

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

Vliv tepelné úpravy na obsah vitamínu C v zelenině

Tocháčková Denisa

Bakalářská práce

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Denisa Tocháčková**
Osobní číslo: **C14457**
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**
Název tématu: **Vliv tepelné úpravy na obsah vitamínů C v zelenině**
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na extrakci a analýzu vitamínu C v zelenině s využitím klasických i moderních analytických metod. Dále se zaměřte na účinky vitamínu C na organismus.
2. Diskutujte využití různých typů metod pro zjištění obsahu vitamínu C a vyberte nejvhodnější metody pro experimentální stanovení jeho obsahu v syrové a tepelně upravené zelenině.
3. Výsledky porovnejte a kriticky zhodnoťte.
4. Sepište závěrečnou zprávu.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce:

28. února 2017

Termín odevzdání bakalářské práce:

3. července 2017



prof. Ing. Petr Kalenda, CSC.
děkan

L.S.



prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že tuto práci 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., autorský zákon, 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. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 29. června 2017

Tocháčková Denisa

Ráda bych poděkovala paní doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D za odborné vedení při psaní mé bakalářské práce, za cenné rady, poskytnuté informace, ochotu, vstřícnost a trpělivost.

ANOTACE

Bakalářská práce popisuje vliv tepelné úpravy na obsah vitamínu C v zelenině. V teoretické části se zabývá vitamínem C, jeho vlastnostmi, stabilitou a účinky na lidský organismus. Dále jsou zde popsány vybrané analytické metody, prostřednictvím kterých lze vitamín C stanovit. Praktická část je zaměřena na stanovení obsahu vitamínu C (kyseliny askorbové) v brokolici před a po tepelné úpravě metodou HPLC s UV detekcí.

Klíčová slova: vitamín C, kyselina askorbová, obsah, tepelná úprava, HPLC/UV

ANNOTATION

The bachelor thesis deals with the influence of vegetable heat treatment on vitamin C content. The theoretical part is focused on vitamin C, its chemical properties, stability and influence on human body. The next part of the thesis describes the chosen analytic methods of vitamin C (ascorbic acid) detection. The practical part of this work is focused on the determination of vitamin C concentration in broccoli before and after the heat treatment by using HPLC method with UV detection.

Keywords: vitamin C, ascorbic acid, content, thermal processing, HPLC/UV

OBSAH

SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ	9
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	10
ÚVOD.....	11
1 VITAMINY	12
2 VITAMIN C	13
2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti a reakce	13
2.2 Zdroje vitamínu.....	14
2.3 Doporučený denní příjem	15
2.3.1 Hypervitaminóza.....	16
2.3.2 Hypovitaminóza.....	16
2.3.3 Avitaminóza.....	16
2.4 Účinky na organismus	17
2.5 Stabilita vitamínu.....	20
2.5.1 Ztráty vitamínu způsobené skladováním	21
2.5.2 Ztráty vitamínu způsobené kulinární úpravou	21
3 ZELENINA.....	24
3.1 Rozdělení zeleniny.....	24
3.2 Brokolice.....	24
3.2.1 Charakteristika a původ	24
3.2.2 Druhy	25
3.2.3 Vliv na zdraví.....	25
4 KUCHYŇSKÉ ZPRACOVÁNÍ ZELENINY	26
4.1 Předběžná úprava.....	26
4.2 Tepelná úprava.....	26
5 METODY STANOVENÍ VITAMINU C.....	29
5.1 Titrační stanovení	29

5.2	Kolorimetrické stanovení.....	30
5.3	Spektrofotometrické stanovení	30
5.4	Fluorimetrické stanovení	31
5.5	Elektrochemické stanovení	31
5.5.1	Coulometrie	31
5.5.2	Polarografie.....	31
5.5.3	Voltametrie	32
5.6	Chromatografické stanovení	32
6	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
6.1	Materiál a přístroje.....	34
6.1.1	Vzorky zkoumané brokolice.....	34
6.1.2	Pomůcky	34
6.1.3	Přístroje.....	34
6.1.4	Chemikálie	35
6.2	Příprava roztoků.....	35
6.2.1	Příprava standardních roztoků	35
6.2.2	Příprava extrakčního činidla	35
6.3	Příprava vzorků brokolice.....	35
6.3.1	Příprava vzorku syrové brokolice	36
6.3.2	Příprava vzorku vařené brokolice	36
6.3.3	Příprava vzorku blanšírované brokolice	36
6.4	Podmínky stanovení kyseliny askorbové metodou HPLC	36
6.5	Výsledky	37
	ZÁVĚR	40
	POUŽITÁ LITERATURA	41

SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ

Tabulka 1 - Průměrný obsah vitamínu C ve vybraných potravinách	14
Tabulka 2 - Zastoupení AA a DHA ve vybraných druzích zeleniny	15
Tabulka 3 - Kolísání obsahu vitamínu v závislosti na analyzované části ovoce.....	22
Tabulka 4 – Ztráty vitamínu C vařením u různých druhů zeleniny	23
Tabulka 5 – Způsoby stanovení vitamínu C v potravinách metodou HPLC.....	33
Tabulka 6 - Množství kyseliny askorbové ve vzorku brokolice.....	38
Obrázek 1 - Struktura vitamínu C	13
Obrázek 2 – Vznik kyseliny 2,3-dioxo-L-gulonové.....	13
Obrázek 3 – Oxidace kyseliny askorbové činidlem DCIP	29
Obrázek 4 – Oxidace kyseliny askorbové jódem	30
Obrázek 5 – Kondenzace AA s 2,4-dinitrofenylhydrazinem	31
Obrázek 6 - Chromatogram separace kyseliny askorbové ve vzorku spařené brokolice	37
Obrázek 7 – Kalibrační přímka pro stanovení kyseliny askorbové.....	38

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	kyselina askorbová
DAD	detektor s diodovým polem
DCIP	2,6-dichlorfenolindofenol
DHA	kyselina dehydroaskorbová
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
MPA	kyselina metafosforečná
SWV	square-wave voltametrie
USA	Spojené státy americké
UV	ultrafialový
VIS	viditelný

ÚVOD

Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňující naše zdraví je výživa. Každodenní konzumace dostatečného množství zeleniny zajišťuje příjem vitaminů, minerálů a dalších biologicky aktivních látek nezbytných pro správné fungování organismu. Zelenina je zvláště bohatá na vitamin C. Ten hraje v lidském těle velmi významnou roli, neboť se účastní řady fyziologických procesů, jako je syntéza kolagenu, vylučování cholesterolu či vstřebávání železa. Díky antioxidačním účinkům zabraňuje šíření volných radikálů a snižuje tak riziko vzniku cévní mozkové příhody a ischemické choroby srdeční. Vitamin C se také podílí na stimulaci obranyschopnosti, čímž napomáhá organismu bránit se nepříznivým vlivům vnějšího prostředí.

Vitamin C je velmi málo stabilní. Například působením vzdušného kyslíku či v přítomnosti iontů kovů dochází k jeho oxidaci a tím ztrátě biologické aktivity. Největší ztráty vitaminu však vznikají vlivem vysokých teplot. Cílem této bakalářské práce je proto provedení experimentálního stanovení jeho obsahu v syrové a následně tepelně upravené zelenině.

Existuje mnoho způsobů, pomocí nichž lze obsah vitaminu C v zelenině stanovit. V praxi se nejčastěji aplikuje vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), a proto byla tato metoda použita i v předkládané bakalářské práci.

1 VITAMINY

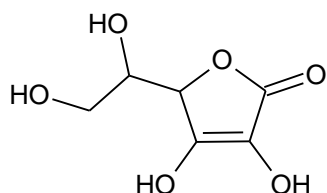
Vitaminy jsou nízkomolekulární sloučeniny, zajišťující životně důležité funkce v organismu člověka. Lidské tělo je nedokáže samo syntetizovat a musí být proto přijímány potravou. Hlavní úloha vitaminů spočívá především v katalytickém účinku. Uplatňují se jako kofaktory různých enzymů v metabolismu nukleových kyseliny, bílkovin, sacharidů či tuků a bývají proto často nazývány exogenními esenciálními biokatalyzátory^{1,2}.

Kromě katalytických účinků sehrávají vitaminy nepostradatelnou roli také v prevenci a podpůrné léčbě některých onemocnění. Například vitaminy A, C a E se díky svým antioxidačním vlastnostem podílí na prevenci nádorových onemocnění. Vitamin D zase reguluje v organismu metabolismus vápníku, fosforu a dalších minerálních látek zpevňujících kosti a zabraňuje tak vzniku osteoporózy³. Vitaminy lze rozdělit dle rozpustnosti na vitaminy rozpustné v tucích (A, D, E, K) a vitaminy rozpustné ve vodě (C, H a vitaminy skupiny B)⁴. Vitaminy rozpustné v tucích se mohou po delší dobu ukládat v játrech a tukové tkáni, a proto může být jejich nadbytek toxický. Stav organismu vyvolaný jejich přílišným nahromaděním se nazývá hypervitaminóza. Vitaminy rozpustné ve vodě v organismu skladovány nejsou a jejich případný přebytek je z těla ven vyloučen močí. Optimální příjem vitaminů by měl být dosažen vyváženou stravou. U ohrožených skupin populace by mělo být v rámci prevence nádorových a kardiovaskulárních onemocnění uvažováno o suplementaci vitaminů prostřednictvím vhodných farmaceutických přípravků. Nedostatek vitaminů v potravě, tzn. avitaminóza, totiž vede k vážným metabolickým poruchám, které mohou být i příčinou smrti. Lehčí forma avitaminózy, způsobená částečným nedostatkem určitého vitaminů, je nazývána hypovitaminóza^{4,5,6}.

2 VITAMIN C

2.1 FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI A REAKCE

Vitamin C neboli kyselina L-askorbová patří mezi deriváty monosacharidů. Chemicky se jedná o lakton kyseliny 2-oxo-L-gulonové, jehož struktura je zobrazena na obrázku 1.

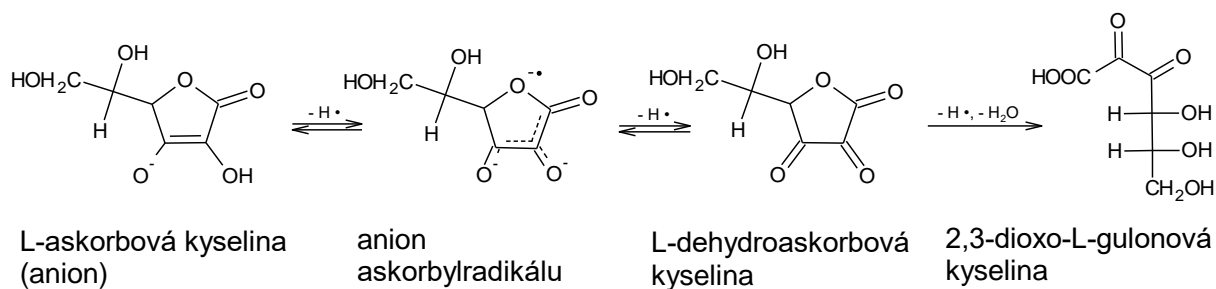


Obrázek 1 - Struktura vitamínu C²

Kyselina L-askorbová je bílá krystalická ve vodě snadno rozpustná látka. Díky přítomnosti dvou enolových hydroxylů se vyznačuje značně kyselým charakterem. Velmi snadno podléhá oxidaci a je proto významným redukčním činidlem, uplatňujícím se v mnoha extracelulárních i intracelulárních procesech probíhajících v organismu^{1,4}.

