Stanovení B-komplexu v pivu

Bc. Alžběta Stašková

Diplomová práce
2011

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav biochemie a analýzy potravin
akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Bc. Alžběta STAŠKOVÁ**
Osobní číslo:	**T09562**
Studijní program:	**N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Téma práce:	**Stanovení B-komplexu v pivu**

Zásady pro vypracování:

Teoretická část:

1. **shrnout druhy piv a udělat stručný přehled pivovarů na území ČR.**
2. **stručně zpracovat chemizmus vitaminů sk. B.**
3. **popsat základy/principy kapalinové chromatografie**

Praktická část:

1. **vlastní stanovení vitaminů B ve vzorcích piva z obchodní sítě.**
2. **vyhodnocení výsledků z pohledu konzumenta.**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1]HLÁDEK, L. Pivovarnictví. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 2007. 208 s. ISBN 978-80-247-1616-9 +vyhláška 335/1997 Sb. [2] KLOUDA, P. Moderní analytické metody. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2. [3] ANDRE'S-LACUEVA, C, MATTIVI, F, TONON, D Determination of Ribofla-vin, Flavin Mononucleotide And Flavin? Adenine Dinucleotide in Wine and Other Beverages By High Performance Liquid Chromatography with Fluorescen-ce Detection. Journal of Chromatography A, 1998 vol. 823. p. 355 ? 363, ISSN: 0021-9673 [4]M. JACKSON Encyklopedie piva, Quarto Publishing 1988, ISBN 80-85769-37-9

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Daniela Sumczynski, Ph.D.**
Ústav biochemie a analýzy potravin

Datum zadání diplomové práce: **25. února 2011**

Termín odevzdání diplomové práce: **20. května 2011**

Ve Zlíně dne 21. března 2011

L.S.

UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ
Fakulta technologická

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan

doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Staskova Alžběta Obor: THEVP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 20.5.2011

Staská Alžbeta

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Abstrakt česky

Diplomová práce je zaměřena na stanovení vitaminů skupiny B pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve vybraných vzorcích piva. Byly vyzkoušeny možnosti úpravy vzorků a nalezeny optimální chromatografické podmínky pro jejich analýzu. Bylo stanoveno množství vitaminů skupiny B ve vybraných vzorcích a získané hodnoty byly porovnány s publikovanou literaturou.

Klíčová slova: pivo, HPLC, vitaminy

ABSTRACT

The master thesis is focused on the group B vitamins by high performance liquid chromatography in selected samples of beer. Treatment options have been tested samples and found optimal conditions for their chromatographic analysis. It was the quantity of B-vitamins in selected samples and the values were compared with the published literature.

Keywords: Beer, HPLC, vitamins

Tímto bych ráda poděkovala Ing. et Bc. Daniele Sumczynski, PhD. za poskytnutí cenných rad a odborné vedení při vypracovávání diplomové práce. Děkuji i své rodině za podporu během studia.

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

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

OBSAH

ÚVOD

Pivo je kvašený slabě alkoholický nápoj vyráběný z obilného sladu, vody a chmele pomocí pivovarských kvasinek. Pivo je ceněné pro svoji nutriční hodnotu, především vhodnou vyváženost iontů a minerálních látek, vitaminů a polyfenolů s antioxidačním účinkem. Příznivé účinky piva na lidský organismus se mohou projevit při jeho střídmé konzumaci, kdy nepřevažují negativní účinky alkoholu.
V České republice má mnohaletou tradici výroba tradičních piv typu ležáku. Vyrazná modernizace dnešního pivovarnictví vedla v letech 1990 - 1995 ke značné koncentraci výroby, k rozvoji velkých pivovarských společností, k zániku mnoha menších pivovarů a otevření několika desítek minipivovarů.

B-komplex je souhrnné označení pro vitaminy skupiny B. Jsou to ve vodě rozpustné vitamíny, nezbytné pro správné fungování metabolizmu. Hlavním zdrojem vitamínu skupiny B jsou kvasnice, maso, sýry, celozrnné obiloviny, luštěniny a ořechy. Objevitelem vitaminu B byl polský biochemik Kazimierz Funk, a to v roce 1912 a to v otrubách rýže. Mezi
B-komplex řadíme vitamin B_1 (tiamin), B_2 (riboflavin), vitamin B_3 (kyselina nikotinová a její amid), vitamin B_5 (kyselina pantotenová), vitamin B_6 (pyridoxin), vitamin B_7 (biotin), vitamin B_9 (kyselina listová) a vitamin B_{12} (kobalamin).

Chromatografie je separační a současně analytická fyzikálně chemická metoda pro separaci a analýzu směsí látek, jejímž základním principem je rozdělování složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi. Vysoce účinná kapalinová chromatografie je pokročilou a instrumentálně náročnou technikou kapalinové chromatografie. Mezi výhody HPLC patří zejména široká oblast použitelnosti. Lze analyzovat ionty, látky polární i nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární. Další výhodou je možnost ovlivňovat separaci složením mobilní fáze

Cílem této práce bylo najít vhodnou metodu úpravy vzorků, nalézt optimální chromatografické podmínky pro analýzu a pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie stanovit množství B-komplexu ve vzorcích piva, které jsou k dostání v běžných tržních sítích. Cílem bylo stanovit vitaminy B_1, B_2, B_3, B_5 a B_6.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VÝROBA PIVA

1.1 Výroba piva

Pivo je slabě alkoholický nedokvašený nápoj, sycený CO_2. Vyrábí se ze sladu, chmele, kvasnic a vody. Obsahuje obvykle 2 až 8 % alkoholu [1].

Výroba piva se dělí na výrobu sladu a výrobu piva. Výroba sladu je v dnešní době záležitostí speciálních sladoven a pouze některé pivovary si slad vyrábějí ve vlastním provozu. Cílem výroby sladu je přeměnit většinu škrobu v obilkách na sladový cukr, a tím vytvořit předpoklady pro alkoholické kvašení [2].

1.1.1 Výroba sladu

Na výrobu sladu se používá nejlepší ječmen s vysokou klíčivostí (klíčivost musí být 95 %). Výroba se skládá z několika operací: příjem, čištění, třídění a skladování ječmene, máčení ječmene, klíčení, hvozdění a odkličkování a skladování sladu [1].

Účelem příjmu, čištění, třídění a skladování ječmene je zajištění podmínek pro uskladnění ječmene bez prachu a cizích příměsí a vytříděného nejen podle velikosti zrna, ale též podle odrůd a jakosti. Čištění ječmene se provádí na sítech a proudem vzduchu se zbavuje nečistot. Skladuje se na sýpkách, kde probíhá dozrávání ječmene a zvyšuje se klíčivost.
Při procesu máčení se zvyšuje obsah vody v ječném zrnu (na 42 - 48 %). Důležitá je také přítomnost kyslíku pro aerobní dýchání. Tento proces trvá dva dny.
Cílem sladařského klíčení je aktivace a syntéza enzymů a docílení požadovaného rozluštění. Jakmile klíček vyroste do 2/3 velikosti zrna, klíčení se zastavuje. Provádí se na humnech, což jsou hladké podlahy v prostorných místnostech. Výsledným produktem klíčení je tzv. zelený slad.
Cílem hvozdění sladu je snížení obsahu vody pod 4 %, zastavení vegetačních pochodů při zachování odpovídající enzymové aktivity a vytvoření chuťových, barevných a oxidoredukčních látek tvořících charakter sladu. Zelený slad je dopraven na hvozd, což je sušárna, ve které se slad zbaví vody dodané pro klíčení, tím se proces klíčení zastaví.
Odhvozděný slad se sklápí do košů a dopravuje se k odkličovačce, kde se zbavuje kořínků zvaných sladový květ. Odklíčený slad se chladí a je dopravován do sil, kde se nechává šest týdnů odležet před vlastním zpracováním [3,4,5].

1.1.1.1 Druhy sladů

Nejběžnějším druhy vyráběných sladů v České republice jsou slad světlý a bavorský. Ostatní druhy sladů jsou vyráběny pouze v malých množstvích pro speciální účely.

Světlý slad též nazývaný slad český nebo plzeňský, se vyrábí z ječmene s nízkým až středním obsahem bílkovin (do 11 %). Je charakteristický dostatečnou enzymatickou silou a světlou barvou, sloužící k výrobě světlého, lehkého a speciálního piva. Při výrobě je charakteristické máčení zrna na 42 - 45 % vlhkosti. Na humnech se vede tak, aby dosáhlo optimálního rozluštění endospermu (1/3 délka střelky a 1/2 délky zrna). Předsouší se při teplotě 40 – 50 °C, až poklesne obsah vody na 10 %. Potom se dosouší při 80 °C. Obsah vody v hotovém sladu je okolo 4 % [6,7].

Bavorský slad se vyrábí z ječmene, který má vyšší obsah bílkovin (12 % a více). Je charakteristický vysokou barvou, výraznějším aromatem. Ječmen je klíčen (luštěn) o 1 - 2 dny déle s vyšším obsahem vody a při vyšší teplotě (105 °C) s cílem ještě podpořit tvorbu melanoidů. Obsah vody je okolo 2 % [6,7].

Speciální slady se od běžných světlých a tmavých sladů liší především enzymovou aktivitou, kyselostí, barvou a vůní [8].

Diastatický slad se využívá se při přípravě enzymově chudých sladů nebo při použití surogátů (náhražky sladu). K výrobě sladu se používá většinou ječmen s vyšším obsahem bílkovin (14 % i více). Na humně se vede při nízké teplotě 2 týdny, aby se nepoškodila enzymová aktivita, až se dosáhne dokonalého zcukření. Obsahuje značný počet úplně vyklíčených zrn. Diastatický slad je charakteristický vysokou diastatickou mohutností (schopnost sladu měnit škrob na maltózu), alespoň 350 j.W.K [6,7].

Karamelový slad je charakteristický vysokým obsahem cukru a aromatických a barevných složek, používá se pro výrobu tmavých a speciálních piv. Slad je enzymaticky inaktivní. Karamelové slady rozdělujeme podle barvy na světlý, polotmavý a tmavý, který se praží ve speciálním pražiči. Princip výroby spočívá v tom, že zelený slad se navlhčený na 45 % vody nebo navlhčený již odklíčený světlý slad se nejprve nechá v bubnu pražiče dokonale zcukřit při teplotě 70 - 75 °C. Potom následuje vlastní karamelizační proces při teplotě 120 – 180 °C (pro světlý karamel je teplota asi 120 - 130 °C, pro polotmavý asi 160 °C a tmavý karamel asi 180 °C) [6,7,8].

Barvicí slad se používá k výrobě piv bavorského typu, jimž dodává tmavou barvu. Slad se po ovlhčení nechá zcukřit při teplotě 60 – 80 °C po dobu 30 – 60 minut a potom se postupně zvyšuje teplota až na 220 °C. Tento slad neobsahuje žádné aktivní enzymy [6,7].

Pšeničný slad se používá při výrobě speciálních piv (tzv. bílých piv) nebo v pekárenství. Sladování pšenice má své odlišnosti pro snadný příjem vody do zrna, zrno je bezpluché. Celková výroba speciálních sladů činí asi 5 % z celkové výroby sladu v Česku [6].
V některých zemích se slad nahrazuje levnějšími surovinami, náhražkami sladu. Surogáty mohou být škrobnaté, např. nesladovaný ječmen, rýže, kukuřice, maniok, škrob aj. Dále jsou to cukernaté surogáty, které jsou oproti škrobovým snáze zpracovatelné, ale jsou dražší. K nim patří především řepný a třtinový cukr a různé glukózové a dextrinové sirupy. V některých zemích je přídavek surogátů zakázán, v USA se využívají v plné míře [7].

1.1.2 Výroba piva

Pivo se vyrábí v pivovaru a technologie sestává ze tří výrobních úseků, zahrnujících řadu složitých mechanických, fyzikálně-chemických a biochemických procesů: výroba mladiny, kvašení mladiny a dokvašování mladého piva, závěrečné úpravy a stáčení zralého piva. První úsek se v moderních pivovarských učebnicích nazývá horká fáze a druhé dva studená fáze [9].

1.1.2.1 Výroba mladiny

Odleželý slad se rozdrtí na sladový šrot, který se dokonale rozmíchá s vystírací vodou. Vzniklá směs tzv. rmut, je postupně vyhříván na technologicky významné teploty - 52, 63 a 75 °C. Tyto teploty jsou ideální pro působení enzymů, které mění především škroby a bílkoviny na zkvasitelné cukry, dextriny a polypeptidy. Bílkoviny jsou důležité pro pěnivost piva a plnost chuti a jejich štěpné produkty aminokyseliny jsou důležité pro kvašení. Proces vystírání a rmutování probíhá ve rmuto-vystírací pánvi. Celý proces trvá čtyři hodiny. V tomto procesu vzniká sladina, kterou je nutno přefiltrovat na sladinovém filtru. Nerozpuštěným částem se říká mláto a je to odpad vznikající při výrobě piva. Sladina se dále vaří s chmelovými preparáty a dochází k převedení hořkých chmelových látek do roztoku, dále k upravením koncentrace odpařením části vody. Výsledným produktem chmelovaru je mladina. Tento proces probíhá na zařízení, kterému se říká mladinová pánev. Při chlazení mladiny je třeba odseparovat tzv. hořké kaly, které vznikly při chmelovaru. Toto probíhá ve vířivé kádi, kde se kaly usadí na dno, odtud je mladina odčerpávána a ochlazována na zákvasnou teplotu 8 - 10 °C [5, 8].

1.1.2.2 Kvašení mladiny a dokvašování mladého piva

Kvašení mladiny je při klasické technologii rozděleno do dvou fází, na hlavní kvašení a dokvašování.

Hlavní kvašení se u nás provádí obvykle v otevřených kvasných kádích spodními pivovarskými kvasinkami. Nejdůležitějšími reakcemi jsou přeměny zkvasitelných sacharidů glukózy, maltózy a maltotriózy na etanol a CO_2. Současně se v malé míře tvoří vedlejší kvasné produkty, alifatické alkoholy, aldehydy, diketony, mastné kyseliny a estery, které vytváří spolu chuť a aroma piva. Toto kvašení probíhá v prostorách, které se nazývají spilky. Kvašení probíhá v kvasných tancích s přívodem studené vody pro řízené chlazení kvasící mladiny. Tanky jsou plněny zchlazenou mladinou, v průběhu plnění je mladina provzdušněna sterilním vzduchem a jsou do ní přidány pivovarské kvasinky. Proces hlavního kvašení trvá 5 - 7 dní podle stupňovitosti vyráběného piva a v jeho průběhu se udržuje teplota do max 11 °C. Na konci hlavního kvašení sedimentují spodní kvasinky na dno kvasné kádě a po stáhnutí piva se sbírají, propírají se studenou vodou a znovu se nasazují do provozu. Po ukončení kvašení se obsah tanku zchladí na 5 - 7 °C, mladé pivo je stáčeno do sudů a ukládáno do ležáckého sklepa [5].

Dokvašování a zrání mladého piva se provádí v ležáckém sklepě, kde pivo při teplotách 1 - 3 °C velmi pozvolna dokvasí, čiří se, zraje a sytí se pod tlakem vznikajícího oxidu uhličitého v uzavřených ležáckých tancích. Vznikající CO_2 se váže na bílkovinné složky piva
a tím vytváří jeho charakteristický říz. U běžných piv do koncentrace 10 % EPM (extraktu původní mladiny) bývá doba ležení tři týdny, pro speciální exportní piva se zvyšuje až na několik měsíců [5].

V současné době moderní technologie umožňuje jednofázové kvašení, kde kvašení a dokvašování probíhá v jedné nádobě. Většinou jsou to cylindrokónické velkoobjemové tanky, které umožňují tlakový i beztlakový režim. Tato metoda ovšem představuje vysoké nároky na dodržování technologického postupu, je náročná na hygienu a sanitaci, ale s výraznými ekonomickými přednostmi [10].

1.1.2.3 Závěrečné úpravy a stáčení zralého piva

Dokonale vyzrálé pivo se musí ještě zfiltrovat, případně pasterovat či stabilizovat a nakonec se stáčí do transportních obalů [5].

2 DRUHY PIVA

Pivo lze rozdělovat dle barvy, dle způsobu kvašení a dle stupňovitosti.

2.1 Rozdělení podle barvy

Světlá piva – vyrábějí se z tzv. plzeňského sladu, sušeného při teplotě 80 až 90 °C.

Tmavá piva – vyrábějí se z tzv. bavorských sladů, pražených při teplotě kolem 105 °C.

Řezaná piva – vznikají smícháním při stáčení z tmavého a světlého piva [2, 11].

2.2 Rozdělení podle způsobu kvašení

V dnešní době existují tři hlavní typy piv, lišící se způsobem kvašení: piva spodně kvašená, piva svrchně kvašená a piva spontánně kvašená. Rozdíl mezi svrchním a spodním kvašením spočívá v tom, že zatímco při výrobě spodně kvašených piv kvasnice postupně klesají ke dnu, kde vytvoří kompaktní vrstvu, u svrchně kvašených piv jsou kvasnice na konci kvašení vynášeny k povrchu. Piva spontánně kvašená se vyrábějí bez přídavku pivovarských kvasnic, ale zkvašují se mikroorganizmy přítomnými ve vzduchu [12,13].

2.2.1 Spodně kvašená piva

Spodní kvašení piva probíhá při nižších teplotách pohybujících se v rozmezí 8 až 14 °C. K výrobě se používají kvasinky *Saccharomyces cerevisie* subsp. *uvarum* (*carlsbergensis).* Základním druhem je tzv. pivo českého (plzeňského) typu, které je reprezentováno světlým ležákem. Rozumí se jím světlé pivo o koncentraci původní mladiny 11 - 12 % [11,12].

Pils – převážně světlé pivo s chuťově plnou, jemnou až mírně drsnou hořkostí, jehož původním vzorem je pivo uvařené v roce 1842 v Měšťanském pivovaru v Plzni.

Bock - silné světlé nebo tmavé pivo se sladko-hořkou příchutí. Piva vyrobená z mladiny se stupňovitostí nad 18 % se nazývají Doppelbock.

Märzen (březňák) – sezónně, zpravidla v březnu vyráběné, velmi silné nebo polotmavé pivo, které má vydržet přes léto. V březnu se vyrábělo proto, že ještě byl k dispozici led nutný pro chlazení při spodním kvašení a ležení [11,13,15].

2.2.2 Svrchně kvašená piva

Svrchně kvašená piva se tradičně vyrábějí ve Velké Británii, v Belgii, částečně ve Francii a v Německu, mají jiný organoleptický charakter, nezvyklí pro naše piva. Svrchně kvašená piva vznikají při teplotách okolo 15 až 20 °C, s využitím kvasinek z rodu *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *cerevisiae* či za pomoci spontánního kvašení vlivem mikroflóry mléčných či octových bakterií. Využívá se k výrobě veškerých pšeničných piv. Samotné kvašení trvá nejdéle tři až čtyři dny. Vznikající kvasnice jsou z hladiny sbírány a zkvašená mladina se následně ukládá do sudů nebo do tanků, kde dozrává za přirozené či sklepní teploty po dobu několika dní až měsíců [11,12].

