denní dávka tiaminu je pro průměrného obyvatele ČR stanovena na 1,1 mg.den⁻¹, zvýšený příjem tiaminu je doporučen pro těhotné a kojící ženy, denní

doporučená dávka je pro ně stanovena na $1,4 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$. Zvýšený příjem tiaminu je také doporučen při trvalé energetické zátěži a při nevyvážené sacharidové dietě [1].

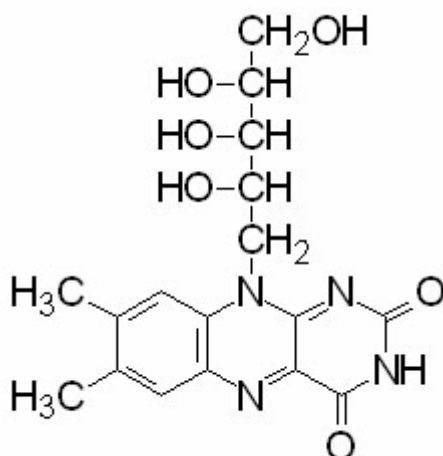
Nedostatek tiaminu byl prokázán jako činitel způsobující neurologické (tzv. dry beri-beri neboli suchá beri-beri) nebo kardiovaskulární (tzv. wet beri-beri neboli mokrá beri-beri) onemocnění. Srdeční onemocnění z nedostatku tiaminu byly charakterizovány rozšířením cév a selháním myokardu [13]. Dry beri-beri se projevuje nervovým poškozením (neuropatií), v jejímž průběhu se může objevit syndrom pálení nohou. Dalšími příznaky jsou pocity svalové bolesti a také slabost v končetinách. Wet beri-beri je charakterizována kardiovaskulárními problémy jako je rychlá srdeční frekvence, zvětšení srdce, dýchací potíže a může dojít až k selhání srdce. U lidí, kteří nadměrně konzumují alkohol se může projevit mozková beri-beri, kdy nedostatek tiaminu ovlivňuje centrální nervový systém [7]. Hypervitaminóza způsobená tiaminem se prakticky nevyskytuje, jelikož jeho toxicita je velmi nízká. Při dlouhodobém podávání tiaminu ve vysokých dávkách se mohou objevit žaludeční potíže, kožní reakce a bolesti hlavy [1].

Tabulka 1: Obsah tiaminu v některých potravinách [12]

Potravina	Obsah tiaminu (mg.100g⁻¹)	Potravina	Obsah tiaminu (mg.100g⁻¹)
vepřové maso libové	0,834	těstoviny	0,110
vepřová játra	0,417	slepičí vejce	0,089
mléko egalizované	0,035	fazole	0,715
sýr Eidam, 30 % t.v s.	0,051	mrkev karotka	0,070
ovesné vločky	0,485	špenát	0,147
rýže	0,116	pomeranč	0,070

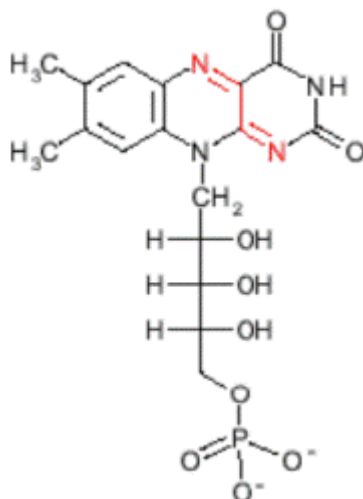
2.2 Riboflavin

Riboflavin neboli vitamin B₂ je žlutozelená krystalická látka s bodem tání 275 - 292 °C, dříve také známá jako laktoflavin, ovoflavin, uroflavin a vitamin G, a její vodné roztoky mají schopnost fluorescence [4, 8, 14].



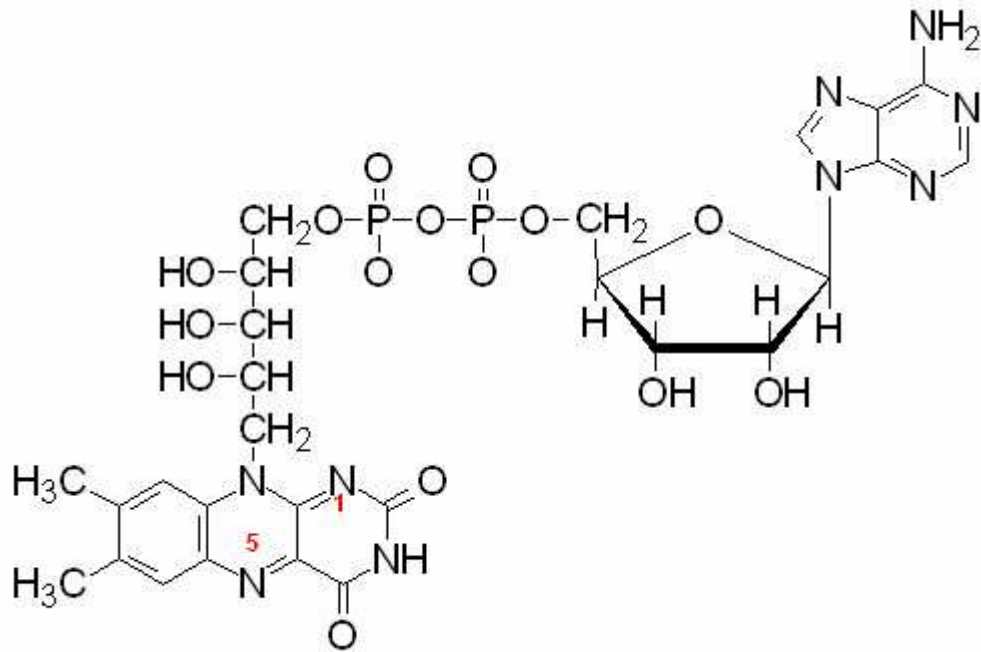
Riboflavin [9]

Riboflavin patří do skupiny látek zvaných flaviny. Základem struktury riboflavinu je isoalloxazinové jádro, na které je vázán ribitol, alditol odvozený od D-ribózy. Po chemické stránce se jedná o 7,8-dimethyl-10-(-1-d-ribityl)isoalloxazin. Stejně jako ostatní vitaminy skupiny B hraje riboflavin klíčovou roli v energetickém metabolismu tuků, sacharidů a proteinů. Je také důležitý pro metabolismus pyridoxinu, niacinu a kyseliny listové [1, 15, 16].



FMN [17].

Riboflavin se vyskytuje jako volná látka, převážně však existuje ve formě FMN (flavinmononukleotidu neboli riboflavin-5'-fosfátu), dále pak ve formě FAD (flavinadenindinukleotidu) a kovalentně vázaného riboflavinu [4].



FAD [9]

Volný vitamin se vyskytuje pouze v oční sítnici, syrovátce a moči. Vázaný ve formě FMN a FAD se ve větším množství nachází v droždí a obilných klíčcích. Ze živočišných surovin nejvíce riboflavinu obsahují játra, ledviny, maso, vejce, mléko a mléčné výrobky, z rostlinných produktů je obsažen ve větším množství v luštěninách. V ovoci a zelenině je jeho obsah nízký. V naší stravě je hlavním zdrojem mléko a mléčné výrobky, maso a cereálie. V cereáliích se riboflavin nachází zejména v klíčcích v aleuronové vrstvě obilky. Dobrým zdrojem tohoto vitaminu jsou i některé houby [18].

Obr. 2: Zdroje vitaminu B₂ [20]

Ve tmě je riboflavin velmi stabilním vitamínem, v neutrálních a slabě kyselých roztocích je prakticky stálý. Je také velmi stálý při tepelném zpracování potravin, degraduje však při ozáření. Během technologického a kulinářského zpracování potravin dochází ke ztrátám riboflavinu, především vyluhováním. Pokud jsou hydrotermické operace prováděny v podmínkách s omezeným přístupem světla, ztráty riboflavinu se snižují. Vzhledem k tomu, že je riboflavin fotosenzibilní, je nutno potraviny uchovávat ve vhodném obalu. Za účelem fortifikace se přidává do některých potravin a používá se také k jejich barvení [4, 8].

Doporučená denní dávka pro průměrného obyvatele ČR činí $1,5 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$. Zvýšený denní příjem na $1,8 \text{ mg}$ i vyšší se doporučuje těhotným a kojícím ženám, při infekčních onemocněních, po chirurgických zákrocích a při zvýšené aktivitě štítné žlázy [1].

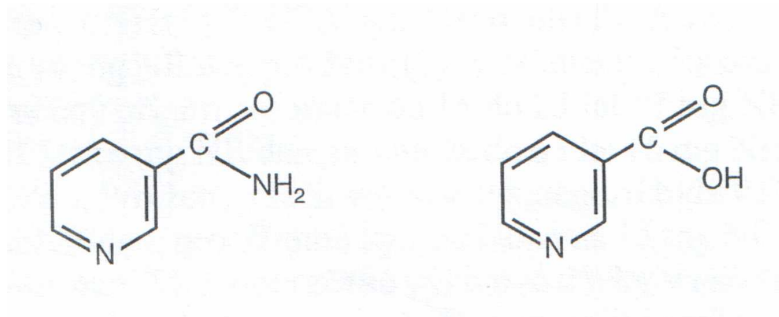
Nedostatek riboflavinu se u člověka projevuje zánětlivými změnami sliznic a kůže, některými očními nebo nervovými poruchami. Nedostatečný příjem riboflavinu trvající více než 100 dní vede ke vzniku hypovitaminózy. Ta byla nejčastěji diagnostikována u osob konzumujících nedostatečné množství mléka a mléčných výrobků. Kromě toho může být hypovitaminóza způsobena stresem organismu, nemocemi štítné žlázy nebo záněty tenkého střeva. Nedostatečná saturace riboflavinem byla indikována u vegetariánů a veganů. Obvykle se u těchto osob projevuje nedostatek riboflavinu spolu se symptomy nedostatku ostatních vitaminů skupiny B [1].

Tabulka 2: Obsah riboflavinu v některých potravinách [19]

Potravina	Obsah riboflavinu ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$)	Potravina	Obsah riboflavinu ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$)
sója	0,30	sýry	0,40-0,70
houby	0,40	netučné mléko	0,20
pivní kvasnice	4,30	vepřové srdce	1,30
tmavý chléb	0,20	játra	2,70
mléčná čokoláda	0,34	makrela	0,35
hořká čokoláda	0,14	hrách	0,29
vejce	0,34	čočka	0,25

2.3 Vitamin B₃

Kyselina nikotinová byla původně nazývána jako vitamin P-P, později se zavedl název niacin. V roce 1954 IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry, Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii) rozhodla, že správný název je kyselina nikotinová a nikotinamid. Niacin je v současné literatuře používán jako název pro skupinu látek tvořených kyselinou nikotinovou, jejím amidem a jejich deriváty. Po chemické stránce je kyselina nikotinová 3-pyridinkarboxylová kyselina a její amid je 3-pyridinkarboxamid. Obě látky jsou fyziologicky stejně účinné [12]. Kyselina nikotinová je bezbarvá krystalická látka bez zápachu, bod tání je 234 - 237 °C, od 150 °C začíná sublimovat. Amid kyseliny nikotinové tvoří bezbarvé krystaly, které jsou bez zápachu a jsou s nahořklou chladivou chutí, v krystalickém stavu se vyskytuje v několika polymorfních formách a jeho stabilní modifikace má bod tání 129 °C [8].



Kyselina nikotinová a její amid [12]

Amid kyseliny nikotinové je součástí nikotinamidadenindinukleotidu (NAD⁺) a nikotinamidadenindinukleotidfosfátu (NADP⁺) [10]. NAD⁺ i NADP⁺ jsou kofaktory různých enzymů, účastní se přenosu elektronů v respiračních systémech (např. v Krebsově cyklu) [4]. Tyto látky jsou také nezbytné při tvorbě i odbourávání mnoha látek, např. sacharidů, aminokyselin, tuků, cholesterolu, steroidních hormonů [21]. Při biosyntéze a katabolismu NAD⁺ i NADP⁺ vznikají různé deriváty niacinu, např. *N*¹-metylnikotinamid, což je produkt katabolismu člověka i zvířat, nebo vzniká *N*-metylnikotinová kyselina neboli trigonelin, což je produkt katabolismu rostlin a hub [4]. Kyselina nikotinová má schopnost snižovat hladinu LDL (Low-Density Lipoprotein, lipoproteiny o nízké hustotě) cholesterolu a zároveň má schopnost zvyšovat hladinu HDL (High-Density Lipoprotein, lipoproteiny o vysoké hustotě) cholesterolu. Této schopnosti se využívá

při léčbě poruch metabolismu lipidů a jako prevence proti ateroskleróze. Nikotinamid má ochranné vlastnosti při nervových a cévních onemocněních a vyznačuje se výbornou protizánětlivou aktivitou [22].

Lidský organismus je schopen omezeně tvořit niacin z aminokyseliny tryptofanu pomocí enzymů, které obsahují jako kofaktor vitamin B₆. Udává se, že pro biosyntézu 1 mg niacinu je potřeba asi 60 mg tryptofanu [1]. Nejbohatším zdrojem kyseliny nikotinové a jejího amidu jsou kvasnice, z nutričního hlediska pak maso a vnitřnosti. V potravinách rostlinného původu se vyskytuje kyselina nikotinová, v živočišných tkáních převažuje nikotinamid. Na kyselinu nikotinovou jsou bohaté obiloviny, nachází se především v obalových vrstvách zrna a v klíčku, proto je obsah kyseliny nikotinové v mouce závislý na stupni vymletí. V kukuřici a čiroku je niacin z velké části vázán na peptid niacytin a v zažívacím traktu může být stráven jen částečně [12]. Bohatým zdrojem niacinu je pražená káva. Zelené kávové boby obsahují alkaloid trigonelin, který se při pražení degraduje na kyselinu nikotinovou a pyridiny. Obsah niacinu v pražené kávě je asi 500 mg.kg⁻¹. Menší množství trigonelinu obsahují také obiloviny a luštěniny [4].



Obr. 3: Zdroje vitaminu B₃ [24, 25]

Při zahřívání ve vodných roztocích, v kyselém i alkalickém prostředí je kyselina nikotinová stabilní. Nikotinamid je stálý v neutrálních roztocích, v kyselém a alkalickém prostředí se hydrolyzuje na kyselinu nikotinovou. Ztráty niacinu z potravin jsou většinou způsobeny výluhem, při zpracování masa nastávají ztráty při nevhodném rozmrazování, ztráty niacinu nastanou také při vymílání mouk [4].

Tabulka 3: Obsah kyseliny nikotinové ve vybraných potravinách [12]

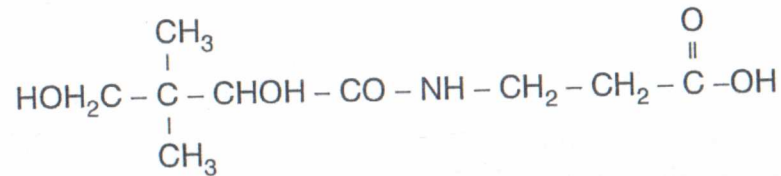
Potravina	Obsah kyseliny nikotinové (mg.100g ⁻¹)	Potravina	Obsah kyseliny nikotinové (mg.100g ⁻¹)
vepřové maso	3,3 - 13,0	brambory	1,0 - 2,0
hovězí maso	3,8 - 10,2	čočka	3,1
telecí maso	4,9 - 18,0	mrkev	0,5 - 1,5
hovězí játra	7,6 - 27,5	rýže loupaná	6,0
vepřová játra	9,7 - 27,5	pšeničná mouka	0,9 - 1,2

Při stanovení doporučených dávek vitamínu B₃ se musí brát v úvahu nejen jeho příjem z potravy, ale i příjem niacinu, který je syntetizován ve vnitřnostech z tryptofanu. Pro stanovení doporučených dávek se používá jednotka niacin-ekvivalent (NE), kdy 1 NE se rovná 60 mg tryptofanu [12]. V ČR jsou doporučené dávky tohoto vitamínu udávány v mg niacinu. Pro středně pracující obyvatele jsou stanoveny na 16 - 20 mg.den⁻¹, horní limit příjmu niacinu je pro dospělého osobu 30 - 35 mg.den⁻¹, toxická dávka niacinu je pro dospělého člověka 1,8 mg na 1 kg hmotnosti [1]. Nedostatek vitamínu B₃ se projevuje nemocí zvanou pelagra, jejími příznaky jsou záněty kůže, průjemy a demence, dalšími příznaky mohou být ztráta čichu nebo chuti, závratě nebo bolesti hlavy. S tímto onemocněním se setkáváme u lidí se stravou chudou na bílkoviny, hlavně tehdy když převažují kukuřice a čirok ve kterých je vitamin pevně vázán a málo se z nich vstřebává. Jedná se o onemocnění, které převládá v Jižní části Spojených Států Amerických a vyskytuje se také v některých částech Španělska, Itálie a Rumunska [21, 23]. Nedostatek vitamínu také vede k poruchám sekrece kyseliny chlorovodíkové v žaludku, dále se objevují poruchy přenosu sodíku, draslíku a glukózy [1].

2.4 Kyselina pantotenová

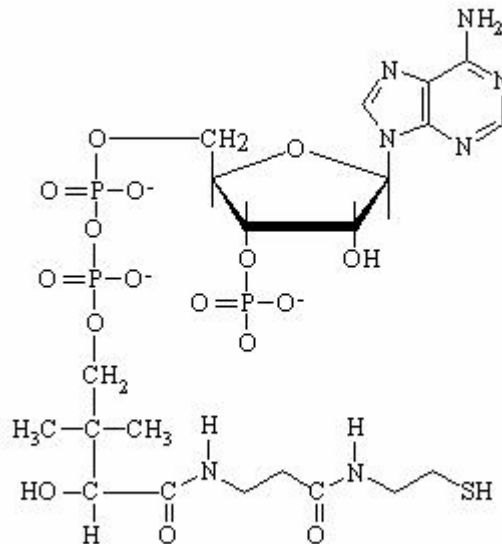
Kyselina pantotenová byla izolována v roce 1939 jako růstový faktor pro kvasinky a slouží také jako stimulační růstový faktor pro mléčné bakterie [26]. Po chemické stránce je kyselina pantotenová D-(+)- α,γ -dihydroxy- β -dimetylbutyryl- β -alanin a je to viskózní, slabě nažloutlý olej, v roztocích stabilní v rozmezí pH 5,5 - 7,0. Přítomnost β -alaninu

je pro biologický účinek nezbytná, pokud by byl nahrazen jinou aminokyselinou, vznikla by látka fyziologicky neúčinná nebo by vzniklá látka mohla mít antivitaminovou aktivitu [8, 12].



Kyselina pantotenová [12].

Kyselina pantotenová se vyskytuje buď jako volná ve tkáních, ale převážně jako vázaná na koenzym A (CoA) a jako přenašeč proteinů (ACP). Koenzym A je nezbytný meziprodukt různých metabolických reakcí (odbourávání mastných kyselin, citrátový cyklus). Nejdůležitější sloučeninou koenzymu A je aktivovaná kyselina octová, kdy vzniká acetyl-CoA, ve kterém je kyselina octová vázána jako tioester na tiolovou skupinu cysteaminu [8, 27].

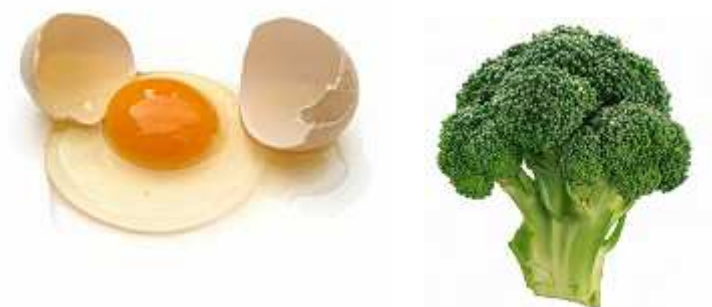


Koenzym A [30].

Kyselina pantotenová je také zapojena do syntézy cholesterolu, syntézy některých aminokyselin, steroidních hormonů, vitamínu D, mastných kyselin [28].