Název vitamin C označuje nejen samotnou kyselinu L-askorbovou, ale zahrnuje také celý reverzibilní redoxní systém. Do tohoto systému patří produkt jednoelektronové oxidace L-askorbylradikál a produkt dvouelektronové oxidace kyselina L-dehydroaskorbová².

O reverzibilní proces se jedná do té doby, dokud není kruhová struktura L-dehydroaskorbové kyseliny porušena. Rozštěpením laktonového kruhu dochází ke vzniku kyseliny 2,3-dioxo-L-gulonové (obrázek 2), která již není biologicky účinná a aktivita vitamínu C zaniká^{2,7}.



Obrázek 2 – Vznik kyseliny 2,3-dioxo-L-gulonové²

K oxidaci může docházet působením enzymů, konkrétně oxidoreduktáz, které se řadí do kategorie antivitaminů C. Antivitaminy jsou látky eliminující biologické aktivity vitaminů, což může vést až k jejich nedostatečnému příjmu – deficienci. Mezi antivitaminy C patří například askorbát oxidasa, askorbátperoxidasa či superoxid dismutasa. Askorbovou kyselinu oxiduje také vzdušný kyslík, peroxid vodíku a další oxidační činidla. Nejvýznamnější je oxidace právě vzdušným kyslíkem, neboť způsobuje většinu ztrát vitamínu C v potravinách v průběhu jejich zpracování. Reakce může probíhat v přítomnosti i nepřítomnosti iontů kovů, nejčastěji dvojmocné mědi nebo trojmocného železa. Kyselina vytváří s iontem kovu a s kyslíkem velmi stabilní komplex, ve kterém dochází prostřednictvím kovu k přenosu 2 elektronů z askorbové kyseliny na kyslík. Reakcí vzniká dehydroaskorbová kyselina, peroxid vodíku a regeneruje se ion kovu².

Reakcí kyseliny askorbové s ionty kovů vznikají komplexy. Je-li ovšem kyselina přítomna v malém množství a provádí-li se reakce při nízkých hodnotách pH, může kyselina ionty kovů redukovat. Redukční působení vede k urychlení oxidační reakce, což se projevuje vznikem nežádoucích změn na chuti, vůni a barvě potravin².

2.2 ZDROJE VITAMINU

Hlavními zdroji vitamínu C jsou především potraviny rostlinného původu, zejména čerstvé ovoce a zelenina. Jak dokládá tabulka 1, z potravin živočišného původu mají větší význam pouze játra^{4,8}.

Tabulka 1 - Průměrný obsah vitamínu C ve vybraných potravinách⁸

Potraviny rostlinného původu	Obsah vitamínu C (mg/100 g)	Potraviny živočišného původu	Obsah vitamínu C (mg/100 g)
šípek	800	slepičí játra	45
červená paprika	200	hovězí ledvinky	15
černý rybíz	180	jikry	13
jahody	60	drůbež	5
špenát	55	hovězí maso	2
citron	50	polotučné mléko	1
červená řepa	13	vejce	0-1
brambory	7-30	máslo	0,3

Dle odhadů prováděných na území České republiky, pochází 18 % veškerého vitamínu C přijímaného potravou z citrusů, 15 % z ostatních druhů ovoce, zelenina přispívá 45 % a mléko přibližně 3 %. Z masa pocházejí maximálně dvě procenta⁹. Velmi důležitým zdrojem vitamínu C jsou brambory. Přestože 100 g brambor obsahuje v průměru jen 7-30 mg tohoto vitamínu, z důvodu konzumace poměrně velkého množství v průběhu celého roku, je význam této potraviny značný⁹.

Výši obsahu vitamínu C v ovoci a zelenině ovlivňuje mnoho faktorů, zejména klimatické podmínky během růstu, stupeň zralosti při sklizni, způsob zpracování, atd. Např. papriky odrůdy Topan sklizené na konci července obsahovaly o 142,5 mg vitamínu/100 g méně než papriky té samé odrůdy sklizené začátkem října¹⁰.

Jak již bylo uvedeno výše, vitamin C je tvořen 2 aktivními složkami - kyselinou askorbovou (AA) a její oxidovanou formou kyselinou dehydroaskorbovou (DHA). V ovoci a zelenině bývá množství DHA proti AA výrazně nižší (tabulka 2). Studie z roku 1984 uvádí průměrné zastoupení DHA v ovoci a zelenině (z celkového obsahu vitamínu) menší než 10 %. Množství DHA je závislé na oxidační aktivitě AA. S rostoucí aktivitou AA vzrůstá podíl DHA⁹.

Tabulka 2 - Zastoupení AA a DHA ve vybraných druzích zeleniny⁹

Vybrané druhy zeleniny	AA (mg/100 g)	DHA (mg/100 g)	Celkový obsah vitamínu C (mg/100 g)
brokolice	89	7,7	96,7
květák	54	8,7	62,7
červená paprika	151	4	155

2.3 DOPORUČENÝ DENNÍ PŘÍJEM

Fyziologická potřeba vitamínu C roste s věkem. Zatímco u kojenců se doporučená denní dávka pohybuje v rozmezí 50-55 mg, u adolescentů, resp. dospělých stoupá až na 100 mg/denně. Tato doporučení jsou platná v České republice. Podle amerických doporučení je adekvátní příjem vitamínu C pro dospělého člověka 50-60 mg, v Kanadě se uvádí 25-40 mg/denně¹¹.

Vhodná denní dávka závisí na mnoha faktorech. Spotřeba vitamínu C výrazně vzrůstá při infekcích a hojení ran, fyzické a psychické zátěži, ve stáří či např. v těhotenství a v průběhu

kojení. Doporučený příjem vitamínu C u těhotných žen byl stanoven na 110 mg/denně. Kojící ženy potřebují až o 50 mg více, celkem by tedy měly denně přijímat kolem 150 mg¹¹.

Zvýšené požadavky organismu na příjem kyseliny L-askorbové byly pozorovány u kuřáků. Aktivním ale i pasivním kouřením narůstá její potřeba o 60-100 %. Razantní nárůst je způsoben jejími antioxidačními účinky, kterými chrání organismus před volnými radikály obsaženými v kouři. Aby měl kuřák stejnou koncentraci vitamínu C v krvi jako nekuřák, musel by jeho denní příjem tohoto vitamínu být okolo 200-250 mg/denně. Kromě samotných kuřáků bývá riziku hypovitaminózy vystaven i plod těhotných kuřáček. Mnoha studiemi byla v krvi plodu prokázána nižší průměrná hladina vitamínu C^{9,11}.

Metabolismus vitamínu C narušují i některá léčiva, jako například antibiotika, léky barbiturátové povahy či preparáty obsahující kortizon. Pacienti by proto k těmto lékům měli dodatečně užívat 100 až 200 mg vitamínu C denně³.

2.3.1 HYPERVITAMINÓZA

Vitamin C spadá do skupiny vitaminů rozpustných ve vodě, a proto je jeho případný nadbytek vyloučen z organismu močí. Jen velmi vzácně se mohou objevit symptomy předávkování, jako je například nevolnost či zvracení. Při vysokých dávkách (překračujících 10 g vitamínu C za den) byly pozorovány průjmy. Pokud by příjem větších dávek přetrvával delší dobu, mohlo by v ledvinách a močových cestách docházet k tvorbě oxalátových kaménků^{3,6}.

2.3.2 HYPOVITAMINÓZA

Nedostatek vitamínu C se nejčastěji projevuje zvýšenou únavou, větší náchylností k infekčním onemocněním, poruchami spánku či snížením vitality. Zhoršené hojení ran a celkově zpomalená rekonvalescence, zvýšená náklonnost k tvorbě křečových žil, depresivní nálady a sklony k nadváze mohou být taktéž zapříčiněny nízkým příjmem vitamínu C. Hypovitaminóza postihuje zejména osoby s nevhodnými stravovacími návyky, v jejichž jídelníčku není dostatek čerstvého ovoce a zeleniny^{3,7}.

2.3.3 AVITAMINÓZA

Avitaminóza vyvolává onemocnění zvané kurděje. Příznaky kurdějí se odvozují od nedostatečné hydroxylace prolinu v protokolagenu, což má za důsledek narušení syntézy

kolagenu. Mezi hlavní symptomy proto patří zejména poruchy vazivových tkání projevující se vypadáváním zubů, poškozením kapilár a otoky sliznic⁷.

2.4 ÚČINKY NA ORGANISMUS

Syntéza kolagenu

Kyselina askorbová se v organismu podílí na hydroxylaci prolinu a lysinu (na-3-hydroxyprolin a 5-hydroxylysin) v protokolagenu. Hydroxylací dochází k přeměně protokolagenu na kolagen – glykoprotein, tvořící základ pojivových tkání jako jsou kosti, chrupavky či kůže. V případě nedostatečného příjmu vitamínu C hydroxylace nenastává a dochází k poruchám kůže, krvácením dásní, vypadáváním zubů atd^{2,12}.

Syntéza karnitinu

Jako kofaktor dioxygenáz se vitamin C účastní biosyntézy L-karnitinu. Úkolem této aminokyseliny je transport dlouhých řetězců mastných kyselin do mitochondriální matrice, kde proběhne jejich degradace a jsou posléze organismem využívány jako zdroj energie. Nedostatečný příjem vitamínu proto zapříčiňuje únavu a letargii^{2,7,13}.

Syntéza noradrenalinu

Vitamin C významně zasahuje i do biosyntézy katecholaminů. Tyto hormony jsou produkovány dřením nadledvin a řadí se mezi ně dopamin, adrenalin a noradrenalin. V přítomnosti kyseliny askorbové je umožněna hydroxylace dopaminu vedoucí ke vzniku noradrenalinu. Hlavní funkce katecholaminů spočívá v přípravě organismu na zátěžovou situaci. Noradrenalin aktivuje kardiovaskulární systém a adrenalin zajišťuje rychlé zvýšení hladiny glykémie v krvi, což umožňuje svalovou činnost. Nedostatek vitamínu C se v této oblasti projevuje především výskytem depresí, hypochondrií a častými změnami nálad^{2,7,14}.

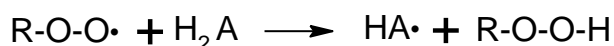
Vylučování cholesterolu

Vitamin C se rovněž se podílí na hydroxylaci cholesterolu, čímž usnadňuje jeho vylučování z organismu⁶. Rozsáhlé epidemiologické studie opakovaně prokázaly, že populační skupiny konzumující denně velké množství čerstvé zeleniny a ovoce, vykazovaly mnohem nižší hladinu cholesterolu v krvi než lidé, stravující se běžnou evropskou stravou¹⁵.

