

Stanovení vitamínu B₂ v produktech živočišného původu

Bc. Magda Hábová

Diplomová práce
2006



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav potravinářského inženýrství a chemie
akademický rok: 2005/2006

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Magda HÁBOVÁ**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie a ekonomika výroby tuků, detergentů
a kosmetiky**

Téma práce: **Stanovení vitamínu B2 v produktech živočišného
původu**

Zásady pro vypracování:

1. Teoretické pojednání o fyziologických účincích vitamínu B2
2. Princip kapalinové chromatografie
3. Optimalizace postupu vysrážení proteinů
4. Stanovení vitamínu B2 metodou HPLC/UV-VIS

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Dle doporučení vedoucího DP.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.

Ústav potravinářského inženýrství a chemie

Datum zadání diplomové práce:

10. října 2005

Termín odevzdání diplomové práce:

31. května 2006

Ve Zlíně dne 20. dubna 2006


prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
děkan




prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Cílem diplomové práce bylo stanovit obsah vitamínu B₂ v živočišných produktech. Vitamin B₂, nazývaný jako riboflavin, byl stanovován ve vepřovém a v hovězím masu, v kuřecích, krůtích, vepřových a hovězích játrech a tavených sýrech.

Ke stanovení riboflavínu byla použita chromatografická metoda HPLC s UV/VIS detekcí. Odborná literatura uvádí množství vitamínu B₂ v těchto zvolených živočišných produktech vyšší, než bylo zjištěno při analýze pomocí HPLC. Nižší naměřené hodnoty riboflavínu mohou souviset s podmínkami při skladování živočišných produktů, transportu do prodejen nebo přechováváním v prodejních prostorách, kde byly živočišné produkty intenzivně vystaveny světelnému záření. Záření v rozmezí 420 až 560 nm způsobuje rychlý úbytek riboflavínu.

Klíčová slova: vitamin B₂, riboflavin, HPLC, živočišné produkty, vepřové maso, hovězí maso, játra, tavené sýry

ABSTRACT

The topic of this Master thesis was to determine the amount of vitamin B₂ contained in animal products. Vitamin B₂, also known like riboflavin, was measured in a pork and beef meat, in chicken, turkey, pork and beef livers and in processed cheese.

To determine the amount of riboflavin, the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method with UV/VIS detector was used. The amount of riboflavin in these products showed that its amount was determined lower than was published in science paper till now. It could be probably caused by shelf-life of animal products during transportation or during storage in shops, where these products are exposed to the light. Sunny radiation in the range of 420 to 560 nm causes rapid loss of riboflavin.

Keywords: vitamin B₂, riboflavin, HPLC, animal products, pork, beef, liver, processed cheese

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

Souhlasím s tím, že s výsledky mé práce může být naloženo podle uvážení vedoucího diplomové práce, ředitele ústavu a institutu. V případě publikace budu uveden jako spoluautor.

Prohlašuji, že jsem na celé diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala.

Ve Zlíně, 20. 5. 2006

.....

podpis diplomanta

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 VITAMIN B₂	11
1.1 STRUKTURA RIBOFLAVINU	11
1.2 VLASTNOSTI.....	13
1.3 VÝSKYT RIBOFLAVINU V POTRAVINÁCH	15
1.4 ZMĚNY MNOŽSTVÍ RIBOFLAVINU PŘI ZPRACOVÁNÍ SUROVIN	16
1.5 FYZIOLOGICKÉ A METABOLICKÉ ASPEKTY.....	18
1.6 DOPORUČENÝ PŘÍJEM RIBOFLAVINU.....	19
2 MOŽNOSTI STANOVENÍ VITAMINU B₂	20
3 VYSOCE ÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE	21
3.1 TECHNIKA VNÁŠENÍ VZORKU DO SEPARAČNÍHO SYSTÉMU.....	22
3.1.1 Frontální chromatografie.....	22
3.1.2 Vytěšňovací chromatografie	22
3.1.3 Eluční chromatografie	23
3.2 PŘÍSLUŠENSTVÍ HPLC	23
3.2.1 Zásobník mobilních fází.....	23
3.2.2 Čerpadla	24
3.2.3 Dávkovací zařízení.....	24
3.2.4 Kolona	24
3.2.5 Detektory.....	25
4 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ	27
II PRAKTICKÁ ČÁST	29
5 METODIKA	30
5.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	30
5.2 MATERIÁL.....	30
5.2.1 Vzorky masa, jater a tavených sýrů	30
5.2.2 Použité roztoky a chemikálie	31
5.3 ANALÝZA JEDNOTLIVÝCH VZORKŮ	32
5.3.1 Vysrážení proteinů ze vzorku vepřového a hovězího masa	32
5.3.2 Vysrážení proteinů a polysacharidů ze vzorku jater	32
5.3.3 Vysrážení proteinů ze vzorku tavených sýrů	33
5.3.4 Stanovení riboflavinu metodou HPLC ve vepřovém a hovězím mase	33
5.3.5 Stanovení riboflavinu metodou HPLC v játrech.....	34
5.3.6 Stanovení riboflavinu metodou HPLC v tavených sýrech.....	34
5.3.7 Kalibrační křivka pro chromatografické stanovení vitamínu B ₂	34
6 VÝSLEDKY A DISKUSE	35

6.1	VÝSLEDKY VYSRÁŽENÍ PROTEINŮ ZE VZORKU VEPŘOVÉHO A HOVĚZÍHO MASA.....	35
6.2	VÝSLEDKY VYSRÁŽENÍ PROTEINŮ A POLYSACHARIDŮ ZE VZORKU JATER.....	36
6.3	VÝSLEDKY VYSRÁŽENÍ PROTEINŮ ZE VZORKU TAVENÝCH SÝRŮ.....	37
6.4	VÝSLEDKY MĚŘENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY PRO STANOVENÍ VITAMINU B ₂ METODOU HPLC	38
6.5	VÝSLEDKY STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU VE VEPŘOVÉ KÝTĚ.....	39
6.6	PŘESNOST STANOVENÍ VITAMINU B ₂ VE VEPŘOVÉ KÝTĚ METODOU HPLC.....	40
6.7	VÝSLEDKY STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU VE VEPŘOVÉ PLECI	41
6.8	PŘESNOST STANOVENÍ VITAMINU B ₂ VE VEPŘOVÉ PLECI METODOU HPLC	42
6.9	VÝSLEDKY STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU VE VEPŘOVÉM BOKU	43
6.10	PŘESNOST STANOVENÍ VITAMINU B ₂ VE VEPŘOVÉM BOKU METODOU HPLC	44
6.11	VÝSLEDKY STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU VE VEPŘOVÉ KRKOVICI.....	45
6.12	PŘESNOST STANOVENÍ VITAMINU B ₂ VE VEPŘOVÉ KRKOVICI METODOU HPLC.....	45
6.13	VÝSLEDKY STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU VE VEPŘOVÉ KOTLETĚ.....	46
6.14	PŘESNOST STANOVENÍ VITAMINU B ₂ VE VEPŘOVÉ KOTLETĚ METODOU HPLC	47
6.15	VÝSLEDKY STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V HOVĚZÍ KLÍŽCE	48
6.16	PŘESNOST STANOVENÍ VITAMINU B ₂ V HOVĚZÍ KLÍŽCE METODOU HPLC.....	49
6.17	VÝSLEDKY STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V HOVĚZÍM PŘEDNÍM.....	50
6.18	PŘESNOST STANOVENÍ VITAMINU B ₂ V HOVĚZÍM PŘEDNÍM METODOU HPLC.....	51
6.19	VÝSLEDKY STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V HOVĚZÍM ZADNÍM	52
6.20	PŘESNOST STANOVENÍ VITAMINU B ₂ V HOVĚZÍM ZADNÍM METODOU HPLC	52
6.21	VÝSLEDKY STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU VE VEPŘOVÝCH JÁTRECH	53
6.22	PŘESNOST STANOVENÍ VITAMINU B ₂ VE VEPŘOVÝCH JÁTRECH METODOU HPLC.....	54
6.23	VÝSLEDKY STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V HOVĚZÍCH JÁTRECH	55
6.24	PŘESNOST STANOVENÍ VITAMINU B ₂ V HOVĚZÍCH JÁTRECH METODOU HPLC.....	56
6.25	VÝSLEDKY STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V KUŘECÍCH JÁTRECH	57
6.26	PŘESNOST STANOVENÍ VITAMINU B ₂ V KUŘECÍCH JÁTRECH METODOU HPLC.....	58
6.27	VÝSLEDKY STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V KRŮTÍCH JÁTRECH	59
6.28	PŘESNOST STANOVENÍ VITAMINU B ₂ V KRŮTÍCH JÁTRECH METODOU HPLC.....	60
6.29	VÝSLEDKY STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU VE NESTERILOVANÉM TAVENÉM SÝRU	61
6.30	PŘESNOST STANOVENÍ VITAMINU B ₂ V NESTERILOVANÉM TAVENÉM SÝRU METODOU HPLC	61
6.31	VÝSLEDKY STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU VE STERILOVANÉM TAVENÉM SÝRU VZOREK S.....	63
6.32	PŘESNOST STANOVENÍ VITAMINU B ₂ V STERILOVANÉM TAVENÉM SÝRU METODOU HPLC	63
6.33	VÝSLEDKY STANOVENÍ VITAMINU B ₂ U HOVĚZÍHO ZADNÍHO S PŘÍDAVKEM STANDARDU	65

6.34	PŘESNOST STANOVENÍ RIBOFLAVINU U HOVĚZÍHO ZADNÍHO S PŘÍDAVKEM ZNÁMÉHO MNOŽSTVÍ RIBOFLAVINU	65
ZÁVĚR		67
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		69
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		72
SEZNAM OBRÁZKŮ		73
SEZNAM TABULEK		74
SEZNAM PŘÍLOH		76

ÚVOD

Vitaminy jsou organické nízkomolekulární látky syntetizované autotrofními organismy. Heterotrofní organismy je syntetizují jen v omezené míře (např. člověk syntetizuje niacin z tryptofanu) a získávají je jako exogenní látky především potravou, některé z nich prostřednictvím střevní mikroflóry. Vitaminy jsou v určitém množství nezbytné pro látkovou přeměnu a regulaci metabolismu člověka. Nejsou zdrojem energie ani stavebním materiálem, ale vesměs mají funkci katalyzátorů biochemických reakcí, a proto bývají často označovány jako exogenní esenciální biokatalyzátory.

Mezi vitaminy skupiny B patří i vitamin B₂, taktéž nazývaný riboflavin. Tento vitamin je řazen do skupiny flavinů. V biochemických systémech se vyskytuje volný nebo vázaný ve formě koenzymů oxidoredukčních enzymů. Vyskytuje se jako součást dvou kofaktorů, flavinmononukleotidu (FMN) a flavinadeninukleotidu (FAD). Význam uvedených kofaktorů spočívá v roli kofaktorů *flavinových oxidoreduktás*. Vitamin B₂ je důležitý pro dobrý stav kůže, očí a dalších orgánů. Je obsažen v droždí, v masných a mléčných výrobcích.

Metody pro stanovení obsahu vitamínu B₂ v potravinách jsou fluorometrické, fotometrické, polarografické a spektrální. Kromě fyzikálně chemických metod se používají metody mikrobiologické. Mezi nejnovější metody stanovení riboflavínu patří separační chromatografická metoda vysoceúčinné kapalinové chromatografie - HPLC.

Diplomová práce se zabývá stanovením vitamínu B₂ v produktech živočišného původu. Pro stanovení obsahu tohoto vitamínu je použita analytická metoda HPLC. Jako zástupci živočišných produktů byly zvoleny vzorky vepřového a hovězího masa, jater a tavených sýrů.

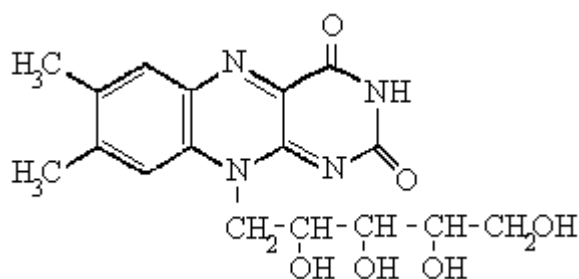
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VITAMIN B₂

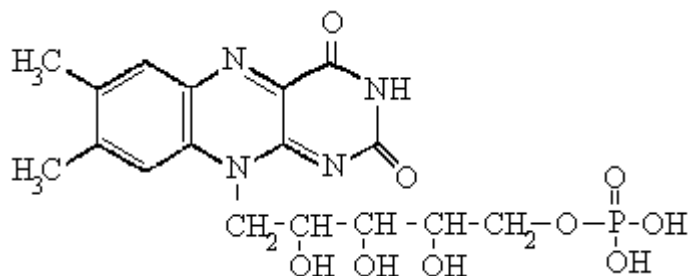
1.1 Struktura riboflavinu

Riboflavin je chemicky 6,7-dimetyl-9-(D-1'-ribyl)izalloxazin, a řadíme jej do skupiny flavinů. Pro riboflavin se také používá název vitamin B₂. [1]

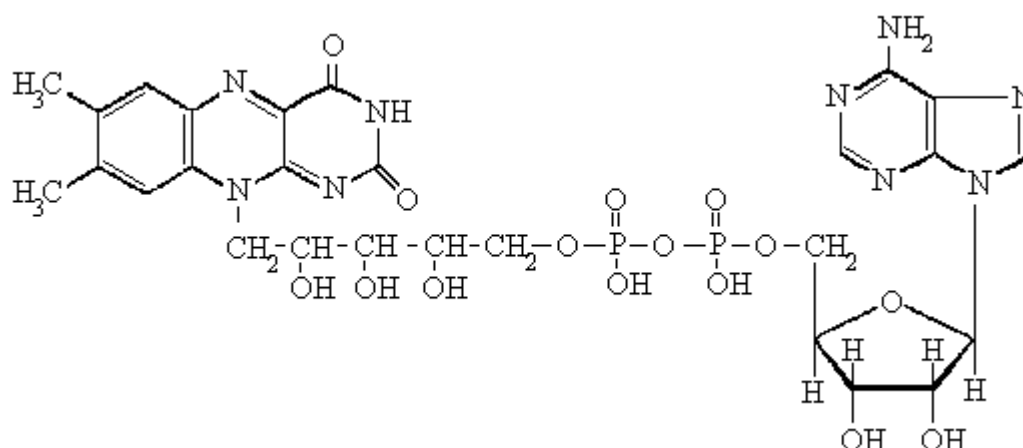
V biochemických systémech se vyskytuje volný nebo vázaný ve formě koenzymů oxidoredukčních enzymů, jako tzv. flavinové neboli žluté enzymy. Vitamin B₂ se vyskytuje jako součást dvou kofaktorů, flavinmononukleotidu (FMN) a flavinadeninukleotidu (FAD). [2]



Obr. 1. Struktura vitamínu B₂

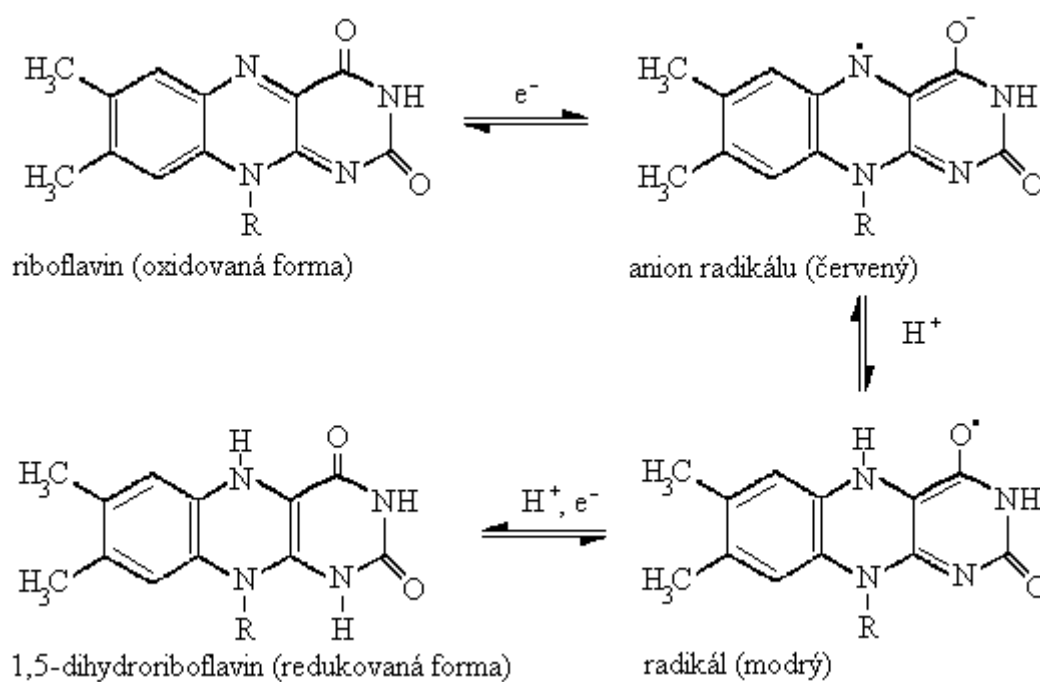


Obr. 2. Flavinmononukleotid, FMN



Obr. 3. Flavinadeninindinukleotid, FAD

Jednoelektronovou redukcí riboflavinu vznikají dvě formy radikálu riboflavinu, červený anion a modrá neutrální molekula (tzv. flavosemichinon). Redukovanou, téměř bezbarvou formou při enzymových oxidoredukčních reakcích je 1,5-dihydroriboflavin, neboli leukoflavin, který spontánně oxiduje vzdušným kyslíkem na riboflavin. Další redukovanou formou (vznikající dvou elektronovou redukcí při některých enzymových reakcích) je 4 α ,5-dihydroriboflavin. [3]



Obr. 4. Oxidované a redukované formy riboflavinu

1.2 Vlastnosti

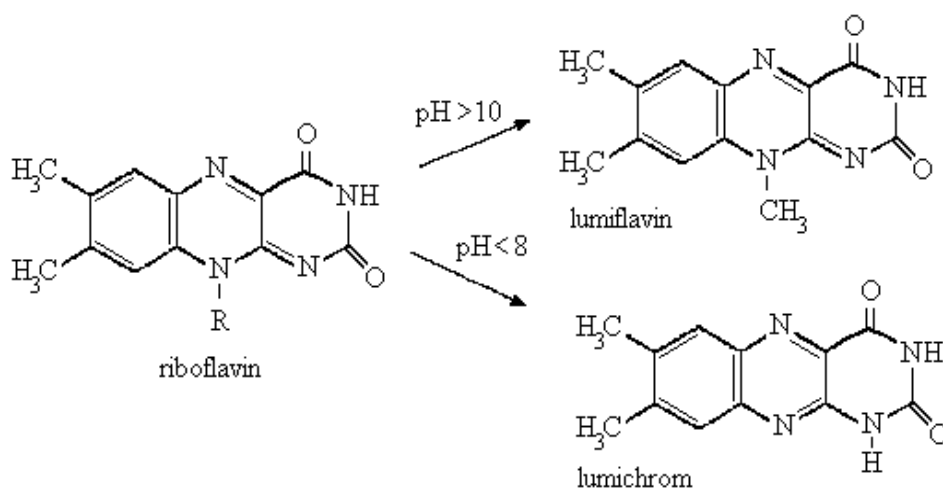
Riboflavin je žlutá krystalická látka o bodu tání 275 až 292 °C. Ve vodě se rozpouští pozvolna. Udává se, že jeho rozpustnost je 120 mg ve 100 ml vody při 27,5°C. Lehce se rozpouští ve vodných roztocích alkalických hydroxidů, proto je pro přípravu jeho roztoků používána sodná sůl riboflavin-5'-fosfátu, která je ve vodě více rozpustná. [1]

Nejdůležitějším faktorem, který ovlivňuje stabilitu riboflavinu je světlo. Při ozáření viditelným i UV světlem je nestálý a dochází k odštěpení ribitolového zbytku. Nejvíce jej ovlivňuje světlo v rozsahu 420 až 560 nm. Zářivkové světlo je méně škodlivé než přímé sluneční světlo, ale potravinové výrobky v průhledných obalech mohou být ovlivněny osvětlením v prodejních regálech, a tím dochází ke ztrátám vitamínu B₂. [4], [5]

V nepřítomnosti světla je riboflavin velmi stabilním vitamínem. V neutrálních a slabě kyselých roztocích je prakticky stálý, je odolný vůči záhřevu i atmosférickému kyslíku. V alkalickém prostředí je labilní a rozkládá se na fyziologicky neúčinné rozkladné produkty. [4], [6]

Flavinové koenzymy jsou velmi náchylné k chemické nebo enzymové hydrolyze. FAD se v kyselém prostředí hydrolyzuje na FMN. V kyselých roztocích mění polohu fosfátová skupina FMN a následnou hydrolyzou fosfátů vzniká riboflavin. [4]