Kyselina pantotenová se vyskytuje prakticky ve všech potravinách živočišného i rostlinného původu, ale v pouze omezených množstvích. Z potravin živočišného původu jsou to zejména vaječné žloutky, vnitřnosti a rybí maso, poměrně chudým zdrojem je mléko. V potravinách rostlinného původu se vyskytuje v celozrnných cereálních výrobcích, luštěninách, rýži, houbách a kvasnicích, nízký obsah tohoto vitamínu je v ovoci a zelenině. Při skladování a při termickém zpracování je poměrně labilní. Ztráty, které nastanou vyluhováním do vody jsou podstatně vyšší než ztráty způsobené hydrolýzou [1, 4].

Mezinárodní doporučené dávky vitamínu B₅ se pohybují v rozmezí 3 - 14 mg.den⁻¹. Pro průměrného obyvatele ČR je doporučená dávka 7,3 mg.den⁻¹ [1]. Jelikož je kyselina pantotenová široce rozšířena v běžných potravinách, je avitaminóza kyseliny pantotenové pouze ojedinělým případem a byl pozorován u válečných zajatců v důsledku nedostatečné výživy, kdy byl popsán tzv. syndrom pálení nohou. Při snížené produkci energie, která je způsobena nízkou úrovní koenzymu A v těle se vyskytují příznaky podrážděnosti, únavy a apatie. Nedostatek kyseliny pantotenové může způsobit také hypoglykemii, poruchy spánku, malátnost a nevolnost (zvracení, křeče v břiše) [19, 29].



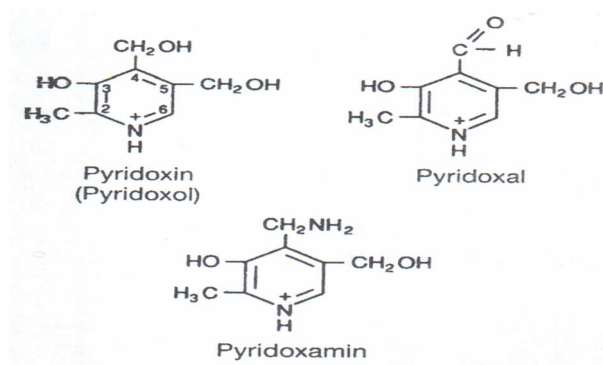
Obr. 4: Zdroje kyseliny pantotenové [32,33]

Tabulka 4: Obsah kyseliny pantotenové ve vybraných potravinách [12]

Potravina	Obsah kyseliny pantotenové ($\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$)	Potravina	Obsah kyseliny pantotenové ($\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$)
vepřové maso	470 - 1 500	vejce	2700
hovězí maso	1100	houby	1700
kuřecí maso	530 - 900	brokolice	1400
hovězí játra	5700 - 8200	pšenice	1300
vepřová játra	5900 - 7300	mléko	290 - 380

2.5 Pyridoxin

Vitamin B₆, dříve nazývaný také jako adermin, byl izolován v roce 1938, kdy byl pojmenován jako pyridoxin. Postupně byly na základě různých testů rozlišeny složky pyridoxinové triády, které vykazují účinek vitaminu B₆ a nesou společný název pyridoxin [1]. Pyridoxinová triáda je tvořená pyridoxolem (2-metyl-3-hydroxy-4,5-bishydroxymetylpyridin), další složkou pyridoxinové triády je pyridoxal (2-metyl-3-hydroxy-4-formyl-5-hydroxymetylpyridin), a poslední složkou triády je pyridoxamin (2-metyl-3-hydroxy-4-aminometyl-5-hydroxy-metylpyridin) [8]. Pyridoxin je v živém organismu nezbytný pro více než 100 enzymatických reakcí, včetně přenosu aminoskupin, kyselin nebo vody v metabolismu proteinů, dále je nezbytný pro přeměnu tryptofanu na niacin a také je důležitým přenašečem nervových vzruchů [31].



V biochemických procesech se pyridoxin uplatňuje ve formě fosfátových derivátů pyridoxalfosfátu a pyridoxaminfosfátu [1]. Největší význam v lidském metabolismu má pyridoxal-5'-fosfát, který funguje například jako koenzym pro enzym *fosforylázu*, který katalyzuje uvolnění glukózy z glykogenu, nebo nachází své uplatnění v procesu glukoneogeneze [34]. V rostlinných pletivech a živočišných tkáních se vyskytují pyridoxamin-5'-fosfát a pyridoxol-5'-fosfát. Metabolitem pyridoxalu, který je vylučován močí je 4-pyridoxová kyselina a její lakton 4-pyridoxolakton [4].

Z potravin živočišného původu jsou bohatým zdrojem tohoto vitamínu maso, masné výrobky, vnitřnosti a vaječný žloutek. V těchto potravinách se vyskytuje zejména pyridoxal a pyridoxamin ve formách fosforečných esterů. V potravinách rostlinného původu se vyskytuje pyridoxol a pyridoxal a najdeme je v celozrnných cereálních výrobcích, zelenině, bramborách a luštěninách. Dobrým zdrojem pyridoxinu je také droždí [4].

Ztráty vitamínu B₆ při skladování a zpracování potravin se liší podle převládající formy vitamínu. V potravinách rostlinného původu jsou většinou malé, u potravin živočišného původu jsou ztráty vyšší. Hlavní příčinou ztrát bývá vyluhování a také reakce pyridoxalu s bílkovinami [4].



Obr. 5: Zdroje vitamínu B₆ [35, 36]

Doporučená denní dávka pyridoxinu je pro průměrného obyvatele ČR stanovena na 1,7 mg.den⁻¹. Doporučená denní dávka se zvyšuje pro těhotné a kojící ženy a také pro osoby se zvýšeným příjmem bílkovin v potravě a také při užívání léků jako jsou cytostatika nebo estrogeny [1]. Nedostatek vitamínu B₆ se projevuje vyrážkami v oblasti nosu, rtů a očí, záněty v ústech a na rtech, dalšími projevy může být nespavost, přecitlivělost a neurologické problémy. Příznakem nedostatku může být také zvýšené vylučování kyseliny šťavelové v moči. Tyto příznaky se mohou objevit při dlouhodobé nevyvážené dietě, při dlouhodobém užívání některých léků, dále v těhotenství a při kojení, také při poruchách trávicího traktu a při metabolických poruchách. Nedostatek tohoto vitamínu se projeví také u lidí závislých na alkoholu [12].

Tabulka 5: Obsah pyridoxinu ve vybraných potravinách [12]

Potravina	Obsah pyridoxinu ($\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$)	Potravina	Obsah pyridoxinu ($\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$)
vepřové maso	330-680	pekařské droždí	620-700
hovězí maso	230-320	rýže loupaná	340-450
losos čerstvý	590	sójové boby	710-1200
hovězí játra	600-700	brambory podzimní	160-250
vepřová játra	290-590	kukuřice žlutá	360-570
pšeničná mouka	120-600	mrkev syrová	120-220

3 CEREÁLIE

Pěstování obilovin má významnou roli v zemědělské produkci ve většině zemí světa. Mezi hlavní plodiny, které se využívají pro potravu patří pšenice, rýže, žito, čirok a proso. Tyto obiloviny jsou důležitým zdrojem bílkovin pro obyvatele mnoha států světa. V mnoha rozvojových zemích tvoří obilné bílkoviny 70 – 90 % z celkové spotřeby bílkovin (tyto bílkoviny však nedosahují nutriční hodnoty živočišných bílkovin, protože je zde nízký obsah lyzinu) [37, 38].

Cereálie můžeme z hlediska jejich funkce rozdělit na dvě skupiny a to na obilniny (skupina pěstovaných rostlin) a obiloviny (potravinářská surovina určená ke konzumaci). Botanicky patří obiloviny do třídy jednoděložných rostlin (*Monocotyledones*) a řadí se mezi traviny (*Gramineae*). Většina obilovin patří do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Jedná se o vyšlechtěné jednoleté trávy, kam zařazujeme např. pšenici, žito, ječmen, oves, proso, čirok, rýži a kukuřici. Mezi obilniny řadíme také skupinu zvanou pseudocereálie. Jsou to také jednoleté rostliny, ale patří do třídy dvouděložných rostlin (*Dicotyledones*). Do této skupiny zařazujeme pohanku z čeledi rdesnovitých, laskavec z čeledi laskavcovitých a merlíky z čeledi merlíkovitých [38].

Rozdělení obilovin podle morfologických a fyziologických vlastností je uvedeno v příloze IV.

3.1 Morfologická stavba obilovin

Obiloviny tvoří nadzemní orgány, kam se zařazují stébla, listy, květenství a plody, dále tvoří podzemní orgány, kam se řadí kořeny a odnožovací kolénka. Vegetativní zásobní orgány jako jsou hlízy, bulvy nebo cibule obiloviny netvoří [38].

3.1.1 Kořen a kořenová soustava

Kořen je základním vegetativním orgánem těla rostlin. Má tři základní funkce a to upevňovací (upevňuje rostlinu v půdě), další funkcí je funkce absorpční (přijímá vodu a minerální živiny a rozvádí ji do nadzemních částí rostliny) a poslední funkcí je funkce růstová (pomocí dělivých pletiv se kořen prodlužuje) [39]. Obilniny mají kořeny svazčité, zatímco pseudocereálie mají kořen kulovitý. Kořenová soustava jednoděložných obilovin se dělí na primární a sekundární. Primární kořenová soustava se tvoří při klíčení obilky,

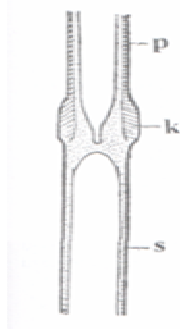
takové kořínky se nazývají prvotní kořínky nebo-li zárodečné kořínky. Sekundární kořeny jsou svazčité, nazývají se jako korunkové a tvoří se z podzemního kolénka. Kořenová soustava obilovin má funkci zpevňovací, vyživovací a zásobní. Funkce kořenové soustavy končí sklizní rostlin nebo po dozrání semen. Nejbohatší kořenovou soustavu mají žito a oves, méně vyvinutý kořenový systém má pšenice jarní a nejchudší kořenový systém se nalézá u ječmene jarního [38].

3.1.2 Stonek

Stonek nese listy a květy, dále rozvádí anorganické látky z kořene do listů a organické látky z listů do místa spotřeby. Stonek má také funkci zásobní. Další jeho funkcí je to, že napomáhá orientaci listů ke světlu a vyzvedává květy nad ostatní části rostliny [40]. U obilovin je stonkem stéblo, u pseudocereálií je to lodyha. Po sklizni se tyto části nazývají slámou. Stébla jsou dlouhá 50 - 300 cm, mají kruhový průřez, jsou mírně kónická a většinou jsou dutá. Pomocí kolének se stéblo rozděluje na články (internodia), ve spodní části stébla jsou články kratší, směrem vzhůru se články prodlužují. U některých obilovin (kukuřice, čirok, laskavec, některé formy pšenice a prosa) jsou stébla úplně nebo částečně vyplněna parenchymatickým pletivem, do kterého mohou zasahovat i cévní svazky [38].

3.1.3 Kolénko

Kolénko nebo-li nodus je prstencovitě ztlustlá část stébla v místě nasazení listové pochvy. Těsně nad kolénkem se nachází dělivé pletivo, které ovlivňuje prodlužování článků. Odnožovací kolénko, ze kterého vyrůstají další stébla tzv. odnože a sekundární kořínky, které se nachází těsně pod povrchem půdy [38].



Obr. 6: Průřez stéblem ječmene [38]

Popis obrázku: (S – stéblo, K – kolénko, P – listová pochva)

3.1.4 List

Funkcemi listu jsou fotosyntéza, transpirace a výměna plynů mezi rostlinou a prostředím. Většina listů je k těmto funkcím přizpůsobena svým tvarem. Nadměrným vývojem dolní části listu vzniká listová pochva. U lipnicovitých rostlin jsou listové pochvy dlouhé a těsně objímají stéblo [40]. Přisedlý, vztyčený až převislý list vyrůstá z horní části každého kolénka. List má úzkou čárkovitou čepel a listovou pochvu, která objímá kolénko a dolní část článku stébla. Na přechodu čepele v listovou pochvu se nachází jemný blanitý jazýček tzv. ligula, která přiléhá ke stěnám stébla a dvě ouška tzv. auricula, které v přední části obepínají stéblo. Listy jednotlivých obilovin mají své charakteristické znaky, podle kterých lze rozeznat jednotlivé druhy obilovin. Listy pseudocereálií jsou řapíkaté, u pohanky jsou střelovité, v případě laskavce jsou listy oválné až kopinaté [38].

3.1.5 Květenství obilovin

Květy obilovin jsou umístěny na stonku, který se nazývá jako páteřní, tento stonek může být rozvětvený, může nést točící se klásky a může nést více než 1 květ na každém kolénku. Květy mohou být organizovány jako volná lata a to v případě čiroku, ova a některých druhů prosa, nebo je květenství ve formě klasů jako je to v případě pšenice [41]. Klas je složený z klasového větvena, po obou stranách větvena vyrůstají střídavě klásky a každý klásek je tvořený z několika květů. Lata je morfologicky shodná s klasem, liší se tím, že postranní větve květenství nejsou zkrácené, na konci větví jsou opět klásky. Květ je složený ze svrchního jednovaječného semeníku se dvěma bliznami a třemi tyčinkami, které mají dlouhé a tenké nitky s prašníky. Ve spodu semeníku jsou dvě lodikuly, které v období kvetení nabobtnají, dojde tak k oddálení pluchy a plušky, květ se otevře a tyčinky a blizny se vykloní z květu a dojde tak ke snadnějšímu opylování. Květ je uzavřený vnější plevou, pluchou s osinou nebo pluchou bez osiny a vnitřní pluškou. Osiny chrání květ před mechanickým poškozením a před škůdci a má význam při transpiraci asimilátů do obilky [38].

3.1.6 Plod obilovin

Obiloviny mají jednosemenný suchý plod nazývaný nažka. U obilovin z čeledi lipnicovitých (*Poaceae*) je nažka nazývaná jako obilka. Obilky rozdělujeme podle toho, zda po sklizni obsahují pluchy a plušky, na obilky nahé (pšenice, žito, kukuřice) a obilky

pluchaté (ječmen, rýže, oves, čirok, proso) [38]. O složení obilky bude blíže pojednáno v kapitole 3.2.

3.2 Anatomické složení a vlastnosti obilky

Anatomická stavba obilného zrna má význam při hodnocení zrna, při skladování zrna a při jeho následném zpracování. Jednotlivá zrna se liší především tvarem, velikostí a podílem jednotlivých vrstev. Tvary zrna jsou zastoupeny od tenkých protáhlých až po téměř kulatá zrna, ovšem zastoupení a pořadí jednotlivých vrstev zrna jsou vždy shodné. U jednotlivých druhů obilovin se ale liší hmotnostní podíl jednotlivých částí zrna a je proměnlivý vlivem vnitřních a vnějších faktorů. Rozměry zrna se mohou lišit i pro stejný druh obiloviny v závislosti na odrůdě, klimatických podmínkách lokality a daného období (dešťové srážky, sluneční svit, teplotní profil, nadmořská výška), kvalitě půdy a agrotechnice (především na hnojení) [42, 43].

Každá obilka se skládá z endospermu, klíčku a obalových vrstev

3.2.1 Obalové vrstvy (ektosperm)

U nahých obilek je obal tvořen oplodím a osemením, u obilek pluchatých tvoří obal kromě oplodí a osemení i plucha a pluška. Oplodí (perikarp) je tvořeno pokožkou (epidermis), buňkami podélnými (epikarp), buňkami příčnými (mesokarp) a buňkami hadicovými (endokarp). Osemení nebo-li perisperm je tvořeno vrstvou barevnou a hyalinní (skelnou). Celkově tvoří obalové vrstvy 8 - 14 % hmotnosti zrna. Obalové vrstvy jsou tvořeny několika vrstvami buněk, které chrání klíček a endosperm před vysycháním a mechanickým poškozením a jsou významným zdrojem vlákniny (celulóza a hemicelulóza) a minerálních látek (vápník, železo, hořčík, křemík a fosfor). Oplodí je složeno převážně z nerozpustných polysacharidů typu celulózy a slouží tedy jako zdroj nerozpustné vlákniny. Osemení je složeno z polysacharidů, které ve vodě bobtnají nebo se částečně rozpouštějí a jsou schopny pevně vázat vodu. Pokud se nejedná o celozrnné výrobky jsou v mlýnské technologii obalové vrstvy součástí otrub [38, 43, 44].

3.2.2 Aleuronová vrstva

Aleuronová vrstva se nachází mezi obalovými vrstvami a endospermem a tvoří asi 8 % hmotnosti zrna a technologicky se zahrnuje mezi celkový endosperm. Tato vrstva

je tvořena parenchymatickými buňkami v jedné vrstvě (u pšenice) nebo ve více vrstvách (u ječmene až 4 vrstvy). Tyto buňky jsou vyplněny drobnými kulatými zrny tzv. aleurony. Aleurony jsou krystaloidy bílkovin převážně globulinového typu. Kromě těchto bílkovin obsahuje aleuronová vrstva i nukleoproteiny, ty jsou obsaženy v buněčném jádře a obsahují vázanou kyselinu fosforečnou a během klíčení dávají vznik ribozomům. Aleuronová vrstva dále obsahuje tuky, vitaminy a minerální látky [38, 43].

3.2.3 Klíček

Klíček neboli embryo tvoří nejmenší část obilky (u pšenice tvoří asi 3 %, u kukuřice 12 - 15 %) a je zárodkem pro novou rostlinu a zároveň je nositelem genetické informace. K endospermu je klíček spojen štítkem, což je vrstva tenkostěnných palisádových buněk, které produkují během klíčení enzym *amylázu*, která přeměňuje škrob obsažený v endospermu na D-glukózu, která je potřebná pro výživu rostliny. Klíček je bohatým zdrojem tuku (10 - 15 %), nejvíce jsou zastoupeny kyselina palmitová a stearová, oves obsahuje navíc i kyselinu erukovou. Dále jsou v klíčku obsaženy bílkoviny, jednoduché cukry, minerální látky a vitamin E. Při mletí se klíček odstraňuje, jelikož je díky vysokému obsahu tuku na vzduchu málo stabilní [38, 43].

3.2.4 Endosperm

Endosperm tvoří největší podíl zrna a to 84 - 86 % a je z technologického hlediska nejdůležitější částí obilky. Endosperm je tvořen velkými hranolovitými buňkami a jemnou buněčnou blánou. Endosperm obsahuje převážně škrob a zásobní bílkoviny gliadiny a gluteniny. Endosperm zajišťuje výživu pro zárodek a při zpracování tvoří podstatnou složku konečného výrobku. Při výživě a krmení je hlavním zdrojem energie a bílkovin [43, 44].

Podélný řez pšeničným zrnem je uveden v příloze V.

3.3 Chemické složení obilovin

Chemické složení obilovin je závislé na odrůdě, způsobu kultivace, době a podmínkách růstu, sklizni a způsobu skladování. Hlavními složkami obilovin jsou 12 - 14 % voda, 65 - 75 % sacharidy, 2 - 6 % lipidy a 7 - 12 % proteiny, v menší míře 2 % jsou zastoupeny minerální látky a vitaminy. V případě ovsa a kukuřice je obsah lipidů relativně vyšší, oves

obsahuje nejméně 10 % lipidů a v kukuřici se obsah lipidů pohybuje v rozmezí 0,4 – 17 % a většinou se jedná o triacylglyceroly [45, 46].