Antioxidační účinky

Metabolickými pochody v organismu, ale také UV zářením, kouřením, vdechováním výfukových plynů stresem či užíváním léků, vznikají v lidském těle reaktivní formy kyslíku a dusíku, tzn. volné radikály. Volné radikály mají značný význam při vzniku a rozvoji řady onemocnění. Oxidací lipidů vyvolávají změny permeability buněčných membrán, a tím se podílí na vzniku cévních komplikací při diabetu. Radikály jsou rovněž odpovědné za vznik aterosklerózy, neboť způsobují oxidaci lipoproteinů třídy LDL. Takto modifikované lipoproteiny jsou vychytávány makrofágy, dochází k jejich ukládání do cévních stěn a postupné tvorbě aterosklerotických plátů. Radikály se také uplatňují při rozvoji neurodegenerativních chorob (zejména Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby), šedého zákalu, revmatoidní artritidy či emfyzému plic.

Nadměrné produkci volných radikálů neboli oxidačnímu stresu zabraňuje organismus prostřednictvím antioxidantů – látek, potlačujících jejich tvorbu, nebo, pokud se již vytvořily, snižující jejich účinek. K významným antioxidantům patří právě kyselina askorbová, neboť dokáže šíření radikálů zamezit. Antioxidační účinek lze schematicky popsat následující reakcí, při které kyselina reaguje s peroxylovým radikálem mastné kyseliny (R-O-O•) za vzniku askorbyl radikálu (HA•), který již není schopen vyvolat další řetězovou reakci a rozpadá se na askorbovou a dehydroaskorbovou kyselinu.



Podobně reaguje vitamin C s toxickými formami kyslíku, ke kterým se řadí hydroxylový radikál (HO•), singletový kyslík ($^1\text{O}_2$) nebo anion superoxidového radikálu ($\text{O}_2\cdot^-$)^{2,14,16}

Dle studie NHANES II (The National Health and Nutrition Examination Survey) zabývající se vlivem kyseliny askorbové na kardiovaskulární onemocnění bylo zjištěno, že zvýšení koncentrace kyseliny v krevním séru testovaných dobrovolníků mělo za následek snížení výskytu ischemické choroby srdeční a cévní mozkové příhody o 11 %. Výsledky studie nedokázaly jednoznačně stanovit roli vitaminu C spojenou s tímto poklesem, ale předpokládá se, že pozitivní efekt byl pravděpodobně vyvolán právě jeho antioxidačními účinky¹⁶.

Alergie

Nejnovější studie poukazují na možnou roli vitamínu C v prevenci alergií. Studie prováděná finskými lékaři prokázala, že u kojenců jejichž matky konzumovaly v průběhu kojení potraviny s vysokým obsahem kyseliny askorbové, došlo ke snížení výskytu atopických onemocnění¹⁷.

Vstřebávání železa

Vitamin C významně podporuje vstřebávání železa. V žaludku vytváří ze železa přijatého potravou chelát, který zůstává rozpustný i v alkalickém pH dvanáctníku a tím prodlužuje dobu absorpce¹⁸.

Spermie

Suplementace vitamínu C může zlepšovat kvalitu spermií u neplodných jedinců a napomáhat tak početí. Po dobu 2 měsíců bylo neplodným pacientům podáváno dvakrát denně 1000 mg vitamínu C. Výsledky studie prokázaly zvýšení počtu spermií. Z průměrného množství 14,3. 10⁶ spermií v 1 ml stoupl jejich počet na 32,8. 10⁶/ml. Výrazně vzrostla i jejich pohyblivost¹⁹.

Rakovina

O pozitivním vlivu vitamínu C na onkologická onemocnění se vedou spory již řadu let. S myšlenkou léčby rakoviny pomocí vysokých dávek vitamínu C přišel jako první Linus Pauling. Spolu se svým kolegou Evanem Cameronem provedli studii, které se zúčastnilo 100 pacientů v pokročilém stádiu nádorového onemocnění. Těm v průběhu léčby (chemoterapie či radioterapie) podávali intravenózně 10 g kyseliny askorbové denně. Výsledky studie následně porovnali s údaji získanými sledováním 1000 onkologicky nemocných pacientů, kteří vitamin C po dobu léčby neužívali. Pauling s Cameronem zjistili, že průměrná doba přežití se u pacientů přijímajících velké dávky vitamínu C zvýšila 4,2 krát^{20,21}.

Závěry Paulingova výzkumu byly mnoha lékaři zpochybňovány, a proto byla provedena spousta dalších studií zabývajících se možnými protirakovinnými účinky tohoto vitamínu. Jednu z nejvýznamnějších studií vypracovala americká klinika „Mayo Clinic“. Pacienty s pokročilým stádiem rakoviny rozdělila do 2 skupin, kdy první skupina čítající 63 pacientů dostávala každý den 10 g kyseliny askorbové, druhá (o 60 pacientech) placebo. U žádné ze skupiny nedošlo ke zlepšení zdravotního stavu²². Kladný účinek velkých dávek vitamínu C

na nádorové buňky nebyl pozorován ani u pacientů s rakovinou slinivky²³. Taktéž studie riordarské kliniky v USA z roku 2013 nezaznamenala žádnou pozitivní nádorovou odpověď²⁴.

Do současné doby nebyla vypracována studie, která by jednoznačně dokázala pozitivní vliv vitamínu C na léčbu onkologických onemocnění. Jediný dosud prokazatelný účinek kyseliny askorbové v boji proti rakovině spočívá v inhibici přeměny dusitanů a dusičnanů na karcinogenní nitrosaminy, čímž snižuje riziko vzniku nádorových onemocnění⁷.

V posledních letech se však začaly objevovat názory, že vysoký příjem vitamínu C může vést ke zmírnění nežádoucích vedlejších účinků onkologické léčby. Pacienti, užívající v průběhu chemoterapie či radioterapie vysoké dávky vitamínu C, pocívali menší únavu a ustoupení bolestí, méně často zvraceli, zvýšila se jim chuť k jídlu a celkově došlo ke zkvalitnění jejich života²⁵.

Imunita

Vitamin C bývá často užíván v zimě a na jaře jako prevence proti infekčním nemocem a nemocem z nachlazení. Účinek vitamínu spočívá v jeho pozitivním vlivu na funkci fagocytů – buněk, schopných pohlcovat a destruovat mikroorganismy či jiné cizorodé buňky, které pronikly do organismu. Zvýšením fagocytární aktivity a ochranou jejich membrán před oxidačním poškozením, stimuluje obranyschopnost a významně tím napomáhá organismu bránit se nepříznivým vlivům vnějšího prostředí^{7,14}.

Vylučování kovů z těla

Kyselina askorbová je významné redukční činidlo, neboť se velmi snadno oxiduje na biologicky neaktivní kyselinu dehydroaskorbovou. Právě díky těmto redukčním vlastnostem má schopnost odbourávat z organismu těžké kovy, jako jsou například olovo, rtuť anebo kadmium^{4,15}.

2.5 STABILITA VITAMINU

Vitamin C je jedním z nejméně stálých vitaminů. Skladováním a v průběhu kulinární úpravy potravin přechází kyselina askorbová na kyselinu dehydroaskorbovou. Dehydroaskorbová kyselina poměrně snadno otevírá laktonový kruh, a tím dochází ke ztrátě biologické aktivity⁷.

2.5.1 ZTRÁTY VITAMINU ZPŮSOBENÉ SKLADOVÁNÍM

Pro zachování maximálního obsahu vitamínu C v ovoci a zelenině v průběhu skladování, jsou potravinářskými podniky používány nejrůznější metody a postupy.

U potravin skladovaných pouze krátkou dobu se především dbá na omezení jejich kontaktu se vzduchem, např. výměnou vzduchu za inertní atmosféru. Vzdušný kyslík totiž způsobuje oxidaci vitamínu C a tím ztrátu jeho biologické aktivity. Také působením enzymů může za přítomnosti iontů Fe^{3+} a Cu^{2+} docházet k oxidaci. Vazbou iontů do komplexů či vyloučením přímého styku potravin se železnými, měděnými, mosaznými a bronzovými nádobami množství iontů klesá a ztráty vitamínu C nejsou tolik výrazné^{2,10}.

K dlouhodobému skladování ovoce a zeleniny se často využívá tzv. sterilace. Při této metodě je potravina v autoklávu vystavena teplotám okolo 115–140 °C. Vlivem vysokých teplot dochází k likvidaci veškeré bakteriální mikroflóry a enzymů, schopných potravinu ničit či jinak znehodnocovat pro konzumaci, a tím prodlužuje dobu její trvanlivosti. Sterilace je k vitamínu C velmi šetrná. Mnohé studie totiž dokázaly, že ve sterilovaných potravinách ubývá tohoto vitamínu jen velmi málo. Např. v konzervě sterilovaných višní bylo zachováno 98,1 % vitamínu C, u meruněk 95,8 % a v konzervě hrušek zůstalo vitamínu 96,7 %. Vitamin C je citlivý na teplo, a proto by měli být sterilované potraviny uchovávány na chladnějších místech. Pokusy s konzervou sterilovaných meruněk ukázaly, že v průběhu dvou let skladování při teplotě nižší než 20 °C poklesl obsah vitamínu C o 10 %, zatímco při teplotě nad 20 °C se snížil na polovinu^{5,10}.

Další způsob, sloužící k dlouhodobému uchování potravin, je zmrazení. Mnoha studiemi bylo potvrzeno, že čím nižší je teplota zmrazování, tím menší ztráty vitamínu C v potravinách nastanou. Pokusy s jablky prokázaly, že zmrazením při – 5 °C ztratila jablka téměř všechny vitamín C, při – 10 °C činila ztráta 50 % a při teplotě – 30 °C se původní obsah vitamínu C téměř nezměnil. Hlavní příčinou úbytku vitamínu C jsou krystalky ledu, které se vytváří vlivem nízkých teplot a roztrhávají stěny buněk. Při následném rozmrazení přichází vnitřní obsah narušených buněk do styku se vzdušným kyslíkem a nastává rychlá oxidace vitamínu vedoucí až k jeho degradaci¹⁰.

2.5.2 ZTRÁTY VITAMINU ZPŮSOBENÉ KULINÁRNÍ ÚPRAVOU

Při úpravě ovoce a zeleniny nastává úbytek vitamínu již během omývání, protože je vitamin C ve vodě rozpustný a velmi snadno se vyluhuje¹. Také krájením se obsah vitamínu výrazně

snižuje. Krájení ovoce a zeleniny na malé kousky vede k narušení buněčné tkáně a zároveň zvětšení plochy pro styk se vzduchem. Vlivem těchto faktorů se aktivuje askorbát peroxidáza, enzym, který způsobuje oxidaci vitamínu a tím ztrátu jeho biologické aktivity²⁶.

V ovoci a zelenině není vitamin C rozložen rovnoměrně. Povrchové části plodů bývají na vitamin C bohatší, což potvrzuje i práce A. A. Kolesníka, který sledoval koncentraci vitamínu ve slupce, dřeni a jaderníku různých odrůd jablek. Výsledky této práce uvádí tabulka 3. Značné ztráty vitamínu proto nastávají také oloupaním, neboť dochází k odstranění povrchových - na vitamin C nejbohatších částí¹⁰.

