

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Bakalářská práce

2022

Eliška Dvořáková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Eliška Dvořáková**
Osobní číslo: **C18081**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Stanovení vitamínu C pomocí moderních analytických metod**
Téma práce anglicky: **Determination of ascorbic acid using recent analytical methods**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Úvodní část zaměřte na vitamíny obecně.
2. Provedte literární rešerši zabývající se stanovením vitamínu C ve ovoci a zelenině pomocí moderních analytických metod. Uveďte konkrétní příklady zajímavých stanovení vitamínu C v ovoci a zelenině.
3. Stručně popište využívané analytické metody.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Aleš Eisner, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **5. února 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Ing. Karel Ventura, CSc. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2022

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení vitamínu C pomocí moderních analytických metod

Bakalářská práce

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych tímto poděkovat mému vedoucímu bakalářské práce panu Ing. Alešovi Eisnerovi Ph.D. za cenné rady a vedení bakalářské práce. Dále děkuji rodině a přátelům za podporu a pomoc během studia.

Prohlašuji:

Práci s názvem stanovení vitamínu C pomocí moderních analytických metod jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Eliška Dvořáková v.r.

ANOTACE

Práce se zabývá vitaminy, především vitaminem C a jeho stanovením pomocí moderních analytických metod v ovoci a zelenině. První část práce je věnována stručné charakterizaci ovoce a zeleniny a teoretickému úvodu do světa vitaminů. Následující část pojednává již o stanovení a o vybraných metodách s konkrétními příklady.

KLÍČOVÁ SLOVA

ovoce, zelenina, vitamin C, stanovení

TITLE

Determination of ascorbic acid using recent analytical methods

ANNOTATION

The thesis deals with vitamins, mainly with vitamin C and its determination by modern analytical methods in fruits and vegetables. The first part of the thesis is devoted to a brief characterization of fruits and vegetables and a theoretical introduction to the world of vitamins. The following section is already about determination and selected methods with specific examples.

KEYWORDS

fruits, vegetables, vitamin C, determination

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK	11
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK.....	12
ÚVOD.....	13
1 Ovoce a zelenina.....	14
1.1 Ovoce	14
1.2 Zelenina.....	15
2 Vitaminy	16
2.1 Historie a vývoj.....	16
2.2 Rozdělení.....	17
2.3 Funkce vitaminů	18
2.4 Stabilita vitaminu.....	19
2.5 Obohacování potravin vitaminy	19
2.6 Distribuce vitaminů v tkáních	20
2.7 Metabolismus vitaminů a jejich aktivace	20
2.8 Vylučování vitaminů.....	20
2.9 Antivitaminy.....	20
2.10 Nadměrný příjem vitaminů	21
2.11 Nedostatečný příjem vitaminů.....	21
2.12 Výskyt v potravinách	21
3 Vitami C.....	22
3.1 Struktura a názvosloví.....	22
3.2 Biochemie.....	23
3.3 Fyziologie a výživa.....	23
3.4 Využití.....	24
3.5 Výskyt	24

3.6	Reakce	25
3.6.1	Oxidace.....	26
3.6.2	Hydrolyza kyseliny dehydroaskorbové.....	27
3.7	Změny a ztráty.....	27
4	Stanovení vitamínu C	29
4.1	Elektrochemické metody.....	29
4.1.1	Voltametrie	29
4.1.1.1	Stanovení obsahu kyseliny askorbové v ovocných šťávách pomocí voltametrie provedené s využitím platinové a uhlíkové pastové elektrody	30
4.1.1.2	Stanovení kyseliny askorbové v ovoci a zelenině stripping voltametrií na elektrodě ze skelného uhlíku	31
4.1.2	Polarografie	33
4.1.2.1	Stanovení kyseliny askorbové v ovoci a zelenině za použití polarografie ...	33
4.1.3	Coulometrie	34
4.1.3.1	Coulometrické stanovení vitamínu C s použitím dithiothreitolu, N-ethylmaleimidu a askorbát oxidázy	34
4.1.4	Amperometrie	35
4.1.4.1	Modifikovaná uhlíková pastová elektroda s inkluzivním komplexem β - cyklodextrin-ferrocenem pro amperometrické stanovení kyseliny askorbové	36
4.2	Kapalinová chromatografie (LC).....	37
4.2.1	Kapalinová chromatografie pro stanovení askorbové a dehydroaskorbové kyseliny v ovoci a zelenině	37
4.2.2	Současné stanovení askorbové a dehydroaskorbové kyseliny v zelenině a ovoci kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní spektrometrií	39
4.3	Kapilární zónová elektroforéza (CZE).....	40
4.3.1	Stanovení celkového vitamínu C v ovoci kapilární zónovou elektroforézou.....	41
4.4	UV/VIS spektroskopie	42
4.4.1	Jednoduchá UV spektrofotometrická metoda pro stanovení obsahu vitamínu C v různých druzích ovoce a zeleniny v oblasti Silétu v Bangladéši	42
4.4.2	Spektrofotometrická metoda použitá pro stanovení obsahu vitamínu C v ovoci a zelenině.....	43
4.5	Průtoková injekční analýza	44

4.5.1 Průtoková injekční analýza se spektrofotometrickou detekcí pro stanovení kyseliny askorbové v ovocných šťávách	44
ZÁVĚR.....	46
SEZNAM CITACÍ.....	47

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 – L-askorbová kyselina	22
Obrázek 2 – D-askorbová kyselina.....	22
Obrázek 3 – L-isoaskorbová.....	22
Obrázek 4 – D-isoaskorbová	22
Obrázek 5 – L-dehydroaskorbová kyselina.....	22
Obrázek 6 – Vznik hydrátu L-dehydroaskorbové kyseliny	26
Obrázek 7 – Oxidace L-askorbové kyseliny na kyselinu L-dehydroaskorbovou	26
Obrázek 8 – Oxidace kyseliny L-askorbové singletovým kyslíkem	27
Obrázek 9 – Hydrolýza kyseliny L-dehydroaskorbové	27
Tabulka 1 – Seznam vitaminů, vitamerů a provitaminů	17
Tabulka 2 – Obsah vitamínu C v některých potravinách	25
Tabulka 3 – Výsledky stanovení AA diferenčně pulsní voltametrií s platinovou elektrodou	31
Tabulka 4 – Výsledky stanovení AA diferenčně pulsní voltametrií s uhlíkovou pastovou elektrodou	31
Tabulka 5 – Stanovení kyseliny askorbové v pomerančové a zeleninové šťávě pomocí stripping voltametrie	32
Tabulka 6 – Výsledný obsah AA v rajčatech a pomerančích stanovený polarograficky	34
Tabulka 7 – Výsledný obsah AA a DHAA stanovený coulometricky	35
Tabulka 8 – Výsledný obsah AA stanovený amperometricky	36
Tabulka 9 – Obsah AA a DHAA ve vzorcích stanovený pomocí LC s UV/VIS detektorem	39
Tabulka 10 – Obsah AA a DHAA stanovený pomocí LC s hmotnostním detektorem	40
Tabulka 11 – Obsah vitamínu C stanovený spektrometricky	43
Tabulka 12 – Obsah vitamínu C stanovený UV/VIS spektrofotometrií	44
Tabulka 13 – Obsah AA získaný průtokovou injekční analýzou	45

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AA – kyselina askorbová

CZE – Kapilární zónová elektroforéza

DHAA – kyselina dehydroaskorbová

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DTT – dithiothreitol

ESI – ionizace elektrosprejem

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

LC – kapalinová chromatografie

SKE – nasycená kalomelová elektroda

UV/VIS – ultrafialové/viditelné

ÚVOD

Cílem bakalářské práce byl vitamin C a jeho stanovení pomocí moderních analytických metod v ovoci a zelenině, respektive v ovocných a zeleninových šťávách. Toto téma mě zaujalo, protože vitaminy všeobecně jsou v dnešní době často diskutovaným tématem. Zejména pro jejich nezbytnost pro lidský organismus. Mezi důležité a probírané aspekty patří například jejich dostatečný příjem, způsoby zpracování potravin obsahujících vitaminy či jejich celkové pozitivní účinky na člověka. Konkrétně vitamin C jsem si vybrala z toho důvodu, že je mezi širokou veřejností asi nejvíce známý a ve větší míře je na něj zaměřen i marketing.

Na začátku práce se zaměříme na vitaminy obecně, na jejich charakterizaci, rozdělení, funkce, historii, stabilitu. Dále se seznámíme konkrétně s vitaminem C. Podíváme se na jeho biochemické vlastnosti, reakce, využití, výskyt a na projevy jeho nedostatku.

Poslední část obsahuje metody stanovení vitaminu C s konkrétními příklady. Jednu část tvoří elektrochemické techniky jako je například voltametrie, polarografie atd. Dále jsou uvedeny další nespektrální i spektrální metody.

1 Ovoce a zelenina

1.1 Ovoce

Jako ovoce jsou označovány obvykle semena, plody, plodenství nebo souplodí zpravidla víceletých semenných rostlin. Termín ovoce ovšem není z biologického hlediska přesně vymezen. Tento pojem v gastronomii, potravinářství a v zemědělství obecně označuje sladké dužinaté plody. V zemědělské, potravinářské a gastronomické praxi se tento termín používá k označení spíše sladkých dužinatých plodů kulturních keřů, stromů, případně lesních plodin. Dělíme ho do těchto základních skupin [1]:

- jádrové – aronie, jablka, hrušky, jeřabiny atd.
- bobulové – lesní ovoce, angrešt, rybíz atd.
- peckové – nektarinky a broskve, meruňky, třešně a višně, švestky atd.
- skořápkové – lískové a vlašské ořechy, jedlé kaštiny atd.
- hrozny vinné révy
- exotické ovoce (plody pěstované v subtropích a tropech) – citrusové ovoce, banány, kiwi, fíky, avokádo, ananas atd.

Ovoce má proměnný obsah vody, dužnaté ovoce obsahuje 70-90 % vody, skořápkové pouze 4-8 %. Dále je zdrojem cukrů, obsah se pohybuje v rozmezí 5-15 %. Naopak obsah tuků a bílkovin je z hlediska výživy u většiny druhů zanedbatelný. Výjimku například tvoří skořápkové ovoce, především ořechy, které jsou bohaté na tuky s vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin. Ovoce je dobrým zdrojem řady vitaminů (vitamin C, vitaminy řady B atd.), ochranných látek nejčastěji ve formě přírodních antioxidantů a minerálních látek. Neocenitelnou výhodou pro konzumaci ovoce je jeho vysoká sensorická hodnota, kterou způsobují přítomné cukry, těkavé aromatické látky (silice), organické kyseliny a další sensoricky významné látky.

Tyto plody konzumujeme buď čerstvé, tedy v syrovém stavu, nebo zpracované. Mezi zpracované ovoce řadíme například marmelády, džemy, ovocné protlaky, kompoty atd. U těchto výrobků se prakticky pokaždé snižuje výživová hodnota daného ovoce, a naopak dochází často ke zvyšování energetické hodnoty (přídavkem cukru). Z toho vyplývá, že z výživového hlediska, je lepší konzumovat čerstvé ovoce.

1.2 Zelenina

Mezi zeleninu patří jedlé části rostlin (např. bulvy, nať, kořeny, listy). Zeleninu rovněž dělíme do základních skupin:

- kořenová – petržel, křen, mrkev, celer, ředkvička atd.
- košťálová – brokolice, kapusta, zelí, květák, kedlubna atd.
- cibulová – cibule, pažitka, česnek atd.
- listová – špenát, salát atd.
- plodová – okurky, meloun vodní, paprika, rajče, lilek atd.
- výhonky – bambus, chřest atd.
- klasy – kukuřice cukrová atd.
- natě – celer, kopr, libeček atd.