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 ¹O₂ a ten oxiduje další organické sloučeniny. Současně dochází k fotolytickému štěpení (fotodegradaci) flavinů. Hlavním produktem fotodegradace riboflavinu po štěpení ribitolu v kyselém a neutrálním prostředí je lumichrom, v alkalickém prostředí vzniká lumiflavin (Obr. 5). Oba flaviny vznikající fotodegradací riboflavinu jsou účinnější oxidační činidla než samotný riboflavin. [7]



Obr. 5. Fotolýza riboflavinu

Běžný atmosférický kyslík O₂ existuje v tripletovém stavu, tj. má dvanáct valenčních elektronů, přičemž dva elektrony s nejvyšší energií a se souhlasným spinem se nacházejí v různých orbitalech. Excitací běžného tripletového kyslíku ³O₂ vzniká reaktivní singletový kyslík ¹O₂, který má elektrony párové v jednom orbitalu a s opačným spinem. Reaguje např. s nenasycenými sloučeninami, aby se doplnil jeho volný molekulový orbital elektrony. [3]

U reakce typu I se jedná o přímou interakci fotosenzibilizátoru (S) s další molekulou (R-H), při které dojde k přenosu atomu vodíku nebo elektronu a vznikají volné radikály (R• a •S-H). Tripletové senzibilizátory jsou tedy fotochemicky aktivovanými iniciátory volných radikálů. Reakce typu II popisuje nejrozšířenější způsob přenosu energie z excitovaného tripletového fotosenzibilizátoru na tripletový kyslík za vzniku singletového. Méně než 1 % tripletového kyslíku současně přechází na superoxidový anion O²⁻ a oxidovanou formu senzibilizátoru (S+). [3]

Riboflavin působí jako fotosenzibilizátor například u mléka, pokud je vystaveno expozici přímému slunečnímu světlu v nevhodných obalech. Podobně je tomu u vína a piva. Singletový kyslík a produkty degradace riboflavinu způsobují rozsáhlou destrukci vitamínu C a oxidaci dalších významných látek, jako je retinol, esenciální mastné kyseliny

a esenciální aminokyseliny, například z methioninu vznikají rozkladem těkavé sirné sloučeniny. Výsledkem je nepříjemné aroma, tzv. sluneční přípach. [4]

1.3 Výskyt riboflavinu v potravinách

Riboflavin je velmi rozšířený v potravinách, kde je výhradně vázaný na proteiny, hlavně ve formě FMN a FAD. [8]

K nejbohatším zdrojům riboflavinu patří játra, vejce, sýr, maso a mléko. [1] 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 jako je 10-(2-hydroxyethyl)flavin, 7 α -hydroxyriboflavin a jeho 8 α -isomer. [3]

Ze zeleniny jsou nejbohatším zdrojem vitamínu B₂ zelená rajčata, špenát, hrášek, kapusta, pažitka, červená řepa, rajčata a paprika. Z ovoce jsou to hlavně šípky, hrušky, maliny, třešně a černý rybíz. [9]

Kromě riboflavinu, FMN a FAD se ve vyšších rostlinách a mikroorganismech vyskytuje velký počet derivátů riboflavinu (např. esterů a glykosidů) vykazujících biologickou aktivitu obdobnou riboflavinu. V ovsu byl například nalezen ester s malonovou kyselinou 5'-malonylriboflavin. Deriváty riboflavinu s C_{5'} hydroxyskupinou ribitolu oxidovanou na karbonylovou skupinu (riboflavinal) či karboxylovou skupinu (tzv. riboflavinová kyselina) se vyskytují v některých jedlých houbách čeledi *Basidiomycetes*. Vyšší obsah vitamínu B₂ obsahují celozrnné výrobky. [3]

Na rozdíl od thiaminu, který při fermentaci zůstává v kvasničných buňkách, je riboflavin přítomen v pivu v množství zhruba 0,5 mg.l⁻¹. Bohatým zdrojem jsou i kvasnice. [3]

Tabulka 1. Obsah riboflavinu ve vybraných potravinách [6]

Potravina	mg.kg ⁻¹ jedlého podílu
maso vepřové	0,9-3,5
maso hovězí	0,4-3,5
maso kuřecí	0,7-2,8
játra vepřová	29-44
ryby	1,0-3,3
mléko	0,2-3,0
sýry	3,3-5,7
vejce	2,8-3,5
chléb	0,6-1,5
špenát	0,6-3,4
luštěniny	1,2-2,8
rajčata	0,3-0,4
mrkev	0,5-2,6
brambory	0,3-2,0
ořechy	0,2-1,3
droždí	17-44

1.4 Změny množství riboflavinu při zpracování surovin

Významné ztráty obsahu vitaminů mohou vznikat již při manipulacích a nešetrném zacházení, které předchází vlastnímu zpracování potravinářské suroviny. Dochází k tomu např. při sklizni, skladování a dopravě. V těchto případech jsou ztráty nutrientů v potravine především funkcí teploty a délky skladování, ale mohou být ovlivněny i nedostatečnou ochranou proti slunečnímu záření. Snižování teploty při dopravě a skladování a zkracování časového úseku nezbytného pro obě uvedené manipulace jsou významnými faktory pro zachování nutriční kvality suroviny před dalším zpracováním. [2]

Někdy se potraviny máčejí, aby třeba změkla slupka (luštěniny), aby se nabobtnáním urychlilo vaření, zlepšila chuť a aby došlo k rehydrataci (sušené zeleniny, ovoce, hub). Dlouhým máčením však mohou vznikat ztráty vitaminů vyluhováním. Vliv doby máčení na ztráty vitaminu B₂ u čočky byl zkoumán již v 70. letech minulého století. Z výsledků vyplynulo, že při máčení čočky do 3 hodin byly ztráty minimální, kdežto po 3 hodinách se rychle zvyšovaly. [10], [11]

K tepelnému ošetření potravinářských surovin se používá teplot nad 60 °C, může to však být i více než 200 °C. Tepelnou úpravou je dosahováno lepší stravitelnosti

potravin, kdy se mění jejich struktura a uvolňuje se tuhá konzistence syrových potravin, čímž je usnadněno jejich trávení. Dále se zlepšují organoleptické vlastnosti (účinkem tepla nebo biochemických vlivů vznikají nové chuťové a vonné látky), ničí se škodlivé mikroorganismy, inaktivují se enzymy a prodloužuje se údržnost potravin. Působením vyšší teploty mohou vznikat i toxické a lidskému zdraví škodlivé látky. [11], [12], [13]

Při blanšírování dochází ke změně stavu riboflavinu. Retence vitamínu B₂ při blanšírování parou činila ve špenátu 88 až 100 % a při blanšírování ve vroucí vodě se pohybovala mezi 64 až 95 %. Při blanšírování je retence riboflavinu v rozsahu 80 až 95 %. [2], [5]

Ztráty vitamínů v případě vaření jsou dvojího druhu: část vitamínů degraduje varem s vodou a část je vyluhována do vývaru a záleží na dalším postupu, zda bude vývar využit. Výše ztrát závisí také na objemu potraviny a množství vody. Šetrnější je příprava větších kusů surovin, zejména masa a použití menšího množství vody a kratší doby tepelného záhřevu, zatímco vitamin B₂ je vůči teplotě relativně stabilní a ke ztrátám dochází hlavně vyluhováním (uvádí se až z 55 %). [2], [6], [10], [14]

Jsou známy i případy, kdy se technologicky anebo domácí přípravou množství vitamínů zvýší. Týká se to zejména riboflavinu, kdy se jeho obsah zvyšuje při fermentaci mléka anebo případně i při mléčném kvašení (kysané zelí). Zde nárůst obsahu vitamínu závisí na použité mikrobiální kultuře. Fermentované mléčné výrobky obsahují ve většině případů vyšší koncentrace riboflavinu než původní mléko, díky jeho syntéze mikroorganismy. V této souvislosti lze uvést i zvýšený obsah vitamínů skupiny B u kvasnicových typů pív. Je známo, že pro vitaminy skupiny B jsou kvasnice nejbohatším zdrojem. [6], [14]

1.5 Fyziologické a metabolické aspekty

Živé organismy čerpají energii z oxidoredukčních reakcí. Flavinové koenzymy ze účastní mnoha metabolických procesů. Jsou důležité pro látkovou výměnu sacharidů, tuků a aminokyselin. Lidské tělo přemění riboflavin na FAD, který slouží jako koenzym pro *glutathionreduktasu* a další enzymy. *Glutathionreduktasa* umožňuje redukci glutathionu, který hraje významnou roli v ochraně organismů proti reaktivnímu kyslíku ve formě peroxidu vodíku. [8],[15],[16]

Flavinmononukleotid i flavinadenindinukleotid se štěpí v tenkém střevě. Absorpce nízkých koncentrací riboflavinu je regulována pomocí saturačního mechanismu, vyšší koncentrace jsou absorbovány pasivní difuzí. Riboflavin z potravin živočišného původu je snáze absorbován v trávicím traktu než vitamin z potravin rostlinného původu, kde převládají kovalentně vázané formy, obtížně štěpitelné *proteasami*. Po fosforylaci je riboflavin dále transportován ve vazbě na bílkovinu především do jater, srdce a ledvin, kde nemůže vytvářet významné zásoby. Proto je třeba, aby příjem riboflavinu potravou byl relativně pravidelný. [2],[6]

Nedostatek vitamínu B₂ se v industrializovaných zemích objevuje zřídka a jen u omezených populačních skupin. Typickým místem výskytu hypovitaminózy jsou země třetího světa, kde především dětská populace trpí protein-kalorickou malnutricí. Nedostatek vitamínu se projevuje trhlinkami v koutech úst, na kůži, zarudlými sliznicemi, vypadáváním vlasů, tvorbou lupů, lámavými nehty, zvýšenou citlivostí na světlo (fotofolie) a tupozrakostí (amblyopie). [2],[17]

Nedostatečný příjem riboflavinu, méně než 0,5 mg.den⁻¹, trvající více než 100 dní vede ke vzniku hypovitaminózy. Nejčastěji se vyskytuje u osob, které konzumují nedostatečné množství mléka a mléčných produktů. Kromě toho může být způsobena nadměrnou konzumací alkoholu, používáním orální antikoncepce, dlouhodobým působením stresu, nemocemi štítné žlázy (hyperfunkce), *diabetes mellitus*, záněty tenkého střeva aj. Jen zřídka jde o nedostatek riboflavinu samotného, obvykle se objevuje spolu se symptomy nedostatku ostatních vitamínů skupiny B. [2]

Riboflavin je důležitý pro dobrý stav kůže, očí, funkce srdce a dalších orgánů. Jako součást enzymů v dýchacím řetězci je nezbytný pro základní buněčný metabolismus. [18]

1.6 Doporučený příjem riboflavinu

Výše 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. Minimální denní příjem vitamínu B₂ pro dospělého jedince byl stanoven ve výši 0,6 mg. Pro udržení bazálního metabolismu a zajištění hlavních metabolických funkcí by příjem riboflavinu neměl klesnout pod 1,2 mg.den⁻¹, i když je energetický příjem nižší než 2000 kcal na den. Doporučená dávka pro průměrného obyvatele ČR činí 1,514 mg.den⁻¹. Doporučená dávka pro středně těžce pracující muže ve věku 19 až 34 let činí 1,8 mg.den⁻¹ a ve věku 35 až 59 let 1,7 mg.den⁻¹. Pro stejné kategorie žen platí hodnota 1,6 mg, resp. 1,5 mg.den⁻¹. [2]

2 MOŽNOSTI STANOVENÍ VITAMINU B₂

Riboflavin je vázán esterickou vazbou na kyselinu fosforečnou ve formě koenzymu flavinadenindinukleotidu a flavinmononukleotidu, které jsou vázané na svůj specifický bílkovinný nosič a nejčastěji vystupují ve formě barevné bílkoviny, žlutého flavoproteinu. K uvolnění vázaného riboflavinu na bílkovinu se používá hydrolýzy zředěných minerálních kyselin HCl a H₂SO₄. Kromě kyselé hydrolýzy se používá enzymatická hydrolýza, která je nezbytná k uvolnění riboflavinu z esterické vazby s kyselinou fosforečnou. Jako enzymu se používá *takadiastasa*, *trypsin* nebo *clarasa*. [19]

Nejvíce používané metody jsou fluorometrické metody založené na měření žlutozelené fluorescence riboflavinu nebo lumiflavinu, fotometrické měření žluté barvy riboflavinu, případně lumiflavinu, polarografické a spektrální měření. Kromě fyzikálněchemických metod se na stanovení riboflavinu používají metody mikrobiologické s *Lactobacillus helveticus*, množství mikroorganismů se potěstanoví turbidimetricky. [20]

Mezi nejnovější metody stanovení riboflavinu patří separační chromatografická metoda vysoceúčinné kapalinové chromatografie HPLC.

3 VYSOCE ÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

Chromatografie je separační proces, při kterém se látky rozdělují mezi dvě nemísitelné fáze, jednu pohyblivou (mobilní) a druhou nepohyblivou (stacionární), na základě fyzikálněchemických interakcí jako jsou adsorpce, iontová výměna apod. [21]

Kapalinová chromatografie se využívá především k separaci směsí látek, které jsou netěkavé nebo špatně těkavé a termicky labilní (až 85% všech sloučenin). K separaci využívá různé systémy pevné nebo kapalné stacionární fáze a kapalné mobilní fáze. Na rozdíl od plynové chromatografie rozhodují o separaci složek vzorku nejen jejich interakce se stacionární fází, ale rovněž velmi výrazně použitá mobilní fáze. Podle uspořádání stacionární fáze rozlišujeme kolonovou a tenkovrstvou či papírovou chromatografii. [22], [23]

HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) je metoda používaná k separaci složek směsi na základě jejich různých vlastností jako je polarita, náboj nebo velikost. Princip separace jednotlivých složek směsi spočívá v dělení látek mezi stacionární fází naplněnou v koloně a mobilní fází procházející v koloně za vysokého tlaku. [24]

Základní výhodou HPLC je široký obor použitelnosti (lze analyzovat až 80 % veškerých známých látek, které se podstatně liší v chemických i fyzikálních vlastnostech). Další předností je možnost účinně ovlivňovat separaci nejenom volbou stacionární fáze, ale rovněž změnami složení mobilní fáze, protože kapalná mobilní fáze není pouze inertním nosičem vzorků, ale podílí se přímo na interakcích rozpuštěných látek se stacionární fází. [21]

V HPLC je nejdůležitější přesnost analýzy, neboť se v ní odráží důvěryhodnost výsledků získaných při dané analýze. Přesnost v HPLC závisí na kvalitě kontroly instrumentálních a separačních podmínek. Správnost metody je dána možnostmi kalibrovat systém standardy o známém složení. [25]

3.1 Technika vnášení vzorku do separačního systému

Chromatografickou separaci látek v koloně lze provést třemi rozdílnými technikami:

1. Frontální
2. Vytěšňovací
3. Eluční

3.1.1 Frontální chromatografie

V případě frontální chromatografie (také: frontální analýza) je vzorek přímo rozpuštěn v mobilní fázi nebo slouží jako mobilní fáze. Při průtoku ložem stacionární fáze jsou zadržovány složky s velkým rozdělovacím koeficientem až k nasycení stacionární fáze všemi složkami přiváděné směsi. Poté je z kolony vymývána nejméně zadržovaná složka, po ní směs první složky a silněji sorbované složky atd., až nakonec (po proražení směsi všech složek) je z kolony vymývána směs téhož složení, jako je vzorek v mobilní fázi. Výměnou mobilní fáze se vzorkem za čistou mobilní fázi se dosáhne resorpce složek směsi mezi stacionární fázi v opačném pořadí. Nejprve se eluována směs všech složek, poté postupně jednotlivé směsi zmenšené vždy o předchozí nejméně sorbovanou složku, až nakonec samotná nejvíce sorbovaná složka a za ní samostatná mobilní fáze. Výsledkem je separace pouze nejméně a nejvíce sorbované složky ze vzorku. [23]

3.1.2 Vytěšňovací chromatografie

Chromatogram složek směsi se vyvíjí proudem silně se sorbující kapaliny nebo plynu. Mobilní fáze sorbuje silněji než kterákoliv složka vzorku a působí jako vytěšňovací činidlo, přičemž tlačí vzorek před sebou. Výsledkem jsou zóny, které nejsou odděleny mobilní fází a chromatogram ve formě stupňů. [23]

3.1.3 Eluční chromatografie

Při eluční chromatografii je analyzovaná směs jednorázově vnášena do přerušného nebo nepřetržitého proudu (toku) mobilní fáze. Podmínkou úspěšné separace je, aby složka vzorku byla stacionární fází zadržována silněji, než složky mobilní fáze. Jednotlivé složky jsou eluovány v pořadí rostoucí velikosti interakce se stacionární fází a jsou odděleny čistou mobilní fází.

Eluce může být izokratická (za konstantních podmínek), stupňovitá nebo gradientová. Gradientová eluce souvisí se změnou rozdělovacích konstant jednotlivých složek vzorku v čase a to v důsledku změny složení mobilní fáze, změny pH, teploty, koncentrace komplexotvorného činidla. Eluční chromatografie je nejčastěji používaným postupem v analytické chromatografii. Poloha píku v chromatogramu je odrazem velikosti interakce složky vzorku s chromatografickým systémem a slouží k její identifikaci. Plocha uzavřená píkem a základní linií (symetrické píky) slouží k zjištění obsahu složky ve vzorku. [23]

3.2 Příslušenství HPLC

- Zásobník mobilních fází
- Čerpadla
- Dávkovací zařízení
- Kolona
- Detektory

3.2.1 Zásobník mobilních fází

Mobilními fázemi jsou v pořadí stoupající polarity: *n*-hexan, cyklohexan, methylbenzen, chlorované uhlovodíky, tetrahydrofuran, propanon, acetonitril, *iso*-propanol, ethanol, methanol, voda a další. Používají se buď jednotlivě, nebo jejich mísitelné směsi. Např. pro reversní HPLC na vázané fázi s C18 se jako mobilní fáze často užívá směs methanolu nebo acetonitrilu s vodou nebo s vodným roztokem pufru. Pro dělení bazických nebo slabě kyselých látek je velmi důležité pH, protože ionizované formy těchto látek mají pro vázanou fázi C18 menší afinitu než látky neutrální a budou eluovány rychleji. [26]

3.2.2 Čerpadla

Moderní instrumentace umožňuje pracovat s tlaky až 60 MPa. Důležitá je vysoká přesnost a reprodukovatelnost průtoků v celé škále pracovních tlaků. Čerpadla bývají dělena na pulzní a bezpulzní, používají se pístová, membránová. Materiálem pro výrobu čerpadel v HPLC je nejčastěji nerezová ocel, safír, titan a keramika. [27]

3.2.3 Dávkovací zařízení

Přímý nástřik vzorku injekční stříkačkou přes septum nebo při zastavení toku mobilní fáze (stop-flow) přímo na vrstvu sorbentu v koloně je metodou se špatnou reprodukovatelností, tedy nevhodnou pro kvantitativní analýzu. Nástřiková zařízení se musí vyrovnat s vysokými tlaky na koloně, používají se především dávkovací vysokotlaké ventily se smyčkou. Dobře vybavená chromatografická zařízení mají k dispozici autosamplery se zásobníkem vzorků (nejlépe s temperací) s případnou programovatelnou derivatizací vzorku před analýzou. [27]

3.2.4 Kolona

Kolony pro HPLC jsou z materiálu, který musí odolávat relativně vysokým pracovním tlakům a zároveň chemickému působení mobilních fází a separovaných složek. Materiálem chromatografických kolon je většinou antikorozivní ocel nebo speciálně tvrzené borosilikátové sklo, lze použít i kombinaci obou materiálů. Pro analytické aplikace se převážně používají kolony plněné pórovitými náplněmi o průměru 3-10 μm o délce 5-30 cm a vnitřním průměrem 3-4 mm. Účinnost separace, doba analýzy a pracovní tlak se zvyšují s rostoucí délkou kolony a naopak klesají s rostoucím průměrem částic náplně. Při práci s kolonami o průměru menším než 2 mm se jedná o tzv. mikrokolonovou kapalinovou chromatografii, jejíž výhodou je hlavně snížení spotřeby mobilní fáze i vzorku a zvýšení citlivosti detekce. Materiály pro plnění kolon jsou většinou založeny na anorganické matici (silikagel, oxid hlinitý, pórovité sklo), na níž mohou být chemicky vázány nebo zakotveny různé stacionární fáze. Méně často se používá organických gelů různé struktury, které mohou být rovněž chemicky modifikovány. Charakter stacionární fáze závisí na chromatografickém systému. V HPLC se často vyskytují pojmy "normální fáze" a "reverzní fáze". U normálních fází jsou funkční skupiny stacionární fáze polární, mobilní fází bývá nepolární rozpouštědlo

(pentan, hexan). Chromatografie na tzv. systémech s obrácenými fázemi (RP, Reversed-Phase, asi v 80 % všech aplikací HPLC) používá chemicky vázanou nepolární stacionární fázi. Nejpoužívanější je typ C18 nebo C8, kde jsou molekuly vázány na částicích silikagelu. Mobilní fáze v systému RP je polární. [27], [28]

3.2.5 Detektory

Základní podmínkou použitelnosti detektoru je lineární závislost odezvy v širokém koncentračním rozmezí stanovované látky a plná automatizace záznamu. Oblast linearity je vymezena intervalem odezvy detektoru, kdy odchylka od lineárního průběhu odezvy detektoru v závislosti na koncentraci je menší než 2 %. [26]

K detekci separovaných látek se zpravidla užívá obecných nebo specifických vlastností, kterými se tyto látky liší od mobilní fáze, v tomto základě se také rozlišují univerzální a selektivní detektory. Nejčastěji jsou používané tyto detektory: [27]

- Fotometrické detektory (UV, VIS)

Většina organických látek absorbuje v oblasti UV záření, některé i ve viditelné oblasti světla. Detektory pracují buď s fixní vlnovou délkou (nejčastěji 254 nm), s možností výběru několika vlnových délek (filtrové), nebo jsou opatřeny monochromátorem a pracují na principu spektrofotometru v rozsahu 190-400 nm. Světlo zdroje prochází průtokovou celou, intenzita prošlého paprsku je měřena fotonásobičem, kontinuálně se snímá signál eluovaných složek

- Detektor diodového pole (DAD)

Umožňuje získat spektrální data látek v průběhu celé analýzy. Průtokovou celou prochází polychromatické světlo, transmitované záření je spektrálně rozkládáno holografickou mřížkou, takže na každou z miniaturních fotodiod umístěných na destičce o délce cca 1 cm dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v průtokové cele detektoru. Použití DAD je podmíněno softwarovým zázemím, které umožňuje např. průběžné hodnocení tzv. "čistoty píků", identifikaci neznámých složek pomocí spektrální knihovny, rychlé stanovení absorpčního maxima látky, kvantifikaci píků s odlišnými spektrálními vlastnostmi.