Tabulka 3 - Kolísání obsahu vitamínu v závislosti na analyzované části ovoce¹⁰

Odrůda	Obsah vitamínu C (mg/100g ovoce) v různých částech jablek		
	slupka	dužnina	jaderník
Renet bumažnyj	6,6	4,7	3,4
Belfler	5,1	2,9	2,6

Vitamin C je velmi termolabilní, a proto k jeho značným ztrátám dochází také tepelnou úpravou. Vlivem vysokých teplot na změny v obsahu vitamínu v ovoci a zelenině se zabývá řada studií. Většina z těchto studií se shoduje, že největší ztráty vitamínu nastávají vařením. Např. brokolice vařená ve vroucí vodě po dobu 5 minut ztratila 54,6 % vitamínu C, zatímco mikrovlnným ohřevem pouhých 28,1 %²⁷. U květáku vařeného 6 minut poklesl obsah vitamínu o 40,5 % kdežto mikrovlnným ohřevem o 26,5 %²⁸.

Velké ztráty způsobuje také pečení. Zelené banány pečené v troubě na 200 stupňů ztratily 76 % vitamínu, oproti banánům smaženým na palmovém oleji, u nichž byl zaznamenán úbytek 47 %²⁹.

Nejvhodnější způsob tepelné úpravy představuje vaření na páře, což potvrzují i výsledky studie zveřejněné v roce 2013 časopisem Nutrition&Food Science. Tato studie porovnávala výši ztrát vitamínu C u salátu a špenátu za použití 3 různých metod tepelné úpravy - vaření ve vodě, na páře a mikrovlnný ohřev. U špenátu vařeného ve vodě se obsah vitamínu C snížil o 50,5 %, mikrovlnným ohřevem o 25,5 % a vařením na páře o 11,1 %. Podobné výsledky vykazoval i salát, u nějž dosahovaly ztráty vařením ve vodě 40,4 % a ohřevem v mikrovlnné troubě 21,2 %, zatímco vařením na páře obsah vitamínu C klesl o pouhých 8,6 %²⁷.

Vitamin C obsažený v různých druzích ovoce a zeleniny reaguje na tepelné zpracování různě citlivě, viz tabulka 4. Nejmenší ztráty vitamínu byly po 5 minutách vaření zaznamenány u špenátu, největší u mrkve³⁰.

Tabulka 4 – Ztráty vitamínu C vařením u různých druhů zeleniny³⁰

Druh zeleniny	Ztráty vitamínu C po 5 minutách vaření (v %)
špenát	9,9
zelený hrášek	10,6
dýně	12,4
mrkev	16,6
paprika	11,8

3 ZELENINA

Zelenina má pro výživu člověka nesmírný význam. Poskytuje nejen základní živiny, jako jsou sacharidy, tuky a bílkoviny, ale především vitaminy, minerály a další biologicky aktivní látky, které jsou nezbytné pro správné fungování lidského organismu. Každodenní příjem zeleniny napomáhá v prevenci a léčbě různých onemocnění, a proto by měla tvořit nejméně jednu čtvrtinu z celkového denního příjmu potravy. Zelenina je zvláště bohatá na vitamin C. Doporučenou denní spotřebu vitamínu pro dospělého člověka lze pokrýt velmi snadno, a to např. konzumací 50-100 g špenátu, 100-150 g bílého hlávkového zelí nebo 150-200 g rajčat³¹.

3.1 ROZDĚLENÍ ZELENINY

Zelenina se na jednotlivé druhy nejčastěji třídí dle tzv. užitkovosti. Toto třídění je založeno na charakteru rostlinných orgánů, pro něž se příslušný druh pěstuje. Podle užitkovosti rozdělujeme zeleninu na zeleninu košťálovou (např. brokolice, růžičková kapusta, květák), kořenovou (např. mrkev, celer, ředkev), listovou (např. špenát, čínské zelí), luskovou (např. hrách, fazole, sója), plodovou (např. rajče, paprika, lilek), cibulovou (např. cibule, česnek, pažitka), vytrvalou (např. chřest, křen) a kořenovou (např. kopr, tymián, fenykl)³².

3.2 BROKOLICE

3.2.1 Charakteristika a původ

Brokolice je druhem košťálové zeleniny, která patří do velké skupiny rostlin z čeledi brukvovitých (Brassicaceae)³³. Košťáloviny pocházejí z plané formy brukve zelné, která dodnes roste na pobřeží Středozemního moře a v přímořských oblastech západní Evropy. V dnešní době existuje řada druhů a variet košťálovin. Mezi nejvýznamnější a nejčastěji pěstované patří včetně brokolice například květák, hlávkové zelí, kapusta, kadeřávek či kedluben³¹.

Prvními pěstiteli brokolice byli již staří Římané. Po staletí byla pěstována pouze na Apeninském poloostrově a do dalších evropských zemí začala pronikat teprve v 17. století. Po druhé světové válce se dostala i na americký kontinent a odsud se její konzumace rozšířila do celé Evropy³³.

3.2.2 Druhy

Brokolice se pěstuje ve 2 formách – květáková a výhonková. Květáková forma vytváří mohutné růžice bílé, žluté nebo nafialovělé barvy. Pěstuje se jako dvouletá rostlina, která je schopna přezimovat pouze v přímořských oblastech s mírným klimatem. Díky nižším nárokům na klimatické podmínky je rozšířenější brokolice výhonková. Je jednoletá a tvoří menší růžici zelené barvy o průměru 10–25 cm³³.

3.2.3 Vliv na zdraví

Brokolice má významný pozitivní vliv na lidské zdraví. Nutričně se jedná o velmi hodnotnou potravinu, a to zejména díky vysokému obsahu vitaminů C, E a A. Je také zdrojem řady minerálních látek, především vápníku, železa, hořčíku a draslíku³³.

Vzhledem k velkému množství vlákniny napomáhá brokolice vyprazdňování střev a léčivě působí i na žaludeční a dvanáctíkové vředy. Brokolice je také ceněna pro své protisklerotické účinky - zabraňuje přeměně sacharidů na tuky a výrazně ovlivňuje rozpouštění cholesterolu³⁴.

Během rozsáhlých studií posledních let bylo zjištěno, že pravidelná konzumace této zeleniny velmi významně snižuje riziko vzniku rakoviny, především rakoviny plic a děložního čípku³¹. Důvodem je vysoký obsah glukosinolátů. Tyto látky jsou žvýkáním rozštěpeny na řadu biologicky aktivních sloučenin. Jednou z nich jsou isothiokyanáty, které při studiích na zvířatech jevíly značné protektivní účinky při rozvoji karcinomu plic³⁵.

Vědecké poznatky dále prokázaly schopnost brokolice napomáhat snášet ionizující záření. Pokusná zvířata krmená touto zeleninou byla po určitou dobu vystavena záření o velikosti 4 grayů. Z těchto zvířat přežilo 60 %. Ze zvířat ozářených stejnou dávkou ovšem nekrmených brokolicí nepřežilo jediné³⁶.

4 KUCHYŇSKÉ ZPRACOVÁNÍ ZELENINY

Před použitím v kuchyni je nutné zeleninu zpracovat tak, aby byla zdravotně nezávadná a nepředstavovala riziko pro zdraví spotřebitele. První krok představuje předběžná úprava, po níž lze zeleninu již bezpečně konzumovat. U některých druhů zeleniny, které nejsou konzumovány v syrovém stavu, je dalším krokem úprava tepelná³⁷.

4.1 PŘEDBĚŽNÁ ÚPRAVA

Předběžná úprava je řada operací, sloužících k odstranění částí potravin, které nebudou konzumovány. Zeleninu je třeba zbavit kořínků a dalších nestravitelných částí. Z důvodu možné kontaminace (pesticidy, herbicidy, mikroorganismy, atd.) je nutné zeleninu řádně očistit (např. oloupáním) a důkladně omýt. Dále je nezbytné odstranit nahnilá místa, neboť se zde vytvořily přírodní toxické látky, které mohou působit jako silné alergenů a fotokarcinogenů³⁷.

Během předběžných úprav dochází v zelenině i k negativním změnám, a to zejména k úbytku biologicky a nutričně hodnotných látek. Výrazný pokles těchto látek (vitaminů rozpustných ve vodě, některých minerálních látek, sacharidů a bílkovin) nastává především při kontaktu zeleniny s vodou. O velikosti ztrát rozhoduje teplota vody (čím vyšší teplota, tím je ztráta cenných složek vyšší) a doba kontaktu zeleniny s vodou. Také narušením rostlinné tkáně, např. krájením, dochází k vyplavení oxidačních enzymů způsobujících degradaci některých vitaminů (vit. C, B1 a E) a nenasycených mastných kyselin. Úbytek vitaminů A, B2, C, E a karotenoidů způsobuje také světelné a UV záření³⁷.

4.2 TEPELNÁ ÚPRAVA

Během tepelné úpravy nastávají v zelenině změny v sensorické i nutriční hodnotě. Působením vysokých teplot dochází k ničení vegetativních forem mikroorganismů, inaktivaci toxických látek, zvyšuje se stravitelnost a mění struktura, vzhled i chuť. Současně mohou ovšem vznikat i látky pro lidské tělo nebezpečné, a to látky s karcinogenním charakterem. Mezi nejběžnější tepelné úpravy zeleniny patří vaření, blanšírování, dušení, pečení a smažení³⁷.

Vaření

Vaření je tepelná úprava prostřednictvím horké tekutiny nebo páry. Při vaření v tekutině je zelenina rovnoměrně zahřívána ze všech stran vroucí tekutinou, např. vodou, mlékem či vývarem³⁷. Vaření v tekutině je nejméně vhodnou tepelnou úpravou, neboť značné množství biologicky důležitých látek přechází do vody a zelenina tak ztrácí na své výživové hodnotě¹⁰. Šetrnější metodu představuje vaření pod tlakem. Použitím tlakového hrnce lze díky přetlaku zkrátit dobu varu až o jednu třetinu, a proto je zelenina upravovaná tímto způsobem nutričně hodnotnější³⁷.

Vaření v páře je způsob úpravy, při němž je zelenina umístěna na děrované podložce, pod kterou je vroucí voda. Díky tomu, že je zelenina ohřívána pouze párou a nedochází k jejímu kontaktu s vodou, jsou ztráty cenných složek výrazně nižší³⁷.

Blanšírování

Blanšírování je metoda spočívající v krátkodobém ponoření zeleniny do vroucí vody. Tímto způsobem se zelenina zpracovává zejména před uložením do konzerv. Blanšírováním se snižuje množství mikrobiální flóry z povrchu zeleniny a deaktivují enzymy, které by mohly při následné konzervaci způsobovat její zkažení^{9,37}.

Dušení

Dušení se provádí v uzavřené nádobě působením malého množství tekutiny (případně tuku) a páry, která se v nádobě kumuluje. Vzhledem ke sníženému kontaktu zeleniny s vodou je zachována většina biologicky aktivních látek, a proto představuje dušení jednu z nejvhodnějších metod tepelné úpravy zeleniny³⁷.