Tabulka 6: Obsah jednotlivých složek v obilovinách [45]

Obilovina	Bílkoviny (%)	Lipidy (%)	Popeloviny (%)	Vláknina (%)	Sacharidy (%)
neloupaná rýže	7,3	2,2	1,4	0,8	64,3
čirok	8,3	3,9	2,6	4,1	62,9
žito	8,7	1,5	1,8	2,2	71,8
oves	9,3	5,9	2,3	2,3	62,9
kukuřice	9,8	4,9	1,4	2,0	63,6
pšenice	10,6	1,9	1,4	1,0	69,7
ječmen	11,0	3,4	1,9	3,7	55,8

3.3.1 Sacharidy

Sacharidy tvoří hlavní podíl jednotlivých složek, které jsou v obilovinách obsaženy. V cereáliích, stejně jako v dalších rostlinných tkáních, jsou sacharidy obsaženy v buněčné stěně, plastidech a vakuolách nebo v cytoplasmě. Hlavními složkami buněčné stěny jsou celulóza, hemicelulóza, pektin a lignin. Z monosacharidů se v obilce vyskytují pentózy, dále glukóza a fruktóza, z disacharidů se vyskytuje sacharóza a maltóza. Nejdůležitější složkou obilného zrna je škrob, který se řadí mezi zásobní polysacharidy. V obilovinách se vyskytuje ve formě škrobových zrn a je složen z amylozy (vazba α 1 \rightarrow 4) a amylopektinu (vazba α 1 \rightarrow 4 a vazba α 1 \rightarrow 6). Ve studené vodě je škrob nerozpustný a pouze bobtná, při teplotách nad 60 °C mazovatí (nejnižší teplotu mazovatění má žitný škrob, nejobtížněji mazovatí rýžový škrob, který netvoří úplný gel ani po dosažení teploty 95 °C) [43, 44, 45].

3.3.2 Bílkoviny

Bílkoviny vznikly procesem proteosyntézy a jsou to polymery aminokyselin. Ve své molekule obsahují více než 100 aminokyselin, které jsou vzájemně spojené peptidovou vazbou, kromě této vazby se v bílkovinách vyskytují i jiné vazby, jako je disulfidová, amidová a esterová. Pořadí a počet aminokyselinových zbytků v řetězci je pro každou bílkovinu specifické a je to dáno genovou výbavou buněk [47].

Obilná zrna obsahují všechny esenciální aminokyseliny a navíc obsahují i cystein, tyrozin, histidin a arginin. Největší podíl aminokyselin je v endospermu a jsou tvořeny převážně kyselinou glutamovou a prolinem, naopak nízký obsah je lyzinu, metioninu a tryptofanu. Vysoký obsah lyzinu je charakteristický pro oves a rýži, kukuřice je nejhudší na obsah tryptofanu. Biologická hodnota cereálních bílkovin leží mezi 50 a 60. Obecně lze říci, že příznivější složení aminokyselin z hlediska biologické hodnoty je v klíčku a v aleuronové vrstvě, zatímco endosperm obsahuje více bílkovin, ale tyto bílkoviny mají nižší biologickou hodnotu [37]. Biologická hodnota bílkovin je definována jako procentuální podíl absorbovaného dusíku, který je uchován v těle. Pro určení biologické hodnoty jednotlivých potravin se bere jako standard vaječná bílkovina, u které se biologická hodnota rovná 100 [48].

Obsah aminokyselin v cereáliích je uveden v příloze VI.

Bílkoviny přítomné v pšenici lze rozdělit do čtyř Osbornových frakcí a to na albuminy (rozpustné ve vodě), globuliny (rozpustné v roztocích solí, nerozpustné ve vodě), gliadiny (rozpustné v 70 – 90% alkoholu) a gluteniny (nerozpustné v neutrálním vodném roztoku, fyziologickém roztoku nebo alkoholu). Tyto frakce se nacházejí v podstatě ve všech obilovinách a jsou obecně nazývány jako albuminy, globuliny, prolamininy a gluteliny. Nejvíce prostudovanou frakcí je prolaminová frakce, která je u pšenice nazývána jako gliadin, u žita je nazývána jako sekalin, hordein v ječmeni, avenin u ovesa a zein u kukuřice [45].

Největší význam mají bílkoviny pšenice, které mají schopnost tvořit pružný gel tzv. lepek. Lepek je tvořen gliadinem a gluteninem, což jsou bílkoviny nerozpustné ve vodě. Gliadin je nositelem tažnosti lepku a gluteninová frakce představuje asi 40 % z celkových bílkovin a je nositelem pružnosti a bobtnavosti lepku. Lepek tvoří konstituci těsta tím, že vytvoří trojrozměrnou síť peptidových řetězců, které jsou propojeny různými můstky a vazbami

(nejdůležitější jsou disulfidické můstky mezi aminokyselinami). Při teplotě 60 °C začíná lepek denaturovat a při záhřevu nad 70 °C dojde ke snížení rozpustnosti všech lepkových frakcí. Kromě gliadinu a gluteninu lepek obsahuje i vlákninu, škrob, sacharidy a kyselinu fosforečnou a další minerálie [43, 44].

3.3.3 Lipidy

Nejvíce tuků je obsaženo v klíčku a v aleuronové vrstvě. U pšenice a žita je 65 - 78 % celkového tuku tvořeno nepolárními lipidy, 7 – 13 % je tvořeno galaktolipidy a 15 – 26 % je tvořeno fosfolipidy. Převážný podíl nepolárních tuků tvoří nenasycené mastné kyseliny, ze kterých je z 55 % obsažena kyselina linolová, dále jsou přítomny kyseliny linolenová, olejová a palmitová. U ovsa tvoří asi 1/3 tuků polární tuky a to 8 – 17 % glykolipidy a 10 - 20 % fosfolipidy. U kukuřice převažují triacylglyceroly. Z lipofilních barviv se v obilovinách vyskytují karotenoidy a žlutá a oranžová barviva, ze kterých je nejvýznamnější xantofyl přítomný v pšenici [43, 44, 45].

3.3.4 Vitaminy a minerální látky

Vysoký obsah vitaminů je v obalových vrstvách a klíčku, hlavně ve štítku a v aleuronové vrstvě, endosperm obilovin je na vitaminy chudý. V obalových vrstvách většiny obilovin a v klíčku se nachází tiamin a riboflavin, při skladování a technologickém zpracování jsou ztráty riboflavinu nižší než je tomu v případě tiaminu. Kyselina nikotinová a nikotinamid se ve větším množství nachází v zrnech pšenice a ječmene. Kyselina pantotenová je obsažena v okrajových částech zrna. Pyridoxin je obsažen v aleuronové vrstvě a ve štítku. Vitamin E se ve větším množství nachází v pšeničných klíčkách, vitamin A se nachází v klíčku a v aleuronové vrstvě ve formě β -karotenu [43, 44].

Minerální látky se nachází převážně v klíčku a v obalových vrstvách a v případě pluchatých obilovin je jejich obsah vyšší než u bezpluchých obilovin. Největší podíl minerálních látek tvoří oxid fosforečný, dále jsou přítomny hořčík, draslík, vápník a železo [43].

3.3.5 Biologicky významné látky

Obiloviny obsahují i některé další složky, ovšem pouze v minoritním množství. Velmi významná je přítomnost kyseliny fytové, která je přítomná ve formě rozpustných solí, tzv. fytátů, převážně v obalových vrstvách. Kyselina fytová má schopnost vázat na 1 svou

molekulu až 6 atomů vápníku, hořčíku nebo železa, tyto sloučeniny nejsou v lidském těle dále rozložitelné. Další významnou minoritní složkou obilovin je cholin, který má velký význam pro nervomotorickou činnost a je obsažen rovnoměrně ve všech částech obilného zrna. Jako poslední bych zmínila kyselinu *p*-aminobenzoovou, která je významným růstovým faktorem a je nejvíce obsažena v obalových vrstvách [42].

3.4 Zástupci obilovin

Mezi obiloviny se řadí pšenice, ječmen setý, žito, oves setý, kukuřice, rýže a mnoho dalších. Teoretická část se dále věnuje jen obilovinám analyzovaným v této práci.

3.4.1 Pšenice

Pšenice je hlavní obilovinou, která je v dnešní době pěstována a konzumována. Hned po ní následuje rýže a kukuřice. Počátky pěstování pšenice jsou známé už několik tisíc let a dnes se pěstuje na všech kontinentech kromě Antarktidy [49]. Pšenice se pěstuje asi na 17 % obdělávatelné půdy, což je asi 200 milionů hektarů půdy. Pšenice je jedním z nejvýznamnějších zdrojů energie a bílkovin v lidské stravě. Je také zdrojem esenciálních vitaminů a minerálních látek jako jsou vitaminy skupiny B, vitamin E, hořčík a fosfor. Je také jedinou obilovinou, která produkuje gluten, který je důležitý při výrobě chleba a dalších produktů z cereálií [50].

Pšenici je možné rozdělit do tří skupin, které jsou navzájem odlišné počtem chromozomů. Nejstarší skupinou je diploidní pšenice se 14 chromozomy a patří sem například druh pšenice einkorn, který byl pěstován ve starověkém Egyptě. Běžnější skupinou je tetraploidní pšenice s 28 chromozomy a patří sem pšenice která je prodávána pod značkou kamut. Nejběžnější skupinou je pšenice hexaploidní se 42 chromozomy a zahrnuje se sem například pšenice špalda [51].

Mezi tzv. chlebové pšenice, které tvoří 90 % celkové světové produkce, patří pšenice ozimá *Triticum aestivum* a řadí se mezi hexaploidní. Jedná se o nový druh, který byl vyvinutý z tetraploidní pšenice *Triticum turgidum* [52]. Pšenice ozimá je obilovina mírného podnebí. Jedná se o jednoletou trsnatou travu 60 – 150 cm vysokou, listy jsou úzké a dlouhé, květenstvím je klas nebo 2 stlačené klásky, zrno je protáhlé a tupé na obou koncích. Minimální teplota pro klíčení semen pšenice ozimé je v rozmezí 3 – 4 °C a kvést začíná při teplotách nad 14 °C. Vegetační období pšenice ozimé je 280 - 350 dní [54, 55].



Obr. 7: Pšenice ozimá [53]

Další odrůdou pšenice je pšenice špalda *Triticum spelta*. Je to rostlina s mnoha sekundárními stonky, které jsou duté a mohou dorůst do výšky 140 - 170 cm. Listy pšenice špaldy jsou ve srovnání s běžnou pšenicí delší a užší a jsou méně chlupaté nebo vůbec. V mírném podnebí může být zasévána v pozdějším období než běžná pšenice. V Evropě se pšenice špalda zasévá v zimním období, zatímco v Americe a Kanadě se pšenice špalda zasévá v letních měsících [56]. Svým nutričním složením je špalda podobná pšenici tvrdé, díky obsahu glutenu je špalda vhodná pro použití na přípravu těst pro pečení chleba a různých koláčů a pro přípravu snídaňových cereálií [57].

V Německu se nezralá semena pšenice špaldy praží a tato upravená semena se nazývají Grünkern. Jedná se o tradiční specialitu, která se vyrábí ze zelených semen sklizených ve stupni mléčné zralosti, kdy má semeno asi 40% vlhkost. Po sklizni se semena suší při teplotě 110 – 160 °C, což dodá semenům bukovou vůni a semena si zachovávají své zelené zbarvení. Takto upravené semena se používají jako speciální přísada při pečení chleba nebo do polévek, nebo jako kávová náhražka [56, 57].

Dalším výrobkem z pšenice špaldy je špaldové kernotto. Jedná se o velké kroupy. Tento výrobek vzniká šetrným obroušením tvrdých obalových vrstev špaldových zrn a proto není nutné kernotto před vařením namáčet. Po uvaření špaldové kernotto připomíná ječné kroupy. Jedná se o výrobek, který vyniká chuťovými vlastnostmi, vysokou nutriční hodnotou a rychlou přípravou nahrazuje zcela rýži. Výhodou kernotta je také krátká doba přípravy [58].



Obr. 8: Grünkern [59]

3.4.2 Kamut

Jako kamut se na dnešním trhu prodává pšenice značky Khorasan. Kamut, latinsky *Triticum turgidum* subs. *polonicum*, je biologickou příbuznou pšenice tvrdé a byla objevena již před 6000 lety v oblasti řeky Nilu. Pšenice Kamut roste přirozeně, bez použití kříženců nebo genetických modifikací a má vysokou kvalitu. Je vyhledávanou obilovinou zejména pro přirozeně sladkou a ořechovou chuť. Kamut patří mezi obiloviny s vysokými výživovými vlastnostmi a vyznačuje se tím, že je výborným energetickým zdrojem. Ve srovnání s ostatními pšenicemi obsahuje až o 40 % více bílkovin a o 27 % více tuků a o 30 – 35 % více minerálních látek, zejména selen, hořčík a zinek. Velikost zrna je 2x větší než velikost pšeničného. Mezinárodní výzkum pro potravinové alergie dokonce uvedl, že Kamut je výbornou náhražkou pšenice pro obyvatele, kteří jsou citliví na výrobky z pšenice. V současné době probíhají studie na hypoalergenicitu, stravitelnost a antioxidační kapacitu kamutu [51, 60, 61].



Obr. 9: Pšenice Kamut [62]

3.5 Biopotraviny

Podle zákona 242/2000 Sb. O ekologickém zemědělství je biopotravinou potravina, která je vyrobena za podmínek uvedených v tomto zákoně a v předpisech Evropských společenství (Nařízení komise ES č.2342/1999, článek 14, odstavec 1 písmeno b) a která splňuje požadavky na jakost a zdravotní nezávadnost stanovené zvláštními právními předpisy. Bioproduktem je podle tohoto zákona surovina rostlinného nebo živočišného původu nebo hospodářské zvíře získané v ekologickém zemědělství podle předpisů Evropských společenství (Nařízení ES 2092/1991, článek 1, odstavec 1, písmeno a) [63].

Od klasických potravin se biopotraviny liší tím, že neobsahují chemická aditiva, konzervanty, stabilizátory, umělá barviva apod. Je prokázáno, že biopotraviny mají lepší výživovou hodnotu (mají vyšší obsah vitaminů, zejména vitaminů C a E, a vyšší obsah minerálních látek). Ekologicky vypěstovaná zelenina má nižší obsah dusičnanů až o 50 % a nižší obsah pesticidů o více než 90 % v porovnání s běžnou zeleninou. Sortiment českých biopotravin je poměrně široký a zahrnuje výrobky jako je mléko a mléčné výrobky (převážně jogurty, sýry, tvarohy), dále pečivo, čaje, koření, mouku, těstoviny, dětskou výživu, vejce, vepřové a hovězí maso, ovoce, zeleninu, sušené ovoce, víno a další výrobky. Některé biopotraviny nejsou českými výrobci biopotravin produkovány vůbec a dovážejí se k nám ze zahraničí, např. oleje [64].

Bioprodukty a biopotraviny se značí v souladu s předpisy Evropských společenství, včetně kódu pověřené osoby, se kterou osoba podnikající v ekologickém zemědělství uzavřela smlouvu o kontrole a osvědčování, a která provedla poslední kontrolu. Bioprodukty a biopotraviny se na obale označí také grafickým znakem. Kontrolu výrobce potravin provádí osoba pověřená Ministerstvem zemědělství [63].

Biopotraviny vyrobené a balené v zemích Evropské unie a biopotraviny dovážené do Evropské unie budou od 1. července 2010 povinně označovány logem s motivem listu s evropskými hvězdami na zeleném pozadí. Jedná se o velmi jednoduchý symbol obsahující dva jasné prvky, jimiž jsou příroda a Evropa [65].



Obr. 10: Evropské logo pro biopotraviny [65]

4 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

4.1 Chromatografie a její rozdělení

Všechny formy chromatografických technik je možné definovat jako diferencovaný migrační proces, ve kterém jsou molekuly složek vzorku selektivně zpomalované stacionární fází, pro všechny chromatografické metody je dále společné to, že existuje fázové rozhraní mezi látkou na které probíhá rozdělování (stacionární fáze), a eluentem, který unáší separovaný vzorek tak, aby obtékal stacionární fázi. Dalším společným znakem je to, že při obtékání stacionární fáze mobilní fází nastává interakce molekul separované látky s oběma fázemi [66]. Vzorek se vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, umístí se na začátek stacionární fáze, která je nepohyblivá a pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek unášen přes celou soustavu. Složky vzorku mohou být stacionární fází zadržovány, tím se jednotlivé složky vzorku od sebe separují a na konec stacionární fáze se dříve dostávají složky, které jsou zadržované méně [67].

Chromatografické metody se dělí podle několika hledisek [67]:

- Podle skupenství mobilní fáze
 - plynová chromatografie (GC, Gas Chromatography) - mobilní fází je plyn,
 - kapalinová chromatografie (LC, Liquid Chromatography) – mobilní fáze je kapalina.
- Podle uspořádání stacionární fáze
 - kolonová chromatografie – stacionární fáze je umístěna v koloně (trubicí),
 - papírová chromatografie (PC, Paper Chromatography) – stacionární fáze je součástí chromatografického papíru,
 - tenkovrstvá chromatografie (TLC, Thin Layer Chromatography) – stacionární fáze je umístěna na pevném plochém podkladu, např. na skleněné desce.
- Podle děje, který převládá při separaci
 - rozdělovací chromatografie – o separaci rozhoduje odlišná rozpustnost složek vzorku ve stacionární fázi a mobilní fázi,

- adsorpční chromatografie – pro separaci je rozhodující různá schopnost složek adsorbovat se na povrch stacionární fáze,
- iontově-výměnná chromatografie – o separaci rozhodují odlišné elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze a ionty vzorku,
- gelová chromatografie – složky se separují podle velikosti na stacionární fázi, která je pórovitá,
- afinitní chromatografie – stacionární fáze je schopna vázat ze vzorku určité složky, ke kterým má úzký selektivní vztah nebo-li afinitu.

4.2 HPLC

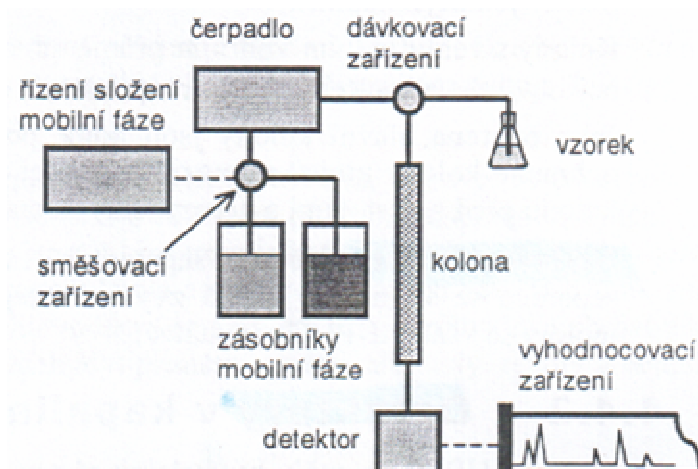
HPLC (High Performance Liquid Chromatography, Vysoce účinná kapalinová chromatografie) je jedna z několika chromatografických metod užívaná pro separaci a analýzu chemických směsí. V porovnání s ostatními separačními metodami je HPLC výjimečná z několika hledisek, např. má téměř univerzální použitelnost, přesnost této metody je $\pm 0,5\%$ (v mnoha případech i vyšší) apod. [68]. Výhodou HPLC je také to, že umožňuje separovat termolabilní kapalné a tuhé látky, další výhodou je to, že použití HPLC není vázané na plyny a látky, které lze bez chemické změny odpařit [66].

Podle složení stacionární a mobilní fáze se v HPLC rozlišuje režim normální fáze nebo režim reverzní (obrácené) fáze. V režimu normální fáze je stacionární fáze obvykle polární sorbent jako je oxid křemičitý nebo oxid uhličitý a mobilní fáze je složena z nepolární složky, např. hexanu. V režimu reverzní fáze je stacionární fáze složena ze sorbentu, který má nepolární charakter a mobilní fáze je složena z primárního polárního rozpouštědla, kterým je obvykle voda a toto rozpouštědlo může být modifikováno nepolárními složkami jako je metanol nebo acetonitril [70].

Podle složení mobilní fáze v průběhu separace se rozlišuje izokratická eluce (mobilní fáze se během separace nemění) a gradientová eluce (mobilní fáze se během separace mění) [67].

Chromatograf HPLC se skládá z částí, které zabezpečují transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci látek a jejich detekci. Kapalinový chromatograf může mít řadu různých

obměn, ale vždy musí obsahovat zásobník mobilní fáze, čerpadlo, dávkovací zařízení, kolonu a detektor [67, 69].



Obr. 11: Schéma kapalinového chromatografu [67]

4.2.1 Čerpadlo

Funkcí čerpadel je vytlačení mobilní fáze ze zásobníku do kolony a to buď pístem nebo membránou. Čerpadla se dělí do dvou skupin podle toho zda pracují při konstantním tlaku nebo při konstantním průtoku [69].

