

Stanovení riboflavinu v cereálních produktech

Bc. Pavlína Sikorová

Diplomová práce
2008



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2007/2008

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Pavlína SIKOROVÁ**

Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Stanovení riboflavinu v cereálních produktech**

Zásady pro vypracování:

1. Formou literární rešerše zpracujte téma o riboflavinu (vitaminu B2) – jeho zdrojích a vlastnostech.
2. Popište analytické metody, především chromatografické techniky, využívané pro stanovení tohoto vitamínu.
3. Charakterizujte i cereální výrobky.
4. Pro stanovení obsahu riboflavinu provedte optimalizaci izolačního postupu vitamínu B2 z vybraných produktů.
5. Pomocí chromatografické techniky HPLC stanovte obsah tohoto vitamínu v cereálních produktech (chléb, rohlík, cereální snídaně, těstoviny).

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

VELÍŠEK, J. Chemie potravin 2. 1 vyd. Tábor: OSSIS, 1999. 328 s.

HLÚBIK, P., OPLTOVÁ, L. Vitaminy. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2004. 232 s.

ŽAMBOCH, J. Vitaminy. 1. vyd. Praha: Grada, 1996. 80 s.

CHURÁČEK, J., JANDERA, P. Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie. 1. vyd. Praha: SNTL, 1985. 192 s.

CHURÁČEK, J. a kol. Analytická separace látek. 1 vyd. Praha: SNTL, 1990. 384 s.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Soňa Škrovánková, Ph.D.

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání diplomové práce:

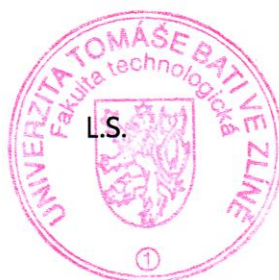
21. listopadu 2007

Termín odevzdání diplomové práce:

31. května 2008

Ve Zlíně dne 2. května 2008

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



v.z. prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

V teoretické části diplomové práce je popsán vitamin B₂ – riboflavin, jeho zdroje a vlastnosti (fyzikálně-chemické i fyziologické) a také ztráty vitamínu při technologických operacích. Dále jsou popsány analytické metody, především chromatografické techniky, využívané pro stanovení tohoto vitamínu a technika HPLC. Je zde uvedena i charakteristika cereálních produktů.

Experimentální část popisuje optimalizaci izolačního postupu vitamínu B₂ z vybraných 22 běžných cereálních produktů (mouka, chléb, rohlík, cereální snídaně, těstoviny), kdy bylo zjišťováno vhodné složení a množství extrakčních činidel i průběh celé izolace. Následně byly pomocí chromatografické techniky HPLC/UV-DAD stanoveny obsahy riboflavínu ve vybraných 22 cereálních produktech, kdy obsah vitamínu klesal v následujícím pořadí: cereální snídaně, mouky obohacené vitamíny, celozrnné sušenky, celozrnné chleby, celozrnné mouky, pšeničný chléb, celozrnné těstoviny, tukový rohlík, pšeničné mouky a celozrnné pečivo.

Klíčová slova:

Riboflavin, vitamin B₂, HPLC/UV, cereální produkty

ABSTRACT

Theoretical part of the thesis describes vitamin B₂ – riboflavin, its sources and features (physico-chemical and physiological) and also losses of vitamin at technological operations. Further there are described analytical methods, first of all chromatographic technics, to use for determination of vitamin B₂ and HPLC technic. The characteristics of cereal products also introduced.

Experimental part describes optimalization of isolating process of vitamin B₂ of 22 selected common cereal products (flour, bread, roll, cereal breakfast, pastries), the suitable composition and quantity of extraction reagents and isolation process were evaluated. Subsequently the contents of riboflavin of 22 selected cereal products with chromatographic technic HPLC/UV DAD was defined. The riboflavin content decreases is this order: cereal breakfast, flours enriched with riboflavin, wholemeal biscuits, wholemeal breads, wholemeals, bread, wholemeal pastries, roll, wheat flours and wholemeal rolls.

Keywords:

Riboflavin, vitamin B₂, HPLC/UV, cereal products

Děkuji tímto vedoucí mé diplomové práce Ing. Soni Škrovánkové, Ph.D. za odborné vedení, rady, připomínky a všechny zodpovězené dotazy týkající se dané problematiky.

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

Ve Zlíně, 13.5.2008

.....

..

Podpis diplomanta

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 VITAMINY	11
1.1 RIBOFLAVIN	13
1.1.1 Reaktivita riboflavinu	14
1.1.2 Fyziologie a výživa	15
1.1.3 Výskyt riboflavinu v potravinách	17
1.1.4 Ztráty riboflavinu při zpracování potravin	18
1.2 STANOVENÍ VITAMINŮ	20
1.2.1 Metody stanovení riboflavinu	20
2 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE	26
2.1 HPLC	26
2.1.1 Frontální chromatografie	27
2.1.2 Eluční chromatografie	27
2.1.3 Vytěšňovací chromatografie	27
2.2 KAPALINOVÝ CHROMATOGRAF	27
2.2.1 Čerpadla	28
2.2.2 Gradientová zařízení	29
2.2.3 Dávkování vzorků	29
2.2.4 Chromatografické kolony a jejich náplně	30
2.2.5 Detektory	31
3 CEREÁLNÍ TECHNOLOGIE	35
3.1 MORFOLOGICKÁ STAVBA ZRNA OBILOVIN	36
3.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ OBILOVIN	37
3.2.1 Bílkoviny obilovin	38
3.2.2 Sacharidy obilovin	38
3.2.3 Lipidy obilovin	39
3.2.4 Vitaminy obilovin	39
3.3 PRODUKCE OBILOVIN	41
4 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	43
II PRAKTICKÁ ČÁST	45
5 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	46
6 MATERIÁL A PŘÍSTROJE	47
6.1 VZORKY CEREÁLNÍCH PRODUKTŮ	47
6.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	48
6.3 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY	48
7 METODIKA STANOVENÍ VITAMINU	50

7.1	OPTIMALIZACE IZOLACE RIBOFLAVINU Z CEREÁLNÍCH VÝROBKŮ.....	50
7.1.1	Optimalizace izolace riboflavinu ze vzorků mouk	50
7.1.2	Optimalizace izolace riboflavinu z celozrnných lupínků, celozrnných chlebů a celozrnných sušenek	51
7.1.3	Optimalizace izolace riboflavinu z celozrnného pečiva, tukového rohlíku a pšeničného chleba	51
7.1.4	Optimalizace izolace riboflavinu z celozrnných těstovin	52
7.2	STANOVENÍ RIBOFLAVINU METODOU HPLC.....	54
8	VÝSLEDKY A DISKUZE	55
8.1	IZOLACE RIBOFLAVINU ZE VZORKŮ CEREÁLNÍCH PRODUKTŮ.....	55
8.1.1	Postup izolace riboflavinu ze vzorků mouk.....	55
8.1.2	Postup izolace riboflavinu ze vzorků celozrnných lupínků, celozrnných chlebů a celozrnných sušenek	55
8.1.3	Postup izolace riboflavinu ze vzorků celozrnného pečiva, tukového rohlíku a pšeničného chleba	56
8.1.4	Postup izolace riboflavinu ze vzorků celozrnných těstovin	56
8.1.5	Postup izolace riboflavinu ze vzorků výluhů z celozrnných těstovin	57
8.2	STANOVENÍ RIBOFLAVINU METODOU HPLC.....	57
8.2.1	Kalibrační křivka pro stanovení riboflavinu metodou HPLC	57
8.2.2	Stanovení riboflavinu u vzorků cereálních produktů	59
8.2.2.1	Stanovení riboflavinu u vzorků celozrnných mouk	60
8.2.2.2	Stanovení riboflavinu u vzorků mouk obohacených vitaminy	62
8.2.2.3	Stanovení riboflavinu u vzorků pšeničných mouk	64
8.2.2.4	Stanovení riboflavinu u vzorků celozrnných lupínků	65
8.2.2.5	Stanovení riboflavinu u vzorků celozrnných chlebů.....	67
8.2.2.6	Stanovení riboflavinu u vzorku pšeničného chleba	69
8.2.2.7	Stanovení riboflavinu u vzorků celozrnného pečiva	70
8.2.2.8	Stanovení riboflavinu u vzorku tukového rohlíku.....	70
8.2.2.9	Stanovení riboflavinu u vzorku celozrnných sušenek	71
8.2.2.10	Stanovení riboflavinu u vzorků celozrnných těstovin	72
8.2.2.11	Stanovení riboflavinu u vzorků výluhů z celozrnných těstovin	73
8.3	POROVNÁNÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V CEREÁLNÍCH PRODUKTECH	75
	ZÁVĚR	80
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	83
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	88
	SEZNAM OBRÁZKŮ	89
	SEZNAM TABULEK	90
	SEZNAM PŘÍLOH	92

ÚVOD

Vitamin B₂, nebo-li riboflavin, patří do skupiny flavinů. Riboflavin je důležitý pro tvorbu látek nezbytných pro přeměnu a produkci energie z bílkovin, tuků a sacharidů. Vitamin B₂ podporuje tvorbu imunitních buněk a je také důležitý pro správnou funkci jater, ovlivňuje kvalitu nehtů, vlasů a kůže.

V biochemických systémech se riboflavin vyskytuje ve formě koenzymů oxidoredukčních enzymů, nejběžnější jsou flavinmononukleotid (FMN) a flavinadeninukleotid (FAD). Riboflavin je velmi citlivý na světelné záření. Působením UV paprsků se rozkládá za vzniku neaktivních forem.

Bohatým zdrojem riboflavinu je mléko a mléčné výrobky, játra, maso, droždí a cereálie. Obsah vitamínu v potravinách ovlivňuje mnoho faktorů. Během technologického a kulinárního zpracování dochází ve většině případů k největším ztrátám výluhem. Při tepelném zpracování potravin je riboflavin velmi stálý.

Existuje řada možností stanovení riboflavinu. Často používanou metodou jeho stanovení je vysoce účinná kapalinová chromatografie. Z dalších metod lze uvést lumiflavinovou metodu, spektrometrickou metodu, kapilární elektroforézu a mikrobiologickou metodu.

Chromatografie je separační technika, která využívá dělení složek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární. Výhody chromatografických metod jsou v jejich schopnosti rozdělit, případně i kvantitativně stanovit desítky až stovky složek vzorku. Dalšími přednostmi jsou rychlost a reprodukovatelnost rozdělení, malá spotřeba vzorku a možnosti automatizace.

Cereálie (obiloviny) provázejí lidskou společnost od nepaměti. Pro lidskou výživu se přímo používá z obilovin výhradně zrno. Riboflavin je obsažen především v obalových vrstvách a klíčku zrna. Endosperm obilovin obsahuje nižší množství riboflavinu.

V diplomové práci byl stanovován obsah riboflavinu ve vybraných cereálních produktech (mouka, chléb, rohlík, cereální snídaně, těstoviny). Pro stanovení riboflavinu byla provedena optimalizace izolačního postupu vitamínu a ke stanovení obsahu byla použita metoda HPLC/UV-DAD.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VITAMINY

Vitaminy jsou esenciální složky potravy, které lze definovat jako organické exogenní esenciální biokatalyzátory heterotrofních organismů. Z hlediska jejich charakterizace je nutné zdůraznit především jejich exogennost, esenciálnost a katalytický charakter. Jsou to tedy látky, které si organismus neumí sám syntetizovat v dostatečném množství a musí je přijímat potravou.[1, 2]

Skupina vitaminů je z hlediska chemické struktury velmi různorodá a jednotlivé vitaminy se liší i konkrétní funkcí v buněčném metabolismu. Vitaminy vykonávají v organismu řadu funkcí, nejdůležitější z nich je katalytický účinek při řadě reakcí látkové přeměny, který vykazují buď samy nebo ve formě složitých sloučenin, které vznikají až v organismu. Některé vitaminy mají v živých objektech významnou úlohu jako prekursorů kofaktorů různých enzymů (hlavně vitaminy skupiny B), jiné se uplatňují v oxidačně redukčních systémech. K základním funkcím některých vitaminů patří antioxidační působení, tedy zabránění tvorby aktivních forem kyslíku. Vitaminy vykonávají stejné funkce u různých druhů organismů, ale nemusí být všemi druhy vyžadovány v potravě (nemusí být pro všechny druhy exogenními faktory), i když zůstávají faktory esenciálními.[2, 3, 4]

Potřeba většiny vitaminů je poměrně nízká. Množství potřebné k zajištění normálních fyziologických funkcí člověka je však závislé na mnoha faktorech jako je stáří, pohlaví, zdravotní stav, životní styl, stravovací zvyklosti, pracovní aktivita apod. Potřeba jednotlivých vitaminů se u různých organismů liší. Všechny organismy nepotřebují všechny vitaminy, jakmile však je určitá látka nepostradatelným biokatalyzátorem, stává se pro tento organismus vitamínem.[1, 4]

Při nedostatku některého vitamínu dochází k hypovitaminose (je-li vitamin dodáván v nedostatečném množství) nebo až k avitaminose (přechodný úplný nedostatek vitamínu projevující se poruchou některých biochemických procesů). Deficience vitaminů byla dříve jednou z hlavních příčin mnoha chorob a úmrtí. Avitaminosy však nevznikají pouze v důsledku nedostatečného množství příslušného vitamínu v potravě, ale mohou se na nich podílet i jiné faktory, jakými jsou například špatná resorpce vitamínu v trávicí soustavě a v některých případech i zvýšená potřeba vitaminů při zvýšené fyzické a psychické zátěži. Naopak nadbytek některých vitaminů se označuje jako hypervitaminosa. V našich

klimatických podmínkách se s ní prakticky nesetkáme, objeví se většinou ve spojitosti s nadměrným přísunem prostřednictvím aditivních preparátů. Zde jsou nebezpečné zejména zvýšené dávky vitaminů A a D.[1, 4, 5]

Potřeba jednotlivých vitaminů může být zásadně ovlivněna některou ze složek potravin, které zabrání plnému využití daného vitamínu nebo jej inhibují. Takové látky se označují jako antivitaminy. Jedná se o látky inhibující určitým mechanismem funkci daného vitamínu, což může vést k projevům deficiencie.[5]

Vitaminy vznikají i v těle heterotrofních organismů, a to z tzv. provitaminů. Provitaminy jsou organické sloučeniny, které samy nevykazují fyziologické účinky a mohou sloužit jako prekursory vitaminů, z nichž si organismus dokáže vitaminy syntetizovat působením ultrafialového záření nebo v enzymových systémech.[2, 4]

Vitaminy se dělí do různých skupin, například podle jejich rozpustnosti. Mezi vitaminy rozpustné v tucích, tzv. lipofilní vitaminy, patří all-trans retinoidy (vitamin A), ergokalciferol a cholekalciferol (vitamin D), tokoferoly a tokotrienoly (vitamin E), fylochinony a farnochinony (vitamin K). Mezi vitaminy rozpustné ve vodě, tzv. hydrofilní vitaminy, patří vitaminy B, tj. thiamin (vitamin B₁), riboflavin (vitamin B₂), pyridoxin (vitamin B₆), nikotinová kyselina a nikotinamid (vitamin B₃, PP), kyselina pantothenová (vitamin B₅), biotin, kyselina listová, korinoidy (vitamin B₁₂) a také kyselina L-askorbová a dehydroaskorbová (vitamin C). [2, 3, 4]

V potravinách se vitaminy vyskytují v proměnném množství zpravidla od $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ po stovky až tisíce $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ podle druhu vitamínu, druhu potravin a způsobu jejího zpracování. Vyskytují se jednak volné nebo v různých vázaných formách, obvykle vázané na bílkoviny nebo sacharidy. Významnými zdroji vitaminů jsou především základní potraviny jako je maso a masné výrobky, mléko a mléčné výrobky, vejce, chléb a jiné cereální výrobky, ovoce a zelenina, jimiž se zpravidla dostatečně pokrývá potřeba vitaminů.[2, 4]

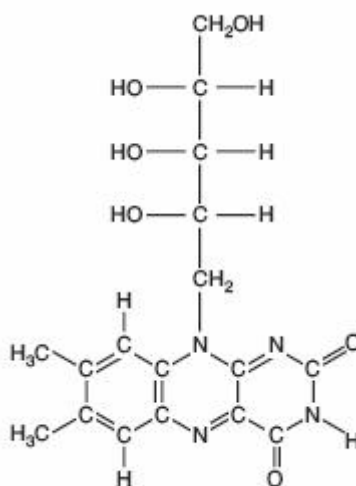
Obsah vitaminů v potravinách ovlivňuje mnoho faktorů. U potravin živočišného původu závisí obsah vitaminů hlavně na způsobu skladování a zpracování surovin a produktů. U potravin rostlinného původu je významný zejména stupeň zralosti a klimatické podmínky během růstu. U vitaminů rozpustných ve vodě dochází během technologického a kulinárního zpracování ve většině případů k největším ztrátám výluhem, u vitaminů rozpustných v tucích jsou největší ztráty způsobeny oxidací. Obsah vitaminů v potravinách

nebo surovinách je indikátorem nejen kvality a šetrnosti technologických operací použitých při výrobě, ale i vhodných podmínek skladování surovin a hotových potravinářských výrobků. Dnes jsou vitaminy využívány i k obohacování potravinářských výrobků, k tzv. fortifikaci a restituci. Restituce je doplnění jejich obsahu na původní hladiny v surovině, fortifikace je obohacování na koncentrace vyšší než bylo jejich původní množství.[1, 4, 5]

1.1 Riboflavin

Riboflavin (Obr.1), nebo-li vitamin B₂, je chemicky 6,7-dimetyl-9-(D-1-ribityl)isoalloxazin. Patří do skupiny flavinů. Základem struktury riboflavinu je isoalloxazinové jádro, na které je v poloze N-10 vázán ribitol, alditol odvozený od d-ribosy. Je to žlutá krystalická látka. [1, 2, 6]

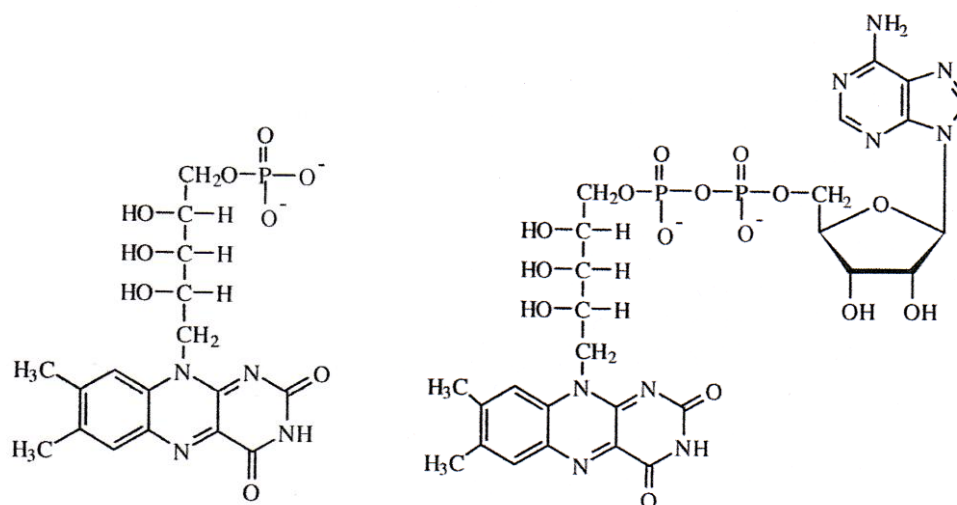
Jednou z nejvýznamnějších vlastností riboflavinu je možnost účastnit se oxidačně redukčních reakcí. Při redukci přijímá isoalloxazinové jádro riboflavinu dva atomy vodíku a vytváří se bezbarvý 1,5-dihydroriboflavin. Na vzduchu dochází k jeho zpětné oxidaci. Další redukovanou formou (vznikající dvouelektronovou redukcí při některých enzymových reakcích) je 4a,5-dihydroriboflavin.[1, 2, 4, 6, 7]



Obr. 1. Riboflavin

V biochemických systémech se riboflavin vyskytuje ve formě koenzymů oxidoredukčních enzymů. Nejběžnější jsou flavinmononukleotid (FMN) a flavinadeninukleotid (FAD), jejich vzorce jsou na obrázku (Obr. 2). U FMN není pojmenování zcela správné, protože nejde o nukleotid, tj. N-glykosid ribosafosfátu. FAD má stejně jako pyridinové nukleotidy

vázány adenisinmonofosfát a riboflavinofosfát pyrofosfátovou vazbou. FMN a FAD jsou pevně vázány na proteinový apoenzym. Flavinové koenzymy se snadno redukují. Tato reakce je reversibilní a umožňuje přenos vodíku ze substrátu na akceptor pomocí flavinových enzymů. Aby mohl enzym splnit svou katalytickou funkci, musí být flavinový systém znovu oxidován; děje se tak na téže enzymové bílkovině, nejčastěji zapojením dalšího enzymového systému. Většina enzymů je součástí dýchacího řetězce lokalizovaného v mitochondriích, některé enzymy se účastní i jiných metabolických pochodů. [4, 6, 7, 8]



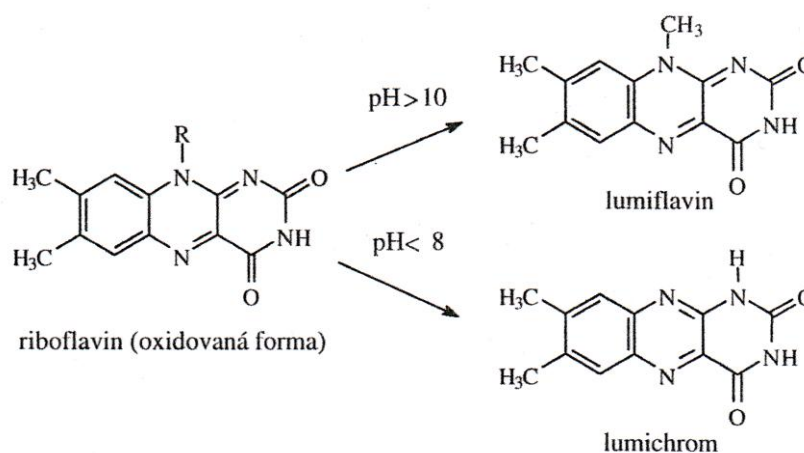
Obr. 1. Flavinmononukleotid a flavinadenindinukleotid

Syntéza FMN, FAD a flavinových enzymů je kontrolována thyroïdními hormony. Flavinové enzymy se zúčastňují řady oxidačních reakcí v intermediárním metabolismu. Jsou především akceptory vodíkových atomů z redukovaných pyridinových koenzymů. Také se zúčastňují oxidačních reakcí, při nichž jsou substrátu odebírány dva vodíkové atomy za vzniku dvojné vazby. Příkladem je oxidace kyseliny jantarové na kyselinu fumarovou katalyzovaná *FAD-oxidoreduktasou*. Riboflavin se účastní také procesu vidění tím, že převádí krátkovlnné modré paprsky na žlutozelené a tím umožňuje vidění za šera. Koncentrace riboflavínu v oku je vysoká, volně se vyskytuje hlavně v sítnici. [2, 5, 9]

1.1.1 Reaktivita riboflavínu

Riboflavin je poměrně stálý vůči teplu, především v kyselých roztocích. V neutrálním a alkalickém prostředí za přístupu světla jsou všechny flaviny nestálé, zvláště pak volný riboflavin a FMN. Tyto sloučeniny působí jako fotosenzibilizátory typu I a II, absorbovanou světelnou energii předávají vzdušnému kyslíku, ze kterého vzniká singletový kyslík a ten

oxiduje další organické sloučeniny. Riboflavin je velmi citlivý především na světelné záření. Má vysoký stupeň přírodní fluorescence, pokud je vystaven UV záření. Této vlastnosti může být využito při jeho detekci a stanovení. Účinkem světla v neutrálním nebo kyselém prostředí odštěpením postranního řetězce přechází na lumiflavin, v alkalickém prostředí poskytuje za stejných podmínek lumichrom (obr.3).[1, 4, 9]



Obr. 2. Fotolýza riboflavinu

Oba flaviny vzniklé fotodegradací riboflavinu jsou účinnější oxidační činidla než samotný riboflavin. Interakcí těchto flavinů s tripletovým kyslíkem vzniká singletový kyslík, reaktivní radikály a peroxid vodíku. Reakcí peroxidu vodíku s železnatými ionty vzniká hydroxylový radikál, který je velmi účinným oxidačním činidlem. [4]

1.1.2 Fyziologie a výživa

Flavinmononukleotid a flavinadeninukleotid se štěpí v proximální části tenkého střeva: absorpce nízkých koncentrací riboflavinu je regulována pomocí saturačního mechanismu, vyšší koncentrace jsou absorbovány pasivní difuzí. Po fosforylaci vlivem korových enzymů je riboflavin dále transportován ve vazbě na bílkovinu především do jater, srdce a ledvin, kde ale nemůže vytvářet významné zásoby. Proto je třeba, aby příjem riboflavinu potravou byl relativně pravidelný. [3]

Riboflavin je důležitý pro tvorbu látek, které jsou nezbytné pro přeměnu a produkci energie z bílkovin, tuků a sacharidů. Přeměňuje vitamin B₆ a listovou kyselinu na aktivní formy, aby v organismu mohly plnit svoje funkce. Vitamin B₂ podporuje tvorbu imunitních buněk a je také důležitý pro správnou funkci jater. Riboflavin ovlivňuje kvalitu nehtů, vlasů a kůže.

Pomáhá léčit chudokrevnost, napomáhá vstřebávání železa a stimuluje tvorbu červených krvinek. Riboflavin je důležitý při tvorbě hormonu štítné žlázy, který urychluje metabolismus a pomáhá zajišťovat energetickou potřebu pro všechny tělesné orgány. [10, 11, 12, 13]

Hodnota doporučeného denního příjmu riboflavinu je vzhledem k jeho působení v energetickém metabolismu a metabolismu bílkovin závislá na obsahu bílkovin a energetické hodnotě potravy. Měla by být v souladu s energetickým výdejem a tělesnou hmotností konzumenta. Riboflavin se nejlépe vstřebává za přítomnosti ostatních vitaminů skupiny B a minerálu selenu.[3, 10, 14]

Denní potřeba vitamínu se udává v mezích od 0,4 mg (u kojenců) do 1,7 mg (u adolescentů a dospělých mužů). U žen je denní potřeba vitamínu poněkud nižší 1,2-1,3 mg. Zvýšený denní příjem na 1,8 mg, i vyšší, se doporučuje těhotným a kojícím ženám, při infekčních onemocněních, po chirurgických zákrocích a při zvýšené aktivitě štítné žlázy. [4, 5, 13, 15]

Nedostatečný příjem riboflavinu (méně než $0,5 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$) trvající více než 100 dní vede ke vzniku hypovitaminózy. Nejčastěji je diagnostikována u osob, které konzumují nedostatečné množství mléka a mléčných produktů. Kromě toho může být způsobena používáním orální antikoncepce, dlouhodobým působením stresu, nemocemi štítné žlázy, diabetes mellitus, záněty tenkého střeva, alkoholismem a u dětí hyperbilirubinemií. Nedostatek riboflavinu se u člověka projevuje zánětlivými změnami sliznic a kůže, některými očními nebo nervovými poruchami. [3, 5, 8, 10, 12]

Nedostatek vitamínu B₂ se v industrializovaných zemích objevuje zřídka a jen u omezených populačních skupin. Nedostatečná saturace riboflavinem byla indikována u striktních vegetariánů a veganů. Obvykle se u těchto osob projevuje nedostatek riboflavinu spolu se symptomy nedostatku ostatních vitaminů skupiny B. Typickým místem jeho výskytu jsou země třetího světa, kde především dětská populace trpí protein-kalorickou malnutricí. [3]

Neexistuje žádné skutečné riziko předávkování riboflavinem, neboť je rozpustný ve vodě a tedy i největší dávky jsou z organismu rychle vylučovány močí. [12, 14]

1.1.3 Výskyt riboflavinu v potravinách

Riboflavin, především jako FMN a FAD, méně jako volný vitamin, se nachází ve většině potravin. Bohatým zdrojem riboflavinu je mléko a mléčné výrobky, játra, maso, droždí a cereálie. Odhaduje se, že téměř 40 % vitamínu získaného potravou zajišťuje mléko a mléčné výrobky, asi 20 % pak maso a 15 % cereálie. [3, 4, 15]

V mléce je riboflavin z části vázán na α S- a β -kasein, asi 14 % riboflavinu je ve formě FAD a 4 % jako FMN. V menším množství se v mléce vyskytují také některé další flaviny. Z živočišných surovin jsou dobrými zdroji riboflavinu také játra, ledviny, maso a vejce.[4,9]

Kromě riboflavinu, FMN a FAD se ve vyšších rostlinách vyskytuje velký počet dalších derivátů riboflavinu vykazujících biologickou aktivitu obdobnou riboflavinu. Z rostlinných zdrojů se ve větším množství nachází v obilných klíčcích a luštěninách. V zelenině a ovoci je jeho obsah nízký. V cereáliích se riboflavin nachází především v klíčcích a v aleuronové vrstvě, proto obsah riboflavinu v mouce závisí na stupni vymletí. [3, 4]

Obilné výrobky, které obsahují poměrně málo riboflavinu, jsou často fortifikovány tímto vitamínem. Fortifikuje se mouka, snídaňové cereálie, ale také instantní polévky, výživa pro kojenče a cukrovinky. Riboflavin je také povoleným barvivem pro potraviny a farmaceutické přípravky.[3, 14, 15]

Bohatým zdrojem riboflavinu je pekařské droždí. V pekařském droždí se vyskytují i další deriváty flavinu. Polští vědci zkoumali přítomnost těchto derivátů ve vzorcích pekařského droždí, kde kromě FMN a FAD bylo nalezeno také malé množství volného riboflavinu a stopy 10-formylmethylflavinu. V některých vzorcích bylo nalezeno malé množství nového derivátu flavinu, který byl na základě fyzikálních a chemických vlastností označen jako cyklický 4',5'-riboflavin fosfát. Tato sloučenina je nejspíš produktem rozkladu FAD a dříve byla chybně označována jako FMN. [16]

Obsah riboflavinu ve vybraných potravinách uvádí tabulka (Tab. 1).