Pečení

Zeleninu lze upravovat působením horkého suchého vzduchu. Dle technologického postupu rozlišujeme pečení a zapékání. Pečením se upravuje syrová zelenina, zatímco při zapékání je horkému vzduchu vystavena zelenina již tepelně ošetřená. Dalším způsobem je úprava sálavým teplem při teplotách 250-350°C, tzv. grilování. Z hygienického hlediska se jedná o nejméně bezpečnou metodu, neboť při ní vzniká řada různých chemických, ve většině případů karcinogenních, látek³⁷.

Smažení

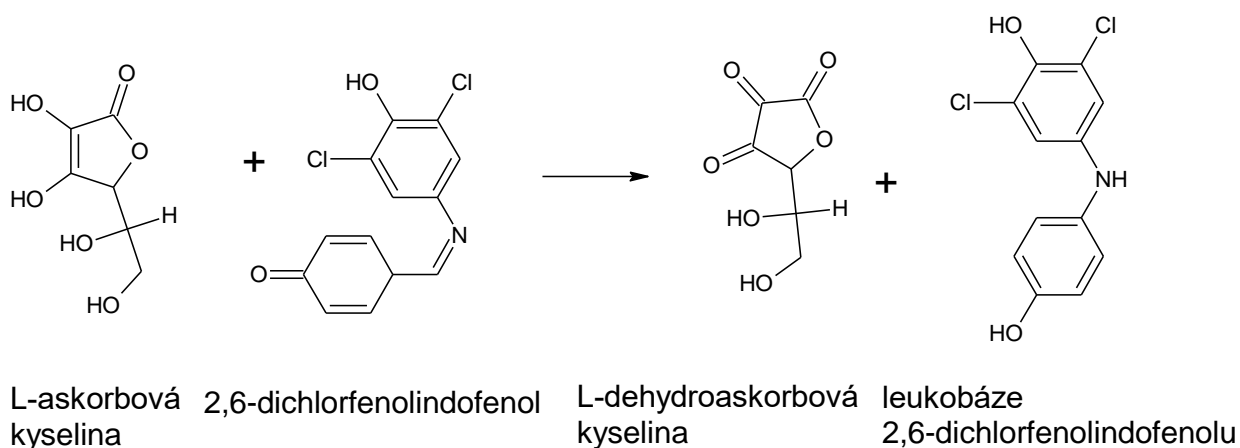
Smažení je tepelná úprava, při které je zelenina ponechána na pánvi v tuku o teplotě pohybující se v rozmezí 150 až 190 °C. Vlivem vysokých teplot dochází k tvorbě mnoha pro lidské tělo zdraví škodlivých látek, a proto by se smažení k úpravě zeleniny mělo užívat pouze v omezené míře³⁷.

5 METODY STANOVENÍ VITAMINU C

První biologické stanovení vitamínu C vypracovali H. Shermann a V. La Mer se svými spolupracovníky již v roce 1935. Jejich metoda byla založena na určení minimální dávky vitamínu potřebné k tomu, aby chránila morčata krmená stravou s nízkým obsahem vitamínu C před kurdějemi. S objevením chemické struktury vitamínu C se od této biologické metody upustilo a ke stanovení se začalo užívat metod od jednoduchých titrací až po složitější a selektivnější metody jako je např. spektrofotometrie nebo vysokoúčinná kapalinová chromatografie³⁸.

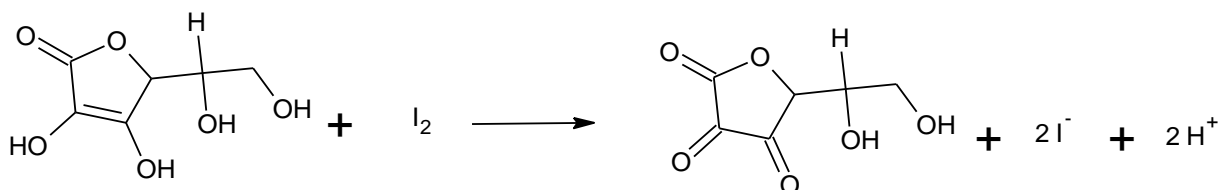
5.1 TITRAČNÍ STANOVENÍ

Titrační stanovení je založeno na reakci titračního činidla 2,6-dichlorfenolindofenolu (DCIP) s kyselinou askorbovou. Při reakci je kyselina askorbová oxidována roztokem DCIP na kyselinu dehydroaskorbovou a činidlo zredukováno na bezbarvou bázi, viz obrázek 3. Konec titrace indikuje narůžovělé zbarvení, svědčící o nadbytku nezredukováného činidla. Reakce se provádí v kyselém prostředí, nejčastěji v prostředí kyseliny metafosforečné³⁸. Množství kyseliny dehydroaskorbové je stanoveno po redukci, např. plynným H₂S nebo homocysteinem a celkový obsah vitamínu C následně zjištěn jako suma AA a DHA³⁹.



Obrázek 3 – Oxidace kyseliny askorbové činidlem DCIP³⁹

Kyselinu askorbovou lze také stanovit přímou jodometrickou titrací. Při titraci je kyselina jódem stechiometricky oxidována na kyselinu dehydroaskorbovou, přičemž jedna molekula kyseliny reaguje s jednou molekulou jódu. Reakci znázorňuje obrázek 4. Jako indikátoru se užívá škrobového mazu, zbarvujícího roztok modře. Titraci je nutno provádět v kyselém prostředí (např. kyseliny sírové), aby se zamezilo zpětné oxidaci jodidu na jód⁴⁰.



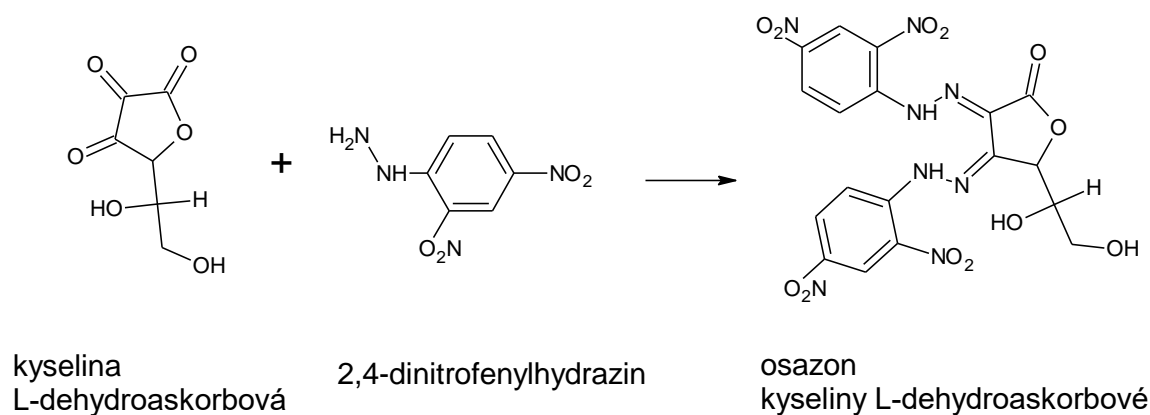
Obrázek 4 – Oxidace kyseliny askorbové jódem⁴⁰

5.2 KOLORIMETRICKÉ STANOVENÍ

Kyselinu askorbovou lze stanovit mnoha různými kolorimetrickými metodami. Např. za přítomnosti uranylacetátu ve slabě kyselém prostředí, poskytuje AA hnědé zabarvení. Působením diazotovaného 4-methoxy-2nitroanilinu se kyselina zbarvuje do modra. Modré zabarvení lze také pozorovat v přítomnosti kyseliny fosfowolframové³⁸.

5.3 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ

Kyselina askorbová se v přítomnosti octové kyseliny oxiduje bromovou vodou na kyselinu dehydroaskorbovou. Tato vzniklá kyselina následně kondenzuje s 2,4-dinitrofenylhydrazinem za vzniku červeného komplexu (osazonu), viz obrázek 5, jehož absorbance je spektrofotometricky změřena. Proměňování absorbance se provádí ve viditelné oblasti spektra, nejčastěji při 521 nm⁴¹.



Obrázek 5 – Kondenzace AA s 2,4-dinitrofenylhydrazinem³⁹

5.4 FLUORIMETRICKÉ STANOVENÍ

Fluorimetrické stanovení je založeno na kondenzační reakci DHA s o-fenylendiaminem. Výsledný produkt reakce je fluoreskující chinoxalinový derivát, jehož detekce je provedena emisí při 430 nm a excitací při 350 nm. Před samotným stanovením musí být AA zoxidována na DHA⁴².

5.5 ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ

5.5.1 COULOMETRIE

Kyselinu askorbovou lze stanovit přímou coulometrickou titrací v porézní uhlíkové elektrodě. Kyselina je konstantním proudem oxidována na dehydroaskorbovou kyselinu. Po úplném zoxidování dochází ke skokové změně potenciálu pracovní elektrody, což indikuje konec titrace. Získaný signál má tvar píku, jehož plocha odpovídá koncentraci AA⁴³.

5.5.2 POLAROGRAFIE

Polarografická metoda je založena na elektrochemické oxidaci kyseliny askorbové na rtuťové kapkové elektrodě. Výsledkem je dvouelektrová anodická vlna, z jejíž výšky je obsah kyseliny určen. AA je stálá při nižších hodnotách pH, proto se při polarografickém stanovení pracuje nejčastěji v prostředí acetátového (pH 4,64) či ftalátového (pH 4) pufru⁴⁴.

5.5.3 VOLTAMETRIE

Jedna z nejcitlivějších metod ke stanovení kyseliny askorbové je square-wave voltametrie (SWV). Při této metodě, podobně jako u jiných voltametrických technik, je sledována závislost procházejícího proudu na proměnlivém potenciálu, který je vkládán na pracovní elektrodu. Oxidace kyseliny askorbové se na křivce, jež tuto závislost vyjadřuje, projeví vznikem tzv. anodické vlny. Plocha této vlny odpovídá množství stanovované kyseliny⁴⁵.

5.6 CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ

V praxi se vitamin C nejčastěji stanovuje prostřednictvím vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Tato separační metoda je založena na opakovaném procesu distribuce složek analyzovaného vzorku mezi kapalnou mobilní a stacionární fází. Jednotlivé složky vzorku migrují na základě rozdílné afinity k oběma fázím různou rychlostí chromatografickým prostředím a dochází tak k jejich vzájemné separaci⁴⁶.

HPLC představuje jednu z nejúčinnějších separačních metod. Využívají se při ní speciální vysokotlaké chromatografy s kolonami naplněnými velmi jemnými částicemi sorbentu. K detekci látek vystupujících z chromatografické kolony, tzv. eluátů, slouží různé typy detektorů. Mezi nejpoužívanější patří především spektrofotometrické (UV/VIS) a fluorescenční. Signál z detektoru je pomocí převodníku převeden a výstupem je chromatogram, který obsahuje píky odpovídající jednotlivým analyzovaným látkám. Plocha píků slouží k určení obsahu sledované látky⁴⁶.

Princip UV/VIS detektorů je založen na měření absorbance eluátu v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm. Nejjednodušší detektory měří pouze při jedné vlnové délce, složitější dovolují nastavení vlnové délky pomocí monochromátoru. Nejdokonalejším spektrofotometrickým detektorem je DAD detektor, který je schopen pomocí diodového pole zaznamenat v určené oblasti vlnových délek celé absorpční spektrum. Fluorescenční detektory vychází ze schopnosti látek absorbovat elektromagnetické záření, přecházet tak ze základního stavu do vyšších energetických hladin a následně absorbovanou energii vyzářit jako fluorescenci, jejíž vlnová délka je detektory změřena⁴⁷.