4.2.2 Dávkovací zařízení

Nástřik přesného objemu vzorku na kolonu musí proběhnout co nejrychleji, aby se co nejméně narušil dynamický režim mobilní fáze, jejíž tok musí být z kolony na detektor stabilní. Toho se dosáhne použitím speciálního vysokotlakého ventilu. Tento ventil funguje ve dvou polohách, a to v poloze load (zavádění) a v poloze inject (nástřik). Vzorky obsažené v roztoku se za atmosférického tlaku zavádí pomocí injekční stříkačky do tzv. smyčky. Každá smyčka má přesně definovaný objem. V poloze inject je vzorek, který je už přítomen ve smyčce, vložen do proudu mobilní fáze a probíhá analýza vzorku [73]. Pro dávkování vzorku je použito injekční zařízení, které může být ovládáno ručně nebo automaticky [67].



Obr. 12: Dávkovací zařízení [72]

4.2.3 Kolona

Většina kolon pro HPLC je vyrobena z nerezové oceli, která je odolná vůči tlakům používaným v HPLC a je také relativně inertní vůči chemické korozi. Pro analýzu pomocí HPLC se mohou využívat také ocelové kolony, které jsou obaleny sklem. Další typ kolon je vyroben z tantalu, jedná se o kolony, které jsou méně náchylné ke korozi než ocel, ale jejich využití je omezeno tím, že jsou velmi finančně nákladné. Zvláštním typem kolon jsou polyetylenové kolony, které jsou stlačené hydraulickou kapalinou a jsou uzavřené ve speciálním obalu [71].

Pro analytické účely se využívají kolony o průměru 2 – 5 mm. Pokud jsou mikročástice stacionární fáze 5 μm a menší používají se kolony o délce 5, 10, 15 a 25 cm. Delší kolony zvyšují retenční objem. Kolony jsou uzavřené ocelovými fritami s menší velikostí pórů než je průměr částic v koloně. Standardní velikost pórů je 20 μm , ale k dostání jsou i frity o průměru pórů 3,5 μm nebo jemnější frity o průměru 0,5 μm . Pokud dojde k ucpání frity, je nejlepší ji vyměnit nebo ji lze vyčistit pomocí ultrazvuku [71].

Jako ochrana hlavní kolony slouží předkolony, které jsou umístěny mezi čerpadlo a dávkovací zařízení, nebo jsou umístěné mezi dávkovacím zařízením a kolonou. Předkolony chrání kolonu před nečistotami a nerozpustnými materiály [67].



Obr. 13: Kolony pro HPLC [72]

4.2.4 Detektory

Mezi detektory používané v HPLC lze řadit např. spektrofotometrický (UV–VIS) detektor, fluorescenční, elektrochemický, refraktometrický, hmotnostní spektrometr a další.

Detektory jsou konstrukční části měřících zařízení, ve kterých je fyzikálně chemická vlastnost analytu převedena na měřitelný signál. Detektor by měl mít malý vnitřní objem, signál detektoru by měl být stabilní a reprodukovatelný, dále by měl být lineárně závislý na koncentraci vzorku, citlivost by měla být co největší a mez detekce co nejnižší. Signál by měl mít co nejmenší šum [74].

Vzhledem k tomu, že pro měření praktické části této práce byl použit spektrofotometrický detektor, tak se teoretická část zabývá dále pouze tímto detektorem.

K nejpoužívanějším detektorům v HPLC patří spektrofotometrické detektory, protože jsou poměrně jednoduché, spolehlivé, lze jimi detekovat velký počet látek a jsou kompatibilní s gradientovou elucí. Dalším požadavkem je nízká absorbance mobilní fáze při použité vlnové délce. Největší využití mají dvoupaprskové spektrofotometry s průtokovou detekční celou. Pro zachování potřebné citlivosti detekce musí být cela dostatečně malá při dostatečně dlouhé optické dráze. Složitější systém představují rychlé skenovací spektrofotometrické detektory, které opakovaně zaznamenávají celá spektra během toho,

co látka prochází kyvetou. Získají se tak trojrozměrné chromatogramy, které zaznamenají retenční čas, absorbanční a vlnovou délku [74].



Obr. 14: Chromatograf HPLC na kterém byla provedena analýza

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 METODIKA

5.1 Materiál

Pšenice ozimá - PRO-BIO, s.r.o, Staré Město pod Sněžníkem, země původu ČR

Špalda loupaná - PRO-BIO, s.r.o, Staré Město pod Sněžníkem, země původu ČR

Špaldové kernotto - PRO-BIO, s.r.o, Staré Město pod Sněžníkem, země původu ČR

Grünkern - PRO-BIO, s.r.o, Staré Město pod Sněžníkem, země původu ČR

Kamut - PRO-BIO, s.r.o, Staré Město pod Sněžníkem, země původu ČR

5.2 Použité pomůcky a přístroje

Standardní laboratorní vybavení:

- předvážky (Kern, SRN)
- analytické váhy (Adam, AFA – 210 LC)
- temperovaná vodní lázeň (Memmert, SRN)
- pH metr (Hanna instruments, pH 211, Microprocesor pH metr)
- míchadlo (Heidolph instruments, MR 1000)
- mineralizátor (Bloc Digest 12)
- destilační aparatura Parnas-Wagner
- topné hnízdo (LTHS 2000)
- titrátor (Titronic Basic, Schott instruments)
- dávkovací stříkačka (Hamilton, USA)
- mikrofiltry 0,45 µm, NYLON (Supelco, USA)
- běžné laboratorní sklo a vybavení

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 o objemu 20 μ l)
- kolona SUPELCOSIL - LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5 μ m, Supelco, USA)
- PC s vyhodnocovacím programem ChemStation – Instrument 1 (Agilent, USA)

5.3 Použité chemikálie

- redestilovaná voda
- standard tiaminu hydrochloridu (Supelco, USA)
- standard riboflavinu (Supelco, USA)
- standard kyseliny nikotinové (Supelco, USA)
- standard kyseliny pantotenové (Supelco, USA)
- standard pyridoxinu (Sigma-Aldrich, Německo)
- metanol pro HPLC, gradient grade (Lab - Scan)
- isopropylalkohol (dodavatel - Lukeš, Uherský Brod)
- kyselina chlorovodíková 37% (dodavatel - Lukeš, Uherský Brod)
- octan sodný krystalický (dodavatel - Lukeš, Uherský Brod)
- kyselina mravenčí 85% (dodavatel - Švec, Penta Chrudim)
- dihydrogenfosforečnan draselný (dodavatel - Švec, Penta Chrudim)
- hydroxid sodný (dodavatel - Švec, Penta Chrudim)
- kyselina sírová 95% (dodavatel - Lukeš, Uherský Brod)
- peroxid vodíku 30% (dodavatel - Švec, Penta Chrudim)
- kyselina boritá (dodavatel – Lach-Ner, s.r.o, Neratovice)
- indikátor Tashiro

5.4 Použité enzymy

- *Pancreatin* (Sigma Life science, USA) – směs trávicích enzymů slinivky břišní složená z *amylázy*, *lipázy* a *proteázy*

- *Clara*-diastáza z *Aspergillus oryzae* (Fluka analytical) – směs enzymů α -amylázy, celulózy, invertázy, peptidázy, fosfatázy a sulfatázy.

5.5 Optimalizace izolačního postupu

Pro izolaci vitaminů skupiny B byla volena kyselá a enzymatická hydrolýza.

5.5.1 Izolace vitaminů skupiny B kyselou cestou

Pro kyselou hydrolýzu byla volena navážka vzorku 10 g s přesností na 0,0001g. Extrakce byla provedena pomocí 50 ml 0,1 mol.dm⁻³ HCl, 50 ml 0,2 mol.dm⁻³ HCl, dále pomocí octanu sodného o pH 4,8 a pomocí 50 ml dihydrogenfosforečnanu draselného o pH 5,5. Extrakce byla prováděna v třepací vodní lázni při teplotě 35 °C po dobu 2 a 3 hodin. Poté byla provedena filtrace přes papírový filtr a před nástřikem na kolonu byl použit filtr Nylon 0,45 µm používaný při chromatografii (Příloha VII.).

Dále byla provedena extrakce 50 ml 0,1 mol.dm⁻³ HCl a 50 ml octanu sodného o pH 4,8, doba hydrolýzy byla tentokrát volena 1 a 2 hodiny při teplotě vodní lázně 35 °C, za stálého třepání. Z důvodu lepší extrakce vitaminů skupiny B byla pro pozdější analýzu volena kyselá hydrolýza pomocí 0,1 mol.dm⁻³ HCl, kdy byla provedena hydrolýza při 35 °C a doba hydrolýzy byla 1, 2, 3 a 4 hodiny a dále byla provedena extrakce pomocí 0,1 mol.dm⁻³ HCl při teplotě vodní lázně 95 °C a extrakce trvala 1 hodinu. Poté byla provedena filtrace přes papírový a nylonový filtr 0,45 µm používaný při chromatografii. Veškeré měření bylo prováděno v odměrných baňkách, které byly obaleny hliníkovou fólií.

5.5.2 Izolace vitaminů skupiny B pomocí enzymů

Pro enzymatickou hydrolýzu byla zvolena navážka vzorku 2,5 g s přesností na 0,0001 g. Jednotlivé hydrolýzy byly provedeny pomocí 50 ml *clara*-diastázy o koncentraci 20 mg.ml⁻¹ o pH 6, dále pomocí enzymu *pancreatinu* o pH 7,5 a koncentraci 20 mg.ml⁻¹ a dále byla provedena hydrolýza pomocí směsi enzymů *clara*-diastasy a *pancreatinu* o pH 6,75 a koncentraci 20 mg.ml⁻¹. Všechny tyto hydrolýzy byly provedeny při teplotě vodní lázně 35 °C po dobu 18 a 20 hodin za neustálého třepání. Poté byla provedena filtrace přes papírový a nylonový filtr 0,45 µm používaný při chromatografii. Veškeré měření bylo prováděno v odměrných baňkách, které byly obaleny hliníkovou fólií (Příloha VIII.).

5.5.3 Pilotní chromatografická analýza vzorků

Po zfiltrování byl vzorek dávkován alikvotním podílem 20 μl do HPLC. Měření vzorků probíhalo izokratickou i gradientovou elucí. V případě izokratické eluce byla použita mobilní fáze složená z 0,1 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ dihydrogenfosforečnanu draselného o pH 7 (později bylo voleno pH 5,5) a metanolu v poměru 80 : 20. Při gradientové eluci byla použita mobilní fáze, která byla složena z 0,12 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ octanu sodného o pH 4,8, které bylo upraveno 85% kyselinou mravenčí a z metanolu. V obou případech byl průtok mobilní fáze 0,8 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a teplota termostatu kolony 30 °C. Signál byl snímán detektorem UV při vlnových délkách 220, 230, 254 a 270 nm. Doba analýzy byla 30 minut.

5.5.4 Pilotní chromatografická analýza standardů vitaminů skupiny B

Pro zjištění retenčních časů vitaminů a zjištění nejvhodnější absorbance vitaminů B₁, B₂, B₃, B₅ a B₆ bylo provedeno měření standardů jednotlivých vitaminů za stejných chromatografických podmínek jako je uvedeno v kapitole 5.5.3.

5.6 Modelace konečné chromatografické analýzy vzorků obilovin

Pro extrakci kyselou hydrolyzou byla zvolena navážka 10 g s přesností na 0,0001 g. Pro hydrolyzu byla použita 0,1 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ kyselina chlorovodíková, extrakce byla provedena v třepací vodní lázni při 35 °C po dobu 3 hodin. Poté byla provedena filtrace přes papírový filtr a před nástřikem na kolonu byl použit filtr Nylon 0,45 μm používaný při chromatografii. Měření bylo prováděno v odměrných baňkách, které byly obaleny hliníkovou fólií.

V případě enzymatické hydrolyzy byla použita navážka vzorku 2,5 g s přesností na 0,0001 g. Byla provedena hydrolyza pomocí 50 ml enzymu *clara-diastry* o koncentraci 20 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ o pH 6 po dobu 20 hodin a při neustálém třepání ve vodní lázni o teplotě 35 °C. Po proběhlé hydrolyze byly vzorky filtrovány přes papírový filtr a před nástřikem na kolonu byl použit filtr Nylon 0,45 μm používaný při chromatografii.

Zfiltrovaný vzorek byl dávkován alikvotním podílem 20 μl do HPLC. Analýza byla provedena na koloně SUPELCOSIL LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5 μm). Byla použita gradientová eluce mobilní fáze, která byla složena z 0,12 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ octanu sodného o pH 4,8 (pH bylo upraveno 85% kyselinou mravenčí) a z metanolu. Průtok mobilní fáze byl

0,8 ml.min⁻¹ a teplota termostatu kolony 30 °C. Signál byl snímán detektorem UV při vlnových délkách 220, 230, 254 a 270 nm.

Tabulka 7: Gradient mobilní fáze

Minuta	Poměr octan sodný : metanol
0	87 : 13
3	87 : 13
15	0:100
30	0:100

5.7 Měření kalibrační křivky

Z důvodu poruchy chromatografu HPLC byla změřena kalibrace pouze pro vitamin B₂.

Na měření kalibrační křivky se použil standard riboflavinu, ze kterého byl připraven zásobní roztok o koncentraci 20 µg.ml⁻¹. Ze zásobního roztoku byly dále připraveny roztoky o koncentracích 4, 6, 8, 10 a 12 µg.ml⁻¹. Měření kalibrační křivky proběhlo za stejných chromatografických podmínek jako je uvedeno v kapitole 5.6.

5.8 Stanovení obsahu dusíku a hrubé bílkoviny v obilovinách

Pro stanovení obsahu dusíku a obsahu hrubé bílkoviny v obilovinách byla použita klasická metoda podle Kjeldahla.

Pro analýzu byla zvolena navážka vzorku 0,25 g s přesností na 0,0001 g. Byla provedena mineralizace jednotlivých vzorků obilovin pomocí 5 ml 95% kyseliny sírové a pomocí 30% peroxidu vodíku. Mineralizace vzorku byla prováděna při 400 °C a probíhala až do vyčerení jednotlivých vzorků. Po proběhlé mineralizaci byly vzorky ochlazeny a kvantitavně převedeny do 50 ml odměrné baňky a byly doplněny destilovanou vodou do objemu 50 ml. Během mineralizace se dusík, který je přítomný ve vzorku, mění na síran amonný.

Poté byla provedena destilace vzorku pomocí Parnas-Wagnerova přístroje (Příloha IX.), během destilace se síran amonný uvolňuje pomocí hydroxidu sodného za varu na amoniak a je jímán v roztoku kyseliny borité. Pro provedení destilace bylo pipetováno 10 ml vzorku, ke kterému bylo přidáno 20 ml 30% NaOH. Celá destilace trvala 15 minut od začátku varu, během destilace byl vzniklý amoniak jímán do 50 ml 2% kyseliny borité.

Obsah přítomného dusíku byl po ukončení destilace stanoven titračně pomocí $0,025 \text{ mol.dm}^{-3}$ kyseliny sírové na indikátor Tashiro. Ze zjištěného obsahu dusíku byl pomocí přepočítávacího faktoru 5,7 určen obsah hrubé bílkoviny ve vzorcích jednotlivých obilovin.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Vyhodnocení výsledků chromatografické analýzy vitaminů skupiny B

6.1.1 Kvalitativní stanovení vitaminů skupiny B chromatografickou analýzou

Pro kvalitativní stanovení vybraných vitaminů skupiny B byla zvolena kyselá a enzymatická extrakce vzorku.

Optimalizace izolačního postupu v případě kyselé hydrolyzy je popsán v kap. 5.5.1. V počátečních měřeních bylo z důvodu nadměrného zakalení vzorku pro další analýzu vyloučeno použití $0,2 \text{ mol.dm}^{-3}$ HCl a použití dihydrogenfosforečnanu draselného. V dalších analýzách byla z důvodu lepší extrakce vitaminů skupiny B volena kyselá hydrolyza pomocí $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ HCl, kdy byla jako nejlepší hydrolyza pro extrakci vitaminů skupiny B ze vzorku pšenice ozimé zvolena hydrolyza 50 ml $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ HCl při teplotě vodní lázně $35 \text{ }^\circ\text{C}$ s dobou hydrolyzy 3 hodiny. Při zvoleném způsobu extrakce se ze vzorku podařilo kvalitativně prokázat pomocí chromatografické analýzy, která je popsána v kap. 5.6, přítomnost vitaminů B₂ a B₆ při vlnové délce 270 nm a při vlnové délce 254 nm byla prokázána přítomnost vitamínu B₃ a B₆. Ostatní vlnové délky byly pro stanovení těchto vitaminů nevhodné. Kvantitativní stanovení vitamínu B₂ je uvedeno dále v kap. 6.1.3 a 6.1.4. Vitaminy B₃ a B₆ nebylo z technických důvodů možné kvantitativně prokázat.

Optimalizace izolačního postupu pro enzymatickou hydrolyzu vzorků je popsána v kap. 5.5.2. Z důvodu silného zakalení vzorku byla pro další analýzy vyloučena hydrolyza pomocí směsí enzymů *clara-diastry* a *pancreatinu*, při dalších analýzách bylo také vyloučeno použití enzymu *pancreatinu* vzhledem k tomu, že při použití této extrakce bylo kvalitativně prokázáno (z naměřeného chromatogramu) méně přítomných píků vitaminů skupiny B než tomu bylo v případě enzymu *clara-diastry*. Chromatografická analýza pomocí enzymatické hydrolyzy je popsána v kap. 5.6 a podařilo se při ní prokázat přítomnost píků vitaminů B₂, B₃ a B₆ při vlnové délce 270 nm. Při vlnové délce 254 nm byla prokázána přítomnost vitamínu B₃ a B₆. Ostatní vlnové délky byly pro stanovení těchto vitaminů nevhodné. Kvantitativní stanovení vitamínu B₂ je uvedeno dále

v kap. 6.1.3 a 6.1.4. Vitaminy B₃ a B₆ nebylo z technických důvodů možné kvantitativně prokázat. Pro další měření bych doporučila v případě vitamínu B₃ a B₆ volit analýzu s použitím kyselé i enzymatické hydrolyzy a chromatografické měření bych doporučila dělat s použitím vlnových délek 270 a 254 nm.

Přítomnost vitamínu B₁ se nepodařilo prokázat v žádné použité hydrolyze ani při použití mobilní fáze ve složení dihydrogenfosforečnan draselný a metanol, tudíž lze říci že zvolené extrakce nebyly vhodné pro izolaci tohoto vitamínu. Pro další případné měření bych tedy v případě tohoto vitamínu doporučila vyzkoušet jiný způsob extrakce vzorku, jelikož cereálie by měly obsahovat významné množství tiaminu nebo použít jinou mobilní fázi či kolonu. Jako jednu z možných alternativ bych doporučovala metodu s použitím navážky vzorku 2,5 g, kdy se vzorek naváží do 100 ml odměrné baňky společně s 23,5 ml 0,05 mol.dm⁻³ octanu sodného o pH 4,5 a baňka se umístí na 10 minut do třepací vodní lázně o teplotě 100 °C. Po ochlazení se do baňky přidá 500 µl kyselá fosfatázy (20mg.ml⁻¹), papainu (100 mg.ml⁻¹), α-amylázy (10 mg.ml⁻¹), β-glukosidázy (20 mg.ml⁻¹), dále 1,25 ml 1 mol.dm⁻³ kyseliny glyoxylové, 200 µl 2% roztoku síranu železnatého a 250 µl 1% glutationu. Připravený roztok se nechá inkubovat 18 hodin v třepací vodní lázni při teplotě 37 °C, poté se zředí 50 ml destilované vody a provede se centrifugace vzorku při 5000 otáčkách po dobu 10 minut. Dále se pro izolaci tiaminu odpipetuje 4 ml připraveného vzorku, přidají se k němu 3 ml 1% roztoku kyanoželezitanu draselného v 15% NaOH a po promíchání se nechá 1 minutu odstát. Připravený roztok se poté nechá projet přes cartridge SerPackC18 po úpravě 5 ml destilované vody a 2 ml etanolu. Poté se provede filtrace vzorku a provede se chromatografická analýza na tiochrom. Tato studie uvádí obsah tiaminu v různých odrůdách pšenice v rozmezí 2,59 – 6,13 µg.g⁻¹. Stejnou metodou lze stanovit i riboflavin a pyridoxin, liší se pouze konečné fáze izolace jednotlivých vitaminů [76]. Další možnou metodou je použití 25 ml 0,1 mol.dm⁻³ HCl, která se přidá k 5 – 10 g vzorku. Suspenze se nechá homogenizovat na ultrazvukovém zařízení po dobu 30 sekund a poté se zahřívá ve vodní lázni o teplotě 90 °C po dobu 30 minut. Po ochlazení suspenze se upraví octanem sodným pH na 4 a přidá se 0,1 g *taka-diastázy*. Vzorek je poté udržován 2 hodiny ve vodní lázni na magnetické míchačce, teplota vodní lázně je 50 °C. Poté se přidá 1 ml 50% kyseliny trichloroctové a vzorek se vloží do vodní lázně o teplotě 90 °C po dobu 10 minut. Vzorek se poté ochladí a upraví se pH na 6 pomocí 10 mol.dm⁻³ KOH. Poté se vzorek převede do 50 ml odměrné baňky a provede se centrifugace 6000

otáčkami po dobu 10 minut. Po filtraci vzorku se provede chromatografická analýza vzorku. Tato metoda je vhodná pro stanovení všech vitaminů skupiny B [77].