Tab. 1. Obsah riboflavinu ve vybraných potravinách [4,17]

Potravina	Obsah riboflavinu [mg.kg ⁻¹]	Potravina	Obsah riboflavinu [mg.kg ⁻¹]
Maso vepřové	0,9-3,5	Luštěniny	1,2-2,8
Maso hovězí	0,4-3,5	Zelí	0,5
Maso kuřecí	0,7-2,8	Špenát	0,6-3,4
Játra vepřová	29-44	Rajčata	0,3-0,4
Ryby	1,0-3,3	Mrkev	0,5-2,6
Mléko	0,2-3,0	Brambory	0,3-2,0
Sýry	3,3-5,7	Jablka	0,1
Vejsce	2,8-3,5	Citrusové ovoce	0,2-0,4
Chléb	0,6-1,5	Ořechy	0,2-1,3
Ovesné vločky	1,04	Mouka pšeničná hladká	0,5
Rýže	0,31	Mouka pšeničná polohrubá	0,31
Droždí	17-44	Mouka pšeničná hrubá	0,21

1.1.4 Ztráty riboflavinu při zpracování potravin

Při tepelném zpracování potravin je riboflavin velmi stálý, degraduje však při ozáření. Aby se zabránilo fotochemické degradaci riboflavinu, neměly by se potraviny obsahující větší množství vitamínu vystavovat účinkům slunečního záření. Měly by se skladovat ve vhodných neprůhledných nebo alespoň barevných obalech.[4]

Při vaření a pečení masa jsou ztráty riboflavinu způsobeny především výluhem. Rovněž během zmrazování a mrazírenského skladování masa jsou ztráty nízké (po 15 měsíčním skladování asi 15%). Významné ztráty vitamínů nastávají až vyluhováním při nesprávném rozmrazování a u riboflavinu mohou činit až 10 %.[4, 18]

Během obvyklých technologických operací (např. pasteraci, sterilaci) je riboflavin v mléce velmi stálý, ztráty nedosahují ani 5%. K značným ztrátám riboflavinu v mléce dochází přímým ozářením slunečním světlem. Při skladování mléka na slunci degraduje za 1 hodinu asi 20-40% přítomného vitamínu. Podobné účinky má také rozptýlené denní světlo. Čerstvé mléko vystavené světlu může ztratit 20 až 80 % obsahu riboflavinu do dvou hodin. Rychlost a rozsah ztrát závisí na intenzitě světla, teplotě prostředí a vlastnostech obalu.[4, 18]

Obiloviny obsahují značné množství vitamínu. Obsah riboflavinu v mouce závisí na stupni vymílání. V celozrnných moukách je jeho obsah vyšší než v moukách málo vymílaných. Během pečení jsou ztráty rovněž malé (do 10%), vyšší ztráty (až 30%) byly zjištěny u mouk

obohacených riboflavinem. U vařených těstovin dosahují ztráty podle druhu těstovin 35 až 55%. [4]

Významnou složkou naší stravy jsou brambory, proto je změněnám jejich nutriční hodnoty při různé délce skladování a úpravě věnována značná pozornost. Při tříměsíčním skladování zimních odrůd nedochází k žádným ztrátám riboflavinu. Po šestiměsíčním uložení jsou ztráty riboflavinu asi 7%. Ztráty riboflavinu při vaření brambor ve slané vodě činí 43%. Retence riboflavinu po tepelné úpravě ve vybraných pokrmech jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2. Retence riboflavinu po tepelné úpravě ve vybraných pokrmech [3]

Tepelná úprava	Pokrm	Retence riboflavinu (%)
Pečení	hovězí maso	95
	kuře	90
	vepřové maso	95
	moučná jídla	90
Smažení	játra	90
Vaření	mléko ohřívání 10 minut	100
	zelenina kořenová	90
Sušení	ovoce	90

1.2 Stanovení vitaminů

Stanovení vitaminů v potravinářském materiálu je velmi složitý úkol, neboť jejich koncentrace jsou ve srovnání s ostatními složkami analyzovaného vzorku velmi nízké. Vitaminy jsou rovněž látky ve většině případů velmi citlivé k oxidaci a někdy i na světelné záření. Skupina vitaminů je chemicky tak heterogenní, že nelze použít žádné univerzální metody ke stanovení celé skupiny vitaminů, i když v poslední době se v potravinářské analýze využívají vysoce účinné chromatografické metody, které umožňují stanovení většího počtu vitaminů dohromady.[19]

1.2.1 Metody stanovení riboflavinu

V současnosti dochází neustále k zlepšování a vývoji nových metod, které jsou využívány pro stanovení riboflavinu. Velmi rozšířenou metodou stanovení riboflavinu je HPLC. Používá se i lumiflavinová, fluorimetrická metoda, kapilární elektroforéza, tenkovrstvá chromatografie a mikrobiologická metoda. Při stanovení vyšších koncentrací riboflavinu lze použít i polarografické metody. [19, 20, 21, 22]

Izolace riboflavinu

Před samotným stanovením riboflavinu je potřeba provést jeho izolaci. Riboflavin je v potravinách vázán esterickou vazbou na kyselinu fosforečnou ve formě koenzymů specificky vázaných na svůj bílkovinný nosič - apoenzym. K jeho uvolnění se používá hydrolyza mineralními kyselinami, jako jsou kyselina chlorovodíková nebo kyselina sírová. Kromě kyselé hydrolyzy lze použít také enzymatickou hydrolyzu *takadiastasou*, *claradiastasou*, *papainem* aj. Může být použita i kombinace obou hydrolyz.[23]

Lumiflavinová metoda

Pro stanovení riboflavinu se často používá lumiflavinová metoda založená na stanovení lumiflavinu, který vzniká fotolýzou riboflavinu v alkalickém prostředí. Přímé fluorimetrické stanovení lze použít jen v některých případech; je méně specifické a je rušeno ostatními fluoreskujícími látkami.[19, 20]

Při stanovení lumiflavinovou metodou se riboflavin ze vzorku uvolní kyselou nebo enzymovou hydrolyzou, po zalkalizování se převede ozářením na lumiflavin, který se po extrakci chloroformem stanoví fluorimetricky. Vzhledem k fotolabilitě riboflavínu je nutné celé stanovení provádět za minimálního přístupu světla. Metodu lze použít pro veškerý potravinářský materiál rostlinného i živočišného původu a pro farmaceutické preparáty. Lumiflavinová metoda je velmi citlivá a lze jí stanovit 0,05 - 1 μg riboflavínu v 1 ml extraktu vzorku.[19,20]

Mikrobiologická metoda

U mikrobiologické metody se sleduje růst testovaného mikroorganismu na základě obsahu přítomného vitamínu B₂, což se projeví změnou množství sušiny, která se určuje vážkově. Také je možné sledovat obsah přítomného vitamínu měřením intenzity vzniklého zákalu turbidimetricky. [19, 24]

Kapilární elektroforéza

Cataldi a kol. stanovovali obsah riboflavínu a flavinů ve vzorcích běžných potravin pomocí kapilární elektroforézy s fluorescenční detekcí. Navržená metoda umožňuje jednoduché, kvantitativní a velmi rychlé stanovení velkého počtu vzorků. Může být použita na stanovení obsahu flavinů v potravinách a nápojích rostlinného původu. V pšeničné mouce vědci stanovili nejen obsah riboflavínu 26,5 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$, ale i množství FAD 24 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ a FMN 18 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$. V mouce z tvrdé pšenice byl stanoven obsah riboflavínu 50,2 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ a v kukuřičné mouce byl obsah riboflavínu 35,4 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$, FAD 31 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ a FMN 16 $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$. [25]

Fluorescenční spektrometrie

García a kol. ve své práci použili pro stanovení riboflavínu a dalších dvou vitamínů ve vitamínových preparátech fluorescenční spektrofotometrii. Tato metoda umožňuje provést jednoduchou a rychlou analýzu, má vysokou citlivost a je aplikovatelná pro široký rozsah koncentrací. Pro riboflavin byl u této metody detekční limit 9 $\mu\text{g}\cdot \text{l}^{-1}$. Riboflavin byl

stanovován u vitaminových preparátů, kde stanovené množství bylo téměř shodné s množstvím uváděným výrobcem. [26]

Tenkovrstvá chromatografie

Polští vědci zjišťovali přítomnost derivátů flavinu v pekařském droždí pomocí tenkovrstvé chromatografie. Na tenkovrstvou chromatografii byly použity pláty silikagelu a celulosy. Vyzkoušeli několik různých vyvíjecích soustav pro oba druhy adsorbentů, přičemž jako nejvhodnější vyvíjecí soustava byla vybrána směs: n-butanol – kyselina octová – voda. Pomocí tenkovrstvé chromatografie vědci stanovili jednotlivé flavinové deriváty a podařilo se jim také identifikovat nový derivát flavinu v droždí.[16]

Stanovení riboflavinu metodou HPLC

Metoda HPLC má široký rozsah použitelnosti a dobrou přesnost analýzy umožňující stanovení malých množství s vysokým rozlišením.[23]

Metoda HPLC/UV byla použita pro stanovení obsahu riboflavinu např. v tavených sýrech. U vzorků byla provedena kyselá hydrolyza pomocí HCl a proteiny byly vysráženy kyselinou trichloroocetovou. Pro stanovení riboflavinu byla použita mobilní fáze o složení octan sodný a methanol s gradientovou elucí. Signál byl snímán detektorem při vlnové délce 270 nm.[27]

Munoz a kol. zjišťovali obsah riboflavinu v kravském mléce a náhražce mléka, ve kterém byl živočišný tuk nahrazen rostlinným. Vzorky byly před samotným stanovením upraveny octanem olovnatým a kyselinou octovou. Stanovení riboflavinu bylo provedeno metodou HPLC/UV. Při stanovení byla použita mobilní fáze o složení methanol a kyselina octová. Detekce byla provedena při vlnové délce 270 nm. Bylo zjištěno, že náhražka mléka měla mírně vyšší koncentraci riboflavinu než kravské mléko. [28]

Pro stanovení obsahu riboflavinu v játrech byla také použita metoda HPLC/UV. U vzorků jater byla provedena kyselá hydrolyza pomocí HCl a přidavkem kyseliny trichloroocetové byly vysráženy proteiny. Na konečné vyčištění byla použita činidla Carrez I a II. Mobilní fáze byla: octan sodný a methanol. Byla použita gradientová eluce. Signál byl snímán detektorem UV při vlnové délce 270 nm. Nejvyšší obsah riboflavinu byl stanoven u kuřecích jater, nejnižší obsah měla játra hovězí. [23]

Cílem práce maďarských vědců bylo stanovit obsah thiaminu a riboflavinu ve vepřovém mase a játrech metodou HPLC/UV. U vzorků byla použita kombinace kyselé a enzymové hydrolyzy na uvolnění vitaminů. Na kyselou hydrolyzu byla použita HCl a na enzymovou *takadiastasa*, *claradiastasa* a *papain*. Mobilní fáze měla složení dihydrogenfosforečnan draselný a acetonitril. Byl použit UV detektor při vlnové délce 254 nm. Stanovený obsah riboflavinu ve vepřovém mase a játrech byl srovnatelný s obsahem uváděným v literatuře. [29]

Ekinci zjišťoval obsah riboflavinu v tradičním tureckém cereálním pokrmu tarhana. Tarhana se vyrábí z pšeničné mouky, jogurtu, droždí a vařené zeleniny. Vitamin byl ze vzorků extrahován pomocí metody SPE - extrakce na pevné fázi. Na stanovení vitaminu byla použita metoda HPLC/UV. Mobilní fáze byla hydrogenfosforečnan draselný a methanol. Detekce byla provedena při vlnové délce 220 nm. [30]

Monferrer-Pons a kol. použili pro stanovení riboflavinu a dalších čtyř ve vodě rozpustných vitaminů v multivitaminových přípravcích metodu HPLC s přímým nástřikem a UV detekcí. Běžně používanou mobilní fází je propanol, ale použití jiných alkoholů může být výhodné pro zvýšení přesnosti. Mobilní fáze byla pentanol a fosfátový pufr. Stanovené obsahy riboflavinu v multivitaminových přípravcích se příliš nelišily od obsahů deklarovaných výrobcem. [31]

Moreno a kol. použili ve své práci pro stanovení pěti ve vodě rozpustných vitaminů v multivitaminových preparátech metodu HPLC/UV. Mezi stanovovanými vitaminy byl i riboflavin. Vzorky byly upraveny metodou SPE - extrakcí na pevné fázi. Při této extrakci jsou odstraněny ze vzorku složky, které by rušily chromatografické stanovení vitaminu. Poté byly vitaminy analyzovány pomocí HPLC. Byla použita mobilní fáze o složení methanol a octan sodný. UV detekce byla provedena při vlnové délce 270 nm. Stanovený obsah riboflavinu v multivitaminovém preparátu byl o něco vyšší než obsah uváděný výrobcem. [32]

Höller a kol. použili pro automatické stanovení riboflavinu, riboflavin-5'-fosfátu a dalších pěti ve vodě rozpustných vitaminů ve vitaminových tabletách metodu HPLC s UV detekcí. Automatické stanovení zahrnuje úpravu vzorku (extrakci, homogenizaci, filtraci) i jeho nástřik do chromatografu. U vzorku byla provedena extrakce kyselinou octovou a acetonitrem. Mobilní fáze byla: fosfátový pufr a methanol. Pro stanovení riboflavin-5'-

fosfátu byla použita vlnová délka 264 nm a pro stanovení riboflavinu 280 nm. Tato nová automatická metoda byla uznána použitelnou pro běžnou analýzu všech typů multivitaminových tablet. Stanovené množství riboflavinu ve vitaminových tabletách bylo o něco nižší než množství uvedené výrobcem.[33]

Španělská vědci navrhli kapalinovou chromatografii pro separaci a stanovení devíti vitaminů skupiny B, mezi nimiž byl i riboflavin, v dětské výživě. Metoda je založena na použití nové amidové stacionární fáze. Mobilní fází byl acetonitril s fosfátovým pufrům. Byla použita gradientová eluce a detektor s diodovým polem. U vzorků byla provedena kyselá hydrolyza HCl a enzymová hydrolyza *takadiastasou*. Použitá metoda poskytla velmi dobré výsledky pro analyzované vzorky dětské výživy. [34]

Chen a kol. použili pro souběžné stanovení 10 ve vodě rozpustných vitaminů, mezi nimiž byli riboflavin, v multivitaminových tabletách metodu HPLC/ESI-MS. Jedná se o nově vyvinutou metodu, která je dostatečně citlivá a selektivní. Mobilní fází byl methanol ve vodném roztoku heptafluormásečné kyseliny a byla použita gradientová eluce. Stanovený obsah riboflavinu ve vitaminových tabletách byl téměř shodný s obsahem uváděným výrobcem.[22]

Dánský vědec ve své práci optimalizoval použití směsi enzymů a ultrazvuku na uvolnění proteinových a fosfátových vazeb riboflavinu při stanovení jeho obsahu v potravinách. Směs enzymů obsahovala *α-amylasu*, *proteinasu* a *fosfatasu*. Použití ultrazvuku při enzymové hydrolyze urychluje průběh celého procesu. Pro srovnání byla provedena také hydrolyza kombinací HCl a *takadiastasy*. Stanovení obsahu vitaminů bylo provedeno u 16 vzorků, mezi nimiž byly mléčné výrobky, maso, zelenina, cereálie a droždí, metodou HPLC s fluorescenčním detektorem s excitační vlnovou délkou 468 nm a emisní vlnovou délkou 520 nm. Mobilní fází byl methanol upravený pufrům. U obou způsobů hydrolyzy byly zjištěny téměř shodné obsahy riboflavinu v analyzovaných vzorcích. [35]

Russell a kol. použili plně automatickou metodu pro souběžné stanovení FMN, FAD a riboflavinu ve vzorcích potravin (játra, maso, vejce, mléko). Jedná se o kombinaci automatické extrakce a metody HPLC. Automatická extrakce byla srovnána s extrakcí provedenou manuálně. U obou extrakcí byl použit methanolem, methylen chlorid a fosfátový pufr. Stanovení bylo provedeno metodou HPLC s fluorescenčním detektorem, kde excitační vlnová délka byla 450 nm a emisní vlnová délka 522 nm. Mobilní fází byl

acetonitril upravený fosfátovým pufrem. Po manuální i automatické extrakci nebyl zaznamenán významný rozdíl v obsahu FMN, FAD a riboflavinu u jednotlivých vzorků.[36]

Gliszcyńska a Koziolowa testovali pomocí HPLC přítomnost derivátů flavinu v pekařském droždí. HPLC s fluorescenčním detektorem se používá pro kvalitativní a kvantitativní stanovení riboflavinu a všech jeho derivátů v přírodních zdrojích. Tato metoda dává více možností separace a stanovení všech složek flavinu, i když jsou obsaženy ve velmi malém množství. Stanovení FAD a FMN vyžaduje extrakci, při které nedojde k jejich hydrolyze. FMN je stabilní ve vodném prostředí při pH 7. FAD je relativně stabilní v destilované vodě a nemění se při teplotě do 60 °C. Při stanovení byly použity tři druhy mobilní fáze: methanol s hydrogenuhličitanem amonným, methanol s octanem amonným a methanol s demineralizovanou vodou. Pro isoalloxazinové deriváty byl použit fluorescenční detektor, kde excitační vlnová délka byla 450 nm a emisní vlnová délka 530 nm. Pro alloxazinové deriváty byla excitační vlnová délka 380 nm a emisní 430 nm. Obsah celkových flavinů v čerstvém droždí byl 17,9 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. [16]

Španělská vědci stanovovali obsah riboflavinu, FMN a FAD u 16 druhů vína, 6 druhů piva a 4 druhů džusů metodou HPLC s fluorescenční detekcí, kde excitační vlnová délka byla 265 nm a emisní vlnová délka 525 nm. Pro tuto metodu měla mobilní fáze složení dihydrogenfosforečnan sodný s kyselinou fosforečnou a acetonitril. Byla použita gradientová eluce. Riboflavin byl stanoven u všech druhů vína, u dvou druhů byl stanoven FMN. Pouze u jednoho druhu piva byl stanoven FMN, FAD byl stanoven u všech druhů piva stejně jako riboflavin. U všech druhů džusu byl stanoven FAD, FMN a riboflavin. Nejvyšší obsah riboflavinu byl stanoven v pivu a nejvyšší obsah FMN a FAD měly džusy. [37]

2 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Chromatografie je separační technika, která využívá dělení složek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární. Při dělení dochází k opakovanému transportu molekul složek do stacionární fáze a zpět do fáze mobilní. Výhody chromatografických metod jsou v jejich schopnosti rozdělit, případně i kvantitativně stanovit desítky až stovky složek vzorku. Dalšími přednostmi jsou rychlost a reprodukovatelnost rozdělení, malá spotřeba vzorku a možnosti automatizace. [38, 39, 40, 41]

Kapalinová chromatografie je jednou z chromatografických separačních metod. Pro všechny metody kapalinové chromatografie platí, že mobilní fázi tvoří kapalina. Stacionární fáze představuje sorbent, který může být umístěn plošně anebo v uzavřené trubici (koloně). Z tohoto hlediska se také vyvinuly i názvy jednotlivých metod kapalinové chromatografie. V plošném uspořádání to jsou metody papírové a tenkovrstvé chromatografie, v kolonové chromatografii se jedná o klasickou sloupcovou chromatografii a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC – High Performance Liquid Chromatography). [38, 42, 44]

2.1 HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie zahrnuje soubor metod založených na různém mechanismu separace, jejichž společným pojátkem je použití kapalné mobilní fáze, vysokotlaké techniky a účinných kolon pro rychlou analýzu. Tyto metody lze dále členit na [38, 41]:

- chromatografii v systému kapalina-kapalina, která se v dnešní době používá již jen v omezené míře,
- chromatografii v systému kapalina-tuhá fáze.

Chromatografie v systému kapalina-tuhá fáze se dále dělí na:

- chromatografii na polárních adsorbentech,
- chromatografii na nepolárních a na středně polárních chemicky vázaných fázích,
- iontově výměnnou chromatografii,

- gelovou permeační chromatografi využívající sterické vyluky látek,
- afinitní chromatografi.

2.1.1 Frontální chromatografie

Kontinuální přívod analyzovaného materiálu nebo jeho směsi s nesorbovanou mobilní fází do kolony vede nejprve k frontální chromatografii a posléze k nasycení sorbentu všemi složkami přiváděného materiálu. Po vyvinutí chromatogramu se při pokračujícím přívodu směsi nejprve vymyje fronta nejméně sorbované složky, po ní směs první složky a silněji sorbované složky atd. Až po proražení směsi všech složek odchází z kolony směs stejného složení jako směs přiváděná. Přerušением přívodu analyzované směsi do již nasycené kolony a připojením přívodu samotné mobilní fáze dojde k vývoji opačného frontálního chromatogramu.[39, 43]

2.1.2 Eluční chromatografie

Z hlediska separace analyzované směsi je účinnější eluční chromatografie. Na vstup kolony se zavede jednorázově dávka analyzovaného materiálu, která se pak promývá kolonou proudem nesorbované mobilní fáze. Přitom dochází k vývoji a diferenciální migraci elučních zón jednotlivých složek směsi. Při pokračujícím přívodu mobilní fáze nakonec dojde k postupnému vymývání jednotlivých zón ven z kolony.[39, 43]

2.1.3 Vytěšňovací chromatografie

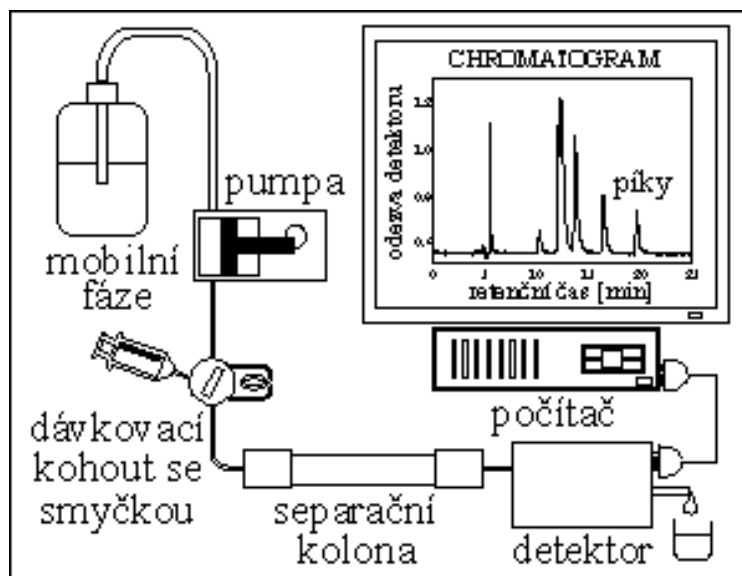
Pokud stacionární fáze funguje jako adsorbent a za mobilní fázi se použije látka, která se adsorbuje silněji než kterákoliv složka analyzované směsi pak při jinak stejném postupu jako u eluční chromatografie dojde k vytěšňovací chromatografii. Nejméně adsorbovaná složka je vytěšňována silněji adsorbovanou složkou, až nejsilněji adsorbovaná složka analyzované směsi je vytěšňována přiváděným vytěšňovacím činidlem.[39, 43]

2.2 Kapalinový chromatograf

Kapalinový chromatograf (Obr. 3) se skládá ze [38, 41, 45]:

- zásobníku mobilní fáze,

- čerpadla,
- dávkovače vzorku,
- kolony,
- detektoru,
- sběrače frakcí.



Obr. 3 Schéma kapalinového chromatografu

Mobilní fáze z vhodného zásobníku je dávkována vysokotlakým čerpadlem vybaveným čidlem k měření tlaku přes filtr tuhých částic, průtočný tlumič pulzů a přes zařízení pro dávkování vzorku do chromatografické kolony a detektoru. Také je možno použít řady doplňkových zařízení, jako jsou ochranné filtry a předklony, zařízení pro odplyňování mobilní fáze, ventily pro přepojování několika chromatografických kolon v průběhu separace a je možno používat i dvou či více detektorů řazených za sebou.[38, 41, 45]

2.2.1 Čerpadla

Obecným požadavkem na funkci čerpadel je, aby dávkování bylo plynulé, tj. bez pulsů, které by mohly způsobit výkyvy v detektoru. Dále musí čerpadlo zaručit konstantní průtok mobilní fáze, plynule regulovatelný v rozsahu asi $0,1$ až $10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, umožňující kvalitativní i kvantitativní analýzu. Zároveň je třeba, aby konstrukční materiál byl chemicky odolný proti korozivním účinkům dopravovaných kapalin.[38, 41, 46]

Čerpadla lze rozdělit podle toho, zda dodávají mobilní fázi bez pulsů nebo pulsující. Pulsující jsou čerpadla pístová a membránová. Při každém pohybu pístu nebo membrány vpřed dochází k vytlačení malého objemu mobilní fáze do chromatografického systému a při pohybu zpět se komora naplní. Pulsování lze značně omezit použitím zdvojených čerpadel a zařazením tlumiče pulsů.[43, 45]

Bezpulsní čerpadla jsou konstruována buď jako lineární dávkovače, nebo jako pneumatické zesilovače. Lineární dávkovač je válcová komora o objemu 200 až 500 ml, ve které se pohybuje dokonale utěsněný píst. Pneumatický zesilovač je založen na obdobném principu, ale pohyb pístu obstarává membrána o velké ploše, kterou pohybuje tlak vzduchu. [45, 46]

2.2.2 Gradientová zařízení

Složitější směsi látek lze v chromatografické koloně výhodně dělit gradientovou eluční technikou. Gradientová eluce se používá k dělení směsí, jejichž složky se značně liší retencí při eluci s konstantním složením mobilní fáze. Její princip spočívá v použití mobilních fází, jejichž složení se mění s časem. Toho se docílí mícháním několika složek v poměru, který se řídí předem zvoleným časovým programem.[38, 41, 46]

Nejjednodušší zařízení umožňující exponenciální průběh gradientu se skládá ze dvou nádob spojených trubičkou. V první nádobě je méně polární, v druhé polárnější eluent. Pístové nebo membránové čerpadlo saje z první nádoby a dodává eluent do kolony. Polárnější eluent pomalu vtéká do první nádoby a míchadlo zajišťuje promíchávání. Moderní gradientová zařízení se mohou skládat ze dvou lineárních dávkovačů, které jsou elektronicky řízeny tak, aby se v průběhu experimentu jednotlivá čerpadla podílela na celkovém průtoku požadovaným podílem.[39, 43, 45]

2.2.3 Dávkování vzorků

Konstrukce zařízení pro dávkování vzorku na chromatografickou kolonu může významně ovlivnit účinnost separace. Při nedokonalém dávkování může docházet k významnému rozšiřování elučních zón vlivem mimokolonového příspěvku dávkovacího zařízení, zejména při použití vysoce účinných kolon.[38, 46]

Vzorek se dávkuje do kolony buď přímým nástřikem stříkačkou, předřazenou dávkovací smyčkou nebo automatickými dávkovači.[38, 47]

Pro přímý nástřik je kolona opatřena nástřikovací hlavou se septem. Stříkačky pro kapalinovou chromatografii mají speciální konstrukci, jsou plynotěsné a může se jimi nástřikovat vzorek až do přetlaku 10 MPa. Nástřikovací hlava musí mít malý objem a celý prostor musí být dokonale vyplachován mobilní fází.[42, 45]

Druhý způsob dávkování používá šesticečný kohout s dávkovací smyčkou. Dávkovací smyčka se známým objemem je součástí vícepolohového ventilu, který umožňuje změnit postup mobilní fáze do kolony. V jedné poloze je zdroj toku spojen přímo s kolonou a s vlastní dávkovací smyčkou je možno libovolně manipulovat. Otočením kohoutu do druhé polohy je smyčka vřazena do kapalinového vedení mezi čerpadlo a kolonu a její obsah je mobilní fází vytlačen do kolony.[42, 45]

Při třením způsobu dávkování vzorků se používají automatické dávkovače, které na rozdíl od předchozích manuálních způsobů umožňují dávkovat automaticky řadu vzorků po sobě bez zásahu obsluhy přístroje. To je výhodné zejména pro sériové rutinní analýzy řady vzorků, zejména pokud lze dávkovač ovládat řídicím počítačem, který současně kontroluje zpracování dat. Dávkovač se skládá ze zásobníku s nádobkami se vzorky, které se před každým nástřikem posunou pod stříkačku dávkovače. Ta vzorek nádoby nasaje do dávkovací smyčky, po přepnutí ventilu se vytlačí vzorek ze smyčky do chromatografické kolony.[38, 41, 42]

2.2.4 Chromatografické kolony a jejich náplně

Volba vhodné kolony má ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii rozhodující význam, neboť výsledek chromatografické analýzy je především určován kvalitou kolony a její náplně. Optimálního využití vlastností chromatografické kolony se dosáhne pouze v přístroji, kde jsou i ostatní části konstruovány s ohledem na použitou chromatografickou kolonu.[38, 44, 47]

Kolony pro HPLC jsou rovné trubice s hladkým vnitřním povrchem, zhotovené z materiálu, který musí odolávat jak relativně vysokým pracovním tlakům, tak i chemickému působení mobilních fází a separovaných látek, na něž rovněž nemá působit katalyticky, aby nedošlo k rozkladu vzorku v průběhu analýzy. Používají se bezešvé trubice s vnitřním povrchem z antikorozi oceli nebo niklu. Do tlaků 20 MPa lze použít i kolony ze speciálně vytvrzeného

skla. Používají se i trubice z vysoce inertních plastů, umístěné ve speciálních kovových pouzdrech.[38, 43]

Délka kolony je závislá jednak na materiálu, kterým je naplněna a také na tom, kolik teoretických pater je potřeba k separaci dané směsi látek. Pokud se vychází z toho, jakým materiálem je kolona plněna, pak platí, že čím menší je zrnění sorbentu, tím je kolona kratší. Vnitřní průměr kolon a tloušťka stěny závisí na tom, z jakého materiálu jsou kolony zhotoveny. Pro tlaky vyšší než 50 MPa se musí použít nerezová ocel a poměr vnitřního průměru a tloušťky stěny má být nejvýše 1 : 0,25. Pro skleněné kolony se doporučuje nepřekračovat 10 MPa, přičemž tloušťka stěny má být 3 až 6 mm. [39, 46]

V analytických kolonách se používají náplně s porézními částicemi o velikosti 3-10 μm sférického nebo nepravidelného tvaru. Jsou vyvíjeny i neporézní náplně pro chromatografii v systému s obrácenými fázemi. V systémech s obrácenými fázemi se používají oktadecylsilikagel, oktylsilikagel a nepolární chemicky vázané fáze s alkyly o jiných délkách a s chemicky vázanými aryly nebo alkylaryly. V systémech s normálními fázemi je nejčastěji používaným polárním adsorbentem silikagel.[42, 43]

2.2.5 Detektory

Detektor poskytuje informace o složení eluátu vystupujícího z kolony, a tím umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení výsledků analýzy. Detektor sleduje pomocí vhodného snímače některou z vlastností eluátu a signál se po zesílení přivádí do zapisovače, který poskytuje záznam závislosti intenzity daného signálu na čase. K detekci separovaných látek se zpravidla využívá jejich určitých vlastností, jimiž se tyto látky liší od složek mobilní fáze.[42, 46]

Rozlišují se dva typy detektorů – selektivní a univerzální. U selektivních detektorů je jejich signál úměrný koncentraci samotné detekované látky v eluátu. U univerzálních detektorů je jejich odezva úměrná určité vlastnosti eluátu jako celku, tj. analyzované látky a mobilní fáze.[38, 43]

Ideální detektor pro kapalinovou chromatografii by měl umožňovat detekci všech typů látek, měl by poskytovat okamžitou a lineární koncentrační odezvu v co nejširším rozmezí koncentrací analyzované látky, měl by mít vysokou citlivost a nízkou úroveň šumu, neměl by být citlivý ke změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty, měl by mít minimální

příspěvek k rozšiřování elučnicích zón látek a měl by umožňovat použití gradientové eluce či jiných technik s programovanou změnou pracovních podmínek.[38, 46]

Nejpoužívanější detektory jsou:

Fotometrické detektory

Fotometrické detektory pracují v ultrafialové (vlnová délka 280-400 nm) a viditelné oblasti (vlnová délka 400 -700 nm). Lze je dělit do čtyř základních typů [42, 43, 45]:

- 1) Detektory, které pracují s jednou pevně nastavenou vlnovou délkou, používají většinou jako zdroje záření nízkotlakou rtuťovou výbojku opatřenou na výstupu záření interferenčním filtrem. Měří rozdíl absorbance mezi měrnou a srovnávací celou, v níž může být buď vzduch nebo mobilní fáze.
- 2) Na stejném principu jsou založeny detektory, u nichž lze volit mezi několika předem danými vlnovými délkami pomocí vyměnitelných interferenčních filtrů.
- 3) Detektory vybavené polychromatickým zdrojem záření, nejčastěji deuteriovou výbojkou a monochromátorem, jsou z konstrukčního hlediska malé spektrofotometry s průtočnými mikrokyvetami. Tyto detektory umožňují volit libovolnou vlnovou délku záření pro detekci.
- 4) Spektrofotometrické detektory s rychlým záznamem spektra bez přerušení chromatografické separace jsou většinou založeny na současném měření signálu velkého počtu miniaturních plošných fotodiod – tzv. „photodiode-array“ detektory. Tyto detektory umožňují současnou detekci a integraci signálů při několika vlnových délkách.

Fluorimetrické a fosforimetrické detektory

Princip detekce je založen na tom, že látky s určitými funkčními skupinami v cele detektoru absorbují ultrafialové záření, jehož pohlcená energie se zčásti vyzáří ve formě luminiscenčního záření o nižší energii, než má záření excitační. Fluorimetrické detektory jsou vysoce selektivní a citlivé a uplatňují se při stopové analýze, zejména biochemicky významných látek.[41, 43, 46]

Nejjednodušší fluorimetrické detektory používají rtuťové výbojky a interferenčního filtru jako zdroje monochromatického excitačního záření a detekují fluorescenční záření současně při všech vlnových délkách po oddělení zbytku rozptýleného excitačního záření hranovým filtrem.[43, 46]

Elektrochemické detektory

Slouží k detekci látek schopných elektrochemické reakce. Tyto detektory měří proud vyvolaný při průchodu redukovatelné či oxidovatelné látky měrnou celou, ve které jsou umístěny elektrody, na něž je vloženo pracovní napětí nezbytné k průběhu elektrochemické reakce. Většinou se používá tříelektrodového systému (elektrody měrné, srovnávací a pomocné). [38, 43]

Refraktometrické detektory

Poskytují odezvu úměrnou rozdílu indexů lomu eluátu v měrné cele a srovnávací kapaliny (mobilní fáze) v referenční cele. Citlivost detekce je úměrná rozdílu indexu lomu látky a indexu lomu mobilní fáze, je však podstatně nižší než u specifických detektorů.[43, 46]

Vodivostní detektory

Tyto nespecifické detektory měří elektrickou vodivost eluátu v průtokové cele mezi dvěma elektrodami, na něž je vkládáno střídavé napětí, aby se zabránilo jejich polarizaci. Jsou vhodné pro detekci iontových látek, které zprostředkují vedení elektrického proudu v roztocích. Mobilní fáze by měla být pokud možno nevodivá, tj. voda, popřípadě vodné roztoky organických rozpouštědel.[38, 43, 46]

Hmotnostní detektor

Eluát z kolony je veden do proudu pracovního plynu (nejčastěji dusíku) a s ním do rozprašovače. Aerosol potom přechází do vypařovací kolony, kde se odpaří rozpouštědlo. Méně těžké detekované látky zůstanou v pracovním plynu ve formě tuhých částic. Na nich dojde k rozptylu světla ze světelného zdroje a rozptýlené světlo je zachycováno fotoelektrickým násobičem, který je umístěn pod úhlem 120° vůči ose světelného paprsku. Výhodou tohoto detektoru je možnost analyzovat široký rozsah sloučenin. Mohou být analyzovány také sloučeniny, které jsou teplotně nestálé nebo mají velkou molekulární hmotnost.[42, 48]

3 CEREÁLNÍ TECHNOLOGIE

Cereálie, nebo-li obiloviny, provázejí lidskou společnost od nepaměti. Na základě historických poznatků se předpokládá, že náznaky pěstování obilovin v Asii byly již ve 12. až 10. tisíciletí před naším letopočtem. První zprávy o chlebu kypřeném kváskem se objevují ve východním Středomoří kolem roku 1800 před naším letopočtem. K jeho rozšíření došlo zhruba o 1000 let později a až začátkem našeho letopočtu se rozšířila znalost výroby kvašeného těsta do střední Evropy. Obiloviny si udržely v průběhu tisíciletí výlučné postavení základní potraviny. Ve druhé polovině 20. století, ale dochází k poklesu přímé spotřeby výrobků z obilovin.[49, 50]

Pro lidskou výživu se přímo používá z obilovin výhradně zrno. Obiloviny (cereálie) patří botanicky mezi traviny – latinsky *Gramineae*. Téměř všechny známé obiloviny patří do čeledi lipnicovité, latinsky *Poaceae*. Společný botanický původ obilovin čeledi lipnicovité předurčuje jejich značnou vzájemnou podobnost jak ve struktuře a tvorbě zrna, tak v jeho chemickém složení. Vlivem různých klimatických podmínek a během staletí šlechtění a pěstování se však současně vytvořily odlišnosti mezi jednotlivými botanickými rody a druhy obilovin i mezi jednotlivými odrůdami téhož druhu. Postupem doby se zjistila vhodnost různých obilovin pro různá zpracování a proto jen některé získaly dominantní postavení ve využití pro pekárenské účely. [49, 50, 51]

Přehled potravinářsky využívaných obilovin je uveden v tabulce (Tab. 3).

Tab. 3. Přehled obilovin běžně pěstovaných a využívaných pro potravinářské účely [50,52]

Česky	Latinsky
pšenice obecná	<i>Triticum aestivum</i>
pšenice tvrdá	<i>Triticum durum</i>
žito seté	<i>Secale cereale</i>
tritikale	<i>Triticale</i>
ječmen víceřadý	<i>Hordeum vulgare</i>
ječmen dvouřadý	<i>Hordeum distichum</i>
oves setý	<i>Avena sativa</i>
rýže setá	<i>Oryza sativa</i>
kukuřice setá	<i>Zea mays</i>
proso seté	<i>Panicum miliaceum</i>
čirok	<i>Sorghum sp.</i>

3.1 Morfologická stavba zrna obilovin

Morfologická skladba zrna všech obilovin je přibližně shodná. Klas i zrno pšenice obecné je na obrázku (Obr. 4). Zrna se liší především tvarem, velikostí a podílem jednotlivých vrstev. Tvary zrna jsou od tenkých protáhlých až po téměř kulatá, zastoupení a pořadí jednotlivých vrstev je však shodné. Charakteristické pro jednotlivé obiloviny je to, zda má zrno pluchy nebo je nahé, a tvar zrna. Absolutní rozměry zrna se mohou poněkud lišit i pro stejný druh obilovin v závislosti na odrůdě, klimatických podmínkách každého roku a lokality, kvalitě půdy a agrotechnice. Každá obilka se skládá z endospermu, klíčku a obalových vrstev. [52, 53]



Obr. 4. Pšenice obecná

Endosperm představuje 84 – 86 % hmotnosti zrna, je tvořen velkými hranolovitými buňkami a obsahuje především škrob a bílkoviny. Od obalových vrstev je oddělen vrstvou aleuronových buněk, obsahujících bílkoviny, minerální látky, tuky a vitaminy. Aleuronová vrstva může být vymleta společně s endospermem do mouk nebo jí část zůstává ulpělá na otrubách. Endosperm zajišťuje výživu zárodku a při zpracování tvoří podstatnou složku finálního výrobku. Při výživě a krmení je hlavním zdrojem energie a bílkovin.[50, 52]

Klíček tvoří nejmenší část obilky. Obsahuje mnoho živin, protože slouží jako zárodek nové rostliny. Živiny musí být v době příznivých podmínek pro vyklíčení pohotově k dispozici. Mimo jednoduchých cukrů obsahuje klíček bílkoviny, aminokyseliny a značné množství vitamínu E. V klíčku je obsažen také tuk. Proto jsou klíčky před mletím obilky odstraňovány tak, aby v získané mouce nebyl tuk hydrolyzován a nevznikla žluklá chuť.[50, 54]

Obaly tvoří 8 – 14 % hmotnosti zrna. Jsou tvořena několika vrstvami buněk, které chrání endosperm a klíček před vysycháním a mechanickým poškozením. Obalové vrstvy se skládají z oplodí a osemení. Oplodí je tvořeno nerozpustnými a obtížně bobtnajícími materiály, především celulosou. Osemení nese v buňkách barviva a určuje tak vnější vzhled zrna.[50, 52]

3.2 Chemické složení obilovin

Chemické složení většiny obilovin se příliš neliší. Daleko větší variabilita ve složení je mezi odrůdami jednoho druhu obilí. Také půdní, klimatické a agrotechnické podmínky mají velmi výrazný vliv na chemické složení zrna a v některých případech i na vlastnosti jednotlivých složek.[50, 55]

Chemické složení různých druhů obilovin uvádí tabulka (Tab. 4).