Voda je hlavní složkou zeleniny, její obsah přesahuje u převážné části druhů 80 %. Obsah tuků a bílkovin je obdobně jako u ovoce výživově nevýznamný (výjimkou je lusková zelenina). Energetická hodnota zeleniny je zanedbatelná, a to kvůli nízkému obsahu cukru, která má maximálně vliv na chuť. U některých druhů můžeme nalézt vyšší obsah škrobu (lusková zelenina). Zelenina je významným zdrojem hořčíku a draslíku, vlákniny a vitaminů (vitaminy skupiny B, vitamin C). Dalšími důležitými látkami jsou netěkavé i těkavé látky. Tyto látky jsou zdrojem typické vůně a chuti. Některé z nich působí jako prevence různých onemocnění (například kardiovaskulárního onemocnění).

Zelenina může obsahovat i zdraví škodlivé látky. V mrkvi, špenátu a dalších druzích se za určitých podmínek při nadměrném používání dusíkatých hnojiv mohou vyskytovat dusičnany. Dalšími nebezpečnými látkami jsou toxické přírodní látky, jako je ve špenátu se vyskytující kyselina oxalová, ta zvyšuje riziko ledvinových kamenů.

Stejně jako u ovoce můžeme zeleninu konzumovat syrovou nebo zpracovanou. Mezi možné úpravy patří sterilace, sušení, chemická konzervace, proslazování či solení. Také v tomto případě platí, že výživové hodnoty se s procedurami snižují [2].

2 Vitaminy

Vitaminy řadíme mezi organické nízkomolekulární látky. Tyto sloučeniny jsou syntetizovány výhradně autotrofními organismy. Pro heterotrofní organismy jsou vitaminy sice nezbytné, například pro látkovou výměnu, ale syntetizují je pouze výjimečně. Proto je přijímají jako exogenní látky z potravy. Vitaminy nejsou považovány za zdroj energie ani jako stavební materiál a své využití nalézají především jako složky katalyzátorů biochemických reakcí. Můžeme je rovněž pojmenovat jako exogenní esenciální biokatalyzátory [3]. Jedná se o velmi různorodou skupinu látek s rozmanitými chemickými strukturami a lišící se i svými funkcemi v organismech [4].

2.1 Historie a vývoj

Termín vitamin byl v roce 1912 zaveden polským biochemikem Kazimierzem Funkem, kterému se podařilo izolovat látku účinnou v prevenci nemoci beri-beri, vyskytující se v rýžových slupkách. Dnes už se ví, že se jednalo o vitamin B₁. Funk navrhl nazvat tuto látku vitamin, neboť se domníval, že se jednalo o významnou aminokyselinu. Název je odvozen z latinského „*vital amine*“, v překladu „životně důležité aminy“ [5]. Z historického hlediska byly za vitaminy označovány všeobecně látky, které jsou potřebné pro běžnou výživu a jejich nedostatek způsobuje onemocnění. To dnes ovšem platí jen o některých z nich [6].

Pojem vitamin jako takový se v historii tedy využíval pro řadu chemických sloučenin, které nesplňovaly dnešní podmínky pro zařazení mezi vitaminy. O řadě těchto tělu prospěšných látek mylně popisovaných v odborné literatuře 30. a 40. let vyšlo najevo, že jsou shodné s jinými esenciálními nutričními látkami, nebo že se jedná o směs více sloučenin. Například se jednalo o tzv. vitamin M, B₁₁, T a B_C, které jsou identické s kyselinou listovou, vitamin G, což je vlastně riboflavin (vitamin B₂) aj. [5]. Dříve, když struktura všech vitaminů nebyla známá a vitaminové preparáty byly směsí několika látek, se pro vyjadřování kvantitativních hodnot využívaly tzv. biologické jednotky (kuřecí, myší atd.). Tyto jednotky udávaly potřebné množství k vyvolání fyziologického účinku na daném zvířeti. V následujících letech byly odvozeny tzv. mezinárodní jednotky IU (z anglického výrazu International Units), s přímou vazbou na hmotnost konkrétního vitaminu. V dnešní době se tyto jednotky u vitaminů rozpustných v tucích využívají především v odvětvích farmacie a medicíny. Naopak pro vitaminy v potravinách se obsah vyjadřuje v hmotnostních jednotkách [3].

2.2 Rozdělení

Nejčastěji používané kritérium třídění vitaminů je podle společných fyzikálních vlastností. Vitaminy se poté dělí podle rozpustnosti do těchto 2 skupin:

- vitaminy rozpustné v tucích, takzvané lipofilní vitaminy (vitamin A, D, E a K)
- vitaminy rozpustné ve vodě (respektive v polárním rozpouštědle), takzvané hydrofilní vitaminy (vitamin C a vitaminy skupiny B, tzv B-komplex – vitamin B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇, B₉, B₁₂) [3].

Některé vitaminy netvoří pouze jedna aktivní forma, ale jedná se o tzv. vitaminovou skupinu, která se skládá z jednotlivých, strukturně podobných, sloučenin. Tyto sloučeniny se souhrnně nazývají vitamery.

Existují také látky, které samy o sobě nevykazují fyziologické účinky, nicméně slouží jako prekurzory vitaminů, tzv. provitaminy. Z těchto látek dokáže organismus vitaminy syntetizovat [5]. Seznam všech vitaminů, jejich vitamerů a některých provitaminů je uveden v **Tabulka 1** – Seznam vitaminů, vitamerů a provitaminů

Tabulka 1 – Seznam vitaminů, vitamerů a provitaminů [3] [5]

Vitamin	Vitamer	Provitamin
Vitamin A	retinol (A ₁) retinal 3,4-dehydroretinol (A ₂) retinová kyselina	α, β, γ-karoten
Vitamin D	cholecalciferol (D ₃) ergocalciferol (D ₂)	7-dehydrocholesterolergosterol ergosterol
Vitamin E	tokoferoly tokotrienoly	
Vitamin K	fyllochinony (K ₁) menachinony (K ₂) menadion (K ₃) menadiol-difosfát (K ₄)	
Vitamin C	kyselina L-askorbová	

Vitamin	Vitamer	Provitamin
	kyselina L-dehydroaskorbová	
Vitamin B ₁ , Thiamin	thiamin	
Vitamin B ₂ , Riboflavin (vitamin G)	riboflavin	
Vitamin B ₃ , Niacin (vitamin PP)	kyselina nikotinová nikotinamid	tryptofan
Vitamin B ₅ , Pantothenová kyselina	kyselina pantothenová koenzym A	
Vitamin B ₆ , Pyridoxin	pyridoxol pyridoxal pyridoxamin	
Vitamin B ₇ , Biotin (vitamin H)	biotin	
Vitamin B ₉ , Folacin	kyselina listová	
Vitamin B ₁₂ , Korinoidy	kyanokobalamin (B ₁₂) hydroxykobalamin (B _{12a}) akvakobalamin (B _{12b}) nitritokobalamin (B _{12c}) adenosinkobalamin	

2.3 Funkce vitaminů

Vitaminy nacházejí uplatnění v oxidačně redukčních systémech [4]. Některé z nich mají antioxidační účinky (vitamin E, C atd.), které mohou mít pozitivní vliv na různé civilizační nemoci jako je například rakovina, alergie, srdeční onemocnění, osteoporóza aj. Také zajišťují některé běžné fyziologické funkce (například vývoj, růst).

Některé vitaminy mají i metabolické funkce. Druh těchto funkcí u jednotlivých vitaminů nebo vitamerů závisí jednak na jejich chemické reaktivitě a také na jejich distribuci v tkáni či buňce. [5].

Lipofilní vitaminy plní v organismu různé funkce. Vitamin A₁ nachází například uplatnění v biochemických reakcích zrakového vjemu. Dále pak provitamin A (konkrétně β-karoten) má funkci antioxidantu a rostlinného barviva.

Vitaminy rozpustné ve vodě mají katalytický účinek. V organismech vesměs fungují jako kofaktory enzymů v metabolismu bílkovin, tuků, nukleových kyselin, sacharidů a dalších látek, které jsou produktem sekundárního metabolismu [3].

2.4 Stabilita vitamínu

Některé vitaminy jsou velmi labilní a jsou citlivé na nejrůznější faktory a fyzikálně chemické vlivy. U vitaminů rozpustných v tucích obecně platí, že jsou méně stabilní k oxidaci, pokud se využívají k výživě, stabilizují se často pomocí antioxidantů. Tato skupina vitaminů je citlivá na působení kyslíku, tepla, kovových iontů a UV záření. Vitaminy rozpustné ve vodě využívané při výrobě potravin jsou stabilnější. Výjimkou je riboflavin, vitamínu B₆ a B₁₂, které se rozkládají vlivem působení světla. Dále pak thiamin, který je citlivý k alkalickému prostředí [5].

Jak již bylo zmíněno, vitaminy jsou většinou exogenní látky a jsou přijímány buď jako suroviny nebo jako potraviny. Během tepelného zpracování v rámci kulinářských úprav, anebo během technologického zpracování dochází k menším či větším ztrátám u většiny vitaminů. U vitaminů rozpustných ve vodě dochází k největším ztrátám výluhem, u vitaminů rozpustných v tucích jsou ztráty způsobeny nejvíce již zmíněnou oxidací [3].

Obsah vitamínu v surovinách a v potravinách se v technologické praxi bere jako indikátor kvality a šetrnosti zpracování, a také jako ukazatel vhodného skladování hotových potravinářských výrobků a surovin [7]. Nutno podotknout, že stabilita různých forem vitaminů je odlišná a ovlivněna vnějšími faktory, konkrétními potravinami a také použitými technologiemi [3].

2.5 Obohacování potravin vitaminy

Vzhledem k významnosti ve výživě se dnes vitaminy v potravinářském průmyslu využívají k obohacování velkého množství výrobků, tzv. k fortifikaci a restituci potravin. Restitucí se doplňují hladiny vitaminů na původní obsah. Fortifikací se rozumí obohacení na vyšší koncentraci, než byla původní. Toto obohacování se provádí obvykle z fyziologických důvodů. Mohou se do potravin přidávat i jako barviva (β-karoten) nebo antioxidanty

(vitamin C, E). Obohacování se hojně využívá k výrobě různých doplňků stravy tzv. multivitaminových přípravků [3].

2.6 Distribuce vitaminů v tkáních

Vitaminy rozpustné v tucích se nahromadují v tkáních s vysokým obsahem tuků (játra, tukové tkáně). V případě, že poklesne jejich příjem, jsou z tkání podle potřeby uvolňovány. Naopak vitaminy rozpustné ve vodě se v organismu zadržují jen v malém množství a většinou jsou rychle z těla vylučovány [5].

2.7 Metabolismus vitaminů a jejich aktivace

Některé vitaminy působí v biologických systémech bez nutnosti metabolické aktivace nebo vazby na kofaktor (například enzym). Mezi přímo působící vitaminy patří vitamin E, C a K, respektive některé jejich formy. Většina vitaminů ovšem vyžaduje metabolickou aktivaci. Metabolická transformace forem vyskytujících se v potravě na formy, které jsou metabolicky aktivní, může probíhat buď přímou modifikací chemické struktury vitaminů nebo spojením s jiným metabolicky důležitými faktory. Vitaminy vyžadující metabolickou aktivaci jsou například vitamin A, D, vitamin B₆ aj. Některé vitaminy jsou biologicky aktivní pouze tehdy, pokud jsou vázány na protein. Mezi vitaminy, které se musí vázat na proteiny, patří například vitamin B₆, niacin atd. [5].

2.8 Vylučování vitaminů

Pro vitaminy rozpustné v tucích obecně platí, že jsou vylučovány z jater se žlučí a následně, pokud nedochází k jejich resorpci, jsou vylučovány se stolicí. Výjimku tvoří vitamin E a A, které mají metabolity do jisté míry rozpustné ve vodě a jsou vylučovány močí. Vitaminy rozpustné ve vodě se vylučují výhradně močí, a to neporušené (například riboflavin) nebo ve formě metabolitů rozpustných ve vodě (např. vitamin C, B₁₂) [5].

2.9 Antivitaminy

Antivitaminy neboli antagonisté vitaminů neumožňují plné využití vitaminů nebo vitaminy inhibují [3]. Jedná se také o látky, které určitým způsobem eliminují jejich biochemické využití v organismu, a vyvolávají tak projevy spojené s jejich nedostatkem. Konkrétně se antivitaminy dají rozdělit do následujících skupin:

- látky strukturně podobné vitaminům
- látky tvořící s vitaminy nevyužitelné komplexy

- enzymy přeměňující vitaminy [7].