- Elektrochemický detektor

Umožňuje stanovit velmi nízké koncentrace látek v eluentu v případě, že tyto látky jsou elektrochemicky aktivní (redukovatelné nebo oxidovatelné). Měří se proud protékající mezi polarizovatelnou pracovní elektrodou a pomocnou elektrodou v závislosti na vloženém napětí. Detektor pracuje buď jako polarografický se rtuťovou kapkovou elektrodou, nebo s tuhou elektrodou zhotovenou např. z grafitu. Obecně se tento detektor nehodí pro detekci gradientové eluce.

- Vodivostní detektor

Měří elektrickou vodivost eluátu vytékajícího z kolony dvěma elektrodami (nerez, zlato, platina) umístěnými v průtokové cele. Tento detektor je vhodný pouze pro detekci iontů.

- Hmotnostní detekce (LC/ MS)

Snímání hmotnostního spektra během eluce látek je velmi výhodné pro strukturní analýzu a identifikaci látek ve složitých směsích. Technicky výhodné pro přímé napojení je používání mikrokolon a kapilárních kolon.

4 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky statistické analýzy hodnotíme podle správnosti, tj. schopnosti metody kvantitativně určovat danou veličinu, dále podle přesnosti, tj. schopnosti metody poskytovat konzistentně stejné výsledky pro řadu opakovaných stanovení a podle reprodukovatelnosti, tj. schopnosti metody poskytovat konzistentně stejné výsledky pro nezávislá měření, prováděná se stejným vzorkem a stejným postupem různými pracovníky v různých laboratořích.

Analytická chyba představuje rozdíl mezi nalezeným obsahem analytu (x) a jeho skutečným obsahem (μ) ve vzorku. Malé, nepravidelné odchylky od skutečné hodnoty se určují statisticky ze souboru paralelních (opakovaných) analýz. Ovlivňují přesnost (reprodukovatelnost) či opakovatelnost stanovení. Aritmetický průměr všech výsledků se zpravidla nejvíce blíží skutečné hodnotě:

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

Základní charakteristikou nahodilých chyb je odhad směrodatné odchylky:

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

Ve skutečnosti máme k dispozici jen omezený počet výsledků, který je podstatně menší než $n \rightarrow \infty$ a tudíž je směrodatná odchylka závislá na počtu paralelních výsledků. Byl definován Studentův koeficient t , který charakterizuje Studentovo rozložení náhodných odchylek pro daný stupeň volnosti (daný počet výsledků analýz a použitou hladinu významnosti $1-\alpha$). Studentovým koeficientem pak násobíme hodnotu směrodatné odchylky. Nejlepším vyjádřením pro průměrný výsledek ze série paralelních stanovení je proto vztah: [30]

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{\sqrt{s}}{t} \cdot n \quad (3)$$

Tabulka 2. Kvantily $t(n)$ Studentova rozdělení o n stupních volnosti [29]

t(n)	α		
n	0,05	0,01	0,001
1	12,71	63,66	636,58
2	4,30	9,93	31,60
3	3,18	5,84	12,92
4	2,78	4,60	8,60
5	2,57	4,03	6,87
6	2,45	3,71	5,96
7	2,37	3,50	5,41
8	2,31	3,36	5,04
9	2,26	3,25	4,78
10	2,23	3,14	4,59

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 METODIKA

5.1 Použité přístroje a pomůcky

Standardní laboratorní vybavení:

předvážky (Kern, SRN)

lednice (Samsung- Calex, CZ)

temperovaná vodní lázeň (Memmert, SRN)

běžné laboratorní sklo a pomůcky

Speciální zřízení:

Aparatura pro HPLC (Hewlett Packard 1100)

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

Dávkovací stříkačka (Hamilton, USA)

Mikrofiltry 0,45 µm, PTFE (Supelco, USA)

5.2 Materiál

5.2.1 Vzorky masa, jater a tavených sýrů

Vzorky masa vepřové kýty, vepřové kotlety, vepřové pleci, vepřové krkovice, vepřového boku, hovězího předního, hovězí kližky, hovězího zadního, hovězích jater, vepřových jater byly zakoupen v masně ve Vizovicích patřící firmě Carnex.

Vzorek kuřecích jater, krůtích jater byly zakoupen v masně ve Zlíně patřící firmě Raciola.

Analyzovány byly 2 řady tavených sýrů (sušina 40 % w/w, tuk v sušině 45 % w/w), vyrobené ve společnosti MADETA, a. s. Řípec. K výrobě tavených sýrů byla použita směs přírodních sýrů, máslo, voda, tavicí soli (fosfátové a polyfosfátové tavicí soli) a sušená syrovátka v množství 0,5 % w/w. Celková doba tavení byla cca 5 minut a tavicí teplota 92 °C. Tavenina byla plněna do 75-gramových obalů z taženého hliníku uzavřených přivařitelným hliníkovým víčkem. U obou řad byly po uzavření vyčleněny vzorky, které byly zchlazeny během 3 hodin na teplotu 10 ± 2 °C a označeny jako „nesterilované tavené sýry“. Na větší části vzorků obou analyzovaných řad byl proveden sterilační záhřev (sterilátor LUBECA) při teplotě 117 °C s výdrží 20 minut. Sterilované vzorky byly ve sterilátoru zchlazeny na 25 °C a odebrány – označeno jako „sterilované tavené sýry“. Nesterilované i sterilované tavené sýry byly skladovány do okamžiku analýzy v chladícím boxu při teplotě 8 ± 2 °C.

5.2.2 Použité roztoky a chemikálie

Methanol pro HPLC, gradient grade (Riedel-del Haën, SRN; Sigma- Aldrich, SRN)

kyselina trichloroctová (dodavatel- ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

kyselina chlorovodíková (dodavatel- ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

octan sodný (dodavatel- ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

kyselina mravenčí (dodavatel- ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

síran zinečnatý (dodavatel- ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

hexakynoželeznatan draselný (dodavatel- ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

standard riboflavinu (výrobce Supelco, USA)

redestilovaná voda

5.3 Analýza jednotlivých vzorků

5.3.1 Vysrážení proteinů ze vzorku vepřového a hovězího masa

S přesností na 0,01 g bylo naváženo 16,00 g analyzovaného rozmixovaného vzorku masa. Vzorek byl kvantitativně převeden do třecí misky, kde bylo postupně přidáno 80 ml 0,1 mol.l⁻¹ kyseliny chlorovodíkové a po zhomogenizování byla směs kvantitativně převedena do 250 ml Erlenmayerovy baňky, která byla obalena hliníkovou fólií. Baňka byla vložena do vodní lázně na 1 hodinu při teplotě 97 °C a po celou dobu byla třepána. V 50. minutě ohřevu byly přidáním kyseliny trichloroctové vysráženy proteiny a stejné množství bylo přidáno i v 60. minutě ohřevu (kapitola 6.1). Směs byla po vaření ochlazena, kvantitativně převedena do 100 ml odměrné baňky a baňka byla doplněna redestilovanou vodou po značku. Obsah baňky byl poté dvojstupňově zfiltrován (nejdříve byl vzorek zfiltrován přes papírový filtr a následně byl zfiltrován přes filtr používaný pro chromatografii HPLC o velikosti pórů 0,45 μm).

5.3.2 Vysrážení proteinů a polysacharidů ze vzorku jater

S přesností na 0,01 g bylo naváženo 16,00 g analyzovaného rozmixovaného vzorku jater. Vzorek byl kvantitativně převeden do třecí misky, kde bylo postupně přidáno 80 ml 0,1 mol.l⁻¹ kyseliny chlorovodíkové a po zhomogenizování byla směs kvantitativně převedena do 250 ml Erlenmayerovy baňky, která byla obalena hliníkovou fólií. Baňka byla vložena do vodní lázně na 1 hodinu při teplotě 97 °C a po celou dobu byla třepána. V 50. minutě ohřevu byly přidáním kyseliny trichloroctové vysráženy proteiny a stejné množství bylo přidáno i v 60. minutě ohřevu (kapitola 6.2). Následným přidáním 10 ml činidla Carrez I a 10 ml činidla Carrez II byly vysráženy polysacharidy, převážně glykogen. Směs byla po vaření ochlazena, kvantitativně převedena do 200 ml odměrné baňky a baňka byla doplněna redestilovanou vodou po rysku. Obsah baňky byl poté opět dvojstupňově zfiltrován.

5.3.3 Vysrážení proteinů ze vzorku tavených sýrů

S přesností na 0,01 g bylo naváženo 16,00 g analyzovaného vzorku taveného sýru. Vzorek byl kvantitativně převeden do třecí misky, kde bylo postupně přidáno 60 ml 0,1 mol.l⁻¹ kyseliny chlorovodíkové a po zhomogenizování byla směs kvantitativně převedena do 250 ml Erlenmayerovy baňky, která byla obalena hliníkovou fólií. Baňka byla vložena do vodní lázně na 1 hodinu při teplotě 97 °C a po celou dobu byla třepána. V 50. minutě ohřevu byly přidáním 1 ml 50 % kyseliny trichloroctové vysráženy proteiny. Směs byla po vaření ochlazena, kvantitativně převedena do 100 ml odměrné baňky a baňka byla doplněna redestilovanou vodou po rysku. Obsah baňky byl poté opět dvojestupňově zfiltrován.

5.3.4 Stanovení riboflavinu metodou HPLC ve vepřovém a hovězím mase

Vysrážení proteinů ze vzorku masa bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 5.3.1. Jako optimální způsob vysrážení proteinů ze vzorku masa byl určen postup, kdy jen v 50. minutě ohřevu byly přidány 3 ml 80 % kyseliny trichloroctové.

Ze získaného filtrátu byl dávkován alikvotní podíl 20 µl do HPLC. Separace byla provedena na koloně SUPERCOSIL LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm). Byla použita gradientová eluce mobilní fází o složení 0,12 mol.l⁻¹ octan sodný (pH 4,5 upraveno pomocí 85 % kyseliny mravenčí w/w – složka A) a methanol (složka B) o počátečním poměru 87:13 (A:B) v/v v čase 0 s gradientem uvedeným v tabulce 3. Průtok mobilní fází byl 0,8 ml.min⁻¹ a teplota termostatu kolony 30 °C. Signál byl snímán detektorem UV/VIS DAD při vlnové délce 270 nm. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno za použití chromatografického softwaru ChemStation – Instrument 1 (Agilent Technologies, USA).

Tabulka 3. 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

5.3.5 Stanovení riboflavinu metodou HPLC v játrech

Vysrážení proteinů ze vzorku jater bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 5.3.2. Jako optimální způsob vysrážení proteinů ze vzorku jater byl určen postup, kdy jen v 50. minutě ohřevu byly přidány 3 ml 80 % kyseliny trichloroctové a v 60. minutě byly přidáno 10 ml činidla Carrez I a 10 ml činidla Carrez II.

Ze získaného filtrátu byl dávkován alikvotní podíl 20 μl do HPLC a podmínky analýzy byly stejné jako v kapitole 5.3.4.

5.3.6 Stanovení riboflavinu metodou HPLC v tavených sýrech

Vysrážení proteinů ze vzorku tavených sýrů bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 5.3.3.

Ze získaného filtrátu byl dávkován alikvotní podíl 20 μl do HPLC a podmínky analýzy byly stejné jako v kapitole 5.3.4.

5.3.7 Kalibrační křivka pro chromatografické stanovení vitamínu B₂

Jako standardní preparát vitamínu B₂ byl použit standard riboflavinu (Supelco, USA). 4000 μg riboflavinu bylo rozpuštěno v 1000 ml odměrné baňce a doplněno po rysku redestilovanou vodou. Výchozí koncentrace zásobního roztoku byla 4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ze zásobního roztoku riboflavinu byly připraveny dalším ředěním redestilovanou vodou kalibrační roztoky o koncentraci 2; 1; 0.5 a 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

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

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

6.1 Výsledky vysrážení proteinů ze vzorku vepřového a hovězího masa

Vysrážení proteinů z masa bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 5.3.1. Při vysrážení bylo použito různých koncentrací a různého množství kyseliny trichloroctové . První srážení bylo provedeno v 50. minutě ohřevu a druhé srážení bylo provedeno v 60. minutě ohřevu. Vzorky byly vyhodnoceny symboly + a – :

- + proteiny byly kvantitativně vysráženy
- proteiny nebyly kvantitativně vysráženy

Pro stanovení postupu vysrážení proteinů byl použit vzorek vepřové kýty.

Tabulka 4. Přídavek 50 % kyseliny trichloroctové v 50. minutě záhřevu

Přídavek kyseliny [ml]	Vysrážené proteiny
1	-
3	-
5	-

Tabulka 5. Přídavek 50 % kyseliny trichloroctové v 50. minutě ohřevu a v 60. minutě ohřevu

První přídavek kyseliny [ml]	1. Srážení	Druhý přídavek kyseliny [ml]	2. Srážení
1	-	1	-
3	-	3	-
5	-	5	-

Tabulka 6. Přídavek 80 % kyseliny trichloroctové v 50. minutě záhřevu

Přídavek kyseliny [ml]	Vysrážené proteiny
1	-
2	+
3	+
5	+

Tabulka 7. Přídavek 80 % kyseliny trichloroctové v 50. minutě ohřevu a v 60. minutě ohřevu

První přídavek kyseliny [ml]	1. Srážení	Druhý přídavek kyseliny [ml]	2. Srážení
1	-	1	-
2	+	2	+
3	+	3	+
5	+	5	+

Z výsledků je patrné, že 50% kyselina trichloroctová byla k vysrážení proteinů z masa málo koncentrovaná, a tudíž proteiny nebyly kvantitativně vysráženy. Celkového vysrážení proteinů z masa bylo docíleno až použitím 2 ml 80 % kyseliny trichloroctové v 50 min ohřevu.

6.2 Výsledky vysrážení proteinů a polysacharidů ze vzorku jater

Vysrážení proteinů z jater bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 5.3.2. Při vysrážení bylo použito různých koncentrací a různého množství kyseliny trichloroctové. První srážení bylo provedeno v 50. minutě ohřevu a druhé srážení bylo provedeno v 60. minutě ohřevu. Vzorky byly vyhodnoceny symboly + a - :

+ proteiny byly kvantitativně vysráženy

- proteiny nebyly kvantitativně vysráženy

Pro stanovení postupu vysrážení proteinů byl použit vzorek vepřových jater.

Tabulka 8. Přídavek 80 % kyseliny trichloroctové v 50. minutě záhřevu

Přídavek kyseliny [ml]	Vysrážené proteiny
1	-
2	+
3	+

Tabulka 9. Přídavek 80 % kyseliny trichloroctové v 50. minutě ohřevu a v 60. minutě ohřevu

První přídavek kyseliny [ml]	1. Srážení	Druhý přídavek kyseliny [ml]	2. Srážení
1	-	1	-
2	+	2	+
3	+	3	+

Z výsledků je patrné, že celkového vysrážení proteinů z jater bylo docíleno až použitím 2 ml 80 % kyseliny trichloroctové v 50 min ohřevu.

Přidáním 10 ml činidla Carrez I a 10 ml činidla Carrez II byly kvantitativně vysráženy ze vzorku polysacharidy, převážně glykogen.

6.3 Výsledky vysrážení proteinů ze vzorku tavených sýrů

Vysrážení proteinů z tavených sýrů bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 5.3.3. Při vysrážení byl použit 1 ml 50 % kyseliny trichloroctové. Srážení bylo provedeno v 50. minutě ohřevu. Vzorky byly vyhodnoceny symboly + a – :

- + proteiny byly kvantitativně vysráženy
- proteiny nebyly kvantitativně vysráženy

Tabulka 10. Přídavek 50 % kyseliny trichloroctové v 50. minutě ohřevu

Přídavek kyseliny [ml]	Vysrážené proteiny
1	+

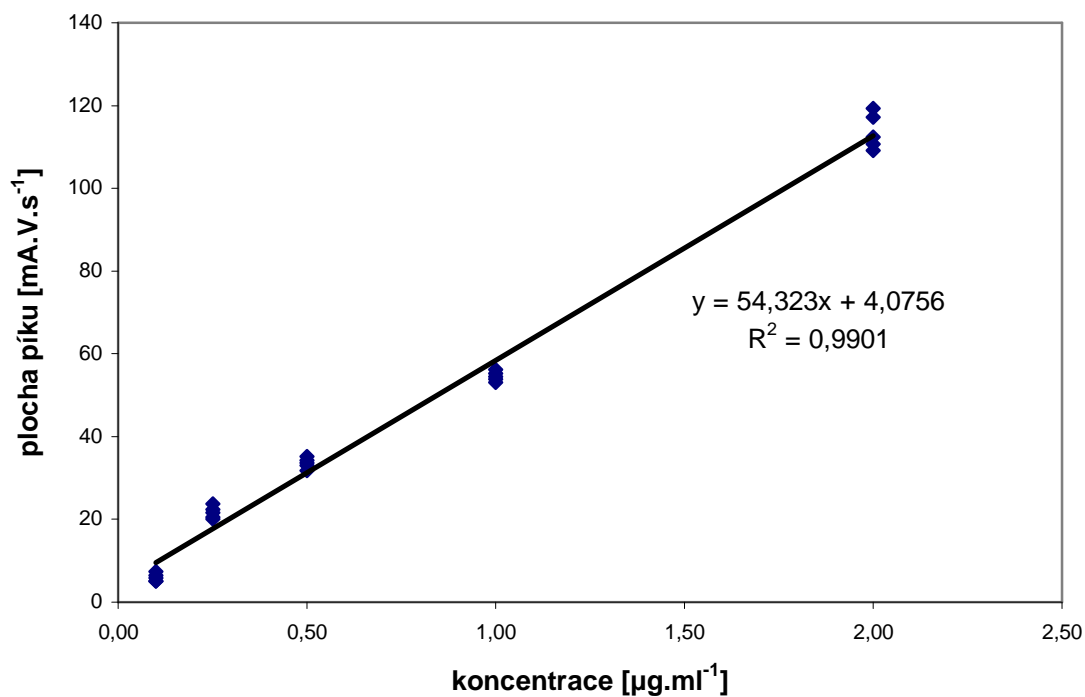
6.4 Výsledky měření kalibrační křivky pro stanovení vitamínu B₂ metodou HPLC

Kalibrace byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 5.3.7. Každý bod kalibrační křivky byl proměřen pětkrát. Všechna měření jsou uvedena v tabulce 11 a znázorněna v následujícím grafu 1.

Tabulka 11. Kalibrace riboflavinu

Koncentrace riboflavinu [$\mu\text{g}, \text{ml}^{-1}$]	Plocha píku [$\text{mA} \cdot \text{V} \cdot \text{s}^{-1}$]	Průměrná plocha píku [$\text{mA} \cdot \text{V} \cdot \text{s}^{-1}$]
0,10	5,1	5,98
	5,1	
	7,4	
	6,5	
	5,8	
0,25	23,7	21,66
	21,6	
	20,0	
	20,6	
	22,4	
0,50	35,2	33,58
	31,8	
	34,2	
	33,6	
	33,1	
1,00	53,1	54,58
	56,2	
	53,9	
	54,5	
	55,2	
2,00	110,6	113,72
	117,2	
	119,3	
	109,1	
	112,4	

Graf 1. Kalibrační křivka s regresní rovnicí pro stanovení riboflavinu metodou HPLC



6.5 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu ve vepřové kýtě

Stanovení bylo provedeno u dvou paralelních vzorků vepřové kýty podle postupu uvedeného v kapitole 5.3.4. Z každého filtrátu byla provedena analýza pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitamínu B₂ v $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na mg.100 g^{-1} masa.