Ale – svrchně kvašená, hluboce prokvašená piva s vyšší hořkostí, někdy s ovocnou příchutí (Pale Ale, India Ale apod.). Rychlé kvašení za tepla při postupném dodávání různých druhů kvasnic, původně nechmelené pivo, typické pro Anglii.

Pšeničné pivo (Weissbier nebo **Weizenbier)** – středně silné, převážně světlé pivo vyráběné z více než 50% pšeničného sladu svrchním kvašením. Vyznačuje se menší hořkostí, nakyslou chutí, vysokým nasycením CO_2 a výrazným aroma. Vyrábí se v mnoha chuťových i druhových variantách zejména v Německu.

Stout – velmi tmavé svrchně kvašené pivo s tmavě červenou až černou barvou, část s přídavkem karamelového cukru. Typickým představitelem je irské pivo Guiness. Vyšší přídavek barvících sladů dodává pivu typickou nahořklou chuť.

Porter – velmi tmavé svrchně kvašené pivo s tmavě červenou až černou barvou a vysokým obsahem alkoholu, typické pro Anglii. Typickou chuť dává přídavek praženého ječmene.

Trappist – je silné kvasnicové pivo původem z Belgie a Nizozemí. V současné době se vyrábí pouze ze tří druhů speciálních sladů, ze dvojího chmele a s různými příchutěmi.

Zázvorové pivo – anglicky svrchně kvašené pivo, vyráběné s přísadou různého koření.

Hoogarden - belgické pivo, pojmenované po stejnojmenném pivovaru a městečku, kde se vyrábí. Jedná se o pšeničné pivo, do kterého se přidává pomerančová kůra, koriandr a jiné ingredience. Po hlavním kvašení se do mladého piva přidávají další kvasnice a živiny a pivo se po určitou dobu nechá dozrát [11,13,15].

2.2.3 Spontánně kvašená piva

Rozdíl mezi předchozími dvěma druhy kvašení je, že se mladina nezkvašuje pivovarskými násadními kvasnicemi, ale v podstatě se infikuje mikroorganizmy přítomnými ve vzduchu. Spontánní kvašení vyvolávají kvasinky typu *Brettanomyces*, dále divoké kvasinky a mléčné bakterie. Uvařená, zchlazená a provzdušněná mladina se čerpá do kádí na půdách pivovarů, kde kvasí. Po prokvašení se suduje do dubových sudů, kde leží minimálně jeden rok. Tento způsob kvašení však v dnešní době používá jen velmi málo výrobců piva, a to zejména v Belgii, některých částech Francie a Nizozemí [11,13,14].

Lambic – belgické pivo, které vzniklo v městečku Lambeek poblíž Bruselu. Vyrábí se s ječného a pšeničného sladu (60 % ječný a 40 % pšeničný). Vyrobená mladina má asi 13 % obsahu původního extraktu a je silně chmelená. Složení kvasících mikroorganizmů je typické pro místo, kde Lambic vzniká. Sládkové považují pivo Lambic za hotové pivo až po době zrání v sudech, a to je minimálně rok i déle. Velmi často pivo zraje i v lahvích. Mladší Lambic lze objevit jako čepované pivo v hospodách.

Gueuze – pivo vyrobené smícháním tři roky starého Lambicu se zakvašenou mladinou nebo mladým pivem. Často se do piva přidává ovoce (třešně, ostružiny, borůvky, broskve apod.), které se v pivu vyluhuje. Ovoce potlačuje kyselou chuť původního piva.

Faro – pivo se vyrábí v Belgii z Lambicu přidáním cukru a karamelizovaného cukru. Tím v pivu přítomné kvasinky dostanou nové živiny a začnou kvasit. Proto se pivo před distribucí pasteruje, aby se činnost kvasinek zastavila.

La Kriek – belgické ovocné pivo, které se vyrábí přidáním přibližně 50 kg čerstvých třešní („krieg“) do 250 l piva Lambic. Pivo potom zraje po dobu asi šesti měsíců. Chuť je výrazná třešňová, ale pivo není sladké [13].

2.3 Rozdělení podle stupňovitosti

Protože podle soustavy SI je pojem „stupeň“ vyhrazeno obloukové míře, muselo se upustit od tradičního používání označení druhů piva, např. desetistupňové nebo dvanáctistupňové, což znamenalo procento zkvasitelného extraktu v mladině před jejím kvašením; tedy pivo „desítka“ obsahovalo na začátku kvasného procesu 10 % zkvasitelného extraktu a 88 % vody, což představovalo po ukončení výroby asi 4 % obj. alkoholu. Nově se má tedy používat termín „extrakt v původní mladině“ (EPM), což je v podstatě stejné označení,

tedy

10 EPM je pivo „desítka“

Podle obsahu „extraktu v původní mladině“ (EPM) neboli podle původní stupňovitosti se pivo dělí na:

lehké pivo - pivo vyrobené převážně z ječných sladů s extraktem původní mladiny do 7 % hm.a s obsahem využitelné energie nejvýše 130 kJ.100 ml^{-1},

výčepní pivo – pivo vyrobené převážně z ječných sladů s extraktem původní mladiny 8 až 10 % hm.

ležáky - pivo vyrobené převážně z ječných sladů s extraktem původní mladiny 11 až 12 % hm.

speciální – pivo vyrobené převážně z ječných sladů s extraktem původní mladiny nad 13 % hm. a vyšším [13,15].

2.4 Piva speciální

Pivo se sníženým obsahem alkoholu - pivo s obsahem alkoholu nejvýše 1,2 % obj. (1 % hm.).

Nealkoholické pivo - pivo s obsahem alkoholu nejvýše 0,5 % obj. (0,4 % hm.)

Pivo se sníženým obsahem cukrů (dia-pivo) - hluboce prokvašené pivo s obsahem zatěžujících sacharidů nejvýše 0,75 $g.ml^{-1}$ a bílkovin 0,4 $g.ml^{-1}$. Je určeno převážně pro diabetiky.

Pšeničné pivo - pivo vyrobené s podílem extraktu z použitého pšeničného sladu vyšším než jedna třetina hmotnosti celkově dodaného extraktu.

Kvasnicové pivo - vyrobené dodatečným přídavkem malého podílu rozkvašené mladiny do hotového piva v průběhu stáčení. Obsahuje rozptýlené živé kvasinky. Pivo dokvašuje asi 14 dní ve sklepě, je bohatě syceno CO_2 a vyniká silnou pěnivostí.

Bylinné pivo - pivo vyrobené s přídavkem části bylin, dřevin nebo jejich extraktů.

Lehké pivo - pivo s obsahem původního extraktu mladiny do 7,99 % nebo hluboce prokvašené pivo s obsahem využitelné energie nejvýše 1300 $kJ.l^{-1}$.

Pivo nefiltrované – pivo z ležáckého tanku, které nebylo ani pasterizované, ani filtrované.

Pivo ochucené - pivo vyrobené s přídavkem látek určených k aromatizaci. Obsah alkoholu pocházejícího z lihovin a ostatních alkoholických nápojů přitom nesmí překročit obsah alkoholu v původním pivu [12,15].

3 HISTORIE VÝROBY PIVA

3.1 Vaření piva ve světě

Za kolébku piva se považuje Mezopotámie. Již v 7. tisíciletí před n. l. zde pěstovali obilí Sumerové, Akkadové, Babyloňané a Asyřané. Předpokládá se, že pivo bylo objeveno náhodně, díky tehdejšímu skladování obilí v hliněných nádobách. Následně se začaly z obilí připravovat kvašené nápoje cíleně, což byl jakýsi druh piva, Sumery nazývaný kaš, Babyloňany šikarum. Sumerské pivo kaš bylo na rozdíl od současného piva připravováno bez chmele. Kaš vznikal z ječného chleba a sladu. Okolo 3. tisíce př.n.l. tehdejší pivo nepodstupovalo proces filtrace, což mělo za následek přítomnost velkého množství mechanických částic a pivo proto nebylo čiré. Z tohoto důvodu se pro pití využívalo obilné stéblo, které fungovalo jako brčko.

Egypťané používali pro výrobu piva ječmen, ze kterého vyráběli slad a různé typy pšenice, jako náhradu za chmel. Absence chmelu pak měla za následek, že pivo mělo nasládlou chuť. V době Antiky se pivo nacházelo na okraji zájmu. Dominovalo víno v oblasti Středomoří a medovina v oblastech Evropy obývané Kelty. Proti tomu germánské kmeny i nadále preferovaly výrobu a konzumaci piva. Mezi další oblasti, kde byla konzumace piva hojně rozšířená, patří oblasti pod nadvládou Vikingů v oblastech severní Evropy. Zde se jednalo se o metodu tzv. vymrazování, během kterého pivo zmrzlo a vzhledem k rozdílné teplotě tání vody a alkoholu došlo k nárůstu obsahu alkoholu v pivě.

V roce 1876 vydává Louis Pasteur dílo Studie o pivu, ve které podrobně popisuje novodobou technologii pro výrobu piva založené na filtraci a pasterizaci. Současně po celé 19. století narůstaly poznatky o přípravě, kvašení a filtraci. Současně v roce 1876 je založen první americký pivovar Budweiser, určený k masové produkci piva.

V druhé polovině 20. století došlo ke změně trendů vyrábět většinu piva v masových pivovarech a začaly se zakládat malé pivovary, které se v první fázi objevily převážně na území Británie [11,16,17].

3.2 Historie výroby piva v Československu a ČR

První písemná zmínka o vaření piva v Čechách pochází ze zakládací listiny Vyšehradské kapituly, vydané Vratislavem II. v roce 1088. Profese pivovarská neexistovala a pivo se vařilo vesměs doma ze sladu, dodávané sladovníky. Vznikem a zakládáním měst byla

udělována různá privilegia. Jedno z povolení měšťanstvu bylo vařit si vlastní pivo. S tímto právem souviselo i tzv. „právo mílové“, zakazující v dosahu jedné míle od města, tj. asi 10 km, vařit pivo jinou osobou. Královská města a kláštery byly tak prvními a monopolními českými výrobci piva. Šlechta však začala překračovat zákazy a zakládala si na svých panstvích své pivovary. Spory vyvrcholily počátkem 16. století, kdy bylo dáno šlechtě povolení ke zřizování vlastních pivovarů. Zlom nastal v druhé polovině 18. století, kdy český sládek a pivovarský reformátor František Ondřej Poupě zavedl a ve své práci uplatnil do té doby nevídaný pořádek a empirický způsob výroby piva pozvedl na vědeckou úroveň. Navíc při svých pivovarských štacích dokázal zaučit a vychovat řadu pokračovatelů a založit školu českých sládků. V minulosti byly Čechy proslulé především svým pšeničným pivem, zde zvaným „bílé“. Pivo z ječného sladu, zvané „červené“ se tu vařilo rovněž, ale jeho hlavní rozvoj nastal až v polovině 17. století. Teprve od poloviny minulého století si však tato část světa vydobyla místo ve výrobě světlého piva, vařeného ze sladovnického ječmene, piva tzv. „plzeňského typu“.

Oblasti pěstování chmele jsou okolo Žatce, Loun, Rakovníka, hlavními producenty sladovnického ječmene jsou Polabí a moravská Haná. Čechy mají k výrobě piva obzvlášť vhodnou vodu, čerpanou ze studní. Proslulá je voda z okolí Plzně, vyznačující se svojí měkkostí a výraznou alkalickou kvalitou.

Po zrušení propinačního práva (zvláštní forma direktivního způsobu výroby a prodeje piva, kdy jednotlivé kraje byly nuceny odebírat pivo z pivovarů tam činných) a uvolnění podnikatelské činnosti, vznikají v Čechách a na Moravě další pivovary, které patří dodnes mezi nejoblíbenější a nejznámější. Druhý plzeňský (dnešní Gambrinus), smíchovský akcionářský pivovar (Staropramen), Ringhofferův pivovar ve Velkých Popovicích u Prahy, swanzenberský podnik v Protivíně, na Moravě brněnský akciový (Starobrno). Rozvoj těchto moderních pivovarů měl i stinné stránky, přivodil postupný zánik menších pivovarů. V Čechách zcela převládla výroba piva plzeňského typu, který se používá prakticky dodnes. Převratné bylo zavedení nové metody „spodního kvašení“ mladiny na pivovarských spilkách. Objev profesora Hansena z dánského Carlsbergu se záhy uplatnil nejen v Dánsku, ale i v Německu, a ze sousedního Bavorska dorazil v první polovině 19. století i do Čech. Spodní kvašení revolučně mění staleté způsoby výroby piva. Plzeňský Měšťanský pivovar prováděl spodní kvašení od prvopočátku, poslední pivovar, který používal svrchní kvašení, byl městský pivovar v Krupce u Teplic.

V roce 1918 přebírá Československo z bývalé habsburské monarchie asi 60 % výrobního potenciálu pivovarů. Katastrofu českému pivovarství přinesla druhá světová válka, poté pivovarský a sladařský průmysl byl postupně v celé Československé republice zestátněn a centrálně řízen. V době komunistického režimu nebyly do pivovarů a sladoven vkládány potřebné finanční prostředky. Po válce byly na území dnešní České republiky postaveny pouze 2 pivovary: Radegast a Most. Druhý jmenovaný byl v roce 1998 uzavřen. Sladoven bylo postaveno 5. Na Slovensku bylo postaveno v období socialistického Československa 8 pivovarů. Po roce 1989 nastala privatizace, mnohé pivovary zanikly, do některých vstoupil zahraniční kapitál. V roce 2003 bylo v České republice 36 sladoven, které vyrobily 483 693 tun sladu. Činných průmyslových pivovarů bylo v roce 2007 48, vyrobily 18 548 314 hl piva, roční spotřeba na jednoho obyvatele činila 160,9 l piva. Sedm největších pivovarů pokrývá 84 % produkce českého piva (jedná se o pivovary Plzeňský Prazdroj, Budějovický Budvar, Staropramen, Královský Pivovar Krušovice, PMS Přerov, Drinks Union a Starobrno) [11, 18].

4 ZMAPOVÁNÍ ČESKÉHO TRHU PIV

V této části práce jsou uvedeny všechny průmyslové pivovary na území České republiky. Jsou to pivovary, které pivo stáčejí do sudů i do lahví a dodávají ho do obchodů a restaurací. Seřazeny jsou abecedně podle měst, kde se pivovar sídlí a podrobněji jsou popsány nejznámější z nich [19].

Tab. 1 Seznam všech průmyslových pivovarů na území České republiky [19,20]

Město	**Pivovar**
Benešov	Pivovar Ferdinand
Brno	Pivovar Starobrno
Broumov	Pivovar Broumov
Březnice	Pivovar Herold Březnice
Černá Hora	Pivovar Černá Hora
České Budějovice	Budějovický Budvar
	Budějovický měšťanský pivovar
Český Krumlov	Pivovar Eggenberg
Hanušovice	Pivovar Holba (PMS Přerov)
Havlíčkův Brod	Měšťanský pivovar Havlíčkův Brod
Hlinsko v Čechách	Pivovar Rychtář
Humpolec	Rodinný pivovar Bernanrd
Chodová Planá	Rodinný pivovar Chodovar
Chotěboř	Pivovar Chotěboř
Jihlava	Pivovar a sodovkárna Jihlava
Klášter Hradiště	Pivovar Klášter
Krušovice	Královský pivovar Krušovice
Kutná Hora	Pivovar Kutná Hora (Drings Union)
Litovel	Pivovar Litovel (PMS Přerov)
Louny	Pivovar Louny (Drings Union)
Malý Rohozec	Pivovar Rohozec
Náchod	Pivovar Náchod
Nošovice	Pivovar Radegast (Plzeňský Prazdroj)
Nová Paka	Pivovar Nová Paka
Nymburk	Pivovar Nymburk
Ostrava	Pivovar Ostravar (Pivovary Staropramen)
Pardubice	Pivovar Pernštejn
Pelhřimov	Pivovar Poutník
Plzeň	Plzeňský Prazdroj (Pilsner Urquell)
	Plzeňský Prazdroj (Gambrinus)
Podkováň	Pivovar Podkováň
Polička	Měšťanský pivovar v Poličce

Praha	Pivovar Braník (Pivovary Staropramen)
	Pivovar Staropramen (Pivovary Staropramen)
Protivín	Městský pivovar Platan
Přerov	Pivovar Zubr (PMS Přerov)
Rakovník	Pivovar Rakovník
Sokolov	Měšťanský pivovar Sokolov
Strakonice	Měšťanský pivovar Strakonice
Svijany	Pivovar Svijany
Týn nad Vltavou	Pivovar Lipan
Trutnov	Pivovar Krakonoš
Třeboň	Pivovar Bohemia Regent
Uherský Brod	Pivovar Janáček
Ústí nad Labem	Pivovar Krásné Březno (Drinks Unions) - Zlatopramen
Vimperk	Šumavský pivovar
Velké Březno	Pivovar Velké Březno (Drings Union)
Velké Popovice	Pivovar Velké Popovice (Plzeňský Prazdroj)
Vratislavice nad Nisou	Pivovar Konrad Vratislavice
Vysoký Chlumec	Lobkowiczký pivovar
Vyškov	Pivovar Vyškov
Znojmo	Pivovar Hostan (Starobrno)
Žatec	Žatecký pivovar

4.1 Starobrno

V současné době činí roční výstav pivovaru cca 800 000 hektolitrů piva, což je řadí do první pětky největších pivovarů v české republice. V Brněnském pivovaru se vaří pivo vlastní značky Starobrno, celý sortiment lahvového piva Hostan a v licenci sudový Zlatý bažant. Je také distributorem zahraničních značek Heineken, Amstel a pšeničného piva Edelweiss. Celostátní podíl na trhu se pohybuje okolo 4 %. Celkově se vyváží do 15 zemí a významnou úlohu zde má podpora sesterských společností patřící pod rakouskou společnost, kde majoritním vlastníkem je firma Schwechat AG.

Sortiment zahrnuje i pivo nealkoholické a několik méně tradičních piv. Jsou to zejména „dračí“ speciály. Červený drak je netradiční pivo červené barvy, kterou mu dávají exotické byliny. Později se začal vyrábět drak černý – Black Drak. Pivovar vyrábí i pivní pálenku, která se vyrábí destilací čerstvého tmavého piva ve spolupráci s vizovickou firmou Rudolf Jelínek. Na Velikonoce se připravuje pivo na Zelený čtvrtek – zelené pivo. To je speciální 13 % EPM nápoj, který má zelenou barvu, kterou mu dává bylinný likér.

Sortiment:

Starobrno Tradiční – světlé výčepní pivo s obsahem alkoholu 4 % obj.,

Starobrno Medium – světlý ležák s obsahem alkoholu 4,5 % obj.,

Starobrno Ležák – světlé pivo vyzrálé chuti s osobitou vůní chmele s obsahem alkoholu 5 % obj.,

Starobrno Černé – tmavé výčepní pivo s obsahem alkoholu 3,8 % obj.,

Starobrno Řezák – polotmavé, řezané výčepní pivo s obsahem alkoholu 4 % obj.,

Baron Trenck - 14% EPM speciální ležák s obsahem alkoholu 6 % obj.; pro speciální příležitosti,

Červený drak – 15% EPM ležák, bylinné polotmavé pivo červené barvy s obsahem alkoholu 6 % obj.,

Black drak – speciální tmavý ležák s obsahem alkoholu 5,5 % obj., obsahuje výluh ze Zázvoru lékařského.