Pro zjištění retenčních časů jednotlivých vitaminů skupiny B byla provedena chromatografická analýza standardů vitaminů skupiny B, která je popsána v kap. 5.5.4. Z použitých vlnových délek měla nejlepší odezvu vlnová délka 270 nm, kdy retenční čas pro tiamin byl 6,616 minut, pro riboflavin 9,861 minut, kyselina nikotinová měla retenční čas 3,061 minut a v případě pyridoxinu byl retenční čas 3,651 minut. Vitamin B₅ se nepodařilo změřit při žádné vlnové délce a nepodařilo se ho změřit ani při použití mobilní fáze ve složení dihydrogenfosforečnan draselný a metanol.

6.1.2 Vyhodnocení získaných výsledků pro chromatografickou analýzu riboflavinu

Ze získané kalibrační křivky byly do rovnice lineární regrese dosazeny jednotlivé plochy píků a takto byly získány hodnoty koncentrací riboflavinu ve stanovovaném vzorku pšenice ozimé.

Ze získaných koncentrací byl vyhodnocen aritmetický průměr obsahu riboflavinu ve vzorku podle vztahu:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{n}$$

Míra přesnosti získaných výsledků byla vyjádřena směrodatnou odchylkou, která byla vypočítaná podle vztahu:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \left(\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right)}$$

Jelikož je směrodatná odchylka závislá na počtu paralelních výsledků, byl definován Studentův koeficient, kterým násobíme hodnotu směrodatné odchylky. Kritická hodnota Studentova stanovení byla v tomto případě stanovena na $t_\alpha = 2,78$ podle hladiny významnosti $\alpha = 0,05$.

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{t_\alpha * S}{\sqrt{n}}$$

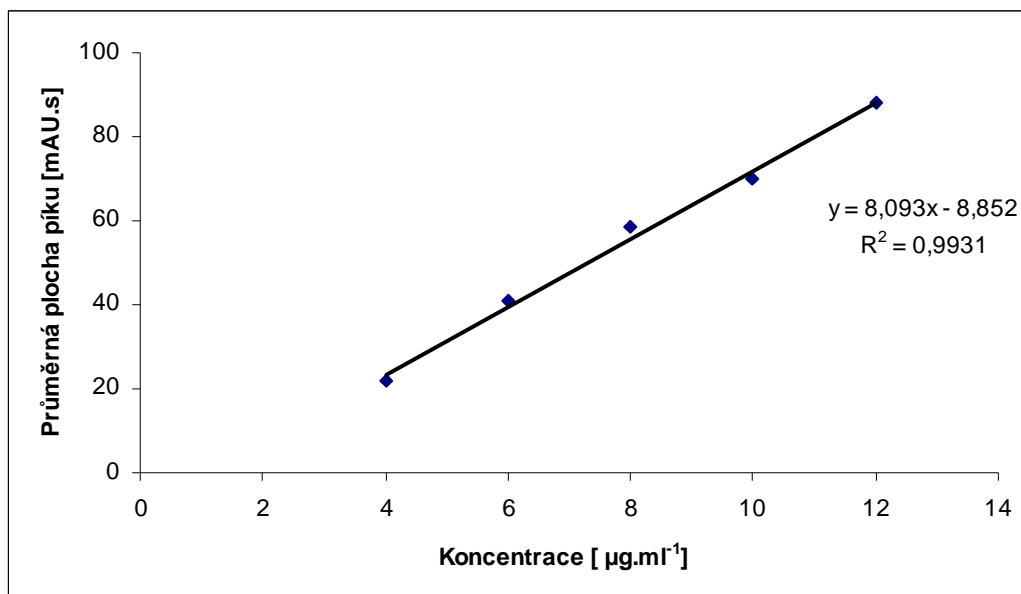
6.1.3 Výsledky měření kalibrace riboflavinu

Velikost plochy píku u jednotlivých koncentrací byla měřena podle postupu v kap. 5.7 a byla vytvořena kalibrační křivka závislosti plochy píku (mAU.s) na koncentraci ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Výsledky kalibrace riboflavinu pro vlnovou délku 270 a 254 nm jsou uvedeny v tabulce 8 a v grafu 1.

Tabulka 8: Kalibrace riboflavinu pro vlnovou délku 270 a 254 nm

Koncentrace riboflavinu [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	270 nm		254 nm	
	Plocha píku [mAU.s]	Průměrná plocha píku [mAU.s]	Plocha píku [mAU.s]	Průměrná plocha píku [mAU.s]
4	27,3	21,70	15,5	13,57
	16,0		12,3	
	21,8		12,9	
6	38,1	41,00	21,7	23,20
	42,8		24,3	
	42,1		23,6	
8	58,9	58,73	33,7	33,43
	58,3		33,2	
	59,0		33,4	
10	72,1	69,80	41,5	39,90
	71,8		41,1	
	65,5		37,1	
12	88,6	88,23	51,2	50,80
	89,6		51,7	
	86,5		49,5	

Chromatogram kalibrační křivky pro vlnovou délku 270 nm je uveden v příloze X. Chromatogram pro stanovení obsahu riboflavinu v pšenici ozimé po extrakci kyselou cestou je uveden v příloze XI. a chromatogram měření obsahu riboflavinu v pšenici ozimé při použití enzymatické hydrolyzy je uveden v příloze XII.



Graf 1: Kalibrační křivka pro vlnovou délku 270 nm

Pro vyhodnocení obsahu riboflavinu v pšenici ozimé byla použita kalibrační křivka pro vlnovou délku 270 nm.

6.1.4 Výsledky měření obsahu riboflavinu v obilovinách

Stanovení obsahu riboflavinu bylo provedeno ve vzorku pšenice ozimé. Postup izolace vzorku je uveden v kapitole 5.6. Získaná plocha píku byla dosazena do rovnice regresivní přímky kalibrační křivky a tak byla zjištěna koncentrace riboflavinu ve vzorku.

Tabulka 9: : Obsah riboflavinu po izolaci kyselou cestou

Plocha píku (mAU.s ⁻¹)	Koncentrace riboflavinu (mg.100g ⁻¹)	Průměrná koncentrace (mg.100g ⁻¹)	Směrodatná odchylka (mg.100g ⁻¹)
46,40	3,41	3,33	0,056
44,22	3,28		
44,84	3,31		

Obsah riboflavinu: $\mu = 3,33 \pm 0,090 \text{ mg.100g}^{-1}$

Tabulka 10: Obsah riboflavinu po hydrolyze enzymem *clara-dia*stázou

Plocha píku (mAU.s ⁻¹)	Koncentrace riboflavinu (mg.100 ⁻¹)	Průměrná koncentrace (mg.100g ⁻¹)	Směrodatná odchylka (mg.100g ⁻¹)
50,03	14,36	14,30	0,059
49,88	14,32		
49,50	14,22		

Obsah riboflavinu: $\mu = 14,30 \pm 0,095 \text{ mg.100g}^{-1}$

Vzhledem k použitým navážkám jednotlivých vzorků při kyselé a enzymatické analýze jsou výsledné koncentrace zjištěného riboflavinu adekvátní. Po extrakci kyselou cestou byla zjištěná koncentrace riboflavinu $3,33 \pm 0,090 \text{ mg.100g}^{-1}$. Při použití hydrolyzy pomocí enzymu *clara-dia*stázy byla koncentrace riboflavinu stanovena na $14,30 \pm 0,095 \text{ mg.100g}^{-1}$ a je tedy vyšší o $10,97 \text{ mg.100g}^{-1}$. Dá se tedy předpokládat, že při použití hydrolyzy pomocí enzymu *clara-dia*stázy byla tato chyba způsobena tím, že hydrolyza nebyla kvantitativní a plochu píku riboflavinu ovlivňovaly jiné látky přítomné ve vzorku či vznikající v průběhu hydrolyzy. Literatura [78] uvádí obsah riboflavinu v pšenici $0,13 \text{ mg.100g}^{-1}$. Námi stanovená koncentrace riboflavinu po kyselé hydrolyze je tedy podstatně vyšší. Lze to vysvětlit tím, že literatura uvádí číslo průměrné pro pšenici, a námi stanovovaná pšenice může obsahovat vyšší obsah riboflavinu. Je třeba brát také v úvahu to, že námi stanovovaný vzorek pšenice ozimé je řazen mezi biopotraviny, které jak známo obsahují větší výživovou hodnotu a tudíž by měly obsahovat, či by mohly obsahovat i vyšší množství vitaminů než potraviny, které nejsou produktem ekologického zemědělství. Naše tvrzení bylo také podloženo metodou standardního přídatku, který ukázal na kvantitu našeho stanovení.

6.2 Stanovení obsahu dusíku a hrubé bílkoviny v cereáliích

Pro stanovení obsahu dusíku a obsahu hrubé bílkoviny v cereáliích byla zvolena metoda podle Kjeldahla. Měření bylo provedeno v pěti různých vzorcích cereálií a to v pšenici ozimé, špaldě loupané, špaldovém kernottu, Grünkernu a v kamutu. Jednotlivé druhy cereálií byly naváženy celkem dvakrát a každá navážka byla proměřena dvakrát. Měření proběhlo podle kap. 5.8.

6.2.1 Vyhodnocení získaných výsledků pro stanovení dusíku a hrubé bílkoviny

Obsah dusíku v jednotlivých vzorcích cereálií byl stanoven z množství spotřebované kyseliny sírové při titraci amoniaku, který vznikl při destilaci vzorku a byl jímán do kyseliny borité.

$$\% \text{ (w/w) N} = \frac{a * 10^{-3} * c * M_N * f_t * f_z * 100}{n}$$

kde: a – spotřeba H₂SO₄ při titraci [ml]

c – koncentrace H₂SO₄ [mol.dm⁻³]

M_N – molární hmotnost dusíku [g.mol⁻¹]

n – navážka vzorku [g]

f_t – titrační faktor (f_t = 2)

f_z – zřed'ovací faktor (f_z = 5)

Obsah hrubé bílkoviny ve vzorcích byl určen z obsahu dusíku pomocí přepočítavacího faktoru, který je v případě cereálií roven číslu 5,7.

Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno podle kap.6.1.2

6.2.2 Stanovení dusíku a hrubé bílkoviny ve vzorku pšenice ozimé

Tabulka 11: Obsah dusíku ve vzorku pšenice ozimé

Navážka vzorku (g)	Spotřeba H ₂ SO ₄ (ml)	Obsah dusíku (% w/w)	Průměrný obsah dusíku (% w/w)	Směrodatná odchylka (% w/w)
0,2586	1,25	1,645	1,593	0,036
	1,22	1,605		
0,2529	1,15	1,547		
	1,17	1,574		

Obsah dusíku: $\mu = 1,593 \pm 0,050$ % w/w

Tabulka 12: : Obsah hrubé bílkoviny ve vzorku pšenice ozimé

Navážka vzorku (g)	Obsah dusíku (% w/w)	Obsah hrubé bílkoviny (% w/w)	Průměrný obsah hrubé bílkoviny (% w/w)	Směrodatná odchylka (% w/w)
0,2586	1,645	9,377	9,079	0,208
	1,605	9,149		
0,2529	1,547	8,818		
	1,574	8,972		

Obsah hrubé bílkoviny: $\mu = 9,079 \pm 0,290$ % w/w

6.2.3 Stanovení dusíku a hrubé bílkoviny ve vzorku špaldy loupané

Tabulka 13: Obsah dusíku ve vzorku špaldy loupané

Navážka vzorku (g)	Spotřeba H ₂ SO ₄ (ml)	Obsah dusíku (% w/w)	Průměrný obsah dusíku (% w/w)	Směrodatná odchylka (% w/w)
0,2531	1,27	1,708	1,778	0,053
	1,30	1,745		
0,2503	1,35	1,835		
	1,34	1,822		

Obsah dusíku: $\mu = 1,778 \pm 0,074$ % w/w

Tabulka 14: Obsah hrubé bílkoviny ve vzorku špaldy loupané

Navážka vzorku (g)	Obsah dusíku (% w/w)	Obsah hrubé bílkoviny (% w/w)	Průměrný obsah hrubé bílkoviny (% w/w)	Směrodatná odchylka (% w/w)
0,2531	1,708	9,736	10,132	0,301
	1,745	9,947		
0,2503	1,835	10,460		
	1,822	10,385		

Obsah hrubé bílkoviny: $\mu = 10,132 \pm 0,301$ % w/w

6.2.4 Stanovení dusíku a hrubé bílkoviny ve vzorku špaldového kernotta

Tabulka 15: Obsah dusíku ve špaldovém kernottu

Navážka vzorku (g)	Spotřeba H ₂ SO ₄ (ml)	Obsah dusíku (% w/w)	Průměrný obsah dusíku (% w/w)	Směrodatná odchylka (% w/w)
0,2517	1,46	1,974	1,919	0,040
	1,43	1,933		
0,2520	1,38	1,864		
	1,41	1,904		

Obsah dusíku: $\mu = 1,919 \pm 0,056$ % w/w

Tabulka 16: Obsah hrubé bílkoviny ve špaldovém kernottu

Navážka vzorku (g)	Obsah dusíku (% w/w)	Obsah hrubé bílkoviny (% w/w)	Průměrný obsah hrubé bílkoviny (% w/w)	Směrodatná odchylka (% w/w)
0,2517	1,974	11,252	10,937	0,229
	1,933	11,018		
0,2520	1,864	10,625		
	1,904	10,853		

Obsah hrubé bílkoviny: $\mu = 10,937 \pm 0,318$ % w/w

6.2.5 Stanovení obsahu dusíku a hrubé bílkoviny ve vzorku Grünkernu

Tabulka 17: Obsah dusíku ve vzorku Grünkernu

Navážka vzorku (g)	Spotřeba H ₂ SO ₄ (ml)	Obsah dusíku (% w/w)	Průměrný obsah dusíku (% w/w)	Směrodatná odchylka (% w/w)
0,2508	1,51	2,049	2,033	0,037
	1,53	2,076		
0,2515	1,46	1,976		
	1,50	2,030		

Obsah dusíku: $\mu = 2,033 \pm 0,037$ % w/w

Tabulka 18: Obsah hrubé bílkoviny ve vzorku Grünkernu

Navážka vzorku (g)	Obsah dusíku (% w/w)	Obsah hrubé bílkoviny (% w/w)	Průměrný obsah hrubé bílkoviny (% w/w)	Směrodatná odchylka (% w/w)
0,2508	2,049	11,679	11,587	0,209
	2,076	11,833		
0,2515	1,976	11,263		
	2,030	11,571		

Obsah hrubé bílkoviny: $\mu = 11,587 \pm 0,291$ % w/w

6.2.6 Stanovení obsahu dusíku a hrubé bílkoviny ve vzorku kamutu

Tabulka 19: Obsah dusíku ve vzorku kamutu

Navážka vzorku (g)	Spotřeba H ₂ SO ₄ (ml)	Obsah dusíku (% w/w)	Průměrný obsah dusíku (% w/w)	Směrodatná odchylka (% w/w)
0,2579	1,50	1,980	2,043	0,047
	1,54	2,032		
0,2562	1,59	2,112		
	1,54	2,046		

Obsah dusíku: $\mu = 2,043 \pm 0,047$ % w/w

Tabulka 20: Obsah hrubé bílkoviny ve vzorku kamutu

Navážka vzorku (g)	Obsah dusíku (% w/w)	Obsah hrubé bílkoviny (% w/w)	Průměrný obsah hrubé bílkoviny (% w/w)	Směrodatná odchylka (% w/w)
0,2579	1,980	11,286	11,642	0,268
	2,032	11,582		
0,2562	2,112	12,038		
	2,046	11,662		

Obsah hrubé bílkoviny: $\mu = 11,642 \pm 0,268$ % w/w

Stanovený obsah dusíku v pěti různých odrůdách pšenice se pohybuje v rozmezí 1,593 – 2,043 % w/w, toto rozmezí obsahu dusíku je menší než udává literatura [79], kdy za použití stejné metody analýzy bylo stanoveno v pšenici 2,26 % dusíku. Nejméně dusíku bylo stanoveno ve vzorku pšenice ozimé kde tvořil dusík $1,593 \pm 0,050$ % w/w, naopak nejvíce dusíku bylo stanoveno ve vzorku kamutu, kde byla hodnota dusíku stanovena na $2,043 \pm 0,047$ % w/w. V případě vzorků špaldy loupané, špaldového kernotta a Grünkernu se stanovené množství dusíku pohybovalo v rozmezí těchto hodnot.

Z obsahu dusíku byla pomocí přepočítávacího faktoru určena hodnota hrubé bílkoviny v jednotlivých vzorcích pšenice. Obsah bílkovin v pšenici je dle literatury [45] 10,6 %.

Hodnoty hrubé bílkoviny v odrůdách pšenice, které byly analyzovány v této diplomové práci tomuto průměru odpovídají. Naměřené hodnoty pro hrubou bílkovinu logicky odpovídají hodnotám, které byly naměřeny v případě dusíku. Nejméně bílkovin bylo tedy stanoveno ve vzorku pšenice ozimé, kdy byl obsah bílkovin roven $9,079 \pm 0,29$ % w/w. Ve vzorku špaldy loupané byl stanoven obsah bílkovin $10,132 \pm 0,301$ % w/w, v případě špaldového kernotta byl stanoven obsah hrubých bílkovin $10,937 \pm 0,318$ % w/w a ve vzorku Grünkernu byl staven obsah bílkovin $11,587 \pm 0,291$ % w/w. Nejvíce bílkovin bylo tedy stanoveno ve vzorku kamutu, kdy stanovený obsah bílkovin odpovídal číslu $11,642 \pm 0,268$ % w/w. Toto zjištění potvrzuje i literární zdroj [62], který udává, že pšenice kamut obsahuje až o 40 % více bílkovin než ostatní druhy pšenice. Ve srovnání s obsahem bílkoviny ve vzorku pšenice ozimé se jedná o 28,23 %, v případě vzorku špaldy loupané je to 14,90 %, rozdíl v obsahu bílkovin špaldového kernotta činí 6,45 % a nejmenší rozdíl v obsahu bílkovin je v případě vzorku Grünkernu u kterého byl stanoven rozdíl 0,47 %.

Vzhledem k tomu, že cereálie obsahují poměrně vysoký obsah aminokyselin [37] (příloha VI), myslím, že by bylo vhodné se při dalších analýzách cereálních výrobků zaměřit také na stanovení jednotlivých aminokyselin z různých vzorků a odrůd cereálií. Jako jednu z možností analýzy navrhuji použití automatického analyzátoru aminokyselin, další z možností stanovení může být použití plynové chromatografie i použití HPLC.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo stanovení vitaminů skupiny B v cereáliích pomocí chromatografické metody HPLC. Z technických důvodů bylo možné stanovit vybrané vitaminy skupiny B pouze kvalitativně. Kvantitativně byl stanoven pouze vitamin B₂ ve vzorku pšenice ozimé.

Dalším cílem diplomové práce bylo stanovení obsahu hrubé bílkoviny v cereáliích pomocí metody dle Kjeldahla. Pro stanovení hrubé bílkoviny byly použity vzorky cereálií pšenice ozimé, špaldy loupané, špaldového kernotta, Grünkernu a vzorek starodávné odrůdy pšenice kamut. Všechny použité vzorky cereálií se řadí mezi biopotraviny a země původu je Česká republika, na trh je dodává firma PRO-BIO, s.r.o Staré Město pod Sněžníkem.