Tabulka 12. Obsah riboflavinu u vzorku vepřové kýty s navázkou $m = 15,99$ g

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg.ml ⁻¹]	Koncentrace [μg.g ⁻¹]	Koncentrace [mg.100 g ⁻¹]
16,5	0,229	1,430	0,143
13,1	0,166	1,039	0,104
15,4	0,208	1,304	0,130
16,2	0,223	1,396	0,140
14,8	0,197	1,235	0,124

Tabulka 13. Obsah riboflavinu u vzorku vepřové kýty s navázkou $m = 16,01$ g

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg/ml]	Koncentrace [μg/g]	Koncentrace [mg.100 g ⁻¹]
12,2	0,150	0,934	0,093
12,7	0,159	0,992	0,099
12,6	0,157	0,981	0,098
13,1	0,166	1,038	0,104
12,4	0,153	0,957	0,096

6.6 Přesnost stanovení vitamínu B₂ ve vepřové kýtě metodou HPLC

Analýza vitamínu B₂ ve vepřové kýtě byla provedena celkem desetkrát. Přesnost stanovení vitamínu B₂ je vyjádřena ve formě standardních statistických metod uvedených v kapitole 4. V tabulce 14 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitamínu B₂ ve vepřové kýtě.

Tabulka 14. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B₂ ve vepřové kýtě

Koncentrace [mg. 100g ⁻¹]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
0,143	0,019	0,0004
0,104	-0,020	0,0004
0,130	0,006	0,0000
0,140	0,016	0,0002
0,124	0,000	0,0000
0,093	-0,031	0,0009
0,099	-0,025	0,0006
0,098	-0,026	0,0007
0,104	-0,020	0,0004
0,096	-0,028	0,0008
$\bar{x} = 0,113$		$\Sigma = 0,004$

Průměrný obsah vitamínu B₂ ve vepřové kýti byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky s podle vzorce (2). Skutečný obsah vitamínu B₂ stanovovaný metodou HPLC byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 4. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha=0,05$) a při devíti stupních volnosti 2,26 [30].

$$\text{směrodatná odchylka } s = 0,019 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$$

$$\begin{aligned} &\text{Obsah vitamínu B}_2 \text{ ve vepřové kýti} \\ &\mu = 0,113 \pm 0,610 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1} (\alpha=0,05) \end{aligned}$$

6.7 Výsledky stanovení obsahu riboflavínu ve vepřové pleci

Stanovení bylo provedeno u dvou paralelních vzorků vepřové pleci podle postupu uvedeného v kapitole 5.3.4. Z každého filtrátu byla provedena analýza pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitamínu B₂ v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na $\text{mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ masa.

Tabulka 15. Obsah riboflavínu u vzorku vepřové pleci s navázkou $m = 15,98 \text{ g}$

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{g}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$]
16,1	0,221	1,385	0,139
16,7	0,232	1,454	0,145
15,9	0,218	1,362	0,136
16,4	0,227	1,420	0,142
16,2	0,223	1,396	0,140

Tabulka 16. Obsah riboflavinu u vzorku vepřové pleci s navázkou $m = 15,99$ g

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg/ml]	Koncentrace [μg/g]	Koncentrace [mg.100 g ⁻¹]
16,2	0,223	1,396	0,140
16,3	0,225	1,407	0,141
16,0	0,220	1,373	0,137
15,9	0,218	1,362	0,136
16,8	0,234	1,465	0,147

6.8 Přesnost stanovení vitamínu B₂ ve vepřové pleci metodou HPLC

Analýza vitamínu B₂ ve vepřové pleci byla provedena celkem desetkrát. Přesnost stanovení vitamínu B₂ je vyjádřena ve formě standardních statistických metod uvedených v kapitole 4. V tabulce 17 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitamínu B₂ ve vepřové pleci.

Tabulka 17. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B₂ ve vepřové pleci

Koncentrace [mg. 100g ⁻¹]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
0,139	-0,002	0,0000023
0,145	0,005	0,0000292
0,136	-0,004	0,0000144
0,142	0,002	0,0000040
0,140	0,000	0,0000002
0,140	0,000	0,0000002
0,141	0,001	0,0000005
0,137	-0,003	0,0000073
0,136	-0,004	0,0000144
0,147	0,007	0,0000423
$\bar{x} = 0,140$		$\Sigma=0,0001146$

Průměrný obsah vitamínu B₂ ve vepřové pleci byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky s podle vzorce (2). Skutečný obsah vitamínu B₂ stanovovaný metodou HPLC byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 4. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha = 0,05$) a při devíti stupních volnosti 2,26 [30].

směrodatná odchylka $s = 0,004 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$

Obsah vitamínu B₂ ve vepřové pleci

$\mu = 0,140 \pm 0,280 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ($\alpha=0,05$)

6.9 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu ve vepřovém boku

Stanovení bylo provedeno u dvou paralelních vzorků vepřového boku podle postupu uvedeného v kapitole 5.3.4. Z každého filtrátu byla provedena analýza pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitamínu B₂ v $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ masa.

Tabulka 18. Obsah riboflavinu u vzorku vepřovém boku s navázkou $m = 15,99 \text{ g}$

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{g}$]	Koncentrace [$\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$]
20,2	0,298	1,864	0,186
23,3	0,354	2,213	0,221
21,6	0,323	2,017	0,202
20,8	0,308	1,925	0,193
22,1	0,332	2,075	0,208

Tabulka 19. Obsah riboflavinu u vzorku vepřovém boku s navázkou $m = 16,00 \text{ g}$

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentra ce [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Koncentra ce [$\mu\text{g}/\text{g}$]	Koncentrace [$\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$]
17,9	0,254	1,591	0,159
20,9	0,310	1,936	0,194
18,2	0,260	1,625	0,163
20,3	0,299	1,867	0,187
20,8	0,308	1,924	0,192

6.10 Přesnost stanovení vitamínu B₂ ve vepřovém boku metodou HPLC

Analýza vitamínu B₂ ve vepřovém boku byla provedena celkem desetkrát. Přesnost stanovení vitamínu B₂ je vyjádřena ve formě standardních statistických metod uvedených v kapitole 4. V tabulce 20 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitamínu B₂ ve vepřovém boku.

Tabulka 20. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B₂ ve vepřovém boku

Koncentrace [mg. 100g ⁻¹]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
0,186	-0,004	0,0000130
0,221	0,031	0,0009797
0,202	0,012	0,0001369
0,193	0,003	0,0000063
0,208	0,018	0,0003063
0,159	-0,031	0,0009548
0,194	0,004	0,0000130
0,163	-0,028	0,0007563
0,187	-0,003	0,0000109
0,192	0,002	0,0000058
$\bar{x} = 0,190$		$\Sigma=0,0031827$

Průměrný obsah vitamínu B₂ ve vepřovém boku byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky s podle vzorce (2). Skutečný obsah vitamínu B₂ stanovovaný metodou HPLC byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 4. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha=0,05$) a při devíti stupních volnosti 2,26 [30].

$$\text{směrodatná odchylka } s = 0,019 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$$

Obsah vitamínu B₂ ve vepřovém boku

$$\mu = 0,190 \pm 0,610 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1} (\alpha=0,05)$$

6.11 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu ve vepřové krkovičce

Stanovení bylo provedeno u dvou paralelních vzorků vepřové krkovičce podle postupu uvedeného v kapitole 5.3.4. Z každého filtrátu byla provedena analýza pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitamínu B₂ v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ masa.

Tabulka 21. Obsah riboflavinu u vzorku vepřové krkovičce s navázkou $m = 16,01\text{ g}$

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{g}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$]
18,6	0,267	1,670	0,167
17,6	0,249	1,555	0,156
17,4	0,245	1,532	0,153
17,1	0,24	1,498	0,150
18,3	0,262	1,636	0,164

Tabulka 22. Obsah riboflavinu u vzorku vepřové krkovičce s navázkou $m = 16,01\text{ g}$

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{g}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$]
20,8	0,308	1,923	0,192
22,0	0,330	2,061	0,206
19,4	0,282	1,762	0,176
20,3	0,299	1,865	0,187
21,5	0,321	2,003	0,200

6.12 Přesnost stanovení vitamínu B₂ ve vepřové krkovičce metodou HPLC

Analýza vitamínu B₂ ve vepřové krkovičce byla provedena celkem desetkrát. Přesnost stanovení vitamínu B₂ je vyjádřena ve formě standardních statistických metod uvedených v kapitole 4. V tabulce 23 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitamínu B₂ ve vepřové krkovičce.

Tabulka 23. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B₂ ve vepřové krkovičce

Koncentrace [mg. 100g ⁻¹]	$/ x_i - \bar{x} /$	$/ x_i - \bar{x} / ^2$
0,167	-0,008	0,0000640
0,156	-0,020	0,0003803
0,153	-0,022	0,0004752
0,150	-0,025	0,0006350
0,164	-0,011	0,0001300
0,192	0,017	0,0002993
0,206	0,031	0,0009672
0,176	0,001	0,0000014
0,187	0,012	0,0001323
0,200	0,025	0,0006401
$\bar{x} = 0,175$		$\Sigma=0,0037248$

Průměrný obsah vitamínu B₂ ve vepřové krkovičce byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky s podle vzorce (2). Skutečný obsah vitamínu B₂ stanovovaný metodou HPLC byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 4. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha=0,05$) a při devíti stupních volnosti 2,26 [30].

$$\text{směrodatná odchylka } s = 0,020 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$$

Obsah vitamínu B₂ ve vepřové krkovičce

$$\mu = 0,175 \pm 0,626 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1} (\alpha=0,05)$$

6.13 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu ve vepřové kotletě

Stanovení bylo provedeno u dvou paralelních vzorků vepřové kotlety podle postupu uvedeného v kapitole 5.3.4. Z každého filtrátu byla provedena analýza pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitamínu B₂ v $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na $\text{mg} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ masa.

Tabulka 24. Obsah riboflavinu u vzorku vepřové kotlety s navázkou $m = 16,00$ g

Plocha piku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [µg/ml]	Koncentrace [µg/g]	Koncentrace [mg.100 g ⁻¹]
21,7	0,324	2,028	0,203
19,3	0,280	1,752	0,175
20,1	0,295	1,844	0,184
21,3	0,317	1,982	0,198
20,0	0,293	1,832	0,183

Tabulka 25. Obsah riboflavinu u vzorku vepřové kotlety s navázkou $m = 15,99$ g

Plocha piku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [µg/ml]	Koncentrace [µg/g]	Koncentrace [mg.100 g ⁻¹]
18,7	0,269	1,684	0,168
18,9	0,273	1,707	0,171
20,3	0,299	1,868	0,187
19,7	0,288	1,799	0,180
19,1	0,277	1,730	0,173

6.14 Přesnost stanovení vitamínu B₂ ve vepřové kotletě metodou HPLC

Analýza vitamínu B₂ ve vepřové kotletě byla provedena celkem desetkrát. Přesnost stanovení vitamínu B₂ je vyjádřena ve formě standardních statistických metod uvedených v kapitole 4. V tabulce 26 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitamínu B₂ ve vepřové kotletě.

Tabulka 26. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B₂ ve vepřové kotletě

Koncentrace [mg. 100g ⁻¹]	$/ x_i - \bar{x} /$	$/ x_i - \bar{x} / ^2$
0,203	0,021	0,000433
0,175	-0,007	0,000046
0,184	0,002	0,000006
0,198	0,016	0,000262
0,183	0,001	0,000001
0,168	-0,014	0,000185
0,171	-0,011	0,000128
0,187	0,005	0,000023
0,180	-0,002	0,000004
0,173	-0,009	0,000081
$\bar{x} = 0,182$		$\Sigma = 0,001170$

Průměrný obsah vitamínu B₂ ve vepřové kotletě byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky s podle vzorce (2). Skutečný obsah vitamínu B₂ stanovovaný metodou HPLC byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 4. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha=0,05$) a při devíti stupních volnosti 2,26 [30].

$$\text{směrodatná odchylka } s = 0,011 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$$

$$\begin{aligned} &\text{Obsah vitamínu B}_2 \text{ ve vepřové kotletě} \\ &\mu = 0,182 \pm 0,464 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1} (\alpha=0,05) \end{aligned}$$

6.15 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v hovězí klišce

Stanovení bylo provedeno u dvou paralelních vzorků hovězí klišky podle postupu uvedeného v kapitole 5.3.4. Z každého filtrátu byla provedena analýza pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitamínu B₂ v $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ masa.

Tabulka 27. Obsah riboflavinu u vzorku hovězí klišky s navázkou $m = 16,00 \text{ g}$

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{g}$]	Koncentrace [$\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$]
23,5	0,358	2,235	0,224
22,1	0,332	2,074	0,207
24,3	0,372	2,327	0,233
23,6	0,359	2,246	0,225
23,8	0,363	2,269	0,227

Tabulka 28. Obsah riboflavinu u vzorku hovězí klišky s navázkou $m = 16,03$ g

Plocha piků [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg/ml]	Koncentrace [μg/g]	Koncentrace [mg.100 g ⁻¹]
23,6	0,359	2,242	0,224
25,5	0,394	2,460	0,246
25,0	0,385	2,403	0,240
24,9	0,383	2,391	0,239
23,8	0,363	2,265	0,227

6.16 Přesnost stanovení vitamínu B₂ v hovězí klišce metodou HPLC

Analýza vitamínu B₂ v hovězí klišce byla provedena celkem desetkrát. Přesnost stanovení vitamínu B₂ je vyjádřena ve formě standardních statistických metod uvedených v kapitole 4. V tabulce 29 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitamínu B₂ v hovězí klišce.

Tabulka 29. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B₂ v hovězí klišce

Koncentrace [mg. 100g ⁻¹]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
0,224	-0,006	0,000030
0,207	-0,022	0,000467
0,233	0,004	0,000014
0,225	-0,004	0,000019
0,227	-0,002	0,000004
0,224	-0,005	0,000023
0,246	0,017	0,000289
0,240	0,011	0,000128
0,239	0,010	0,000102
0,227	-0,003	0,000006
$\bar{x} = 0,229$		$\Sigma=0,001082$

Průměrný obsah vitamínu B₂ v hovězí klišce byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky s podle vzorce (2). Skutečný obsah vitamínu B₂ stanovovaný metodou HPLC byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 4. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha = 0,05$) a při devíti stupních volnosti 2,26 [30].

směrodatná odchylka $s = 0,011 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$

Obsah vitamínu B₂ v hovězí klišce

$\mu = 0,229 \pm 0,464 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1} (\alpha=0,05)$

6.17 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v hovězím předním

Stanovení bylo provedeno u dvou paralelních vzorků hovězího předního podle postupu uvedeného v kapitole 5.3.4. Z každého filtrátu byla provedena analýza pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitamínu B₂ v $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ masa.

Tabulka 30. Obsah riboflavinu u vzorku hovězího předního s navázkou $m = 16,00 \text{ g}$

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{g}$]	Koncentrace [$\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$]
25,4	0,393	2,453	0,245
21,2	0,315	1,970	0,197
22,3	0,335	2,097	0,210
25,2	0,389	2,430	0,243
23,8	0,363	2,269	0,227

Tabulka 31. Obsah riboflavinu u vzorku hovězího předního s navázkou $m = 16,03 \text{ g}$

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{g}$]	Koncentrace [$\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$]
20,7	0,306	1,909	0,191
22,7	0,343	2,139	0,214
23,2	0,352	2,196	0,220
22,4	0,337	2,104	0,210
23,6	0,359	2,242	0,224

6.18 Přesnost stanovení vitamínu B₂ v hovězím předním metodou HPLC

Analýza vitamínu B₂ v hovězím předním byla provedena celkem desetkrát. Přesnost stanovení vitamínu B₂ je vyjádřena ve formě standardních statistických metod uvedených v kapitole 4. V tabulce 32 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitamínu B₂ v hovězím předním.

Tabulka 32. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B₂ v hovězím předním

Koncentrace [mg. 100g ⁻¹]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
0,245	0,027	0,000745
0,197	-0,021	0,000441
0,210	-0,008	0,000069
0,243	0,025	0,000625
0,227	0,009	0,000079
0,191	-0,027	0,000734
0,214	-0,004	0,000017
0,220	0,002	0,000003
0,210	-0,008	0,000058
0,224	0,006	0,000038
$\bar{x} = 0,218$		$\Sigma = 0,002809$

Průměrný obsah vitamínu B₂ v hovězím předním byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky s podle vzorce (2). Skutečný obsah vitamínu B₂ stanovovaný metodou HPLC byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 4. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha = 0,05$) a při devíti stupních volnosti 2,26 [30].

$$\text{směrodatná odchylka } s = 0,018 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$$

Obsah vitamínu B₂ v hovězím předním

$$\mu = 0,218 \pm 0,594 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

6.19 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v hovězím zadním

Stanovení bylo provedeno u dvou paralelních vzorků hovězího zadního podle postupu uvedeného v kapitole 5.3.4. Z každého filtrátu byla provedena analýza pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitamínu B₂ v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ masa.

Tabulka 33. Obsah riboflavinu u vzorku hovězího zadního s navázkou $m = 16,01\text{ g}$

Plocha píku [mA.V.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{g}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$]
20,61	0,304	1,902	0,190
20,85	0,309	1,930	0,193
21,16	0,314	1,966	0,197
21,03	0,312	1,951	0,195
20,51	0,303	1,891	0,189

Tabulka 34. Obsah riboflavinu u vzorku hovězího zadního s navázkou $m = 15,98\text{ g}$

Plocha píku [mA.V.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{g}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$]
21,51	0,321	2,006	0,201
21,32	0,317	1,984	0,198
21,01	0,312	1,948	0,195
21,65	0,324	2,022	0,202
21,24	0,316	1,975	0,198

6.20 Přesnost stanovení vitamínu B₂ v hovězím zadním metodou HPLC

Analýza vitamínu B₂ v hovězím zadním byla provedena celkem desetkrát. Přesnost stanovení vitamínu B₂ je vyjádřena ve formě standardních statistických metod uvedených v kapitole 4. V tabulce 35 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitamínu B₂ v hovězím zadním.

Tabulka 35. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B₂ v hovězím zadním

Koncentrace [mg. 100g ⁻¹]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
0,190	-0,006	0,000034
0,193	-0,003	0,000009
0,197	0,001	0,000001
0,195	-0,001	0,000001
0,189	-0,007	0,000048
0,201	0,005	0,000025
0,198	0,002	0,000004
0,195	-0,001	0,000001
0,202	0,006	0,000036
0,198	0,002	0,000004
$\bar{x} = 0,196$		$\Sigma = 0,000160$

Průměrný obsah vitamínu B₂ v hovězím zadním byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky s podle vzorce (2). Skutečný obsah vitamínu B₂ stanovovaný metodou HPLC byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 4. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha = 0,05$) a při devíti stupních volnosti 2,26 [30].

$$\text{směrodatná odchylka } s = 0,004 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$$

$$\text{Obsah vitamínu B}_2 \text{ v hovězím zadním}$$

$$\mu = 0,196 \pm 0,280 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

6.21 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu ve vepřových játrech

Stanovení bylo provedeno u dvou paralelních vzorků vepřových jater podle postupu uvedeného v kapitole 5.3.5. Z každého filtrátu byla provedena analýza pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitamínu B₂ v $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ jater.

Tabulka 36. Obsah riboflavinu u vzorku vepřových jater s navázkou $m = 16,02$ g

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [µg/ml]	Koncentrace [µg/g]	Koncentrace [mg.100 g ⁻¹]
18,8	0,271	3,384	0,338
15,9	0,218	2,717	0,272
16,4	0,227	2,832	0,283
16,8	0,234	2,924	0,292
17,6	0,249	3,108	0,311

Tabulka 37. Obsah riboflavinu u vzorku vepřových jater s navázkou $m = 16,07$ g

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [µg/ml]	Koncentrace [µg/g]	Koncentrace [mg.100 g ⁻¹]
15,6	0,212	2,640	0,264
15,9	0,218	2,709	0,271
17,2	0,242	3,007	0,301
17,6	0,249	3,098	0,310
16,4	0,227	2,824	0,282

6.22 Přesnost stanovení vitamínu B₂ ve vepřových játrech metodou HPLC

Analýza vitamínu B₂ ve vepřových játrech byla provedena celkem desetkrát. Přesnost stanovení vitamínu B₂ je vyjádřena ve formě standardních statistických metod uvedených v kapitole 4. V tabulce 38 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitamínu B₂ ve vepřových játrech.

Tabulka 38. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B₂ ve vepřových játrech

Koncentrace [mg. 100g ⁻¹]	$/ x_i - \bar{x} /$	$/ x_i - \bar{x} / ^2$
0,338	0,046	0,00215
0,272	-0,020	0,00041
0,283	-0,009	0,00008
0,292	0,000	0,00000
0,311	0,019	0,00035
0,264	-0,028	0,00078
0,271	-0,021	0,00045
0,301	0,009	0,00008
0,310	0,018	0,00032
0,282	-0,010	0,00009
$\bar{x} = 0,292$		$\Sigma=0,00471$

Průměrný obsah vitamínu B₂ ve vepřových játrech byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky s podle vzorce (2). Skutečný obsah vitamínu B₂ stanovovaný metodou HPLC byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 4. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha=0,05$) a při devíti stupních volnosti 2,26 [30].

$$\text{směrodatná odchylka } s = 0,023 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$$

Obsah vitamínu B₂ ve vepřových játrech

$$\mu = 0,292 \pm 0,671 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1} (\alpha=0,05)$$

6.23 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v hovězích játrech

Stanovení bylo provedeno u dvou paralelních vzorků hovězích jater podle postupu uvedeného v kapitole 5.3.5. Z každého filtrátu byla provedena analýza pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitamínu B₂ v $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na $\text{mg} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ jater.