Tab. 4. Obsah jednotlivých složek v obilovinách (v % hmot. při 15 % vlhkosti obilí)[50]

Obiloviny	minerálie	bílkoviny	tuky	sacharidy
Žito	1,7	9,0	1,7	70,7
Pšenice durum	1,7	13,2	2,4	65,0
Ječmen s pluchami	2,5	9,5	2,1	67,0
Oves s pluchami	3,2	10,3	4,8	56,4
Kukuřice	1,5	11,0	4,4	67,2
Proso loupané	1,8	11,5	3,9	68,1
Rýže Paddy	4,0	6,9	1,6	68,4

3.2.1 Bílkoviny obilovin

Zralá zrna obilovin obsahují podle druhů a odrůd nejčastěji 9 – 13 % bílkovin v sušině. Mezi jednotlivými obilovinami není velký rozdíl v zastoupení jejich základních složek aminokyselin. Zcela dominantní aminokyselinou v obilovinách je kyselina glutamová, která je ovšem téměř výhradně přítomna jako glutamin. Druhou nejvíce obsaženou aminokyselinou je prolin, který díky svému strukturnímu uspořádání dává předpoklady k vytvoření pružné prostorové bílkovinné struktury pšeničného těsta.[49, 54]

Ze všech obilovin jsou nejlépe prozkoumány bílkoviny pšenice, které mají také největší technologický význam. Z technologického hlediska jsou nejvýznamnější zásobní proteiny pekařských obilovin, které jsou obsaženy v endospermu, prolaminu a glutelinu, za současného vložení mechanické energie na hnětení za přítomnosti vzdušného kyslíku tvoří pevný gel, který se nazývá lepek. Při hnětení pšeničné mouky s vodou dochází ke vzniku lepku a ten tvoří vlastní „kostru“ těsta.[49, 54, 56]

Chemické složení lepku a koloidně chemický stav bílkovin ovlivňují jeho fyzikální vlastnosti. Lepek vytváří konstituci těsta tím, že tvoří trojrozměrnou síť peptidových řetězců propojených navzájem různými můstky a vazbami.[50, 55]

3.2.2 Sacharidy obilovin

V obilném zrně lze nalézt pestrou paletu sacharidů od jednoduchých cukrů až po vysokomolekulární polysacharidy.[52]

Volné monosacharidy se vyskytují ve zralých obilných zrnech pouze v nepatrném množství a to především v klíčku. Do mouky se jich dostává jen málo. Nejdůležitějšími monosacharidy v obilovinách jsou: pentosy – arabinosa, xylosa, ribosa; hexosy – glukosa, fruktosa, galaktosa, mannososa.[50, 52, 54]

Ve zralém, neporušeném a suchém zrně se i oligosacharidy vyskytují ve velmi nízkých koncentracích. Nejvíce se v zrně nachází maltosa a sacharosa.[52, 54]

Z technologického hlediska jsou vedle bílkovin nejvýznamnější skupinou biopolymerů obilovin polysacharidy. Zásobní polysacharidy, jejichž typickým představitelem je škrob, jsou pro organismy zdrojem či rezervoárem energie. Škrob je obsažen v zrnech obilovin v endospermu. Jeho obsah tvoří přibližně 60 – 75 % sušiny obilky a kolísá zhruba v uvedeném rozmezí podle druhů a odrůd. Jeho obsah v mouce, která je tvořena převážně endospermem, je ještě vyšší – cca 80 %.[50, 52, 54]

Z hlediska lidské výživy jsou důležité celulóza, hemicelulózy, lignin aj., které tvoří podstatnou část vlákniny. Dále je přítomna skupina rozpustných nebo ve vodě bobtnajících polysacharidů, které jsou schopny vytvářet vysokoviskózní a vysokovazné koloidní systémy. Patří sem např. žitné pentosany, ječné a ovesné β -glukany. [50, 52, 54]

3.2.3 Lipidy obilovin

Obilná zrna jsou na lipidy poměrně chudá. Tuk je obsažen především v klíčku a v aleuronové vrstvě. Tuky chlebových obilovin jsou nažloutlé olejovité kapaliny, které obsahují nasycené mastné kyseliny v množství 18 – 25 %, kyselinu olejovou 16 – 18 %, kyselinu linolovou 48 – 57 % a kyselinu α linolenovou - 5 %.[50, 54]

Tuk obsažený v obilce nemá větší technologický význam. V případě nevhodného skladování mouky může však dojít k hydrolyze tuku a nežádoucímu zvyšování kyselosti mouky. Žluknutí je podmíněno vyšší vlhkostí obilí a rozvojem plísní produkujících lipasy.[50, 54]

3.2.4 Vitaminy obilovin

Endosperm obilovin obsahuje poměrně málo vitaminů. V obalových vrstvách a klíčku je obsah vitaminů podstatně vyšší. Obiloviny je možno považovat za zdroj vitaminů skupiny B.[53]

Vitamin B₁ (thiamin) se v obilovinách vyskytuje ve volné formě. Obiloviny jsou považovány za jeden z hlavních zdrojů thiaminu. Je obsažen v klíčku a v aleuronové vrstvě, a tedy i v otrubách. Bílé mouky proto obsahují podle stupně vymletí až asi desetkrát méně thiaminu než celozrnné mouky. Celozrnné cereální výrobky bohaté na thiamin však obsahují také relativně vysoké koncentrace vlákniny a fytátů, které inhibují intestinální absorpci thiaminu i dalších látek. V pšenici obsah thiaminu vyšší než v žitu. [4, 52, 51]

Vitamin B₂ (riboflavin) se nachází rovněž především v klíčku a v aleuronové vrstvě. Při skladování a technologickém zpracování jsou ztráty riboflavinu poněkud vyšší než thiaminu.[4, 52, 54] O riboflavinu je více pojednáno v kapitole 1.1.

Batifoulier a kol. zjišťovali změnu obsahu riboflavinu v pšeničném zrně, mouce a chlebu. Bylo zkoumáno 49 kultivarů pšenice. Pšeničná zrna měla velmi rozdílný obsah vitamínu. Obsah riboflavinu v sušině byl 0,48 – 1,06 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Po mletí byl zůstatek vitamínu v bílé mouce 67 %. Pro srovnání v celozrnné mouce byl zůstatek vitamínu 100 %. Obsah riboflavinu v celozrnném chlebu byl dvakrát vyšší než v bílé mouce. [46]

Kyselina nikotinová a nikotinamid (vitamin B₃) jsou ve vyšších množstvích přítomny v pšenici a ječmeni. Z ječného sladu se dostávají do piva, které je jejich bohatým zdrojem.[52, 54]

Obiloviny jsou dobrým zdrojem pyridoxinu, pantothenové kyseliny a biotinu. Vyšší obsah těchto vitamínů mají celozrnné cereální výrobky a obilné klíčky.[4, 54]

Vitamin A (retinol) je obsažen ve formě svého provitaminu β -karotenu v klíčcích. Vitamin E (tokoferol) se ve vysoké koncentraci vyskytuje v pšeničných klíčcích, z nichž se dokonce izoluje při výrobě vitaminových preparátů ve farmaceutickém průmyslu.[52, 54]

Obsah některých vitamínů v obilovinách uvádí tabulka (Tab. 5).

Tab. 5. Obsah vitamínů v obilovinách[51]

Obilovina	obsah v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$			
	vitamin B ₁	Vitamin B ₂	vitamin B ₃	vitamin E
pšenice	1,35 - 19,0	0,62 - 7,6	15,0 - 83,7	9,0 - 50,4
žito	1,65 - 7,6	1,1 - 8,0	2,0 - 32,8	4,9 - 36,9
ječmen	3,0 - 9,2	1,0 - 1,5	30,0 - 75,2	44,6
oves	3,0 - 7,8	1,1 - 1,4	6,0 - 40,0	17,0 - 50,0

3.3 Produkce obilovin

V současné době patří podle statistik FAO a OSN pšenice ke dvěma obilovinám s největším objemem produkce na světě. Její produkce trvale stoupala až do roku 1997, pak se projevuje stagnace. Z hlediska celkového objemu produkce obilovin je objem produkované pšenice přibližně stejný jako objem produkované rýže. Ta se ale jen málo zpracovává na mouku a podíl jejího využití pro pekařské výrobky je nízký.[52, 54]

V jiných částech světa mimo Evropu dosahují značného významu další obiloviny, zejména kukuřice, proso a čirok. Pekařské využití těchto surovin na výrobky podle našich zvyklostí je omezené, neboť nejsou schopny vytvořit pevnou strukturu klenutého výrobku. V zemích, kde jsou tyto suroviny původní, patří historicky k základním surovinám.

V celosvětovém měřítku jsou největšími tradičními producenty pšenice USA, Rusko, Kanada, Austrálie, Argentina a Čína. [52, 54]

Také v ČR se již od druhé světové války stala dominantní obilovinou pšenice. Její produkce postupně stoupala a přibližně od 70. let 20. století se produkce v ČR stala soběstačnou.

Největší výkyvy v její produkci nastaly po privatizaci zemědělství po roce 1990. [52, 58]

Produkcí pšenice v letech 2002 až 2006 v ČR uvádí tabulka (Tab. 6).

Tab. 6. Produkce pšenice v ČR[58]

Rok	Produkce (mil. t)
2002	3,867
2003	2,638
2004	5,043
2005	4,145
2006	3,506

Ve srovnání s pšenicí poklesla výrazně produkce jedné z dříve hlavních evropských plodin – žita. Jeho produkce činí kolem 50 milionů tun ročně. Je pěstováno hlavně v zemích Střední Evropy. [52, 55]

Produkce žita v ČR rovněž zaznamenává výrazný pokles. Přitom význam žita pro krmení je malý a lze tudíž předpokládat, že pokles produkce odpovídá klesajícímu podílu žitných mouk v pekárenské výrobě. Pokles produkce žita v ČR je značně rychlejší než v ostatních

státech Evropy a světa. Přitom v minulosti bylo žito v Čechách dominantní obilovinou. [52, 58]

Produkci žita v letech 2002 až 2006 v ČR uvádí tabulka (Tab. 7).

Tab. 7. Produkce žita v ČR [58]

Rok	Produkce (mil. t)
2002	1,191
2003	1,593
2004	3,313
2005	1,968
2006	0,748

4 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

K charakterizování úrovně hodnot znaku jednorozměrných statistických souborů se užívají střední hodnoty. [59]

Nejužívanějšími středními hodnotami jsou průměry. Aritmetický průměr je nejčastěji užívanou střední hodnotou. Je definován jako součet hodnot znaků všech statistických jednotek sledovaného souboru dělený jejich počtem. [59, 60]

Jsou-li k dispozici údaje o hodnotách znaku všech statistických jednotek sledovaného souboru o rozsahu n statistických jednotek a označíme-li tyto hodnoty znaku x_1, x_2, \dots, x_n , pak se aritmetický průměr vypočítá

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (1)$$

Střední hodnoty patří k významným charakteristikám jednorozměrných rozdělení četností. Větší poznávací hodnotu mají střední hodnoty jako míry úrovně jevů u souborů stejnorodých z hlediska znaku, který zkoumaný jev vystihuje, tj. u souborů, u nichž je malá variabilita hodnot tohoto znaku. Měření variability hodnot znaků zkoumaných souborů umožňuje posoudit kvalitu středních hodnot jako měr úrovně a rozšiřuje znalosti o tomto souboru z hlediska sledovaného znaku. K měření variability hodnot znaků užíváme různé druhy měr variace.[59, 60]

Nejužívanější mírou variace, která je rovněž závislá na hodnotách znaku všech statistických jednotek sledovaného souboru je směrodatná odchylka, která je kvadratickým průměrem odchylek hodnot znaku od jejich aritmetického průměru[59, 60]

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

V analytické chemii se výsledky uvádí ve tvaru

$$\bar{x} \pm \frac{t_{\alpha} \cdot s}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Tab. 8. Kvantily rozdělení t [60]

Stupně volnosti	Hladina pravděpodobnosti		
	90 %	95 %	97,5 %
1	3,078	6,314	12,706
2	1,886	2,92	4,303
3	1,638	2,353	3,182
4	1,533	2,132	2,776
5	1,476	2,015	2,571

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem práce je stanovit obsah riboflavinu (vitaminu B₂) pomocí chromatografické techniky HPLC v cereálních produktech.

1. Formou literární rešerše zpracovat téma o riboflavinu (vitaminu B₂) - jeho zdrojích a vlastnostech – fyzikálně-chemických i fyziologických a ztrátách vitaminu při technologických operacích.

Dále popsat techniku HPLC (i kapalinový chromatograf) a analytické metody, především chromatografické techniky, využívané pro stanovení tohoto vitaminu a charakterizovat i cereální produkty.

2. Pro stanovení riboflavinu provést optimalizaci izolačního postupu vitaminu B₂ (vhodné složení a množství extrakčních činidel i průběh celé izolace) z vybraných cereálních produktů (mouka, chléb, rohlík, cereální snídaně, těstoviny).
3. Pomocí chromatografické techniky HPLC/UV stanovit a porovnat obsah tohoto vitaminu ve vybraných 22 běžných cereálních produktech (mouka, chléb, rohlík, cereální snídaně, těstoviny).

6 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

6.1 Vzorky cereálních produktů

V diplomové práci bylo analyzováno 22 vzorků cereálních produktů od českých výrobců:

- celozrnná mouka pšeničná, PRO-BIO, Staré Město pod Sněžníkem
- celozrnná mouka žitná, PRO-BIO, Staré Město pod Sněžníkem
- celozrnná mouka špaldová, PRO-BIO, Staré Město pod Sněžníkem
- pšeničná hladká mouka obohacená vitaminy, Mlýny J. Voženílek , Předměřice n. L.
- pšeničná polohrubá mouka obohacená vitaminy, Mlýny J. Voženílek, Předměřice n. L.
- pšeničná hrubá mouka obohacená vitaminy, Mlýny J. Voženílek , Předměřice n. L.
- pšeničná hladká mouka, Mlýn Herber, Opava
- pšeničná polohrubá mouka, Mlýn Herber, Opava
- pšeničná hrubá mouka, Mlýn Herber, Opava
- celozrnný chléb pochoutkový, PENAM, Brno
- křehký celozrnný chlebiček, Pěkný-Unimex, Praha
- žitný křupavý chlebiček, RACIO, Břeclav
- pšeničný chléb, Bachan Blatnická pekárna, Hodonín
- zrná špička, Svoboda a Březík – pečivo, Zlín
- vícezrnná kostka, Bachan Blatnická pekárna, Hodonín
- rohlík tukový, DELTA Pekárny, Brno
- celozrnné lupínky s vitaminy a minerálními látkami Fitness, Nestlé, Praha
- celozrnné lupínky s jablky a hrozkami Frutina, Nestlé, Praha

- Dobrá vláknina cereální lupínky, PRAGOSOJA, Praha
- pšeničná celozrnná vřetena, Pekárny Blansko, Blansko
- žitná celozrnná kolínka, Pekárny Blansko, Blansko
- celozrnné sušenky, Bio nebio, Zdice

6.2 Použité chemikálie

- redestilovaná voda
- kyselina chlorovodíková (P. Lukeš, Uherský Brod)
- kyselina trichloroctová (P. Lukeš, Uherský Brod)
- Carrezovo činidlo I - síran zinečnatý (P. Lukeš, Uherský Brod)
- Carrezovo činidlo II - hexakynoželeznan draselný (P. Lukeš, Uherský Brod)
- octan sodný (P. Lukeš, Uherský Brod)
- kyselina mravenčí (P. Lukeš, Uherský Brod)
- standard riboflavinu (Supelco, USA)
- methanol pro HPLC, gradient grade (Riedel-del Haen, SRN; Sigma – Aldrich, SRN)

6.3 Použité přístroje a pomůcky

Laboratorní vybavení:

- analytické váhy (Schoeller instruments, CZ)
- temperovaná vodní lázeň (Memmert, SRN)
- laboratorní sklo a pomůcky
- dávkovací stříkačka (Hamilton, USA)

- mikrofiltry 0,45 μm , PTFE (Supelco, USA)

Aparatura pro HPLC (Hewlett Packard 1100, USA):

- vakuový odplyňovací modul G1322A
- binární pumpy G1312A
- termostat kolony G1316A
- detektor UV/VIS DAD G1315A
- dávkovací analytický smyčkový ventil (dávkovací smyčka o objemu 20 μl)
- kolona SUPELCOSIL - LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5 μm , Supelco, USA)
- PC s vyhodnocovacím programem ChemStation – Instrument1 (Agilent, USA)

7 METODIKA STANOVENÍ VITAMINU

Pro přesné stanovení riboflavinu je nutné optimalizovat postup izolace vitamínu a také stanovit vhodné podmínky pro jeho měření pomocí HPLC/UV-DAD.

7.1 Optimalizace izolace riboflavinu z cereálních výrobků

Pro optimalizaci izolace riboflavinu se zjišťovalo vhodné složení a množství extrakčních činidel i průběh celého izolačního postupu.

Základní postup pro izolaci riboflavinu byl použit na základě informací z experimentálního stanovení tohoto vitamínu z několika literárních zdrojů. [23, 27]

7.1.1 Optimalizace izolace riboflavinu ze vzorků mouk

Byly zkoušeny navážky 20 g, 30 g a 40 g mouk (celozrnných, pšeničných obohacených vitamíny a pšeničných). Vzhledem k předběžně zjištěným výsledkům prostřednictvím HPLC byla zvolena nejvyšší navážka 40 g.

Hydrolyza FMN a FAD, ve kterých je riboflavin vázán, byla ze vzorků mouky provedena pomocí $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ i $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ HCl. Při vyšší koncentraci HCl bylo dosaženo přesnějších výsledků následného stanovení riboflavinu. Z tohoto důvodu byla pro tyto vzorky, kvůli důkladnější hydrolyze použita koncentrace $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ HCl.

Na vysrážení proteinů byly použity 3 ml 80 % kyseliny trichloroctové. Při tomto množství byly proteiny částečně vysráženy a na konečné vyčiření byla ještě použita činidla Carrez I a Carrez II.

Pro čiření pomocí činidel Carrez I a Carrez II byl zkoušen přídavek obou činidel po 15, 20, 30 a také 35 ml. Zjistilo se, že přídavek 30 ml činidel Carrez I a Carrez II byl nejvhodnější.

K oddělení kapalného podílu od tuhé části upravených vzorků byly použity 2 způsoby - filtrování pomocí vývěvy a odstředění. Po odstředění nedošlo k úplnému oddělení

kapalného podílu od tuhého a získaný roztok zůstal mírně zakalený. Po filtrování pomocí vývěvy byl získán čirý roztok vzorku, který je potřebný pro analýzu pomocí HPLC.

7.1.2 Optimalizace izolace riboflavinu z celozrnných lupínků, celozrnných chlebů a celozrnných sušenek

U celozrnných lupínků, chlebů a sušenek byly zkoušeny navážky 20 g a 30 g. Vzhledem k předběžně zjištěným výsledkům prostřednictvím HPLC byla, jako dostatečná, zvolena navážka 20 g.

Pro hydrolyzu FMN a FAD, ve kterých je riboflavin vázán, u vzorků celozrnných lupínků, chlebů a sušenek byla použita 0,1 mol.l⁻¹ i 0,2 mol.l⁻¹ HCl. Při vyšší koncentraci HCl bylo dosaženo přesnějších výsledků u konečného stanovení riboflavinu. Byla tedy použita vyšší koncentrace HCl.

Na vysrážení proteinů byly použity 3 ml 80 % kyseliny trichloroctové. Na konečné vyčištění byla ještě použita činidla Carrez I a Carrez II.

Přídavek činidel Carrez I a Carrez II byl zkoušen po 15 ml a také 20 ml. Při přidání 15 ml činidel Carrez I a Carrez II nedošlo k úplnému vyčištění a i po přefiltrování zůstal vzorek zakalený. Proto bylo pro důkladné vyčištění vzorku použito množství 20 ml činidel Carrez I a Carrez II.

Byly zkoušeny 2 způsoby oddělení kapalné části od tuhého podílu vzorku - odstředění, po kterém roztok zůstal mírně zakalený. Dalším způsobem bylo filtrování pomocí vývěvy, kdy byl získán čirý roztok vzorku.

7.1.3 Optimalizace izolace riboflavinu z celozrnného pečiva, tukového rohlíku a pšeničného chleba

Byly zkoušeny navážky 20 g a 30 g celozrnného pečiva, tukového rohlíku a pšeničného chleba. Vzhledem k předběžně zjištěným výsledkům prostřednictvím HPLC byla zvolena vyšší navážka.

Hydrolyza u vzorků celozrnného pečiva, tukového rohlíku a pšeničného chleba byla opět provedena pomocí 0,1 mol.l⁻¹ i 0,2 mol.l⁻¹ HCl. Při vyšší koncentraci HCl bylo dosaženo přesnějších výsledků následného stanovení riboflavinu. Z tohoto důvodu a také kvůli důkladnější hydrolyze FMN a FAD byla použita koncentrace 0,2 mol.l⁻¹ HCl.

Kyselina trichloroctová (80 %, 3 ml) byla opět využita na vysrážení proteinů. Na konečné vyčiření se použila i činidla Carrez I a Carrez II.

Pro čiření pomocí činidel Carrez I a Carrez II byl zkoušen přídavek obou činidel po 20 ml a také 25 ml. Přídavek 20 ml činidel Carrez I a Carrez II nebyl dostačující, protože po přefiltrování zůstával roztok vzorku zakalený, přídavku obou činidel po 25 ml byldostatečný pro získání čirého filtrátu.

K oddělení kapalného podílu upravených vzorků od tuhé části byly opět použity 2 způsoby - filtrování pomocí vývěvy a odstředění. Po odstředění nedošlo k úplnému oddělení kapalného podílu od tuhé a získaný roztok zůstával zakalený. Po filtrování pomocí vývěvy byl získán čirý roztok vzorku.

7.1.4 Optimalizace izolace riboflavinu z celozrnných těstovin

U suchých celozrnných těstovin byly zkoušeny navážky 20 g a 30 g. Vzhledem k předběžně zjištěným výsledkům prostřednictvím HPLC byla pro získání dostatečné odezvy při stanovení vitamínu zvolena vyšší navážka 30 g.

Těstoviny byly podle návodu vařeny po dobu 10 minut ve 300 ml redestilované vody.

U vzorků uvařených těstovin byla provedena kyselá hydrolyza pomocí 0,1 mol.l⁻¹ i 0,2 mol.l⁻¹ HCl. Vyšší koncentrace HCl (0,2 mol.l⁻¹), byla vhodnější pro hydrolyzu FMN a FAD, ve kterých je riboflavin vázán.

Na vysrážení proteinů byly použity 3 ml 80 % kyseliny trichloroctové. Při tomto množství byly proteiny částečně vysráženy a na konečné vyčiření byla ještě použita činidla Carrez I a Carrez II – zkoušené množství: 25 ml a 30 ml. Přídavek 25 ml obou činidel byl dostačující, po přefiltrování byl získán čirý roztok vzorku.

Na oddělení kapalně části vzorku od tuhé podílu bylo opět vhodnější filtrování pomocí vývěvy, kdy byl získán čirý roztok vzorku.

U těstovin byla provedena také analýza vodného výluhu z vaření těstovin.

Ve výluhu těstovin byla provedena hydrolyza FMN a FAD pomocí 0,1 mol.l⁻¹ i 0,2 mol.l⁻¹ HCl. Vyšší koncentrace HCl byla pro hydrolyzu vhodnější.

Na vysrážení proteinů byl použit 1 ml 80 % kyseliny trichloroctové, vzhledem k nižšímu obsah proteinů ve výluhu. Při tomto množství byly proteiny částečně vysráženy a na

konečné vyčiření byl zkoušen přídavek činidel Carrez I a Carrez II po 5 ml a také 10 ml. Přídavek 5 ml činidel Carrez I a Carrez II nebyl dostačující, při přídavku 10 ml obou činidel už byl roztok vzorku po přefiltrování dostatečně čirý.

Na oddělení kapalné části od tuhé sraženiny bylo použito filtrování pomocí vývěvy, které se ukázalo jako nejvhodnější, kdy po přefiltrování byl získán čirý roztok.

7.2 Stanovení riboflavinu metodou HPLC

Základní postup pro stanovení riboflavinu metodou HPLC/UV byl použit na základě informací z experimentálního stanovení tohoto vitamínu z několika literárních zdrojů. [23,27]

Roztoky vzorků připravené optimalizovaným postupem uvedeným v kapitolách 8.1.1 až 8.1.5 byly zfiltrvány přes filtry, používané pro HPLC, o velikosti pórů 0,45 μm , a ze získaných filtrátů byl vždy dávkován alikvotní podíl 20 μl do nástřikové části HPLC.

Složení mobilní fáze bylo:

- octan sodný 0,12 mol.l^{-1} , jehož pH bylo upraveno na hodnotu 4,8 pomocí 85 % kyseliny mravenčí
- methanol

Pro stanovení riboflavinu byla použita gradientová eluce. Počáteční poměr složek mobilní fáze byl 87:13 (octan sodný:methanol) v/v v čase 0 s gradientem uvedeným v tabulce (Tab. 9). Průtok mobilní fáze byl 0,8 ml.min^{-1} . Čas analýzy vitamínu B₂ byl 30 minut.

Tab. 9. Gradient mobilní fáze pro stanovení riboflavinu metodou HPLC

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

Separace byla provedena na koloně SUPELCOSIL LC8.

Teplota termostatu při měření byla 30°C.

Pro stanovení riboflavinu byl s HPLC použit detektor UV-DAD při vlnové délce 270 nm.

Na vyhodnocení výsledků byl použit chromatografický software pro PC - ChemStation Instrument 1.

Každý vzorek i jednotlivé koncentrace kalibrační křivky byly proměřeny na HPLC pětkrát kvůli dostatečné přesnosti stanovení.

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

8.1 Izolace riboflavinu ze vzorků cereálních produktů

Na základě optimalizace izolace riboflavinu byly pro jednotlivé vzorky cereálních produktů zvoleny následující postupy.

8.1.1 Postup izolace riboflavinu ze vzorků mouk

Na analytických vahách bylo s přesností na čtyři desetinná místa naváženo 40 g vzorku mouky (celozrnné, pšeničné obohacené vitaminy a pšeničné). Vzorek byl kvantitativně převeden do třecí misky, kde bylo postupně přidáno 100 ml 0,2 mol.l⁻¹ kyseliny chlorovodíkové.

Po zhomogenizování byla směs kvantitativně převedena do 250 ml Erlenmayerovy baňky obalené hliníkovou fólií, kvůli citlivosti riboflavinu na světelné záření. Baňka byla následně 1 hodinu třepána ve vodní lázni o teplotě 97 °C. V 50. minutě ohřevu byly přidány 3 ml 80 % kyseliny trichloroctové na částečné vysrážení proteinů.

Po skončení varu byla směs ochlazena. Ke směsi bylo přidáno 30 ml činidla Carrez I a po minutě míchání 30 ml činidla Carrez II. Po 5 minutách byl obsah baňky kvantitativně převeden do 200 ml odměrné baňky obalené hliníkovou fólií a doplněn redestilovanou vodou po rysku. Směs byla zfiltrována pomocí vývěvy.

8.1.2 Postup izolace riboflavinu ze vzorků celozrnných lupínků, celozrnných chlebů a celozrnných sušenek

Na analytických vahách bylo s přesností na čtyři desetinná místa naváženo 20 g vzorku celozrnných lupínků, chlebů a sušenek. Vzorek byl kvantitativně převeden do třecí misky, kde bylo postupně přidáno vzhledem k nižší navážce pouze 80 ml 0,2 mol.l⁻¹ kyseliny chlorovodíkové.

Po zhomogenizování byla směs kvantitativně převedena do 250 ml Erlenmayerovy baňky obalené hliníkovou fólií, kvůli citlivosti riboflavinu na světlo. Baňka byla následně 1 hodinu

třepána ve vodní lázni o teplotě 97 °C. V 50. minutě ohřevu byly přidány 3 ml 80 % kyseliny trichloroctové .

Po skončení varu byla směs ochlazena. Ke směsi bylo přidáno 20 ml činidla Carrez I a po minutovém promíchání 20 ml činidla Carrez II. Po 5 minutách byl obsah baňky kvantitativně převeden do 200 ml odměrné baňky obalené hliníkovou fólií a doplněn redestilovanou vodou po rysku. Směs byla zfiltrována pomocí vývěvy.

8.1.3 Postup izolace riboflavinu ze vzorků celozrnného pečiva, tukového rohlíku a pšeničného chleba

Na analytických vahách bylo s přesností na čtyři desetinná místa naváženo 30 g vzorku celozrnného pečiva, tukového rohlíku a pšeničného chleba. Vzorek byl kvantitativně převeden do třecí misky, kde bylo postupně přidáno 100 ml 0,2 mol.l⁻¹ kyseliny chlorovodíkové, pomocí které dochází k hydrolyze FMN a FAD.

Po zhomogenizování byla směs kvantitativně převedena do 250 ml Erlenmayerovy baňky obalené hliníkovou fólií, kvůli citlivosti riboflavinu na světelné záření. Baňka byla následně 1 hodinu třepána ve vodní lázni o teplotě 97 °C. V 50. minutě ohřevu byly přidány 3 ml 80 % kyseliny trichloroctové na částečné vysrážení proteinů.

Po skončení varu byla směs ochlazena. Ke směsi bylo přidáno 25 ml činidla Carrez I a po minutě míchání bylo přidáno 25 ml činidla Carrez II. Po 5 minutách byl obsah baňky kvantitativně převeden do 200 ml odměrné baňky obalené hliníkovou fólií a doplněn redestilovanou vodou po rysku. Směs byla zfiltrována pomocí vývěvy.

8.1.4 Postup izolace riboflavinu ze vzorků celozrnných těstovin

Na analytických vahách bylo s přesností na čtyři desetinná místa naváženo 30 g vzorku suchých těstovin. Těstoviny byly 10 minut vařeny ve 300 ml redestilované vody.

Vzorek uvařených těstovin o hmotnosti 60 g byl kvantitativně převeden do třecí misky, kde bylo postupně přidáno 100 ml 0,2 mol.l⁻¹ kyseliny chlorovodíkové, pomocí které dochází k uvolnění vitamínu z vázaných forem.

Po zhomogenizování byla směs kvantitativně převedena do 250 ml Erlenmayerovy baňky obalené hliníkovou fólií, protože riboflavin je citlivý na světelné záření. Baňka byla 1

hodinu třepána ve vodní lázni o teplotě 97 °C. V 50. minutě ohřevu byly přidány 3 ml 80 % kyseliny trichloroctové na vysrážení proteinů.

Po skončení varu byla směs ochlazená. Ke směsi bylo přidáno 25 ml činidla Carrez I a po minutovém promíchání bylo přidáno 25 ml činidla Carrez II. Po 5 minutách byl obsah baňky kvantitativně převeden do 200 ml odměrné baňky obalené hliníkovou fólií a doplněn redestilovanou vodou po rysku. Směs byla zfiltrována pomocí vývěvy.

8.1.5 Postup izolace riboflavinu ze vzorků výluhů z celozrnných těstovin

Odměřených 100 ml výluhu těstovin bylo kvantitativně převedeno do 250 ml Erlenmayerovy baňky obalené hliníkovou fólií, kde bylo postupně přidáno vzhledem k nižšímu množství pouze 30 ml 0,2 mol.l⁻¹ kyseliny chlorovodíkové.

Baňka byla 0,5 hodiny třepána ve vodní lázni o teplotě 97 °C. Ve 20. minutě ohřevu byl přidán 1 ml 80 % kyseliny trichloroctové na vysrážení proteinů. Čas byl zkrácen vzhledem k nižšímu obsahu FMN, FAD i proteinů.

Po skončení byla směs ochlazená a bylo přidáno 10 ml činidla Carrez I a po minutovém promíchání 10 ml činidla Carrez II. Po 5 minutách byla směs zfiltrována pomocí vývěvy. 150 ml takto získaného roztoku bylo, kvůli zvýšení odezvy na HPLC, zakonzentrováno na odparce na množství 50 ml.

8.2 Stanovení riboflavinu metodou HPLC

8.2.1 Kalibrační křivka pro stanovení riboflavinu metodou HPLC

Na měření kalibrační křivky byl použit standard riboflavinu.

Byl připraven zásobní roztok o koncentraci 8 µg.ml⁻¹ riboflavinu. Ze zásobního roztoku byly připraveny dalším ředěním roztoky o koncentraci 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 4 µg.ml⁻¹.

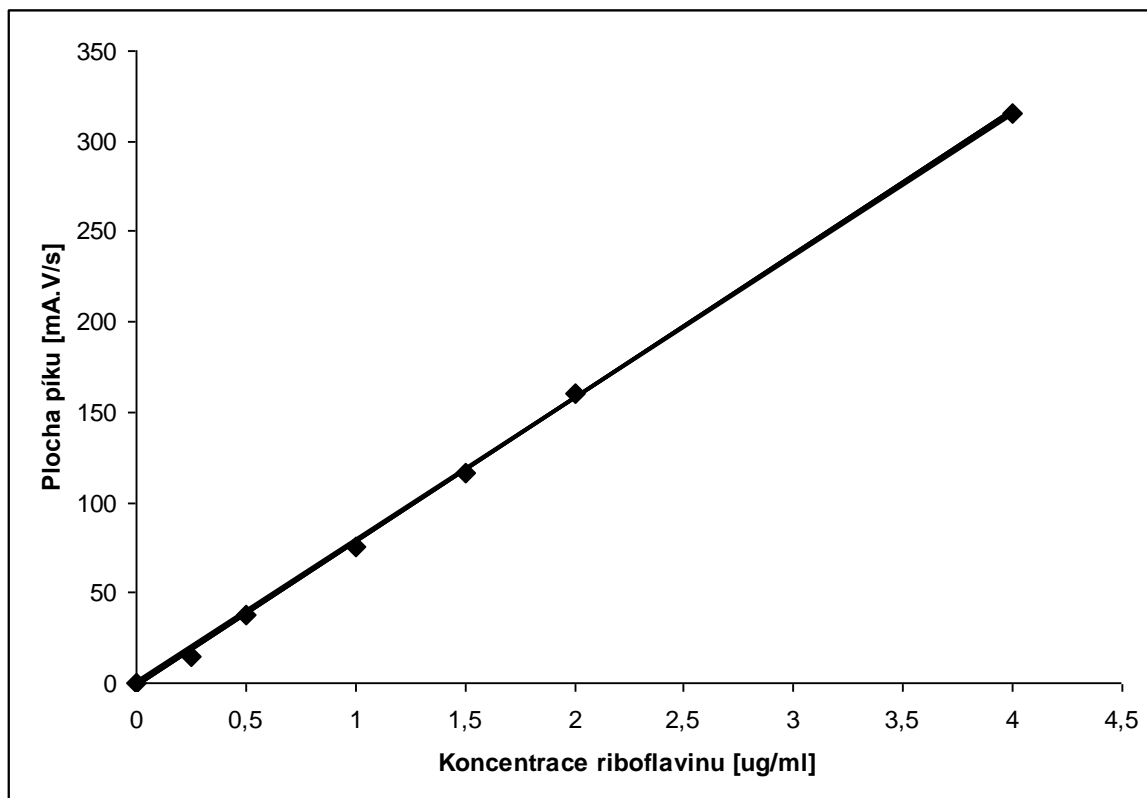
Měření proběhlo stejným postupem jako při stanovení vzorků, uvedeným v kapitole 7.2. Vzorové chromatogramy standardu riboflavinu pro jednotlivé koncentrace jsou uvedeny v příloze (P I – P VI).

Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost plochy píku (mA.V.s^{-1}) na koncentraci riboflavinu ($\mu\text{g.ml}^{-1}$).

Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce (Tab. 10) a v grafu kalibrační přímky (Obr. 5).

Tab. 10. Naměřené hodnoty pro kalibrační přímku riboflavinu

Koncentrace riboflavinu [$\mu\text{g.ml}^{-1}$]	Plocha píku [mA.V.s^{-1}]	Průměrná plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Směrodatná odchylka - s
0,25	14,30	14,80	0,77
	15,10		
	14,90		
	14,50		
	15,20		
0,50	38,00	37,84	0,23
	37,70		
	37,80		
	37,90		
	37,80		
1,00	73,90	75,44	2,15
	76,90		
	75,20		
	75,50		
	75,70		
1,50	115,30	116,50	1,74
	117,70		
	116,30		
	116,80		
	116,40		
2,00	160,70	160,84	0,27
	161,00		
	160,90		
	160,70		
	160,90		
4,00	313,10	314,92	3,32
	316,50		
	316,70		
	313,50		
	314,80		



Obr. 5. Kalibrační přímka pro stanovení riboflavinu metodou HPLC

Byla sestavena kalibrační přímka, pro kterou má regresní rovnice tvar:

$$y = 79,572 x - 2,2433$$

kde: y je velikost plochy píku na chromatogramu

x je obsah riboflavinu v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

Korelační koeficient pro závislost plochy píku na obsahu riboflavinu:

$$R = 0,9995$$

8.2.2 Stanovení riboflavinu u vzorků cereálních produktů

Stanovení obsahu riboflavinu bylo provedeno u 22 vzorků cereálních produktů. Analyzovány byly celozrnné mouky, mouky obohacené vitaminy, pšeničné mouky, celozrnné lupínky, celozrnné chleby, pšeničný chleba, celozrnné pečivo, tukový rohlík, celozrnné sušenky a celozrnné těstoviny.

Naměřené plochy píků byly dosazeny do regresní rovnice kalibrační přímky. Výpočtem byly získány koncentrace riboflavinu ve vzorcích v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tyto hodnoty byly následně přepočteny podle navážek jednotlivých vzorků.

8.2.2.1 Stanovení riboflavinu u vzorků celozrnných mouk

Stanovení bylo provedeno u tří druhů celozrnných mouk – pšeničné, žitné a špaldové. Vzorky byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 8.1.1 a každý vzorek byl pětkrát proměřen na HPLC postupem uvedeným v kapitole 7.2 .

Navážka celozrnné mouky pšeničné byla 40,0423 g. Naměřené hodnoty, jejich aritmetický průměr a směrodatná odchylka jsou uvedeny v tabulce (Tab. 11). Vzorový chromatogram stanovení riboflavinu je v příloze (P VII).

Tab. 11. Obsah riboflavinu ve vzorku celozrnné mouky pšeničné

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Koncentrace [mg.100g ⁻¹]	\bar{x} [mg.100g ⁻¹]	s
39,46	0,525	0,262	0,265	0,005
40,28	0,534	0,267		
38,75	0,515	0,257		
41,15	0,545	0,272		
40,67	0,539	0,269		

Obsah riboflavinu: $0,265 \pm 0,005 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$

Navážka celozrnné mouky žitné byla 40,0012 g. Naměřené hodnoty, jejich aritmetický průměr a směrodatná odchylka jsou uvedeny v tabulce (Tab. 12). Vzorový chromatogram stanovení riboflavinu je v příloze (P VIII).

Tab. 12. Obsah riboflavinu ve vzorku celozrnné mouky žitné

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace [mg.100g ⁻¹]	\bar{x} [mg.100g ⁻¹]	s
34,91	0,467	0,233	0,235	0,003
35,68	0,477	0,238		
34,26	0,459	0,229		
35,15	0,470	0,235		
35,73	0,477	0,238		

Obsah riboflavinu: $0,235 \pm 0,003 \text{ mg.100g}^{-1}$

Navážka celozrnné mouky špaldové byla 40,0365 g. Naměřené hodnoty, jejich aritmetický průměr a směrodatná odchylka jsou uvedeny v tabulce (Tab. 13). Vzorový chromatogram stanovení riboflavinu je v příloze (P IX).

Tab. 13. Obsah riboflavinu ve vzorku celozrnné mouky špaldové

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace [mg.100g ⁻¹]	\bar{x} [mg.100g ⁻¹]	s
29,68	0,401	0,200	0,204	0,004
30,51	0,120	0,206		
29,43	0,398	0,199		
31,29	0,421	0,210		
30,74	0,415	0,207		

Obsah riboflavinu: $0,204 \pm 0,004 \text{ mg.100g}^{-1}$

U celozrnných mouk byl nejvyšší obsah riboflavinu naměřen v celozrnné mouce pšeničné ($0,265 \text{ mg.100g}^{-1}$), dále v celozrnné mouce žitné ($0,235 \text{ mg.100g}^{-1}$) a nejnižší množství riboflavinu měla celozrnná mouka špaldová ($0,204 \text{ mg.100g}^{-1}$). Hodnoty obsahu u jednotlivých druhů celozrnných mouk se příliš neliší. Výrobce obsah riboflavinu v celozrnných moukách neuvádí.

8.2.2.2 Stanovení riboflavinu u vzorků pšeničných mouk obohacených vitaminy

Stanovení bylo provedeno u tří druhů pšeničných mouk obohacených vitaminy – hladké, polohrubé a hrubé. Vzorky byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 8.1.1 a každý vzorek byl pětkrát proměřen na HPLC postupem uvedeným v kapitole 7.2.

Navážka hladké pšeničné mouky obohacené vitaminy byla 40,0214 g. Naměřené hodnoty, jejich aritmetický průměr a směrodatná odchylka jsou uvedeny v tabulce (Tab. 14). Vzorový chromatogram stanovení riboflavinu je v příloze (P X).

Tab. 14. Obsah riboflavinu ve vzorku hladké pšeničné mouky obohacené vitaminy

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [[μg.ml ⁻¹]	Koncentrace [mg.100g ⁻¹]	\bar{x} [mg.100g ⁻¹]	s
124,15	1,588	0,794	0,800	0,004
125,63	1,607	0,803		
125,21	1,602	0,800		
124,77	1,596	0,798		
126,12	1,613	0,806		

Obsah riboflavinu: $0,800 \pm 0,004 \text{ mg.100g}^{-1}$

Navážka polohrubé pšeničné mouky obohacené vitaminy byla 40,0358 g. Naměřené hodnoty, jejich aritmetický průměr a směrodatná odchylka jsou uvedeny v tabulce (Tab. 15). Vzorový chromatogram stanovení riboflavinu je v příloze (P XI).

Tab. 15. Obsah riboflavinu ve vzorku polohrubé pšeničné mouky obohacené vitaminy

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace [mg.100g ⁻¹]	\bar{x} [mg.100g ⁻¹]	s
80,85	1,044	0,522	0,525	0,005
81,47	1,052	0,526		
80,23	1,036	0,516		
82,34	1,063	0,531		
81,78	1,056	0,528		

Obsah riboflavinu $0,525 \pm 0,005$ mg.100g⁻¹

Navážka hrubé pšeničné mouky obohacené vitaminy byla 40,1214 g. Naměřené hodnoty, jejich aritmetický průměr a směrodatná odchylka jsou uvedeny v tabulce (Tab. 16). Vzorový chromatogram stanovení riboflavinu je v příloze (P XII).

Tab. 16. Obsah riboflavinu ve vzorku hrubé pšeničné mouky obohacené vitaminy

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace [mg.100g ⁻¹]	\bar{x} [mg.100g ⁻¹]	s
90,92	1,171	0,584	0,584	0,006
89,16	1,149	0,573		
92,14	1,186	0,591		
90,78	1,169	0,583		
91,54	1,179	0,588		

Obsah riboflavinu: $0,584 \pm 0,006$ mg.100g⁻¹

Nejvyšší obsah riboflavinu byl stanoven u mouky hladké obohacené vitaminy (0,800 mg.100g⁻¹), což je o 0,016 víc než uvádí výrobce. V hrubé mouce byl určen obsah riboflavinu (0,584 mg.100g⁻¹), což je o 0,056 mg.100g⁻¹ nižší množství než uvádí výrobce, a nejnižší množství riboflavinu bylo zjištěno v mouce polohrubé (0,525 mg.100g⁻¹), tedy o 0,115 mg.100g⁻¹ nižší obsah než uvádí výrobce. Výrobce uvádí obsah riboflavinu u všech tří druhů mouk obohacených vitaminy (0,640 mg.100g⁻¹).

8.2.2.3 Stanovení riboflavinu u vzorků pšeničných mouk

Stanovení bylo provedeno u tří druhů pšeničných mouk – hladké, polohrubé a hrubé. Vzorky byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 8.1.1 a každý vzorek byl pětikrát proměřen na HPLC postupem uvedeným v kapitole 7.2.

Navážka pšeničné hladké mouky byla 40,0425 g. Naměřené hodnoty, jejich aritmetický průměr a směrodatná odchylka jsou uvedeny v tabulce (Tab. 17). Vzorový chromatogram stanovení riboflavinu je v příloze (P XIII).

Tab. 17. Obsah riboflavinu ve vzorku pšeničné hladké mouky

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace [mg.100g ⁻¹]	\bar{x} [mg.100g ⁻¹]	s
11,76	0,176	0,087	0,087	0,005
12,39	0,184	0,092		
10,14	0,156	0,078		
12,48	0,185	0,092		
11,25	0,170	0,085		

Obsah riboflavinu: $0,087 \pm 0,005$ mg.100g⁻¹

Navážka pšeničné polohrubé mouky byla 40,0507 g. Vzorový chromatogram stanovení riboflavinu je v příloze (P XIV). V polohrubé pšeničné mouce nebyl riboflavin použitou metodou stanovitelný, vzhledem k velmi nízkému množství vitamínu v této mouce.

Navážka pšeničné hrubé mouky byla 40,0289 g. Vzorový chromatogram stanovení riboflavinu je v příloze (P XV). Riboflavin nebyl v polohrubé pšeničné mouce použitou metodou stanovitelný, vzhledem k velmi nízkému množství vitamínu v této mouce.

V pšeničné hladké mouce byl stanoven obsah riboflavinu (0,087 mg.100g⁻¹), v mouce polohrubé a hrubé byl riboflavin touto metodou nestanovitelný. Literatura uvádí obsah riboflavinu v pšeničné hladké mouce (0,050 mg.100g⁻¹), v polohrubé mouce (0,031

mg.100g⁻¹) a v hrubé mouce (0,021 mg.100g⁻¹).[17] Stanovené množství riboflavinu v hladké mouce je o 0,037 mg.100g⁻¹ vyšší než uvádí literatura.

Ze všech mouk, u kterých byl stanovován obsah riboflavinu, byl nejvyšší obsah stanoven u mouk obohacených vitaminy. Z nich nejvyšší obsah riboflavinu měla mouka hladká (0,800 mg.100g⁻¹), dále hrubá mouka (0,584 mg.100g⁻¹) a mouka polohrubá (0,525 mg.100g⁻¹). Následují celozrnné mouky - mouka pšeničná (0,265 mg.100g⁻¹), celozrnná mouka žitná (0,235 mg.100g⁻¹) a celozrnná mouka špaldová (0,204 mg.100g⁻¹). Nejnižší obsah riboflavinu měly pšeničné mouky - mouka hladká (0,087 mg.100g⁻¹), u mouky polohrubé a hrubé nebyl riboflavin použitou metodou stanovitelný.

8.2.2.4 Stanovení riboflavinu u vzorků celozrnných lupínků

Stanovení bylo provedeno u tří druhů celozrnných lupínků – Fitness, Frutina a Dobrá vláknina. Vzorky byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 8.1.2 a každý vzorek byl pětkrát proměřen na HPLC postupem uvedeným v kapitole 7.2.

Navážka celozrnných lupínků Fitness byla 20,0045 g. Naměřené hodnoty, jejich aritmetický průměr a směrodatná odchylka jsou uvedeny v tabulce (Tab. 18). Vzorový chromatogram stanovení riboflavinu je v příloze (P XVI).

Tab. 18. Obsah riboflavinu ve vzorku celozrnných lupínků Fitness

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace [mg.100g ⁻¹]	\bar{x} [mg.100g ⁻¹]	s
219,24	2,783	2,782	2,779	0,007
218,76	2,777	2,776		
220,31	2,797	2,796		
219,88	2,791	2,790		
218,14	2,770	2,769		

Obsah riboflavinu: 2,779 ± 0,007 mg.100g⁻¹

Navážka celozrnných lupínků Frutina byla 20,0234 g. Naměřené hodnoty, jejich aritmetický průměr a směrodatná odchylka jsou uvedeny v tabulce (Tab. 19). Vzorový chromatogram stanovení riboflavinu je v příloze (P XVII).

Tab. 19. Obsah riboflavinu ve vzorku celozrnných lupínků Frutina

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace [mg.100g ⁻¹]	\bar{x} [mg.100g ⁻¹]	s
96,5	1,241	1,240	1,246	0,011
98,29	1,263	1,262		
95,73	1,231	1,230		
96,84	1,245	1,244		
97,46	1,253	1,252		

Obsah riboflavinu $1,246 \pm 0,010 \text{ mg.100g}^{-1}$

Navážka celozrnných lupínků Dobrá vláknina byla 20,0256 g. Naměřené hodnoty, jejich aritmetický průměr a směrodatná odchylka jsou uvedeny v tabulce (Tab. 20). Vzorový chromatogram stanovení riboflavinu je v příloze (P XVIII).

Tab. 20. Obsah riboflavinu ve vzorku celozrnných lupínků Dobrá vláknina

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace [mg.100g ⁻¹]	\bar{x} [mg.100g ⁻¹]	s
40,46	0,537	0,536	0,553	0,012
41,93	0,555	0,554		
39,78	0,528	0,572		
42,27	0,559	0,558		
41,34	0,548	0,547		

Obsah riboflavinu: $0,553 \pm 0,011 \text{ mg.100g}^{-1}$

Všechny celozrnné lupínky byly podle údajů uváděných výrobcem obohaceny riboflavinem. Nejvyšší obsah riboflavinu byl stanoven v celozrnných lupíncích Fitness ($2,779 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$). Výrobce uvádí obsah riboflavinu $2,700 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, což je jen o $0,079 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ méně než námi stanovené množství. V celozrnných lupíncích Frutina byl stanoven obsah riboflavinu ($1,246 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), který je o $0,154 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ nižší než obsah uváděný výrobcem - $1,400 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$. V celozrnných lupíncích Dobrá vláknina byl stanoven nejnižší obsah riboflavinu ($0,553 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$). Výrobce uvádí o $0,347 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ vyšší obsah riboflavinu a to $0,900 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$.

8.2.2.5 Stanovení riboflavinu u vzorků celozrnných chlebů

Stanovení bylo provedeno u tří druhů celozrnných chlebů - žitného křupavého chlebičku, křehkého celozrnného chlebičku a celozrnného chleba pochoutkového. Vzorky byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 8.1.2 a každý vzorek byl pětkrát proměřen na HPLC postupem uvedeným v kapitole 7.2.

Navážka žitného křupavého chlebičku byla $20,0387 \text{ g}$. Naměřené hodnoty, jejich aritmetický průměr a směrodatná odchylka jsou uvedeny v tabulce (Tab. 21). Vzorový chromatogram stanovení riboflavinu je v příloze (P XIX).

Tab. 21. Obsah riboflavinu ve vzorku žitného křupavého chlebičku

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace [mg.100g ⁻¹]	\bar{x} [mg.100g ⁻¹]	s
42,32	0,560	0,559	0,561	0,011
41,57	0,551	0,550		
43,29	0,572	0,571		
43,78	0,578	0,577		
41,64	0,551	0,550		

Obsah riboflavinu: $0,561 \pm 0,010 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$

Navážka křehkého celozrnného chlebičku byla $20,0245 \text{ g}$. Naměřené hodnoty, jejich aritmetický průměr a směrodatná odchylka jsou uvedeny v tabulce (Tab. 22). Vzorový chromatogram stanovení riboflavinu je v příloze (P XX).

Tab. 22. Obsah riboflavinu ve vzorku křehkého celozrnného chlebičku

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace [mg.100g ⁻¹]	\bar{x} [mg.100g ⁻¹]	s
22,48	0,311	0,312	0,322	0,014
24,15	0,332	0,332		
23,69	0,326	0,326		
21,73	0,301	0,301		
24,87	0,341	0,341		

Obsah riboflavinu: $0,322 \pm 0,013 \text{ mg.100g}^{-1}$

Navážka celozrnného chleba pochoutkového byla 20,0368 g. Naměřené hodnoty, jejich aritmetický průměr a směrodatná odchylka jsou uvedeny v tabulce (Tab. 23). Vzorový chromatogram stanovení riboflavinu je v příloze (P XXI).

Tab. 23. Obsah riboflavinu ve vzorku celozrnného chleba pochoutkového

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace [mg.100g ⁻¹]	\bar{x} [mg.100g ⁻¹]	s
37,91	0,505	0,504	0,504	0,014
36,23	0,484	0,483		
39,46	0,524	0,523		
38,67	0,514	0,513		
37,35	0,498	0,497		

Obsah riboflavinu: $0,504 \pm 0,013 \text{ mg.100g}^{-1}$

V žitném křupavém chlebičku byl stanoven nejvyšší obsah riboflavinu ($0,561 \text{ mg.100g}^{-1}$), podobné množství bylo v celozrnném chlebu pochoutkovém ($0,504 \text{ mg.100g}^{-1}$) a v křehkém celozrnném chlebičku byl obsah riboflavinu nejnižší, a to ($0,322 \text{ mg.100g}^{-1}$). Výrobci obsah riboflavinu u celozrnných chlebů neuvádějí.

8.2.2.6 Stanovení riboflavinu u vzorku pšeničného chleba

Stanovení bylo provedeno u jednoho druhu pšeničného chleba. Vzorek byly připraven podle postupu uvedeného v kapitole 8.1.3 a byl pětkrát proměřen na HPLC postupem uvedeným v kapitole 7.2.

Navážka pšeničného chleba byla 30,0325 g. Naměřené hodnoty, jejich aritmetický průměr a směrodatná odchylka jsou uvedeny v tabulce (Tab. 24). Vzorový chromatogram stanovení riboflavinu je v příloze (P XXII).

Tab. 24. Obsah riboflavinu ve vzorku pšeničného chleba

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace [mg.100g ⁻¹]	\bar{x} [mg.100g ⁻¹]	s
21,78	0,302	0,201	0,208	0,008
23,34	0,322	0,214		
22,96	0,317	0,211		
21,17	0,294	0,196		
23,83	0,328	0,218		

Obsah riboflavinu: $0,208 \pm 0,008$ mg.100g⁻¹

V pšeničném chlebu byl stanoven obsah riboflavinu (0,208 mg.100g⁻¹). Literatura [17] uvádí obsah riboflavinu v chlebu v rozmezí 0,06 až 0,15 mg.100g⁻¹, námi stanovené množství je o 0,058 mg.100g⁻¹ vyšší.

Ze všech druhů chlebů, u kterých byl stanovován obsah riboflavinu, měl nejvyšší obsah žitný křupavý chlebiček (0,561 mg.100g⁻¹), dále celozrnný chléb pochoutkový (0,504 mg.100g⁻¹) a křehký celozrnný chlebiček (0,322 mg.100g⁻¹). Nejnižší obsah riboflavinu byl stanoven v pšeničném chlebu (0,208 mg.100g⁻¹).

8.2.2.7 Stanovení riboflavinu u vzorků celozrnného pečiva

Stanovení bylo provedeno u dvou druhů celozrnného pečiva – zrné špičky a vícezrné kostky. Vzorky byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 8.1.3 a každý vzorek byl pětikrát proměřen na HPLC postupem uvedeným v kapitole 7.2.

Navážka zrné špičky byla 30,0412 g. Vzorový chromatogram stanovení riboflavinu je v příloze (P XXIII). Obsah riboflavinu v zrné špičce byl tak nízký, že nebyl touto metodou stanovitelný.

Navážka vícezrné kostky byla 30,0154 g. Naměřené hodnoty, jejich aritmetický průměr a směrodatná odchylka jsou uvedeny v tabulce (Tab. 25). Vzorový chromatogram stanovení riboflavinu je v příloze (P XXIV).

Tab. 25. Obsah riboflavinu ve vzorku vícezrné kostky

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace [mg.100g ⁻¹]	\bar{x} [mg.100g ⁻¹]	s
6,67	0,111	0,075	0,081	0,007
8,34	0,133	0,089		
7,78	0,126	0,084		
6,13	0,105	0,070		
7,95	0,128	0,085		

Obsah riboflavinu: $0,081 \pm 0,007$ mg.100g⁻¹

Ve vícezrné kostce bylo stanoven obsah riboflavinu $0,081 \pm 0,0067$ mg.100g⁻¹. V zrné špičce nebyl riboflavin použitou metodou stanovitelný. Výrobce obsah riboflavinu u těchto výrobků neuvádí.

8.2.2.8 Stanovení riboflavinu u vzorku tukového rohlíku

Stanovení bylo provedeno u jednoho druhu tukového rohlíků. Vzorek byl připraven podle postupu uvedeného v kapitole 8.1.3 a byl pětikrát proměřen na HPLC postupem uvedeným v kapitole 7.2.

Navážka tukového rohlíku byla 30,0451 g. Naměřené hodnoty, jejich aritmetický průměr a směrodatná odchylka jsou uvedeny v tabulce (Tab. 26). Vzorový chromatogram stanovení riboflavinu je v příloze (P XXV).

Tab. 26. Obsah riboflavinu ve vzorku tukového rohlíku

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace [mg.100g ⁻¹]	\bar{x} [mg.100g ⁻¹]	s
8,58	0,136	0,091	0,094	0,007
7,92	0,128	0,085		
10,23	0,157	0,105		
9,47	0,147	0,098		
8,79	0,139	0,093		

Obsah riboflavinu: $0,094 \pm 0,007$ mg.100g⁻¹

V tukovém rohlíku byl stanoven obsah riboflavinu (0,094 mg.100g⁻¹). Výrobce obsah riboflavinu u tukového rohlíku neuvádí.

Ze všech vzorků pečiva byl nejvyšší obsah riboflavinu stanoven v tukovém rohlíku (0,094 mg.100g⁻¹), vícezrná kostka měla obsah riboflavinu (0,081 mg.100g⁻¹) a v zrné špičce nebyl riboflavin touto metodou stanovitelný, z čehož by se dalo usuzovat, že se nejednalo o celozrnné pečivo.

8.2.2.9 Stanovení riboflavinu u vzorku celozrnných sušenek

Stanovení bylo provedeno u jednoho druhu celozrnných sušenek. Vzorek byl připraven podle postupu uvedeného v kapitole 8.1.2 a byl pětkrát proměřen na HPLC postupem uvedeným v kapitole 7.2.

Navážka celozrnných sušenek byla 20,0296 g. Naměřené hodnoty, jejich aritmetický průměr a směrodatná odchylka jsou uvedeny v tabulce (Tab. 27). Vzorový chromatogram stanovení riboflavinu je v příloze (P XXVI).

Tab. 27. Obsah riboflavinu ve vzorku celozrnných sušenek

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace [mg.100g ⁻¹]	\bar{x} [mg.100g ⁻¹]	s
45,97	0,606	0,605	0,581	0,029
43,13	0,570	0,569		
44,76	0,591	0,590		
46,34	0,611	0,610		
44,92	0,593	0,529		

Obsah riboflavinu: $0,581 \pm 0,028 \text{ mg.100g}^{-1}$

V celozrnných sušenkách byl naměřen obsah riboflavinu ($0,581 \text{ mg.100g}^{-1}$). Výrobce obsah riboflavinu u celozrnných sušenek neuvádí.

8.2.2.10 Stanovení riboflavinu u vzorků celozrnných těstovin

Stanovení bylo provedeno u dvou druhů celozrnných těstovin – žitných celozrnných kolínek a pšeničných celozrnných větren. Vzorky byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 8.1.4 a každý vzorek byl pětkrát proměřen na HPLC postupem uvedeným v kapitole 7.2.

Navážka žitných celozrnných kolínek byla 30,0306 g. Naměřené hodnoty, jejich aritmetický průměr a směrodatná odchylka jsou uvedeny v tabulce (Tab. 28). Vzorový chromatogram stanovení riboflavinu je v příloze (P XXVII).

Tab. 28. Obsah riboflavinu ve vzorku žitných celozrnných kolínek

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace [mg.100g ⁻¹]	\bar{x} [mg.100g ⁻¹]	s
24,41	0,335	0,223	0,223	0,01
22,56	0,312	0,208		
26,17	0,357	0,238		
23,94	0,329	0,219		
24,73	0,339	0,226		

Obsah riboflavinu: $0,223 \pm 0,010 \text{ mg.100g}^{-1}$

Navážka pšeničných celozrnných vřeten byla 30,0561 g. Naměřené hodnoty, jejich aritmetický průměr a směrodatná odchylka jsou uvedeny v tabulce (Tab. 29). Vzorový chromatogram stanovení riboflavinu je v příloze (P XXVIII).

Tab. 29. Obsah riboflavinu ve vzorku pšeničných celozrnných vřeten

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace [mg.100g ⁻¹]	\bar{x} [mg.100g ⁻¹]	s
18,9	0,266	0,177	0,179	0,007
20,36	0,284	0,189		
19,54	0,274	0,182		
17,68	0,250	0,166		
19,13	0,269	0,179		

Obsah riboflavinu: $0,179 \pm 0,007$ mg.100g⁻¹

V žitných celozrnných kolíčkách byl stanoven obsah riboflavinu (0,223 mg.100g⁻¹) a v pšeničných celozrnných vřetenech byl obsah vitamin B₂ nižší - (0,179 mg.100g⁻¹). Výrobce obsah vitamínu B₂ v těstovinách neuvádí.

8.2.2.11 Stanovení riboflavinu u vzorků výluhů z celozrnných těstovin

Stanovení bylo provedeno u dvou druhů výluhů z celozrnných těstovin. Vzorky byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 8.1.5 a každý vzorek byl pětkrát proměřen na HPLC postupem uvedeným v kapitole 7.2.

Navážka žitných celozrnných kolíček byla 30,0306 g. Výluh po vaření těstovin byl zkoncentrován na objem 50 ml. Naměřené hodnoty vztahované na původní navážku suchých těstovin, jejich aritmetický průměr a směrodatná odchylka jsou uvedeny v tabulce (Tab. 30). Vzorový chromatogram stanovení riboflavinu je v příloze (P XXIX).

Tab. 30. Obsah riboflavinu ve vzorku výluhu žitných celozrnných kolínek

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace [mg.100g ⁻¹]	\bar{x} [mg.100g ⁻¹]	s
5,29	0,095	0,016	0,017	0,002
7,32	0,120	0,020		
4,98	0,091	0,015		
6,76	0,113	0,019		
5,95	0,103	0,017		

Obsah riboflavinu: $0,017 \pm 0,002$ mg.100g⁻¹

Navážka pšeničných celozrnných vřeten byla 30,0561 g. Výluh po vaření těstovin byl zkoncentrován na objem 50 ml. Naměřené hodnoty vztažené na původní navážku suchých těstovin, jejich aritmetický průměr a směrodatná odchylka jsou uvedeny v tabulce (Tab. 31). Vzorový chromatogram stanovení riboflavinu je v příloze (P XXX).

Tab. 31. Obsah riboflavinu ve vzorku výluhu pšeničných celozrnných vřeten

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace [mg.100g ⁻¹]	\bar{x} [mg.100g ⁻¹]	s
21,83	0,306	0,051	0,049	0,002
19,74	0,276	0,046		
20,47	0,285	0,047		
22,16	0,307	0,051		
20,98	0,292	0,049		

Obsah riboflavinu: $0,049 \pm 0,002$ mg.100g⁻¹

U výluhů z těstovin byl vyšší obsah stanoven u výluhu z pšeničných celozrnných vřeten ($0,049$ mg.100g⁻¹). U výluhu z žitných celozrnných kolínek byl obsah ($0,017$ mg.100g⁻¹).

V žitných celozrnných kolínkách byl stanoven obsah riboflavinu ($0,223 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), ve výluhu z těchto těstovin byl obsah riboflavinu ($0,017 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$). V pšeničných celozrnných vřetenech byl určen nižší obsah riboflavinu ($0,179 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), ale ve výluhu z těchto těstovin byl obsah riboflavinu vyšší ($0,049 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) v porovnání s žitnými těstovinami.

8.3 Porovnání obsahu riboflavinu v cereálních produktech

Obsah riboflavinu byl stanoven u 22 vzorků cereálních produktů. Stanovená množství riboflavinu a přepočet na procenta DDD pro jednotlivé produkty jsou uvedeny v tabulce (Tab. 32). Doporučená denní dávka (DDD) vitamínu se udává v mezích od 0,4 mg (u kojenců) do 1,7 mg (u adolescentů a dospělých mužů). U žen je denní potřeba vitamínu poněkud nižší 1,2-1,3 mg. Doporučená dávka pro průměrného obyvatele ČR činí 1,5 mg/den. Na obrázku (Obr. 6) je graficky znázorněno sestupné pořadí jednotlivých produktů podle stanoveného obsahu riboflavinu

Ze všech cereálních produktů, u kterých byl stanovován riboflavin, byl nejvyšší obsah ($2,779 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) stanoven v celozrnných lupincích Fitness, které jsou vitamínem B₂ obohaceny. Výrobce u těchto lupínek uvádí obsah riboflavinu $2,700 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, což je téměř stejné množství jako stanovené analýzou.

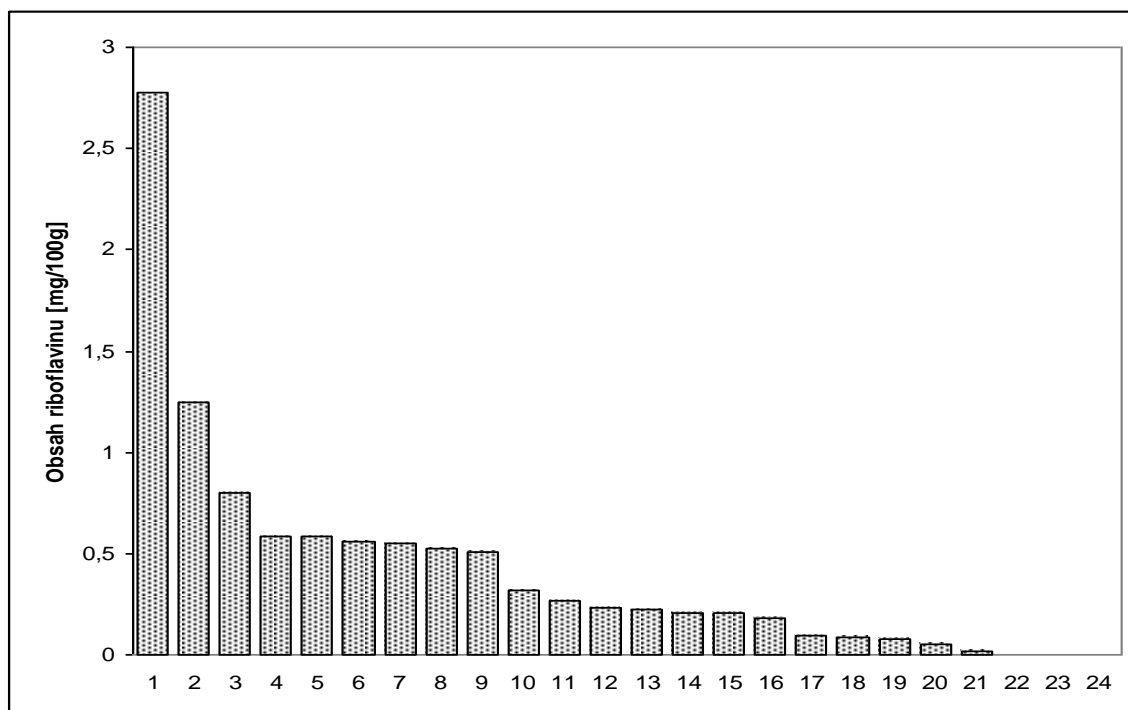
Následují celozrnné lupínky Frutina, které jsou také vitamínem obohaceny, kde byl zjištěn o $0,154 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ nižší obsah riboflavinu než jaký uvádí výrobce, tedy ($1,246 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$). Obsah vitamínu deklarovaný výrobcem je $1,400 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$.

Ze všech druhů mouk byla nejvyšší koncentrace riboflavinu podle předpokladu stanovena u mouk obohacených vitamíny. Výrobce uvádí obsah riboflavinu $0,640 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$. U pšeničné hladké mouky obohacené vitamíny byl zjištěný obsah ještě o $0,160 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ vyšší a to ($0,800 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$).

Další v pořadí je hrubá mouka obohacená vitamíny, kde byl obsah riboflavinu ($0,584 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), což je o $0,056 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ méně než množství deklarované výrobcem.

Tab. 32. Obsah riboflavinu v cereálních produktech a přepočítání obsahu riboflavinu na procenta DDD

Cereální produkt	Obsah riboflavinu [mg.100g ⁻¹]	% DDD
celozrnná mouka pšeničná	0,265 ± 0,005	17,7
celozrnná mouka žitná	0,235 ± 0,003	15,7
celozrnná mouka špaldová	0,204 ± 0,004	13,6
pšeničná hladká mouka obohacená vitaminy	0,800 ± 0,004	53,3
pšeničná hrubá mouka obohacená vitaminy	0,584 ± 0,006	38,9
pšeničná polohrubá mouka obohacená vitaminy	0,525 ± 0,005	35,0
pšeničná hladká mouka	0,087 ± 0,005	5,8
pšeničná mouka polohrubá	0	0
pšeničná mouka hrubá	0	0
celozrnné lupínky Fitness	2,779 ± 0,007	185,3
celozrnné lupínky Frutina	1,246 ± 0,010	83,1
celozrnné lupínky Dobrá vláknina	0,553 ± 0,011	36,9
žitný křupavý chlebiček	0,561 ± 0,010	37,4
celozrnný chléb pochoutkový	0,504 ± 0,013	25,2
křehký celozrnný chlebiček	0,322 ± 0,013	21,5
pšeničný chleba	0,208 ± 0,008	13,9
vícezrnná kostka	0,081 ± 0,007	5,4
zrnná špička	0	0
tukový rohlík	0,094 ± 0,007	6,3
celozrnné sušenky	0,581 ± 0,030	38,7
žitná celozrnné kolínka	0,223 ± 0,010	14,9
pšeničná celozrnná vřetena	0,179 ± 0,007	11,9
výluh z pšeničných celozrnných vřeten	0,049 ± 0,002	3,3
výluh z žitných celozrnných kolínek	0,017 ± 0,002	1,1



Obr. 6. Sestupné pořadí jednotlivých produktů podle obsahu riboflavinu

Uvedená čísla v grafu odpovídají cereálním produktům seřazeným sestupně podle obsahu riboflavinu:

- | | |
|---|---|
| 1 celozrnné lupínky Fitness | 13 žitná celozrnná kolínka |
| 2 celozrnné lupínky Frutina | 14 pšeničný chleba |
| 3 pšeničná hladká mouka obohacená vitaminy | 15 celozrnná mouka špaldová |
| 4 pšeničná hrubá mouka obohacená vitaminy | 16 pšeničná celozrnná větena |
| 5 celozrnné sušenky | 17 tukový rohlík |
| 6 žitný křupavý chlebíček | 18 pšeničná hladká mouka |
| 7 celozrnné lupínky Dobrá vláknina | 19 vícezrnná kostka |
| 8 pšeničná polohrubá mouka obohacená vitaminy | 20 výluh z celozrnných pšeničných věteten |
| 9 celozrnný chléb pochoutkový | 21 výluh z celozrnných žitných kolínek |
| 10 křehký celozrnný chlebíček | 22 pšeničná mouka polohrubá |
| 11 celozrnná mouka pšeničná | 23 pšeničná mouka hrubá |
| 12 celozrnná mouka žitná | 24 zrná špička |

Z dalších celozrnných výrobků byla vysoká koncentrace riboflavinu ($0,581 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) stanovena v celozrnných sušenkách.