Antivitaminy patřící do první skupiny řadíme mezi tzv. pravé antivitaminy. Tyto antagonisty nelze obvykle odstranit běžnými technologickými úpravami a zákroky. Následující dvě skupiny antivitaminu lze do jisté míry odstranit použitím vhodných kulinárních nebo technologických postupů, jako je třeba denaturace bílkovinné části vitamínu, která je vázaná v nevyužitelném komplexu s bílkovinou či tepelná inaktivace enzymů [3].

2.10 Nadměrný příjem vitaminů

Tento stav se odborně nazývá hypervitaminosa a je způsoben příliš vysokým příjmem vitaminů rozpustných v tucích, konkrétně skupin vitaminů A a D. Tento stav vyvolává poruchy biochemických procesů a v krajních případech vede až k těžkým onemocněním [3].

2.11 Nedostatečný příjem vitaminů

Nedostatečný příjem vitaminů vyvolává hypovitaminosu. Pokud vitamin v organismu zcela chybí, jedná se o avitaminosu. V minulosti byla deficiencie vitaminů jednou z příčin mnoha chorob a úmrtí. Jednalo se především o kurděje (nedostatek vitamínu C), pelagra (nedostatek některých vitaminů B-komplexu), beri-beri (nedostatek thiaminu), křivice (vitamin D). V dnešní době jsou tato onemocnění dobře známá a lze jim předcházet [3]. Hypovitaminosa a avitaminosa mají různé příčiny, nejčastěji se jedná o:

- nedostatečný příjem vitaminů v potravě
- nedostatečné vstřebávání vitaminů v zažívacím traktu (nejčastější příčinou jsou zánětlivá a průjmová onemocnění či zrychlená peristaltika)
- zvýšená potřeba vitaminů v organismu
- vliv antivitaminů [4].

2.12 Výskyt v potravinách

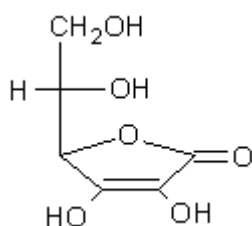
Vitaminy se v potravinách vyskytují v proměnném množství obvykle od jednotek $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ až po tisíce $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Obsah závisí na druhu potraviny i vitamínu a je ovlivněn i metodou jejich zpracování. V potravinách se vitaminy nachází volně i ve vázané formě. Obvykle jsou vázány na sacharidy nebo bílkoviny. Důležitými zdroji vitaminů jsou v první řadě základní potraviny jako mléko a mléčné výrobky, chléb a další cereální výrobky, maso a masné výrobky, ovoce a zelenina. Tyto potraviny obvykle zajišťují potřebný příjem vitaminů v organismu [3].

3 Vitami C

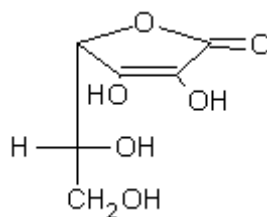
Vitamin C patří mezi nejdůležitější a nejvýznamnější vitaminy a hlavním zdrojem tohoto exogenního vitamínu je ovoce a zelenina. Maďarský vědec Albert Szent-Györgyi ho popsal koncem dvacátých let minulého století [6]. V lidském organismu v obecném pojetí plní dva úkoly. Stabilizuje psychiku a imunitu [8].

3.1 Struktura a názvosloví

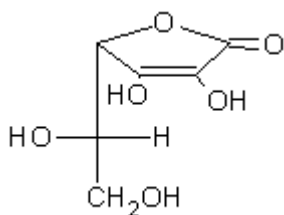
Kyselina askorbová je základní biologicky aktivní sloučeninou vitamínu C. Tato kyselina má čtyři stereoisomery. Aktivitu vitamínu C má kyselina L-askorbová (**Obrázek 1**). Ostatní izomery, mezi které patří kyselina D-askorbová (**Obrázek 2**), druhý pár enantiomerů (sloučeniny se stejným sumárním vzorcem, které jsou zrcadlově obráceny) L-isoaskorbová kyselina (**Obrázek 3**) a D-isoaskorbová kyselina (**Obrázek 4**) nevykazují biologickou aktivitu. Aktivitu vitamínu C vykazuje také kyselina L-dehydroaskorbová (**Obrázek 5**) [3].



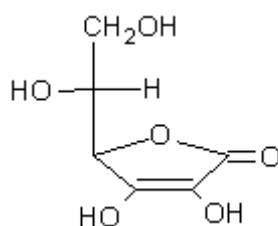
Obrázek 1 – L-askorbová kyselina



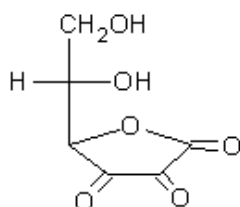
Obrázek 2 – D-askorbová kyselina



Obrázek 3 – L-isoaskorbová



Obrázek 4 – D-isoaskorbová



Obrázek 5 – L-dehydroaskorbová kyselina

3.2 Biochemie

Kyselinu askorbovou jsou schopny syntetizovat všechny zelené rostliny. Tyto rostliny svoji energetickou potřebu pokrývají fotosyntézou. Schopnost syntetizovat AA u živočichů chybí u většiny ryb, hmyzu, bezobratlých a některých druhů ptáků a savců [3]. Tito živočichové postrádají enzym L-gulonolaktonoxidasu [4]. Vitamin C plní funkci vitaminu pouze u vybraných savců jako je člověk, morčata, primáti a netopýři. V případě netopýřů se jedná pouze o druhy, které se živí ovocem.

Funkce kyseliny askorbové souvisí hlavně s jejími redoxními vlastnostmi [3]. Účastní se především přenosu elektronů. Podílí se také na hydroxylačních reakcích, které probíhají v organismu u živočichů, na biosyntéze prostaglandinů nebo mukopolysacharidů, absorpci iontových forem železa a jeho transportu. Dále stimuluje transport chloridových a sodných iontů. Nachází uplatnění v metabolismu drog a cholesterolu.

S antioxidantními vlastnostmi vitaminu C souvisejí důležité reakce s aktivní formou kyslíku, respektive s volnými radikály a reakce s oxidovanými formami vitaminu E zabezpečující ochranu lipidů membrán a vitaminu E před oxidací [7].

3.3 Fyziologie a výživa

Doporučený denní příjem byl dříve 30 mg, u těhotných žen 60 mg, u mladistvých 50 mg. Dnes se doporučená denní dávka pohybuje v rozmezí 60-200 mg. Denní dávka se zvyšuje až na 400-1000 mg v případě, že u člověka dochází k rekonvalescenci. Déle je zvýšený příjem potřebný například při respiračních onemocnění atd.

Potřeba vitaminu C je výhradně kryta vitaminy z potravy, především zeleninou (30-40 %), ovocem (30-35 %), brambory (20-30 %) a méně pak mlékem (necelých 10 %) [3].

Mezi příznaky hypovitaminózy patří například nateklé a krvácející dásně, které snadno tvoří paradentózní kapsy, některé projevy stárnutí (vrásky, ztráta pružnosti kůže, křehkost kostí, vypadávání vlasů a zubů). V důsledku nedostatku vitaminu C může vzniknout například chudokrevnost, šedý zákal, zvyšuje se náchylnost k nachlazení a infekcím, dochází ke špatnému hojení ran, k poruchám spánku, depresivním náladám a může docházet k zhoršení psychického stavu [8]. Akutní avitaminóza způsobuje například nemoc zvanou skorbut neboli kurděje.

Mezi antivitaminy C patří oxidoreduktasy (například askorbát oxidasa, askorbátperoxidasa aj.), které se uplatňují v metabolismu vitaminu C rostlin a živočichů [3].

3.4 Využití

Díky svým vlastnostem (antioxidant, vitamin) má vitamin C široké využití jako potravinářské aditivum hlavně v technologii masa a tuků, v konzervářské a kvasné technologii a v cereální technologii. Dále se jako antioxidant (například ve vodě rozpustná sůl askorbové kyseliny, nitrium-askorbát) používá k inhibici nitrosaminů v masných výrobcích, nakládaném mase nebo při výrobě šunky.

V ovoci a zelenině nachází rovněž využití. K ovocným džusům, mrazírensky skladovanému, a konzervovanému ovoci je kyselina askorbová přidávána pro její antioxidační účinky, kdy slouží k prevenci nežádoucích změn aroma během zpracování a skladování. V poměrně nízkých koncentracích slouží jako inhibitor reakcí spojených s enzymovým hnědnutím, a to při sušení, loupání a krájení ovoce a zeleniny [3]

3.5 Výskyt

V potravinách živočišného původu jsou významným zdrojem vitaminu C pouze játra. Ostatní potraviny (vejce, mléko a maso) mají jako zdroj vitaminu zanedbatelný význam.

V potravinách rostlinného původu se obvykle 90-95 % vitaminu vyskytuje ve formě askorbové kyseliny, zbytek ve formě dehydroaskorbové kyseliny. Nejvyšší obsah vitaminu C má čerstvá zelenina a čerstvé ovoce. Mezi jednotlivými druhy jsou ovšem velké rozdíly obsahu vitaminu C. Ten závisí na vegetačních podmínkách během růstu, způsobu posklizňového zpracování, stupni zralosti a dalších faktorech. Některé potraviny s vysokým obsahem vitaminu C (šípky, černý rybíz, kadeřavá petržel) zpravidla nepředstavují velký význam pro doplnění vitaminu, neboť se konzumují pouze příležitostně nebo v malé míře. Větší význam mají potraviny s průměrným obsahem vitaminu C (např. brambory), které se mohou konzumovat pravidelně a ve větším množství [3].

Obsah vitaminu C ve vybraných potravinách živočišného i rostlinného původu je uveden v **Tabulka 2**. V této tabulce je rovněž jeden příklad obsahu tohoto vitaminu v potravině, ve které se kyselina askorbová používá jako aditivní látka.

Tabulka 2 – Obsah vitamínu C v některých potravinách [3]

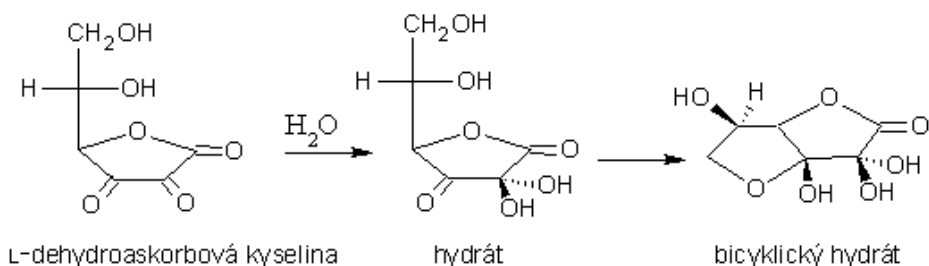
Potravina	mg.kg⁻¹ (nebo mg.dm⁻³) v jedlém podílu	Potravina	mg.kg⁻¹ (nebo mg.dm⁻³) v jedlém podílu
maso	10-20	mrkev	50-100
šunka*	300-500	petržel kadeřavá	1500-2700
vnitřnosti	50-340	pažitka	430
mléko	5-20	pór	150-300
jablka	15-50	cibule	90-100
hrušky	20-40	česnek	150-160
švestky	25-45	křen	450-120
broskve	70-100	zelí	170-700
višně, třešně	60-300	kapusta hlávková	700-1400
angrešt	330-480	kapusta růžičková	1000-1030
rybíz černý	1100-3000	brokolice	1010-1130
hroznové víno	20-50	květák	47-1610
jahody	400-700	kedluben	280-700
borůvky	90	salát hlávkový	60-300
melouny	130-590	špenát	350-840
pomeranče	300-600	rajčata	80-380
citrony	300-640	lilek	80
grapefruit	240-700	paprika	620-3000
ananas	150-250	okurka	65-110
banány	90-320	chřest	150-400
kiwi	700-1270	hrášek	80-1410
mango	100-350	fazolové lusky	90-300
papája	620-980	řepa salátová	65
šípky	2500-10000	brambory	80-400

*Askorbová kyselina se používá jako aditivní látka

3.6 Reakce

Kyselina askorbová se účastní mnoha reakcí, mezi nejvýznamnější patří její oxidace na kyselinu dehydroaskorbovou. Také může reagovat například s volnými radikály, s dusitany,

s bílkovinami atd. Kyselina dehydroaskorbová může podléhat například hydrolýze a ve vodných roztocích je přítomna ve formě hydratovaného bicyklického monomeru (**Obrázek 6**).