Tabulka 39. Obsah riboflavinu u vzorku hovězích jater s navázkou $m = 15,98$ g

Plocha piku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg/ml]	Koncentrace [μg/g]	Koncentrace [mg.100 g ⁻¹]
14,1	0,185	2,310	0,231
13,8	0,179	2,240	0,224
15,2	0,205	2,563	0,256
14,9	0,199	2,494	0,249
13,9	0,181	2,263	0,226

Tabulka 40. Obsah riboflavinu u vzorku hovězích jater s navázkou $m = 16,01$ g

Plocha piku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg/ml]	Koncentrace [μg/g]	Koncentrace [mg.100 g ⁻¹]
19,5	0,284	3,547	0,355
18,3	0,262	3,271	0,327
17,5	0,247	3,087	0,309
17,1	0,240	2,995	0,300
16,8	0,234	2,926	0,293

6.24 Přesnost stanovení vitamínu B₂ v hovězích játrech metodou HPLC

Analýza vitamínu B₂ v hovězích játrech byla provedena celkem desetkrát. Přesnost stanovení vitamínu B₂ je vyjádřena ve formě standardních statistických metod uvedených v kapitole 4. V tabulce 41 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitamínu B₂ v hovězích játrech.

Tabulka 41. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B₂ v hovězích játrech

Koncentrace 100g ⁻¹ [mg.]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
0,231	-0,046	0,00212
0,224	-0,053	0,00281
0,256	-0,021	0,00043
0,249	-0,028	0,00076
0,226	-0,051	0,00257
0,355	0,078	0,00604
0,327	0,050	0,00251
0,309	0,032	0,00100
0,300	0,023	0,00051
0,293	0,016	0,00024
$\bar{x} = 0,277$		$\Sigma=0,01899$

Průměrný obsah vitamínu B₂ v hovězích játrech byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky s podle vzorce (2). Skutečný obsah vitamínu B₂ stanovovaný metodou HPLC byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 4. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha=0,05$) a při devíti stupních volnosti 2,26 [30].

$$\text{směrodatná odchylka } s = 0,046 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$$

Obsah vitamínu B₂ v hovězích játrech

$$\mu = 0,277 \pm 0,949 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1} (\alpha=0,05)$$

6.25 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v kuřecích játrech

Stanovení bylo provedeno u dvou paralelních vzorků kuřecích jater podle postupu uvedeného v kapitole 5.3.5. Z každého filtrátu byla provedena analýza pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitamínu B₂ v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na $\text{mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ jater.

Tabulka 42. Obsah riboflavinu u vzorku kuřecích jater s navázkou $m = 16,03 \text{ g}$

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{g}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$]
28,2	0,444	5,541	0,554
28,6	0,451	5,633	0,563
28,1	0,442	5,518	0,552
28,8	0,455	5,679	0,568
29,0	0,459	5,724	0,572

Tabulka 43. Obsah riboflavinu u vzorku kuřecích jater s navázkou $m = 15,99$ g

Plocha piku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [μg/ml]	Koncentrace [μg/g]	Koncentrace [mg.100 g ⁻¹]
29,6	0,470	5,877	0,588
28,3	0,446	5,578	0,558
29,1	0,461	5,762	0,576
28,7	0,453	5,670	0,567
28,9	0,457	5,716	0,572

6.26 Přesnost stanovení vitamínu B₂ v kuřecích játrech metodou HPLC

Analýza vitamínu B₂ v kuřecích játrech byla provedena celkem desetkrát. Přesnost stanovení vitamínu B₂ je vyjádřena ve formě standardních statistických metod uvedených v kapitole 4. V tabulce 44 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitamínu B₂ v kuřecích játrech.

Tabulka 44. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B₂ v kuřecích játrech

Koncentrace [mg. 100g ⁻¹]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
0,554	-0,013	0,00017
0,563	-0,004	0,00001
0,552	-0,015	0,00023
0,568	0,001	0,00000
0,572	0,005	0,00003
0,588	0,021	0,00043
0,558	-0,009	0,00008
0,576	0,009	0,00008
0,567	0,000	0,00000
0,572	0,005	0,00002
$\bar{x} = 0,567$		$\Sigma=0,00106$

Průměrný obsah vitamínu B₂ v kuřecích játrech byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky s podle vzorce (2). Skutečný obsah vitamínu B₂ stanovovaný metodou HPLC byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 4. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha = 0,05$) a při devíti stupních volnosti 2,26 [30].

směrodatná odchylka $s = 0,011 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$

Obsah vitamínu B₂ v kuřecích játrech

$\mu = 0,567 \pm 0,464 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ($\alpha=0,05$)

6.27 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu v krůtích játrech

Stanovení bylo provedeno u dvou paralelních vzorků krůtích jater podle postupu uvedeného v kapitole 5.3.5. Z každého filtrátu byla provedena analýza pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitamínu B₂ v $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ jater.

Tabulka 45. Obsah riboflavinu u vzorku krůtích jater s navázkou $m = 16,00 \text{ g}$

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{g}$]	Koncentrace [$\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$]
19,0	0,275	3,434	0,343
21,2	0,315	3,940	0,394
21,0	0,312	3,894	0,389
19,4	0,282	3,526	0,353
19,2	0,278	3,480	0,348

Tabulka 46. Obsah riboflavinu u vzorku krůtích jater s navázkou $m = 16,00 \text{ g}$

Plocha píku [mA.V.s ⁻¹]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{g}$]	Koncentrace [$\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$]
17,9	0,254	3,181	0,318
18,2	0,260	3,250	0,325
18,7	0,269	3,365	0,337
18,6	0,267	3,342	0,334
19,0	0,275	3,434	0,343

6.28 Přesnost stanovení vitamínu B₂ v krůtích játrech metodou HPLC

Analýza vitamínu B₂ v krůtích játrech byla provedena celkem desetkrát. Přesnost stanovení vitamínu B₂ je vyjádřena ve formě standardních statistických metod uvedených v kapitole 4. V tabulce 47 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitamínu B₂ v krůtích játrech.

Tabulka 47. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B₂ v krůtích játrech

Koncentrace [mg. 100g ⁻¹]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
0,343	-0,005	0,00002
0,394	0,046	0,00212
0,389	0,041	0,00171
0,353	0,005	0,00002
0,348	0,000	0,00000
0,318	-0,030	0,00089
0,325	-0,023	0,00053
0,337	-0,012	0,00013
0,334	-0,014	0,00019
0,343	-0,005	0,00002
$\bar{x} = 0,348$		$\Sigma=0,00564$

Průměrný obsah vitamínu B₂ v krůtích játrech byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky s podle vzorce (2). Skutečný obsah vitamínu B₂ stanovovaný metodu HPLC byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 4. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha=0,05$) a při devíti stupních volnosti 2,26 [30].

$$\text{směrodatná odchylka } s = 0,025 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$$

$$\text{Obsah vitamínu B}_2 \text{ v krůtích játrech}$$

$$\mu = 0,348 \pm 0,700 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1} (\alpha=0,05)$$

6.29 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu ve nesterilovaném taveném sýru

Stanovení bylo provedeno u dvou paralelních vzorků tavených sýrů podle postupu uvedeného v kapitole 5.3.6. Z každého filtrátu byla provedena analýza pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitamínu B₂ v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ sýru.

Tabulka 48. Obsah riboflavinu u vzorku nesterilovaného taveného sýru s navázkou

$m = 16,04\text{ g}$

Plocha píku [mA.V.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{g}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$]
16,4	0,227	1,412	0,1412
17,2	0,242	1,506	0,1506
17,5	0,247	1,541	0,1541
16,8	0,234	1,460	0,146
15,9	0,218	1,357	0,1357

Tabulka 49. Obsah riboflavinu u vzorku nesterilovaného taveného sýru s navázkou

$m = 16,10\text{ g}$

Plocha píku [mA.V.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{g}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$]
11,2	0,131	0,815	0,0815
13,7	0,177	1,100	0,1100
14,1	0,185	1,146	0,1146
13,3	0,170	1,055	0,1055
12,8	0,161	0,998	0,0998

6.30 Přesnost stanovení vitamínu B₂ v nesterilovaném taveném sýru metodou HPLC

Analýza vitamínu B₂ v nesterilovaném taveném sýru byla provedena celkem desetkrát. Přesnost stanovení vitamínu B₂ je vyjádřena ve formě standardních statistických metod uvedených v kapitole 4. V tabulce 50 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující

přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitamínu B₂ ve nesterilovaném taveném sýru.

Tabulka 50. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B₂ ve nesterilovaném taveném sýru

Koncentrace [mg. 100g ⁻¹]	$/ x_i - \bar{x} /$	$/ x_i - \bar{x} / ^2$
0,141	0,017	0,0002958
0,151	0,027	0,0007076
0,154	0,030	0,0009060
0,146	0,022	0,0004840
0,136	0,012	0,0001369
0,082	-0,043	0,0018063
0,110	-0,014	0,0001960
0,115	-0,009	0,0000884
0,106	-0,019	0,0003423
0,100	-0,024	0,0005856
$\bar{x} = 0,124$		$\Sigma=0,0055488$

Průměrný obsah vitamínu B₂ ve nesterilovaném taveném sýru byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky s podle vzorce (2). Skutečný obsah vitamínu B₂ stanovovaný metodou HPLC byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 4. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha=0,05$) a při devíti stupních volnosti 2,26 [30].

směrodatná odchylka $s = 0,025 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$

Obsah vitamínu B₂ v nesterilovaném taveném sýru

$\mu = 0,124 \pm 0,700 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1} (\alpha=0,05)$

6.31 Výsledky stanovení obsahu riboflavinu ve sterilovaném taveném sýru vzorek S

Stanovení bylo provedeno u dvou paralelních vzorků sterilovaných tavených sýrů podle postupu uvedeného v kapitole 5.3.6. Z každého filtrátu byla provedena analýza pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitamínu B₂ v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ sýru.

Tabulka 51. Obsah riboflavinu u vzorku sterilovaného taveného sýru s navázkou $m = 16,07\text{ g}$

Plocha píku [mA.V.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{g}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$]
14,7	0,196	1,217	0,1217
14,5	0,192	1,194	0,1194
14,3	0,188	1,171	0,1171
14,1	0,185	1,148	0,1148
15,0	0,201	1,251	0,1251

Tabulka 52. Obsah riboflavinu u vzorku sterilovaného taveného sýru s navázkou $m = 16,10\text{ g}$

Plocha píku [mA.V.s]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Koncentrace [$\mu\text{g}/\text{g}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$]
16,8	0,234	1,217	0,1217
14,9	0,199	1,194	0,1194
15,3	0,207	1,171	0,1171
16,6	0,231	1,148	0,1148
15,8	0,216	1,251	0,1251

6.32 Přesnost stanovení vitamínu B₂ v sterilovaném taveném sýru metodou HPLC

Analýza vitamínu B₂ ve sterilovaném taveném sýru byla provedena celkem desetkrát. Přesnost stanovení vitamínu B₂ je vyjádřena ve formě standardních statistických metod uvedených v kapitole 4. V tabulce 53 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitamínu B₂ ve sterilovaném taveném sýru. . Z každého filtrátu byla provedena analýza pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitamínu B₂ v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ masa.

Tabulka 53. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B₂ ve sterilovaném taveném sýru

Koncentrace [mg. 100g ⁻¹]	$/ x_i - \bar{x} /$	$/ x_i - \bar{x} / ^2$
0,122	0,002	0,0000029
0,119	-0,001	0,0000004
0,117	-0,003	0,0000084
0,115	-0,005	0,0000270
0,125	0,005	0,0000260
0,122	0,002	0,0000029
0,119	-0,001	0,0000004
0,117	-0,003	0,0000084
0,115	-0,005	0,0000270
0,125	0,005	0,0000260
$\bar{x} = 0,120$		$\Sigma=0,0001294$

Průměrný obsah vitamínu B₂ ve sterilovaném taveném sýru byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky s podle vzorce (2). Skutečný obsah vitamínu B₂ stanovovaný metodou HPLC byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 4. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha=0,05$) a při devíti stupních volnosti 2,26 [30].

směrodatná odchylka $s = 0,004\text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$

Obsah vitamínu B₂ v sterilovaném taveném sýru

$\mu = 0,120 \pm 0,280\text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ($\alpha=0,05$)

6.33 Výsledky stanovení vitamínu B₂ u hovězího zadního s přidavkem standardu

Stanovení bylo provedeno u dvou paralelních vzorků. Stanovení bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 5.3.4, kdy bylo ke každému vzorku hovězího zadního přidáno 0,032 mg standardu riboflavinu.

Tabulka 54. Obsah riboflavinu u vzorku hovězího zadního s přidavkem standardu riboflavinu s navázkou $m = 15,99$ g

Plocha píku [mA.V.s]	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]	Koncentrace [$\mu\text{g/g}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$]
42,16	0,701	4,382	0,438
41,55	0,690	4,312	0,431
42,25	0,703	4,392	0,439
41,95	0,697	4,358	0,436
42,03	0,700	4,367	0,437

Tabulka 55. Obsah riboflavinu u vzorku hovězího zadního s přidavkem standardu riboflavinu s navázkou $m = 16,01$ g

Plocha píku [mA.V.s]	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]	Koncentrace [$\mu\text{g/g}$]	Koncentrace [$\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$]
41,98	0,698	4,361	0,436
42,03	0,699	4,367	0,437
42,17	0,701	4,383	0,438
41,83	0,695	4,344	0,434
42,21	0,702	4,387	0,439

6.34 Přesnost stanovení riboflavinu u hovězího zadního s přidavkem známého množství riboflavinu

Analýza vitamínu B₂ u hovězího zadního s přidavkem riboflavinu byla provedena celkem desetkrát. Přesnost stanovení vitamínu B₂ je vyjádřena ve formě standardních statistických metod uvedených v kapitole 4. V tabulce 56 jsou uvedeny statistické parametry charakterizující přesnost provedené kvantitativní analýzy obsahu vitamínu B₂ u hovězího zadního s přidavkem riboflavinu. Z každého filtrátu byla provedena analýza pětkrát.

U každé analýzy byl vypočten dosazením plochy píku do regresní rovnice obsah vitamínu B₂ v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tato hodnota byla přepočtena na $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ masa.

Tabulka 56. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B₂ u hovězího zadního s přidavkem riboflavinu

Koncentrace [mg. 100g ⁻¹]	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
0,438	0,0012	0,000014
0,431	-0,0058	0,0000336
0,439	0,0022	0,0000048
0,436	-0,0012	0,0000014
0,437	-0,0003	0,0000001
0,436	-0,0009	0,0000008
0,437	-0,0003	0,0000001
0,438	0,0013	0,0000017
0,434	-0,0026	0,0000068
0,439	0,0017	0,0000029
$\bar{x} = 0,437$		$\Sigma=0,0000537$

Průměrný obsah vitamínu B₂ u hovězího zadního s přidavkem riboflavinu byl vypočten podle vzorce (1). Dále byl vypočten odhad směrodatné odchylky s podle vzorce (2). Skutečný obsah vitamínu B₂ stanovovaný metodou HPLC byl vypočten podle vzorce (3), který je s ostatními statistickými parametry uveden v kapitole 4. Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti ($\alpha=0,05$) a při devíti stupních volnosti 2,26 [30].

$$\text{směrodatná odchylka } s = 0,002 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$$

Obsah vitamínu B₂ u hovězího zadního s přidavkem riboflavinu

$$\mu = 0,437 \pm 0,198 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1} (\alpha=0,05)$$

Přidavkem 0,032 mg standardu riboflavinu ke vzorku hovězího zadního byla ověřena separační chromatografická metoda HPLC, kdy koncentrace odpovídala součtu koncentraci 16 g hovězího zadního a přidavku riboflavinu přepočteného na 100 g vzorku.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byla izolace vitamínu B₂ stanovení jeho obsahu v živočišných produktech. Jako zástupci živočišných produktů byly použity vzorky vepřového, hovězího masa, jater a tavených sýrů.

Pro stanovení obsahu riboflavinu v živočišných produktech byla použita separační chromatografická metoda vysoceúčinné kapalinové chromatografie HPLC. Separace byla provedena na koloně SUPERCOSIL LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5 μm). Byla použita gradientová eluce mobilní fází o složení 0,12 mol.l⁻¹ octan sodný (pH 4,5 upraveno pomocí 85 % kyseliny mravenčí w/w – složka A) a methanol (složka B) o počátečním poměru 87:13 (A:B) v/v v čase 0 s gradientem uvedeným v tabulce 3. Průtok mobilní fází byl 0,8 ml.min⁻¹ a teplota termostatu kolony 30 °C. Signál byl snímán detektorem UV/VIS DAD při vlnové délce 270 nm. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno za použití chromatografického softwaru ChemStation – Instrument 1 (Agilent Technologies, USA).

Výsledky jednotlivých analýz byly zpracovány pomocí standardních statistických parametrů za využití Studentova rozdělení náhodných odchylek pro daný stupeň volnosti. Výsledky byly testovány na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (95 %).

U vepřové kýty byl naměřen průměrný obsah vitamínu B₂ $0,113 \pm 0,610$ mg. 100g⁻¹, u vepřové pleci byl stanoven průměrný obsah riboflavinu $0,140 \pm 0,280$ mg. 100g⁻¹, u vepřového boku byla zjištěna průměrná hodnota riboflavinu $0,190 \pm 0,610$ mg. 100g⁻¹, u vepřové krkovice byl stanoven průměrný obsah vitamínu B₂ $0,175 \pm 0,626$ mg. 100g⁻¹, u vepřové kotlety byla naměřena průměrná hodnota riboflavinu $0,182 \pm 0,024$ mg. 100g⁻¹.

Průměrný obsah vitamínu B₂ v hovězí kličce byl stanoven $0,229 \pm 0,464$ mg.100g⁻¹, v hovězím předním byla zjištěna průměrná hodnota riboflavinu $0,218 \pm 0,594$ mg.100g⁻¹, u hovězího zadního byl naměřen průměrný obsah vitamínu B₂ $0,196 \pm 0,280$ mg. 100g⁻¹.

Ve vepřových játrech byl zjištěn průměrný obsah riboflavinu $0,292 \pm 0,671$ mg. 100g^{-1} , v hovězích játrech byl stanoven průměrný obsah vitamínu B₂ $0,277 \pm 0,949$ mg. 100g^{-1} . V kuřecích játrech byl určen průměrný obsah riboflavinu $0,567 \pm 0,464$ mg. 100g^{-1} , v krůtích játrech byla zjištěna průměrná hodnota riboflavinu $0,348 \pm 0,700$ mg. 100g^{-1} .

Odborná literatura uvádí množství vitamínu B₂ v těchto zvolených živočišných produktech vyšší, než bylo zjištěno při naší analýze pomocí HPLC. Nižší naměřené hodnoty riboflavinu mohly být způsobeny nedostatečnými podmínkami skladování živočišných produktů, transportem do prodejen nebo přechováváním v prodejních prostorech, kde byly živočišné produkty intenzivně vystaveny světelnému záření. Záření v rozmezí 420 až 560 nm způsobuje rychlý úbytek riboflavinu.

Ve v nesterilovaném taveném sýru byla naměřena průměrná hodnota vitamínu B₂ $0,124 \pm 0,700$ mg. 100g^{-1} . Ve sterilovaném taveném sýru byl stanoven průměrný obsah riboflavinu $0,120 \pm 0,280$ mg. 100g^{-1} .

Jak je na první pohled patrné z výsledku analýz, ve vzorku sterilovaného taveného sýru byl naměřen nižší obsah riboflavinu, a to o $0,004$ mg. 100g^{-1} . Z těchto výsledků lze jasně vyvodit, že vitamín B₂ se tavením při vyšší teplotě prakticky neztrácí, což je také dáno jeho termostabilitou.

Přídavkem standardu riboflavinu k hovězímu zadnímu byla ověřena spolehlivost uvedeného izolačního postupu a chromatografické separační metody HPLC. Bylo přidáno stejné množství standardu vitamínu B₂ jako byl zjištěn průměrný obsah riboflavinu v hovězí masě. U hovězího zadního byla stanovena hodnota riboflavinu $0,196 \pm 0,280$ mg. 100g^{-1} . U vzorku hovězího zadního s přídavkem standardu riboflavinu byla stanovena průměrná hodnota vitamínu B₂ $0,437 \pm 0,198$ mg. 100g^{-1} .