Frií - nealkoholické pivo s obsahem alkoholu 0,5 % obj.

Další značky: Hostan Cechovní, Hostan Naše pivko, Hostan Hradní, Hostan Premium, Hostan Zámecké, Zlatý bažant [19,21,22].

4.1.1 Společnost Heineken

Heineken je třetí největší pivovarnickou skupinou na světě a evropskou jedničkou mezi výrobci piv. V roce 2003 se součástí skupiny Heineken Česká republika stal pivovar Starobrno, v roce 2007 Královský pivovar Krušovice, a.s. V polovině roku 2008 byla úspěšně dokončena akvizice společnosti Drinks Union, a.s. V roce 2009 bylo Starobrno, a.s., fúzováno do společnosti Královské pivovary Krušovice, a.s. Na počátku roku 2010 byla do obchodního rejstříku zapsána změna obchodní společnosti, kterou byla společnost Královské pivovary Krušovice, a.s. přejmenována na Heineken Česká republika, a.s. V současné době je Heineken Česká republika třetím nejsilnějším hráčem na domácím trhu s pivem, v exportu se řadí mezi nejdůležitější vývozce piva [23].

4.2 Černá Hora

V současné době dodává pivovar na trh deset druhů piv: 3 výčepní, 3 ležáky, 3 speciální a jedno nealkoholické pivo. Kromě piva pivovar vyrábí také pivní pálenku, sudové a lahvové limonády s přídavkem chmelového extraktu a stáčí pitnou vodu z černohorského pramene Zelený kříž. Desítka Tas dostala název po historickém majiteli pivovaru ze 16. století. Další název je Moravské sklepní nefiltrované. Používají pouze moravský chmel

i slad – proto moravské, pivo zraje ve sklepních prostorách pivovaru - proto sklepní, před stočením se nezbavuje kvasnic – proto v názvu nefiltrované. Medový speciál Kvasar, dostal název v Senticích, kde ho od roku 1992 vaří Jiří Jelínek, od něhož pivovar koupil licenci. V polovině roku 2007 bylo uvedeno jako první na trhu nealkoholické pivo, které je absolutně bez alkoholu. Alkohol se zde odstraňuje pomocí filmové vakuové destilace a díky ní se získává i jiný produkt, a to pivní pálenku. V roce 2006 vystavil pivovar Černá hora 161 000 hektolitrů piva.

Sortiment:

Černá Hora Tas – 10% EPM světlé výčepní pivo s obsahem alkoholu 4 % obj.,

Černá Hora Ležák – 12% EPM tmavý ležák s obsahem alkoholu 4,8 % obj.,

Černá Hora Granát - 12% EPM tmavý ležák s obsahem alkoholu 4,5 % obj.,

Černá Hora Kern - 10% EPM polotmavé výčepní s obsahem alkoholu 4 % obj.,

Černá Hora Moravské sklepní nefiltrované – 10% EPM světlé výčepní s obsahem alkoholu 4 % obj.,

Černá Hora Kvasar – 14% EPM speciální světlý ležák s přídavkem medu a obsahem alkoholu 5,7 % obj.,

Černá Hora Velen – světlé svrchně kvašené pivo s 1/3 sladu z pšenice a s obsahem alkoholu 4,8 % obj.,

Černá Hora Modrá Luna – ochucený světlý ležák s přídavkem lihového borůvkového macerátu ze sušených borůvek s obsahem alkoholu 4,4 % obj..

Další: Monte Negro Gold a Silver, Pivní režná, Černá Hora Black Hill [19,21,24].

4.3 Budějovický Budvar

V roce 2009 vystavil Budějovický Budvar 1,28 mil. hektolitrů piva. Je jedním z mála pivovarů, které používají žatecký chmel v hlávkové podobě a výjimečná je i délka ležení u ležáků (90 dnů). Hlavní značkou Budvaru je Budweiser Budvar, kvůli, které vede pivovar už téměř sto let soudní spory s americkou pivovarnickou firmou Anheuser-Busch. Sortiment Budvaru zahrnuje kromě světlého výčepního a ležáku i ležák tmavý, pivo nealkoholické a speciál Bud Super Strong, což je 16% EPM ležák s hustou pěnou, tmavší barvou

a výraznou sladovou chutí, která zraje až 200 dnů. Novinkou od roku 2007 je světlé výčepní Pardál. Budvar patří k největším českým exportérům piva. Téměř polovinu

produkce vyváží do 50 zemí světa. Od 1. června 2007 je Budějovický Budvar výhradním dovozcem světlého prémiového ležáku dánské značky Carlsberg pro Českou republiku.

Sortiment:
Budějovický Budvar Světlé výčepní pivo – světlé výčepní pivo s obsahem alkoholu 4 % obj.,
Budweiser Budvar Světlý ležák – světlý ležák s obsahem alkoholu 5 % obj.,
Budweiser Budvar Tmavý ležák – tmavý ležák s obsahem alkoholu 4,7 % obj.,
Bud Super Strong – 16% EPM světlý speciální ležák s obsahem alkoholu 7,6 % obj.,
Budweiser Budvar Nealkoholické pivo - nealkoholické pivo s obsahem alkoholu 0,5 % obj.,
Budweiser Budvar kroužkový ležák - 11,9% EPM světlý ležák s obsahem alkoholu 5 % obj.,
Pardál - světlé výčepní pivo s obsahem alkoholu 3,8 % obj. [19].

4.4 Rodinný pivovar Bernard

Pivo vyrobené v pivovaru Bernard není ošetřeno pasterací, nýbrž mikrofiltrací. Pivo tak při dosahování dlouhé trvanlivosti nepřichází o svou specifickou chuť, vůni ani barvu. Pivovar Bernard také přišel na trh s novou lahví s patentním uzávěrem. 15 % produkce Bernard vyváží na Slovensko, do Švédska, Německa, Chorvatska a Ruska. Pivovar provozuje vlastní sladovnu v Rajhradě. Sladovna v ní produkuje zhruba 6 700 tun sladu plzeňského typu. Od roku 2001 prodal polovinu svých podílů belgickému pivovaru Duvel Moortgat. Prodej akcií umožnil oddlužit firmu a výrazně investovat do rozvoje pivovaru a zároveň umožnil prodávat značku Duvel v Česku. V roce 2006 pivovar vystavil 139 922 hektolitrů piva.
Sortiment:
Bernard Světlé pivo – světlé pivo výčepní s obsahem alkoholu 3,8 % obj.,
Bernard Světlý ležák – 11% EPM a 12% EPM světlý ležák s obsahem alkoholu 4,5 % obj. a 4, 7 % obj.,
Bernard Sváteční ležák - 12% EPM světlý ležák s přísadou jemných kvasnic s obsahem alkoholu 5,0 % obj.,
Bernard Jantarový ležák – 11% EPM polotmavý ležák s přísadou jemných kvasnic a obsahem alkoholu 4,5 % obj.,

Bernard Speciální Černé pivo – 13% EPM tmavé speciální pivo s jemnou přísadou kvasnic a obsahem alkoholu 5,1 % obj.,
Bernard Free - světlé nealkoholické pivo s obsahem alkoholu 0,5 % obj.,
Bernard Free Jantar – polotmavé nealkoholické pivo s obsahem alkoholu 0,5 % obj.,
Bernard Světlé lehké pivo – nízkoalkoholové pivo s obsahem alkoholu 2,2 % obj. [19,21,25].

4.5 Pivovar Radegast

Mimořádný úspěch má nealkoholické pivo Birell. S výstavem přes 200 tisíc hektolitrů ročně je nejprodávanějším nealkoholickým pivem v České republice. Jeho úspěch tkví v tom, že je vyráběno jiným způsobem než všechna ostatní nealkoholická piva a chutná jako skutečné pivo. K výrově se používají speciální kvasnice, které produkují minimální množství alkoholu. V Nošovicích ho poprvé uvařili v roce 1992 podle licence malého švýcarského pivovaru.

Sortiment:
Radegast Klasik – světlé výčepní pivo s obsahem alkoholu 3,6 % obj.,
Radegast Originál – světlé výčepní pivo s obsahem alkoholu 3,9 % obj.,
Radegast Premium – světlý ležák s obsahem alkoholu 5 % obj.,
Radegast Birel – světlé nealkoholické pivo s obsahem alkoholu 0,49 % obj.,
Primus – světlé výčepní pivo s obsahem alkoholu 4,2 % obj.,
Gambrinus Desítka a Gambrinus Premium - licenční výroba jen sudového piva od února 2002 [19,21,26].

4.6 Pivovar Ostravar

Hlavní značkou pivovaru je regionální Ostravar, který se vyrábí tradiční technologií spodního kvašení. V současné době pivovar nabízí 3 druhy piva - světlé výčepní, světlý ležák, 14% EPM speciál a netradiční piva -Velvet a Kelt. Pivo Kelt je jediné české pivo typu stout, ale na rozdíl se vyrábí spodním kvašením. Má nahořklou chuť a hodně tmavou barvu, kterou mu dodávají barevné a karamelové slady. Velvet byl inspirován tradiční anglickou recepturou, je charakteristický jemně nahořklou, zlatohnědou barvou a lávovým efektem, který vzniká ve sklenici po nalití.

Sortiment:

Ostravar Originál – světlé výčepní pivo s obsahem alkoholu 4,3 % obj.,
Ostravar Premium – světlý ležák s obsahem alkoholu 5,1 % obj.,
Velvet – polotmavý speciální ležák s obsahem alkoholu 5,3 % obj.,
Kelt – tmavý stout, spodně kvašený a obsahem alkoholu 4,8 % obj.,
Rallye - světlé nealkoholické pivo obsahující max 0,5 % obj. alkoholu [19,21,27].

4.7 Plzeňský prazdroj

Sortiment:

Značka Pilsner Urguell:

Pilsner Urquell – světlý ležák s obsahem alkoholu 4,4 % obj.

Značka Gambrinus:

Gambrinus Světlý – světlé výčepní pivo s obsahem alkoholu 4,1 % obj.,
Gambrinus Premium – světlý ležák s obsahem alkoholu 5 % obj.,
Gambrinus Excelent – 11% EPM světlé výčepní pivo s obsahem alkoholu 4,7 % obj. [19].

4.7.1 SABMiller

SABMiller patří s 239 miliony hektolitrů piva mezi největší pivovarnické společnosti na světě. Společnost SABMiller vznikla v roce 2002, poté, co tehdejší SAB (South African Breweries – Jihoafrické pivovary) koupila většinu akcií druhého největšího amerického pivovaru, Miller Brewing Company [28].

4.8 Pivovar Staropramen

Společnost Pivovary Staropramen distribuuje na český trh také belgická piva ze sortimentu mateřské společnosti InBev: především prémiový ležák Stella Artois, který se na Smíchově také vaří. Pšeničný Hoegarden White nebo ochucený svrchně kvašený Hoegarden Forbidden Fruit s kořeněným a bylinkovým aroma, klášterní pivo Leffe s tradiční výrobou sahající až do 13. století a třešňový Belle-Vue Kriek, spontánně kvašené pivo typu lambic, dozrávající v dřevěných kádích, které získávají svou karmínovou barvu a ovocnou chuť macerací čerstvých třešní. V nabídce má i německý prémiový ležák Beck´s.

Sortiment:

Staropramen Světlý – světlé výčepní pivo s obsahem alkoholu 4 % obj.,
Staropramen Ležák – světlý ležák s obsahem alkoholu 5 % obj.,
Staropramen Granát – polotmavý ležák s obsahem alkoholu 4,8 % obj.,
Staropramen Černý – tmavý ležák s obsahem alkoholu 4,4 % obj.,
Staropramen Nealko – světlé nealkoholické pivo s obsahel alkoholu 0,5 % obj.,
Staropramen D pivo – pivo se sníženým obsahem cukru s obsahem alkoholu 4 % obj.
Další značky společnosti: Stella Artois, Hoegarden, Leffe, Belle-Vue, Beck´s [19,29].

4.8.1 Společnost Pivovary Staropramen

V roce 1992 vznikla společnost Pražské pivovary, a. s. a do jejího vlastnictví patřily pivovary Staropramen a Braník. V roce 1994 se strategickým partnerem Pražských pivovarů stala britská pivovarnická společnost Bass. V roce 1996 započala první etapa modernizace pivovaru Staropramen postavením v té době jedné z největších varen ve střední Evropě. Současně byl zmodernizován celý energetický blok. V roce 1997 se pivovar Ostravar začlenil do společnosti Pražské pivovary, a. s. V říjnu roku 2003 došlo ke změně korporátního jména. Původní název společnosti - Pražské pivovary a.s., se změnil na Pivovary Staropramen a.s. [29].

4.9 Pivovar Zubr

Dnes patří pivovar spolu s dalšími dvěma regionálními podniky (Holba Hanušovice a Litovel) do skupiny PMS, která se výstavem blížícím se milionu hektolitrů ročně, řadí do první pětky předních tuzemských pivovarnických firem. Pivovar vyváží do zahraničí – na Slovensko, do Maďarska, ale také do Řecka, Polska nebo Itálie.

Sortiment:

Zubr Classic světlé – světlé výčepní pivo s obsahem alkoholu 4,1 % obj.,
Zubr Classic tmavé – tmavé výčepní pivo s obsahem alkoholu 4,6 % obj.,
Zubr Gold – světlé 11% EPM výčepní pivo s obsahem alkoholu 4,6 % obj.,
Zubr Premium – světlý 12% EPM ležák s obsahem alkoholu 5,1 % obj.,
Zubr Free – nealkoholické pivo o obsahu alkoholu 0,5 % obj. [19,21,30].

4.10 Pivovar Svijany

Pivo se vyrábí klasickou cestou a je nepasterizované, a to i stáčené do lahví. Jedničkou v produkci je 11% EPM Svijanský Máz. Proslulé jsou svijanské hořké 13% EPM piva –

světlý Kníže a tmavá Kněžna, 12% EPM Rytíř nebo 15% EPM Baron. Sortiment doplňuje i nealkoholické pivo s názvem Svijanská Vozka a lehké pivo Fitness. Výstav pivovaru stále roste, v roce 2005 překročil daňovou hranici malého pivovaru, když poprvé v historii uvařil přes 200 tisíc hektolitrů piva.

Sortiment:

Svijanská Desítka – světlé výčepní pivo s obsahem alkoholu 4 % obj.,

Svijanský Máz – světlý 11% EPM ležák s obsahem alkoholui 4,8 % obj.,

Svijanský Rytíř – světlý 12% EPM ležák s obsahem alkoholu 4,8 % obj.,

Kvasničák – speciální světlé nefiltrované pivo s obsahem alkoholu 6 % obj.,

Svijanský Kníže – světlý 13% EPM speciální ležák s obsahem alkoholu 5,6 % obj.,

Svijanská Kněžna – tmavý 13% EPM speciální ležák s obsahem alkoholu 5,2 % obj.,

Svijanský Baron - světlý 15% EPM speciální ležák s obsahem alkoholu 6,5 % obj.,

Svijanská Vozka – nealkoholické pivo s obsahem alokoholu 0,5 % obj.,

Fitness - světlé lehké pivo s obsahem alkoholu 3,2 % obj. [19,31].

4.11 Pivovar Krakonoš

V současné době vyrábí pivovar Krakonoš 5 druhů piva v celkovém objemu přes 100 tisíc hl ročně. Na vánoce a velikonoce obohacujeme trh o speciální světlé pivo Krakonoš 14% EPM. Pivovar Krakonoš vyrábí pivo klasickou technologií, není pasterizované, ale mikrobiálně filtrované. Hlavním místem odbytu trutnovského piva jsou Krkonoše a Podkrkonoší, kde podnik prodá kolem 60 % produkce.

Sortiment:

Krakonoš 10 – světlé výčepní pivo s obsahem alkoholu 3,9 % obj.,

Krakonoš 10 – tmavé výčepní pivo s obsahem alkoholu 3,8 % obj.,

Krakonoš 11 – světlý ležák s obsahem alkoholu 4,3 % obj.,

Krakonoš 12 – světlý ležák s obsahem alkoholu 5,1 obj.,

Krakonoš 14 – světlý speciální ležák, který se připravuje na Vánoce a Velikonoce, obsah alkoholu 5,8 % obj. [19,32].

4.12 Pivovar Janáček

Sortiment je široký: počínaje lehkou 8% EPM pivo přes 10% EPM pivo, světlé i tmavé, 11% a 12% EPM pivo až po 14% EPM pivo. Velká specialita pivovaru je pivo s názvem

Beerberry. Dělá se v šesti chuťových variantách – s příchutí citronu, zázvoru, bylin, višně, maliny a coly. V nabídce nechybí ani nealkoholické pivo. Zhruba čtvrtinu své produkce pivovar vyváží, a to především na Slovensko, do Maďarska, Itálie a Švédska.

Sortiment:

Janáček Prima – světlé 10% EPM výčepní pivo s obsahem alkoholu 4 % obj.,
Janáček Olšavan – 8% EPM světlé výčepní pivo s obsahem alkoholu 3,7 % obj.,
Janáček Kvasničák – 10% EPM světlé kvasnicové pivo s obsahem alkoholu 4 % obj.,
Janáček Tmavé - 10 % EPM tmavé výčepní pivo s obsahem alkoholu 4 % obj.,
Janáček Patriot – 11 % EPM světlý ležák s obsahem alkoholu 4,5 % obj.,
Janáček Extra – 12 % EPM světlý ležák s obsahem alkoholu 5 % obj.,
Janáček Comenius – 14 % EPM světlý speciál s obsahem alkoholu 6 % obj.,
Beerberry – speciální světlé a polotmavé ochucené pivo s příchutí citronu, zázvoru, bylin, višně, maliny a coly a obsahem alkoholu 3,9 % obj.,
Janáček Caliber – nealkholické světlé pivo s obsahem alkoholu 0,5 % obj. [19,21,33].

4.13 Pivovar Velké Popovice

V roce 2006 překročil pivovar v Popovicích hranici 1,5 milionů hektolitrů piva ročně a zařadil se tak na třetí příčku v České republice. Černý Velkopopovický Kozel je nejprodávanějším českým tmavým pivem. V roce 2005 připojil pivovar ke svému sortimentu, který tvořil světlé a tmavé 10% EPM piva a 12% EPM světlé piva, ještě světlé 11% EPM pivo – Kozel Medium. Od roku 2007 se zde vaří také dvě speciální piva se značkou Master – polotmavé 13% EPM pivo a tmavé 18% EPM pivo, které se čepují pouze ve vybraných restauracích. V Popovicích se dále vyrábí také levná nízkostupňová piva Primus a Klasik. Významnou část produkce pivovaru tvoří export. Prodává se v 24 zemích světa od Finska až po Austrálii. Licenčně se kozel vyrábí také v pivovarech patřících do skupiny SABMiller na Slovensku, v Maďarsku a v Rusku, kde je dokonce největší zahraniční značkou.