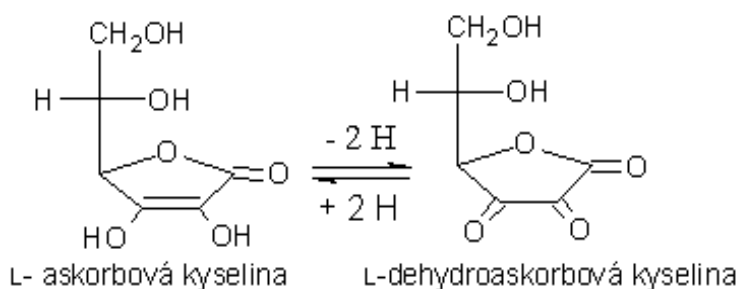


Obrázek 6 – Vznik hydrátu L-dehydroaskorbové kyseliny

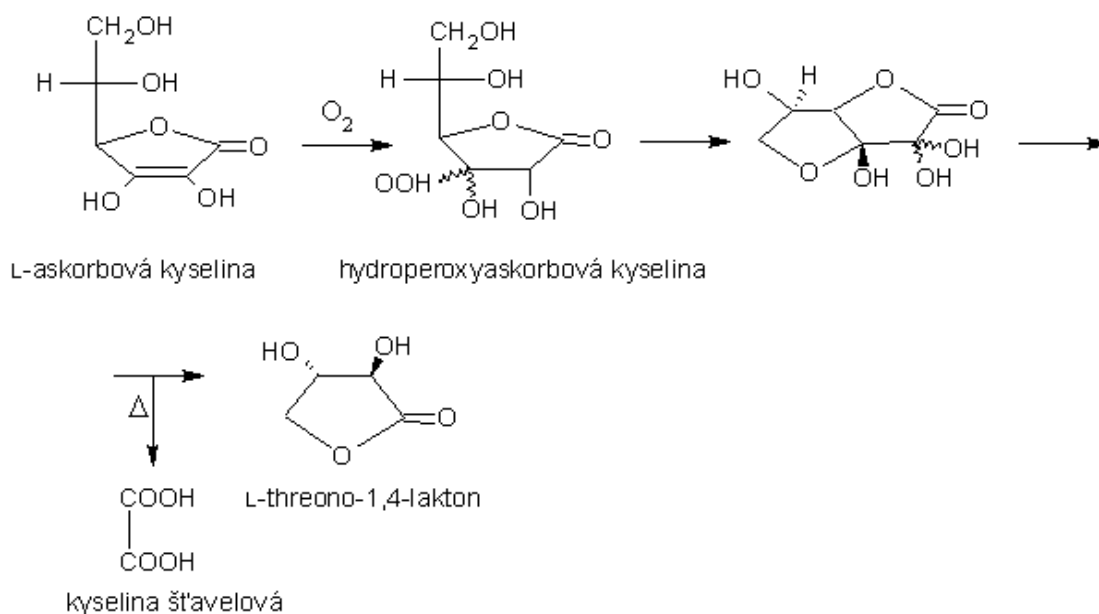
3.6.1 Oxidace

K oxidaci dochází působením oxidačních činidel jako je například peroxid vodíku nebo vzdušný kyslík. Tato reakce může být rovněž katalyzována působením enzymů (tzv. oxidoreduktas). Oxidace kyseliny askorbové na kyselinu dehydroaskorbovou (**Obrázek 7**) může probíhat několika různými mechanismy a jedná se o vratnou reakci, DHAA může být pomocí vhodných činidel (cystein, hydrochinon) zpět redukována na kyselinu askorbovou.

Autooxidací vzdušným kyslíkem, která je příčinou ztrát v potravinách během zpracování, vzniká kyselina šťavelová a 1,4-lakton L-threonové kyseliny a jako meziproducty vystupují hydroperoxy kyseliny askorbové (**Obrázek 8**). Reakce je závislá na pH prostředí. Nejrychleji probíhá v alkalickém prostředí a nejpomaleji pak v prostředí kyselém [3].



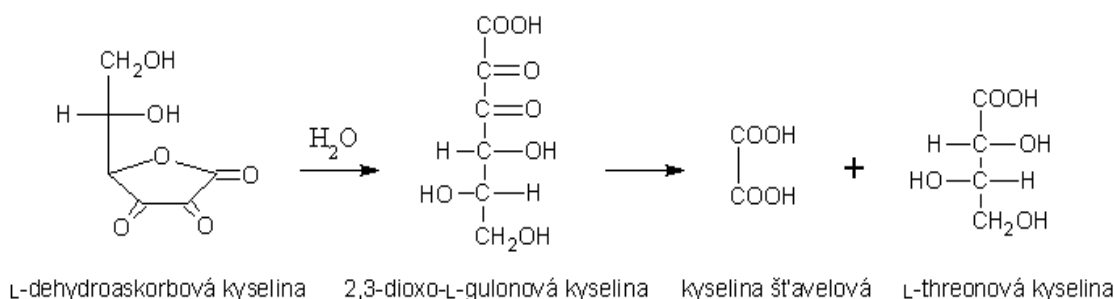
Obrázek 7 – Oxidace L-askorbové kyseliny na kyselinu L-dehydroaskorbovou



Obrázek 8 – Oxidace kyseliny L-askorbové singletovým kyslíkem

3.6.2 Hydrolýza kyseliny dehydroaskorbové

Obecně je tato reakce katalyzována a probíhá rychleji v alkalickém prostředí. Hydrolýzou této kyseliny vzniká 2,3-dioxogulonová kyselina, která je biologicky neaktivní [3]. Ta se může dále štěpit na kyseliny L-threonovou a šťavelovou (**Obrázek 9**).



Obrázek 9 – Hydrolýza kyseliny L-dehydroaskorbové

3.7 Změny a ztráty

Vitamin C patří mezi nejméně stálé vitaminy a je velmi labilní. V závislosti na pH prostředí dochází principiálně ke dvěma způsobům štěpení. V kyselém a neutrálním prostředí se tvoří deriváty furanu a v alkalickém vznikají především kyseliny a soli [7].

Ke ztrátám dochází především při skladování a při průmyslových a kulinárních úpravách. K největším ztrátám dochází konkrétně výluhem a oxidací. Za nepřítomnosti

vzdušného kyslíku ztráty způsobuje degradace, která je katalyzována kyselinami. Celkové ztráty se obvykle pohybují v rozmezí 20 až 80 %.

V ovoci a zelenině jsou ztráty askorbové kyseliny často způsobeny výluhem. Vznikají při blanšírování (předvaření), mytí, konzervování a vaření ovoce a zeleniny. K významnému úbytku dochází také loupáním plodů, během kterého jsou odstraňovány povrchové vrstvy bohaté na vitamin. Například u kompotů největší ztráty vznikají během skladování. Tyto ztráty závisí na teplotě a době skladování. Pohybují se mezi 10-50 %. Ztráty mohou být způsobeny rovněž mléčným kvašením zeleniny (například kysané zelí obsahuje 50 % vitamínu C oproti čerstvému zelí).

Rozsah a povaha ztrát závisí na několika faktorech, jako je teplota, množství vody, pH, velikost povrchu materiálu, zralost atd. Vyšší stabilitu během zpracování má ovoce, které má nižší pH než zelenina. Nejvyšší stabilitu má vitamin C při mrazírenském skladování a zmrazování ovoce a zeleniny (k minimálním ztrátám dochází při teplotách -18°C). Naopak během rozmrazování může docházet ke značným ztrátám (30-50 %). Ztráty vitamínu C, které vznikají při zpracování ovoce a zeleniny lze zmírnit blanšírováním, to inaktivuje enzymy, které kyselinu askorbovou oxidují [3].

4 Stanovení vitamínu C

Ke kvantitativní analýze vitamínu C je možné použít několik metod. Využit se dají spektrální techniky jako je například UV/VIS spektrometrie, i nespektrální metody jako chromatografie, elektroforéza, elektrochemické metody atd.

4.1 Elektrochemické metody

Elektrochemické metody využívají přeměnu chemické energie na elektrickou a naopak. Principem těchto metod je analýza látek pomocí elektrického proudu v elektrochemickém článku. Měří se elektrický signál generovaný elektrochemickou reakcí. Proces spojený s těmito reakcemi se nazývá elektrolýza.

Elektrochemický článek je složený minimálně ze dvou elektrod. Jedna z elektrod má funkci anody, druhá elektroda má funkci katody. Elektrody vykazují specifický potenciál a jsou ponořeny ve vodivém roztoku (elektrolytu), který umožňuje výměnu elektronů mezi elektrodami. Probíhající reakce v článku může mít buď anodicko-katodický nebo katodicko-anodický průběh.

Standardním uspořádání tohoto článku je dvouelektrodové zapojení skládající se z pracovní (indikační) elektrody s proměnlivým potenciálem v čase. Druhá elektroda se nazývá referentní (srovnávací) a má konstantní potenciál. Může být použito i tříelektrodové zapojení. To obsahuje navíc pomocnou elektrodu, která chrání referentní elektrodu před eventuálním průchodem proudu o větší intenzitě [9].

4.1.1 Voltametrie

Principem této metody je vnější aplikované napětí, které se mění v čase. Informace o studované látce se získávají měřením generovaného proudu v závislosti na vloženém potenciálu. Měřený proud je úměrný koncentraci látky.

Mezi možné modifikace patří například cyklická voltametrie, diferenčně pulsní voltametrie atd. [9].

Další specifickou modifikací je stripping voltametrie. Ta se skládá z prekoncentračního (nahromadňovacího) kroku, doby klidu a rozpouštěcího neboli stripping kroku. Díky prekoncentračnímu kroku se rozšiřuje rozsah aplikací o stanovení stopových koncentrací v rozsahu $\mu\text{g/l}$ nebo ng/l . [10].

4.1.1.1 Stanovení obsahu kyseliny askorbové v ovocných šťávách pomocí voltametrie provedené s využitím platinové a uhlíkové pastové elektrody

Diferenčně pulsní voltametrií byl stanoven obsah kyseliny askorbové v pomerančové, grapefruitové a citrónové šťávě. Navíc byla zkoumána procentuální výtěžnost vitamínu C po přidání standardního roztoku kyseliny askorbové do vzorků. Tato metoda byla porovnána s výsledky cyklické voltametrie.

Zapojení bylo tříelektrodové, v jednom případě byla pracovní elektrodou uhlíková pastová elektroda a v tom druhém byla použita platinová elektroda. Referentní elektroda byla nasycená kalomelová elektroda (SKE) a pomocnou elektrodu tvořil platinový drátek.

Objem analyzovaného vzorku byl 50 ml. Všechna měření byla provedena při teplotě 295,5 K s použitím roztoku KCl o koncentraci 0,10 mol/l jako elektrolytu. Před každým stanovením byla pracovní platinová elektroda mechanicky vyčištěna působením potenciálního pulsu o intenzitě -1,5 V po dobu 3 sekund. Snímaný potenciál byl v rozsahu -100 až 1000 mV.

Zásobní roztok kyseliny askorbové o výsledné koncentraci 0,10 mol/l byl připravován denně rozpuštěním vitamínu C v roztoku 0,10 mol/l KCl.

Z ovoce byla odstředěna šťáva. Do tohoto neředěného čirého roztoku vzorku byl přidán pevný KCl, pro získání výsledné koncentrace 0,10 mol/l KCl. Pro stanovení výtěžnosti vitamínu C přidaného do analyzovaných vzorků šťáv byl do 50 ml vzorku přidán 1 ml roztoku kyseliny askorbové o koncentraci 0,10 mol/l.