Následuje žitný křupavý chlebiček, kde byl určen metodou HPLC obsah riboflavinu ($0,561 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$).

O něco nižší obsah riboflavinu měly celozrnné lupínky Dobrá vláknina, které jsou riboflavinem obohaceny, zde byl obsah riboflavinu ($0,553 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), tedy o $0,347 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ nižší obsah než množství uváděné výrobcem $0,900 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$.

Následuje polohrubá mouka obohacená vitaminy, která měla obsah riboflavinu ($0,525 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), což je o $0,115 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ nižší obsah než jaký uvádí výrobce.

Nepatrně nižší koncentrace vitamínu B₂ byla stanovena v celozrnném chlebu pochoutkovém ($0,504 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$).

Další v pořadí je křehký celozrnný chlebiček, kde byl obsah riboflavinu ($0,322 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$).

Následuje celozrnná mouka pšeničná se stanoveným množstvím riboflavinu ($0,265 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$).

Celozrnná mouka žitná měla o něco nižší koncentraci riboflavinu a to ($0,235 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$).

Podobná koncentrace ($0,223 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) byla stanovena v žitných celozrnných kolínech.

V pšeničném chlebu byl naměřen obsah riboflavinu ($0,208 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$). Literatura uvádí obsah riboflavinu v chlebu v rozmezí $0,060 - 0,150 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, stanovené množství je tedy o $0,058 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ vyšší.[17]

Celozrnná mouka špaldová v porovnání s ostatními celozrnnými moukami měla nejnižší obsah vitamínu B₂ ($0,204 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$).

Následují pšeničná celozrnná vřetena, kde byl zjištěn obsah riboflavinu ($0,179 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$).

Menší množství vitamínu B₂ bylo stanoveno v tukovém rohlíku ($0,094 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$).

Další v pořadí je pšeničná hladká mouka, u které byl obsah riboflavinu ($0,087 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$). Literatura uvádí obsah riboflavinu v pšeničné hladké mouce $0,050 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, což je o $0,037 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ méně než stanovený obsah.[17]

U celozrnného pečiva byl riboflavin stanoven jen v jednom vzorku a to ve vícezrnné kostce, kde byl zjištěn obsah ($0,081 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$).

Nejnižší obsah měly výluhy z celozrnných těstovin, a to výluh z pšeničných celozrnných větven (0,049 mg.100g⁻¹) a výluh z žitných celozrnných kolínek (0,017 mg.100g⁻¹).

Riboflavin touto metodou nebyl stanovitelný, vzhledem k velmi nízkým množstvím tohoto vitamínu – nižším než mez stanovitelnosti, v následujících výrobcích: pšeničné mouce polohrubé a hrubé a v zrně špičce. Literatura uvádí obsah riboflavínu v polohrubé mouce 0,031 mg.100g⁻¹ a v hrubé mouce 0,021 mg.100g⁻¹ .[17]

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo stanovení obsahu riboflavinu (vitaminu B₂) pomocí chromatografické techniky HPLC v cereálních produktech.

V práci bylo analyzováno 22 vzorků cereálních produktů - celozrnné mouky (pšeničná, žitná a špaldová), mouky obohacené vitaminy (hladká, polohrubá a hrubá), pšeničné mouky (hladká, polohrubá a hrubá), celozrnné lupínky (Fitness, Frutina a Dobrá vláknina), celozrnné chleby (žitný křupavý, křehký celozrnný a pochoutkový chléb), pšeničný chleba, celozrnné pečivo (zrnná špička a vícezrnná kostka), tukový rohlík, celozrnné sušenky a celozrnné těstoviny (žitná celozrnná kolínka a pšeničná celozrnná vřetená), které jsou významným zdrojem vitaminu B₂ v naší stravě.

Riboflavin, ve vodě rozpustný vitamin, je důležitý pro tvorbu látek, které jsou nezbytné pro přeměnu a produkci energie z bílkovin, tuků a sacharidů. Hodnota doporučeného denního příjmu riboflavinu by měla být v souladu s energetickým výdejem a tělesnou hmotností konzumenta. Doporučená dávka pro průměrného obyvatele ČR činí 1,5 mg/den.

Pro přesné stanovení riboflavinu bylo nutné optimalizovat postup izolace vitaminu a také stanovit vhodné podmínky pro jeho měření pomocí HPLC/UV-DAD. Při optimalizaci izolace riboflavinu bylo zjišťováno vhodné složení a množství extrakčních činidel i průběh celého izolačního postupu pro jednotlivé cereální produkty.

Při stanovení riboflavinu metodou HPLC/UV-DAD byla použita kolona SUPELCOSIL LC8. Složení mobilní fáze bylo: octan sodný (0,12 mol.l⁻¹) a methanol, s použitím gradientové eluce. Signál byl snímán detektorem UV-DAD při vlnové délce 270 nm.

V cereálních produktech byla stanovena následující množství riboflavinu. Ze všech mouk, u kterých byl stanovován obsah riboflavinu, byl nejvyšší obsah stanoven u mouk obohacených vitaminy. Z nich nejvyšší obsah riboflavinu měla mouka hladká 0,800 mg.100g⁻¹, v hrubé mouce byl obsah riboflavinu 0,584 mg.100g⁻¹ a v mouce polohrubé 0,525 mg.100g⁻¹. U celozrnných mouk byl nejvyšší obsah riboflavinu stanoven v mouce pšeničné 0,265 mg.100g⁻¹, dále v celozrnné mouce žitné 0,235 mg.100g⁻¹ a v celozrnné mouce špaldové 0,204 mg.100g⁻¹. Nejnižší obsah riboflavinu měly pšeničné mouky. U mouky hladké byl

obsah riboflavinu $0,087 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, u mouky polohrubé a hrubé nebyl riboflavin touto metodou stanovitelný, vzhledem k velmi nízkému množství tohoto vitamínu.

U celozrnných lupínků byl nejvyšší obsah riboflavinu stanoven v celozrnných lupíncích Fitness $2,779 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, což je 185,3 % DDD. V celozrnných lupíncích Frutina byl stanoven obsah $1,246 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, který představuje 83,1 % DDD. V celozrnných lupíncích Dobrá vláknina byl stanoven nejnižší obsah riboflavinu $0,553 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, tedy 36,9 % DDD.

U vzorků chlebů měl nejvyšší obsah riboflavinu žitný křupavý chlebiček $0,561 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, toto množství tvoří 37,4 % DDD. V celozrnném chlebu pochoutkovém byl obsah $0,504 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, což je 25,2 % DDD. V křehkém celozrnném chlebičku bylo stanoveno množství $0,322 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, které představuje 21,5 % DDD. Nejnižší obsah riboflavinu byl zjištěn v pšeničném chlebu $0,208 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, tedy 13,9 % DDD.

Z pečiva byl nejvyšší obsah riboflavinu stanoven v tukovém rohlíku $0,094 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, což tvoří 6,3 % DDD. Vícezrná kostka měla obsah riboflavinu $0,081 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, tedy 5,4 % DDD. V zrné špičce byl riboflavin touto metodou nestanovitelný, vzhledem k velmi nízkému obsahu tohoto vitamínu – nižšímu než mez stanovitelnosti.

V celozrnných sušenkách byl naměřen obsah riboflavinu $0,581 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, který by pokryl 38,7 % DDD.

V žitných celozrnných kolíncích byl určen metodou HPLC obsah riboflavinu $0,223 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, což je 14,9 % DDD. Ve výluhu z těchto těstovin byl obsah riboflavinu $0,017 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$. U pšeničných celozrnných vřeten byl stanoven nižší obsah riboflavinu $0,179 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, který tvoří 11,9 % DDD. Ale ve výluhu z těchto těstovin byl obsah riboflavinu vyšší $0,049 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ v porovnání s žitnými těstovinami.

Z našeho stanovení bylo tedy zjištěno následující pořadí jednotlivých cereálních produktů podle obsahu riboflavinu: celozrnné lupínky Fitness, celozrnné lupínky Frutina, pšeničná hladká mouka obohacená vitamíny, pšeničná hrubá mouka obohacená vitamíny, celozrnné sušenky, žitný křupavý chlebiček, celozrnné lupínky Dobrá vláknina, pšeničná polohrubá mouka obohacená vitamíny, celozrnný chléb pochoutkový, křehký celozrnný chlebiček, celozrnná mouka pšeničná, celozrnná mouka žitná, žitná celozrnná kolínka, pšeničný chleba, celozrnná mouka špaldová, pšeničná celozrnná vřetena, tukový rohlík, pšeničná hladká mouka, vícezrná kostka, výluh z celozrnných pšeničných vřeten, výluh z celozrnných žitných kolínek, pšeničná mouka polohrubá, pšeničná mouka hrubá a zrná špička.

Použitá metoda se ukázala být vhodná pro stanovení obsahu riboflavinu v cereálních produktech. Stanovený obsah riboflavinu se ve většině případů příliš nelišil od obsahu uváděného výrobcem nebo uváděného v literatuře. Pouze u tří vzorků byl obsah vitamínu tak nízký, že byl touto metodou nestanovitelný.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] DAVÍDEK, J. a kol. *Chemie potravin*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1983. 632 s.
- [2] ŠÍCHO, V. a kol. *Potravinářská biochemie*. 2. vyd. Praha: SNTL, 1981.
- [3] HLÚBIK, P., OPLTOVÁ, L. *Vitaminy*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2004. 232 s. ISBN 80-247-0373-4.
- [4] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999. 328 s. ISBN 80-86659-01-1
- [5] HOZA, I. a kol. *Potravinářská biochemie II*. 1. vyd. Zlín: UTB, 2006. 102 s. ISBN 80-7318-395-1.
- [6] KARLSON, P. *Základy biochemie*. 10. vyd. Praha: Academia, 1981. 504 s.
- [7] BENEŠOVÁ, L. a kol. *Potravinářství IV*. 1. vyd. Praha: ÚZPI, 1997. 156 s. ISBN 80-85120-56-9
- [8] ŽAMBOCH, J. *Vitaminy*. 1. vyd. Praha: Grada, 1996. 80 s. ISBN 80-7169-322-7
- [9] ROGINSKI, Hubert. *Encyclopedia of dairy sciences*. 1. vyd. London: Academic Press, 2002. s. 2694-2698. ISBN 0-12-227235-8
- [10] MANDŽUKOVÁ, J. *Léčivá síla vitaminů, minerálů a dalších látek*. 1. vyd. Benešov: Start, 2005. 267 s. ISBN 80-86231-36-4
- [11] JORDÁN, V. a HEMZALOVÁ M. *Antioxidanty zázračné zbraně*. 1. vyd. Brno: JOTA, 2001. 160 s. ISBN 80-7217-156-9
- [12] *Vitamin B₂ (riboflavin)* [online]. [cit. 2008-3-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.vitamins-supplements.org/carbohydrates/>>
- [13] *WHO: Healthy food for women and their families* [online]. [cit. 2008-3-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.euro.who.int/Document/E73470.pdf>>
- [14] AGERBO, P., ANDERSEN, H. F. *Vitaminy a minerály pro zdravý život*. 1. vyd. Praha: Ferrosan, 1997. 146 s. ISBN 80-7169-489-4
- [15] *Expert group on Vitamins and Minerals: Riboflavin* [online]. [cit. 2008-3-15]. Dostupný z WWW: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/evm_riboflavin.pdf>

- [16] GLISZCZYŃSKA, Anna., KOZIOŁOWA, Anna. Chromatographic determination of flavin derivatives in baker's yeast. *Journal of Chromatography A*. 1998, roč. 822, č. 1, s. 59-66
- [17] PERLÍN, C. a kol. *Potravinové tabulky*. Praha: Společnost pro výživu, 1993. 66 s. ISBN 80-85120-44-5
- [18] BUŇKA, F. a kol. *Ekonomika výživy a výživová politika I*. 1. vyd. Zlín: UTB, 2006. 159. s. ISBN 80-7318-429-X
- [19] HÁLKOVÁ, J. a kol. *Analýza potravin*. 1. vyd. Újezd u Brna: RNDr. Ivan Straka, 2000.
- [20] DAVÍDEK, J., VELÍŠEK, J. *Analýza potravin*. 1 vyd. Praha: VŠCHT, 1988. 122 s.
- [21] SIDDIQUI, I., PITRE, K. S. Voltammetric determination of vitamins in pharmaceutical formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2001, roč. 26, č. 5-6, s. 1009-1015
- [22] CHEN, Zhi., CHEN, Bo., YAO, Shouzhuo. High-performance liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry for simultaneous determination of taurine and 10-water-soluble vitamins in multivitamin tablets. *Analytica Chimica Acta*. 2006, roč. 569, č. 1-2, s. 169-175
- [23] KRAMÁŘOVÁ, D., ŠKROVÁNKOVÁ, S., HÁBOVÁ, M., HOZA, I. Stanovení vitamínu B₂ v játrech metodou HPLC. In: *Laboralim 2007*. Bratislava: STU, 2007. s. 282-286
- [24] DAVÍDEK, J. a kol. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. Praha: SNTL, 1977. 720 s.
- [25] CATALDI, T. R. I. a kol. Assessment of riboflavin and flavin content in common food samples by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Food Chemistry*. 2003, roč. 82, č. 2, s. 309-314
- [26] GARCÍA, L. a kol. Determination of thiamine, riboflavin and pyridoxine in pharmaceuticals by synchronous fluorescence spectrometry in organized media. *Analytica Chimica Acta*. 2001, roč. 434, č. 2, s. 193-199

- [27] BUŇKA, František., SEVEROVÁ, Marta., HRABĚ, Jan. Vliv sterilace na obsah riboflavinu v tavených sýrech určených do bojových dávek potravin. In: *Sborník VVŠ PV 2/2003*. Vyškov: VVŠ PV, 2003. s. 121-129
- [28] MUNOZ, R. a kol. Determination by HPLC of changes in riboflavin levels in milk and nondairy imitation milk during refrigerated storage. *Food Chemistry*. 1994, roč. 49, č. 2, s. 203-206
- [29] Barna, E. a kol. Determination of thiamine (vitamin B₁) and riboflavin (vitamin B₂) in meat and liver by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1994, roč. 668, č. 2, s. 359-363
- [30] EKINCI, R. The effect of fermentation and drying on the water-soluble vitamin content of tarhana, a traditional Turkish cereal food. *Food Chemistry*. 2004, roč. 90, č. 1-2, s. 127-132
- [31] MONFERRER-PONS, Llorenç. a kol. Micellar liquid chromatography determination of B vitamins with direct injection and ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A*. 2002, roč. 984, č. 2, s. 223-231
- [32] MORENO, P. a kol. Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2000, roč. 870, č. 1-2, s. 207-215
- [33] HÖLLER, U. a kol. Automated determination of selected water-soluble vitamins in tablets using a bench-top robotic system coupled to reversed-phase (RP-18) HPLC with UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003, roč. 31, č. 1, s. 151-158
- [34] VINAS, P. a kol. Reversed-phase liquid chromatography on an amide stationary phase for the determination of the B group vitamins in baby foods. *Journal of Chromatography A*. 2003, roč. 1007, č. 1-2, s. 77-84
- [35] JAKOBSEN, J. Optimisation of the determination of thiamin, 2-(1-hydroxyethyl)thiamin, and riboflavin in food samples by use of HPLC. *Food Chemistry*. 2008, roč. 106, č. 3, s. 1209-1217

- [36] RUSSELL, L. F. a kol. Development of a robotic-HPLC determination of riboflavin vitamers in food. *Food Chemistry*. 1998, roč. 63, č. 1, s. 125-131
- [37] ANDRÉS-LACUEVA, C. a kol. Determination of riboflavin, flavin mononucleotide and flavinadenine dinucleotide in wine and other beverages by highperformance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. 1998. roč. 823,č. 1-2, s. 355-363
- [38] CHURÁČEK, J. a kol. *Analytická separace látek*. 1 vyd. Praha: SNTL, 1990. 384 s.
- [39] KARDOŠ, E., BEREŠ, D. *Základy kvapalinovej chromatografie*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1979. 296 s.
- [40] SÝKORA, D. a FÄHNRIK, J. *Kapalinová chromatografie a absorpční UV spektrofotometre*. [online]. [cit. 2008-2-25]. Dostupný z WWW: <http://www.vscht.cz/anl/lach1/6_LC.pdf>.
- [41] MIKEŠ, O. a kol. *Laboratorní chromatografické metody*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1980. 676 s.
- [42] ZÍKA, J. *Nové směry v analytické chemii*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1988. 248 s.
- [43] CHURÁČEK, J. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. 1. vyd. Praha: Academia, 1993.
- [44] PUNGOR, Erno. *A practical guide to instrumental analysis*. 1. vyd. Boca Raton: CRC Press LLC, 1995. s. 234-271 ISBN 0-8493-8681-0
- [45] POPL, M. a kol. *Instrumentální analýza*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1986.
- [46] CHURÁČEK, J., JANDERA, P. *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1985. 192 s.
- [47] CHURÁČEK, J., JANDERA, P. *Kapalinová chromatografie s programovým složením mobilní fáze*. 1. vyd. Praha: Academia, 1984. 152 s.
- [48] *High Performance Liquid Chromatography Mass Spektrometry*. [online]. [cit. 2008-4-16]. Dostupný z www: <<http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/hplcms.html>>

- [49] ZAJÍC, J. a kol. *Principy potravinářských technologií a vody*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 1988.
- [50] HRABĚ, J. a kol. *Technologie výroby potravin rostlinného původu*. 1. vyd. Zlín: UTB, 2006. s. 7- 16. ISBN 80-7318-372-2
- [51] HAMPL, J. *Cereální chemie a technologie I*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 1988. 241 s.
- [52] PŘÍHODA, J. a kol. *Cereální chemie a technologie I*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2003. 202 s. ISBN 80-7080-530-7
- [53] DRDÁK, M. a kol. *Základy potravinářských technologií*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 1996. 512 s. ISBN 80-967064-1-1.
- [54] KADLEL, P. a kol. *Technologie potravin I*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2007. s. 140 - 149. ISBN 80-7080-509-9
- [55] ČEPIČKA, J. a kol. *Obecná potravinářská technologie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1995. 246 s.
- [56] DODOK, L. *Chémia a technológia trvanlivého pečiva*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1988. 300 s.
- [57] BATIFOULIER, F. a kol. Variability of B vitamins concentrations in wheat bran, milling fractions and bread products. *European Journal of Agronomy*. 2006, roč. 25, č. 2, s. 163-169
- [58] *Statistická ročenka České republiky 2007*. [online]. [cit. 2008-3-8]. Dostupný z www:
<<http://www.czso.cz/csu/2007edicniplan.nsf/kapitola/10n1-07-2007-1400>>
- [59] CYHELSKÝ, L. a kol. *Teorie statistiky*. 2.vyd. Praha: SNTL, 1986. 344 s.
- [60] CYHELSKÝ, L. a kol. *Elementární statistická analýza*. 1. vyd. Praha: Management press, 1996. 302 s. ISBN 80-85943-18-2.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

FMN Flavinmononukleotid

FAD Flavinadeninukleotid

HPLC Vysokoučinná kapalinová chromatografie

DAD Detektor s diodovým polem

DDD Doporučená denní dávka

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Flavinmononukleotid a flavinadeninukleotid	14
Obr. 2. Fotolýza riboflavinu	15
Obr. 3 Schéma kapalinového chromatografu	28
Obr. 4. Pšenice obecná.....	36
Obr. 5. Kalibrační přímka pro stanovení riboflavinu metodou HPLC	59
Obr. 6. Sestupné pořadí jednotlivých produktů podle obsahu riboflavinu	77

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Obsah riboflavinu ve vybraných potravinách	18
Tab. 2. Retence riboflavinu po tepelné úpravě ve vybraných pokrmech.....	19
Tab. 3. Přehled obilovin běžně pěstovaných a využívaných pro potravinářské účely.....	36
Tab. 4. Obsah jednotlivých složek v obilovinách (v % hmot. při 15 % vlhkosti obilí)	38
Tab. 5. Obsah vitaminů v obilovinách.....	40
Tab. 6. Produkce pšenice v ČR.....	41
Tab. 7. Produkce žita v ČR	42
Tab. 8. Kvantily rozdělení t	44
Tab. 9. Gradient mobilní fáze pro stanovení riboflavinu metodou HPLC.....	54
Tab. 10. Naměřené hodnoty pro kalibrační přímkou riboflavinu.....	58
Tab. 11. Obsah riboflavinu ve vzorku celozrnné mouky pšeničné	60
Tab. 12. Obsah riboflavinu ve vzorku celozrnné mouky žitné	61
Tab. 13. Obsah riboflavinu ve vzorku celozrnné mouky špaldové	61
Tab. 14. Obsah riboflavinu ve vzorku hladké pšeničné mouky obohacené vitaminy.....	62
Tab. 15. Obsah riboflavinu ve vzorku polohrubé pšeničné mouky obohacené vitaminy	63
Tab. 16. Obsah riboflavinu ve vzorku hrubé pšeničné mouky obohacené vitaminy	63
Tab. 17. Obsah riboflavinu ve vzorku pšeničné hladké mouky.....	64
Tab. 18. Obsah riboflavinu ve vzorku celozrnných lupínků Fitness	65
Tab. 19. Obsah riboflavinu ve vzorku celozrnných lupínků Frutina	66
Tab. 20. Obsah riboflavinu ve vzorku celozrnných lupínů Dobrá vláknina.....	66
Tab. 21. Obsah riboflavinu ve vzorku žitného křupavého chlebičku	67
Tab. 22. Obsah riboflavinu ve vzorku křehkého celozrnného chlebičku	68
Tab. 23. Obsah riboflavinu ve vzorku celozrnného chleba pochoutkového.....	68
Tab. 24. Obsah riboflavinu ve vzorku pšeničného chleba	69
Tab. 25. Obsah riboflavinu ve vzorku vícezrnné kostky	70
Tab. 26. Obsah riboflavinu ve vzorku tukového rohlíku	71
Tab. 27. Obsah riboflavinu ve vzorku celozrnných sušenek	72
Tab. 28. Obsah riboflavinu ve vzorku žitných celozrnných kolínek	72
Tab. 29. Obsah riboflavinu ve vzorku pšeničných celozrnných vřeten	73
Tab. 30. Obsah riboflavinu ve vzorku výluhu žitných celozrnných kolínek	74
Tab. 31. Obsah riboflavinu ve vzorku výluhu pšeničných celozrnných vřeten.....	74

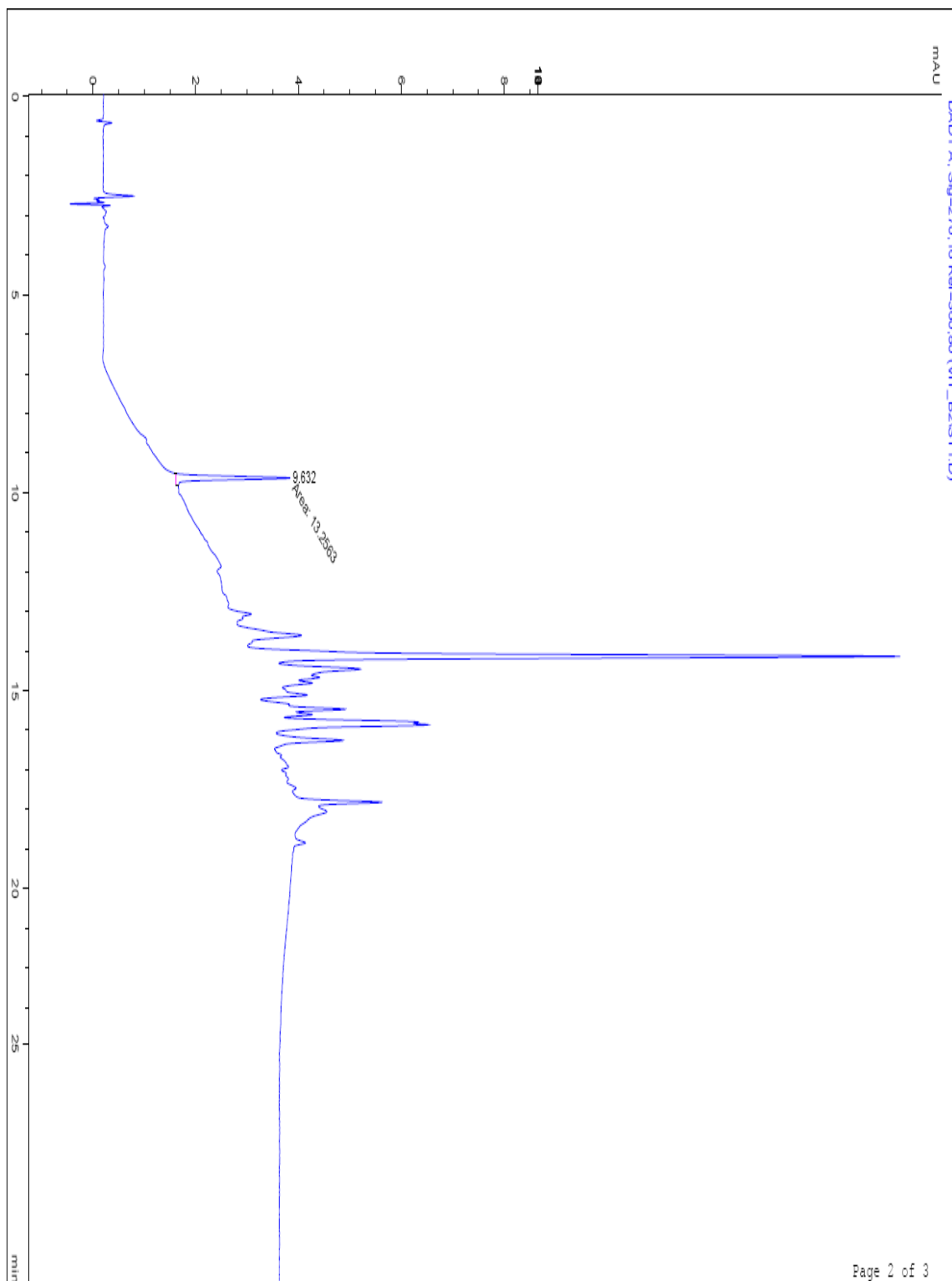
Tab. 32. Obsah riboflavinu v cereálních produktech a přepoččet obsahu riboflavinu na procenta DDD	76
---	----

SEZNAM PŘÍLOH

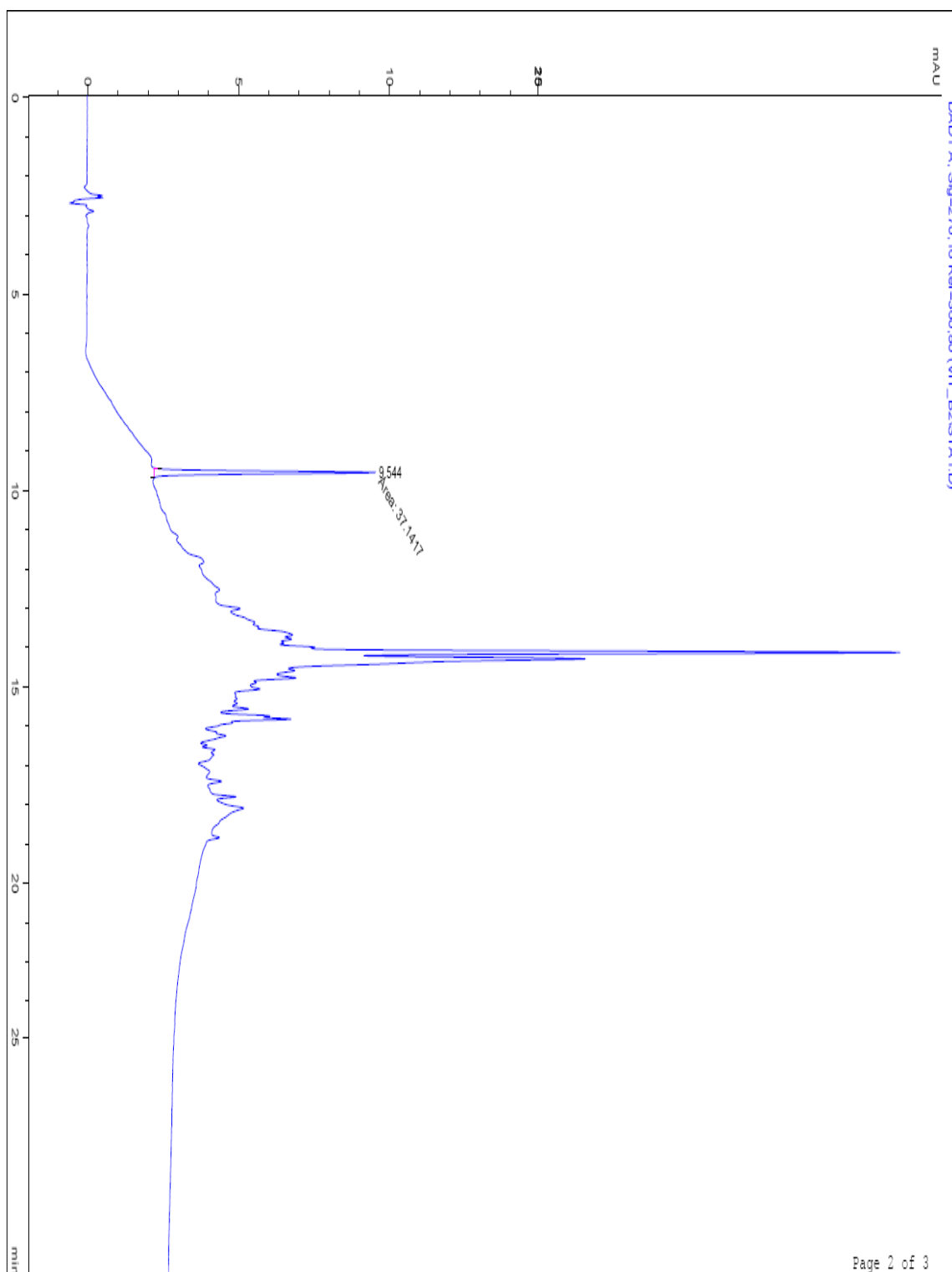
- P I Chromatogram standardu riboflavinu (koncentrace 0,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
- P II Chromatogram standardu riboflavinu (koncentrace 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
- P III Chromatogram standardu riboflavinu (koncentrace 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
- P IV Chromatogram standardu riboflavinu (koncentrace 1,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
- P V Chromatogram standardu riboflavinu (koncentrace 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
- P VI Chromatogram standardu riboflavinu (koncentrace 4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
- P VII Chromatogram stanovení riboflavinu ve vzorku celozrnné mouky pšeničné
- P VIII Chromatogram stanovení riboflavinu ve vzorku celozrnné mouky žitné
- P IX Chromatogram stanovení riboflavinu ve vzorku celozrnné mouky špaldové
- P X Chromatogram stanovení riboflavinu ve vzorku hladké pšeničné mouky obohacené vitaminy
- P XI Chromatogram stanovení riboflavinu ve vzorku polohrubé pšeničné mouky obohacené vitaminy
- P XII Chromatogram stanovení riboflavinu ve vzorku hrubé pšeničné mouky obohacené vitaminy
- P XIII Chromatogram stanovení riboflavinu ve vzorku pšeničné hladké mouky
- P XIV Chromatogram stanovení riboflavinu ve vzorku pšeničné polohrubé mouky
- P V Chromatogram stanovení riboflavinu ve vzorku pšeničné hrubé mouky
- P XVI Chromatogram stanovení riboflavinu ve vzorku celozrnných lupínků Fitness
- PXVII Chromatogram stanovení riboflavinu ve vzorku celozrnných lupínků Frutina
- P XVIII Chromatogram stanovení riboflavinu ve vzorku ve vzorku celozrnných lupínků Dobrá vláknina
- P XIX Chromatogram stanovení riboflavinu ve vzorku žitného křupavého chlebičku

- P XX Chromatogram stanovení riboflavinu ve vzorku křehkého celozrnného chlebičku
- P XXI Chromatogram stanovení riboflavinu ve vzorku celozrnného chleba pochoutkového
- P XXII Chromatogram stanovení riboflavinu ve vzorku pšeničného chleba
- P XXIII Chromatogram stanovení riboflavinu ve vzorku zrné špičky
- P XXIV Chromatogram stanovení riboflavinu ve vzorku vícezrné kostky
- P XXV Chromatogram stanovení riboflavinu ve vzorku tukového rohlíku
- P XXVI Chromatogram stanovení riboflavinu ve vzorku celozrnných sušenek
- P XXVII Chromatogram stanovení riboflavinu ve vzorku žitných celozrnných kolínek
- P XXVIII Chromatogram stanovení riboflavinu ve vzorku pšeničných celozrnných vřeten
- P XXIX Chromatogram stanovení riboflavinu ve vzorku výluhu z žitných celozrnných kolínek
- P XXX Chromatogram stanovení riboflavinu ve vzorku výluhu z pšeničných celozrnných vřeten