Sortiment:

Velkopopovický Kozel Světlý - světlé výčepní pivo s obsahem alkoholu 4 % obj.,
Velkopopovický Kozel Černý – tmavé výčepní pivo s obsahem alkoholu 3,8 % obj.,
Velkopopovický Kozel 11° Medium – světlý ležák s obsahem alkoholu 4,6 % obj.,
Velkopopovický Kozel Premium – světlý ležák s obsahem alkoholu 4,8 % obj.,

Master polotmavý – speciální 13% EPM polotmavý ležák s obsahem alkoholu 5,8 % obj.,

Master tmavý – speciální 18% EPM tmavý ležák s obsahem alkoholu 7,0 % obj.,

Primus – výčepní světlé pivo s obsahem alkoholu 4,2 % obj.,

Klasic – lehké pivo výčepní světlé s obsahem alkoholu 3,6 % obj. [19,34].

5 VITAMINY SKUPINY B

Vitaminy jsou látky organického původu, potřebné v malých množstvích pro různé biochemické funkce. Nemohou se samy syntetizovat v těle, a proto musí být dodávány z potravy. Jsou označovány jako organické exogenní esenciální katalyzátory heterotrofních organizmů. Jsou to látky, které jsou v malých koncentracích nepostradatelné pro existenci živých systémů, a jejich nedostatek vyvolává vážné poruchy životních funkcí. Vitaminy přijímáme v potravě buď v hotové formě, nebo jako provitamin. Provitaminy jsou organické sloučeniny bez vitaminového účinku, který se v těle mění působením UV záření nebo pomocí enzymů na vitaminy. Vitaminy mohou mít katalytickou funkci v řadě reakcí látkové přeměny buď samy, nebo jako součást sloučenin, které z nich vznikají až v organizmu

a tvoří kofaktory enzymů. Některé vitaminy vytvářejí i důležité redox- systémy a mohou mít i jiné než katalytické funkce, jako je zachování volných radikálů, kontrola metabolizmu některých látek aj. [35,36,37].

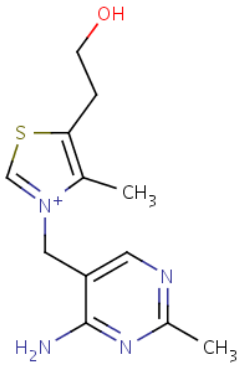
Nedostatek vitaminů v potravě se projevuje různými poruchami, které se v lehčí formě označují jako hypovitaminózy, těžší jako avitaminózy. Hypovitaminózy jsou způsobeny přechodným nedostatkem určitého vitaminu, což se projeví v poruše jen některých životních procesů. Avitaminózy jsou vyvolány dlouhotrvajícím chyběním jednoho nebo několika vitaminů, čímž vzniká celkové onemocnění organizmu, v krajním případě až smrt [35].

Pivo je dobrým zdrojem řady vitaminů, zejména vitaminů B. Tyto, ve voděrozpustné vitaminy, se často vyskytují společně v rostlinných surovinách jako naklíčený sladový ječmen, což je u piva slad, a v kvasnicích. Z jediného půllitru piva mohou poskytnout, o průměru 10 až 20 % denní potřeby niacinu, riboflavin, pyridoxinu a kyseliny listové. Pivo není nijak zvlášť dobrým zdrojem vitaminu C, protože tento vitamin je termolabilní, je snadno zničen v chmelovaru a při pasterizaci. Některá lahvová piva mohou obsahovat vitamin C (až 30 $mg.l^{-1}$) a mohou tak zlepšit chuťové vlastnosti. Niacin, riboflavin tiamin jsou nezbytné pro využití sacharidů a tuků ve stravě, zatímco pyridoxin má podobnou roli v metabolismu bílkovin.

Piva připravená s významnými podíly nesladového doplňku, jako jsou rýže nebo kukuřičné krupice, obvykle obsahují méně vitaminů, zatímco všechna piva připravená z ječmených sladů a černá piva jsou obvykle na horní hranici rozmezí. Je třeba zdůraznit, že významný příspěvek může přispět k příjmu vitaminů B pouze při středním příjmu alkoholu. Lidé

závislí na alkoholu trpí nedostatkem vitaminů, mají často i špatné stravovací návyky, ale také proto, že při vysokých koncentracích alkoholu v potravě může zasahovat jak do absorpce (tzn. zabraňuje vstřebávání), tak do jejich metabolizmu [38].

5.1 Vitamin B_1 (tiamin)



Thiamin

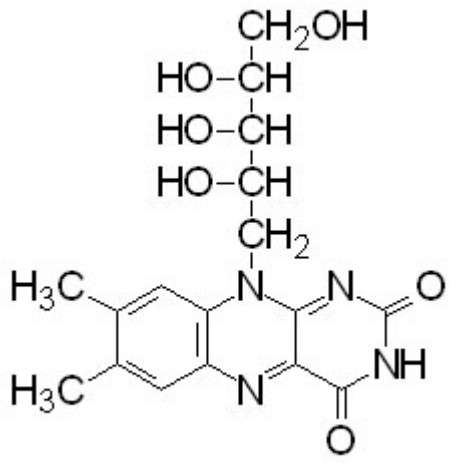
Tiamin se skládá ze substituovaných jader tiazolu a pyrimidinu, spojených metylenovým můstkem. Tiamin se vyskytuje v živém organizmu ve dvou biologicky aktivních formách, jako tiamindifosfát (TDP) a tiamintrifosfát (TTP) [39,40,41].

Vyskytuje se v rostlinných surovinách ve volné formě a v živočišných surovinách ve vázáné formě jako tiamindifosfát. Mnohé mikroorganizmy mají schopnost biosyntézy tiaminu, zejména pivovarské kvasnice. Vyskytuje se v malých koncentracích ve většině rostlin. Cenným zdrojem jsou luštěniny, obsah v moukách kolísá podle stupně vymletí. Ze živočišných surovin jsou nejcennějším zdrojem játra, srdce, ledviny, vepřové maso a masné výrobky, mléko a mléčné výrobky. V pivu se jeho obsah pohybuje v rozmezí 0,002 - 0,14 $mg.l^{-1}$ [38,40,41].

Tiamin je v suchém stavu termostabilní, ale var potravin ve vodě obsah snižuje, zvláště v alkalickém prostředí [37].

Současná doporučená tabulková výživová dávka thiaminu pro průměrného obyvatele ČR činí 1,1 $mg.den^{-1}$. Zvýšený příjem 1,2 a 1,4 $mg.den^{-1}$ je doporučen pro těhotné a kojící ženy [41].

5.2 Vitamin B_2 (riboflavin)



Riboflavin

Riboflavin patří do skupiny látek zvaných flaviny. Je to žlutozelená krystalická látka, jejíž vodný roztok má schopnost fluorescence. Působením UV paprsků se riboflavin rozkládá za vzniku lumichromu (kyselé nebo neutrální pH) nebo lumoflavinu (zásadité pH) [36,43].

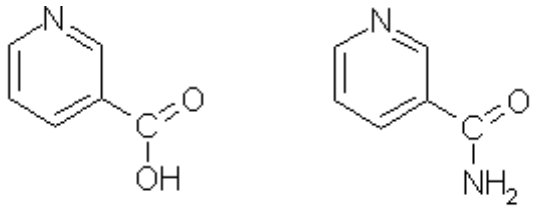
V biochemických systémech se vyskytuje volný nebo vázaný ve formě flavinových koenzymů oxidoredukčních enzymů. Téměř vždy se vyskytuje jako součást flavinových kofaktorů FMN (flavinmononukleotid) a FAD (flavinadenindinukleotid) [36,45].

Riboflavin je termostabilní a kuchyňská úprava jeho obsah nesnižuje. Avitaminóza se projevuje zánětlivými změnami sliznic a kůže, změnami oční rohovky, někdy i nervovými poruchami a poruchami růstu [35,37].

Volný riboflavin se vyskytuje pouze v sítnici, syrovátce a moči. Vázaný ve formě FMN a FAD se ve větším množství nachází v droždí a v obilných klíčcích a luštěninách, ze živočišných zdrojů riboflavin obsahují nejvíce játra, ledviny, maso, vejce, mléko a mléčné výrobky. V pivu se jeho obsah pohybuje v rozmezí 0,002 - 0,14 $mg.l^{-1}$ [38,41].

Doporučená denní dávka pro průměrného obyvatele je ČR činí 1,5 $mg.den^{-1}$ [41].

5.3 Vitamin B_3 (kyselina nikotinová a její amid)



Kyselina nikotinová a její amid

Vitamin B_3 lze také nazývat jako niacin, což je název pro celou skupinu příbuzných látek tvořenou kyselinou nikotinovou, jejím amidem a jejich deriváty [41,46].

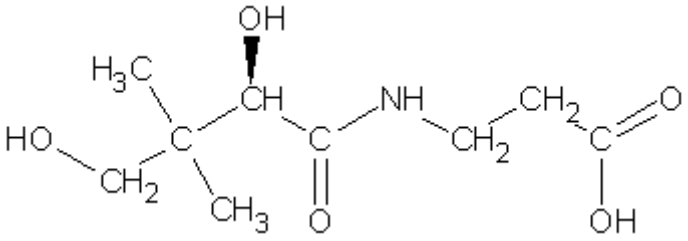
Kyselina nikotinová je monokarboxylová kyselina odvozená od pyridinu. Z kyseliny nikotinové vznikají dva koenzymy, které mají významnou úlohu v biochemických systémech. Jsou to nikotinamidadenindinukleotid (NAD+) a nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADP+), souhrnně označované jako koenzymy *pyridinových dehydrogenáz* [36].

V rostlinných pletivech převažuje kyselina nikotinová a v živočišných tkáních její amid. Jejich nejbohatším zdrojem jsou kvasnice, maso a vnitřnosti (hlavně játra). Obiloviny jsou bohaté na kyselinu nikotinovou. Velmi málo je ho v ovoci a zelenině. Obsah niacinu v pivu se pohybuje v rozmezí 3 - 20 $mg.l^{-1}$ [38,41].

Avitaminóza je pelagra, což je nemoc projevující se dermatitidou, průjmem a poruchami nervového ústrojí. [41,47].

Doporučené výživové dávky v ČR jsou uváděny v mg niacinu a činí pro středně pracující 16 - 20 mg za den. U těhotných a kojících žen by neměl být horní limit vyšší než 30 - 35 mg na den [41].

5.4 Vitamin B_5 (kyselina pantotenová)

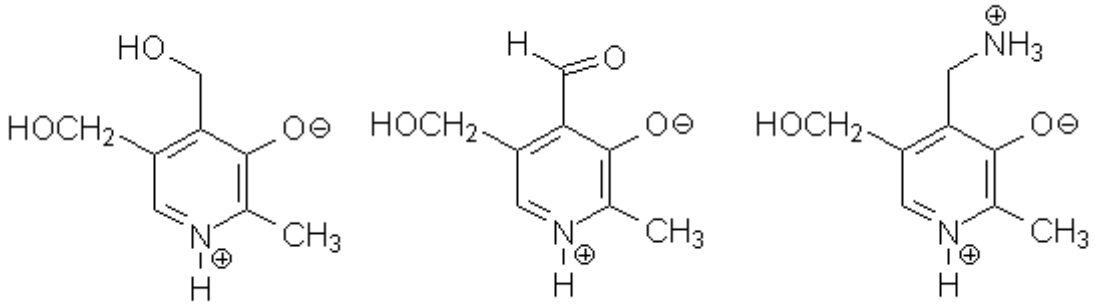


Kyselina pantotenová

Kyselina pantotenová je u lidí i zvířat esenciálním faktorem pro růst, reprodukci a normální fyziologické funkce organizmu. V přírodě se nejčastěji vyskytuje jako přirozená součást koenzymu A (CoA). Účastní se klíčových reakcí v metabolizmu aminokyselin, tuků a sacharidů. Speciální funkci má kyselina pantotenová při syntéze a degradaci tuků, protože koenzym A přenáší dvojuhlíkové skupiny a aktivuje mastné kyseliny s dlouhým řetězcem. Důležitá je její role v regeneračních procesech na kůži, jak perorálně tak po požívání mastí. Účastní se i procesu růstu a pigmentace vlasů [36,48,49].

Malá množství kyseliny pantotenové jsou přítomna v téměř všech potravinách. Z rostlinných zdrojů jsou to luštěniny, houby, celozrnné cereální produkty, kvasnice, rýže a zeleniny se zelenými listy. Obsah kyseliny pantotenové v pivu se pohybuje v rozmezí 0,5 - 2,7 $mg.l^{-1}$. Živočišné produkty jsou bohatšími zdroji. Dobrými zdroji jsou játra, ledviny, maso, rybí maso, sýry a vaječný žloutek [41].
Výživová doporučená dávka pro průměrného obyvatele ČR byla vypočtena ve výši 7,29 $mg.den^{-1}$ [41].

5.5 Vitamin B_6 (pyridoxin)



Pyridoxol, pyridoxal, pyridoxamin

Funkci vitaminu B_6 tvoří tři vzájemně příbuzné látky, které vystupují pod společným názvem pyridoxin. Pyridoxin tvoří pyridoxol, pyridoxal a pyridoxamin. Všechny tři látky mají bazický charakter a vytvářejí s minerálními kyselinami soli rozpustné ve vodě. V biochemických procesech vystupuje pyridoxin ve formě fosfátových derivátů pyridoxalfosfátu a pyridoxaminfosfátu. Koenzymy jsou nezbytné i v metabolismu cukrů při štěpení glykogenu. Dále ovlivňují biosyntézu porfyrinu a některé funkce v nervovém a imunitním systému i syntézu hemoglobinu [36, 41].

Ve vyšších koncentracích se vyskytuje v droždí, ve zvířecích vnitřnostech, ve vepřovém, drůbežím a rybím mase. Z rostlinných potravin je nejhojněji obsažen v pšeničných klíčcích, cereáliích, celozrnných produktech a v sójových bobech. Rovněž brambory, zelí, kukuřice, mrkev, banány, zelené fazole a hrách jsou dobrými zdroji. Obsah pyridoxinu v pivu se pohybuje v rozmezí 0,13 - 1,7 $mg.l^{-1}$.

Výživová doporučená dávka vitaminu B_6 je pro průměrného obyvatele ČR 1,68 $mg.den^{-1}$ [36, 41].

Nedostatek vitaminu B6 se projevuje vyrážkami v oblasti nosu, očí a rtů, záněty v ústech a na rtech, anémií nereagující na podání železa, nespavostí. Příčinami uvedených příznaků mohou být dlouhodobá konzumace nevyvážené diety, hemodialýza, dlouhodobé užívání určitých léků, vyšší potřeba v těhotenství a při kojení, chronický alkoholizmus, různé poruchy zažívacího traktu a metabolické poruchy [36, 41].

6 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

6.1 Princip

Chromatografie je analytická metoda, při které se separují složky obsažené ve vzorku. V chromatografii je vzorek vnášen mezi dvě nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá. Mobilní fází je v tomto případě kapalina, stacionární fází je film příslušné látky zakotvený na povrchu nosiče nebo pevný adsorbent. Vzorek je umístěn na začátek stacionární fáze. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Čas, který stráví ve stacionární fázi, závisí na afinitě analitu k fázi. Jsou využity všechny možné mechanizmy separace – adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, molekulově sítový efekt nebo specifické interakce v afinitní chromatografii [51,52].

K nejpoužívanějším metodám v současné době patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performace Liquid Chromatography, HPLC). Vysokých účinností se dosahuje použitím stacionárních fází, které obsahují malé částice pravidelného tvaru a jednotné velikosti, které homogenně vyplňují kolonu. Průtok mobilní fáze je zajištěn vysokým tlakem (až desítky MPa), proto také bývá tato metoda někdy nazývána vysokotlaká kapalinová chromatografie (High-Pressure Liquid Chromatography). Dávkují se malé množství vzorku (řádově mikrolitry). K detekci jsou nutné citlivé detektory, které umožňují kontinuální monitorování látek na výstupu kolony.

Mezi výhody HPLC patří zejména široká oblast použitelnosti. Lze analyzovat ionty, látky polární i nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární. Další výhodou je možnost ovlivňovat separaci složením mobilní fáze. Nevýhodou ve srovnání s GC (Gas Chromatography, Plynová chromatografie) je náročnější instrumentace a složitější mechanizmus separace [53].

6.2 Principy separace látek v kapalinové chromatografii

V kapalinové chromatografii se pro separaci využívá adsorpce, rozdělování mezi dvě fáze na základě různé rozpustnosti (separace na chemicky vázaných fázích), iontová výměna, biospecifické interakce (molekulové rozpoznávání) a síťový efekt. V reálném chromatografickém systému se uplatňuje více typů interakcí současně, např. na chemicky vázaných fázích je rozpouštění kombinováno s adsorbcí, případně iontovou výměnou [53].

6.2.1 Adsorbční kapalinová chromatografie

Adsorbční kapalinová chromatografie využívá mezimolekulových přitažlivých sil mezi stacionární fází a analytem. Jako adsorbent se používají zrnité materiály na bázi silikagelu a oxidu zirkonu aj. materiálů. Silikagel je dostupný s různě velikými částicemi od 1 – 12 μm. Mají kulovitý nebo nepravidelný tvar a jsou zcela porézní. Průměr pórů musí být dostatečně velký, aby soluty mohly volně proniknout tam i zpět. Adsorbční aktivita adsorbentu je dána jeho polaritou a počtem adsorbčních míst. Mobilní fáze je charakterizovaná eluční silou (čím větší má rozpouštědlo eluční sílu, tím více se adsorbuje na stacionární fázi [52,53].

6.2.2 Rozdělovací kapalinová chromatografie

V rozdělovací kapalinové chromatografii se analyt rozděluje mezi dvě nemísitelné kapalné fáze. Jako stacionární fáze se používají nejčastěji kapaliny, které jsou chemicky vázány na nosič. Nosičem je většinou silikagel. Retenční čas analytů závisí na tom, jak jsou rozpustné. Rozdělovací chromatografie jevhidná pro látky menších až středních relativních molekulových hmotností. Přítomnost vody není překážkou. [52,53].

6.2.2.1 Chromatografie na normálních fázách (Normal Phase Chromatogrphy, NPC)

V počátcích rozdělovací kapalinové chromatografie byla používána polární stacionární fáze (např. voda v silikagelu) a mobilní fáze byla nepolární (např. hexan). Zvýšením polarity mobilní fáze se snižuje retenční čas analytů. Separace v NPC závisí na interakci složek s polární stacionární fází. Proto nejméně polární analyt je eluován jako první a polární analyty jako poslední. [52,53].

6.2.2.2 Chromatografie na obrácených fázích (Reversed Phase Chromatography, RPC)

Byla vyvinuta, protože v NPC při separaci polárních vzorků, kdy interakce polárních molekul ve stacionární fázi je silná, by nevyšly analyty v rozumném čase z kolony ven. U metody RPC jsou polarity mobilní a stacionární fáze naopak. Stacionární fáze je nepolární (uhlovodíky nebo alkyly vázané na silikagel) a mobilní fáze je polární (voda, acetonitril, pofry). Růst polarity mobilní fáze v RPC vede k růstu retenčních časů analytů [52,53].