Stanovena byla relativní směrodatná odchylka, která činila u platinové elektrody 2,09 %. U uhlíkové pastové elektrody měla hodnotu 2,35 %. Výtěžnost se pohybovala v rozmezí 94,74-104,97 %. Při použití platinové elektrody byla mez detekce 0,087 mmol/l a mez stanovitelnosti byla 0,29 mmol/l. U uhlíkové pastové elektrody bylo dosaženo nižších hodnot pro mez detekce (0,02 mmol/l) a stanovitelnosti (0,068 mmol/l) než při použití platinové elektrody. Výsledky stanovení kyseliny askorbové pomocí diferenčně pulsní voltametrie využívající platinovou elektrodu (**Tabulka 3**) a uhlíkovou pastovou elektrodu (**Tabulka 4**) byly porovnány s výsledky získanými cyklickou voltametrií a dobře se shodovaly.

Ukázalo se, že diferenčně pulsní voltametrie je technika charakterizovaná citlivostí, rychlostí a reprodukovatelností. Lze ji s dobrými výsledky aplikovat při kontrole kvality potravin [11].

Tabulka 3 – Výsledky stanovení AA diferenčně pulsní voltametří s platinovou elektrodou [11]

Testovaný vzorek	Obsah AA mg/100 ml šťávy	Obsah AA po přidavku (25 mg AA/100 ml šťávy) mg/100 ml šťávy	Výtěžnost %
pomeranč	41,24	76,06	103,24
grapefruit	39,82	74,54	102,87
citrón	52,15	85,19	98,72

Tabulka 4 – Výsledky stanovení AA diferenčně pulsní voltametří s uhlíkovou pastovou elektrodou [11]

Testovaný vzorek	Obsah AA mg/100 ml šťávy	Obsah AA po přidavku (25 mg AA/100 ml šťávy) mg/100 ml šťávy	Výtěžnost %
pomeranč	40,68	75,64	103,62
grapefruit	39,05	74,50	104,96
citrón	54,74	87,15	97,04

4.1.1.2 Stanovení kyseliny askorbové v ovoci a zelenině stripping voltametří na elektrodě ze skelného uhlíku

Tato metoda je založena na detekci feroinu, který vzniká při reakci kyseliny askorbové se směsí železa (ve formě Fe^{3+} iontů) a 1,10-fenantrolinu. Vzniklý feroin je během prekoncentračního kroku adsorbován na pracovní elektrodě. Následuje rozpouštěcí krok, během kterého je feroin převáděn zpět do roztoku a je voltametricky detekován, a to konkrétně s využitím cyklické voltametrie v katodickém režimu. Metoda byla úspěšně použita pro stanovení kyseliny askorbové v ovocných a zeleninových šťávách.

Instrumentální vybavení tvořil polarograf. Byla použita tříelektrodová soustava s pracovní elektrodou ze skelného uhlíku, jako referentní elektroda byla použita nasycená kalomelová elektroda a jako pomocná platinová elektroda (platinový drátek).

Vzorky byly stabilizovány acidifikací 10% kyselinou octovou, aby se zabránilo ztrátám AA. Standardní roztok kyseliny askorbové o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ byl připravován denně.

Použitý roztok 1,10-fenantrolinu měl koncentraci $7,6 \times 10^{-3}$ mol/l. Roztok železa (Fe^{3+}) měl koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ a byl připraven rozpuštěním 0,08634 g $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ ve 2 ml 1 mol/l kyseliny dusičné. Následně byl tento roztok zředěn destilovanou vodou na objem 100 ml. Výsledná koncentrace železa (Fe^{3+}) byla $1,8 \times 10^{-3}$ mol/l. Byl také připraven pufovaný roztok o složení 0,14 mol/l kyseliny octové a 0,08 mol/l octanu sodného. Ve všech případech byla použita destilovaná voda.

Vlastní stanovení probíhalo v roztoku obsahující standardní roztok kyseliny askorbové, 2,0 ml $1,8 \times 10^{-3}$ mol/l železa (Fe^{3+}), 3,0 ml $7,6 \times 10^{-3}$ mol/l roztoku 1,10-fenantrolinu. Následně byl roztok zředěn na objem 50 ml pufovaným roztokem na výsledné pH 4,5.

Prekoncentrační krok probíhal za intenzivního míchání po dobu 30 s. Následovala doba klidu v již nemíchaném roztoku, trvala rovněž 30 s. Během stripping kroku byla zaznamenávána křivka odezvy proudu na vloženém napětí o potenciálu v rozmezí od 1,2 do 0,3 V vs. SKE. Byl získán dobře definovaný vrchol píku s maximální hodnotou proudu odpovídající hodnotě potenciálu 0,87 V. Po každém stanovení bylo nutné vyleštit povrch pracovní elektrody, opláchnou ji destilovanou vodou a usušit filtračním papírem. Tento postup je nezbytný pro úspěšnou stripping analýzu.

Za účelem zhodnocení platnosti navrhované metody stanovení kyseliny askorbové (**Tabulka 5**) v pomerančové šťávě byly provedeny studie výtěžnosti vzorků, ke kterým bylo přidáno známé množství kyseliny askorbové. Hodnoty výtěžnosti byly 102–105 % [12].

Tabulka 5 – Stanovení kyseliny askorbové v pomerančové a zeleninové šťávě pomocí stripping voltrametrie [12]

Testovaný vzorek	Obsah kyseliny askorbové mg/g
pomeranč 1	$42,5 \pm 0,51$
pomeranč 2	$43,3 \pm 0,48$
pomeranč 3	$46,1 \pm 0,39$
rajče	$42,0 \pm 0,43$
česnek	$18,1 \pm 0,53$
zelená paprika	$23,3 \pm 0,46$

4.1.2 Polarografie

Principiálně je polarografie totožná s voltametrií. Hlavním rozdílem je použitá pracovní elektroda. V polarografii tato indikační elektroda mění svůj povrch během stanovení.

4.1.2.1 Stanovení kyseliny askorbové v ovoci a zelenině za použití polarografie

Pro analýzu vzorků rajčat a pomerančů byla použita polarografie. Jako vhodný podpůrný elektrolyt byl použit citrátový pufr, protože se již vyskytoval ve vzorcích a odolával změně pH po přidání ovocného extraktu. Jako pracovní elektroda byla použita kapající rtuťová elektroda a jako referentní nasycená kalomelová elektroda.

Pro přípravu všech roztoků a ve všech ostatních fázích analýzy byla použita trojnásobně destilovaná voda. Standardní roztok kyseliny askorbové o koncentraci 5 mg/ml byl připravován denně rozpuštěním 250 mg kyseliny askorbové v 50 ml vody. Citrátový pufr o původní koncentraci 0,5 mol/l byl upraven 4-5 kapkami 0,5 mol/l KOH na výslednou hodnotu pH 4,5, za použití pH-metru. Tento roztok byl stabilní po dobu 2 týdnů.

Tento pufr s konkrétní hodnotou pH byl použit proto, že při pH 4,5 bylo dosaženo maximální citlivosti (citlivost byla zkoumána v intervalu pH 2,6-6,0). Při hodnotách pH vyšších než 4,5 začala být kyselina askorbová nestabilní. Při nižších hodnotách pH byla polarografická vlna příliš strmá na to, aby se dal změřit anodický proud.

Navážené vzorky, 5 kusů od každého, bylo mixováno v mixéru s 50 ml 0,2% kyseliny šťavelové po dobu asi 2-3 minut. Extrakt byl přefiltrován přes bavlněnou gázu a byl změřen objem filtrátu.

V polarografické cele bylo nejprve od vzdušně (po dobu 10 minut) 5 ml citrátového pufru a byl u něj změřen tzv. zbytkový proud. Následně byl přidán známý objem extraktu vzorku (1-5 ml). Po od vzdušnění tohoto roztoku byl změřen difúzní proud. Poté bylo ještě přidáno 0,1 ml standardního roztoku (o koncentraci 5 mg/ml) a byl zaznamenán druhý difúzní proud. Obsah kyseliny askorbové v extraktu byl získán metodou standardního přídatku. U každého vzorku byl celý postup měření opakován třikrát.

Na základě experimentů bylo zjištěno nejnižší detekovatelné množství kyseliny askorbové, které odpovídalo koncentraci 25 $\mu\text{g/ml}$ ($1,42 \times 10^{-4}$ mol/l). Množství kyseliny askorbové v rajčatech a pomerančích bylo uvedeno v mg/100 ml šťávy vzorku (**Tabulka 6**). Celková výtěžnost byla $102 \pm 0,9$ %. Variační koeficient byl u rajčatových výtažků 3,4-8,2 % a u pomerančových extraktů činil 4,0-7,5 % [13].

Tabulka 6 – Výsledný obsah AA v rajčatech a pomerančích stanovený polarograficky [13]

Vzorek	Kyselina askorbová mg/100 ml
rajče 1	17,8 ± 1,5
rajče 2	13,5 ± 0,8
rajče 3	23,0 ± 2,5
rajče 4	17,4 ± 2,2
rajče 5	21,0 ± 1,3
pomeranč 1	39,1 ± 3,8
pomeranč 2	69,0 ± 4,6
pomeranč 3	48,6 ± 6,0
pomeranč 4	52,6 ± 6,6
pomeranč 5	53,5 ± 4,5

4.1.3 Coulometrie

Tato metoda je založena na principu elektrolýzy a slouží ke kvantitativnímu stanovení látky pomocí měření velikosti prošlého náboje elektrodou [9].

4.1.3.1 Coulometrické stanovení vitamínu C s použitím dithiothreitholu, N-ethylmaleimidu a askorbát oxidázy

Byla použita coulometrická metoda s konstantním potenciálem pro stanovení vitamínu C ve vzorcích ovocných šťáv citrónu, grapefruitu a pomerančů. Tato metoda používala jako redukční činidlo dithiothreitol. Obsah vitamínu C v ovocných šťávách získaný tímto měřením byl porovnán s výsledky získanými spektrofotometricky.

Kyselina dehydroaskorbová byla redukována na AA pomocí dithiothreoninu. Redukce probíhala při pH 7,0, při pokojové teplotě a po dobu několika minut. Po jejím skončení byl přebytečný dithiothreonin převeden na elektroinaktivní sloučeninu přidáním N-ethylmaleimidu. Tato směs byla poté kompletně elektrooxidována. Byl změřen celkový náboj Q_s .

Dále byl do tohoto roztoku přidán enzym askorbát oxidáza. Elektroaktivní kyselina askorbová byla zoxidována na elektroinaktivní kyselinu dehydroaskorbovou. Poté byl změřen celkový náboj Q_b pro roztok obsahující enzym. Náboj Q_b byl změřen i pro roztok bez enzymu.

Byla použita uhlíková pracovní elektroda s porézním povrchem a jako elektrolyt byl použit hexakyanoželezitan draselný o pH 7,5.

Standardní roztok kyseliny dehydroaskorbové byl připraven rozpuštěním čisté kyseliny askorbové ve vodě o teplotě 4°C. Pro přípravu standardního roztoku dithiothreitholu byl alikvotní podíl kyseliny dehydroaskorbové při teplotě 4 °C přímo rozpuštěn v pufru dithiothreitholu (pH 7.0). DHAA byla během rozpouštění zredukována na kyselinu askorbovou.

Vzorky ovoce byly nejprve vymačkány. Dále bylo 10 ml takto vymačkané šťávy odstředěno při 2500 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. Roztok byl filtrován přes membránový filtr. Nakonec bylo 5 ml tohoto filtrovaného roztoku 8krát nebo 20krát zředěno fosfát-citrátovým pufrvaným roztokem. Fosfátový pufr měl koncentraci 0,2 mol/l a citrátový pufr měl koncentraci 0,1 mol/l.

Pro stanovení kyseliny L-askorbové bylo 0,01 ml roztoku vzorku aplikováno na porézní povrch pracovní elektrody. Do roztoků vzorků, ve kterých se provádělo měření za přítomnosti askorbát oxidázy, byl přidán 1 mg tohoto enzymu. Byl změřen celkový náboj.

Pro stanovení celkového vitamínu C byl do roztoku postupně přidán $1,5 \times 10^{-8}$ mol/l dithiothreitol a $2,0 \times 10^{-3}$ mol/l N-ethylmaleimid. Byl získán rozdíl celkových nábojů tohoto roztoku obsahující askorbát oxidázou a roztoku bez askorbát oxidázy.