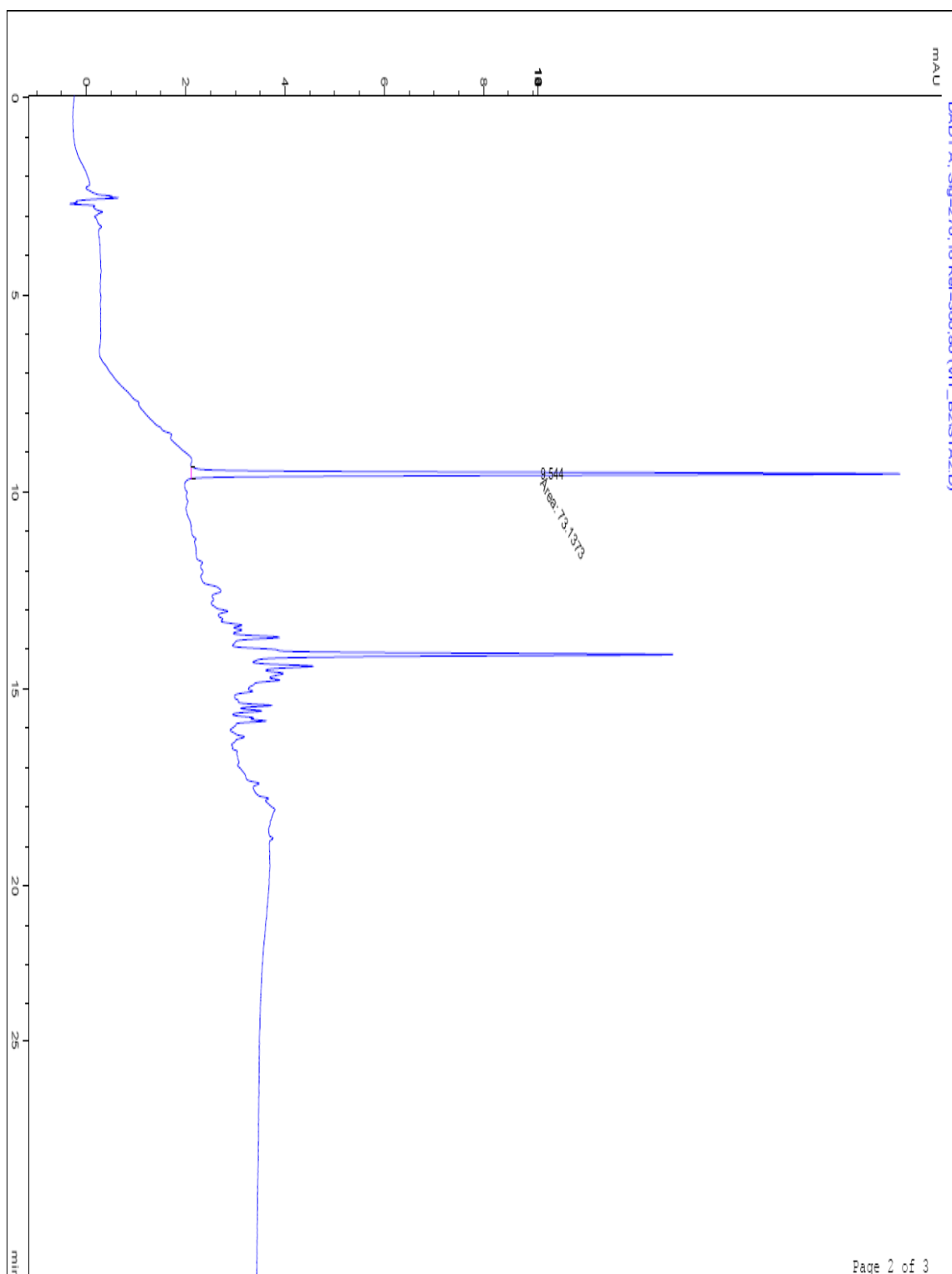
**PŘÍLOHA P I: CHROMATOGRAM STANDARDU RIBOFLAVINU
(KONCENTRACE 0,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)**



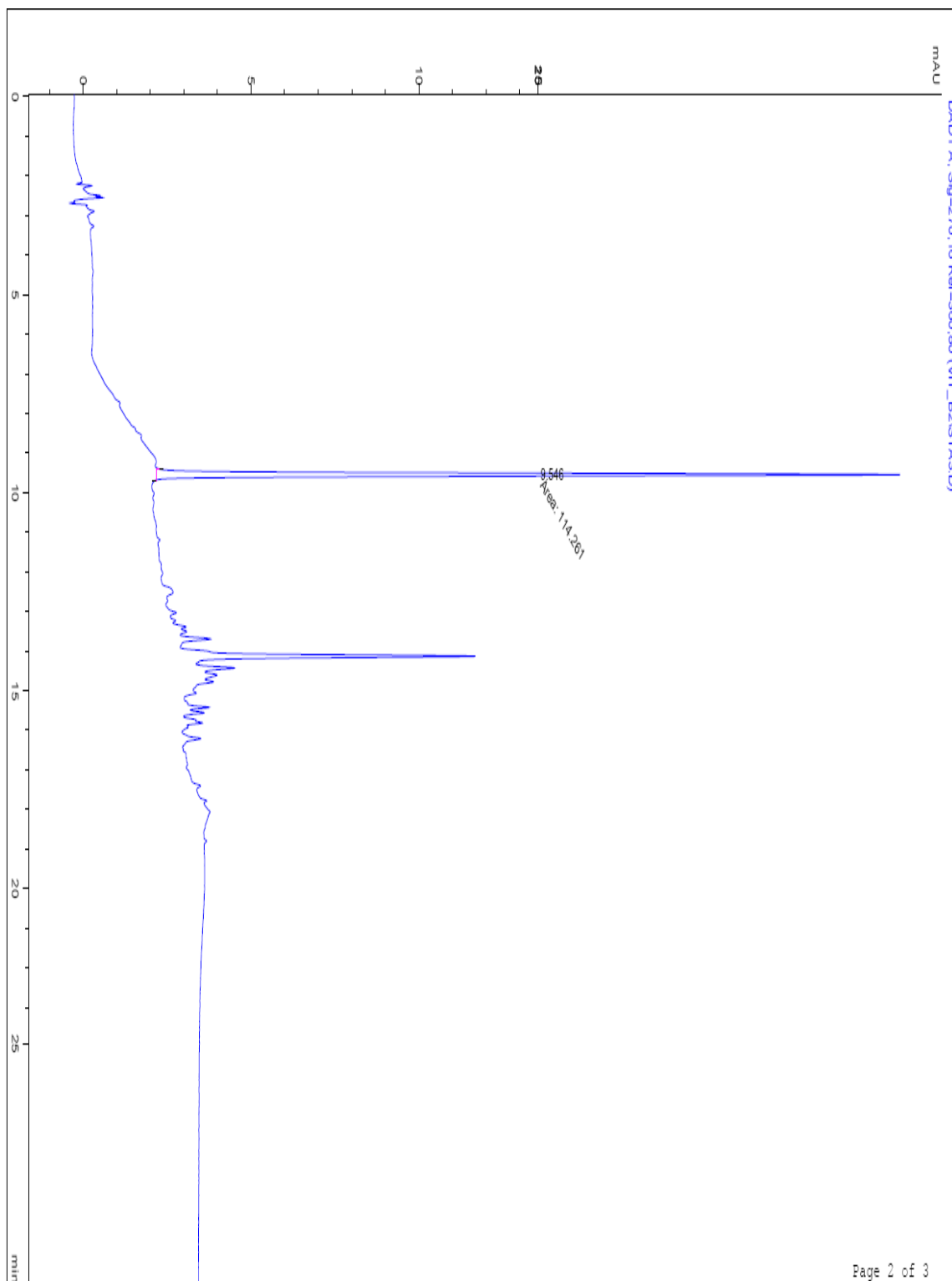
**PŘÍLOHA P II: CHROMATOGRAM STANDARDU RIBOFLAVINU
(KONCENTRACE 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)**



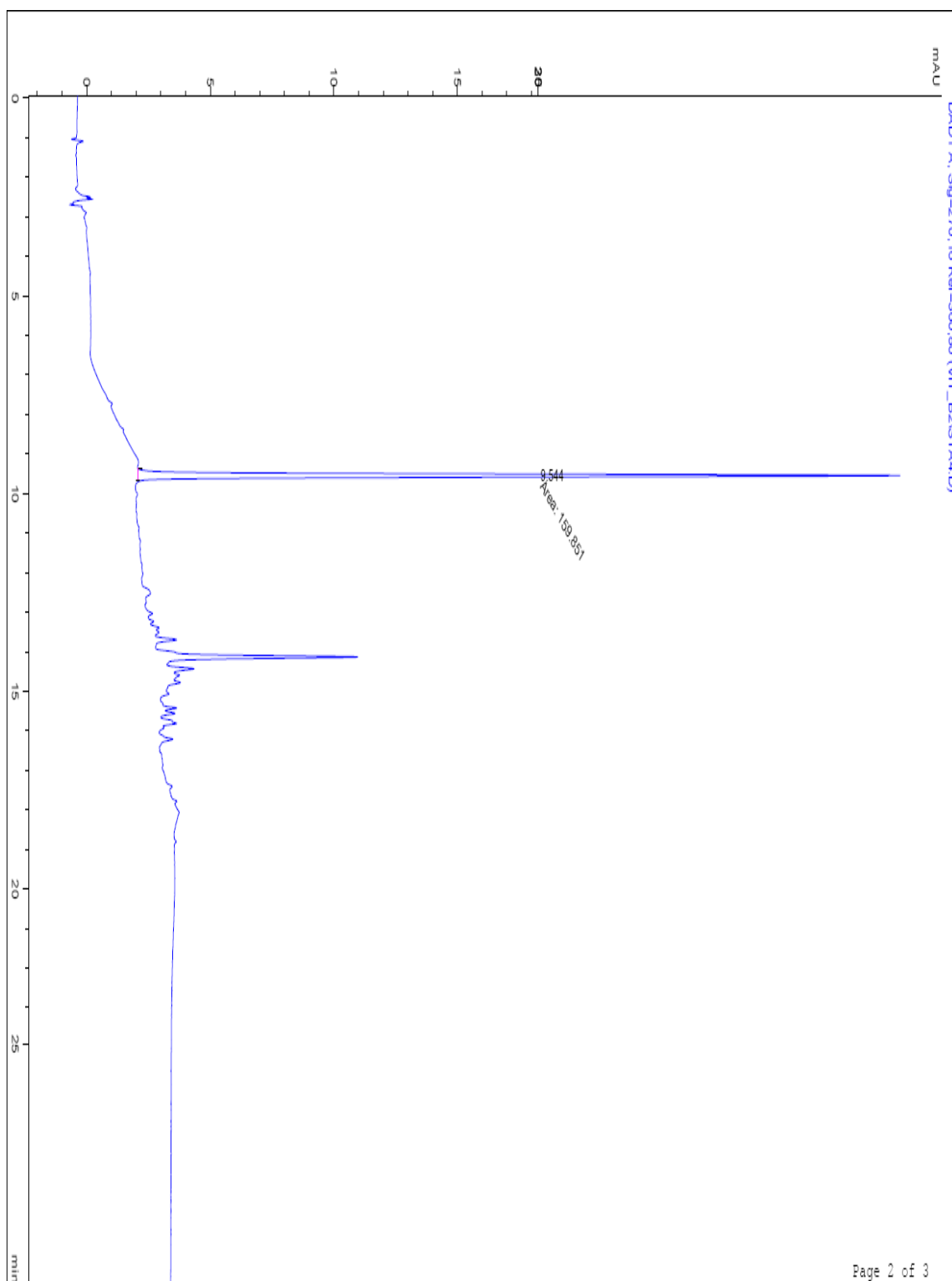
PŘÍLOHA P III: CROMATOGRAM STANDARDU RIBOFLAVINU (KONCENTRACE 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)



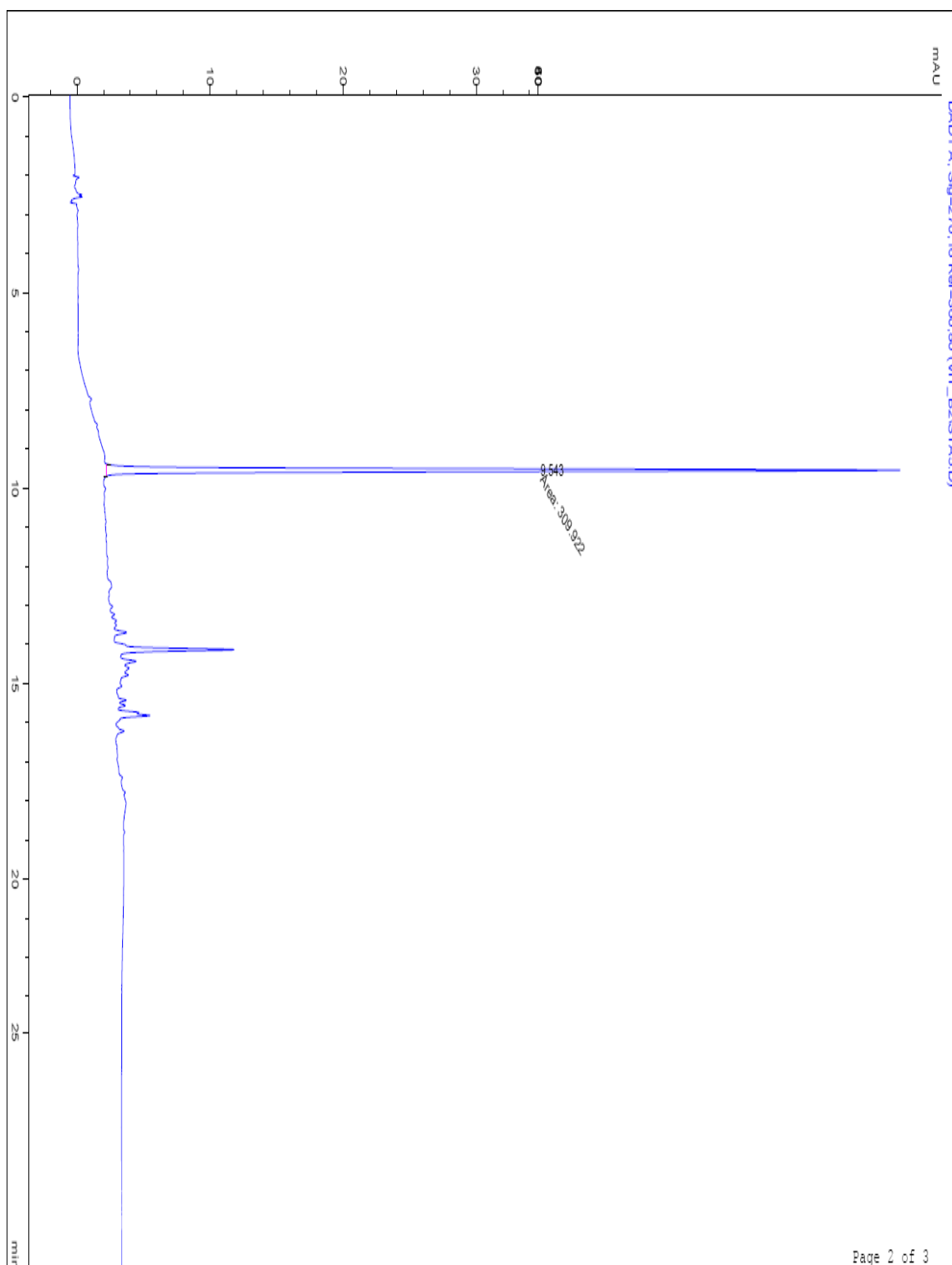
**PŘÍLOHA P IV: CHROMATOGRAM STANDARDU RIBOFLAVINU
(KONCENTRACE 1,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)**



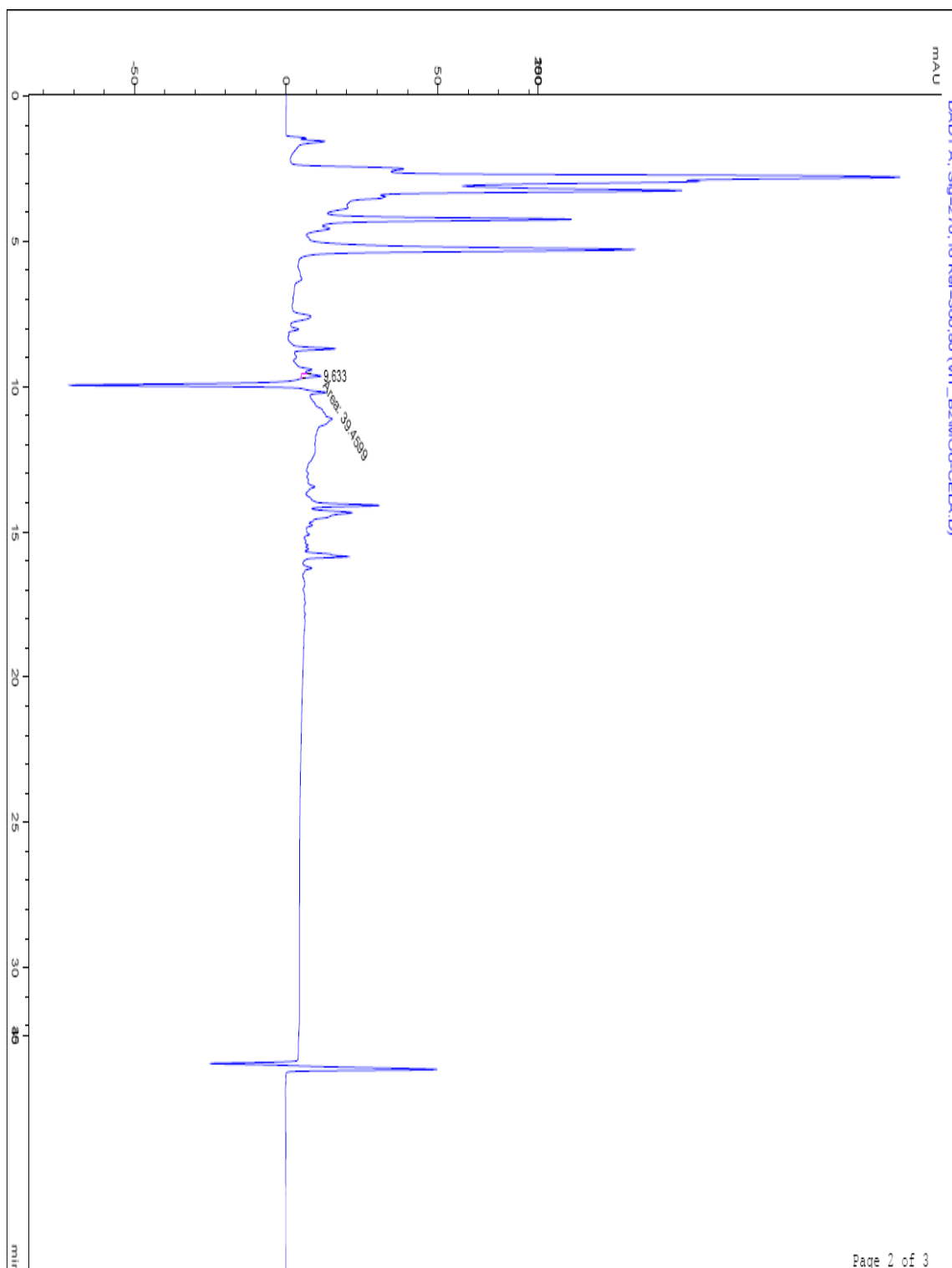
**PŘÍLOHA P V: CHROMATOGRAM STANDARDU RIBOFLAVINU
(KONCENTRACE 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)**



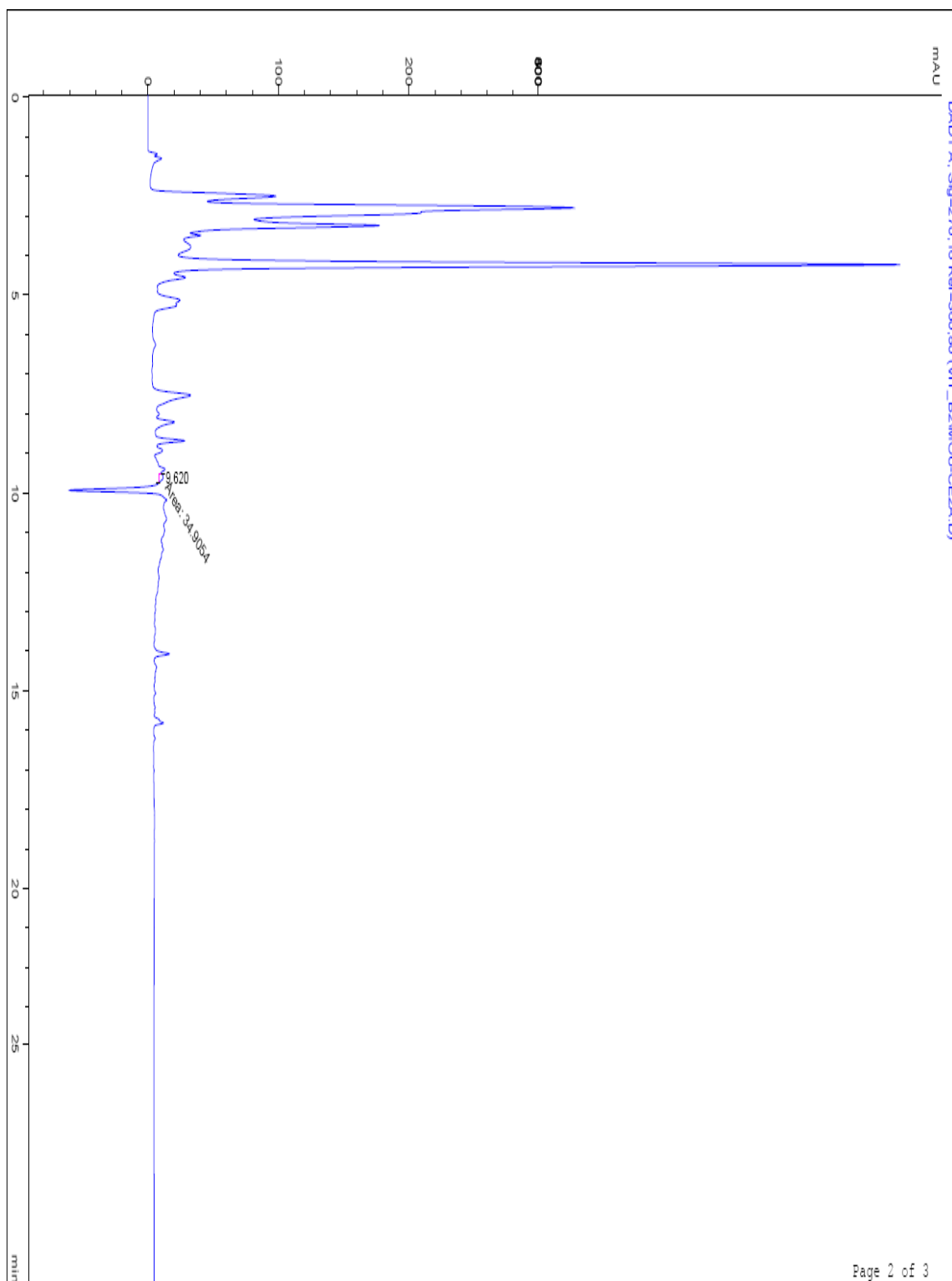
**PŘÍLOHA P VI: CHROMATOGRAM STANDARDU RIBOFLAVINU
(KONCENTRACE 4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)**



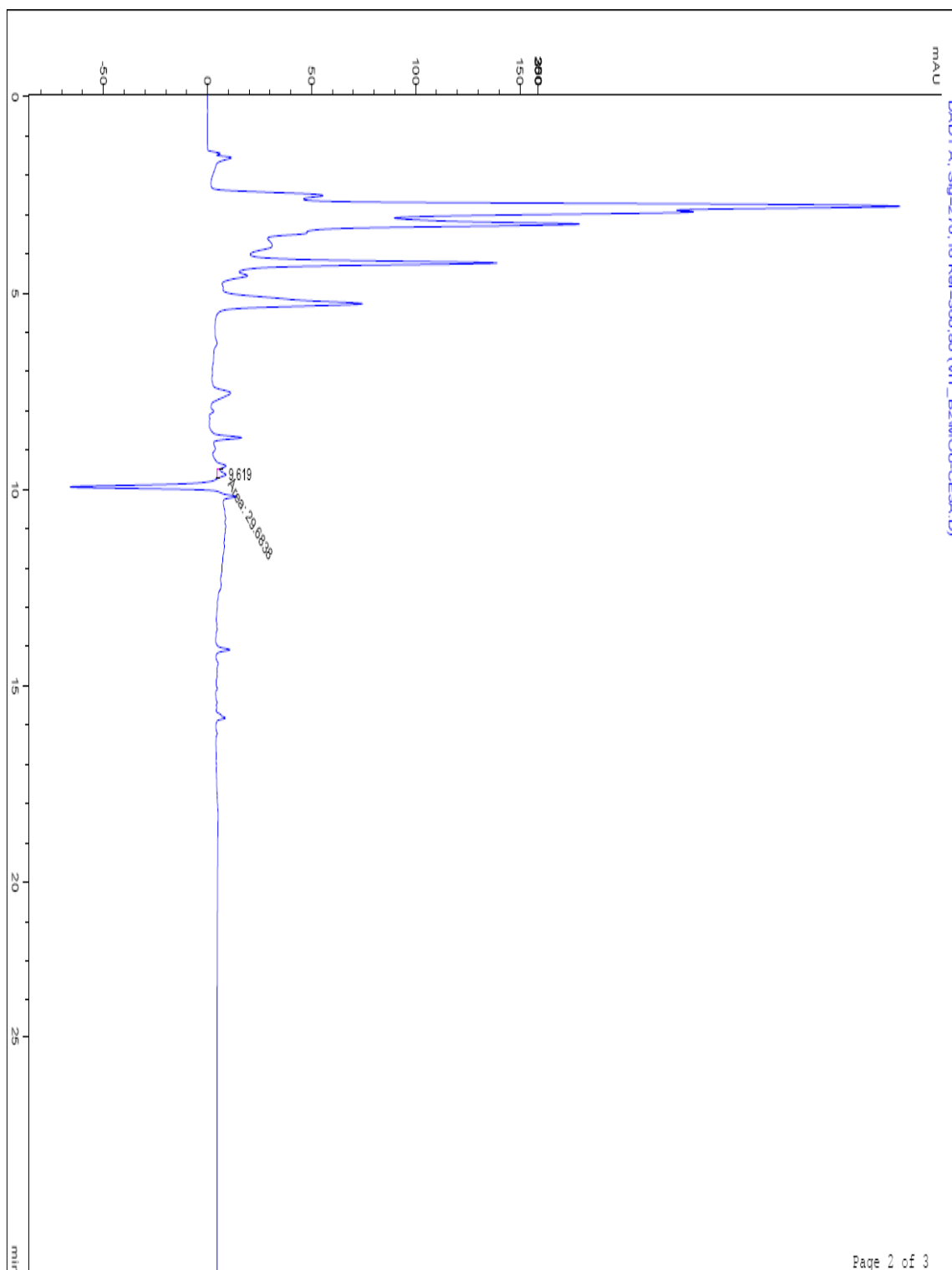
PŘÍLOHA P VII: CROMATOGRAM STANOVENÍ RIBOFLAVINU VE VZORKU CELOZRNNÉ MOUKY PŠENIČNÉ



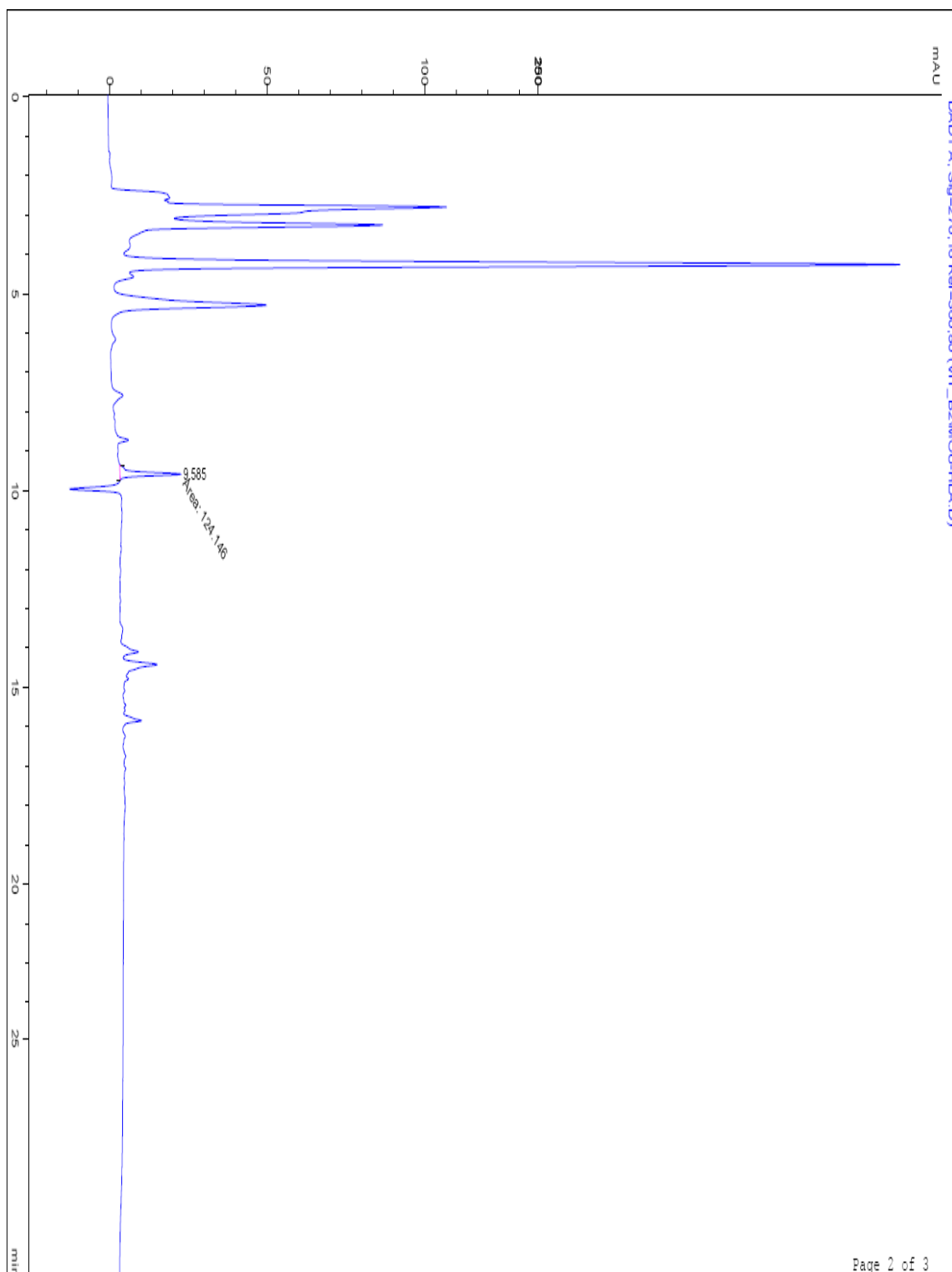
PŘÍLOHA P VIII: CROMATOGRAM STANOVENÍ RIBOFLAVINU VE VZORKU CELOZRNNÉ MOUKY ŽÍTNÉ



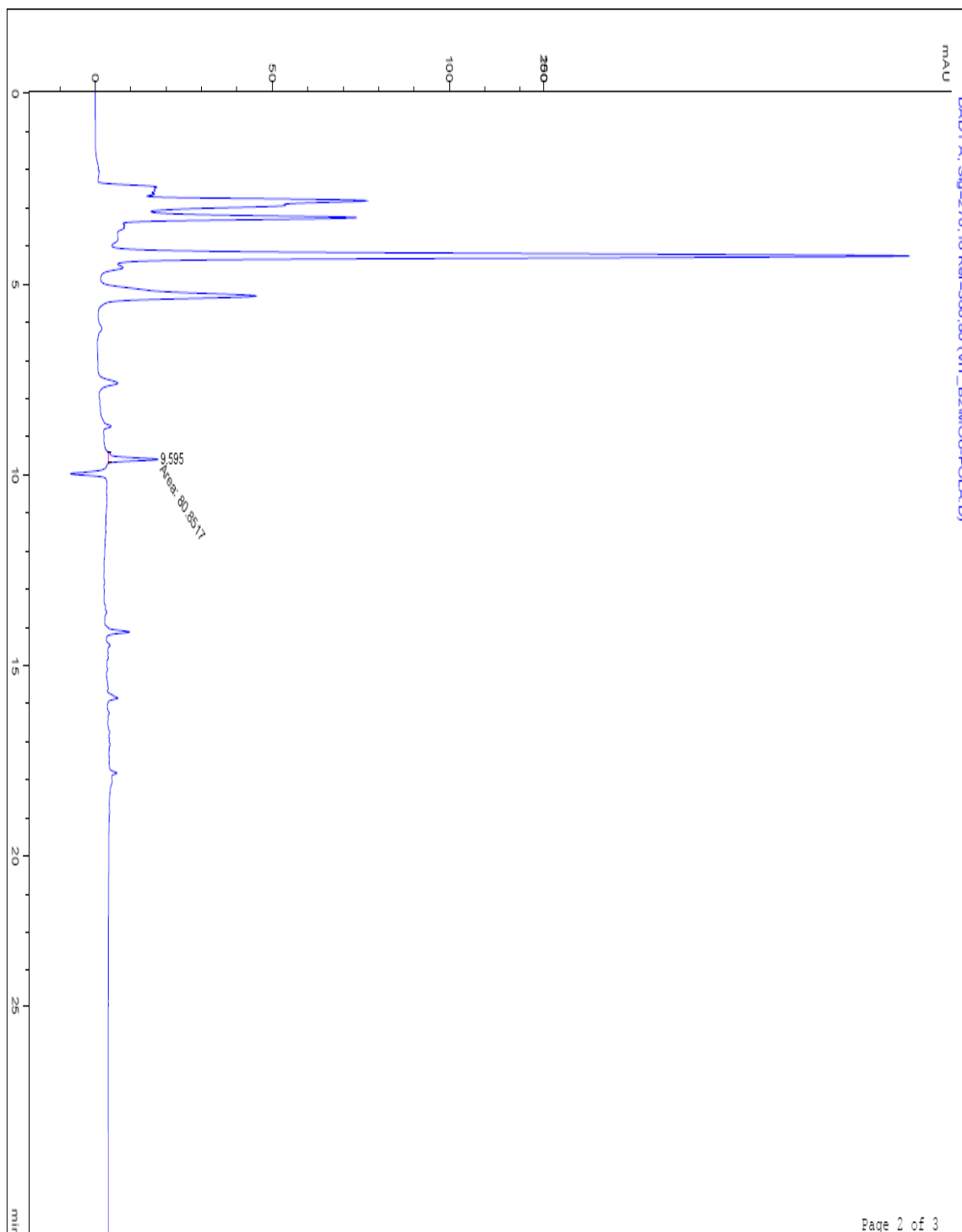
PŘÍLOHA P IX: CHROMATOGRAM STANOVENÍ RIBOFLAVINU VE VZORKU CELOZRNNÉ MOUKY ŠPALDOVÉ