6.2.3 Iontově – výměnná chromatografie (Ion Exchange Chromatography, IEC)

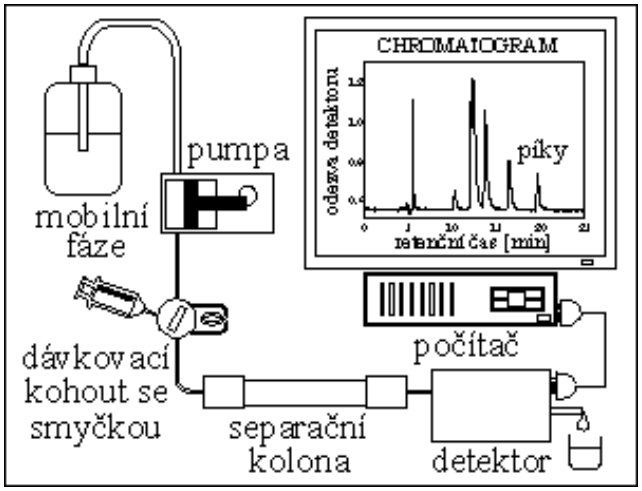
Podstatou iontové výměny jsou elektrostatické interakce. Stacionární fází v IEC je měnič iontů. Nejčastěji se používají organické polymery (polystyren, celulóza, dextran aj.) či materiály na bázi silikagelu. Silikagelové měniče iontů jsou účinnější, rychle se ustavuje rovnováha a jsou tedy kompatibilní s gradientovou elucí. Matrice musí mít vhodné funkční skupiny, kyselé nebo zásadité povahy. Každá funkční skupina je pevně vázaná iontem, na který je iontovou vazbou připojen protiion s opačným nábojem. Ten je vyměňován s iontem obsaženým v mobilní fázi. Iontoměniče (ionexy) se dělí na: anexy, jejichž funkční skupiny jsou zásadité (aminoskupiny) a slouží k výměně aniontů, a katexy, jejichž funkční skupiny jsou kyselé (sulfoskupiny, karboxylové skupiny) a slouží k výměně kationtů. Jako mobilní fáze se používají vodné tlumivé roztoky, jejichž ionty (protiionty) jsou v dynamické rovnováze s ionty měniče [52,53].

6.2.4 Gelová permeační chromatografie (Gel Permeation Chromatography, GP neboli Size Exclusion Chromatography , SEC)

V gelové permeační chromatografii jsou molekuly rozdělovány podle své velikosti. Rozhodující úlohu při separaci hraje velikost a tvar solutu a velikost a tvar pórů stacionární fáze. K rozdělování dochází mezi pohyblivou částí mobilní fáze, která se nachází mezi jednotlivými zrny gelu a nepohyblivou částí mobilní fáze, která se nachází uvnitř póru gelu. Při průchodu kolonou jsou molekuly složek zdržovány v důsledku svého pronikání do rozpouštědlem naplněných pórů. Malé molekuly pronikají hlouběji, a mají tudíž vyšší hodnotu retenčních objemů než větší molekuly. Gel se volí dle vlastností separovaných látek. Pro látky ve vodě rozpustné se používají hydrofilní gely, např. Sephadex (dextran zesítěný epichlorhydrinem). Mobilní fáze je voda s případným přídavkem organického rozpouštědla. Pro látky nerozpustné ve vodě se používají hydrofobní gely, např. styren nebo divinylbenzen (Styragel). Mobilními fázemi mohou být aromatické, chlorované a některé heterocyklické uhlovodíky. Existují i univerzální gely na bázi silikagelu a porézních skel, které jsou vhodné pro separaci hydrofobních a hydrofilních látek. Metoda se často používá pro biopolymery, např. proteiny [52,53].

6.3 Kapalinový chromatograf

Přístroj, na kterém se provádí HPLC analýzy se nazývá kapalinový chromatograf.



Obr. 1 kapalinový chromatograf [55]

6.3.1 Čerpadlo

Kapalina se do kolony čerpá pístovými čerpadly. Materiál čerpadla (nerezová ocel, keramika, plast) nesmí narušovat mobilní fázi a nesmí se do ní uvolňovat žádné látky. Průtok musí být konstantní, reprodukovatelný a bezpulzní. Dobré čerpadlo dociluje průtoku z rozsahu od nl. min^{-1} až do desítek $ml.min^{-1}$. Nejčastěji se používají pístová dvoučinná čerpadla [52,53].

6.3.2 Směšovací zařízení

Složení mobilní fáze může zůstat stálé (izokratická eluce) nebo se během separace mění (gradientová eluce). Naprogramované směšovací zařízení může s využitím zásobníků různých kapalin připravovat směs kapalin stálého složení nebo řídit změny ve složení výsledné mobilní fáze v průběhu separace [52].

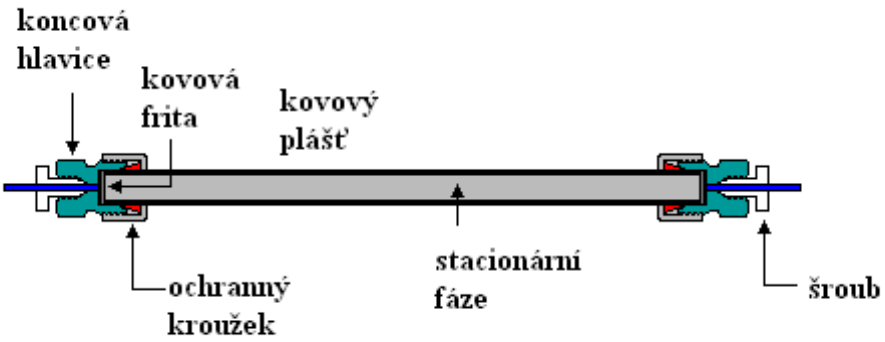
6.3.3 Dávkovací zařízení

Dnes se téměř výhradně používají dávkovací ventily se smyčkou a autosamplery. Objem smyčky se pohybuje od desítek nanolitrů po mililitry. Komerčně dostupné dávkovače (rheodyne, valco, waters) mají různé objemy dávkovacích smyček od 0,2 µl do 2 000 µl. Automatické dávkovače (autosamplery) jsou spojené se zásobníkem vzorku, ve kterém

jsou umístěny mikronádobky (vialky) uzavřené septem nebo perforovanou zátkou [52,53,54].

6.3.4 Kolony

Kolony jsou obvykle vyrobeny z nerezové oceli, avšak mohou být i skleněné a plastové. Používají se pouze náplňové kolony, které jsou naplněny stacionární fází. V současnosti se obvykle používají kolony o délce 3 až 25 cm a průměr bývá 1,2 – 4,6 mm. Běžný průtok eluentu je0,5 - 2 ml za minutu. Jako ochrana hlavní kolony jsou běžně používány předkolony umístěné mezi čerpadlem a dávkovacím zařízením nebo ochranné kolony umístěné mezi dávkovacím zařízením a analytickou kolonou. Předkolony chrání kolonu před nečistotami a nerozpustnými materiály [55,53].



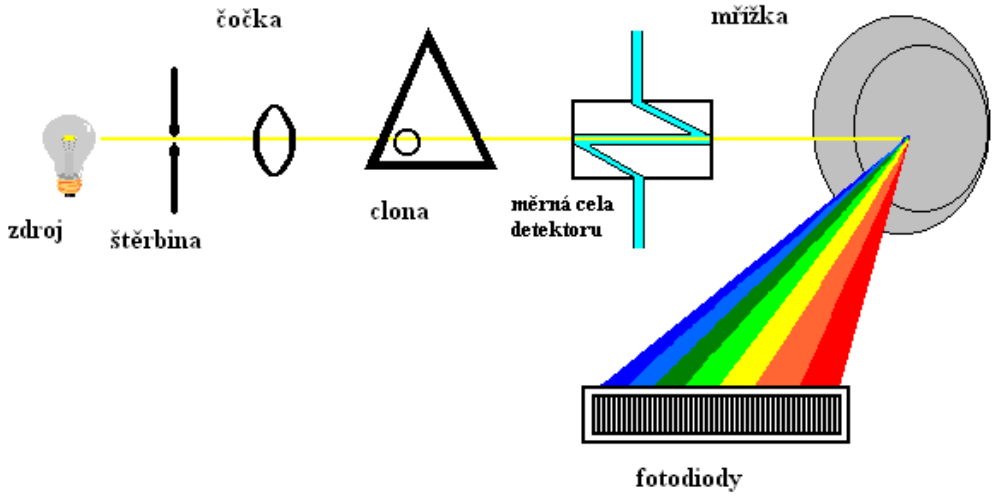
Obr. 2 Sestava kolona [56]

6.3.5 Detektory

Detektory v HPLC by měly být selektivní pro analyty a málo citlivé pro mobilní fázi. K detekci se využívá analytická vlastnost systému, která je ve známém a reprodukovatelném vztahu ke koncentraci analytu. Podle toho rozlišujeme detektory buď univerzální (měří vlastnosti systému jako celku, tj. index lomu, tepelnou vodivost, relativní permitivitu) nebo selektivní (měří absorbanci při určité vlnové délce, elektrolytický proud při určitém potenciál atd.). Selektivní detekce je obvykle citlivější a vhodnější zejména při analýze složek přítomných v komplikovaných matricích. Mezi běžnými detektory v HPLC patří fotometrické, fluorimetrické, elektrochemické, hmotnostní a refraktometrické [51].

6.3.5.1 Fotometrické detektory

Měří absorbanci eluátu vycházejícího z kolony. Jednodušší detektory měří při jedné vlnové délce v ultrafialové oblasti, složitější dovolují nastavení vlnové délky pomocí monochromátoru (mřížka). Nejdokonalejší detektory jsou schopny pomocí diodového pole (Diode Array Detector , DAD) proměřit absorpční spektrum v určité oblasti vlnových délek a uložit ho do paměti. Diodové pole je umístěno tak, že na každou fotodiodu dopadá určitý rozsah vlnových délek. Vždy se změří celé spektrum najednou a doba měření se tak může zkrátit z několika minut na zlomky sekundy [52,58].



Obr. 3 Schéma fotometrického detektoru DAD [57]

6.3.5.2 Refraktometrické detektory

Měří rozdíly mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze. Nevýhodou je i značná závislost indexu lomu na teplotě a nemožnost použít gradientovou eluci. Používají se tehdy, pokud ostatní detektory neposkytují pro analyzované látky odezvu [52,53].

6.3.5.3 Fluorescenční detektor

Detektor je založen na principu fluorescence, tedy schopnosti látek absorbovat ultrafialové záření a měření sekundárního záření, které látka vydá po absorpci primárního elektromagnetického záření. Je vysoce selektivní a lze ho vhodně kombinovat s fotometrickým detektorem [52,53,59].

6.3.5.4 Hmotnostní spektrometr

Detektor, který je založen na principu určování hmotností atomů, molekul a jejich částí po jejich převedení na kladné a záporné ionty. Těžištěm analytického využití hmotnostní spektrometrie je především stopová analýza organických látek s důrazem na zjištění jejich struktury. Využití hmotnostního spektrometru jako detektoru v kapalinové chromatografii výrazně zvyšuje selektivitu a umožňuje provádět identifikaci komponent vzorku ve složité matrici [53].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

7 METODIKA

7.1 Chemikálie

- Standard Thiamine Hydrochloride (B_1), SUPELCO,USA 2003
- Standard Riboflavin (B_2), SUPELCO,USA 2003
- Standard Nicotinic acid, SUPELCO, USA 2005
- Redestilovaná voda
- Acetonitril – nitril kyseliny octové pro HPLC Super Gradient (dodavatel Lab-scan, Poland)
- Chemikálie běžně přítomné v biochemické laboratoři.

7.2 Pomůcky a přístroje

- Standardní laboratorní vybavení
  - Předvážky (Kern, SRN)
  - Analytické váhy (Adam, AFA – 210 LC, Schoeller instruments, ČR)
  - Lednice (Whirpool, ČR)
  - Injekční stříkačka (Braum injekt, 10ml)
  - Mikrofiltry (LUT Syringe Filters Nylon 13 mm x 0,45 µm, UK)
  - Mikropipeta (Transferpette 100-1000 µl, Brand, Germeny)
  - Dávkovací stříkačka o objemu 50 µl (Hamilton, USA)
  - Ultrazvuk (Ultrasonic compact cleaner PS 4000 A)
  - Stolní digitální pH-metr HANNA pH 211 (dodavatel Fisher Scientific, USA)
  - Centrifuga Eppendorf MiniSpin plus

- Speciální laboratorní vybavení
  - Aparatura pro HPLC (Hewlett Packard 1100)
    - Binární pumpy G1312A
    - Termostat kolon G1316A
    - Detektor UV/VIS DAD G1315A
    - Kolony
      - Discovery C 18 (250 x 4,6 mm; 5 µm, Supelco, USA)
      - Supelcosil LC 8 (150 x 4,6 mm; 5 µm, Supelco, USA)

- Dávkovací ventil analytický smyčkový - dávkovací smyčka o objemu 20 µl
- PC s vyhodnocovacím programem ChemStation - Instrument 1 (Agilent, USA)

Obr. 4 HPLC sestava HP 1100

7.3 Vzorky piva

Pro analýzu bylo vybráno celkem 16 druhů piva. 4 vzorky pivo světlé výčepní, 4 vzorky světlý ležák, 4 vzorky pivo nealkoholické a 4 vzorky pivo speciální. Vzorky byly analyzovány ihned po zakoupení. Vzorky piva byly kupovány v obchodních řetězcích Kaufland Česká republika, v.o.s. a Billa, spol. s r.o.

Výrobce všech značek doporučuje skladovat vzorky v chladu a temnu.

7.3.1 Pivo světlé výčepní

Gambrinus světlý:

Výrobce: Plzeňský Prazdroj a.s.,

Datum spotřeby: 4. 10. 2011,

Objem balení: 500 ml,

Obsah alkoholu: 4,1 % obj.

Budějovický Budvar Světlé výčepní pivo:

Výrobce: Budějovický Budvar, n.p.,

Datum spotřeby: 27. 4. 2011,

Objem balení: 500 ml,

Obsah alkoholu: 4 % obj.

Staropramen Světlý:

Výrobce: Pivovary Staropramen a.s.,

Datum spotřeby: 16. 5. 2011,

Objem balení: 500 ml,

Obsah alkoholu: 4 % obj.

Velkopopovický Kozel Světlý

Výrobce: Plzeňský Prazdroj a.s. - Pivovar Velké Popovice,

Datum spotřeby: 4. 10. 2011,

Objem balení: 500 ml,

Obsah alkoholu: 4,0 % obj.

7.3.2 Pivo světlý ležák

Gambrinus Premium:

Výrobce: Plzeňský Prazdroj a.s,

Datum spotřeby: 28. 4. 2011,

Objem balení: 500 ml,

Obsah alkoholu: 5,0 % obj.

Budějovický Budvar Světlý ležák:

Výrobce: Budějovický Budvar, n.p.,

Datum spotřeby: 9. 9. 2011,

Objem balení: 500 ml,

Obsah alkoholu: 5,0 % obj.

Pilsner Urquelle:

Výrobce: Plzeňský Prazdroj a.s,

Datum spotřeby: 3. 9. 2011,

Objem balení: 500 ml,

Obsah alkoholu: 4,4 % obj.

Staropramen Ležák:

Výrobce: Pivovary Staropramen a.s.,

Datum spotřeby: 26. 10. 2011,

Objem balení: 500 ml,

Obsah alkoholu: 5,0 % obj.

7.3.3 Pivo nealkoholické

Bernard Free:

Výrobce: Rodinný pivovar Bernard a.s.,

Datum spotřeby: 7. 7. 2011,

Objem balení: 500 ml,

Obsah alkoholu: 0,5 % obj.

Starobrno Frií:

Výrobce: Starobrno a.s.,

Datum spotřeby: 12. 9. 2011,

Objem balení: 500 ml,

Obsah alkoholu: 0,5 % obj.

Lobkowicz Premium Nealko:

Výrobce: Lobkowiczký pivovar Vysoký Chlumec s.r.o,

Datum spotřeby: 13. 9. 2011,

Objem balení: 500 ml,

Obsah alkoholu: 0,49 % obj.

Radegast Birel:

Výrobce: Plzeňský Prazdroj a.s – Pivovar Nošovice,

Datum spotřeby: 19. 9. 2011,

Objem balení: 500 ml,

Obsah alkoholu: 0,49 % obj.

7.3.4 Pivo speciální

Krakonoš – vánoční speciál:

Výrobce: Pivovar Krakonoš s.r.o.,

Datum spotřeby: 25. 1. 2011,

Objem balení: 500 ml,

Obsah alkoholu: 5,8 % obj.

Starobrno Zelené pivo:

Výrobce: Starobrno a.s.,

Datum spotřeby: 21. 4. 2011,

Objem balení: 500 ml,

Obsah alkoholu: 5,3 % obj.

Staropramen D pivo:

Výrobce: Pivovary Staropramen a.s.,

Datum spotřeby: 10. 4. 2011,

Objem balení: 500 ml,

Obsah alkoholu: 4,0 % obj.

Primátor Diamant – pivo se sníženým obsahem cukru:

Výrobce: Pivovar Náchod a.s.,

Datum spotřeby: 8. 9. 2011,

Objem balení: 500 ml,

Obsah alkoholu: 4,0 % obj.

7.4 Úprava vzorků

7.4.1 Úprava vzorků piv světlých výčepních

Po otevření spotřebitelského obalu byl vzorek piva zbaven oxidu uhličitého pomocí ultrazvuku při teplotě 40 °C po dobu 30 minut. Vzorek zbavený oxidu uhličitého byl upraven na pH 2 pomocí 30% HCl. Dále bylo odebráno 10 ml vzorku a bylo přidáno 1 ml Carrezova činidla I. (30 % hm. roztok síranu zinečnatého) a 1 ml Carrezova činidla II. (15 % hm. roztok hexakyanoželeznatanu draselného) na vysrážení polysacharidů. Poté došlo k odstředění vzorku na odstředivce při 14,5 tis. ot. za minutu po dobu 10 minut. Po odstředění byl opatrně odebrán odstředěný tekutý podíl. Vzorek byl zfiltrován přes nylonový mikrofiltr s velikostí pórů 0,45 μm a připraven na HPLC analýzu. Po celou dobu přípravy, byl vzorek obalen hliníkovou fólií.

7.4.2 Úprava vzorků ležáků

Po otevření spotřebitelského obalu byl vzorek piva zbaven oxidu uhličitého pomocí ultrazvuku při teplotě 40 °C po dobu 30 minut. Vzorek zbavený oxidu uhličitého byl upraven na pH 2 pomocí 30% HCl. Poté došlo k odstředění vzorku na odstředivce při 14,5 tis. ot. za minutu po dobu 10 minut. Vzorek byl zfiltrován přes nylonový mikrofiltr s velikostí pórů 0,45 μm a připraven na HPLC analýzu. Po celou dobu přípravy, byl vzorek obalen hliníkovou fólií.

7.4.3 Úprava vzorů nealkoholických piv a piv speciálních

Po otevření spotřebitelského obalu byl vzorek piva zbaven oxidu uhličitého pomocí ultrazvuku při teplotě 40 °C po dobu 30 minut. Vzorek zbavené oxidu uhličitého byl upraven na pH 2 pomocí 30% HCl. Dále bylo odebráno 10 ml vzorku a bylo přidáno 0,5 ml Carrezova činidla I. a 0,5 ml Carrezova činidla II. na vysrážení polysacharidů. Poté došlo k odstředění vzorku na odstředivce při 14,5 tis. ot. za minutu po dobu 10 minut. Po odstředění byl opatrně odebrán odstředěný tekutý podíl. Vzorek byl zfiltrován přes nylonový mikrofiltr s velikostí pórů 0,45 μm a připraven na HPLC analýzu. Po celou dobu přípravy, byly vzorky zabaleny hliníkovou fólií.