Diplomová práce, která zahrnuje izolační i separační postup vitamínu B₂ ze živočišných produktů, může být následně použita např. pro sledování různých kulinárních úprav mas a masných výrobků, které by potenciálně mohly ovlivnit jeho obsah v dané potravíně.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] **DAVÍDEK, J. a kolektiv.: Chemie potravin.**
1. vydání. Praha: STNL, 1983. 632 s.
- [2] **HLÚBIK, P., OPLTOVÁ, L.: Vitaminy.**
1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2004. ISBN 80-247-0373-4.
- [3] **VELÍŠEK, J.: Chemie potravin 2.**
VŠCHT Praha, Tábor: OSSIS, 1999.
- [4] **PÁNEK, J., POKORNÝ, J., DOSTÁLOVÁ, J.: Základy výživy a výživová politika.** 1. vydání. Praha: VŠCHT, 2002. 219 s. ISBN 80-7080-468-8.
- [5] **HENRY, C. J. K., CHAPMAN, C.: Nutrition Handbood for Food Processors.**
Woodhead Publishing, 2002. 416 p. ISBN 1-85573-665-9.
- [6] **VELÍŠEK, J.: Chemie potravin 3.**
VŠCHT Praha, Tábor: OSSIS, 1999.
- [7] **NADACE NUTRIVIT: Vitamin B₂ [online].**
Dostupný z www: <<http://www.HZP.cz/>>
- [8] **CABALLERO, B., ALLEN, L.: Encyclopedia of Human Nutrition**
Oxford, UK: Elsevier, 2005.
- [9] **KAŠČÁK, J., PRÍBELA, A.: Rukovät konzervárenského technológa.**
2. vydání. Bratislava: Slovenská spoločnosť pre racionálnu výživu, 1969. 416s.
- [10] **PAULUS, J., CIDLINSKÝ, L.: Ztráty při kuchyňské přípravě pokrmů.**
2. vydání. Praha: Merkur, 1989. 160 s.
- [11] **ČIPERA, P., KREUZIGER, J.: Základy technologie přípravy stravy.**
1. vydání. Vyškov: VVŠ PV, 2000. 54 s.
- [12] **HRABĚ, J., KOMÁR, A.: Technologie, zbožiznalství a hygieny potravin III.**
část – Technologie, zbožiznalství a hygiena potravin rostlinného původu.
1. vydání. Vyškov: VVŠ PV, 2003. 168s. ISBN 80-7231-107-7.
- [13] **RYLEY, J., KAJDA, P.: Vitamins in thermal processing.**
Food Chemistry, 1994, vol. 49. p.119-129.

- [14] **Ztráty vitamínů v potravinách [online].**
Dostupný z www: <<http://www.Ordinace.cz/>>
- [15] **WERNER, R., MANTHEY, K.C.: HepG2 cells signs of riboflavin deficiency within 4 days of culture in riboflavin – deficient medium.**
The Journal of Nutritional Biochemistry, 2005, vol. 16. p. 617- 624.
- [16] **Mc CORMICK, D. B.: Riboflavin [online].**
Dostupný z www: <[http://LinusPaulingInstitute's MicronutrientInformation.htm](http://LinusPaulingInstitute's%20MicronutrientInformation.htm)>
- [17] **Vitaminy a minerály přehled [online].**
Dostupný z www: <<http://kzw.cz>>
- [18] **PATOČKOVÁ, M.: Riboflavin [online].**
Dostupný z www: <<http://www.Ordinace.cz/>>
- [19] **ROUGHEAD, Z. K., Mc CORMICK, D. B.: Metody stanovení ve vodě rozpustných vitamínů [online].**
Dostupný z www: <<http://sweb.cz/HPLC1/vitamin.htm/>>
- [20] **PRÍBELA, A.: Analýza přírodních látek v potravinách.**
1. vydání. Bratislava: ALFA, 1978. 432 s.
- [21] **PACÁKOVÁ, A., ŠTULÍK, K.: Vysokoučinná kapalinová chromatografie.**
UK, Praha. Praha: SPN, 1986.
- [22] **SOMMER, L.: Teoretické základy analytické chemie III.**
Brno: FCH VUT, 1995.
- [23] **KLOUDA, P.: Moderní analytické metody.**
1. vydání. Ostrava: Nakladatelství Petr Klouda, 1996.
- [24] **NĚMEC, M.: Diplomová práce.**
UK Praha, Farmaceutická fakulta Hradec Králové, 2004.
- [25] **MASOPUST, J.: Patobiochemie buňky.**
Praha: 2. lékařská fakulta, 2003.
- [26] **Vysokoučinná kapalinová chromatografie dosahuje vysoké účinnosti a rychlosti dělení látek [online].**
Dostupný z www: <<http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/2006/hypertext/htm/>>

[27] **CHURÁČEK, J., FERENČÍK, M.: Biochemické laboratorní metody.**

Praha: Alfa, 1981.

[28] **CHURÁČEK, J., JANDERA, P.: Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie.**

Praha: SNTL, 1984.

[29] **LIKEŠ, J., LAGA, J.: Základní statistické tabulky.**

Praha: SNTL, 1978.

[30] **HENDL, J.: Přehled statistických metod zpracování dat: Analýza a metaanalýza.**

Praha: Portál, 2005. 2. vydání, 586 s.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HPLC Vysocúčinná kapalinová chromatografie

FMN Flavinmononukleotid

FAD Flavinadenindinukleotid

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Struktura vitamínu B ₂	11
Obr. 2. Flavinmononukleotid, FMN.....	11
Obr. 3. Flavinadeninukleotid, FAD.....	12
Obr. 4. Oxidované a redukované formy riboflavinu	12
Obr. 5. Fotolýza riboflavinu	14

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Obsah riboflavinu ve vybraných potravinách [6].....	16
Tabulka 2. Kvantily $t(n)$ Studentova rozdělení o n stupních volnosti [29]	28
Tabulka 3. Gradient mobilní fáze pro stanovení riboflavinu metodou HPLC	33
Tabulka 4. Přídavek 50 % kyseliny trichloroctové v 50. minutě záhřevu	35
Tabulka 5. Přídavek 50 % kyseliny trichloroctové v 50. minutě ohřevu a v 60. minutě ohřevu	35
Tabulka 6. Přídavek 80 % kyseliny trichloroctové v 50. minutě záhřevu	35
Tabulka 7. Přídavek 80 % kyseliny trichloroctové v 50. minutě ohřevu a v 60. minutě ohřevu	36
Tabulka 8. Přídavek 80 % kyseliny trichloroctové v 50. minutě záhřevu	36
Tabulka 9. Přídavek 80 % kyseliny trichloroctové v 50. minutě ohřevu a v 60. minutě ohřevu	37
Tabulka 10. Přídavek 50 % kyseliny trichloroctové v 50. minutě ohřevu	37
Tabulka 11. Kalibrace riboflavinu	38
Tabulka 12. Obsah riboflavinu u vzorku vepřové kýty s navázkou $m = 15,99$ g	40
Tabulka 13. Obsah riboflavinu u vzorku vepřové kýty s navázkou $m = 16,01$ g	40
Tabulka 14. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B_2 ve vepřové kýtě.....	40
Tabulka 15. Obsah riboflavinu u vzorku vepřové pleci s navázkou $m = 15,98$ g.....	41
Tabulka 16. Obsah riboflavinu u vzorku vepřové pleci s navázkou $m = 15,99$ g.....	42
Tabulka 17. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B_2 ve vepřové pleci.....	42
Tabulka 18. Obsah riboflavinu u vzorku vepřovém boku s navázkou $m = 15,99$ g	43
Tabulka 19. Obsah riboflavinu u vzorku vepřovém boku s navázkou $m = 16,00$ g	43
Tabulka 20. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B_2 ve vepřovém boku.....	44
Tabulka 21. Obsah riboflavinu u vzorku vepřové krkovičky s navázkou $m = 16,01$ g	45
Tabulka 22. Obsah riboflavinu u vzorku vepřové krkovičky s navázkou $m = 16,01$ g	45
Tabulka 23. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B_2 ve vepřové krkovičky	46
Tabulka 24. Obsah riboflavinu u vzorku vepřové kotlety s navázkou $m = 16,00$ g	47
Tabulka 25. Obsah riboflavinu u vzorku vepřové kotlety s navázkou $m = 15,99$ g	47
Tabulka 26. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B_2 ve vepřové kotletě.....	47
Tabulka 27. Obsah riboflavinu u vzorku hovězí klišky s navázkou $m = 16,00$ g.....	48
Tabulka 28. Obsah riboflavinu u vzorku hovězí klišky s navázkou $m = 16,03$ g.....	49
Tabulka 29. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B_2 v hovězí klišce	49

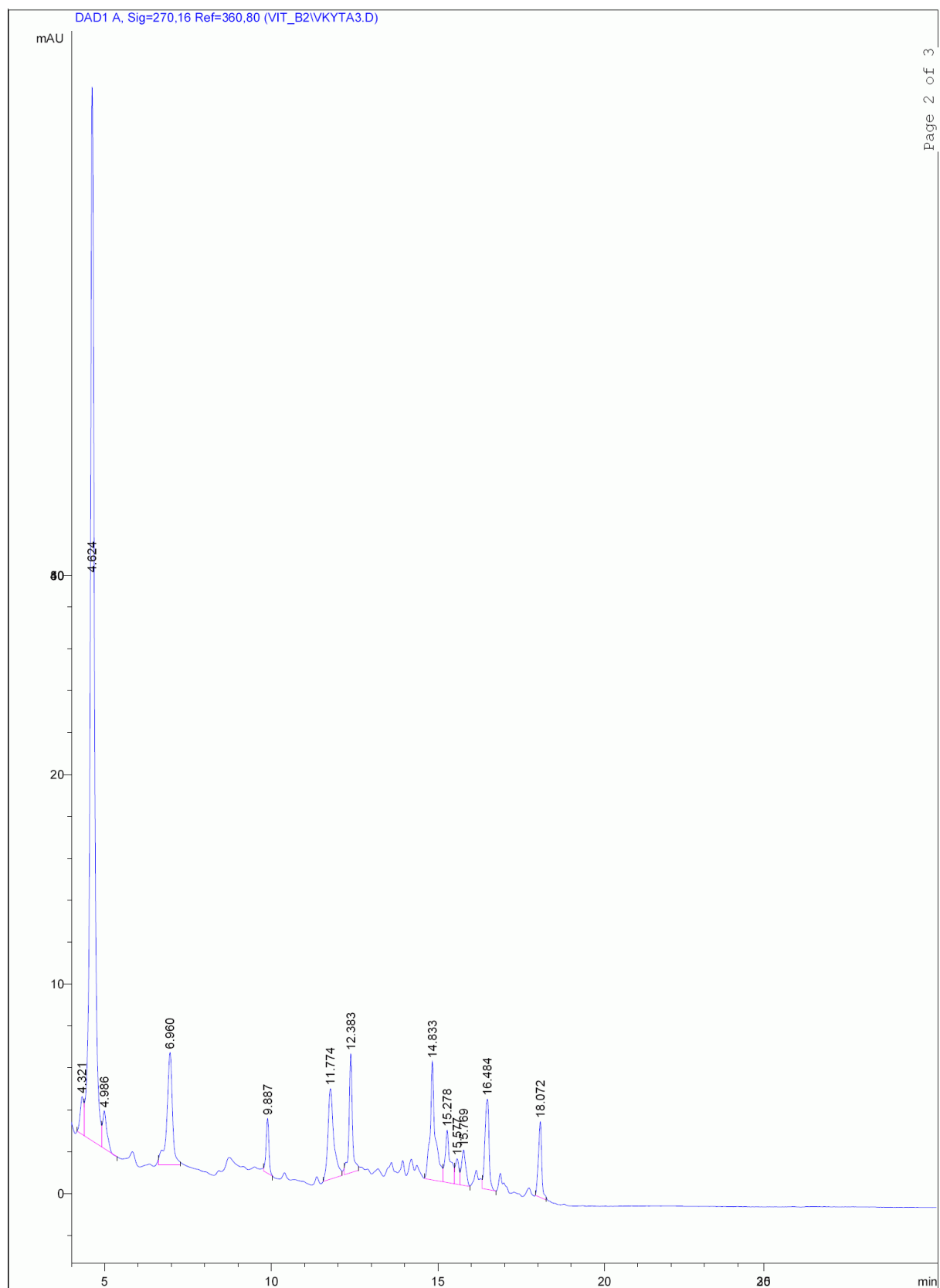
Tabulka 30. Obsah riboflavinu u vzorku hovězího předního s navázkou m = 16,00 g.....	50
Tabulka 31. Obsah riboflavinu u vzorku hovězího předního s navázkou m = 16,03 g.....	50
Tabulka 32. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B ₂ v hovězím předním	51
Tabulka 33. Obsah riboflavinu u vzorku hovězího zadního s navázkou m = 16,01 g	52
Tabulka 34. Obsah riboflavinu u vzorku hovězího zadního s navázkou m = 15,98 g	52
Tabulka 35. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B ₂ v hovězím zadním.....	53
Tabulka 36. Obsah riboflavinu u vzorku vepřových jater s navázkou m = 16,02 g	54
Tabulka 37. Obsah riboflavinu u vzorku vepřových jater s navázkou m = 16,07 g	54
Tabulka 38. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B ₂ ve vepřových játrech.....	55
Tabulka 39. Obsah riboflavinu u vzorku hovězích jater s navázkou m = 15,98 g.....	56
Tabulka 40. Obsah riboflavinu u vzorku hovězích jater s navázkou m = 16,01 g.....	56
Tabulka 41. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B ₂ v hovězích játrech	56
Tabulka 42. Obsah riboflavinu u vzorku kuřecích jater s navázkou m = 16,03 g.....	57
Tabulka 43. Obsah riboflavinu u vzorku kuřecích jater s navázkou m = 15,99 g.....	58
Tabulka 44. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B ₂ v kuřecích játrech.....	58
Tabulka 45. Obsah riboflavinu u vzorku krůtích jater s navázkou m = 16,00 g	59
Tabulka 46. Obsah riboflavinu u vzorku krůtích jater s navázkou m = 16,00 g	59
Tabulka 47. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B ₂ v krůtích játrech	60
Tabulka 48. Obsah riboflavinu u vzorku nesterilovaného taveného sýru s navázkou	61
Tabulka 49. Obsah riboflavinu u vzorku nesterilovaného taveného sýru s navázkou	61
Tabulka 50. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B ₂ ve nesterilovaném taveném sýru.....	62
Tabulka 51. Obsah riboflavinu u vzorku sterilovaného taveného sýru s navázkou m = 16,07 g	63
Tabulka 52. Obsah riboflavinu u vzorku sterilovaného taveného sýru s navázkou m = 16,10 g	63
Tabulka 53. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B ₂ ve sterilovaném taveném sýru	64
Tabulka 54. Obsah riboflavinu u vzorku hovězího zadního s přidavkem standardu riboflavinu s navázkou m = 15,99 g	65
Tabulka 55. Obsah riboflavinu u vzorku hovězího zadního s přidavkem standardu riboflavinu s navázkou m = 16,01 g	65
Tabulka 56. Přesnost stanovení obsahu vitamínu B ₂ u hovězího zadního s přidavkem riboflavinu.....	66

SEZNAM PŘÍLOH

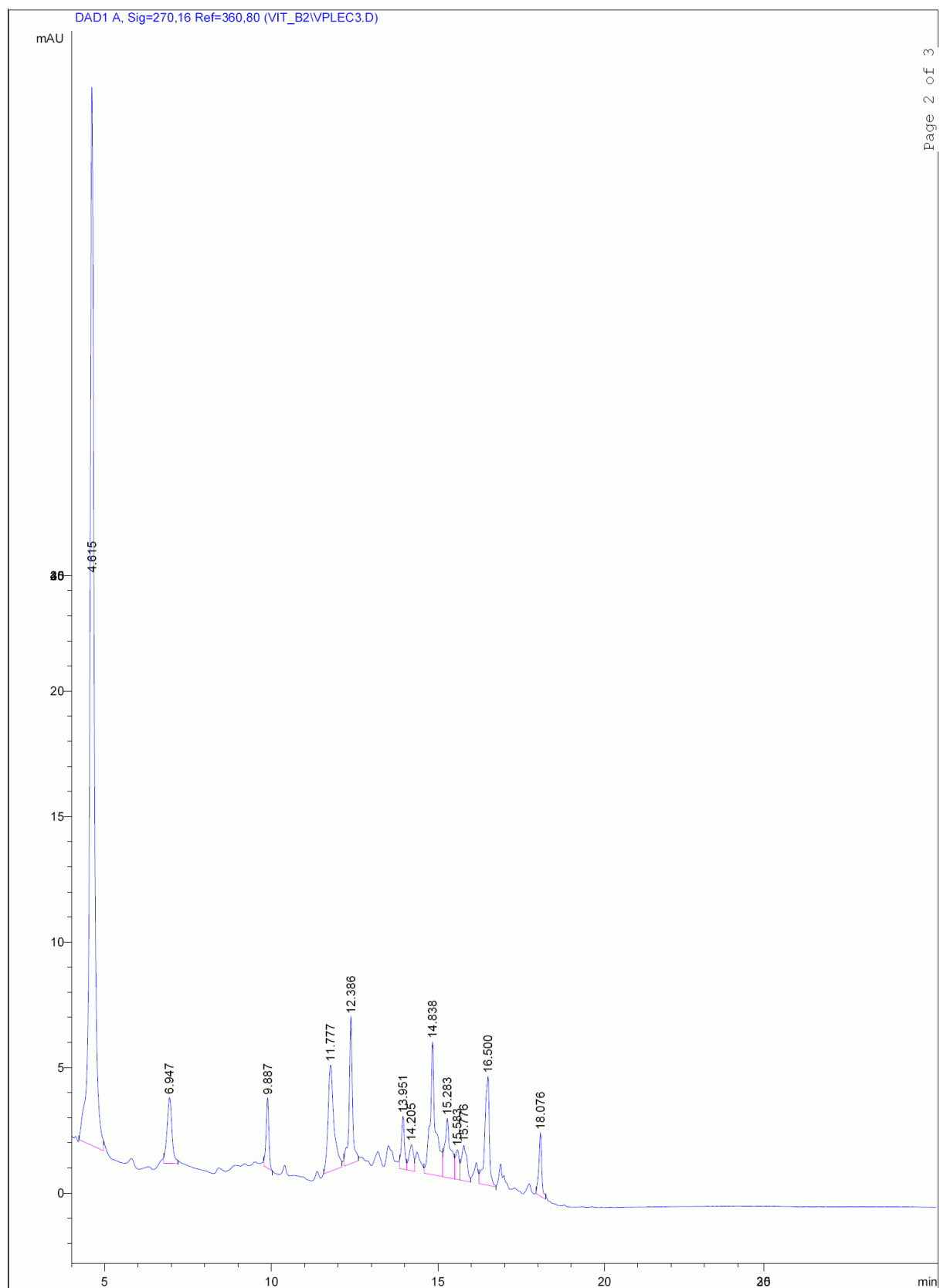
- P I. STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU VE VEPŘOVÉ KÝTĚ METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.**
- P II. STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU VE VEPŘOVÉ PLECI METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.**
- P III. STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU VE VEPŘOVÉM BOKU METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.**
- P IV. STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU VE VEPŘOVÉ KRKOVICI METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.**
- P V. STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU VE VEPŘOVÉ KOTLETĚ METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.**
- P VI. STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V HOVĚZÍ KLIŽCE METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.**
- P VII. STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V HOVĚZÍM PŘEDNÍM METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.**
- P VIII. STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V HOVĚZÍM ZADNÍM METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.**
- P IX. STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU VE VEPŘOVÝCH JÁTRECH METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.**
- P X. STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V HOVĚZÍCH JÁTRECH METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.**
- P XI. STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V KUŘECÍCH JÁTRECH METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.**
- P XII. STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V KRŮTÍCH JÁTRECH METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.**

**P XIII. STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V NESTERIOVANÉM TAVENÉM
SÝRU METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.**