Existuje mnoho způsobů, pomocí nichž lze metodou HPLC vitamin C stanovit. Každý z nich uplatňuje jinou metodiku, využívá odlišné přístroje, má rozdílné podmínky stanovení atd.

Např. laboratoře Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského extrahují vitamin C ze vzorku roztokem kyseliny metafosforečné (MPA), která tím zabraňuje jeho nežádoucí oxidaci. Následně L-cysteinem provedou redukci DHA na AA a celkový obsah vitaminu stanoví metodou HPLC s UV detekcí při 265 nm⁴⁸.

Jiné zdroje uvádí, že konverze DHA na AA může být také prováděna pomocí dithiothreitolu či TCEP (tris(2-karboxyethyl)fosfinu) a k extrakci lze využít i kyselinu šřavelovou anebo směs kyseliny metafosforečné s kyselinou octovou⁴⁹.

Dále lze využít reakce DHA s o-fenyldiaminem. Výsledný chinoxalinový derivát je fluorescenčně detekován při 348 nm, čímž je stanoven obsah kyseliny dehydroaskorbové. AA je poté detekována elektrochemicky na skleněné uhlíkové elektrodě s potenciálem + 600 mV ve srovnání s referenční Ag/AgCl elektrodou. Celkové množství vitaminu C je získáno součtem obsahu těchto dvou kyselin⁴⁹.

Odborná literatura uvádí řadu dalších možných způsobů, kterými lze vitamin C v potravinách stanovit. Některé z nich jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5 – Způsoby stanovení vitaminu C v potravinách metodou HPLC⁴⁹

Stanovovaná potravina	Příprava vzorku	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce
brambory, jahody	<ul style="list-style-type: none"> - extrakce MPA (c = 0,0625 mol.l-1) - míchání - odstředění - filtrace přes papírový filtr 	Animex HPX-87H (9 µm)	H ₂ SO ₄ (c=0,0045mol/l) průtok: 0,5 ml/min	DAD, 245 nm
zelenina	<ul style="list-style-type: none"> - homogenizace (5% MPA) - odstředění - filtrace přes papírový filtr - zředění - čištění (Sep-Pak C18) - membránová filtrace 	µBondapack NH2	KH ₂ PO ₄ - CH ₃ CN (30:70) průtok: 1 ml/min	UV, 254 nm
ovocné a zeleninové džusy	<ul style="list-style-type: none"> - homogenizace v fosfátovém pufru (0,2M) - extrakce 3% MPA - filtrace (nylonový filtr) 	PLRP-S (5 µm)	1,8% kyselina tetrahydrofolová a 0,3% MPA průtok: 0,5 ml/min	DAD, 244 nm

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

6.1.1 VZORKY ZKOUMANÉ BROKOLICE

Brokolice byla zakoupena v červnu 2017 v supermarketu Lidl v Hradci Králové. Jednalo se o I. jakost a zemí původu bylo Španělsko. Brokolice byla do provedení experimentu skladována po dobu jednoho dne v lednici při teplotě 8 °C.

6.1.2 POMŮCKY

- běžné laboratorní sklo
- injekční stříkačky, 2 ml
- mikrostříkačka, 25 µl (Hamilton)
- stříkačkové PTFE mikrofiltry (0,45µm)
- skládaný filtrační papír
- mikropipety s nastavitelným objemem (Biohit-Proline, Biohit Finsko)
- vialky
- váženky
- plastová lžička
- plastové mikrozkuhavky

6.1.3 PŘÍSTROJE

- ultrazvuková lázeň (Kraintek 12, Slovensko)
- homogenizátor ULTRA TURRAX T 18 (Ika, Německo)
- digitální analytické váhy (Sartorius, Ústí nad Labem)
- centrifuga 5424 (Eppendorf)
- pH metr (Metrohm 827, Švýcarsko)
- plotýnkový ohřívač
- rychlovarná konvice

- modulární kapalinový chromatogram složený z čerpadla mobilní fáze LC-20AD, degaseru DGU-3014, spektrofotometrického detektoru SPD-M30A (vše Shimadzu, Kyoto, Japonsko), dávkovacího smyčkového zařízení 7725i (Rheodyne, USA) a termostatu kolon LCO 102 single (Ecom, Praha)
- počítač software LabSolution Lite (Shimadzu)

6.1.4 CHEMIKÁLIE

- deionizovaná voda (Mili-Q, Merck, Německo)
- kyselina metafosforečná (Sigma Aldrich, USA)
- metanol (Sigma Aldrich, USA)
- kyselina askorbová (Sigma Aldrich, USA)

6.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

6.2.1 PŘÍPRAVA STANDARDNÍCH ROZTOKŮ

Nejprve byl připraven zásobní roztok kyseliny askorbové o koncentraci 1 mg.ml⁻¹. Navážka 10 mg kyseliny askorbové byla kvantitativně převedena do 10 ml odměrné baňky a doplněna po rysku extrakčním činidlem. Standardní roztoky kalibrační křivky o koncentracích 0,005; 0,01; 0,02; 0,04; 0,05; 0,07; 0,08 a 0,1 mg.ml⁻¹ byly připraveny zředěním zásobního roztoku extrakčním činidlem a následně proměřeny.

6.2.2 PŘÍPRAVA EXTRAČNÍHO ČINIDLA

Jako extrakční činidlo byl používán roztok 3 % kyseliny metafosforečné. Činidlo bylo připraveno rozpuštěním 15 g pevné kyseliny metafosforečné (pomocí ultrazvuku) v 500 ml redestilované vody.

6.3 PŘÍPRAVA VZORKŮ BROKOLICE

K tepelné úpravě byly použity 2 metody, a to vaření a blanšírování.

6.3.1 PŘÍPRAVA VZORKU SYROVÉ BROKOLICE

K přípravě vzorku byla brokolice rozkrájena na menší růžičky. Ty byly (s přesností na dvě desetinná místa) zváženy na analytických vahách, vloženy do kádinky a zality 45 ml extrakčního činidla. Vzorek byl poté homogenizován při otáčkách cca 22000 po dobu jedné minuty a zfiltrován přes skládaný filtr. Přibližně 2,5 ml tohoto filtrátu bylo převedeno do mikrozkušavky a 3 minuty centrifugován. Následně byl vzorek přefiltrován přes PTFE mikrofiltr, zředěn kyselinou metafosforečnou (200 μ l vzorku : 800 μ l kyseliny metafosforečné) a analyzován.

6.3.2 PŘÍPRAVA VZORKU VAŘENÉ BROKOLICE

Růžičky brokolice byly naváženy na analytických vahách, vloženy do kádinky s vroucí vodou a vařeny po dobu 10 minut. Po uvaření byly růžičky z vody vyjmuty a v čisté kádince ponechány částečně zchladnout. Pro další úpravy byl aplikován tentýž postup jako u přípravy vzorku syrové brokolice (6.3.1) jen s tím rozdílem, že ředění kyselinou metafosforečnou bylo v poměru 1 : 1, konkrétně 400 μ l vzorku na 400 μ l kyseliny.

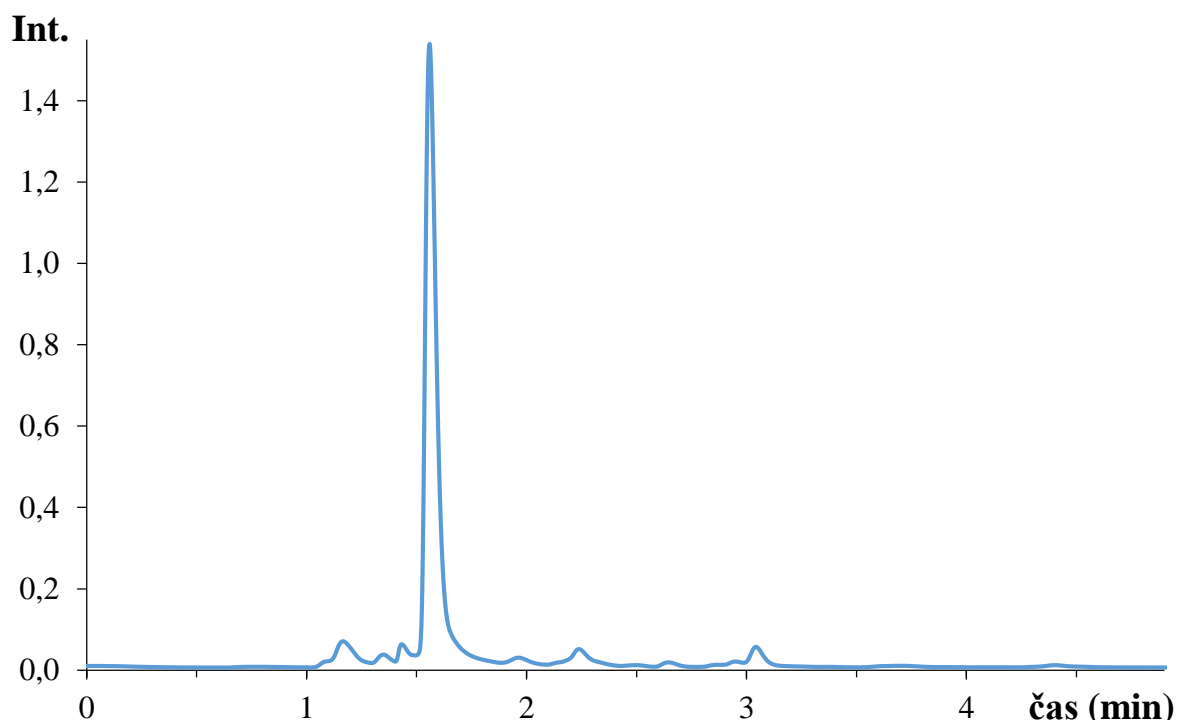
6.3.3 PŘÍPRAVA VZORKU BLANŠÍROVANÉ BROKOLICE

Zvážené růžičky brokolice byly vloženy do kádinky a zality vroucí vodou z rychlovarné konvice. Po uplynutí jedné minuty byly z vody vyjmuty a v čisté kádince ponechány zchladnout. Dále byl vzorek upravován stejným způsobem jako u syrové brokolice (6.3.1) s rozdílem, že 300 μ l vzorku bylo zředěno 700 μ l kyseliny metafosforečné.