7.5 Optimalizace metody a použití mobilní fáze

Před samotným stanovením se musela najít vhodná metoda izolace a nalézt optimální chromatografické podmínky pro analýzu.

7.5.1 Použití mobilní fáze metanol a octan sodný

Dle postupu uvedeného v kapitole 7.4.3 byly připraveny náhodně vybrané vzorky piv. Byly použity standardy, pouze pro testování retenčního času daného vitaminu a vhodné vlnové délky pro jejich detekci. Byl použit i směsný standard vitaminů B_1, B_2, B_3, B_5 a B_6 pro optimalizaci rozseparování jednotlivých píků s pomocí daných kolon. Vzorky i standardy byly vstřikovány přes dávkovací ventil se smyčkou o objemu 20 µl. Byla použita izokratická eluce. Jednou složkou mobilní fáze byl 0,12 $mol.dm^{-3}$ octan sodný o pH 4,8 (upraveno 85% HCOOH), druhá složka byl metanol. Metanol a octan sodný byly nastaveny v poměru 90:10. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,8 $ml.min^{-1}$. Byla použita kolona Supelcosil LC 8 (150 x 4,6 mm; 5 µm). Teplota termostatu kolony při měření byla 30 °C. Čas pro analýzu byl zadán 30 minut. Vzorky byly měřeny při vlnových délkách 220, 230, 254 a 270 nm.

7.5.2 Použití mobilní fáze metanol a dihydrogenfosforečnan draselný

Postupováno bylo stejně jako je uvedeno v kapitole 7.5.1. Vzorky i standardy byly vstřikovány přes dávkovací ventil se smyčkou o objemu 20 µl. Byla použita izokratická eluce. Jednou složkou mobilní fáze byl dihydrogenfosforečnan draselný o pH 5,5 (upraveno KOH), druhá složka byl metanol. Metanol a dihydrogenfosforečnan draselný byly v poměru 10:90. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,8 $ml.min^{-1}$. Jako nová kolona byla testována Discovery C 18 (250 x 4,6 mm; 5 µm). Teplota termostatu kolony během analýzy byla 30 °C. Čas pro analýzu byl zadán 30 minut. Vzorky byly měřeny při vlnových délkách 220, 230, 254, 270 a 280 nm.

7.5.3 Použití mobilní fáze acetonitril a kyselina trifluoroctová

Postupováno bylo stejně jako je uvedeno v kapitole 7.5.1. Vzorky i standardy byly vstřikovány přes dávkovací ventil se smyčkou o objemu 20 µl. Byla použita gradientová eluce. Jednou složkou mobilní fáze byla 0,025% kyselina trifluoroctová, druhá složka byl acetonitril. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,8 $ml.min^{-1}$. Byla použita kolona Discovery C 18 (250 x 4,6 mm; 5 µm). Teplota termostatu kolony během analýzy byla

30 °C. Čas pro analýzu byl zadán 30 minut. Vzorky byly měřeny při vlnových délkách 220, 230, 254, 270 a 280 nm.

Tab. 2 Gradient mobilní fáze

Čas [min]	% acetonitrilu
0	13
3	13
15	100
20	100
30	100

7.5.4 Použití mobilní fáze acetonitril a octan sodný

Postupováno bylo stejně jako je uvedeno v kapitole 7.5.1. Vzorky i standardy byly vstřikovány přes dávkovací ventil se smyčkou o objemu 20 µl. Byla použita gradientová eluce, procentuální změna acetonitrilu je ukázaná v tabulce 3. Jednou složkou mobilní fáze byl 0,12 mol.dm^{-3} octan sodný o pH 4,8 (upraveno 85% HCOOH), druhá složka byl acetonitril. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,8 ml.min^{-1}. Použita byla kolona Discovery C 18 (250 x 4,6 mm; 5 µm). Teplota termostatu kolony při měření byla 30 °C. Čas pro analýzu byl zadán 30 minut. Vzorky byly měřeny při vlnových délkách 220, 230, 254 a 270 nm.

7.6 Vlastní měření vzorků piva metodou HPLC

Postupy uvedenými v kapitolách 7.4.1, 7.4.2 a 7.4.3 byly připraveny vzorky, které byly vstřikovány přes dávkovací ventil se smyčkou o objemu 20 µl. Byla použita gradientová eluce. Jednou složkou mobilní fáze byl 0,12 mol.dm^{-3} octan sodný o pH 4,8 (upraveno 85% HCOOH), druhá složka byl acetonitril. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,8 ml.min^{-1}. Byla použita kolona Discovery C 18 (250 x 4,6 mm; 5 µm). Teplota termostatu kolony při měření byla 30 °C. Čas pro analýzu byl zadán 25 minut. Vzorky byly měřeny při vlnových délkách 220, 230, 254 a 270 nm. Vzorky byly před analýzou přefiltrovány přes nylonový mikrofiltr o velikosti pórů 0,45 µm.

Tab. 3 Gradient mobilní fáze

Čas [min]	% acetonitrilu
0	13
3	13
15	100
20	100
25	100

7.7 kalibrační křivky

K vytvoření kalibrační křivky potřebné pro následné kvantitativní stanovení obsahu vitaminů B_1, B_2 a B_3 byly použity standardy tiaminu, riboflavinu a kyseliny nikotinové. Bylo naváženo 0,0200 g standardu s přesností na 0,0001 g. Poté došlo k rozpuštění navážky v redestilované vodě takovým způsobem, že byl získán zásobní roztok o koncentraci 20 $\mu g.ml^{-1}$. Z něj byla pro následné měření připravena kalibrační řada roztoků o koncentracích 1, 2,5 a 5 $\mu g.ml^{-1}$. Před dávkováním na kolonu proběhlo přefiltrování vzorků přes nylonový mikrofiltr. K analýze byla použita kolona Discovery C 18 (250 x 4,6 mm; 5 µm). Objem dávkovací smyčky byl 20 µl. Chromatografické podminky byly shodné jako při proměřování jednotlivých vzorků, jsou uvedeny v kapitole 7.6

Kalibrační křivka byla sestavena dle závislosti naměřených ploch píků (mA.V.s) na koncentraci daného vitaminu ($\mu g.ml^{-1}$).

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

8.1 Vysledky optimalizace chromatografických podmínek

8.1.1 Výsledky při oužití mobilní fáze metanol a octan sodný

Chromatografické podmínky byly popsány v kapitole 7.5.1. Použitím tohoto složení mobilní fáze došlo ke krytí retenčních času vitaminů obsažených ve vzorcích piva, proto je tato metoda nevhodná ke stanovení.

8.1.2 Výsledky při použití mobilní fáze metanol a dihydrogenfosforečnan draselný

Chromatografické podmínky byly popsány v kapitole 7.5.2. Tato metoda je opět nevhodná pro stanovení, neboť retenční časy některých vitaminů se kryjí.

8.1.3 Výsledky při použití mobilní fáze kyselina trifluoroctová a acetonitril

Chromatografické podmínky byly popsány v kapitole 7.5.3. Použitím tohoto složení mobilní fáze došlo ke krytí retenčních času vitaminů obsažených ve vzorcích piva, proto je tato metoda nevhodná ke stanovení.

8.1.4 Výsledky při použití mobilní fáze acetonitril a octan sodný

Chromatografické podmínky byly popsány v kapitole 7.5.4. Toto složení mobilní fáze i průběh gradientové eluce bylo nejvhodnější pro stanovení vitaminů ve vzorcích piva, proto byla tato metoda vybrána a následně použita pro vlastní měření.

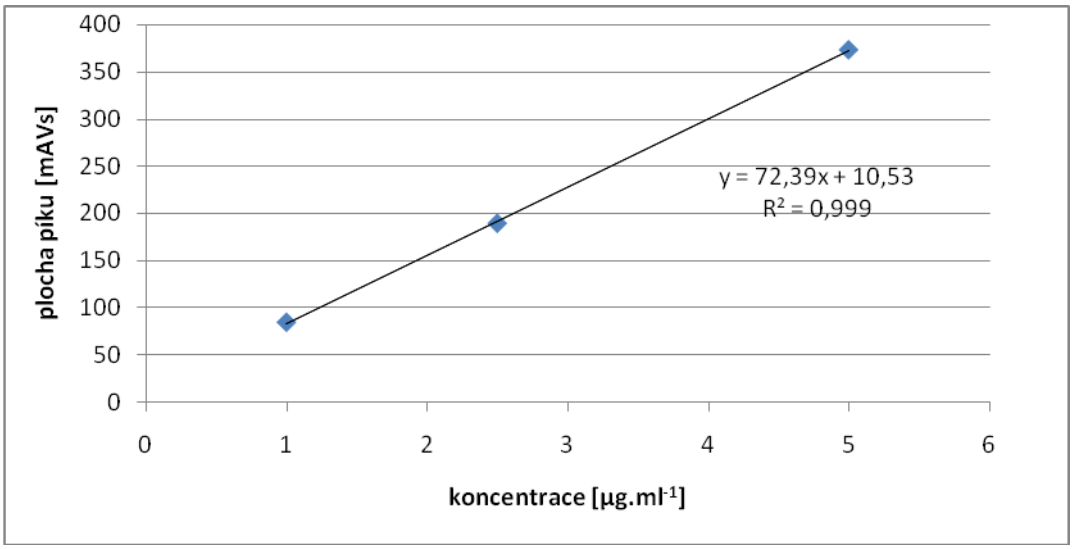
8.2 Výsledky měření kalibrace B komplexu

8.2.1 Výsledky měření kalibrace vitaminu B_1

Podle postupu uvedeného v kapitole 7.4.5 byly změřeny velikosti plochy píků standardu o koncentracích 1, 2,5 a 5 $\mu g.ml^{-1}$. Detekce proběhla při vlnových délkách 220, 230, 254 a 270 nm. Nejvyšší absorbanci a tudíž signál odezvy detektoru byl naměřen při 254 nm, z toho důvodu byla také kalibrační křivka sestrojena za těchto podmínek. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost ploch píků (mA.Vs) na daných koncentracích standardu ($\mu g.ml^{-1}$). Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 4 a na obrázku 5.

Tab. 4 Kalibrace vitaminu B_1 při vlnové délce 254 nm

koncentrace [µg.ml^{-1}]	plocha píku [mAVs]	průměrná plocha píku [mAVs]
1	80,6	88,33
	92,2	
	80,2	
2,5	189,7	189,30
	179,4	
	198,8	
5	352,5	373,367
	395,3	
	372,3	



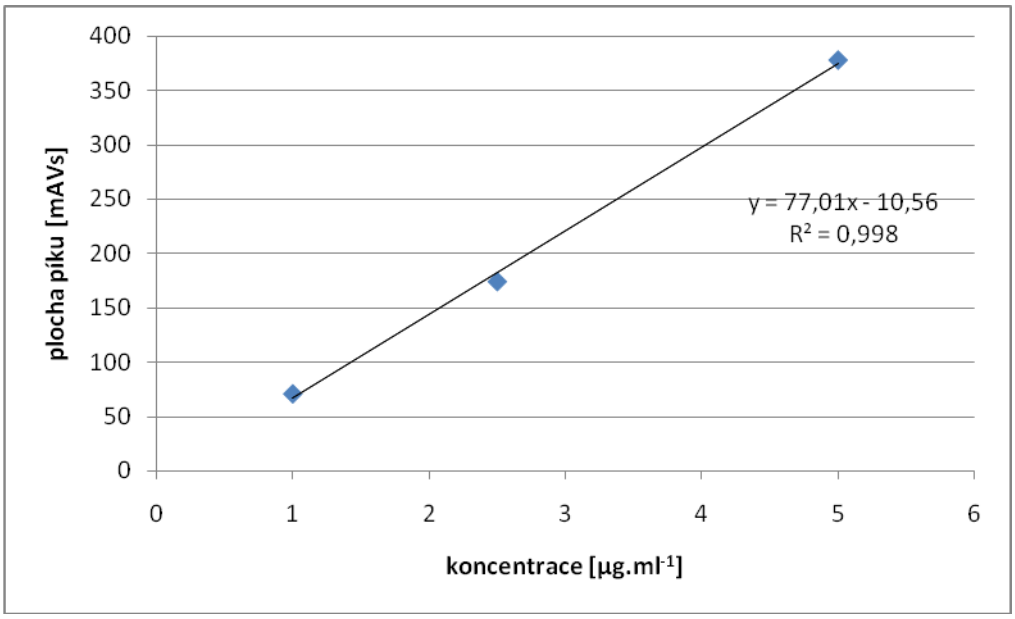
Obr. 5 Kalibrační křivka vitaminu B_1 při vlnové délce 254 nm

8.2.2 Výsledky měření kalibrace vitaminu B_2

Podle postupu uvedeného v kapitole 7.4.5 byly změřeny velikosti plochy píků standardu o koncentracích 1, 2,5 a 5 µg.ml^{-1}. Detekce proběhla při vlnových délkách 220, 230, 254 a 270 nm. Nejvyšší absorbanci a tudíž signál odezvy detektoru byl naměřen při 270 nm, z toho důvodu byla také kalibrační křivka sestrojena za těchto podmínek. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost ploch píků (mA.Vs) na daných koncentracích standardu (µg.ml^{-1}). Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 5 a na obrázku 6.

Tab. 5 Kalibrace vitaminu B_2 při vlnové délce 270 nm

koncentrace [µg.ml^{-1}]	plocha píku [mAVs]	průměrná plocha píku [mAVs]
1	77,7	71,267
	70,7	
	65,4	
2,5	135,4	174,27
	191,3	
	196,1	
5	384,1	377,400
	370,7	



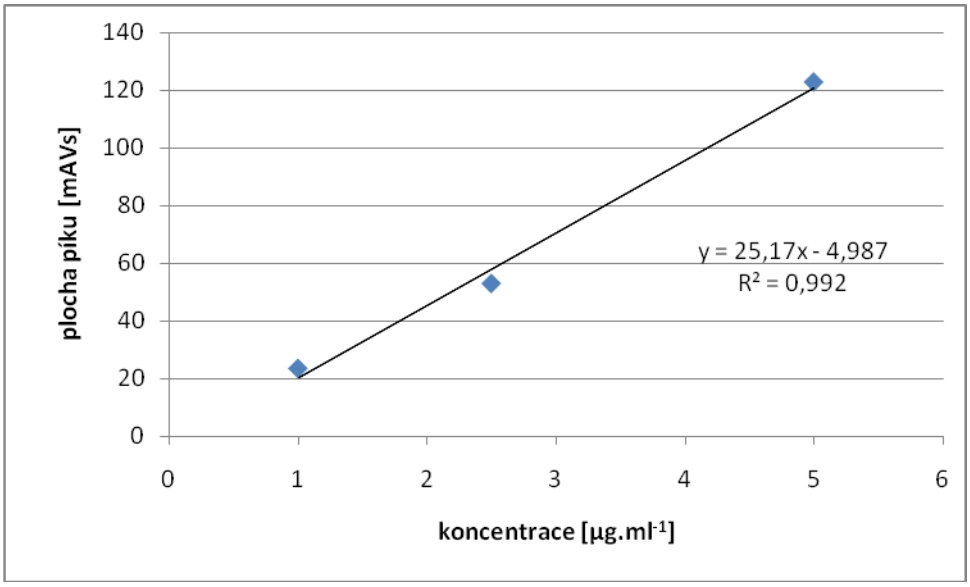
Obr. 6 Kalibrační křivka vitaminu B_2 při vlnové délce 270 nm

8.2.3 Výsledky měření kalibrace vitaminu B_3

Podle postupu uvedeného v kapitole 7.4.5 byly změřeny velikosti plochy píků standardu o koncentracích 1, 2,5 a 5 µg.ml^{-1}. Detekce proběhla při vlnových délkách 220, 230, 254 a 270 nm. Nejvyšší absorbanci a tudíž signál odezvy detektoru byl naměřen při 254 nm, z toho důvodu byla také kalibrační křivka sestrojena za těchto podmínek. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost ploch píků (mA.Vs) na daných koncentracích standardu (µg.ml^{-1}). Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 6 a na obrázku 7.

Tab. 6 Kalibrace vitaminu B_3 při vlnové délce 254 nm

koncentrace [µg.ml^{-1}]	plocha píku [mAVs]	průměrná plocha píku [mAVs]
1	24,1	23,367
	22,8	
	23,2	
2,5	44,1	52,867
	55,3	
	59,2	
5	123,2	122,80
	124,1	
	121,1	



Obr. 7 Kalibrační křivka vitaminu B_3 při vlnové délce 254 nm

8.3 Výsledky stanovení B - komplexu ve vybraných vzorcích piv

Z jednotlivých vzorků piva byl připraven vždy jeden vzorek, který byl pětkrát proměřen. V diplomové práci jsou uvedeny průměrné hodnoty ploch píků a průměrné hodnoty koncentrace daných vitaminů. Nejlepších výsledků bylo dosaženo pro vitaminy B_1 a B_3 při vlnové délce 254 nm a pro vitamin B_2 při vlnové délce 270 nm. Odečtená plocha píku byla

dosazena do rovnice regresní přímky kalibrační křivky, sestrojené pro každý vitamin. Pro vitamin B_1 měla rovnice regrese tvar y = 72,39 x + 10,53, pro vitamin B_2 měla tvar y = 77,01 x – 10,56 a pro vitamin B_3 měla tvar y = 25,17 x – 4,987.

Ze získaných koncentrací vitaminů B_1, B_2 a B_3 byl vypočten aritmetický průměr podle vztahu 1:

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

n - počet všech výsledků, $\bar{x}$ - výsledné hodnoty.

Míra přesnosti výsledků byla vyjádřena směrodatnou odchylkou, která byla zjištěna ze vztahu 2:

$$S.D. = \sqrt{\frac{1}{n}\left(\sum_{n-1}^{n} (x_i - \bar{x})^2\right)} \tag{2}$$

n – počet všech výsledků, $x_i - \bar{x}$ - míra odchylky jednotlivého výsledku

Skutečný obsah vitaminů B1, B2 a B3 byl vypočítán ze vzorce 3:

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{S.D.}{\sqrt{n}} . t \tag{3}$$

$\bar{x}$ - aritmetický průměr, *S.D.* - směrodatná odchylka, *n* – počet výsledků, *t* – Studentův koeficient

Hodnota Studentova koeficientu je při testované hladině významnosti α = 0,05 a při 5 stupních volnosti 2,571 [60].

8.3.1 Výsledky stanovení B – komplexu ve vzorcích světlých výčepních piv

Vzorky piva byly upraveny dle postupu uvedeného v kapitole 7.4.1. Chromatografické podmínky byly popsány v kapitole 7.4.4. Píky stanovovaných vitaminů byly v retenčních časech u vitaminu B_1 4,54 minuty, u vitamin B_2 v 9,5 minutě a u vitaminu B_3 v čase 4,05 minuty. Vitaminy B_1 a B_3 byly odečítány při vlnové délce 254 nm a vitamin B_2 byl odečítán při vlnové délce 270 nm. Vitamin B_1 u vzorků piva Budějovický Budvar, Staropramen a Velkopopovický Kozel nebylo možno změřit a následně kvantitativně vyhodnotit, protože hladina odezvy signálu detektoru pro tento vitamin byla pod jeho detekčním limitem.