Pro kvalitativní stanovení vitaminů B₁, B₂, B₃, B₅ a B₆ a pro kvantitativní stanovení vitaminu B₂ z cereálií byla použita separační chromatografická metoda vysoceúčinné kapalinové chromatografie HPLC. Vzorky byly do HPLC dávkovány alikvotním podílem 20 µl. Analýza byla provedena na koloně SUPELCOSIL LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm). Při měření byla použita gradientová eluce mobilní fáze, která byla složena z 0,12 mol.l⁻¹ octanu sodného o pH 4,8 (pH bylo upraveno 85 % kyselinou mravenčí) a z metanolu o počátečním poměru 87:13. Průtok mobilní fází byl 0,8 ml.min⁻¹ a teplota termostatu kolony 30°C. Signál byl snímán detektorem UV při vlnových délkách 270, 254, 230 a 220 nm. Ze standardů vitaminů byly za stejných chromatografických podmínek stanoveny retenční časy jednotlivých vitaminů. Nejlepší odezvu měla vlnová délka 270 nm, kdy retenční čas pro tiamin byl 6,616 minut, pro riboflavin 9,861 minut, kyselina nikotinová měla retenční čas 3,061 minut a v případě pyridoxinu byl retenční čas 3,651 minut. Vitamin B₅ nebyl změřen při žádné vlnové délce a nepodařilo se jej změřit ani při použití mobilní fáze ve složení dihydrogenfosforečnan draselný a metanol. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno za použití chromatografického programu ChemStation – Instrument 1 (Agilent USA). Na měření kalibrační křivky byl použit standard riboflavinu (Supelco, USA).

Pro kvalitativní stanovení vybraných vitaminů skupiny B z cereálií byla zkoušena metoda extrakce vitaminů kyselou hydrolyzou a enzymatickou hydrolyzou. Pro použití kyselé hydrolyzy se jako nejlepší prokázala extrakce vzorku, kdy byla použita 0,1 mol.dm⁻³ kyselina chlorovodíková s délkou trvání hydrolyzy 3 hodiny při teplotě vodní lázně 35 °C.

Při použití této metody byla volena navážka vzorku 10 g s přesností na 0,0001 g. Po provedení chromatografické analýzy při použití vlnové délky 270 nm se touto metodou podařilo kvalitativně stanovit přítomnost vitamínu B₂ a vitamínu B₆. Při použití vlnové délky 254 nm byla prokázána přítomnost vitamínů B₃ a B₆. Při použití enzymatické hydrolýzy byla nejprve jako optimální stanovena metoda s použitím enzymu *clara-diastázy* o koncentraci 20 mg.ml⁻¹ a pH 6 s dobu hydrolýzy 20 hodin, při neustálém třepání ve vodní lázni o teplotě 35 °C. Navážka vzorku byla při této metodě volena 2,5 g s přesností na 0,0001 g. Při použití této metody se podařilo po chromatografické analýze při vlnové délce 270 nm prokázat přítomnost vitamínů B₂, B₃ a B₆. Při použití vlnové délky 254 nm byla kvalitativně stanovena přítomnost vitamínů B₃ a B₆. Jako jediný vitamin, který se nepodařilo ve vzorku pšenice ozimé změřit ani při použití kyselé hydrolýzy ani při použití enzymatické hydrolýzy, byl vitamin B₁. Jeho přítomnost ve vzorku pšenice ozimé nebyla prokázána ani při použití mobilní fáze ve složení dihydrogenfosforečnan draselný a metanol, lze to vysvětlovat tím, že zvolené extrakce nebyly vhodné pro izolaci tohoto vitamínu.

Pro kvantitativní vyhodnocení riboflavinu ze vzorku pšenice ozimé byly výsledky analýzy zpracovány pomocí standardních statistických parametrů za využití Studentova rozdělení náhodných odchylek pro daný stupeň volnosti. Výsledky byly testovány na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (95 %).

Při stanovení obsahu riboflavinu v pšenici ozimé po hydrolýze kyselou cestou byl průměrný obsah vitamínu B₂ stanoven na $3,33 \pm 0,090$ mg.100g⁻¹. Stanovený obsah riboflavinu je vyšší než udává literatura. Lze to vysvětlovat tím, pšenice ozimá obsahuje více tohoto vitamínu než je průměrně udávaný obsah riboflavinu v pšenici. Je třeba brát také v úvahu to, že stanovovaný vzorek pšenice ozimé pochází z ekologického zemědělství, tudíž může být obsah výživných látek vyšší.

Pro stanovení dusíku a obsahu hrubé bílkoviny ve vzorcích pšenice byla použita metoda podle Kjeldahla. Pro analýzu byla zvolena navážka vzorku 0,25 g s přesností na 0,0001 g. Byla provedena mineralizace jednotlivých vzorků obilovin pomocí 95% kyseliny sírové a 30% peroxidu vodíku. Mineralizace vzorku byla prováděna při 400 °C a probíhala až do vyčeření jednotlivých vzorků. Poté byla provedena destilace vzorku pomocí Parnas-Wagnerova přístroje. Pro destilaci bylo odebráno 10 ml vzorku, ke kterému byl přidán 30% NaOH. Celá destilace trvala 15 minut od začátku varu, během destilace

byl vzniklý amoniak jímán do 2% kyseliny borité. Celkový obsah přítomného dusíku byl po ukončení destilace stanoven titračně pomocí $0,025 \text{ mol.dm}^{-3}$ kyseliny sírové na indikátor Tashiro.

Pro vyhodnocení analýzy z jednotlivých vzorků pšenice byly jednotlivé výsledky zpracovány pomocí standardních statistických parametrů za využití Studentova rozdělení náhodných odchylek pro daný stupeň volnosti. Výsledky byly testovány na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (95 %).

Ve vzorku pšenice ozimé byl obsah dusíku stanoven na $1,593 \pm 0,050$ % poté byl pomocí přepočítávacího faktoru stanoven obsah hrubé bílkoviny na $9,079 \pm 0,29$ %. Pro vzorek špaldy loupané byl obsah dusíku stanoven na $1,778 \pm 0,074$ % a obsah hrubé bílkoviny byl $10,132 \pm 0,301$ %. V případě vzorku špaldového kernotta byl obsah dusíku $1,919 \pm 0,056$ % a obsah hrubé bílkoviny byl stanoven na $10,937 \pm 0,318$ %. Ve vzorku Grünkernu činil obsah dusíku $2,033 \pm 0,037$ % a obsah hrubých bílkovin byl stanoven na $11,587 \pm 0,291$ %. Vzorek kamutu obsahoval nejvíce množství dusíku a tudíž i největší podíl hrubých bílkovin. V případě dusíku byl obsah stanoven na $2,043 \pm 0,047$ % a v případě hrubých bílkovin to bylo $11,642 \pm 0,268$ %. Tímto zjištěním byl potvrzen předpoklad, že odrůda pšenice kamutu obsahuje mnohem více % nejen bílkovin, ale i ostatních důležitých složek pro lidskou výživu. Vzhledem ke složení bílkovin je pšenice kamut doporučována pro konzumaci obyvateli trpícími celiakií, jelikož tento druh pšenice neobsahuje gliadinovou složku bílkovin.

Všeobecně jsou cereálie výborným zdrojem nejen vitaminů a bílkovin, ale obsahují i značné množství sacharidů, tuků a minerálních látek a jsou také významným zdrojem energie, proto by měly být zařazeny do skladby jídelníčku každého člověka.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., BUDÍNSKÝ, P. *Potravinářská biochemie II*.
1.vyd, Zlín: Academia centrum UTB 2006, 102 s. ISBN 80-7318-395-1
- [2] *Přírodní vitamíny a doplňky stravy* [online] [cit. 2010-02-25]. Dostupný z www:
< <http://www.my-vitamin-source.com/>>
- [3] BENEŠOVÁ, L a kol. *Potravinářství IV*. 1.vyd, Praha: ÚZPI, 1997, 156 s.
ISBN 80-85120-56-9
- [4] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*
1.vyd, Tábor: OSSIS, 1999, 328 s. ISBN 80-902391-4-5
- [5] *Vitamíny skupiny B* [online] [cit. 2010-02-25]. Dostupný z www:
< http://en.wikipedia.org/wiki/B_vitamins>
- [6] MURRAY, R.K. a kol. *Harperova biochemie*, 4 vyd., nakladatelství H+H 2002,
ISBN 80-7319-013-3
- [7] *Tiamin* [online] [cit. 2010-02-25]. Dostupný z www:
< <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/thiamin/>>
- [8] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J. *Chemie potravin*
1.vyd, Praha: SNTL, 1983, 632 s. ISBN 04-815-83
- [9] *Vitamíny* [online] [cit. 2010-02-25]. Dostupný z www:
< <http://themedicalbiochemistrypage.org/vitamins.html>>
- [10] BAKER, L. J., DOROCKE, J. A., HARRIS, R. A., TIMM, D. E. The Crystal
Structure of Yeast Thiamin Pyrophosphokinase, *Structure*, Vol. 9, (June 2001),
p. 539 – 546
- [11] *Tiamin* [online] [cit. 2010-02-25]. Dostupný z www:
< <http://www.thenutritiondr.com/node/165>>

- [12] HLÚBIK, P., OPLTOVÁ, L. *Vitaminy*, 1 vyd., Praha: Grada Publishing 2004, 232 s.
ISBN 80-247-0373-4
- [13] HANNINEN, S. A., DARLING, P. B., SOLE, M. J., BARR, A., KEITH, M. E.
The Prevalence of Thiamin Deficiency in Hospitalized Patients With Congestive Heart Failure, *Journal of the American College of Cardiology*, Vol. 47, No. 2, (2006), p. 354-361, ISSN 0735-1097/06
- [14] ŠÍCHO, V., VODRÁŽKA, Z., KRÁLOVÁ, B. *Potravinářská biochemie*
2.vyd, Praha: SNTL, 1981, 360 s.
- [15] *Riboflavin* [online] [cit. 2010-03-02]. Dostupný z www:
<<http://en.wikipedia.org/wiki/Riboflavin> >
- [16] *Vitamin B₂* [online] [cit. 2010-03-02]. Dostupný z www:
<http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/riboflavin/>
- [17] *Flavinmononukleotid* [online] [cit. 2010-03-02]. Dostupný z www:
<<http://www.biochem.uni-freiburg.de/research.htm>>
- [18] BUŇKA, F., NOVÁK, V., KADIDLOVÁ, H. *Ekonomika výživy a výživová politika I*, 1.vyd, Zlín: Academia centrum UTB 2006, 159 s.
- [19] SCHREIBER, V. *Vitamíny kdy – jak – proč – kolik*, 1.vyd, Jinočany: H&H, 1993
- [20] *Mléčné výrobky* [online] [cit. 2010-03-02]. Dostupný z www:
<http://www.agroweb.cz/Spotreba-mlecnych-vyrobku-loni-klesla__s43x33625.html>
- [21] ŽAMBOCH, J.: *Vitamíny*, 1.vyd., Praha: Grada 1996, 77 s., ISBN 80-7169-322-7
- [22] SZAFARZ, M., LOMNICKA, M., STERNAK, M., CHLOPICKY, S., SZYMURA - OLEKSIK, J. Simultaneous Determination of Nicotinic Acid and its Four Metabolites in Rat Plasma Using High Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometric Detection (LC/MS/MS), *Journal of Chromatography B*, Vol. 878 (2010), p. 895 - 902

- [23] GARRET, R., GRISHAM, CH., M.: *Biochemistry*, 3rd edition, Cengage Learning 2005, p.1248
- [24] *Vepřová játra* [online] [cit. 2010-02-25]. Dostupný z www:
<<http://www.reznictvihrdlicka.cz/nase-produkty/?category=veprovemaso&actpage=2>>
- [25] *Rýže* [online] [cit. 2010-02-25]. Dostupný z www:
< <http://www.goldenrice.org/> >
- [26] NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S.): SUBCOMMITE ON VITAMIN TOLERANCE, *Vitamin tolerance of animals*, National Academy Press, 1987, ISBN 0-309-03728-X
- [27] WOOLLARD, D. C., INDYK, H. E., CHRISTIANSEN, S. K. The Analysis of Pantothenic Acid in Milk and Infant Formulas by HPLC, *Food Chemistry*, Vol. 69 (2000), p. 201 - 208
- [28] KIRSCHMAN, J. D., et al. *Nutrition almanac*, Vol 6 (2007), ISBN 0-07-143658-8
- [29] *Kyselina pantotenová* [online] [cit. 2010-03-07]. Dostupný z www:
<http://en.wikipedia.org/wiki/Pantothenic_acid>
- [30] *Koenzym A* [online] [cit. 2010-03-07]. Dostupný z www:
<http://nauka.katalogi.pl/%5BCh%5D_Utlenianie_glukozy-t1882.html>
- [31] ALBARRÁN, G., RAMIRÉZ-CAHERO, F., ALIEV, R., Radiolysis of Pyridoxine (Vitamin B₆) in Aqueous Solution Under Different Conditions, *Radiation Physics And Chemistry*, Vol. 77 (2008), p. 605 - 611
- [32] *Brokolice* [online] [cit. 2010-03-07]. Dostupný z www:
< <http://aragonit.cz/sections/5> >
- [33] *Vejce* [online] [cit. 2010-03-07]. Dostupný z www:
< <http://www.viviente.cz/vejce/> >
- [34] *Vitamin B₆* [online] [cit. 2010-03-07]. Dostupný z www:
< <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/vitaminB6/> >

- [35] *Losos* [online] [cit. 2010-03-07]. Dostupný z www:
<<http://www.novinky.cz/zena/zdravi/110704-lososem-na-taliri-clovek-prospeje-svemu-srdci.html>>
- [36] *Droždí* [online] [cit. 2010-03-07]. Dostupný z www:
<<http://www.cukrar.cz/show.asp?id=1180>>
- [37] LÁSZTITY, R. *The chemistry of cereal proteins*, 2nd edition, CRC Press inc. 1996,
p. 328, ISBN 0-8493-2763-6
- [38] BENDA, V., BABŮREK, I., ŽĎÁRSKÝ, J. *Biologie II – nauka o potravinářských surovinách*, Praha: VŠCHT 2003, 3. vyd., 196 s., ISBN 80-7080-402-5
- [39] PECHAROVÁ, E., HEJNÝ, S. *Botanika I*, České Budějovice: DONA 1993, 173 s.
ISBN 85-85463-28-8
- [40] SLAVÍKOVÁ, Z. *Morfologie rostlin*, 1. vyd., Praha: Karlova Univerzita 2002, 218 s.,
ISBN 80-246-0327-6
- [41] MORRIS, P. C., BRYCE, J. H. *Cereal biotechnology*,
Wordhead Publishing 2002, 252 p., ISBN 978-1-85573-498-2
- [42] PŘÍHODA, J., SKŘIVAN, P., HRUŠKOVÁ, M. *Cereální chemie a technologie I*
1.vyd, Praha: VŠCHT 2003, 202 s. ISBN 80-7080-530-7
- [43] KUČEROVÁ, J.: *Technologie cereálií*, 1. vyd., Brno: MZLU 2004,
ISBN 978-80-7157-811-6
- [44] HRABĚ, J., ROP, O., HOZA, I. *Technologie výroby potravin rostlinného původu*
1.vyd, Zlín: Academia centrum UTB 2006, 177 s. ISBN 80-7318-372-2
- [45] HAARD, N. F. *Fermented cereals: a global perspective*, Food & agriculture org.
1999, 114 p. ISBN 92-5-104296-9
- [46] SIKORSKI, Z. E. *Chemical and functional properties of food components*,
3rd edition, CRC Press 2007, 532 p.
- [47] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D. *Potravinářská biochemie I*, 1. vyd., Zlín: Academia
centrum 2005, 168 s., ISBN 80-7318-295-5

- [48] NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S.): COMMITTEON AMINO ACIDS
Evaluation of protein nutrition, 711 publication, National Academies 1959, 61 p.
- [49] BUSHUK, W., RASPER, V. F. *Wheat: production, properties and quality*,
1st edition, Springer 1994, 239 p. ISBN 0-7514-0181-1
- [50] JONES, H. D. Wheat Transformation: Current Technology and Applications to Grain
Development and Composition, *Journal of Cereal Science* Vol. 41 (2005),
p. 137 - 147
- [51] *Kamut* [online] [cit. 2010-03-22]. Dostupný z www:
< <http://www.kamut.com/> >
- [52] ZOHARY, D., HOPF, M. *Domestication of plants in the old world*, 3th edition,
Oxford University Press US 2000, 316 p., ISBN 0-19-850357-1
- [53] *Pšenice ozimá* [online] [cit. 2010-03-24]. Dostupný z www:
<http://www.strube.cz/ozima_psenice/?n=5-72 >
- [54] ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT
Saffety assessment of transgenic organism, vol. 1 and 2, OECD Publishing 2006
821 p., ISBN 9264022589
- [55] WARRIER, P. K., NAMBIAR, V. P. K. *Indian medicinal plants*, Vol.5,
Orient Blackswan 1993, 592 p., ISBN 81-250-0760-6
- [56] BAVEC, F., BAVEC, M. *Organic production and use of alternative crops*,
CRC Press 2007, 241 p. ISBN 1-57444-617-7
- [57] VAUGHAN, J., GEISSLER, C. *The New Oxford Book of food plants*, 2nd edition
Oxford University Press 2009, 280 p. ISBN 978-0-19-954946-7
- [58] *Špaldové kernotto* [online] [cit. 2010-03-24]. Dostupný z www:
<<http://www.bio-life.cz/bio-vyroby/kernotto.html>>
- [59] *Grünkern* [online] [cit. 2010-03-24]. Dostupný z www:
<<http://www.kuechengoetter.de/rezepte/warenkunde/15048/Gruenkern.html>>

- [60] Kamut *Yoga Journal*, Vol. 107 (November/December 1992), p.27 ISSN 0191-0965
- [61] *Staronový kamut je velmi výživný* [online] [cit. 2010-03-24]. Dostupný z www:
<<http://www.agronavigator.cz/default.asp?typ=1&val=89344>>
- [62] *Kamut* [online] [cit. 2010-03-24]. Dostupný z www:
<<http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92219>>
- [63] *Zákon č.242/2000 sb. O ekologickém zemědělství* [online] [cit. 2010-03-22].
Dostupný z www:
<<http://www.sagit.cz/pages/sbirkatxt.asp?zdroj=sb00242&cd=76&typ=r>>
- [64] *Biopotraviny* [online] [cit. 2010-03-22]. Dostupný z www:
<<http://eagri.cz/public/eagri/potraviny/biopotraviny/>>
- [65] *Evropské biologo* [online] [cit. 2010-03-22]. Dostupný z www:
<<http://eagri.cz/public/eagri/zemedelstvi/ekologicke-zemedelstvi/aktuality/nove-evropske-bio-logo.html>>
- [66] KARDOŠ, E., BEREK, D. *Základy kvapalinovej chromatografie*
1.vyd, Bratislava: Alfa, 1979, 269 s.
- [67] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*, 2 vyd., 132 s., Ostrava:
nakladatelství Pavel Klouda 2003, 132 s., ISBN 80-86369-07-2
- [68] SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J., DOLAN, J. W. *Introduction to modern liquid Chromatography*, 3rd edition, John Wiley and Sons 2009, 912 p.
ISBN 978-0-470-16754-0
- [69] CHURÁČEK, J., JANDERA, P. *Úvod do vysoceúčinné kapalinové chromatografie*
1.vyd, Praha: SNTL 1984, 192 s., ISBN 04-607-85
- [70] CAZER, J. *Encyclopedia of chromatography*, 2nd edition, vol.2,
Marcel Dekker 2005, 800 p.
- [71] MEYER, V. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 5th edition,
John Wiley and Sons 2010, 416 p., ISBN 978-0-470-68217-3