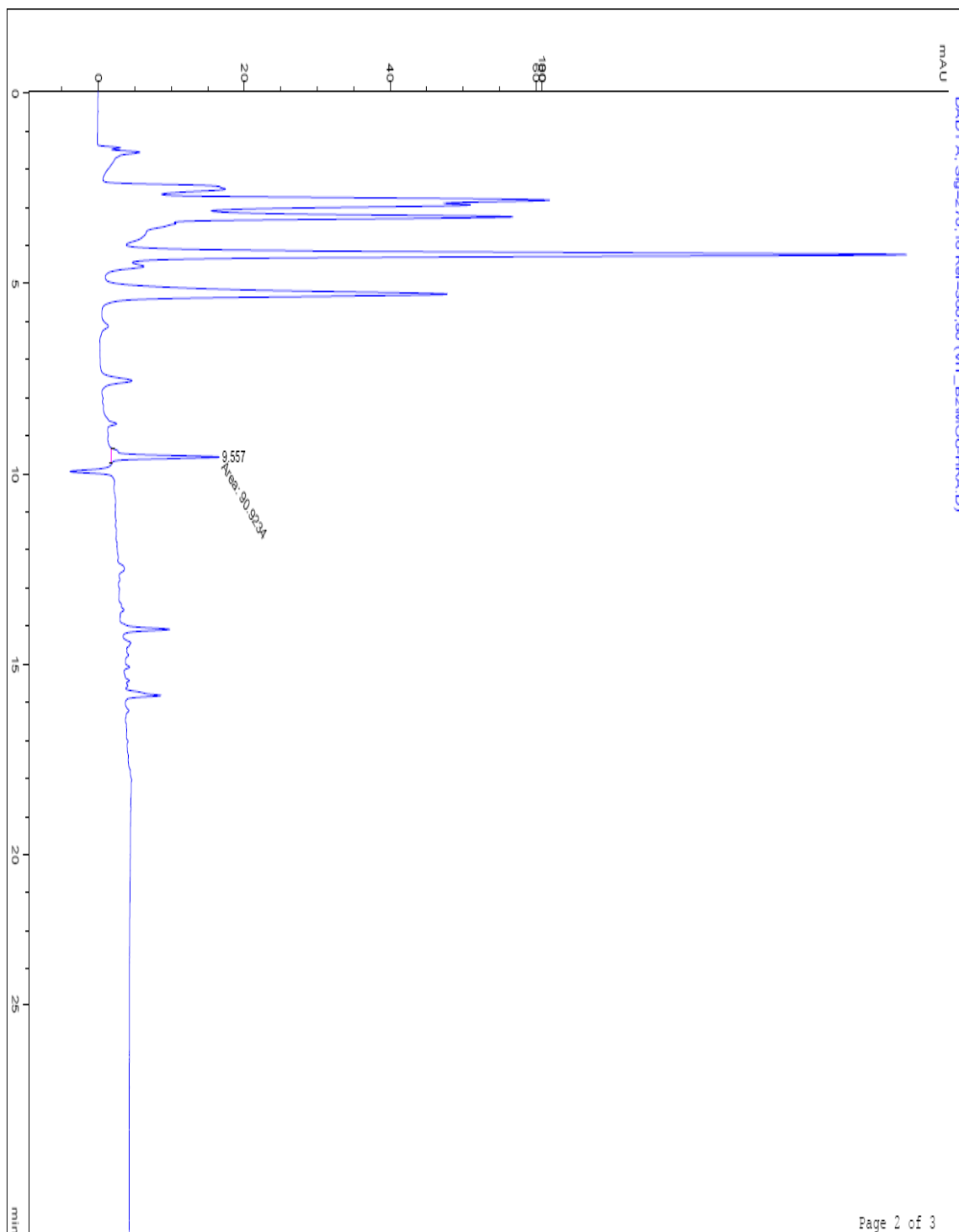
PŘÍLOHA P X: CHROMATOGRAM STANOVENÍ RIBOFLAVINU VE VZORKU HLADKÉ PŠENIČNÉ MOUKY OBOHACENÉ VITAMINY



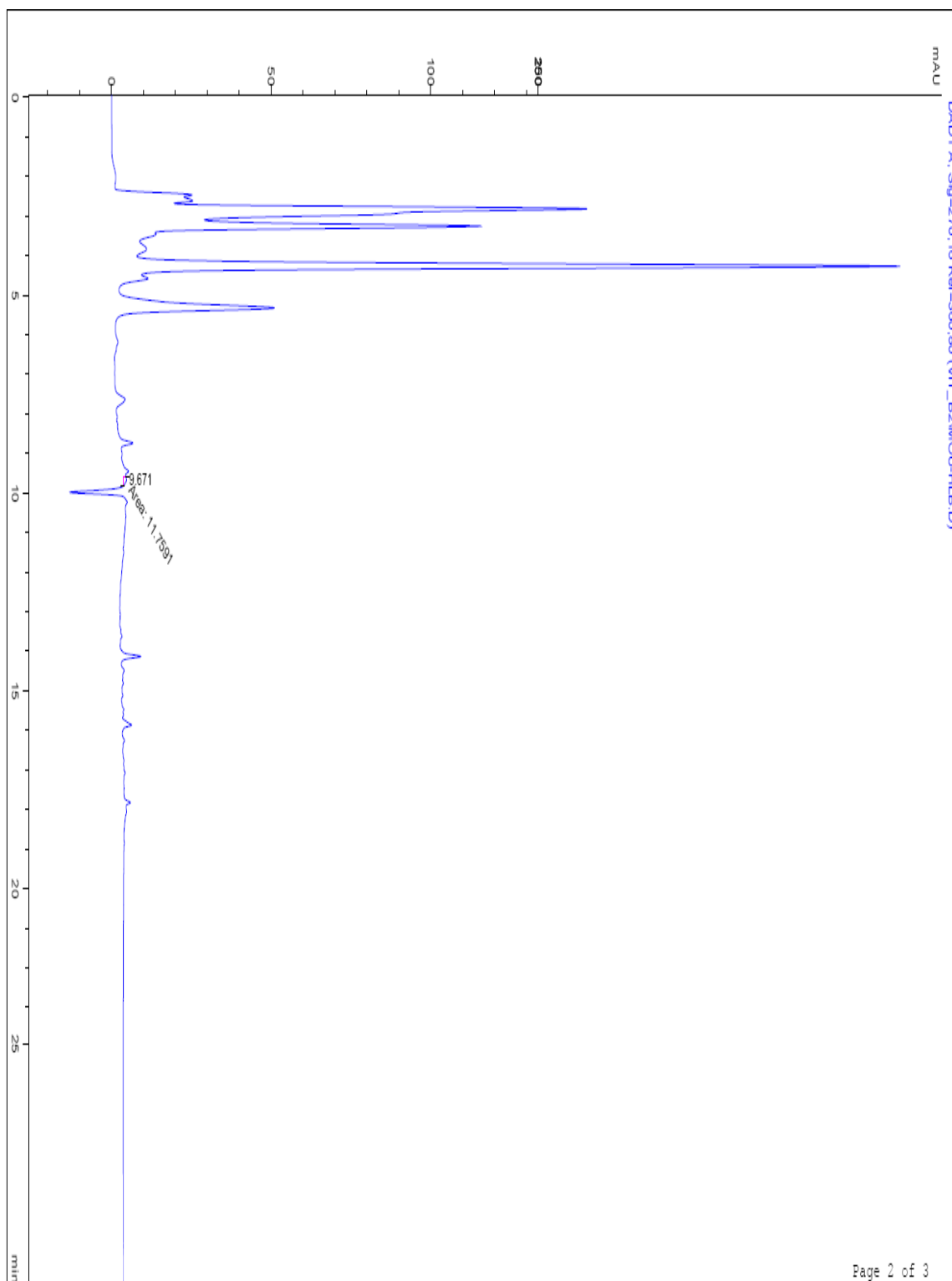
**PŘÍLOHA P XI: CHROMATOGRAM STANOVENÍ RIBOFLAVINU
VE VZORKU POLOHRUBÉ PŠENIČNÉ MOUKY OBOHACENÉ
VITAMINY**



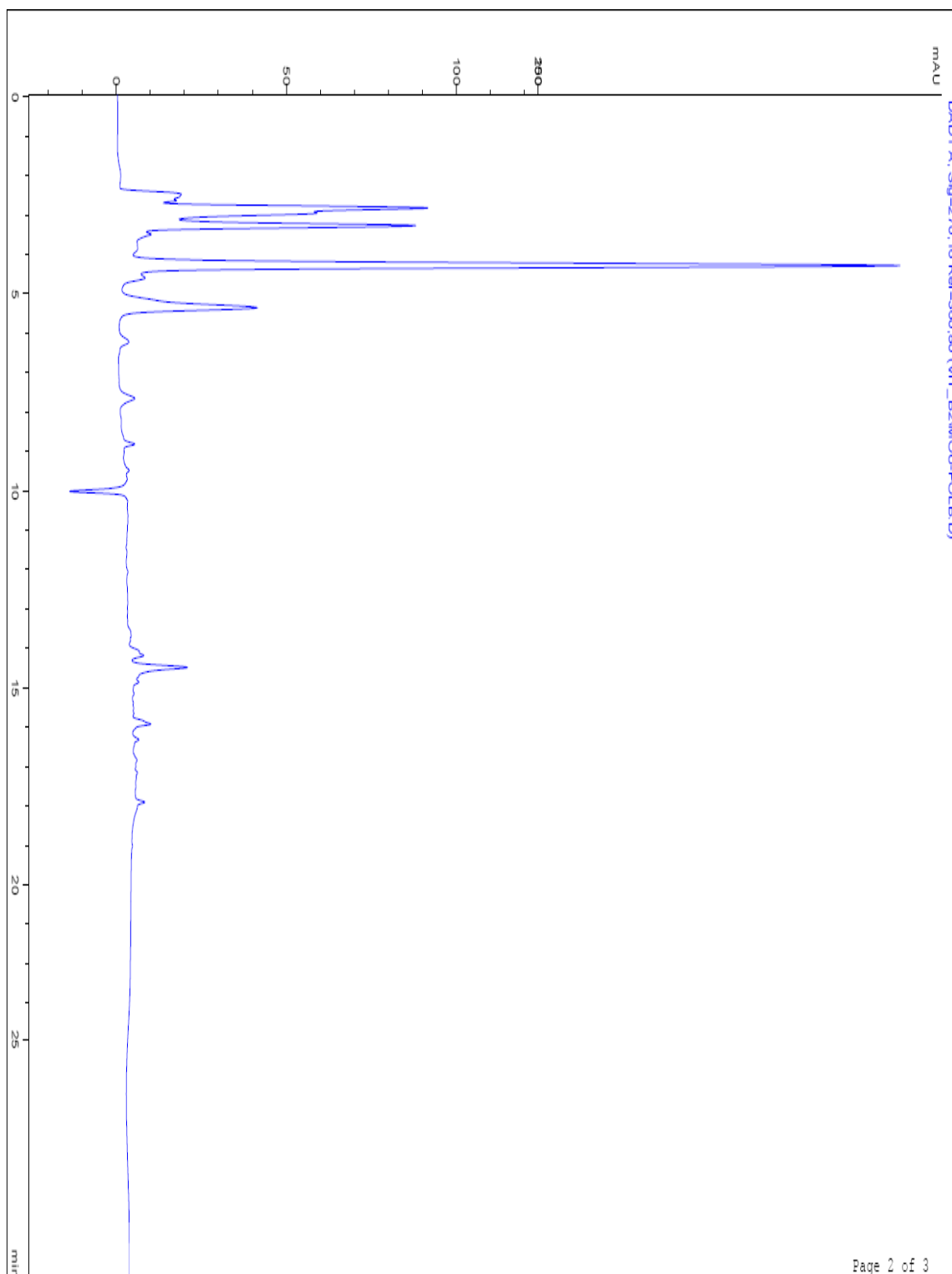
PŘÍLOHA P XII: CHROMATOGRAM STANOVENÍ RIBOFLAVINU VE VZORKU HRUBÉ PŠENIČNÉ MOUKY OBOHACENÉ VITAMINY



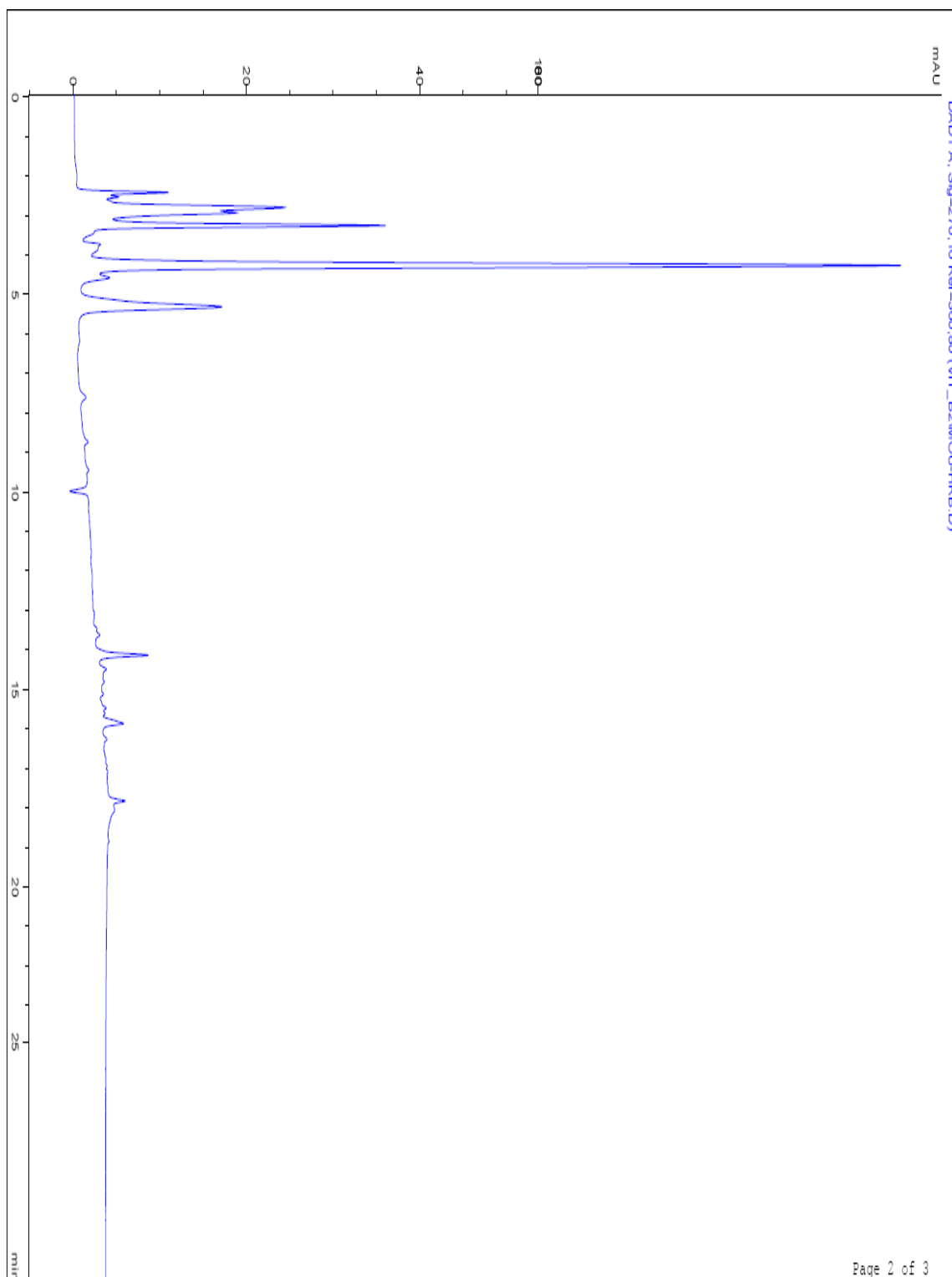
PŘÍLOHA P XIII: CHROMATOGRAM STANOVENÍ RIBOFLAVINU VE VZORKU HLADKÉ PŠENIČNÉ MOUKY



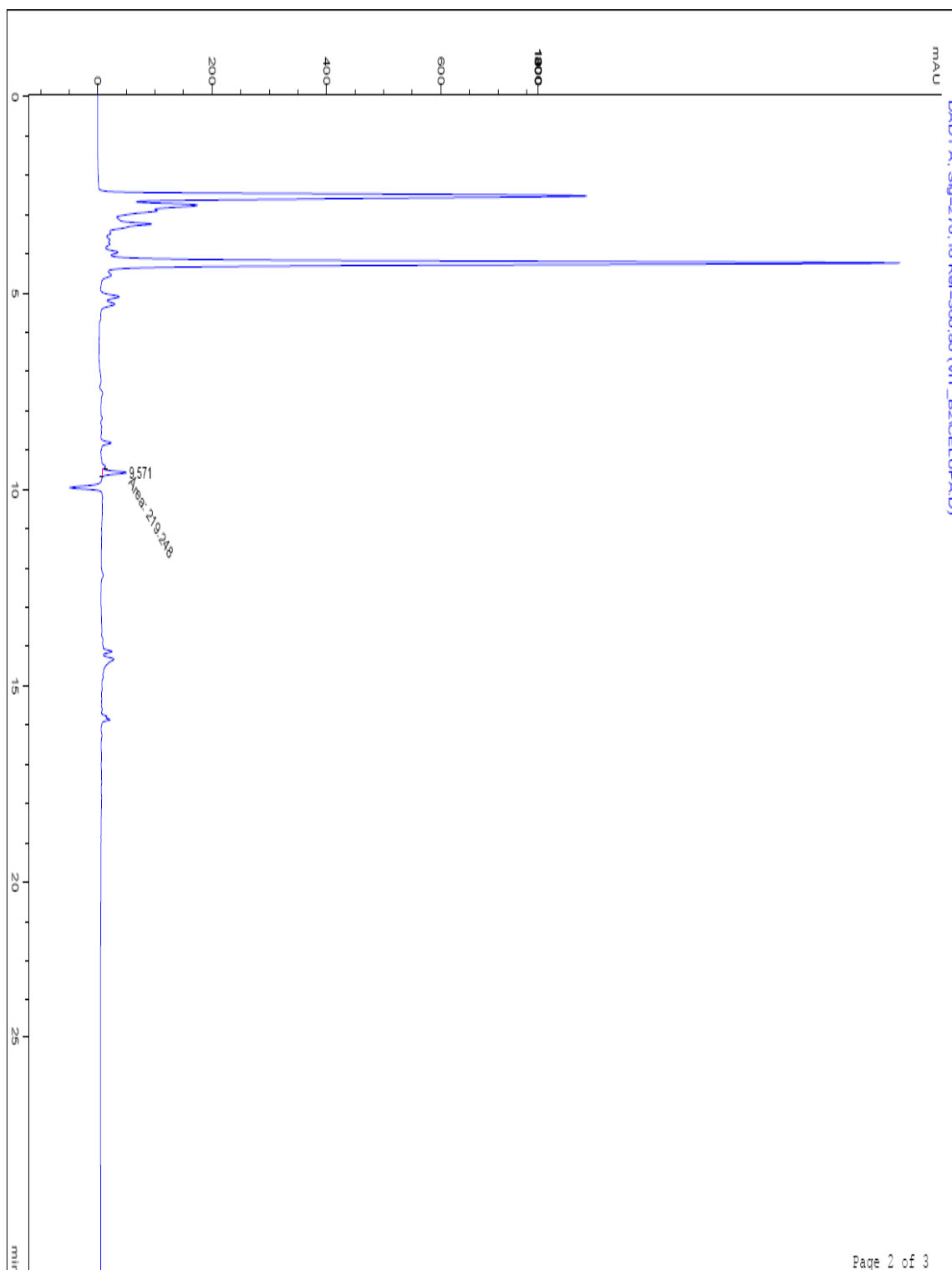
PŘÍLOHA P XIV: CHROMATOGRAM STANOVENÍ RIBOFLAVINU VE VZORKU POLOHRUBÉ PŠENIČNÉ MOUKY



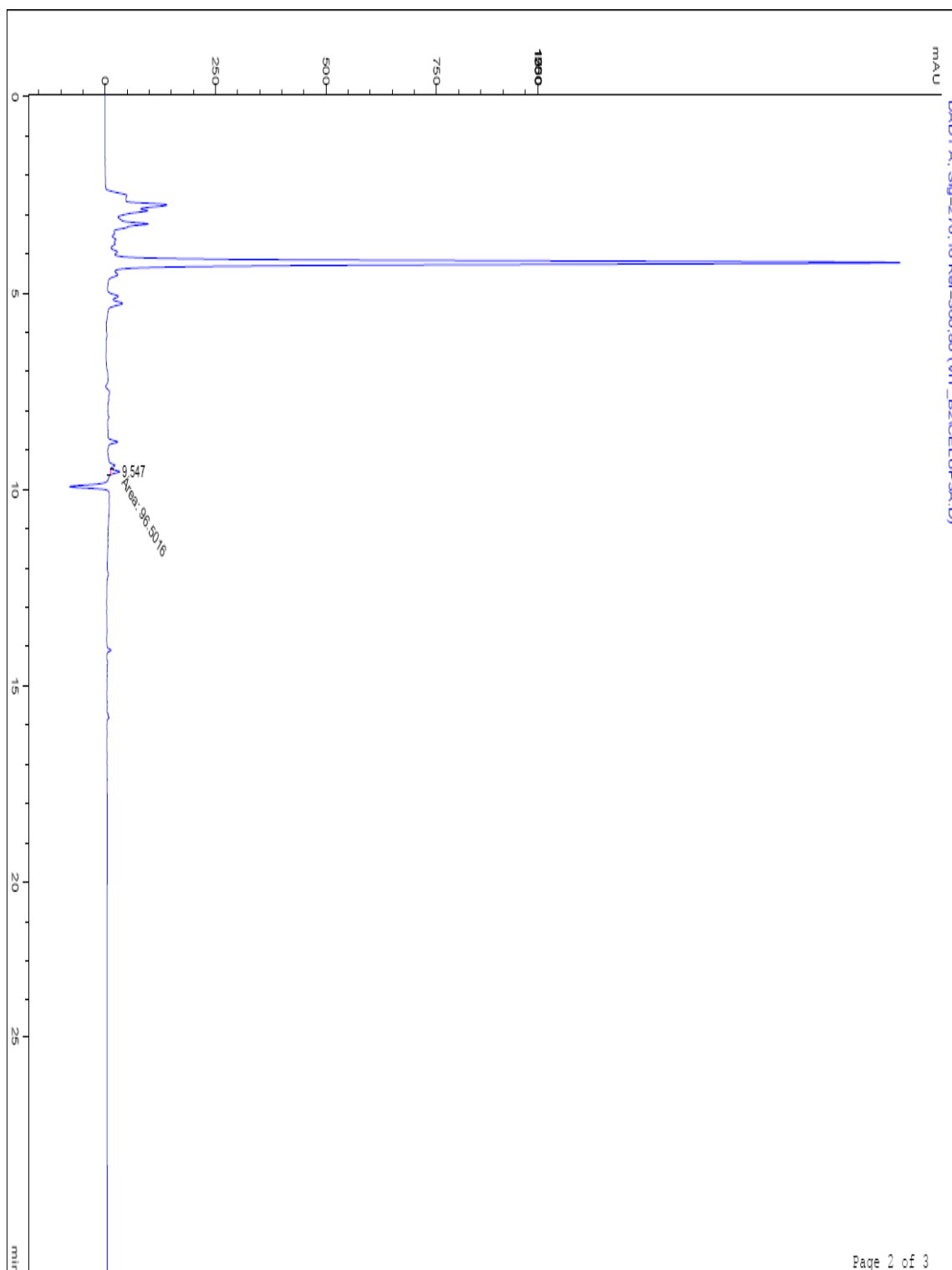
PŘÍLOHA P XV: CHROMATOGRAM STANOVENÍ RIBOFLAVINU VE VZORKU HRUBÉ PŠENIČNÉ MOUKY



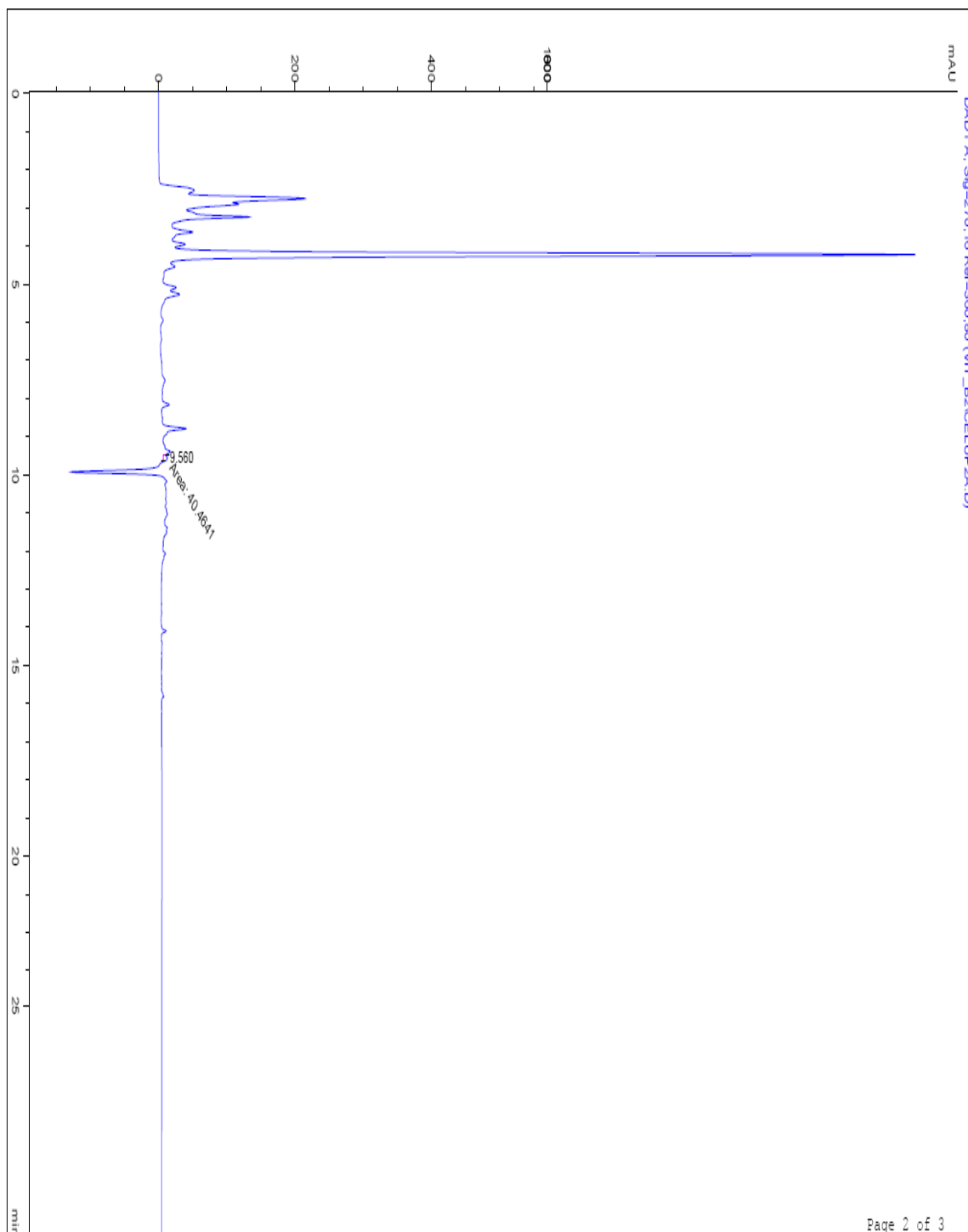
PŘÍLOHA P XVI: CHROMATOGRAM STANOVENÍ RIBOFLAVINU VE VZORKU CELOZRNNÝCH LUPÍNKŮ FITNESS



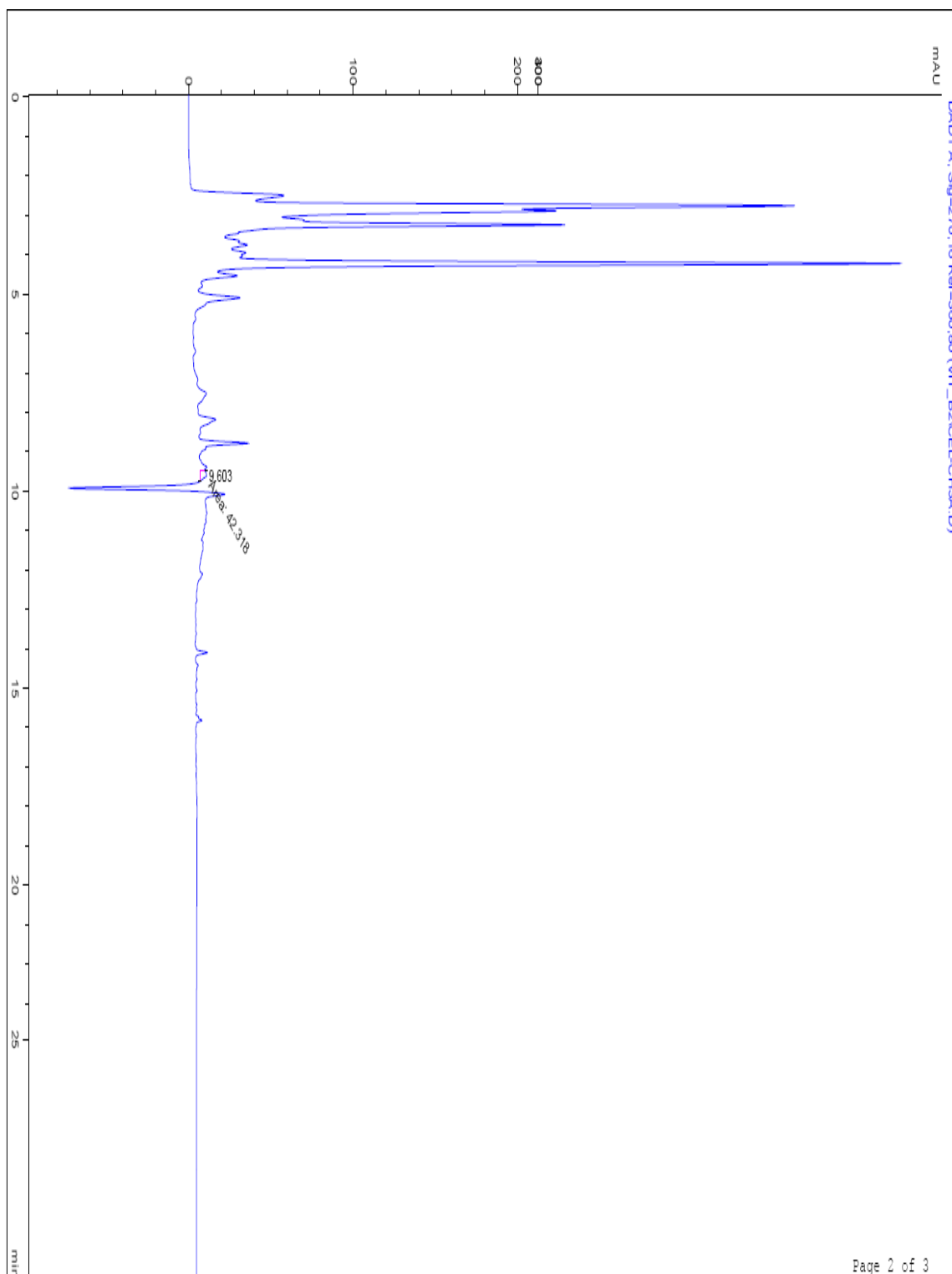
PŘÍLOHA P XVII: CHROMATOGRAM STANOVENÍ RIBOFLAVINU VE VZORKU CELOZRNNÝCH LUPÍNKŮ FRUTINA



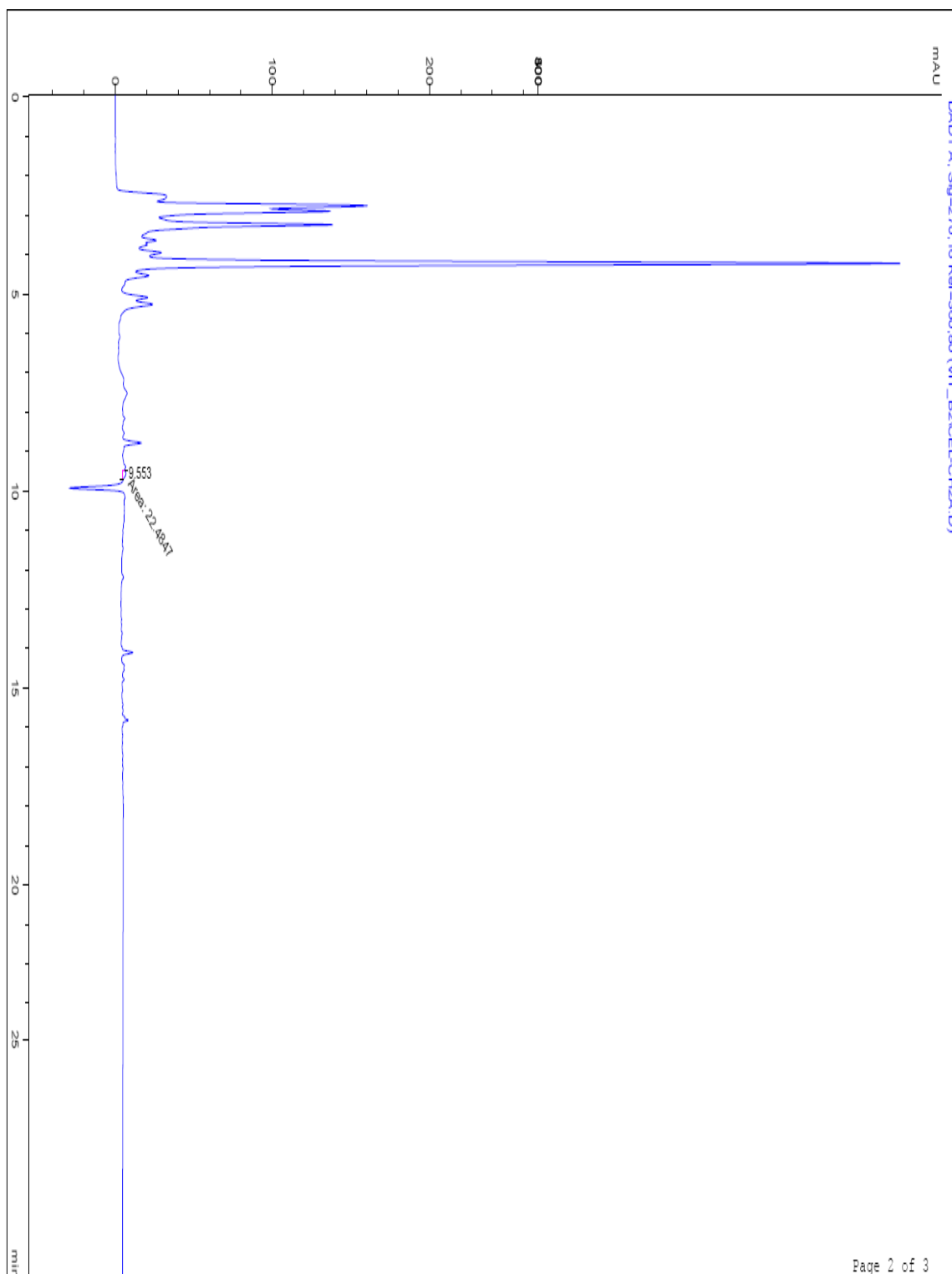
**PŘÍLOHA P XVIII: CHROMATOGRAM STANOVENÍ
RIBOFLAVINU VE VZORKU CELOZRNNÝCH LUPÍNKŮ DOBRÁ
VLÁKNINA**