Měření zředěných roztoků kyseliny askorbové a celkového vitamínu C pro každý vzorek bylo dokončeno za méně než 10 minut a současná metoda má tedy výhodu v rychlosti. Proto lze tuto metodu stanovení vitamínu C použít i pro další druhy vzorků, například pro nápoje. Výsledky získané coulometricky (**Tabulka 7**) se dobře shodovaly s výsledky získanými spektrofotometricky [14].

Tabulka 7 – Výsledný obsah AA a DHAA stanovený coulometricky [14]

Testovaný vzorek	Obsah AA mg/100 g	Obsah DHAA mg/100 g
citrón*	38,1	8,7
grapefruit*	35,6	1,6
pomeranč 1*	45,6	0,9
pomeranč 2*	39,8	5,2

*vzorky zředěné 20krát; * vzorek zředěný 8krát

4.1.4 Amperometrie

Amperometrie patří mezi elektrochemické metody, reakce jsou poháněny vkládaným konstantním potenciálem. Následně se sleduje průběh vznikajícího proudu na čase. [15].

4.1.4.1 Modifikovaná uhlíková pastová elektroda s inkluzivním komplexem β -cyklodextrin-ferrocenem pro amperometrické stanovení kyseliny askorbové

Pro tvorbu uhlíkové pasty byl použit inkluzivní komplex ferrocenu s β -cyklodextrinem (dále jen komplex), který byl syntetizován v ethylenglykolu. Jako pojivo elektrody byl použit pevný parafín. Použití inkluzivního komplexu jako elektroaktivní látky výrazně zvýšilo stabilitu a reprodukovatelnost.

Elektroda byla připravena důkladným ručním smícháním 0,213 g komplexu a 0,787 g grafitového prášku. Poté byla tato směs uhlíkové pasty a 0,20 g parafínu vložena do kádinky o objemu 10 ml a zahřívána, dokud se parafín úplně nerozpustil. Po promíchání byla směs aplikována do skleněné trubičky a pevně přimáčknuta. Optimální poměr těchto tří použitých materiálů byl 17,75 % komplexu, 65,58 % grafitového prášku a 16,67 % parafínu. Životnost takto připravené elektrody může být delší než 1 rok.

V této studii byl použit tříelektrodový systém obsahující laboratorně vyrobenou pracovní uhlíkovou pastovou elektrodu, pomocnou elektrodu z platinového drátu a nasycenou kalomelovou referenční elektrodu. Elektrody byly ponořeny do 10 ml pufovaného roztoku obsahujícího 0,02 mol/l NH_4Cl , 0,08 mol/l NH_3 a různé koncentrace AA. Potenciál elektrody byl při míchání udržován na +0,20 V.

Všechny použité roztoky byly před experimentem odvzdušněny probubláváním dusíkem po dobu 5 minut.

Zásobní roztok AA byl připravován denně a uchováván v chladu. Kyselina askorbová byla elektrokatalyticky oxidována na pracovní elektrodě v pufru $\text{NH}_3\text{--NH}_4\text{Cl}$.

Vzorky šťávy byly měřeny amperometricky za konstantního potenciálu. Navrhovaná metoda byla úspěšně použita pro přímé stanovení AA v ovocných šťávách (**Tabulka 8**). Mez detekce AA byla $1,0 \times 10^{-7}$ mol/l [16].

Tabulka 8 – Výsledný obsah AA stanovený amperometricky [16]

Testovaný vzorek	Obsah AA ve vzorku mg/100 g	Relativní směrodatná odchylka %
100% jablečný džus	6,10	0,47
100% hruškový džus	10,81	1,53

4.2 Kapalinová chromatografie (LC)

Chromatografie je separační analytická metoda, která se používá ke kvalifikaci, kvantifikaci jednotlivých látek.

Principem je rozdělování složek vzorku mezi mobilní a stacionární fázi uvnitř kolony. K rozdělování dochází na základě rozdílné afinity k oběma fázím. Jednotlivé složky jsou poté na konci kolony analyzovány pomocí vhodného detektoru, který vygeneruje měřitelný signál.

Výsledným záznamem je chromatogram. Chromatogram je tvořen z řady píků. Poloha píku tedy slouží k identifikaci složek a plocha píku k určení jejich koncentrace [17] [18].

Chromatografické přístroje se nazývají chromatografy a jsou vybaveny dávkovacím systémem, kolonou a detektorem.

U kapalinové chromatografie je mobilní fáze kapalná a obvykle se skládá z jednoho rozpouštědla nebo ze směsi rozpouštědel. Stacionární fáze může být kapalná či pevná.

Pro výkonnější separaci je možno použít vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC), která pracuje za vyšších tlaků než LC [17].

Mezi nejčastěji používané detektory v kapalinové chromatografii patří ultrafialová a viditelná spektrometrie a hmotnostní spektrometrie. Lze použít i tandemová hmotnostní spektrometrie. Nejběžněji používaným typem tandemového hmotnostního spektrometru je trojitý kvadrupól [19].

4.2.1 Kapalinová chromatografie pro stanovení askorbové a dehydroaskorbové kyseliny v ovoci a zelenině

Tato metoda byla použita pro stanovení celkového vitamínu C, tedy pro stanovení kyseliny askorbové a kyseliny dehydroaskorbové v ovoci a zelenině. K detekci byl použit UV/VIS detektor.

Přímé stanovení DHAA pomocí HPLC za použití běžných detektorů je složité a problematické. Z tohoto důvodu se DHAA stanovuje jako rozdíl mezi celkovým obsahem AA po redukci DHAA a obsahem AA v původním vzorku. V tomto případě tomu nebylo jinak a k redukci DHAA byl použit dithiothreitol (DTT).

Vzorky byly rozděleny na malé kousky. Byly zředěny deionizovanou vodou, zhomogenizovány pomocí homogenizátoru a dvakrát přefiltrovány. Tento čirý roztok byl rozdělen na dvě části. Jedna část byla použita na přímé stanovení obsahu AA. Do druhé části

bylo přidáno redukční činidlo DTT v poměru 1:1. Takto upravený roztok vzorku byl na 90-120 minut umístěn do tmy. Po převedení veškeré DHAA na AA byl i v této části stanoven obsah AA.

Byl použit kapalinový chromatograf vybavený dávkovačem s 10 µl vzorkovací smyčkou, předkolumnou o rozměrech 10 x 4 mm obsahující částice C₁₈. Nerezová kolona o rozměrech 250 x 4 mm byla vyplněna částicemi C₁₈ o velikosti 5µm. Kolona pracovala při teplotě okolí. UV/VIS detektor byl nastaven na 254 nm (specifická detekční vlnová délka AA). Jako mobilní fáze byl použit vodný roztok 0,2 mol/l KH₂PO₄ s průtokem 0,5 ml/min. Hodnota pH mobilní fáze byla upravena pomocí H₃PO₄ na hodnotu 2,4.

Příprava vzorků byla optimalizována tak, aby se spotřebovalo menší množství činidel, ale aby se dosáhlo přijatelného výsledku z hlediska citlivosti, stability a reprodukovatelnosti. Vzhledem k nízké UV senzitivitě na DHAA byla přímá analýza této molekuly nemožná i při nadlimitních množstvích, zatímco adekvátního stanovení celkového vitamínu C bylo možné dosáhnout konverzí DHAA na AA s DTT a detekcí redukované formy. Výsledky byly potvrzeny enzymatickou zkouškou.

Mez stanovitelnosti kyseliny askorbové odpovídala koncentraci 0,5 mg/100 g. Konkrétní výsledky obsahu obou kyselin jsou uvedeny v **Tabulka 9**. Obsah DHAA byl získán metodou odčítání [20].

Tabulka 9 – Obsah AA a DHAA ve vzorcích stanovený pomocí LC s UV/VIS detektorem [20]

Testovaný vzorek	Obsah AA mg/100 g	Obsah DHAA mg/100 g
citron	53,8	0,9
pomeranč	43,5	3,5
grapefruit	33,7	1,2
kiwi	34,2	6,5
jahoda	29,0	5,4
rajče	7,9	5,4
červená paprika	1,6	22,5
petržel	méně než mez detekce	218,4
máta	méně než mez detekce	50,3
kapusta	5,5	20,1
čerstvá cibule	1,8	4,6
fazole	méně než mez detekce	7,3

4.2.2 Současné stanovení askorbové a dehydroaskorbové kyseliny v zelenině a ovoci kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní spektrometrií

Tato analytická metoda využívající kapalinovou chromatografii spojenou s tandemovou hmotnostní spektrometrií s trojitým kvadrupólem byla použita pro současné stanovení kyseliny askorbové a kyseliny dehydroaskorbové v paprikách, rajčatech, pomeranči a citronu. K odlišení AA a DHA byla použita metoda odčítání a jako redukční činidlo byl použit 1,4-dithiotreitol. Byla měřena efektivní hmotnost. Ionizace vzorku byla provedena elektrosprejem (ESI).

Bylo homogenizováno reprezentativní množství z každého vzorku, které odpovídalo 500 g. Z tohoto množství byly odebrány 3 g (papriky, rajčata) respektive 3 ml (citron, pomeranč) čerstvé šťávy. Vzorky byly dále zhomogenizovány s 10 ml 0,05% kyseliny ethylendiamintetraoctové a následně byla tato směs odstředěna. Výsledná koncentrace AA a DHAA byla 0,05–200 µg/ml.

Všechny standardy byly připravovány denně maximálně 2 hodiny před použitím a byly uchovávány v lahvičkách jantarové barvy. Oddělení AA a DHAA bylo provedeno pomocí systému HPLC sestávajícího z autosampleru, vzorkovacího termostatu a binárního čerpadla.

Analytická kolona o rozměrech 250 × 3 mm byla vyplněna částicemi C₁₈ o velikosti a 3 μm. Vzorek byl udržován v termostatu při teplotě 10 °C a v koloně při teplotě 20 °C. Objem injektovaného vzorku byl 20 μl.

Hmotnostní spektrální analýza byla provedena na trojitém kvadrupólovém hmotnostním spektrometru vybaveném rozhraním ESI. V rozmezí efektivní hmotnosti 70–400 byla zaznamenána přesná hmotnostní spektra jednotlivých vzorků.

Popsaná metoda je velmi jednoduchá a vyžaduje jen malou přípravu vzorku. Celková doba analýzy nepřesahuje 5 min. Další výhodou metody je její výborná citlivost, mez detekce pro AA byla 13 ng/ml a 11 ng/ml pro DHAA a mez stanovitelnosti byla 44 ng/ml pro AA a pro DHAA 38 ng/ml. Metoda je navíc všestranná a mohla by být vhodná i pro stanovení u dalších druhů ovoce a zeleniny. Výsledky stanovení kyseliny askorbové a dehydroaskorbové ve vzorcích jsou uvedeny v **Tabulka 10**[21].

Tabulka 10 – Obsah AA a DHAA stanovený pomocí LC s hmotnostním detektorem [21]

Testovaný vzorek	Obsah AA	Obsah DHAA
zelená paprika	977,6 ± 15,1 μg/g	95,3 ± 3,1 μg/g
červená paprika	1292,1 ± 9,2 μg/g	44,4 ± 2,4 μg/g
kulaté rajče	89,5 ± 1,9 μg/g	67,2 ± 1,2 μg/g
oválné rajče	163,4 ± 4,1 μg/g	40,9 ± 3,2 μg/g
pomeranč	444,9 ± 7,0 μg/ml	55,0 ± 0,6 μg/ml
citron	329,6 ± 5,5 μg/ml	7,1 ± 0,6 μg/ml

4.3 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Tato analytická metoda je v poslední době hojně využívána k analýze potravin a jejich sloučenin. CZE nabízí vysokou rychlost analýzy, vysokou účinnost separace, velkou rozmanitost aplikací, sníženou spotřebu vzorků a rozpouštědel a automatizaci. Pomocí kapilární elektroforézy je možno v různých potravinách stanovit široké spektrum molekul (např. aminokyseliny, sacharidy, vitaminy atd.).