- [72] *Instrumentace pro HPLC* [online] [cit. 2010-03-28]. Dostupný z www:
<<http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc5.pdf>>
- [73] ROUESSAC, F., ROUESSAC, A. *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*, 2nd edition, John Wiley and Sons 2007, 600 p.
ISBN 978-0-470-85902-5
- [74] ŠTULÍK, K. a kol. *Analytické separační metody*, Praha: Karlova Univerzita 2004,
1. vyd., 264 s. ISBN 80-246-0852-9
- [75] *Rozdělení obilnin* [online] [cit. 2010-03-14]. Dostupný z www:
<<http://cs.wikipedia.org/wiki/Obilniny>>
- [76] BATIFOULIER, F., VERNY, M. A., CHANLIAUD, E., RÉMÉSY, C., DEMIGNÉ, C. Variability of B Vitamin Concentrations in Wheat Grain, Milling Fractions and Bread Products, *European Journal of Agronomy*, Vol. 25 (2006), p. 163 - 169
- [77] VINAS, P., LÓPEZ-ERROZ, C., BALSALOBRE, N., HERMÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Reversed – Phase Liquid Chromatography on an Amide Stationary Phase for the Determination of the B Group Vitamins in Baby Foods, *Journal of Chromatography A*, Vol. 1007 (2003), p. 77 – 84
- [78] KENT, N. L., EVERS, A.D. *Technology of cereal*, 4th edition, Woodhead Publishing, 1994, 334 p., ISBN 0 – 08 – 040833 - 8
- [79] ROSSI, A.M., VILLARREAL, M., JUARÉZ, M. D., SAMMÁN, N.C. Nitrogen Contents in Food: a Comparison Between the Kjeldahl and Hach Methods, *The Journal of the Argentine Chemical Society*, Vol. 92 (2004), p. 99-108

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HPLC vysoce účinná kapalinová chromatografie

UV-VIS spektrofotometrický detektor

FMN flavinmononukleotid

FAD flavinadenindinukleotid

IUPAC Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii

NAD nikotinamidadenindinukleotid

NADP nikotinanidadenindinukleotidfosfát

LDL lipoproteiny o nízké hustotě

HDL lipoproteiny o vysoké hustotě

NE niacin-ekvivalent

CoA koenzym A

Acetyl-CoA acetylkoenzym A

ACP přenašeč proteinů

GC plynová chromatografie

LC kapalinová chromatografie

PC papírová chromatografie

TLC chromatografie na tenké vrstvě

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Zdroje vitamínu B ₁ [11].....	15
Obr. 2: Zdroje vitamínu B ₂ [20].....	18
Obr. 3: Zdroje vitamínu B ₃ [24, 25].....	21
Obr. 4: Zdroje kyseliny pantotenové [32,33].....	24
Obr. 5: Zdroje vitamínu B ₆ [35, 36].....	26
Obr. 6: Průřez stéblem ječmene [38]	29
Obr. 7: Pšenice ozimá [53]	37
Obr. 8: Grünkern [59]	38
Obr. 9: Pšenice Kamut [62]	38
Obr. 10: Evropské logo pro biopotraviny [65].....	40
Obr. 11: Schéma kapalinového chromatografu [67].....	43
Obr. 12: Dávkovací zařízení [72]	44
Obr. 13: Kolony pro HPLC [72]	45
Obr. 14: Chromatograf HPLC na kterém byla provedena analýza	46

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Obsah tiaminu v některých potravinách [12].....	16
Tabulka 2: Obsah riboflavinu v některých potravinách [19]	19
Tabulka 3: Obsah kyseliny nikotinové ve vybraných potravinách [12].....	22
Tabulka 4: Obsah kyseliny pantotenové ve vybraných potravinách [12]	25
Tabulka 5: Obsah pyridoxinu ve vybraných potravinách [12].....	27
Tabulka 6: Obsah jednotlivých složek v obilovinách [45]	33
Tabulka 7: Gradient mobilní fáze	52
Tabulka 8: Kalibrace riboflavinu pro vlnovou délku 270 a 254 nm.....	57
Tabulka 9: : Obsah riboflavinu po izolaci kyselou cestou	58
Tabulka 10: Obsah riboflavinu po hydrolýze enzymem <i>clara-dia</i> stázou.....	59
Tabulka 11: Obsah dusíku ve vzorku pšenice ozimé.....	60
Tabulka 12: : Obsah hrubé bílkoviny ve vzorku pšenice ozimé.....	61
Tabulka 13: Obsah dusíku ve vzorku špaldy loupané.....	61
Tabulka 14: Obsah hrubé bílkoviny ve vzorku špaldy loupané.....	61
Tabulka 15: Obsah dusíku ve špaldovém kernottu	62
Tabulka 16: Obsah hrubé bílkoviny ve špaldovém kernottu	62
Tabulka 17: Obsah dusíku ve vzorku Grünkernu	63
Tabulka 18: Obsah hrubé bílkoviny ve vzorku Grünkernu.....	63
Tabulka 19: Obsah dusíku ve vzorku kamutu	64
Tabulka 20: Obsah hrubé bílkoviny ve vzorku kamutu.....	64

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Kalibrační křivka pro vlnovou délku 270 nm.....	58
---	----

SEZNAM PŘÍLOH

I: VITAMINY ROZPUSTNÉ V TUCÍCH

II: VITAMINY ROZPUSTNÉ VE VODĚ

III: PŘEHLED VITAMINŮ PŘIDÁVANÝCH DO POTRAVIN V EU

IV: ROZDĚLENÍ OBILOVIN PODLE MORFOLOGICKÝCH A FYZIOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ

V: PODÉLNÝ ŘEZ PŠENIČNÝM ZRNEM

VI: OBSAH AMINOKYSELIN PŘÍTOMNÝCH V CEREÁLÍCH

VII: OPTIMALIZACE HYDROLÝZY VITAMINŮ SKUPINY B KYSELOU CESTOU

VIII: OPTIMALIZACE ENZYMATICKÉ HYDROLÝZY VITAMINŮ SKUPINY B

IX: PARNAS-WAGNERŮV DESTILAČNÍ PŘÍSTROJ

X: CHROMATOGRAM KALIBRAČNÍ KŘIVKY RIBOFLAVINU PRO VLNOVOU DÉLKU 270 nm

XI: CHROMATOGRAM PRO STANOVENÍ RIBOFLAVINU V PŠENICI OZIMÉ PO EXTRAKCI KYSELOU CESTOU

XII: CHROMATOGRAM PRO STANOVENÍ RIBOFLAVINU V PŠENICI OZIMÉ PŘI POUŽITÍ ENZYMATICKÉ HYDROLÝZY

PŘÍLOHA I: VITAMINY ROZPUSTNÉ V TUCÍCH [12]

Vitamin	Fyziologická funkce	Příznaky karence	Toxicita
Vitamin A	Produkce rodopsinu, stavba a udržování epitelu, zvýšená rezistence k infekcím, zvýšený růst a reprodukce	Šeroslepost, noční slepota, funkční poruchy kůže a sliznic, zpomalený růst, mužská sterilita	Šupinatění kůže, bolesti v kostech a kloubech, hyperkalcemie
Vitamin D	Podpora resorpce a utilizace vápníku a fosforu, zachování kostního matrixu	<u>Dospělí</u> : osteomalacie, hypokalcemie, hypofosfatimie <u>Děti</u> : křivice, deformace kostí, zvětšení epifýz a růstových štěrbin	Bolesti hlavy a kloubů, hyperkalcemie, poruchy gastrointestinálního traktu, omezení funkce ledvin, růstový skok u dětí
Vitamin E	Antioxidant nenasycených mastných kyselin	Anémie, poruchy metabolismu nervstva a svalů a kapilární permeability	Průjem, únava, svalová slabost, zvýšení hladiny kreatinu
Vitamin K	Aktivuje tvorbu koagulačních faktorů Je tvořen střevní mikroflórou	Krvácení, prodloužení protrombinového času, u novorozenců hemoragie	Horečka, nechutenství

PŘÍLOHA II: VITAMINY ROZPUSTNÉ VE VODĚ [12]

Komplex vitaminů B

Vitamin	Fyziologická funkce	Karenční příznaky
Tiamin	Metabolismus sacharidů (dekarboxylace α -ketokyselin v transketolázové reakci)	Mokré beri-beri, kardiomegalie, tachykardie, selhání srdce, Suché beri-beri, periferní neuropatie, hyperestezie, anestezie Alkoholová polyneuropatie, mozkové příznaky, anorexie
Riboflavin	Koenzym flavoproteinů	Záněty sliznic, stomatitida, malinový jazyk, atrofie papil jazyka
Niacin	Složka NAD a NADP, účastní se glykolýzy a buněčné respirace	Pelagra, průjmy, dermatitida, demence, atrofie jazykových papil, kožní pigmentace, poruchy srdeční a centrálních nervových funkcí
Kyselina pantotenová	Účast při tvorbě koenzymu A, který je potřebný při syntéze mastných kyselin, cholesterolu, účast v metabolismu tuků, sacharidů a aminokyselin	V experimentu: gastrointestinální potíže, periferní neuropatie, křeče
Pyridoxin	Enzym mnoha reakcí, hlavně v přeměně aminokyselin	Pokles hladiny v graviditě, při orální antikoncepci, změny kůže a sliznic, sklon ke křečím
Kobalamin	Syntéza aminokyselin, syntéza hemu, syntéza mastných kyselin, koenzym	Megaloblastická anémie, periferní neuropatie, stomatitida
Kyselina listová	Přenos formylových skupin, biosyntéza purinů, histidinu, cholinu a serinu	Megaloblastická anémie, pancytopenie
Biotin	Kofaktor karboxyláz, kofaktor enzymů podílejících se na metabolismu mastných kyselin, bílkovin a cholesterolu	Dermatitida, atrofie jazykových papil, hypercholesterolemie, anomálie EKG

Vitamin C

Fyziologická úloha	Karenční příznaky	Toxicita
Antioxidant, biosyntéza kolagenu usnadňuje biologické využití železa a kyseliny listové, metabolismus (stupňuje resorpci železa, tlumí resorpci mědi, biosyntéza katecholaminů, účast na syntéze steroidních hormonů v nadledvinkách)	Krvácení dásní, hematomy, folikulární hyperkeratóza, zhoršené hojení ran., zvýšená vnímavost k infekcím, útlum stresové reakce	Průjmy, tvorba oxalátových konkrementů, zvýšení hladin kyseliny močové a šťavelové v moči, hypoglykemický efekt, zvyšuje vylučování pyridoxinu, zvyšuje vstřebávání rtuti

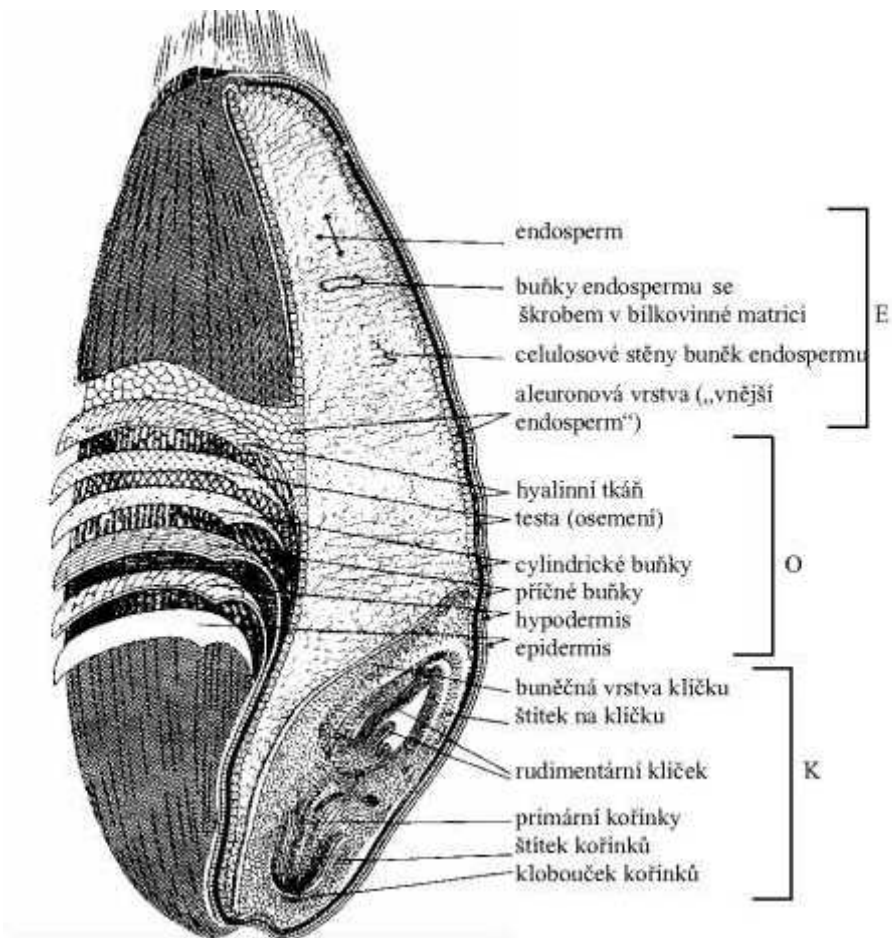
PŘÍLOHA III: PŘEHLED VITAMINŮ PŘIDÁVANÝCH DO POTRAVIN V EU [3]

Vitamin	Použití
Tiamin	fortifikace mouky, snídaňových cereálií, výživy pro kojence, olejů a tuků, nápojů, těstovin, umělé stravy, cukrovinek
Riboflavin	fortifikace mouky, snídaňových cereálií, polévek, výživy pro kojence, nápojů, umělé stravy, cukrovinek, barvení instantních výrobků
Niacin	fortifikace mouky, snídaňových cereálií, výživy pro kojence, ovocných nápojů, cukrovinek, umělé výživy, těstovin
Pantotenová kyselina	kalciium-D-pantotenát se používá k fortifikaci výživy pro kojence, snídaňových cereálií, ovocných nápojů, cukrovinek, umělé výživy, nápojů
Pyridoxin	fortifikace snídaňových cereálií, výživy pro kojence, olejů a tuků, umělé stravy, cukrovinek, nápojů
Kobalamin	fortifikace výživy pro kojence, umělé stravy, potravin pro vegetariány
Biotin	fortifikace umělé výživy, výživy pro kojence
Kyselina listová	fortifikace výživy pro kojence, cereálií, nápojů, cukrovinek, umělé výživy
Vitamin C	fortifikace výživy pro kojence, umělé stravy, nápojů, cukrovinek, mléčných a cereálních výrobků Antioxidant v nápojích, cereálních, masných, mléčných, ovocných a zeleninových výrobcích, nakládání masa
Vitamin A	fortifikace olejů a tuků, tekutého mléka, snídaňových cereálií, výživy pro kojence
Provitamin A (β-karoten)	barvení a fortifikace olejů a tuků, nápojů, mléčných výrobků, pekařských výrobků, snacků, polévek, omáček, dresinků, těstovin
Vitamin D ₃	fortifikace mléčných výrobků, olejů a tuků, cereálních výrobků
Vitamin E	fortifikace výživy pro kojence, cukrovinek, tuků a olejů, nápojů, mléčných a cereálních výrobků antioxidant v tucích, margarínech, omáčkách, pekařských výrobcích, cukrovinkách, potravinách typu snack, zeleninových a drůbežích výrobcích
Vitamin K ₁	fortifikace výživy pro kojence, tekutého mléka, olejů a dietetických výrobků

**PŘÍLOHA IV: ROZDĚLENÍ OBILOVIN PODLE
MORFOLOGICKÝCH A FYZIOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ [75]**

I. skupina	II. skupina
<p>Rod:</p> <p><i>Triticum</i> - pšenice</p> <p><i>Secale</i> - žito</p> <p><i>Hordeum</i> - ječmen</p> <p><i>Avena</i> - oves</p> <p>Mezidruhový kříženec:</p> <p><i>Triticosecale</i> - tritikale (žitovec)</p> <p><i>Tritordeum</i></p>	<p>Rod:</p> <p><i>Zea</i> - kukuřice</p> <p><i>Panicum</i> - proso</p> <p><i>Sorghum</i> - čirok</p> <p><i>Oryza</i> - rýže</p> <p><i>Setaria</i> - (druhy: čumíza, mohár)</p> <p><i>Fagopyrum</i> - pohanka</p>
Charakteristické znaky:	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Na spodní straně obilky je podélná rýha. 2. Při klíčení roste více zárodečných kořínků. 5. Stéblo duté, jen kolénka vyplněna dřevem. 6. V klásku nejvíce plodné dolní kvítky. 7. Méně náročné na teplo, více na vodu. 9. Existují ozimé i jarní formy. 10. V době jarovizace vyžadují nižší teploty. 11. Při fotoperiodické reakci vyžadují dlouhý světelný den. 12. Počáteční vývin je rychlejší, vytvářejí odnože již po druhém až třetím listu. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Obilka je bez rýhy. 2. Při klíčení roste jeden zárodečný kořínek. 5. Stéblo vyplněno dřevem. 6. V klásku nejvíce plodné horní kvítky. 7. Více náročné na teplo, méně na vodu. 9. Existují pouze jarní formy. 10. V době jarovizace vyžadují vyšší teploty. 11. Při fotoperiodické reakci vyžadují krátký světelný den nebo jsou k délce dne neutrální. 12. Počáteční vývin je pomalý, vytvářejí odnože po čtvrtém až osmém listu.

PŘÍLOHA V: PODÉLNÝ ŘEZ PŠENIČNÝM ZRNEM [42]



Vrstva E – vrstva, která při mletí přechází do mouky

Vrstva O – vrstva, která přechází při mletí do otrub

Vrstva K – vrstva, která je odstraňována společně s klíčkem

**PŘÍLOHA VI: OBSAH AMINOKYSELIN PŘÍTOMNÝCH
V CEREÁLIÍCH [37]**

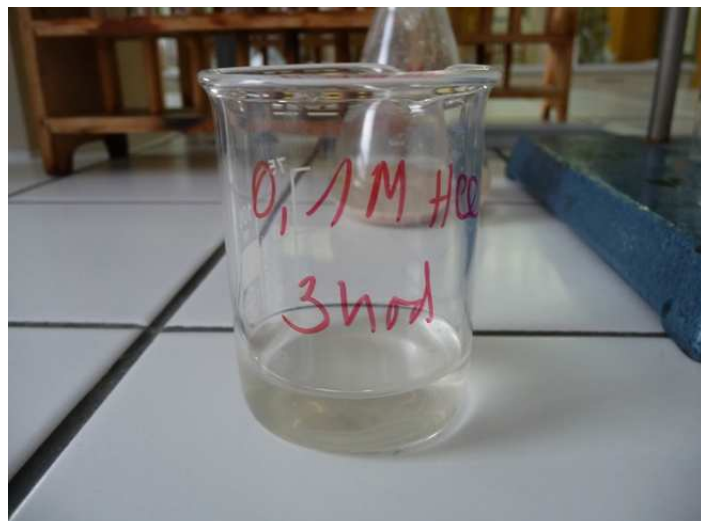
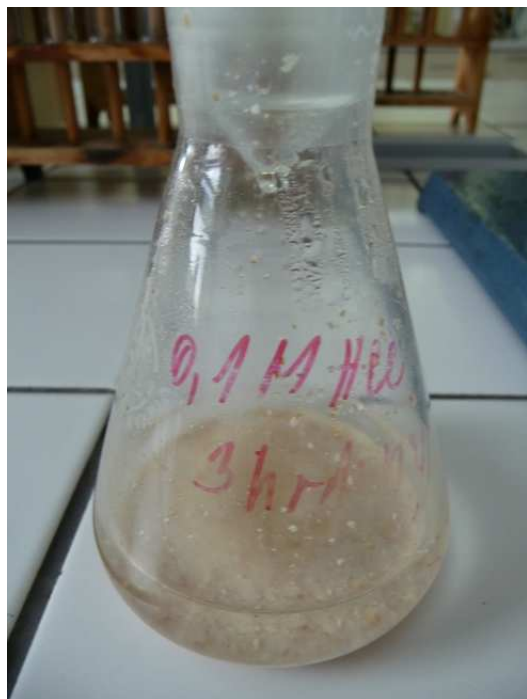
	Pšenice	Oves	Žito	Čirok	Rýže	Kukuřice	Ječmen	Proso
Arginin	4,71	6,98	4,93	3,19	8,26	4,19	4,40	4,70
Cystein	2,19	1,73	1,90	1,73	1,07	1,55	2,50	2,19
Histidin	2,02	2,46	2,20	1,71	2,49	2,72	2,10	2,35
Izoleucin	4,70	3,90	4,26	3,77	3,71	3,68	3,80	4,55
Leucin	6,72	7,55	6,68	13,11	8,22	12,43	6,90	10,30
Lysin	2,79	4,51	3,42	2,24	3,69	2,67	3,50	3,05
Metionin	1,30	1,65	1,68	1,23	2,32	1,92	1,60	1,85
Fenylalanin	4,96	4,93	4,82	4,89	5,15	4,88	5,10	4,91
Treonin	2,84	3,64	3,70	3,64	3,91	3,60	3,50	3,19
Tryptofan	1,28	1,70	1,13	1,20	1,15	0,70	1,40	1,40
Tyrosin	3,72	3,61	3,27	3,41	3,49	3,83	2,50	3,70
Valin	4,48	5,24	5,21	4,51	5,51	4,85	5,40	5,31