6.4 PODMÍNKY STANOVENÍ KYSELINY ASKORBOVÉ METODOU HPLC

Kyselina askorbová byla ve vzorcích brokolice stanovena metodou kapalinové chromatografie s UV detekcí. Separace probíhala na koloně Ascentis Express C18 o délce 150 mm, průměru 3,0 mm a zrnitosti 2,7 μ m s využitím isokratické eluce. Mobilní fází byl 5 % roztok metanolu ve vodě (s přídavkem kyseliny metafosforečné, pH 2,8). Použitá teplota pro separaci byla 30 °C. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min a dávkované množství vzorku bylo 5 μ l. K detekci byla využita vlnová délka 254 nm. Ukázkový chromatogram separace

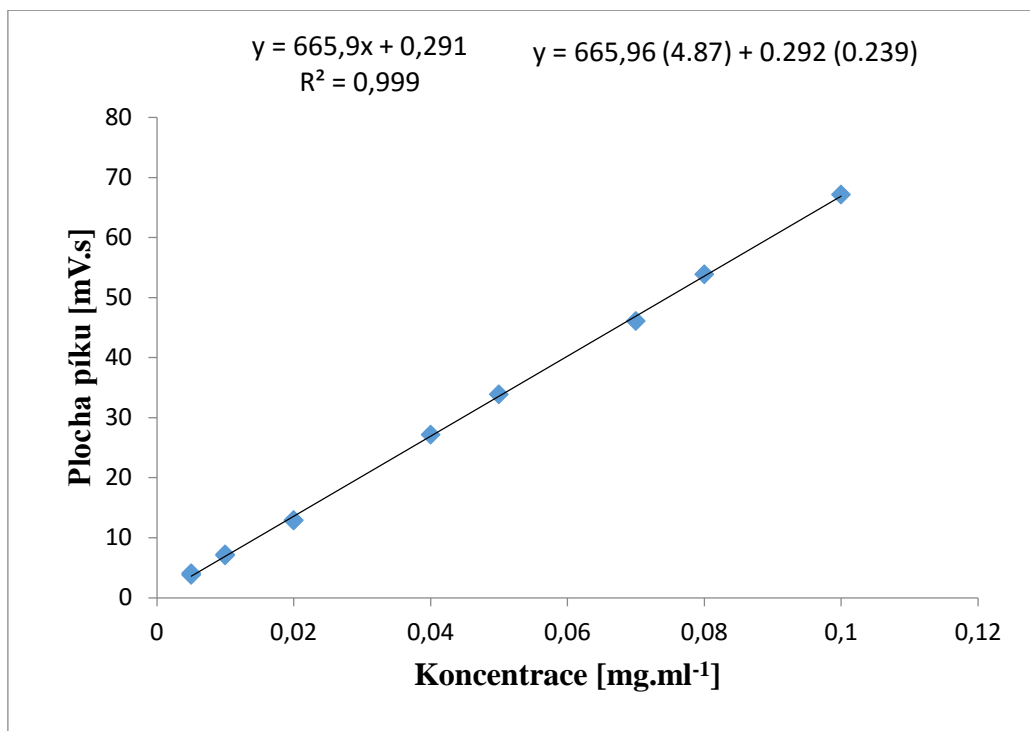
kyseliny askorbové ve vzorku spařené brokolice je uveden na obrázku 6. Retenční čas AA byl 1,56 min.



Obrázek 6 - Chromatogram separace kyseliny askorbové ve vzorku spařené brokolice

6.5 VÝSLEDKY

Kvantitativní stanovení kyseliny askorbové bylo provedeno metodou kalibrační křivky v rozsahu koncentrací $c = 0,0005\text{--}0,1$ mg/ml. Jednotlivé kalibrační roztoky byly proměřeny dvakrát na osmi koncentračních hladinách. Regresní diagnostika byla provedena v programu QC Expert 2.9 (TriloByte, ČR). Nejprve byla provedena kritika dat a s využitím grafických diagnostik (Pregibonův graf, Williamsův graf, L-R graf, Jackknife rezidua a McCulloh-Meterův) byly odhaleny a odstraněny vlivné body. Významnost regresivních parametrů byla testována pomocí Studentova t-testu. Kalibrační křivka je zobrazena na obrázku 7, kde jsou uvedeny regresní parametry (úsek a směrnice) spolu s jejich směrodatnými odchylkami ($y = 665,96 (4.87) + 0.292 (0.239)$) a koeficientem determinace. Již ze směrodatné odchylky je patrné, že absolutní člen kalibrační křivky je nevýznamný. Při testování významnosti tohoto parametru byla na hladině významnosti 95 % pravděpodobnost větší než 0,05 ($P = 0,25$).



Obrázek 7 – Kalibrační přímka pro stanovení kyseliny askorbové

Následovala analýza připravených extraktů. Celkem byly provedeny pro každý vzorek (syrová, vařená a blanširovaná brokolice) dvě extrakce. Jednotlivé extrakty byly měřeny pomocí HPLC/UV celkem třikrát. Plocha píků kyseliny askorbové byla pomocí rovnice regrese přepočtena na koncentraci, která byla upravena v závislosti na ředění a navážce vzorku na množství AA ve 100 g brokolice. Zjištěná množství kyseliny askorbové v brokolici před a po tepelné úpravě jsou zaznamenána v tabulce 6.

Tabulka 6 - Množství kyseliny askorbové ve vzorku brokolice

Vzorek	Průměrný obsah kyseliny askorbové (mg/100g)	Relativní směrodatná odchylka (%)
brokolice syrová	60,58	2,66
brokolice blanširovaná	48,79	1,61
brokolice vařená	19,61	1,76

Tepelnou úpravou brokolice došlo k významným ztrátám v obsahu kyseliny askorbové. Čím déle byla brokolice v horké vodě ponořena, tím více se obsah kyseliny snižoval. Měřením

bylo zjištěno, že ve vzorku syrové brokolice činil průměrný obsah AA 60,59 mg/100g. Blanšírováním množství kyseliny pokleslo o 19,5 % na průměrných 48,77 mg/100g. V brokolici vařené po dobu 10 minut byl zaznamenán úbytek ještě výraznější. V takto tepelně upravené brokolici bylo analýzou stanoveno 19,61 mg/100g AA. Množství kyseliny se tak snížilo o 67,6 %. Odchytky měření byly u všech typů vzorků do 3 %, což svědčí o dobré opakovatelnosti extrakční procedury.

Průměrný obsah vitamínu C (kyseliny askorbové) v syrové brokolici závisí na mnoha faktorech. Ke ztrátám dochází přístupem slunečního světla, vlivem vzdušného kyslíku, nevhodným skladováním atd. Z toho důvodu uvádí různé literární zdroje různé hodnoty průměrného obsahu. Dle analýzy publikované v knize *The World's Healthiest Foods*⁵⁰ je průměrné množství vitamínu C v syrové brokolici 64,9 mg/100g. Tato hodnota je přibližně shodná s námi zjištěnou hodnotou. Studie uveřejněná v roce 2013 časopisem *World Applied Sciences Journal*⁵¹ uvádí průměrné množství vitamínu vyšší, a to 92,65 mg/100g. Vařením obsah vitamínu poklesl na 32,94 mg/100g, tzn. o 64,5 %. Procentuální pokles přibližně odpovídá poklesu námi naměřenému.

ZÁVĚR

Vitamin C neboli kyselina askorbová je pro organismus velmi důležitou látkou, bez jejíž přítomnosti by v lidském těle nemohla probíhat řada fyziologických procesů. Významně se podílí na syntéze kolagenu, vylučování cholesterolu, vstřebávání železa či stimulaci obranyschopnosti. Svými antioxidačními účinky zabraňuje šíření volných radikálů a napomáhá tak snižovat riziko vzniku cévní mozkové příhody a ischemické choroby srdeční.

Doporučený denní příjem vitamínu C se pro dospělého člověka pohybuje okolo 100 mg na den. Spotřeba výrazně stoupá při infekcích a hojení ran, fyzické a psychické zátěži, ve stáří, v těhotenství a v průběhu kojení. Zvýšené požadavky organismu na příjem byly pozorovány také u kuřáků. Ti by proto měli denně vitamínu C přijmout okolo 200-250 mg.

Lidský organismus si vitamin C nedokáže syntetizovat sám. Z toho důvodu je nezbytné zajistit jeho dostatečný příjem v potravinách a nápojích. Nejbohatšími zdroji jsou zejména čerstvé ovoce a zelenina.

Vitamin C je velmi málo stabilní. Při kontaktu se vzdušným kyslíkem, v přítomnosti iontů Fe^{3+} a Cu^{2+} či vlivem vysokých teplot dochází k jeho oxidaci a tím ztrátě biologické aktivity.

Existuje mnoho analytických metod, pomocí kterých lze množství vitamínu C stanovit. Běžně se užívá titrace kyseliny askorbové 2,6-dichlorfenolindofenolem v kyselém prostředí nebo elektrochemické stanovení prostřednictvím voltametrie, polarografie či coulometrie. V praxi se nejčastěji uplatňuje vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s UV detekcí, a proto byla tato metoda aplikována i v předložené bakalářské práci, jejíž cílem bylo stanovení obsahu vitamínu C (kyseliny askorbové) v zelenině před a po tepelné úpravě.

V experimentální části byla provedena analýza brokolice před a po tepelné úpravě (blanšírováním a vařením po dobu 10 minut). Měřením bylo zjištěno, že ve vzorku syrové brokolice činil průměrný obsah kyseliny askorbové 60,59 mg/100g. Následnou tepelnou úpravou došlo v obsahu kyseliny askorbové k výrazným ztrátám. Blanšírováním pokleslo množství kyseliny o 19,5 %. V brokolici uvařené byl zaznamenán úbytek ještě výraznější. Čím déle byla brokolice v kontaktu s horkou vodou, tím více se obsah kyseliny snižoval. Po 10 minutách vaření kleslo množství kyseliny o 67,6 % až na konečných 19,61 mg/100g.

POUŽITÁ LITERATURA

- (1) KOMPRDA, T. *Základy výživy*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. s. 84-86. ISBN 80-7157-655-7.
- (2) VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin I*. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. s. 49, 371-444. ISBN 978-80-86659-15-2.
- (3) UNGEROVÁ-GÖBELOVÁ, U. *Vitaminy*. Praha: Ikar, 1999. s. 34. ISBN 80-7202-508-2.
- (4) DOSTÁL, J. et al. *Lékařská chemie II*. 2. vydání. Brno: Nakladatelství MU, 2005. s. 156. ISBN 80-210-3789-X.
- (5) KUDLOVÁ, E. et al. *Hygiena výživy a nutriční epidemiologie*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2009. s. 59-151. ISBN 978-80-246-1735-0.
- (6) JANÍČEK, G., HALAČKA, K. *Základy výživy*. Praha: nakladatelství VŠCHT, 1985. s. 85-99.
- (7) HLÚBIK, P., OPLTOVÁ, L. *Vitaminy*. Praha: Grada Publishing, 2004. s. 139-149. ISBN 80-247-0373-4.
- (8) ŽAMBOCH, J. *Vitaminy*. Praha: Grada Publishing, 1996. s. 9-16. ISBN 80-7169-322-7.
- (9) KUDLOVÁ, E. et al. *Hygiena výživy a nutriční epidemiologie*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2009. s. 59-151. ISBN 978-80-246-1735-0.
- (10) CEREVITINOV, F. V. *Chemické složení a fyzikální vlastnosti ovoce a zeleniny*, Praha: Průmyslové nakladatelství, 1952, s. 196-218.
- (11) BUCHANEC, J., MIKLER, J., ĎURDÍK, P., ČILJAKOVÁ, M. Vitamín C – čo o ňom (ne)vieme. *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. 2005, 19 (1), 53–56. ISSN 1803-5353. Dostupné z:
<http://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2005/01/11.pdf>
- (12) SCHREIBER, V. *Vitaminy*. Praha: nakladatelství a vydavatelství H&H, 1993. s. 63-68. ISBN 80-85787-17-2.
- (13) LEDVINA, M., STOKLASOVÁ, A., CERMAN, J. *Biochemie pro studující medicíny I. díl*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2009. s. 95-100, 155-158. ISBN 978-80-246-1416-8.