Separace analytů se provádí uvnitř kapiláry, která je naplněná tzv. separačním pufrem. Na rozhraní záporně nabitě stěny kapiláry a pufrovaného roztoku (tzv. difúzní vrstvy) se vytváří

elektrická dvojvrstva. Na celý systém působí elektrické pole, jehož vlivem se kladné náboje z difúzní zóny přesouvají ke stěně kapiláry a strhávají s sebou částice rozpuštěných látek. Výsledkem je globální pohyb pufru uvnitř kapiláry.

Separované částice jsou následně detekovány na příslušných detektorech. Výsledný záznam udává závislost detekce (například absorbance) na čase a je ve formě píků. Tento záznam slouží ke kvalitativní i kvantitativní analýze.

Nejčastěji používané detektory jsou UV/VIS, následovaný například hmotnostními spektrometry. Tato metoda poskytuje vysokou účinnost separace [22].

4.3.1 Stanovení celkového vitamínu C v ovoci kapilární zónovou elektroforézou

Pro rychlé stanovení kyseliny askorbové a kyseliny dehydroaskorbové v ovoci, v tomto případě v pomerančové šťávě, je použita jednoduchá metoda kapilární zónové elektroforézy. Celková kyselina askorbová byla stanovena nejprve redukcí kyseliny dehydroaskorbové na kyselinu askorbovou pomocí DL-homeocysteinu.

Jako separační pufr byl použit fosfátový pufr o koncentraci 20 mmol/l a pH=7. Napětí bylo 6 kV, proud měl hodnotu 60 μ A. Použitá kapilára měla rozměry 40 cm x 100 μ m. Byl použit UV/VIS detektor, který byl nastaven na 254 nm. Kapilára byla po každém stanovení opláchnuta již zmíněným fosfátovým pufrem.

Pro stanovení celkového vitamínu C bylo do 15 g čerstvě vymačkané pomerančové šťávy přidáno 5 ml 12,5% kyseliny trichloroctové. Roztok byl odstředěn a přefiltrován. Ve filtrátu byla následně stanovena kyselina askorbová. Roztok vzorku byl poté zředěn destilovanou vodou tak, aby byla zajištěna odhadovaná koncentrace kyseliny askorbové 10-100 μ g/ml. Hodnota pH byla upravena na 7,0.

Redukce DHAA byla provedena přidáním 2,0 ml 0,8% roztoku DL-homocysteinu do 0,5 ml vzorku (minimální molární přebytek homeocysteinu ku kyselině dehydroaskorbové byl 40:1). Po 15 minutách, kdy byla veškerá DHAA převedena na AA, byl vzorek ihned přefiltrován a opět v něm proběhlo stanovení kyseliny askorbové.

Byla sestavena kalibrační řada standardů AA o koncentracích v rozmezí 5-80 μ g/ml. Standardní roztoky byly připraveny smícháním AA s kyselinou ftalovou, která byla použita jako vnitřní standard. Alikvotní podíly každého standardu byly analyzovány.

Byl sestrojen kalibrační graf. Koncentrace kyseliny askorbové v extraktu vzorku byla vypočítána interpolací na kalibračním grafu a použitím ředících faktorů.

Výsledná koncentrace AA byla ve dvou různých vzorcích pomerančové šťávy $44,7 \pm 1,3$ a $57,5 \pm 1,7$ mg/100 ml.

Navrhovaný postup použití CZE pro stanovení kyseliny askorbové je jednoduchý, vyžaduje minimální přípravu vzorku. Poskytuje rychlé stanovení celkového vitamínu C [23].

4.4 UV/VIS spektroskopie

Spektroskopie je analytická metoda sloužící ke kvalifikaci i kvantifikaci látek. Principem je, že atomy nebo molekuly vzorku vystaveného různé frekvenci elektromagnetickému záření, absorbují energii a vstupují do excitovaného stavu. Poté se tyto excitované částice vrací do původního stavu vyzařováním spektra elektromagnetického záření. Spektra se rozlišují na absorpční a emisní a jsou charakteristická pro každý atom.

Spektrální rozsah odpovídající UV/VIS spektroskopii je od 100 nm do 800 nm, ale častější je užší interval od 190 nm do 750 nm. Vlnové délky UV záření se pohybují mezi 190 nm a 380 nm a viditelné složky od 380 nm do 750 nm.

Spektroskopie má tu výhodu, že je nedestruktivní. Tato metoda je velmi rychlá a k analýze využívá jen malé množství materiálu. Lze ji také použít pro k analýze široké škály látek s dobrou přesností a citlivostí [17].

4.4.1 Jednoduchá UV spektrofotometrická metoda pro stanovení obsahu vitamínu C v různých druzích ovoce a zeleniny v oblasti Silétu v Bangladéši

Jednoduchá UV spektrofotometrie byla použita pro stanovení celkového obsahu vitamínu C (AA i DHA) v různých druzích ovoce a zeleniny, které jsou běžně v této oblasti k dispozici. Tato metoda spočívá v oxidaci kyseliny askorbové na kyselinu dehydroaskorbovou bromovou vodou za přítomnosti kyseliny octové.

Standardní 0,05% roztok kyseliny askorbové byl připraven rozpuštěním 0,05 g standardní krystalické kyseliny askorbové ve 100 ml destilované vody.

Roztoky vzorku byly připraveny smícháním 10 g vzorku s 50 ml 5% roztokem kyseliny metafosforečné nebo 10% roztokem kyseliny octové. Tato směs byla kvantitativně převedena do 100 ml odměrné baňky, byla protřepána a poté doplněna po rysku 5% roztokem kyseliny metafosforečné nebo 10% roztokem kyseliny octové.

Poté byl k roztokům vzorků přidán 2,4-dinitrofenylhydrazinem. Reakce probíhala při teplotě 37 °C. Po 3 hodinách byla k roztokům ještě přidána 85% H₂SO₄. Výsledkem byl červený komplex.

Spektrofotometricky byla měřena absorbance všech standardů při vlnové délce 521 nm, což odpovídá absorpčnímu maximu. Z jednotlivých absorbancí byla vytvořena kalibrační křivka.

Pomocí této studie byl stanoven celkový obsah vitamínu C v dumuru a katabadamu (**Tabulka 11**) [24].

Tabulka 11 – Obsah vitamínu C stanovený spektrometricky [24]

Testovaný zorek	Obsah vitamínu C mg/100 g
dumur	15
katabadam	77

4.4.2 Spektrofotometrická metoda použitá pro stanovení obsahu vitamínu C v ovoci a zelenině

Tato UV spektrofotometrická metoda byla použita pro stanovení obsahu kyseliny askorbové v různých druzích ovoce a zelenině. Je založena na měření spektra AA při vlnové délce v rozmezí 250-350 nm.

Zásobní roztok kyseliny askorbové byl připraven rozpuštěním příslušného množství kyseliny askorbové v 1,0 mol/l roztoku HCl. Výsledná koncentrace byla 1 x 10⁻³ mol/l. Takto připravený roztok je stabilní 2 hodiny. Dále byla z tohoto zásobního roztoku vytvořena kalibrační řada o koncentracích 2,5 x 10⁻⁵ až 1 x 10⁻⁴ mol/l, ze které byl sestrojen kalibrační graf pro určení maximální vlnové délky AA.

Vzorky ovoce, které byly zakoupeny na místních trzích, byly připraveny tak, že 5 cm³ čerstvě vymačkané šťávy bylo smícháno s 1,0 mol/l roztokem HCl za intenzivního míchání. Poté byly extrakty přefiltrovány a zředěny pěti – až desetinásobně roztokem HCl, aby byly pro získání vhodné koncentrace AA.

Vzorky zeleniny byly připraveny zhomogenizováním 5,0 g vzorku s 100,0 cm³ 1,0 mol/l HCl po dobu 10 minut. Po filtraci byly roztoky zředěny obdobně jako roztoky vzorků ovoce.

Vzorky byly analyzovány při vlnové délce o hodnotě 267,5 nm. Tato vlnová délka sloužila ke kvantifikaci obsahu vitamínu C (**Tabulka 12**).

Toto konkrétní použití spektrofotometrie je velmi jednoduché a přímé, protože nevyžaduje žádné předzpracování zkoumaného materiálu a lze ho doporučit pro běžné analýzy [25].

Tabulka 12 – Obsah vitamínu C stanovený UV/VIS spektrofotometrií [25].

Testovaný vzorek	Celkový obsah vitamínu C mg/100 g
pomeranč	43,42
citron	34,24
mandarinka	18,62
grapefruit	43,33
kiwi	42,26
červená paprika	144,73
zelená paprika	85,29
květák	17,21
petržel	50,56
růžičková kapusta	76,06
kapusta	92,62
hlávkové zelí	28,17

4.5 Průtoková injekční analýza

4.5.1 Průtoková injekční analýza se spektrofotometrickou detekcí pro stanovení kyseliny askorbové v ovocných šťávách

Pro stanovení obsahu AA ve vzorcích ovoce byla použita injekční průtoková analýza. K detekci byl použit spektrofotometrický detektor pracující v UV.

Byl použit diodový spektrofotometr s průtokovou celou o vnitřním objemu 18 μ l a délce 10 mm. Tato cela byla naplněna hydroxidem sodným o koncentraci 0,1 mol/l a pH 12,6. Všechny reakční cely byly vyrobeny z PTFE kapilár o vnitřním průměru 0,8 mm. Sestava dále obsahovala dávkovací ventil. Všechna měření byla provedena při pokojové teplotě (kolem 23 °C).

Standardní roztok kyseliny askorbové měl koncentraci 100 mg/l. Tento roztok byl připravován denně ředěním s destilovanou vodou. Stejným způsobem byl připravován i roztok NaOH.

Přírodní šťávy byly vymačkány a poté filtrovány přes 0,45 µm nylonové filtry ze skleněných vláken. Pro analýzu každého vzorku bylo provedena jeho vhodné ředění.

Vzorek o objemu 50 µl byl vstříknut pomocí rotačního ventilu do nosného proudu v průtokové cele. Průtok byl nastaven na hodnotu 1,46 ml/min. Spektrofotometrická detekce AA byla provedena při vlnové délce 300 nm.

Mez detekce kyseliny askorbové byla 2,26 mg/l, mez stanovitelnosti byla 7,5 mg/l. Relativní směrodatné odchylky měly hodnotu 3,4 %. Byla zkoumána i výtěžnost metody přidáním standardního roztoku AA do vzorků. Výtěžnost společně s obsahy AA je uvedena v **Tabulka 13**.

Použitá metoda je jednoduchá a použitelná pro rutinní analýzu. Mezi její výhody patří rychlost analýzy, nízké riziko kontaminace, nízká spotřeba činidel a dobrá dostupnost spektrofotometrického detektoru. Rovněž příprava vzorku je velmi jednoduchá, protože vyžaduje pouze filtraci a ředění [26].

Tabulka 13 – Obsah AA získaný průtokovou injekční analýzou [26]

Testovaný vzorek	Původní množství AA g/l	Přidané množství AA g/l	Množství AA po přídávku g/l	Stupeň výtěžnosti %
100% pomerančový džus	0,678 ± 0,03	0,180	0,861 ± 0,02	101,7
100% grapefruitový džus	0,432 ± 0,07	0,180	0,608 ± 0,05	97,8

ZÁVĚR

Vitamin C řadíme mezi tělu prospěšné látky. Mezi sloučeniny vykazující aktivitu tohoto vitamínu patří L-askorbová kyselina a L-dehydroaskorbová kyselina.

Lidský organismus si ho neumí syntetizovat, proto ho musíme přijímat z potravy. Hlavním zdrojem tohoto vitamínu je především ovoce a zelenina. Při zpracování potravin obvykle dochází k jeho ztrátám, proto bývají potraviny vitamínem obohacovány [3].

Tento vitamin má pozitivní vliv na psychické i fyzické zdraví člověka. Přispívá k duševní pohodě. Působí protizánětlivě, zvyšuje imunitu organismu nebo zabraňuje projevům stárnutí [8]. Jeho doporučený denní příjem se pohybuje v rozmezí 60-200 mg [3].