Obsah jednotlivých aminokyselin je uveden v g.100g⁻¹ proteinu

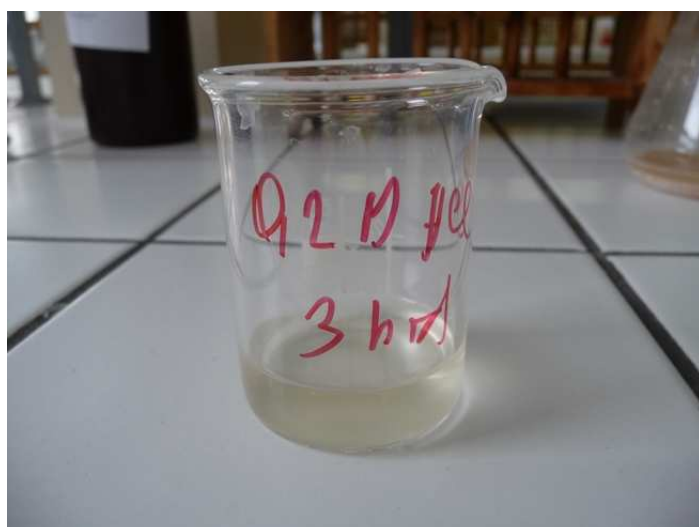
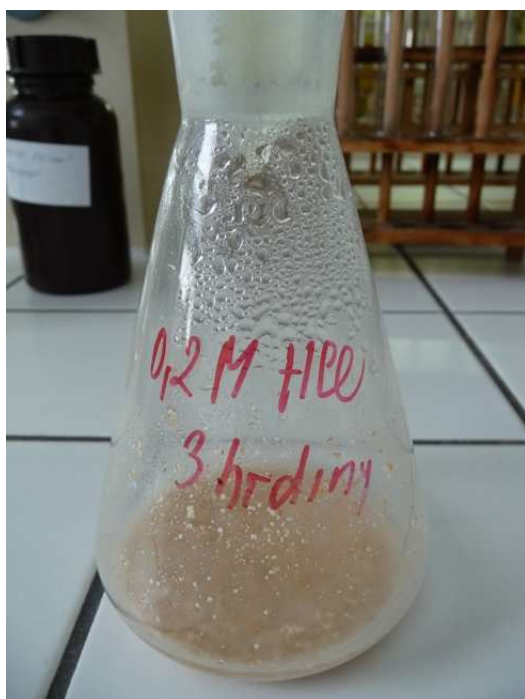
PŘÍLOHA VII: OPTIMALIZACE HYDROLÝZY VITAMINŮ SKUPINY B

Výsledky extrakce po 3 hodinách hydrolýzy

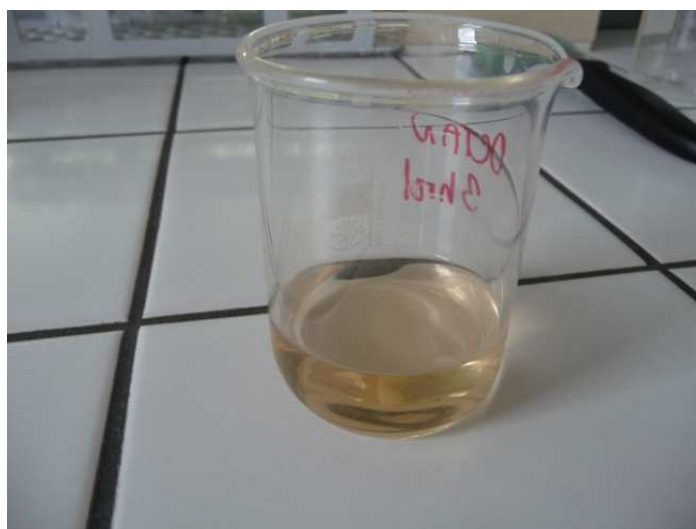
0,1 mol.dm⁻³:



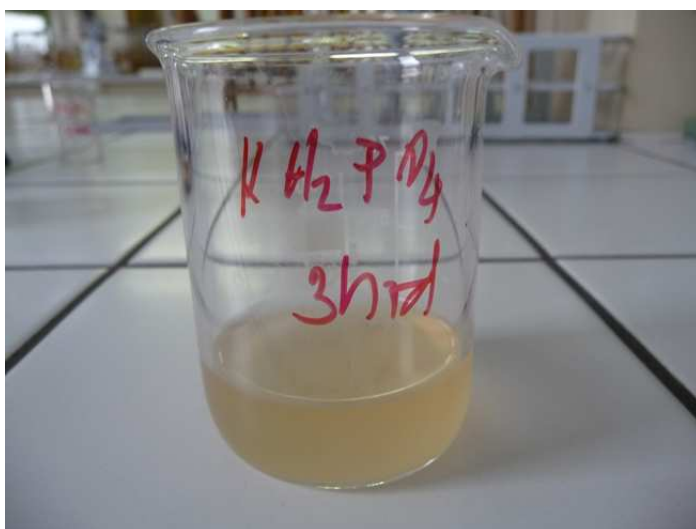
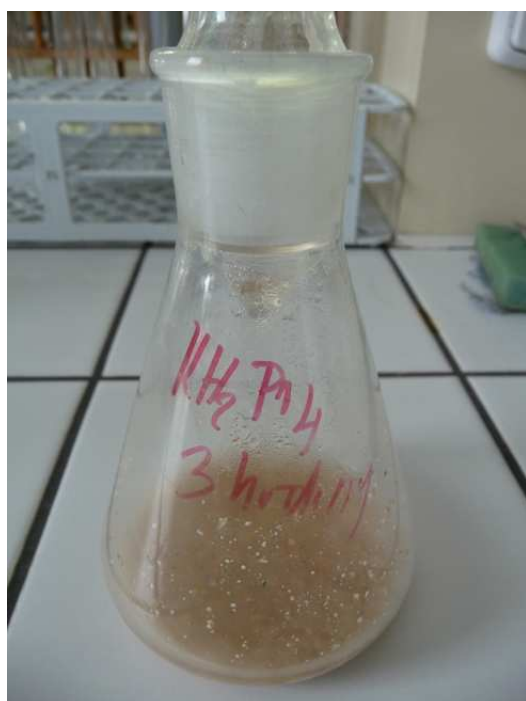
0,2 mol.dm⁻³:



Octan sodný:



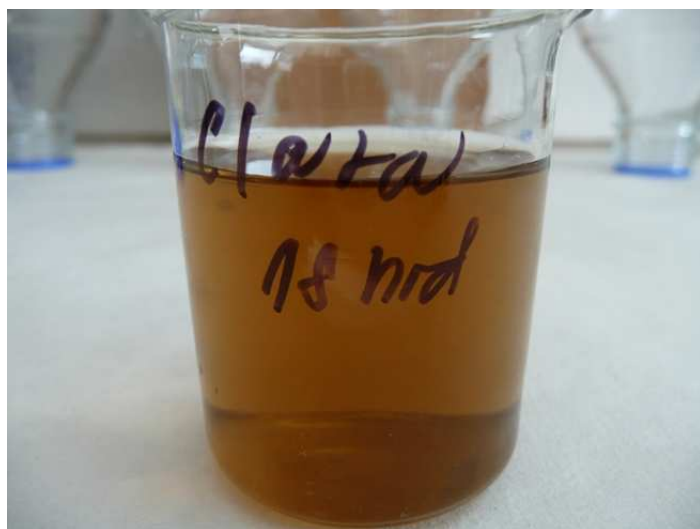
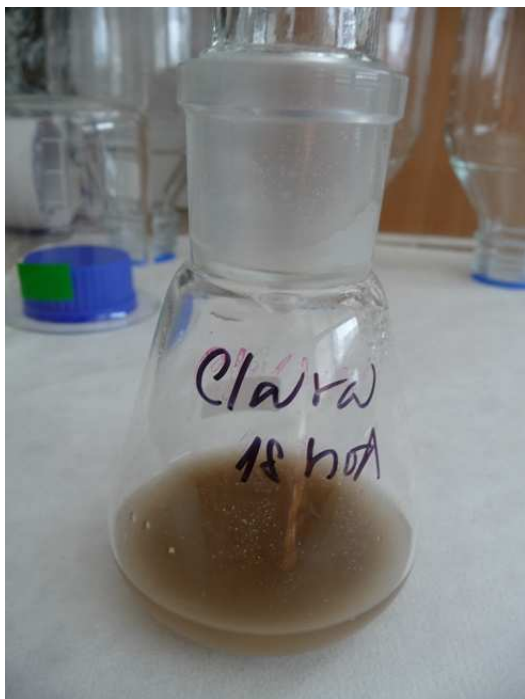
Dihydrogenfosforečnan draselný:



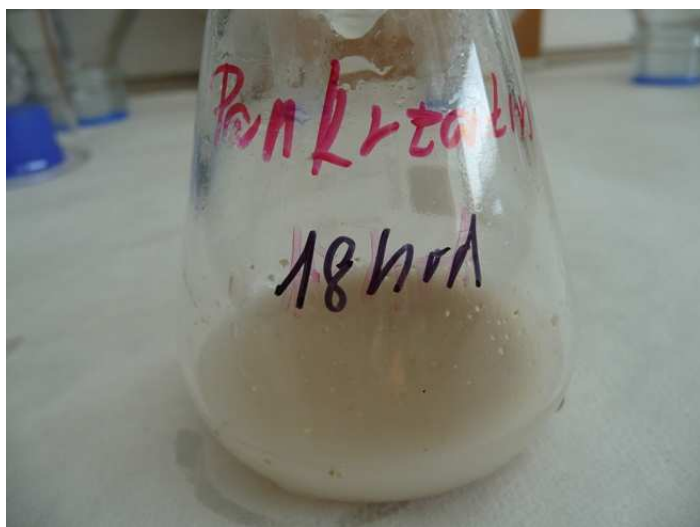
PŘÍLOHA VIII: OPTIMALIZACE ENZYMATICKÉ HYDROLÝZY VITAMINŮ SKUPINY B

Výsledky extrakce po 18 hodinách hydrolýzy

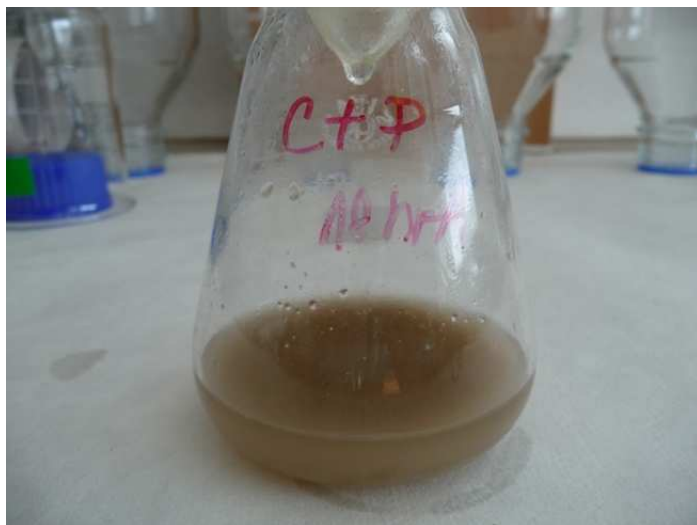
Clara-diaastáza:



Pankreatin:



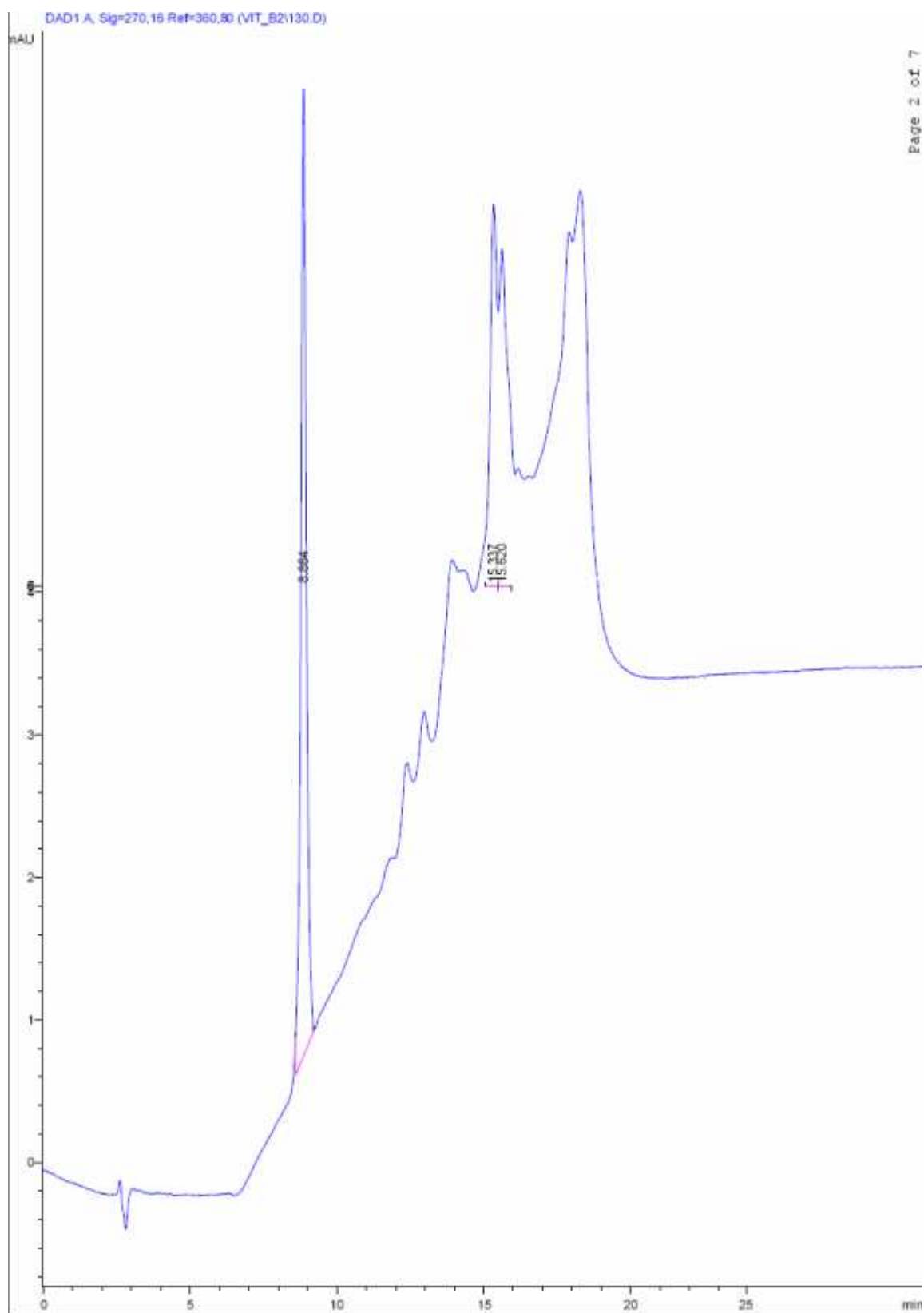
Směs enzymů *clara*-diastázy a pankreatinu



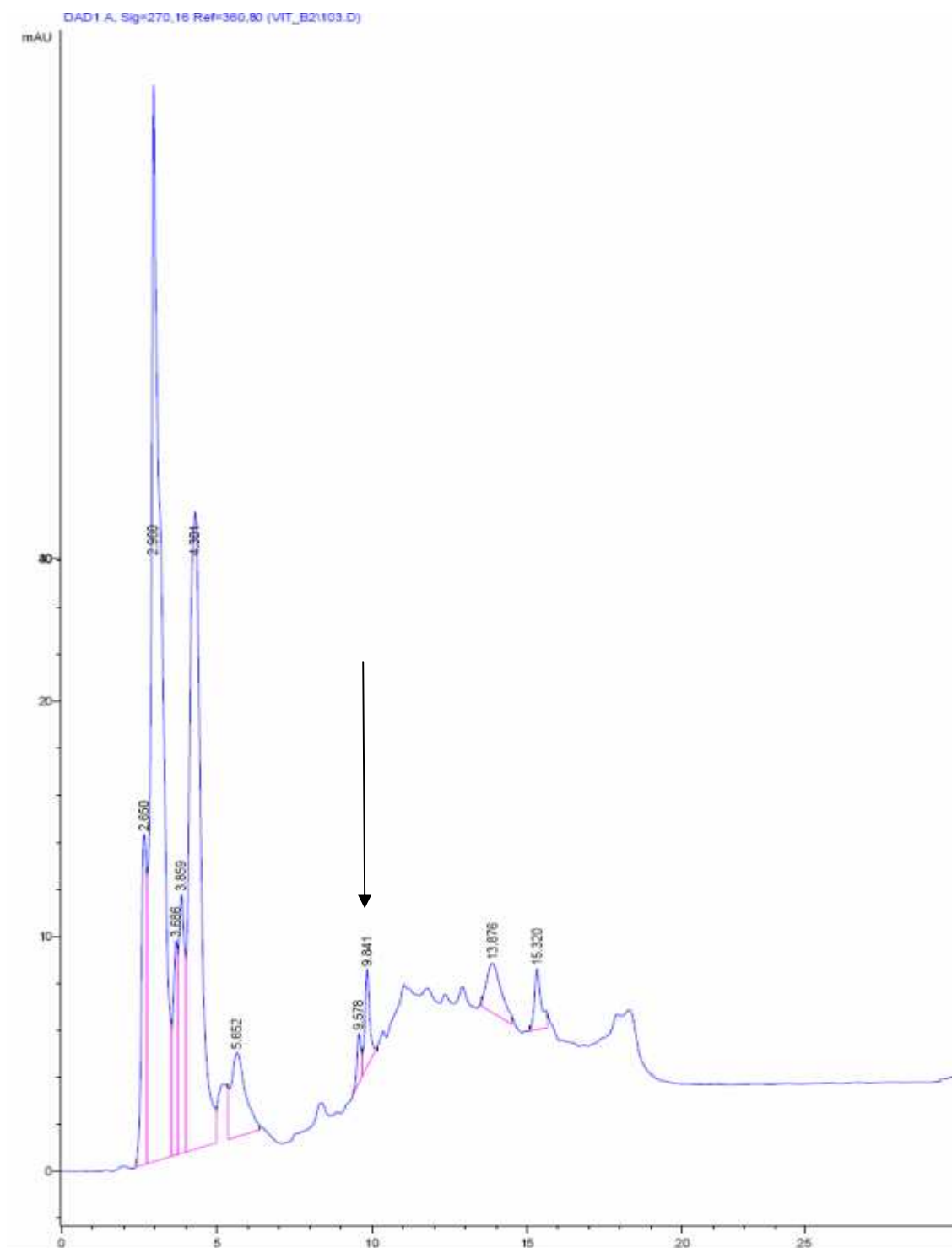
PŘÍLOHA IX: PARNAS-WAGNERŮV DESTILAČNÍ PŘÍSTROJ



PŘÍLOHA X: CHROMATOGRAM KALIBRAČNÍ KŘIVKY RIBOFLAVINU PRO VLNOVOU DÉLKU 270 NM



PŘÍLOHA XI: CHROMATOGRAM PRO STANOVENÍ RIBOFLAVINU V PŠENICI OZIMÉ PO EXTRAKCI KYSELOU CESTOU



PŘÍLOHA XII: CHROMATOGRAM PRO STANOVENÍ RIBOFLAVINU V PŠENICI OZIMÉ PŘI POUŽITÍ ENZYMATICKÉ HYDROLÝZY