Tab. 7 Průměrný obsah vitaminu B_1 ve vzorcích světlých výčepních piv

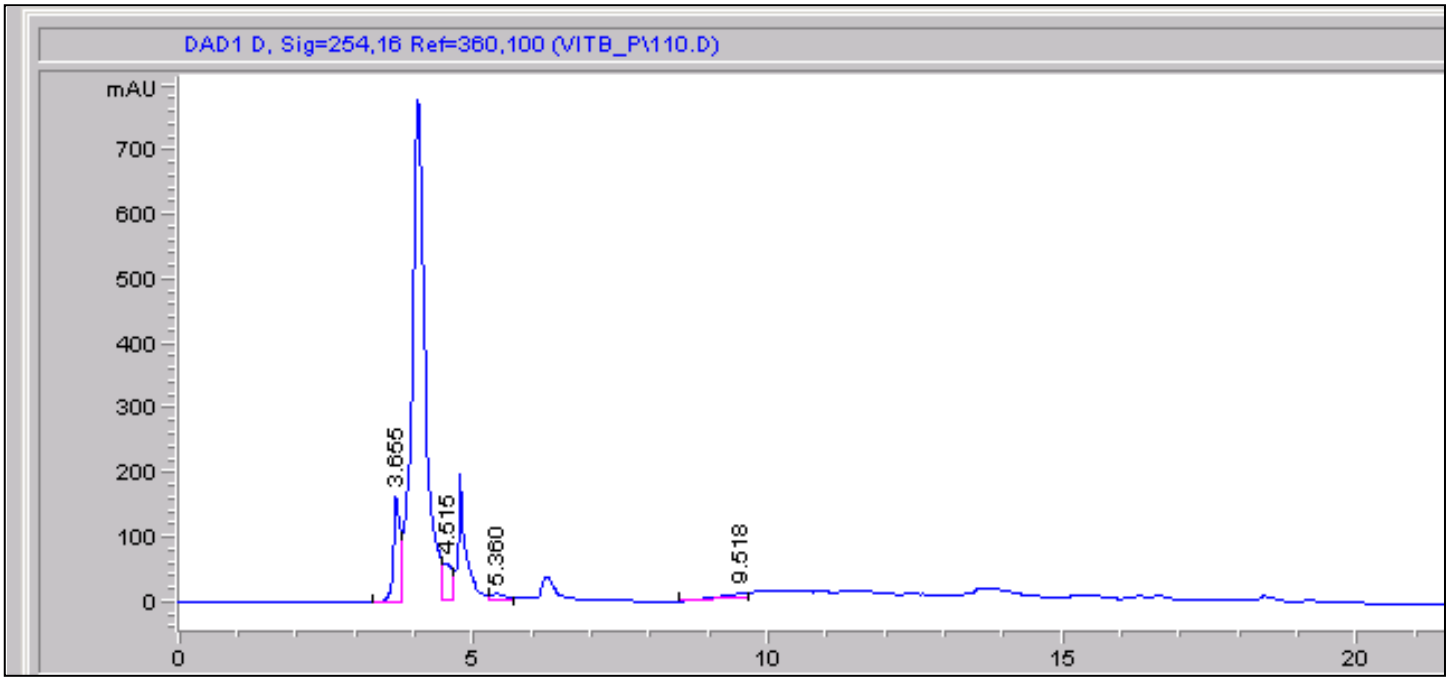
Vzorek piva	Průměrná plocha píku [mAVs]	Průměrný obsah vitaminu B_1 [mg.l^{-1}]	S.D. [mg.l^{-1}]	μ [mg.l^{-1}]
Gambrinus Světlý	35,45	0,34	0,12	0,34 ± 0,12

Tab. 8 Průměrný obsah vitaminu B_2 ve vzorcích světlých výčepních piv

Vzorek piva	Průměrná plocha píku [mAVs]	Průměrný obsah vitaminu B_2 [mg.l^{-1}]	S.D. [mg.l^{-1}]	μ [mg.l^{-1}]
Gambrinus	11,19	0,28	0,01	0,28 ± 0,01
Bud. Budvar	48,59	0,77	0,14	0,77 ± 0,14
Staropramen	49,64	0,78	0,02	0,78 ± 0,02
Velkop. Kozel	17,00	0,36	0,03	0,36 ± 0,03

Tab. 9 Průměrný obsah vitaminu B_3 ve vzorcích světlých výčepních piv

Vzorek piva	Průměrná plocha píku [mAVs]	Průměrný obsah vitaminu B_3 [mg.l^{-1}]	S.D. [mg.l^{-1}]	μ [mg.l^{-1}]
Gambrinus	24,24	1,16	0,04	1,16 ± 0,04
Bud. Budvar	24,39	1,17	0,02	1,17 ± 0,02
Staropramen	27,58	1,29	0,04	1,29 ± 0,04
Velkop. Kozel	26,37	1,25	0,09	1,25 ± 0,09



Obr. 8 Chromatogram piva Gambrinus Světlý při vlnové délce 254 nm

8.3.2 Výsledky stanovení B – komplexu ve vzorcích ležáků

Vzorky piva byly upraveny dle postupu uvedeného v kapitole 7.4.2. Chromatografické podmínky byly popsány v kapitole 7.4.4. Vitaminy B_1 a B_3 byly odečítány při vlnové délce 254 nm a vitamin B_2 byl odečítán při vlnové délce 270 nm.

Tab. 10 Průměrný obsah vitaminu B_1 ve vzorcích ležáků

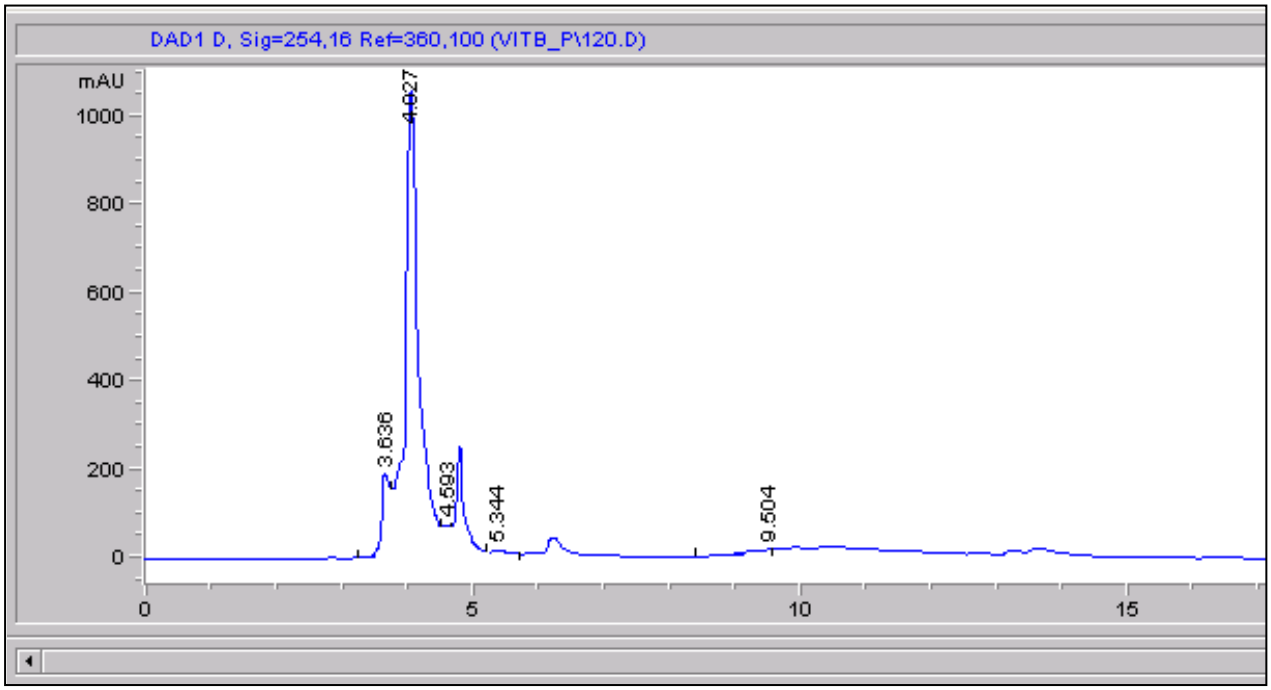
Vzorek piva	Průměrná plocha píku [mAVs]	Průměrný obsah vitaminu B_1 [mg.l^{-1}]	S.D. [mg.l^{-1}]	μ [mg.l^{-1}]
Gambrinus	43,50	0,46	0,02	0,456 ± 0,02
Buď. Budvar	24,38	0,19	0,01	0,19 ± 0,01
Pilsner Urquelle	48,09	0,52	0,24	0,52 ± 0,24

Tab. 11 Průměrný obsah vitaminu B_2 ve vzorcích ležáků

Vzorek piva	Průměrná plocha píku [mAVs]	Průměrný obsah vitaminu B_2 [mg.l^{-1}]	S.D. [mg.l^{-1}]	μ [mg.l^{-1}]
Gambrinus	50,61	0,79	0,01	0,79 ± 0,01
Buď. Budvar	61,94	0,94	0,10	0,94 ± 0,10
Pilsner Urquelle	52,38	0,82	0,05	0,82 ± 0,05
Staropramen	50,72	0,80	0,01	0,80 ± 0,01

Tab. 12 Průměrný obsah vitaminu B_3 ve vzorcích ležáků

Vzorek piva	Průměrná plocha píku [mAVs]	Průměrný obsah vitaminu B_3 [mg.l^{-1}]	S.D. [mg.l^{-1}]	μ [mg.l^{-1}]
Gambrinus	25,84	1,23	0,12	1,23 ± 0,12
Buď. Budvar	20,09	1,00	0,08	1,00 ± 0,08
Pilsner Urquelle	24,37	1,17	0,10	1,17 ± 0,10
Staropramen	22,17	1,05	0,14	1,05 ± 0,14



Obr. 9 Chromatogram piva Gambrinus Světlý Ležák při vlnové délce 254 nm

8.3.3 Výsledky stanovení B – komplexu ve vzorcích nealkoholických piv

Vzorky piva byly upraveny dle postupu uvedeného v kapitole 7.4.3. Chromatografické podmínky byly popsány v kapitole 7.4.4. Obsah vitaminu B_2 nebylo možno ve vzorku piva Radegast Birel stanovit, neboť se nacházel pod hranicí detekce.

Tab. 13 Průměrný obsah vitaminu B_1 ve vzorcích nealkoholických piv

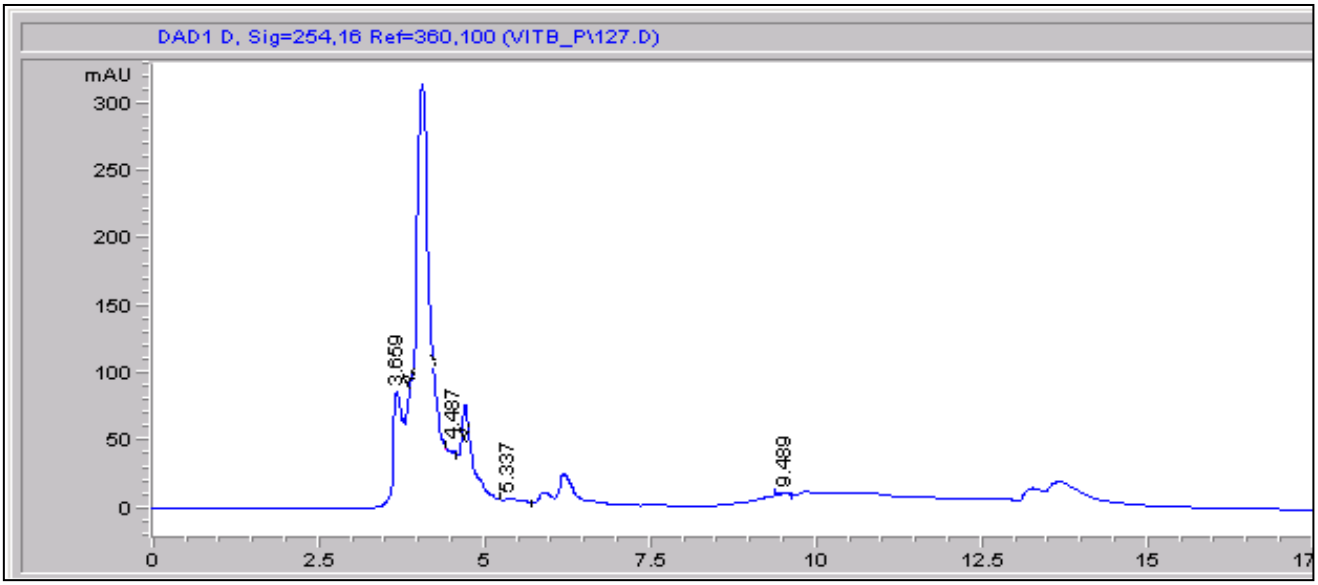
Vzorek piva	Průměrná plocha píku [mAVs]	Průměrný obsah vitaminu B_1 [mg.l^{-1}]	S.D. [mg.l^{-1}]	μ [mg.l^{-1}]
Bernard Free	16,15	0,08	0,02	0,08 ± 0,02
Starobrno Frií	19,03	0,12	0,04	0,12 ± 0,04
Radegast Birel	15,18	0,06	0,06	0,06 ± 0,06
Lobkowicz	18,00	0,10	0,04	0,10 ± 0,04

Tab. 14 Průměrný obsah vitaminu B_2 ve vzorcích nealkoholických piv

Vzorek piva	Průměrná plocha píku [mAVs]	Průměrný obsah vitaminu B_2 [mg.l^{-1}]	S.D. [mg.l^{-1}]	μ [mg.l^{-1}]
Bernard Free	10,69	0,28	0,01	0,28 ± 0,01
Starobrno Frií	15,00	0,33	0,02	0,33 ± 0,02
Lobkowicz	10,03	0,27	0,03	0,27 ± 0,03

Tab. 15 Průměrný obsah vitaminu B_3 ve vzorcích nealkoholických piv

Vzorek piva	Průměrná plocha píku [mAVs]	Průměrný obsah vitaminu B_3 [mg.l^{-1}]	S.D. [mg.l^{-1}]	μ [mg.l^{-1}]
Bernard Free	10,75	0,63	0,01	0,63 ± 0,01
Starobrno Frií	10,61	0,62	0,03	0,62 ± 0,03
Radegast Birel	14,90	0,79	0,11	0,79 ± 0,11
Lobkowicz	80,22	3,39	0,05	3,39 ± 0,05



Obr. 10 Chromatogram piva Bernard Free při vlnové délce 254 nm

8.3.1 Výsledky stanovení B – komplexu ve vzorcích speciálních piv

Vzorky piva byly upraveny dle postupu uvedeného v kapitole 7.4.3. Chromatografické podmínky byly popsány v kapitole 7.4.4. Vitamin B_1 u vzorků Zelené pivo, Staropramen D pivo a primátor Diamant nebylo možno stanovit, protože se nacházelo pod hranicí detekce.

Tab. 16 Průměrný obsah vitaminu B_1 ve vzorcích speciálních piv

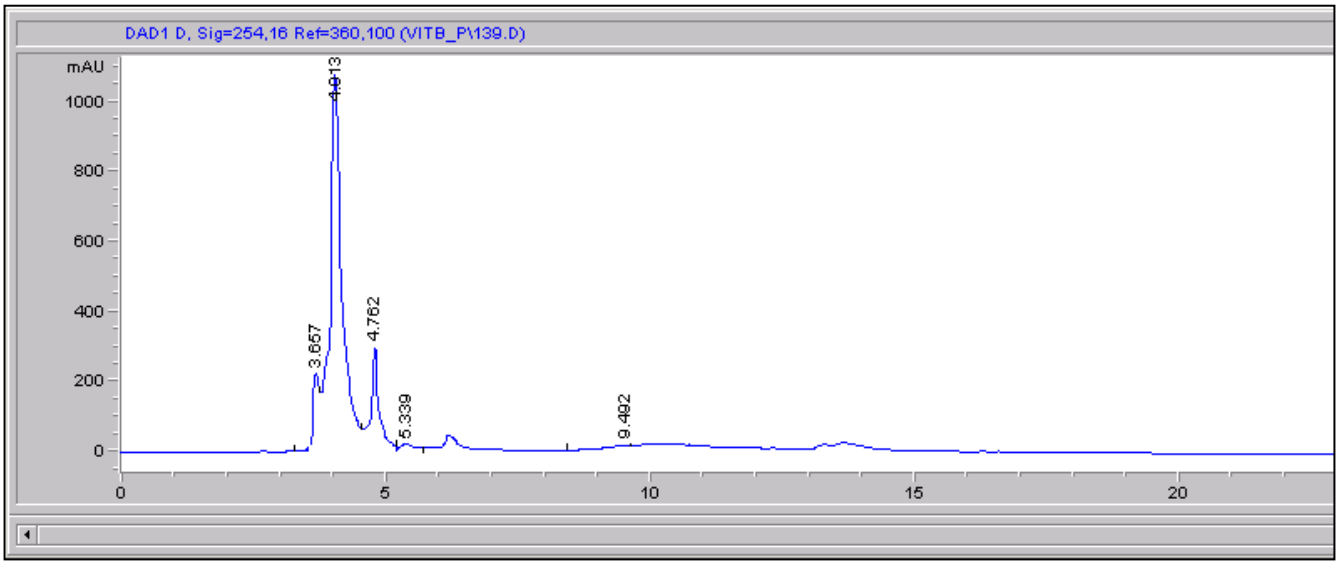
Vzorek piva	Průměrná plocha píku [mAVs]	Průměrný obsah vitaminu B_1 [mg.l^{-1}]	S.D. [mg.l^{-1}]	μ [mg.l^{-1}]
Krakonoš	34,60	0,33	0,02	0,33 ± 0,02

Tab. 17 Průměrný obsah vitaminu B_2 ve vzorcích speciálních piv

Vzorek piva	Průměrná plocha píku [mAVs]	Průměrný obsah vitaminu B_2 [mg.l^{-1}]	S.D. [mg.l^{-1}]	μ [mg.l^{-1}]
Krakonoš	43,93	0,71	0,05	0,71 ± 0,05
Zelené pivo	40,92	0,67	0,03	0,67 ± 0,03
Staropramen	30,19	0,53	0,03	0,53 ± 0,03
Primátor	24,48	0,46	0,02	0,46 ± 0,02

Tab. 18 Průměrný obsah vitaminu B_3 ve vzorcích speciálních piv

Vzorek piva	Průměrná plocha píku [mAVs]	Průměrný obsah vitaminu B_3 [mg.l^{-1}]	S.D. [mg.l^{-1}]	μ [mg.l^{-1}]
Krakonoš	28,47	1,33	0,05	1,33 ± 0,05
Zelené pivo	23,52	1,13	0,03	1,13 ± 0,03
Staropramen	20,85	1,03	0,06	1,03 ± 0,06
Primátor	24,69	1,18	0,06	1,18 ± 0,06



Obr. 11 Chromatogram Zeleného piva při vlnové délce 254 nm

Ve vzorku piva Gambrinus Světlý byl zjištěn průměrný obsah vitaminu B_1 0,34 ± 0,12 mg.l^{-1}, obsah vitaminu B_2 0,28 ± 0,01 mg.l^{-1} a obsah vitaminu B_3 0,16 ± 0,04 mg.l^{-1}. Ve vzorku piva Budějovický Budvar Světlé výčepní pivo byl zjištěn průměrný obsah vitaminu B_2 0,77 ± 0,14 mg.l^{-1}, obsah vitaminu B_3 1,17 ± 0,02 mg.l^{-1}. Ve vzorku piva Staropramen Světlý byl zjištěn průměrný obsah vitaminu B_2 0,78 ± 0,02 mg.l^{-1}, obsah vitaminu B_3 1,29 ± 0,04 mg.l^{-1}. U vzorku piva Velkopopovický Kozel Světlý byl zjištěn průměrný obsah vitaminu B_2 0,36 ± 0,03 mg.l^{-1}, obsah vitaminu B_3 1,25 ± 0,09 mg.l^{-1}. Množství vitaminu B_1 u vzorků Budějovický Budvar Světlé výčepní, Staropramen Světlý a Velkopopovický Kozel Světlý nebylo možno stanovit, protože se nacházelo pod hranicí detekce.