Vitamin C se ve vzorcích ovoce a zeleniny může stanovovat přímo, nebo může být stanoven tzv. odčítací metodou. V tomto případě je buď kyselina askorbová oxidací převedena na kyselinu dehydroaskorbovou, nebo je naopak kyselina dehydroaskorbové redukci převedena na kyselinu askorbovou. Při použití některých metod byl ve vzorcích stanoven pouze obsah kyseliny askorbové. U jiných metod byl stanoven obsah AA i DHAA, nebo byl stanoven celkový obsah vitamínu C.

Mezi často používané metody patří elektrochemické techniky. Jedná se například o stripping voltametrii. Ta se ve spojení s elektrodou ze skelného uhlíku používá ke stanovení obsahu AA například v pomerančích, rajčatech, česneku, paprikách atd. Další elektrochemickou metodou používající se ke stanovení obsahu AA je polarografie, která lze využít k analýze rajčat nebo pomerančů.

Ke stanovení celkového vitamínu C byla použita UV/VIS spektrofotometrie, které byla použita k analýze v mandarinkách, pomerančích, kvěťáku petrželi, kapustě atd.

Ve spojení s UV/VIS detektorem lze provést stanovení kyseliny askorbové i dehydroaskorbové například kapalinovou chromatografií. Tato separační technika se používá k analýze celé řady vzorků (například citrónů, grapefruitů, kiwi, jahod, cibule, fazole atd.). Tento detektor využívá i průtoková injekční analýza, kterou se dá stanovit obsah AA například v pomerančových či grapefruitových šťávách.

Cílem práce bylo seznámit se s vitamínem C a s jeho možnými metodami stanovení v ovoci a zelenině. K vitamínu C je zde uvedena celá škála důležitých a užitečných informací. V práci je také popsáno 11 příkladů stanovení vitamínu C v ovoci, v zelenině a v ovocných šťávách využívajících několik různých metod.

SEZNAM CITACÍ

- [1] Ovoce. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2022-06-21]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Ovoce>
- [2] PÁNEK, Jan. *Základy výživy*. Praha: Svoboda Servis, 2002. ISBN 80-863-2023-5.
- [3] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [4] ŠÍCHO, Vladislav, Zdeněk VODRÁŽKA a Blanka KRÁLOVÁ. *Potravinářská biochemie*. 2. dopl. a přeprac. vyd. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1981. ISBN neuvedeno.
- [5] BENEŠOVÁ, Luisa. *Potravinářství IV*. Praha: ÚZPI, 1997. ISBN 80-851-2056-9.
- [6] LÁNSKÁ, Dagmar a Bohumír HLAVA. *Vitamíny z domova i zdaleka*. Praha: Práce, 1982. ISBN neuvedeno.
- [7] DAVÍDEK, Jiří, Gustav JANÍČEK a Jan POKORNÝ. *Chemie potravin*. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1983. ISBN neuvedeno.
- [8] JORDÁN, Václav a Marie HEMZALOVÁ. *Antioxidanty: zázračné zbraně : vitaminy, minerály, stopové prvky, aminokyseliny a jejich využití pro zdravý život*. Brno: Jota, 2001. Jak na to (Jota). ISBN 80-721-7156-9.
- [9] BRUN, Thomas J., Ryan DEACO, Jeffrey A. JANSE, Neal MAGDEFRA, Erik MUELLE, George F. VANDER VOOR a Dehua YAN. *ASM Handbook, Volume 10 - Materials Characterization* [online]. ASM International, 2019 [cit. 2022-06-09]. ISBN 978-1-62708-211-2. Dostupné z: [https://app.knovel.com/kn/resources/kpASMHVM2B/toc?b-q=stripping%20voltammetry&include_synonyms=no&b-toc-cid=kpASMHVM2B&b-toc-title=ASM%20Handbook%2C%20Volume%2010%20-%20Materials%20Characterization%20\(2019%20edition\)&b-toc-url-slug=electrochemical-methods](https://app.knovel.com/kn/resources/kpASMHVM2B/toc?b-q=stripping%20voltammetry&include_synonyms=no&b-toc-cid=kpASMHVM2B&b-toc-title=ASM%20Handbook%2C%20Volume%2010%20-%20Materials%20Characterization%20(2019%20edition)&b-toc-url-slug=electrochemical-methods)

- [10] BOUIS, Paul A. *Reagent Chemicals - Specifications and Procedures for Reagents and Standard-Grade Reference Materials* [online]. 11th Edition. Oxford University Press, 2015 [cit. 2022-06-09]. ISBN 978-0-8412-3045-3. Dostupné z: [https://app.knovel.com/kn/resources/kpRCSPRSG4/toc?b-q=stripping%20voltammetry&include_synonyms=no&b-toc-cid=kpRCSPRSG4&b-toc-title=Reagent%20Chemicals%20-%20Specifications%20and%20Procedures%20for%20Reagents%20and%20Standard-Grade%20Reference%20Materials%20\(11th%20Edition\)&b-toc-url-slug=direct-electrometric](https://app.knovel.com/kn/resources/kpRCSPRSG4/toc?b-q=stripping%20voltammetry&include_synonyms=no&b-toc-cid=kpRCSPRSG4&b-toc-title=Reagent%20Chemicals%20-%20Specifications%20and%20Procedures%20for%20Reagents%20and%20Standard-Grade%20Reference%20Materials%20(11th%20Edition)&b-toc-url-slug=direct-electrometric)
- [11] PISOSCHI, Aurelia Magdalena, Aneta POP, Gheorghe Petre NEGULESCU a Aurel PISOSCHI. Determination of ascorbic acid content of some fruit juices and wine by voltammetry performed at Pt and carbon paste electrodes. *Molecules* [online]. 2011, **16**(2), 1349-1365 [cit. 2022-06-09]. ISSN 1420-3049. doi:10.3390/molecules16021349
- [12] GUANGHAN, Lu, Wang YU, Yao LEIMING a Hu SHUANGLONG. Determination of ascorbic acid in fruits and vegetables by stripping voltammetry on a glassy carbon electrode. *Food Chemistry* [online]. 1994, **51**(2), 237-239 [cit. 2022-06-09]. ISSN 0308-8146. doi:10.1016/0308-8146(94)90264-x
- [13] SAHBAZ, Ferhunde a Güler SOMER. Determination of ascorbic acid in fruit and vegetables using normal polarography. *Food Chemistry* [online]. 1992, **44**(2), 141-146 [cit. 2022-06-09]. ISSN 0308-8146. doi:10.1016/0308-8146(92)90327-x
- [14] UCHIYAMA, Shunichi, Yutaka KOBAYASHI, Shuichi SUZUKI a Osamu HAMAMOTO. Selective biocoulometry of vitamin C using dithiothreitol, N-ethylmaleimide, and ascorbate oxidase. *Analytical Chemistry* [online]. 1991, **63**(20), 2259–2262 [cit. 2022-06-10]. ISSN 0003-2700. doi:10.1021/ac00020a012
- [15] SADDOW, Stephen E. *Silicon Carbide Biotechnology - A Biocompatible Semiconductor for Advanced Biomedical Devices and Applications* [online]. 2nd Edition. Elsevier, 2016 [cit. 2022-06-09]. ISBN 978-0-12-802993-0. Dostupné z: https://app.knovel.com/kn/resources/kpSCBABS01/toc?b-q=amperometry&include_synonyms=no

- [16] GUORONG, Zhang, Wang XIAOLEI, Shi XINGWANG a Sun TIANLING. B-Cyclodextrin–ferrocene inclusion complex modified carbon paste electrode for amperometric determination of ascorbic acid. *Talanta* [online]. 2000, **51**(5), 1019-1025 [cit. 2022-06-17]. ISSN 1873-3573. doi:10.1016/s0039-9140(00)00287-3
- [17] PATIENCE, Gregory S. *Experimental Methods and Instrumentation for Chemical Engineers* [online]. Elsevier, 2013 [cit. 2022-04-03]. ISBN 978-0-444-53804-8. Dostupné z: https://app.knovel.com/kn/resources/kpEMICE004/toc?b-q=liquid%20chromatography&include_synonyms=no&issue_id=kt00BYF7Y2&hierarchy=toggle-content
- [18] SELLEY, Richard C., L. ROBIN, Ian R. a Ian R. PLIMER. *Encyclopedia of Geology, Volumes 1 - 5* [online]. Elsevier, 2005 [cit. 2022-04-03]. ISBN 978-0-12-636380-7. Dostupné z: https://app.knovel.com/kn/resources/kpEGV00001/toc?b-q=Liquid%20chromatography&b-content-type=encyclopedia&include_synonyms=no&issue_id=kt004OKDY1&hierarchy=toggle-content
- [19] WILSON, Ian D. a Colin F. POOLE. *Handbook of methods and instrumentation in separation science volume 1* [online]. Elsevier, 2009 [cit. 2022-04-03]. ISBN 978-0-12-375095-2. Dostupné z: https://app.knovel.com/kn/resources/kpHMISSV0D/toc?b-q=Introduction%20to%20Modern%20Liquid%20Chromatography&issue_id=kt00BYDDQ6&hierarchy=undefined
- [20] GÖKMEN, Vural, Nermin KAHRAMAN, Nilay DEMIR a Jale ACAR. Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A* [online]. 2000, 881(1-2), 309-316 [cit. 2022-04-16]. ISSN 0021-9673. doi:10.1016/s0021-9673(00)00080-7
- [21] FENOLL, Jose, Alicia MARTINEZ, Pilar FLORES a Pilar HELLIN. Simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in vegetables and fruits by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. *Food Chemistry* [online]. 2011, 127(1), 340-344 [cit. 2022-04-15]. ISSN 0308-8146. doi:10.1016/j.foodchem.2010.12.140

- [22] SUN, Da-Wen. *Modern Techniques for Food Authentication* [online]. 2nd Edition. Elsevier, 2018 [cit. 2022-04-18]. ISBN 978-0-12-814264-6. Dostupné z: [https://app.knovel.com/kn/resources/kpMTFAE002/toc?q=electrophoresis&include_synonyms=no&b-toc-cid=kpMTFAE002&b-toc-title=Modern%20Techniques%20for%20Food%20Authentication%20\(2nd%20Edition\)&b-toc-url-slug=modern-tec-chromatographic](https://app.knovel.com/kn/resources/kpMTFAE002/toc?q=electrophoresis&include_synonyms=no&b-toc-cid=kpMTFAE002&b-toc-title=Modern%20Techniques%20for%20Food%20Authentication%20(2nd%20Edition)&b-toc-url-slug=modern-tec-chromatographic)
- [23] CHIARI, Marcella, Marina NESI, Giacomo CARREA a Pier Giorgio RIGHETTI. Determination of total vitamin C in fruits by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* [online]. 1993, **645**(1), 197-200 [cit. 2022-05-22]. ISSN 0021-9673. doi:10.1016/0021-9673(93)80637-n
- [24] RAHMAN, M.M., M.S. ISLAM a S.A. BEGUM. A Simple UV-spectrophotometric Method for the Determination of Vitamin C Content in Various Fruits and Vegetables at Sylhet Area in Bangladesh. *Journal of Biological Sciences* [online]. 2006, **6**(2), 388-392 [cit. 2022-05-21]. ISSN 1727-3048. doi:10.3923/jbs.2006.388.392
- [25] PFENDT, Lidija B., Vesna L. VUKAŠINOVIĆ, Nada Z. BLAGOJEVIĆ a Mirjana P. RADOJEVIĆ. Second order derivative spectrophotometric method for determination of vitamin C content in fruits, vegetables and fruit juices. *European Food Research and Technology* [online]. 2003, 217(3), 269-272 [cit. 2022-05-21]. ISSN 1438-2377. doi:10.1007/s00217-003-0746-8
- [26] LLAMAS, Natalia E., María S. DI NEZIO a Beatriz S. FERNÁNDEZ BAND. Flow-injection spectrophotometric method with on-line photodegradation for determination of ascorbic acid and total sugars in fruit juices. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2011, **24**(1), 127-130 [cit. 2022-06-23]. ISSN 0889-1575. doi:10.1016/j.jfca.2010.06.002