(14) LEDVINA, M., STOKLASOVÁ, A., CERMAN, J. *Biochemie pro studující medicíny II. díl*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2009. s. 415-418. ISBN 978-80-246-1415-1.

(15) KIMÁKOVÁ, T., BARANOVIČOVÁ, I. *Léčivá síla antioxidantů*. Bratislava: Vydavateľstvo Príroda, s.r.o., 2015. s. 15-27, 38-41. ISBN 978-80-07-02455-7.

(16) SIMON, A., HUDES, E. S., BROWNER, W. S. Serum ascorbic acid and cardiovascular disease prevalence in U. S. adults. *Epidemiology* [online]. 1998, 9 (3), s. 316-321. ISSN 1531-5487.

Dostupné z:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9583425>

(17) HOPPU, U., RINNE, M., SALO-VÄÄNÄNEN, P., LAMPI, A-M., PIIRONEN, V., ISOLAURI, E. Vitamin C in breast milk may reduce the risk of atopy in the infant. *European Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2005, 59, s. 123–128. ISSN 1476-5640.

Dostupné z:

<http://www.nature.com/ejcn/journal/v59/n1/pdf/1602048a.pdf>

(18) LYNCH, S. R. Ascorbic acid and iron nutrition. *Journal of Dentistry for Children* [online]. 1981, 48 (1), s. 61-63. ISSN 1945-1954.

Dostupné z:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6936423>

(19) AKMAL, M., QADRI, J. Q., AL-WAILI, N. S., THANGAL, S., HAG, A., SALOOM, K. Y. Improvement in human semen quality after oral supplementation of vitamin C. *Journal of Medicinal Food* [online]. 2006, 9 (3), s. 440-442. ISSN 1557-7600.

Dostupné z:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17004914>

(20) FANTÓ, A. *Vitamíny a prevence*. České Budějovice: DONA, 1992. s. 66-76. ISBN: 80-85463-18-0.

(21) CAMERON, E., PAULING, L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 1976, 73 (10), s. 3685-3689. ISSN 1091-6490.

Dostupné z:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1068480>

(22) CREGAN, E. T., MOERTEL, C. G., O'FALLON, J. R., SCHUTT, A. J., O'CONNELL, M. J., RUBIN, J., FRYTAK, S. Failure of high-dose vitamin C (ascorbic acid) therapy to benefit patients with advanced cancer. A controlled trial. *The New England Journal of Medicine* [online]. 1979, 301 (13), s. 687-690. ISSN 1533-4406.

Dostupné z:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/384241>

(23) WELSH, J. L., WAGNER, B. A., VAN'T ERVE, T. J., ZEHR, P. S., BERG, D. J., HALFDANARSON, T. R., YEE, N. S., BODEKER, K. L., DU, J., ROBERTS, L. J., DRISKO, J., LEVINE, M., BUETTNER, G. R., CULLEN, J. J. Pharmacological Ascorbate with Gemcitabine for the Control of Metastatic and Node-Positive Pancreatic Cancer (PACMAN): Results from a Phase I Clinical Trial. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. 2013, 71 (3), s. 765-775. ISSN 1432-0843.

Dostupné z:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3587047/>

(24) STEPHENSON, CH. M., LEVIN, R. D., SPECTOR, T., LIS, CH. C. Phase I clinical trial to evaluate the safety, tolerability, and pharmacokinetics of high-dose intravenous ascorbic acid in patients with advanced cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* [online]. 2013, 72 (1), s. 139-146. ISSN 1432-0843.

Dostupné z:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00280-013-2179-9>

(25) YEOM, CH. H., JUNG, G. CH., SONG, K. J. Changes of Terminal Cancer Patients' Health-related Quality of Life after High Dose Vitamin C Administration. *The Korean Academy of Medical Sciences* [online]. 2007, 22 (1), s. 7-11. ISSN 1598-6357.

Dostupné z:

<https://synapse.koreamed.org/search.php?where=aview&id=10.3346/jkms.2007.22.1.7&code=0063JKMS&vmode=FULL>

(26) VARZAKAS, T., TZIA, C. *Handbook of Food Processing: Food Safety, Quality and Manufacturing Processes*. Boca Raton: CRC Press, 2015. s. 263. ISBN 9781498721783.

(27) ZENG, CH. Effects of Different Cooking Methods on the Vitamin C Content of Selected Vegetables. *Nutrition & Food Science* [online]. 2013, 43 (5), s. 438-443. ISSN 0034-6659.

Dostupné z:

<http://www.emeraldinsight.com/doi/pdfplus/10.1108/NFS-11-2012-0123>

(28) SHAMS EL-DIN, M. H. A., MADIHA M. ABDEL-KADER, S. K. Effect of Some Cooking Methods on Natural Antioxidants and Their Activities in Some Brassica Vegetables. *World Applied Sciences Journal* [online]. 2013, 26 (6), s. 697-703. ISSN 1818-4952.

Dostupné z:

[https://www.idosi.org/wasj/wasj26\(6\)13/1.pdf](https://www.idosi.org/wasj/wasj26(6)13/1.pdf)

(29) GOUADO, I., DEMASSE, M. A., ETAME, L. G., MEYIMGO, O. R. S., EJOH, A. R., FOKOU, E. Impact of Three Cooking Methods (Steaming, Roasting on Charcoal and Frying) on the β -Carotene and Vitamin C Contents of Plantain and Sweet Potato. *American Journal of Food Technology* [online]. 2011, 6. s. 994-1001. ISSN 1557-458X.

Dostupné z:

http://scialert.net/fulltext/?doi=ajft.2011.994.1001&org=10#44660_an

(30) IGWEMMAR, N. C., KOLAWOLE, S. A., IMRAM, I. A. Effect of Heating on Vitamin C Content of Some Selected Vegetables. *International Journal of Scientific & Technology Research* [online]. 2013, 2 (11), s. 209-212. ISSN 2277-8616.

Dostupné z:

<http://www.ijstr.org/final-print/nov2013/Effect-Of-Heating-On-Vitamin-C-Content-Of-Some-Selected-Vegetables.pdf>

(31) ŠAPITO, D. K., et al. *Ovoce a zelenina ve výživě člověka*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1989. s. 90.

(32) TRONÍČKOVÁ, Z. *Zelenina*. Praha: Artia, 1985. s. 6-11.

(33) MALÝ, I. *Pěstujeme květák, zelí a další košťáloviny*. Praha: Grada Publishing a.s., 2003. s. 11-36. ISBN 80-247-0409-9.

(34) LÁNSKÁ, D. *Květák, brokolice*. Praha: Vydavatelství a nakladatelství Práce, s.r.o., 1998.

(35) BENCKO, V., NOVOTNÝ, L. Chemoprevence rakoviny plic isothiokyanáty v křížatých rostlinách a Mendelovská randomizace. *Additives and Contaminants in Foodstuffs 2013, Zborník vedeckých prác*. Bratislava: Fakulta Chemickej a potravinárskej technológie STU v Bratislave, 2013. s. 7-11. ISBN 978-80-89597-12-3.

- (36) ČERVENÁ, D., ČERVENÝ, K. *Léčba výživou, encyklopedie léčivých potravin*. Martin: Neografia a.s, 1994. s. 76. ISBN 80-85186-56-X.
- (37) DOSTÁLOVÁ, J. *Co se děje s potravinami při přípravě pokrmů*. 1. vydání. Praha: Forsapi, 2009. s. 25. ISBN 978-80-903820-8-4.
- (38) KNOBLOCH, E. *Fysikálně chemické metody stanovení vitaminů*. 1. vydání. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1956, s. 319-331.
- (39) KUBÁŇ, V., KUBÁŇ, P. *Analýza potravin*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. s. 106-109. ISBN 978-80-7375-036-7.
- (40) BARTOŠ, M., ŠRÁMKOVÁ J., STANĚK V., *Laboratorní cvičení z analytické chemie*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2014, s. 66.
- (41) RAHMAN KHAN, M. M., ISLAM, M. S., RAHMAN, M. M., BEGUM, S. A. 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, s. 388-392. ISSN 1727-3048.
- (42) EITENMILLER, R. R., LANDEN, W. O., YE, L. *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences*. 2. vydání. Boca Raton: CRC Press, 2008. s. 246-248. ISBN 9780-8493-9711-4.
- (43) COULOMETRICKÉ STANOVENÍ ASKORBOVÉ KYSELINY V POTRAVINÁCH [online]. [citace 2017-04-26].
Dostupné z:
<http://ach.upol.cz/user-files/files/coulometricke-stanoveni-kyseliny-askorbove.pdf>
- (44) GUPTA, S. R. N. Polarographic Methods for Determination of Ascorbic Acid in Pharmaceutical Preparations. *International Journal of Chemical Engineering and Applications* [online]. 2015, 6 (2), s. 75-80. ISSN 2010022.
- (45) KRAČMAROVÁ, A., SOCHOR, J., ADAM, V., KIZEK, R. POHANKA, M. Electrochemical Determination of Low Molecular Weight Antioxidants in Serum Samples. *The Conference MendelNet 2012*. Brno: Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, 2012, s. 1225-1232. ISBN: 978-80-7375-836-3.
- (46) KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 3. vydání. Ostrava: nakladatelství Pavko, 2016. s. 32-34. ISBN 978-80-86369-22-8.

(47) CVAČKA, J. *Detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii* [online]. 24. 11. 2010, [citace 2017-05-10].

Dostupné z:

<https://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc3.pdf>

(48) ÚSTŘEDNÍ KONTROLNÍ A ZKUŠEBNÍ ÚSTAV, Národní referenční laboratoř, Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv, *Stanovení vitamínu C metodou HPLC* [online], platné od 10. 12. 2015, [citace 2017-05-10].

Dostupné z:

http://eagri.cz/public/web/file/246808/_10260.1StanoveniobsahuvitaminuCMetodouHPLC.pdf

(49) RIZZOLO, A., POLESELLO, S. Chromatographic determination of vitamins in foods. *Journal of Chromatography* [online]. 1992, 624 (1-2), s. 103-152. ISSN 0021-9673.

(50) Broccoli. *The World's Healthiest Foods* [online]. The George Mateljan Foundation. © 2001-2017 [cit. 27. 6. 2017].

Dostupné z:

<http://www.whfoods.com/genpage.php?tname=foodspice&dbid=9>

(51) SHAMS EL-DIN, M. H. A., ABDEL-KADER, M. M., MOHAMED, O. S. S., MAKHLOUF, S. K. Effect of Some Cooking Methods on Natural Antioxidants and Their Activities in Some *Brassica* Vegetables. *World Applied Sciences Journal* [online]. 2013, 26 (6), s. 697-703. ISSN 1818-4952.

Dostupné z:

https://www.researchgate.net/publication/267036933_Effect_of_some_cooking_methods_on_natural_antioxidants_and_their_activities_in_some_Brassica_vegetables