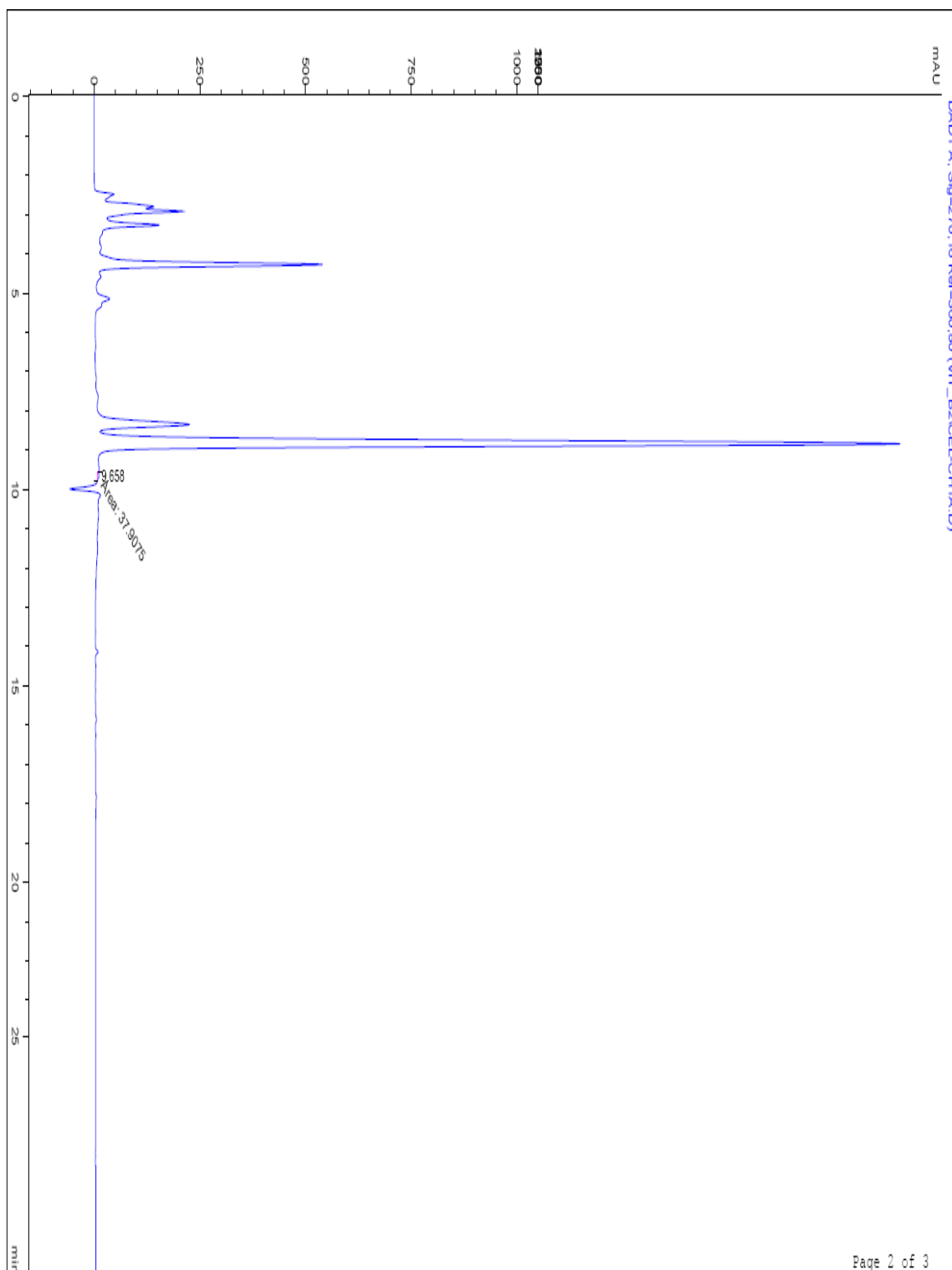
PŘÍLOHA P XIX: CHROMATOGRAM STANOVENÍ RIBOFLAVINU VE VZORKU ŽITNÉHO KŘUPAVÉHO CHLEBÍČKU



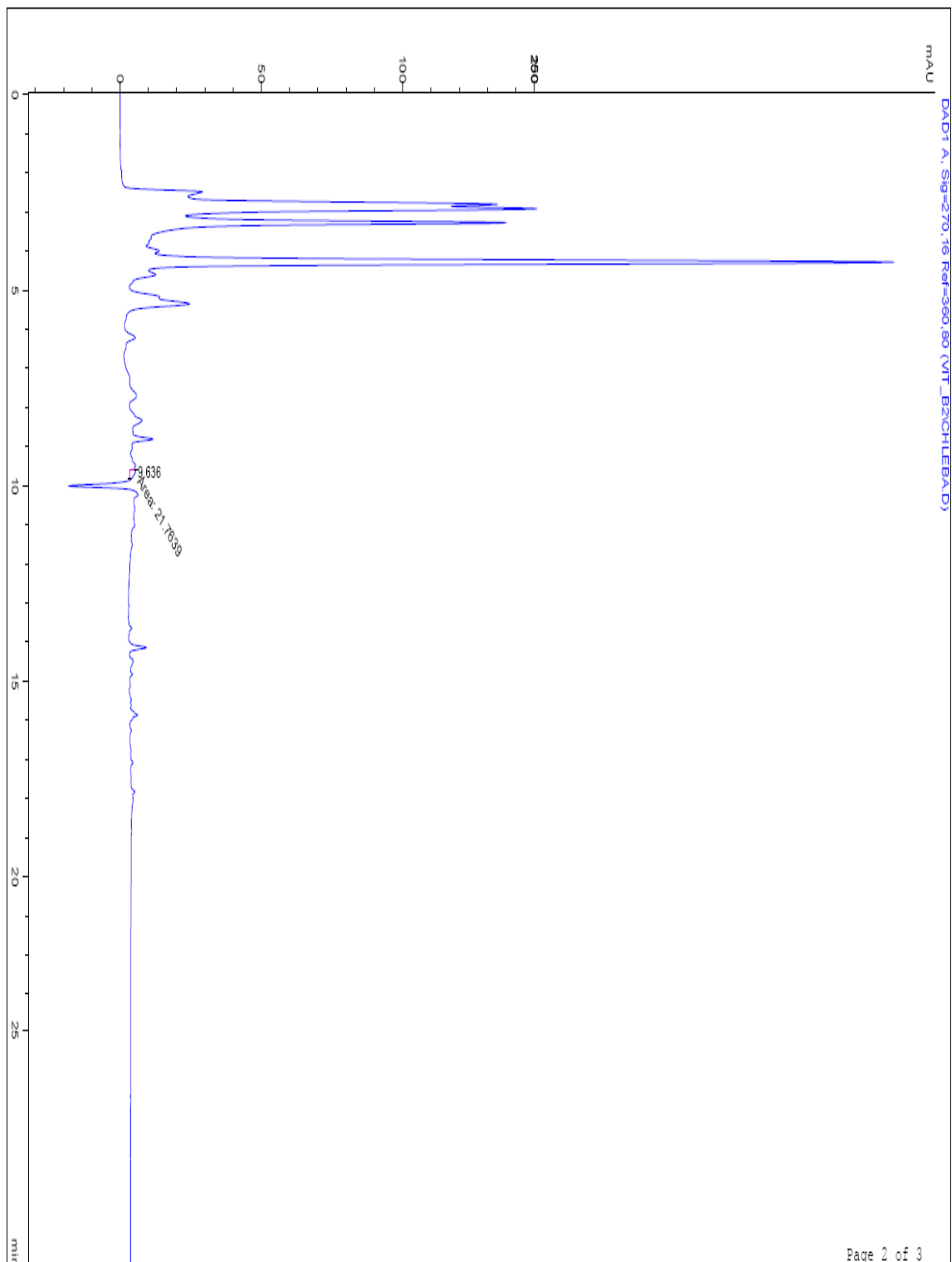
PŘÍLOHA P XX: CHROMATOGRAM STANOVENÍ RIBOFLAVINU VE VZORKU KŘEHKÉHO CELOZRNNÉHO CHLEBÍČKU



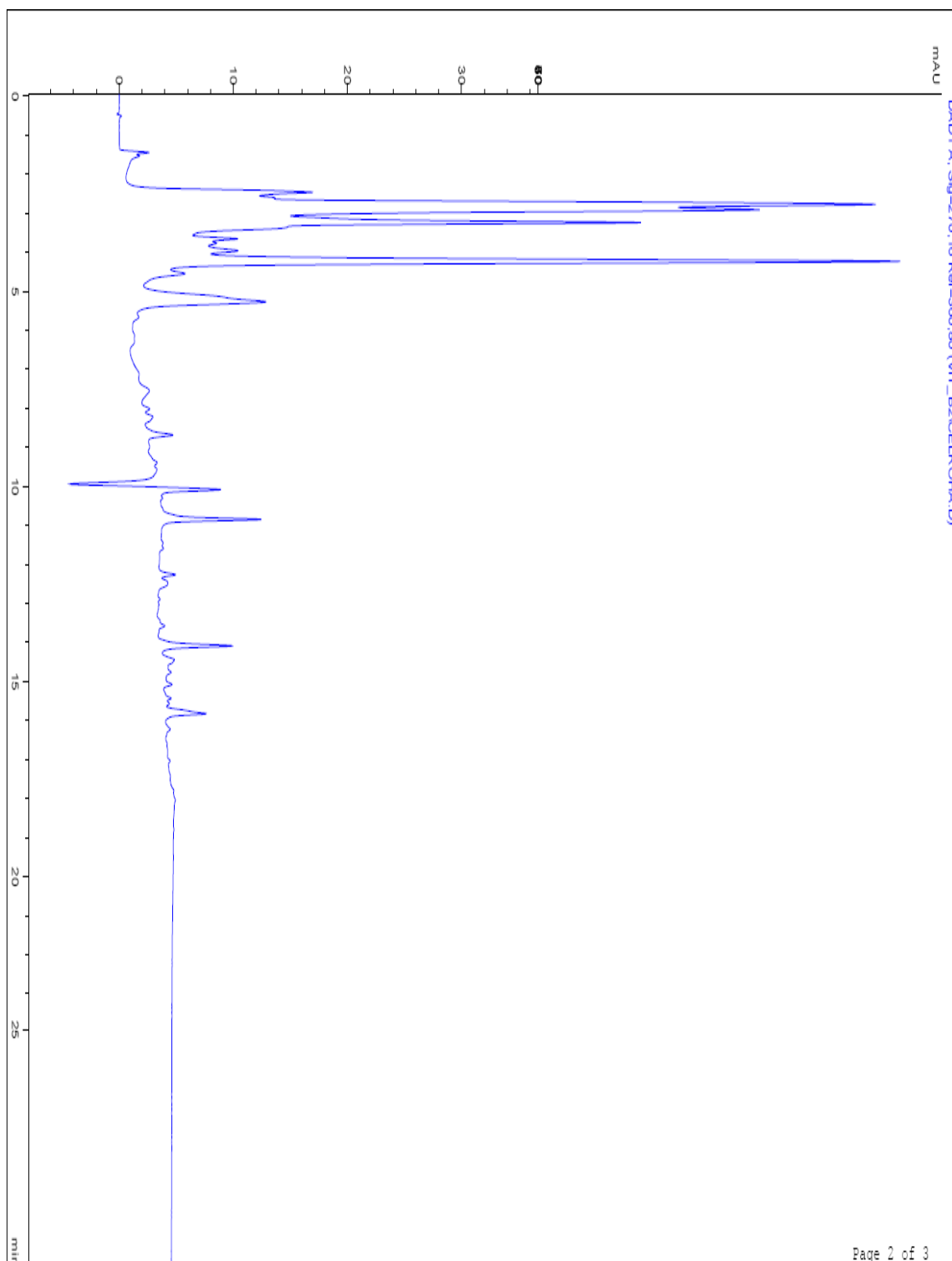
PŘÍLOHA P XXI: CHROMATOGRAM STANOVENÍ RIBOFLAVINU VE VZORKU CELOZRNNÉHO CHLEBA POCHOUTKOVÉHO



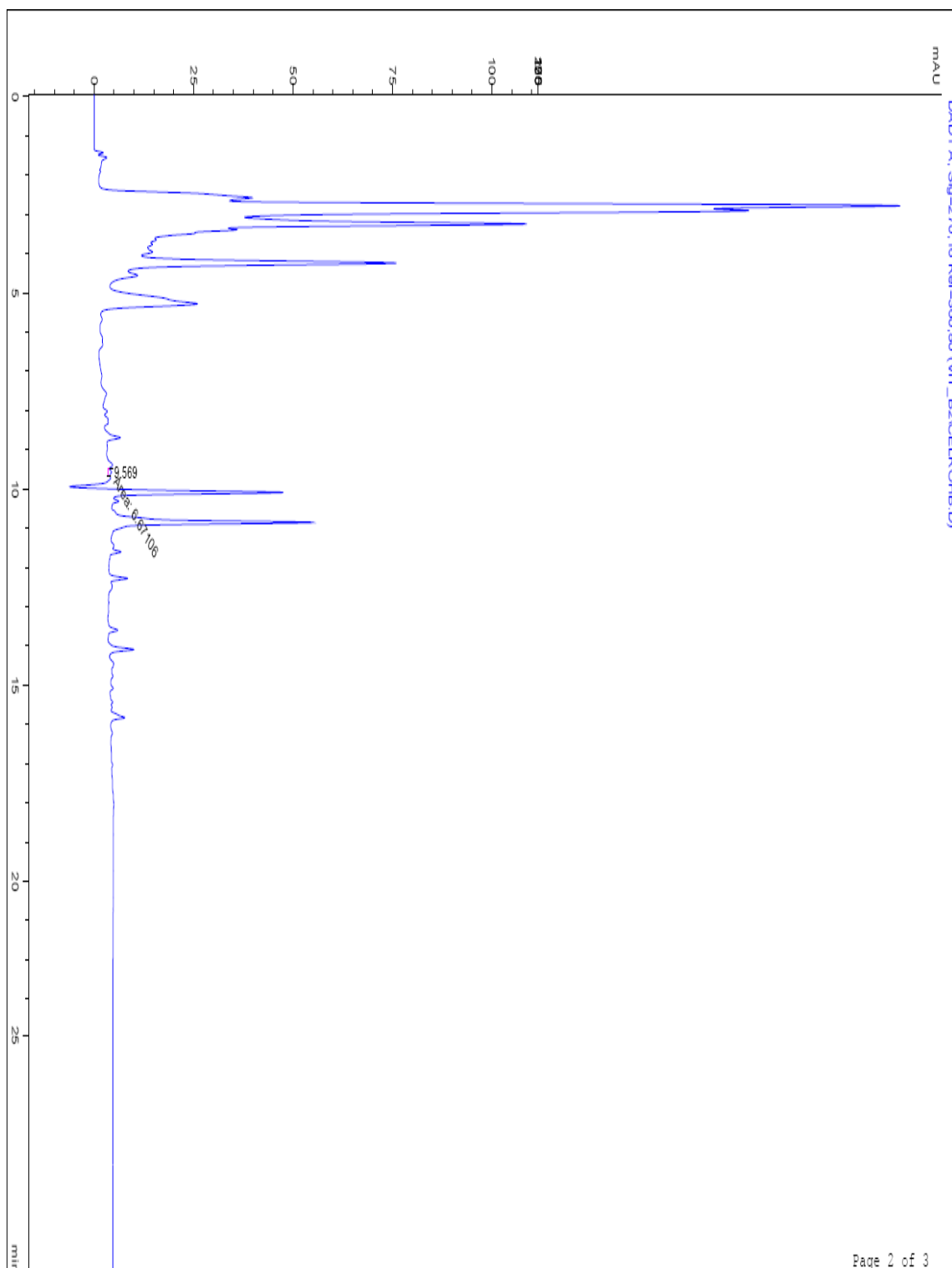
PŘÍLOHA P XXII: CHROMATGRAM STANOVENÍ RIBOFLAVINU VE VZORKU PŠENIČNÉHO CHLEBA



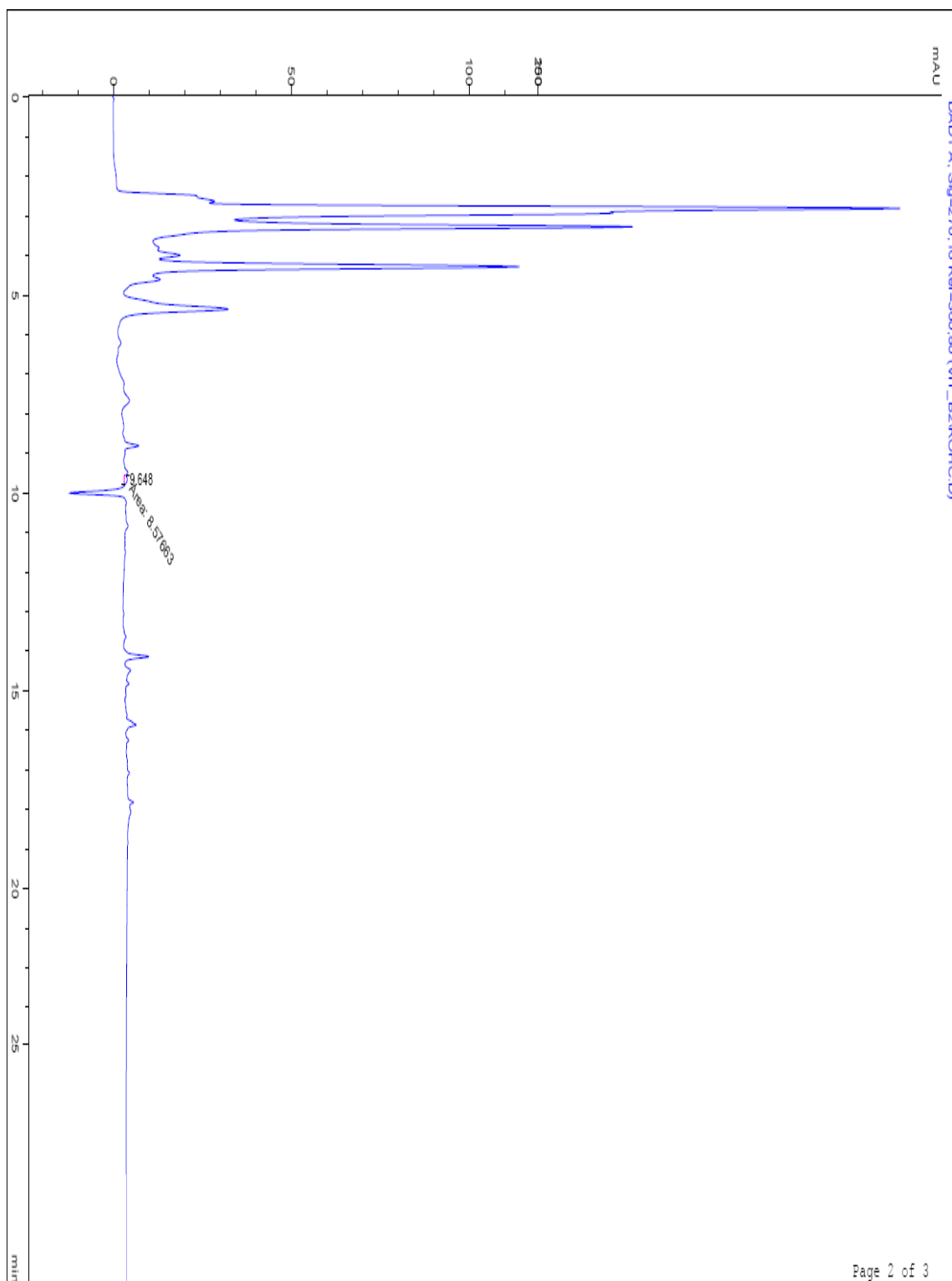
PŘÍLOHA P XXIII: CHROMATOGRAM STANOVENÍ RIBOFLAVINU VE VZORKU ZRNNÉ ŠPIČKY



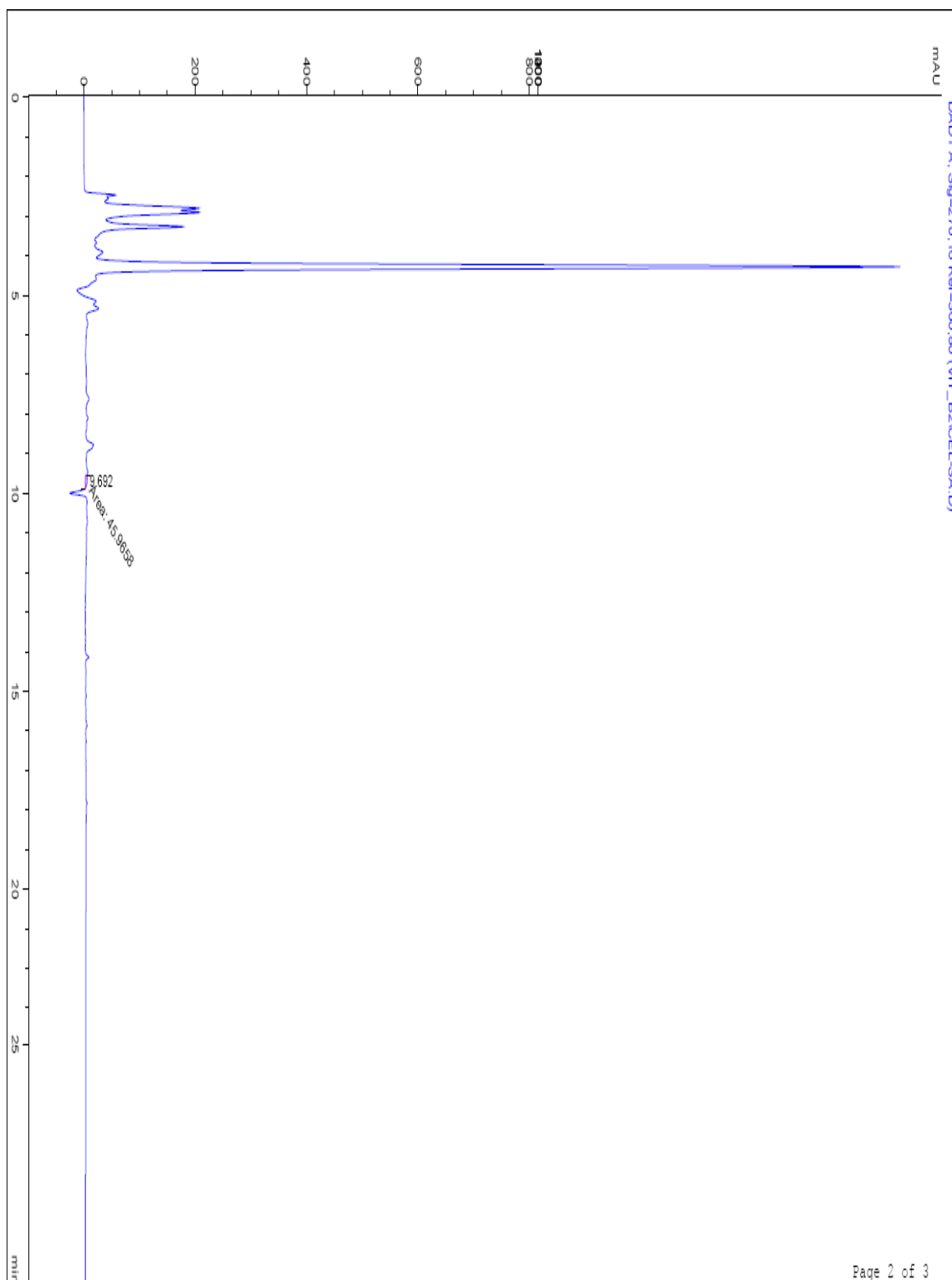
PŘÍLOHA P XXIV: CHROMATOGRAM STANOVENÍ RIBOFLAVINU VE VZORKU VÍCEZRNNÉ KOSTKY



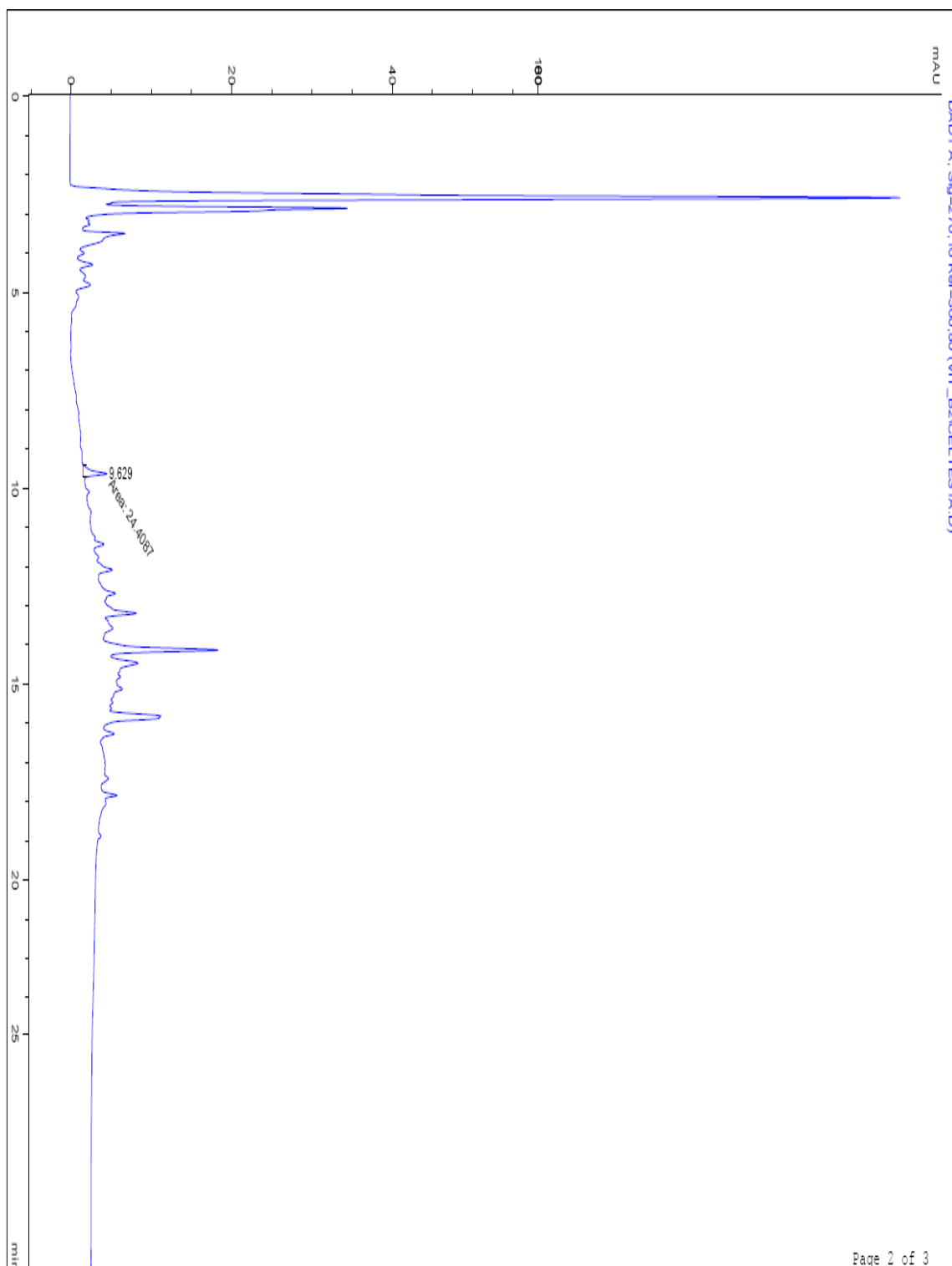
PŘÍLOHA P XXV: CHROMATOGRAM STANOVENÍ RIBOFLAVINU VE VZORKU TUKOVÉHO ROHLÍKU



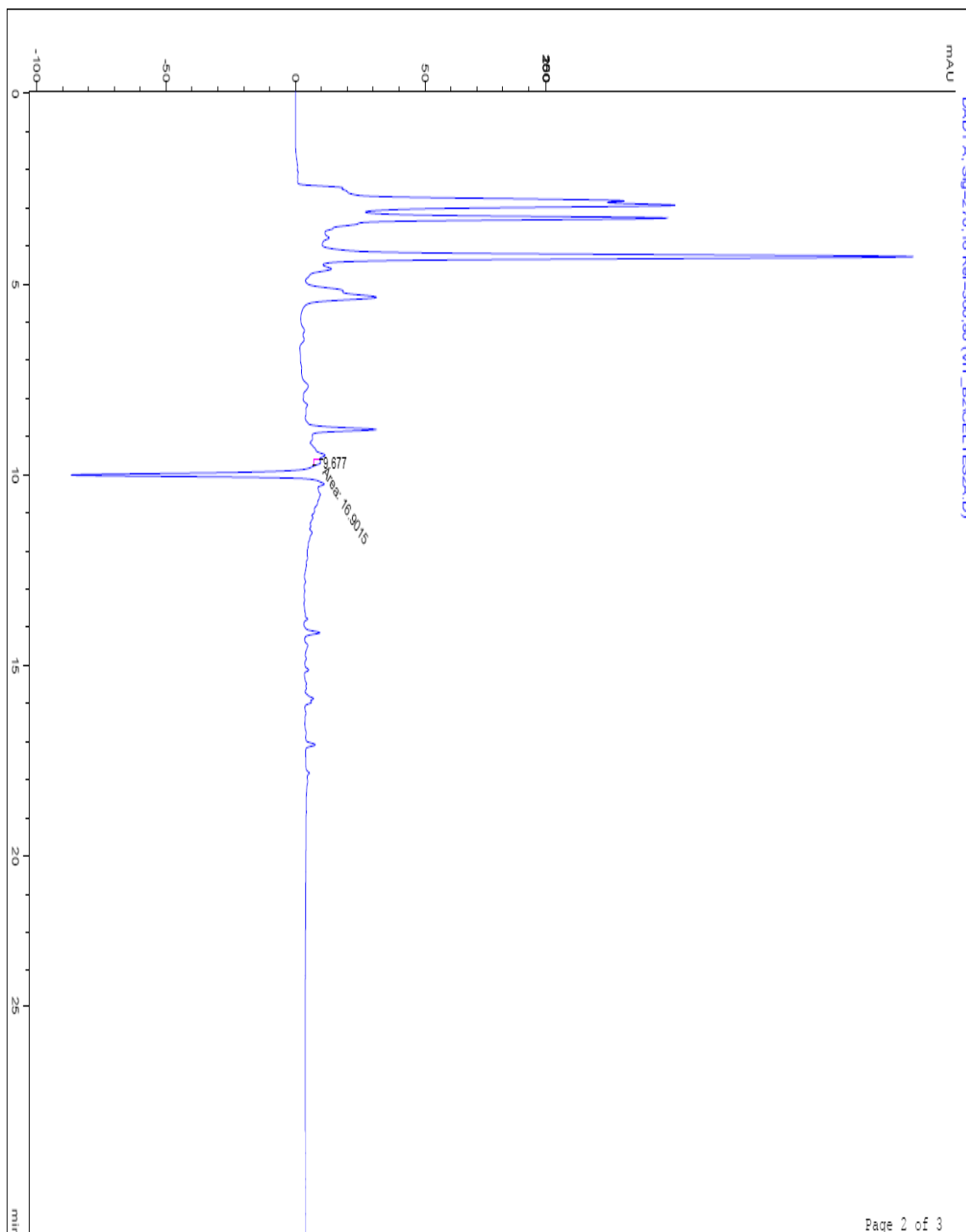
PŘÍLOHA P XXVI: CHROMATOGRAM STANOVENÍ RIBOFLAVINU VE VZORKU CELOZRNNÝCH SUŠENEK



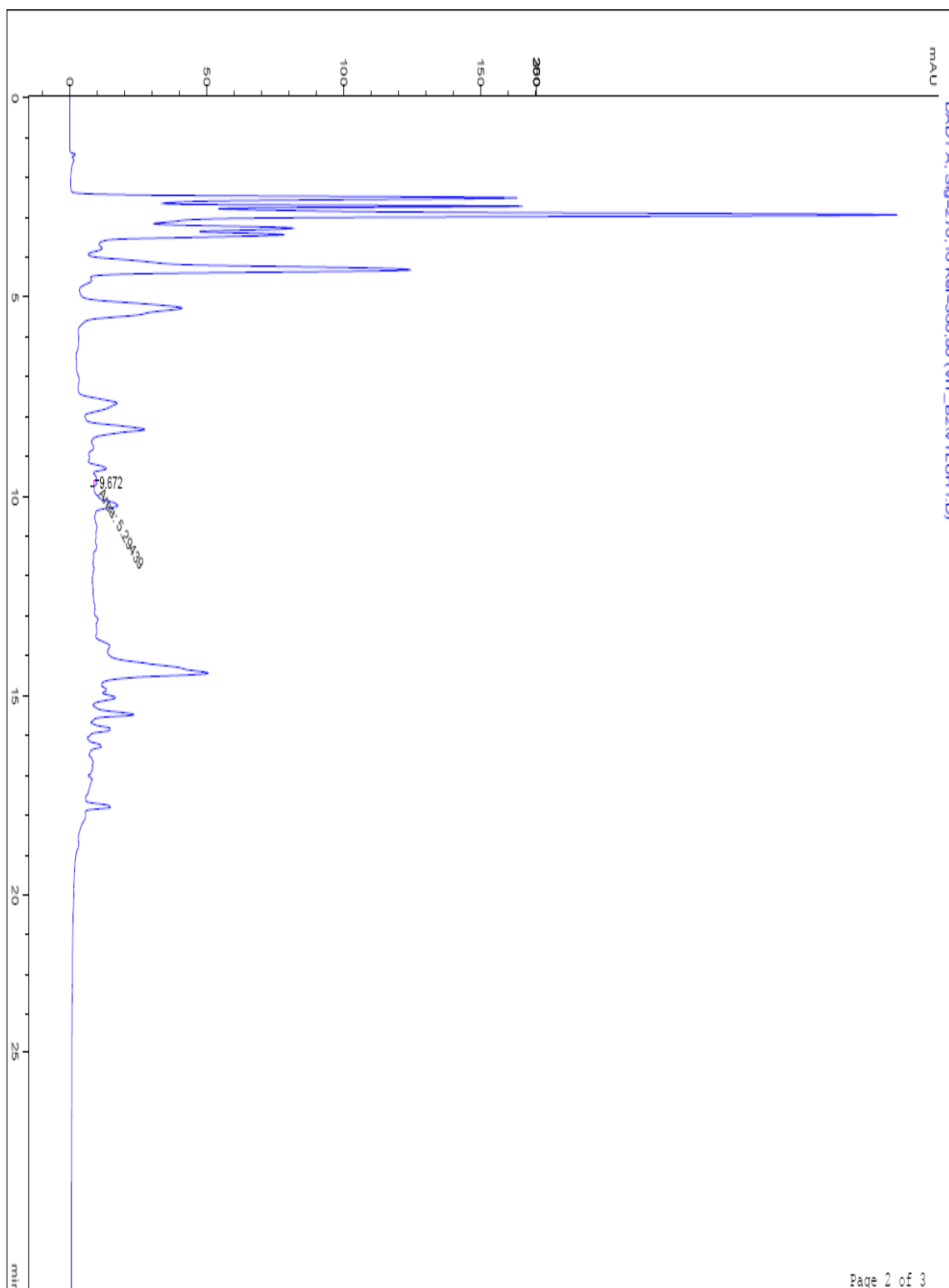
PŘÍLOHA P XXVII: CHROMATOGRAM STANOVENÍ RIBOFLAVINU VE VZORKU ŽITNÝCH CELOZRNNÝCH KOLÍNEK



PŘÍLOHA P XXVIII: CHROMATOGRAM STANOVENÍ RIBOFLAVINU VE VZORKU PŠENIČNÝCH CELOZRNNÝCH VŘETEN



PŘÍLOHA P XXIX: CHROMATOGRAM STANOVENÍ RIBOFLAVINU VE VZORKU VÝLUHU Z ŽITNÝCH CELOZRNNÝCH KOLÍNEK



PŘÍLOHA P XXX: CHROMATOGRAM STANOVENÍ RIBOFLAVINU VE VZORKU VÝLUHU Z PŠENIČNÝCH CELOZRNNÝCH VŘETEN