U vzorků Ležáků bylo zjištěno, že obsah vitamin B_1 ve vzorku piva Gambrinus Premium je 0,46 ± 0,02 mg.l^{-1}, obsah vitaminu B_2 0,79 ± 0,01 mg.l^{-1} je a obsah vitaminu B_3 je 1,23 ± 0,12 mg.l^{-1}. U vzorku piva Budějovický Budvar Světlý ležák byl zjištěn obsah vitaminu B_1 0,19 ± 0,01 mg.l^{-1} , obsah vitaminu B_2 0,94 ± 0,10 mg.l^{-1} a obsah vitaminu B_3 je 1,00 ± 0,08 mg.l^{-1}. Pivo Pilsner Urquelle obsahuje 0,52 ± 0,24 mg.l^{-1} vitaminu B_1, obsah vitaminu B_2 je 0,82 ± 0,05 mg.l^{-1} a obsah vitaminu B_3 je 1,17 ± 0,10 mg.l^{-1}. U vzorku piva Staropramen Ležák byl zjištěn obsah vitaminu B_2 v množství 0,80 ± 0,01 mg.l^{-1} a obsah vitaminu B_3 v množství 1,05 ± 0,14 mg.l^{-1}. Množství vitaminu B_1 nebylo možno stanovit, protože se nacházelo pod hranicí detekce.

U nealkoholických piv bylo zjištěno, že pivo Bernard Free obsahuje 0,08 ± 0,02 mg.l^{-1} vitaminu B_1, 0,28 ± 0,01 mg.l^{-1} vitaminu B_2 a 0,63 ± 0,01 mg.l^{-1} vitaminu B_3. U vzorku piva Starobrno Frií byl zjištěn obsah vitaminu B_1 0,12 ± 0,04 mg.l^{-1}, obsah vitaminu B_2 0,33 ± 0,02 mg.l^{-1} a obsah vitaminu B_3 0,62 ± 0,03 mg.l^{-1}. U vzorku piva Lobkowicz Premium Nealko byl zjištěn obsah vitamin B_1 0,10 ± 0,04 mg.l^{-1}, obsah vitaminu B_2 0,27 ± 0,03 mg.l^{-1} a obsah vitaminu B_3 3,39 ± 0,05 mg.l^{-1}. U vzorku piva Radegast Birel byl zjištěn obsah vitaminu B_1 0,06 ± 0,06 mg.l^{-1} , obsah vitaminu B_3 0,79 ± 0,11 mg.l^{-1}. Množství vitaminu B_2 nebylo možno stanovit, neboť se nacházelo pod hranicí detekce.

U vzorků speciálních piv se u žádného, kromě piva Krakonoš, nedalo stanovit množství vitaminu B_1, protože jeho odezva se nacházela pod hranicí detekce. Tato piva obsahovala vitamin B_1 ve velmi nízkých koncentracích nebo zde vitamin B_1 nebyl přítomen. U vzorku piva Krakonoš – vánoční speciál bylo zjištěno množství vitaminu B1 0,33 ± 0,02 mg.l^{-1}, množství vitaminu B_2 0,71 ± 0,05 mg.l^{-1}a množství vitaminu B_3 1,33 ± 0,05 mg.l^{-1}. Ve vzorku Starobrno Zelené pivo byl zjištěn obsah vitaminu B_2 0,67 ± 0,03 mg.l^{-1} a obsah vitaminu B_3 1,13 ± 0,03 mg.l^{-1}. Ve vzorku piva Staropramen D pivo byl zjištěn obsah vitaminu B_2 0,53 ± 0,03 mg.l^{-1} a obsah vitaminu B_3 1,03 ± 0,06 mg.l^{-1}. Ve vzorku Piva Primátor Diamant bylo zjištěno množství vitaminu B_2 0,46 ± 0,02 mg.l^{-1} a množství vitaminu B_3 1,18 ± 0,06 mg.l^{-1}.

Koncentrace vitaminů dle vyhledané literatury se pohybuje v rozmezí pro vitamin B_1 0,002 - 0,14 mg.l^{-1}, koncentrace vitaminu B_2 se pohybuje v rozmezí 0,07 - 1,3 mg.l^{-1} a koncentrace vitaminu B_3 se pohybuje v rozmezí 3 - 20 mg.l^{-1} [38]. Naše výsledky se pohybují v rozmezí od 0,08 - 0,52 mg.l^{-1} pro vitamin B_1, 0,27 - 0,94 mg.l^{-1} pro vitamin B_2 a 0,62 - 3,39 mg.l^{-1} a dalo by se říci, že obsah vitaminu B_2 byl srovnatelný s údaji, které poskytuje vyhledaná literatura. Mírný rozdíl mezi hodnotami nastává u vitaminů B_1 a B_3, kdy koncetrace vitaminu B_1 je mírně nad hranicí daného rozmezí a koncentrace vitaminu B_3 mírně pod hranicí daného rozmezí. Nase tělo však tyto vitaminy nemůže v plné míře využít, neboť přítomný alkohol resorpci snižuje.

Jedná se samozřejmě o průměrné hodnoty, které se liší v závislosti na technologii výroby piva (i na použitých surovinách při jeho výrobě, každý druh piva se liší svou výrobou a tudíž těžké je vzájemně srovnat), podmínkách skladování, expedice, způsobu prodeje apod. Vliv na obsah vitaminů mohla mít i samotná degradace vitaminů ve vzorku mezi jednotlivými chromatografickými měřeními i přes prováděná opatření, jako např. uchovávání vzorků při nízkých teplotách nebo v temnu.

Vitamin B_5 a B_6 nebylo možno za daných chromatografických podmínek v jednotlivých vzorcích piv nakonec stanovit, jejich plochy píků se překrývaly s rušivými složkami vzorků piva. Tento problém by se dal do budoucna vyřešit zařazením semipreparativní techniky SPE (Solid Phase Extraction, Extrakce na tuhé fázi), kdy by došlo k přečištění a zakoncentrování vzorku.

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo najít vhodnou metodu úpravy vzorků, nalézt optimální chromatografické podmínky pro analýzu a pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie stanovit množství B-komplexu ve vzorcích piva, které jsou k dostání v běžných tržních sítích. Cílem bylo stanovit vitaminy B_1, B_2, B_3, B_5 a B_6, bohužel vitaminy B_5 a B_6 nebylo možno stanovit.

Při hledání chromatografických podmínek bylo vyzkoušeno několik mobilních fází, jako nejvhodnější bylo vybráno použití acetonitrilu a 0,12 $mol.dm^{-3}$ octanu sodného o pH 4,8, bylo použito gradientové eluce, její průběh je zapsán v tabulce 3.

K proměření kalibračních křivek byly použity standardy tiaminu, riboflavinu a kyseliny nikotinové o koncentracích 1, 2,5 a 5 $\mu g.ml^{-1}$. Při následných výpočtech se vycházelo z přímky regrese obdržené pro vitaminy B_1 a B_3 při vlnové délce 254 nm a pro vitamin B_2 při 270 nm. Analýza proběhla na aparatuře Hewlett Packard 1100 s detektorem UV/VIS (DAD). Vyhodnocování výsledků proběhlo díky programu ChemStation Instrument 1. Termostat kolony byl nastaven na teplotu 30 °C. Analýza probíhala na koloně Discovery C 18 (250 x 4,6 mm; 5 µm). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,8 $ml.min^{-1}$.

Pro účel stanovení B-komplexu v tržních vzorcích piva byly vybrány 4 vzorky piva světlého výčepního, 4 vzorky ležáku, 4 vzorky nealkoholických piv a 4 vzorky piv speciálních. Obsahy vitaminů se u vzorků lišily jak dle druhu piva, tak i podle výrobce. Obsahy vitaminů se pohybovaly v rozmezí 0,08 - 0,52 $mg.l^{-1}$ u vitaminu B_1, 0,27 - 0,94 $mg.l^{-1}$ u vitaminu B_2 a 0,62 - 3,39 $mg.l^{-1}$ u vitaminu B_3. Pro srovnání byly vyhledány hodnoty o obsahu vitaminů v odborné literatuře, koncentrace vitaminu B_1 se pohybuje v rozmezí 0,002 - 0,14 $mg.l^{-1}$, koncentrace vitaminu B_2 se pohybuje v rozmezí 0,07 - 1,3 $mg.l^{-1}$ a koncentrace vitaminu B_3 se pohybuje v rozmezí 3 - 20 $mg.l^{-1}$. Dalo by se tedy říci, že obsah vitaminu B_2 byl srovnatelný s údaji, které poskytuje vyhledaná literatura. Mírný rozdíl mezi hodnotami nastává u vitaminů B_1 a B_3, kdy koncetrace vitaminu B_1 je mírně nad hranicí daného rozmezí a koncentrace vitaminu B_3 mírně pod hranicí daného rozmezí poskytnuté v odborné literatuře.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] ODSTRČIL, J. ODSTRČILOVÁ, M. *Chemie potravin*, Brno 2006, ISBN 80-7013-435-6

[2] SALAČ, G. *Stolničení,* FORTUNA, 2004, 224 s. ISBN: 80-7168-752-9

[3] KLÍČENÍ JEČMENE, *dostupné na:* http:// www.pivovarska-skola.cz, *[on-line 2010-16-12]*

[4] TECHNOLOGIE VÝROBY PIVA, *dostupné na*: http://utb.cepac.cz, *[on-line 2010-17-12]*

[5] TRADIČNÍ TECHNOLOGIE VÝROBY PIVA, *dostupné na*: http://www.sci.muni.cz/mikrob/kvasbiotech/pivo/tradpiv.html *[online 2011-01-12]*.

[6] KOSAŘ, K. a kol. *Technologie výroby sladu a piva*. 1. vyd. Praha: VIVAS pre-press, 2000. 394 s. ISBN 80-902658-6-3.

[7] ROP, O. HRABĚ, J. *Nealkoholické a alkoholické nápoje*, Zlín 2009, ISBN: 978-80-7318-748-4.

[8] EßLINGER,H. M. *Handbook of Brewing*, Weinheim 2009, ISBN 978-3-527-31678-8

[9] PIVOVARNICTVÍ, *dostupné na:* http://www.vscht.cz, *[on-line 2011-17-02]*

[10] KADLEC, P. *Technologie potravin II.*, Praha 2008, ISBN 978-80-7080-510-7

[11] PIVO *dostupné na:* http://cs.wikipedia.org/wiki/Pivo, *[on-line 2010-11-07]*

[12] PIVOVARNICTVÍ, *dostupné na*: http://www.vscht.cz, *[on-line 2010-16-12]*

[13] CHLÁDEK, L. *Pivovarnictví*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2007. 208 s. ISBN 978-80-247-1616-9

[14] HLAVÁČEK, F., LHOTSKÝ, A. *Pivovarnictví*, 2.vyd., Praha: Nakladatelství technické literatury, 1972. 540 s, ISBN 04-827-72

[15] Vyhlaška Ministerstva zemědělstvi ČR č. 335/1997 Sb., pro pivo (oddil 3)

[16] HORSEY, I.S. *Brewing*, Royal Society of Chemisty, 1999, ISBN 0-85404-568-6

[17] HORSEY, I.S. *A history of beer and brewing,* Royal Society of Chemisty, 2003, ISBN 0-85404-630-5

[18] M. JACKSON *Encyklopedie piva,* Quarto Publishing 1988, ISBN 80-85769-37-9

[19] VEČERKOVÁ, H. *Abeceda piva,* Praha 2007, 206 s. ISBN 978-80-85005-86-8

[20] PIVOVARY V KRAJÍCH *dostupné na*: http://pivni.info *[on-line 2010-7-11]*

[21] CICHÁ, I. *Pivovary Moravy A Slezska*, Region Silesia 2002, 108 s, ISBN 80-238-9776-4

[22] PIVOVAR STAROBRNO *dostupné na:* http://www.starobrno.cz/ [*on-line 2010-7-11*]

[23] KRAUSOVÁ, D. *Desítkou roku je světlý výčepní Březňák – rozhodlo Sdružení přátel piva*. Potravinářský zpravodaj. Praha,2010, roč.XI č. 8,s. 25

[24] PIVOVAR ČERNÁ HORA *dostupné na:* http://www.pivovarch.cz/ *[on-line 2010-12-11]*

[25] PIVOVAR BERNARD *dostupné na:* http://www.bernard.cz/ *[on-line 2010-12-11]*

[26] PIVOVAR RADEGAST *dostupné na:* www.radegast.cz *[on-line 2010-26-11]*

[27] PIVOVAR OSTRAVAR *dostupné na:* http://www.ostravar.cz/ *[on-line 2010-12-11]*

[28] SABMILLER *dostupné na:* http://cs.wikipedia.org/wiki/SABMiller *[on-line 2011-12-03]*

[29] PIVOVAR STAROPRAMEN *dostupné na:* http://www.staropramen.cz *[on-line 2010-27-11]*

[30] PIVOVAR ZUBR *dostupné na:* http://www.zubr.cz *[on-line 2010-26-11]*

[31] PIVOVAR SVIJANY *dostupné na:* http://www. pivovarsvijany.cz *[on-line 2010-27-11]*

[32] PIVOVAR KRAKONOŠ *dostupné na:* http:// www.pivovar-krakonos.cz *[on-line 2011-26-03]*

[33] PIVOVAR JANÁČEK *dostupné na:* http:// www.pivovar-janacek.cz *[on-line 2011-11-03]*

[34] PIVOVAR VELKÉ POPOVICE *dostupné na:* http:// www.kozel.cz *[on-line 2010-26-11]*

[35] VORAŽKA,Z. *Biochemie 3*, Praha:Akademie věd České republiky, 2002 ISBN 80-200-0471-8

[36] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., BUDÍNSKÝ P. *Potravinářská biochemie II*, UTB ve Zlíně, 2007 ISBM 80-7318-395-1

[37] LEDVINA,M., STOKLASOVÁ,A., CERMAN,J. *Biochemie pro studující medicíny II. Díl*, Praha: Univerzita Karlova, 2009 ISBN 978-80-246-1415-1

[38] BAXTER,D. Hughes P.S. *Beer: Quality, safety and nutritional aspects*, Royal Society of Chemisty, 2001, ISBN 0-8504-588-0

[39] THIAMIN *dostupné na:* http://www.bmrb.wisc.edu/metabolomics/ mol_summary/?molName=Thiamin *[on-line 2011-09-04]*

[40] RODWELL,V.W., MURRAY, R.K.., MAYES,P. A., GRANNERD. K., *Harperova Biochemie*, Appleton & Large, 2002 ISBN 80-7319-013-3

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

[42] INSEL,P. TURNER, R.E. ROSS, D. *Discovering Nutrition*, 2010, ISBN 978-0-7637-5873-8

[43] THIAMIN *dostupné na:* http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/ vitamins/thiamin/ *[on-line 2011-09-04]*

[44] RIBOFLAVIN *dostupné na:* http://themedicalbiochemistrypage.org/vitamins.html#b2 *[on-line 2011-12-04]*

[45] PETTEYS,B. J., FRANK, E. L. *Rapid determination of vitamin B2 (riboflavin) in plasma by HPLC,* Clinica Chimica Acta, 2011 vol. 412. p. 38-43

[46] NIACIN (B3) *dostupné na:* http://www.worldofmolecules.com/supplements/niacin.htm *[on-line 2011-16-04]*

[47] NIACIN *dostupné na:* http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/niacin/ *[on-line 2011-16-04]*

[48] PANTOTHENIC ACID *dostupné na:* http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/98/Pantothenic_acid.gif *[on-line 2011-16-04]*

[49] PANTOTHENIC ACID *dostupné na:*

http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/pa/ *[on-line 2010-24-03]*

[50] VITAMIN B6 *dostupné na:* http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/VitB6.gif *[on-line 2010-24-03]*

[51] CHROMATOGRAFIE dostupné na: http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/ chromatografie.doc *[on-line 2010-24-11]*

[52] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.

[53] ŠTULÍK, K. a kol. *Analytické separační metody*, Praha 2005. 260 s. ISBN 80-246-0852-9

[54] AUTOSAMPLERY HPLC *dostupné na:* http://www.hplc.cz *[on-line 2011-27-03]*

[55] KAPALINOVÝ CHROMATOGRAF *dostupné na:* http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html *[on-line 2011-28-04]*

[56] CHROMATOGRAFICKÁ KOLONA *dostupné na*: http://hplc.cz *[on-line 2011-28-04]*

[57] UV/VIS HPLC detektory dostupné na: http:// www.hplc.cz *[on-line 2011-28-04]*

[58] SPEKTROFOTOMETR *dostupné na:* http://www.wikipedia.cz *[on-line 2011-19-04]*

[59] FLUORESCENČNÍ HPLC DETEKTORY *dostupné na:* http://www.hplc.cz *[on-line 2011-27-03]*

[60] SOMMER, L. *Teoretické základy analytické chemie III.*, Brno: Chemická fakulta Vysokého učení technického v Brně, 1995

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ACP-SH	Acyl Carrier protein, protein nesoucí acylové zbytky
Co-A	Koenzym A
DAD	Diode array detector, Detektor s diodovým polem
EPM	Extrakt v původní mladině
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
GC	Gas Chromatography, Plynová chromatografie
GPC	Gel Permeation Chromatography, Gelová permeační chromatografie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEC	Ion, Exchange Chromatography, Iontově - výměnná chromatografie
NAD^+	Nikotinamidadenindinukleotid
$NADP^+$	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NCP	Normal Phase Chromatography, chromatografie na normálních fázích
RCP	Reversed Phase Chromatography, Chromatografie na obrácených fázích
SEC	Size Exclusion Chromatography, Sterická exkluzní chromatografie
SPE	Solid Phase Extraction, Extrakce na tuhé fázi
TDP	Tiamindifosfát
TTP	Tiamintrifosfát

SEZNAM OBRÁZKŮ

SEZNAM TABULEK