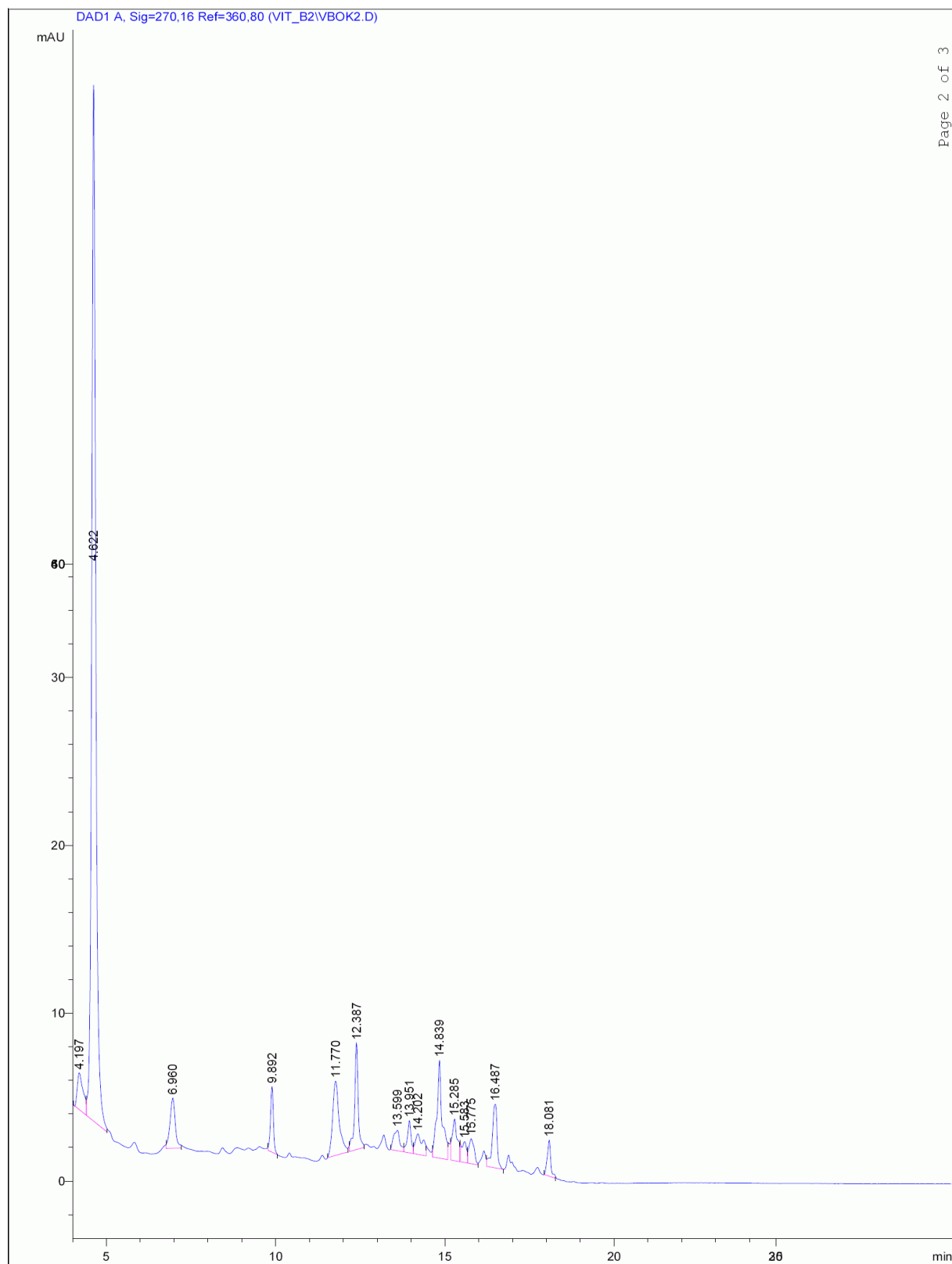
**P XIV. STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU VE STERIOVANÉM TAVENÉM
SÝRU METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.**

**PŘÍLOHA P I.: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU VE VEPŘOVÉ
KÝTĚ METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.**

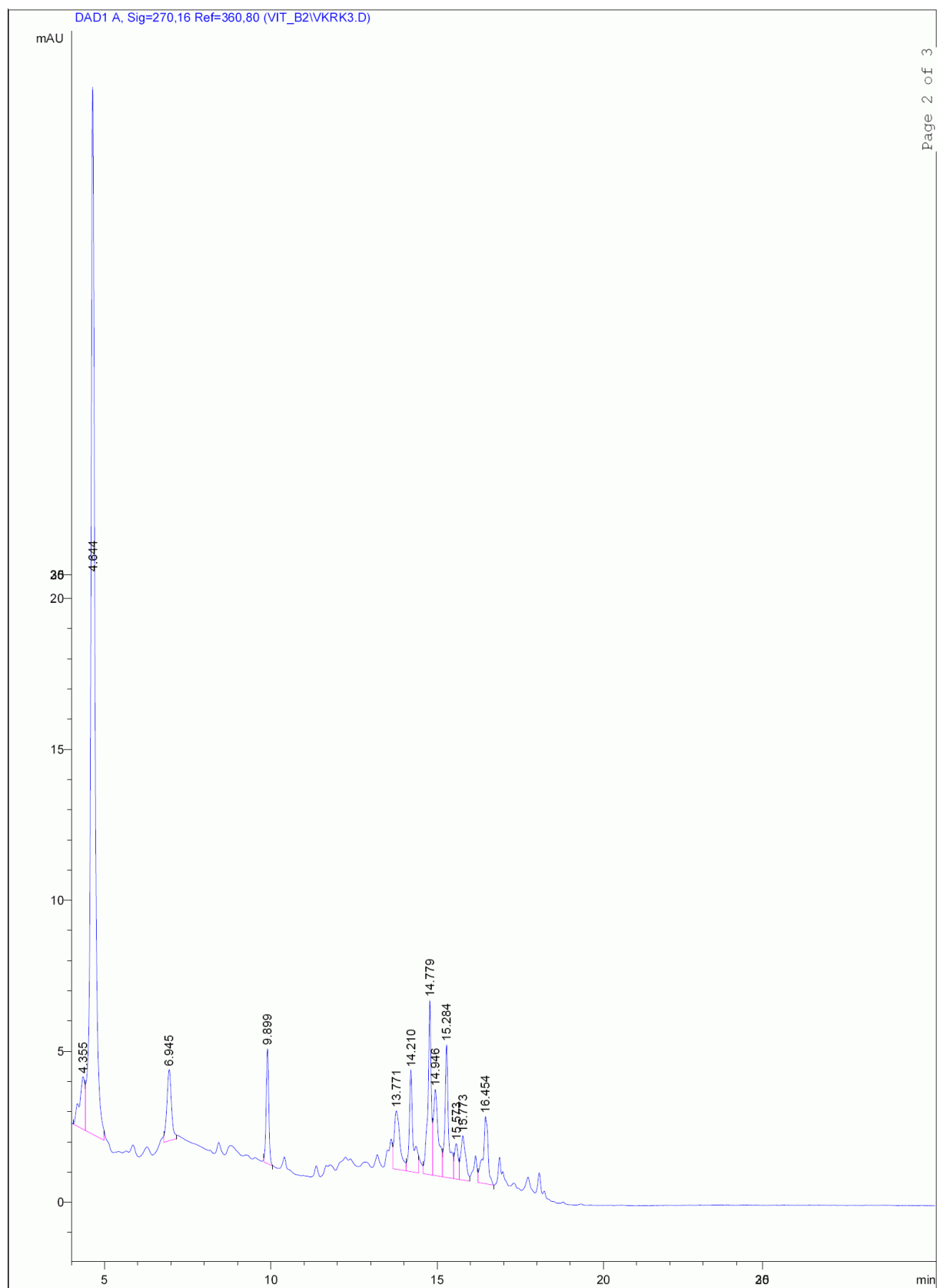
PŘÍLOHA P II.: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU VE VEPŘOVÉ PLECI METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.



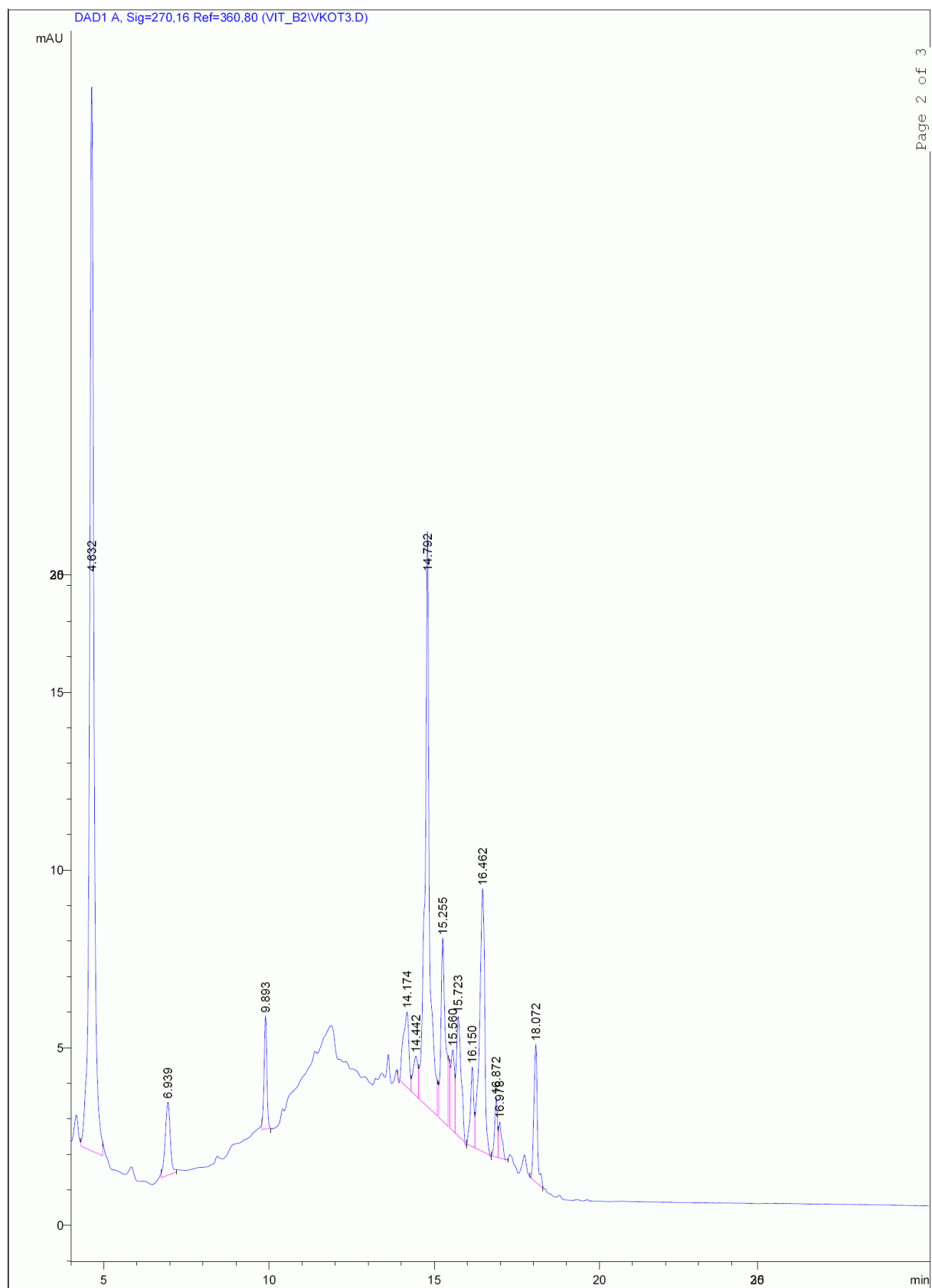
PŘÍLOHA P III.: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU VE VEPŘOVÉM BOKU METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.



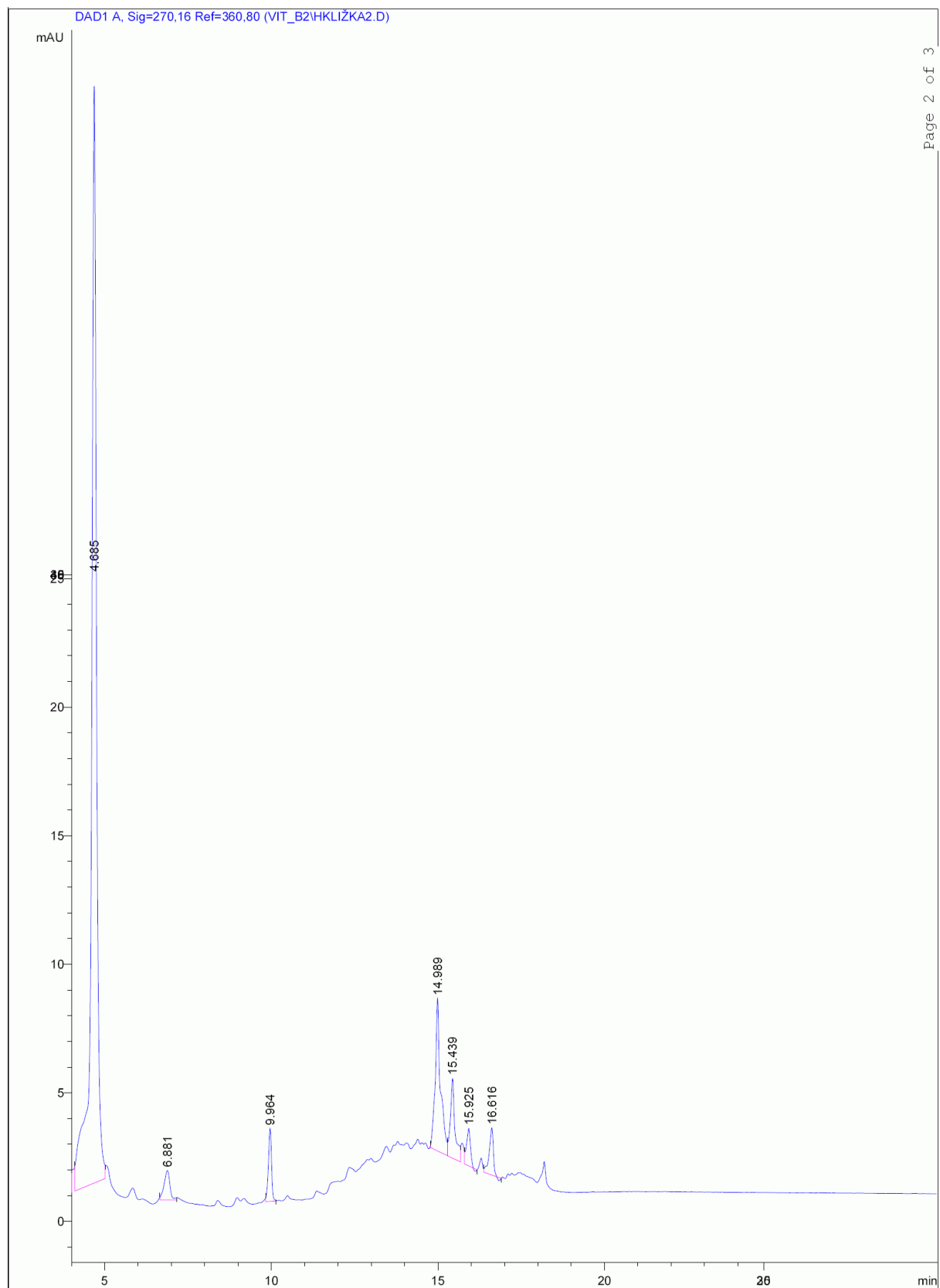
PŘÍLOHA P IV.: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU VE VEPŘOVÉ KRKOVICI METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.



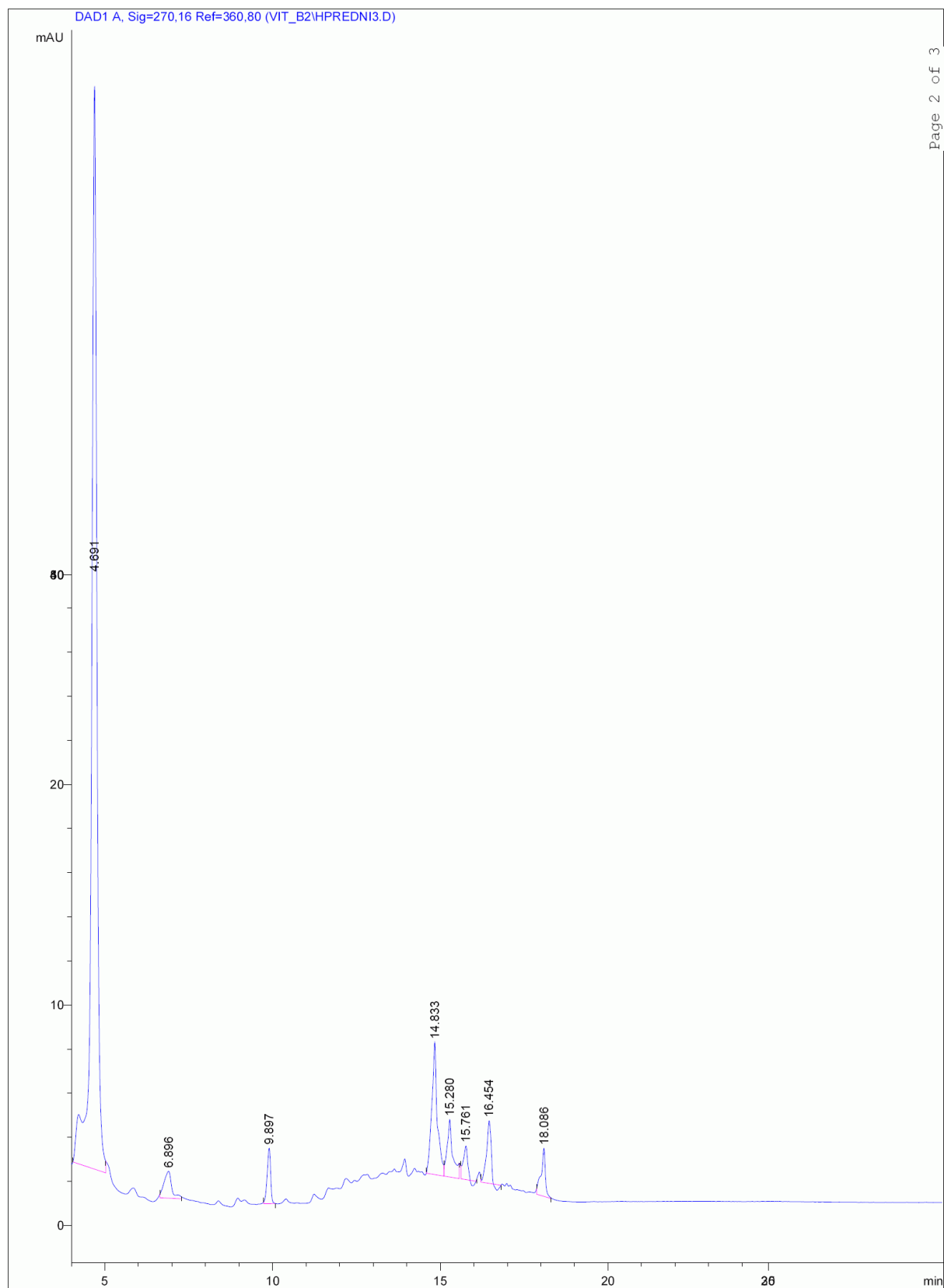
PŘÍLOHA P V.: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU VE VEPŘOVÉ KOTLETĚ METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.



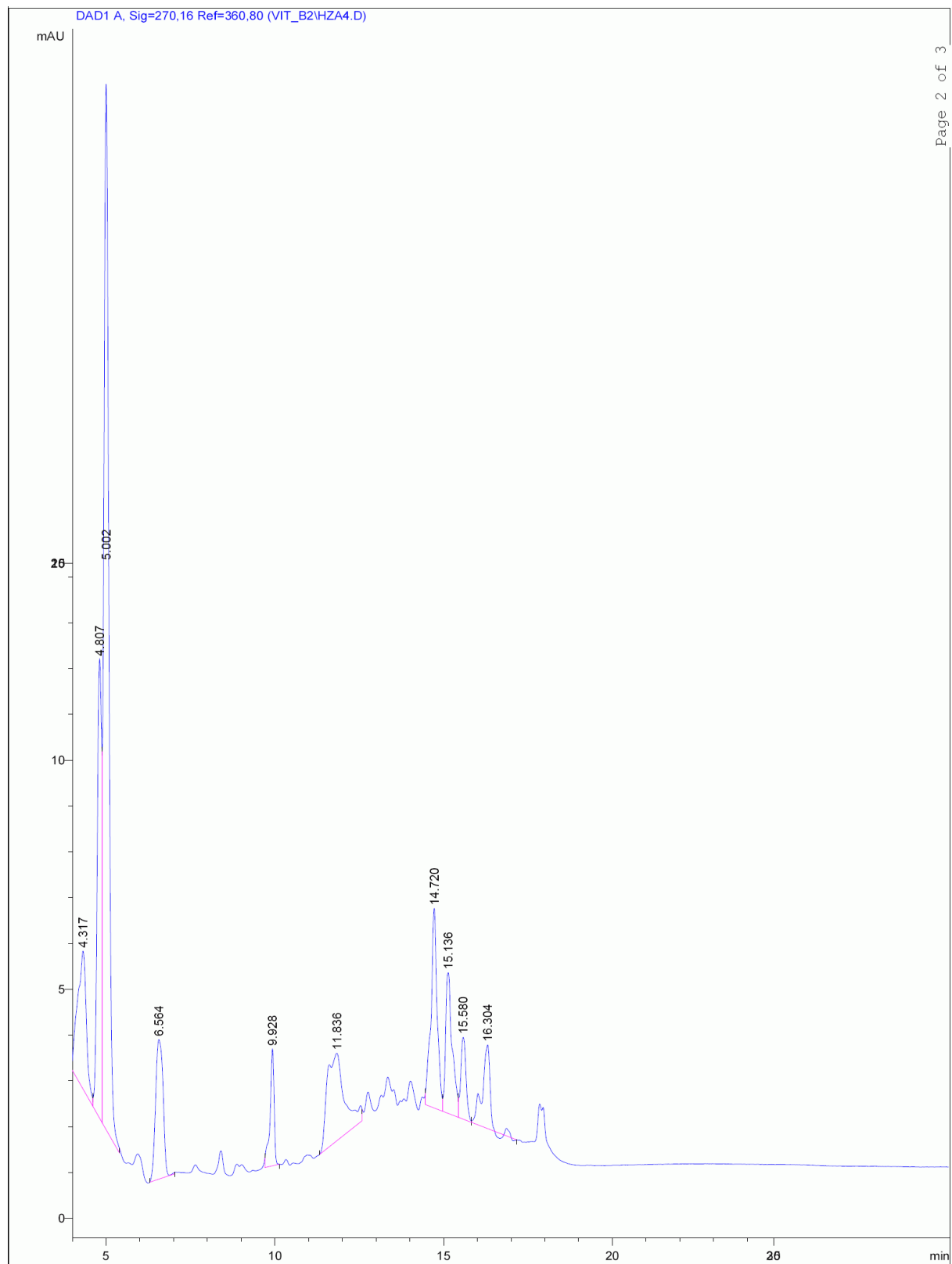
PŘÍLOHA P VI.: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V HOVĚZÍ KLIŽCE METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.



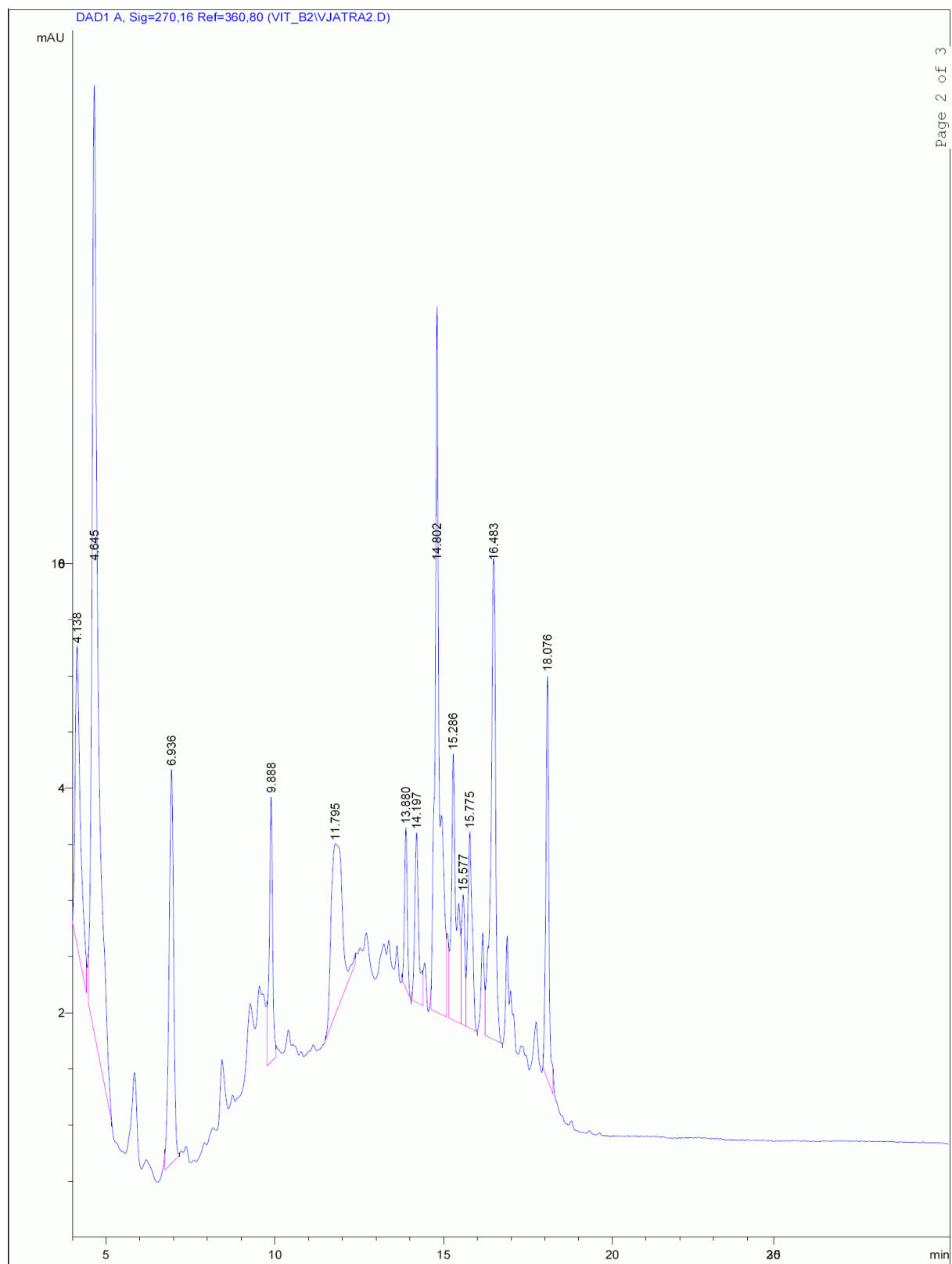
PŘÍLOHA P VII.: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V HOVĚZÍM PŘEDNÍM METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.



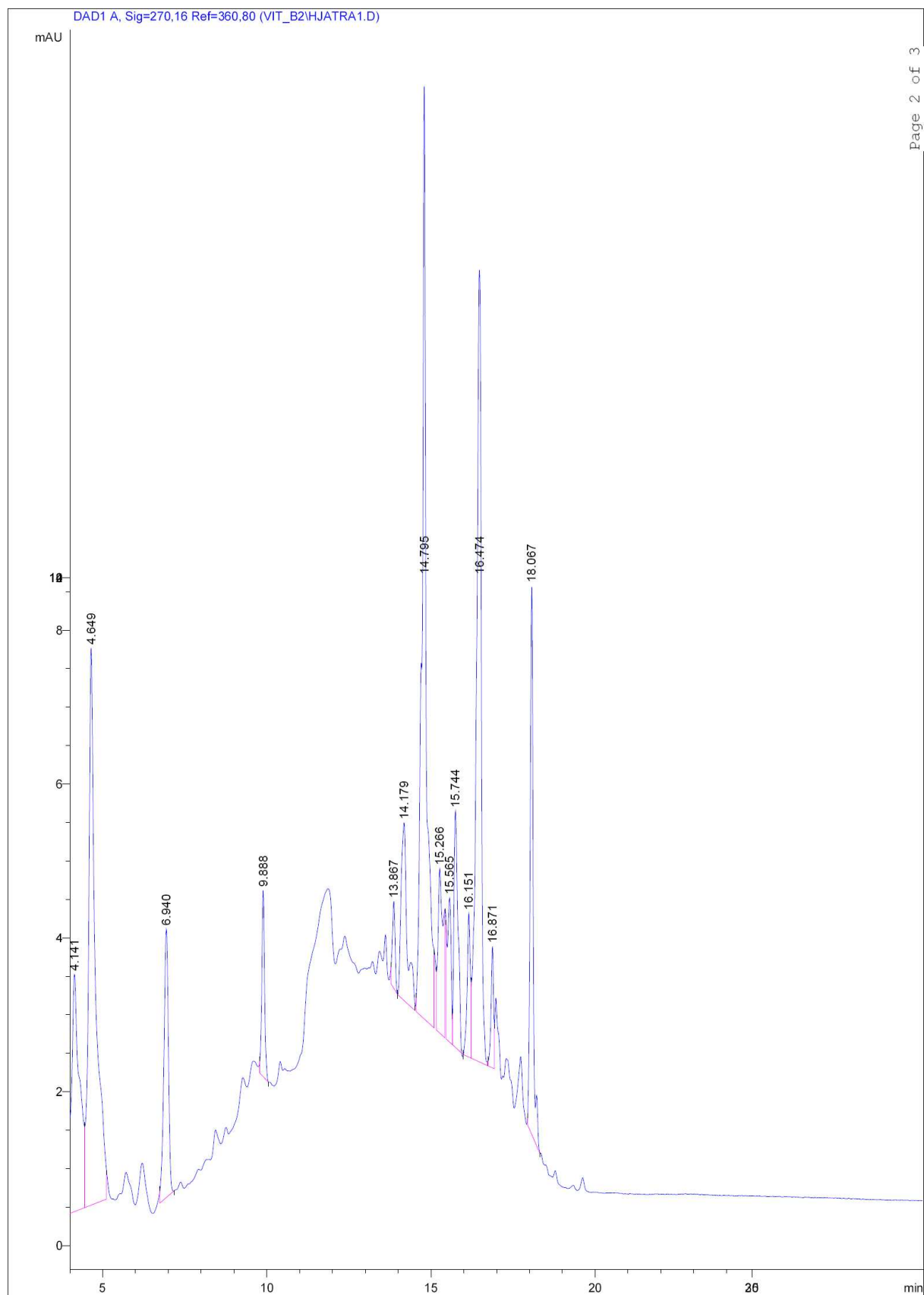
PŘÍLOHA P VIII.: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V HOVĚZÍM ZADNÍM METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.



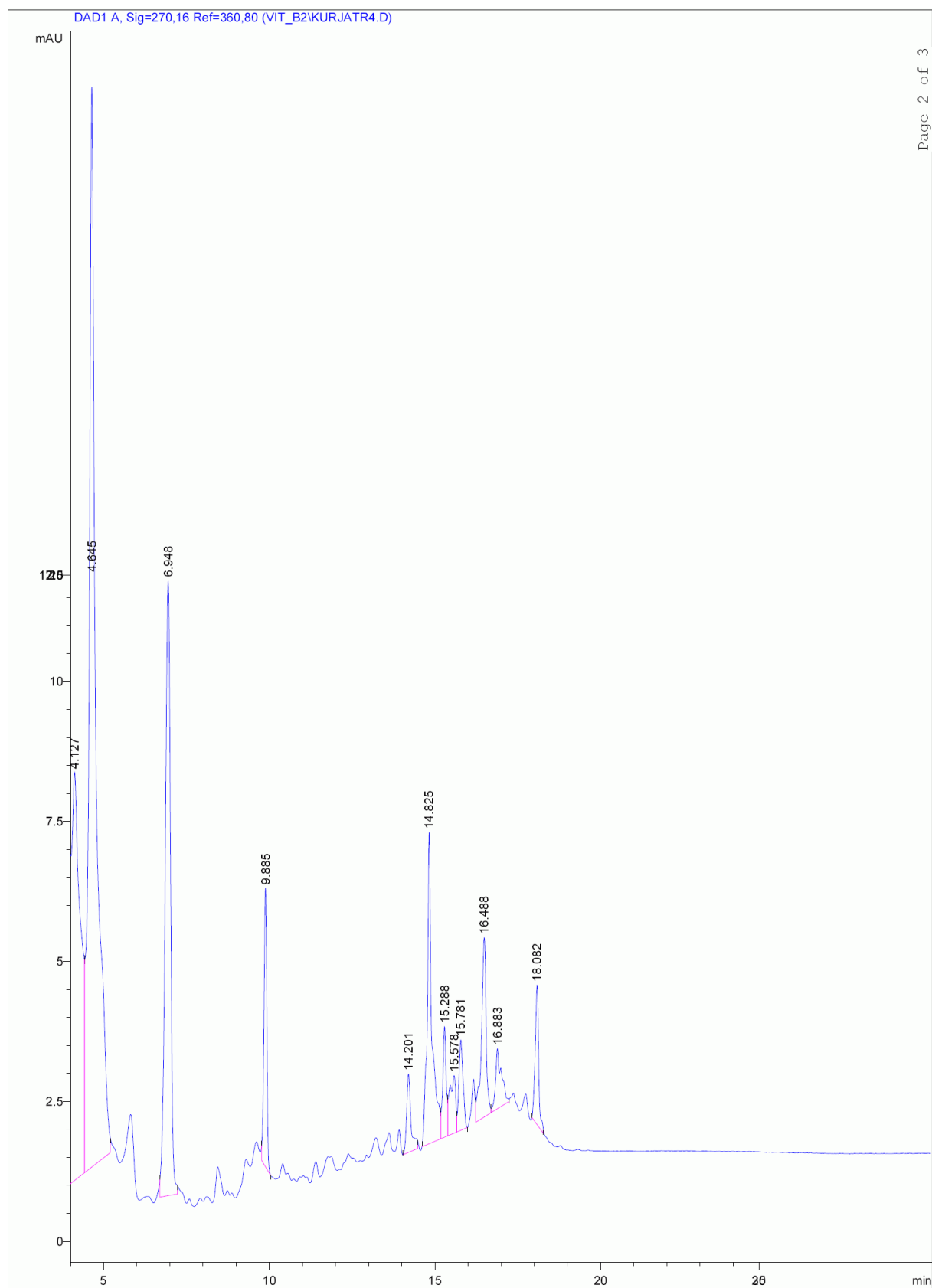
PŘÍLOHA P IX.: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU VE VEPŘOVÝCH JÁTRECH METODOU HPLC NA KOLONĚ SPELCOFIL LC8.

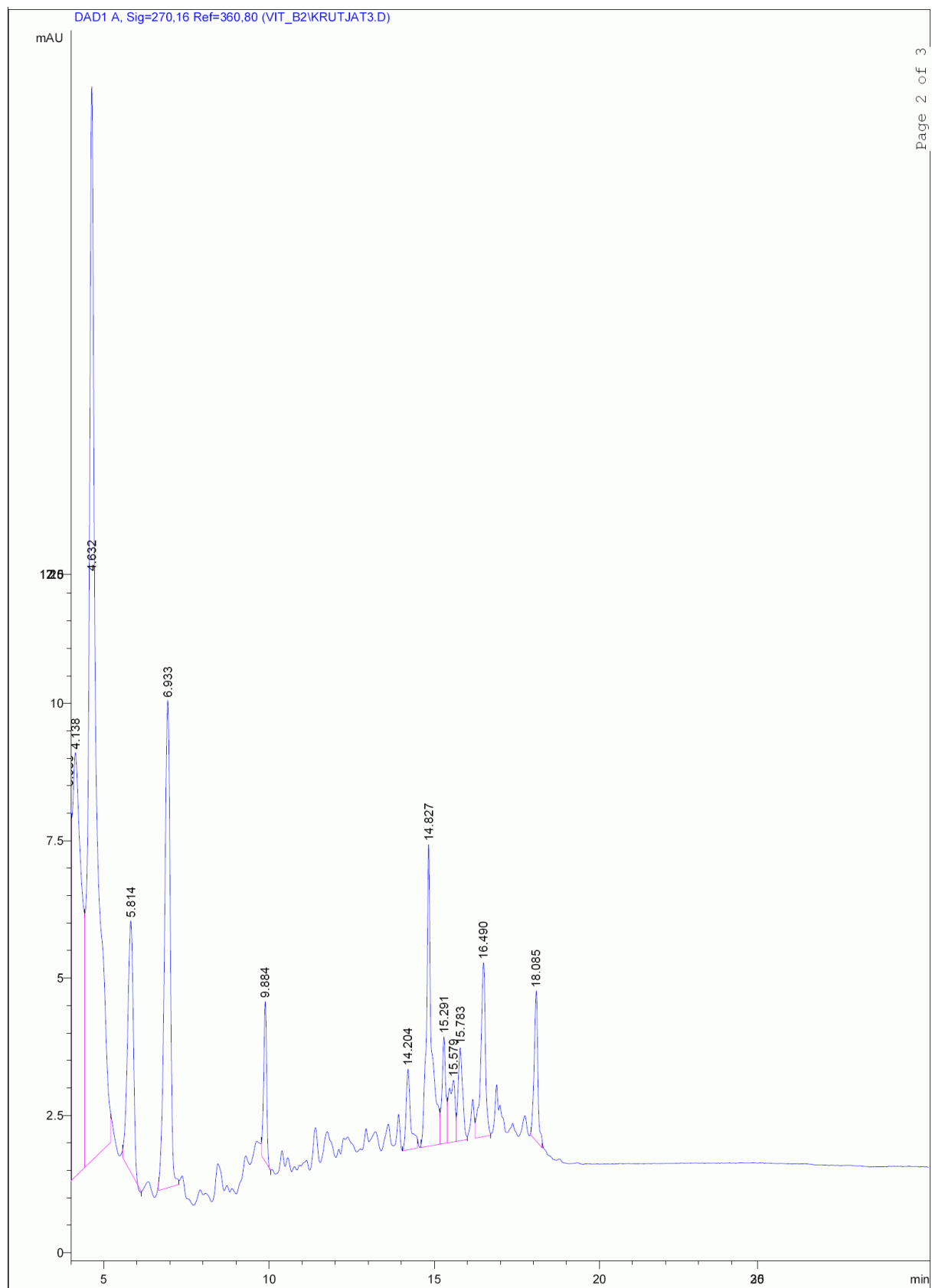


PŘÍLOHA P X.: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V HOVĚZÍCH JÁTRECH METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.

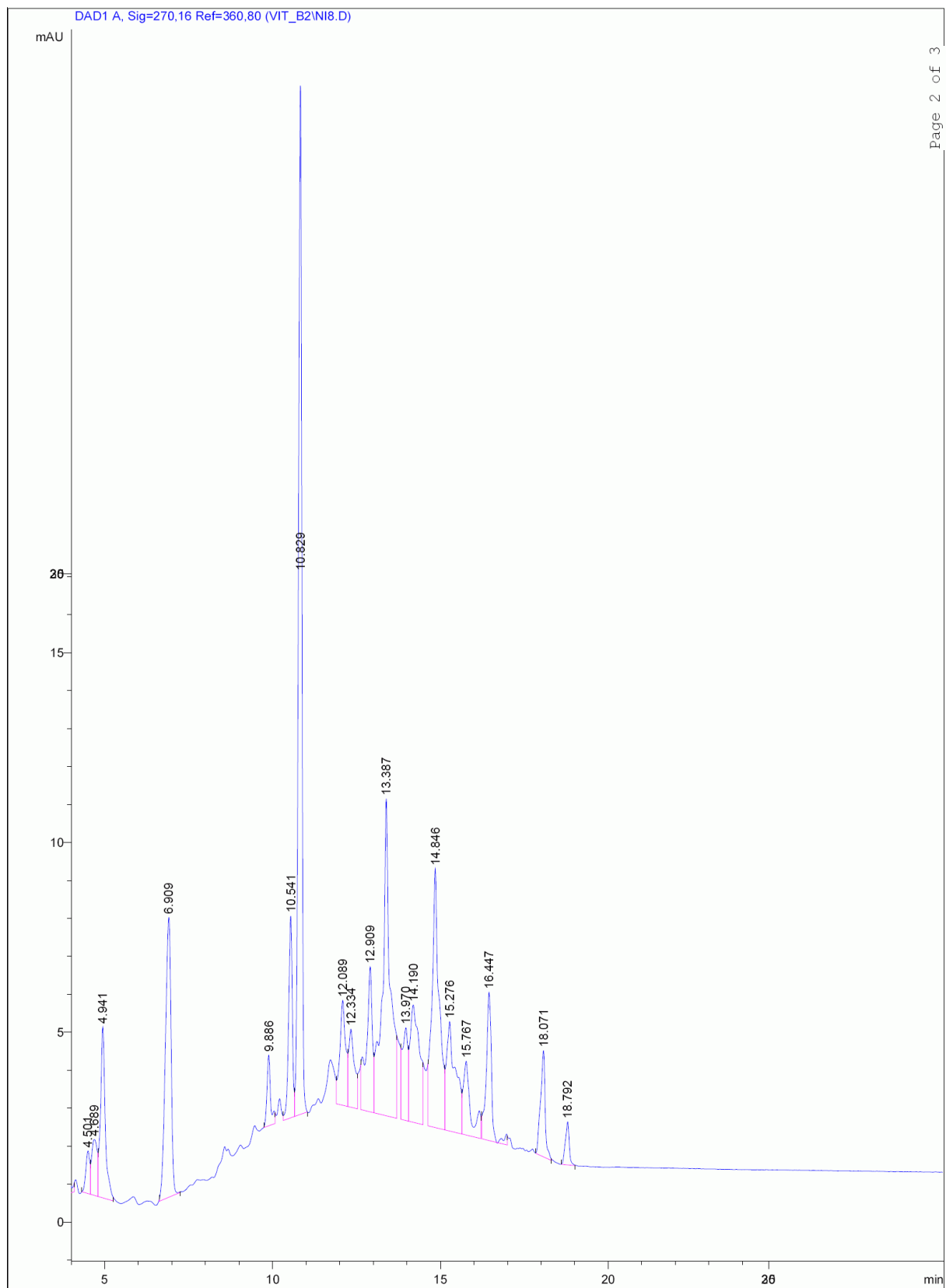


PŘÍLOHA P XI.: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V KUŘECÍCH JÁTRECH METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.



**PŘÍLOHA P XII.: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V KRŮTÍCH
JÁTRECH METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.**

PŘÍLOHA P XIII.: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU V NESTERIOVANÉM TAVENÉM SÝRU METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.



PŘÍLOHA P XIV.: STANOVENÍ OBSAHU RIBOFLAVINU VE STERILOVANÉM TAVENÉM SÝRU METODOU HPLC NA KOLONĚ SUPELCOSIL LC8.

